



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

Διευθύντρια: Ιωάννα Traeger-Συνοδινού

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΝΟΣ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΟΠΟΙΗΣΙΜΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ
ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΩΝ
ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΙΑΙΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΙΡΗΝΗ Ν. ΣΦΟΥΓΚΑΤΑΚΗ
Βιολόγος

ΑΘΗΝΑ 2020

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

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

■

Ημερομηνία αίτησης έναρξης διδακτορικής διατριβής: 30-04-2014

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 26-11-2014

Ημερομηνία ορισμού του θέματος της διατριβής: 13-03-2015

Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής: 25-10-2020

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Ιωάννα Traeger-Συνοδινού, Καθηγήτρια Γενετικής, **Επιβλέπουσα**

Εμμανουήλ Καναβάκης, Ομότιμος Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής

Σοφία Κίτσιου-Τζέλη, Ομότιμη Καθηγήτρια Γενετικής

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Εμμανουήλ Καναβάκης, Ομότιμος Καθηγητής

Σοφία Κίτσιου-Τζέλη, Ομότιμη Καθηγήτρια

Ιωάννα Traeger-Συνοδινού, Καθηγήτρια

Αντώνης Καττάμης, Καθηγητής

Μαρία Τζέτη, Καθηγήτρια

Μαρία Ρουμπελάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Παναγιώτης Τσιριγώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής

Ημερομηνία παρουσίασης διδακτορικής διατριβής: 19-2-2021

Βαθμός διδακτορικής διατριβής: ΑΡΙΣΤΑ

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών:

Καθηγητής Πέτρος Π. Σφηκάκης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	5
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. Στελεχιαία κύτταρα (stem cells)	8
1.2. Κατηγορίες στελεχιαίων κυττάρων	9
1.3. Ενήλικα στελεχιαία κύτταρα	11
1.4. Μεσεγχυματικά στελεχιαία ή στρωματικά κύτταρα (ΜΣΚ).....	13
1.4.1. Ιστορική ανασκόπηση	13
1.4.2. Προέλευση των ΜΣΚ	15
1.4.3. Δείκτες έκφρασης και ιδιότητες των ΜΣΚ.....	18
1.4.4. Ανοσοτροποποιητική δράση των ΜΣΚ	20
1.4.5. Αναπλαστική ικανότητα των ΜΣΚ	24
1.4.6. Ανοσογονικότητα των ΜΣΚ.....	26
1.4.7. Μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα στην αναγεννητική ιατρική.....	27
1.4.8. Περιορισμοί της χρήσης των ΜΣΚ στην αναγεννητική ιατρική	29
1.5. Πολυδύναμα στελεχιαία κύτταρα (ΠΣΚ)	30
1.5.1. Εμβρυονικά στελεχιαία κύτταρα (ΕΣΚ)	30
1.5.1.1. Έκφραση χαρακτηριστικών μορίων-δεικτών στα ΕΣΚ	32
1.5.2. Επαγόμενα πολυδύναμα στελεχιαία κύτταρα (ΕΠΣΚ)	34
1.5.2.1. Ιστορική ανασκόπηση.....	34
1.5.2.2. Το μοριακό κύκλωμα επαγωγής και διατήρησης της πολυδυναμίας	37
1.5.2.3. Πηγές ΕΠΣΚ.....	39
1.5.2.4. Μέθοδοι δημιουργίας ΕΠΣΚ	40
1.5.2.5. In vitro καλλιέργεια των ΕΠΣΚ.....	42
1.5.2.6. In vitro διαφοροποίηση των ΕΠΣΚ	43
1.5.2.7. Εφαρμογές των ΕΠΣΚ και των παραγώγων τους	45
1.5.2.8. Τα ΕΠΣΚ στην αναγεννητική ιατρική	47
1.5.2.9. Κλινικές μελέτες με ΕΠΣΚ.....	48
1.5.2.10. Περιορισμοί στη χρήση των ΕΠΣΚ και των παραγώγων τους	49
1.6. Σκοπός μελέτης-Πειραματικός σχεδιασμός.....	53
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	55
2.1. Απόψυξη και πολλαπλασιασμός ανθρώπινων επαγόμενων πολυδύναμων στελεχιαίων κυττάρων (ΕΠΣΚ)	55
2.1.1. Απόψυξη των ΕΠΣΚ	56
2.1.2. Ανακαλλιέργεια των σειρών ΕΠΣΚ	58
2.2. Μελέτη της ικανότητας διαφοροποίησης των σειρών ΕΠΣΚ σε ΜΣΚ	59
2.2.1. Απευθείας διαφοροποίηση των ΕΠΣΚ σε ΜΣΚ.....	60
2.2.2. Διαφοροποίηση των ΕΠΣΚ σε ΜΣΚ μέσω εμβρυικών σωματιδίων (ΕΣ).....	61
2.2.2.1. Δημιουργία εμβρυικών σωματιδίων	62
2.2.2.2. Μεταφορά εμβρυικών σωματιδίων σε ζελατίνη	63

2.2.3.	Ανακαλλιέργεια των ΜΣΚ που προέρχονται από τα ΕΠΣΚ (ΕΠΣΚ-ΜΣΚ)	64
2.3.	Ανοσοφαινοτυπικός προσδιορισμός των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ:	66
2.4.	Διερεύνηση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ.	68
2.5.	Κλωνογενής ικανότητα των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ	69
2.6.	Διερεύνηση ικανότητας των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ για <i>in vitro</i> διαφοροποίηση.....	70
2.7.	Έλεγχος γενετικής σταθερότητας αδιαφοροποίητων και διαφοροποιημένων κυττάρων με μικροσυστοιχίες συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού (array Comparative Genomic Hybridization, aCGH)	73
2.7.1.	Απομόνωση γενωμικού DNA	74
2.7.2.	Έλεγχος ποσότητας και καθαρότητας του DNA	76
2.7.3.	Μικροσυστοιχίες συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού (array Comparative Genomic Hybridization, aCGH)	76
2.8.	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης- Αντίστροφης Μεταγραφής (RT-PCR) για τον έλεγχο έκφρασης δεικτών πολυδυναμίας και δεικτών οστεογένεσης, λιπογένεσης και χονδρογένεσης	77
2.8.1.	Απομόνωση ολικού RNA	78
2.8.2.	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης- Αντίστροφης Μεταγραφής (RT-PCR).....	80
2.8.3.	Ηλεκτροφόρηση προϊόντων RT-PCR σε πήκτωμα αγαρόζης	84
2.9.	<i>In vivo</i> έλεγχος για δημιουργία όγκων από τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ.....	86
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	88
3.1.	Πολλαπλασιασμός των πολυδύναμων κυττάρων στην καλλιέργεια.....	88
3.2.	Διαφοροποίηση των πολυδύναμων κυττάρων σε ΜΣΚ	89
3.3.	Ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ	92
3.4.	Πολλαπλασιαστικό δυναμικό των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ.....	93
3.5.	<i>In vitro</i> ικανότητα διαφοροποίησης των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ σε ιστούς μεσοδερμικής προέλευσης	95
3.6.	Απώλεια έκφρασης δεικτών πολυδυναμίας στα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ.....	100
3.7.	<i>In vivo</i> πειράματα χορήγησης ΕΠΣΚ-ΜΣΚ σε ποντίκια	103
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	104
5.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	120
6.	ABSTRACT	123
7.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	125
8.	ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	141

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε με συνεργασία του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, με διευθυντές τον Καθηγ. κ. Ε. Καναβάκη και ακολούθως τις Καθηγ. κ. Σ. Κίτσιου- Τζέλη, κ. Ε. Φρυσίρα και κ. Ιωάννα Traeger-Συνοδινού και της Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών (ΜΜΜΟ) στην Ογκολογική Μονάδα ΕΛΠΙΔΑ-Μαριάννα Βαρδινογιάννη του Νοσοκομείου Παιδών «Η Αγία Σοφία», με διευθυντές τους κ. Σ. Γραφάκο και ακολούθως την κ. Β. Κίτρα-Ρούσσου. Τους ευχαριστώ θερμά για την δυνατότητα που μου έδωσαν να συμμετάσχω στις δραστηριότητες των εργαστηρίων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιστημονικό υπεύθυνο της εργασίας, Παιδίατρο-Αιματολόγο και Διευθυντή ΕΣΥ στη ΜΜΜΟ, κ. Ε. Γουσέτη, ο οποίος με τη καθημερινή καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές και τις βαθιές γνώσεις του πάνω στο αντικείμενο, αποτελεί την κινητήριο δύναμη του εργαστηρίου σε ερευνητικό και κλινικό επίπεδο και αποτελεί καταλυτικό παράγοντα για το σχεδιασμό και την ολοκλήρωση, οποιωνδήποτε ερευνητικών έργων λαμβάνουν χώρα σε αυτό.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα της διατριβής, την Καθηγήτρια και Διευθύντρια του εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής, κ. Ι. Traeger-Συνοδινού, η οποία μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω την παρούσα διατριβή στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών. Επίσης, στον Ομότιμο Καθηγητή κ. Ε. Καναβάκη που ως μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής και Διευθυντής του Ερευνητικού Πανεπιστημιακού Ινστιτούτου Μελέτης και Αντιμετώπισης Γενετικών και Κακοήθων Νοσημάτων της Παιδικής Ηλικίας υποστήριξε το ερευνητικό αυτό έργο. Ευχαριστώ θερμά την Ομότιμη Καθηγήτρια κ. Σ. Κίτσιου- Τζέλη, η οποία αποτέλεσε μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής και πίστεψε στην παρούσα ερευνητική δουλειά.

Επιπλέον, την Καθηγήτρια κ. Μ. Τζέτη, η οποία με την καθοδήγησή της και την πραγματοποίηση του γενετικού χαρακτηρισμού των παραχθέντων στην παρούσα διατριβή κυττάρων, συνέβαλε σημαντικά στην ολοκλήρωση αυτού του έργου.

Την κ. Κ. Στεφανάκη, Διευθύντρια του Παθολογοανατομικού εργαστηρίου του Νοσ. Παίδων «Η Αγία Σοφία» για την ιστολογική ανάλυση των χόνδρων. Την Αναπληρώτρια Καθηγ. Βιολογίας και Εφαρμογών Αναγεννητικής Ιατρικής του Εργαστηρίου Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Μ. Ρουμπελάκη για τη βοήθεια στα *in vivo* πειράματα και στον *in vitro* χαρακτηρισμό.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τις βιολόγους του εργαστηρίου της ΜΜΜΟ, κ. Μ. Θεοδοσάκη και κ. Ε. Πετράκου, οι οποίες με δέχτηκαν υπομονετικά από την αρχή, στηρίζοντάς με καθημερινά και βοηθώντας με από τα πρώτα μου βήματα να αποκτήσω εμπειρία στις καθημερινές απαιτήσεις ενός εργαστηρίου και στη διεξαγωγή πειραματικών διαδικασιών.

Επίσης, τις βιολόγους κ. Ι. Βαρελά και κ. Α. Καραγιαννίδου, οι οποίες έχοντας ήδη αποκτήσει εμπειρία στο πεδίο των πολυδύναμων στελεχιαίων κυττάρων, με εκπαίδευσαν ώστε να καταφέρω να συνεχίσω το έργο πάνω στο συγκεκριμένο αντικείμενο. Επίσης, τη βιολόγο κ. Α. Μερτζανιάν και τη βιοχημικό κ. Α. Μακρή, νέα μέλη του εργαστηρίου, για την άψογη καθημερινή τους συνεργασία και σε όλους τους υπόλοιπους συναδέλφους από τα εργαστήρια της Ογκολογικής Μονάδας του Νοσ. Παίδων «Η Αγία Σοφία», με τους οποίους μοιραζόμαστε την καθημερινότητα.

Τέλος, την οικογένειά μου, που στέκεται πάντα δίπλα μου σε όποιες δραστηριότητες αναλαμβάνω.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΑΣΚ	Αιμοποιητικά στελεχιαία κύτταρα
ΕΠΣΚ	Επαγόμενα πολυδύναμα στελεχιαία κύτταρα
ΕΠΣΚ-ΜΣΚ	Μεσεγχυματικά στελεχιαία κύτταρα από ΕΠΣΚ
ΕΣ	Εμβρυικά σωματίδια
ΕΣΚ	Εμβρυονικά στελεχιαία κύτταρα
ΕΣΚ-ΜΣΚ	Μεσεγχυματικά στελεχιαία κύτταρα από ΕΣΚ
ΜΟ	Μυελός των οστών
ΜΟ-ΜΣΚ	Μεσεγχυματικά στελεχιαία κύτταρα του μυελού των οστών
ΜΣΚ	Μεσεγχυματικά στελεχιαία κύτταρα
ΠΣΚ	Πολυδύναμα στελεχιαία κύτταρα
aCGH	Array comparative genomic hybridization
ALP	Alkaline phosphatase
BMP-4	Bone morphogenetic protein 4
COL2A1	Alpha 2 chain of collagen II
CFU-Fs	Colony-forming units-fibroblasts
c-MYC	Avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
CNVs	Copy number variations
FBS	Fetal bovine serum
FGF-2	Basic fibroblast growth factor
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GMP	Good manufacturing practices
GvHD	Graft versus host-disease
H&E	Hematoxylin and eosin
hPL	Human platelet lysate
ICM	Inner cell mass
KLF4	Kruppel-like factor 4
KSR	Knockout serum replacement
LPL	Lipoprotein lipase
MLR	Mixed lymphocyte reactions
NEAA	Non essential aminoacids
NK	Natural killer cells
OCT3/4	Octamer-binding transcription factor 3/4
PGE2	Prostaglandin E2
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SOX2	SRV-box transcription factor 2
SOX9	SRV-box transcription factor 9
TGF-β	Transforming growth factor β
TSG-6	TNFα-stimulated gene 6

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Στελεχιαία κύτταρα (stem cells)

Με τον όρο «στελεχιαία κύτταρα» ή «βλαστοκύτταρα» (stem cells) καλούμε τα κύτταρα που χαρακτηρίζονται από τις ιδιότητες της αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησης προς διάφορους τύπους ιστικών κυττάρων (Potten and Loeffler, 1990). Η αυτοανανέωση σημαίνει ότι μπορούν να δίνουν γένεση σε περισσότερα στελεχιαία κύτταρα, τα οποία είναι πανομοιότυπα με τα αρχικά, ενώ με τη διαφοροποίηση εννοούμε ότι μπορούν να δημιουργήσουν απογόνους πιο εξειδικευμένους (διαφοροποιημένα κύτταρα), ανάλογα με τον ιστό στον οποίο εντοπίζονται. Τα στελεχιαία κύτταρα, αν και μπορούν να βρεθούν σε μιτωτικά αδρανή (quiescent) μορφή, έχουν πολλαπλασιαστικό δυναμικό (proliferative capacity) και μπορούν ανάλογα με τις ανάγκες του ιστού στον οποίο εντοπίζονται, είτε να διατηρούν τα αποθέματά τους, είτε να τα αυξάνουν. Τα στελεχιαία κύτταρα είναι υπεύθυνα για την αναγέννηση των ιστών (regenerative capacity), αφού μπορούν να αναπληρώσουν το απόθεμα όλων των εξειδικευμένων κυτταρικών τύπων που συνιστούν έναν ιστό (Potten and Loeffler, 1990). Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη τέτοιων κυττάρων στον οργανισμό ήρθαν από τις μελέτες των McCulloch, Till, Becker, Wu και Siminovitch σχετικά με τα αιμοποιητικά στελεχιαία κύτταρα (ΑΣΚ, hematopoietic stem cells). Οι μελέτες αυτές έγιναν σε ποντίκια και έδειξαν ότι ο αιμοποιητικός ιστός περιέχει πληθυσμό κυττάρων, τα οποία μπορούν να δημιουργούν αποικίες εκατομμυρίων πολλαπλασιαζόμενων αιμοποιητικών κυττάρων στο σπλήνα ακτινοβολημένων ποντικών μετά από ενδοφλέβια χορήγηση κυττάρων μυελού των οστών (MO). Οι αποικίες συχνά περιείχαν πάνω από έναν τύπο διαφοροποιημένων προγονικών κυττάρων (κύτταρα ερυθράς, κοκκιώδους, μεγακαρυοκυτταρικής σειράς) (Till and McCulloch, 1961). Από σειρά πειραμάτων προέκυψε το συμπέρασμα ότι οι αποικίες προέρχονται από κλωνογενή, μονήρη κύτταρα με ικανότητα εκτεταμένου

πολλαπλασιασμού και δημιουργίας απογόνων, οι οποίοι περιλαμβάνουν πιο διαφοροποιημένα κύτταρα, αλλά και στελεχιαία κύτταρα που μπορούν με τη σειρά τους να δημιουργήσουν επιπλέον κλωνικές αποικίες (Becker et al., 1963) (Siminonitch et al., 1963). Η ιδέα της ύπαρξης των στελεχιαίων κυττάρων έκτοτε έχει επεκταθεί και σε άλλους ιστούς, εκτός από τον αιμοποιητικό. Τα στελεχιαία κύτταρα θεωρείται ότι μπορεί να διαιρούνται είτε με συμμετρικές είτε με ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις (Morrison et al., 1997a) διατηρώντας την ισορροπία μεταξύ στελεχιαίων και διαφοροποιημένων κυττάρων. Στην ασύμμετρη διαίρεση, το κάθε κύτταρο διαιρείται δίνοντας ένα πανομοιότυπο στελεχιαίο κύτταρο και ένα πιο διαφοροποιημένο (προγονικό) κύτταρο κάτω από ενδογενή (ασύμμετρη κατανομή ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μορίων) (Zhong et al., 1997) ή εξωγενή σινιάλα (θέση στο μικροπεριβάλλον των στελεχιαίων κυττάρων) (Xie and Spradling, 2000). Κατά τη συμμετρική διαίρεση, το στελεχιαίο κύτταρο δίνει γένεση σε δύο στελεχιαία κύτταρα. Οι συμμετρικές διαιρέσεις αυξάνουν τα αποθέματα των στελεχιαίων κυττάρων κατά την ανάπτυξη, αλλά και κατά την επούλωση τραυμάτων και την αναγέννηση ιστών (Morrison et al., 1995; Zhang et al., 2004). Οι ασύμμετρες διαιρέσεις έχουν στόχο την παραγωγή διαφοροποιημένων κυττάρων στον ιστό. Τα στελεχιαία κύτταρα μπορεί να μεταπίπτουν από τον ένα τρόπο διαίρεσης στον άλλον, ανάλογα με το αν θέλουν να διατηρήσουν τα αποθέματα ενός ιστού σε αδιαφοροποίητα ή διαφοροποιημένα κύτταρα ή αν θέλουν να αναπληρώσουν απώλειες στα αποθέματα στελεχιαίων κυττάρων (Zhang et al., 2004).

1.2. Κατηγορίες στελεχιαίων κυττάρων

Τα στελεχιαία κύτταρα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση το εύρος των διαφοροποιημένων κυτταρικών τύπων στους οποίους μπορούν να δώσουν γένεση. Έτσι, ορίζουμε ως **ολοδύναμα** (totipotent), τα στελεχιαία κύτταρα τα οποία μπορούν

να διαφοροποιηθούν προς όλους τους ιστούς ενός οργανισμού, καθώς επίσης και σε όλες τις εξωεμβρυικές δομές, συμπεριλαμβανομένου του πλακούντα. Ολοδύναμα είναι τα πλέον αδιαφοροποίητα κύτταρα του οργανισμού και συγκεκριμένα το ζυγωτό και τα κύτταρα που προκύπτουν από τις πρώτες μιτωτικές διαιρέσεις, μέχρι και το στάδιο του μοριδίου, την 4^η περίπου μέρα της εμβρυικής ανάπτυξης (Los et al., 2019). Με περαιτέρω μιτωτικές διαιρέσεις έπειτα δημιουργείται η βλαστοκύστη (περίπου 5^η ημέρα της εμβρυικής ανάπτυξης), στην εσωτερική κυτταρική μάζα (inner cell mass, ICM) της οποίας εντοπίζονται τα αμέσως επόμενα σε δυνατότητες διαφοροποίησης κύτταρα, τα **πολυδύναμα** στελεχειαία κύτταρα (ΠΣΚ, pluripotent stem cells). Τα ΠΣΚ είναι ικανά να διαφοροποιηθούν προς τους ιστούς όλων των βλαστικών δερμάτων (germ layers) (εξώδερμα, ενδόδερμα, μεσόδερμα) που θα δημιουργήσουν το έμβρυο και στη συνέχεια τον ενήλικο οργανισμό, όχι όμως και προς τα κύτταρα του πλακούντα. Τα ΠΣΚ κατά την ανάπτυξη εξειδικεύονται όλο και περισσότερο και δίνουν γένεση σε ιστοειδικά, **πλειοδύναμα** (multipotent) στελεχειαία κύτταρα, που έχουν δυνατότητα διαφοροποίησης σε πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων που κατάγονται από το ίδιο βλαστικό δέρμα (Los et al., 2019; Melton, 2014). Παράδειγμα τέτοιων κυττάρων είναι τα ΑΣΚ, τα οποία είναι οι πρόδρομοι όλων των διαφορετικών κυττάρων του αίματος. Τα **ολιγοδύναμα** (oligopotent) κύτταρα, έχουν ακόμα πιο περιορισμένη ικανότητα διαφοροποίησης από τα πλειοδύναμα και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ένα μικρό φάσμα εξειδικευμένων κυττάρων (Los et al., 2019). Παράδειγμα αποτελούν τα προγονικά κύτταρα (progenitor cells) των διαφόρων σειρών του αίματος, όπως τα κοινά μυελικά προγονικά κύτταρα (common myeloid progenitors) και τα κοινά λεμφοκυτταρικά προγονικά κύτταρα (common lymphocyte progenitors), τα οποία δίνουν γένεση αποκλειστικά σε κύτταρα της μυελικής σειράς (κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα,

μεγακαρυοκύτταρα, ερυθροκύτταρα) και της λεμφικής σειράς (T και B λεμφοκύτταρα, φυσικά φονικά κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα), αντίστοιχα (Akashi et al., 2000; Kondo et al., 1997). Τέλος, τα **μονοδύναμα** (unipotent) κύτταρα μπορούν να παράγουν μόνο έναν συγκεκριμένο διαφοροποιημένο απόγονο. Ουσιαστικά τα κύτταρα αυτά είναι απόγονοι στελεχιαίων κυττάρων και χαρακτηρίζονται και ως πρόδρομα κύτταρα (precursors) των ώριμων κυττάρων (McKay, 1997; Melton, 2014). Παραδείγματα τέτοιων κυττάρων είναι τα μυϊκά δορυφορικά κύτταρα και τα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα (Holterman and Rudnicki, 2005; Rafii et al., 1994).

1.3. Ενήλικα στελεχιαία κύτταρα

Διάφοροι πληθυσμοί στελεχιαίων κυττάρων έχουν εντοπιστεί στα περισσότερα όργανα και ιστούς των θηλαστικών, καθώς επίσης και στον ομφάλιο λώρο (umbilical cord). Αυτά τα κύτταρα είναι πλειοδύναμα και συμμετέχουν στην αναγέννηση κατεστραμμένων ιστών και στην ανανέωση του κυτταρικού αποθέματός τους, ώστε να διατηρείται η ομοιόστασή τους (Morrison et al., 1997a). Δημιουργούνται στη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης, με μετανάστευση στελεχιαίων κυττάρων και εποικισμό σε διάφορους αναπτυσσόμενους ιστούς, στους οποίους εγκαθίστανται (Melton, 2014). Σε αυτούς, τα ενήλικα στελεχιαία κύτταρα σπανίζουν αριθμητικά και είναι περιορισμένα σε συγκεκριμένες θέσεις (niches), κοντά στη βασική μεμβράνη (basal lamina), που αποτελούν ένα κατάλληλο μικροπεριβάλλον για τη διατήρησή τους. Στις θέσεις αυτές, εντοπίζονται στρωματικά κύτταρα που εκκρίνουν κατάλληλους παράγοντες ή στέλνουν σήματα μέσω κυτταρικών συνδέσεων (Li and Xie, 2005; Spradling et al., 2001), ελέγχοντας την ισορροπία μεταξύ πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των στελεχιαίων κυττάρων. Στο έντερο των θηλαστικών, τα εντερικά στελεχιαία κύτταρα εδράζουν στις κρύπτες, οι οποίες

αποτελούν μικρές εγκολπώσεις ανάμεσα στις εντερικές λάχνες. Στη βάση τους, κλωνογενή στελεχειαία κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε εγγύτητα με τα περιβάλλοντα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα, δίνουν γένεση σε όλους τους τύπους επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου, μέσω ασύμμετρης διαίρεσης και διαφοροποίησης σε ενδιάμεσα, πιο εξειδικευμένα προδρομικά κύτταρα που διαφοροποιούνται περαιτέρω (Brittan and Wright, 2002; Potten and Loeffler, 1990; Wright, 2000). Τα ΑΣΚ, που είναι τα πιο μελετημένα σωματικά στελεχειαία κύτταρα, στον ενήλικο οργανισμό, εδράζουν στο ΜΟ, ενώ εντοπίζονται και στον ομφάλιο λώρο (umbilical cord), καθώς και στο εμβρυικό ήπαρ (Weissman et al., 2001). Στο ΜΟ μελέτες δείχνουν ότι ΑΣΚ βρίσκονται σε στενή επαφή με τους οστεοβλάστες στο ενδόστεο, οι οποίοι παίζουν ρόλο στη διατήρησή τους, ενώ υπάρχουν επίσης υποπληθυσμοί ΑΣΚ που εντοπίζονται στο ενδοθήλιο των κολποειδών του μυελού και αυτοί κινητοποιούνται πιο γρήγορα μετά από κατάλληλα σινιάλα (Kiel et al., 2005). Τα ενήλικα στελεχειαία κύτταρα συνήθως βρίσκονται σε αδρανή μορφή, όπως συμβαίνει με τα ΑΣΚ (Morrison and Weissman, 1994) και εισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο κατόπιν διαφόρων σινιάλων. Τέτοια μπορεί να είναι μιτογόνα που προέρχονται από αποπτωτικά κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος, η απώλεια αναστολέων μίτωσης που εκκρίνονται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (Morrison et al., 1997a) και διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, όπως ο G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) που επάγει *in vivo* τον πολλαπλασιασμό και την κινητοποίηση των ΑΣΚ (Morrison et al., 1997b). Πάρα πολλές μελέτες εδώ και πολλά χρόνια έχουν καλλιεργήσει *in vitro*, κάτω από κατάλληλα σινιάλα, πληθυσμούς κυττάρων από αναπτυσσόμενα ή ενήλικα όργανα θηλαστικών που περιέχουν ενήλικα στελεχειαία κύτταρα με ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους (Gritti et al., 1996; Johe et al., 1996; Richards et al., 1992; Gage et al., 1995).

Μέχρι σήμερα, στελεχειαία κύτταρα πληθώρας ενήλικων ιστών θηλαστικών έχουν εντοπιστεί και χαρακτηριστεί: νευρικά στελεχειαία κύτταρα από τον εγκέφαλο (Gritti et al., 1996), καρδιακά στελεχειαία κύτταρα που διαφοροποιούνται σε καρδιομυοκύτταρα, λεία μυικά και ενδοθηλιακά κύτταρα (Leri et al., 2005), βρογχοκυψελιδικά στελεχειαία κύτταρα από τον πνεύμονα (Kim et al., 2005) και διάφορα άλλα, όπως αυτά του κερατοειδούς (Watanabe et al., 2004), του αμφιβληστροειδούς (Coles et al., 2004), του παγκρέατος (Zhao et al., 2007), των ωοθηκών (Tilly and Telfer, 2009), του ήπατος (Herrera et al., 2006), του προστάτη (Mimeault and Batra, 2005), των όρχεων (Waheeb and Hofmann, 2011), των μαστικών αδένων (Eirew et al., 2008), των μυών (Péault et al., 2007), των νεφρών (Oliver, 2004).

1.4. Μεσεγχυματικά στελεχειαία ή στρωματικά κύτταρα (ΜΣΚ)

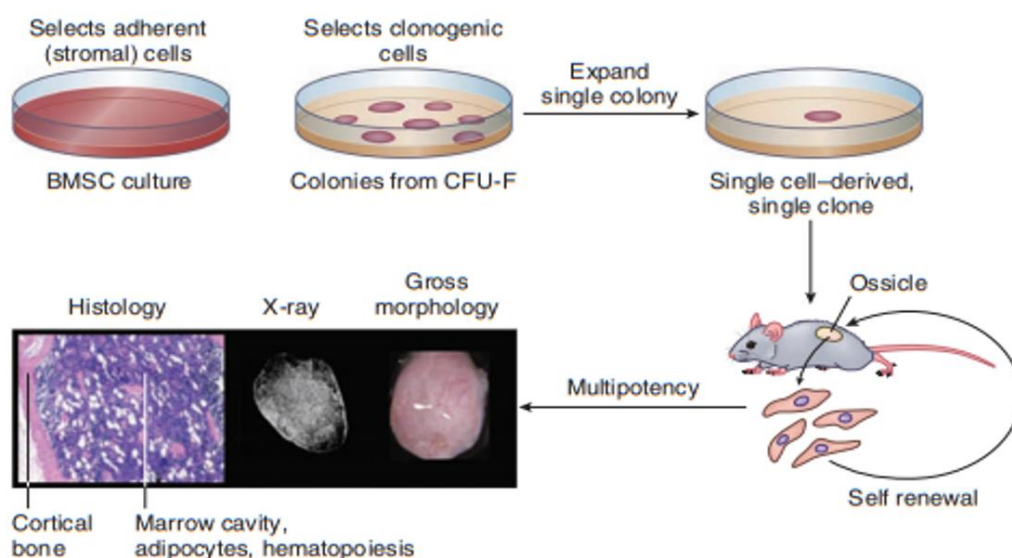
Τα μεσεγχυματικά στελεχειαία ή στρωματικά κύτταρα (ΜΣΚ) είναι κύτταρα ινοβλαστοειδούς μορφολογίας τα οποία έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται στην *in vitro* καλλιέργεια και μπορούν να δώσουν γένεση σε μεσοδερμικής προέλευσης ιστούς, όπως είναι ο χόνδρος, το οστό, ο λιπώδης ιστός και άλλοι συνδετικοί ιστοί (Bianco et al., 2008; Friedenstein et al., 1974; Prockop, 1997). Στους ενήλικους τα ΜΣΚ στρατολογούνται για την επούλωση τραυμάτων και την ανάπλαση των συνδετικών και σκελετικών οστών (Caplan, 1991, 1994).

1.4.1. Ιστορική ανασκόπηση

Τα ΜΣΚ περιγράφηκαν για πρώτη φορά τη δεκαετία του '70 από τον Friedenstein, με πηγή προέλευσής τους το ΜΟ (Friedenstein et al., 1968, 1970, 1974, 1976, 1978, 1987). Στις μελέτες του, ο Friedenstein έδειξε ότι ο ΜΟ περιέχει έναν πληθυσμό μη-αιμοποιητικών στρωματικών κυττάρων, τα οποία μετά από ετεροτοπική μεταμόσχευση ΜΟ σε πειραματόζωα, είναι υπεύθυνα για τη *de novo*, έκτοπη

δημιουργία οστού και μυελού, τα λεγόμενα οστάρια (ossicles). Μέσα σε αυτά, το στρώμα αποτελείται από κύτταρα του δότη, ενώ τα αιμοποιητικά κύτταρα έχουν υποκατασταθεί από κύτταρα του λήπτη που εποίκισαν το όργανο. Επίσης, όταν καλλιεργείται ο ΜΟ *in vitro* σε χαμηλή συγκέντρωση κυττάρων, δημιουργούνται κλωνικές αποικίες προσκολλημένων κυττάρων με ινοβλαστική μορφολογία (colony forming units- fibroblasts, CFU-Fs), κάθε μία από τις οποίες προέρχεται από ένα προγονικό κύτταρο. Αν οι απόγονοι των αποικιών αυτών ανακαλλιεργηθούν και μεταμοσχευθούν εκ νέου, τότε δημιουργούνται έκτοπα όργανα οστού και μυελού (Εικόνα 1.1). Έτσι δείχθηκε ότι τα στρωματικά κύτταρα του μυελού, περιέχουν υποπληθυσμό προγονικών κυττάρων που έχουν ικανότητα να προσκολλώνται στην πλαστική επιφάνεια των καλλιεργητικών δοχείων και ινοβλαστική μορφολογία, ενώ είναι πλειοδύναμα και αυτοανανεώνονται. Η πλειοδυναμία τους αναγνωρίστηκε λόγω της ικανότητας δημιουργίας διαφοροποιημένων απογόνων που μπορούν να δημιουργήσουν οστό, χόνδρο, λιπώδη και ινώδη ιστό, καθώς επίσης και δικτυωτά κύτταρα (reticular cells), που αποτελούν το υποστηρικτικό στρώμα της αιμοποίησης (Friedenstein, 1980). Αρχικά, ο πληθυσμός αυτός ορίστηκε λόγω της ικανότητας διαφοροποίησης σε ώριμα κύτταρα του σκελετικού ιστού ως «οστεογενή στελεχιαία κύτταρα» (osteogenic stem cells) από τον Friedenstein, ενώ αργότερα, εισήχθησε από τον Caplan ο όρος μεσεγχυματικά στελεχιαία κύτταρα, ΜΣΚ (mesenchymal stem cells) καθώς η ιδέα της πλειοδυναμίας τους επεκτάθηκε πέρα από τους σκελετικούς ιστούς, σε όλους τους μη-αιμοποιητικούς και μη-επιθηλιακούς μεσοδερμικούς ιστούς, όπως είναι ο μυϊκός ιστός, το μυοκάρδιο και το ενδοθήλιο (Caplan, 1991, 1994). Οι ιδιότητες των ΜΣΚ μελετήθηκαν *in vitro*, σε κατάλληλες προσκολλητικές καλλιέργειες, όπου δείχθηκε το πολλαπλασιαστικό δυναμικό τους και η ικανότητά τους κάτω από κατάλληλες συνθήκες να διαφοροποιούνται σε χόνδρο, οστεοβλάστες

και λιποκύτταρα (Pittenger et al., 1999). Επιπλέον, ο πληθυσμός των ΜΣΚ χαρακτηρίστηκε ανοσοφαινοτυπικά ως προς πληθώρα δεικτών που αργότερα καθιερώθηκαν σαν ένα από τα κριτήρια ορισμού των ΜΣΚ (Dominici et al., 2006; Pittenger et al., 1999).



Εικόνα 1.1: Κατάλληλη *in vitro* καλλιέργεια μυελού των οστών δίνει κλωνογενείς αποικίες, οι οποίες αν απομονωθούν μία προς μία και ανακαλλιεργηθούν, δίνουν απογόνους που διατηρούν την ικανότητα δημιουργίας *in vivo* οσταρίων (ossicles). Αυτά περιλαμβάνουν τους κυτταρικούς τύπους που αποτελούν το οστό και το μυελό, ενώ προσφέρουν κατάλληλο περιβάλλον για την εγκατάσταση αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων του ξενιστή.

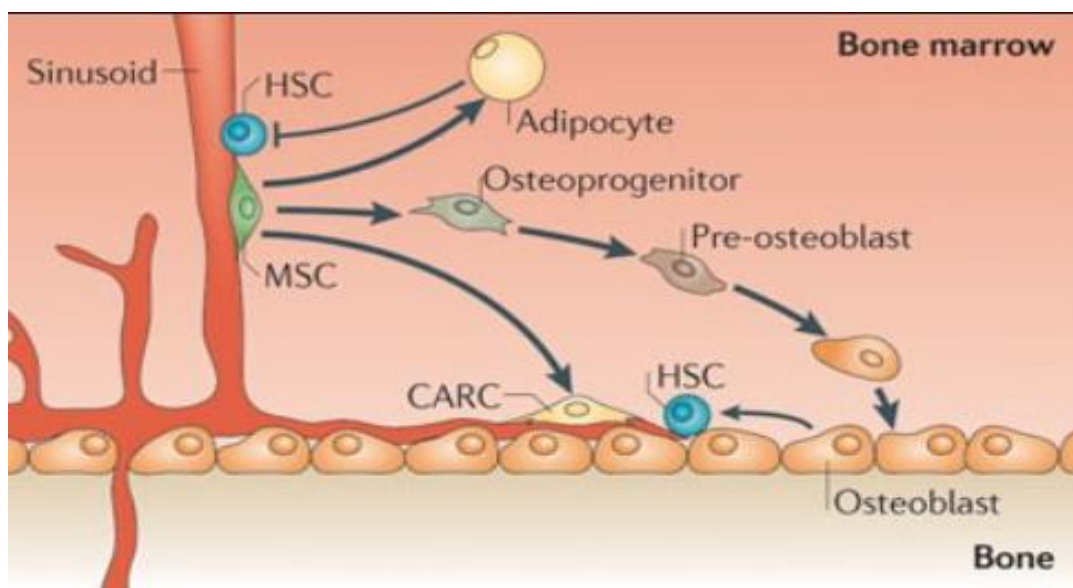
1.4.2. Προέλευση των ΜΣΚ

Εδώ και αρκετά χρόνια διερευνάται η προέλευση των ΜΣΚ κατά την εμβρυογένεση. Διάφορες μελέτες σε ζώα έχουν δείξει ότι διάφοροι ιστοί περιέχουν προγονικά κύτταρα τα οποία είναι ικανά να διαφοροποιηθούν σε άλλους τύπους κυττάρων που δε σχετίζονται με τον εκάστοτε ιστό στον οποίο εντοπίζονται. Για παράδειγμα, στο κεντρικό νευρικό σύστημα εντοπίζονται κύτταρα τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε αιμοποιητικά κύτταρα ή σε μυικά (Bjornson et al., 1999; Galli et

al., 2000). Επίσης, στο ΜΟ εντοπίζονται κύτταρα που έχουν αναπλαστική ικανότητα στο μυϊκό ιστό, το ήπαρ ή το ΚΝΣ (Ferrari et al., 1998; Gussoni et al., 1999; Kopen et al., 1999; Lagasse et al., 2000; Mezey et al., 2000). Επιπλέον, πειράματα έχουν δείξει την ύπαρξη πληθυσμού κυττάρων στη ραχιαία αρτηρία εμβρύων ποντικού της E9.5 τα οποία έχουν την ικανότητα μυογένεσης, ενώ αντίστροφα, οι σκελετικοί μύες περιέχουν κύτταρα που μπορούν να αναπλάσουν το ΜΟ ποντικών (De Angelis et al., 1999; Jackson et al., 1999). Με αυτά τα δεδομένα, έχει προταθεί ότι τα ΜΣΚ προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα, τα οποία κατά την εμβρυογένεση και την νεογνική φάση σχετίζονται με το αγγειακό σύστημα. Έτσι εισήχθησε από κάποιους ερευνητές ο όρος μεσοαγγειοβλάστη, ως ο κοινός μεσοδερμικός πρόγονος, ο οποίος εμφανίζεται την E9.5 και δίνει γένεση σε ενδοθηλιακά κύτταρα και ΜΣΚ (Minasi et al., 2002). Οι μεσοαγγειοβλάστες εκφράζουν τους μεσοδερμικούς/ενδοθηλιακούς δείκτες KDR, CD34 και VE-Cadherin και μετά από χορήγηση σε έμβρυα κοτόπουλου ενσωματώνονται σε πληθώρα μεσοδερμικών ιστών, όπως ο χόνδρος, το αίμα, το οστό, ο λείος και ο σκελετικός μυϊκός ιστός και τα καρδιομυοκύτταρα (Minasi et al., 2002). Έχει θεωρηθεί ότι κατά την ανάπτυξη των αγγείων και την εισχώρησή τους στους διάφορους ιστούς, πρόδρομα τέτοια κύτταρα πιθανώς αφήνουν το αγγείο και αποκτούν κάποια εξειδίκευση αντίστοιχη του ιστού στον οποίο εισήλθαν. Αργότερα, προτάθηκε η μεσεγγυμοαγγειοβλάστη, ως ένας κοινός μεσοδερμικός πρόγονος των ΜΣΚ και των κυττάρων που απαρτίζουν τα αγγεία (περικύτταρα, ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά), ο οποίος εμφανίζεται πολύ νωρίτερα, κατά τη γαστριδίωση και το σχηματισμό της αρχικής γραμμής (primitive streak) (Slukvin and Kumar, 2018; Vodyanik et al., 2010). Αυτή σχηματίζεται από μεσοδερμικά APLNR+PDGFR+KDR+ κύτταρα υπό την επίδραση του FGF-2 (basic fibroblast growth factor). Στη συνέχεια ακολουθείται διαφοροποίησή της διαμέσου της

ενδοθηλιακής κατεύθυνσης σε ΜΣΚ και αγγειακά κύτταρα. Ο πρόγονος αυτός, σε αντίθεση με τη μεσοαγγειοβλάστη, δε διαθέτει ικανότητα διαφοροποίησης σε αιμοποιητικά ή καρδιομυοκύτταρα.

Σήμερα, έχειδειχθεί ότι *in vivo* η τοπολογική θέση των ΜΣΚ στους ενήλικους ιστούς βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια των κολποειδών (sinusoids), τα οποία είναι χαρακτηριστικά αιμοφόρα αγγεία στο ΜΟ, σε εγγύτητα με το ενδοθήλιο και τα αντίστοιχα αυτά κύτταρα ονομάζονται περιαγγειακά (perivascular) (Sacchetti et al., 2007). Μέσα στο ΜΟ, τα ΜΣΚ είναι τα κύτταρα που δομούν και οργανώνουν το μικροπεριβάλλον και τις θέσεις της αιμοποίησης (Sacchetti et al., 2007). Έτσι, το στρώμα του μυελού αποτελείται από ετερογενείς πληθυσμούς κυττάρων, με πολλαπλές λειτουργίες, οι οποίοι προέρχονται από τα ΜΣΚ (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2: Θέση των ΜΣΚ μέσα στο μυελό των οστών.

Λόγω της περιαγγειακής προέλευσης των ΜΣΚ, θεωρείται ότι αντίστοιχα κύτταρα πρέπει να εντοπίζονται σε όλους τους ενήλικους ιστούς (Crisan et al., 2008; Meirelles

et al., 2006). Πράγματι, σήμερα ισχύει η παραδοχή αυτή και πληθώρα μελετών έχουν απομονώσει και καλλιεργήσει κύτταρα με χαρακτηριστικά ΜΣΚ, από ιστούς όπως από ο μυϊκός ιστός, το περιόστεο, το δέρμα, ο λιπώδης ιστός, οι αρθρώσεις, ο περιοδοντικός σύνδεσμος (Crisan et al., 2008; De Bari et al., 2001; Meirelles et al., 2006; Seo et al., 2004; Zuk et al., 2001). Ο Crisan εντόπισε με συγκεκριμένο συνδυασμό δεικτών, όπως είναι οι CD146+NG2+PDGFRβ+CD34- περιαγγειακά κύτταρα από πληθώρα οργάνων, όπως οι σκελετικοί μύες, το πάγκρεας, ο λιπώδης ιστός, το δέρμα, η καρδιά, ο πλακούντας. Απομονώνοντας τέτοια κύτταρα έδειξε ότι αυτά παρουσιάζουν *in vitro* όλα τα χαρακτηριστικά των ΜΣΚ. Επιπλέον, έδειξε ότι τα μη καλλιεργημένα περιαγγειακά κύτταρα εκφράζουν τους ειδικούς δείκτες των ΜΣΚ. Από τις παραπάνω ενδείξεις τα ΜΣΚ ταυτίστηκαν με τα κύτταρα τα οποία στο ενήλικο άτομο εντοπίζονται τοπολογικά στην επιφάνεια των αιμοφόρων αγγείων των ιστών, τα περιαγγειακά (Crisan et al., 2008). Επιπρόσθετα, το προφίλ έκφρασης των ΜΣΚ παρουσιάζει μεγάλες ομοιότητες με αυτό των περιαγγειακών κυττάρων (Conas et al., 2008).

1.4.3. Δείκτες έκφρασης και ιδιότητες των ΜΣΚ

Διάφορες μελέτες επιχείρησαν την εύρεση δεικτών που επιτρέπουν την απομόνωση/εμπλουτισμό πλειοδύναμων ΜΣΚ από κυτταρικούς πληθυσμούς του ΜΟ. Ο πιο εξειδικευμένος δείκτης ΜΣΚ είναι το επιφανειακό αντιγόνο CD271 (nerve growth factor receptor), το οποίο όταν χρησιμοποιείται για την απομόνωση των ΜΣΚ από το ΜΟ, εμπλουτίζει σημαντικά την καλλιέργεια με κύτταρα που έχουν δυνατότητα δημιουργίας CFU-F, ενώ τα CD271⁻ κύτταρα δεν έχουν αυτήν την ιδιότητα (Kuczi et al., 2010). Επίσης, τα CD271⁺ ΜΣΚ έχει δειχθεί ότι έχουν ισχυρότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης σε οστό (Barilani et al., 2018; Kuczi et al., 2010). Ο δείκτης STRO-1 επίσης έχει δειχθεί ότι εκφράζεται σε όλα

τα κύτταρα του στρώματος του ΜΟ τα οποία μπορούν να δώσουν CFU-F και να διαφοροποιηθούν σε οστό *in vivo* (Gronthos et al., 2003). Άλλοι δείκτες έκφρασης που χρησιμοποιούνται για απομόνωση των ΜΣΚ είναι το CD166 (ALCAM) και το CD106 (VCAM-1). Στον Πίνακα 1.1 φαίνονται τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ΜΣΚ του ΜΟ που προέρχονται από την καλλιέργεια.

Λόγω του ότι παρατηρούνται συχνά διαφορές μεταξύ πληθυσμών ΜΣΚ που απομονώνονται από διάφορα εργαστήρια, με διαφορετικές μεθόδους και από διαφορετικούς ιστούς, καθορίστηκαν κάποια κριτήρια από την Επιτροπή Μεσεγχυματικών και Ιστικών Στελεχειαίων Κυττάρων της Διεθνούς Κοινότητας Κυτταρικής Θεραπείας (ISCT), τα όποια ορίζουν ένα πληθυσμό κυττάρων ως ΜΣΚ (Dominici et al., 2006). Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι η πρόσφυση στην πλαστική επιφάνεια, η έκφραση συνδυασμού ειδικών επιφανειακών δεικτών και απουσία έκφρασης άλλων δεικτών και η ικανότητα μεσεγχυματικής διαφοροποίησης *in vitro*. Πιο συγκεκριμένα, θα πρέπει να εκφράζονται μόρια όπως τα CD73 (5'-νουκλεοτιδάση), CD105 (ενδογλίνη), CD90 (Thy-1) σε ποσοστό $\geq 95\%$ και να απουσιάζουν ($\leq 2\%$) τα αντιγόνα επιφανείας αιμοποιητικών /λευκών κυττάρων CD34, CD45, μονοκυττάρων CD11b ή CD14, Β λεμφοκυττάρων CD19 ή CD79a και τα HLA τάξης II τα οποία δεν εκφράζονται στα ΜΣΚ παρά μόνο μετά από διέγερση με IFN- γ . Επίσης, τα κύτταρα αυτά θα πρέπει να μπορούν να διαφοροποιούνται σε οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα.

Δείκτης	Έκφραση	Περιγραφή	Άλλα κύτταρα με έκφραση
CD29	+	β1-integrin	Ενεργοποιημένα και μη λευκοκύτταρα
CD44	+	Hyaluronic cell adhesion molecule (HCAM)	T και B λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα, ερυθροκύτταρα
CD73	+	εξω-5'-νουκλεοτιδάση	T και B λεμφοκύτταρα, ενδοθηλιακά
CD90	+	Thymus cell antigen-1 (Thy-1)	Προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα
CD105	+	Ενδογλίνη. Υποδοχέας των TGF-β1, β3	Ενδοθηλιακά, ερυθροβλάστες, μονοκύτταρα
CD106	+	Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)	Ενδοθηλιακά
CD166	+	Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)	Ενεργοποιημένα T και B λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα
CD271	+	Low affinity nerve growth factor receptor (LNGFR)	Κύτταρα του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος, λεμφοκύτταρα
STRO-1	+	Stromal-derived factor-1	Ερυθροβλάστες, B λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά
CD146	+	Melanoma cell adhesion molecule	Ενδοθηλιακά, λεία μυϊκά, περικύτταρα
CD34	-	Διαμεμβρανική φωσφογλυκοπρωτεΐνη	Αιμοποιητικά προγονικά, ενδοθηλιακά
CD45	-	Κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο	Αιμοποιητικά κύτταρα, εκτός αυτών της ερυθράς σειράς
CD14	-	Υποδοχέας του συμπλόκου LPS	Μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα, κάποια δενδριτικά
CD11b	-	Υποδοχέας του συμπληρώματος C3bi	Μυελικά κύτταρα, NK, μερικά ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα
CD235a	-	Γλυκοφορίνη A	Ερυθροκύτταρα
CD31	-	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)	Ενδοθηλιακά, αιμοπετάλια, μερικά λευκοκύτταρα

Πίνακας 1.1: Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ΜΣΚ.

1.4.4. Ανοσοτροποποιητική δράση των ΜΣΚ

Τα ΜΣΚ ρυθμίζουν τη δράση διαφόρων κυτταρικών πληθυσμών του ανοσοποιητικού συστήματος με πάρα πολλούς τρόπους, είτε μέσω έκκρισης διαφόρων κυτταροκινών και χημειοκινών, είτε απευθείας μέσω κυτταρικών συνδέσεων. Η δράση των ΜΣΚ πυροδοτείται όταν αυξάνονται στο μικροπεριβάλλον τα επίπεδα μορίων

εκκρινόμενων από αντιγονοπαρουσιαστικά ή T κύτταρα στη διάρκεια φλεγμονής, όπως η IFN- γ (interferon- γ), ο TNF- α (tumor necrosis factor α) και οι ιντερλευκίνες IL-1 α , IL-1 β (Ren et al., 2008) και έχει δειχθεί *in vitro* σε πληθώρα πειραμάτων που χρησιμοποίησαν μεικτές λεμφοκυτταρικές καλλιέργειες (mixed lymphocyte reactions, MLR). Σε αυτές, ο πολλαπλασιασμός των CD4+ και των CD8+ T λεμφοκυττάρων, που προκύπτει ως απόκριση στην παρουσία αλλογενών περιφερικών κυττάρων, παρεμποδίζεται παρουσία των ΜΣΚ (Aggarwal and Pittenger, 2005; Di Nicola et al., 2002; Klyushnenkova et al., 2005; Yang et al., 2009).

Η καταστολή των T κυττάρων από τα ΜΣΚ στις MLR συνδέεται με αυξημένα επίπεδα ιντερλευκίνης IL-10, καθώς και με μείωση των επιπέδων των TNF- α και IFN- γ (Aggarwal and Pittenger, 2005; Klyushnenkova et al., 2005).

Τα ΜΣΚ επάγουν την έκφραση της IL-10 από τα δενδριτικά, τα μακροφάγα και τα B και T λεμφοκύτταρα. (Yang et al., 2009). Η IL-10 μειώνει την έκφραση των μορίων MHC II και των συνδιεγερτικών μορίων, καθώς και την έκκριση κυτταροκινών από τα μονοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα, καταστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων (Couper et al., 2008). Τα ΜΣΚ μειώνουν την έκφραση του TNF- α στα δενδριτικά κύτταρα με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η ωρίμανσή τους, η μετανάστευσή τους στους λεμφαδένες και η ικανότητά τους να επάγουν τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων (Aggarwal and Pittenger, 2005; Ramasamy et al., 2007). Επίσης, σε περιβάλλον φλεγμονής εκκρίνεται από τα ΜΣΚ το ένζυμο IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase), το οποίο επιδρά στο μεταβολισμό της τρυπτοφάνης αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων (Meisel et al., 2004; Yang et al., 2009; Zimmermann et al., 2017). Η PGE2 (prostaglandin E2) που εκκρίνεται από τα ΜΣΚ δρα στην καταστολή του πολλαπλασιασμού και στην μείωση έκκρισης IFN- γ από τα T κύτταρα (Aggarwal and Pittenger, 2005; Sato et al., 2007).

Τα ΜΣΚ μειώνουν την έκφραση IFN- γ από τα Τ βοηθητικά κύτταρα τύπου 1 (Th1), ενώ αυξάνουν την έκφραση της αντιφλεγμονώδους IL-4 στα Th2 (Aggarwal and Pittenger, 2005), αποκαθιστώντας σε πολλές περιπτώσεις την ισορροπία μεταξύ των Th1 και Th2 (Bai et al., 2012; Nemeth et al., 2010). Επιπλέον, τα Τ κύτταρα καταστέλλονται από την έκκριση μεγάλων ποσοτήτων μονοξειδίου του αζώτου (NO) από τα ΜΣΚ (Ren et al., 2008; Sato et al., 2007). Το NO είναι βιοδραστικό μόριο, το οποίο μπλοκάρει σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως του STAT5 και του TCR, την έκφραση υποδοχέων κυτταροκινών και τον πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων (Hoffman et al., 2002; Niedbala et al., 2006; Sato et al., 2007). Άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με την καταστολή του πολλαπλασιασμού των Τ κυττάρων από τα ΜΣΚ είναι οι TGF- β (transforming growth factor β) και HGF (hepatocyte growth factor) (Di Nicola et al., 2002).

Η ανοσοκατασταλτική δράση των ΜΣΚ προκύπτει επίσης με επαγωγή του πολλαπλασιασμού των κατασταλτικών CD4+CD25+FoxP3+ Τ-ρυθμιστικών **κυττάρων** (T-regs) (Aggarwal and Pittenger, 2005; Kuçi et al., 2011; Melief et al., 2013). Τα ΜΣΚ επάγουν την έκφραση στα CD4+, του γονιδίου του FoxP3, που παίζει κομβικό ρόλο στην επαγωγή του T-reg φαινοτύπου (English et al., 2009). Στη στρατολόγηση των T-regs, εκτός από την απευθείας κυτταρική επαφή των ΜΣΚ με τα CD4+ Τ κύτταρα, φαίνεται να παίζει ρόλο ο TGF- β 1 τον οποίο εκκρίνουν (Melief et al., 2013; Nemeth et al., 2010), αλλά και η PGE2. Όσον αφορά την επίδραση στα Τ κύτταρα μέσω κυτταρικών συνδέσεων, τα ΜΣΚ εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον προσδέτη (ligand) του υποδοχέα απόπτωσης Fas (Fas ligand, FasL) κι έτσι επάγουν την απόπτωση στα Τ κύτταρα μέσω του FasL-Fas σηματοδοτικού μονοπατιού (Akiyama et al., 2012). Η απόπτωση των Τ κυττάρων επάγει την έκκριση TGF- β στα μακροφάγα, ο οποίος οδηγεί στην αύξηση των T-regs (Akiyama et al., 2012). Πέρα

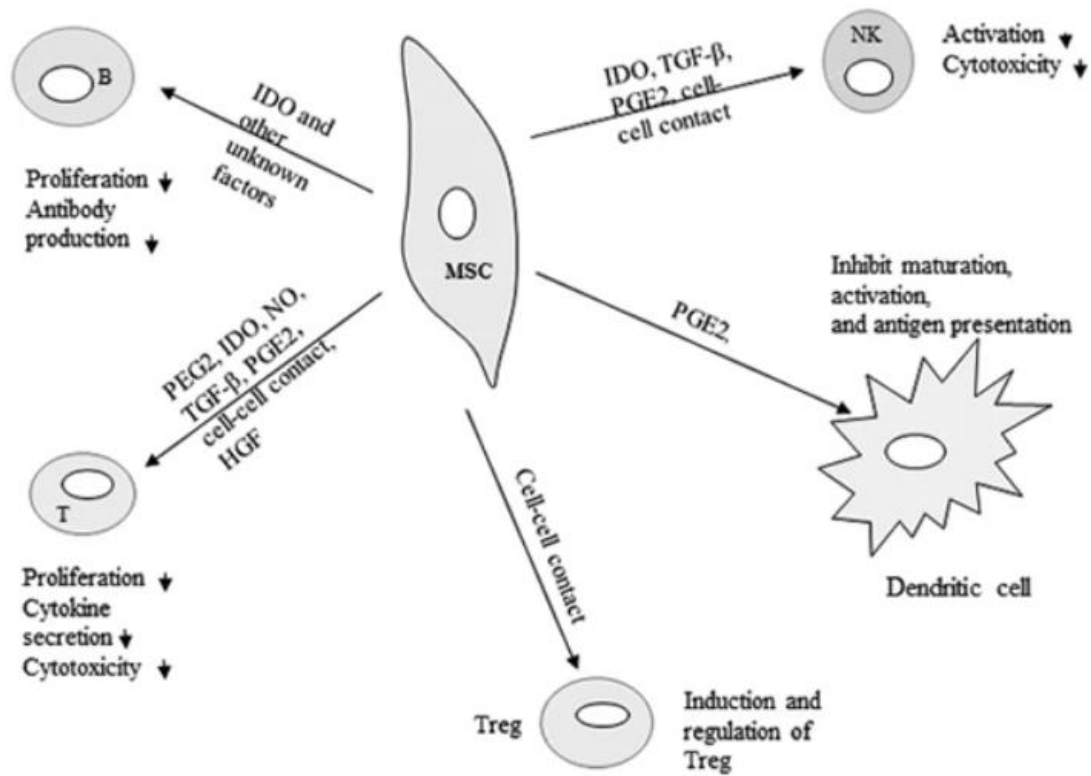
από το μονοπάτι FasL-Fas, τα ΜΣΚ αναστέλλουν την ενεργοποίηση των Τ και των Β κυττάρων μέσω της επιφανειακής έκφρασης και έκκρισης των προσδετών του ανασταλτικού μορίου Programmed Death 1 (PD-1), PD-L1 και PD-L2 (Augello et al., 2005; Davies et al., 2017).

Επιπρόσθετα, τα ΜΣΚ έχουν επίδραση στα μονοκύτταρα, μέσω έκκρισης PGE2, IL-6 και GM-CSF, προωθώντας την ωρίμανσή τους προς μακροφάγα τύπου 2 (M2), τα οποία μειώνουν τη φλεγμονή και προάγουν την επούλωση ιστών και όχι προς τα τύπου 1 που έχουν φλεγμονώδη δράση (Melief et al., 2013; Prockop, 2013; Zhang et al., 2010). Τα M2 εκκρίνουν IL-6, CCL-18 και IL-10 και βοηθούν στον πολλαπλασιασμό των T-regs, ενώ παράλληλα έχουν ελαττωμένη έκφραση TNF-α και μειωμένη ικανότητα διέγερσης των Th17 κυττάρων (Melief et al., 2013; Zhang et al., 2010). Η έκκριση TNFα από τα μακροφάγα μειώνεται και με επίδραση του μορίου TNFα-stimulated gene/protein 6 (TSG-6) από τα ΜΣΚ, το οποίο αποσυνδέει διάφορους υποδοχείς Toll-like receptors (TLRs) από τους αντίστοιχους προσδέτες τους με αποτέλεσμα να μπλοκάρεται η δράση του μεταγραφικού παράγοντα nuclear factor kappa B, NF-κB (Prockop, 2013).

Τα ΜΣΚ, μετά από αλληλεπίδραση με διάφορα προϊόντα ξеноπαθογόνων ή τραυματισμένων κυττάρων, εκκρίνουν τη χημειοκίνη CC chemokine ligand 2, CCL2 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1), η οποία επιδρά στα μονοκύτταρα επάγοντας τη μετανάστευσή τους από το μυελό των οστών στην κυκλοφορία, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την απόκριση του ανοσοποιητικού στα ξένα παθογόνα (Shi et al., 2011).

Τέλος, τα ΜΣΚ επιδρούν στα φυσικά φονικά κύτταρα (natural killer cells, NK) μέσω απευθείας κυτταρικών συνδέσεων, αλλά και μέσω των μορίων PGE2, TGF-β1 και IDO, ελαττώνοντας την κυτταρολυτική δράση *in vitro*, τον πολλαπλασιασμό τους,

την έκκριση IFN- γ και την έκφραση υποδοχέων ενεργοποίησης όταν αυτά διεγείρονται με κυτταροκίνες (Sotiropoulou et al., 2006; Spaggiari et al., 2008).



Εικόνα 1.1: Ανοσοτροποποιητική δράση των ΜΣΚ.

1.4.5. Αναπλαστική ικανότητα των ΜΣΚ

Τα ΜΣΚ έχουν την ιδιότητα να μεταναστεύουν σε τραυματισμένους ιστούς, ως απόκριση στην έκκριση χημειοκινών από περιβάλλοντα κύτταρα, αλλά και στο μηχανικό στρες. Εκεί, φαίνεται να συνεισφέρουν στην αναπλήρωση των κυτταρικών αποθεμάτων μέσω ποικίλων τρόπων. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι αυτό γίνεται σε ένα βαθμό μέσω διαφοροποίησής τους σε διάφορους τύπους κυττάρων, όπως σε ώριμα ενδοθηλιακά, λεία μυικά ή καρδιομυοκύτταρα (Al-Khaldi et al., 2003; Silva et al., 2005; Toma et al., 2002) και μέσω έκκρισης διαλυτών αυξητικών και αντιαποπτωτικών παραγόντων, κυτταροκινών και μικροκυστιδίων που βοηθούν στην

αναγέννηση του ιστού. Τα τελευταία χρόνια φαίνεται η αναπλαστική τους δράση να αποδίδεται σε μεγαλύτερο βαθμό σε παρακρινή δραστηριότητα. Διάφορες μελέτες δείχνουν ότι είναι περιορισμένος ο αριθμός των ΜΣΚ που εγκαθίστανται στα σημεία του τραύματος και ότι η επούλωση γίνεται με τη συνδρομή τους στην στρατολόγηση και τον πολλαπλασιασμό ενδογενών προγονικών κυττάρων, όπως για παράδειγμα των καρδιακών στελεχιαίων κυττάρων και μυοκυττάρων σε περιπτώσεις εμφράγματος του μυοκαρδίου (Hatzistergos et al., 2010; Wehman et al., 2016). Διάφορα μόρια που έχουν θεωρηθεί ως χημειοκίνες και κινητοποιούν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ΜΣΚ σε τραυματισμένους ιστούς είναι ο SDF-1 (stromal-derived factor 1), η οστεοποντίνη, και διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, όπως οι FGF-2, TGF-β1, PDGF (platelet derived growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor), VEGF (vascular-endothelial growth factor), (Ball et al., 2007; Forte et al., 2006; Huang et al., 2014; Liu et al., 2011; Mishima and Lotz, 2008; Schmidt et al., 2006; Tang et al., 2011; Xiao Ling et al., 2016; Zhang et al., 2016; Zou et al., 2011).

Είναι γνωστό ότι σε περιοχές τραυμάτων τα ΜΣΚ προωθούν την νεοαγγειογένεση. Η δράση αυτή σχετίζεται με την έκκριση του παράγοντα VEGF (Al-Khaldi et al., 2003; Cunha et al., 2013) από τα ΜΣΚ, αλλά και με την έκκριση αντιαποπτωτικών και μιτογόνων παραγόντων, όπως ο IGF-1 (Imberti et al., 2007; Ribot et al., 2017), ο TGF-β1 (Oh et al., 2018; Selvasandran et al., 2018), οι FGF-2, EGF (Selvasandran et al., 2018; Wakabayashi et al., 2010). Επίσης, παράγοντες όπως ο NGF, HGF εκκρινόμενοι από τα ΜΣΚ παίζουν ρόλο στον πολλαπλασιασμό των ενδογενών ηπατοκυττάρων σε ζωικά μοντέλα τραυμάτων του ήπατος (Francois et al., 2013). Άλλοι διεγέρτες της αγγειογένεσης που σχετίζονται με τη δράση των ΜΣΚ είναι η αγγειογενίνη, οι αγγειοποιητίνες 1 και 2, ο MCP-1, η IL-8 (Francois et al., 2013; Kim

et al., 2019; Selvasandran et al., 2018). Επίσης, έχει παρατηρηθεί σε ζωικά μοντέλα ισχαιμίας οργάνων η αυξημένη στρατολόγηση καρδιακών στελεχιαίων κυττάρων και ο πολλαπλασιασμός καρδιομυοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων (Cunha et al., 2013; Wehman et al., 2016; Yamahara et al., 2014).

Έχουν παρατηρηθεί διαφορές στην ικανότητα διαφοροποίησης των ΜΣΚ *in vitro* μεταξύ διαφόρων πηγών ΜΣΚ. Αυτό πιθανώς αντικατοπτρίζει διαφορές στο φαινότυπο των ΜΣΚ που προέρχονται από διαφορετικούς ιστούς και οι οποίες έχουν διαμορφωθεί λόγω διαφορών στο μικροπεριβάλλον τους (Meirelles et al., 2006).

Επιπλέον, τα ΜΣΚ διαθέτουν πλαστικότητα, που σημαίνει ότι μπορούν να διαφοροποιούνται και σε ιστούς άλλων βλαστικών δερμάτων, όπως οι νευρώνες και τα ηπατοκύτταρα (Sanchez-Ramos et al., 2000; Schwartz et al., 2002).

1.4.6. Ανοσογονικότητα των ΜΣΚ

Τα ΜΣΚ εκφράζουν σε μέτριο βαθμό τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I (major histocompatibility complex class I, MHC I), ενώ δεν εκφράζουν μόρια MHC τάξης II, ούτε συνδιεγερτικά μόρια B7-1, B7-2, CD40 και CD40 ligand (Di Nicola et al., 2002; Majumdar et al., 2003). Ωστόσο, η έκφραση των μορίων MHC I και II αυξάνεται υπό την επίδραση της IFN- γ , χωρίς όμως να επάγεται έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων (Tse et al., 2003). Πειράματα χρήσης αλλογενών ΜΣΚ σε μικτές λεμφοκυτταρικές καλλιέργειες επίσης δείχνουν ότι αυτά δεν επάγουν τον πολλαπλασιασμό και την έκφραση δεικτών ενεργοποίησης των αλλογενών T λεμφοκυττάρων (Klyushnenkova et al., 2005; Tse et al., 2003). Επομένως, δεν προκαλούν ενεργοποίηση αλλοδραστικών T λεμφοκυττάρων και αυτό επεκτείνει πολύ τις δυνατότητες χρήσης τους, αφού καθιστά δυνατή τη χρήση σε αλλογενείς κυτταρικές θεραπείες.

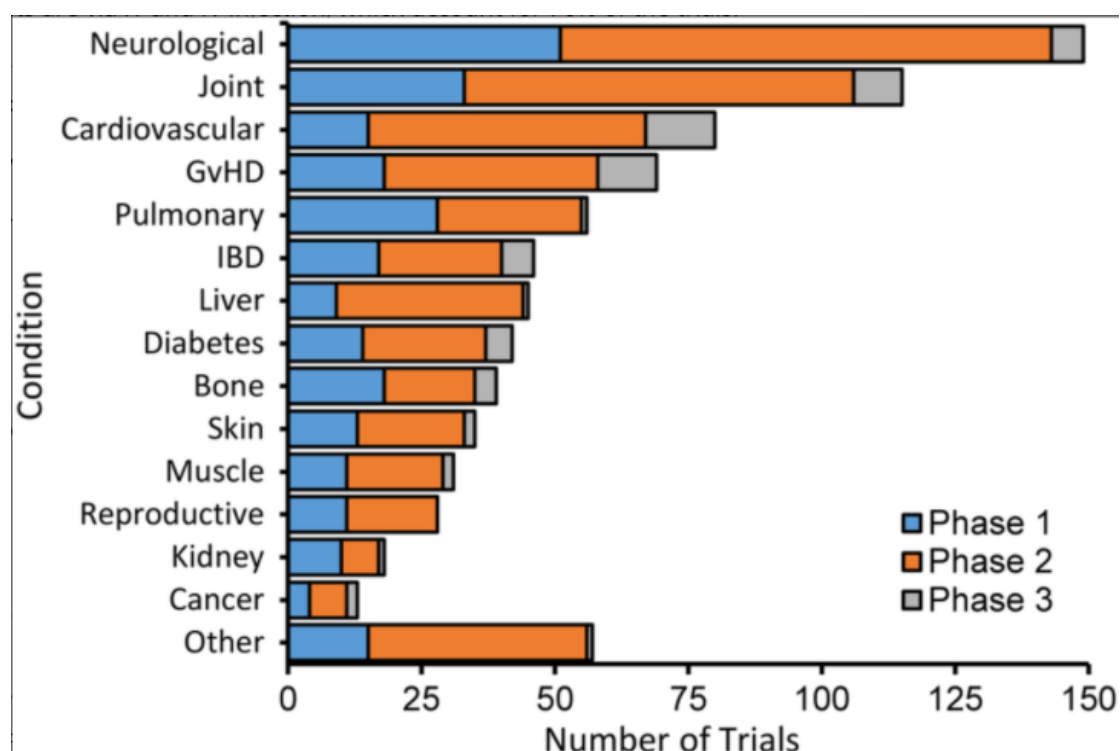
1.4.7. Μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα στην αναγεννητική ιατρική

Η αναγεννητική ιατρική είναι ένα σχετικά πρόσφατο επιστημονικό πεδίο, το οποίο στοχεύει στην αντιμετώπιση ασθενειών, τραυμάτων και εκφυλιστικών νόσων χρησιμοποιώντας τις αναγεννητικές ικανότητες των ανθρώπινων κυττάρων. Τα ΜΣΚ βρίσκονται υπό διερεύνηση για την αποτελεσματικότητά τους στην ανάπλαση ιστών και σε διάφορες φλεγμονώδεις διαταραχές. Πληθώρα κλινικών μελετών που έχουν διεξαχθεί και διεξάγονται χρησιμοποιώντας στην πλειοψηφία τους ΜΣΚ του ΜΟ, παρέχουν ετερογενή και ακόμα αμφιλεγόμενα αποτελέσματα, αλλά με σοβαρές ενδείξεις ότι η χορήγηση ΜΣΚ μπορεί να βελτιώσει την κατάσταση του ασθενούς σε διάφορες νόσους και έτσι μπορούν να αποτελέσουν ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο στην κυτταρική θεραπεία.

Οι περισσότερες κλινικές μελέτες προέρχονται από εταιρίες που αποσκοπούν στην εμπορευματοποίηση κυρίως της αλλογενούς χρήσης των ΜΣΚ. Αυτές, συνήθως διαθέτουν μικρές κυτταρικές τράπεζες σειρών ΜΣΚ από λίγους δότες, οι οποίες αναπτύσσονται στην καλλιέργεια και στη συνέχεια χορηγούνται σε ασθενείς (Jossen et al., 2018). Οι πρώτες κλινικές μελέτες όπου διερευνήθηκε η ανοσορυθμιστική δράση των ΜΣΚ αφορούσαν τη θεραπεία της ανθεκτικής στα στεροειδή φάρμακα νόσου μοσχεύματος κατά του ξενιστή (graft-versus-host disease, GvHD) σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων. Σήμερα, λόγω των θετικών αποτελεσμάτων αυτών των μελετών, τα οποία δείχνουν αύξηση της επιβίωσης των ασθενών, κυρίως σε παιδιά, η θεραπευτική έγχυση ΜΣΚ σε ασθενείς με GvHD έχει εγκριθεί σε διάφορες χώρες (Kurtzberg et al., 2020; Locatelli et al., 2017; Wu et al., 2020). Τα ΜΣΚ έχουν χρησιμοποιηθεί σε πληθώρα μελετών για τη θεραπεία ισχαιμικών οργάνων, της καρδιακής ανεπάρκειας και του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Στις μελέτες αυτές, η χορήγηση ΜΣΚ τοπικά,

παρουσιάζεται ασφαλής για τον ασθενή, βοηθά στην επούλωση, την επαναφορά της κυκλοφορίας και τη μείωση της ίνωσης του καρδιακού μυ. Σε κλινικές μελέτες με αλλογενή ή αυτόλογα ΜΣΚ ενδοκαρδιακά, για τη θεραπεία ισχαιμικών καρδιοπαθειών και άλλων καρδιακών ανεπαρκειών, έχει δειχθεί η βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας και η ασφάλεια της χρήσης τους (Hare et al., 2012; Karantalis et al., 2014; Perin et al., 2015; Teerlink et al., 2017). Η νόσος του Crohn's αποτελεί επίσης μια ασθένεια για τη θεραπεία της οποίας έχουν διεξαχθεί πολλές κλινικές μελέτες με ΜΣΚ. Αυτόλογες και αλλογενείς θεραπείες με χρήση ΜΣΚ ΜΟ ή λιπώδους ιστού είχαν στατιστικά σημαντική βελτίωση των συμπτωμάτων (Barnhoorn et al., 2019, 2020; Duijvestein et al., 2010; Panés et al., 2018). Το 2015 ολοκληρώθηκε μια μεγάλη τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή φάσης III, στην οποία χορηγήθηκαν αλλογενή ΜΣΚ του λιπώδους ιστού για την αντιμετώπιση των περιπρωκτικών συριγγίων στην νόσο του Crohn's, όπου υπήρξε σαφής, στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών που έλαβαν ΜΣΚ και όσων έλαβαν μόνο φυσιολογικό ορό (Panés et al., 2016). Ακολούθως, η χρήση των ΜΣΚ από λιπώδη ιστό στα περιπρωκτικά συρίγγια εγκρίθηκε στην Ευρώπη (2018). Παράλληλα, κλινικές μελέτες φάσης I/II έχουν διεξαχθεί ή ξεκινήσει και για άλλες αυτοάνοσες καταστάσεις όπως είναι ο συστηματικός ερυθρεμάτωδης λύκος, ο διαβήτης τύπου I και η πολλαπλή σκλήρυνση με ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Cai et al., 2016; Wang et al., 2013; Yamout et al., 2010). Μέχρι τώρα μελέτες που αφορούν τη θεραπεία της οστεοαρθρίτιδας επίσης έχουν δείξει την ασφάλεια και αποτελεσματικότητα των ΜΣΚ μετά από τοπική έγχυσή τους, μειώνοντας τον πόνο και βελτιώνοντας τη λειτουργία στο γόνατο, ενώ κάποιου βαθμού αναγέννηση του ιστού παρατηρείται και απεικονιστικά (Jo et al., 2017; Lamo-Espinosa et al., 2016; Vangsnæss et al., 2014). Στη διάρκεια των τελευταίων χρόνων, διεξάγονται πάρα πολλές κλινικές μελέτες οι

οποίες παρατίθενται στην Εικόνα 1.3. Το μεγαλύτερο ποσοστό τους εστιάζει στη θεραπεία νευρολογικών παθήσεων, όπως είναι οι τραυματισμοί της σπονδυλικής στήλης, η πολλαπλή σκλήρυνση, η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση, το εγκεφαλικό, και οι νόσοι Parkinson's και Alzheimer's. Η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία κλινικών δοκιμών αφορά τη θεραπεία εκφυλιστικών αρθροπαθειών με την πλειοψηφία τους να στοχεύει στη θεραπεία της οστεοαρθρίτιδας, ενώ η τρίτη μεγαλύτερη αφορά τις καρδιαγγειακές παθήσεις (Kabat et al., 2020). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι τα αλλογενή ΜΣΚ δε φαίνεται να επάγουν ανοσοαντίδραση (Hare et al., 2012; Perin et al., 2015).



Εικόνα 1.3: Κλινικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί / διεξάγονται με τη χρήση ΜΣΚ.

1.4.8. Περιορισμοί της χρήσης των ΜΣΚ στην αναγεννητική ιατρική

Η χρήση των ΜΣΚ στην κλινική συναντά κάποιους περιορισμούς. Τα ΜΣΚ ανιχνεύονται σε χαμηλές ποσότητες στους ενήλικους ιστούς, με συχνότητα μόλις περίπου 0,001-0,01% στο μυελό των οστών (Pittenger et al., 1999), ο οποίος είναι η πιο χρησιμοποιημένη και μελετημένη πηγή ΜΣΚ στις κλινικές μελέτες. Επιπλέον, η χρήση τους απαιτεί την *ex vivo* έκπτυξή τους, η οποία οδηγεί σε κυτταρική γήρανση (replicative senescence) και σε σταδιακή απώλεια των ιδιοτήτων τους και της λειτουργικότητάς τους, γεγονός που δυσχεραίνει την αποτελεσματικότητά τους στην αντιμετώπιση ασθενειών (Wagner et al., 2008). Προκειμένου να πολλαπλασιαστούν σε βαθμό ικανό ώστε να προκύψουν επαρκείς ποσότητες κυττάρων για κλινική χρήση, απαιτείται ένα χρονικό διάστημα, κατά το οποίο, ο ασθενής θα πρέπει περιμένει μέχρι τη χορήγηση. Έτσι, για παράδειγμα στην περίπτωση αντιμετώπισης του GnHD, όπου επιδιώκεται η χορήγηση $>2 \times 10^6$ κυττάρων / Kg βάρους σώματος, ένας ασθενής με βάρος 70 Kg θα περιμένει περίπου 25-30 ημέρες ώστε να προκύψει μια επαρκής ποσότητα κυττάρων. Σε αυτά τα προβλήματα έρχεται να προστεθεί η διαφορά που μπορεί να παρατηρείται στην ποιότητα των ΜΣΚ που προέρχονται από διαφορετικούς δότες. Αυτές οι παράμετροι έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή περιορισμένου αριθμού νεαρών, υγιών κυττάρων για κυτταρική θεραπεία. Επιπλέον, σημαντικό μειονέκτημα στην ευρεία κλινική εφαρμογή των ΜΣΚ αποτελεί η επεμβατική διαδικασία με την οποία απομονώνονται, κυρίως από το μυελό των οστών.

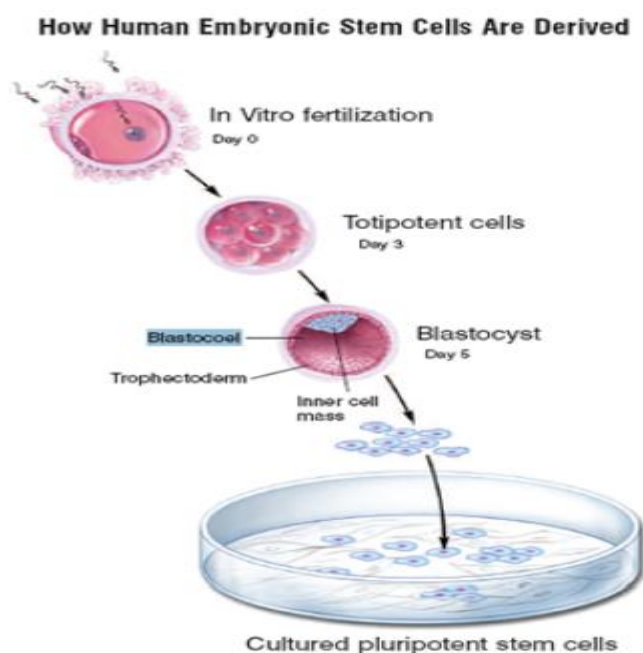
1.5. Πολυδύναμα στελεχιαία κύτταρα (ΠΣΚ)

1.5.1. Εμβρυονικά στελεχιαία κύτταρα (ΕΣΚ)

Τα εμβρυονικά στελεχιαία κύτταρα (ΕΣΚ, embryonic stem cells, ESCs) εντοπίζονται στην έσω κυτταρική μάζα (inner cell mass, ICM) της βλαστοκύστης των θηλαστικών,

που σχηματίζεται 4-5 μέρες μετά τη γονιμοποίηση και πριν την εμφύτευση. Κατά το στάδιο αυτό, το έμβρυο αποτελείται από την ICM που θα δώσει σε επόμενα στάδια γένεση σε όλους τους ιστούς του εμβρύου και από μια εξωτερική στιβάδα κυττάρων, την τροφοβλάστη, η οποία θα δώσει τον πλακούντα (Εικόνα 1.4). Τα ΕΣΚ είναι πολυδύναμα και έχουν τη δυνατότητα να αυτοανανεώνονται απεριόριστα *in vitro*, καθώς και να διαφοροποιούνται σε κύτταρα που προέρχονται και από τα 3 βλαστικά δέρματα, δηλαδή το ενδόδερμα, το εξώδερμα και το μεσόδερμα. Το 1981 τα ΕΣΚ εγκαταστάθηκαν στην *in vitro* καλλιέργεια για πρώτη φορά, μετά από απομόνωση κυττάρων της ICM ποντικών και καλλιέργειά τους σε κατάλληλες συνθήκες προσκόλλησης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία κυτταρικών σειρών (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Τα κύτταρα που προέκυψαν (ΕΣΚ) σχηματίζουν στην καλλιέργεια αναπτυσσόμενες αποικίες στενά συνδεδεμένων μικρών, σφαιρικών κυττάρων. Αυτά έμοιαζαν σημαντικά με τα στελεχιαία κύτταρα που απομονώνονται από τερατοκαρκινώματα (embryonal carcinoma cells), ενώ παρουσίαζαν παραπλήσιες ιδιότητες, καθώς μετά από έκτοπη χορήγησή τους υποδορίως σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια παρατηρήθηκε ο σχηματισμός τερατωμάτων, τα οποία περιείχαν ιστούς που προέρχονται από τα τρία βλαστικά δέρματα. Επιπλέον, η πολυδυναμία τους παρατηρήθηκε και *in vitro* με καλλιέργεια των ΕΣΚ σε εναιώρημα, όπου σχημάτιζαν ομοιογενή σφαιρικά συσσωματώματα, τα λεγόμενα εμβρυικά σωματίδια (ΕΣ), τα οποία μιμούνται το στάδιο της γαστριδίωσης του εμβρύου κατά το οποίο σχηματίζονται τα 3 εμβρυικά δέρματα. Όταν τα ΕΣ τοποθετούνταν σε καλλιέργεια προσκόλλησης, παρατηρούνταν η εμφάνιση πληθώρας κυτταρικών τύπων με προέλευση από όλα τα βλαστικά δέρματα. Επίσης, όταν εγχυθούν ΕΣΚ σε βλαστοκύστες ποντικών, συνεισφέρουν στη δημιουργία των ιστών που σχηματίζουν το έμβρυο και είναι ικανά να δημιουργήσουν βιώσιμα ποντίκια-χίμαιρες (Bradley et

al., 1984). Αρκετά χρόνια αργότερα, επιτεύχθηκε η δημιουργία σειρών ανθρώπινων εμβρυονικών στελεχιαίων κυττάρων (Thomson et al., 1998).



Εικόνα 1.4: Εμβρυονικά στελεχιαία κύτταρα.

1.5.1.1. Έκφραση χαρακτηριστικών μορίων-δεικτών στα ΕΣΚ

Τα ανθρώπινα ΕΣΚ χαρακτηρίζονται από την έκφραση διαφόρων μορίων τα οποία χρησιμεύουν ως δείκτες ταυτοποίησής τους και η έκφρασή τους μειώνεται κατά την έναρξη της διαφοροποίησής τους, ενώ είναι ελάχιστη ή απουσιάζει από τους ενήλικους ιστούς. Οι πιο σημαντικοί και ευρέως χρησιμοποιούμενοι επιφανειακοί δείκτες είναι τα αντιγόνα stage-specific embryonic antigens (SSEA)-3, SSEA-4, τα οποία αποτελούν επιτόπους που βρίσκονται πάνω στα γλυκολιπίδια Gb5, GL7 αντίστοιχα και οι επίτοποι tumor rejection antigens, (TRA)-1-60, TRA-1-81 που εντοπίζονται πάνω στο μόριο της γλυκοπρωτεΐνης ποδοκαλυξίνη (podocalyxin) (Thomson et al., 1998). Τα παραπάνω μόρια εκφράζονται και στα εμβρυονικά καρκινωματικά στελεχιαία κύτταρα, όπως επίσης και σε διάφορους τύπους καρκίνων (Giwerzman et al., 1993; Kannagi et al., 1983; Schopperle and DeWolf, 2007;

Sivasubramaniyan et al., 2015). Ο λειτουργικός τους ρόλος δεν είναι ακόμα αποσαφηνισμένος. Άλλα επιφανειακά αντιγόνα που εκφράζονται στα ΕΣΚ είναι οι μεμβρανικοί υποδοχείς CRIPTO, LEFTY2, GDF3 που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι TGF-β/Activin/Nodal και τα γλυκοπρωτεϊνικά μόρια CD9, CD24, CD90 (Bhattacharya et al., 2004; International Stem Cell Initiative et al., 2007; Skottman et al., 2005).

Από τους πιο χαρακτηριστικούς ενδοκυτταρικούς δείκτες των ΕΣΚ είναι ο μεταγραφικός παράγοντας OCT3/4 (Octamer-Binding Transcription Factor 3/4), ο οποίος παίζει κομβικό ρόλο στην διατήρηση της πολυδυναμίας. Κατά το στάδιο της βλαστοκύστης στην εμβρυική ανάπτυξη του ποντικού, ο OCT3/4 εντοπίζεται μόνο στα κύτταρα της ICM και όχι στην τροφοβλάστη που θα δώσει γένεση στους εξτραεμβρυονικούς ιστούς (Palmieri et al., 1994). Η έκφραση του OCT3/4 στο ζυγωτό είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του πληθυσμού των ΠΣΚ στην ICM (Nichols et al., 1998). Άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες, των οποίων η έκφραση είναι χαρακτηριστική στα ΕΣΚ είναι οι NANOG και SOX2. Και οι δύο, όπως και ο OCT3/4 έχουν κεντρικό ρυθμιστικό ρόλο για την έκφραση πληθώρας γονιδίων που σχετίζονται με τη διατήρηση της πολυδυναμίας και της αυτοανανέωσης (Boyer et al., 2005). Το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα REX1 (reduced expression 1) είναι από εκείνα που ρυθμίζονται από το δίκτυο OCT3/4- NANOG- SOX2 και αποτελεί επίσης ειδικό δείκτη ΕΣΚ (Koestenbauer et al., 2006; Richards et al., 2004). Χαρακτηριστικός δείκτης ΕΣΚ είναι και το hTERT (human telomerase reverse transcriptase), το καταλυτικό μέρος του ενζύμου τελομεράση που είναι υπεύθυνο για την επιμήκυνση των τελομερών στα χρωμοσώματα. Η τελομεράση εκφράζεται στα ΕΣΚ, επεκτείνοντας τον αριθμό των γεγονότων αντιγραφής του DNA που μπορούν να υποστούν και κατ'επέκταση διατηρώντας την ικανότητά τους να

πολλαπλασιάζονται (Thomson et al., 1998). Αντίθετα, στα ενήλικα κύτταρα η έκφραση του ενζύμου απουσιάζει, με αποτέλεσμα αυτά να μπορούν να υφίσταται μικρό αριθμό διαιρέσεων και έπειτα να εισέρχονται σε γήρας. Η αλκαλική φωσφατάση χρησιμοποιείται επίσης ως δείκτης πολυδυναμίας, αφού εκφράζεται στα ΕΣΚ, όπως και στο αναπτυσσόμενο έμβryo μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης, κατά το οποίο παραμένει μόνο στα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας και αργότερα όσο διαφοροποιούνται, τα επίπεδά της πέφτουν (Štefková et al., 2015). Χαρακτηριστικοί δείκτες είναι επίσης η DNA μεθυλοτρανσφεράση 3b, DNMT3b, που ρυθμίζει τη μεθυλίωση γονιδίων, και το μόριο LIN28 που συνδέεται σε miRNA μόρια και ρυθμίζει μετα-μεταγραφικά την έκφρασή τους (Skottman et al., 2005). Πληθώρα άλλων μεταγραφικών παραγόντων και συνενεργοποιητών γονιδίων έχουν βρεθεί ότι εκφράζονται έντονα στα ΕΣΚ, σε αντίθεση με τους ενήλικους ιστούς, όπως είναι οι FOXD3 (forkhead box d3) (Arduini and Brivanlou, 2012), SALL4 (sal-like protein 4) (Zhang et al., 2006), UTF1 (undifferentiated embryonic cell transcription factor 1) (Nishimoto et al., 1999), ESRRB (estrogen related receptor beta) (Zhang et al., 2008), DPPA4 (developmental pluripotency associated factor 4) (Klein et al., 2018), HMGA2 (high mobility group AT-hook 2), ERH (enhancer of rudimentary homolog), HESX1 (homeobox, ES cell expressed 1), και KLF4 (Kruppel-Like Factor 4) (Richards et al., 2004) και άλλοι.

1.5.2. Επαγόμενα πολυδύναμα στελεχιαία κύτταρα (ΕΠΣΚ)

1.5.2.1. Ιστορική ανασκόπηση

Από τη δεκαετία του 1950, οι ερευνητές προσπαθούσαν να διερευνήσουν το ρόλο του κυτταρικού πυρήνα στην εμβρυική ανάπτυξη και να απαντήσουν σε ερωτήματα, όπως το αν η πληροφορία της διαφοροποίησης των κυττάρων στο αναπτυσσόμενο έμβryo βρίσκεται στον πυρήνα τους και αν κατά τη διαφοροποίηση ενός κυττάρου το

γονιδίωμα υφίσταται μη αναστρέψιμες αλλαγές. Στα πλαίσια αυτά, το 1952, οι King and Briggs κατάφεραν να αναπτύξουν την τεχνική της μεταφοράς πυρήνα από κύτταρα προερχόμενα από βλαστίδια (blastulae) αμφιβίων σε απύρνηνα, αγονιμοποίητα ωάρια (Briggs and King, 1952). Στη μελέτη τους έδειξαν ότι η μεταφορά αυτή μπορούσε να οδηγήσει στο σχηματισμό φυσιολογικών εμβρύων και γυρίνων. Στα τέλη της δεκαετίας του '50, ο Sir John Gurdon, ξεκίνησε σειρά πειραμάτων σε αμφίβια, επιτυγχάνοντας τη λεγόμενη μεταφορά πυρήνα ενήλικων σωματικών κυττάρων (somatic cell nuclear transfer) σε απύρνηνα ωάρια (Gurdon et al., 1958; Gurdon, 1960, 1962a). Στα πειράματά του στο αμφίβιο *Xenopus laevis*, μετέφερε πυρήνες διαφοροποιούμενων ενδοδερμικών κυττάρων εμβρύου (Gurdon, 1960, 1962b), αλλά και πλήρως διαφοροποιημένων κυττάρων, όπως τα κύτταρα εντερικού επιθηλίου γυρίνου (Gurdon, 1962a) και άλλα ιστικά κύτταρα ενήλικου βατράχου (Gurdon et al., 1975; Laskey and Gurdon, 1970), σε απύρνηνα ωάρια και έδειξε ότι η μεταφορά οδηγεί στο σχηματισμό φυσιολογικών γυρίνων, αλλά και ενήλικων βατράχων. Συμπέρανε λοιπόν, ότι ο πυρήνας ενός διαφοροποιημένου κυττάρου περιέχει την πληροφορία που χρειάζεται για την ανάπτυξη ενός εμβρύου και τη δημιουργία πληθώρας διαφορετικών κυτταρικών τύπων και ότι κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων δεν λαμβάνουν χώρα μόνιμες και μη αναστρέψιμες αλλαγές στο γονιδίωμα. Η εφαρμογή της μεταφοράς πυρήνα σωματικού κυττάρου επεκτάθηκε και στα θηλαστικά, με μελέτες οι οποίες οδήγησαν το 1997 στην κλωνοποίηση προβάτων, με μεταφορά πυρήνα από κύτταρα μαστικού αδένου ενήλικου προβάτου σε απύρνηνα ωάρια ξεχωριστών ατόμων (Wilmut et al., 1997). Έτσι προέκυψαν απόγονοι που έφεραν τα φαινοτυπικά και γονοτυπικά χαρακτηριστικά των ατόμων στα οποία ανήκαν οι πυρήνες και όχι τα ωάρια. Έκτοτε, μελέτες με επιτυχή κλωνοποίηση και βιώσιμο απόγονο από διαφοροποιημένα

εμβρυικά και ενήλικα κύτταρα έχουν διεξαχθεί σε άλλα θηλαστικά όπως ποντίκια, βοοειδή, γάτες, σκύλους, χοίρους, αρουραίους, ακόμη και σε πρωτεύοντα (Wakayama et al., 1998; Kato et al., 1998; Polejaeva et al., 2000; Zhou et al., 2003; Shin et al., 2002; Lee et al., 2005; Liu et al., 2018). Το 2001, η ομάδα της Tada πραγματοποίησε τη δημιουργία κυττάρων με ιδιότητα πολυδυναμίας, μέσω σύντηξης σωματικών κυττάρων με ΕΣΚ, δείχνοντας ότι τα ΕΣΚ περιέχουν παράγοντες οι οποίοι επάγουν την πολυδυναμία στα ώριμα κύτταρα (Tada et al., 2001).

Βασισμένοι στα παραπάνω ευρήματα, ο Yamanaka και οι συνεργάτες τους για πρώτη φορά το 2006 δημοσίευσαν τον επιτυχή επαναπρογραμματισμό εμβρυονικών δερματικών ινοβλαστών ποντικού (mouse embryonal fibroblasts, MEFs) σε ΠΣΚ (Takahashi and Yamanaka, 2006). Με άλλα λόγια, χρησιμοποιώντας ώριμα σωματικά κύτταρα, επιτεύχθηκε *in vitro* η δημιουργία κυττάρων τα οποία έχουν όμοιες ιδιότητες με τα ΕΣΚ, τα λεγόμενα επαγόμενα πολυδύναμα στελεχειαία κύτταρα (ΕΠΣΚ, induced pluripotent stem cells, iPSCs). Αυτό πραγματοποιήθηκε με πειράματα στα οποία διερευνήθηκε η επίδραση που είχαν στους ινοβλάστες, μεταγραφικοί παράγοντες και άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες είχε δειχθεί ότι συνεισφέρουν στη διατήρηση της πολυδυναμίας και της αυτοανανέωσης στις εμβρυονικές σειρές και σε πρώιμα έμβρυα. Αρχικά δοκιμάστηκε η διαμόλυνση 24 τέτοιων γονιδίων στους ινοβλάστες, όπου διαπιστώθηκε ο επαναπρογραμματισμός των σωματικών κυττάρων. Η εισαγωγή των διαγονιδίων στα κύτταρα έγινε με ρετροικούς φορείς. Στη συνέχεια ελέγχθηκε η επίδραση της απουσίας καθενός από τους παράγοντες, στη δημιουργία κυττάρων με φαινότυπο ΕΣΚ, αφαιρώντας τον από το κοκτέιλ διαμόλυνσης. Έτσι, βρέθηκαν 4 μεταγραφικοί παράγοντες, των οποίων η απουσία έκφρασης αποτελούσε ανασταλτικό παράγοντα στον επαναπρογραμματισμό. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες είναι οι OCT3/4 (Octamer-Binding Transcription

Factor 3/4), SOX2 (SRY-box 2), c-MYC (Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog) και KLF4 (Kruppel-Like Factor 4). Η διαμόλυνση των ινοβλαστών μόνο με τα διαγονίδια των 4 αυτών παραγόντων ήταν αρκετή για τη δημιουργία κυττάρων με φαινότυπο ΕΣΚ. Τα κύτταρα που προέκυψαν, που ονομάστηκαν επαγόμενα πολυδύναμα στελεχειαία κύτταρα (ΕΠΣΚ, induced pluripotent stem cells, iPSCs) είχαν μορφολογία ΕΣΚ και σχημάτιζαν τερατώματα μετά από υποδόρια έγχυση σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια. Επιπλέον, παρουσίαζαν μεταγραφικό προφίλ έκφρασης παρόμοιο με αυτό των ΕΣΚ και διακριτό από αυτό των ινοβλαστών. Ένα χρόνο μετά, από την ίδια ομάδα επιτεύχθηκε ο επαναπρογραμματισμός ανθρώπινων σωματικών κυττάρων (ενήλικοι δερματικοί ινοβλάστες) σε ΕΠΣΚ (Takahashi et al., 2007). Το 2012, τόσο ο Shinya Yamanaka, όσο και ο Sir John Gurdon τιμήθηκαν με το βραβείο Nobel of Physiology or Medicine 2012 για την ανακάλυψή τους ότι τα ώριμα κύτταρα μπορούν να επαναπρογραμματιστούν στο στάδιο της πολυδυναμίας.

1.5.2.2. Το μοριακό κύκλωμα επαγωγής και διατήρησης της πολυδυναμίας

Η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων OCT3/4, SOX2, NANOG παίζει κρίσιμο ρόλο στα αρχικά στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης και τα επίπεδα έκφρασης ελαττώνονται κατά τη διαφοροποίηση των ΕΣΚ. Οι τρεις παράγοντες είναι απαραίτητοι για τη διαμόρφωση της επιβλάστης στη βλαστοκύστη, που θα δώσει γένεση στα τρία βλαστικά δέρματα και η απουσία τους οδηγεί στην ανώμαλη διαφοροποίηση προς εξτραεμβρυικούς ιστούς (Boyer et al., 2005; Niwa, 2007). Οι OCT3/4, SOX2, σχηματίζουν ετεροδιμερή σύμπλοκα, τα οποία μαζί με τον μεταγραφικό παράγοντα NANOG ρυθμίζουν τη διατήρηση της πολυδυναμίας, μέσω συνεργατικής σύνδεσης στους υποκινητές μεγάλου αριθμού γονιδίων (Boyer et al., 2005; Loh et al., 2006), ενεργοποιώντας την έκφραση αναπτυξιακά σημαντικών

μεταγραφικών παραγόντων ή σηματοδοτικών μορίων που ρυθμίζουν την αυτανανέωση και αναστέλλοντας γονίδια που οδηγούν σε διαφοροποίηση των ΕΣΚ. Ταυτόχρονα, δημιουργείται μια θετική ανάδραση στην έκφραση των OCT3/4, SOX2, NANOG, αφού προσδένονται και στους δικούς τους υποκινητές ελέγχοντας την έκφρασή τους (Boyer et al., 2005). Μεταξύ γονιδίων στόχων του δικτύου αυτού είναι οι παράγοντες REX1, UTF1, DPPA4, και διάφορες πρωτεΐνες των σηματοδοτικών μονοπατιών TGFβ και WNT που παίζουν κεντρικό ρόλο στην πολυδυναμία, όπως οι LEFTY2, CRIPTO, DKK1 (Boyer et al., 2005). Οι παράγοντες του κεντρικού δικτύου αλληλεπιδρούν με διάφορους συν-παράγοντες (cofactors), όπως οι SMAD1, STAT3, ESRRB, SALL4, TBX3, ZFX, RONIN, KLF4, c-MYC, πολλοί από τους οποίους σχετίζονται με τα μονοπάτια LIF, WNT, BMP, TGF-β (Chen et al., 2008; Kim et al., 2008a; Niwa, 2007).

Επιπλέον, στρατολογούνται τροποποιητές της χρωματίνης όπως οι SetDB1 και Polycomb group (PcG) που καταλύουν τη μεθυλίωση ιστονών και έτσι αναστέλλεται η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση (Bilodeau et al., 2009; Guenther et al., 2010). Σημαντικό ρόλο έχουν και τα miRNAs, αφού εκφράζονται εκείνα που διευκολύνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και παρεμποδίζονται εκείνα που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση (Boyer et al., 2005).

Παράλληλα, στο δίκτυο ρύθμισης της πολυδυναμίας συμμετέχουν σύμπλοκα που τροποποιούν τη χρωματίνη, μέσω αλληλεπίδρασης με τα νουκλεοσώματα (nucleosomes) και τις ιστόνες, όπως επίσης και DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs) (Young, 2011).

Οι παράγοντες c-MYC και KLF4 είναι γνωστά ογκογονίδια που ελέγχουν πληθώρα άλλων γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Chen et al., 2008; Kim et al., 2008a; Rahl et al., 2010). Ο KLF4 είναι μεταγραφικός παράγοντας

που αλληλεπιδρά με τους παράγοντες του κεντρικού δικτύου, ενεργοποιώντας τους υποκινητές πολλών γονιδίων και συμμετέχει στην αυτορύθμιση του δικτύου (Chen et al., 2008; Kim et al., 2008a). Ο c-MYC παίζει ρόλο στη μεταγραφή πληθώρας γονιδίων των οποίων η έκφραση ελέγχεται από τους παράγοντες OCT3/4, SOX2, NANOG. Φαίνεται ότι οι περιοχές σύνδεσης του c-MYC με γονίδια στόχους συνοδεύεται με μεγάλες αλλαγές στη χρωματίνη που διευκολύνουν την έκφραση (Kim et al., 2008a). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι αυξάνει την αποτελεσματικότητα της μεταγραφής, διευκολύνοντας έτσι τον επαναπρογραμματισμό και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Rahl et al., 2010). Το LIN28 είναι γνωστό ότι παρεμποδίζει την ωρίμανση των let-7 miRNAs τα οποία δρουν στα σωματικά κύτταρα αναστέλλοντας γονίδια σχετικά με την αυτοανανέωση, ενώ σχετίζονται με την επαγωγή της διαφοροποίησης (Melton et al., 2010).

Κατά τον επαναπρογραμματισμό, η εξωγενής έκφραση των παραγόντων OCT3/4, SOX2, KLF4, ξεκινά το σύστημα θετικής ανάδρασης/αυτορύθμισης του κεντρικού δικτύου. Η εξωγενής έκφραση του c-MYC επάγει την αντιγραφή του DNA, οδηγώντας σε χαλάρωση της χρωματίνης με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η ενεργοποίηση έκφρασης γονιδίων από τον OCT3/4. Επιπλέον, λαμβάνουν χώρα μέσω μεθυλίωσης και ακετυλίωσης των ιστονών τροποποιήσεις στη χρωματίνη που διευκολύνουν την έκφραση των γονιδίων των OCT3/4, NANOG (Niwa, 2007).

Κατά τη διαφοροποίηση των ΕΣΚ η έκφραση των παραγόντων του κεντρικού δικτύου μειώνεται, με αποσιώπηση του γονιδίου του OCT3/4, μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις των παραγόντων με miRNAs και μετα-μεταφραστικά (πρωτεόλυση του NANOG) (Feldman et al., 2006; Fujita et al., 2008; Tay et al., 2008).

1.5.2.3. Πηγές ΕΠΣΚ

Στα πρώτα πειράματα επαναπρογραμματισμού τα αρχικά σωματικά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι δερματικοί ινοβλάστες. Από τότε αποτελούν την πιο συχνή πηγή κυττάρων για επαναπρογραμματισμό. Αυτό οφείλεται στη μεγάλη διαθεσιμότητα αυτών των κυττάρων αφού μπορούν να απομονωθούν από βιοψίες δέρματος, αλλά και στο γεγονός ότι είναι εύκολα καλλιεργήσιμα κύτταρα, με πολλαπλασιαστικό δυναμικό το οποίο διευκολύνει τον επαναπρογραμματισμό. Το μειονέκτημά τους, είναι η σχετικά επεμβατική διαδικασία με την οποία συλλέγονται. Τα τελευταία χρόνια, έχουν επαναπρογραμματιστεί πάρα πολλοί τύποι σωματικών κυττάρων επιβεβαιώνοντας την καθολικότητα της διαδικασίας στα ώριμα κύτταρα. Διάφορες μελέτες έχουν περιγράψει τον επαναπρογραμματισμό κερατινοκυττάρων (Aasen et al., 2008), μελανοκυττάρων (Utikal et al., 2009), μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος, μεταξύ των οποίων CD34+ κυττάρων, μυελικών, ώριμων T και B λεμφοκυττάρων (Hanna et al., 2008; Loh et al., 2009; Staerk et al., 2010), επιθηλιακών νεφρικών κυττάρων που ανιχνεύονται στα ούρα (Zhou et al., 2011), ηπατικών και γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων (Aoi et al., 2008), νευρικών στελεχιαίων κυττάρων (Kim et al., 2008b), ΜΣΚ (μυελού των οστών, αρθρώσεων, λιπώδους ιστού και εξτραεμβρυικών ιστών) (Cai et al., 2010; Heng et al., 2013; Kim et al., 2011b; Varela et al., 2014), ενδοθηλιακών τόσο του περιφερικού αίματος όσο και του ομφαλίου λώρου (Polegannon et al., 2015), παγκρεατικών β-κυττάρων (Stadtfeld et al., 2008a).

1.5.2.4. Μέθοδοι δημιουργίας ΕΠΣΚ

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον επαναπρογραμματισμό διακρίνονται στο αν περιλαμβάνουν τη χρήση εξωγενούς DNA ή όχι, για την έκφραση των παραγόντων πολυδυναμίας και στο αν αυτό κάνει ενσωμάτωση στο γονιδίωμα των κυττάρων-

στόχων. Τα πρώτα πειράματα επαναπρογραμματισμού χρησιμοποιούσαν τα διαγονίδια (transgenes) των παραγόντων, τα οποία εισάγονταν στο κύτταρο μέσω διαμόλυνσης με γάμμα-ρετροϊικούς φορείς. Πρόκειται για μια κατηγορία ιών που φέρουν RNA ως γενετικό υλικό, το οποίο ενσωματώνεται σε τυχαίες θέσεις του γονιδιώματος του κυττάρου ξενιστή, με αποτέλεσμα τη σταθερή έκφραση των διαγονιδίων. Αργότερα, αναπτύχθηκαν πρωτόκολλα που χρησιμοποιούν λεντιϊικούς φορείς, οι οποίοι είναι επίσης ρετροϊικοί, αλλά μπορούν να μολύνουν και κύτταρα που δεν πολλαπλασιάζονται.

Επειδή όμως η έκτοπη έκφραση των παραγόντων πολυδυναμίας είναι απαραίτητη μόνο προσωρινά, μέχρι να ενεργοποιηθούν οι ενδογενείς μηχανισμοί ρύθμισης της πολυδυναμίας, για τον επαναπρογραμματισμό δε χρειάζεται η μόνιμη ενσωμάτωση των διαγονιδίων στο γονιδίωμα (Okita et al., 2007). Επιπλέον, η ενσωμάτωση ξένου γενετικού υλικού στα κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε εισχωρητική μεταλλαξιγένεση (insertional mutagenesis). Αυτό πυροδοτεί ιδιαίτερη ανησυχία για την πιθανή κλινική εφαρμογή των ΕΠΣΚ, εφόσον μάλιστα τα KLF4, c-MYC αποτελούν ογκογονίδια. Για αυτούς τους λόγους, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι που δεν προκαλούν μόνιμη ενσωμάτωση διαγονιδίων στο γονιδίωμα. Τα συστήματα του τρανσποζονίου-τρανσποζάσης (PiggyBac και Sleeping Beauty) και της Cre-loxP recombinase, κάνουν αρχική ενσωμάτωση των διαγονιδίων στο γονιδίωμα μέσω των ενζύμων τρανσποζάση ή Cre-recombinase, αντίστοιχα, αλλά κατόπιν επαγωγής πολυδυναμίας τα διαγονίδια αφαιρούνται με τη δράση των ενζύμων αυτών (Grabundzija et al., 2013; Wolftjen et al., 2009). Άλλες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει ιικούς φορείς οι οποίοι δεν ενσωματώνουν τα διαγονίδια στο γονιδίωμα, όπως ο RNA ιός Sendai (Ban et al., 2011; Beers et al., 2015) και διάφοροι απενεργοποιημένοι αδενοϊοί (Stadtfield et al., 2008b). Έχουν επίσης, αναπτυχθεί oriP/EBNA1 επισωματικοί φορείς (Chou et al.,

2015; Okita et al., 2013; Wen et al., 2016). Σε όλες αυτές τις μεθόδους, οι φορείς παραμένουν προσωρινά στα κύτταρα και σταδιακά χάνονται από τον κυτταρικό πληθυσμό, πρέπει ωστόσο να γίνεται επιβεβαίωση της απομάκρυνσής τους από τα κύτταρα. Σε πολλές μελέτες έχει επιτευχθεί, με πολύ καλή απόδοση, η εισαγωγή συνθετικών μορίων mRNAs που κωδικοποιούν τους παράγοντες πολυδυναμίας. Οι περισσότερες δοκιμές έχουν γίνει σε ινοβλάστες, αλλά η μέθοδος έχει πολύ καλά αποτελέσματα σε ενδοθηλιακά κύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα του ουροποιητικού συστήματος (Arnold et al., 2012; Heng et al., 2013; Mandal and Rossi, 2013; Poleganov et al., 2015; Rohani et al., 2016; Varela et al., 2014; Warren et al., 2010, 2012). Η μέθοδος αυτή έχει το πλεονέκτημα ότι είναι ασφαλής και δεν απαιτεί ελέγχους για την απομάκρυνση των διαγονιδίων από τα κύτταρα. Τέλος, κάποιες μελέτες έχουν επιχειρήσει τον επαναπρογραμματισμό εισάγοντας κατευθείαν τους παράγοντες πολυδυναμίας σε πρωτεϊνικό επίπεδο στα κύτταρα, επιτυγχάνοντας τον επαναπρογραμματισμό, με τόσο χαμηλή απόδοση, ώστε να είναι μη πρακτική η συστηματική εφαρμογή της μεθόδου για τη δημιουργία ΕΠΣΚ (Kim et al., 2009).

1.5.2.5. In vitro καλλιέργεια των ΕΠΣΚ

Τα ΕΠΣΚ, όπως και τα ΕΣΚ, στην καλλιέργεια διατηρούν σφαιρικό σχήμα, με μεγάλη αναλογία πυρήνα/κυτταροπλάσματος και διακριτό πυρηνίσκο. Σχηματίζουν αποικίες στενά συνδεδεμένων διαιρούμενων κυττάρων, οι οποίες αυξάνονται σε μέγεθος. Τα ΕΠΣΚ χρειάζονται καλλιεργητικό υπόστρωμα προκειμένου να μπορούν να διατηρούνται και να αυτοανανεώνονται. Μέχρι πρόσφατα, ως υπόστρωμα προσκόλλησης χρησιμοποιούνταν αδρανοποιημένα υποστηρικτικά κύτταρα, κυρίως εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού, οι οποίες ευνοούν τη διατήρηση της πολυδυναμίας των ΕΠΣΚ, μέσω έκκρισης αυξητικών παραγόντων και συστατικών εξωκυττάριας

ουσίας, μέσω κυτταρικών αλληλεπιδράσεων και εκκαθάρισης των τοξικών αποβλήτων (Thomson et al., 1998; Takahashi et al., 2007). Συνήθως, η χρήση τους συνδυάζεται με καλλιεργητικά υλικά που περιέχουν επιπρόσθετα τον παράγοντα FGF-2, που είναι απαραίτητος για την πολυδυναμία των ΕΣΚ. Μέχρι σήμερα η χρήση υποστηρικτικών κυττάρων είναι ακόμη ευρέως διαδεδομένη, αλλά έχουν παράλληλα αναπτυχθεί και υιοθετούνται πλέον διάφορα άλλα υποστρώματα, μιγμάτων εξωκυττάριας ουσίας ή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Παραδείγματα τέτοιων υποστρωμάτων είναι το Matrigel (ζωικής προέλευσης πρωτεϊνικό μίγμα εξωκυττάριας ουσίας αντίστοιχο της βασικής μεμβράνης), η ανασυνδυασμένη λαμινίνη, η βιτρονεκτίνη, το ανθρώπινης προέλευσης μίγμα CellSTART. Παράλληλα έχουν αναπτυχθεί καλλιεργητικά υλικά καθορισμένης σύστασης, τα οποία συνήθως περιλαμβάνουν τους παράγοντες FGF-2, TGF-β. Όταν οι αποικίες μεγαλώνουν σε βαθμό που να μην έχουν αρκετό χώρο περαιτέρω ανάπτυξης, ανακαλλιεργούνται με τη βοήθεια ενζυμικής αποκόλλησης από το υπόστρωμά τους. Τα ΕΠΣΚ διατηρούν την πολυδυναμία τους στην καλλιέργεια, ενώ παρατηρείται αυθόρμητη διαφοροποίηση ενός ποσοστού των κυττάρων, το οποίο ποικίλλει ανάλογα με την κυτταρική σειρά και τις συνθήκες καλλιέργειας.

1.5.2.6. In vitro διαφοροποίηση των ΕΠΣΚ

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί πολλαπλές μέθοδοι με τις οποίες επιτυγχάνεται *in vitro* η διαφοροποίηση των ΕΠΣΚ σε διάφορους ιστικούς τύπους. Τα αρχικά μοντέλα διαφοροποίησης αναπτύχθηκαν πάνω σε σειρές ΕΣΚ και έχουν βοηθήσει σημαντικά στην κατανόηση των διαφόρων σταδίων της εμβρυογένεσης και των μονοπατιών που εμπλέκονται στη διαμόρφωση των διαφόρων ιστών. Προκειμένου να επιτευχθεί διαφοροποίηση των ΕΠΣΚ, τα αδιαφοροποίητα κύτταρα

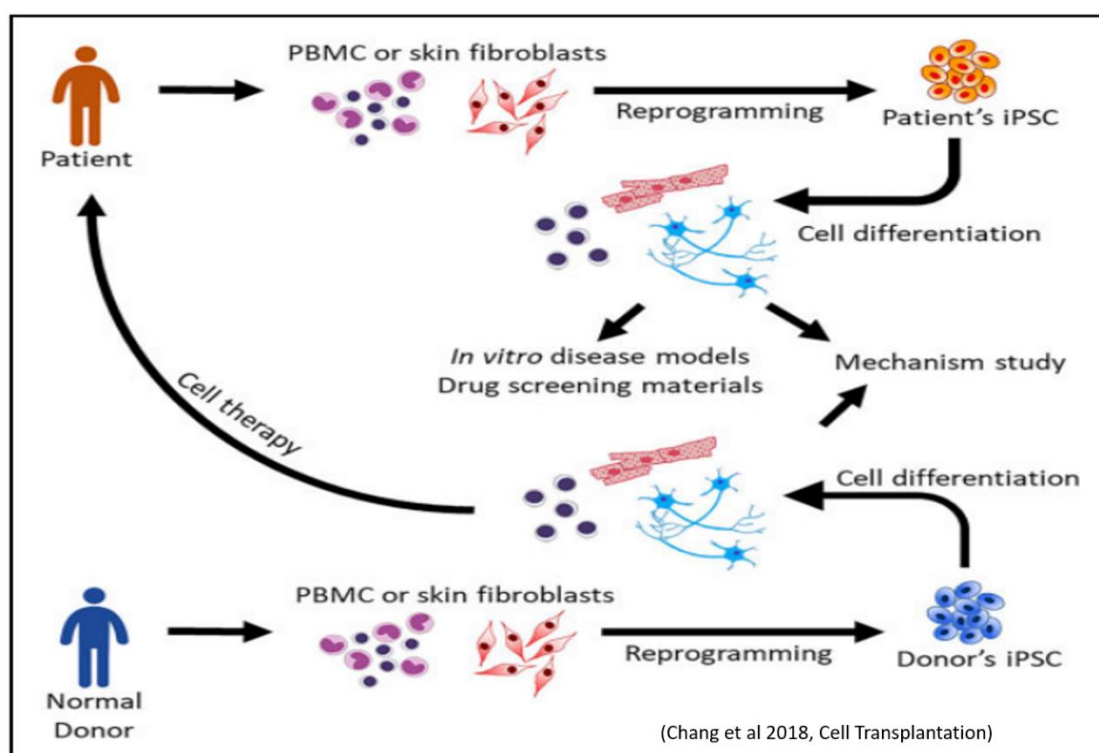
συχνά καλλιεργούνται ως μονοστιβάδα πάνω σε κατάλληλα υποστρώματα, υπό την επίδραση κατάλληλων αυξητικών παραγόντων, ανάλογα με την κατεύθυνση της εξειδίκευσης που επιθυμούμε να τους δώσουμε. Εναλλακτικά, χρησιμοποιούνται πρωτόκολλα που έχουν σαν αρχικό στάδιο διαφοροποίησης αυτό του σχηματισμού εμβρυικών σωματιδίων (ΕΣ), κάτω από συνθήκες μη προσκόλλησής τους. Τα ΕΣ είναι τρισδιάστατα συσσωματώματα στα οποία οργανώνονται τα ΠΣΚ όταν καλλιεργούνται σε εναιώρημα. Μέσα σε αυτά, τα κύτταρα ξεκινούν να διαφοροποιούνται και να διαμορφώνουν τα τρία βλαστικά δέρματα, όπως συμβαίνει κατά τη γαστριδίωση του εμβρύου (Itskovitz-Eldor et al., 2000; Kim et al., 2011a; Leahy et al., 1999; Pettinato et al., 2014). Κατά τη γαστριδίωση, η ICM εξειδικεύεται περαιτέρω αρχικά σε δύο στρώματα, την επιβλάστη (epiblast) και την υποβλάστη (hypoblast). Στη συνέχεια, κύτταρα της επιβλάστης μεταναστεύουν προς την επιφάνειά της (ραχιαία πλευρά του εμβρύου) σχηματίζοντας μια αυλάκωση, την αρχική γραμμή (primitive streak). Μέσω αυτής της αυλάκωσης, κύτταρα μεταναστεύουν προς την εσωτερική πλευρά της και προς την υποβλάστη δίνοντας γένεση στο καθορισμένο ενδόδερμα (definitive endoderm) του εμβρύου, ενώ όσα παραμένουν στη ραχιαία πλευρά δίνουν το εξώδερμα και όσα μεταναστεύουν μεταξύ ενδοδέρματος και εξωδέρματος δίνουν το μεσόδερμα. Η υποβλάστη ή αλλιώς αρχέγονο ενδόδερμα (primitive endoderm) δίνει γένεση στο λεκιθικό σάκο (yolk sac). Στα ΕΣ διατηρείται κάποιου βαθμού κυτταρική οργάνωση των διαφοροποιούμενων ΠΣΚ, αν και δεν είναι πανομοιότυπη με αυτή του εμβρύου, αφού παρουσιάζει μια εξωτερική στιβάδα με χαρακτηριστικά ενδοδέρματος και προς το εσωτερικό παρουσιάζονται κύτταρα του εξωδέρματος και του μεσοδέρματος (Choi et al., 2005; Leahy et al., 1999). Στη συνέχεια, τα ΕΣ μπορούν να καλλιεργηθούν υπό την επίδραση κατάλληλων σινιάλων και να διαφοροποιηθούν περαιτέρω σε πληθώρα

κυττάρων όπως νευρικά, καρδιακά, αιμοποιητικά, παγκρεατικά, ηπατικά κα (Choi et al., 2005; Dang et al., 2002; Hori et al., 2002; Kumar et al., 2007; Mohr et al., 2010; T et al., 2002). Η γνώσεις μας ως προς τα αναπτυξιακά στάδια και τα σινιάλα που εμπλέκονται στην οντογένεση κάθε ιστού καθορίζουν σημαντικά την αποδοτικότητα των πρωτοκόλλων διαφοροποίησης. Επίσης, ο παράγοντας της επιγενετικής μνήμης ενδέχεται να επηρεάζει την ικανότητα διαφοροποίησης των ΕΠΣΚ. Επιγενετική μνήμη είναι η παραμονή στοιχείων του DNA μεθυλώματος και του μεταγραφώματος των αρχικών σωματικών κυττάρων στα ΕΠΣΚ. Αυτό μπορεί πρακτικά να έχει ως αποτέλεσμα τις δυσκολίες στη διαφοροποίηση των ΕΠΣΚ, αφού αυτά μπορεί να παρουσιάζουν παραπάνω τάση να διαφοροποιούνται προς τον ιστό από τον οποίο προήλθαν και λιγότερο ως προς άλλους ιστούς, επομένως μπορεί να δυσχεραίνεται η όποια εφαρμογή των ΕΠΣΚ (Noguchi et al., 2018). Έχει παρατηρηθεί ότι σε κάποιο βαθμό η επιγενετική μνήμη εξασθενεί μετά από εκτεταμένες ανακαλλιέργειες (Polo et al., 2010).

1.5.2.7. Εφαρμογές των ΕΠΣΚ και των παραγώγων τους

Τα ΠΣΚ μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές για την παραγωγή διαφοροποιημένων κυττάρων και ιστών με σκοπό τη χρησιμοποίησή τους στην αναγεννητική ιατρική και τις μεταμοσχεύσεις, αλλά και στη μελέτη ασθενειών και φαρμάκων (Εικόνα 1.5). Το πλεονέκτημά τους είναι ότι μπορούν, σε αντίθεση με τα ενήλικα στελεχιαία κύτταρα, να αυξάνονται απεριόριστα *in vitro*, χωρίς να επέρχεται σε αυτά κυτταρικό γήρας, με αποτέλεσμα να συνιστούν μια ανεξάντλητη πηγή διαφοροποιημένων κυττάρων. Τα ΠΣΚ, λόγω της πολυδυναμίας τους, μπορούν ανά πάσα στιγμή να οδηγηθούν σε διαφοροποίηση κάτω από κατάλληλες *in vitro* συνθήκες, προς οποιοδήποτε τύπο ώριμων κυττάρων. Έτσι, αφού πολλαπλασιαστούν

σε επαρκείς αριθμούς και χαρακτηρίζονται ως προς την πολυδυναμία τους και τη γενετική τους σταθερότητα αποθηκεύονται στη βαθιά κατάψυξη (υγρό άζωτο), από όπου μπορεί ανά πάσα στιγμή να αποψυχθεί μια μικρή ποσότητα και να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή διαφοροποιημένων κυττάρων. Ενώ η συστηματική χρήση των ΕΣΚ στην έρευνα και την ιατρική περιορίζεται από βιοηθικούς φραγμούς, καθώς για τη δημιουργία ΕΣΚ σειρών πρέπει να καταστραφούν ανθρώπινα έμβρυα, αυτό το ζήτημα προσπερνάται με τη χρήση ΕΠΣΚ, καθώς αυτά δημιουργούνται στο εργαστήριο από μικρό δείγμα σωματικών κυττάρων ενηλίκου. Επιπλέον, τα ΕΠΣΚ φέρουν το πλεονέκτημα ότι δίνουν τη δυνατότητα αυτόλογης κυτταρικής θεραπείας σε αντίθεση με τα ΕΣΚ, που εξ ορισμού αποτελούν πηγές αλλογενών κυττάρων προερχόμενων από έμβρυα. Ακόμη, η ανάπτυξη αυτόλογων ΕΠΣΚ κυττάρων από ασθενείς με διάφορα νοσήματα επιτρέπουν επίσης τη μελέτη του φαινότυπου των νοσούντων κυττάρων του ασθενούς, τους μηχανισμούς οι οποίοι καθορίζουν το φαινότυπο και το σχεδιασμό εξατομικευμένων θεραπειών.



Εικόνα 1.5: Εφαρμογές των ΕΠΣΚ.

1.5.2.8. Τα ΕΠΣΚ στην αναγεννητική ιατρική

Τα ενήλικα σωματικά κύτταρα, όπως για παράδειγμα οι δερματικοί ινοβλάστες, τα μονοκύτταρα του μυελού των οστών ή του περιφερικού αίματος μπορούν να απομονωθούν από υγιή δότη ή από ασθενή και να επαναπρογραμματιστούν στο εργαστήριο, ώστε να παραχθούν κυτταρικές σειρές ΕΠΣΚ. Στη συνέχεια, οι κυτταρικές σειρές μπορούν να διαφοροποιηθούν στον κυτταρικό τύπο προς μεταμόσχευση. Η ανάπτυξη κυτταρικών σειρών από τον ίδιο τον ασθενή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις εκφυλιστικών παθήσεων μη γενετικής αιτιολογίας ή αν αυτή υπάρχει, τότε θα πρέπει να διορθωθεί η παθολογική μετάλλαξη με γενετική διόρθωση. Διάφορες τεχνικές γενετικής μηχανικής χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια για τη δημιουργία γενετικά διορθωμένων σειρών ΕΠΣΚ από ασθενείς με διάφορα νοσήματα. Τέτοιες τεχνικές χρησιμοποιούν διάφορες νουκλεάσες, όπως οι transcription activator like effector nucleases, (TALENs), οι νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου (zinc finger nucleases, ZFNs) και το πλέον αποτελεσματικό σύστημα Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 (Hockemeyer and Jaenisch, 2016). Η αυτόλογη χρήση των ΕΠΣΚ έχει το πλεονέκτημα ότι αποφεύγεται η απόρριψη του μοσχεύματος. Σε περιπτώσεις θεραπείας γενετικών παθήσεων πολλά υποσχόμενες είναι οι διάφορες αναπτυσσόμενες κυτταρικές τράπεζες ΕΠΣΚ (Huang et al., 2019), οι οποίες εκτός από τη διάθεση πληθώρας κυτταρικών σειρών για τη μελέτη νοσημάτων, αποσκοπούν και στη χρήση ΕΠΣΚ από φυσιολογικούς δότες για αλλογενείς μεταμοσχεύσεις. Η στρατηγική αυτή έχει το πλεονέκτημα ενός πολύ χαμηλότερου κόστους ανά ασθενή, αλλά και εξοικονόμησης χρόνου από τη διάγνωση στη θεραπεία, αφού χρησιμοποιεί ήδη έτοιμες και πλήρως χαρακτηρισμένες φυσιολογικές κυτταρικές σειρές, σε

αντίθεση με την αυτόλογη κυτταρική θεραπεία, όπου πρέπει να γίνεται δημιουργία νέων κλινικά αξιοποιήσιμων κυτταρικών σειρών για κάθε ασθενή, που παράλληλα ανεβάζει και κατά πολύ το κόστος. Από την άλλη, οι αλλογενείς μεταμοσχεύσεις φέρουν το πρόβλημα της HLA συμβατότητας το οποίο μπορεί να εξομαλυνθεί με την ύπαρξη μεγάλου αποθέματος ΕΠΣΚ σειρών από διαφορετικούς δότες, όπως γίνεται με τις τράπεζες δοτών αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Λόγω της δυσκολίας δημιουργίας σειρών από τόσο μεγάλο αριθμό διαφορετικών δοτών, διάφορες τράπεζες προσπαθούν να αναπτύξουν απόθεμα από HLA ομόζυγους δότες.

Για την κλινική εφαρμογή των ΕΠΣΚ απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ανάπτυξη αποδοτικών και ασφαλών πρωτοκόλλων διαφοροποίησης των πολυδύναμων βλαστοκυττάρων.

1.5.2.9. Κλινικές μελέτες με ΕΠΣΚ

Όσον αφορά ολοκληρωμένες ή τρέχουσες κλινικές δοκιμές με χρήση ΕΠΣΚ, το συγκεκριμένο πεδίο βρίσκεται ακόμα σε πολύ αρχικά στάδια. Η θεραπεία του εκφυλισμού της ωχράς κηλίδας που έχει αποτελέσει στόχο σε αρκετές κλινικές μελέτες που έχουν χρησιμοποιήσει ΕΣΚ μέχρι σήμερα, έχει αποτελέσει και την πρώτη κλινική δοκιμή φάσης 1 που ξεκίνησε με χρήση ΕΠΣΚ. Αυτή ξεκίνησε το 2013, με ασθενή από τον οποίο δημιουργήθηκαν ΕΠΣΚ και στη συνέχεια αυτά διαφοροποιήθηκαν δίνοντας στιβάδα υποστηρικτικών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς (retinal pigmented epithelium), η οποία χορηγήθηκε τοπικά. Ο ασθενής δεν ανέπτυξε ανεπιθύμητες ενέργειες και διαπιστώθηκε βελτίωση της νόσου. Η συγκεκριμένη κλινική δοκιμή σταμάτησε στο συγκεκριμένο ασθενή, λόγω του ότι τα ΕΠΣΚ του δεύτερου ασθενούς που θα λάμβανε θεραπεία εμφάνισαν γενωμικές αλλοιώσεις, επομένως δεν έλαβε μόσχευμα (Mandai et al., 2017). Το 2016 η κλινική

μελέτη άνοιξε ξανά, αυτή τη φορά αποσκοπώντας στην αλλογενή μεταμόσχευση με κύτταρα από φυσιολογικούς δότες. Η πρώτη ολοκληρωμένη κλινική δοκιμή φάσης 1 έγινε από την εταιρία Cynata Therapeutics, με ενδοφλέβια χορήγηση αλλογενών ΜΣΚ που δημιουργήθηκαν από ΕΠΣΚ, σε 15 ασθενείς με νόσο μοσχεύματος κατά ξενιστή (graft versus host disease, GvHD), μετά από αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων. Οι ασθενείς δεν ανέπτυξαν ανεπιθύμητες ενέργειες και εμφάνισαν γενική βελτίωση μέχρι την ημέρα 100 της θεραπείας, ενώ συνεχίζουν να παρακολουθούνται (Rasko et al., 2019) και σχεδιάζεται κλινική μελέτη φάσης 2 από την ίδια εταιρία. Παράλληλα, άλλες κλινικές μελέτες έχουν εγκριθεί πρόσφατα και ξεκινήσει, κυρίως στην Ιαπωνία, μεταξύ των οποίων μια για τη θεραπεία της νόσου του Πάρκινσον με μεταμόσχευση ντοπαμινεργικών προγονικών κυττάρων (Takahashi, 2019), μια για τη θεραπεία ασθενών με καρδιακά νοσήματα με μεταμόσχευση στιβάδων καρδιομυοκυττάρων (Cyranoski, 2018a) και μια για τη θεραπεία ασθενών με τραύματα της σπονδυλικής στήλης με χορήγηση νευρικών προγονικών κυττάρων από ΕΠΣΚ (Nagoshi et al., 2019). Επίσης, στην Αμερική η εταιρία Fate Therapeutics έχει ξεκινήσει κλινικές μελέτες ανοσοθεραπείας με χρήση NK κυττάρων από ΕΠΣΚ για την αντιμετώπιση προχωρημένων συμπαγών όγκων σαν μονοθεραπεία ή και σε συνδυασμό με αναστολείς των σημείων ανοσιακού ελέγχου (immune checkpoint inhibitors), αλλά και σε περιπτώσεις οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και Β λεμφωμάτων (Inc, 2019). Η ίδια εταιρία επιπλέον έχει λάβει έγκριση για χρήση NK κυττάρων που εκφράζουν χμιαϊκούς αντιγονικούς υποδοχείς (chimeric antigen receptors, CAR) από ΕΠΣΚ για τα Β λεμφώματα και τη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (Inc, 2020).

1.5.2.10. Περιορισμοί στη χρήση των ΕΠΣΚ και των παραγώγων τους Γενετική αστάθεια

Η γενετική αστάθεια αποτελεί φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί ευρέως σε κυτταρικές σειρές ΕΣΚ και ΕΠΣΚ. Γενετικές αλλαγές μπορεί να προκύψουν κατά τον επαναπρογραμματισμό και κατά την παρατεταμένη καλλιέργεια των ΕΠΣΚ, ενώ συχνά προϋπάρχουν στα αρχικά σωματικά κύτταρα πριν τον επαναπρογραμματισμό σε χαμηλή συχνότητα και παγιώνονται στα ΕΠΣΚ, λόγω της κλωνικής διαδικασίας με την οποία αυτά προκύπτουν. Χρωμοσωμικές αλλαγές έχουν παρατηρηθεί σε σειρές ΕΠΣΚ και ΕΣΚ σε παρόμοιο βαθμό, με κάποιες από τις πιο συχνές να είναι η τρισωμία 12, αλλά και στα χρωμοσώματα 8 και Χ. Το χρωμόσωμα 12 περιέχει γονίδια σχετικά με τον κυτταρικό κύκλο και την πολυδυναμία, όπως το *NANOG* και θεωρείται ότι διπλασιασμοί σε αυτό σχετίζονται με επιλεκτικό πλεονέκτημα στον πολλαπλασιασμό ή τον επαναπρογραμματισμό αυτών των κυττάρων (Mayshar et al., 2010; Taarcken et al., 2011). Στις σειρές έχουν επίσης παρατηρηθεί διάφορες αλλαγές αριθμού αντιγράφων (copy number variations, CNVs) (Hussein et al., 2011; Laurent et al., 2011). Μια μελέτη έδειξε ότι σε γενικές γραμμές τα CNVs μειώνονται με τις συνεχείς ανακαλλιέργειες και ότι τα πιο πολλά είναι ελλείμματα που δίνουν μειονέκτημα στην επιβίωση των κυττάρων και σταδιακά εκλείπουν από τον πληθυσμό (Hussein et al., 2011). Άλλη μελέτη έδειξε ότι CNVs που εμφανίζονται στις πρώτες ανακαλλιέργειες των ΕΠΣΚ συχνά αποτελούν ελλείμματα σε περιοχές με ογκοκατασταλτικά γονίδια, ενώ έχει παρατηρηθεί αύξηση διπλασιασμών σε περιοχές με ογκογονίδια κατά την παρατεταμένη καλλιέργεια (Laurent et al., 2011). Από την άλλη, έχει δειχθεί ότι συχνά τα CNVs που παρατηρούνται στα ΕΠΣΚ, προϋπάρχουν σε χαμηλή συχνότητα στα αρχικά σωματικά κύτταρα, αλλά είναι μη ανιχνεύσιμα (Abyzov et al., 2012).

Οι κυτταρικές σειρές των ΕΠΣΚ που προορίζονται για κλινική χρήση είναι πολύ σημαντικό να είναι γενετικά σταθερές, που σημαίνει ότι δε θα πρέπει να αλλοιώνεται

η ακεραιότητα και η έκφραση σημαντικών γνωστών γονιδίων, ιδίως όσων παίζουν ρόλο στον κυτταρικό κύκλο και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επομένως, θα πρέπει να γίνεται παρακολούθηση του μοριακού προφίλ των πολυδύναμων σειρών, αλλά και των διαφοροποιημένων κυττάρων πριν τη χορήγηση.

Ενσωμάτωση ξένου DNA

Οι μέθοδοι επαναπρογραμματισμού θα πρέπει να μη ενσωματώνουν ξένο γενετικό υλικό στα κύτταρα. Οι κλασσικές μέθοδοι επαναπρογραμματισμού που χρησιμοποιούν ιικούς φορείς δεν αποτελούν μια ασφαλή στρατηγική με προοπτικές χρήσης στην κλινική πράξη. Η εισχωρητική μεταλλαξιγένεση μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία ενδογενών γονιδίων που μπορεί να επηρεαστούν ή/και κακοήθη εξαλλαγή των κυττάρων λόγω απορρύθμισης της έκφρασης ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Επιπλέον, υπάρχει κίνδυνος τα διαγονίδια να ενσωματωθούν κοντά σε υποκινητές άλλων γονιδίων, με αποτέλεσμα τη συνεχή υπερέκφραση των συγκεκριμένων παραγόντων ή να επανενεργοποιηθούν κάποια στιγμή με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων-παραγώγων των ΕΠΣΚ μετά τη διαφοροποίηση.

Κατάλοιπα αδιαφοροποίητων κυττάρων στον πληθυσμό των διαφοροποιημένων

Ακόμη ένα ζήτημα είναι τα πιθανά κατάλοιπα αδιαφοροποίητων κυττάρων στον πληθυσμό των διαφοροποιημένων, προς χορήγηση κυττάρων. Όλα αυτά τα φαινόμενα μπορεί να οδηγήσουν σε ογκογένεση μετά τη χορήγηση σε ασθενείς. Έτσι είναι απαραίτητο να γίνεται έλεγχος για το αν στον πληθυσμό των διαφοροποιημένων κυττάρων εκφράζονται γονίδια που σχετίζονται με την πολυδυναμία. Η καθοριστική απόδειξη βέβαια ότι τα παραχθέντα κύτταρα δεν έχουν ογκογενετική τάση είναι μετά από *in vivo* χορήγηση των διαφοροποιημένων κυττάρων σε πειραματόζωα, για να διερευνηθεί η πιθανή ανάπτυξη όγκων.

Παρουσία συστατικών ζωικής προέλευσης στην καλλιέργεια

Είναι σημαντική η ανάπτυξη μεθόδων καλλιέργειας των κυττάρων οι οποίες δεν περιλαμβάνουν τη χρήση υποστηρικτικών κυττάρων, καθώς αυτά συνήθως είναι κυτταρικές σειρές ζωικών κυττάρων που μπορούν να αποτελέσουν εστία ανοσολογικών αντιδράσεων σε ξενοαντιγόνα ή και μόλυνσης της καλλιέργειας με ξενοπαθογόνα (xenopathogen contamination). Επίσης, η χρήση τους αυξάνει την πολυπλοκότητα των διαδικασιών και απαιτεί επιπλέον χρόνο και υλικά. Τέλος, οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους επιδρούν στα κύτταρα δεν είναι αποσαφηνισμένοι, επομένως η αποτελεσματικότητά τους στη διατήρηση των ΕΠΣΚ μπορεί να διαφέρει από παρτίδα σε παρτίδα. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί πρωτόκολλα καλλιέργειας τόσο των πολυδύναμων όσο και των διαφοροποιημένων κυττάρων πάνω σε υποστρώματα φυσικών ή συνθετικών πολυμερών που μιμούνται τον εξωκυττάριο χώρο των ιστών. Προκειμένου να μπορούν να αξιοποιηθούν κλινικά τα ΕΠΣΚ, είναι απαραίτητη η εξάλειψη των συστατικών ζωικής προέλευσης από την καλλιέργεια και η χρήση πλήρως καθορισμένων υλικών.

Αποδοτικότητα πρωτοκόλλων διαφοροποίησης

Τα πρωτόκολλα διαφοροποίησης θα πρέπει να είναι ικανά να παράγουν ένα μεγάλο αριθμό ώριμων κυττάρων και έναν πληθυσμό καθαρό από άλλους κυτταρικούς τύπους. Λόγω των κενών που υπάρχουν στη γνώση της οντογένεσης διαφόρων οργάνων, όπως αναφέρθηκε, συχνά τα πρωτόκολλα δεν αποδίδουν κύτταρα στον επιθυμητό αριθμό ή καθαρότητα και αυτό συμβαίνει ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων που θέλουμε να παράγουμε. Η ανάπτυξη τέτοιων πρωτοκόλλων είναι καθοριστική για την κλινική εφαρμογή των ΕΠΣΚ.

1.6. Σκοπός μελέτης-Πειραματικός σχεδιασμός

Το εργαστήριό μας έχει αναπτύξει εδώ και πολλά χρόνια εμπειρία στην καλλιέργεια και των χαρακτηρισμό των ανθρώπινων ΜΣΚ του ΜΟ. Παράλληλα, την τελευταία δεκαετία έχει δραστηριοποιηθεί στις καλλιέργειες των ΕΣΚ, αλλά και στη δημιουργία κυτταρικών σειρών ΕΠΣΚ στα πλαίσια της προσπάθειας μας να αναπτύξουμε και να ενσωματώσουμε πρωτόκολλα προκλινικής/μεταφραστικής έρευνας για την κυτταρική και γονιδιακή θεραπεία αιματολογικών νόσων της παιδικής ηλικίας. Η μέθοδος του επαναπρογραμματισμού που έχουμε υιοθετήσει είναι αυτή των συνθετικών μορίων mRNA πάνω σε λιποσωμικούς φορείς. Στόχος μας είναι η αποφυγή της δημιουργίας κυτταρικών προϊόντων με ενσωματωμένα τα διαγονίδια των μεταγραφικών παραγόντων πολυδυναμίας στο DNA τους.

Στα πλαίσια αυτά, στην παρούσα διατριβή θελήσαμε να διερευνήσουμε την δυνατότητα να παραχθεί κλινικά αξιοποιήσιμος αριθμός ΜΣΚ από σειρές ΕΠΣΚ που έχουν δημιουργηθεί στο εργαστήριό μας και δε φέρουν ενσωματωμένα διαγονίδια, κάτω από ασφαλή, αλλά ταυτόχρονα απλά και αποδοτικά πρωτόκολλα καλλιέργειας. Τα ΕΠΣΚ έχουν δημιουργηθεί με επαναπρογραμματισμό ΜΣΚ που απομονώθηκαν από μια πολύ μικρή ποσότητα ΜΟ φυσιολογικών δοτών. Τα ΜΣΚ του ΜΟ χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή δημιουργίας ΕΠΣΚ, λόγω της εμπειρίας του εργαστηρίου στις καλλιέργειες αυτών των κυττάρων, αλλά και της πρόσβασης της Μονάδας μας σε τέτοιους είδους βιολογικά δείγματα.

Επιπρόσθετα, επιδιώξαμε τον πλήρη χαρακτηρισμό των παραχθεισών σειρών ΜΣΚ (ΕΠΣΚ-ΜΣΚ) και τη μελέτη των ιδιοτήτων τους σε σύγκριση με τα ΜΣΚ του ΜΟ, τα οποία αποτέλεσαν τα κύτταρα αναφοράς μας, λόγω του ότι είναι τα πιο καλά μελετημένα και ευρέως χρησιμοποιούμενα σε προκλινικές και κλινικές δοκιμές. Παράλληλα, δημιουργήθηκε σειρά ΜΣΚ από ΕΣΚ της καλά χαρακτηρισμένης σειράς

HUES9, ώστε να συγκριθεί η αποτελεσματικότητα της διαφοροποίησης των ΕΠΣΚ με αυτή των «πραγματικών» εμβρυονικών κυττάρων, αλλά και η ποιότητα των παραχθέντων ΜΣΚ των αντίστοιχων σειρών.

Ο πειραματικός σχεδιασμός της διατριβής περιλαμβάνει τις εξής ενότητες:

- Πολλαπλασιασμός των ΕΠΣΚ σε σύστημα καλλιέργειας χωρίς υποστηρικτικά κύτταρα. Παραγωγή μεγάλου αριθμού πολυδύναμων κυττάρων, ώστε να μπορούν να διατηρούνται αποθέματα σε μορφή κυτταρικής τράπεζας και να είναι διαθέσιμα ανά πάσα στιγμή για διαφοροποίηση σε ΜΣΚ.
- Καλλιέργειες διαφοροποίησης σε ΜΣΚ. Δοκιμές εφαρμογής πρωτοκόλλων διαφοροποίησης και επιλογή εκείνου με το υψηλότερο δυναμικό διαφοροποίησης και την πιο μικρή χρονική διάρκεια. Παράλληλα, εφαρμογή των πρωτοκόλλων στα εμβρυονικά κύτταρα.
- Μελέτη του πολλαπλασιαστικού δυναμικού των παραχθέντων ΜΣΚ (ΕΠΣΚ-ΜΣΚ), με συνεχείς ανακαλλιέργειες έως ότου σταματήσει ο πολλαπλασιασμός τους. Υπολογισμός του χρόνου διπλασιασμού τους, του συνολικού αριθμού ανακαλλιεργειών και του συνολικού αριθμού κυττάρων που παρήχθησαν. Σύγκριση με τα ΜΣΚ του ΜΟ.
- Έλεγχος των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ ανοσοφαινοτυπικά για την έκφραση των τυπικών αντιγόνων επιφανείας για τα ΜΣΚ.
- Έλεγχος έκφρασης παραγόντων πολυδυναμίας στα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ.
- Μελέτη της γενετικής σταθερότητας των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ με μοριακό καρυότυπο.
- Έλεγχος ικανότητας διαφοροποίησης σε οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα *in vitro*.
- Έλεγχος τυχόν δημιουργίας όγκων μετά από *in vivo* χορήγηση σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Σε όλες τις διαδικασίες απόψυξης, ανακαλλιέργειας και συλλογής κυττάρων, οι χειρισμοί γίνονται σε θάλαμο νηματικής ροής, σε στείρες συνθήκες και χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα πλαστικά (πιπέττες μιας χρήσης, ρύγχη, τρυβλία, φλάσκες). Οι συνθήκες του κλιβάνου επώασης των κυττάρων είναι 37°C, 5% CO₂, 90% υγρασία.

2.1. Απόψυξη και πολλαπλασιασμός ανθρώπινων επαγόμενων πολυδύναμων στελεχειαίων κυττάρων (ΕΠΣΚ)

Στην παρούσα μελέτη, ως πηγή παραγωγής ΜΣΚ από ΕΠΣΚ χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές ΕΠΣΚ (ΕΠΣΚ-1, ΕΠΣΚ-2) οι οποίες είχαν προηγουμένως δημιουργηθεί στο εργαστήριό μας από ΜΣΚ του ΜΟ φυσιολογικών δοτών και διατηρούνταν στο υγρό άζωτο. Η μέθοδος επαναπρογραμματισμού ήταν η λιποσωματική μεταφορά συνθετικών μορίων mRNA των μεταγραφικών παραγόντων πολυδυναμίας Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28. Οι σειρές αυτές εκφράζουν τους δείκτες πολυδυναμίας Oct3/4, Rex-1, Sox2, Nanog, ενώ *in vivo* δημιουργούν τερατώματα. Προκειμένου να παραχθούν επαρκείς αριθμοί κυττάρων, ώστε να μπορούμε να προχωρήσουμε σε διαφοροποίηση σε ΜΣΚ, αλλά και να ανανεώσουμε το απόθεμα, ήταν αναγκαίος ο πολλαπλασιασμός των ΕΠΣΚ στην καλλιέργεια. Παράλληλα, πολλαπλασιάστηκε στην καλλιέργεια και η ανθρώπινη σειρά ΕΣΚ, HUES-9p18. Η σειρά αυτή έχει απομονωθεί στο Harvard Stem Cell Institute, από την ομάδα του Prof. D. Melton και μια μικρή ποσότητα κυττάρων έχει παραχωρηθεί στο εργαστήριο, όπου διατηρείται.

Όλα τα πολυδύναμα κύτταρα πολλαπλασιάστηκαν χωρίς την παρουσία υποστηρικτικών κυττάρων (feeder cells), πάνω σε υπόστρωμα μίγματος εξωκυττάριας

ουσίας, το Matrigel, το οποίο περιέχει πρωτεΐνες όπως η λαμινίνη, το κολλαγόνο 4, το βιδογόνο και πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαράνης. Το υλικό καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε ήταν το mTeSR1, το οποίο είναι συμβατό με καλλιέργεια χωρίς υποστηρικτικά κύτταρα. Το mTeSR1 έχει καθορισμένη σύσταση και περιέχει ανασυνδυασμένους τους αυξητικούς παράγοντες TGF-β και FGF-2 που σχετίζονται με τη διατήρηση της πολυδυναμίας των ΕΠΣΚ. Πλέον παρασκευάζεται με συνθήκες GMP (Good Manufacturing Practices) και δεν περιέχει ορό. Τα ΕΠΣΚ, όπως και τα ΕΣΚ αποψύχθηκαν από το υγρό άζωτο και πολλαπλασιάστηκαν σε καλλιέργειες ως προσκολλημένες αποικίες. Ο πολλαπλασιασμός τους παρακολουθούνταν καθημερινά στο ανάστροφο μικροσκόπιο. Όταν έφταναν να μεγαλώσουν τόσο ώστε να αποκτήσουν πυκνό κέντρο και να αρχίσει η μεταξύ τους συγχώνευση (κάθε 4-6 μέρες), ανακαλλιεργούνταν με μεταφορά σε τριπλάσιο αριθμό φλασκών. Η αποκόλληση των κυττάρων γινόταν με τη δράση του ενζύμου Dispase. Πραγματοποιήθηκαν 8 ανακαλλιέργειες στην ΕΠΣΚ-1 και 10 ανακαλλιέργειες στην ΕΠΣΚ-2. Στη διάρκεια των ανακαλλιεργιών κάποιες φλάσκες καταψύχθηκαν, προς ανανέωση του κυτταρικού αποθέματος, 1 φλάσκα από κάθε σειρά χρησιμοποιήθηκε για διαφοροποίηση σε ΜΣΚ και 1 φλάσκα για έλεγχο της γενετικής σταθερότητας πριν από τη διαφοροποίηση.

2.1.1. Απόψυξη των ΕΠΣΚ

Υλικά-Αντιδραστήρια

Corning® Matrigel® hESC-Qualified Matrix, LDEV-free (Corning, #354277)

mTeSR™1 (STEMCELL, #85850)

DMEM/F-12 with 15mM HEPES (STEMCELL, #36254)

Φλάσκες καλλιέργειας 25cm² (Sarstedt, 83.3910.002)

Σωληνάρια πολυπροπυλενίου 15ml (Corning, #352095)

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, DPBS (Gibco, #14190-086)

Rho kinase (ROCK) inhibitor, Y-27632 (STEMCELL, #72302)

Πρωτόκολλο απόψυξης

Για την απόψυξη απαιτείται υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37°C.

- Τουλάχιστον μια ώρα πριν την απόψυξη, γίνεται επίστρωση μιας νέας φλάσκας 25cm² με υπόστρωμα Matrigel. Μια ποσότητα Matrigel, ανάλογα με τη συγκέντρωση πρωτεϊνών της συγκεκριμένης παρτίδας (η πληροφορία παρέχεται από τον προμηθευτή), διαλύεται σε 2.5ml υλικού DMEM/F-12.
- Με το πέρας της μιας ώρας, αφαιρούμε από το υγρό άζωτο μια αμπούλα που περιέχει τα ΕΠΣΚ. Στο υδατόλουτρο αποψύχουμε την αμπούλα και μόλις παραμείνει ένα πολύ μικρό κομμάτι πάγου τη μεταφέρουμε γρήγορα στο θάλαμο νηματικής ροής και την ψεκάζουμε με 70% αιθανόλη.
- Συλλέγουμε από την αμπούλα το υλικό που περιέχει τα κύτταρα και το μεταφέρουμε σε σωληνάριο.
- Ξεπλένουμε την αμπούλα 2 φορές με DMEM/F-12 για να συλλέξουμε εναπομείναντα κύτταρα.
- Προσθέτουμε στο σωληνάριο περίπου 10 ml φρέσκο DMEM/F-12 για να αραιωθεί η συγκέντρωση 10% του DMSO του κρυοπροστατευτικού, το οποίο είναι τοξικό για τα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 320 x g (1300 rpm) για 6 λεπτά.
- Από τη νέα επικαλυμμένη με Matrigel φλάσκα αφαιρείται το DMEM/F-12 και προστίθεται φρέσκο υλικό καλλιέργειας mTeSR1. Προστίθενται 10μM Rock

inhibitor, Y-27632, το οποίο βοηθά στην επιβίωση των ΕΣΚ και ΕΠΣΚ μετά την κατάψυξη.

- Μετά τη φυγοκέντρηση, αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα αναδιαλύεται σε φρέσκο mTeSR1.
- Τα κύτταρα μεταφέρονται ως συσσωματώματα 3-10 κυττάρων στη νέα φλάσκα και η φλάσκα ανακινείται για την ομοιόμορφη διασπορά τους.
- Επώαση στον κλίβανο και αλλαγή υλικού καλλιέργειας καθημερινά, χωρίς προσθήκη Y-27632.

2.1.2. Ανακαλλιέργεια των σειρών ΕΠΣΚ

Υλικά-Αντιδραστήρια

Corning® Matrigel® hESC-Qualified Matrix, LDEV-free (Corning, #354277)

mTeSR™1 (STEMCELL, #85850)

Dispase 1U/ml (STEMCELL, #07923)

DMEM/F-12 with 15mM HEPES (STEMCELL, #36254)

Φλάσκες καλλιέργειας 25cm² (Sarstedt, 83.3910.002)

Εύστρα κυττάρων (cell scraper) (1.8x25cm, Corning, #353086)

Σωληνάρια πολυπροπυλενίου 15ml (Corning, #352095)

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, DPBS (Gibco, #14190-086)

Πρωτόκολλο ανακαλλιέργειας

- Τουλάχιστον μια ώρα πριν την ανακαλλιέργεια, γίνεται επίστρωση φλασκών 25cm² με Matrigel, τριπλάσιον σε αριθμό από αυτές της τρέχουσας καλλιέργειας.
- Το υλικό καλλιέργειας των κυττάρων αφαιρείται και τα κύτταρα ξεπλένονται με DPBS.

- Προσθέτουμε στη φλάσκα 1 ml από το ένζυμο Dispase. Τοποθετούμε τη φλάσκα στον κλίβανο για 1-2 λεπτά για να δράσει το ένζυμο, έως ότου τα περιθώρια των αποικιών αρχίσουν να σηκώνονται. Παρακολουθούμε τις αποικίες στο ανάστροφο μικροσκόπιο.
- Αφαιρούμε το Dispase. Ξεπλένουμε 2 φορές με DPBS.
- Προσθέτουμε 3 ml DMEM/F-12. Χρησιμοποιώντας ξύστρα αποκολλούμε τις μερικώς αποκολλημένες αποικίες από το υπόστρωμα. Με πιπέττα μιας χρήσης ξεπλένουμε τα τοιχώματα της φλάσκας με το εναιώρημα, ώστε να σηκωθούν όλες οι αποικίες.
- Τοποθετούμε το εναιώρημα σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου και ξεπλένουμε άλλες 2-3 φορές μέχρι να μαζέψουμε όλες τις αποικίες. Φυγοκεντρούμε στις 320 x g (1300 rpm) για 6 λεπτά.
- Από τις νέες επικαλυμμένες με Matrigel φλάσκες αφαιρείται το DMEM/F-12 και προστίθεται φρέσκο υλικό καλλιέργειας mTeSR1.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και αναδιαλύουμε το ίζημα με mTeSR1 προσεχτικά να μην σπάσουμε τελείως τα συσσωματώματα.
- Μοιράζουμε τα κύτταρα στις καινούριες φλάσκες και τοποθετούμε στον κλίβανο. Καθημερινά ανανεώνουμε το υλικό καλλιέργειας.

2.2. Μελέτη της ικανότητας διαφοροποίησης των σειρών ΕΠΣΚ σε ΜΣΚ

Δοκιμάστηκαν δύο πρωτόκολλα διαφοροποίησης στα ΕΠΣΚ, προκειμένου να συγκριθεί η αποδοτικότητά τους, η ευκολία στη χρήση και ο χρόνος που απαιτείται για τη διαφοροποίηση. Παράλληλα, δοκιμάστηκε η διαφοροποίηση της σειράς HUES-9, η οποία αποτελεί μάρτυρα αναφοράς για την *in vitro* διαφοροποίηση σε ΜΣΚ.

2.2.1. Απευθείας διαφοροποίηση των ΕΠΣΚ σε ΜΣΚ

Το πρωτόκολλο αυτό επάγει τη διαφοροποίηση των αποικιών ΕΠΣΚ πάνω στο Matrigel, καλλιεργώντας τις σε τυπικό υλικό καλλιέργειας ΜΣΚ (με 10% υποκατάστατο ορού, Knockout Serum Replacement, KSR), προσθέτοντας τον αυξητικό παράγοντα FGF-2. Μια φλάσκα κυττάρων από τις 2 σειρές ΕΠΣΚ (ΕΠΣΚ-1, ΕΠΣΚ-2), καλλιεργήθηκαν σε υλικό διαφοροποίησης προς ΜΣΚ και τα διαφοροποιούμενα κύτταρα ανακαλλιεργήθηκαν πάνω σε ζελατίνη, μέχρι να προκύψει ομοιογενής πληθυσμός ινοβλαστοειδών κυττάρων.

Υλικά-Αντιδραστήρια

Corning® Matrigel® hESC-Qualified Matrix, LDEV-free (Corning, #354277)

Φλάσκες καλλιέργειας 25cm² (Sarstedt, 83.3910.002)

Σωληνάρια πολυπροπυλενίου 15ml (Corning, #352095)

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, DPBS (Gibco, #14190-086)

Knockout DMEM (Gibco, #10829-018)

Dulbecco's Modified Eagle Medium with Glutamax (Gibco, #21885-025)

Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF (FGF-2) (R&D Systems, #233-FB-025)

Fetal Bovine Serum, FBS (Gibco, #12662029)

MEM Non-essential aminoacids (NEAA) (Gibco, #11140-035)

Dispase 1U/ml (STEMCELL, #07923)

Gelatin 0.1% in water (STEMCELL, #07903)

Πρωτόκολλο

- Σε φλάσκα που περιέχει αδιαφοροποίητα κύτταρα αφαιρούμε το mTeSR1 και ξεπλένουμε με DPBS.

- Προσθέτουμε υλικό διαφοροποίησης Knockout DMEM + 10% KSR + 1% NEAA + 5ng/ml FGF-2. Αλλαγή υλικού κάθε 2 ημέρες.
- Μετά από 7 ημέρες, σε νέα φλάσκα 25cm² πραγματοποιούμε επίστρωση με ζελατίνη: Προσθέτουμε 3ml διάλυμα 0.1% ζελατίνης και αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Αφαιρούμε τη ζελατίνη και με ανοιχτό καπάκι αφήνουμε να στεγνώσει τελείως το διάλυμα στη φλάσκα.
- Αφαιρούμε το υλικό διαφοροποίησης από τα διαφοροποιούμενα ΠΣΚ και ξεπλένουμε με DPBS. Προσθέτουμε 1ml Dispase και αφήνουμε να δράσει για 1-2 λεπτά στον κλίβανο.
- Αφαιρούμε το Dispase και ξεπλένουμε 2 φορές τα κύτταρα με DPBS.
- Προσθέτουμε 3 ml υλικού διαφοροποίησης και συλλέγουμε τα κύτταρα σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου. Φυγοκεντρούμε στις 320 x g (1300 rpm).
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και αναδιαλύουμε τα κύτταρα σε υλικό διαφοροποίησης.
- Τοποθετούμε τα κύτταρα στη φλάσκα με τη ζελατίνη και επωάζουμε στον κλίβανο. Όταν η φλάσκα καλυφθεί με κύτταρα, πραγματοποιούμε ανακαλλιέργεια.

2.2.2. Διαφοροποίηση των ΕΠΣΚ σε ΜΣΚ μέσω εμβρυικών σωματιδίων (ΕΣ)

Το πρωτόκολλο αυτό επάγει τη δημιουργία εμβρυικών σωματιδίων (ΕΣ), τα οποία είναι σφαιρικές συναθροίσεις κυττάρων μέσα στις οποίες ξεκινά αυτόματα η διαφοροποίηση προς τα τρία βλαστικά δέρματα. Μια φλάσκα κυττάρων από δύο τις 2 σειρές ΕΠΣΚ (ΕΠΣΚ-1, ΕΠΣΚ-2) και τα ΕΣΚ αποκολλήθηκαν από την καλλιεργητική επιφάνεια με την δράση του ενζύμου Dispase και διαφοροποιήθηκαν σε ΕΣ με την τοποθέτησή τους, ως συσσωματώματα, σε τρυβλία χαμηλής

προσκολλητικότητας απουσία του παράγοντα FGF-2 και παρουσία 50ng/ml του παράγοντα BMP-4 ώστε να ενισχυθεί η δημιουργία μεσοδέρματος (Jackson et al., 2010). Στη συνέχεια, τα ΕΣ μεταφέρθηκαν σε φλάσκες επικαλυμμένες με ζελατίνη και υλικό διαφοροποίησης DMEM/F12 με 10% Knockout Serum Replacement (KSR) και 5ng/ml FGF-2 όπου παρέμειναν μέχρι να γεμίσει η επιφάνεια κατά 80-90% με κύτταρα και να γίνει ανακαλλιέργεια (p0) αυτών με την επίδραση 0,05% θρυψίνης, σε 2 νέες φλάσκες με ζελατίνη. Τα ΜΣΚ που προέκυψαν (ΕΠΣΚ-ΜΣΚ) καλλιεργήθηκαν, μετά τις 2 πρώτες ανακαλλιέργειες, σε πλαστικές φλάσκες καλλιέργειας, χωρίς επίστρωση με ζελατίνη, σε DMEM και 10% FBS ή ανθρώπινο Platelet Lysate (hPL).

2.2.2.1. Δημιουργία εμβρυικών σωματιδίων

Υλικά-Αντιδραστήρια

Σωληνάρια πολυπροπυλενίου 15ml (Corning, #352095)

Τρυβλία χαμηλής προσκολλητικότητας 6 θέσεων (Corning, #3471)

Σωληνάρια φυγοκέντρησης 50 ml (Corning, #430290)

Knockout Serum Replacement, KSR (Gibco, #10828-028)

2-Mercaptoethanol, 55mM (Gibco, #21985-023)

L-Glutamine, 200mM (Gibco, #25030-032)

Knockout DMEM (Gibco, #10829-018)

Bone Morphogenetic Protein 4, BMP-4 (Miltenyi Biotec, #130-098-786)

Πρωτόκολλο

- Αρχικά, προετοιμάζεται σε σωληνάριο των 50 ml υλικό διαφοροποίησης σε ΕΣ.

Συστατικά	Τελική συγκέντρωση	Όγκος
-----------	--------------------	-------

Knockout DMEM	1X	40 ml
Knockout Serum Replacement	20%	10 ml
NEAA	1%	0.5 ml
L-Glutamine	1mM	250 μl
2-Mercaptoethanol	0.1 mM	90.9 μl

- Σε τρυβλίο χαμηλής προσκόλλησης προστίθενται 3 ml υλικού διαφοροποίησης σε ΕΣ.
- Από φλάσκα με αδιαφοροποίητα πολυδύναμα κύτταρα αφαιρούμε το mTeSR1 και πραγματοποιούμε μάζεμα των κυττάρων, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.2, με τη διαφορά ότι το ίζημα επαναδιαλύεται σε υλικό διαφοροποίησης σε ΕΣ, χωρίς να σπάσουμε καθόλου τα συσσωματώματα.
- Τα συσσωματώματα μεταφέρονται με προσοχή στο τρυβλίο χαμηλής προσκόλλησης και τοποθετούνται στον κλίβανο.
- Την επόμενη μέρα αλλάζουμε το υλικό των ΕΣ αφαιρώντας το εναιώρημα των κυττάρων και φυγοκεντρώντας στις 320 x g (1300 rpm) για 2 λεπτά. Αφαιρούμε το υπερκείμενο, αναδιαλύουμε το ίζημα χωρίς να σπάσουμε τα ΕΣ και τοποθετούμε στο τρυβλίο τα ΕΣ με φρέσκο υλικό διαφοροποίησης στο οποίο προσθέτουμε επίσης και 50ng/ml BMP-4.
- Τοποθετούμε στον κλίβανο και ανανεώνουμε το υλικό κάθε 2 μέρες προσθέτοντας και BMP-4. Διατήρηση των ΕΣ για 7 μέρες.

2.2.2.2. Μεταφορά εμβρυικών σωματιδίων σε ζελατίνη

Υλικά-Αντιδραστήρια

Φλάσκες καλλιέργειας 25cm² (Sarstedt, 83.3910.002)

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, DPBS (Gibco, #14190-086)

Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF (FGF-2) (R&D Systems, #233-FB-025)

MEM Non-essential aminoacids (NEAA) (Gibco, #11140-035)

Gelatin 0.1% in water (STEMCELL, #07903)

Knockout Serum Replacement, KSR (Gibco, #10828-028)

L-Glutamine, 200mM (Gibco, #25030-032)

DMEM/F-12 with 15mM HEPES (STEMCELL, #36254)

Πρωτόκολλο

- Σε νέα φιάσκα 25cm² πραγματοποιούμε επίστρωση με ζελατίνη. Προσθέτουμε 3ml διάλυμα 0.1% ζελατίνης και αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Αφαιρούμε τη ζελατίνη και με ανοιχτό καπάκι αφήνουμε να στεγνώσει τελείως το διάλυμα στη φιάσκα.
- Τοποθετούμε στη φιάσκα 5 ml υλικού διαφοροποίησης σε ΜΣΚ, το οποίο περιέχει DMEM/F12 εμπλουτισμένο με 10% KSR, 5ng/ml FGF-2, 1mM L-Glutamine και 1% NEAA.
- Συλλέγουμε τα ΕΣ από το τρυβλίο χαμηλής προσκόλλησης αφαιρώντας το εναιώρημα των κυττάρων, ξεπλένοντας με DPBS το τρυβλίο και φυγοκεντρώντας στις 320 x g (1300 rpm) για 2 λεπτά. Αφαιρούμε το υπερκείμενο, αναδιαλύουμε το ίζημα σε υλικό διαφοροποίησης σε ΜΣΚ και με μια αποστειρωμένη σύριγγα με βελόνα 21G διαχωρίζουμε καλά τα ΕΣ.
- Τοποθετούμε στη νέα φιάσκα τα ΕΣ και επωάζουμε στον κλίβανο. Αλλαγή υλικού κάθε 3 ημέρες.

2.2.3. Ανακαλλιέργεια των ΜΣΚ που προέρχονται από τα ΕΠΣΚ (ΕΠΣΚ-ΜΣΚ)

Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ ανακαλλιεργούνται μόλις καλύψουν το 90% της επιφάνειας της φιάσκας και διαμοιράζονται σε 2 ή 3 νέες φιάσκες. Στις 2 πρώτες ανακαλλιέργειες (p0, p1) τα κύτταρα επανατοποθετήθηκαν σε φιάσκες επικαλυμμένες με ζελατίνη και

υλικό διαφοροποίησης σε ΜΣΚ. Από την τρίτη ανακαλλιέργεια (p2) άρχισαν να καλλιεργούνται σε μη επικαλυμμένες φλάσκες, με DMEM Glutamax + 10% FBS, υλικό τυπικό για την καλλιέργεια των ΜΣΚ. Επιπλέον, δοκιμάστηκε η καλλιέργειά τους και σε DMEM + 10% ανθρώπινο Platelet Lysate (hPL). Το hPL είναι θρεπτικό που αποτελείται από πλάσμα και αιμοπετάλια που έχουν υποστεί θραύση ελευθερώνοντας το περιεχόμενό τους και αποτελεί ένα GMP συμβατό υποκατάστατο του FBS.

Υλικά-Αντιδραστήρια

Trypsin-EDTA 0.25% (Gibco, #25200-056)

Dulbecco's Modified Eagle Medium with Glutamax (Gibco, #21885-025)

Fetal Bovine Serum, FBS (Gibco, #12662029)

MultiPL' Human Platelet Lysate (Macopharma)

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, DPBS (Gibco, #14190-086)

Φλάσκες καλλιέργειας 25cm² (Sarstedt, 83.3910.002)

Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF (FGF-2) (R&D Systems, #233-FB-025)

MEM Non-essential aminoacids (NEAA) (Gibco, #11140-035)

Gelatin 0.1% in water (STEMCELL, #07903)

Knockout Serum Replacement, KSR (Gibco, #10828-028)

L-Glutamine, 200mM (Gibco, #25030-032)

DMEM/F-12 with 15mM HEPES (STEMCELL, #36254)

Πρωτόκολλο

- Όταν καλυφθεί το 90% της επιφάνειας της φλάσκας με κύτταρα, αφαιρείται το υλικό και τα κύτταρα ξεπλένονται με DPBS.

- Προσθέτουμε στη φλάσκα διάλυμα Trypsin-EDTA αραιωμένο 1:5 (0.05%) σε DPBS. Αφήνουμε να δράσει το ένζυμο στον κλίβανο για 3 λεπτά.
- Απενεργοποιούμε το ένζυμο με υλικό διαφοροποίησης ή με DMEM + 10% FBS ή hPL, μετά τις πρώτες 2 ανακαλλιέργειες.
- Ξεπλένουμε τα τοιχώματα της φλάσκας χρησιμοποιώντας πιπέττα μιας χρήσης και μαζεύουμε τα κύτταρα σε σωληνάριο των 15 ml. Φυγοκεντρούμε στις 320 x g (1300 rpm) για 6 λεπτά.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο, αναδιαλύουμε το ίζημα και διαμοιράζουμε τα κύτταρα σε νέες φλάσκες με υλικό διαφοροποίησης ή μετά τις 2 πρώτες ανακαλλιέργειες, σε υλικό καλλιέργειας ΜΣΚ (DMEM + 10% FBS ή hPL).
- Επωάζουμε στον κλίβανο.

2.3. Ανοσοφαινοτυπικός προσδιορισμός των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ:

Τα ΜΣΚ τα οποία προέκυψαν από την διαφοροποίηση των ΕΠΣΚ, αλλά και των ΕΣΚ ελέγχθηκαν με κυτταρομετρία ροής κατά την τέταρτη ανακαλλιέργεια (p4), για την έκφραση των ειδικών για τα ΜΣΚ επιφανειακών δεικτών CD105, CD90, CD44, CD73 αλλά και για την απουσία αντιγόνων αιμοποιητικών κυττάρων CD34, CD45. Η κυτταρομετρία ροής είναι μια μέθοδος με την οποία μπορούμε να ταυτοποιήσουμε διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς με βάση ειδικά αντιγόνα τα οποία εκφράζονται σε συγκεκριμένα κύτταρα, χρησιμοποιώντας ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα και φθορίζουσες χρωστικές. Στον κυτταρομετρικό αναλυτή τα κύτταρα περνούν μέσα σε υγρό ροής από μια λεπτή δίοδο ένα-ένα. Εκεί, υπάρχει δέσμη φωτός η οποία πέφτει πάνω στα κύτταρα και τα χαρακτηριστικά τους αναλύονται με βάση: 1) Το σκεδασμό, ο οποίος σχετίζεται με τη διασπορά των φωτονίων σε όλες τις κατευθύνσεις του χώρου. Ο πρόσθιος σκεδασμός, που ανιχνεύεται από οπτικό ανιχνευτή που βρίσκεται ευθύγραμμο ως προς την πηγή φωτός δίνει πληροφορία για το μέγεθος του κυττάρου

ενώ ο πλάγιος σκεδασμός, που ανιχνεύεται από οπτικό ανιχνευτή που βρίσκεται κάθετα ως προς την πηγή φωτός πληροφορεί για τη σύσταση του κυτταροπλάσματος.

2) Το φθορισμό, ο οποίος προκύπτει μετά από πρόσδεση στα κύτταρα, αντισωμάτων ειδικών για κάποιο αντιγόνο, τα οποία είναι συζευγμένα με κάποια φθορίζουσα χρωστική. Στην παρούσα μελέτη οι χρωστικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η ισοθειοκυανική φλουοροσκεΐνη (FITC) και η φυκοερυθρίνη (PE).

Για την ταυτοποίηση, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω μονοκλωνικά αντισώματα CD90-FITC, CD44-PE, CD105-FITC, CD73-PE, CD34-PE, CD45-FITC.

Υλικά-Αντιδραστήρια

Trypsin-EDTA 0.25% (Gibco, #25200-056)

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, DPBS (Gibco, #14190-086)

Σωληνάρια πολυπροπυλενίου 15ml (Corning, #352095)

Dulbecco's Modified Eagle Medium with Glutamax (Gibco, #21885-025)

Fetal Bovine Serum, FBS (Gibco, #12662029)

Πρωτόκολλο

Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ αποκολλώνται από μια φλάσκα καλλιέργειας χρησιμοποιώντας το ένζυμο θρυψίνη, με διαδικασία που έχει περιγραφεί για την ανακαλλιέργεια των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ στην παράγραφο 2.2.3. Μετά τη φυγοκέντρηση των κυττάρων, τα κύτταρα αναδιαλύονται σε 5 ml DPBS και 200 μl μεταφέρονται σε σωληνάριο Eppendorf, μετρώνται σε αιματολογικό αναλυτή και υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός των κυττάρων.

1×10^6 κύτταρα από το εναιώρημα των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ μεταφέρονται σε νέο σωληνάριο των 15 ml σε συγκέντρωση 1×10^5 κύτταρα / ml.

Η κυτταρομετρία έγινε με το κυτταρόμετρο Cytomics FC500 της Beckman Coulter με λογισμικό CXP version 2.2. Χρησιμοποιήθηκαν 400 μL από συνολικό όγκο 1 mL των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ ώστε να μετρηθούν ο συνολικός αριθμός των κυττάρων και η βιωσιμότητα προσθέτοντας 10 μl 7-αμινοακτινομυκίνης D (7-AAD).

2.4. Διερεύνηση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ.

Τα ΜΣΚ που προέκυψαν από τις δύο σειρές ΕΠΣΚ (ΕΠΣΚ-1-ΜΣΚ, ΕΠΣΚ-2-ΜΣΚ), τη σειρά HUES-9 (ΕΣΚ-ΜΣΚ) και τις αρχικές σειρές ΜΣΚ (ΜΟ-1-ΜΣΚ, ΜΟ-2-ΜΣΚ) από τις οποίες προήλθαν τα ΕΠΣΚ τοποθετήθηκαν σε φλάσκες καλλιέργειας, προκειμένου να γίνει συγκριτική μελέτη του πολλαπλασιαστικού δυναμικού τους. Έναρξη συνεχών ανακαλλιιεργειών, μέχρι να επέλθει το κυτταρικό γήρας. Όταν τα κύτταρα κάλυπταν το 90% της καλλιιεργητικής επιφάνειας, ανακαλλιιεργούνταν με το ένζυμο θρυψίνη και αφού μετρούνταν με αιματολογικό αναλυτή, τοποθετούνταν κατά 1:3 σε νέα φλάσκα. Για την εκτίμηση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού κάθε κυτταρικής σειράς, καταγράφηκαν ο αριθμός των ανακαλλιιεργειών που υπέστησαν τα κύτταρα μέχρι να σταματήσουν να αυξάνονται και υπολογίστηκαν:

1. Ο αριθμός των διπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού (population doublings), σύμφωνα με τη φόρμουλα $PD = (\lg N - \lg N_0) / \lg 2$, όπου $N_0 =$ ο αρχικός αριθμός κυττάρων που τοποθετούνταν σε κάθε νέα φλάσκα, $N =$ ο τελικός αριθμός κυττάρων στη φλάσκα, πριν αυτά ανακαλλιιεργηθούν.
2. Ο χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού, σύμφωνα με τη φόρμουλα $PDT = T / PD$, όπου $T =$ ο χρόνος μετρημένος σε ημέρες.
3. Ο τελικός αριθμός των κυττάρων που παρήχθησαν συνολικά από όλες τις ανακαλλιιεργειες κάθε κυτταρικής σειράς, μέχρι να επέλθει το κυτταρικό γήρας

4. Η παράμετρος fold expansion, δηλαδή πόσες φορές τον αρχικό αριθμό των κυττάρων απέδωσαν οι καλλιέργειες κάθε σειράς.

2.5. Κλωνογενής ικανότητα των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ

Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ κατά την τέταρτη ανακαλλιέργειά τους τοποθετήθηκαν σε χαμηλή πυκνότητα σε πλάκες προσκόλλησης, οι οποίες περιείχαν DMEM και 10% FBS, ώστε να προσκολληθούν τα μονήρη κύτταρα και να πολλαπλασιαστούν δίνοντας μεμονωμένες αποικίες. Μετά από 2 εβδομάδες, οι αποικίες που προέκυψαν ή αλλιώς colony-forming units- fibroblasts (CFU-Fs), βάφτηκαν με χρώση Giemsa και παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο. Μετρήθηκαν οι αποικίες που αποτελούνταν από τουλάχιστον 50 κύτταρα και υπολογίστηκε η απόδοση της κλωνογενούς ικανότητάς τους (αριθμός αποικιών / αρχικό αριθμό κυττάρων). Αντίστοιχη καλλιέργεια έγινε και στα ΜΟ-ΜΣΚ τα οποία αποτέλεσαν μάρτυρα αναφοράς.

Υλικό-Αντιδραστήρια

Dulbecco's Modified Eagle Medium with Glutamax (Gibco, #21885-025)

Fetal Bovine Serum, FBS (Gibco, #12662029)

Πλάκες μικροτιλοποίησης των 6 θέσεων 9.5cm² (Corning, #3516)

Χρώση Giemsa (Merck, #1.09204.2500)

Πρωτόκολλο

- Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ αποκολλώνται από μια φλάσκα καλλιέργειας χρησιμοποιώντας το ένζυμο θρυψίνη, με διαδικασία που έχει περιγραφεί για την ανακαλλιέργεια των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ στην παράγραφο 2.2.3.

- Μετά τη φυγοκέντρηση των κυττάρων, τα κύτταρα αναδιαλύονται σε 5 ml DPBS και 200 μl μεταφέρονται σε σωληνάριο Eppendorf, μετρώνται σε αιματολογικό αναλυτή και υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός των κυττάρων.
- 800 κύτταρα από το εναιώρημα των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ μεταφέρονται σε δοχεία των 9.6 cm². Καλλιέργεια σε DMEM και 10% FBS στον κλίβανο για 14 ημέρες.
- Αφαιρούμε το καλλιεργητικό υλικό και η καλλιέργεια ξεπλένεται με DPBS δύο φορές. Το DPBS αφαιρείται τελείως και προστίθενται 2 ml καθαρή μεθανόλη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αφαιρούμε τη μεθανόλη και αφήνουμε τα κύτταρα να στεγνώσουν. Προσθέτουμε 2 ml διαλύματος Giemsa 1:20 σε απιονισμένο νερό και αφήνουμε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Απομακρύνουμε τη χρωστική και ξεπλένουμε με άφθονο απιονισμένο νερό.
- Αφήνουμε τα δοχεία να στεγνώσουν και παρατηρούμε στο μικροσκόπιο.

2.6. Διερεύνηση ικανότητας των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ για *in vitro* διαφοροποίηση

Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ στην τέταρτη ανακαλλιέργειά τους (p4) συλλέχθηκαν και επανατοποθετήθηκαν σε κατάλληλες συγκεντρώσεις σε καλλιέργειες που ευνοούν τη διαφοροποίηση των ΜΣΚ σε χόνδρο, οστεοκύτταρα και λιποκύτταρα. Η διαφοροποίηση σε χόνδρο, πραγματοποιήθηκε σε τρισδιάστατες καλλιέργειες και πολύ πυκνή συγκέντρωση κυττάρων, συνθήκες που ευνοούν τις κυτταρικές συναθροίσεις για τη δημιουργία πρώιμων χονδροκυττάρων που θα εκκρίνουν την εξωκυττάρια ουσία του χόνδρου. Η οστεογένεση και η λιπογένεση έγιναν σε καλλιέργειες μονοστιβάδας κυττάρων.

Υλικά-Αντιδραστήρια

MesenCult Osteogenic Stimulatory Kit (STEMCELL, #05465)

StemPro Adipogenesis Differentiation Kit (Gibco, #A1007001)

StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco, #A1007101)

Φλάσκες καλλιέργειας 25cm² (Sarstedt, 83.3910.002)

Πλάκες μικροτιτλοποίησης 24-θέσεων (Corning, #3524)

Anti-Sox9 Rabbit monoclonal antibody, clone EPR14335 (1/1000 dilution, Abcam).

Anti-COL2A1 Mouse monoclonal antibody, clone M2139 (1/20 dilution, Santa Cruz Biotechnology)

Χρώση Alcian Blue (Sigma-Aldrich)

Χρώση Hematoxylin and eosin (Sigma-Aldrich)

Χρώση Oil Red O (Sigma-Aldrich)

Χρώση Alizarin Red S (Sigma-Aldrich)

Πρωτόκολλα διαφοροποίησης

Διαφοροποίηση προς λιποκύτταρα: Από μια φλάσκα με ΕΠΣΚ-ΜΣΚ τα κύτταρα συλλέγονται με τη βοήθεια της θρυψίνης, όπως έχει περιγραφεί στην παράγραφο 2.2.3. Μετά τη φυγοκέντρηση των κυττάρων, τα κύτταρα αναδιαλύονται σε 5 ml DPBS και 200 μl μεταφέρονται σε σωληνάριο erpendorf, μετρώνται σε αιματολογικό αναλυτή και υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός των κυττάρων. Το υπόλοιπο εναιώρημα φυγοκεντρείται ξανά. Μετά τη φυγοκέντρηση, τα κύτταρα αναδιαλύονται σε έτοιμο υλικό διαφοροποίησης προς λιποκύτταρα (StemPro Adipogenesis Differentiation Kit) και τοποθετούνται σε συγκέντρωση $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ σε φλάσκες καλλιέργειας για 4 εβδομάδες με ανανέωση του υλικού κάθε 3-4 μέρες. Από αυτές κάποιες χρησιμοποιούνται για χρώση με Oil Red O, μετά από μονιμοποίηση με 4% παραφορμαλδεύδη, ενώ κάποιες για έλεγχο έκφρασης του *LPL* με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR).

Διαφοροποίηση προς οστεοκύτταρα: Από μια δεύτερη φλάσκα με ΕΠΣΚ-ΜΣΚ τα κύτταρα συλλέγονται με τη βοήθεια της θρυψίνης, όπως έχει περιγραφεί στην παράγραφο 2.2.3, με τη διαφορά ότι μετά τη φυγοκέντρηση, τα κύτταρα αναδιαλύονται σε 5 ml DPBS και 200 μl από το εναιώρημα μετρώνται σε αιματολογικό αναλυτή για να υπολογιστεί ο συνολικός αριθμός των κυττάρων. Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρηση των κυττάρων και το ίζημα αναδιαλύεται σε έτοιμο υλικό διαφοροποίησης προς οστεοκύτταρα (MesenCult Osteogenesis Stimulatory Kit). Η διαφοροποίηση προς οστεοκύτταρα γίνεται καλλιεργώντας 5×10^3 /cm² κύτταρα για 5 εβδομάδες, με ανανέωση του υλικού κάθε 3-4 μέρες. Κάποιες φλάσκες διαφοροποιημένων κυττάρων χρησιμοποιούνται για χρώση με Alizarin Red O, μετά από μονιμοποίηση με 4% παραφορμαλδεύδη, ενώ κάποιες για έλεγχο έκφρασης του *ALP* με RT-PCR.

Διαφοροποίηση προς χονδροκύτταρα: Για την χονδρογένεση, από μια φλάσκα με μεσεγχυματικά συλλέγονται τα κύτταρα με θρυψίνη, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.2.3. Μετά τη φυγοκέντρηση των κυττάρων, γίνεται αναδιάλυση του ιζήματος σε 5 ml DPBS και 200 μl από το εναιώρημα μετρώνται σε αιματολογικό αναλυτή για να υπολογιστεί ο συνολικός αριθμός των κυττάρων. Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρηση των κυττάρων και αυτά αναδιαλύονται σε έτοιμο υλικό χονδρογένεσης (StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit) σε πολύ υψηλή πυκνότητα 2×10^7 κύτταρα / ml. Στη συνέχεια, με μικροπιπέττα τα κύτταρα μεταφέρονται ως σταγόνες των 12,5 μl (2.5×10^5 κύτταρα/ σταγόνα), κάθε μία στο κέντρο ενός πηγαδιού πλάκας μικροτιτλοποίησης 24 θέσεων και καλλιεργούνται στο υλικό χονδρογένεσης για 3 εβδομάδες. Η αλλαγή του υλικού γίνεται ανά 3-4 μέρες. Από τις χονδρογενείς μάζες που προκύπτουν, κάποιες χρησιμοποιούνται για έλεγχο έκφρασης του *COL2A1* με

RT-PCR, ενώ κάποιες μονιμοποιούνται με 10% φορμαλδεΐδη, εγκλείονται σε παραφίνη και υφίστανται μικροτομές. Στη συνέχεια κάποιες τομές βάφονται με τις χρώσεις αιματοξυλίνη και εοσίνη (H&E) και Alcian Blue, ενώ σε κάποιες γίνεται ανοσοϊστοχημεία με anti-Sox9, anti-COL2A1. Η ανοσοϊστοχημεία γίνεται στην πλατφόρμα Leica Bond-Max automated strainer (Leica Biosystems) με χρήση του συστήματος ανίχνευσης Bond Polymer Refine Detection, με τη διαμινοβενζιδίνη σαν χρωμογόνο.

Λόγω της κλινικής σημασίας που έχει η χρήση των ΜΣΚ στην ανάπλαση του χόνδρου, επιδιώξαμε να χαρακτηρίσουμε περαιτέρω την ποιότητα των δημιουργηθέντων χόνδρων και να συγκρίνουμε την ικανότητα δημιουργίας ώριμου υαλώδους χόνδρου στα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ με την αντίστοιχη των ΜΣΚ του ΜΟ. Για το λόγο αυτό καλλιεργήθηκαν προς διαφοροποίηση και οι σειρές των αρχικών ΜΣΚ του ΜΟ, από τις οποίες προήλθαν τα ΕΠΣΚ. Επιπλέον, αντίστοιχη καλλιέργεια έγινε στα ΕΣΚ-ΜΣΚ, τα οποία προέρχονται από γνωστή και πλήρως χαρακτηρισμένη σειρά εμβρυονικών κυττάρων.

2.7. Έλεγχος γενετικής σταθερότητας αδιαφοροποίητων και διαφοροποιημένων κυττάρων με μικροσυτοιχίες συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού (array Comparative Genomic Hybridization, aCGH)

Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ, μετά από 5 ανακαλλιέργειες, όπως και τα ΕΠΣΚ πριν τη διαφοροποίηση, ελέγχθηκαν με το σύστημα του συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού (aCGH) με την τεχνολογία Agilent Human Genome CGH+SNP 4x180K DNA συτοιχία, ώστε να μελετηθεί η γενετική τους σταθερότητα και να διαπιστωθεί

αν η διαφοροποίηση προκάλεσε χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Η τεχνολογία αυτή δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης αλλαγών στον αριθμό των αντιγράφων περιοχών του DNA (copy number variations, CNVs) σε όλο το γονιδίωμα, σε πολύ υψηλή ανάλυση σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους (κυτταρογενετική). Η μέθοδος βασίζεται στον ανταγωνιστικό υβριδισμό του υπό έλεγχο γονιδιωματικού DNA και ενός DNA αναφοράς, πάνω σε συστοιχίες χιλιάδων ανιχνευτών. Τα δύο DNA σημαίνονται με διαφορετικά φθοριοχρώματα και ανάλογα με τον αριθμό των αντιγράφων σε διάφορες περιοχές του υπό έλεγχο DNA, το τελικό σήμα εμφανίζεται με διαφορετικό χρώμα. Η πλατφόρμα του 4x180K CGH+SNP (SurePrint G3 ISCA CGH+SNP) περιέχει 110.712 CGH, καθώς και 59.647 SNP ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές (60-mer oligonucleotide probes), με διάμεση απόσταση 25.3 Kb.

2.7.1. Απομόνωση γενωμικού DNA

Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ, όπως και τα ΕΠΣΚ συλλέχθηκαν από φλάσκες καλλιέργειας και πραγματοποιήθηκε απομόνωση του γενωμικού τους DNA. Η διαδικασία έγινε με το QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen), όπου αρχικά πραγματοποιείται λύση των κυττάρων με τη βοήθεια πρωτεάσης και κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη. Στη συνέχεια το δείγμα τοποθετείται σε στήλη και το DNA προσδένεται σε πυριτική μεμβράνη, όπου εκπλένεται από άλλες προσμίξεις με κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα. Στη συνέχεια το DNA ανακτάται από τη στήλη σε κατάλληλο διάλυμα.

Υλικά-Αντιδραστήρια

QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, #51104) το οποίο περιέχει:

- Qiagen Protease
- Buffer AL

- QIAamp mini spin columns
- Buffer AW1
- Buffer AW2
- Buffer AE
- Σωληνάρια συλλογής 2 ml

Σωληνάρια Eppendorf 1.5 ml

96-100% αιθανόλη

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, DPBS (Gibco, #14190-086)

Πρωτόκολλο

- Προετοιμάζουμε υδατόλουτρο στους 56°C.
- Τα κύτταρα συλλέγονται ενζυμικά από φλάσκα καλλιέργειας με τις διαδικασίες που περιγράφηκαν για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων (παράγραφοι 2.2.3 για τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ και 2.1.2 για τα ΕΠΣΚ), με τη διαφορά ότι μετά τη φυγοκέντρηση το ίζημα αναδιαλύεται σε 200 μl DPBS.
- Προσθέτουμε 20 μl Protease σε ένα σωληνάριο του 1.5 ml. Στη συνέχεια προσθέτουμε το εναιώρημα κυττάρων και 200 μl Buffer AL. Πραγματοποιούμε ανάδευση με vortex. Επωάζουμε για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 56°C.
- Προσθέτουμε 200 μl αιθανόλη. Πραγματοποιούμε ανάδευση με vortex. Πραγματοποιούμε ένα γρήγορο spin για να συλλεχθούν τυχόν σταγονίδια στον πυθμένα του σωληναρίου.
- Μεταφέρουμε το δείγμα σε μια στήλη QIAamp mini spin column. Φυγοκεντρούμε στις 6000 x g για 1 λεπτό. Απορρίπτουμε το σωληνάριο συλλογής και τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καινούριο.

- Προσθέτουμε 500 μl Buffer AW1 και φυγοκεντρούμε στις 6000 x g για 1 λεπτό. Απορρίπτουμε το σωληνάριο συλλογής και τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καινούριο.
- Προσθέτουμε 500 μl Buffer AW2 και φυγοκεντρούμε στις 20000 x g για 3 λεπτά. Απορρίπτουμε το σωληνάριο συλλογής και τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καινούριο. Επαναλαμβάνουμε τη φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.
- Τοποθετούμε τη στήλη σε ένα σωληνάριο του 1.5 ml και προσθέτουμε Buffer AE. Επιάζουμε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούμε στις 6000 x g για 1 λεπτό, ώστε να γίνει έκλυση του DNA.

2.7.2. Έλεγχος ποσότητας και καθαρότητας του DNA

Μετά την απομόνωση του DNA έγινε προσδιορισμός της ποσότητας και της καθαρότητας του με το φασματοφωτόμετρο NanoDrop 2000. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίστηκε μέσω μέτρησης της απορρόφησης του DNA στα 260 nm. Επίσης προσδιορίστηκε η καθαρότητα, μέσω του λόγου της απορρόφησης στα 260 nm προς την απορρόφηση στα 280 nm, όπου απορροφούν οι πρωτεΐνες. Όταν η τιμή είναι 1.8-2 τότε το DNA θεωρείται καθαρό. Επιπλέον, προσδιορίστηκε η καθαρότητα από οργανικούς διαλύτες μέσω του λόγου της απορρόφησης στα 260 nm προς τα 230nm, με φυσιολογικές τιμές τις 1.8-2.2.

2.7.3. Μικροσυστοιχίες συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού (array Comparative Genomic Hybridization, aCGH)

Υλικά-Αντιδραστήρια

DNA αναφοράς (Promega)

Περιοριστικά ένζυμα AluI και RsaI (Promega)

Σύστημα σήμανσης DNA, Agilent Genomic DNA Labeling Kit (Agilent Technologies)

Περιστρεφόμενος κλίβανος (Agilent Technologies)

Σαρωτής μικροσυστοιχιών, Agilent Microarray Scanner (Agilent Technologies)

Λογισμικό ανάλυσης Agilent Cyto Genomics v. 2.7 (Agilent Technologies)

Πρωτόκολλο

Το γενωμικό DNA των δύο σειρών ΕΠΣΚ-ΜΣΚ, αλλά και των ΕΠΣΚ από τα οποία προήλθαν, παράλληλα με DNA αναφοράς επωάζεται με τα περιοριστικά ένζυμα AluI και RsaI και ακολουθεί σήμανση με το Agilent Genomic DNA Labeling Kit, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το DNA αναφοράς και το υπό μελέτη DNA σημαίνονται με τα φθοριοχρώματα Cy3, Cy5, αντίστοιχα και στη συνέχεια γίνεται υβριδοποίησή τους με τους ανιχνευτές για 40 ώρες σε περιστρεφόμενο κλίβανο με 65°C στα 20 rpm. Ακολουθεί έκπλυση των συστοιχιών και σάρωση αυτών με το σαρωτή μικροσυστοιχιών. Πραγματοποιείται συλλογή των δεδομένων μέσω του προγράμματος Agilent Feature Extraction Image Analysis Software (v. 10.7.3.1) και τέλος, το λογισμικό Agilent Cyto Genomics (v. 2.7) χρησιμοποιείται για την ανάλυση.

2.8. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης- Αντίστροφης Μεταγραφής (RT-PCR) για τον έλεγχο έκφρασης δεικτών πολυδυναμίας και δεικτών οστεογένεσης, λιπογένεσης και χονδρογένεσης

Μετά από 4 ανακαλλιέργειες, τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ ελέγχθηκαν για το αν σε αυτά έχει μειωθεί η έκφραση των δεικτών πολυδυναμίας Oct3/4, Nanog.

Ο έλεγχος έκφρασης των δεικτών έγινε με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης-Αντίστροφης Μεταγραφής, Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Αρχικά, απομονώθηκε RNA από τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ αλλά και από τα ΕΠΣΚ και αρχικά ΜΣΚ του ΜΟ. Στη συνέχεια, με το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση, συντίθεται από το ολικό RNA συμπληρωματικό DNA (cDNA). Το cDNA έπειτα ενισχύεται σε συμβατική PCR, με εκκινητές (primers) ειδικούς για τα μετάγραφα των Oct3/4, Nanog. Ως αποτέλεσμα, αν τα γονίδια των Oct3/4, Nanog εκφράζονται στα κύτταρα, παίρνουμε προϊόντα στην PCR, του μεγέθους των μεταγράφων αυτών. Τα προϊόντα της PCR φορτώνονται σε γέλη αγαρόζης, παράλληλα με μάρτυρα αναφοράς (DNA ladder). Επιπλέον, έγινε PCR για το cDNA της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης *GAPDH*, το οποίο αποτελεί γονίδιο αναφοράς (housekeeping gene).

Η ίδια μέθοδος εφαρμόστηκε και για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων του κολλαγόνου ΙΙ (*COL2A1*) της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (*LPL*) και της αλκαλικής φωσφατάσης (*ALP*), στα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ, μετά από διαφοροποίησή τους σε χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα και οστεοκύτταρα, αντίστοιχα.

2.8.1. Απομόνωση ολικού RNA

Τα κύτταρα επωάζονται με διάλυμα λύσης που φέρει ισχυρούς αποδιατακτικούς παράγοντες και μερκαπτοαιθανόλη, η οποία απενεργοποιεί τις RNases που τυχόν βρίσκονται στο δείγμα. Ταυτόχρονα γίνεται ομογενοποίηση του δείγματος. Ακολουθεί τοποθέτηση του δείγματος σε μεμβράνη στήλης, όπου προσδένεται το DNA και απορρίπτεται. Στη συνέχεια, το RNA κατακρημνίζεται με αιθανόλη και

προσδένεται σε δεύτερη στήλη και εκπλένεται από προσμίξεις με διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα. Τελικά, το καθαρό RNA εκλύεται από τη στήλη σε RNase-free H₂O.

Υλικά-Αντιδραστήρια

RNase-free σύριγγα με βελόνα διαμέτρου 0.9 mm

70% αιθανόλη

14.3 M β-μερκαπτοαιθανόλη (β-ME)

RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, #74134), το οποίο περιέχει:

- gDNA Eliminator mini spin column
- RNeasy mini spin column
- Σωληνάρια των 1.5 ml, 2 ml
- Buffer RLT Plus
- Buffer RW1
- Buffer RPE
- RNase-free H₂O

Πρωτόκολλο

- Τα κύτταρα συλλέγονται από μια φλάσκα καλλιέργειας ενζυμικά, όπως προβλέπεται στο πρωτόκολλο ανακαλλιέργειας των ΕΠΣΚ και των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ, με τη διαφορά ότι μετά τη φυγοκέντρηση αφαιρείται όλο το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 350 μl διαλύματος RLT που περιέχει 3.5 μl β-ME.
- Με σύριγγα και βελόνα 0.9 mm, αναδεύουμε 5-6 φορές το εναιώρημα, ώστε να ομογενοποιηθεί. Μεταφέρουμε το διάλυμα σε στήλη gDNA Eliminator mini spin column και φυγοκεντρούμε στις 8000 x g για 30 sec.

- Απορρίπτουμε τη στήλη, καθώς εκεί έχει προσδεθεί το DNA. Στο δείγμα, το οποίο βρίσκεται στο σωληνάριο συλλογής, προσθέτουμε 350 μl αιθανόλης. Ανακινούμε καλά. Μεταφέρουμε 700 μl από το δείγμα σε μία RNeasy spin column και φυγοκεντρούμε στις 8000 x g για 15 sec. Απορρίπτουμε το περιεχόμενο του σωληναρίου συλλογής και κρατάμε τη στήλη.
- Προσθέτουμε 700 μl Buffer RW1 στη στήλη και φυγοκεντρούμε στις 8000 x g για 15 sec. Απορρίπτουμε το περιεχόμενο του σωληναρίου συλλογής και κρατάμε τη στήλη.
- Προσθέτουμε 500 μl Buffer RPE στη στήλη και φυγοκεντρούμε στις 8000 x g για 15 sec. Απορρίπτουμε το περιεχόμενο του σωληναρίου συλλογής και κρατάμε τη στήλη.
- Προσθέτουμε 500 μl Buffer RPE στη στήλη και φυγοκεντρούμε στις 8000 x g για 2 λεπτά. Απορρίπτουμε το σωληνάριο συλλογής και τοποθετούμε τη στήλη σε νέο. Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 8000 x g.
- Τοποθετούμε τη στήλη σε σωληνάριο του 1.5 ml και προσθέτουμε 35 μl RNase-free H₂O. Φυγοκεντρούμε στις 8000 x g για 1 λεπτό ώστε να γίνει έκλυση του RNA.
- Με χρήση του φασματοφωτομέτρου Genova Nano της Jenway, μετράται η συγκέντρωση του RNA που προκύπτει, σε σταγόνα περίπου 2 μl του δείγματος.

2.8.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης- Αντίστροφης Μεταγραφής (RT-PCR)

Υλικά-Αντιδραστήρια

DNase I, Amplification Grade Kit (Invitrogen, #18068-015), το οποίο περιέχει:

- DNase I, Amp Grade
- 10X DNase I Reaction Buffer

- 25mM EDTA (pH 8.0)

DEPC-treated H₂O (Invitrogen)

Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer (Invitrogen, #18418-012)

dNTPs mix (Promega)

RNaseOUT (Invitrogen, #10777-019)

SuperScript II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, #18064-022), το οποίο περιέχει:

- 5X First-Strand Buffer
- DDT (100 mM)
- SuperScript II RT

GoTaq DNA Polymerase Kit, με 5X PCR Buffer and MgCl₂ 25mM (Promega)

Primers (Eurofins MWG Operon)

RNase-free σωληνάρια 0.5 ml

Πρωτόκολλο

Όλες οι παρακάτω διαδικασίες πραγματοποιούνται σε θάλαμο νηματικής ροής, στείρες συνθήκες και τα όλα τα αντιδραστήρια και τα σωληνάρια διατηρούνται σε πάγο.

Πριν την αντίστροφη μεταγραφή, πραγματοποιείται καθαρισμός του RNA από γενωμικό DNA.

- Σε RNase-free σωληνάριο 0.5 ml μεταφέρονται:

Δείγμα RNA	1 μg
10X DNase I Reaction Buffer	1 μl
DNase I, Amp Grade, 1U/ μl	1 μl
DEPC-treated H ₂ O	μέχρι 10 μl

- Επιάζουμε το μίγμα σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.

- Απενεργοποιούμε την DNase με 1 μl EDTA 25mM και επώαση στους 65°C για 10 λεπτά.
- Στη συνέχεια όλο το παραπάνω μίγμα RNA, καθαρό από DNA χρησιμοποιείται για αντίστροφη μεταγραφή. Προσθέτουμε σε αυτό 1 μl Oligo (dT) primer και 1 μl dNTPs.
- Επωάζουμε στους 65°C για 5 λεπτά και μεταφέρουμε αμέσως σε πάγο. Πραγματοποιούμε ένα γρήγορο spin.
- Προσθέτουμε στο μίγμα τα παρακάτω:

5X First-Strand Buffer	4 μl
DDT (0.1 M)	2 μl
RNaseOUT (40U / μl)	1 μl

- Επωάζουμε το μίγμα στους 42°C για 2 λεπτά.
- Προσθέτουμε 1 μl Superscript II RT στο μίγμα, αναδεύουμε και επωάζουμε στους 42°C για 50 λεπτά.
- Απενεργοποιούμε το ένζυμο με επώαση στους 70°C για 15 λεπτά.

Το cDNA που προκύπτει από την παραπάνω διαδικασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ενίσχυση των μεταγράφων που μας ενδιαφέρουν με PCR.

Για την PCR χρησιμοποιούνται οι εκκινητές του Πίνακα 2.1.

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητών (5'-3')	Μέγεθος προϊόντος
<i>GAPDH</i>	Forward: CAAGGCTGAGAACGGGAAGC Reverse: AGGGGGCAGAGATGATGACC	472 bp
<i>OCT3/4</i>	Forward: CTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAA Reverse: CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA	169 bp

<i>NANOG</i>	Forward: CAAAGGCAAACAACCCACTT Reverse: TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT	398 bp
<i>LPL</i>	Forward: GAGATTTCTCTGTATGGCACC Reverse: CTGCAAATGAGACACTTTCTC	276 bp
<i>ALP</i>	Forward: TCAGAAGCTCAACACCAACG Reverse: GTCAGGGACCTGGGCATT	199 bp
<i>COL2A1</i>	Forward: GGAAACTTTGCTGCCCAGATG Reverse: TCACCAGGTTACCCAGGATTGC	167 bp

Πίνακας 2.1: Εκκινητές ειδικοί για κάθε ένα από τα μετάγραφα που ελέγχθηκαν.

Σε αποστειρωμένα, RNA-, DNA-free σωληνάρια των 0.5 ml προστίθενται τα αντιδραστήρια που φαίνονται στους παρακάτω πίνακες:

	Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)/ αντίδραση
<i>GAPDH, NANOG, OCT3/4</i>	cDNA	1
	5X PCR Buffer	10
	25mM MgCL ₂	4
	Forward Primer (10 μM)	2
	Reverse Primer (10 μM)	2
	dNTPs mix (10 mM το καθένα)	1
	Taq DNA Polymerase	0.25
	H ₂ O	29.75

Πίνακας 2.2: Αντίδραση PCR για τα μετάγραφα NANOG, OCT3/4, GAPDH.

	Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)/ αντίδραση
--	---------------	-----------------------

<i>LPL, ALP, COL2A1</i>	cDNA	2
	5X PCR Buffer	10
	25mM MgCL ₂	3
	Forward Primer (10 μM)	1
	Reverse Primer (10 μM)	1
	dNTPs mix (10 mM το καθένα)	1
	Taq DNA Polymerase	0.25
	H ₂ O	31.75

Πίνακας 2.3: Αντίδραση PCR για τα μεταγράφα LPL, ALP, COL2A1

Στη συνέχεια, η αντίδραση τοποθετείται σε θερμικό κυκλοποιητή προγραμματισμένο με τα βήματα που φαίνονται στον Πίνακα 2.4.

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος
1	94°C (αρχική αποδιάταξη)	2 min
2	94°C (αποδιάταξη)	30 sec
3	55°C (<i>GAPDH-NANOG-OCT3/4-ALP</i>) 52°C (<i>LPL</i>) 58°C (<i>COL2A1</i>)	(υβριδίωση) 30 sec
4	72°C (επιμήκυνση)	1 min
5	72°C (τελική επιμήκυνση)	10 min
6	10°C (συντήρηση)	∞

Πίνακας 2.4: Παράμετροι του θερμικού κυκλοποιητή για την PCR.

Τα βήματα 2-4 επαναλαμβάνονται σε 35 συνολικά κύκλους.

2.8.3. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων RT-PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή μη προϊόντων PCR που δείχνει αν τα υπό μελέτη γονίδια εκφράζονται στα αντίστοιχα κύτταρα, είναι απαραίτητη η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης. Παρασκευάζεται 2% αγαρόζη, η οποία σε αυτή τη συγκέντρωση δημιουργεί γέλη με πόρους σε μέγεθος κατάλληλο για να τρέξουν τμήματα DNA μεγέθους περίπου 100-2000 bp. Στην αγαρόζη προστίθεται διάλυμα φθορίζουσας χρωστικής η οποία βάφει τα νουκλεϊκά οξέα, ώστε να είναι ορατά στην υπεριώδη ακτινοβολία. Στη συνέχεια τα προϊόντα της PCR φορτώνονται στη γέλη, μαζί με μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών DNA, ώστε να εκτιμήσουμε τα μεγέθη των τμημάτων που έχουν τα προϊόντα μας. Μετά την ηλεκτροφόρηση παρατηρούμε τα προϊόντα στην υπεριώδη ακτινοβολία.

Υλικά-Αντιδραστήρια

TBE Buffer 10X, Molecular Biology Grade (Promega, #V4251)

Agarose, LE, Analytical Grade (Promega, #V3125)

Blue/Orange Loading Dye, 6X (Promega, #G1881)

GelRed Dropper Bottle (Olerup, #103.302.05)

Μάρτυρας φX174 DNA-HaeIII Digest (NEB, #B7025) ή TrackIt™ 50 bp DNA Ladder (Invitrogen, #10488043)

Πρωτόκολλο

- Σε 200 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1X TBE διαλύονται με βρασμό 4 gr αγαρόζης. Στο διάλυμα προστίθενται 7 σταγόνες GelRed Dropper Bottle, γίνεται ανάδευση και η γέλη αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου να πήξει.
- Τοποθετούμε το πήκτωμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, μέσα σε διάλυμα 1X TBE.

- Σε σωληνάρια 0.5 ml αναμιγνύουμε 15 μl από το προϊόν της PCR με 5 μl από το Blue/Orange Loading Dye. Φορτώνουμε τα 20 μl του μίγματος κάθε προϊόντος σε ένα πηγαδάκι και στο τέλος φορτώνουμε το μάρτυρα.
- Πραγματοποιούμε ηλεκτροφόρηση με 90 V για 30 λεπτά.
- Παρατηρούμε το πήκτωμα στην υπεριώδη ακτινοβολία. Αξιολογούμε τα μεγέθη των πολλαπλασιασμένων μεταγράφων, σε σχέση με το μάρτυρα γνωστών μεγεθών DNA.

2.9. *In vivo* έλεγχος για δημιουργία όγκων από τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ

Μετά από 4 ανακαλλιέργειες, τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ εξετάστηκαν ως προς την ασφάλεια της χορήγησής τους *in vivo*. Στόχος ήταν να επιβεβαιωθεί ότι δεν προκαλούν τη δημιουργία όγκων μετά τη χορήγηση. Για το λόγο αυτό 1×10^6 κύτταρα εγχύθηκαν υποδορίως σε 3 ανοσοανεπαρκή ποντίκια NOD/SCID ηλικίας 6 με 8 εβδομάδων. Τα *in vivo* πειράματα έλαβαν χώρα στη Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), ακολουθώντας την Ευρωπαϊκή και Εθνική νομοθεσία, καθώς και τις κατευθυντήριες γραμμές διεθνών οργανισμών όπως η Ευρωπαϊκή Ομοσπονδία των Εταιρειών που ασχολούνται με τα Ζώα Εργαστηρίου (Federation of European Laboratory Animal Science Associations - FELASA) και η Ένωση για την Αξιολόγηση και τη Διαπίστευση της Φροντίδας των Εργαστηριακών Ζώων (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, AAALAC).

Υλικά-Αντιδραστήρια

Corning® Matrigel® hESC-Qualified Matrix, LDEV-free (Corning, #354277)

DMEM/F-12 with 15mM HEPES (STEMCELL, #36254)

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, DPBS (Gibco, #14190-086)

Σωληνάρια πολυπροπυλενίου 15ml (Corning, #352095)

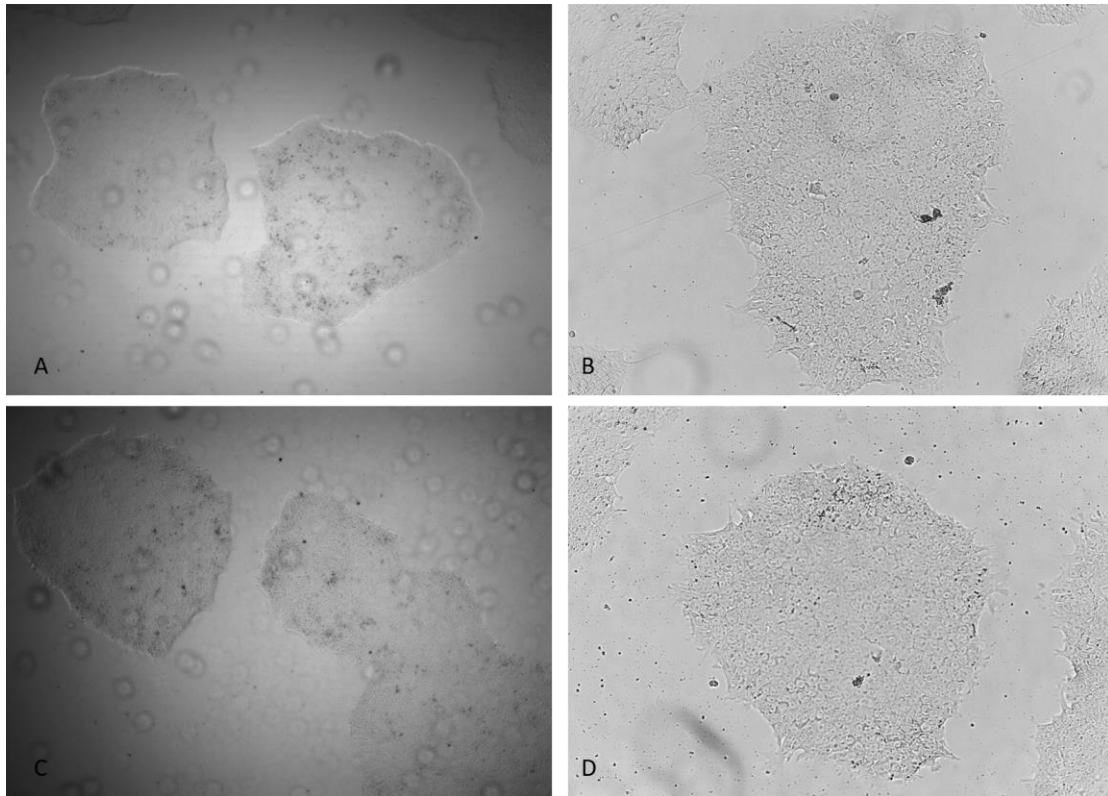
Πρωτόκολλο

- Αποψύχουμε ένα σωληνάριο με Matrigel στους 4°C και το διατηρούμε σε παγοκύστη.
- Από μια φλάσκα με ΕΠΣΚ-ΜΣΚ τα κύτταρα αποκολλώνται και συλλέγονται με το ένζυμο θρυψίνη με διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.3 με τη διαφορά ότι μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα αναδιαλύεται σε 5 ml DPBS.
- 200 μl από το εναιώρημα μετρώνται σε αιματολογικό αναλυτή. Από το εναιώρημα παίρνουμε ποσότητα που αντιστοιχεί σε 1×10^6 κύτταρα και την ξεχωρίζουμε σε σωληνάριο των 15 ml.
- Πραγματοποιούμε εκ νέου φυγοκέντρηση. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και αναδιαλύουμε το ίζημα σε 100 μl DMEM/F-12.
- Αμέσως πριν την έγχυση, το κυτταρικό εναιώρημα αναμιγνύεται με 100 μl Matrigel (αναλογία 1:1). Με σύριγγα και βελόνα των 29G το εναιώρημα εγχύεται υποδορίως σε ποντίκι NOD/SCID.
- Η πορεία των ποντικών παρακαλουθείται για την εμφάνιση όγκων.
- 10 εβδομάδες μετά, τα ποντίκια θυσιάζονται και τα σημεία της έγχυσης ελέγχονται ιστολογικά για την παρουσία όγκων, μετά από μονιμοποίηση με 4% παραφορμαλδεΐδη, εμπότισμα σε παραφίνες, μικροτομές και χρώση αιματοξυλίνης-εοσίνης.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Πολλαπλασιασμός των πολυδύναμων κυττάρων στην καλλιέργεια

Οι κυτταρικές σειρές των ΕΠΣΚ (ΕΠΣΚ-1, ΕΠΣΚ-2) πολλαπλασιάστηκαν στο υπόστρωμα Matrigel μέχρι να παραχθεί επαρκής ποσότητα κυττάρων για αποθήκευση και διαφοροποίηση. Παράλληλα καλλιεργήθηκε παρομοίως η σειρά ΕΣΚ HUES-9. Τα ΕΠΣΚ πολλαπλασιάστηκαν με ρυθμούς αντίστοιχους με τα HUES-9. Τα κύτταρα διατήρησαν την τυπική οργάνωση σε αποικίες στενά συνδεδεμένων προσκολλημένων σφαιρικών κυττάρων (Εικόνα 3.1), οι οποίες αυξάνονταν κυκλικά σε μέγεθος με αποτέλεσμα να χρειάζονται ανακαλλιέργεια κάθε 3-6 ημέρες. Συνολικά πέρασαν 10 και 8 ανακαλλιέργειες στα ΕΠΣΚ-1 και ΕΠΣΚ-2, αντίστοιχα, μέχρι να δοκιμαστεί η διαφοροποίησή τους, έτσι, ο συνολικός αριθμός ανακαλλιεργειών που είχαν υποστεί τα κύτταρα από τον επαναπρογραμματισμό μέχρι τη διαφοροποίηση ήταν 22 (ΕΠΣΚ-1) και 30 (ΕΠΣΚ-2), αντίστοιχα.



Εικόνα 3.1: Μορφολογικά χαρακτηριστικά των ΕΠΣΚ πριν τη διαφοροποίηση. Τα ΕΠΣΚ διατήρησαν μετά από 10 ανακαλλιέργειες μορφολογία όμοια με αυτή των ΕΣΚ. Α, Β) Αποικίες ΕΠΣΚ στην 10^η ανακαλλιέργεια σε μεγέθυνση ανάστροφης μικροσκόπησης 4x, 10x, αντίστοιχα. C, D) Αποικίες ΕΣΚ της σειράς HUES-9 σε μεγέθυνση ανάστροφης μικροσκόπησης 4x, 10x, αντίστοιχα.

3.2. Διαφοροποίηση των πολυδύναμων κυττάρων σε ΜΣΚ

Αρχικά, επιδιώχθηκε η δοκιμασία δύο διαφορετικών πρωτοκόλλων διαφοροποίησης των πολυδύναμων κυττάρων σε ΜΣΚ.

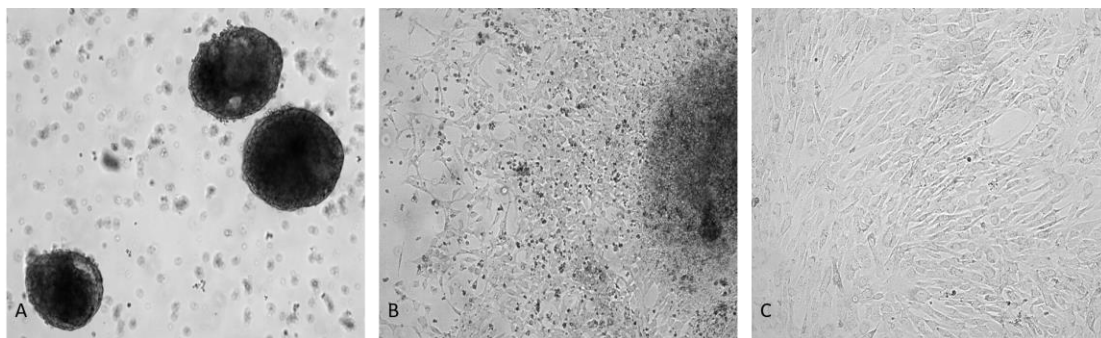
Το πρωτόκολλο των εμβρυικών σωματιδίων (ΕΣ) ήταν αυτό που υιοθετήθηκε για τη δημιουργία και το χαρακτηρισμό των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ, καθώς η απευθείας διαφοροποίηση σαν μονοστιβάδα πάνω στο Matrigel, ήταν μια αρκετά πιο χρονοβόρα και με χαμηλή απόδοση διαδικασία τόσο για τα ΕΣΚ, όσο και για τα ΕΠΣΚ, αφού προκαλούσε μεγάλη απόπτωση και αργή αύξηση των διαφοροποιούμενων ινοβλαστοειδών κυττάρων. Κατά την εφαρμογή αυτού του πρωτοκόλλου τα κύτταρα

δεν πολλαπλασιάζονταν αρκετά ώστε να μπορούν να ανακαλλιεργηθούν και χρειάστηκαν 35 ημέρες μέχρι να προκύψει ένας μικρός πληθυσμός ινοβλαστοειδών κυττάρων, αναλογικά με τα ΠΣΚ που χρησιμοποιήθηκαν.

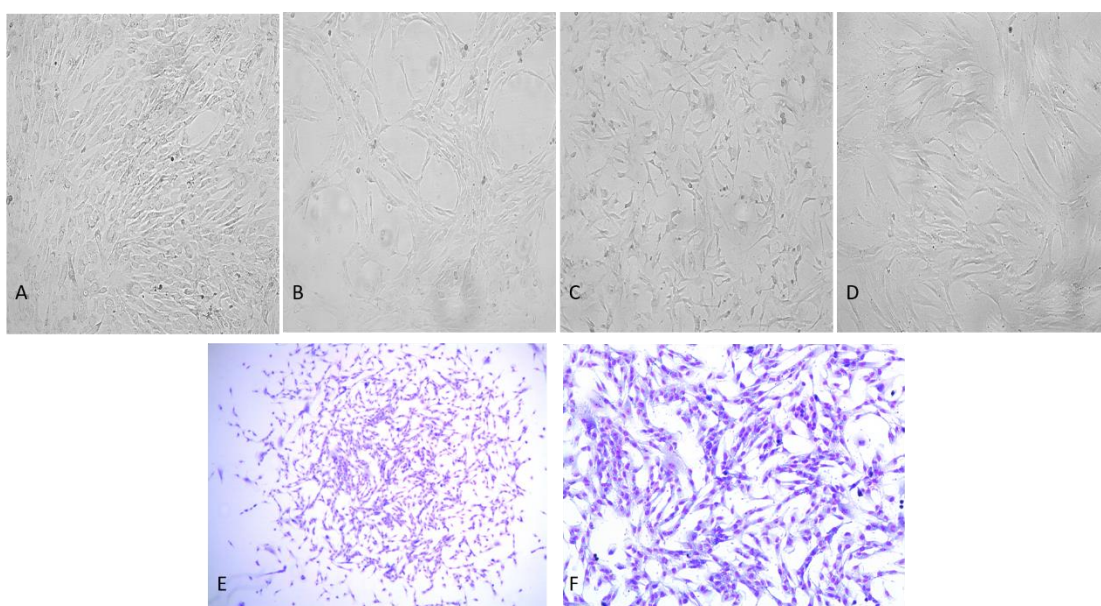
Κατά τη διαφοροποίηση των ΕΠΣΚ σε ΜΣΚ μέσω ΕΣ, από τις πρώτες 2 ημέρες, άρχισαν να σχηματίζονται συμπαγείς σφαιρικές δομές κυττάρων με καλά ορισμένο όριο (Εικόνα 3.2). Τα ΕΣ αυξάνονταν σε μέγεθος μέχρι την 7^η μέρα, οπότε και συλλέχθηκαν. Όταν στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε καλλιέργειες μονοστιβάδας πάνω σε ζελατίνη, τα διαχωρισμένα ΕΣ προσκολλήθηκαν στο υπόστρωμα και μέσα σε 2-3 ημέρες άρχισαν να εμφανίζονται στην περιφέρεια κάθε ΕΣ πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα ινοβλαστοειδούς μορφολογίας (Εικόνα 3.2). Η αύξηση αυτών των κυττάρων ήταν γρήγορη, ενώ κάλυψαν όλη την επιφάνεια της φλάσκας μετά από 7 ημέρες. Ο αρχικός πληθυσμός κυττάρων ήταν ετερογενής μορφολογικά, αλλά η ομοιογένεια αυξήθηκε με τις συνεχείς ανακαλλιέργειες. Μετά από 2 ανακαλλιέργειες με θρυψίνη, τα πιο αδιαφοροποίητα κύτταρα επιθηλιακής μορφολογίας, αλλά και διαφοροποιημένα άλλης μορφολογίας (ενδοθηλιακά, νευρικά) είχαν εξαλειφθεί και ο πληθυσμός έγινε ομοιογενής (Εικόνα 3.2). Ο χρόνος που χρειάστηκε για τη δημιουργία ομοιογενούς πληθυσμού ΜΣΚ από ΕΠΣΚ ήταν συνολικά 3 εβδομάδες και ήταν παρόμοιος με αυτόν για τα ΕΣΚ.

Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ παρουσίασαν μορφολογία όμοια με αυτήν των ΜΟ-ΜΣΚ, με τυπικό ατρακτοειδές σχήμα, ενώ είχαν ελαφρώς μικρότερο μέγεθος (Εικόνα 3.3). Λόγω του μικρότερου μεγέθους των ΜΣΚ από πολυδύναμα κύτταρα, κάθε γεμάτη φλάσκα περιείχε περίπου 1.5×10^6 ($6 \times 10^4/\text{cm}^2$), ενώ κάθε γεμάτη φλάσκα ΜΟ-ΜΣΚ είχε περίπου 7×10^5 ($2.8 \times 10^4/\text{cm}^2$). Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ σε καλλιέργεια χαμηλής πυκνότητας σχημάτισαν κλωνογενείς αποικίες CFU-Fs, κάθε μια από τις οποίες προέρχεται από ένα προγονικό κύτταρο (Εικόνα 3.3). Η απόδοση της κλωνογενούς ικανότητας ήταν

παρόμοια με αυτήν των ΜΟ-ΜΣΚ του ίδιου αριθμού ανακαλλιιεργειών (p5) και κυμαινόταν 2,75-3,12% (22-25 αποικίες / 800 αρχικά κύτταρα). Η καλλιέργεια των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ δοκιμάστηκε επίσης και σε καλλιιεργητικό υλικό που περιείχε 10% ανθρώπινου Platelet Lysate (hPL), αντί του FBS, όπου διατήρησαν παρόμοια χαρακτηριστικά (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.2: Διαφοροποίηση των ΕΠΣΚ σε ΜΣΚ μέσω ΕΣ. Α) Σχηματιζόμενα ΕΣ μετά από δύο ημέρες καλλιέργειας σε τρυβλία χαμηλής προσκόλλησης. Β) Κύτταρα ατρακτοειδούς μορφολογίας, τα οποία αυξάνονται από τον πυρήνα του ΕΣ, μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας πάνω σε ζελατίνη. Γ) Ομοιογενής πληθυσμός ΕΠΣΚ-ΜΣΚ στην 3^η ανακαλλιέργεια. Εικόνες από ανάστροφο μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 10x.

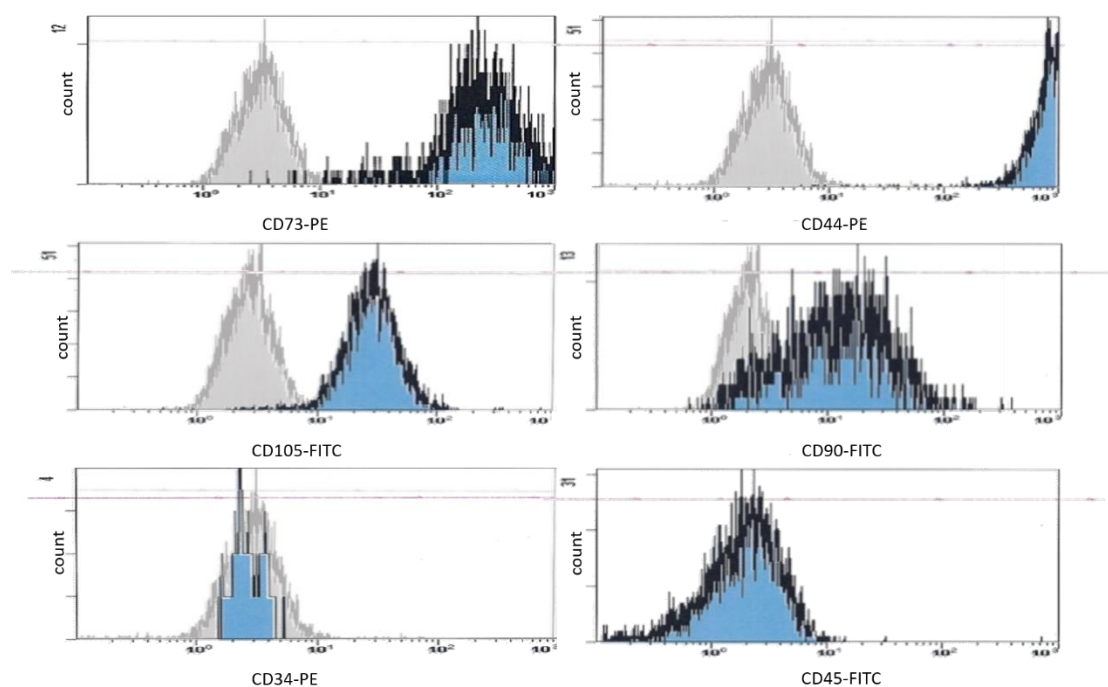


Εικόνα 3.3: Εικόνες των πληθυσμών ΜΣΚ στο ανάστροφο μικροσκόπιο. Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ μοιάζουν μορφολογικά τόσο στο FBS όσο και στο hPL με τα ΜΟ-ΜΣΚ. Α, Β) ΕΠΣΚ-ΜΣΚ κατά την 3^η

ανακαλλιέργεια σε FBS και σε hPL, αντίστοιχα (μεγέθυνση 10x). C) ΕΣΚ-ΜΣΚ κατά την 3^η ανακαλλιέργεια (μεγέθυνση 10x). D) ΜΟ-ΜΣΚ κατά την 3^η ανακαλλιέργεια (μεγέθυνση 10x). E, F) CFU-F αποικία από τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ μετά από 14 ημέρες καλλιέργειας, όπως φαίνεται μετά από χρώση Giemsa, σε μεγεθύνσεις 4x, 10x, αντίστοιχα.

3.3. Ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ

Όπως διαπιστώθηκε με κυτταρομετρία ροής, τα κύτταρα που προέκυψαν μετά τη διαφοροποίηση των ΕΠΣΚ (ΕΠΣΚ-ΜΣΚ), από την 4^η ανακαλλιέργεια εξέφραζαν, στο μεγαλύτερο ποσοστό τους >95%, τους τυπικούς δείκτες των ΜΣΚ CD73, CD105, CD90, CD44. Επίσης, απουσίαζαν από τον κυτταρικό πληθυσμό (<2%) οι δείκτες ενδοθηλιακών και αιμοποιητικών κυττάρων CD34 και CD45 (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4: Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής όπου φαίνεται ότι τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ είναι CD73+CD44+CD105+CD90+CD34-CD45-.

3.4. Πολλαπλασιαστικό δυναμικό των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ

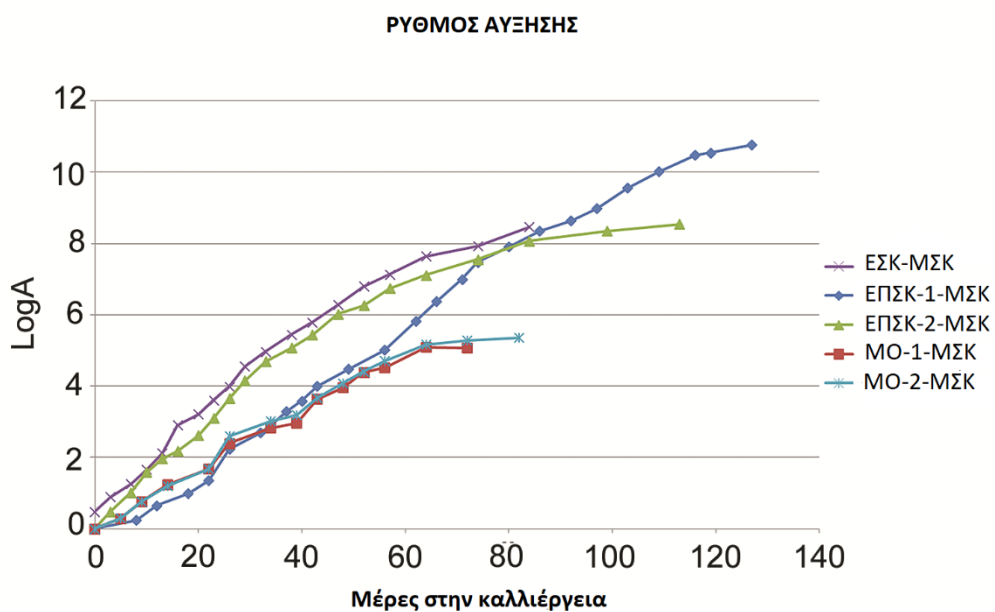
Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ ανακαλλιεργήθηκαν έως ότου επέλθει η κυτταρική γήρανση. Παράλληλα, καλλιεργήθηκαν και τα ΜΟ-ΜΣΚ, αλλά και τα ΕΣΚ-ΜΣΚ, ώστε να συγκρίνουμε το πολλαπλασιαστικό δυναμικό τους. Το πολλαπλασιαστικό δυναμικό τόσο των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ όσο και των ΕΣΚ-ΜΣΚ είχε πτωτική τάση μετά από το πέρας πολλών ανακαλλιεργιών και τελικά τα κύτταρα σταμάτησαν να διαιρούνται, όπως συμβαίνει και στα φυσιολογικά ΜΟ-ΜΣΚ. Τα ΕΠΣΚ-1-ΜΣΚ και τα ΕΠΣΚ-2-ΜΣΚ σταμάτησαν να αυξάνονται μετά από 25 και 20 ανακαλλιέργειες, αντίστοιχα. Οι αντίστοιχοι αριθμοί για τα ΕΣΚ-ΜΣΚ και τις δύο σειρές των ΜΟ-ΜΣΚ ήταν 19, 13 και 14 ανακαλλιέργειες. Τα πολλαπλασιαστικό δυναμικό των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ συγκριτικά με τα ΜΟ-ΜΣΚ και τα ΕΣΚ-ΜΣΚ περιγράφεται στον Πίνακα 3.1, όπου φαίνεται ο αυξημένος αριθμός των συνολικών διπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού (PD), ο χρόνος διπλασιασμού (PDT), ο συνολικός αριθμός κυττάρων που παρήχθησαν και πόσες φορές τον αρχικό πληθυσμό απέδωσαν (fold expansion). Σύμφωνα με αυτές τις παραμέτρους, το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ, όπως και αυτό των ΕΣΚ-ΜΣΚ είναι μεγαλύτερο σε σχέση με τα ΜΟ-ΜΣΚ. Στην Εικόνα 3.5 φαίνεται ο αυξημένος ρυθμός αύξησης των πληθυσμών των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ και των ΕΣΚ-ΜΣΚ σε σχέση με τα ΜΟ-ΜΣΚ. Στον άξονα του x απεικονίζεται ο χρόνος (σε ημέρες) παραμονής των κυττάρων στην καλλιέργεια, ενώ στον άξονα του y απεικονίζεται ο $\log A$, όπου

$$A = \frac{\text{συνολικός αριθμός κυττάρων που παρήχθησαν μετά από κάθε ανακαλλιέργεια}}{\text{αρχικός αριθμός κυττάρων}} \quad \text{και εκφράζει}$$

το πόσο αυξάνονται ποσοτικώς τα κύτταρα σε σχέση με τον αρχικό αριθμό τους, μετά από κάθε ανακαλλιέργεια.

	Αριθμός ανακαλλιέργειών	Διπλασιασμοί του κυτταρικού πληθυσμού (PD)	Χρόνος διπλασιασμού (PDT)	Συνολικός αριθμός παραθέντων κυττάρων	Fold expansion
ΕΠΣΚ-1-ΜΣΚ	25	35.7	3.3	1.41×10^{17}	5.88×10^{10}
ΕΠΣΚ-2-ΜΣΚ	20	28.3	3.3	9×10^{14}	3.49×10^8
ΕΣΚ-ΜΣΚ	19	28.1	3.08	6×10^{14}	2.88×10^8
ΜΟ-1-ΜΣΚ	13	16.9	3.9	8.5×10^{10}	1.18×10^5
ΜΟ-2-ΜΣΚ	14	17.8	3.9	1.7×10^{11}	2.3×10^5

Πίνακας 3.1: Συγκριτική απεικόνιση των παραμέτρων που αντιπροσωπεύουν το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ σε σχέση με τα ΕΣΚ-ΜΣΚ και τα ΜΟ-ΜΣΚ.



Εικόνα 3.5: Ρυθμός αύξησης των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ. Κάθε γράφημα αναφέρεται σε έναν από τους πληθυσμούς (ΕΠΣΚ)- (ΕΣΚ)- και (ΜΟ)- ΜΣΚ και δείχνει το λογάριθμο της παραμέτρου A ανά μέρες στην καλλιέργεια, όπου το A αντιπροσωπεύει το συνολικό αριθμό κυττάρων που παρήχθησαν μετά από κάθε ανακαλλιέργεια προς τον αρχικό αριθμό τους στην αρχή της καλλιέργειας. Οι κουκκίδες στο γράφημα αντιπροσωπεύουν τις συνεχείς ανακαλλιέργειες των κυττάρων.

3.5. *In vitro* ικανότητα διαφοροποίησης των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ σε ιστούς μεσοδερμικής προέλευσης

Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ τοποθετήθηκαν σε καλλιέργειες που ευνοούν τη διαφοροποίηση των ΜΣΚ σε λιποκύτταρα, οστεοβλάστες και χονδροκύτταρα, ώστε να ελέγξουμε αν πληρούν ένα από τα βασικά κριτήρια που είναι απαραίτητα για να θεωρηθεί ένας πληθυσμός κυττάρων ως ΜΣΚ, αυτό της ικανότητας διαφοροποίησης σε ιστούς μεσοδερμικής προέλευσης.

Η διαφοροποίηση των ΜΣΚ προς οστεοκύτταρα ολοκληρώθηκε στις 5 εβδομάδες, με εμφανή εναπόθεση ασβεστίου στα κύτταρα, κατά την παρατήρηση της καλλιέργειας στο ανάστροφο μικροσκόπιο. Η εναπόθεση ασβεστίου επιβεβαιώθηκε και με τη χρώση Alizarin Red S, η οποία συνδέεται με τα άλατα ασβεστίου και προκύπτει ένωση με κόκκινο χρώμα (Εικόνα 3.6). Επιπλέον, επιτεύχθηκε απομόνωση ολικού RNA και με τη μέθοδο RT-PCR για το γονίδιο της αλκαλικής φωσφατάσης *ALP*, διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα που προέκυψαν εξέφραζαν το συγκεκριμένο δείκτη (Εικόνα 3.6).

Τα λιποκύτταρα χαρακτηρίζονται από το γεγονός ότι συγκεντρώνουν λιποσταγονίδια στο κυτταρόπλασμά τους. Η διαφοροποίηση των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ σε λιποκύτταρα ήταν επιτυχής, καθώς παρατηρήθηκε με το ανάστροφο μικροσκόπιο συσσώρευση λιποσταγονιδίων εντός των κυττάρων μετά από τη δεύτερη εβδομάδα. Η χρώση Oil

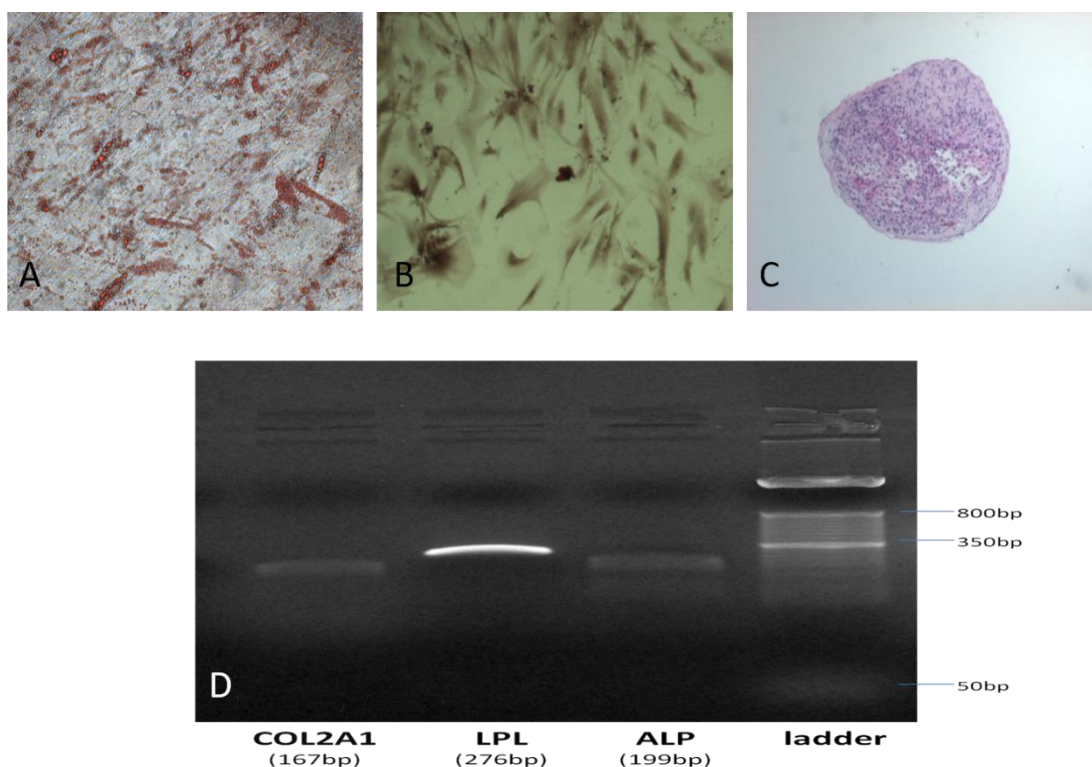
Red έδωσε θετικό αποτέλεσμα βάφοντας τα ουδέτερα λιποσταγονίδια κόκκινα (Εικόνα 3.6). Επιπλέον, μετά από απομόνωση RNA από τα κύτταρα, πραγματοποιήθηκε RT-PCR, όπου διαπιστώθηκε η έκφραση του γονιδίου της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης *LPL*, ένζυμο το οποίο είναι υπεύθυνο για την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων σε λιπαρά οξέα και γλυκερόλη στην κυκλοφορία του αίματος, με τα πρώτα να εναποτίθενται στη συνέχεια στο λιπώδη ιστό (Εικόνα 3.6).

Λόγω της κλινικής σημασίας που έχει η χρήση των ΜΣΚ στην ανάπλαση του χόνδρου, καθώς αυτά χρησιμοποιούνται σε πληθώρα κλινικών μελετών για τη θεραπεία εκφυλιστικών νόσων των αρθρώσεων, επιδιώξαμε να εμβαθύνουμε περισσότερο στην ικανότητα χονδρογένεσης των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ και να αξιολογήσουμε την ποιότητα του χόνδρου που προέκυψε από την *in vitro* διαφοροποίησή τους. Έτσι, τόσο τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ, όσο και τα ΜΣΚ του ΜΟ και τα ΕΣΚ-ΜΣΚ καλλιεργήθηκαν στις ίδιες ακριβώς συνθήκες χονδρογένεσης. Σε όλες τις διαφορετικές σειρές παρατηρήθηκε ο σχηματισμός λευκών συμπαγών δομών (micromasses), οι οποίες μετά τις 3 εβδομάδες απομονώθηκαν και ελέγχθηκαν ιστολογικά. Οι χονδρογενείς μάζες που προέκυψαν από τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ και τα ΕΣΚ-ΜΣΚ είχαν πολύ μικρότερο μέγεθος από τις αντίστοιχες από ΜΟ-ΜΣΚ, γεγονός που αποτελεί ένδειξη παραγωγής μικρότερης ποσότητας εξωκυττάριας ουσίας. Οι μάζες αναλύθηκαν με RT-PCR, όπου διαπιστώθηκε ότι περιέχουν κύτταρα που εκφράζουν το γονίδιο *COL2A1* (Εικόνα 3.6). Το γονίδιο αυτό εκφράζεται στα χονδροκύτταρα και κωδικοποιεί την αλυσίδα alpha-1 του κολλαγόνου II, της πιο άφθονης δομικής πρωτεΐνης του υαλώδους χόνδρου. Στη συνέχεια, έγινε ιστολογική ανάλυση και συγκρίθηκε η ποιότητα του χόνδρου που προέκυψε από τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ και τα ΕΣΚ-ΜΣΚ με εκείνον που προέκυψε από τα ΜΟ-ΜΣΚ, τα οποία αποτέλεσαν μάρτυρα αναφοράς. Τα ευρήματα της ιστολογικής μελέτης παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.7. Κατά τη χρώση H&E, ο

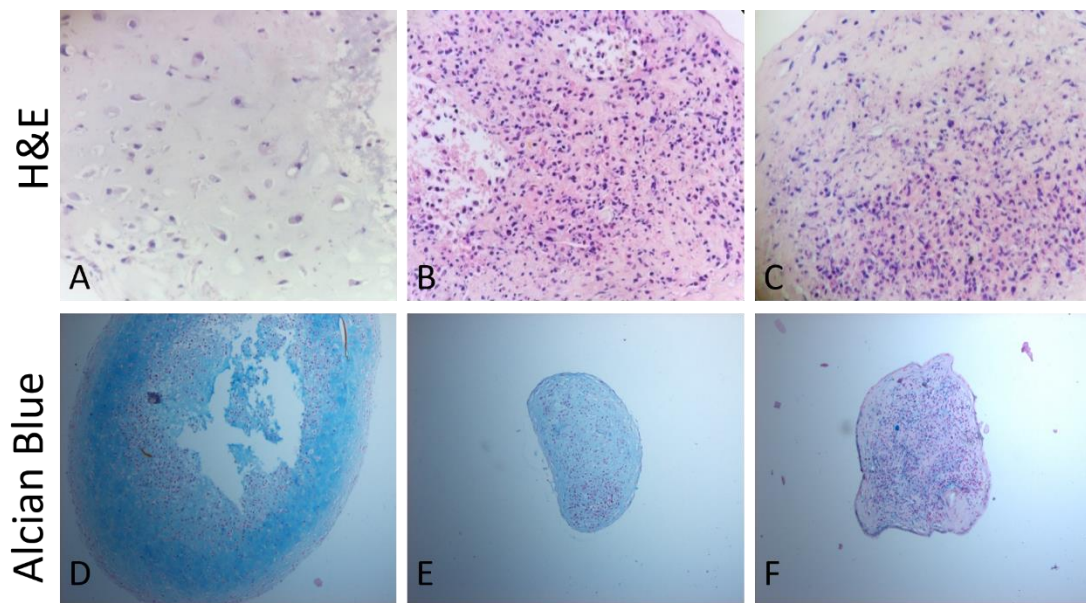
ιστός που προέκυψε από τα ΜΟ-ΜΣΚ (μάρτυρας αναφοράς) περιείχε έντονα βασίφιλη εξωκυττάρια ουσία, με μπλε απόχρωση. Επομένως, είναι πλούσια σε πρωτεογλυκάνες που χαρακτηρίζουν τον ώριμο υαλώδη χόνδρο. Επίσης, είχε μια μορφολογία τυπική του υαλώδους χόνδρου, αφού περιείχε πολυάριθμες κοιλότητες, τα λεγόμενα “lacunae”, μέσα στα οποία εντοπιζόνταν τα ώριμα χονδροκύτταρα. Από την άλλη πλευρά, τα ΜΣΚ που προήλθαν από τη διαφοροποίηση πολυδύναμων κυττάρων, αν και έδειξαν κάποιο βαθμό χονδρογένεσης, δημιούργησαν ιστό ο οποίος δεν είχε τα τυπικά χαρακτηριστικά του ώριμου υαλώδους χόνδρου, με την εξωκυττάρια ουσία να βάφεται ροζ και όχι μπλε. Επίσης, παρουσίαζαν υψηλή κυτταρική αφθονία σε πιο ανώριμα κύτταρα που είχαν μικρό μέγεθος ή ατρακτοειδές σχήμα, ενώ σε γενικές γραμμές απουσίαζε η τυπική ιστολογική δομή των lacunae. Η συνολική ιστολογική εικόνα έμοιαζε περισσότερο με το ροζ χόνδρο που παρατηρείται στο χονδροβλάστωμα και όχι με τον υαλώδη χόνδρο και παραπέμπει σε ένα μη ολοκληρωμένο πρόγραμμα διαφοροποίησης των ΜΣΚ. Παρόμοια εικόνα είχαν όλες οι σειρές των ΜΣΚ από πολυδύναμα κύτταρα (ΕΠΣΚ-1-ΜΣΚ, ΕΠΣΚ-2-ΜΣΚ, ΕΣΚ-ΜΣΚ). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε χρώση Alcian Blue, η οποία βάφει τις πρωτεογλυκάνες της εξωκυττάριας ουσίας του χόνδρου βαθύ μπλε. Κατά τη χρώση αυτή, ο μάρτυρας αναφοράς (χονδρογενή ΜΟ-ΜΣΚ) βάφτηκε με το αναμενόμενο μπλε χρώμα, ενώ τα παρασκευάσματα των ΜΣΚ από πολυδύναμα κύτταρα έδειξαν πολύ ασθενή χρώση (Εικόνα 3.7), επιβεβαιώνοντας την έλλειψη σε πρωτεογλυκάνες.

Η ανοσοϊστοχημεία για το δείκτη Sox9 έδειξε ότι στα δείγματα των ΜΟ-ΜΣΚ, ο μεταγραφικός παράγοντας εκφραζόταν σε επίπεδο πρωτεΐνης στο 80% των κυττάρων. Αντιθέτως, τα δείγματα από ΕΠΣΚ-ΜΣΚ εξέφραζαν το δείκτη σε ποσοστό περίπου 1% των κυττάρων, ενώ ακόμα και τα κύτταρα που εξέφραζαν το δείκτη είχαν ασθενές

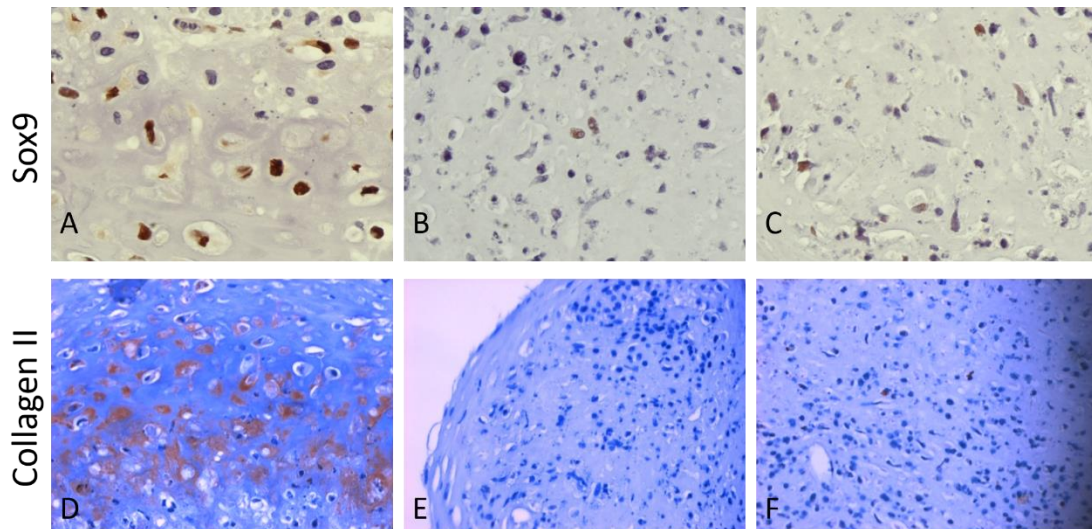
σήμα και επομένως χαμηλή έκφραση. Τα δείγματα των ΕΣΚ-ΜΣΚ είχαν ένα ποσοστό έκφρασης περίπου 40%, το οποίο περιοριζόταν σε μια συγκεκριμένη περιοχή του παρασκευάσματος (Εικόνα 3.8). Όπως έδειξε η ανοσοϊστοχημεία στο COL2A1, η πρωτεΐνη βρισκόταν παρούσα στο 70% περίπου του χόνδρου και συνυπήρχε με την έκφραση του Sox9, σε αντίθεση με τους ιστούς που προήλθαν από τα πολυδύναμα κύτταρα όπου σε επίπεδο πρωτεΐνης δεν εντοπίστηκε έκφραση του COL2A1 (Εικόνα 3.8).



Εικόνα 3.6: Διαφοροποίηση των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ σε ιστούς μεσοδερμικής προέλευσης. Α) Χρώση Oil Red που δείχνει τη συσσώρευση λιποκυστιδίων εντός των κυττάρων (ανάστροφη μικροσκόπηση 10x). Β) Χρώση Alizarin Red S που δείχνει την εξωκυτταρική εναπόθεση ασβεστίου (ανάστροφη μικροσκόπηση 10x). Γ) Χρώση H&E που δείχνει τη διαφοροποίηση σε ιστό με μορφολογικά χαρακτηριστικά χόνδρου (ανάστροφη μικροσκόπηση 10x). Δ) Γέλη αгарόζης μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT-PCR στα παραχθέντα χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα και οστεοκύτταρα, όπου φαίνεται η έκφραση των *COL2A1*, *LPL* *ALP*, αντίστοιχα.



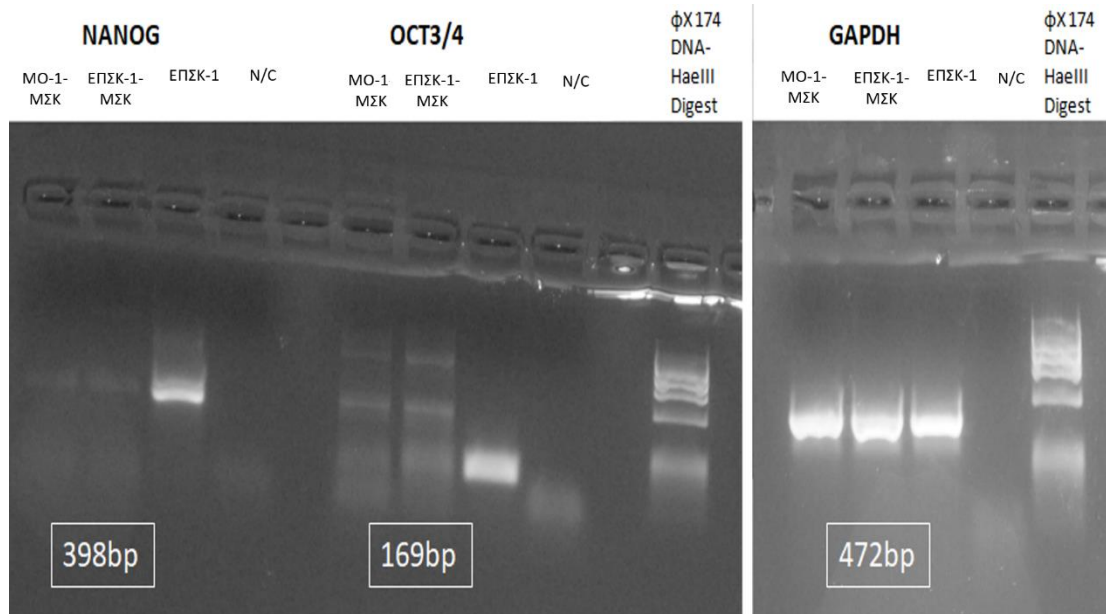
Εικόνα 3.7: Ιστολογική ανάλυση των χονδρογενών ιστών που προέκυψαν από τα (ΕΠΣΚ)- (ΕΣΚ)- (ΜΟ)- ΜΣΚ. Α) Οι ιστοί των ΜΟ-ΜΣΚ παρουσιάζουν χαρακτηριστικά υαλώδους χόνδρου στην Η&Ε, με βασίφιλη εξωκυττάρια ουσία με μπλε απόχρωση, χαμηλή κυτταρική και παρουσία χονδροκυττάρων μέσα σε κοιλότητες (lacunae). Β, C) Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ και ΕΣΚ-ΜΣΚ, αντίστοιχα, έδωσαν ιστό με μεγάλη κυτταρική, μεγάλη αναλογία σε κύτταρα ινοβλαστοειδούς μορφολογίας και έλλειψη τυπικής οργάνωσης μέσα σε κοιλότητες, ενώ η εξωκυττάρια ουσία είναι λιγότερο βασίφιλη και βάφεται ροζ, συνιστώντας έλλειψη σε πρωτεογλυκάνες. Οπτικό μικροσκόπιο, μεγέθυνση 40x. D, E, F) Χρώση Alcian Blue στις χονδρογενείς μάζες από (ΜΟ)-, (ΕΠΣΚ)-, (ΕΣΚ)- ΜΣΚ, αντίστοιχα. Ο ιστός από ΜΟ-ΜΣΚ, βάφτηκε έντονο μπλε που συνιστά αφθονία σε πρωτεογλυκάνες, ενώ το χρώμα ήταν πολύ ασθενέστερο στα (ΕΠΣΚ)- και (ΕΣΚ)- ΜΣΚ. Οπτικό μικροσκόπιο, μεγέθυνση 10x.



Εικόνα 3.8: Ανοσοϊστοχημεία στις χονδρογενείς μάζες των (MO)- (ΕΠΣΚ)- (ΕΣΚ)-ΜΣΚ, για τους δείκτες χονδρογένεσης Sox9, COL2A1. A, B, C) Έκφραση του Sox9 στο χόνδρο από ΜΟ-ΜΣΚ, ΕΠΣΚ-ΜΣΚ και ΕΣΚ-ΜΣΚ, αντίστοιχα. Η πρωτεΐνη εκφράζεται στα περισσότερα κύτταρα στα ΜΟ-ΜΣΚ, ενώ παρουσιάζει ασθενή έως ελάχιστη έκφραση στα δείγματα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ, ΕΣΚ-ΜΣΚ. Οπτικό μικροσκόπιο, μεγέθυνση 50x. D, E, F) Έκφραση του COL2A1 στο χόνδρο από ΜΟ-ΜΣΚ, ΕΠΣΚ-ΜΣΚ και ΕΣΚ-ΜΣΚ, αντίστοιχα. Το δείγμα από ΜΟ-ΜΣΚ εκφράζει σε αφθονία το δείκτη, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα απουσιάζει η έκφραση. Οπτικό μικροσκόπιο, μεγέθυνση 40x.

3.6. Απώλεια έκφρασης δεικτών πολυδυναμίας στα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ

Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ ελέγχθηκαν μετά από 4 ανακαλλιέργειες (passage 4), για το αν εκφράζουν χαρακτηριστικούς δείκτες πολυδυναμίας. Με RT-PCR ειδική για τα Oct3/4 και Nanog, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση των κεντρικών αυτών για την πολυδυναμία μεταγραφικών παραγόντων είχε ελαττωθεί σε επίπεδα αντίστοιχα με τα ΜΟ-ΜΣΚ (Εικόνα 3.9). Επομένως, ο κυτταρικός πληθυσμός αποτελείται από διαφοροποιημένα κύτταρα που έχουν χάσει την πολυδυναμία τους.

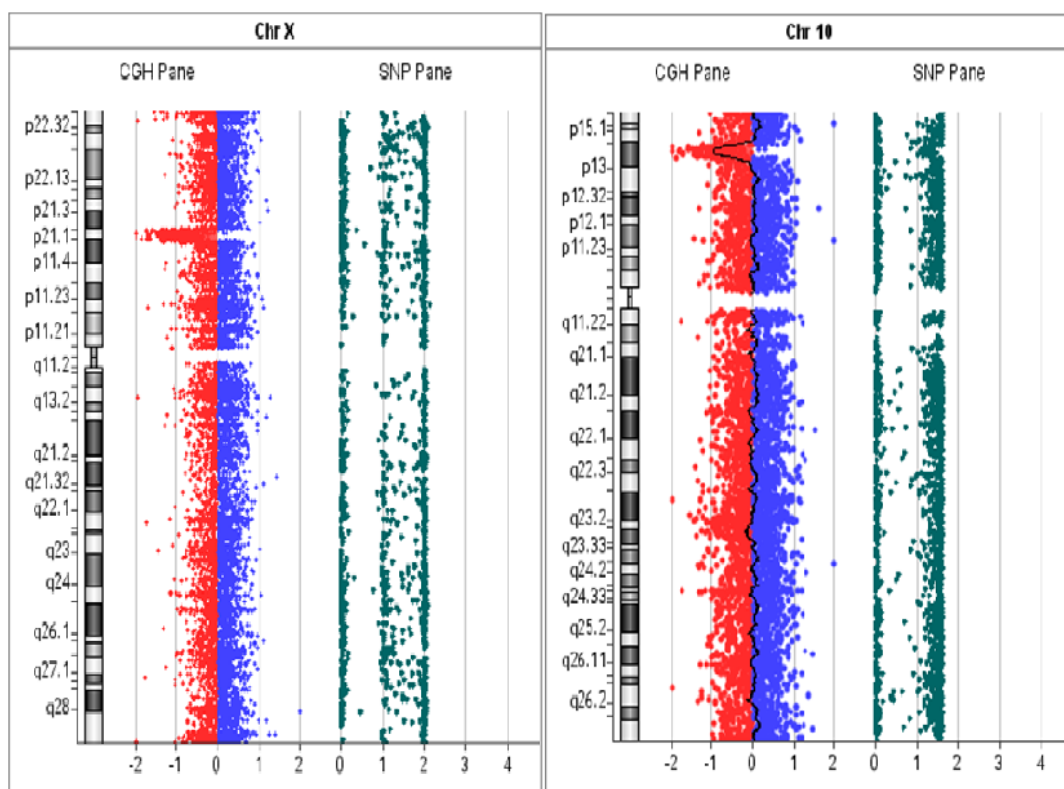


Εικόνα 3.9: Μείωση της έκφρασης των δεικτών πολυδυναμίας στα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ. Γέλη αгарόζης μετά από RT-PCR για τους δείκτες Oct3/4, Nanog, που δείχνει ότι τα ΕΠΣΚ-1-ΜΣΚ έχουν μειώσει την έκφρασή τους, σε επίπεδα αντίστοιχα με αυτά των ΜΟ-1-ΜΣΚ. Παράλληλα, φαίνεται η έκφραση των δεικτών στα ΕΠΣΚ-1, πριν τη διαφοροποίηση.

Γενετική σταθερότητα των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ

Όπως διαπιστώθηκε με μικροσυστοιχίες συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού (aCGH), τα διαφοροποιημένα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ στην 5^η ανακαλλιέργεια εμφανίζουν φυσιολογικό καρυότυπο, όμοιο με αυτόν των ΕΠΣΚ από τα οποία προήλθαν. Σε μοριακό επίπεδο παρουσιάζουν μόνο κάποιους μικρούς πολυμορφισμούς στον αριθμό αντιγράφων (Copy Number Variations, CNVs), ενώ επιπλέον εντοπίστηκε από ένα χρωμοσωμικό έλλειμμα περίπου 3 Mb στην κάθε σειρά ΕΠΣΚ-ΜΣΚ. Με βάση το γονιδίωμα αναφοράς hg19, η σειρά ΕΠΣΚ-1-ΜΣΚ είχε το έλλειμμα chrX: 29182625-32011209 (DEL Xp21.3-p21.1), ενώ η σειρά ΕΠΣΚ-2-ΜΣΚ είχε το έλλειμμα chr10: 6998908- 10013116 (DEL10p14), αντίστοιχα (Εικόνα 3.10). Τα ελλείμματα στις συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος δεν επηρέασαν γονίδια, των οποίων η έλλειψη σχετίζεται με αυξημένο ή ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Συγκεκριμένα, το DEL Xp21.3-p21.1 περιλαμβάνει τα γονίδια *IL1RAPL1*, *MAGEB2*, *MAGEB3*, *MAGEB4*, *MAGEB1*, *NR0B1*, *CXorf21*, *GK*, *TAB3*, *FTHL17*, *DMD*, ενώ το DEL10p14 τα γονίδια *SFMBT2*, *ITIH5*, *ITIH2*, *KIN*, *ATP5C1*, *TAF3*, *FLJ45983*, *GATA3*. Τα ελλείμματα αυτά, όπως διαπιστώθηκε, προϋπήρχαν στις πολυδύναμες κυτταρικές σειρές ΕΠΣΚ-1, ΕΠΣΚ-2 αντίστοιχα και δεν προέκυψαν κατά τη διαφοροποίησή τους σε ΕΠΣΚ-ΜΣΚ, αλλά κατά τις συνεχείς ανακαλλιέργειες των ΕΠΣΚ. Επομένως, η διαφοροποίηση δε δημιούργησε χρωμοσωμικές ανωμαλίες στα κύτταρα.



Εικόνα 3.10: Χρωμοσωμικά ελλείμματα που ανιχνεύθηκαν στις σειρές ΕΠΣΚ και μεταβιβάστηκαν στα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ μετά τη διαφοροποίηση. Το έλλειμμα DEL Xp21.3-p21.1 βρέθηκε στα ΕΠΣΚ-1-ΜΣΚ και το έλλειμμα DEL10p14 βρέθηκε στα ΕΠΣΚ-2-ΜΣΚ.

3.7. *In vivo* πειράματα χορήγησης ΕΠΣΚ-ΜΣΚ σε ποντίκια

Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ ελέγχθηκαν μετά από 4 ανακαλλιέργειες για το αν δημιουργούν όγκους όταν χορηγηθούν *in vivo*. Έως και 10 εβδομάδες μετά από υποδόρια εμφύτευση σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια, δε σχημάτισαν όγκους στα σημεία αυτά. Επομένως, πρόκειται για κυτταρικό πληθυσμό καθαρό από κατάλοιπα αδιαφοροποίητων πολυδύναμων κυττάρων. Επιπλέον, το εύρημα αυτό δείχνει την απουσία κακοήθους εξαλλαγής των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ΜΣΚ, λόγω των ανοσοτροποποιητικών και αναπλαστικών τους ιδιοτήτων, έχουν αποτελέσει ενδιαφέρον αντικείμενο μελέτης εδώ και αρκετά χρόνια. Πολλές έρευνες έχουν εστιάσει στο ρόλο τους σε πληθώρα φλεγμονωδών και εκφυλιστικών νοσημάτων. Στις αλλογενείς μεταμοσχεύσεις, ιδιαίτερα στην αντιμετώπιση του GvHD, μπορούν να δράσουν καταστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό και την κυτταροτοξικότητα των T λεμφοκυττάρων (Castro-Manrreza and Montesinos, 2015). Για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν κλινικά, είναι αναγκαία η ανάπτυξη ασφαλών και αποδοτικών πρωτοκόλλων παραγωγής τους σε μεγάλη κλίμακα. Η παραγωγή των ΜΣΚ από το ΜΟ και από άλλες πηγές, όπως ο λιπώδης ιστός, το αμνιακό υγρό και το ομφάλιο αίμα έχει διάφορα μειονεκτήματα, τα οποία αναφέρθηκαν εκτεταμένα στην Εισαγωγή και οδηγούν σε τεχνικές δυσκολίες στην κλινικής κλίμακας παραγωγή και ευρεία χρήση των ΜΣΚ σε κυτταρικές θεραπείες. Τα ΕΠΣΚ, λόγω της πολυδυναμίας τους, θα μπορούσαν να προσφέρουν μια ανεξάντλητη πηγή ΜΣΚ στο εργαστήριο, αφού μπορούν να πολλαπλασιάζονται απεριόριστα και να αποθηκεύονται σε μεγάλες ποσότητες στο υγρό άζωτο. Κατά αυτόν τον τρόπο, μπορούν να είναι συνεχώς διαθέσιμα για διαφοροποίηση σε ΜΣΚ και καθιστούν δυνατή τη δημιουργία τράπεζας σειρών ΜΣΚ, στην οποία θα υπάρχει έτοιμο απόθεμα κυττάρων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα σε ασθενείς, σε μεγάλες ποσότητες. Η εφαρμογή τους μπορεί να γίνει σε οποιονδήποτε ασθενή, χωρίς να απαιτείται HLA συμβατότητα, επομένως η αλλογενής χρήση είναι εφικτή. Διάφορες μελέτες έχουν πετύχει τα τελευταία χρόνια τη διαφοροποίηση των ΕΠΣΚ προς πληθυσμούς κυττάρων οι οποίοι διαθέτουν χαρακτηριστικά των ΜΣΚ, όπως η τυπική ινοβλαστοειδής μορφολογία, η προσκόλληση στην πλαστική επιφάνεια, η ικανότητα πολλαπλασιασμού σε συνθήκες

καλλιέργειας ΜΣΚ, ο ειδικός ανοσοφαινότυπος και η ικανότητα χονδρογένεσης, λιπογένεσης και οστεογένεσης.

Στην παρούσα μελέτη, επιδιώχθηκε η τυποποίηση απλών και αποδοτικών πρωτοκόλλων για την παραγωγή μεγάλου αριθμού ΜΣΚ από ΕΠΣΚ και διερευνήθηκαν οι ιδιότητες των παραχθέντων κυττάρων. Οι σειρές ΕΠΣΚ που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαφοροποίηση σε ΜΣΚ είχαν προηγουμένως δημιουργηθεί στο εργαστήριό μας με μέθοδο που δεν οδηγεί στην ενσωμάτωση ξένου DNA, ελαχιστοποιώντας τον κίνδυνο μετάλλαξης από εισχώρηση (insertional mutagenesis) καθιστώντας την, έτσι, ασφαλή για χρήση των κυττάρων στην κλινική πράξη (Warren et al., 2010). Οι σειρές ΕΠΣΚ-1, ΕΠΣΚ-2 προέκυψαν από επαναπρογραμματισμό δύο σειρών ΜΣΚ από ΜΟ. Τα ΜΟ-ΜΣΚ είναι η κύρια πηγή σωματικών κυττάρων που χρησιμοποιεί το εργαστήριό μας για επαναπρογραμματισμό σε ΕΠΣΚ, λόγω της πρόσβασης που έχει, ως μέρος Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, στη συλλογή μυελικών δειγμάτων και λόγω της εμπειρίας που έχει αποκτήσει στην καλλιέργεια των συγκεκριμένων κυττάρων εδώ και πολλά χρόνια. Τα ΕΠΣΚ αρχικά αναπτύχθηκαν στην καλλιέργεια, ως πολυδύναμα κύτταρα χωρίς την παρουσία υποστηρικτικών κυττάρων, που ενέχουν τον κίνδυνο μεταφοράς ξеноπαθογόνων ή ξеноαντιγόνων. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε υλικό καθορισμένης σύστασης. Στις συνθήκες αυτές διατήρησαν τη μορφολογία τους και το πολλαπλασιαστικό δυναμικό τους μέχρι τη διαφοροποίηση. Σήμερα, στο εργαστήριό μας οι κυτταρικές σειρές πλέον διατηρούνται σε υλικό NutriStem hPSC XF, καθορισμένο και χωρίς καθόλου ζωικά συστατικά και έχει πλέον εγκατασταθεί και πρωτόκολλο επαναπρογραμματισμού χωρίς υποστηρικτικά κύτταρα, σε αντίθεση με το αρχικό πρωτόκολλο μέσω του οποίου προέκυψαν και οι σειρές ΕΠΣΚ-1, ΕΠΣΚ-2.

Τα ΕΠΣΚ διαφοροποιήθηκαν προς ΜΣΚ επιτυχώς, κάτω από δύο διαφορετικές προσεγγίσεις, εκείνη της απευθείας διαφοροποίησης των αποικιών ΕΠΣΚ, σε συνθήκες προσκόλλησης στο υπόστρωμά τους και εκείνη που έχει ενδιάμεσο στάδιο τη δημιουργία ΕΣ. Τα ΕΣ αποτελούν *in vitro* σχηματισμούς που μιμούνται τη διαφοροποίηση της ICM κατά τη γαστριδίωση. Κατά το σχηματισμό τους, τα ΕΠΣΚ σταματούν να πολλαπλασιάζονται και ξεκινά η αυτόματη διαφοροποίησή τους στα τρία εμβρυικά δέρματα. Το πρωτόκολλο των ΕΣ τελικά υιοθετήθηκε από το εργαστήριο, ως πιο αποδοτικό, καθώς απαιτεί ένα χρονικό διάστημα περίπου 3 εβδομάδων συνολικά μέχρι τη δημιουργία ομοιογενούς πληθυσμού ΕΠΣΚ-ΜΣΚ. Το πρωτόκολλο της απευθείας διαφοροποίησης στα δικά μας χέρια χρειάστηκε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για την εμφάνιση πληθυσμού ΜΣΚ και παράγαγε μικρότερη ποσότητα ΜΣΚ, αναλογικά με τα αρχικά ΕΠΣΚ που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς παρατηρήθηκε μεγάλη απόπτωση και αργή αύξηση. Έτσι, δεν υιοθετήθηκε για την περαιτέρω διερεύνηση των ιδιοτήτων των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ. Τα τελευταία χρόνια, έχουν δοκιμαστεί διάφορα πρωτόκολλα διαφοροποίησης σε ΜΣΚ. Μερικά από αυτά πραγματοποιούν αρχικά καλλιέργεια κυττάρων σαν μονοστιβάδα, πάνω σε Matrigel ή ζελατίνη σε υλικό καλλιέργειας ΜΣΚ μαζί με FGF-2 και επακόλουθη ανακαλλιέργεια πάνω σε ζελατίνη (Hu et al., 2015; Hynes et al., 2014; Liu et al., 2017). Η επώαση με μικρά μόρια αναστολής του TGF- β μονοπατιού διευκολύνουν τη διαφοροποίηση, ενώ κάποιοι χρησιμοποιούν κοκτέιλ αυξητικών παραγόντων όπως οι PDGF-AB, EGF, FGF-2 (Chen et al., 2012; Lian et al., 2010). Άλλοι συνδυάζουν τη δημιουργία ΕΣ ή την προσκολλητική καλλιέργεια με επακόλουθη απομόνωση συγκεκριμένων πληθυσμών με FACS (fluorescence-activated cell sorting), όπως οι CD105+, CD73+, PDGFR α +, ώστε να γίνει εμπλουτισμός σε ΜΣΚ (Eto et al., 2018; Lian et al., 2010; Moslem et al., 2015). Η δημιουργία ΕΣ αποτελεί πλέον μια απλή και στανταρισμένη

μέθοδο διαφοροποίησης προς διάφορους ιστούς, με επαναλήψιμα αποτελέσματα (Sheyn et al., 2016; Tang et al., 2014; Wei et al., 2012; Xie et al., 2016; Xu et al., 2019). Επιπλέον, για την καλλιέργεια των ΕΣ έχουν πλέον εξελιχθεί και συστήματα που χρησιμοποιούν βιοαντιδραστήρες, όπου τα ΕΣ παραμένουν σε συνθήκες συνεχούς ανακίνησης και όχι σε στατική καλλιέργεια. Μέσα σε αυτά τα συστήματα, η ανάπτυξη των ΕΣ είναι πιο αποδοτική, ελεγχόμενη και ταυτόχρονα επιτρέπεται η παραγωγή κυττάρων σε μεγάλη κλίμακα, έτσι αποτελούν ένα βήμα παραπάνω προς την κλινική χρήση (Cameron et al., 2006; Gerecht-Nir et al., 2004).

Η μέθοδος διαφοροποίησης με ΕΣ έδωσε μεγάλο αριθμό ΕΠΣΚ-ΜΣΚ, αναλογικά με τα ΕΠΣΚ που χρησιμοποιήθηκαν (μια μικρή φλάσκα), αφού μέσα σε λίγες μέρες κύτταρα ινοβλαστοειδούς μορφολογίας πολλαπλασιάστηκαν γρήγορα από το εσωτερικό των ΕΣ και κάλυψαν όλη την επιφάνεια της φλάσκας. Μετά από 2 ανακαλλιέργειες είχε προκύψει ομοιογενής πληθυσμός με τη χαρακτηριστική μορφολογία των ΜΣΚ, ενώ αυτά είχαν μικρότερο μέγεθος από τα ΜΟ-ΜΣΚ και μια πιο νεανική μορφολογία. Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ έχουν το χαρακτηριστικό ανοσοφαινότυπο των ΜΟ-ΜΣΚ, αφού εκφράζουν τους αντίστοιχους δείκτες και δεν εκφράζουν δείκτες αιμοποιητικών και ενδοθηλιακών κυττάρων. Η διαφοροποίηση των ΕΠΣΚ σε ΜΣΚ δεν προκάλεσε χρωμοσωμικές ανωμαλίες, καθώς τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ είχαν πανομοιότυπο μοριακό καρυότυπο με τα ΕΠΣΚ από τα οποία προήλθαν. Τα ελλείματα που εντοπίστηκαν στις σειρές ΕΠΣΚ-ΜΣΚ προϋπήρχαν και στα ΕΠΣΚ και είχαν δημιουργηθεί κατά τη διάρκεια της εκτεταμένης καλλιέργειας των ΕΠΣΚ. Ωστόσο, τα ελλείματα αυτά δε σχετίζονται με τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η απόκτηση μικρών ελλειμάτων ή διπλασιασμών σε περιοχές του γονιδιώματος είναι ένα φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί σε πολλές σειρές ΕΣΚ και ΕΠΣΚ (Hussein et al., 2011; Laurent et al., 2011; Taapken et al., 2011). Η

παρακολούθηση του γενετικού προφίλ των ΕΠΣΚ και των διαφοροποιημένων κυττάρων που προκύπτουν από αυτά είναι σημαντικό να πραγματοποιείται όσο διατηρούνται στην καλλιέργεια τα κύτταρα. Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες μπορεί να έχουν επίπτωση στον κυτταρικό κύκλο αλλά και στο πολλαπλασιασμό των κυττάρων προσδίδοντάς τους ογκογενετική ικανότητα, γεγονός που θα πρέπει αυστηρά να αποκλειστεί σε οποιαδήποτε περίπτωση κλινικής τους χρήσης σε κυτταρική θεραπεία. Επίσης, μπορεί να επηρεάζουν τη λειτουργικότητα των κυττάρων, δυσκολεύοντας τη διαφοροποίηση των ΕΠΣΚ ή τις εξειδικευμένες λειτουργίες των διαφοροποιημένων από αυτά κυττάρων. Η χρήση της τεχνολογίας των aCGH για τον τακτικό έλεγχο της γενετικής σταθερότητας είναι επιτακτική ανάγκη.

Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ μέχρι την 4^η ανακαλλιέργειά τους είχαν ελαττώσει την έκφραση των δεικτών πολυδυναμίας Nanog, Oct3/4, σε επίπεδα ανάλογα των ΜΟ-ΜΣΚ. Επίσης, όπως έδειξαν τα πειράματα σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια, η χορήγηση των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ δεν προκαλεί τη δημιουργία όγκων έως και 10 εβδομάδες μετά. Άρα ο πληθυσμός κυττάρων που προκύπτει με τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήσαμε είναι ασφαλής, καθαρός από αδιαφοροποίητα κύτταρα και χωρίς ενδείξεις κακοήθους εξαλλαγής. Η απουσία αδιαφοροποίητων κυττάρων στον πληθυσμό των διαφοροποιημένων είναι απαραίτητη προϋπόθεση, ώστε να μπορούν να αξιοποιηθούν κλινικά. Έχει δειχθεί ότι μόλις 2 αποικίες ΕΣΚ ή 245 μονήρη ΕΣΚ εάν χορηγηθούν σε ποντίκια είναι ικανά να δημιουργήσουν τερατώματα (Hentze et al., 2009). Τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία και με άλλες μελέτες κατά τις οποίες έχουν χορηγηθεί ΕΠΣΚ-ΜΣΚ σε πειραματόζωα και δεν παρατηρήθηκε ογκογένεση (Chen et al., 2012; Eto et al., 2018; Yang et al., 2019). Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι πρώτες κλινικές δοκιμές όπου έχουν χορηγηθεί διαφοροποιημένα από ΕΠΣΚ κύτταρα, όπως επιθηλιακά του αμφιβληστροειδούς, ΜΣΚ, αλλά και

ντοπαμινεργικούς νευρώνες δεν έδειξαν σοβαρές παρενέργειες στους ασθενείς (Cyranoski, 2018b; Mandai et al., 2017; Rasko et al., 2019). Επιπλέον, τα κύτταρα σταμάτησαν να αυξάνονται μετά από έναν αριθμό ανακαλλιιεργειών, όπως ακριβώς συμβαίνει και με τα ΜΟ-ΜΣΚ γεγονός που δείχνει την απουσία ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού και την προοδευτική κυτταρική γήρανση ως αποτέλεσμα των εκτεταμένων κύκλων αντιγραφής του DNA και των κυτταρικών διαιρέσεων.

Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ, παράλληλα με τα ΕΣΚ-ΜΣΚ, ελέγχθηκαν για το πολλαπλασιαστικό δυναμικό τους σε σύγκριση με τα ΜΟ-ΜΣΚ, τα οποία είναι τα πλέον χρησιμοποιούμενα ΜΣΚ σε προκλινικές και κλινικές μελέτες. Το πολλαπλασιαστικό δυναμικό τους, όμοια με αυτό των ΕΣΚ-ΜΣΚ, βρέθηκε να είναι αρκετά υψηλότερο, αφού μπόρεσαν και έδωσαν έναν μεγαλύτερο αριθμό διπλασιασμών του πληθυσμού τους, ενώ διατηρήθηκαν για πολύ περισσότερες ανακαλλιέργειες. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι απέδωσαν πολύ μεγαλύτερες ποσότητες κυττάρων, μέχρι να σταματήσουν να αυξάνονται. Η παράμετρος fold expansion ήταν 5×10^5 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τα ΜΟ-ΜΣΚ. Το αυξημένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ είναι σε συμφωνία με άλλες μελέτες που έχουν δημοσιευθεί πρόσφατα. Κάποιες έρευνες έδειξαν ότι τα ΜΣΚ που προέρχονται από τα πολυδύναμα κύτταρα ήταν ικανά να φτάσουν το διπλάσιο αριθμό διπλασιασμών του πληθυσμού τους και 3×10^4 μεγαλύτερο fold expansion σε σχέση με τα ΜΟ-ΜΣΚ (Kimbrel et al., 2014; Wei et al., 2012). Άλλες ομάδες έχουν δείξει επίσης ότι τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ είχαν γρηγορότερη αύξηση σε σχέση με τα ΜΟ-ΜΣΚ, παρουσιάζοντας μειωμένο χρόνο διπλασιασμού (PDT) και περισσότερους διπλασιασμούς σε μικρότερο χρονικό διάστημα (Moslem et al., 2015; Sheyn et al., 2016; Zhao et al., 2015). Μάλιστα, οι Lian et al. κατάφεραν να πολλαπλασιάσουν τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ, έως και 40 ανακαλλιέργειες (120 διπλασιασμούς του κυτταρικού πληθυσμού), χωρίς να

παρατηρηθούν χρωμοσωμικές ανωμαλίες και έδειξαν ότι τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ μετά από 36 ανακαλλιέργειες είχαν 10 φορές μεγαλύτερη δράση του ενζύμου τελομεράση, σε σχέση με τα ΜΟ-ΜΣΚ στην 6^η ανακαλλιέργεια (Lian et al., 2010). Η παρούσα μελέτη υποστηρίζει περαιτέρω το εύρημα ότι από τα πολυδύναμα κύτταρα προκύπτουν ΜΣΚ με μεγαλύτερο πολλαπλασιαστικό δυναμικό από αυτό των ΜΟ-ΜΣΚ και ότι παράγονται πολύ μεγάλες ποσότητες κυττάρων με προοπτική χρήσης σε κυτταρική θεραπεία. Για έναν μέσο ασθενή με GnHD βάρους 70 κιλών η δόση των θεραπευτικών ΜΣΚ είναι τουλάχιστον 2×10^6 ΜΣΚ / Kg σωματικού βάρους, δηλαδή συνολικά $1,4 \times 10^8$ κύτταρα. Η ποσότητα αυτή είναι εφικτό να παραχθεί από τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ μετά από 4 ανακαλλιέργειες. Ο συνολικός χρόνος ξεκινώντας από μία φλάσκα 75cm^2 αδιαφοροποίητων ΕΠΣΚ είναι περίπου 40 ημέρες. Τα ΕΠΣΚ όμως λόγω της ικανότητας τους να αυξάνονται απεριόριστα, αλλά και να διαφοροποιούνται προς ΜΣΚ, καθιστούν δυνατή την συνεχή παραγωγή ΕΠΣΚ-ΜΣΚ στο εργαστήριο, τα οποία μέσα σε μόλις 4-5 ανακαλλιέργειες, μπορούν να αποθηκευτούν σε μεγάλες ποσότητες στους -160°C , ως έτοιμες προς χρήση δόσεις, για μεγάλα χρονικά διαστήματα και να αποψυχθούν όταν είναι απαραίτητο, αποδίδοντας επαρκή αριθμό κυττάρων για χορήγηση σε οποιονδήποτε ασθενή. Ένα πολύ ενδιαφέρον πρόσφατο εύρημα είναι ότι ο επαναπρογραμματισμός ΜΣΚ σε ΕΠΣΚ διαγράφει πρότυπα μεθυλίωσης που εντοπίζονται στα αρχικά ΜΣΚ και έχουν να κάνουν με τη γήρανση του οργανισμού και οι αλλαγές αυτές διατηρούνται και στα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ. Έτσι, τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ παρουσιάζονται πιο νεαρά από τα σωματικά ΜΣΚ, γεγονός που τα καθιστά πιθανώς ιδανικότερα σε κυτταρικές θεραπείες (Frobel et al., 2014).

Επιπρόσθετα, δοκιμάστηκε η καλλιέργεια των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ σε υλικό το οποίο είναι συμβατό με τις συνθήκες GMP, το hPL. Το hPL είναι θρεπτικό υλικό που προέρχεται από ληγμένες μονάδες αιμοπεταλίων και αποτελείται από πλάσμα δότη ή πολλαπλών

δοτών (pooled donors), με αιμοπετάλια που έχουν υποστεί μηχανική θραύση και είναι πλούσιο σε αυξητικούς παράγοντες, όπως οι FGF-2, PDGF-AB, IGF-1, EGF, TGF-β, VEGF (Becherucci et al., 2018; Hemeda et al., 2014; Rubio-Azpeitia and Andia, 2014). Μελέτες δείχνουν ότι προσδίδει αυξημένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό στα ΜΣΚ σε σχέση με το FBS, ενώ δεν επηρεάζει τις ιδιότητές τους (Becherucci et al., 2018; Fernandez-Rebollo et al., 2017). Το hPL αποτελεί ασφαλές υποκατάστατο του FBS που δεν ενέχει κίνδυνο μετάδοσης ξеноπαθογόνων ή ανοσολογικής αντίδρασης από ξενοαντιγόνα. Κατά την καλλιέργεια των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ στο hPL, αυτά διατήρησαν το φαινότυπο και τις ιδιότητές τους. Συμπερασματικά, είναι εφικτή η καλλιέργεια των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ σε υλικό που δεν περιέχει ζωικής προέλευσης συστατικά και είναι συμβατό με τις συνθήκες GMP.

Όσον αφορά στην ικανότητα διαφοροποίησης των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι είναι ικανά να διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες και λιποκύτταρα *in vitro*. Η ικανότητα χονδρογένεσης διερευνήθηκε πιο διεξοδικά, προκειμένου να αξιολογήσουμε τη δυνατότητα δημιουργίας υαλώδους χόνδρου από τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ, με ποιότητα ανάλογη ή καλύτερη του χόνδρου που προέρχεται από τη διαφοροποίηση των ΜΟ-ΜΣΚ, τα οποία διερευνώνται εδώ και χρόνια σε κλινικές μελέτες για τη θεραπεία των εκφυλιστικών παθήσεων των αρθρώσεων. Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ καλλιεργήθηκαν παράλληλα με τα ΜΟ-ΜΣΚ, αλλά και τα ΕΣΚ-ΜΣΚ σε τυπικό υλικό χονδρογένεσης, το οποίο έχει εφαρμοστεί ευρέως στα ΜΟ-ΜΣΚ. Η ιστολογική εικόνα έδειξε ότι τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ, όμοια με τα ΕΣΚ-ΜΣΚ έδωσαν ιστό που δεν είχε τη μορφολογία του τυπικού υαλώδους χόνδρου, σε αντίθεση με το χόνδρο από τα ΜΟ-ΜΣΚ και είχε χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεογλυκάνες. Ο χόνδρος που προέκυψε από τα ΜΣΚ τόσο των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ όσο και των ΕΣΚ-ΜΣΚ αντιστοιχεί στο ροζ χόνδρο που παρατηρείται σε κάποιες νεοπλασίες του χόνδρου, όπως το

χονδροβλάστωμα. Η έκφραση της πρωτεΐνης Sox9 ήταν έντονη στο μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων στα δείγματα από ΜΟ-ΜΣΚ, ενώ ήταν πολύ χαμηλή στους χόνδρους των ΕΣΚ-ΜΣΚ και απύσα σε εκείνους των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ. Ο μεταγραφικός παράγοντας Sox9 εκφράζεται από τα αρχικά στάδια της χονδρογένεσης και έχει κεντρικό ρόλο στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, αλλά και στη διατήρησή τους, ρυθμίζοντας τη μεταγραφή πληθώρας άλλων γονιδίων, όπως είναι το κολλαγόνο ΙΙ, η αγγρεκάνη (aggrecan), οι μεταγραφικοί παράγοντες Sox5 και Sox6, ενώ εμποδίζει την έκφραση της μεταλλοπρωτεΐνάσης MMP-13 που αποικοδομεί το χόνδρο (Szychlinska et al., 2017). Το κολλαγόνο ΙΙ αποτελεί το βασικό δομικό συστατικό της εξωκυττάριας ουσίας του χόνδρου και συντίθεται και εκκρίνεται στα χονδροκύτταρα. Η παρουσία του σε αφθονία δημιουργεί πλέγμα που προσδίδει σταθερότητα και αντοχή έναντι στις μηχανικές καταπονήσεις των αρθρώσεων. Παρότι η RT-PCR έδειξε έκφραση του γονιδίου *COL2A1* στα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ, σε πρωτεϊνικό επίπεδο η ανοσοϊστοχημεία έδειξε πλήρη απουσία έκφρασης, σε αντίθεση με το χόνδρο από ΜΟ-ΜΣΚ όπου υπήρχε έντονη έκφραση σε όλη την έκταση του χόνδρου. Οι διαφορές στη μορφολογία και στην έκφραση μείζονων πρωτεϊνών του χόνδρου μεταξύ των ΜΣΚ από ΠΣΚ και ΜΟ δείχνουν ότι η χονδρογένεση των ΜΣΚ από ΠΣΚ ήταν μη αποδοτική *in vitro*, κάτω από τις ίδιες συνθήκες στις οποίες τα ΜΟ-ΜΣΚ διαφοροποιήθηκαν πλήρως.

Έχει προταθεί ότι τα ΜΣΚ από ΠΣΚ θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν τα ΜΣΚ των ενήλικων ιστών όπως είναι τα ΜΟ-ΜΣΚ στην αναγέννηση των ιστών. Αυτή τη στιγμή, τα ΜΟ-ΜΣΚ χρησιμοποιούνται σε πολλές προκλινικές και κλινικές μελέτες παγκοσμίως, συμπεριλαμβανομένης της θεραπείας για την οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ). Η κυτταρική θεραπεία της ΟΑ εδώ και πολλά χρόνια περιορίζεται στην Αυτόλογη Εμφύτευση Χονδροκυττάρων (Autologous Chondrocyte Implantation, ACI), η οποία

έχει κάποιους περιορισμούς, όπως είναι η αποδιαφοροποίηση των χονδροκυττάρων κατά την έκπτυξή τους στην καλλιέργεια, η νοσηρότητα στα σημεία της συλλογής και η ανεπαρκής εγκατάσταση των κυττάρων (Burke et al., 2016). Κλινικές μελέτες με χρήση ΜΟ-ΜΣΚ δείχνουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Οι Centeno et al. διεξήγαγαν μελέτη με 339 ασθενείς, 69% των οποίων χρειάζονταν ολική αντικατάσταση της άρθρωσης. Μετά από τοπική έγχυση αυτόλογων ΜΟ-ΜΣΚ μόνο το 7% αυτών των ασθενών εξακολούθησαν να χρειάζονται επέμβαση, ενώ πάνω από το 60% αυτών ανέφερε σημαντική ανακούφιση από τον πόνο (Centeno et al., 2011). Οι Vega et al. ανέφεραν ότι 12 μήνες μετά από τοπική έγχυση αλλογενών ΜΟ-ΜΣΚ, σε 15 ασθενείς, όλοι εμφάνισαν βελτίωση στον πόνο και τη λειτουργικότητα στις αρθρώσεις (Vega et al., 2015). Σε μια άλλη μελέτη με 6 ασθενείς επίσης διαπιστώθηκε βελτίωση του πόνου, αλλά και αύξηση της πυκνότητας του χόνδρου, μετά από χορήγηση αυτόλογων ΜΟ-ΜΣΚ (Emadedin et al., 2012). Επομένως, η χρήση των ΜΟ-ΜΣΚ για την αναγέννηση του χόνδρου φαίνεται σκόπιμη, αν και βρίσκεται ακόμα υπό διερεύνηση. Από την άλλη πλευρά, διάφορες μελέτες έχουν επικεντρωθεί πρόσφατα στην παραγωγή χονδροκυττάρων απευθείας από τα ΕΠΣΚ, με διάφορες μεθόδους, χωρίς να προηγηθεί η δημιουργία ΕΠΣΚ-ΜΣΚ. Αυτές οι προσπάθειες έχουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα, δείχνοντας ότι τα χονδροκύτταρα αυτά επιβιώνουν και ενσωματώνονται σε περιοχές ελλειμάτων του χόνδρου σε ζωικά μοντέλα (Kawata et al., 2019; Nejadnik et al., 2015; Yamashita et al., 2015; Zhu et al., 2016).

Διάφορες μελέτες έχουν αναφέρει ότι τα ΜΣΚ από πολυδύναμα κύτταρα μπορούν να δημιουργήσουν χόνδρο, καθώς παρατηρείται σε επίπεδο mRNA η έκφραση δεικτών του χόνδρου και η θετική χρώση πρωτεογλυκανών (Kimbrel et al., 2014; Lian et al., 2007; Wei et al., 2012). Κάποιες μελέτες έδειξαν ότι οι σειρές ΕΠΣΚ-ΜΣΚ ήταν

ικανές να διαφοροποιηθούν σε οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα, όπως και τα ΜΟ-ΜΣΚ, αλλά δεν μπόρεσαν να διαφοροποιηθούν σε λιποκύτταρα (Frobel et al., 2014; Kang et al., 2015). Άλλες πρόσφατες δημοσιεύσεις επίσης αναφέρουν την επιτυχή δημιουργία χόνδρου από τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ (Moslem et al., 2015; Nam et al., 2017; Zhao et al., 2015). Τα δικά μας ευρήματα είναι σε συμφωνία με δύο άλλες πρόσφατες μελέτες, οι οποίες επίσης συγκρίνουν την ικανότητα διαφοροποίησης των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ με αυτήν των ΜΟ-ΜΣΚ και αναφέρουν ότι τα πρώτα ήταν μη αποτελεσματικά στην χονδρογένεση, κάτω από τα καθιερωμένα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται για τα ΜΟ-ΜΣΚ (Diederichs and Tuan, 2014; Xu et al., 2019). Στην παρούσα μελέτη, η ανεπαρκής χονδρογένεση παρατηρείται εκτός από τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ και στα ΕΣΚ-ΜΣΚ, τα οποία προέρχονται από «πραγματικά» ΕΣΚ που έχουν μελετηθεί εδώ και πολλά χρόνια.

Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ, όπως φαίνεται από την παρούσα μελέτη, εμφανίζουν μεγάλες ομοιότητες με τα ΜΟ-ΜΣΚ. Παρόλα αυτά, το εύρημα της μη αποδοτικής διαφοροποίησής τους σε χόνδρο χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Είναι γεγονός ότι υπάρχουν διαφορές στην ικανότητα διαφοροποίησης των ΜΣΚ που προέρχονται από διαφορετικές πηγές. Τα ΜΟ-ΜΣΚ παρουσιάζουν υψηλότερη ικανότητα χονδρογένεσης από άλλες κατηγορίες ΜΣΚ, όπως αυτά του λιπώδους και του μυϊκού ιστού (Giai Via et al., 2012; Huang et al., 2005; Liu et al., 2007; Sakaguchi et al., 2005). Έτσι, κάθε πηγή προέλευσης ΜΣΚ διαθέτει έναν ετερογενή πληθυσμό ΜΣΚ με διακριτά χαρακτηριστικά, που σχετίζονται πιθανώς με το μικροπεριβάλλον τους και τα σινιάλα κάτω από τα οποία δημιουργήθηκαν.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η ικανότητα διαφοροποίησης των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ μπορεί να εξαρτάται από τα αρχικά σωματικά κύτταρα από τα οποία προήλθαν τα ΕΠΣΚ (Hynes et al., 2014), γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με την επιγενετική μνήμη που

διατηρούν τα ΕΠΣΚ. Στην παρούσα μελέτη όμως, οι σειρές των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ, προέρχονται από ΕΠΣΚ που δημιουργήθηκαν με επαναπρογραμματισμό ΜΟ-ΜΣΚ, τα οποία όπως αναφέρθηκε διαθέτουν έντονο δυναμικό χονδρογένεσης. Επίσης, όμοια αποτελέσματα με τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ είχε και η σειρά ΕΣΚ-ΜΣΚ που προήλθε από εμβρυονικά κύτταρα βλαστοκύστης και δεν έχουν σαν πηγή προέλευσης οποιαδήποτε ενήλικα σωματικά κύτταρα. Μια μελέτη έδειξε ότι η ικανότητα διαφοροποίησης των ΕΠΣΚ σε χονδροκύτταρα διαφέρει μεταξύ διαφορετικών κλώνων του ίδιου ατόμου, αλλά όχι μεταξύ διαφορετικών ιστών προέλευσης (Nasu et al., 2013).

Το γεγονός ότι στην παρούσα μελέτη η χονδρογένεση των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ ήταν μη αποδοτική δε δείχνει απαραίτητα ενδογενή αδυναμία διαφοροποίησης των ΕΠΣΚ. Τα πρωτόκολλα διαφοροποίησης των ΕΠΣΚ μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στις ιδιότητες των παραχθέντων ΕΠΣΚ-ΜΣΚ (Diederichs and Tuan, 2014; Xu et al., 2019). Μια πρόσφατη μελέτη από την ομάδα μας έδειξε ότι τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ που δημιουργήθηκαν στην παρούσα διατριβή είχαν χαμηλότερη αντιφλεγμονώδη δράση από τα ΜΟ-ΜΣΚ και τα ΜΣΚ του ομφαλίου λώρου σε ζωικό μοντέλο νεκρωτικής εντεροκολίτιδας (Kagia et al., 2019). Η βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων είναι αναγκαία ώστε να παράγονται ΕΠΣΚ-ΜΣΚ με όμοιες ιδιότητες με αυτές των ΜΟ-ΜΣΚ. Ένα ενδιαφέρον ερώτημα είναι σε τι βαθμό μοιάζουν οι πληθυσμοί των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ με τα ενήλικα ΜΣΚ και κατά πόσο πρόκειται για πληθυσμούς που έχουν διαφορετικές ιδιότητες και διαφορετικά επιγενετικά και μεταγραφικά προφίλ. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ έχουν παρόμοιο προφίλ έκφρασης με τα ΜΟ-ΜΣΚ και εκφράζουν τους αντίστοιχους μεσοδερμικούς δείκτες, ενώ έχουν ελαττώσει την έκφραση των δεικτών πολυδυναμίας σε σχέση με τα ΕΠΣΚ. Παρουσίαζαν, όμως διαφορετική έκφραση κάποιων γονιδίων, που σχετίζονταν με τη

μεταγραφική ρύθμιση, την κυτταρική προσκόλληση, αλλά και την ανοσοαπόκριση (Froebel et al., 2014). Πολύ πρόσφατα, οι Xu et al. πραγματοποίησαν ανάλυση της έκφρασης γονιδίων σε ΕΠΣΚ-ΜΣΚ τα οποία είχαν προκύψει με παρόμοιο πρωτόκολλο με αυτό της παρούσας διατριβής και σε ΜΟ-ΜΣΚ. Η ανάλυση έδειξε σημαντικές διαφορές, όπως η έκφραση $KDR^{high}MSX2^{high}PDGFRa^{low}$ στα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ, η οποία δίνει περισσότερο χαρακτηριστικά αγγειακών προγονικών κυττάρων (vascular progenitor cells, VPCs) παρά ΜΣΚ, τα οποία είναι $KDR^{low}MSX2^{low}PDGFRa^{high}$ (Xu et al., 2019). Τα VPCs διαθέτουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται, όπως και τα ΜΣΚ, σε οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα, αλλά κάτω από ένα διαφορετικό μικροπεριβάλλον, από αυτό που χρειάζονται τα ΜΣΚ. Αν πράγματι αυτός ο πληθυσμός είναι πιο κοντά στα VPCs, τότε θα μπορούσε το γεγονός αυτό να εξηγήσει την ανεπάρκεια της διαφοροποίησης σε χόνδρο κάτω από συνθήκες που εφαρμόζονται στα ΜΣΚ. Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ ως διαφορετικός πληθυσμός με διακριτά χαρακτηριστικά από τα ΜΟ-ΜΣΚ ενδεχομένως να έχουν διαφορετικές *in vitro* απαιτήσεις για να διαφοροποιηθούν σε χόνδρο. Ήδη γίνονται προσπάθειες για την βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων διαφοροποίησης σε χόνδρο ώστε να είναι πιο αποδοτικά (Guzzo et al., 2013).

Από την άλλη πλευρά, τα τελευταία χρόνια, η διερεύνηση των αναγεννητικών και ανοσορυθμιστικών δυνατοτήτων των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ εκτοξεύθηκε ραγδαία με πληθώρα προκλινικών μοντέλων. Μετά από τοπική χορήγηση των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ σε ποντίκια με κρανιακά οστικά ελλείμματα, διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση της οστικής πυκνότητας, ενώ φαίνεται να συνεισφέρουν και τα ίδια τα χορηγηθέντα κύτταρα στο νέο ιστό που σχηματίστηκε (Villa-Diaz et al., 2012; Xie et al., 2016). Σε μοντέλο με οστικά ελλείμματα των άκρων, οι πληθυσμοί ΕΠΣΚ-ΜΣΚ οδήγησαν σε μεγαλύτερη ανάπλαση του οστού σε σχέση με τα ΜΣΚ του ΜΟ (Sheyn et al., 2016). Η ανάπλαση

των οστικών ελλειμμάτων έχει παρατηρηθεί πρόσφατα και σε χοίρους σε παρόμοιο βαθμό με τα ΜΟ-ΜΣΚ (Jungbluth et al., 2019). Επιπλέον, μελέτες δείχνουν ότι έχουν ανοσοτροποποιητική δράση, αφού καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων *in vitro*, ενώ επάγουν την απόκριση των Τ-regs σε MLRs (Moslem et al., 2015). *In vivo*, σε ξενομεταμοσχευμένα ποντίκια, καταστέλλουν την απόκριση των Th1, Th2 κυττάρων και αυξάνουν την απόκριση των Th17 και των Τ-regs, μέσω έκκρισης IL-10 MCP-1, TGF- β (Li et al., 2017). Σε περιφερικά μονοκύτταρα από ασθενείς με αλλεργική ρινίτιδα τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ έχουν όμοια ανοσοκατασταλτική δράση με τα ΜΟ-ΜΣΚ, η οποία σχετίζεται με την έκκριση PGE2 και με κυτταρικές συνδέσεις (Fu et al., 2012). Σε μοντέλα φλεγμονώδους νόσου του εντέρου τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ φαίνεται να προάγουν τον πολλαπλασιασμό των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων βοηθώντας στην επούλωση της βλεννογόνου και η δράση τους σχετίζεται με την έκκριση TSG-6 (Soontararak et al., 2018; Yang et al., 2019). Επίσης, τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ φαίνεται να έχουν ευεργετική δράση στην επούλωση δερματικών τραυμάτων και στην οστεοαρθρίτιδα σε ποντίκια, ενώ στην οξεία ενδοκρανιακή αιμορραγία μειώνουν τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες και βοηθούν στη διατήρηση των νευρώνων (Chen et al., 2019; Eto et al., 2018). Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ εξετάζονται επίσης σε ζωικά μοντέλα για τη θεραπεία της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (Sheu et al., 2020) με ευεργετικά αποτελέσματα. Πρόσφατες μελέτες διερευνούν τη δράση των εξωκυτταρικών μικροκυστιδίων (εξωσώματα) τα οποία εκκρίνουν τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ και δείχνουν ότι σε ζωικά μοντέλα βελτιώνουν τη νεοαγγειογένεση μετά από ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο, ισχαιμίες των άκρων και στην οστεονέκρωση, ενώ επάγουν την αναγέννηση του δέρματος μέσω πολλαπλασιασμού και έκκρισης εξωκυτταρικής ουσίας των κερατινοκυττάρων και των δερματικών ινοβλαστών (Hu et al., 2015; Kim et al., 2018; Liu et al., 2017; Xia et al.,

2020). Σήμερα, οι πιο σύγχρονες τεχνολογίες της μηχανικής ιστών (tissue engineering), έχουν αρχίσει να δοκιμάζουν τη χρήση βιοεκτυπωτών τρισδιάστατης εκτύπωσης (Bio 3D-printers), καθώς και κατάλληλων εκμαγείων για την κατασκευή πιο περίπλοκων δομών. Έτσι, σε προκλινική μελέτη κατασκεύασαν σωληνοειδείς αγωγούς αποτελούμενους από ΕΠΣΚ-ΜΣΚ που δοκιμάζονται στην αναπλήρωση ασυνεχειών σε νεύρα και παρατηρήθηκε η συμβολή τους στην αναγέννησή τους, μέσω έκκρισης νευροτροφικών και αγγειογενετικών παραγόντων (Mitsuzawa et al., 2020). Τέλος, η πρώτη κλινική μελέτη φάσης I με χρήση ΕΠΣΚ-ΜΣΚ ολοκληρώθηκε πρόσφατα και αφορά τη θεραπεία του GnHD δείχνοντας ότι η χορήγηση ήταν ασφαλής και ανεκτή από τους ασθενείς, ενώ παρατηρήθηκε συνολική ανταπόκριση (OR) και συνολική επιβίωση (OS) 86.7% μέχρι την ημέρα 100, ανοίγοντας το δρόμο για περαιτέρω κλινικές μελέτες τόσο στο GnHD, όσο και σε άλλες φλεγμονώδεις παθήσεις (Bloor et al., 2020).

Μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να επικεντρωθούν στη βελτίωση των πρωτοκόλλων διαφοροποίησης των ΕΠΣΚ και στις επιγενετικές διαφορές μεταξύ των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ και των ΜΟ-ΜΣΚ, ώστε να αποσαφηνιστεί σε τι βαθμό διαφέρουν οι δύο πληθυσμοί. Επιπλέον, θα πρέπει να γίνουν εκτεταμένες *in vivo* μελέτες σε μεγαλύτερα ζώα, καθώς είναι ο καταλληλότερος τρόπος να αξιολογηθεί η λειτουργικότητα των ΕΠΣΚ-ΜΣΚ και η θεραπευτική τους δράση σε διάφορες φλεγμονώδεις ή εκφυλιστικές παθήσεις.

○ Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής συμπεριλήφθηκε στις παρακάτω δημοσιεύσεις:

- **Proliferative and chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells from pluripotent and bone marrow cells.**

Sfougataki I, Varela I, Stefanaki K, Karagiannidou A, Roubelakis MG, Kalodimou V, Papathanasiou I, Traeger-Synodinos J, Kitsiou-Tzeli S, Kanavakis E, Kitra V, Tsezou A, Tzetis M, Goussetis E. *Histol Histopathol*. 2020 Sep 22:18259. doi: 10.14670/HH-18-259. Epub ahead of print. PMID: 32959885.

- **Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cells Derived From Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, and Pluripotent Stem Cells in a Mouse Model of Chemically Induced Inflammatory Bowel Disease.**

Kagia A, Tzetis M, Kanavakis E, Perrea D, Sfougataki I, Mertzianian A, Varela I, Dimopoulou A, Karagiannidou A, Goussetis E. *Inflammation*. 2019 Oct;42(5):1730-1740. doi: 10.1007/s10753-019-01033-x.

- **Reprogramming of bone marrow derived mesenchymal stromal cells to human induced pluripotent stem cells from pediatric patients with hematological diseases using a commercial mRNA kit.** Irene Sfougataki, Ioannis Grafakos, Ioanna Varela, Anastasios Mitrakos, Angeliki Karagiannidou, Marianna Tzannoudaki, Myrto Poulou, Anny Mertzianian, Maria Roubelakis G., Kalliope Stefanaki, Joanne Traeger-Synodinos, Emmanuel Kanavakis, Vasiliki Kitra, Maria Tzetis, Evgenios Goussetis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, Volume 76, 2019, Pages 32-39, ISSN 1079-9796, <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2019.01.003>.

- Μέρος της συγκεκριμένης εργασίας βραβεύτηκε με το βραβείο «Φαίδων Φέσσας» στο **26^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 12-14 Νοεμβρίου 2015, Αθήνα**, με τίτλο «Κλινικής κλίμακας παραγωγή μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα».

5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μεσεγχυματικά στελεχειαία κύτταρα (ΜΣΚ) έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών αφού, λόγω των ανοσορυθμιστικών και αναγεννητικών τους ιδιοτήτων, εξετάζονται ως θεραπευτικό εργαλείο διαφόρων νοσημάτων. Η πιο συχνή πηγή παραγωγής ΜΣΚ είναι ο μυελός των οστών, από τον οποίο, όμως, μπορεί να παραχθεί ένας περιορισμένος αριθμός ΜΣΚ, που πολλές φορές δεν επαρκεί για κλινική χρήση. Μια εναλλακτική πηγή ΜΣΚ που παρακάμπτει τα προβλήματα χρήσης ΜΣΚ από ενήλικους ιστούς είναι τα επαγόμενα πολυδύναμα στελεχειαία κύτταρα (ΕΠΣΚ). Λόγω της πολυδυναμίας τους, τα ΕΠΣΚ μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μεγάλης κλίμακας παραγωγή διαφοροποιημένων κυττάρων με σκοπό τη χρησιμοποίησή τους στην αναγεννητική ιατρική. Στην παρούσα μελέτη επιδιώξαμε να αναπτύξουμε κλινικής κλίμακας πρωτόκολλο παραγωγής ΜΣΚ από ΕΠΣΚ σειρές που δημιουργήθηκαν με ασφαλή μέθοδο επαναπρογραμματισμού χωρίς δεν ενσωμάτωση ξένου γενετικού υλικού και στη συνέχεια να διερευνήσουμε τα χαρακτηριστικά των παραχθέντων ΜΣΚ.

Δύο σειρές ΕΠΣΚ που δε φέρουν ξένο DNA, πολλαπλασιάστηκαν χωρίς υποστηρικτικά κύτταρα σε κατάλληλες καλλιέργειες, ώστε να προκύψουν επαρκείς αριθμοί κυττάρων. Ακολούθως, οι σειρές ΕΠΣΚ καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία χαμηλής προσκόλλησης απουσία του παράγοντα FGF-2, προς σχηματισμό εμβρυικών σωματιδίων, τα οποία στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε ζελατίνη και υλικό διαφοροποίησης σε ΜΣΚ. Τα παραχθέντα ΜΣΚ (ΕΠΣΚ-ΜΣΚ) ελέγχθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την έκφραση των τυπικών επιφανειακών αντιγόνων των ΜΣΚ. Κάτω από κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας ελέγχθηκε η διαφοροποίησή τους σε χονδροκύτταρα, οστεοκύτταρα και λιποκύτταρα. Επιπλέον, η ικανότητα χονδρογένεσής τους συγκρίθηκε με αυτήν των ΜΣΚ του μυελού των οστών (ΜΟ-

ΜΣΚ) ιστολογικά και ανοσοϊστοχημικά. Το πολλαπλασιαστικό δυναμικό τους συγκρίθηκε με αυτό των ΜΟ-ΜΣΚ, μέσω παράλληλων, συνεχών ανακαλλιέργειών μέχρι να επέλθει το κυτταρικό γήρας. Η πιθανή *in vivo* ογκογενετική τους ικανότητα εξετάστηκε με υποδόρια χορήγησή τους σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια και ελέγχθηκε η έκφραση σε αυτά, των δεικτών πολυδυναμίας Nanog, Oct3/4. Η γενετική τους σταθερότητα ελέγχθηκε με μικροσυστοιχίες συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού (aCGH).

Τα ΕΠΣΚ διαφοροποιήθηκαν με μεγάλη αποδοτικότητα σε ΜΣΚ, μετά από καλλιέργεια 3 εβδομάδων. Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ μοιάζουν με τα ΜΟ-ΜΣΚ και εκφράζουν τους επιφανειακούς δείκτες CD105, CD73, CD44, CD90 ενώ απουσιάζουν από αυτά οι δείκτες CD34, CD45. *In vivo* δε δημιουργούν όγκους σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια έως και 10 εβδομάδες μετά την έγχυση, ενώ έχουν ελαττώσει την έκφραση των δεικτών πολυδυναμίας. Η διαφοροποίηση δεν προκάλεσε χρωμοσωμικές αλλαγές στα κύτταρα και αυτά διατηρούν το χρωμοσωμικό προφίλ των ΕΠΣΚ από όπου προήλθαν, συμπεριλαμβανομένων 2 ελλειμμάτων μεγέθους 3Mb, τα οποία προέκυψαν κατά τις συνεχείς ανακαλλιέργειες των ΕΠΣΚ, αλλά δε σχετίζονται με ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Παρουσιάζουν πολλαπλασιαστικό δυναμικό πολύ μεγαλύτερο από αυτό των ΜΟ-ΜΣΚ, με συνολικούς αριθμούς διπλασιασμών 35.7 και 28.3, έναντι 16.9 και 17.8 των ΜΟ-ΜΣΚ, ενώ μπορούν να αποδώσουν τον αρχικό αριθμό τους έως και 5.88×10^{10} φορές έναντι 2.3×10^5 στα ΜΟ-ΜΣΚ. Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ *in vitro* διαφοροποιούνται σε χονδροκύτταρα, οστεοκύτταρα και λιποκύτταρα. Παρόλα αυτά, ο χόνδρος που σχηματίστηκε από τη διαφοροποίησή τους, ιστολογικά δεν είχε την τυπική οργάνωση και περιεκτικότητα σε πρωτεογλυκάνες του υαλώδους χόνδρου, ενώ παρουσίαζε ελάχιστη έκφραση των δεικτών Sox9, Collagen II, σε αντίθεση με τα ΜΟ-ΜΣΚ.

Για πρώτη φορά στην Ελλάδα δημιουργούνται σειρές ΜΣΚ από ΕΠΣΚ που δε φέρουν διαγονίδια, κάτω από ασφαλή και αποδοτικά πρωτόκολλα και διερευνώνται οι ιδιότητές τους σε σχέση με τα ΜΟ-ΜΣΚ. Τα ΕΠΣΚ μπορούν να αποτελέσουν ασφαλή πηγή παραγωγής ΜΣΚ, με φύλαξη σε κυτταρική τράπεζα και συνεχή διαφοροποίηση, ενώ μελλοντικά μπορούν να αξιοποιηθούν σε πρωτόκολλα κυτταρικής θεραπείας. Τα ΕΠΣΚ-ΜΣΚ παρουσιάζουν μεγάλες ομοιότητες με τα ΜΟ-ΜΣΚ, αλλά χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης, κυρίως σε προκλινικά μοντέλα ποικίλων ασθενειών, ώστε να αποσαφηνιστεί η θεραπευτική τους δράση.

6. ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) have gained much interest during the last years, due to their immunomodulatory and regenerative properties and they are being examined as a therapeutic tool for a wide variety of diseases. The most widely used MSC-source is the bone marrow, from which, though, only a limited amount of MSCs can be produced that is usually not sufficient for clinical use. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) can represent an alternative source of MSCs that would overcome the limitations of the adult sources. Due to their property of pluripotency they can be used for large scale production of differentiated cells with potential to be used in regenerative medicine. In the current study, we aimed at developing a clinical scale protocol for the production of MSCs from iPSC lines that had been generated with integration-free method of reprogramming and at examining the properties of the produced MSCs.

Two integration-free iPSC lines were expanded in *in vitro* cultures without feeder cells in order to derive sufficient numbers of cells. The lines were then cultured in low attachment plates, without FGF-2 for the formation of embryoid bodies and afterwards they were cultured on gelatin with appropriate MSC differentiation medium. The derived MSCs (iPSC-MSCs) were tested with flow cytometry for the expression of MSC markers. Their multilineage differentiation potential was examined under chondrogenic, osteogenic and adipogenic cultures. Their chondrogenic capacity was further examined in comparison with MSCs from bone marrow (BM-MSCs) histologically and immunohistochemically. Their proliferative capacity was examined in comparison with BM-MSCs under parallel cultures till senescence. They were also tested for *in vivo* tumor formation after administration in immunoincompetent mice and for downregulation of pluripotency markers Oct3/4

and Nanog. Their genomic stability was tested with array comparative genomic hybridization (aCGH).

iPSCs were efficiently differentiated in MSCs, within a time interval of 3 weeks. iPSC-MSCs are similar to BM-MSCs and express the surface antigens CD105, CD73, CD44, CD90 whereas they are negative for CD34 and CD45. *In vivo*, they do not induce oncogenesis in immunoincompetent mice 10 weeks after administration. They have downregulated the expression of pluripotency markers. Differentiation did not induce chromosomal aberrations and iPSC-MSCs had similar chromosomal pattern as their parental iPSCs, including 2 deletions of 3Mb that had been generated during their expansion. The deletions were not related to aberrant proliferation of cells. The proliferative capacity of iPSC-MSCs was much higher than that of BM-MSCs with cumulative population doubling being 35.7 and 28.3 versus 16.9 and 17.8 in BM-MSCs. iPSC-MSCs had up to 5.88×10^{10} fold expansion, while the respective number in BM-MSCs was 2.3×10^5 . iPSC-MSCs exhibited multilineage differentiation potential. However, the derived chondrogenic tissues did not have the typical hyaline cartilage morphology and proteoglycan composition and displayed poor expression of Sox9 and Collagen II, in contrast to BM-MSCs.

For the first time in Greece, MSC lines are derived from integration-free iPSCs under safe and efficient protocols and their properties are examined in comparison with BM-MSCs. iPSCs can be a safe source of MSCs and can be stored in iPSC-bank allowing consecutive differentiation with potential to be used clinically in the future in cell therapy. iPSC-MSCs have great similarities with BM-MSCs, but their properties need to be further investigated in preclinical models of various diseases for the elucidation of their therapeutic effects.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., et al. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1276–1284.
- Abyzov, A., Mariani, J., Palejev, D., Zhang, Y., Haney, M.S., Tomasini, L., Ferrandino, A.F., Rosenberg Belmaker, L.A., Szekely, A., Wilson, M., et al. (2012). Somatic copy number mosaicism in human skin revealed by induced pluripotent stem cells. *Nature* *492*, 438–442.
- Aggarwal, S., and Pittenger, M.F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* *105*, 1815–1822.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* *404*, 193–197.
- Akiyama, K., Chen, C., Wang, D., Xu, X., Qu, C., Yamaza, T., Cai, T., Chen, W., Sun, L., and Shi, S. (2012). Mesenchymal Stem Cell-Induced Immunoregulation Involves Fas Ligand/Fas-Mediated T Cell Apoptosis. *Cell Stem Cell* *10*, 544–555.
- Al-Khaldi, A., Eliopoulos, N., Martineau, D., Lejeune, L., Lachapelle, K., and Galipeau, J. (2003). Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response in vivo. *Gene Ther.* *10*, 621–629.
- Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells. *Science* *321*, 699–702.
- Arduini, B.L., and Brivanlou, A.H. (2012). Modulation of FOXD3 Activity in Human Embryonic Stem Cells Directs Pluripotency and Paraxial Mesoderm Fates. *STEM CELLS* *30*, 2188–2198.
- Arnold, A., Naaldijk, Y.M., Fabian, C., Wirth, H., Binder, H., Nikkha, G., Armstrong, L., and Stolzing, A. (2012). Reprogramming of Human Huntington Fibroblasts Using mRNA.
- Augello, A., Tasso, R., Negrini, S.M., Amateis, A., Indiveri, F., Cancedda, R., and Pennesi, G. (2005). Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur. J. Immunol.* *35*, 1482–1490.
- Bai, L., Lennon, D.P., Caplan, A.I., DeChant, A., Hecker, J., Kranso, J., Zaremba, A., and Miller, R.H. (2012). Hepatocyte growth factor mediates MSCs stimulated functional recovery in animal models of MS. *Nat. Neurosci.* *15*, 862–870.
- Ball, S.G., Shuttleworth, C.A., and Kielty, C.M. (2007). Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors. *J. Cell Biol.* *177*, 489–500.
- Ban, H., Nishishita, N., Fusaki, N., Tabata, T., Saeki, K., Shikamura, M., Takada, N., Inoue, M., Hasegawa, M., Kawamata, S., et al. (2011). Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 14234.
- Barilani, M., Banfi, F., Sironi, S., Ragni, E., Guillaumin, S., Polveraccio, F., Rosso, L., Moro, M., Astori, G., Pozzobon, M., et al. (2018). Low-affinity Nerve Growth Factor Receptor (CD271) Heterogeneous Expression in Adult and Fetal Mesenchymal Stromal Cells. *Sci. Rep.* *8*, 9321.
- Barnhoorn, M.C., Van Halteren, A.G.S., Van Pel, M., Molendijk, I., Struijk, A.C., Jansen, P.M., Verspaget, H.W., Dijkstra, G., Oosten, L.E.M., and Van der Meulen – de Jong, A.E. (2019). Lymphoproliferative Disease in the Rectum 4 Years After Local Mesenchymal Stromal Cell Therapy for Refractory Perianal Crohn’s Fistulas: A Case Report. *J. Crohns Colitis* *13*, 807–811.
- Barnhoorn, M.C., Wasser, M.N.J.M., Roelofs, H., Maljaars, P.W.J., Molendijk, I., Bonsing, B.A., Oosten, L.E.M., Dijkstra, G., van der Woude, C.J., Roelen, D.L., et al. (2020). Long-term Evaluation of Allogeneic Bone Marrow-derived Mesenchymal Stromal Cell Therapy for Crohn’s Disease Perianal Fistulas. *J. Crohns Colitis* *14*, 64–70.
- Becherucci, V., Piccini, L., Casamassima, S., Bisin, S., Gori, V., Gentile, F., Ceccantini, R., De Rienzo, E., Bindi, B., Pavan, P., et al. (2018). Human platelet lysate in mesenchymal stromal cell expansion according to a GMP grade protocol: a cell factory experience. *Stem Cell Res. Ther.* *9*.
- Becker, A.J., McCULLOCH, E.A., and Till, J.E. (1963). Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells. *Nature* *197*, 452–454.
- Beers, J., Linask, K.L., Chen, J.A., Siniscalchi, L.I., Lin, Y., Zheng, W., Rao, M., and Chen, G. (2015). A cost-effective and efficient reprogramming platform for large-scale production of integration-free human induced pluripotent stem cells in chemically defined culture. *Sci. Rep.* *5*, 1–9.

- Bhattacharya, B., Miura, T., Brandenberger, R., Mejido, J., Luo, Y., Yang, A.X., Joshi, B.H., Ginis, I., Thies, R.S., Amit, M., et al. (2004). Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature. *Blood* *103*, 2956–2964.
- Bianco, P., Robey, P.G., and Simmons, P.J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* *2*, 313–319.
- Bilodeau, S., Kagey, M.H., Frampton, G.M., Rahl, P.B., and Young, R.A. (2009). SetDB1 contributes to repression of genes encoding developmental regulators and maintenance of ES cell state. *Genes Dev.* *23*, 2484–2489.
- Bjornson, C.R., Rietze, R.L., Reynolds, B.A., Magli, M.C., and Vescovi, A.L. (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* *283*, 534–537.
- Bloor, A.J.C., Patel, A., Griffin, J.E., Gilleece, M.H., Radia, R., Yeung, D.T., Drier, D., Larson, L.S., Uenishi, G.I., Hei, D., et al. (2020). Production, safety and efficacy of iPSC-derived mesenchymal stromal cells in acute steroid-resistant graft versus host disease: a phase I, multicenter, open-label, dose-escalation study. *Nat. Med.*
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., et al. (2005). Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* *122*, 947–956.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H., and Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* *309*, 255–256.
- Briggs, R., and King, T.J. (1952). Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *38*, 455–463.
- Brittan, M., and Wright, N.A. (2002). Gastrointestinal stem cells. *J. Pathol.* *197*, 492–509.
- Burke, J., Hunter, M., Kolhe, R., Isales, C., Hamrick, M., and Fulzele, S. (2016). Therapeutic potential of mesenchymal stem cell based therapy for osteoarthritis. *Clin. Transl. Med.* *5*.
- Cai, J., Li, W., Su, H., Qin, D., Yang, J., Zhu, F., Xu, J., He, W., Guo, X., Labuda, K., et al. (2010). Generation of human induced pluripotent stem cells from umbilical cord matrix and amniotic membrane mesenchymal cells. *J. Biol. Chem.* *285*, 11227–11234.
- Cai, J., Wu, Z., Xu, X., Liao, L., Chen, J., Huang, L., Wu, W., Luo, F., Wu, C., Pugliese, A., et al. (2016). Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cell With Autologous Bone Marrow Cell Transplantation in Established Type 1 Diabetes: A Pilot Randomized Controlled Open-Label Clinical Study to Assess Safety and Impact on Insulin Secretion. *Diabetes Care* *39*, 149–157.
- Cameron, C.M., Hu, W.-S., and Kaufman, D.S. (2006). Improved development of human embryonic stem cell-derived embryoid bodies by stirred vessel cultivation. *Biotechnol. Bioeng.* *94*, 938–948.
- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* *9*, 641–650.
- Caplan, A.I. (1994). The mesengenic process. *Clin. Plast. Surg.* *21*, 429–435.
- Castro-Manreza, M.E., and Montesinos, J.J. (2015). Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications. *J. Immunol. Res.* *2015*.
- Centeno, C.J., Schultz, J.R., Cheever, M., Freeman, M., Faulkner, S., Robinson, B., and Hanson, R. (2011). Safety and complications reporting update on the re-implantation of culture-expanded mesenchymal stem cells using autologous platelet lysate technique. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* *6*, 368–378.
- Chen, K.-H., Lin, K.-C., Wallace, C.G., Li, Y.-C., Shao, P.-L., Chiang, J.Y., Sung, P.-H., and Yip, H.-K. (2019). Human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cell therapy effectively reduced brain infarct volume and preserved neurological function in rat after acute intracranial hemorrhage. *Am. J. Transl. Res.* *11*, 6232–6248.
- Chen, X., Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vega, V.B., Wong, E., Orlov, Y.L., Zhang, W., Jiang, J., et al. (2008). Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells. *Cell* *133*, 1106–1117.
- Chen, Y.S., Pelekanos, R.A., Ellis, R.L., Horne, R., Wolvetang, E.J., and Fisk, N.M. (2012). Small Molecule Mesengenic Induction of Human Induced Pluripotent Stem Cells to Generate Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *STEM CELLS Transl. Med.* *1*, 83–95.
- Choi, D., Lee, H.-J., Jee, S., Jin, S., Koo, S.K., Paik, S.S., Jung, S.C., Hwang, S.-Y., Lee, K.S., and Oh, B. (2005). In Vitro Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells: Enrichment of Endodermal Cells in the Embryoid Body. *STEM CELLS* *23*, 817–827.
- Chou, B.-K., Gu, H., Gao, Y., Dowey, S.N., Wang, Y., Shi, J., Li, Y., Ye, Z., Cheng, T., and Cheng, L. (2015). A Facile Method to Establish Human Induced Pluripotent Stem Cells From Adult Blood Cells Under Feeder-Free and Xeno-Free Culture Conditions: A Clinically Compliant Approach. *Stem Cells Transl. Med.* *4*, 320–332.

- Coles, B.L.K., Angénioux, B., Inoue, T., Rio-Tsonis, K.D., Spence, J.R., McInnes, R.R., Arsenijevic, Y., and Kooy, D. van der (2004). Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 15772–15777.
- Couper, K.N., Blount, D.G., and Riley, E.M. (2008). IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J. Immunol.* *180*, 5771–5777.
- Covas, D.T., Panepucci, R.A., Fontes, A.M., Silva, W.A., Orellana, M.D., Freitas, M.C.C., Neder, L., Santos, A.R.D., Peres, L.C., Jamur, M.C., et al. (2008). Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp. Hematol.* *36*, 642–654.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., et al. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* *3*, 301–313.
- Cunha, F.F., Martins, L., Martin, P.K.M., Stilhano, R.S., and Han, S.W. (2013). A comparison of the reparative and angiogenic properties of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow of BALB/c and C57/BL6 mice in a model of limb ischemia. *Stem Cell Res. Ther.* *4*, 86.
- Cyranoski, D. (2018a). “Reprogrammed” stem cells approved to mend human hearts for the first time. *Nature* *557*, 619–620.
- Cyranoski, D. (2018b). ‘Reprogrammed’ stem cells implanted into patient with Parkinson’s disease. *Nature*.
- Dang, S.M., Kyba, M., Perlingeiro, R., Daley, G.Q., and Zandstra, P.W. (2002). Efficiency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cells in different culture systems. *Biotechnol. Bioeng.* *78*, 442–453.
- Davies, L.C., Heldring, N., Kadri, N., and Le Blanc, K. (2017). Mesenchymal Stromal Cell Secretion of Programmed Death-1 Ligands Regulates T Cell Mediated Immunosuppression. *Stem Cells Dayt. Ohio* *35*, 766–776.
- De Angelis, L., Berghella, L., Coletta, M., Lattanzi, L., Zanchi, M., Gabriella, M., Ponzetto, C., and Cossu, G. (1999). Skeletal Myogenic Progenitors Originating from Embryonic Dorsal Aorta Coexpress Endothelial and Myogenic Markers and Contribute to Postnatal Muscle Growth and Regeneration. *J. Cell Biol.* *147*, 869–878.
- De Bari, C., Dell’Accio, F., Tylzanowski, P., and Luyten, F.P. (2001). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* *44*, 1928–1942.
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S., and Gianni, A.M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* *99*, 3838–3843.
- Diederichs, S., and Tuan, R.S. (2014). Functional Comparison of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Cells and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells from the Same Donor. *Stem Cells Dev.* *23*, 1594–1610.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* *8*, 315–317.
- Duijvestein, M., Vos, A.C.W., Roelofs, H., Wildenberg, M.E., Wendrich, B.B., Verspaget, H.W., Kooy-Winkelaar, E.M.C., Koning, F., Zwaginga, J.J., Fidder, H.H., et al. (2010). Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn’s disease: results of a phase I study. *Gut* *59*, 1662–1669.
- Eirew, P., Stingl, J., Raouf, A., Turashvili, G., Aparicio, S., Emerman, J.T., and Eaves, C.J. (2008). A method for quantifying normal human mammary epithelial stem cells with in vivo regenerative ability. *Nat. Med.* *14*, 1384–1389.
- Emadedin, M., Aghdami, N., Taghiyar, L., Fazeli, R., Moghadasali, R., Jahangir, S., Farjad, R., and Baghaban Eslaminejad, M. (2012). Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in six patients with knee osteoarthritis. *Arch. Iran. Med.* *15*, 422–428.
- English, K., Ryan, J.M., Tobin, L., Murphy, M.J., Barry, F.P., and Mahon, B.P. (2009). Cell contact, prostaglandin E2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25Highforkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin. Exp. Immunol.* *156*, 149–160.
- Eto, S., Goto, M., Soga, M., Kaneko, Y., Uehara, Y., Mizuta, H., and Era, T. (2018). Mesenchymal stem cells derived from human iPS cells via mesoderm and neuroepithelium have different features and therapeutic potentials. *PLOS ONE* *13*, e0200790.

- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.
- Feldman, N., Gerson, A., Fang, J., Li, E., Zhang, Y., Shinkai, Y., Cedar, H., and Bergman, Y. (2006). G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nat. Cell Biol.* 8, 188–194.
- Fernandez-Rebollo, E., Mentrup, B., Ebert, R., Franzen, J., Abagnale, G., Sieben, T., Ostrowska, A., Hoffmann, P., Roux, P.-F., Rath, B., et al. (2017). Human Platelet Lysate versus Fetal Calf Serum: These Supplements Do Not Select for Different Mesenchymal Stromal Cells. *Sci. Rep.* 7, 5132.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., and Mavilio, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 1528–1530.
- Forte, G., Minieri, M., Cossa, P., Antenucci, D., Sala, M., Gnocchi, V., Fiaccavento, R., Carotenuto, F., De Vito, P., Baldini, P.M., et al. (2006). Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration, and differentiation. *Stem Cells Dayt. Ohio* 24, 23–33.
- Francois, S., Mouiseddine, M., Allenet-Lepage, B., Voswinkel, J., Douay, L., Benderitter, M., and Chapel, A. (2013). Human Mesenchymal Stem Cells Provide Protection against Radiation-Induced Liver Injury by Antioxidative Process, Vasculature Protection, Hepatocyte Differentiation, and Trophic Effects. *BioMed Res. Int.* 2013.
- Friedenstein, A.J. (1980). Stromal Mechanisms of Bone Marrow: Cloning in Vitro and Replantation in Vivo. In *Immunobiology of Bone Marrow Transplantation*, S. Thierfelder, H. Rodt, and H.J. Kolb, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 19–29.
- Friedenstein, A.J., Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I., and Frolova, G.P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6, 230–247.
- Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., and Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3, 393–403.
- Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., Latsinik, N.V., Panasyuk, A.F., and Keiliss-Borok, I.V. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 17, 331–340.
- Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., and Kulagina, N.N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 4, 267–274.
- Friedenstein, A.J., Ivanov-Smolenski, A.A., Chajlakjan, R.K., Gorskaya, U.F., Kuralesova, A.I., Latzinik, N.W., and Gerasimow, U.W. (1978). Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants. *Exp. Hematol.* 6, 440–444.
- Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., and Gerasimov, U.V. (1987). Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Prolif.* 20, 263–272.
- Frobel, J., Hemedda, H., Lenz, M., Abagnale, G., Joussem, S., Denecke, B., Šarić, T., Zenke, M., and Wagner, W. (2014). Epigenetic Rejuvenation of Mesenchymal Stromal Cells Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rep.* 3, 414–422.
- Fu, Q.L., Chow, Y.Y., Sun, S.J., Zeng, Q.X., Li, H.B., Shi, J.B., Sun, Y.Q., Wen, W., Tse, H.F., Lian, Q., et al. (2012). Mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells modulate T-cell phenotypes in allergic rhinitis. *Allergy* 67, 1215–1222.
- Fujita, J., Crane, A.M., Souza, M.K., Dejosez, M., Kyba, M., Flavell, R.A., Thomson, J.A., and Zwaka, T.P. (2008). Caspase activity mediates the differentiation of embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2, 595–601.
- Gage, F.H., Ray, J., and Fisher, L.J. (1995). Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu. Rev. Neurosci.* 18, 159–192.
- Galli, R., Borello, U., Gritti, A., Minasi, M.G., Bjornson, C., Coletta, M., Mora, M., De Angelis, M.G., Fiocco, R., Cossu, G., et al. (2000). Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat. Neurosci.* 3, 986–991.
- Gerecht-Nir, S., Cohen, S., and Itskovitz-Eldor, J. (2004). Bioreactor cultivation enhances the efficiency of human embryoid body (hEB) formation and differentiation. *Biotechnol. Bioeng.* 86, 493–502.
- Giai Via, A., Frizziero, A., and Oliva, F. (2012). Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2, 154–162.

- Giwerzman, A., Andrews, P.W., Jørgensen, N., Müller, J., Graem, N., and Skakkebaek, N.E. (1993). Immunohistochemical expression of embryonal marker TRA-1-60 in carcinoma in situ and germ cell tumors of the testis. *Cancer* 72, 1308–1314.
- Grabundzija, I., Wang, J., Sebe, A., Erdei, Z., Kajdi, R., Devaraj, A., Steinemann, D., Szuhai, K., Stein, U., Cantz, T., et al. (2013). Sleeping Beauty transposon-based system for cellular reprogramming and targeted gene insertion in induced pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res.* 41, 1829–1847.
- Gritti, A., Parati, E., Cova, L., Frolichsthal, P., Galli, R., Wanke, E., Faravelli, L., Morassutti, D., Roisen, F., Nickel, D., et al. (1996). Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J. Neurosci.* 16, 1091–1100.
- Gronthos, S., Zannettino, A.C.W., Hay, S.J., Shi, S., Graves, S.E., Kortessidis, A., and Simmons, P.J. (2003). Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J. Cell Sci.* 116, 1827–1835.
- Guenther, M.G., Frampton, G.M., Soldner, F., Hockemeyer, D., Mitalipova, M., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2010). Chromatin Structure and Gene Expression Programs of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 7, 249–257.
- Gurdon, J.B. (1960). The Developmental Capacity of Nuclei Taken from Differentiating Endoderm Cells of *Xenopus laevis*. *Development* 8, 505–526.
- Gurdon, J.B. (1962a). The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles. *Development* 10, 622–640.
- Gurdon, J.B. (1962b). Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev. Biol.* 4, 256–273.
- Gurdon, J.B., Elsdale, T.R., and Fischberg, M. (1958). Sexually Mature Individuals of *Xenopus laevis* from the Transplantation of Single Somatic Nuclei. *Nature* 182, 64–65.
- Gurdon, J.B., Laskey, R.A., and Reeves, O.R. (1975). The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *Development* 34, 93–112.
- Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C.D., Buzney, E.A., Khan, M.K., Flint, A.F., Kunkel, L.M., and Mulligan, R.C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401, 390–394.
- Guzzo, R.M., Gibson, J., Xu, R.-H., Lee, F.Y., and Drissi, H. (2013). Efficient differentiation of human iPSC-derived mesenchymal stem cells to chondroprogenitor cells. *J. Cell. Biochem.* 114, 480–490.
- Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B.W., Beard, C., Wernig, M., Creighton, M.P., Steine, E.J., Cassady, J.P., Foreman, R., et al. (2008). Direct Reprogramming of Terminally Differentiated Mature B Lymphocytes To Pluripotency. *Cell* 133, 250–264.
- Hare, J.M., Fishman, J.E., Gerstenblith, G., DiFede Velazquez, D.L., Zambrano, J.P., Suncion, V.Y., Tracy, M., Ghersin, E., Johnston, P.V., Brinker, J.A., et al. (2012). Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA* 308, 2369–2379.
- Hatzistergos, K.E., Quevedo, H., Oskouei, B.N., Hu, Q., Feigenbaum, G.S., Margitich, I.S., Mazhari, R., Boyle, A.J., Zambrano, J.P., Rodriguez, J.E., et al. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ. Res.* 107, 913–922.
- Hemeda, H., Giebel, B., and Wagner, W. (2014). Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 16, 170–180.
- Heng, B.C., Heinemann, K., Miny, P., Iezzi, G., Glatz, K., Scherberich, A., Zulewski, H., and Fussenegger, M. (2013). mRNA transfection-based, feeder-free, induced pluripotent stem cells derived from adipose tissue of a 50-year-old patient. *Metab. Eng.* 18, 9–24.
- Hentze, H., Soong, P.L., Wang, S.T., Phillips, B.W., Putti, T.C., and Dunn, N.R. (2009). Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Res.* 2, 198–210.
- Herrera, M.B., Bruno, S., Buttiglieri, S., Tetta, C., Gatti, S., Deregibus, M.C., Bussolati, B., and Camussi, G. (2006). Isolation and Characterization of a Stem Cell Population from Adult Human Liver. *STEM CELLS* 24, 2840–2850.
- Hockemeyer, D., and Jaenisch, R. (2016). Induced pluripotent stem cells meet genome editing. *Cell Stem Cell* 18, 573–586.

- Hoffman, R.A., Mahidhara, R.S., Wolf-Johnston, A.S., Lu, L., Thomson, A.W., and Simmons, R.L. (2002). Differential modulation of CD4 and CD8 T-cell proliferation by induction of nitric oxide synthesis in antigen presenting cells. *Transplantation* 74, 836–845.
- Holterman, C.E., and Rudnicki, M.A. (2005). Molecular regulation of satellite cell function. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 575–584.
- Hori, Y., Rulifson, I.C., Tsai, B.C., Heit, J.J., Cahoy, J.D., and Kim, S.K. (2002). Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 16105–16110.
- Hu, G., Li, Q., Niu, X., Hu, B., Liu, J., Zhou, S., Guo, S., Lang, H., Zhang, C., Wang, Y., et al. (2015). Exosomes secreted by human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells attenuate limb ischemia by promoting angiogenesis in mice. *Stem Cell Res. Ther.* 6.
- Huang, B., Qian, J., Ma, J., Huang, Z., Shen, Y., Chen, X., Sun, A., Ge, J., and Chen, H. (2014). Myocardial transfection of hypoxia-inducible factor-1 α and co-transplantation of mesenchymal stem cells enhance cardiac repair in rats with experimental myocardial infarction. *Stem Cell Res. Ther.* 5, 22.
- Huang, C.-Y., Liu, C.-L., Ting, C.-Y., Chiu, Y.-T., Cheng, Y.-C., Nicholson, M.W., and Hsieh, P.C.H. (2019). Human iPSC banking: barriers and opportunities. *J. Biomed. Sci.* 26, 87.
- Huang, J.I., Kazmi, N., Durbhakula, M.M., Hering, T.M., Yoo, J.U., and Johnstone, B. (2005). Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 23, 1383–1389.
- Hussein, S.M., Batada, N.N., Vuoristo, S., Ching, R.W., Autio, R., Närvä, E., Ng, S., Sourour, M., Hämmäläinen, R., Olsson, C., et al. (2011). Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 471, 58–62.
- Hynes, K., Menicanin, D., Mrozik, K., Gronthos, S., and Bartold, P.M. (2014). Generation of Functional Mesenchymal Stem Cells from Different Induced Pluripotent Stem Cell Lines. *Stem Cells Dev.* 23, 1084–1096.
- Imberti, B., Morigi, M., Tomasoni, S., Rota, C., Corna, D., Longaretti, L., Rottoli, D., Valsecchi, F., Benigni, A., Wang, J., et al. (2007). Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell mediated renal repair. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 18, 2921–2928.
- Inc, F.T. (2019). Fate Therapeutics Announces Clinical Data from Landmark Phase 1 Studies of First-ever Universal, Off-the-shelf, iPSC-derived NK Cell Cancer Immunotherapy Programs.
- Inc, F.T. (2020). Fate Therapeutics Announces First Patient Treated in First-in-human Clinical Trial of FT596 and Provides Corporate Update.
- International Stem Cell Initiative, Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P.W., Beighton, G., Bello, P.A., Benvenisty, N., Berry, L.S., et al. (2007). Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat. Biotechnol.* 25, 803–816.
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H., and Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* 6, 88–95.
- Jackson, K.A., Mi, T., and Goodell, M.A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 14482–14486.
- Jackson, S.A., Schiesser, J., Stanley, E.G., and Elefanty, A.G. (2010). Differentiating embryonic stem cells pass through “temporal windows” that mark responsiveness to exogenous and paracrine mesoderm inducing signals. *PLoS One* 5, e10706.
- Jo, C.H., Chai, J.W., Jeong, E.C., Oh, S., Shin, J.S., Shim, H., and Yoon, K.S. (2017). Intra-articular Injection of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A 2-Year Follow-up Study. *Am. J. Sports Med.* 45, 2774–2783.
- Johe, K.K., Hazel, T.G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M.M., and McKay, R.D. (1996). Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev.* 10, 3129–3140.
- Jossen, V., van den Bos, C., Eibl, R., and Eibl, D. (2018). Manufacturing human mesenchymal stem cells at clinical scale: process and regulatory challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 3981–3994.
- Jungbluth, P., Spitzhorn, L.-S., Grassmann, J., Tanner, S., Latz, D., Rahman, M.S., Bohndorf, M., Wruck, W., Sager, M., Grotheer, V., et al. (2019). Human iPSC-derived iMSCs improve bone regeneration in mini-pigs. *Bone Res.* 7.

- Kabat, M., Bobkov, I., Kumar, S., and Grumet, M. (2020). Trends in mesenchymal stem cell clinical trials 2004-2018: Is efficacy optimal in a narrow dose range? *STEM CELLS Transl. Med.* *9*, 17–27.
- Kagia, A., Tzetis, M., Kanavakis, E., Perrea, D., Sfougataki, I., Mertzianian, A., Varela, I., Dimopoulou, A., Karagiannidou, A., and Goussetis, E. (2019). Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cells Derived From Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, and Pluripotent Stem Cells in a Mouse Model of Chemically Induced Inflammatory Bowel Disease. *Inflammation* *42*, 1730–1740.
- Kang, R., Zhou, Y., Tan, S., Zhou, G., Aagaard, L., Xie, L., Bünger, C., Bolund, L., and Luo, Y. (2015). Mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells retain adequate osteogenicity and chondrogenicity but less adipogenicity. *Stem Cell Res. Ther.* *6*, 144.
- Kannagi, R., Cochran, N.A., Ishigami, F., Hakomori, S., Andrews, P.W., Knowles, B.B., and Solter, D. (1983). Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globoseries ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *EMBO J.* *2*, 2355–2361.
- Karantalis, V., DiFede, D.L., Gerstenblith, G., Pham, S., Symes, J., Zambrano, J.P., Fishman, J., Pattany, P., McNiece, I., Conte, J., et al. (2014). Autologous mesenchymal stem cells produce concordant improvements in regional function, tissue perfusion, and fibrotic burden when administered to patients undergoing coronary artery bypass grafting: The Prospective Randomized Study of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Patients Undergoing Cardiac Surgery (PROMETHEUS) trial. *Circ. Res.* *114*, 1302–1310.
- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H., and Tsunoda, Y. (1998). Eight Calves Cloned from Somatic Cells of a Single Adult. *Science* *282*, 2095–2098.
- Kawata, M., Mori, D., Kanke, K., Hojo, H., Ohba, S., Chung, U., Yano, F., Masaki, H., Otsu, M., Nakauchi, H., et al. (2019). Simple and Robust Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells toward Chondrocytes by Two Small-Molecule Compounds. *Stem Cell Rep.* *13*, 530–544.
- Kiel, M.J., Yilmaz, Ö.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005). SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells. *Cell* *121*, 1109–1121.
- Kim, C.F.B., Jackson, E.L., Woolfenden, A.E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., Crowley, D., Bronson, R.T., and Jacks, T. (2005). Identification of Bronchioalveolar Stem Cells in Normal Lung and Lung Cancer. *Cell* *121*, 823–835.
- Kim, D., Kim, C.-H., Moon, J.-I., Chung, Y.-G., Chang, M.-Y., Han, B.-S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., et al. (2009). Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins. *Cell Stem Cell* *4*, 472–476.
- Kim, H.-K., Lee, S.-G., Lee, S.-W., Oh, B.J., Kim, J.H., Kim, J.A., Lee, G., Jang, J.-D., and Joe, Y.A. (2019). A Subset of Paracrine Factors as Efficient Biomarkers for Predicting Vascular Regenerative Efficacy of Mesenchymal Stromal/Stem Cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *37*, 77–88.
- Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J., and Orkin, S.H. (2008a). An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* *132*.
- Kim, J.B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Araúzo-Bravo, M.J., Ruau, D., Han, D.W., Zenke, M., et al. (2008b). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* *454*, 646–650.
- Kim, J.M., Moon, S.-H., Lee, S.G., Cho, Y.J., Hong, K.S., Lee, J.H., Lee, H.J., and Chung, H.-M. (2011a). Assessment of Differentiation Aspects by the Morphological Classification of Embryoid Bodies Derived from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev.* *20*, 1925–1935.
- Kim, M.-J., Son, M.J., Son, M.-Y., Seol, B., Kim, J., Park, J., Kim, J.H., Kim, Y.-H., Park, S.A., Lee, C.-H., et al. (2011b). Generation of human induced pluripotent stem cells from osteoarthritis patient-derived synovial cells. *Arthritis Rheum.* *63*, 3010–3021.
- Kim, S., Lee, S.K., Kim, H., and Kim, T.M. (2018). Exosomes Secreted from Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Accelerate Skin Cell Proliferation. *Int. J. Mol. Sci.* *19*.
- Kimbrel, E.A., Kouris, N.A., Yavarian, G.J., Chu, J., Qin, Y., Chan, A., Singh, R.P., McCurdy, D., Gordon, L., Levinson, R.D., et al. (2014). Mesenchymal stem cell population derived from human pluripotent stem cells displays potent immunomodulatory and therapeutic properties. *Stem Cells Dev.* *23*, 1611–1624.

- Klein, R.H., Tung, P.-Y., Somanath, P., Fehling, H.J., and Knoepfler, P.S. (2018). Genomic functions of developmental pluripotency associated factor 4 (Dppa4) in pluripotent stem cells and cancer. *Stem Cell Res.* *31*, 83–94.
- Klyushnenkova, E., Mosca, J.D., Zernetkina, V., Majumdar, M.K., Beggs, K.J., Simonetti, D.W., Deans, R.J., and McIntosh, K.R. (2005). T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J. Biomed. Sci.* *12*, 47–57.
- Koestenbauer, S., Zech, N.H., Juch, H., Vanderzwalmen, P., Schoonjans, L., and Dohr, G. (2006). Embryonic stem cells: similarities and differences between human and murine embryonic stem cells. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 *55*, 169–180.
- Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* *91*, 661–672.
- Kopen, G.C., Prockop, D.J., and Phinney, D.G. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 10711–10716.
- Kuçi, S., Kuçi, Z., Kreyenberg, H., Deak, E., Pütsch, K., Huenecke, S., Amara, C., Koller, S., Rettinger, E., Grez, M., et al. (2010). CD271 antigen defines a subset of multipotent stromal cells with immunosuppressive and lymphohematopoietic engraftment-promoting properties. *Haematologica* *95*, 651–659.
- Kuçi, Z., Kuçi, S., Zircher, S., Koller, S., Schubert, R., Bönig, H., Henschler, R., Lieberz, R., Klingebiel, T., and Bader, P. (2011). Mesenchymal stromal cells derived from CD271(+) bone marrow mononuclear cells exert potent allosuppressive properties. *Cytotherapy* *13*, 1193–1204.
- Kumar, M., Bagchi, B., Gupta, S.K., Meena, A.S., Gressens, P., and Mani, S. (2007). Neurospheres derived from human embryoid bodies treated with retinoic Acid show an increase in nestin and ngn2 expression that correlates with the proportion of tyrosine hydroxylase-positive cells. *Stem Cells Dev.* *16*, 667–681.
- Kurtzberg, J., Abdel-Aziz, H., Carpenter, P., Chaudhury, S., Horn, B., Mahadeo, K., Nemecek, E., Neudorf, S., Prasad, V., Prockop, S., et al. (2020). A Phase 3, Single-Arm, Prospective Study of Remestemcel-L, Ex Vivo Culture-Expanded Adult Human Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of Pediatric Patients Who Failed to Respond to Steroid Treatment for Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *26*, 845–854.
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I.L., and Grompe, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* *6*, 1229–1234.
- Lamo-Espinosa, J.M., Mora, G., Blanco, J.F., Granero-Moltó, F., Nuñez-Córdoba, J.M., Sánchez-Echenique, C., Bondía, J.M., Aquerreta, J.D., Andreu, E.J., Ornilla, E., et al. (2016). Intra-articular injection of two different doses of autologous bone marrow mesenchymal stem cells versus hyaluronic acid in the treatment of knee osteoarthritis: multicenter randomized controlled clinical trial (phase I/II). *J. Transl. Med.* *14*, 246.
- Laskey, R.A., and Gurdon, J.B. (1970). Genetic Content of Adult Somatic Cells tested by Nuclear Transplantation from Cultured Cells. *Nature* *228*, 1332–1334.
- Laurent, L.C., Ulitsky, I., Slavin, I., Tran, H., Schork, A., Morey, R., Lynch, C., Harness, J.V., Lee, S., Barrero, M.J., et al. (2011). Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell* *8*, 106–118.
- Leahy, A., Xiong, J.-W., Kuhnert, F., and Stuhlmann, H. (1999). Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J. Exp. Zool.* *284*, 67–81.
- Lee, B.C., Kim, M.K., Jang, G., Oh, H.J., Yuda, F., Kim, H.J., Hossein, M.S., Shamim, M.H., Kim, J.J., Kang, S.K., et al. (2005). Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* *436*, 641.
- Leri, A., Kajstura, J., and Anversa, P. (2005). Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol. Rev.* *85*, 1373–1416.
- Li, L., and Xie, T. (2005). STEM CELL NICHE: Structure and Function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *21*, 605–631.
- Li, C.-L., Leng, Y., Zhao, B., Gao, C., Du, F.-F., Jin, N., Lian, Q.-Z., Xu, S.-Y., Yan, G.-L., Xia, J.-J., et al. (2017). Human iPSC-MSC-Derived Xenografts Modulate Immune Responses by Inhibiting the Cleavage of Caspases. *STEM CELLS* *35*, 1719–1732.

- Lian, Q., Lye, E., Suan Yeo, K., Khia Way Tan, E., Salto-Tellez, M., Liu, T.M., Palanisamy, N., El Oakley, R.M., Lee, E.H., Lim, B., et al. (2007). Derivation of clinically compliant MSCs from CD105+, CD24- differentiated human ESCs. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 425–436.
- Lian, Q., Zhang, Y., Zhang, J., Zhang, H.K., Wu, X., Zhang, Y., Lam, F.F.-Y., Kang, S., Xia, J.C., Lai, W.-H., et al. (2010). Functional mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells attenuate limb ischemia in mice. *Circulation* 121, 1113–1123.
- Liu, T.M., Martina, M., Hutmacher, D.W., Hui, J.H.P., Lee, E.H., and Lim, B. (2007). Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 750–760.
- Liu, X., Duan, B., Cheng, Z., Jia, X., Mao, L., Fu, H., Che, Y., Ou, L., Liu, L., and Kong, D. (2011). SDF-1/CXCR4 axis modulates bone marrow mesenchymal stem cell apoptosis, migration and cytokine secretion. *Protein Cell* 2, 845–854.
- Liu, X., Li, Q., Niu, X., Hu, B., Chen, S., Song, W., Ding, J., Zhang, C., and Wang, Y. (2017). Exosomes Secreted from Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Prevent Osteonecrosis of the Femoral Head by Promoting Angiogenesis. *Int. J. Biol. Sci.* 13, 232–244.
- Liu, Z., Cai, Y., Wang, Y., Nie, Y., Zhang, C., Xu, Y., Zhang, X., Lu, Y., Wang, Z., Poo, M., et al. (2018). Cloning of Macaque Monkeys by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell* 172, 881–887.e7.
- Locatelli, F., Algeri, M., Trevisan, V., and Bertaina, A. (2017). Remestemcel-L for the treatment of graft versus host disease. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 13, 43–56.
- Loh, Y.-H., Wu, Q., Chew, J.-L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., et al. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 38, 431–440.
- Loh, Y.-H., Agarwal, S., Park, I.-H., Urbach, A., Huo, H., Heffner, G.C., Kim, K., Miller, J.D., Ng, K., and Daley, G.Q. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 113, 5476–5479.
- Los, M.J., Skubis, A., and Ghavami, S. (2019). Stem Cells. In *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*, (Elsevier), pp. 5–16.
- Majumdar, M.K., Keane-Moore, M., Buyaner, D., Hardy, W.B., Moorman, M.A., McIntosh, K.R., and Mosca, J.D. (2003). Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Sci.* 10, 228–241.
- Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hirami, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., et al. (2017). Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* 376, 1038–1046.
- Mandal, P.K., and Rossi, D.J. (2013). Reprogramming human fibroblasts to pluripotency using modified mRNA. *Nat. Protoc.* 8, 568–582.
- Martin, G.R. (1981). 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.* 78, 7634–7638.
- Mayshar, Y., Ben-David, U., Lavon, N., Biancotti, J.-C., Yakir, B., Clark, A.T., Plath, K., Lowry, W.E., and Benvenisty, N. (2010). Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 521–531.
- McKay, R. (1997). Stem Cells in the Central Nervous System. *Science* 276, 66–71.
- Meirelles, L. da S., Chagastelles, P.C., and Nardi, N.B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* 119, 2204–2213.
- Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W., and Dilloo, D. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103, 4619–4621.
- Melief, S.M., Schrama, E., Brugman, M.H., Tiemessen, M.M., Hoogduijn, M.J., Fibbe, W.E., and Roelofs, H. (2013). Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages: MSC Induce Tregs Through Skewing of Monocytes. *STEM CELLS* 31, 1980–1991.
- Melton, D. (2014). ‘Stemness.’ In *Essentials of Stem Cell Biology*, (Elsevier), pp. 7–17.
- Melton, C., Judson, R.L., and Blalock, R. (2010). Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature* 463, 621–626.
- Mezey, E., Chandross, K.J., Harta, G., Maki, R.A., and McKecher, S.R. (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290, 1779–1782.

- Mimeault, M., and Batra, S.K. (2005). Recent advances on multiple tumorigenic cascades involved in prostatic cancer progression and targeting therapies. *Carcinogenesis* 27, 1–22.
- Minasi, M.G., Riminucci, M., De Angelis, L., Borello, U., Berarducci, B., Innocenzi, A., Caprioli, A., Sirabella, D., Baiocchi, M., De Maria, R., et al. (2002). The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Dev. Camb. Engl.* 129, 2773–2783.
- Mishima, Y., and Lotz, M. (2008). Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 26, 1407–1412.
- Mitsuzawa, S., Zhao, C., Ikeguchi, R., Aoyama, T., Kamiya, D., Ando, M., Takeuchi, H., Akieda, S., Nakayama, K., Matsuda, S., et al. (2020). Pro-angiogenic scaffold-free Bio three-dimensional conduit developed from human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells promotes peripheral nerve regeneration. *Sci. Rep.* 10.
- Mohr, J.C., Zhang, J., Azarin, S.M., Soerens, A.G., de Pablo, J.J., Thomson, J.A., Lyons, G.E., Palecek, S.P., and Kamp, T.J. (2010). The Microwell Control of Embryoid Body Size in order to Regulate Cardiac Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Biomaterials* 31, 1885.
- Morrison, S.J., and Weissman, I.L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1, 661–673.
- Morrison, S.J., Hemmati, H.D., Wandycz, A.M., and Weissman, I.L. (1995). The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10302–10306.
- Morrison, S.J., Shah, N.M., and Anderson, D.J. (1997a). Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology. *Cell* 88, 287–298.
- Morrison, S.J., Wright, D.E., and Weissman, I.L. (1997b). Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior to mobilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 1908–1913.
- Moslem, M., Eberle, I., Weber, I., Henschler, R., and Cantz, T. (2015). Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Induced Pluripotent Stem Cells Support CD34pos Hematopoietic Stem Cell Propagation and Suppress Inflammatory Reaction. *Stem Cells Int.* 2015.
- Nagoshi, N., Tsuji, O., Nakamura, M., and Okano, H. (2019). Cell therapy for spinal cord injury using induced pluripotent stem cells. *Regen. Ther.* 11, 75–80.
- Nam, Y., Rim, Y.A., Jung, S.M., and Ju, J.H. (2017). Cord blood cell-derived iPSCs as a new candidate for chondrogenic differentiation and cartilage regeneration. *Stem Cell Res. Ther.* 8.
- Nasu, A., Ikeya, M., Yamamoto, T., Watanabe, A., Jin, Y., Matsumoto, Y., Hayakawa, K., Amano, N., Sato, S., Osafune, K., et al. (2013). Genetically Matched Human iPS Cells Reveal that Propensity for Cartilage and Bone Differentiation Differs with Clones, not Cell Type of Origin. *PLoS ONE* 8.
- Nejadnik, H., Diecke, S., Lenkov, O.D., Chapelin, F., Donig, J., Tong, X., Derugin, N., Chan, R.C.F., Gaur, A., Yang, F., et al. (2015). Improved Approach for Chondrogenic Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev.* 11, 242–253.
- Nemeth, K., Keane-Myers, A., Brown, J.M., Metcalfe, D.D., Gorham, J.D., Bundoc, V.G., Hodges, M.G., Jelinek, I., Madala, S., Karpati, S., et al. (2010). Bone marrow stromal cells use TGF- β to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed-induced asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 5652–5657.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379–391.
- Niedbala, W., Cai, B., and Liew, F.Y. (2006). Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. *Ann. Rheum. Dis.* 65, iii37–iii40.
- Nishimoto, M., Fukushima, A., Okuda, A., and Muramatsu, M. (1999). The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5453–5465.
- Niwa, H. (2007). How is pluripotency determined and maintained? *Development* 134, 635–646.
- Noguchi, H., Miyagi-Shiohira, C., and Nakashima, Y. (2018). Induced Tissue-Specific Stem Cells and Epigenetic Memory in Induced Pluripotent Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 19.
- Oh, E.J., Lee, H.W., Kalimuthu, S., Kim, T.J., Kim, H.M., Baek, S.H., Zhu, L., Oh, J.M., Son, S.H., Chung, H.Y., et al. (2018). In vivo migration of mesenchymal stem cells to burn injury sites and their therapeutic effects in a living mouse model. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 279, 79–88.
- Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313–317.

- Okita, K., Yamakawa, T., Matsumura, Y., Sato, Y., Amano, N., Watanabe, A., Goshima, N., and Yamanaka, S. (2013). An Efficient Nonviral Method to Generate Integration-Free Human-Induced Pluripotent Stem Cells from Cord Blood and Peripheral Blood Cells. *STEM CELLS* 31, 458–466.
- Oliver, J.A. (2004). Adult renal stem cells and renal repair. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 13, 17–22.
- Palmieri, S.L., Peter, W., Hess, H., and Schöler, H.R. (1994). Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev. Biol.* 166, 259–267.
- Panés, J., García-Olmo, D., Van Assche, G., Colombel, J.F., Reinisch, W., Baumgart, D.C., Dignass, A., Nachury, M., Ferrante, M., Kazemi-Shirazi, L., et al. (2016). Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn’s disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 388, 1281–1290.
- Panés, J., García-Olmo, D., Van Assche, G., Colombel, J.F., Reinisch, W., Baumgart, D.C., Dignass, A., Nachury, M., Ferrante, M., Kazemi-Shirazi, L., et al. (2018). Long-term Efficacy and Safety of Stem Cell Therapy (Cx601) for Complex Perianal Fistulas in Patients With Crohn’s Disease. *Gastroenterology* 154, 1334-1342.e4.
- Péault, B., Rudnicki, M., Torrente, Y., Cossu, G., Tremblay, J.P., Partridge, T., Gussoni, E., Kunkel, L.M., and Huard, J. (2007). Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 15, 867–877.
- Perin, E.C., Borow, K.M., Silva, G.V., DeMaria, A.N., Marroquin, O.C., Huang, P.P., Traverse, J.H., Krum, H., Skerrett, D., Zheng, Y., et al. (2015). A Phase II Dose-Escalation Study of Allogeneic Mesenchymal Precursor Cells in Patients With Ischemic or Nonischemic Heart Failure. *Circ. Res.* 117, 576–584.
- Pettinato, G., Wen, X., and Zhang, N. (2014). Formation of Well-defined Embryoid Bodies from Dissociated Human Induced Pluripotent Stem Cells using Microfabricated Cell-repellent Microwell Arrays. *Sci. Rep.* 4.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 284, 143–147.
- Poleganov, M.A., Eminli, S., Beissert, T., Herz, S., Moon, J.-I., Goldmann, J., Beyer, A., Heck, R., Burkhart, I., Barea Roldan, D., et al. (2015). Efficient Reprogramming of Human Fibroblasts and Blood-Derived Endothelial Progenitor Cells Using Nonmodified RNA for Reprogramming and Immune Evasion. *Hum. Gene Ther.* 26, 751–766.
- Polejaeva, I.A., Chen, S.H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D.L., et al. (2000). Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407, 86–90.
- Polo, J.M., Liu, S., Figueroa, M.E., Kulalert, W., Eminli, S., Tan, K.Y., Apostolou, E., Stadtfeld, M., Li, Y., Shioda, T., et al. (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 28, 848–855.
- Potten, C.S., and Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Dev. Camb. Engl.* 110, 1001–1020.
- Prockop, D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71–74.
- Prockop, D.J. (2013). Concise Review: Two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation. *STEM CELLS* 31, 2042–2046.
- Rafii, S., Shapiro, F., Rimarachin, J., Nachman, R.L., Ferris, B., Weksler, B., Moore, M.A., and Asch, A.S. (1994). Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hematopoietic progenitor cell adhesion. *Blood* 84, 10–19.
- Rahl, P.B., Lin, C.Y., Seila, A.C., Flynn, R.A., McCuine, S., Burge, C.B., Sharp, P.A., and Young, R.A. (2010). c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell* 141, 432–445.
- Ramasamy, R., Fazekasova, H., Lam, E.W.-F., Soeiro, I., Lombardi, G., and Dazzi, F. (2007). Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation* 83, 71–76.
- Rasko, J.E.J., Patel, A., Griffin, J.E., Gilleece, M.H., Radia, R., Yeung, D.T., Slukvin, I., Kelly, K., and Bloor, A.J. (2019). Results of the First Completed Clinical Trial of an iPSC-Derived Product: CYP-001 in Steroid-Resistant Acute GvHD. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 25, S255–S256.
- Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A.I., Zhao, R.C., and Shi, Y. (2008). Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell* 2, 141–150.

- Ribot, J., Caliaperoumal, G., Paquet, J., Boisson-vidal, C., Petite, H., and Anagnostou, F. (2017). Type 2 diabetes alters mesenchymal stem cell secretome composition and angiogenic properties. *J. Cell. Mol. Med.* *21*, 349–363.
- Richards, L.J., Kilpatrick, T.J., and Bartlett, P.F. (1992). De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *89*, 8591–8595.
- Richards, M., Tan, S.-P., Tan, J.-H., Chan, W.-K., and Bongso, A. (2004). The Transcriptome Profile of Human Embryonic Stem Cells as Defined by SAGE. *STEM CELLS* *22*, 51–64.
- Rohani, L., Fabian, C., Holland, H., Naaldijk, Y., Dressel, R., Löffler-Wirth, H., Binder, H., Arnold, A., and Stolzing, A. (2016). Generation of human induced pluripotent stem cells using non-synthetic mRNA. *Stem Cell Res.* *16*, 662–672.
- Rubio-Azpeitia, E., and Andia, I. (2014). Partnership between platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells: in vitro experience. *Muscles Ligaments Tendons J.* *4*, 52–62.
- Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Cesare, S.D., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P.G., Riminucci, M., et al. (2007). Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. *Cell* *131*, 324–336.
- Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K., and Muneta, T. (2005). Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* *52*, 2521–2529.
- Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T.B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., et al. (2000). Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp. Neurol.* *164*, 247–256.
- Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., and Ozawa, K. (2007). Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* *109*, 228–234.
- Schmidt, A., Ladage, D., Schinköthe, T., Klausmann, U., Ulrichs, C., Klinz, F.-J., Brixius, K., Arnhold, S., Desai, B., Mehlhorn, U., et al. (2006). Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *24*, 1750–1758.
- Schopperle, W.M., and DeWolf, W.C. (2007). The TRA-1-60 and TRA-1-81 human pluripotent stem cell markers are expressed on podocalyxin in embryonal carcinoma. *Stem Cells Dayt. Ohio* *25*, 723–730.
- Schwartz, R.E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, T., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W.-S., and Verfaillie, C.M. (2002). Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest.* *109*, 1291–1302.
- Selvasandran, K., Makhoul, G., Jaiswal, P.K., Jurakhan, R., Li, L., Ridwan, K., and Cecere, R. (2018). A Tumor Necrosis Factor- α and Hypoxia-Induced Secretome Therapy for Myocardial Repair. *Ann. Thorac. Surg.* *105*, 715–723.
- Seo, B.-M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Robey, P.G., Wang, C.-Y., and Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet Lond. Engl.* *364*, 149–155.
- Sheu, J., Sung, P., Wallace, C.G., Yang, C., Chen, K., Shao, P., Chu, Y., Huang, C., Chen, Y., Ko, S., et al. (2020). Intravenous administration of iPS-MSCSPIONs mobilized into CKD parenchyma and effectively preserved residual renal function in CKD rat. *J. Cell. Mol. Med.* *24*, 3593–3610.
- Sheyn, D., Ben-David, S., Shapiro, G., De Mel, S., Bez, M., Ornelas, L., Sahabian, A., Sareen, D., Da, X., Pelled, G., et al. (2016). Human Induced Pluripotent Stem Cells Differentiate Into Functional Mesenchymal Stem Cells and Repair Bone Defects. *STEM CELLS Transl. Med.* *5*, 1447–1460.
- Shi, C., Jia, T., Mendez-Ferrer, S., Hohl, T.M., Serbina, N.V., Lipuma, L., Leiner, I., Li, M.O., Frenette, P.S., and Pamer, E.G. (2011). Bone Marrow Mesenchymal Stem and Progenitor Cells Induce Monocyte Emigration in Response to Circulating Toll-like Receptor Ligands. *Immunity* *34*, 590–601.
- Shin, T., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K., Lyons, L., and Westhusin, M. (2002). A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* *415*, 859.
- Silva, G.V., Litovsky, S., Assad, J.A.R., Sousa, A.L.S., Martin, B.J., Vela, D., Coulter, S.C., Lin, J., Ober, J., Vaughn, W.K., et al. (2005). Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* *111*, 150–156.
- Siminovitch, L., McCulloch, E.A., and Till, J.E. (1963). The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J. Cell. Comp. Physiol.* *62*, 327–336.

- Sivasubramaniyan, K., Harichandan, A., Schilbach, K., Mack, A.F., Bedke, J., Stenzl, A., Kanz, L., Niederfellner, G., and Bühring, H.-J. (2015). Expression of stage-specific embryonic antigen-4 (SSEA-4) defines spontaneous loss of epithelial phenotype in human solid tumor cells. *Glycobiology* 25, 902–917.
- Skottman, H., Mikkola, M., Lundin, K., Olsson, C., Strömberg, A.-M., Tuuri, T., Otonkoski, T., Hovatta, O., and Lahesmaa, R. (2005). Gene Expression Signatures of Seven Individual Human Embryonic Stem Cell Lines. *STEM CELLS* 23, 1343–1356.
- Slukvin, I.I., and Kumar, A. (2018). The Mesenchymoangioblast, Mesodermal Precursor for Mesenchymal and Endothelial Cells. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 75, 3507–3520.
- Soontararak, S., Chow, L., Johnson, V., Coy, J., Wheat, W., Regan, D., and Dow, S. (2018). Mesenchymal Stem Cells (MSC) Derived from Induced Pluripotent Stem Cells (iPSC) Equivalent to Adipose-Derived MSC in Promoting Intestinal Healing and Microbiome Normalization in Mouse Inflammatory Bowel Disease Model. *Stem Cells Transl. Med.* 7, 456–467.
- Sotiropoulou, P.A., Perez, S.A., Gritzapis, A.D., Baxevas, C.N., and Papamichail, M. (2006). Interactions Between Human Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer Cells. *STEM CELLS* 24, 74–85.
- Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M.C., and Moretta, L. (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer–cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 111, 1327–1333.
- Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., and Kai, T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature* 414, 98–104.
- Stadtfeld, M., Brennand, K., and Hochedlinger, K. (2008a). Reprogramming of Pancreatic β Cells into Induced Pluripotent Stem Cells. *Curr. Biol. CB* 18, 890.
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008b). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322, 945–949.
- Staerk, J., Dawlaty, M.M., Gao, Q., Maetzel, D., Hanna, J., Sommer, C.A., Mostoslavsky, G., and Jaenisch, R. (2010). Reprogramming of peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 20–24.
- Štefková, K., Procházková, J., and Pacherník, J. (2015). Alkaline Phosphatase in Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2015.
- Szychlińska, M.A., Stoddart, M.J., D’Amora, U., Ambrosio, L., Alini, M., and Musumeci, G. (2017). Mesenchymal Stem Cell-Based Cartilage Regeneration Approach and Cell Senescence: Can We Manipulate Cell Aging and Function? *Tissue Eng. Part B Rev.* 23, 529–539.
- T, Y., M, Y., S, K., Y, K., Y, N., S, I., and Y, T. (2002). In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells Dayt. Ohio* 20, 146–154.
- Taapken, S.M., Nisler, B.S., Newton, M.A., Sampsel-Barron, T.L., Leonhard, K.A., McIntire, E.M., and Montgomery, K.D. (2011). Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29, 313–314.
- Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr. Biol. CB* 11, 1553–1558.
- Takahashi, J. (2019). Preparing for first human trial of induced pluripotent stem cell-derived cells for Parkinson’s disease: an interview with Jun Takahashi. *Regen. Med.* 14, 93–95.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
- Tang, J.-M., Wang, J.-N., Zhang, L., Zheng, F., Yang, J.-Y., Kong, X., Guo, L.-Y., Chen, L., Huang, Y.-Z., Wan, Y., et al. (2011). VEGF/SDF-1 promotes cardiac stem cell mobilization and myocardial repair in the infarcted heart. *Cardiovasc. Res.* 91, 402–411.
- Tang, M., Chen, W., Liu, J., Weir, M.D., Cheng, L., and Xu, H.H.K. (2014). Human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cell seeding on calcium phosphate scaffold for bone regeneration. *Tissue Eng. Part A* 20, 1295–1305.
- Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A.M., Lim, B., and Rigoutsos, I. (2008). MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* 455, 1124–1128.
- Teerlink, J.R., Metra, M., Filippatos, G.S., Davison, B.A., Bartunek, J., Terzic, A., Gersh, B.J., Povsic, T.J., Henry, T.D., Alexandre, B., et al. (2017). Benefit of cardiopoietic mesenchymal stem cell

- therapy on left ventricular remodelling: results from the Congestive Heart Failure Cardiopoietic Regenerative Therapy (CHART-1) study. *Eur. J. Heart Fail.* *19*, 1520–1529.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* *282*, 1145–1147.
- Till, J.E., and McCulloch, E.A. (1961). A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiat. Res.* *14*, 213.
- Tilly, J.L., and Telfer, E.E. (2009). Purification of germline stem cells from adult mammalian ovaries: a step closer towards control of the female biological clock? *Mol. Hum. Reprod.* *15*, 393–398.
- Toma, C., Pittenger, M.F., Cahill, K.S., Byrne, B.J., and Kessler, P.D. (2002). Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* *105*, 93–98.
- Tse, W.T., Pendleton, J.D., Beyer, W.M., Egalka, M.C., and Guinan, E.C. (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* *75*, 389–397.
- Utikal, J., Maherali, N., Kulalert, W., and Hochedlinger, K. (2009). Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J. Cell Sci.* *122*, 3502–3510.
- Vangsness, C.T., Farr, J., Boyd, J., Dellaero, D.T., Mills, C.R., and LeRoux-Williams, M. (2014). Adult human mesenchymal stem cells delivered via intra-articular injection to the knee following partial medial meniscectomy: a randomized, double-blind, controlled study. *J. Bone Joint Surg. Am.* *96*, 90–98.
- Varela, I., Karagiannidou, A., Oikonomakis, V., Tzetis, M., Tzanoudaki, M., Siapati, E.-K., Vassilopoulos, G., Graphakos, S., Kanavakis, E., and Goussetis, E. (2014). Generation of human β -thalassemia induced pluripotent cell lines by reprogramming of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells using modified mRNA. *Cell. Reprogramming* *16*, 447–455.
- Vega, A., Martín-Ferrero, M.A., Del Canto, F., Alberca, M., García, V., Munar, A., Orozco, L., Soler, R., Fuertes, J.J., Huguet, M., et al. (2015). Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Randomized Controlled Trial. *Transplantation* *99*, 1681–1690.
- Villa-Diaz, L.G., Brown, S.E., Liu, Y., Ross, A., Lahann, J., Parent, J.M., and Krebsbach, P.H. (2012). Derivation of functional mesenchymal stem cells from human induced pluripotent stem cells cultured on synthetic polymer substrates. *Stem Cells Dayt. Ohio* *30*, 1174–1181.
- Vodyanik, M.A., Yu, J., Zhang, X., Tian, S., Stewart, R., Thomson, J.A., and Slukvin, I.I. (2010). A mesoderm-derived precursor for mesenchymal stem and endothelial cells. *Cell Stem Cell* *7*, 718–729.
- Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., Diehlmann, A., Bork, S., Saffrich, R., Benes, V., Blake, J., Pfister, S., Eckstein, V., et al. (2008). Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. *PLoS ONE* *3*.
- Waheeb, R., and Hofmann, M.-C. (2011). Human spermatogonial stem cells: a possible origin for spermatocytic seminoma. *Int. J. Androl.* *34*, e296–e305.
- Wakabayashi, K., Nagai, A., Sheikh, A.M., Shiota, Y., Narantuya, D., Watanabe, T., Masuda, J., Kobayashi, S., Kim, S.U., and Yamaguchi, S. (2010). Transplantation of human mesenchymal stem cells promotes functional improvement and increased expression of neurotrophic factors in a rat focal cerebral ischemia model. *J. Neurosci. Res.* *88*, 1017–1025.
- Wakayama, T., Perry, A.C.F., Zuccotti, M., Johnson, K.R., and Yanagimachi, R. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* *394*, 369–374.
- Wang, D., Zhang, H., Liang, J., Li, X., Feng, X., Wang, H., Hua, B., Liu, B., Lu, L., Gilkeson, G.S., et al. (2013). Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus: 4 years of experience. *Cell Transplant.* *22*, 2267–2277.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., et al. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* *7*, 618–630.
- Warren, L., Ni, Y., Wang, J., and Guo, X. (2012). Feeder-Free Derivation of Human Induced Pluripotent Stem Cells with Messenger RNA. *Sci. Rep.* *2*, 657.
- Watanabe, K., Nishida, K., Yamato, M., Umemoto, T., Sumide, T., Yamamoto, K., Maeda, N., Watanabe, H., Okano, T., and Tano, Y. (2004). Human limbal epithelium contains side

- population cells expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS Lett.* 565, 6–10.
- Wehman, B., Sharma, S., Pietris, N., Mishra, R., Siddiqui, O.T., Bigham, G., Li, T., Aiello, E., Murthi, S., Pittenger, M., et al. (2016). Mesenchymal stem cells preserve neonatal right ventricular function in a porcine model of pressure overload. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 310, H1816-1826.
- Wei, H., Tan, G., Manasi, Qiu, S., Kong, G., Yong, P., Koh, C., Ooi, T.H., Lim, S.Y., Wong, P., et al. (2012). One-step derivation of cardiomyocytes and mesenchymal stem cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 9, 87–100.
- Weissman, I.L., Anderson, D.J., and Gage, F. (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 387–403.
- Wen, W., Zhang, J.-P., Xu, J., Su, R.J., Neises, A., Ji, G.-Z., Yuan, W., Cheng, T., and Zhang, X.-B. (2016). Enhanced Generation of Integration-free iPSCs from Human Adult Peripheral Blood Mononuclear Cells with an Optimal Combination of Episomal Vectors. *Stem Cell Rep.* 6, 873–884.
- Wilmot, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810–813.
- Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., et al. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766–770.
- Wright, N.A. (2000). Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer. *Int. J. Exp. Pathol.* 81, 117–143.
- Wu, X., Jiang, J., Gu, Z., Zhang, J., Chen, Y., and Liu, X. (2020). Mesenchymal stromal cell therapies: immunomodulatory properties and clinical progress. *Stem Cell Res. Ther.* 11, 345.
- Xia, Y., Ling, X., Hu, G., Zhu, Q., Zhang, J., Li, Q., Zhao, B., Wang, Y., and Deng, Z. (2020). Small extracellular vesicles secreted by human iPSC-derived MSC enhance angiogenesis through inhibiting STAT3-dependent autophagy in ischemic stroke. *Stem Cell Res. Ther.* 11.
- Xiao Ling, K., Peng, L., Jian Feng, Z., Wei, C., Wei Yan, Y., Nan, S., Cheng Qi, G., and Zhi Wei, W. (2016). Stromal Derived Factor-1/CXCR4 Axis Involved in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Recruitment to Injured Liver. *Stem Cells Int.* 2016, 8906945.
- Xie, T., and Spradling, A.C. (2000). A Niche Maintaining Germ Line Stem Cells in the Drosophila Ovary. *Science* 290, 328–330.
- Xie, J., Peng, C., Zhao, Q., Wang, X., Yuan, H., Yang, L., Li, K., Lou, X., and Zhang, Y. (2016). Osteogenic differentiation and bone regeneration of iPSC-MSCs supported by a biomimetic nanofibrous scaffold. *Acta Biomater.* 29, 365–379.
- Xu, M., Shaw, G., Murphy, M., and Barry, F. (2019). Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stromal Cells Are Functionally and Genetically Different From Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 37, 754–765.
- Yamahara, K., Harada, K., Ohshima, M., Ishikane, S., Ohnishi, S., Tsuda, H., Otani, K., Taguchi, A., Soma, T., Ogawa, H., et al. (2014). Comparison of Angiogenic, Cytoprotective, and Immunosuppressive Properties of Human Amnion- and Chorion-Derived Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE* 9.
- Yamashita, A., Morioka, M., Yahara, Y., Okada, M., Kobayashi, T., Kuriyama, S., Matsuda, S., and Tsumaki, N. (2015). Generation of Scaffoldless Hyaline Cartilaginous Tissue from Human iPSCs. *Stem Cell Rep.* 4, 404–418.
- Yamout, B., Hourani, R., Salti, H., Barada, W., El-Hajj, T., Al-Kutoubi, A., Herlopian, A., Baz, E.K., Mahfouz, R., Khalil-Hamdan, R., et al. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis: a pilot study. *J. Neuroimmunol.* 227, 185–189.
- Yang, H., Feng, R., Fu, Q., Xu, S., Hao, X., Qiu, Y., Feng, T., Zeng, Z., Chen, M., and Zhang, S. (2019). Human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells promote healing via TNF- α -stimulated gene-6 in inflammatory bowel disease models. *Cell Death Dis.* 10, 1–16.
- Yang, S.-H., Park, M.-J., Yoon, I.-H., Kim, S.-Y., Hong, S.-H., Shin, J.-Y., Nam, H.-Y., Kim, Y.-H., Kim, B., and Park, C.-G. (2009). Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp. Mol. Med.* 41, 315–324.
- Young, R.A. (2011). Control of the embryonic stem cell state. *Cell* 144, 940–954.
- Zhang, J., Tam, W.-L., Tong, G.Q., Wu, Q., Chan, H.-Y., Soh, B.-S., Lou, Y., Yang, J., Ma, Y., Chai, L., et al. (2006). Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. *Nat. Cell Biol.* 8, 1114–1123.

- Zhang, Q.-Z., Su, W.-R., Shi, S.-H., Wilder-Smith, P., Xiang, A.P., Wong, A., Nguyen, A.L., Kwon, C.W., and Le, A.D. (2010). Human Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells Elicit Polarization of M2 Macrophages and Enhance Cutaneous Wound Healing. *STEM CELLS* 28, 1856–1868.
- Zhang, R., Zhang, Z., Zhang, C., Zhang, L., Robin, A., Wang, Y., Lu, M., and Chopp, M. (2004). Stroke Transiently Increases Subventricular Zone Cell Division from Asymmetric to Symmetric and Increases Neuronal Differentiation in the Adult Rat. *J. Neurosci.* 24, 5810–5815.
- Zhang, S.-J., Song, X.-Y., He, M., and Yu, S.-B. (2016). Effect of TGF- β 1/SDF-1/CXCR4 signal on BM-MSCs homing in rat heart of ischemia/perfusion injury. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 20, 899–905.
- Zhang, X., Zhang, J., Wang, T., Esteban, M.A., and Pei, D. (2008). Esrrb activates Oct4 transcription and sustains self-renewal and pluripotency in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 283, 35825–35833.
- Zhao, M., Amiel, S.A., Christie, M.R., Muiesan, P., Srinivasan, P., Littlejohn, W., Rela, M., Arno, M., Heaton, N., and Huang, G.C. (2007). Evidence for the presence of stem cell-like progenitor cells in human adult pancreas. *J. Endocrinol.* 195, 407–414.
- Zhao, Q., Gregory, C.A., Lee, R.H., Reger, R.L., Qin, L., Hai, B., Park, M.S., Yoon, N., Clough, B., McNeill, E., et al. (2015). MSCs derived from iPSCs with a modified protocol are tumorigenic but have much less potential to promote tumors than bone marrow MSCs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 530–535.
- Zhong, W., Jiang, M.M., Weinmaster, G., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1997). Differential expression of mammalian Numb, Numlike and Notch1 suggests distinct roles during mouse cortical neurogenesis. *Development* 124, 1887–1897.
- Zhou, Q., Renard, J.-P., Le Friec, G., Brochard, V., Beaujean, N., Cherifi, Y., Fraichard, A., and Cozzi, J. (2003). Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science* 302, 1179.
- Zhou, T., Benda, C., Duzinger, S., Huang, Y., Li, X., Li, Y., Guo, X., Cao, G., Chen, S., Hao, L., et al. (2011). Generation of induced pluripotent stem cells from urine. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22, 1221–1228.
- Zhu, Y., Wu, X., Liang, Y., Gu, H., Song, K., Zou, X., and Zhou, G. (2016). Repair of cartilage defects in osteoarthritis rats with induced pluripotent stem cell derived chondrocytes. *BMC Biotechnol.* 16, 78.
- Zimmermann, J.A., Hettiaratchi, M.H., and McDevitt, T.C. (2017). Enhanced Immunosuppression of T Cells by Sustained Presentation of Bioactive Interferon- γ Within Three-Dimensional Mesenchymal Stem Cell Constructs. *STEM CELLS Transl. Med.* 6, 223–237.
- Zou, C., Song, G., Luo, Q., Yuan, L., and Yang, L. (2011). Mesenchymal stem cells require integrin β 1 for directed migration induced by osteopontin in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 47, 241–250.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., and Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211–228.

8. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ειρήνη Σφουγκατάκη, Βιολόγος

✉ Irene_sf@hotmail.com

Φύλο Γυναίκα | Ημερομ. Γέννησης 01/05/1990 | Εθνικότητα Ελληνική

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

5/2018-σήμερα

Εργαστήριο Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία», Αθήνα, σε σύμβαση έργου με το Ερευνητικό Πανεπιστημιακό Ινστιτούτο για τη Μελέτη Γενετικών και Κακοήθων Νοσημάτων της Παιδικής Ηλικίας (Αθήνα).

Επεξεργασία και κρουσυντήρηση μοσχευμάτων αρχέγονων αιμοποιητικών στελεχιαίων κυττάρων. Έλεγχος της χιμαιρικής κατάστασης των ασθενών μετά τη μεταμόσχευση με μοριακές τεχνικές.

3/2015-4/2020

Γραμματειακή υποστήριξη σε παιδιατρείο.

5/2014-5/2016

Εργαστήριο Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία» με χρηματοδότηση από το Ερευνητικό Πανεπιστημιακό Ινστιτούτο για τη Μελέτη Γενετικών και Κακοήθων Νοσημάτων της Παιδικής Ηλικίας.

Έργο με θέμα: Δημιουργία, πολλαπλασιασμός, αποθήκευση και διαφοροποίηση επαγόμενων πολυδύναμων στελεχιαίων κυττάρων.

Καλλιέργειες εμβρυονικών και επαγόμενων πολυδύναμων στελεχιαίων κυττάρων.

Μοριακή ανάλυση και χαρακτηρισμός των κυτταρικών σειρών.

PCR, STRs, VNTRs, RT-PCR

Τριχοειδική ηλεκτροφόρηση

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

26/11/2014-σήμερα

Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής της Ιατρικής Σχολής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Θέση: «Ανάπτυξη ενός κλινικά αξιοποιήσιμου πρωτοκόλλου διαφοροποίησης επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων σε μεσεγχυματικά στελεχιαία κύτταρα».

9/2013-3/2014

Εκπαίδευση στο εργαστήριο της Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία». Κυτταρικές καλλιέργειες διαφόρων τύπων ενήλικων και πολυδύναμων στελεχιαίων κυττάρων.

9/2008-2/2014

Φοίτηση στο τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Μητρική γλώσσα

Άλλες γλώσσες

Ελληνικά

Αγγλικά

- First certificate in English, University of Cambridge
- Certificate of competency in English, University of Michigan
- Advanced level certificate in English, University of Michigan

Βραβεύσεις

26^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 12-14 Νοεμβρίου 2015, Αθήνα
Κλινικής κλίμακας παραγωγή μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα.

Ε.Σφουγκατάκη, Ι.Βαρελά, Α.Καραγιαννίδου, Μ.Ρουμπελάκη, Μ.Τζέτη, Κ.Στεφανάκη, Β.Καλοδήμου, Ι.Γραφάκος, Ε.Καναβάκης, Σ.Γραφάκος, Ε.Γουσέτης

Βράβευση με το έπαθλο νέου ερευνητή «Φαίδων Φέσσας»

Δημοσιεύσεις

Proliferative and chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells from pluripotent and bone marrow cells. Sfougataki I, Varela I, Stefanaki K, Karagiannidou A, Roubelakis MG, Kalodimou V, Papatheanasiou I, Traeger-Synodinos J, Kitsiou-Tzeli S, Kanavakis E, Kitra V, Tsezou A, Tzetis M, Goussetis E. *Histol Histopathol.* 2020 Sep 22:18259. doi: 10.14670/HH-18-259. Epub ahead of print. PMID: 32959885.

Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cells Derived From Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, and Pluripotent Stem Cells in a Mouse Model of Chemically Induced Inflammatory Bowel Disease. Kagia A, Tzetis M, Kanavakis E, Perrea D, Sfougataki I, Mertzanian A, Varela I, Dimopoulou A, Karagiannidou A, Goussetis E. *Inflammation.* 2019 Oct;42(5):1730-1740. doi: 10.1007/s10753-019-01033-x.

Reprogramming of bone marrow derived mesenchymal stromal cells to human induced pluripotent stem cells from pediatric patients with hematological diseases using a commercial mRNA kit. Irene Sfougataki, Ioannis Grafakos, Ioanna Varela, Anastasios Mitrakos, Angeliki Karagiannidou, Marianna Tzannoudaki, Myrto Poulou, Anny Mertzanian, Maria Roubelakis G., Kalliope Stefanaki, Joanne Traeger-Synodinos, Emmanuel Kanavakis, Vasiliki Kitra, Maria Tzetis, Evgenios Goussetis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, Volume 76, 2019, Pages 32-39, ISSN 1079-9796, <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2019.01.003>.