



ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μελέτη του ρόλου των microRNAs στη ρύθμιση
των μηχανισμών αυτοανανέωσης και
διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών
βλαστικών κυττάρων του αμνιακού υγρού**

ΤΡΟΧΑΤΟΥ ΟΥΡΑΝΙΑ

Αθήνα 2013

Στην Κατερίνα...

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα microRNAs (miRNAs) είναι μονόκλωνα μόρια RNA, μήκους 20-23 nt, που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση, αλληλεπιδρώντας με ειδικές θέσεις της 3' αμετάφραστης περιοχής (3' UTR) του mRNA συγκεκριμένων γονιδίων, προκαλώντας αναστολή της μετάφρασης. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι τα miRNAs μπορούν να δρουν ως ρυθμιστικά σηματοδοτικά μόρια καθορίζοντας τις χαρακτηριστικές ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων ενήλικης ή εμβρυϊκής προέλευσης. Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) αποτελούν ένα πληθυσμό προγονικών κυττάρων με δυνατότητα διαφοροποίησης σε επιμέρους ιστούς της μεσεγχυματικής σειράς και με ικανότητα *in vivo* αποκατάστασης του ομόλογου ιστού. Οι κύριες πηγές MSCs είναι ο μυελός των οστών (BM), το αίμα ομφαλίου λώρου (UCB) και το αμνιακό υγρό (AF). Από την ερευνητική μας ομάδα έχει ήδη πραγματοποιηθεί α) απομόνωση μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων του αμνιακού υγρού (AF-MSCs), β) φαινοτυπικός χαρακτηρισμός τους, γ) πιστοποίηση του υψηλού ρυθμού πολλαπλασιασμού τους, δ) εκτίμηση του φάσματος διαφοροποίησής τους και ε) ανάλυση του πρωτεωμικού τους προτύπου. Επιπρόσθετα μελετήθηκε, για πρώτη φορά, η παρουσία δύο μορφολογικά διακριτών υποπληθυσμών κυττάρων στις αρχικές αποικίες των AF-MSCs, σχήματος ατρακτοειδούς [spindle-shaped (SS)] ή σφαιρικού [round-shaped (RS)], οι οποίοι ονομάστηκαν SS-AF-MSCs και RS-AF-MSCs, αντιστοίχως. Λεπτομερής ανάλυση των δύο αυτών υποπληθυσμών, κατόπιν μηχανικού διαχωρισμού τους, έδειξε ότι τα SS-AF-MSCs εκφράζουν τον αντιγονικό δείκτη Thy-1 (CD90) σε μεγαλύτερο ποσοστό, παρουσιάζουν υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού και ευρύτερο φάσμα διαφοροποίησης σε σχέση με τα RS-AF-MSCs. Με σκοπό την εμπειριστατωμένη μελέτη της μοριακής ταυτότητας των δύο αυτών υποπληθυσμών, έγινε συστηματική ανάλυση του πρωτεωμικού τους προτύπου, πριν την ενδεχόμενη αξιοποίησή τους σε *in vivo* θεραπευτικές δοκιμές.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η μελέτη της μετά-μεταγραφικής ρύθμισης τριών πληθυσμών MSCs από AF, BM και UCB, σε επίπεδο προτύπου έκφρασης των miRNAs με τη χρήση miRNAs μικροσυστοιχιών. Τα miRNAs είναι μονόκλωνα μόρια RNA, μήκους 20-23 nt, που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση, αλληλεπιδρώντας με ειδικές θέσεις της 3' αμετάφραστης περιοχής (3' UTR) του mRNA συγκεκριμένων γονιδίων, προκαλώντας αναστολή της μετάφρασης.

Ανιχνεύθηκαν 67 διαφορετικά εκφραζόμενα miRNAs στους τρεις τύπους MSCs. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι το miR-21 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα RS-AF-MSCs και στα BM-MSCs σε σύγκριση με τα SS-AF-MSCs. Με στόχο τη διερεύνηση του ρυθμιστικού ρόλου του miR-21 στην βλαστικότητα των AF-MSCs, περιγράφηκε για πρώτη φορά η άμεση αλληλεπίδραση του miR-21 με τον δείκτη βλαστικότητας Sox2. Η επαγωγή της έκφρασης του miR-21 στα SS-AF-MSCs, προκάλεσε σημαντική καταστολή της έκφρασης του Sox2. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην στατιστικά σημαντική μείωση της κλωνογονικής ικανότητας και του ρυθμού πολλαπλασιασμού των SS-AF-MSCs. Επιπρόσθετα, μετά την επαγωγή της έκφρασης του miR-21 στα SS-AF-MSCs διαπιστώθηκε μείωση της έκφρασης των κυκλινών D1, E1 και A και αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1/G0. Παράλληλα, διαπιστώθηκε αυξημένο ποσοστό κυτταρικής γήρανσης στα SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21. Αντίθετα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν μετά την καταστολή της έκφρασης του miR-21 στα RS-AF-MSCs και στα BM-MSCs, όπου διαπιστώθηκε αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Επίσης, η επαγωγή του miR-21 ενίσχυσε την ικανότητα διαφοροποίησης SS-AF-MSCs προς οστεοκύτταρα και μείωσε την ικανότητα διαφοροποίησής τους προς λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα.

Ακολούθησε λεπτομερής ανάλυση του προτύπου έκφρασης των miRNAs των SS-AF-MSCs σε σύγκριση με αυτό των διαφοροποιημένων SS-AF-MSCs προς λιποκύτταρα. Αναγνωρίστηκαν 13 διαφορετικά εκφραζόμενα miRNAs και από αυτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε το miR-26a, το οποίο εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στα λιποκύτταρα σε σύγκριση με τα αδιαφοροποίητα SS-AF-MSCs. Η επαγωγή της έκφρασης του miR-26a προκάλεσε μείωση στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των SS-AF-MSCs, μείωση των επιπέδων έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων Sox2, Oct4 και Nanog και καταστολή της ικανότητας τους να διαφοροποιούνται προς λιποκύτταρα.

Συμπερασματικά, βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα διακρίνεται ότι το miR-21 ρυθμίζοντας τα επίπεδα έκφρασης του Sox2 μπορεί να επιδρά σε βασικές κυτταρικές διεργασίες των MSCs και να είναι ένα μόριο «κλειδί» για τον καθορισμό της πολλαπλασιαστικής τους ικανότητας καθώς και της ικανότητας του να διαφοροποιούν. Επιπρόσθετα, το miR-26 είναι πιθανό να αποτελεί ρυθμιστικό μόριο της διαφοροποίησης των SS-AF-MSCs προς λιποκύτταρα *in vitro*.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **Ανάγνου Π. Νικόλαος,**

Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής Σχολής Αθηνών, Τομέας Μορφολειτουργικός

- **Αντσακλής Αριστείδης,**

Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής Σχολής Αθηνών, Τομέας Υγεία- Μητέρα- Παιδί

- **Κίττας Χρήστος,**

Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής Σχολής Αθηνών, Τομέας Μορφολειτουργικός

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **Ανάγνου Π. Νικόλαος,**

Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής Σχολής Αθηνών, Τομέας Μορφολειτουργικός

- **Αντσακλής Αριστείδης,**

Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής Σχολής Αθηνών, Τομέας Υγεία- Μητέρα- Παιδί

- **Κίττας Χρήστος,**

Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής Σχολής Αθηνών, Τομέας Μορφολειτουργικός

- **Ρουμπελάκη Μαρία,**

Λέκτορας, Τμήμα Ιατρικής Σχολής Αθηνών, Τομέας Μορφολειτουργικός

- **Παππά Καλιόπη,**

Επίκουρη καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής Σχολής Αθηνών, Τομέας Υγεία- Μητέρα- Παιδί

- **Κωνσταντόπουλος Κωνσταντίνος,**

Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής Σχολής Αθηνών, Τομέας Παθολογίας

- **Γαζούλη Μαρία,**

Επίκουρη καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής Σχολής Αθηνών, Τομέας Μορφολειτουργικός

ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ (70/3/11019). Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- **Trohatou O**, Zagoura DS, Bitsika V, Pappa K.I., Antsaklis A., Anagnou NP and Roubelakis MG, Sox2 suppression by miR-21 governs human mesenchymal stem cell properties, Stem cell translational medicine, in press
- Zagoura DS*, **Trohatou O***, Bitsika V, Makridakis M, Vlahou A, Roubelakis MG, Anagnou NP, "Determination of the fate of mesenchymal stem cells, derived from amniotic fluid, can be regulated by culture conditions in vitro", Cell Death and Disease, 2013 4, e571; doi:10.1038/cddis.2013.93
*joined first authors
- **Trohatou O**, Anagnou NP, Roubelakis MG., Human amniotic fluid stem cells as an attractive tool for clinical applications, Current Stem Cell Research & Therapy, 2013, 8(2):125-132
- Roubelakis MG, **Trohatou O**, Anagnou NP., Amniotic fluid and amniotic membrane stem cells: marker discovery. Stem Cells Int., 2012, 107836. doi: 10.1155/2012/107836. Epub 2012 Jun 3
- Zagoura DS, Roubelakis MG, Bitsika V, **Trohatou O**, Pappa KI, Kapelouzou A, Antsaklis A, Anagnou NP. "Therapeutic potential of a distinct population of human amniotic fluid mesenchymal stem cells and their secreted molecules in mice with acute hepatic failure", Gut, 2012, 61:894-906
- Bitsika V., Roubelakis M.G., Zagoura D, **Trohatou. O.**, Makridakis M., Pappa K.I., Antsaklis A., Marini F.C., Vlahou A. and Anagnou N.P. Human Amniotic Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells as Therapeutic Vehicles: A Novel Approach for the Treatment of Bladder Cancer. Stem Cells and Development, 2012, 21(7): 1097-1111. doi:10.1089/scd.2011.0151
- Bitsika V., Roubelakis M.G., Zagoura D, **Trohatou. O.**, Pappa K.I., Antsaklis A., and Anagnou N.P. In vitro and in vivo properties of distinct clonal populations of cultured mesenchymal progenitor cells (MPCs) derived from amniotic fluid. J Cell Mol Med. 2011 Sep;15(9):1896-913. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01180.x

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Ιούνιος 2009 - Ιούνιος 2013, στο Εργαστήριο Βιολογίας της Ιατρικής σχολής καθώς και στο Εργαστήριο Κυτταρικής και Γονιδιακής Θεραπείας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ). Επιβεβαιώνω ότι εκπόνησα πάνω από το 90% των πειραματικών διεργασιών της παρούσας διατριβής. Η απομόνωση και ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των MSCs καθώς και η ανάλυση των miRNAs μικροσυστοιχιών πραγματοποιήθηκαν με την συνεργασία της Δήμητρας Ζάγουρα και της Μαρίας Ρουμπελάκη. Επιπρόσθετα η κλωνοποίηση του miR-26a πραγματοποιήθηκε από τον Νίκο Ορφανό.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω τον καθηγητή Βιολογίας της Ιατρικής σχολής Αθηνών, κ. Νικόλαο Π. Ανάγνου (MD, PhD) για την προτροπή και τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω τη διδακτορική μου διατριβή στο εργαστήριό του. Η ανάθεση ενός ενδιαφέροντος και πρωτοποριακού θέματος, η καθοδήγησή του και η οικονομική στήριξη που μου παρείχε μέχρι την ολοκλήρωση της συγγραφής ήταν εξαιρετική τιμή προς το πρόσωπό μου.

Αδιαμφισβήτητα οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην κ. Μαρία Ρουμπελάκη (DPhil), λέκτορα Βιολογίας της Ιατρικής σχολής Αθηνών, για την επίβλεψη και καθοδήγηση κατά τον σχεδιασμό της διδακτορικής διατριβής καθώς και την συνεχή συμπαράσταση και βοήθεια κατά την πραγματοποίηση των πειραματικών διαδικασιών και την συγγραφή της εργασίας.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες μου Βασιλική Μπίτσικα και Δήμητρα Ζάγουρα για την ξεχωριστή στήριξη και τη συνεχή βοήθειά τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης των πειραματικών διαδικασιών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Έλενα Σιαπάτη και τον Παναγιώτη Πολίτη για την παροχή βοήθειας και συμβουλών κατά την πραγματοποίηση των πειραματικών διαδικασιών. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την εξαιρετική συνεργασία και τη δημιουργία ενός πραγματικά φιλικού κλίματος και ιδιαίτερα την Μαρία Γεωργομανώλη και την Εκάτη Δρακοπούλου.

Ξεχωριστό ρόλο σε όλη αυτήν την πορεία έπαιξαν η Βίκυ, ο Στάθης και η Βάσω που πάντα ήταν δίπλα μου για να με συμβουλευούν και να με παροτρύνουν με πολύ υπομονή και αγάπη.

Τέλος, θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την επίκουρη καθηγήτρια κ. Κ. Παππά και τον καθηγητή κ. Α. Αντσακλή για την χορήγηση δειγμάτων αμνιακού υγρού, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής τους καθηγητές κ. Χ. Κίττα, κ. Κ. Κωνσταντόπουλο και την επίκουρη καθηγήτρια κ. Μ. Γαζούλη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	ii
ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	iv
ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ.....	v
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	vi
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	vii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	1
ΣΥΧΝΕΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	7

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Βλαστικά κύτταρα (Stem Cells, SCs).....	8
1.2 Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (Embryonic Stem Cells, ESCs).....	12
1.3 Ενήλικα βλαστικά κύτταρα (Adult Stem Cells, ASCs)	15
1.3.1 Αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (Heamatopoietic Stem Cells, HSCs).....	18
1.3.2 Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (Mesenchymal Stem Cells, MSCs)	19
1.4 Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Fetal Stem Cells, FSCs)	23
1.4.1 Βλαστικά κύτταρα αίματος ομφαλίου λώρου	24
1.4.2 Βλαστικά κύτταρα του ελύτρου του Wharton	26
1.4.3 Βλαστικά κύτταρα του πλακούντα.....	28
1.4.4 Βλαστικά κύτταρα της αμνιακής μεμβράνης	29
1.4.5 Βλαστικά κύτταρα αμνιακού υγρού	31
1.4.5.1 Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα αμνιακού υγρού.....	35
1.4.5.2 Εφαρμογές των AF-MSCs στην κυτταρική θεραπεία.....	40
1.5 MicroRNAs.....	45
1.5.1 Βιοσύνθεση των microRNAs	47

1.5.2 Μηχανισμός δράσης των microRNAs	49
1.5.3 Ταυτοποίηση microRNAs	51
1.5.4 Ο ρόλος των microRNAs στα βλαστικά κύτταρα.....	54
1.6 Σκοπός της διδακτορικής εργασίας	57

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	58
2.1 Τεχνικές χειρισμού κυττάρων.....	58
2.1.1 Απομόνωση και καλλιέργεια μεσεγχυματικών κυττάρων από αμνιακό υγρό	58
2.1.2 Απομόνωση και καλλιέργεια μεσεγχυματικών κυττάρων από μυελό των οστών.....	60
2.1.3 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από αίμα ομφαλίου λώρου	61
2.1.4 Καλλιέργεια 293T και HT1080 κυττάρων	62
2.2 Τεχνικές διαφοροποίησης των AF-MSCs	63
2.2.1 Διαφοροποίηση των AF-MSCs προς λιποκύτταρα	63
2.2.1.1 Χρώση Oil Red O.....	63
2.2.2 Διαφοροποίηση των AF-MSCs προς οστεοκύτταρα	64
2.2.2.1 Χρώση Alizarin Red S	64
2.2.3 Διαφοροποίηση των AF-MSCs προς χονδροκύτταρα	65
2.2.3.1 Χρώση Alcian Blue.....	66
2.2.3.2 Ανοσοφθορισμός χονδροκυττάρων για την έκφραση του κολλαγόνο IV	67
2.3 Κυτταρομετρία ροής.....	67
2.4 Απομόνωση ολικού RNA.....	69
2.5 Μικροσυστοιχίες miRNAs	69
2.6 Αναζήτηση in silico γονιδίων-στόχων	72
2.7 Παραγωγή cDNA	73
2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)	73

2.9 Τεχνικές μοριακής κλωνοποίησης.....	77
2.9.1 Απομόνωση γενωμικού DNA	77
2.9.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	78
2.9.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	79
2.9.4 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης	79
2.9.5 Πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού	80
2.9.6 Καθαρισμός DNA	80
2.9.7 Αντίδραση σύνδεσης τμημάτων DNA	81
2.9.8 Δημιουργία δεκτικών κυττάρων για μετασχηματισμό.....	81
2.9.9 Μετασχηματισμός βακτηρίων.....	82
2.9.10 Υγρές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων.....	83
2.8.11 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα	83
2.9.12 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα	84
2.10 Λεντιϊκοί φορείς	85
2.10.1 Δομή του λεντιϊκού γονιδιώματος.....	86
2.10.2 Κατασκευή HIV-1 λεντιϊκών φορέων.....	88
2.10.3 Παροδική συνδιαμόλυνση 293T κυττάρων με τη μέθοδο φωσφορικού ασβεστίου	89
2.10.4 Συγκέντρωση του λεντιϊού	90
2.10.5 Τιτλοποίηση του λεντιϊού.....	91
2.10.6 Μεταγωγή SS-AF-MSCs με λεντιϊό	92
2.10.7 Διαλογή NGFR ⁺ SS-AF-MSCs.....	92
2.11 Διαμόλυνση με λιποσωμάτια.....	93
2.12 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών	95
2.13 Ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	96
2.14 Μελέτη της κλωνογονικής ικανότητας των AF-MSCs.....	100
2.15 Δοκιμασία απόπτωσης	102

2.16 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου.....	103
2.17 Μελέτη κυτταρικής γήρανσης.....	104
2.18 Στατιστική πειραμάτων	105

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ miRNAs ΤΩΝ

ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΡΙΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΗΓΩΝ.....

3.1 Περίληψη.....	106
3.2 Εισαγωγή	106
3.3 Αποτελέσματα	108
3.3.1 Χαρακτηρισμός AF-, BM- και UCB-MSCs	108
3.3.2 Πρότυπο έκφρασης miRNAs των AF-, BM- και UCB-MSCs με τη χρήση miRNAs μικροσυστοιχιών	112
3.3.3 Επιβεβαίωση miRNA μικροσυστοιχιών με αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.....	117
3.3.4 Σύγκριση της έκφρασης των miRNAs των AF-, BM- και UCB-MSCs .	118
3.3.5 Σύγκριση της έκφρασης των miRNAs των υποπληθυσμών των AF-MSCs	122
3.3.6 Εύρεση γονιδίων-στόχων για το miR-21	123

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Η ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ Sox2 ΑΠΟ ΤΟ miR-21 ΕΠΙΔΡΑ ΣΤΙΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....

4.1 Περίληψη.....	127
4.2 Εισαγωγή	127
4.3 Αποτελέσματα	129

4.3.1 Έλεγχος πρόσδεσης του miR-21 στο γονίδιο-στόχο Sox2	129
4.3.2 Επαγωγή του miR-21 στα SS-AF-MSCs οδηγεί σε μείωση της έκφρασης του Sox2.....	133
4.3.3 Επαγωγή του miR-21 στα SS-AF-MSCs οδηγεί σε μείωση της έκφρασης του Oct4 και του Nanog	135
4.3.4 Το miR-21 επηρεάζει την κλωνογονική ικανότητα και τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των SS-AF-MSCs	138
4.3.5 Επαγωγή του miR-21 στα SS-AF-MSCs επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο	140
4.3.6 Αναστολή του miR-21 αυξάνει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των RS-AF-MSCs	145
4.3.7 Αναστολή του miR-21 αυξάνει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των BM-MSCs	149
4.3.8 Επαγωγή του miR-21 επηρεάζει την ικανότητα διαφοροποίησης των SS-AF-MSCs.....	153
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	
ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ miRNAs ΤΩΝ SS-AF-MSCs ΚΑΙ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ SS-AF-MSCs ΠΡΟΣ ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΑ.	
5.1 Περίληψη	159
5.2 Εισαγωγή	159
5.3 Αποτελέσματα	161
5.3.1 Πρότυπο έκφρασης miRNAs των SS-AF-MSCs και των διαφοροποιημένων SS-AF-MSCs προς λιποκύτταρα με τη χρήση miRNAs μικροσυστοιχιών.....	161
5.3.2 Επιβεβαίωση miRNA μικροσυστοιχιών με αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.....	163
5.3.3 Σύγκριση της έκφρασης των miRNAs των SS-AF-MSCs και των λιποκυττάρων	164

5.3.4 Επαγωγή του miR-26a στα SS-AF-MSCs οδηγεί σε μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού.....	165
5.3.5 Επαγωγή του miR-26a στα SS-AF-MSCs επηρεάζει την ικανότητα διαφοροποίησης των SS-AF-MSCs προς λιποκύτταρα	168
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	169
6.1 Λειτουργική κατηγοριοποίηση των miRNAs που εκφράζονται στα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα των τριών διαφορετικών πηγών.....	169
6.2 Η καταστολή του Sox2 από το miR-21 επιδρά στις ιδιότητες των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων.....	171
6.3 Η σύγκριση του προτύπου έκφρασης των miRNAs των SS-AF-MSCs και των διαφοροποιημένων SS-AF-MSCs προς λιποκύτταρα	175
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	178

ΣΥΧΝΕΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AF: Αμνιακό υγρό (Amniotic Fluid)

BM: Μυελός των οστών (Bone marrow)

UCB: Αίμα ομφαλίου λώρου (Umbilical cord blood)

MSCs: Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (Mesenchymal Stem cells)

AF-MSCs: Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα αμνιακού υγρού (amniotic fluid-mesenchymal stem cells)

BM-MSCs: Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα μυελού των οστών (Bone marrow-mesenchymal stem cells)

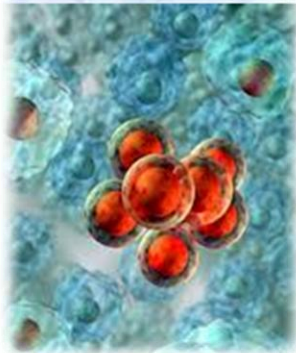
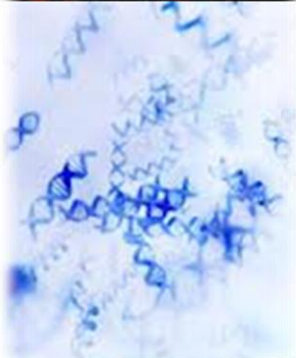
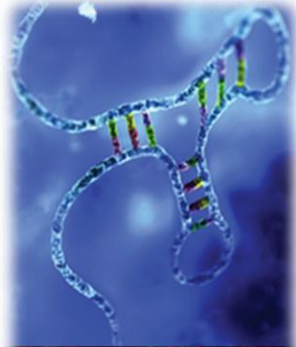
UCB-MSCs: Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα αίματος ομφαλίου λώρου (Umbilical cord blood -mesenchymal stem cells)

SS-AF-MSCs: ατρακτοειδές σχήμα (spindle shape)

RS-AF-MSCs: σφαιρικό σχήμα (round shape)

GFP: Φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green fluorescent protein)

MOI: Πολλαπλότητα ιικής μόλυνσης (Multiplicity of infection)



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βλαστικά κύτταρα (Stem Cells, SCs)

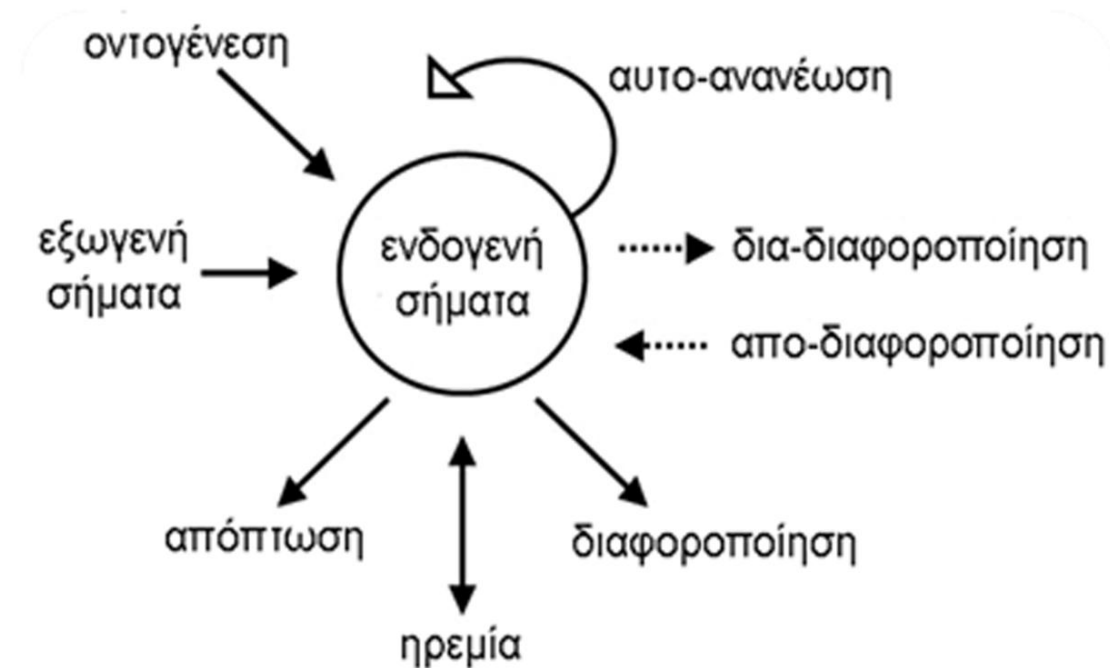
Τα βλαστικά κύτταρα (Stem cells, SCs) μονοπωλούν το ενδιαφέρον περισσότερο από κάθε άλλο πεδίο στην Βιολογία τα τελευταία χρόνια. Αυτό συμβαίνει διότι η αποκάλυψη αλλά και η αποκωδικοποίηση των μοναδικών ιδιοτήτων τους αναμένεται να βοηθήσει στην κατανόηση των βιολογικών μηχανισμών των κυττάρων και παράλληλα να οδηγήσει στην ανεύρεση δυνητικών θεραπειών με εφαρμογή στην Αναγεννητική Ιατρική [1].

Τα SCs αποτελούν μία κατηγορία αδιαφοροποίητων κυττάρων που χαρακτηρίζονται από την ικανότητα αυτοανανέωσης για απεριόριστο χρονικό διάστημα και την ικανότητα διαφοροποίησης σε εξειδικευμένους τύπους κυττάρων [2, 3] (Εικόνα 1.1). Επομένως, τα SCs μπορούν να αυτοανανεώνονται, δηλαδή να δίνουν γένεση σε θυγατρικά κύτταρα απόλυτα όμοια με το μητρικό καθώς επίσης και να δημιουργούν γενεές με περιορισμένο δυναμικό όσον αφορά τη διαφοροποίηση [1]. Παρόλο που τα περισσότερα κύτταρα στο ενήλικο στάδιο είναι ήδη διαφοροποιημένα, τα βλαστικά κύτταρα έχουν ποικίλες λειτουργίες, όπως να αναπληρώνουν συνεχώς πληθυσμούς ώριμων κυττάρων, όπως είναι τα αιμοποιητικά ή τα κύτταρα του δέρματος ή να αντικαθιστούν διαφοροποιημένα κύτταρα σε περίπτωση βλάβης του ιστού [4].



Εικόνα 1.1: Οι ιδιότητες ενός βλαστικού κυττάρου.

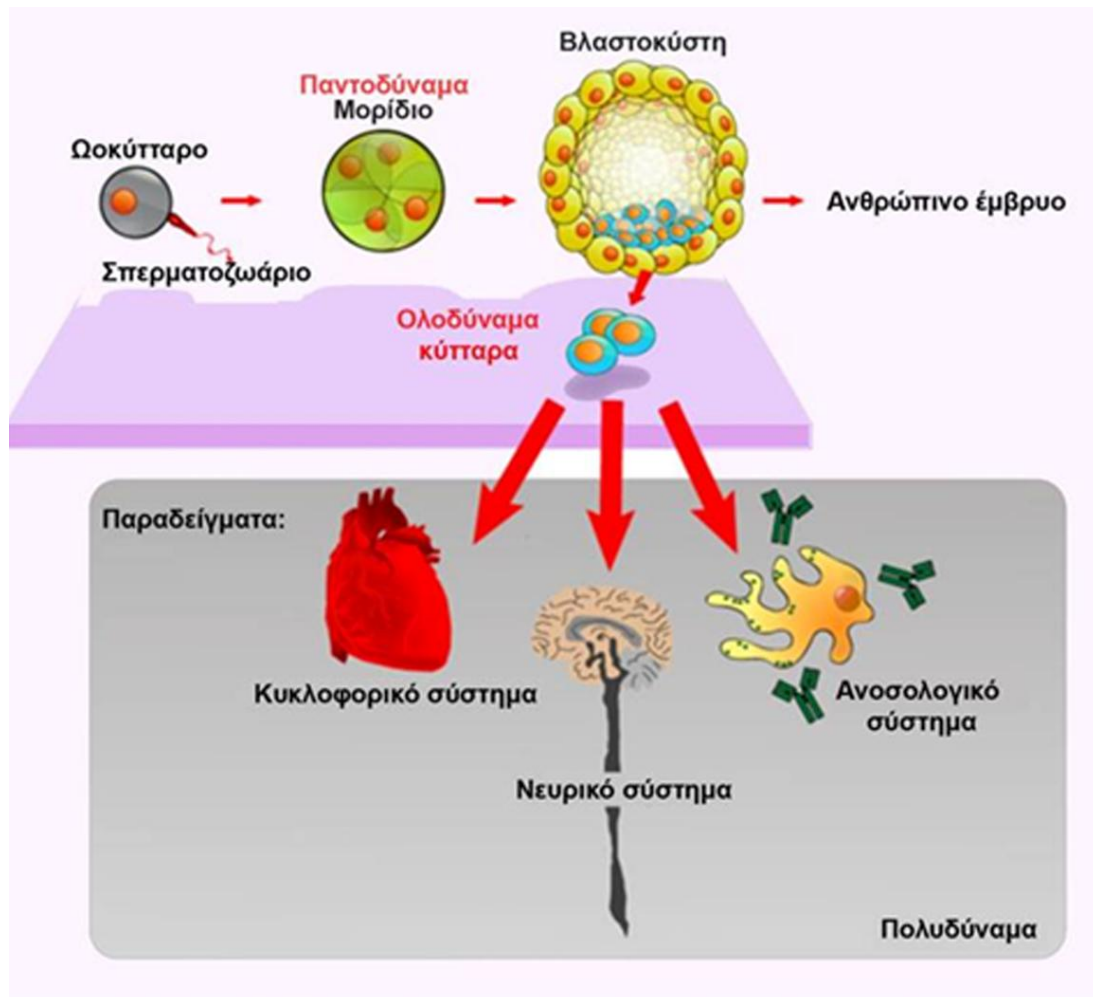
Οι αποφάσεις του βλαστικού κυττάρου, καθώς και η επιλογή προς την κατεύθυνση της απόπτωσης, της μετάπτωσης σε ηρεμία ή της διαφοροποίησης προς ιστούς διαφορετικούς από εκείνους στους οποίους ευρίσκεται καθορίζεται από την αλληλεπίδραση εξωγενών και ενδογενών σημάτων καθώς και από το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασής του [1] (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2: Οι αποφάσεις ενός βλαστικού κυττάρου.

Κατά τη διάρκεια της οντογένεσης τα βλαστικά κύτταρα εμφανίζουν ετερογένεια όσον αφορά την πολυδυναμία τους (Εικόνα 1.3). Έτσι στην κορυφή της κλίμακας της οντογενετικής εξέλιξης των βλαστικών κυττάρων βρίσκεται το ζυγωτό και τα παράγωγα των δύο πρώτων κυτταρικών του διαιρέσεων. Τα κύτταρα αυτά είναι παντοδύναμα (totipotent) και ικανά να δώσουν γένεση σε ολόκληρο το έμβρυο και την τροφοβλάστη. Καθώς το ζυγωτό συνεχίζει να αναπτύσσεται, σχηματίζεται η έσω κυτταρική μάζα (inner cell mass) της βλαστοκύστης, όπου συναντάμε τα αρχέγονα εμβρυϊκά ή εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, τα οποία θα δώσουν γένεση σε όλους τους ιστούς του εμβρύου. Τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας είναι ολοδύναμα ή πλειοδύναμα (pluripotent) και μπορούν να διαφοροποιηθούν και προς τα τρία

βλαστικά δέρματα, καθώς και προς τα γαμετικά κύτταρα, όχι όμως προς ολόκληρο το έμβryo [1].

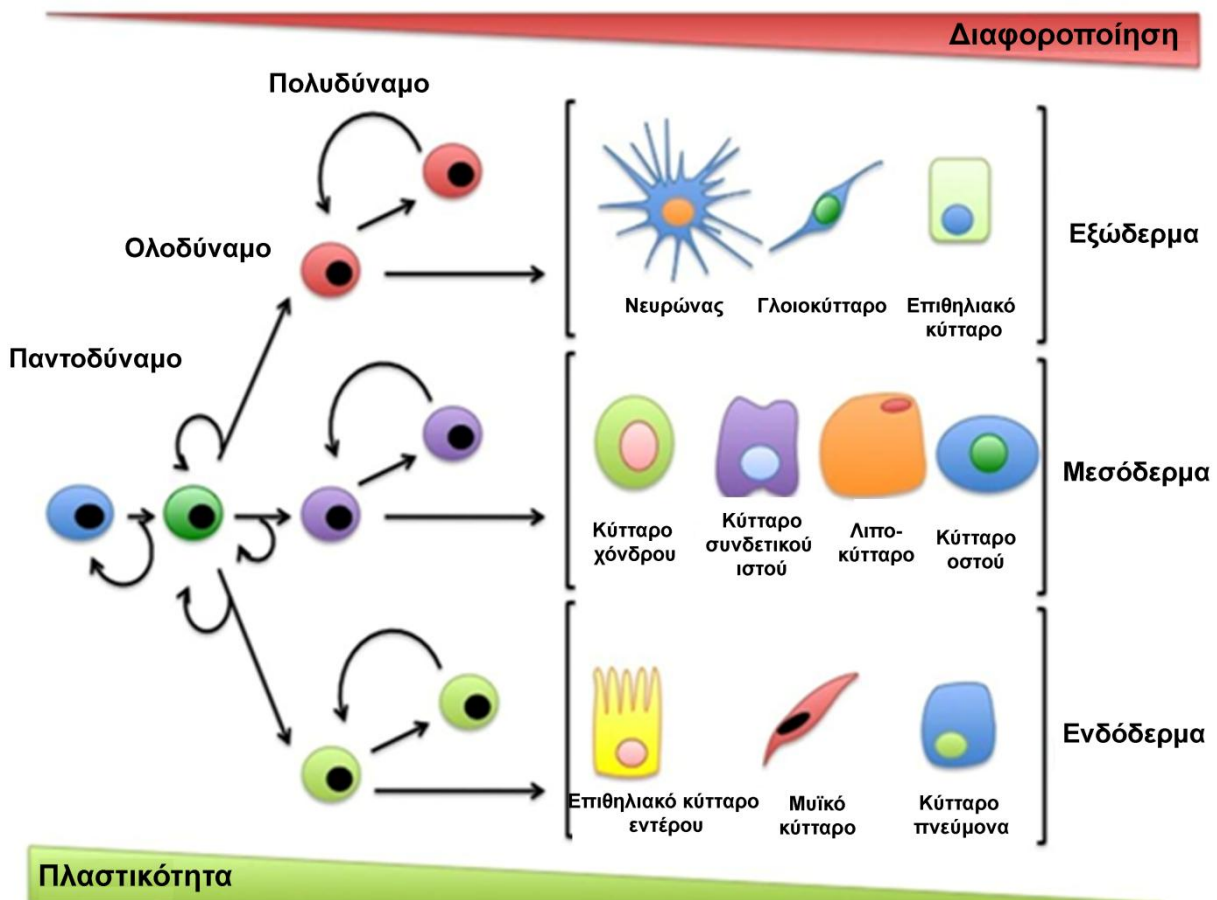


Εικόνα 1.3: Η οντογένεση των διαφόρων τύπων βλαστικών κυττάρων.

Μετά τη γέννηση, οι περισσότεροι ιστοί ενηλίκου σταδίου περιέχουν πολυδύναμα (multipotent) βλαστικά κύτταρα, που μπορούν να παράγουν κύτταρα περιορισμένου εύρους διαφοροποίησης και κατά βάση ανάλογα με τον ιστό στον οποίο βρίσκονται (Εικόνα 1.3). Παρόλα αυτά, σε μερικές περιπτώσεις διατηρούν τη λεγόμενη πλαστικότητα, δηλαδή την ικανότητα διαφοροποίησης προς άλλους κυτταρικούς τύπους [5] (Εικόνα 1.4). Τέλος, υπάρχουν και τα μονοδύναμα βλαστικά κύτταρα

(unipotent) που είναι ικανά να εξελιχθούν μόνο σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο [6].

Τα βλαστοκύτταρα (SC) μπορούν να κατηγοριοποιηθούν είτε σε εμβρυονικού (embryonic stem cells, ESCs) είτε σε ενηλίκου σταδίου (adult stem cells, ASCs). Στη συνέχεια οι δύο αυτές ομάδες υποδιαιρούνται σε υποομάδες, ανάλογα με τον οργανισμό ή τον ιστό από τον οποίο προέρχονται καθώς και ανάλογα με τον ιστό προς τον οποίο μπορούν να διαφοροποιηθούν [6]. Πιο συγκεκριμένα, τα ESCs απομονώνονται από την βλαστοκύστη και πληρούν όλες τις ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων ενώ τα ASCs απομονώνονται από πολλούς ενήλικους ιστούς, όπως ο μυελός των οστών (Bone marrow, BM) και ο λιπώδης ιστός, και διαθέτουν τις ίδιες χαρακτηριστικές ιδιότητες αλλά με πιο περιορισμένο δυναμικό σε σύγκριση με τα ESCs [7-9].



Εικόνα 1.4: Η δυνατότητα διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων.

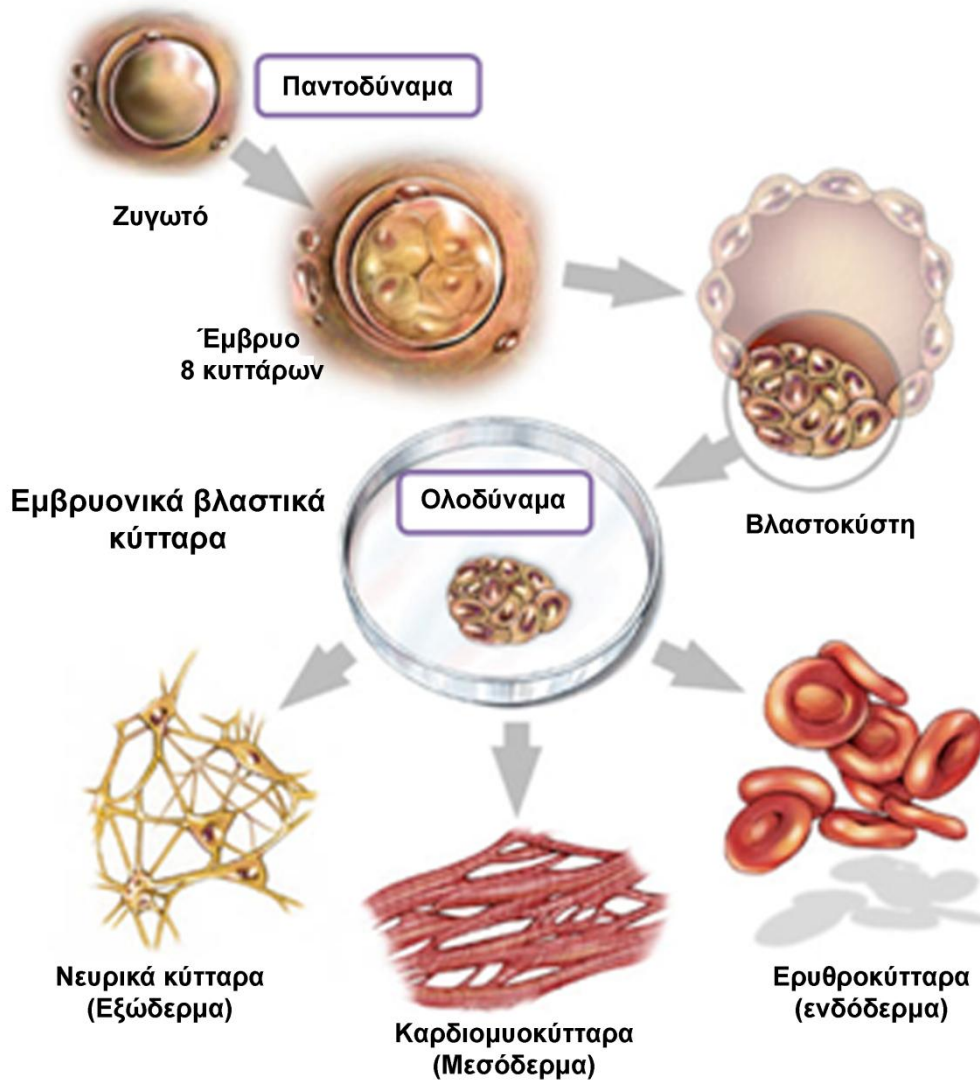
Επιπλέον, μία πιο πρόσφατα χαρακτηρισμένη κατηγορία βλαστικών κυττάρων είναι τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Fetal stem cells, FSCs), τα οποία έχουν απομονωθεί κατά την διάρκεια της κύησης ή της γέννησης του εμβρύου από πολλούς διαφορετικούς ιστούς, όπως ο πλακούντας, το αίμα ομφαλίου λώρου, η γέλη του Wharton και το αμνιακό υγρό [10-12]. Τα κύτταρα αυτά πληρούν τις ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων και χαρακτηρίζονται από προγονικό φαινότυπο με ευρύτερο δυναμικό διαφοροποίησης σε σχέση με τα αντίστοιχα ενήλικα κύτταρα [10, 12].

Γενικότερα, τα βλαστικά κύτταρα, εμβρυονικά, εμβρυϊκά και ενήλικα, χαρακτηρίζονται από μοναδικές ιδιότητες που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε πρωτόκολλα κυτταρικής θεραπείας και αναγεννητικής θεραπείας. Καθένας από τους παραπάνω τύπους βλαστικών κυττάρων διαθέτει μια σύνολο πλεονεκτημάτων αλλά και μειονεκτημάτων που θα πρέπει να αξιολογηθούν περαιτέρω για την εφαρμογή τους σε θεραπείες.

1.2 Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (Embryonic Stem Cells, ESCs)

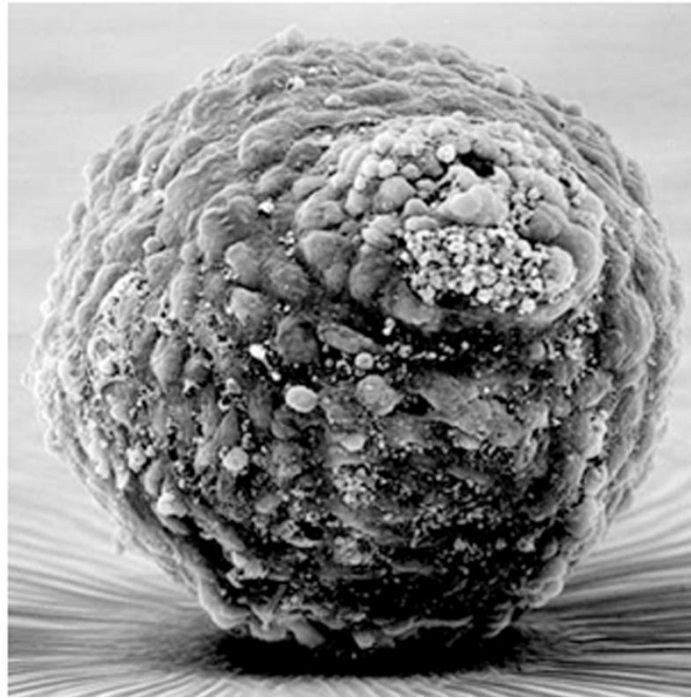
Από το 1998 που απομονώθηκαν για πρώτη φορά τα ανθρώπινα ESCs προκάλεσαν το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας και τη συνεχή μελέτη τους [13]. Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ESC) χαρακτηρίζονται ως ολοδύναμα (pluripotent) και έχουν τη δυνατότητα να δίδουν γένεση και στα τρία βλαστικά δέρματα (ενδόδερμα, μεσόδερμα και εξώδερμα) καθώς και στα γαμετικά κύτταρα [14] (Εικόνα 1.5).

Βασικό χαρακτηριστικό των ESCs είναι η ικανότητα της αυτοανανέωσης, όπου με ασύμμετρη διαίρεση παράγουν ένα πανομοιότυπο κύτταρο με το αρχικό και ένα κύτταρο που πρόκειται να ακολουθήσει ένα συγκεκριμένο πρόγραμμα διαφοροποίησης [15, 16].



Εικόνα 1.5: Αρχέγονα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα.

Η πιο ενδιαφέρουσα ιδιότητα των βλαστικών κυττάρων να διαφοροποιούνται, αφού σχηματίσουν *in vitro* τρισδιάστατες μορφές, τα εμβρυονικά σώματα (Embryonic bodies, EB) [17, 18] (Εικόνα 1.6). Πρόδρομα κύτταρα από το μεσόδερμα και το εξώδερμα αναπτύσσονται μέσα σε λίγες ημέρες, ενώ κύτταρα ενδοδέρματος συνήθως εμφανίζονται μετά την δέκατη μέρα, όπου τα περισσότερα EB αποκτούν μία κυστική μορφή [19].



Εικόνα 1.6 :In vitro τρισδιάστατες μορφές, τα εμβρυονικά σωμάτια.

Τα ESCs μπορούν να διατηρηθούν στην in vitro καλλιέργεια για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να χάσουν την ικανότητα διαφοροποίησής τους και υπό καθορισμένες συνθήκες είναι ικανά να πολλαπλασιάζονται επ' άοριστον. Ταυτοποιούνται και χαρακτηρίζονται από την έκφραση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων και μορίων επιφανείας. Οι μεταγραφικοί παράγοντες Oct4, Nanog και Sox2 σχηματίζουν ένα ρυθμιστικό δίκτυο που εξασφαλίζει την καταστολή γονιδίων που οδηγούν στην διαφοροποίηση και στην διατήρηση της πολυδυναμικότητας [20]. Μάλιστα το Oct4 χαρακτηρίζεται ως δείκτης ολοδυναμίας για τα ESCs. Τα πιο συχνά μόρια επιφανείας που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των hESCs είναι τα γλυκολιπίδια SSEA3 και SSEA4 και τα αντιγόνα Tra-160 και Tra-1-81 [21].

Η ικανότητα των ESCs να πολλαπλασιάζονται απεριόριστα και να διαφοροποιούνται σε όλους τους τύπους κυττάρων των τριών βλαστικών δερμάτων έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών. Αυτά τα μοναδικά χαρακτηριστικά τοποθετούν τα ESCs στο κέντρο του ενδιαφέροντος καθώς τα καθιστούν ιδανικά εργαλεία για την

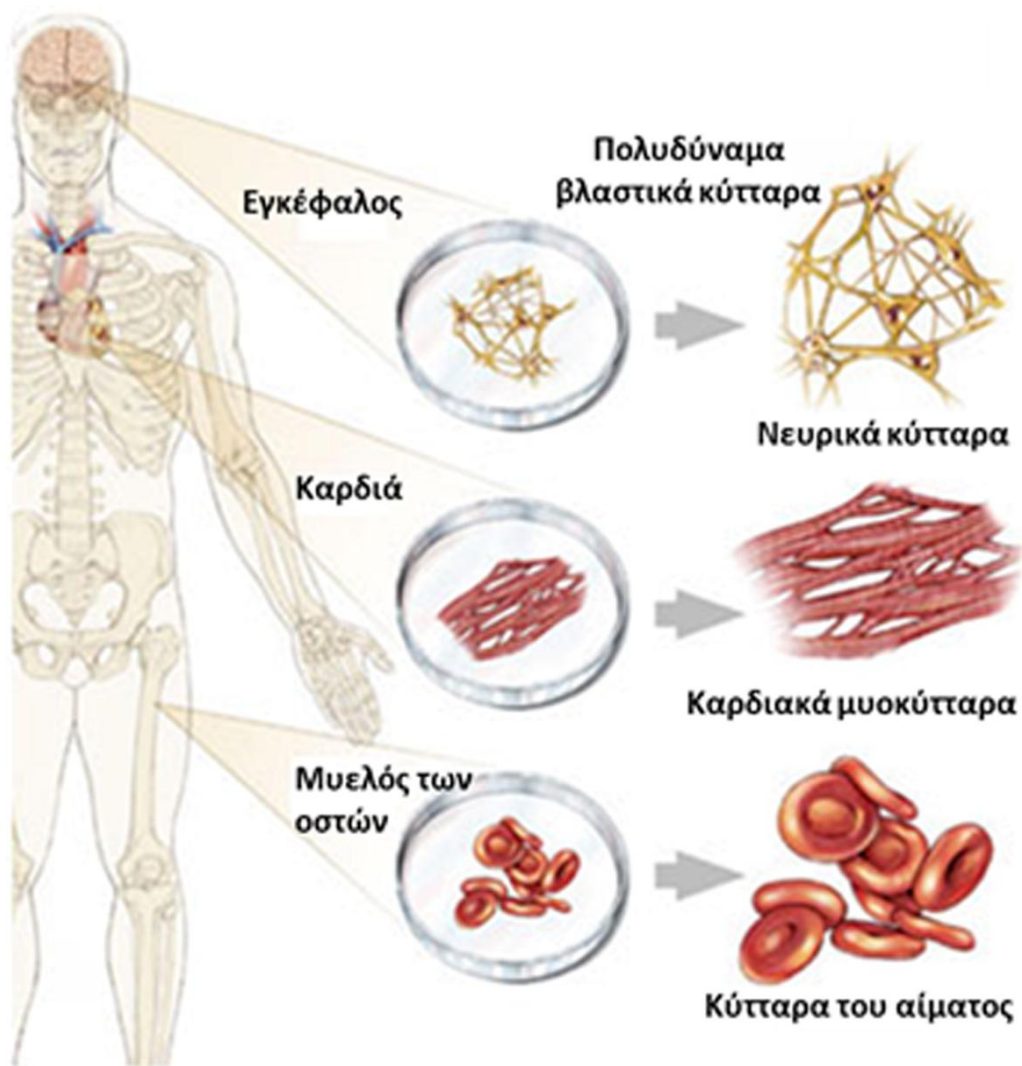
κυτταρική θεραπεία αλλά και την βαθύτερη κατανόηση της κυτταρικής βιολογίας [22-24]. Έχει αναπτυχθεί σημαντική ερευνητική δραστηριότητα για τη διερεύνηση της δυνατότητας των hESCs να αντικαταστήσουν κατεστραμμένα ή νοσούντα κύτταρα και ιστούς. Έτσι, μελέτες σε μοντέλα ζώων έχουν δείξει ότι η μεταμόσχευση ESCs μπορεί να βοηθήσει στη θεραπεία χρόνιων νοσημάτων όπως η νόσος Parkinson, η μυοπάθεια Duchenne, η καρδιακή και ηπατική μυοπάθεια και η ατελής οστεογένεση [25]. Παράλληλα, όμως δημιουργούνται σημαντικοί νομικοί και ηθικοί ενδοιασμοί ως προς την χρήση τους σε θεραπευτικές και κλινικές εφαρμογές, λόγω της χρήσης ανθρώπινων εμβρύων [26, 27]. Για το λόγο αυτό έρευνες έχουν στραφεί στην ανεύρεση εναλλακτικών πηγών βλαστικών κυττάρων μέσα στον ενήλικο οργανισμό.

1.3 Ενήλικα βλαστικά κύτταρα (Adult Stem Cells, ASCs)

Τα ASCs είναι αδιαφοροποίητα κύτταρα που απαντούν στο σώμα του οργανισμού μετά τη εμβρυϊκή ανάπτυξη. Βρίσκονται μεταξύ διαφοροποιημένων κυττάρων σε ιστούς ή όργανα όπως ο μυελός των οστών, το περιφερικό αίμα, ο κερατοειδής, ο αμφιβληστροειδής, ο εγκέφαλος, οι σκελετικοί μύες, το ήπαρ, το δέρμα, ο λιπώδης ιστός, ο πολφός των οδόντων, το πάγκρεας και το επιθήλιο του γαστρεντερικού σωλήνα [9, 28-33] (Εικόνα 1.7).

Τα ASCs, ως πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται και να αυτοανανεώνονται μέσα στο ανθρώπινο σώμα χωρίς να διαφοροποιούνται για μακρά χρονικά διαστήματα (long term self renewal) και είναι δυνατόν να δώσουν γένεση σε ώριμα κύτταρα με χαρακτηριστικά και εξειδικευμένες λειτουργίες [9, 34, 35]. Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα είναι σχετικά σπάνια μέσα στον οργανισμό και ως εκ τούτου είναι δύσκολο να αναγνωριστούν και να απομονωθούν.

Ένα άλλο βασικό μειονέκτημα είναι ότι όταν αναπτύσσονται *in vitro*, δεν είναι δυνατόν να παραμείνουν αδιαφοροποίητα για μεγάλο χρονικό διάστημα [9]. Ταυτόχρονα όμως η χρήση τους στον τομέα της έρευνας και της θεραπείας δεν θεωρείται αμφιλεγόμενη, όπως αυτή των ESCs, διότι προκύπτουν από ενήλικα δείγματα ιστού και όχι από καταστροφή εμβρύων [36].

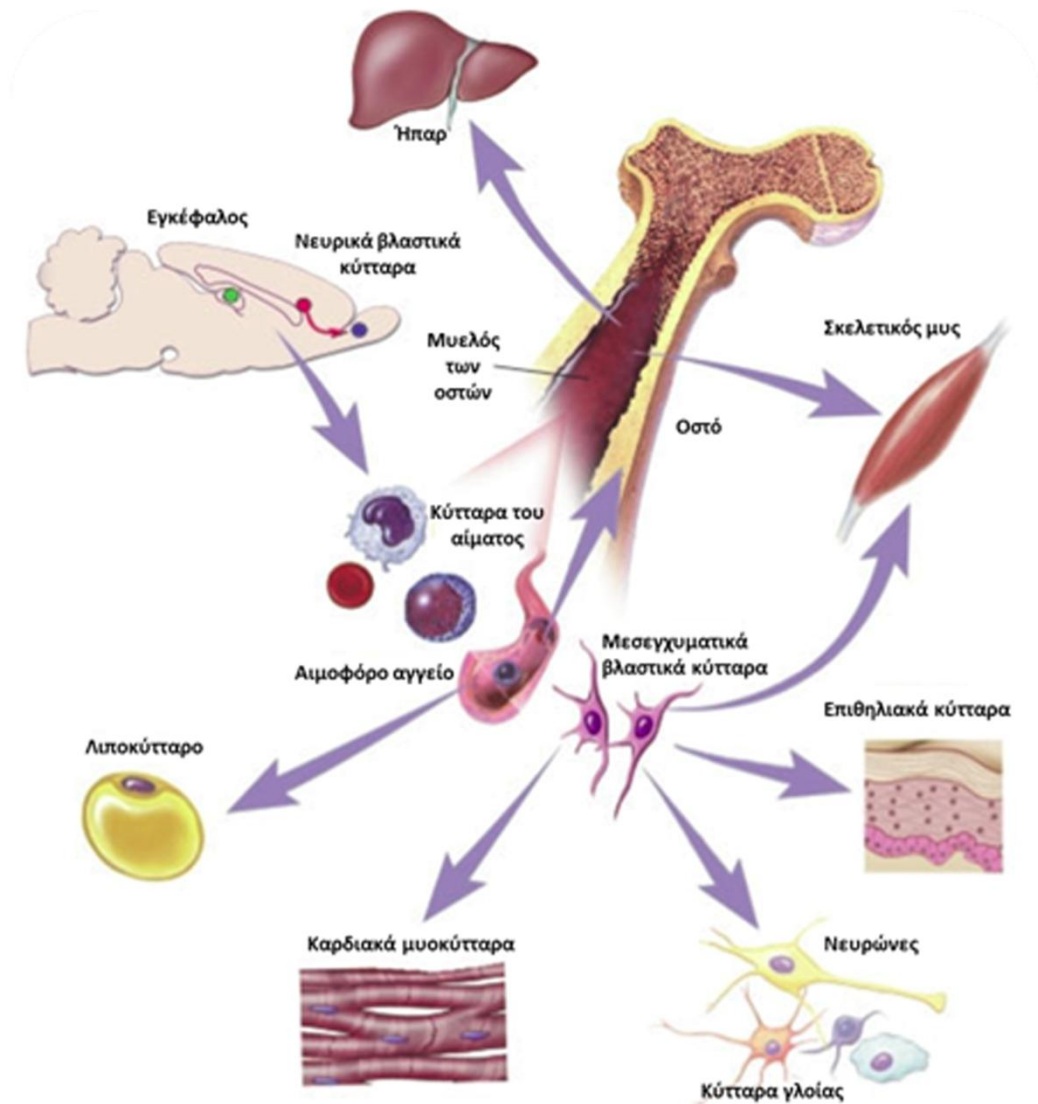


Εικόνα 1.7: Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα (ASCs) είναι πολυδύναμα (multipotent).

Η κύρια πηγή προέλευσης των ASCs και η καλύτερα μελετημένη είναι ο μυελός των οστών (Bone marrow, BM) (Εικόνα 1.8). Ο μυελός των οστών είναι μαλακός, σπογγώδης ιστός που βρίσκεται μέσα στα οστά του σώματος και κυρίως στα οστά της λεκάνης και του στέρνου.

Από εκεί απομονώνονται ASCs, τα οποία υποδιαιρούνται σε δύο υποομάδες, τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα τα οποία δίδουν γένεση στα κύτταρα του αίματος και του ανοσοποιητικού συστήματος και τα στρωματικά ή μεσεγχυματικά βλαστικά

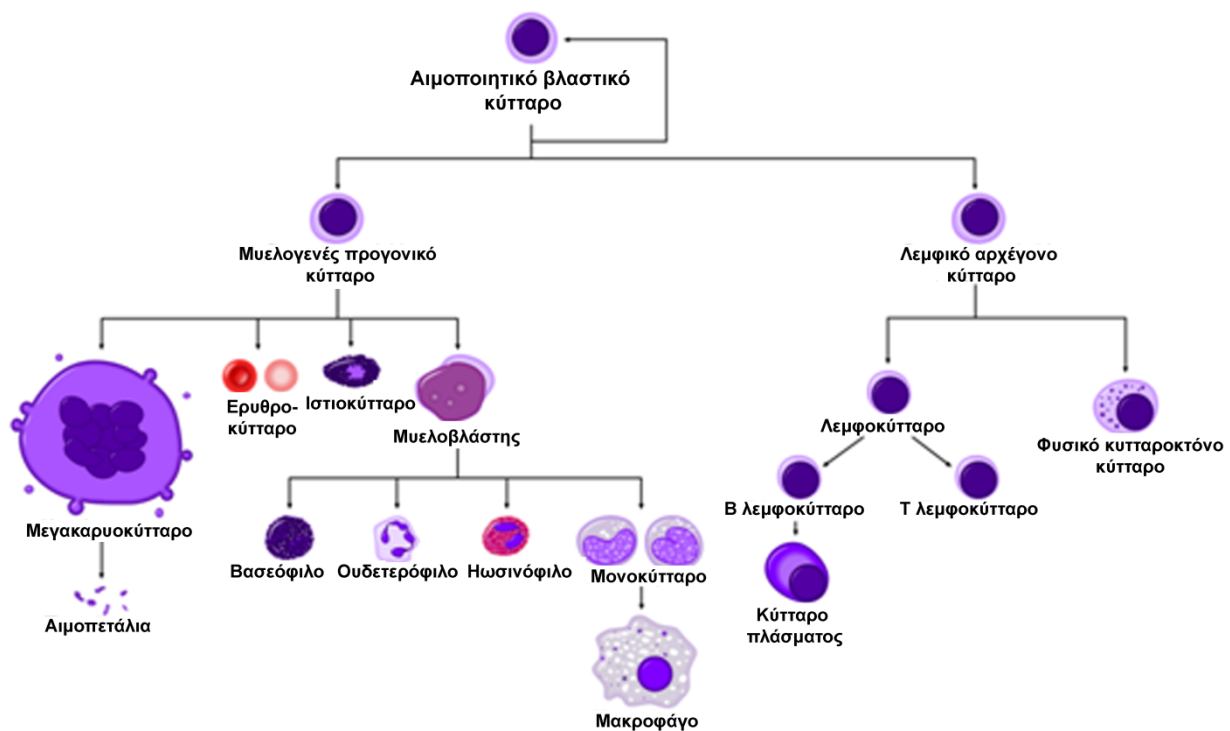
κύτταρα από τα οποία προέρχονται τα κύτταρα του λιπώδους ιστού, των χόνδρων, τα κύτταρα του οστίτη ιστού, των μυών, ενώ συγχρόνως παρέχουν στρωματική υποστήριξη για τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα [37].



Εικόνα 1.8: Από τον μυελό των οστών απομονώνονται τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα και τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα.

1.3.1 Αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (Hematopoietic Stem Cells, HSCs)

Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (HSCs) έχουν χαρακτηριστεί φαινοτυπικά και μπορούν να διαιρεθούν σε διακριτούς πληθυσμούς με βάση το φαινότυπο και τη λειτουργία τους. Ο ένας εκ των δύο είναι τα μακράς διάρκειας αιμοποιητικά κύτταρα (Long Term HSCs) που έχουν τη μέγιστη ικανότητα αυτοανανέωσης και δίνουν γένεση σε όλες τις αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές (Εικόνα 1.9) [1, 3, 9]. Οι άμεσοι απόγονοι των LT-HSCs είναι τα βραχείας διάρκειας αιμοποιητικά κύτταρα (Short Term HSCs), τα οποία μπορούν να δώσουν γένεση στις αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές, αλλά μόνο για περιορισμένη χρονική περίοδο και αποτελούν το δεύτερο υποπληθυσμό [3].



Εικόνα 1.9: Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα δίνουν γένεση στα κύτταρα του αίματος και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Τα HSCs είναι σπάνια και απαντούν σε συχνότητα 1 στα 10^4 - 10^5 των συνολικών αιμοποιητικών κυττάρων. Εντούτοις έχει επιτευχθεί η απομόνωσή τους βάσει της έκφρασης συγκεκριμένων μορίων επιφανείας των κυττάρων [5]. Πιο συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι κύτταρα που εκφράζουν το μόριο CD34 είναι ικανά για αποκατάσταση της αιμοποίησης σε ανοσο-ανεπαρκή ποντίκια και στα περισσότερα κλινικά πρωτόκολλα η απομόνωση των HSCs επιτυγχάνεται με τη χρήση $CD34^+$ πληθυσμών [34].

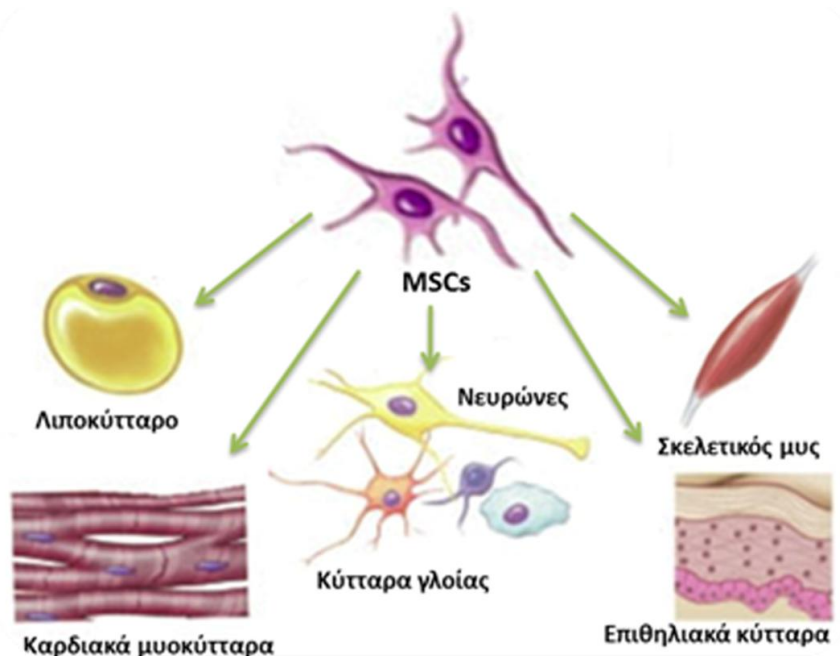
Η μεταμόσχευση των HSCs είναι πλέον στις μέρες μας μία καθιερωμένη κλινική διαδικασία, παρόλο που δεν επιτυγχάνονται πάντα τα ιδανικά αποτελέσματα. Αυτό συμβαίνει διότι είναι ακόμα ανεπαρκής η γνώση για τους διάφορους υποπληθυσμούς αρχέγονων κυττάρων που χρειάζονται για την μόνιμη ανάκτηση της παραγωγής κυττάρων του αίματος [38]. Τα HSCs έχουν χρησιμοποιηθεί ως μόσχευμα για την αποκατάσταση μυελού των οστών σε περιπτώσεις όπως συγγενείς ανωμαλίες ανοσοανεπάρκειας, απλαστική αναιμία, β-θαλασσαιμία, καθώς και σε κακοήθη νοσήματα, όπως το λέμφωμα, η λευχαιμία και το μυέλωμα [39, 40]. Επιπλέον, τα HSCs αποτελούν ιδανικό στόχο για την τεχνολογία της γονιδιακής θεραπείας, με τη μεταφορά γονιδίων μέσω μεταγωγής από ιογενείς φορείς, όπως οι ρετροϊοί και οι λεντιϊοί [41].

1.3.2 Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (Mesenchymal Stem Cells, MSCs)

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs), που ανήκουν στο στρωματικό περιβάλλον του μυελού των οστών ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά την δεκαετία του 60 από τον Alexander Friedenstein [42]. Η κύρια πηγή ενηλίκων MSCs είναι ο μυελός των οστών. Τα MSCs αντιπροσωπεύουν ένα μικρό τμήμα (0.001-0.01% του συνολικού πληθυσμού) των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών. Απομονώνονται συνήθως από τη στοιβάδα μονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών, που προκύπτει μετά από επιστοίβαση του μυελού σε φικόλη ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση [43]. Τα μονοπύρηννα κύτταρα καλλιεργούνται στη συνέχεια σε κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο και τα MSCs προσκολλώνται στην πλαστική καλλιεργητική επιφάνεια.

Τα MSCs είναι ένας διακριτός πληθυσμός από τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, καθώς δεν εκφράζουν τα μόρια επιφανείας CD14, CD34, CD117 και CD31 (δείκτες των ενδοθηλιακών και αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων) καθώς και το μόριο CD45 (δείκτης των αιμοποιητικών κυττάρων) [44]. Ο χαρακτηρισμός τους βασίζεται στην έκφραση ενός συνόλου δεικτών όπως το μόριο Stro-1, το οποίο εκφράζεται στα μη αιμοποιητικά στρωματικά προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών, τα αντιγόνα επιφανείας CD105 (ενδογλίνη), CD73, CD166 (ALCAM), CD90/Thy-1, CD44 και CD29 [45-47].

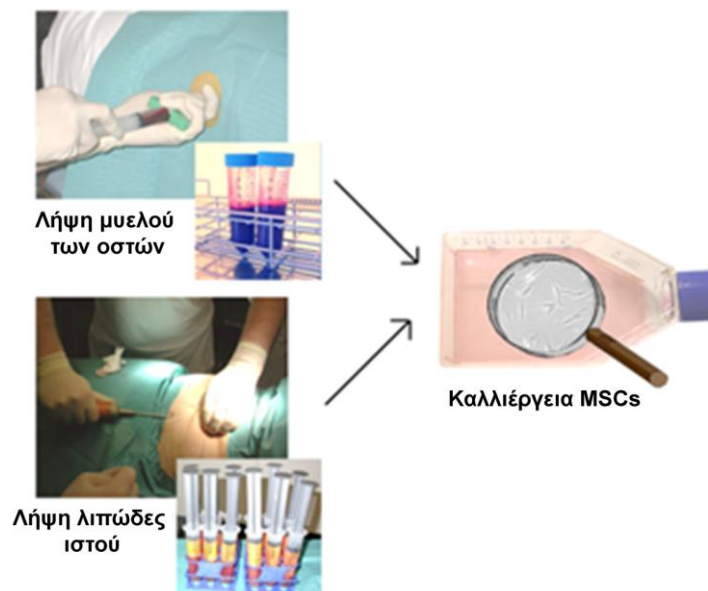
Εκτεταμένες μελέτες σε αυτά τα κύτταρα έδειξαν ότι είναι πολυδύναμα και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα του λιπώδους ιστού, των χόνδρων και του οστίτη ιστού [48]. Επιπρόσθετα έχουν δείξει ότι τα MSCs εκτός από ιστούς μεσοδερμικής προέλευσης μπορούν να διαφοροποιηθούν *in vitro* σε κύτταρα που προέρχονται από άλλες εμβρυϊκές στοιβάδες όπως σε νευρικά κύτταρα [49], ηπατοκύτταρα [50], καρδιακά κύτταρα [51], σκελετικά κύτταρα [52] και επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος, του πνεύμονα, του εντέρου και του σπλήνα [50] (Εικόνα 1.10).



Εικόνα 1.10: Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα εκτός από ιστούς μεσοδερμικής προέλευσης μπορούν να διαφοροποιηθούν *in vitro* σε κύτταρα που προέρχονται από άλλες εμβρυϊκές στοιβάδες

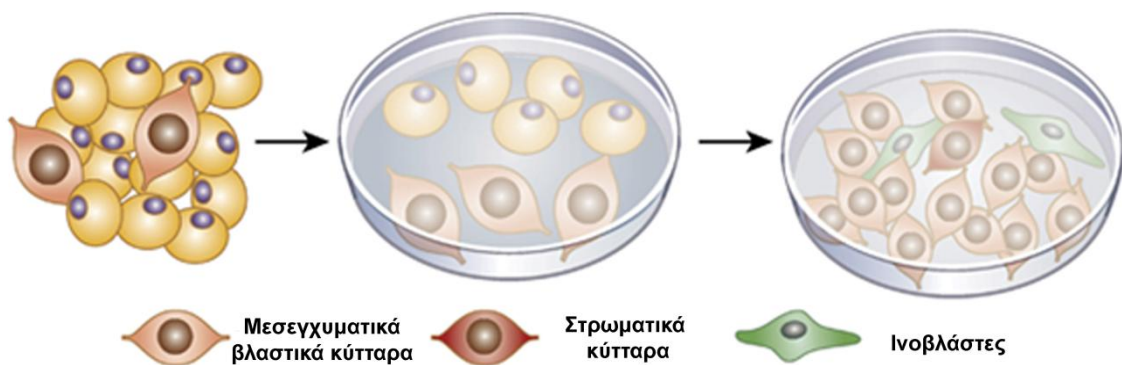
Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για την διερεύνηση του πολλαπλασιασμού και τον φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των κυττάρων αυτών *in vitro* όπως και για την αναγνώριση παραγόντων που τα διατηρούν σε αδιαφοροποίητο στάδιο [53, 54] με σκοπό τη χρήση τους σε μεταμοσχεύσεις *in vivo* σε περιπτώσεις επιδιόρθωσης συγκεκριμένων ιστών όπως τα οστά και οι χόνδροι [55, 56]. Δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο θεραπευτικός τους ρόλος βασίζεται ιδιαίτερα στην ικανότητα τους να εκκρίνουν παράγοντες που μπορούν και επηρεάζουν το μικροπεριβάλλον του τραυματισμένου ιστού [57].

Εντούτοις ένα μείζον πρόβλημα του ιστού αυτού είναι το γεγονός ότι ο αριθμός των MSCs μειώνεται σημαντικά με την πάροδο της ηλικίας, έχουν περιορισμένο δυναμικό διαφοροποίησης και βραχύτερο χρόνο ζωής σε σχέση με τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Ένα άλλο μειονέκτημα των ενήλικων βλαστικών κυττάρων του μυελού των οστών είναι ότι όταν αναπτύσσονται *in vitro* δεν είναι δυνατόν να παραμείνουν αδιαφοροποίητα για μεγάλο χρονικό διάστημα [58]. Επιπλέον, η διαδικασία είναι αρκετά επίπονη για το δότη (Εικόνα 1.11), γεγονός το οποίο καθιστά επιτακτική την ανάγκη της αναζήτησης επαρκών εναλλακτικών πηγών των κυττάρων αυτών για αυτόλογη ή ετερόλογη θεραπευτική χρήση.



Εικόνα 1.11: Διαδικασίες απομόνωσης μυελού των οστών και λιπώδη ιστού για την περαιτέρω απομόνωση και καλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων.

Μία ενήλικη πηγή MSCs κερδίζει το ενδιαφέρον των ερευνητών όλα και περισσότερο είναι ο λιπώδης ιστός. Τα MSCs του λιπώδους ιστού (adipose tissue derived mesenchymal stem cells, ATMSCs) απομονώνονται με μία απλή χειρουργική διαδικασία που είναι εύκολη και επαναλήψιμη [59] (Εικόνα 1.11). Τα MSCs του λιπώδους ιστού προσκολλώνται στην πλαστική καλλιεργητική επιφάνεια. Η καλλιέργεια όμως είναι ετερογενής αφού μαζί καλλιεργούνται στρωματικά κύτταρα του λιπώδους ιστού και ινοβλάστες (Εικόνα 1.12). Πρόσφατες μελέτες επιβεβαίωσαν ότι τα ATMSCs έχουν ανάλογο φαινότυπο με τα BM-MSCs, καθώς και παρόμοιες χαρακτηριστικές ιδιότητες [60-62]. Εντούτοις, παράγοντες, όπως η ηλικία του δότη, ο τύπος του λιπώδους ιστού, η προέλευσή του (υποδορίως ή σπλαγχνικώς), το είδος της χειρουργικής επέμβασης και οι συνθήκες καλλιέργειας μπορούν να επηρεάσουν το δυναμικό πολλαπλασιασμού και την ικανότητα διαφοροποίησης των ATMSCs [59].



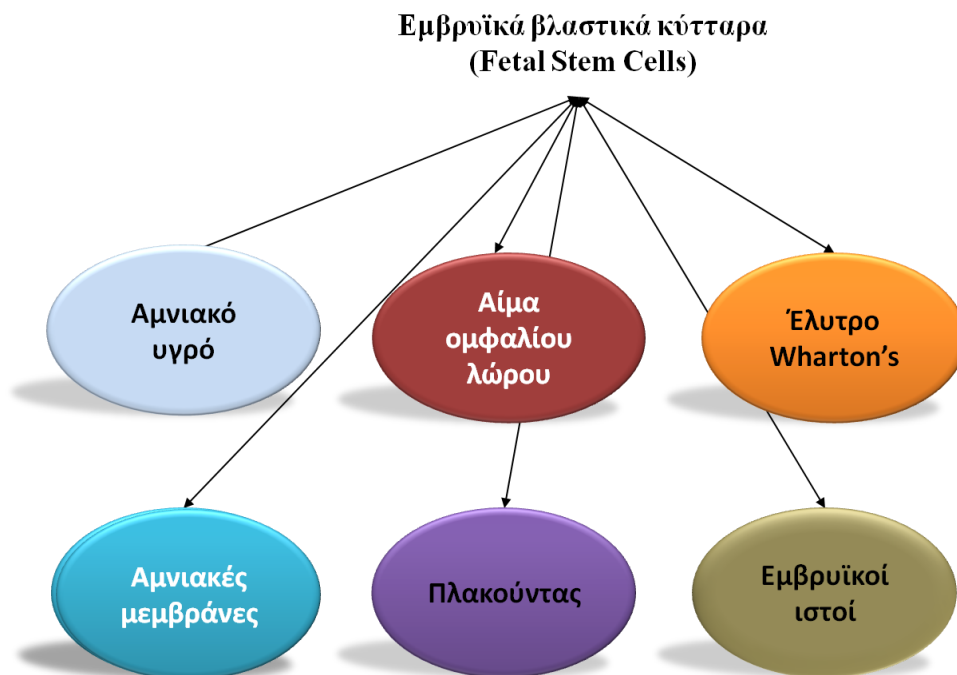
Εικόνα 1.12: Τα MSCs του λιπώδους ιστού προσκολλώνται στην πλαστική καλλιεργητική επιφάνεια. Η καλλιέργεια όμως είναι ετερογενής αφού μαζί καλλιεργούνται στρωματικά κύτταρα του λιπώδους ιστού και ινοβλάστες.

Όπως αναφέρθηκε, εκτός από τον μυελό των οστών υπάρχουν και άλλες πηγές ενήλικων MSCs. Αυτό το γεγονός δείχνει αν και δεν αποδεικνύει, ότι υπάρχει ένα δίκτυο μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων που μεταναστεύει από την κύρια πηγή (το στρώμα του μυελού των οστών) στους διάφορους ιστούς μέσω της κυκλοφορίας και στην συνέχεια αποκτά κατάλληλα χαρακτηριστικά, έτσι ώστε να συνδράμει στην

διατήρηση και επιδιόρθωση του συγκεκριμένου ιστού [63]. Παρόλη την φαινοτυπική ομοιογένεια, τα κύτταρα αυτά μπορεί να παρουσιάζουν ετερογένεια στην ικανότητα διαφοροποίησης, γεγονός που σχετίζεται με τον ιστό από τον οποίο προέρχονται. Έτσι, τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα διαφέρουν μεταξύ τους ανάλογα με την πηγή προέλευσής τους και η σχέση τους με τα MSCs από τον μυελό των οστών θα πρέπει να διερευνηθεί [50].

1.4 Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Fetal Stem Cells, FSCs)

Πρόσφατα έχουν χαρακτηριστεί τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Fetal stem cells, FSCs) που αποτελούν μία κατηγορία βλαστικών κυττάρων με ενδιάμεσες ιδιότητες μεταξύ αρχέγονων εμβρυϊκών και ενήλικων βλαστικών κυττάρων. Τα FSCs έχουν απομονωθεί κατά την διάρκεια της κύησης από πολλούς διαφορετικούς ιστούς, όπως ο μυελός των οστών, το αίμα και το ήπαρ του εμβρύου, καθώς και από αρκετούς εξω-εμβρυϊκούς ιστούς, όπως το έλυτρο του Wharton, η αμνιακή μεμβράνη, το αμνιακό υγρό, ο πλακούντας και ομφαλοπλακουντιακό αίμα [10-12] (Εικόνα 1.13). Οι ιστοί αυτοί συνήθως απορρίπτονται μετά τη γέννα ή είναι εύκολα προσβάσιμοι μέσω των εξετάσεων της αμνιοκέντησης και των χοριακών λαχνών.



Εικόνα 1.13: Εμβρυϊκές πηγές βλαστικών κυττάρων.

Τα κύτταρα αυτά, αν και παρουσιάζουν περιορισμένο δυναμικό διαφοροποίησης σε σχέση με τα ESCs, εντούτοις πλεονεκτούν, τόσο στην ικανότητα πολλαπλασιασμού όσο και στην ικανότητα διαφοροποίησης, ως προς τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα. Συμπερασματικά, τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα αποτελούν μία νέα τάξη πολυδύναμων βλαστοκυττάρων που διαθέτουν ενδιάμεσα χαρακτηριστικά, μεταξύ εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων της βλαστοκύστης και ενήλικων βλαστικών κυττάρων [12](Εικόνα 1.14).



Εικόνα 1.14: Το αναπτυξιακό στάδιο και η δυναμικότητα των εμβρυϊκών κυττάρων κατά τη διάρκεια της οντογένεσης.

1.4.1 Βλαστικά κύτταρα αίματος ομφάλιου λώρου

Το αίμα του ομφάλιου λώρου (Umbilical cord blood, UCB), που επίσης ονομάζεται αίμα του πλακούντα, είναι το αίμα που παραμένει στον ομφάλιο λώρο και στον πλακούντα μετά την γέννηση του παιδιού (Εικόνα 1.15). Συνήθως, μετά την γέννηση του παιδιού, το αίμα του ομφάλιου λώρου αχρηστεύεται μαζί με τον πλακούντα και τον ομφάλιο λώρο διότι αποτελούν υπολείμματα της γέννας. Το αίμα ομφάλιου λώρου αποτελεί μία από τις πιο καλά χαρακτηρισμένες πηγές τόσο αιμοποιητικών όσο και μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων, που προέρχονται από το νεογνό [10, 64, 65]. Η πηγή αυτή μπορεί να αποτελέσει μία εναλλακτική πηγή βλαστικών κυττάρων για την κυτταρική θεραπεία, καθώς δεν προκύπτουν ηθικοί φραγμοί για την χρήση αυτού του υλικού [66].



Εικόνα 1.15: Το αίμα ομφαλίου λώρου είναι το αίμα που παραμένει στον ομφάλιο λώρο και στον πλακούντα μετά τη γέννηση του εμβρύου.

Η συχνότητα των MSCs στο αίμα ομφαλίου λώρου είναι εξαιρετικά μικρή, συγκεκριμένα το 0.00003% των εμπύρηνων κυττάρων, αλλά διαθέτουν μεγάλη πολλαπλασιαστική ικανότητα σε σύγκριση με MSCs άλλων πηγών [67]. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα UCB-MSCs είναι παρόμοια με τα BM-MSCs με βάση τα κυτταρικά τους χαρακτηριστικά και την ικανότητα διαφοροποίησης τους [65, 67]. Τα UCB-MSCs είναι αρνητικά για τους αιμοποιητικούς επιφανειακούς δείκτες ενώ είναι θετικά για τους μεσεγχυματικούς δείκτες CD90, CD105 και CD73 [11] (Πίνακας 1.1). Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι τα UCB-MSCs εκφράζουν και τους εμβρυϊκούς δείκτες SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60, Tra 1-81 και NANOG [12]. Επιπρόσθετα, τα UCB-MSCs παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα διαφοροποίησης προς οστεοβλάστες και περιορισμένη ικανότητα διαφοροποίησης προς λιποκύτταρα σε σύγκριση με τα BM-MSCs [68].

	Αντιγόνα	CD no.	UCB-MSCs
Μεσεγχυματικοί δείκτες	Thy-1	CD90	+
	SH3, SH4	CD73	+
	Endoglobin	CD105	+
Αιμοποιητικοί δείκτες	LCA	CD45	-
	Gp105-120	CD34	-

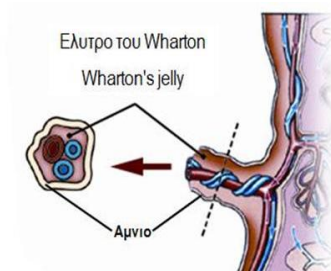
Πίνακας 1.1: Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των UCB-MSCs.

Επιπροσθέτως, έχει αναφερθεί ότι τα UCB-MSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν προς νευρικά κύτταρα ή καρδιομυοκύτταρα [69, 70]. Τα UCB-MSCs είναι λιγότερο ώριμα από τα BM-MSCs, έχουν λιγότερες πιθανότητες να προκαλέσουν ανοσολογικές αντιδράσεις σε διαδικασίες μεταμόσχευσης [71]. Αναλυτικότερα, τα UCB-MSCs έχουν ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και δεν φαίνεται να πυροδοτούν το ανοσοποιητικό σύστημα του μετά από αλλογενή μεταμόσχευση [72].

Έτσι, τα UCB-MSCs παρουσιάζουν σημαντικά περισσότερα πλεονεκτήματα στην απομόνωση, αποθήκευση και στην μεταμόσχευση σε σύγκριση με τα BM-MSCs [73, 74]. Εντούτοις, στα μειονεκτήματα των UCB-MSCs πρέπει να συμπεριληφθούν οι δύσκολες συνθήκες απομόνωσης και έκπτυξης τους, καθώς και το μικρό ποσοστό τους στα δείγματα ομφαλοπλακουντιακού αίματος. Αυτό το γεγονός προβάλλει έντονη την ανάγκη για την εύρεση εναλλακτικών πηγών MSCs, που θα έχουν βελτιωμένες ιδιότητες και θα επιτρέψουν την αποτελεσματική τους χρήση στην κυτταρική θεραπεία.

1.4.2 Βλαστικά κύτταρα του ελύτρου του Wharton

Πηγή εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων αποτελεί και το έλυτρο του Wharton, το οποίο συνιστά το συνδετικό ιστό που περιβάλλεται από τις δύο αρτηρίες και τη μία φλέβα του ομφαλίου λώρου [11, 12] (Εικόνα 1.16). Αναλυτικότερα, MSCs έχουν απομονωθεί από την περιοχή του ελύτρου του Wharton του ομφαλίου λώρου και ονομάζονται UC- MSCs (Umbilical cord blood mesenchymal stem cells) [75]. Έχει εκτιμηθεί ότι περίπου 3.6×10^6 UC-MSCs απομονώνονται από κάθε δείγμα ομφαλίου λώρου [12].



Εικόνα 1.16: Έλυτρο του Wharton

Εκτεταμένες μελέτες έχουν δείξει ότι τα UB-MSCs διαθέτουν την ικανότητα της αυτοανανέωσης καθώς και την ικανότητα διαφοροποίησης όπως τα MSCs άλλων πηγών [75]. Τα UC-MSCs εκφράζουν τους επιφανειακούς δείκτες CD90, CD73, CD105, CD10, CD13, CD29 και CD44, ενώ δεν εκφράζουν τα μόρια CD14, CD33, CD56, CD31, CD34, CD45 και HLA-DR [76-78] (Πίνακας 1.2). Επιπρόσθετα, τα UC-MSCs εκφράζουν τους δείκτες βλαστικότητας Sox2, Oct4 και Nanog [79].

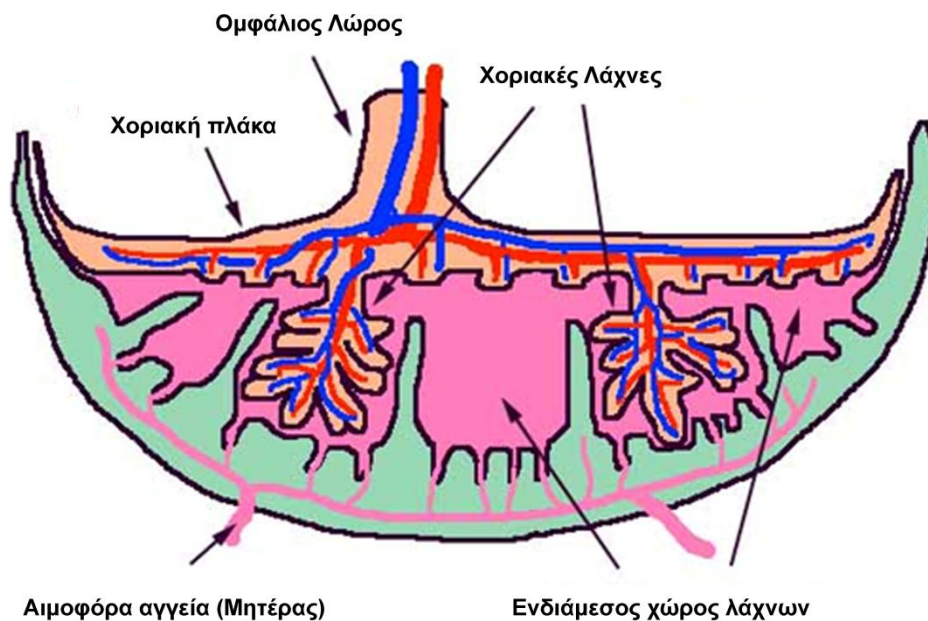
	Αντιγόνα	CD no.	UCB-MSCs
Μεσεγχυματικοί δείκτες	Thy-1	CD90	+
	SH3, SH4	CD73	+
	Endoglobin	CD105	+
	HCAM-1	CD44	+
Αιμοποιητικοί δείκτες	LCA	CD45	-
	Gp105-120	CD34	-
	LPS-R	CD14	-
Ιντεγκρίνες	β1-ιντεγκρίνη	CD29	+
	α5-ιντεγκρίνη	CD49e	+
Σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας	HLA-DR		-

Πίνακας 1.2: Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των UC-MSCs.

Επιπρόσθετα, τα UC-MSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν προς λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα, καρδιομυοκύτταρα, νευρικά κύτταρα, γλοιοκύτταρα και ντοπαμινεργικούς νευρώνες [80-82]. Τα UC-MSCs είναι ανοσοκατασταλτικά με αποτέλεσμα να θεωρούνται ιδανικά για αλλογενής μεταμοσχεύσεις [76]. Ακόμα πιο σημαντικό χαρακτηριστικό των κυττάρων αυτών είναι ότι μετά την μεταμόσχευση δεν έχει παρουσιαστεί σχηματισμός όγκου, ούτε 50 ημέρες μετά [83]. Εντούτοις, πρέπει να πραγματοποιηθούν περισσότερες μελέτες σχετικά με την in vivo εφαρμογή των συγκεκριμένων κυττάρων, ώστε να διασφαλιστεί η θεραπευτική τους σημασία.

1.4.3 Βλαστικά κύτταρα του πλακούντα

Ο πλακούντας αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη πηγή MSCs. Πιο συγκεκριμένα προέρχεται από το τροφοεκτόδερμα και σχηματίζει την τροφοβλάστη, που περιλαμβάνει την κυτιοτροφοβλάστη και τη συγκυτιοτροφοβλάστη (Εικόνα 1.17). Οι αμιγείς πληθυσμοί βλαστοκυττάρων, που προέρχονται από τον ανθρώπινο πλακούντα περιλαμβάνουν τα χοριονικά μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα και τους χοριονικούς τροφοβλάστες [12].



Εικόνα 1.17: Ο πλακούντας.

Η απομόνωση των MSCs του πλακούντα (pMSCs) πραγματοποιείται από τις χοριακές λάχνες μετά από ειδική επεξεργασία [84]. Ακολούθως τα pMSCs μπορούν να απομονωθούν με τη χρήση συγκεκριμένων μοριακών δεικτών που εκφράζουν τα κύτταρα αυτά, την πρωτεΐνη CD349/FZD9 (frizzled family receptor 9) [85]. Τα pMSCs εκφράζουν τα επιφανειακά μόρια CD44, CD90, CD105, CD146, CD166 και HLA-ABC αλλά δεν εκφράζουν τα μόρια CD14, CD19, CD40, CD45, CD80, CD83, CD86 και HLA-DR [84]. Επιπρόσθετα, τα pMSCs εκφράζουν δείκτες πολυδυναμικότητας όπως το SSEA-4, SSEA-3, TRA-1-60 και TRA-1-81 [86, 87].

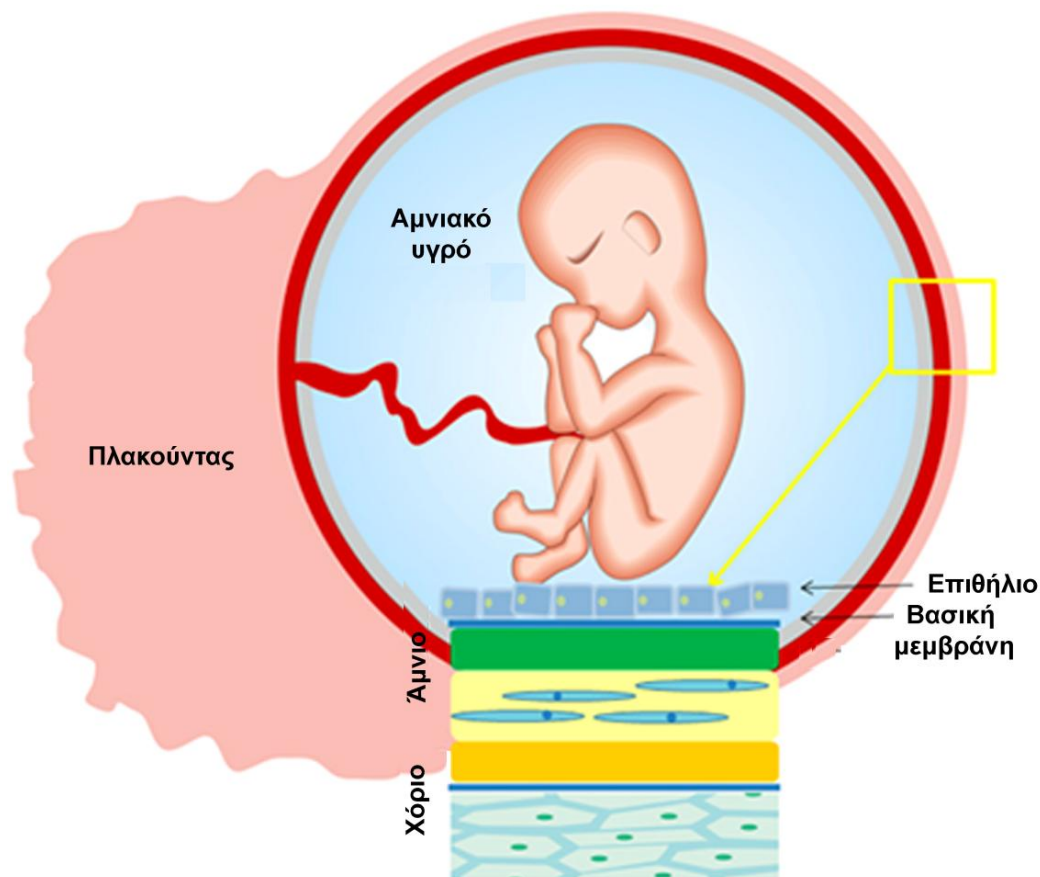
Επιπρόσθετα, τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν υψηλό δυναμικό διαφοροποίησης προς οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα, πλαστικότητα και ανοσορυθμιστικές ιδιότητες [12, 87]. Έτσι, τα pMSCs να χρησιμοποιηθούν για αυτόλογες ή αλλογενής μεταμοσχεύσεις [87]. Ακολούθως έχει δειχθεί ότι τα pMSCs εκκρίνουν πολλές κυτοκίνες όπως οι IL-1Ra, IL6, IL8, IL10, IL11 και IL15 και ότι παρουσιάζουν την ικανότητα να μεταναστεύουν απαντώντας σε χημειοτακτικά μόρια όπως τα SDF-1 (stromal cell-derived factor-1), PDGF (platelet derived growth factor), HGF (hepatocyte growth factor) και MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) [84].

Είναι αναγκαίο να γίνει κατανοητός ο ρόλος των βλαστικών κυττάρων του πλακούντα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης καθώς και η παρακρινής δράσης τους θα μπορούσε να βοηθήσει στη μελέτη ασθενειών που επηρεάζουν τον πλακούντα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης.

1.4.4 Βλαστικά κύτταρα της αμνιακής μεμβράνης

Η αμνιακή μεμβράνη δεν διαθέτει αγγεία και προέρχεται από την επιβλάστη και συνίσταται από 3 στιβάδες: την επιθηλιακή στιβάδα που περιέχει επιθηλιακά κύτταρα, την ενδιάμεση βασική μεμβράνη, που δεν περιέχει κύτταρα και ένα εξωτερικό στρώμα, που βρίσκεται δίπλα στο χόριον και συνίσταται από μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα [88, 89] (Εικόνα 1.18).

Η αμνιακή μεμβράνη έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για πολλές δεκαετίες για τη θεραπεία εγκαυμάτων, αφού έχει φανεί να προωθεί τον σχηματισμό του επιθηλίου και επιπρόσθετα να προστατεύει από τη διαδικασία της μόλυνσης [90, 91]. Πρόσφατες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει την αμνιακή μεμβράνη σε χειρουργικές επεμβάσεις στον βλεννογόνο του στόματος [92], σε ανακατασκευή της οφθαλμικής επιφάνειας [93] και σε κερατοειδική διάτριση [94].



Εικόνα 1.18: Εναλλακτική πηγή εμβρυικών βλαστικών κυττάρων αποτελεί η αμνιακή μεμβράνη.

Από την αμνιακή μεμβράνη έχουν απομονωθεί δύο πληθυσμοί βλαστικών κυττάρων: τα αμνιακά επιθηλιακά κύτταρα (amniotic epithelial stem cells, AECs) και τα MSCs της αμνιακής μεμβράνης (amniotic membrane mesenchymal stem cells, AM-MSCs) που προέρχονται από το αμνιακό επιθήλιο και τα αμνιακά μεσεγχειματικά στρώματα, αντίστοιχα [11, 89]. Για την απομόνωση των δύο αυτών πληθυσμών βλαστικών κυττάρων της αμνιακής μεμβράνης έχουν χρησιμοποιηθεί πολλά πρωτόκολλα κυρίως στηριζόμενα στον μηχανικό διαχωρισμό της αμνιακής μεμβράνης από τη χοριακή μεμβράνη με ενζυματική πέψη [95, 96]. Τα AM-MSCs εμφανίζουν ινοβλαστική μορφολογία, ενώ τα AECs παρουσιάζουν πλακόστρωτη επιθηλιακή μορφολογία. Αναλυτικότερα, τα AM-MSCs διαθέτουν παρόμοιες ιδιότητες με τα MSCs που προέρχονται από ενήλικες πηγές [97]. Τα AM-MSCs προέρχονται από τα κύτταρα της επιβλάστης και για αυτό το λόγο διατηρούν τα χαρακτηριστικά των βλαστικών

κυττάρων κατά τη γέννηση, που σχετίζονται με μειωμένη έκφραση του αντιγόνου HLA, που υποδηλώνει μειωμένη πιθανότητα απόρριψης του μοσχεύματος [12].

Αναλυτικός φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των AM-MSCs και των AECs δείχνει ότι οι δύο πληθυσμοί αυτοί εκφράζουν τα μόρια επιφανείας CD13, CD29, CD44, CD73, CD105 και CD90, ενώ είναι αρνητικοί για τους αιμοποιητικούς δείκτες CD14, CD34 και CD45 [11] (Πίνακας 1.3). Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι τα AM-MSCs εκφράζουν τον δείκτη βλαστικότητας Oct4, ενώ τα AECs εκφράζουν τους δείκτες SSEA-4, SSEA-1, Nanog και Sox2 [89].

Το γεγονός ότι η αμνιακή μεμβράνη είναι ένας εύκολα προσβάσιμος ιστός και σε ιδιαίτερη αφθονία, μπορεί να χαρακτηριστεί ως μία πηγή βλαστικών κυττάρων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κυτταρικές θεραπευτικές προσεγγίσεις.

	Αντιγόνα	CD no.	AM-MSCs	AECs
Μεσεγχυματικοί δείκτες	Thy-1	CD90	+	+
	SH3, SH4	CD73	+	+
	Endoglobin	CD105	+	+
	HCAM-1	CD44	+	+
Αιμοποιητικοί δείκτες	LCA	CD45	-	-
	Gp105-120	CD34	-	-
	LPS-R	CD14		-
Ιντεγκρίνες	β1-ιντεγκρίνη	CD29	+	+
	α5-ιντεγκρίνη	CD49e		+
Σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας	HLA-DR		-	-

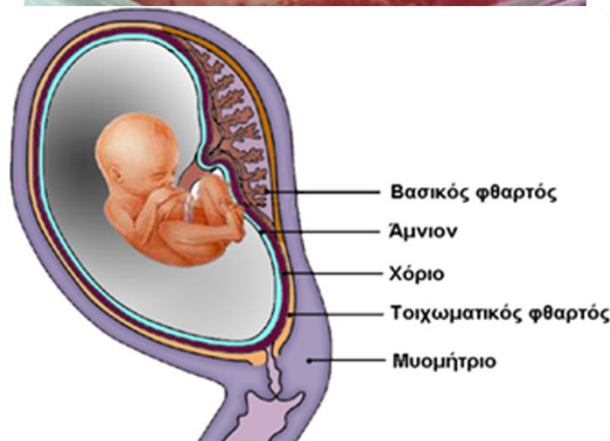
Πίνακας 1.3: Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των AM-MSCs και των AECs.

1.4.5 Βλαστικά κύτταρα αμνιακού υγρού

Το αμνιακό υγρό περιβρέχει το αναπτυσσόμενο έμβρυο κατά την διάρκεια της κύησης. Η παραγωγή του αμνιακού υγρού αρχίζει 4-5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, όταν ο ζυγώτης ετοιμάζεται να εμφυτευτεί στο ενδομήτριο. Ανάμεσα στην 8^η και 10^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, το υγρό αρχίζει σταδιακά να εξαπλώνεται και να

διαχωρίζει την επιβλάστη (μελλοντικό έμβρυο) από την αμνιοβλάστη (μελλοντικό άμνιο) σχηματίζοντας κατά αυτό τον τρόπο την αμνιακή κοιλότητα. Κατά τη διάρκεια του πρώτου μισού της κύησης το αμνιακό υγρό (Amniotic fluid, AF) προέρχεται από την ενεργό μεταφορά νατρίου και χλωρίου διαμέσου της αμνιακής μεμβράνης και του μη κερατινοποιημένου δέρματος του εμβρύου, με ταυτόχρονη παθητική μεταφορά νερού. Κατά το δεύτερο μισό της εγκυμοσύνης το αμνιακό υγρό συνίσταται από εμβρυϊκά ούρα, απεκκρίσεις της αναπνευστικής και γαστρεντερικής οδού, καθώς και ουσίες ανταλλαγής, μέσω του αμνιακού σάκου [98].

Το αμνιακό υγρό προστατεύει το έμβρυο από μηχανικές κακώσεις και βοηθά παρέχοντας τον απαραίτητο χώρο και περιβάλλον στο έμβρυο να εκτείνει και να κάμπτει τα άκρα και τον κορμό του (Εικόνα 1.19). Επιπλέον, παίζει σημαντικό ρόλο στην έκπτυξη των εμβρυϊκών πνευμόνων και την εκτέλεση των αναπνευστικών κινήσεων καθώς και την ανάπτυξη και λειτουργία του πεπτικού συστήματος.



Εικόνα 1.19: Το αμνιακό υγρό περιβρέχει το αναπτυσσόμενο έμβρυο κατά τη διάρκεια της κύησης.

Το αμνιακό υγρό χρησιμοποιείται στην προγεννητική διάγνωση τα τελευταία 70 χρόνια επιτρέποντας τον εντοπισμό διαφόρων γενετικών ασθενειών στα αναπτυσσόμενα έμβρυα (Εικόνα 1.20). Το αμνιακό υγρό λαμβάνεται με τη διαδικασία της αμνιοπαρακέντησης με κίνδυνο άμβλωσης μόλις 0,06-0,5% [99]. Έτσι, λοιπόν είναι ασφαλές, αξιόπιστο και αποτελεσματικό εργαλείο για την μελέτη του καρυότυπου του εμβρύου και την πρόβλεψη πολλών γενετικών και αναπτυξιακών ασθενειών.



Εικόνα 1.20: Το αμνιακό υγρό λαμβάνεται με τη διαδικασία της αμνιοπαρακέντησης.

Το αμνιακό υγρό αποτελεί και μία πλούσια πηγή κυττάρων που προέρχονται είτε από το αναπτυσσόμενο έμβρυο είτε από την περιβάλλουσα αμνιακή μεμβράνη [89, 100]. Πιο συγκεκριμένα, οι πληθυσμοί κυττάρων του αμνιακού υγρού χωρίζονται σε τρεις ομάδες κυττάρων ανάλογα με τη μορφολογία και τα βιοχημικά χαρακτηριστικά τους [12, 89]. Η πρώτη κατηγορία είναι τα επιθηλιοειδή κύτταρα, E-τύπου, που έχουν κυβοειδές προς κινοειδές σχήμα, προέρχονται από το δέρμα και το ουροποιητικό σύστημα του εμβρύου και βρίσκονται στο αμνιακό υγρό σε ποσοστό 33.7% [11, 89]. Η δεύτερη κατηγορία κυττάρων είναι αυτά του αμνιακού υγρού, AF τύπου, που βρίσκονται στο αμνιακό υγρό σε ποσοστό 60,8% και προέρχονται από τις εμβρυϊκές μεμβράνες και την τροφοβλάστη [11, 89]. Η τελευταία κατηγορία είναι τα ινοβλαστικά κύτταρα, F τύπου, που προέρχονται από τον ινώδη συνδετικό ιστό και τους δερματικούς ινοβλάστες και βρίσκονται στο αμνιακό υγρό σε ποσοστό 5.5%

[11, 89]. Τα AF και F τύπου κύτταρα έχουν παρόμοια ινοβλαστική μορφολογία και εκφράζουν πρωτεΐνες κερατίνης (keratins) και βιμεντίνης (vimentins) [89, 100-103].

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν απομονωθεί διάφοροι πληθυσμοί βλαστικών κυττάρων από το αμνιακό υγρό (Amniotic fluid stem cells, AFSCs). Αρχικά, περιγράφηκε ένας πληθυσμός βλαστικών κυττάρων με χαρακτηριστικά μεσεγχυματικών κυττάρων από τον Kaniani και τους συνεργάτες του [104]. Μέχρι σήμερα έχουν δημοσιευτεί διάφορα πρωτόκολλα απομόνωση και καλλιέργειας των AFSCs, τα οποία είναι τα εξής: α) το πρωτόκολλο καλλιέργειας ενός βήματος, όπου η πρωταρχική καλλιέργεια αφήνεται για 7 ή παραπάνω ημέρες μέχρι να εμφανιστούν οι πρώτες αποικίες [103, 105-107], β) το πρωτόκολλο καλλιέργειας δύο βημάτων, όπου τα αμνιοκύτταρα που δεν προσκολλήθηκαν μετά από 5 ημέρες στην καλλιέργεια, συλλέγονται για περαιτέρω καλλιέργεια [107-109], γ) το πρωτόκολλο καλλιέργειας με τη χρήση του επιφανειακού δείκτη CD117 (c-kit υποδοχέας) [107, 110-112], δ) το πρωτόκολλο μηχανικής απομόνωσης των μεσεγχυματικών προγονικών κυττάρων από την πρωταρχική καλλιέργεια [102] και ε) το πρωτόκολλο μικρής διάρκειας καλλιέργειας για την απομόνωση ινοβλαστικών αποικιών [113].

Τα AFSCs εκφράζουν μόρια επιφανείας χαρακτηριστικά των MSCs, όπως τα CD29, CD73, CD90 και CD105, ενώ δεν εκφράζουν αιμοποιητικούς δείκτες όπως τα CD45, CD34 και CD133 (Πίνακας 1.4). Τα AFSCs είναι πολύδυναμα, με υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού, ευρύ φάσμα διαφοροποίησης και φυσιολογικό καρυότυπο μετά από συνεχή ανακαλλιέργειες [11]. Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι τα AFSCs όταν ενεθούν σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια δεν προκαλούν σχηματισμό όγκου [89, 112].

	Αντιγόνα	CD no.	AFSCs
Μεσεγχυματικοί δείκτες	Thy-1	CD90	+
	SH3, SH4	CD73	+
	Endoglobin	CD105	+
	HCAM-1	CD44	+
Αιμοποιητικοί δείκτες	LCA	CD45	-
	Gp105-120	CD34	-
	Prominin-1	CD133	
Ιντεγκρίνες	β1-ιντεγκρίνη	CD29	+

Πίνακας 1.4: Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των AFSCs.

Σε μια πρόσφατη μελέτη έχειδειχθεί ότι τα AFSCs μπορούν να επαναπρογραμματιστούν πλήρως, μετά από την καλλιέργεια των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο κατάλληλο για ESCs παρουσία βαλπορικού οξέος, το οποίο είναι αναστολέας της απακετυλάσης ιστονών [114]. Κανένας άλλος παράγοντας δεν χρειάζεται για τον επαναπρογραμματισμό των AFSCs, αφού τα ίδια ήδη εκφράζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες βλαστικότητας Sox2, Oct4, Klf4 και c-Myc. Τα AFSCs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να παράγουν ολοδόναμα βλαστικά κύτταρα ειδικά για κάθε ασθενή και έτσι να χρησιμοποιηθούν στην αναγεννητική ιατρική, στη φαρμακευτική διαλογή και στη μοντελοποίηση ασθενειών [114].

Το αμνιακό υγρό καθώς και τα AFSCs παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα, με βασικότερο το γεγονός ότι δεν προκύπτει κανένας ηθικός φραγμός για την χρήση των κυττάρων αυτών σε μελλοντικές κυτταρικές θεραπείες.

1.4.5.1 Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα αμνιακού υγρού

Τα τελευταία χρόνια διερευνάται περαιτέρω ο πληθυσμός των MSCs που μπορούν να απομονωθούν από το αμνιακό υγρό (Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells, AF-MSCs). Η προέλευση των AF-MSCs του αμνιακού υγρού δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Έχει όμως διευκρινιστεί ότι τα κύτταρα αυτά είναι καθαρά εμβρυικής προέλευσης, μέσω τυποποίησης αντιγόνων ιστοσυμβατότητας HLA (Molecular human leucocyte antigen typing) και ενίσχυσης της περιοχής του φυλετικού Y χρωμοσώματος σε κύτταρα αμνιακού υγρού προερχόμενα από αρσενικά έμβρυα [12]. Γενικότερα, τα AF-MSCs αποτελούν μία νέα κατηγορία πολυδύναμων βλαστοκυττάρων που διαθέτουν ενδιάμεσα χαρακτηριστικά, μεταξύ εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (ESCs) και ενηλίκων βλαστικών κυττάρων.

Τα AF-MSCs μπορούν εύκολα να συλλεχθούν από το ανθρώπινο αμνιακό υγρό κατά τη διάρκεια προγραμματισμένης αμνιοπαρακέντησης κατά το δεύτερο τρίμηνο της κύησης, όπου το ποσοστό των AF-MSCs προσεγγίζει το 0,9-1,5% όλων των κυτταρικών πληθυσμών του αμνιακού υγρού [109, 113]. Σε μελέτες φαινοτυπικού χαρακτηρισμού, τα AF-MSCs βρέθηκαν θετικά για τους μεσεγχυματικούς δείκτες CD90, CD105, CD73, CD166, για την ιντεγκρίνη VLA-5 (CD49e) και τα αντιγόνα HCAM-1 (CD44d), HLA-ABC και ICAM-1 (CD54f). Επίσης βρέθηκαν αρνητικά για

τα αιμοποιητικά αντιγόνα CD45, CD34 και CD14 (Πίνακας 1.5) [11, 89]. Το μόριο SSEA-4, δείκτης που θεωρούνταν εξειδικευμένος στην πρόιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη και στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, είναι επίσης θετικό στα MSCs και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην απομόνωσή τους [4]. Παρομοίως, το μόριο επιφάνειας c-kit (CD117) (υποδοχέας του μορίου stem cell factor, SCF) μπορεί να χρησιμοποιηθεί και αυτό για την απομόνωση MSCs από το αμνιακό υγρό και στην συνέχεια να δημιουργηθούν κυτταρικές σειρές που προέρχονται κλωνογονικά από ένα μόνο αρχικό κύτταρο (clonal stem cell lines) [111]. Ακολούθως, τα AF-MSCs εκφράζουν τους δείκτες βλαστικότητας Sox2, Oct4 και Nanog [4, 102, 103].

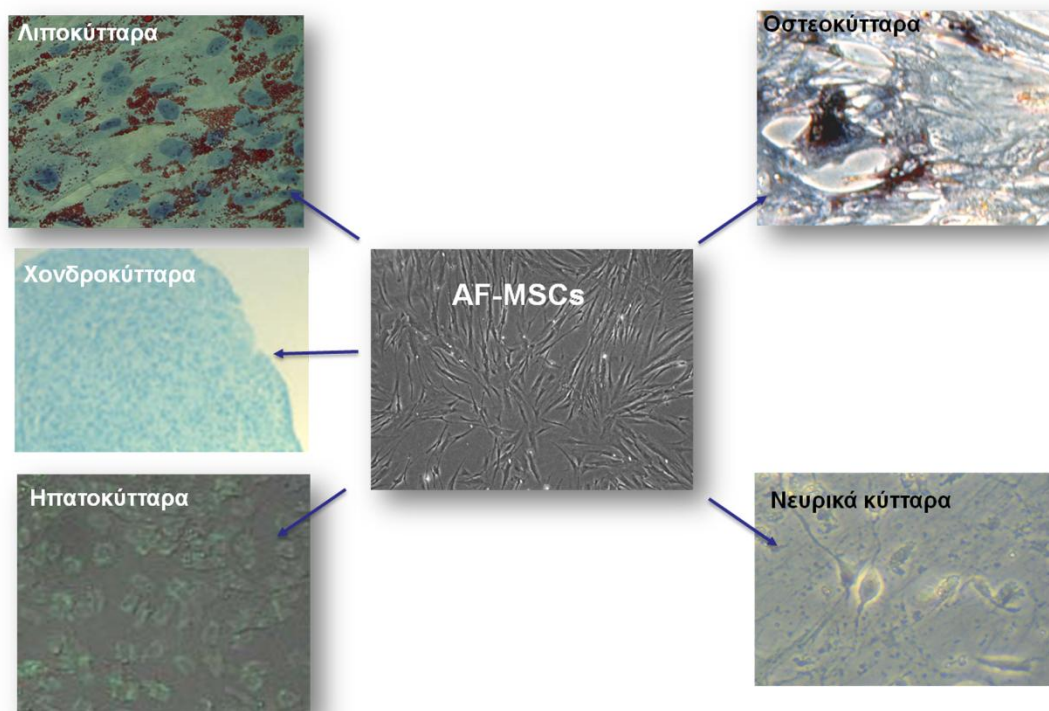
	Αντιγόνα	CD no.	AF-MSCs
Μεσεγχυματικοί δείκτες	Thy-1	CD90	+
	SH3, SH4	CD73	+
	Endoglobin	CD105	+
	SB10/ALCAM	CD166	+
	HCAM-1	CD44	+
Αιμοποιητικοί δείκτες	LCA	CD45	-
	Gp105-120	CD34	-
	Prominin-1	CD133	-
	LPS-R	CD14	-
Ιντεγκρίνες	β1-ιντεγκρίνη	CD29	+
	α5-ιντεγκρίνη	CD49e	+
Σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας	HLA-DR		-
	HLA-ABC		+

Πίνακας 1.5: Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των AFSCs.

Τα AF-MSCs χαρακτηρίζονται από αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, ενώ παράλληλα διατηρούν σταθερό τον καρυότυπο τους, όταν καλλιεργούνται *in vitro* [4, 102, 103]. Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει στα AF-MSCs απουσία κυτταρικής γήρανσης και τη διατήρηση μεγάλων τελομερών στις κυτταρικές αυτές σειρές για πάνω από 250 κυτταρικές διαιρέσεις (population doublings), αριθμός που ξεπερνά το όριο Hayflick των 50 κυτταρικών διαιρέσεων που χαρακτηρίζει πολλά μετα-εμβρυϊκά κύτταρα [111].

Τα AF-MSCs παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα διαφοροποίησης. Κάτω από συγκεκριμένες καλλιεργητικές συνθήκες *in vitro* μπορούν να διαφοροποιηθούν με επιτυχία σε κυτταρικούς τύπους μεσοδερμικών σειρών (λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα και οστεοκύτταρα) [103, 109, 115] (Εικόνα 1.21). Επιπλέον η διαφοροποίηση των AF-MSCs σε νευρικά και ηπατικά κύτταρα, δείχνει ότι τα κύτταρα αυτά μπορούν να ξεπεράσουν την μεσοδερμική τους προέλευση και να δώσουν κύτταρα προερχόμενα από άλλες γαμετικές στοιβάδες [103, 116, 117] (Εικόνα 1.21).

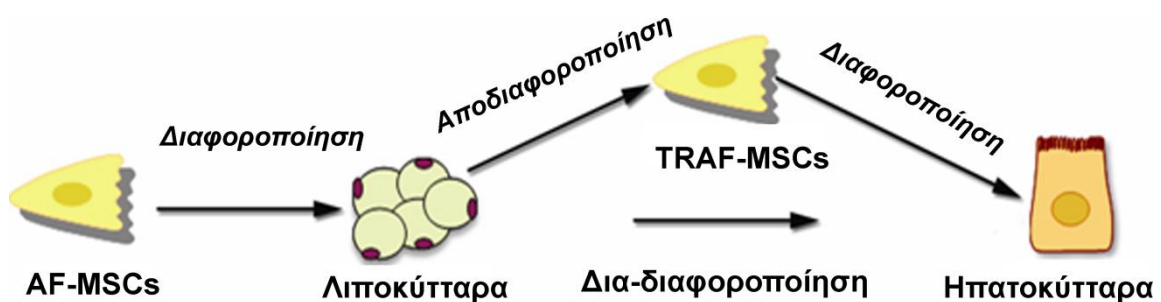
Ανάλυση της *in vitro* διαφοροποίησης των MSCs έχει οδηγήσει στην ταυτοποίηση ποικίλων παραγόντων, απαραίτητων για τον καθορισμό των βλαστικών κυττάρων. Σε αυτούς περιλαμβάνονται εκκρινόμενα μόρια, όπως ο TGF- β , μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως κολλαγόνο και πρωτεογλυκάνες, κυτταροσκελετός της ακτίνης και ενδοκυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες, όπως Runx2, PPAR γ , Sox9 και MEF2 που έχουν σημαντικό ρόλο στην κατεύθυνση των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων προς συγκεκριμένες σειρές και στην ανάκτηση διαφοροποιημένων φαινοτύπων [118].



Εικόνα 1.21: Τα AF-MSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν σε λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα, ηπατοκύτταρα και νευρικά κύτταρα.

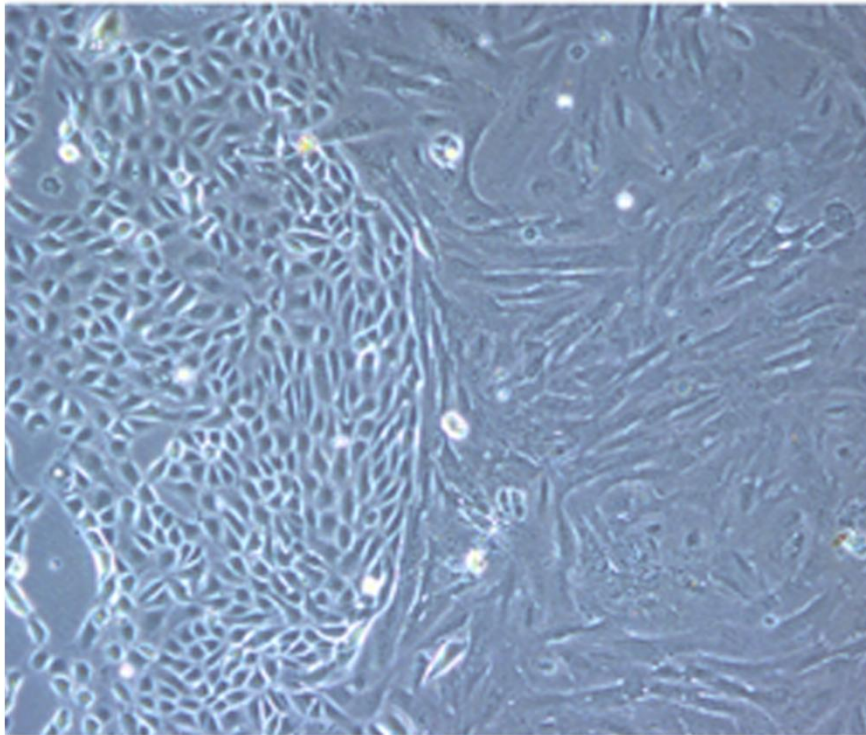
Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί ότι μέλη της οικογένειας Wnt συντελούν στη διαφοροποίηση των MSCs προς συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές [119, 120]. Η οικογένεια Wnt αποτελείται από εκκρινόμενες γλυκοπρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνη, που συμβάλλουν στη ρύθμιση της ανάπτυξης του φαινοτύπου των βλαστοκυττάρων, στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του Wnt αυξάνει τη σταθερότητα της κυτταροπλασματικής β-κατενίνης, μέσω απενεργοποίησης της ενεργότητας της GSK-3 κινάσης και προώθησης της μετανάστευσης της β-κατενίνης στον πυρήνα. Στη συνέχεια το ενεργοποιημένο σύμπλοκο β-κατενίνη/TCF/LEF ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων που περιλαμβάνονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην κυτταρική διαφοροποίηση [121].

Τα AF-MSCs εκτός όμως από τη δυνατότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης παρουσιάζουν και τη δυνατότητα δια-διαφοροποίησης, δηλαδή μπορούν να μεταβούν από ένα διαφοροποιημένο τύπο κυττάρου σε έναν άλλο αλλά και την ικανότητα αποδιαφοροποίησης, δηλαδή από ένα διαφοροποιημένο τύπου κυττάρου μπορούν να μεταβούν σε ένα πιο πρωταρχικό τύπο κυττάρου [117]. Η δια-διαφοροποίηση των AF-MSCs μπορεί να πραγματοποιηθεί από ένα διαφοροποιημένο κύτταρο προς τη μεσοδερμική σειρά σε διαφοροποιημένο κύτταρο προς την ενδοδερμική σειρά, ως απάντηση σε εξωτερικούς παράγοντες, μέσω του σταδίου αποδιαφοροποίησης προς ένα πιο προγονικό στάδιο [117] (Εικόνα 1.22).



Εικόνα 1.22: Δια-διαφοροποίησης των λιποκυττάρων σε ηπατοκύτταρα, μέσω ενός ενδιάμεσου σταδίου αποδιαφοροποίησης (TRAF-MSCs).

Η ερευνητική μας ομάδα μελέτησε την παρουσία δύο μορφολογικά διακριτών υποπληθυσμών κυττάρων στις αρχικές αποικίες των AF-MSCs, σχήματος επιμήκους [spindle-shaped (SS)] ή σφαιρικού [round-shaped (RS)], τους οποίους και ονομάσαμε SS-AF-MSCs και RS-AF-MSCs, αντιστοίχως [102] (Εικόνα 1.23).



RS-AF-MSCs
p0

SS-AF-MSCs
p0

Εικόνα 1.23: Στην αρχική καλλιέργεια των AF-MSCs υπάρχουν δυο μορφολογικά διακριτοί υποπληθυσμοί, τα SS-AF-MSCs και τα RS-AF-MSCs.

Λεπτομερής ανάλυση των δύο αυτών υποπληθυσμών, κατόπιν μηχανικού διαχωρισμού τους, έδειξε ότι τα SS-AF-MSCs εκφράζουν τον αντιγονικό δείκτη Thy-1 (CD90) σε μεγαλύτερο ποσοστό, παρουσιάζουν υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού και ευρύτερο φάσμα διαφοροποίησης σε σχέση με τα RS-AF-MSCs. Επιπλέον, τα SS-AF-MSCs εκφράζουν αυξημένα επίπεδα ιντεγκρινών και μορίων προσκόλλησης, γεγονός που μπορεί να δικαιολογεί την σημαντικά αυξημένη

μεταναστευτική ικανότητα που παρουσιάζουν *in vitro* προς εξωκυττάρια ουσίες, όπως ινονεκτίνη (fibronectin) και η λαμινίνη (laminin), σε σχέση με τα RS-AF-MSCs [102].

Ακολούθησε η εκτίμηση της χρήσης των SS-AF-MSCs ως εργαλεία σε θεραπευτικές προσπελάσεις *in vivo*. Πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των AF-MSCs με λεντιϊκό φορέα που φέρει το γονίδιο GFP. Διαπιστώθηκε ότι τα GFP-SS-AF-MSCs διατηρούν τη βλαστικότητα τους, εκφράζοντας τα μόρια Nanog, SSEA-4 και Oct-4, καθώς και τη δυνατότητα διαφοροποίησής τους σε οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και ηπατοκύτταρα [102]. Ακολούθησε ενδοφλέβια χορήγηση των κυττάρων αυτών σε ανοσοκατασταλμένα NOD/SCID ποντίκια και διαπιστώθηκε ο τροπισμός και η επιβίωσή τους σε διάφορους ιστούς για μεγάλο χρονικό διάστημα *in vivo* με μεθόδους ανοσοεντοπισμού [102].

1.4.5.2 Εφαρμογές των AF-MSCs στην κυτταρική θεραπεία

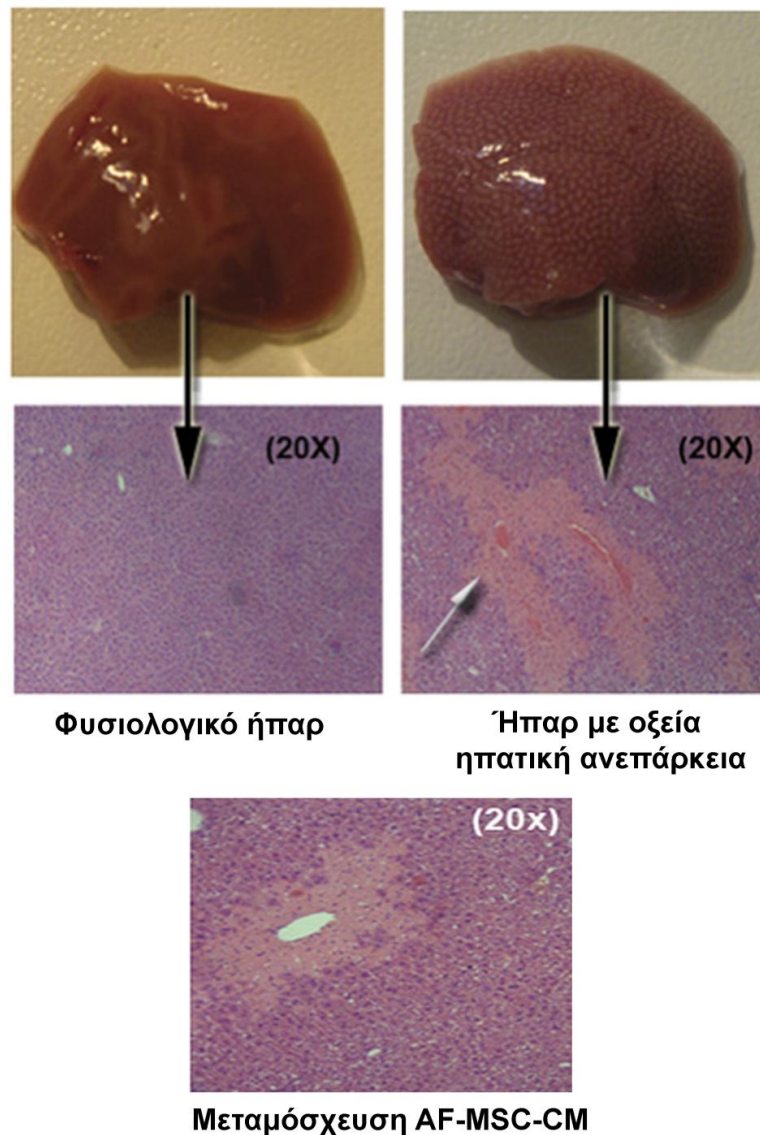
Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα βλαστικά κύτταρα προέρχεται κυρίως από την πιθανή χρήση τους στην θεραπεία πολλών ασθενειών, στις οποίες οι τρέχουσες θεραπείες βασίζονται σε αλλογενείς ή αυτόλογες μεταμοσχεύσεις κυττάρων ή οργάνων και είναι δύσκολα εφαρμόσιμες ή αναποτελεσματικές. Η βασική αρχή της κυτταρικής θεραπείας με τη χρήση βλαστοκυττάρων είναι ότι τα μη διαφοροποιημένα βλαστικά κύτταρα μεταμοσχεύονται στον ασθενή, μεταναστεύουν στο σημείο του τραύματος και εκεί υπό την επίρεια τοπικών σημάτων, πιθανότατα διαφοροποιούνται σε κύτταρα με τον κατάλληλο φαινότυπο. Για την επιτυχία της κυτταρικής θεραπείας είναι βασικό τα βλαστικά κύτταρα που θα μεταμοσχευθούν να διαθέτουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Τα AF-MSCs όλο και περισσότερο κεντρίζουν το ενδιαφέρον των ερευνητών, οι οποίοι πραγματοποιούν όλο και περισσότερες μελέτες για τη χρήση των κυττάρων αυτών στη θεραπεία διάφορων ασθενειών.

Βασικό πλεονέκτημα των AF-MSCs είναι ότι απομονώνονται από το αμνιακό υγρό που αποτελεί μία εύκολα προσβάσιμη πηγή βλαστικών κυττάρων, χωρίς ηθικούς περιορισμούς και ακόμα πιο σημαντικό είναι ότι η απομόνωσή τους δεν είναι επώδυνη για τον ασθενή [122]. Στην κυτταρική θεραπεία ένας βασικός περιορισμός είναι η απόρριψη των κυττάρων που θα μεταμοσχευθούν. Τα AF-MSCs

παρουσιάζουν το πλεονέκτημα ότι έχουν χαμηλή ανοσογονικότητα αφού εκφράζουν σε χαμηλά επίπεδα τα HLA-ABC αντιγόνα και δεν εκφράζουν καθόλου τα HLA-DR αντιγόνα [102, 103, 111, 115]. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα η χρήση των AF-MSCs να μειώνει το ρίσκο απόρριψης των κυττάρων που θα μεταμοσχευθούν. Επιπρόσθετα, ένα σημαντικό πλεονέκτημα των AF-MSCs είναι ότι μπορεί να καταστείλει την φλεγμονώδη απόκριση, εκκρίνοντας συγκεκριμένες κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες όπως το TGF- β 1 (transforming growth factor beta-1), το GM-CSF (granulocyte macrophase colony stimulation factor), η IL-6 (interleukin-6) και το MCP (monocyte chemotactic protein) [116, 123]. Άλλο ένα σημαντικό πλεονέκτημα των AF-MSCs είναι ότι έχουν τη δυνατότητα να τροποποιηθούν γενετικά, ώστε να μεταφέρουν το επιθυμητό θεραπευτικό γονίδιο στην τραυματισμένη περιοχή. Η γενετική τροποποίηση των AF-MSCs έχει πραγματοποιηθεί με τη χρήση αδενοϊών και λεντιϊών με υψηλή απόδοση, όπου δεν παρατηρήθηκαν φαινοτυπικές αλλαγές στα AF-MSCs και επίσης δεν επηρεάστηκαν οι χαρακτηριστικές τους ιδιότητες [102, 124]. Στην κυτταρική θεραπεία ίσως η μεγαλύτερη ανησυχία είναι ο σχηματισμός τερατωμάτων *in vivo*. Τα AF-MSCs έχει φανεί ότι δεν σχηματίζουν όγκους ακόμα και 3 μήνες μετά την μεταμόσχευση τους σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια [102, 111].

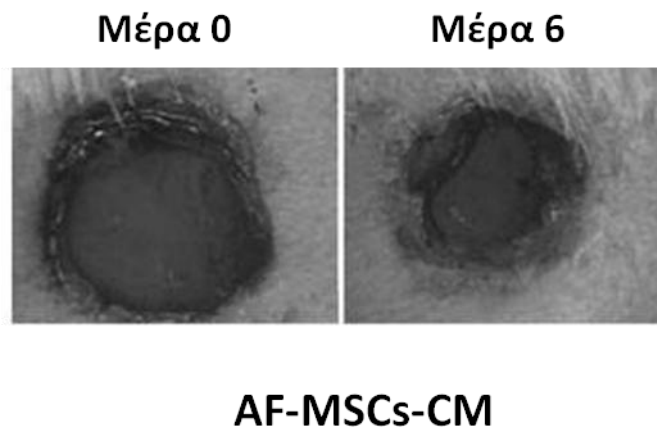
Μέχρι σήμερα τα AF-MSCs έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών σε κατάλληλα ζωικά μοντέλα και με τη χρήση των κατάλληλων ικριωμάτων (scaffolds) [122]. Πρώτη φορά ο De Coppi και οι συνεργάτες του έδειξαν τη δημιουργία οστού από hAFSCs που είχαν τοποθετηθεί σε ειδικό ικρίωμα και μεταμοσχευθεί σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια [111]. Τα AF-MSCs έχουν μεταμοσχευθεί σε ισχαιμικές καρδίες μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου και παρατηρήθηκε ότι τα ενσωματώνονται στον τραυματισμένο ιστό και διαφοροποιούνται σε καρδιακά κύτταρα [125]. Τα AF-MSCs έχει δειχθεί ότι μπορούν να μεταναστεύσουν στο ραβδωτό σώμα του εγκεφάλου των ποντικών [126]. Έτσι έχουν χρησιμοποιηθεί σε μοντέλα ισχαιμικής νευρικής βλάβης σε κατάλληλο κάθε φορά ικρίωμα, όπου παρατηρήθηκε περιφερική νευρική αναγέννηση [127-130]. Τα AF-MSCs έχουν επίσης μεταμοσχευθεί σε μοντέλα οξείας νεφρικής βλάβης, όπου παρατηρήθηκε βελτίωση του φαινοτύπου που οφείλεται ουσιαστικά στην παρακρινή δράση των κυττάρων, αφού εκκρίνουν παράγοντες που παίζουν βασικό αντιφλεγμονώδες ρόλο [131, 132]. Παρόμοια αποτελέσματα φάνηκαν μετά την

μεταμόσχευση των AF-MSCs σε μοντέλο ποντικού οξείας ηπατικής ανεπάρκειας, όπου παρατηρείται βελτίωση του φαινοτύπου λόγω της παρακρινής δράσης των κυττάρων [116] (Εικόνα 1.24). Συγκεκριμένα, το θρεπτικό μέσο των AF-MSCs (Condition medium, CM) περιέχει κυτοκίνες όπως οι IL-10, IL-27, IL-17E, IL-12p70, IL-1β και IL-1ra, που είναι υπεύθυνες για την τοπική και συστηματική ρύθμιση της αντι-φλεγμονώδους αντίδρασης [116].



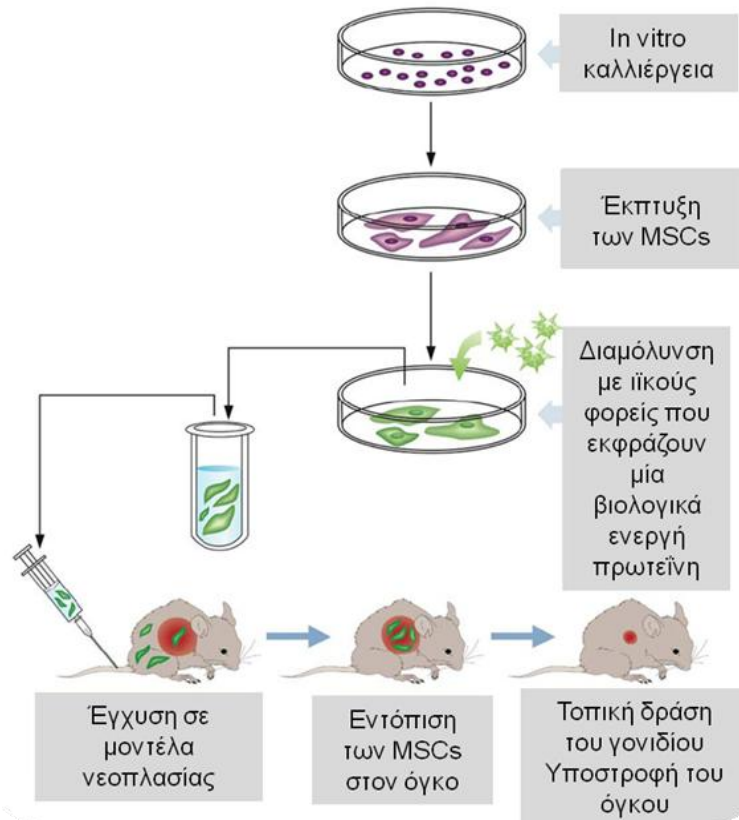
Εικόνα 1.24: Μορφολογία του ήπατος μετά την θεραπεία με το θρεπτικό μέσο από τα AF-MSCs σε σύγκριση με την μορφολογία μετά την πρόκληση οξείας ηπατικής ανεπάρκειας με τη χρήση CCl₄.

Στηριζόμενοι στην παρακρινή δράση των AF-MSCs, πραγματοποιήθηκαν μελέτες όπου χορηγήθηκε σε τραύματα δέρματος μοντέλου ποντικού, το θρεπτικό μέσο των κυττάρων (Condition medium, CM) σε ειδικά ικρίωματα σιλκόνης ή ζελατίνης και παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση λόγω των κυτοκινών, των χημειοκινών και των αγγειογενετικών παραγόντων που εκκρίνονται [133-135] (Εικόνα 1.25).



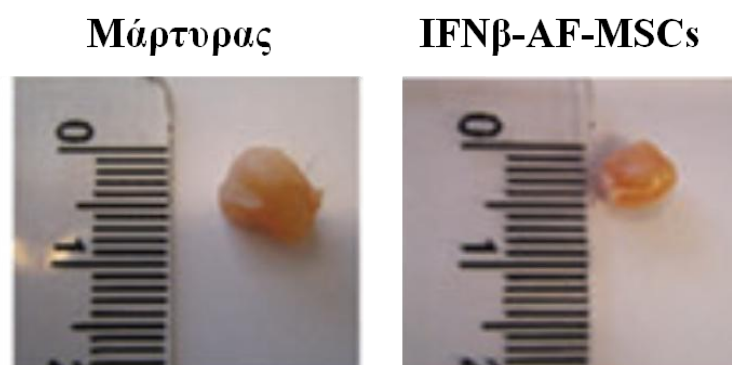
Εικόνα 1.25: Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τραύματα 6 ημέρες μετά τη χορήγηση θρεπτικού μέσου από AF-MSCs.

Πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι τα AF-MSCs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως οχήματα για την μεταφορά αντικαρκινικών ουσιών στην περιοχή του όγκου, λόγω της φυσικής ικανότητας τους να μεταναστεύουν στην περιοχή του όγκου [136] (Εικόνα 1.26). Ο Yin και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν γενετικά τροποποιημένα AF-MSCs ώστε να εκφράζουν τον αναστολέα της αγγειογένεσης, ενδοστατίνη, για τη θεραπεία του γλοιοβλαστώματος [137]. Παρατηρήθηκε ότι μειώνεται σημαντικά ο σχηματισμός αγγείων και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων καθώς και ότι αυξάνεται η κυτταρική απόπτωση [137].



Εικόνα 1.26: Πειραματικός σχεδιασμός θεραπευτικής στόχευσης όγκων με MSCs.

Χρησιμοποιώντας την ίδια θεραπευτική διαδικασία, η ερευνητική μας ομάδα έχει τροποποιήσει γενετικά AF-MSCs ώστε να εκφράζουν την αντικαρκινική ουσία IFN β τα οποία έχουν μεταμοσχευθεί σε μοντέλου ποντικού με καρκίνο της ουροδόχου κύστης, προκαλώντας σημαντική μείωση του όγκου αλλά και αύξηση του χρόνου ζωής των ποντικών [138] (Εικόνα 1.27).



Εικόνα 1.27: Μείωση του όγκου της ουροδόχου κύστης μετά από την μεταμόσχευσή IFN β -AF-MSCs.

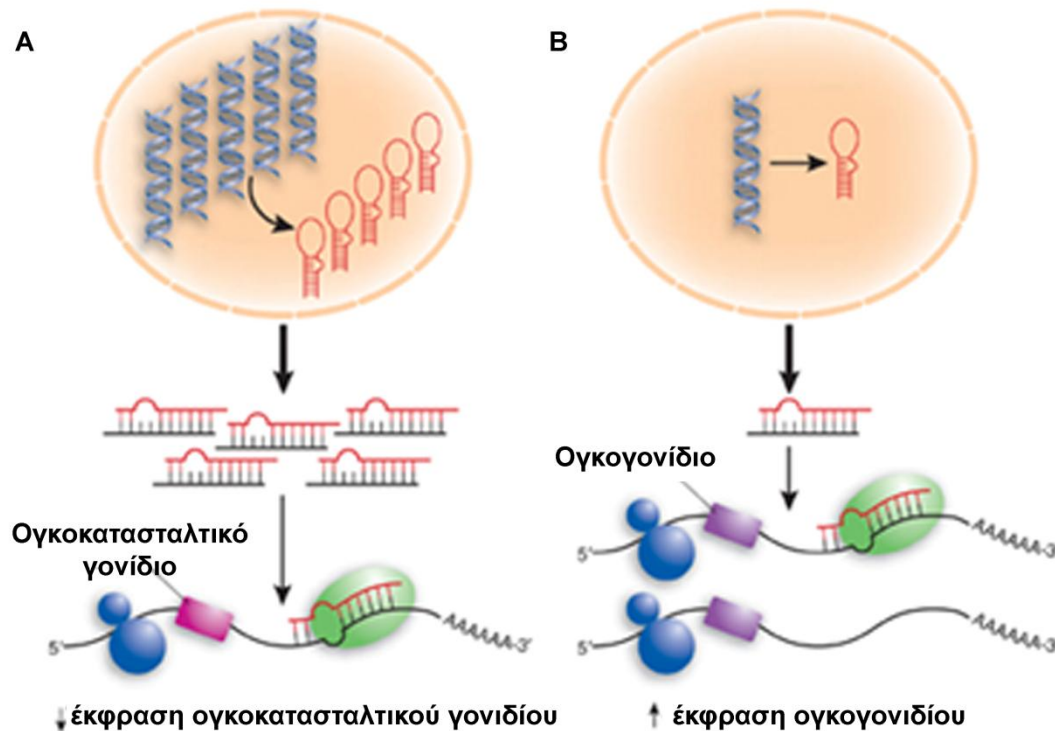
Συνεπώς, νέες στρατηγικές που επιτρέπουν την απομόνωση και τη γενετική τροποποίηση των MSCs, χωρίς να επηρεάζουν τη δυνατότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησής τους, είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τις μακροχρόνιες θεραπευτικές δράσεις των MSCs.

1.5 MicroRNAs

Τα microRNAs (miRNAs) είναι ενδογενή, μικρά, μονόκλωνα μόρια RNA με μέγεθος από 21-23 νουκλεοτίδια, τα οποία δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Συνιστούν μία νέα τάξη γονιδιακών ρυθμιστών που βρίσκονται τόσο στα φυτά, όσο και στα ζώα. Για πρώτη φορά περιγράφηκαν το 1993 από τον Lee και τους συναδέλφους του στο εργαστήριο του Victor Ambros [139], ενώ ο όρος miRNAs εισήχθη μόλις το 2001 μετά από την δημοσίευση τριών άρθρων στο επιστημονικό περιοδικό Science [140-142]. Υπολογίζεται ότι υπάρχουν τουλάχιστον 300 miRNAs στο ανθρώπινο γονιδίωμα, συνιστώντας περίπου το 1-4% όλων των εκφραζόμενων ανθρώπινων γονιδίων, γεγονός που καθιστά τα miRNAs μια από τις μεγαλύτερες τάξεις γονιδιακών ρυθμιστών [143]. Τα περισσότερα ανθρώπινα miRNAs βρίσκονται είτε μέσα σε εσώνια mRNA μορίων, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, είτε μέσα σε εσώνια mRNA μορίων που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες [143]. Τα υπόλοιπα miRNAs βρίσκονται είτε σε εξώνια mRNA γονιδίων, είτε μέσα στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR) άλλων mRNA γονιδίων, είτε τέλος ομαδοποιημένα σε ειδικά γονίδια miRNA [143, 144].

Τα miRNAs έχουν κυρίως αρνητική ρυθμιστική δράση στην γονιδιακή έκφραση χρησιμοποιώντας διάφορους μηχανισμούς ανάλογα με το βαθμό συμπληρωματικότητας ανάμεσα στο miRNA και το γονίδιο στόχο, προκαλώντας είτε αποικοδόμηση των μεταγράφων, είτε καταστολή της μετάφρασης [143, 145]. Φαίνεται να είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη ενός οργανισμού αφού εμπλέκονται σε πολλές βιολογικές διαδικασίες του κυττάρου, ενώ η διαταραχή στην έκφραση τους φαίνεται να παίζει ρόλο σε πολλές παθολογικές καταστάσεις [146]. Τα γονίδια των miRNAs εντοπίζονται συχνά σε ευαίσθητες θέσεις και σε γενωμικές περιοχές που εμπλέκονται στον καρκίνο, υποδηλώνοντας ότι αυτά τα miRNAs εμπλέκονται σε κυτταρικές διαδικασίες που διαταράσσονται στον καρκίνο, όπως κυτταρική αύξηση,

κυτταρική διαίρεση και πολλαπλασιασμό [144] (Εικόνα 1.28). Έτσι, δημιουργείται ένα νέο πεδίο έρευνας, τα ογκογόνα miRNAs (oncomiRs) που σχετίζονται με τον καρκίνο και τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου [147].

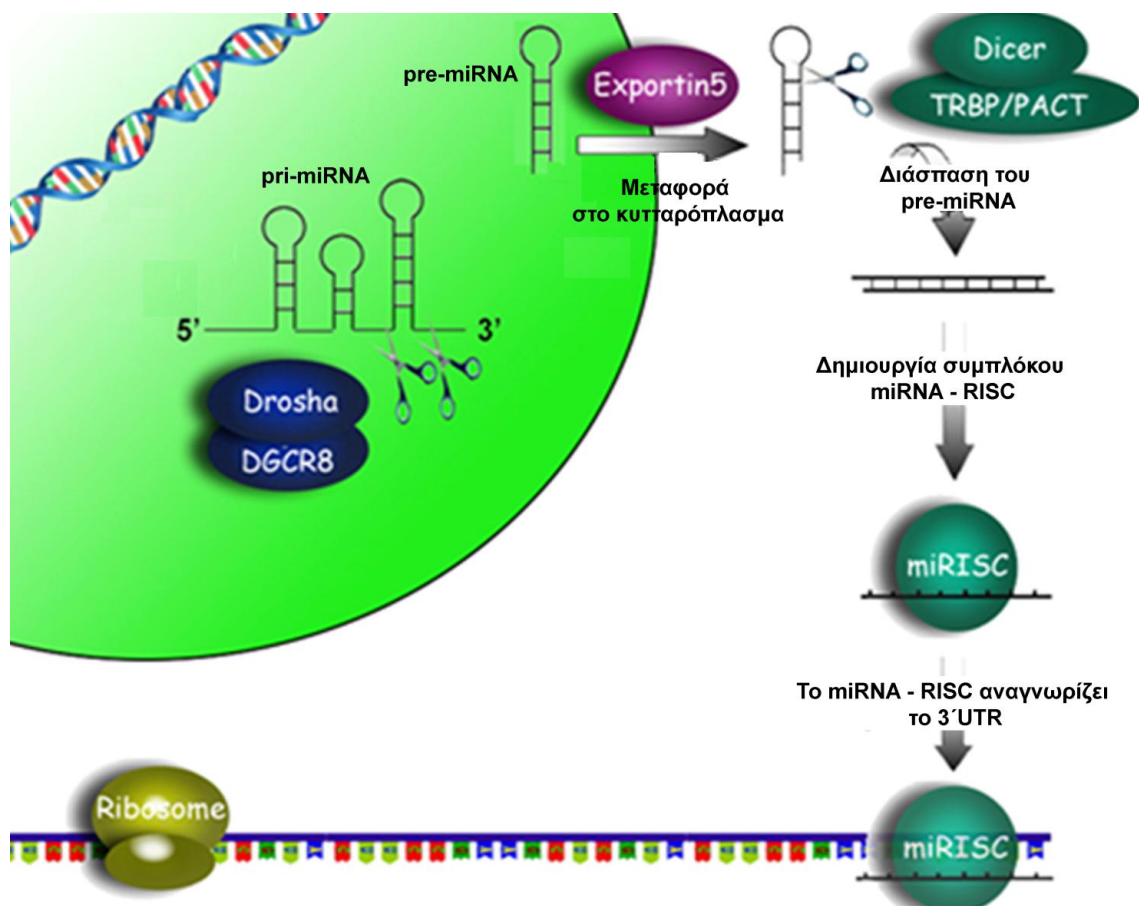


Εικόνα 1.28: Α) Η υπερέκφραση miRNAs είναι πιθανό να οδηγήσει σε μειωμένη έκφραση του στόχου του, όπως για παράδειγμα ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου. Β) Η μειωμένη έκφραση miRNAs είναι πιθανόν να οδηγήσει σε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου στόχου, όπως για παράδειγμα ενός ογκογονιδίου. Και στις δύο περιπτώσεις μπορεί να προκληθεί δημιουργία όγκου.

Παρόλα αυτά πρέπει να επισημάνουμε ότι τα miRNAs έχει φανεί να δρουν και ογκοκατασταλτικά, και η καταστολή των συγκεκριμένων miRNAs οδηγούν σε αυξημένο πολλαπλασιασμό, μεταστατικότητα ή αγγειογένεση, περιορισμό της απόπτωσης, αποδιαφοροποίηση, γεγονότα που οδηγούν σε σχηματισμό όγκου [148, 149] (Εικόνα 1.27). Συμπερασματικά, η κατανόηση του μηχανισμού δράσης των miRNAs μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καινοτόμων θεραπευτικών προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση πολλών ασθενειών καθώς και στη χρήση τους ως διαγνωστικά εργαλεία.

1.5.1 Βιοσύνθεση των miRNAs

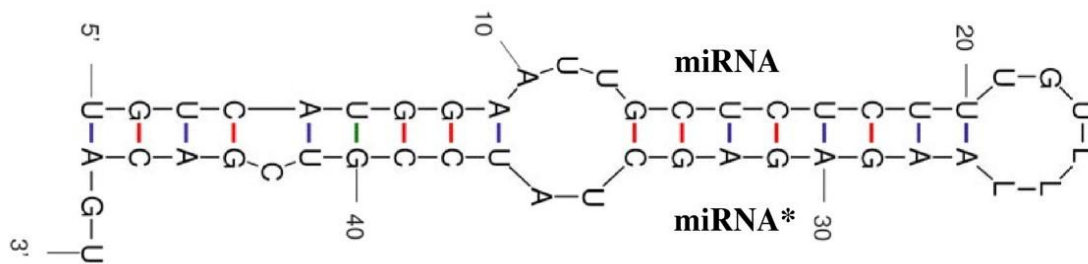
Τα γονίδια των miRNA μεταγράφονται είτε από την RNA πολυμεράση II είτε από την RNA πολυμεράση III σε πρωτογενή miRNA μετάγραφο (pri-miRNAs) [150, 151]. Τα pri-miRNAs, που έχουν σχήμα φουρκέτας (stem-loop structure), νουκλεολύνονται στον πυρήνα από ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών, το σύμπλοκο μικροεπεξεργαστών (microprocessor complex) [152]. Το σύμπλοκο αυτό συγκροτείται από την πρωτεΐνη Drosha που έχει τον κύριο νουκλεολυτικό ρόλο και από την πρωτεΐνη DGCR8 (DiGeorge critical region 8) που κατευθύνει και σταθεροποιεί τη δράση της Drosha [152]. Τα πρόδρομα miRNAs (pre-miRNAs) που απελευθερώνονται με δομή φουρκέτα (stem-loop structure) [153], βγαίνουν από τον πυρήνα με τη βοήθεια της Εξπορτίνης-5, μιας Ran-GTP πρωτεΐνης-μεταφορέα που βρίσκεται στο σύμπλεγμα του πυρηνικού πόρου [154, 155] (Εικόνα 1.29).



Εικόνα 1.29 : Το μονοπάτι βιοσύνθεσης των MicroRNAs (miRNAs).

Στο κυτταρόπλασμα, τα pre-miRNA νουκλεολύνονται από το ένζυμο Dicer και παράγονται δίκλιωνα τμήματα μήκους ~21 νουκλεοτιδίων, που έχουν 5' φωσφορυλιωμένα άκρα και 3' προεξέχοντα άκρα μήκους 2 νουκλεοτιδίων [156, 157]. Έχει διαπιστωθεί ότι η ανθρώπινη Dicer αλληλεπιδρά με δύο στενά συνδεδεμένες πρωτεΐνες, την TRBP (trans activator RNA (Tar) binding protein) και την PACT (protein activator of PKR) οι οποίες συμβάλλουν στο σχηματισμό του συμπλέγματος αποσιώπησης RISC που επάγεται από RNA [158, 159] (Εικόνα 1.28).

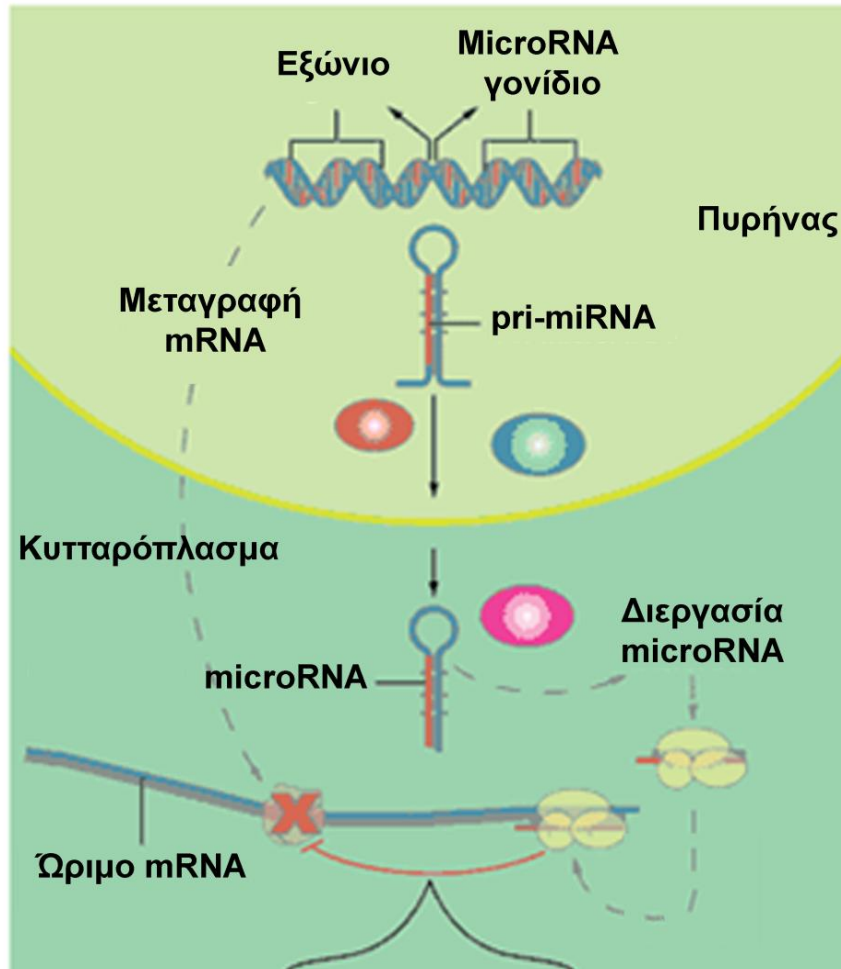
Τα παραγόμενα δίκλιωνα τμήματα αποτελούνται από το ώριμο miRNA και το συμπληρωματικό του, miRNA* [160] (Εικόνα 1.30). Η συχνότητα εμφάνισης των miRNA* στις βιβλιοθήκες κλωνοποιημένων miRNAs είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με τα miRNA, πιθανώς λόγω του πολύ μικρού χρόνου ημιζωής αφού αποικοδομούνται [160].



Εικόνα 1.30: Δευτεροταγής δομή του miRNA:miRNA* συμπλόκου.

Τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωμάτια (RNPs) που περιέχουν τα δίκλιωνα miRNAs οδηγούν το ώριμο μόνο miRNA στο καταλυτικό σύμπλοκο RISC και κατ' επέκταση στο mRNA-στόχο για μετα-μεταγραφική αποσιώπηση [161, 162] (Εικόνα 1.31). Η ασύμμετρη σύνδεση του ώριμου miRNA στο σύμπλοκο RISC ρυθμίζεται από τις θερμοδυναμικές ιδιότητες του δίκλωνου miRNA:miRNA* όπου το ώριμο miRNA έχει το λιγότερο σταθερό 5' άκρο [162]. Ως τώρα, έχουν ανακαλυφθεί πολλά σύμπλοκα RISC που διαφέρουν στο μέγεθος και στη σύστασή τους. Η συγκρότηση του συμπλόκου RISC είναι μία ATP-εξαρτώμενη διαδικασία αφού το ξεδίπλωμα του

δίκλωνου miRNA και η αλλαγή στη διαμόρφωση ή στη σύσταση του ριβοπρωτεϊνικού συμπλοκή απαιτούν ενέργεια [163].



Εικόνα 1.31 : Μηχανισμός δράσης των miRNAs.

1.5.2 Μηχανισμός δράσης των miRNAs

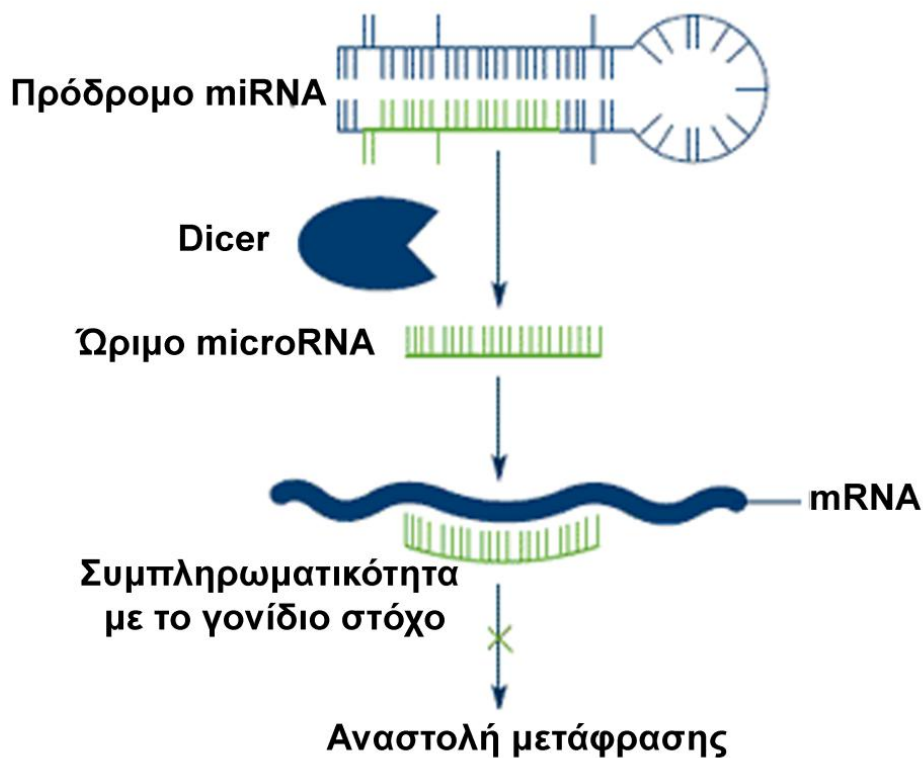
Τα miRNAs ενεργοποιούνται σε μονόκλωνη μορφή και δρουν σε μορφή συμπλέγματος με το miRISC [164]. Τα miRNA φέρουν στο 5' άκρο μία περιοχή μήκους 2-8 νουκλεοτιδίων, με την οποία αναγνωρίζουν το mRNA στόχο και ονομάζεται “seed sequence” ή “seed site” [164]. Στο σύμπλεγμα miRISC, το miRNA προσδέεται στην 3' UTR του mRNA στόχου με ακριβή συμπληρωματικότητα στο μοτίβο αναγνώρισης [164]. Η μερική συμπληρωματικότητα με τις υπόλοιπες

αλληλουχίες του miRNA που βρίσκονται στη μέση και στο 3' άκρο, σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση του miRNA::mRNA ενώ μπορεί να εμπλέκεται στο σχηματισμό του miRISC [164]. Μελέτες έδειξαν ότι τα miRNA μπορούν να επάγουν αποσιώπηση της έκφρασης ενός γονιδίου αλληλεπιδρώντας με την κωδική και την 5' UTR περιοχή του mRNA [165].

Τα miRNAs μπορούν είτε να αναστείλουν τη μετάφραση είτε να επάγουν την διάσπαση του mRNA στόχου ή και τα δύο σύμφωνα με τους εξής παράγοντες: 1) το βαθμό συμπληρωματικότητας με την περιοχή πρόσδεσης, 2) τον αριθμό των μοτίβων που αναγνωρίζει το 5' άκρο του και 3) την προσβασιμότητα στις θέσεις πρόσδεσης [166-168].

Τέλεια συμπληρωματικότητα στην αλληλεπίδραση του miRNA:mRNA οδηγεί στη διάσπαση του mRNA στόχου από την ενδονουκλεοτιδική δράση ορισμένων Argonaute πρωτεϊνών [169, 170]. Στα θηλαστικά όμως, η πλειοψηφία των προβλεπόμενων στόχων έχουν μόνο μερική συμπληρωματικότητα [171-173] και καταλήγουν σε αναστολή της μετάφρασης [166-168] (Εικόνα 1.32). Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι μπορούν να προάγουν την αποαδενυλίωση προκαλώντας την ταχύτερη αποικοδόμηση των mRNAs [174], καθώς και να προκαλέσουν ιστονικές τροποποιήσεις και DNA μεθυλίωση σε περιοχές εκκινητών επηρεάζοντας την έκφραση των γονιδίων στόχων [175, 176].

Έχει προβλεφθεί ότι κάθε μονόκλωνο miRNA μπορεί να έχει περισσότερα από 1,000 γονίδια στόχους και ότι κάθε γονίδιο που κωδικοποιείται σε πρωτεΐνη μπορεί να ρυθμίζεται από πολλαπλά miRNA [166-168]. Αυτό συμβαίνει λόγω της χαλαρής συμπληρωματικότητας που απαιτείται για την αλληλεπίδραση miRNA::mRNA [177]. Συνεπώς, διαφορετικά γονίδια μπορούν να έχουν τα ίδια μοτίβα πρόσδεσης των miRNAs και ένα συγκεκριμένο γονίδιο μπορεί να έχει πολλαπλά μοτίβα πρόσδεσης για διαφορετικά miRNAs. Τα miRNAs μπορούν να θεωρηθούν ως ρυθμιστές μιας κυτταρικής λειτουργίας ή ενός κυτταρικού προγράμματος και όχι μόνο ενός συγκεκριμένου γονιδίου.



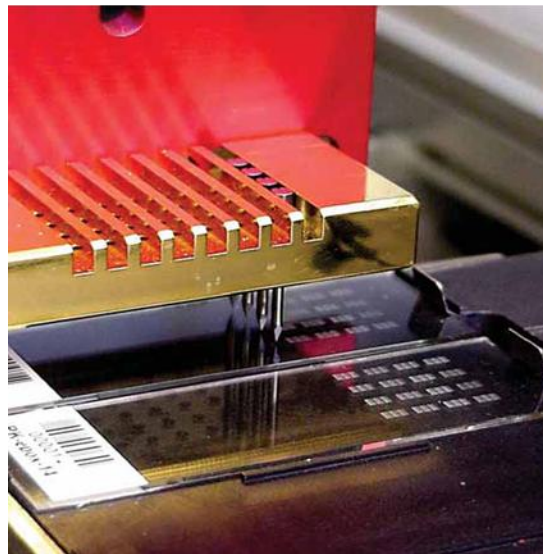
Εικόνα 1.32: Αναστολή της μετάφρασης μέσω των miRNAs.

1.5.3 Ταυτοποίηση miRNAs

Το πρώτο βήμα στην κατανόηση της σημασίας των miRNAs και της λειτουργίας τους είναι η απομόνωση και η ταυτοποίηση τους στα κύτταρα και στους οργανισμούς. Χρησιμοποιούνται διάφοροι τρόποι για την απομόνωση των miRNAs όπως κλωνοποίηση από cDNA, ευθεία γενετική διαλογή (forward genetic screen) που έχει χρησιμοποιηθεί στο *C.elegans*, υπολογιστικοί αλγόριθμοι, οι οποίοι με βάση τη δομή φουρκέτας προβλέπουν miRNAs στο γονιδίωμα νηματόζων, εντόμων και σπονδυλωτών, η τεχνολογία μικροσυστοιχιών και η αλληλούχηση (Deep sequencing).

Αναλυτικότερα, η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών που μας επιτρέπει να παίρνουμε ποσοτικές και ποιοτικές πληροφορίες για χιλιάδες γονίδια ταυτόχρονα. Η τεχνική αυτή εκμεταλλεύεται την αρχή της συμπληρωματικότητας μεταξύ νουκλεϊκών οξέων DNA-DNA ή DNA-RNA ή πρόσφατα και μεταξύ αμινοξέων-πρωτεϊνών υπό

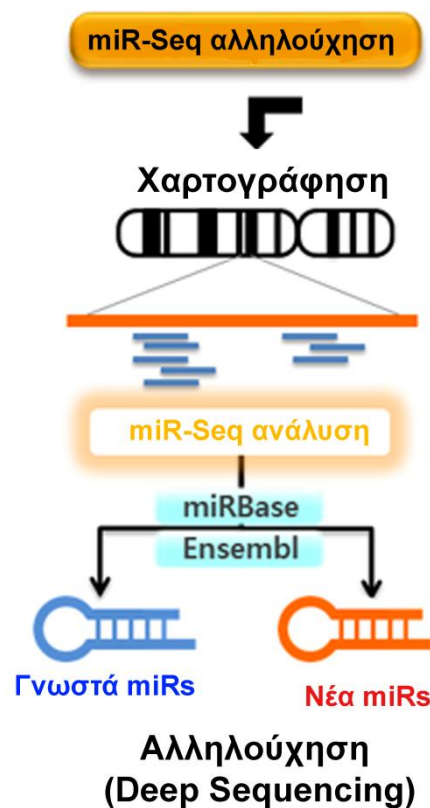
αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και τη χρήση φθορίζουσων ουσιών. Οι μικροσυστοιχίες ουσιαστικά είναι μια διάταξη χιλιάδων μικροσκοπικών σημείων που αντιπροσωπεύουν DNA αλληλουχίες με τη μορφή ολιγονουκλεοτιδίων που ονομάζονται ανιχνευτές (probes) (Εικόνα 1.33) και ακινητοποιούνται με ομοιοπολικούς δεσμούς σε μία στερεή επιφάνεια και μπορούν να υβριδοποιηθούν με cDNA ή RNA δείγματα. Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση του υβριδισμού πραγματοποιείται με τη χρήση φθορίζουσων ουσιών και ειδικά σχεδιασμένων βιοπληροφορικών αλγορίθμων.



Εικόνα 1.33: Η καλυπτρίδα που χρησιμοποιείται στην τεχνική των μικροσυστοιχιών.

Η πιο πρόσφατη τεχνική που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση και την δημιουργία προτύπου miRNAs είναι η τεχνολογία της αλληλούχησης (Deep sequencing technology), η οποία δίνει την δυνατότητα για την ταυτόχρονη αλληλούχηση εκατομμυρίων μορίων RNA [178] (Εικόνα 1.34). Είναι γεγονός ότι σαν αναπτυσσόμενη τεχνική παραμένει ακόμα ιδιαίτερα ακριβή σε σχέση με την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών. Σημαντικό είναι ότι η τεχνική αυτή ξεπερνά βασικά μειονεκτήματα της τεχνικής των μικροσυστοιχιών όπως τον θόρυβο (background) λόγω του φθορισμού καθώς και ότι μπορεί να ταυτοποιήσει μόνο τα miRNAs που είναι σε αφθονία και μόνο τα miRNAs που είναι ήδη καταχωρημένα

στις βάσεις δεδομένων [178]. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα από με τη τεχνική των μικροσυστοιχιών διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο του μηχανήματος που θα χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση του φθορισμού, οπότε τα αποτελέσματα πολλές φορές δεν είναι επαναλήψιμα [179]. Μετά από μία δεκαετία που γίνεται η χρήση της τεχνικής των μικροσυστοιχιών, έχουν πλέον αναγνωρισθεί τα μειονεκτήματα της και έχουν πλέον βρεθεί τρόποι για την αντιμετώπιση τους. Η τεχνολογία της αλληλούχησης δεν παρουσιάζει τους παραπάνω περιορισμούς και έτσι μπορούν να ταυτοποιηθούν και νέα miRNAs, όμως θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι είναι μια τεχνική που θα πρέπει να επαναληφθεί πολλές φορές για να διαβαστούν αλληλουχίες που εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα [179]. Συμπερασματικά και οι δύο τεχνικές έχουν υψηλή απόδοση για την ταυτοποίηση του προτύπου έκφρασης των miRNAs.



Εικόνα 1.34: Διαδικασία δημιουργίας προτύπου έκφρασης miRNAs με την τεχνική της αλληλούχησης (Deep sequencing).

1.5.4 Ο ρόλος των miRNAs στα βλαστικά κύτταρα

Το 40-50% των mRNAs των θηλαστικών φαίνεται να ρυθμίζεται από τα miRNAs σε μεταγραφικό επίπεδο [143, 145]. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί συνολικά 678 γονίδια miRNA στο γονιδίωμα του ανθρώπου και μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση των miRNAs στα βλαστικά κύτταρα διαφέρει σημαντικά από άλλους κυτταρικούς τύπους [180, 181]. Τα miRNAs έχουν βρεθεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιολογία των βλαστικών κυττάρων, συγκεκριμένα στους μηχανισμούς αυτοανανέωσης, πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης.

Τα miRNAs είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό των ESCs. Ερευνητικές ομάδες έδειξαν ότι ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου *Dicer*^{-/-} δεν ήταν δυνατό να επεξεργαστούν τα ενδογενή miRNAs με αποτέλεσμα να πεθαίνουν πρόωρα, καθώς και ότι εμβρυικά βλαστικά κύτταρα στα οποία έλλειπε το γονίδιο *Dicer*^{-/-} παρουσίαζαν χαμηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού και τροποποιημένο κυτταρικό κύκλο [181]. Συνεπώς, τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν ότι τα ενδογενή miRNAs προϊόντα της *Dicer* είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας των ESCs και τη φυσιολογική εμβρυϊκή ανάπτυξη.

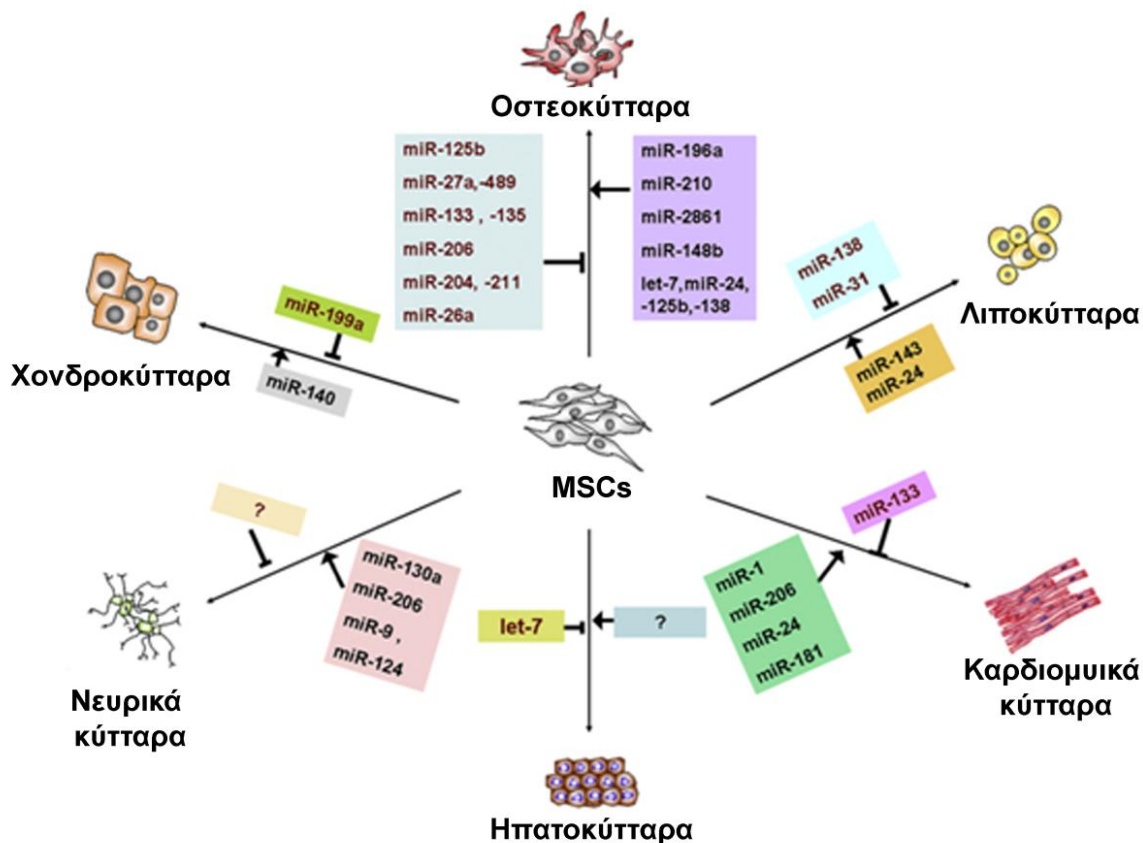
Επιπρόσθετα, τα miRNAs είναι απαραίτητα για την έναρξη της διαφοροποίησης των ESCs. Για παράδειγμα, το miRNA *let-7*, είναι ένα από τα πρώτα που φάνηκε να διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο κατά την διαφοροποίηση βλαστικών κυττάρων σε νευρικά [182]. Επιπρόσθετα, υπάρχουν και τα ιστό-ειδικά micro-RNAs που κατευθύνουν τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων προς συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους αναστέλλοντας τη διαφοροποίηση προς άλλους εναλλακτικούς κυτταρικούς τύπους [183].

Πολλές έρευνες έχουν διεξαχθεί και σε MSCs προσπαθώντας να καθορίσουν τα miRNAs που ρυθμίζουν τα μοναδικά χαρακτηριστικά τους [184-187]. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι το πρότυπο έκφρασης των miRNAs στα MSCs είναι διαφορετικά από αυτό των ESCs [188, 189]. Διάφορες μελέτες έχουν εστιάσει στους διαφορετικούς πληθυσμούς των MSCs, είτε από ενήλικες είτε από εμβρυϊκές πηγές [89, 122, 190]. Λόγω της χρήσης των MSCs σε διάφορες κυτταρικές θεραπείες, πολλές μελέτες έχουν εστιάσει σε ένα βασικό τους μειονέκτημα, τη κυτταρική γήρανση που επέρχεται μετά από τον συνεχή πολλαπλασιασμό τους [191, 192]. Έχει

διαπιστωθεί ότι η κυτταρική γήρανση επηρεάζει τη συνολική έκφραση των εκφραζόμενων γονιδίων αλλά και των miRNAs [193, 194]. Επίσης, έχει διερευνηθεί ο ρόλος των miRNAs στη διαδικασία αποκατάστασης τραυμάτων με τη χρήση MSCs [195]. Διαπιστώθηκε ότι ο TGF- β (Transforming growth factor – beta), ο οποίος είναι χαρακτηριστικό μόριο στην περιοχή του τραύματος, διεγείρει την έκφραση του miR-21 στα MSCs και προωθεί τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κυττάρων in vitro [196].

Δεδομένου ότι τα MSCs διαφοροποιούνται προς τρεις (οστεογενής, λιπογενής, χονδρογενής) ή και περισσότερες κυτταρικές σειρές όπως η μυελογενής και η καρδιογενής σειρά διερευνήθηκε η αλλαγή στην έκφραση των miRNAs κατά τη διαφοροποίησή τους [197]. Διαπιστώθηκε ότι η έκφραση των miR-143 και miR-145 είναι αυξημένη στα προγονικά λιποκύτταρα και η έκφραση των miR-638 και miR-663 στα χονδροκύτταρα, miRNAs που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για τον αντίστοιχο τύπο κυττάρων [197]. Παρομοίως, έχει ταυτοποιηθεί το πρότυπο έκφρασης των miRNAs σε hUC-MSCs κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησής τους ως προς ηπατοκύτταρα, αναδεικνύοντας συγκεκριμένα miRNAs που διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο [184]. Επίσης, συγκεκριμένα miRNAs έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται κατά τη διαδικασία της νευρογένεσης στα MSCs. Για παράδειγμα, τα miR-9 και miR-124 ρυθμίζονται από τον μεταγραφικό παράγοντα REST, που είναι βασικό μόριο στη ντοπαμινεργική νευρογένεση των MSCs [198, 199]. Το miR-133 και το miR-135 έχει φανεί να αναστέλλουν τη διαφοροποίηση των MSCs προς οστεοκύτταρα επηρεάζοντας τις πρωτεΐνες RUNX2 και SMAD5 που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία οστού [200]. Παράλληλα, έχει αποδειχθεί ότι υπάρχουν miRNAs που δρουν και σαν θετικοί ρυθμιστές στη διαδικασία της διαφοροποίησης των MSCs προς οστεοκύτταρα. Το miR-196a έχει διαπιστωθεί να ενισχύει την διαφοροποίηση προς οστεοκύτταρα στοχεύοντας το γονίδιο HOXC8 [201]. Πέντε miRNAs (miR-130b, miR-152, miR-28, miR-26b και miR-193b) παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση κατά τη διάρκεια διαφοροποίησης των MSCs προς χονδροκύτταρα, όπως διαπιστώθηκε με την χρήση μικροσυστοιχιών [202]. Κατά τον ίδιο τόπο, το miR-143 έχει διαπιστωθεί ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της διαφοροποίησης των MSCs προς λιποκύτταρα στοχεύοντας το γονίδιο ERK5, που βρίσκεται στο LIF σηματοδοτικό μονοπάτι [203]. Έτσι, παρατηρείται ότι ένας

μεγάλος αριθμός μελετών έχει επικεντρωθεί στην αναζήτηση miRNAs που ρυθμίζουν τις χαρακτηριστικές ιδιότητες των MSCs [185] (Εικόνα 1.35).



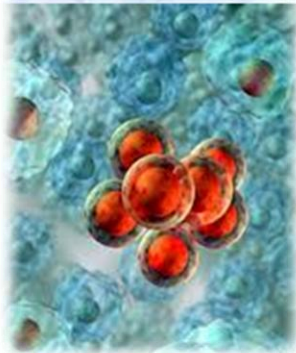
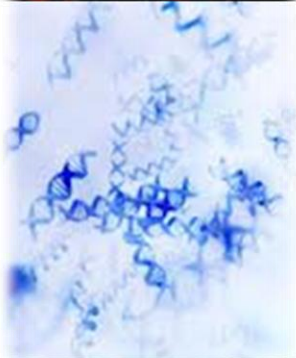
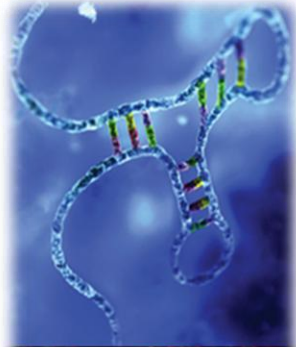
Εικόνα 1.35: Ο ρόλος των miRNA στη διαφοροποίηση των MSCs (Guo et al., 2011).

Η εισαγωγή miRNAs στα κύτταρα θα μπορούσε να διευκολύνει την παραγωγή ομογενών κυτταρικών πληθυσμών του επιθυμητού κυτταρικού τύπου από βλαστικά κύτταρα και θα μπορεί να αξιοποιηθεί σε θεραπευτικές προσεγγίσεις. Η εισαγωγή στα κύτταρα θα μπορούσε να επιτυγχάνεται με τη χρήση λεντιϊών ή λιποσωμάτων. Γι' αυτό χρειάζεται να πραγματοποιηθούν εκτενείς έρευνες για την ανίχνευση μοναδικών miRNAs που εκφράζονται στους διάφορους τύπους βλαστικών κυττάρων.

1.6 Σκοπός της διδακτορικής εργασίας

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν τη μελέτη της μετά-μεταγραφικής ρύθμισης τριών πληθυσμών MSCs από AF, BM και UCB, σε επίπεδο προτύπου έκφρασης των miRNAs με τη χρήση miRNAs μικροσυστοιχιών. Παράλληλα, στα πλαίσια αυτής της μελέτης, αναλύθηκε η δυνατότητα συγκεκριμένων miRNAs να επιδρούν στον ρυθμό πολλαπλασιασμού και στην ικανότητα διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών κυττάρων από το αμνιακό υγρό (AF-MSCs). Τέλος, διευρύνθηκε το διαφορετικό πρότυπο έκφρασης miRNAs μεταξύ των AF-MSCs και διαφοροποιημένων AF-MSCs προς λιποκύτταρα, με τη χρήση miRNAs μικροσυστοιχιών.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής περιγράφονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2. Το Κεφάλαιο 3 περιγράφει τη λειτουργική κατηγοριοποίηση των miRNAs που παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση μεταξύ των τριών πληθυσμών MSCs από AF, BM και UCB. Στη συνέχεια στο Κεφάλαιο 4 ακολουθεί η διερεύνηση της επίδρασης της καταστολής του μεταγραφικού παράγοντα Sox2 από το miR-21 στις ιδιότητες των AF-MSCs. Τέλος, το Κεφάλαιο 5 διαπραγματεύεται τη σύγκριση του προτύπου έκφρασης των miRNAs των AF-MSCs και των διαφοροποιημένων AF-MSCs προς λιποκύτταρα, αλλά και τον ρόλο του miR-26a στα AF-MSCs.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

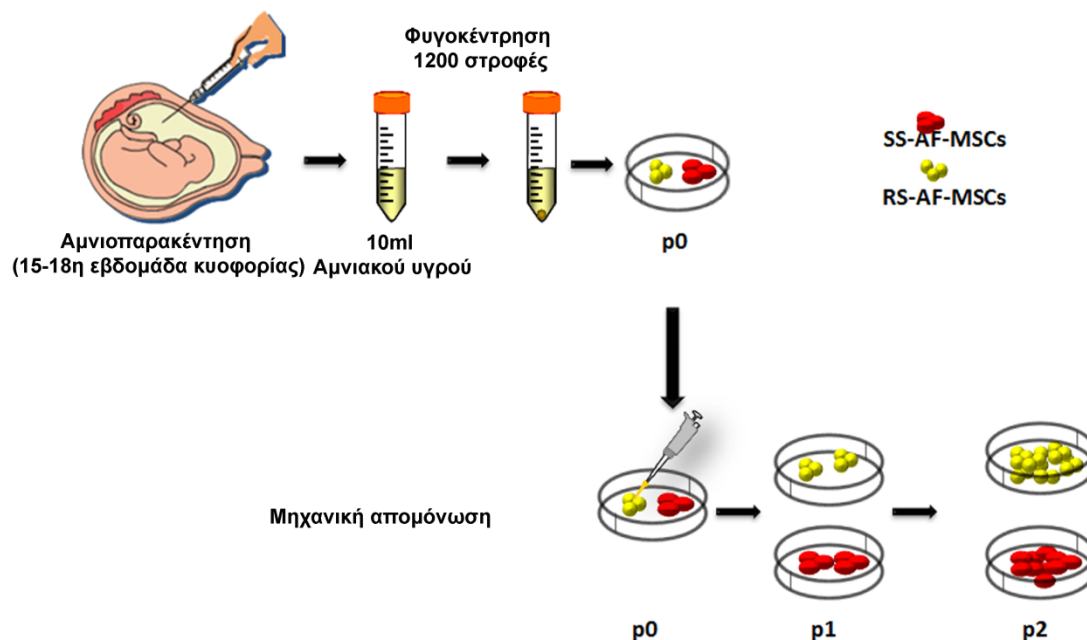
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Τεχνικές χειρισμού κυττάρων

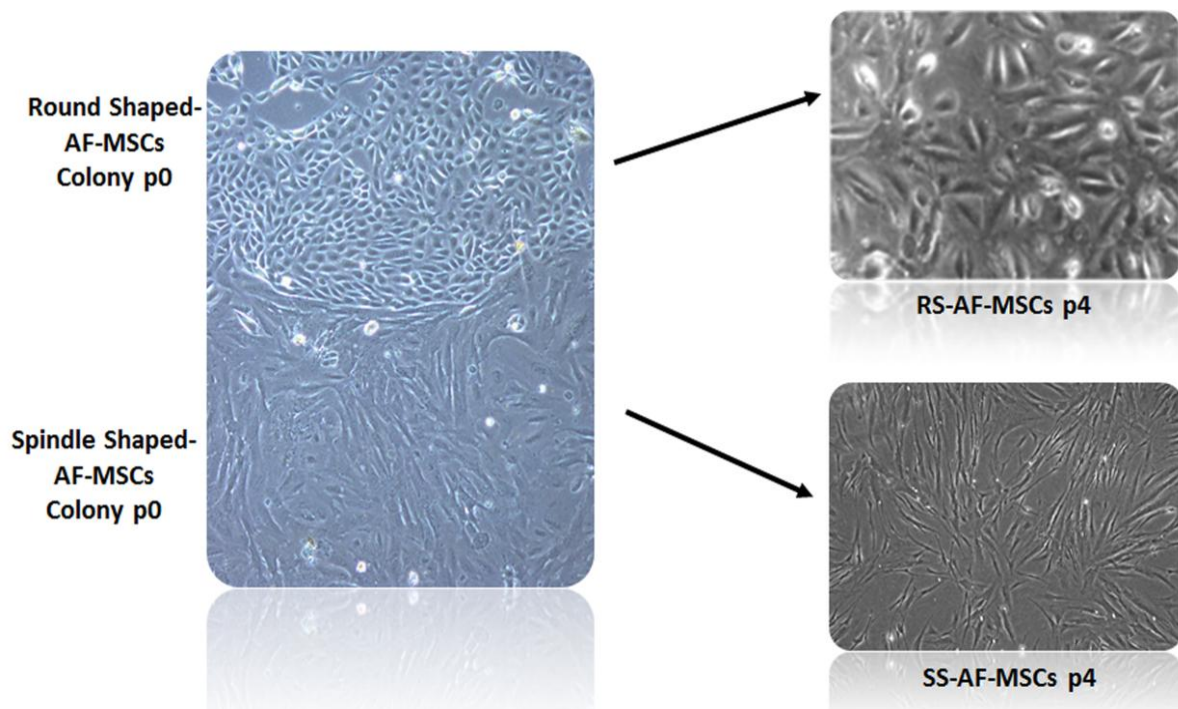
2.1.1 Απομόνωση και καλλιέργεια μεσεγχυματικών κυττάρων από αμνιακό υγρό

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα απομονώθηκαν από αμνιακό υγρό, προερχόμενο από προγραμματισμένες αμνιοκεντήσεις μεταξύ της 15^{ης} και της 18^{ης} εβδομάδας κύησης (2^ο τρίμηνο) με τη σύμφωνη γνώμη της επιτροπής βιοηθικής των νοσοκομείων Αλεξάνδρα και ΙΑΣΩ και τη συγκατάθεση του Διοικητικού Συμβουλίου της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και τη γραπτή συγκατάθεση των εγκύων. Η αμνιοκέντηση πραγματοποιήθηκε σε στείρες συνθήκες, με τη χρήση 22G βελόνας και με υπερηχογραφικό έλεγχο, και 10-15ml αμνιακού υγρού ελήφθησαν για κάθε δείγμα.



Εικόνα 2.1 : Απομόνωση και καλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων από αμνιακό υγρό.

Το κάθε δείγμα αμνιακού υγρού (10ml) φυγοκεντρήθηκε στις 1300 στροφές για 10 λεπτά (Εικόνα 2.1). Ακολούθησε επαναδιάλυση του ιζήματος σε 5ml καλλιεργητικό μέσο Dulbecco's modified Eagle's καλλιεργητικό μέσο (DMEM; Gibco-BRL, Paisley, Scotland, UK) που περιείχε 20% εμβρυϊκό ορό βοός (FBS) (Gibco-BRL) και 1% αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Gibco-BRL) σε μία φλάσκα 25cm² κυτταροκαλλιέργειας και επώαστηκε στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ υπό άσηπτες συνθήκες για περίπου είκοσι μέρες, όπου και εμφανίστηκαν οι πρώτες αποικίες. Η αλλαγή του καλλιεργητικού μέσου γίνονταν στη συνέχεια κάθε πέντε μέρες. Όταν τα κύτταρα κάλυψαν τον πυθμένα της καλλιεργητικής φλάσκας κατά 70-80%, αποκολλήθηκαν με την προσθήκη 1mL διαλύματος θρυψίνης 0.25%(w/v) / EDTA 2.65mM (Gibco-BRL). Μετά την αποκόλλησή τους τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό υλικό, φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στις 1200 στροφές και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε θρεπτικό μέσο. Στη συνέχεια έγινε ανακαλλιέργεια τους σε μεγαλύτερη φλάσκα 75cm² και ακολούθησε η περαιτέρω έκπτυξη των κυττάρων.



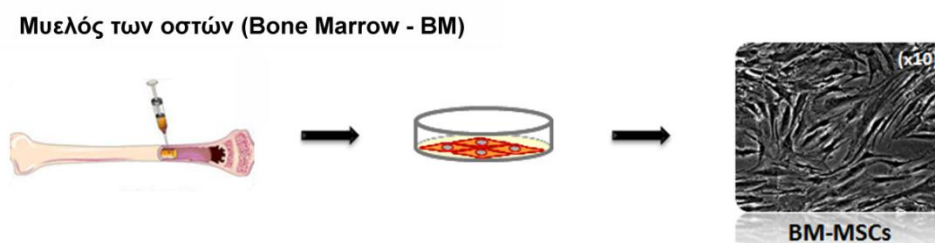
Εικόνα 2.2: Από τα AF-MSCs απομονώθηκαν με μηχανικά μέσα δύο υποπληθυσμοί, ατρακτοειδούς [spindle – shaped (SS)] και σφαιρικού σχήματος [round-shaped (RS)].

Στα δείγματα αμνιακού υγρού διαπιστώθηκε ότι στις αρχικές καλλιέργειες σταδίου έκπτυξης 0-1 δημιουργήθηκαν αποικίες προσκολλημένων κυττάρων από δύο μορφολογικά διακριτούς κυτταρικούς τύπους, ατρακτοειδούς [spindle – shaped (SS)] και σφαιρικού σχήματος [round-shaped (RS)], οι οποίοι απομονώθηκαν ξεχωριστά μηχανικά, ώστε να επιτευχθεί η έκπτυξη μεμονωμένων αποικιών και χαρακτηρίστηκαν ως SS-AF-MSCs και RS-AF-MSCs, αντιστοίχως (Εικόνα 2.2) [102]. Τα κύτταρα από κάθε αποικία εκπύχθηκαν περαιτέρω και παρατηρήθηκε ότι κατά την ανακαλλιέργεια διατήρησαν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους.

Για την κρυοκατάψυξη τους τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από τις φλάσκες όπως και κατά την ανακαλλιέργεια τους, φυγοκεντρήθηκαν και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα 90% FBS και 10% DMSO (dimethyl sulfoxide, κρυοπροστατευτική ουσία, Applichem, USA). Τα κύτταρα φυλάχθηκαν σε συγκέντρωση 10^6 κύτταρα ανά φιαλίδιο. Τα φιαλίδια μεταφέρθηκαν αρχικά σε υπερκαταψύξη -80°C και στη συνέχεια σε υπερκαταψύξη -140°C .

2.1.2 Απομόνωση και καλλιέργεια μεσεγχυματικών κυττάρων από μυελό των οστών

Πραγματοποιήθηκε λήψη μυελού των οστών από υγιείς δότες και ακολούθησε απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων μετά από επιστοίβαση του μυελού σε φικόλη. Κατόπιν ακολούθησε έκπτυξη και καλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων *in vitro* σε θρεπτικό υλικό καλλιεργητικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 10% ή 20% FBS στους 37°C και σε 5% CO_2 (Εικόνα 2.3) [43]. Επιπλέον, κάποια δείγματα BM-MSCs προήλθαν από την Cambrex (Cambrex, UK, Lot.L2F1657) και καλλιεργήθηκαν στις παραπάνω συνθήκες.

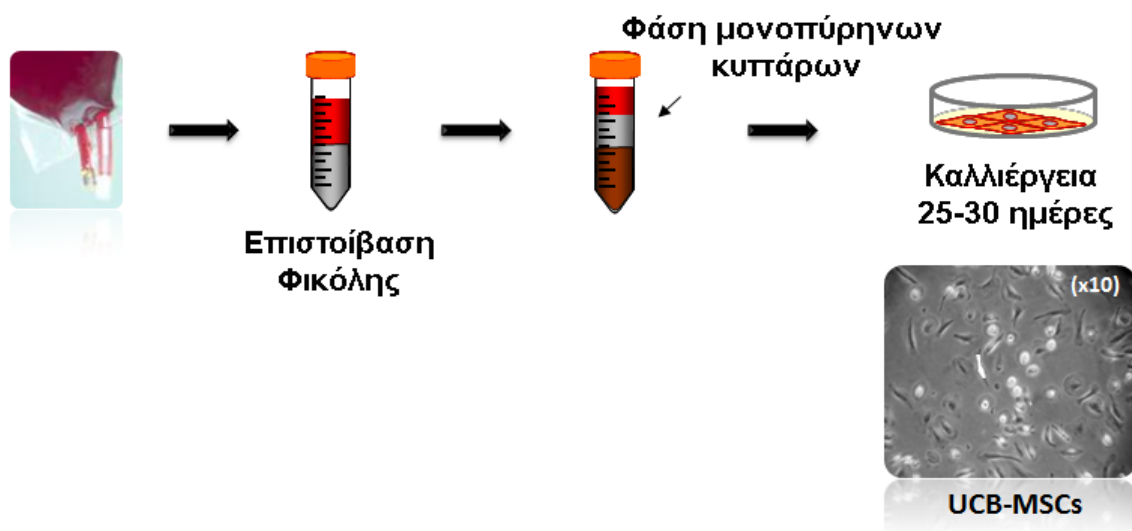


Εικόνα 2.3: Απομόνωση και καλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων από μυελό των οστών.

2.1.3 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από αίμα ομφαλίου λώρου

Η λήψη των δειγμάτων αίματος ομφαλίου λώρου, μετά το πέρας του τοκετού, έγινε με τη σύμφωνη γνώμη της επιτροπής βιοηθικής των νοσοκομείων Αλεξάνδρα και ΙΑΣΩ και τη συγκατάθεση του Διοικητικού Συμβουλίου της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Μετά τη λήψη του δείγματος αίματος ομφαλίου λώρου πραγματοποιήθηκε αραίωση (1:1) σε διάλυμα HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Sigma-Aldrich Ltd., Gillingham, Dorset, UK). Κατόπιν το αραιωμένο δείγμα επιστοιβάστηκε σε διάλυμα φικόλης (Histopaque, Sigma-Aldrich Ltd.) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1900 στροφές για 30 λεπτά, χωρίς φρένο, σε θερμοκρασία δωματίου.

Αίμα ομφαλίου λώρου (Umbilical cord blood - UCB)



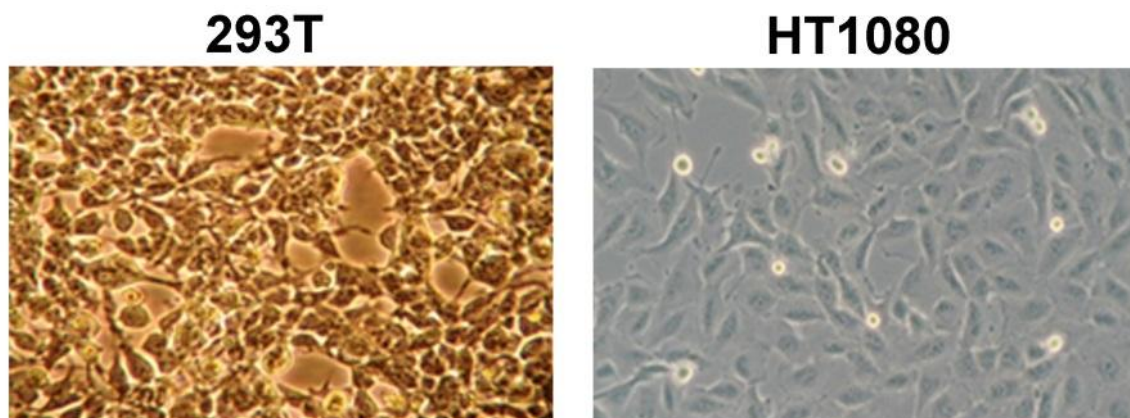
Εικόνα 2.4: Απομόνωση και καλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων από αίμα ομφαλίου λώρου.

Στη συνέχεια, απομονώθηκε η ενδιάμεση στοιβάδα των μονοπύρηνων κυττάρων και πραγματοποιήθηκε αραίωση (1:3) σε διάλυμα HBSS και φυγοκέντρηση στις 1600 στροφές για 5 λεπτά (Εικόνα 2.4). Κατόπιν, επαναδιαλύθηκαν τα κύτταρα σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων (Χλωριούχο αμμώνιο 155mM, διττανθρακικό νάτριο 10mM, EDTA 0.1mM). Ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά στον πάγο και η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 1ml

FBS. Η φυγοκέντρωση επαναλήφθηκε στις 1600 στροφές για 5 λεπτά, ακολούθησε έκπλυση με HBSS και επαναδιάλυση των κυττάρων στο κατάλληλο θρεπτικό υλικό (DMEM, 10% FBS, 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μέτρηση των κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συγκέντρωση $10^7 / \text{cm}^2$ στο παραπάνω θρεπτικό μέσο.

2.1.4 Καλλιέργεια 293T και HT1080 κυττάρων

Τα κύτταρα 293T προέρχονται από τα 293 κύτταρα (Human Embryonic Kidney 293 cells), μία κυτταρική σειρά από ανθρώπινα κύτταρα εμβρυϊκού νεφρού. Τα κύτταρα αυτά έχουν μετασχηματιστεί με το SV-40 Large T-αντιγόνο, το οποίο επιτρέπει την αντιγραφή των πλασμιδίων που φέρουν SV-40 με αποτέλεσμα να ενισχύονται τα πλασμίδια και να επιμηκύνεται ο χρόνος έκφρασης του επιθυμητού γονιδίου. Θεωρούνται ιδανικά για πειράματα συνδιαμόλυνσης (Εικόνα 2.5).



Εικόνα 2.5: Τα 293T είναι ανθρώπινη κυτταρική σειρά εμβρυϊκού νεφρού και τα HT1080 είναι ανθρώπινη κυτταρική σειρά ινοσαρκώματος.

Επιπρόσθετα, τα κύτταρα HT1080 είναι μία ανθρώπινη κυτταρική σειρά ινοσαρκώματος, η οποία διαθέτει ενεργό το ογκογονίδιο N-Ras. Οι δύο αυτές κυτταρικές σειρές καλλιεργούνται σε DMEM που περιείχε 10% FBS και 1% αντιβιοτικό πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 υπό άσηπτες συνθήκες (Εικόνα 2.5).

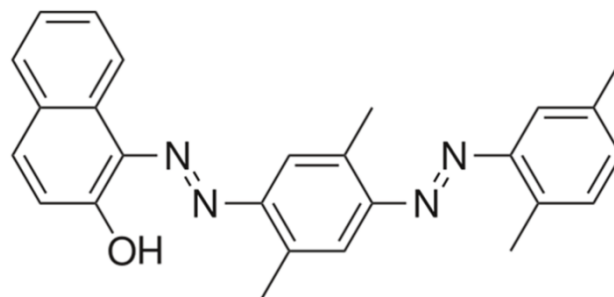
2.2 Τεχνικές διαφοροποίησης των AF-MSCs

2.2.1 Διαφοροποίηση των AF-MSCs προς λιποκύτταρα

Τα SS-AF-MSCs που μετάχθηκαν με τον ανάλογο κάθε φορά λεντιϊό τέθηκαν σε καλλιέργεια σε πιάτο καλλιέργειας 12 βοθρίων καλύπτοντας το 80% της επιφάνειας του βοθρίου. Η διαφοροποίησή τους προς λιποκύτταρα πραγματοποιήθηκε σε κατάλληλο μέσο που περιείχε 40% DMEM και 50% Ham F12 (Gibco-BRL) εμπλουτισμένο με 10% ορό (rabbit serum) (Sigma-Aldrich Ltd.), 10^{-7} μ M δεξαμεθαζόνη (Sigma-Aldrich Ltd.) και 0.5 μ g/ml ινσουλίνη (Sigma-Aldrich Ltd.) [102, 103, 117]. Το καλλιεργητικό μέσο αυτό ανανεώνονταν δύο φορές την εβδομάδα. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 21 ημέρες όπου και επιτυγχάνεται η πλήρης διαφοροποίησή τους προς λιποκύτταρα.

2.2.1.1 Χρώση Oil Red O

Η αξιολόγηση των διαφοροποιημένων κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της χρωστικής Oil Red O (Sigma-Aldrich Ltd.), η οποία απορροφήθηκε από τα σταγονίδια λιπιδίων που σχηματίστηκαν στα λιποκύτταρα (Εικόνα 2.6).



Oil Red O

Εικόνα 2.6: Η απεικόνιση της χημικής δομής του Oil Red O αντιδραστηρίου, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη χρώση των λιποσταγονιδίων.

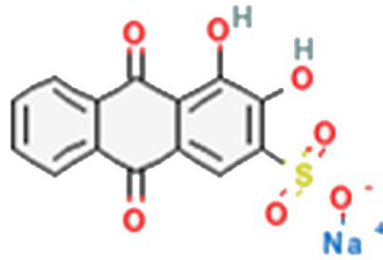
Κατά αυτή τη διαδικασία τα διαφοροποιημένα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε 1ml/βοθρίο διαλύματος 10% φορμαλίνη (Sigma-Aldrich Ltd.) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε πλύσιμο με dH₂O και έπειτα προστέθηκε 1ml/βοθρίο 100% ισοπροπανόλη (Appllichem) για 10 λεπτά. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επώαση με 1ml/βοθρίο Oil Red O σε 60% διάλυμα ισοπροπανόλης για 10 λεπτά. Ακολούθησαν τρία πλυσίματα με dH₂O για την απομάκρυνση του αντιδραστηρίου που δεν είχε προσδεθεί, καθώς και στέγνωμα του πιάτου καλλιέργειας. Η παρατήρηση των βαμμένων λιποσωμάτων πραγματοποιήθηκε σε φωτονικό μικροσκόπιο. Για την ποσοτικοποίηση της χρώσης προστέθηκε 1ml/βοθρίο 100% ισοπροπανόλης επωάζοντας για 10 λεπτά. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 500nm και υπολογίστηκε το ποσοστό της οπτικής πυκνότητας από τον παρακάτω τύπο: $[(OD_{dayx} - OD_{day0}) / (OD_{day0} \times 100)]$. Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα, με τουλάχιστον δύο επαναλήψεις το καθένα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος \pm SEM από κάθε πείραμα.

2.2.2 Διαφοροποίηση των AF-MSCs προς οστεοκύτταρα

Τα SS-AF-MSCs που έχουν μεταχθεί με τον ανάλογο κάθε φορά λεντιϊό καλλιεργήθηκαν για 21 ημέρες σε πιάτο καλλιέργειας 12 βοθρίων σε 80% πληρότητα με κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο DMEM, εμπλουτισμένο με 10% FBS, 10 mM β-γλυκεροφωσφορικό οξύ (Sigma-Aldrich Ltd.), 10^{-8} M δεξαμεθαζόνη και 50 μM ασκορβικό οξύ (Sigma-Aldrich Ltd.) [102, 103, 117]. Το καλλιεργητικό μέσο αυτό ανανεωνόταν δύο φορές την εβδομάδα

2.2.2.1 Χρώση Alizarin Red S

Η αξιολόγηση της διαφοροποίησης των κυττάρων προς οστεοβλάστες πραγματοποιήθηκε με τη χρήση χρωστικής Alizarin S Red (Sigma-Aldrich Ltd.), η οποία απορροφήθηκε από το ασβέστιο που σχηματίστηκε στα οστεοκύτταρα (Εικόνα 2.7).



Alizarin S Red

Εικόνα 2.7: Η απεικόνιση της χημικής δομής του Alizarin S Red αντιδραστηρίου, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη χρώση των εναποθέσεων ασβεστίου.

Κατά αυτή τη διαδικασία τα διαφοροποιημένα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε 1ml/βοθρίο 95% παγωμένης αιθανόλης (Sigma-Aldrich Ltd.) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε πλύσιμο με dH₂O και έπειτα προστέθηκε 1ml/βοθρίο διαλύματος Alizarin S Red χρωστικής με pH 4.1-4.3 για 30 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησαν τρία πλυσίματα με dH₂O για την απομάκρυνση του αντιδραστηρίου που δεν είχε προσδεθεί, καθώς και στέγνωμα του πιάτου καλλιέργειας. Η παρατήρηση της εναπόθεσης ασβεστίου στα οστεοκύτταρα πραγματοποιήθηκε σε φωτονικό μικροσκόπιο. Για την ποσοτικοποίηση της χρώσης προστέθηκε 1ml/βοθρίο 10% χλωριούχου κετυλπυριδίνιου (Sigma-Aldrich Ltd.) για 10 λεπτά. Τέλος, πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 570 nm και υπολογίστηκε το ποσοστό της οπτικής πυκνότητας από τον παρακάτω τύπο: $[(OD_{day21}-OD_{day0})/OD_{day0} \times 100]$. Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα, με τουλάχιστον δύο επαναλήψεις το καθένα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος \pm SEM από κάθε πείραμα.

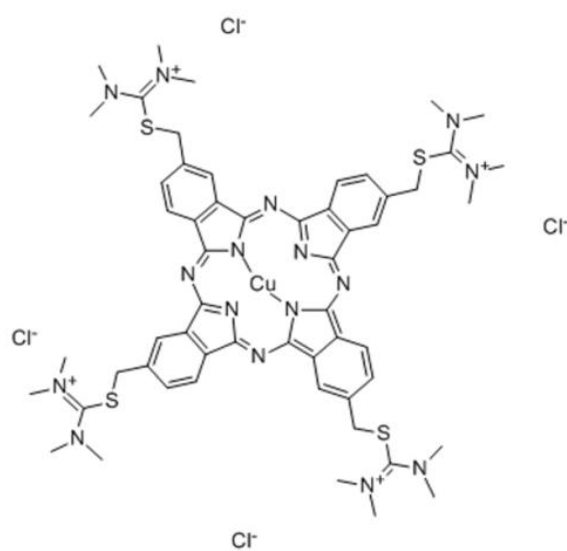
2.2.3 Διαφοροποίηση των AF-MSCs προς χονδροκύτταρα

Για τη διαφοροποίηση των SS-AF-MSCs προς χονδροκύτταρα, 2.5×10^5 κύτταρα μεταφέρθηκαν σε σωλήνες πολυπροπυλενίου των 15 ml, στους οποίους προστέθηκε 0.5 ml κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 5.33 g/ml λινολεϊκό οξύ (Sigma-Aldrich Ltd.), 6.25 µg/ml μίγμα ινσουλίνης-τρανφερίνης-

σελήνιου (ITS+) (Sigma-Aldrich Ltd.), 1.25 mg/ml FBS, 10 ng/ml transforming growth factor β 3 (TGF- β 3) (Peprotech), 10^{-7} M δεξαμεθαζόνη, 0.17 mM ασκορβικό οξύ και 0.35 mM L-προλίνη (Sigma-Aldrich Ltd.) [102]. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 2000 στροφές για 5 λεπτά και διατηρήθηκαν στον επωαστήρα στους 37°C ως πυκνά κυτταρικά ιζήματα. Το καλλιεργητικό μέσο ανανεωνόταν δύο φορές την εβδομάδα για 21 ημέρες.

2.2.3.1 Χρώση Alcian Blue

Η αξιολόγηση της διαφοροποίησης των κυττάρων προς χονδροκύτταρα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση χρωστικής Alcian blue 8G (Sigma-Aldrich Ltd.) (Εικόνα 2.8). Συγκεκριμένα, τα ιζήματα των διαφοροποιημένων SS-AF-MSCs εμβαπτίστηκαν σε 10% φορμαλίνη (Sigma-Aldrich Ltd.) και μονιμοποιήθηκαν. Έπειτα, παραφινολοιήθηκαν και ελήφθησαν τομές πάχους 5 μm , στις οποίες πραγματοποιήθηκε χρώση Alcian blue 8G, η οποία πιστοποιεί τη σύνθεση πρωτεογλυκανών από τα χονδροκύτταρα.



Alcian Blue

Εικόνα 2.8: Η απεικόνιση της χημικής δομής του Alcian Blue αντιδραστηρίου, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη χρώση των πρωτεογλυκανών.

2.2.3.2 Ανοσοφθορισμός χονδροκυττάρων για την έκφραση του κολλαγόνο IV

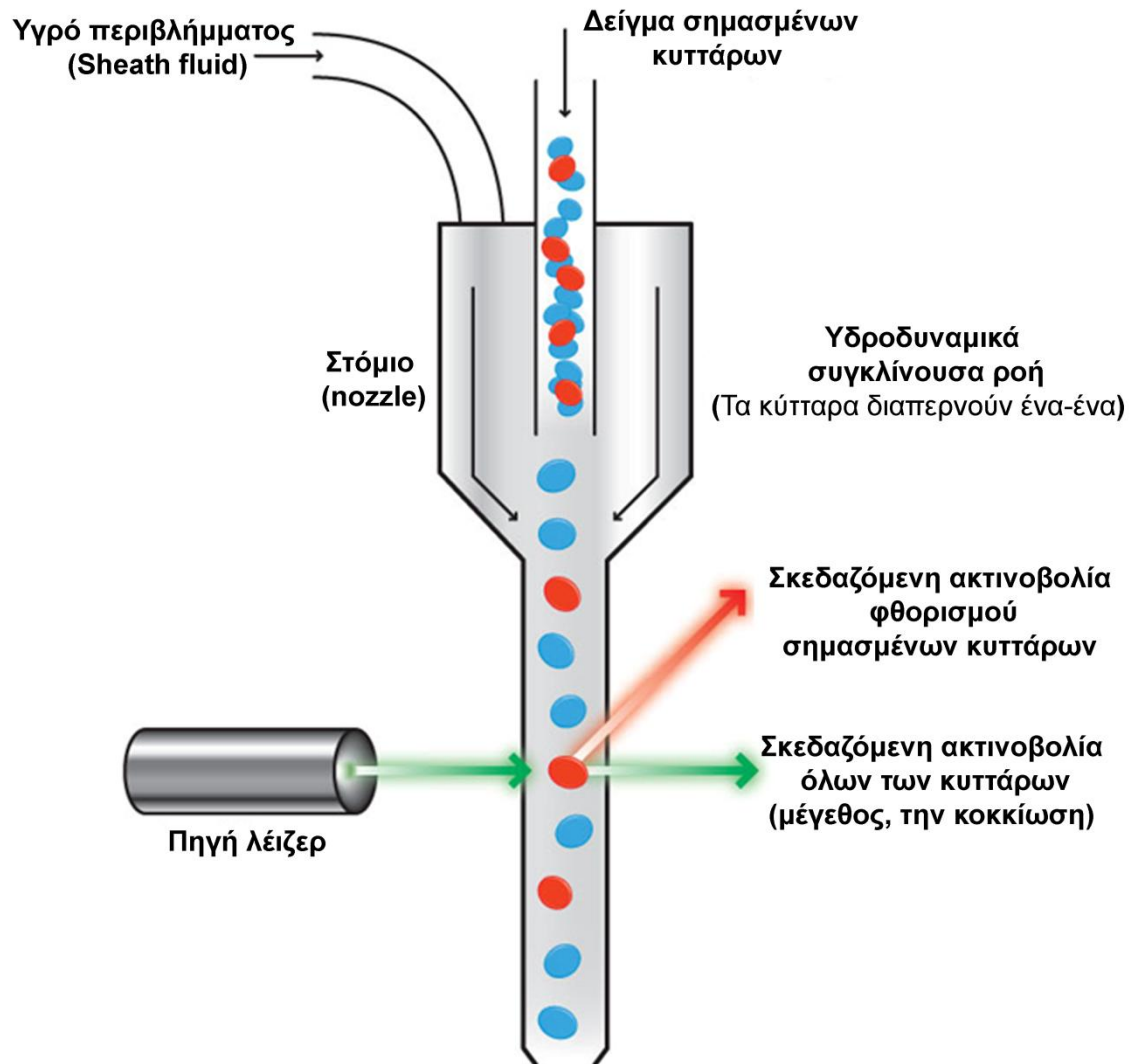
Η αξιολόγηση της διαφοροποίησης των SS-AF-MSCs προς χονδροκύτταρα πραγματοποιήθηκε με χρώση ανοσοφθορισμού για την πρωτεΐνη κολλαγόνου τύπου IV. Η παρουσία κολλαγόνου τύπου IV σχετίζεται με τον σχηματισμό των συμπαγών μαζών κατά τη διαφοροποίηση των SS-AF-MSCs σε χονδροκύτταρα. Συγκεκριμένα, τομές από τα σχηματιζόμενα ιζήματα επώαστηκαν σε διάλυμα 4% παραφορμαδεύδης (Applichem) για 15 λεπτά και στη συνέχεια ακολούθησε επώαση τους σε φωσφορικό ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα (DPBS) (Gibco-BRL) που περιέχει 5% όρο (donkey serum) (Sigma-Aldrich Ltd.) και 0.2% Triton-X (Sigma-Aldrich Ltd.) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε επώαση για 16 ώρες στους 4°C με αντίσωμα έναντι του ανθρώπινου κολλαγόνο τύπου IV (Sigma-Aldrich Ltd.). Ως δευτερογενές αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε το goat anti-mouse IgG προσδεδεμένο με το Alexa-488 φθοριόχρωμα (Invitrogen Ltd., Paisley, Scotland). Τέλος, τα κύτταρα επώαστηκαν με την πυρηνική χρωστική DAPI (Invitrogen Ltd.) για 10 λεπτά. Για την παρατήρηση της χρώσης των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο φθορισμού τύπου Leica CTR-MIC.

2.3 Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων κυττάρων, καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει ακτίνα laser (Εικόνα 2.9). Τα πλεονεκτήματα της κυτταρομετρίας ροής στηρίζονται κυρίως στη δυνατότητα να αναλύει με μεγάλη ταχύτητα, ακόμη και σε μικρά δείγματα, ταυτόχρονα πολλαπλά φυσικά ή/ και χημικά χαρακτηριστικά του κυττάρου.

Οι κυτταρομετρητές ροής λειτουργούν με ακτίνα φωτός από πηγές laser, η οποία προσπίπτει στην επιφάνεια των κυττάρων, καθώς ρέουν υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο (Εικόνα 2.9). Η σκεδαζόμενη από κάθε κύτταρο ακτινοβολία συλλέγεται από κατάλληλους ανιχνευτές και αξιολογείται μέσω ειδικού λογισμικού, προσφέροντας πληροφορίες για το σχετικό μέγεθος, την κοκκίωση, την πολυπλοκότητα δομής, την παρουσία επιφανειακών ή ενδοκυττάρων αντιγόνων, το

περιεχόμενο DNA και την ένταση φθορισμού ταυτοχρόνως. Για τα πειράματα της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκε ο κυτταρομετρητής Beckman Coulter Cytomics FC 500 (Beckman Coulter Ltd, Palo Alto, CA, USA).



Εικόνα 2.9: Οι κυτταρομετρητές ροής λειτουργούν με ακτίνα φωτός από πηγές laser, η οποία προσπίπτει επάνω στα κύτταρα, καθώς ρέουν υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο.

2.4 Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση του RNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Trizol (Invitrogen Ltd.), το οποίο αποτελεί ένα μίγμα φαινόλης και θειοκυανίου γουανιδίνης σε μονοφασικό διάλυμα. Πιο συγκεκριμένα, το ίζημα των κυττάρων ομογενοποιήθηκε σε 0.5ml Trizol και προστέθηκε 0.1ml χλωροφορμίου (Applichem). Στη συνέχεια το μίγμα ανακινήθηκε και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 12000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C. Μετά την φυγοκέντρηση το μίγμα χωρίστηκε σε τρεις φάσεις: την κόκκινη οργανική φάση που περιέχει τις πρωτεΐνες, την ενδιάμεση φάση που περιείχε το DNA και τη διαφανή υδάτινη άνω φάση που περιείχε το RNA. Η άνω υδάτινη φάση μεταφέρθηκε σε καθαρό σωλήνα erpendorf και ακολούθησε κατακρήμνιση του RNA με την προσθήκη 0.25ml ισοπροπυλικής αλκοόλης (Applichem). Το δείγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και κατόπιν φυγοκεντρήθηκε στις 12000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και στο ίζημα προστέθηκε 0.5ml 75% αιθανόλη και φυγοκεντρήθηκε στα 12000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα του RNA αφέθηκε να στεγνώσει για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το RNA επαναδιαλύθηκε σε 30μl dH₂O και επώαστηκε στους 55-60 °C για 10 λεπτά.

2.5 Μικροσυστοιχίες miRNAs

Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών μας επιτρέπει να παίρνουμε ποσοτικές και ποιοτικές πληροφορίες για χιλιάδες γονίδια ταυτόχρονα. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην αρχή της συμπληρωματικότητας μεταξύ νουκλεϊκών οξέων DNA-DNA ή DNA-RNA ή πρόσφατα και μεταξύ αμινοξέων-πρωτεϊνών υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και τη χρήση φθορίζουσων ουσιών. Οι μικροσυστοιχίες γονιδίων ουσιαστικά είναι μια διάταξη χιλιάδων μικροσκοπικών σημείων που αντιπροσωπεύουν μοναδικά γονίδια με τη μορφή ολιγονουκλεοτιδίων που ονομάζονται ανιχνευτές και ακινητοποιούνται με ομοιοπολικούς δεσμούς σε μία στερεή επιφάνεια και μπορούν να υβριδοποιηθούν με cDNA ή RNA δείγματα. Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση του υβριδισμού πραγματοποιείται με τη χρήση

φοριζουσών ουσιών και ειδικά σχεδιασμένων βιοπληροφορικών αλγορίθμων. Κατά την ίδια αρχή έχουν σχεδιαστεί και οι miRNA μικροσυστοιχίες.

Τα πειράματα μικροσυστοιχιών miRNAs πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με την εταιρία Exiqon (Exiqon A/S, Vedbaek Denmark) και συγκεκριμένα με τη χρήση του miRCURY™ LNA Array v.8.1. Ολικό RNA, κατόπιν της απομόνωσης από AF-MSCs (SS and RS), BM-MSCs, UCB-MSCs και λιποκυττάρων (AL cells) προερχόμενα από διαφοροποιημένα SS-AF-MSCs, χρησιμοποιήθηκε για υβριδοποίηση με τη συγκεκριμένη τεχνολογία μικροσυστοιχιών.

Συγκεκριμένα, απομονώθηκε ολικό RNA από περίπου 10^6 MSCs από AF, BM και UCB με τη χρήση του TRizol για τη σύγκριση του προτύπου έκφρασης των miRNAs μεταξύ τους. Απομονώθηκε RNA από τρία διαφορετικά δείγματα AF-MSCs, το AF7 p12, το AF3 p13 και το AF1 p5. Τα δύο πρώτα δείγματα είναι SS-AF-MSCs και το τρίτο αντίστοιχα είναι RS-AF-MSCs. Απομονώθηκε RNA από UCB-MSCs p1 και p0 και από BM-MSCs p2 και p3. Τα δείγματα RNA φωτομετρήθηκαν με τη χρήση του φωτόμετρου BioPhotometer (Eppendorf) στα 260 nm και υπολογίστηκε η συγκέντρωσή τους όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.1. Επιπρόσθετα, μετρήθηκε ο λόγος της απορρόφησης 260 nm / 280 nm, ο οποίος αποτελεί δείκτη καθαρότητας του RNA από πρωτεΐνες, αφού αυτές απορροφούν στα 280 nm, αλλά και ο λόγος 260 nm /230 nm που και αυτός είναι δείκτης καθαρότητας του RNA από οργανικά συστατικά. Οι δείκτες καθαρότητας πρέπει έχουν περίπου την τιμή 2.

Δείγμα	Ποσότητα RNA	260/280	260/230
AF7, p12	6.9 µg	1.72	1.71
AF3, p13	10.2 µg	1.89	2.14
AF1, p5	32.8 µg	1.74	1.72
UCB, p1	3.61 µg	1.80	1.78
UCB, p0	19 µg	1.78	2.0
BM, p2	15 µg	1.91	2.18
BM,p2	9.8 µg	2.57	5.49
BM, p3	10.6 µg	1.74	2.34

Πίνακας 2.1: Ποσότητες RNA και τιμές καθαρότητας των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τις miRNA μικροσυστοιχίες για τη σύγκριση του προτύπου έκφρασης των AF-, BM- και UCB-MSCs.

Παρομοίως, απομονώθηκε ολικό RNA από περίπου 10^6 MSCs από AF-MSCs και λιποκυττάρων (AL cells) προερχόμενα από διαφοροποιημένα SS-AF-MSCs με τη χρήση του TRizol για τη σύγκριση του προτύπου έκφρασης των miRNAs μεταξύ τους. Απομονώθηκε RNA από δύο διαφορετικά δείγματα SS-AF-MSCs, το AF3 p14 και το AF9 p7 και από δύο διαφορετικά δείγματα λιποκυττάρων προερχόμενα από διαφοροποιημένα SS-AF-MSCs. Ο λόγος 260 nm / 230 nm είχε περίπου την τιμή 2 και στα τέσσερα δείγματα.

Αναλυτικότερα, το miRCURY™ LNA Array αποτελείται από ειδικές πλάκες στις οποίες έχουν μονιμοποιηθεί ανιχνευτές συμπληρωματικοί με την αλληλουχία όλων των ώριμων miRNAs ανθρώπου, ποντικού και αρουραίου, με βάση τα δεδομένα της miRBase Release 14.0 (Εικόνα 2.10).



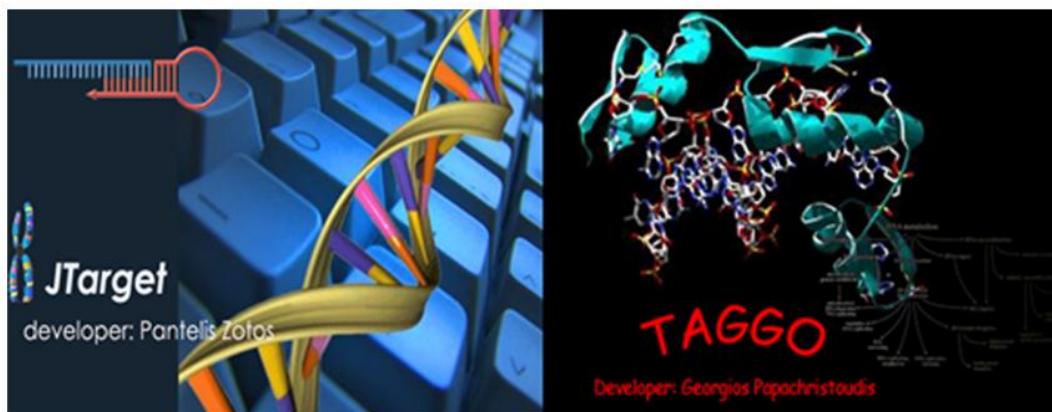
Εικόνα 2.10: Η διάταξη της πλάκας υβριδισμού του miRCURY™ LNA Array της εταιρίας Exiqon.

Οι ανιχνευτές είναι ενισχυμένα Locked Nuclei Acid (LNA™) ολιγονουκλεοτίδια που περιέχουν 2'-O-4' γέφυρες μεθυλενίου με αποτέλεσμα να προσφέρουν μεγαλύτερη θερμική σταθερότητα και να αυξάνουν την ευαισθησία του υβριδισμού. Αρχικά, τα RNA δείγματα σημάνθηκαν με φθορίζουσες χρωστικές, τις Hy3™ και Hy5™ με τη χρήση του miRCURY™ LNA Array labeling σύστημα αντιδραστηρίων (kit) της ίδιας εταιρίας. Συγκεκριμένα, σημάνθηκαν όλα τα δείγματα RNA με την χρωστική Hy3™ και στη συνέχεια κάθε ένα ξεχωριστά με την χρωστική Hy5™. Οπότε πραγματοποιήθηκαν υβριδισμοί δύο χρωμάτων, όπου κάθε δείγμα συγκρίθηκε ως προς το σύνολο όλων των δειγμάτων μαζί.

Οι ειδικές πλάκες πάνω στις οποίες πραγματοποιήθηκε ο υβριδισμός στη συνέχεια σαρώθηκαν. Έπειτα, τα σήματα ποσοτικοποιήθηκαν με τον αλγόριθμο global Lowess (Locally WEighted Scatterplot Smoothing), ιδανικό για υβριδισμό δύο χρωμάτων. Τα αποτελέσματα οπτικοποιήθηκαν σε Heat map γράφημα όπου φαίνεται η ομαδοποίηση των δειγμάτων και των miRNAs που εντοπίστηκαν. Η χρωματική κλίμακα, επιπλέον, απεικονίζει τα επίπεδα έκφρασης του κάθε miRNA σε καθένα από τα δείγματα. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα συνοδεύθηκαν και από ένα γράφημα ανάλυσης των κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis - PCA) όπου παρουσιάζεται ο βαθμός διαφορετικότητας των βιολογικών δειγμάτων.

2.6 Αναζήτηση in silico γονιδίων-στόχων

Για την αναζήτηση πιθανών γονιδίων-στόχων συγκεκριμένων miRNAs σε διάφορους οργανισμούς, υπάρχουν βάσεις δεδομένων που στηρίζονται στη χρήση ειδικών αλγορίθμων. Στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή για την αναζήτηση των γονιδίων-στόχων των miRNAs που αναγνωρίστηκαν από τις μικροσυστοιχίες miRNAs χρησιμοποιήθηκε το βιοπληροφορικό εργαλείο Gomir (<http://www.bioacademy.gr/bioinformatics/TAGGO/>) (Εικόνα 2.11) [204, 205].



Εικόνα 2.11: Το βιοπληροφορικό πρόγραμμα Gomir διαθέτει δυο βασικά εργαλεία το JTarget και το TAGGO.

Το GomiR διαθέτει την Jtarget υπομονάδα που δίνει αποτελέσματα για την εύρεση miRNAs ή γονιδίων-στόχων μετά από ταυτόχρονη σύγκριση τεσσάρων βάσεων δεδομένων: TargetScan, MiRanda, RNAhybrid και PicTar. Παράλληλα, μπορεί να πραγματοποιηθεί και η αντίστροφη αναζήτηση όπου για ένα συγκεκριμένο γονίδιο μπορούμε να αναζητήσουμε τα πιθανά miRNAs που μπορούν να το στοχεύσουν. Επιπρόσθετα, το GomiR, έχει τη δυνατότητα να δίνει πληροφορίες για τον λειτουργικό ρόλο των γονιδίων-στόχων και με το εργαλείο TAGGO ομαδοποιεί πληροφορίες οντογένεσης των γονιδίων-στόχων.

2.7 Παραγωγή cDNA

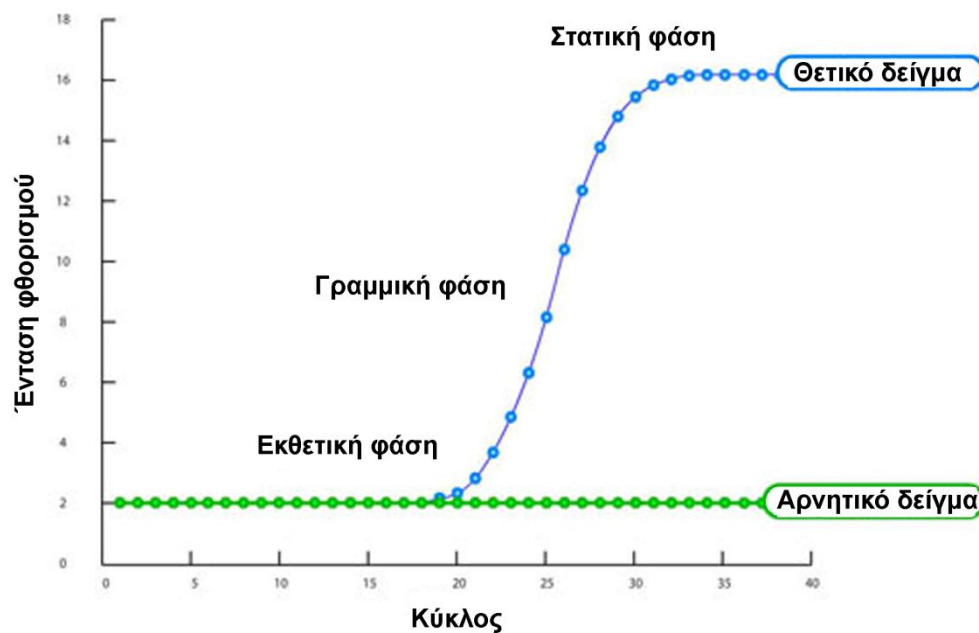
Σε 1μg RNA προστέθηκαν 1μg από τον εκκινητή (oligo-dT) και dH₂O σε τελικό όγκο 14μl. Ακολούθησε επώαση στους 70°C για 5 λεπτά, ώστε να αναδιαταχτεί η δευτεροταγής δομή του RNA. Στη συνέχεια το μίγμα τοποθετήθηκε σε πάγο ώστε να αποφευχθεί η επαναδιάταξη της δευτεροταγούς δομής και προστέθηκε το μίγμα αντίδρασης που περιείχε M-MLV Buffer 5X, dNTPs 10mM (Promega Ltd., Madison, WI, USA), το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV RT (H-) (Promega Ltd.) σε τελικό όγκο 25 μl σε dH₂O. Με την προσθήκη των oligo-dT εκκινητών επιτρέπεται η υβριδοποίηση με τις πολύ-A ουρές των mRNA μορίων, δημιουργώντας κατά αυτό τον τρόπο το πρωταρχικό τμήμα για να δράσει το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση, που χρησιμοποιώντας το RNA ως μήτρα μπορεί να συνθέσει μια αλυσίδα DNA. Το τελικό μίγμα επώαστηκε στους 42°C για 60 λεπτά.

2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

Η μέθοδος αυτή αποτελεί μια τροποποιημένη μορφή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR στην οποία χρησιμοποιείται ένας φθορίζων ανιχνευτής που επιτρέπει την καταγραφή των παραγόμενων μορίων DNA από ειδική κάμερα μέσω της συνεχούς καταγραφής της έντασης του φθορισμού σε πραγματικό χρόνο.

Σε κάθε αντίδραση για ένα συγκεκριμένο δείγμα DNA υπάρχει ένα συγκεκριμένο σημείο στην ένταση του φθορισμού που σηματοδοτεί την είσοδο της καμπύλης πολυμερισμού του παραγόμενου DNA στην εκθετική φάση της αντίδρασης.

Το σημείο αυτό ορίζεται ως το "κατώφλι" της μεταβολής του ρυθμού αύξησης της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος και αποτελεί την τιμή Ct (cycle threshold) (Εικόνα 2.12). Έτσι, για κάθε αντίδραση χρειάζεται ένας αριθμός κύκλων προκειμένου το σήμα φθορισμού να υπερβεί το κατώφλι αυτό. Τα επίπεδα της τιμής Ct είναι αντιστρόφως ανάλογα με την ποσότητα του παραγόμενου DNA στο συγκεκριμένο δείγμα.

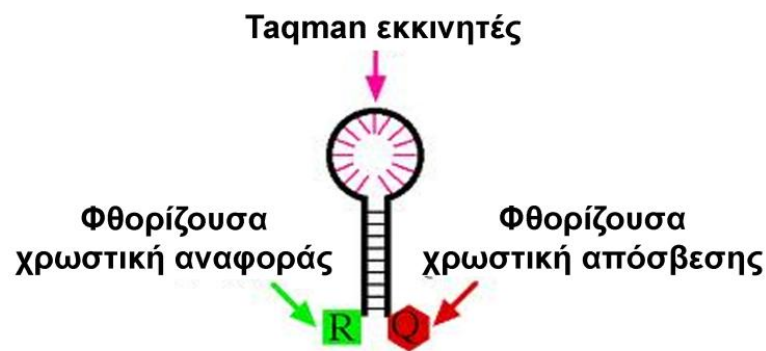


Εικόνα 2.12: Τα επίπεδα της τιμής Ct (Κύκλος) είναι αντιστρόφως ανάλογα με την ποσότητα του παραγόμενου DNA.

Επιπλέον η μεταβολή της συγκέντρωσης σε συγκεκριμένο κύκλο εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση του προϊόντος. Για το λόγο αυτό πραγματοποιείται αρχικά κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας ως γονίδια μάρτυρες κάποια

γονίδια που παρουσιάζουν σταθερή και αυξημένη έκφραση σε όλους τους ιστούς (house-keeping genes).

Στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν Taqman ανιχνευτές, οι οποίοι περιέχουν μία φθορίζουσα χρωστική αναφοράς (reporter dye) ομοιοπολικά συνδεδεμένη στο 5' άκρο του και μία χρωστική απόσβεσης (quencher dye) στο 3' άκρο (Εικόνα 2.13). Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού καθώς η Taq πολυμεράση ενσωματώνει τον υβριδοποιημένο ανιχνευτή στην νέα αλυσίδα DNA διαχωρίζεται η χρωστική αναφοράς από τη χρωστική απόσβεσης, γεγονός που καταλήγει στην αύξηση φθορισμού. Ο φθορισμός αυξάνει σε κάθε κύκλο και είναι ανάλογος του αριθμού των διασπώμενων φθορίζοντων ανιχνευτών.



Εικόνα 2.13: Οι Taqman ανιχνευτές περιέχουν μία φθορίζουσα χρωστική αναφοράς (reporter dye) ομοιοπολικά συνδεδεμένη στο 5' άκρο του και μία χρωστική απόσβεσης (quencher dye) στο 3' άκρο.

Για τις αντιδράσεις πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για τα ώριμα miR-21, miR-221, miR-222, miR-572, miR-210, miR-26a, miR-34a και let-7d και τον RNA μάρτυρα RNU44 χρησιμοποιήθηκε το ειδικό TaqMan MicroRNA Reverse Transcription σύστημα αντιδραστηρίων (kit) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) για την παραγωγή του cDNA με ειδικά σχεδιασμένο RT εκκινήτη που αυξάνει την ειδικότητα και την ευαισθησία. Έπειτα, για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκε το 1:4 από το παραγόμενο cDNA, 1μl από τον ειδικό ανιχνευτή και 10μl μίγματος αντίδρασης Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) με τελικό όγκο αντίδρασης 20μl. Η ενίσχυση έγινε σύμφωνα με τις συνθήκες που προτείνονται από τον κατασκευαστή.

Για τις αντιδράσεις πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για τα γονίδια Sox2, Oct4, Nanog και GAPDH χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι ανιχνευτές από την εταιρία Applied Biosystems. Κάθε δείγμα cDNA (160ng) αναμίχθηκε με 1μl από τον ειδικό ανιχνευτή και 10μl μίγματος αντίδρασης Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) με τελικό όγκο αντίδρασης 20μl. Η ενίσχυση έγινε σύμφωνα με τις συνθήκες που προτείνονται από τον κατασκευαστή.

Επιπρόσθετα χρησιμοποιήθηκαν SYBR Green φθορίζοντες ανιχνευτές, όπου η φθορίζουσα χρωστική SYBR Green είναι μια ασύμμετρη χρωστική κυανίνης η οποία προσδένεται στα δίκλιωνα μόρια DNA που παράγονται κατά την αντίδραση. Το σύμπλοκο DNA-SYBR Green μετά τη διέγερση εκπέμπει φθορισμό στα 530nm. Ειδικοί εκκινητές για τα γονίδια κυκλίνη D1, κυκλίνη E1, κυκλίνη A2, κυκλίνη B2, CDKN1B, CDKN2C, Cdc25A, SOX9, AggreCAN, PPAR γ , FABP4, Osteocalcin, Runx2 και β -ακτίνη (Invitrogen Ltd.) χρησιμοποιήθηκαν μαζί με SYBR Green PCR master mix σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας Applied Biosystems. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.

Primers	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
PPARγ	ACCAAAGTGCAATCAAAGTGGA	ATGAGGGAGTTGGAAGGCTCT
Osteocalcin	GGCGCTACCTGTATCAATGG	GTGGTCAGCCAACTCGTCA
RUNX2	TGGTTACTGTCATGGCGGGTA	TCTCAGATCGTTGAACCTTGCTA
SOX9	AGCGAACGCACATCAAGAC	CTGTAGGCGATCTGTTGGGG
AggreCAN	CCCCTGCTATTTTCATCGACCC	GACACACGGCTCCACTTGAT
Cyclin D1	CCAGAGGCGGAGGAGAAC	CGTGTGAGGCGGTAGTAGG
Cyclin E1	ATCAGCACTTTCTTGAGCAACA	TTGTGCCAAGTAAAAGGTCTCC
Cyclin A2	CGCTGGCGGTACTGAAGTC	AAGGAGGAACGGTGACATGC
Cyclin B2	TGCTCTGCAAAAATCGAGGACA	GCCAATCCACTAGGATGGCA
p27 (CDKN1B)	TAATTGGGGCTCCGGCTAACT	TGCAGGTCGCTTCCTTATTCC
p18 (CDKN2C)	GGGGACCTAGAGCAACTTACT	CAGCGCAGTCCTTCCAAAT
Cdc25A	CTCCTCCGAGTCAACAGATTCA	CAACAGCTTCTGAGGTAGGGA

Πίνακας 2.2: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.

Οι αντιδράσεις πολυμεράσης πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκαν στη συσκευή ABI Prism 7700 apparatus (Applied Biosystems) και η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό ABI Prism 7700 SDS software (Applied Biosystems). Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων και η ποσοτικοποίηση ή ο προσδιορισμός της διαφοράς βαθμού έκφρασης έγινε με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.9 Τεχνικές μοριακής κλωνοποίησης

2.9.1 Απομόνωση γενωμικού DNA

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν στις 1200 στροφές για 10 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Στη συνέχεια επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα 1x φωσφορικό ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα (PBS: 0.24g KH_2PO_4 , 8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na_2HPO_4 , dH_2O ώστε ο τελικός όγκος 1000ml) και φυγοκεντρήθηκαν ξανά. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 400 μ l διαλύματος κυτταρικής λύσης (0.2M NaCl, 0.1M EDTA, 0.05M Tris-Cl, 0,5% v/v SDS) με 20 μ l πρωτεΐνάσης K (20mg/ml) (Sigma-Aldrich Ltd.) και το μίγμα επώαστηκε για 12-16 ώρες στους 55°C. Ακολούθησε καθαρισμός του DNA με το πρωτόκολλο φαινόλης-χλωροφόρμιου και κατακρήμνιση με αιθανόλη.

Στο διάλυμα του DNA προστέθηκαν αρχικά 15 μ l RNAάσης (20mg/ml) και ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37°C. Στη συνέχεια προστέθηκε ίσου όγκου μίγματος φαινόλης-χλωροφορμίου (1:1) και αναμίχθηκαν οι δύο φάσεις πολύ καλά. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 2 λεπτά στις 2000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου και η άνω φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα erpendorf. Ακολούθησε ανάμιξη της άνω φάσης με ίσο όγκο χλωροφορμίου και φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στις 2000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου. Η υδατική (άνω) φάση μεταφέρθηκε για δεύτερη φορά σε νέο σωλήνα erpendorf, αναμίχθηκε με ίσο όγκο χλωροφορμίου και φυγοκεντρήθηκε για 2 λεπτά στις 2000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου. Η άνω φάση μεταφέρθηκε εκ νέου σε σωλήνα erpendorf και ακολούθησε κατακρήμνιση του DNA με ισοπροπανόλη (0.7 όγκοι). Μετά από καλή ανάδευση ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 13000 στροφές για 10 λεπτά. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 200 μ l παγωμένης αιθανόλης 70% v/v. Στη συνέχεια,

απορρίφθηκε το υπερκείμενο και τα υπολείμματα της αιθανόλης αφέθηκαν να εξατμισθούν στον απαγωγό. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε συνολικό όγκο 50μl dH₂O.

2.9.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR) ανακαλύφθηκε το 1983 από τον Kary Mullis, ο οποίος βραβεύτηκε με Nobel για την τεχνική αυτή το 1993. Για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε η θερμοσταθερή Pfx Platinum DNA πολυμεράση (Invitrogen Ltd.), η οποία προέρχεται από το *Pfycoccus* sp. Η Pfx Platinum DNA πολυμεράση διαθέτει υψηλή 3' → 5' εξωνουκλεϊκή δράση με αποτέλεσμα να διορθώνει τα λάθη που πιθανώς γίνονται κατά τον πολλαπλασιασμό του DNA, γι' αυτό χρησιμοποιείται ιδιαίτερα για κλωνοποίηση από PCR. Αναλυτικότερα, για μία αντίδραση PCR τελικού όγκου 50μl χρησιμοποιήθηκαν 5μl διάλυμα αντίδρασης της Pfx Platinum DNA πολυμεράση με MgSO₄ (10X), 1μl μίγματος dNTPs (10mM το καθένα), 1μl F εκκινητή (10μM), 1μl R εκκινητή (10μM), δείγμα DNA (50pg-1μg), 0.5μl Pfx Platinum DNA πολυμεράση (2.5U/ μl) και dH₂O. Τα στάδια της PCR περιελάμβαναν ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης για 1-3 λεπτά στους 95°C και στη συνέχεια ένα στάδιο αποδιάταξης των 30 sec στους 95°C, ένα στάδιο υβριδοποίησης των εκκινητών των 30 sec στους 58°C και ένα στάδιο πολυμερισμού των αλυσίδων του ενός λεπτού στους 75°C, τα οποία επαναλήφθηκαν κυκλικά 39 φορές. Τέλος, ακολούθησε ένα τελικό στάδιο πολυμερισμού για 5 λεπτά στους 75°C.

Όσον αφορά τους εκκινητές, η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται από το σημείο τήξης (T_m) του κάθε εκκινητή. Ως T_m ορίζεται η θερμοκρασία εκείνη που το 50% του DNA είναι αποδιαταγμένο και υπολογίζεται από τον εξής τύπο: $4x(G+C)+2x(A+T)$. Αφού υπολογιστεί το T_m του κάθε εκκινητή αφαιρείτε από το καθένα 5 μονάδες και επιλέγεται ως θερμοκρασία υβριδισμού η μικρότερη από αυτές τις δύο. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3.

Primers	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
3'UTR-SOX2	AGA AACTCGAGATGAAAA TCCCATCACCCAC	AGAAGGATCCACAGAGATGGTT CGCCAGT
pre-miR-21	TCGACTCGAGGTTTCGATC TTAACAGG	TCGAACGCGTACCAGACAGAAG GACC
pre-miR-26a	CCTGGCACGCGTGTGATA TCACAAGGTCCCA	TGGACGGCTAGCTTTGCTACATG CAAAGGGC

Πίνακας 2.3: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

2.9.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Για το διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθαρισμό τμημάτων DNA πραγματοποιήθηκαν πειράματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, η οποία διαλύθηκε σε διάλυμα TAE (40mM Tris-Acetate, 1mM EDTA, pH=8.0, 20mM Glacial acetic acid). Το διάλυμα της αγαρόζης περιείχε 10μg βρωμιούχο αιθίδιο ανά ml. Κάθε δείγμα DNA αναμίχθηκε με διάλυμα χρωστικής ουσίας (0.25% v/v κυανού της βρωμοφαινόλης, 0,25% v/v ξυλόλιο (xylene cyanol), 40% w/v σουκρόζη) πριν φορτωθεί στο πήκτωμα. Παράλληλα με τα δείγματα φορτώθηκε και δείγμα DNA μάρτυρας μοριακού βάρους (GeneRuler 1kb DNA Ladder Fermentas), προκειμένου να είναι δυνατός ο προσδιορισμός του μεγέθους του δείγματος DNA. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε τάση 100V και τα δείγματα DNA έγιναν ορατά σε φως υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

2.9.4 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Τα τμήματα DNA που διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μπορούν να ανακτηθούν και να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα κλωνοποίησης με τη χρήση του DNA Gel extraction συστήματος της εταιρίας Qiagen. Το πρωτόκολλο ακολουθήθηκε σύμφωνα με το εγχειρίδιο της εταιρίας.

Πιο συγκεκριμένα, έγινε απομόνωση της ζώνης του DNA από το πήκτωμα με τη βοήθεια καθαρού ξυραφιού. Στη συνέχεια το κομμάτι από το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε ένα σωλήνα erpendorf και προσδιορίστηκε το βάρος του. Έπειτα αναμίχθηκε με το διάλυμα QG (300μl διαλύματος QG ανά 100mg πηκτώματος) και επώαστηκε στους 50°C αναδεύοντάς το σε τακτά χρονικά διαστήματα έως ότου το πήκτωμα να λιώσει εντελώς. Κατόπιν, προστέθηκε 1 όγκος ισοπροπανόλης και ακολούθησε ανάμιξη και μεταφορά του μίγματος σε ειδική κολώνα. Έγινε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 13000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου και προσθήκη 0.5ml διαλύματος QG στην κολώνα. Το βήμα αυτό επαναλήφθηκε δύο φορές. Τέλος στην κολώνα προστέθηκαν 30-50μl διαλύματος EB (10mM Tris-HCl, pH=8.5) και ακολούθησε έκλυση του DNA σε καθαρό σωλήνα erpendorf μετά από φυγοκέντρηση 1 λεπτό στα 13000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου.

2.9.5 Πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ειδικές ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και πέπτουν το DNA με επαναλήψιμο τρόπο. Απομονώνονται από βακτήρια και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι η προστασία του βακτηρίου από ιούς.

Οι πέψεις των δειγμάτων DNA έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας προέλευσης των ενζύμων περιορισμού (Biolabs). Συγκεκριμένα, το κάθε δείγμα DNA αντέδρασε με 1 μονάδα ενζύμου ανά μg DNA παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος και αλβουμίνη βόιου ορού (BSA, Sigma-Aldrich Ltd.), όπου ήταν απαραίτητο. Οι επώσεις έλαβαν χώρα στους 37°C για 2-3 ώρες.

2.9.6 Καθαρισμός DNA

Ο καθαρισμός του DNA πραγματοποιήθηκε για την απομάκρυνση των ρυθμιστικών διαλυμάτων από αντιδράσεις πέψεων ή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα καθαρισμού PCR προϊόντων της Qiagen. Αναλυτικότερα, το διάλυμα του DNA αναμίχθηκε με 5 όγκους διαλύματος PB και το

δείγμα μεταφέρθηκε σε κολώνα που παρέχεται από την εταιρία και φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό στα 13000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 0.75ml διαλύματος PE στη κολώνα και επαναλήφθηκε η ίδια φυγοκέντρωση δύο φορές. Τέλος στην κολώνα προστέθηκαν 30-50μl διαλύματος EB και ακολούθησε έκλυση του DNA σε καθαρό σωλήνα eppendorf μετά από φυγοκέντρωση 1 λεπτό στα 13000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου.

2.9.7 Αντίδραση σύνδεσης τμημάτων DNA

Οι αντιδράσεις σύνδεσης τμημάτων DNA και πλασμιδίων έγιναν με το ένζυμο της T4 λιγάσης (Fermentas) σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας προέλευσης του ενζύμου. Η T₄ λιγάση παράγεται από τον βακτηριοφάγο T₄ και καταλύει τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών. Επειδή κατά την διάρκεια της αντίδρασης τόσο τα εξωγενή τμήματα DNA, όσο και τα πλασμίδια έχουν την τάση να επανακυκλοποιούνται, απαιτείται προσεκτικός προσδιορισμός των συγκεντρώσεων του φορέα και του ενθέματος. Συγκεκριμένα πρέπει να βρίσκονται σε αναλογία 3(ένθεμα):1(φορέας). Σε κάθε αντίδραση η ποσότητα του ενθέματος που προστέθηκε στην αντίδραση καθορίστηκε από την εξής σχέση: Απαιτούμενη ποσότητα ενθέματος (ng)= ποσότητα φορέα (ng) x μέγεθος ενθέματος (Kb)/μέγεθος φορέα (Kb) x 3/1. Για κάθε αντίδραση αναμίχθηκαν 100ng φορέα με την κατάλληλη ποσότητα ενθέματος σε όγκο 15μl, παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος και 3-6 units ενζύμου. Ακολουθεί επώαση του δείγματος στους 4°C για 12-16 ώρες.

2.9.8 Δημιουργία δεκτικών κυττάρων για μετασχηματισμό

Τα βακτήρια του στελέχους E. coli (DH5a, JM109) μεταφέρθηκαν σε 10ml θρεπτικό μέσο LB Broth (10g/L Bacto-tryptone, 5g/L Yeast extract, 10g/L NaCl), χρησιμοποιώντας έναν αποστειρωμένο μικροβιολογικό κρίκο και επώαστηκαν στους 37°C υπό ανάδευση (225 στροφές) για 16 ώρες. Έπειτα, η καλλιέργεια αυτή μεταφέρθηκε σε 200ml LB Broth και επώαστηκε στους 37°C υπό ανάδευση (225 στροφές) έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να κυμανθεί μεταξύ 0.4-0.5,

τιμή που αντιστοιχεί σε 10^8 κύτταρα/ml. Στη συνέχεια η καλλιέργεια χωρίστηκε σε σωλήνες falcon χωρητικότητας 50ml ο καθένας και επώαστηκε στον πάγο για 10 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (4000 στροφές, 15 λεπτά, 4°C) και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Το ίζημα των βακτηρίων επαναδιαλύθηκαν προσεκτικά σε 25ml παγωμένου CaCl_2 0.1M και τα βακτήρια επώαστηκαν στον πάγο για 20 λεπτά. Ακολούθησε δεύτερη φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Το ίζημα των βακτηρίων επαναδιαλύθηκε σε 4.25ml παγωμένου CaCl_2 0.1M και τα βακτήρια επώαστηκαν στον πάγο για 15 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη 1.25ml γλυκερόλης (Applichem). Τα δεκτικά πλέον κύτταρα χωρίστηκαν σε σωληνάκια erpendorf σε κλάσματα των 200μl και αφού παγώθηκαν ακαριαία σε υγρό άζωτο αποθηκεύθηκαν αμέσως στους -80°C .

2.9.9 Μετασηματισμός βακτηρίων

Σε 200μl δεκτικών κυττάρων JM109 (Promega Ltd.) προστίθενται $\frac{1}{2}$ DNA από την αντίδραση σύνδεσης (5% του όγκου των δεκτικών κυττάρων) και το δείγμα επώαστηκε σε πάγο για 30 min, αφού προηγήθηκε ελαφριά ανάδευση για την ανάμιξη των συστατικών του. Ακολούθησε επώαση του δείγματος στους 42°C για 90 δευτερόλεπτα. Το δείγμα μεταφέρθηκε στον πάγο για 2 λεπτά. Στο σημείο αυτό τα πλασμίδια εισήχθησαν στα κύτταρα που έχουν υποστεί θερμικό σοκ (heat shock). Στη συνέχεια το δείγμα προστέθηκε σε 800μl θρεπτικού μέσου LB Broth και επώαστηκε υπό ανάδευση (180 στροφές) στους 37°C για μία ώρα. Τέλος το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 2000 στροφές για 5 λεπτά και τα καθιζάνοντα κύτταρα αναδιαλύθηκαν σε τελικό όγκο 200μl (αφαιρέθηκαν 600μl υπερκείμενου υγρού). Ακολούθησε επίστρωση των κυττάρων στην επιφάνεια τριβλίου που περιείχε LB agar (10g/L Bacto-tryptone, 5g/L Yeast extract, 10g/L NaCl, 15g/L Agar) και αμπικιλίνη (100μg/ml) και επώαση στους 37°C για 12-16 ώρες.

2.9.10 Υγρές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων

Για τη δημιουργία υγρών καλλιεργειών ενοφθαλμίστηκαν αποικίες βακτηριακών κυττάρων σε θρεπτικό μέσο LB Broth που περιείχε το αντιβιοτικό αμπικιλίνης (1 αποικία/3 ml LB Broth). Στη συνέχεια οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε ένα σωλήνα καλλιέργειας υπό ανάδευση (225 στροφές) στους 37°C για 12-16 ώρες. Η καλλιέργεια αυτή μπορεί να αναμειχθεί με διάλυμα γλυκερόλης (40% v/v) και να αποθηκευθεί στους -80°C για μετέπειτα χρήση.

2.8.11 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια επιλέχθηκε η αλκαλική μέθοδος. Μία κορεσμένη βακτηριακή καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε σωλήνα erpendorf (1.5ml), φυγοκεντρήθηκε για 3 λεπτά στις 5000 στροφές και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο ενώ το ίζημα τοποθετήθηκε σε πάγο. Στο βακτηριακό ίζημα προστέθηκαν 100μl παγωμένου διαλύματος GET (50mM γλυκόζη, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0) και ακολούθησε ανάδευση για 1 λεπτό και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200μl αλκαλικού διαλύματος (0.2N NaOH, 1% SDS) και ακολούθησε έντονη ανακίνηση του σωλήνα erpendorf και επώαση στον πάγο για 3-5 λεπτά. Έπειτα προστέθηκαν 300μl παγωμένου διαλύματος οξικού καλίου (pH~4.8) και ακολούθησε ανάδευση και επώαση στον πάγο για 8-10 λεπτά και φυγοκέντρωση για 10 λεπτά σε 13000 στροφές. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο erpendorf και ακολούθησε κατακρήμνιση του DNA σε 1ml αιθανόλης 100%. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 13.000στροφές και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 0.5ml αιθανόλης 70% και φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές. Έπειτα απορρίφθηκε όλο το υπερκείμενο και τα υπολείμματα της αιθανόλης αφέθηκαν να εξατμισθούν στον απαγωγό. Το ίζημα επαναϊωρήθηκε σε συνολικό όγκο 100μl TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0) με την προσθήκη 2μl RNασης 20μg/ml.

2.9.12 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα

Μετασηματισμένα βακτήρια του στελέχους *E. coli* (DH5a, JM109) μεταφέρθηκαν σε 3ml θρεπτικό μέσο LB Broth (10g/L Bacto-tryptone, 5g/L Yeast extract, 10g/L NaCl), χρησιμοποιώντας έναν αποστειρωμένο μικροβιολογικό κρίκο, παρουσία του αντίστοιχου κάθε φορά αντιβιοτικό επιλογής και επώστηκαν στους 37°C υπό ανάδευση (225 στροφές) για περίπου 2.5 ώρες. Η καλλιέργεια αυτή μεταφέρθηκε σε 300ml LB Broth με αμικικιλίνη (100μg/ml) και επώστηκε στους 37°C υπό ανάδευση (225 στροφές) για 16 ώρες. Το πρωτόκολλο και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν περιλαμβάνονται στο HiPure Plasmid Maxiprep σύστημα αντιδραστηρίων της εταιρίας Invitrogen Ltd. Η βακτηριακή καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε για 20 λεπτά, στις 4000g στα ειδικά δοχεία χωρητικότητας 500ml της κεφαλής Sorvall GS3 στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 10ml του διαλύματος R3. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10ml από το διάλυμα L7 και το μίγμα αναδεύτηκε 4-6 φορές και επώστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Προστέθηκαν 10ml από το διάλυμα N3 και το μίγμα αναδεύτηκε 4-6 φορές ακόμα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα ειδικά δοχεία της κεφαλής SS34 στις 16000g για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Σε αυτό το χρονικό διάστημα εξισορροπήθηκε η κολώνα που παρέχεται από την εταιρία με 30ml διάλυμα EQ1, αφήνοντας το διάλυμα να περάσει από την κολώνα με την επίδραση της βαρύτητας. Ακολούθως, το καθαρό υπερκείμενο από τη φυγοκέντρηση αφέθηκε να περάσει από την κολώνα προκειμένου να δεσμευτεί το πλασμιδιακό DNA στην κολώνα. Έπειτα, η κολώνα ξεπλύθηκε δύο φορές με 30ml από το διάλυμα W8 και τέλος πραγματοποιήθηκε έκλυση του πλασμιδιακού DNA από την κολώνα με 15ml από το διάλυμα E4. Ακολούθησε κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA με 10.5ml ισοπροπανόλης (0.7 όγκοι) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 15000g για 30 λεπτά στους 4°C σε ειδικά δοχεία με κωνικό πάτο για την κεφαλή SS34. Απορρίφθηκε πολύ προσεχτικά το υπερκείμενο και το ίζημα ξεπλύθηκε σε 5ml αιθανόλης 70% (θερμοκρασία δωματίου). Στη συνέχεια το περιεχόμενο μοιράστηκε σε 5 σωλήνες erpendorf και φυγοκεντρήθηκε στις 13000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C. Κατόπιν το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα υπολείμματα της αιθανόλης αφέθηκαν να εξατμισθούν στον απαγωγό. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε συνολικό όγκο 500μl αποστειρωμένου νερού. Η περιεκτικότητα σε πλασμιδιακό DNA εκτιμήθηκε με

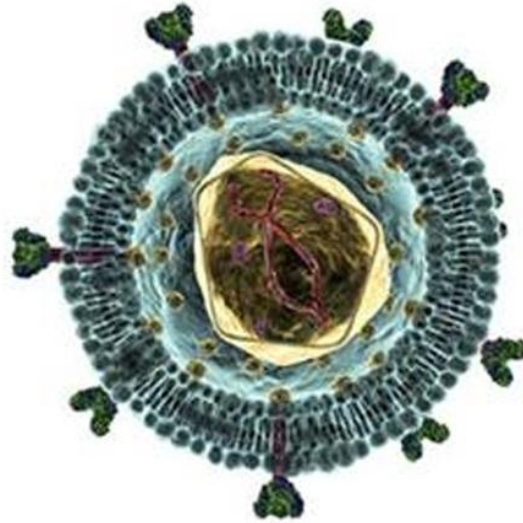
φωτομέτρηση, ελέγχοντας τα επίπεδα απορρόφησης σε μήκος κύματος A_{260} nm και ηλεκτροφορώντας το δείγμα σε πήκτωμα αγαρόζης.

2.9.13 Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης DNA και επεξεργασία αλληλουχίας με το πρόγραμμα DNAMAN

Ο προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των κλωνοποιημένων τμημάτων DNA πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Sanger από την εταιρία Biogenomica. Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων αλληλούχησης κάθε δείγματος απαιτήθηκαν 1000ng DNA. Κάθε αλληλουχία που προσδιορίστηκε, επεξεργάστηκε με το πρόγραμμα DNAMAN version 5.2.9 (Lynnon BioSoft). Το DNAMAN είναι ένα πρόγραμμα επεξεργασίας της πρωτοταγούς δομής του DNA με δυνατότητα σύγκρισης και ομοπαράθεσης αλληλουχιών και χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της αλληλουχίας των ενθεμάτων και για την εύρεση θέσεων κοπής περιοριστικών ενζύμων.

2.10 Λεντιϊκοί φορείς

Οι λεντιϊοί ανήκουν στην οικογένεια των Retroviridae (Ρετροϊοί) και χαρακτηρίζονται από τη μακρά περίοδο επώασης καθώς και τη μοναδική ιδιότητα τους να μολύνουν κύτταρα που δεν διαιρούνται. Για αυτόν λόγο, χρησιμοποιούνται αποτελεσματικά ως φορείς μεταφοράς γονιδίων. Χαρακτηριστικά παράδειγμα λεντιϊού είναι ο ανθρώπινος ιός ανοσοανεπάρκειας (HIV). Τα ιϊκά σωματίδια διαθέτουν ελυτροφόρο περίβλημα και είναι πλειομορφικά με σφαιρικό σχήμα και διάμετρο 80-100nm. Οι προεκβολές στο περίβλημα δημιουργούν μικροσκοπικές αιχμές περίπου 8nm που διασπείρονται ομοιόμορφα πάνω στην επιφάνεια (Εικόνα 2.14).



Εικόνα 2.14: Τα ιικά σωματίδια διαθέτουν σφαιρικό σχήμα και στο περίβλημα εμφανίζονται αιχμές που διασπείρονται ομοιόμορφα.

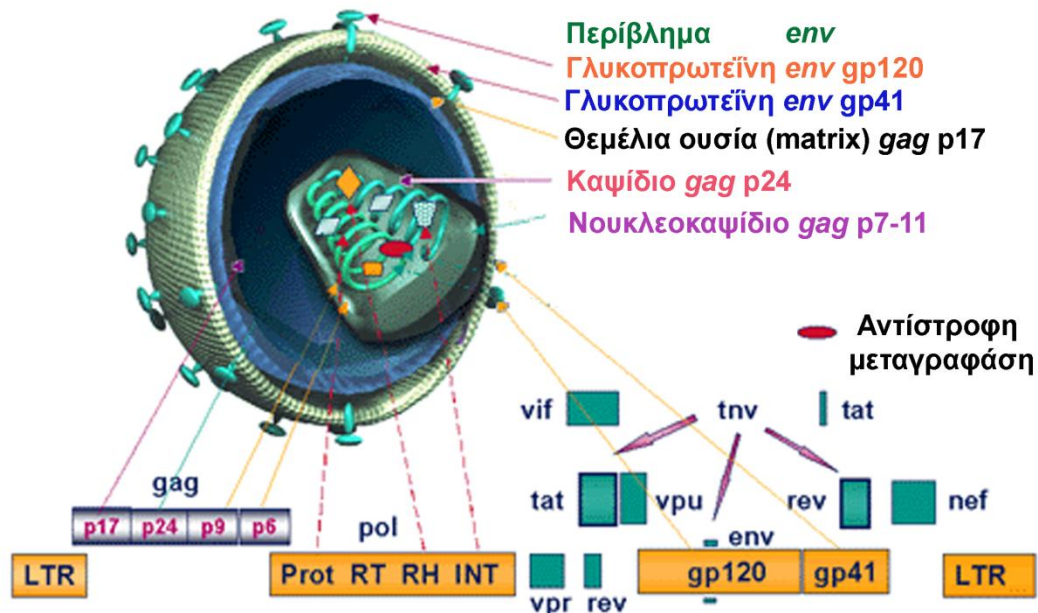
2.10.1 Δομή του λεντιϊκού γονιδιώματος

Το γονιδίωμα των λεντιϊών αποτελείται από δύο πανομοιότυπα μόρια RNA, τα οποία είναι συνδεδεμένα το καθένα με ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελείται από τα μόρια της αντίστροφης μεταγραφάσης, της πρωτεάσης p9, της RNάσης H και της ιντεγκράσης p32. Τα δύο άκρα του γονιδιώματος αποτελούνται από ομόλογες περιοχές 634 bp, γνωστές ως μακριές τελικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (LTRs-Long Terminal Repeats), οι οποίες είναι απαραίτητες για την αντιγραφή του ιού, την ενσωμάτωσή του και την έκφρασή του (Εικόνα 2.15) [206]. Περιέχει τρία κύρια γονίδια που κωδικοποιούν δομικές πρωτεΐνες και είναι τα 5'- gag – pol – env - 3', τα οποία εμφανίζονται σε σειρά. Τα τελικά προϊόντα των gag και pol γονιδίων περιλαμβάνουν τις δομικές πρωτεΐνες του ιού, την αντίστροφη μεταγραφάση, η οποία συμμετέχει στη σύνθεση του ιϊκού cDNA από το γενωμικό RNA και την ιντεγκράση, η οποία είναι απαραίτητη για την ενσωμάτωση του ιϊκού DNA στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή [207]. Το env γονίδιο εκφράζει τις επιφανειακές και τις διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου του ιού, gp120 και gp41(Εικόνα 2.15).

Αυτές συμμετέχουν στην αναγνώριση των υποδοχέων των κυττάρων που προσβάλλει ο ιός και στην συγχώνευση των ιικών και κυτταρικών μεμβρανών, αντίστοιχα [208].

Επιπρόσθετα, ο ιός περιλαμβάνει τα γονίδια *tat* και *rev*, που κωδικοποιούν τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες Tat (transactivator of transcription) και Rev (Regulator of expression of virion proteins) (Εικόνα 2.15). Η πρωτεΐνη Tat είναι απαραίτητη για την αύξηση του ρυθμού της μεταγραφής του ιικού γονιδιώματος [209] και η πρωτεΐνη Rev είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά των ιικών μεταγράφων από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα [210]. Τέλος, υπάρχουν τέσσερα ακόμα βοηθητικά γονίδια, τα *vif*, *vpr*, *vpu* και *nef*, τα οποία κωδικοποιούν αντίστοιχως τις πρωτεΐνες Vif, Vpr, Vpu και Nef (Εικόνα 2.15). Οι λεντιϊοί διαφέρουν από τους ρετροϊούς ως προς αυτά τα μικρά βοηθητικά γονίδια, τα οποία παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην κατασκευή λεντιϊκών φορέων, προκειμένου αυτοί να είναι ικανοί να διαμολύνουν ηρεμούντα κύτταρα [211-213].

Χάρτης γονιδιώματος λεντιϊού



Εικόνα 2.15: Χάρτης του γονιδιώματος του λεντιϊού.

Η μόλυνση του ιού HIV-1 ξεκινάει με την πρόσδεση της gp120 γλυκοπρωτεΐνης του ελύτρου του ιού στον υποδοχέα CD4 ο οποίος βρίσκεται στην επιφάνεια των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων, των μονοκυττάρων, των δενδριτικών κυττάρων και των κυττάρων της μικρογλοίας και πραγματοποιείται με ενδοκύττωση [214, 215]. Μετά την είσοδο του ιού στο κύτταρο, το έλυτρο απομακρύνεται και το ιικό καψίδιο αποδιατάσσεται απελευθερώνοντας στο κυτταρόπλασμα τα δύο μόρια γενωμικού RNA και τα ενσωματωμένα σε αυτά πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Στην συνέχεια η αντίστροφη μεταγραφάση πραγματοποιεί την αντίστροφη μεταγραφή και το δίκλωνο μόριο DNA που σχηματίζεται μεταφέρεται με τη μορφή νουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου στον πυρήνα του κυττάρου-ξενιστή [216, 217]. Ακολουθεί η ενσωμάτωση του ιικού DNA στο γονιδίωμα του κυττάρου με τη βοήθεια της ιντεγκράσης [216, 218].

2.10.2 Κατασκευή HIV-1 λεντιϊκών φορέων

Για τη γονιδιακή και κυτταρική θεραπεία χρησιμοποιούνται λεντιϊκοί φορείς της σύγχρονης γενιάς HIV-1 φορέων, όπου τα ιικά γονίδια που είναι απαραίτητα για την παραγωγή νέων ιών έχουν διαγραφεί και αντικατασταθεί από το διαγονίδιο και ταυτόχρονα οι αλληλουχίες που είναι απαραίτητες για την μεταφορά και την ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος στο κύτταρο στόχο έχουν διατηρηθεί. Οπότε, τα ένζυμα και οι απαραίτητες πρωτεΐνες για να σχηματιστούν τα ανασυνδιασμένα ιικά σωματίδια, παρέχονται σε *trans* διάταξη μέσα σε πλασμιδιακούς φορείς που συνδιαμολύνονται παροδικά σε μια κατάλληλη κυτταρική σειρά, όπως τα 293T.

Για να διευρυνθεί η ικανότητα μεταγωγής του ιού πέρα από τα κύτταρα που φέρουν CD4 υποδοχέα, χρησιμοποιείται η γλυκοπρωτεΐνη VSVG του ελύτρου του ιού της φουσαλιδώδους στοματίτιδας (Vesicular stomatitis virus-Glycoprotein), η οποία αναγνωρίζει ένα φωσφολιπιδικό συστατικό που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη όλων των κυττάρων [219, 220]. Επιπρόσθετα, οι φορείς παρέχουν *in trans* τα δύο από τα βοηθητικά γονίδια (*tat* και *rev*), καθώς και το στοιχείο *wpre* (Woodchuck Posttranscriptional Regulatory Element), το οποίο επιδρά στην μεταφορά του mRNA αυξάνοντας την εκφραστική ισχύ του φορέα. Έτσι, για την παρασκευή ιικών σωματιδίων χρησιμοποιήθηκε το σύστημα συνδιαμόλυνσης 4 πλασμιδιακών φορέων

στην κυτταρική σειρά 293T. Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα παρακάτω (Εικόνα 2.16):

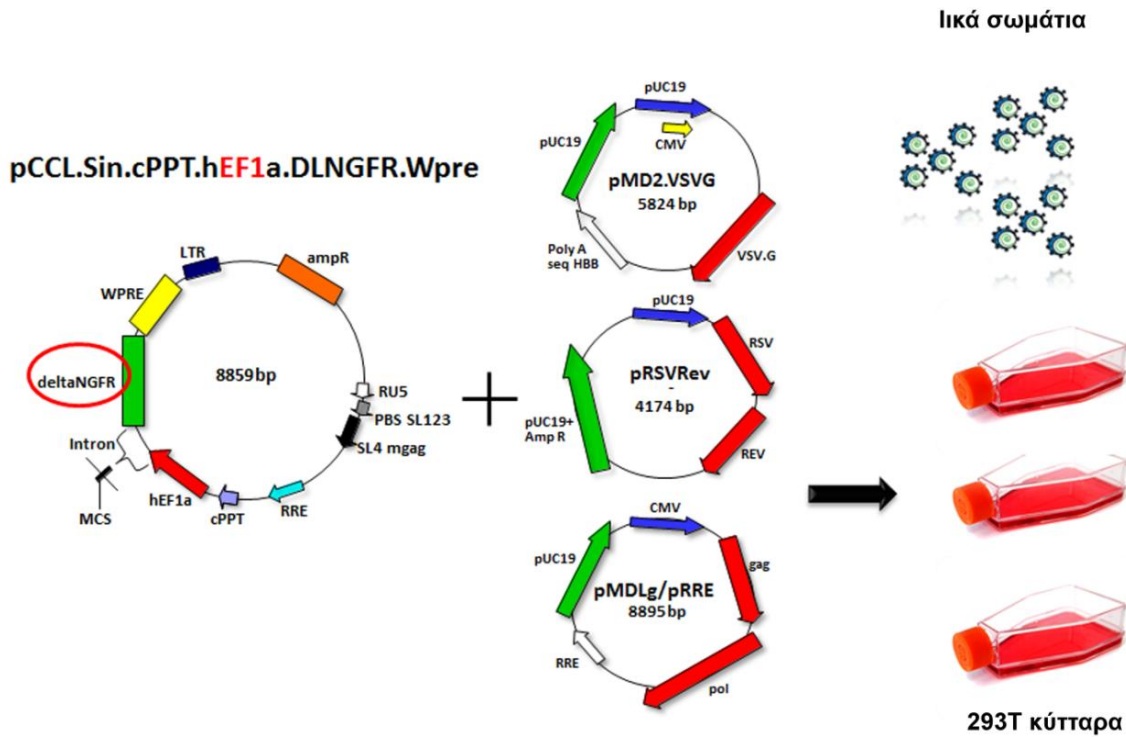
- Το πλασμίδιο pMD2.VSVG, που περιέχει το γονίδιο της γλυκοπρωτεΐνης VSVG.
- Το πλασμίδιο και pMDLgag/pol/RRE, που περιέχει τα γονίδια gag, pol και rev (REV response element). Τα πλασμίδια αυτά παρέχουν τα γονίδια που είναι απαραίτητα για τη συναρμολόγηση των πρωτεϊνών του καψιδίου.
- Το πλασμίδιο pRSV-REV, που περιέχει το γονίδιο rev, το οποίο είναι απαραίτητο για την αντιγραφή του DNA που έχει ενσωματωθεί στον φορέα.
- Ανασυνδυασμένος φορέας pCCLsin.cPPT.hEF1a (intron with MCS as). deltaLNGFR.Wpre.

2.10.3 Παροδική συνδιαμόλυνση 293T κυττάρων με τη μέθοδο φωσφορικού ασβεστίου

Τα κύτταρα 293T χρησιμοποιήθηκαν ως κυτταρική σειρά πακεταρίσματος για την παραγωγή των λεντιϊκών φορέων. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις 175 cm² φλάσκες σε 80% πληρότητα με 293T (Εικόνα 2.16). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η συνδιαμόλυνση με τους τέσσερις πλασμιδιακούς φορείς με την μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου. Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την τεχνική ήταν σε θερμοκρασία δωματίου. Σε κάθε φλάσκα προστέθηκαν 34ml θρεπτικό υλικό (DMEM, 10% FBS, 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη) και στη συνέχεια προστέθηκε το μίγμα διαμόλυνσης το οποίο παρασκευάστηκε ως εξής:

Σε σωλήνα πολυστυρενίου 15ml προστέθηκαν τα πλασμίδια σε τελικές συγκεντρώσεις: 21μg pVSVG, 35μg pRRE, 18,2 μg pREV και 70μg pCCL.EF1 ή pCCL.miR-21 ή pCCL.miR-26a, προστέθηκε H₂O μέχρι ο τελικός όγκος να είναι 3062,3μl και μετά από ανάμιξη με vortex προστέθηκαν 437,6μl CaCl₂ 2M. Το μίγμα αυτό με τελικό όγκο 3500μl, αναμίχθηκε πάλι με συσκευή Vortex και προστέθηκαν 3,5ml από 2x HBS διάλυμα (Hepes Buffered Saline: 3,08ml NaCl 1M, 1,1ml Hepes 1M, 33μl Na₂HPO₄ 1M) και αμέσως μόλις θόλωσε προστέθηκε σταγόνα-σταγόνα σε κάθε φλάσκα με τα κύτταρα. Οι φλάσκες επωάστηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας

και την επόμενη μέρα έγινε ξέπλυμα των κυττάρων 2 φορές με 1x PBS και προσθήκη 17ml φρέσκου θρεπτικού μέσου σε κάθε φλάσκα.



Εικόνα 2.16: Σχηματική περιγραφή της παροδικής συνδιαμόλυνσης 293T κυττάρων με τη μέθοδο φωσφορικού ασβεστίου για την κατασκευή του λεντιϊού EF1.

2.10.4 Συγκέντρωση του λεντιϊού

Την επόμενη μέρα συλλέχθηκε το υπερκείμενο των φλασκών (συνολικός όγκος 51ml) και προστέθηκε σε κάθε φλάσκα από 17ml φρέσκου θρεπτικού μέσου. Το υπερκείμενο περάστηκε από φίλτρο 0,45μm οξικής κυτταρίνης χαμηλής συγγένειας με πρωτεΐνες (Sartsted) και έπειτα χωρίστηκε σε δύο ειδικούς σωλήνες συμπίκνωσης χωρητικότητας 17ml (Amicon Ultra – Centrifugal Filters Units 100K, Millipore) και φυγοκεντρήθηκε στα 4000g για περίπου 15 λεπτά. Επαναλήφθηκε η διαδικασία μέχρι να φυγοκεντρηθεί όλη η ποσότητα υπερκειμένου και τελικά συλλέχθηκε 1ml συγκεντρωμένου ιού, το οποίο ισομοιράστηκε σε σωλήνες eppendorf που αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Πραγματοποιήθηκε συλλογή του ιού για δεύτερη συνεχόμενη μέρα με επανάληψη της ίδιας ακριβώς πειραματικής πορείας.

2.10.5 Τίτλοποίηση του λεντιϊού

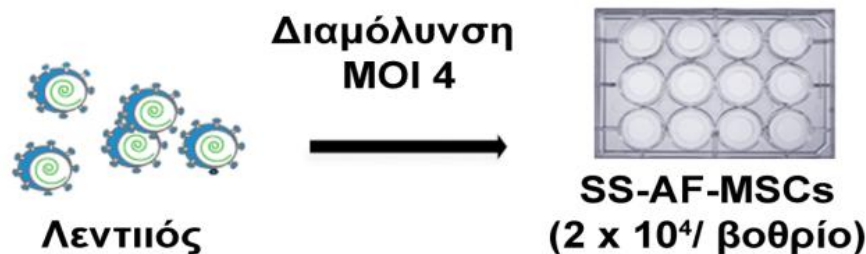
Ως τίτλο του λεντιϊκού φορέα ορίζεται ο αριθμός των λεντιϊκών σωματιδίων που υπάρχουν ανά mL υπερκειμένου (μονάδες μεταγωγής/mL ή Transduction units/mL). Ο προσδιορισμός του τίτλου των λεντιϊκών σωματιδίων έκφρασης του miR-21 πραγματοποιήθηκε με μεταγωγή HT1080 κυττάρων με διαδοχικές αραιώσεις του ιού. Καλλιεργήθηκαν HT1080 κύτταρα σε 12-well plate (Orange) σε συγκέντρωση 5×10^4 κύτταρα/well και τελικό όγκο 1ml/well. Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής αραιώσεις:

- HT1080 control - 1000μl 10% DMEM
- 1:5000 – 200μl λεντιϊού από αραιώση 1:1000 και 800 μl 10% DMEM
- 1:1000 – 1μl λεντιϊού και 999 μl 10% DMEM
- 1:100 – 10μl λεντιϊού και 990 μl 10% DMEM
- 1:50 – 20μl λεντιϊού και 980 μl 10% DMEM

Μετά από τέσσερις μέρες επώασης στον ειδικό επωαστικό κλίβανο στους 37°C και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂ συλλέχθηκαν τα κύτταρα σε ειδικά tubes (FACS tubes), φυγοκεντρήθηκαν στις 1200 στροφές για 10 λεπτά, απορρίφθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκε 1000μl 1x PBS και ξαναφυγοκεντρήθηκαν στις ίδιες συνθήκες. Το κυτταρικό ίζημα σε κάθε FACS tube επαναδιαλύθηκε σε 100μl 1x PBS που περιείχε το αντίσωμα PE Mouse Anti-Human CD271/LNGFR (BD Biosciences, Athens, Greece) σε συγκέντρωση 1:50. Ακολούθησε επώαση στους 4°C για μία ώρα, πλύσιμο με 1x PBS και φυγοκέντρηση στα 1200 στροφές για 5 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα σε κάθε FACS tube επαναδιαλύθηκε σε 400μl 1x PBS και έπειτα πραγματοποιήθηκε ανάλυση στον κυτταρομετρητή ροής Beckman Coulter Cytomics FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter Ltd, Palo Alto, CA, USA). Χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο υπολογίστηκε ο τίτλος του λεντιϊκού φορέα: % NGFR θετικών κυττάρων x αραιώση λεντιϊκού φορέα x αριθμό κυττάρων που μετάχθηκαν /100. Υπολογίστηκε για κάθε αραιώση και ως τίτλος θεωρήθηκε ο μέσος όρος αυτών.

2.10.6 Μεταγωγή SS-AF-MSCs με λεντιϊό

Τα SS-AF-MSCs τέθηκαν σε καλλιέργεια με αναλογία 2×10^4 κύτταρα ανά βοθρίο σε ένα πιάτο καλλιέργειας με 12 βοθρία, όπου και μετάχθηκαν με τους διαφορετικούς λεντιϊούς που κατασκευάστηκαν σε πολλαπλότητα μόλυνσης 4 (Multiplicity of infection - MOI4) (Εικόνα 2.17). Έπειτα, από 7 ημέρες καλλιέργειας ακολούθησε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής για την επιφανειακή πρωτεΐνη CD271/LNGFR, η οποία είναι ο ανενεργός υποδοχέας νευρικού αυξητικού παράγοντα (Nerve Growth Factor Receptor).

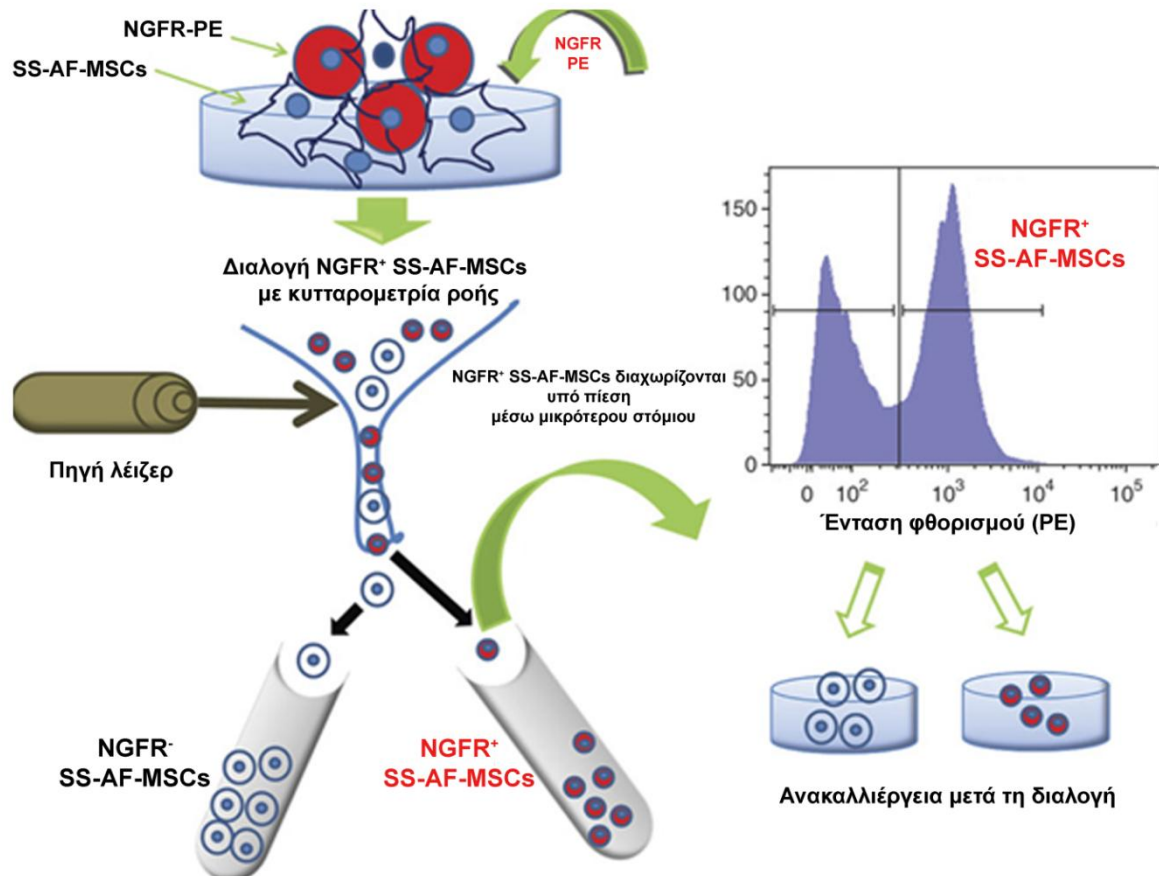


Εικόνα 2.17: Σχηματική περιγραφή της διαδικασίας μεταγωγής SS-AF-MSCs με λεντιϊό.

2.10.7 Διαλογή NGFR⁺ SS-AF-MSCs

Η διαλογή των NGFR⁺ SS-AF-MSCs επιτυγχάνθηκε με τη χρήση της τεχνικής διαχωρισμού φθορίζοντων κυττάρων (FACS) χρησιμοποιώντας το μηχάνημα FACS Aria Cell Sorter (BD Biosciences, Athens, Greece). Η διαδικασία άρχισε με την τοποθέτηση των σημασμένων κυττάρων σε μία φιάλη και αναγκάζοντας τα κύτταρα να περάσουν από το ακροφύσιο καθώς πάλλονται με μία βέλτιστη συχνότητα για την παραγωγή σταγόνων σε σταθερή απόσταση από το ακροφύσιο (Εικόνα 2.18). Έπειτα σαρώνονται από το επιλεγμένο λέιζερ, το οποίο διεγείρει την χρωστική και το φως που εκπέμπεται, ανιχνεύεται από το φωτοπολλαπλασιαστικό σωλήνα, ή ανιχνευτή φωτός. Με τη συλλογή των πληροφοριών από το φως (σκέδασης και φθορισμού) ένας υπολογιστής μπορεί να προσδιορίσει ποια κύτταρα πρόκειται να διαχωριστούν και να συλλέγει στο τέλος της ροής.

Το τελικό αποτέλεσμα είναι η συλλογή των σημασμένων και μόνο κυττάρων, στα οποία ο αριθμός και το επίπεδο φθορισμού καταγράφεται (Εικόνα 2.18). Σε όλες τις περιπτώσεις, η διαλογή των NGFR⁺ SS-AF-MSCs είχε αποδοτικότητα μεγαλύτερη από 98%.

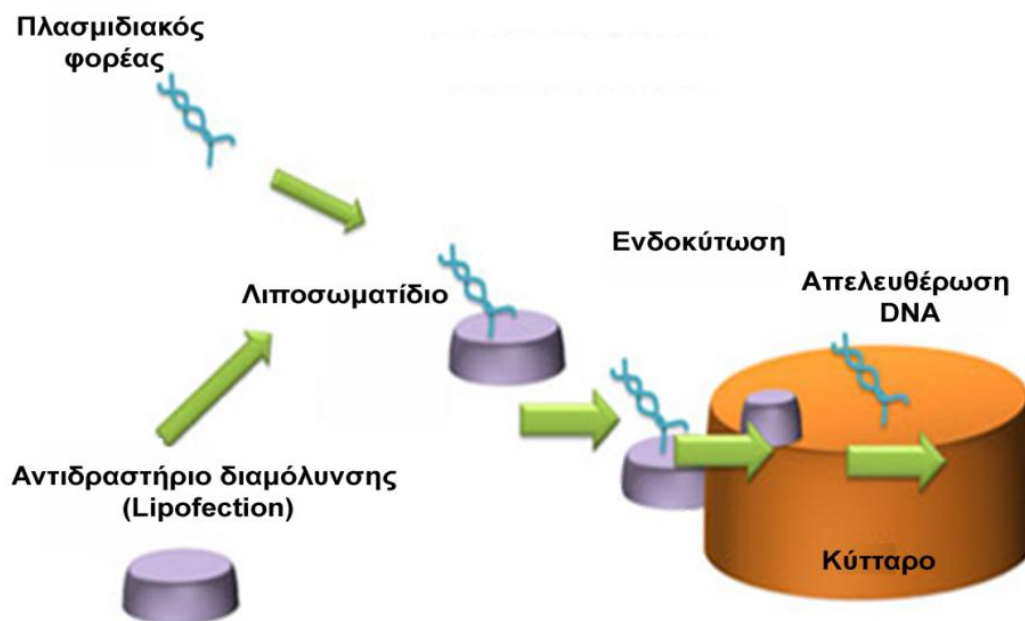


Εικόνα 2.18: Σχηματική περιγραφή της διαδικασίας διαλογής NGFR⁺ SS-AF-MSCs με κυτταρομετρία ροής.

2.11 Διαμόλυνση με λιποσωμάτια

Διαμόλυνση με λιποσωμάτια (Lipofection) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την ένεση του γενετικού υλικού σε ένα κύτταρο μέσω των λιποσωμάτων, τα οποία είναι φυσαλίδες που μπορούν εύκολα να συγχωνευθούν με την κυτταρική μεμβράνη,

δεδομένου ότι και τα δύο αποτελούνται από διαπλεγμένα φωσφολιπίδια (Εικόνα 2.19). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί γενικά θετικά φορτισμένα λιπίδια για να σχηματίσουν ένα συνολικό με το αρνητικά φορτισμένο γενετικό υλικό. Τα κύρια πλεονεκτήματα της είναι η υψηλή αποτελεσματικότητα, η ικανότητά να επιμολύνεται ένα ευρύ φάσμα τύπων κυττάρων με όλα τα είδη των νουκλεϊκών οξέων, η εύκολη χρήση και η χαμηλή τοξικότητα. Επιπλέον, αυτή η μέθοδος είναι κατάλληλη για όλες τις εφαρμογές διαμόλυνσης (παροδική, σταθερή, συνδιαμόλυνση, διαδοχική ή πολλαπλές διαμολύνσεις). Το αντιδραστήριο Lipofectamine αποτελεί το βασικό αντιδραστήριο για την διαμόλυνση των κυττάρων, γιατί έχει την ιδιότητα να μεταβάλλει την κυτταρική μεμβράνη, επιτρέποντας σε νουκλεϊκά οξέα να εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα. Στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η Lipofectamine™ LTX and Plus™ της εταιρίας Invitrogen Ltd.



Εικόνα 2.19: Σχηματική περιγραφή της διαδικασίας διαμόλυνσης με τη χρήση λιποσωμάτων.

Αρχικά, ο απαιτούμενος αριθμός κυττάρων τέθηκε στη καλλιέργεια σε πιάτο 12 βοθρίων (Orange) έτσι ώστε να καλύπτει το 50% της επιφάνειας του βοθρίου. Κάθε φορά η επιθυμητή συγκέντρωση του φορέα DNA ή του RNA αναδιαλύθηκε σε 100μl

θρεπτικό μέσο Opti-MEM^R I (Gibco) και κατόπιν προστέθηκε και η αντίστοιχη ποσότητα από το αντιδραστήριο PLUSTM. Ακολούθησε ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκε ανάλογη ποσότητα του αντιδραστήριου LipofectamineTM LTX. Κατόπιν το μίγμα αυτό επώαστηκε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα σύμπλοκα DNA-λιπιδίων που έχουν σχηματιστεί, μπορούν να παραμείνουν σταθερά για 6 ώρες. Στη συνέχεια το τελικό μίγμα προστέθηκε σε κάθε βοθρίο υπό ροή σταγόνας. Το θρεπτικό μέσο αντικαταστάθηκε μετά από 4-6 ώρες. Τα κύτταρα επώαστηκαν στον ειδικό επωαστήρα στους 37°C και σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂ για 18-48 ώρες.

Αναλυτικότερα, RS-AF-MSCs και BM-MSCs διαμολύνθηκαν με 0.3μM του ανταγωνιστή του miR-21 (Exiqon A/S) και/ή με 1μg pLKO.1-sh-Sox2 (Erasmus MC, Rotterdam, NL) χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Lipofectamine όπως περιγράφεται παραπάνω. Για μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ο αρνητικός μάρτυρας του ανταγωνιστή του miR-21 ή το pLKO.1-sh-control (Erasmus, NL). Έπειτα, από 32 ώρες απομονώθηκε το ολικό RNA και οι ολικές πρωτεΐνες των κυττάρων για περαιτέρω ανάλυση.

2.12 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών

Για την απομόνωση ολική πρωτεΐνης, 2×10^6 κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές για 5 λεπτά και ακολούθησε έκπλυση με 1x PBS (Lonza). Το ίζημα των κυττάρων αναδιαλύθηκε σε 50-150μl διάλυμα λύσης (Lysis Buffer: 20mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% NP40, 10% Glycerol, 1mM PMSF, 10μl Cocktail inhibitors) και μεταφέρθηκε σε σωλήνα eppendorf. Έπειτα, το κυτταρικό εκχύλισμα επώαστηκε για 1 ώρα στον πάγο υπό ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο το οποίο αποτελεί και το εκχύλισμα των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών μεταφέρθηκε σε σωλήνα eppendorf. Όλα τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -80°C για μελλοντική χρήση.

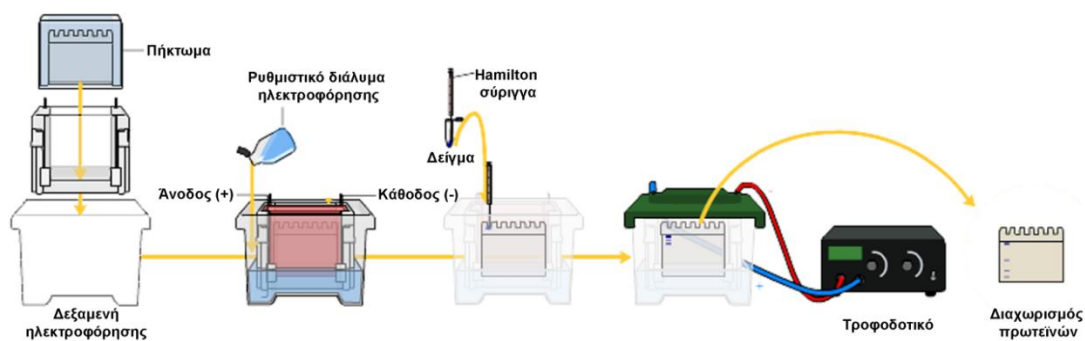
Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών στα παραπάνω εκχυλίσματα πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη μετατόπιση του μήκους κύματος μέγιστης απορρόφησης από τα 450nm στα 595nm όταν η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma), δεσμευτεί στα βασικά αμινοξέα των πρωτεϊνών υπό όξινες συνθήκες. Η δέσμευση είναι ανάλογη του ποσού των πρωτεϊνών, ενώ το κυανό χρώμα που προκύπτει είναι σταθερό για μία ώρα περίπου και έχει υψηλό μοριακό συντελεστή απορρόφησης που συνεπάγεται υψηλή ευαισθησία στις ποσοτικές μετρήσεις πρωτεϊνικών δειγμάτων.

2.13 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν, διαχωρίστηκαν με κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Παρασκευάστηκε πήκτωμα με διαβάθμιση συγκέντρωσης σε ειδική υάλινη μήτρα πάχους 0.75mm (BIORAD). Αρχικά τοποθετήθηκε στη υάλινη μήτρα το διάλυμα που θα σχηματίσει 10% πηκτή διαχωρισμού (10% separation gel: 3.75ml 1M Tris-HCl pH8.8, 3.2ml 30% Acrylamid/Bis, 100μl SDS, 5μl Temed, 2.95ml H₂O, 50μL 10% Ammonium persulfate), προστέθηκε H₂O και αφέθηκε να πήξει για περίπου 30 λεπτά. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το H₂O και προστέθηκε το διάλυμα που θα σχηματίσει 4% πηκτή επιστοίβασης (4% stacking gel: 625μl 1M Tris-HCl pH6.8, 650μl 30% Acrylamid/Bis, 50μl SDS, 5μl Temed, 3.72ml H₂O, 50μL 10% Ammonium persulfate), και τοποθετήθηκε το ειδικό χτενάκι και αφέθηκε να πήξει για περίπου 30 λεπτά.

Τα δείγματα των πρωτεϊνών (30-50μg) μεταφέρθηκαν στο σύστημα της πηκτής, αφού πρώτα προστέθηκε 4x SDS/PAGE sample διάλυμα (62.5mM Tris-HCl pH6.8, 25% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 10% Glycerol, 0.05% Bromophenol Blue) και πραγματοποιήθηκε μετουσίωση με βρασμό επί 5 λεπτά στους 100°C. Εκτός από τα δείγματα τοποθετήθηκε στην πηκτή και μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Protein Marker BIORAD 161-0373), οι οποίες φέρουν συνδεδεμένη χρωστική, εξυπηρετώντας τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης ανάμεσα στο μοριακό βάρος και την απόσταση, που διανύει η κάθε πρωτεΐνη στην πηκτή ηλεκτροφόρησης.

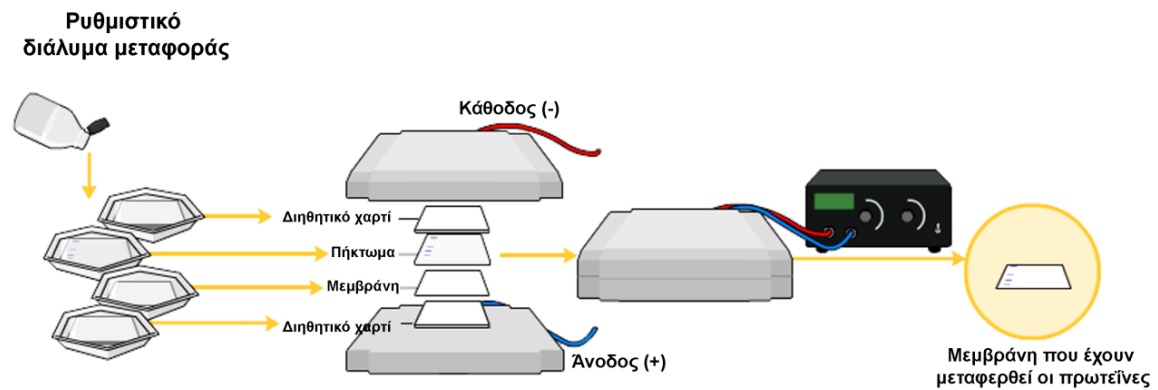
Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε 0.5L ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1x SDS Running Buffer: 50ml 10x SDS Running Buffer, 5ml 10% SDS, 450ml H₂O)(10x SDS Running Buffer: 144g Glycine, 30g Trizma Base, 1L H₂O) σε θερμοκρασία δωματίου στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (συσκευή MINI – PROTEAN II, BIO-RAD) (Εικόνα 2.20). Αρχικά, εφαρμόστηκε τάση 80V για 30 λεπτά ώστε να γίνει η επιστοίβαση των πρωτεϊνών και στη συνέχεια 120V μέχρι να εξέλθει η χρωστική των δειγμάτων (κυανούν της βρωμοφαινόλης) από την πηκτή, οπότε ολοκληρώνεται η διαδικασία.



Εικόνα 2.20 : Διαδικασία διαχωρισμού πρωτεϊνών στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

Μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη PVDF (Polyvinylidene Difluoride - Roche) υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου (Εικόνα 2.21). Οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες, λόγω πρόσδεσης του SDS κατά την ηλεκτροφόρηση, κινήθηκαν προς το θετικό πόλο της συσκευής όπου τοποθετήθηκε η μεμβράνη. Για την αποτελεσματική πρόσδεση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη PVDF απαιτείται η ενεργοποίηση της για 10 δευτερόλεπτα σε μεθανόλη, ξέπλυμα για 2 λεπτά σε νερό και έπειτα για 15 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (100ml 10x SDS Running Buffer, 200ml μεθανόλη, 700ml H₂O). Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της ειδικής συσκευής Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad Laboratories Inc., CA, USA), η

οποία απαιτεί μια συγκεκριμένη διάταξη της μεμβράνης, της πηκτής, του διηθητικού χαρτιού Whatman και των σπόγγων (Εικόνα 2.21). Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς σε ψυχρό θάλαμο με εφαρμογή τάσης 100V για 1 ώρα.



Εικόνα 2.21: Διαδικασία μεταφοράς πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε PVDF μεμβράνη.

Πραγματοποιήθηκε έκπλυση της μεμβράνης για 5 λεπτά με 1xPBS-0.1% Tween-20 (PBS-T) σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα για τη δέσμευση των μη-ειδικών θέσεων, η μεμβράνη επώαστηκε για 60 λεπτά σε διάλυμα δέσμευσης (blocking buffer: 5% milk σε PBS-T). Μετά η μεμβράνη ξεπλύθηκε τρεις φορές για 5 λεπτά με διάλυμα PBS-T. Ακολούθησε επώαση με το πρώτο αντίσωμα, ειδικό κάθε φορά για την μελετώμενη πρωτεΐνη (Πίνακας 2.4) για 16 ώρες σε ψυχρό θάλαμο υπό ανάδευση. Την επόμενη μέρα απορρίφθηκε το πρώτο αντίσωμα και ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα PBS-T. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επώαστηκε με το δεύτερο αντίσωμα anti-rabbit HRP (Sigma-Aldrich Ltd.) σε αραιώση 1:1000 ή anti-mouse HRP (Santa Cruz Biotechnology Inc.) σε αραιώση 1:2000 για 60 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα PBS-T.

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ
1:1000 rabbit anti-human SOX2 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
1:1000 rabbit anti-human Oct4 (Abcam, Cambridge, UK)
1:1000 rabbit anti-human Nanog (Abcam)
1:1000 rabbit anti-human Cyclin D1 (Thermo Scientific Inc., MA, USA)
1:1000 mouse anti-human Cyclin A (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, U.S.A)
1:1000 rabbit anti-human Cyclin E1 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)

Πίνακας 2.4: Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι αραιώσεις τους.

Για την ανίχνευση του σήματος με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας, η μεμβράνη επώαστηκε για 1 λεπτό με το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης το οποίο παρασκευάζεται κάθε φορά εκ νέου με τη ανάμιξη ίσων όγκων των αντιδραστηρίων ECL, Peroxidase Solution και Luminol/Enhancer Solution (Perkin-Elmer, MA, USA). Αποστραγγίστηκε η περίσσεια του αντιδραστηρίου σε χαρτί Whatman και η μεμβράνη εκτέθηκε σε φωτογραφικό φιλμ για διάφορους χρόνους, μέχρι να ληφθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα. Μετά την έκθεση, το φιλμ εμφανίστηκε σε αυτόματο εμφανιστήριο. Η ποσοτικοποίηση των φωτογραφικών φιλμ έγινε με τη χρήση του πυκνόμετρου GS-800 Densitometer (BioRad Laboratories Inc.) και του προγράμματος Quantity One 4.4.1 (Bio-Rad Laboratories).

Η ανίχνευση των αντιγόνων στο ανοσοαποτύπωμα με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας, επιτρέπει την επαναχρησιμοποίηση της μεμβράνης με διαφορετικά αντισώματα, καθότι δεν επέρχεται αλλοίωση της μεμβράνης και των μεταφερόμενων σε αυτήν αντιγόνων. Η αποδέσμευση των αντισωμάτων (stripping) πραγματοποιήθηκε επάζοντας τη μεμβράνη σε υδατόλουτρο στους 50°C υπό

ανάδευση για 30 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα (Stripping buffer: 100mM β-mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5mM Tris-HCl pH6.7). Πραγματοποιήθηκε διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος και απελευθέρωση των αντισώματος, χωρίς να επηρεάζονται οι πρωτεΐνες που είναι δεσμευμένες ισχυρά με υδροφοβικούς δεσμούς στη μεμβράνη. Ακολούθησε έκπλυση της μεμβράνης με PBS-T και εκ νέου επώαση με τα επιθυμητά αντισώματα.

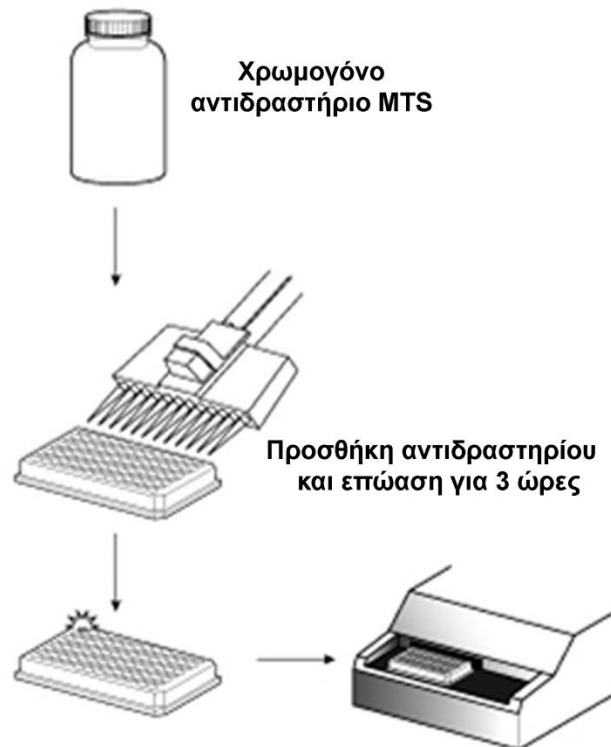
2.14 Μελέτη της κλωνογονικής ικανότητας των AF-MSCs

Για την μελέτη της κλωνογονικής ικανότητας των SS-AF-MSCs που έχουν μεταχθεί με τον ανάλογο κάθε φορά λεντιϊό, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλα τρυβλία διαμέτρου 60mm σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις των 70, 140 και 280 κυττάρων αντίστοιχα. Ο αριθμός των σχηματιζόμενων αποικιών είναι η γραμμική συνάρτηση του αριθμού των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν και αποτελεί ένδειξη της κλωνογονικής τους ικανότητας [221]. Έπειτα, από 14 μέρες πραγματοποιήθηκε χρώση Giemsa (Sigma-Aldrich) και υπολογίστηκε ο αριθμός των σχηματιζόμενων αποικιών. Ο τελικός αριθμός των αποικιών υπολογίστηκε ανά 100 MSCs με βάση την πολυπαραγοντική ανάλυση που προέκυψε από τις 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις των κυττάρων. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το Student's t-test.

2.15 Ανάλυση του ρυθμού πολλαπλασιασμού

Για την μελέτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού των SS-AF-MSCs μεταγμένα με τον ανάλογο κάθε φορά λεντιϊό, των BM-MSCs και των RS-AF-MSCs χρησιμοποιήθηκε το χρωμογόνο αντιδραστήριο MTS (CellTiter 96 AQueous One Solution cell proliferation assay, Promega). Το αντιδραστήριο αυτό είναι ένα τετραζόλιο [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4-sulphophenyl) - 2H-tetrazolium, σε αλάτι], το οποίο μετατρέπεται από τα κύτταρα σε μία χρωμογόνο φορμαζάνη, διαλυτή στο καλλιεργητικό μέσο των κυττάρων. Η απορρόφηση της παραγόμενης φορμαζάνης μπορεί να μετρηθεί απευθείας στα 490 nm σε πιάτα καλλιέργειας των 96 βοθρίων (Εικόνα 2.22). Η μετατροπή του αντιδραστηρίου MTS στην υδατοδιαλυτή φορμαζάνη πραγματοποιείται από αφυδρογονάσες που

περιέχονται στα μεταβολικά ενεργά κύτταρα. Η ποσότητα της παραγόμενης φορμαζάνης, η οποία υπολογίζεται από το ποσοστό απορρόφησης στα 490 nm, είναι ευθέως ανάλογη με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων της καλλιέργειας.



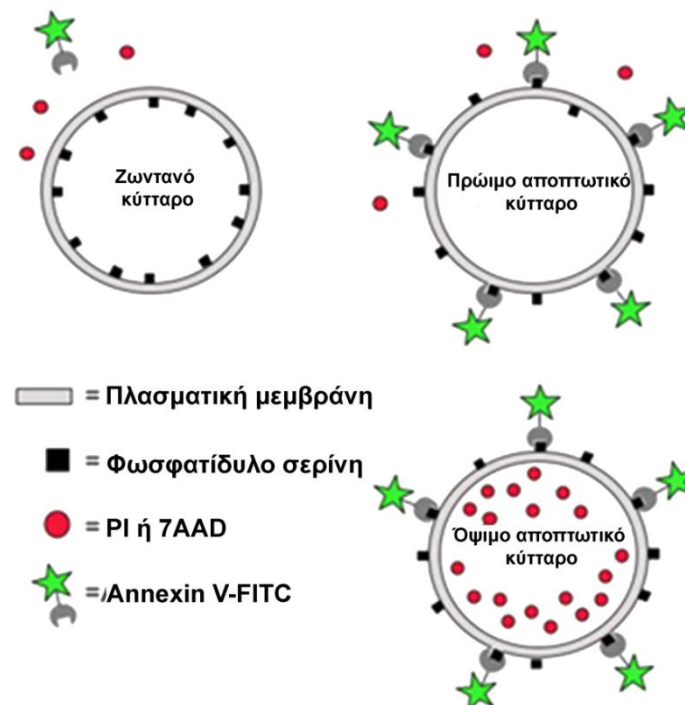
Εικόνα 2.22: Για την μελέτη του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, προστίθεται σε αυτά το αντιδραστήριο MTS και έπειτα από 3 ώρες επώασης, μετράται η απορρόφηση στα 490 nm.

Τα RS-AF-MSCs, SS-AF-MSCs και BM-MSCs τέθηκαν σε καλλιέργεια με αναλογία 10^3 κύτταρα ανά βοθρίο σε ένα πιάτο καλλιέργειας με 96 βοθρία, όπου και καλλιεργήθηκαν για 3, 7 και 10 ημέρες σε καλλιεργητικό μέσο DMEM με 20% FBS. Την ημέρα μέτρησης του ρυθμού πολλαπλασιασμού αναλύθηκαν τα κύτταρα από 5 βοθρία όπου και χρησιμοποιήθηκε κατάλληλη ποσότητα του αντιδραστηρίου MTS σε κάθε βοθρίο και τα κύτταρα επώαστηκαν με το αντιδραστήριο για 3 ώρες. Στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση των βοθρίων στα 490 nm με τη χρήση ενός μετρητή ELISA (ELX 800; Biotek). Προκειμένου να υπολογιστεί το ποσοστό της

αύξησης χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη συνάρτηση, $(OD_{\text{ημέραX}} - OD_{\text{ημέρα0}}) / OD_{\text{ημέρα0}} \times 100$. Η Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα, το καθένα από πέντε επαναλήψεις, και υπολογίστηκε ο μέσος όρος \pm SEM από κάθε πείραμα.

2.15 Δοκιμασία απόπτωσης

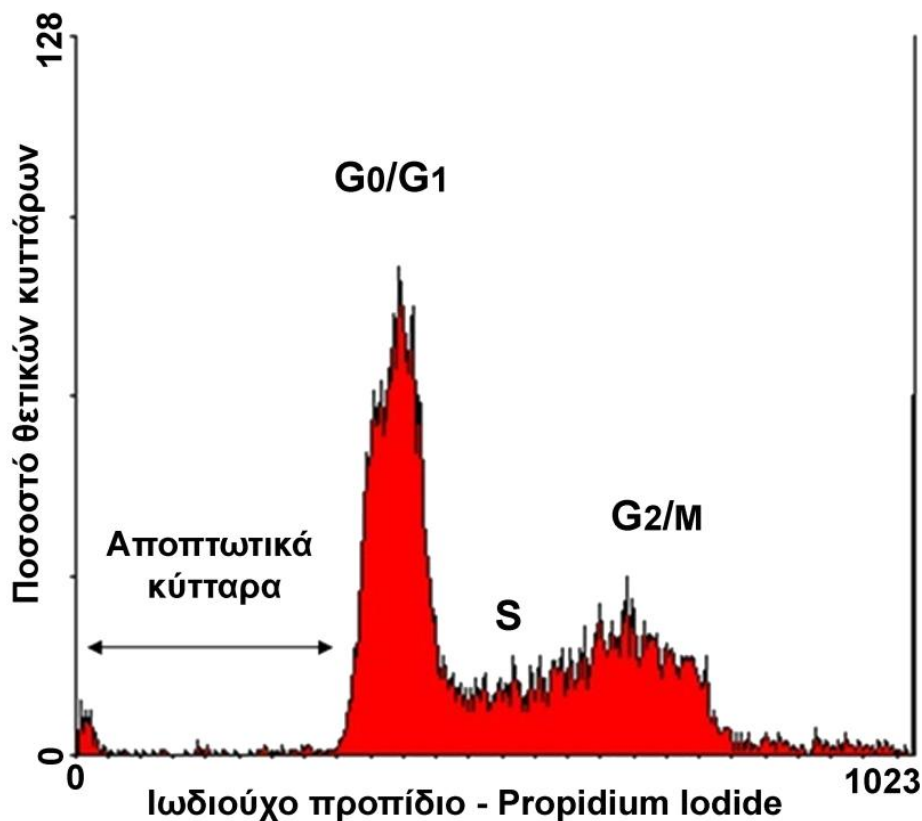
Τα 10^6 SS-AF-MSCs μεταγμένα με τον ανάλογο κάθε φορά λεντιϊό, εκπλύθηκαν με παγωμένο 1x PBS, επαναδιαλύθηκαν σε 100μl 1x Binding buffer (10x Binding Buffer: 0.1M HEPES, 1.4M NaCl, 25mM CaCl₂) και προστέθηκαν 5μl Ανεξίνη V-FITC (BD Biosciences) και 5μl 7-Amino-Actinomycin (ADD) (Sigma-Aldrich Ltd.) και επώαστηκαν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου απουσία φωτός. Στη συνέχεια, ακολούθησε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Το 7ADD έχει την ικανότητα να βάφει το DNA των νεκρών κυττάρων καθώς διαπερνά τη μεμβράνη τους (Εικόνα 2.23). Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος \pm SEM από κάθε πείραμα.



Εικόνα 2.23: Για τη μελέτη της απόπτωσης καθώς και του κυτταρικού κύκλου χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια όπως το Ανεξίνη V και το ιωδιούχο προπιδίο (PI) αντίστοιχα.

2.16 Ανάλυση κυτταρικού κύκλου

Για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου, πραγματοποιήθηκε χρώση σε SS-AF-MSCs μεταγμένα με τον ανάλογο κάθε φορά λεντιϊό, με ιωδιούχου προπίδιο (propidium iodide – PI), μια χρωστική για την ποσοτική εκτίμηση του DNA των κυττάρων. Το ιωδιούχο προπίδιο προσδένεται στα νουκλεϊκά οξέα και ανάλογα με την ένταση φθορισμού των κυττάρων καθορίζεται και η ποσότητα DNA των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 2.24). Καθώς κατά την διάρκεια διπλασιασμού των κυττάρων, στη φάση S το DNA διπλασιάζεται σε σχέση με την ποσότητα στη φάση G0 και G1.



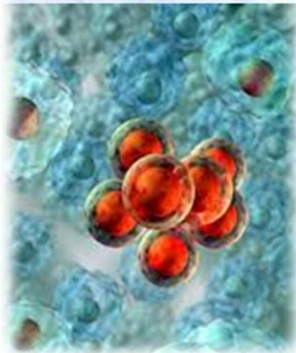
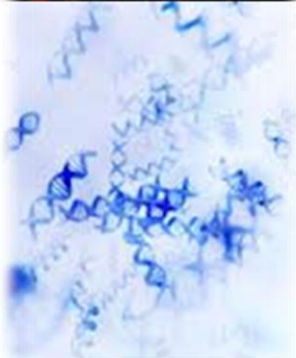
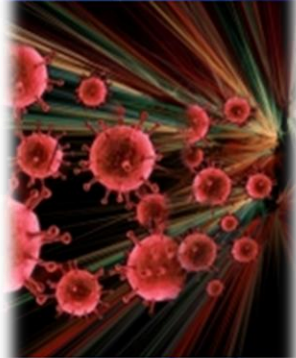
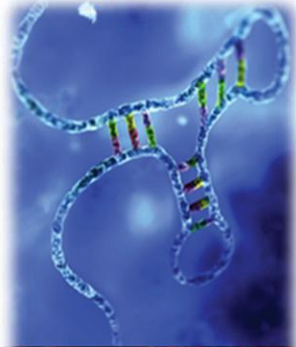
Εικόνα 2.24: Για τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιείται χρώση ιωδιούχου προπιδίου και με κυτταρομετρία ροής επιτυγχάνεται η ανάλυση των θετικών κυττάρων.

Συγκεκριμένα, 5×10^4 SS-AF-MSCs μεταγμένα με τον ανάλογο κάθε φορά λεντιϊό καλλιεργημένα σε πιάτο καλλιέργειας με 12 βοθρία, μονιμοποιήθηκαν με 1x διάλυμα μονιμοποίησης μετά από επώαση 15 λεπτών. Έπειτα, προστέθηκε το 1x διάλυμα X-gal υποστρώματος και επώαστηκε στους 37°C , υπό σκιά για 16 ώρες.

Τα μπλε κύτταρα που εμφανίζονται μετρήθηκαν με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου και υπολογίστηκε η σχετική ενεργότητα του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση. Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος \pm SEM από κάθε πείραμα.

2.18 Στατιστική πειραμάτων

Πραγματοποιήθηκε η μέθοδος Student t-test για να καθοριστεί η στατιστική σημαντικότητα και οι πιθανότητες (p-values) υποδεικνύονται στις εικόνες, όπου (*) : $p < 0.05$, (**) : $p < 0.01$ και (***) : $p < 0.001$.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ miRNAs ΤΩΝ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΡΙΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΗΓΩΝ

3.1 Περίληψη

Τα microRNAs (miRNAs) έχει να δειχθεί να δρουν ως ρυθμιστικά μόρια για τη διατήρηση της βλαστικότητας και να καθορίζουν την διαφοροποίηση των ενήλικων και εμβρυικών βλαστικών κυττάρων. Τα ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) είναι ένας πληθυσμός βλαστικών κυττάρων που χαρακτηρίζονται από υψηλή πολλαπλασιαστική ικανότητα καθώς και από την ικανότητα τους να διαφοροποιούνται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους [102]. Η ερευνητική μας ομάδα έχει απομονώσει δύο υποπληθυσμούς των εμβρυικών MSCs από το αμνιακό υγρό (AF) που ονομάστηκαν SS-AF-MSCs και RS-AF-MSCs και χαρακτηρίστηκαν ως προς το φαινότυπο, το ρυθμό πολλαπλασιασμού και την ικανότητα διαφοροποίησης τους. Στη παρούσα διδακτορική διατριβή, αναλύθηκε το πρότυπο έκφρασης των miRNAs των MSCs που προέρχονται από το AF, τον μυελό των οστών (BM) και το ομφαλοπλακουντιακό αίμα (UCB). Αρχικά, αναγνωρίστηκαν 67 διαφορετικά εκφραζόμενα miRNAs στις τρεις πηγές MSCs και αναλύθηκαν με βάση τα επίπεδα έκφρασης τους. Ακολουθώντας μια αναλυτικότερη προσέγγιση δείξαμε ότι το miR-21 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα RS-AF-MSCs και στα BM-MSCs σε σύγκριση με τα SS-AF-MSCs. Επιπλέον, ένα από τα προβλεπόμενα γονίδια-στόχους του miR-21 είναι ο δείκτης βλαστικότητας Sox2 (SRY- sex determination SRY region Y-box2), ο οποίος εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα SS-AF-MSCs σε σύγκριση με τα RS-AF-MSCs [102].

3.2 Εισαγωγή

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) αποτελούν ένα πληθυσμό προγονικών κυττάρων με δυνατότητα διαφοροποίησης σε επιμέρους ιστούς της μεσεγχυματικής σειράς και με ικανότητα in vivo αποκατάστασης του ομόλογου ιστού [111]. Οι κύριες

πηγές MSCs είναι ο μυελός των οστών (BM) [43, 50], το αίμα ομφαλίου λώρου (UCB) [67, 222] και το αμνιακό υγρό (AF) [89, 101-103, 109, 111, 115]. Από την ερευνητική μας ομάδα έχει πραγματοποιηθεί α) απομόνωση μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων του αμνιακού υγρού (AF-MSCs), β) φαινοτυπικός χαρακτηρισμός, γ) πιστοποίηση του υψηλού ρυθμού πολλαπλασιασμού τους, δ) εκτίμηση του φάσματος διαφοροποίησής τους και ε) ανάλυση του πρωτεωμικού τους προτύπου [103]. Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε ότι στις αρχικές καλλιέργειες των AF-MSCs σταδίου έκπτυξης 0-1 δημιουργήθηκαν αποικίες προσκολλημένων κυττάρων από δύο μορφολογικά διακριτούς κυτταρικούς τύπους, ατρακτοειδούς [spindle – shaped (SS)] και σφαιρικού σχήματος [round-shaped (RS)], οι οποίοι απομονώθηκαν η καθεμία ξεχωριστά μηχανικά, ώστε να επιτευχθεί η έκπτυξη μεμονωμένων αποικιών και χαρακτηρίστηκαν ως SS-AF-MSCs και RS-AF-MSCs [102]. Λεπτομερής ανάλυση των δύο αυτών υποπληθυσμών έδειξε ότι τα SS-AF-MSCs εκφράζουν τον αντιγονικό δείκτη Thy-1 (CD90) σε μεγαλύτερο ποσοστό, παρουσιάζουν υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού και ευρύτερο φάσμα διαφοροποίησης σε σχέση με τα RS-AF-MSCs [102]. Επιπλέον, τα SS-AF-MSCs εκφράζουν αυξημένα επίπεδα ιντεγκρινών (CD29, CD49e κ.α.) και μορίων προσκόλλησης (CD44 κ.α.), γεγονός που μπορεί να δικαιολογεί την σημαντικά αυξημένη μεταναστευτική ικανότητα που παρουσιάζουν *in vitro* προς εξωκυττάρια ουσίες, όπως ινονεκτίνη (fibronectin) και η λαμινίνη (laminin), σε σχέση με τα RS-AF-MSCs. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η μελέτη της μετά-μεταγραφικής ρύθμισης και των τριών πληθυσμών MSCs σε επίπεδο προτύπου έκφρασης των microRNAs (miRNAs). Τα miRNAs είναι μονόκλιωνα μόρια RNA, μήκους 20-23 nt, που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση, αλληλεπιδρώντας με ειδικές θέσεις της 3' αμετάφραστης περιοχής (3' UTR) του mRNA συγκεκριμένων γονιδίων [143]. Τα miRNAs έχουν κυρίως αρνητική ρυθμιστική δράση στην γονιδιακή έκφραση χρησιμοποιώντας διάφορους μηχανισμούς, προκαλώντας είτε αποικοδόμηση των μεταγράφων, είτε καταστολή της μετάφρασης [145, 197].

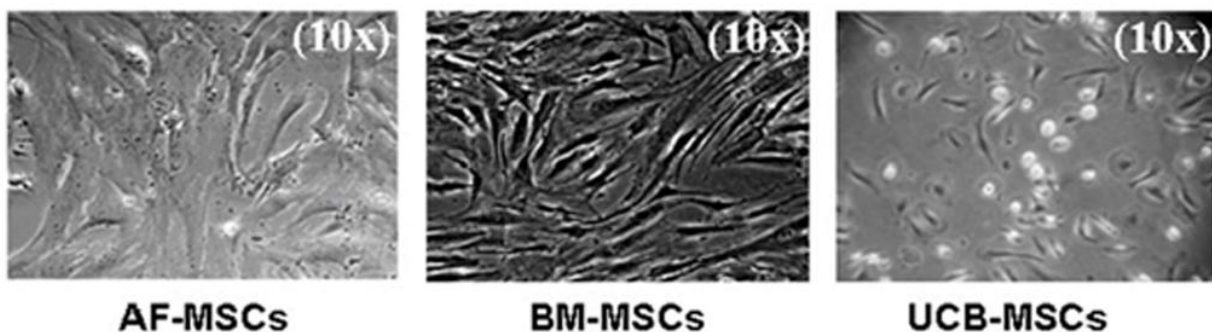
Στο Κεφάλαιο 3 περιγράφεται α) η ανίχνευση των miRNAs που εκφράζονται σε AF-, BM- και UCB-MSCs με τη χρήση miRNAs μικροσυστοιχιών, β) η επαλήθευση των επιπέδων έκφρασης των miRNAs με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πραγματικού χρόνου, γ) η σύγκριση του προτύπου έκφρασης των miRNAs AF-MSCs με το

αντίστοιχο των BM- και UCB-MSCs, δ) η σύγκριση των miRNAs που εκφράζονται στους υποπληθυσμούς των AF-MSCs και ε) η *in silico* ανίχνευση γονιδίων – στόχων στα AF-MSCs.

3.3 Αποτελέσματα

3.3.1 Χαρακτηρισμός AF-, BM- και UCB-MSCs

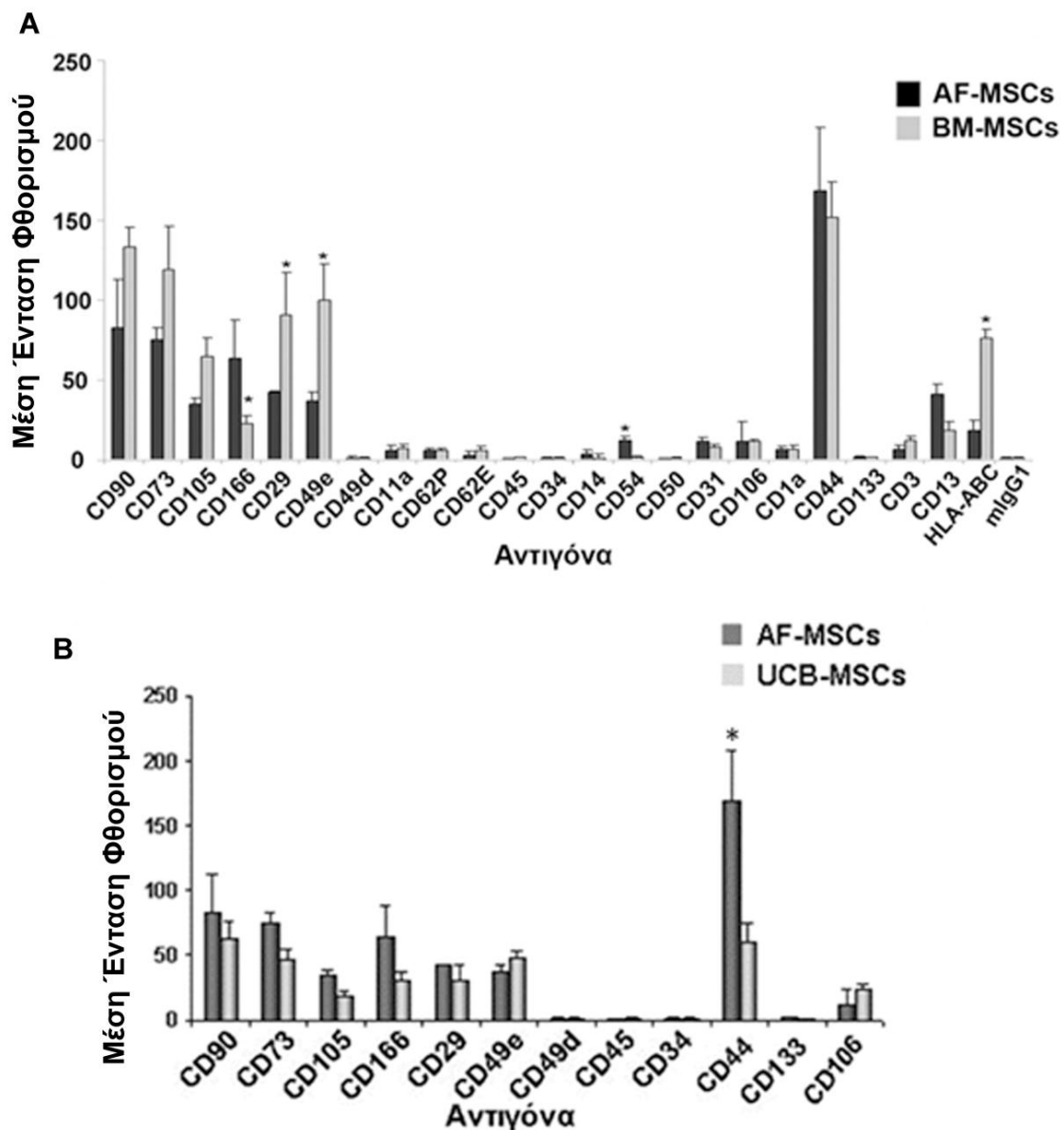
Αρχικά, απομονώθηκαν AF-, BM- και UCB-MSCs και καλλιεργήθηκαν με βάση τα πρωτόκολλα καλλιέργειας που αναφέρθηκαν. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τα AF-MSCs, απομονώθηκαν από 80 δείγματα αμνιακού υγρού (από σύνολο 118 δειγμάτων) [103]. Η συχνότητα των AF-MSCs στα δείγματα αμνιακού υγρού υπολογίστηκε περίπου από 0,9% έως 1,5% με κατάλληλη χρώση των κυττάρων και κυτταρομετρία ροής, που έγινε από την ερευνητική μας ομάδα, ενώ ο αριθμός των AF-MSCs που απομονώθηκε από την αρχική καλλιέργεια (στάδιο έκπτυξης 1) κάθε δείγματος ήταν περίπου $5 \times 10^4 - 10^5$ [103]. Τα υπόλοιπα δείγματα δεν έδωσαν κυτταρικές αποικίες ή τα κύτταρα δεν μπόρεσαν να εκπτυχθούν μετά τη δεύτερη ή τρίτη ανακαλλιέργεια. Τα AF-MSCs παρουσιάζαν ινοβλαστική μορφολογία και είναι παρόμοια με τα BM-MSCs και τα UCB-MSCs (Εικόνα 3.1) [103].



Εικόνα 3.1: Φωτογραφία φωτονικής μικροσκοπίας που απεικονίζει τη μορφολογία των AF-MSCs, BM-MSCs και UCB-MSCs στην καλλιέργεια.

Πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη της έκφρασης των μεσεγχυματικών δεικτών μεταξύ AF-MSCs με BM- και UCB-MSCs. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα MSCs και των τριών πηγών έχουν παρόμοιο πρότυπο έκφρασης μετά από ανάλυση με

κυτταρομετρία ροής με τη χρήση όμοιων αντισωμάτων, συγκεκριμένα για τους μεσεγχυματικούς δείκτες CD90 (Thy-1), το CD73 (SH3, SH4), το CD105 (ενδογλίνη) και το CD166 (SB10/ALCAM) και αρνητικά για αιμοποιητικούς και ενδοθηλιακούς δείκτες, όπως το CD45 (κοινό αντιγόνο λευκοκυττάρων), το CD34 και το CD133 (προμινίνη 1) (Εικόνα 3.2) [89, 103].



Εικόνα 3.2: Συγκριτική μελέτη του προτύπου έκφρασης επιφανειακών δεικτών μεταξύ των (A) AF-MSCs με BM-MSCs και των (B) AF-MSCs με UCB-MSCs.

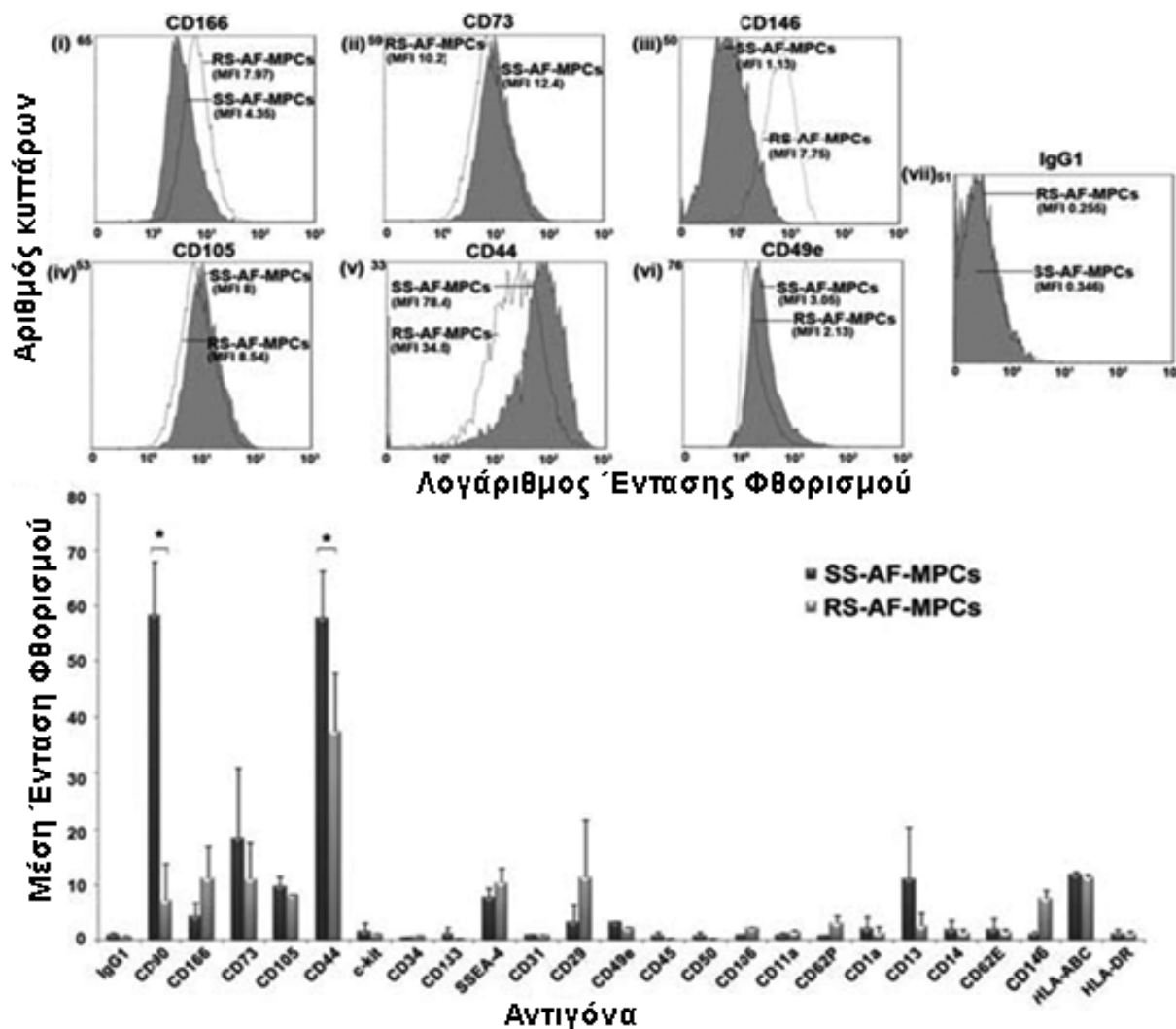
Εντούτοις παρουσιάστηκαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης για τους δείκτες CD29 (β 1-ιντεγκρίνη) και CD49e (α 4-ιντεγκρίνη) στα BM-MSCs σε σχέση με τα AF-MSCs, καθώς και αυξημένη έκφραση του μορίου προσκόλλησης CD44 (HCAM-1) στα AF-MSCs σε σχέση με τα UCB-MSCs [89, 103] (Εικόνα 3.2). Επιπρόσθετα, τα BM-MSCs παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης για το αντιγόνο ιστοσυμβατότητας HLA-ABC σε σχέση με τα AF-MSCs [103].

Παράλληλα από την ερευνητική μας ομάδα έχει πραγματοποιηθεί η επιβεβαίωση της έκφρασης των εμβρυϊκών δεικτών Oct-4, Nanog και SSEA-4 (Stage-specific embryonic antigen-4) από τα AF-MSCs. Οι δείκτες πολυδυναμικότητας αυτοί διαπιστώθηκε ότι εκφράζονται σε μεγαλύτερα επίπεδα σε σχέση με τα BM-MSCs, γεγονός που σχετίζεται με την εμβρυϊκή προέλευση των AF-MSCs. Επιπλέον οι δείκτες αυτοί δεν εκφράζονται από τα κύτταρα του αμνιακού υγρού πριν αυτά τεθούν σε καλλιέργεια, επιβεβαιώνοντας ότι το αμνιακό υγρό αποτελεί μία πηγή πλούσια σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα [103].

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο μοριακός χαρακτηρισμός των AF-MSCs και BM-MSCs σε πρωτεωμικό επίπεδο. Χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση δυο διαστάσεων (2D-gel electrophoresis) και φασματοσκοπία μάζας [(MALDI-TOF) MS] κατασκευάστηκε για πρώτη φορά ο πρωτεωμικός χάρτης των AF-MSCs, ανιχνεύοντας 261 διαφορετικές πρωτεΐνες [103]. Ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία, κατασκευάστηκε ο πρωτεωμικός χάρτης για τα MSCs του μυελού των οστών ανιχνεύοντας έτσι 170 διαφορετικές πρωτεΐνες. Συνοπτικά, ανιχνεύθηκαν 140 πρωτεΐνες στα AF-MSCs, σχετιζόμενες με την κυτταρική αύξηση, τον πρωτεϊνικό μεταβολισμό, την απόπτωση, την μεταγωγή σημάτων, την μεταγραφή και την κυτταρική επικοινωνία, οι οποίες ήταν απύσες από τα BM-MSCs [103].

Παρατηρήθηκε η ύπαρξη διακριτών υποπληθυσμών στις αρχικές καλλιέργειες σταδίου έκπτυξης 0-1 των AF-MSCs. Μετά από μικροσκοπική ανάλυση αναγνωρίστηκαν δύο μορφολογικά διαφορετικοί τύποι AF-MSCs, σχήματος ατρακτοειδούς [spindle-shaped (SS)] ή σφαιρικού [round-shaped (RS)], οι οποίοι ονομάστηκαν SS-AF-MSCs και RS-AF-MSCs, αντιστοίχως [89, 102]. Συγκεκριμένα, σε στάδιο έκπτυξης 2-3 στο 94% των δειγμάτων τα RS-AF-MSCs αποτελούσαν τον κυρίαρχο υποπληθυσμό της καλλιέργειας [102]. Από την άλλη πλευρά, στο υπόλοιπο

6% των δειγμάτων ο κυρίαρχος υποπληθυσμός ήταν τα SS-AF-MSCs [102]. Ακολούθησε μηχανική απομόνωση πέντε κυτταρικών σειρών SS-AF-MSCs (6% από τα αρχικά δείγματα) και το υπόλοιπο 94% των αρχικών δειγμάτων αποτελούν τα RS-AF-MSCs. Ακολούθησε φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των δύο κυτταρικών τύπων με κυτταρομετρία ροής. Και οι δύο υποπληθυσμοί ήταν αρνητικοί για τους δείκτες επιφανείας CD34, CD133, CD31, CD45, CD14 και HLA-DR, ενώ ήταν θετικοί για την έκφραση των δεικτών των μεσεγχυματικών κυττάρων CD73, CD105 και CD166, για τα μόρια προσκόλλησης CD29, CD44, CD49e και τον δείκτη HLA-ABC [102] (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3: Συγκριτική μελέτη του προτύπου έκφρασης επιφανειακών δεικτών (i) CD166, (ii) CD73, (iii) CD146, (iv) CD105, (v) CD44, (vi) CD49e και (vii) IgG1 (αρνητικός μάρτυρας) μεταξύ των SS-AF-MSCs και RS-AF-MSCs.

Παρατηρήθηκε ότι το CD90 και το μόριο προσκόλλησης CD44 εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα στα SS-AF-MSCs σε σχέση με τα RS-AF-MSCs [102]. Αναλυτικότερα, η αυξημένη έκφραση του μορίου προσκόλλησης CD44 στα SS-AF-MSCs που μπορεί να δικαιολογήσει τη σημαντικά αυξημένη μεταναστευτική ικανότητα που παρουσιάζουν *in vitro* προς εξωκυττάρια ουσίες τα κύτταρα αυτά σε σχέση με τα RS-AF-MSCs.

Επίσης, έχει πραγματοποιηθεί μελέτη της μοριακής ταυτότητας των δύο αυτών υποπληθυσμών με συστηματική ανάλυση του πρωτεωμικού τους προτύπου. Χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση δυο διαστάσεων (2D-gel electrophoresis) και φασματομετρία μάζας [(MALDI-TOF) MS], ανιχνεύθηκαν 25 πρωτεΐνες με διαφορετικό επίπεδο έκφρασης στους δύο υποπληθυσμούς και 10 πρωτεΐνες μοναδικές στα RS-AF-MSCs [102].

3.3.2 Πρότυπο έκφρασης miRNAs των AF-, BM- και UCB-MSCs με τη χρήση miRNAs μικροσυστοιχιών

Για τη μελέτη του πρότυπου έκφρασης miRNAs των AF-, BM- και τα UCB-MSCs, απομονώθηκε ολικό RNA σύμφωνα με την μεθοδολογία που αναφέρεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.4. Αναλυτικά στοιχεία των δειγμάτων αυτών αναφέρονται στον Πίνακα 2.1, στην παράγραφο 2.5. Για την πραγματοποίηση των miRNAs μικροσυστοιχιών επιτεύχθηκε συνεργασία με την εταιρία Exiqon και χρησιμοποιήθηκε το miRCURY™ LNA Array v.8.1, το οποίο περιέχει ανιχνευτές που αντιστοιχούν σε αλληλουχίες miRNAs ανθρώπου, ποντικού και αρουραίου από την βάση δεδομένων miRBase 7.1. Αναλυτικότερα, η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών παρέχει ποσοτικές και ποιοτικές πληροφορίες για χιλιάδες γονίδια ταυτόχρονα. Η τεχνική αυτή εκμεταλλεύεται την αρχή της συμπληρωματικότητας υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και τη χρήση φθορίζουσων ουσιών.

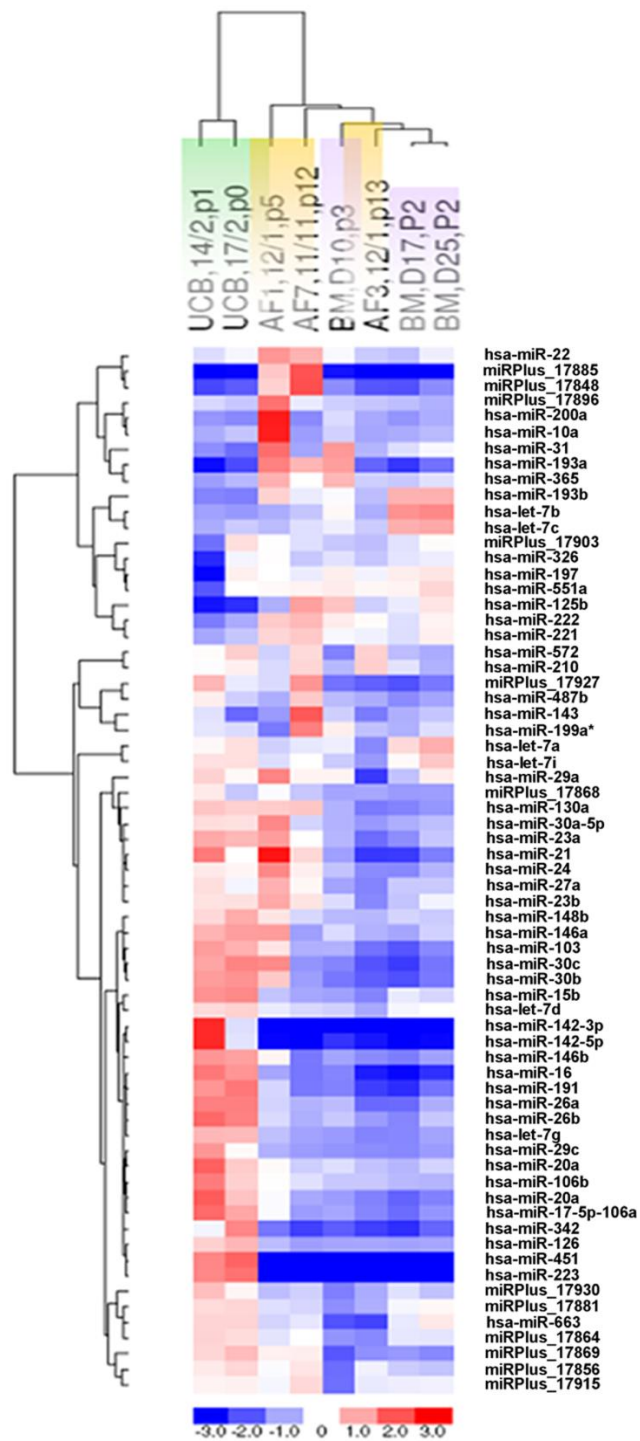
Χρησιμοποιήθηκαν τα RNA δείγματα από τα AF-, UCB- και τα BM-MSCs και η υβριδοποίηση στο miRCURY™ LNA Array v.8.1 πραγματοποιήθηκε για καθέ ένα από τα δείγματα ξεχωριστά ως προς το σύνολο όλων των δειγμάτων. Αναλυτικότερα, το σύνολο όλων των δειγμάτων σημάνθηκε με τη χρωστική Hy5™ και το κάθε

δείγμα ξεχωριστά με την χρωστική Hy3TM με το miRCURYTM σύστημα σήμανσης αντιδραστηρίων. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν οι υβριδισμοί στο miRCURYTM LNA Array v.8.1 και η πλάκα πέρασαν από ειδικό ανιχνευτή (scanner).

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση της εικόνας ώστε να επιτευχθεί ποσοτικοποίηση και κανονικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο global Lowess (Locally Weighted Scatterplot Smoothing). Τα συνολικά αποτελέσματα παρουσιάζονται με τη μορφή Heat Map διαγράμματος στο οποίο εμφανίζεται και ομαδοποίηση των miRNAs καθώς και ομαδοποίηση των δειγμάτων (Hierarchical Clustering) (Εικόνα 3.4). Η ομαδοποίηση έγινε με βάση το $\log_2(\text{Hy3}/\text{Hy5})$ με τυπική απόκλιση > 0.50 .

Στο Heat Map διάγραμμα (Εικόνα 3.4), κάθε σειρά παρουσιάζει ένα miRNA και κάθε στήλη ένα από τα δείγματα. Η ομαδοποίηση των miRNAs φαίνεται με δενδρόγραμμα στα αριστερά της εικόνας, ενώ το δενδροδιάγραμμα των δειγμάτων εμφανίζεται στην κορυφή. Η κλίμακα των χρωμάτων φαίνεται στο κάτω μέρος και δείχνει το επίπεδο έκφρασης για καθένα από τα miRNA σε κάθε δείγμα. Αναλυτικότερα, το κόκκινο χρώμα δείχνει ότι το συγκεκριμένο miRNA στο συγκεκριμένο δείγμα παρουσιάζει επίπεδα έκφρασης υψηλότερα από το μέσο όρο του συνόλου των δειγμάτων και το μπλε χρώμα δείχνει χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης από το μέσο όρο του συνόλου των δειγμάτων.

Αναλυτικότερα, 67 miRNAs βρέθηκαν να παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης στις τρεις πηγές MSCs, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.1, όπου παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη αναλογία Hy3/Hy5 από όλους τους υβριδισμούς που πραγματοποιήθηκαν. Το p-value υπολογίστηκε με Student's t-test, καθώς και με τη μέθοδο πολλαπλής ανάλυσης Benjamini and Hochberg.



Εικόνα 3.4: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων του miRCURY™ LNA Array v.8.1 με heat map γράφημα..

Πίνακας 3.1: Τα διαφορετικά εκφραζόμενα miRNAs στις τρεις πηγές MSCs με τις τιμές της αναλογίας Hy3/Hy5

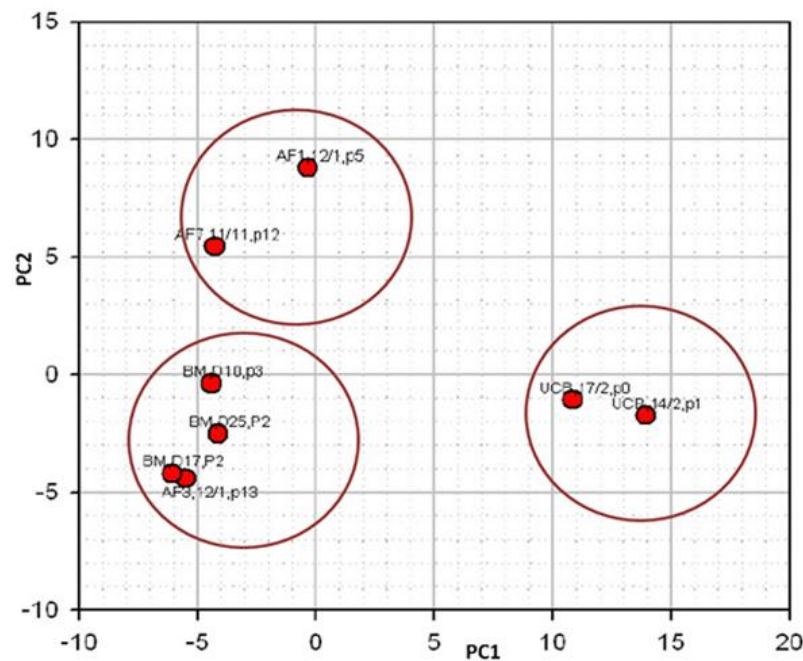
Genelid	Annotation	LogMedianRatios log ₂ (Hy3/Hy5)								
		AF-MSCs			UCB-MSCs		BM-MSCs			SDV
		RS	SS	RS	Slide 4	Slide 5	Slide 6	Slide 7	Slide 8	
11248	hsa-miR-451	-4,94	-4,50	-4,42	1,42	1,84	-4,78	-4,28	-4,32	2,87
10947	hsa-miR-142-3p	-5,36	-4,82	-4,44	2,51	-0,38	-5,09	-4,28	-4,27	2,81
11024	hsa-miR-223	-4,99	-4,47	-4,47	1,40	1,64	-4,81	-4,03	-3,63	2,78
17885	miRPlus_17885*	2,03	-4,41	0,65	-4,24	-2,93	-4,01	-4,01	-2,76	2,45
19015	hsa-miR-142-5p	-3,07	-2,71	-2,92	2,50	-0,33	-3,01	-2,89	-2,37	1,98
5740	hsa-miR-21	0,46	-2,33	2,74	1,54	0,01	-2,30	-1,51	-1,12	1,83
10986	hsa-miR-193a	0,86	-1,81	1,48	-2,85	-2,10	-2,34	-1,64	1,14	1,76
10967	hsa-miR-16	-1,60	-2,65	-1,04	1,58	1,25	-2,90	-2,42	-1,44	1,71
17502	hsa-miR-30c	-1,26	-2,02	1,37	1,06	1,44	-2,28	-1,62	-1,43	1,59
10985	hsa-miR-191	-1,58	-2,26	-0,50	1,25	1,59	-2,47	-1,63	-1,47	1,54
17848	miRPlus_17848*	2,06	-1,99	0,55	-2,16	-1,92	-2,03	-1,35	-1,34	1,52
17565	hsa-miR-30b	-1,14	-1,89	0,63	1,17	1,29	-2,05	-1,57	-1,59	1,42
10929	hsa-miR-125b	1,11	-0,57	-0,93	-2,75	-2,44	-0,23	0,30	0,70	1,40
11000	hsa-miR-200a	-1,36	-1,02	2,66	-1,22	-1,38	-1,24	-0,97	-0,42	1,36
11069	hsa-miR-342	-2,23	-2,24	-1,60	-0,13	1,41	-2,43	-1,79	-1,88	1,33
11008	hsa-miR-20a	-1,01	-1,47	-0,04	1,91	0,71	-1,83	-1,47	-1,15	1,30
11030	hsa-miR-26a	-0,90	-1,76	-0,52	1,49	1,50	-1,74	-0,95	-0,79	1,29
17605	hsa-miR-17-5p-106a	-1,17	-1,43	-0,06	1,76	1,04	-1,73	-1,24	-1,05	1,27
17927	miRPlus_17927*	1,23	-1,86	-0,43	0,85	-0,25	-2,03	-1,57	-1,64	1,26
13485	hsa-miR-10a	-1,15	-1,04	2,63	-0,97	-0,69	-0,98	-0,81	-0,54	1,26
11052	hsa-miR-31	-1,04	-0,87	1,70	-1,33	-1,71	-0,40	-0,09	1,20	1,21
11031	hsa-miR-26b	-0,95	-1,17	-0,44	1,76	1,47	-1,43	-0,66	-0,65	1,20
10919	hsa-miR-103	-0,93	-1,64	0,32	1,16	0,93	-1,97	-1,39	-0,90	1,20
10306	hsa-miR-146b	-1,58	-1,36	0,14	1,25	1,10	-1,51	-1,12	-1,08	1,18
13177	hsa-miR-143	1,94	-1,53	-1,19	-0,34	-1,76	-0,95	-0,68	-0,56	1,15
11026	hsa-miR-23a	0,02	-1,72	1,15	1,02	0,84	-1,33	-0,66	-0,86	1,11
11039	hsa-miR-29a	0,14	-2,31	1,44	0,53	0,08	-0,72	0,23	0,14	1,09
10992	hsa-miR-197	-0,22	-0,15	-0,01	-2,93	0,19	0,21	0,29	0,20	1,08
17280	hsa-miR-15b	-1,04	-1,45	-0,70	1,27	1,38	-0,25	-0,49	-1,12	1,07
17749	hsa-let-7b	-0,67	-0,95	-0,96	-1,10	-1,21	1,27	1,39	0,10	1,06
17558	hsa-miR-663	-0,28	-2,18	-0,51	0,50	0,51	-0,26	0,26	-2,03	1,06
17869	miRPlus_17869*	0,20	-1,30	0,18	0,48	0,79	-1,20	-1,39	-1,97	1,05
10935	hsa-miR-130a	0,67	-1,54	0,61	0,68	0,54	-1,44	-1,23	-0,91	1,04
10952	hsa-miR-146a	-1,12	-0,91	1,15	0,88	1,15	-1,04	-0,54	-0,43	1,00
10987	hsa-miR-193b	-0,22	-0,76	0,53	-1,44	-1,51	0,91	0,91	-0,05	0,97
17506	hsa-miR-24	0,20	-1,37	1,40	0,26	0,12	-1,40	-0,88	-0,70	0,96
19602	hsa-let-7g	-1,08	-1,45	-0,74	0,85	0,80	-1,42	-1,07	-1,17	0,94
11041	hsa-miR-29c	-1,16	-1,34	-0,91	1,24	0,06	-1,41	-1,16	-1,26	0,93

Πίνακας 3.1: Τα διαφορετικά εκφραζόμενα miRNAs στις τρεις πηγές MSCs με τις τιμές της αναλογίας Hy3/Hy5

Genelid	Annotation	LogMedianRatios log ₂ (Hy3/Hy5)									SDV
		AF-MSCs			UCB-MSCs		BM-MSCs				
		RS	SS	RS	Slide 4	Slide 5	Slide 6	Slide 7	Slide 8		
10999	hsa-miR-20a	-0,58	-0,72	0,06	1,86	0,61	-0,86	-0,52	-0,39	0,91	
11048	hsa-miR-30a-5p	-0,50	-1,21	1,40	0,40	0,36	-0,95	-0,76	-0,90	0,90	
10995	hsa-miR-199a*	1,49	-0,72	-1,57	-0,30	-0,43	-0,92	-0,39	0,21	0,90	
19582	hsa-miR-106b	-0,35	-0,65	0,02	1,53	0,55	-0,82	-0,88	-0,65	0,83	
17896	miRPlus_17896*	-0,24	-0,67	1,64	-0,47	-0,66	-0,77	-0,93	-0,58	0,82	
4610	hsa-miR-126	-1,14	-1,05	-0,79	0,56	0,86	-1,11	-1,05	-1,05	0,82	
11059	hsa-miR-326	-0,64	-0,65	0,03	-2,51	-0,13	-0,31	-0,21	-0,34	0,81	
11023	hsa-miR-222	0,83	0,05	0,61	-1,51	-0,99	-0,38	0,15	0,22	0,79	
19593	hsa-miR-27a	0,10	-1,45	0,91	0,39	-0,13	-0,64	-0,62	-1,06	0,78	
17551	hsa-miR-572	0,43	0,54	-0,54	0,05	0,57	-0,77	-0,98	-1,47	0,78	
17272	hsa-miR-551a	0,15	0,10	0,08	-1,98	0,00	0,14	0,48	0,24	0,77	
19004	hsa-let-7c	-0,37	-0,61	-0,78	-0,98	-0,61	0,94	1,01	-0,20	0,76	
11078	hsa-miR-365	-0,01	-0,56	0,91	-1,14	-0,83	-0,65	-0,36	0,84	0,76	
11027	hsa-miR-23b	0,32	-1,39	1,01	0,34	0,36	-0,69	-0,16	-0,41	0,75	
17856	miRPlus_17856*	0,31	-0,18	-0,05	0,25	0,46	-0,60	-0,70	-1,71	0,71	
17748	hsa-let-7a	-0,27	-1,39	-0,55	0,10	0,38	0,45	0,94	-0,20	0,71	
11020	hsa-miR-22	0,90	-0,61	1,22	-0,40	-0,11	-0,75	-0,19	-0,08	0,70	
17864	miRPlus_17864*	0,01	-1,40	-0,32	0,52	0,41	-0,28	-0,30	-1,26	0,70	
17930	miRPlus_17930*	-0,55	-0,98	-0,76	0,76	0,13	-0,37	-0,72	-1,51	0,69	
14285	hsa-miR-487b	0,63	-0,98	-0,95	0,19	-0,56	-1,35	-1,06	-0,81	0,68	
19585	hsa-miR-148b	-0,46	-0,85	0,31	0,45	0,96	-0,51	-0,61	-0,82	0,67	
17915	miRPlus_17915*	0,44	-0,25	-0,10	0,14	0,17	-0,21	-0,18	-1,69	0,64	
17881	miRPlus_17881*	-0,48	-0,94	-0,37	0,42	0,48	-0,11	0,10	-1,33	0,64	
17903	miRPlus_17903*	-0,37	-0,76	0,02	-1,68	0,39	-0,34	0,04	-0,65	0,63	
19580	hsa-let-7i	0,00	-1,20	-0,39	0,35	0,37	0,08	0,66	-0,60	0,61	
11022	hsa-miR-221	0,64	-0,17	0,48	-1,04	-0,67	-0,39	0,18	-0,10	0,57	
13511	hsa-miR-210	0,48	0,56	-0,44	-0,03	0,18	-0,33	-0,91	-0,84	0,56	
17868	miRPlus_17868*	-0,64	-1,03	-0,05	0,26	-0,65	-1,19	-1,14	-1,06	0,54	
17750	hsa-let-7d	-0,47	-1,02	-0,23	0,44	0,54	-0,11	-0,01	-0,55	0,51	

* Οι miRPlus αλληλουχίες δεν έχουν ακόμα καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων miRBase

Επιπρόσθετα, με βάση τα αποτελέσματα δημιουργήθηκε ένα PCA (Principal Component Analysis) γράφημα όπου παρουσιάζεται ο βαθμός διαφορετικότητας των βιολογικών δειγμάτων (Εικόνα 3.5). Όπως και για το Heat Map έτσι και το PCA γράφημα υπολογίστηκε με βάση το $\log_2(\text{Hy3}/\text{Hy5})$ με τυπική απόκλιση >0.50 . Παρατηρούμε στο PCA γράφημα ότι όντως τα δείγματα ομαδοποιούνται με βάση την πηγή προέλευσης τους, με εξαίρεση το AF3 12/1 p13 που φαίνεται να πλησιάζει αρκετά τα BM- δείγματα.

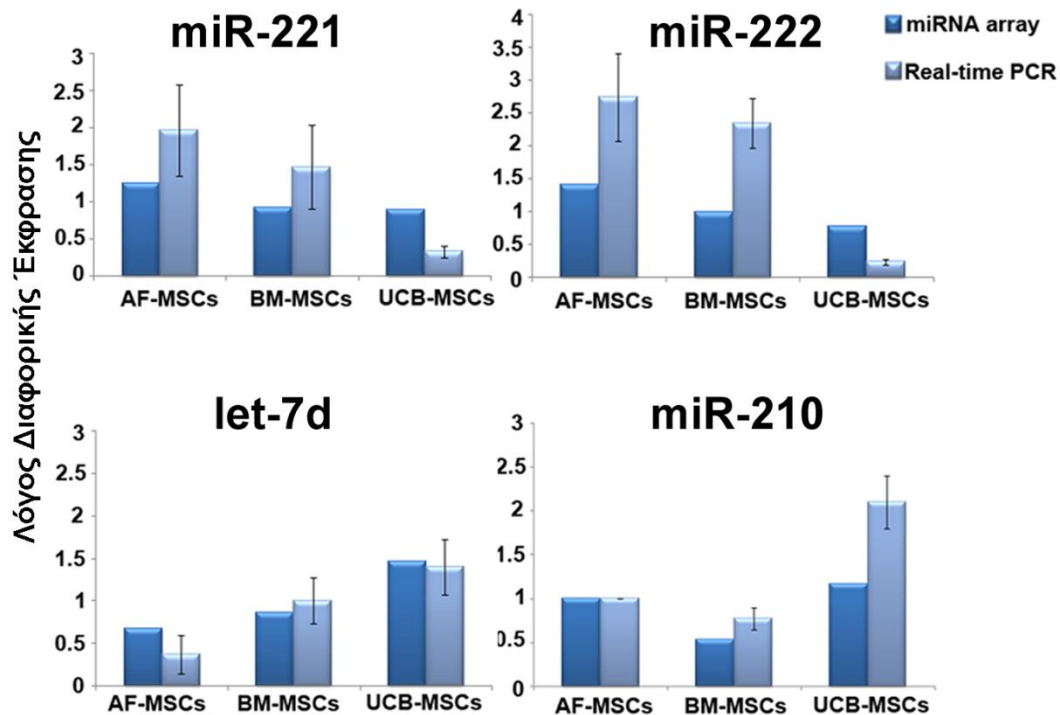


Εικόνα 3.5: Principal Component Analysis γράφημα όπου παρουσιάζεται ο βαθμός διαφορετικότητας των βιολογικών δειγμάτων.

3.3.3 Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των miRNA μικροσυτοιχιών με αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των miRNA μικροσυτοιχιών πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time PCR) για επιλεγμένα miRNAs που ανιχνεύθηκαν, όπως το hsa-miR-221, το hsa-miR-222, το hsa-let-7d και το hsa-miR-210. Αρχικά, συντέθηκε cDNA με το ειδικούς εκκινητές για τα παραπάνω miRNAs καθώς και για το μάρτυρα RNU44, τα οποία στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Η

κανονικοποίηση κάθε αποτελέσματος έγινε αρχικά με βάση τα επίπεδα έκφρασης του μάρτυρα RNU44 και στη συνέχεια τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με βάση το μέσο όρο όλων των τιμών από όλα τα δείγματα. Τα τελικά αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα των miRNA μικροσυστοιχιών, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.6.

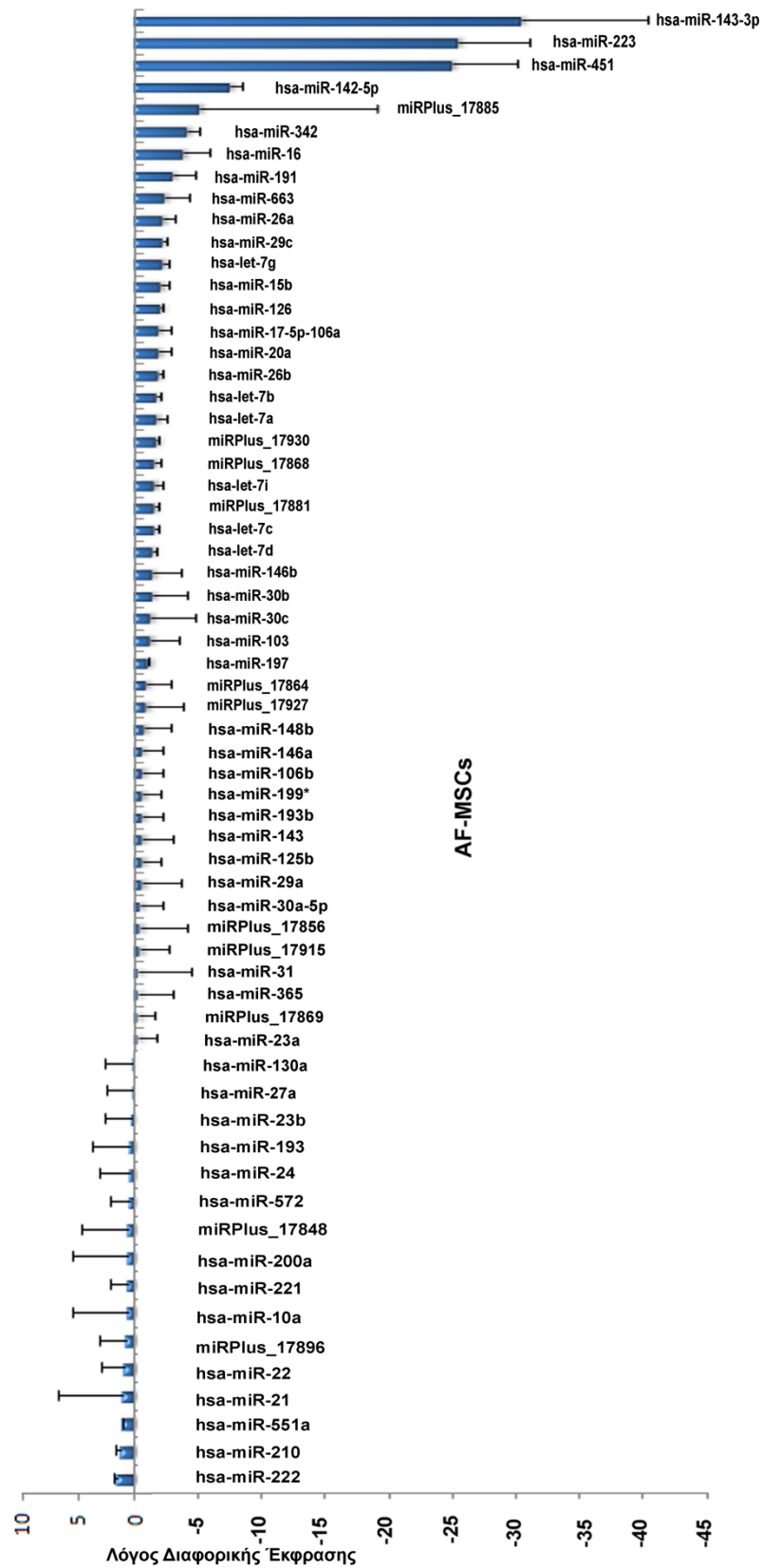


Εικόνα 3.6: Επιβεβαίωση των miRNA μικροσυστοιχιών με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για το hsa-miR-221, το hsa-miR-222, το hsa-let-7d και το hsa-miR-210.

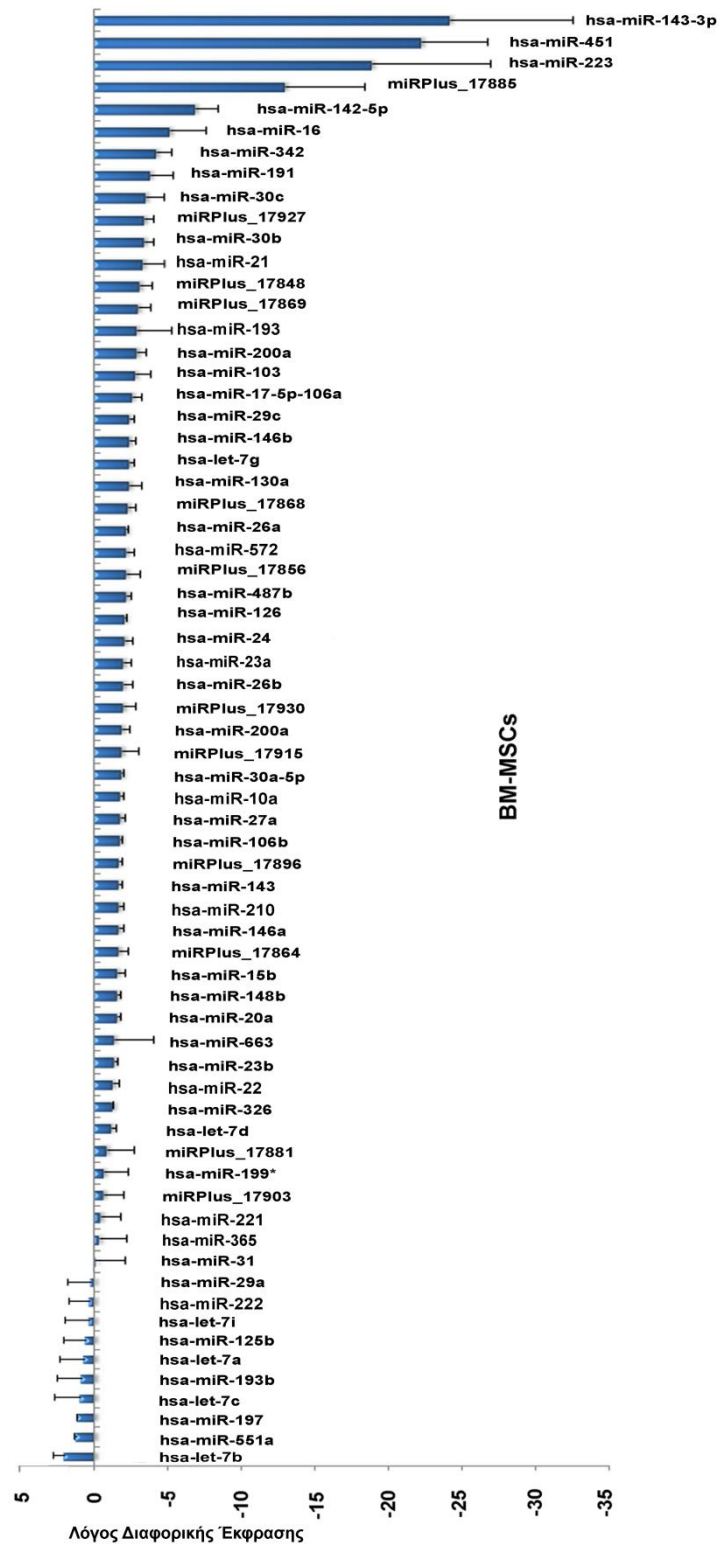
3.3.4 Σύγκριση της έκφρασης των miRNAs των AF-, BM- και UCB-MSCs

Μελετώντας αναλυτικότερα τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs που ανιχνεύθηκαν, βρέθηκαν 16 miRNAs στα AF-MSCs, 9 στα BM-MSCs και 44 στα UCB-MSCs που εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα. Ενώ 51 miRNAs στα AF-MSCs (Εικόνα 3.7), 58 στα BM-MSCs (Εικόνα 3.8), και 23 στα UCB-MSCs (Εικόνα 3.9), εκφράζονται σε χαμηλότερα επίπεδα αντίστοιχα, σε σύγκριση με το σύνολο των miRNAs που ανιχνεύθηκαν. Επιπρόσθετα, miRNAs, όπως το miR-143, το miR-487, το miR-326 και το miR-199* εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα στα MSCs και των τριών πηγών, ενώ δεν βρέθηκε κοινό miRNA με υψηλή έκφραση στα MSCs και των τριών πηγών.

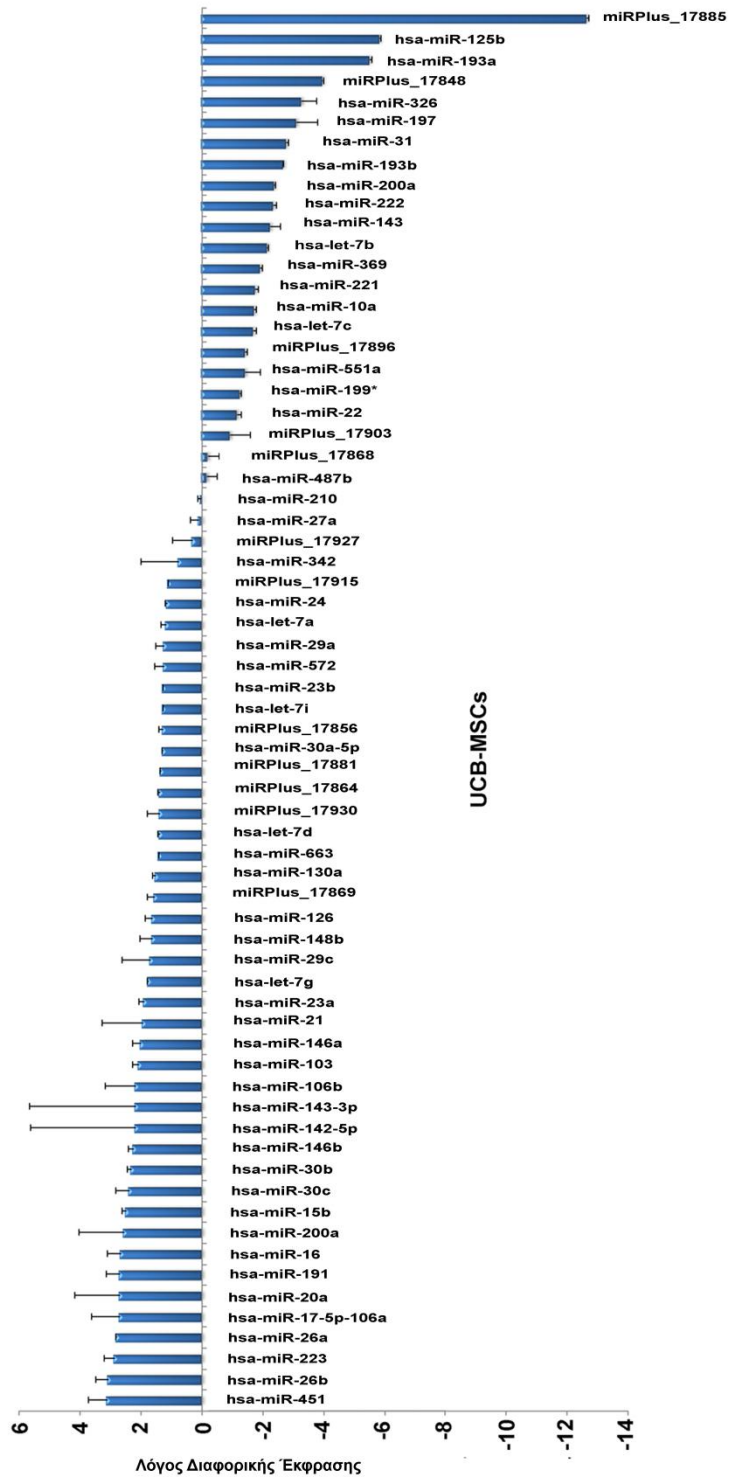
Εικόνα 3.7: Πρότυπο miRNA στα AF-MSCs.



Εικόνα 3.8: Πρότυπο miRNA στα BM-MSCs.

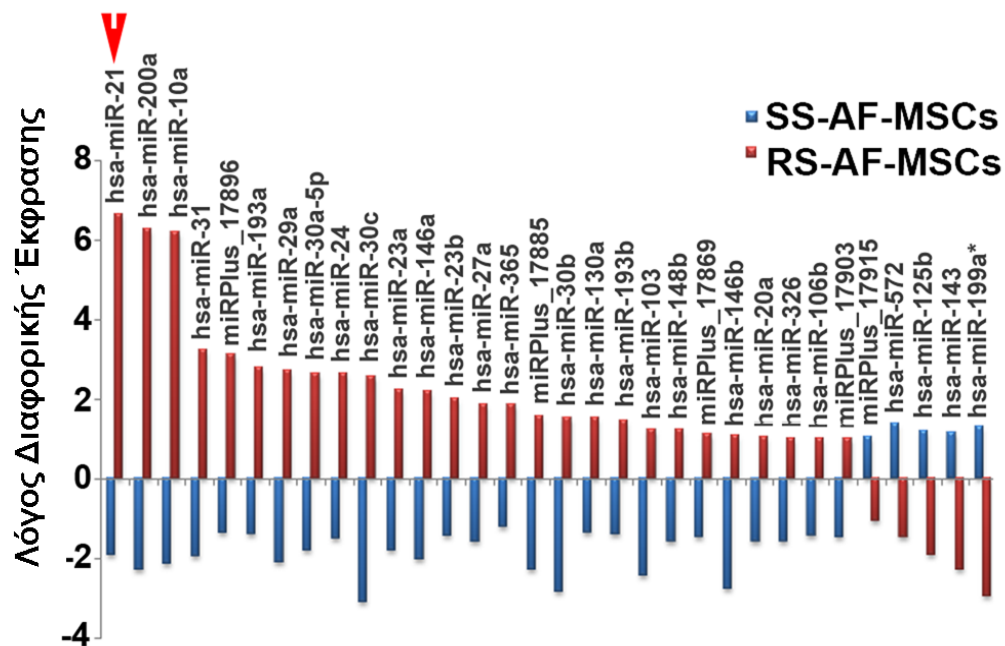


Εικόνα 3.9: Πρότυπο miRNA στα UCB-MSCs.



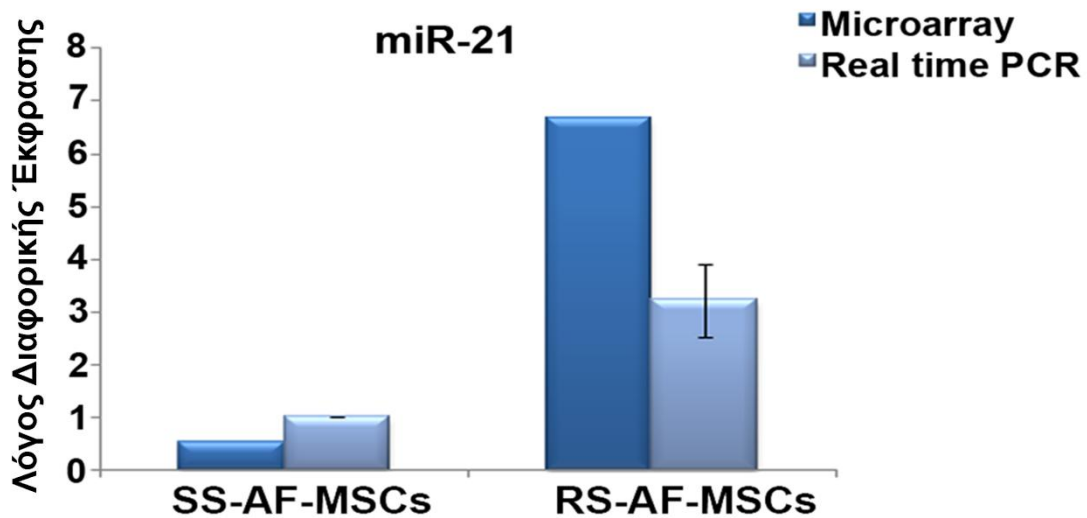
3.3.5 Σύγκριση της έκφρασης των miRNAs των υποπληθυσμών των AF-MSCs

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της έκφρασης των miRNAs στους δύο υποπληθυσμούς των AF-MSCs [ατρακτοειδούς σχήματος (SS) και τα σφαιρικού σχήματος (RS)]. Συγκεκριμένα, 32 miRNAs βρέθηκαν να παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση μεταξύ των δύο υποπληθυσμών (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10: Πρότυπο έκφρασης των miRNAs στους δύο υποπληθυσμούς των AF-MSCs.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί η υψηλή έκφραση του miR-21 (6.6 - λόγος έκφρασης) στα RS-AF-MSCs σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης του στα SS-AF-MSCs (0.52 - λόγος έκφρασης), όπως καθορίζεται από τα αποτελέσματα των miRNA μικροσυστοιχιών (Εικόνα 3.10). Για να επιβεβαιωθεί η διαφορετική έκφραση του miR-21 στους δύο υποπληθυσμούς πραγματοποιήθηκε αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.11.



Εικόνα 3.11: Λόγος διαφορικής έκφρασης του miR-21 στους δύο υποπληθυσμούς των AF-MSCs.

3.3.6 Εύρεση γονιδίων-στόχων για το miR-21

Πραγματοποιήθηκε εκτεταμένη βιοπληροφορική ανάλυση για τα προβλεπόμενα γονίδια-στόχους του miR-21 με τη χρήση του προγράμματος GomiR, το οποίο δίνει τη δυνατότητα σύγκρισης μέχρι και 5 διαφορετικών μηχανών εύρεσης γονιδίων-στόχων. Η ανάλυση με το GomiR ανέδειξε 55 προβλεπόμενα γονίδια-στόχους για το miR-21, συγκρίνοντας τις βάσεις δεδομένων miRanda, TargetScan και PicTar4way (Πίνακας 3.2). Έπειτα, με τη χρήση του προγράμματος GomiR βρέθηκε και η περιγραφή καθώς και η λειτουργία για καθένα από τα γονίδια-στόχους.

Χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων miRecords (<http://mirecords.biolead.org/>) φαίνεται ότι 42 γονίδια-στόχοι έχουν ήδη χαρακτηριστεί πειραματικά ως στόχοι του miR-21. Τα γονίδια αυτά περιλαμβάνουν το PTEN (Phosphatase and tensin homolog / ομόλογο φωσφατάσης και τενσίνης) [223], το TPM1 (Tropomyosin 1 / Τροπομυοσίνη 1) [224], το PDCD4 (Programmed cell death factor 4 / Παράγοντας προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου 4) [225], το TGFBR2 (Transforming growth factor, beta receptor II / Αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού, βήτα υποδοχέα II) [226].

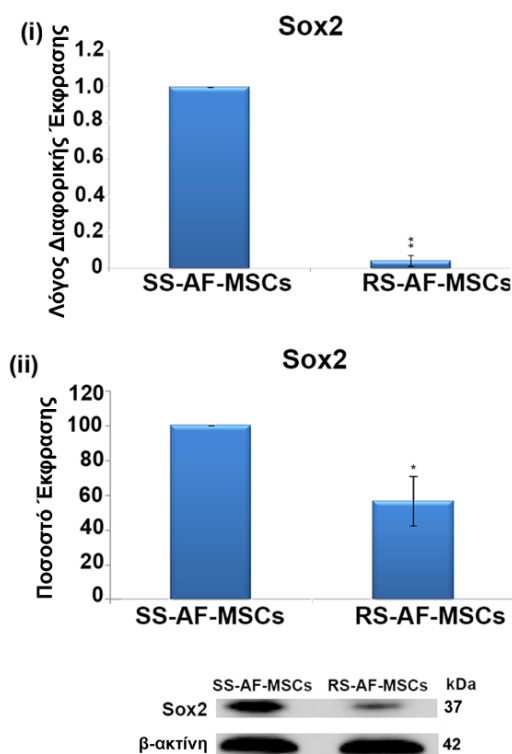
Πίνακας 3.2: Τα προβλεπόμενα γονίδια-στόχοι του miR-21 με τη χρήση του GomiR

Όνομα γονιδίου	Περιγραφή γονιδίου
ARHGAP24	RHO GTPASE ACTIVATING PROTEIN 24
BCL11A	B-CELL CLL/LYMPHOMA 11A (ZINC FINGER PROTEIN)
BNC2	BASONUCLIN 2
BOLL	BOL BOULE-LIKE (DROSOPHILA)
C17orf39	CHROMOSOME 17 OPEN READING FRAME 39
C4orf16	CHROMOSOME 4 OPEN READING FRAME 16
CCL1	CHEMOKINE (C-C MOTIF) LIGAND 1
CDC25A	CELL DIVISION CYCLE 25A
CHD7	CHROMODOMAIN HELICASE DNA BINDING PROTEIN 7
CNTFR	CILIARY NEUROTROPHIC FACTOR RECEPTOR
CPEB3	CYTOPLASMIC POLYADENYLATION ELEMENT BINDING PROTEIN 3
CREBL2	CAMP RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN-LIKE 2
FBXO11	F-BOX ONLY PROTEIN 11
GATAD2B	GATA ZINC FINGER DOMAIN CONTAINING 2B
JAG1	JAGGED 1
KBTBD6	KELCH REPEAT AND BTB (POZ) DOMAIN CONTAINING 6
KIAA1012	KIAA1012
KRIT1	KRIT1 ANKYRIN REPEAT CONTAINING
LEMD3	LEM DOMAIN CONTAINING 3
LRRC57	LEUCINE RICH REPEAT CONTAINING 57
MTMR12	MYOTUBULARIN RELATED PROTEIN 12
NFIB	NUCLEAR FACTOR I/B
NTF3	NEUROTROPHIN 3
OSR1	OXIDATIVE-STRESS RESPONSIVE 1
PAG1	PHOSPHOPROTEIN ASSOCIATED WITH GLYCOSPHINGOLIPID MICRODOMAINS 1

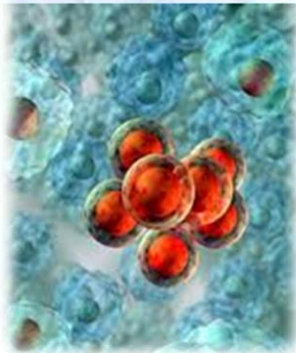
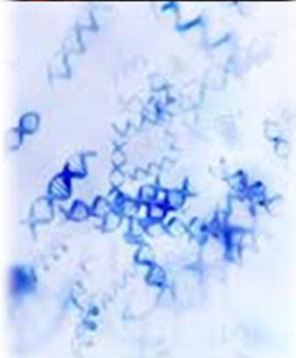
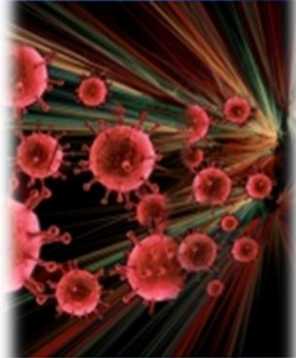
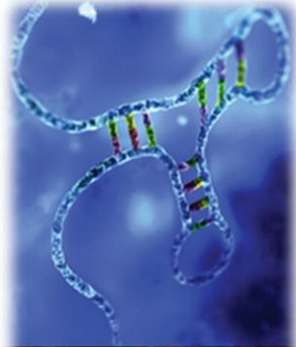
Πίνακας 3.2: Τα προβλεπόμενα γονίδια-στόχοι του miR-21 με τη χρήση του Gomit

Όνομα γονιδίου	Περιγραφή γονιδίου
PAN3	PABP1-DEPENDENT POLY A-SPECIFIC RIBONUCLEASE SUBUNIT PAN3
PCBP1	POLY(RC) BINDING PROTEIN 1
PCSK6	PROPROTEIN CONVERTASE SUBTILISIN/KEXIN TYPE 6
PDCD4	PROGRAMMED CELL DEATH 4
PELI1	PELLINO HOMOLOG 1 (DROSOPHILA)
PITX2	PAIRED-LIKE HOMEODOMAIN TRANSCRIPTION FACTOR 2
PLAG1	PLEIOMORPHIC ADENOMA GENE 1
PLEKHA1	PLECKSTRIN HOMOLOGY DOMAIN CONTAINING FAMILY A MEMBER 1
PPP3CA	CALCINEURIN
PURB	PURINE-RICH ELEMENT BINDING PROTEIN B
RAB11A	RAB11A MEMBER RAS ONCOGENE FAMILY
RECK	REVERSION-INDUCING-CYSTEINE-RICH PROTEIN WITH KAZAL MOTIFS
RHOB	RAS HOMOLOG GENE FAMILY MEMBER B
RP2	XRP2 PROTEIN
SATB1	SPECIAL AT-RICH SEQUENCE BINDING PROTEIN 1
SFRS3	SPLICING FACTOR ARGININE/SERINE-RICH 3
SKI	AVIAN SARCOMA VIRAL (V-SKI) ONCOGENE HOMOLOG NATURAL RESISTANCE-ASSOCIATED MACROPHAGE PROTEIN 1
SMAD7	MOTHERS AGAINST DECAPENTAPLEGIC HOMOLOG 7 (DROSOPHILA)
SMARCD1	SWI/SNF RELATED MATRIX ASSOCIATED ACTIN DEPENDENT REGULATOR OF CHROMATIN SUBFAMILY D MEMBER 1
SOX2	SRY-RELATED HMG-BOX 2 [SEX DETERMINING REGION Y-BOX 2] [SRY-BOX 2]
SOX5	SRY (SEX DETERMINING REGION Y)-BOX 5
SPRY2	SPROUTY (DROSOPHILA) HOMOLOG 2
STAG2	STROMAL ANTIGEN 2
TGFBI	TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA-INDUCED 68KDA
TIMP3	TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASE 3

Από τα προβλεπόμενα γονίδια-στόχους του miR-21 ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γονίδιο Sox2 (SRY- sex determination SRY region Y-box2), το οποίο είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ικανότητα αυτοανανέωσης και στη διατήρηση της βλαστικότητας των κυττάρων αυτών, συμπεριλαμβανομένων και των AF-MSCs [102, 103]. Η ερευνητική μας ομάδα έχει δείξει ότι τα SS-AF-MSCs εκφράζουν σε υψηλότερα επίπεδα τον μεταγραφικό παράγοντα Sox2 σε σύγκριση με τα RS-AF-MSCs [102]. Επιβεβαιώθηκε ξανά η έκφραση του Sox2 σε RNA και πρωτεϊνικό επίπεδο και στους δύο υποπληθυσμούς των AF-MSCs (Εικόνα 3.12). Βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα, εστίασαμε στη μελέτη του ρόλου του miR-21 και του πιθανού γονιδίου-στόχου του Sox2 σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες των SS- και RS-AF-MSCs όπως η κλωνογονική ικανότητα, η δυνατότητα πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης.



Εικόνα 3.12: (i) Αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου Sox2 σε SS- και RS-AF-MSCs. (ii) Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τη πρωτεΐνη Sox2 σε SS- και RS-AF-MSCs.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Η ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ Sox2 ΑΠΟ ΤΟ miR-21 ΕΠΙΔΡΑ ΣΤΙΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

4.1 Περίληψη

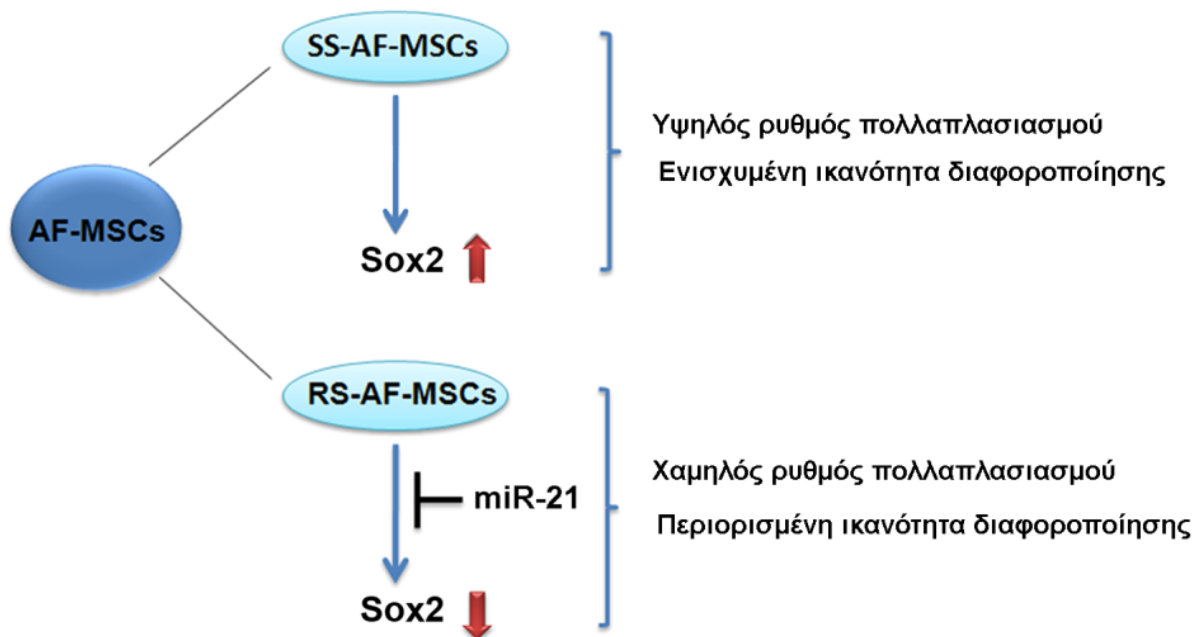
Αναλύοντας το πρότυπο έκφρασης των miRNAs μεταξύ των δύο υποπληθυσμών των AF-MSCs, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η υψηλή έκφραση του miR-21 στα RS-AF-MSCs σε σύγκριση με τα SS-AF-MSCs. Ερευνώντας τα προβλεπόμενα γονίδια-στόχους του miR-21, αποδείχτηκε για πρώτη φορά η άμεση αλληλεπίδραση του miR-21 με τον δείκτη βλαστικότητας Sox2. Η επαγωγή του miR-21 καταστέλλει την έκφραση του Sox2 στα SS-AF-MSCs, οδηγώντας σε μειωμένη κλωνογονικότητα και μειωμένο ρυθμό πολλαπλασιασμό. Επιπρόσθετα, η επαγωγή του miR-21 προκαλεί την μείωση των επιπέδων έκφρασης των κυκλινών D1, E1 και A, έχοντας ως αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Η αντίθετη επίδραση παρατηρείται κατά τη διάρκεια της καταστολής του miR-21 στα RS-AF-MSCs και τα BM-MSCs, που οδηγεί αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Τέλος, η επαγωγή του miR-21 στα SS-AF-MSCs προωθεί την οστεογένεση, ενώ ταυτόχρονα επιβραδύνει την λιπογένεση και την χονδρογένεση. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το miR-21 μπορεί, μέσω της ρύθμισης, του Sox2 να παίζει βασικό ρόλο στον καθορισμό της ικανότητας πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των MSCs.

4.2 Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενα κεφάλαια οι δύο υποπληθυσμοί των AF-MSCs διαφέρουν στο ρυθμό πολλαπλασιασμού τους και συγκεκριμένα, τα SS-AF-MSCs διαθέτουν υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού σε σύγκριση με τα RS-AF-MSCs [102], καθώς επίσης εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα τους δείκτες βλαστικότητας Sox2, Oct4 και Nanog σε σύγκριση με τα RS-AF-MSCs [102, 103, 227]. Επιπρόσθετα, οι δύο υποπληθυσμοί μπορούν να διαφοροποιηθούν επιτυχώς *in vitro* σε κυτταρικούς τύπους

της μεσοδερμικής σειράς ενώ τα SS-AF-MSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν επιπρόσθετα και σε κύτταρα ενδοδερμικής προέλευσης, όπως τα ηπατοκύτταρα [116, 117].

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των miRNA μικροσυστοιχιών για τους δύο υποπληθυσμούς των AF-MSCs προκάλεσε ενδιαφέρον για το miR-21, το οποίο φάνηκε ότι εμφανίζει υψηλή έκφραση στα RS-AF-MSCs και χαμηλή στα SS-AF-MSCs. Ταυτόχρονα, η βιοπληροφορική ανάλυση για τους στόχους του miR-21 παρουσίασε τον δείκτη βλαστικότητας Sox2 ως ένα πιθανό γονίδιο-στόχο [102]. Βασίζόμενοι στις παραπάνω ενδείξεις θελήσαμε να αποδείξουμε τη πιθανή πρόσδεση του miR-21 στο Sox2 και έπειτα να επάγουμε την έκφραση του miR-21 ώστε να μελετηθούν περαιτέρω πιθανές αλλαγές στις βασικές ιδιότητες των δύο υποπληθυσμών των AF-MSCs (Εικόνα 4.1).



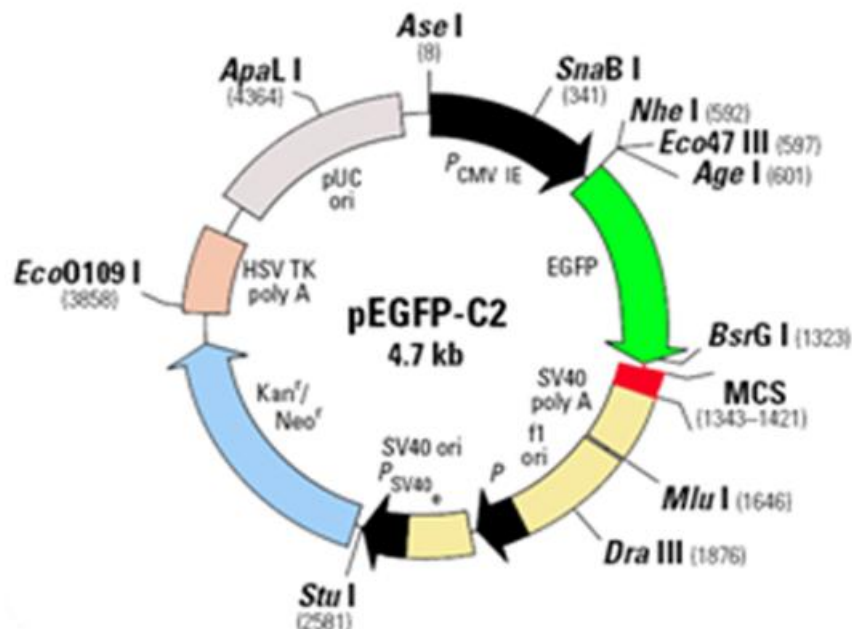
Εικόνα 4.1: Σχηματική παρουσίαση της πειραματικής υπόθεσης για το ρόλο του miR-21 στους δύο υποπληθυσμούς των AF-MSCs.

Στο Κεφάλαιο 4 περιγράφεται αρχικά ο έλεγχος πρόσδεσης του miR-21 στη 3'-αμετάφραστη περιοχή του mRNA του Sox2. Ακολουθεί η μελέτη της επίδρασης της επαγωγής της έκφρασης του miR-21 i) στους μεταγραφικούς παράγοντες Oct4 και Nanog, ii) στην κλωνογονική ικανότητα των SS-AF-MSCs, iii) στην πολλαπλασιαστική ικανότητα των SS-AF-MSCs και iii) στην ικανότητα διαφοροποίησης των SS-AF-MSCs. Επίσης, περιγράφεται η επίδραση της καταστολής του miR-21 στα RS-AF-MSCs και στα BM-MSCs.

4.3 Αποτελέσματα

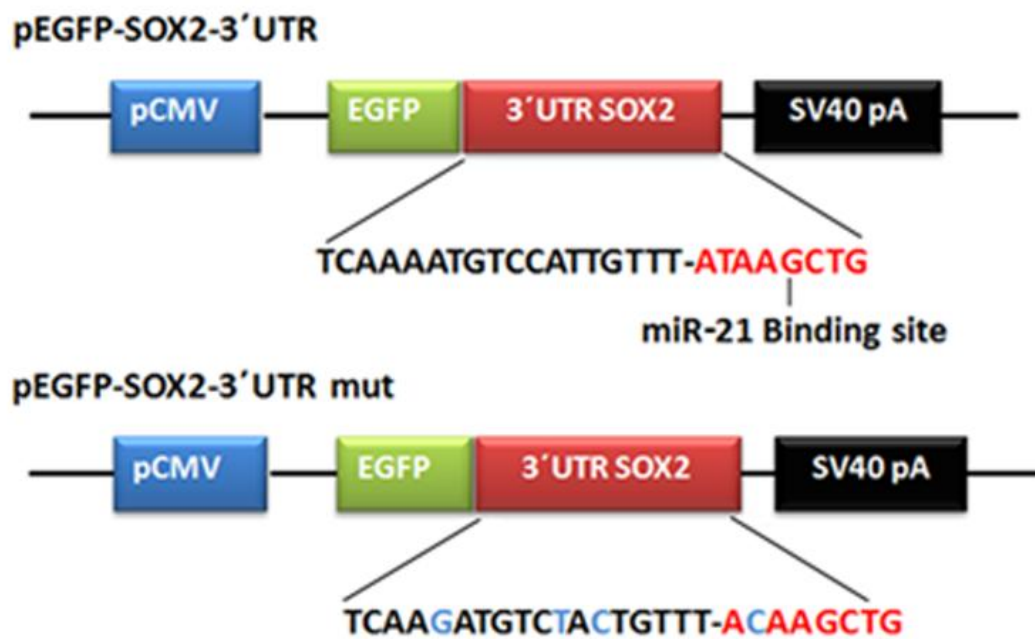
4.3.1 Έλεγχος πρόσδεσης του miR-21 στο γονίδιο-στόχο Sox2

Για την πραγματοποίηση του έλεγχου πρόσδεσης του miR-21 στο γονίδιο-στόχο Sox2, χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pEGFP-C2, ο οποίος διαθέτει pCMV προαγωγή και το σήμα πολυαδενυλίωσης SV40pA (Εικόνα 4.2).



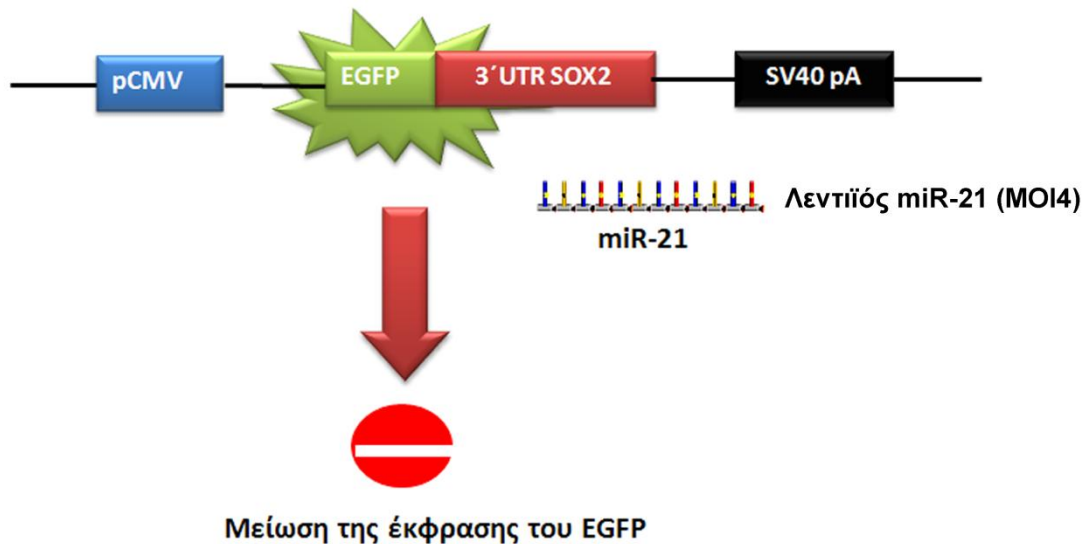
Εικόνα 4.2: Ο πλασμιδιακός φορέας pEGFP-C2.

Στο φορέα κλωνοποιήθηκε η φυσιολογική αλληλουχία της 3'-αμετάφραστης περιοχής (3'-UTR) του mRNA του Sox2 που περιέχει τη θέση πρόσδεσης του miR-21, συνδεδεμένη με τη EGFP πρωτεΐνη του φορέα (Enhanced Green Fluorescent Protein / Ενισχυμένη πράσινη φθορίζουσα χρωστική) (Εικόνα 4.3). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pEGFP-C2 με κλωνοποιημένη τη μεταλλαγμένη αλληλουχία της 3'-UTR του mRNA του Sox2 (Εικόνα 4.3).



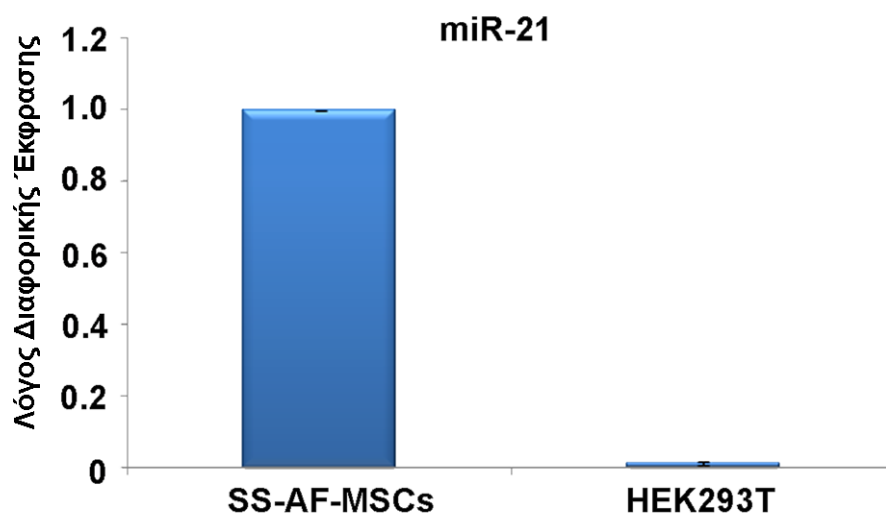
Εικόνα 4.3: Οι ανασυνδυασμένοι φορείς περιέχουν τη φυσιολογική ή τη μεταλλαγμένη αλληλουχία της 3'-UTR του mRNA του Sox2.

Οπότε, στην περίπτωση που το miR-21 προσδένεται στη 3'-UTR του mRNA του Sox2 θα ανασταλλεί η μετάφραση του και μαζί και της πρωτεΐνης EGFP, με αποτέλεσμα τη μείωση του φθορισμού (Εικόνα 4.4).



Εικόνα 4.4: Το miR-21 προσδένεται στη 3'-UTR του mRNA του Sox2 και αναστέλλει τη μετάφραση του και μαζί και της πρωτεΐνης EGFP, με αποτέλεσμα τη μείωση του φορισμού.

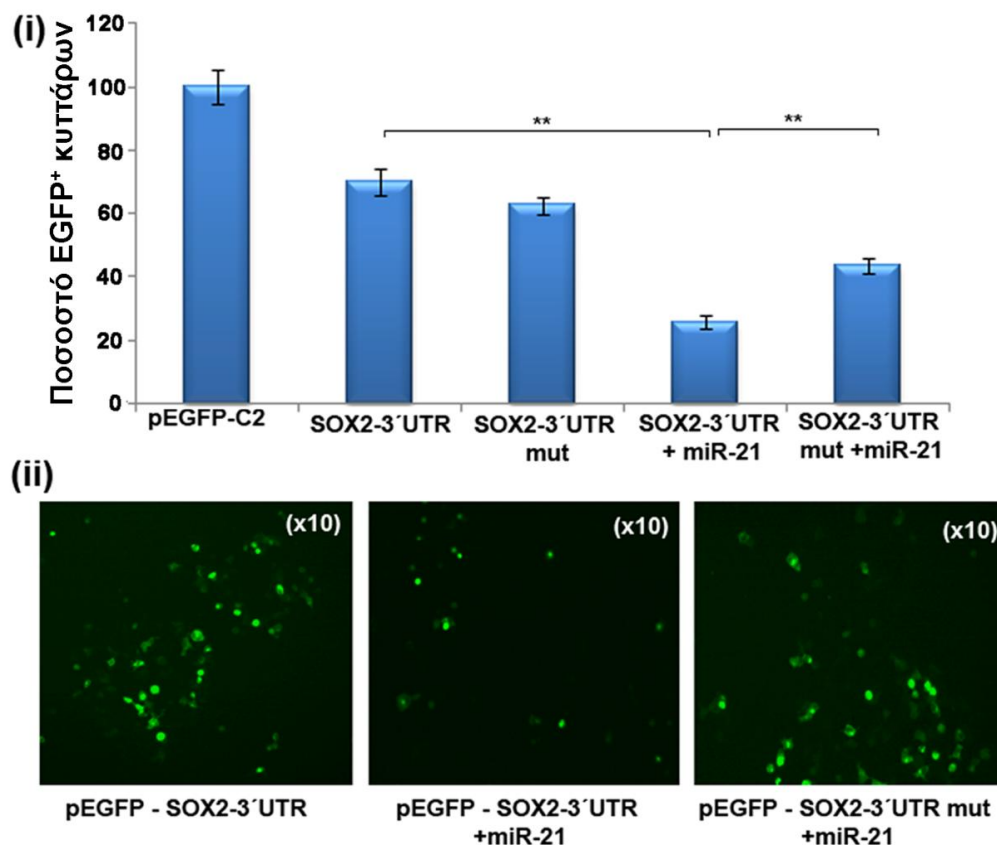
Παράλληλα, τα HEK293T κύτταρα μετάχθηκαν με τον λεντιϊό του miR-21 σε πολλαπλότητα μόλυνσης 4 (Multiplicity of Infection - MOI4). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HEK293T επειδή δεν εκφράζει ενδογενώς το miR-21 (Εικόνα 4.5).



Εικόνα 4.5: Τα HEK293T δεν εκφράζουν miR-21 σε σύγκριση με τα SS-AF-MSCs.

Ο έλεγχος πρόσδεσης πραγματοποιήθηκε κατά τη διαμόλυνση HEK293T κυττάρων που εκφράζουν miR-21 με τον pEGFP-C2-3'UTR-SOX2 φορέα με τη χρήση λιποσωμάτων (Lipofectamine, Invitrogen), με σκοπό να μειωθεί η έκφραση της EGFP κατά τη διάρκεια της πιθανής πρόσδεσης του miR-21 στη 3'-UTR του Sox2.

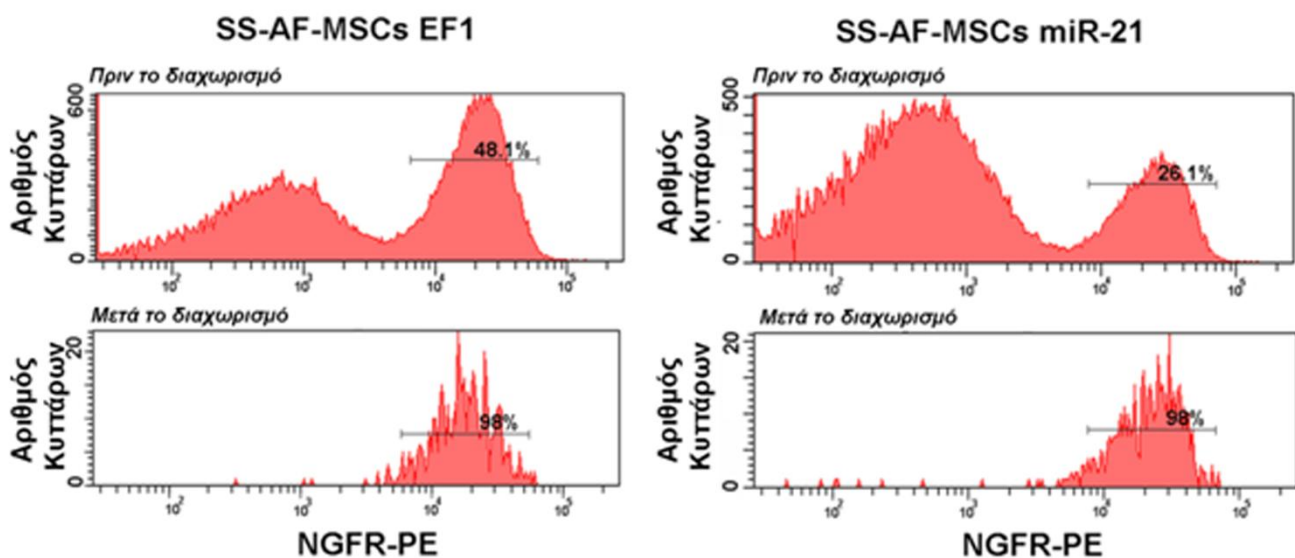
Η έκφραση της EGFP πρωτεΐνης καθορίστηκε με κυτταρομετρία ροής. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.6, η έκφραση του miR-21 οδήγησε σε μείωση της έκφρασης της EGFP πρωτεΐνης σε ποσοστό $15.1\% \pm 2.04$. Ακολούθως, η διαμόλυνση του μεταλλαγμένου pEGFP-3'UTR-Sox2 παρουσία του miR-21 (EGFP έκφραση: $36.7\% \pm 2.8$) ή η διαμόλυνση του φυσιολογικού pEGFP-3'UTR-Sox2 απουσία του miR-21 (EGFP έκφραση: $41.125\% \pm 4.06$) δεν επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης της EGFP πρωτεΐνης, όπως προδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής και με μικροσκοπία φθορισμού. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι το miR-21 προσδένεται στην συγκεκριμένη αλληλουχία πρόσδεσης που βρίσκεται στην 3'-UTR του Sox2.



Εικόνα 4.6: i) Το miR-21 στοχεύει το Sox2 άμεσα, όπως εκτιμήθηκε με κυτταρομετρία ροής. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (** $p < 0.01$, Student's t-test). ii) Εικόνες φθορισμού από το πείραμα του έλεγχου πρόσδεσης.

4.3.2 Επαγωγή του miR-21 στα SS-AF-MSCs οδηγεί σε μείωση της έκφρασης του Sox2

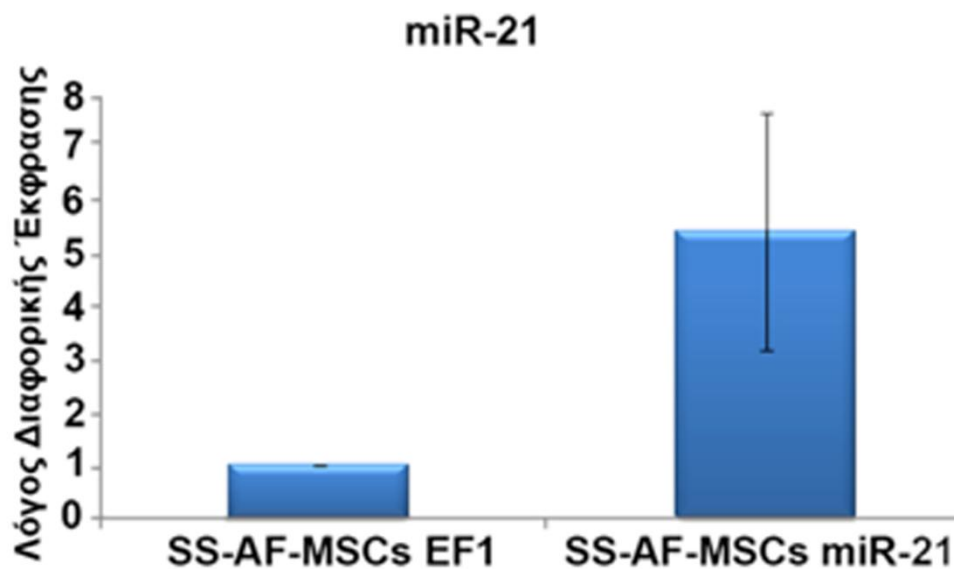
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μεταγωγή των SS-AF-MSCs με τον λεντιϊό του miR-21 ή του EF1 σε πολλαπλότητα μόλυνσης 4 - MOI4. Για την δημιουργία του λεντιϊού του miR-21 χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pCCLsin.cPPT.hEF1a (intron with MCS as).deltaLNGFR.Wpre., ο οποίος διαθέτει τον ανενεργό υποδοχέα του νευρικού αυξητικού παράγοντα CD271/LNGFR και μέσω αυτού δίνει τη δυνατότητα να διαχωριστούν τα μεταγμένα κύτταρα. Οπότε τη χρήση της τεχνικής διαχωρισμού φθορίζοντων κυττάρων πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των NGFR θετικών κυττάρων με απόδοση διαχωρισμού 98% (Εικόνα 4.7).



Εικόνα 4.7: Η έκφραση του NGFR στα SS-AF-MSCs μεταγμένα με λεντιϊό miR-21 ή EF1 σε MOI 4 πριν και μετά το διαχωρισμό.

Ο λόγος αλλαγής έκφρασης του miR-21 στα μεταγμένα SS-AF-MSCs μετά τον διαχωρισμό φάνηκε να είναι μεταξύ 2.5-9.8 φορές σε σύγκριση με τα κύτταρα που είναι μεταγμένα με τον λεντιϊό EF1 που αποτελεί τον μάρτυρα (Εικόνα 4.8). Ο λόγος

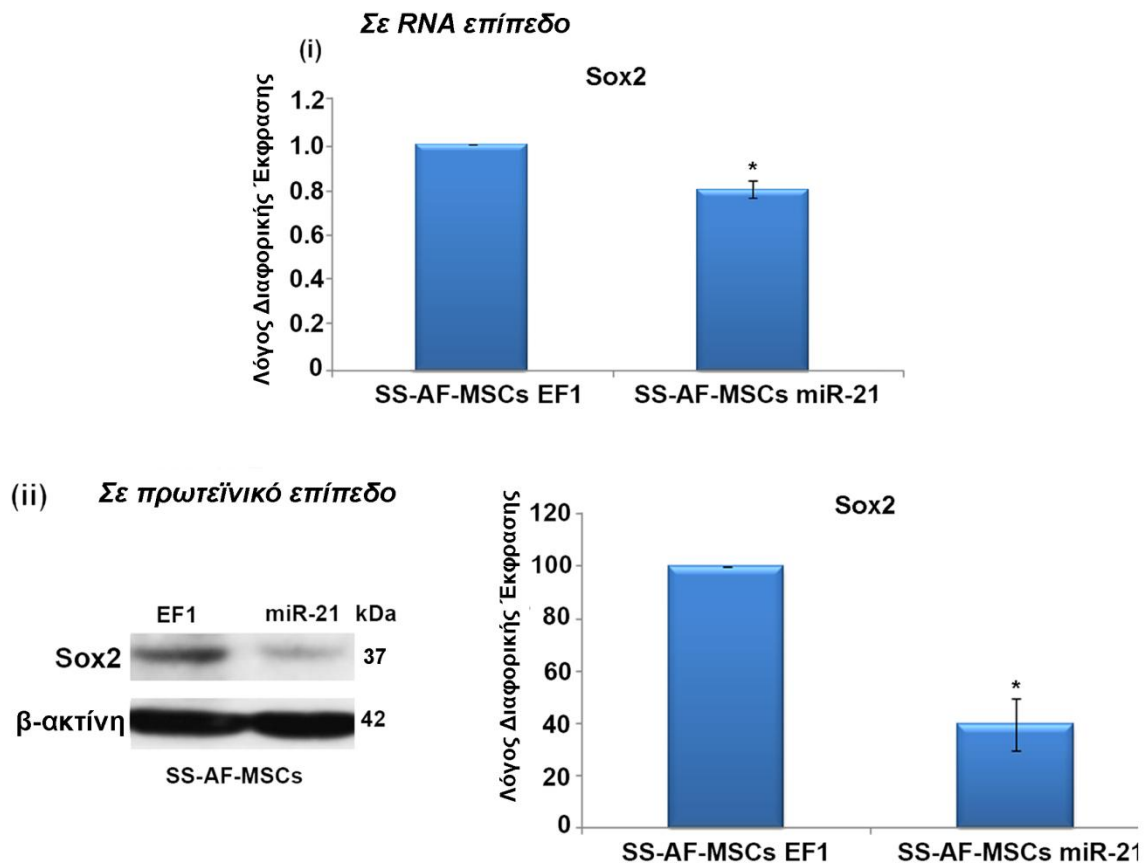
αλλαγής έκφρασης του miR-21 εμφάνισε μία σημαντική ετερογένεια, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στο ότι τα δείγματα των AF-MSCs προέρχονται από διαφορετικούς δότες. Έπειτα, ακολούθησε απομόνωση ολικών πρωτεϊνών και ολικού RNA από SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 ή EF1 για να μελετηθούν οι πιθανές αλλαγές στην έκφραση του Sox2.



Εικόνα 4.8: Αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης του miR-21 ή EF1 σε SS-AF-MSCs. Η έκφραση του RNU44 χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας.

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης του Sox2 σε επίπεδο RNA στα SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 σε σύγκριση με τα SS-AF-MSCs που έχουν μεταχθεί με τον EF1 λεντιϊό (Εικόνα 4.9 i). Παρατηρήθηκε επίσης στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης του Sox2 σε πρωτεϊνικό επίπεδο μετά την υπερέκφραση του miR-21 στα SS-AF-MSCs (Εικόνα 4.9ii). Τα παραπάνω ευρήματα αποδεικνύουν ότι το miR-21 προσδένεται άμεσα στη 3'-UTR του Sox2, γεγονός που

οδηγεί σε καταστολή της μετάφρασης και αποικοδόμηση του mRNA του γονιδίου στόχου.

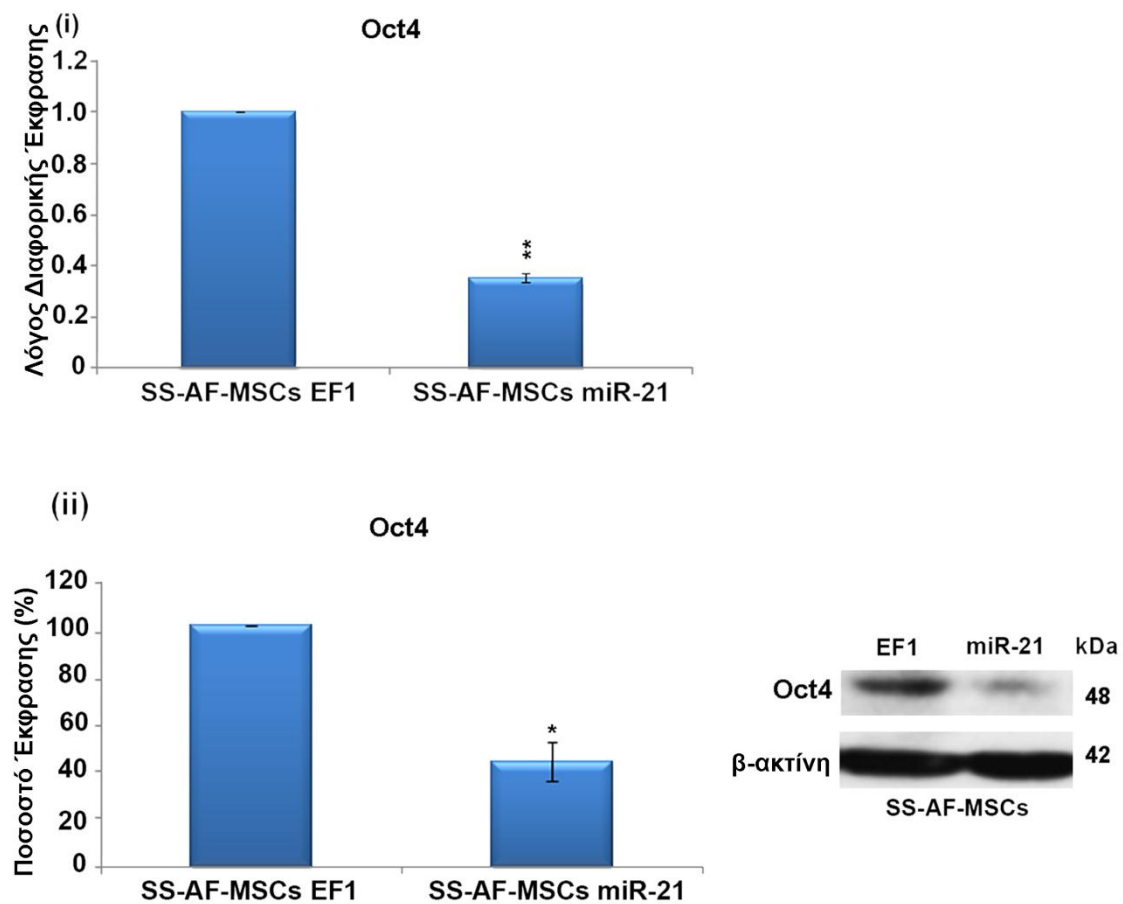


Εικόνα 4.9: (i) Αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για το Sox2 σε SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 σε σύγκριση με τα SS-AF-MSCs μεταγμένα με λεντιϊό EF1. Το GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας (ii) Ανοσοαποτύπωση κατά Western για το Sox2 σε SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 σε σύγκριση με τα SS-AF-MSCs μεταγμένα με λεντιϊό EF1. Το β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$, Student's t-test).

4.3.3 Επαγωγή του miR-21 στα SS-AF-MSCs οδηγεί σε μείωση της έκφρασης του Oct4 και του Nanog

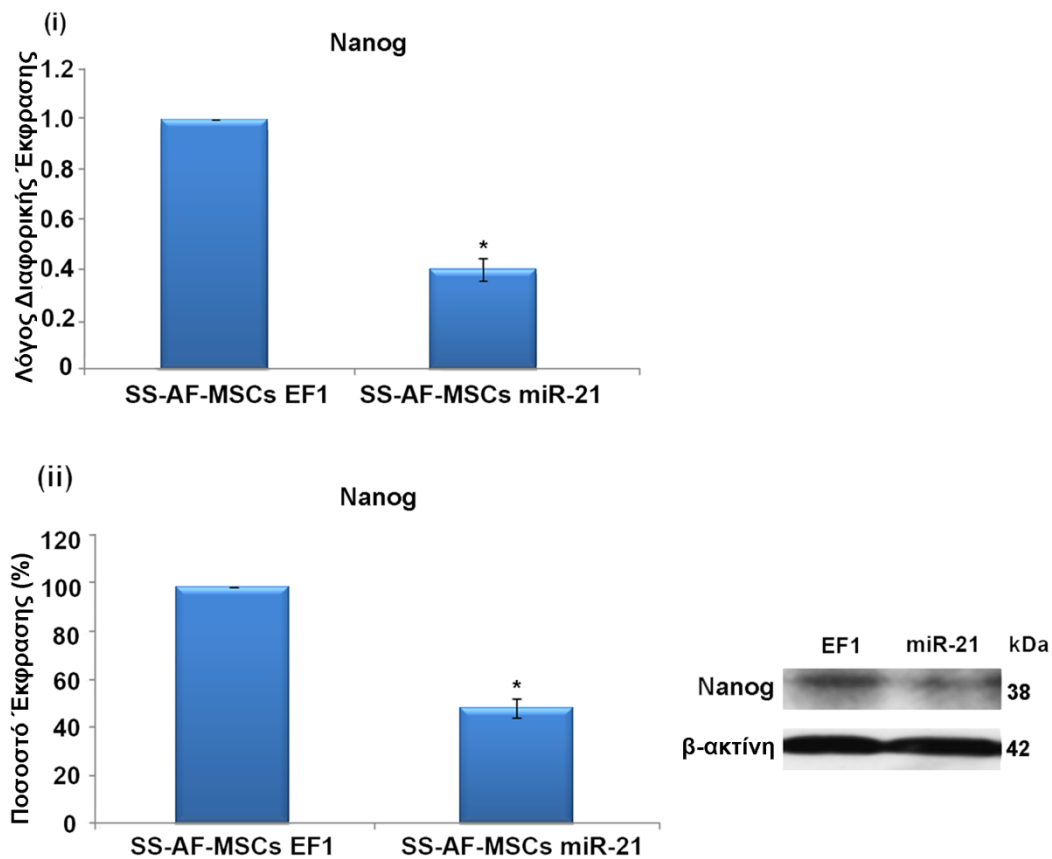
Ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο μεταγραφικός παράγοντας Sox2 επάγει την ικανότητα πολλαπλασιασμού και μειώνει την ικανότητα διαφοροποίησης των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων, σε συνεργασία με άλλους δύο μεταγραφικούς

παράγοντες τον Oct4 (octamer-binding transcription factor 4) και τον Nanog (homeobox transcription factor Nanog) δημιουργώντας ένα δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων [20, 228]. Για να εξετάσουμε αν η καταστολή του Sox2 από το miR-21 επηρεάζει και τους άλλους δύο μεταγραφικούς παράγοντες, πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου και ανοσοαποτύπωση κατά Western σε SS-AF-MSCs που έχουν μεταχθεί με λεντιϊό miR-21 ή EF1. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στην έκφραση του Oct4 σε επίπεδο NA αλλά και σε επίπεδο πρωτεΐνης στα SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 σε σύγκριση με αυτά που έχουν μεταχθεί με EF1 λεντιϊό (Εικόνα 4.10).



Εικόνα 4.10: (i) Αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για το Oct4 σε SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 σε σύγκριση με τα SS-AF-MSCs μεταγμένα με λεντιϊό EF1. (ii) Ανοσοαποτύπωση κατά Western για το Oct4 σε S-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 ή EF1. Το β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$, Student's t-test).

Παράλληλα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στην έκφραση του Nanog σε επίπεδο RNA αλλά και σε επίπεδο πρωτεΐνης στα SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 σε σύγκριση με αυτά που έχουν μεταχθεί με EF1 λεντιϊό (Εικόνα 4.11). Οι μεταγραφικοί παράγοντες Oct4 και Nanog δεν είναι προβλεπόμενοι στόχοι για το miR-21 όπως φάνηκε έπειτα από *in silico* βιοπληροφορική ανάλυση. Αυτό το γεγονός οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μείωση έκφρασης των μεταγραφικών αυτών παραγόντων που παρατηρείται προκαλείται με κάποιο έμμεσο μηχανισμό και όχι άμεσα από το miR-21.

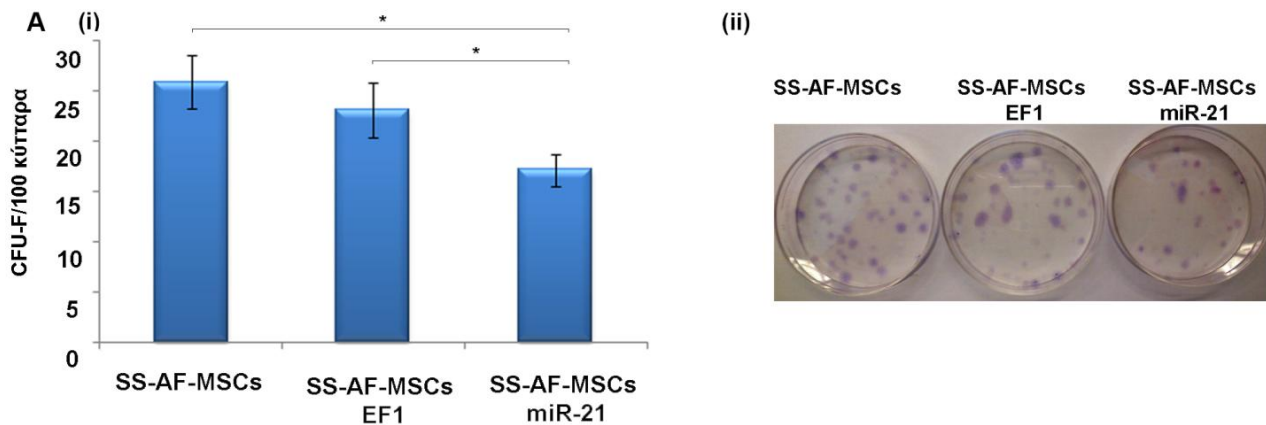


Εικόνα 4.11: (i) Αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για το Nanog σε SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 ή EF1. Το GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας (ii) Ανοσοαποτύπωση κατά Western για το Nanog σε SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 ή EF1. Το β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$, Student's t-test).

4.3.4 Το miR-21 επηρεάζει την κλωνογονική ικανότητα και τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των SS-AF-MSCs

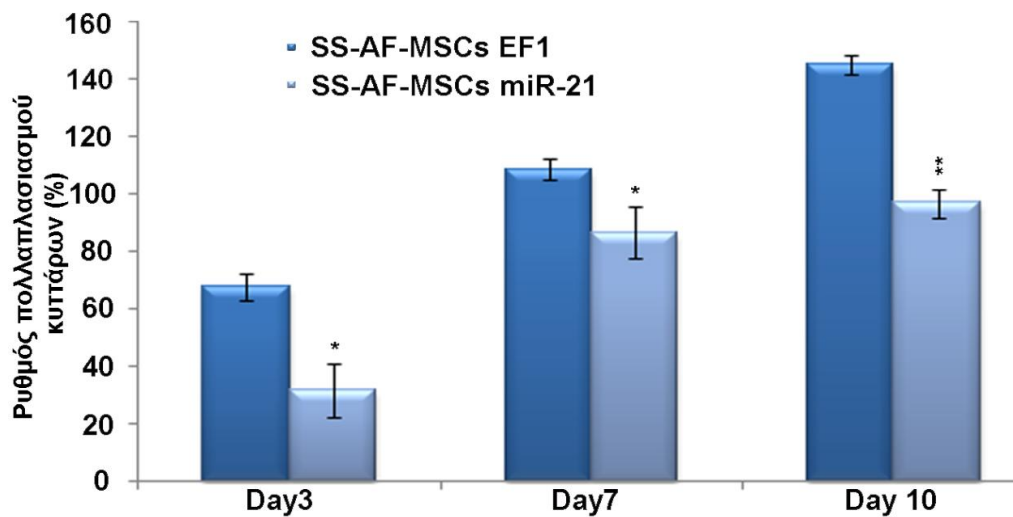
Κατόπιν, ελέγχθηκε αν η μείωση της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων Sox2, Oct4 και Nanog στα SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 μπορεί να επηρεάζει την ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Γι' αυτό λόγο πραγματοποιήθηκε μελέτη της κλωνογονικής ικανότητας και ανάλυση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 σε σύγκριση με SS-AF-MSCs μεταγμένα με το EF1 λεντιϊό.

Η κλωνογονική ικανότητα αναφέρθηκε από τον Friedenstein, όπου παρατηρήθηκε ότι τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών μπορούσαν να σχηματίζουν αποικίες (colony forming units – CFU) [221]. Ο αριθμός των σχηματιζόμενων αποικιών εκφράζεται ως γραμμική συνάρτηση του αριθμού των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν και αποτελεί ένδειξη της κλωνογονικής τους ικανότητας. Σύμφωνα με τα παραπάνω διαπιστώθηκε ότι τα SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 παρουσιάζουν μειωμένη κλωνογονική ικανότητα (11.7 αποικίες \pm 1.59) σε σύγκριση με τα SS-AF-MSCs μεταγμένα με το EF1 λεντιϊό (20.9 αποικίες \pm 0.53) (Εικόνα 4.12).



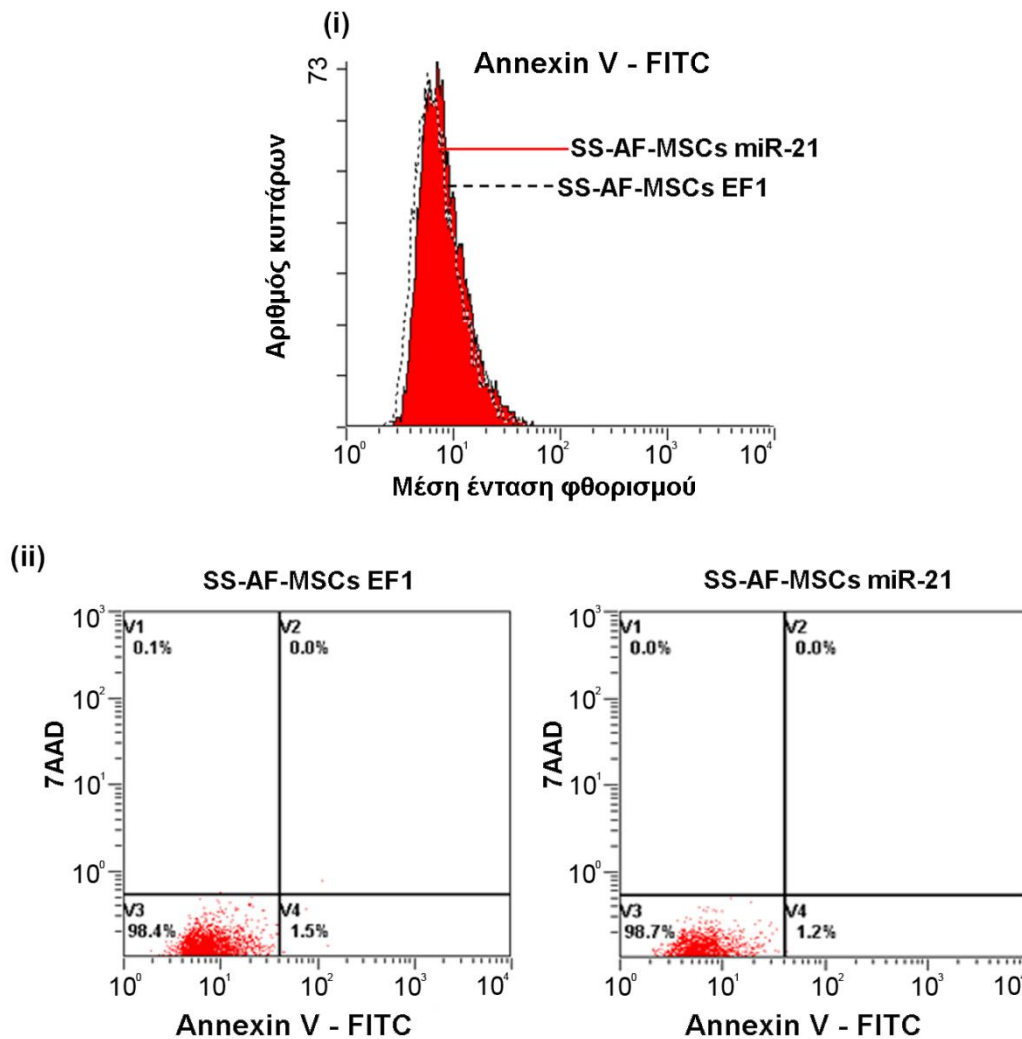
Εικόνα 4.12: (A) Η κλωνογονική ικανότητα των SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 όπως καθορίστηκε από την CFU-F δοκιμασία. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm την τυπική απόκλιση από τις σχηματιζόμενες αποικίες /100 κύτταρα.

Για την περαιτέρω ανάλυση του ρόλου του miR-21 στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των SS-AF-MSCs, πραγματοποιήθηκε μελέτη χρησιμοποιώντας το χρωμογόνο αντιδραστήριο MTS μετά από τρεις, επτά και δέκα ημέρες. Η επαγωγή του miR-21 στα SS-AF-MSCs προκαλεί στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε σύγκριση με τα SS-AF-MSCs που έχουν μεταχθεί με το EF1 λεντιϊό και στις τρεις διαφορετικές ημέρες όπου πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία (Εικόνα 4.13).



Εικόνα 4.13: Συγκριτική ανάλυση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 σε σύγκριση με τα SS-AF-MSCs μεταγμένα με λεντιϊό EF1. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$ και ** $p < 0.01$, Student's t-test).

Τέλος, για να ενισχύσουμε τα παραπάνω αποτελέσματα, μελετήθηκε η απόπτωση και ο αριθμός των νεκρών κυττάρων στα SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 με κυτταρομετρία ροής και συγκεκριμένα τη χρήση των χρώσεων Ανεξίνη V και 7ADD, αντίστοιχα. Διαπιστώθηκε ότι τα SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 δεν παρουσιάζουν τάση για απόπτωση συγκρίνοντάς τα με SS-AF-MSCs μεταγμένα με το EF1 λεντιϊό (Εικόνα 4.14).

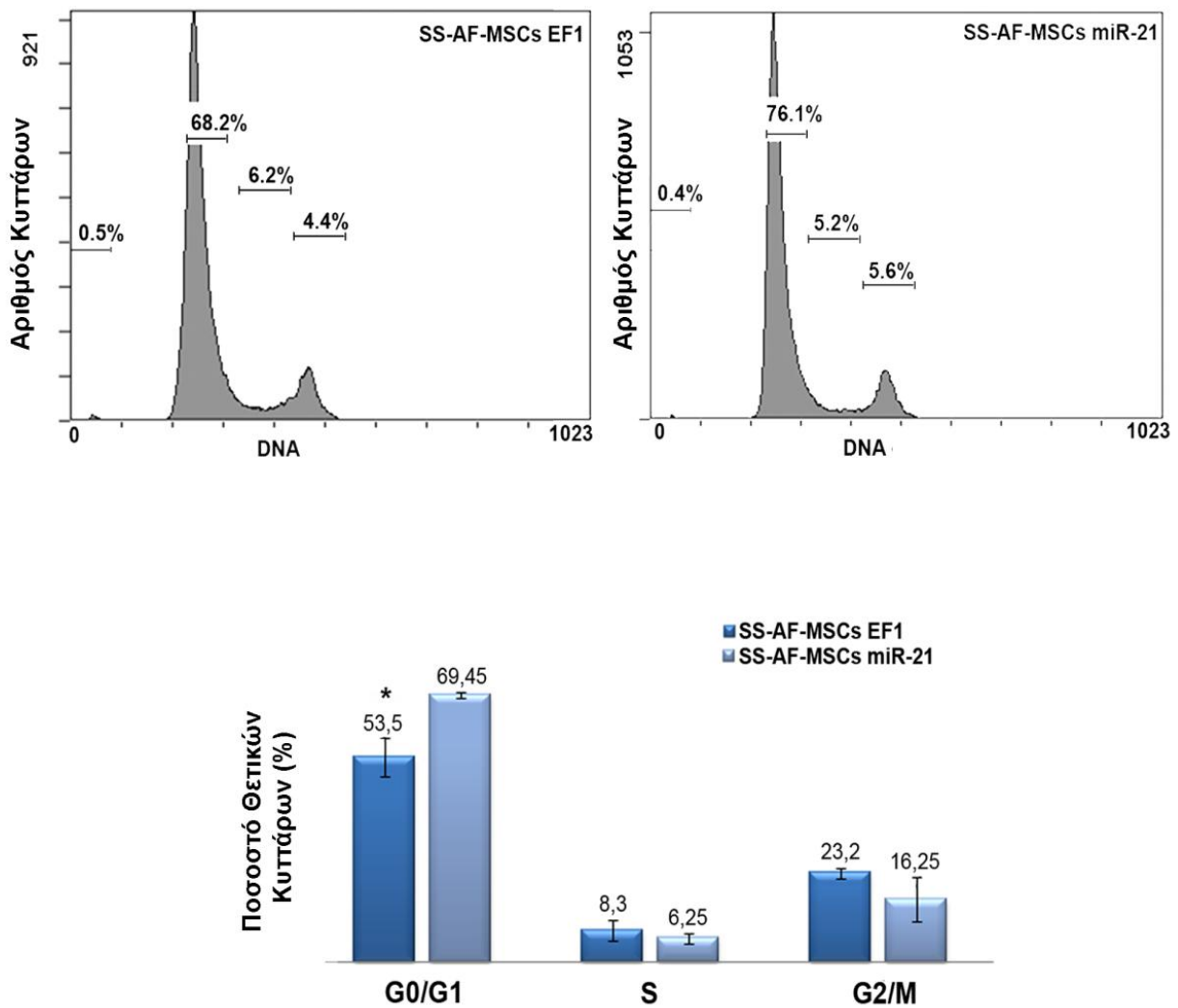


Εικόνα 4.14: A) (i) Η απόπτωση εξετάστηκε με κυτταρομετρία ροής για την Ανεξίνη V σε SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 ή EF1, (ii) Το 7AAD χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό των νεκρών κυττάρων.

4.3.5 Επαγωγή του miR-21 στα SS-AF-MSCs επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο

Για να κατανοήσουμε τον μηχανισμό που οδηγεί στη μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των SS-AF-MSCs μετά την επαγωγή του miR-21, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων με τη χρήση του ιωδιούχου προπιδίου. Μετά την επαγωγή του miR-21 στα SS-AF-MSCs παρατηρήθηκε αύξηση της κυτταρικής φάσης G0/G1 ($69.45\% \pm 0.85$), ενώ το

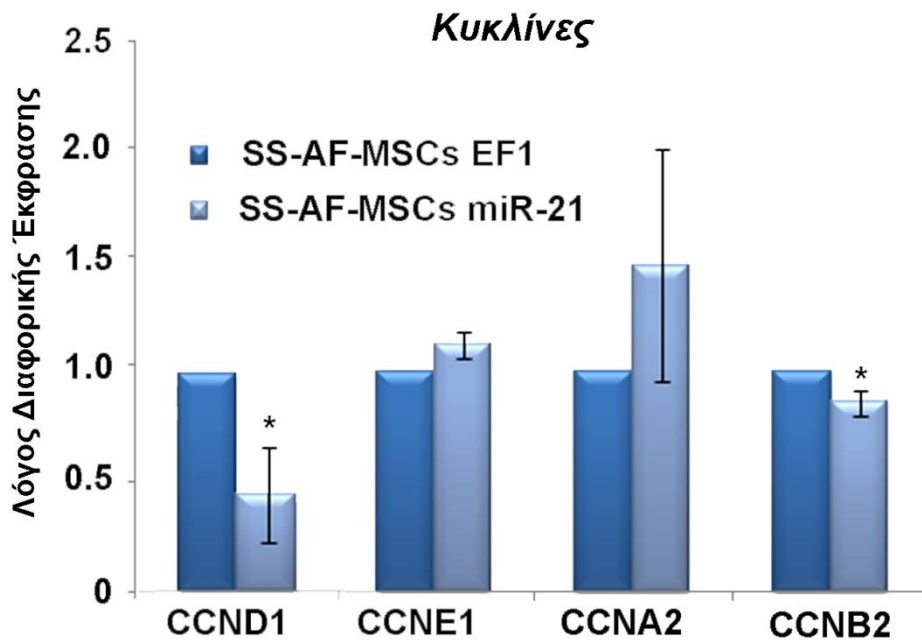
ποσοστό των κυττάρων στη φάση S μειώθηκε ($6.25\% \pm 1.25$), σε σύγκριση με τα SS-AF-MSCs που έχουν μεταχθεί με τον EF1 λεντιίο (G0/G1: $53.5\% \pm 5$ and S: $8.3\% \pm 2.7$) (Εικόνα 4.15).



Εικόνα 4.15: Χρώση ιωδιούχου προπιδίου σε SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 ή EF1, όπως καθορίστηκε με κυτταρομετρία ροής. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$, Student's t-test).

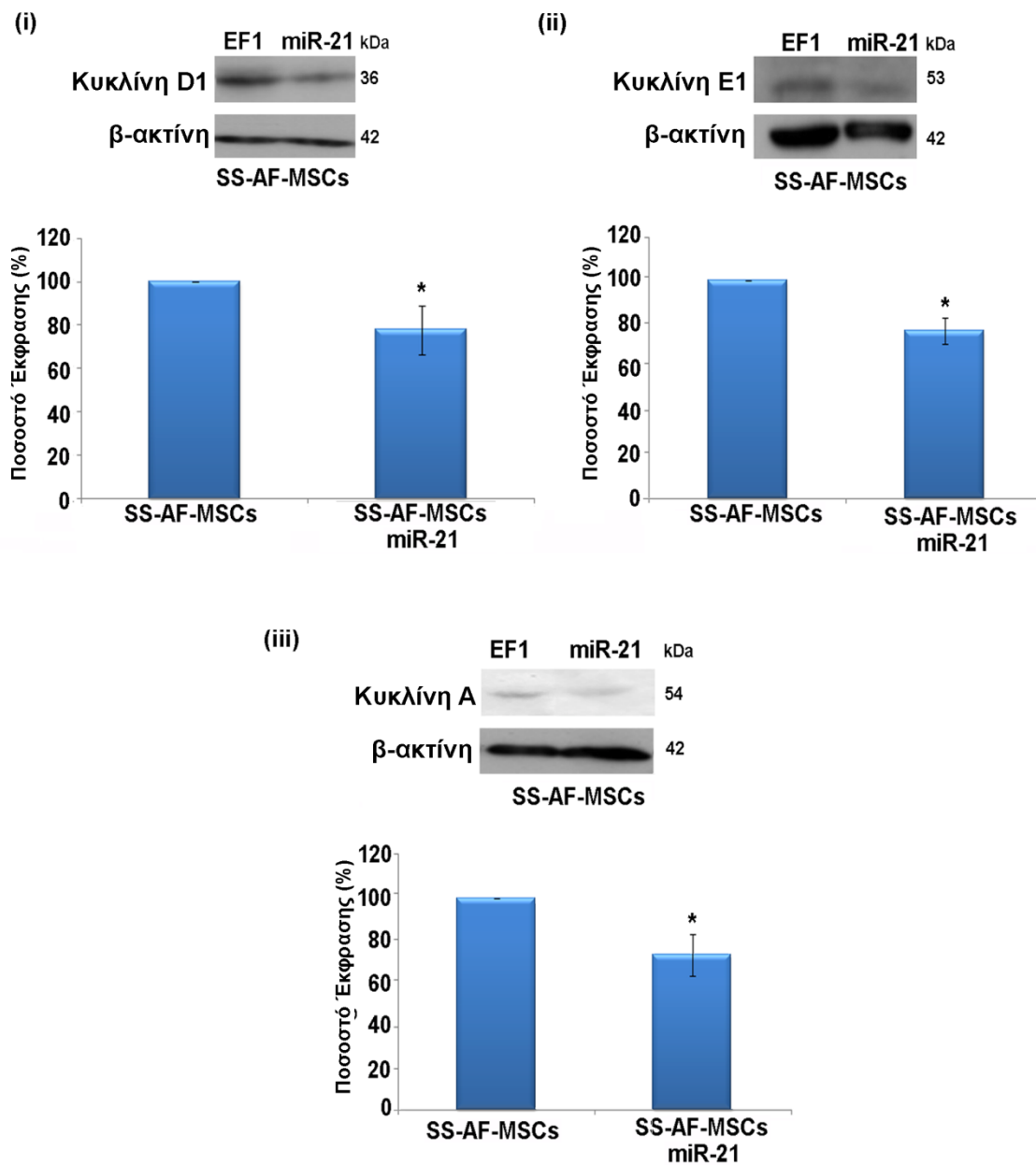
Στη συνέχεια, διαπιστώθηκε ότι η αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, συνοδεύεται από μείωση της έκφρασης της κυκλίνης D1, η οποία είναι

χαρακτηριστική για την φάση G1 του κυτταρικού κύκλου, τόσο σε RNA όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο (Εικόνα 4.17). Σε επίπεδο RNA δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές για τις κυκλίνες E1 και A2. (Εικόνα 4.16).

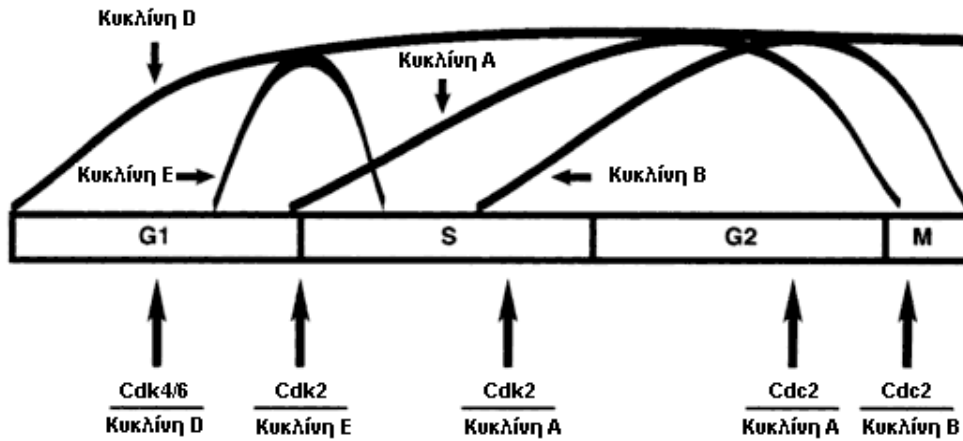


Εικόνα 4.16: Αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για τις κυκλίνες D1, E1, A2 και B2 σε SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 ή EF1. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$, Student's t-test).

Ακολούθως, η επαγωγή της έκφρασης του miR-21 στα SS-AF-MSCs φάνηκε να προκαλεί στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα έκφρασης των κυκλινών D1, E1 και A σε πρωτεϊνικό επίπεδο (Εικόνα 4.17), γεγονός που στηρίζεται από τις μέχρι σήμερα μελέτες που επιβεβαιώνουν την έκφραση των κυκλινών στα διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 4.18).

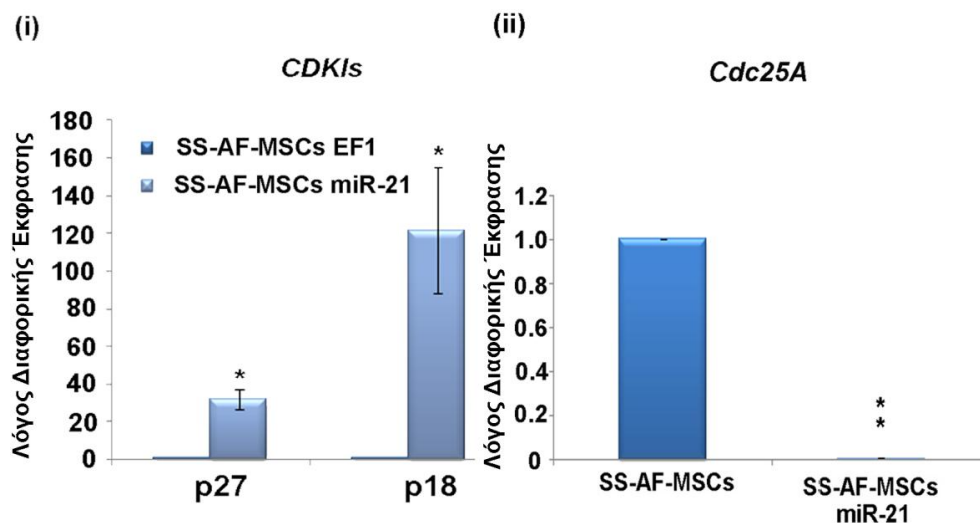


Εικόνα 4.17: Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τις κυκλίνες D1, E1 και A σε SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 ή EF1. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$, Student's t-test).



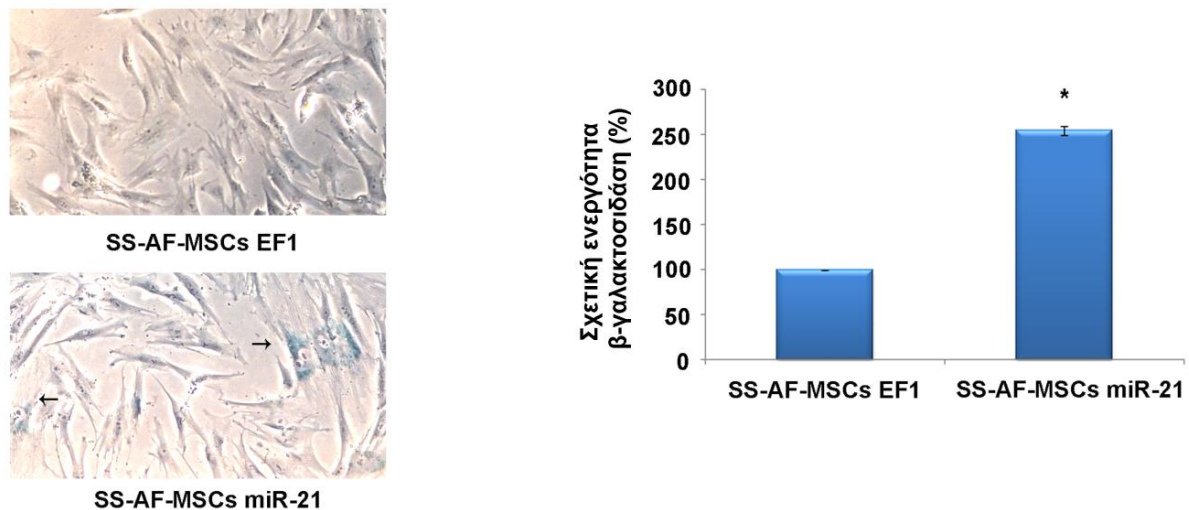
Εικόνα 4.18: Τα επίπεδα έκφρασης των κυκλινών κατά τη διάρκεια του κύτταρικού κύκλου.

Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης κυκλίνο-εξαρτώμενων αναστολέων κινάσης (cyclin-dependent kinase inhibitors - CDKIs) όπως η p27 (CDKN1B) και η p18 (CDKN2C) σε SS-AF-MSCs κύτταρα που εκφράζουν miR-21 (Εικόνα 4.19). Παράλληλα, παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης Cdc25A (Cell division cycle 25A) που φαίνεται να έχει βασικό ρόλο στον κυτταρικό κύκλο σε SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 σε σύγκριση με τα SS-AF-MSCs που έχουν μεταχθεί με τον EF1 λεντιϊό (Εικόνα 4.19).



Εικόνα 4.19: Αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για τις πρωτεΐνες (i) p18, p27 και (ii) Cdc25A σε SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 ή EF1. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$, Student's t-test).

Τέλος, βρέθηκε ότι τα SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 αυξάνουν την ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης σε σύγκριση με τα SS-AF-MSCs που έχουν μεταχθεί με τον EF1 λεντιό (Εικόνα 4.20). Έχει διαπιστωθεί ότι η επαγωγή της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό του κυτταρικού φαινοτύπου γήρανσης.



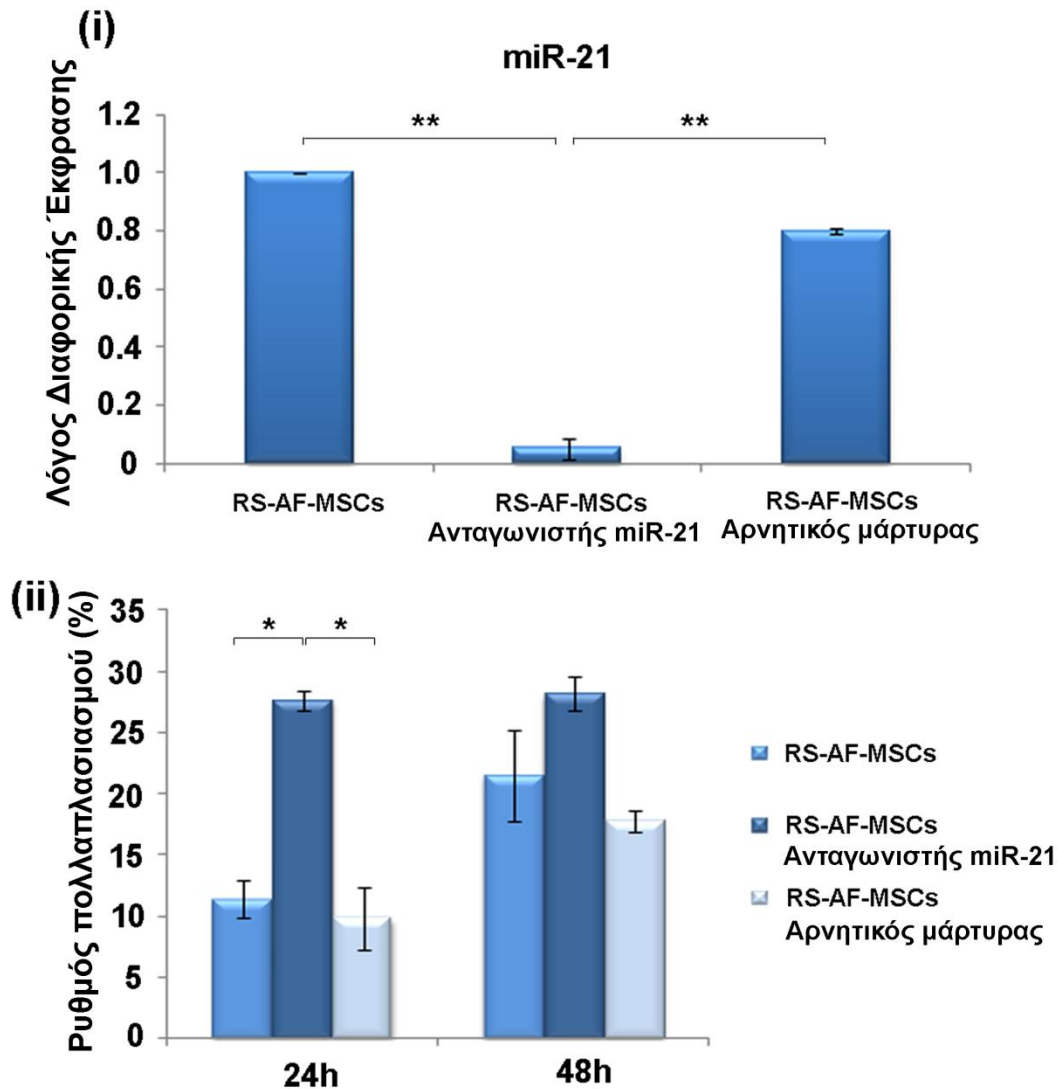
Εικόνα 4.20: Αντιπροσωπευτικές εικόνες από SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 ή EF1 που έχουν υποστεί δοκιμασία για την ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης. Το γράφημα παρουσιάζει τη σχετική ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης των θετικών κυττάρων. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$, Student's t-test).

Τα παραπάνω αποτελέσματα προτείνουν ότι το miR21 έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των SS-AF-MSCs μέσω διαφόρων μηχανισμών που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο και τη ρύθμιση του.

4.3.6 Αναστολή του miR-21 αυξάνει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των RS-AF-MSCs

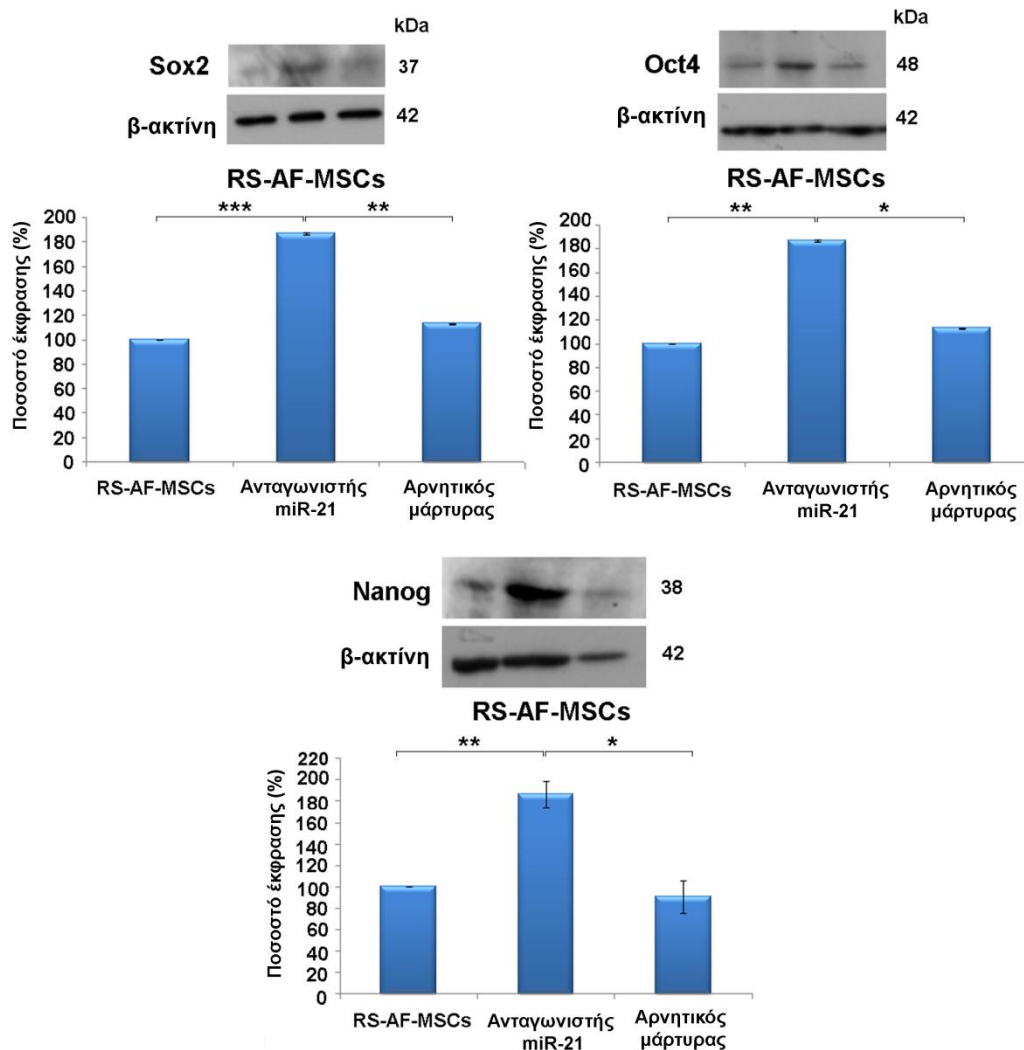
Όπως περιγράφηκε νωρίτερα, τα RS-AF-MSCs εκφράζουν το miR-21 σε υψηλά επίπεδα. Γι' αυτό το λόγο, τα RS-AF-MSCs διαμολύνθηκαν με τη χρήση λιποσωμάτων με ανταγωνιστή για το miR-21, ώστε να παρατηρηθεί η πιθανή μετάβαση τους προς το φαινότυπο και τα χαρακτηριστικά των SS-AF-MSCs. Μετά τη διαμόλυνση με τον ανταγωνιστή του miR-21 παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης

του miR-21 στα RS-AF-MSCs σε σύγκριση με τα κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με τον αρνητικό μάρτυρα (Εικόνα 4.21). Έπειτα, διαπιστώθηκε με την δοκιμασία MTS ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση, 24 ώρες μετά την αναστολή του miR-21 από τον ανταγωνιστή (Εικόνα 4.21).



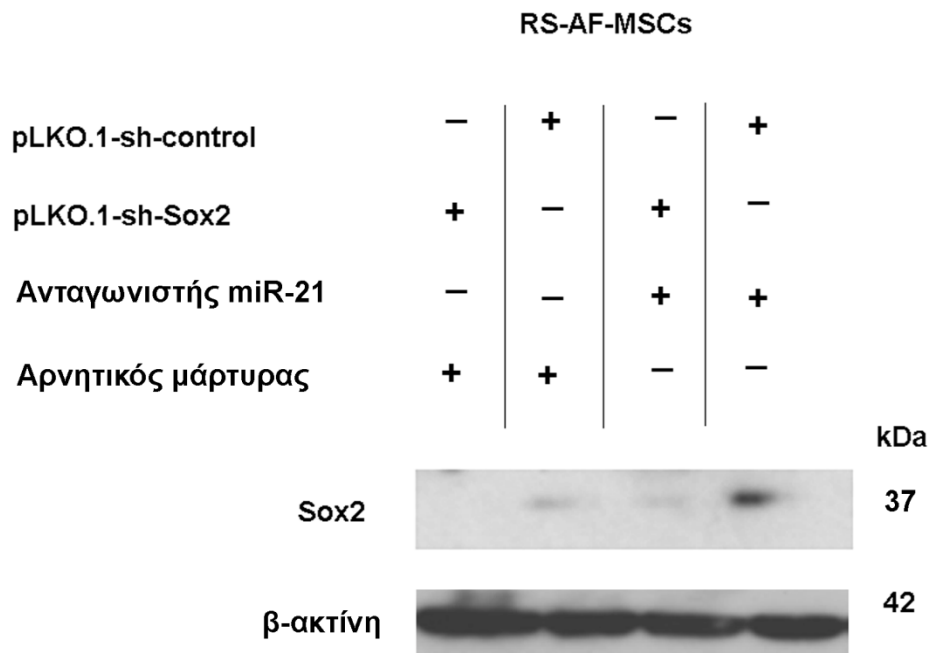
Εικόνα 4.21: (i) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για το miR-21 σε RS-AF-MSCs που έχουν διαμολυνθεί με τον ανταγωνιστή του miR-21 ή με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με τον εσωτερικό μάρτυρα RNU44. (ii) Συγκριτική ανάλυση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των RS-AF-MSCs που έχουν διαμολυνθεί με τον ανταγωνιστή του miR-21 σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα μετά από 24 και 48 ώρες. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$, Student's t-test).

Επιπρόσθετα, η μείωση της έκφρασης του miR-21 οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης των δεικτών Sox2, Oct4 και Nanog (Εικόνα 4.22). Παρόλα αυτά, δεν παρατηρήθηκαν μορφολογικές διαφορές στα RS-AF-MSCs μετά την αναστολή του miR-21.



Εικόνα 4.22: Ανοσοαποτύπωση κατά Western για το Sox2, Oct4 και Nanog σε RS-AF-MSCs που έχουν διαμολυνθεί με τον ανταγωνιστή του miR-21 ή με τον αρνητικό μάρτυρα. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Quantity One και τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με το θετικό μάρτυρα β-ακτίνη. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$, Student's t-test).

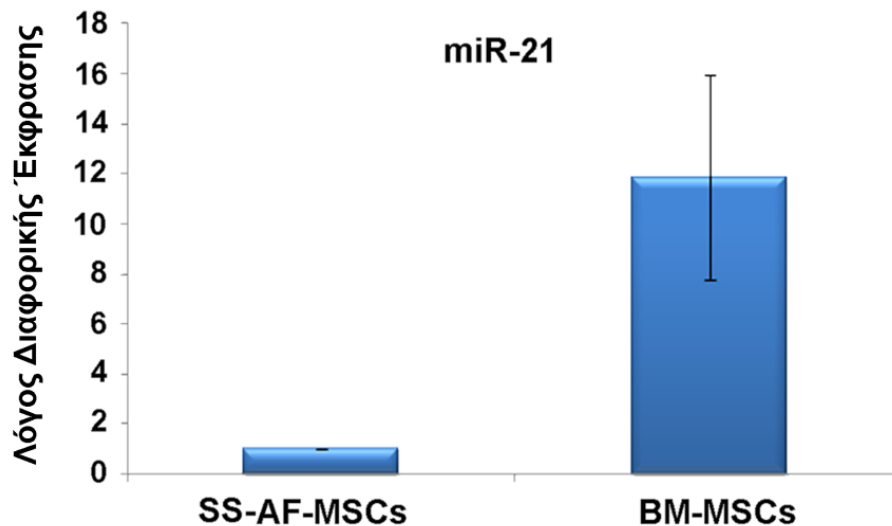
Τέλος, για να διαπιστωθεί αν οι αλλαγές που παρατηρούνται οφείλονται αποκλειστικά στην επίδραση του miR-21, πραγματοποιήθηκαν πειράματα διάσωσης. Έτσι, τα RS-AF-MSCs διαμολύνθηκαν με τον ανταγωνιστή του miR-21 και παράλληλα με το shRNA (short hairpin RNA) του Sox2. Όπως ήταν αναμενόμενο, η διαμόλυνση με το sh-Sox2 φορέα προκάλεσε τη μείωση της αυξανόμενης έκφρασης του Sox2 που προκαλείται αντίστοιχα από τη διαμόλυνση με τον ανταγωνιστή του miR-21 (Εικόνα 4.23).



Εικόνα 4.23: Ανοσοαποτύπωση κατά Western για το Sox2 σε RS-AF-MSCs που έχουν διαμολυνθεί με τον αρνητικό μάρτυρα ή με τον ανταγωνιστή του miR-21 και παράλληλα με το pLKO.1-sh-Sox2 ή με το pLKO.1-sh-control.

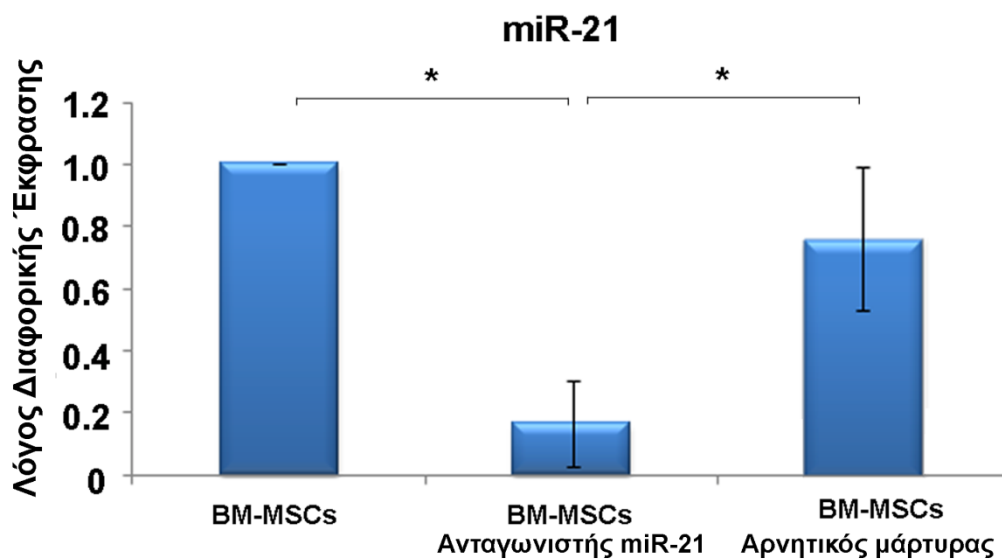
4.3.7 Αναστολή του miR-21 αυξάνει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των BM-MSCs

Τα BM-MSCs χαρακτηρίζονται από μειωμένο ρυθμό πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα SS-AF-MSCs μετά την πάροδο πολλαπλών ανακαλλιέργειών [67]. Επιπρόσθετα, είναι αξιοσημείωτο ότι τα BM-MSCs μετά από κάποιες ανακαλλιέργειες, όπως και τα RS-AF-MSCs, εκφράζουν το miR-21 σε υψηλά επίπεδα (Εικόνα 4.24). Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν BM-MSCs (passage 6) που εκφράζουν miR-21 σε υψηλά επίπεδα για να διαμολυνθούν με τη χρήση λιποσωμάτων με τον ανταγωνιστή του miR-21 ή τον αρνητικό μάρτυρα.

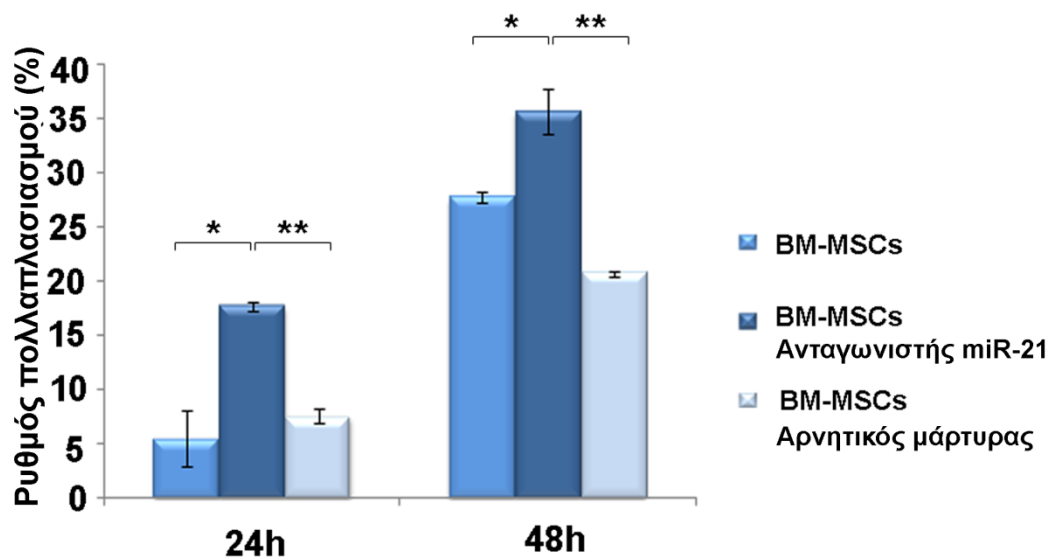


Εικόνα 4.24: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για το miR-21 σε BM-MSCs σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-21 στα SS-AF-MSCs. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Μετά τη διαμόλυνση με τον ανταγωνιστή του miR-21 παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του miR-21 στα BM-MSCs σε σύγκριση με τα κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με τον αρνητικό μάρτυρα (Εικόνα 4.25).

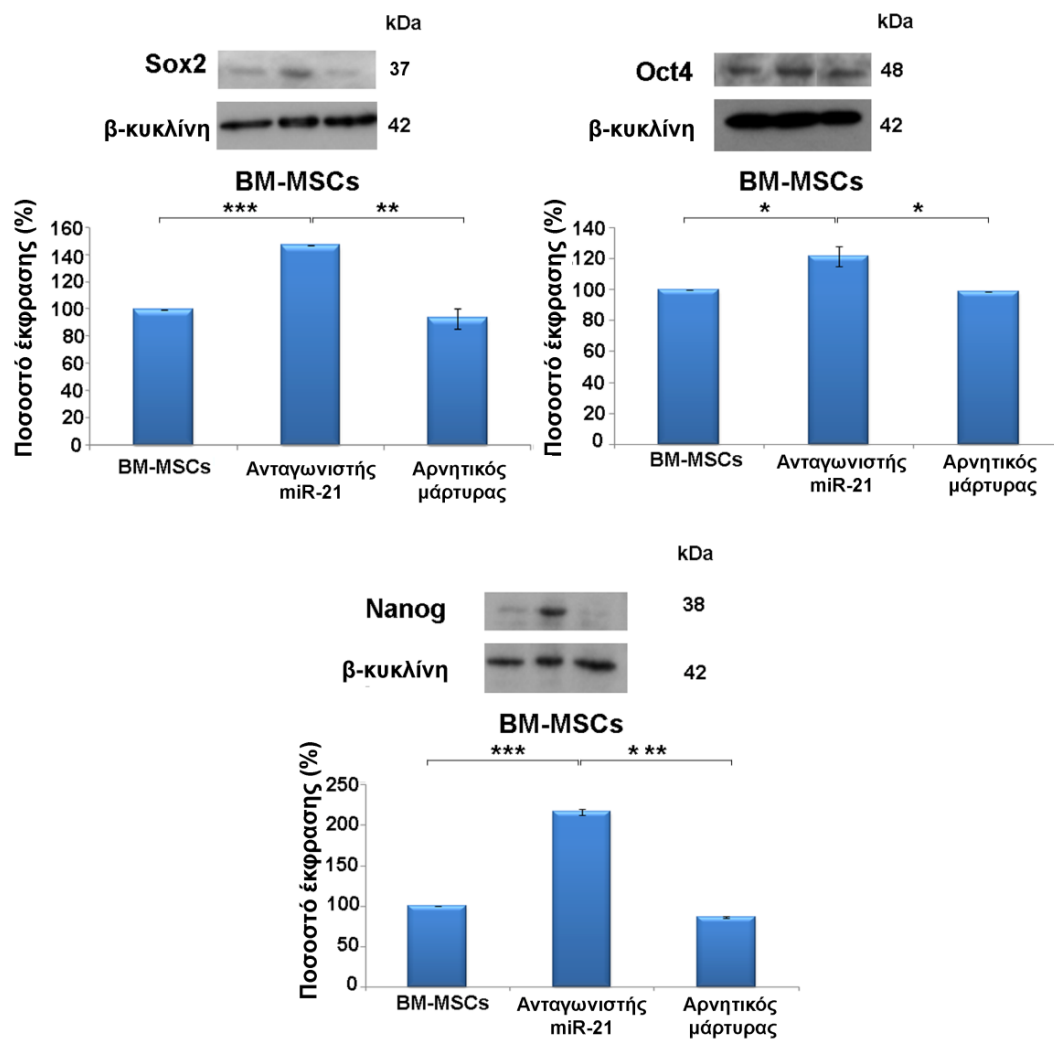


Εικόνα 4.25: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για το miR-21 σε BM-MSCs που έχουν διαμολυνθεί με τον ανταγωνιστή του miR-21 ή με τον αρνητικό μάρτυρα. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$, Student's t-test).



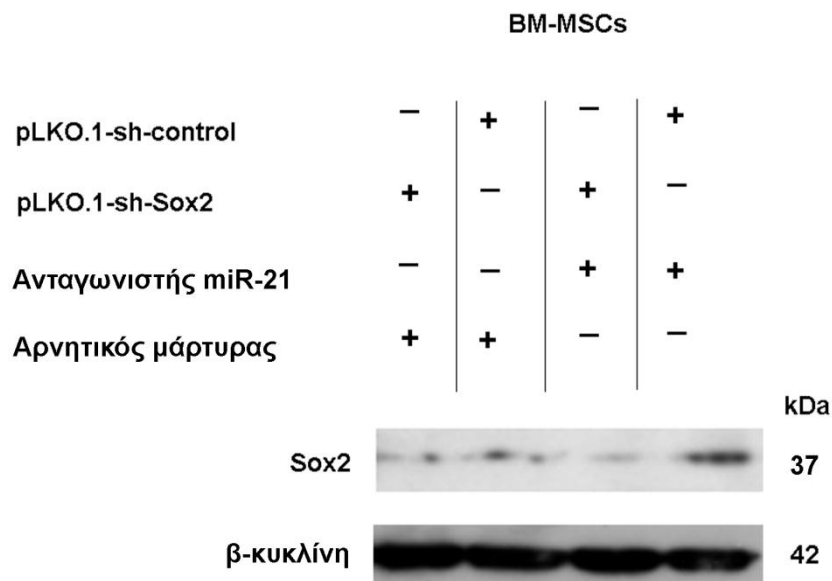
Εικόνα 4.26: Συγκριτική ανάλυση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των BM-MSCs που έχουν διαμολυνθεί με τον ανταγωνιστή του miR-21 σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα μετά από 24 και 48 ώρες. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$, Student's t-test).

Έπειτα, διαπιστώθηκε ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού, παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση 24 ώρες μετά την αναστολή του miR-21 από τον ανταγωνιστή, όπως καθορίστηκε με την MTS δοκιμασία (Εικόνα 4.26). Επιπρόσθετα, η μείωση της έκφρασης του miR-21 οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης των δεικτών Sox2, Oct4 και Nanog (Εικόνα 4.27).



Εικόνα 4.27 : Ανοσοαποτύπωση κατά Western για το Sox2, Oct4 και Nanog σε BM-MSCs που έχουν διαμολυνθεί με τον ανταγωνιστή του miR-21 ή με τον αρνητικό μάρτυρα. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$, Student's t-test).

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα διάσωσης, όπου τα BM-MSCs διαμολύνθηκαν με τον ανταγωνιστή του miR-21 και παράλληλα με το shRNA (short hairpin RNA) του Sox2. Όπως ήταν αναμενόμενο, η διαμόλυνση με το sh-Sox2 προκάλεσε τη μείωση της αυξανόμενης έκφρασης του Sox2 που προκαλείται αντίστοιχα από τη διαμόλυνση με τον ανταγωνιστή του miR-21 (Εικόνα 4.28).

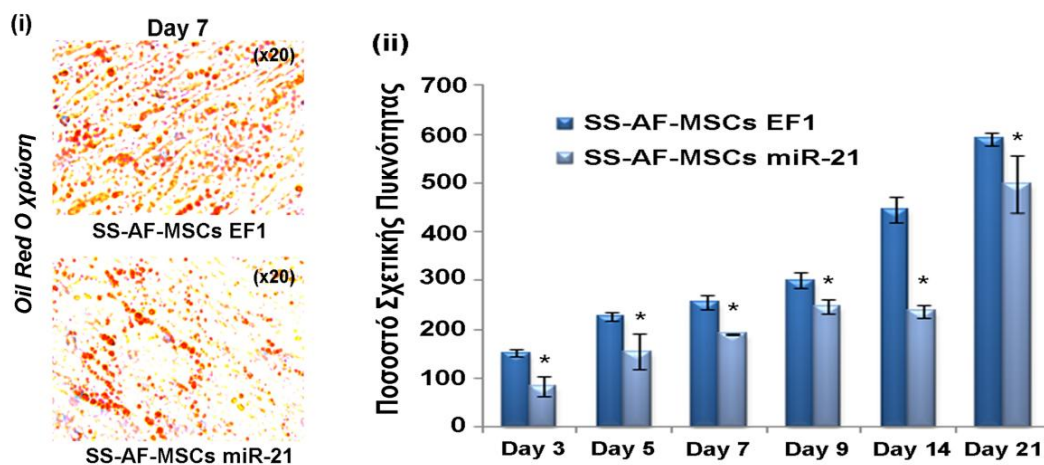


Εικόνα 4.28: Ανοσοαποτύπωση κατά Western για το Sox2 σε BM-MSCs που έχουν διαμολυνθεί με τον αρνητικό μάρτυρα ή με τον ανταγωνιστή του miR-21 και παράλληλα με το pLKO.1-sh-Sox2 ή με το pLKO.1-sh-control. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$, Student's t-test).

4.3.8 Επαγωγή του miR-21 επηρεάζει την ικανότητα διαφοροποίησης των SS-AF-MSCs

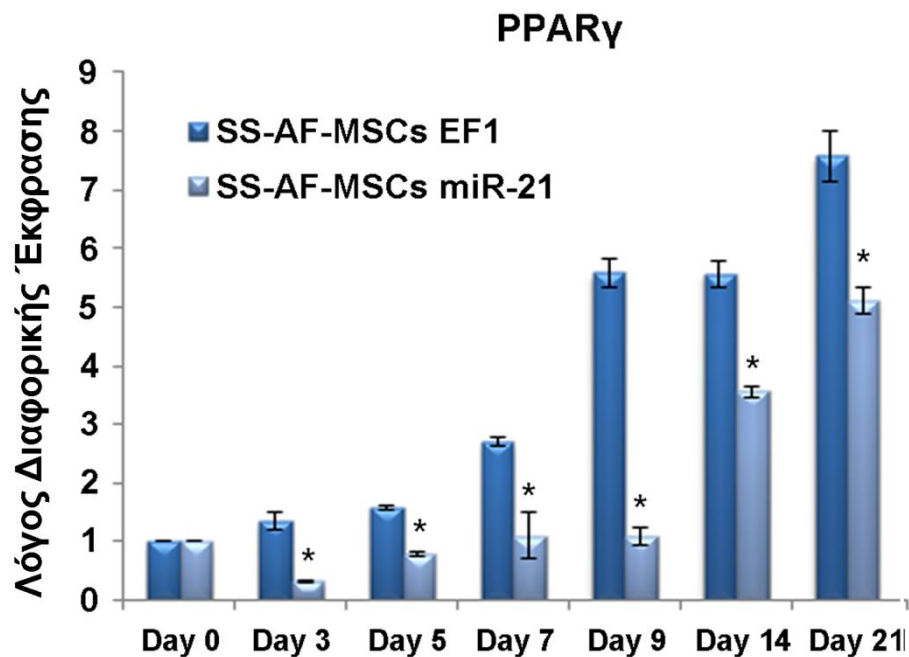
Ακολούθως πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση του ρόλου του miR-21 στην ικανότητα διαφοροποίησης των SS-AF-MSCs προς λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα.

Αρχικά, SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 ή έχουν μεταχθεί με τον EF1 λεντιό καλλιεργήθηκαν με κατάλληλα καλλιεργητικά μέσα για 3, 5, 7, 9, 14 και 21 ημέρες που προωθούν την διαφοροποίησή τους ως προς λιποκύτταρα. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του σχηματισμού λιποσταγονιδίων στα SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 σε σύγκριση με αυτά που έχουν μεταχθεί με τον EF1 λεντιό (Εικόνα 4.29). Χρησιμοποιώντας την χρώση Oil Red O ποσοτικοποιήθηκε η μείωση της διαφοροποίησης των SS-AF-MSCs προς λιποκύτταρα μετά την επαγωγή του miR-21 (Εικόνα 4.29).



Εικόνα 4.29: (i) Χρώση Oil Red O σε SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 ή έχουν μεταχθεί με τον EF1 λεντιό. (ii) Ποσοτική ανάλυση της Oil Red O χρώσης στις διάφορες ημέρες διαφοροποίησης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$, Student's t-test).

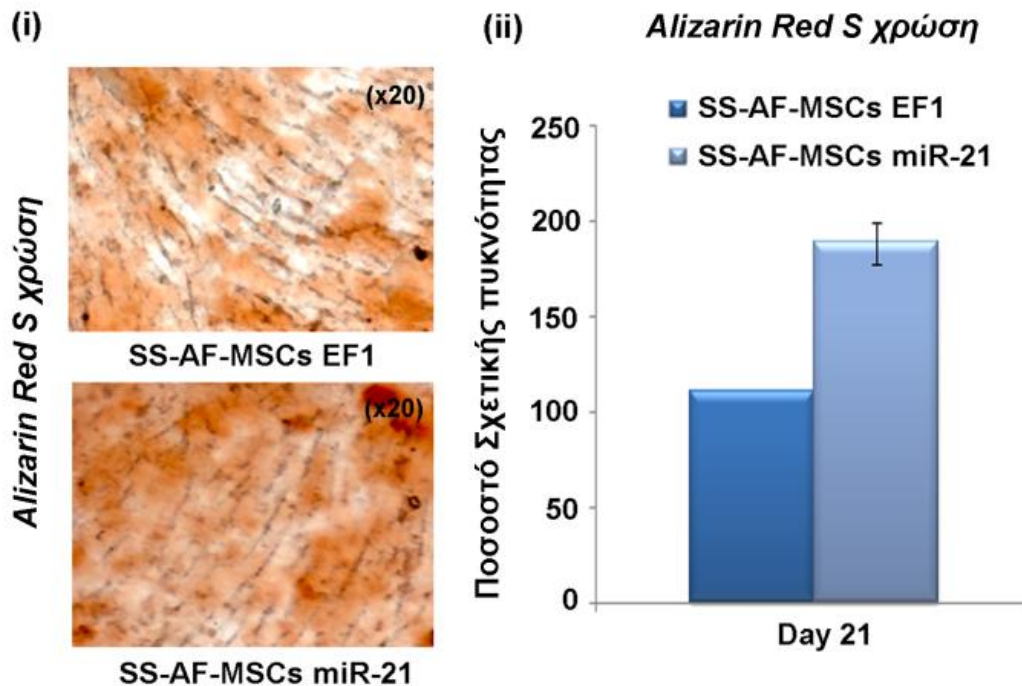
Παράλληλα, με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου παρατηρήθηκε η μείωση της σχετικής έκφρασης δεικτών διαφοροποίησης όπως του PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ) λιποσταγονιδίων στα SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 σε σύγκριση με αυτά που έχουν διαμολυνθεί με τον EF1 λεντιό (Εικόνα 4.30).



Εικόνα 4.30: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για τον δείκτη διαφοροποίησης προς λιποκύτταρα PPAR γ σε διαφοροποιημένα SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 ή έχουν μεταχθεί με τον EF1 λεντιό. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$, Student's t-test).

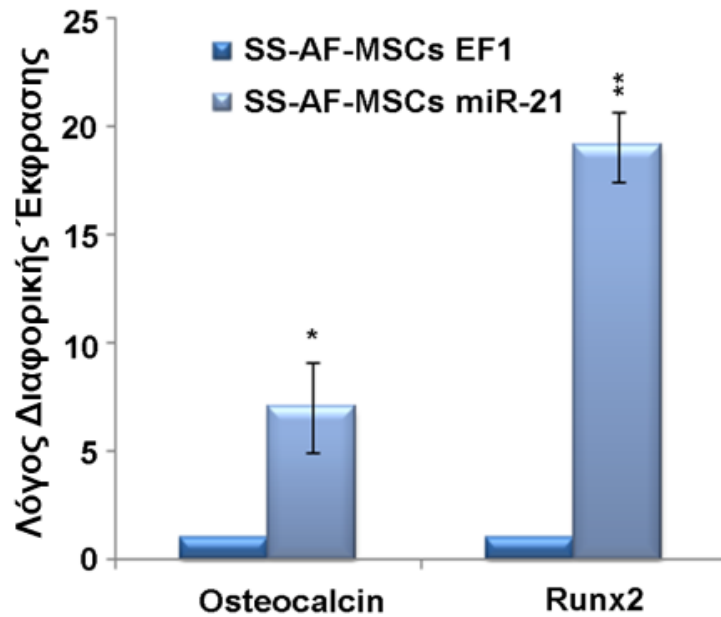
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διαφοροποίηση των SS-AF-MSCs που έχουν μεταχθεί με τον miR-21 ή με τον EF1 λεντιό, ως προς οστεοκύτταρα με τη χρήση κατάλληλων καλλιεργητικών μέσων. Παρατηρήθηκε, αύξηση των εναποθέσεων ασβεστίου μετά την επαγωγή του miR-21 στα SS-AF-MSCs με τη χρήση της Alizarin red S χρώσης (Εικόνα 4.31). Σε αντίθεση με την μείωση της ικανότητα

διαφοροποίησης των SS-AF-MSCs προς λιποκύτταρα μετά την επαγωγή του miR-21, παρατηρείται αύξηση της ικανότητας διαφοροποίησης ως προς οστεοκύτταρα (Εικόνα 4.31).



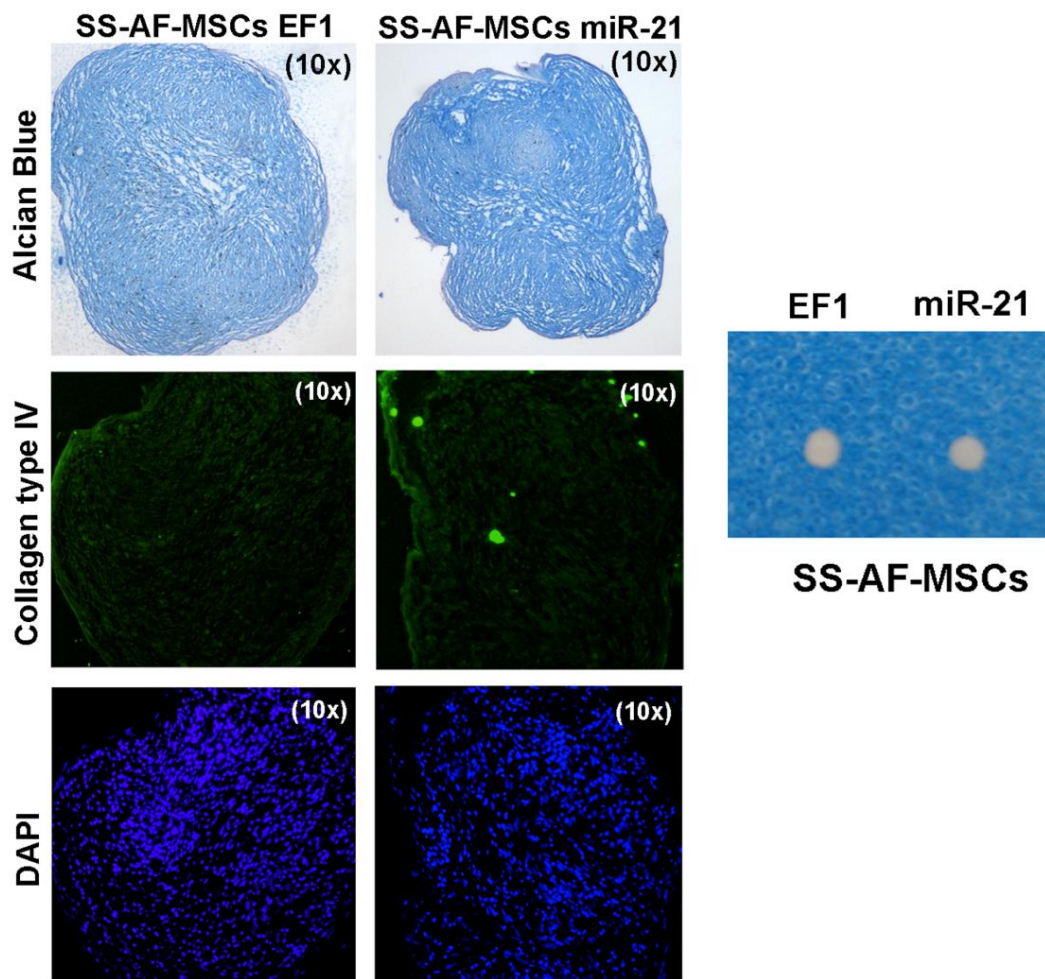
Εικόνα 4.31: (i) Χρώση Alizarin Red S σε SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 ή έχουν μεταχθεί με τον EF1 λεντιό. (ii) Ποσοτική ανάλυση της Alizarin Red S χρώσης στις διάφορες ημέρες διαφοροποίησης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$ και ** $p < 0.01$, Student's t-test).

Η έκφραση των δεικτών οστεογένεσης, όπως η οστεοκαλσίνη (Osteocalcin) και η Runx2 (Runt-related transcription factor 2), αυξάνεται στα SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 σε σύγκριση με αυτά που είναι μεταγμένα με τον EF1 λεντιό (Εικόνα 4.32).



Εικόνα 4.32: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για τους δείκτες διαφοροποίησης προς οστεοκύτταρα Osteocalcin και Runx2 σε διαφοροποιημένα SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 ή έχουν μεταχθεί με τον EF1 λεντίο. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm τη τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$ και ** $p < 0.01$, Student's t-test).

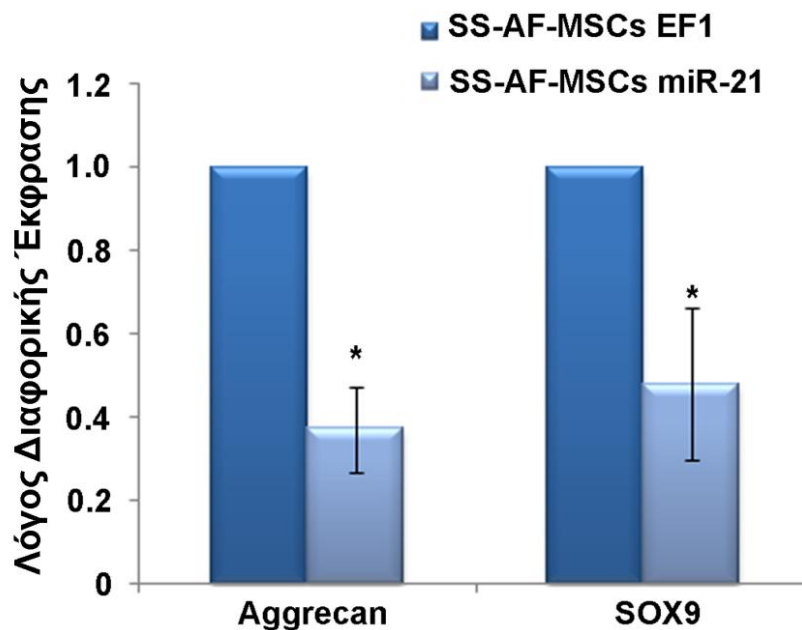
Έπειτα, πραγματοποιήθηκε διαφοροποίηση των SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 ή που είναι μεταγμένα με τον EF1 λεντίο, ως προς χονδροκύτταρα με τη χρήση κατάλληλων καλλιεργητικών μέσων. Αρχικά, παρατηρήθηκε ότι το κυτταρικό ίζημα που σχηματίστηκε από τα SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 είναι μικρότερο σε μέγεθος από το κυτταρικό ίζημα των SS-AF-MSCs που έχουν μεταχθεί με τον EF1 λεντίο (Εικόνα 4.33). Για την περαιτέρω αξιολόγηση της διαφοροποίησης, τα σχηματιζόμενα κυτταρικά ιζήματα παραφινολοιήθηκαν και λήφθηκαν τομές πάχους 5 μ m, στις οποίες πραγματοποιήθηκε χρώση Alcian Blue (Εικόνα 4.33).



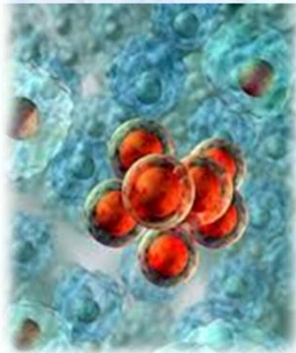
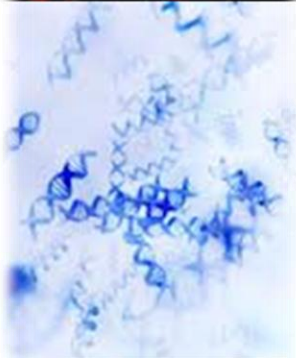
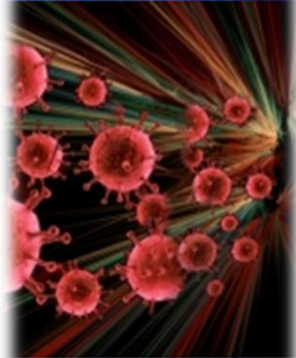
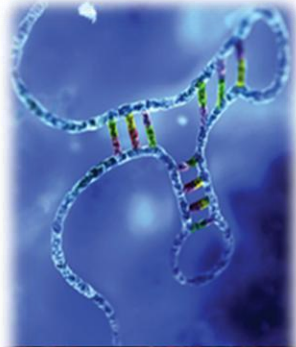
Εικόνα 4.33: Κυτταρικά ιζήματα από SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 ή έχουν μεταχθεί με τον EF1 λεντιό. Χρώση Alcian Blue και collagen IV μετά τη διαφοροποίηση σε χονδροκύτταρα. (iii) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για τους δείκτες διαφοροποίησης Sox9 και Aggrecan. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$, Student's t-test).

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση της έκφρασης της πρωτεΐνης του κολλαγόνου τύπου IV (collagen IV) με την τεχνική του ανοσοφθορισμού, μια πρωτεΐνη που διαδραματίζει βασικό ρόλο στην δημιουργία της συμπαγούς μάζας των διαφοροποιημένων κυττάρων [229] (Εικόνα 4.33).

Επιπρόσθετα, η έκφραση των δεικτών χονδρογένεσης, όπως η πρωτεΐνη Sox9 (SR_Y sex determining region Y box 9) και η Aggrecan, μειώνεται στα SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 σε σύγκριση με αυτά που έχουν μεταχθεί με τον EF1 λεντίο (Εικόνα 4.34). Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η επαγωγή του miR-21 στα SS-AF-MSCs επιταχύνει την οστεογένεση, ενώ ταυτόχρονα επιβραδύνει την λιπογένεση και την χονδρογένεση.



Εικόνα 4.34: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για τους δείκτες διαφοροποίησης προς χονδροκύτταρα Aggrecan και Sox9 σε διαφοροποιημένα SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-21 ή έχουν μεταχθεί με τον EF1 λεντίο. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$, Student's t-test).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ miRNAs ΤΩΝ SS-AF-MSCs ΚΑΙ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ SS-AF-MSCs ΠΡΟΣ ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΑ

5.1 Περίληψη

Έχει δειχθεί ότι τα miRNAs στοχεύουν βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες και γονίδια που διαδραματίζουν βασικό ρόλο στον καθορισμό της μοίρας των βλαστικών κυττάρων. Επιπρόσθετα, η έκφραση μοναδικών miRNAs σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους μπορεί να αξιοποιηθεί ως διαγνωστικό εργαλείο που θα καθορίζει τον συγκεκριμένο τύπο κυττάρων. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αναλύθηκε το πρότυπο έκφρασης των miRNAs των SS-AF-MSCs σε σύγκριση με αυτό των διαφοροποιημένων SS-AF-MSCs προς λιποκύτταρα. Αναγνωρίστηκαν 13 διαφορετικά εκφραζόμενα miRNAs και από αυτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε το miR-26a, το οποίο εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στα λιποκύτταρα σε σύγκριση με τα αδιαφοροποίητα SS-AF-MSCs. Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση της επαγωγής του miR-26a στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των SS-AF-MSCs. Φάνηκε ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού στα SS-AF-MSCs που εκφράζουν το miR-26a μειώνεται σημαντικά, καθώς και η έκφραση των δεικτών βλαστικότητας Sox2, Oct4 και Nanog. Τέλος, φάνηκε ότι η επαγωγή της έκφρασης του miR-26a στα SS-AF-MSCs μειώνει την ικανότητα τους να διαφοροποιούνται ως προς λιποκύτταρα.

5.2 Εισαγωγή

Τα AF-MSCs εμφανίζουν ένα ευρύ δυναμικό διαφοροποίησης προς κύτταρα της μεσοδερμικής σειράς, με αποτέλεσμα υπό κατάλληλες συνθήκες να μπορούν να διαφοροποιηθούν προς λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα [102, 103, 117]. Εντούτοις, νεότερες μελέτες έχουν αποδείξει ότι μπορούν να διαφοροποιηθούν επιτυχώς και προς κύτταρα της ενδοδερμικής σειράς, όπως είναι τα ηπατοκύτταρα [116, 117] και προς κύτταρα της εκτοδερμικής σειράς, όπως είναι τα νευρικά κύτταρα

[103, 109, 115], γεγονός που τα καθιστά εξαιρετικά χρήσιμα εργαλεία στην κυτταρική και γονιδιακή θεραπεία.

Τα miRNAs έχουν βρεθεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιολογία των βλαστικών κυττάρων και πιο συγκεκριμένα στην ικανότητα διαφοροποίησης του προς ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών σειρών. Έχει βρεθεί ότι τα βλαστικά κύτταρα διαθέτουν ένα συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης miRNAs ανάλογα με τον τύπο κυττάρου που διαφοροποιούνται [230]. Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στα ανθρώπινα MSCs, που δείχνουν ότι συγκεκριμένα miRNAs έχουν καθοριστικό ρόλο κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης και ότι αυτά τα miRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για τον αντίστοιχο τύπο κυττάρων. Για παράδειγμα, τα miR-143 και miR-145 έχουν βρεθεί να διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη διαφοροποίηση των BM-MSCs προς λιποκύτταρα, και αντίστοιχα τα miR-638 και miR-663 να διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη διαφοροποίηση των BM-MSCs προς χονδροκύτταρα [197, 230]. Πρόσφατα, ο Paik και άλλοι έδειξαν ότι το miR-449a στοχεύει τον παράγοντα LEF-1 (lymphoid enhancer-binding factor-1), ο οποίος με τη σειρά του επηρεάζει την έκφραση της πρωτεΐνης Sox9 που αποτελεί βασικό ρυθμιστή της διαφοροποίησης των BM-MSCs προς χονδροκύτταρα [231]. Παρομοίως, ο Cai και άλλοι διαπίστωσαν ότι το miR-124 ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των BM-MSCs προς μυϊκά κύτταρα, στοχεύοντας το STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), αποκτώντας έτσι καλύτερη εικόνα για τους μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην καρδιομυογένεση [232].

Είναι λοιπόν φανερό ότι η αποκάλυψη του προτύπου έκφρασης των miRNAs στα διαφοροποιημένα MSCs, μπορεί να οδηγήσει σε βασικές πληροφορίες για τους μηχανισμούς που ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης.

Στο Κεφάλαιο 5 περιγράφονται α) η ανίχνευση των miRNAs που εκφράζονται σε SS-AF-MSCs και σε διαφοροποιημένα SS-AF-MSCs προς λιποκύτταρα με τη χρήση miRNAs μικροσυστοιχιών, β) η επαλήθευση των επιπέδων έκφρασης των miRNAs με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πραγματικού χρόνου, γ) η σύγκριση του προτύπου έκφρασης των miRNAs που εκφράζονται σε SS-AF-MSCs και σε διαφοροποιημένα SS-AF-MSCs προς λιποκύτταρα, δ) η μελέτη της επίδρασης της

επαγωγής της έκφρασης του miR-26a στην ικανότητα πολλαπλασιαστική των SS-AF-MSCs και τη ικανότητα διαφοροποίησης τους σε λιποκύτταρα.

5.3 Αποτελέσματα

5.3.1 Πρότυπο έκφρασης miRNAs των SS-AF-MSCs και των διαφοροποιημένων SS-AF-MSCs προς λιποκύτταρα με τη χρήση miRNAs μικροσυστοιχιών

Για τη μελέτη του πρότυπου έκφρασης miRNAs των SS-AF-MSCs και των διαφοροποιημένων SS-AF-MSCs προς λιποκύτταρα απομονώθηκε ολικό RNA σύμφωνα με την μεθοδολογία που αναφέρεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.5. Η πραγματοποίηση των miRNAs μικροσυστοιχιών επιτεύχθηκε σε συνεργασία με την εταιρία Exiqon και χρησιμοποιήθηκε το miRCURY™ LNA Array v.8.1, το οποίο περιέχει ανιχνευτές που αντιστοιχούν σε αλληλουχίες miRNAs ανθρώπου, ποντικού και αρουραίου από την βάση δεδομένων miRBase 7.1. Χρησιμοποιήθηκαν RNA από δείγματα δύο SS-AF-MSCs και δύο διαφοροποιημένων SS-AF-MSCs προς λιποκύτταρα. Η υβριδοποίηση στο miRCURY™ LNA Array v.8.1 πραγματοποιήθηκε για καθέ ένα από τα δείγματα ξεχωριστά ως προς το σύνολο όλων των δειγμάτων. Αναλυτικότερα, το σύνολο όλων των δειγμάτων σημάνθηκε με τη χρωστική Hy5™ και το κάθε δείγμα ξεχωριστά με την χρωστική Hy3™ με το σύστημα σήμανσης αντιδραστηρίων miRCURY™. Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν οι υβριδισμοί στο miRCURY™ LNA Array v.8.1 και η πλάκα επεξεργάστηκε από ειδικό ανιχνευτή (scanner). Πραγματοποιήθηκε ανάλυση της εικόνας ώστε να επιτευχθεί ποσοτικοποίηση και κανονικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο global Lowess (Locally Weighted Scatterplot Smoothing). Τα συνολικά αποτελέσματα παρουσιάζονται με βάση το $\log_2(\text{Hy3}/\text{Hy5})$ και με τυπική απόκλιση > 0.50 .

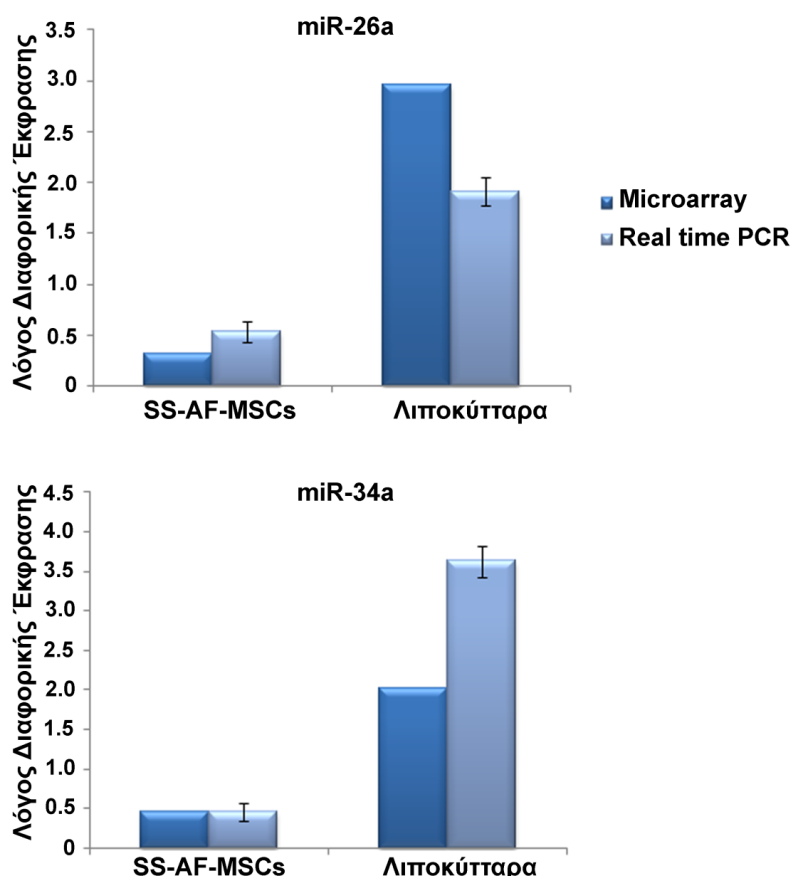
Αναλυτικότερα, 13 miRNAs βρέθηκαν να παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης ανάμεσα στα SS-AF-MSCs και στα λιποκύτταρα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.1, όπου παρουσιάζεται η κανονικοποιημένη αναλογία Hy3/Hy5 από όλους τους υβριδισμούς που πραγματοποιήθηκαν. Το p-value υπολογίστηκε με Student's t-test, καθώς και με τη μέθοδο πολλαπλής ανάλυσης Benjamini and Hochberg.

Annotation	Λιποκύτταρα / SS-AF-MSCs	LogMedianRatios log ₂ (Hy3/Hy5)	SS-AF-MSCs / Λιποκύτταρα
hsa-miR-923	-0,95	1,98	
hsa-miR-26a	1,56	-1,66	
hsa-miR-30d	1,43	-0,71	
hsa-miR-483-5p	1,15	-1,38	
hsa-miR-199a-5p	1,35	-1,21	
hsa-miR-30a	1,33	-1,31	
hsa-miR-199a-3p/hsa-miR-199b-3p	1,01	-1,32	
miRPlus_17952	-1,27	1,07	
hsa-miR-34a	1,01	-1,14	
hsa-miR-191	1,13	-1,03	
hsa-miR-668	-1,11	0,75	
hsa-miR-99b	0,54	-1,04	
hsa-miR-31	-1,01	0,81	

Πίνακας 5.1: Τα διαφορετικά εκφραζόμενα miRNAs στα SS-AF-MSCs και στα διαφοροποιημένα SS-AF-MSCs προς λιποκύτταρα με τις τιμές της αναλογίας Hy3/Hy5. Οι miRPlus αλληλουχίες δεν έχουν ακόμα καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων miRBase.

5.3.2 Επιβεβαίωση miRNA μικροσυστοιχιών με αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

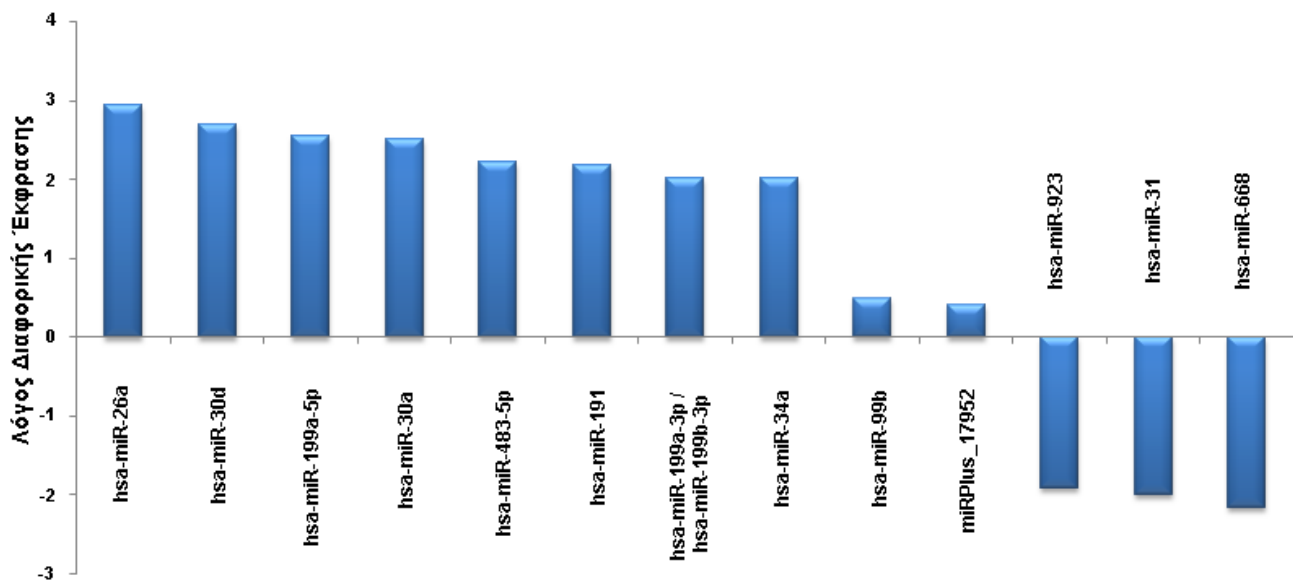
Για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των miRNA μικροσυστοιχιών πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time PCR) για επιλεγμένα miRNAs που ανιχνεύθηκαν, όπως το hsa-miR-26a και το hsa-miR-34a. Αρχικά, συντέθηκε cDNA με τη χρήση ειδικών εκκινήτων για τα παραπάνω miRNAs καθώς και για το μάρτυρα RNU44. Τα παραγόμενα cDNA στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Η κανονικοποίηση κάθε αποτελέσματος έγινε αρχικά με βάση τα επίπεδα έκφρασης του μάρτυρα RNU44 και στη συνέχεια τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με βάση το μέσο όρο όλων των τιμών όλων των δειγμάτων. Τα τελικά αποτελέσματα επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα των miRNA μικροσυστοιχιών, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.1.



Εικόνα 5.1: Επιβεβαίωση των miRNA μικροσυστοιχιών με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για το hsa-miR-26a και το hsa-miR-34a.

5.3.3 Σύγκριση της έκφρασης των miRNAs των SS-AF-MSCs και των λιποκυττάρων

Μελετώντας αναλυτικότερα τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs που ανιχνεύθηκαν, βρέθηκαν 10 miRNAs που εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στα λιποκύτταρα και 3 miRNAs που εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα σε σύγκριση με τα SS-AF-MSCs (Εικόνα 5.2).



Εικόνα 5.2: Πρότυπο miRNA στα διαφοροποιημένα SS-AF-MSCs προς λιποκύτταρα.

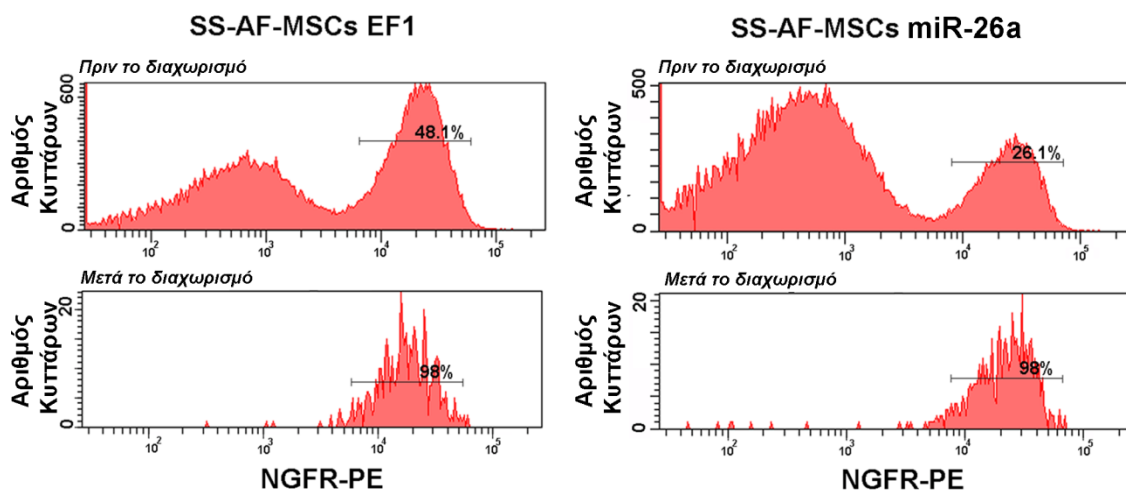
Αναλυτικότερα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκάλεσε το miR-26a, το οποίο εκφράζεται στα υψηλότερα επίπεδα στα λιποκύτταρα (2.95 - λόγος έκφρασης) σε σύγκριση με τα SS-AF-MSCs (0.32 - λόγος έκφρασης), όπως καθορίζεται από τα αποτελέσματα των miRNA μικροσυστοιχιών και επιβεβαιώνεται από την αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.2.

Χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων miRecords (<http://mirecords.biolead.org/>) φαίνεται ότι 5 γονίδια έχουν ήδη χαρακτηριστεί πειραματικά ως στόχοι του miR-26a. Τα γονίδια αυτά είναι το Smad 1 (Smad family member 1) [233], το PLAG1 (Human pleomorphic adenoma gene 1) [234], το TGFBR2 (Transforming growth factor, beta receptor II / Αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού, βήτα υποδοχέα II) [235], το

SERBP1 (SERPINE1 mRNA binding protein 1) [236] και το EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) [237].

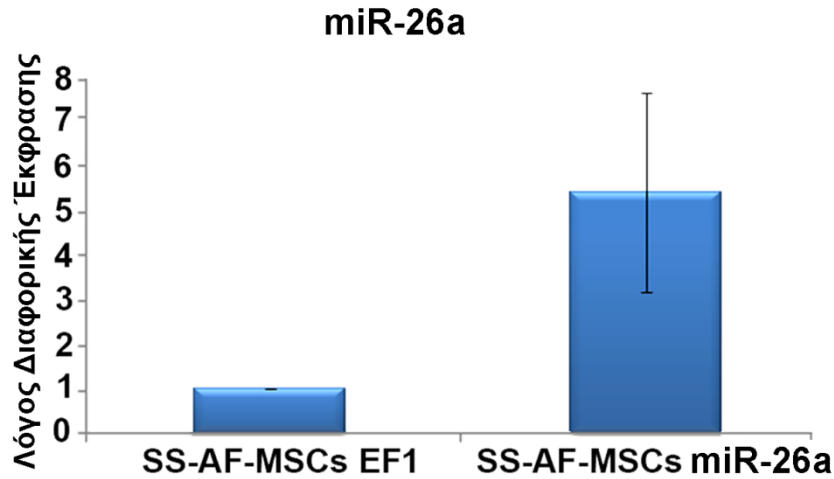
5.3.4 Επαγωγή του miR-26a στα SS-AF-MSCs οδηγεί σε μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού

Αρχικά μελετήθηκε ο ρόλος του miR-26a στα βασικά χαρακτηριστικά των SS-AF-MSCs, γι' αυτό κατασκευάστηκε λεντιϊός που επάγει την έκφραση του miR-26a. Πραγματοποιήθηκε μεταγωγή των SS-AF-MSCs με τον λεντιϊό του miR-26a ή του EF1 σε πολλαπλότητα μόλυνσης 4 - MOI4 και διαχωρισμός των NGFR θετικών κυττάρων με τη χρήση της τεχνικής διαχωρισμού φθορίζοντων κυττάρων (απόδοση διαχωρισμού 98%) (Εικόνα 5.3).



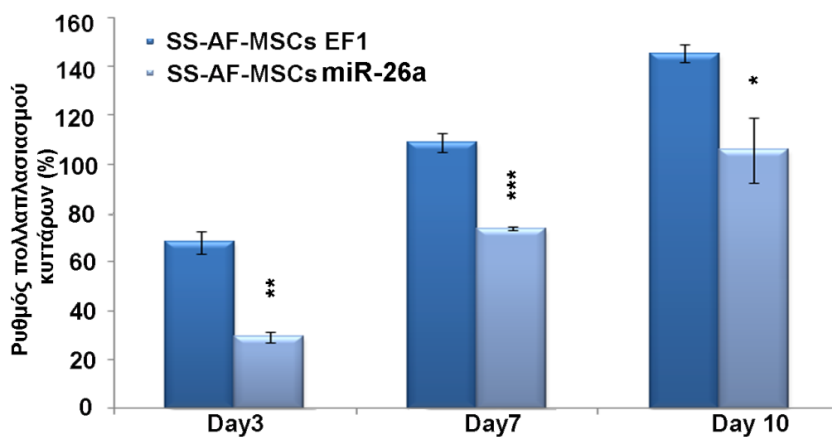
Εικόνα 5.3: Η έκφραση του NGFR στα SS-AF-MSCs μεταγμένα με λεντιϊό miR-26a ή EF1 σε MOI 4 πριν και μετά το διαχωρισμό.

Ο λόγος αλλαγής έκφρασης των SS-AF-MSCs μετά τη μεταγωγή με λεντιϊό miR-26a και τον διαχωρισμό είναι μεταξύ 2.5-9.8 φορές σε σύγκριση με τα κύτταρα που είναι μεταγμένα με τον λεντιϊό EF1 που αποτελούν τον μάρτυρα (Εικόνα 5.4).). Ο λόγος αλλαγής έκφρασης του miR-21 εμφάνισε μία σημαντική ετερογένεια, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στο ότι τα δείγματα των AF-MSCs προέρχονται από διαφορετικούς δότες.



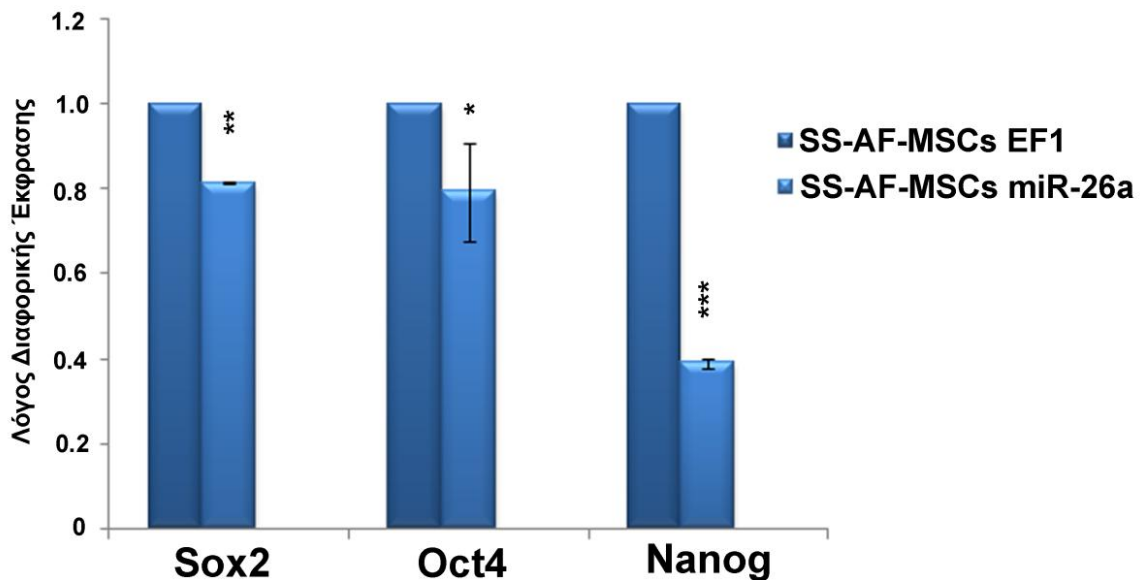
Εικόνα 5.4: Αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για το miR-26a σε SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-26a ή EF1. Το RNU44 χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας.

Για την ανάλυση του ρόλου του miR-26a στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των SS-AF-MSCs, πραγματοποιήθηκε μελέτη χρησιμοποιώντας το χρωμογόνο αντιδραστήριο MTS μετά από τρεις, επτά και δέκα ημέρες. Η επαγωγή του miR-26a στα SS-AF-MSCs προκαλεί στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε σύγκριση με τα SS-AF-MSCs που έχουν μεταχθεί με το EF1 λεντιϊό (Εικόνα 5.5).



Εικόνα 5.5: Συγκριτική ανάλυση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-26a σε σύγκριση με τα SS-AF-MSCs μεταγμένα με λεντιϊό EF1. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$ και ** $p < 0.01$, Student's t-test).

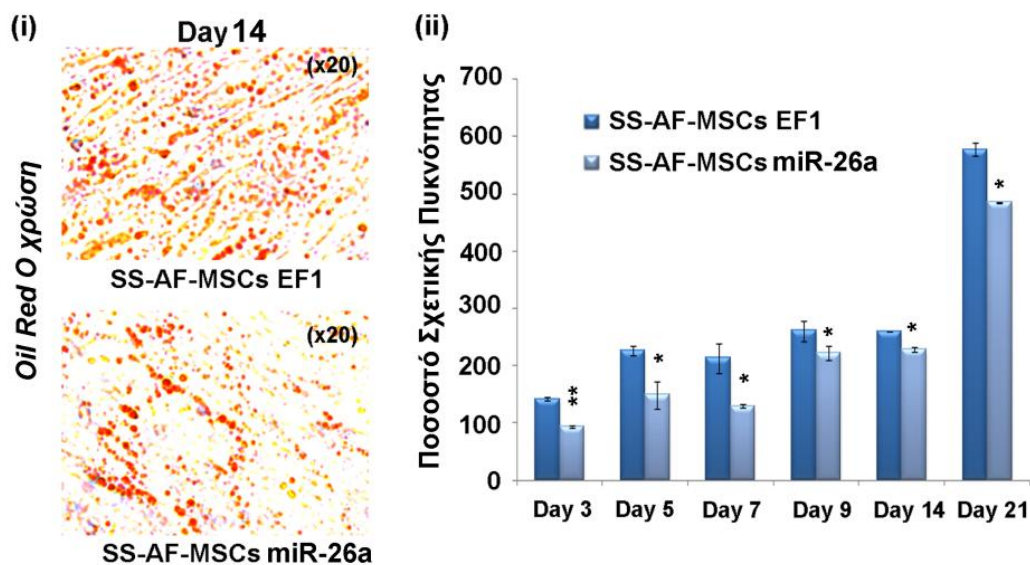
Στηριζόμενοι στη μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των SS-AF-MSCs μετά από την επαγωγή της έκφρασης του miR-26a, μελετήθηκε η έκφραση των δεικτών βλαστικότητας Sox2, Oct4 και Nanog. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στην έκφραση και των τριών δεικτών σε επίπεδο RNA στα SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-26a σε σύγκριση με αυτά που έχουν μεταχθεί με EF1 λεντιϊό (Εικόνα 5.6). Οι μεταγραφικοί παράγοντες Sox2, Oct4 και Nanog δεν είναι προβλεπόμενοι στόχοι για το miR-26a, όπως φάνηκε έπειτα από *in silico* βιοπληροφορική ανάλυση. Αυτό το γεγονός οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μείωση της έκφρασης τους που παρατηρείται προκαλείται με κάποιο έμμεσο μηχανισμό και όχι άμεσα από το miR-26a.



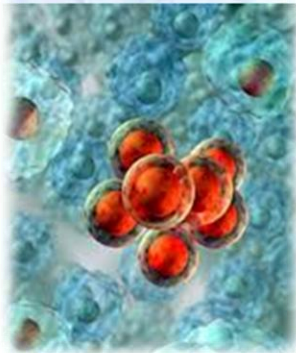
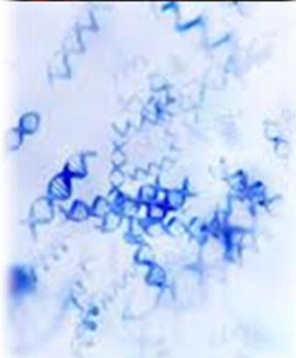
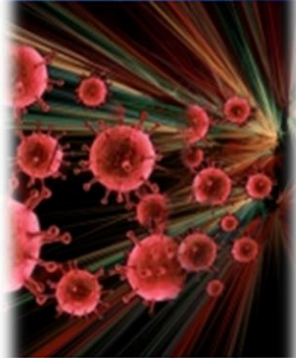
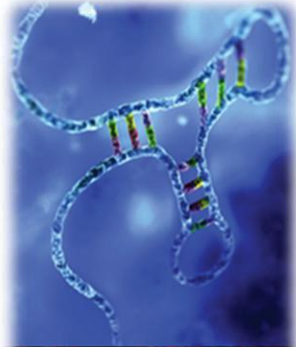
Εικόνα 5.6: Αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου Sox2, Oct4 και Nanog σε SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-26a σε σύγκριση με τα SS-AF-MSCs μεταγμένα με τον λεντιϊό EF1. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$ και ** $p < 0.01$, Student's t-test).

5.3.5 Επαγωγή του miR-26a στα SS-AF-MSCs επηρεάζει την ικανότητα διαφοροποίησης των SS-AF-MSCs προς λιποκύτταρα

Στη πορεία, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση του ρόλου του miR-26a στην ικανότητα διαφοροποίησης των SS-AF-MSCs προς λιποκύτταρα. Αρχικά, SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-26a ή έχουν μεταχθεί με τον EF1 λεντιόο καλλιεργήθηκαν με κατάλληλα καλλιεργητικά μέσα που προωθούν την διαφοροποίησή τους ως προς λιποκύτταρα για 3, 5, 7, 9, 14 και 21 ημέρες. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του σχηματισμού λιποσταγονιδίων στα SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-26a σε σύγκριση με αυτά που έχουν μεταχθεί με τον EF1 λεντιόο (Εικόνα 5.7). Χρησιμοποιώντας την χρώση Oil Red O ποσοτικοποιήθηκε η μείωση της διαφοροποίησης των SS-AF-MSCs που εξέφραζαν το miR-26a προς λιποκύτταρα (Εικόνα 5.7).



Εικόνα 5.7: Α (i) Χρώση Oil Red O σε SS-AF-MSCs που εκφράζουν miR-26a ή έχουν μεταχθεί με τον EF1 λεντιόο. (ii) Ποσοτική ανάλυση της Oil Red O χρώσης στις διάφορες ημέρες διαφοροποίησης. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα (* $p < 0.05$, Student's t-test).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1 Λειτουργική κατηγοριοποίηση των miRNAs που εκφράζονται στα μεσεγχοματικά βλαστικά κύτταρα τριών διαφορετικών πηγών

Ο ρόλος των microRNAs (miRNAs) στον καθορισμό της ‘μοίρας’ των διαφόρων κατηγοριών των βλαστικών κυττάρων έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών. Πρόσφατες μελέτες έχουν εστιαστεί στον χαρακτηρισμό των miRNAs που εκφράζονται στα μεσεγχοματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) [184-187]. Τα MSCs αποτελούν μια κατηγορία βλαστικών κυττάρων μεσοδερμικής προέλευσης, προερχόμενων από ενήλικες ή εμβρυϊκές πηγές [89, 122, 190]. Τα καλύτερα χαρακτηρισμένα MSCs είναι αυτά του μυελού των οστών (BM-MSCs). Εντούτοις, πρόσφατα έχουν χαρακτηριστεί MSCs από εμβρυϊκές πηγές όπως αυτές του αμνιακού υγρού (AF) και του αίματος ομφαλίου λώρου (UCB) [102, 103, 115, 238].

Η ερευνητική μας ομάδα έχει επιτυχώς απομονώσει και χαρακτηρίσει δύο καρυοτυπικά φυσιολογικούς και μορφολογικά διακριτούς πληθυσμούς των AF-MSCs (τα SS-AF-MSCs και τα RS-AF-MSCs), και έχει πραγματοποιήσει συστηματικό φαινοτυπικό χαρακτηρισμό, καθώς και μοριακή και πρωτεωμική ανάλυση [102, 103]. Αποτελέσματα της ομάδας μας έχουν δείξει ότι τα SS-AF-MSCs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανό εργαλείο στην κυτταρική θεραπεία αφού είναι ικανά να επιταχύνουν την ιστική επιδιόρθωση σε καταστάσεις οξείας ηπατικής ανεπάρκειας [116] και μπορούν να αποτελέσουν οχήματα μεταφοράς αντικαρκινικών φαρμάκων in vivo [138].

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση των εκφραζόμενων miRNAs σε AF, BM και UCB-MSCs με τη χρήση μικροσυστοιχιών miRNAs (miRCURY™ LNA Array v.8.1). Κατόπιν έγινε σύγκριση του προτύπου έκφρασης των miRNAs των AF-MSCs με το αντίστοιχο των BM και UCB-MSCs, η οποία και τεκμηρίωσε ένα διακριτό πρότυπο για κάθε πηγή. Η ανάλυση του προτύπου έκφρασης των miRNAs οδήγησε στην ταυτοποίηση 67 διαφορετικά εκφραζόμενα miRNAs στα MSCs των τριών πηγών. Εκτενής ανάλυση έδειξε ότι δεν βρέθηκε κοινό υψηλά εκφραζόμενο miRNA, ενώ τα miR-143, miR-487, miR-326 και miR-199*

φάνηκαν να εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα και στους τρεις πληθυσμούς των MSCs. Τα παραπάνω miRNAs έχει αποδειχθεί ότι στοχεύουν γονίδια που παίζουν ρόλο στη ρύθμιση κυτταρικών διεργασιών, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η κυτταρική επιβίωση. Για παράδειγμα, το miR-143 στοχεύει γονίδια όπως το ERK5 (Extracellular-signal-regulated kinase 5) [203], το DNMT3A (DNA methyltransferase 3A) [239], FNDC3b (fibronectin type III domain containing 3B) [240] και το Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) [241] όπως φαίνεται μετά την ανάλυση με την βάση δεδομένων miRecords [205].

Εκτενής ανάλυση του πρότυπου έκφρασης των miRNAs στους δύο υποπληθυσμούς των AF-MSCs, οδήγησε στην ταυτοποίηση 32 διαφορεικά εκφραζόμενων miRNAs στα SS- και RS-AF-MSCs. Οι δυο αυτοί υποπληθυσμοί παρουσιάζουν διαφορετική μορφολογία και ικανότητα διαφοροποίησης καθώς επίσης και διαφορετικό ρυθμό πολλαπλασιασμού [102], γεγονός που υποστηρίζει την υπόθεση ότι τα διαφορετικά εκφραζόμενα miRNAs είναι δυνατό να παίζουν βασικό ρόλο στη ρύθμιση των παραπάνω κυτταρικών διεργασιών.

Από την ανάλυση του προτύπου έκφρασης, τεκμηριώθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των miR-21 στα RS-AF-MSCs σε σύγκριση με τα SS-AF-MSCs. Ο ρόλος του miR-21 έχει μελετηθεί σε διάφορα ερευνητικά πεδία όπως η ογκολογία, η βιολογία των βλαστικών κυττάρων, η γήρανση και η ανάπτυξη [242]. Έχει αποδειχθεί ότι το miR-21 παρουσιάζει ογκογονικό ρόλο σε διάφορους τύπους καρκίνου και εξετάζεται η χρήση του ως καρκινικός δείκτης [223, 225]. Αναλυτικότερα, το miR-21 έχει φανεί να εμπλέκεται στην προώθηση της ανάπτυξης του όγκου σε διάφορους τύπους καρκίνου στοχεύοντας γονίδια όπως το ογκοκατασταλτικό γονίδιο Pcd4 (Programmed cell death 4) [225], το PTEN (Phosphatase and tensin homologue) [243] ή το TPM1 (Tropomyosin 1) [224]. Σε συνδυασμό με τον ογκογονικό του ρόλο, το miR-21 φαίνεται να προκαλεί καταστολή της αγγειογένεσης, στοχεύοντας το μετάγραφο της RhoB (Ras homolog gene family member B) σε ενδοθηλιακά κύτταρα [244]. Παράλληλα, σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ESCs) ποντικού βρέθηκε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας REST (RE1 silencing transcription factor) προκαλεί την αναστολή του miR-21, οδηγώντας σε καταστολή του ρυθμού πολλαπλασιασμού και της βλαστικότητας των κυττάρων, καθώς και σε καταστολή της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων Sox2, Oct4, Nanog και c-Myc [245].

Στη συνέχεια, ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση με τη χρήση του προγράμματος GomiR, όπου αναγνωρίστηκε ο μεταγραφικός παράγοντας Sox2 ως πιθανός στόχος του miR-21. Έπειτα, αποδείχτηκε πειραματικά για πρώτη φορά ότι το Sox2 ρυθμίζεται αρνητικά από το miR-21 σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, μέσω συγκεκριμένης αλληλουχίας που βρίσκεται στη 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) του γονιδίου.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι συγκεκριμένα miRNAs μπορούν να προωθούν τον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό μέσω ρύθμισης της έκφρασης συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων [246]. Για παράδειγμα, το miR-302-367 μπορεί να αντικαταστήσει τους μεταγραφικούς παράγοντες Sox2, Oct4 και Klf4 που προωθούν τον επαναπρογραμματισμό στα iPSCs κύτταρα [247]. Η εύρεση λοιπόν miRNAs ικανών να ρυθμίζουν τους παράγοντες επαναπρογραμματισμού, μπορεί να αποβεί χρήσιμη για τον επαναπρογραμματισμό σωματικών κυττάρων και τον σχηματισμό iPSCs κυττάρων.

6.2 Η καταστολή του Sox2 από το miR-21 επιδρά στις ιδιότητες των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων

Ακολούθησε εκτενής μελέτη του ρόλου του miR-21 στους δύο υποπληθυσμούς των AF-MSCs. Η επαγωγή της έκφρασης του miR-21 στα SS-AF-MSCs οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης του Sox2 σε επίπεδο RNA αλλά και πρωτεΐνης. Ταυτόχρονα, διαπιστώθηκε ότι η επαγωγή της έκφρασης του miR-21 προκάλεσε μείωση της έκφρασης και των μεταγραφικών παραγόντων Oct4 και Nanog, πιθανόν μέσω κάποιου έμμεσου μηχανισμού, εφόσον κανένα από τα δύο γονίδια δεν θεωρείται πιθανός στόχος του miR-21 με βάση διάφορους αλγορίθμους πρόβλεψης. Οι τρεις αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες είναι γνωστό ότι δρουν συνεργατικά δημιουργώντας ένα δίκτυο και παίζουν σημαντικό ρόλο στα χαρακτηριστικά των βλαστικών κυττάρων [20]. Επιπρόσθετα, το Sox2 έχει βρεθεί να ρυθμίζει άμεσα την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Nanog [248]. Όπως είναι αναμενόμενο μείωση της έκφρασης του Sox2 οδηγεί σε καταστολή της έκφρασης του Nanog [248].

Η μείωση της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων Sox2, Oct4 και Nanog μετά την επαγωγή της έκφρασης του miR-21 δύναται να παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση των ιδιοτήτων των SS-AF-MSCs. Παρατηρήθηκε ότι η επαγωγή του miR-21 στα SS-AF-MSCs έχει ως επακόλουθο την μείωση της κλωνογονικής τους ικανότητας καθώς και του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους. Ταυτόχρονα, δεν παρατηρήθηκε αύξηση της απόπτωσης με δοκιμασία χρώσης για την Ανεξίνη V, μετά την επαγωγή της έκφρασης του miR-21 στα SS-AF-MSCs. Παρομοίως, μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε BM-MSCs έδειξαν ότι η καταστολή του Sox2 οδήγησε σε μείωση της κλωνογονικής ικανότητας και σε μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων [249].

Επιπρόσθετα, η επαγωγή της έκφρασης του miR-21 στα SS-AF-MSCs σε συνδυασμό με την στατιστικά σημαντική μείωση του Sox2, οδήγησε σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G0/G1. Παράλληλα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης των κυκλινών D1, E1 και A, μετά την επαγωγή της έκφρασης του miR-21 στα SS-AF-MSCs. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το Sox2 προωθεί τον πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων, έτσι ώστε να είναι δυνατή η μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου [250]. Επιπρόσθετα, η καταστολή του Sox2 με τη χρήση sh-Sox2 φορέων σε MSCs, οδηγεί σε μείωση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, καταστέλλοντας τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών [251].

Στη συνέχεια, αναλύθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου p27 και p18. Οι αναστολείς του κυτταρικού κύκλου προσδένονται στα σύμπλοκα των κυκλινών με τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (CDKs) και αναστέλλουν την καταλυτική τους δράση, οδηγώντας στην αναστολή της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου [252, 253]. Όπως ήταν αναμενόμενο, οι δύο αυτοί αναστολείς του κυτταρικού κύκλου βρέθηκαν σε αυξημένα επίπεδα στα SS-AF-MSCs μετά την επαγωγή της έκφρασης του miR-21. Παράλληλα, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Cdc25A (cell division cycle 25A protein) και διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης της Cdc25A πρωτεΐνης μειώθηκαν σημαντικά μετά την επαγωγή του miR-21. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το miR-21 επιδρά άμεσα στην πρωτεΐνη Cdc25A, οδηγώντας σε καταστολή της, γεγονός που προκαλεί την αναστολή του κυτταρικού κύκλου σε καρκινικά κύτταρα του παχέως εντέρου [254]. Αυτό μπορεί να

εξηγεί και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στα SS-AF-MSCs μετά την επαγωγή του miR-21.

Τέλος, διαπιστώθηκε ότι τα SS-AF-MSCs μετά την επαγωγή του miR-21 οδηγήθηκαν προς την διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης. Αναλυτικότερα, μετά την επαγωγή του miR-21 στα SS-AF-MSCs βρέθηκε στατιστικά μεγάλος αριθμός κυττάρων με ενεργότητα του ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η κυτταρική γήρανση είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται μετά την αναστολή του κυτταρικού κύκλου [255]. Πρέπει να τονιστεί ότι οι περισσότερες έρευνες δείχνουν ότι κατά την ανακαλλιέργεια των MSCs παρατηρείται κυτταρική γήρανση [255, 256], φαινόμενο που θα ήταν χρήσιμο να μελετηθεί περαιτέρω και στα AF-MSCs.

Για την περαιτέρω διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου του miR-21, αλλά και για να διερευνηθεί η υψηλή του έκφραση στα RS-AF-MSCs, πραγματοποιήθηκε αναστολή του miR-21 χρησιμοποιώντας κατάλληλο ανταγωνιστή. Η καταστολή της έκφρασης του miR-21 στα RS-AF-MSCs οδήγησε σε σημαντική αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους και σε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης των Sox2, Oct4 και Nanog μεταγραφικών παραγόντων. Παρόλο όμως που το miR-21 φαίνεται να ρυθμίζει την ικανότητα πολλαπλασιασμού των δύο υποπληθυσμών των AF-MSCs, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στον φαινότυπο των RS-AF-MSCs μετά την καταστολή του miR-21. Αυξημένη έκφραση του miR-21, φάνηκε να παρουσιάζουν και τα BM-MSCs μετά από συνεχή ανακαλλιέργεια. Επιπρόσθετα, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των BM-MSCs είναι χαμηλότερος σε σχέση με αυτόν των SS-AF-MSCs [103] και γι' αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκαν πειράματα καταστολής του miR-21 και σε αυτό τον πληθυσμό MSCs. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού μετά την καταστολή του miR-21. Επιπρόσθετα, η καταστολή του miR-21 στα BM-MSCs οδήγησε σε σημαντική αύξηση της έκφραση των Sox2, Oct4 και Nanog μεταγραφικών παραγόντων.

Παρόμοια αποτελέσματα με τα πειράματα καταστολής του miR-21 στα RS-AF-MSCs και στα BM-MSCs, διαπιστώθηκαν μετά από την καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα Sox2 με τη χρήση κατάλληλου sh-Sox2 φορέα. Παρομοίως, έχει δειχθεί ότι η εξαναγκασμένη υπερέκφραση του Sox2 στα BM-MSCs διατηρεί την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα [257], οπότε με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα

αποδεικνύεται ότι η μείωση της έκφρασης του Sox2 λόγω της καταστολής μέσω shRNA και η αύξηση της έκφρασης του Sox2 λόγω της καταστολής του miR-21, επηρεάζουν την ικανότητα του πολλαπλασιασμού των BM-MSCs και των RS-AF-MSCs.

Μελέτες έχουν δείξει ότι το miR-145 ρυθμίζει την βλαστικότητα και τη διαφοροποίηση των ESCs στοχεύοντας τους μεταγραφικούς παράγοντες Sox2, Oct4 και Klf4 [258]. Αυξημένη έκφραση του miR-145 οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα αυτοανανέωσης, μειωμένη έκφραση των δεικτών βλαστικότητας και προάγει τη διαφοροποίηση των κυττάρων [258]. Παρόλο που το miR-145 έχει φανεί να ταυτοποιείται σε διάφορα είδη και όργανα [259], δεν βρέθηκε να εκφράζεται στα MSCs των τριών πηγών που αναλύθηκαν. Είναι πιθανό ο τρόπος ταυτοποίησης του προτύπου των miRNAs μέσω των συγκεκριμένων μικροσυστοιχιών να μην επέτρεψε την αναγνώριση του συγκεκριμένου miRNA.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η καταστολή του Sox2 στα MSCs μείωσε την ικανότητα διαφοροποίησης τους προς λιποκύτταρα και αύξησε την ικανότητα διαφοροποίησης τους προς οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα [251]. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω ενεργοποίησης του WNT σηματοδοτικού μονοπατιού, όπου πραγματοποιείται καταστολή του DKK1 μετά την μείωση των επιπέδων έκφρασης του Sox2 [251]. Επιπρόσθετα, έχει φανεί ότι η επαγωγή της έκφρασης του Sox2 από τους αυξητικούς παράγοντες FGF και FGFR2 οδήγησε σε αναστολή της διαφοροποίησης προς οστεοβλάστες [260]. Σε πρόσφατη μελέτη πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των miRNAs που εκφράζονται κατά τη διάρκεια διαφοροποίησης των BM-MSCs προς οστεοκύτταρα όπου ανιχνεύθηκε διαφορετική έκφραση του miR-21 [261]. Παρομοίως, στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε ότι η μείωση της έκφρασης του Sox2 μέσω της επαγωγής του miR-21 στα SS-AF-MSCs, οδήγησε στην επαγωγή της οστεογένεσης ενώ παράλληλα συντέλεσε στη μείωση της ικανότητας διαφοροποίησής τους προς λιποκύτταρα. Παράλληλα, η δυνατότητα διαφοροποίησης των SS-AF-MSCs προς χονδροκύτταρα μειώθηκε μετά την επαγωγή της έκφρασης του miR-21, γεγονός που δείχνει ότι κάποιος εναλλακτικός μηχανισμός θα πρέπει να ενεργοποιείται, πιθανώς εξαρτώμενος από το miR-21.

Συμπερασματικά, παρόλο που πολλές μελέτες παρουσιάζουν το miR-21 ως ογκογονίδιο, στην παρούσα μελέτη φαίνεται ότι το miR-21, έχει ένα διαφορετικό ρόλο, αποτελώντας αναστολέα της πολλαπλασιαστικής τους ικανότητα. Τα αποτελέσματα προτείνουν ότι το miR-21 μπορεί να δρα ως ρυθμιστής της κλωνογονικής ικανότητας, του ρυθμού πολλαπλασιασμού και της ικανότητας διαφοροποίησης των AF-MSCs. Ένας πιθανός τρόπος δράσης του miR-21 είναι μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης του με τον μεταγραφικό παράγοντα Sox2 που οδηγεί στη μείωση της έκφρασης του. Παράλληλα, διαπιστώθηκε ότι το miR-21 μπορεί να διαδραματίζει βασικό ρυθμιστικό ρόλο στην ικανότητα πολλαπλασιασμού των MSCs από άλλες πηγές, όπως ο μυελός των οστών.

6.3 Η σύγκριση του προτύπου έκφρασης των miRNAs των SS-AF-MSCs και των διαφοροποιημένων SS-AF-MSCs προς λιποκύτταρα

Τα AF-MSCs εμφανίζουν ένα ευρύ δυναμικό διαφοροποίησης προς κύτταρα της μεσοδερμικής σειράς, με αποτέλεσμα υπό κατάλληλες συνθήκες να μπορούν να διαφοροποιηθούν προς λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα [102, 103, 117]. Εντούτοις, νεότερες μελέτες έχουν αποδείξει ότι μπορούν να διαφοροποιηθούν επιτυχώς και προς κύτταρα της ενδοδερμικής σειράς, όπως είναι τα ηπατοκύτταρα [116, 117]. Τα miRNAs έχει δειχθεί ότι στοχεύουν βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες και γονίδια που διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην ικανότητα διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων.

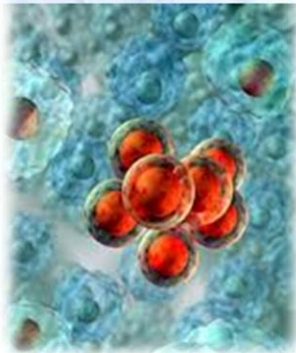
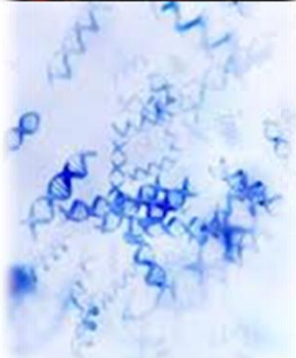
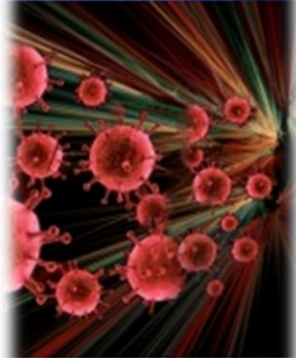
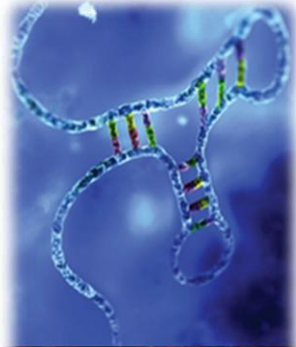
Στη παρούσα διδακτορική διατριβή, αναλύθηκε το πρότυπο έκφρασης των miRNAs των SS-AF-MSCs σε σύγκριση με αυτό των διαφοροποιημένων SS-AF-MSCs προς λιποκύτταρα. Αναγνωρίστηκαν 13 διαφορετικά εκφραζόμενα miRNAs εκ των οποίων ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε το miR-26a, το οποίο εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στα λιποκύτταρα σε σύγκριση με τα αδιαφοροποίητα SS-AF-MSCs. Το miR-26a διαθέτει διπλό ρόλο στη διαδικασία της καρκινογένεσης, καθώς έχει δειχθεί ότι μπορεί να δράσει ως αναστολέας της αύξησης του όγκου αλλά και ως ογκογόνο μόριο [262, 263]. Επιπρόσθετα, το miR-26a εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε 3T3-L1 κύτταρα κατά τη διάρκεια της λιπογένεσης [264]. Παράλληλα, το miR-26a έχει διαπιστωθεί να στοχεύει διάφορα γονίδια, κάποια από τα οποία διαδραματίζουν

σημαντικό ρόλο στην ικανότητα διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων. Για παράδειγμα, ένας πειραματικά αποδεδειγμένος στόχος του miR-26a είναι το EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) μία μεθυλοτρανσφεράση που μεθυλιώνει τη λυσίνη 27 της ιστόνης H3, προκαλώντας αναστολή στην έκφραση γονιδίων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης [265, 266]. Το EZH2 έχει φανεί ότι στοχεύει τον μεταγραφικό παράγοντα MITR (histone deacetylase 9c – HDAC9c) και οδηγεί στην προώθηση της οστεογένεσης και στην καταστολή της λιπογένεσης των MSCs [237].

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, μελετήθηκε η επίδραση της επαγωγής του miR-26a στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των SS-AF-MSCs. Δείχθηκε ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των SS-AF-MSCs μετά την επαγωγή του miR-26a μειώθηκε σημαντικά, όπως και η έκφραση των δεικτών βλαστικότητας Sox2, Oct4 και Nanog. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το miR-26a μπορεί να αναστείλει τη μετάβαση από την G1 στη S φάση του κυτταρικού κύκλου σε καρκινικά κύτταρα [267]. Η μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των SS-AF-MSCs μετά την επαγωγή της έκφρασης του miR-26a είναι πιθανό να οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Παρόλα αυτά, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για την εξακρίβωση της παραπάνω υπόθεσης.

Επιπρόσθετα, η επαγωγή της έκφρασης του miR-26a στα SS-AF-MSCs προκάλεσε την μείωση της ικανότητας τους να διαφοροποιούνται ως προς λιποκύτταρα. Είναι πιθανό το miR-26a να στοχεύει γονίδια που έχουν ρυθμιστικό ρόλο στη διαδικασία της διαφοροποίησης προς λιποκύτταρα. Για παράδειγμα, μελέτες έχουν δείξει ότι το EZH2 προωθεί την λιπογένεση, διαταράσσοντας το σηματοδοτικό μονοπάτι της Wnt/β-κατενίνη, στοχεύοντας Wnt γονίδια όπως το Wnt1, Wnt6, Wnt10a ή Wnt10b και καταστέλλοντας έτσι την έκφρασή τους [268]. Παράλληλα, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η διάσπαση του EZH2, μέσω της απακετυλάσης ιστονών 9c (HDAC9c), επηρεάζει την ενεργότητα της PPAR γ 2 και αναστέλλει την λιπογένεση [237]. Επομένως, η μείωση της ικανότητας λιπογένεσης των SS-AF-MSCs μετά την επαγωγή του miR-26a, μπορεί να οφείλεται σε πιθανή αλληλεπίδραση του miR-26a με το EZH2 και καταστολή της έκφρασής του. Η παραπάνω υπόθεση είναι αναγκαίο να ερευνηθεί περαιτέρω. Παρόλα αυτά είναι ήδη γνωστό ότι το miR-26a προσδένεται στο mRNA του EZH2 και προκαλεί την καταστολή της έκφρασης του [266].

Συμπερασματικά, με τη χρήση miRNAs μικροσυστοιχιών αναγνωρίστηκαν 13 διαφορετικά εκφραζόμενα miRNAs στα SS-AF-MSCs και στα διαφοροποιημένα SS-AF-MSCs προς λιποκύτταρα. Το miR-26a προκάλεσε ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της αυξημένης έκφρασης του στα λιποκύτταρα. Το σύνολο των αποτελεσμάτων προτείνουν ότι το miR-26a μπορεί να δρα ως ρυθμιστής του ρυθμού πολλαπλασιασμού και της ικανότητας διαφοροποίησης των SS-AF-MSCs προς λιποκύτταρα. Παρόλα αυτά είναι αναγκαίο να διερευνηθούν σε βάθος οι πιθανοί μηχανισμοί που ενεργοποιούνται κατά τις παραπάνω μεταβολές.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Pappa KI, M. Roubelakis, N. P. Anagnou, A. I. Antsaklis. Stem cells: present status and future. *Greek journal of Gynaikology and Obstetrics* 2005; 4: 251-3
2. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000; 28: 875-84
3. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 2000; 100: 143-55
4. Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* 2007; 109: 1743-51
5. Martin-Rendon E, Watt SM. Stem cell plasticity. *Br J Haematol* 2003; 122: 877-91
6. Overturf K, al-Dhalimy M, Ou CN, Finegold M, Grompe M. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol* 1997; 151: 1273-80
7. Lanza RaV, C. Handbook of stem cells. Academic Press 2004:
8. Verfaillie C. Pluripotent stem cells. *Transfus Clin Biol* 2009; 16: 65-9
9. Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol* 2002; 12: 502-8
10. Abdulrazzak H, Moschidou D, Jones G, Guillot PV. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. *J R Soc Interface* 2010; 7 Suppl 6: S689-706
11. Bitsika V, Vlahou A, Roubelakis MG. Fetal mesenchymal stem cells in cancer therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 2013; 8: 133-43
12. Pappa KI, Anagnou NP. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen Med* 2009; 4: 423-33
13. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7
14. Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng* 2005; 100: 12-27

15. Lin H. The tao of stem cells in the germline. *Annu Rev Genet* 1997; 31: 455-91
16. Wray J, Kalkan T, Smith AG. The ground state of pluripotency. *Biochem Soc Trans* 2010; 38: 1027-32
17. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* 2005; 19: 1129-55
18. Keller GM. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 862-9
19. Leahy A, Xiong JW, Kuhnert F, Stuhlmann H. Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J Exp Zool* 1999; 284: 67-81
20. Boyer LA, Lee TI, Cole MF et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122: 947-56
21. Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 803-16
22. Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 2344-9
23. Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 2008; 132: 661-80
24. Evans M. Discovering pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12: 680-6
25. Tutter AV, Baltus GA, Kadam S. Embryonic stem cells: a great hope for a new era of medicine. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2006; 9: 169-75
26. Aboody K, Capela A, Niazi N, Stern JH, Temple S. Translating stem cell studies to the clinic for CNS repair: current state of the art and the need for a Rosetta stone. *Neuron* 2011; 70: 597-613
27. Puri MC, Nagy A. Concise review: Embryonic stem cells versus induced pluripotent stem cells: the game is on. *Stem Cells* 2012; 30: 10-4
28. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9: 641-50
29. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000; 287: 1433-8

30. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 778-84
31. Zuk PA. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell* 2010; 21: 1783-7
32. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 4279-95
33. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7: 211-28
34. Shanthly N, Aruva MR, Zhang K, Mathew B, Thakur ML. Stem cells: a regenerative pharmaceutical. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2006; 50: 205-16
35. Gao L, Thilakavathy K, Nordin N. A Plethora of Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Biol Int* 2013:
36. Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* 2008; 2: 169-83
37. He Q, Wan C, Li G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells* 2007; 25: 69-77
38. Miller PH, Knapp DJ, Eaves CJ. Heterogeneity in hematopoietic stem cell populations: implications for transplantation. *Curr Opin Hematol* 2013:
39. Hough R, Rocha V. Transplant outcomes in acute leukemia. II. *Semin Hematol* 2010; 47: 51-8
40. Smith AR, Gross TG, Baker KS. Transplant outcomes for primary immunodeficiency disease. *Semin Hematol* 2010; 47: 79-85
41. Fragkos M, Anagnou NP, Tubb J, Emery DW. Use of the hereditary persistence of fetal hemoglobin 2 enhancer to increase the expression of oncoretrovirus vectors for human gamma-globin. *Gene Ther* 2005; 12: 1591-600
42. Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966; 16: 381-90
43. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3213-8

44. Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, Middleton J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol* 2007; 137: 491-502
45. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997; 64: 278-94
46. in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* 2003; 88: 845-52
47. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991; 78: 55-62
48. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71-4
49. Deng YB, Liu XG, Liu ZG et al. Implantation of BM mesenchymal stem cells into injured spinal cord elicits de novo neurogenesis and functional recovery: evidence from a study in rhesus monkeys. *Cytotherapy* 2006; 8: 210-4
50. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007; 25: 2739-49
51. Antonitsis P, Ioannidou-Papagiannaki E, Kaidoglou A, Papakonstantinou C. In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2007; 6: 593-7
52. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-30
53. Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A et al. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics* 2007; 8: 70
54. Song L, Webb NE, Song Y, Tuan RS. Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. *Stem Cells* 2006; 24: 1707-18

55. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 2007; 25: 2896-902
56. Yoshikawa T, Mitsuno H, Nonaka I et al. Wound therapy by marrow mesenchymal cell transplantation. *Plast Reconstr Surg* 2008; 121: 860-77
57. Prockop DJ. "Stemness" does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs). *Clin Pharmacol Ther* 2007; 82: 241-3
58. Rao MS, Mattson MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev* 2001; 122: 713-34
59. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy* 2006; 8: 166-77
60. Musina RA, Bekchanova ES, Sukhikh GT. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. *Bull Exp Biol Med* 2005; 139: 504-9
61. Pendleton C, Li Q, Chesler DA et al. Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue vs Bone Marrow: In Vitro Comparison of Their Tropism towards Gliomas. *PLoS One* 2013; 8: e58198
62. Schaffler A, Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007; 25: 818-27
63. Ferrari M, Corradi A, Lazzaretti M et al. Adult stem cells: perspectives for therapeutic applications. *Vet Res Commun* 2007; 31 Suppl 1: 1-8
64. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 3828-32
65. Lee OK, Kuo TK, Chen WM et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; 103: 1669-75
66. McGuckin CP, Forraz N, Baradez MO et al. Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif* 2005; 38: 245-55

67. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24: 1294-301
68. Chang YJ, Shih DT, Tseng CP et al. Disparate mesenchyme-lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cord blood. *Stem Cells* 2006; 24: 679-85
69. Roura S, Farre J, Hove-Madsen L et al. Exposure to cardiomyogenic stimuli fails to transdifferentiate human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Basic Res Cardiol* 2010; 105: 419-30
70. Divya MS, Roshin GE, Divya TS et al. Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells consist of a unique population of progenitors co-expressing mesenchymal stem cell and neuronal markers capable of instantaneous neuronal differentiation. *Stem Cell Res Ther* 2012; 3: 57
71. Kang XQ, Zang WJ, Bao LJ et al. Differentiating characterization of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biol Int* 2006; 30: 569-75
72. Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol* 2007; 28: 219-26
73. Jeong JA, Hong SH, Gang EJ et al. Differential gene expression profiling of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells by DNA microarray. *Stem Cells* 2005; 23: 584-93
74. Tondreau T, Meuleman N, Delforge A et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells* 2005; 23: 1105-12
75. Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 2008; 26: 591-9
76. Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 2006; 24: 781-92
77. Weiss ML, Troyer DL. Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Rev* 2006; 2: 155-62

78. Zeddou M, Briquet A, Relic B et al. The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood. *Cell Biol Int* 2010; 34: 693-701
79. Carlin R, Davis D, Weiss M, Schultz B, Troyer D. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2006; 4: 8
80. Fu YS, Cheng YC, Lin MY et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells* 2006; 24: 115-24
81. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* 2003; 21: 50-60
82. Wang HS, Hung SC, Peng ST et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004; 22: 1330-7
83. Rachakatla RS, Marini F, Weiss ML, Tamura M, Troyer D. Development of human umbilical cord matrix stem cell-based gene therapy for experimental lung tumors. *Cancer Gene Ther* 2007; 14: 828-35
84. Arnulf B, Lecourt S, Soulier J et al. Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. *Leukemia* 2007; 21: 158-63
85. Battula VL, Treml S, Abele H, Buhring HJ. Prospective isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human placenta using a frizzled-9-specific monoclonal antibody. *Differentiation* 2008; 76: 326-36
86. Delo DM, De Coppi P, Bartsch G, Jr., Atala A. Amniotic fluid and placental stem cells. *Methods Enzymol* 2006; 419: 426-38
87. Pipino C, Shangaris P, Resca E et al. Placenta as a reservoir of stem cells: an underutilized resource? *Br Med Bull* 2013; 105: 43-68
88. Ilancheran S, Michalska A, Peh G et al. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod* 2007; 77: 577-88
89. Roubelakis MG, Trohatou O, Anagnou NP. Amniotic fluid and amniotic membrane stem cells: marker discovery. *Stem Cells Int* 2012; 2012: 107836
90. Bose B. Burn wound dressing with human amniotic membrane. *Ann R Coll Surg Engl* 1979; 61: 444-7

91. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000; 19: 348-52
92. Arai N, Tsuno H, Okabe M et al. Clinical application of a hyperdry amniotic membrane on surgical defects of the oral mucosa. *J Oral Maxillofac Surg* 2012; 70: 2221-8
93. Kim JC, Tseng SC. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995; 14: 473-84
94. Kitagawa K, Okabe M, Yanagisawa S et al. Use of a hyperdried cross-linked amniotic membrane as initial therapy for corneal perforations. *Jpn J Ophthalmol* 2011; 55: 16-21
95. Marongiu F, Gramignoli R, Sun Q et al. Isolation of amniotic mesenchymal stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2010; Chapter 1: Unit 1E 5
96. Soncini M, Vertua E, Gibelli L et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med* 2007; 1: 296-305
97. Miki T, Mitamura K, Ross MA, Stolz DB, Strom SC. Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *J Reprod Immunol* 2007; 75: 91-6
98. Underwood MA, Gilbert WM, Sherman MP. Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. *J Perinatol* 2005; 25: 341-8
99. Eddleman KA, Malone FD, Sullivan L et al. Pregnancy loss rates after midtrimester amniocentesis. *Obstet Gynecol* 2006; 108: 1067-72
100. Fauza D. Amniotic fluid and placental stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18: 877-91
101. Prusa AR, Hengstschlager M. Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. *Med Sci Monit* 2002; 8: RA253-7
102. Roubelakis MG, Bitsika V, Zagoura D et al. In vitro and in vivo properties of distinct populations of amniotic fluid mesenchymal progenitor cells. *J Cell Mol Med* 2011; 15: 1896-913
103. Roubelakis MG, Pappa KI, Bitsika V et al. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid:

- comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2007; 16: 931-52
104. Kaviani A, Perry TE, Dzakovic A et al. The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering. *J Pediatr Surg* 2001; 36: 1662-5
105. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 2004; 22: 1338-45
106. Kim J, Lee Y, Kim H et al. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Prolif* 2007; 40: 75-90
107. Klemmt PA, Vafaizadeh V, Groner B. The potential of amniotic fluid stem cells for cellular therapy and tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther* 2011; 11: 1297-314
108. Bossolasco P, Montemurro T, Cova L et al. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Res* 2006; 16: 329-36
109. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod* 2004; 19: 1450-6
110. Chen WQ, Siegel N, Li L et al. Variations of protein levels in human amniotic fluid stem cells CD117/2 over passages 5-25. *J Proteome Res* 2009; 8: 5285-95
111. De Coppi P, Bartsch G, Jr., Siddiqui MM et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 100-6
112. Ditadi A, de Coppi P, Picone O et al. Human and murine amniotic fluid c-Kit+Lin- cells display hematopoietic activity. *Blood* 2009; 113: 3953-60
113. Sessarego N, Parodi A, Podesta M et al. Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application. *Haematologica* 2008; 93: 339-46
114. Moschidou D, Mukherjee S, Blundell MP et al. Valproic acid confers functional pluripotency to human amniotic fluid stem cells in a transgene-free approach. *Mol Ther* 2012; 20: 1953-67
115. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 2003; 102: 1548-9

116. Zagoura DS, Roubelakis MG, Bitsika V et al. Therapeutic potential of a distinct population of human amniotic fluid mesenchymal stem cells and their secreted molecules in mice with acute hepatic failure. *Gut* 2012; 61: 894-906
117. Zagoura DS, Trohatou O, Bitsika V et al. AF-MSCs fate can be regulated by culture conditions. *Cell Death & Disease* 2013; in press:
118. Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16: 191-220
119. Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2004; 93: 1210-30
120. De Boer J, Wang HJ, Van Blitterswijk C. Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2004; 10: 393-401
121. Willert K, Brown JD, Danenberg E et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 2003; 423: 448-52
122. Trohatou O, Anagnou NP, Roubelakis MG. Human amniotic fluid stem cells as an attractive tool for clinical applications. *Curr Stem Cell Res Ther* 2013; 8: 125-32
123. Moorefield EC, McKee EE, Solchaga L et al. Cloned, CD117 selected human amniotic fluid stem cells are capable of modulating the immune response. *PLoS One* 2011; 6: e26535
124. Grisafi D, Piccoli M, Pozzobon M et al. High transduction efficiency of human amniotic fluid stem cells mediated by adenovirus vectors. *Stem Cells Dev* 2008; 17: 953-62
125. Zhao P, Ise H, Hongo M et al. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation* 2005; 79: 528-35
126. Cipriani S, Bonini D, Marchina E et al. Mesenchymal cells from human amniotic fluid survive and migrate after transplantation into adult rat brain. *Cell Biol Int* 2007; 31: 845-50
127. Cheng FC, Tai MH, Sheu ML et al. Enhancement of regeneration with glia cell line-derived neurotrophic factor-transduced human amniotic fluid mesenchymal stem cells after sciatic nerve crush injury. *J Neurosurg* 2010; 112: 868-79

128. Pan HC, Chen CJ, Cheng FC et al. Combination of G-CSF administration and human amniotic fluid mesenchymal stem cell transplantation promotes peripheral nerve regeneration. *Neurochem Res* 2009; 34: 518-27
129. Pan HC, Chin CS, Yang DY et al. Human amniotic fluid mesenchymal stem cells in combination with hyperbaric oxygen augment peripheral nerve regeneration. *Neurochem Res* 2009; 34: 1304-16
130. Pan HC, Yang DY, Ho SP et al. Escalated regeneration in sciatic nerve crush injury by the combined therapy of human amniotic fluid mesenchymal stem cells and fermented soybean extracts, Natto. *J Biomed Sci* 2009; 16: 75
131. Perin L, Sedrakyan S, Giuliani S et al. Protective effect of human amniotic fluid stem cells in an immunodeficient mouse model of acute tubular necrosis. *PLoS One* 2010; 5: e9357
132. Rota C, Imberti B, Pozzobon M et al. Human amniotic fluid stem cell preconditioning improves their regenerative potential. *Stem Cells Dev* 2012; 21: 1911-23
133. Mirabella T, Cilli M, Carlone S, Cancedda R, Gentili C. Amniotic liquid derived stem cells as reservoir of secreted angiogenic factors capable of stimulating neo-arteriogenesis in an ischemic model. *Biomaterials* 2011; 32: 3689-99
134. Mirabella T, Hartinger J, Lorandi C et al. Proangiogenic Soluble Factors from Amniotic Fluid Stem Cells Mediate the Recruitment of Endothelial Progenitors in a Model of Ischemic Fasciocutaneous Flap. *Stem Cells Dev* 2012:
135. Yoon BS, Moon JH, Jun EK et al. Secretory profiles and wound healing effects of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2010; 19: 887-902
136. Sasportas LS, Kasmieh R, Wakimoto H et al. Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 4822-7
137. Yin J, Kim JK, Moon JH et al. hMSC-mediated concurrent delivery of endostatin and carboxylesterase to mouse xenografts suppresses glioma initiation and recurrence. *Mol Ther* 2011; 19: 1161-9
138. Bitsika V, Roubelakis MG, Zagoura D et al. Human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells as therapeutic vehicles: a novel approach for the treatment of bladder cancer. *Stem Cells Dev* 2012; 21: 1097-111

139. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843-54
140. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294: 853-8
141. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 858-62
142. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 862-4
143. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-97
144. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2999-3004
145. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136: 215-33
146. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15524-9
147. He L, Thomson JM, Hemann MT et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005; 435: 828-33
148. Lu J, Getz G, Miska EA et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834-8
149. Michael MZ, SM OC, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 882-91
150. Lee Y, Ahn C, Han J et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-9
151. Lee Y, Kim M, Han J et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* 2004; 23: 4051-60
152. Han J, Lee Y, Yeom KH et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 2004; 18: 3016-27
153. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo J* 2002; 21: 4663-70

154. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; 303: 95-8
155. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003; 17: 3011-6
156. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE et al. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001; 293: 834-8
157. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E et al. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 2001; 15: 2654-9
158. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 2005; 436: 740-4
159. Lee Y, Hur I, Park SY et al. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *Embo J* 2006; 25: 522-32
160. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 2002; 12: 735-9
161. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000; 404: 293-6
162. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003; 115: 209-16
163. Nykanen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 2001; 107: 309-21
164. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; 115: 787-98
165. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 2005; 309: 1577-81
166. Jackson RJ, Standart N. How do microRNAs regulate gene expression? *Sci STKE* 2007; 2007: re1
167. Nilsen TW. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet* 2007; 23: 243-9

168. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol* 2007; 17: 118-26
169. Kawasaki H, Wadhwa R, Taira K. World of small RNAs: from ribozymes to siRNA and miRNA. *Differentiation* 2004; 72: 58-64
170. Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 2004; 304: 594-6
171. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 2005; 3: e85
172. Grun D, Wang YL, Langenberger D, Gunsalus KC, Rajewsky N. microRNA target predictions across seven *Drosophila* species and comparison to mammalian targets. *PLoS Comput Biol* 2005; 1: e13
173. Krek A, Grun D, Poy MN et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 2005; 37: 495-500
174. Eulalio A, Huntzinger E, Nishihara T et al. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *Rna* 2009; 15: 21-32
175. Hawkins PG, Morris KV. RNA and transcriptional modulation of gene expression. *Cell Cycle* 2008; 7: 602-7
176. Tan Y, Zhang B, Wu T et al. Transcriptional inhibition of Hoxd4 expression by miRNA-10a in human breast cancer cells. *BMC Mol Biol* 2009; 10: 12
177. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005; 433: 769-73
178. Creighton CJ, Reid JG, Gunaratne PH. Expression profiling of microRNAs by deep sequencing. *Brief Bioinform* 2009; 10: 490-7
179. Malone JH, Oliver B. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biol* 2011; 9: 34
180. Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell* 2003; 5: 351-8
181. Murchison EP, Partridge JF, Tam OH, Cheloufi S, Hannon GJ. Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 12135-40
182. Wulczyn FG, Smirnova L, Rybak A et al. Post-transcriptional regulation of the let-7 microRNA during neural cell specification. *Faseb J* 2007; 21: 415-26

183. Ivey KN, Muth A, Arnold J et al. MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 219-29
184. Cui L, Zhou X, Li J et al. Dynamic microRNA profiles of hepatic differentiated human umbilical cord lining-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One* 2012; 7: e44737
185. Guo L, Zhao RC, Wu Y. The role of microRNAs in self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2011; 39: 608-16
186. Wang J, Huang W, Wu Y et al. MicroRNA-193 pro-proliferation effects for bone mesenchymal stem cells after low-level laser irradiation treatment through inhibitor of growth family, member 5. *Stem Cells Dev* 2012; 21: 2508-19
187. Yu X, Cohen DM, Chen CS. miR-125b Is an adhesion-regulated microRNA that protects mesenchymal stem cells from anoikis. *Stem Cells* 2012; 30: 956-64
188. Josephson R, Ording CJ, Liu Y et al. Qualification of embryonal carcinoma 2102Ep as a reference for human embryonic stem cell research. *Stem Cells* 2007; 25: 437-46
189. Lakshmiathy U, Love B, Goff LA et al. MicroRNA expression pattern of undifferentiated and differentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2007; 16: 1003-16
190. Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Exp Cell Res* 2005; 306: 330-5
191. Hayflick L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 1965; 37: 614-36
192. Ho AD, Wagner W, Mahlknecht U. Stem cells and ageing. The potential of stem cells to overcome age-related deteriorations of the body in regenerative medicine. *EMBO Rep* 2005; 6 Spec No: S35-8
193. Hackl M, Brunner S, Fortschegger K et al. miR-17, miR-19b, miR-20a, and miR-106a are down-regulated in human aging. *Aging Cell* 2010; 9: 291-6
194. Yu JM, Wu X, Gimble JM et al. Age-related changes in mesenchymal stem cells derived from rhesus macaque bone marrow. *Aging Cell* 2011; 10: 66-79
195. Shilo S, Roy S, Khanna S, Sen CK. MicroRNA in cutaneous wound healing: a new paradigm. *DNA Cell Biol* 2007; 26: 227-37

196. Zou Z, Zhang Y, Hao L et al. More insight into mesenchymal stem cells and their effects inside the body. *Expert Opin Biol Ther* 2010; 10: 215-30
197. Lakshmipathy U, Hart RP. Concise review: MicroRNA expression in multipotent mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 2008; 26: 356-63
198. Trzaska KA, Reddy BY, Munoz JL et al. Loss of RE-1 silencing factor in mesenchymal stem cell-derived dopamine progenitors induces functional maturity. *Mol Cell Neurosci* 2008; 39: 285-90
199. Yoo AS, Staahl BT, Chen L, Crabtree GR. MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development. *Nature* 2009; 460: 642-6
200. Li Z, Hassan MQ, Volinia S et al. A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 13906-11
201. Kim YJ, Bae SW, Yu SS, Bae YC, Jung JS. miR-196a regulates proliferation and osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *J Bone Miner Res* 2009; 24: 816-25
202. Han J, Yang T, Gao J et al. Specific microRNA expression during chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med* 2010; 25: 377-84
203. Esau C, Kang X, Peralta E et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2004; 279: 52361-5
204. Roubelakis MG, Zotos P, Papachristoudis G et al. Human microRNA target analysis and gene ontology clustering by GOMir, a novel stand-alone application. *BMC Bioinformatics* 2009; 10 Suppl 6: S20
205. Zotos P, Roubelakis MG, Anagnou NP, Kossida S. Overview of microRNA Target Analysis Tools. *Curr Bioinf* 2012; 7: 310-23
206. Pereira LA, Bentley K, Peeters A, Churchill MJ, Deacon NJ. A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 663-8
207. Li X, Quan Y, Wainberg MA. Controlling elements in replication of the human immunodeficiency virus type 1. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1997; 43: 443-54
208. Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 1998; 280: 1884-8

209. Marcello A, Zoppe M, Giacca M. Multiple modes of transcriptional regulation by the HIV-1 Tat transactivator. *IUBMB Life* 2001; 51: 175-81
210. Pollard VW, Malim MH. The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* 1998; 52: 491-532
211. Arold ST, Baur AS. Dynamic Nef and Nef dynamics: how structure could explain the complex activities of this small HIV protein. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 356-63
212. Federico M. From lentiviruses to lentivirus vectors. *Methods Mol Biol* 2003; 229: 3-15
213. Geyer M, Fackler OT, Peterlin BM. Structure--function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep* 2001; 2: 580-5
214. Dalglish AG, Beverley PC, Clapham PR et al. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984; 312: 763-7
215. McDougal JS, Maddon PJ, Orloff G et al. Role of CD4 in the penetration of cells by HIV. *Adv Exp Med Biol* 1991; 300: 145-54; discussion 55-8
216. Farnet CM, Haseltine WA. Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. *J Virol* 1991; 65: 1910-5
217. Goff SP. Retroviral reverse transcriptase: synthesis, structure, and function. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1990; 3: 817-31
218. Bukrinsky MI, Sharova N, McDonald TL et al. Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 6125-9
219. Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 8033-7
220. Naldini L, Blomer U, Gallay P et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272: 263-7
221. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974; 2: 83-92

222. Chen N, Hudson JE, Walczak P et al. Human umbilical cord blood progenitors: the potential of these hematopoietic cells to become neural. *Stem Cells* 2005; 23: 1560-70
223. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007; 133: 647-58
224. Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem* 2007; 282: 14328-36
225. Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 2008; 27: 2128-36
226. Kim YJ, Hwang SJ, Bae YC, Jung JS. MiR-21 regulates adipogenic differentiation through the modulation of TGF-beta signaling in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Stem Cells* 2009; 27: 3093-102
227. Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschlager M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod* 2003; 18: 1489-93
228. Loh YH, Wu Q, Chew JL et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 2006; 38: 431-40
229. Quintana L, zur Nieden NI, Semino CE. Morphogenetic and regulatory mechanisms during developmental chondrogenesis: new paradigms for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 2009; 15: 29-41
230. Goff LA, Boucher S, Ricupero CL et al. Differentiating human multipotent mesenchymal stromal cells regulate microRNAs: prediction of microRNA regulation by PDGF during osteogenesis. *Exp Hematol* 2008; 36: 1354-69
231. Paik S, Jung HS, Lee S et al. miR-449a Regulates the Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells Through Direct Targeting of Lymphoid Enhancer-Binding Factor-1. *Stem Cells Dev* 2012:
232. Cai B, Li J, Wang J et al. microRNA-124 regulates cardiomyocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via targeting STAT3 signaling. *Stem Cells* 2012; 30: 1746-55

233. Lee JS, Park JH, Kwon IK, Lim JY. Retinoic acid inhibits BMP4-induced C3H10T1/2 stem cell commitment to adipocyte via downregulating Smad/p38MAPK signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 409: 550-5
234. Royer-Pokora B, Busch M, Beier M et al. Wilms tumor cells with WT1 mutations have characteristic features of mesenchymal stem cells and express molecular markers of paraxial mesoderm. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 1651-68
235. Volinia S, Calin GA, Liu CG et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2257-61
236. Beitzinger M, Peters L, Zhu JY, Kremmer E, Meister G. Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes. *RNA Biol* 2007; 4: 76-84
237. Chen YH, Yeh FL, Yeh SP et al. Myocyte enhancer factor-2 interacting transcriptional repressor (MITR) is a switch that promotes osteogenesis and inhibits adipogenesis of mesenchymal stem cells by inactivating peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2. *J Biol Chem* 2011; 286: 10671-80
238. Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004; 22: 625-34
239. Ng EK, Tsang WP, Ng SS et al. MicroRNA-143 targets DNA methyltransferases 3A in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 101: 699-706
240. Zhang X, Liu S, Hu T et al. Up-regulated microRNA-143 transcribed by nuclear factor kappa B enhances hepatocarcinoma metastasis by repressing fibronectin expression. *Hepatology* 2009; 50: 490-9
241. Zhang H, Cai X, Wang Y et al. microRNA-143, down-regulated in osteosarcoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity by targeting Bcl-2. *Oncol Rep* 2010; 24: 1363-9
242. Krichevsky AM, Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 39-53
243. Zhang JG, Wang JJ, Zhao F et al. MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clin Chim Acta* 2010; 411: 846-52

244. Sabatel C, Malvaux L, Bovy N et al. MicroRNA-21 exhibits antiangiogenic function by targeting RhoB expression in endothelial cells. *PLoS One* 2011; 6: e16979
245. Singh SK, Kagalwala MN, Parker-Thornburg J, Adams H, Majumder S. REST maintains self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 2008; 453: 223-7
246. Anokye-Danso F, Snitow M, Morrisey EE. How microRNAs facilitate reprogramming to pluripotency. *J Cell Sci* 2012; 125: 4179-87
247. Anokye-Danso F, Trivedi CM, Jühr D et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2011; 8: 376-88
248. Rodda DJ, Chew JL, Lim LH et al. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem* 2005; 280: 24731-7
249. Yoon DS, Kim YH, Jung HS, Paik S, Lee JW. Importance of Sox2 in maintenance of cell proliferation and multipotency of mesenchymal stem cells in low-density culture. *Cell Prolif* 2011; 44: 428-40
250. Chen Y, Shi L, Zhang L et al. The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J Biol Chem* 2008; 283: 17969-78
251. Park SB, Seo KW, So AY et al. SOX2 has a crucial role in the lineage determination and proliferation of mesenchymal stem cells through Dickkopf-1 and c-MYC. *Cell Death Differ* 2012; 19: 534-45
252. Cheng T. Cell cycle inhibitors in normal and tumor stem cells. *Oncogene* 2004; 23: 7256-66
253. Jakel H, Peschel I, Kunze C, Weinl C, Hengst L. Regulation of p27 (Kip1) by mitogen-induced tyrosine phosphorylation. *Cell Cycle* 2012; 11: 1910-7
254. Wang P, Zou F, Zhang X et al. microRNA-21 negatively regulates Cdc25A and cell cycle progression in colon cancer cells. *Cancer Res* 2009; 69: 8157-65
255. Wagner W, Horn P, Castoldi M et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One* 2008; 3: e2213
256. Shibata KR, Aoyama T, Shima Y et al. Expression of the p16INK4A gene is associated closely with senescence of human mesenchymal stem cells and is potentially silenced by DNA methylation during in vitro expansion. *Stem Cells* 2007; 25: 2371-82

257. Go MJ, Takenaka C, Ohgushi H. Forced expression of Sox2 or Nanog in human bone marrow derived mesenchymal stem cells maintains their expansion and differentiation capabilities. *Exp Cell Res* 2008; 314: 1147-54
258. Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, Kosik KS. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell* 2009; 137: 647-58
259. Adegani FJ, Langroudi L, Arefian E et al. A comparison of pluripotency and differentiation status of four mesenchymal adult stem cells. *Mol Biol Rep* 2013; 40: 3693-703
260. Mansukhani A, Ambrosetti D, Holmes G, Cornivelli L, Basilico C. Sox2 induction by FGF and FGFR2 activating mutations inhibits Wnt signaling and osteoblast differentiation. *J Cell Biol* 2005; 168: 1065-76
261. Gao J, Yang T, Han J et al. MicroRNA expression during osteogenic differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow. *J Cell Biochem* 2011; 112: 1844-56
262. Huse JT, Brennan C, Hambarzumyan D et al. The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes Dev* 2009; 23: 1327-37
263. Zhang B, Liu XX, He JR et al. Pathologically decreased miR-26a antagonizes apoptosis and facilitates carcinogenesis by targeting MTDH and EZH2 in breast cancer. *Carcinogenesis* 2011; 32: 2-9
264. Kajimoto K, Naraba H, Iwai N. MicroRNA and 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation. *Rna* 2006; 12: 1626-32
265. Kuzmichev A, Jenuwein T, Tempst P, Reinberg D. Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol Cell* 2004; 14: 183-93
266. Sander S, Bullinger L, Klapproth K et al. MYC stimulates EZH2 expression by repression of its negative regulator miR-26a. *Blood* 2008; 112: 4202-12
267. Zhu Y, Lu Y, Zhang Q et al. MicroRNA-26a/b and their host genes cooperate to inhibit the G1/S transition by activating the pRb protein. *Nucleic Acids Res* 2011; 40: 4615-25

268. Wei Y, Chen YH, Li LY et al. CDK1-dependent phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of H3K27 and promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 87-94