



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ
ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΗΣ RAS/ERK ΟΔΟΥ ΜΕΣΩ
ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ *ERF*

ΒΟΡΓΙΑ ΕΛΕΝΗ

Επιβλέπων Καθηγητής: ΜΑΥΡΟΘΑΛΑΣΣΙΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ 2013

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Μετά την ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής και το πέραςμα σχεδόν επτά ετών στο εργαστήριο του κ. Γ. Μαυροθαλασσίτη θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με βοήθησαν στην επίτευξη αυτή.

Καταρχήν, ένα μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στον κ. Μαυροθαλασσίτη, πέρα από τις τυπικές ευχαριστίες. Θέλω πάνω απ' όλα να τον ευχαριστήσω για την υπομονή με την οποία με καθοδήγησε όλα αυτά τα χρόνια. Οι επιστημονικές του παρατηρήσεις και οι εύστοχες ιδέες του στάθηκαν το πολυτιμότερο εργαλείο που θα μπορούσε να έχει ένας μεταπτυχιακός φοιτητής. Μάθαινα πολλά, χωρίς να νιώθω πως οι γνώσεις αυτές έχουν όριο.

Ευχαριστώ πολύ τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής, κ.Δ. Καραγωγέως και κ. Αντ. Μακρυγιαννάκη, για τη συμβολή τους κατά την εκπόνηση της διατριβής μου. Ευχαριστώ επίσης τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής κ. Καρδάση, κ. Θερμού, κ. Τσατσάνη και κ. Μαμαλάκη.

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη των γειτονικών εργαστηρίων, τόσο για τη «δανεική» συνεισφορά τους σε αναλώσιμα και αντιδραστήρια, όσο για τις συμβουλές τους και κυρίως για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε στην πτέρυγα. Είχαμε μια άριστη συνεργασία.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τα παλαιότερα μέλη του εργαστηρίου μας, τα οποία με βοήθησαν από τα πρώτα μου βήματα. Ευχαριστώ λοιπόν το Μιχάλη, τη Χαρούλα, τη Marylline και την Έρη.

Οι συνεργάτες μου στο εργαστήριο αξίζουν ένα μεγάλο ευχαριστώ, για την άψογη συνεργασία μας, για τις «επιστημονικές» κουβέντες μας, τις βόλτες μας, τις ώρες εντός και εκτός εργαστηρίου και κυρίως για τη φιλία μας. Ανδρέα, Ιωάννα και Γιολάντα σας ευχαριστώ πολύ!

Τα χρόνια αυτά της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής θα ήταν πολύ δυσκολότερα αν δεν είχα δίπλα μου τους φίλους μου, εντός κι εκτός πανεπιστημίου, εντός κι εκτός Κρήτης. Ευχαριστώ (αλφαβητικά) τις φίλες μου (που με επισκέφτηκαν

πολλές φορές!) Αριάδνη, Ελευθερία και Μαριάνθη που όλα αυτά τα χρόνια τις ένιωθα δίπλα μου. Τους φίλους μου στην Κρήτη που μοιραστήκαμε απογοητεύσεις, στεναχώριες, προβληματισμούς αλλά και πολλές όμορφες στιγμές με εκδρομές, φαγοπότια, ξενύχτια και πολλά γέλια. Γιολάντα, Ιωάννα, Ανδρέα, Εύη, Νίκο, Δημήτρη και Σοφία σας ευχαριστώ πολύ για τη φιλία μας!

Θα ένιωθα πραγματικά μόνη χωρίς μια οικογένεια στην Κρήτη... Οι φίλες μου Αντιγόνη, Μαρία και Χριστίνα (αλφαβητικά) ήταν για μένα πάντα δίπλα μου σε στιγμές γέλιου αλλά και στο δάκρυ. Μαζί γνωρίσαμε πολλά όμορφα μέρη στην Κρήτη, δοκιμάσαμε ΟΛΑ τα φαγητά του νησιού, κολυπήσαμε, κατασκηνώσαμε, μοιραστήκαμε στιγμές και γίναμε «οικογένεια». Τις ευχαριστώ που τις έχω στη ζωή μου...

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το δίνω στην οικογένειά μου στην Αθήνα, στους γονείς μου, την αδερφή μου και τους παππούδες-γιαγιάδες μου που τόσα χρόνια με στηρίζουν με το δικό τους τρόπο. Είναι δίπλα σε μένα και τα όνειρά μου, στις καλές και άσχημες στιγμές...

Στην οικογένειά μου και ιδιαιτέρως στον παππού μου που έφυγε νωρίς...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	12
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	15
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	17
1. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ETS ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	18
2. Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΚΑΤΑΣΤΟΛΕΑΣ ERF.....	20
3. ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΤΗΣ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΩΣΗΣ.....	23
I. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ – ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ.....	24
II. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΡΑΝΙΟΥ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟΝ ΤΥΠΟ ΤΗΣ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΩΣΗΣ.....	25
III. ΑΛΛΟΙ ΤΥΠΟΙ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΩΣΗΣ.....	26
IV. ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ.....	26
V. ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	28
VI. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ.....	28
4. ΠΛΑΚΟΥΝΤΟΓΕΝΕΣΗ.....	30
I. Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ ΣΤΟ ΠΟΝΤΙΚΙ.....	31
II. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΩΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ ΚΑΙ ΤΟ ΠΟΝΤΙΚΙ.....	35
III. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΡΥΘΜΙΖΟΥΝ ΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ.....	36
IV. ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	37
i. ΣΠΟΓΓΙΟΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΕΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΑ ΓΙΓΑΝΤΙΑΙΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	37
ii. ΣΥΓΚΥΤΙΟΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΕΣ.....	40

V. Ο ΙΝΟΒΛΑΣΤΙΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ 2 (FIBROBLAST GROWTH FACTOR 2- FGF2).....	42
VI. ΓΟΝΙΔΙΑ-ΜΑΡΤΥΡΕΣ ΤΗΣ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	43
5. Η ΝΕΥΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ.....	46
I. ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ (ΚΝΣ).....	47
i. ΝΕΥΡΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	47
ii. ΝΕΥΡΩΝΕΣ.....	47
iii. ΑΣΤΡΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	48
iv. ΟΛΙΓΟΔΕΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	49
II. OLIG ΓΟΝΙΔΙΑ.....	49
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	51
1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ.....	52
I. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΤΟΥ DNA.....	52
II. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΗΛΕΚΤΡΟΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	53
III. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΗΛΕΚΤΡΟΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ELECTROPORATION.....	53
IV. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΟΡΙΩΝ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	54
V. ΨΗΞΗ ΣΕ ΦΑΙΝΟΛΗ.....	54
VI. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ (SEQUENCING).....	55
VII. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΙ ΙΣΤΟΥΣ.....	55
VIII. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.....	56
2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	57

I. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΜΒΡΥΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΟΥ (MEFs) ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ G418.....	57
II. ΧΡΩΣΗ ΜΕ DAPI ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΠΙΣΤΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ MYCOPLASMA.....	59
III. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	59
IV. ΝΕΥΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΜΟΝΟΣΤΟΙΒΑΔΑ.....	61
V. Γ-ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΕΜΒΡΥΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΟΥ.....	62
VI. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΜΕΣΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΕΩΝ.....	63
3. ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ.....	63
4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ ΚΛΩΝΟΥ (cDNA) ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ RNA ΚΑΙ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL-TIME PCR).....	65
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	68
1. ERF ΚΑΙ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΩΣΗ.....	69
2. ERF ΚΑΙ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ.....	71
3. ERF ΚΑΙ ΝΕΥΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ.....	85
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	93
1. ERF ΚΑΙ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΩΣΗ.....	95
2. Η ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΜΒΟΛΗΣ ΤΟΥ ERF ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ.....	96
3. Η ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΜΒΟΛΗΣ ΤΟΥ ERF ΣΤΗ ΝΕΥΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ.....	102
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	105

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη του ρόλου του γονιδίου *erf* στην ανάπτυξη, διαφοροποίηση και καρκινογένεση, μέσω διαγονιδιακών ζώων και βλαστικών κυττάρων.

Ο Erf είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής στην κύρια μιτωτική RTK/Ras/Erk οδό και ενέχεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Έχει δειχθεί επίσης ότι μπορεί να καταστείλει την *ets*- και *gas*- εξαρτώμενη καρκινογένεση σε ινοβλάστες. Αποτελεί στόχο των Erks με τις οποίες αλληλεπιδρά και φωσφορυλιώνεται. Αυτό έχει ως συνέπεια την έξοδό του από τον πυρήνα και την απενεργοποίηση του. Ο πυρηνικός Erf σταματά τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G0/G1.

Έχουν δημιουργηθεί στο εργαστήριό μας ποντίκια με απαλοιφή του γονιδίου του Erf (Erf knock-out) και έχει μελετηθεί η πορεία ανάπτυξης σε όλα τα εμβρυικά στάδια. Οι μελέτες αυτές έχουν δείξει πως τα knock-out στελέχη παρουσιάζουν ανωμαλίες στην ανάπτυξη και συγκεκριμένα δεν παρατηρείται διαφοροποίηση στη χοριονική τροφοβλάστη, απουσία της χοριοαλλαντοϊκής σύντηξης, «έντονη» χοριονική στοιβάδα, ελάττωση της έκτασης της σπογγιοτροφοβλάστης, αποδιοργανωμένες στοιβάδες της σπογγιοτροφοβλάστης και των γιγαντιαίων κυττάρων και τέλος πρόκληση εμβρυικού θανάτου κατά τη δέκατη (E10.5) μέρα της κύησης λόγω τροφικής ανεπάρκειας.

Σύμφωνα με τις παραπάνω παρατηρήσεις καθώς και τη μελέτη της έκφρασης του Erf στα διάφορα στάδια της εμβρυογένεσης και πλακουντογένεσης, κρίθηκε σημαντική η διερεύνηση του ρόλου του Erf κατά τη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων σε σπογγιοτροφοβλάστη και συγκυτιοτροφοβλάστη. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαφοροποίησης τροφοβλαστικών κυττάρων *in vitro*. Έγινε χρήση τεσσάρων (4) κυτταρικών σειρών: τροφοβλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου (WT), τροφοβλαστικά κύτταρα με απαλοιφή του Erf (Erf knock-out), τροφοβλαστικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον αγρίου τύπου Erf και τέλος τροφοβλαστικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον M1-7 Erf. Στο μετάλλαγμα αυτό, ο Erf, στερείται των 7 θέσεων του φωσφορυλίωσης από τις Erks, με αποτέλεσμα τον πυρηνικό του εντοπισμό και συνεπώς μια συνεχώς ενεργοποιημένη μορφή. Έπειτα

από ανάλυση των επιπέδων έκφρασης διαφόρων γονιδίων-μαρτύρων για τα στάδια διαφοροποίησης, προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- Τα αγρίου τύπου κύτταρα, ακολουθούν μια πορεία διαφοροποίησης προς σπογγιοτροφοβλαστικά κι γιγαντιαία κύτταρα.
- Τα κύτταρα με την απαλοιφή του *Erf*, παρουσιάζουν καθυστέρηση στο πρόγραμμα διαφοροποίησης, δίνοντας πληθυσμούς γιγαντιαίων κυττάρων.
- Τα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον αγρίου τύπου *Erf*, διαφοροποιούνται προς σπογγιοτροφοβλαστικά κύτταρα.
- Τα κύτταρα που υπερεκφράζουν τη συνεχώς πυρηνική μορφή του *Erf* (M1-7), οδηγούνται προς συγκυτιοτροφοβλάστες και γιγαντιαία κύτταρα.

Από τα παραπάνω προκύπτει ένα μοντέλο διαφοροποίησης που προτείνει την εμπλοκή του *Erf* στον καθορισμό της σπογγιοτροφοβλαστικής και συγκυτιοτροφοβλαστικής γενεαλογίας, προάγοντας τη διαφοροποίηση προς αυτές τις κατευθύνσεις.

Πειράματα ChIP-seq έδειξαν ότι ο FGF2, ένας παράγοντας που συμβάλλει στη διατήρηση των TSC, μπορεί να ρυθμίζεται από τον ERF. Ανάλυση της διαφοροποίησης *Erf*-KO TSCs αποκάλυψαν υψηλά επίπεδα FGF2 σε σύγκριση με τα WT TSCs. Έκφραση ενός μετάλλαγματος του ERF που δεν αποκρίνεται στη σηματοδότηση μέσω RTK / Ras / ERK σε TSCs, καταστέλλει εντελώς την έκφραση του FGF2. Αναλύσεις υποκινητή πρότειναν την άμεση μεταγραφική ρύθμιση του FGF2 από τον ERF. Συλλογικά αυτά τα στοιχεία δείχνουν ότι ο ERF συμβάλλει στη διαφοροποίηση των TSC, πέρα από την επίδρασή του στα χοριακά τροφοβλαστικά κύτταρα μέσω της ρύθμισης του Fgf2.

Εκτός από τις ανωμαλίες που παρατηρούνται κατά την πλακουντογένεση απουσία του *Erf*, έχουν επίσης παρατηρηθεί και ανωμαλίες κατά την εμβρυική ανάπτυξη απουσία του *Erf*. Συγκεκριμένα, τα έμβρυα παρουσιάζουν ανωμαλίες στην περιοχή του κεφαλιού και σε νευρικές δομές, όπως ο νευρικός σωλήνας. Με πειράματα ανάλυσης DNA με microarrays στο εργαστήριό μας, έχει δειχθεί η μεταγραφική κατασταλτική δράση του *Erf* στο γονίδιο *olig1*, που αποτελεί μάρτυρα των ολιγοδενδροκυττάρων που συμμετέχουν στη διαδικασία της μυελινοποίησης. Τέλος,

έχει παρατηρηθεί αύξηση των επιπέδων του Erf κατά τη διάρκεια της *in vivo* μυελινοποίησης, διαδικασία που είναι RTK-εξαρτώμενη.

Κρίθηκε, λοιπόν, σημαντική η μελέτη του πιθανού ρόλου του Erf στη νευρική διαφοροποίηση. Για το σκοπό αυτό έγινε χρήση εμβρυικών βλαστικών κυττάρων αγρίου τύπου και κυττάρων με απαλοιφή του Erf. Με εξέταση της γονιδιακής έκφρασης των Erf^{+/+} και Erf^{-/-} βλαστικών κυττάρων υπό συνθήκες διαφοροποίησης, αποκαλύφθηκε ένα αυξημένο δυναμικό διαφοροποίησης προς ολιγοδενδροκύτταρα απουσία του Erf.

Για τη διαφοροποίηση των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων έγινε χρήση ειδικού θρεπτικού μέσου για κατευθυνόμενη νευρική διαφοροποίηση σε μονοστοιβάδα. Τέτοιου είδους πρωτόκολλο έδινε κυρίως πληθυσμούς νευρικών κυττάρων και λιγότερο γλοιακών κυττάρων. Οπότε, κρίθηκε απαραίτητη η αλλαγή στον τρόπο καλλιέργειας. Αποφασίστηκε, λοιπόν, διαφοροποίηση μέσω δημιουργίας εμβρυικών σωματιδίων, πείραμα το οποίο είναι σε εξέλιξη. Με τις μέχρι τώρα παρατηρήσεις, η διαδικασία αυτή εμπλουτίζει την καλλιέργεια με γλοιακά κύτταρα, σύμφωνα με τη μορφολογία των υπό διαφοροποίηση κυττάρων.

Παράλληλα, έγινε δημιουργία διαγονιδιακών ζώων στα οποία πραγματοποιείται conditional απαλοιφή του γονιδίου του Erf. Έτσι έχουν προκύψει τα Emx-1-cre και Meox2-cre ποντίκια, με τα δεύτερα να εμφανίζουν εμβρυική θνησιμότητα. Στην παρούσα μελέτη δείξαμε πως μειωμένα επίπεδα του μεταγραφικού καταστολέα Erf προκαλεί σύνθετη κρανιοσυνόστωση στους ανθρώπους και τα ποντίκια.

Χαρακτηριστικά γνωρίσματα της πρόσφατα αναγνωρισμένης αυτής κλινικής διαταραχής αποτελούν η πολλαπλή συνοστέωση, η κρανιοπροσωπική δυσμορφία, η δυσπλασία Chiari και η γλωσσική καθυστέρηση. Ποντίκια με μειωμένα επίπεδα λειτουργικού Erf στο ~30% των φυσιολογικών επιπέδων εμφανίζουν μεταγεννητική πολλαπλή συνοστέωση. Αντίθετα, η ανάπτυξη των εμβρυικών κρανίων εμφανίζει ήπια καθυστέρηση. Χρησιμοποιώντας ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού καθώς και high-throughput αλληλούχιση, βρήκαμε ότι ο Erf προσδέεται με μεγάλη συνάφεια σε στοιχεία απομακρυσμένα από τους υποκινητές που περιέχουν τα RUNX και AP-1 μοτίβα. Η εργασία αυτή αναγνωρίζει τον Erf ως νέο ρυθμιστή της οστεογόνου διέγερσης μέσω RAS-ERK σηματοδότησης,

πιθανώς ανταγωνιζόμενος με ETS ενεργοποιητές σε πολυπαραγοντικά μεταγραφικά σύμπλοκα.

ABSTRACT

The purpose of this thesis is to study the role of the erf gene in development, differentiation and carcinogenesis through transgenic animal stem cells.

The Erf is an important regulator in the main mitotic RTK / Ras / Erk pathway and is involved in cell proliferation. It has also been shown that it can suppress ets-and ras-dependent carcinogenesis in fibroblasts. It is the target of Erks with which interacts and gets phosphorylated. This causes his export from the nucleus. The nuclear Erf stops the cell cycle at the phase G0/G1.

In our laboratory we created transgenic mice with gene deletion of Erf (Erf knock-out) and we studied the development in all embryonic stages. These studies have shown that the knock-out strains have defects in development and there is no chorionic trophoblast differentiation, absence of chorioallantoic fusion, persisting chorionic layer, reduced spongiotrophoblast layer, disorganized layers of spongiotrophoblast and giant cells and finally embryonic death in the tenth (E10.5) day of pregnancy due to food deficiency.

According to these observations and the study of the expression of Erf in the various stages of embryogenesis and placenta formation, it was important to investigate the role of Erf in the differentiation of trophoblast cells towards the spongiotrophoblast and syncytiotrophoblast. For this purpose, we examined differentiating trophoblast cells in *in vitro* assays. We used four (4) cell lines: wild type (WT) trophoblasts, trophoblast cells with deletion of Erf (Erf knock-out), trophoblast cells overexpressing the wild type protein Erf and trophoblast cells overexpressing the M1-7 Erf. In this mutant, Erf lacks the 7 phosphorylation sites by of the Erks, resulting in its nuclear detection and therefore in a continuously activated form. After analyzing the expression levels of different genes markers specific for each differentiation stage, we came up with the following conclusions:

- The wild-type cells, follow a path of differentiation towards spongiotrophoblasts and giant cells.
- The cells with the deletion of Erf, show a delayed differentiation program, giving populations of giant cells.

- The cells overexpressing the wild type Erf, differentiate into spongiotrophoblast cells.
- The cells overexpressing the nuclear form of Erf (M1-7), led to syncytiotrophoblasts and giant cells.

From the above observations, we came up with a differentiation model that suggests the involvement of Erf with the specification of the spongiotrophoblasts and syncytiotrophoblasts, forcing the differentiation towards these lineages.

ChIP-seq experiments indicated that Fgf2, a factor supporting TSC maintenance, may be regulated by Erf. Analysis of differentiating Erf-KO TSCs revealed high levels of Fgf2 compared to WT TSCs. Expression of an RTK/Ras/Erk insensitive ERF mutation in TSCs, totally suppressed Fgf2 expression. Promoter assays suggested a direct regulation of Fgf2 transcription by Erf. Collectively these data suggest that Erf contributes to TSC differentiation, silencing the inappropriate expression of Fgf2.

Thus our data indicate that Erf may actively contribute to syncytiotrophoblast lineage development beyond its effect on chorionic trophoblast cells mediated by Fgf2 regulation.

Apart from the abnormalities observed in the absence of Erf during the placenta formation there are also abnormalities observed during embryogenesis in the absence of Erf. Specifically, embryos exhibit defects in the head and neural structures, such as neural tube. DNA microarrays analysis in our laboratory has demonstrated the transcriptional repression activity of Erf on *olig1*, which is a marker gene of oligodendrocytes in the process of myelination. Furthermore, ERF increased during *in vivo* remyelination (RTK-dependent process).

We considered, therefore, important to study the possible role of Erf in neural differentiation. For this purpose we used wild type embryonic stem cells and cells with deletion of Erf. By examining the gene expression of Erf *+/+* and Erf *-/-* stem cells in differentiating conditions, we found an increased potential for differentiating cells towards oligodendrocytes in the absence of Erf.

For the differentiation of embryonic stem cells we used a special nutrient medium for directed neural differentiation in monolayer. Such protocol gave mainly populations

of nerve cells and less glial cells. So, it was necessary to change the culture conditions. It was decided, therefore, to differentiate the cells through the creation of embryoid bodies, an experiment that is underway. With the observations so far, this procedure enriches the culture by glial cells, according to the morphology of differentiating cells.

In parallel, we created transgenic animals with conditional gene deletion of Erf. Thus, we have in disposal Emx-1-cre and Meox2-cre mice, with the second ones showing embryonic lethality.

Here, we show that reduced dosage of ERF causes complex craniosynostosis (premature fusion of the cranial sutures) in humans and mice. Features of this newly recognized clinical disorder include multiple-suture synostosis, craniofacial dysmorphism, Chiari malformation and language delay. Mice with functional Erf levels reduced to ~30% of normal exhibit postnatal multiple-suture synostosis; by contrast, embryonic calvarial development appears mildly delayed. Using chromatin immunoprecipitation in mouse embryonic fibroblasts and high-throughput sequencing, we find that ERF binds preferentially to elements away from promoters that contain RUNX or AP-1 motifs. This work identifies ERF as a novel regulator of osteogenic stimulation by RAS-ERK signaling, potentially by competing with activating ETS factors in multifactor transcriptional complexes.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

bHLH basic helix loop helix

BMPs bone morphogenetic proteins

Cdx2 caudal related homeobox 2

ChIP chromatin immunoprecipitation

DNA deoxyribonucleic acid

dpc days post coitum

EBS ETS binding site

Eomes eomesodermin

EPC ectoplacental cone

ERF Ets2 Repressor Factor

ERK extracellular signal- regulated kinase

Err β oestrogen- receptor- related receptor β

ESC embryonic stem cells

Ets E twenty six (E26)

FGF fibroblast growth factor

FGFR fibroblast growth factor receptor

GCM1 Glial Cell Missing factor 1

IgIII immunoglobulin III

IGF insulin-like growth factor

ΚΝΣ κεντρικό νευρικό σύστημα

KO knock-out

LIF leukemia inhibitory factor

MAPK mitogen activated protein kinase

MEFs mouse embryonic fibroblasts

RNA ribonucleic acid

RTK receptor tyrosine kinase

RUNX runt-related transcription factor

VEGF vascular endothelial growth factor

PDGF β platelet derived growth factor β

PDGF β R platelet derived growth factor β receptor

Pl1 placenta lactogen 1

SHH sonic hedgehog

TGF β transforming growth factor β

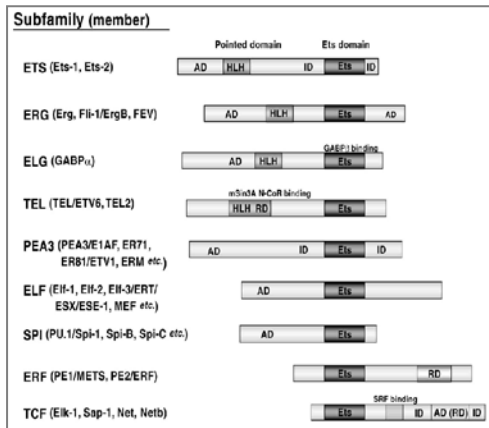
TSC trophoblast stem cells

VEGF vascular endothelial growth factor

WT wild type

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ETS ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ



Oikawa & Yamada Gene 2003, 303: 11-34 1

Οι ETS πρωτεΐνες αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες σηματοεξαρτώμενων μεταγραφικών ρυθμιστών, μεσολαβώντας σε διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η καρκινογένεση. Οι περισσότερες από τις γνωστές πρωτεΐνες ETS έχει αποδειχθεί ότι δρουν ως ενεργοποιητές της μεταγραφής. Ωστόσο, τέσσερις ETS πρωτεΐνες (YAN, ERF, NET

και TEL) μπορούν να λειτουργήσουν ως μεταγραφικοί καταστολείς. Σε τρεις περιπτώσεις (ERF, NET και TEL) έχουν εντοπιστεί διακριτές κατασταλτικές περιοχές και υπάρχουν ενδείξεις ότι οι NET και TEL μπορεί να μεσολαβούν στη μεταγραφή μέσω της στρατολόγησης απακετυλασών των ιστονών. Και οι τέσσερις πρωτεΐνες φαίνεται να ρυθμίζονται από MAPKs, αν και για τους παράγοντες YAN και ERF η ρύθμιση αυτή φαίνεται να περιορίζεται στις ERKs. Οι YAN, ERF και TEL έχουν εμπλακεί στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αν και υπάρχουν ενδείξεις για πιθανή συμμετοχή των YAN και TEL επίσης στη διαφοροποίηση. Άλλες ETS πρωτεΐνες έχει δειχθεί ότι καταστέλλουν τη μεταγραφή και προτείνεται ότι η περιοχή πρόσδεσης των ETS πρωτεϊνών στο DNA μπορεί να ενεργήσει ως μεταγραφικός καταστολέας. Η μεταγραφική καταστολή από τις ETS πρωτεΐνες προσθέτει ένα ακόμη επίπεδο στην ενορχηστρωμένη ρύθμιση από τη συγκεκριμένη οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων που συχνά αναγνωρίζουν παρόμοιες, αν όχι ταυτόσημες, θέσεις πρόσδεσης στο DNA και πιστεύεται ότι ρυθμίζουν κρίσιμα γονίδια σε μια ποικιλία βιολογικών διεργασιών. Οριστική εκτίμηση της σημασίας αυτού του καινοτόμου ρυθμιστικού επιπέδου θα απαιτεί τον προσδιορισμό των γονιδίων-στόχων των ETS πρωτεϊνών και την περαιτέρω ανάλυση του μεταγραφικού ελέγχου και της βιολογικής λειτουργίας των πρωτεϊνών αυτών σε συγκεκριμένα μονοπάτια [1].

Η σημασία της μεταγραφικής καταστολής στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε βακτήρια, αναγνωρίστηκε σχεδόν 40 χρόνια πριν από τους Jacob και Monod και από τότε έχει καθιερωθεί ως ένας σημαντικός μηχανισμός στη μεταγραφική ρύθμιση.

Κατασταλτικές πρωτεΐνες της μεταγραφής επηρεάζουν τα γονίδια-στόχους τους μέσω της άμεσης ή έμμεσης σύνδεσής τους στο DNA σε ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου-στόχου και καταστέλλουν τη μεταγραφή μέσω μιας ποικιλίας διαφορετικών μηχανισμών [2-4]. Μια κατασταλτική πρωτεΐνη μπορεί να εμποδίσει τη μεταγραφή του γονιδίου-στόχου 1) εκτοπίζοντας έναν ενεργοποιητή από το DNA, και 2) καλύπτοντας / μπλοκάροντας την περιοχή ενεργοποίησης ενός μεταγραφικού ενεργοποιητή. Επιπλέον, μια πρωτεΐνη καταστολέας μπορεί να εμποδίσει ενεργά τη μεταγραφή, ανεξάρτητα από μεταγραφικούς ενεργοποιητές 1) επηρεάζοντας τη δομή της χρωματίνης και την προσβασιμότητα στην περιοχή του γονιδίου-στόχου και 2) παρεμβαίνοντας άμεσα στη βασική μεταγραφική μηχανή. Υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι οι ETS πρωτεΐνες μπορεί να αποτελούν παραδείγματα για κάθε μία από αυτές τις κατηγορίες.

Γονίδια που κωδικοποιούν για την ETS περιοχή, αρχέτυπο των οποίων είναι το *v-ets* ογκογονίδιο του ιού της λευχαιμικής γρίπης E26 των πτηνών [5, 6] ανιχνεύονται σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς που αναλύθηκαν μέχρι στιγμής [7-9]. Η αναγνώριση των *v-ets* σχετιζόμενων γονιδίων τα τελευταία 15 χρόνια έχει κατατάξει την ETS οικογένεια ως μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες μεταγραφικών ρυθμιστών, με ποικίλες λειτουργίες και δραστηριότητες [10-12]. Οι ETS πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από μια συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης στο DNA (ETS περιοχή), η οποία προσδέεται σε αλληλουχίες DNA με κεντρικό μοτίβο το GGAA / T (EBS:.. ETS σημείο σύνδεσης, [13]) και έχει δειχθεί ότι μεσολαβούν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την ογκογένεση [14-17]. Οι περισσότερες από τις γνωστές ETS πρωτεΐνες έχει δειχθεί ότι ενεργοποιούν τη μεταγραφή, ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχει αναγνωριστεί ένας αυξανόμενος αριθμός μεταγραφικών καταστολέων [18-22]. Επιπλέον, ένας αριθμός ETS πρωτεϊνών έχουν προταθεί για τη μεταγραφική ενεργοποίηση ή καταστολή με τρόπο εξαρτώμενο από άλλους παράγοντες [23-28].

Η μέχρι στιγμής γνώση μας για τις ETS πρωτεΐνες δείχνει ότι ανά πάσα στιγμή πολλά μέλη αυτής της οικογένειας υπάρχουν σε κάθε κύτταρο και πολλά από αυτά μπορούν να αναγνωρίσουν πανομοιότυπα EBS στοιχεία. Η λειτουργία και η ειδικότητα των ETS πρωτεϊνών ελέγχονται σε διάφορα επίπεδα. Πρώτον, η έκφραση πολλών γονιδίων ETS είτε είναι πολύ ιστοειδική είτε ρυθμίζεται ως απάντηση σε συγκεκριμένα εξωκυττάρια σήματα. Δεύτερον, συγκεκριμένα ενδοκυττάρια

σηματοδοτικά μονοπάτια έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν άμεσα τη δραστηριότητα συγκεκριμένων πρωτεϊνών ETS, ρυθμίζοντας την υποκυτταρική διαμερισματοποίησή τους [29-30], τη δραστηριότητά τους να προσδένουν στο DNA [31-33] ή το δυναμικό τρανσενεργοποίησής τους [34-36]. Τέλος, η ρύθμιση πολλών υποκινητών / ενισχυτών από ETS πρωτεΐνες συχνά εξαρτάται, σε σημαντικό βαθμό, από την αλληλεπίδρασή τους με άσχετους μεταγραφικούς παράγοντες σε σύνθετα στοιχεία του DNA [37-41]. Αυτοί και άλλοι μηχανισμοί δρουν ώστε να συνυπάρχει η πληθώρα των ETS πρωτεϊνών σε ένα κύτταρο αρμονικά. Ωστόσο, θα ήταν δύσκολο σήμερα να φανταστούμε μια αυστηρή ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης χωρίς την παρουσία των μεταγραφικών καταστολέων που εξασφαλίζουν αποκλεισμό μεταγραφής ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Στα πλαίσια αυτά, οι ETS πρωτεΐνες με κατασταλτική μεταγραφική δραστηριότητα είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση της ενορχηστρωμένης παρουσίας και του ρόλου των ETS πρωτεϊνών στη μεταγραφική ρύθμιση.

Τα περισσότερα μέλη της σηματοδοτικής οδού RTK είναι εξαιρετικά εξελικτικά συντηρημένα, από τους υποδοχείς μέχρι τις MAPK κινάσες. Το YAN είναι πολύ συντηρημένο στη δομή, λειτουργία, πρότυπο έκφρασης και τη ρύθμιση ανάμεσα σε δύο συγγενικά είδη της *Drosophila* υποστηρίζοντας το σημαντικό ρόλο της [42]. Ωστόσο, μεταγραφικοί παράγοντες εμφανίζουν σημαντική διαφοροποίηση κατά τη διάρκεια της εξέλιξης που αυξάνεται και με την ανάπτυξη του γονιδιώματος, και στο μέτρο αυτό δεν μπορεί να είναι έκπληξη το γεγονός ότι δεν έχουν εντοπιστεί ορθόλογα γονίδια του Yan σε σπονδυλωτά. Το πλησιέστερο ομόλογο YAN σε σπονδυλωτά είναι το TEL [43], μια ETS πρωτεΐνη, η οποία παρουσιάζει επίσης μεταγραφική κατασταλτική δραστηριότητα.

2. Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΚΑΤΑΣΤΟΛΕΑΣ ERF

Ο ERF (ETS2 Repressor Factor) είναι μέλος της οικογένειας των ETS γονιδίων. Εκτός από τη συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης στο DNA (EBS) [19], ο ERF δεν παρουσιάζει άλλη ομολογία με άλλες ETS πρωτεΐνες, εκτός από την PE-1 [44], με την οποία αποτελούν μια νέα υποκατηγορία των ETS πρωτεϊνών. Ο ERF είναι ένας

ισχυρός μεταγραφικός καταστολέας και καταστέλλει τη μεταγραφή μέσω μια διακριτής περιοχής στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, η οποία δεν εντοπίζεται στον PE-1. Αυτός ο τομέας δεν έχει κάποιο αναγνωρίσιμο μοτίβο ενδεικτικό για τον τρόπο δράσης του και οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην καταστολή μέσω ERF είναι άγνωστοι. Ωστόσο, υπάρχει μια αναφορά που υποστηρίζει ότι η καταστολή αυτή δεν ενέχει το σύστημα Sin3/NcoR [45]. Η κατασταλτική περιοχή του ERF έχει μεταφερθεί σε μια σειρά άλλων περιοχών πρόσδεσης στο DNA και μεταγραφικούς παράγοντες (GAL4, ETS1, FLI1, c-myc, NFkB) με αποτέλεσμα να προκύψει μια σειρά από μεταγραφικούς καταστολείς με ποικίλες λειτουργίες και ειδικότητα [46-47]. Ένα πλήθος φυσικών και τεχνητών υποκινητών έχει δείχθει ότι καταστέλλονται από τον ERF με τρόπο εξαρτώμενο από την πρόσδεση στο DNA.

Όπως και το Yan, ο ERF είναι στον κατάρρου του Ras / ERK σηματοδοτικού μονοπατιού και ρυθμίζεται άμεσα από την ERK μέσω φωσφορυλίωσης. Η ERK προσδένεται φυσικά και φωσφορυλιώνει τον ERF σε πολλές θέσεις τόσο in vitro όσο και in vivo. Ο Erf μπορεί να αλληλεπιδράσει ειδικά τόσο με ενεργό όσο και με ανενεργό Erk μέσω δύο διακριτών FxF μοτίβων και μπορεί να μπλοκάρει αποτελεσματικά την αλληλεπίδραση Erk- υποστρώματος [48]. Η φωσφορυλίωση από την ERK έχει ως αποτελέσματα στην ταχεία εξαγωγή του ERF από τον πυρήνα. Σε αντίθεση με το Yan, η πρωτεΐνη είναι σταθερή στο κυτταρόπλασμα και επανασυσσωρεύεται στον πυρήνα κατά την αδρανοποίηση της ERK [29]. Η κυτταρική εντόπιση του ERF εξαρτάται αποκλειστικά από το ρυθμό εξαγωγής του, με την εισαγωγή του να μην επηρεάζεται από την κατάσταση φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης. Η πυρηνική εξαγωγή είναι ευαίσθητη στη Leptomycin B υποδηλώνοντας την εμπλοκή του Exportin / RanGTP εξαρτώμενου μονοπατιού, αν και ο ERF δε διαθέτει ένα αναγνωρίσιμο σήμα πυρηνικής εξαγωγής (NES). Χαρτογράφηση των περιοχών δείχνει ότι τουλάχιστον δύο περιοχές της πρωτεΐνης απαιτούνται για την εξαγωγή από τον πυρήνα, που συμφωνεί με την εξαγωγή του ERF μέσω εκτεταμένης φωσφορυλίωσης. Δεν είναι σαφές εάν ο υποκυτταρικός εντοπισμός είναι η μόνη λειτουργία του ERF που ρυθμίζεται με φωσφορυλίωσή του από τις ERK. Μετάλλαξη μιας θέσης φωσφορυλίωσης από την ERK στην κατασταλτική περιοχή του ERF σε γλουταμινικό οξύ, ώστε να μιμείται τη φωσφορυλιωμένη κατάσταση της πρωτεΐνης, μειώνει την κατασταλτική της δραστηριότητα [46]. Η μείωση αυτή δεν μπορεί να αποδοθεί σε πρόσδεση στο DNA ούτε σε πυρηνική συσσωρευση προτείνοντας μια

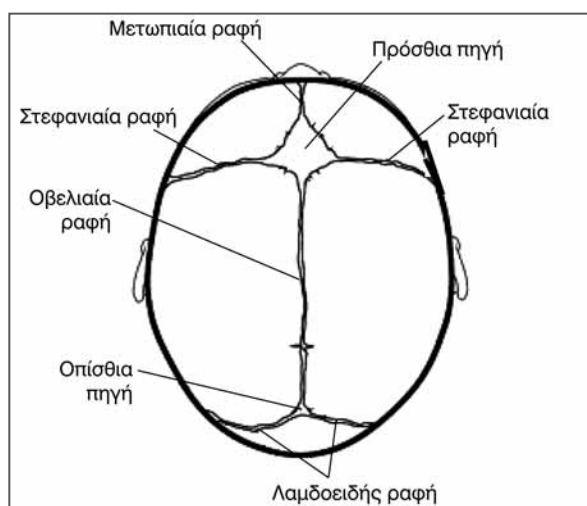
επιπλέον ρύθμιση στο κατασταλτικό επίπεδο. Ωστόσο, αυτή η υπόθεση πρέπει να αξιολογηθεί περαιτέρω στο πλαίσιο του μηχανισμού καταστολής του ERF.

Ο ERF μπορεί να καταστείλει τον ογκογόνο μετασχηματισμό των NIH3T3 κυττάρων από αρκετά ογκογονίδια. Ο αγρίου τύπου ERF μπορεί να καταστείλει τον E26-επαγόμενο μετασχηματισμό [46]. Το δυναμικό μετασχηματισμού της Gag-Myb-ETS ογκοπρωτεΐνης του ιού E26, τόσο σε αυτό το σύστημα όσο και σε αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα, έχειδειχθεί ότι εξαρτάται από την v-ETS περιοχή πρόσδεσης στο DNA [49-50], γεγονός που υποδηλώνει ότι οι δύο πρωτεΐνες μπορεί να ελέγχουν κοινά ή συνεργαζόμενα μονοπάτια και/ή γονίδια-στόχους.

Μεταλλάγματα του ERF, που έχουν μεταλλαγμένες τις θέσεις φωσφορυλίωσης από τις MAPK σε αλανίνη (μετάλλαγμα M1-7) είναι ανθεκτικοί στη φωσφορυλίωση από την ERK και καθίστανται πυρηνικά. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν να μπλοκάρουν τον RAS επαγόμενο μετασχηματισμό των NIH3T3 κυττάρων, σε αντίθεση με τον αγρίου τύπου ERF. Αυτό προσφέρει μια γενετική επιβεβαίωση για το ρόλο του ERF στο σηματοδοτικό μονοπάτι RAS. Η έκφραση των ίδιων μεταλλάξεων σε φυσιολογικά κύτταρα επάγει σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, ενώ η υπερέκφραση του ERF αγρίου τύπου έχει ελάχιστη επίδραση στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Αυτό είναι σύμφωνο με τον πυρηνικό εντοπισμό του ERF σε κύτταρα που έχουν σταματήσει στη φάση G0/G1 και την άμεση εξαγωγή του από τον πυρήνα ύστερα από μιτογόνο διέγερση, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο ERF μπορεί να ρυθμίζει *ras*-αποκρινόμενα γονίδια που απαιτούνται για την είσοδο στον κυτταρικό κύκλο ή την εξέλιξή του [29]. Η καθολική έκφραση του ERF προτείνει ότι κάποια συστατικά της μηχανής του κυτταρικού κύκλου μπορεί να υπόκεινται στη μεταγραφική καταστολή του ERF. Αυτό θα υπονοούσε μια άμεση σύνδεση μεταξύ της Ras σηματοδοτικής οδού και του μηχανισμού του κυτταρικού κύκλου. Έχειδειχθεί επίσης ότι η λειτουργικότητα του *Erf* μεσολαβείται από την ικανότητά του να καταστέλλει τη μεταγραφή του *c-Myc* [51]. Ομόζυγη απαλοιφή του *Erf* σε ποντίκια έχει ως αποτέλεσμα το μπλοκάρισμα της διαφοροποίησης των χοριοειδών κυττάρων πριν τη χοριοαλλαντοϊδική σύντηξη, προκαλώντας παραμονή της χοριακής στοιβάδας σε αδιαφοροποίητη κατάσταση, αδιαφοροποίητη κοιλότητα του εξωπλακουντικού κώνου, απουσία χοριοαλλαντοϊδικής σύντηξης και λαβυρίνθου. Τα παραπάνω οδηγούν σε εμβρυική θνησιμότητα μέχρι την E10.5 [52].

3. ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΤΗΣ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΩΣΗΣ

Η κρανιοσυνόστωση/ κρανιοσυνοστεώση είναι μια κατάσταση κατά την οποία μία ή περισσότερες από τις ινώδεις ραφές στο κρανίο ενός βρέφους συντήκονται πρόωρα μέσω οστεοποίησης, αλλάζοντας έτσι το ρυθμό αύξησης του κρανίου [53]. Επειδή το κρανίο δεν μπορεί να επεκταθεί κάθετα προς την ενωμένη ραφή, αντισταθμίζει με την ανάπτυξη περισσότερο με κατεύθυνση παράλληλη προς τις κλειστές ραφές. Μερικές φορές το τελικό μοντέλο ανάπτυξης παρέχει τον απαραίτητο χώρο για την ανάπτυξη του εγκεφάλου, αλλά έχει ως αποτέλεσμα ένα ανώμαλο σχήμα του κεφαλιού και ανώμαλα χαρακτηριστικά του προσώπου. Σε περιπτώσεις κατά τις οποίες η αντιστάθμιση δεν παρέχει αποτελεσματικά αρκετό χώρο για την ανάπτυξη του



εγκεφάλου, η κρανιοσυνοστεώση έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενδοκρανιακής πίεσης οδηγώντας ενδεχομένως σε διαταραχές της όρασης, διαταραχή ύπνου, διατροφικές δυσκολίες, ή μια διαταραχή της νοητικής ανάπτυξης σε συνδυασμό με μια σημαντική μείωση του δείκτη νοημοσύνης [54].

Το εγκεφαλικό κρανίο αποτελείται από τα χονδρογενή οστά της βάσης του κρανίου και τα υμενογενή πλατιά οστά που αποτελούν το θόλο του κρανίου, που είναι τα δύο μετωπιαία, δύο βρεγματικά και το ινιακό οστό. Φυσιολογικά, κατά τη γέννηση, τα οστά του κρανιακού θόλου χωρίζονται μεταξύ τους με σχισμές πλάτους μερικών χιλιοστών γεμάτες από συνδετικό ιστό. Οι σχισμές αυτές ονομάζονται κρανιακές ραφές και είναι οι εξής: η μετωπιαία και η οβελιαία ραφή κατά μήκος της μέσης γραμμής, η στεφανιαία και η λαμδοειδής. Η σύγκλειση των κρανιακών ραφών εξελίσσεται σταδιακά μέχρι και την Τρίτη δεκαετία της ζωής ή και αργότερα, με εξαίρεση αυτή της μετωπιαίας ραφής, η οποία συνήθως ολοκληρώνεται μέσα στα δύο πρώτα χρόνια από τη γέννηση.

I. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ – ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Ταξινόμηση της Κρανιοσυνοστέωσης
Πρωτοπαθής
A. Απλή
• Μη συνδρομική: οβελιαία, στεφανιαία, μετωπική, λαμδοειδής
• Συνδρομική
B. Πολλαπλή
• Μη συνδρομική
• Συνδρομική: Νόσος Crouzon, Σύνδρομο του Apert, Νόσος του Pfeiffer κ.ά.
Δευτεροπαθής
• Μεταβολικές διαταραχές (π.χ. υπερθυρεοειδισμός)
• Δυσμορφίες Ν.Σ. (π.χ. ολοπροσεγκεφαλία, μικροκεφαλία, εγκεφαλοκήλη, υδροκεφαλός υπό παροχέτευση)
• Έκθεση του εμβρύου σε τοξικές ουσίες ή φάρμακα (π.χ. βαλπροϊκό οξύ, υδαντοΐνη)
• Βλεννοπολυσακχαριδώσεις (π.χ. Σύνδρομο του Hurler, Σύνδρομο του Morquio)

Η πρόωμη συνοστέωση μπορεί να αφορά μια κρανιακή ραφή μεμονωμένα ή περισσότερες, οπότε ονομάζεται αντίστοιχα απλή ή πολλαπλή κρανιοσυνοστέωση. Μπορεί να εμφανίζεται στα πλαίσια κάποιου συνδρόμου και να συνοδεύεται από πολλαπλές ανωμαλίες (συνδρομική) ή να εμφανίζεται σποραδικά ως μεμονωμένο γεγονός (μη συνδρομική). Τέλος, υπάρχουν περιπτώσεις

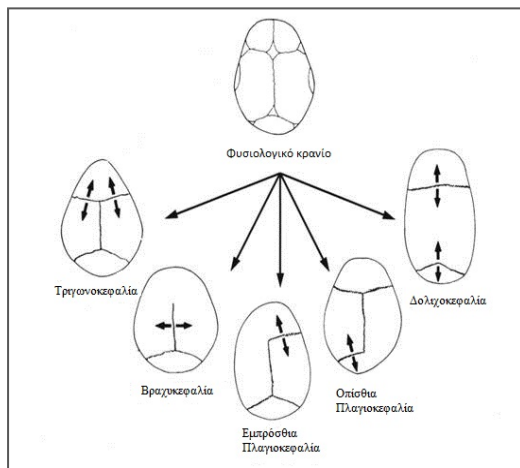
στις οποίες η πρόωμη σύγκλειση των ραφών οφείλεται σε κάποιο πρωτοπαθές νόσημα, όπως για παράδειγμα μικροκεφαλία, υπερθυρεοειδισμό κ.ά., οπότε χαρακτηρίζεται ως δευτεροπαθής.

Η συχνότητα της πρωτοπαθούς κρανιοσυνόστωσης είναι κατά μέσο όρο μία για κάθε 2500 γεννήσεις, πρόκειται δηλαδή για μία κατάσταση ασυνήθη, αλλά όχι σπάνια. Στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων απαντάται μεμονωμένη συνοστέωση μίας από τις ραφές του κρανίου, ενώ οι υπόλοιπες ραφές παραμένουν ανοιχτές. Η οβελιαία ραφή εμπλέκεται στο 40-60% των περιπτώσεων, ακολουθεί η στεφανιαία στο 20-30% και η μετωπιαία ραφή σε λιγότερο από το 10% των περιπτώσεων. Η αληθής συνοστέωση της λαμδοειδούς ραφής είναι εξαιρετικά σπάνια, αφού αφορά περίπου 3 στις 100.000 γεννήσεις.

Η συνδρομική κρανιοσυνόστωση είναι λιγότερο συχνή, καλύπτοντας το 20% του συνόλου των περιπτώσεων. Παρ' όλα αυτά, έχουν αναγνωριστεί έως σήμερα πάνω από 150 διαφορετικά σύνδρομα στα οποία κάποιας μορφής κρανιοσυνόστωση, συνήθως πολλαπλή, συνυπάρχει με ανωμαλίες από κάποιο άλλο σύστημα. Από αυτά, πιο συχνά περιγράφονται η νόσος Crouzon και το σύνδρομο του Apert. Στο πρώτο παρατηρείται οξυκεφαλική διαμόρφωση του κρανίου και υποπλασία του προσώπου με προβολή της μύτης, προγναθισμό και νοητική υστέρηση, ενώ στο δεύτερο συνυπάρχει συμμετρική συνδακτυλία των άκρων με κρανιοσυνόστωση και ανωμαλίες στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ).

II. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΡΑΝΙΟΥ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟΝ ΤΥΠΟ ΤΗΣ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΩΣΗΣ

Το σχήμα του κρανίου είναι χαρακτηριστικό για κάθε τύπο κρανιοσυνόστωσης, ανάλογα με την κρανιακή ραφή ή το συνδυασμό των ραφών που κλείνουν σε κάθε περίπτωση. Σύμφωνα με τους κανόνες που πρώτος ο ίδιος ο R. Virchow αναγνώρισε και περιέγραψε το 1851, όταν μια ραφή συνοστεωθεί πρώιμα στην πορεία της διάπλασης του κρανίου, παρεμποδίζεται η αύξηση του κρανίου κάθετα στη



Journal of Medicine and Life

συνοστεωμένη ραφή και συνεχίζεται αντιτροπιστικά προς τις άλλες κατευθύνσεις δίνοντας στο κρανίο μια τυπική τελική μορφολογία. Έτσι, η μεμονωμένη πρώιμη σύγκλειση της οβελιαίας ραφής, που είναι και η συχνότερη σε εμφάνιση, οδηγεί σε αύξηση της προσθοπίσθιας διαμέτρου του κρανίου και τελικό σχήμα που ονομάζεται σκαφοκεφαλία. Η πρώιμη συνοστέωση της

μετωπιαίας ραφής οδηγεί στη διαμόρφωση της τριγωνοκεφαλίας, με χαρακτηριστική προσεκβολή στη μετωπιαία χώρα, ενώ η ταυτόχρονη σύγκλειση των στεφανιαίων ραφών αμφοτερόπλευρα οδηγεί σε βράχυνση του μεγέθους του κρανίου που ονομάζεται βραχυκεφαλία. Στην περίπτωση που η μία από τις δύο σταφανιαίες ραφές παραμένει ανοιχτή, η αύξηση του κρανίου παρεμποδίζεται μόνο προς την πλευρά της συνοστεωμένης ραφής και το τελικό σχήμα του κρανίου χαρακτηρίζεται ως πρόσθια πλαγιοκεφαλία. Τέλος, η συνοστέωση μονόπλευρα της λαμδοειδούς ραφής οδηγεί στη διαμόρφωση της οπίσθιας πλαγιοκεφαλίας.

III. ΑΛΛΟΙ ΤΥΠΟΙ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΩΣΗΣ

Συνδυασμός ταυτόχρονης συνοστέωσης της στεφαναϊάς και οβελιαϊάς ραφής τείνει να προκαλέσει ένα μυτερό κρανίο με αντιρροπιστική αύξηση προς την κατακόρυφη διάμετρο, η οποία δίνει την εικόνα της λεγόμενης οξυκεφαλίας. Ωστόσο, εάν συνοστεωθεί πρώτη η στεφαναϊά ραφή και ακολουθήσει με κάποια χρονική απόσταση η σύγκλειση της οβελιαϊάς, θα προκληθεί βραχυκεφαλία με δευτερογενή προς τα πάνω διεύρυνση του κρανίου, που καλείται χαρακτηριστικά πυργοκεφαλία.

Ένας ακόμη τύπος πολλαπλής κρανιοσυνόστωσης, η οποία συμβαίνει συνήθως στα πλαίσια κάποιου συνδρόμου, είναι η συνοστέωση τύπου Clover-leaf (τριφύλλι) ή Kleeblattschdel, η οποία προκαλεί ιδιαίτερη κρανιακή δυσμορφία και περιορισμό της φυσιολογικής ανάπτυξης του εγκεφάλου. Η κατάσταση αυτή δεν παρατηρείται από τη γέννηση, αλλά εξελίσσεται κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους της ζωής με συνοστέωση τόσο της οβελιαϊάς όσο και των στεφαναϊών ραφών.

IV. ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η αιτιολογία της πρωτοπαθούς κρανιοσυνόστωσης είναι αμφιλεγόμενη. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές επιδημιολογικές μελέτες και εκτεταμένη έρευνα γύρω από τους μηχανισμούς διάπλασης του εγκεφαλικού κρανίου. Έχουν αναγνωριστεί συγκεκριμένες γονιδιακές μεταλλάξεις, οι οποίες συνδέονται με συγκεκριμένους φαινοτύπους συνδρομικής ή σποραδικής κρανιοσυνόστωσης. Ωστόσο, η πρωταρχική αιτία που πυροδοτεί την πρόιμη σύγκλειση κάποιας κρανιακής ραφής παραμένει άγνωστη.

Ως πιθανοί παράγοντες που συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κρανιοσυνόστωσης, όπως φαίνεται από επιδημιολογικές μελέτες, είναι οι εξής: λευκή φυλή, άρρεν φύλο, παράταση της ηλικίας κύησης, κάπνισμα της μητέρας, έκθεση της μητέρας σε νιτρώδη άλατα, θεραπείες υπογονιμότητας, χωρίς όμως την ανεύρεση συγκεκριμένου μηχανισμού δράσης των παραπάνω παραγόντων. Παλαιότερα, οι επιστήμονες πίστευαν ότι μηχανικοί παράγοντες όπως για παράδειγμα, ο ενδομήτριος περιορισμός του εμβρυϊκού κρανίου σε πολύδυμη κύηση, διαδραματίζουν κάποιο

ρόλο στην εμφάνιση πρώιμης συνοστέωσης, κυρίως της οβελιαίας ραφής. Πιο πρόσφατες έρευνες, ωστόσο, καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι ο φυσικός ενδομήτριος περιορισμός μπορεί να οδηγήσει εν μέρει σε δυσμορφίες του κρανίου, χωρίς όμως αν προσβάλλει τη βατότητα των κρανιακών ραφών.

Τα τελευταία χρόνια, πειραματικά μοντέλα σε ποντίκια έχουν καταδείξει το σημαντικό ρόλο που επιτελεί η σκληρά μήνιγγα στη διατήρηση της βατότητας των κρανιακών ραφών. Τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών στηρίζουν την υπόθεση ότι η σκληρά μήνιγγα εκκρίνει διαλυτούς αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι στη συνέχεια διαχέονται στην υπερκείμενη κρανιακή ραφή δίνοντας το έναυσμα για τη συγκέντρωση οστεοβλαστών και την ενεργοποίηση της οστεοποίησης. Τέτοιοι αυξητικοί παράγοντες είναι οι FGFs (fibroblast growth factors) και οι TGFbs (transforming growth factors-beta), ενώ έχει μελετηθεί και ο ρόλος των IGFs (insulin-like growth factors) στη διαδικασία της πρώιμης κρανιοσυνόστωσης.

Την δεκαετία του '90 , μετά τη σημαντική πρόοδο που έχει επιτευχθεί στη χαρτογράφηση των ανθρωπίνων γονιδίων, έχει επιβεβαιωθεί η γενετική προέλευση πολλών από τις συνδρομικές μορφές κρανιοσυνόστωσης. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις στα γονίδια τριών από τους τέσσερις υποδοχείς του ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3) έχει αποδειχθεί ότι συνδέονται με την εμφάνιση των συνδρόμων Apert, Crouzon, Jackson-Weiss, Muenke και Pfeiffer. Επίσης, σε ασθενείς με κρανιοσυνόστωση τύπου Boston ή σύνδρομο Saethre-Chotzen έχουν αναγνωριστεί μεταλλάξεις στα γονίδια MSX και TWIST. Επιπλέον, υπάρχουν και περιπτώσεις μη-συνδρομικής κρανιοσυνόστωσης στις οποίες έχουν ανακαλυφθεί κάποιες σημειακές μεταλλάξεις, όπως για παράδειγμα αυτή στον υποδοχέα FGFR-3, που βρέθηκε σε μεμονωμένη συνοστέωση της στεφανιαίας ραφής. Ωστόσο, παρά την ταυτοποίηση των παραπάνω γενετικών μεταλλάξεων, ο τρόπος που η γενετική αυτή διαφοροποίηση παράγει ένα συγκεκριμένο φαινότυπο κρανιοσυνόστωσης παραμένει αδιευκρίνιστος, ενώ για τη συχνότερη μορφή κρανιοσυνόστωσης, δηλαδή τη μεμονωμένη συνοστέωση της οβελιαίας ραφής, καμία μετάλλαξη δεν έχει βρεθεί ακόμα.

Αυτό που είναι ξεκάθαρο, όμως, είναι ότι τα οστά του θόλου του κρανίου δεν αναπτύσσονται απομονωμένα, αλλά σε στενή και πολύπλοκη αλληλεπίδραση με τον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο και τις υποκείμενες μήνιγγες. Πρόσφατες μελέτες

κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι, στην κρανιοσυνόστωση, η αρχιτεκτονική του εγκεφάλου διαφέρει όχι μόνο στις φλοιώδεις περιοχές που υπόκεινται της συνοστεωμένης ραφής, αλλά και σε αρκετούς υποφλοιώδεις σχηματισμούς. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι πιθανόν το αναπτυσσόμενο ΚΝΣ να παίζει εξίσου σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του τελικού φαινοτύπου του κρανίου, και άρα η έρευνα για μεταλλάξεις που προκαλούν πρόωμη σύγκλειση των κρανιακών ραφών θα πρέπει να προσανατολιστεί και σε γονίδια και μηχανισμούς που εμπλέκονται στη διάπλαση του ίδιου του εγκεφάλου.

Τελικά, η κατανόηση της αιτιοπαθογένειας συγγενών ανωμαλιών, όπως η κρανιοσυνόστωση, εξαρτάται πλήρως από την κατανόηση όλων των παραγόντων-μηχανικών, μεταβολικών και γενετικών-, που επηρεάζουν τη φυσιολογική διάπλαση.

V. ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η κρανιοσυνόστωση είναι μια διεργασία που κατά κανόνα ολοκληρώνεται στη διάρκεια της ενδομήτριας ζωής του εμβρύου, οπότε είναι παρούσα από τη γέννηση, αλλά δεν αναγνωρίζεται πάντοτε στο νεογνό, ειδικά όταν αυτή είναι ήπια. Συνήθως διαγιγνώσκεται ως μια κρανιακή δυσμορφία στους πρώτους μήνες της ζωής, καθώς το ανώμαλο σχήμα γίνεται πιο εμφανές ακολουθώντας τη γρήγορη αύξηση του μεγέθους του κρανίου. Η διάγνωση βασίζεται στη φυσική εξέταση και τεκμηριώνεται με την απεικόνιση του κρανίου είτε με απλή ακτινογραφία, είτε συνηθέστερα με τρισδιάστατη αξονική τομογραφία.

VI. ΣΗΜΑΤΟΛΟΤΗΣΗ

Το οστό είναι ένας εξαιρετικά πολύπλοκος ιστός. Πρόσφατες μελέτες σε ανθρώπους και ποντίκια για εμπλεκόμενα με διάφορες σκελετικές ανωμαλίες γονίδια, παρέχουν μια κατανόηση κάποιων μοριακών μηχανισμών που ελέγχουν τη δραστηριότητα, τη διαφοροποίηση και τη διατήρηση των οστών. Πολλές μελέτες έχουν εστιάσει το

ενδιαφέρον τους στην ανάλυση της υπεροικογένειας των TGFb εκκρινόμενων σηματοδοτικών μορίων. Η έρευνες επεκτάθηκαν αργότερα στη μελέτη των κρανιακών ραφών σε μια προσπάθεια για κατανόηση της ανάπτυξής τους, τη διατήρηση του προτύπου τους, τη φυσιολογική τους σύγκλειση και την κρανιοσυνόστωση.

Η ραφή είναι μια κρανιοπροσωπική άρθρωση στην οποία τα προσκείμενα όρια οστών πλησιάζουν μεταξύ τους και ενώνονται με μια λεπτή στοιβάδα ινώδους ιστού. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, μια εμβρυική πρόδρομη ραφή οριστικοποιείται μέσω συγκλείσεων. Τόσο οι κρανιακές όσο και οι προσωπικές ραφές κλείνουν με οστεοποίηση.

Οι TGF-bs είναι ισχυρά αναπτυξιακά ρυθμιστικά μόρια που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση πρόδρομων μεσεγχοματικών κυττάρων, χονδροκυττάρων, οστεοβλαστών και οστεοκλαστών, τη ρύθμιση της χονδρογένεσης και της οστεογένεσης και την επαγωγή εξοκυττάρων πρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας. Οι TGF-bs μαζί με τους αυξητικούς παράγοντες IGFs είναι οι πλέον άφθονοι αυξητικοί παράγοντες που συσσωρεύονται στα οστά. Παρά τις ενδείξεις για το ρόλο των TGF-bs στη βιολογία των ραφών, δεν έχουν διευκρινιστεί οι αιτιολογικοί παράγοντες για την κρανιοσυνόστωση. Η υπεροικογένεια των TGFb εκκρινόμενων σηματοδοτικών μορίων αποτελείται από περισσότερα των 24 πεπτίδια που μεσολαβούν σε πολλά βασικά γεγονότα μιας φυσιολογικής ανάπτυξης και αύξησης, περιλαμβανομένης της κυτταρικής διαφοροποίησης, κινητικότητας, οργάνωσης και θανάτου. Κάποια μόρια της οικογένειας αυτής μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε συγκεκριμένες υποοικογένειες με στενά σχετιζόμενες αλληλουχίες. Πέρα από τα παραπάνω οι TGFbs μπορούν να καταστείλουν τον πολλαπλασιασμό διαφορετικών κυτταρικών σειρών.

Είναι σημαντικό επίσης να αναφερθεί ότι στην υπεροικογένεια των TGF-bs έχουν αναγνωριστεί οι ισομορφές TGF-b1, TGF-b2 και TGF-b3, οι BMPs και η activin-A. Τα παραπάνω μόρια εκφράζονται στα οστικά κύτταρα, συσσωρεύονται στην οστική θεμέλια ουσία και αυξάνουν τη δραστηριότητα των οστικών κυττάρων τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*.

Οι FGFRs έχουν μια φουρκέτα εναλλακτικού ματίσματος στο δεύτερο μισό της περιοχής τους που ομοιάζει με την ανοσοσφαιρίνη (IgIII). Η ματισμένη μορφή IgIIIc

είναι η πιο συχνή και εκφράζεται αρχικά σε μεσεγγυματικούς ιστούς. Μετάγραφα IgIIIc του υποδοχέα FGFR2 μπορεί να εκφράζονται στο μεσοδακτύλιο μεσέγγυμα του προεξέχοντος άκρου του οστού και αρχικά στην περιοχή των μελλοντικών κρανιακών οστών και έπειτα να καταστέλλονται εκτός από την περιφέρεια των κρανιακών οστών (εμβρυικές πρόδρομες ραφές). Πολλές συγκεκριμένες μεταλλάξεις στους FGFRs είναι γνωστό ότι προκαλούν σύνδρομα κρανιοσυνόστωσης, αλλά λίγα είναι γνωστά για την παθογένεια.

4. ΠΛΑΚΟΥΝΤΟΓΕΝΕΣΗ

Η εμβρυϊκή ανάπτυξη των θηλαστικών βασίζεται στον πλακούντα τους. Αυτό το παροδικό όργανο συνδέει το έμβρυο με τη μητέρα και στηρίζει την ανάπτυξή του και τη βιωσιμότητά του. Η δημιουργία του πλακούντα είναι επομένως μια βασική αναπτυξιακή διαδικασία, απαραίτητη για την περαιτέρω ενδομήτριο ανάπτυξη του εμβρύου. Εκτός από την κύρια λειτουργία του πλακούντα, δηλαδή τη μεταφορά αερίων, θρεπτικών συστατικών και των προϊόντων του μεταβολισμού, επιτελούνται μεταβολές στην έκκριση ορμονών που επηρεάζουν τόσο τη φυσιολογία της μητέρας όσο και του εμβρύου.

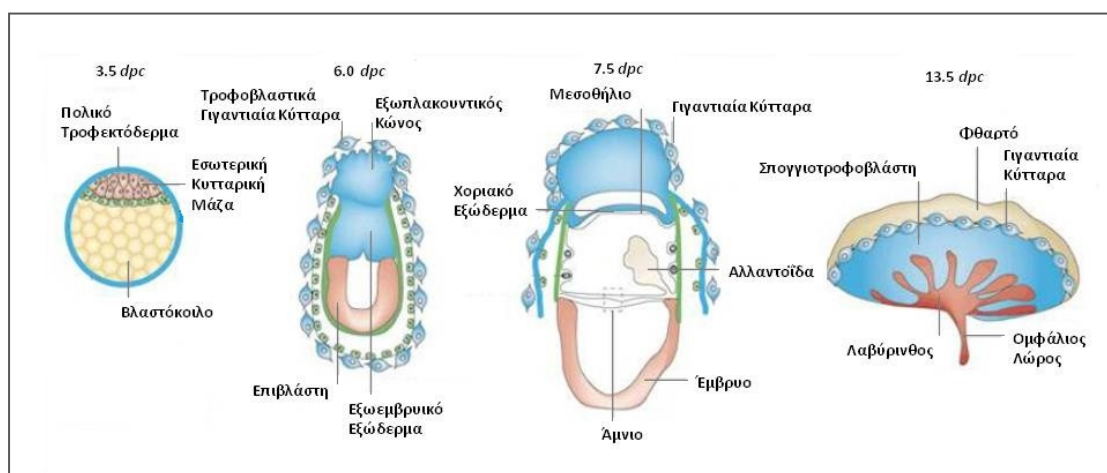
Ο πλακούντας δεν είναι μόνο το πρώτο όργανο που σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, είναι επίσης ο μόνος ιστός που προέρχεται από δύο γενετικώς διαφορετικά άτομα. Η πλακουντογένεση, η διαδικασία του σχηματισμού και η επακόλουθη ανάπτυξη του πλακούντα, ενέχει μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων του εμβρύου με τα κύτταρα της μήτρας της μητέρας.

Γενετικοί ή περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν την ανάπτυξη του πλακούντα οδηγώντας σε ανεπαρκή πλακουντοποίηση, καθυστέρηση της ανάπτυξης του εμβρύου και αποβολή. Σε οικόσιτα ζώα παρατηρούνται αποβολές περίπου στο 80% των κήσεων που οφείλονται σε κάποια σφάλματα κατά την περίοδο της περιεμφύτευσης του εμβρύου στη μήτρα [55]. Στους ανθρώπους, το ένα τρίτο του συνόλου των κήσεων καταλήγει σε αυτόματες αποβολές και από αυτές μόνο το 22% μπορεί από πριν να ανιχνευθεί κλινικά [56]. Η προεκλαμψία είναι η πιο κοινή

επιπλοκή της ανθρώπινης κύησης, η οποία προκαλείται από μια δυσλειτουργία του πλακούντα και μπορεί να απειλήσει τη ζωή της μητέρας και του εμβρύου [57].

Μολονότι ο πλακούντας σε όλα τα θηλαστικά επιτελεί το ίδιο έργο, παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανατομική μεταβλητότητα ανά τα είδη [58]. Οι μοριακοί μηχανισμοί που ενέχονται στην πλακουντογένεση βρίσκονται υπό έρευνα και με τη χρήση των ποντικών ως πειραματόζωα, οι μηχανισμοί αυτοί μπορούν να διευκρινιστούν περαιτέρω [59-60].

I. Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ ΣΤΟ ΠΟΝΤΙΚΙ



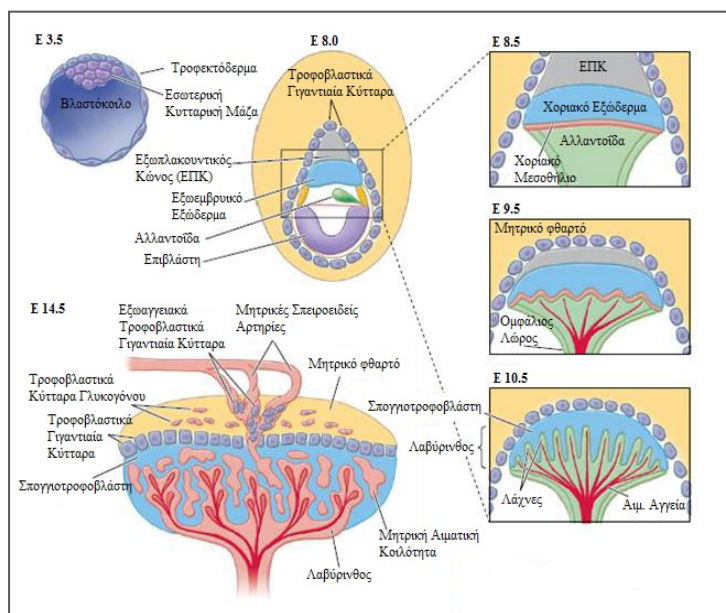
Ανάπτυξη του πλακούντα του ποντικού (3.5-13.5 dpc)(Rossant και Cross, 2001)

Με το σχηματισμό της βλαστοκύστης την εμβρυϊκή μέρα E3.5 ημέρες (3.5dpc), λαμβάνει χώρα το πρώτο βήμα της διαφοροποίησης στην εμβρυϊκή ανάπτυξη των θηλαστικών (Σχ. 1,1). Το εξωτερικό επιθηλιακό στρώμα της βλαστοκύστης, το τροφεικόδερμα, θα αποτελέσει το μεγαλύτερο τμήμα του πλακούντα [61-62]. Η εσωτερική κυτταρική μάζα αποτελείται από πολυδύναμα κύτταρα που δημιουργούν ολόκληρο το έμβryo, και μερικές από τις εξωεμβρυϊκές μεμβράνες του. Στο στάδιο της βλαστοκύστης τελειώνει η αυτόνομη ανάπτυξη του εμβρύου, η οποία πλέον εξαρτάται από τη θρέψη μέσω του μητρικού οργανισμού.

Την ημέρα E4.5 της εμβρυϊκής ανάπτυξης πραγματοποιείται η εμφύτευση της βλαστοκύστης στη μήτρα. Σε αυτό το στάδιο ξεκινά και ο σχηματισμός των

διαφόρων κυτταρικών τύπων του τροφοβλάστη. Τα πολικά κύτταρα του τροφεκτοδέρματος, τα οποία έρχονται σε άμεση επαφή με την εσωτερική κυτταρική μάζα, πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν τα διπλοειδή τροφοβλαστικά κύτταρα του εξωεμβρυικού εκτοδέρματος και τον εξωπλακουντικό κώνο, διαδικασία που προάγεται από τον αυξητικό παράγοντα Fgf4. Ο Fgf4 συνεχίζει να εκφράζεται από το εμβρυικό εξώδερμα μετά την εμφύτευση και πράγματι μπορούν να απομονωθούν τροφοβλαστικές κυτταρικές σειρές από την επικείμενη τροφοβλαστική στοιβάδα, που ονομάζεται χοριονική τροφοβλάστη ή εξωεμβρυικό εξώδερμα. Τα τροφοβλαστικά κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται σε καλλιέργεια για πολλές γενιές και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μια πληθώρα τροφοβλαστικών κυτταρικών τύπων, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, αποδεικνύοντας έτσι τον πολυδύναμο χαρακτήρα τους. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν έχει γίνει εφικτό να απομονωθούν τροφοβλαστικές κυτταρικές σειρές που να ομοιάζουν με αυτές που προέρχονται από τη βλαστοκύστη ή το μεταεμφυτευτικό χόριο πέραν του σταδίου των 7.5-8 ημερών. Το γεγονός αυτό προτείνει ότι η ανάπτυξη του πλακούντα πέραν της 7.5 μέρας οφείλεται σε πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση ενός συγκεκριμένου τροφοβλαστικού πρόγονου κυτταρικού τύπου [62]. Τα μη πολικά κύτταρα του τροφεκτοδέρματος, που δεν έχουν επαφή με την εσωτερική κυτταρική μάζα, χάνουν την πολλαπλασιαστική δραστηριότητά τους και διαφοροποιούνται σε μεταμιτωτικά γιγαντιαία κύτταρα, που προκύπτουν ως προϊόντα ενδοπολλαπλασιασμού του DNA τους [63]. Τα γιγαντιαία κύτταρα, τα οποία προκύπτουν από τα μη πολικά κύτταρα του τροφεκτοδέρματος ονομάζονται πρωτογενή γιγαντιαία κύτταρα, ενώ αυτά που προκύπτουν από τη διαφοροποίηση των τροφοβλαστών του εξωπλακουντικού κώνου αργότερα ονομάζονται δευτερογενή γιγαντιαία κύτταρα. Τα γιγαντιαία κύτταρα ενέχονται στη διαμόρφωση του μητρικού αγγειακού συστήματος του φθαρτού υμένα και παράγουν διάφορες ειδικές ορμόνες του πλακούντα που είναι παρόμοιες με την υποφυσιακή ορμόνη προλακτίνη [64]. Αυτές περιλαμβάνουν τις ορμόνες PI-1, PI-2 (placenta lactogen) και εκκρίνονται αποκλειστικά από τα γιγαντιαία κύτταρα. Οι PI-1 και PI-2 ρυθμίζουν τη δράση της ωοθήκης, διεγείροντας την παραγωγή προγεστερόνης από το ωχρό σώμα, η οποία είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της εγκυμοσύνης. Επιπλέον, οι PI-1 και PI-2 εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανάπτυξης του μαστικού αδένου [65].

Στην περαιτέρω πορεία της ανάπτυξης του πλακούντα το εξωεμβρυϊκό εκτόδερμα επεκτείνεται ώστε να προκύψει το χοριονικό εκτόδερμα (E7.5). Παράλληλα, αναπτύσσεται από το εμβρυϊκό μεσόδερμα η αλλαντοΐδα, που αποτελεί τον πρόδρομο των εμβρυϊκών αιμοφόρων αγγείων του πλακούντα και του ομφάλιου λώρου. Την ημέρα E8.5 συντήκεται η αλλαντοΐδα με το χόριο. Η διαδικασία αυτή, που αναφέρεται ως χοριοαλλαντοϊδική σύντηξη, αποτελεί την αφετηρία της διαφοροποίησης των τριών διακριτών δομών του πλακούντα που παραμένουν μέχρι το τέλος της κύησης: τη σπογγιοτροφοβλάστη, το λαβύρινθο και τα γιγαντιαία κύτταρα.



Physiology 20:180-193, 2005.

Μετά τη χοριοαλλαντοϊδική σύντηξη, αναπτύσσονται στο εμβρυϊκό τμήμα του πλακούντα αιμοφόρα αγγεία, τα οποία προέρχονται από το μεσόδερμα της αλλαντοΐδας. Η χοριονική τροφοβλάστη κατά μήκος του αναπτυσσόμενου μεσεγγύματος και των αιμοφόρων αγγείων

διαφοροποιείται για να προκύψουν οι χοριακές λάχνες και ο λαβύρινθος. Από τα τροφοβλαστικά κύτταρα του λαβυρίνθου μέσω κυτταρικής σύντηξης σχηματίζονται τα πολυπυρηνικά κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης που περιβάλλουν τα αιμοφόρα αγγεία του εμβρυϊκού τμήματος του πλακούντα. Η τροφοβλάστη του λαβυρίνθου αποτελείται από δύο στοιβάδες συγκυτιοτροφοβλαστικών κυττάρων και μία στοιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων που οριοθετούν την περιοχή μεταξύ των λαχνών και των μητρικών τμημάτων[66].

Μεταξύ του λαβυρίνθου και της εξωτερικής στοιβάδας των γιγαντιαίων κυττάρων σχηματίζεται η συμπαγής στοιβάδα της σπογγιοτροφοβλάστης, που αποτελείται από μονοπύρηννα διπλοειδή κύτταρα. Η σπογγιοτροφοβλάστη προέρχεται από τους

κυτταρικούς πληθυσμούς του εξωπλακουντικού κώνου. Τα σπογγιοτροφοβλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται εισχωρώντας προς το μητρικό φθαρτό για να δώσουν τα δευτερογενή γιγαντιαία κύτταρα. Επιπλέον, τα σπογγιοτροφοβλαστικά κύτταρα παράγουν ορμόνες που μοιάζουν με την προλακτίνη [64], ενώ συμμετέχουν και στο σχηματισμό του λαβυρίνθου [66].

Κατά τη διάρκεια της κύησης λαμβάνει χώρα μια έντονη αναδιαμόρφωση της αγγείωσης της μήτρας. Πραγματοποιείται διάταση των υπάρχουσών κοιλοτήτων στο φθαρτό και επιπλέον αγγειογένεση, ώστε να αυξηθεί η ροή του αίματος στην περιοχή εμφύτευσης και τον πλακούντα [67]. Στη διαδικασία αυτή, τα γιγαντιαία κύτταρα διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο. Παράγουν τους αγγειογόνους παράγοντες VEGF [68] και proliferin [69] καθώς και αγγειοδιασταλτικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα τους Adrenomedullin και NO [70]. Στη συνέχεια, η τροφοβλάστη τροποποιεί τις μητρικές αρτηρίες στο φθαρτό, στο οποίο το ενδοθήλιο των κοιλοτήτων διαβρώνεται και αντικαθίσταται [67]. Αυτό οδηγεί σε μία συνεχή ροή του αίματος από τα μητρικά τριχοειδή αγγεία στα κανάλια που δημιουργούνται από την τροφοβλάστη, και οδηγούν το αίμα στο λαβύρινθο μέσω της σπογγιοτροφοβλάστης. Δεδομένου ότι η τροφοβλάστη έχει άμεση επαφή με το μητρικό αίμα, ο πλακούντας του ποντικού ανήκει στους αιμοχοριακούς πλακούντες. Η μεταφορά των θρεπτικών συστατικών και η ανταλλαγή αερίων μεταξύ της μητέρας και του εμβρύου επιτελούνται μέσω τριών φραγμών του πλακούντα: των δύο στρωμάτων της συγκυτιοτροφοβλάστης και του ενδοθηλίου των εμβρυϊκών αιμοφόρων αγγείων του πλακούντα [66].

Ο χοριοαλλαντοϊδικός πλακούντας του ποντικού αποκτά την πλήρη λειτουργικότητά του στην ημέρα E9.0 και παρουσιάζει συνεχή αύξηση του μεγέθους του μέχρι το τέλος της κύησης.

II. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΩΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ ΚΑΙ ΤΟ ΠΟΝΤΙΚΙ

Τα ποντίκια και οι άνθρωποι διαφέρουν ως προς το χρόνο ενεργοποίησης του σχηματισμού του φθαρτού στη μήτρα κατά τη διάρκεια της κύησης. Η δημιουργία του φθαρτού περιλαμβάνει το μετασχηματισμό των στρωματικών κυττάρων στα μεγάλα κύτταρα του φθαρτού με εκκριτικό χαρακτήρα, και τη στρατολόγηση ειδικευμένων πληθυσμών κυττάρων που προέρχονται από το μυελό των οστών (μακροφάγα, κοκκιώδη λεμφοκύτταρα, κ.λπ.). Στο ποντίκι, η εμφύτευση του εμβρύου επάγει την έναρξη του σχηματισμού του φθαρτού [71], ενώ στους ανθρώπους η διαδικασία αυτή ξεκινά πριν από τη σύλληψη ήδη από την 23^η ημέρα ενός φυσιολογικού εμμηνορυσιακού κύκλου, όταν αρχίζουν να εξέχουν οι σπειροειδείς αρτηρίες του ενδομητρίου [72]. Ο σχηματισμός του φθαρτού είναι ένδειξη ότι η κοιλότητα της μήτρας στο σύνολό της είναι έτοιμη για την εμφύτευση του εμβρύου. Μια εξωμήτρια κύηση δεν είναι ασυνήθιστη στον άνθρωπο [73-74], ενώ είναι άγνωστη στα ποντίκια. Έτσι αποτυπώνεται μια θεμελιώδης διαφορά μεταξύ αυτών των δύο ειδών όσον αφορά την εμφύτευση. Στον άνθρωπο, η οριστική δομή του πλακούντα γίνεται εμφανής ήδη από την 21^η ημέρα της εγκυμοσύνης. Μετά την πρόσφυση της βλαστοκύστης, ξεκινά ένας εξαιρετικά γρήγορος πολλαπλασιασμός της τροφοβλάστης και τα τροφοβλαστικά κύτταρα υφίστανται σύντηξη ώστε να σχηματίσουν την πολυπύρηνη συγκυτιοτροφοβλάστη, που εισβάλλει στο στρώμα της μήτρας της μητέρας.

Παρά τις διαφορές στη δομή και την οργάνωση του ανθρώπινου και του ποντικίσιου πλακούντα, υπάρχουν και βασικές ομοιότητες που επιτρέπουν τη χρήση των ποντικών ως μοντέλα για τη μελέτη του συστήματος του πλακούντα. Για παράδειγμα, η γενεαλογία των τροφοβλαστικών κυττάρων φαίνεται πως ακολουθεί τα ίδια μονοπάτια: 1) ένα διηθητικό μονοπάτι που περιλαμβάνει εξωλαχνική τροφοβλάστη στους ανθρώπους, 2) γιγαντιαία κύτταρα και κύτταρα γλυκογόνου στα ποντίκια και 3) ένα μονοπάτι ανταλλαγών που εμπλέκει τη συγκυτιοτροφοβλάστη και στα δύο είδη. Επιπλέον, έχουν περιγραφεί συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες που

ρυθμίζουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων του πλακούντα, τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ποντίκια.

Οι ενδοκρινικές λειτουργίες στον πλακούντα του ανθρώπου και του ποντικιού είναι πολύ διαφορετικές. Η προγεστερόνη, που προάγει την ακινησία της μήτρας, απαιτείται καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης. Η βασική διαφορά ανάμεσα στα ποντίκια και τον άνθρωπο είναι ο μηχανισμός που ελέγχει τη μετάβαση του κυκλικού ωχρού σωματίου σε ωχρό σωματίο της κύησης, επιτρέποντας τη διατήρηση της έκκρισης προγεστερόνης. Στα ποντίκια, το ωχρό σωματίο πρέπει να παράγει προγεστερόνη σε όλη τη διάρκεια της κύησης. Η λειτουργία του ωχρού σωματίου στα ποντίκια ρυθμίζεται από ορμόνες λακτογόνου ή προλακτίνης. Στο ποντίκι, η mPL1 (mouse Placental Lactogen 1) παράγεται από τα τροφοβλαστικά γιγαντιαία κύτταρα και ανιχνεύεται στο μητρικό κυκλοφορικό σύστημα. Η συγκέντρωση αυτής της ορμόνης κορυφώνεται τη 10^η ημέρα έπειτα μειώνεται μετά την 11^η ημέρα και παραμένει σε χαμηλά επίπεδα. Η mPL2 αυξάνει απότομα μέχρι τη 14^η ημέρα και μετά παραμένει σε υψηλά επίπεδα μέχρι το τέλος της κύησης. Τα λακτογόνα αυτά ασκούν την επιρροή τους προσδεδεμένα στον ίδιο υποδοχέα της μεμβράνης του ωχρού σωματίου.

III. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΡΥΘΜΙΖΟΥΝ ΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ

Με μελέτες μέσω διαγονιδιακών και knock-out ποντικών, όπως και με *in vitro* πειράματα τροποποιημένης έκφρασης γονιδίων, έχει αποκαλυφθεί μια λίστα γονιδίων/πρωτεϊνών που είναι σημαντικά για την ανάπτυξη του πλακούντα. Ένα από τα κυριότερα συμπεράσματα που προκύπτουν από αυτές τις μελέτες είναι ότι η διαφοροποίηση των διαφόρων τροφοβλαστικών κυτταρικών υποτύπων ρυθμίζεται από συγκεκριμένους μοριακούς μηχανισμούς. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ωστόσο, τα μεμονωμένα γονίδια δεν έχουν ενταχθεί εξ ολοκλήρου σε μοριακά μονοπάτια και σε λίγες μόνο περιπτώσεις έχουμε σαφή εικόνα του γενικού μοριακού μηχανισμού.

IV. ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Ο πολλαπλασιασμός και η διατήρηση του βλαστικού χαρακτήρα των τροφοβλαστικών κυττάρων επάγονται από τη δράση του FGF4 που ενεργοποιεί τη σηματοδότηση μέσω του Fgfr2 υποδοχέα [75]. Η αναγνώριση του FGF4 ως κρίσιμου παράγοντα βασίστηκε στο γεγονός ότι μεταλλάξεις τόσο του fgf4 γονιδίου, που εκφράζεται στο εμβρυϊκό εξώδερμα [76-77], όσο και του fgfr2 γονιδίου, που εκφράζεται στο τροφεκτόδερμα [78], οδηγούν σε αποτυχία πολλαπλασιασμού των τροφοβλαστών. Ο αυξητικός παράγοντας Nodal απαιτείται επίσης για τη διατήρηση του βλαστικού χαρακτήρα συνεργαζόμενος με τη σηματοδότηση μέσω FGF [79]. Η FGF σηματοδότηση ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν τους homeobox μεταγραφικούς παράγοντες Cdx2 [80] και Eomes [81] οι οποίοι με τη σειρά τους απαιτούνται για τη διατήρηση του βλαστικού χαρακτήρα [82]. Οι μεταγραφικοί παράγοντες Egrβ [83] και AP-γ [84] απαιτούνται επίσης για τον ίδιο σκοπό και ρυθμίζονται από το σηματοδοτικό μονοπάτι FGF. Ωστόσο, φαίνεται να απαιτούνται σε λίγο αργότερο στάδιο απ' ό τι φαίνεται από μηδενικά μεταλλάγματα (null mutants) τα οποία μπαίνουν σε φάση ανάπαυσης σε αργότερο στάδιο από τα μεταλλάγματα Cdx2 και Eomes.

i. ΣΠΟΓΓΙΟΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΕΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΑ ΓΙΓΑΝΤΙΑΙΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Η διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών γιγαντιαίων κυττάρων καταστέλλεται ενεργά από τη σηματοδότηση μέσω FGF/Nodal στα τροφοβλαστικά κύτταρα καθώς η απομάκρυνση των παραγόντων αυτών αρκεί για να προωθήσει τη διαφοροποίηση προς γιγαντιαία κύτταρα σε μεγάλο βαθμό [85]. Ενώ η διαφοροποίηση προς γιγαντιαία κύτταρα είναι ένα προκαθορισμένο μονοπάτι για τη διαφοροποίηση τροφοβλαστικών κυττάρων, ρυθμίζεται από τη δράση μιας σειράς μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας bHLH. Ο παράγοντας Mash2 φαίνεται να καταστέλλει τη διαφοροποίηση προς γιγαντιαία κύτταρα [86-88] και είναι ικανός να διατηρεί τον

πολλαπλασιασμό των τροφοβλαστικών κυττάρων ανεξάρτητα από τον FGF4, εντούτοις παροδικά [82]. Απουσία του Mash2 οδηγεί σε πρόωρη απώλεια του εξωπλακουντικού κώνου και της σπογγιοτροφοβλάστης και σε αύξηση της διαφοροποίησης των γιγαντιαίων κυττάρων [89-91]. Σε αντίθεση με το Mash2, οι μεταγραφικοί παράγοντες Hand1[92] και Stra13 της οικογένειας bHLH προωθούν τη διαφοροποίηση των γιγαντιαίων κυττάρων και όταν εκφραστούν εκτοπικά σε τροφοβλαστικά κύτταρα, επαρκούν ώστε να προωθήσουν τη διαφοροποίηση προς αυτή την κατεύθυνση ακόμα και παρουσία του FGF4 [82]. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η καταστολή της ενεργότητας ή/και της έκφρασης των δύο αυτών παραγόντων στα τροφοβλαστικά κύτταρα απαιτείται για τη φυσιολογική ανάπτυξη του πλακούντα. Οι παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση του Hand1 είναι προς το παρόν άγνωστοι. Ωστόσο, η φωσφορυλίωση της Hand1 πρωτεΐνης μπορεί να μεταβάλλει τη μεταγραφική της ενεργότητα [93]. Ο Stra13 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας του οποίου η έκφραση επάγεται κατά τη διαφοροποίηση των γιγαντιαίων κυττάρων από το ρετινοϊκό οξύ [82], πράγμα το οποίο επιβεβαιώνεται όταν σε τροφοβλαστικά κύτταρα σε καλλιέργεια προσθήκη ρετινοϊκού οξέος προωθεί άμεσα σταμάτημα του πολλαπλασιασμού και διαφοροποίηση προς γιγαντιαία κύτταρα [94], όπως ακριβώς συμβαίνει και σε περίπτωση υπερέκφρασης του Stra13. Γενικά, οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας bHLH σχηματίζουν διμερή για να προσδεθούν στο DNA, ωστόσο οι πρωτεΐνες Stra13 και Hand1 δε φαίνεται να αλληλεπιδρούν άμεσα.

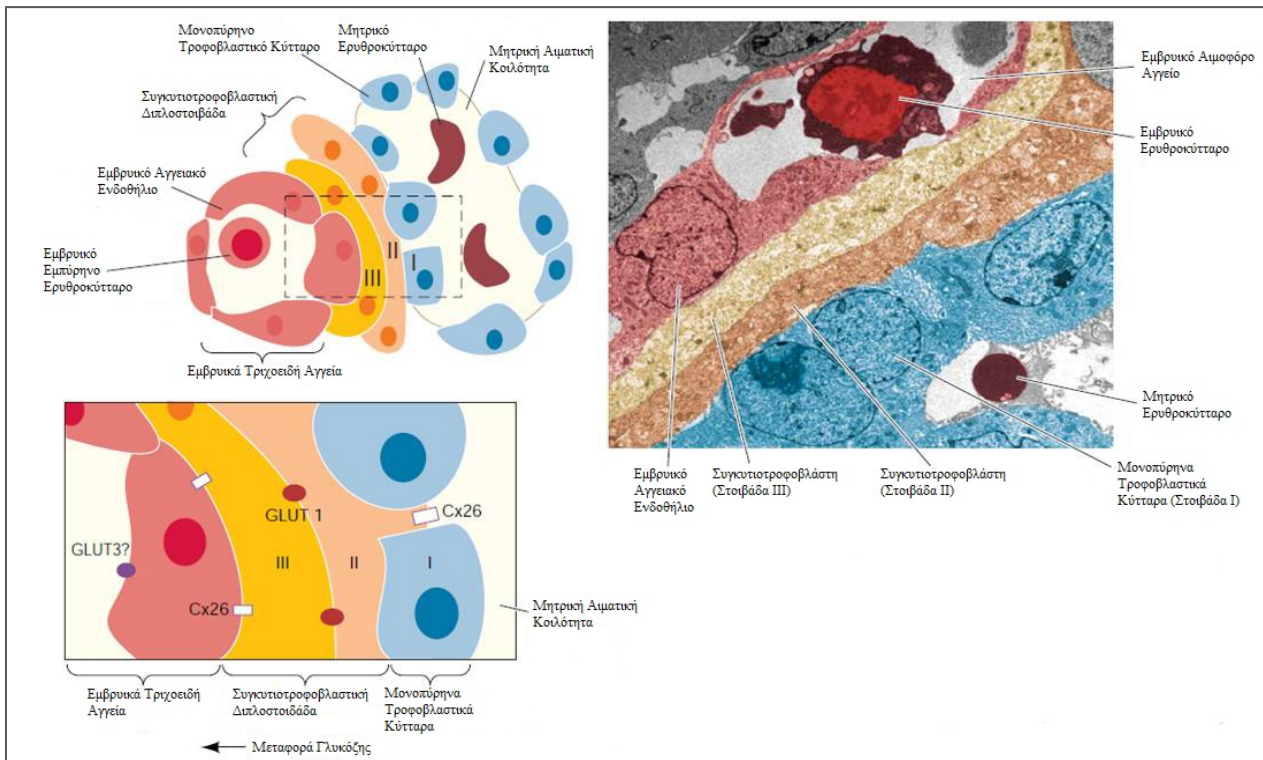
Εκτός από τους ενδογενείς μηχανισμούς, η διαφοροποίηση προς σπογγιοτροφοβλάστη και γιγαντιαία κύτταρα ρυθμίζεται επίσης από ορισμένους εξωγενείς παράγοντες. Τα επίπεδα οξυγόνου στους ιστούς ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ανθρώπινων τροφοβλαστικών κυττάρων [95-96]. Παρομοίως στα ποντίκια, μετάλλαξη στο γονίδιο Arnt, που κωδικοποιεί για ένα συστατικό του μεταγραφικού παράγοντα Hif1 που επάγεται από την υποξία, οδηγεί σε ελαττωματικό πλακούντα στον οποίο η στοιβάδα της σπογγιοτροφοβλάστης εξαφανίζεται και αυξάνεται ο αριθμός των γιγαντιαίων κυττάρων [97]. Η σηματοδότηση μέσω του Lif (Leukemia inhibitory factor) ρυθμίζει επίσης τη διαφοροποίηση προς γιγαντιαία κύτταρα. Μεταλλαγμένα ποντίκια για τον υποδοχέα του Lif παρουσιάζουν ανωμαλίες στον πλακούντα αργότερα κατά την κύηση [98], παρ' ότι μη εστιασμένες στα γιγαντιαία κύτταρα. Παρ' όλα αυτά,

μετάλλαξη στο γονίδιο *Socs3*, που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που σταματά τη σηματοδότηση στον κατάρρου συγκεκριμένων υποδοχέων κυτοκινών συμπεριλαμβανομένου του *Lif*, οδηγεί σε αυξημένη διαφοροποίηση γιγαντιαίων κυττάρων με κόστος το σχηματισμό μιας φυσιολογικής στοιβάδας λαβυρίνθου [99]. Ο φαινότυπος αυτός του μεταλλαγμένου *Socs3* εξαφανίζεται όταν μεταλλαχθεί επίσης ο υποδοχέας του *Lif* υποδεικνύοντας ότι το πραγματικό πρόβλημα είναι η υπερ-διέγερση από το *Lif* [99].

Ενώ ο σχηματισμός και η διατήρηση των τροφοβλαστικών γιγαντιαίων και σπογγιοτροφοβλαστικών κυττάρων είναι κατανοητά σε μοριακό επίπεδο, οι παράγοντες που ρυθμίζουν την εξειδίκευσή τους ώστε να γίνουν ενδοθηλιακά γιγαντιαία κύτταρα και κύτταρα γλυκογόνου, αντίστοιχα, δεν είναι ακόμα γνωστοί. Η μόνη γνώση ως τώρα είναι ότι ο αριθμός των τροφοβλαστικών κυττάρων γλυκογόνου μεταβάλλεται σε μεταλλαγμένα ποντίκια για *Igf2* [100] και *p57^{Kip2}* [101].

Οι λειτουργίες των γονιδίων *Mash2*, *Hand1* και *Stra13* στη ρύθμιση της διαφοροποίησης των τροφοβλαστών στα ποντίκια πιθανώς να είναι συντηρημένες και σε άλλα είδη, τουλάχιστον αναφορικά με τις μελέτες έκφρασης των γονιδίων. Τα ανθρώπινα γονίδια *MASH2* (*HASH2*), *HAND1* και *STRA13* εκφράζονται όλα σε πρώιμα τροφοβλαστικά παράγωγα. Μετάγραφα του *HASH2* έχουν ανιχνευθεί σε κυτοτροφοβλαστικά κύτταρα στο πρώτο τρίμηνο της κύησης [102]. Η πρωτεΐνη και το mRNA του *HAND1* έχουν ανιχνευθεί στο τροφεκτόδερμα της βλαστοκύστης [103-104], αλλά όχι σε ιστούς των λαχνών ή σε κυτοτροφοβλαστικά κύτταρα που απομονώθηκαν από τις λάχνες. Το εάν το ανθρώπινο *HAND1* εκφράζεται σε τροφοβλαστικά κύτταρα που εισβάλλουν στο στρώμα του πλακούντα δεν είναι ξεκάθαρο. Η έκφραση του *Hand1* έχει επίσης ανιχνευθεί στους πλακούντες των προβάτων, των βοοειδών και των αλόγων. Η έκφραση του mRNA του *STRA13* δεν έχει ανιχνευθεί ούτε σε ιστούς του ανθρώπινου πλακούντα ούτε και σε απομονωμένα κυτοτροφοβλαστικά κύτταρα που διαφοροποιούνται σε κύτταρα που μοιάζουν εξω-λαχνικά *in vitro* [102].

ii. ΣΥΓΚΥΤΙΟΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΕΣ



Physiology 20:180-193, 2005.

Η διαφοροποίηση των συγκυτιοτροφοβλαστών ξεκινά και ελέγχεται από τη δραστηριότητα του μεταγραφικού παράγοντα Gcm1. Το mRNA του Gcm1 εντοπίζεται σε μικρές δέσμες κυττάρων στη στοιβάδα του χορίου κατά την εμβρυική μέρα E7.5, μια στοιβάδα που απαρτίζεται από τροφοβλαστικά κύτταρα [105-106]. Οι περιοχές αυτές έκφρασης του γονιδίου συμπίπτουν αργότερα με τα σημεία εκείνα του χορίου στα οποία ξεκινά η διαφοροποίηση και η μορφογένεση των λαχνών [105]. Σε μεταλλαγμένα ποντίκια για το Gcm1, τα συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα δε σχηματίζονται και δεν ξεκινά η μορφογένεση των λαχνών. Σε κυτταρικό επίπεδο, το Gcm1 επαρκεί για την προώθηση της διαφοροποίησης των τροφοβλαστικών κυττάρων προς τη συγκυτιοτροφοβλαστική κατεύθυνση. Εκτοπική έκφραση του γονιδίου αρκεί να εξαναγκάσει την έξοδο των τροφοβλαστικών κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο και να εμποδίσει την ικανότητά τους να διαφοροποιηθούν σε γιγαντιαία κύτταρα [82]. Στους ανθρώπους, το mRNA και η πρωτεΐνη του GCM1 εκφράζονται σε περιορισμένες ομάδες κυτοτροφοβλαστικών κυττάρων των λαχνών, μοτίβο που ομοιάζει με αυτό του ποντικιού [107].

Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση του mRNA του Gcm1 στα ποντίκια εντοπίζεται μόνο σε εκείνα τα κύτταρα που ειδικά είναι προκαθορισμένα να διαφοροποιηθούν σε συγκυτιοτροφοβλάστες ώστε να σχηματιστεί ο λαβύρινθος. Η έκφραση του Gcm1 καθώς επίσης και η τελική διαφοροποίηση στη χοριονική πλάκα (chorionic plate) εξαρτώνται από την έκφραση του μεταγραφικού καταστολέα ERF. Ο Erf ρυθμίζει την έκφραση του Gcm1 και επιπλέον τη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων ώστε να δώσουν τα διαφοροποιημένα κύτταρα του ώριμου λαβυρίνθου. Το γεγονός αυτό βασίζεται στην παρατήρηση των μεταλλαγμένων ποντικών που στερούνται έκφρασης του Erf, στα οποία απουσιάζει η έκφραση του Gcm1. Έτσι, αποκαλύπτεται ότι ο ERF και το GCM1 είναι καθοριστικής σημασίας για την κατάλληλη δέσμευση των προγονικών κυττάρων προς τη συγκυτιοτροφοβλαστική γενεαλογία. Επιπλέον, τα τροφοβλαστικά κύτταρα που στερούνται έκφρασης του Erf (Erf KO), σε πειράματα in vitro διαφοροποίησης, παρουσιάζουν καθυστέρηση στη διαφοροποίηση διατηρώντας την έκφραση γονιδίων μαρτύρων αδιαφοροποίητων τροφοβλαστικών κυττάρων, όπως τα Cdx2, Eomes και Esrrb καθώς επίσης παρουσιάζοντας χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης γονιδίων μαρτύρων ειδικά για τη σπογγιοτροφοβλάστη, όπως το Trpbpa (4311)[52]. Όλα τα παραπάνω συνιστούν ένα πολύτιμο εργαλείο στη μελέτη της συμπεριφοράς των τροφοβλαστικών κυττάρων, διαλευκαίνοντας ζητήματα που εξετάζονται σε πειράματα διαφοροποίησης.

Όπως και με τους υπόλοιπους τροφοβλαστικούς υποτύπους, έτσι και στη διαφοροποίηση των συγκυτιοτροφοβλαστών και την ανάπτυξη των χοριονικών λαχνών σπουδαίο ρόλο παίζει η ενδοκυτταρική σηματοδότηση [108]. Η πρώτη προϋπόθεση για τη σηματοδότηση στη χοριοαλλαντοϊδική επιφάνεια είναι ότι ενώ η έκφραση του Gcm1 στα ποντίκια εμφανίζεται στα τροφοβλαστικά κύτταρα του χορίου πριν την αλλαντοϊδική σύντηξη, η διατήρηση της έκφρασης εξαρτάται από σήματα προερχόμενα από την αλλαντοΐδα [109-110]. Η φύση του σήματος παραμένει άγνωστη. Ωστόσο, είναι σαφές πως ορισμένα σηματοδοτικά συστήματα ρυθμίζουν τα ακόλουθα βήματα κατά τη μορφογένεση των διακλαδώσεων της χοριοαλλαντοϊδικής επιφάνειας συμπεριλαμβανομένων των Wnt/Fzd,[111] FGF/Fgfr,[112] EGF/Egfr και HGF/Met [113].

V. Ο ΙΝΟΒΛΑΣΤΙΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ 2 (FIBROBLAST GROWTH FACTOR 2 - FGF2)

Σε φυσιολογικούς ιστούς, ο fgf2 εντοπίζεται στις βασικές μεμβράνες και στην υποενδοθηλιακή εξωκυτταρική μήτρα των αιμοφόρων αγγείων. Παραμένει δεσμευμένος στη μεμβράνη όσο δεν υπάρχει πεπτιδίο σήματος.

Έχει υποτεθεί ότι, κατά τη διάρκεια τόσο της επούλωσης πληγών των φυσιολογικών ιστών όσο και κατά την ανάπτυξη όγκων, ο bFGF ενεργοποιείται, ώστε να σχηματιστούν νέα αιμοφόρα αγγεία, μια διαδικασία γνωστή ως αγγειογένεση.

Επιπλέον, ο fgf2 συντίθεται και εκκρίνεται από ανθρώπινα λιποκύτταρα και η συγκέντρωσή του συσχετίζεται με το δείκτη BMI (Body Mass Index) στα δείγματα αίματος. Ο bFGF φαίνεται επίσης να ενεργεί στα πρόδρομα οστεοβλαστικά κύτταρα - προκαλώντας αυξημένο πολλαπλασιασμό- μετά τη σύνδεσή του στον υποδοχέα του ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα 1 (fgfr1) και ενεργοποίηση της κινάσης PI3 [114].

Ο bFGF έχει δειχθεί σε προκαταρκτικές μελέτες σε ζώα ότι μπορεί να προστατεύσει την καρδιά από τον τραυματισμό έπειτα από μια καρδιακή προσβολή, μειώνοντας το θάνατο των ιστών και προάγοντας μια βελτιωμένη λειτουργία μετά την επαναιμάτωση [115].

Πρόσφατα στοιχεία έχουν δείξει ότι τα χαμηλά επίπεδα του FGF2 διαδραματίζουν έναν βασικό ρόλο στην συχνότητα εμφάνισης υπερβολικού άγχους [114].

Επιπροσθέτως, ο bFGF είναι ένα κρίσιμο συστατικό στην καλλιέργεια των ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Η παρουσία του παράγοντα κρίνεται απαραίτητη ώστε τα κύτταρα να παραμένουν σε μια αδιαφοροποίητη κατάσταση, αν και οι μηχανισμοί με τους οποίους αυτό επιτελείται είναι ανεπαρκώς καθορισμένα. Έχει αποδειχτεί ότι επάγει την έκφραση της gremlin, η οποία με τη σειρά της είναι γνωστό ότι αναστέλλει την επαγωγή της διαφοροποίησης από τις BMP [116]. Είναι απαραίτητος ο παράγοντας σε συστήματα καλλιέργειας εξαρτώμενα από κύτταρα-τροφούς καθώς και σε μη εξαρτώμενα όπως επίσης και σε καλλιέργειες απουσία ορού [117].

VI. ΓΟΝΙΔΙΑ-ΜΑΡΤΥΡΕΣ ΤΗΣ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

Eomes

Το γονίδιο *Eomesodermin* (*Eomes*) περιγράφηκε πρώτα στον οργανισμό *Xenopus laevis* όπου απαιτείται για το σχηματισμό του μεσοδέρματος. Από τότε έχει δειχθεί ότι έχει πολλές κύτταρο-ειδικές λειτουργίες σε διάφορους ιστούς στα ενήλικα σπονδυλωτά. Το πρώτο γεγονός διαφοροποίησης στην ανάπτυξη των θηλαστικών ενέχει το διαχωρισμό του τροφεκτοδέρματος από την ICM ώστε να σχηματιστεί η βλαστοκύστη. Το ποντικίσιο γονίδιο *mEomes* είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που περιέχει ένα T-box και μελετήθηκε για το ρόλο του στα αναπτυξιακά στάδια περί την εμφύτευση. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι εκτός από την έκφρασή του κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του μεσοδέρματος και την ανάπτυξη του εγκεφάλου, μετάγραφα του *mEomes* ανιχνεύονται στα τροφοβλαστικά κύτταρα στο έμβρυο στο στάδιο της βλαστοκύστης την E3.5. Επιπλέον λεπτομερείς αναλύσεις έδειξαν ότι αυτή η ζυγωτική έκφραση στα όψιμα στάδια της βλαστοκύστης ήταν απαραίτητη για τη λειτουργία της τροφοβλάστης. Σε μεταλλάγματα με διπλή απαλοιφή του γονιδίου, αναφέρθηκαν αξιοσημείωτες ανωμαλίες στη μορφολογία της τροφοβλάστης και τα έμβρυα δεν κατάφεραν να επιβιώσουν πέρα από τις μέρες E6-7 [85, 112, 118].

Cdx2

Ο μεταγραφικός παράγοντας *Cdx2* είναι το πιο γνωστό γονίδιο μάρτυρας για την αναγνώριση του τροφεκτοδέρματος από την ICM στο ποντίκι και σε άλλα είδη. Τα *Cdx2*^{-/-} έμβρυα στο ποντίκι δεν καταφέρνουν να εμφυτευτούν, παρότι σχηματίζουν μια υποτυπώδη εσωτερική κυτταρική μάζα. Επιπλέον, εκτοπική έκφραση του *Cdx2* σε ποντίκια ρυθμίζει αρνητικά το POU5F1 και καταστέλλει την έκφραση γονιδίων που χαρακτηρίζουν το βλαστικό χαρακτήρα, ωθώντας τα κύτταρα να υιοθετήσουν τροφοβλαστικό φαινότυπο. Η έκφραση επίσης του *Cdx2* χάνεται καθώς τα τροφοβλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται. Παρότι η πρωτεΐνη *Cdx2* δεν είναι

απαραίτητη για την αρχική εξειδίκευση του τροφεκτοδέρματος, απαιτείται για την εμφάνιση της τροφοβλαστικής γενεαλογίας [85, 92, 112, 119-120].

Errb

Ενδοκρινολογικές μελέτες έχουν δείξει τη σημασία των στεροειδών ορμονών στη διατήρηση της εγκυμοσύνης και τη βιωσιμότητα του πλακούντα. Ο *Errb* (estrogen-receptor-related receptor beta) είναι ένας ορφανό μέλος της υπερικογένειας των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων. Παρόλο που ο *Errb* είναι ομόλογος με τον οιστρογονικό υποδοχέα και προσδένει το οιστρογονικό στοιχείο απόκρισης (oestrogen response element), δεν ενεργοποιείται από τα οιστρογόνα. Η έκφραση του *Errb* κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης καθορίζει ένα τμήμα του εξωεμβρικού εξωδέρματος το οποίο ακολούθως σχηματίζει το χόριο, προτείνοντας την εμπλοκή του στην πρώιμη ανάπτυξη του πλακούντα. Ομόζυγα μεταλλαγμένα έμβρυα για τον *Errb*, παρουσιάζουν έντονα αποδιοργανωμένο σχηματισμό του πλακούντα και πεθαίνουν την ημέρα E10.5. Τα μεταλλαγμένα στελέχη εμφανίζουν ανώμαλη ανάπτυξη του χορίου, με παράλληλη αύξηση των τροφοβλαστικών γιγαντιαίων κυττάρων και σοβαρή ανεπάρκεια της διπλοειδούς τροφοβλάστης. Ο φαινότυπος μπορεί να αντιστραφεί με χορήγηση στα μεταλλαγμένα έμβρυα τετραπλοειδών κυττάρων αγρίου τύπου, τα οποία συμβάλλουν αποκλειστικά στις εξωεμβρικές δομές. Ο *Errb* έχει σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια του σχηματισμού του πλακούντα. Ένα επαγωγικό σήμα προερχόμενο από ή ρυθμιζόμενο από το χόριο απαιτείται για το φυσιολογικό τροφοβλαστικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση [85, 92, 112, 121-122].

Gcm1

Το *Gcm1* είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος εκφράζεται σε μικρές ομάδες τροφοβλαστικών κυττάρων του χορίου και στο επίπεδο τμήμα του χορίου στα σημεία στα οποία αρχίζουν να δημιουργούνται οι αναδιπλώσεις του χορίου για να προκύψουν οι χοριακές λάχνες. Το γονίδιο αποτελεί μάρτυρα για τη συγκυτιοτροφοβλαστική γενεαλογία του λαβυρίνθου [105].

Tpbpa (4311)

Το γονίδιο 4311 εκφράζεται ειδικά από μια ομάδα κυττάρων του εξωπλακουντικού κώνου. Τα κύτταρα που εκφράζουν το 4311 δίνουν την πυκνοπακεταρισμένη στοιβάδα της σπογγιοτροφοβλάστης και όχι τα τροφοβλαστικά γιγαντιαία κύτταρα του λαβυρίνθου του πλακούντα, προτείνοντας μια πιθανή διαμερισματοποίηση και εξειδίκευση ανάμεσα στα τροφοβλαστικά κύτταρα του εξωπλακουντικού κώνου [123].

PL

Τα τροφοβλαστικά γιγαντιαία κύτταρα εκκρίνουν δύο τύπους PLs in vitro, ένα υψηλού μοριακού βάρους, PL1, και ένα χαμηλού μοριακού βάρους, PL2 [52].

Tef5

Ανήκει στην οικογένεια TEF των μεταγραφικών παραγόντων και εκφράζεται ειδικά στην περιοχή του λαβυρίνθου και συγκεκριμένα στα συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα [124-125].

Connexin 26 (Cx26)

Η κοννεξίνη 26 (Cx26) αποτελεί υπομονάδα των καναλιών των χασματοσυνδέσμων. Συμμετέχει στη σύνδεση των δύο συγκυτιοτροφοβλαστικών στοιβάδων του τμήματος του λαβυρίνθου, άρα αποτελεί μάρτυρα για τη συγκυτιοτροφοβλαστική γενεαλογία [126-127].

5. Η ΝΕΥΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ

Το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) αναπτύσσεται από ένα μικρό αριθμό υψηλά πλαστικών κυττάρων που πολλαπλασιάζονται, αποκτούν τοπολογικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα και παράγουν διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Τα κύτταρα αυτά έχουν χαρακτηριστεί ως νευρικά βλαστικά κύτταρα με βάση το δυναμικό τους να παράγουν πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους (π.χ. νευρώνες και γλοία) και την ικανότητά τους να αυτό-ανανεώνονται σε *in vitro* καλλιέργειες [128].

Στα σπονδυλωτά το κεντρικό νευρικό σύστημα, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου, της σπονδυλικής στήλης και του αμφιβληστροειδούς του ματιού, προέρχεται από το εξώδερμα. Ύστερα από ένα επαγωγικό σήμα από το υποκείμενο μεσόδερμα, μια ευρεία περιοχή του εξωδέρματος δημιουργεί μια πάχυνση και σχηματίζει τη νευρική πλάκα. Μέσω νευριδίωσης, η νευρική πλάκα αναδιπλώνεται και σχηματίζει το νευρικό σωλήνα (Kandel E.- Principles of Neural Sciences, 4th edition- 2000). Αρχικά, ο νευρικός σωλήνας αποτελείται από μία μονή στοιβάδα ταχέως διαιρούμενων νευρικών βλαστικών κυττάρων. Όσο ο σωλήνας παχαιίνει, τα κύτταρα στην κοιλιακή ζώνη (ventricular zone, VZ) που βρίσκονται πιο κοντά στην κοιλότητα του νευρικού σωλήνα, συνεχίζουν να διαιρούνται. Η αρχική συμμετρική κυτταρική διαίρεση αντικαθίσταται από ασύμμετρη διαίρεση και σχηματίζονται τα νευρικά πρόδρομα κύτταρα [129]. Η ταυτότητα των κυττάρων σε διαφορετικές θέσεις κατά το ραχαιοκοιλιακό άξονα του σωλήνα καθορίζεται από τα ανταγωνιστικά σήματα των πρωτεϊνών BMP και SHH. Ο εμπροσθοπίσθιος άξονας καθορίζεται από ποικίλα μορφογόνα που περιλαμβάνουν τους FGFs, τις Wnt πρωτεΐνες και το ρετινοϊκό οξύ. Οι FGF, BMP, Wnt και SHH είναι επίσης μιτογόνα που προωθούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων τα οποία καθοδηγούν [130]. Η έκταση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού δεν είναι καθολική για όλο το νευρικό σωλήνα και γι' αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό των τριών κυστιδίων του εγκεφάλου, τον πρόσθιο εγκέφαλο, το μεσεγκέφαλο και τον οπίσθιο εγκέφαλο. Ο πρόσθιος εγκέφαλος αργότερα δίνει δομές όπως ο εγκεφαλικός φλοιός, ο ιππόκαμπος, ο θάλαμος και ο οσφρητικός βολβός.

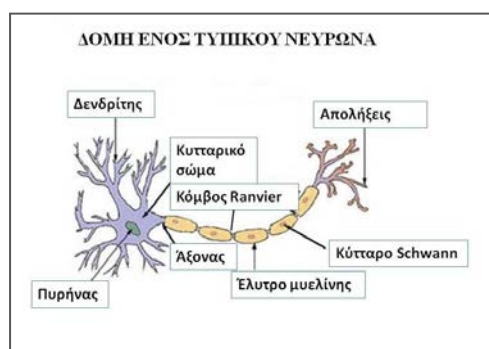
I. ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ (ΚΝΣ)

i. ΝΕΥΡΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Στο ΚΝΣ, τα νευρικά βλαστικά κύτταρα είναι τα κοινά πρόδρομα κύτταρα τόσο των νευρώνων, όσο και των αστροκυττάρων και ολιγοδενδροκυττάρων [131-132]. Κατά την ανάπτυξη, τα διαιρούμενα βλαστικά κύτταρα στην κοιλιακή ζώνη (ventricular zone- VZ) του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού αρχικά σχηματίζουν νευρώνες, αλλά σταδιακά μεταστρέφονται και παράγουν διαφορετικούς τύπους γλοίας [129]. Η απομόνωση βλαστικών κυττάρων από ζώα διαφόρων ηλικιών φανερώνει ότι ο συγχρονισμός αυτός επιτυγχάνεται από τη μεταβολή των ιδιοτήτων των βλαστικών κυττάρων με την πάροδο του χρόνου [133].

Μέχρι πρόσφατα πιστευόταν ότι στο ενήλικο ΚΝΣ δεν υπάρχουν βλαστικά κύτταρα. Νευρογένεση όμως έχει αποδειχθεί σε διάφορες περιοχές του ενήλικου εγκεφάλου σε πολλά είδη, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου [134-136]. Η πλουσιότερη πηγή ενήλικων νευρικών βλαστικών κυττάρων είναι η υποκοιλιακή ζώνη (subventricular zone, SVZ) που γειτνιάζει με την πλευρική κοιλότητα (lateral ventricle) και την οδοντωτή έλικα (dentate gyrus) του ιππόκαμπου. Έχει επίσης προταθεί ότι ένας μικρός αριθμός νευρώνων παράγονται και σε άλλες περιοχές του ιπποκάμπου καθώς και στο φλοιό [137-139] και στη μελανά ουσία (substantia nigra) [140].

ii. ΝΕΥΡΩΝΕΣ



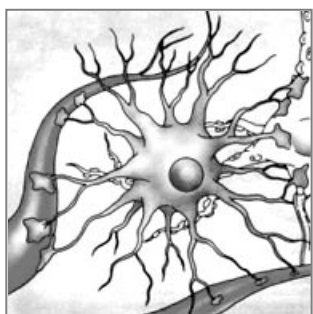
The Encyclopedia of Science

<http://www.daviddarling.info/encyclopedia/N/neuron.html>

Ο ανθρώπινος εγκέφαλος περιέχει περισσότερους από 10^{11} νευρώνες, καθένας από τους οποίους κάνει συνάψεις με χιλιάδες άλλους (Alberts B.- Molecular Biology of the Cell, 4th edition- 2002). Οι νευρώνες είναι τα αγγελιαφόρα κύτταρα του νευρικού συστήματος. Ένας τυπικός νευρώνας αποτελείται από το κυτταρικό σώμα και δυο

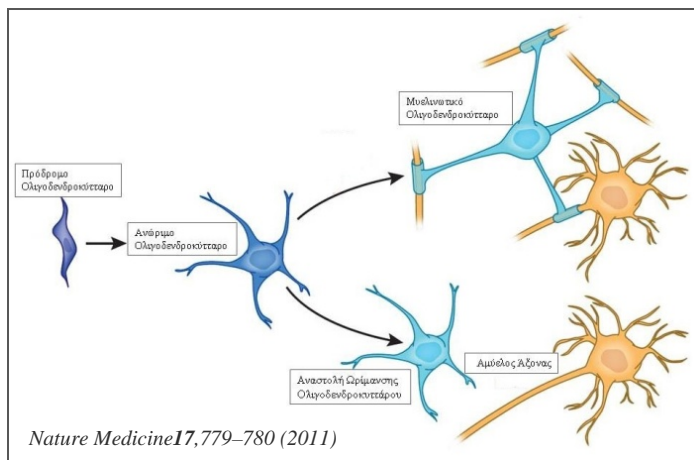
τύπους προεκβολών, τους δενδρίτες και τον άξονα. Οι δενδρίτες έχουν μικρό μήκος και διακλαδώσεις και λαμβάνουν σήματα από άλλους νευρώνες, ενώ ο άξονας έχει μεγάλο μήκος και μετάγει τα εξερχόμενα σήματα (Kandel E.- Principles of Neural Sciences, 4th edition- 2000). Οι νευρώνες στο εμβρυικό και το ενήλικο ΚΝΣ κατηγοριοποιούνται με βάση τη μορφολογία και τη λειτουργία τους. Κάποιοι μάρτυρες είναι κοινοί για πολλούς τύπους νευρώνων, όπως πχ οι MAP2, β-III tubulin και neurofilament [141-142]. Συγκεκριμένοι τύποι νευρικών κυττάρων μπορούν να αναγνωριστούν από τα επίπεδα έκφρασης διαφόρων νευροδιαβιβαστών ή των υποδοχέων τους, πχ γ-aminobutyric acid (GABA) ή τον υποδοχέα της ακετυλοχολίνης.

iii. ΑΣΤΡΟΚΥΤΤΑΡΑ



Τα γλοιακά κύτταρα χωρίζονται σε δυο βασικές κατηγορίες, τη μικρογλοία και τη μακρογλοία. Η μικρογλοία δε σχετίζεται με τους υπόλοιπους κυτταρικούς τύπους στο ΚΝΣ. Είναι φαγοκύτταρα και προκύπτουν από μακροφάγα εκτός νευρικού συστήματος [143]. Η μακρογλοία στο ΚΝΣ αφορά στα ολιγοδενδροκύτταρα και τα αστροκύτταρα. Τα αστροκύτταρα είναι τα πολυπληθέστερα γλοιακά κύτταρα. Έχουν σχήμα αστεροειδές με πεπλατυσμένα άκρα στις απολήξεις τους (Kandel E.- Principles of Neural Sciences, 4th edition- 2000). Τα ώριμα αστροκύτταρα μπορούν να αναγνωριστούν από την έκφραση της πρωτεΐνης GFAP (glial fibrillary acidic protein) [144], ωστόσο, μερικά αστροκύτταρα δεν εκφράζουν GFAP [145-146]. Παλαιότερα πιστευόταν πως τα αστροκύτταρα είχαν ρόλο «πακεταρίσματος», κρατώντας τους νευρώνες στη θέση τους. Σε αυτό ήρθαν να προστεθούν η δομική υποστήριξη προς τους νευρώνες και επίσης ο ενεργός ρυθμιστικός τους ρόλος στο ΚΝΣ. Τα αστροκύτταρα είναι σημαντικά για το σχηματισμό του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και απελευθερώνουν μια γκάμα διαφόρων νευρικών αυξητικών παραγόντων [147]. Στον ενήλικο εγκέφαλο, τα αστροκύτταρα επηρεάζουν τη νευρογένεση προκαλώντας ανειδίκευτα κύτταρα να γίνουν νευρώνες. Εμπλέκονται επίσης στη ρύθμιση της παραγωγής νευρικών συνάψεων [148-149].

iv. ΟΛΙΓΟΔΕΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ



Στο ΚΝΣ, τα ολιγοδενδροκύτταρα είναι τα υπεύθυνα κύτταρα για το σχηματισμό του ελύτρου μυελίνης που περιτυλίγεται στους άξονες. Η μυελίνη είναι μια προέκταση της πλασματικής μεμβράνης των ολιγοδενδροκυττάρων. Έχει

υψηλή σύσταση από λιπίδια και έτσι λειτουργεί ως ηλεκτρικός μονωτής, αυξάνοντας το ρυθμό μετάδοσης του δυναμικού από τους άξονες (Alberts B.- Molecular Biology of the Cell, 4th edition- 2002). Πρώιμοι μάρτυρες για ολιγοδενδροκύτταρα είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες *Olig1* και *Olig2* [150-151] και ο επιφανειακός μάρτυρας *O4* [152]. Μελέτες, ωστόσο, έχουν δείξει ότι το *Olig2* εκφράζεται επίσης σε κύτταρα που διαφοροποιούνται σε νευρώνες [151, 153-154]. Ο υποδοχέας PDGFRα χρησιμοποιείται ευρέως σα μάρτυρας για πρόδρομα ολιγοδενδροκύτταρα, αλλά έχει δειχθεί ότι εκφράζεται επίσης από νευρικά βλαστικά κύτταρα και πρόδρομα νευρικά κύτταρα [155-159]. Χρώση των πρωτεϊνών της μυελίνης, πχ GalC ή CNPase, χαρακτηρίζει τα ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα [160-161].

II. OLIG ΓΟΝΙΔΙΑ

Η οικογένεια των *olig* γονιδίων έχει απασχολήσει πρόσφατα πολλές ερευνητικές ομάδες. Κωδικοποιούν για bHLH μεταγραφικούς παράγοντες που κατά την ανάπτυξη εκφράζονται σε διακριτούς υπο-πληθυσμούς των προγονικών νευρικών κυττάρων [154, 162-163]. Η έκφραση συνεχίζεται και μετά την εμβρυική περίοδο και εντοπίζεται σε ολιγοδενδροκύτταρα του ενήλικου ΚΝΣ των τρωκτικών, καθώς επίσης και σε άλλα κύτταρα που πιθανώς αντιπροσωπεύουν ανώριμα προγονικά κύτταρα. Παρά το γεγονός ότι τα *olig* γονίδια πήραν το όνομά τους από την παρουσία τους σε

αναπτυσσόμενα και ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα, είναι πλέον σαφές ότι ο ρόλος τους εντοπίζεται και σε άλλες βασικές διαδικασίες όπως ο καθορισμός του νευρικού μοτίβου και η εξειδίκευση των κινητικών νευρώνων [164-166].

Στους ανθρώπους και στα ποντίκια, τα *olig1* και *olig2* γονίδια βρίσκονται σε απόσταση ~40kb το ένα από το άλλο στα χρωμοσώματα 21 και 16 στα δύο είδη, αντίστοιχα. Το *olig1* έχει ανιχνευτεί μόνο στα θηλαστικά, γεγονός το οποίο μπορεί να σημαίνει ότι το *olig2* είναι το πιο παλιό από τα δυο.

Πολλές πληροφορίες για τη λειτουργικότητα των *olig* γονιδίων μπορούν να μας δώσουν πειράματα εξάλειψής τους και μελέτης των φαινοτύπων που προκύπτουν. Έτσι λοιπόν, πειράματα έδειξαν ότι *olig1*^{-/-} ζώα είναι βιώσιμα, αλλά παρουσιάζουν καθυστέρηση στην ωρίμανση των ολιγοδενδροκυττάρων. Τα *olig2*^{-/-} ζώα στερούνται ολοκληρωτικά προγονικών ολιγοδενδροκυττάρων στη σπονδυλική στήλη. Παράγουν, ωστόσο, μικρές κοιλότητες πρόδρομων ολιγοδενδροκυττάρων στον πρόσθιο εγκέφαλο και σχεδόν φυσιολογικούς αριθμούς στο μεσεγκέφαλο και τον οπίσθιο εγκέφαλο. Όλα τα προγονικά ολιγοδενδροκύτταρα που επιζούν στα *olig2*^{-/-} ζώα φαίνεται να εκφράζουν το *olig1*, αποκαλύπτοντας ότι τα δύο αυτά γονίδια παρουσιάζουν λειτουργικό πλεονασμό σε συγκεκριμένες περιοχές του ΚΝΣ. Σε ζώα που απουσιάζουν συνδυαστικά και τα δύο γονίδια, δεν παρατηρήθηκαν καθόλου πρόδρομα ολιγοδενδροκύτταρα οπουδήποτε στο ΚΝΣ. Συνδυάζοντας τα παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι οι αλληλεπικαλυπτόμενες λειτουργίες των *olig* γονιδίων ευθύνονται για τον καθορισμό των ολιγοδενδροκυττάρων, παρότι οι λειτουργίες των *olig1* και *olig2* φαίνεται να είναι εξαρτημένες με το περιβάλλον [167].

Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι οι *olig* πρωτεΐνες δρουν συνεργιστικά με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, (π.χ. *Ngn2*), για την προώθηση της διαφοροποίησης των κινητικών νευρώνων. Δεδομένα που δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες *olig* δρουν ως μεταγραφικοί καταστολείς αυξάνουν την πιθανότητα οι μεταγραφικοί στόχοι των *olig* να είναι ανταγωνιστές της ανάπτυξης των κινητικών νευρώνων. Έτσι μπορούμε να πούμε ότι οι πρωτεΐνες *olig* προωθούν την ανάπτυξη των κινητικών νευρώνων καταστέλλοντας τους καταστολείς της.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

I. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΤΟΥ DNA

Οι διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν για τον ανασυνδυασμό του DNA περιλαμβάνονται στο εργαστηριακό εγχειρίδιο Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 2nd Edition (Sambrook et al., 1989) και είναι οι παρακάτω:

- Ενζυματικοί χειρισμοί του DNA που περιλαμβάνουν αντιδράσεις πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, υδρόλυση των 5' ελεύθερων φωσφορικών ομάδων με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (SAP, shrimp alkaline phosphatase), τροποποίηση των άκρων του με DNA πολυμεράση I (Klenow fragment) και σύνδεση μορίων DNA με T4 DNA λιγάση
- Διαχωρισμός μορίων νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης (TAE ή TBE)
- Μετασηματισμός βακτηριακών στελεχών E. coli από πλασμιδιακό DNA ή από DNA μετά από αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA
- Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini prep) με την αλκαλική μέθοδο
- Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα με διαβάθμιση CsCl παρουσία EtBr

Τα βακτηριακά στελέχη της E. Coli που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα DH10B

Τα ένζυμα για τις αντιδράσεις του DNA αγοράστηκαν από την New England Biolabs, την Roche και την Minotech και χρησιμοποιήθηκαν με βάση τις οδηγίες της κάθε εταιρείας.

II. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΗΛΕΚΤΡΟΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Υλικά

LB* :10gr Tryptone, 5gr εκχυλίσματος ζύμης, 2gr NaCl, 10% γλυκερόλη

Διαδικασία

-200ml θρεπτικού διαλύματος LB* εμβολιάζονται με τόσα ml ολονύκτιας καλλιέργειας ώστε η αρχική OD στα 600nm να γίνει 0.05 και επωάζονται στους 37°C μέχρι τελικής OD = 0.6. Η καλλιέργεια τοποθετείται στον πάγο για 20 λεπτά και στη συνέχεια τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 4000 στροφές, στους 4°C, για 15 λεπτά. Ακολουθεί μία σειρά από πλυσίματα των κυττάρων με milli-Q νερό με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις. Όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων πραγματοποιούνται στους 4°C. Στο τέλος τα κύτταρα επαναδιαλύονται στο διάλυμα της γλυκερόλης και παγώνονται σε μέρη των 50μl σε ξηρό πάγο. Φυλάσσονται στους -80°C.

III. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΗΛΕΚΤΡΟΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ELECTROPORATION

Τα ηλεκτροδεκτικά κύτταρα αναμιγνύονται με 1μl (περιέχει 10ng συνολικού DNA) από την αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA (ligation) και μεταφέρονται σε 0.2cm electroporation cuvette. Το electroporation πραγματοποιείται στα 1880 volts στον electroporator BTX ECM 399. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται για 1 ώρα στους 37°C, φυγοκεντρώνονται στις 1500 στροφές για 5 λεπτά και απλώνονται σε βακτηριολογικό τρυβλίο με LB+ άγαρ το οποίο φέρει το αντιβιοτικό επιλογής.

IV. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΟΡΙΩΝ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Ανάλογα με το μέγεθος του DNA, ο διαχωρισμός γίνεται είτε σε 1xTBE (**10x, 1l:** 108gr Tris, 55gr Boric Acid, 40ml EDTA) ή σε 1xTAE (**10x, 1l:** 242gr Tris, 57.1gr glacial acetic acid, 100ml EDTA) πήκτωμα αγαρόζης.

Η απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιήθηκε μετά από ψήξη σε φαινόλη. Η ταυτοποίηση του μεγέθους έγινε χρησιμοποιώντας ως δείκτη DNA από το βακτηριοφάγο λ που έχει υποστεί ενζυμική πέψη με την ενδονουκλεάση HindIII.

V. ΨΗΞΗ ΣΕ ΦΑΙΝΟΛΗ

Αφού διαχωριστούν τα προϊόντα του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, απομονώνουμε τη ζώνη που αντιστοιχεί στο επιθυμητό προϊόν κάτω από λάμπα UV, τεμαχίζουμε το κομμάτι της αγαρόζης με την επιθυμητή ζώνη και φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό στις 13.000 στροφές/λεπτό. Αναμειγνύουμε με ίσο όγκο φαινόλης και ανακατεύουμε πολύ καλά για 30 δευτερόλεπτα (vortex). Αφήνουμε το μίγμα στους -80°C μέχρι να παγώσει και στη συνέχεια φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Στην υδατική φάση προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλη/χλωροφόρμιο και 1/10 του όγκου 3M CH₃COONa pH 5.5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, στη συνέχεια το DNA κατακρημνίζεται με 2 όγκους αιθανόλης 100% στους -80°C και πλένεται σε 70% αιθανόλη. Το ίζημα του DNA επαναδιαλύεται σε TE και η ποσότητά του εκτιμάται σε πήκτωμα αγαρόζης.

VI. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ (SEQUENCING)

Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τμημάτων DNA έγινε με τη μέθοδο Sanger (Sanger et al., 1977) η οποία αφορά τον τερματισμό της αλυσίδας DNA μέσω της ενσωμάτωσης τριφωσφορικών δι-δεόξυνουκλεοτιδίων.

VII. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΙ ΙΣΤΟΥΣ

Υλικά

Διάλυμα λύσης: 50mM Tris- HCl pH 8.0, 10-100mM EDTA pH 8.0 (10mM για κυτταρικές σειρές-100mM για ιστούς), 100mM NaCl, 1% SDS, Πρωτεϊνάση K (0.1-0.5mg/ml), 20μg/ml RNase, Κεκορεσμένο διάλυμα NaCl Ισοπροπανόλη, 70% αιθανόλη, TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA)

Διαδικασία

Στην περίπτωση των κυττάρων αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, και ξεπλένονται 2 φορές με 1xPBS και στη συνέχεια προστίθενται 500μl από το διάλυμα λύσης το οποίο περιέχει 0.1mg/ml πρωτεϊνάση K. Το μείγμα μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf και ακολουθεί επώαση στους 55⁰C, όλη τη νύχτα. Στην περίπτωση των ιστών, τοποθετούνται απευθείας σε διάλυμα λύσης το οποίο περιέχει 0.5mg/ml πρωτεϊνάση K.

Την επόμενη μέρα προσθέτουμε RNase και επωάζουμε για 15 λεπτά, στους 37⁰C.

Στη συνέχεια για να κατακρημνιστεί το SDS προσθέτουμε 250μl από το διάλυμα NaCl και επωάζουμε στον πάγο για 5 λεπτά.

Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 13000 στροφές για 10 λεπτά στους 4⁰C.

Στο υπερκείμενο προστίθενται 0.6 όγκοι ισοπροπανόλη για την κατακρήμνιση του γενωμικού DNA.

Μετά από φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές στους 4⁰C, για 10 λεπτά, το ίζημα του DNA πλένεται με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε TE. Ο όγκος του TE κυμαίνεται ανάλογα με την πυκνότητα των κυττάρων ή τη μάζα του ιστού.

VIII. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Η απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Trizol (Invitrogen), το οποίο είναι μια βελτιωμένη μέθοδος αυτής που αναπτύχθηκε από τους Chomczynski και Sacchi, το 1987. Το Trizol το οποίο περιέχει φαινόλη και ισοθειοκυανική γουανιδίνη διατηρεί την ακεραιότητα του RNA ενώ, από την άλλη, λύνει τα κύτταρα και διαλύει τα κυτταρικά συστατικά.

Τα κύτταρα ξεπλένονται με 1xPBS και λύνονται προσθέτοντας απευθείας σε αυτά 1ml Trizol ανά 10 cm² επιφάνειας τρυβλίου. Τα λυμένα κύτταρα ομογενοποιούνται με πιπετάρισμα, μεταφέρονται σε σωλήνα eppendorf και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Στη συνέχεια προσθέτουμε 200μl χλωροφόρμιο, αναμιγνύουμε και το ομογενοποίημα των κυττάρων επωάζεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Ο διαχωρισμός της υδατικής φάσης που περιέχει το RNA (αποτελεί το 60% του Trizol) από την οργανική φάση πραγματοποιείται με φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 15 λεπτά στους 4⁰C. Το RNA κατακρημνίζεται με 0.5ml ισοπροπανόλη ανά 1ml Trizol με φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 15 λεπτά στους 4⁰C. Μετά από πλύσιμο με 70% αιθανόλη και φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές, για 5 λεπτά, το RNA επαναδιαλύεται σε 10μl καθαρό από RNase νερό. Για τον προσδιορισμό της ποσότητάς του, 1μl από το δείγμα φωτομετρείται στα 260nm. Η ποιότητα του RNA ελέγχεται αναλύοντας 1μl δείγματος σε 1.2% TBE πήκτωμα αγαρόζης. Κατά την ανάλυση είναι ορατές ζώνες υψηλού μοριακού βάρους μεταξύ 7 και 15 kb που αποτελούνται από mRNAs και hnRNAs, δύο ζώνες που αντιστοιχούν στις

ριβοσωμικές υπομονάδες στα 5 kb (28S) και στα 2 kb (18S) και το χαμηλού μοριακού βάρους RNA μεταξύ 0.1 και 0.3 kb (tRNA, 5S).

2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

I. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΜΒΡΥΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΟΥ (MEFS) ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ G418

Τα ES κύτταρα καλλιεργούνται είτε πάνω σε μονοστοιβάδα εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικού (MEFs) τα οποία έχουν σταματήσει να πολλαπλασιάζονται μετά από έκθεση σε γ ακτινοβολία, είτε σε τρυβλία που έχουν προηγουμένως επεξεργαστεί με 0.1% ζελατίνη. Οι εμβρυϊκοί ινοβλάστες απομονώθηκαν από έμβρυα σταδίου 13.5dpc και από στέλεχος ποντικού που φέρει το γονίδιο της νεομυκίνης (neomycin) δίνοντάς τους ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό G418.

Υλικά

1xPBS

Θρεπτικό υλικό για MEFs: DMEM (4.500mg/ml γλυκόζη) (GIBCO), Penicillin/Streptomycin (10000units/ml penicillin, 10000μg/ml streptomycin) (GIBCO), 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Biochrom)

2x Freezing υλικό για MEFs : 20% FBS, 20% DMSO (AppliChem), 60% DMEM

Διαδικασία

Θηλυκές ποντικίνες που φέρουν το γονίδιο της νεομυκίνης διασταυρώνονται με αρσενικούς του ίδιου στελέχους και θυσιάζονται την ημέρα 13.5. Ακολουθεί διατομή της μήτρας μέσα σε 1xPBS και απομόνωση των εμβρύων, αφού πρώτα

απομακρύνουμε από αυτά τους εξωεμβρυϊκούς ιστούς (συνήθως 1 ποντικίνα δίνει 9-10 έμβρυα, αρκετά για να δώσουν εκατομμύρια MEFs).

Από τα έμβρυα αφαιρούμε το κεφάλι και το συκώτι και τα μεταφέρουμε σε θρεπτικό υλικό όπου τα κόβουμε σε μικρά κομμάτια και στη συνέχεια σπάμε το συνδετικό ιστό ανάμεσα στα κύτταρα των εμβρύων ασκώντας μηχανική πίεση.

Συλλέγουμε το εναιώρημα των κυττάρων σε 50ml σωλήνα και αφήνουμε σε ηρεμία για 2 λεπτά ώστε τα μεγάλα κομμάτια των ιστών να κατακαθίσουν. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωλήνα και φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές για 7 λεπτά.

Επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων σε 25ml θρεπτικό και καλλιεργούμε σε φλάσκα T75, στους 37⁰C και σε 5% CO₂. Χρειάζεται 2- 3 ημέρες για να καλύψουν το 100% της επιφάνειας της φλάσκας και τότε ακολουθεί πέρασμα των κυττάρων 1:4.

Όταν τα κύτταρα καλύψουν το 100% της επιφάνειας κάθε φλάσκας, ξεπλένουμε 2 φορές με 1xPBS και στη συνέχεια προσθέτουμε τρυψίνη (0.25%- Invitrogen) στην οποία επωάζουμε τα κύτταρα για περίπου 5 λεπτά. Αδρανοποιούμε την τρυψίνη με θρεπτικό και με διαδοχικά πιπεταρίσματα διαχωρίζουμε τα κύτταρα. Φυγοκεντρούμε στις 1200 στροφές για 5 λεπτά και επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό. Παγώνουμε τα ¾ των κυττάρων (1 φλάσκα/vial) αναμιγνύοντας 1 όγκο κυττάρων με 1 όγκο 2x freezing υλικό. Κρατάμε την άλλη φλάσκα για να επεκτείνουμε τον αριθμό των MEFs με σταδιακά περάσματα 1:4 κάθε φορά. Τα MEFs είναι κατάλληλα για να χρησιμοποιηθούν σε καλλιέργεια ES κυττάρων μέχρι 5- 6 περάσματα αφού έκτοτε χάνουν το δυναμικό του πολλαπλασιασμού και μπαίνουν στο στάδιο της ηρεμίας (senescence).

Πριν τα MEFs χρησιμοποιηθούν για την καλλιέργεια των ES κυττάρων απενεργοποιούνται με γ ακτινοβολία στα 3500 rads (η ακτινοβολήση πραγματοποιήθηκε στο εντομοτροφείο του Βιολογικού τμήματος). Ακτινοβολημένα MEFs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα ES κυττάρων μέσα σε 3 ημέρες.

*Στον πίνακα αναφέρεται ο συνολικός αριθμός των MEFs που μπορεί να καλλιεργηθεί ανά επιφάνεια.

Επιφάνεια κατά όνομα	Επιφάνεια (mm ²)	Αριθμός MEFs
100mm	5675	4x10 ⁶
60mm	2206	2x10 ⁶
24-well plate	177	1.3x10 ⁵
48-well plate	78	6x10 ⁴
96-well plate	28	2x10 ⁴

II. ΧΡΩΣΗ ΜΕ DAPI ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΠΙΣΤΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ MYCOPLASMA

Η χρώση κυττάρων με DAPI αποτελεί ένα τρόπο διαπίστωσης πιθανής μόλυνσης των ευκαρυωτικών κυτταρικών καλλιεργειών από το βακτήριο Mycoplasma. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα που βρίσκονται σε καλλιέργεια μέσα σε τρυβλίο, πλένονται με 1xPBS δύο φορές και μονιμοποιούνται με μεθανόλη. Στη συνέχεια προστίθεται DAPI 1μg/ml διαλυμένο σε μεθανόλη και επωάζεται στους 37°C για 15 λεπτά. Τα κύτταρα ξεπλένονται αρχικά με μεθανόλη και μετά με 1xPBS, οπότε είναι έτοιμα για παρατήρηση στο ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού.

III. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ES ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα ES κύτταρα καλλιεργούνται σε 60 ή 100mm τρυβλία που περιέχουν ινοβλάστες που έχουν ακτινοβοληθεί ή σε τρυβλία καλλιέργειας που έχουν επωαστεί για μία ώρα στους 37°C με 0.1% ζελατίνη (Fluka). Μία καλλιέργεια σε 60mm τρυβλίο ξεκινάει με 5x10⁵-1x10⁶ κύτταρα ενώ σε 100mm με 1.5-2x10⁶ κύτταρα. Ο χρόνος διπλασιασμού τους είναι 16-18 ώρες και το πέρασμα τους γίνεται κάθε 2 ημέρες και πριν οι κλώνοι αρχίσουν να πλησιάζουν ο ένας τον άλλον, σε αναλογία 1:4 ή 1:6. Σημαντικό ρόλο στο να παραμείνουν αδιαφοροποίητα τα ES κύτταρα παίζει ο ορός στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Τα κριτήρια που χρησιμοποιούμε για να παρακολουθήσουμε την κατάσταση διαφοροποίησης των ES κυττάρων είναι το αν εμφανίζονται ενδοδερμικά

κύτταρα στην περιφέρεια των κλώνων, εάν οι κλώνοι είναι λαμπεροί και στρογγυλοί και δεν έχουν νεκρά κύτταρα στην επιφάνειά τους. Από την άλλη ποσοστό διαφοροποίησης κάτω του 5% δείχνει ότι τα κύτταρα αυτά διατηρούν την ικανότητα της διαφοροποίησης και συνεπώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή χιμαϊρικών ποντικών.

Υλικά

Θρεπτικό υλικό για ES κύτταρα

410ml Knockout DMEM (GIBCO)

15% FBS HYCLONE (ES Qualified)

200μM L- γλουταμίνης (GIBCO)

1x Non Essential Aminoacids (GIBCO)

Penicillin/Streptomycin (10000units/ml penicillin, 10000mg/ml streptomycin)
(GIBCO)

100μM β-μερκαπτοαιθανόλη

1000 units/ml LIF (ESGRO, Chemicon)

1xPBS (χωρίς Ca^{2+} ή Mg^{2+})

Trypsin/EDTA (0.25%- Invitrogen)

2x Freezing υλικό, ίδιο με εκείνο για τα MEFs

Διαδικασία

Η επώαση των ES κυττάρων [Pc3 (wild type) και 130-9 (erf knock-out)] γίνεται στους 37⁰C και σε 5% CO₂. Η αλλαγή στο θρεπτικό τους γίνεται κάθε μέρα ενώ το πέρασμα των κυττάρων γίνεται με τρυψίνη κάθε δεύτερη ή τρίτη μέρα.

Τα ES κύτταρα ξεπλένονται 3 φορές με 1xPBS και στη συνέχεια επωάζονται με τρυψίνη (0.5ml/60mm ή 1ml/100mm), για 5 λεπτά στους 37⁰C (κάθε φορά και 2 ώρες πριν επωάσουμε τα κύτταρα με τρυψίνη αλλάζουμε σε αυτά το θρεπτικό υλικό). Στη συνέχεια αφού απενεργοποιήσουμε την τρυψίνη με θρεπτικό υλικό διαχωρίζουμε τα συσσωματώματα των κυττάρων πιετάροντας 20 φορές επιδιώκοντας να μείνουν στο τέλος συσσωματώματα από 2- 3 ES κύτταρα. Αυτό είναι απαραίτητο για να παρεμποδιστεί η διαφοροποίηση των ES κυττάρων μετά την προσκόλλησή τους στη στοιβάδα των MEFs. Τα κύτταρα συλλέγονται σε 15ml σωλήνα και ο αριθμός τους μετριέται σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer.

Στη συνέχεια το εναιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρείται ώστε να απομακρυνθεί η τρυψίνη στις 1000 στροφές, για 3 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε θρεπτικό υλικό για ES και απλώνουμε 0.5- 10⁶ κύτταρα σε 60mm ή 1.5- 2x10⁶ κύτταρα σε 100mm τρυβλίο καλυμμένο με ζελατίνη. Τα υπόλοιπα ES κύτταρα τα παγώνουμε σε 2x freezing υλικό με τον ίδιο τρόπο που παγώνουμε και τα MEFs. Τα παγωμένα ES κύτταρα διατηρούνται σε υγρό άζωτο χωρίς να χάνουν το δυναμικό τους, για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα.

IV. ΝΕΥΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ES ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΜΟΝΟΣΤΟΙΒΑΔΑ

Προετοιμασία τρυβλίων καλλιέργειας καλυμμένων με PDL-Laminin: Για την ανάπτυξη και την επέκταση των νευρικών κυττάρων σε *in vitro* κυτταροκαλλιέργειες σε μονοστοιβάδα, απαιτείται η επικάλυψη των τρυβλίων με τις ουσίες πολυ-D-λυσίνη (poly-D-lysine – PDL) και λαμινίνη (Laminin). Το διάλυμα της PDL (τελική συγκέντρωση 10μg/ml- SIGMA) τοποθετείται στα τρυβλία της καλλιέργειας και ακολουθεί επώαση για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ξεπλένουμε τα τρυβλία 2 φορές με 1xPBS και βάζουμε το διάλυμα της λαμινίνης (τελική συγκέντρωση 2.5μg/ml – SIGMA). Η επώαση γίνεται ολονύκτια (O/N) στους 37⁰C και σε 5% CO₂. Μπορούμε να αποθηκεύσουμε τα επικαλυμμένα τρυβλία στους -20⁰C στα σκοτεινά για έξι (6) μήνες. Στην περίπτωση αυτή, πριν τη χρήση τους, τα τοποθετούμε στους

37⁰C για 20 λεπτά. Το διάλυμα της λαμινίνης απομακρύνεται από το τρυβλίο ακριβώς πριν το στρώσιμο των κυττάρων και χωρίς να στεγνώσει.

Μια ημέρα πριν την έναρξη της διαφοροποίησης σε μονοστοιβάδα, τα κύτταρα στρώνονται σε τρυβλία καλλιέργειας καλυμμένα με ζελατίνη, σε μεγάλη πυκνότητα. Συγκεκριμένα στρώνονται 3x10⁶ κύτταρα/ P60mm τρυβλίο. Την ημέρα που ξεκινά η διαφοροποίηση είναι σημαντικό να παρατηρήσουμε τα κύτταρα στο μικροσκόπιο πριν την έναρξη της διαδικασίας. Τα κύτταρα μετά την τρυψινοποίησή τους, επαναδιαλύονται σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης RHB-A (NDiff Stem Cell Sciences). Στρώνουμε 25x10⁴ κύτταρα/ P60mm τρυβλίο καλλιέργειας καλυμμένο με ζελατίνη. Αλλάζουμε το θρεπτικό μέσο μετά από δύο ημέρες (day2). Τα κύτταρα τρυψινοποιούνται και ξαναστρώνονται την τέταρτη ημέρα (day4) σε τρυβλία καλλιέργειας καλυμμένα με PDL-Laminin, σε πυκνότητα 5x10⁵ κύτταρα/ P60mm τρυβλίο με προσθήκη 5ng/ml bFGF (Peprotech). Ακολουθεί αλλαγή θρεπτικού κατά την έκτη ημέρα (day6) και τα κύτταρα τρυψινοποιούνται και ξαναστρώνονται κατά την όγδοη ημέρα (day8) όπως ακριβώς την τέταρτη ημέρα (day4).

V. Γ-ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΕΜΒΡΥΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

Η απενεργοποίηση των ινοβλαστών εξυπηρετεί τη χρησιμοποίησή τους ως τροφικών κυττάρων σε καλλιέργειες ES και TS κυττάρων αλλά και την παραγωγή εμπλουτισμένου TS θρεπτικού. Γι αυτούς τους σκοπούς, ινοβλάστες πρόωρου περάσματος που βρίσκονται σε καλλιέργεια με πυκνότητα 80-90% μέσα σε φλάσκες τρυψινοποιούνται και το κυτταρικό εναιώρημα συλλέγεται σε σωλήνα 15ml τύπου Falcon με πλήρες θρεπτικό. Η ακτινοβόληση γίνεται στα 4000-5000rad σε ραδιενεργή πηγή. Για τα πειράματα η ακτινοβόληση έγινε σε πηγή κοβαλτίου στο Τμήμα Βιολογίας. Τα ακτινοβολημένα κύτταρα μετρούνται μετά από χρώση με trypan blue και απλώνονται σε τρυβλία κυτταροκαλλιιεργειών. Στην περίπτωση καλλιέργειας ES κυττάρων, οι ινοβλάστες επιστρώνονται στα τρυβλία σε πυκνότητα 6x10⁴ ζωντανά κύτταρα/cm², ενώ στην περίπτωση καλλιέργειας TS κυττάρων 3x10⁴ ζωντανά κύτταρα/cm².

VI. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΜΕΣΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΕΩΝ

Το TS θρεπτικό έχει την εξής τελική σύσταση :

1x RPMI 1640 με L-Γλουταμίνη και Heps (Gibco 52400)

20% Εμβρυϊκός βοδινός ορός (Biochrom)

1mM Πυροσταφυλικό οξύ (Gibco 11360)

100μM β-Μερκαπτοαιθανόλη

1x Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη

Ο παράγοντας FGF4 σε μορφή λυοφιλομένης σκόνης επαναδιαλύεται σε PBS/0.1% BSA σε συγκέντρωση 25μg/ml (1000x) και μοιράζεται σε ποσότητες των 100μl, οι οποίες φυλάσσονται στους -80°C. Η ηπαρίνη επαναδιαλύεται σε PBS σε συγκέντρωση 10mg/ml (10,000x), μοιράζεται σε ποσότητες των 500μl και φυλάσσεται στους -80°C. Για την παρασκευή πλήρους TS θρεπτικού (TS+F4H) προστίθενται σε τελική συγκέντρωση 25ng/ml FGF-4 (Peprotech 100-31 ή Sigma F8424) και 1μg/ml Ηπαρίνη (Sigma H-3149).

Για την προετοιμασία εμπλουτισμένου θρεπτικού (Feeder-conditioned medium, CM), γ-ακτινοβολημένοι εμβρυϊκοί ινοβλάστες περάσματος 1 (Passage1, P1) απλώνονται σε πυκνότητα 2×10^5 κύτταρα/ml θρεπτικού σε πιάτα διαμέτρου 10cm. Προστίθενται 10ml TS θρεπτικού και οι καλλιέργειες αφήνονται για 72 ώρες. Το θρεπτικό συλλέγεται, φυγοκεντρείται σε 1200rpm για 3λεπτά για την κατακρήμνιση των νεκρών κυττάρων και το υπερκείμενο εκλούεται μέσα από φίλτρα 0.45μm. Το CM θρεπτικό φυλάσσεται στους -20°C και ξεπαγώνεται πριν τη χρήση του, οπότε διατηρείται στους 4°C. Τα πιάτα με τους εμβρυϊκούς ινοβλάστες χρησιμοποιούνται για την παραγωγή μιας ακόμη σειράς θρεπτικού.

3. ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ

Σε κάθε πείραμα ανοσοεντοπισμού τα πρωτοταγή αντισώματα ελέγχθηκαν για την ειδικότητά τους πραγματοποιώντας το πείραμα σε δείγματα τα οποία επώαστηκαν

μόνο με το δευτεροταγές αντίσωμα, ενώ τα δευτεροταγή αντισώματα ελέγχθηκαν για τυχόν θόρυβο σε διαφορετικές αραιώσεις.

Καλλιέργεια τροφοβλαστικών κυττάρων σε αδιαφοροποίητη κατάσταση

Υλικά: RPMI 1640, FBS, Penicillin/ Streptomycin, Sodium pyruvate, β-mercaptoethanol, fgf-4, heparin

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου (full medium) για την καλλιέργεια των τροφοβλαστικών κυττάρων είναι η ακόλουθη:

RPMI 1640 (Invitrogen)

20% Fetal Bovine Serum (FBS)

Penicillin/ Streptomycin (1x) (GIBCO)

Sodium Pyruvate (1x) (GIBCO)

B-mercaptoethanol (20μM)

Fgf-4 Peprotech (25ng/ml)

Heparin (1x)

Το παραπάνω θρεπτικό μέσο, αρχικά χρησιμοποιήθηκε σε καλλιέργεια ινοβλαστών ποντικού E13.5, οι οποίοι είχαν ακτινοβοληθεί με γ-ακτινοβολία, ώστε να σταματήσουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, για 3 ημέρες. Το θρεπτικό συλλέγεται μετά την καλλιέργεια των ινοβλαστών και φιλτράρεται από φίλτρο 0,45mm (NALGENE). Χαρακτηρίζεται πλέον ως *condition medium*.

Για την καλλιέργεια των τροφοβλαστικών κυττάρων σε κατάσταση αδιαφοροποίητη, διατηρώντας την ικανότητα αυτοανανέωσης και πολλαπλασιασμού, γίνεται χρήση θρεπτικού με την παρακάτω σύσταση: 70% condition medium, 30% full medium, fgf-4, heparin. Τα κύτταρα παραμένουν σε καλλιέργεια ανανεώνοντας το θρεπτικό μέσο ανά μια μέρα, ενώ γίνεται πέρασμά τους σε νέο δοχείο καλλιέργειας κάθε 4 μέρες.

Προκειμένου να προχωρήσουμε σε διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων, αρκεί να απομακρύνουμε τα condition medium, fgf-4 και heparin από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Παραμένοντας σε full medium, για τις επιθυμητές ημέρες του

πειράματος, τα κύτταρα μπαίνουν σε πρόγραμμα διαφοροποίησης, χάνοντας την ικανότητα της αυτοανανέωσης.

4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ ΚΛΩΝΟΥ (cDNA) ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ RNA ΚΑΙ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL-TIME PCR)

Μετά από απομόνωση ολικού RNA με τη χρήση του αντιδραστηρίου Trizol (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας, ακολουθεί σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου χρησιμοποιώντας το kit της STRATAGENE (cDNA Synthesis Kit). Για τη σύνθεση γινόταν χρήση 5μg ολικού RNA και oligo(dT) primers. Για τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης των διαφόρων γονιδίων-μαρτύρων διαφοροποίησης των τροφοβλαστικών αλλά και των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων, ακολουθήσαμε τη μέθοδο της Real-Time PCR. Χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Brilliant SyberGreen της STRATAGENE σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

<i>Cdx2</i>	TCTCCGAGAGGCAGGTAAA / GCAAGGAGGTCACAGGACTC
<i>Gcm1</i>	ACGAAGAGATGGCATGCATG / CTTGTGACATTACACCTGGC
<i>Tpbp(4311)</i>	CGGAAGGCTCCAACATAGAA / TTTCGCTCGTTGCCTAACTT
<i>Pl1</i>	GGGCAGAAACCTTGTAATTC / ATGGATGTCCCTTTTAATGC
<i>Gapdh</i>	CCAGTATGACTCCACTCACG / GACTCCACGACATACTCAGC
<i>Cx26</i>	GACCCGCTTCAGACCTGCTCCTTAC / GCCTGGAAATGAAGCAGTCCACTGT
<i>Fgf2</i>	TTCTTCCTGCGCATCCATCC / CTGGAGTATTTCCGTGACCG
<i>Tef5</i>	CTAGACAGGGCTCTATTTCC / AAATACCCAGGTGACCTTGG

<i>Islet1</i>	GATGACAGGAACTCCCATGG / GAATTAGAGCCTGGTCCTCC
<i>Nestin</i>	GGCTGAGACAGGTGAGATCC / GAGCAGTCTCGTGGGAAAGC
<i>Sox1</i>	TACATTCCCTGGCAATCTGC / ATCCTGACCCAGACCTCACC
<i>Olig2</i>	GCGGGTACTTTCATCCCTGG / GTCAAGTGCAGTGCTCTGCG
<i>Nkx6.1</i>	ACTTGGCAGGACCAGAGAGA / AGAGTTCGGGTCCAGAGGTT
<i>Nkx2.2</i>	CCGGGCGGAGAAAGGTATG / CTGTAGGCGGAAAAGGGGA
<i>GalC</i>	CGCCTACGTGCTAGACGAC / ACGATAGGGCTCTGGGTAATTT
<i>Plp1</i>	CCAGAATGTATGGTGTCTCCC / GGCCCATGAGTTTAAGGACG
<i>PDGFRa</i>	ACACGTTTGAGCTGTCAACC / CCCGACCACACAAGAACAGG
<i>CNPase</i>	TTTACCCGCAAAGCCACACA / CACCGTGTCTCATCTTGAAG
<i>Ngn2</i>	AACTCCACGTCCCCATACAG / GAGGCGCATAACGATGCTTCT
<i>Ibsp (BSP)</i>	GAAACGGTTTCCAGTCCAG / CTGAAACCCGTTTCAGAAGG
<i>Col1a2</i>	TGAAGTGGGTCTTCCAGGTC / GACCAGGCTCACCAACAAGT
<i>Fos</i>	ATGGGCTCTCCTGTCAACAC / ACGGAGGAGACCAGAGTGG
<i>Fosb</i>	CCTTCAACCAGCACAACCAC / CTTCAAGCTGATCAGTTTCCG
<i>Jun</i>	GAAAAGTAGCCCCAACCTC / AATCAGACAGGGGACACAGC
<i>Junb</i>	GCAGCTACTTTTCGGGTCAG / AAAAGTACTGTCCCGGAGGC
<i>Sp7</i>	TCTGCTTGAGGAAGAAGCTC / TCCATTGGTGCTTGAGAAGG
<i>Tgfb1</i>	GGAGAGCCCTGGATACCAAC / AAGTTGGCATGGTAGCCCTT
<i>Serinc5</i>	ACGTGATGATGACTCTGACC / CACCAGTTGCTGCTTAAACC
<i>Prkg2</i>	CAACCACCCGAACCTATGAC / CTGGGGATCCAATCTCTTCA
<i>Capg</i>	CTGGACAGATGAATCTGACC / CATTCGAGAGATGAAGCCATC

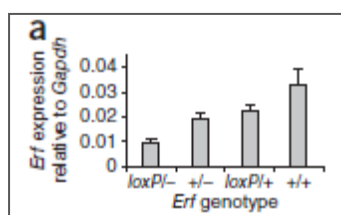
<i>Anxa1</i>	CCGGGAAGACAAGCAAATAC / CCCAGGACCACCTTTGTATG
<i>Hpgd</i>	CAGCAACCTGTTTATTGTGC / TAATCCATTGGCAATGGTTG
<i>Apcdd1</i>	ACTCAGACCCTGTCTGCAAG / CACTGAAGACATTGAGGAGG
<i>Runx2</i>	GAACCAAGAAGGCACAGACA / AACTGCCTGGGGTCTGAAAA
<i>Bglap- rs1/Bglap2</i>	CTCTGTCTCTCTGACCTCACAG / CAGGTCCTAAATAGTGATACCG
<i>Alpl (AP)</i>	AATGCCCTGAAACTCCAAAAGC / CCTCTGGTGGCATCTCGTTATC
<i>Erf</i>	TGTGGCACTTTATCCTGGAG / CTTGTAGGTGAACCGTTTCC

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ERF ΚΑΙ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΩΣΗ

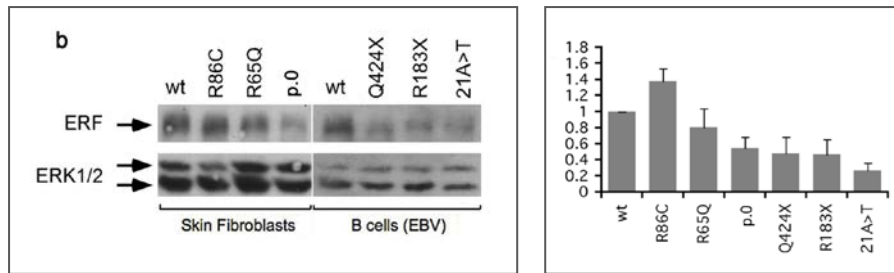
Στο κεφάλαιο αυτό θα παρουσιαστεί συνοπτικά τμήμα των πειραμάτων που διεξήχθησαν στο εργαστήριό μας για τη μελέτη του ρόλου του *Erf* στο σύνδρομο της κρανιοσυνόστωσης στους ανθρώπους και τα ποντίκια, καθώς και την εμπλοκή της σηματοδότησης μέσω Erk1/2 στη ρύθμιση της οστεογένεσης.

Στην εικόνα 1 παρουσιάζεται η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του *Erf* σε μεταλλαγμένα ποντίκια. Έγινε χρήση Real-Time PCR για τον *Erf* σε ολικό RNA που απομονώθηκε από κρανία ποντικών ημέρας E16,5 διαφόρων γονοτύπων, δείχνοντας μειωμένη έκφραση για τον *Erf* στα LoxP αλληλία συγκριτικά με τα αλληλία αγρίου τύπου. Το γεγονός αυτό καθιστά το *Erf*^{LoxP} αλληλίο ως υπομορφικό, πιθανώς εξαιτίας της PGKneo κασέτας επιλογής, της οποίας η ένθεση μειώνει την παραγωγή μεταγράφων του *Erf*.



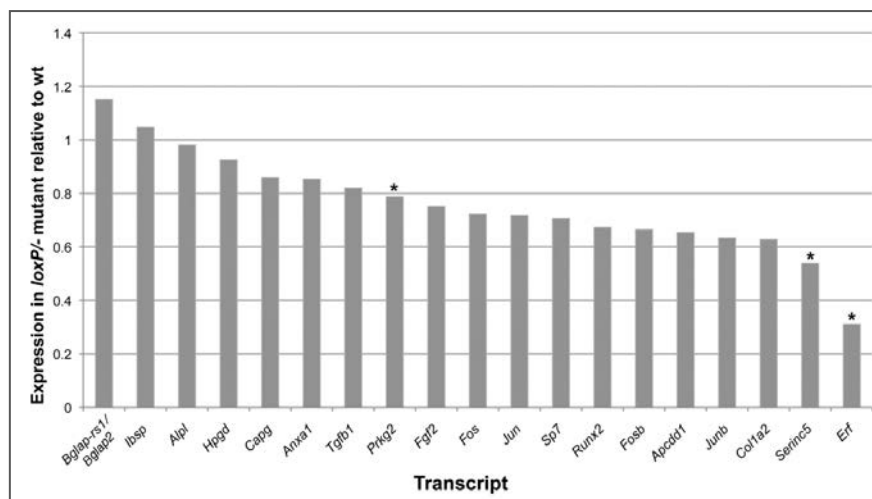
Εικόνα 1. Ανάλυση του *Erf* σε μεταλλαγμένα ποντίκια και εμβρυονικούς ινοβλάστες. Ποσοτική RT-PCR σε κρανία E16.5 διαφόρων γονοτύπων έδειξε μειωμένη έκφραση του *ErfloxP* αλληλίου σε σύγκριση με το αλληλίο αγρίου τύπου.

Στην εικόνα 2, ανοσοαποτύπωση ινοβλαστών ή λεμφοβλαστικών κυττάρων από ανθρώπινα δείγματα με παθολογικό φαινότυπο, αποκάλυψε χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης της πλήρους μήκους πρωτεΐνης *Erf* σε δείγματα με μεταλλάξεις στο κωδικόνιο έναρξης και μεταλλάξεις πρόωρης λήξης αλλά όχι σε δείγματα με μεταλλάξεις αλλαγής κάποιου κωδικονίου στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA.



Εικόνα 2. Αποτύπωση κατά Western για επιλεγμένες μεταλλάξεις του ERF σε ινοβλάστες ή λεμφοβλαστικές κυτταρικές σειρές. Μειωμένα επίπεδα ERF εντοπίζονται σε κύτταρα που εκφράζουν μεταλλάξεις που προκαλούν ατελή πρωτεΐνη (p0, Q424X, R183X, 21A>T). Η ποσοτικοποίηση στο δεξί διάγραμμα δείχνει τη μέση απόκλιση (\pm SD) σε σύγκριση με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου. Το αντίσωμα ERK1/2 χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο στην απόκλιση φορτώματος των δειγμάτων.

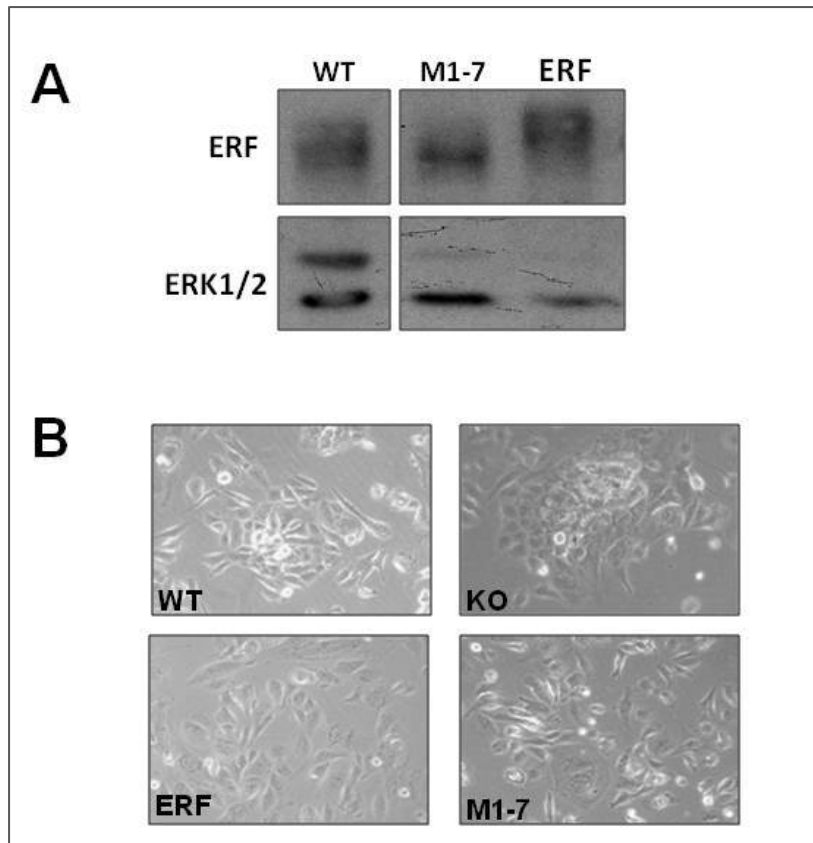
Τέλος, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης διαφόρων γονιδίων-μαρτύρων κατόπιν απομόνωσης ολικού RNA από κρανία ποντικών E16,5 αγρίου τύπου αλλά και ERF^{loxP/-}. Η ποσοτικοποίηση των μεταγράφων έδειξε χαμηλή καταστολή πολλαπλών μαρτύρων οστεογένεσης στα ERF^{loxP/-} μεταλλαγμένα στελέχη συγκριτικά με τα αγρίου τύπου, με στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα για τα γονίδια Prkg2 και Serine5. Παρόλα αυτά σε αυτό το στάδιο της ανάπτυξης, η οστεοποίηση φαίνεται να καθυστερεί ελαφρά στα ERF^{loxP/-} έμβρυα.



Εικόνα 3. RT-PCR πραγματικού χρόνου για την ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων 18 οστεογενετικών μαρτύρων σε ιστούς κρανίων E16.5. Τα δεδομένα βασίζονται σε σύγκριση ποντικών αγρίου τύπου ($n=5$) και ERF^{loxP/-} ($n=4$) από δύο γέννες. Φαίνεται η μέση αναλογία έκφρασης των μεταλλαγμένων προς του αγρίου τύπου, οι αστερίσκοι δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με $P<0.05$ (t-test).

2. ERF ΚΑΙ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ

Η μελέτη της επίδρασης του Erf κατά την ανάπτυξη του πλακούντα έγινε με χρήση τροφοβλαστικών κυττάρων. Στο εργαστήριο είχαμε στη διάθεσή μας τροφοβλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου (WT T.S.C.) και στη συνέχεια δημιουργήσαμε και χρησιμοποιήσαμε διαφορετικούς κλώνους των κυττάρων αυτών προκειμένου να έχουμε ολοκληρωμένη εικόνα της συμπεριφοράς τους, ανάλογα με το αν εκφράζουν τον Erf ή όχι και τι τύπου πρωτεΐνη Erf εκφράζουν. Έτσι, χρησιμοποιήσαμε τροφοβλαστικά κύτταρα με απαλοιφή του γονιδίου του Erf (knock-out), τα οποία είχαν κατασκευαστεί παλαιότερα στο εργαστήριό μας (KO T.S.C.). Μέσω μόνιμης επιμόλυνσης σε τροφοβλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου, δημιουργήσαμε κλώνους κυττάρων που υπερεκφράζουν την αγρίου τύπου πρωτεΐνη του Erf (ERF T.S.C.) και τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη M1-7 του Erf (M1-7 T.S.C.). Το μετάλλαγμα Erf M1-7 στερείται τις 7 θέσεις φωσφορυλίωσης από τις Erk, οπότε η πρωτεΐνη εφόσον δε μπορεί να φωσφορυλιωθεί παραμένει στον πυρήνα στη συνεχώς ενεργή της μορφή. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της λιποφεκταμίνης ώστε να εισάγουμε, με επιμόλυνση, στα τροφοβλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου πλασμίδια που έφεραν τα γονίδια του Erf (pCMV-HA-ERF) και του μεταλλάγματος M1-7 Erf (pCMV-HA-ERF M1-7). Ακολούθησε η επιλογή των επιμολυσμένων κλώνων με νεομυκίνη (G418) για περίπου 10 ημέρες και η υπερέκφραση των πρωτεϊνών ελέγχθηκε με στύπωμα κατά Western κάνοντας χρήση του αντισώματος S17S (εικόνα 4-A). Για κανονικοποίηση του ισοφορτώματος των πρωτεϊνών έγινε χρήση του αντισώματος για την ολική Erk (p44/42 total erk, Cell signaling). Μετά την επιλογή των επιθυμητών κλώνων, έγινε περαιτέρω καλλιέργειά τους και με λήψη φωτογραφιών είδαμε πως όλα τα κύτταρα διατηρούσαν την επιθηλιακή μορφολογία των τροφοβλαστικών κυττάρων (εικόνα 4-B), ενώ η υπερέκφραση των πρωτεϊνών δεν επηρέασε το ρυθμό ανάπτυξής τους και τις βλαστικές ιδιότητές τους.



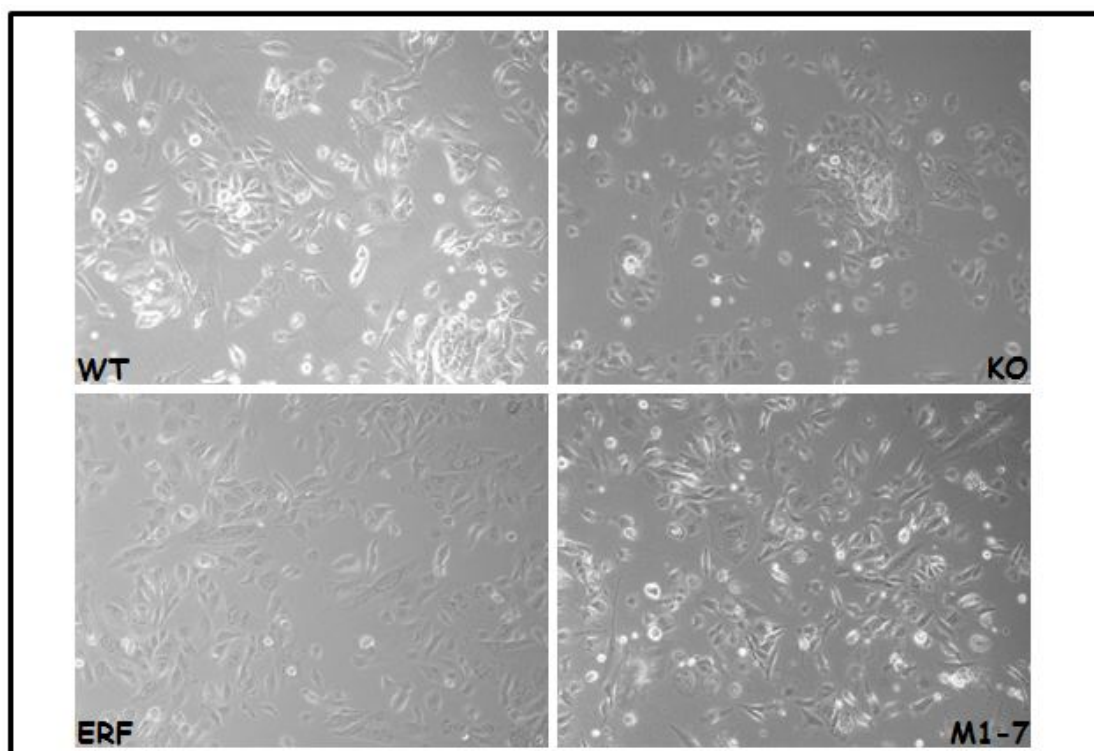
Εικόνα 4. (A) Αποτύπωση κατά Western για την έκφραση του ERF σε κλώνους τροφοβλαστικών κυττάρων. Ο κλώνος M1-7 εκφράζει 1.8 φορές περισσότερη πρωτεΐνη σε σύγκριση με τα κύτταρα αγρίου τύπου ενώ ο κλώνος ERF εκφράζει ~4 φορές περισσότερη πρωτεΐνη συγκριτικά με τα κύτταρα αγρίου τύπου. Το αντίσωμα ERK1/2 χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο στην απόκλιση φορτώματος των δειγμάτων. (B) Μελέτη της μορφολογίας των επιλεγμένων κλώνων των τροφοβλαστικών κυττάρων. WT: τροφοβλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου, KO: τροφοβλαστικά κύτταρα knock-out, ERF: τροφοβλαστικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ERF, M1-7: τροφοβλαστικά κύτταρα που υπερεκφράζουν το μετάλλαγμα ERF M1-7.

Τα τροφοβλαστικά κύτταρα μπορούν να καλλιεργηθούν *in vitro* σε συγκεκριμένες συνθήκες ώστε να διατηρούν την ικανότητά τους για αυτοανανέωση και πολλαπλασιασμό. Στο υγρό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των κυττάρων αυτών, απαιτείται η προσθήκη condition-medium, το οποίο είναι θρεπτικό μέσο προερχόμενο από καλλιέργεια ινοβλαστών απενεργοποιημένων με γ-ακτινοβολία. Επίσης, απαιτείται η προσθήκη του αυξητικού παράγοντα fgf4 (reprotech) καθώς και ηπαρίνης. Η έκκριση του παράγοντα αυτού σε φυσιολογικές συνθήκες *in vivo* κατά την εμβρυογένεση, γίνεται από την εσωτερική κυτταρική μάζα (inner cell mass) προς τα τροφοβλαστικά κύτταρα ώστε αυτά να διατηρούν το βλαστικό χαρακτήρα τους. Απομάκρυνση του condition-medium, του fgf4 και της ηπαρίνης από την *in vitro* καλλιέργεια των τροφοβλαστικών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την είσοδο των

κυττάρων σε πρόγραμμα διαφοροποίησης. Τα τροφοβλαστικά κύτταρα που διαφοροποιούνται *in vitro* οδηγούνται προς γιγαντιαία κύτταρα.

Αρχικά, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διαλευκανθεί το κατά πόσο ο ERF επηρεάζει το πρόγραμμα διαφοροποίησης των τροφοβλαστικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό κάναμε χρήση των παραπάνω κλώνων των τροφοβλαστικών κυττάρων σε πειράματα *in vitro* διαφοροποίησης.

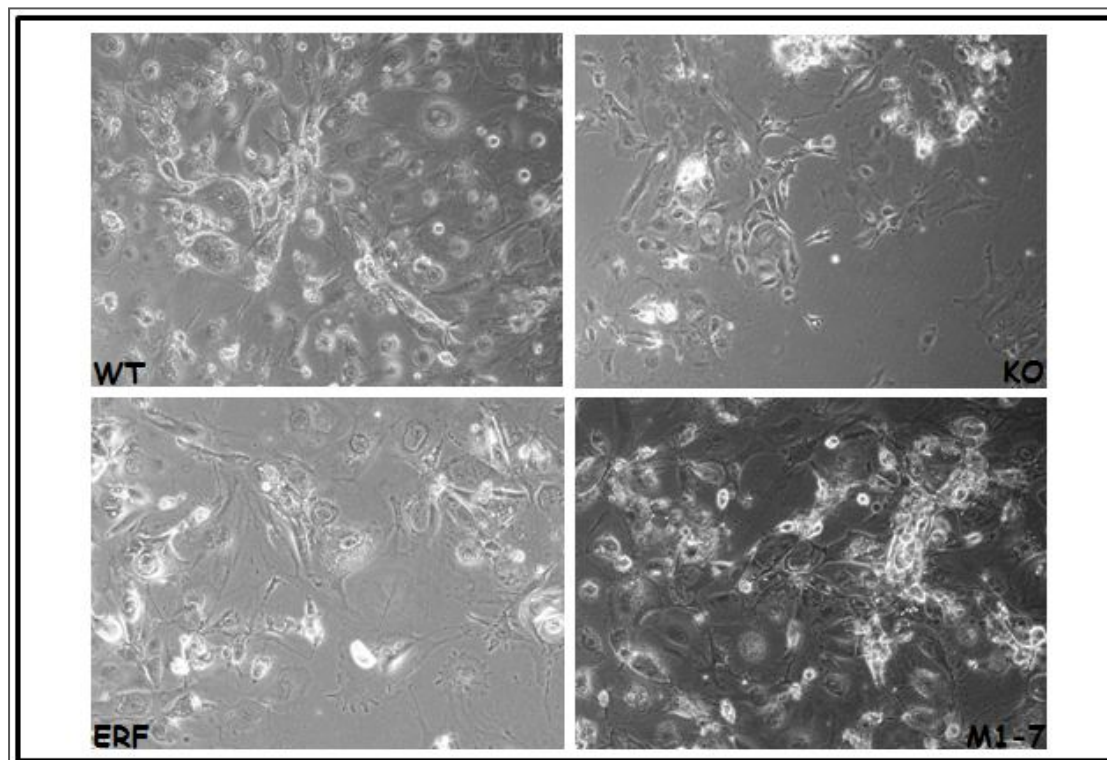
Τα πειράματα διαφοροποίησης είχαν διάρκεια δώδεκα (12) ημέρες. Ανά τρεις (3) ημέρες γινόταν λήψη φωτογραφιών καθώς και απομόνωση ολικού RNA με χρήση του Trizol reagent. Με τον τρόπο αυτό, θα δινόταν η δυνατότητα ελέγχου της μορφολογίας των κυττάρων κατά τη διαφοροποίηση αλλά και της μελέτης της έκφρασης γονιδίων-μαρτύρων ειδικών για το κάθε στάδιο της διαφοροποίησης και το είδος των διαφοροποιημένων κυττάρων.



Εικόνα 5. Μελέτη της μορφολογίας των τροφοβλαστικών κυττάρων κατά την έναρξη του πειράματος διαφοροποίησης (day0). WT: τροφοβλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου, KO: τροφοβλαστικά κύτταρα knock-out, ERF: τροφοβλαστικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ERF, M1-7: τροφοβλαστικά κύτταρα που υπερεκφράζουν το μετάλλαγμα ERF M1-7.

Όπως φαίνεται από την εικόνα 5, τα κύτταρα αρχικά, στην αδιαφοροποίητη μορφή τους, εμφανίζουν έναν επιθηλιακό χαρακτήρα από άποψη μορφολογίας και οι κλώνοι

είναι όμοιοι μεταξύ τους. Στο τέλος του προγράμματος διαφοροποίησης (ημέρα 12), τα κύτταρα πλέον έχουν αλλάξει μορφή και μοιάζουν με γιγαντιαία κύτταρα (εικόνα 6).

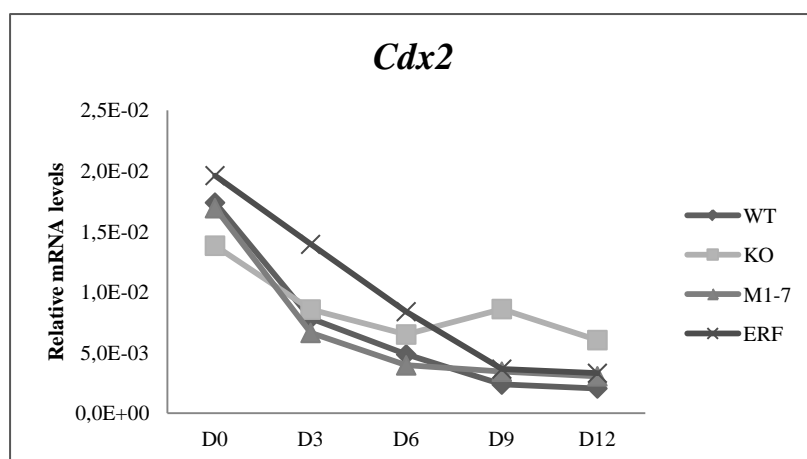


Εικόνα 6. Μελέτη της μορφολογίας των τροφοβλαστικών κυττάρων κατά τη λήξη του πειράματος διαφοροποίησης (day12). Τα κύτταρα πλέον έχουν χάσει τον επιθηλιακό χαρακτήρα τους και έχουν δώσει παράγωγα της τροφοβλαστικής γενεαλογίας. WT: τροφοβλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου, KO: τροφοβλαστικά κύτταρα knock-out, ERF: τροφοβλαστικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον Erf, M1-7: τροφοβλαστικά κύτταρα που υπερεκφράζουν το μετάλλαγμα Erf M1-7.

Η μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων-μαρτύρων για τα στάδια της διαφοροποίησης, έγινε με Real-Time PCR. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν γονίδια ειδικά για την κάθε κυτταρική γενεαλογία που συναντάμε κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ενός φυσιολογικού πλακούντα στο ποντίκι.

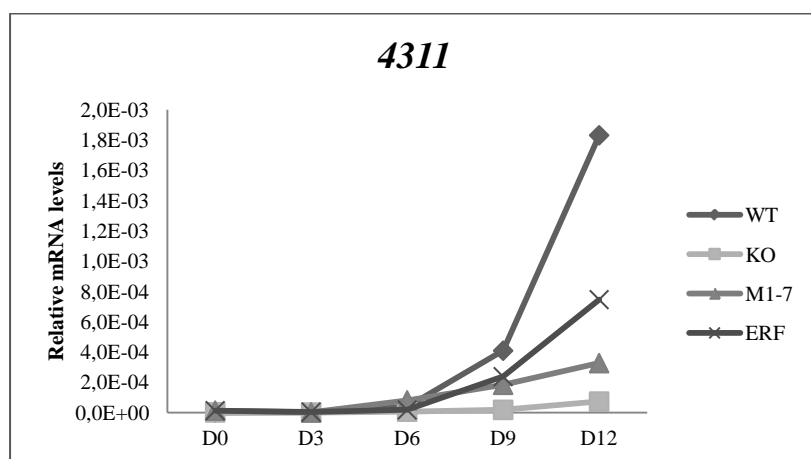
Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Cdx2* που μελετήθηκε αρχικά, παρουσιάζονται στο διάγραμμα 1. Το *Cdx2* γονίδιο είναι χαρακτηριστικό του βλαστικού χαρακτήρα των τροφοβλαστικών κυττάρων και κατά τη διαφοροποίησή τους παρουσιάζει καθοδική πορεία στα επίπεδα έκφρασης. Στο διάγραμμα φαίνεται πως το μοτίβο έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου-μάρτυρα είναι ελαττούμενο και στους 4 υπό μελέτη κλώνους, αποδεικνύοντας πως τα κύτταρα διαφοροποιούνται. Αυτό που αξίζει

να παρατηρήσουμε σε αυτό το διάγραμμα είναι η καμπύλη των ΚΟ κυττάρων. Υποδεικνύει μια ομαλή πορεία διαφοροποίησής τους, παρατηρώντας επίσης πως το γονίδιο *Cdx2* παραμένει σε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης κατά το τέλος του πειράματος αυτού, που ορίζεται η δωδεκάτη ημέρα. Όπως γνωρίζουμε και με τα μέχρι τώρα δεδομένα, τα ΚΟ κύτταρα αργούν να διαφοροποιηθούν και αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας.



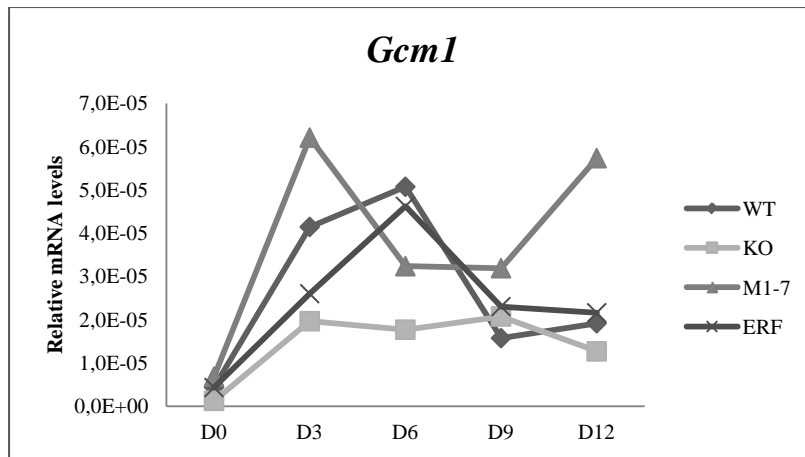
Διάγραμμα 1. Μελέτη επιπέδων έκφρασης του γονιδίου-μάρτυρα *Cdx2* με RT-PCR. Τα επίπεδα έκφρασης μειώνονται καθώς τα κύτταρα διαφοροποιούνται. Τα ΚΟ κύτταρα ανθίστανται στη διαφοροποίηση. WT: τροφοβλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου, ΚΟ: τροφοβλαστικά κύτταρα knock-out, ERF: τροφοβλαστικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ERF, M1-7: τροφοβλαστικά κύτταρα που υπερεκφράζουν το μετάλλαγμα ERF M1-7.

Ο επόμενος μάρτυρας, του οποίου τα επίπεδα έκφρασης μελετήθηκαν, είναι ο *Trhra* (4311), που αποτελεί γονίδιο χαρακτηριστικό της σπογγιοτροφοβλαστικής γενεαλογίας. Συγκριτικά, για τους τέσσερις υπό μελέτη κλώνους, το γονίδιο 4311 παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα αγρίου τύπου και ακολουθούν τα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ERF, αυτά που υπερεκφράζουν το μετάλλαγμα M1-7 και τέλος τα ΚΟ παρουσιάζουν τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης (διάγραμμα 2).



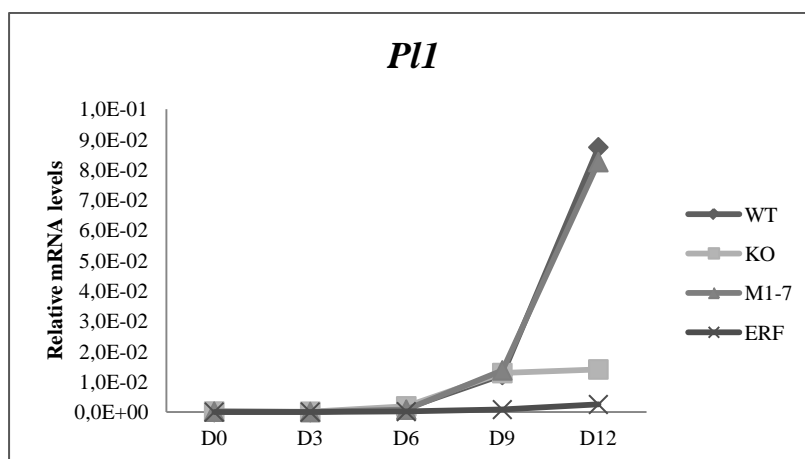
Διάγραμμα 2. Μελέτη επιπέδων έκφρασης του γονιδίου-μάρτυρα *Trhpa(4311)* με RT-PCR. Τα επίπεδα έκφρασης αυξάνονται καθώς τα κύτταρα διαφοροποιούνται. Τα KO κύτταρα ανθίστανται στη διαφοροποίηση προς αυτή την κατεύθυνση. Τα WT κύτταρα εμφανίζουν τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης. WT: τροφοβλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου, KO: τροφοβλαστικά κύτταρα knock-out, ERF: τροφοβλαστικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ERF, M1-7: τροφοβλαστικά κύτταρα που υπερεκφράζουν το μετάλλαγμα ERF M1-7.

Στο διάγραμμα 3, παρουσιάζεται το μοτίβο έκφρασης του γονιδίου *Gcm1* που αφορά στην πρώιμη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων προς τη συγκυτιοτροφοβλαστική γενεαλογία. Και οι τέσσερις κλώνοι που εξετάστηκαν παρουσιάζουν το αναμενόμενο μοτίβο έκφρασης για το συγκεκριμένο γονίδιο. Τα KO κύτταρα παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης και αυτό είναι κάτι το αναμενόμενο καθώς στα KO ποντίκια απουσιάζει η στοιβάδα της συγκυτιοτροφοβλάστης και ο λαβύρινθος. Κάτι το οποίο πρέπει να σημειωθεί επίσης είναι η αυξημένη έκφραση του *Gcm1* στα M1-7 κύτταρα, φανερώνοντας τη δυναμική των κυττάρων αυτών προς τη συγκυτιοτροφοβλαστική γενεαλογία.



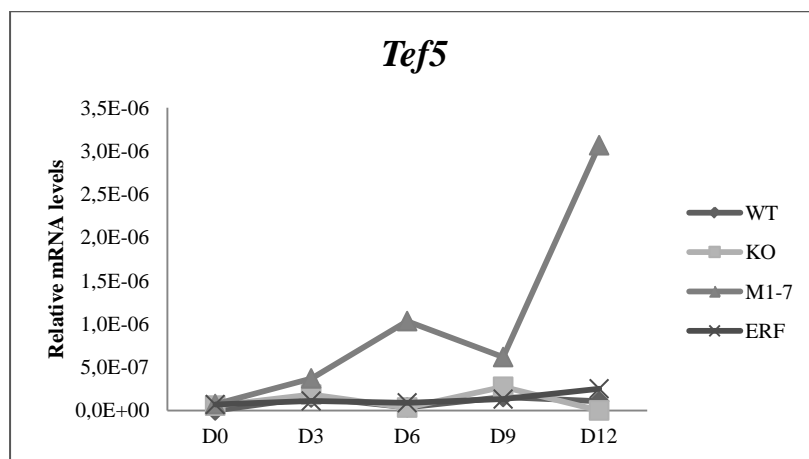
Διάγραμμα 3. Μελέτη επιπέδων έκφρασης του γονιδίου-μάρτυρα *Gcm1* με RT-PCR. Όλες οι κυτταρικές σειρές εμφανίζουν το αναμενόμενο μοτίβο έκφρασης, σημειώνοντας τα υψηλότερα επίπεδα για τον κλώνο M1-7 και τα χαμηλότερα για τα KO κύτταρα. WT: τροφοβλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου, KO: τροφοβλαστικά κύτταρα knock-out, ERF: τροφοβλαστικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ERF, M1-7: τροφοβλαστικά κύτταρα που υπερεκφράζουν το μετάλλαγμα ERF M1-7.

Ο επόμενος μάρτυρας που εξετάστηκε είναι ο *Pli*, η έκφραση του οποίου παρουσιάζεται στο διάγραμμα 4. Ο μάρτυρας αυτός αφορά στα γιγαντιαία κύτταρα και παρουσιάζει το αναμενόμενο μοτίβο αυξανόμενης έκφρασης για όλους τους κλώνους τροφοβλαστικών κυττάρων. Οι κλώνοι που εκφράζουν το γονίδιο-μάρτυρα σε υψηλότερα επίπεδα είναι τα αγρίου τύπου και τα M1-7, ακολουθούν τα KO και τέλος τη χαμηλότερη έκφραση παρουσιάζουν τα ERF.



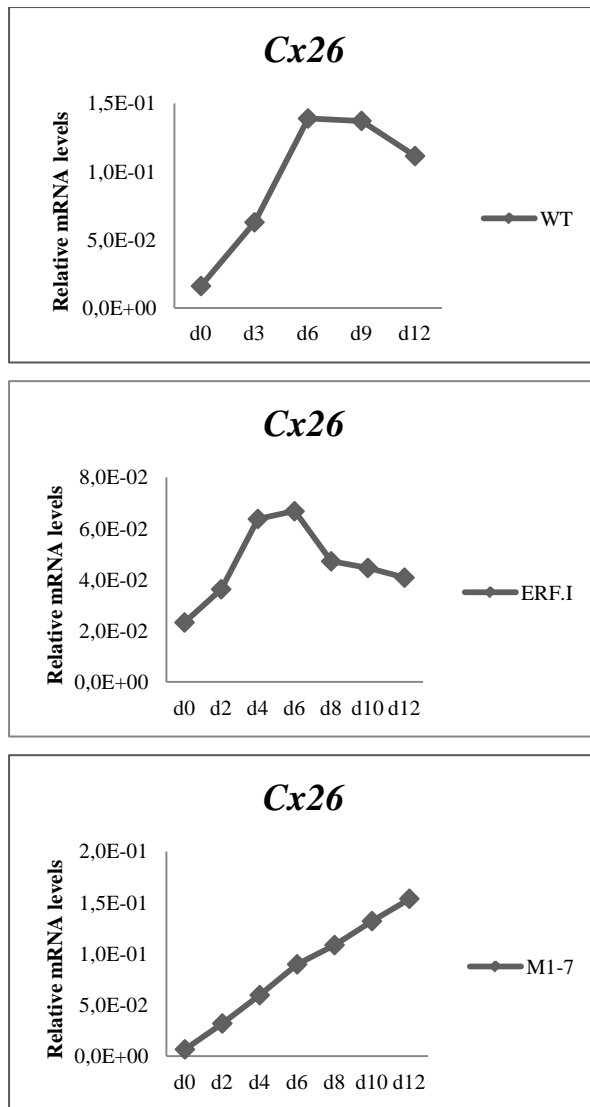
Διάγραμμα 4. Μελέτη επιπέδων έκφρασης του γονιδίου-μάρτυρα *Pli* με RT-PCR. Τα επίπεδα έκφρασης αυξάνονται καθώς τα κύτταρα διαφοροποιούνται. Τα ERF κύτταρα παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης, ακολουθούν τα KO κύτταρα ενώ τα WT και τα M1-7 κύτταρα εμφανίζουν τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης. WT: τροφοβλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου, KO: τροφοβλαστικά κύτταρα knock-out, ERF: τροφοβλαστικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ERF, M1-7: τροφοβλαστικά κύτταρα που υπερεκφράζουν το μετάλλαγμα ERF M1-7.

Το διάγραμμα 5 μελετά το μοτίβο έκφρασης του γονιδίου-μάρτυρα *Tef5*, ειδικού για τη συγκυτιοτροφοβλαστική γενεαλογία. Μόνον ο κλώνος M1-7 φαίνεται να εκφράζει το γονίδιο αυτό, δείχνοντας πως η πυρηνική μορφή του Erf ωθεί τα κύτταρα προς συγκυτιοτροφοβλάστες. Το γεγονός αυτό είναι κάτι το αναμενόμενο διότι απουσία Erf τα ποντίκια αποτυγχάνουν να επιβιώσουν λόγω έλλειψης συγκυτιοτροφοβλάστης και λαβυρίνθου. Άρα, ο ρόλος του Erf είναι πιθανώς η ρύθμιση της διαφοροποίησης των χοριακών κυττάρων προς συγκυτιοκύτταρα.



Διάγραμμα 5. Μελέτη επιπέδων έκφρασης του γονιδίου-μάρτυρα *Tef5* με RT-PCR. Έκφραση του γονιδίου αυτού παρατηρείται μόνο στα M1-7 κύτταρα. WT: τροφοβλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου, KO: τροφοβλαστικά κύτταρα knock-out, ERF: τροφοβλαστικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον Erf, M1-7: τροφοβλαστικά κύτταρα που υπερεκφράζουν το μετάλλαγμα Erf M1-7.

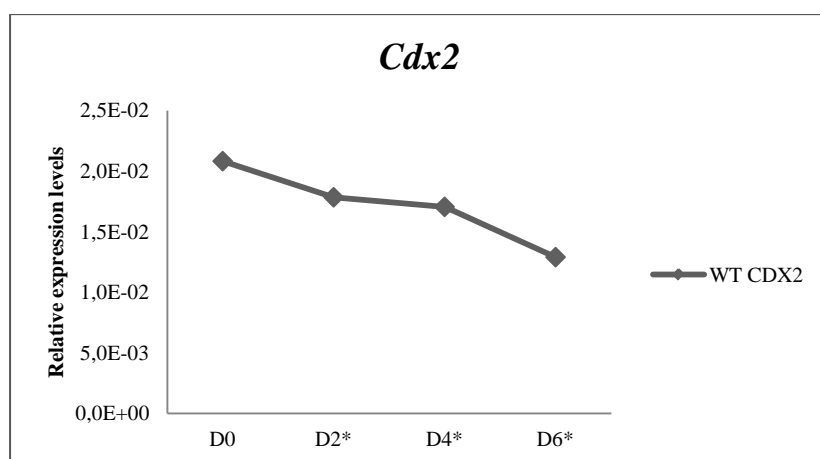
Το δυναμικό αυτό διαφοροποίησης των M1-7 κυττάρων προς συγκυτιοτροφοβλάστες εξετάστηκε με ένα επιπλέον γονίδιο-μάρτυρα, την κοννεξίνη *Cx26*. Η πρωτεΐνη αυτή συμμετέχει στους χασματοσυνδέσμους που συνδέουν τις συγκυτιοτροφοβλαστικές στοιβάδες του λαβυρίνθου, μεσολαβώντας έτσι στην επικοινωνία της μητρικής αιματικής κυκλοφορίας με το αναπτυσσόμενο έμβρυο. Το μοτίβο έκφρασης του μάρτυρα αυτού στα αγρίου τύπου κύτταρα και σε αυτά που υπερεκφράζουν τον Erf είναι το αναμενόμενο (διαγράμματα 6). Σε αντίθεση, στα M1-7 κύτταρα, τα επίπεδα έκφρασης του μάρτυρα αυτού έχει συνεχώς ανοδική πορεία, φτάνοντας στο μέγιστο της έκφρασης κατά τη δωδεκάτη μέρα της διαφοροποίησης (διάγραμμα 6). Αυτό αποτελεί μια ακόμα ισχυρή ένδειξη για τη συμβολή του Erf στη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων προς τη συγκυτιοτροφοβλαστική γενεαλογία *in vitro*.



Διάγραμμα 6-7-8. Μελέτη επιπέδων έκφρασης του γονιδίου-μάρτυρα Cx26 με RT-PCR. Τα επίπεδα έκφρασης ακολουθούν το αναμενόμενο μοτίβο για τους κλώνους WT και ERF. Αντιθέτως, το μοτίβο έκφρασης για τον κλώνο M1-7 είναι συνεχώς αυξανόμενο φανερόνοντας το δυναμικό διαφοροποίησης των κυττάρων αυτών προς τη συγκυτιοτροφοβλαστική γενεαλογία. WT: τροφοβλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου, KO: τροφοβλαστικά κύτταρα knock-out, ERF: τροφοβλαστικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον Erf, M1-7: τροφοβλαστικά κύτταρα που υπερεκφράζουν το μετάλλαγμα Erf M1-7.

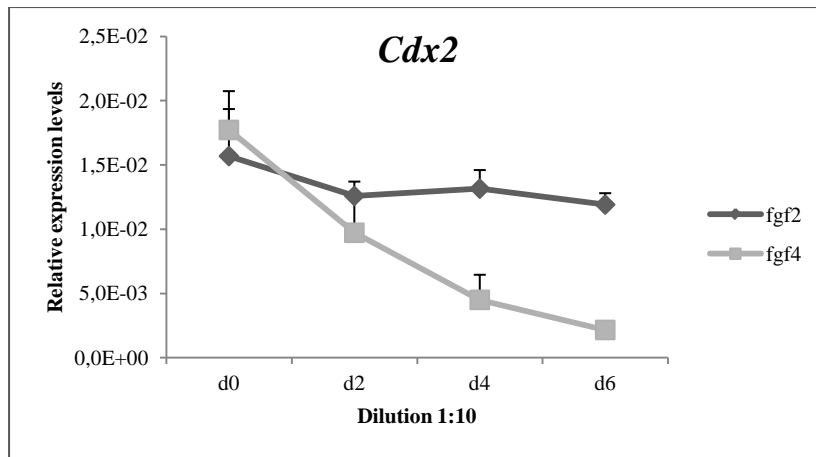
Για την καλλιέργεια των τροφοβλαστικών κυττάρων *in vitro* σε αδιαφοροποίητη κατάσταση είναι απαραίτητη, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η παρουσία του αυξητικού παράγοντα fgf4 στο υγρό θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Από πειράματα ChIP-seq που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό μας για την εύρεση πιθανών γονιδίων-στόχων του Erf, βρέθηκε ότι το γονίδιο του αυξητικού παράγοντα fgf2 μπορεί να υπόκειται στη ρύθμιση του Erf.

Το πρώτο ερώτημα που τέθηκε υπό μελέτη είναι το κατά πόσο ο fgf2 μπορεί να διατηρήσει τα τροφοβλαστικά κύτταρα σε αδιαφοροποίητη κατάσταση, όπως κάνει ο fgf4. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε τροφοβλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου τα οποία καλλιεργήθηκαν *in vitro* σε θρεπτικό μέσο που περιείχε την ίδια συγκέντρωση fgf2 με την απαιτούμενη συγκέντρωση του fgf4, το 1/10 και το 1/30 της απαραίτητης συγκέντρωσης fgf4 αλλά και fgf2, για να μπορέσουμε να συγκρίνουμε τη συμβολή των δύο αυτών αυξητικών παραγόντων στη διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης των τροφοβλαστικών κυττάρων. Με χρήση 25μg/ml fgf2 βλέπουμε πως τα κύτταρα διατηρούνται σε αδιαφοροποίητη κατάσταση μιας και με το πέρας των ημερών τα επίπεδα έκφρασης του *Cdx2* διατηρούνται στα επίπεδα που χαρακτηρίζουν τα κύτταρα ως αδιαφοροποίητα (διάγραμμα 9).



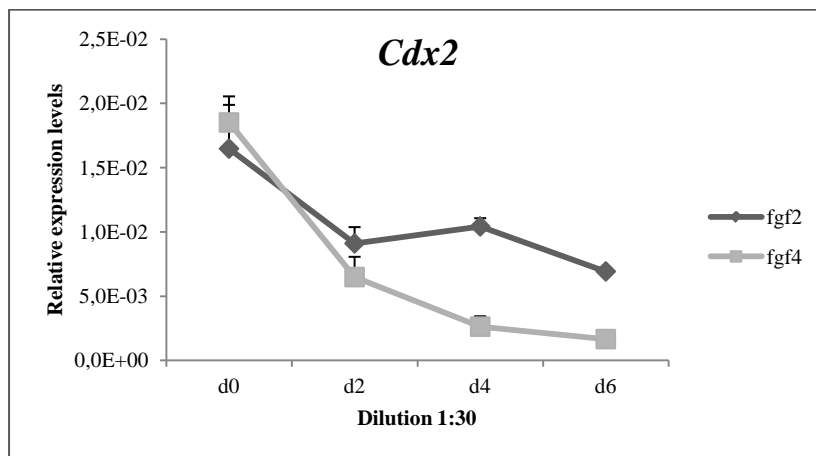
Διάγραμμα 7. Μελέτη επιπέδων έκφρασης του γονιδίου-μάρτυρα *Cdx2* με RT-PCR. Πείραμα καλλιέργειας τροφοβλαστικών κυττάρων αγρίου τύπου παρουσία fgf2 σε συγκέντρωση 25μg/ml. Τα επίπεδα έκφρασης παραμένουν στα επίπεδα αυτά που χαρακτηρίζουν τα κύτταρα ως αδιαφοροποίητα. WT: τροφοβλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου.

Στο διάγραμμα 10 παρουσιάζεται η πορεία διαφοροποίησης των κυττάρων αγρίου τύπου παρουσία fgf4 ή fgf2 σε συγκέντρωση 2.5 ng/ml, δηλαδή στο 1/10 της απαραίτητης συγκέντρωσης. Μάρτυρα για την πορεία διαφοροποίησης αποτέλεσε το γονίδιο *Cdx2*, το οποίο κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης έχει φθίνουσα έκφραση. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν με προσθήκη fgf2 στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας διατήρησαν τα επίπεδα του *Cdx2* σε υψηλότερα επίπεδα, άρα διαφοροποιήθηκαν λιγότερο.



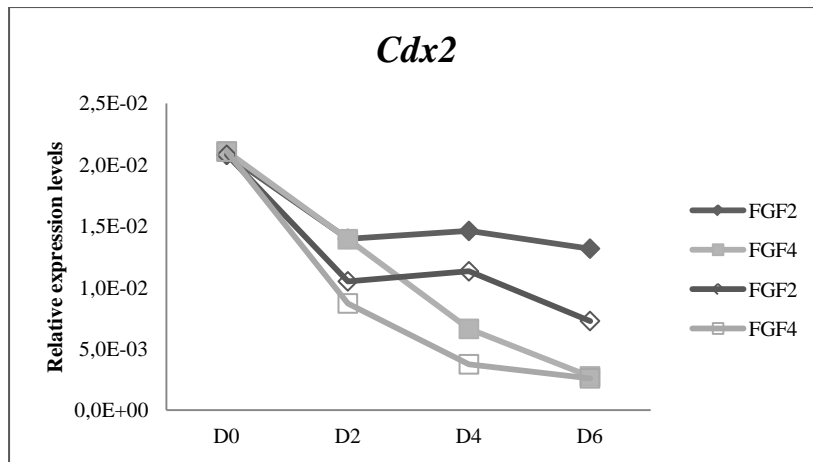
Διάγραμμα 10. Μελέτη επιπέδων έκφρασης του γονιδίου-μάρτυρα *Cdx2* με RT-PCR. Πείραμα καλλιέργειας τροφοβλαστικών κυττάρων αγρίου τύπου παρουσία fgf2 ή fgf4 σε συγκέντρωση 2.5μg/ml (1/10 της απαραίτητης συγκέντρωσης). Τα επίπεδα έκφρασης παραμένουν σε υψηλότερα επίπεδα στα κύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία fgf2 συγκριτικά με τον fgf4. WT: τροφοβλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου.

Το ίδιο παρατηρείται και όταν σε διαφοροποίηση των κυττάρων έγινε προσθήκη fgf4 ή fgf2 σε συγκέντρωση 1/30 της απαραίτητης (0.8 ng/ml). Αυτό φαίνεται στο διάγραμμα 11, όπου έγινε χρήση πάλι του γονιδίου-μάρτυρα *Cdx2*.



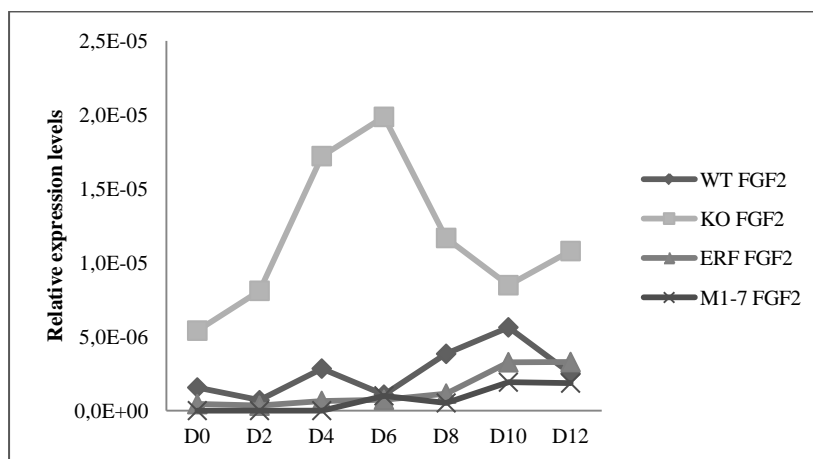
Διάγραμμα 11. Μελέτη επιπέδων έκφρασης του γονιδίου-μάρτυρα *Cdx2* με RT-PCR. Πείραμα καλλιέργειας τροφοβλαστικών κυττάρων αγρίου τύπου παρουσία fgf2 ή fgf4 σε συγκέντρωση 0.8μg/ml (1/30 της απαραίτητης συγκέντρωσης). Τα επίπεδα έκφρασης παραμένουν σε υψηλότερα επίπεδα στα κύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία fgf2 συγκριτικά με τον fgf4. WT: τροφοβλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου.

Αν βάλουμε συγκεντρωτικά τα παραπάνω δεδομένα σε κοινό διάγραμμα (12), θα δούμε πως ο fgf2 είναι σε θέση να συμβάλλει σε μεγαλύτερο βαθμό στην αδιαφοροποίητη κατάσταση των τροφοβλαστικών κυττάρων, πράγμα το οποίο αποτελεί καινοτομία στη μέχρι στιγμής γνώση.



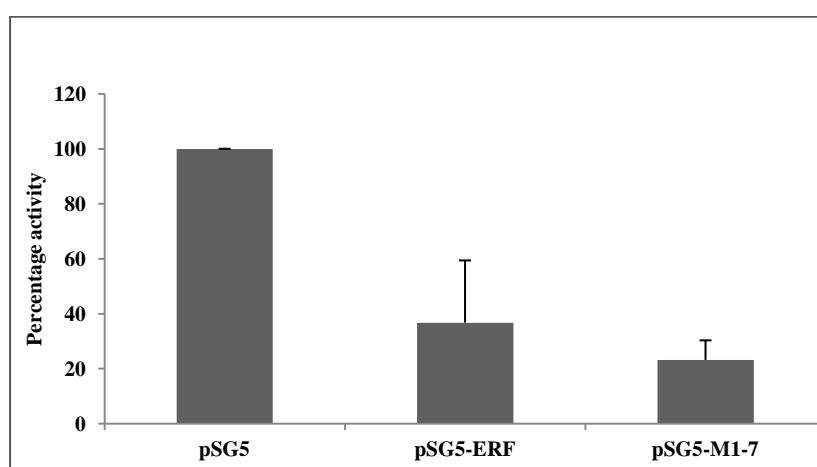
Διάγραμμα 12. Μελέτη επιπέδων έκφρασης του γονιδίου-μάρτυρα *Cdx2* με RT-PCR. Πείραμα καλλιέργειας τροφοβλαστικών κυττάρων αγρίου τύπου παρουσία *fgf2* ή *fgf4* σε συγκέντρωση 2.5μg/ml (1/10 της απαραίτητης συγκέντρωσης) (γεμάτος δείκτης) και 0.8 μg/ml (1/30 της απαραίτητης συγκέντρωσης) (κενός δείκτης). Τα επίπεδα έκφρασης παραμένουν σε υψηλότερα επίπεδα στα κύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία *fgf2* συγκριτικά με τον *fgf4*. WT: τροφοβλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου.

Με μελέτη των επιπέδων έκφρασης του *fgf2* κατά τη διάρκεια διαφοροποίησης τροφοβλαστικών κυττάρων (WT, KO, ERF και M1-7) με Real-Time PCR, προκύπτει το διάγραμμα 13. Το διάγραμμα αυτό αποκαλύπτει τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του αυξητικού παράγοντα στα KO κύτταρα, ενώ στους υπόλοιπους κλώνους τα επίπεδα αυτά είναι σαφώς μειωμένα. Το γεγονός αυτό αποτελεί μια επιπλέον ένδειξη ότι ο *Erf* μπορεί να ρυθμίζει το γονίδιο του *Fgf2*, καταστέλλοντας την έκφρασή του.



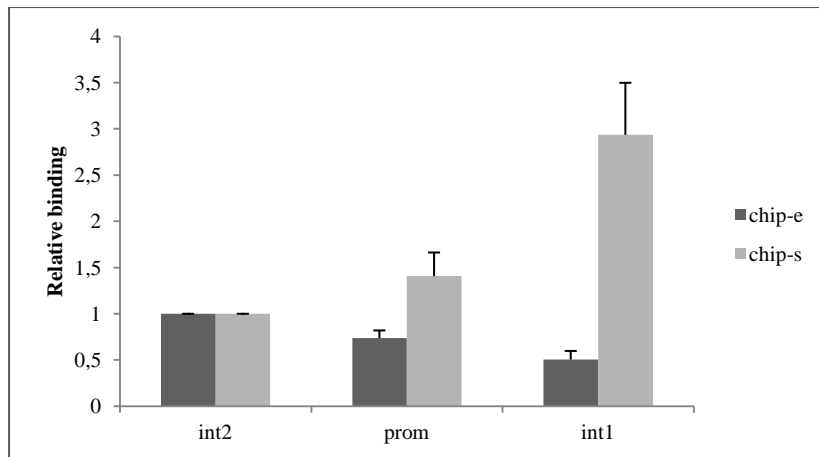
Διάγραμμα 8. Μελέτη επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *fgf2* με RT-PCR. Η έκφραση του *fgf2* καταστέλλεται παρουσία *Erf* ενώ στα KO κύτταρα διατηρείται σε υψηλότερα επίπεδα. WT: τροφοβλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου, KO: τροφοβλαστικά κύτταρα knock-out, ERF: τροφοβλαστικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον *Erf*, M1-7: τροφοβλαστικά κύτταρα που υπερεκφράζουν το μετάλλαγμα *Erf* M1-7.

Για να μελετήσουμε περαιτέρω την πιθανή ρύθμιση που μπορεί να πραγματοποιεί ο ERF στον υποκινητή του γονιδίου του *fgf2*, έγινε κατασκευή πλασμιδίου, στο οποίο το γονίδιο της λουσιφεράσης τέθηκε υπό τον έλεγχο του υποκινητή του *Fgf2*. Κύτταρα HeLa επιμόλυνθηκαν με το πλασμίδιο της λουσιφεράσης, επίσης με πλασμίδιο pSG5 ή pSG5-ERF ή pSG5-ERF M1-7 καθώς και με το πλασμίδιο SV40 LacZ, που φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης. Τα πειράματα επιμόλυνσης έδειξαν πως τα επίπεδα έκφρασης της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή του *Fgf2* μειώνονταν κατά 60% περίπου παρουσία ERF ενώ υπάρχει ελάττωση περίπου κατά 80% παρουσία του πυρηνικού ERF (διάγραμμα 14).



Διάγραμμα 9. Δοκιμασία λουσιφεράσης. Το γονίδιο της λουσιφεράσης βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του *fgf2*. Σε πειράματα παροδικής επιμόλυνσης HeLa κυττάρων με πλασμίδια που φέρουν τον ERF (pSG5-ERF) ή την πυρηνική μορφή του (pSG5 M1-7) αποδείχθηκε η καταστολή της έκφρασης της λουσιφεράσης κατά περίπου 60% και 80%, αντίστοιχα. Οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές με $P < 0.05$ (t-test).

Οι διαφορές αυτές χαρακτηρίζονται ως στατιστικά σημαντικές και αποτελούν μια ακόμα ένδειξη για την πιθανή ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου του *Fgf2* από τον ERF. Επιπροσθέτως, με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε τροφοβλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου σε συνθήκες κανονικές αλλά και απουσίας ορού, δείχτηκε ότι υπάρχει αυξημένη πρόσδεση κατά 1,5 φορές του ERF στον υποκινητή του *Fgf2* και κατά 3 φορές περισσότερο στο εσώνιο 1 σε σύγκριση με το εσώνιο 2, που ξέρουμε πως ο ERF δεν προσδένεται καθόλου. Τα παραπάνω αποτελούν επιπλέον αποδείξεις για την πιθανή ρύθμιση του γονιδίου του *Fgf2* από τον ERF (διάγραμμα 15).

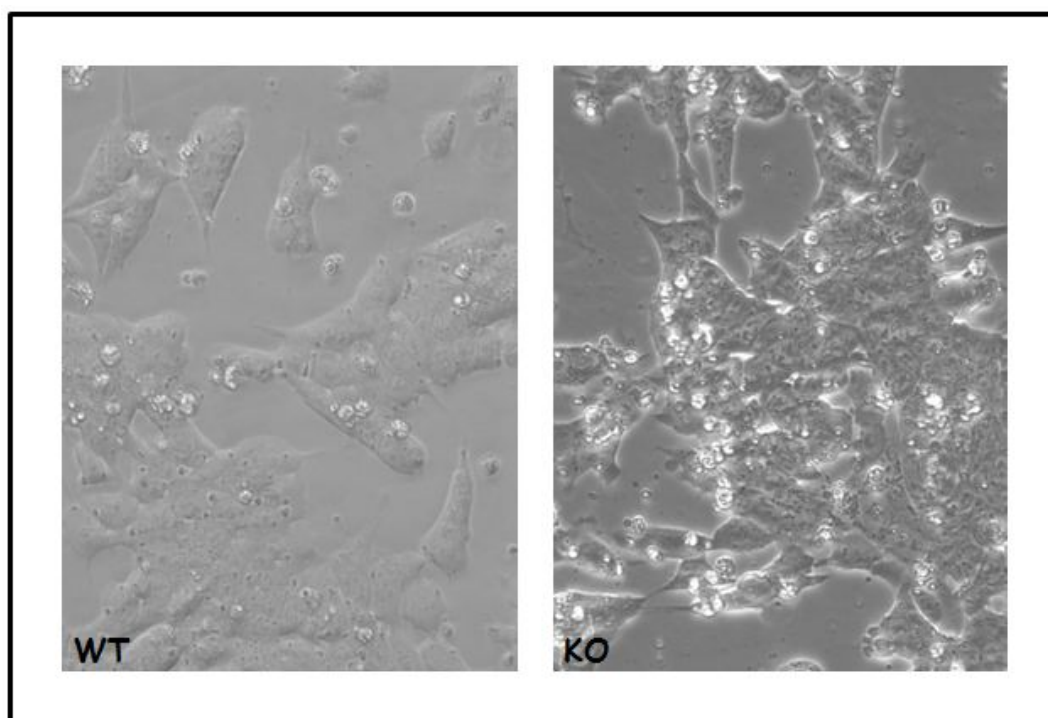


Διάγραμμα 10. Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης σε τροφοβλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου. Αλληλεπίδραση του Etf με τα στοιχεία int2, prom και int1 του *Fgf2* *in vivo* σε κύτταρα παρουσία και απουσία ορού. Ο Etf προσδένεται 3 φορές περισσότερο στο ιντρόνιο 1 συγκριτικά με το ιντρόνιο 2 και επρίπου 1.5 φορές περισσότερο στον υποκινητή σχετικά με το ιντρόνιο 2. int2: ιντρόνιο 2, prom: υποκινητής, int1: ιντρόνιο 1, chip-e: συνθήκες παρουσίας ορού, chip-s: συνθήκες απουσίας ορού.

3. ERF ΚΑΙ ΝΕΥΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ

Η μελέτη του πιθανού ρόλου του ERF κατά τη νευρική διαφοροποίηση, έγινε με χρήση εμβρυικών βλαστικών κυττάρων αγρίου τύπου (pc3) και knock-out για τον ERF (130-9), σε πειράματα *in vitro* διαφοροποίησης. Ως μέθοδος διαφοροποίησης επιλέχθηκε αρχικά η καλλιέργεια σε μονοστοιβάδα. Έγινε χρήση ειδικού θρεπτικού μέσου (NDiff, RHB-A, Stem Cell Sciences, UK) το οποίο επάγει τη νευρική διαφοροποίηση των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων. Ως ολοκλήρωση της διαφοροποίησης τέθηκε η δωδέκατη ημέρα. Κατά τις ημέρες 4 και 8, γινόταν πέρασμα των κυττάρων σε νέα τρυβλία καλλιέργειας, καθώς επίσης και λήψη φωτογραφιών και απομόνωση ολικού RNA. Η φωτογραφίες αποκαλύπτουν τη μορφολογική μεταβολή των βλαστικών κυττάρων καθώς διαφοροποιούνται, ενώ η απομόνωση RNA προσφέρει μέσο μελέτης των επιπέδων έκφρασης γονιδίων-μαρτύρων ειδικών για τα στάδια και τους κυτταρικούς τύπους της διαφοροποίησης με Real-Time PCR.

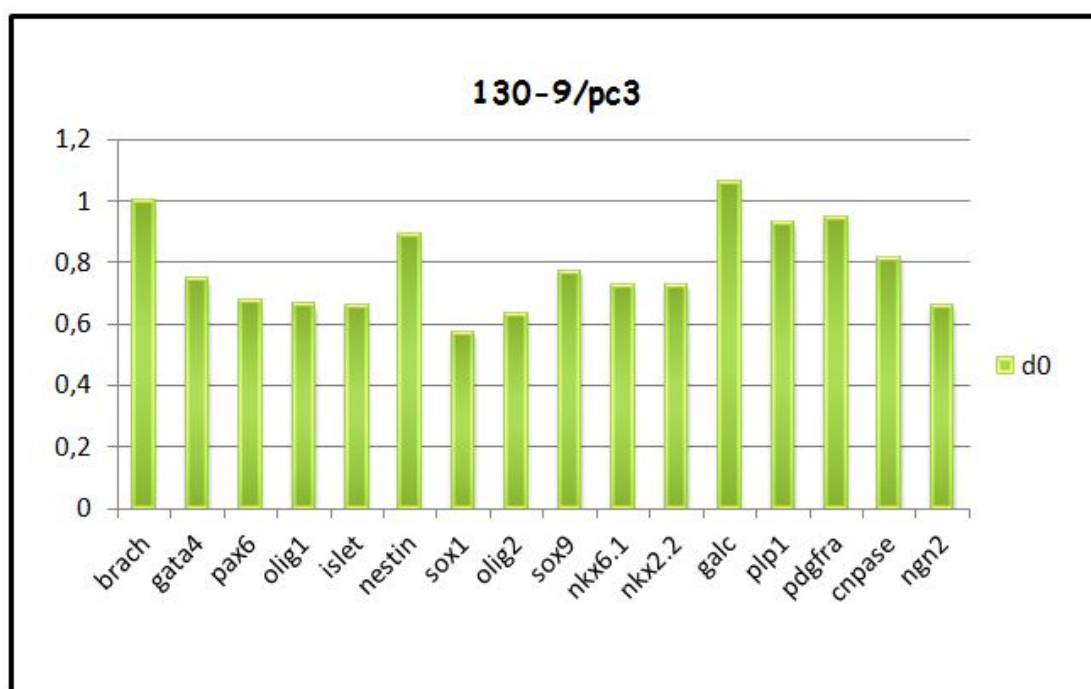
Τα αδιαφοροποίητα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα, τόσο τα αγρίου τύπου όσο και τα KO, εμφανίζουν κοινή μορφολογία η οποία απεικονίζεται στην εικόνα 7.



Εικόνα 7. Μελέτη της μορφολογίας των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων κατά την έναρξη του πειράματος διαφοροποίησης (day0). WT: εμβρυικά βλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου, KO: εμβρυικά βλαστικά κύτταρα knock-out.

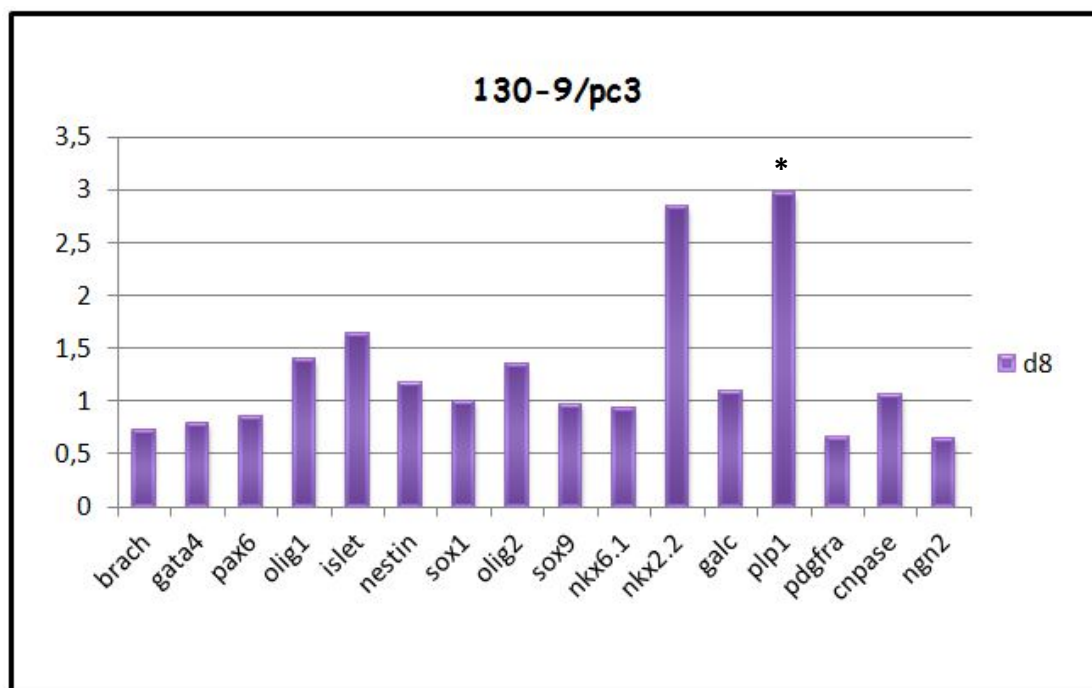
Κατά την πορεία της διαφοροποίησης, τα κύτταρα χάνουν πλέον τη σφαιρική μορφή τους και αποκτούν μορφολογία νευρωνικών κυττάρων, με εμφανείς χαρακτηριστικές δομές των κυττάρων αυτών, όπως για παράδειγμα οι άξονες και οι διακλαδισμένες απολήξεις. Από τη μορφολογία και μόνο δε μπορούμε να κρίνουμε τις διαφορές ανάμεσα στις δυο κυτταρικές σειρές ως προς το είδος των κυττάρων που προκύπτουν κατά τη διαφοροποίησή τους. Κρίνεται απαραίτητη η μελέτη των επιπέδων έκφρασης διαφόρων γονιδίων-μαρτύρων ειδικών για συγκεκριμένους τύπους κυττάρων διαφορετικής γενεαλογίας.

Τα αποτελέσματα που απεικονίζονται ως λόγοι έκφρασης στα διαγράμματα μεταξύ των ΚΟ (130-9) και αγρίου τύπου κυττάρων (pc3), προέρχονται από 6, 7 και 9 ανεξάρτητα πειράματα για τις ημέρες διαφοροποίησης 0, 8 και 12, αντίστοιχα. Την ημέρα 0 (διάγραμμα 16) οι λόγοι των γονιδίων-μαρτύρων για τα Κ.Ο. και αγρίου τύπου κύτταρα, δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.



Διάγραμμα 11. RT-PCR πραγματικού χρόνου για την ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων γονιδίων-μαρτύρων της νευρικής διαφοροποίησης σε RNA από εμβρυικά βλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου και knock-out. Τα δεδομένα βασίζονται σε σύγκριση της έκφρασης των knock-out (130-9) προς την έκφραση των αγρίου τύπου (pc3) κατά την έναρξη του πειράματος διαφοροποίησης (day0). Οι διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντικές ($P < 0.05$ t-test).

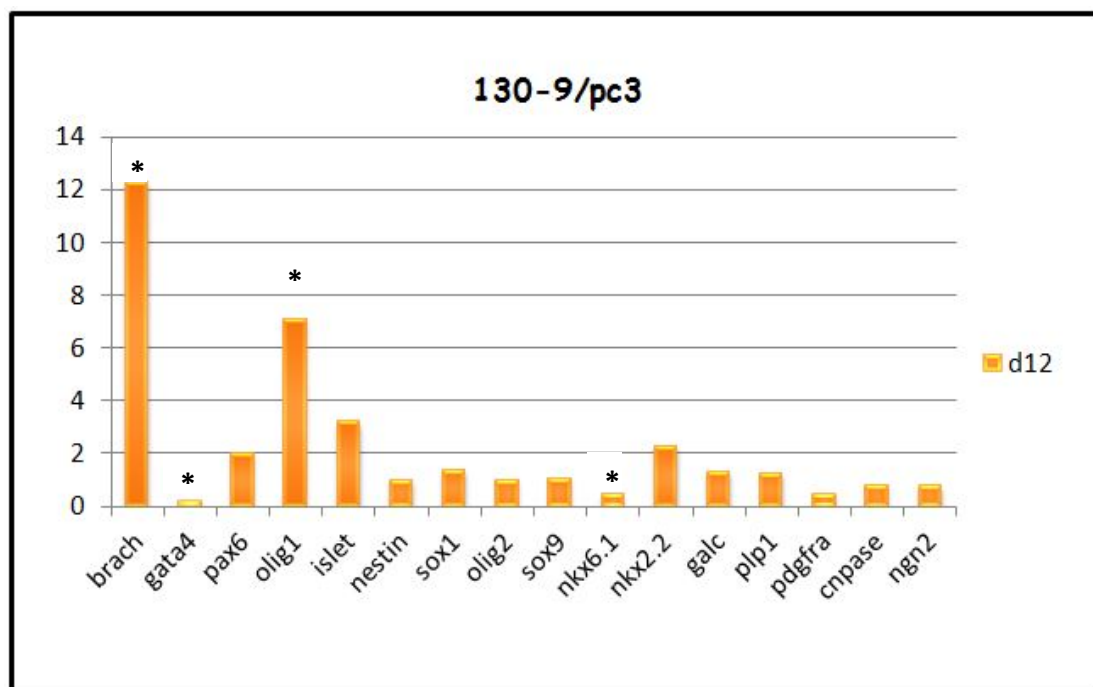
Την ημέρα 8, το γονίδιο που εμφανίζεται σε 3 φορές υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στα Κ.Ο. κύτταρα από τα αγρίου τύπου, είναι το *Plp1*, μάρτυρας ειδικός για τα ολιγοδενδροκύτταρα. Το *Nkx2.2* που φαίνεται να εκφράζεται περίπου 3 φορές υψηλότερα στα ΚΟ κύτταρα, δεν αποτελεί στατιστικά σημαντική διαφορά (διάγραμμα 17).



Διάγραμμα 12. RT-PCR πραγματικού χρόνου για την ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων γονιδίων-μαρτύρων της νευρικής διαφοροποίησης σε RNA από εμβρυικά βλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου και knock-out. Τα δεδομένα βασίζονται σε σύγκριση της έκφρασης των knock-out (130-9) προς την έκφραση των αγρίου τύπου (pc3) κατά την όγδοη ημέρα του πειράματος διαφοροποίησης (day8). Με αστερίσκο σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$ t-test).

Συνεχίζοντας στη δωδέκατη μέρα διαφοροποίησης, βλέπουμε πως υπάρχουν τέσσερα (4) γονίδια που εμφανίζουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης ανάμεσα στα ΚΟ και αγρίου τύπου κύτταρα, με στατιστικά σημαντικές διαφορές (διάγραμμα 18). Το *Brach*, μεσοδερμικός δείκτης, εμφανίζεται κατά 12 φορές υψηλότερο στα ΚΟ κύτταρα, αλλά οι τιμές κατά τη μέρα δώδεκα είναι πολύ μικρές για το γονίδιο αυτό και στις δυο κυτταρικές σειρές. Το *Gata-4*, ενδοδερμικός δείκτης, εμφανίζεται ελαττωμένος στα ΚΟ σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου κύτταρα, όμως και σε αυτή την περίπτωση, οι τιμές είναι χαμηλές. Το γονίδιο *Olig1*, μάρτυρας ολιγοδενδροκυττάρων που εμπλέκονται στη μυελίνωση, εμφανίζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης κατά επτά (7) φορές περισσότερο στα ΚΟ σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου

κύτταρα. Αντίθετα, ο μάρτυρας *Nkx6.1*, ειδικός για τους κινητικούς νευρώνες, εμφανίζεται σε υψηλότερα επίπεδα στα αγρίου τύπου κύτταρα.



Διάγραμμα 13. RT-PCR πραγματικού χρόνου για την ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων γονιδίων-μαρτύρων της νευρικής διαφοροποίησης σε RNA από εμβρυικά βλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου και knock-out. Τα δεδομένα βασίζονται σε σύγκριση της έκφρασης των knock-out (130-9) προς την έκφραση των αγρίου τύπου (pc3) κατά την τελευταία ημέρα του πειράματος διαφοροποίησης (day12). Με αστερίσκο σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$ t-test).

Τα παραπάνω στοιχεία, παρέχουν μια ένδειξη ότι απουσία του *Erf*, τα βλαστικά κύτταρα οδηγούνται προς τη γλοιακή γενεαλογία και ειδικότερα προς ολιγοδενδροκύτταρα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο *Erf* δρα κατασταλτικά στο γονίδιο του *Olig1*, αυτό προτείνει την εμπλοκή του κατά τη διαφοροποίηση των ολιγοδενδροκυττάρων. Κρίθηκε λοιπόν απαραίτητο να μεταβάλλουμε τις συνθήκες καλλιέργειας των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων κατά τα πειράματα διαφοροποίησης, εμπλουτίζοντας τους πληθυσμούς διαφοροποιημένων κυττάρων με ολιγοδενδροκύτταρα.

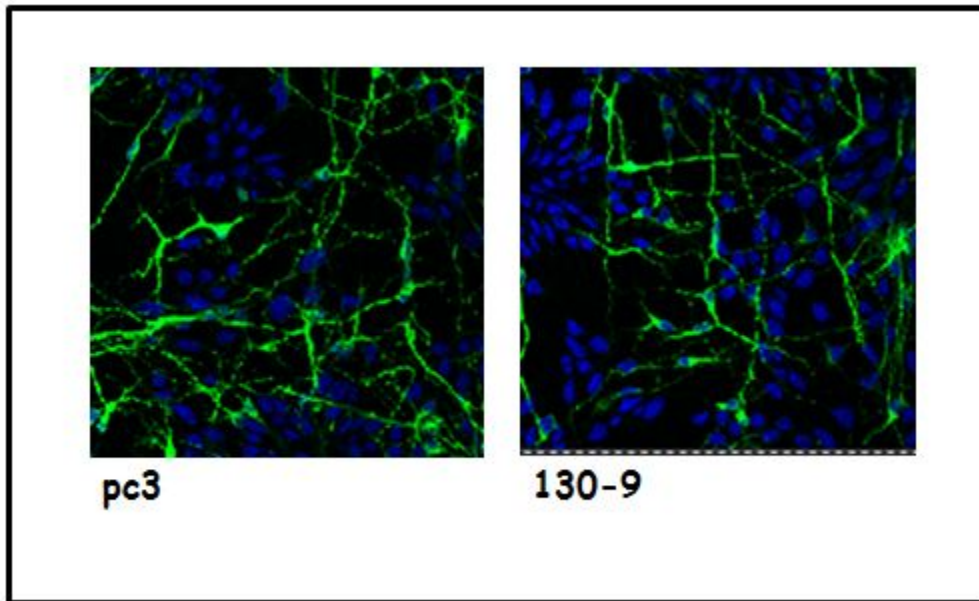
Πρώτη παράμετρος που δοκιμάστηκε είναι οι συνθήκες πυκνότητας στην καλλιέργεια. Δοκιμάζονται αραιές και πυκνές συγκεντρώσεις κυττάρων κατά την καλλιέργεια διαφοροποίησης. Αυτό που παρατηρείται είναι η αύξηση του ρυθμού και της έντασης διαφοροποίησης των κυττάρων σε πυκνότερες συνθήκες, τόσο στα ΚΟ όσο και στα αγρίου τύπου κύτταρα. Τα κύτταρα δεν παρουσιάζουν ροπή προς κάποια

συγκεκριμένη κατεύθυνση διαφοροποίησης, είτε προς νευρικά είτε προς γλοιακά. Έχουν γενικά μια εντονότερη διαφοροποιητική δραστηριότητα, χωρίς προτίμηση προς κάποια συγκεκριμένη γενεαλογία.

Σε επόμενο πείραμα διαφοροποίησης έγινε προσθήκη του παράγοντα PDGF-AA. Ο παράγοντας αυτός ρυθμίζει χρονικά τη διαφοροποίηση των ολιγοδενδροκυττάρων επάγοντας τον πολλαπλασιασμό των πρώιμων προγονικών ολιγοδενδροκυττάρων για μερικές διαιρέσεις. Η προσθήκη του PDGF-AA έγινε μετά την τέταρτη μέρα διαφοροποίησης. Οι τιμές των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων-μαρτύρων, δεν έδειξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στη διαφοροποίηση προς ολιγοδενδροκύτταρα, ούτε ανάμεσα στα ΚΟ και τα αγρίου τύπου κύτταρα, ούτε στην κάθε κυτταρική σειρά με ή χωρίς προσθήκη του παράγοντα αυτού.

Στη συνέχεια, σε νέο πείραμα διαφοροποίησης, έγινε χρήση της T3 θυροξίνης. Η T3 θυροξίνη επάγει τη διαφοροποίηση σε ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα. Η προσθήκη έγινε κατά την τέταρτη ημέρα στο πρωτόκολλο διαφοροποίησης. Παρόλα αυτά συγκρίνοντας τις τιμές των επιπέδων έκφρασης των διαφόρων γονιδίων-μαρτύρων, δεν παρατηρούμε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δυο κυτταρικές σειρές.

Πέρα από τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων-μαρτύρων με Real-Time PCR, είναι αναγκαίο να μπορούμε και σε πρωτεϊνικό επίπεδο να ελέγχουμε την έκφραση ειδικών μαρτύρων με ανοσοεντοπισμό. Έγινε λοιπόν σήμανση με αντισώματα ειδικά για διάφορους πρωτεϊνικούς επιτόπους στην επιφάνεια των διαφοροποιημένων κυττάρων. Τα περισσότερα από τα κύτταρα που εμφανίζονταν θετικά για την έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνικών-μαρτύρων, αφορούσαν νευρικά κύτταρα και όχι γλοιακά (εικόνα 8 - νευρικός μάρτυρας TuJ1). Αυτό ήταν μια ακόμα ένδειξη για την ύπαρξη περισσότερων νευρικών κυττάρων στην καλλιέργεια και όχι γλοιακών, γεγονός που επέβαλλε τη μετατροπή του πρωτόκολλου διαφοροποίησης ώστε να επιτευχθεί ο εμπλουτισμός του πληθυσμού σε γλοιακά κύτταρα και πιο συγκεκριμένα σε ολιγοδενδροκύτταρα.



Εικόνα 8. Ανοσοφθορισμός σε διαφοροποιημένα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα. Εντοπισμός της έκφρασης του πρωτεϊνικού μάρτυρα Tuj1 ειδικού για τα νευρικά κύτταρα. Τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα αγρίου τύπου (pc3) και τα knock-out για τον Egf παρουσιάζουν παρόμοια έκφραση του μάρτυρα.

ΜΑΡΤΥΡΕΣ ΓΙΑ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ

Ένα σημαντικό ζήτημα για τη μελέτη των νευρικών βλαστικών κυττάρων είναι η αναγνώριση των απογόνων τους, δηλαδή των διαφοροποιημένων και δεσμευμένων κυττάρων. Υπάρχει πληθώρα αντισωμάτων για τη σήμανση διαφοροποιημένων κυττάρων που προέρχονται από νευρικά βλαστικά κύτταρα. Εξαιτίας της έλλειψης πλήρως ειδικών μαρτύρων, κρίνεται αναγκαίος ο συνδυασμός τους για τη σωστή αναγνώριση.

ΓΟΝΙΔΙΑ-ΜΑΡΤΥΡΕΣ ΤΗΣ ΝΕΥΡΙΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

- Nanog: μάρτυρας αδιαφοροποίητων εμβρυικών βλαστικών κυττάρων[168]
- Oct4: μάρτυρας αδιαφοροποίητων εμβρυικών βλαστικών κυττάρων[169]

- Sox2: μάρτυρας αδιαφοροποίητων εμβρυικών βλαστικών κυττάρων[170]
- Brach: μεσόδερμα[171]
- Gata-4: ενδόδερμα[171]
- Gata-6: ενδόδερμα[171]
- Olig1: μυελινοποιητικά ολιγοδενδροκύτταρα[167, 172-174]
- Olig2: ολιγοδενδροκύτταρα[167, 172-175]
- Sox9: νευρικά βλαστικά κύτταρα, γλοιακά κύτταρα του ΚΝΣ, απαραίτητος για ολιγοδενδροκύτταρα και αστροκύτταρα[176-179]
- Nkx2.2: πρωταρχικός ρόλος στον καθορισμό του κοιλιακού νευρικού μοτίβου, ολιγοδενδροκύτταρα[175, 180]
- Galc: ανώριμα ολιγοδενδροκύτταρα, μη-μυελινοποιητικά ολιγοδενδροκύτταρα, ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα[175, 181]
- Plp1: ολιγοδενδροκύτταρα[175, 182-183]
- Pdgfr-a: πρόδρομα ολιγοδενδροκύτταρα[183-184]
- Cnp-ase: ολιγοδενδροκύτταρα (όλων των σταδίων)[175, 183, 185]
- Pax6: νευροεπιθήλιο[180]
- Islet-1: πρώιμος μάρτυρας της διαφοροποίησης των κινητικών νευρώνων και των κοιλιακών διάμεσων νευρώνων[186]
- Nestin: προγονικά κύτταρα, νευροβλάστες, νευροεπιθήλιο, σωματικό μεσόδερμα[183, 187]
- Sox1: νευροεπιθήλιο της νευρικής πλάκας, διαιρούμενα προγονικά νευρικά κύτταρα[180, 188]
- Nkx6.1: προωθεί τους κινητικούς νευρώνες, καταστέλλει τους διάμεσους νευρώνες[189]
- Ngn2: προγονικά κύτταρα/ νευροβλάστες, απαιτείται για την ανάπτυξη του κοιλιακού μεσεγκέφαλου, ντοπαμινεργικοί νευρώνες[180].

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η μελέτη της ρύθμισης του προγράμματος διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού των βλαστικών κυττάρων στα πλαίσια της Ras/Erk οδού μέσω του μεταγραφικού παράγοντα *Erf*.

Ο Erf είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας με έντονη κατασταλτική δράση. Ο ρόλος του Erf, όπως ερμηνεύεται από τα αποτελέσματα της έρευνάς μας, είναι να μπορεί να μεταδίδει στα κύτταρα το μήνυμα για την απουσία του σήματος. Η παρουσία του Erf είναι απαραίτητη ώστε τα κύτταρα του εκάστοτε συστήματος να μπορούν να καταλάβουν με βεβαιότητα την απουσία του μιτογόνου ερεθίσματος. Αυτό για το κάθε σύστημα μεταφράζεται ως εξής: 1) η διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων προς συγκυτιοτροφοβλάστες εξαρτάται από την καταστολή της σηματοδότησης μέσω του fgf2, 2) στα νευρικά βλαστικά κύτταρα ο Erf καλείται να καταστείλει τη σηματοδότηση μέσω του PDGF που οδηγεί σε ενεργοποίηση του *Olig1* γονιδίου με αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση σε ολιγοδενδροκύτταρα και 3) η παρουσία του Erf κατά τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων του κρανίου κρίνεται απαραίτητη για το σωστό συγχρονισμό της έναρξης της οστεοποίησης μέσω διέγερσης από τους FGF. Με λίγα λόγια, η παρουσία του Erf είναι τόσο μεγάλης σημασίας ώστε ανά πάσα στιγμή τα κύτταρα να μπορούν να αναγνωρίσουν την έλλειψη έκφρασης κάποιων παραγόντων και έτσι να είναι σε θέση να σταματήσουν να πολλαπλασιάζονται και να μπουν σε πρόγραμμα διαφοροποίησης ή/και να δεσμευτούν προς συγκεκριμένη κατεύθυνση στο πρόγραμμα διαφοροποίησής τους. Αναλυτικά για το κάθε σύστημα που μελετήθηκε κατά την παρούσα διατριβή προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα και οι ακόλουθες παρατηρήσεις.

1. ERF ΚΑΙ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΩΣΗ

Οι κινάσες ERK1/2 είναι κύριες πρωτεΐνες που μεσολαβούν στη σηματοδότηση στον κατάρρου των RAS, έπειτα από μιτογόνο ερέθισμα. Φωσφορυλίωση των ERK1/2 οδηγεί στη μεταφορά τους στον πυρήνα όπου και ρυθμίζουν πολλαπλούς στόχους [190]. Στην παρούσα μελέτη δείξαμε πως μειωμένα επίπεδα του μεταγραφικού καταστολέα E1f προκαλεί σύνθετη κρανιοσυνόστωση στους ανθρώπους και τα ποντίκια.

Χαρακτηριστικά γνωρίσματα της πρόσφατα αναγνωρισμένης αυτής κλινικής διαταραχής αποτελούν η πολλαπλή συνοστέωση, η κρανιοπροσωπική δυσμορφία, η δυσπλασία Chiari και η γλωσσική καθυστέρηση. Ποντίκια με μειωμένα επίπεδα λειτουργικού E1f στο ~30% των φυσιολογικών επιπέδων εμφανίζουν μεταγεννητική πολλαπλή συνοστέωση. Αντίθετα, η ανάπτυξη των εμβρυικών κρανίων εμφανίζει ήπια καθυστέρηση. Χρησιμοποιώντας ανοσοκατακρήμιση της χρωματίνης σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού καθώς και high-throughput αλληλούχιση, βρήκαμε ότι ο E1f προσδέεται με μεγάλη συνάφεια σε στοιχεία απομακρυσμένα από τους υποκινητές που περιέχουν τα RUNX και AP-1 μοτίβα. Η εργασία αυτή αναγνωρίζει τον E1f ως νέο ρυθμιστή της οστεογόνου διέγερσης μέσω RAS-ERK σηματοδότησης, πιθανώς ανταγωνιζόμενος με ETS ενεργοποιητές σε πολυπαραγοντικά μεταγραφικά σύμπλοκα.

Γενετικές παρατηρήσεις μας σε ανθρώπους και ποντίκια θα εστιάσει εκ νέου την προσοχή στο ρόλο των Ets παραγόντων στη ρύθμιση της οστεογένεσης, που αν και τεκμηριωμένη, δεν είναι καλά καθορισμένη [191-192]. Άμεση φωσφορυλίωση μέσω των Erk1/2 έχει συνδεθεί με τη διαδικασία σταθεροποίησης και/ή ενεργοποίησης του Runx2 [193-194]. Θεωρούμε ότι ασκείται επιπλέον έμμεσος έλεγχος της δράσης του Runx2 από τις Erk1/2 μέσω του ελέγχου του υποκυτταρικού εντοπισμού του E1f. Τα δεδομένα της εργασίας μας προτείνουν μια φαινοτυπική σύνδεση με μεταλλάξεις του FGFR2, καθώς σε αρκετά άτομα με κρανιοσυνόστωση σχετιζόμενη με τον E1f είχε γίνει διάγνωση για σύνδρομο Crouzon [195-196]. Η θέση του E1f στον κατάρρου του μονοπατιού RAS-MEK-ERK και η καθυστερημένη έναρξη της οστεοποίησης που σχετίζεται με την απλοανεπάρκεια του *ERF*, καθιστούν τον *ERF* ως ένα πολλά υποσχόμενο και ελκυστικό στόχο για θεραπευτική προσέγγιση.

2. Η ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΜΒΟΛΗΣ ΤΟΥ Erf ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ

Για την επίδραση του Erf στις διαδικασίες της πλακουντογένεσης, έγινε χρήση τροφοβλαστικών κυττάρων σε πειράματα *in vitro* διαφοροποίησης. Χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικοί κλώνοι τροφοβλαστικών κυττάρων: ένας αγρίου τύπου για τον Erf, ένας κλώνος με ομόζυγη απαλοιφή του Erf (Erf knock-out) και δυο κλώνοι που έπειτα από μόνιμη επιμόλυνση υπερεκφράζουν τον αγρίου τύπου Erf και το μετάλλαγμα M1-7, αντίστοιχα. Η χρήση των κυττάρων δίνει τη δυνατότητα μελέτης του κατά πόσο η παρουσία ή η απουσία του Erf μπορεί να επηρεάσει το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κυττάρων, και αν ο πυρηνικός εντοπισμός προάγει κάποια από τις διαδικασίες.

Από αυτά που γνωρίζουμε από τις *in vivo* συνέπειες της έλλειψης του Erf, ξέρουμε πως η παρουσία του είναι απαραίτητη για τη σωστή δομή του πλακούντα και τη δημιουργία δομών όπως ο λαβύρινθος και η σπογγιοτροφοβλαστική γενεαλογία. Στα έμβρυα που στερούνται έκφρασης του Erf, οι πλακούντες τους παρουσιάζουν τις εξής ανωμαλίες: τα εμβρυικά αγγεία της αλλαντοΐδας δεν εισχωρούν στο χόριο και δε σχηματίζεται λαβύρινθος. Αντίθετα παρατηρείται μία συμπαγής στοιβάδα στο χόριο, η οποία ρήγνυται στις άκρες, ενώ παραμένει και η κοιλότητα του εξωπλακουντικού κώνου. Επίσης στους μεταλλαγμένους πλακούντες παρατηρείται μια μικρή σπογγώδης στοιβάδα και μια εκτεταμένη στοιβάδα από δευτερογενή γιγαντιαία κύτταρα. Επίσης παρατηρείται καθυστέρηση στην οργανογένεση της αλλαντοΐδας και δεν πραγματοποιείται χοριοαλλαντοϊδική σύντηξη. Μία σειρά δεδομένων από τις μέχρι τώρα έρευνες στο εργαστήριό μας, και συγκεκριμένα από την ερευνήτρια Dr. Παπαδάκη [52], δείχνουν ότι απουσία του Erf επηρεάζεται τόσο το τροφοβλαστικό όσο και το εμβρυϊκό μέρος του πλακούντα. Στη στοιβάδα του χορίου παρατηρείται παρατεταμένη έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη διατήρηση του προγράμματος των αρχέγονων τροφοβλαστικών κυττάρων. Τα κύτταρα της στοιβάδας του χορίου στους μεταλλαγμένους πλακούντες παρουσιάζουν υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού σε σχέση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς. Στα τροφοβλαστικά κύτταρα στις άκρες του χορίου και εκεί όπου παρουσιάζεται το ρήγμα παρατηρείται απόπτωση. Τα κύτταρα του χορίου δε διαφοροποιούνται σε συγκυτιοκύτταρα, όπως αποδεικνύεται μέσα από την απουσία της έκφρασης του

Gcm1. Απουσία του *Erf* δε σχηματίζεται λαβύρινθος, όπως διαπιστώνεται από την έλλειψη γονιδίων- δεικτών για αυτή τη στοιβάδα. Η απουσία του *Erf* δεν επηρεάζει την έκφραση γονιδίων- δεικτών της σπογγώδους στοιβάδας και των γιγαντιαίων κυττάρων, αλλά την οργάνωση αυτών των δομών. Παρόλο που στους μεταλλαγμένους πλακούντες εκφράζονται γονίδια- δείκτες για τη χοριοαλλαντοϊδική σύντηξη εντούτοις δεν παρατηρείται σύντηξη ανάμεσα στο χόριο και τα μεσοθηλιακά κύτταρα της αλλαντοΐδας.

Μέσω της μελέτης του προτύπου έκφρασης του *Erf* στον πλακούντα στα διάφορα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης εξακριβώθηκε το ποιοι από τους κυτταρικούς τύπους της τροφοβλαστικής γενεαλογίας επηρεάζονται από τον *Erf*. Διαπιστώσαμε ότι το *Erf* εκφράζεται στο χοριακό εκτόδερμα και στη συνέχεια στα διπλοειδή κύτταρα του χορίου κάτι που είναι συμβατό με την ανωμαλία που παρουσιάζεται στη στοιβάδα του χορίου και την αγενεσία στο λαβύρινθο. Από την άλλη δεν εκφράζεται στα συγκυτιοκύτταρα, στη σπογγώδη στοιβάδα και τα γιγαντιαία κύτταρα.

Τα συμπεράσματα τα οποία προέκυψαν συνοψίζονται ως εξής:

- i. Ο *Erf* είναι απαραίτητος στις διαδικασίες που μεσολαβούν κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης τόσο στο έμβρυο όσο και στο λεκιθικό σάκο.
- ii. Ο *Erf* είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη ενός λειτουργικού χοριοαλλαντοϊκού πλακούντα αφού απουσία του δε σχηματίζεται λαβύρινθος και τα μεταλλαγμένα έμβρυα πεθαίνουν λόγω της αδυναμίας να ανταλλάξουν θρεπτικά υλικά και αέρια με τη μητέρα.
- iii. Ο *Erf* πιθανό να δρα στο μονοπάτι διαφοροποίησης των διπλοειδών κυττάρων του χορίου σε συγκυτιοκύτταρα. Έτσι αποκαλύπτεται ένας νέος ρόλος των *ETS* μεταγραφικών παραγόντων στη διαφοροποίηση της τροφοβλαστικής γενεαλογίας.
- iv. Ο *Erf* είναι πιθανό να συμμετέχει στους μηχανισμούς που μεσολαβούν κατά τη διαδικασία της χοριοαλλαντοϊκής σύντηξης.

Για την προαγωγή της περαιτέρω έρευνας σχετικά με τη συμβολή του *Erf* κατά την πλακουντογένεση και κατ' επέκταση τη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων, σχεδιάστηκαν πειράματα *in vitro* διαφοροποίησης. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός του μεταγραφικού αυτού καταστολέα είναι κομβικής σημασίας για τη

δραστηριότητά του και τη μεταγραφική ρύθμιση που ασκεί σε πιθανά γονίδια-στόχους. Για το λόγο αυτό, έγινε χρήση κυττάρων που εκφράζουν τα φυσιολογικά επίπεδα του Erf (WT TSC) και στα οποία, κυττάρων που στερούνται της έκφρασης του Erf (KO TSC), κυττάρων που υπερεκφράζουν το μεταγραφικό καταστολέα (ERF TSC) και κυττάρων που υπερεκφράζουν το μετάλλαγμα M1-7 της πρωτεΐνης του Erf (M1-7 TSC), που καθιστά τον Erf πυρηνικό, οπότε βρίσκεται στην ενεργή μορφή του με δυνατότητα ρύθμισης των πιθανών γονιδίων-στόχων.

Για τη δημιουργία κλώνων που υπερεκφράζουν τον Erf είτε σαν αγρίου τύπου πρωτεΐνη είτε ως μετάλλαγμα M1-7 που εντοπίζεται συνεχώς στον πυρήνα, έγινε μόνιμη επιμόλυνση σε αγρίου τύπου τροφοβλαστικά κύτταρα με τους κατάλληλους φορείς. Αρχικά, δημιουργήθηκε μια κυτταρική σειρά τροφοβλαστικών κυττάρων που υπερεκφράζουν τον αγρίου τύπου Erf. Τροφοβλαστικά κύτταρα TS43 χρησιμοποιήθηκαν για μόνιμη επιμόλυνση με τον πλασμιδιακό φορέα pCMV-HA-ERF. Το πλασμίδιο αυτό φέρει κλωνοποιημένο τον Erf αγρίου τύπου, συντηγμένο με το HA, ενώ φέρει και γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη (G418). Τα κύτταρα υποβάλλονται σε διαδικασία επιμόλυνσης με λιποφεκταμίνη και εισέρχεται σε αυτά το πλασμίδιο με την κλωνοποιημένη πρωτεΐνη. Ακολουθούν περίπου δέκα (10) ημέρες θετικής επιλογής κυττάρων που έχουν προσλάβει τον πλασμιδιακό φορέα σε καλλιέργεια με προσθήκη νεομυκίνης (300 µg/ml). Μετά από τις οκτώ μέρες της θετικής επιλογής, έχουν μείνει ζωντανά στην καλλιέργεια μόνο τα κύτταρα τα οποία έχουν πλέον ανθεκτικότητα στη νεομυκίνη, άρα έχουν ενσωματώσει στο γένωμά τους και την πρωτεΐνη που έχει κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα. Τα κύτταρα πλέον αναπτύσσονται και δίνουν αποικίες, οι οποίες απομονώνονται η κάθε μια ξεχωριστά και καλλιεργούνται περαιτέρω έως ότου φτάσουν στο επιθυμητό μέγεθος πληθυσμού. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα επιμολυσμένα κύτταρα ώστε να ελεγχθεί με στύπωμα κατά Western εάν τα κύτταρα όντως υπερεκφράζουν την επιθυμητή πρωτεΐνη. Για την ανίχνευση της πρωτεΐνης του Erf, χρησιμοποιείται ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει τον επίτοπο S17S του Erf, προερχόμενο από κουνέλι και καθαρισμένο με χρωματογραφία συγγένειας.

Με την ίδια διαδικασία δημιουργήθηκε και η κυτταρική σειρά που υπερεκφράζει το μετάλλαγμα M1-7 του Erf. Σκοπός της δημιουργίας του κλώνου αυτού ήταν μελέτη της επίδρασης του πυρηνικού Erf στη διαδικασία της διαφοροποίησης των τροφοβλαστικών κυττάρων. Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε αυτή τη φορά είναι ο

pCMV-HA-ERF M1-7, ο οποίος φέρει επίσης γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη ώστε να γίνει θετική επιλογή των κλώνων που θα ενσωματώσουν το πλασμίδιο στο γένωμά τους. Μετά τη θετική επιλογή των κλώνων, ακολούθησε επέκταση του πληθυσμού των κυττάρων, απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και έλεγχος της υπερέκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης με στύπωμα κατά Western, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα S17S.

Με βάση τα μέχρι τώρα δεδομένα, η μελέτη της διαφοροποίησης των τροφοβλαστικών κυττάρων, στα οποία ο ERF είτε εκφράζεται κανονικά, είτε απουσιάζει, είτε υπερεκφράζεται στην αγρίου τύπου μορφή του ή σαν μετάλλαγμα M1-7, παρουσιάζει ιδιαίτερα ενδιαφέροντα αποτελέσματα ως προς τη συμβολή του στις διαδικασίες της διαφοροποίησης. Ελλείπει του ERF τα κύτταρα οδηγούνται προς γιγαντιαία κύτταρα, αποκαλύπτοντας πως η απουσία του αποκλείει τη διαφοροποίηση προς τη γενεαλογία του χορίου και κατ' επέκταση της συγκυτιοτροφοβλάστης. Άρα η παρουσία του ERF κρίνεται απαραίτητη για τη μετάβαση των κυττάρων προς τη χοριακή γενεαλογία.

Η έκφραση του αγρίου τύπου ERF οδηγεί τα τροφοβλαστικά κύτταρα προς γιγαντιαία κύτταρα, γεγονός το οποίο είναι σύμφωνο με τα μέχρι σήμερα δεδομένα ότι σε *in vitro* καλλιέργειες τροφοβλαστικών κυττάρων υπό συνθήκες διαφοροποίησης, τα κύτταρα γίνονται γιγαντιαία. Σε καλλιέργεια κυττάρων που υπερεκφράζουν τον ERF, οδηγούμαστε προς πληθυσμούς γιγαντιαίων κυττάρων αλλά και προς σπογγιοτροφοβλάστη, όπως δείχνουν οι μάρτυρες *P11* και *4311*, αντίστοιχα.

Η πυρηνική μορφή του ERF, και συνεπώς η συνεχώς ενεργοποιημένη μορφή του, ωθεί τα κύτταρα προς τη συγκυτιοτροφοβλαστική γενεαλογία αλλά και προς γιγαντιαία κύτταρα. Οι μάρτυρες *Gcm1*, *Tef5* και *Cx26* σε ανεβασμένα επίπεδα, δείχνουν πως ο ERF επηρεάζει το πρόγραμμα διαφοροποίησης των τροφοβλαστικών κυττάρων. Κανονικά θα έπρεπε να δίνουν πληθυσμούς μόνο γιγαντιαίων κυττάρων, όμως η υπερέκφραση της συνεχώς ενεργοποιημένης μορφής του με πυρηνικό εντοπισμό, έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή του μονοπατιού διαφοροποίησης προς συγκυτιοκύτταρα.

Έτσι λοιπόν, συμπεραίνουμε το πόσο σημαντική είναι η ενεργοποίηση του ERF κατά τη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων κατά την πλακουντογένεση. Σε φυσιολογικές συνθήκες απαιτείται η παρουσία του ERF για τη σωστή δόμηση και

επαρκή διαφοροποίηση των κυττάρων ώστε να προκύψουν όλοι οι υπότυποι κυττάρων που συμμετέχουν σε διαδικασίες μορφοποίησης του πλακούντα, όπως για παράδειγμα η χοριοαλλαντοϊκή σύντηξη. Ο Erf επάγει τη διαφοροποίηση των κυττάρων του χορίου προς συγκυτιοκύτταρα ώστε να σχηματιστεί σωστά η δομή του λαβυρίνθου.

Από τα πειράματα μελέτης της αλληλεπίδρασης του Erf με τον υποκινητή του γονιδίου *fgf2* και οι ενδείξεις της πιθανής κατασταλτικής ρύθμισης του τελευταίου από τον Erf, προσδίδουν μια επιπλέον και ανεξάρτητη λειτουργικότητα του μεταγραφικού αυτού παράγοντα. Πέρα από τη ρυθμιστική του δράση στο πρόγραμμα διαφοροποίησης των τροφοβλαστικών κυττάρων προωθώντας τη διαφοροποίησή τους προς τη συγκυτιοτροφοβλαστική γενεαλογία, αποκαλύπτεται πλέον και το κρίσιμο της παρουσίας του ώστε τα αδιαφοροποίητα χοριακά κύτταρα να σταματήσουν να πολλαπλασιάζονται και να εισέλθουν στο πρόγραμμα της διαφοροποίησης. Έτσι λοιπόν ο Erf είναι απαραίτητος ώστε να κατασταλεί η έκφραση του *fgf2* που κρατά τα τροφοβλαστικά κύτταρα σε αδιαφοροποίητη μορφή και στη συνέχεια η παρουσία του είναι κομβική ώστε να προκύψει η συγκυτιοτροφοβλαστική γενεαλογία προκειμένου να δομηθεί σωστά ο λαβύρινθος σε έναν άρτια αναπτυσσόμενο πλακούντα.

Αντίστοιχη μελέτη έχει πραγματοποιηθεί και σε ανθρώπινα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα από την ομάδα του James Adjaye [197]. Τα ανθρώπινα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (human Embryonic Stem Cells- hESCs) προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης, είναι πολυδύναμα, αυτό-ανανεώνονται και έχουν την ιδιότητα να δίνουν εμβρυικά και εξωεμβρυικά παράγωγα [198-199]. Η σηματοδότηση μέσω ACTIVIN/NODAL και FGF προάγει και διατηρεί την ικανότητα αυτοανανέωσης των hESCs [200-205]. Αποτελούν επίσης πολύ κομβικά αναπτυξιακά μονοπάτια, που περιλαμβάνουν και τα BMP και WNT, συμμετέχοντας στη διαφοροποίηση, η οποία παίζει καθοριστικό ρόλο στην εμβρυική ανάπτυξη [206-207]. Στο ποντίκι, τα ACTIVIN/NODAL και FGF σηματοδοτικά μονοπάτια είναι κρίσιμα για τον σχηματισμό της πρωτογενούς ράβδου (primitive streak- PS), επάγοντας το σχηματισμό του μεσοδέρματος και του ενδοδέρματος [208-212]. Το σηματοδοτικό μονοπάτι FGF οδηγεί την εξειδίκευση των αρχικών κυτταρικών τύπων, της επιβλάστης, του τροφεκτοδέρματος και του πρωτογενούς ενδοδέρματος [76, 78, 213].

Τόσο το ACTIVIN/NODAL όσο και το FGF σηματοδοτικά μονοπάτια μπορούν να επηρεάσουν τη διαφοροποίηση των hESCs μέσω BMP [202, 214-215]. Η σηματοδότηση μέσω BMP4 και FGF2 είναι γνωστό πως δρουν συνεργιστικά για την επαγωγή σχηματισμού του μεσοδέρματος και την καταστολή διαφοροποίησης προς ενδόδερμα των hESCs [216-217]. Η ομάδα του James Adjaye στη μελέτη της, έδειξε πως με καταστολή των FGF, η BMP4 οδηγεί τη διαφοροποίηση των hESCs προς τη συγκυτιοτροφοβλαστική γενεαλογία, εμποδίζοντας τη δημιουργία άλλων γενεαλογιών που επάγονται από την BMP4, όπως είναι το μεσενδόδερμα και το πρωτογενές ενδόδερμα. Τα ACTIVIN/NODAL και FGF σηματοδοτικά μονοπάτια έχουν ένα συντηρημένο ρόλο στη διατήρηση των τροφοβλαστικών κυττάρων [75, 218] και μεταγραφικοί παράγοντες που αποκρίνονται στην FGF σηματοδότηση όπως οι Eomes και Cdx2, είναι κρίσιμοι για την ανάπτυξη του τροφεκτοδέρματος [108].

Ο πλακούντας είναι ένα χμαιοειδές όργανο που είναι διαφορετικό ανάμεσα στα είδη και ακολουθεί ξεχωριστά μοτίβα ανάπτυξης για τον άνθρωπο, το ποντίκι, τον αρουραίο και διάφορα άλλα οικόσιτα ζώα. Εντούτοις, οι κρίσιμότερες κυτταρικές στοιβάδες που τον απαρτίζουν και επιτελούν λειτουργίες ζωτικής σημασίας για το αναπτυσσόμενο έμβρυο, όπως είναι η θρέψη και η απομάκρυνση μεταβολιτών, είναι παρούσες σε όλα σχεδόν τα είδη και μοιράζονται αρκετές ιδιότητες. Η μελέτη λοιπόν του πλακούντα του ποντικού σε αυτή την εργασία ρίχνει φως στην κατανόηση βασικών διαδικασιών στην ανάπτυξη ενός λειτουργικά σωστού πλακούντα, όπως είναι η διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων για τη δημιουργία της συγκυτιοτροφοβλάστης και κατά συνέπεια τον άρτιο σχηματισμό του λαβυρίνθου. Η καταστολή της σηματοδότησης μέσω FGF κρίνεται σημαντική τόσο στον άνθρωπο όσο και στο ποντίκι ώστε να προκύψει η συγκυτιοτροφοβλαστική γενεαλογία. Ο Egr1 μέσω της κατασταλατατικής ρύθμισης που ασκεί στον fgf2 στο ποντίκι, δίνει το έναυσμα για τη διαδικασία της διαφοροποίησης των χοριακών κυττάρων που θα δώσουν τα συγκυτιοκύτταρα του λαβυρίνθου.

3. Η ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΜΒΟΛΗΣ ΤΟΥ ERF ΣΤΗ ΝΕΥΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ

Κατά την πρόωμη ανάπτυξή του, το έμβρυο, αποτελείται εξ ολοκλήρου από βλαστικά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά ξέρουν ακριβώς τι να κάνουν και πού να πάνε, ώστε να σχηματίσουν τη συναρπαστική δομή ενός έμβριου οργανισμού. Είναι γνωστό ότι τα βλαστικά κύτταρα ρυθμίζονται αυστηρά τόσο από περιβαλλοντικούς παράγοντες όσο και από ενδογενή σήματα. Μπορούν πάντοτε να επιλέξουν να διαιρεθούν, να διαφοροποιηθούν, να μεταναστεύσουν ή να πεθάνουν. Μια λάθος επιλογή μπορεί να έχει άσχημες συνέπειες, οδηγώντας σε δυσπλασίες ή όγκους. Εκτός από τη γνώση που προσφέρουν τα βλαστικά κύτταρα για την αναπτυξιακή βιολογία, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για κλινικούς σκοπούς.

Το κεντρικό νευρικό σύστημα, αντίθετα με πολλούς άλλους ιστούς, έχει μια πιο περιορισμένη ικανότητα για αυτο-ίαση. Τα τελευταία χρόνια οι μελέτες για τα νευρικά βλαστικά κύτταρα έχουν δώσει ελπίδα ότι η θεραπεία βασισμένη στα βλαστικά κύτταρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως η νόσος του Parkinson και η νόσος του Alzheimer. Για το σκοπό αυτό κρίνεται απαραίτητη η γνώση σχετικά με τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού των βλαστικών κυττάρων καθώς και τη διαφοροποίηση των θυγατρικών τους κυττάρων και τη μετανάστευσή τους σε συγκεκριμένους προορισμούς στο ΚΝΣ.

Τα βλαστικά κύτταρα έχουν αρκετά κοινά χαρακτηριστικά με τα κύτταρα των όγκων. Αρκετοί τύποι όγκων στο κεντρικό νευρικό σύστημα πιστεύεται πως έχουν προέλευση από νευρικά βλαστικά κύτταρα ή νευρικά προγονικά κύτταρα. Η μελέτη επίσης των νευρικών βλαστικών κυττάρων μπορεί έτσι να δώσει πληροφορίες σχετικά με το σχηματισμό των όγκων του εγκεφάλου.

Ο Erf έχει γίνει αναφορά πως είναι από τους μεταγραφικούς εκείνους παράγοντες που ρυθμίζουν τη γλοιακή ανάπτυξη. Σύμφωνα με πειραματικές μελέτες στο εργαστήριό μας, έχειδειχθεί ότι ο Erf προκαλεί αλλαγές στο πρόγραμμα της νευρικής διαφοροποίησης. Μπορεί και καταστέλλει μεταγραφικά την έκφραση του *Olig1* γονιδίου, όπως παρατηρήθηκε έπειτα από πειράματα παροδικής διαμόλυνσης. Οι ενδείξεις της πιθανής εμπλοκής του στις διαδικασίες της νευρικής διαφοροποίησης και συγκεκριμένα στη γλοιακή ανάπτυξη, επιβεβαιώθηκαν από τα αποτελέσματα των

πειραμάτων της *in vitro* διαφοροποίησης εμβρυικών βλαστικών κυττάρων. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν τη μεταβολή των επιπέδων έκφρασης γονιδίων-μαρτύρων που αποκαλύπτουν το αυξημένο δυναμικό διαφοροποίησης προς την ολιγοδενδροκυτταρική γενεαλογία, απουσία του Erf. Τέτοιες παρατηρήσεις δείχνουν τη σημασία του ρόλου του Erf στη σωστή ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και συγκεκριμένα στην ολιγοδενδροκυτταρική γενεαλογία.

Τα πειράματα διαφοροποίησης των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων με εναλλακτικές μεθόδους από αυτές που ακολουθούνταν μέχρι σήμερα βρίσκονται υπό εξέλιξη. Σκοπός είναι ο εμπλουτισμός των καλλιιεργειών με κυτταρικούς πληθυσμούς γλοιακής γενεαλογίας, και συγκεκριμένα με ολιγοδενδροκύτταρα. Με χρήση αντισωμάτων ειδικών για αντιγονικούς επιτόπους του κάθε κυτταρικού τύπου, θα επιτευχθεί η αναγνώριση των διαφοροποιημένων κυττάρων. Με μετρήσεις του αριθμού των κυττάρων του κάθε τύπου, θα καταφέρουμε να αποκαλύψουμε τη συμβολή του Erf στη νευρική διαφοροποίηση και το κατά πόσο συμβάλλει η απουσία του στην προαγωγή της ολιγοδενδροκυτταρικής γενεαλογίας.

Σχεδιάζοντας νέα πειραματική διαδικασία, θα αλλάξουν οι συνθήκες καλλιέργειας εξ ολοκλήρου. Τα κύτταρα πλέον θα διαφοροποιούνται μέσω δημιουργίας εμβρυικών σωματιδίων (embryoid bodies, EB). Στη συνέχεια τα κύτταρα θα διαφοροποιούνται υπό την επίδραση διαφόρων παραγόντων και συνδυασμού αυτών, ώστε να προσομοιάζει η διαδικασία με μια *in vivo* διαφοροποίηση. Έτσι, μετά τη δημιουργία των εμβρυικών σωματιδίων, τα κύτταρα θα καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο με fibronectin, ώστε να προσκολληθούν στο επικαλυμμένο με poly-L-ornithine τρυβλίο. Μετά από τέσσερις (4) ημέρες, θα γίνεται προσθήκη b-FGF για την επέκταση των πρόδρομων νευρικών κυττάρων. Έπειτα από 4 ημέρες, παράλληλα με τον b-FGF θα προστίθεται στην καλλιέργεια και EGF, που διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων νευρικών κυττάρων. Μετά το πέρας 5 ημερών, τη θέση του EGF θα παίρνει ο PDGF-AA, για την επαγωγή της διαφοροποίησης των ολιγοδενδροκυττάρων από προγονικά ολιγοδενδροκύτταρα. Έπειτα από 8 ημέρες, θα απομακρύνονται όλοι οι υπόλοιποι παράγοντες και θα γίνεται προσθήκη μόνο T3 θυροξίνης για 4 ημέρες, για τη διαφοροποίηση σε ώριμα πλέον ολιγοδενδροκύτταρα.

Η νέα αυτή πειραματική διαδικασία έχει ως σκοπό τον εμπλουτισμό της καλλιέργειας σε ολιγοδενδροκύτταρα διαφόρων σταδίων ανάπτυξης. Εφόσον ο Erf επηρεάζει τη

διαφοροποίηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων καταστέλλοντας την έκφραση του γονιδίου *Olig1*, περιμένουμε ότι σε καλλιέργειες βλαστικών κυττάρων αγρίου τύπου και κυττάρων που στερούνται τον *Erf* θα παρατηρηθούν διαφορές στους πληθυσμούς των διαφοροποιημένων κυττάρων, που θα προκύψουν με βάση την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων-μαρτύρων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mavrothalassitis, G. and J. Ghysdael, *Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity*. *Oncogene*, 2000. **19**(55): p. 6524-32.
2. Knoepfler, P.S. and R.N. Eisenman, *Sin meets NuRD and other tails of repression*. *Cell*, 1999. **99**(5): p. 447-50.
3. Bird, A.P. and A.P. Wolffe, *Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin*. *Cell*, 1999. **99**(5): p. 451-4.
4. Maldonado, E., M. Hampsey, and D. Reinberg, *Repression: targeting the heart of the matter*. *Cell*, 1999. **99**(5): p. 455-8.
5. Nunn, M.F., et al., *Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene*. *Nature*, 1983. **306**(5941): p. 391-5.
6. Leprince, D., et al., *A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26*. *Nature*, 1983. **306**(5941): p. 395-7.
7. Lautenberger, J.A., et al., *Genomic dispersal of the ets gene family during metazoan evolution*. *Oncogene*, 1992. **7**(9): p. 1713-9.
8. Degan, B.M., et al., *The Ets Multigene Family Is Conserved Throughout the Metazoa*. *Nucleic Acids Research*, 1993. **21**(15): p. 3479-3484.
9. Laudet, V., et al., *Molecular phylogeny of the ETS gene family*. *Oncogene*, 1999. **18**(6): p. 1351-9.
10. Papas, T.S., et al., *Functional relationships among ETS gene family members*. *Leukemia*, 1997. **11 Suppl 3**: p. 557-66.
11. Dittmer, J. and A. Nordheim, *Ets transcription factors and human disease*. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1377**(2): p. F1-11.
12. Ghosh, A. and A.L. Kolodkin, *Specification of neuronal connectivity: ETS marks the spot*. *Cell*, 1998. **95**(3): p. 303-6.
13. Karim, F.D., et al., *The ETS-domain: a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence*. *Genes Dev*, 1990. **4**(9): p. 1451-3.
14. Watson, D.K., R. Ascione, and T.S. Papas, *Molecular analysis of the ets genes and their products*. *Crit Rev Oncog*, 1990. **1**(4): p. 409-36.
15. Wasylyk, B., S.J.L. Hahn, and A. Giovane, *The Ets Family of Transcription Factors*. *European Journal of Biochemistry*, 1993. **211**(1-2): p. 7-18.
16. Dittmer, J. and A. Nordheim, *Ets transcription factors and human disease*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 1998. **1377**(2): p. F1-F11.

17. Ghosh, A. and A.L. Kolodkin, *Specification of neuronal connectivity: ETS marks the spot*. Cell, 1998. **95**(3): p. 303-306.
18. Oneill, E.M., et al., *The Activities of 2 Ets-Related Transcription Factors Required for Drosophila Eye Development Are Modulated by the Ras/Mapk Pathway*. Cell, 1994. **78**(1): p. 137-147.
19. Sgouras, D.N., et al., *Erf - an Ets Domain Protein with Strong Transcriptional Repressor Activity, Can Suppress Ets-Associated Tumorigenesis and Is Regulated by Phosphorylation during Cell-Cycle and Mitogenic Stimulation*. Embo Journal, 1995. **14**(19): p. 4781-4793.
20. Maira, S.M., J.M. Wurtz, and B. Wasyluk, *Net (ERP/SAP2), one of the Ras-inducible TCFs, has a novel inhibitory domain with resemblance to the helix-loop-helix motif*. Embo Journal, 1996. **15**(21): p. 5849-5865.
21. Lopez, R., et al., *TEL is a sequence-specific transcriptional repressor*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(42): p. 30132-30138.
22. Chakrabarti, S.R. and G. Nucifora, *The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999. **264**(3): p. 871-877.
23. Zinck, R., et al., *C-Fos Transcriptional Activation and Repression Correlate Temporally with the Phosphorylation Status of Tcf*. Embo Journal, 1993. **12**(6): p. 2377-2387.
24. Borrás, F.E., et al., *Repression of I-a-Beta Gene-Expression by the Transcription Factor Pu.1*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(41): p. 24385-24391.
25. Sieweke, M.H., et al., *MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation*. Cell, 1996. **85**(1): p. 49-60.
26. Foos, G., et al., *Elevated expression of Ets2 or distinct portions of Ets2 can reverse Ras-mediated cellular transformation*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(30): p. 18871-18880.
27. Xing, X.M., et al., *The Ets protein PEA3 suppresses HER-2/neu overexpression and inhibits tumorigenesis*. Nature Medicine, 2000. **6**(2): p. 189-195.
28. Li, R.Z., et al., *EAP1/Daxx interacts with ETS1 and represses transcriptional activation of ETS1 target genes*. Oncogene, 2000. **19**(6): p. 745-753.

29. Le Gallic, L., et al., *Transcriptional repressor ERF is a Ras/mitogen-activated protein kinase target that regulates cellular proliferation*. *Molecular and Cellular Biology*, 1999. **19**(6): p. 4121-4133.
30. Ducret, C., et al., *The net repressor is regulated by nuclear export in response to anisomycin, UV, and heat shock*. *Molecular and Cellular Biology*, 1999. **19**(10): p. 7076-7087.
31. Rabault, B. and J. Ghysdael, *Calcium-Induced Phosphorylation of Ets1 Inhibits Its Specific DNA-Binding Activity*. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. **269**(45): p. 28143-28151.
32. Martin, M.E., et al., *Redox regulation of GA-binding protein-alpha DNA binding activity*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. **271**(41): p. 25617-25623.
33. Cowley, D.O. and B.J. Graves, *Phosphorylation represses Ets-1 DNA binding by reinforcing autoinhibition*. *Genes & Development*, 2000. **14**(3): p. 366-376.
34. Marais, R., J. Wynne, and R. Treisman, *The Srf Accessory Protein Elk-1 Contains a Growth Factor-Regulated Transcriptional Activation Domain*. *Cell*, 1993. **73**(2): p. 381-393.
35. OHagan, R.C., et al., *The activity of the ets transcription factor PEA3 is regulated by two distinct MAPK cascades*. *Oncogene*, 1996. **13**(6): p. 1323-1333.
36. McCarthy, S.A., et al., *Rapid phosphorylation of Ets-2 accompanies mitogen-activated protein kinase activation and the induction of heparin-binding epidermal growth factor gene expression by oncogenic Raf-1*. *Molecular and Cellular Biology*, 1997. **17**(5): p. 2401-2412.
37. Dalton, S. and R. Treisman, *Characterization of Sap-1, a Protein Recruited by Serum Response Factor to the C-Fos Serum Response Element*. *Cell*, 1992. **68**(3): p. 597-612.
38. Janknecht, R., et al., *Activation of Ternary Complex Factor Elk-1 by Map Kinases*. *Embo Journal*, 1993. **12**(13): p. 5097-5104.
39. Giese, K., et al., *Assembly and Function of a Tcr-Alpha Enhancer Complex Is Dependent on Lef-1-Induced DNA Bending and Multiple Protein-Protein Interactions*. *Genes & Development*, 1995. **9**(8): p. 995-1008.
40. Wolberger, C., *Combinatorial transcription factors*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 1998. **8**(5): p. 552-559.

41. Goetz, T.L., et al., *Auto-inhibition of Ets-1 is counteracted by DNA binding cooperativity with core-binding factor alpha 2*. Molecular and Cellular Biology, 2000. **20**(1): p. 81-90.
42. Price, M.D. and Z.C. Lai, *The yan gene is highly conserved in Drosophila and its expression suggests a complex role throughout development*. Development Genes and Evolution, 1999. **209**(4): p. 207-217.
43. Golub, T.R., et al., *Fusion of Pdgf Receptor-Beta to a Novel Ets-Like Gene, Tel, in Chronic Myelomonocytic Leukemia with T(512) Chromosomal Translocation*. Cell, 1994. **77**(2): p. 307-316.
44. Klemsz, M., et al., *Pe-1, a Novel Ets Oncogene Family Member, Localizes to Chromosome-1q21-Q23*. Genomics, 1994. **20**(2): p. 291-294.
45. Heinzel, T., et al., *A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression*. Nature, 1997. **387**(6628): p. 43-48.
46. Sgouras, D.N., et al., *ERF: an ETS domain protein with strong transcriptional repressor activity, can suppress ets-associated tumorigenesis and is regulated by phosphorylation during cell cycle and mitogenic stimulation*. EMBO J, 1995. **14**(19): p. 4781-93.
47. Athanasiou, M., et al., *Suppression of the Ewing's sarcoma phenotype by FLII/ERF repressor hybrids*. Cancer Gene Therapy, 2000. **7**(8): p. 1188-1195.
48. Polychronopoulos, S., et al., *The transcriptional ETS2 repressor factor associates with active and inactive Erks through distinct FXF motifs*. J Biol Chem, 2006. **281**(35): p. 25601-11.
49. Yuan, C.C., et al., *Properties of a Murine Retroviral Recombinant of Avian Acute-Leukemia Virus E26 - a Murine Fibroblast Assay for V-Ets Function*. Journal of Virology, 1989. **63**(1): p. 205-215.
50. Rossi, F., et al., *Excision of Ets by an inducible site-specific recombinase causes differentiation of Myb-Ets-transformed hematopoietic progenitors*. Current Biology, 1996. **6**(7): p. 866-872.
51. Verykokakis, M., et al., *The RAS-dependent ERF control of cell proliferation and differentiation is mediated by c-Myc repression*. J Biol Chem, 2007. **282**(41): p. 30285-94.
52. Papadaki, C., et al., *Transcriptional repressor erf determines extraembryonic ectoderm differentiation*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(14): p. 5201-13.

53. Slater, B.J., et al., *Cranial Sutures: A Brief Review*. Plastic and Reconstructive Surgery, 2008. **121**(4): p. 170e-178e.
54. Gault, D.T., et al., *Intracranial-Pressure and Intracranial Volume in Children with Craniosynostosis*. Plastic and Reconstructive Surgery, 1992. **90**(3): p. 377-381.
55. Roberts, R.M., C.E. Farin, and J.C. Cross, *Trophoblast Proteins and Maternal Recognition of Pregnancy*. Oxford Reviews of Reproductive Biology, 1990. **12**: p. 147-180.
56. Wilcox, A.J., et al., *Incidence of Early Loss of Pregnancy*. New England Journal of Medicine, 1988. **319**(4): p. 189-194.
57. Norwitz, E.R. and J.T. Repke, *Preeclampsia prevention and management*. Journal of the Society for Gynecologic Investigation, 2000. **7**(1): p. 21-36.
58. Cross, J.C., Z. Werb, and S.J. Fisher, *Implantation and the Placenta - Key Pieces of the Development Puzzle*. Science, 1994. **266**(5190): p. 1508-1518.
59. Hemberger, M. and J.C. Cross, *Genes governing placental development*. Trends in Endocrinology and Metabolism, 2001. **12**(4): p. 162-168.
60. Cross, J.C., *Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2000. **11**(2): p. 105-113.
61. Gardner, R.L., *Investigation of Inner Cell Mass and Trophoblast Tissues Following Their Isolation from Mouse Blastocyst*. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 1972. **28**(Oct): p. 279-&.
62. Copp, A.J., *Interaction between Inner Cell Mass and Trophectoderm of the Mouse Blastocyst .1. Study of Cellular Proliferation*. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 1978. **48**(Dec): p. 109-125.
63. Barlow, P.W. and M.I. Sherman, *Biochemistry of Differentiation of Mouse Trophoblast - Studies on Polyploidy*. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 1972. **27**(Apr): p. 447-&.
64. Linzer, D.I.H. and S.J. Fisher, *The placenta and the prolactin family of hormones: Regulation of the physiology of pregnancy*. Molecular Endocrinology, 1999. **13**(6): p. 837-840.
65. Colosi, P., et al., *Biological, Immunological, and Binding-Properties of Recombinant Mouse Placental Lactogen-I*. Endocrinology, 1988. **123**(6): p. 2662-2667.

66. Watson, E.D. and J.C. Cross, *Development of structures and transport functions in the mouse placenta*. Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 180-93.
67. Adamson, S.L., et al., *Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta*. Developmental Biology, 2002. **250**(2): p. 358-373.
68. Achen, M.G., et al., *Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor are co-expressed during early embryonic development*. Growth Factors, 1997. **15**(1): p. 69-&.
69. Jackson, D., et al., *Stimulation and Inhibition of Angiogenesis by Placental Proliferin and Proliferin-Related Protein*. Science, 1994. **266**(5190): p. 1581-1584.
70. Yotsumoto, S., et al., *Expression of adrenomedullin, a hypotensive peptide, in the trophoblast giant cells at the embryo implantation site in mouse*. Developmental Biology, 1998. **203**(2): p. 264-275.
71. Enders, A.C. and A.O. Welsh, *Structural Interactions of Trophoblast and Uterus during Hemochorial Placenta Formation*. Journal of Experimental Zoology, 1993. **266**(6): p. 578-587.
72. Kliman, H.J., *Uteroplacental blood flow - The story of decidualization, menstruation, and trophoblast invasion*. American Journal of Pathology, 2000. **157**(6): p. 1759-1768.
73. Kemp, B., et al., *Invasive depth of extravillous trophoblast correlates with cellular phenotype: a comparison of intra- and extrauterine implantation sites*. Histochemistry and Cell Biology, 2002. **117**(5): p. 401-414.
74. Goffin, F., et al., *Evidence of a limited contribution of feto-maternal interactions to trophoblast differentiation along the invasive pathway*. Tissue Antigens, 2003. **62**(2): p. 104-116.
75. Tanaka, S., et al., *Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2072-2075.
76. Feldman, B., et al., *Requirement of Fgf-4 for Postimplantation Mouse Development*. Science, 1995. **267**(5195): p. 246-249.
77. Goldin, S.N. and V.E. Papaioannou, *Paracrine action of FGF4 during periimplantation development maintains trophectoderm and primitive endoderm*. Genesis, 2003. **36**(1): p. 40-47.

78. Arman, E., et al., *Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(9): p. 5082-5087.
79. Guzman-Ayala, M., et al., *Nodal protein processing and fibroblast growth factor 4 synergize to maintain a trophoblast stem cell microenvironment*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(44): p. 15656-15660.
80. Chawengsaksophak, K., et al., *Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice*. Nature, 1997. **386**(6620): p. 84-87.
81. Russ, A.P., et al., *Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation*. Nature, 2000. **404**(6773): p. 95-99.
82. Hughes, M., et al., *The Hand1, Stra13 and Gcm1 transcription factors override FGF signaling to promote terminal differentiation of trophoblast stem cells*. Dev Biol, 2004. **271**(1): p. 26-37.
83. Luo, J.M., et al., *Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR-beta*. Nature, 1997. **388**(6644): p. 778-782.
84. Auman, H.J., et al., *Transcription factor AP-2 gamma is essential in the extra-embryonic lineages for early postimplantation development*. Development, 2002. **129**(11): p. 2733-2747.
85. Roberts, R.M. and S.J. Fisher, *Trophoblast stem cells*. Biol Reprod, 2011. **84**(3): p. 412-21.
86. Scott, I.C., et al., *The HAND1 basic helix-loop-helix transcription factor regulates trophoblast differentiation via multiple mechanisms*. Molecular and Cellular Biology, 2000. **20**(2): p. 530-541.
87. Cross, J.C., et al., *Hxt Encodes a Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor That Regulates Trophoblast Cell-Development*. Development, 1995. **121**(8): p. 2513-2523.
88. Kraut, N., et al., *Requirement of the mouse I-mfa gene for placental development and skeletal patterning*. Embo Journal, 1998. **17**(21): p. 6276-6288.
89. Guillemot, F., et al., *Essential Role of Mash-2 in Extraembryonic Development*. Nature, 1994. **371**(6495): p. 333-336.

90. Guillemot, F., et al., *Genomic Imprinting of Mash2, a Mouse Gene Required for Trophoblast Development*. Nature Genetics, 1995. **9**(3): p. 235-242.
91. Tanaka, M., et al., *Mash2 acts cell autonomously in mouse spongiotrophoblast development*. Developmental Biology, 1997. **190**(1): p. 55-65.
92. Maltepe, E., A.I. Bakardjiev, and S.J. Fisher, *The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development*. J Clin Invest, 2010. **120**(4): p. 1016-25.
93. Firulli, B.A., et al., *PKA, PKC, and the protein phosphatase 2A influence HAND factor function: A mechanism for tissue-specific transcriptional regulation*. Molecular Cell, 2003. **12**(5): p. 1225-1237.
94. Yan, J.L., et al., *Retinoic acid promotes differentiation of trophoblast stem cells to a giant cell fate*. Developmental Biology, 2001. **235**(2): p. 422-432.
95. Genbacev, O., et al., *Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia*. Journal of Clinical Investigation, 1996. **97**(2): p. 540-550.
96. Caniggia, I., et al., *Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGF beta(3)*. Journal of Clinical Investigation, 2000. **105**(5): p. 577-587.
97. Adelman, D.M., et al., *Placental cell fates are regulated in vivo by HIF-mediated hypoxia responses*. Genes & Development, 2000. **14**(24): p. 3191-3203.
98. Ware, C.B., et al., *Targeted Disruption of the Low-Affinity Leukemia Inhibitory Factor-Receptor Gene Causes Placental, Skeletal, Neural and Metabolic Defects and Results in Perinatal Death*. Development, 1995. **121**(5): p. 1283-1299.
99. Takahashi, Y., et al., *SOCCS3: an essential regulator of LIF receptor signaling in trophoblast giant cell differentiation*. Embo Journal, 2003. **22**(3): p. 372-384.
100. Lopez, M.F., et al., *Insulin-like growth factor II affects the appearance and glycogen content of glycogen cells in the murine placenta*. Endocrinology, 1996. **137**(5): p. 2100-2108.
101. Takahashi, K., T. Kobayashi, and N. Kanayama, *p57(Kip2) regulates the proper development of labyrinthine and spongiotrophoblasts*. Molecular Human Reproduction, 2000. **6**(11): p. 1019-1025.

102. Janatpour, M.J., et al., *A repertoire of differentially expressed transcription factors that offers insight into mechanisms of human cytotrophoblast differentiation*. *Developmental Genetics*, 1999. **25**(2): p. 146-157.
103. Knofler, M., et al., *Molecular cloning of the human Hand1 gene/cDNA and its tissue-restricted expression in cytotrophoblastic cells and heart*. *Gene*, 1998. **224**(1-2): p. 77-86.
104. Knofler, M., et al., *Human Hand1 basic helix-loop-helix (bHLH) protein: extra-embryonic expression pattern, interaction partners and identification of its transcriptional repressor domains*. *Biochemical Journal*, 2002. **361**: p. 641-651.
105. Anson-Cartwright, L., et al., *The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta*. *Nat Genet*, 2000. **25**(3): p. 311-4.
106. Basyuk, E., et al., *Murine Gcm1 gene is expressed in a subset of placental trophoblast cells*. *Developmental Dynamics*, 1999. **214**(4): p. 303-311.
107. Baczyk, D., et al., *Complex patterns of GCM1 mRNA and protein in villous and extravillous trophoblast cells of the human placenta*. *Placenta*, 2004. **25**(6): p. 553-559.
108. Rossant, J. and J.C. Cross, *Placental development: lessons from mouse mutants*. *Nat Rev Genet*, 2001. **2**(7): p. 538-48.
109. Hunter, P.J., et al., *Mrj encodes a DnaJ-related co-chaperone that is essential for murine placental development*. *Development*, 1999. **126**(6): p. 1247-1258.
110. Stecca, B., et al., *Gcm1 expression defines three stages of chorio-allantoic interaction during placental development*. *Mechanisms of Development*, 2002. **115**(1-2): p. 27-34.
111. Sonderegger, S., J. Pollheimer, and M. Knofler, *Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation--review*. *Placenta*, 2010. **31**(10): p. 839-47.
112. Kunath, T., D. Strumpf, and J. Rossant, *Early trophoblast determination and stem cell maintenance in the mouse--a review*. *Placenta*, 2004. **25 Suppl A**: p. S32-8.
113. Cross, J.C., *How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice--a review*. *Placenta*, 2005. **26 Suppl A**: p. S3-9.

114. Kuhn, M.C., et al., *Adipocyte-secreted factors increase osteoblast proliferation and the OPG/RANKL ratio to influence osteoclast formation*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2012. **349**(2): p. 180-188.
115. House, S.L., et al., *Cardiac-specific overexpression of fibroblast growth factor-2 protects against myocardial dysfunction and infarction in a murine model of low-flow ischemia*. Circulation, 2003. **108**(25): p. 3140-3148.
116. Pereira, R.C., A.N. Economides, and E. Canalis, *Bone morphogenetic proteins induce gremlin, a protein that limits their activity in osteoblasts*. Endocrinology, 2000. **141**(12): p. 4558-4563.
117. Liu, Y.X., et al., *A novel chemical-defined medium with bFGF and N2B27 supplements supports undifferentiated growth in human embryonic stem cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006. **346**(1): p. 131-139.
118. McConnell, J., et al., *Eomesodermin is expressed in mouse oocytes and pre-implantation embryos*. Mol Reprod Dev, 2005. **71**(4): p. 399-404.
119. Chawengsaksophak, K., et al., *Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice*. Nature, 1997. **386**(6620): p. 84-7.
120. Senner, C.E. and M. Hemberger, *Regulation of early trophoblast differentiation - lessons from the mouse*. Placenta, 2010. **31**(11): p. 944-50.
121. Luo, J., et al., *Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR-beta*. Nature, 1997. **388**(6644): p. 778-82.
122. Tremblay, G.B., et al., *Diethylstilbestrol regulates trophoblast stem cell differentiation as a ligand of orphan nuclear receptor ERR beta*. Genes Dev, 2001. **15**(7): p. 833-8.
123. Hu, D. and J.C. Cross, *Ablation of Tpbpa-positive trophoblast precursors leads to defects in maternal spiral artery remodeling in the mouse placenta*. Dev Biol, 2011. **358**(1): p. 231-9.
124. Liu, J., et al., *Hyperosmolar stress induces global mRNA responses in placental trophoblast stem cells that emulate early post-implantation differentiation*. Placenta, 2009. **30**(1): p. 66-73.
125. Jacquemin, P., et al., *Differential expression of the TEF family of transcription factors in the murine placenta and during differentiation of primary human trophoblasts in vitro*. Dev Dyn, 1998. **212**(3): p. 423-36.

126. Kibschull, M., et al., *Connexin31-deficient trophoblast stem cells: a model to analyze the role of gap junction communication in mouse placental development*. Dev Biol, 2004. **273**(1): p. 63-75.
127. Pauken, C.M. and C.W. Lo, *Nonoverlapping Expression of Cx43 and Cx26 in the Mouse Placenta and Decidua - a Pattern of Gap Junction Gene-Expression Differing from That in the Rat*. Molecular Reproduction and Development, 1995. **41**(2): p. 195-203.
128. Merkle, F.T. and A. Alvarez-Buylla, *Neural stem cells in mammalian development*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(6): p. 704-9.
129. Temple, S., *The development of neural stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 112-117.
130. Panchision, D.M. and R.D.G. McKay, *The control of neural stem cells by morphogenic signals*. Current Opinion in Genetics & Development, 2002. **12**(4): p. 478-487.
131. Gage, F.H., *Mammalian neural stem cells*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1433-1438.
132. Davis, A.A. and S. Temple, *A Self-Renewing Multipotential Stem-Cell in Embryonic Rat Cerebral-Cortex*. Nature, 1994. **372**(6503): p. 263-266.
133. Qian, X.M., et al., *Timing of CNS cell generation: A programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells*. Neuron, 2000. **28**(1): p. 69-80.
134. Eriksson, P.S., et al., *Neurogenesis in the adult human hippocampus*. Nature Medicine, 1998. **4**(11): p. 1313-1317.
135. Momma, S., C.B. Johansson, and J. Frisen, *Get to know your stem cells*. Current Opinion in Neurobiology, 2000. **10**(1): p. 45-49.
136. Gage, F.H., *Neurogenesis in the adult brain*. Journal of Neuroscience, 2002. **22**(3): p. 612-613.
137. Gould, E., et al., *Neurogenesis in the neocortex of adult primates*. Science, 1999. **286**(5439): p. 548-552.
138. Gould, E., et al., *Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(9): p. 5263-5267.

139. Rietze, R., P. Poulin, and S. Weiss, *Mitotically active cells that generate neurons and astrocytes are present in multiple regions of the adult mouse hippocampus*. *Journal of Comparative Neurology*, 2000. **424**(3): p. 397-408.
140. Zhao, M., et al., *Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003. **100**(13): p. 7925-7930.
141. Huneus, F.C. and P.F. Davison, *Fibrillar Proteins from Squid Axons .I. Neurofilament Protein*. *Journal of Molecular Biology*, 1970. **52**(3): p. 415-&.
142. Ferreira, A. and A. Caceres, *Expression of the Class-Iii Beta-Tubulin Isotype in Developing Neurons in Culture*. *Journal of Neuroscience Research*, 1992. **32**(4): p. 516-529.
143. Perry, V.H. and S. Gordon, *Macrophages and Microglia in the Nervous-System*. *Trends in Neurosciences*, 1988. **11**(6): p. 273-277.
144. Lazarides, E., et al., *Intermediate Filaments as Mechanical Integrators in Muscle-Cells*. *European Journal of Cell Biology*, 1980. **22**(1): p. 368-368.
145. Menet, V., et al., *GFAP null astrocytes are a favorable substrate for neuronal survival and neurite growth*. *Glia*, 2000. **31**(3): p. 267-272.
146. Yoshida, M., *Intermediate filament proteins define different glial subpopulations*. *Journal of Neuroscience Research*, 2001. **63**(3): p. 284-289.
147. Svendsen, C.N., *Neurobiology - The amazing astrocyte*. *Nature*, 2002. **417**(6884): p. 29-+.
148. Ullian, E.M., et al., *Control of synapse number by glia*. *Science*, 2001. **291**(5504): p. 657-661.
149. Song, S.H., C.F. Stevens, and F.H. Gage, *Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells*. *Nature*, 2002. **417**(6884): p. 39-44.
150. Lu, Q.R., et al., *Sonic hedgehog-regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system*. *Neuron*, 2000. **25**(2): p. 317-329.
151. Zhou, Q., S.L. Wang, and D.J. Anderson, *Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors*. *Neuron*, 2000. **25**(2): p. 331-343.
152. Sommer, I. and M. Schachner, *Monoclonal-Antibodies (O1 to O4) to Oligodendrocyte Cell-Surfaces - an Immunocytological Study in the Central Nervous-System*. *Developmental Biology*, 1981. **83**(2): p. 311-327.

153. Mizuguchi, R., et al., *Combinatorial roles of Olig2 and Neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons*. *Neuron*, 2001. **31**(5): p. 757-771.
154. Zhou, Q. and D.J. Anderson, *The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification*. *Cell*, 2002. **109**(1): p. 61-73.
155. Oumesmar, B.N., L. Vignais, and A. BaronVanEvercooren, *Developmental expression of platelet-derived growth factor alpha-receptor in neurons and glial cells of the mouse CNS*. *Journal of Neuroscience*, 1997. **17**(1): p. 125-139.
156. Williams, B.P., et al., *A PDGF-regulated immediate early gene response initiates neuronal differentiation in ventricular zone progenitor cells*. *Neuron*, 1997. **18**(4): p. 553-562.
157. Forsberg-Nilsson, K., et al., *Platelet-derived growth factor induces chemotaxis of neuroepithelial stem cells*. *Journal of Neuroscience Research*, 1998. **53**(5): p. 521-530.
158. Andrae, J., et al., *Platelet-derived growth factor receptor-alpha in ventricular zone cells and in developing neurons*. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2001. **17**(6): p. 1001-1013.
159. Erlandsson, A., M. Enarsson, and K. Forsberg-Nilsson, *Immature neurons from CNS stem cells proliferate in response to platelet-derived growth factor*. *Journal of Neuroscience*, 2001. **21**(10): p. 3483-3491.
160. Raff, M.C., et al., *Galactocerebroside Is a Specific Cell-Surface Antigenic Marker for Oligodendrocytes in Culture*. *Nature*, 1978. **274**(5673): p. 813-816.
161. Belachew, S., X.Q. Yuan, and V. Gallo, *Unraveling oligodendrocyte origin and function by cell-specific transgenesis*. *Developmental Neuroscience*, 2001. **23**(4-5): p. 287-298.
162. Takebayashi, H., et al., *The basic helix-loop-helix factor Olig2 is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages*. *Current Biology*, 2002. **12**(13): p. 1157-1163.
163. Lu, Q.R., et al., *Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection*. *Cell*, 2002. **109**(1): p. 75-86.

164. Fu, H., et al., *Dual origin of spinal oligodendrocyte progenitors and evidence for the cooperative role of Olig2 and Nkx2.2 in the control of oligodendrocyte differentiation*. *Development*, 2002. **129**(3): p. 681-693.
165. Li, H.L., et al., *Olig1 and Sox10 interact synergistically to drive Myelin Basic Protein transcription in oligodendrocytes*. *Journal of Neuroscience*, 2007. **27**(52): p. 14375-14382.
166. Liu, Z.J., et al., *Induction of oligodendrocyte differentiation by Olig2 and Sox10: Evidence for reciprocal interactions and dosage-dependent mechanisms*. *Developmental Biology*, 2007. **302**(2): p. 683-693.
167. Rowitch, D.H., et al., *An 'oligarchy' rules neural development*. *Trends Neurosci*, 2002. **25**(8): p. 417-22.
168. Ralston, A. and J. Rossant, *The genetics of induced pluripotency*. *Reproduction*, 2010. **139**(1): p. 35-44.
169. Kim, J.B., et al., *Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells*. *Cell*, 2009. **136**(3): p. 411-9.
170. Avilion, A.A., et al., *Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function*. *Genes Dev*, 2003. **17**(1): p. 126-40.
171. Technau, U. and C.B. Scholz, *Origin and evolution of endoderm and mesoderm*. *Int J Dev Biol*, 2003. **47**(7-8): p. 531-9.
172. Li, H. and W.D. Richardson, *The evolution of Olig genes and their roles in myelination*. *Neuron Glia Biol*, 2008. **4**(2): p. 129-35.
173. Ligon, K.L., et al., *Olig gene function in CNS development and disease*. *Glia*, 2006. **54**(1): p. 1-10.
174. Hoang-Xuan, K., et al., *OLIG-1 and 2 gene expression and oligodendroglial tumours*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2002. **28**(2): p. 89-94.
175. Bradl, M. and H. Lassmann, *Oligodendrocytes: biology and pathology*. *Acta Neuropathol*, 2010. **119**(1): p. 37-53.
176. Wegner, M. and C.C. Stolt, *From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development*. *Trends Neurosci*, 2005. **28**(11): p. 583-8.
177. Hong, C.S. and J.P. Saint-Jeannet, *Sox proteins and neural crest development*. *Semin Cell Dev Biol*, 2005. **16**(6): p. 694-703.
178. Sakai, D. and Y. Wakamatsu, *Regulatory mechanisms for neural crest formation*. *Cells Tissues Organs*, 2005. **179**(1-2): p. 24-35.

179. Gudas, L.J. and J.A. Wagner, *Retinoids regulate stem cell differentiation*. J Cell Physiol, 2011. **226**(2): p. 322-30.
180. Guillemot, F., *Cell fate specification in the mammalian telencephalon*. Prog Neurobiol, 2007. **83**(1): p. 37-52.
181. Wu, Y., et al., *Regulation of glioblastoma multiforme stem-like cells by inhibitor of DNA binding proteins and oligodendroglial lineage-associated transcription factors*. Cancer Sci, 2012. **103**(6): p. 1028-37.
182. Zolova, O.E. and P.A. Wight, *YY1 negatively regulates mouse myelin proteolipid protein (Plp1) gene expression in oligodendroglial cells*. ASN Neuro, 2011. **3**(4).
183. Baumann, N. and D. Pham-Dinh, *Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system*. Physiol Rev, 2001. **81**(2): p. 871-927.
184. Watatani, K., et al., *PDK1 regulates the generation of oligodendrocyte precursor cells at an early stage of mouse telencephalic development*. Genes Cells, 2012. **17**(4): p. 326-35.
185. Millet, V., M. Marder, and L.A. Pasquini, *Adult CNP::EGFP transgenic mouse shows pronounced hypomyelination and an increased vulnerability to cuprizone-induced demyelination*. Experimental Neurology, 2012. **233**(1): p. 490-504.
186. Kobayashi, M., et al., *Islet-1 expression in thoracic spinal motor neurons in prenatal mouse*. Int J Dev Neurosci, 2011. **29**(7): p. 749-56.
187. Armstrong, R.C., *Isolation and characterization of immature oligodendrocyte lineage cells*. Methods, 1998. **16**(3): p. 282-92.
188. Kim, P.T. and C.J. Ong, *Differentiation of definitive endoderm from mouse embryonic stem cells*. Results Probl Cell Differ, 2012. **55**: p. 303-19.
189. Dichmann, D.S. and R.M. Harland, *Nkx6 genes pattern the frog neural plate and Nkx6.1 is necessary for motoneuron axon projection*. Developmental Biology, 2011. **349**(2): p. 378-386.
190. Plotnikov, A., et al., *The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, 2011. **1813**(9): p. 1619-1633.
191. Vary, C.P.H., et al., *Involvement of Ets transcription factors and targets in osteoblast differentiation and matrix mineralization*. Experimental Cell Research, 2000. **257**(1): p. 213-222.

192. Wai, P.Y., et al., *Ets-1 and Runx2 regulate transcription of a metastatic gene, osteopontin, in murine colorectal cancer cells*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(28): p. 18973-18982.
193. Ge, C.X., et al., *Identification and Functional Characterization of ERK/MAPK Phosphorylation Sites in the Runx2 Transcription Factor*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(47): p. 32533-32543.
194. Park, O.J., et al., *FGF2-activated ERK Mitogen-activated Protein Kinase Enhances Runx2 Acetylation and Stabilization*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(6): p. 3568-3574.
195. Kan, S., et al., *Genomic screening of fibroblast growth-factor receptor 2 reveals a wide spectrum of mutations in patients with syndromic craniosynostosis*. American Journal of Human Genetics, 2002. **70**(2): p. 472-486.
196. Lajeunie, E., et al., *Mutation screening in patients with syndromic craniosynostoses indicates that a limited number of recurrent FGFR2 mutations accounts for severe forms of Pfeiffer syndrome*. European Journal of Human Genetics, 2006. **14**(3): p. 289-298.
197. Sudheer, S., et al., *FGF Inhibition Directs BMP4-Mediated Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Syncytiotrophoblast*. Stem Cells and Development, 2012. **21**(16): p. 2987-3000.
198. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-1147.
199. Xu, R.H., et al., *BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast*. Nature Biotechnology, 2002. **20**(12): p. 1261-1264.
200. Amit, M., et al., *Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells*. Biology of Reproduction, 2004. **70**(3): p. 837-845.
201. Beattie, G.M., et al., *Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers*. Stem Cells, 2005. **23**(4): p. 489-495.
202. Greber, B., H. Lehrach, and J. Adjaye, *Control of Early Fate Decisions in Human ES Cells by Distinct States of TGF beta Pathway Activity*. Stem Cells and Development, 2008. **17**(6): p. 1065-1077.
203. James, D., et al., *TGF beta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem*. Development, 2005. **132**(6): p. 1273-1282.

204. Vallier, L., D. Reynolds, and R.A. Pederson, *Nodal inhibits differentiation of human embryonic stem cells along the neuroectodermal default pathway*. *Developmental Biology*, 2004. **275**(2): p. 403-421.
205. Xu, R.H., et al., *Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells*. *Nature Methods*, 2005. **2**(3): p. 185-190.
206. Tam, P.P.L. and D.A.F. Loebel, *Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation*. *Nature Reviews Genetics*, 2007. **8**(5): p. 368-381.
207. Arnold, S.J. and E.J. Robertson, *Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009. **10**(2): p. 91-103.
208. Ciruna, B. and J. Rossant, *FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak*. *Developmental Cell*, 2001. **1**(1): p. 37-49.
209. Kunath, T., et al., *FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment*. *Development*, 2007. **134**(16): p. 2895-2902.
210. Chai, N., et al., *FGF is an essential regulator of the fifth cell division in preimplantation mouse embryos*. *Developmental Biology*, 1998. **198**(1): p. 105-115.
211. Conlon, F.L., et al., *A Primary Requirement for Nodal in the Formation and Maintenance of the Primitive Streak in the Mouse*. *Development*, 1994. **120**(7): p. 1919-1928.
212. D'Amour, K.A., et al., *Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm*. *Nature Biotechnology*, 2005. **23**(12): p. 1534-1541.
213. Yamanaka, Y., F. Lanner, and J. Rossant, *FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst*. *Development*, 2010. **137**(5): p. 715-724.
214. Das, P., et al., *Effects of FGF2 and oxygen in the BMP4-driven differentiation of trophoblast from human embryonic stem cells*. *Stem Cell Research*, 2007. **1**(1): p. 61-74.
215. Vallier, L., et al., *Early Cell Fate Decisions of Human Embryonic Stem Cells and Mouse Epiblast Stem Cells Are Controlled by the Same Signalling Pathways*. *PLoS One*, 2009. **4**(6).

216. Yu, P.Z., et al., *FGF2 Sustains NANOG and Switches the Outcome of BMP4-Induced Human Embryonic Stem Cell Differentiation*. *Cell Stem Cell*, 2011. **8**(3): p. 326-334.
217. Bernardo, A.S., et al., *BRACHYURY and CDX2 Mediate BMP-Induced Differentiation of Human and Mouse Pluripotent Stem Cells into Embryonic and Extraembryonic Lineages*. *Cell Stem Cell*, 2011. **9**(2): p. 144-155.
218. Erlebacher, A., K.A. Price, and L.H. Glimcher, *Maintenance of mouse trophoblast stem cell proliferation by TGF-beta/activin*. *Developmental Biology*, 2004. **275**(1): p. 158-169.