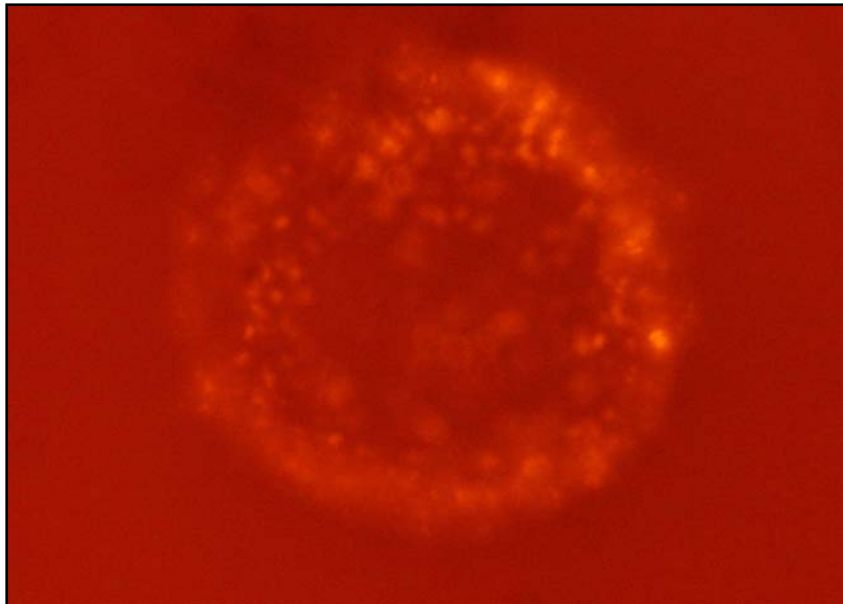


**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
«ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ-ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ»**

Εργασία μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης



Επιμέλεια: Δοξάκη Χριστίνα

Υπεύθυνη καθηγήτρια: Κρετσόβαλη Νίκη

Επιβλέπων καθηγητής: Παπαματθαϊάκης Ιωσήφ

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2007

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή	05
Υλικά και Μέθοδοι	22
2.1 Υλικά.....	22
2.2 Μέθοδοι.....	24
Αποτελέσματα.....	31
Συζήτηση.....	39
Βιβλιογραφία.....	41

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Χαρακτηριστικά εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων

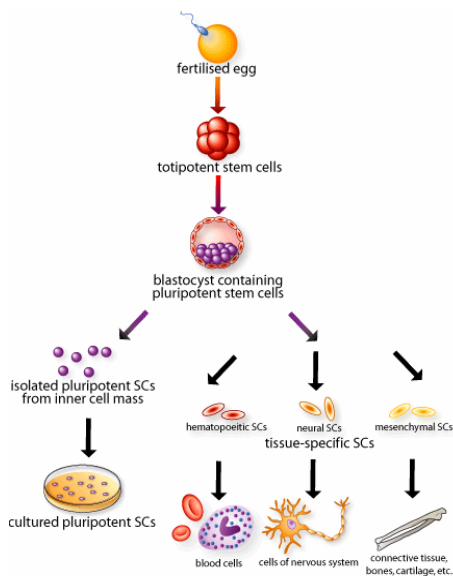
Το πεδίο της βιολογίας που ασχολείται με τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον εξαιτίας των ιδιοτήτων των βλαστικών κυττάρων και της δυνατότητας που προσφέρουν για την χρήση τους σε κλινικές εφαρμογές.

Στην πορεία της εμβρυογένεσης, το πρώτο στάδιο αποτελεί η σύντηξη του μητρικού και πατρικού προπυρήνα και ο σχηματισμός του διπλοειδούς ζυγώτη, ο οποίος μετά την πρώτη μειωτική διαίρεση δίνει έμβρυο με δύο κύτταρα. Κατά τις αρχικές διαιρέσεις, το συνολικό μέγεθος του εμβρύου δεν μεταβάλλεται ενώ τα κύτταρα που προκύπτουν λέγονται βλαστομερίδια και είναι ολοδύναμα (totipotent). Η έκφραση των εμβρυϊκών γονιδίων ενεργοποιείται μετά το στάδιο των 4-8 κυττάρων. Μέχρι τότε η πρωτεϊνοσύνθεση γίνεται με το απόθεμα μητρικού mRNA. Γύρω στο στάδιο των 8-16 βλαστομεριδίων, το έμβρυο μετατρέπεται σε μια συμπαγή μάζα κυττάρων μέσω σχηματισμού σφικτών κυτταρικών συνδέσεων, αποκτά πολικότητα και χαρακτηρίζεται ως μορίδιο. Μέσω αποπτωτικών διαδικασιών, στο εσωτερικό του εμβρύου σχηματίζεται μια κοιλότητα, το βλαστόκοιλο, η οποία γεμίζει με βλαστοκοιλιακό υγρό. Το τοίχωμα της κοιλότητας διαφοροποιείται σε τροφεκτόδερμα από το οποίο θα προκύψει η τροφοβλάστη και στη συνέχεια ο πλακούντας του εμβρύου, καθώς και όλες οι εξωεμβρυϊκές δομές. Στο εσωτερικό υπάρχει η εσωτερική μάζα κυττάρων (inner cell mass) που περιέχει πολυδύναμα κύτταρα (pluripotent) από τα οποία θα διαφοροποιηθούν όλες οι κυτταρικές σειρές του εμβρύου ((Brook and Gardner, 1997; Evans and Kaufman, 1981); (Martin, 1981). Στο στάδιο αυτό, το έμβρυο ονομάζεται βλαστοκύστη και είναι πλέον δυνατή η εμφύτευσή του στο ενδομήτριο.

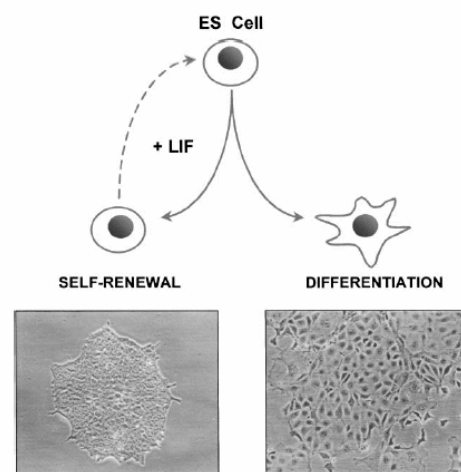
Αυτή είναι η πορεία της εμβρυογένεσης των θηλαστικών μέχρι το στάδιο της εμφύτευσης του εμβρύου στην μήτρα. Η εσωτερική μάζα κυττάρων αποτελεί την πηγή όλων των ιστών του αναπτυσσόμενου εμβρύου, του ενήλικου οργανισμού καθώς και την πηγή των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να βρεθούν σε προεμφυτευτικά έμβρυα και σε πολλούς ενήλικους ιστούς ή να απομονωθούν και να

διατηρηθούν in vitro ως εμβρυϊκά καρκινικά κύτταρα, βλαστικά κύτταρα ή σε εκείνα που θα δώσουν την γαμετική σειρά.

Η αξία των κυττάρων αυτών έγκειται στην ικανότητά τους να συνεισφέρουν και στις τρεις βλαστικές στιβάδες ενδόδερμα, μεσόδερμα, εξώδερμα. Η ικανότητά τους αυτή που ορίζεται ως πλειο-δυναμικότητα αποτελεί ένα από τα δύο χαρακτηριστικά που ορίζουν ένα εμβρυϊκό βλαστικό κύτταρο. Πολλοί συγγραφείς χαρακτηρίζουν τα κύτταρα αυτά ως ολοδόναμα, αν και in vivo δεν μπορούν να παράγουν τροφεκτόδερμα ούτε αρχέγονο ενδόδερμα. Το δεύτερο βασικό χαρακτηριστικό των κυττάρων αυτών είναι η ικανότητά τους να υφίστανται συνεχώς κυτταρικές διαιρέσεις χωρίς να διαφοροποιούνται, ιδιότητα που αναφέρεται ως αυτό-ανανέωση των βλαστικών κυττάρων. Ένα σημαντικό γνώρισμα τους που επιτρέπει την in vitro μελέτη της διαφοροποίησής τους είναι το γεγονός ότι μπορούν να σχηματίσουν in vitro ενδιάμεσα στάδια μεταξύ αδιαφοροποίητης και διαφοροποιημένης κατάστασης (Doetschman et al., 1985). Οι σχηματισμοί αυτοί ονομάζονται εμβρυϊκά σωματίδια (embryoid bodies) και αποτελούν τα πρώτα στάδια δέσμευσης των κυττάρων αυτών προς την διαφοροποίησή τους.



Πλειο-δυναμικότητα εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων



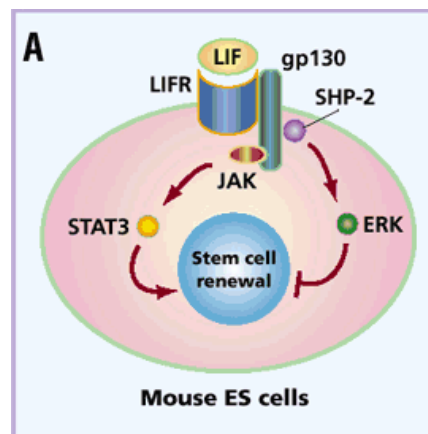
Αυτό-ανανέωση εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων

Παράγοντες απαραίτητοι για την διατήρηση της πλειο-δυναμικότητας και αυτό-ανανέωσης των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων

Η απομόνωση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων από την εσωτερική κυτταρική μάζα και η χρήση κατάλληλων ερεθισμάτων, επιτρέπει την διατήρησή τους *in vitro* για περαιτέρω μελέτη και κατανόηση του μηχανισμού αυτό-ανανέωσης και πλειο-δυναμικότητας ή ακόμα την κατευθυνόμενη διαφοροποίησή τους σε οποιονδήποτε από τους 216 διαφοροποιημένους κυτταρικούς τύπους του οργανισμού. Αν και έχει συντελεστεί σημαντική πρόοδος και προς τις δύο κατευθύνσεις απαιτείται περαιτέρω μελέτη και έρευνα.

Συνεχείς έρευνες αποδεικνύουν ότι για την διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης και της αυτό-ανανέωσης των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων είναι απαραίτητη η παρουσία τόσο μορίων κλειδιών όσο και η έκφραση γονιδίων που δρουν ως ρυθμιστικοί παράγοντες και εξασφαλίζουν τις ιδιότητες αυτές.

Ένα μόριο κλειδί που ανήκει στην οικογένεια IL6 των κυτοκινών είναι η πρωτεΐνη LIF (Leukemia inhibitory factor), η οποία ενεργοποιεί το μονοπάτι Jak/Stat3 και αναστέλλει την κυτταρική διαφοροποίηση προς μεσοδερμικά και ενδοδερμικά κύτταρα. Το σηματοδοτικό μονοπάτι, παρουσία LIF ξεκινά με το διμερισμό των υποδοχέων κυτοκίνης, LIFR και gp130 που οδηγεί στην ενεργοποίηση της κινάσης Jak (Burdon et al., 1999); Bouton et al., 1994(Zhang et al., 1997). Αυτή με την σειρά της φωσφορυλιώνει τους δύο υποδοχείς στα κατάλοιπα τυροσίνης και στρατολογεί τον μεταγραφικό παράγοντα STAT3 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη όπου και



Ρόλος του LIF στο μονοπάτι Jak/Stat3

τον φωσφορυλιώνει. Ακολουθεί διμερισμός του STAT3 και μετατόπιση του στον πυρήνα για την ενεργοποίηση της μεταγραφής (Darnell, 1997). Ενεργοποίηση του STAT3, απουσία LIF είναι επαρκής για την αυτό-ανανέωση των βλαστικών κυττάρων (Matsuda et al., 1999) ενώ παρουσία LIF και απενεργοποίηση του Stat3 οδηγεί σε άμεση διαφοροποίηση προς μεσόδερμα και ενδόδερμα (Niwa et al., 1998). Το LIF επιπλέον επάγει την ενεργοποίηση ενός αριθμού επιπρόσθετων πρωτεϊνών σηματοδότησης, όπως αυτές που εμπλέκονται στο μονοπάτι Erk, ριβοσωμικές κινάσες S6, πρωτεΐνες που αποκρίνονται και προσδέονται στο κυκλικό AMP και κινάσες Src της οικογένειας των τυροσινών. Το μονοπάτι Erk ανταγωνίζεται την αυτό-ανανέωση των βλαστικών κυττάρων, εξαιτίας κυρίως της αρνητικής δράσης που ασκεί στην ενεργότητα του JAK. Έτσι μία ισορροπία της ενεργότητας μεταξύ Stat3 και MAPK ίσως καθορίζει την αποτελεσματικότητα της αυτό-ανανέωσης των βλαστικών κυττάρων (Qi et al. 2004). Μια κινάση Src της οικογένειας των τυροσινών, η cYes συναντάται στους εμβρυϊκούς, αιμοποιητικούς και νευρικούς βλαστικούς πληθυσμούς κυττάρων και φαίνεται να παίζει κάποιο βασικό ρόλο στην διατήρηση των ιδιοτήτων των βλαστικών κυττάρων (Kurisaki et al., 2005).

Ωστόσο, το LIF δεν είναι ικανό να αναστείλει την κυτταρική διαφοροποίηση υπό την απουσία ορού. Ο Ying et al. προσδιόρισαν στον ορό την παρουσία των bone morphogenic πρωτεϊνών (BMPs), οι οποίες μαζί με το LIF δρουν για να εξασφαλίσουν την διατήρηση της αυτό-ανανέωσης. Συγκεκριμένα, οι BMPs επάγουν την έκφραση των ID γονιδίων, μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού SMAD προκειμένου να καταστείλουν την διαφοροποίηση προς νευροεξωδερμικά κύτταρα (Ying et al., 2003). Προκύπτει λοιπόν ότι παρά την απουσία LIF ή την ύπαρξη βλαστικών κυττάρων που δεν έχουν τον υποδοχέα (LIFR^{-/-}), ένας μικρός αριθμός των κυττάρων αυτών παραμένει αδιαφοροποίητος, πράγμα που σημαίνει ότι υπάρχει ένα ανεξάρτητο του LIF μονοπάτι που εξασφαλίζει τις χαρακτηριστικές ιδιότητες τους.

Ο Sato et al., προσδιόρισαν έναν εναλλακτικό μηχανισμό για την αυτό-ανανέωση των βλαστικών κυττάρων και συγκεκριμένα, τον ρόλο του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt, που δρα ανεξάρτητα του μονοπατιού LIF/STAT και καταστέλλει την νευρική τύχη (Aubert et al., 2002; Sato et al., 2004). Επιπλέον, καταστολή του GSK3β, ενός ανταγωνιστή του Wnt και υπεύθυνου για την αποικοδόμηση του, έδειξε ότι είναι

επαρκής για την διατήρηση της πλειο-δυναμικότητας και της αυτό-ανανέωσης των βλαστικών κυττάρων του ανθρώπου και των τρωκτικών (Cartwright et al., 2005).

Επιπρόσθετα, αρκετοί είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες που παίζουν ουσιώδη ρόλο στην διατήρηση της πλειο-δυναμικότητας και της αυτό-ανανέωσης των βλαστικών κυττάρων. Ένας από αυτούς είναι ο παράγοντας Oct4 (octamer binding protein 4), μέλος της οικογένειας POU, που δρα υπό την παρουσία του LIF. Όταν αφαιρεθεί από τα κύτταρα, αυτά διαφοροποιούνται προς κύτταρα του τροφεκτοδέρματος, ενώ κατά την διαφοροποίηση τα επίπεδα έκφρασής του πέφτουν. Αυτό αποδεικνύει ότι ο Oct4 είναι συνεχώς απαραίτητος προκειμένου να διατηρηθεί η πλειο-δυναμικότητα των βλαστικών κυττάρων. Ωστόσο, με υπερέκφραση ή υπό-έκφραση του, τα κύτταρα οδηγούνται σε διαφοροποίηση εκφράζοντας μεσοδερμικούς και νευρικούς δείκτες. Αυτό σημαίνει ότι ένας άλλος παράγοντας που δρα συνεργικά με τον Oct4 και κατευθύνει το μεταγραφώσωμα των βλαστικών κυττάρων είναι παρών σε μικρά ποσά. Μία πιθανότητα είναι ότι ο παράγοντας αυτός αλληλεπιδρά άμεσα με τον Oct4, έτσι ώστε όταν τα επίπεδα του τελευταίου αυξάνονται, ο πρώτος απομακρύνεται από τα γονίδια στόχους (Chambers and Smith, 2004).

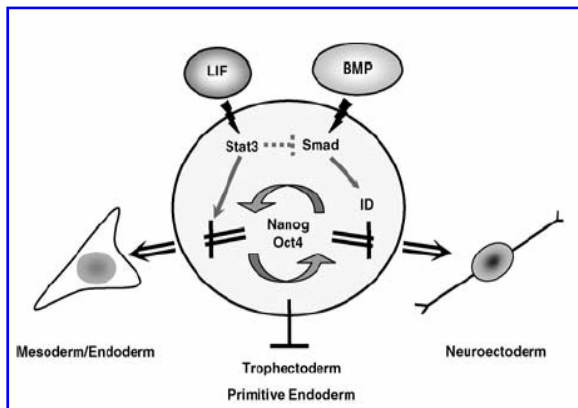
Δύο άλλοι παράγοντες που αλληλεπιδρούν με τον Oct4 και παίζουν ρόλο στην πλειο-δυναμικότητα των κυττάρων αυτών είναι οι Sox2 και FoxD3. Ο FoxD3 είναι απαραίτητος στο στάδιο πριν την εγκαθίδρυση και την διατήρηση της πολυδύναμης εσωτερικής μάζας κυττάρων. Ο Sox2, ένας μεταγραφικός παράγοντας που περιέχει μια επικράτεια HMG που προσδέεται στο DNA, παίζει βασικό ρόλο στην μεταγραφή πολλών γονιδίων που αποτελούν στόχο του Oct4. Μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια των *oct4* και *sox2* γονιδίων οδηγούν σε εμβρυϊκό θάνατο, ενώ απώλεια των BMP4, LIF, υποδοχέα LIF και του *stat3* γονιδίου δεν οδηγεί σε κάποια προφανή ανωμαλία, τουλάχιστον κατά την προεμφυτευτική ανάπτυξη του εμβρύου του ποντικού (Kuroda et al., 2005).

Πρόσφατα, βρέθηκε ότι ένας ακόμη μεταγραφικός παράγοντας ο Nanog, μια homeodomain πρωτεΐνη είναι απαραίτητος για την διατήρηση των ιδιοτήτων των βλαστικών κυττάρων. Ο Nanog εκφράζεται σε ένα περιορισμένο αριθμό κυττάρων και μόνο σε αυτά που εκφράζουν τον παράγοντα Oct4. Η έκφραση του Nanog ανιχνεύεται για πρώτη φορά στο στάδιο του μοριδίου, υψηλά επίπεδα mRNA συναντώνται στο

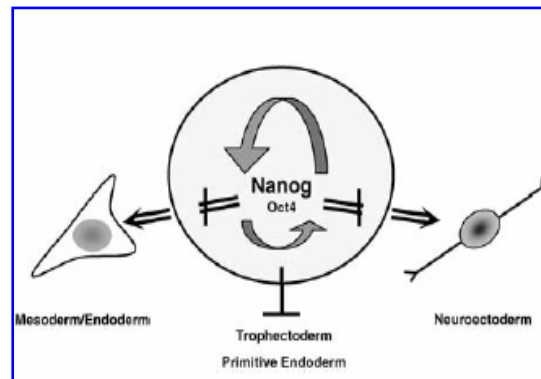
στάδιο της βλαστοκύστης, ενώ μια πτώση των επιπέδων παρατηρείται πριν το στάδιο της εμφυτεύσεως του εμβρύου. Η συνεχής του έκφραση αναστέλλει την διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων, ενώ υπερέκφρασή του υποκαθιστά το LIF χωρίς να επηρεάζει την δράση του Stat3, που σημαίνει ότι δρα ανεξάρτητα του μονοπατιού LIF/Stat3 (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Άλλωστε, υπερέκφραση του Nanog οδηγεί στην αυτό-ανανέωση των κυττάρων, παρά την συνεχή παρουσία του SOCS3, ενός παράγοντα που αναστέλλει το LIF/Stat3 μονοπάτι. Ωστόσο, Nanog και Stat3 δρουν συνεργικά για να παρέχουν το καλύτερο δυνατό μηχανισμό της αυτό-ανανέωσης των βλαστικών κυττάρων. Σε κύτταρα στα οποία απουσιάζει το Nanog (Nanog -/-), παρατηρείται αύξηση των επιπέδων των ενδοδερμικών μεταγραφικών παραγόντων Gata4, Gata6 και AFP (Yoshida-Koide et al., 2004). Αυτό ίσως υποδηλώνει έναν μηχανισμό μεταγραφικής καταστολής γονιδίων σημαντικών για την διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων σε extraembryonic ενδόδεσμα και τροφεκτόδεσμα (Hattori et al., 2004; Hay et al., 2004; Mitsui et al., 2003). Ωστόσο, ένας επιπρόσθετος μηχανισμός για την διατήρηση της πλειο-δυναμικότητας, είναι η ενεργοποίηση γονιδίων ειδικών για τα κύτταρα, όπως το *rex1*, μέσω πρόσδεσής του σε συντηρημένες αλληλουχίες του ενισχυτή του γονιδίου *rex1*.

Πρέπει να τονιστεί ότι για την λειτουργία του Nanog απαιτείται η συνεχής παρουσία του παράγοντα Oct4, ενώ στον υποκινητή του υπάρχουν τα στοιχεία octamer και Sox που εμφανίζονται συντηρημένα στον ποντικό και στον άνθρωπο. Τα στοιχεία αυτά στρατολογούν τους παράγοντες Oct4 και Sox2, αντίστοιχα, αυξάνοντας την μεταγραφή του γονιδίου *nanog*. Σύμφωνα με τον Kuroda et al., ο παράγοντας Oct4 είναι ένα απαραίτητο συστατικό στο κύριο σύμπλεγμα ειδικό για τα βλαστικά κύτταρα, ενώ ο παράγοντας Sox2 όχι. Επιπλέον, αποδεικνύουν ότι η έκφραση του Oct4 από μόνη της δεν είναι επαρκής για την επαγωγή της έκφρασης του Nanog γι' αυτό και υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός αγνώστου μέχρι τώρα παράγοντα (PSBP) που αλληλεπιδρά με τον Oct4 για να σχηματίσουν το ειδικό για τα κύτταρα αυτά σύμπλοκο και να προσδεθούν στα στοιχεία octamer και Sox στον υποκινητή του *nanog*. Προτείνουν δηλαδή, ότι η έκφραση του Nanog ρυθμίζεται αυστηρά από τους συν-ενεργοποιητές (Sox2 και PSBP) σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, που εμφανίζουν διαφορετικές συγγένειες για την αλληλουχία του Sox στοιχείου (Kuroda et al., 2005).

Συνολικά, ένα μοντέλο των μονοπατιών που ευθύνονται για την αυτοανανέωση και την πλειο-δυναμικότητα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων φαίνεται στην εικόνα. Το LIF και οι BMPs ενεργούν ταυτόχρονα για να καταστείλουν την διαφοροποίηση μέσω του STAT3 (αναστέλλει την μη νευρική διαφοροποίηση) και των ID (αναστέλλουν την νευρική διαφοροποίηση) αντίστοιχα. Όσο για τους ρυθμιστές της μεταγραφής Nanog και Oct4, αυτοί δρουν προκειμένου να διατηρήσουν τον αδιαφοροποίητο φαινότυπο. Επιπλέον στην εικόνα που ακολουθεί φαίνεται ότι κατά την υπερ-έκφραση του Nanog, δεν απαιτούνται εξωτερικοί παράγοντες για να αναστείλουν την διαφοροποίηση και η αυτό-ανανέωση συνεχίζεται.



Υπερέκφραση του Nanog



Δράση Nanog και Oct4

Σε γενικές γραμμές ό, τι ισχύει για τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα του ποντικού, που περιγράφεται κυρίως παραπάνω, ισχύει και για αυτά του ανθρώπου. Παρατηρείται λοιπόν, η έκφραση τόσο του παράγοντα Oct4 όσο και του Nanog. Ορθόλογα του *nanog* έχουν προσδιοριστεί στους ανθρώπους και στους αρουραίους και cDNAs έχουν ελεγχθεί λειτουργικά στα βλαστικά κύτταρα του ποντικού. Και τα δύο είναι ικανά να οδηγούν στην αυτό-ανανέωση και στην πλειο-δυναμικότητα των κυττάρων αυτών υπό την απουσία του LIF. Άλλωστε, το LIF δεν είναι από μόνο του ικανό να αποτρέψει την διαφοροποίηση των ανθρώπινων βλαστικών κυττάρων (Niwa, 2001), (Reubinoff et al., 2000). Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα με την οποία το ανθρώπινο Nanog κατευθύνει την αυτο-ανανέωση στα κύτταρα του ποντικού είναι πιο χαμηλή σε σύγκριση με το

αντίστοιχο γονίδιο του ποντικού. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει ποικιλομορφία στην πρωτεϊνική αλληλουχία μεταξύ των δύο ειδών.

Ο παράγοντας Oct4 φαίνεται να είναι απαραίτητος για την καταστολή της εξωεμβρυϊκής διαφοροποίησης τόσο στα ανθρώπινα όσο και στα ποντικίσια βλαστικά κύτταρα (Hay et al., 2004); (Matin et al., 2004). Τα ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα μπορούν να αυτό-ανανεώνονται χωρίς την εξωγενή προσθήκη LIF, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι η ενεργοποίηση του Stat3 δεν είναι σημαντική για αυτήν την ιδιότητα. Απλά, πιθανόν να επαρκεί ένα αυτοκρινές σήμα που προέρχεται μέσω του gp 130. Ένας επιπρόσθετος λόγος που το LIF δεν παίζει ουσιώδη ρόλο στα ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα είναι ότι αυτά διαθέτουν την ικανότητα να εκφράζουν μεγαλύτερα ποσά Nanog σε σύγκριση με αυτήν των κυττάρων του ποντικού.

Ρόλο κλειδί στην πλείο-δυναμικότητα και την διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων φαίνεται να παίζουν οι επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις στις ουρές των ιστονών και σε άλλες πρωτεΐνες που προσδένονται στην χρωματίνη (Morgan et al., 2005). Για παράδειγμα, ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA στον υποκινητή και ενισχυτή του Oct4 έδειξε ότι στην περίπτωση των βλαστικών κυττάρων, η περιοχή αυτή είναι υπο-μεθυλιωμένη, ενώ στην περίπτωση των κυττάρων του τροφοβλάστη βρίσκεται υπερ-μεθυλιωμένη (Kurisaki et al., 2005); (Hattori et al., 2004). Επιπλέον, πρόσφατα έχει δειχθεί ότι η μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου *nanog* συσχετίζεται με την καταστολή της έκφρασης του (Deb-Rinker et al., 2005). Στην περίπτωση του ανθρώπινου γονιδίου *nanog*, οι Ser και οι Thr της αμινοτελικής περιοχής του υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως φωσφορυλιώσεις, επηρεάζοντας την μεταγραφική ενεργότητα της καρβοξυτελικής του περιοχής (Oh et al., 2005).

Επιγενετικοί μηχανισμοί

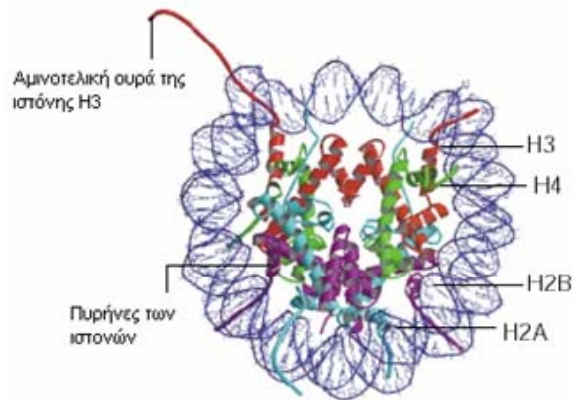
Το επιγενετικό πρόγραμμα είναι σημαντικό κατά την ανάπτυξη των θηλαστικών και η σταθερή κληρονόμηση των επιγενετικών αλλαγών είναι απαραίτητη για την διατήρηση της λειτουργίας του κάθε κυττάρου και ιστού (Li et al., 2002). Οι επιγενετικοί μηχανισμοί δρουν προκειμένου να αλλάξουν την προσβασιμότητα της χρωματίνης κατά

την μεταγραφική ρύθμιση μέσω τροποποιήσεων του DNA και ανακατατάξεων των νουκλεοσωμάτων. Το νουκλεόσωμα αποτελείται από περίπου δύο στροφές DNA τυλιγμένου γύρω από το οκταμερές των ιστονών, το οποίο περιλαμβάνει 2 υπομονάδες από την κάθε ιστόνη H2A, H2B, H3, H4. Η ιστόνη H1 παίζει συνδετικό ρόλο και σταθεροποιεί το σύμπλοκο (Khorasanizadeh, 2004). Το πακετάρισμα αυτό, που αποτελεί την πρώτη φάση δημιουργίας της χρωματίνης παρεμποδίζει στερεοχημικά τους διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες να προσδεθούν στο DNA. Η πρόσδεση αυτή διευκολύνεται με την τροποποίηση της νουκλεοσωμικής δομής μέσω τροποποιήσεων των συμμετεχόντων ιστονών.

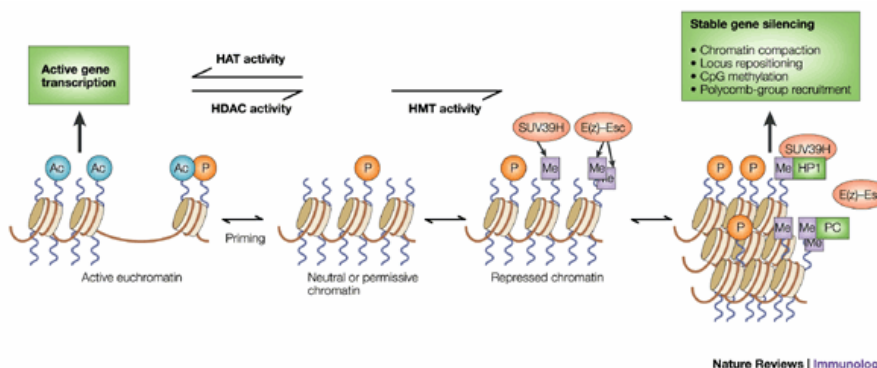
Οι ιστόνες έχει βρεθεί ότι αποτελούνται από έναν σφαιρικό πυρήνα από τον οποίο προεξέχει η αμινοτελική ουρά. Οι αμινοτελικές ουρές των ιστονών αποτελούν τα υποστρώματα για ομοιοπολικές τροποποιήσεις, όπως ακετυλίωσεις Lys, φωσφορυλιώσεις σε κατάλοιπα Thr και Ser, μεθυλιώσεις σε κατάλοιπα Lys και Arg, ADP- ριβοζυλίωση

καταλοίπων Glu, ουμπικουϊτίνωση και σουμοϋλίωση καταλοίπων Lys, με τις πρώτες να μας απασχολούν περισσότερο.

Διάφορες τροποποιήσεις των ιστονών μπορούν, συνεργικά ή ανταγωνιστικά, να τροποποιήσουν τη συγγένεια πρόσδεσης διαφόρων πρωτεϊνών που προσδέονται στη χρωματίνη. Υπάρχει λοιπόν ένας κώδικας των ιστονών που ερμηνεύει όλους αυτούς τους συνδυασμούς των ιστονικών τροποποιήσεων (Jenuwein and Allis, 2001).



Δομή ιστονών



Εικόνα: Ιστονικές τροποποιήσεις

Οι μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών αποτελούν πεδίο εκτεταμένης έρευνας, κυρίως απο τη στιγμή που ανακαλύφθηκε ότι αποτελούν το συνδετικό κρίκο μεταξύ της ενζυμικής δράσης των μεταγραφικών παραγόντων και της μεταγραφικής ενεργοποίησης ή καταστολής. Οι ιστόνες μπορούν να υποστούν μια σειρά τροποποιήσεων όπως ακετυλίωση, μεθυλίωση ή φωσφορυλίωση. Η κάθε τροποποίηση είναι αποτέλεσμα δράσης διαφορετικών ενζύμων, όπως ακετυλάσες ιστονών (Histones acetyltransferases- HATs), απακετυλάσες ιστονών (Histone deacetylases- HDACs) μεθυλάσες (histone methyltransferases - HMTs), απομεθυλάσες και διάφορες κινάσες. Από το σύνολο των ιστονών, οι καλύτερα μελετημένες είναι οι ιστόνες H3 και H4 του νουκλεοσώματος, στις οποίες οι αμινοτελικές ουρές αποτελούν υποστρώματα των παραπάνω τροποποιητικών ενζύμων. Η ανακάλυψη ότι ο συνενεργοποιητής Gcn5p του σακχαρομύκητα λειτουργεί σαν καταλυτική υπομονάδα ακετυλοτρανσφεράσης ιστόνης τύπου A (Brownell et al.,1996) οδήγησε στην σύνδεση της ακετυλίωσης με την επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης. Ακετυλίωσεις λαμβάνουν χώρα σε κατάλοιπα λυσίνης όπως K9, K14, K18, K12 και K20 στην H4 (Lusser, 2002). Τα ένζυμα με δραστικότητα HAT, όπως P300/CBP, PCAF, GCN5,καταλύουν τις τροποποιήσεις αυτές που στο σύνολό του σχετίζονται με μεταγραφική ενεργοποίηση και είναι αναστρέψιμες. Η αφαίρεση των τροποποιήσεων αυτών καταλύεται από ένζυμα με δραστικότητα HDAC και σχετίζονται συνήθως με καταστολή της μεταγραφής. Το χρωματινικό περιβάλλον και η κυτταρική τροποποίηση είναι οι παράγοντες που εξασφαλίζουν τις δύο αυτές αντίθετες ενζυμικές δραστικότητες σε ισορροπία. Όσον αφορά την μεθυλίωση έχουν βρεθεί ένζυμα όπως CARM1 και PRMT1 με δράση HMT τόσο σε ιστόνες όσο και σε άλλες πρωτεΐνες (Strahl et al., 2001). Η μεθυλίωση συναντάται σε κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης (στην περίπτωση της ιστόνης H3 μεθυλίωση παρατηρείται στα κατάλοιπα R2, K4, K9, K14, K17, K8, K23, K26, K27 και K36, ενώ για την περίπτωση της H4 στα κατάλοιπα R3 και K20) και μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ότι έχει χαρακτηριστικά πιο μόνιμης τροποποίησης. Συγκεκριμένα, υπήρχε η άποψη ότι η αλλαγή στη τροποποίηση αυτή επιτυγχάνονταν μόνο με την αλλαγή των υπαρχόντων νουκλεοσωμάτων. Ωστόσο, η άποψη αυτή αναθεωρήθηκε πρόσφατα, ύστερα από την ανακάλυψη ότι υπάρχουν ένζυμα

που αντίστοιχα με τις απακετυλάσες μπορούν να απομεθυλιώσουν τα κατάλοιπα Lys και Arg. Οι απομεθυλάσες των ιστονών καταλύουν την απομάκρυνση των μεθυλικών ομάδων. Δύο είδη τετοιων ενζύμων έχουν προσδιοριστεί: η lysine specific demethylase 1 και η οικογένεια των πρωτεϊνών με το Jumonji C (JmjC) domain. Οι φωσφορυλιώσεις τέλος, συναντώνται σε κατάλοιπα σερίνης όπως S10 και S28 για την ιστόνη H3 ενώ S1 για την ιστόνη H4. Οι τροποποιήσεις αυτές, δεν γίνονται τυχαία, αλλά υπακούουν σε συγκεκριμένα σήματα όπου εξασφαλίζουν την εμφάνιση συγκεκριμένων και την επακόλουθη αναστολή άλλων. Τα δεδομένα αυτά οδηγούν στην υπόθεση ότι υπάρχει κάποιος κώδικας ιστονών, κατά τον οποίο συγκεκριμένες τροποποιήσεις αποτελούν σήμα για συγκεκριμένη χρωματινική κατάσταση και επακόλουθη ενεργοποίηση ή καταστολή γονιδίων στη συνέχεια (Jenuwein and Alis, 2001). Οι τροποποιήσεις αυτές αποτελούν θέσεις αναγνώρισης για πρωτεΐνες που φέρουν κατάλληλες επικράτειες, όπως την επικράτεια Bromodomain που συνδέεται με την αναγνώριση ακετυλιώσεων και την chromodomain για τις μεθυλιώσεις (Marmostein, 2001). Παράγοντες με ρόλο στην αναδιομόρφωση της χρωματίνης (chromatin remodelers) διαθέτουν τέτοιες συντηρημένες επικράτειες με εξειδίκευση σε συγκεκριμένα τροποποιημένα κατάλοιπα ιστονών. Χαρακτηριστικά παράδειγματα αποτελούν η ακετυλίωση της K8 της H4 όπου οδηγεί στην διαμεσολάβηση του συμπλόκου SWI/SNF και των K9 και K14 της H3 για την στρατολόγηση του TFIID (Agalioti et al., 2002). Επομένως, αδιαμφισβήτητο είναι το γεγονός ότι οι τροποποιήσεις των ιστονών είναι βασικοί ρυθμιστές της δομής της χρωματίνης. Έχει επιπλέον ήδη προταθεί ότι τροποποιήσεις τους σε περιοχές που αντιστοιχούν σε ενεργοποιημένα γονίδια μπορούν να λειτουργήσουν σαν μνήμη για το κύτταρο (Jeppesen, 1997). Μελέτες έδειξαν ότι οι περιοχές των ενεργοποιημένων γονιδίων συνδέονται με συγκεκριμένες τροποποιήσεις ιστονών, όπως υπερακετυλίωση της H3 και H4, τρι- και διμεθυλίωση της λυσίνης 4 της H3 και διμεθυλίωση της λυσίνης 79 της H3 (Kouskouiti and Talianidis, 2005). Οι τροποποιήσεις αυτές πραγματοποιούνται από τα ειδικά ένζυμα τροποποίησης ιστονών που στρατολογούνται είτε από μεταγραφικούς παράγοντες που ήταν συνδεδεμένοι στις θέσεις αυτές είτε από το σύμπλοκο της RNA πολυμεράσης II.

Πρόσφατη μελέτη εμπλέκει τις διάφορες παραλλαγές των ιστονών ως μέσο γονιδιακής σήμανσης. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι διάφορες παραλλαγές των

ιστονών. Για την H3 υπάρχουν οι παραλλαγές Cenp-A(εντοπίζεται στο κεντρομερές), H3.3, H3.2, H3.1. Παρόλο τις ελάχιστες διαφορές στην αλληλουχία (οι δύο τελευταίες διαφέρουν κατά 1 αμινοξύ) εμφανίζουν σαφείς διαφορές τόσο στην έκφραση όσο και στο προφίλ των μεταφραστικών τους τροποποιήσεων PTMs (post translational modifications), προτείνοντας ότι αυτές οι H3 παραλλαγές των θηλαστικών μπορούν, πράγματι, να έχουν χωριστές βιολογικές λειτουργίες (Hake et al., 2006).

- Η H3.3 έχει PTMs (post translational modifications) που συνδέονται με την ενεργοποίηση γονιδίων (υπερακετυλίωση και διμεθυλίωση των K36 και K79),
- Η H3.2 έχει PTMs που σχετίζονται με γονίδια μεταγραφικά κατεσταλμένα-απενεργοποιημένα (K27 δι - και τριμεθυλίωση), και
- Η H3.1 έχει PTMs που συνδέονται με την ενεργοποίηση γονιδίων (K14 ακετυλίωση) και την απενεργοποίηση (K9 διμεθυλίωση).

Ωστόσο, η παρούσα εργασία θα επικεντρωθεί στην παραλλαγή της ιστόνης H3 την H3.3, η οποία συντίθεται συνεχώς σε χαμηλά επίπεδα σε όλους του ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η H3.3 διαφέρει από την H3.1 σε 4 μόνο αμινοξέα και αποτελεί τον κυρίαρχο τύπο σε μη διαιαρούμενα διαφοροποιημένα κύτταρα στα σπονδυλόζωα. Έχει βρεθεί ότι τα 3 από τα τέσσερα αμινοξέα στα οποία οι δύο ιστόνες διαφέρουν καθορίζουν την διαφορετική συμπεριφορά συναρμολόγησης του νουκλεοσώματος. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της ιστόνης H3.3 διευκολύνεται η ανεξάρτητη της αντιγραφής (RI) συναρμολόγηση σε αντίθεση με εκείνη της εξαρτώμενης από την αντιγραφή (RC) που απαιτεί η H3 (Henikoff, Ahmad., 2005). Στο σημείο αυτό, έχει δειχθεί ότι η RI ενσωμάτωση της H3.3 στην χρωματίνη είναι εξαρτώμενη από την μεταγραφή, εντοπίζεται σε μεταγραφικές περιοχές γονιδίων και συνδέεται με απομάκρυνση των άλλων μορφών- παραλλαγών της H3 (Kulaeva et al., 2007). Επιπλέον, η H3.3 έχει συσχετιστεί με ενεργές μεταγραφικά χρωματινικές περιοχές γονιδίων και σύμφωνα με τον Chow, η παραλλαγή αυτή σε συνδυασμό με τις κατάλληλες μεταφραστικές τροποποιήσεις (ακετυλίωση- μεθυλίωση) μπορούν να διατηρηθούν και κατά την διάρκεια της μίτωσης εξασφαλίζοντας την γονιδιακή σήμανση και την διαίωσιση της επιγενετικής μνήμης (Chow et al., 2005). Για παράδειγμα, κατά την ενεργοποίηση της μεταγραφής, η H3 που μεταφέρει την κατασταλτική μεθυλίωση H3K9 μπορεί να

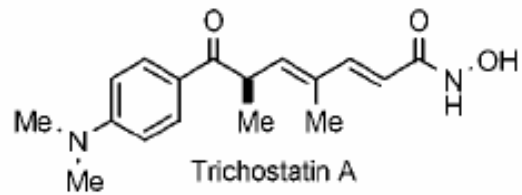
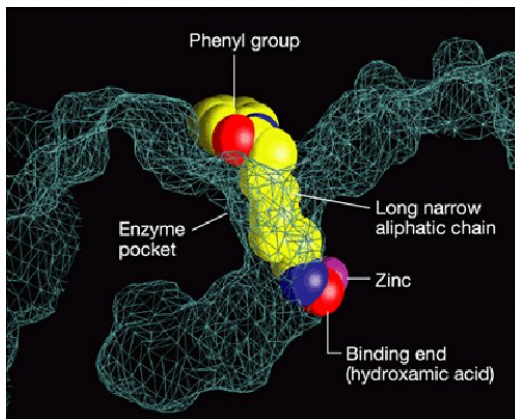
αντικατασταθεί από την H3.3 που δεν φέρει αυτήν την τροποποίηση (Torres-Padilla et al. 2006)

Histones	Features
Archaeal histones	Ancestral histone fold proteins without tails found in singly wrapped tetrameric units that comprise nucleosome particles.
H2A, H2B	Canonical core histones encoded by replication-coupled genes.
H2AZ	H2A variant found in nearly all eukaryotes that has a diverged self-interaction domain.
macroH2A	Vertebrate-specific H2A variant with a C-terminal globular domain. Enriched on the mammalian inactive X-chromosome.
H2A-Bbd	Vertebrate-specific H2A variant that is widely distributed. Relatively deficient on the inactive X-chromosome.
H2AX	H2A form with an SQ[E/D] Ø (Ø = hydrophobic) C-terminal motif that becomes serine phosphorylated at sites of double-stranded breaks.
H3, H4	Canonical core histones encoded by replication-coupled genes.
H3.3 (H3.2 in plants)	H3 variant that replaces H3 and differs at position 31 and at a few residues on helix 2 that allow deposition outside of replication.
Packaging histones	Core and linker histone variants adapted for tight packaging of DNA in sperm and pollen in some organisms.

Απακετυλάσες των ιστονών (HDACs)

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί τρεις οικογένειες απακετυλασών των ιστονών, Rpd3p, Hda1p και Sir2p, οι οποίες είναι διατηρημένες από το σακχαρομύκητα μέχρι τον άνθρωπο. Η δράση των απακετυλασών συσχετίζεται συνήθως με την καταστολή της μεταγραφής. Η αφαίρεση των ακετυλομάδων από τις ιστόνες αποκαθιστά το θετικό τους φορτίο και ενισχύει την πρόσδεση της αρνητικά φορτισμένης ραχοκοκαλιάς του DNA με αυτές, οδηγώντας σε πιο κλειστή διαμόρφωση της χρωματίνης που αποκλείει την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων (Johnson and Turner, 1999). Ωστόσο, οι απακετυλάσες καταστέλλουν την μεταγραφή όχι μόνο επιδρώντας στην δομή της χρωματίνης αλλά δρώντας επίσης, σε ενεργοποιητές της μεταγραφής, σε συν-καταστολείς και σε άλλους παράγοντες που προσδένονται στο DNA. Έτσι, αλληλεπιδρούν άμεσα με μεταγραφικούς παράγοντες όπως η p53 και MyoD, τους απακετυλιώνουν και καταστέλλουν την μεταγραφική τους ενεργότητα (Mal et al., 2001). Επιπλέον, μπορούν να εμποδίσουν την αλληλεπίδραση των HAT με τους μεταγραφικούς παράγοντες – στόχους τους ή ακόμα να στρατολογήσουν συν-καταστολείς στα γονίδια στόχους. Δεν είναι περίεργο λοιπόν το γεγονός ότι οι HDACs συναντώνται σαν υπομονάδες συμπλόκων καταστολής της μεταγραφής (Lagace and Nachtigal, 2004).

Η δράση των απακετυλασών των ιστονών μπορεί να ανασταλεί με τη χρήση αναστολέων (HDAC Inhibitors ή HDACIs). Τέτοιοι αναστολείς είναι η τριχοστατίνη A (TSA), το βουτυρικό νάτριο, η τραποξίνη B και το SAHA (Suberoylanilide hydroxamate). Κοινό χαρακτηριστικό όλων των παραπάνω αναστολέων είναι ότι περιέχουν υδροξαμικό δακτύλιο στη δομή τους. Ο δακτύλιος αυτός δεσμεύεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου παρεμποδίζοντας τη δράση του. Η δομή και ο τρόπος πρόσδεσης ενός τέτοιου αναστολέα, της TSA, φαίνεται στην εικόνα.



Τρόπος πρόσδεσης της TSA στο ένζυμο

Δομή TSA

Μελέτες έχουν δείξει ότι η TSA δρα υπέρ της ακετυλίωσης, αλλάζοντας την χρωματινική δομή και ρυθμίζοντας θετικά την μεταγραφή των *gelsolin*, ιστόνης H1, κυτοκερατίνη A, *c-fos* και *c-myc*. Ωστόσο, μπορεί να παρουσιάζει και αντίθετα αποτελέσματα, δηλαδή καταστολή της μεταγραφής γονιδίων όπως στις περιπτώσεις κυκλίνης B1, κυκλίνης A και ιντερλευκίνης IL-12 (Iwata et al., 2002). Επιπλέον, πρόσφατες έρευνες αποκαλύπτουν ότι η χρήση της TSA ενισχύει την ακετυλίωση των αμινοτελικών ουρών των ιστονών στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα. Από μία πρόσφατη έρευνα, προέκυψε επίσης, ότι ενισχύει την ακετυλίωση του GATA4 και οδηγεί τα βλαστικά κύτταρα να διαφοροποιηθούν προς μυοκύτταρα της καρδιάς. Μια ακόμα πιο πρόσφατη έρευνα δείχνει ότι επάγει την διαφοροποίηση των ES κυττάρων του πιθήκου σε μυοκαρδιακά. Συγκεκριμένα, δείχνουν ότι 24 ωρη επαγωγή με TSA των EBs από ES πιθήκου οδηγεί σε διαφοροποίηση προς καρδιομυοκύτταρα (Hosseinkhani et al., 2007).

Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι αναστέλλει την διαφοροποίηση σε αδιποκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα ενώ, στους σκελετικούς μύες, είτε επάγει είτε αναστέλλει την διαφοροποίηση ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο. Τα παραπάνω στοιχεία αποκαλύπτουν ότι η TSA έχει διαφορετικές επιδράσεις σε διακριτούς κυτταρικούς τύπους και σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια (Kawamura et al., 2005).

In vitro σύστημα διαφοροποίησης εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων

Σχηματισμός **embryoid bodies**

Όταν καλλιεργούνται σε εναιώρημα χωρίς παράγοντες αντι-διαφοροποίησης, τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ES) διαφοροποιούνται αυθόρμητα και σχηματίζουν τα τρισδιάστατα multicellular σύνολα αποκαλούμενα εμβρυϊκά σωματίδια **embryoid bodies**

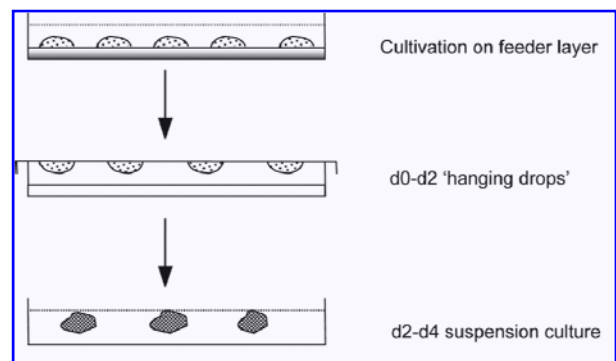
(EBs). Τα EBs ανακεφαλαιώνουν πολλές πτυχές της διαφοροποίησης κυττάρων κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, και διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των κυττάρων ES σε ποικίλους τύπους κυττάρων *in vitro*.

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για το σχηματισμό EBs από τα κύτταρα ES. Οι τρεις βασικές μέθοδοι είναι:

- liquid suspension culture in bacterial-grade dishes
- culture in methylcellulose semisolid media
- culture in hanging drops.

Πρόσφατα, οι μέθοδοι που βασίζονται σε ένα round-bottomed πιάτο 96 πηγαδιών και έναν κωνικό σωλήνα (conical tube) χρησιμοποιούνται για τη διαμόρφωση EBs από προκαθορισμένους αριθμούς κυττάρων ES. Για την παραγωγή μεγάλων αριθμών EBs, κατάλληλη είναι

η stirred-suspension καλλιέργεια (stirred-suspension culture), που χρησιμοποιεί φιάλες (spinner flasks) και τους βιολογικούς αντιδραστήρες (bioreactors). Κάθε μια από αυτές τις μεθόδους έχει την ιδιαιτερότητά της και κατά συνέπεια, τα EBs διαμορφώνουν



χαρακτηριστικά γνωρίσματα ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο (Kurosawa, 2007). Ένα εμβρυικό σωματίο αποτελείται από εξωδερμικούς, μεσοδερμικούς και ενδοδερμικούς ιστούς, που συνοψίζουν πολλές πτυχές της κυτταρικής διαφοροποίησης κατά την εμβρυογένεση των θηλαστικών και διαφοροποιούνται σε παράγωγα και των τριών βλαστικών στρωμάτων.

Για την διαφοροποίηση των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων θα χρησιμοποιηθεί η τεχνική Hanging drop culture, που αποτελεί ένα κατάλληλο περιβάλλον για τον σχηματισμό των εμβρυικών σωματίων. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον σχηματισμό ενός ομογενούς πληθυσμού EBs από έναν καθορισμένο αριθμό κυττάρων. Τα σωματίδια που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται για να σχηματίσουν ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένου νευρικών, λεμφοειδών, αιματοποιητικών, νεφρικών, ηπατικών, ινσουλινοπαραγωγών, γαμετικών κυττάρων και καρδιομυοκυττάρων. Από το σύνολο των διαφοροποιημένων κυτταρικών τύπων που αναφέρονται, είναι εμφανές

οτι η μέθοδος αυτή κυρίως διευκολύνει την διαφοροποίηση των ES κυττάρων προς μεσόδερμα.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΥΛΙΚΑ

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες καθώς και τα ένζυμα τροποποίησης νουκλεϊκών οξέων προήλθαν από τις εταιρίες: MINOTECH και NEW ENGLAND BIOLABS (NEB).

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία ανασυνδιασμένων πλασμιδίων ήταν ο pBLUESCRIPT KS II της STRATAGENE.

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν κολώνες NOUCLEOBOND ενώ για τον καθαρισμό των τμημάτων DNA από το πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν κολώνες NOUCLEOSPIN της εταιρείας MACHEREY-NAGEL.

Οι αλληλουχίες των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων καθώς και τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ι.Τ.Ε.

Κυτταρικές σειρές

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται είναι η cgr8, η οποία προήλθε από την εσωτερική μάζα κυττάρων ενός αρσενικού 3.5 ημερών εμβρύου ποντικού της σειράς 129 που βρισκόταν στο στάδιο της βλαστοκύστης.

Η κυτταρική σειρά cos που χρησιμοποιήθηκε, ήταν κατάλληλη για την υπερέκφραση των ιστονών και τον έλεγχο ενσωμάτωσης στην χρωματίνη. Έχει μορφολογία ινοβλαστών, αναπτύσσεται σε ένα στρώμα (monolayer), προέρχεται από τα CV-1 Simian κύτταρα το νεφρού του αφρικανού πιθήκου (*cercopithecus aethiops*) και περιέχει το T αντιγόνο.

Για την μελέτη των εμβρυικών σωματίων χρησιμοποιήθηκαν οι ES κυτταρικές σειρές οι οποίες προέκυψαν ύστερα από ομόλογο ανασυνδυασμό:

- eGFP στον γενετικό τόπο Brachyury (μεσόδερμα)
- dsRedExpress στον γενετικό τόπο Sox17 (ενδόδερμα)

Στελέχη βακτηρίων

Το βακτηριακό στέλεχος *E.coli* που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων ήταν σε όλες τις περιπτώσεις το DH5α. Το στέλεχος αυτό είναι ανίκανο ανασυνδυασμού και χρησιμοποιείται για επίστρωση σε τριβλία Petri και ανάπτυξη πλασμιδίων.

Θρεπτικά μέσα

Καλλιέργειες βακτηρίων

Η καλλιέργεια των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε στο θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertany) το οποίο περιέχει 1% τρυπτόνη (bacto tryptone), 0.5% εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) και 1% NaCl, ενώ για τις στερεές καλλιέργειες προστίθεται επιπλέον 1.5% άγαρ. Και στις δυο περιπτώσεις το pH ρυθμίζεται στο 7.0 με NaOH.

Καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων

Για τις καλλιέργειες των ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής θρεπτικά μέσα:

GMEM για την κυτταρική σειρά cgr8,

DMEM(+10%FBS + 2mM-L-Glutamine) για την κυτταρική σειρά cos και

IMDM για τον σχηματισμό των εμβρυικών σωματίων. Σε κάθε περίπτωση προστίθεται 10% FBS.

Αντισώματα

Anti-acetyl histone H4: Upstate biotechnology, Rabbit antiserum, 1μg/μg, Cat# 06-866, Lot# 29532, 2μl/ανοσοκατακρήμνιση

Anti-pol II: Santa Cruz biotechnology, 200μg/ml, Cat# sc-899, Lot# B2106, 2μl/ανοσοκατακρήμνιση

Ολιγονουκλεοτίδια

Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των μεταγραφικών επιπέδων με RealtimePCR ήταν:

Ανίχνευση του mRNA του Nanog γονιδίου

5' εκκινητής: 5'-CGCTGCTCCGCTCCATAACT -3'

3' εκκινητής: 5'-GCGCATGGTTTCCCTAGTG-3'

Ανίχνευση του mRNA του Gapdh γονιδίου

5' εκκινητής: 5'-GATGACATCAAGAAGGTGGT -3'

3' εκκινητής: 5'-AGGAAATGAGCTTGACAAAG -3'

Ανίχνευση του mRNA του Hprt γονιδίου

5' εκκινητής: 5'-CTCCTCAGACCGCTTTTGG -3'

3' εκκινητής: 5'-TCCTCGGCATAATGATTAGG -3'

Ανίχνευση του mRNA του Brachyury γονιδίου

5' εκκινητής: 5'-GCGAGCTGGGTGGATGTAGA-3'

3' εκκινητής: 5'-CAAGGCGGCACAAGACTAAGTC-3'

Ανίχνευση του mRNA του Gata 4 γονιδίου

5' εκκινητής: 5'-GCCAACTGCCAACTACCAC-3'

3' εκκινητής: 5'-GACCTGCTGGCGTCTTAGA-3'

Ανίχνευση του mRNA του Gata 6 γονιδίου

5' εκκινητής: 5'-GCCACTGTGGAGACGAGA-3'

3' εκκινητής: 5'-CATATAGAGCCCGCAAGCAT-3'

Ανίχνευση του mRNA του Hoxa1 γονιδίου

5' εκκινητής: 5'-GGTCAACCCAACGCAGTG-3'

3' εκκινητής: 5'-TGCTTCATGCGGCGATT-3'

Ανίχνευση του mRNA του Mlf1 γονιδίου

5' εκκινητής: 5'-GAACCCATAATCGTCGAG-3'

3' εκκινητής: 5'-CTTCGGGTTTGAGTTGAG-3'

Ανίχνευση του mRNA του Mash 1 γονιδίου

5' εκκινητής: 5'-CCACCATCTCCCCAACTA-3'

3' εκκινητής: 5'-CTGGGCTAAGAGGGTCGTAGG-3'

Ανίχνευση του mRNA του Oct4 γονιδίου

5' εκκινητής: 5'-ACCAGGGTCTCCGATTTGCAT-3'

3' εκκινητής: 5'-CCCTGGGCGTTCTCTTTGGAA-3'

Ανίχνευση του mRNA του Pdgfrb γονιδίου

5' εκκινητής: 5'-GACTACCTGCACCGGAACA-3'

3' εκκινητής: 5'-GGGACTCAATGTCTGCGTATT-3'

Ανίχνευση του mRNA του Wnt3 γονιδίου

5' εκκινητής: 5'-AAAGTGTAATGCCACGGGT-3'

3' εκκινητής: 5'-GGGACTCACGGTGTTC-3'

Για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων μετά την ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές:

Gapdh

F: 5'-ATCTCAGCTCCCCTCCCCCTAT-3'

R: 5'-CACCCGTAAAGCCGCGAGTAG-3'

Gdf3

F: 5'-CCCAGGTGATACCGGATG-3'

R: 5'-GAGGCGGACACAGGTTAAGAA-3'

Hprt

F: 5'-AAGAACTGGGCCTAAATC-3'

R: 5'-CCGGAACTCTTATCTGACTA-3'

mNanog

F: 5'-CTTACTAAGGTAGCCCGAGTC-3'

R: 5'-GTTTATACACGGCTTTCCTTT-3'

Oct4

F: 5'-TTGGCACACGAACATTCAATGGAT-3'

R: 5'-CTCACAAACCAGTTGCTCGGATG-3'

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

Πέψη πλασμιδιακού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Προκειμένου να γίνει δυνατή η κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA είναι απαραίτητη η πέψη τόσο του τμήματος που θέλουμε να κλωνοποιηθεί όσο και του πλασμιδιακού φορέα με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στα

κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα με την παρουσία της πρωτεΐνης BSA, στις ιδανικές συνθήκες (μοριακότητα και σύσταση αλάτων στο ρυθμιστικό διάλυμα, συγκέντρωση ενζύμου, θερμοκρασία, pH, συγκέντρωση υποστρώματος) σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της εκάστοτε εταιρείας.

Αντίδραση σύνδεσης γραμμικών μορίων

Η αντίδραση πραγματοποιείται με τη δράση της λιγάσης του DNA βακτηριοφάγου T₄ (T₄ DNA ligase), η οποία καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της φωσφορικής ομάδας του 5' άκρου και της υδροξυλικής ομάδας του 3' άκρου δίκλωνων μορίων DNA. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις σύνδεσης ποικίλουν ανάλογα με τα άκρα των γραμμικών μορίων που επρόκειτο να ενωθούν (συμπληρωματικά ή τυφλά), το μέγεθος τους και το επιθυμητό προϊόν της αντίδρασης, όπως επανακυκλοποίηση του πλασμιδίου ή κατασκευή ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Το ένθεμα στην αντίδραση έχει 10πλάσια μοριακότητα σε σχέση με τον φορέα.

Μετασχηματισμός E.coli κυττάρων με θερμικό σοκ (Transformation)

Ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων είναι απαραίτητος τόσο για τον πολλαπλασιασμό και την απομόνωση πλασμιδιακού DNA όσο και για την ανίχνευση ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών κατασκευών που προέρχονται από αντίδραση σύνδεσης (ligation). Οι πλασμιδιακοί φορείς έχουν την ικανότητα αναδιπλασιασμού μέσα στο βακτηριακό κύτταρο λόγω της θέσης έναρξης της αντιγραφής που διαθέτουν. Ακόμη φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε διάφορα αντιβιοτικά και μας δίνουν τη δυνατότητα επιλογής των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών κατασκευών μας γιατί μόνο αυτά που περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο επιζούν σε θρεπτικό μέσο με τα κατάλληλα αντιβιοτικά.

Σε 100μl δεκτικών κυττάρων *E.coli* (DH5α) προστίθεται το μίγμα της αντίδρασης της λιγάσης ή κάποιο πλασμίδιο και το μίγμα ανακινείται ήπια. Επωάζεται για 30min στον πάγο και έπειτα προκαλείται θερμικό σοκ στους 42° C για 90sec. Τα κύτταρα επανατοποθετούνται στον πάγο για 2-4min και προστίθεται 1ml LB χωρίς αντιβιοτικά. Γίνεται επώαση στους 37° C για 1h έτσι ώστε τα κύτταρα να συνέλθουν από το σοκ, να αναπτυχθούν και να παράγουν τις πρωτεΐνες που τους προσδίδουν αντίσταση στα αντιβιοτικά. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται για 1min στις 14.000 rpm σε RT, απομακρύνεται το LB και μια μικρή ποσότητα που απομένει απλώνεται σε πιάτα LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά για επιλογή. Επωάζονται στους 37° C O/N.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μετασχηματισμένων βακτηρίων

Μολύνονται 3ml υγρού θρεπτικού μέσου LB (1% τρυπτόνη, 0.5% εκχύλισμα ζύμης, 1% NaCl) με την επιθυμητή βακτηριακή αποικία, προσθέτοντας τα κατάλληλα αντιβιοτικά και επωάζεται στους 37° C ολονύκτια (O/N). Την επόμενη μέρα οι πελλέτες επαναδιαλύεται σε 1 όγκο κρούς διαλύματος I (50mM γλυκόζη, 25mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA pH 8) που περιέχει RNase A. Στη συνέχεια προστίθενται 2 όγκοι διαλύματος II (0.2N NaOH, 0.1% SDS) για την λύση των κυττάρων και 1.5 όγκοι διαλύματος III (3M οξικό κάλιο, 5M οξικό οξύ) που είναι το διάλυμα εξουδετέρωσης.

Στην συνέχεια αν το πλασμίδιο προορίζονταν για διαγνωστικές πέψεις γινόταν κατακρήμνιση με 2 όγκους αιθανόλη ενώ αν το πλασμίδιο επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί για διαμόλυνση σε ευκαρυωτικά κύτταρα γινόταν καθαρισμός με κολώνα σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Nucleobond και έπειτα κατακρήμνιση με 0.8 όγκους ισοπροπανόλης.

Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA

Υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, τα γραμμικά μόρια του DNA μεταναστεύουν σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης με ταχύτητες ανάλογες του μεγέθους τους. Η πυκνότητα του πηκτώματος και η εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού καθορίζονται ανάλογα με τα μεγέθη των μορίων που θα διαχωριστούν. Τα μεγέθη καθώς και οι ποσότητες του DNA που ηλεκτροφορούνται καθορίζονται μετά από σύγκριση των ζωνών που δίνουν με μεγέθη γνωστών τμημάτων DNA που ηλεκτροφορούνται ταυτόχρονα με ακτινοβολία του πηκτώματος με UV ακτινοβολία. Ο μάρτυρας ποσότητας και μεγέθους που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα ήταν το DNA του λ φάγου τεμαχισμένο με το περιοριστικό ένζυμο PstI. Το διάλυμα που προστέθηκε σε όλα τα διαλύματα πριν την ηλεκτροφόρηση ήταν το διάλυμα 6x της χρωστικής orange G (0.25% orange G, 15% φικόλλη σε TE). Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης, που χρήτα ησιμοποιήθηκε ν 0.5x TBE.

Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης: Ανάλογα με την επιθυμητή πυκνότητα του πηκτώματος διαλύεται με βρασμό μια ποσότητα σκόνης αγαρόζης σε 0.5x TBE (π.χ. για πήκτωμα 1%, 1gr σκόνης αγαρόζης διαλύεται σε 100ml 0.5x TBE).

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction)

Με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επιτυγχάνεται πολλαπλασιασμός επιθυμητών περιοχών του DNA με τη βοήθεια δυο μικρών συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές της αντίδρασης και είναι συμπληρωματικοί των άκρων της αλληλουχίας που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Η αντίδραση πραγματοποιείται με μια σειρά επαναλαμβανόμενων κύκλων που περιλαμβάνουν: καταστροφή των κυτταρικών δομών και αποδιάταξη των νουκλεϊκών οξέων στους 94° C, υβριδοποίηση των εκκινητών στις κατάλληλες θέσεις σε θερμοκρασία συγκεκριμένη για το καθένα ζεύγος εκκινητών και τέλος, ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων για την επιμήκυνση των δύο αλυσίδων στους 72° C με τη δράση της θερμοανθεκτικής DNA εξαρτώμενης DNA πολυμεράσης Taq (πολυμεράση που έχει απομονωθεί από τον θερμοφίλο οργανισμό *Thermus aquaticus*). Οι παραπάνω αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε αυτόματους θερμοκούς κυκλοποιητές.

Στις περιπτώσεις που ήταν απαραίτητη η ποσοτικοποίηση των προϊόντων όπως στις ανοσοκατακρημνίσεις της χρωματίνης χρησιμοποιήθηκε real time PCR. Στην αντίδραση γινόταν προσθήκη επιπλέον της φθορίζουσας χρωστικής SYBER Green I (1μl από διάλυμα με οπτική πυκνότητα 0.4) που έχει την ικανότητα σύνδεσης σε δίκλιωνα τμήματα DNA και η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος Opticon Monitor.

Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε στην προκειμένη περίπτωση είναι:

- 5 min στους 94° C
- 30 sec στους 94° C
- 30 sec στους 60° C 38 κύκλοι (επιμήκυνση)

- 30 sec στους 72° C
- 2 min στους 72° C
- Καμπύλη τήξης με μέτρηση ανά 0.5° C από τους 72° C μέχρι τους 94° C

Ενώ η αντίδραση είχε ως έξης:

- 2.5mM MgCl₂
- 1/10 του όγκου της αντίδρασης ρυθμιστικό διάλυμα της Taq
- 0.2mM dNTPs
- 2μM εκκινητής 3' άκρου
- 2μM εκκινητής 5' άκρου
- 0.5 units Taq polymerase
- 1μl Syber Green I
- H₂O σε τελικό όγκο 20μl

Απομόνωση συνολικού RNA από τα κύτταρα

Η απομόνωση συνολικού RNA από τα κύτταρα πραγματοποιείται με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol της εταιρίας Gibco. Χρησιμοποιείται 1ml αντιδραστηρίου για περίπου 10⁶ κύτταρα τα οποία είχαν πλυθεί με PBS. Τα κύτταρα επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να λυθούν. Ακολουθεί προσθήκη 0,2 όγκων CHCl₃ και έπειτα από ισχυρή ανάδευση, φυγοκέντρωση στις 14000rpm για 15 λεπτά στους 4°C.

Το υπερκείμενο που περιέχει το RNA (το γενωμικό DNA είναι στην μεσόφαση ενώ οι πρωτεΐνες στην κατώτερη φάση) απομονώνεται και κατακρημνίζεται με 0,5 όγκους ισοπροπανόλης και φυγοκεντρείται στις 14000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης αφαιρείται και στην πελλέτα του RNA προστίθεται 70% ΕΤΟΗ. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 14000 rpm για 4 λεπτά στους 4°C και επαναδιαλυτοποίηση της πελλέτας σε DEPC treated νερό. Η συγκέντρωση υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 260nm, έχοντας σαν δεδομένο ότι 1 OD αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 40μg/ml.

Η απομόνωση του RNA των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των μικροσυστοιχειών πραγματοποιήθηκε με το RNeasy Mini Kit της Qiagen.

Σχηματισμός cDNA από RNA

(Αντίστροφη μεταγραφή ή reverse transcription)

Για κάθε αντίδραση RT χρησιμοποιείται 2μg συνολικού RNA. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 40μl. Σε κάθε αντίδραση προστίθεται το RNA, το H₂O και οι εκκινητές (τυχαία εξαμερή ολιγονουκλεοτίδια για την αναπαραγωγή όλου του RNA σε cDNA). Ακολουθεί θέρμανση για 7 λεπτά στους 65°C για την αποδιάταξη τυχόντων δευτεροταγών δομών. Στη συνέχεια προστίθεται 4μl διάλυμα αντίδρασης συγκεντρωμένο 10x, dNTPs σε τελική συγκέντρωση 0,5mM, 10U RNasin και 0,5μl ένζυμο RTase και η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37°C για 2 ώρες.

Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Οι πήκτες πολυακρυλαμίδης αποτελούνται από δυο τύπους πήκτης: το stacking gel που χρησιμεύει για το πακετάρισμα των μείγματος των πρωτεϊνών και το running gel που χρησιμεύει για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών βάσει του μεγέθους τους.

Για τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης, είναι απαραίτητη η προσθήκη πολυμεριστικών υλικών. Το πίσω μέρος του πήκτωματος γεμίζει με running buffer όπως επίσης και ο πάτος της συσκευής. Τα δείγματα, προτού φορτωθούν ζεσταίνονται στους 75°C για 5 λεπτά. Κατά την ηλεκτροφόρηση, η τάση όταν τα δείγματα βρίσκονται στο stacking gel ορίζεται στα 80 volts, ενώ μόλις φτάσουν στο running buffer, η τάση ορίζεται γύρω στα 100-110 volts.

Ανοσοαποτύπωση (Western blot)

Με τη χρήση του Western blot μπορεί να ελεγχθεί εάν μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκφράζεται σε ένα πληθυσμό κυττάρων ή όχι.

Transfer των πρωτεϊνών από το gel σε μεμβράνη PVDF.

Για να γίνει το transfer, τοποθετούνται 3 Whatman πάνω από το gel. Έπειτα, τοποθετείται η μεμβράνη PVDF (προσοχή – όχι φυσαλίδες μεταξύ τους) και πάνω από αυτήν ακόμα 3 Whatman. Με την χρήση ηλεκτρικού πεδίου ο/n, έτσι ώστε ο αρνητικός πόλος να είναι προς τη μεριά του gel και ο θετικός προς την PVDF, οι πρωτεΐνες αποτυπώνονται από το gel στη μεμβράνη. Απαιτείται transfer buffer όγκου περίπου 1lt το οποίο έχει την ίδια σύσταση με το running buffer των gel ακρυλαμίδης και 20% μεθανόλη. Ακολουθεί χρώση της μεμβράνης PVDF με χρωστική PONCEAU ώστε να διευκρινιστεί αν πράγματι μεταφέρθηκαν οι πρωτεΐνες. Σημειώνονται οι θέσεις του marker. Η μεμβράνη ξεβάζεται με H₂O.

Blocking μη ειδικών θέσεων με γάλα

(TBS-Tween + 5% Regilait)

1 ώρα επώασης σε θερμοκρασία δωματίου ή O/N στους 4°C.

Προσθήκη 1^{ου} αντισώματος στην PVDF

Επώαση στο luna park για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή O/N στους 4°C.

Ακολουθούν 3 πλυσίματα με TBS –Tween για 10 λεπτά.

Προσθήκη του 2^{ου} αντισώματος (ίδια διαδικασία με το πρώτο).

3 δεκάλεπτα πλυσίματα.

Προσθήκη του ECL στη μεμβράνη του PVDF (1ml από καθένα από τα δυο διαλύματα). Επώαση για 3 έως 5 λεπτά.

Η PVDF τυλίγεται σε saran και μεταφέρεται σε κασέτα με φιλμ.

Ακολουθεί 30 λεπτών maximum έκθεση και τέλος εμφάνιση του φιλμ.

Παρασκευή χρωματίνης

Σε καλλιέργεια κυττάρων cgr8 με πυκνότητα 1×10^6 κύτταρα στο ml που έχουν υποστεί την εκάστοτε επεξεργασία γίνεται μονιμοποίηση της χρωματίνης με 1.1% φορμαλδεΰδη (1/10 του όγκου της καλλιέργειας από φορμαλδεΰδη 11%) για 12 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση της μονιμοποίησης σταματά με τη προσθήκη γλυκίνης σε τελική συγκέντρωση 0.125M (1/20 του όγκου της καλλιέργειας από διάλυμα γλυκίνης 25M). Έπειτα γίνονται τρία διαδοχικά πλυσίματα των κυττάρων με PBS που περιέχει αναστολείς πρωτεασών (1mM PMSF) και φυγοκεντρήσεις για 5 min στις 2000 rpm στους 4°C. Μετά την τρίτη φυγοκέντρωση η πελλέτα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε διάλυμα λύσης των κυττάρων (Lysis buffer: 1% SDS, 10mM

EDTA, 50mM Tris-HCl pH 8). Για κάθε 10×10^6 κύτταρα βάζουμε 1ml του διαλύματος αυτού και τοποθετούνται στον πάγο για 10 min ώστε να λυθούν οι κυτταρικές μεμβράνες. Έπειτα, η χρωματίνη σπάει σε μικρότερα τμήματα των 250bp-500bp με τη βοήθεια υπερήχων με 7 εφαρμογές διάρκειας 60 sec ενώ η ένταση των υπερήχων ρυθμίζεται αναλόγως του όγκου κάθε δείγματος. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνται για 15 min στις 14.000 rpm στους 4°C για την απομάκρυνση κυτταρικών υπολειμμάτων και γίνεται ηλεκτροφόρηση μιας μικρής ποσότητας, μετά από θέρμανση στους 65°C για 5 min προκειμένου να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες, για την ταυτοποίηση του μεγέθους των τμημάτων στα οποία έσπασε η χρωματίνη. Η χρωματίνη διατηρείται στους -80°C για λίγες εβδομάδες.

Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, CHIP)

Για την ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης χρησιμοποιούνται σφαιρίδια αγαρόζης πρωτεΐνης G τα οποία αφού πλυθούν με το διάλυμα ανοσοκατακρήμνισης (IP buffer: 0.01% SDS, 1.1% TritonX-100, 1.2mM EDTA, 16.7mM Tris-HCl pH 8, 167mM NaCl και αναστολείς πρωτεασών) μπλοκάρονται με BSA 1mg/ml, Salmon sperm DNA 100μg/ml και IP buffer.

Η ανοσοκατακρήμνιση πραγματοποιείται με ποσότητα χρωματίνης που αντιστοιχεί σε 1×10^6 κύτταρα. Αραιώνεται αρχικά σε IP buffer 4 φορές και επωάζεται με το κάθε αντίσωμα (2-10μg) O/N στους 4°C με ανακίνηση. Ξεχωριστά ανακινούνται O/N και τα σφαιρίδια της πρωτεΐνης A με το διάλυμα μπλοκαρίσματος.

Την επόμενη μέρα μοιράζονται τα σφαιρίδια ισόποσα στα δείγματα και επωάζονται 3 ώρες στους 4°C σε ανακίνηση προκειμένου να πιάσει η πρωτεΐνη A την Fc ουρά του αντισώματος το οποίο μετά την επώαση του με τη χρωματίνη θα έχει συνδεθεί με την πρωτεΐνη που αναγνωρίζει. Έπειτα, πραγματοποιούνται 5 πλυσίματα, για να καθαριστούν τα σύμπλοκα χρωματίνης-αντισώματος-σφαιριδίων, με 1ml από τα παρακάτω διαλύματα με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις για 1 min στις 6000 rpm στους 4°C : 2 πλυσίματα με χαμηλής αλατότητας διάλυμα (0.1% SDS, 1% TritonX-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl και αναστολείς πρωτεασών), 2 πλυσίματα με υψηλής αλατότητας διάλυμα (0.1% SDS, 1% TritonX-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl και αναστολείς πρωτεασών) και 1 πλύσιμο με T.E, pH 8. Μετά το τελευταίο πλύσιμο γίνεται αντίστροφη μονιμοποίηση των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-πρωτεϊνών και πρωτεϊνών-DNA με τη προσθήκη πρωτεϊνάσης K 200μg/ml, SDS 0.5% και TE μέχρι τον τελικό όγκο των 200μl. Πραγματοποιείται επώαση των δειγμάτων στους 55°C για 3 ώρες και στη συνέχεια O/N στους 65°C .

Την επόμενη μέρα γίνεται καθαρισμός των δειγμάτων 2 φορές με ίσο όγκο μίγματος φαινόλης, χλωροφορμίου και ισοαμυλικής αλκοόλης και μετά με ίσο όγκο χλωροφορμίου. Έπειτα, κατακρήμνιση του DNA με 2 όγκους αιθανόλης, 1/10 του όγκου οξικό νάτριο και 20μg γλυκογόνου. Η πελλέτα επαναδιαλύεται σε 70μl H₂O. Η ποσότητα του DNA που κατακρημνίστηκε ταυτοποιείται ποσοτικά με real time PCR χρησιμοποιώντας σαν συνολική ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε το 1/10 του συνολικού όγκου του δείγματος.

Απομόνωση ιστονών από πυρηνικά εκχυλίσματα

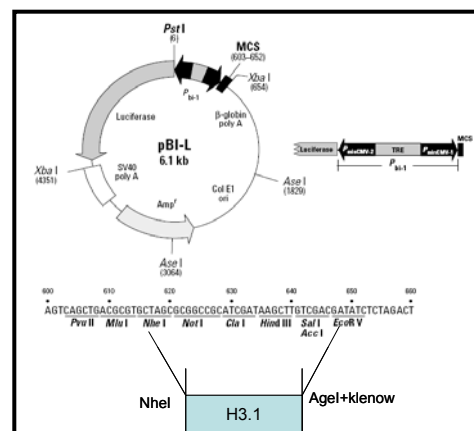
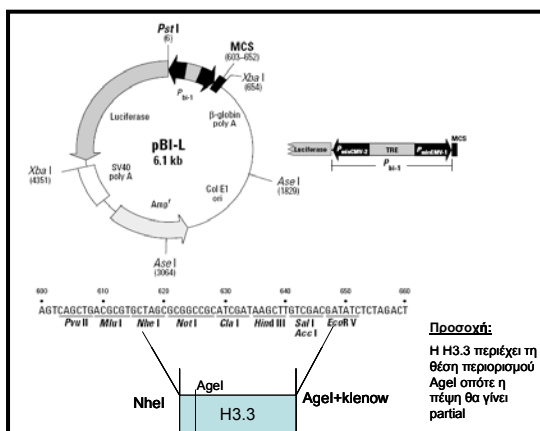
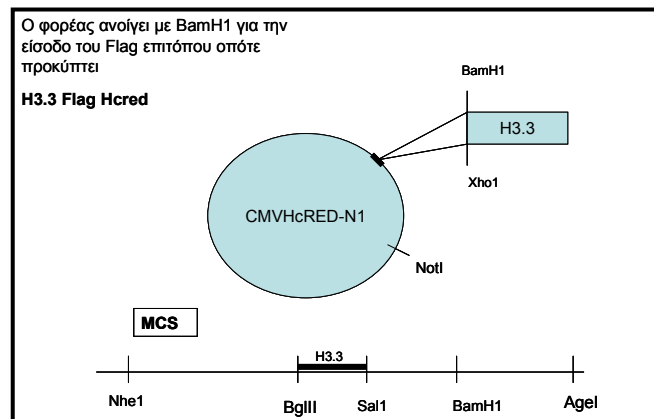
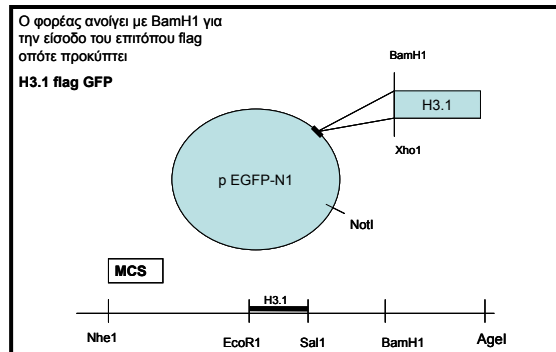
Τα κύτταρα μαζεύονται και πλένονται σε PBS, την πρώτη φορά σε 10 ml και τη δεύτερη σε 1ml. Μεταφέρονται σε eppendorf και φυγοκεντρώνονται στις 4000 rpm στους 40C για 30 sec. Έπειτα, η πελέττα επαναδιαλύεται σε 1ml διαλύματος A (υποτονικό) με αναστολείς πρωτεασών. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 10 λεπτά και ομογενοποίηση με τον ομογενοποιητή Dounce (10-30 φορές), ώστε να σπάσουν τα κύτταρα και να απομονώσουμε τους πυρήνες. Έπειτα από φυγοκέντρηση στις 2000 rpm στους 4 για 10 λεπτά, επαναδιαλύεται το ίζημα των πυρήνων σε 100 ml διαλύματος A και 100 ml διαλύματος 2x NUN (2M Urea, 600mM NaCl, 2% NP40, 50mM HEPES pH 7.6, 2mM DTT, 2mM PMSF, 0.1mg/ml Aprotinin και 200 mM Sodium Butyrate). Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 14000 rpm στους 40C. Το υπερκείμενο πλέον περιέχει τις διαλυτές πρωτεΐνες του πυρήνα και το ίζημα τη χρωματίνη με τις ιστόνες. Επαναδιαλύεται σε 100 ml διαλύματος A και προστίθεται σε αυτό H₂SO₄ σε τελική συγκέντρωση 0,2 M. Επώαση υπό περιστροφή στους 40 C για 1 ώρα, ενώ ακολουθεί φυγοκέντρηση, και το υπερκείμενο που προκύπτει υπόκειται σε διαπίδυση για 1 ώρα σε 0.1 M CH₃COOH και έπειτα σε ddH₂O με πολλές αλλαγές ή όλη νύχτα στους 40C. Το υπερκείμενο από την τελευταία φυγοκέντρηση όπου αποτελεί το εκχύλισμα των ιστονών, φυλάσσεται στους 80C.

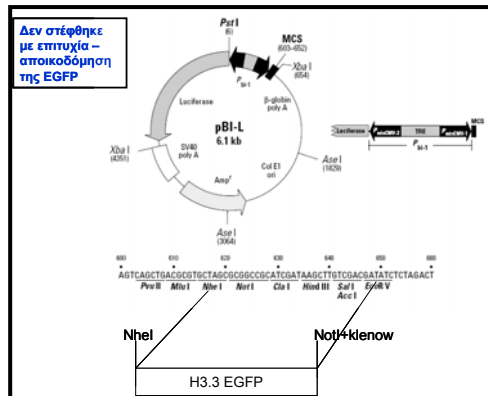
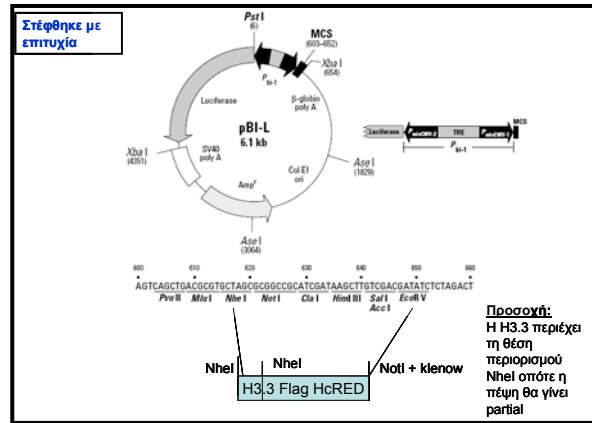
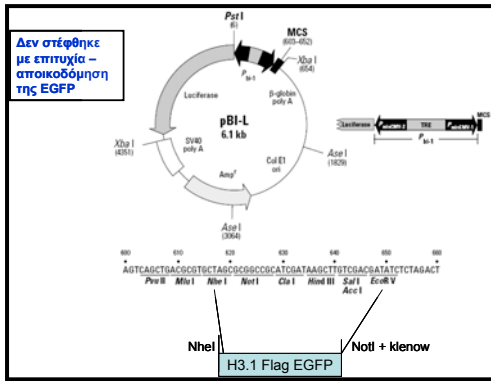
Σχηματισμός εμβρυικών σωματίων (embryoid bodies)

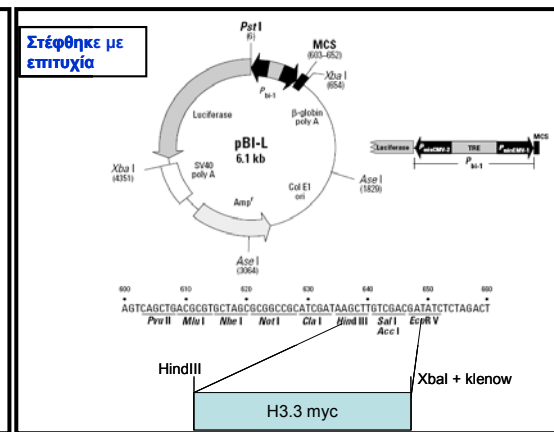
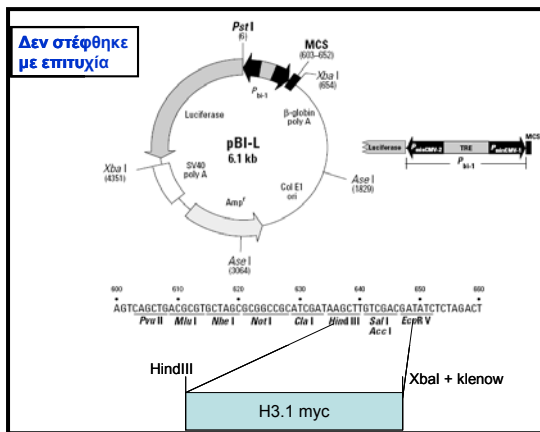
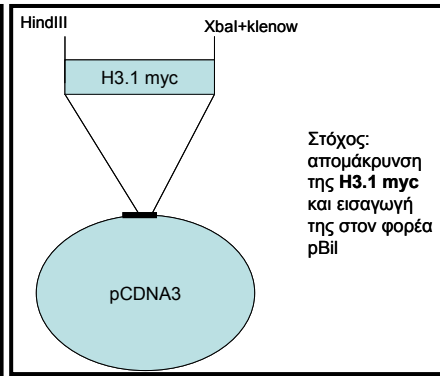
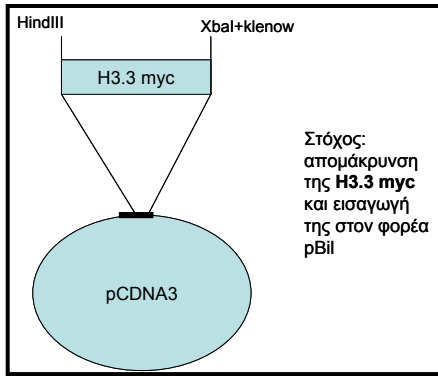
- Στρώσιμο 60-70 σταγόνων των 20L σε καπάκια απο Plates Petri σε κανονικές σειρές.
- Αναστροφή του καπακιού στο πιάτο Petri το οποίο περιέχει 7 ml PBS προκειμένου να διατηρεί την υγρασία των σταγόνων. Κάθε σταγόνα σταγόνα κρέμεται όποτε, τα ES κύτταρα λόγω βαρύτητας μαζεύονται στην άκρη της σταγόνας.
- Ακολουθεί επώαση των κρεμαστών σταγόνων για 2 μέρες σε incubator. Τα ES κύτταρα συναθροίζονται και σχηματίζουν ένα εμβρυικό σωματίο.
- Τα Ebs συλλέγονται και μεταφέρονται σε πιάτα που περιέχει θρεπτικό μέσο IMDM +10% FBS. Αυτά καλλιεργούνται σε εναιώρημα για 4-5 μέρες ακόμα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πλασμιδιακές Κατασκευές



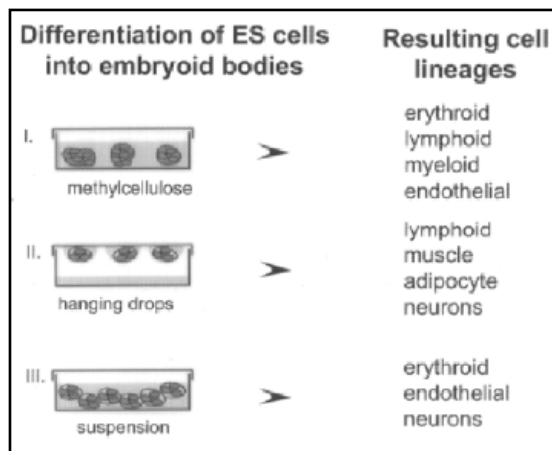




Διαφοροποίηση εμβρυικών βλαστικών κυττάρων

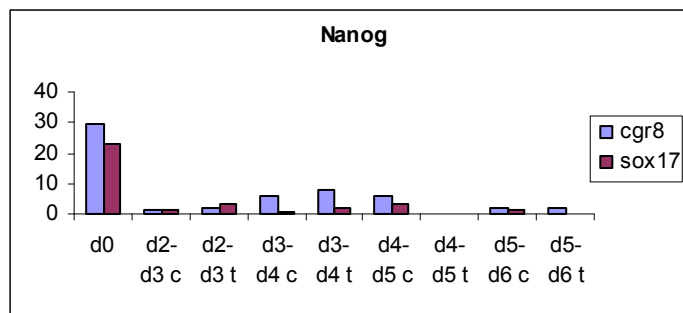
Εμβρυικά σωματίδια

Το εξώδερμα αποτελεί πρόδρομη στιβάδα των νευρικών κυττάρων, κυττάρων του περιφερικού και νευρικού συστήματος, του δέρματος και των αδένων. Το μεσόδερμα αποτελεί τη βλαστική στιβάδα από την οποία θα προκύψουν τα κύτταρα της καρδιάς, των μυών, του ενδοθηλίου, του αίματος, των οστών. Το ενδόδερμα αποτελεί την στιβάδα από την οποία τα κύτταρα που θα προκύψουν θα αποτελούν προγόνους του ήπατος και του παγκρέατος.



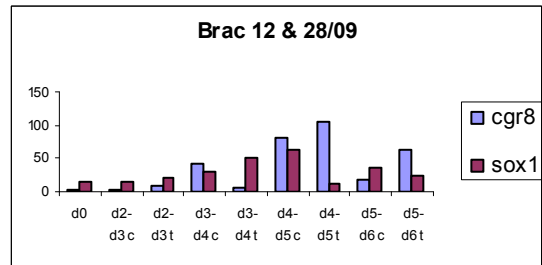
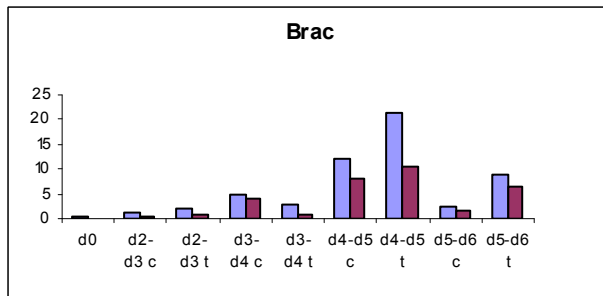
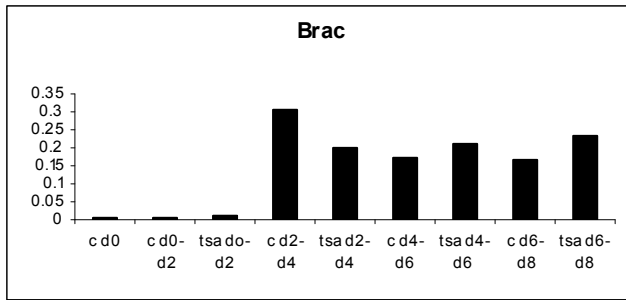
Στο σημείο αυτό, πρέπει να αναφερθεί ότι για την κάθε βλαστική στιβάδα υπάρχουν συγκεκριμένοι δείκτες – γονίδια που η έκφρασή τους δηλώνει σε γενικές γραμμές την δέυση των κυττάρων προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι παράγοντες *Foxa1*, *Gata4* και *Gata6*, *Sox17* των οποίων τα επίπεδα έκφρασης αυξάνονται κατά τον σχηματισμό του ενδοδέρματος, οι *Brach* και *Pdgfrb* κατά τον σχηματισμό του μεσοδέρματος και τέλος του *Hoxa1* και *Wnt3a* των οποίων τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης εντοπίζονται κατά τον σχηματισμό του εξωδέρματος. Δεδομένου ότι οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών και επακόλουθα η χρωματινική δομή παίζει βασικό ρόλο στην έκφραση των γονιδίων, στόχος της εργασίας αυτής είναι η επεξεργασία των εμβρυικών σωματίων με έναν αναστολέα απακετυλασών, όπως η TSA και η μελέτη του ρόλου της κατά την πορεία της *in vitro* διαφοροποίησης. Συγκεκριμένα, πρέπει να αναλυθεί αν επεξεργασία με TSA, προκύπτει επιτάχυνση των γεγονότων διαφοροποίησης στο σύνολο τους ή υπάρχει κάποια προτίμηση προς συγκεκριμένο lineage. Αυτό μπορεί να διαπιστωθεί με την ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων των διαφόρων γονιδίων – δεικτών που είναι υπεύθυνα για την κάθε κυτταρική κατεύθυνση.

Ύστερα από τον σχηματισμό των εβρικών σωματίων από τα ES κύτταρα με τη μέθοδο της κρεμαστής σταγόνας, τα EBs καλλιεργούνται σε εναιώρημα για 6 μέρες. Αρχικά, για την ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων των διαφόρων γονιδίων, τα εμβρυικά σωματίδια συλλέγονταν ανα δύο ημέρες, οπότε είχαν προκύψει τα παράθυρα 0-2, 2-4, 4-6, 6-8. Για τα συγκεκριμένα παράθυρα, υπάρχουν δύο πληθυσμοί εμβρυικών σωματίων, ο ένας από τους οποίους έχει επωαστεί με TSA. Ωστόσο, για μια πιο λεπτομερή μελέτη των επιπέδων έκφρασης των υποψηφίων προς μελέτη γονιδίων αλλά και εκτενέστερη ανάλυση του ρόλου της TSA στην πορεία προς τη διαφοροποίηση, τα παράθυρα που επιλέχτηκαν ήταν ανα μια ημέρα και συγκεκριμένα: 0-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5-6. Όπως είναι αναμενόμενο, κατά την *in vitro* διαφοροποίηση τα επίπεδα έκφρασης των παραγόντων που παίζουν ρόλο στην πλειοδυναμικότητα των ES κυττάρων μειώνονται. Ενδεικτικά, στην παρακάτω γραφική παράσταση φαίνονται τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου *nanog*.

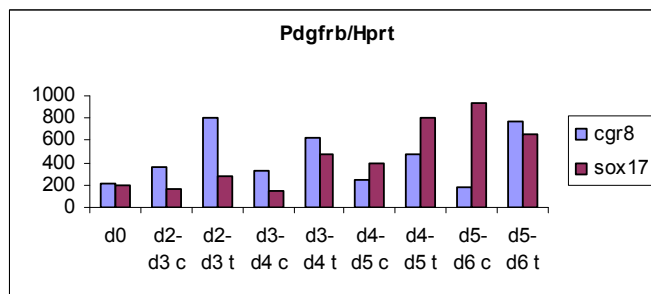


Εκτός από την κυτταρική σειρά *cgr8*, χρησιμοποιήθηκε η ίδια κυτταρική σειρά με την διαφορά ότι στο ένα αλληλόμορφο του γονιδίου *Sox17*, μετά τον υποκινητή έχει εισαχθεί το γονίδιο της *dsRed*. Αυτό συνεπάγεται ότι με την ενεργοποίηση του γονιδίου *Sox17* (ενδοδερμικός δείκτης) παρατηρείται φθορισμός και επιτρέπει επομένως με μια εύκολη προσέγγιση (μικροσκοπία φθορισμού) την διαπίστωση της μεταγραφής του γονιδίου. Αντίστοιχα με την περίπτωση της *cgr8 Sox17 +/- (dsRed)*, εναλλακτικό εργαλείο για την διαπίστωση της μεταγραφής ενός μεσοδερμικού δείκτη (*Brachyury*) είναι η σειρά *cgr8 Brach +/- (eGFP)*. Από την γραφική παράσταση προκύπτει ότι και στις δύο κυτταρικές σειρές τα επίπεδα μεταγραφής του *nanog* πέφτουν κατά την πορεία της διαφοροποίησης.

Για την μελέτη των επιπέδων μεταγραφής γονιδίων που αποτελούν ενδοδερμικούς δείκτες, χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια *Gata4*, *Gata6*, και *Foxa1*. Ακολουθούν οι γραφικές παραστάσεις και η ανάλυση των αποτελεσμάτων.

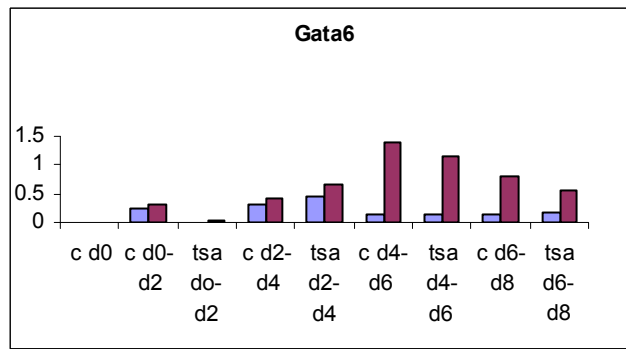
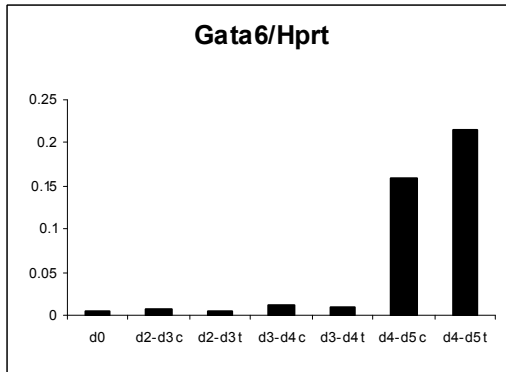


Όσον αφορά το γονίδιο *Brac*, μπορεί κανείς να παρατηρήσει από την πρώτη γραφική παράσταση ότι η μεταγραφή του κυρίως αυξάνεται στο παράθυρο 2-4, δηλαδή την τέταρτη μέρα καλλιέργειας των EBs και τα επίπεδα της έκφρασης εμφανίζουν μια μικρή ελάττωση μέχρι την μέρα 8. Η TSA ασκεί θετική δράση στο παράθυρο 4-6 και 6-8, με το να διατηρεί τα επίπεδα έκφρασης ίσα με εκείνα της μέρας 4. Για πιο διεξοδική ανάλυση μελετήθηκε το γονίδιο σε παράθυρο μίας ημέρας και διαπιστώθηκε ότι η μεταγραφή του γονιδίου είναι ιδιαίτερα αυξημένη στο παράθυρο 4-5. Στο συγκεκριμένο παράθυρο, η TSA συμβάλλει στην μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων μεταγραφής σε σύγκριση με τα άλλα παράθυρα. Ωστόσο, και από τις δύο γραφικές παραστάσεις (2&3), διαπιστώνει κανείς ότι από νωρίς (παράθυρο 2-3) επηρεάζει θετικά την μεταγραφή.

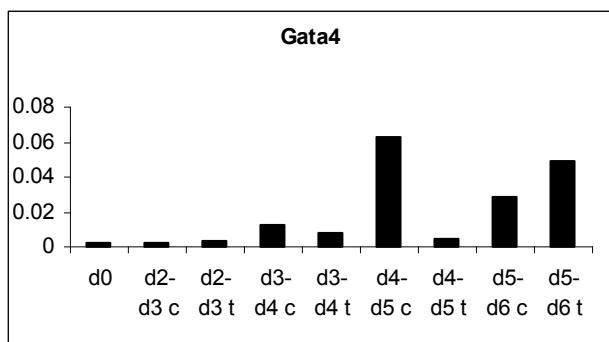
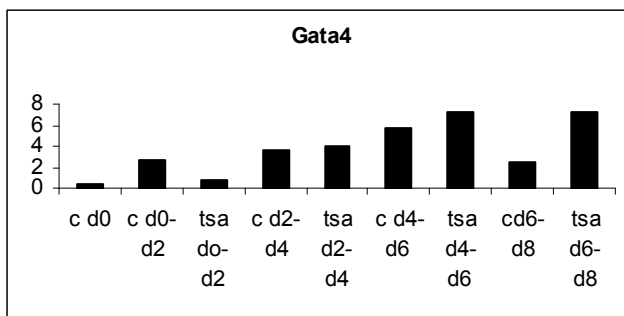


Ένας άλλος μεσοδερμικός δείκτης, ο *Pdgfrb* φαίνεται να εκφράζεται από νωρίς κατά την πορεία της *in vitro* διαφοροποίησης και τα επίπεδα του παρόλο που φαίνεται να αυξάνονται σε μεγαλύτερο βαθμό στο παράθυρο 4-5, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η TSA επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου σε μεγάλο βαθμό δρώντας θετικά από την

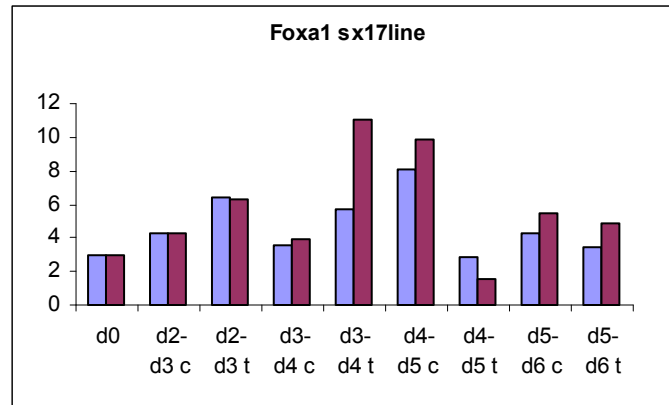
τρίτη ημέρα (παράθυρο 2-3).



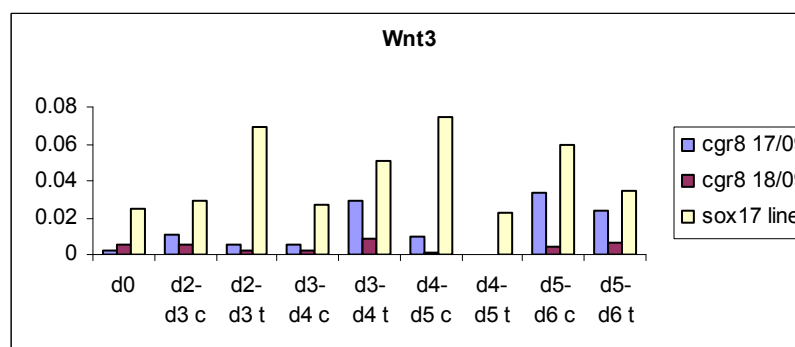
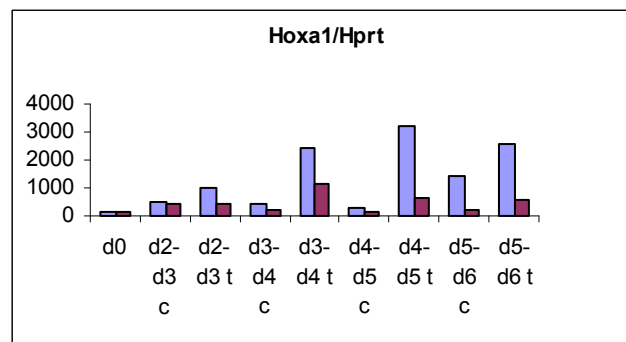
Στην περίπτωση του Gata6, ενός ενδοδερμικού δείκτη, η ενεργοποίηση του γονιδίου παρόλο που είναι μικρή αρχίζει νωρίς, ενώ τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης εμφανίζονται την μέρα 4. Στο παράθυρο 2-4 της γραφικής παράστασης 2, η TSA ασκεί σε σημαντικό βαθμό θετική δράση, ενώ φαίνεται να μην παίζει ουσιαστικό ρόλο στα επόμενα παράθυρα. Μια επανάληψη όμως είναι απαραίτητη για να διαπιστώσει κανείς τι ακριβώς συμβαίνει.



Στην περίπτωση του Gata4, υποτυπώδης έκφραση συναντάται από νωρίς, ωστόσο ο θετικός ρόλος της TSA φαίνεται να καθυστερεί και να εμφανίζεται στο παράθυρο 4-6.



Τέλος, μελετώντας το γονίδιο Foxa1 στην κυτταρική σειρά sx17 line, μπορεί κανείς να καταλήξει ότι ο ρόλος της TSA στην άνοδο των επιπέδων μεταγραφής είναι ουσιαστικός από το παράθυρο 2-3. Σε όλες τις περιπτώσεις, στο παράθυρο 4-5 τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων ελαττώθηκαν κατά πολύ, όταν τα εμβρυικά σωματίδια επώαστηκαν με TSA.



Στην περίπτωση των εξωδερμικών δεικτών, Hoxa1 και Wnt3, τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων τους παραμένουν χαμηλά παρά την πάροδο ενός ικανοποιητικού χρονικού διαστήματος. Ουσιαστικά, εμφανής αύξηση των επιπέδων συναντάται στο παράθυρο 5-6. Ωστόσο, αυτό που αποτελεί αρκετά ενδιαφέρον είναι ότι η TSA σε κάθε παράθυρο

οδηγεί σε μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων. Στην περίπτωση του Hoxa1 είναι χαρακτηριστική η αύξηση της μεταγραφής, στο παράθυρο 2-3 και 3-4, ενώ στην περίπτωση του Wnt3, είναι αξιοσημείωτη η διαφορετική εικόνα που εμφανίζουν τα εμβρυικά σωματίδια που προκύπτουν από την SX17line. Στην σειρά αυτή, ιδιαίτερα υψηλός αριθμός μεταγράφων εντοπίζεται στο παράθυρο 2-3 αλλά και 3-4, ενώ φθίνουσα πορεία των επιπέδων μεταγραφής παρουσιάζεται στα υπόλοιπα παράθυρα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αλληλουχία των γονιδιωμάτων ανθρώπων και ποντικών αποτελούν σημαντικά βήματα για την κατανόηση των διαδικασιών διαφοροποίησης. Η γνώση του πλήρους γονιδιώματος, εντούτοις, δεν παρέχει αυτόματα την κατανόηση της ανάπτυξης του οργανισμού. Απώτερος στόχος είναι η ανακάλυψη του υποσύνολου των γονιδίων που είναι απαραίτητο για την πλειοδυναμικότητα των ES κυττάρων και έπειτα η εύρεση του τρόπου με τον οποίο το υποσύνολο αυτό μετατοπίζεται σε άλλα υποσύνολα, προκειμένου να καθοριστούν οι διαφορετικοί τύποι κυττάρων. Στα εμβρυικά σωματίδια, σε διάστημα 5-7 ημερών εντοπίζονται κύτταρα και των τριών βλαστικών στιβάδων, παρόμοιο με το πρότυπο που συναντάται στο στάδιο του γαστριδίου (στάδιο gastrula) ενός εμβρύου. Στόχος λοιπόν αποτελεί η ανάλυση της αυτο-ανανέωσης των ES κυττάρων και της διαφοροποίησης - δέσμευσης τους στις τρεις βλαστικές στιβάδες. Έπειτα, η ανάλυση των γονιδίων και των σηματοδοτικών παραγόντων που ευθύνονται για την περαιτέρω διαφοροποίηση στα κύτταρα της κάθε στιβάδας αποτελεί αρκετά ενδιαφέρουσα πρόταση. Δεδομένου ότι οι επιγενετικοί μηχανισμοί και η κατάσταση της χρωματίνης αποτελούν παράγοντες σημαντικούς για τον προγραμματισμό της έκφρασης γονιδίων που ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση κυττάρων και την ανάπτυξη του οργανισμού, στόχος της παρούσας μελέτης είναι η ανάλυση του ρόλου ενός αναστολέα απακετυλασών, της TSA κατά τον σχηματισμό των εμβρυικών σωματίων. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της "φυσικής" *in vitro* διαδικασίας διαφοροποίησης η χαλαρή χρωματίνη των ES κυττάρων γίνεται ακόμα πιο προσιτή, έτσι ώστε να είναι δυνατή η έκφραση των γονιδίων απαραίτητων για την εμφάνιση του σταδίου και των τριών βλαστικών στιβάδων, πριν από τη τελική κυτταρική δέσμευση. Η επεξεργασία με TSA πιθανόν από τα ευρήματα που προκύπτουν διευκολύνει την ενισχυμένη προσβασιμότητα και παίζει ένα θετικό ρόλο με το να επιταχύνει τα γεγονότα προς την *in vitro* πορεία της διαφοροποίησης.Ωστόσο, είναι σημαντικό να γίνει περαιτέρω ανάλυση του ρόλου της TSA στην ενεργοποίηση γονιδίων τόσο στο επίπεδο της μεταγραφής τους, όσο και σε επίπεδο μεταφραστικών τροποποιήσεων του υποκινητή αυτών των γονιδίων. Οπότε, θα μπορεί να διαπιστωθεί αν με την TSA, έχουμε μια επιτάχυνση των γεγονότων διαφοροποίησης στο σύνολο τους ή υπάρχει κάποια προτίμηση προς συγκεκριμένο lineage.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agalioti, T., Chen, G. and Thanos, D. (2002) Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell*, **111**, 381-392.
- Aubert, J., Dunstan, H., Chambers, I. and Smith, A. (2002) Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation. *Nat Biotechnol*, **20**, 1240-1245.
- Brook, F.A. and Gardner, R.L. (1997) The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5709-5712.
- Burdon, T., Chambers, I., Stracey, C., Niwa, H. and Smith, A. (1999) Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs*, **165**, 131-143.
- Caricasole, A.A., van Schaik, R.H., Zeinstra, L.M., Wierikx, C.D., van Gorp, R.J., van den Pol, M., Looijenga, L.H., Oosterhuis, J.W., Pera, M.F., Ward, A., de Bruijn, D., Kramer, P., de Jong, F.H. and van den Eijnden-van Raaij, A.J. (1998) Human growth-differentiation factor 3 (hGDF3): developmental regulation in human teratocarcinoma cell lines and expression in primary testicular germ cell tumours. *Oncogene*, **16**, 95-103.
- Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K. and Dalton, S. (2005) LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*, **132**, 885-896.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. and Smith, A. (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, **113**, 643-655.
- Chambers, I. and Smith, A. (2004) Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene*, **23**, 7150-7160.
- Clark, A.T., Rodriguez, R.T., Bodnar, M.S., Abeyta, M.J., Cedars, M.I., Turek, P.J., Firpo, M.T. and Reijo Pera, R.A. (2004) Human STELLAR, NANOG, and GDF3 genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p13, a hotspot for teratocarcinoma. *Stem Cells*, **22**, 169-179.
- Clipsham, R., Niakan, K. and McCabe, E.R. (2004) Nr0b1 and its network partners are expressed early in murine embryos prior to steroidogenic axis organogenesis. *Gene Expr Patterns*, **4**, 3-14.
- Darnell, J.E., Jr. (1997) STATs and gene regulation. *Science*, **277**, 1630-1635.
- Deb-Rinker, P., Ly, D., Jezierski, A., Sikorska, M. and Walker, P.R. (2005) Sequential DNA methylation of the Nanog and Oct-4 upstream regions in human NT2 cells during neuronal differentiation. *J Biol Chem*, **280**, 6257-6260.
- Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W. and Kemler, R. (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol*, **87**, 27-45.
- Evans, M.J. and Kaufman, M.H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, **292**, 154-156.
- Hattori, N., Nishino, K., Ko, Y.G., Ohgane, J., Tanaka, S. and Shiota, K. (2004) Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J Biol Chem*, **279**, 17063-17069.
- Hay, D.C., Sutherland, L., Clark, J. and Burdon, T. (2004) Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human

- and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*, **22**, 225-235.
- He, Z., Li, J., Zhen, C., Feng, L. and Ding, X. (2005) Knockdown of p53 by RNAi in ES cells facilitates RA-induced differentiation into muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **335**, 676-683.
- Iwata, K., Tomita, K., Sano, H., Fujii, Y., Yamasaki, A. and Shimizu, E. (2002) Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, down-regulates interleukin-12 transcription in SV-40-transformed lung epithelial cells. *Cell Immunol*, **218**, 26-33.
- Iyer, A.K. and McCabe, E.R. (2004) Molecular mechanisms of DAX1 action. *Mol Genet Metab*, **83**, 60-73.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074-1080.
- Johnson, C.A. and Turner, B.M. (1999) Histone deacetylases: complex transducers of nuclear signals. *Semin Cell Dev Biol*, **10**, 179-188.
- Kawamura, T., Ono, K., Morimoto, T., Wada, H., Hirai, M., Hidaka, K., Morisaki, T., Heike, T., Nakahata, T., Kita, T. and Hasegawa, K. (2005) Acetylation of GATA-4 is involved in the differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *J Biol Chem*, **280**, 19682-19688.
- Khorasanizadeh, S. (2004) The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*, **116**, 259-272.
- Kurisaki, A., Hamazaki, T.S., Okabayashi, K., Iida, T., Nishine, T., Chonan, R., Kido, H., Tsunasawa, S., Nishimura, O., Asashima, M. and Sugino, H. (2005) Chromatin-related proteins in pluripotent mouse embryonic stem cells are downregulated after removal of leukemia inhibitory factor. *Biochem Biophys Res Commun*, **335**, 667-675.
- Kuroda, T., Tada, M., Kubota, H., Kimura, H., Hatano, S.Y., Suemori, H., Nakatsuji, N. and Tada, T. (2005) Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol Cell Biol*, **25**, 2475-2485.
- Lagace, D.C. and Nachtigal, M.W. (2004) Inhibition of histone deacetylase activity by valproic acid blocks adipogenesis. *J Biol Chem*, **279**, 18851-18860.
- Li, J., Lin, Q., Wang, W., Wade, P. and Wong, J. (2002) Specific targeting and constitutive association of histone deacetylase complexes during transcriptional repression. *Genes Dev*, **16**, 687-692.
- Lin, T., Chao, C., Saito, S., Mazur, S.J., Murphy, M.E., Appella, E. and Xu, Y. (2005) p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol*, **7**, 165-171.
- Mal, A., Sturniolo, M., Schiltz, R.L., Ghosh, M.K. and Harter, M.L. (2001) A role for histone deacetylase HDAC1 in modulating the transcriptional activity of MyoD: inhibition of the myogenic program. *Embo J*, **20**, 1739-1753.
- Marmorstein, R. and Roth, S.Y. (2001) Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 155-161.
- Martin, G.R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 7634-7638.
- Matin, M.M., Walsh, J.R., Gokhale, P.J., Draper, J.S., Bahrami, A.R., Morton, I., Moore, H.D. and Andrews, P.W. (2004) Specific knockdown of Oct4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. *Stem Cells*, **22**, 659-668.
- Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T. and Yokota, T. (1999) STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of

- mouse embryonic stem cells. *Embo J*, **18**, 4261-4269.
- McPherron, A.C. and Lee, S.J. (1993) GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J Biol Chem*, **268**, 3444-3449.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M. and Yamanaka, S. (2003) The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, **113**, 631-642.
- Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W. and Reik, W. (2005) Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet*, **14 Spec No 1**, R47-58.
- Niwa, H. (2001) Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct*, **26**, 137-148.
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I. and Smith, A. (1998) Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*, **12**, 2048-2060.
- Oh, J.H., Do, H.J., Yang, H.M., Moon, S.Y., Cha, K.Y., Chung, H.M. and Kim, J.H. (2005) Identification of a putative transactivation domain in human Nanog. *Exp Mol Med*, **37**, 250-254.
- Pain, D., Chirn, G.W., Strassel, C. and Kemp, D.M. (2005) Multiple retropseudogenes from pluripotent cell-specific gene expression indicates a potential signature for novel gene identification. *J Biol Chem*, **280**, 6265-6268.
- Park, S.Y., Meeks, J.J., Raverot, G., Pfaff, L.E., Weiss, J., Hammer, G.D. and Jameson, J.L. (2005) Nuclear receptors Sfl and Dax1 function cooperatively to mediate somatic cell differentiation during testis development. *Development*, **132**, 2415-2423.
- Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A. and Bongso, A. (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*, **18**, 399-404.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. and Brivanlou, A.H. (2004) Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med*, **10**, 55-63.
- Song, K.H., Park, Y.Y., Park, K.C., Hong, C.Y., Park, J.H., Shong, M., Lee, K. and Choi, H.S. (2004) The atypical orphan nuclear receptor DAX-1 interacts with orphan nuclear receptor Nur77 and represses its transactivation. *Mol Endocrinol*, **18**, 1929-1940.
- Xu, Y. (2003) Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death Differ*, **10**, 400-403.
- Ying, Q.L., Nichols, J., Chambers, I. and Smith, A. (2003) BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, **115**, 281-292.
- Yoshida-Koide, U., Matsuda, T., Saikawa, K., Nakanuma, Y., Yokota, T., Asashima, M. and Koide, H. (2004) Involvement of Ras in extraembryonic endoderm differentiation of embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **313**, 475-481.
- Zhang, H., Thomsen, J.S., Johansson, L., Gustafsson, J.A. and Treuter, E. (2000) DAX-1 functions as an LXXLL-containing corepressor for activated estrogen receptors. *J Biol Chem*, **275**, 39855-39859.
- Zhang, J.G., Owczarek, C.M., Ward, L.D., Howlett, G.J., Fabri, L.J., Roberts, B.A. and Nicola, N.A. (1997) Evidence for the formation of a heterotrimeric complex of

leukaemia inhibitory factor with its receptor subunits in solution. *Biochem J*, **325** (Pt 3), 693-700.

