



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

*Πρωτεωμικός χαρακτηρισμός καρδιομυοκυττάρων προερχόμενα από εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ανθρώπου. Ο ρόλος της σηματοδότησης του NO.*

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Διδρυματικό και Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών  
«ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

Χρήστος Γκουγκούσης

Χημικός

Επιβλέπων : Πασχάλης- Θωμάς Δούλιας

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας

Ιωάννινα 2023

## Πρόλογος

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Βιοχημείας Πασχάλη Θωμά Δούλια τον οποίο ευχαριστώ θερμά, καθώς τα τελευταία χρόνια υπήρξε εξαιρετικός άνθρωπος, συνεργάτης και μέντορας. Δεν υπάρχουν λόγια να εκφράσουν την εκτίμηση και τον σεβασμό μου.

Ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της πενταμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή Βιολογικής Χημείας και Διευθυντή του ΔΔΠΜΣ Μοριακή Κυτταρική Βιολογία και Βιοτεχνολογία κ. Ευστάθιο Φριλίγγο, την Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας, κα Θωμαΐς Παπαμαρκάκη, Αναπληρώτρια Διευθύντρια του ΔΔΠΜΣ Μοριακή Κυτταρική Βιολογία και Βιοτεχνολογία, τον Καθηγητή Βιολογικής Χημείας κ. Σάββα Χριστοφορίδη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιολογίας κ. Παναγιώτη Κούκλη για την γνώση που μου προσέφεραν σε όλη την διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών καθώς και για την τιμή να συμμετάσχουν στην εξεταστική μου επιτροπή.

Η διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων σε καρδιοκύτταρα πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου Βιοιατρικών Ερευνών Ιωαννίνων- IBEI. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ απευθύνω στις Μαρία Μάρκου, Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια, και Carol Murphy, Ερευνήτρια Β'. Η πρακτική, θεωρητική και υλική στήριξη τους ήταν αποφασιστική στην διαδικασία της διαφοροποίησης των κυττάρων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους δικούς μου ανθρώπους, Οικογένεια και Φίλους, για όλη την στήριξη και αγάπη που μου προσφέρουν διαρκώς. Χωρίς αυτούς δεν θα ήταν τίποτα εφικτό.

## Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	2
Περίληψη.....	7
Abstract.....	9

### ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΚΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΗ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ.

1.1. Καταβολισμός λιπαρών οξέων. ....	11
1.2. Ενεργοποίηση λιπαρών οξέων και μεταφορά στα μιτοχόνδρια.....	12
1.3. β-οξείδωση λιπαρών οξέων.....	13
1.4. Διαταραχές β-οξείδωσης.....	15
1.5. Γενικά στοιχεία για την υγιή καρδιακή λειτουργία.....	16
1.6. Ρόλος της ηλικίας στην επιλογή μεταβολικών καυσίμων στην καρδιά.....	17
1.7. Μεταβολισμός λιπαρών οξέων στην καρδιά.....	17
1.7.1 Μηχανισμοί ρύθμισης της β-οξείδωσης.....	19
1.8. Μεταβολισμός γλυκόζης στον καρδιακό μυ.....	20
1.9. Καθορισμός της πηγής του ενεργειακού υποστρώματος στην καρδιά.....	22

#### Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>: ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.

2.1. Προεμφυτευτική ανάπτυξη και προέλευση βλαστικών κυττάρων.....	25
2.2. Δυναμικό διαφοροποίησης και κατηγορίες βλαστικών κυττάρων.....	26
2.3. Ιδιότητες βλαστικών κυττάρων.....	29

2.3.1. Αυτοανανέωση βλαστικών κυττάρων.....	29
2.3.2. Κυτταρικός κύκλος βλαστικών κυττάρων.....	30
2.4. Το γονιδιακό δίκτυο των εβρυονικών βλαστικών κυττάρων.....	32
2.4.1. Τα βασικά για την πολυδυναμία γονίδια.....	33
2.5. Το επιγενετικό τοπίο των εβρυονικών βλαστικών κυττάρων.....	34

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: ΤΑ ΕΜΒΡΥΟΝΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΩΣ ΜΟΝΤΕΛΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ.

3.1. Απομόνωση και καλλιέργεια ESCs.....	36
3.1.1. Σύστημα καλλιέργειας LIF-BMP4.....	37
3.1.2. Σύστημα καλλιέργειας δύο αναστολέων -2i.....	37
3.2. Μέθοδοι ελέγχου της πολυδυναμίας.....	38
3.3. Στοχευμένη διαφοροποίηση ESCs.....	40
3.4. Στοχευμένη διαφοροποίηση ESCs προς καρδιομυοκύτταρα.....	41
3.5. Καρδιακοί προγονικοί πληθυσμοί.....	42

### Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup>: ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ-NO.

4.1. Γενικά στοιχεία και ιστορική αναδρομή.....	45
4.2. Βιοσύνθεση μονοξειδίου του αζώτου-NO.....	45
4.2.1. Ενζυμική παραγωγή NO.....	46
4.2.2. Μη ενζυμική παραγωγή NO.....	48

4.3. Πρωτεΐνες που διαμεσολαβούν την βιολογική δράση του NO.....	49
4.3.1. Συνθάσες του NO.....	49
4.3.2. Η διαλυτή γουανιλική κυκλάση (sGC).....	50
4.4. S-νιτροζυλίωση.....	51
 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	 53

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup>: ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ.

5.1. Διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων προς καρδιομυοκύτταρα.....	54
5.2. Λύση κυττάρων και συλλογή πρωτεϊνών.....	57
5.3. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με την μέθοδο BCA.....	57
5.4. Ηλεκτροφόριση πρωτεϊνών σε gel πολυακρυλαμιδίου υπό μετουσιωτικές συνθήκες (SDS).....	59
5.5. Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών.....	63
5.6. Κυτταρομετρία ροής.....	67
5.7. Ανοσθορισμός.....	69
5.8. Επίδραση καρδιομυοκυττάρων, προερχόμενων από εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, με ντομπουταμίνη.....	72
5.9. Ανίχνευση s-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών.....	73

## Κεφάλαιο 6<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα.

6.1. Διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων-Παρατηρήσεις μικροσκοπίας.....	77
6.2. Χαρακτηρισμός καρδιομυοκυττάρων που προέρχονται από ανθρώπινα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα.....	79
6.2.1. Ανοσοανίχνευση των Troponin-T και SIRP-α.....	79
6.2.2. Ποσοτικοποίηση της απόδοσης διαφοροποίησης με κυτταρομετρία ροής.....	80
6.2.3. Ανίχνευση Troponin-T σε διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα με την μέθοδο του ανοσοφθορισμού.....	82
6.3. Έλεγχος παρουσίας των ενζύμων της β-οξειδωσης στα διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα.....	83
6.3.1 Έκφραση των VLCAD και CPT2.....	83
6.3.2. Έλεγχος επιπέδων των TFP-α και TFP-β.....	84
6.4. Επιπτώσεις της ενεργοποίησης των β-αδρενεργικών υποδοχέων στην μεταγωγή σήματος από το NO.....	86
6.5. Χημειοεπιλεκτικός εμπλουτισμός s-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών.....	86
6.6. S-νιτροζυλίωση ενζύμων της β-οξειδωσης σε διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα.....	88
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	90
Κεφάλαιο 7 <sup>ο</sup> : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	93
Παράρτημα.....	104

## Περίληψη

Οι πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (ESCs) προσφέρουν ευκαιρίες για καλύτερη κατανόηση της μοριακής βάσης των ανθρώπινων ασθενειών και για την ανάπτυξη μοντέλων ασθενειών για την δοκιμή νέων θεραπευτικών μεθόδων.

Τα καρδιομυοκύτταρα προσλαμβάνουν περίπου το 70% των μορίων ATP που απαιτούνται για τις φυσιολογικές συσταλτικές, ιοντικές αλλά και για άλλες σημαντικές λειτουργίες τους, από την μιτοχονδριακή β-οξείδωση (mFAO). Η αναποτελεσματική β-οξείδωση συνεπάγεται, μειωμένη παραγωγή ATP, μεταβολική ανισορροπία και οδηγεί σε καρδιακή δυσλειτουργία και παθολογία.

Η πλήρης κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης της β-οξείδωσης υπό παθοφυσιολογικές συνθήκες, δεν έχει επιτευχθεί ακόμα κυρίως εξαιτίας της έλλειψης πειραματικών μοντέλων που αναπαράγουν πιστά την ανθρώπινη παθοφυσιολογία.

Τα παλλόμενα καρδιομυοκύτταρα που προέρχονται από εβρυονικά βλαστικά κύτταρα αποτελούν ένα ελκυστικό πειραματικό μοντέλο. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήσαμε πρωτεομικό χαρακτηρισμό των προερχόμενων από hESCs, καρδιομυοκυττάρων, εστιάζοντας στα επίπεδα έκφρασης καρδιοειδικών δεικτών καθώς και των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι της β-οξείδωσης. Παρατηρήθηκε ότι η έκφραση των πρωτεϊνών Troponin-T και SIRP-α, είναι υψηλότερη σε διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα σε σχέση με τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Η χρήση κυτταρομετρίας ροής αποκάλυψε ότι η Troponin-T εκφράζεται στο 70% των κυττάρων την 14<sup>η</sup> ημέρα της διαφοροποίησης. Σε ότι αφορά την β-οξείδωση, εξετάστηκε η έκφραση των, carnitine palmitoyl-transferase-2 (CPT2), very long chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) and trifunctional protein A (TFPa), σε εμβρυονικά βλαστικά και σε διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα. Παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης των παραπάνω πρωτεϊνών στα διαφοροποιημένα κύτταρα σε σχέση με τα αδιαφοροποίητα.

Σε διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα εξετάστηκε η παρουσία S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών. Η S-νιτροζυλίωση αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς σηματοδότησης του NO. Παρατηρήθηκε ενδογενής S-νιτροζυλίωση σε

διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη μιας πηγής παραγωγής NO. Μεταξύ των S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών ήταν και τα ένζυμα της β-οξειδωσης. Συνοπτικά, η διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων προς καρδιοκύτταρα είναι αποτελεσματική. Τα καρδιομυοκύτταρα εκφράζουν τα κύρια ένζυμα της β-οξειδωσης. Η παρούσα μελέτη παρέχει πρωταρχικά αποτελέσματα σχετικά με τη ρύθμιση της β-οξειδωσης από την σηματοδότηση του NO.



## Abstract

Recent advances in the field of embryonic stem (ESCs) cells have provided opportunities for better understanding the molecular basis of human diseases and the development of disease models to test novel therapeutics.

Cardiomyocytes derive 70% of the ATP molecules that are required for normal contractile, ionic, and other important functions through the mitochondrial  $\beta$ -oxidation pathway (mFAO). Deficiencies of FAO pathway result in inadequate ATP production, metabolic imbalance, and cardiac dysfunction.

Our understanding regarding the regulation of  $\beta$ -oxidation under pathophysiological conditions has lagged due to the lack of experimental models that recapitulate human physiology and disease.

Contracting cardiomyocytes derived from differentiated ESCs represent an attractive experimental model. Herein, we performed proteomic characterization of ESCs-derived cardiomyocytes following the expression levels of Troponin-T and SIRPA as markers of cells maturation. Western blot analysis documented the presence of both proteins in lysates prepared from cells differentiated for 14 days. Proteins were not detected in undifferentiated cells. Immunostaining of fixed cells as well as flow cytometric analysis of live cells revealed that troponin-T was expressed in 70% of the cells differentiated for 14 days. Moreover, the expression of carnitine palmitoyl-transferase-2 (CPT2), very long chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) and trifunctional protein A (TFPa), the three obligate partners for mFAO, was documented in mature cardiomyocytes. To start gaining insights regarding the regulation of  $\beta$ -oxidation by nitric oxide signaling we examined the S-nitrosylation status of the three enzymes. We and others have shown that S-nitrosylation, an NO-derived posttranslational modification, regulates protein function and coordinates metabolic activity. Chemoselective enrichment followed by western blot analysis revealed the presence of CPT2, VLCAD and TFPa in the bound fractions indicating the endogenous S-nitrosylation of these proteins.

In summary, ESCs-derived cardiomyocytes express key enzymes participating to mFAO. Our study provides initial evidence regarding the regulation of this pathway by NO-signaling.



## Εισαγωγικό Μέρος

### Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>

#### **Λιπαρά οξέα και καρδιακή ενεργειακή ομοιόσταση.**

Τα λιπαρά οξέα αποτελούν υπόστρωμα για την παραγωγή ATP και αντιπροσωπεύουν την βασική μορφή αποθήκευσης ενέργειας για πολλούς οργανισμούς. Η κύρια οδός του καταβολισμού των λιπαρών οξέων είναι η μιτοχονδριακή β-οξείδωση. Το μονοπάτι αυτό συμβάλλει αποφασιστικά στην ενεργειακή ομοιόσταση της καρδιάς, των σκελετικών μυών και του ήπατος[1].

#### **1.1. Καταβολισμός λιπαρών οξέων.**

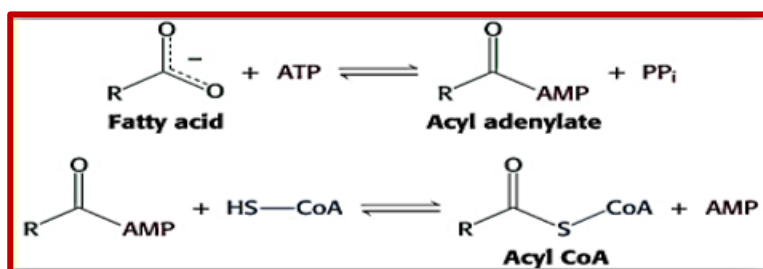
Ο καταβολισμός των λιπαρών οξέων απαιτεί την μεταφορά τους στα μιτοχόνδρια. Κατά κύριο λόγο, τα λιπαρά οξέα αποθηκεύονται στον λιπώδη ιστό ως τριακυλογλυκερόλες (τριγλυκερίδια). Για την μεταφορά τους οι τριακυλογλυκερόλες υδρολύονται μέσω της δράσης της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης προς ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Τα λιπαρά οξέα που απελευθερώνονται είναι αδιάλυτα σε υδατικά διαλύματα (αίμα) και έτσι η πρωτεΐνη του αίματος, λευκωματίνη, δρα ως φορέας λιπαρών οξέων τα οποία δεσμεύει και μεταφέρει στους ιστούς που τα έχουν ανάγκη. Η γλυκερόλη που απελευθερώνεται μέσω της λιπόλυσης απορροφάται από το ήπαρ και μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό ή γλυκόζη δηλαδή αποτελεί εναλλακτική πηγή ενέργειας και μεταβολικών ενδιάμεσων σε συνθήκες που το απαιτούν (γλυκόλυση, γλυκονεογένεση) και στην συνέχεια τα «ελεύθερα» ΛΟ μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας στους ιστούς όπου και πραγματοποιείται η οξείδωση τους.

Η πρόσληψη λιπαρών οξέων από τους ιστούς, πραγματοποιείται σε μεγάλο βαθμό από μεμβρανικές πρωτεΐνες, τις πρωτεΐνες μεταφοράς λιπαρών οξέων (fatty acid Transport proteins FATPs, solute carrier family 27), μια οικογένεια 6 πρωτεϊνών (FATP1-6) [2]. Οι FATPs είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και η έκφραση τους είναι διαφορετική στους ιστούς του σώματος που χρησιμοποιούν λιπαρά οξέα. Στον καρδιακό μυ εκφράζονται κυρίως η FATP-1 και η FATP-6. Οι FATPs διαμεσολαβούν

την πρόσληψη λιπαρών οξέων μακράς και πολύ μακράς αλυσίδας στα κύτταρα (εικόνα 1)[1] [3].

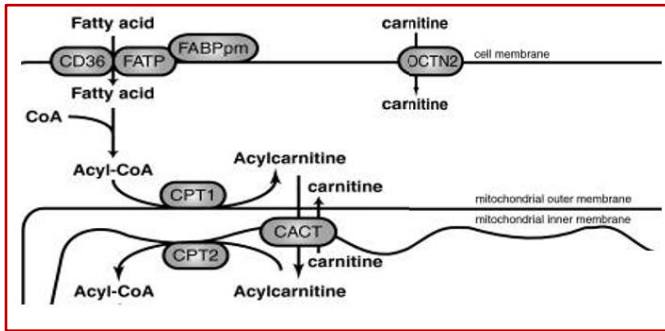
## 1.2. Ενεργοποίηση λιπαρών οξέων και μεταφορά στα μιτοχόνδρια.

Κατά την είσοδο στο κυτταρόπλασμα τα λιπαρά οξέα ενεργοποιούνται μέσω εστεροποίησης τους με το συνένζυμο A (CoA) από το ένζυμο συνθετάση του άκυλο-CoA (Αντίδραση 1):



Αντίδραση 1: Αντίδραση ενεργοποίησης λιπαρών οξέων στο κυτταρόπλασμα[4].

Η μιτοχονδριακή μεμβράνη είναι αδιαπέραστη από τα άκυλο-CoAs μακράς και πολύ μακράς αλυσίδας. Στην εικόνα 1 περιγράφεται η μετατροπή των άκυλο-CoAs σε άκυλο καρνιτίνες από την CPT1 (carnitine palmitoyl-transferase 1), ένα ένζυμο που βρίσκεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Στην συνέχεια το ένζυμο, Carnitine-acyl-carnitine translocase (CACT) μεταφέρει άκυλο-καρνιτίνες από το εξωτερικό του μιτοχονδρίου στο εσωτερικό με παράλληλη ανταλλαγή μορίων καρνιτίνης από το εσωτερικό στο εξωτερικό. Με την εισαγωγή των άκυλο-καρνιτίνων στα μιτοχόνδρια το ένζυμο CPT2 (carnitine palmitoyl transferase 2) που βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη μετατρέπει τις άκυλο-καρνιτίνες στα αντίστοιχα άκυλο -CoAs. Τα τελευταία στην συνέχεια καταβολίζονται μέσω της β-οξειδωσης[1].

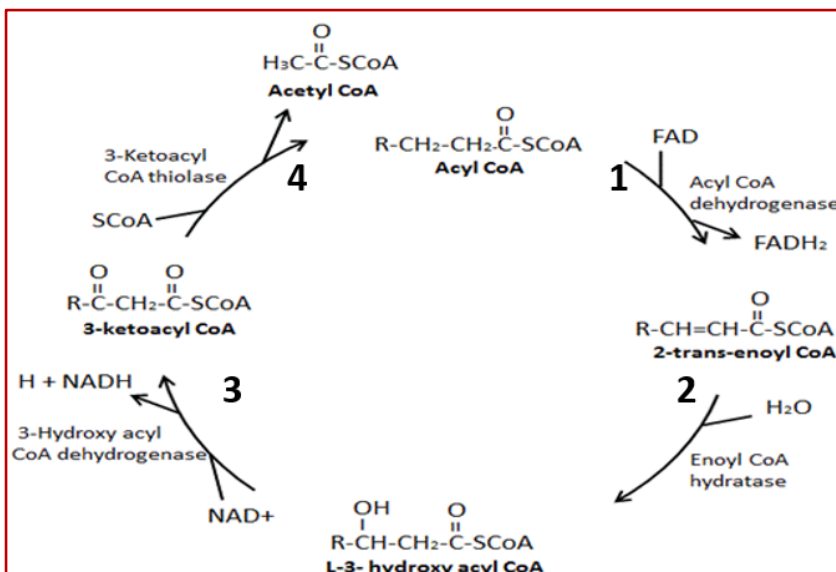


Εικόνα 1. : Η διαμεσολαβούμενη από ένζυμα, είσοδος των λιπαρών οξέων στα κύτταρα και η μεταφορά τους εντός των μιτοχονδρίων. T. J. Grevenkoed et al 2014 [5].

### 1.3. β-Οξείδωση λιπαρών οξέων.

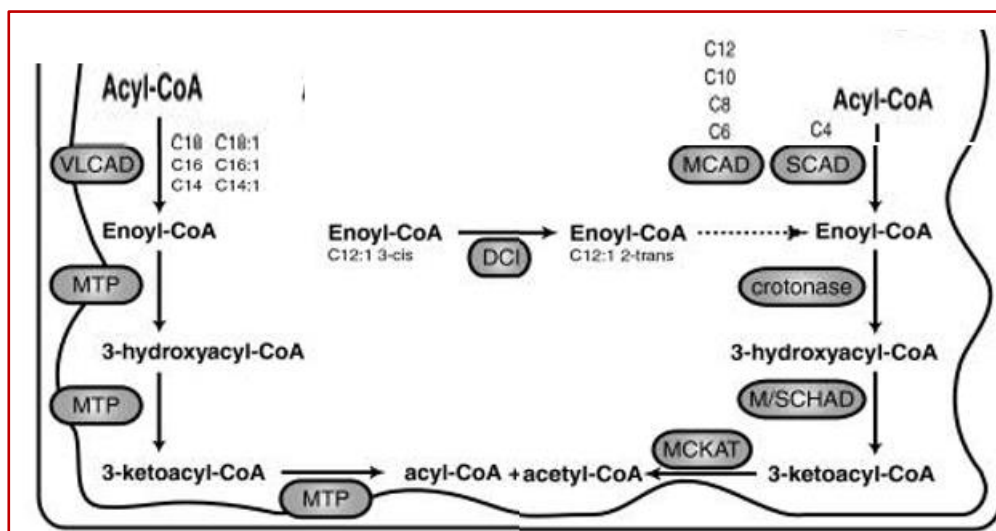
Το τρίτο στάδιο αποτελεί το τελικό βήμα στην οξείδωση των λιπαρών οξέων. Στο στάδιο αυτό μέσω 4 ενζυμικών αντιδράσεων τα εισερχόμενα στα μιτοχόνδρια άκυλο-CoAs, μετατρέπονται σε ακέτυλο-CoA. (Εικόνα 2)

Στο πρώτο στάδιο (1) ένα άκυλο-CoA αφυδρογονώνεται για να δώσει ένα 2-trans-ενόυλο-CoA. Στο δεύτερο στάδιο (2) το παραγόμενο από την αφυδρογόνωση ενδιάμεσο υφίσταται ενυδάτωση. Στο τρίτο στάδιο (3) το L-3-υδροξυ-άκυλο-CoA οξειδώνεται για να δώσει 3-κέτο-άκυλο-CoA, το οποίο στο τέταρτο στάδιο (4) υφίσταται θειολιτική διάσπαση και παράγει ακέτυλο-CoA και ένα άκυλο-CoA με δύο άτομα άνθρακα λιγότερα από το αρχικό. Το άκυλο-CoA που προκύπτει εισέρχεται σε έναν άλλον κύκλο β-οξείδωσης[6].



Εικόνα 2: Ο κύκλος της β-Οξείδωσης. Τροποποιήθηκε από Fillmore et al, 2016.[7]

Τα τέσσερα στάδια της β-οξείδωσης καταλύονται από μία σειρά ενζύμων, η δράση των οποίων εξαρτάται από το μέγεθος της λιπαρής αλυσίδας των άκυλο-CoAs (Εικόνα 3). Συγκεκριμένα, τα άκυλο-CoAs μακράς αλυσίδας (14-18 άτομα άνθρακα) μεταβολίζονται πρώτα από τα ένζυμα αφυδρογονάση των άκυλο-CoA πολύ μακράς αλυσίδας (very long chain acyl-CoA dehydrogenase, VLCAD) και την μιτοχονδριακή τριλειτουργική πρωτεΐνη (mitochondrial trifunctional protein, MTP). Αυτά τα δύο ένζυμα καταλύουν τους πρώτους 2 κύκλους της οξείδωσης για να προκύψει ένα άκυλο-CoA μήκους 8 με 10 άτομα άνθρακα. Στην συνέχεια το ένζυμο αφυδρογονάση των άκυλο-CoA μεσαίας αλυσίδας (medium chain acyl-CoA dehydrogenase, MCAD) καταλύει τους επόμενους 2-3 κύκλους ακολουθούμενο από το ένζυμο αφυδρογονάση των άκυλο-CoA βραχείας αλυσίδας (Short chain acyl-CoA dehydrogenase, SCAD). Σε ότι αφορά τα βήματα 2, 3 και 4 της διαδικασίας της β-οξείδωσης (Εικόνα 2), εκτός της TFP που εξειδικεύεται για λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας υπάρχουν τα ένζυμα κροτονάση (enoyl-CoA hydratase, 2ο στάδιο), αφυδρογονάση των υδρόξυακυλο-CoA μεσαίας/βραχείας αλυσίδας (hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, 3ο στάδιο) και θειολάση των 3-κετο-άκυλο-CoA μεσαίας αλυσίδας (3-ketoacyl-CoA thiolase, 4ο στάδιο) [1][5].



Εικόνα 3: Ενζυμική κατάλυση των σταδίων της β -οξείδωσης. T. J. Grevengoed et al 2014 [5].

#### 1.4. Διαταραχές β-Οξείδωσης.

Για την πλειονότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στην οξείδωση των λιπαρών οξέων, έχουν περιγραφεί κληρονομούμενες διαταραχές. Γενικά οι διαταραχές στην οξείδωση των λιπαρών οξέων έχουν τρεις διαφορετικούς κλινικούς φαινότυπους. Ηπατικός φαινότυπος, συχνά θανατηφόρος στην βρεφική ή νεογνική περίοδο. Καρδιακός φαινότυπος, κατά την βρεφική ηλικία, με διασταλμένη ή υπερτροφική καρδιομυοπάθεια ή/και αρρυθμίες. Τέλος ο ηπιότερος φαινότυπος εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ηλικία ως μυοπάθειες. Σπάνια έχουν καταγραφεί ασθενείς που εμφάνισαν και τους τρεις φαινότυπους[5][8]. Ο Πίνακας 1 παρουσιάζει τις πιο διαδεδομένες διαταραχές της β-οξείδωσης

Ελαττωματικές πρωτεΐνες ή ένζυμα	Παθολογία
CPT1 (carnitine palmitoyltransferase I)	Ηπατομεγαλία, επιληπτικές κρίσεις, κώμα
CACT (Carnitine-acylcarnitine translocase)	Υπογλυκαιμικό κώμα, εμετός, αδυναμία, καρδιομυοπάθεια, αραθυμίες
CPT2 (Carnitine palmitoyltransferase II)	Μυϊκός πόνος, αδυναμία μετά από παρατεταμένη άσκηση, καρδιομυοπάθεια, αρρυθμίες, κώμα, επιληπτικές κρίσεις
CACT (Carnitine-acylcarnitine translocase)	Εμετός, υπογλυκαιμικό κώμα, καρδιομυοπάθεια, αρρυθμία
VLCAD (Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase)	Αρρυθμία, υπερτροφική καρδιομυοπάθεια, ξαφνικός θάνατος, εγκεφαλοπάθεια
MCAD (Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase)	Εμετός, λήθαργος, κώμα, σύνδρομο ξαφνικού βρεφικού θανάτου, σύνδρομο Reye
SCAD (Short Chain Acyl CoA Dehydrogenase)	Αναπτυξιακή καθυστέρηση, προοδευτική μυοπάθεια
S/MCAD	Ηπατική ανεπάρκεια, εγκεφαλοπάθεια
MCKAT (Medium chain 3-ketoacyl-CoA thiolase)	Ραβδομύωση, ηπατική δυσλειτουργία, δυσανεξία
DECR1 (2,4-Dienoyl-CoA Reductase 1)	Νεογνική υποτονία, αναπνευστική οξέωση

Πίνακας 1. Διαταραχές της β-οξείδωσης και τα συμπτώματά τους.

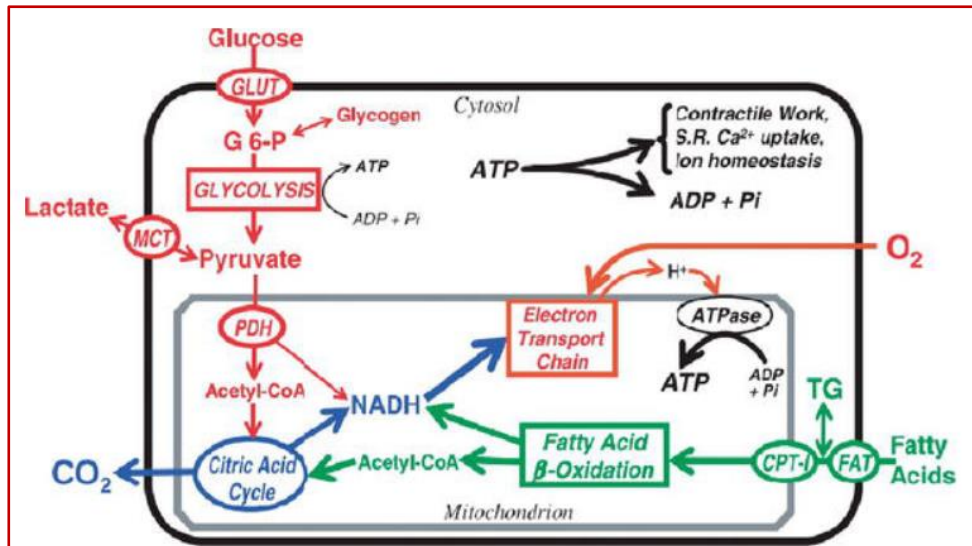
Οι ακριβείς μηχανισμοί που οδηγούν στους κλινικούς φαινότυπους των διαταραχών της β-οξείδωσης παραμένουν εν πολλοίς άγνωστοι. Δύο είναι οι επικρατούσες

απόψεις για την παθογένεση τους. Η πρώτη αφορά την έλλειψη ενέργειας λόγω της μειωμένης ικανότητας πραγματοποίησης της β-οξειδωσης και η δεύτερη είναι η συσσώρευση μεταβολιτών που προκύπτουν από την ατελή οξείδωση των λιπαρών οξέων. Πιθανή όμως είναι και η συνεργία αυτών των δύο για την εμφάνιση των συμπτωμάτων[9].

### **1.5. Γενικά στοιχεία για την υγιή καρδιακή λειτουργία.**

Η καρδιά ενός μέσου ανθρώπου χτυπά πάνω από 2,5 δισεκατομμύρια φορές κατά την διάρκεια της ζωής του, έχοντας πολύ υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις. Μια υγιής ανθρώπινη καρδιά χρησιμοποιεί διάφορα μεταβολικά υποστρώματα ανάλογα με την διαθεσιμότητα τους, την ορμονική κατάσταση και τις συνθήκες, προκειμένου να καλύψει τις ενεργειακές ανάγκες της. Ο μεταβολισμός ενός υποστρώματος περιορίζει την χρήση άλλων υποστρωμάτων ως πηγών παραγωγής ενέργειας[10]. Η καρδιά είναι μεταβολικά ευέλικτο όργανο, ικανό να διαφοροποιήσει το είδος του μεταβολικού του καυσίμου, σε εξαιρετικά μικρό χρονικό διάστημα, και να προσαρμοστεί σε ένα ευρύ φάσμα καταστάσεων. Περίπου το 95% της καρδιακής ενέργειας παράγεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης ενώ το υπόλοιπο 5% προκύπτει μέσω φωσφορυλίωσης από μη οξυγονοεξαρτόμενες αντιδράσεις. Στην κατάσταση ηρεμίας, η καρδιά ενός ενήλικα βασίζεται πρωτίστως στα λιπαρά οξέα για την παραγωγή ενέργειας. Μέσω της οξείδωσης των λιπαρών οξέων η καρδιά λαμβάνει 60-70% του συνολικού ATP. Το υπόλοιπο 30-35% προέρχεται κυρίως από την οξείδωση της γλυκόζης, με ένα ποσοστό αυτού να οφείλεται στον οξειδωτικό μεταβολισμό του γαλακτικού, αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας και κετονικών σωμάτων. Τέλος ένα μικρό ποσοστό της τάξης < 5% του συνολικού καρδιακού ATP δεν είναι προϊόν οξειδωτικού μεταβολισμού αλλά οφείλεται στην γλυκόλυση[11][12].





Εικόνα 4: Ο ενεργειακός μεταβολισμός της καρδιάς, υπό φυσιολογικές συνθήκες. Η εικόνα χρησιμοποιείται αυτούσια από *Oleinikov et al, 2019* [13].

## 1.6. Ρόλος της ηλικίας στην επιλογή μεταβολικών καυσίμων στην καρδιά.

Στην καρδιά του ενήλικα τα λιπαρά οξέα διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο διότι αποτελούν το πιο πυκνό ενεργειακά καύσιμο[14]. Αντίθετα στις καρδιές των εμβρύων το προτιμώμενο καύσιμο δεν καθορίζεται από την ενεργειακή του πυκνότητα, αλλά από την ως προς το οξυγόνο αποδοτικότητα του, δεδομένου ότι στην καρδιά του εμβρύου επικρατεί περιβάλλον χαμηλού οξυγόνου. Τα λιπαρά οξέα αποτελούν το πιο πυκνό ενεργειακά καύσιμο αλλά ταυτοχρόνως αποτελούν και το λιγότερο αποδοτικό ως προς την κατανάλωση οξυγόνου[11], έτσι η εμβρυακή καρδιά μεταβολίζει την γλυκόζη ως το κύριο ενεργειακό υπόστρωμα[12].

## 1.7. Μεταβολισμός λιπαρών οξέων στην υγιή καρδιά.

Τα λιπαρά οξέα αποτελούν το κύριο μεταβολικό υπόστρωμα στον ενήλικο καρδιακό μυ. Τα καρδιομυοκύτταρα έχουν περιορισμένη ικανότητα για αποθήκευση και σύνθεση λιπαρών οξέων, με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητη η λήψη τους από εξωκυτταρικές πηγές. Η πρόσληψη των λιπαρών οξέων από τα καρδιακά κύτταρα πραγματοποιείται με τους μεταφορείς λιπαρών οξέων, οι οποίοι είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες (CD36 ή platelet glycoprotein 4 ή Fatty acid translocase -FAT,

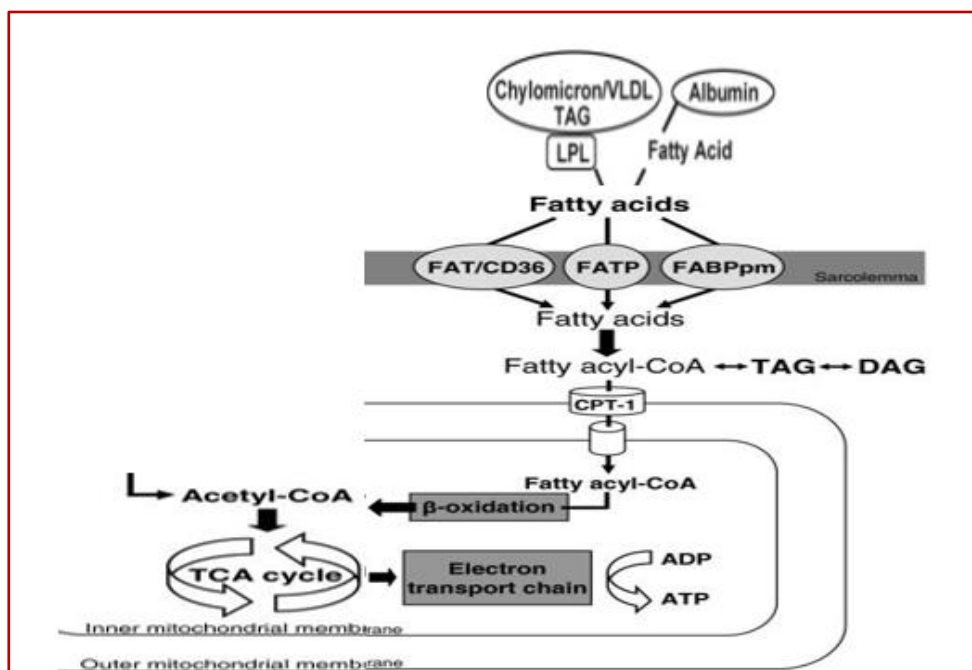
κυτταροπλασματική πρωτεΐνη δέσμευσης) και 2 πρωτεΐνες μεταφορείς (FATP-1 και FATP-6)[2]. Επίσης τα λιπαρά οξέα, μεσαίας και μικρού μήκους αλυσίδας, δύνανται να εισέλθουν στα καρδιομυοκύτταρα μέσω παθητικής διάχυσης (λόγω του αμφίφυλου χαρακτήρα τους).

Επιπροσθέτως, η πρόσληψη των λιπαρών οξέων από τα καρδιομυοκύτταρα διεγείρεται από την συστολή, μέσω δύο μηχανισμών στους οποίους καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει η AMPK[15]. Αναλυτικότερα, η ενεργοποιημένη AMPK φωσφωρυλιώνει τις Troponin-I και T, δύο πρωτεΐνες που συμμετέχουν ενεργά στην ομοιόσταση του  $Ca^{2+}$  με αποτέλεσμα να διεγείρεται η καρδιακή συστολή. Επίσης, η AMPK είναι υπεύθυνη για την φωσφωρυλίωση και ενεργοποίηση των τύπου L διαύλων  $Ca^{2+}$ , οι οποίοι εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη και εισάγουν ασβέστιο εντός των κυττάρων [16]. Επίσης έχει δειχθεί πως σε καταστάσεις stress, η AMPK, φωσφωρυλιώνει τα ένζυμα eNOS (Endothelial nitric oxide synthase) και nNOS (neuronal nitric oxide synthase), με αποτέλεσμα να ενισχύεται η απελευθέρωση μονοξειδίου του αζώτου, με το τελευταίο να επηρεάζει μέσω s-νιτροζυλίωσης τον χειρισμό του ενδοκυτταρικού  $Ca^{2+}$  και να αυξάνει την συστολική λειτουργία του μυοκαρδίου [17].

Με την εισαγωγή τους στα καρδιομυοκύτταρα τα λιπαρά οξέα είτε καταβολίζονται (**β οξειδωση**), ή **εστεροποιούνται σε τριγλυκερίδια (triglycerides, TAGs)** τα οποία ακολούθως μετατρέπονται σε DAGs (διάκυλογλυκερόλες) μέσω της δράσης του ενζύμου ATGL (adipose triglyceride lipase) και αποθηκεύονται (Εικόνα 5). Έρευνες απέδειξαν πως το 60% των εξωγενών λιπαρών οξέων ενσωματώνεται σε TAGs ενώ το 40% οξειδώνεται αμέσως προς παραγωγή ATP όταν η ζήτηση είναι χαμηλή[18].

Ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων στην καρδιά θα πρέπει να πραγματοποιείται με ρυθμό που να καλύπτει τις μεταβολικές της ανάγκες. Χρόνια αδυναμία της καρδιάς να καλύψει τις ενεργειακές της απαιτήσεις, οδηγεί σε συστολική δυσλειτουργία, υπερτροφία και καρδιακή ανεπάρκεια. Από την άλλη, στον διαβήτη τύπου 2 εμφανίζεται αυξημένος μεταβολισμός λιπαρών οξέων, διαστολική δυσλειτουργία και αντίσταση στην ινσουλίνη. Κατά συνέπεια η διατήρηση της ισορροπίας στον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων είναι αποφασιστικής σημασίας για την φυσιολογική καρδιακή λειτουργία. Η συγκεκριμένη μεταβολική πορεία θα μπορούσε να

αποτελέσει επίσης στόχο φαρμακευτικών παρεμβάσεων σε ασθενείς με καρδιακή δυσλειτουργία [15].



Εικόνα 5: Η μεταβολική τύχη των λιπαρών οξέων ως καρδιακό καύσιμο. Η εικόνα χρησιμοποιείται αυτούσια από van den Brom et al, 2013[19].

### 1.7.1. Μηχανισμοί ρύθμισης β-Οξειδωσης.

Η ρύθμιση της οξείδωσης των λιπαρών οξέων αποτελεί καθοριστικό παράγοντα προκειμένου η καρδιά να εναλλάξει τα διαθέσιμα υποστρώματα προς όφελος της. Η οξείδωση των λιπαρών οξέων μπορεί να ρυθμιστεί με ποικίλους τρόπους[11]:

1. Μέσω παροχής λιπαρών οξέων στην καρδιά. Συνήθως επιτυγχάνεται με ρύθμιση της έκφρασης του PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor alpha). Η υπερέκφραση του, αυξάνει τα επίπεδα πολλών, εμπλεκόμενων στην β-οξείδωση, πρωτεϊνών αυξάνοντας τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων. Η μειωμένη έκφραση του οδηγεί στα αντίθετα αποτελέσματα[20].
2. Μέσω προκαλούμενης από το μηλότυλο-CoA αναστολή της CPT1. Η ενδομυοκαρδιακή συγκέντρωση μηλότυλο-CoA αυξάνεται μετά από αναστολή της MCD (malonyl-CoA decarboxylase), του ενζύμου που μεσολαβεί την αποικοδόμηση του μηλότυλο-CoA, ή διαμέσου της δράσης της ACC (acetyl-CoA

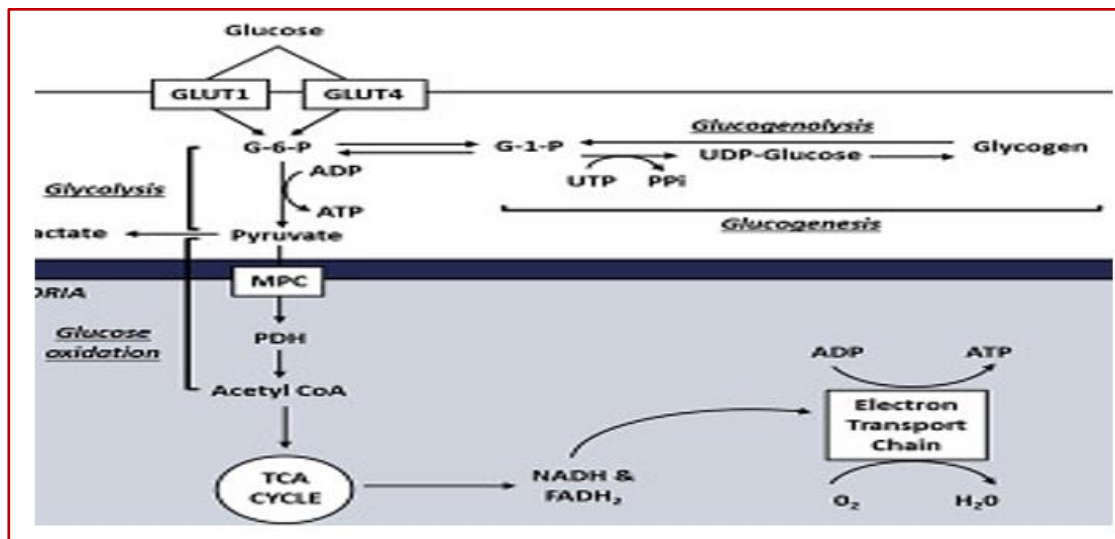
carboxylase), η οποία καταλύει την σύνθεση μηλότυλο-CoA από ακέτυλο-CoA[21].

3. Μέσω των αναλογίων FAD/FADH<sub>2</sub> και NAD/NADH, οι οποίες διαφοροποιούν την δραστικότητα της αφυδρογονάσης του άκυλο-CoA (acyl-CoA dehydrogenase, ACAD) και της 3-υδροξυάκυλ-CoA αφυδρογονάσης (hydroxyacyl-CoA dehydrogenase) επηρεάζοντας το πρώτο και τέταρτο βήμα της β-οξείδωσης λιπαρών οξέων, αντίστοιχα[22].
4. Μέσω μετα-μεταφραστικής τροποποίησης πρωτεϊνών. Η ρύθμιση της β-οξείδωσης μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων αποτελεί ένα σχετικά καινούργιο πεδίο στην έρευνα. Καλύτερα μελετημένος μηχανισμός είναι η ακετυλίωση καταλοίπων λυσίνης ενζύμων που συμμετέχουν σε αυτή την μεταβολική πορεία, όπως η VLCAD, LCAD. Η εκλεκτική ακετυλίωση της LCAD αναστέλλει την ενζυμική δραστικότητα της [23]. Ωστόσο ο ρόλος της ακετυλίωσης σε ότι αφορά την β-οξείδωση δεν είναι ξεκάθαρος. Μελέτες υποστηρίζουν ότι η ακετυλίωση αναστέλλει την β-οξείδωση ενώ άλλες υποστηρίζουν το αντίθετο [24]. Τέλος, έχει δειχθεί σε γενετικά τροποποιημένα πειραματόζωα ότι η ακετυλίωση των πρωτεϊνών της β-οξείδωσης πραγματοποιείται από ακέτυλο-CoA που παράγεται κατά την οξείδωση των λιπαρών οξέων [25] [26]. Εκτός της ακετυλίωσης άλλες τροποποιήσεις όπως η προσθήκη ηλεκτρικού (succinylation)[27], ή η προσθήκη του μονοξειδίου του αζώτου (S-nitrosylation), έχουν προταθεί ως πιθανοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί της καρδιακής β-οξείδωσης[28].
5. Μέσω της δράσης του πρωτεϊνικού συμπλόκου mTOR (mammalian target of rapamycin complex 1). Διαδραματίζει κεντρικό ρόλο τόσο στον αναβολισμό (λιπονεογένεση) όσο και στον καταβολισμό (β-οξείδωση) των λιπαρών οξέων, καθώς επηρεάζει την πρωτεϊνική έκφραση. Η αναστολή του mTOR οδηγεί σε αυξημένη έκφραση VLCAD και CACT ευνοώντας την β-οξείδωση λιπαρών οξέων[29].

## 1.8. Μεταβολισμός γλυκόζης στον καρδιακό μυ.

Η γλυκόζη αποτελεί την πηγή σημαντικού ποσοστού του συνολικού καρδιακού ATP. Είναι το πιο αποδοτικό, ως προς την κατανάλωση  $O_2$ , καύσιμο για την παραγωγή ATP (6 μόρια  $O_2$  καταναλώνονται ανά μόριο γλυκόζης που καταβολίζεται). Τα καρδιομυοκύτταρα λαμβάνουν την γλυκόζη είτε μέσω της πρόσληψης της από το πλάσμα, είτε από την υδρόλυση του ενδομυοκαρδιακού γλυκογόνου. Λόγω των χαμηλών καρδιακών αποθεμάτων σε γλυκογόνο, την κύρια προέλευση της γλυκόζης στα καρδιομυοκύτταρα αποτελεί η προσλαμβανόμενη από το πλάσμα. Η εικόνα 6 περιγράφει τους μηχανισμούς που διαμεσολαβούν την είσοδο και τον μεταβολισμό της γλυκόζης στα καρδιοκύτταρα. Η είσοδος της γλυκόζης στο σαρκώλιμα αποτελεί το περιοριστικό βήμα για τον μεταβολισμό της [30]. Η μεταφορά της εξωκυτταρικής γλυκόζης στα καρδιομυοκύτταρα λόγω της υδρόφιλης φύσης της, μεσολαβεί από τους διαμεμβρανικούς μεταφορείς γλυκόζης GLUT 4 (glucose transporter type 4) και GLUT 1 (glucose transporter type 1). Με την εισαγωγή της στα μυοκύτταρα η γλυκόζη με την επίδραση εξοκινάσης φωσφοριλώνεται ταχέως σε 6-φωσφορική γλυκόζη. Στην συνέχεια η 6-φωσφορική γλυκόζη δύναται να μετατραπεί σε πυροσταφυλικό μέσω γλυκόλυσης ή να οδηγήσει στην σύνθεση γλυκογόνου (καρδιά νεογνού και εμβρύου) [8]. Το εκ της γλυκόλυσης παραγόμενο πυροσταφυλικό μπορεί να μετατραπεί σε γαλακτικό στο κυτταρόπλασμα είτε να μεταφερθεί εντός των μιτοχονδρίων και να ανοικοδομηθεί προς την παραγωγή ακέτυλο-CoA μέσω της δράσης την πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (Pyruvate dehydrogenase, PDH) (Εικόνα 6). Η PDH παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία τόσο ως προς την αναλογία ADP/ATP και NADH/NAD<sup>+</sup> όσο και ως προς τις συγκεντρώσεις πυροσταφυλικού και ακέτυλο-CoA. Η πρόσληψη γλυκόζης από τα καρδιομυοκύτταρα διεγείρεται από την ινσουλίνη μέσω της δράσης της φωσφατιδύλοσινοσιτόλης 3-κινάσης (PI3K) και από την συστολή μέσω αύξησης του λόγου AMP/ATP. Και οι δύο παραπάνω μηχανισμοί ενεργοποιούν την AMPK, η οποία διαμεσολαβεί την μετατόπιση του GLUT 4 στην κυτταρική μεμβράνη των καρδιακών κυττάρων, καθώς αναστέλλει τις Rab-GTPase-activating proteins AS160 TBC1D4 και TBC1D1, οδηγώντας έτσι σε αύξηση της πρόσληψης γλυκόζης. Ο GLUT 1 ενδέχεται να μετατοπιστεί επίσης στο σαρκώλιμα ως

απάντηση στην σηματοδότηση ινσουλίνης και στην συστολή αλλά η επίδραση του στην πρόσληψη γλυκόζης είναι αμελητέα[31].

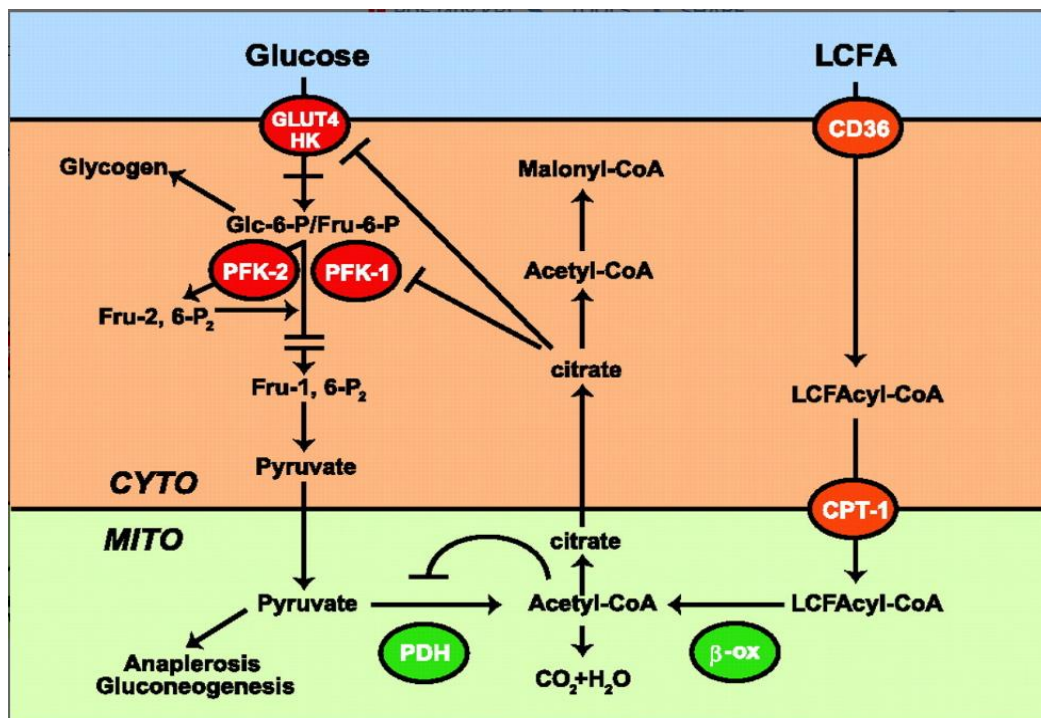


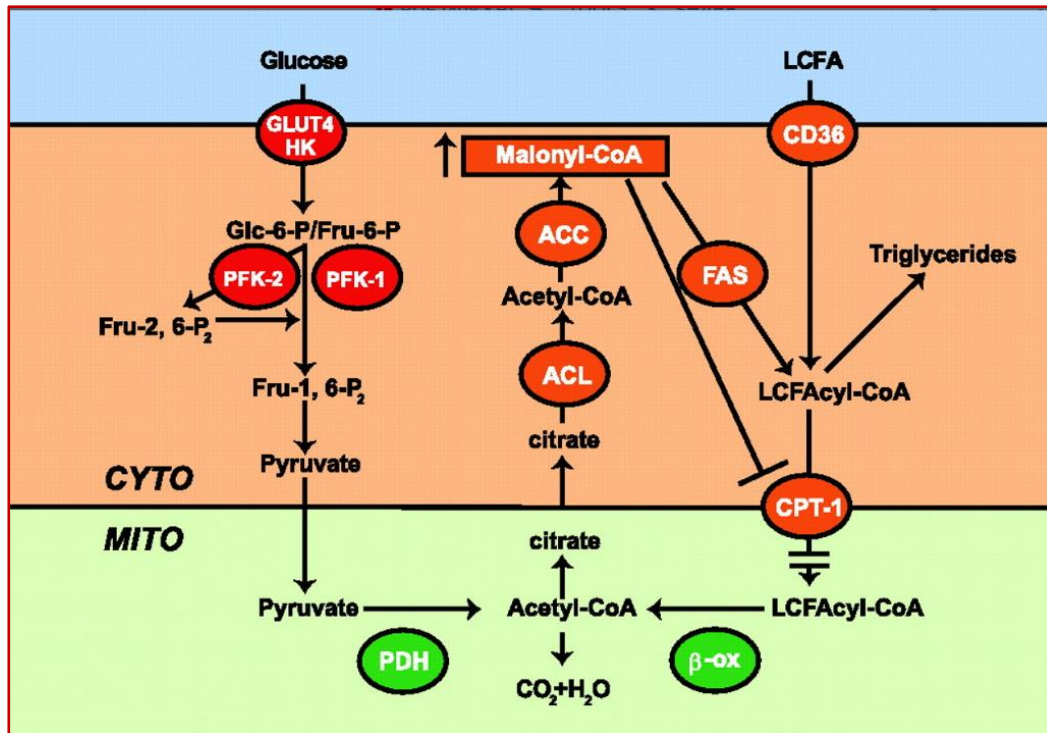
Εικόνα 6: Η γλυκόζη ως καρδιακό καύσιμο. Η εικόνα χρησιμοποιείται αυτούσια από De Yong et al 2017.[11]

## 1.9. Καθορισμός της πηγής του ενεργειακού υποστρώματος στην καρδιά.

Η καρδιά με σκοπό την επίτευξη και διατήρηση της ενεργειακής της ομοιόστασης, βασίζεται στον μεταβολισμό μια πληθώρας υποστρωμάτων άνθρακα (λιπαρά οξέα, γλυκόζη, γαλακτικό, αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας και κετονικά σώματα). Η επιλογή του εκάστοτε μεταβολικού καυσίμου καθορίζεται από συγκεκριμένους παράγοντες. Η διαθεσιμότητα και μεταφορά του υποστρώματος εντός των καρδιομυοκυττάρων αποτελούν τον κύριο παράγοντα επιλογής μεταβολικού καυσίμου. Οι φυσιολογικές καταστάσεις επηρεάζουν τον καθορισμό ενεργειακού υποστρώματος από την καρδιά. Σε περιόδους νηστείας τα κετονικά σώματα, που απελευθερώνονται από το ήπαρ, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στον καρδιακό μεταβολισμό. Αντίθετα κατά την διάρκεια άσκησης το γαλακτικό χρησιμοποιείται από τον καρδιακό μυ ως το κύριο μεταβολικό υπόστρωμα [32]. Τέλος η παρουσία μεταβολιτών προερχόμενων από τον μεταβολισμό ενός ενεργειακού υποστρώματος περιορίζει την χρήση των υπολοίπων. Συγκεκριμένα, η παρουσία ενδιάμεσων της

γλυκόλυσης και της β-οξείδωσης οδηγούν σε αμοιβαία αναστολή. Το φαινόμενο αυτό περιεγράφηκε από τον Randle και ονομάστηκε ο κύκλος του Randle [33]. Ειδικότερα, παρουσία ενδιάμεσων μεταβολιτών της γλυκόλυσης, παρατηρείται μείωση του ρυθμού οξείδωσης των λιπαρών οξέων, οφειλόμενη στην αναστολή της CPT-1 από μηλότυλο-CoA, μέσω αύξησης των επιπέδων του προερχόμενου από το πυροσταφυλικό, ακέτυλο-CoA. Αντιστρόφως η προερχόμενη από λιπόλυση αύξηση του λόγου NADH/NAD<sup>+</sup> προάγει την αλλοστερική ενεργοποίηση της κινάσης της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης οδηγώντας σε απευθείας αναστολή της PDH (Pyruvate Dehydrogenase) και άρα της οξείδωσης της γλυκόζης. Επιπροσθέτως το παραγόμενο, από την β-οξείδωση, ακέτυλο-CoA μετατρέπεται σε κιτρικό μετά την εισαγωγή του στον κύκλο του Krebs, αναστέλλοντας την φωσφοφρουκτοκινάση 1 διακόπτοντας κατά αυτόν τον τρόπο την γλυκόλυση (Εικόνα 7) [33].





Εικόνα 7: Ο κύκλος του Randle. Στο επάνω μέρος παρουσιάζονται οι μηχανισμοί αναστολής του μεταβολισμού της γλυκόζης από την οξείδωση των λιπαρών οξέων. Στο κάτω μέρος παρουσιάζονται οι μηχανισμοί αναστολής της οξείδωσης λιπαρών οξέων από τον μεταβολισμό της γλυκόζης. Η εικόνα παρουσιάζεται αυτούσια από Hue et al., 2009.[34]



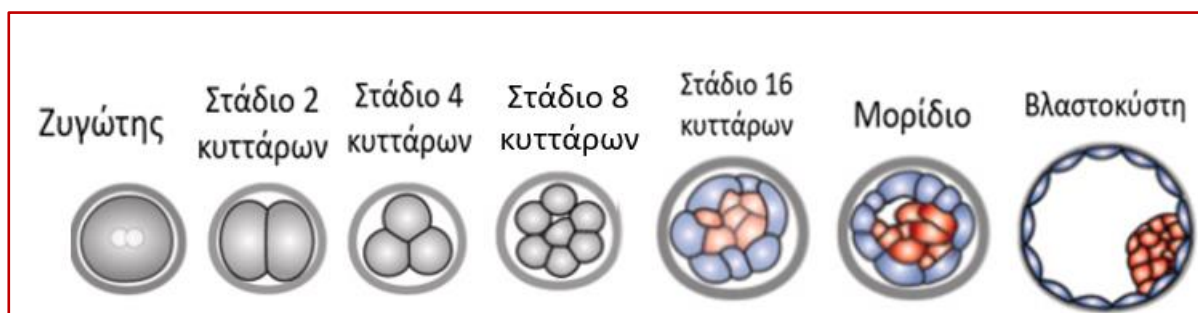
## Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>

### Βιολογία των Βλαστικών Κυττάρων.

#### 2.1. Προεμφυτευτική ανάπτυξη και προέλευση βλαστικών κυττάρων.

Η εμβρυική ανάπτυξη ξεκινά μερικές μόνο ώρες μετά την γονιμοποίηση του ωαρίου από το σπερματοζώαριο με την διαδικασία της αυλάκωσης, μία έννοια που περιγράφει τις πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις του εμβρύου. Η πρώτη κυτταρική διαίρεση, οδηγεί στην δημιουργία δύο κυττάρων που ονομάζονται βλαστομερίδια (Εικόνα 8). Ακολουθούν άλλες δύο κυτταρικές διαιρέσεις κατά την αυλάκωση, μέχρι και τον σχηματισμό των 8 πρώτων βλαστομεριδίων, τα οποία αναπτύσσονται στον χώρο που καταλάμβανε αρχικά το ωάριο. Και τα οχτώ κύτταρα σε αυτό το στάδιο (στάδιο 8 κυττάρων στην εικόνα) έχουν την δυνατότητα να δημιουργήσουν όλους τους εμβρυικούς και εξωεμβρυικούς ιστούς. Στο στάδιο των 8 με 16 βλαστομεριδίων λοιπόν, λόγω του περιορισμένου χώρου, τα κύτταρα συσπειρώνονται και απαλείφεται κάθε κενό μεταξύ τους με αποτέλεσμα να σχηματίζεται μία συμπαγής μάζα που ονομάζεται μορίδιο. Έπειτα σχηματίζεται ένα κενό στο εσωτερικό αυτής της συμπαγούς δομής κυττάρων στο οποίο εκβάλλεται υγρό και δημιουργείται μία κοιλότητα, η λεγόμενη βλαστοκώλη. Αυτό το συμβάν σηματοδοτεί την έναρξη του επόμενου σταδίου ανάπτυξης που ονομάζεται βλαστοκύστη. Η βλαστοκύστη εμπεριέχει την βλαστοκώλη και τα κύτταρα στο εσωτερικό της έως τώρα εμβρυικής δομής, αυτά τα κύτταρα ονομάζονται κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας και από αυτά θα προκύψουν όλοι οι εμβρυικοί ιστοί αφού πρώτα σχηματιστούν τα τρία εμβρυικά δέρματα, το εξώδερμα, το μεσόδερμα και το ενδόδερμα [35]. Η ιδιότητα αυτή, δηλαδή η ικανότητα αυτών των κυττάρων της βλαστοκύστης να μετατραπούν και να συγκροτήσουν όλους τους εμβρυικούς ιστούς, περιγράφεται με τον όρο της πολυδυναμίας. Αυτά λοιπόν τα κύτταρα με τον πολυδύναμο χαρακτήρα, όταν απομονώνονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα χαρακτηρίζονται ως εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ESCs). Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Επίσης η βλαστοκύστη ενδύεται από την τροφοβλάστη, που αποτελείται από τα κύτταρα που βρίσκονται στην επιφάνεια και από αυτά τα κύτταρα θα προέλθουν οι εξωεμβρυικοί ιστοί. Σε αυτό το στάδιο ο συνολικός εμβρυικός όγκος δεν

μεταβάλλεται αλλά τα κύτταρα διαιρούνται συνεχώς με αποτέλεσμα να διαρρηγνύεται η διαυγής ζώνη που περιβάλλει την βλαστοκύστη και να ακολουθεί η εμφύτευση του εμβρύου στην μήτρα (Εικόνα 8) [36].



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της προεμφυτευτικής ανάπτυξης. Η εικόνα τροποποιήθηκε από την αρχική Firmin et al, 2021 [37].

## 2.2. Δυναμικό διαφοροποίησης και κατηγορίες βλαστικών κυττάρων.

Ένα κύτταρο χαρακτηρίζεται ως βλαστικό μόνο εάν πληροί δύο συγκεκριμένα κριτήρια, εκείνα, της αυτοανανέωσης και της πλαστικότητας. Συγκεκριμένα αυτά τα κύτταρα, είναι πλήρως ή μερικώς αδιαφοροποίητα και έχουν την δυνατότητα να εισέλθουν κατόπιν ενέργειας συγκεκριμένων ερεθισμάτων, στην διαδικασία της διαφοροποίησης και να μετατραπούν σε διάφορους τύπους ενήλικων ιστοειδικών κυττάρων. Η τελευταία πρόταση περιγράφεται συντομότερα από τον όρο της πλαστικότητας- πλειοδυναμίας.

Υπάρχουν δύο κριτήρια κατηγοριοποίησης με βάση τα οποία τα βλαστικά κύτταρα κατατάσσονται σε διαφορετικές ομάδες:

### (A) Με βάση την προέλευση.

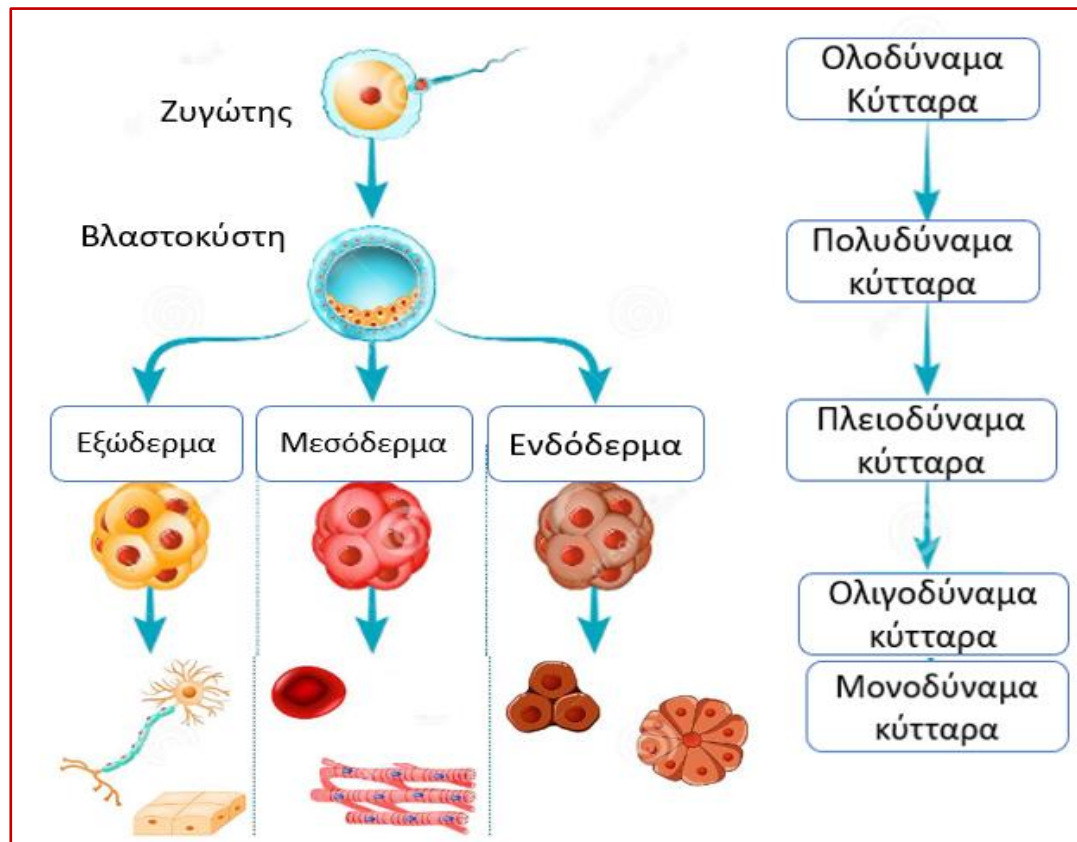
- 1) Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, τα οποία παραλαμβάνονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα κατά την προεμφυτευτική ανάπτυξη.
- 2) Εμβρυικά βλαστικά κύτταρα, προέρχονται από τα τελευταία στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης και χαρακτηρίζονται από μειωμένο δυναμικό διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού από ότι τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα.

- 3) Ενήλικα βλαστικά κύτταρα. Σχεδόν όλα τα όργανα του ενήλικα περιέχουν και βλαστικά κύτταρα. Υπάρχουν ενδείξεις πως αυτά τα κύτταρα είναι υπεύθυνα για την αναγέννηση διαφόρων ιστών μετά από κάποιο τραύμα. Κάποιες από τις κατηγορίες ενήλικων βλαστικών κυττάρων χρήζουν αναλυτικότερης μελέτης, ώστε να διαπιστωθεί η λειτουργία τους.
- 4) Καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Αποτελούν ένα εξαιρετικά μικρό μέρος των όγκων και είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά στις υπάρχουσες θεραπείες [38].

**(B) Με βάση το δυναμικό διαφοροποίησης (εικόνα 9)[39].**

- 1) Ολοδύναμα: Ολοδύναμα είναι τα οχτώ πρώτα Βλαστομερίδια έως δηλαδή και το στάδιο δημιουργίας της τροφοβλάστης. Αυτά τα κύτταρα είναι ισοδύναμα και μπορούν από αυτά να προκύψουν όλοι οι εξωεμβρυικοί και εμβρυικοί ιστοί.
- 2) Πολυδύναμα: Είναι τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας, τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Από τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα δύνανται να προέλθουν όλοι οι εμβρυικοί ιστοί.
- 3) Πλειοδύναμα: Τα βλαστικά κύτταρα αυτής της κατηγορίας κατέχουν συγκεκριμένο δυναμικό διαφοροποίησης και έχουν την δυνατότητα να ακολουθήσουν τρεις με τέσσερις, μόνο, ξεχωριστές ιστικές κατευθύνσεις κατά την διαφοροποίηση τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων κυττάρων αποτελούν τα μεσευγχυματικά βλαστικά κύτταρα του ενήλικου, καθώς αυτά μπορούν να διαφοροποιηθούν προς λιπώδη ιστό, χόνδρο και οστό [40].
- 4) Ολιγοδύναμα: Είναι η κατηγορία βλαστικών κυττάρων με το αμέσως μικρότερο δυναμικό διαφοροποίησης. Αυτά τα κύτταρα διαφοροποιούνται μόνο προς πολύ συγκεκριμένους και στενά συνδεδεμένους ενήλικους κυτταρικούς πληθυσμούς δεδομένης ιστικής κατεύθυνσης. Τα αγγειακά βλαστικά κύτταρα του ενήλικα εμπίπτουν σε αυτή την κατηγορία καθώς μπορούν να διαφοροποιηθούν μόνο προς ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα.
- 5) Μονοδύναμα: Είναι τα βλαστικά κύτταρα με το ελάχιστον δυνατό δυναμικό διαφοροποίησης, καθώς έχουν την δυνατότητα να διαφοροποιούνται μόνο

προς μία συγκεκριμένη ιστική κατεύθυνση, παράδειγμα αυτής της κατηγορίας αποτελούν τα μυϊκά βλαστικά κύτταρα του ενήλικου.



Εικόνα 9: Κατηγοριοποίηση βλαστικών κύτταρων με βάση το δυναμικό διαφοροποίησης.

Υπάρχει ακόμη μία κατηγορία πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων τα οποία κατασκευάζονται εργαστηριακά και δεν υπάρχουν εντός των βιολογικών συστημάτων. Το 2006 ο Yamanaka μετέτρεψε ινοβλάστες ποντικού, εισάγοντας σε αυτούς συγκεκριμένους παράγοντες (OCT4, SXO2, KLF4, c-myc), σε κύτταρα με παρόμοιο φαινότυπο με εκείνον των ESCs [41]. Έναν χρόνο αργότερα κατάφερε να πραγματοποιήσει, επιτυχώς, την ίδια διαδικασία και σε ινοβλάστες ανθρώπου [42]. Αυτά τα κύτταρα ονομάζονται βλαστικά κύτταρα επαγόμενης πολυδυναμίας (iPSCs) και η ανακάλυψη τους, χάρισε στον Yamanaka το βραβείο Nobel ιατρικής ή φυσιολογίας για το έτος 2012. Μετά την προσθήκη των προαναφερθέντων παραγόντων, οι οποίοι ονομάζονται παράγοντες του Yamanaka, τα σωματικά

κύτταρα διέρχονται από διάφορα στάδια μέχρι τελικά να υιοθετήσουν τον πολυδύναμο βλαστικό φαινότυπο. Αρχικά τα σωματικά γονίδια και τα γονίδια αναστολής του κυτταρικού κύκλου, μεθυλιώνονται και απενεργοποιούνται ενώ ταυτόχρονα τα γονίδια πρώιμης και έπειτα όψιμης πολυδυναμίας καθώς και τα γονίδια προαγωγής του κυτταρικού κύκλου απομεθυλιώνονται και ενεργοποιούνται. Ακολουθεί επιμήκυνση των τελομερών και ενεργοποίηση της τελομεράσης και τέλος επαναενεργοποιείται το χρωμόσωμα X και επέρχεται η αθανатоποίηση αυτών των κυττάρων[41], [42].

Νεότερα δεδομένα υποστηρίζουν πως τα συγκεκριμένα κύτταρα είναι απολύτως ικανά να χρησιμοποιηθούν ερευνητικά αντικαθιστώντας ενδεχομένως τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, ξεπερνώντας με αυτόν τον τρόπο τα διάφορα νομικά και ηθικά ζητήματα που ακολουθούν τα τελευταία.

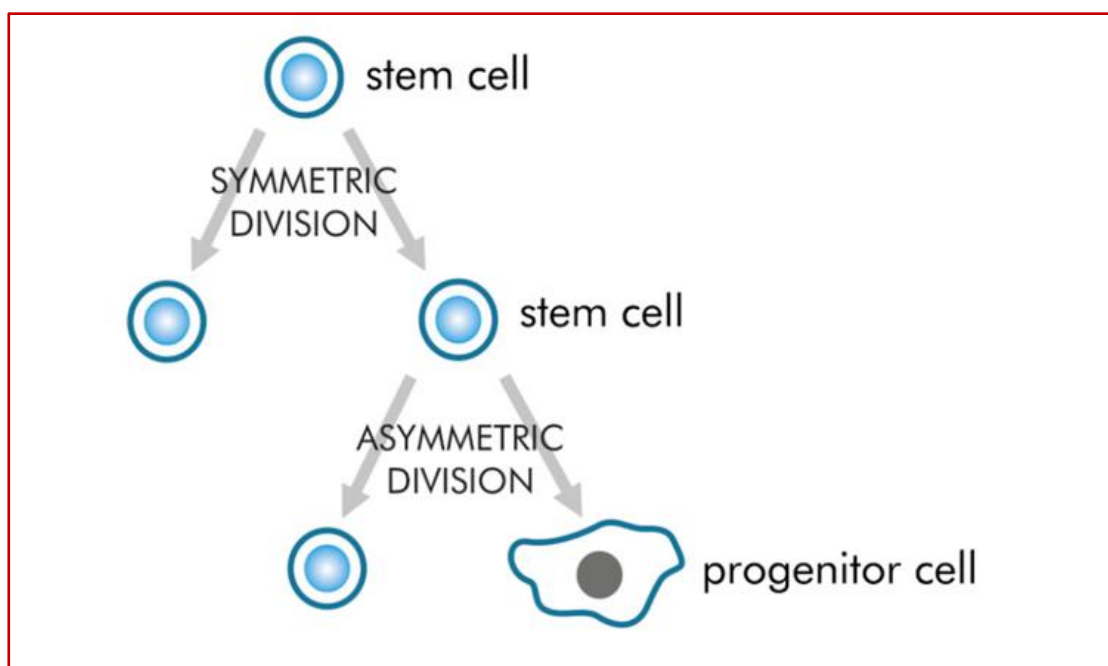
### **2.3. Ιδιότητες βλαστικών κυττάρων.**

Ο αδιαφοροποίητος φαινότυπος προσδίδει στα βλαστικά κύτταρα έναν αθανατοποιημένο χαρακτήρα, καθώς η ιστοειδικότητα είναι αντιστρόφως ανάλογη του πολλαπλασιαστικού δυναμικού. Γενικότερα η αυτοανανέωση και ο πολλαπλασιασμός των βλαστικών κυττάρων πέραν από την ρύθμιση του πληθυσμιακού όγκου αυτών των κυττάρων, αποτελούν και καθοριστικά μέσα διατήρησης του υπάρχοντος δυναμικού διαφοροποίησής τους [43].

#### **2.3.1. Αυτοανανέωση βλαστικών κυττάρων.**

Η αυτοανανεωτική ικανότητα των βλαστοκυττάρων αποτελεί μηχανισμό κλειδί για την διαφύλαξη και διατήρηση της πλαστικότητας. Ως αυτοανανέωση μπορεί να οριστεί η μίτωση μέσω της οποίας παράγεται τουλάχιστον ένα θυγατρικό κύτταρο όμοιο με το αρχικό. Η ικανότητα τους αυτή έγκειται στο φαινόμενο της συμμετρικής και ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης αυτών των κυττάρων (εικόνα 10). Αρχικά η συμμετρική διαίρεση οδηγεί στην γέννηση δύο κυττάρων, όμοιων, φαινοτυπικά, με το αρχικό. Κατ'αυτόν τον τρόπο τα βλαστοκύτταρα πληθαίνουν και ταυτόχρονα διατηρούν στο έπακρον την πλαστική τους φύση. Ο συγκεκριμένος τρόπος

αυτοανανέωσης συναντάται στα πρώιμα στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης και μέσω αυτού επιτυγχάνεται η εκθετική αύξηση της συνολικής μάζας του εμβρύου [44]. Αντίθετα η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση, είναι μία κυτταρική λειτουργία που συναντάται κατ' εξοχήν στα βλαστικά κύτταρα των μεταγενέστερων αναπτυξιακών σταδίων και στα μερικώς διαφοροποιημένα κύτταρα [45]. Έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός όμοιου, με το αρχικό, κυττάρου και ενός κυττάρου απογόνου του αρχικού με μειωμένο δυναμικό πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης, το οποίο εν ευθέτω χρόνο θα μεταναστεύσει στο κατάλληλο όργανο ή ιστό.

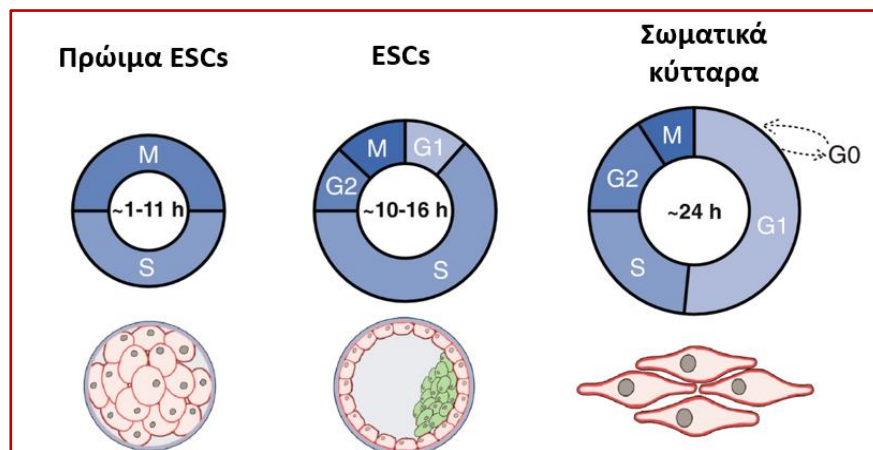


Εικόνα 10: Μηχανισμοί κυτταρικής διαίρεσης βλαστικών κυττάρων. Η εικόνα χρησιμοποιείται αυτούσια από Fulawka et al., 2014. [46]

### 2.3.2. Κυτταρικός Κύκλος βλαστικών κυττάρων.

Ένα ακόμη σημείο διαχωρισμού των βλαστικών κυττάρων από τα σωματικά κύτταρα αποτελεί και ο κυτταρικός κύκλος ως σύνολο, πέραν της διαίρεσης που αναφέρθηκε παραπάνω. Τα βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από έναν εξαιρετικά σύντομο κυτταρικό κύκλο. Μάλιστα όσο αφορά τις πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις φαίνεται, τουλάχιστον σε έμβρυα ψαριού, βατράχου και μύγας, πως οι φάσεις G1 και G2 είναι τόσο βραχείες που πρακτικά ο κυτταρικός κύκλος σε αυτό το στάδιο συγκροτείται

από συνεχώς εναλλασσόμενες φάσεις μίτωσης (M) και αντιγραφής του DNA (S)[47]. Οι δύο φάσεις ανάτασης του κυτταρικού κύκλου μεγεθύνονται χρονικά στο στάδιο της δημιουργίας των τριών βλαστικών δερμάτων από τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας. (εικόνα 11).



Εικόνα 11: Σχηματική συγκριτική αναπαράσταση του κυτταρικού κύκλου πρώιμων ESCs, ESCs και σωματικών κυττάρων. Η εικόνα χρησιμοποιείται αυτούσια από Padgett et al., 2020 [48].

Ο αξιοσημείωτα μειωμένος απαιτούμενος χρόνος κυτταρικής διαίρεσης αυτών των κυττάρων και συγκεκριμένα των ESCs που αποτελούν το κεντρικό σημείο της εργασίας, δικαιολογείται απόλυτα δεδομένου του μοριακού υποβάθρου τους, όσον αφορά τις κυκλίνες και τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες. Τα ESCs χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης των κυκλινών A, E, και B [49]. Οι δύο πρώτες μάλιστα εκφράζονται συνεχώς κατά μήκος του κυτταρικού κύκλου και όχι παροδικά όπως συμβαίνει στην περίπτωση των σωματικών κυττάρων. Επίσης και οι κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες Cdk1 και 2 βρίσκονται ιδιοσυστατικά ενεργές καθ' όλη την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου με αποτέλεσμα η RB1 να παραμένει συνεχώς φωσφορυλιωμένη και κατ' επέκταση απενεργοποιημένη, οδηγώντας έτσι στην συνεχή αποκαταστολή του E2F [47]. Τέλος ο χαρακτηριστικός για τα ESCs ιδιαίτερος κυτταρικός κύκλος δεν αποτελεί μόνο ένα μοριακό εργαλείο επίτευξης ταχύτατου πολλαπλασιασμού τους, αλλά διαδραματίζει επίσης και καθοριστικό ρόλο στην διατήρηση του δυναμικού διαφοροποίησης αυτών των κυττάρων. Αδιαμφισβήτητη απόδειξη της ανωτέρας δήλωσης αποτελεί η απαλοιφή του πλαστικού χαρακτήρα

αυτών των κυττάρων μετά από εξωγενή χορήγηση αναστολέων Cdk καθώς και η προώθηση της αυτοανανέωσης τους, μετά από υπερέκφραση των κυκλινών D και E [47].

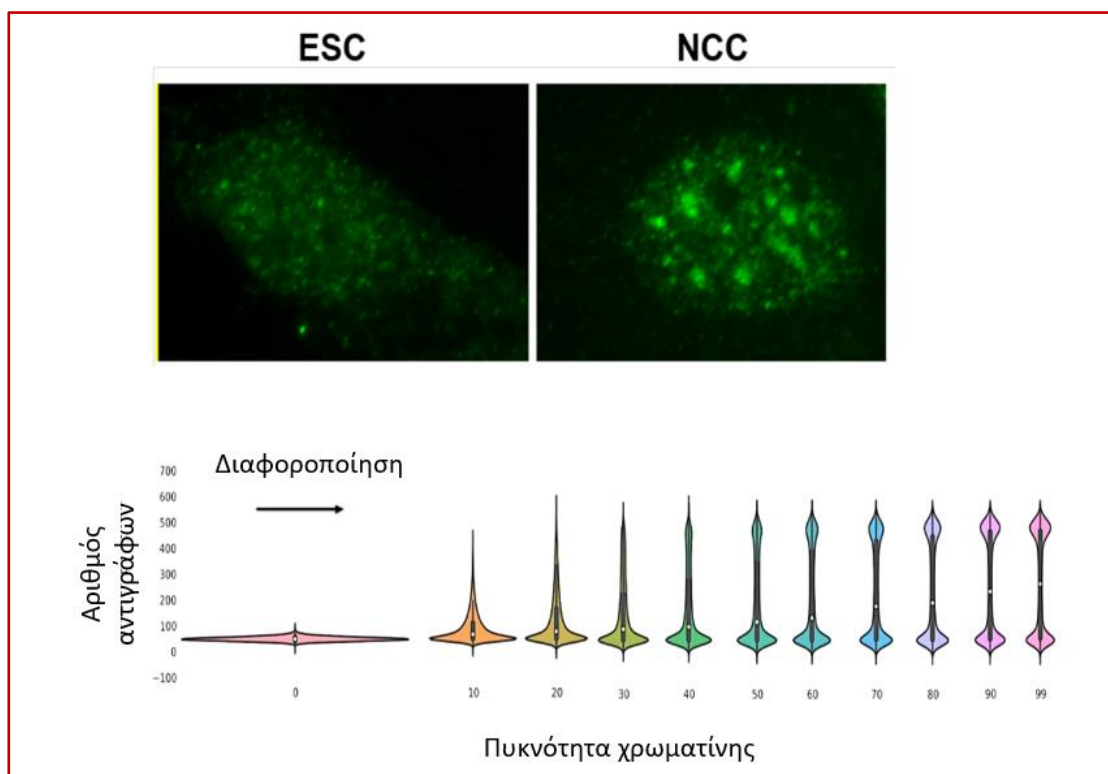
#### **2.4. Το γονιδιακό δίκτυο των Εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων.**

Ο αδιαφοροποίητος φαινότυπος των βλαστικών κυττάρων, εκ πρώτης όψεως φαντάζει απόλυτα λογικό να προκύπτει από έναν περιορισμένο γονότυπο αυτών των κυττάρων από τον οποίον απουσιάζει η έκφραση πολυάριθμων ιστοειδικών γονιδίων. Στη πραγματικότητα όμως συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο. Η βλαστική κατάσταση χαρακτηρίζεται από ένα εξαιρετικά δυναμικό και ελευθεριάζον μεταγραφικό καθεστώς [50]. Συγκεκριμένα στην αδιαφοροποίητη κατάσταση εκφράζονται σχεδόν όλα τα γονίδια του ανθρώπινου γονιδιώματος. Ενώ αντίθετα στην περίπτωση των σωματικών κυττάρων εκφράζονται, συγκριτικά με την ανωτέρα κατάσταση, πολύ λιγότερα γονίδια. Στα βλαστικά κύτταρα αν και εκφράζεται το σύνολο του γονιδιώματος, η πλαστικότητα διατηρείται, καθώς τα ιστοειδικά γονίδια εκφράζονται σε μικρά ποσοστά και επίσης λαμβάνει χώρα το crossinhibiting, δηλαδή εκφράζονται οι ιστοειδικοί παράγοντες αλλά ταυτόχρονα εκφράζονται και οι αντι-παράγοντες τους. Συνολικά λοιπόν, περνώντας από την αδιαφοροποίητη κατάσταση στην διαφοροποιημένη, περνάμε από ένα μονοφυές πρότυπο έκφρασης, όπου εκφράζονται όλα τα γονίδια, με τα περισσότερα από αυτά να εκφράζονται σε χαμηλά ποσοστά, σε ένα διφυές πρότυπο έκφρασης, όπου εκφράζονται πολύ λιγότερα γονίδια, ένα μέρος των οποίων είναι ιστοειδικά και παράγονται σε πολλά αντίγραφα και τα υπόλοιπα ανήκουν στα housekeeping γονίδια και παράγοντα στα ελάχιστα απαιτούμενα αντίγραφα (Εικόνα 12).

Επίσης η φυσική κατάσταση και η κατανομή της χρωματίνης διαφέρει έντονα, μεταξύ των σωματικών και των βλαστικών κυττάρων. Στην περίπτωση των βλαστικών κυττάρων η έτεροχρωματίνη συγκεκριμένα έχει λιγότερες εστίες από ότι στα σωματικά, οι οποίες είναι μάλιστα εντοπισμένες στην περιφέρεια του πυρήνα. Επίσης το δυναμικό διαφοροποίησης του εκάστοτε κυττάρου επηρεάζει και την δομική σκληρότητα της χρωματίνης. Συγκεκριμένα, στην αδιαφοροποίητη κατάσταση η δομή της χρωματίνης, συνολικά, χαρακτηρίζεται από αυξημένη



χαλαρότητα, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η διάχυση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων και η μεταγραφή να είναι πιο ενεργή στην βλαστική κατάσταση (Εικόνα 12)[51].



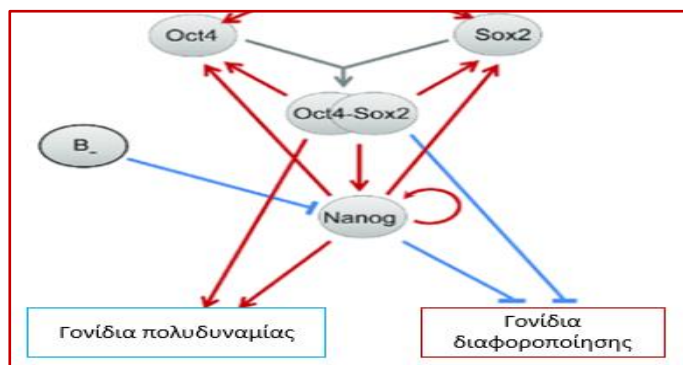
Εικόνα 12: Διαφορές ως προς την πυκνότητα της χρωματίνης και το μεταγραφικό προφίλ, μεταξύ διαφοροποιημένων και σωματικών κυττάρων. Η εικόνα τροποποιήθηκε με βάση τις εργασίες των *Dekker et al., 2011* [52], *Golkaram et al. 2017* [53]

#### 2.4.1. Τα βασικά για την πολυδυναμία γονίδια.

Τα πρωταγωνιστικά γονίδια με τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις επιμέρους ομάδες. Η σπουδαιότερη από αυτές είναι η ομάδα των γονιδίων πολυδυναμίας, με κεντρικά γονίδια τα *Nanog*, *OCT4*, και *SOX2* [54]. Η συγκεκριμένη τριάδα γονιδίων είναι καθοριστική για την πολυδυναμία αυτών των κυττάρων. Η σπουδαιότητα αυτών, αντικατοπτρίζεται από το γεγονός πως τα προϊόντα έκφρασης αυτών των γονιδίων είναι μεταγραφικοί παράγοντες που έχουν την ιδιότητα να ενεργοποιούν έντονα, το γονίδιο τους αλλά και τα υπόλοιπα δύο γονίδια αυτής της τριάδας. Επίσης οι

συγκεκριμένοι τρεις μεταγραφικοί παράγοντες, σε διάφορους συνδυασμούς, προσδένονται στους υποκινητές μία πλειάδας γονιδίων που κωδικοποιούν άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλουν γονίδια που θα μπορούσαν να προσδώσουν στα κύτταρα έναν διαφοροποιημένο φαινότυπο. Με αυτόν τον τρόπο στα βλαστικά κύτταρα, ρυθμίζονται από ένα κύκλωμα τριών μόνο γονιδίων, πολυάριθμες κυτταρικές λειτουργίες και διασφαλίζεται η διατήρηση αυτών των κυττάρων στην αδιαφοροποίητη κατάσταση.

Η δεύτερη ομάδα γονιδίων των βλαστικών κυττάρων, δεν διαθέτει τον ευρύ ρυθμιστικό ρόλο της πρώτης, αλλά είναι υπεύθυνη για την διατήρηση της αυτοανανεωτικής ικανότητας αυτών των κυττάρων. Ιδιαίτερα σημαντικά γονίδια αυτής της ομάδας, αποτελούν το *c-myc* και το *Max* [55]. Τέλος το τρίτο σύστημα γονιδίων των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, συγκροτείται από γονίδια που συσχετίζονται με την επιγενετική ρύθμιση, όπως τα DNMT1 και PRC2



Εικόνα 13: Απλουστευμένη απεικόνιση των μεταγραφικών αλληλεπιδράσεων των γονιδίων πολυδυναμίας. Τροποποιημένη εικόνα από Akberdin et al, 2018 [56].

## 2.5. Το επιγενετικό τοπίο των ESCs.

Όπως τονίστηκε στην προηγούμενη ενότητα στην βλαστική κατάσταση εκφράζεται το σύνολο του γονιδιώματος, με τα περισσότερα όμως, επιμέρους γονίδια, να εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα. Η έναρξη της διαφοροποίησης συνοδεύεται από εκλεκτική αποσιώπηση γονιδίων που συνεργούν στην διατήρηση της βλαστικότητας, και ταυτόχρονα αυξάνεται σημαντικά η έκφραση ιστοειδικών γονιδίων. Αυτό προϋποθέτει πως από επιγενετικής όψews αυτά τα κύτταρα, θα πρέπει να ρυθμίζονται από ένα εξαιρετικά συγχρονισμένο δίκτυο τροποποιήσεων. Όντως, στην βλαστική κατάσταση, παρατηρείται ένα παράδοξο είδος επιγενετικών τροποποιήσεων, οι οποίες ονομάζονται bivalent και εγκαθιδρύουν μία κατάσταση εκκρεμότητας-ετοιμότητας σε αυτά τα κύτταρα [57]. Αναλυτικότερα, οι

συγκεκριμένες τροποποιήσεις αποτελούνται από τουλάχιστον δύο επιμέρους ιστονικές τροποποιήσεις οι οποίες συνυπάρχουν στο ίδιο μόριο ιστόνης, ως δύο πλήρως αντιφάσκοντα σήματα. Μάλιστα, ορισμένα γονίδια με αναπτυξιακό κυρίως ρόλο, παραμένουν σε αυτή την επιγενετική κατάσταση εσαεί, έτσι ώστε όταν προκύψει το κατάλληλο σήμα, αυτά να μεταγράφονται μαζικά [51].

Όπως ειπώθηκε προηγουμένως, η όλη διαδικασία της διαφοροποίησης προχωρά εξαιτίας μία προοδευτικής γονιδιακής σίγασης. Δύο πολύ σημαντικά, αναπτυξιακά, πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα που συμβάλουν σε αυτή την πρόοδο είναι, το Polycomb και το Trithorax. Αρχικά, το Polycomb αποτελείται από δύο επιμέρους σύμπλοκα, το PRC1 το οποίο χωρίζεται σε canonical και μη, και το PRC2. Το canonical PRC1 προσδένεται στην τριμεθυλιωμένη λυσίνη 27 της H3, μία τριμεθυλίωση που έχει εισαχθεί προηγουμένως από το PRC2, και στην συνέχεια ουβικουιτινιλιώνει την H2A στην Lys 111. Το non-canonical PRC1 αντίστοιχα, διαδραματίζει τον ίδιο ρόλο με το canonical PRC1 χωρίς όμως να συνδέεται κατά ανάγκη στην H3[58].

Όσον αφορά το Trithorax, στο συγκεκριμένο σύμπλοκο πρωταγωνιστικό ρόλο καταλαμβάνει μία μέθυλοτρανσφεράση η οποία μεθυλιώνει την Lys 4 της H3 ( $K_4Me_3H_3$ ) με αποτέλεσμα να ευοδώνεται η σύνδεση μεταγραφικών παραγόντων σε αυτήν την ιστονική ισομορφή και κατ' επέκταση να ενεργοποιείται η μεταγραφή[58].

## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>

### Τα ESCs ως μοντέλα μελέτης της ανθρώπινης παθοφυσιολογίας

Οι βασικές ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων, κατέστησαν ελπιδοφόρα την χρήση τους στην αναγεννητική ιατρική αλλά και σε διάφορα άλλα της βασικής έρευνας. Επιγραμματικά, η ικανότητα της αυτοανανέωσης των βλαστικών κυττάρων μειώνει την απαιτούμενη ποσότητα ιστού από τον δότη, αυξάνει την ανοσοσυμβατότητα με τον δέκτη και κατά συνέπεια ελαττώνει σημαντικά την πιθανότητα απόρριψής του μοσχεύματος. Σε ότι αφορά την βασική έρευνα, η στοχευμένη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων επιτρέπει την δημιουργία εργαστηριακών μοντέλων που προσομοιάζουν πλήρως την παθοφυσιολογία του ανθρώπου.

#### 3.1. Απομόνωση και καλλιέργεια ESCs.

Το 1970 αποτελεί χρονιά ορόσημο, καθώς τότε, για πρώτη φορά, βλαστικά κύτταρα βρέθηκαν εκτός του φυσιολογικού τους περιβάλλοντος. Συγκεκριμένα, λήφθηκαν έμβρυα ποντικού από το στάδιο της βλαστοκύστης και στην συνέχεια μεταμοσχεύθηκαν σε ενήλικα ζώα. Έτσι για πρώτη φορά παρατηρήθηκε μία ομάδα κυττάρων τα οποία πολλαπλασιάζονταν άναρχα και διαφοροποιούνταν προς μία πληθώρα ιστικών κατευθύνσεων, κατά βούληση. Αυτή ήταν η πρώτη επαφή της επιστημονικής κοινότητας με τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα .

Το 1981 οι Evans, Martin και Kaufman για πρώτη φορά περιέγραψαν την *in vitro* καλλιέργεια κυττάρων τα οποία λήφθηκαν χειρουργικά από την βλαστοκύστη[59], [60]. Αναλυτικότερα, αυτά τα κύτταρα τοποθετήθηκαν αρχικά σε μία στοιβάδα τροφικών κυττάρων, συγκεκριμένα, μιτωτικά ανενεργών ινοβλαστών, σε μέσο που περιείχε ορό βοός. Μερικές μέρες αργότερα παρατηρήθηκε η ανάπτυξη και ο σχηματισμός διαφόρων μαζών.

Στα χρόνια που ακολούθησαν αναπτύχθηκαν διάφορα, συστήματα καλλιέργειας βλαστικών κυττάρων. Τα σημαντικότερα εξ αυτών τα οποία χρησιμοποιούνται κατά κόρον σήμερα, είναι το σύστημα LIF-BMP4, και το σύστημα δύο αναστολέων (2i).

### 3.1.1. Σύστημα καλλιέργειας LIF-BMP4.

Ο LIF (Leukemia Inhibitor Factor) αποτελεί μέλος της οικογένειας των κιτοκινών IL-6. Το συγκεκριμένο μόριο εμπλέκεται σε πολυάριθμες βιολογικές διεργασίες, σε διάφορους τύπους κυττάρων, καθώς η έκφραση του υποδοχέα του παρατηρείται σε πολλούς διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων και των ESCs ποντικού. Η δέσμευση του LIF στον κυτταρικό υποδοχέα του έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση αντίρροπων σηματοδοτικών μονοπατιών, με απώτερο σκοπό την διατήρηση των ιδιοτήτων των βλαστικών κυττάρων. Συγκεκριμένα ενεργοποιείται η σηματοδότηση JAK/STAT, η οποία καταστέλλει την διαφοροποίηση προς μεσόδερμα και ενδόδερμα και τελικά προωθεί την διατήρηση της πολυδυναμίας. Επίσης ενεργοποιείται το μονοπάτι των MAP κινασών, επάγοντας την διαφοροποίηση και τέλος ενεργοποιείται η σηματοδοτική πορεία της PI3K που εμπλέκεται στην επιβίωση των κυττάρων [61].

Ο BMP4 αντίστοιχα, ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των παραγόντων TGFβ και αντικαθιστά των ορό βοός που αποτελούσε απαραίτητο στοιχείο του θρεπτικού μέσου στα πρώτα συστήματα καλλιέργειας ESCs, καθώς μπορεί να υποστηρίξει πλήρως την διατήρηση της αυτοανευτικής ικανότητας αυτών των κυττάρων. Επιπλέον, η σηματοδοτική δράση αυτού του παράγοντα αυξάνει την έκφραση των πρωτεϊνών Id οι οποίες με την σειρά τους καταστέλλουν την έκφραση πληθάριμων ιστοειδικών γονιδίων [62].

Εν κατακλείδι, η συντονισμένη δράση των δύο αυτών παραγόντων, LIF και BMP4, είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την διατήρηση της πολυδυναμίας και αυτοαναέωσης των βλαστικών κυττάρων στην καλλιέργεια[63].

### 3.1.2. Σύστημα δύο αναστολέων- 2i.

Το σύστημα στοχεύει τον λειτουργικό πυρήνα της ομάδας γονιδίων πολυδυναμίας η οποία αναφέρθηκε στην ενότητα 2.4.1. Συγκεκριμένα, στην καλλιέργεια προστίθεται ένα μείγμα δύο χημικών αναστολέων. Ο πρώτος είναι ο CHIR99021 που αποσκοπεί στην αναστολή της GSK3 σηματοδότησης προάγοντας την βιωσιμότητα των κυττάρων και ο δεύτερος αναστολέας είναι ο PD0325901 ο οποίος συγκρατεί τα ESCs στην

αδιαφοροποίητη κατάσταση, αναστέλλοντας πρώτα την σηματοδότηση MAP-ERK[64].

### **3.2. Μέθοδοι ελέγχου τις πολυδυναμίας των ESCs.**

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα που βρίσκονται σε καλλιέργεια παρουσιάζουν ορισμένες διαφορές συγκριτικά με εκείνα που υπάρχουν φυσικά στο σώμα. Το γεγονός αυτό ώθησε πολλούς επιστήμονες στην αμφισβήτηση της πολυδύναμης φύσης αυτών των κυττάρων στην καλλιέργεια. Έτσι καθιερωθήκαν ανά τα χρόνια διάφορες πειραματικές δοκιμασίες που αξιολογούν την πολυδυναμία των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων[65].

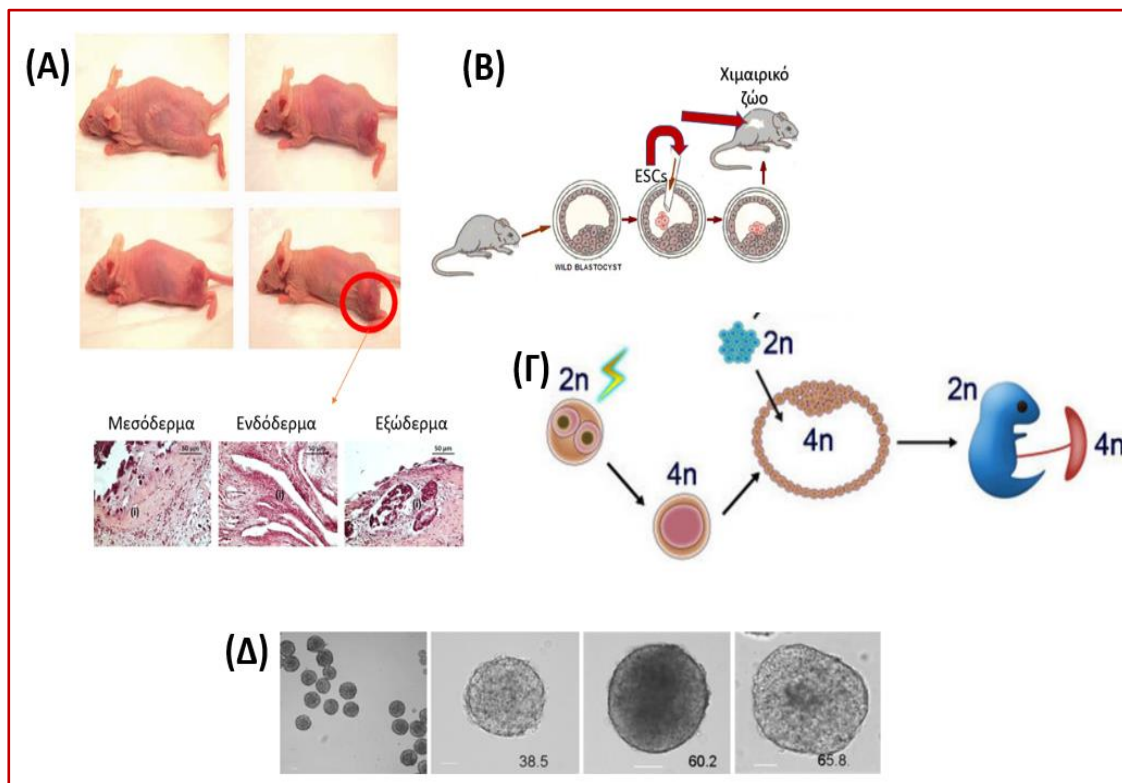
(1) teratomas assay: Το πιο διαδεδομένο και συχνά χρησιμοποιούμενο από αυτά τα tests αποτελεί, η δοκιμασία δημιουργίας τερατωμάτων. Το πρωτόκολλο του συγκεκριμένου assay ξεκινά με έγχυση εναιωρήματος ESCs, που βρισκότουσαν προηγουμένως σε καλλιέργεια, στον μηρό ανοσοκατεσταλμένων ποντικών. Μέσα στις επόμενες εβδομάδες αναμένεται να αναπτυχθεί κάποιος όγκος στο σημείο έγχυσης. Την 8<sup>η</sup> εβδομάδα τα ζώα θυσιάζονται και οι όγκοι συλλέγονται. Τέλος με χρήση ανοσοϊστοχημείας διαπιστώνεται η ύπαρξη η μη και των τριών βλαστικών δερμάτων, στην συνολική σύσταση του όγκου. Πολυδύναμα κύτταρα χαρακτηρίζονται από την παρουσία και των τριών βλαστικών δερμάτων στον όγκο[66].

(2) Δημιουργία χιμαιρικών ποντικών.: Σε αυτή την μέθοδο, ESCs σε καλλιέργεια εισάγονται σε βλαστοκύστες οι οποίες ακολούθως, εμφυτεύονται σε ζώα δέκτες. Αφήνεται να ολοκληρωθεί η κύηση αυτών των ζώων και αν τα κύτταρα είναι πολυδύναμα αναμένεται να προκύψουν βιώσιμοι απόγονοι. Συγκεκριμένα, οι απόγονοι μετά την έγχυση των ESCs χαρακτηρίζονται από διχρωμία στο τρίχωμα (agouti color), καθώς προκύπτουν μερικώς και από τα ESCs[67]. Τα προκύπτον ζώα ονομάζονται χίμαιρες, για αυτό λοιπόν δόθηκε και το συγκεκριμένο όνομα σε αυτό το assay.

(3) Δοκιμασία ελέγχου τετραπλοϊδίας: Αρχικά γίνεται σύντηξη των δύο βλαστομεριδίων στο στάδιο των δύο μόνο κυττάρων, με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος. Κατ' αυτόν τον τρόπο προκύπτει ένα τετραπλοϊδικό κύτταρο, που έχει δηλαδή κάθε χρωμόσωμα του σε 4 αντίγραφα, το οποίο συνεχίζει να διαιρείται

κανονικά, παράγοντας τετραπλοϊδικούς απογόνους. Μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης, το συγκεκριμένο αντισυμβατικό έμβρυο, αναπτύσσεται χωρίς δυσκολία. Στην βλαστοκύστη του εμβρύου προστίθενται ESCs των οποίων εξετάζεται η πολυδυναμία. Πολυδύναμα κύτταρα θα δώσουν τους ενδοεμβρυικούς ιστούς, ενώ οι εξωεμβρυικοί ιστοί αναπτύσσονται αποκλειστικά από τα τετραπλοϊδικά κύτταρα[68].

(4) 2D/3D Διαφοροποίηση: Το δεδομένο assay βασίζεται στην έμφυτη ικανότητα των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων, γενικότερα, να σχηματίζουν τρισδιάστατα συσσωματώματα σε εναιώρημα, που ονομάζονται εμβρυοειδή σωματίδια. Έτσι, με απομάκρυνση του παράγοντα LIF από την καλλιέργεια, εάν τα κύτταρα είναι πολυδύναμα, παρατηρείται η δημιουργία των τρισδιάστατων συσσωματωμάτων.



Εικόνα 14. Σχηματική αναπαράσταση των τεσσάρων διακριτών μεθόδων ελέγχου της πολυδυναμίας . A) Teratomas assay, B) Δημιουργία χιμαιρικών ποντικών, Γ) Δοκιμασία ελέγχου τετραπλοιδίας Δ) 2D/3D διαφοροποίηση. Οι φωτογραφίες τροποποιήθηκαν από την παρουσίαση της Δρ. Χριστογιάννη στα πλαίσια του μαθήματος: Βιολογία βλαστικών κυττάρων και εφαρμογές στην αναγεννητική

ιατρική. A. Zorina et al., 2011, Dzhakarov et al., 2014, Springer et al, 2009, Christogianni et al., 2020.

### 3.3. Στοχευμένη διαφοροποίηση ESCs.

Όπως τονίστηκε σε προηγούμενες ενότητες, τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα μετασχηματίζονται σε διαφορετικές ιστικές κατευθύνσεις. Αυτή η διαδικασία περιγράφεται με τον όρο της στοχευμένης διαφοροποίησης.

Αρχικά, σημαντικό είναι να τονιστεί η πολυσταδιακή φύση της διαφοροποίησης. Αναλυτικότερά, ένα αδιαφοροποίητο πολυδύναμο κύτταρο δεν δύναται να λάβει απευθείας έναν πλήρως καθορισμένο και ώριμο σωματικό φαινότυπο. Στην πραγματικότητα η μετάβαση αυτή περιλαμβάνει την παροδική δημιουργία πολλαπλών προγονικών, όπως λέγονται, πληθυσμών. Αυτοί οι πληθυσμοί λοιπόν, είναι παρόντες και στην φυσιολογική εμβρυική ανάπτυξη *in vivo*. Κάθε ένας από αυτούς χαρακτηρίζεται από την έκφραση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων καθώς και από ένα μειωμένο δυναμικό διαφοροποίησης από τον προηγούμενο του. Κατ' αυτόν τον τρόπο ο κάθε πληθυσμός που σχηματίζεται με την πρόοδο της διαφοροποίησης, ομοιάζει ουσιαστικά ολοένα και περισσότερο με το τελικό σωματικό κύτταρο [69].

Ως επί το πλείστον τα πρωτόκολλα στοχευμένης διαφοροποίησης βασίζονται στην χορήγηση διαφόρων σηματοδοτικών μορίων, τα οποία εκδηλώνουν συγκεκριμένες ιδιότητες και λειτουργίες. Αυτές οι στρατηγικές όμως, αν και χρησιμοποιούνταν για αρκετά χρόνια και πολλές από αυτές ακολουθούνται πιστά και σήμερα, συνοδεύονται πολλές φορές, από χαμηλή αποτελεσματικότητα και καθαρότητα, καθώς και από χρονοβόρες συνθήκες καλλιέργειας. Τα τελευταία χρόνια εμφανίστηκαν στην βιβλιογραφία και εναλλακτικοί τρόποι στοχευμένης διαφοροποίησης. Εξέχον παράδειγμα αποτελεί η διαφοροποίηση με την χορήγηση ειδικών μεταγραφικών παραγόντων. Εκμεταλλευόμενοι το γεγονός, πως η κυτταρική μοίρα στα αναπτυξιακά στάδια εξαρτάται απολύτως από διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, έχουν καθιερωθεί εργαστηριακά πρωτόκολλα για την *in vitro* γένεση διαφόρων ιστοειδικών κυττάρων, που βασίζονται στην έκφραση ενός ή



περισσότερων μεταγραφικών παραγόντων. Σε τέτοιο είδος πρωτόκολλα παρατηρείται αυξημένη καθαρότητα, με αποτέλεσμα να μην είναι πάντα απαραίτητες τεχνικές απομόνωσης συγκεκριμένων πληθυσμών, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο, σε ένα ικανοποιητικό επίπεδο, το κόστος. Επίσης με την χορήγηση μεταγραφικών παραγόντων η διαδικασία επιταχύνεται σημαντικά. Η διαφοροποίηση με μεταγραφικούς παράγοντες ωστόσο, δεν είναι πλήρως αποτελεσματική για πολλές κυτταρικές σειρές και υπό περιπτώσεις, εγείρονται σημαντικά ερωτήματα ως προς την λειτουργική ωριμότητα των τελικών προϊόντων της[70].

### **3.4 Στοχευμένη διαφοροποίηση ESCs προς καρδιομυοκύτταρα.**

Τρεις μέθοδοι στοχευμένης διαφοροποίησης προς καρδιομυοκύτταρα έχουν περιγραφεί:

#### (1) Διαφοροποίηση με την δημιουργία εμβρυοειδών σωματιδίων.

Βλαστικά κύτταρα σχηματίζουν τρισδιάστατες πολυκυτταρικές δομές οι οποίες ονομάζονται εμβρυοειδή σωματίδια και στις δομές αυτές προστίθενται παράγοντες σηματοδότησης και άλλα μικρά μόρια, σε πλήρως καθορισμένο μέσο. Αρχικά, τα εμβρυοειδή σωματίδια, επιστρώνονται σε καλλιεργητικές πλάκες επικαλυμμένες με matrix (εξωκυττάρια μήτρα) και εντός λίγων ημερών τα κύτταρα αρχίζουν και εμφανίζουν συστολική λειτουργία. Η συγκεκριμένη μέθοδος ωστόσο παρουσιάζει σημαντική ετερογένεια όσον αφορά τον τελικό κυτταρικό πληθυσμό και χαμηλή επαναληψιμότητα. Η συγκεκριμένη μέθοδος διαφοροποίησης χρησιμοποιείται κατά κόρον για την διαφοροποίηση των ESCs σε καρδιομυοκύτταρα [71].

#### (2) END-2 προκαλούμενη διαφοροποίηση.

Η δεύτερη ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος διαφοροποίησης για την in vitro παραγωγή καρδιομυοκυττάρων βασίζεται στην συνκαλλιέργεια των αδιαφοροποίητων βλαστικών κυττάρων, με κύτταρα σπλαχνικού ενδοδερμίου ποντικού (END-2). Τα δεύτερα πιστεύεται πως προσομοιάζουν το εμβρυικό ενδόδερμα, από το οποίο, σύμφωνα με αναπτυξιακές μελέτες εκκρίνονται κάρδιο-επαγωγικοί παράγοντες. Τα πειραματικά πρωτόκολλα χαρακτηρίζονται από εξαιρετική αποτελεσματικότητα, που φτάνει ακόμα και το 85%. Ωστόσο τα τελικά καρδιομυοκύτταρα, χαρακτηρίζονται κυρίως από έναν φαινότυπο που μοιάζει

περισσότερο με κοιλιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η εφαρμογή τους σε μεγάλο βαθμό [72].

### (3) Μονοστρωματική διαφοροποίηση.

Κατά την διαδικασία της μονοστρωματικής διαφοροποίησης τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα καλλιεργούνται απουσία άλλων κυττάρων, σε ένα καθορισμένο θρεπτικό μέσο που περιέχει αυξητικούς παράγοντες, όπως ο BMP4 και Activin-A, με σκοπό την επαγωγή της καρδιογενούς διαφοροποίησης και την βελτίωση της απόδοσης της διαφοροποίησης [73]. Η αποτελεσματικότητα της διαφοροποίησης εξαρτάται από την συγκέντρωση και τον χρόνο έκθεσης στους αυξητικούς παράγοντες. Αν και η συγκεκριμένη μέθοδος έχει κοινά στοιχεία με την διαφοροποίηση μέσω σχηματισμού εμβρυοειδών σωματιδίων σε ότι αφορά την χορήγηση αυξητικών παραγόντων και άλλων μικρών μορίων, η βασική διαφορά τους είναι πώς κατά την μονοστρωματική διαφοροποίηση τα κύτταρα αναπτύσσονται σε μία δυσδιάστατη μονοστοιβάδα που επιτρέπει την κλιμακούμενη διαφοροποίηση πολλών περισσότερων κυττάρων [73]. Το τελευταίο, συμβάλει στο να είναι ομοιόμορφη η έκθεση των κυττάρων στους αναπτυξιακούς παράγοντες.

### **3.5. Καρδιακοί προγονικοί πληθυσμοί.**

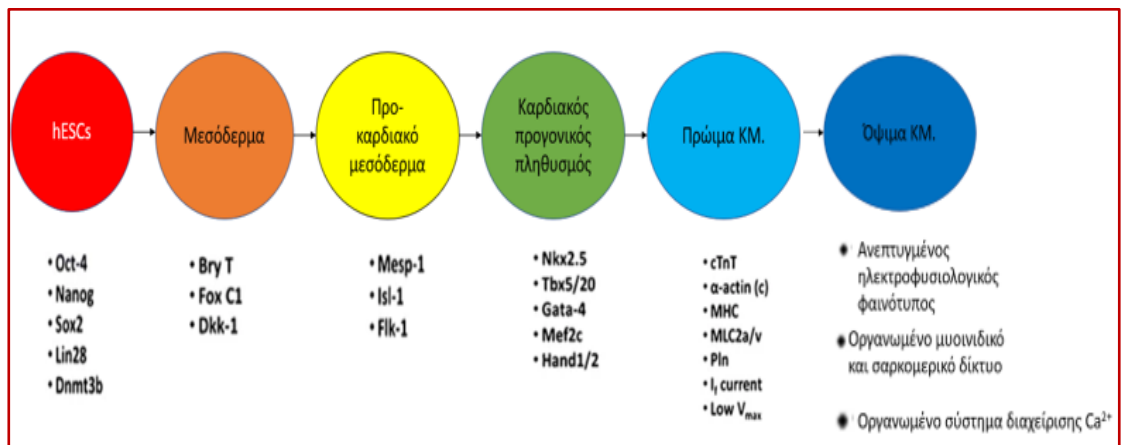
Η καρδιά αποτελεί το πρώτο πλήρως λειτουργικό όργανο που αναπτύσσεται στα έμβρυα των σπονδυλωτών. Η καρδιακή ανάπτυξη ξεκινάει την τρίτη εβδομάδα της εμβρυογένεσης στον άνθρωπο, που ισοδυναμεί με την ημέρα 7,5 στο ποντίκι και συντονίζεται απόλυτα από αλληλεπιδράσεις συντηρημένων, μεταξύ των ειδών, μεταγραφικών παραγόντων. Πρωταρχικό γεγονός αυτής της διαδικασίας αποτελεί η δημιουργία της καρδιακής ημισελήνου της οποίας έπεται ο σχηματισμός του καρδιακού σωλήνα, από τα πρόσθια μεταναστευτικά μεσοδερμικά κύτταρα που παρεμβάλλονται στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ ενδοδέρματος και εξωδέρματος κατά την πρωτογενή λωρίδα. Ο χωρικός εντοπισμός αυτών των κυττάρων έχει εξαιρετική σημασία, καθώς έχει δειχθεί πως οι γειτονικοί, σε αυτά, κυτταρικοί πληθυσμοί, ιδιαίτερα τα κύτταρα του ενδοδερμίου, εκκρίνουν καρδιοεπαγωγικούς παράγοντες. Εγκεκριμένα έχει ταυτοποιηθεί η ενδοδερμική έκφραση τριών, στο σύνολο, ευρύτερων οικογενειών μεταγραφικών παραγόντων που κατά κοινή ομολογία

ρυθμίζουν την διαδικασία σχηματισμού του μεσοδέρματος, και γενικότερα την όλη πρώιμη καρδιογέννεση[74].

- BMPs (bone morphogenetic proteins): Η σηματοδοτική δράση αυτών των παραγόντων έχει δειχθεί να προάγει την καρδιογέννεση στα έμβρυα σπονδυλωτών.
- FGFs (fibroblasts growth factors): Η σηματοδότηση αυτών των παραγόντων έχει ισχυρά καρδιοεπαγωγικά αποτελέσματα.
- Wnts (Wingless-related integration site): Η δράση τους σχετίζεται στενά με την καρδιακή προδιαγραφή. Βέβαια η σηματοδότηση τους μπορεί να οδηγήσει σε προαγωγή ή αναστολή της διαφοροποίησης των κυττάρων προς την καρδιακή γενεαλογία, ανάλογα με τον χωροχρονικό πλαίσιο, καθώς και με το είδος της σηματοδότησης (canonical/non-canonical) η οποία ενεργοποιείται [75].

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας της διαφοροποίησης προκύπτουν συγκεκριμένοι προγονικοί πληθυσμοί. Κάθε ένας από αυτούς φέρει διαφορετικές μοριακές υπογραφές, οι οποίες χρησιμεύουν για τον διαχωρισμό του εκάστοτε πληθυσμού από τον επόμενο. Η εικόνα 15 απεικονίζει τα σημαντικότερα βήματα της μετατροπής των ESCs σε καρδιοκύτταρα. Ο πρώτος πρόδρομος πληθυσμός, των καρδιομυοκυττάρων, είναι το μεσόδερμα όπου συναντάται αυξημένη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα T-box Brachyury (**Εικόνα 15 πορτοκαλί**). Τα μεσοδερμικά κύτταρα, στην συνέχεια, παροδικά ενεργοποιούν την *Mesp1* και μεταναστεύουν από την πρωτογενή λωρίδα δημιουργώντας έτσι τον δεύτερο προγονικό πληθυσμό που ονομάζεται προ-καρδιακό μεσόδερμα (**Εικόνα 15-κίτρινο**). Ακολούθως, παρατηρείται αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών *Isl1* και *Tbx5* καθώς και του μεταγραφικού παράγοντα *Nkx2.5* οι οποίοι είναι πρώιμοι δείκτες καρδιακής γενεαλογίας, και η έκφραση τους επισημαίνει τον σχηματισμό ενός άλλου κυτταρικού πληθυσμού, που ονομάζεται καρδιακός προγονικός πληθυσμός (**Εικόνα 15-πράσινο**) [76]. Τέλος, μέσα στις επόμενες ημέρες, μετά την εμφάνιση του καρδιακού προγονικού πληθυσμού, αρχίζουν και δημιουργούνται εστίες παλμικών καρδιομυοκυττάρων τα οποία βέβαια κατέχουν έναν ανώριμο ακόμη, χαρακτήρα ως προς την ηλεκτροφυσιολογική και μορφολογική τους εικόνα (**Εικόνα 15-γαλάζιο**). Αφήνοντας αυτά τα κύτταρα στην καλλιέργεια για ένα επιπλέον σύντομο χρονικό

διάστημα, παρατηρείται η πλήρης λειτουργικής τους ωρίμανση (Εικόνα 15-μπλέ) [74].



Εικόνα 15: Μετατροπή των ESCs σε καρδιομυκύτταρα (ΚΜ). Η εικόνα τροποποιήθηκε από την αρχική των Vidarsson *et al*, 2010 [72].

## Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup>

### Βιοσύνθεση και σηματοδοτική δράση μονοξειδίου του αζώτου.

#### 4.1. Γενικά στοιχεία και ιστορική αναδρομή.

Το μονοξείδιο του αζώτου ανακαλύφθηκε το 1772 από τον Joseph Priestly (Molecule of the Week Archive, American Chemistry Society, February 2013). Το NO αποτελείται από ένα άτομο οξυγόνου συνδεδεμένο, μέσω ενός τριπλού δεσμού, με ένα άτομο αζώτου. Για πολλά χρόνια μετά την ανακάλυψη του λογιζόταν ως ένας ατμοσφαιρικός ρίπος, επιζήμιος για την υγεία. Η νιτρογλυκερίνη (NG) συντέθηκε περίπου πενήντα χρόνια μετά την ανακάλυψη του Priestly, το 1847, η οποία αποτελεί την πρώτη ένωση με βιολογικό ενδιαφέρον που οφείλει την δράση της στο NO [77]. Αρχικά, ο Hering το 1849 χορήγησε την νιτρογλυκερίνη σε εθελοντές και διαπίστωσε πως οδηγεί σε πονοκέφαλο. Στην συνέχεια, ο William Muller χρησιμοποίησε την NG ως θεραπευτική προσέγγιση κατά της στηθάγχης, οδηγώντας έτσι στην καθιέρωση της, στο δεύτερο ήμισυ του 19ου αιώνα, ως ένα φαρμακευτικό σκεύασμα για την καταπολέμηση του στηθαγχικού άλγους [77].

Το 1970 οι Bodo και Mitchell απέδειξαν την ικανότητα των ιστών να παράγουν νιτρικά και την αγγειοχαλαρωτική τους δράση. Το 1992 το NO ανακηρύχθηκε ως μόριο της χρονιάς [78] και το 1998 οι Furchgot, Murad και Ignaro τιμήθηκαν με το βραβείο Nobel ιατρικής ή φυσιολογίας, καθώς ανέδειξαν το NO ως τον αγγειοχαλαρωτικό παράγοντα που προέρχεται από το ενδοθήλιο, μέσω μηχανισμού που διαμεσολαβείτε από την διαλυτή γουανυλική κυκλάση (soluble guanylate cyclase, sGC) [79][80] [81][82][83]

#### 4.2. Βιοσύνθεση μονοξειδίου του αζώτου-NO.

Το NO είναι ένα μικρό αέριο λιπόφιλο σηματοδοτικό μόριο. Χημικά, είναι μια ελεύθερη ρίζα που συμμετέχει σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών όπως η μεταγωγή νευρικών σημάτων, η απόκριση σε ξενιστές, η συμμετοχή σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Η βιολογική δράση του NO οφείλεται στην αλληλεπίδραση του κυρίως με πρωτεΐνες αλλά και σε κάποιες περιπτώσεις με άλλα βιομόρια όπως το DNA και

τα λιπίδια [84] [85]. Ο καλύτερα μελετημένος μηχανισμός δράσης του NO αποτελεί η βιοσύνθεση του στο ενδοθήλιο και η δράση του στα λεία μυϊκά κύτταρα με αποτέλεσμα την χαλάρωση των αγγείων και την ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης [86], [87].

Η ενδογενής παραγωγή του NO πραγματοποιείται ενζυμικά και μη ενζυμικά. Οι δύο μηχανισμοί περιγράφονται εν συντομία παρακάτω .

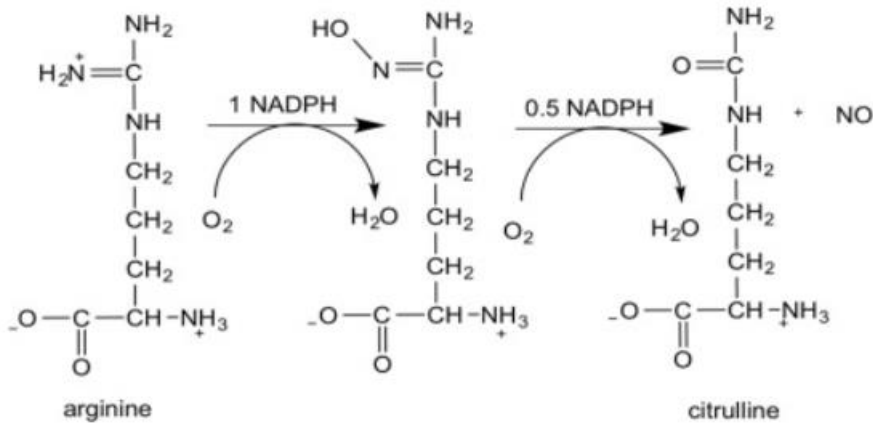
#### **4.2.1. Ενζυμική παραγωγή NO.**

Η ενζυματική παραγωγή του NO πραγματοποιείται από μια οικογένεια ενζύμων που ονομάζονται συνθάσες του NO [88]. Έχουν περιγραφεί τρεις συνθάσες, η neuronal NOS ή nNOS ή NOS1, η inducible NOS ή iNOS ή NOS2 και η endothelial NOS ή eNOS ή NOS3.

Κάθε συνθάση κωδικοποιείται από διαφορετικό γονίδιο. Το γονίδιο της eNOS εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7 στην θέση 36.1 και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη μήκους 1153 αα. Αντίστοιχα, εκείνο της nNOS βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12 στην θέση 22-24 και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 1434 αα και τέλος το γονίδιο της iNOS βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 στην θέση 11.2 και παράγει μία πρωτεΐνη 1203 αα [89].

Οι ισομορφές nNOS και eNOS εκφράζονται συνεχώς στα κύτταρα, ενώ η iNOS, απαιτεί κάποιο φλεγμονώδες ερέθισμα για να επαχθεί η έκφραση της. Σε ότι αφορά την συγκέντρωση του NO που παράγουν οι διαφορετικές συνθάσες έχει μετρηθεί ότι η iNOS παράγει πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις NO σε σχέση με τις υπόλοιπες δύο [90].

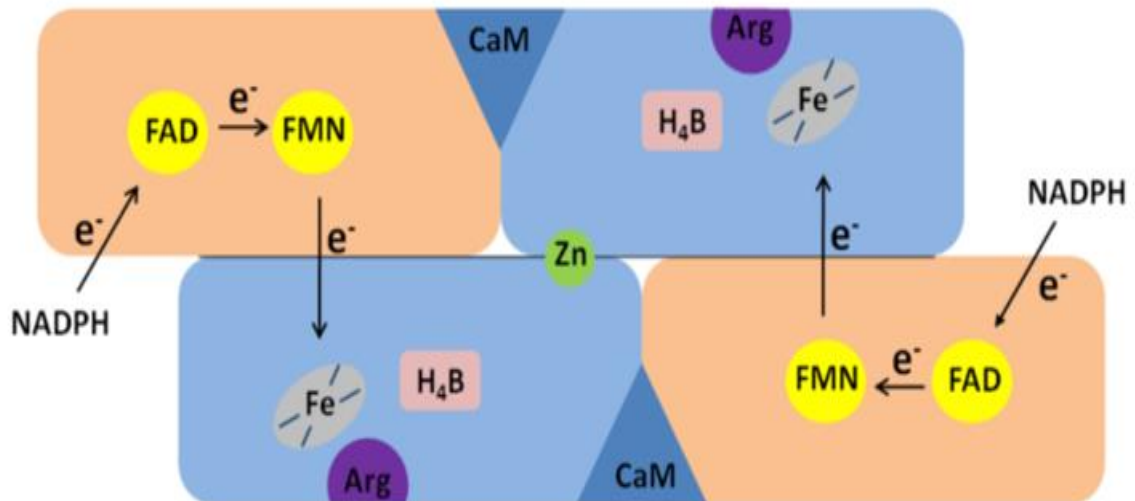
Τα ένζυμα χρησιμοποιούν L-αργινίνη ως υπόστρωμα και καταλύουν την βιοσύνθεση NO μετατρέποντας το αμιδικό άζωτο της L-αργινίνης παρουσία NADPH και οξυγόνου. Ταυτόχρονα, παράγεται ένα μόριο L-κιτροουλίνης. Η αντίδραση απαιτεί συνολικά 5 ηλεκτρόνια. Πρώτα η L-arg μετατρέπεται υπό την παρουσία ενός μορίου οξυγόνου και ενός μορίου NADPH σε N-υδρόξυ-αργινίνη η οποία με την σειρά της οξειδώνεται και σχηματίζει NO και κιτροουλίνη (Αντίδραση 2).



Αντίδραση 2: Αντίδραση παραγωγής NO από τις NOS. *M. Ludwig et al 1999.* [91]

Σε ότι αφορά την δομή τους, οι συνθάσες του NO είναι ομοδημερείς πρωτεΐνες. Το κάθε μονομερές αποτελείται από 3 διαφορετικά domains. Το domain αναγωγής, domain οξυγενάσης και ένα domain δέσμευσης καλμοδουλίνης. Το πρώτο περιέχει θέσεις δέσμευσης των συμπαραγόντων FMN, FAD και NADPH, τα οποία διαμεσολαβούν την μεταφορά ηλεκτρονίων στο domain οξυγενάσης της δεύτερη υπομονάδας [92]. Ένας ακόμα βασικός συμπαραγόντας, είναι το BH<sub>4</sub> το οποίο δεσμεύεται στο ένζυμο στο τμήμα της οξυγενάσης και εξαιτίας της δομής του που περιέχει ετεροκυκλικό δακτύλιο συμβάλει στην σταθεροποίηση του ομοδημερούς, και προσφέρει ένα ηλεκτρόνιο κατά την αντίδραση βιοσύνθεσης NO[93].

Τα μονομερή είναι λειτουργικά, δεν παράγουν όμως NO αλλά O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Η διαδικασία ονομάζεται uncoupling της NOS και οδηγεί σε αύξηση των οξειδωτικών παραγόντων (Εικόνα 16) [94].

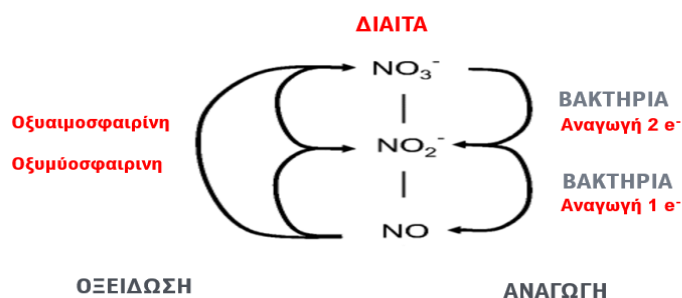


Εικόνα 16. Αναπαράσταση της δομής και της μεταφοράς ηλεκτρονίων εντός αυτής, των συνθασών του NO. *C Wheatley et al 2012 [95]* .

#### 4.2.2. Μη ενζυμική παραγωγή NO.

Η μη ενζυμική σύνθεση NO λαμβάνει χώρα μέσω της αναγωγής των νιτρικών και νιτρωδών ανιόντων,  $[\text{NO}_3^-] - [\text{NO}_2^-]$ , σε όξινες συνθήκες και/ή σε υποξικά περιβάλλοντα [96]. Συγκεκριμένα, τα νιτρικά που προσλαμβάνονται από την διατροφή, ανάγονται στους σιελογόνους αδένες από αναερόβια βακτήρια προς νιτρώδη. Η μετατροπή αυτή όμως μπορεί να πραγματοποιηθεί και στους υπόλοιπους ιστούς του σώματος πέραν της στοματικής κοιλότητας, από ένζυμα που εμπεριέχουν μολυβδαίνιο [97].

Τα νιτρώδη, μετατρέπονται σε NO με αναγωγή ενός ηλεκτρονίου που ευνοείται, από τις όξινες συνθήκες του αυλού του στομάχου ή από μηχανισμούς, που δραστηριοποιούνται σε υποξικές συνθήκες [98].





Έικονα 17. Εικονική αναπαράσταση μη ενζυμικής παραγωγής NO. A. Ghasemi et al 2011. [79]

### **4.3. Πρωτεΐνες που διαμεσολαβούν την βιολογική δράση του NO.**

#### **4.3.1. Συνθάσες του NO.**

Οι Συνθάσες του NO υπόκεινται σε διάφορες τροποποιήσεις οι οποίες είτε τις καταστέλλουν είτε τις ενεργοποιούν. Παραδείγματα αποτελούν η φωσφορυλίωση, η ακετυλίωση και η S-νιτροζηλίωση[99]. Έχει αναφερθεί ότι η S-νιτροζυλίωση αναστέλλει την δράση των συνθασών του NO, η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει την ύπαρξη ενός μηχανισμού ανατροφοδότησης με τον οποίο το NO ρυθμίζει την βιοσύνθεση του.

#### **Κυτταρική έκφραση των συνθασών του NO.**

Η eNOS εκφράζεται ως επί των πλείστων σε ενδοθηλιακά κύτταρα, στα οποία και ανακαλύφθηκε πρώτα, αλλά είναι πλέον γνωστό πως το συγκεκριμένο ένζυμο συναντάται σε ανιχνεύσιμα επίπεδα σε καρδιομυοκύτταρα, νευρώνες, κύτταρα του αίματος και μυϊκά κύτταρα. Σε φυσιολογικές συνθήκες η eNOS εντοπίζεται σε εγκοιλώσεις τις μεμβράνης, οι οποίες ονομάζονται caveolae. Εκεί παραμένει ανενεργή λόγω της παρουσίας των caveolin-1 ή 3 που την αναστέλλουν. Το ενεργό ένζυμο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα όπου αλληλοεπιδρά με τις CaM και hsp90 [100]. Η ενεργοποίηση της eNOS συμβαίνει μετά από αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ασβεστίου. Άλλοι παράγοντες που ενεργοποιούν την eNOS αποτελούν τα οιστρογόνα, ο VEGF, η ινσουλίνη και η φωσφορυλίωση της σερίνης 1177. Έχει αναφερθεί ότι η S-νιτροζυλίωση αναστέλλει την ενεργότητα του ενζύμου[89].

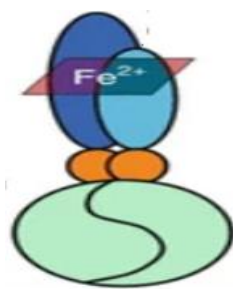
Η nNOS ανιχνεύθηκε αρχικά σε περιφερικούς και κινητικούς νευρώνες. Ο βιολογικός ρόλος της σχετίζεται με τις διαδικασίες της μάθησης και της μνήμης μέσω ρύθμισης της μετάδοσης νευρικών σημάτων στις συνάψεις. Πλέον γνωρίζουμε ότι το ένζυμο εκφράζεται και σε άλλους τύπους κυττάρων συμπεριλαμβανομένων και των καρδιομυοκυττάρων [101]. Η nNOS είναι διαρκώς ενεργή, και ρυθμίζεται από το Ca<sup>2+</sup> και την CaM. Ενδοκυττάρια, εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, βέβαια

υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι σε παθολογικές καταστάσεις όπως η καρδιακή ανεπάρκεια, το ένζυμο μετατοπίζεται σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα [102].

Η iNOS απομονώθηκε αρχικά από μακροφάγα κύτταρα ποντικού και ονομάστηκε επαγωγίμη NOS καθώς σε αντίθεση με τις πρώτες δύο, η iNOS δεν εκφράζεται συνεχώς στα κύτταρα, αλλά η έκφραση της επάγεται ως απόκριση στην δράση της Ιντερφερόνης και ενδοτοξινών [103]. Η iNOS διαφέρει από τις άλλες δύο συνθάσες ως προς την εξάρτηση της από το  $Ca^{2+}/CaM$ , καθώς η δραστηριότητα της δεν απαιτεί υψηλά επίπεδα  $Ca^{2+}$ . Το ενεργό ένζυμο παράγει υψηλότερες συγκεντρώσεις NO σε σχέση με τις άλλες δύο συνθάσες. Ο βιολογικός της ρόλος σχετίζεται με μηχανισμούς άμυνας έναντι ξενιστών [104].

#### 4.3.2. Η διαλυτή γουανυλική κυκλάση(sGC).

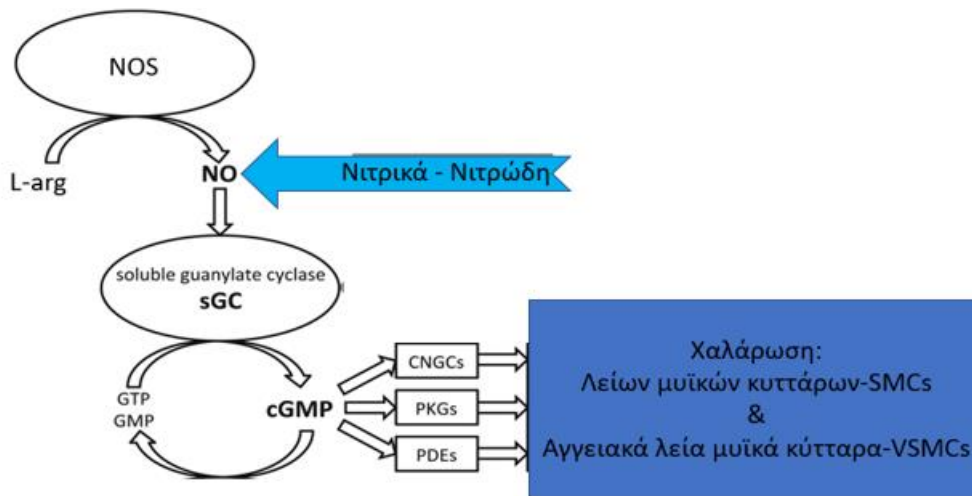
Η περιπλασματική γουανυλική κυκλάση (Soluble Guanylyl Cyclase- sGC) διαμεσολαβεί την βιολογική δράση του NO. Αποτελεί μια ετεροδυμερή πρωτεΐνη η οποία απαρτίζεται από δύο ομόλογες υπομονάδες α και β μοριακού βάρους 70-80 kDa. Οι N-τελικές περιοχές των τριών υπομονάδων σχηματίζουν μια κοιλότητα που περικλείει ένα μόριο αίμης, πράγμα που καθιστά το ένζυμο ευαίσθητο σε οξειδοαναγωγικές αλλαγές. Η αίμη αποτελεί το σημείο πρόσδεσης του NO. Το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης αποτελεί τον καταλυτικό θύλακα (Εικόνα 18) [105].



Εικόνα 18: Δομική αναπαράσταση της sGC. J Pan et al. 2013. [106].

Η sGC λειτουργεί ως ενδοκυτταρικός υποδοχέας του NO, με το τελευταίο να συνδέεται στον αιμικό Fe του ενζύμου, πυροδοτώντας την μετατροπή του GTP σε cGMP. Στην συνέχεια το cGMP χρησιμοποιείται για την φωσφορυλίωση κινασών, με πιο καλά μελετημένες της πρωτεϊνικές κινάσες G. Οι κινάσες αυτές με την σειρά

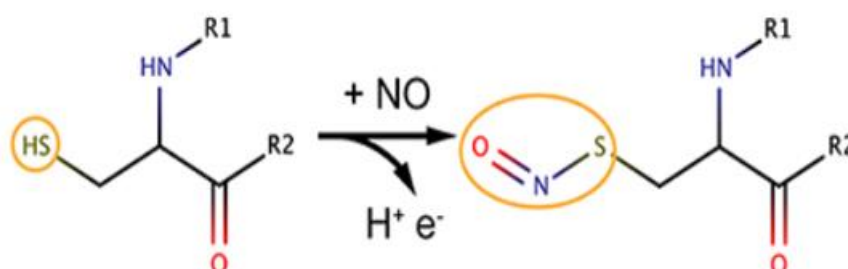
τους, ρυθμίζουν μέσω φωσφορυλιώσεων τον ενδοκυτταρικό χειρισμό του  $Ca^{2+}$  στα λεία μυϊκά κύτταρα και οδηγούν σε χαλάρωση του αγγειακού τόνου [107] (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Εξαρτώμενη από sGC, σηματοδότηση του NO. S. Kansakar, et al 2021 [108]

#### 4.4. S-Νιτροζυλίωση.

Ο όρος S-νιτροζηλίωση, προτάθηκε από τον Jonathan Stemler και περιγράφει την αντιστρεπτή ομοιοπολική σύνδεση ενός NO με ένα μόριο θείου, προς σχηματισμού μίας S-νιτροσοθειόλης (Αντίδραση 3) [109]. Ο δεσμός θειόλης και NO παρουσιάζει μικρότερη βιολογική δραστηριότητα σε σχέση με το ελεύθερο NO, πράγμα που εξυπηρετεί την βιολογική εξειδίκευση του NO. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι θειόλες στόχοι του NO, ανήκουν σε πρωτεϊνικά κατάλοιπα Cys όμως η νιτροζυλίωση συμβαίνει και σε μικρού μοριακού βάρους μόρια όπως η γλουταθειόνη προς σχηματισμό S-νιτροσογλουταθειόνης (GSNO). Μέχρι στιγμής έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία, περίπου 4000 νιτροζυλιωμένες κυστεΐνες σε περίπου 3000 πρωτεΐνες γεγονός που υποδηλώνει ότι η συγκεκριμένη τροποποίηση είναι ευρεία και πιθανά να επηρεάζει πληθώρα βιολογικών λειτουργιών [110].



Αντίδραση 3: Αντίδραση σχηματισμού *s*-νιτροσοθειόλης. Y. Zhou et al 2018. [111].

Επιπλέον, η *S*-νιτροζυλίωση υπάρχει σε όλα τα όργανα όπως δείχνουν μελέτες σε ποντίκια. Μάλιστα, τα μεταβολικά ένζυμα αποτελούν στόχους της *S*-νιτροζυλίωσης γεγονός που υποδηλώνει ότι η τροποποίηση αυτή πιθανά να αποτελεί ρυθμιστικό μηχανισμό του μεταβολισμού [28].

Ο βιολογικός ρόλος της *S*-νιτροζυλίωσης συνδέεται με την ρύθμιση της πρωτεϊνικής και ενζυμικής δραστηριότητας [112]. Συγκεκριμένα *s*-νιτροζυλίωση τροποποιεί την πρωτεϊνική λειτουργία, μέσω:

- Αλλαγής του ενδοκυττάρου πρωτεϊνικού εντοπισμού.
- Αλλαγής στην αλληλεπίδραση πρωτεϊνών
- Επηρεάζει την σταθερότητα της πρωτεΐνης.

## **Σκοπός Εργασίας.**

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο χαρακτηρισμός καρδιομυοκυττάρων που προήλθαν από διαφοροποιημένα ανθρώπινα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, μέσω ανίχνευσης της παρουσίας καρδιοειδικών πρωτεϊνών-δεικτών (Cardiac Troponin-T, SIRP-α) σε αυτά τα κύτταρα. Θεματικά, η παρούσα μελέτη εντάσσεται στο ευρύτερο πλαίσιο της μελέτης των μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν την β-οξείδωση των λιπαρών οξέων σε παθοφυσιολογικές συνθήκες. Επομένως, μέρος της παρούσας μελέτης επικεντρώθηκε στην ανίχνευση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι της β-οξείδωσης και εξετάστηκε η ρύθμιση του μονοπατιού αυτού από το μονοξείδιο του αζώτου μέσω της S-νιτροζυλίωσης.

## Πειραματικό μέρος

### Κεφάλαιο 5°

#### Υλικά και μέθοδοι

##### 5.1. Διαφοροποίηση Εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων προς καρδιομυοκύτταρα.

Για την διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων σε καρδιομυοκύτταρα ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιεγράφηκε από την C. Mummery με κάποιες διαφοροποιήσεις που περιγράφονται παρακάτω [113]. Η διαδικασία της διαφοροποίησης πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Βιοιατρικών Ερευνών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και συγκεκριμένα από την Δρ. Μάρκου, μεταδιδακτορική ερευνήτρια στο Εργαστήριο της Δρ. Murphy (Ερευνήτρια Β΄).

##### Αντιδραστήρια

- 0.5 mM Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ σε PBS (EDTA, Invitrogen).
- 1 mg/mL dispase (Gibco).
- 10 % w/v Αλβουμίνη ορού Βοός (BSA, Bovogen Biologicals).
- 100 ng/mL human FGF-2 (Miltenyi Biotec).
- 150 mM α-Μονοθουογλυκερόλη (α-MTG, Sigma-Aldrich).
- 25 ng/μL Recombinant human Activin A (R&D).
- 25 ng/μL Recombinant human BMP4 (R&D).
- 4 mM CHIR99021 (Axon Medchem).
- 5 mM XAV939 (Tocris).
- Chemically Defined Lipid Concentrate (100X stock, Gibco).
- DMEM/F12 (Gibco).
- F12 Nutrient Mixture (Ham, Gibco).
- GlutaMAX supplement (100X stock, Gibco).
- Insulin-Transferrin-Selenium-X Supplement (100X stock, Gibco).
- Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco).
- L-Ascorbic acid 2-phosphate (Sigma-Aldrich).

- Matrigel™ Matrix Growth Factor Reduced (BD).
- Protein-Free Hybridoma Medium (PFHM-II, Gibco).
- TrypLE™ Select Enzyme (1X) (Gibco).
- Διμέθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO, Sigma Aldrich).
- Ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών χωρίς CaCl<sub>2</sub> και MgCl<sub>2</sub> (PBS, Gibco).

### Διαλύματα

1. 10 % w/v BSA: 4,5 g BSA διαλύονται σε 35 mL IMDM σε falcon των 50 mL και θερμαίνονται στους 37 °C. Συμπληρώνεται IMDM μέχρι τελικό όγκο 45 mL και το διάλυμα φιλτράρεται.
2. 150 mM α-MTG: Προστίθενται 13 μL α-MTG σε 1 mL IMDM.
3. 1 mg/mL dispase: Η σκόνη διαλύεται σε συγκέντρωση 5 mg/mL DMEM/F12.
4. Μέσο διαφοροποίησης: Το μέσο διαφοροποίησης αποτελείται από IMDM και F12 σε μεταξύ τους αναλογία 1:1. Στην συνέχεια προστίθεται 5% (v/v) PFHM-II, 0,25% w/v BSA (10%), 1X Chemically defined lipid concentrate, 0,1X ITS, 450 μM α-MTG, 0,05 mg/mL L-ascorbic acid 2-phosphate και 2 mM GlutaMAX. Το διάλυμα φιλτράρεται και αποθηκεύεται στους 4 °C για χρονικό διάστημα έως και δύο εβδομάδων.
5. Matrigel solution: Το matrigel αραιώνεται σε αναλογία 1/80 σε DMEM/F12.

### Πειραματική διαδικασία

#### Καλλιέργεια εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων

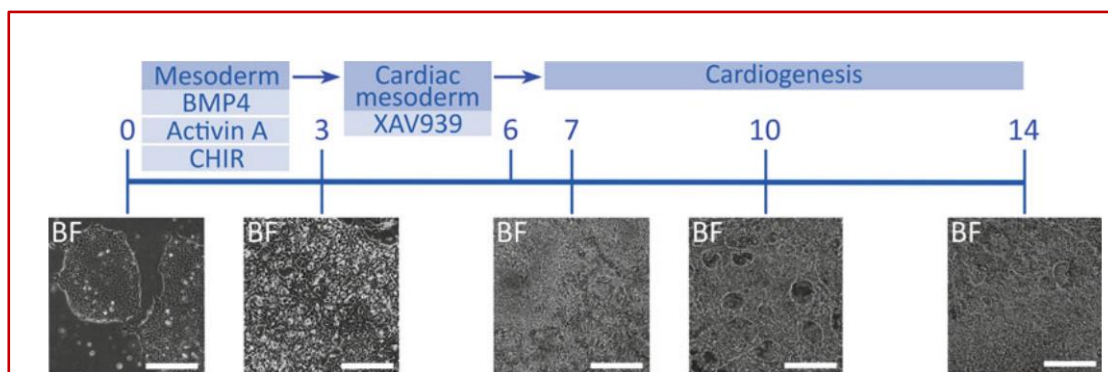
Τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα ανθρώπου της κυτταρικής σειράς H1, καλλιεργούνται σε τρυβλία 6 θέσεων. Τα τρυβλία επιστρώνονται με matrigel (1 mL ανά θέση) για τουλάχιστον μία ώρα. Τα κύτταρα μεταφέρονται στις θέσεις του τρυβλίου σε 2 mL mTESR1 (θρεπτικό μέσο). Προκειμένου να αυξηθεί η επιβίωση των κυττάρων κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα επιστρώνονται σε υψηλή πυκνότητα ώστε να καλύπτουν περίπου το 80% της επιφάνειας του τρυβλίου 3-4 ημέρες πριν την έναρξη της διαφοροποίησης.

Τα κύτταρα αποκολλούνται με dispase στους 37°C. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με DMEMF/12, το οποίο προστίθεται σε μεγάλο όγκο προς αποκόλληση των αποικιών

από το τριβλίο. Οι αποικίες μεταφέρονται σε νέα τρυβλία επιστρωμένα με matrigel σε πυκνότητα που να καταλαμβάνουν περίπου το 80% της επιφάνειας του τρυβλίου. Το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται καθημερινά έως και την έναρξη της διαφοροποίησης.

### **Διαφοροποίηση πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων προς καρδιομυοκύτταρα.**

Την ημέρα που ξεκινάει η διαφοροποίηση (ονομάζεται συμβολικά ημέρα 0) τα κύτταρα εξετάζονται στο μικροσκόπιο ώστε να διαπιστωθεί ότι έχουν φυσιολογική μορφολογία και υψηλή πυκνότητα. Προστίθεται το μέσο της διαφοροποίησης που περιέχει 20 ng/mL Ακτιβίνης Α, 20 ng /mL BMP4 και 1,5 μM CHIR99021. Στην παρούσα μελέτη η διαφοροποίηση πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία 6 θέσεων. Κάθε φρεάτιο περιείχε 3,5 mL του μέσου διαφοροποίησης. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε αυτές της συνθήκες μέχρι και την ημέρα 3 της διαδικασίας της διαφοροποίησης. Την ημέρα αυτή θα έχει σχηματιστεί μία μονοστοιβάδα κυττάρων η οποία θα καλύπτει πλήρως την επιφάνεια του τριβλίου. Το καλλιεργητικό μέσο αντικαθίσταται από φρέσκο που περιέχει 5 μM XAV939. Το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται την ημέρα 6 της διαφοροποίησης με φρέσκο που δεν περιέχει κανέναν από τους 4 παράγοντες. Τα κύτταρα λαμβάνουν φρέσκο θρεπτικό μέσο κάθε 3 ημέρες. Μεταξύ των ημερών 7-9 της διαφοροποίησης παρατηρούνται τα πρώτα κύτταρα με συστολική λειτουργία. Ο αριθμός τους αυξάνεται τις επόμενες ημέρες. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, καρδιομυοκύτταρα τα οποία συστέλλονται αυθόρμητα παρατηρήθηκαν έως και την 28<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της διαφοροποίησης. Στην συνέχεια τα κύτταρα διατηρούνται χωρίς να συστέλλονται.





Εικόνα 20: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας διαφοροποίησης εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ανθρώπου προς καρδιομυοκύτταρα. Η εικόνα χρησιμοποιείται αυτούσια από C. Mummery et al., 2016 [113].

## 5.2. Λύση κυττάρων και συλλογή πρωτεϊνών.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν 2 τρόποι για την λύση των κυττάρων. Για τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, η λύση πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 500  $\mu$ L PBS, 2% SDS και 1% PMSF σε κάθε φρεάτιο πλακιδίου 6 θέσεων. Ακολούθησε απόξεση των κυττάρων με ρύγχος πιπέτας 1000  $\mu$ L και το ομογενοποίημα συλλέχθηκε. Ακολούθησαν τρεις κύκλοι sonication (Vibra Cell, Sonic Material)-ψύξης των δειγμάτων σε ένταση 15%. Ο κάθε κύκλος sonication είχε διάρκεια 30 δευτερόλεπτα ακολουθούμενος από 30 δευτερόλεπτα παραμονής στον πάγο. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 10.000 x g για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο Eppendorf και φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Στα πειράματα ανίχνευσης S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών ακολουθήθηκε διαφορετική διαδικασία λύσης. Τα κύτταρα λύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 250 mM HEPES, 1 mM DTPA, 0,1mM neocuproine, pH 7,7 που περιείχε 1% Triton X-100. 500  $\mu$ L προστέθηκαν ανά φρεάτιο πλακιδίου 6 θέσεων και τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φύλλο σιλκόνης. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πάγο για 30 λεπτά με ενδιάμεση ανάδευση σε vortex ανά 5 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντριση σε 10.000 x g, συλλογή των υπερκειμένων και απόρριψη των ιζημάτων. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 5.3. Προσδιορισμός Πρωτεΐνης με την μέθοδο BCA.

### Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος BCA είναι μία φασματοφωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης. Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση Piotrowski σύμφωνα με την οποία, ο  $\text{Cu}^{2+}$  ανάγεται σε  $\text{Cu}^{+}$  παρουσία αμιδικών ομάδων. Η αναγωγή οδηγεί στην δημιουργία ενός συμπλόκου μωβ χρώματος το οποίο απορροφά έντονα στα 562 nm.

## Αντιδραστήρια

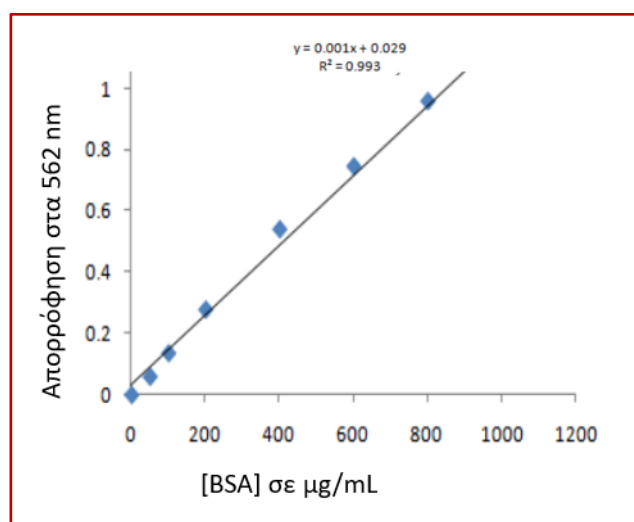
Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το kit 'BCA Protein Assay Kit' (Novagen®) το οποίο περιείχε τα παρακάτω αντιδραστήρια.

- BCA Solution.
- 4% Cupric Sulfate.
- BSA Standard, 2 mg/mL

Τα αντιδραστήρια A και B αναμιγνύονται σε αναλογία 49:1.

**Πειραματική διαδικασία** Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις BSA από 0.016 mg/mL μέχρι 1 mg/mL. Όπως φαίνεται στην εικόνα 21, οι συγκεντρώσεις αυτές αποτελούν μια γραμμική περιοχή.

Διάλυμα 1	Τυφλό
Διάλυμα 2	0,016 mg/mL
Διάλυμα 3	0,031 mg/mL
Διάλυμα 4	0,0625 mg/mL
Διάλυμα 5	0,125 mg/mL
Διάλυμα 6	0,25 mg/mL
Διάλυμα 7	0,5 mg/mL
Διάλυμα 8	1 mg/mL



Εικόνα 21 : Πρότυπη καμπύλη για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης. (Πάρθηκε αυτούσια από την σελίδα της Novagen που αναφέρεται στο συγκεκριμένο kit)

Κάθε πρότυπο/δείγμα αποτελείται από 25  $\mu$ L τα οποία τοποθετούνται σε πλακίδιο 96 θέσεων. Προστίθενται 200  $\mu$ L του μείγματος που προκύπτει με την ανάμιξη των A και B και η αντίδραση λαμβάνει χώρα για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για την μέτρηση της απορρόφησης χρησιμοποιήθηκε plate reader EPOCH 2 εφοδιασμένο με το πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό πρωτεΐνης με την μέθοδο BCA. Τα πρότυπα μετρήθηκαν εις διπλούν ενώ τα άγνωστα εις τριπλούν.

## 5.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε gel πολύ-ακρυλαμιδίου υπό μετουσιωτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

### Αρχή της Μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση υπό μετουσιωτικές συνθήκες επιτρέπει τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών ενός δείγματος σε gel πολυακρυλαμιδίου με βάση το μοριακό τους βάρος. Χρησιμοποιείται ως αποδιατακτικό μέσο το δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο (SDS), ένα ανιονικό απορρυπαντικό που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μίας πρωτεΐνης και β-μερκαπτοαιθανόλη για την αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών. Επιπλέον, το SDS, δεσμεύεται στις πρωτεΐνες σε εντελώς καθορισμένα ποσά κατά βάρος (1,4 g SDS/g πρωτεΐνης). Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση με το SDS είναι ευθύγραμμα και φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο. Η ηλεκτροφορητική ικανότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι μοναδική συνάρτηση του μοριακού βάρους.

Το gel σχηματίζεται κατά τον συμπολυμερισμό του ακρυλαμιδίου ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) και του δις-ακρυλαμιδίου ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ). Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένα πολυμερές πλέγμα που διαθέτει πόρους, με μέγεθος εξαρτώμενο από τον βαθμό πολυμερισμού και από την συγκέντρωση των μονομερών στο διάλυμα. Η δημιουργία του πλέγματος γίνεται μέσω του μηχανισμού των ελευθέρων ριζών με την προσθήκη του υπερθειικού αμμωνίου  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  για την έναρξη του μηχανισμού και του φωτοχημικού καταλύτη τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) για την διάδοσή του. Κατασκευάζονται δύο διαφορετικά gels, το gel επιστοίβαξης, που είναι υπεύθυνο για την συμπύκνωση των πρωτεϊνών του δείγματος σε μία πολύ λεπτή στιβάδα, και το gel διαχωρισμού, που είναι υπεύθυνο για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε λεπτές ζώνες κατά την κίνησή τους μέσα σε αυτό. Τα διαλύματα από τα οποία παρασκευάζονται τα δύο gel τα είναι διαφορετικά ως προς το pH και την σύστασή τους.

### Αντιδραστήρια

- 2-Μερκαπτοαιθανόλη (Sigma Aldrich).
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma Aldrich).
- Tris-HCl (Sigma Aldrich).

- Ακρυλαμίδιο (Sigma Aldrich).
- Γλυκερόλη (AnalaR).
- Γλυκίνη (Sigma Aldrich).
- Κυανό της βρωμοφαινόλης, Bromophenol Blue Sodium Salt (Sigma Aldrich).
- Μεθανόλη (Reidel-de Haën).
- Οξικό Οξύ (Fluka).
- Πρότυπα Μοριακά Βάρη (Prestained protein ladder 10-245 kDa, Thermo Scientific).
- Σουλφονυλοδωδέκυλο νάτριο (SDS, Applichem).
- Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED, Sigma Aldrich).
- Υπερθειικό αμμώνιο (APS, Sigma Aldrich).

### Διαλύματα

1. Ρυθμιστικό διάλυμα 0,5 M Tris-HCl, pH 6.8: Ζυγίζονται 6,0 g Tris-HCl και διαλύονται σε 100 mL νερού. Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 6.8 με διάλυμα 12 N HCl. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

2. Ρυθμιστικό διάλυμα 1,5 M Tris-HCl, pH 8.8: Ζυγίζονται 18,15 g Tris-HCl και διαλύονται σε 100 mL νερού. Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 8.8 με διάλυμα 12N NaOH. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

3. Διάλυμα 10 % w/v SDS: Ζυγίζονται 10 g SDS και διαλύονται σε 100 mL νερού. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Διάλυμα 10 % w/v υπερθειικού αμμωνίου (APS): Ζυγίζεται 0,1 g υπερθειικού αμμωνίου και διαλύεται σε 1 mL νερού. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του και στην συνέχεια απορρίπτεται.

5. Διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων (Sample Buffer) 6x: Περιέχει 65,8 mM Tris-HCl, 26,3 % v/v γλυκερόλη, 2,1 % w/v SDS, 0,01 % w/v κυανό της βρωμοφαινόλης και 2 % v/v 2-μερκαπτοαιθανόλη. Αναμιγνύονται 398,6 mg Tris-HCl, 13,15 mL γλυκερόλης, 1,05 g SDS, 5,0 mg κυανού της βρωμοφαινόλης και 1 mL 2-μερκαπτοαιθανόλης. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 50 mL με νερό και το pH ρυθμίζεται στην τιμή 6.8. Το διάλυμα χωρίζεται ανά 1,0 mL σε πλαστικά σωληνάκια, τα οποία φυλάσσονται στους -20°C.

6. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Electrode ή Running Buffer) 10x: Περιέχει 192 mM γλυκίνη, 25 mM Tris-HCl και 0,1 % w/v SDS. Ζυγίζονται 144,1 g γλυκίνης, 30,3 g Tris-HCl και 10 g SDS και διαλύονται σε 1 L απεσταγμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται στην τιμή 8.8. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

7. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Electrode ή Running Buffer) 1x: 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 10x αραιώνονται σε τελικό όγκο 1 L με νερό. Το διάλυμα παρασκευάζεται πριν την χρήση του και έπειτα απορρίπτεται.

8. Διάλυμα χρωματισμού gelτος (Staining Buffer): Περιέχει 0,1 % w/v Coomassie R-250, 40% v/v μεθανόλη και 10 % v/v οξικό οξύ. Ζυγίζεται 0,5 g Coomassie R-250 και διαλύεται σε 400 mL μεθανόλης και 100 mL οξικού οξέος. Ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L με νερό. Το διάλυμα αναδεύεται και διηθείται σε πτυχωτό ηθμό. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

9. Διάλυμα αποχρωματισμού gelτος (Destaining Buffer): Περιέχει 40% v/v μεθανόλη και 10 % v/v οξικό οξύ. Αναμιγνύονται 400 mL μεθανόλης και 100 mL οξικού οξέος και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L με νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

### Πειραματική διαδικασία

#### Παρασκευή gel διαχωρισμού (Resolving gel).

Σε σωληνάριο 15 mL αναμιγνύονται τα αντιδραστήρια με την σειρά που εμφανίζονται στον παρακάτω **Πίνακα**. Ακολουθως το διάλυμα εισάγεται ανάμεσα στις υάλινες πλάκες, έως ότου φτάσει σε απόσταση 1 εκατοστό πριν το χτένι. Καλύπτεται η επιφάνεια του με νερό και αφήνεται να πήξει για περίπου μία ώρα.

Αντιδραστήρια	Gel διαδρομής 12%
dH <sub>2</sub> O	1,67 mL
Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris-HCl 1,5 M, pH 8.8	1,25 mL

Ακριλαμίδιο	2 mL
10% SDS	50 $\mu$ L
10% Υπερθειϊκό Αμμώνιο (APS)	25 $\mu$ L
TEMED	2,5 $\mu$ l

### Παρασκευή gel επιστοιβαξης (Stacking Gel).

Το gel επιστοιβαξης, παρασκευάζεται σύμφωνα με τον Πίνακα που ακολουθεί. Τα αντιδραστήρια προστίθενται με την σειρά που εμφανίζονται στον πίνακα. Αμέσως μετά την ανάμιξη το μίγμα επιστοιβάζεται προσεκτικά στο gel διαχωρισμού και στη συνέχεια προστίθεται το κτένι για την δημιουργία των θέσεων. Το μίγμα αφήνεται να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 45 λεπτά.

Αντιδραστήρια	Gel Επιστοιβαξης 4%
dH <sub>2</sub> O	1,8 mL
Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris-HCl 0,5 M, pH 6.8	0,756 mL
Ακριλαμίδιο	0,396 ml
10% SDS	30 $\mu$ L
10% Υπερθειϊκό Αμμώνιο (APS)	15 $\mu$ l
TEMED	3 $\mu$ l

### Φόρτωση δειγμάτων στο gel.

Τα δείγματα αναμειγνύονται με διάλυμα φόρτωσης (Sample Buffer) 6x και βράζουν στους 100 °C για 5 λεπτά. Μετά το βρασμό τους, τα δείγματα «φορτώνονται», στις

αντίστοιχες θέσεις του gel. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 150-200 V μέχρι το μέτωπο της βαφής να φτάσει στο τέλος του gel διαχωρισμού .

#### **Χρώση πρωτεϊνών με Coomassie blue.**

Το gel μεταφέρεται σε γυάλινο δοχείο που περιέχει το διάλυμα χρωματισμού (Staining solution) και αφήνεται υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου, έως ότου οι πρωτεϊνικές ζώνες χρωματιστούν κυανές.

#### **Αποχρωματισμός του gel.**

Το διάλυμα χρώσης αντικαθίσταται με το διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining solution) και αφήνεται υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος έως ότου μείνουν χρωματισμένες στον επιθυμητό βαθμό μόνο οι πρωτεϊνικές ζώνες.

### **5.5. Ανοσοαποτύπωση Πρωτεϊνών κατά Western**

#### **Αρχή της μεθόδου**

Η ανοσοαποτύπωση διευκολύνει την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Στηρίζεται στην εκλεκτική αναγνώριση και την ειδική πρόσδεση αντιγόνου-αντισώματος. Η πειραματική διαδικασία αποτελείται από τρία στάδια.

1. Διαχωρισμός πρωτεϊνών υπό μετουσιωτικές συνθήκες (Περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα).
2. Μεταφορά πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (PVDF) σε ηλεκτρικό πεδίο. Η συγκεκριμένη διαδικασία είναι δυνατή λόγω του αρνητικού φορτίου των πρωτεϊνών εξαιτίας της πρόσδεσης SDS σε αυτές.
3. Ανίχνευση. Η πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος, ανιχνεύεται, με την χρήση αντισωμάτων τα οποία ονομάζονται πρωτογενή και δευτερογενή. Συνήθως, τα δευτερογενή αντισώματα είναι συνδεδεμένα με κάποιο ένζυμο το οποίο καταλύει την παραγωγή φωτός παρουσία κατάλληλου υποστρώματος. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με το ένζυμο Horse Radish Peroxidase (HRP). Χρησιμοποιήθηκε χημειοφωταύγεια για την εμφάνιση και ενίσχυση του σήματος.

## Αντιδραστήρια-Υλικά

- Blotting Paper (Macherey Nagel).
- Tris-HCl (Sigma Aldrich).
- Tween-20 (Sigma Aldrich).
- Γλυκίνη (Sigma Aldrich).
- Διάλυμα 0,1 % χρωστικής Rouge Ponceau σε 5 % οξικό οξύ (Sigma Aldrich).
- Διάλυμα χημειοφωταύγειας (ECL, Merck Millipore).
- Μεθανόλη (Riedel-de Haën).
- Μεμβράνη μεταφοράς πρωτεϊνών PVDF (Merck Millipore).
- Σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος εμπορίου.
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl, Thermo Scientific).

## Διαλύματα

1. Πυκνό ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer 10x): Περιέχει 192 mM γλυκίνη, 25 mM Tris-Base. Ζυγίζονται 144,1 g γλυκίνης και 30,3 g Tris-Base και διαλύονται σε 1 L απεσταγμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται στην τιμή 8,3.
2. Διάλυμα εργασίας μεταφοράς (Transfer Buffer 1x): 100 mL πυκνού ρυθμιστικού διαλύματος αναμιγνύονται με 200 mL μεθανόλης και αραιώνονται σε τελικό όγκο 1 L με νερό. Το διάλυμα παρασκευάζεται πριν την χρήση του και έπειτα απορρίπτεται.
3. Πυκνό ρυθμιστικό διάλυμα για έκπλυση (TBS 10x): Περιέχει 1.5 M NaCl και 200 mM Tris- Base. Ζυγίζονται 87.7 g NaCl και 24.2 g Tris-Base και διαλύονται σε 1 L απεσταγμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται στην τιμή 7,6.
4. Διάλυμα έκπλυσης TBS-T: 100 mL του πυκνού διαλύματος αραιώνονται σε τελικό όγκο 1 L με νερό. Στη συνέχεια προστίθεται 0,1 % v/v Tween-20.
5. Διάλυμα γάλακτος 5% w/v γνωστό ως blocking buffer: Ζυγίζονται 2,5 g σκόνης αποβουτυρωμένου γάλακτος εμπορίου και διαλύονται σε 50 mL διαλύματος έκπλυσης TBS-T. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν από την χρήση του και έπειτα απορρίπτεται.



## **Αντισώματα**

### *Πρωτογενή αντισώματα*

- Rabbit monoclonal Anti Cardiac Troponin T antibody (Abcam).
- Rabbit monoclonal Anti CPT2 antibody (Abcam).
- Rabbit monoclonal Anti SRIP alpha antibody (Abcam).
- Rabbit polyclonal Anti HADHA antibody (Abcam).
- Rabbit polyclonal Anti HADHB antibody (Abcam).
- Rabbit polyclonal Anti VLCAD antibody (Abcam).

### *Δευτερογενές αντίσωμα*

- Goat Anti-Rabbit IgG (HRP) (Abcam).

## **Πειραματική διαδικασία**

### Ενεργοποίηση μεμβράνης PVDF

Η μεμβράνη ενεργοποιείται αφού εμβαπτιστεί σε μεθανόλη για τουλάχιστον 1 λεπτό.

Στην συνέχεια τοποθετείται στο διάλυμα μεταφοράς

### Μεταφορά Πρωτεϊνών (Protein Transfer)

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το gel εμβαπτίζεται στο διάλυμα μεταφοράς.

Στην συνέχεια κατασκευάζεται το sandwich με την εξής διαδικασία. Το gel

τοποθετείται σε χαρτί Whatman και πάνω στο gel τοποθετείται η μεμβράνη.

Απομακρύνεται ο αέρας με προσεκτικό «πλάσιμο» της μεμβράνης. Πάνω από την

μεμβράνη τοποθετείται χαρτί Whatman και απομακρύνεται εκ νέου ο αέρας. Στην

συνέχεια το sandwich καλύπτεται εξωτερικά με σφουγγαράκια και τοποθετείται σε

πλαστική θήκη. Η θήκη τοποθετείται με την σειρά της στην συσκευή μεταφοράς

προσέχοντας ώστε το gel να βρίσκεται στον αρνητικό πόλο (μαύρο) και η μεμβράνη

στον θετικό (κόκκινο). Η μεταφορά πραγματοποιείται με εφαρμογή ηλεκτρικού

πεδίου εντάσεως 100 Volt για περίπου δύο ώρες.

### Blocking και επώαση με αντισώματα.

Η μεμβράνη μεταφέρεται σε blocking buffer και επωάζεται για τουλάχιστον 60 λεπτά

σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, το blocking buffer αντικαθίσταται με

φρέσκο διάλυμα 1% γάλα σε TBST όπου προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα. Οι

αραιώσεις των πρωτογενών αντισωμάτων παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα.

Ο χρόνος επώασης για όλα τα πρωτογενή αντισώματα ήταν 12 ώρες. Με την ολοκλήρωση της επώασης με το πρωτογενές αντίσωμα η μεμβράνη μεταφέρεται σε διάλυμα TBST. Το διάλυμα αντικαθίσταται 2 φορές κάθε 5 λεπτά και στην συνέχεια 2 φορές κάθε 10 λεπτά. Στην συνέχεια προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα σε διάλυμα 1% γάλα σε TBST. Η αραιώση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1: 10.000 και ο χρόνος επώασης ήταν 60 λεπτά. Στην συνέχεια, η μεμβράνη πλένεται όπως περιεγράφηκε για το πρωτογενές αντίσωμα.

<u>Πρωτογενή Αντισώματα</u>	<u>Αραιώσεις</u>
<u>Rabbit monoclonal Anti Cardiac Troponin T antibody.</u>	<u>1/2.500</u>
<u>Rabbit monoclonal Anti SRIP alpha antibody</u>	<u>1/2.500</u>
<u>Rabbit monoclonal Anti CPT2 antibody</u>	<u>1/3.000</u>
<u>Rabbit polyclonal Anti VLCAD antibody</u>	<u>1/3.000</u>
<u>Rabbit polyclonal Anti HADHA antibody</u>	<u>1/3.000</u>
<u>Rabbit polyclonal Anti HADHB antibody</u>	<u>1/3.000</u>

#### Ανίχνευση πρωτεϊνών με την μέθοδο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.

Η τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας στηρίζεται στην ανίχνευση της ακτινοβολίας που εκπέμπεται κατά την αποδιέγερση ενός παραγώγου της λουμινόλης. Η υπεροξειδάση παρουσία  $H_2O_2$  σε αλκαλικό περιβάλλον οξειδώνει τη λουμινόλη σύμφωνα με την αντίδραση  $H_2O_2 + \text{Λουμινόλη} \rightarrow \text{παραγώγο λουμινόλης} + N_2 + \text{φως}$ . Αμέσως μετά την αντίδραση η λουμινόλη βρίσκεται σε διηγευμένη κατάσταση και επιστρέφοντας στη θεμελιώδη, εκπέμπει ακτινοβολία. Η ακτινοβολία ενισχύεται σε ένταση και διάρκεια εξαιτίας της παρουσίας χημικών ενισχυτικών (όπως φαινόλες) κάνοντας δυνατή την αποτύπωση της σε φιλμ ή σε φωτογραφική κάμερα.

Η μεμβράνη στεγνώνεται προσεκτικά με χαρτί και επωάζεται για 5 λεπτά με το διάλυμα χημειοφωταύγειας ECL (Merck Millipore). Τέλος εισάγεται εντός του μηχανήματος (Molecular imager ChemiDoc XRS) και λαμβάνεται σειρά φωτογραφιών.

Όλα τα Western blots που πραγματοποιήθηκαν για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης, πραγματοποιήθηκαν σε διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα ημέρα 14 του πρωτοκόλλου διαφοροποίησης.

## **5.6. Κυτταρομετρία ροής**

### **Αρχή της μεθόδου.**

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μία τεχνική που επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση φυσικών χαρακτηριστικών των κυττάρων, καθώς τα τελευταία ρέουν μεμονωμένα μέσα από μία φωτεινή δέσμη. Τα φυσικά μεγέθη τα οποία μετρούνται είναι τα εξής:

- Σχετικό μέγεθος των κυττάρων.
- Σχετική κοκκίωση.
- Σχετική ένταση φθορισμού.

Οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιούνται με την βοήθεια ενός συστήματος οπτικής-ηλεκτρονικής ζεύξης το οποίο προσδιορίζει το μέγεθος του κυττάρου συναρτήσει της πρόσθιας σκέδασης (Forward light scatter -FSC) ενώ αντίστοιχα η εσωτερική κυτταρική πολυπλοκότητα προσδιορίζεται από την πλάγια σκέδαση ( Side Light Scatter-SSC). Μετρώντας αυτά τα δύο χαρακτηριστικά των κυττάρων επιτρέπεται ο διαχωρισμός διαφόρων κυτταρικών πληθυσμών.

Επίσης η χρήση φθοριζόντων υποστρωμάτων, είτε πρόκειται για αντισώματα είτε για μικρού μεγέθους μόρια, επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του αριθμού κυττάρων που έχουν την συγκεκριμένη ιδιότητα.

Στην παρούσα μελέτη η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση των κυττάρων που εκφράζουν τον καρδιοειδικό δείκτη Troponin-T και κατ' επέκταση, για τον υπολογισμό της απόδοσης της διαδικασίας της διαφοροποίησης.

### **Αντιδραστήρια/ διαλύματα**

- Fixation Buffer: FIX & PERM Cell Permeabilization Kit (Invitrogen).

- Permeabilization Buffer: FIX & PERM Cell Permeabilization Kit (Invitrogen).
- TrypLE™ Select Enzyme (1X) (Gibco).
- Διάλυμα αποκλεισμού (Blocking Buffer): 5% (v/v) FBS σε PBS, παρασκευάζεται και τοποθετείται σε πάγο.
- Διάλυμα έκπλυσης (Wash Buffer) : 2% (v/v) FBS σε PBS, παρασκευάζετε και τοποθετείται στον πάγο.

## **Αντισώματα**

### *Πρωτογενή αντισώματα*

Rabbit monoclonal Anti-Cardiac Troponin T antibody (Abcam).

### *Δευτερογενή αντισώματα*

Goat Anti-Rabbit IgG H&L (FITC) (Abcam).

## **Πειραματική διαδικασία**

### Αποκόλληση κυττάρων

Αρχικά απομακρύνεται προσεχτικά το θρεπτικό υλικό και πραγματοποιείται έκπλυση των κυττάρων με 0,5 mL PBS. Απομακρύνεται το PBS και προστίθεται 200  $\mu$ L Triple E. Το τρυβλίο ανακινείται ήπια και τα κύτταρα τοποθετούνται σε επωαστικό θάλαμο για 15 με 20 λεπτά στους 37 °C. Τα κύτταρα εξετάζονται σε μικροσκόπιο ορατού και αν διαπιστωθεί ότι δεν έχουν αποκολληθεί από τον πυθμένα του τρυβλίου τοποθετούνται ξανά στους 37 °C. Στην συνέχεια προστίθενται 200  $\mu$ L PBS, τα κύτταρα συλλέγονται και φυγοκεντρώνονται για 4 λεπτά στα 500 X g.

### Προετοιμασία δειγμάτων /Troponin-T

Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 400  $\mu$ L διάλυμα έκπλυσης και το εναίωρημα των κυττάρων φυγοκεντρείται σε 500 X g για 5 λεπτά. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 100  $\mu$ L Fixation Buffer και αφήνονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Προστίθεται διάλυμα έκπλυσης και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 500 X g για 5 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 300  $\mu$ L Permeabilization Buffer, αρχικά με πιπέττα και στην συνέχεια με vortex σε χαμηλή ταχύτητα.

Σε αυτό το στάδιο, ίσος όγκος κυττάρων μοιράζεται σε τρία Eppendorf. Το ένα χρησιμοποιείται για το Gating των κυττάρων. Στα άλλα δύο προστίθεται πρωτογενές αντίσωμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Τυφλό-/Troponin-T	Troponin-T (1)	Troponin-T (2)
(-) Αντισώματα	1/180 Πρωτογενές	1/250 Πρωτογενές
	1/500 Δευτερογενές	1/500 Δευτερογενές

Ακολουθεί σύντομο vortex και τα κύτταρα αφήνονται για 2 ώρες στο σκοτάδι.

Προστίθεται κρύο διάλυμα έκπλυσης, τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται σε 500X g για 5 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται.

Προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα σε αραιώση 1/500 σε Permeabilization Buffer, και τα κύτταρα αφήνονται στο σκοτάδι για 45 λεπτά με 1 ώρα.

Ακολουθεί προσθήκη 400 µL διαλύματος έκπλυσης, φυγοκέντριση σε 500 X g για 5 λεπτά και απόρριψη του υπερεκκειμένου. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε διάλυμα έκπλυσης και αφήνονται στον πάγο μέχρι την μέτρηση τους.

Τα πειράματα κυτταρομετρίας ροής έλαβαν χώρα σε διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα κατά την 28<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας.

## 5.7. Ανοσοφθορισμός

### Αρχή της μεθόδου

Ο ανοσοφθορισμός βασίζεται στην χρήση αντισωμάτων. Το πρωτογενές ή το δευτερογενές αντίσωμα είναι σημασμένο με φθορίζουσα ουσία η οποία διεγείρεται από πηγή ακτινοβολίας και στην συνέχεια εκπέμπει ακτινοβολία η οποία συλλέγεται, ενισχύεται και παρατηρείται σε μικροσκόπιο. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν δύο αντισώματα για την ανίχνευση της πρωτεΐνης στόχου. Το φθορίζων μόριο ήταν συνδεδεμένο στο δευτερογενές αντίσωμα. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε η βαφή Hoechst ώστε να βαφτούν οι πυρήνες των κυττάρων.

### Αντιδραστήρια

- 15mm round glass coverslips (Thermo Fisher).
- Ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl, Merck Millipore).
- Fetal Calf Serum (FCS, Thermo Fisher).
- Hoechst staining (Abcam).
- Matrigel™ Matrix Growth Factor Reduced (BD).
- Paraformaldehyde (Sigma Aldrich).
- Triton X-100 (Sigma Aldrich).
- TrypLE™ Select Enzyme (1X) (Gibco).
- Γλυκερόλη (Sigma Aldrich).
- Ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών απουσία CaCl<sub>2</sub> και MgCl<sub>2</sub> (PBS, Gibco).

### **Διαλύματα**

1. Fixation solution: 2% Paraformaldehyde σε 0.2 M PBS, με pH 7,4.
2. Permeabilization solution: 0.1% Triton X-100 σε PBS.
3. Blocking solution: 10% FCS σε PBS. Παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση του.
4. Quencher solution: 50 mM NH<sub>4</sub>Cl σε νερό.

### **Αντισώματα**

#### *Πρωτογενή αντισώματα*

- Rabbit monoclonal Anti-Cardiac Troponin T antibody (Abcam).

#### *Δευτερογενή αντισώματα*

- Goat Anti-Rabbit IgG H&L (FITC) (Abcam).

### **Κατασκευή θαλάμου υγρασίας**

Η επώαση των κυττάρων με τα αντισώματα πραγματοποιείται σε χώρο με υγρασία. Για τον λόγο αυτό κατασκευάζεται «θάλαμος υγρασίας» χρησιμοποιώντας το καπάκι πλάκας ELISA 96 θέσεων το οποίο καλύπτεται με parafilm. Οι καλυπτρίδες τοποθετούνται σε προσημασμένες θέσεις. Σε μικρή απόσταση τοποθετείται βρεγμένο χαρτί και σκεπάζεται με δεύτερο καπάκι.

### **Πειραματική πορεία**

#### Ανάπτυξη κυττάρων σε καλυπτρίδες

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε στρογγυλές καλυπτρίδες σε τρυβλίο 24 θέσεων που είχε επιστρωθεί με Matrigel όπως περιεγράφηκε προηγουμένως. Χρησιμοποιήθηκε 1 mL Differentiation medium ανά φρεάτιο. Το καλλιεργητικό υλικό αντικαταστάθηκε με φρέσκο 5 ημέρες αργότερα.

#### Fixation

Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε καλυπτρίδες για 15 ημέρες. Ακολούθως, το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται και πραγματοποιείται μία έκπλυση με 500 μL PBS. Το PBS απομακρύνεται και προστίθενται 500 μL Fixation solution. Τα κύτταρα επωάζονται με το τελευταίο για τουλάχιστον 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στην παρούσα μελέτη τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στους 4 °C και διατηρήθηκαν για 30 ημέρες πριν την πραγματοποίηση των παρακάτω βημάτων.

#### Quench

Η μείωση του αυτοφθορισμού των κυττάρων είναι απαραίτητη για την βελτίωση της διακριτικής ικανότητας της μεθόδου. Με την ολοκλήρωση του fixing, τα κύτταρα πλένονται με 500 μL PBS και ακολουθεί η προσθήκη 500μL διαλύματος 50 mM NH<sub>4</sub>Cl για 25 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια τα κύτταρα πλένονται με 500 μL PBS.

#### Permeabilization

Το PBS αντικαθίσταται από 500 μL Permeabilization solution για 4 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί έκπλυση με 500 μL PBS.

#### Blocking και επώαση με πρωτογενές αντίσωμα

Στο σημείο αυτό, οι καλυπτρίδες μεταφέρονται στον «θάλαμο επώασης». Τα επόμενα βήματα πραγματοποιούνται σε συνθήκες υγρασίας ώστε να χρησιμοποιηθούν μικροί όγκοι και να αποφευχθεί η ξήρανση των καλυπτρίδων.

Οι καλυπτρίδες καλύπτονται με 100μL διαλύματος blocking για 20 λεπτά. Το διάλυμα απομακρύνεται ποσοτικά με πιπέττα και αντικαθίσταται με 100 μL διαλύματος blocking που περιέχει Rabbit monoclonal Anti-Cardiac Troponin T antibody σε αραιώση 1/100. Η επώαση διαρκεί για 90 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα απομακρύνεται ποσοτικά με πιπέττα και οι καλυπτρίδες πλένονται δύο φορές με 100μL PBS, το κάθε πλύσιμο έχει διάρκεια 5 λεπτά. Στην συνέχεια προστίθενται 100μL διαλύματος blocking που περιέχουν Goat Anti-Rabbit

*IgG H&L (FITC)* σε αραιώση 1/100. Η επώαση με το δευτεροταγές αντίσωμα πραγματοποιείται στο σκοτάδι για 60 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.

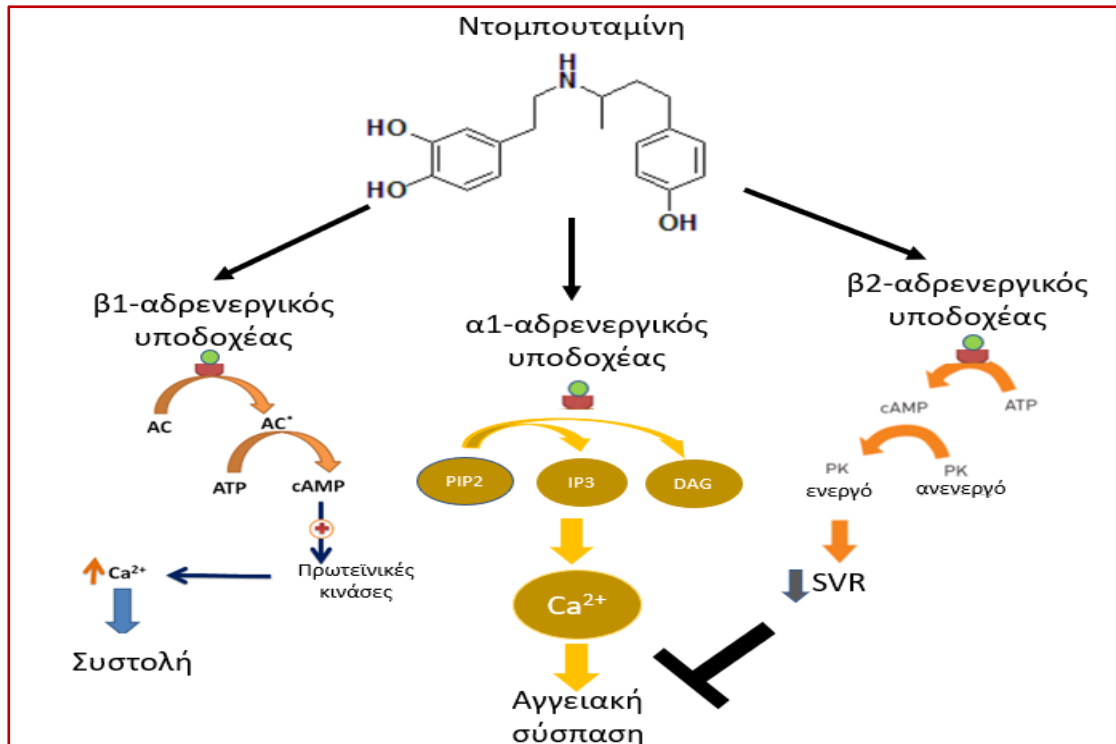
Στην συνέχεια οι καλυπτρίδες πλένονται με 100  $\mu$ L PBS, και προστίθενται 100  $\mu$ L Hoechst σε τελική αραιώση 1/10.000. Η χρώση των πυρήνων πραγματοποιείται για 10 λεπτά στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου. Η Hoechst απομακρύνεται και οι καλυπτρίδες καλύπτονται με 100  $\mu$ L PBS. Οι καλυπτρίδες μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρο πλάκα και τοποθετούνται σε μια σταγόνα γλυκερόλης. Η πλάκα τοποθετείται με υγρασία στο σκοτάδι στους 4°C μέχρι την παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

Τα πειράματα ανοσοφθορισμού έλαβαν χώρα σε διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα κατά την 20<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας.

### **5.8. Επίδραση καρδιομυκυττάρων, προερχόμενων από εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, με dobutamine.**

Η dobutamine αποτελεί ένα φαρμακευτικό σκεύασμα το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στην κλινική πράξη έναντι καρδιαγγειακών παθολογιών που ένα από τα βασικά συμπτώματα τους αποτελεί η μειωμένη καρδιακή συσταλτικότητα [114]. Η εικόνα 22 παρουσιάζει τους μοριακούς μηχανισμούς δράσης της dobutamine. Αποτελεί ενεργοποιητή του  $\beta$ 1-αδρενεργικού υποδοχέα με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζεται από έντονη ινότροπη δράση και κατ' επέκταση να προσδίδει στα κύτταρα έναν υπερσυσταλτικό φαινότυπο (Εικόνα 22, αριστερά). Ωστόσο, η dobutamine χαρακτηρίζεται επίσης από μερική ενεργοποίηση του  $\beta$ 2-αδρενεργικού υποδοχέα με αποτέλεσμα να μειώνεται η συστηματική αγγειακή αντίσταση (Systemic vascular resistance- SVR) (Εικόνα 22, δεξιά) και σε ακόμη μικρότερο βαθμό ενεργοποιεί τον  $\alpha$ 1-αδρενεργικό υποδοχέα (Εικόνα 22, μέση) του οποίου η δράση διαμεσολαβείται από την τριφωσφορική ινοσιτόλη και το ασβέστιο. Στην παρούσα μελέτη η ντομπουταμίνη προστέθηκε στα κύτταρα σε τελική συγκέντρωση 100  $\mu$ M και αφέθηκε να δράσει για τέσσερις ώρες.



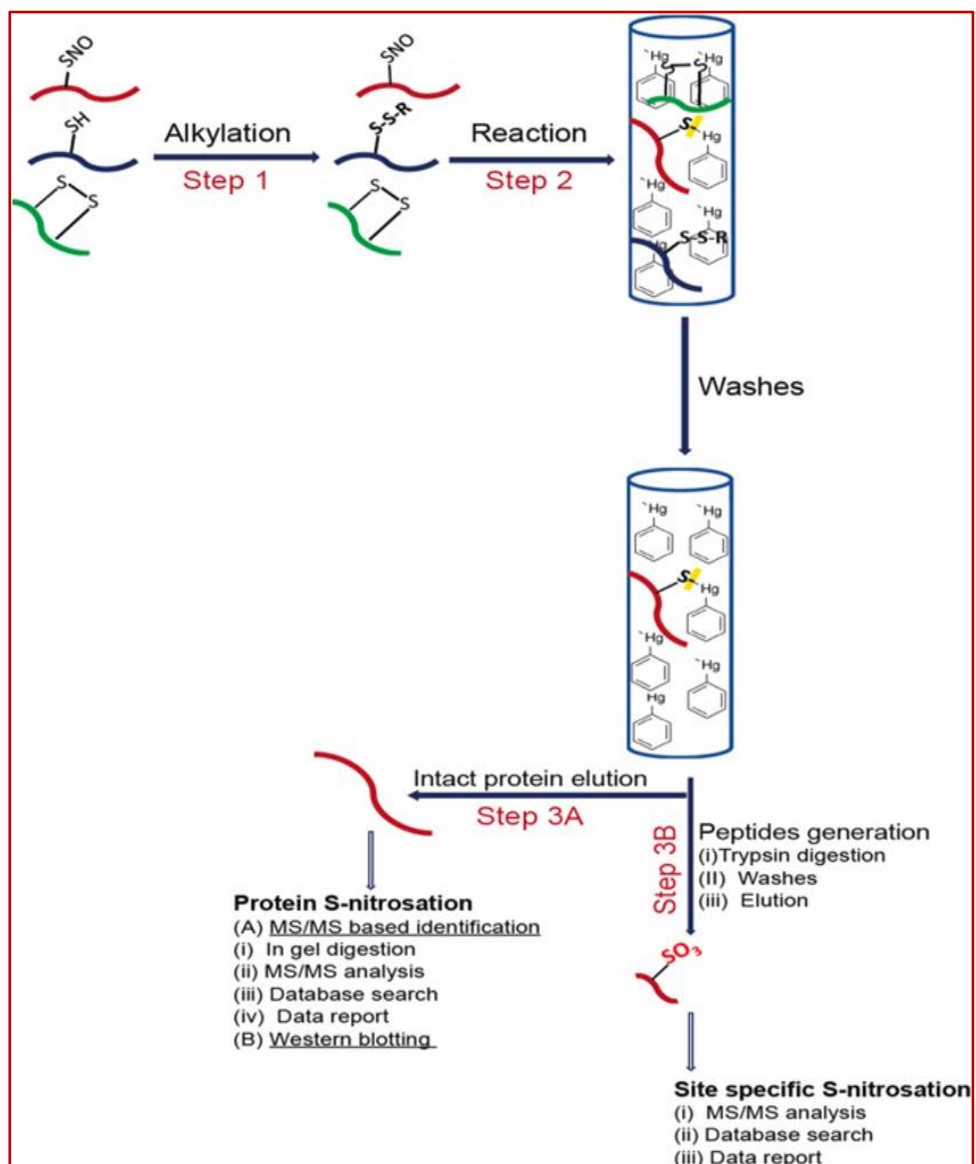


Εικόνα 22: Μοριακοί μηχανισμοί δράσης της ντομπουταμίνης. (Η συγκεκριμένη εικόνα δημιουργήθηκε από εμένα για τις ανάγκες τις παρούσας εργασίας).

### 5.9. Ανίχνευση S-νιτροζυλιωμένων Πρωτεϊνών.

#### Αρχή της μεθόδου.

Η μέθοδος στηρίζεται στην εκλεκτική και ποσοτική αντίδραση του οργανικού υδράργυρου με τις νιτροθειόλες, γνωστή και ως αντίδραση Saville [115]. Η στρατηγική εμπλουτισμού S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών και πεπτιδίων σε βιολογικά δείγματα αποτελείται από τρία βήματα (Α) Αλκυλίωση των ανηγμένων θειολικών ομάδων, (Β) Αντίδραση των S-νιτροζυλιωμένων κυστεϊνών με τον οργανικό υδράργυρο, (Γ) Έκλυση των πρωτεϊνών ή πέψη των πρωτεϊνών με θρυψίνη. Η εκλεκτικότητα, το όριο ανιχνευσιμότητας και οι τεχνικές λεπτομέρειες για την βέλτιστη απόδοση της μεθόδου έχουν περιγραφεί λεπτομερώς [116][117][118][119].



Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση του χημικού εμπλουτισμού S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών και πεπτιδίων. Η εικόνα χρησιμοποιείται αυτούσια από Doulias et al., 2021, [120]

#### Αντιδραστήρια / Υλικά.

- 4-Aminophenylmercuric acid (Sigma Aldrich).
- Affi-gel® 10 media (Bio-Rad).
- Beta Mercaptoethanol (Sigma Aldrich).
- Centrifugal Filter Units (Sigma Aldrich).
- Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA, Sigma Aldrich).

- Dimethylformamide (DMF, Thermo Scientific).
- Econo-Column® Chromatography Columns, 2.5 × 10 cm (Bio-Rad).
- Ethanolamine (Sigma Aldrich).
- Hepes (Sigma Aldrich).
- Neocuproine Hydrate (Sigma Aldrich).
- 2-Propanol (Fisher:Chemical).
- S-Methyl methanethiosulfonate (MMTS, Sigma Aldrich).
- Sodium bicarbonate (Sigma Aldrich).
- Sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma Aldrich).
- Triton-X-100 (Sigma Aldrich).
- Urea (Sigma Aldrich).

### **Διαλύματα**

1. Blocking buffer: 250 mM Hepes, 1mM diethylenetriamine pentaacetate (DTPA), 0.1mM neocuproine, 2.5% SDS, pH 7.7.
2. Equilibration buffer: 50 mM NaCl, 50 mM MES, 1mM DTPA, pH 6.0.
3. Homogenization buffer: 250 mM Hepes, 1 mM DTPA, 0.1 mM neocuproine, 40mM NEM, 1% TritonX-100, pH=7.7.
4. Loading buffer: 250mM MES, 1mM DTPA, 1% SDS pH=6.0.

### **Πειραματική διαδικασία**

#### Παρασκευή ρητίνης Υδραργύρου

Η ρητίνη οργανικού υδραργύρου (mercury resin) παρασκευάστηκε όπως περιγράφηκε προηγουμένως [117].

#### Ενεργοποίηση ρητίνης Hg

Η ενεργοποίηση της ρητίνης πραγματοποιείται με την προσθήκη 20 όγκων HCO<sub>3</sub>, pH 8,8 και στην συνέχεια 20 όγκων Equilibrium Buffer. Κατά την ενεργοποίηση της ρητίνης αποφεύγεται το στέγνωμα της.

#### Αλκυλίωση ανηγμένων κυστεϊνών

Για την αλκυλίωση των ανηγμένων κυστεϊνών, στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα προστίθενται 50 mM MMTS. ακολουθεί έντονη ανάδευση σε vortex και τα δείγματα τοποθετούνται, για 30 λεπτά στους 50 °C. Τα δείγματα αναδεύονται στο vortex κάθε 5 λεπτά.

#### Αντίδραση S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών με τον οργανικό υδράργυρο

Το δείγμα εισάγεται στην ρητίνη σε κατάλληλο όγκο ώστε να κατακρατηθεί. Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ο όγκος της ρητίνης ήταν 1 mL. Το δείγμα εισήχθη στην ρητίνη σε όγκο 300  $\mu$ L και στην συνέχεια εισήχθησαν 300  $\mu$ L νερού. Το καπάκι βιδώθηκε στην έξοδο της στήλης και 500  $\mu$ L νερού προστέθηκαν ώστε να μην στεγνώσει η ρητίνη. Η αντίδραση έλαβε χώρα για 120 λεπτά.

#### Απομάκρυνση μη ειδικών αλληλεπιδράσεων (non-specific interactions)

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης η ρητίνη πλένεται προκειμένου να απομακρυνθούν πρωτεΐνες που δεν είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες. Αρχικά, προστίθενται 10 όγκοι διαλύματος έκπλυσης (1) ακολουθούμενοι από 10 όγκους διαλύματος (2), (3) και (4) αντίστοιχα. Στην συνέχεια, η ρητίνη πλένεται με 20 όγκους νερού.

#### Έκλουση S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών

Οι ομοιοπολικά συνδεδεμένες πρωτεΐνες εκλούνται με αναγωγή του δεσμού Hg-S. Για τον σκοπό αυτό, στην ρητίνη προστίθεται διπλάσιος όγκος 50mM  $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλης σε νερό τα οποία και συλλέγονται (bound fraction).

#### Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα που εκλούνται από την ρητίνη υδραργύρου συμπυκνώνονται με χρήση Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Units. Το δείγμα προστίθεται σε κλάσματα των 500  $\mu$ L ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 10.000 x g για 15 λεπτά, απόχυση του όγκου που δεν έχει κατακρατηθεί στο φίλτρο και προσθήκη νέου κλάσματος. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου ο όγκος του δείγματος είναι περίπου 30  $\mu$ L. Στην συνέχεια, το φίλτρο αντιστρέφεται σε καθαρό Eppendorf, φυγοκεντρείται σε ταχύτητα 1000 x g για 5 λεπτά και τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20 °C.

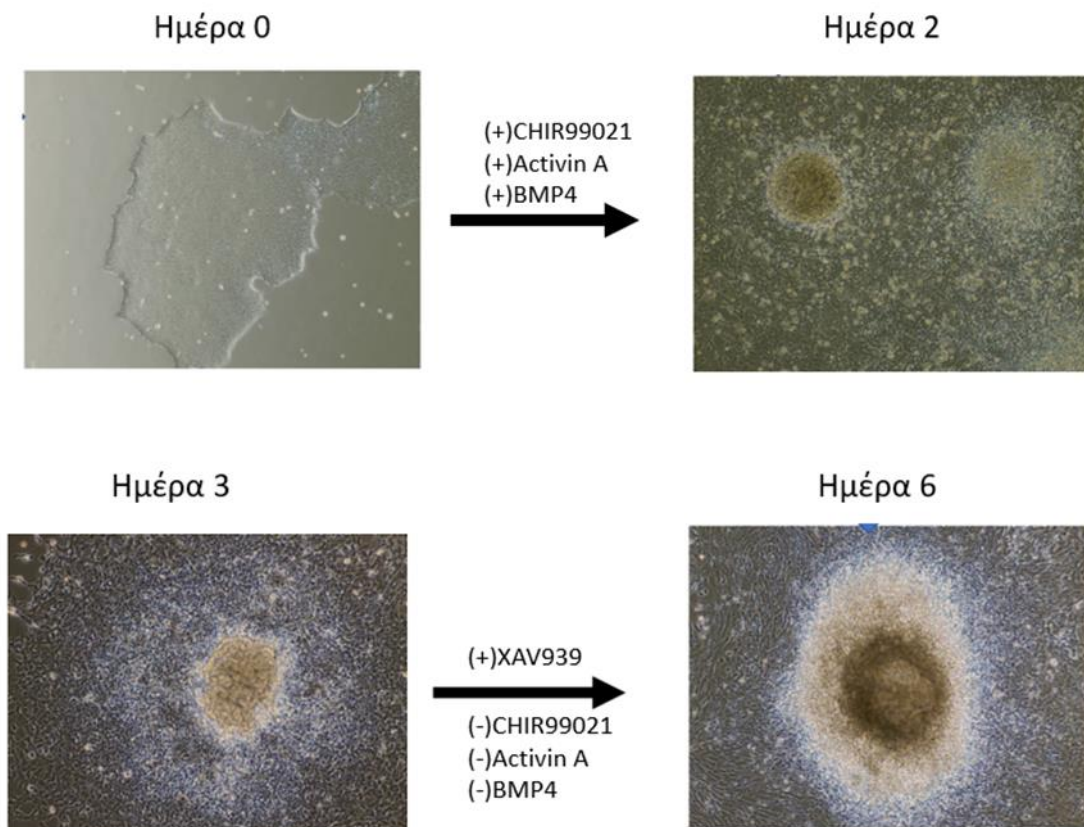
## Κεφάλαιο 6°

### Αποτελέσματα

#### 6.1. Διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων - Παρατηρήσεις μικροσκοπίας.

Η διαφοροποίηση των εμβρυονικών κυττάρων σε καρδιομυοκύτταρα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται στην ενότητα 6.1. Η εικόνα 24 παρουσιάζει τις μορφολογικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα κατά την διαδικασία της διαφοροποίησης. Την ημέρα 0, τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα βρίσκονται συσπειρωμένα σε μικρές αποικίες και τα όρια τους είναι ακανόνιστα και τραχέα. Την ημέρα αυτή, προστίθενται οι παράγοντες CHIR99021, Activin A και BMP4. Ο παράγοντας διαφοροποίησης CHIR99021 ενεργοποιεί το μονοπάτι Wnt, η Activin A διαδραματίζει καίριο ρόλο στην καθιέρωση της καρδιαγγειακής γενεαλογίας, ενώ ο BMP4 είναι σημαντικός ρυθμιστής της σηματοδοτικής δράσης της Activin-A και συνεργατικά ωθούν τα κύτταρα προς την καρδιακή διαφοροποίηση. Αποτέλεσμα της δράσης των παραπάνω παραγόντων είναι οι μορφολογικές αλλαγές που παρατηρούνται την ημέρα 2. Οι αποικίες αρχίζουν και ενώνονται και τα άκρα τους αμβλύνονται, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μεγαλύτερες αποικίες που κατανέμονται ομοιόμορφα στον χώρο. Την ημέρα 3 της διαφοροποίησης τα παραπάνω φαινόμενα είναι πιο έντονα. Η προσθήκη του παράγοντα XAV939 ο οποίος αναστέλλει το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt, επιτρέπει την εμφάνιση του πρώτου προγονικού καρδιακού πληθυσμού. Την 6η ημέρα της διαφοροποίησης φαίνεται πως τα κέντρα των αποικιών καταλαμβάνονται από μεγάλους πληθυσμούς κυττάρων, πράγμα που υποδηλώνεται από το σκούρο χρώμα σε αυτές τις περιοχές. Επίσης παρατηρείται έντονη κυτταρική ανάπτυξη περιμετρικά των μεγάλων αποικιών, μία εικόνα που παρουσιάζεται σε ολόκληρη την επιφάνεια του καλλιεργητικού τριβλίου. Ο XAV939 αφαιρείται με την επόμενη αλλαγή του θρεπτικού υλικού των κυττάρων. Την 7η ημέρα διαφοροποίησης εμφανίζονται τα πρώτα κύτταρα με συστολική λειτουργία. Η διαδικασία συνεχίζεται μέχρι την 14η

ημέρα όπου παρατηρούνται περισσότερα κύτταρα με συστολική λειτουργία (video 1). Σε αυτό το χρονικό διάστημα επίσης, τα κύτταρα συνεχίζουν να συσπειρώνονται στις ευμεγέθεις αποικίες και τα άκρα τους να αμβλύνονται, μέχρι την πλήρη κάλυψη της επιφάνειας του τρυβλίου.



Εικόνα 24: Φάσεις κατά την διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων προς καρδιοκύτταρα. Χαρακτηριστικές εικόνες που λαμβάνονται σε μικροσκόπιο ορατού κατά τις ημέρες 0, 2, 3, 6.



Video 1: Συστολικός φαινότυπος καρδιομυοκυττάρων που προέρχονται από εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα την 14η ημέρα της διαφοροποίησης.

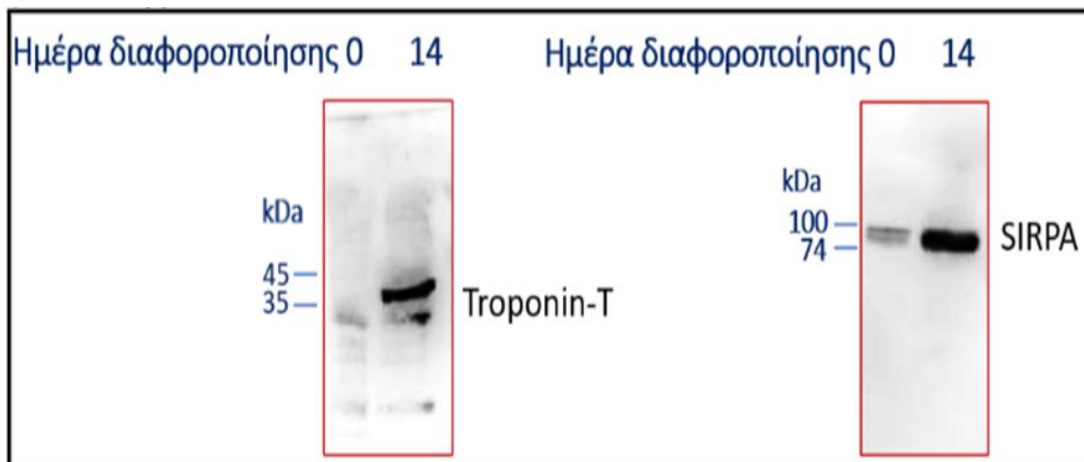
Τα αποτελέσματα αυτά είναι αντιπροσωπευτικά 4 πειραμάτων.

## **6.2. Χαρακτηρισμός καρδιομυοκυττάρων που προέρχεται από ανθρώπινα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα.**

Για την διαπίστωση της επιτυχίας του πρωτοκόλλου διαφοροποίησης που ακολουθήθηκε, απαιτείται ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των τελικών καρδιομυοκυττάρων. Ο χαρακτηρισμός λοιπόν, πραγματοποιήθηκε με την χρήση τριών διακριτών μεθόδων: Ανοσοανίχνευση κατά Western, Κυτταρομετρία ροής και Ανοσοφθορισμός.

### **6.2.1. Ανοσοανίχνευση των Troponin-T και SIRP-α.**

Οι πρωτεΐνες Troponin-T και SIRP-α αποτελούν μάρτυρες τις ωρίμανσης των καρδιομυοκυττάρων<sup>[52]</sup>. Επομένως, 14 ημέρες μετά την διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων εξετάστηκε η παρουσία των παραπάνω πρωτεϊνών με την μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Με χρήση εξειδικευμένων αντισωμάτων διαπιστώνεται η παρουσία Troponin-T σε κυτταρικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων ενώ η πρωτεΐνη είναι απύση σε αδιαφοροποίητα βλαστικά κύτταρα. Επίσης είναι αντιληπτό πως στις ίδιες συνθήκες τα διαφοροποιημένα κύτταρα εκφράζουν σε υψηλότερα επίπεδα την SIRP-α σε σχέση με τα αδιαφοροποίητα.

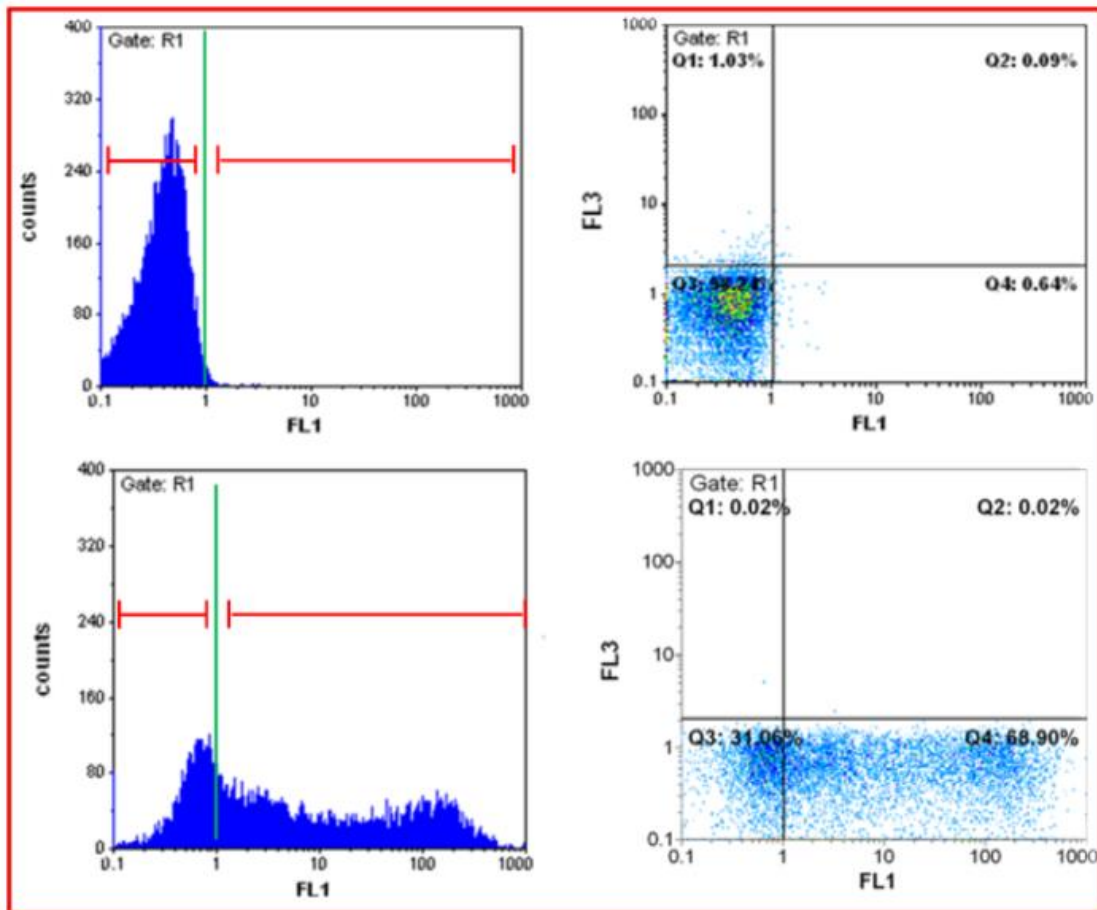


Εικόνα 25: Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι των πρωτεϊνών Troponin-T και SIRP-α σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα H1 εμβρυονικών κυττάρων κατά την ημέρα 0 και την ημέρα 14 της διαφοροποίησης τους σε καρδιομυοκύτταρα.

### 6.2.2. Ποσοτικοποίηση της απόδοσης διαφοροποίησης με κυτταρομετρία ροής.

Αφού ανιχνεύσαμε ποιοτικά την έκφραση των δύο καρδιοειδικών δεικτών στην τελική καλλιέργεια διαφοροποιημένων καρδιομυοκυττάρων, συνεχίσαμε με την ποσοτικοποίηση του αριθμού των κυττάρων που εκφράζουν την Troponin-T και άρα είναι καρδιομυοκύτταρα, στον τελικό πληθυσμό. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήσαμε πειράματα κυτταρομετρίας ροής (Εικόνα 30), όπου χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της Troponin-T. Το συγκεκριμένο πείραμα κρίθηκε αναγκαίο, καθώς πρέπει να γνωρίζουμε την απόδοση της διαδικασίας διαφοροποίησης, για να αξιολογήσουμε πληρέστερα την καταλληλότητα του πρωτοκόλλου, καθώς η ετερογένεια του τελικού πληθυσμού είναι αναπόφευκτη. Η Troponin-T, βρέθηκε να εκφράζεται στο 68,9% των κυττάρων στην τελική καλλιέργεια. Το συγκεκριμένο ποσοστό είναι ικανοποιητικά υψηλό και επισφραγίζει την αξιοπιστία του πρωτοκόλλου διαφοροποίησης που χρησιμοποιήθηκε.



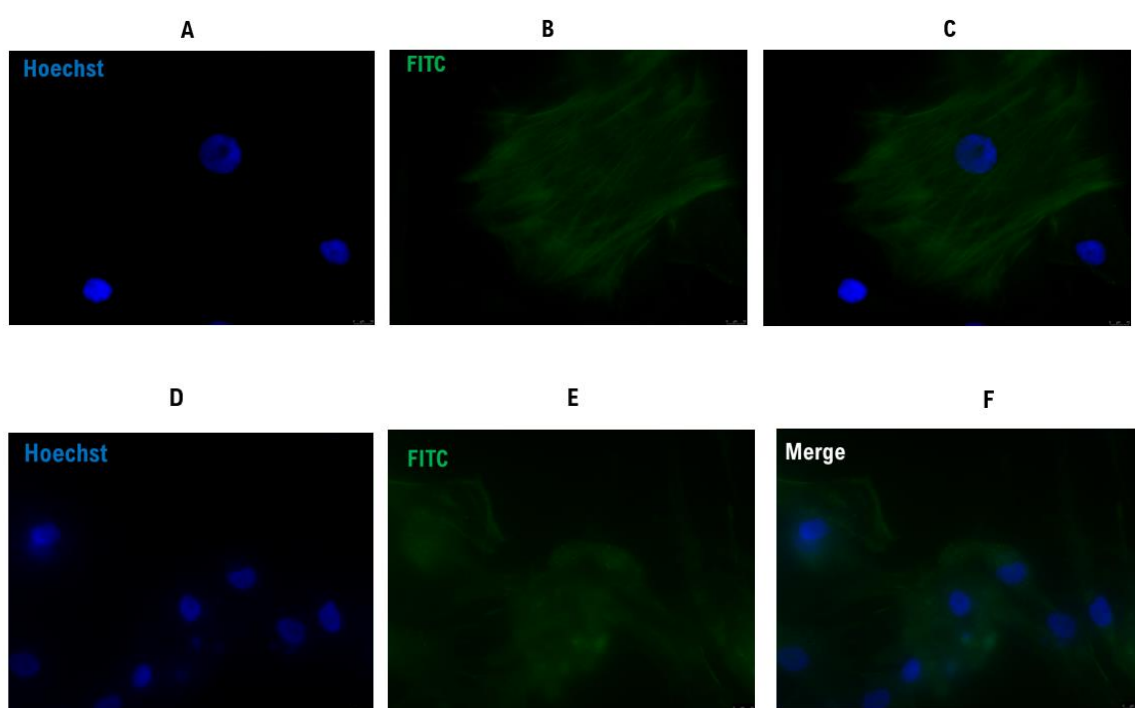


Εικόνα 26: Προσδιορισμός του ποσοστού των κυττάρων που εκφράζουν Troponin-T με χρήση κυτταρομετρίας ροής. Καρδιοκύτταρα προετοιμάστηκαν για τον προσδιορισμό όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Το πάνω τμήμα της εικόνας αντιστοιχεί σε fixed κύτταρα, απουσία αντισώματος (background) και το κάτω τμήμα σε κύτταρα που επώαστηκαν με πρωτογενές και δευτερογενές αντισώματα. Περίπου 70% των κυττάρων που επώαστηκαν με δύο αντισώματα παρουσίασαν φθορισμό υψηλότερο του background.

Τα πειράματα κυτταρομετρίας ροής διεξήχθησαν σε τελικώς διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα κατά την 28<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας.

### 6.2.3. Ανίχνευση Troponin-T σε διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα με την μέθοδο του ανοσοφθορισμού.

Για τον πρωτεομικό χαρακτηρισμό των διαφοροποιημένων καρδιομυοκυττάρων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της Troponin-T (Εικόνα 27). Παρατηρήθηκε σπικτός και διάχυτος πράσινος φθορισμός γεγονός που υποδηλώνει την έκφραση της πρωτεΐνης σε διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι η Troponin-T φαίνεται ότι εκφράζεται στα μυοϊνίδια.



Εικόνα 27: Ανίχνευση της έκφρασης Troponin-T. (A και D) Φθορισμός που οφείλεται στην χρώση των πυρήνων με Hoechst, (B και E). Φθορισμός που οφείλεται στην Troponin-T, (C και F) συνεντοπισμός Hoechst και FITC.

Τα πειράματα του ανοσοφθορισμού διεξήχθησαν σε τελικώς διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα κατά την 20<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας.

### **6.3. Έλεγχος παρουσίας των ενζύμων της β-οξείδωσης στα διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα.**

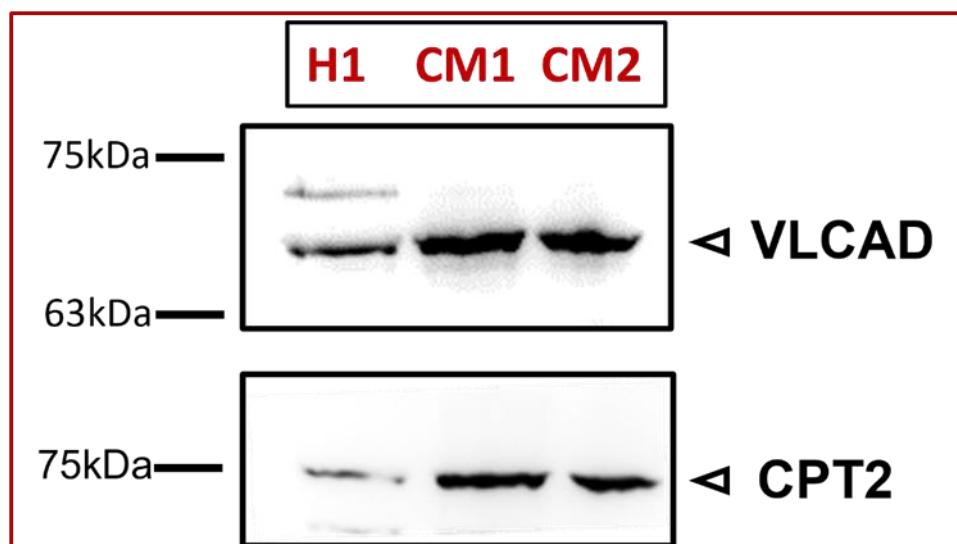
Δεδομένου ότι τα ερευνητικά ενδιαφέροντα του εργαστηρίου εστιάζουν στην ρύθμιση της β-οξείδωσης κάτω από παθοφυσιολογικές συνθήκες, ο πρωτεομικός χαρακτηρισμός του μοντέλου ξεκίνησε από ένζυμα του μονοπατιού της β-οξείδωσης.

#### **6.3.1. Έκφραση των VLCAD και CPT2.**

Η πρωτεΐνη Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (VLCAD, Uniprot Accession Number P49748) καταλύει το πρώτο βήμα του κύκλου της β-οξείδωσης έχοντας ως υπόστρωμα λιπαρά οξέα με ανθρακική αλυσίδα μήκους 14- ατόμων άνθρακα. Στον άνθρωπο, είναι υπεύθυνη για την αφυδρογόνωση του παλμιτικού οξέος σε ποσοστό περίπου 80%. Το ώριμο μόριο της ανθρώπινης VLCAD έχει μοριακό βάρος 70 kDa. Η παρουσία της πρωτεΐνης σε αδιαφοροποίητα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και σε καρδιομυοκύτταρα κατά την 14 η ημέρα της διαφοροποίησης (CM) εξετάστηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικόνα 28). Χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι της VLCAD, ανιχνεύτηκε μια ζώνη με μοριακό βάρος περίπου 70 kDa στα καρδιοκύτταρα, ενώ στα εμβρυονικά κύτταρα ανιχνεύονται δύο ζώνες. Η πιο έντονη, έχει μοριακό βάρος περίπου 70 kDa, ενώ η πιο ασθενής ανιχνεύεται σε υψηλότερο μοριακό βάρος. Συγκρίνοντας την ένταση των ζωνών με μοριακό βάρος 70 kDa παρατηρείται ότι τα καρδιομυοκύτταρα εκφράζουν σε υψηλότερα επίπεδα την VLCAD σε σχέση με τα εμβρυονικά κύτταρα. Η παρουσία μιας δεύτερης ζώνης στα τελευταία, υποδηλώνει ότι τα εμβρυονικά κύτταρα εκφράζουν και κάποια ισομορφή της VLCAD.

Η πρωτεΐνη carnitine palmitoyltransferase II (CPT2, uniprot accession number P23786) βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων καταλύοντας την εστεροποίηση των ακυλο-καρνιτινών σε ακυλο-CoA. Σε κυτταρικά εκχυλίσματα εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων και καρδιομυοκυττάρων παρατηρήθηκε μια κύρια ζώνη με μοριακό βάρος περίπου 75 kDa, η οποία αντιστοιχεί στο ώριμο μόριο

της CPT2 (Εικόνα 28). Η ένταση της ζώνης αυτής ήταν υψηλότερη στα καρδιοκύτταρα σε σύγκριση με τα εμβρυονικά κύτταρα.



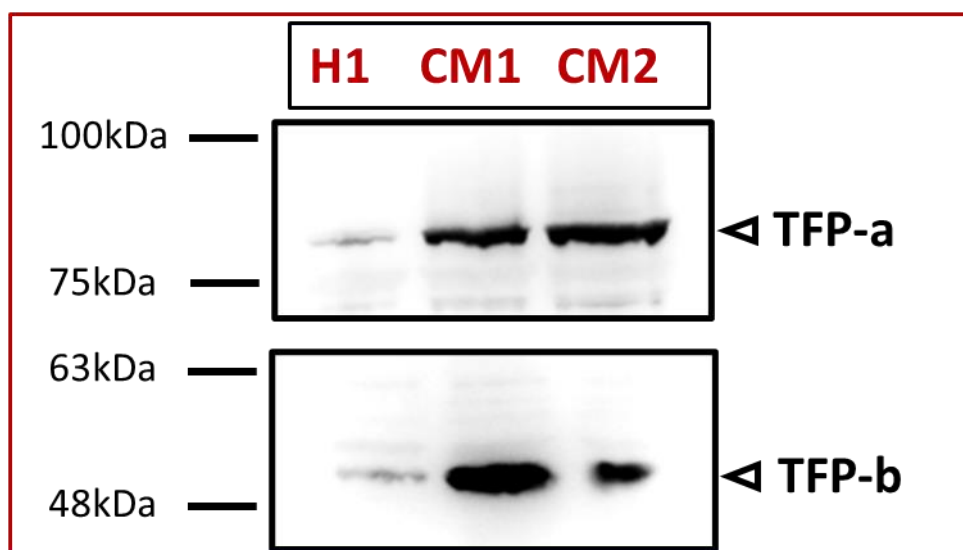
Εικόνα 28: Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι των πρωτεϊνών VLCAD (A) και CPT2 (B) σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (40 µg/lane) H1 εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων και πλήρως διαφοροποιημένων καρδιομυοκυττάρων (CM1 και CM2). Το πείραμα αυτό είναι αντιπροσωπευτικό δύο διαφορετικών πειραμάτων με ίδια αποτελέσματα.

### 6.3.2 Έλεγχος επιπέδων TFP-a και TFP-b.

Η πρωτεΐνη Trifunctional enzyme subunit alpha (TFP-a, Uniprot accession number P40939) εντοπίζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και μαζί με την Trifunctional enzyme subunit beta (TFP-b, Uniprot accession number P55084) αποτελούν πολυενζυμικό σύμπλοκο που καταλύει τα τρία τελευταία βήματα του μονοπατιού της β-οξειδωσης. Το πολύπλοκο αυτό ένζυμο χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας και αποτελείται από 4 υπομονάδες άλφα (TFP-a) με δράση υδατάσης και τέσσερις υπομονάδες βήτα (TFP-b) με δράση θειολάσης.

Με ανοσοαποτύπωση κατά Western, εξετάστηκε η έκφραση των TFP-a και TFP-b σε κυτταρικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων καρδιομυοκυττάρων (CM) και εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων. Σε ότι αφορά την TFP-a παρατηρήθηκε μια ζώνη σε μοριακό βάρος περίπου 83 kDa που αντιστοιχεί στην μάζα της ώριμης πρωτεΐνης. Και στην περίπτωση αυτή, η έκφραση της πρωτεΐνης ήταν υψηλότερή στα καρδιομυοκύτταρα σε σχέση με τα εμβρυονικά κύτταρα.

Η πρωτεΐνη TFP-b έχει μάζα 51 kDa. Τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης σε κυτταρικά εκχυλίσματα εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων και καρδιομυοκυττάρων οδήγησαν στην ανίχνευση μιας ζώνης με μοριακό βάρος που αντιστοιχεί στην μάζα της ώριμης πρωτεΐνης (Εικόνα 29). Από την εικόνα προκύπτει ότι τα καρδιοκύτταρα εκφράζουν την TFP-b σε υψηλότερα επίπεδα από τα εμβρυονικά κύτταρα.



Εικόνα 29: Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι των πρωτεϊνών TFP-a και TFP-b σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα H1 εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων και πλήρως διαφοροποιημένων καρδιομυοκυττάρων (CM). Το πείραμα είναι αντιπροσωπευτικό δύο διαφορετικών πειραμάτων.

#### 6.4. Επιπτώσεις της ενεργοποίησης των β-αδρενεργικών υποδοχέων στην μεταγωγή σήματος από το NO.

Οι β-αδρενεργικοί υποδοχείς αποτελούν το μοναδικό είδος αδρενεργικών υποδοχέων που εκφράζονται στον καρδιακό μυ. Κυρίαρχος είναι ο τύπος β-1 που δρα μέσω της ενεργοποίησης της σηματοδοτικής οδού της πρωτεϊνικής κινάσης A η οποία εξαρτάται από την G-protein adenylyl cyclase. Το μονοπάτι αυτό είναι υπεύθυνο για την επαγωγή ιονοτροπικών και χρονοτροπικών δράσεων. Οι συνθήκες του NO είναι ένζυμα που εξαρτώνται από το ασβέστιο. Τα παρακάτω πειράματα είχαν δύο στόχους. **(α)** να διαπιστωθεί εάν υπάρχει ενδογενής S-νιτροζυλίωση, **(β)** να εξεταστούν πιθανές αλλαγές στη σηματοδοτική δράση του NO λόγω της ενεργοποίησης των β-αδρενεργικών υποδοχέων.

Για την ενεργοποίηση των β-αδρενεργικών υποδοχέων τα κύτταρα εκτέθηκαν σε dobutamine η οποία ενεργοποιεί τους β1 υποδοχείς. Παρατηρήθηκε εντονότερη και ακανόνιστη συστολική λειτουργία σε καρδιοκύτταρα μετά την επίδραση με 100 μM dobutamine για 4 ώρες σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (videos A και B).

**A)**



**B)**



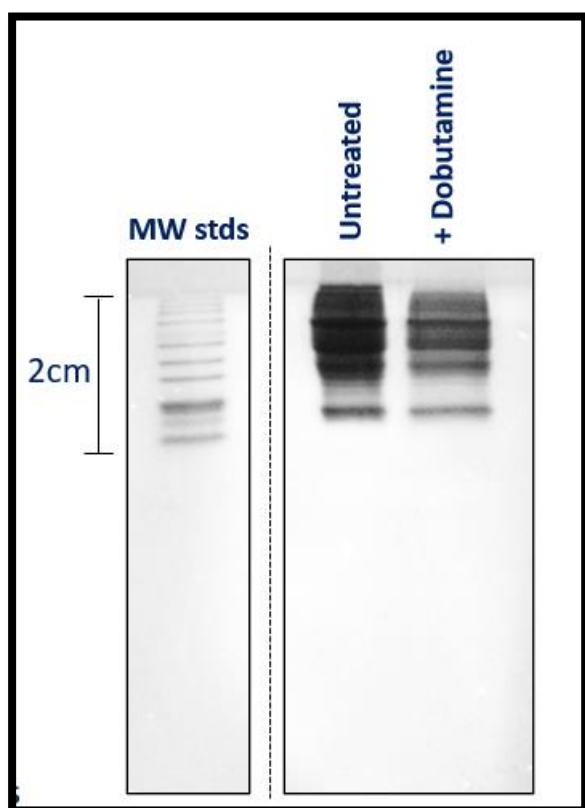
Video 2: Συστολική λειτουργία καρδιοκυττάρων μετά από μη επίδραση (A) ή επίδραση (B) 100 μM dobutamine για 4 ώρες.

#### 6.5. Χημειοεπιλεκτικός εμπλουτισμός S-Νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών.

Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται λεπτομερώς στην ενότητα 6.9. Επιγραμματικά, μετά την επίδραση με dobutamine τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα εκτέθηκαν σε MMTS ώστε να αλκυλιωθούν οι ανηγμένες κυστεΐνες. Ακολούθως, τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αντέδρασαν με τον οργανικό υδράργυρο ώστε να δεσμευτούν σε αυτόν οι S-νιτροζυλιωμένες πρωτεΐνες. Τέλος, οι προσδεδμεμένες στην στήλη πρωτεΐνες, εκλούστηκαν υπό αναγωγικές συνθήκες. Οι πρωτεΐνες

διαχωρίστηκαν σε ένα gel ηλεκτροφόρισης SDS διατρέχοντας απόσταση 2 cm που αντιστοιχεί περίπου στο 1/3 του συνολικού μήκους του gel (Εικόνα 30).

Παρατηρήθηκαν πρωτεϊνικές ζώνες και στα δύο βιολογικά δείγματα γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη ενδογενούς S-νιτροζυλίωσης στα διαφοροποιημένα καρδιοκύτταρα. Παρατηρήθηκε επίσης διαφορετικό μοτίβο στην κινητικότητα των πρωτεϊνών μετά από επίδραση dobutamine. Το τελευταίο πιθανά υποδηλώνει διαφορετικούς στόχους S-νιτροζυλίωσης σε συνθήκες υπερσυστολής.



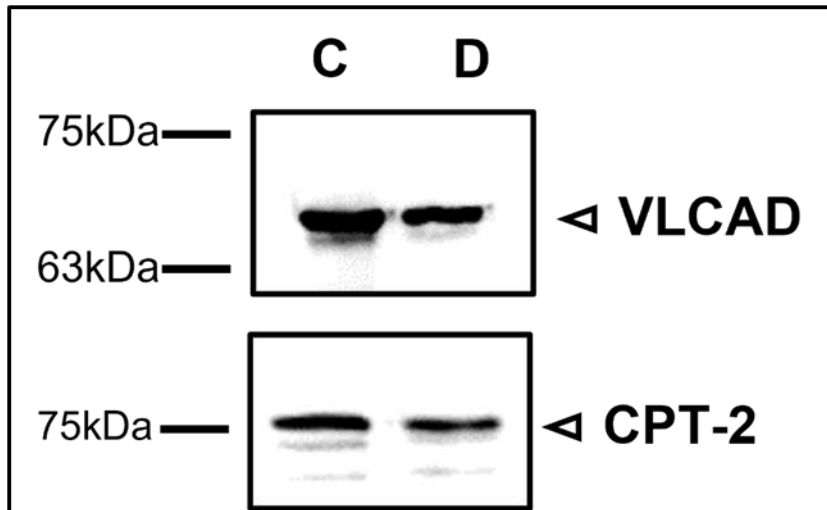
Εικόνα 30: Ενδογενής S-νιτροζυλίωση σε διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται για 2cm και ακολουθεί χρώση με Coomassie brilliant blue.

## 6.6. S-νιτροζυλίωση ενζύμων της β-οξειδωσης σε διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα

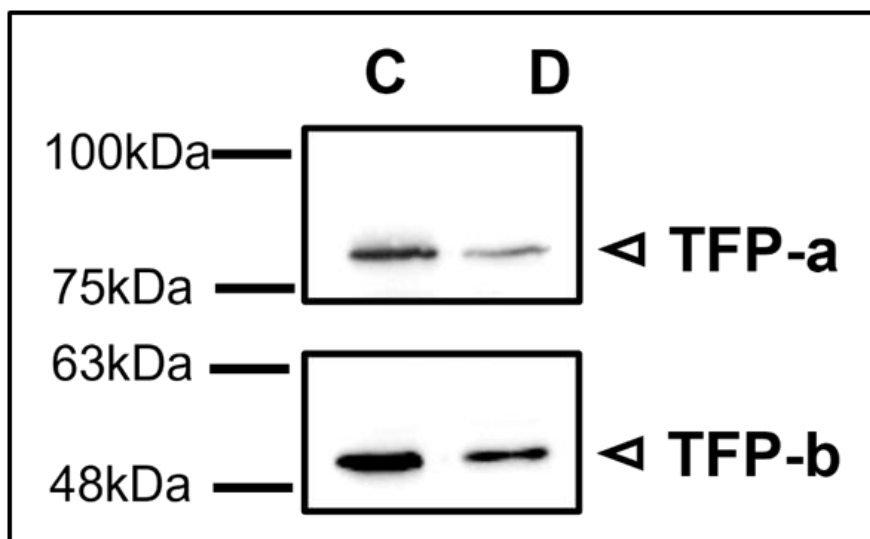
Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην β-οξειδωση στον καρδιακό μυ είναι ενδογενώς S-νιτροζυλιωμένες. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η S-νιτροζυλίωση των πρωτεϊνών VLCAD, CPT2, TFPa και TFPb σε διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα υπό φυσιολογικές συνθήκες και υπό συνθήκες υπερσυστολής.

Ο εμπλουτισμός S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε όπως περιεγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Η διαφορά με το πείραμα της εικόνας 33 ήταν ότι οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν κατά το πλήρες μήκος του gel. Με χρήση εξειδικευμένων αντισωμάτων διαπιστώθηκε η παρουσία και των 4 πρωτεϊνών στο bound fraction διαφοροποιημένων καρδιομυοκυττάρων υποδηλώνοντας την ενδογενή S-νιτροζυλίωση τους (Εικόνες 31, 32). Οι ίδιες πρωτεΐνες ανιχνεύονται και στο bound fraction κυτταρικού εκχυλίσματος προερχόμενο από διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα μετά από επίδραση με dobutamine. Αυτό που παρατηρείται είναι μείωση στην ένταση των ζωνών που ανιχνεύονται στα κύτταρα που είχαν επιδραστεί με dobutamine, υποδηλώνοντας ότι η ενεργοποίηση των β-ανδρενεργικών υποδοχέων επηρεάζει αρνητικά την S-νιτροζυλίωση του μονοπατιού της β-οξειδωσης.





Εικόνα 31: Ανοσοαποτύπωση κατά Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα καρδιομυοκυττάρων μετά από για χημικό εμπλουτισμό S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών (bound fractions). Η παρουσία μιας πρωτεΐνης στο bound fraction υποδηλώνει την S-νιτροζυλίωση της. C= μάρτυρες, D= dobutamine



Εικόνα 32: Ανοσοαποτύπωση κατά Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα καρδιομυοκυττάρων μετά από για χημικό εμπλουτισμό S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών (bound fractions). Η παρουσία μιας πρωτεΐνης στο bound fraction υποδηλώνει την S-νιτροζυλίωση της. C= μάρτυρες, D= dobutamine

## Συζήτηση

### **Διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων προς καρδιομυοκύτταρα και χαρακτηρισμός.**

Η διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων προς καρδιομυοκύτταρα πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο της Christine L. Mummery [113]. Η ενοποίηση μικρών πληθυσμιακά αποικιών προς την δημιουργία μεγαλύτερων, με παράλληλη άμβλυνση των άκρων τους μετά την προσθήκη του παράγοντα CHIR99021 έχει παρατηρηθεί σε προηγούμενες μελέτες και σχετίζεται με την έναρξη της δημιουργίας του μεσοδέρματος η οποία ολοκληρώνεται την 6<sup>η</sup> ημέρα της διαφοροποίησης. Η προσθήκη XAV939, αναστέλλει το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt και οδηγεί στην εμφάνιση των πρώτων κυττάρων με συστολική λειτουργία.

Ο χαρακτηρισμός των καρδιομυοκυττάρων πραγματοποιήθηκε με τρεις μεθόδους. Εστίασαμε στις πρωτεΐνες Troponin-T και SIRP-α. Οι πρωτεΐνες αυτές, συμμετέχουν στην ομοίωση του ενδοκυτταρικού  $Ca^{2+}$ , επηρεάζοντας με τον τρόπο αυτό την συστολική λειτουργία των καρδιοκυττάρων. Επομένως, η παρουσία τους υποδηλώνει την ωρίμανση των καρδιομυοκυττάρων. Διαπιστώθηκε ότι στις 14 ημέρες της διαφοροποίησης, σχεδόν 70% των κυττάρων εκφράζουν Troponin-T η οποία δεν εκφράζεται στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (Εικόνα 26). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η απόδοση της διαδικασίας της διαφοροποίησης που ακολουθήθηκε είναι υψηλή και βρίσκεται σε συμφωνία με το ποσοστό που αναφέρθηκε σε προηγούμενη μελέτη [113]. Τα πειράματα του ανοσοφθορισμού (Εικόνα 27) έδειξαν την ύπαρξη κυττάρων που δεν εκφράζουν την Troponin-T στην καλλιέργεια. Η ετερογένεια της τελικής καλλιέργειας, είναι αναμενόμενη και αποτελείται από καρδιομυοκύτταρα, ενδοθηλιακά και μεσεγχυματικά κύτταρα [121], [122]. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η ένταση του φθορισμού που αντιστοιχεί στην Troponin-T δεν ήταν η ίδια για όλα τα κύτταρα. Μια εξήγηση αυτού αποτελεί η παρουσία καρδιομυοκυττάρων διαφορετικής ωριμότητας στην τελική καλλιέργεια. Επίσης, ο ενδοκυττάριος εντοπισμός της Troponin-T υποδεικνύει πως αυτή η πρωτεΐνη θα

μπορούσε να είναι κατανεμημένη στις μυοϊνδικές δομές των καρδιομυοκυττάρων, κάτι που χρίζει περαιτέρω διερεύνησης σε πειράματα συνεντοπισμού της Troponin-T με πρωτεΐνες των μυοϊνιδίων.

### **Έλεγχος παρουσίας των ενζύμων της β-οξειδωσης στα διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα.**

Ελέγχθηκε επίσης η έκφραση των πρωτεϊνών (VLCAD, CPT2, TFP-a, TFP-b) που αποτελούν ένζυμα της β-οξειδωσης λιπαρών οξέων. Παρατηρήθηκε ότι τα 4 ένζυμα εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα στα καρδιομυοκύτταρα σε σύγκριση με τα εμβρυονικά κύτταρα. Υποθέτουμε ότι η παραπάνω παρατήρηση υποδηλώνει μεγαλύτερη συνεισφορά της β-οξειδωσης στην ενεργειακή ομοιόσταση των καρδιοκυττάρων σε σχέση με τα βλαστικά εμβρυονικά κύτταρα. Είναι γνωστό ότι τα καρδιομυοκύτταρα, εξασφαλίζουν περίπου το 70% του ATP τους, από την β-οξειδωση των λιπαρών οξέων. Αντίθετα, στα βλαστικά κύτταρα, κεντρικό ρόλο διαδραματίζει η γλυκόζη[123], [124]. Παρόλο που η υπόθεση μας υποστηρίζεται από την υπάρχουσα βιβλιογραφία, απαιτούνται επιπλέον πειράματα στα οποία θα μετρηθεί ο ρυθμός της β-οξειδωσης σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και σε καρδιομυοκύτταρα προκειμένου να αποδειχθεί.

### **Σηματοδοτική δράση του NO στα διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα.**

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η παρουσία ενδογενούς S-νιτροζυλίωσης σε «φυσιολογικές» συνθήκες και σε συνθήκες έντονης συστολικής λειτουργίας. Για το τελευταίο τα κύτταρα εκτέθηκαν σε dobutamine η οποία προκαλεί αλλαγές στην ομοιόσταση του ασβεστίου και με τον τρόπο αυτό επιταχύνει τον καρδιακό παλμό. Δεδομένου πως οι συνθάσες του NO ανήκουν στην κατηγορία των άσβεστο-εξαρτώμενων ενζύμων, υποθέσαμε ότι η αλλαγή των επιπέδων του ασβεστίου θα επηρεάσει την ενεργότητα των ενζύμων και πιθανά την σηματοδοτική δράση του NO και την S-νιτροζυλίωση των πρωτεϊνών. Η παρουσία S-νιτροζυλίωσης σε διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα (Εικόνα 30) υποδηλώνει την ύπαρξη μιας ή περισσότερων πηγών βιοδραστικού NO στα κύτταρα αυτά. Οι πιθανότερες πηγές

προέλευσης του NO είναι οι συνθάσες του NO οι οποίες έχει αναφερθεί ότι εκφράζονται σε καρδιομυοκύτταρα[125][126][127]. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το καλλιεργητικό υλικό δεν περιέχει νιτρώδη ( $\text{NO}_2^-$ ) τα οποία κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες θα μπορούσαν να αναχθούν σε NO. Επιπλέον, παρατηρήθηκε διαφορετικό μοτίβο S-νιτροζυλίωσης στα κύτταρα που επιδράστηκαν με dobutamine υποδηλώνοντας ότι διαφορετικές πρωτεΐνες αποτελούν στόχο της σηματοδοτικής δράσης του NO ανάλογα με το μηχανικό έργο που επιτελεί η καρδιά. Μελλοντικές μελέτες απαιτούνται ώστε να ταυτοποιηθούν οι πρωτεΐνες στόχοι και να ποσοτικοποιηθούν οι αλλαγές των επιπέδων της S-νιτροζυλίωσης.

Επιπλέον, ανιχνεύθηκαν τροποποιημένα τα ένζυμα της β-οξειδωσης: VLCAD, CPT2, TFP- $\alpha$ , TFP- $\beta$  (Εικόνα 31, 32). Μάλιστα, παρατηρήθηκαν αλλαγές στην S-νιτροζυλίωση των προαναφερόμενων πρωτεϊνών ως απόκριση των κυττάρων στην έκθεση σε dobutamine. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το μονοπάτι της β-οξειδωσης ρυθμίζεται δυναμικά από το NO σε ώριμα καρδιομυοκύτταρα.

## Κεφάλαιο 7<sup>ο</sup>

### Βιβλιογραφία

- [1] S. M. Houten and R. J. A. Wanders, "A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation," *J Inherit Metab Dis*, vol. 33, no. 5, pp. 469–477, Oct. 2010, doi: 10.1007/s10545-010-9061-2.
- [2] J. Storch and A. E. A. Thumser, "The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1486, no. 1, pp. 28–44, Jun. 2000, doi: 10.1016/S1388-1981(00)00046-9.
- [3] N. Longo, M. Frigeni, and M. Pasquali, "Carnitine transport and fatty acid oxidation," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1863, no. 10, pp. 2422–2435, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.01.023.
- [4] Y. Tang, J. Zhou, S. Hooi, Y. Jiang, and G. Lu, "Fatty acid activation in carcinogenesis and cancer development: Essential roles of long-chain acyl-CoA synthetases (Review)," *Oncol Lett*, May 2018, doi: 10.3892/ol.2018.8843.
- [5] T. J. Grevenkoed, E. L. Klett, and R. A. Coleman, "Acyl-CoA Metabolism and Partitioning," *Annu Rev Nutr*, vol. 34, no. 1, pp. 1–30, Jul. 2014, doi: 10.1146/annurev-nutr-071813-105541.
- [6] S. EATON, K. B. BARTLETT, and M. POURFARZAM, "Mammalian mitochondrial  $\beta$ -oxidation," *Biochemical Journal*, vol. 320, no. 2, pp. 345–357, Dec. 1996, doi: 10.1042/bj3200345.
- [7] N. Fillmore, O. Abo Alrob, and G. D. Lopaschuk, "Fatty Acid beta-Oxidation," Jul. 2011. doi: 10.21748/lipidlibrary.39187.
- [8] J. L. Merritt II, M. Norris, and S. Kanungo, "Fatty acid oxidation disorders," *Ann Transl Med*, vol. 6, no. 24, pp. 473–473, Dec. 2018, doi: 10.21037/atm.2018.10.57.
- [9] V. A. Vishwanath, "Fatty Acid Beta-Oxidation Disorders: A Brief Review," *Ann Neurosci*, vol. 23, no. 1, pp. 51–55, 2016, doi: 10.1159/000443556.
- [10] F. Pascual and R. A. Coleman, "Fuel availability and fate in cardiac metabolism: A tale of two substrates," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1861, no. 10, pp. 1425–1433, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.bbalip.2016.03.014.
- [11] K. A. De Jong and G. D. Lopaschuk, "Complex Energy Metabolic Changes in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction and Heart Failure With Reduced Ejection Fraction," *Canadian Journal of Cardiology*, vol. 33, no. 7, pp. 860–871, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.cjca.2017.03.009.

- [12] M. Kerr, M. S. Dodd, and L. C. Heather, "The 'Goldilocks zone' of fatty acid metabolism; to ensure that the relationship with cardiac function is just right," *Clin Sci*, vol. 131, no. 16, pp. 2079–2094, Aug. 2017, doi: 10.1042/CS20160671.
- [13] D. Oleinikov, "Myocardial Metabolism," in *Veterinary Anatomy and Physiology*, IntechOpen, 2019. doi: 10.5772/intechopen.80870.
- [14] C. Gomes, J. A. Almeida, O. L. Franco, and B. Petriz, "Omics and the molecular exercise physiology," 2020, pp. 55–84. doi: 10.1016/bs.acc.2019.11.003.
- [15] S. C. Bairwa, N. Parajuli, and J. R. B. Dyck, "The role of AMPK in cardiomyocyte health and survival," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1862, no. 12, pp. 2199–2210, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.bbadis.2016.07.001.
- [16] S. Chen *et al.*, "Alpha1 catalytic subunit of AMPK modulates contractile function of cardiomyocytes through phosphorylation of troponin I," *Life Sci*, vol. 98, no. 2, pp. 75–82, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.lfs.2014.01.006.
- [17] M. Morell, J. I. Burgos, L. A. Gonano, and M. Vila Petroff, "AMPK-dependent nitric oxide release provides contractile support during hyperosmotic stress," *Basic Res Cardiol*, vol. 113, no. 1, p. 7, Jan. 2018, doi: 10.1007/s00395-017-0665-7.
- [18] G. D. Lopaschuk, J. R. Ussher, C. D. L. Folmes, J. S. Jaswal, and W. C. Stanley, "Myocardial Fatty Acid Metabolism in Health and Disease," *Physiol Rev*, vol. 90, no. 1, pp. 207–258, Jan. 2010, doi: 10.1152/physrev.00015.2009.
- [19] C. E. van den Brom, C. S. Bulte, S. A. Loer, R. A. Bouwman, and C. Boer, "Diabetes, perioperative ischaemia and volatile anaesthetics: consequences of derangements in myocardial substrate metabolism," *Cardiovasc Diabetol*, vol. 12, no. 1, p. 42, 2013, doi: 10.1186/1475-2840-12-42.
- [20] M. Pawlak, P. Lefebvre, and B. Staels, "Molecular mechanism of PPAR $\alpha$  action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease," *J Hepatol*, vol. 62, no. 3, pp. 720–733, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.jhep.2014.10.039.
- [21] C. FOLMES and G. LOPASCHUK, "Role of malonyl-CoA in heart disease and the hypothalamic control of obesity," *Cardiovasc Res*, vol. 73, no. 2, pp. 278–287, Jan. 2007, doi: 10.1016/j.cardiores.2006.10.008.
- [22] M. A. Walker and R. Tian, "Raising NAD in Heart Failure," *Circulation*, vol. 137, no. 21, pp. 2274–2277, May 2018, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032626.
- [23] S. S. Bharathi *et al.*, "Sirtuin 3 (SIRT3) Protein Regulates Long-chain Acyl-CoA Dehydrogenase by Deacetylating Conserved Lysines Near the Active Site," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 47, pp. 33837–33847, Nov. 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.510354.

- [24] Y. Zhang *et al.*, "SIRT3 and SIRT5 Regulate the Enzyme Activity and Cardiolipin Binding of Very Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase," *PLoS One*, vol. 10, no. 3, p. e0122297, Mar. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0122297.
- [25] A. Fukushima and G. D. Lopaschuk, "Acetylation control of cardiac fatty acid  $\beta$ -oxidation and energy metabolism in obesity, diabetes, and heart failure," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1862, no. 12, pp. 2211–2220, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.bbadis.2016.07.020.
- [26] H. Schulz, "Regulation of Fatty Acid Oxidation in Heart," *J Nutr*, vol. 124, no. 2, pp. 165–171, Oct. 1994, doi: 10.1093/jn/124.2.165.
- [27] A. Sreedhar, E. K. Wiese, and T. Hitosugi, "Enzymatic and metabolic regulation of lysine succinylation," *Genes Dis*, vol. 7, no. 2, pp. 166–171, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.gendis.2019.09.011.
- [28] P.-T. Doulias, M. Tenopoulou, J. L. Greene, K. Raju, and H. Ischiropoulos, "Nitric Oxide Regulates Mitochondrial Fatty Acid Metabolism Through Reversible Protein S-Nitrosylation," *Sci Signal*, vol. 6, no. 256, Jan. 2013, doi: 10.1126/scisignal.2003252.
- [29] G. A. Soliman, "The integral role of mTOR in lipid metabolism," *Cell Cycle*, vol. 10, no. 6, pp. 861–862, Mar. 2011, doi: 10.4161/cc.10.6.14930.
- [30] D. H. Tran and Z. V. Wang, "Glucose Metabolism in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure," *J Am Heart Assoc*, vol. 8, no. 12, Jun. 2019, doi: 10.1161/JAHA.119.012673.
- [31] S. Pragallapati and R. Manyam, "Glucose transporter 1 in health and disease," *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, vol. 23, no. 3, p. 443, 2019, doi: 10.4103/jomfp.JOMFP\_22\_18.
- [32] N. Gandoy-Fieiras, J. R. Gonzalez-Juanatey, and S. Eiras, "Myocardium Metabolism in Physiological and Pathophysiological States: Implications of Epicardial Adipose Tissue and Potential Therapeutic Targets," *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 7, p. 2641, Apr. 2020, doi: 10.3390/ijms21072641.
- [33] P. J. Randle, P. B. Garland, C. N. Hales, and E. A. Newsholme, "THE GLUCOSE FATTY-ACID CYCLE ITS ROLE IN INSULIN SENSITIVITY AND THE METABOLIC DISTURBANCES OF DIABETES MELLITUS," *The Lancet*, vol. 281, no. 7285, pp. 785–789, Apr. 1963, doi: 10.1016/S0140-6736(63)91500-9.
- [34] L. Hue and H. Taegtmeyer, "The Randle cycle revisited: a new head for an old hat," *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, vol. 297, no. 3, pp. E578–E591, Sep. 2009, doi: 10.1152/ajpendo.00093.2009.
- [35] C. Ramathal, R. A. Reijo Pera, and S. L. Chavez, "Preimplantation Embryo Development and Primordial Germ Cell Lineage Specification," in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Elsevier, 2015, pp. 233–265. doi: 10.1016/B978-0-12-397175-3.00006-5.

- [36] K. K. Niakan, J. Han, R. A. Pedersen, C. Simon, and R. A. R. Pera, "Human pre-implantation embryo development," *Development*, vol. 139, no. 5, pp. 829–841, Mar. 2012, doi: 10.1242/dev.060426.
- [37] J. Firmin and J.-L. Maître, "Morphogenesis of the human preimplantation embryo: bringing mechanics to the clinics," *Semin Cell Dev Biol*, vol. 120, pp. 22–31, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.semcdb.2021.07.005.
- [38] A. Z. Ayob and T. S. Ramasamy, "Cancer stem cells as key drivers of tumour progression," *J Biomed Sci*, vol. 25, no. 1, p. 20, Dec. 2018, doi: 10.1186/s12929-018-0426-4.
- [39] W. Zakrzewski, M. Dobrzyński, M. Szymonowicz, and Z. Rybak, "Stem cells: past, present, and future," *Stem Cell Res Ther*, vol. 10, no. 1, p. 68, Dec. 2019, doi: 10.1186/s13287-019-1165-5.
- [40] M. F. Pittenger *et al.*, "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells," *Science (1979)*, vol. 284, no. 5411, pp. 143–147, Apr. 1999, doi: 10.1126/science.284.5411.143.
- [41] K. Takahashi and S. Yamanaka, "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors," *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 663–676, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- [42] K. Takahashi *et al.*, "Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors," *Cell*, vol. 131, no. 5, pp. 861–872, Nov. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- [43] H. Hui, Y. Tang, M. Hu, and X. Zhao, "Stem Cells: General Features and Characteristics," in *Stem Cells in Clinic and Research*, InTech, 2011. doi: 10.5772/23755.
- [44] H. Shenghui, D. Nakada, and S. J. Morrison, "Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal," *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 25, no. 1, pp. 377–406, Nov. 2009, doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113248.
- [45] Z. G. Venkei and Y. M. Yamashita, "Emerging mechanisms of asymmetric stem cell division," *Journal of Cell Biology*, vol. 217, no. 11, pp. 3785–3795, Nov. 2018, doi: 10.1083/jcb.201807037.
- [46] L. Fulawka, P. Donizy, and A. Halon, "Cancer stem cells – the current status of an old concept: literature review and clinical approaches," *Biol Res*, vol. 47, no. 1, p. 66, 2014, doi: 10.1186/0717-6287-47-66.
- [47] L. Liu, W. Michowski, A. Kolodziejczyk, and P. Sicinski, "The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation," *Nat Cell Biol*, vol. 21, no. 9, pp. 1060–1067, Sep. 2019, doi: 10.1038/s41556-019-0384-4.
- [48] J. Padgett and S. D. M. Santos, "From clocks to dominoes: lessons on cell cycle remodelling from embryonic stem cells," *FEBS Lett*, vol. 594, no. 13, pp. 2031–2045, Jul. 2020, doi: 10.1002/1873-3468.13862.



- [49] S. Jirawatnotai, S. Dalton, and M. Wattanapanitch, "Role of cyclins and cyclin-dependent kinases in pluripotent stem cells and their potential as a therapeutic target," *Semin Cell Dev Biol*, vol. 107, pp. 63–71, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.semcdb.2020.05.001.
- [50] S. Efroni *et al.*, "Global Transcription in Pluripotent Embryonic Stem Cells," *Cell Stem Cell*, vol. 2, no. 5, pp. 437–447, May 2008, doi: 10.1016/j.stem.2008.03.021.
- [51] A. Harikumar and E. Meshorer, "Chromatin remodeling and bivalent histone modifications in embryonic stem cells," *EMBO Rep*, vol. 16, no. 12, pp. 1609–1619, Dec. 2015, doi: 10.15252/embr.201541011.
- [52] M. H. Kagey *et al.*, "Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture," *Nature*, vol. 467, no. 7314, pp. 430–435, Sep. 2010, doi: 10.1038/nature09380.
- [53] M. Golkaram, J. Jang, S. Hellander, K. S. Kosik, and L. R. Petzold, "The Role of Chromatin Density in Cell Population Heterogeneity during Stem Cell Differentiation," *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 13307, Oct. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-13731-3.
- [54] N. Swain, M. Thakur, J. Pathak, and B. Swain, "SOX2, OCT4 and NANOG: The core embryonic stem cell pluripotency regulators in oral carcinogenesis," *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, vol. 24, no. 2, p. 368, 2020, doi: 10.4103/jomfp.JOMFP\_22\_20.
- [55] S. Melnik *et al.*, "Impact of c-MYC expression on proliferation, differentiation, and risk of neoplastic transformation of human mesenchymal stromal cells," *Stem Cell Res Ther*, vol. 10, no. 1, p. 73, Dec. 2019, doi: 10.1186/s13287-019-1187-z.
- [56] I. R. Akberdin *et al.*, "Pluripotency gene network dynamics: System views from parametric analysis," *PLoS One*, vol. 13, no. 3, p. e0194464, Mar. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0194464.
- [57] K. Kanayama *et al.*, "Genome-Wide Mapping of Bivalent Histone Modifications in Hepatic Stem/Progenitor Cells," *Stem Cells Int*, vol. 2019, pp. 1–10, Apr. 2019, doi: 10.1155/2019/9789240.
- [58] B. Schuettengruber, D. Chourrout, M. Vervoort, B. Leblanc, and G. Cavalli, "Genome Regulation by Polycomb and Trithorax Proteins," *Cell*, vol. 128, no. 4, pp. 735–745, Feb. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.02.009.
- [59] M. J. Evans and M. H. Kaufman, "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos," *Nature*, vol. 292, no. 5819, pp. 154–156, Jul. 1981, doi: 10.1038/292154a0.
- [60] G. R. Martin, "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 78, no. 12, pp. 7634–7638, Dec. 1981, doi: 10.1073/pnas.78.12.7634.

- [61] U. Graf, E. A. Casanova, and P. Cinelli, "The Role of the Leukemia Inhibitory Factor (LIF) — Pathway in Derivation and Maintenance of Murine Pluripotent Stem Cells," *Genes (Basel)*, vol. 2, no. 1, pp. 280–297, Mar. 2011, doi: 10.3390/genes2010280.
- [62] Q.-L. Ying, J. Nichols, I. Chambers, and A. Smith, "BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3," *Cell*, vol. 115, no. 3, pp. 281–292, Oct. 2003, doi: 10.1016/S0092-8674(03)00847-X.
- [63] J. Zhang and L. Li, "BMP signaling and stem cell regulation," *Dev Biol*, vol. 284, no. 1, pp. 1–11, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.ydbio.2005.05.009.
- [64] Y.-J. Sim *et al.*, "2i Maintains a Naive Ground State in ESCs through Two Distinct Epigenetic Mechanisms," *Stem Cell Reports*, vol. 8, no. 5, pp. 1312–1328, May 2017, doi: 10.1016/j.stemcr.2017.04.001.
- [65] V. K. Singh, A. Saini, M. Kalsan, N. Kumar, and R. Chandra, "Describing the Stem Cell Potency: The Various Methods of Functional Assessment and In silico Diagnostics," *Front Cell Dev Biol*, vol. 4, Nov. 2016, doi: 10.3389/fcell.2016.00134.
- [66] R. L. Wesselschmidt, "The Teratoma Assay: An In Vivo Assessment of Pluripotency," 2011, pp. 231–241. doi: 10.1007/978-1-61779-201-4\_17.
- [67] "Mouse chimeras for testing human stem cell pluripotency," *Nat Methods*, vol. 13, no. 2, pp. 115–115, Feb. 2016, doi: 10.1038/nmeth.3752.
- [68] M. Gertsenstein, "Mouse Embryos' Fusion for the Tetraploid Complementation Assay," 2015, pp. 41–59. doi: 10.1007/978-1-4939-2703-6\_3.
- [69] I. L. Weissman, D. J. Anderson, and F. Gage, "Stem and Progenitor Cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations," *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 17, no. 1, pp. 387–403, Nov. 2001, doi: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.387.
- [70] Y. Oh and J. Jang, "Directed Differentiation of Pluripotent Stem Cells by Transcription Factors.," *Mol Cells*, vol. 42, no. 3, pp. 200–209, Mar. 2019, doi: 10.14348/molcells.2019.2439.
- [71] C. Améen, R. Strehl, P. Björquist, A. Lindahl, J. Hyllner, and P. Sartipy, "Human embryonic stem cells: Current technologies and emerging industrial applications," *Crit Rev Oncol Hematol*, vol. 65, no. 1, pp. 54–80, Jan. 2008, doi: 10.1016/j.critrevonc.2007.06.012.
- [72] H. Vidarsson, J. Hyllner, and P. Sartipy, "Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Cardiomyocytes for In Vitro and In Vivo Applications," *Stem Cell Rev Rep*, vol. 6, no. 1, pp. 108–120, Mar. 2010, doi: 10.1007/s12015-010-9113-x.

- [73] I. Batalov and A. W. Feinberg, "Differentiation of Cardiomyocytes from Human Pluripotent Stem Cells Using Monolayer Culture," *Biomark Insights*, vol. 10s1, p. BMI.S20050, Jan. 2015, doi: 10.4137/BMI.S20050.
- [74] C. L. Mummery, J. Zhang, E. S. Ng, D. A. Elliott, A. G. Elefanty, and T. J. Kamp, "Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells to Cardiomyocytes," *Circ Res*, vol. 111, no. 3, pp. 344–358, Jul. 2012, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.227512.
- [75] A. Pahnke, G. Conant, L. D. Huyer, Y. Zhao, N. Feric, and M. Radisic, "The role of Wnt regulation in heart development, cardiac repair and disease: A tissue engineering perspective," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 473, no. 3, pp. 698–703, May 2016, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.060.
- [76] S. M. Wu, K. R. Chien, and C. Mummery, "Origins and Fates of Cardiovascular Progenitor Cells," *Cell*, vol. 132, no. 4, pp. 537–543, Feb. 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.02.002.
- [77] N. Marsh and A. Marsh, "A Short History Of Nitroglycerine And Nitric Oxide In Pharmacology And Physiology," *Clin Exp Pharmacol Physiol*, vol. 27, no. 4, pp. 313–319, Apr. 2000, doi: 10.1046/j.1440-1681.2000.03240.x.
- [78] D. E. Koshland, "The Molecule of the Year," *Science (1979)*, vol. 258, no. 5090, pp. 1861–1861, Dec. 1992, doi: 10.1126/science.1470903.
- [79] A. Ghasemi and S. Zahediasl, "Is nitric oxide a hormone?," *Iran Biomed J*, vol. 15, no. 3, pp. 59–65, 2011.
- [80] R. F. Furchgott and J. V. Zawadzki, "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine," *Nature*, vol. 288, no. 5789, pp. 373–376, Nov. 1980, doi: 10.1038/288373a0.
- [81] S. Katsuki and F. Murad, "Regulation of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate levels and contractility in bovine tracheal smooth muscle.," *Mol Pharmacol*, vol. 13, no. 2, pp. 330–41, Mar. 1977.
- [82] L. J. Ignarro, G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns, and G. Chaudhuri, "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 84, no. 24, pp. 9265–9269, Dec. 1987, doi: 10.1073/pnas.84.24.9265.
- [83] S. Moncada and E. A. Higgs, "The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology," *Br J Pharmacol*, vol. 147, no. S1, pp. S193–S201, Jan. 2006, doi: 10.1038/sj.bjp.0706458.
- [84] J. M. Pérez de la Lastra, C. A. Juan, F. J. Plou, and E. Pérez-Lebeña, "The Nitration of Proteins, Lipids and DNA by Peroxynitrite Derivatives-Chemistry Involved and Biological Relevance," *Stresses*, vol. 2, no. 1, pp. 53–64, Jan. 2022, doi: 10.3390/stresses2010005.
- [85] B. G. Hill, B. P. Dranka, S. M. Bailey, J. R. Lancaster, and V. M. Darley-Usmar, "What Part of NO Don't You Understand? Some Answers to the Cardinal

Questions in Nitric Oxide Biology," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 26, pp. 19699–19704, Jun. 2010, doi: 10.1074/jbc.R110.101618.

- [86] P. Anand and J. S. Stamler, "Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease," *J Mol Med*, vol. 90, no. 3, pp. 233–244, Mar. 2012, doi: 10.1007/s00109-012-0878-z.
- [87] M. W. Radomski and S. Moncada, "Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide.," *Thromb Haemost*, vol. 70, no. 1, pp. 36–41, Jul. 1993.
- [88] D. J. Stuehr and O. W. Griffith, "Mammalian Nitric Oxide Synthases," 2006, pp. 287–346. doi: 10.1002/9780470123119.ch8.
- [89] M. Król and M. Kepinska, "Human Nitric Oxide Synthase—Its Functions, Polymorphisms, and Inhibitors in the Context of Inflammation, Diabetes and Cardiovascular Diseases," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 1, p. 56, Dec. 2020, doi: 10.3390/ijms22010056.
- [90] M. A. Cinelli, H. T. Do, G. P. Miley, and R. B. Silverman, "Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition," *Med Res Rev*, vol. 40, no. 1, pp. 158–189, Jan. 2020, doi: 10.1002/med.21599.
- [91] M. L. Ludwig and M. A. Marletta, "A new decoration for nitric oxide synthase – a Zn(Cys)<sub>4</sub> site," *Structure*, vol. 7, no. 4, pp. R73–R79, Apr. 1999, doi: 10.1016/S0969-2126(99)80047-1.
- [92] G. Kayki-Mutlu and W. J. Koch, "Nitric Oxide and S-Nitrosylation in Cardiac Regulation: G Protein-Coupled Receptor Kinase-2 and  $\beta$ -Arrestins as Targets," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 2, p. 521, Jan. 2021, doi: 10.3390/ijms22020521.
- [93] Engineer, Saiyin, Greco, and Feng, "Say NO to ROS: Their Roles in Embryonic Heart Development and Pathogenesis of Congenital Heart Defects in Maternal Diabetes," *Antioxidants*, vol. 8, no. 10, p. 436, Oct. 2019, doi: 10.3390/antiox8100436.
- [94] C.-A. Chen *et al.*, "S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function," *Nature*, vol. 468, no. 7327, pp. 1115–1118, Dec. 2010, doi: 10.1038/nature09599.
- [95] Carmen Wheatley, "The Very Large Gorilla Sitting in the Room? Adenosylcobalamin is the Missing Link: its Radical and Tetrahydrobiopterin are the Principal *in vivo* Catalysts for Mammalian Nitric Oxide Synthases," *Hypotheses in the Life Sciences*, vol. 2, no. 2, pp. 31–54, 2012.
- [96] A. W. DeMartino, D. B. Kim-Shapiro, R. P. Patel, and M. T. Gladwin, "Nitrite and nitrate chemical biology and signalling," *Br J Pharmacol*, vol. 176, no. 2, pp. 228–245, Jan. 2019, doi: 10.1111/bph.14484.
- [97] B. Piknova, A. N. Schechter, J. W. Park, A. Vanhatalo, and A. M. Jones, "Skeletal Muscle Nitrate as a Regulator of Systemic Nitric Oxide Homeostasis," *Exerc Sport Sci Rev*, vol. 50, no. 1, pp. 2–13, Jan. 2022, doi: 10.1249/JES.0000000000000272.

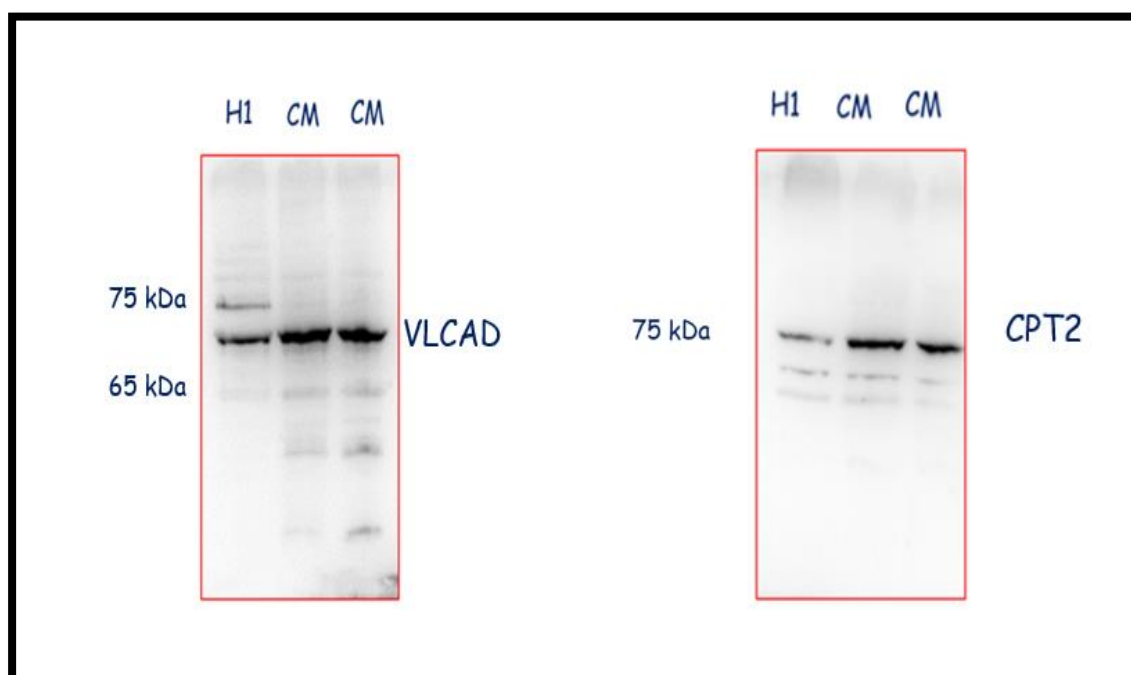
- [98] H. P. Kuschman, M. B. Palczewski, and D. D. Thomas, "Nitric oxide and hydrogen sulfide: Sibling rivalry in the family of epigenetic regulators," *Free Radic Biol Med*, vol. 170, pp. 34–43, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.010.
- [99] Y. Sha and H. E. Marshall, "S-nitrosylation in the regulation of gene transcription," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1820, no. 6, pp. 701–711, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.bbagen.2011.05.008.
- [100] J.-P. Gratton, J. Fontana, D. S. O'Connor, G. García-Cardena, T. J. McCabe, and W. C. Sessa, "Reconstitution of an Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS), hsp90, and Caveolin-1 Complex in Vitro," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 29, pp. 22268–22272, Jul. 2000, doi: 10.1074/jbc.M001644200.
- [101] L. Zhou and D.-Y. Zhu, "Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications," *Nitric Oxide*, vol. 20, no. 4, pp. 223–230, Jun. 2009, doi: 10.1016/j.niox.2009.03.001.
- [102] R. Carnicer *et al.*, "The subcellular localization of neuronal nitric oxide synthase determines the downstream effects of NO on myocardial function," *Cardiovasc Res*, vol. 113, no. 3, pp. 321–331, Mar. 2017, doi: 10.1093/cvr/cvx002.
- [103] B. Salimian Rizi, A. Achreja, and D. Nagrath, "Nitric Oxide: The Forgotten Child of Tumor Metabolism," *Trends Cancer*, vol. 3, no. 9, pp. 659–672, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.trecan.2017.07.005.
- [104] V. Mgbemena, J. Segovia, T.-H. Chang, and S. Bose, "KLF6 and iNOS regulates apoptosis during respiratory syncytial virus infection," *Cell Immunol*, vol. 283, no. 1–2, pp. 1–7, May 2013, doi: 10.1016/j.cellimm.2013.06.002.
- [105] J. Daly, "Role of Cyclic Nucleotides in the Nervous System," in *Synaptic Modulators*, Boston, MA: Springer US, 1975, pp. 47–130. doi: 10.1007/978-1-4684-3177-3\_2.
- [106] J. Pan, F. Zhong, and X. Tan, "Soluble guanylate cyclase in NO signaling transduction," *Reviews in Inorganic Chemistry*, vol. 33, no. 4, pp. 193–205, Dec. 2013, doi: 10.1515/revic-2013-0011.
- [107] Z. Xiyuan, R. H. A. Fink, and M. Mosqueira, "NO-sGC Pathway Modulates Ca<sup>2+</sup> Release and Muscle Contraction in Zebrafish Skeletal Muscle," *Front Physiol*, vol. 8, Aug. 2017, doi: 10.3389/fphys.2017.00607.
- [108] S. Kansakar *et al.*, "Soluble Guanylate Cyclase Stimulators in Heart Failure," *Cureus*, Sep. 2021, doi: 10.7759/cureus.17781.
- [109] J. S. Stamler *et al.*, "S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 89, no. 1, pp. 444–448, Jan. 1992, doi: 10.1073/pnas.89.1.444.

- [110] D. T. Hess, A. Matsumoto, S.-O. Kim, H. E. Marshall, and J. S. Stamler, "Protein S-nitrosylation: purview and parameters," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 6, no. 2, pp. 150–166, Feb. 2005, doi: 10.1038/nrm1569.
- [111] Y. Zhou, J. Tan, Y. Dai, Y. Yu, Q. Zhang, and M. E. Meyerhoff, "Synthesis and nitric oxide releasing properties of novel fluoro S-nitrosothiols," *Chemical Communications*, vol. 55, no. 3, pp. 401–404, 2019, doi: 10.1039/C8CC08868C.
- [112] N. Gould, P.-T. Doulias, M. Tenopoulou, K. Raju, and H. Ischiropoulos, "Regulation of Protein Function and Signaling by Reversible Cysteine S-Nitrosylation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 37, pp. 26473–26479, Sep. 2013, doi: 10.1074/jbc.R113.460261.
- [113] C. W. van den Berg, D. A. Elliott, S. R. Braam, C. L. Mummery, and R. P. Davis, "Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells to Cardiomyocytes Under Defined Conditions," 2014, pp. 163–180. doi: 10.1007/7651\_2014\_178.
- [114] G. Rowe, N. Q. Kelm, J. E. Beare, E. Tracy, F. Yuan, and A. J. LeBlanc, "Enhanced beta-1 adrenergic receptor responsiveness in coronary arterioles following intravenous stromal vascular fraction therapy in aged rats," *Aging*, vol. 11, no. 13, pp. 4561–4578, Jul. 2019, doi: 10.18632/aging.102069.
- [115] B. Saville, "A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols," *Analyst*, vol. 83, no. 993, p. 670, 1958, doi: 10.1039/an9588300670.
- [116] P.-T. Doulias *et al.*, "Structural profiling of endogenous S-nitrosocysteine residues reveals unique features that accommodate diverse mechanisms for protein S-nitrosylation," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 39, pp. 16958–16963, Sep. 2010, doi: 10.1073/pnas.1008036107.
- [117] P.-T. Doulias, K. Raju, J. L. Greene, M. Tenopoulou, and H. Ischiropoulos, "Mass spectrometry-based identification of S-nitrosocysteine in vivo using organic mercury assisted enrichment," *Methods*, vol. 62, no. 2, pp. 165–170, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.ymeth.2012.10.009.
- [118] P. Doulias and N. S. Gould, "Analysis of Cysteine Post Translational Modifications Using Organic Mercury Resin," *Curr Protoc Protein Sci*, vol. 94, no. 1, Nov. 2018, doi: 10.1002/cpps.69.
- [119] K. Raju, P.-T. Doulias, M. Tenopoulou, J. L. Greene, and H. Ischiropoulos, "Strategies and tools to explore protein S-nitrosylation," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1820, no. 6, pp. 684–688, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.bbagen.2011.05.009.
- [120] P.-T. Doulias, M. Tenopoulou, I. Zakopoulos, and H. Ischiropoulos, "Organic mercury solid phase chemoselective capture for proteomic identification of S-nitrosated proteins and peptides," *Nitric Oxide*, vol. 117, pp. 1–6, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.niox.2021.09.004.
- [121] S. M. Biendarra-Tiegs, F. J. Secreto, and T. J. Nelson, "Addressing Variability and Heterogeneity of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes," 2019, pp. 1–29. doi: 10.1007/5584\_2019\_350.

- [122] K. R. Boheler *et al.*, "Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Heterogeneity and the Isolation of Immature and Committed Cells for Cardiac Remodeling and Regeneration," *Stem Cells Int*, vol. 2011, pp. 1–10, 2011, doi: 10.4061/2011/214203.
- [123] W. Gu *et al.*, "Glycolytic Metabolism Plays a Functional Role in Regulating Human Pluripotent Stem Cell State," *Cell Stem Cell*, vol. 19, no. 4, pp. 476–490, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.stem.2016.08.008.
- [124] N. Shyh-Chang and H.-H. Ng, "The metabolic programming of stem cells," *Genes Dev*, vol. 31, no. 4, pp. 336–346, Feb. 2017, doi: 10.1101/gad.293167.116.
- [125] W. Bloch, K. Addicks, J. Hescheler, and B. K. Fleischmann, "Nitric oxide synthase expression and function in embryonic and adult cardiomyocytes," *Microsc Res Tech*, vol. 55, no. 4, pp. 259–269, Nov. 2001, doi: 10.1002/jemt.1175.
- [126] I. B. Buchwalow *et al.*, "Inducible nitric oxide synthase in the myocardium," *Mol Cell Biochem*, vol. 217, no. 1/2, pp. 73–82, 2001, doi: 10.1023/A:1007286602865.
- [127] F. Beigi, B. N. Oskouei, M. Zheng, C. A. Cooke, G. Lamirault, and J. M. Hare, "Cardiac nitric oxide synthase-1 localization within the cardiomyocyte is accompanied by the adaptor protein, CAPON," *Nitric Oxide*, vol. 21, no. 3–4, pp. 226–233, Dec. 2009, doi: 10.1016/j.niox.2009.09.005.

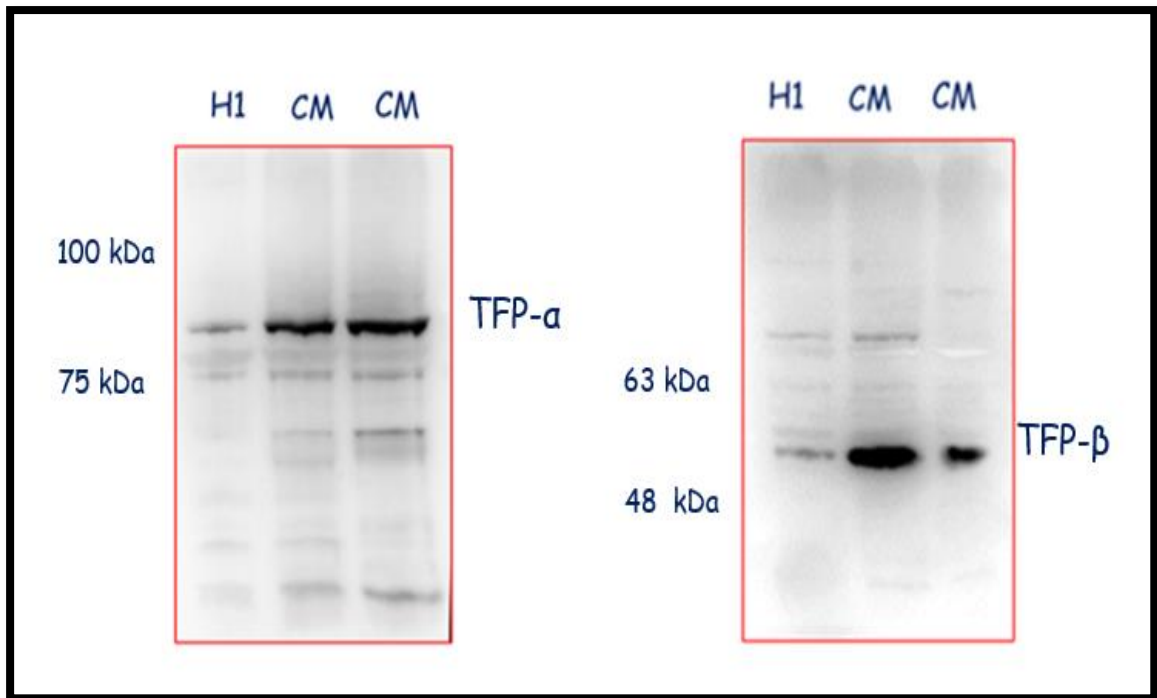
## Παράρτημα

Στο παράρτημα παρατίθενται ολόκληρα τα blots που παρουσιάζονται περικομμένα στην παρούσα εργασία, καθώς και το gating του πειράματος της κυτταρομετρίας ροής. Τέλος υπάρχουν εικόνες ανοσοφθορισμού από τις οποίες φαίνεται η καταλληλότητα χρήσης του δευτερογενούς αντισώματος (FITC) στην παρούσα πειραματική διάταξη.



Εικόνα 33 (σελίδα 91): Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι των πρωτεϊνών VLCAD (A) και CPT2 (B) σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (40 µg/lane) H1 εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων και πλήρως διαφοροποιημένων καρδιομυοκυττάρων (CM1 και CM2).

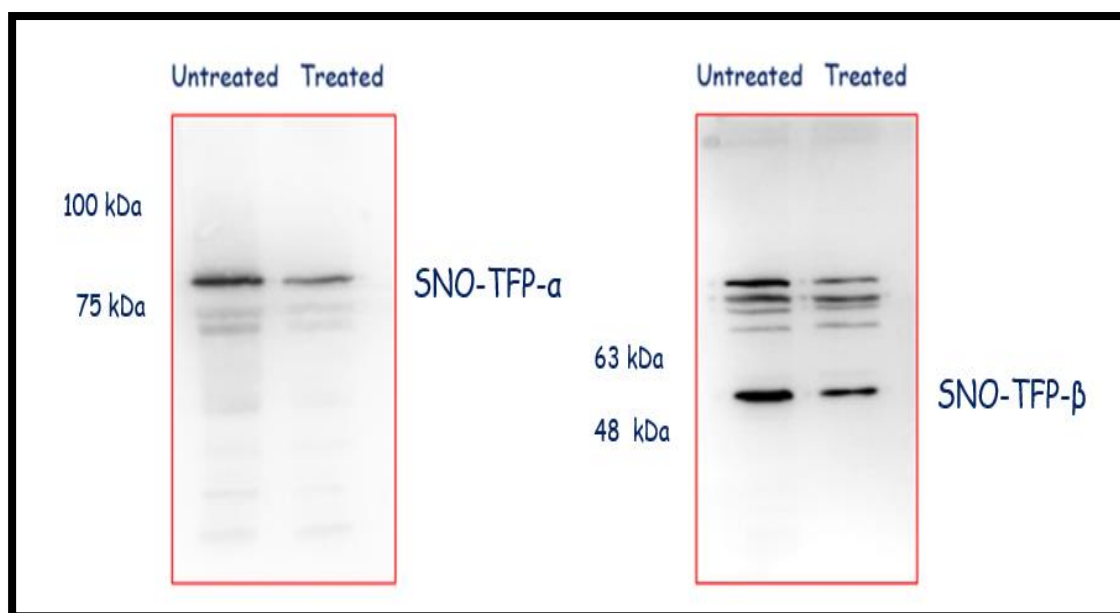




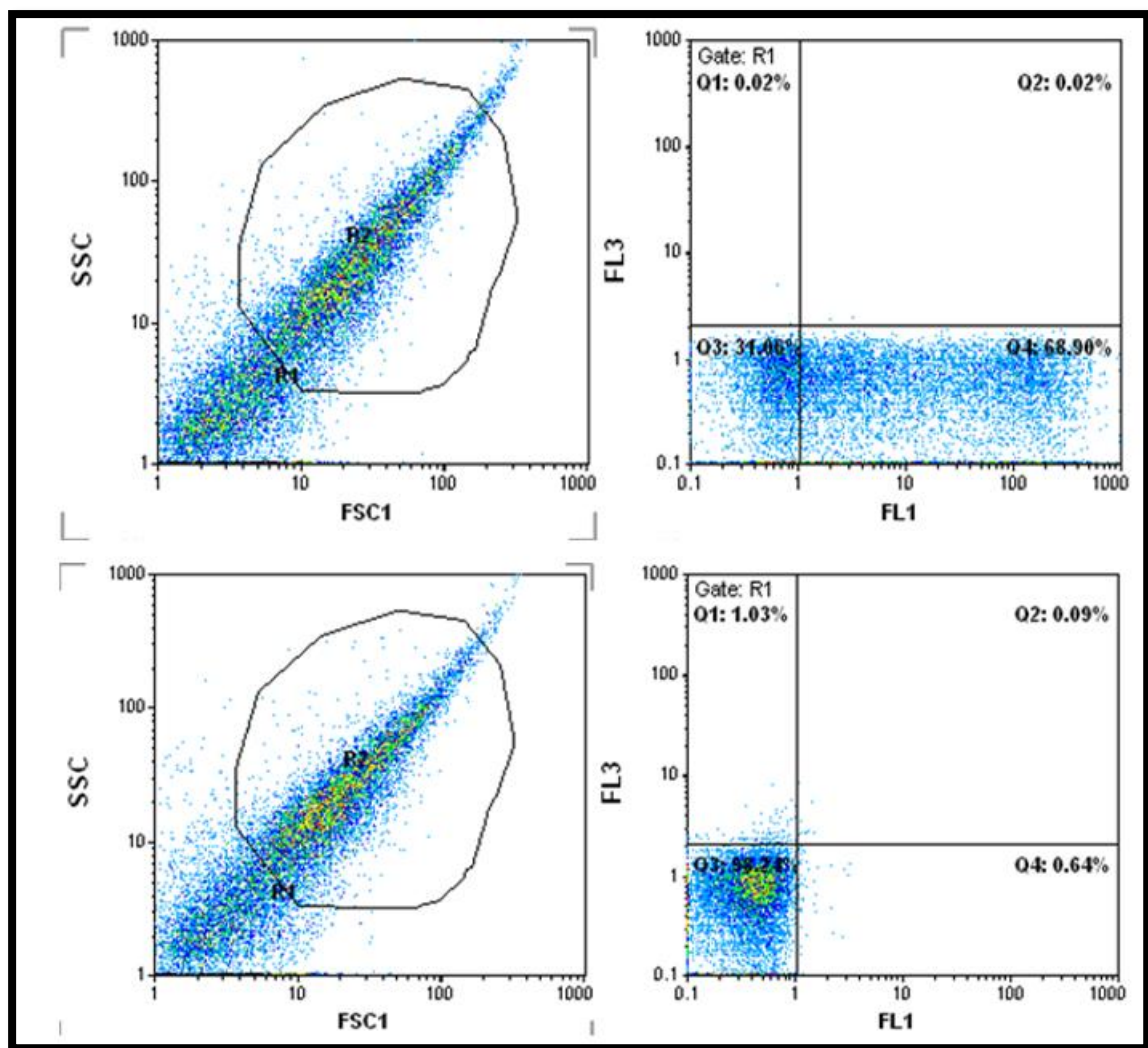
Εικόνα 34 (σελίδα 92): Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι των πρωτεϊνών TFP-α και TFP-β σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα H1 εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων και πλήρως διαφοροποιημένων καρδιομυοκυττάρων (CM).



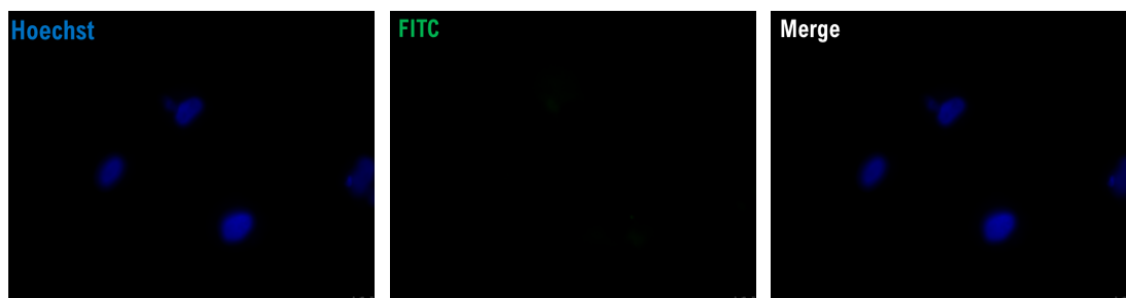
Εικόνα 35 (σελίδα 95): Ανοσοαποτύπωση κατά Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα καρδιομυοκυττάρων μετά από για χημικό εμπλουτισμό S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών (bound fractions). Η παρουσία μιας πρωτεΐνης στο bound fraction



Εικόνα 36 (σελίδα 96): Ανοσοαποτύπωση κατά Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα καρδιομυοκυττάρων μετά από για χημικό εμπλουτισμό S-νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών (bound fractions). Η παρουσία μιας πρωτεΐνης στο bound fraction υποδηλώνει την S-νιτροζυλίωση της. C= μάρτυρες, D= dobutamine



Εικόνα 37 (σελίδα 88) : Προσδιορισμός του ποσοστού των κυττάρων που εκφράζουν Troponin-T με χρήση κυτταρομετρία ροής. Καρδιοκύτταρα προετοιμάστηκαν για τον προσδιορισμό όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Στα αριστερά φαίνονται τα διαγράμματα που αντιστοιχούν στο μέγεθος (FSC1) και την κοκκίωση (SSC) των κυττάρων. Τα διαγράμματα στα δεξιά απεικονίζουν τον αριθμό των κυττάρων (κάθετος άξονας) σε συνάρτηση με την ένταση του φθορισμού (οριζόντιος άξονας). Τα διαγράμματα της πρώτης σειράς αντιστοιχούν σε κύτταρα που επώαστηκαν με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα. Τα διαγράμματα της κάτω σειράς αντιστοιχούν σε κύτταρα δεν επώαστηκαν με κάποιο αντίσωμα.



Εικόνα 38 (σελίδα 89): Ανίχνευση έκφρασης Troponin-T. Στο πείραμα αυτό εξετάστηκε η εξειδίκευση του πρωτογενούς αντισώματος έναντι της Troponin-T. Τα κύτταρα επώαστηκαν μόνο με το δευτερογενές αντίσωμα. Δεν παρατηρήθηκε φθορισμός στο φίλτρο του FITC παρά μόνο στο φίλτρο που αντιστοιχεί στην Hoechst.