



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**Πυρηνο-κυτταροπλασματική κυκλοφορία σε ασύμμετρα διαιρούμενα
βλαστικά κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος: πιθανός ρόλος
στην παθογένεση της λευχαιμίας**

ΚΑΡΑΚΑΪΔΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ-ΓΕΝΕΤΙΣΤΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**Πυρηνο-κυτταροπλασματική κυκλοφορία σε ασύμμετρα διαιρούμενα
βλαστικά κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος: πιθανός ρόλος
στην παθογένεση της λευχαιμίας**

ΚΑΡΑΚΑΪΔΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ-ΓΕΝΕΤΙΣΤΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Επιτροπή Ερευνών

Έργο

«ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ ΙΙ: Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας του ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ»¹

ΚΩΔΙΚΟΣ MIS: 346819

«Πυρνο-κυτταροπλασματική κυκλοφορία σε ασύμμετρα διαιρούμενα βλαστικά κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος: πιθανός ρόλος στην παθογένεση της λευχαιμίας»

Διδακτορική Διατριβή

¹ Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Ημερομηνία αίτησης του κ. Καρακαϊδού Παναγιώτη: 8-10-2010

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 700^α/21-12-2010

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Γεωργάτος Σπυρίδων, Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Φώτση Θεόδωρο, Καθηγητή Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μπριασούλη Ευάγγελο, Αναπληρωτή Καθηγητή Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 15-1-2011

«Πυρηνο –κυτταροπλασματική κυκλοφορία σε ασύμμετρα διαιρούμενα βλαστικά κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος: πιθανός ρόλος στην παθογένεση της λευχαιμίας»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 782^α/13-11-2015

Γεωργάτος Σπυρίδων	Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Μπριασούλης Ευάγγελος	Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Φώτσης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Παπαμαρκάκη Θωμαή	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Πολίτου Αναστασία	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Τζαβάρας Θεόδωρος	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Κούκλης Παναγιώτης	Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 2-6-2016

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

The universe is asymmetric and I am persuaded that life, as it is known to us, is a direct result of the asymmetry of the universe or of its indirect consequences. The universe is asymmetric.

Louis Pasteur

To raise new questions, new possibilities, to regard old problems from a new angle, requires creative imagination and marks real advance in science.

Albert Einstein

We especially need imagination in science. It is not all mathematics, nor all logic, but it is somewhat beauty and poetry.

Maria Mitchell

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Μια από τις δυο καλύτερες ταινίες μου είναι το «π» (το σύμβολο της μαθηματικής σταθεράς που ισούται με 3,14159265... και πάει λέγοντας) του 1998 που έγραψε και σκηνοθέτησε ο Darren Aronofsky. Σε κάποιο σημείο της ταινίας εκτυλίσσεται ο παρακάτω διάλογος μεταξύ του Μαξ (μαθηματικός, ερευνητής της θεωρίας των αριθμών - πρωταγωνιστής) και του Σολ (ηλικιωμένος μαθηματικός και μέντορας του Μαξ), όταν ο Μαξ έχει αρχίσει να... φλιπάρει και επισκέπτεται τον Σολ για την καθιερωμένη τους παρτίδα Γκο (ασιατικό επιτραπέζιο παιχνίδι στρατηγικής):

Sol: Have you met Archimedes?

You remember Archimedes of Syracuse? Eh?

The king asks Archimedes to determine if a present he has received is actually solid gold.

Unsolved problem at the time.

It tortures the great Greek mathematician for weeks. Insomnia haunts him and he twists and turns in his bed for nights on end. Finally, his equally exhausted wife, forced to share a bed with this genius, convinces him to take a bath, to relax. While he's entering the tub, he notices the bath water rise.

Displacement

- a way to determine volume, and thus a way to determine density. Weight over volume. And thus Archimedes solves the problem. He screams "Eureka!" and he is so overwhelmed, he runs naked through the streets to the king's palace to report his discovery.

Now, what is the moral of the story?

Max: That a breakthrough will come.

Sol: **Wrong! The point of the story is the wife. Listen to your wife, she'll give you perspective. Meaning, you need a break. You must take a bath or you'll get nowhere. There will be no order, only chaos. Go home, Max, and you take a bath.**

Όπως αντιλαμβάνεστε η ύπαρξη των σελίδων που ακολουθούν οφείλονται στη Γιούλη μου!!! Εγώ απλά περιορίζομαι στο περιεχόμενό τους.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενικής Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοϊατρικής Έρευνας (ITE-IMBB), κατά την χρονική περίοδο 2010-2016, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σπύρου Γεωργάτου. Η χρηματοδότηση για τη διεκπεραίωση της διατριβής προήλθε από το πρόγραμμα «ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ II: Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας του ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ» (MIS 346819).

Φανταστείτε ότι ακολούθησαν οι τυπικές ευχαριστίες προς διάφορους (μέλη, φορείς κλπ, αλλά όχι απαραίτητα ρηχές για όλους) και ας έρθουμε στις ουσιαστικές. Μέσα από αυτές τις γραμμές θα ήθελα πραγματικά να ευχαριστήσω του καθηγητή μου Σπύρο Γεωργάτο για δυο πράγματα. Τον ευχαριστώ που με δέχτηκε στην ομάδα του, παρά το ιστορικό μου, και κυρίως που μου χάρισε απλόχερα αυτονομία. Με εμπιστεύθηκε από την πρώτη στιγμή και μου παραχώρησε απόλυτη ελευθερία κινήσεων σε ότι αφορά τον πειραματικό σχεδιασμό και εκτέλεση πιλοτικών πειραμάτων, για την ικανοποίηση των προσωπικών μου επιστημονικών εμμονών, κατά την προσπάθεια διερεύνησης ενός δισεπίλυτου παζλ που προέκυψε -σχεδόν- με την έναρξη της διατριβής μου. Έτσι, ανεξάρτητα από το αποτέλεσμα, μου δόθηκε η δυνατότητα να κάνω απόλυτα αυτό που αγαπάω, τον «μικρό επιστημονάκο» (αυτό είναι μια άλλη ιστορία...). Δηλαδή, να διαβάζω, να σκέφτομαι, να υποθέτω, να σχεδιάζω και να δοκιμάζω πειραματικά τις ιδέες μου.

Ο δεύτερος λόγος για τον οποίο θα ήθελα να τον ευχαριστήσω είναι ίσως απόρροια του πρώτου. Μπορεί να μου έδωσε χώρο να «παίζω» αλλά στάθηκε κριτικός απέναντί μου. Κρατούσε πάντα ψηλά τον πήχη και με ανάγκαζε να εξετάζω ακόμα πιο βαθιά τις ιδέες μου πριν του τις ανακοινώσω. Δεν κρύβω ότι μου έσπαγε τα νεύρα ώρες ώρες που ήταν τόσο σχολαστικός και επικριτικός αλλά πραγματικά με βοήθησε. Διάβασα τα διπλάσια απ' ότι θα διάβαζα μόνος μου και -τυχαία; δε νομίζω- επέκτεινα τις γνώσεις μου σε πεδία και έννοιες που δεν φανταζόμουν ότι υπάρχουν ή ότι μπορούν να σχετισθούν με τη βιολογία των βλαστικών κυττάρων (ενδεικτικά αναφέρω mechanotransduction, cell sorting, primary cilia, auxeticity, tension/elasticity, systems biology, self-organization κ.ά.).

Στις μη τυπικές ευχαριστίες δεν θα μπορούσα να μην αναφέρω ονομαστικά (με (φθίνουσα;) ηλικιακή σειρά) στις Ελευθερίες, το Γιάννη και τη Νατάσα. Νοιώθω άβολα που πρέπει να φανεί ότι με το παρόν λέω ευχαριστώ σε κάποιον για το ότι τον νοιώθω φίλο. Δεν ευχαριστείς το φίλο σου, απλά νοιώθεις τη φιλία. Από την άλλη θέλω να τους αναγνωρίσω και κοινοποιήσω την ευγνωμοσύνη που νοιώθω για αυτά τα αμφίδρομα συναισθήματα. Τι να τους ευχαριστήσω; Για τη βοήθεια στο εργαστήριο που μου παρείχαν

πριν καν το ζητήσω; Που τους ζάλιζα με τις θεωρίες μου αλλά και την γκρίνια μου (δεν θα σας λείψει ρε;;;), ή που μου στάθηκαν όλα αυτά τα χρόνια (εμπράκτως) στα μη εργαστηριακά, αλλά ουσιαστικά θέματα της πραγματικής ζωής; Ελπίζω να μπορούσα να το γράψω καλύτερα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθ. Μπριασούλη Ευάγγελο για την άψογη συνεργασία συμπεριλαμβανομένης και της παροχής βιοπτικού υλικού. Ακόμα, τη Βιολέτα για την άψογη συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια, τα υπόλοιπα μέλη της ομάδας και φυσικά τον Βαγγέλη (Κωλέττα) για το tip, την επιμονή και την εμπιστοσύνη του. Πολύ ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον συνονόμάτό μου Παναγιώτη (Κούκλη) για την άμεση ανταπόκριση, την πάντοτε φιλική διάθεση και το ενδιαφέρον για επιστημονικές συζητήσεις, απαντήσεις και συμβουλές. Επιπρόσθετα, θα ήμουν αχάριστος εάν δεν αναγνώριζα τη συμβολή όλων των εργαστηρίων (καθηγητών αλλά και συναδέλφων) του Ινστιτούτου για την διαχρονική καλοπροαίρετη διάθεση στο πρόσωπό μου, τις συμβουλές τους, την ανταλλαγή υλικών/αναλωσίμων, tips, βιβλιογραφίας, αποτελεσμάτων... Επιπλέον, όλους όσους κάναμε απλή ή επιστημονικά επικοινωνιακή παρέα στο κιόσκι!!!

Last but not least, που λένε και αγγλιστί, δεν θα κατάφερα να γράψω αυτές τις γραμμές αν δεν είχα την αμέριστη υποστήριξη κάποιων ανθρώπων εκτός του χώρου όπως οι γονείς μου, η αδερφή μου, τα πεθερικά μου, ο μπάτζ και κάποιοι φίλοι.

Πριν ολοκληρώσω την ενότητα αυτή θα ήθελα μαζί με τα άλλα να ζητήσω από την οικογένειά μου και κυρίως τα παιδάκια μου να με συγχωρέσουν που τα έκανα να νοιώθουν ότι ο μπαμπάς λείπει όλη την ώρα. Που η Μπιανκούλα μου είπε χίλιες φορές «πάλι πανεπιστήμιο;» και ο Γιωργάκης μου «δε θα φύγεις ποτέ μπαμπά» κάθε φορά που γυρνούσα καθυστερημένα σπίτι. Ελπίζω μεγαλώνοντας να καταλάβουν το γιατί και να αξιζε. Θα δείξει. Όχι. Για σας θα το κάνω να αξίζει!

Τέλος, κλείνοντας τον κύκλο, γυρίζω πάλι στην αρχή,

Γιούλη μου, ευχαριστώ για όλα.

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	1
Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή.....	8
Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση.....	9
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά της ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης.....	9
1.2 Πρότυπα ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης	12
1.2.1 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση του ζυγωτού στον σκώλικα <i>C. elegans</i>	14
1.2.2 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση της νευροβλάστης της <i>Drosophila</i>	17
1.2.3 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση των αρσενικών γαμετικών ΒΚ της <i>Drosophila</i>	20
1.2.4 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση των εμβρυονικών νευρικών ΒΚ του ποντικού	22
1.2.5 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση των κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος	25
1.3 Ενδογενείς ασυμμετρίες	27
1.4 Ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση και νεοπλασία	30
1.5 Ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση και εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα.....	32
1.6 Σκοπός	34
Κεφάλαιο 2 Υλικά και Μέθοδοι.....	35
2.1 Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων	36
2.1.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών	36
2.1.2 Καλλιέργεια νωπών δειγμάτων ασθενών με λευχαιμία	37
2.1.3 Διαφοροποίηση ΒΚ.....	37
2.1.3.1 Διαφοροποίηση σε δυο διαστάσεις (2D).....	37
2.1.3.2 Διαφοροποίηση σε τρεις διαστάσεις (3D)	37
2.1.4 Διαμόλυνση ΕΒΚ μέσω ηλεκτροδιαπίδησης	38
2.2 Μέθοδοι γενετικής μηχανικής	39
2.2.1 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων	39
2.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες	39
2.2.2.1 Μικρής κλίμακας καλλιέργειες	39
2.2.2.2 Μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες.....	40
2.2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης.....	40
2.2.4 Απομόνωση DNA από πηκτή αгарόζης	40
2.2.5 Πέψη πλασμιδίων με ένζυμα περιορισμού	40

2.2.6 Συρραφή ενθέματος με το φορέα (ligation)	40
2.3 Μορφολογικές μέθοδοι	41
2.3.1 Επίστρωση κυτταρικών εναιωρημάτων σε γυάλινες επιφάνειες για ανάλυση με έμμεσο ανοσοφθορισμό (διαδικασίες alcian blue, φυγοκέντρησης και cytospin)	41
2.3.2 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κύτταρα επιστρωμένα σε γυάλινες επιφάνειες...	42
2.3.3 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε EB	43
2.3.4 Καταγραφή κυτταρικών διαιρέσεων σε πραγματικό χρόνο	44
2.3.4.1 Παρακολούθηση (βιντεοσκόπηση) κυτταρικών διαιρέσεων σε πραγματικό χρόνο στο φάσμα του ορατού.	44
2.3.4.2 Βιντεοσκόπηση κυτταρικών διαιρέσεων EBK διαμολυσμένων με Centrin-1-GFP και H2B-mCherry	44
2.3.4.3 Ανάλυση βιντεοσκοπήσεων της ενότητας 2.3.4.2	45
Κεφάλαιο 3 Αποτελέσματα.....	46
3.1 Διερεύνηση παρουσίας ΑΚΔ σε λευχαιμικό περιβάλλον.....	47
3.1.1 Το πρότυπο των κυττάρων HL60.....	47
3.1.2 Το πρότυπο των κυττάρων Jurkat	53
3.1.3 Ανάλυση νωπών δειγμάτων από λευχαιμικούς ασθενείς	54
3.2 Διερεύνηση παρουσίας ΑΚΔ σε EBK ποντικού.....	55
3.2.1 Μορφολογικές παρατηρήσεις στις δισδιάστατες καλλιέργειες αδιαφοροποίητων και διαφοροποιούμενων EBK τύπου E14.....	56
3.2.2 Μελέτη κλασικών δεικτών ΑΚΔ σε διαφοροποιήσεις EBK τύπου E14	61
3.2.3 Μελέτη κατανομής δεικτών πολυδυναμίας και ιστοειδικών μεταγραφικών παραγόντων σε θυγατρικά κύτταρα διαφοροποιούμενων EBK τύπου E14	63
3.2.4 Μελέτη παρουσίας ΑΚΔ στη διαφοροποίηση των κυττάρων TNGA προς νευροεξώδερμα.....	65
3.2.5 Μελέτη κατανομής των νουκλεοπορινών της οικογένειας Nup84/Nup107 σε θυγατρικά κύτταρα διαφοροποιούμενων EBK τύπου E14	66
3.2.6 Μελέτη κατανομής της φωσφορυλιωμένης ιστόνης H3 στη Θρεονίνη 3 σε θυγατρικά κύτταρα διαφοροποιούμενων EBK τύπου E14	68
3.2.7 Μελέτη ανάκτησης διαφορετικής κυτταρικής τύχης μέσω της ετερόχρονης ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού Shh	69
3.2.7.1 Μελέτη σχηματισμού ΠΒ στα EBK και χαρακτηρισμός.....	69
3.2.7.2 Μελέτη της ετερόχρονης ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού Shh στα διαφοροποιούμενα EBK	72
3.2.7.3 Επικουρικά πειράματα στα πλαίσια της ενότητας 3.2.7	74
3.2.8 Διερεύνηση της παρουσίας NRTS στη διαφοροποίηση EBK.....	76

3.2.8.1. Μελέτη του NRTS μέσω της κατανομής του BrdU σε διαφοροποιημένα θυγατρικά EBK.....	77
3.2.8.2 Μελέτη της κατανομής του μεταγραφικού παράγοντα Brachyury σε διαφοροποιημένα θυγατρικά κύτταρα.....	80
3.2.8.3 Μελέτη του πρότυπου εντοπισμού του PCNA σε διαφοροποιημένα θυγατρικά κύτταρα	82
3.2.8.4 Μελέτη της κατανομής του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 σε διαφοροποιημένα θυγατρικά κύτταρα.....	85
3.2.8.5 Μελέτη της παρουσίας πληθυσμού συντηρημένης σήμανσης (label retaining population-LRC) κατά τη διαφοροποίηση.....	86
3.2.8.6 Μελέτη κατανομής των νουκλεοπορινών της οικογένειας Nup84/Nup107 σε διαφοροποιημένα θυγατρικά κύτταρα.....	90
3.2.8.7 Μελέτη της κατανομής του Nanog σε τροποποίηση του πρωτοκόλλου διαφοροποίησης	92
3.2.9 Διερεύνηση της συμβολής του κυτταρικού διαχωρισμού (cell sorting) στις διαφοροποιήσεις EBK	94
3.2.9.1 Μελέτη του κυτταρικού διαχωρισμού κατά το σχηματισμό των EB	95
3.2.9.2 Μελέτη του κυτταρικού διαχωρισμού κατά τη διαφοροποίηση των EB	99
3.2.9.3.Μελέτη του κυτταρικού διαχωρισμού στην αδιαφοροποίητη κατάσταση.....	106
3.2.10 Διερεύνηση του πρωτοκόλλου έκπτυξης EBK των Bedzhov & Zernika-Goetz.....	109
Κεφάλαιο 4 Συζήτηση.....	113
4.1 Η ΑΚΔ σε in vitro καλλιέργειες λευχαιμικών κυτταρικών σειρών και νωπά δείγματα ασθενών.	114
4.2 Η ΑΚΔ στα πρώτα στάδια διαφοροποίησης EBK ποντικού.....	115
4.3 Η υπόθεση της ανάκτησης διαφορετικής κυτταρικής τύχης μέσω της ετερόχρονης ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού Shh από τις ΠΒ διαφοροποιούμενων EBK	118
4.4 Τα EBK διαφοροποιούνται σε τρεις διαστάσεις απουσία NRTS.....	123
4.5 Η υπόθεση της συμβολής του κυτταρικού διαχωρισμού στις διαφοροποιήσεις των EBK	127
4.6 Η έκπτυξη εγκιβωτισμένων EBK σε τρισδιάστατο εξωκυττάριο πλέγμα συνοδεύεται από ΑΚΔ	129
4.7 Ανάδειξη πρότυπων δεικτών πολυδυναμίας.....	131
Κεφάλαιο 5 Συμπεράσματα.....	134
Συμπεράσματα	135
Κεφάλαιο 6 Περίληψη.....	136

6.1 Περίληψη.....	137
6.2 Abstract	139
Κεφάλαιο 7 Βιβλιογραφία.....	141
Λίστα βιβλιογραφικών αναφορών:.....	142

Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή

Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση

Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με τη διαδικασία της μίτωσης, της μείωσης ή της σχάσης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι κυτταρικές αυτές διαιρέσεις καταλήγουν στερεότυπα στον σχηματισμό δυο θυγατρικών κυττάρων στα οποία έχει ισοκατανεμηθεί το γενομικό, πρωτεϊνικό και οργανιδιακό υλικό (συμμετρικές διαιρέσεις). Τα παραγόμενα θυγατρικά κύτταρα είναι κατά κανόνα ισοδύναμα τόσο μεταξύ τους όσο και με το μητρικό κύτταρο. Ωστόσο, ακόμα και σε αυτές τις συμμετρικές διαιρέσεις παρατηρούνται κάποιες ασύμμετρες κατανομές οργανιδίων (ενδογενείς ασυμμετρίες), οι οποίες, όμως, δεν αναιρούν την ισοδυναμία των δυο θυγατρικών κυττάρων. Παρ' όλα αυτά, υπάρχει μια αξιοσημείωτη εξαίρεση στον παραπάνω γενικό κανόνα: η περίπτωση της *ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης* (ΑΚΔ – asymmetric cell division).

Ως ασύμμετρη χαρακτηρίζεται η διαίρεση κατά την οποία προκύπτουν δυο ανόμοια θυγατρικά κύτταρα με διακριτή κυτταρική τύχη ή μέγεθος. Κάτι τέτοιο επιτυγχάνεται με την ασύμμετρη κατανομή μορίων (κυρίως καθοριστικών παραγόντων που ρυθμίζουν την κυτταρική τύχη (ΚΚΤ) – cell fate determinants) ή/και οργανιδίων αποκλειστικά στο ένα εκ των θυγατρικών κυττάρων, αφού έχουν προηγηθεί η πόλωση του μητρικού κυττάρου και η αντίστοιχη στοίχιση της μιτωτικής ατράκτου. Αυτός ο τύπος διαίρεσης εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην περίπτωση των βλαστικών κυττάρων (ΒΚ), διότι εξασφαλίζει ταυτόχρονα τη διατήρηση του πληθυσμού τους (το ένα θυγατρικό κύτταρο παραμένει όμοιο με το μητρικό δηλ. βλαστικό) και τη δημιουργία νέων κυτταρικών τύπων (από τους απογόνους του θυγατρικού κυττάρου που διαφοροποιείται). Επιπλέον, από τη σκοπιά της αναπτυξιακής βιολογίας, η συμβολή της ΑΚΔ ως μηχανισμού έχει ιδιαίτερη σημασία εφόσον θα μπορούσε να συνεισφέρει καταλυτικά στην ελεγχόμενη δημιουργία ποικιλίας κυτταρικών τύπων ξεκινώντας μόνο από ένα, το γονιμοποιημένο ωάριο (ζυγωτό).

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά της ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης

Ο όρος ΑΚΔ εισήχθη στη διεθνή βιβλιογραφία από τους Horvitz και Herskowitz το 1992 για να χαρακτηρίσει τις διαιρέσεις από τις οποίες προκύπτουν δυο αδελφά κύτταρα με διαφορετικές κυτταρικές τύχες⁽¹⁾. Ωστόσο, οι πρώτες παρατηρήσεις ΑΚΔ καταγράφονται περίπου έναν αιώνα νωρίτερα, στις χειρόγραφες απεικονίσεις μειωτικών διαιρέσεων ωαρίων του ποταμίσιου μυδιού *Unio* (το 1901)⁽²⁾. Ως διαδικασία, η ΑΚΔ χαρακτηρίστηκε το

1905 από τον Conklin, ο οποίος παρατήρησε πως έμβρυα ασκιδίου (*Ascidacea*) διαιρούνται με τέτοιο τρόπο, ώστε μια χαρακτηριστική κιτρινωπή κυτταροπλασματική περιοχή να κληρονομείται αποκλειστικά από τα κύτταρα που θα διαφοροποιηθούν σε μυϊκά⁽³⁾. Σε λειτουργικό και μοριακό όμως επίπεδο, ο πρώτος χαρακτηρισμός ασύμμετρα διαχωριζόμενου ΚΚΤ, της πρωτεΐνης Numb, ήρθε πολύ αργότερα (το 1994) σε μελέτες των κυττάρων SOP της *Drosophila*⁽⁴⁾, ενώ λίγο νωρίτερα, οι πρώτοι βασικοί παράγοντες κυτταρικής πόλωσης προήλθαν από την ανάλυση μεταλλάξεων στο γονιδίομα του *C. elegans*, όπου ταυτοποιήθηκε η δράση των Paf πρωτεϊνών (το 1988)⁽⁵⁾. Έκτοτε, οι ΑΚΔ έχουν μελετηθεί εκτενώς στα πλαίσια της αναπτυξιακής βιολογίας και της βιολογίας των ΒΚ. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ΑΚΔ δεν περιορίζεται στα ΒΚ, τους πολυκύτταρους οργανισμούς ή τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Στην πραγματικότητα, ΑΚΔ χρησιμοποιούν επίσης πολλά βακτήρια, μύκητες αλλά και μια πλειάδα μη βλαστικών κυττάρων κατά την εμβρυογένεση (π.χ. τα κύτταρα SOP της *Drosophila*) και την ενήλικη ζωή πολυκύτταρων οργανισμών (π.χ. τα παρθένα κύτταρα T του αιμοποιητικού).

Από τη σκοπιά της εξέλιξης, οι ΑΚΔ μπορεί να εμφανίζονται σε μεγάλο εύρος ειδών και κυτταρικών τύπων, αλλά από κύτταρο σε κύτταρο εξυπηρετούνται διαφορετικές λειτουργίες. Για παράδειγμα, κατά την εμβρυογένεση στη *Drosophila*, με ΑΚΔ μπορεί να προκύψουν δυο θυγατρικά κύτταρα όπου: (α) το ένα θα παραμείνει όμοιο με το μητρικό ενώ το άλλο θα διαφοροποιηθεί (η περίπτωση της νευροβλάστης ή των γαμετικών κυττάρων), (β) και τα δύο θα είναι διαφορετικά μεταξύ τους αλλά και από το μητρικό (η περίπτωση του κυττάρου SOP ή του pIIa) και (γ) το ένα θα διαφοροποιηθεί και το άλλο θα αποβιώσει μέσω απόπτωσης (η περίπτωση του γλοιακού κυττάρου που προκύπτει από την ΑΚΔ του κυττάρου pIIb). Παρεμπιπτόντως, από τον ορισμό και μόνο της ΑΚΔ, η δημιουργία δυο διακριτών απογόνων ως αποκλειστικό προϊόν μιας κυτταρικής διαίρεσης φαίνεται ότι χρησιμοποιείται στη φύση ποικιλοτρόπως, με σημαντικότερη διαφορά εκείνη μεταξύ μονοκύτταρων και πολυκύτταρων οργανισμών. Στους πρώτους, για παράδειγμα, ανήκει ο σακχαρομύκητας *S. cerevisiae* που διαιρείται ασύμμετρα μέσω εκβλάστησης.

Η ΑΚΔ εξυπηρετεί τη δημιουργία ενός θυγατρικού κυττάρου με ανανεωμένο αναπτυξιακό δυναμικό σε σχέση με το μητρικό, που «θυσιάζεται» κληρονομώντας όλα σχεδόν τα μόρια εξωχρωμοσωμικών rDNA, παλαιούς πυρηνικούς πόρους, φθαρμένες πρωτεΐνες κ.ά.. Από την άλλη, στους πολυκύτταρους οργανισμούς οι ΑΚΔ των ΒΚ συνεισφέρουν στην οργανογένεση και τη διατήρηση της ομοιόστασης κατά την εμβρυογένεση και την ενήλικη ζωή, αντίστοιχα.

Έχουν διαπιστωθεί δύο τύποι ΑΚΔ (ενδογενής – εξωγενής, intrinsic - extrinsic), ενώ η ΑΚΔ ως διαδικασία χωρίζεται σε τρεις αλληλοσυνδεδεμένες φάσεις: κυτταρική πόλωση, αντίστοιχη στοίχιση της ατράκτου και ασύμμετρο διαχωρισμό ΚΚΤ και, σε κάποιες περιπτώσεις, του DNA⁽⁶⁻⁸⁾. Ο ενδογενής μηχανισμός δημιουργεί διαφορετικά θυγατρικά κύτταρα έπειτα από τον ασύμμετρο διαχωρισμό των ΚΚΤ. Ο εξωγενής μηχανισμός δημιουργεί θυγατρικά κύτταρα τα οποία «βλέπουν» σε διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα, και κατά συνέπεια εκτίθενται σε διαφορετικούς παράγοντες και ακολουθούν διαφορετική αναπτυξιακή πορεία. Και στις δυο πάντως περιπτώσεις το μητρικό κύτταρο εμφανίζει πόλωση, μόνο που στη δεύτερη περίπτωση είναι προκαθορισμένη από τα κύτταρα του «θώκου» και η άτρακτος στοιχίζεται αναλόγως ώστε να προκύψει ο ασύμμετρος καταμερισμός των ΚΚΤ στα δυο θυγατρικά κύτταρα.

Ανεξάρτητα από τον τύπο της διαίρεσης (συμμετρικής ή ασύμμετρης) τα θυγατρικά κύτταρα που θα προκύψουν, παραλαμβάνουν στο ακέραιο το μισό από το γενομικό υλικό που διπλασιάστηκε στην προηγούμενη S φάση. Ιδιαίτερο όμως ενδιαφέρον εμφανίζουν πρόσφατες σχετικά μελέτες, σύμφωνα με τις οποίες το εκμαγείο DNA κάποιων ενήλικων ΒΚ διαχωρίζεται επιλεκτικά στο ένα εκ των δυο θυγατρικών κυττάρων^(9,10). Παρόμοιο επιλεκτικό διαχωρισμό φαίνεται να ακολουθούν και τα κεντρόσωματα (μητρικό και θυγατρικό) σε ορισμένους τύπους ασύμμετρα διαιρούμενων κυττάρων^(11,12). Επιπλέον, με το τέλος της κυτταροκίνησης μόνο το ένα εκ των δυο θυγατρικών κυττάρων, συνήθως αυτό που θα παραμείνει βλαστικό, θα κληρονομήσει επιλεκτικά το υπολειπόμενο μεσόσωμα (ΥΜ)⁽¹³⁾. Και στις τρεις παραπάνω περιπτώσεις (πρότυπο DNA, μητρικό κεντρόσωμα και ΥΜ) η βιολογική σημασία της επιλεκτικής κατανομής δεν έχει εξακριβωθεί.

Επιπλέον των καταγεγραμμένων ασυμμετριών που χαρακτηρίστηκαν σε μελέτες κλασικών προτύπων ΑΚΔ, η όλη διαδικασία περιπλέκεται από παρατηρήσεις που δείχνουν πως όλες ανεξαιρέτως οι διαιρέσεις έχουν έναν βαθμό ενδογενούς ασυμμετρίας⁽¹⁴⁾. Εκτός των παραδειγμάτων του μητρικού κεντροσώματος και του ΥΜ που προαναφέρθηκαν (ισχύει για όλες τις διαιρέσεις), ασυμμετρία εμφανίζεται και στις κατανομές αρκετών μορίων και δομών^(15,16). Σε αυτές τις κατηγορίες ανήκουν κυρίως πρωτεΐνες που οδεύουν προς αποικοδόμηση και πρωτεϊνικά συσσωματώματα (aggregates) τα οποία σχετίζονται άμεσα με τα κεντροσώματα (εντοπίζονται στο περικεντροσωμικό υλικό του μητρικού κεντροσώματος και κληρονομούνται μαζί του στο ένα θυγατρικό κύτταρο).

Από τις κλασσικές αλλά και τις λιγότερο κατανοητές ενδογενείς ασυμμετρίες που παρατηρούνται, προκύπτουν ουσιαστικές λειτουργικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων και εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην περίπτωση των ΒΚ. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι οι περισσότερες από αυτές, π.χ. η κληρονόμηση του μητρικού κεντροσώματος ή του ΥΜ, μπορεί μεν να έχουν μελετηθεί σε συμβατικά κυτταρικά συστήματα, αλλά δεν έχουν επαρκώς διερευνηθεί στα ΒΚ. Σε ό,τι αφορά αυτό το ερώτημα πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν δυο βασικές συνθήκες. Η πρώτη αφορά σε αυτή καθεαυτή την βιολογία των ΒΚ και η δεύτερη τη σχέση της βλαστικής κατάστασης με τις νεοπλασίες. Υπενθυμίζεται ότι τόσο οι αλλαγές στο λόγο συμμετρικές/κλασσικές ασύμμετρες διαιρέσεις που πραγματοποιούν in vivo τα ΒΚ όσο και ενδογενείς ασυμμετρίες (λ.χ. ΥΜ) επηρεάζουν τόσο τη διαφοροποίηση των ΒΚ όσο και την καρκινογένεση ή την εξέλιξη των νεοπλασιών⁽¹⁶⁾.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα νεοπλασίας που έχει βρεθεί να επηρεάζεται από τις ΑΚΔ είναι η λευχαιμία (σχολιάζεται συνοπτικά στο⁽¹⁷⁾). Έχει δειχθεί ότι μια μεταλλαγμένη πρωτεΐνη, η ογκοπρωτεΐνη NUP98-HOX9A, που ενοχοποιείται για την παθογένεση της λευχαιμίας, επιδρά καθοριστικά στο εάν τα κύτταρα θα διαιρεθούν με ΑΚΔ ή όχι⁽¹⁸⁾. Η επίδραση της μεταλλαγμένης νουκλεοπορίνης (που φυσιολογικά συμβάλλει στη σύσταση των πυρηνικών πόρων και κατά συνέπεια στην πυρηνο-κυτταροπλασματική επικοινωνία) στη συχνότητα των ΑΚΔ και την λευχαιμία, αναδεικνύει μια νέα παράμετρο που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

1.2 Πρότυπα ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης

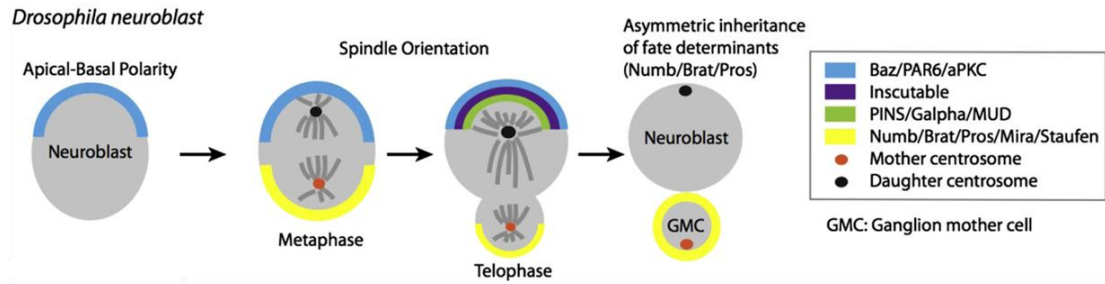
Όπως εξηγήθηκε παραπάνω, η ΑΚΔ μπορεί να εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και να μελετάται σε μεγαλύτερο βαθμό κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ζωής, αλλά δεν αποτελεί συστατική ιδιότητα των ΒΚ στους πολυκύτταρους οργανισμούς ή τους μονοκύτταρους ευκαρυώτες. Με ΑΚΔ διαιρούνται βακτήρια μύκητες αλλά και πολλά μη ΒΚ πολυκύτταρων οργανισμών τόσο κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης όσο και της ενήλικης ζωής. Το μεγάλο αυτό εύρος κυτταρικών τύπων που διαιρούνται με ασύμμετρο τρόπο υποδηλώνει την, προφανώς μη τυχαία, διατήρηση του συγκεκριμένου μηχανισμού κυτταρικής διαίρεσης από εξελικτική άποψη. Πράγματι, τα περισσότερα βασικά μόρια που συνεισφέρουν σε μια ΑΚΔ είναι εξελικτικώς συντηρημένα (για ονοματολογία μεταξύ των μοντέλων οργανισμών βλέπε Πίνακα 1). Επιπλέον, σε μηχανιστικό επίπεδο ακολουθείται μια παρόμοια αλληλουχία γεγονότων που εξελίσσονται σε τρία στάδια: (α) εγκαθίδρυση

κορυφο-βασικής πολικότητας, (β) αντίστοιχη στοίχιση της μιτωτικής ατράκτου και (γ) ασύμμετρη κατανομή ΚΚΤ (Εικόνα 1.1)⁽⁶⁻⁸⁾.

Ονοματολογία βασικών συντελεστών ΑΚΔ στα σημαντικότερα μοντέλα/οργανισμούς που συζητούνται στην παρούσα διατριβή				
	C. elegans	Δροσόφιλα	Θηλαστικά	Αλληλεπιδρούν με
Par-3	PAR-3	Bazooka (Baz)	Par-3	Par-6, aPKC, Insc
Par-6	PAR-6	DmPar-6	Par-6	Cdc42, Par3, aPKC, Lgl
aPKC	PKC-3	DaPKC	aPKC, aPKCζ aPKCξ	Par3, Par-6, Lgl
Inscutable	–	Insc	mInsc	Par-3, Pins
NuMA	LIN-5	Mud	NuMA	Pins, Tubulin, σύμπλοκο δινεΐνης-δινακτίνης
Γα ή Γα _i	GOA-1 GPA-16	Γα _i	Γα _i 1, Γα _i 2, Γα _i 3	Pins
Pins	GPR1/2	Pins	mPins, LGN, GPSM2	Insc, NuMA, Γα _i , Aurora A, aPKC, Dlg

Πίνακας 1.1 Παράθεση της ονοματολογίας ομόλογων πρωτεϊνών που σχετίζονται με τις ΑΚΔ στα τρία βασικότερα μοντέλα/οργανισμούς ΑΚΔ.

Το πρώτο στάδιο αρχίζει κατά τη μεσόφαση, ώστε όταν το κύτταρο εισέλθει στη μίτωση να είναι ήδη πολωμένο. Η κορυφο-βασική πολικότητα εξασφαλίζεται με τη συσσώρευση του τριμερούς συμπλόκου PAR (Par-3/ Par-6/ aPKC) και στη συνέχεια των πρωτεϊνών Pins/ Γα_i/ NuMA, που συνδέονται μεταξύ τους μέσω της πρωτεΐνης προσαρμογέα (adapter) Inscutable (Insc), αποκλειστικά στη μια μεριά της πλασματικής μεμβράνης. Στην απέναντι πλευρά συγκεντρώνονται κατά τη διάρκεια της μίτωσης (προμετάφαση/ μετάφαση) οι ΚΚΤ, όπως το Numb, που διαφέρουν ανάλογα με το τύπο κύτταρου. Το δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται στη μετάφαση όπου με σχετικά κυτταροειδικό τρόπο οι αστρικοί μικροσωληνίσκοι (-AM, astral microtubules) συνδέονται με την πλασματική μεμβράνη και τα εκεί στοιχεία πολικότητας (κορυφαία ή βασικά). Η ασυμμετρία των στοιχείων πολικότητας μεταφράζεται σε διαφορετικής ισχύος ελκτικές δυνάμεις με αποτέλεσμα τη μη συμμετρική διάταξη. Με την ολοκλήρωση της μίτωσης ο συσταλτός δακτύλιος που σχηματίζεται στην περιοχή του μεταφασικού δίσκου (metaphase plate) θα διαχωρίσει το μητρικό κύτταρο σε δυο θυγατρικά, από τα οποία το ένα θα κληρονομήσει την κορυφαία και το άλλο τη βασική μεμβράνη μαζί με τα στοιχεία που συνδέονται σε κάθε περιοχή.



Εικόνα 1.1 Αντιπροσωπευτικό σχεδιάγραμμα μιας ΑΚΔ (της νευροβλάστης της *Drosophila*) όπου γίνονται διακριτά τα τρία βασικά στάδια: κυτταρική πόλωση, στοίχιση της ατράκτου και ασύμμετρης κατανομής ΚΚΤ (βλέπε κείμενο). Προσαρμοσμένη αναπαράγωγή εικόνας από ⁽⁸⁾.

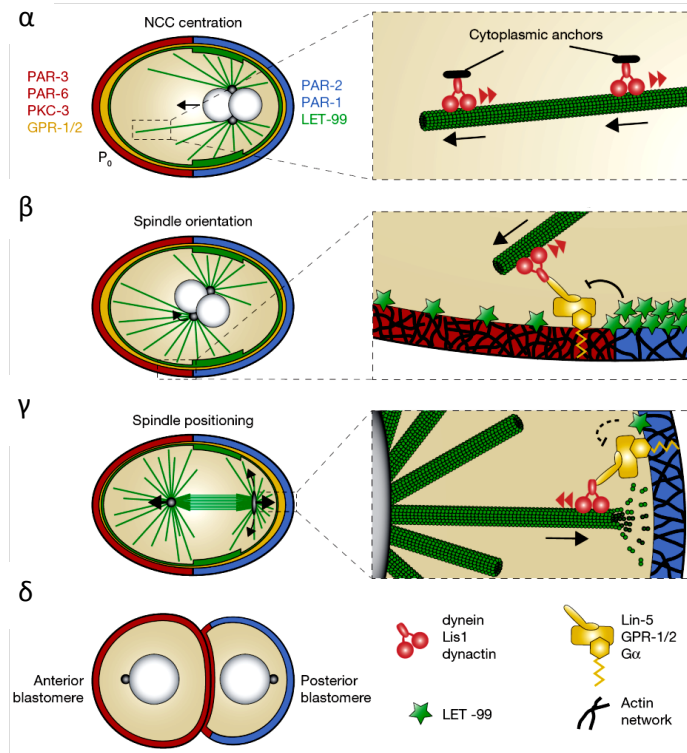
Ανεξάρτητα από τον τύπο του κυττάρου που διαιρείται ασύμμετρα τα παραπάνω βήματα ακολουθούνται απαρέγκλιτα^(6,8). Το τελικό αποτέλεσμα, δηλαδή η δημιουργία δυο διακριτών απογόνων, επιτυγχάνεται σε όλες τις περιπτώσεις, ανεξάρτητα από τον ειδικό μηχανισμό της ΑΚΔ. Το μητρικό κύτταρο που θα διαιρεθεί ασύμμετρα μέσω του εξωγενούς μηχανισμού βρίσκεται σε επαφή με ένα ιδιάζον περιβάλλον (κύτταρα, εξωκυττάριο πλέγμα, σηματοδοτικά μηνύματα), το οποίο ονομάζεται θώκος. Μέσω του θώκου τα μητρικά κύτταρα διατηρούν την ομοιόστασή τους και τυχόν μετανάστευσή τους από το θώκο ισοδυναμεί με αλλοίωση των χαρακτηριστικών τους (δηλαδή διαφοροποίηση). Επιπλέον, μέσω της μερικής επαφής τους με τα κύτταρα του θώκου, τα ασύμμετρα διαιρούμενα κύτταρα εμφανίζουν προκαθορισμένη πολικότητα και προσανατολισμό της ατράκτου (διαίρεσης).

1.2.1 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση του ζυγωτού στον σκώλικα *C. elegans*

Το μοντέλο του ζυγωτού στον *C. elegans* είναι ένα από τα πιο καλά χαρακτηρισμένα συστήματα ΑΚΔ (Εικόνα 1.2) (ανασκοπείται εκτενώς στα^(7,19-21)). Στα πλεονεκτήματά του συγκαταλέγονται το μεγάλο φυσικό μέγεθος του οργανισμού (που επιτρέπει την εύκολη μαγνητοσκόπηση αλλά και τη μηχανική αποκοπή των μικροσωληνίσκων της ατράκτου) και η δυνατότητα γονιδιακών χειρισμών. Ενδεικτικό είναι το γεγονός ότι, στο σύστημα αυτό, μέσω μεταλλαξιγένεσης και γενετικών διαλογών (genetic screens), ταυτοποιήθηκαν οι Par πρωτεΐνες.

Το γονιμοποιημένο ζυγωτό του *C. elegans* είναι επίμηκες και προσανατολισμένο κατά τον προσθι-οπίσθιο (Π-Ο) άξονα. Με την είσοδο του πατρικού DNA δημιουργείται ένα σύμπλοκο μεταξύ των προ-πυρήνων (μητρικού - πατρικού) και των κεντροσωμάτων, το πυρηνοκεντροσωμικό σύμπλοκο (ΠΚΣ, nucleus centrosome complex) στην οπίσθια περιοχή με τα κεντροσώματα να στοιχίζονται κάθετα στον Π-Ο άξονα (Εικόνα 1.2α). Ταυτόχρονα, το

σύμπλοκο Par (Par-3/ Par-6/ PKC-3) συγκεντρώνεται πρόσθια και οι πρωτεΐνες Par-1 και Par-2 οπίσθια (Εικόνα 1.2α). Οι AM πολυμερίζονται στον ίδιο βαθμό από τα δυο κεντροσώματα αλλά, για λόγους που δεν είναι αποσαφηνισμένοι και δεν σχετίζονται με την πολικότητα του συμπλόκου Par, ασκούν διαφορετικής έντασης ελκτικές δυνάμεις.

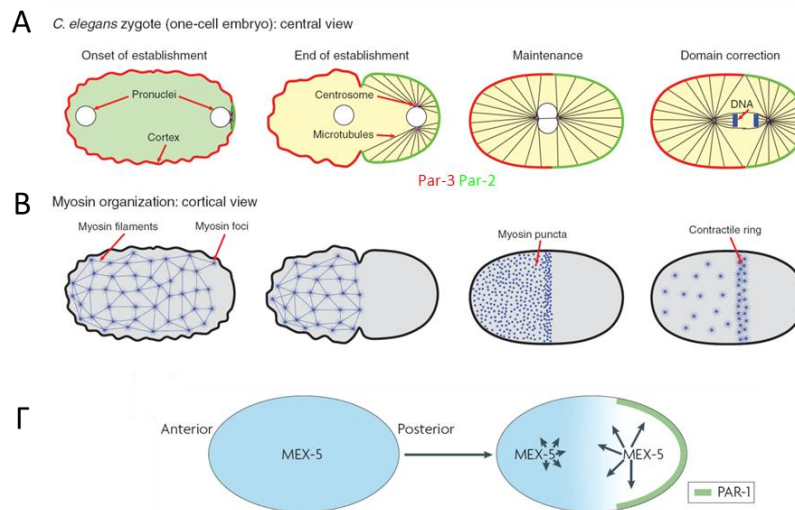


Εικόνα 1.2 Η ΑΚΔ του ζυγωτού του *C. elegans* (βλέπε κείμενο). Στο σχεδιάγραμμα αποτυπώνεται η πολικότητα του ζυγωτού μετά την είσοδο του σπέρματος (α), το κεντράρισμα του ΠΚΣ (α) με τη δράση των ελκτικών δυνάμεων στους μικροσωληνίσκους, η περιστροφή κατά 90° του ΠΚΣ για την ευθυγράμμιση της άτρακτος (β) με τη συμβολή του συμπλόκου GPR1/2 πρόσθια και της πρωτεΐνης LET99 οπίσθια, η ασύμμετρες ελκτικές δυνάμεις κατά την ανάφαση (γ) και η δημιουργία των δυο πρώτων βλαστομεριδίων άνισου μεγέθους (δ). Αναπαράγωγή εικόνας από ⁽¹⁹⁾.

Αποτέλεσμα αυτής της άνισης έλξης είναι το «κεντράρισμα» (centration) του ΠΚΣ. Στη συνέχεια το ΠΚΣ περιστρέφεται κατά 90° , ώστε να ευθυγραμμιστεί η άτρακτος σύμφωνα με την πολικότητα του ζυγωτού. Σε αυτό συμβάλλει η συνεργιστική δράση τριών συμπλόκων (Par, GPR1/2 και δυνεΐνης-δυνακτίνης) στον εσωτερικό φλοιό της πλασματικής μεμβράνης (Εικόνα 1.2β). Κατά τη διάρκεια της ανάφασης, το σύμπλοκο GPR1/2 συγκεντρώνεται σε περίσσεια στο οπίσθιο τμήμα του ζυγωτού, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται ασύμμετρα η δυνεΐνη του εσωτερικού της πλασματικής μεμβράνης και η άτρακτος να μετατοπίζεται έκκεντρα (Εικόνα 1.2γ). Αυτή η μετατόπιση έχει ως επακόλουθο τη δημιουργία ενός μεγαλύτερου πρόσθιου βλαστομεριδίου και ενός μικρότερου οπίσθιου (Εικόνα 1.2δ). Σε αυτό συμβάλλει και η αυξημένη εναπόθεση της πρωτεΐνης LET-99 σε μια πλευρική ζώνη του εσωτερικού φλοιού της πλασματικής μεμβράνης, η οποία περιορίζει την ενεργοποίηση της δυνεΐνης στην περιοχή καθ' όλη τη διάρκεια της μίτωσης (Εικόνα 1.2α-γ). Εκτός από τη

διαφορά στο μέγεθος των δυο πρώτων βλαστομεριδίων, η ΑΚΔ του ζυγωτού του *C. elegans* συνεπάγεται την ασύμμετρη κατανομή μιας σειρά παραγόντων πλέον των Par πρωτεϊνών/συμπλόκων. Στους βασικότερους ΚΚΤ που κληρονομούνται ασύμμετρα στα δυο βλαστομερίδια συγκαταλέγονται οι: MEX-1, MEX-3, MEX-5, MEX-6, POS-1, PIE-1, PIP-1, PAL-1 και τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικής σύστασης σωματίδια Π (P-granules).

Αξίζει να σημειωθεί πως η ΑΚΔ του ζυγωτού του *C. elegans* είναι μια πολύ δυναμική διαδικασία. Πριν τη γονιμοποίηση οι πρωτεΐνες Par-3, Par-6, και PKC-3 είναι ισοκατανεμημένες σε όλη την πλασματική μεμβράνη (Εικόνα 1.3Α). Η είσοδος του σπέρματος πυροδοτεί την αποκόλληση των Par-3 και Par-6 στον εσωτερικό φλοιό πλησίον του σπερμικού κεντροσώματος, επιτρέποντας την πρόσδεση της Par-2 σε αυτήν την περιοχή (Εικόνα 1.3Α). Έπειτα, ενισχύεται η εναπόθεση Par-2 και Par-1 έως ότου καλυφθεί το μισό κύτταρο (οπίσθιο τμήμα) (Εικόνα 1.3Α). Η διαδικασία αυτή συντελείται ταυτόχρονα με μια περιστροφική ροή κυτταροπλασματικού υλικού που διαμεσολαβείται από την ολίσθηση ινιδίων ακτίνης και μυοσίνης II ταυτόχρονα με μια κυματοειδή κίνηση της πλασματικής μεμβράνης (Εικόνα 1.3Β). Πιστεύεται ότι το wάριο βρίσκεται υπό έντονη μεμβρανική τάση και η είσοδος του σπέρματος οδηγεί σε αποσυναρμολόγηση του κυτταροσκελετού (ινίδια ακτίνης και μυοσίνης II) της γύρω περιοχής (Εικόνα 1.3Β). Στη συνέχεια, η Par-2, με τη βοήθεια των Par-1 και Par-5, αποτρέπουν την εναπόθεση Par-3 στην οπίσθια μεμβράνη και η πρόσθια PKC-3 φωσφορυλιώνει την αποσυνδεδεμένη Par-2 καθιστώντας αδύνατη την πρόσδεσή της στη μεμβράνη του πρόσθιου τμήματος. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η πόλωση του ζυγωτού. Αντίστοιχη δυναμική διεργασία πραγματοποιείται και για την ασύμμετρη κατανομή ΚΚΤ μεταξύ πρόσθιου και οπίσθιου τμήματος πριν τη πρώτη διαίρεση του ζυγωτού. Τα πλέον χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι αυτά των πρωτεϊνών MEX-5 και PIE-1. Αυτές υπάρχουν σε δυο μορφές, μια γρήγορα (fast-diffusing form) και μια αργά διαχεόμενη μορφή (slow-diffusing form). Η γρήγορα διαχεόμενη MEX-5 εντοπίζεται οπίσθια και η αργά διαχεόμενη πρόσθια (Εικόνα 1.3Γ). Την ακριβώς αντίθετη κατανομή εμφανίζει η PIE-1. Για την MEX-5 πιθανολογείται πως φωσφορυλιώνεται από την οπίσθια εντοπιζόμενη μεμβρανική Par-1, με αποτέλεσμα να αποκτά γρήγορη κινητική, ενώ για την γρήγορη κινητική της πρόσθιας PIE-1 ευθύνεται ο διαφορετικός βαθμός πρόσδεσής της με τα P-granules, τα οποία βρίσκονται κυρίως οπίσθια. Η διαφορά αυτή στο ρυθμό διάχυσης έχει ως επακόλουθο τη συγκέντρωση της περισσότερης MEX-5 πρόσθια και της PIE-1 οπίσθια.



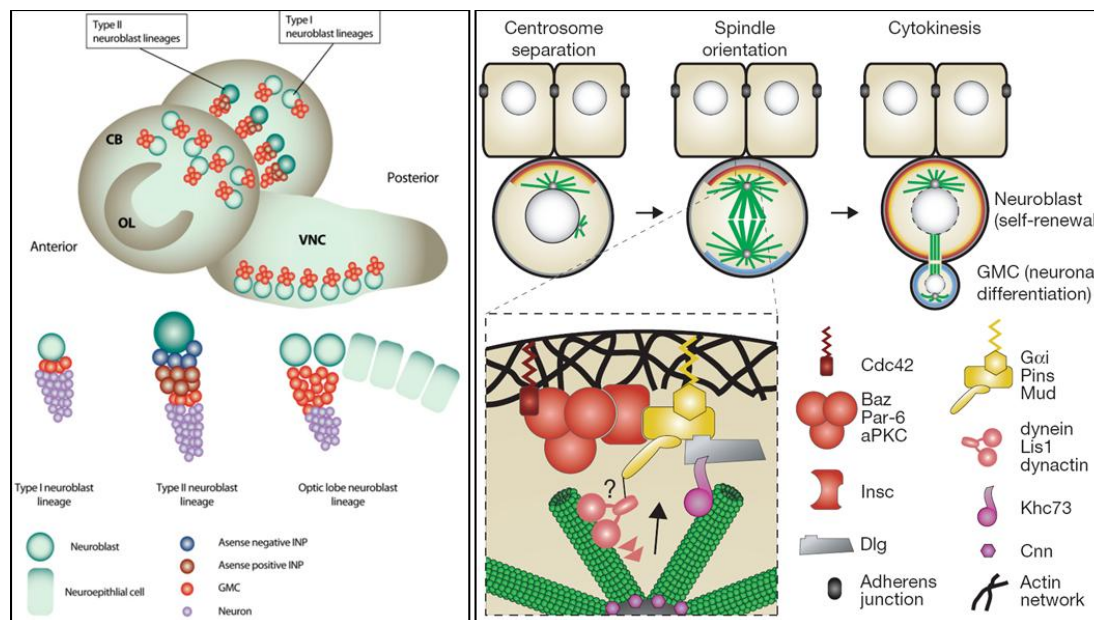
Εικόνα 1.3 Σχεδιαγραμματική αναπαράσταση της (ασύμμετρης) κατανομής διαφόρων στοιχείων στο ζυγωτό του *C. elegans*. Διακρίνονται (Α) οι πρωτεΐνες πολικότητας Par-3 (κόκκινο) και Par-2 (πράσινο) σε εγκάρσια τομή του ζυγωτού σε διάφορα στάδια, (Β) η οργάνωση της μυοσίνης II στον εσωτερικό φλοιό της πλασματικής μεμβράνης και (Γ) η κινητική του ΚΚΤ MEX-5 με βέλη. Προσαρμοσμένη αναπαραγωγή εικόνων από τα ^(21,22).

1.2.2 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση της νευροβλάστης της *Drosophila*

Η νευροβλάστη (NB) της *Drosophila* αποτελεί το πιο γνωστό μοντέλο μελέτης ΑΚΔ, το οποίο, εκτός των κλασικών χαρακτηριστικών μιας ΑΚΔ, προσφέρεται και για τη μελέτη δημιουργίας άνισου μεγέθους θυγατρικών κυττάρων (ανασκοπείται εκτενώς στα ^(7,19,22,23)). Γενικά, κατά τη νευρογένεση της *Drosophila* (στάδιο προνύμφης) εμφανίζονται δυο τύποι NB (νευροβλάστες τύπου I και τύπου II) οι οποίες διαιρούνται με ΑΚΔ (Εικόνα 1.4). Οι NB είναι πρόδρομα ΒΚ από τα οποία προκύπτουν όλα τα μέρη του κεντρικού νευρικού συστήματος του οργανισμού. Μέσω της ΑΚΔ προκύπτουν ένα εξίσου μεγάλο θυγατρικό κύτταρο με τη μητρική NB, που θα παραμείνει NB, και ένα κατά πολύ μικρότερο, που διαφοροποιείται. Στην περίπτωση των NB τύπου I, το τελευταίο, που ονομάζεται γλοιακό μητρικό κύτταρο (GMC, glion mother cell), θα διαιρεθεί μια ακόμη φορά για να προκύψουν δυο νευρώνες. Στις NB τύπου II, το μικρότερο κύτταρο, που είναι ένα πρόδρομο νευρωνικό κύτταρο (INP, intermediate neural progenitor), θα διαιρείται συνεχώς ασύμμετρα, δίνοντας ένα INP και ένα GMC για αρκετές διαιρέσεις (Εικόνα 1.4 αριστερά).

Η διαδικασία που ακολουθείται για την ΑΚΔ των NB της *Drosophila* είναι κοινή και για τους δυο τύπους κυττάρων (Εικόνα 1.4 δεξιά). Αρχικά (τέλος μεσόφασης), οι NB φέρνουν στην κορυφαία επιφάνεια το τριμερές σύμπλοκο DmPar-6/DaPKC/Lgl. Με την είσοδο του κυττάρου στη μίτωση και την ενεργοποίηση της Aurora A, φωσφορυλιώνεται η πρωτεΐνη DmPar-6 σε θέση που σχετίζεται με την πρόσδεση της DaPKC (Εικόνα 1.5Α). Ακολουθεί η φωσφορυλίωση της Lgl για την αποβολή και αντικατάστασή της στο σύμπλοκο

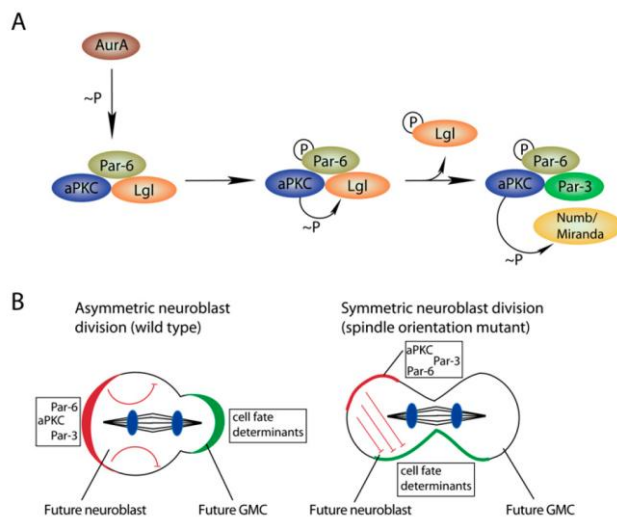
από την Baz (Εικόνα 1.5A). Το σύμπλοκο Par, πλέον, μέσω της πρωτεΐνης Cdc42 προσδένεται στον εσωτερικό φλοιό της κορυφαίας επιφάνειας της πλασματικής μεμβράνης, ενώ μέσω του συνδέτη Insc συνδέεται με το άλλο τριμερές σύμπλοκο των $G\alpha_i$ /Pins/Mud πρωτεϊνών (Εικόνα 1.4 δεξιά). Με τον τρόπο αυτό διαμορφώνεται η κορυφαία πολικότητα.



Εικόνα 1.4 Σχηματική αναπαράσταση της θέσης και των προϊόντων της διαίρεσης των NB τύπου I και II της *Drosophila* (αριστερά) και της ΑΚΔ NB τύπου I (δεξιά) (βλέπε κείμενο). Προσαρμοσμένη αναπαραγωγή εικόνων από τα (19,22).

Κατά την ίδια περίοδο, το ένα κεντρόσωμα αγκυροβολεί πλησίον του κορυφαιού φλοιού με τη σύνδεση των μικροσωληνίσκων του και του συμπλόκου $G\alpha_i$ /Pins/Mud που συμβαίνει με δυο τρόπους. Από τη μια πλευρά, έρχονται σε επαφή οι AM και η πρωτεΐνη Mud (πιθανολογείται μέσω του συμπλόκου δινεΐνης-δυνακτίνης) και από την άλλη συνδέονται διαδοχικά οι Pins, Dlg και Khc73 (Εικόνα 1.4 δεξιά). Λίγο μετά (προμετάφαση/μετάφαση), πραγματοποιείται η σύζευξη του ενός κεντροσώματος με την κορυφαία επιφάνεια της μεμβράνης με τη διαμεσολάβηση των μοριακών κινητήρων δινεΐνης και Khc73. Το κορυφαίο κεντρόσωμα περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα περικεντροσωμικής κεντροσωμίνης (Centrosomin, Cnn) και σχηματίζει περισσότερους AM. Δεδομένου ότι η άτρακτος αρχικά είχε έκκεντρη (βασικότερη) θέση, οι ισχυρές ελκτικές δυνάμεις στο κορυφαίο κεντρόσωμα και η μετακίνησή του κορυφαία έχει σαν αποτέλεσμα την παραμόρφωση της ατράκτου που παίρνει μια ασύμμετρη μορφή (το μεταφασικό δίσκο βρίσκεται πιο κοντά στη βασική μεμβράνη) (Εικόνα 1.4 δεξιά). Αυτή η ασύμμετρη άτρακτος παραμένει κατά τη διάρκεια της ανάφασης και έτσι με το πέρασμα της μίτωσης σχηματίζονται ανισομεγέθη θυγατρικά κύτταρα (Εικόνα 1.4 δεξιά).

Εκτός από τη διαφορά στο μέγεθος των θυγατρικών κυττάρων, μια πλειάδα ΚΚΤ διαχωρίζονται ασύμμετρα στα κύτταρα αυτά. Οι σημαντικότεροι ΚΚΤ είναι οι πρωτεΐνες Numb, Miranda Prospero, PON, Neuralized και Staufen. Σύμφωνα με πιο πρόσφατες μελέτες, η ασύμμετρη κατανομή των ΚΚΤ στη βασική περιοχή της μιτωτικής NB είναι μια εξίσου δυναμική διαδικασία όπως της περίπτωσης του ζυγωτού του *C. elegans*. Μελέτες με βάση την τεχνική FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) υποδεικνύουν ότι η διαφορετική κινητικότητα ή η μεμβρανική σύνδεση κάποιων ΚΚΤ στην κορυφαία και βασική περιοχή ρυθμίζει την ασύμμετρη κατανομή τους.



Εικόνα 1.5 (Α) Αναπαράσταση του σχηματισμού του συμπλόκου Par στον εσωτερικό φλοιό της κορυφαίας πλασματικής μεμβράνης της NB τύπου I της *Drosophila* μετά την είσοδο του κυττάρου στη μίτωση (ενεργοποίηση της Aurora A) (βλέπε κείμενο). **(Β)** Η ΑΚΔ της ΒΝ της *Drosophila* σε φυσιολογικά και μεταλλαγμένα ζώα (βλέπε κείμενο). Αναπαράγωγή εικόνας από ⁽²²⁾.

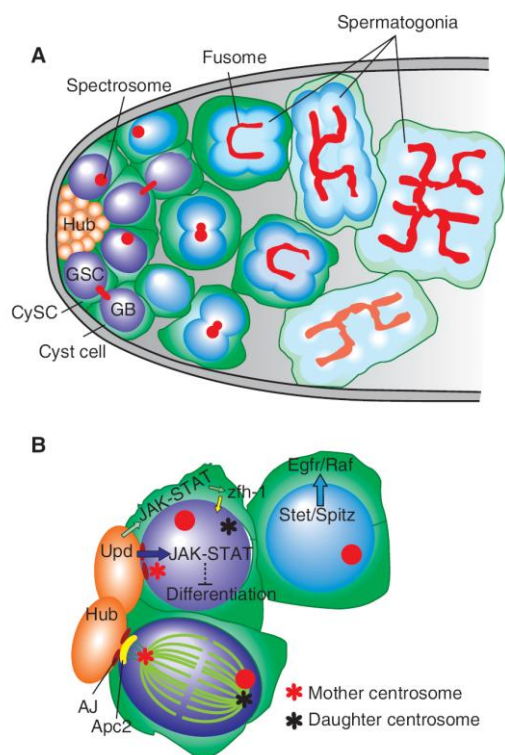
Πιο αναλυτικά, η DaPKC μπορεί και φωσφορυλιώνει τον παράγοντα Numb οδηγώντας τον σε αποσύνδεση από τον κορυφαίο μεμβρανικό φλοιό. Για να λειτουργήσει όμως η κίνηση αυτή θα πρέπει το υπόστρωμά της (Numb) να συνδεθεί μαζί της. Το ρόλο του συνδέτη παίζει η πρωτεΐνη Baz (Εικόνα 1.5Α). Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, η ενεργοποίηση της Aurora A χρειάζεται για τη δημιουργία του τριμερούς συμπλόκου Par και αυτό συμβαίνει αφού το κύτταρο εισέλθει στη μίτωση. Τότε (προμετάφαση) και μόνον, αρχίζει η σταδιακή αποβολή του παράγοντα Numb επιλεκτικά από την κορυφαία πλευρά της πλασματικής μεμβράνης (Εικόνα 1.5) και η συγκέντρωσή του στη βασική μεμβράνη. Κάτι τέτοιο εξηγεί και το πώς η ασύμμετρη κατανομή του Numb πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της μίτωσης, ενώ η ασύμμετρη κατανομή της DaPKC προϋπάρχει. Ο μηχανισμός αυτός είναι καθοριστικός για την ΑΚΔ των NB της *Drosophila*. Έχει παρατηρηθεί ότι συμβάλλει καθοριστικά ακόμα και σε μεταλλαγμένες NB με αδυναμία στοίχισης της ατράκτου σύμφωνα με την πολικότητα του κυττάρου, ώστε τα ισομεγέθη θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν να αποκτήσουν διαφορετικές τύχες (NB και GMC) (Εικόνα 1.5Β). Εκεί, το κορυφαίο κύτταρο θα ανακτήσει την τύχη της NB γιατί το Par σύμπλοκο θα συνεχίσει να

κρατά μακριά από την πλασματική μεμβράνη (αδρανοποιημένα) όσα μόρια Numb κληρονομεί. Αντίστοιχη ρύθμιση με τον παράγοντα Numb έχουν και οι Miranda και Neuralized (φωσφορυλιώνονται από την κινάση DaPKC). Το ίδιο ισχύει και για τον PON, ο οποίος επιπρόσθετα ελέγχεται από την μιτωτική κινάση Polo. Τέλος, υπάρχει και ο επικουρικός μηχανισμός «διάσωση της τελόφασης» (telophase rescue). Σύμφωνα με αυτόν, οι παράγοντες Numb και Miranda διαχωρίζονται ασύμμετρα κατά τη διάρκεια της τελόφασης, ακόμα κι αν δεν είναι ασύμμετρα κατανεμημένοι από τη μετάφαση. Αυτό το γεγονός βασίζεται στη δράση τωνDlg και Khc-73 όπου διάφορες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (κυρίως KKT) μεταφέρονται και διαχωρίζονται ασύμμετρα στον εσωτερικό φλοιό της πλασματικής μεμβράνης μέσω μικροσωληνίσκων.

1.2.3 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση των αρσενικών γαμετικών BK της *Drosophila*

Το αναπαραγωγικό σύστημα της *Drosophila* προσφέρεται για τη μελέτη της ΑΚΔ μέσω του ενδογενούς μηχανισμού (Εικόνα 1.6) (ανασκοπείται εκτενώς στα ^(8,24,25)). Οι ΑΚΔ των BK της αρσενικής αναπαραγωγικής σειράς (male germline stem cells –mGSCs) στο σύστημα αυτό πραγματοποιούνται σε συγκεκριμένο περιβάλλον (θώκος) που καθορίζεται από τα κύτταρα Hub. Εκεί, mGSCs και κυστικά BK (cyst stem cells –CySCs) συνδέονται μέσω προσκολλητικών συνδέσμων (adherens junctions, –AJ) (Εικόνα 1.6B). Από την ΑΚΔ των mGSCs προκύπτουν ένα mGSCs (αυτο-ανανέωση) και μια γαμετοβλάστη (gonialblast –GB) από την οποία θα ξεκινήσει το πρόγραμμα διαφοροποίησης (σπερματογένεση) (Εικόνα 1.6A). Τα mGSCs διατηρούν την βλαστική τους ταυτότητα όντας εγκλωπωμένα από δυο CySCs σε ένα σχηματισμό που λέγεται σπεκτρόσωμα (spectrosome) και λαμβάνοντας τα απαραίτητα μηνύματα που παρέχουν τα κύτταρα Hub και CySCs (π.χ. τα κύτταρα Hub εκκρίνουν το συνδέτη Upd επάγοντας το μονοπάτι JAK-STAT στα mGSCs) (Εικόνα 1.6). Το σπεκτρόσωμα πραγματοποιεί στερεοτυπικές κινήσεις κατά τη διάρκεια της μεσόφασης των mGSCs. Παρ’ όλα αυτά, το κεντρόσωμα του mGSCs από την αρχή της μεσόφασης βρίσκεται πλησίον της επιφάνειας επαφής του mGSCs και των κυττάρων Hub. Μετά την αντιγραφή του, το θυγατρικό κεντρόσωμα μεταναστεύει προς την αντίθετη κατεύθυνση. Η θέση του μητρικού κεντροσώματος διατηρείται σταθερή μέσω των μικροσωληνίσκων που εκφύονται από αυτό και δεσμεύονται από ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο (με βάση την πρωτεΐνη Arc2), το οποίο εδρεύει στην επιφάνεια επαφής μεταξύ των κυττάρων mGSCs και Hub. Το εν λόγω σύμπλοκο μεταξύ άλλων περιέχει E-cadherin, Shg και Armadillo (β-catenin) (Εικόνα 1.6B). Με τον τρόπο αυτό, συντελούνται τα δυο από τα τρία βήματα των ΑΚΔ. Το τρίτο βήμα,

δηλαδή η ασύμμετρη κατανομή ΚΚΤ, δεν έχει ακριβώς διαπιστωθεί στο παραπάνω σύστημα. Σίγουρα διαχωρίζονται ασύμμετρα οι AJ και οι παράγοντες *Apc2*, *E-cadherin*, *Shg* και *Armadillo*, αλλά η διατήρηση της θέσης του ενός θυγατρικού κυττάρου δίπλα από τα κύτταρα Hub είναι ο καθοριστικός παράγοντας για τη διατήρηση της mGSC ταυτότητας από το κύτταρο αυτό. Το άλλο θυγατρικό κύτταρο που θα προκύψει, θα απωλέσει την mGSC ταυτότητα, επειδή δεν έρχεται σε επαφή με τα κύτταρα Hub και δεν λαμβάνει τα απαραίτητα μηνύματα. Με τον τρόπο αυτό η θέση ενός κυττάρου και μόνο αποτελεί ικανή συνθήκη τόσο για τη διατήρηση της ταυτότητάς του όσο και για την ενορχήστρωση των ΑΚΔ του.



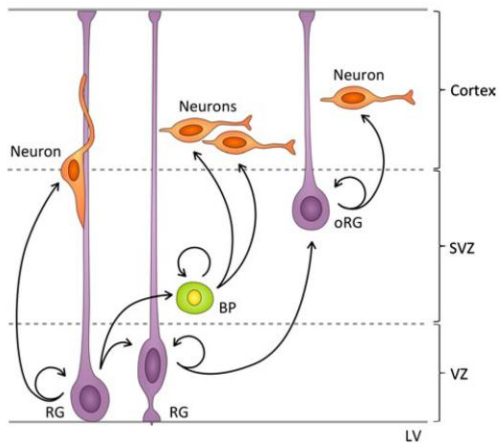
Εικόνα 1.6 Σχηματική αναπαράσταση του αρσενικού αναπαραγωγικού συστήματος της *Drosophila*. Διακρίνονται οι θέσεις (A) και τα βασικότερα μόρια και αλληλεπιδράσεις (B) κατά την εκκίνηση της σπερματογένεσης (βλέπε κείμενο). Προσαρμοσμένη αναπαραγωγή εικόνας από ⁽²⁵⁾.

Το σύστημα των ΑΚΔ των mGSCs προσφέρεται και για τη μελέτη μιας σειράς άλλων ασυμμετριών, όπως αυτή των κεντροσωμάτων, του DNA ή των επιγενετικών τροποποιήσεων (αναλύονται εκτενώς στην ενότητα 1.3). Επιπλέον, εξόχως εντυπωσιακή είναι και μια ακόμα παρατήρηση-ιδιαιτερότητα του αρσενικού αναπαραγωγικού συστήματος σχετικά με τη διαφοροποίηση και την κυτταρική τύχη. Έχει παρατηρηθεί ότι με την ηλικία αυξάνονται οι περιπτώσεις όπου τα ασύμμετρα διαιρούμενα mGSCs καθυστερούν σημαντικά στο να προσανατολίσουν τα κεντροσώματά/άτρακτό τους (σε ζώα ηλικίας >30 ημερών). Επιπλέον, η έλλειψη mGSCs αποκαθίσταται από την από-διαφοροποίηση (de-differentiation) των πρώιμων κυττάρων GB. Υπενθυμίζεται εδώ ότι το

φαινόμενο της από-διαφοροποίησης είναι εξαιρετικά σπάνιο και απαντάται κυρίως στα φυτά. Πιστεύεται ότι λόγω της από-διαφοροποίησης τα νέα mGSCs παρουσιάζουν προβλήματα στον προσανατολισμό των κεντροσωμάτων τους διότι έχουν ως μητρικό κεντρόσωμα το θυγατρικό που κληρονόμησαν κατά την ΑΚΔ από την οποία προήλθαν. Έτσι εξηγείται η ταυτόχρονη παρατήρηση του φαινομένου της από-διαφοροποίησης και της καθυστέρησης στην πρόοδο των ΑΚΔ στις ηλικιωμένες *Drosophila*.

1.2.4 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση των εμβρυονικών νευρικών ΒΚ του ποντικού

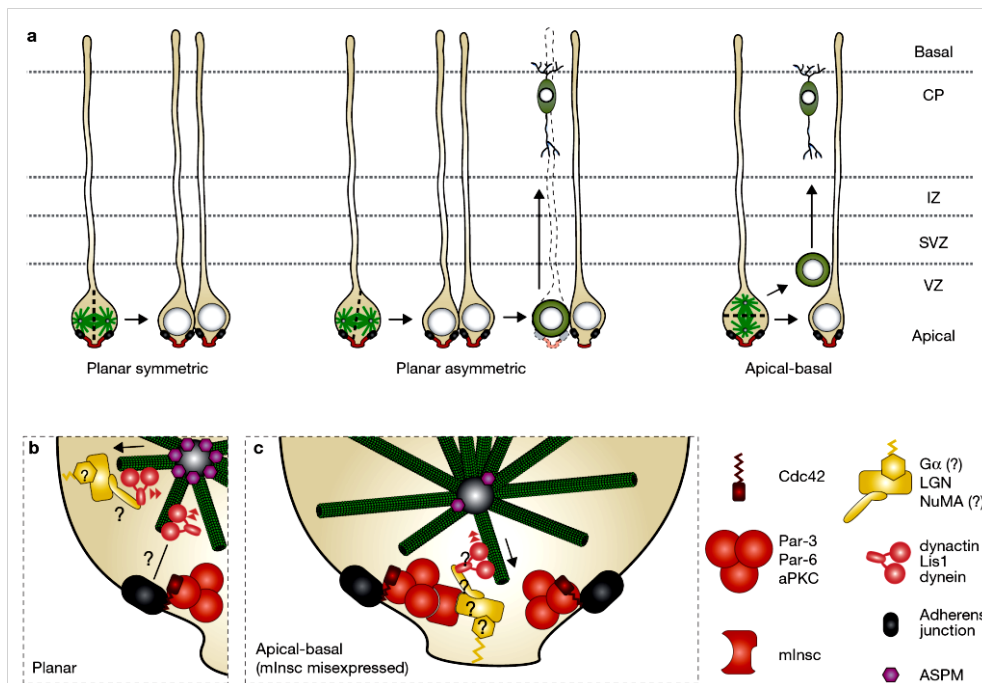
Τα νευρωνικά ΒΚ στο έμβρυο του ποντικού, ή αλλιώς η ακτινωτή γλοία (ΑΓ, radial glia), προέρχονται από νευροεπιθηλιακά κύτταρα και έχουν έντονα στοιχεία κορυφο-βασικής πολικότητας. Το ψευδο-στρωματοποιημένο επιθήλιο του εγκεφαλικού φλοιού χωρίζεται σε τέσσερις στοιβάδες: το φλοιικό πιάτο (cortical plate, CP) βασικά, την ενδιάμεση ζώνη (intermediate zone, IZ), την υποκοιλιακή ζώνη (subventricular zone, SVZ) και τέλος κορυφαία, την κοιλιακή ζώνη (VZ) (Εικόνες 1.7 και 1.8). Ο πυρήνας των ΑΓ εδρεύει στην περιοχή της VZ, ενώ οι απολήξεις τους εκτείνονται εκατέρωθεν και έρχονται σε επαφή με τις κοιλιακές και χοριοειδείς επιφάνειες. Στο κορυφαίο ακροπόδιο, γειτονικά ΑΓ πραγματοποιούν στενές επαφές μέσω ΑJ. Κατά την εμβρυική ανάπτυξη (ημέρες 12-16) αυξάνεται η συχνότητα των ΑΚΔ στα ΑΓ και προκύπτει ένα ΑΓ και ένας νευρώνας ή ένα βασικό πρόδρομο κύτταρο (ΒΠΚ, basal progenitor) (Εικόνα 1.7) (ανασκοπείται εκτενώς στα ^(6,19,20,26)). Οι νευρώνες και τα ΒΠΚ που προκύπτουν από τις ΑΚΔ των ΑΓ δεν σχηματίζουν απολήξεις (χάνουν την πρόσδεση με τις κοιλιακές και χοριοειδείς επιφάνειες) και μεταναστεύουν πιο βασικά στην SVZ (Εικόνα 1.7). Εκεί, τα ΒΠΚ διαιρούνται συμμετρικά είτε προς δυο ΒΠΚ είτε, συχνότερα, προς δυο νευρώνες (Εικόνα 1.7). Τελευταία, πλέον των ΑΓ έχουν παρατηρηθεί και άλλοι κυτταρικοί τύποι που συμβάλλουν στη νευρογένεση με σημαντικότερα τα εξωτερικά ΑΓ (ε-ΑΓ, outer radial glia), τα οποία δεν σχηματίζουν κορυφαίες απολήξεις (δηλαδή δεν έχουν επαφή με την κοιλιακή επιφάνεια) και εδρεύουν στην SVZ (Εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7 Αναπαράσταση της θέσης και των προϊόντων της διαίρεσης ανά τύπο εμβρυονικού νευρικού ΒΚ του ποντικού (βλέπε κείμενο). Αναπαραγωγή εικόνας από ⁽²⁶⁾.

Οι ΑΚΔ των ΑΓ αντιπροσωπεύουν ένα ιδιαίτερο είδος ΑΚΔ όπου διαπιστώνονται τόσο οι «κλασικές» όσο και νέες μορφές ασυμμετρίας. Όπως αναφέρθηκε, τα ΑΓ είναι πολωμένα. Στην κορυφαία επιφάνειά τους εντοπίζονται η κινάση Cdc42 με το σύμπλοκο Par και η δράση τους εκεί είναι διττή (Εικόνα 1.8b). Από τη μία πλευρά συμβάλλουν στον σχηματισμό και ακεραιότητα των ΑΙ (διατηρώντας την πολικότητα και τη θέση των ΑΓ στη VZ) και από την άλλη συμμετέχουν στη διαμόρφωση της κυτταρικής τύχης των ΑΓ. Η πρώτη ουσιαστική ιδιαιτερότητα των διαιρέσεων των κυττάρων ΑΓ είναι η θέση της μιτωτικής ατράκτου. Ασύμμετρος φαινότυπος αποκτάται όχι μόνο στις περιπτώσεις απόλυτης στοίχισης της ατράκτου κατά μήκος του κορυφο-βασικού άξονα, αλλά και σε περιπτώσεις μικρής απόκλισης $\sim 30^\circ$ (λοξές διαιρέσεις- oblique divisions) από την επίπεδη (planar) στοίχιση που χαρακτηρίζει τις συμμετρικές διαιρέσεις (Εικόνα 1.8a). Νεότερες μελέτες έρχονται να περιπλέξουν -αντί να ξεδιαλύνουν- τη σχέση μεταξύ της θέσης της ατράκτου και της κυτταρικής τύχης, δείχνοντας ότι η ταυτόχρονη κληρονόμηση κορυφαίων και βασικών στοιχείων είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των ΒΠΚ (βλέπε παρακάτω). Πάντως, η ασύμμετρη κληρονόμηση των ΑΙ (και μαζί τους το σύμπλοκο Par) φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στη συντριπτική πλειοψηφία των διαιρέσεων για δυο λόγους. Το σύμπλοκο Par συμβάλλει μαζί με την πρωτεΐνη Insc στην μη επίπεδη (planar) στοίχιση της ατράκτου και, επιπλέον, συνεργεί στον καθορισμό της κυτταρικής τύχης (Εικόνα 1.8c). Έτσι, ακόμα και η μικρή απόκλιση από την επίπεδη (planar) στοίχιση είναι ικανή να διαχωρίσει το μεγαλύτερο μέρος των ΑΙ και της κορυφαίας επιφάνειας σε ένα θυγατρικό το οποίο θα διατηρήσει τον ΑΓ φαινότυπο, ενώ το άλλο θα διαφοροποιηθεί. Για τη διαφοροποίηση αυτή είναι απαραίτητη η δράση του ΚΚΤ Numb, ο οποίος αναστέλλει το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch. Στο αυτο-ανανεούμενο ΑΓ θυγατρικό κύτταρο που προκύπτει από λοξές διαιρέσεις, το Notch μονοπάτι παραμένει ενεργό παρά την κληρονόμηση της βασικής

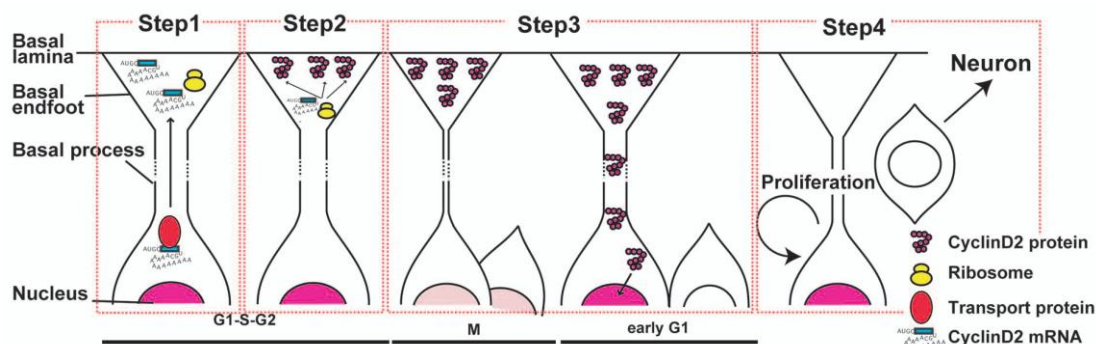
απόληξης που περιέχει Numb και αυτό διότι η δράση του εκεί αναστέλλεται από την περίσσεια Par-3/aPKC. Εκτός από τον Numb, στους ασύμμετρα διαχωριζόμενους ΚΚΤ μεταξύ των δυο θυγατρικών κυττάρων συγκαταλέγονται και οι Staufien, Pum2, Dxd1 αλλά και οι φορείς mRNA Prox1 και Trim32 (ομόλογα των Prospero και Brat της *Drosophila*). Όλα τα παραπάνω στοιχεία βρίσκονται στην βασική επιφάνεια του φλοιού της πλασματικής μεμβράνης σε ένα μεγάλο ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο και προάγουν τη νευρογένεση. Και εδώ, η κινάση aPKC (και συγκεκριμένα η aPKCξ ισομορφή) δρα ανασταλτικά σε τυχόν κληρονομήση υπολειμμάτων Trim32 σε λοξές διαιρέσεις αποκλείοντας την είσοδο της τελευταίας στον πυρήνα με αποτέλεσμα τη μη ενεργοποίηση του c-Myc.



Εικόνα 1.8 Σχηματική αναπαράσταση της θέσης και του τρόπου διαίρεσης των εμβρυικών νευρικών ΒΚ (a), αλλά και των βασικών μορίων που σχετίζονται με τον προσανατολισμό της ατράκτου σε φυσιολογικά (b) και μεταλλαγμένα κύτταρα (c) (βλέπε κείμενο). Αναπαραγωγή εικόνας από ⁽¹⁹⁾.

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, νεότερες μελέτες έρχονται να περιπλέξουν τα δεδομένα στις ΑΚΔ των ΑΓ. Σύμφωνα με αυτές, η πολικότητα και η θέση της ατράκτου δεν σχετίζονται με τη ασύμμετρη κυτταρική τύχη των θυγατρικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, η ταυτόχρονη κληρονομήση των κορυφαίων και βασικών απολήξεων/επιφανειών είναι απαραίτητη για τη διατήρηση του ΑΓ φαινοτύπου. Σε αυτό συμβάλλουν μόρια που εδρεύουν στη βασική απόληξη του μητρικού ΑΓ κυττάρου και που θα κληρονομηθούν από το ένα θυγατρικό κύτταρο το οποίο και θα παραμείνει ΑΓ. Στους παράγοντες αυτούς συγκαταλέγονται οι Lgl και η κυκλίνη D2. Από τις σχετικές μελέτες ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εργασία των Tsunekawa *et al.*,⁽²⁷⁾ στην οποία διαπιστώνεται η ασύμμετρη

κατανομή της πρωτεΐνης και του mRNA της κυκλίνης D2 στο βασικό ακροπόδιο (Εικόνα 1.9). Μετά τη διαίρεση, το κύτταρο που θα κληρονομήσει τα εν λόγω στοιχεία θα ολοκληρώσει γρηγορότερα τη G1 φάση σε σχέση με το αδελφό κύτταρο, που θα πρέπει να συνθέσει νέο mRNA και πρωτεΐνη κυκλίνης D2 (Εικόνα 1.9). Η επιμήκυνση της G1 φάσης στο ένα θυγατρικό κύτταρο δείχνουν πως είναι ικανή συνθήκη για την προαγωγή της διαφοροποίησής του. Υπενθυμίζεται εδώ ότι όσο ένα κύτταρο απομακρύνεται (αναπτυξιακά) από τη βλαστική κατάσταση, τόσο μικραίνει η διάρκεια της S φάσης και μεγαλώνει η φάση G1 (28).



Εικόνα 1.9 Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου ΑΚΔ ΑΓ όπου το αυτοανανεούμενο θυγατρικό κύτταρο είναι αυτό που κληρονομεί τις κορυφαιές και τις βασικές απολήξεις μαζί. Αναπαραγωγή εικόνας από (29).

1.2.5 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση των κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος

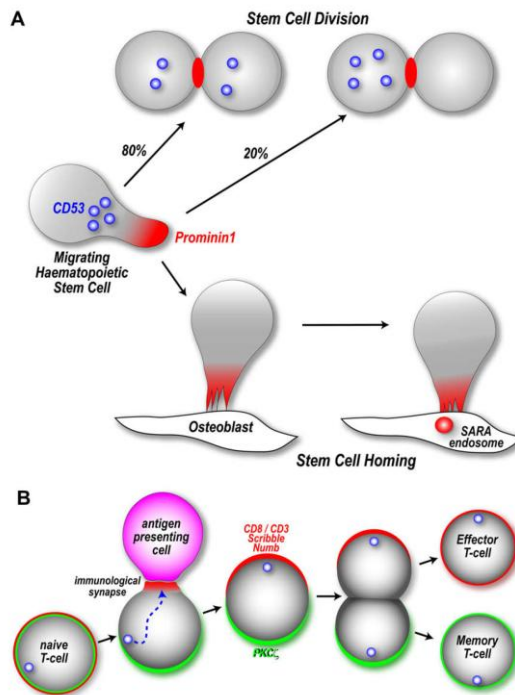
Ένα άλλο μοντέλο ΑΚΔ είναι αυτό των διαιρούμενων Τ λεμφοκυττάρων (Τ κυττάρων) κατά την ανοσοποιητική απόκριση⁽³⁰⁻³²⁾. Για την αντιμετώπιση παθογόνων, τα αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα (antigen presenting cells, -APC) συνδέονται με ανώριμα Τ κύτταρα μέσω της ανοσολογικής σύναψης και τα τελευταία ενεργοποιούνται και διαιρούνται μέσω ΑΚΔ. Έτσι, τα παρθένα (naive) Τ κύτταρα βγαίνουν από τη φάση ηρεμίας και διαιρούνται ασύμμετρα σε ένα κύτταρο μνήμης (memory) και ένα δραστικό (effector) Τ κύτταρο (Εικόνα 1.10B). Δηλαδή, τα παρθένα Τ κύτταρα, ως μη ΒΚ, διαιρούνται ασύμμετρα και κανένα εκ των θυγατρικών τους δεν αυτό-ανανεώνεται. Η ιδιαιτερότητα αυτής της ΑΚΔ έγκειται επίσης στο γεγονός ότι μπορεί μεν να πραγματοποιείται μέσω του εξωγενούς μηχανισμού, όμως, από τη διαδικασία δεν απουσιάζει κανένα από τα κλασσικά χαρακτηριστικά του ενδογενούς μηχανισμού. Επιπλέον, καθοριστικό ρόλο στον καθορισμό της τύχης των θυγατρικών κυττάρων (μνήμης ή δραστικό Τ κύτταρο) παίζει η ασύμμετρη κατανομή και δράση του πρωτεασώματος. Πιο αναλυτικά, τα παρθένα Τ κύτταρα στη φάση ηρεμίας δεν παρουσιάζουν στοιχεία πολικότητας. Για να ενεργοποιηθούν, βασική

προϋπόθεση είναι η προσκόλλησή τους με ένα κύτταρο APC. Η σύνδεση αυτή είναι γνωστή ως ανοσολογική σύναψη και χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση διαφόρων υποδοχέων επιφανείας (παράγοντες της ανοσολογικής απόκρισης όπως οι CD3 και CD8) και τη δραστική αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού (πόλωση ακτίνης και μικροσωληνίσκων). Ταυτόχρονα, το μητρικό κεντρόσωμα μεταναστεύει και αγκυροβολεί πλησίον της ανοσολογικής σύναψης, ενώ στην εκεί εσωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης αρχίζουν να συγκεντρώνονται στοιχεία πολικότητας (όπως οι πρωτεΐνες Scribble και DlgF), ενώ στην αντιδιαμετρική της το σύμπλοκο Par. Στη μίτωση που ακολουθεί, η άτρακτος στοιχίζεται με βάση τη διαμορφωμένη πολικότητα και παρατηρείται ασύμμετρη κατανομή του Numb και του πρωτεασώματος. Η επιλεκτική δράση του τελευταίου κατά τη διάρκεια της μίτωσης έχει ως συνέπεια την αποικοδόμηση του μεταγραφικού παράγοντα T-bet (ο οποίος προάγει την δραστική τύχη και αναστέλλει την τύχη μνήμης στα T κύτταρα) στο ένα ημισφαίριο, αφήνοντας τα υπόλοιπα μόρια T-bet ανέπαφα στο ημισφαίριο πλησίον του κυττάρου APC. Έτσι, στα θυγατρικά κύτταρα που θα προκύψουν, αυτό που εφάπτεται με το κύτταρο APC θα κληρονομήσει τους παράγοντες Numb, T-bet και INF- γ και θα αποκτήσει τύχη δραστικού T κυττάρου, ενώ το άλλο θα γίνει T κύτταρο μνήμης.

Όπως προαναφέρθηκε, η ΑΚΔ των παρθένων T κυττάρων χαρακτηρίζεται ως ΑΚΔ εξωγενούς μηχανισμού λόγω της συμβολής του θώκου (κύτταρο APC), αλλά, ταυτόχρονα η διαδικασία αυτή ακολουθεί όλα τα στάδια ενδογενούς ρύθμισης. Το παράδοξο αυτό φαίνεται να χαρακτηρίζει γενικότερα τις ΑΚΔ του αιμοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων και των ΒΚ του αιμοποιητικού (-ΑιΒΚ) (ανασκοπείται στα ^(33,34)). Τα ΑιΒΚ, όπως συμβαίνει γενικότερα με τα ΒΚ των περισσότερων ιστών ενηλίκων, είναι δύσκολο να ταυτοποιηθούν και κατά συνέπεια, είναι εξίσου δύσκολο να χαρακτηριστεί και ο τρόπος διαίρεσής τους. Επειδή τα ΑιΒΚ μεταναστεύουν συχνά εκτός θώκου (κύτταρα οστεοβλαστών) και φαίνεται πως διαιρούνται και εκεί με ασύμμετρο τρόπο, γίνεται αδύνατη η διάκριση του μηχανισμού ΑΚΔ (ενδογενούς ή εξωγενούς) που ακολουθούν τα ΑιΒΚ (Εικόνα 1.10Α).

Το θολό αυτό τοπίο επιχείρησε να διαλευκάνει το εργαστήριο του Tannishtha Reya, με τη χρήση του διαγονιδιακού στελέχους ποντικού TNR⁽¹⁸⁾. Στα κύτταρα του στελέχους TNR, το ενεργοποιημένο σηματοδοτικό μονοπάτι Notch συνοδεύεται από την έκφραση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP, η οποία, συγκυριακά, λειτουργεί ως αντιπροσωπευτικός δείκτης των ΑιΒΚ. Έτσι, οι διαιρέσεις των ΑιΒΚ μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε: *συμμετρικές αυτο-ανέωσης* (δημιουργία δυο GFP⁺ θυγατρικών

κυττάρων), *συμμετρικές διαφοροποίησης* (δημιουργία δυο GFP⁻ θυγατρικών κυττάρων) και *ασύμμετρες* (δημιουργία ενός GFP⁺ και ενός GFP⁻ θυγατρικού κυττάρου).



Εικόνα 1.10 Οι ΑΚΔ των ΑιΒΚ και παρθένων Τ κυττάρων. (Α) Τα ΑιΒΚ μεταναστεύουν συχνά εκτός θώκου (οστεοβλάστες) και εμφανίζουν έντονα στοιχεία πολικότητας τόσο σε μορφολογικό (σχηματισμός ουροπόδιου, uropod) όσο και μοριακό επίπεδο (μόρια προσκόλλησης όπως CD43, CD44, ICAM-1, ICAM-3 και ο δείκτης ΒΚ Proliminin-1 εδρεύουν στην πλασματική μεμβράνη του ουροπόδιου (κόκκινο), στη βάση του συγκεντρώνονται κυστίδια πρωτεϊνών ενδοκυτταρικής διακίνησης όπως οι CD53, CD63 και CD71 (μπλε), ενώ αντιδιαμετρικά εντοπίζονται υποδοχείς διαφόρων χημειοκινών όπως της CXCR4). Στο 20% των εκεί διαιρέσεων τα κυστίδια των πρωτεϊνών CD53, CD63 και CD71 κατανέμονται ασύμμετρα, ενώ τα μόρια προσκόλλησης (CD43, CD44, ICAM-1 και ICAM-3) συγκεντρώνονται πάντα στο μεσόσωμα. (Β) Τα μη πολωμένα παρθένα Τ κύτταρα αποκτούν έντονα στοιχεία πολικότητας με το σχηματισμό της ανοσολογικής σύναψης κατά τη σύνδεσή τους με κύτταρα APC. Ακολουθεί ΑΚΔ και ο σχηματισμός ενός Τ κυττάρου μνήμης και ενός δραστικού (βλέπε κείμενο). Αναπαραγωγή εικόνας από (34).

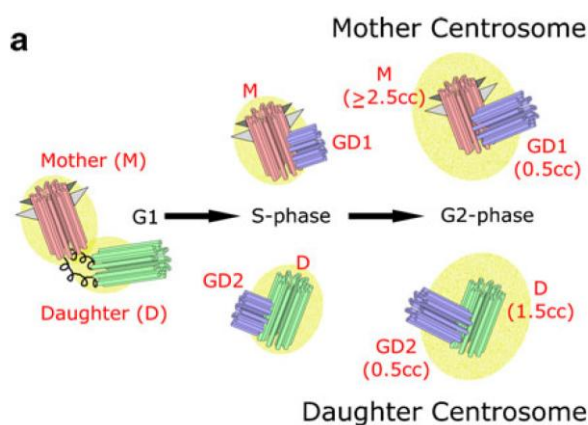
Στα ασύμμετρα διαιρούμενα ΑιΒΚ διαπιστώθηκε επίσης ο επιλεκτικός διαχωρισμός του Numb στα GFP-αρνητικά κύτταρα, υποστηρίζοντας το πρότυπο ΑΚΔ μέσω του ενδογενούς μηχανισμού. Όμως, όταν τα ίδια ΑιΒΚ καλλιεργούνταν σε διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα (συγκαλλιέργεια με στρωματικά κύτταρα που προάγουν την διαφοροποίηση ή την αυτο-ανανέωση) οι ερευνητές παρατήρησαν ότι άλλαζε ο ρυθμός των ΑΚΔ (περισσότερες ή λιγότερες ΑΚΔ, αντίστοιχα), υποστηρίζοντας τη ρύθμιση του τύπου διαίρεσης σε συμμετρική ή ασύμμετρη με βάση την εξωγενή σηματοδότηση.

1.3 Ενδογενείς ασυμμετρίες

Τα κύτταρα διαιρούνται συνήθως με συμμετρικές διαιρέσεις. Παραδόξως, όμως, τα δυο θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν μετά από συμμετρική διαίρεση εμφανίζουν διακριτές ασυμμετρίες οι οποίες ονομάζονται ενδογενείς (ανασκοπείται εκτενώς στα (11,12,14-16)). Τέτοιες ασυμμετρίες συνήθως σχετίζονται με τη βιολογία του κεντροσώματος. Τα κεντροσώματα αποτελούνται από ένα ζεύγος κυλινδρικών κεντριολίων (σε ορθή γωνία μεταξύ τους και με το ένα κεντριόλιο να είναι λίγο μεγαλύτερο από το άλλο), περιτριβαλλόμενο από περικεντροσωμικό υλικό (πρωτεϊνούχο πλέγμα που οργανώνει τους μικροσωληνίσκους) (Εικόνα 1.10). Κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου, τα κεντριόλια

διαχωρίζονται και διπλασιάζονται με ημι-συντηρητική αντιγραφή (παράλληλα με το DNA), από όπου προκύπτουν δυο διακριτά μεταξύ τους κεντροσώματα, το μητρικό και το θυγατρικό (προϊόν του διπλασιασμού του μεγαλύτερου και μικρότερου κεντριολίου, αντίστοιχα) (Εικόνα 1.10). Το θυγατρικό κεντρόσωμα υπολείπεται του μητρικού και ωριμάζει προς μητρικό κεντρόσωμα στην επόμενη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου στο θυγατρικό κύτταρο που θα το κληρονομήσει (Εικόνα 1.11). Συνεπώς, σε κάθε κυτταρική διαίρεση τα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν θα διαφέρουν ως προς την ωριμότητα και την ηλικία του κεντροσώματος που κληρονομούν.

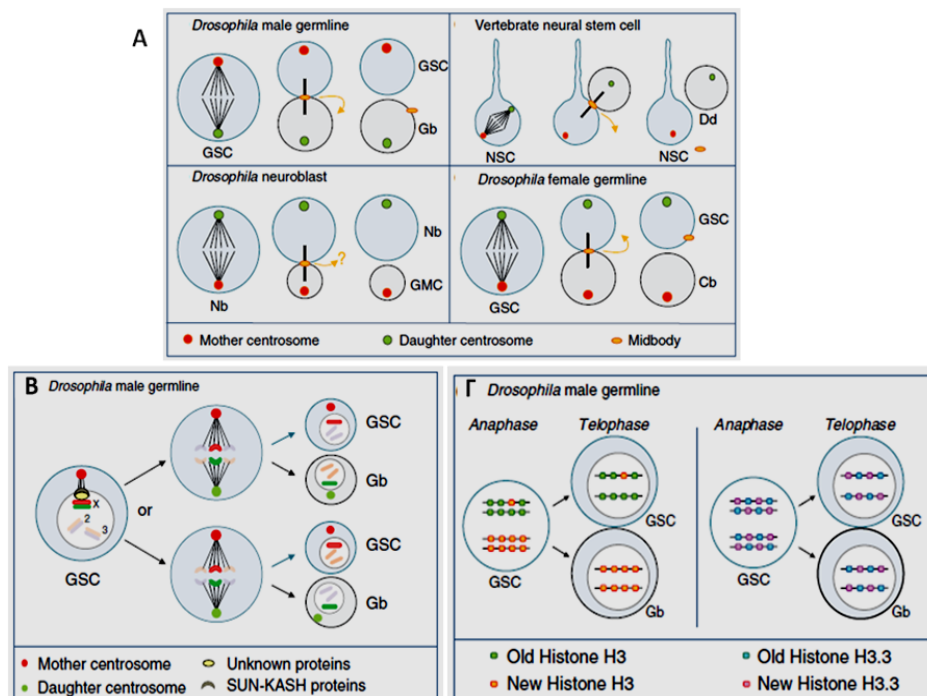
Παράλληλα με τα κεντροσώματα, ασύμμετρα διαχωρίζονται και πρωτεϊνικά συσσωματώματα (aggregates) που συσσωρεύονται στο περικεντροσωμικό υλικό του μητρικού κεντροσώματος και αποτελούνται από λάθος αναδιπλωμένες (misfolded) πρωτεΐνες και πρωτεΐνες που οδεύουν προς αποικοδόμηση (όπως οι φωσφορυλιωμένες Smad1 και β -catenin ή πολυουμπικιτυλιωμένες πρωτεΐνες). Άλλες μορφές ενδογενών ασυμμετριών είναι η κληρονομία του YM, οργανιδίων (λ.χ. ενδοσωμάτων στα ΑιΒΚ ή εξωχρωμοσωμικών κύκλων DNA και πυρηνικών πόρων στο *S. cerevisiae*) και, φυσικά, οι λιγότερο συχνές αλλά πολύ σημαντικές μη τυχαίες κατανομές του DNA εκμαγείου ή επιγενετικών μορίων/τροποποιήσεων.



Εικόνα 1.11 Σχηματική αναπαράσταση της αντιγραφής ενός κεντροσώματος. Σε παρένθεση αναγράφεται η ηλικία κάθε κεντριολίου σε κυτταρικούς κύκλους (cc). Προσαρμοσμένη αναπαραγωγή εικόνας από ⁽¹⁶⁾.

Για αυτές τις ασυμμετρίες θα υπέθετε κανείς ότι δεν εμφανίζουν κάποιο ουσιαστικό ενδιαφέρον, τη στιγμή που παρουσιάζονται σε όλες τις διαιρέσεις χωρίς να προσδίδουν διαφορετική κυτταρική τύχη στο ένα εκ των δυο θυγατρικών κυττάρων. Ωστόσο, στα ασύμμετρα διαιρούμενα κύτταρα εμφανίζουν μερικά πολύ ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Πιο συγκεκριμένα, σε πολλές περιπτώσεις ασύμμετρα διαιρούμενων ΒΚ, η κατανομή των κεντροσωμάτων (μητρικό-θυγατρικό) στο αυτό-ανανεούμενο ή το διαφοροποιούμενο κύτταρο εμφανίζεται με στερεότυπο τρόπο. Επιπλέον, σε πολλές ΑΚΔ,

επίσης στερεότυπα κατανέμεται το ΥΜ. Για παράδειγμα, το θυγατρικό κεντροσώμα μαζί με το ΥΜ κληρονομούνται πάντα μαζί από τη διαφοροποιημένη γαμετοβλάστη (gonialblast) στο αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα (male germline) της *Drosophila* και αντίστοιχα από το αναπαραγωγικό ΒΚ (germline stem cell) στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα (female germline) (Εικόνα 1.12Α). Στο αρσενικό παρατηρούνται και δυο ακόμα ενδιαφέρουσες μορφές ασυμμετρίας. Η πρώτη αφορά στη μη τυχαία κατανομή των αδελφών χρωματίδων των Χ και Υ χρωμοσωμάτων (Εικόνα 1.12Β) και η δεύτερη στη στερεότυπη κατανομή των παλαιότερων και νεοσυντιθέμενων μορίων της ιστόνης H3 σημασμένων ασύμμετρα από την φωσφορυλίωση στην θέση Θρεονίνη 3 (Εικόνα 1.12Γ και (35)). Σε άλλες περιπτώσεις ΑΚΔ, κυρίως σε ενήλικα ΒΚ, παρατηρείται μια πιο εκτεταμένη μορφή μη τυχαίας κατανομής γενομικού υλικού (-NTRS, non-random template segregation) που αφορά το σύνολο του εκμαγείου DNA. Η διαπίστωση αυτή έδωσε το έναυσμα για τη διατύπωση της θεωρίας του αθάνατου κλώνου (*immortal strand hypothesis*) το 1975 (36), η οποία αποτέλεσε αντικείμενο μεγάλης επιστημονικής διαμάχης που συνεχίζεται μέχρι τις μέρες μας (ενδεικτικά⁽³⁷⁾). Το βέβαιο είναι ότι δεν αμφισβητείται τόσο η ύπαρξη της εγγενούς αυτής ασυμμετρίας όσο η τελεονομία της. Για τον λόγο αυτό έχουν προταθεί αρκετές εναλλακτικές θεωρίες (ενδεικτικά^(37,38)).



Εικόνα 1.12 Ενδογενείς ασυμμετρίες στα ασύμμετρα διαιρούμενα κύτταρα που αναγράφονται (βλέπε κείμενο). (Α) Η στερεότυπη κληρονομή του μητρικού κεντροσώματος και του ΥΜ. (Β) Η μη τυχαία κατανομή του μητρικού κεντροσώματος και των αδελφών χρωματίδων των Χ και Υ χρωμοσωμάτων στις ΑΚΔ του αρσενικού αναπαραγωγικού συστήματος της *Drosophila*. (Γ) Η μη τυχαία κατανομή των παλαιότερων και νεοσυντιθέμενων μορίων της ιστόνης H3 (αλλά όχι της H3.3) στις ΑΚΔ του αρσενικού αναπαραγωγικού συστήματος της *Drosophila*. Προσαρμοσμένη αναπαραγωγή εικόνων από⁽¹⁵⁾.

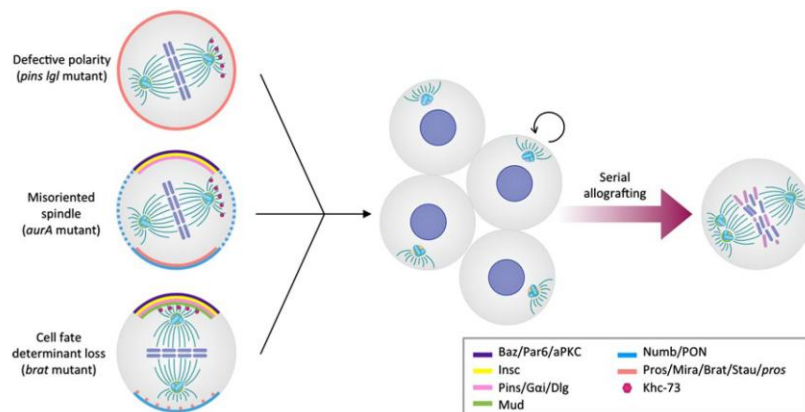
Αντιθέτως, η τελεονομία της ασύμμετρης κατανομής εξωχρωμοσωμικών κύκλων DNA και πυρηνικών πόρων στο *S. cerevisiae* δεν αμφισβητείται αφού αποδεδειγμένα συνεισφέρει στη δημιουργία απογόνων με μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής. Στα κύτταρα που διαιρούνται με ανοιχτή μίτωση, μπορεί η ασύμμετρη κατανομή των πυρηνικών πόρων να είναι αδύνατη (ο πυρηνικός φάκελος διαλύεται στη μίτωση) αλλά δεν αποκλείεται ο σχηματισμός ανόμοιων πυρηνικών φακέλων μεταξύ των θυγατρικών κυττάρων. Η ετερογένεια αυτή μπορεί να είναι ποσοτική, ποιοτική-λειτουργική ή ακόμα και χρονική, δηλαδή να διαχωρίζονται ασύμμετρα τα στοιχεία των διαλυμένων πυρηνικών φακέλων ή των ρυθμιστών της διαδικασίας ανασύστασής τους ώστε να προκύπτουν πυρηνικοί φάκελοι δομικώς διαφορετικοί ή με χρονοκαθυστέρηση μεταξύ των θυγατρικών κυττάρων. Ενδεικτικό πάντως της παραπάνω υπόθεσης είναι το γεγονός ότι η πυρηνο-κυτταροπλασματική κυκλοφορία εξελίσσεται διαφορετικά στα ασύμμετρα και συμμετρικά διαιρούμενα κύτταρα⁽³⁹⁾.

1.4 Ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση και νεοπλασία

Ο καρκίνος αποτελεί ένα πολύ ιδιαίτερο βιολογικό γεγονός, στο οποίο κυριαρχούν χαρακτηριστικά όπως ο άναρχος πολλαπλασιασμός, η απορύθμιση των μηχανισμών ελέγχου της κυτταρικής αύξησης ή της απόπτωσης, η διαρκής ενεργοποίηση μονοπατιών επιβίωσης και όλα αυτά σε ένα περιβάλλον έντονης γενομικής αστάθειας⁽⁴⁰⁾. Η ανάκτηση των χαρακτηριστικών αυτών γίνεται κατά βάση μέσω μεταλλάξεων. Οι αλλοιωμένες βιολογικές λειτουργίες που σχετίζονται με τον καρκίνο (πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης, κυτταρικού σχήματος και τύχης, αρχιτεκτονικής ιστών και γενωμικής σταθερότητας) είναι σε ένα βαθμό κοινές με αυτές που ρυθμίζουν τις ΑΚΔ. Έτσι, η ΑΚΔ θα πρέπει δυνητικά να σχετίζεται με τον καρκίνο ή/και καρκινογένεση (ανασκοπείται στα (7,22,26,33,34,41,42)). Πράγματι, από τη δεκαετία του 1970 είναι γνωστό ότι μεταλλάξεις απώλειας δράσης (loss-of-function mutations) μιας πλειάδας ρυθμιστών της ΑΚΔ (*Lgl*, *Aurora A*, *Polo*, *Numb* και *brat*) στη *Drosophila* προκαλούν υπερτροφίες in situ. Για παράδειγμα, στις NB της *Drosophila* τέτοιες μεταλλάξεις προκαλούν αυξημένη ανάπτυξη μέσω αλληπάλληλων συμμετρικών διαιρέσεων. Αυτές οι ενδείξεις ενισχύθηκαν περαιτέρω από πειράματα μεταμόσχευσης των μεταλλαγμένων ιστών στο υπογάστριο ενήλικων ζώων. Τα εγκεφαλικά μοσχεύματα μεταλλαγμένων προνυμφών για τα *Lgl*, *Dgl*, *Pins*, *Numb*, *Miranda Pros* ή *Brat* αναπτύσσονταν επεκτατικά και εισέβαλαν στον ξενιστή (Εικόνα 1.13). Έπειτα από διαδοχικές αλλογενείς μεταμοσχεύσεις προέκυψαν κύτταρα με χρωμοσωμικές ή κεντροσωμικές ανωμαλίες και ικανότητα ανάπτυξης εκ νέου προς ογκόμορφες

κυτταρικές μάζες (Εικόνα 1.13). Οι παραπάνω εργασίες, πέραν της προφανούς σχέσης μεταξύ της απουσίας ΑΚΔ και της υπερτροφίας ενισχύουν την άποψη ότι η απώλεια της πολικότητας και του ελέγχου της μιτωτικής ατράκτου ίσως να αποτελούν ένα σημαντικό αρχικό στάδιο της εξαλλαγής.

Στα καρκινικά κύτταρα του ανθρώπου, έχουν βρεθεί αντίστοιχες αλλοιώσεις (μεταλλάξεις) ρυθμιστών ΑΚΔ (ενδεικτικά βλέπε τον Πίνακα 1 του ⁽²⁶⁾). Σε αυτούς τους ρυθμιστές συγκαταλέγονται οι *Par-6*, *Par-3* και *Dlg2*. Επιπλέον, υπάρχουν κι άλλοι αντίστοιχοι ρυθμιστές ΑΚΔ οι οποίοι δεν φέρουν μεν μεταλλάξεις, αλλά υπόκεινται σε «αποκλίνουσα» ρύθμιση στα καρκινικά κύτταρα. Η πιο καλά μελετημένη περίπτωση είναι αυτή του Numb. Ο Numb δρα ογκοκατασταλτικά σε διάφορους τύπους καρκίνου π.χ. νεοπλασμάτα του μαστού και λευχαιμίες. Στον καρκίνο του μαστού τα πρωτεϊνικά του επίπεδα είναι συνήθως πολύ χαμηλά ή και ανύπαρκτα. Σε πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων των ασθενών η μειούμενή του έκφραση σχετίζεται με αυξημένη δραστηριότητα του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch, αλλά και με μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης p53.



Εικόνα 1.13 Μεταλλάξεις που προκαλούν απώλεια της πολικότητας, του προσανατολισμού της ατράκτου ή του προσδιορισμού της κυτταρικής τύχης, οδηγούν σε υπερπολλαπλασιασμό χωρίς διαφοροποίηση των NB της *Drosophila* (βλέπε κείμενο). Αναπαραγωγή εικόνας από ⁽²⁶⁾.

Η προκλητή υπερέκφραση του Numb σε αυτές τις καλλιέργειες ακολουθείται από σημαντική μείωση της δραστηριότητας του Notch και επαναφορά της p53 σε φυσιολογικά επίπεδα. Αντίστοιχα, στη βλαστική κρίση της χρόνιας μυελοειδούς λευχαιμίας παρατηρείται μείωση των επιπέδων του παράγοντα Numb, αυξημένη σηματοδότηση Notch και μειωμένη δραστηριότητα του p53. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και στο ποντίκι. Εκεί, η υπερέκφραση του Numb ή η καταστολή της σηματοδότησης Notch είναι ικανές να μειώσουν την εμφάνιση και την πρόοδο της βλαστικής κρίσης. Και στις δύο αυτές νεοπλασίες, η λειτουργική έλλειψη του Numb οφείλεται σε μετα-μεταφραστικές

τροποποιήσεις και όχι σε μεταλλάξεις του γονιδίου. Στη διαδικασία αυτή πρωτεύοντα ρόλο παίζει η πρωτεΐνη Musashi2, η οποία προσδένεται στην 3' αμετάφραστη περιοχή (untranslated region, UTR) του mRNA του *Numb* και το εμποδίζει να μεταφραστεί.

Οι παραπάνω εργασίες προσφέρουν απτά στοιχεία για την συμμετοχή βασικών ρυθμιστών της ΑΚΔ στα μόρια-στόχους που απορρυθμίζονται από τα καρκινικά κύτταρα. Όμως, δεν αποσαφηνίζεται εάν και σε τι βαθμό η απορύθμιση αυτή συνεπάγεται την απώλεια της ικανότητας για ΑΚΔ. Κάτι τέτοιο επιχείρησαν να μελετήσουν οι Wu *et al.*,⁽¹⁸⁾ σε διαγονιδιακό στέλεχος ποντικού (TNR) το οποίο αποτελεί σύστημα αναφοράς της σηματοδότησης μέσω Notch (βλέπε ενότητα 1.2.5). Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν τα αιμοποιητικά κύτταρα του TNR ποντικού *ex vivo*, ώστε να χαρακτηριστούν οι ΑΚΔ των φυσιολογικών προγονικών ΒΚ του αιμοποιητικού. Στη συνέχεια, εξετάζοντας τα κύτταρα αυτά (είτε σε συγκαλλιέργειες με άλλα κύτταρα είτε κατόπιν εξαλλαγής τους) διαπίστωσαν πως η ισορροπία των συμμετρικών και ασύμμετρων διαιρέσεων που πραγματοποιούν επηρεάζεται άμεσα από το μικροπεριβάλλον και την ενεργοποίηση ογκογονιδίων. Με άλλα λόγια, στην οξεία μυελογενή λευχαιμία προάγεται η ανάπτυξη αδιαφοροποίητων κυττάρων (ενεργή σηματοδότηση Notch) που προέρχονται από συμμετρικές διαιρέσεις αυτό-ανανέωσης, ενώ μειώνεται ο ρυθμός των ΑΚΔ. Συγκεντρωτικά, από τις παραπάνω μελέτες γίνεται σαφές ότι μια από τις φυσιολογικές λειτουργίες που απορρυθμίζονται στον καρκίνο είναι και η ΑΚΔ. Η απορύθμιση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση των ΑΚΔ από συμμετρικές διαιρέσεις, χωρίς όμως να είναι σαφές σε πιο στάδιο (δηλαδή πόσο πρώιμα) της καρκινικής εξαλλαγής εμφανίζεται.

1.5 Ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση και εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα

Τα ΕΒΚ είναι πολυδύναμα κύτταρα ικανά να αυτό-ανανεώνονται επ' άπειρον και να διαφοροποιούνται προς όλες τις ιστικές κατευθύνσεις. Τα ΕΚΒ του ποντικού προέρχονται από τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας της πρώιμης βλαστοκύστης (3,5 ημερών μετά τη γονιμοποίηση). Από την ανακάλυψη του πρωτοκόλλου απομόνωσης και καλλιέργειάς τους *in vitro* ξεκίνησε μια νέα εποχή στο πεδίο της αναπτυξιακής βιολογίας⁽⁴³⁾. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το πεδίο των ΒΚ συγκαταλέγεται στα πλέον χρηματοδοτούμενα, αναπτυσσόμενα και πιο παραγωγικά (σε όγκο δημοσιεύσεων) στις μέρες μας (ενδεικτικά⁽⁴⁴⁾). Ωστόσο, το τεράστιο ερευνητικό ενδιαφέρον του πεδίου των ΒΚ συχνά επισκιάζεται από μια διαπιστωμένη ασάφεια, ή οποία είναι ιδιαίτερα έντονη στη βιβλιογραφία της ΑΚΔ

(ανασκοπείται μερικώς στο ⁽⁴⁵⁾). Συχνά, ο όρος της βλαστικότητας χρησιμοποιείται λανθασμένα για να περιγραφούν διαφορετικές περιπτώσεις κυτταρικών τύπων από όλο το εύρος του αναπτυξιακού φάσματος. Πιο αναλυτικά, με τον όρο ΒΚ (stem cell) περιγράφονται συχνά τόσο εμβρυονικά ΒΚ (ΕΒΚ) όσο και ΒΚ ενήλικα, χωρίς σαφή διαχωρισμό. Επιπλέον και κατ' επέκταση του προηγούμενου, στον όρο ΕΒΚ συγκαταλέγονται τα πραγματικά (in vivo) ΕΚΒ, τα ex vivo παράγωγά τους (δηλαδή τα in vitro καλλιεργούμενα ΕΒΚ), αλλά και τα προγονικά κύτταρα (progenitor cells) των διαφόρων ιστικών τύπων που απαντώνται in vivo και in vitro. Πέραν των άλλων, στο πεδίο των ΑΚΔ η στερεότυπη εισαγωγική έκφραση στην πλειοψηφία των δημοσιευμένων ανασκοπήσεων είναι της μορφής: «τα ΒΚ διαιρούνται ασύμμετρα παράγοντας ένα θυγατρικό που παραμένει βλαστικό (αυτό-ανανεώνεται) και ένα άλλο που διαφοροποιείται» (ενδεικτικά ^(6,8,25,46,47)). Η διατύπωση αυτή είναι σωστή εν μέρει. Τα πρότυπα ΑΚΔ που περιγράφηκαν στην ενότητα 1.2 μπορούν να χαρακτηριστούν βλαστικά, αλλά με την υποσημείωση ότι στην περίπτωση του ζυγωτού του *C. elegans* ο όρος θα έχει υποτιμηθεί (το ζυγωτό είναι ολοδύναμο κι όχι απλός πολυδύναμο). Στις άλλες περιπτώσεις ο όρος είναι επίσης παραπλανητικός διότι εξισώνει, κατά μία έννοια, τα ολιγοδύναμα προγονικά ΒΚ με τα πολυδύναμα ΒΚ. Με βάση τα παραπάνω, η παρουσία ΑΚΔ κατά την in vitro διαφοροποίηση ΕΒΚ παραμένει ανεξιχνίαστη, παρά τη βιβλιογραφική αίσθηση περί του αντιθέτου.

Η παρανόηση αυτή θα ήταν άνευ ουσίας αν δεν είχε χρησιμοποιηθεί για να εξηγηθούν αποτελέσματα ή να εξαχθούν συμπεράσματα από μερίδα δημοσιευμένων μελετών (συζητείται εκτενώς στην ενότητα 4.2). Έτσι, παρά τη συχνότητα με την οποία διαπιστώνονται ΑΚΔ σε «ΒΚ», στην πραγματικότητα οι μελέτες διερεύνησης ασυμμετριών σε διαφοροποιούμενα πολυδύναμα ΕΒΚ σπανίζουν. Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι στις περισσότερες in vitro μελέτες ελέγχεται μια σειρά παραμέτρων της κατηγορίας των εγγενών ασυμμετριών ή πρωτότυπων κυτταρο-σχετικών ή ιστοειδικών δεικτών, χωρίς τον ταυτόχρονο έλεγχο κλασικών δεικτών ασυμμετρίας, αναδεικνύει την βιβλιογραφική ασάφεια του γενικότερου πεδίου της ΑΚΔ των ΒΚ in vitro. Έτσι, δημιουργείται η αίσθηση ότι τα ΕΒΚ διαιρούνται πάντα με ασύμμετρο τρόπο. Ωστόσο, η μεγάλη λειτουργική σημασία της ΑΚΔ in vivo επιβάλλει τη διερεύνηση του φαινομένου στο περιβάλλον των ΕΒΚ, διότι τα κύτταρα αυτά αποτελούν το βασικό εργαλείο για την πρόοδο της αναγεννητικής ιατρικής και όχι μόνο.

1.6 Σκοπός

Έχει δειχθεί ότι μια υβριδική πρωτεΐνη, που περιέχει στο μόριό της τμήμα της νουκλεοπορίνης NUP98 και του HOXA9, προκαλεί λευχαιμία στο ποντίκι, ενώ ταυτόχρονα μειώνει το σχετικό ποσοστό ΑΚΔ στα ΑιΒΚ. Βασιζόμενοι σε αυτή την παρατήρηση επιχειρήσαμε να εξετάσουμε το ρόλο των νουκλεοπορινών στην ΑΚΔ και κατά συνέπεια στη λευχαιμία. Ο αρχικός σχεδιασμός περιελάμβανε τη χρήση του διαγονιδιακού στελέχους TNR. Για τεχνικούς και οικονομικούς λόγους, το σύστημα αυτό δεν έγινε δυνατόν να χρησιμοποιηθεί από το εργαστήριό μας. Έτσι, η μελέτη της πυρηνοκυτταροπλασματικής κυκλοφορίας σε ασύμμετρα διαιρούμενα κύτταρα προσεγγίστηκε με εναλλακτικούς τρόπους.

Αρχικά αναζητήθηκε η παρουσία ΑΚΔ σε λευχαιμικές κυτταρικές σειρές, όπου όμως διαπιστώθηκε ότι η ΑΚΔ δεν είναι ανιχνεύσιμη. Ακολούθησε η ανάλογη μελέτη σε ΕΒΚ ποντικού. Για αυτό το λόγο η διερεύνηση της ΑΚΔ συνεχίστηκε χρησιμοποιώντας ένα πλήθος δεικτών και δοκιμασιών. Επιπλέον, διερευνήθηκε η δομή και σύσταση των πυρηνικών φακέλων στα διαφοροποιούμενα θυγατρικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν υπό όλες τις συνθήκες μελέτης συνηγορούν στην ιδέα ότι τα ΕΒΚ διαιρούνται αποκλειστικά με συμμετρικό τρόπο. Ωστόσο, βασική σημασία στην εμφάνιση διαφοροποιημένων εμβρυικών δομών φαίνεται να έχει ο κυτταρικός διαχωρισμός.

Κεφάλαιο 2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων

2.1.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Οι λευχαιμικές κυτταρικές σειρές HL60, HuT78 και Jurkat αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας 37⁰C και εμπλουτισμένης ατμόσφαιρας σε CO₂ (5%). Το θρεπτικό υλικό για τα παραπάνω κυτταρικά συστήματα ήταν το RPMI1640 εμπλουτισμένο με 10% FCS (Fetal Calf Serum), 2mM L-γλουταμίνη και 2mM πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Για τη διαφοροποίηση των κυττάρων HL60 χρησιμοποιήθηκε η προσθήκη DMSO σε τελική συγκέντρωση 1,25%.

Τα EBK ποντικού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν τα κύτταρα τύπου E14 και TNGA, τα οποία αποτελούν ευγενική χορηγία του εργαστηρίου του Austin Smith (Cambridge University). Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας 37⁰C και ατμόσφαιρας εμπλουτισμένης σε CO₂ κατά 5%. Το θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια των EKB ήταν GMEM (Glassgow Modified Eagle's Medium) με την προσθήκη 15% FCS, 2mM L-γλουταμίνη, 2mM πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, 0,1mM μη απαραίτητα αμινοξέα και 1mM πυροσταφυλικό νάτριο. Επιπλέον, κάθε αλλαγή θρεπτικού ακολουθούσε η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας 2-β-μερκαπτοαιθανόλης (τελική συγκέντρωση 100μM) και LIF (παρασκευάζεται στο εργαστήριό μας και χρησιμοποιείται ποσότητα αντίστοιχη με 1000 μονάδες ανά ml θρεπτικού). Πριν πραγματοποιηθούν πειράματα με τα κύτταρα TNGA, είχαν προηγηθεί τρία διαδοχικά περάσματά τους παρουσία 1μg/ml πουρομυκίνης σύμφωνα με τις πρακτικές που ακολουθούνται διεθνώς(48).

Οι κλώνοι του εργαστηρίου μας που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα διατριβή ήταν οι F25, C28, B12 και A11. Ως κλώνοι EBK καλλιεργούνται στις ίδιες συνθήκες με τα κύτταρα τύπου E14, με την εξαίρεση της παρουσίας 1μg/ml πουρομυκίνης στο θρεπτικό μέσο για τη διατήρηση του επισωματικού φορέα με τον οποίο κατασκευάστηκαν.

Οι εμβρυονικοί ινοβλαστες ποντικού (mouse embryonic fibroblasts –MEFs) του εργαστηρίου μας καλλιεργούνται στις σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και ατμόσφαιρας όπως παραπάνω. Το καλλιεργητικό τους μέσο είναι DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) μεγάλης περιεκτικότητας σε γλυκόζη και με πυροσταφυλικό νάτριο εμπλουτισμένο με 10% FCS, 2mM L-glutamax και 2mM πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη.

Κατά περίπτωση, κύτταρα HL60 ή HuT78 καλλιεργήθηκαν παρουσία 5 ή 9μM Nocodazol για 12-18 ώρες και κύτταρα E14 παρουσία 500nM SAG (Calbiochem) για 5 ώρες. Με το πέρας της εκάστοτε επώασης το θρεπτικό μέσο ανανεωνόταν αφού είχαν προηγηθεί τρεις πλύσεις με PBS.

Όλα τα θρεπτικά υλικά (RPMI1640, GMEM, IMDM και DMEM high glucose) προμηθεύτηκαν από τη Lonza, τα συμπληρώματά τους (οροί, γλουταμίνη, πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη κτλ) από τη Gibco και τα λοιπά χημικά (λ.χ. DMSO) από τη Sigma Aldrich, εκτός και αν αναφέρεται διαφορετικά (ισχύει για όλο το κεφάλαιο 2).

2.1.2 Καλλιέργεια νωπών δειγμάτων ασθενών με λευχαιμία.

Νωπά δείγματα λευχαιμικών κυττάρων σε PBS (Phosphate Buffer Saline) εμπλουτισμένα ή όχι σε κύτταρα CD34⁺ παρελήφθησαν από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων σε συνεργασία με τον καθηγητή Ευάγγελο Μπριασούλη. Τα παραπάνω κύτταρα επιχειρήθηκε ανεπιτυχώς να εκπτυχθούν στις παραπάνω συνθήκες καλλιέργειας των λευχαιμικών κυτταρικών σειρών (βλέπε ενότητα 2.1.1).

2.1.3 Διαφοροποίηση ΒΚ

2.1.3.1 Διαφοροποίηση σε δυο διαστάσεις (2D)

Τα ΕΒΚ διαφοροποιήθηκαν σε δυο διαστάσεις (2D) απουσία LIF και 2-β-μερκαπτοαιθανόλης από το θρεπτικό μέσο (τυχαία διαφοροποίηση προς όλες τις κατευθύνσεις), ενώ με τον ταυτόχρονο εμπλουτισμό του με 10μM ρετινοϊκού οξέος (RO) τα ΕΒΚ διαφοροποιήθηκαν στοχευμένα σε νευροεξοδερμική κατεύθυνση. Και στις δυο περιπτώσεις μετά τη θρυψινοποίηση, τα ΕΒΚ καταμετρήθηκαν (χρήση αιμοκυτταρόμετρου) και επιστρώθηκαν ~ 300.000 κύτταρα ανά τρυβλίο 60mm διαμέτρου. Το θρεπτικό μέσο άλλαζε σε καθημερινή βάση για όσο διαρκούσε η εκάστοτε διαφοροποίηση.

2.1.3.2 Διαφοροποίηση σε τρεις διαστάσεις (3D)

Τα ΕΚΒ τύπου E14, οι κλώνοι του εργαστηρίου μας και αναμείξεις κυττάρων E14 με κύτταρα κάποιου κλώνου, διαφοροποιήθηκαν σε τρεις διαστάσεις με τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας. Πιο αναλυτικά, 600 μονήρη κύτταρα σε 20μl θρεπτικού μέσου τοποθετήθηκαν στην εσωτερική επιφάνεια των καπακιών βακτηριολογικών τρυβλίων για διάστημα δυο ημερών, ώστε να σχηματίσουν εμβυοειδή σωμάτια (embryoid bodies-EB). Το θρεπτικό μέσο ήταν α) το ίδιο με αυτό της έκπτυξης των ΕΒΚ χωρίς προσθήκη LIF ή 2-β-

μερκαπτοαιθανόλης (στο εξής GMEM) ή β) IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) εμπλουτισμένο με 15% FCS, 2mM L-γλουταμίνη, 2mM πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και 15mM α-μονοθειογλυκερόλη (στο εξής IMDM). Τη δεύτερη ημέρα, ~100 EB συλλέγονταν σε βακτηριολογικά τρυβλία διαμέτρου 60mm και συμπληρώνονταν το θρεπτικό τους υλικό ως τα 2ml. Στη συνέχεια το θρεπτικό μέσο ανανεώνονταν κάθε δεύτερη ημέρα από την 3^η ημέρα και μετά. Για τυχαίες διαφοροποιήσεις γινόταν χρήση GMEM υλικού. Για νευροεξωδερμικής κατεύθυνσης διαφοροποιήσεις το GMEM μέσο εμπλουτιζόταν με 1μM PO την ημέρα της συλλογής των EB και στις αλλαγές θρεπτικού την 3^η και 5^η ημέρα. Για μεσοδερματικής κατεύθυνσης διαφοροποιήσεις γινόταν χρήση IMDM μέσου. Για το σχηματισμό χιμαιρικών EB μεταξύ κυττάρων ενός κλώνου με κύτταρα E14 δοκιμάστηκαν διάφορες στοιχειομετρικές αναλογίες χωρίς όμως να αλλάζει ο συνολικός αριθμός των 600 κυττάρων ανά σταγόνα. Ανάλογα με τον εκάστοτε πειραματικό σχεδιασμό, σε αρκετές περιπτώσεις μια ή περισσότερες ημέρες πριν την παρατήρηση των EB, αυτά μεταφέρονταν σε τρυβλία (με γυάλινο πυθμένα ή καλυπτρίδες) επιστρωμένα με ζελατίνη ώστε να προσκολλήσουν και εκπτυχθούν εκεί.

Σε ένα μεγάλο κύκλο πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν τρισδιάστατες διαφοροποιήσεις σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Elabd et al.,(49). Η διαδικασία ήταν παρόμοια με αυτή που περιγράφηκε με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν 1000 κύτταρα αντί 600 ανά κρεμάμενη σταγόνα. Στη συνέχεια, ~27 ώρες πριν την επιθυμητή ημέρα παρατήρησης, προστέθηκαν 10μM αναλόγου θυμηδίνης (BrdU) στο θρεπτικό μέσο για ~6 ώρες. Ακολούθησε θρυψινοποίηση των EB ~12 ώρες μετά και τα μονήρη κύτταρα επιστρώθηκαν αραιά (10-20 κύτταρα ανά mm²) σε επιστρωμένες καλυπτρίδες με Matrigel (BD). Τα δείγματα που προέκυψαν μονιμοποιήθηκαν μετά από ~9 ώρες.

2.1.4 Διαμόλυνση EBK μέσω ηλεκτροδιαπίδησης

Τα κύτταρα E14 διαμολύνθηκαν με έναν ή δυο πλασμιδιακούς φορείς ανάλογα με τις απαιτήσεις των πειραμάτων που περιγράφονται στο κεφάλαιο 3. Η διαμόλυνση έγινε με τη διαδικασία της ηλεκτροδιαπίδησης κάνοντας χρήση της ειδικής συσκευής ECM630 (BTX Inc.) και των αντίστοιχων κυψελίδων (cuvettes-BTX 640) του εργαστηρίου μας. Πρακτικά, 5x10⁶ μονήρη κύτταρα αραιωμένα σε 400μl GMEM μέσου τοποθετήθηκαν μαζί με 20μg πλασμιδίου (10μg από κάθε πλασμίδιο στα πειράματα συνδιαμόλυνσης με δυο φορείς) στις ειδικές κυψελίδες και υπέστησαν ηλεκτροδιαπίδηση ορίζοντας τις

παραμέτρους της συσκευής ως εξής: 200V, 950μF και 0Ω. Στη συνέχεια αφέθηκαν να εκπτυχθούν κατά τις συνήθεις πρακτικές.

2.2 Μέθοδοι γενετικής μηχανικής

2.2.1 Μετασηματισμός επιδεκτικών κυττάρων

Για το μετασηματισμό επιδεκτικών κυττάρων ακολουθήθηκε η μεθοδολογία των Sambrook et al.,(50). Περιληπτικά, σε 100μl αιωρήματος επιδεκτικών κυττάρων προστέθηκαν 3ng πλασμιδιακού φορέα και επώαστηκαν στον πάγο για 20 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησε θερμικό σοκ για 1 λεπτό στους 42⁰C. Με την προσθήκη 1ml LB τα κύτταρα αφέθηκαν να εκπτυχθούν για 1 ώρα στους 37⁰C σταθεροποιημένα σε τροχιακό επωαστήρα. Τα βακτήρια που αναπτύχθηκαν συγκεντρώθηκαν με φυγοκέντριση (5000g για 5 λεπτά) και επιστρώθηκαν σε τρυβλία στερεού LB με το κατάλληλο για τον κάθε πλασμιδιακό φορέα αντιβιοτικό (συνήθως αμικιλίνη ή καναμικίνη). Λίγα λεπτά αργότερα (απαραίτητος χρόνος για την απορρόφηση των κυττάρων στην επιφάνεια του στερεού LB) τα τρυβλία επώαστηκαν ανεστραμμένα ολονύκτια στους 37⁰C. Την επόμενη ημέρα μονές αποικίες επιλέχθηκαν για πιστοποίηση.

2.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες

2.2.2.1 Μικρής κλίμακας καλλιέργειες

Μικρής κλίμακας καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν για την άμεση και οικονομική ταυτοποίηση κατασκευής επιθυμητών πλασμιδιακών φορέων. Έτσι, 1,5ml από μονές αποικίες μετασηματισμένων επιδεκτικών κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε 3ml LB παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού (ολονύχτια ανάδευση σε τροχιακό αναδευτήρα στους 37⁰C) φυγοκεντρήθηκε (1200g για 5 λεπτά) και επαναιωρήθηκε σε 100μl διαλύματος P1 (50mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA, 100μg/ml RNase). Στη συνέχεια προστέθηκαν 100μl διαλύματος PII (0,2N NaOH, 1% w/v SDS), 100μl διαλύματος PIII (3M CH₃COONa pH 5,5) και αφού φυγοκεντρήθηκε (13000g για 10 λεπτά), το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο αποστειρωμένο σωληνάριο μαζί με 1ml παγωμένης αιθανόλης (100%). Ακολούθησε φυγοκέντριση (13000g για 15 λεπτά στους 4⁰C) και επαναιώρηση του ιζήματος σε 1ml διαλύματος 70% αιθανόλης πριν φυγοκεντρηθεί εκ νέου στις ίδιες συνθήκες. Με την αφαίρεση του υπερκείμενου, το νέο ίζημα (πλασμιδιακό DNA) αφέθηκε να ξεραθεί πλήρως πριν επαναδιαλυτοποιηθεί με την προσθήκη 30μl δις απεσταγμένου νερού (ddH₂O).

2.2.2.2 Μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες

Η ποιοτική απομόνωση μεγάλης ποσότητας πλασμιδιακού φορέα προϋποθέτει την έκπτυξη μεγάλων καλλιεργειών και τη χρήση κατάλληλων πακέτων (kit) όπως π.χ. το Nucleobond PC100 (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co.) που χρησιμοποιείται από το εργαστήριό μας. Η χρήση του εν λόγω kit έγινε ακολουθώντας πιστά τις εσώκλειστες οδηγίες του κατασκευαστή.

2.2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Ανάλογα με το μέγεθος των θραυσμάτων DNA προς ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν πηκτές αγαρόζης 1-3%. Για την παρασκευή τους, σκόνη αγαρόζης διαλύθηκε σε διάλυμα 1xTAE (ύστερα από βρασμό) και εμπλουτίστηκε με 0,5mg/ml βρομιούχου αιθιδίου. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε κατάλληλο εκμαγείο έως ότου σταθεροποιηθεί. Τέλος, εμβαπτίζεται σε διάλυμα 1xTAE σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης και φορτώνεται με τα δείγματα DNA προς ανάλυση μαζί με κατάλληλο DNA μάρτυρα (DNA ladder, Fermentas). Μετά την ηλεκτροφόρηση, παρατηρείται και φωτογραφίζεται υπό έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV light).

2.2.4 Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης

Η απομόνωση θραυσμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με το kit Nucleobond gel extraction (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co.) σύμφωνα με τις εσώκλειστες οδηγίες του κατασκευαστή.

2.2.5 Πέψη πλασμιδίων με ένζυμα περιορισμού

Για μια πληθώρα περιπτώσεων (π.χ. άνοιγμα ή ταυτοποίηση φορέων) το δίκλωνο DNA κόβεται με συστηματικό τρόπο από ένζυμα περιορισμού (των εταιριών TaKaRa ή New England Biolabs -NEB). Σε διάφορες κατασκευές πλασμιδιακών φορέων έγινε χρήση περιοριστικών ενζύμων πάντα σύμφωνα με τις ανάγκες του εκάστοτε ενζύμου.

2.2.6 Συρραφή ενθέματος με το φορέα (ligation)

Για την κατασκευή του επιθυμητού πλασμιδιακού φορέα, το ένθεμα και ο ανοιγμένος άδειος φορέας πρέπει να έχουν κοπεί από κοινά περιοριστικά ένζυμα. Για τη συρραφή τους απαιτείται η δράση του ενζύμου της λιγάσης DNA η οποία καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών. Στην παρούσα διατριβή έγινε χρήση της T4 λιγάσης DNA από την NEB σύμφωνα με τις προτεινόμενες οδηγίες.

2.3 Μορφολογικές μέθοδοι

2.3.1 Επίστρωση κυτταρικών εναιωρημάτων σε γυάλινες επιφάνειες για ανάλυση με έμμεσο ανοσοφθορισμό (διαδικασίες *alcian blue*, *φυγοκέντρωσης* και *cytospin*)

Τα λευχαιμικά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη αναπτύσσονται σε εναιώρημα. Για την ανάλυσή τους με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού απαιτείται η επίστρωσή τους σε γυάλινες επιφάνειες (όπως καλυπτρίδες ή αντικειμενοφόρες πλάκες). Για την επίστρωσή τους διενεργήθηκαν τρεις μέθοδοι. Αρχικά, καθαρές γυάλινες καλυπτρίδες φορτίστηκαν θετικά έπειτα από 40λεπτη εμβάπτιση σε διάλυμα 0,001% Alcian blue (Sigma Aldrich). Κατόπιν ξεπλύθηκαν διεξοδικά με αποσταγμένο H₂O και αφέθηκαν να στεγνώσουν σε επαγωγό ή κλειστό θάλαμο. Σε αυτές τις καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν μονιμοποιημένα κύτταρα των παραπάνω λευχαιμικών σειρών σε διάφορες συγκεντρώσεις (50.000- 1.000.000 κύτταρα /ml PBS) για 30 λεπτά. Από όλες τις συγκεντρώσεις ανακτήθηκε ικανοποιητικός αριθμός επιστρωμένων λευχαιμικών κυττάρων αλλά απουσίαζαν μιτωτικά κύτταρα (κυρίως αναφασικά και τελοφασικά).

Η δεύτερη μέθοδος έκανε συνδυαστική χρήση των Alcian blue επιστρωμένων καλυπτρίδων και κοινής φυγοκέντρου (800 r.p.m. για 3 λεπτά). Και εδώ δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις μονιμοποιημένων κυττάρων προς εναπόθεση με καλύτερη απόδοση από την πρώτη μέθοδο αλλά και πάλι χωρίς την προσκόλληση μιτωτικών κυττάρων τελικών σταδίων.

Τέλος διενεργήθηκε η διαδικασία επίστρωσης αντικειμενοφόρων πλακών με τη χρήση cytospin. Μονιμοποιημένα κύτταρα επιστρώθηκαν σε ειδικές αντικειμενοφόρες πλάκες (Shandon CYTOSLIDE, Thermo Scientific) κάνοντας χρήση της συσκευής Shandon Cytospin 4 (Thermo Electron Corporation) και των εξαρτημάτων της (Shandon Cytoclip, Shandon Funnel και Shandon Filter Card της Thermo Scientific) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Έπειτα από πολλαπλές δοκιμασίες επιλέχθηκαν οι παρακάτω συνθήκες: 950rpm και μέτρια επιτάχυνση για 3 λεπτά για τα κύτταρα HL60, 700rpm και μέτρια επιτάχυνση για 3 λεπτά για τα κύτταρα Hut78 και 800rpm και μέτρια επιτάχυνση για 3 λεπτά για τα κύτταρα Jurkat και τα νωπά δείγματα λευχαιμικών ασθενών.

2.3.2 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κύτταρα επιστρωμένα σε γυάλινες επιφάνειες

Με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού εξετάστηκαν τόσο κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε γυάλινες επιφάνειες (λ.χ. EBK σε καλυπτρίδες ή ειδικά τρυβλία με γυάλινο πυθμένα τύπου MatTek ή LabTek (Nunc)) όσο και κύτταρα που επιστρώθηκαν μετά τη μονιμοποίησή τους σε γυάλινες επιφάνειες (περιγράφονται στην προηγούμενη παράγραφο).

Η διαδικασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού που ακολουθεί το εργαστήριό μας είναι αυτή των Maison *et al.*, ή Meier & Georgatos(51,52). Επιγραμματικά, τα δείγματα μονιμοποιούνται σε διάλυμα 1-4% φορμαλδεΐδης σε PBS για 10 λεπτά (ανάλογα με τον υπό διερεύνηση επίτοπο, βλέπε Πίνακα 2.1) και κατόπιν ξεπλένονται τρεις φορές με PBS. Ακολουθεί εξουδετέρωση τυχόν εναπομείνουσας φορμαλδεΐδης με εμβάπτιση του δείγματος σε διάλυμα 5mM γλυκίνης σε PBS για 5 λεπτά και τρεις πλύσεις με PBS. Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται για 15 λεπτά σε διάλυμα μπλοκαρίσματος μη ειδικών θέσεων (-MMEΘ, 150mM NaCl, 20mM HEPES pH 7.4, 2mM MgCl₂, 0.1mM EGTA, 0.2% Triton X-100, 0.5% FSG). Ακολουθεί επώαση με το πρωτεύον αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση σε διάλυμα MMEΘ για 1 ώρα (βλέπε Πίνακα 2.1) σε θάλαμο υψηλής υγρασίας σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από τρεις πλύσεις με διάλυμα MMEΘ πραγματοποιείται επώαση με αντίστοιχο δευτερεύον φθορίζον αντίσωμα (Alexa) στις ίδιες συνθήκες με το πρωτεύον αλλά για 45 λεπτά. Την επώαση ακολουθούν τρεις πλύσεις με MMEΘ και άλλες τρεις με PBS. Τα δείγματα μετα-μονιμοποιούνται με 4% φορμαλδεΐδη σε PBS για 10 λεπτά και ξεπλένονται με PBS. Στις περισσότερες περιπτώσεις (ανάλογα με τον πειραματικό σχεδιασμό) επαναλαμβανόταν η διαδικασία για έτερο πρωτεύον και αντίστοιχο δευτερεύον αντίσωμα με την ίδια σειρά και συνθήκες. Τέλος, ακολουθεί χρώση του DNA (με DAPI, TOPRO-3 ή PI) και πλύσεις με PBS. Τα δείγματα σε MatTek ή LabTek (Nunc) παραμένουν σε PBS ενώ όσα βρίσκονται σε γυάλινες επιφάνειες (καλυπτρίδες ή αντικειμενοφόρες πλάκες) καλύπτονται διαδοχικά με Vectashield (Vector Laboratories) και αντικειμενοφόρες πλάκες ή καλυπτρίδες, αντίστοιχα, και σφραγίζονται με διάφανο μανό περιφερικά. Τα δείγματα διατηρούνται στους 4^oC και εξετάστηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica SP5 TCII.

Στα δείγματα που είχαν σημανθεί με το ανάλογο θυμιδίνης (BrdU) ακολούθησε η ανίχνευσή του σύμφωνα με ειδικό πρωτόκολλο. Περιληπτικά, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε παγωμένη αιθανόλη (70%) για 30 λεπτά στους -20^oC. Ακολούθησε

επώαση σε διάλυμα MMEΘ για 15 λεπτά και μετά από τρεις πλύσεις με PBS τα δείγματα εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 2N NaOH για 30 λεπτά στους 37°C για την αποδιάταξη του DNA. Μετά την εξουδετέρωση του οξέος με δίλεπτη επώαση σε διάλυμα 0,1M τετραβορικού νατρίου και πλύσεις με PBS ξεκίνησε η κλασική διαδικασία έμμεσου ανοσοφθορισμού που περιγράφηκε παραπάνω.

Όνομα	Εταιρεία	Μονιμοποίηση	Αραίωση
α-τουμουλίνη	DSHB	4% Φορμαλδεΰδη	1:200
Numb	Abcam	4% Φορμαλδεΰδη	1:200
Par6	Abcam	4% Φορμαλδεΰδη	1:200
mAb414	Abcam	4% Φορμαλδεΰδη	1:500
Λαμίνη A	Παρασκευή του εργαστηρίου μας	1 ή 4% Φορμαλδεΰδη	1:600
Ninein	Χορηγία παρασκευής Andrea Merdes	Μεθανόλη (100%)	1:150
aPKCζ	Santa Cruz	4% Φορμαλδεΰδη	1:300
ακετυλιωμένη τουμουλίνη	Sigma Aldrich	4% Φορμαλδεΰδη	1:5000-8000
Nanog	Abcam	4% Φορμαλδεΰδη	1:300
Oct4	Santa Cruz	4% Φορμαλδεΰδη	1:250
Brachyury	Santa Cruz	4% Φορμαλδεΰδη	1:50
β3-τουμουλίνη/ Tuj-1	Sigma Aldrich	4% Φορμαλδεΰδη	1:1000-1500
H3T3phos	Παρασκευή του εργαστηρίου μας	4% Φορμαλδεΰδη	1:600
Gli2	Santa Cruz	4% Φορμαλδεΰδη	1:200
BrdU	Novus Biologicals	Λιθανόλη (70%)	1:1000
PCNA	Santa Cruz	4% Φορμαλδεΰδη	1:200
GATA4	Santa Cruz	4% Φορμαλδεΰδη	1:100
Ki67	Abcam	4% Φορμαλδεΰδη	1:500
GFP	Χορηγία παρασκευής Σάββα Χρηστοφορίδη	4% Φορμαλδεΰδη	1:200
E-cadherin	R&D	4% Φορμαλδεΰδη	1:50
N-cadherin	R&D	4% Φορμαλδεΰδη	1:50
Sox17	R&D	4% Φορμαλδεΰδη	1:25

Πίνακας 2.1 Αναλυτική λίστα των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν και οι σχετικές πληροφορίες τους.

2.3.3 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε EB

Τα EB που διερευνήθηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό μπορεί να ήταν σε εναιώρημα ή ήδη προσκολλημένα σε γυάλινες επιφάνειες (βλέπε ενότητα 2.1.3.2). Και στις δύο περιπτώσεις ακολουθήθηκε η ίδια τροποποιημένη διαδικασία του πρωτοκόλλου της προηγούμενης παραγράφου. Ακολουθούν επιγραμματικά οι τροποποιήσεις: Η μονιμοποίηση των EB γινόταν πάντα με 4% φορμαλδεΰδη για 1 ώρα. Οι πλύσεις είχαν διάρκεια 5 λεπτά, η εξουδετέρωση της φορμαλδεΰδης για 30 λεπτά, ενώ η επώαση με το διάλυμα MMEΘ για 1 ώρα. Το τελευταίο ακολούθησε ένα επιπλέον στάδιο επώασης με νέο

διάλυμα MMEΘ αυξημένης περιεκτικότητας σε Triton X-100 (0,5%) για 30 λεπτά. Τέλος η επώαση του πρωτεύοντος αντισώματος ήταν ολονύκτια στους 4^oC. Τα δείγματα εξετάστηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica SP5 TCII.

2.3.4 Καταγραφή κυτταρικών διαιρέσεων σε πραγματικό χρόνο

2.3.4.1 Παρακολούθηση (βιντεοσκόπηση) κυτταρικών διαιρέσεων σε πραγματικό χρόνο στο φάσμα του ορατού.

Αιωρούμενα κύτταρα των λευχαιμικών κυτταρικών σειρών HL60 και Hut78 καθώς επίσης αδιαφοροποίητα ή διαφοροποιούμενα κύτταρα E14 παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο (Leica DMI6000B) με χρήση 100x αντικειμενικού φακού. Διαιρούμενα κύτταρα στη φάση της μετάφασης (σφαιρικά κύτταρα με το χαρακτηριστικό σχηματισμό των χρωμοσωμάτων του μεταφασικού δίσκου) αναγνωρίστηκαν και καταγράφηκαν σε πραγματικό χρόνο με τη χρήση του λογισμικού του μικροσκοπίου (LAS AF, live data mode). Τα υπό παρακολούθηση κύτταρα βρίσκονταν σε ειδικά τρυβλία MatTek (Nunc), το θρεπτικό τους υλικό είχε αντικατασταθεί από Imaging medium (Invitrogen) και στο θάλαμο του μικροσκοπίου είχε επιβληθεί σταθερή θερμοκρασία 37^oC. Για την καταγραφή της εκάστοτε κυτταρικής διαίρεσης οριζόταν χειρονακτικά το εύρος των τομών ώστε να περιλαμβάνεται ολόκληρο το κύτταρο με βήμα 0,3 μm και χρονικό διάστημα μεταξύ λήψεων τα 5 δευτερόλεπτα για τις λευχαιμικές σειρές και τα 20 δευτερόλεπτα για τα κύτταρα E14.

2.3.4.2 Βιντεοσκόπηση κυτταρικών διαιρέσεων EBK διαμολυσμένων με Centrin-1-GFP και H2B-mCherry

Η καταγραφή μιτωτικών διαιρέσεων σε πραγματικό χρόνο κυττάρων E14 (αδιαφοροποίητων ή διαφοροποιούμενων) που είχαν ήδη (τουλάχιστον 24 ώρες πριν) συνδιαμολυνθεί με κατάλληλους φορείς για την έκφραση των πρωτεϊνών Centrin-1-GFP και H2B-mCherry, πραγματοποιήθηκε στο συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP5 TCII χρησιμοποιώντας την εφαρμογή Live Data Mode του λογισμικού LAS AF του μικροσκοπίου και τον 100x αντικειμενικό φακό. Επιγραμματικά, στα διαμολυσμένα κύτταρα E14 που αναπτύσσονταν σε τρυβλία MatTek (Nunc) άλλαξε το θρεπτικό του σε προθερμασμένο (37^oC) Imaging medium (Invitrogen) και σφραγίζονταν αεροστεγώς με σιλικονούχο πάστα (Baysilicone-Paste, GE Bayer Silicones) γύρω από το καπάκι του τρυβλίου. Το τρυβλίο MatTek (Nunc) σταθεροποιούνταν στην τράπεζα του μικροσκοπίου και στο θάλαμο καθοριζόταν σταθερή θερμοκρασία 37^oC. Τα κύτταρα που επιλέγονταν για βιντεοσκόπηση

ήταν συνήθως ήδη στη μετάφαση και αναγνωρίζονταν οπτικά από την αντιδιαμετρική παρουσία δυο πράσινων στικτών σημάτων (σημασμένα κεντροσώματα με Centrin-1-GFP) εκατέρωθεν του χαρακτηριστικού σχηματισμού των συγκεντρωμένων κόκκινων χρωμοσωμάτων (σημασμένων με H2B-mCherry) του μεταφασικού δίσκου. Για την καταγραφή της εκάστοτε κυτταρικής διαίρεσης οριζόταν χειρονακτικά το εύρος των τομών ώστε να περιλαμβάνεται ολόκληρο το κύτταρο με βήμα 0,7μm και χρονικό διάστημα μεταξύ λήψεων τα 40 δευτερόλεπτα. Έπειτα από πολλαπλές δοκιμασίες παρατηρήθηκε ότι βήμα μικρότερο του 0,5μm ή συχνότητα λήψεων γρηγορότερη των 30 δευτερολέπτων προκαλούσαν τη διακοπή της μιτωτικής διαδικασίας προφανώς λόγω εκτεταμένης ακτινοβολίας (photodamage).

2.3.4.3 Ανάλυση βιντεοσκοπήσεων της ενότητας 2.3.4.2

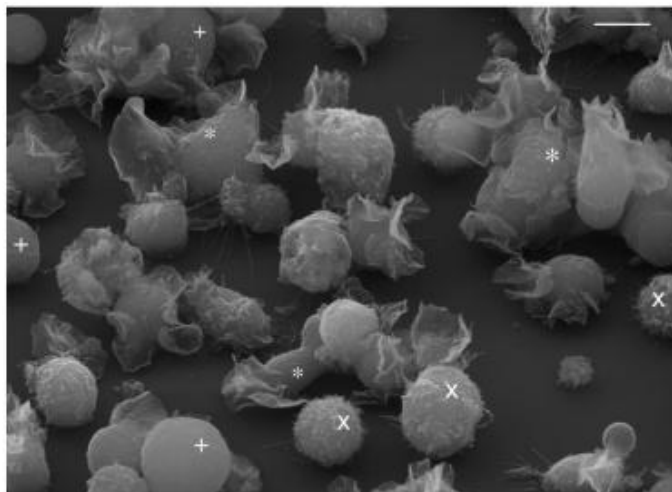
Οι καταγραφές κυτταρικών διαιρέσεων που περιγράφηκαν στην ενότητα 2.3.4.2 αναλύθηκαν με την εφαρμογή MTrackJ του λογισμικού FIJI (διαθέσιμο δωρεάν από τον ιστότοπο: www.fiji.sc/Fiji). Για τον καθορισμό των παραμέτρων επιλεγόταν το τελευταίο πλαίσιο (καρέ) πριν την ανάφαση. Σε αυτό επιλεγόταν η μεσαία από τις τομές που εμπειρεύσαν το μεταφασικό δίσκο και στο κέντρο του οριοθετούνταν το σημείο (δηλαδή οι συντεταγμένες) R (Εικόνα 3.19). Έπειτα, από αυτό το καρέ και για κάθε επόμενο οριοθετούνταν (με αντίστοιχο τρόπο) το σημείο (οι συντεταγμένες) του εκάστοτε κεντροσώματος ως σημεία 1 και 2 αντίστοιχα (Εικόνα 3.19). Με τα δεδομένα αυτά το λογισμικό υπολόγιζε ένα σύνολο πληροφοριών και τις αποθήκευε ως φύλο εργασίας του λογισμικού Excel (Microsoft Inc.) σε θέση της αρεσκείας μας ή αναπαρήγαγε σε μορφή βίντεο δυο διαστάσεων (2D) τις κινήσεις των σημείων 1 και 2 με την πρόοδο του χρόνου (καρέ) (βλέπε Εικόνα 3.18 άνω μέρος). Μέρος των δεδομένων αυτών (οι συντεταγμένες των σημείων 1 και 2 στον επιθυμητό χρόνο) εισήχθησαν σε κατάλληλο λογισμικό (Python x-y, διαθέσιμο δωρεάν από τον ιστότοπο: www.python.org) ώστε να αποδοθεί η τροχιά κίνησης του ενός κεντροσώματος και η αντίστροφη του άλλου από κοινό σημείο εκκίνησης στη μορφή τρισδιάστατου γραφήματος (βλέπε Εικόνα 3.18 κάτω μέρος).

Κεφάλαιο 3 Αποτελέσματα

3.1 Διερεύνηση παρουσίας ΑΚΔ σε λευχαιμικό περιβάλλον

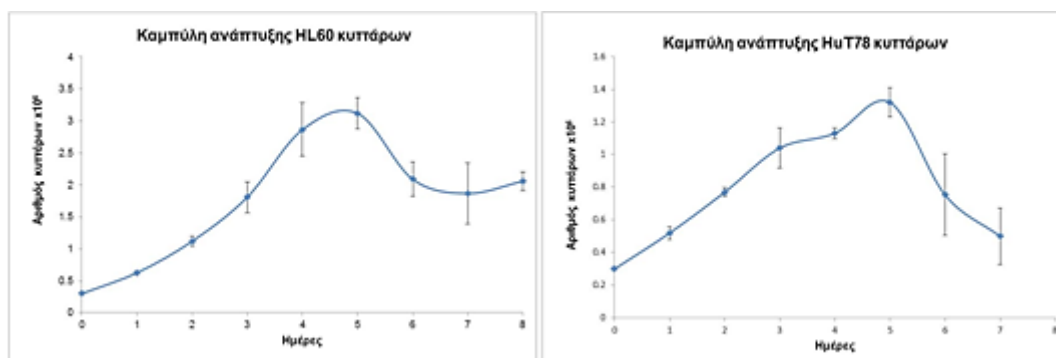
3.1.1 Το πρότυπο των κυττάρων HL60

Σύμφωνα με μια προηγούμενη δημοσίευση, λευχαιμικά κύτταρα της σειράς HL60 (προμυελογενούς προέλευσης) διαιρούνται μέσω ΑΚΔ και παράγουν διαφορετικού μεγέθους απόγονους⁽⁵³⁾. Επιπλέον, τα HL60 κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν *in vitro* όταν το θρεπτικό τους υλικό εμπλουτισθεί με κατάλληλους παράγοντες, όπως για παράδειγμα το διμεθυλοσουλφοξείδιο -DMSO⁽⁵⁴⁾. Τα HL60 κύτταρα θεωρούνται ολιγοδύναμα και μετατρέπονται σε κοκκιοκύτταρα ή μονοκύτταρα/μακροφάγα, ανάλογα με το ερέθισμα που θα δεχθούν (ανασκοπούνται εκτενώς στα ^(54,55)). Επίσης, διακρίνονται από μια έντονη φαινοτυπική ετερογένεια (Εικόνα 3.1) και σε ένα ποσοστό, περί το 10%, διαφοροποιούνται αυθόρμητα στην καλλιέργεια. Με βάση τα χαρακτηριστικά της κυτταρικής σειράς HL60, κρίθηκε ότι το σύστημα αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πειραματικό πρότυπο για τη μελέτη της ΑΚΔ στο πλαίσιο της λευχαιμίας. Παράλληλα με τα κύτταρα HL60, αξιοποιήθηκαν (ως αρνητικοί μάρτυρες) τα τελικώς διαφοροποιημένα ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα της σειράς HuT78. Τα κύτταρα αυτά δεν αναμένεται να ακολουθούν το πρότυπο της ΑΚΔ.



Εικόνα 3.1 Ετερογένεια κυττάρων HL60. Διαφοροποιημένα (*), αδιαφοροποίητα (X) και κύτταρα χωρίς διακριτές επιφανειακές δομές (+). Αναπαραγωγή από (157).

Αρχικά, χαρακτηρίστηκαν οι δυο παραπάνω κυτταρικές σειρές ως προς τον ρυθμό ανάπτυξης και τον μιτωτικό τους δείκτη. Ο ρυθμός ανάπτυξης μετρήθηκε με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου σε δείγματα χρωσμένα με Trypan Blue, ώστε να συμπεριληφθούν στις μετρήσεις μόνο τα ζωντανά κύτταρα (Trypan Blue αρνητικά) (Εικόνα 3.2).



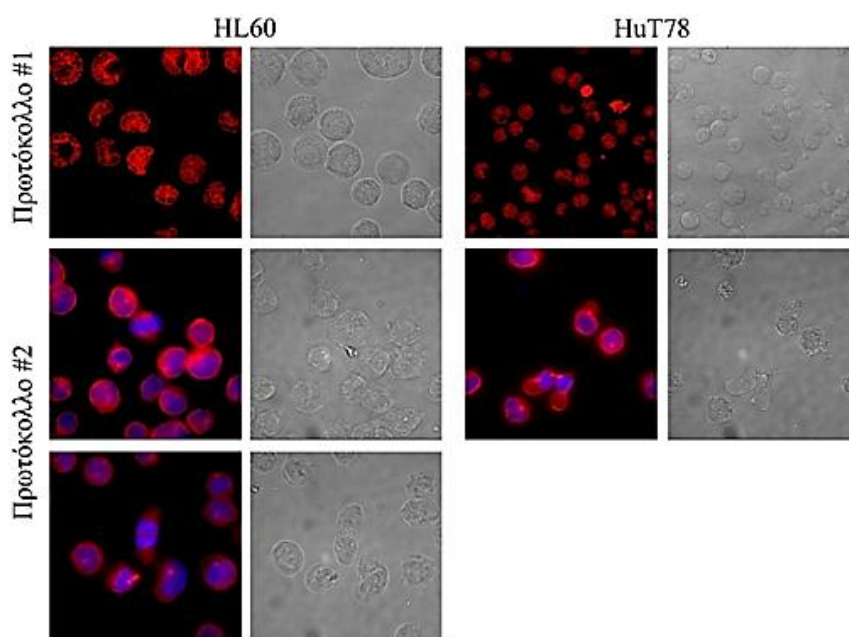
Εικόνα 3.2 Καμπύλες ανάπτυξης για τις κυτταρικές σειρές HL60 και HuT78. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Για τον προσδιορισμό του μιτωτικού δείκτη (ποσοστό μιτωτικών κυττάρων στο σύνολο του πληθυσμού), πραγματοποιήθηκε χρώση με DAPI σε επιστρωμένα και μονιμοποιημένα κύτταρα, τα οποία μετρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού. Υπενθυμίζεται ότι τα κύτταρα HL60 αναπτύσσονται σε εναιώρημα και για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η καθήλωσή τους σε κατάλληλες επιφάνειες για τη διεξαγωγή αντίστοιχων πειραμάτων. Για να επιτευχθεί αυτό κατά τον καλύτερο τρόπο, χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά πρωτόκολλα:

1. εναπόθεση κυττάρων σε θετικά φορτισμένες γυάλινες καλυπτρίδες (προ-επώαση με Alcian Blue) για 30 λεπτά,
2. φυγοκέντρηση σε θετικά φορτισμένες γυάλινες καλυπτρίδες (με Alcian Blue όπως στο 1) σε συνηθισμένη φυγόκεντρο, και
3. φυγοκέντρηση σε κατάλληλες αντικειμενοφόρες πλάκες σε ειδική φυγόκεντρο cytospin.

Και στις τρεις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές δοκιμασίες έως ότου βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες με την καλύτερη απόδοση. Διαπιστώθηκε ότι όλες οι μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να επιστρωθεί μεγάλος αριθμός κυττάρων, αλλά μόνο το τελευταίο πρωτόκολλο συνδύαζε τόσο καλή απόδοση όσο και καλή ποιότητα δείγματος, δεδομένου ότι υπό τις συνθήκες αυτές παρατηρούνταν κύτταρα από όλο το φάσμα των φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Πιο συγκεκριμένα, τα μιτωτικά κύτταρα αποκτούν σφαιρική μορφολογία με την απώλεια δομών της πλασματικής μεμβράνης που υπάρχουν κατά τη διάρκεια της μεσόφασης, κάτι που τα καθιστά μη προσκολλησίμα σε επιφάνειες όπως οι γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες και οι καλυπτρίδες. Έτσι, τα δείγματα που παρασκευάσαμε με τις δυο πρώτες μεθόδους ήταν εμπλουτισμένα κυρίως σε μεσοφασικά κύτταρα, ενώ μόνο η τρίτη μέθοδος έδινε μια αντικειμενική εικόνα του πληθυσμού επιτρέποντας τη μελέτη όλων των φάσεων της μίτωσης και ειδικότερα των τελικών (ανάφαση, τελόφαση και κυττοκίνηση), που αποτελούν και το αντικείμενο της παρούσας

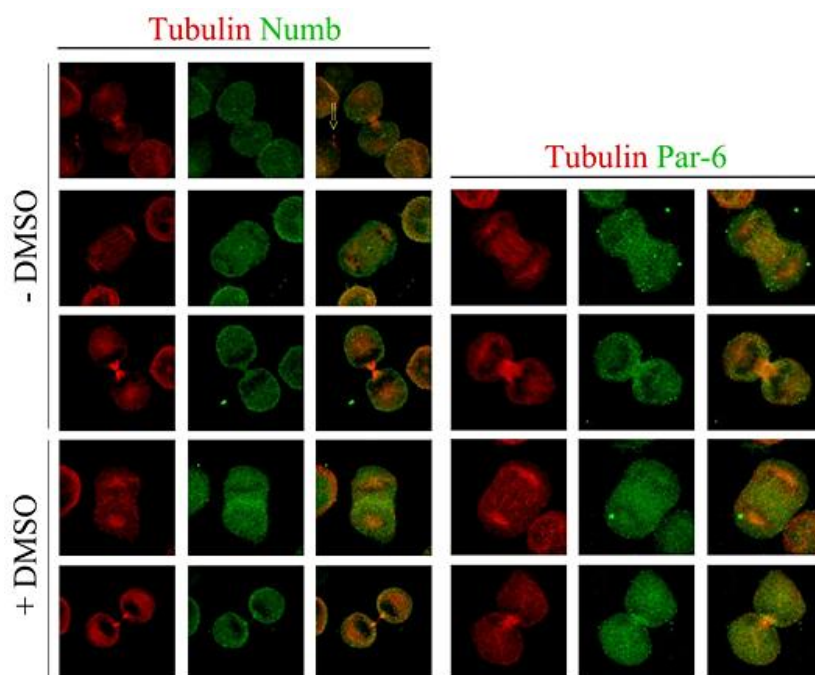
έρευνας. Στα δείγματα που παρασκευάστηκαν με βάση τα πρωτόκολλα #2 και #3 υπήρχε ένα μικρό ποσοστό (<0,5%) κυττάρων στη φάση της κυττοκίνησης/πρώιμης G1 φάσης τα οποία έφεραν διαρρηγμένο μεσόσωμα (Εικόνες 3.3 και 3.4). Συνεπώς, στα παραπάνω παρασκευάσματα, αυτό το τμήμα του δείγματος υποαντιπροσωπεύονταν (βλ. συνέχεια). Τελικώς, χρησιμοποιώντας την καταλληλότερη μέθοδο ο μιτωτικός δείκτης προσδιορίστηκε στο 3,75% και 3,25% για τα HL60 και HuT78, αντίστοιχα (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.3 Ενδεικτικές εικόνες επεξεργασίας κυττάρων χρησιμοποιώντας τα πρωτόκολλα #1 (κόκκινη χρώση του DNA με PI) και #2 (κόκκινο-τουμπουλίνη, μπλε-DAPI) (βλ. κείμενο). Στο κάτω αριστερό ζεύγος εμφανίζεται τόσο μια διαίρεση στη φάση της ανάφασης όσο και ένα κύτταρο με διαρρηγμένο μεσόσωμα.

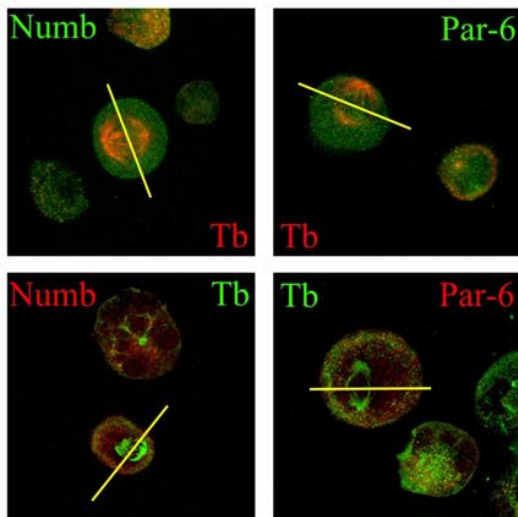
Παρασκευάσματα από τις παραπάνω κυτταρικές σειρές μελετήθηκαν περαιτέρω με ανοσοφθορισμό, χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών Numb και Par-6, αλλά και νουκλεοπορινών, πάντα σε συνδυασμό με αντίσωμα έναντι της α -τουμπουλίνης ή χρώση του DNA (με DAPI, TOPRO ή PI) για την ταυτοποίηση της φάσης του κυτταρικού κύκλου. Είναι γνωστό ότι ο παράγοντας Numb κατά την ΑΚΔ μεταφέρεται επιλεκτικά στο ένα θυγατρικό κύτταρο και πως αυτό ενορχηστρώνεται εν μέρει μέσω του Par-6, το οποίο μεταφέρεται και συγκεντρώνεται επιλεκτικά στο άλλο θυγατρικό κύτταρο (βλέπε ενότητα 1.2). Από την άλλη πλευρά, οι νουκλεοπορίνες δεν έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα σε σχέση με την ΑΚΔ, κάτι που φιλοδοξεί να διερευνήσει η παρούσα εργασία. Παρατηρώντας την κυτταρική εντόπιση των παραπάνω πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια των τελευταίων σταδίων της μίτωσης, όπου κατά την ΑΚΔ οι παράγοντες Numb και Par-6 έχουν μεταναστεύσει σε αντιδιαμετρικά σημεία της πλασματικής μεμβράνης απέναντι από κάθε πόλο της ατράκτου, θα μπορούσαμε να αποφανθούμε εάν το κύτταρο αυτό έχει διαιρεθεί με ασύμμετρο ή

συμμετρικό τρόπο, και, μέσω της κατανομής των νουκλεοπορινών, να κατανοήσουμε εάν ο επανασηματισμός των πυρηνικών φακέλων των θυγατρικών κυττάρων γίνεται ασύμμετρα.



Εικόνα 3.4 Ταυτόχρονος ανοσοεντοπισμός των πρωτεϊνών Numb και Par-6 με την τουμπουλίνη σε δείγματα παρασκευασμένα με βάση το πρωτόκολλο #3 σε αδιαφοροποιητά ή διαφοροποιημένα (- ή + DMSO, αντίστοιχα) κύτταρα HL60. Ενδεικτικά δείγματα κυττάρων όψιμης μίτωσης και κυτταροκίνησης/πρώιμης G1 φάσης για κάθε παράγοντα και συνθήκη. Η πρώτη σειρά περιλαμβάνει ένα επιπλέον σιγμιότυπο κυτταροκίνησης αλλά και κύτταρο με διαρρηγμένο μεσόσωμα (κίτρινο βέλος).

Αρχικά, μελετήθηκε ο εντοπισμός των πρωτεϊνών Numb και Par-6 σε μονιμοποιημένα δείγματα αναπτυσσόμενων HL60 κυττάρων υπό την επίδραση ή όχι DMSO (διαφοροποιημένων ή όχι, αντίστοιχα). Σε δεύτερη φάση, μελετήθηκαν καλλιέργειες HL60 2-6 ώρες μετά από επίδραση με Nocodazole (5 ή 9μM για 12-18 ώρες), με σκοπό τον εμπλουτισμό του δείγματος σε μιτωτικά κύτταρα. Το αποτέλεσμα που προέκυψε σε όλες τις συνθήκες ήταν η απόλυτα συμμετρική κατανομή για τους παράγοντες Numb και Par-6 και, επιπλέον, ίσου μεγέθους θυγατρικά κύτταρα (Εικόνα 3.4). Όμως, αυτό που δεν ήταν αναμενόμενο ήταν η θέση της μεταφασικής ατράκτου, η οποία σε μεγάλο ποσοστό (περίπου στο 40% των δειγμάτων) ήταν έκτοπα τοποθετημένη (Εικόνα 3.5). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στα κύτταρα HuT78. Συνήθως, η θέση των χρωμοσωμάτων κατά τη μετάφαση (βρίσκεται περίπου στον ισημερινό του κυττάρου) χαρακτηρίζει και τη θέση όπου θα πραγματοποιηθεί, μέσω του συστατικού δακτυλίου, η διχοτόμηση του κυττάρου (ενδεικτικά αναφέρονται τα ^(56,57)). Έτσι, με την έκτοπη διάταξη της μεταφασικής ατράκτου αναμένεται η δημιουργία δυο ανισομεγέθων θυγατρικών κυττάρων (Εικόνα 3.5, βλέπε κίτρινη γραμμή).

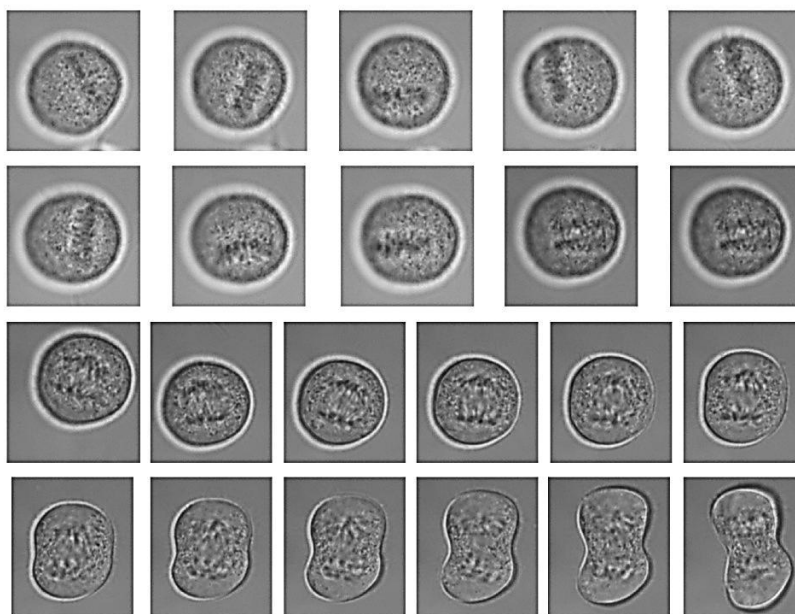


Εικόνα 3.5 Περιπτώσεις ασύμμετρης θέσης της μεταφασικής ατράκτου κυττάρων HL60 (πάνω ζεύγος) ή HuT78 (κάτω ζεύγος). Την πιθανή θέση διχοτόμησης του μητρικού κυττάρου με βάση τον ισημερινό της μεταφασικής ατράκτου καταδεικνύουν οι κίτρινες γραμμές.

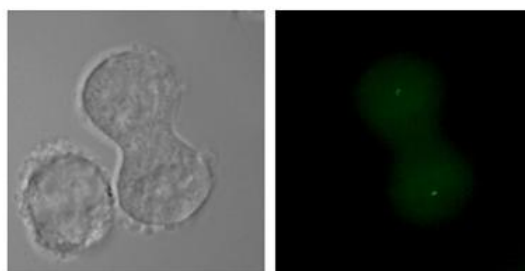
Υπενθυμίζεται εδώ ότι η ποσοτική διαφορά συγκέντρωσης ακόμα και της τάξης του διπλάσιου είναι ικανή να προσδώσει διαφορετική μοίρα στους απογόνους μιας κατά τα άλλα απόλυτα συμμετρικής διαίρεσης σε ευκαρυωτικά κύτταρα⁽⁵⁸⁾. Επιπλέον, μια τέτοια διαφορά στο μέγεθος των κυττάρων θα μπορούσε να δικαιολογήσει και το ποσοστό των κυττάρων που φέρουν διαρρηγμένο μεσόσωμα κατά τη διαδικασία του cytospin, ενισχύοντας την πιθανότητα παρουσίας ΑΚΔ στα HL60 κύτταρα (ένα μεγάλο κύτταρο και το αδελφό μικρότερό του αντιδρούν διαφορετικά στην ίδια φυγόκεντρο δύναμη (κατά τη διάρκεια του cytospin), με αποτέλεσμα το βίαιο και πρώιμο διαχωρισμό τους). Τέλος, οι Matsuhisa et al., υποστηρίζουν ότι η ετερογένεια στο μέγεθος των κυττάρων HL60 οφείλεται στις ΑΚΔ τους⁽⁵³⁾.

Για να εξετάσουμε την πιθανότητα σχηματισμού ανισομεγέθους θυγατρικών κυττάρων προχωρήσαμε στην καταγραφή κυτταρικών διαιρέσεων σε πραγματικό χρόνο, κάνοντας χρήση φωτομικροσκοπίας υπό συνθήκες που δεν επηρεάζουν την ακεραιότητα και φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων. Το αποτέλεσμα ήταν απόλυτα κατατοπιστικό. Πιο αναλυτικά, παρατηρήθηκε ότι σε φυσιολογικές συνθήκες η μεταφασική άτρακτος παρουσιάζει μια έντονη κινητικότητα σε όλο τον όγκο του μιτωτικού κυττάρου για μεγάλο χρονικό διάστημα, ώσπου να λάβει την τελική στοιχισμένη θέση της πριν ξεκινήσει η ανάφαση, καταλήγοντας πάντοτε σε μια απόλυτα συμμετρική διαίρεση με τη δημιουργία δυο ίδιου μεγέθους θυγατρικών (Εικόνα 3.6). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στην κυτταρική σειρά HuT78 (δεν παρουσιάζεται), κάτι που καταδεικνύει ότι το φαινόμενο αυτό είναι μια γενική ιδιότητα των διαιρούμενων κυττάρων. Πράγματι, δυο πολύ πρόσφατες κι εμπειριστατωμένες μελέτες σε διαφορετικά κυτταρικά συστήματα επαληθεύουν την παρατήρησή μας, αναδεικνύοντας μηχανιστικά πώς πραγματοποιείται το φαινόμενο

αυτό^(56,59). Αντίστοιχη εικόνα παρατηρήθηκε και σε πειράματα διαμόλυνσης των HL60 κυττάρων με πλασμιδιακό φορέα που περιέχει το cDNA της πρωτεΐνης centrin-1 και την κωδικοποιούσα περιοχή της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP, επιτρέποντας την ανίχνευση των κεντριολίων στους πόλους της ατράκτου (Εικόνα 3.7). Συνεπώς, η έκτοπη θέση της μεταφασικής ατράκτου στα μονιμοποιημένα δείγματα αντιπροσωπεύει στιγμιότυπα της «αναζήτησης»/«αιώρησης» που κάνει η μεταφασική άτρακτος, χωρίς να αποτυπώνει μια ενδεχόμενη σταθερή κατάσταση ενός υποπληθυσμού κυττάρων.

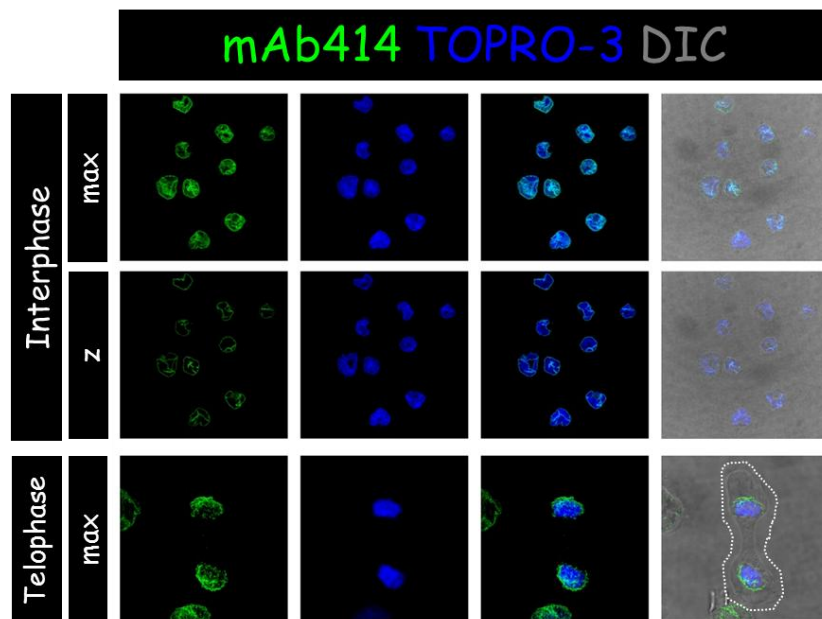


Εικόνα 3.6 Διάρθρωση HL60 κυττάρου. Στιγμιότυπα ενός κυττάρου από τη μετάφαση έως την τελόφαση, όπου είναι εμφανής η έντονη κινητικότητα των χρωμοσωμάτων (μεταφασικού δίσκου) σε όλο τον όγκο του κυττάρου μέχρι να πάρουν την τελική τους -συμμετρική- θέση και να ξεκινήσει η ανάφαση.



Εικόνα 3.7 Στιγμιότυπο κυττάρου HL60 διαμολυσμένου με Centrin-1-GFP κατά τη διάρκεια της τελόφασης. Διακρίνονται τα χρωσμένα πράσινα ζεύγη κεντριολίων των κεντροσωμάτων.

Φυσικό επακόλουθο της απουσίας ΑΚΔ στα κύτταρα HL60 είναι η απουσία ασυμμετρίας σε επίπεδο συμπλέγματος νουκλεοπορίνων που μελετήθηκαν με ανοσοφθορισμο κάνοντας χρήση αντισώματος που αναγνωρίζει τις νουκλεοπορίνες της οικογένειας Nup84/Nup107 (Εικόνα 3.8).



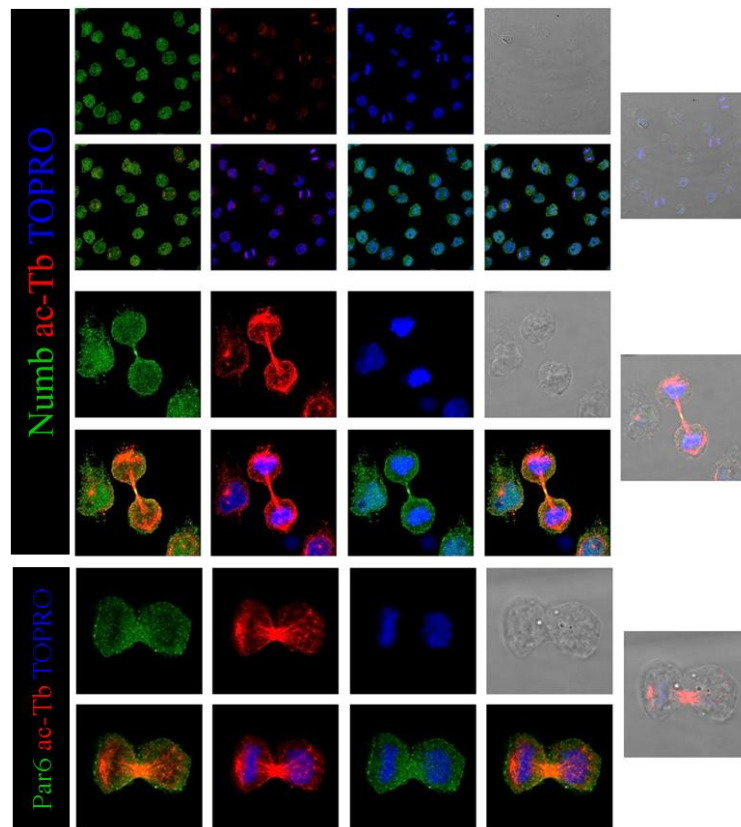
Εικόνα 3.8 Ανοσοεντόπιση νουκλεοπορινών της οικογένειας Nup84/Nup107 σε μεσοφασικά κύτταρα HL60 (σε μέγιστη προβολή (max) ή σε ισημερινή τομή (z), άνω ή μέσον, αντίστοιχα) και σε διαιρούμενο κύτταρο κατά τη φάση της κυτταροκίνησης (κάτω, σε μέγιστη προβολή).

3.1.2 Το πρότυπο των κυττάρων Jurkat

Η ανάλυση των λευχαιμικών κυτταρικών σειρών συνεχίστηκε με τη διεξοδική διερεύνηση της παρουσίας ΑΚΔ κατά την έκπτυξη της κυτταρικής σειράς Jurkat, όπως έδειξαν οι Filby *et al.*,⁽⁶⁰⁾. Στην παραπάνω δημοσίευση μελετήθηκαν δεκάδες χιλιάδες μιτωτικά κύτταρα Jurkat με κυτταρομετρία ροής μέσω μιας διαδικασίας όπου επιλέγονταν πρώτα τα κύτταρα στη φάση της μίτωσης και στη συνέχεια εξετάζαν την κατανομή της πρωτεΐνης aPKCζ οπτικά (imaging flow cytometry) στα κύτταρα αυτά. Υπενθυμίζεται εδώ πως στις ΑΚΔ τα κύτταρα είναι πολωμένα και η πολικότητα αυτή οφείλεται στην ασύμμετρη κατανομή του συμπλόκου Par, το οποίο απαρτίζεται από τις πρωτεΐνες Par6, Par3 και aPKCζ (βλέπε ενότητα 1.2). Στη συνέχεια, τα ασύμμετρα διαιρούμενα κύτταρα διαχωρίζουν επίσης ασύμμετρα τους παράγοντες ΚΚΤ (λ.χ. τον Numb). Από την ανάλυσή τους προέκυψε πως το $0,049 \pm 0,007\%$ των κυττάρων ήταν τελοφασικά και πως το 2,8% αυτών εμφάνιζαν ασύμμετρη κατανομή της πρωτεΐνης aPKCζ. Σε προγενέστερες φάσεις της μίτωσης το ποσοστό ήταν μεγαλύτερο (πλησίαζε το 5%), αλλά για αδιευκρίνιστους λόγους στα τελοφασικά κύτταρα μειωνόταν περίπου στο μισό.

Θέλοντας να επιβεβαιώσουμε τις παραπάνω πληροφορίες και στα πλαίσια αναζήτησης μοντέλου/συστήματος ΑΚΔ, πραγματοποιήσαμε πειράματα εντοπισμού της πρωτεΐνης Par6 και του παράγοντα Numb (Εικόνα 3.9). Με τον τρόπο αυτό θα μπορούσαμε να διαπιστώσουμε α) εάν όντως τα κύτταρα Jurkat εμφανίζουν πολικότητα κατά τη

διάρκεια της μίτωσης και β) εάν αυτή επεκτείνεται και στην κατανομή παραγόντων ΚΚΤ, δηλ. εάν τελικά πραγματοποιούν ΑΚΔ. Από την ανάλυση ικανού αριθμού δειγμάτων (>50 μιτωτικών κυττάρων Jurkat ανά παράγοντα) διαπιστώσαμε αποκλειστικά συμμετρικές κατανομές και για τις δυο πρωτεΐνες. Με άλλα λόγια, από τα 100 και πλέον δείγματα που μελετήσαμε, δεν προκύπτει ΑΚΔ ούτε ως προς τον (πρώιμο) δείκτη (ΑΚΔ) πολικότητας, αλλά ούτε και ως προς το τελικό αποτέλεσμα, δηλαδή την ασύμμετρη κατανομή του κλασικού ΚΚΤ Numb (Εικόνα 3.9). Η διαφορά μας με τα αποτελέσματα της παραπάνω εργασίας ίσως να οφείλεται στον αριθμό των δειγμάτων που μελετήσαμε ή στη μέθοδο που ακολουθήσαμε, πάντως είναι γνωστό πως τα υγιή Τ κύτταρα *in vivo* διαιρούνται ασύμμετρα σε μεγαλύτερα ποσοστά (~15%)⁽³⁰⁾.



Εικόνα 3.9 Τα κύτταρα Jurkat διαιρούνται με συμμετρικές διαιρέσεις. Αντιπροσωπευτικές απεικονίσεις δεικτών ΑΚΔ (Numb και Par-6), όπου παρατηρείται η απόλυτα συμμετρική κατανομή τους σε διαιρούμενα κύτταρα Jurkat.

3.1.3 Ανάλυση νωπών δειγμάτων από λευχαιμικούς ασθενείς

Σύμφωνα με την πρόσφατη διεθνή βιβλιογραφία, στο πεδίο της λευχαιμίας έχουν προκύψει νέες πληροφορίες είτε σε επίπεδο μαθηματικών-στατιστικών μοντέλων⁽⁶¹⁻⁶³⁾, είτε στο επίπεδο άμεσων πειραματικών προσεγγίσεων^(64,65). Στο σύνολό τους, οι παραπάνω μελέτες υποδεικνύουν την άμεση σχέση της ΑΚΔ με τη λευχαιμία, ενώ σε μοριακό επίπεδο αποδίδουν κομβικό ρόλο στο μονοπάτι σηματοδότησης Musashi/Numb/Notch παρουσία

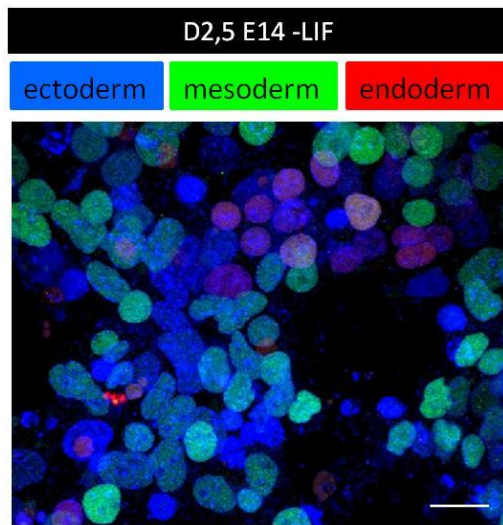
NUP98-NOXA9. Γ' αυτούς τους λόγους, αλλά και με βάση τα παραπάνω ευρήματα, έγινε μια απόπειρα η παρούσα μελέτη να επεκταθεί στη διερεύνηση νωπών δειγμάτων από ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία, οξεία μυελογενή λευχαιμία, χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία ή οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία (CML, AML, CLL και ALL αντίστοιχα).

Στην προσπάθεια καλλιέργειας των παραπάνω κυττάρων (δείγματα που ελήφθησαν από περιφερικό αίμα ασθενών ή/και δείγμα εμπλουτισμένα σε CD34⁺ κύτταρα) δεν κατέστη δυνατή η *in vitro* έκπτυξή τους παρά τις αλληπάλληλες προσπάθειες. Ενδεχομένως, ο περιοριστικός παράγοντας για την παραπάνω αποτυχία ήταν η μερική απουσία προτεινόμενων συμπληρωμάτων του καλλιεργητικού μέσου. Για το λόγο αυτό περιορίστηκε η μελέτη αποκλειστικά σε μονιμοποιημένα δείγματα αμέσως μετά την δειγματοληψία ως ανάλυση ενός *in vivo* στιγμιότυπου. Και σε αυτές τις περιπτώσεις ακολουθήθηκε η διαδικασία εύρεσης της κατάλληλης συνθήκης επίστρωσης των κυττάρων μέσω cytospin. Ο ανοσοεντοπισμός των παραγόντων Numb, Par-6, ακετυλιωμένης τουμπουλίνης και νουκλεοπορινών δεν αποκάλυψε κάτι διαφορετικό από όσα αναφέρθηκαν παραπάνω για τις λευχαιμικές κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν.

3.2 Διερεύνηση παρουσίας ΑΚΔ σε ΕΒΚ ποντικού

Η απουσία ΑΚΔ που διαπιστώσαμε στο λευχαιμικό περιβάλλον επέβαλε την αναζήτηση εναλλακτικού κυτταρικού συστήματος και το σύστημα που επιλέχθηκε για τη μελέτη της ΑΚΔ ήταν τα ΕΒΚ ποντικού τύπου E14. Είναι γνωστό ότι τα ΕΒΚ, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων E14 του εργαστηρίου μας, μπορούν να διατηρηθούν επ' άπειρο υπό *in vitro* συνθήκες αυτό-ανανέωσης παρουσία του παράγοντα LIF. Τα πολυδύναμα αυτά κύτταρα μπορούν επίσης να διαφοροποιηθούν είτε «τυχαία» προς κάθε τύπο εμβρυονικού δέρματος (με απλή αφαίρεση του παράγοντα LIF από το καλλιεργητικό μέσο), είτε προς συγκεκριμένη ιστική κατεύθυνση (με την αφαίρεση του LIF και την ταυτόχρονη προσθήκη των κατάλληλων τροφικών και αυξητικών παραγόντων). Στις διαφοροποιήσεις αυτές (πιο έντονα στις τυχαίες) εμφανίζονται πολυάριθμοι κυτταρικοί τύποι, κάτι που αναδεικνύει την πιθανή συμβολή ΑΚΔ στην προκυπτόμενη ετερογένεια (Εικόνα 3.10). Στην παρούσα μελέτη χαρακτηρίστηκαν τόσο η «τυχαία» (-LIF) όσο και η κατευθυνόμενη διαφοροποίηση με την επίδραση ρετινοϊκού οξέος (-LIF +PO) σε καλλιέργειες δυο διαστάσεων. Ακολούθησε ο έλεγχος τρισδιάστατων καλλιεργείων

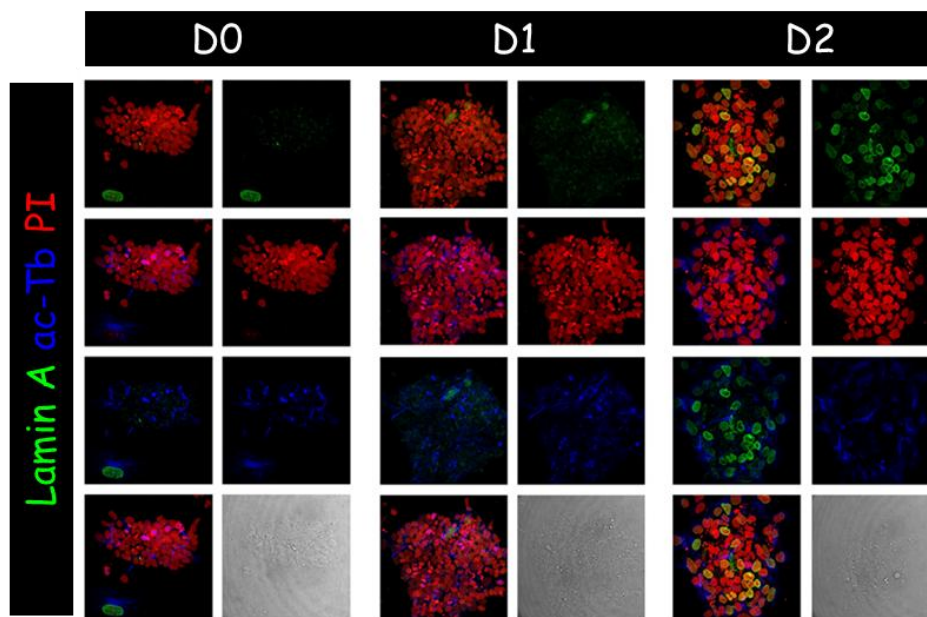
διαφοροποίησης κυττάρων E14 (με τη μέθοδο της αιωρούμενης σταγόνας) ώστε να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα διερεύνησης ΑΚΔ.



Εικόνα 3.10 Η τυχαία διαφοροποίηση (-LIF) των κυττάρων E14 εμφανίζει έντονη ετερογένεια. Στιγμιότυπο διαφοροποίησης κυττάρων E14 όπου έχουν σημειωθεί με κόκκινο τα ενδοδερμικής (Sox17), με πράσινο τα μεσοδερμικής (Brachyury) και με μπλε τα εξωδερμικής (TOPRO-3, απουσία μεσοδερματικών και ενδοδερματικών κατευθύνσεων) κατεύθυνσης κύτταρα. Μπάρα 20μm.

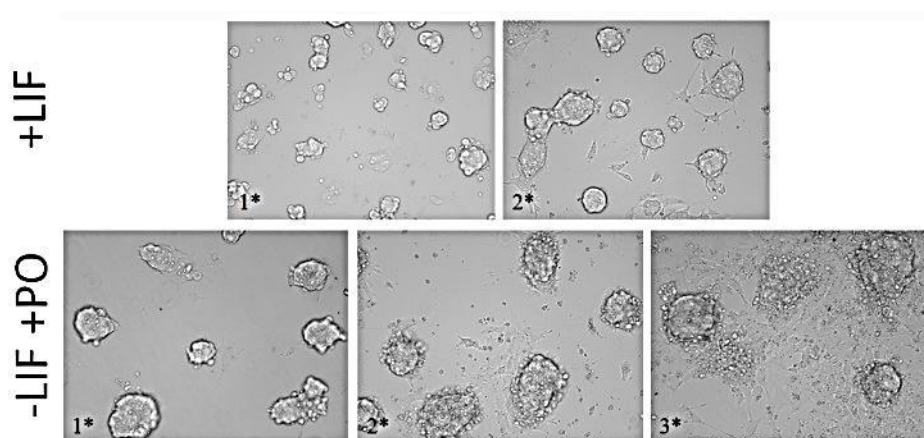
3.2.1 Μορφολογικές παρατηρήσεις στις δισδιάστατες καλλιέργειες αδιαφοροποίητων και διαφοροποιούμενων EBK τύπου E14

Η έναρξη της διαφοροποίησης των E14 επιβεβαιώθηκε μέσω της παρατήρησης ζωντανών δειγμάτων σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων και σε μονιμοποιημένα δείγματα, χρησιμοποιώντας αντισώματα που αναγνωρίζουν τους δείκτες πολυδυναμίας Nanog και Oct4 και την πυρηνική λαμίνη A⁽⁶⁶⁾ (Εικόνα 3.11). Μορφολογικά, τα αδιαφοροποίητα E14 αναπτύσσονται σε τρισδιάστατες αποικίες σφαιρικού σχήματος, με τα κύτταρα να έχουν επίσης σφαιρική μορφολογία και σχετικά περιορισμένο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 3.12). Η αφαίρεση του παράγοντα LIF από το καλλιεργητικό μέσο έχει ως αποτέλεσμα την «άναρχη» ανάπτυξη των κυττάρων, χωρίς να παρατηρείται κάποια συγκεκριμένη κυτταρική αρχιτεκτονική (Εικόνα 3.12). Αρχικά, τα διαιρούμενα κύτταρα εμφανίζονται με αυξημένη συχνότητα στην περιφέρεια των αποικιών, με αποτέλεσμα να χάνεται σταδιακά η ανάπτυξη στην τρίτη διάσταση (δηλαδή, καθ' ύψος). Έτσι, μετά την παρέλευση περίπου τριών ημερών, όλη η επιφάνεια του τρυβλίου έχει καλυφθεί από διαφοροποιούμενα κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά σε κάποιες περιοχές εμφανίζονται σε μονή στιβάδα, πεπλατυσμένα και με μικρό κλάσμα πυρήνα/κυτταρόπλασμα, ενώ σε άλλες περιοχές



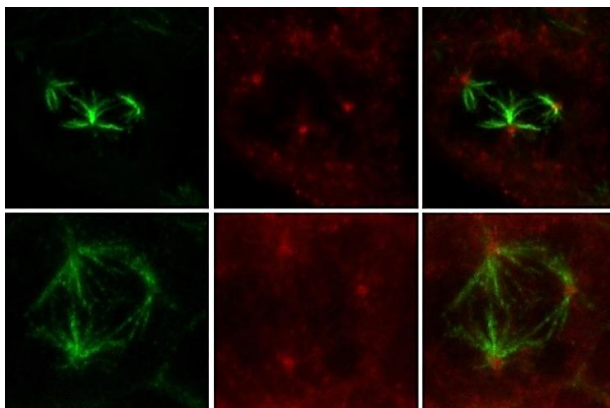
Εικόνα 3.11 Σταδιακή αύξηση της πυρηνικής λαμίνης A με την πρόοδο της διαφοροποίησης. Η κατανομή της λαμίνης A (πράσινο), ακετυλιωμένης τουμπουλίνης (μπλε) και PI (κόκκινο) σε αδιαφοροποίητα (ημέρα 0) και διαφοροποιούμενα (-LIF+PO) κύτταρα E14.

παρατηρούνται περισσότερες στιβάδες ή μια μικτή διάταξη. Η αφαίρεση του LIF με την ταυτόχρονη προσθήκη 10μM PO έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή ανάπτυξη των αποικιών κυρίως καθ' ύψος, που προκύπτει από τη σχετικά μεγαλύτερη συχνότητα διαίρεσης των κυττάρων που βρίσκονται στην κορυφαία επιφάνεια των αρχικών αποικιών (Εικόνα 3.12). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το ύψος των αποικιών μετά από δυο ή τρεις ημέρες ανάπτυξης κυττάρων E14 στις παραπάνω συνθήκες είναι: στην αδιαφοροποίητη κατάσταση μέγιστο ύψος αποικίας τα 50μm, στα τυχαία διαφοροποιούμενα (-LIF) μέγιστο ύψος αποικίας τα 30μm και στα διαφοροποιούμενα απουσία LIF παρουσία PO ελάχιστο ύψος αποικίας τα 95μm, αντίστοιχα.

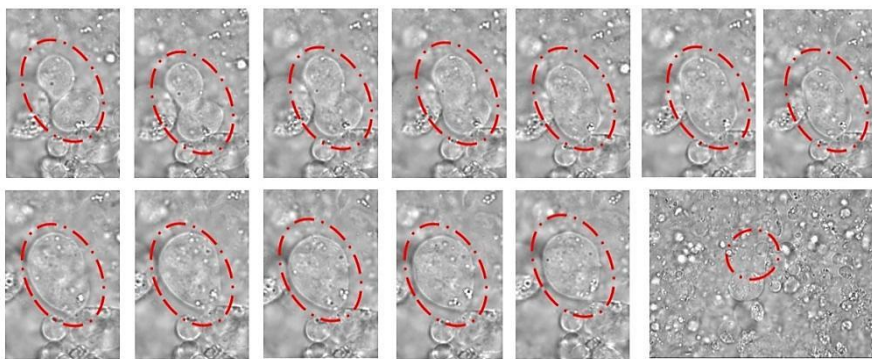


Εικόνα 3.12 Αντιπροσωπευτικές εικόνες από μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων που δείχνουν την ανάπτυξη E14 κυττάρων υπό συνθήκες αυτό-ανανέωσης (+LIF) και διαφοροποίησης (-LIF ή -LIF+PO) σε κάθε ημέρα καλλιέργειας (ένθετοι αριθμοί στις εικόνες). Μεγέθυνση 20x (*).

Η διαφοροποίηση απουσία LIF χωρίς προσθήκη PO παρουσιάζει κι άλλες ατυπίες, όπως η ύπαρξη πολύ-πολικών ατράκτων (κυρίως τριπολικών) στα μιτωτικά κύτταρα από την 3^η ημέρα και μετά (Εικόνα 3.13), συντήξεις κυττάρων (Εικόνα 3.14) και αυξημένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Καμία από τις παραπάνω ατυπίες δεν εμφανίζεται σε μια τυπική καλλιέργεια αυτό-ανανεούμενων κυττάρων E14, με εξαίρεση ίσως την απόπτωση, της οποίας τα ποσοστά είναι όμως πολύ περιορισμένα. Από την άλλη πλευρά, η διαφοροποίηση απουσία LIF και προσθήκης PO χαρακτηρίζεται από την μετανάστευση κυττάρων εκτός των σφαιρόμορφων αποικιών (μετά την παρέλευση 2 ημερών) και παρουσία κυττάρων με μορφολογία νευρώνων από την τρίτη ημέρα και έπειτα.



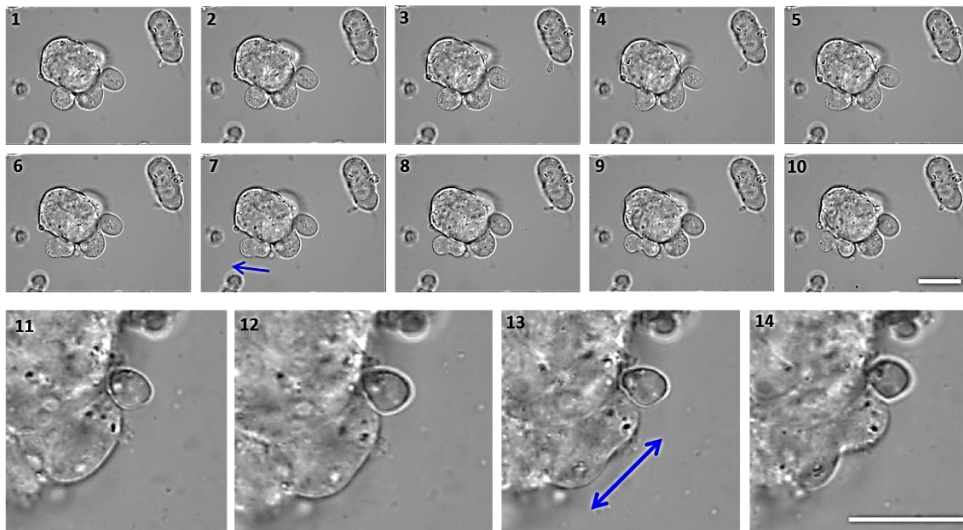
Εικόνα 3.13 Δυο χαρακτηριστικά παραδείγματα τριπολικών ατράκτων σε μονιμοποιημένα δείγματα κυττάρων E14 κατά την 3^η (πάνω σειρά) και 4^η ημέρα (κάτω σειρά) της διαφοροποίησης απουσία LIF, έπειτα από χρώση για α -τουμπουλίνη (πράσινο) και Ninein (περικεντροσωμική πρωτεΐνη, κόκκινο).



Εικόνα 3.14 Κυτταρική σύντηξη (cell fusion). Στιγμιότυπα όπως αποτυπώνονται στο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων κατά τη βιντεοσκόπηση διαφοροποιούμενων κυττάρων E14 (δείγμα 3^{ης} ημέρας διαφοροποίησης απουσία LIF).

Από την παρατήρηση σε πραγματικό χρόνο και τη βιντεοσκόπηση των παραπάνω καλλιεργειών προέκυψε ένα μη αναμενόμενο αποτέλεσμα: το σύνολο των αδιαφοροποίητων κυττάρων εμφάνιζαν μια ανομοιομορφη μετατόπιση των πόλων της μιτωτικής τους ατράκτου, με συνέπεια το ένα θυγατρικό κύτταρο να μένει σχεδόν ακίνητο και το άλλο να απομακρύνεται σταδιακά με τη πρόοδο της μίτωσης (Εικόνα 3.15). Με άλλα λόγια, παρατηρήθηκε ότι ο ένας πόλος της ατράκτου εκτελεί κίνηση τύπου Ανάφασης A, ενώ ο άλλος κίνηση τύπου Ανάφασης A και B (ενδεικτικά ⁽⁶⁷⁾). Το ίδιο πρότυπο

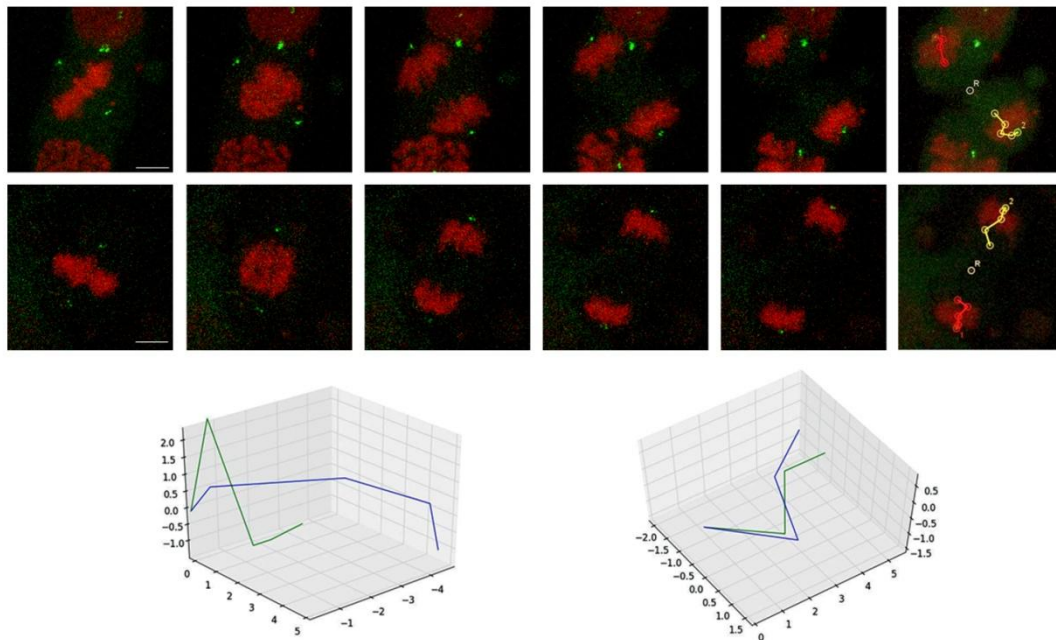
διαπιστώθηκε στο ~50% των διαιρούμενων κυττάρων την 1^η μέρα της διαφοροποίησης απουσία LIF παρουσία PO. Μετά τη 2^η ημέρα της διαφοροποίησης απουσία LIF και παρουσία PO, όλα τα διαιρούμενα κύτταρα εμφάνιζαν απόλυτα ομοιόμορφες κινήσεις των πόλων της ατράκτου, με ταυτόχρονη απομάκρυνση και των δυο θυγατρικών κυττάρων. Από την άλλη, τα κύτταρα που διαφοροποιούνται με την απλή αφαίρεση του LIF από το καλλιεργητικό μέσο παρουσίαζαν, στη συντριπτική τους πλειοψηφία, συμμετρικές κινήσεις των πόλων της ατράκτου από την πρώτη ημέρα.



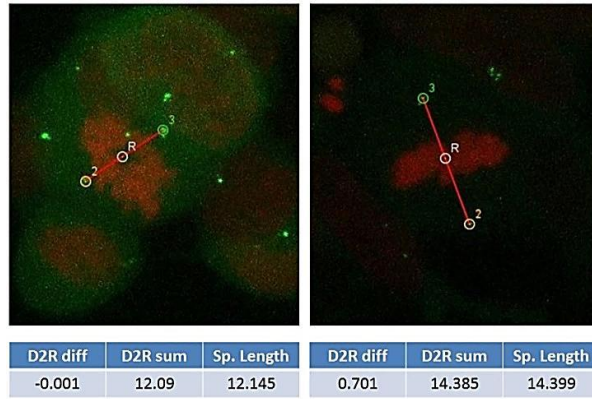
Εικόνα 3.15 Στιγμιότυπα κυτταρικών διαιρέσεων από βιντεοσκοπήση σε πραγματικό χρόνο αδιαφοροποίητων (1-10) και διαφοροποιούμενων (11-14, 2^η ημέρα -LIF) κυττάρων E14. Στην πρώτη περίπτωση μόνο το ένα θυγατρικό κύτταρο φαίνεται να κινείται με την πρόοδο της μίτωσης στη φορά που δείχνει το μπλε βέλος, ενώ στη δεύτερη και τα δυο θυγατρικά κύτταρα κινούνται αντίρροπα (διπλό μπλε βέλος). Κλίμακα 20μm.

Για να μελετηθεί ακριβέστερα η προηγούμενη παρατήρηση της ανομοιόμορφα αντίρροπης κίνησης των πόλων της ατράκτου στα αδιαφοροποίητα ή εν μέρει διαφοροποιημένα κύτταρα E14 πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη διαμόλυνση με Centrin-1-eGFP και H2B-mCherry, ώστε να σημανθούν τα κεντροσωμάτια και τα μιτωτικά χρωμοσώματα, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, άλλα κύτταρα καλλιεργήθηκαν υπό συνθήκες αυτό-ανανέωσης και άλλα υπό συνθήκες διαφοροποίησης (-LIF/-LIF+PO). Σε κάθε καλλιέργεια, τα μιτωτικά κύτταρα βιντεοσκοπήθηκαν και τα μορφολογικά δεδομένα αναλύθηκαν με κατάλληλο λογισμικό (Fiji/MTrackJ plugin). Από την ανάλυση αυτή προσδιορίστηκαν οι ακριβείς τροχιές που ακολουθούν οι πόλοι της ατράκτου στις τρεις διαστάσεις (Εικόνα 3.16). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαίωσαν απόλυτα τις αρχικές μορφολογικές παρατηρήσεις μας. Πιο αναλυτικά, οι πόλοι των αδιαφοροποίητων κυττάρων διέγραφαν ανομοιόμορφα αντίρροπες κινήσεις (σε ποσοστό ~90% των περιπτώσεων), σε αντίθεση με τις απόλυτα αντίρροπες των διαφοροποιημένων κυττάρων (σχεδόν πάντα από τη 2^η ημέρα διαφοροποίησης, ανεξάρτητα από την παρουσία PO).

Επιπλέον, η μεταφασική ατράκτος στις περισσότερες των περιπτώσεων ήταν επίσης ασύμμετρη (δηλ. ο ένας πόλος βρισκόταν πιο κοντά στα χρωμοσώματα από τον άλλο), αλλά και το συνολικό μήκος της ατράκτου διέφερε από κύτταρο σε κύτταρο (Εικόνα 3.17). Οι παραπάνω παρατηρήσεις ήταν ιδιαίτερα απρόσμενες μιας και η συνήθης βιβλιογραφική περιγραφή της μίτωσης εμφανίζει το μοντέλο της μιτωτικής ατράκτου ως ένα απόλυτα συμμετρικό σχηματισμό (ανασκοπείται στο ⁽⁶⁷⁾ και συζητείται εκτενώς στην ενότητα 4.8). Επιπλέον, οι όποιες ταλαντώσεις παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της στοίχισης των χρωμοσωμάτων έχουν ολοκληρωθεί πριν το πέρας της μετάφασης⁽⁶⁸⁾.



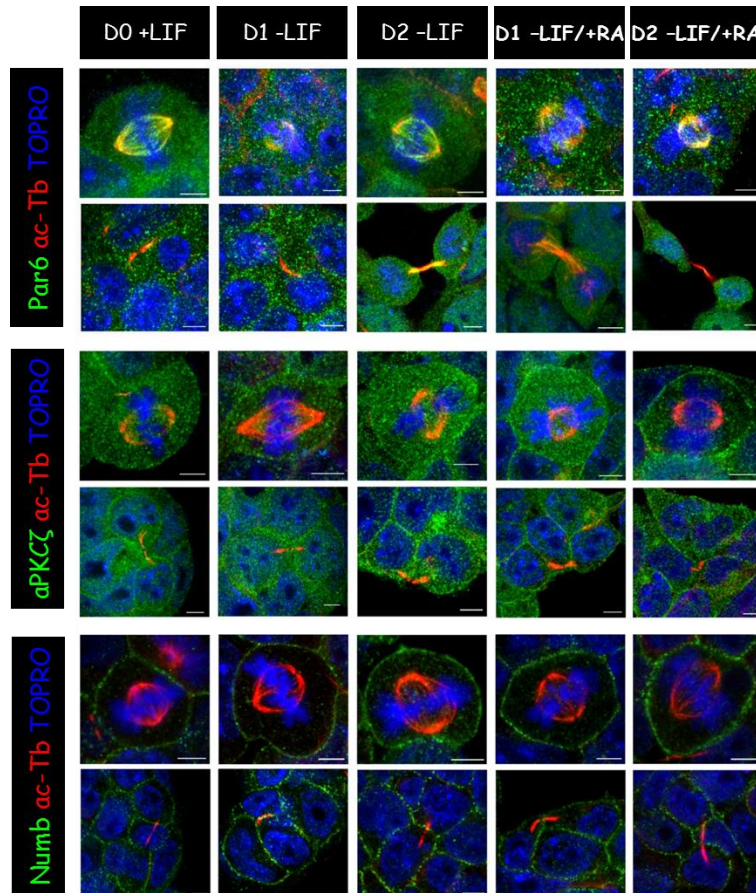
Εικόνα 3.16 Καταγραφή διαιρέσεων κυττάρων E14 σε πραγματικό χρόνο. Διαδοχικά στιγμιότυπα (σε μέγιστη προβολή) από βιντεοσκόπηση διαιρέσεων σε αδιαφοροποίητα (πρώτη σειρά εικόνων) ή διαφοροποιούμενα (2^η ημέρα υπό -LIF+PO συνθήκες, δεύτερη σειρά εικόνων) κύτταρα E14. Τα κύτταρα έχουν συν-διαμολυνθεί με Centrin-1-eGFP και H2B-mCherry ώστε να σημανθούν το DNA και τα κεντροσώματα, αντίστοιχα. Οι πορείες που κατέγραψαν οι πόλοι κάθε ατράκτου ανά στιγμιότυπο αναπαρίστανται γραμμικά σε δισδιάστατη απεικόνιση (κόκκινη και κίτρινη τεθλασμένη γραμμή στο τελευταίο εικονίδιο των δυο πρώτων σειρών) και σε τρισδιάστατες γραφικές παραστάσεις (τρίτη σειρά). Στο αριστερό γράφημα απεικονίζεται η διαίρεση του αδιαφοροποίητου κυττάρου (πρώτη σειρά), ενώ στο δεξιό του διαφοροποιούμενου (δεύτερη σειρά). Στα γραφήματα οι δυο τροχιές αναπαρίστανται με πράσινο και μπλε, αντίστοιχα. Τα ποιοτικά στοιχεία της ανάλυσης αυτής όπως εμφανίζονται και στα αντίστοιχα γραφήματα (τρίτη σειρά) καταδεικνύουν την απόλυτα ομοιόμορφη αλλά αντιδιαμετρική κίνηση των πόλων/θυγατρικών κυττάρων μόνον στην περίπτωση των διαφοροποιημένων κυττάρων. Η ανάλυση έγινε με κατάλληλο λογισμικό (FIJI/MTrackJ plugin).



Εικόνα 3.17 Καταγραφή του μεγέθους των μιτωτικών ατράκτων σε κύτταρα E14. Περαιτέρω επεξεργασία των προηγούμενων δεδομένων (εικόνα 3.16) στο τελευταίο στιγμιότυπο της μετάφασης. Για την ανάλυση ορίστηκαν το σημείο R (κέντρο του μεταφασικού δίσκου, metaphase plate) και οι θέσεις των δύο πόλων της ατράκτου ως σημεία 2 και 3. Συντομούσεις: D2R diff: διαφορά απόστασης των πόλων (2R - 3R) από το σημείο R, D2R sum: άθροισμα αποστάσεων των πόλων (2R + 3R) από το σημείο R, Sp.Length: μήκος ατράκτου, δηλ. το μήκος της κόκκινης γραμμής (από το 2 ως το 3).

3.2.2 Μελέτη κλασσικών δεικτών ΑΚΔ σε διαφοροποιήσεις EBK τύπου E14

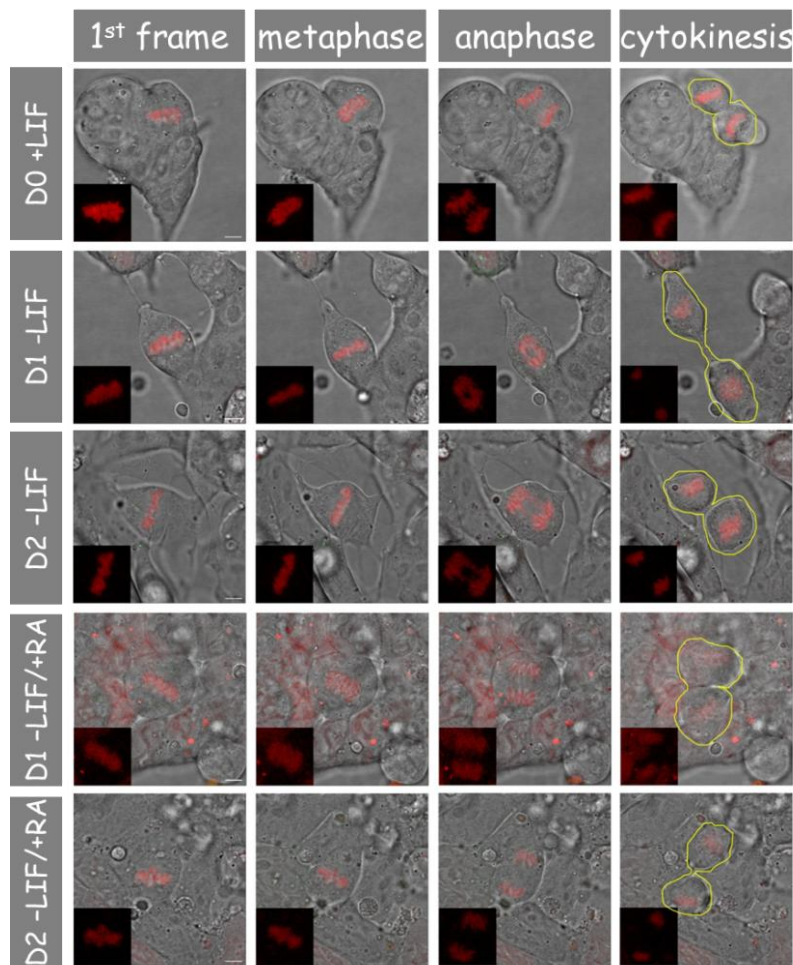
Η παρουσία ΑΚΔ στις παραπάνω καλλιέργειες διερευνήθηκε παρακολουθώντας την κατανομή τυπικών δεικτών ασυμμετρίας, όπως οι πρωτεΐνες πολικότητας Par6 και aPKCζ ή του Numb, που αποτελεί τον πιο γνωστό παράγοντα ΚΚΤ (Εικόνα 3.18).



Εικόνα 3.18 Συμμετρική κατανομή των Par6, aPKCζ και Numb σε διαιρούμενα κύτταρα E14. Ενδεικτικές απεικονίσεις των Par6, aPKCζ ή Numb (πράσινο), ακετυλιωμένη τουμπουλίνη (κόκκινο)

και TOPRO-3 (μπλε) σε αδιαφοροποίητα (ημέρα 0) και διαφοροποιούμενα (-LIF±PO στις δυο πρώτες ημέρες) κύτταρα E14. Κλίμακα 5μm.

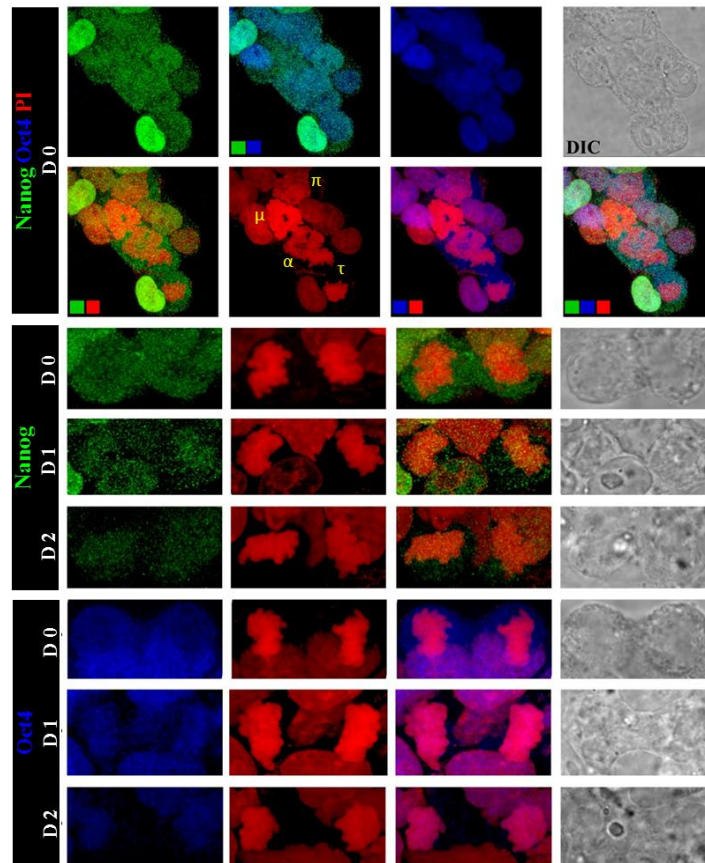
Το αποτέλεσμα που προέκυψε από τον ενδελεχή έλεγχο ικανού αριθμού (>100 κυττάρων ανά παράγοντα και ανά ημέρα μελέτης) μιτωτικών και θυγατρικών κυττάρων σε κάθε συνθήκη διαφοροποίησης ήταν στερεότυπο. Τα διαφοροποιούμενα κύτταρα E14 δεν εμφάνισαν πολικότητα, (συνεπώς) η στοίχιση της μιτωτικής ατράκτου θεωρήθηκε τυχαία, δεν επιβεβαιώθηκε ασύμμετρη κατανομή του παράγοντα Numb και τα θυγατρικά κύτταρα βρέθηκαν ισομεγέθη (Εικόνες 3.18 και 3.19). Με άλλα λόγια, σύμφωνα με τους κλασικούς δείκτες της ΑΚΔ δεν παρατηρήθηκε καμίας μορφής ασυμμετρία κατά τα πρώιμα στάδια της διαφοροποίησης των ΕΒΚ ποντικού.



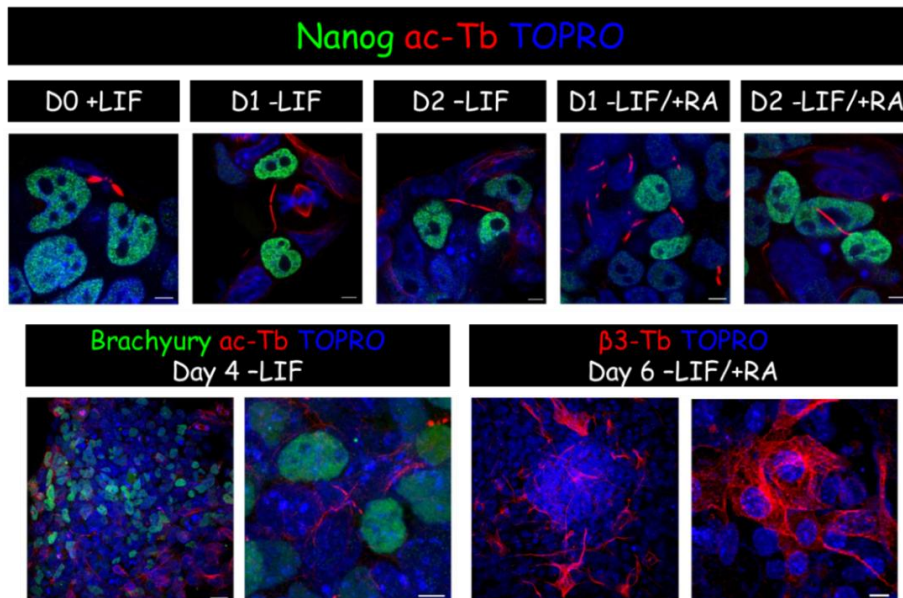
Εικόνα 3.19 Θυγατρικά κύτταρα ίδιου μεγέθους προκύπτουν από τις διαιρέσεις αδιαφοροποίητων ή διαφοροποιούμενων κυττάρων E14. Στιγμιότυπα από την καταγραφή διαιρούμενων κυττάρων E14 σε πραγματικό χρόνο για την ημέρα και τις συνθήκες καλλιέργειας που αναγράφονται αριστερά. Τα δείγματα αυτά προέρχονται από τα πειράματα που περιγράφονται στην Εικόνα 3.18. Στην πρώτη στήλη παρατίθεται το πρώτο στιγμιότυπο της βιντεοσκόπησης, στη δεύτερη το τελευταίο της μετάφασης, στην τρίτη ένα κατά τη διάρκεια της ανάφασης και στην τελευταία ένα κατά τη διάρκεια της κυτταροκίνησης. Σε ένθετο παρατίθεται η καταγραφή της H2B-mCherry σε μέγιστη προβολή για το εκάστοτε στιγμιότυπο, ενώ με κίτρινη γραμμή, στα στιγμιότυπα της κυτταροκίνησης, υποδεικνύονται επιπλέον τα όρια των θυγατρικών κυττάρων. Οι μετρήσεις των μεγεθών των κυττάρων (περιφέρειες κυττάρων) πραγματοποιήθηκαν στην ισιμερινή τομή του εκάστοτε θυγατρικού σε στιγμιότυπο μετά το πέρας της διαιρέσεως (δεν εμφανίζεται).

3.2.3 Μελέτη κατανομής δεικτών πολυδυναμίας και ιστοειδικών μεταγραφικών παραγόντων σε θυγατρικά κύτταρα διαφοροποιούμενων EBK τύπου E14

Με τα αποτελέσματα της προηγούμενης ενότητας φαίνεται πως οι πρώτες διαιρέσεις διαφοροποίησης των EBK του ποντικού πραγματοποιούνται με απόλυτα συμμετρικό τρόπο και πως η ετερογένεια των διαφοροποιούμενων κυττάρων ή οι ΑΚΔ θα πρέπει να εξηγούνται με διαφορετικό τρόπο. Ως πιθανοί εναλλακτικοί δείκτες ΑΚΔ στα EBK ποντικού εξετάστηκαν οι παρακάτω δυο: (α) η ασύμμετρη απώλεια βασικών δεικτών/παραγόντων πολυδυναμίας (Nanog, Oct4 και Sox2) και (β) η ασύμμετρη εμφάνιση ιστοειδικών μεταγραφικών παραγόντων/δεικτών (όπως Brachyury, GATA4 και Tuj-1). Υπενθυμίζεται εδώ, πως η πρώτη πιθανότητα, ως προς το δείκτη Oct4, έχει εξεταστεί στο παρελθόν σε διαφοροποιήσεις EBK του ανθρώπου, και πως από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δεν προέκυπτε κάποια ασυμμετρία(69). Στην παρούσα μελέτη, η έκφραση και ο εντοπισμός των παραπάνω δεικτών μελετήθηκε ενδελεχώς σε ζεύγη θυγατρικών κυττάρων E14 κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησής τους (-LIF ±PO) σε δείγματα κατάλληλων ημερών για καθένα από αυτούς. Πιο αναλυτικά, οι δείκτες πολυδυναμίας (Nanog, Oct4 και Sox2) μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών της διαφοροποίησης (1^η-2^η), ενώ οι Brachyury, GATA4 και Tuj-1 σε μεταγενέστερες (από 3^η έως 8^η ημέρα) (Εικόνα 3.20 και 3.21). Τα ζεύγη των θυγατρικών κυττάρων που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ήταν κατά κύριο λόγο αυτά που είχαν ολοκληρώσει τη μιτωτική διαδικασία και παρέμεναν συνδεδεμένα με μεσόσωμα (όπως αναγνωρίζεται από αντίσωμα έναντι της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης). Τα μιτωτικά κύτταρα εξαιρέθηκαν της γενικότερης ανάλυσης όταν οι πρώτες δοκιμασίες για τους παράγοντες Oct4 και Nanog στα κύτταρα αυτά κατέδειξαν πως οι εν λόγω δείκτες παρουσιάζονται ασθενώς διάχυτοι κυτταροπλασματικοί, ενώ στα μεσοφασικά πολυδύναμα EBK εμφανίζουν τις κλασικές διακυμάνσεις από κύτταρο σε κύτταρο (κυρίως τα επίπεδα του Nanog)^(48,70,71) (Εικόνα 3.20). Από τα αποτελέσματα της παραπάνω ανάλυσης δεν προέκυψε καμία ασυμμετρία, ούτε ως προς την απώλεια των δεικτών πολυδυναμίας αλλά ούτε και ως προς την εμφάνιση ιστοειδικών δεικτών (Εικόνα 3.20 και 3.21). Για την περίπτωση της πρωτεΐνης Tuj-1 (β3-Tb), δεν κατέστη δυνατή η ανάλυση σε ζεύγη θυγατρικών, διότι ο παράγοντας αυτός ανιχνεύεται σε πιο ώριμα, ίσως και τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα νευρωνικού χαρακτήρα (και αντίστοιχης μορφολογίας), τα οποία δεν διαιρούνται (Εικόνα 3.21).



Εικόνα 3.20 Κατανομή Nanog και Oct4 σε αδιαφοροποιητά ή διαφοροποιούμενα κύτταρα E14. Κορυφαία αποτυπώνεται μέρος μιας αποικίας αυτο-ανανεωνόμενων E14 κυττάρων όπου παρατηρούνται όλες οι φάσεις της μίτωσης (πρόφαση, μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση). Ακολουθούν ενδεικτικές απεικονίσεις διακριόμενων κυττάρων E14 (+LIF ή -LIF για τις δυο πρώτες ημέρες διαφοροποίησης).

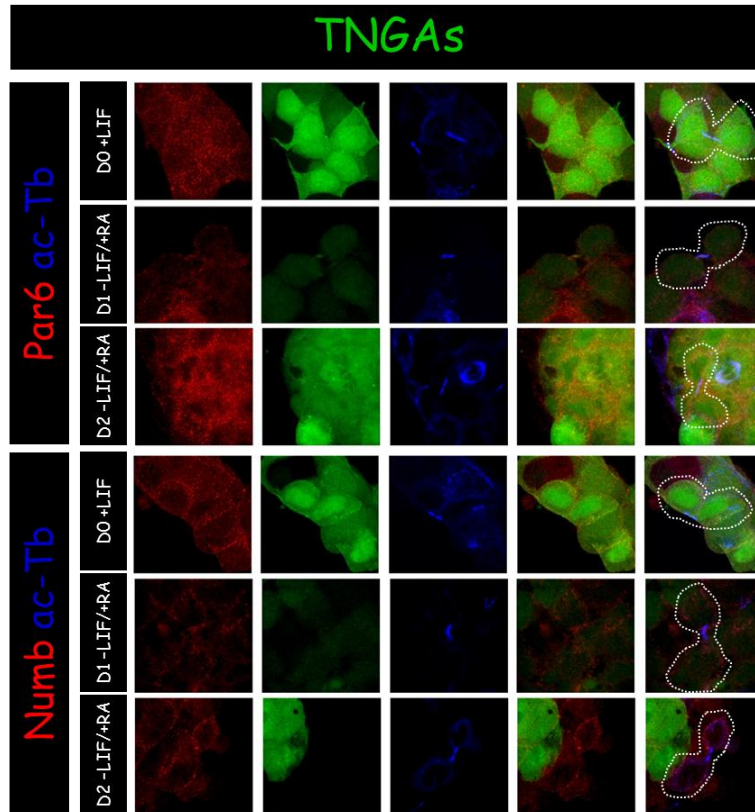


Εικόνα 3.21 Συμμετρική κατανομή των Nanog, Brachyury και $\beta 3$ -Tb σε διαφοροποιούμενα κύτταρα E14 κατά τις αναγραφόμενες ημέρες και συνθήκες. (κλίμακα 20 μ m στις αποικίες και 5 μ m στα θυγατρικά κύτταρα).

3.2.4 Μελέτη παρουσίας ΑΚΔ στη διαφοροποίηση των κυττάρων TNGA προς νευροεξώδερμα

Για την επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων (μη ασύμμετρη απώλεια δεικτών πολυδυναμίας) πραγματοποιήθηκε η αντίστοιχη σειρά πειραμάτων στα EBK τύπου TNGA. Τα κύτταρα TNGA είναι ένας κλώνος που προέκυψε από EBK τύπου E14 (όμοια με αυτά του εργαστηρίου μας), στα οποία το ένα αλληλόμορφο του *Nanog* έχει τροποποιηθεί κατάλληλα ώστε να εκφράζει την Nanog-eGFP πρωτεΐνη⁽⁷⁰⁾. Με άλλα λόγια, αποτελεί ένα κυτταρικό σύστημα αναφοράς της έκφρασης του γονιδίου Nanog (Nanog reporter cell line). Έτσι, με τη χρήση των κυττάρων TNGA θα μπορούσαμε να παρακολουθήσουμε άμεσα την πορεία απώλειας της αυτοδυναμίας των εν λόγω κυττάρων κατά την πορεία της διαφοροποίησής τους για τους σκοπούς της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Πιο συγκεκριμένα, σε διαφοροποιήσεις του παραπάνω κλώνου θελήσαμε να διερευνήσουμε α) εάν πραγματοποιούνται ΑΚΔ, β) εάν γίνονται με ταυτόχρονη ασύμμετρη απώλεια του Nanog (μέσω παρακολούθησης του GFP σήματος), γ) εάν τα δυο φαινόμενα είναι ασύνδετα ή, τέλος, δ) εάν θα επιβεβαιώνονταν τα προηγούμενα αποτελέσματά μας στα κύτταρα E14, δηλαδή εάν θα απουσίαζαν και σε αυτό το σύστημα οι ΑΚΔ. Για να απαντηθούν τα παραπάνω ερωτήματα πραγματοποιήθηκαν διαφοροποιήσεις σε δυο διαστάσεις με αφαίρεση LIF παρουσία ρετινοϊκού οξέος, όπως και προηγουμένως (βλέπε ενότητα 3.2.2). Μιτωτικά κύτταρα που προέκυψαν από τις παραπάνω διαφοροποιήσεις, αλλά και αδιαφοροποίητα που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου, μελετήθηκαν με ανοσοφθορισμό έναντι των πρωτεϊνών *Par6* και *Numb* (Εικόνα 3.22). Από την αξιολόγηση των παραπάνω δειγμάτων διαπιστώθηκε η πλήρης επιβεβαίωση των προηγούμενων αποτελεσμάτων μας με τα κύτταρα E14, δηλαδή σε καμία συνθήκη, ημέρα ή παράγοντα δεν καταγράφηκε ασύμμετρη κατανομή. Αξίζει όμως να σημειωθούν δυο παρατηρήσεις. Πρώτον, έχει ασκηθεί κριτική στο συγκεκριμένο κυτταρικό σύστημα για την έντονη κυτταροπλασματική παρουσία GFP θετικότητας, κάτι που αναγνωρίζουν και οι κατασκευαστές τους^(70,72), υποδηλώνοντας την όχι και τόσο αξιόπιστη υπόδειξη της πρωτεΐνης Nanog. Με την παρατήρηση αυτή συμφωνούν και τα δικά μας αποτελέσματα (Εικόνα 3.22). Δεύτερον, ακόμα και στην περίπτωση όπου το GFP σήμα δεν αντιπροσωπεύει (αναφέρει) απόλυτα την πρωτεΐνη Nanog ή όταν αυτό βρέθηκε αποκλειστικά κυτταροπλασματικό ή ασθενές/κανονικό/έντονο πυρηνικό με ή χωρίς κυτταροπλασματική παρουσία, δηλαδή σε όλες τις περιπτώσεις η κατανομή στα ζεύγη θυγατρικών κυττάρων παρέμενε συμμετρική. Πιο απλά, όσο GFP σήμα έφερε το μητρικό κύτταρο (ότι κι αν αυτό αντιπροσωπεύει) το κληρονομούσε ισομερώς στα θυγατρικά του.

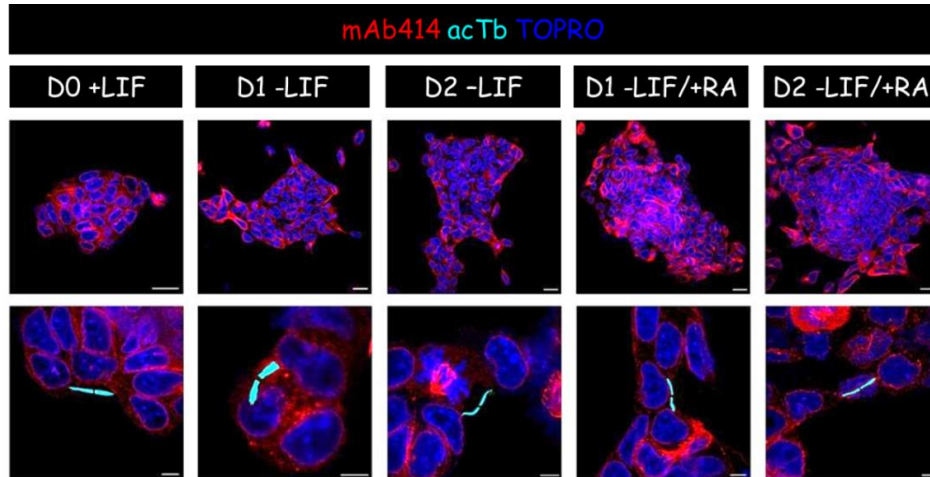
Συνεπώς, επιπλέον των παραγόντων Par6 και Numb, το GFP σήμα των κυττάρων TNGA κατανέμεται συμμετρικά στα θυγατρικά τους κύτταρα κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων διαφοροποίησης των EBK του ποντικού.



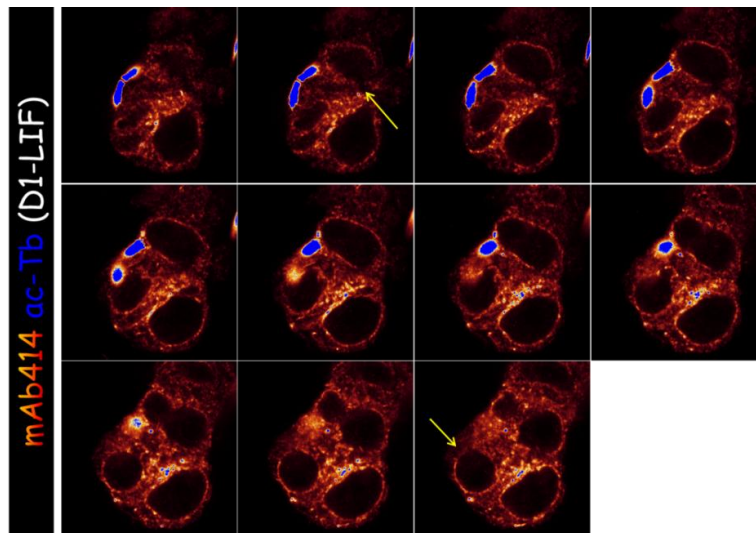
Εικόνα 3.22 Συμμετρική κατανομή των Par6, Numb και GFP στα θυγατρικά κύτταρα (συνδέονται με μεσόσωμα) διαιρούμενων κυττάρων TNGA. Ενδεικτικές κατανομές των Par6 ή Numb (κόκκινο) και ακετυλιωμένης τουμπουλίνης (μπλε) σε αδιαφοροποίητα (ημέρα 0) και διαφοροποιούμενα (-LIF+PO, ημέρες 1 και 2) κύτταρα TNGA. Με πράσινο διακρίνεται η πρωτεΐνη GFP που εκφράζουν τα κύτταρα TNGA. Τα όρια των θυγατρικών κυττάρων εσωκλείονται από διακεκομμένη γραμμή.

3.2.5 Μελέτη κατανομής των νουκλεοπορινών της οικογένειας Nup84/Nup107 σε θυγατρικά κύτταρα διαφοροποιούμενων EBK τύπου E14

Στα πειράματα που ακολουθούν, μελετήθηκε και η υπόθεση εργασίας της παρούσας διατριβής ως προς την πιθανή ασύμμετρη κατανομή πρωτεϊνών του συμπλέγματος των πυρηνικών πόρων (νουκλεοπορινών) ή της ετερόχρονης συγκρότησης του πυρηνικού φακέλου στα δύο θυγατρικά κύτταρα, στα πρότυπα της ανάλυσης που προηγήθηκε για τις λευχαιμικές κυτταρικές σειρές (Εικόνα 8). Στην Εικόνα 3.23 παρουσιάζονται χαρακτηριστικά παραδείγματα της ανάλυσης αυτής, από την οποία δεν προέκυψε κάποια ετερογένεια.



Εικόνα 3.23 Συμμετρική κατανομή νουκελοπορινών σε διαιρούμενα κύτταρα E14. Κατανομή των νουκλεοπορινών της οικογένειας Nup84/Nup107 όπως τις αναγνωρίζει το αντίσωμα mAb414 (κόκκινο), της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης (τιρκουάζ) και του TOPRO-3 (DNA, μπλε). Για την καλύτερη αναπαράσταση παρατίθεται ταυτόχρονα μια τομή για το mAb414, η αντίστοιχη για το TOPRO-3 και η μέγιστη προβολή με αλλοιωμένη ένταση για την ακετυλιωμένη τουμπουλίνη.



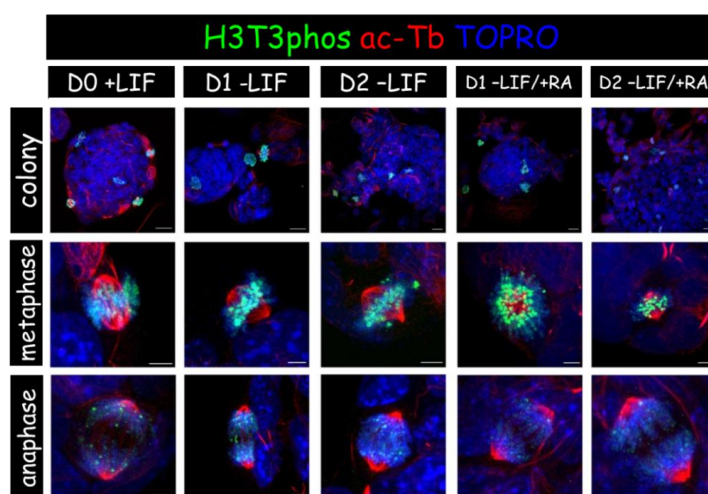
Εικόνα 3.24 Η συμμετρία των διαιρούμενων κυττάρων E14 διαπιστώνεται και στην κατανομή των πυρηνικών πόρων. Παρατίθεται ενδεικτικά η ανάλυση όλων των τομών του δείγματος «D1-LIF» της προηγούμενης εικόνας μετά το μετασχηματισμό με κατάλληλο λογισμικό (χρήση ψευδο-χρώματος glowover). Παρατηρείται ομοιόμορφη κατανομή των πυρηνικών πόρων μεταξύ των πυρηνικών φακέλων των δυο θυγατρικών κυττάρων και οι όποιες ατυπίες (λ.χ. η απουσία πυρηνικών πόρων -το κενό- που δείχνουν τα κίτρινα βέλη) είναι σπάνιες και ισοκατανεμημένες στα δυο θυγατρικά κύτταρα.

Τα παραπάνω δείγματα αναλύθηκαν περαιτέρω και για πιθανές ποιοτικές διαφορές στους νεοσυντιθέμενους πυρηνικούς φακέλους, όπως για παράδειγμα η ετερογενής κατανομή των πυρηνικών πόρων. Σε διάφορες καταστάσεις παρατηρούνται εκτεταμένα «κενά» στην επιφάνεια των πυρηνικών φακέλων από την εκτεταμένη απουσία πόρων με λειτουργικές συνέπειες στη μεταγραφική δραστηριότητα των κυττάρων αυτών (ενδεικτικά αναφέρονται τα ^(73,74)). Η ετερογενής παρουσία μιας τέτοιας ατυπίας μεταξύ των πυρηνικών φακέλων δυο θυγατρικών κυττάρων θα μπορούσε να συμβάλει στην απόκτηση

διακριτής κυτταρικής τύχης από τα εν λόγω θυγατρικά. Η επεξεργασία με κατάλληλο λογισμικό των απεικονίσεων του μεγαλύτερου δυνατού εύρους των εκάστοτε πυρήνων στα ζεύγη θυγατρικών κυττάρων κατέδειξε την απουσία εκτεταμένων περιοχών χωρίς πυρηνικούς πόρους και κατά συνέπεια απουσία ασυμμετρίας μεταξύ αδελφών κυττάρων (Εικόνα 3.24). Στο ίδιο αποτέλεσμα κατέληξαν αντίστοιχα πειράματα σε αδιαφοροποίητα ή διαφοροποιούμενα κύτταρα E14 και αναλύονται παρακάτω (ενότητα 3.2.8.6 και Εικόνες 3.41-3).

3.2.6 Μελέτη κατανομής της φωσφορυλιωμένης ιστόνης H3 στη Θρεονίνη 3 σε θυγατρικά κύτταρα διαφοροποιούμενων EBK τύπου E14

Μια επιπλέον παράμετρος που διερευνήθηκε κατ' αντιστοιχία με τον πυρηνικό φάκελο της προηγούμενης παραγράφου ήταν η κατανομή της φωσφορυλιωμένης μορφής της ιστόνης H3. Η εν λόγω φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 στη Θρεονίνη 3 (H3T3phos) συντελείται στην εκκίνηση της μιτωτικής διαδικασίας και αντιστρέφεται με την πρόοδο της ανάφασης⁽⁷⁵⁾. Η εξέταση του παραπάνω δυναμικού φαινομένου αποσκοπεί στην διερεύνηση τυχόν εμπλοκής ενός επιγενετικού μηχανισμού στην προαγωγή ασυμμετριών. Υπενθυμίζεται εδώ ότι έχει παρατηρηθεί μη τυχαία κατανομή μορίων της ιστόνης H3 (προϋπάρχοντα και νεοσυντιθέμενα) σε ΑΚΔ της *Drosophila* (βλέπε ενότητα 1.3) τα οποία διακρίνονται σε παλαιά και νεοσυντιθέμενα με την παραπάνω φωσφορυλίωση⁽³⁵⁾. Έτσι, παρασκευάστηκαν δείγματα αδιαφοροποίητων και διαφοροποιούμενων κυττάρων E14 (στα καθιερωμένα πρότυπα) και τα μιτωτικά τους κύτταρα εξετάστηκαν για την κατανομή της H3T3phos. Από την ανάλυση ικανού αριθμού μεταφασικών και αναφασικών κυττάρων για κάθε συνθήκη προέκυψαν για μια ακόμη φορά απόλυτα συμμετρικές κατανομές (Εικόνα 3.25).



Εικόνα 3.25 Συμμετρική κατανομή της H3T3phos σε διαιρούμενα κύτταρα E14. Κατανομή των H3T3phos (πράσινο), ακετυλιωμένη τουμπουλίνη (κόκκινο) και TOPRO-3 (DNA, μπλε) σε

αδιαφοροποιήτα (ημέρα 0) και διαφοροποιούμενα (-LIF±PO, ημέρες 1 και 2) κύτταρα. Για την καλύτερη αναπαράσταση παρατίθεται ταυτόχρονα μια τομή για την H3T3rphos, η αντίστοιχη για το TOPRO-3 και η μέγιστη προβολή για την ακετυλιωμένη τουμπουλίνη.

3.2.7 Μελέτη ανάκτησης διαφορετικής κυτταρικής τύχης μέσω της ετερόχρονης ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού Shh

Σύμφωνα με νεότερα βιβλιογραφικά δεδομένα έχει αρχίσει να διαφαίνεται μια νέα μορφή ασυμμετρίας, η οποία δυνητικά θα μπορούσε να προσδώσει διαφορετική κυτταρική τύχη σε θυγατρικά κύτταρα χωρίς απαραίτητα να έχει προηγηθεί μια κλασσική ΑΚΔ(76,77). Πιο αναλυτικά, το θυγατρικό κύτταρο που κληρονομεί το μητρικό (ώριμο) κεντρόσωμα αναπτύσσει νωρίτερα την πρωταρχική βλεφαρίδα (primary cilium, ΠΒ) του και κατ' επέκταση τη δυνατότητα ανταπόκρισης σε σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται μέσω αυτής⁽⁷⁶⁾. Η ετερόχρονη συγκρότηση των ΠΒ δυο αδελφών κυττάρων έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην περίπτωση των ΕΒΚ, διότι τα γνωστά σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται μέσω αυτού του σχηματισμού περιλαμβάνουν τα Wnt, Shh και PDGF, των οποίων η δράση σχετίζεται με βασικές λειτουργίες των ΕΚΒ (όπως η επιβίωση, η αυτο-ανανέωση, η πολυδυναμία και η έκπτυξή τους) (ενδεικτικά⁽⁷⁸⁾). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι οι κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες πολυδυναμίας -Nanog, Oct4 και Sox2- πλέον του πυρηνικού εντοπισμού τους συγκεντρώνονται εν μέρει και στις ΠΒ των ανθρώπινων ΕΒΚ⁽⁷⁹⁾.

Επιπρόσθετα, είναι ενδιαφέρον ότι η «κυκλοφορία» πρωτεϊνών προς και από την ΠΒ «προσομοιάζει» στην πυρηνο-κυτταροπλασματική μεταφορά: (α) η βάση της ΠΒ περιλαμβάνει πλειάδα νουκλεοπορινών και (β) οι πρωτεΐνες που εντοπίζονται στην ΠΒ περιέχουν μια ειδική αλληλουχία αναγνώρισης αντίστοιχη του σήματος πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal) -σήμα βλεφαριδικού εντοπισμού στην προκειμένη περίπτωση (ciliar localization signal)⁽⁸⁰⁻⁸²⁾ και ανασκοπούνται στα⁽⁸³⁻⁸⁵⁾.

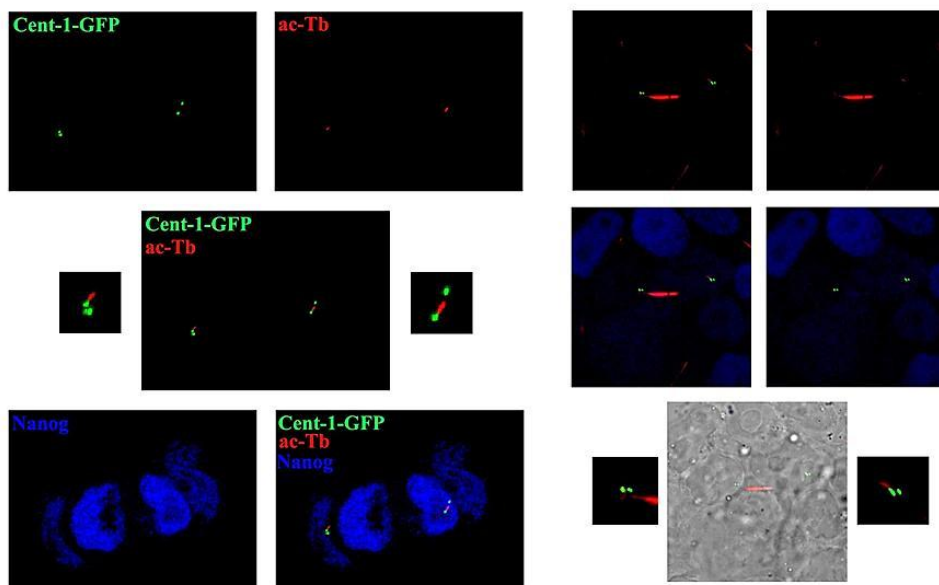
3.2.7.1 Μελέτη σχηματισμού ΠΒ στα ΕΒΚ και χαρακτηρισμός

Για να διερευνήσουμε αυτά τα ενδεχόμενα, δηλαδή το ρόλο της ΠΒ στην ανάκτηση διαφορετικής κυτταρικής τύχης από αδελφά ΕΒΚ με βάση την παραπάνω εγγενή ασυμμετρία, αναζητήθηκε η χαρακτηριστική δομή της ΠΒ στα ΕΒΚ τύπου E14 του εργαστηρίου μας. Υπενθυμίζεται εδώ πως κατά το σχεδιασμό και εκτέλεση των πειραμάτων που ακολουθούν δεν υπήρχε βιβλιογραφικό δεδομένο για την παρουσία ΠΒ στα ΕΒΚ ποντικού (συζητείται ενδελεχώς στην ενότητα 4.3). Για την ταυτοποίηση των ΠΒ χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα που αναγνωρίζει την ακετυλιωμένη τουμπουλίνη (βασικό δομικό συστατικό του αξονιμάτιου των ΠΒ)⁽⁷⁸⁾. Επιπλέον, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με κατάλληλο φορέα ο οποίος κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Centrin-1-eGFP (δομικό συστατικό

των κεντριολίων του κεντροσώματος)⁽⁷⁷⁾. Με αυτό τον τρόπο, αναγνωρίστηκε με βεβαιότητα η παρουσία ΠΒ στα EBK ποντικού, όταν βρέθηκε ότι η χαρακτηριστική μακρόστενη κυλινδρική δομή που περιέχει ακετυλιωμένη τουμπουλίνη αναδύεται από ένα πράσινα σημασμένο (GFP θετικό) κεντριόλιο (Εικόνα 3.26, αριστερά). Εξαιρετικά ενδιαφέρον κρίθηκε επίσης το γεγονός ότι τα κύτταρα E14 αναπτύσσουν ΠΒ υπό τυπικές *in vitro* συνθήκες έκπτυξης, γιατί οι περισσότερες προηγούμενες μελέτες είχαν πραγματοποιηθεί σε μη αναπτυσσόμενα κύτταρα (κύτταρα που εξωθήθηκαν στη φάση G0).

Το επόμενο ερώτημα που διερευνήθηκε στο σύστημά μας είναι το εάν πράγματι οι ΠΒ αναπτύσσονται ετερόχρονα στα θυγατρικά κύτταρα. Ο έλεγχος με την ίδια μέθοδο επιβεβαίωσε αυτή την υπόθεση, πιστοποιώντας ότι οι ΠΒ δυο θυγατρικών κυττάρων έχουν διαφορετικό μήκος κατά τη διάρκεια της G1 φάσης (Εικόνα 3.26, δεξιά).

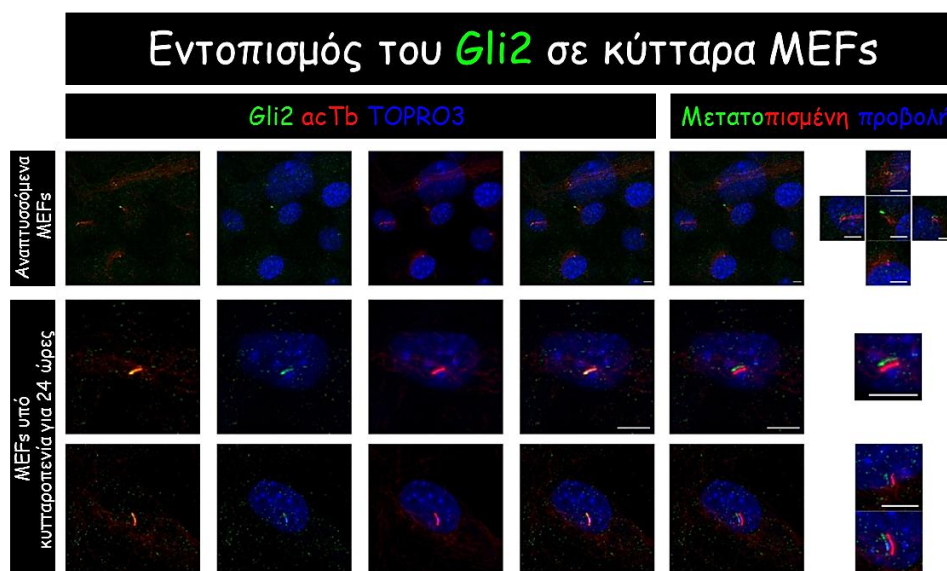
Στη συνέχεια, εξετάσαμε εάν η ΠΒ που συγκροτήθηκε μετά τη μίτωση είναι λειτουργική. Το πρώτο στοιχείο που αναζητήθηκε στις ΠΒ των θυγατρικών κυττάρων ήταν ο μεταγραφικός παράγοντας Nanog (βλέπε παραπάνω). Όμως, σε αδιαφοροποίητα κύτταρα E14 ο εντοπισμός αυτής της πρωτεΐνης βρέθηκε να είναι αποκλειστικά πυρηνικός (Εικόνα 3.21 και 3.26). Το αποτέλεσμα αυτό διαφέρει με αυτό που προέκυψε σε προηγούμενες μελέτες, στις οποίες όμως χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα EBK σε φάση ηρεμίας (G0)^(79,86).



Εικόνα 3.26 Τα EBK ποντικού σχηματίζουν ΠΒ (βλέπε κείμενο). Κύτταρα τύπου E14 διαμολύνθηκαν με Centrin-1-GFP και εξετάστηκαν μετά από χρώση για ακετυλιωμένη τουμπουλίνη (κόκκινο) και Nanog (μπλε).

Σε δεύτερη φάση, μελετήσαμε ένα από τα πιο γνωστά σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται μέσω της ΠΒ, το μονοπάτι Sonic Hedgehog (Shh)⁽⁷⁸⁾. Ο βασικός

τελεστής του συγκεκριμένου σηματοδοτικού μονοπατιού είναι ο Gli2. Όταν το μονοπάτι είναι ενεργό, ο Gli2 εντοπίζεται στην ΠΒ και μάλιστα σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο απομακρυσμένο άκρο της ΠΒ (βλέπε παρακάτω και ⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾).

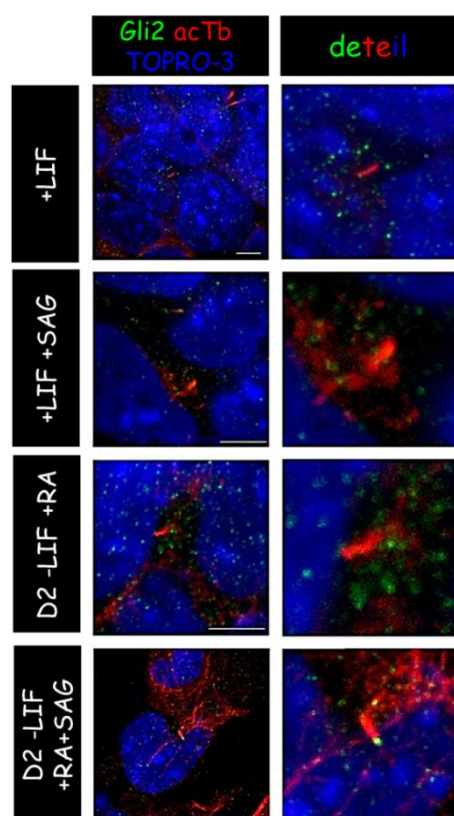


Εικόνα 3.27 Ο εντοπισμός του Gli2 στις ΠΒ των κυττάρων MEFs που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικός μάρτυρας της πειραματικής διαδικασίας. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Shh είναι ενεργοποιημένο σε καλλιέργειες κυττάρων MEFs και παρουσιάζει αυξημένη ενεργοποίηση κατά την ώθηση των κυττάρων MEFs στη φάση G0, όπου οι ΠΒ τους αυξάνουν επίσης σε μέγεθος⁽⁸⁹⁾. Κλίμακα 5μm.

Σε αδιαφοροποίητα κύτταρα E14, ο τελεστής Gli2 του σηματοδοτικού μονοπατιού Shh δεν ανιχνεύθηκε στις ΠΒ των κυττάρων. Ομοίως, στα διαφοροποιούμενα κύτταρα E14 (1^{ης} ή 2^{ης} ημέρας διαφοροποίησης -LIF±PO) η κατανομή του Gli2 ήταν μάλλον διάχυτη χωρίς η εν λόγω πρωτεΐνη να εντοπίζεται στην περιοχή της ΠΒ. Η απουσία Gli2 από τις ΠΒ των παραπάνω δειγμάτων δεν μπορεί να οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα, διότι ανιχνεύθηκε επιτυχώς (Εικόνα 3.27) σε καλλιέργειες εμβρυονικών ινοβλαστών ποντικού (mouse embryonic fibroblasts-MEFs) που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες (ενδεικτικά ⁽⁸⁹⁾).

Η πιθανότερη ερμηνεία για την απουσία ενεργού σηματοδοτικού μονοπατιού Shh στα αδιαφοροποίητα ή διαφοροποιούμενα EBK είναι η απουσία του αντίστοιχου συνδέτη (ligand). Το ενδεχόμενο αυτό διερευνήθηκε με την προσθήκη SAG (Smoothened Agonist, χημικού ενεργοποιητή του μονοπατιού Shh) στο καλλιεργητικό μέσο⁽⁸⁹⁾. Παρά την προσθήκη SAG, ο Gli2 δεν εντοπίστηκε στις ΠΒ των αδιαφοροποίητων EBK. Από τις αντίστοιχες δοκιμασίες στα διαφοροποιούμενα κύτταρα (διαφοροποίησης απουσία LIF με ή χωρίς προσθήκη PO) προέκυψε πως το εν λόγω μονοπάτι ενεργοποιείται πράγματι κατά τη 2^η ημέρα διαφοροποίησης –το νωρίτερο- απουσία LIF παρουσία PO (Εικόνα 3.28). Δεδομένου ότι το καλλιεργητικό μέσο είναι κοινό για τα 1^{ης} και 2^{ης} ημέρας διαφοροποιούμενα EBK, το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει πως μόνο μετά την 2^η ημέρα

διαφοροποίησης τα κύτταρα είναι επιδεκτικά στην ενεργοποίηση του μονοπατιού Shh. Επιπλέον, τα πρώιμα διαφοροποιημένα και τα αδιαφοροποίητα EBK ενδεχομένως υπολείπονται αναπτυξιακά και για άλλους λόγους (ανεξάρτητους της παρουσίας συνδέτη) δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι αυτό (συζητείται ενδελεχώς στην ενότητα 4.3). Τέλος, σε ότι αφορά την ανάκτηση διαφορετικής κυτταρικής τύχης από αδελφά κύτταρα, το παραπάνω αποτέλεσμα δείχνει πως ανεξάρτητα από την ετερόχρονη εμφάνιση των ΠΒ από τα ΕΚΒ στα πρώιμα στάδια της διαφοροποίησης (παρουσία αδιαφοροποίητων ΕΚΒ) δεν μπορεί να διαδραματίσει ουσιαστικό ρόλο αφού οι ΠΒ παραμένουν ανενεργές.

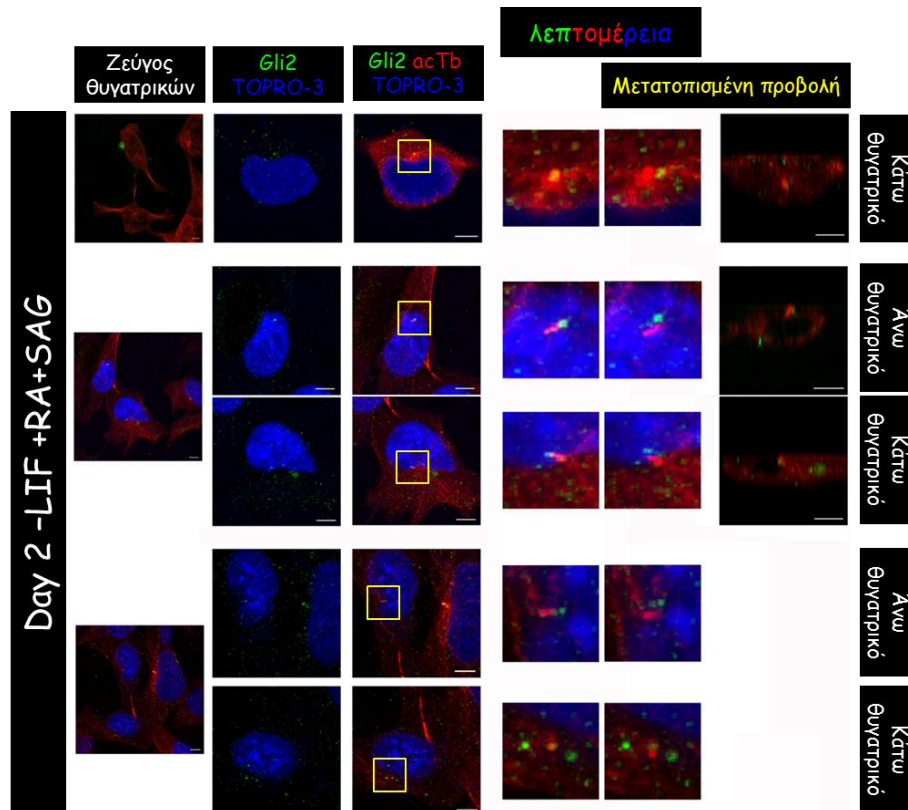


Εικόνα 3.28 Το σηματοδοτικό μονοπάτι Shh ενεργοποιείται όχι νωρίτερα από τη 2^η ημέρα διαφοροποίησης (απουσία LIF, παρουσία PO και SAG). Εντοπισμός των Gli2 (πράσινο), ακετυλιωμένης τουμπουλίνης (κόκκινο) και TOPRO-3 (μπλε) σε αδιαφοροποίητα ή διαφοροποιούμενα κύτταρα E14 στις αναγραφόμενες συνθήκες και ημέρες. Κλίμακα 5μm.

3.2.7.2 Μελέτη της ετερόχρονης ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού Shh στα διαφοροποιούμενα EBK

Στα πλαίσια της χημικής ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού Shh στα 2^ης ημέρας διαφοροποιούμενα κύτταρα θελήσαμε να αποσαφηνίσουμε εάν και σε τι βαθμό πραγματοποιείται η ετερόχρονη ενεργοποίηση του παραπάνω μονοπατιού. Έτσι, ακολούθησε μια πιο εμπειριστατωμένη μελέτη σε ζεύγη θυγατρικών κυττάρων E14 κατά τη 2^η ημέρα διαφοροποίησης (υπό συνθήκες -LIF +PO +SAG). Σύμφωνα με την ανάλυση αυτή προέκυψε πως πέραν της χρονικής καθυστέρησης στην εμφάνιση των ΠΒ σε δυο θυγατρικά κύτταρα, η ενεργοποίηση του Shh σηματοδοτικού μονοπατιού ήταν σχετικά άμεση και

ακολουθούσε γρήγορα το σχηματισμό της εκάστοτε ΠΒ. Πιο αναλυτικά, μόνο σε 7 από τα 23 ζεύγη θυγατρικών κυττάρων που μελετήθηκαν διαπιστώθηκε $Gli2^+$ ΠΒ στο ένα μόνο κύτταρο (Εικόνα 3.29). Σε άλλα τόσα δείγματα παρατηρήθηκε παρόμοια ενεργοποίηση αλλά και μέγεθος ΠΒ μεταξύ δυο θυγατρικών κυττάρων ενώ, τέλος, στα 9 υπολειπόμενα ζεύγη θυγατρικών, η μικρότερη ΠΒ του ενός θυγατρικού έφερε αισθητά μικρότερης έντασης $Gli2^+$ σήμα (Εικόνα 3.29). Τα θυγατρικά δηλαδή με τη μικρότερη ΠΒ, (προφανώς λόγω καθυστέρησης στο σχηματισμό της έως ότου ωριμάσει το θυγατρικό τους κεντρόσωμα), πράγματι εμφάνιζαν πολύ γρήγορα ασθενές $Gli2^+$ σήμα στο απόμακρο άκρο τους. Κατά συνέπεια, οι όποιες ασυμμετρίες στην ενεργοποίηση του μονοπατιού Shh παρατηρήθηκαν, βρίσκονται αποκλειστικά και μόνο σε λίγα ζεύγη κυττάρων όπου το ένα ή δεν έχει αναπτύξει ακόμα ΠΒ ή θα φέρει μια υπερβολικά μικρή και ανώριμη (δηλ. να είναι ακόμη στα πρωταρχικά στάδια της φάσης σύνθεσης) (Εικόνα 3.29).



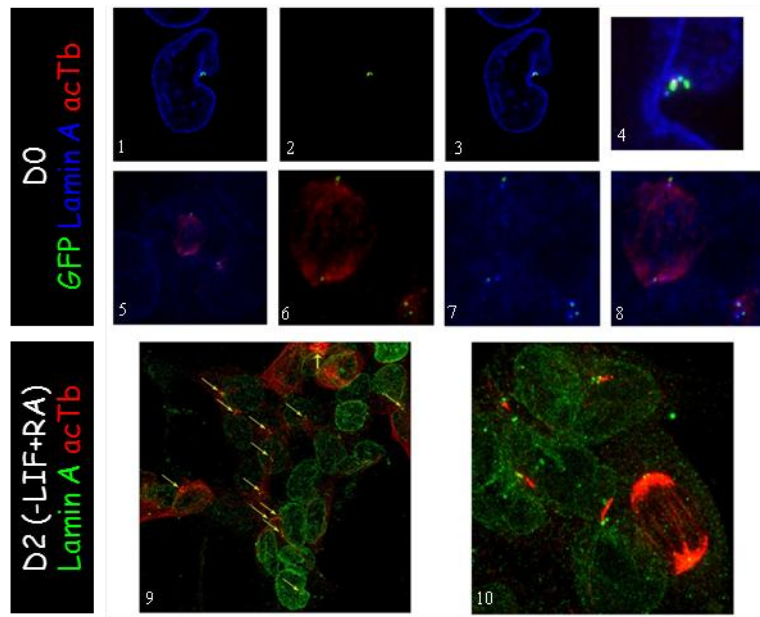
Εικόνα 3.29 Η ενεργοποίηση του Shh σηματοδοτικού μονοπατιού σε διαφοροποιούμενα θυγατρικά κύτταρα E14. Κατά τη 2^η ημέρα διαφοροποίησης (-LIF +PO +SAG) δυο θυγατρικά κύτταρα εμφανίζουν ετερόχρονο σχηματισμό των ΠΒ τους (κορυφαία περίπτωση) και, κατά συνέπεια, διαφορετική ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Shh (παρουσία $Gli2$ στο απόμακρο άκρο της ΠΒ). Σε άλλες περιπτώσεις οι ΠΒ έχουν αναπτυχθεί και στα δύο θυγατρικά κύτταρα αλλά μπορεί να διαφέρουν στο μέγεθος σημαντικά (τελευταία περίπτωση) ή λιγότερο (στη μέση) πάντοτε όμως εμφανίζοντας $Gli2$ στο απόμακρο άκρο τους με σαφή διαφορά στην ένταση υπέρ του θυγατρικού με τη μεγαλύτερη ΠΒ. Στην τελευταία στήλη παρατίθεται xzy προβολή με κλίμακα 1 μ m, στα υπόλοιπα κλίμακα 5 μ m.

Κάτι τέτοιο υποδηλώνει πως το χρονικό διάστημα στο οποίο το σηματοδοτικό μονοπάτι Shh είναι κατ' αποκλειστικότητα ενεργό στο ένα θυγατρικό κύτταρο είναι πολύ περιορισμένο και ίσως όχι αρκετό να του προσδώσει ένα διαφορετικό αναπτυξιακό δυναμικό σε σχέση με το έτερο θυγατρικό. Βέβαια, με τα παραπάνω στοιχεία δεν μπορεί κατηγορηματικά να αποκλειστεί ένα τέτοιο ενδεχόμενο. Επιπλέον, ενισχυτικό είναι το γεγονός ότι τα εν λόγω κύτταρα στη 2^η μόλις ημέρα διαφοροποίησης (όπου φυσιολογικά το μονοπάτι Shh είναι ακόμα ανενεργό) ίσως να μην έχουν τη δυνατότητα ή και την ικανότητα να χρησιμοποιήσουν τα παράγωγα των γονιδίων-στόχων του μονοπατιού Shh και άρα η πρόωρη αυτή ενεργοποίηση (οφειλόμενη αποκλειστικά στην προσθήκη SAG) να γίνεται εις μάτην (συζητείται ενδελεχώς στην ενότητα 4.3).

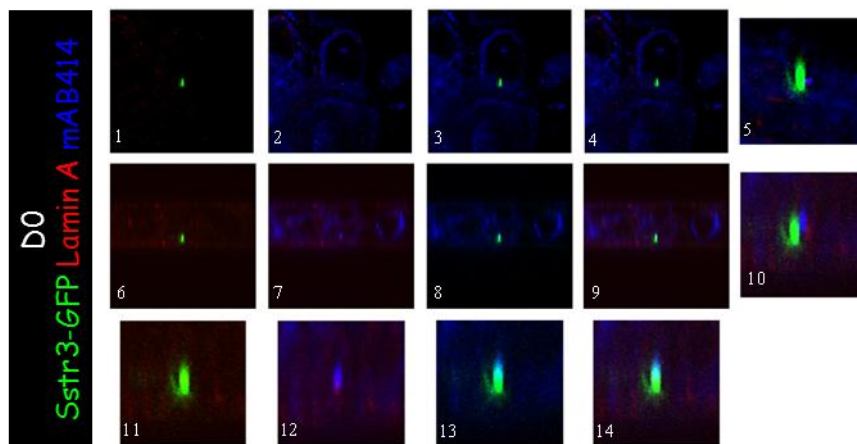
3.2.7.3 Επικουρικά πειράματα στα πλαίσια της ενότητας 3.2.7

Στα πλαίσια του ενδεδειχμένου ελέγχου των EBK ποντικού προέκυψαν μερικές επιπλέον ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις που είχαν σχέση με τις ΠΒ. Ένα απρόσμενο αποτέλεσμα προέκυψε από την παρατήρηση του εντοπισμού της πυρηνικής λαμίνης A. Στα διαφοροποιημένα κύτταρα E14, παρατηρήθηκε, πλέον της αναμενόμενης αύξησης της έκφρασης της Λαμίνης A και του χαρακτηριστικού εντοπισμού της στον πυρηνικό φάκελο στη πλειονότητα των κυττάρων, ακόμα ένας στικτός εντοπισμός της εν λόγω πρωτεΐνης στη βάση των ΠΒ (Εικόνα 3.30 και 3.31). Ο κεντροσωμικός αυτός εντοπισμός της Λαμίνης A φαίνεται πως διατηρείται καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ακόμα και στους πόλους της ατράκτου διαιρούμενων κυττάρων. Χαρακτηριστικά στιγμιότυπα της κεντροσωμικής παρουσίας της λαμίνης A παραθέτονται στην Εικόνα 3.30, σε δείγματα διαμολυσμένων κυττάρων E14 όπου τα κεντριόλια έχουν σημανθεί με την Centrin-1-eGFP πρωτεΐνη. Η παρουσία της λαμίνης A βρέθηκε να διατηρείται και στα διαφοροποιούμενα EBK (Εικόνα 3.30).

Ο εντοπισμός της λαμίνης A ίσως να μην σχετίζεται με το σχηματισμό των ΠΒ, όταν η παρουσία της στα κεντριόλια διαρκεί και πέραν της παρουσίας των ΠΒ (μίτωση), χωρίς όμως να αποκλείει κάποια συμμετοχή στη δράση τους, δεδομένης της απαραίτητης συμμετοχής πολλαπλών πυρηνικών πρωτεϊνών (βλέπε παραπάνω). Σχετικά με το τελευταίο, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυττάρων E14 με φορέα που κωδικοποιεί Sstr3-eGFP (δομικό συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των ΠΒ⁽⁷⁷⁾), με ταυτόχρονη χρώση των κυττάρων με αντισώματα που αναγνωρίζουν τόσο τη Λαμίνη A όσο και διάφορα μέλη της οικογένειας των νουκλεοπορινών (όπως η p62 και στοιχεία του συμπλόκου Nup84-Nup107) (Εικόνα 3.31).

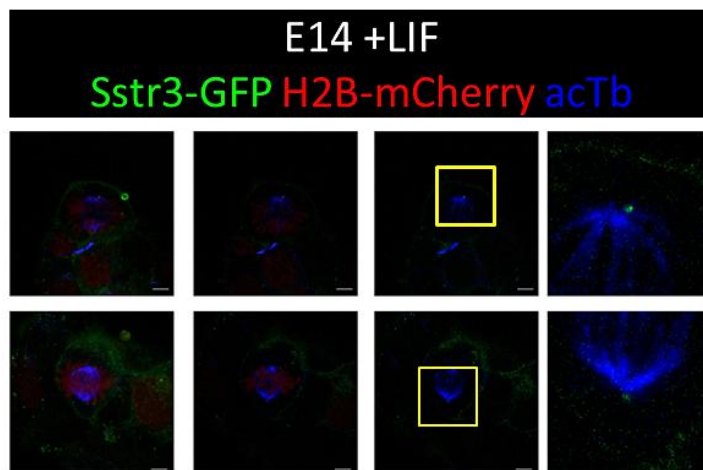


Εικόνα 3.30 Εντοπισμός της λαμίνης A στα κεντροσώματα και τη βάση της ΠΒ σε EBK ποντικού. 1-8 Αδιαφοροποίητα κύτταρα E14 διαμολύνθηκαν με Centrin-1-eGFP (πράσινο) και εξετάστηκαν μετά από χρώση για λαμίνη A (μπλε) και ακετυλιωμένη τουμπουλίνη (κόκκινο). 9-10 Διαφοροποιημένα κύτταρα E14 για 2 ημέρες (-LIF+PO) εξετάστηκαν μετά από χρώση για λαμίνη A (πράσινο) και ακετυλιωμένη τουμπουλίνη (κόκκινο). Και στις δυο περιπτώσεις καταγράφεται η έντονη παρουσία



Εικόνα 3.31 Συνεντόπιση λαμίνης A και νουκλεοπορινών στη βάση της ΠΒ σε αδιαφοροποίητα κύτταρα E14 (βλέπε κείμενο). Κύτταρα διαμολυσμένα με Sstr3-eGFP (πράσινο) εξετάστηκαν μετά από χρώση για λαμίνη A (κόκκινο) και νουκλεοπορίνες (μπλε). Μέγιστη προβολή (xyz, 1-4) και μεγέθυνση της περιοχής της ΠΒ (5). Μέγιστη προβολή (xzy, 6-9) και λεπτομέρεια της περιοχής της ΠΒ με μετατοπισμένη προβολή της λαμίνης A και των νουκλεοπορινών (10). Οι εικόνες 11-14 δείχνουν λεπτομέρειες των εικόνων 6-9.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν επιβεβαιώνουν απόλυτα την παρουσία πυρηνικών πρωτεϊνών στη βάση της ΠΒ των EBK του ποντικού (ανασκοπείται στα ⁽⁸³⁻⁸⁵⁾). Τέλος, διερευνήθηκε η ύπαρξη κατάλοιπου της βλεφαριδικής μεμβράνης (ciliar remnant –CR) στα κεντροσώματα μιτωτικών EBK ποντικού, έπειτα από τη δημοσίευση της παραπάνω παρατήρησης σε πρόδρομα κύτταρα του εμβρυϊκού νευρικού ιστού *in vivo*⁽⁹⁰⁾.

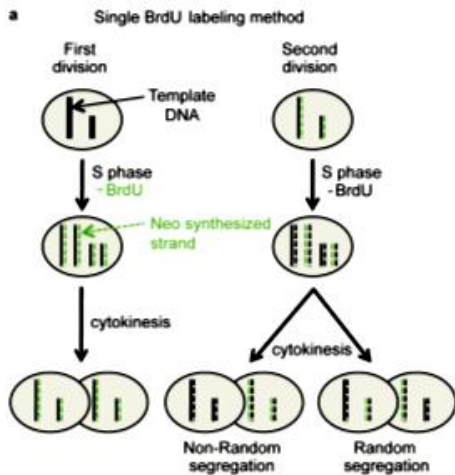


Εικόνα 3.32 Στα αδιαφοροποίητα EBK παρατηρείται CR στον έναν πόλο της μιτωτικής ατράκτου. Δυο χαρακτηριστικά παραδείγματα όπου διαπιστώνεται η παρουσία CR μόνο στον ένα πόλο της ατράκτου μιτωτικών κυττάρων (αδιαφοροποίητα κύτταρα E14 έπειτα από συνδιαμόλυνση με φορείς που εκφράζουν τις πρωτεΐνες Sstr3-GFP (πράσινο) και H2B-mCherry (κόκκινο). Δεξιά παραθέτονται οι περιοχές των κίτρινων πλακιδίων σε μεγέθυνση. Κλίμακα 5μm.

Πιο συγκεκριμένα, η εν λόγω δημοσίευση διαπίστωσε την άμεση συσχέτιση της παρουσίας CR και των ΑΚΔ του αναπτυσσόμενου νευρικού συστήματος εμβρύων και για το λόγο αυτό μελετήθηκε η πιθανή συμβολή του στις *in vitro* διαφοροποιήσεις. Από την *in vitro* ανάλυση στα κύτταρα E14, προέκυψε πως τα διαιρούμενα κύτταρα E14 φέρουν CR στον ένα πόλο της μιτωτικής ατράκτου (κεντρόσωμα) ακόμα και στην αδιαφοροποίητη κατάσταση (Εικόνα 3.32). Συνεπώς, το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει πως ο μηχανισμός αυτός δεν μπορεί να συμβάλει στον καθορισμό της κυτταρικής τύχης σε τόσο πρώιμα στάδια της ανάπτυξης.

3.2.8 Διερεύνηση της παρουσίας NRTS στη διαφοροποίηση EBK.

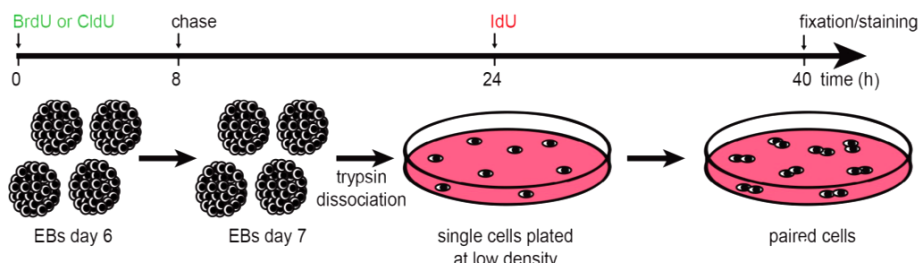
Στη διεθνή βιβλιογραφία δημοσιεύτηκε πρόσφατα μια νέα μελέτη σύμφωνα με την οποία παρατηρήθηκαν μη τυχαίες κατανομές του πρότυπου (DNA εκμαγείο) γενομικού υλικού (NRTS) σε θυγατρικά EBK ανθρώπου και ποντικού κατά την 7^η ημέρα της διαφοροποίησής τους⁽⁴⁹⁾. Το εύρημα αυτό είναι αρκετά πρωτότυπο μιας και για πρώτη φορά παρατηρείται το φαινόμενο NRTS σε EBK. Το προτεινόμενο πειραματικό πρωτόκολλο απαιτούσε τη διαφοροποίηση των EBK σε τρεις διαστάσεις (3D) με τη δημιουργία εμβρυοειδών σωματιδίων (embryoid bodies-EB) για 7 ημέρες, σήμανση του νεοσυντιθέμενου DNA με ανάλογο θυμιδίνης (BrdU), θρυψινοποίηση των EB και έκπτυξη υπερβολικά αραιών μονήρων κυττάρων, ώστε με το πέρας της πρώτης διαίρεσής τους να προκύψουν τα προς μελέτη ζεύγη θυγατρικών κυττάρων (Εικόνες 3.33 και 3.34). Ακολουθώντας πιστά τον παραπάνω πειραματικό σχεδιασμό, αλλά δοκιμάζοντας και επιπλέον συνθήκες, επαναλήφθηκαν τα πειράματα της παραπάνω δημοσίευσης στα διαθέσιμα EBK του εργαστηρίου μας.



Εικόνα 3.33 Σχηματική αναπαράσταση της διερεύνησης NTRS με τη μέθοδο της μονής σήμανσης του DNA με BrdU (αναπαραγωγή τμήματος εικόνας από ⁽⁴⁹⁾).

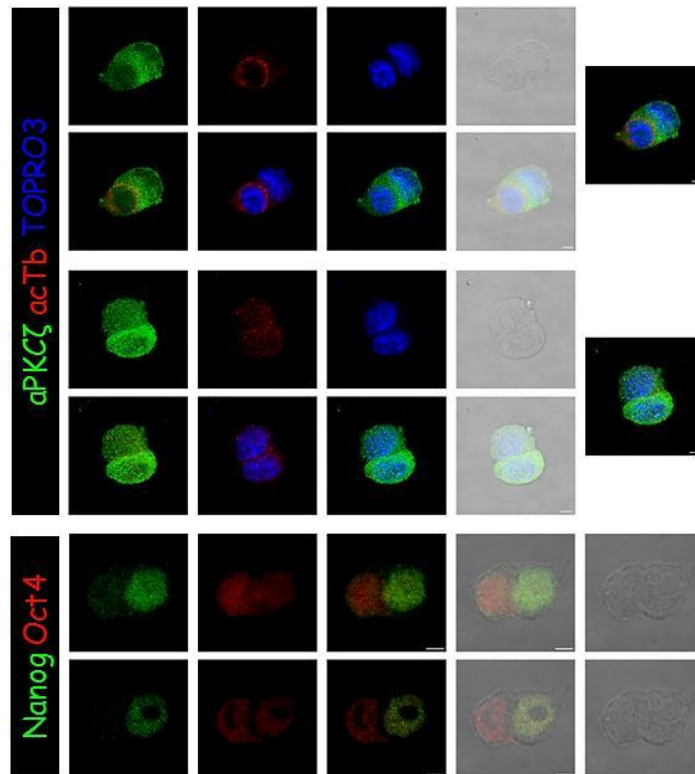
3.2.8.1. Μελέτη του NRTS μέσω της κατανομής του BrdU σε διαφοροποιημένα θυγατρικά EBK

Μια πρώτη ανάγνωση των πιλοτικών αποτελεσμάτων μας έδειξε πως συμφωνούν με τα δημοσιευμένα. Δηλαδή, ένα ποσοστό περί το 20-25% των κυτταρικών ζευγαριών που μελετήθηκαν έναντι του 28-36% των *Elabd et al.*, παρουσίαζαν απόλυτη ασυμμετρία ως προς την παρουσία BrdU στους πυρήνες τους⁽⁴⁹⁾. Το αποτέλεσμα αυτό ερμηνεύτηκε από τους συγγραφείς ως NRTS, δηλαδή ασυμμετρία μεταξύ θυγατρικών κυττάρων, χωρίς όμως να δείχνουν με σαφήνεια ότι τα ζεύγη αυτά αποτελούσαν πραγματικά αδελφά κύτταρα. Όταν προσπαθήσαμε να αξιολογήσουμε τις κατανομές διαφόρων πρωτεϊνών σε αντίστοιχα ζεύγη κυττάρων παρατηρήσαμε πληθώρα τέτοιων ασυμμετριών ακόμα και σε πρωτεΐνες που δεν θα μπορούσαν να εξηγηθούν εύκολα λ.χ. ακετυλιωμένης τουμπουλίνης (Εικόνα 3.35). Ενδεικτικά είναι και τα παραδείγματα παραγόντων πολυδυναμίας σε αντιστοίχως επεξεργασμένα δείγματα 1^{ης} ημέρας διαφοροποίησης (σε συνθήκες -LIF) όπου οι Oct4 και Nanog εμφανίζουν ασύμμετρη αλλά αντίθετη κατανομή, καθιστώντας αδύνατο τον προσδιορισμό του βλαστικού και του διαφοροποιούμενου θυγατρικού κυττάρου (Εικόνα 3.35).



Εικόνα 3.34 Σχηματική αναπαράσταση του πρωτοκόλλου των *Elabd et al.*,⁽⁴⁹⁾ (απ' όπου και η αναπαραγωγή τμήματος εικόνας).

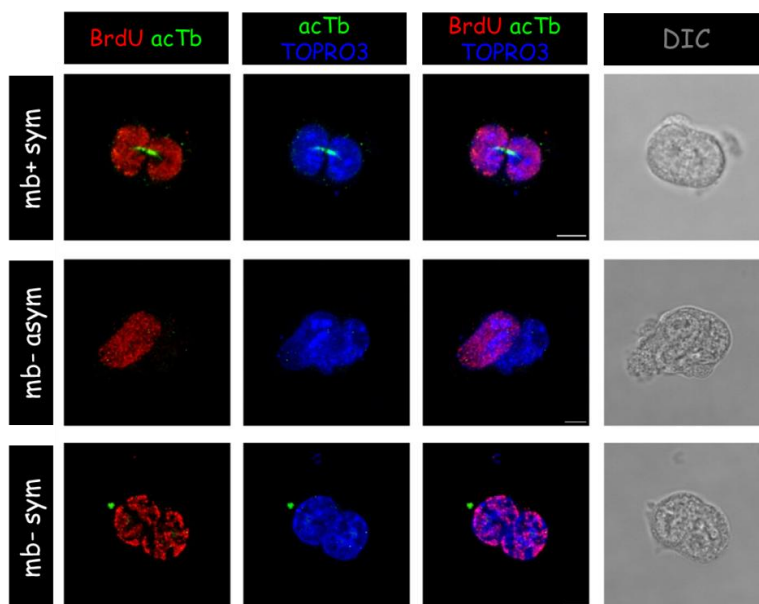
Για να αποσαφηνίσουμε τις παραπάνω «απρόσμενες» παρατηρήσεις μας αλλά και για να μπορέσουμε να απαντήσουμε με βεβαιότητα στο εάν ακολουθώντας το προτεινόμενο πρωτόκολλο τα κύτταρα διαχωρίζουν όντως ασύμμετρα το πρότυπο DNA τους, επαναλάβαμε τους ανοσοφθορισμούς έναντι του BrdU αναλόγου ταυτόχρονα με αντίσωμα για την ακετυλιωμένη τουμπουλίνη. Με τον τρόπο αυτό μπορούσαμε να ταυτοποιήσουμε τα θυγατρικά κύτταρα από την παρουσία του μεσοσώματος. Το αυστηρό αυτό κριτήριο αξιολόγησης διαφοροποίησε καθοριστικά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Τα φέροντα μεσόσωμα ζεύγη θυγατρικών κυττάρων, σε όποια ημέρα διαφοροποίησης και αν ελέγχθησαν, βρέθηκαν αποκλειστικά και μόνο συμμετρικά (είτε θετικά, είτε αρνητικά) ως προς την παρουσία BrdU (Εικόνα 3.36 και Πίνακας 3.1).



Εικόνα 3.35 Ατυπίες κατά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου των Elabd *et al.*,⁽⁴⁹⁾. Σε αδιαφοροποίητα κύτταρα E14 τα οποία είχαν επιστρωθεί και εκπτυχθεί όπως τα αντίστοιχα διαφοροποιημένα EBK παρατηρήθηκαν ασυμμετρίες τόσο ως προς την παρουσία ακετυλιωμένης τουμπουλίνης (κορυφαίο παράδειγμα), όσο και της πρωτεΐνης αPKCζ (μεσαίο παράδειγμα). Στα αντίστοιχα παρασκευάσματα διαφοροποιημένων κυττάρων E14 (-LIF για μια ημέρα) παρατηρήθηκε τόσο η ταυτόχρονη, αλλά αντίστροφη, ασύμμετρη κατανομή των δεικτών πολυδυναμίας Nanog και Oct4, όσο και η ασύμμετρη κατανομή μόνο του ενός, καθιστώντας αδύνατο το χαρακτηρισμό της διαίρεσης σε συμμετρική ή ασύμμετρη.

Επιπλέον, είναι σημαντικό να σημειωθεί πως το μεσόσωμα διατηρείται για περίπου 3 ώρες από το τέλος της μίτωσης, δηλ. καθ' όλη τη διάρκεια της G1 φάσης⁽⁹¹⁾. Άρα, τα πραγματικά θυγατρικά κύτταρα (είτε στη G1, είτε σε πιο προχωρημένη φάση) αποτελούν ένα μέρος των ζευγών του εκάστοτε δείγματος, το οποίο βέβαια οφείλει να

είναι μεγαλύτερο του ποσοστού των ευκρινώς αναγνωρίσιμων θυγατρικών με μεσόσωμα κυττάρων. Στα υπόλοιπα λοιπόν ζεύγη -χωρίς μεσόσωμα- κυττάρων βρέθηκαν και πάλι κάποια ασύμμετρα ως προς την παρουσία BrdU χρώσης σε εφάμιλλα ποσοστά όπως και πριν (πιλοτικά πειράματα χωρίς παράλληλη χρώση με ακετυλιωμένη τουμπουλίνη).



Εικόνα 3.36 Συμμετρική κατανομή του BrdU σε ζεύγη θυγατρικών κυττάρων. Ζεύγη κυττάρων που παρήχθησαν με το πρωτόκολλο των Elabd *et al.*,⁽⁴⁹⁾ σε διάφορα στάδια της διαφοροποίησης EBK (βλέπε κείμενο και Πίνακα 3.1) χρωσμένα με αντι-BrdU αντίσωμα παρουσιάζουν πάντα συμμετρική κατανομή στα φέροντα μεσόσωμα θυγατρικά κύτταρα, ενώ ασύμμετρη κατανομή παρατηρείται μόνο στις περιπτώσεις ζευγών που δεν συνδέονται από μεσόσωμα. Κλίμακα 5μm.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να επισημανθεί πως η παρουσία του BrdU σε ένα πυρήνα προϋποθέτει την κληρονόμησή του από την προηγηθείσα κυτταρική διαίρεση. Έτσι, είναι αδύνατον να προκύψει *de novo* BrdU θετικότητα ή να αποικοδομηθεί το κληρονομημένο BrdU από την προηγηθείσα κυτταρική διαίρεση. Με άλλα λόγια, ένα μεσοφασικό κύτταρο δεν μπορεί να αποκτήσει ή να απολέσει BrdU χρώση, αντίστοιχα. Για το λόγο αυτό, η μελέτη της κληρονόμησης του BrdU σημανμένου γενομικού υλικού, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με την παρατήρηση μιτωτικών κυττάρων (κατά την ανάφαση ή/και τελόφαση) ή μέσω της ταυτοποίησης «πραγματικών» θυγατρικών από την παρουσία μεσοσώματος. Η απουσία αποτύπωσης τέτοιων κυττάρων και όχι ζευγών γειτνιάζοντων κυττάρων από τους Elabd *et al.*,⁽⁴⁹⁾ προκαλεί εντύπωση και εγείρει ερωτηματικά. Η παραπάνω προσέγγιση φαίνεται να καταδεικνύει και απαντά, σε ένα βαθμό, στα ερωτηματικά αυτά. Συνεπώς, τα έως τώρα ευρήματά μας σχετικά με την απουσία ΑΚΔ στις διαφοροποιήσεις EBK ποντικού επαληθεύονται και από τα πρόσφατα αποτελέσματα με βάση το δημοσιευμένο πρωτόκολλο των Elabd *et al.*,⁽⁴⁹⁾.

Παρουσία BrdU σε ζεύγη θυγατρικών	Ημ3 (n=297)		Ημ4 (n=104)		Ημ7 (n=213)		Ημ8 (n=88)	
	GMEM		IMDM		IMDM		IMDM	
	mb+	mb-	mb+	mb-	mb+	mb-	mb+	mb-
	123	174	49	55	75	138	29	59
- / -	41.5% (51)	26% (45)	43% (21)	24% (13)	45% (34)	20.3% (28)	41% (12)	17% (10)
- / +	0% (0)	31.5% (55)	0% (0)	42% (23)	0 (0)	43.5% (60)	0 (0)	44% (26)
+ / +	58.5% (72)	42.5% (74)	57% (28)	34% (19)	55% (41)	36.2% (50)	59% (17)	37% (24)

Πίνακας 3.1 Αποτελέσματα αξιολόγησης της κατανομής του BrdU σε ζεύγη κυττάρων που παρασκευάστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Elabd *et al.*, στις ημέρες και τις συνθήκες που αναγράφονται⁽⁴⁹⁾. (Όπου n ο αριθμός των δειγμάτων και mb+/- η παρουσία/απουσία μεσοσώματος).

3.2.8.2 Μελέτη της κατανομής του μεταγραφικού παράγοντα *Brachyury* σε διαφοροποιημένα θυγατρικά κύτταρα

Ένα επιπλέον στοιχείο που παρουσιάστηκε στην εν λόγω δημοσίευση είναι και η παράλληλη (αν και όχι απόλυτη) ασύμμετρη κατανομή του BrdU και ιστοειδικών δεικτών (*Brachyury* και *GATA4*) σε ζεύγη κυττάρων. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε με διπλό ανοσοφθορισμό έναντι του BrdU και του εκάστοτε δείκτη, μόνο στα EBK του ανθρώπου, κατά την 7η ημέρα της διαφοροποίησής τους, όπου αρχίζουν να εκφράζονται οι παραπάνω δείκτες. Στα EBK ποντικού ο μεσοδερματικός δείκτης *Brachyury* εκφράζεται πολύ νωρίτερα (από ημέρα 3 έως 4,5). Για να μελετήσουμε λοιπόν την κατανομή/επίπεδα έκφρασης του εν λόγω δείκτη στα κύτταρα E14, επαναλήφθηκε το πείραμα με κατάλληλη προσαρμογή στο καλλιεργητικό υλικό, ώστε τα δείγματα της 3,5-4^{ης} ημέρας διαφοροποίησης να είναι πλούσια σε μεσοδερματικής κατεύθυνσης διαφοροποιούμενα κύτταρα (600 κύτταρα ανά EB σε IMDM καλλιεργητικό μέσω)^(92,93). Προηγήθηκε ανάλυση για την πιθανή παρουσία NRTS για την ημέρα αλλά και τον χειρισμό που ακολουθήσαμε με διπλό ανοσοφθορισμό για BrdU και ακετυλιωμένη τουμπουλίνη όπως προηγουμένως. Ενδεικτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.36 και είναι παρόμοια με αυτά των υπολοίπων ημερών που αναλύθηκαν. Αντίστοιχα, στον Πίνακα 3.2 παρατίθενται όλα τα αποτελέσματα της ανάλυσης κυτταρικών ζευγών έπειτα από ανοσοφθορισμό για *Brachyury* και ακετυλιωμένη τουμπουλίνη. Είναι σαφές πως και σε επίπεδο ιστοειδικών δεικτών παραμένει η αντίφαση με την παραπάνω δημοσίευση. Από την παρούσα μελέτη είναι σαφές πως καμία απόλυτη ασυμμετρία του *Brachyury* δεν διαπιστώθηκε μεταξύ πραγματικών θυγατρικών κυττάρων. Απόλυτες ασυμμετρίες σε ποσοστά ανάλογα της ασύμμετρης θετικότητας BrdU

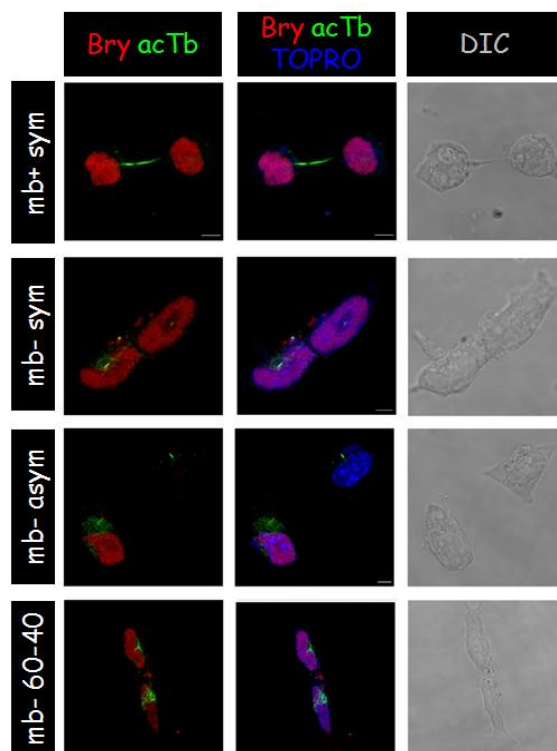
παρατηρήθηκαν μόνο σε ζεύγη κυττάρων χωρίς μεσόσωμα. Επιπλέον, βρέθηκε και ένας σημαντικός αριθμός κυτταρικών ζευγών (17%) με διαφορές στην ένταση της χρώσης του Brachyury, ο οποίος όμως δεν ξεπερνούσε το λόγο 60:40 μεταξύ των δυο κυττάρων (Εικόνα 3.37 και Πίνακα 3.2).

Παρουσία Bry σε 4 ^η ς ημέρας ζεύγη κυττάρων (n=231)				
mb+		mb-		
43		188		
+ / +	+ / -	+ / +	60/40	+ / -
43 (100%)	0 (0%)	58 (31%)	32 (17%)	98 (52%)

Πίνακας 3.2 Αποτελέσματα αξιολόγησης της κατανομής του Brachyury σε ζεύγη κυττάρων που παρασκευάστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Elabd et al.,⁽⁴⁹⁾. (Όπου n ο αριθμός των δειγμάτων, mb+/- η παρουσία/απουσία μεσοσώματος και 60/40 ο λόγος της έντασης του Brachyury, για τις περιπτώσεις όπου η διαφορά δεν είναι της τάξης του 0 (+/+) ή 100% (+/-).

Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν την απουσία ΑΚΔ και συμφωνούν με τα προηγούμενα αποτελέσματά μας, ενώ οι όποιες ασυμμετρίες του Brachyury βρέθηκαν ίσως εντοπίστηκαν μεταξύ μη αδελφών κυττάρων. Διαφορετικά, στα ζεύγη πραγματικών αδελφών κυττάρων χωρίς μεσοσώμα (δηλ. αυτά που διανύουν την S ή G2 φάση του κυτταρικού τους κύκλου) που δεν φέρουν ίδια επίπεδα έκφρασης Brachyury, η διαφορά αυτή μπορεί να προκύπτει λόγω της φάσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται. Εάν δηλαδή ο Brachyury αυξάνει ή μειώνει την έκφρασή του με την πρόοδο του κυττάρου στον κυτταρικό κύκλο και τα θυγατρικά κύτταρα αναπτύσσονται με διαφορετικό ρυθμό, τότε το αποτέλεσμα που παρατηρήσαμε, ήταν το αναμενόμενο. Αυτά τα δυο σενάρια ίσως να ισχύουν ταυτόχρονα και να εξηγούν το 17% των ζευγών με λόγο έντασης της χρώσης του Brachyury 60:40. Συνηγορητικά με αυτό, δηλαδή την πιθανότητα μείωσης των επιπέδων Brachyury με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, είναι τα ευρήματα πρόσφατων δημοσιεύσεων που θέλουν την G1 φάση του κυτταρικού κύκλου ως ρυθμιστή της τύχης ενός διαφοροποιούμενου κυττάρου. Πιο αναλυτικά, οι Singh *et al.*, έδειξαν από τη μία πως η πλειονότητα των ιστοειδικών μεταγραφικών παραγόντων στα διαφοροποιούμενα EBK εκφράζεται κατά τη διάρκεια της φάσης G1 και φθίνει στις επόμενες⁽⁹⁴⁾, κι από την άλλη, οι Paukin & Vallier πως τα EBK διαφοροποιούνται προς μεσενδόδερμα ή νευροεξώδερμα ανάλογα με το εάν ξεκίνησαν τη διαφοροποίησή τους από τα πρώιμα ή όψιμα στάδια της G1 φάσης, αντίστοιχα⁽⁹⁵⁾. Με αυτή την ερμηνεία δεν μπορεί φυσικά να εξηγηθεί η απόλυτη ασυμμετρία στην πλειονότητα των κυτταρικών ζευγών που μελετήθηκαν μια και είναι αναμενόμενο: α) ένα ποσοστό των διαφοροποιούμενων κυττάρων να μην εκφράζει

Brachyury, β) να μην μπορεί να δικαιολογηθεί μια τεράστια διαφορά στο ρυθμό προόδου των αδελφών κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο και γ) με εξαίρεση τα φέροντα μεσόσωμα ζεύγη κυττάρων, δεν μπορεί να θεωρηθούν απαραίτητως ως θυγατρικά το σύνολο των ζευγών που προκύπτουν από την παραπάνω διαδικασία (βλέπε επόμενη ενότητα).



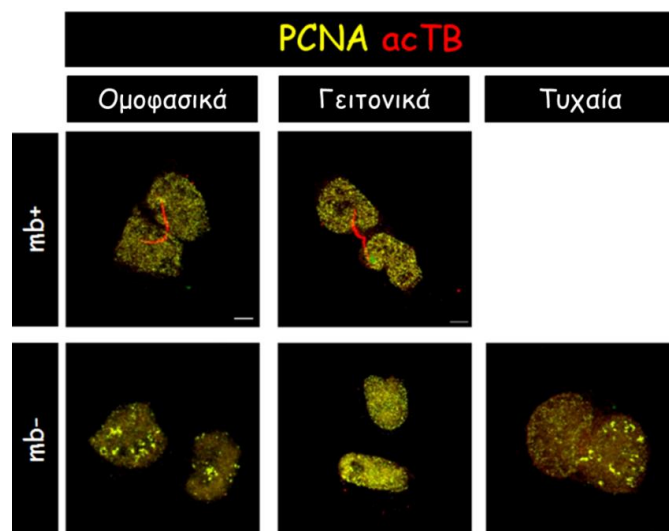
Εικόνα 3.37 Συμμετρική κατανομή του ιστοειδικού μεταγραφικού παράγοντα Brachyury σε ζεύγη πραγματικών θυγατρικών κυττάρων. Ζεύγη κυττάρων που παρήχθησαν με το πρωτόκολλο των Elabd *et al.*,⁽⁴⁹⁾ (βλέπε κείμενο και Πίνακα 3.2) χρωσμένα με αντι-Brachyury αντίσωμα παρουσιάζουν πάντα συμμετρική κατανομή στα φέροντα μεσόσωμα θυγατρικά κύτταρα, ενώ ασύμμετρη κατανομή παρατηρείται μόνο στις περιπτώσεις ζευγών που δεν συνδέονται από μεσόσωμα. Αξιοσημείωτες είναι και οι περιπτώσεις όπου η κατανομή του Brachyury παρουσιάζει διαφορά της τάξης του 60:40 μεταξύ δυο κυττάρων που δεν συνδέονται από μεσόσωμα. Κλίμακα 5μm.

3.2.8.3 Μελέτη του πρότυπου εντοπισμού του PCNA σε διαφοροποιημένα θυγατρικά κύτταρα

Η ταυτοποίηση της φάσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκεται το εκάστοτε κύτταρο σε ένα ζεύγος κυττάρων όπως τα παραπάνω, θα επέτρεπε να καθοριστεί με σαφήνεια τόσο το ποσοστό των πραγματικά θυγατρικών κυττάρων έναντι των «τυχαίων ζευγαριών» όσο και μια πιθανή διαφορά στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου μεταξύ δυο πραγματικά θυγατρικών κυττάρων. Και οι δυο αυτές πληροφορίες θεωρήθηκαν απαραίτητες για την ανάλυση, αξιολόγηση και αποσαφήνιση των αποτελεσμάτων μας. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων σε αντίστοιχα δείγματα χρησιμοποιώντας το PCNA (proliferation cell nuclear antigen, υπομονάδα της DNA πολυμεράσης δ) ως δείκτη. Το PCNA έχει χαρακτηριστικό πρότυπο εντοπισμού ανάλογα με

τη φάση (ή ακόμα και υπο-φάση, σε ότι αφορά την S φάση) του κυτταρικού κύκλου, ενώ απουσιάζει από τα τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα που έχουν αποσυρθεί από τον κυτταρικό κύκλο (βρίσκονται στη φάση G0)⁽⁹⁶⁾. Ανάλογα με το πρότυπο του PCNA στα κυτταρικά ζεύγη που μελετήθηκαν, αυτά χαρακτηρίστηκαν ως ομοφασικά (σε ίδια φάση), γειτονικά (σε γειτονική φάση/υποφάση, λ.χ. G1 και πρώιμη S ή πρώιμη S και μέση S κ.ο.κ.) και τυχαία (διαφορά πλέον της μίας υποφάσης, λ.χ. G1 και ώριμης S) (Εικόνα 3.38). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να επισημανθεί ότι τυχαία ζεύγη κυττάρων που επίσης συμπτωματικά βρίσκονται σε ίδια ή παραπλήσια φάση του κυτταρικού κύκλου (ομοφασικά ή γειτονικά) είναι αδύνατον να διαχωριστούν από τα αντίστοιχα ζεύγη πραγματικών θυγατρικών κυττάρων. Παρ' όλα αυτά, υιοθετήσαμε την παραδοχή πως είναι επίσης δύσκολο να προκύψει το παραπάνω τυχαίο ζεύγος κυττάρων (κυρίως στα πρώτα στάδια του κυτταρικού κύκλου), αφού κάτι τέτοιο προϋποθέτει την ταυτόχρονη αποδέσμευση ενός εκ των θυγατρικών μετά τη διαίρεση δύο κυττάρων και την προσκόλληση των εναπομεινάντων σε γειτονική θέση. Επιπλέον, όπως προαναφέρθηκε, κύτταρα που δεν εμφάνισαν PCNA χρώση (προφανώς κύτταρα σε φάση G0) σε περίπτωση που βρέθηκαν να γειτνιάζουν με άλλο κύτταρο εξαιρέθηκαν της ανάλυσης. Αξιολογώντας κατ' αυτό τον τρόπο τους ανοσοφθορισμούς που διενεργήθηκαν σε δείγματα διαφόρων ημερών (Πίνακας 3.3) σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Elabd *et al.*, προέκυψε μια ξεκάθαρη εικόνα για την ερμηνεία των προηγούμενων αποτελεσμάτων⁽⁴⁹⁾. Πράγματι, η πλειονότητα των κυτταρικών ζευγών που προκύπτουν από την παραπάνω μεθοδολογία είναι προφανώς θυγατρικά (με ή χωρίς μεσόσωμα), αποδεχόμενοι την παραπάνω παραδοχή. Ανεξάρτητα από την παρουσία/απουσία μεσοσώματος τα κυτταρικά αυτά ζεύγη καταχωρήθηκαν στις στήλες «ομοφασικά» και «γειτονικά» του Πίνακα 3.3. Τα φέροντα μεσόσωμα ζευγάρια βρίσκονται στην G1 ή στην πολύ πρώιμη S φάση, με αυτά της S να έχουν λεπτό κι επιμήκες μεσόσωμα. Τα πιο προχωρημένα στον κυτταρικό κύκλο ζεύγη παρουσιάζουν συχνά μικρές διαφορές στην πρόοδο του κύκλου τους κάτι που, σύμφωνα με τα κριτήριά μας, τα καθιστά θυγατρικά. Επιπλέον, η παρατήρηση αυτή ενδεχομένως να δικαιολογεί τη διαφορά των επιπέδων Brachyury που βρεθήκαν από την προηγούμενη σειρά πειραμάτων στο 17% των κυτταρικών ζευγών στη λογική της σταδιακής αποικοδόμησης των μεταγραφικών παραγόντων με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου(94,95). Το ποσοστό των ζευγών με μεγάλη διαφορά στον κυτταρικό τους κύκλο δεν φαίνεται να συμπίπτει με αυτό των ασύμμετρων ως προς το BrdU ή το Brachyury και εμφανίζεται μικρότερο. Κάτι τέτοιο θεωρήθηκε αναμενόμενο μια και τα προς αξιολόγηση ζεύγη στερούνται των τυχαίων ζευγών μεταξύ ενός G0 κυττάρου και ενός άλλου εντός του κύκλου. Αξιοσημείωτο είναι

επίσης και το μικρό ποσοστό των δειγμάτων που παρουσιάζουν κάποια πιο διαφοροποιημένα δείγματα (ημέρα 7) με διαφορετική φάση (G1-πρώιμη S) παρουσία μεσοσώματος, ενδεικτική της επιμήκυνσης της διάρκειας των φάσεων στα διαφοροποιημένα έναντι των αδιαφοροποίητων πολυδύναμων βλαστικών (σύγκρινε τη στήλη «γειτονικά» του Πίνακα 3.3 στις ημέρες διαφοροποίησης)⁽⁹¹⁾.



Εικόνα 3.38 Κατανομή του PCNA σε ζεύγη κυττάρων όπως παρασκευάστηκαν ακολουθώντας το πρωτόκολλο των Elabd *et al.*,⁽⁴⁹⁾ (βλέπε κείμενο για επεξήγηση των όρων Ομοφασικά, Γειτονικά και Τυχαία).

PCNA	Μεσόσωμα	Ομοφασικά	Γειτονικά	Τυχαία
Ημ 3 (n=162)	mb+	39	1	0
	mb-	28	57	37 (30%)
Ημ 4 (n= 212)	mb+	34	2	0
	mb-	42	78	56 (32%)
Ημ 7 (n=126)	mb+	27	6	0
	mb-	34	37	22 (23.5%)

Πίνακας 3.3 Αποτελέσματα αξιολόγησης της κατανομής του PCNA σε ζεύγη κυττάρων που παρασκευάστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Elabd *et al.*, στις ημέρες που αναγράφονται⁽⁴⁹⁾. (Όπου n ο αριθμός των δειγμάτων και mb+/- η παρουσία/απουσία μεσοσώματος, βλέπε κείμενο για επεξήγηση των όρων Ομοφασικά, Γειτονικά και Τυχαία).

3.2.8.4 Μελέτη της κατανομής του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 σε διαφοροποιημένα θυγατρικά κύτταρα

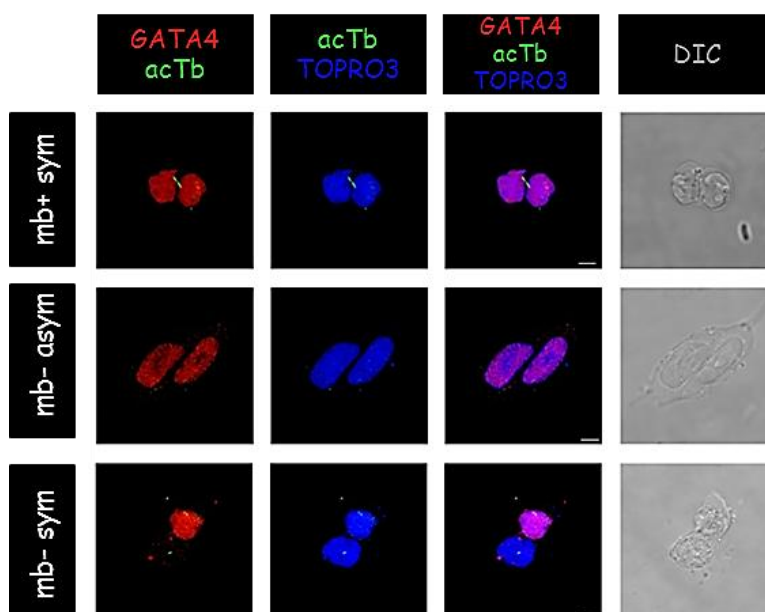
Στην εργασία των Elabd *et al.*, διερευνήθηκε, πλέον του Brachyury, ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4 με παρεμφερή αποτελέσματα(49). Με τη ενεργοποίηση και κατανομή του GATA4 συνεχίστηκε και από την παρούσα διατριβή ο ενδεδειγμένος έλεγχος του παραπάνω πρωτοκόλλου. Η τρισδιάστατη διαφοροποίηση EBK μέσω εμβρυονικών σωματιδίων (embryoid bodies, EB) σε μέσο IMDM είναι γνωστό ότι προάγει τη μεσοδερμικής κατεύθυνσης διαφοροποίηση και πως παράλληλα με την εμφάνιση συσπόμενων καρδιομυοκυττάρων, κατά την 7η -9η ημέρα διαφοροποίησης, ενεργοποιείται ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4^(97,98). Έτσι, διαφοροποιήθηκαν EBK σύμφωνα με τους Elabd *et al.*, σε IMDM και μελετήθηκαν τα δείγματα που προέκυψαν την 8η ημέρα διαφοροποίησης ως προς την παρουσία αλλά και την κατανομή του GATA4⁽⁴⁹⁾. Στον Πίνακα 3.4 παρατίθενται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής, ενώ στην Εικόνα 3.39 υπάρχουν αντιπροσωπευτικές απεικονίσεις των δειγμάτων που διερευνήθηκαν. Τα κριτήρια αξιολόγησης των κυτταρικών ζευγών που προέκυψαν είναι τα ίδια με αυτά των BrdU, Brachyury και PCNA που προηγήθηκαν. Όπως και στις προαναφερθείσες περιπτώσεις, τα αποτελέσματα του GATA4 δεν συμφωνούν με τις παρατηρήσεις των Elabd *et al.*,⁽⁴⁹⁾. Πιο συγκεκριμένα, ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4 δεν βρέθηκε να διαχωρίζεται ασύμμετρα σε κανένα από τα κυτταρικά ζεύγη πραγματικών θυγατρικών κυττάρων (συνδεδεμένων με μεσόσωμα). Αντιθέτως, τα μη συνδεδεμένα με μεσόσωμα ζεύγη, στην πλειονότητα, έδειξαν ασύμμετρη κατανομή του παράγοντα αυτού. Όπως παρατηρήσαμε στην περίπτωση της κατανομής των BrdU και Brachyury σε αντίστοιχες ή προγενέστερες ημέρες διαφοροποίησης, έτσι και εδώ η παρουσία πραγματικά ασύμμετρων κατανομών εξαρτάται από την ακρίβεια με την οποία ταυτοποιούνται τα τυχαία ζεύγη κυττάρων. Πάντως, και στην περίπτωση της μακρόχρονης διαφοροποίησης ο παράγοντας PCNA αναδεικνύει την παρουσία μη θυγατρικών, αλλά τυχαίων, ζευγών (βλέπε Πίνακα 3.3), εξηγώντας δυνητικά την αναντιστοιχία των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής με της εν λόγω δημοσίευσης.

Παρουσία GATA4 σε ζεύγη κυττάρων (n=81)			
mb+		mb-	
38		43	
+ / +	+ / -	+ / +	+ / -
38 (100%)	0 (0%)	9 (21%)	34 (79%)

Πίνακας 3.4 Αποτελέσματα αξιολόγησης της κατανομής του GATA4 στα ζεύγη κυττάρων που παρασκευάστηκαν από παραλλαγή του πρωτοκόλλου των Elabd *et al.*,⁽⁴⁹⁾ κατά την 8^η ημέρα

διαφοροποίησης (βλέπε κείμενο). Όπου n ο αριθμός των δειγμάτων και $mb+/-$ η παρουσία/απουσία μεσόσωματος.

Μια αξιοσημείωτη διαφορά που προέκυψε ανάμεσα στους δυο μεταγραφικούς παράγοντες που διερευνήσαμε είναι πως ο GATA4 δεν εμφανίζεται σε κανένα μη συνδεδεμένο με μεσόσωμα ζεύγος κυττάρων με λόγο κατανομής διαφορετικό του 50:50, όπως συνέβη στο ~17% των περιπτώσεων του Brachyury με λόγο 60:40. Αυτό πιθανόν να οφείλεται σε διαφορές στο ρυθμό μεταγραφής ή αποικοδόμησης των πρωτεϊνών GATA4 και Brachyury. Ανεξαρτήτως πάντως της παραπάνω διαφοράς ή του λόγου στον οποίο μπορεί να οφείλεται, η κατανομή τους στα ζεύγη πραγματικών θυγατρικών κυττάρων, που αποτελεί και το ζητούμενο της παρούσας μελέτης, είναι αδιαμφισβήτητα παράλληλη, συμμετρική και ενδεικτική ως προς την απουσία ΑΚΔ στη διαφοροποίηση EBK με το παραπάνω πρωτόκολλο⁽⁴⁹⁾.



Εικόνα 3.39 Συμμετρική κατανομή του ιστοειδικού μεταγραφικού παράγοντα GATA4 σε ζεύγη πραγματικών θυγατρικών κυττάρων. Ζεύγη κυττάρων που παρήχθησαν με το πρωτόκολλο των Elabd *et al.*,⁽⁴⁹⁾ (βλέπε κείμενο και Πίνακα 3.4) χρωσμένα με αντι-GATA4 αντίσωμα παρουσιάζουν πάντα συμμετρική κατανομή στα φέροντα μεσόσωμα θυγατρικά κύτταρα, ενώ ασύμμετρη κατανομή παρατηρείται μόνο στις περιπτώσεις ζευγών που δεν συνδέονται από μεσόσωμα. Κλίμακα 5μm.

3.2.8.5 Μελέτη της παρουσίας πληθυσμού συντηρημένης σήμανσης (label retaining population-LRC) κατά τη διαφοροποίηση

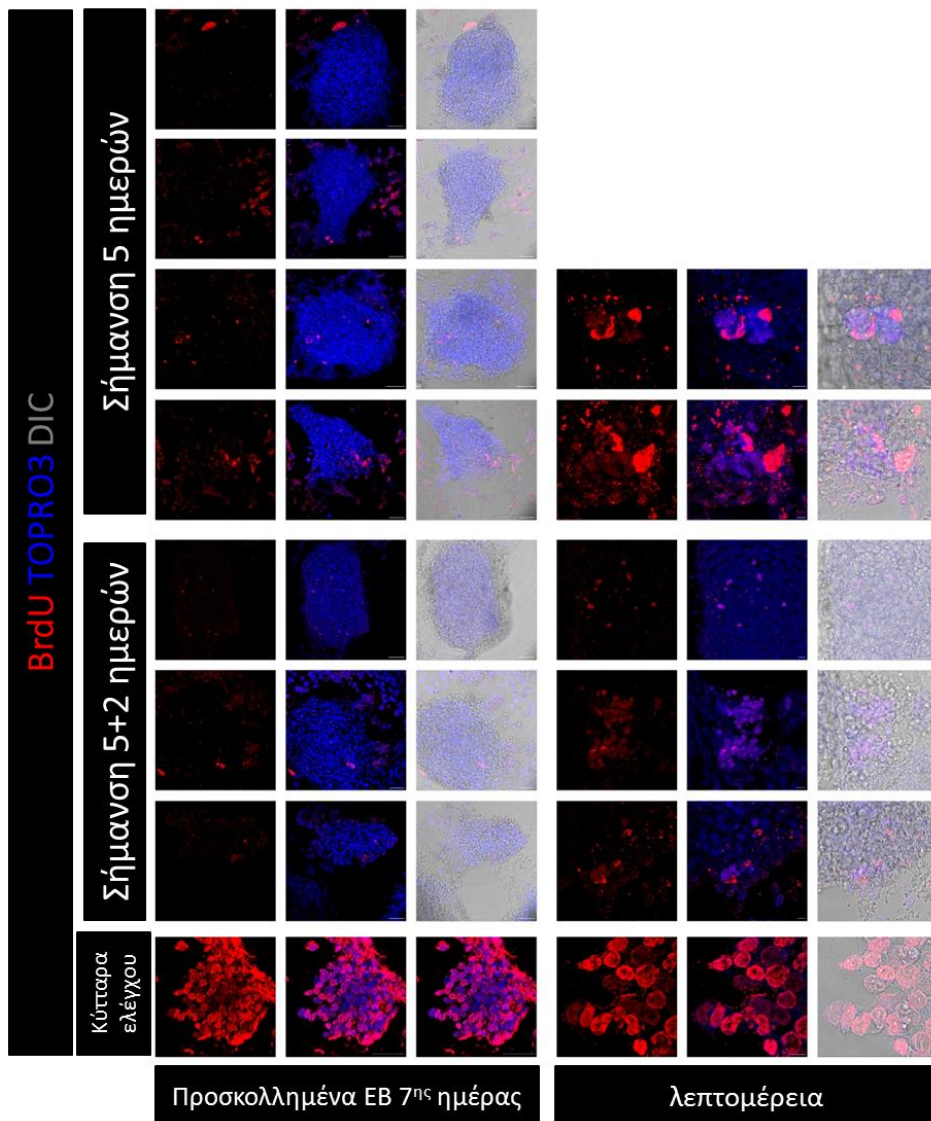
Με την ολοκλήρωση της ανάλυσης και του δεύτερου μεταγραφικού παράγοντα είναι πλέον σαφές πως ασύμμετρος διαχωρισμός γενετικού ή πρωτεϊνικού υλικού στα θυγατρικά κύτταρα διαφοροποιούμενων EBK δεν πραγματοποιείται. Η διαφορά με τη δημοσίευση των Elabd *et al.*, με εξαίρεση τα πειράματα σε πραγματικό χρόνο (live cell

imaging), ίσως να περιορίζεται σε επίπεδο ερμηνείας των αποτελεσμάτων και όχι της πρωτογενούς πληροφορίας⁽⁴⁹⁾. Όπως αναφέρθηκε, τα ποσοστά των ασύμμετρων ζευγών ως προς τον εκάστοτε παράγοντα που μελετήσαμε δεν διαφέρουν ουσιαστικά. Η βασική μας διαφορά έγκειται στον διαφορετικό τρόπο επιλογής δειγμάτων προς αξιολόγηση (κριτηρίων). Για να ξεπεράσουμε το πρόβλημα αυτό προσεγγίσαμε το ζήτημα με εναλλακτικό τρόπο, ο οποίος αποσκοπεί στην αποσαφήνιση του βασικού ευρήματος της παραπάνω εργασίας. Σύμφωνα με την εν λόγω δημοσίευση, το φαινόμενο του NTRS παρατηρήθηκε από την πρώτη κιόλας ημέρα διαφοροποίησης των EBK και (σε ένα ποσοστό) εμφανίζεται σε κάθε κυτταρική διαίρεση έως και την 7η ημέρα διαφοροποίησης. Η πιθανότερη βιολογική ερμηνεία του φαινομένου αυτού είναι ότι τα κύτταρα που φέρουν τον «αθάνατο» κλώνο του DNA θα πρέπει να παραμένουν βλαστικά και να διαιρούνται συνεχώς ασύμμετρα ή τουλάχιστον να εμφανίζουν NTRS σε κάθε τους διαίρεση. Ωστόσο, κάτι τέτοιο δεν φαίνεται να υποστηρίζεται από τα αποτελέσματα της παραπάνω εργασίας, όπου αναφέρεται σαφώς πως τα κύτταρα που μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης είχαν χάσει τη βλαστικότητά τους (βρέθηκαν Oct4 αρνητικά)⁽⁴⁹⁾. Συνεπώς, η μόνη λογική ερμηνεία των αποτελεσμάτων της παραπάνω δημοσίευσης αφορά την περίπτωση που ένας πληθυσμός προγονικών -κι όχι βλαστικών- κυττάρων διατηρείται μέσω ΑΚΔ. Διερευνήσαμε την τελευταία αυτή πιθανότητα με μια εναλλακτική χρήση της σήμανσης του DNA με το BrdU ανάλογο, σύμφωνα με την οποία πραγματοποιώντας παρατεταμένη σήμανση (extended pulse) επιτρέπεται η ανίχνευση του παραπάνω LRC (label retaining population) πληθυσμού μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα (prolonged chase)⁽⁹⁹⁻¹⁰¹⁾. Πιο συγκεκριμένα, καλλιεργήθηκαν EBK σε συνθήκες αυτό-ανανέωσης για μεγάλο χρονικό διάστημα (5 ημέρες pulse) παρουσία αναλόγου BrdU ώστε να σημανθούν και οι δύο κλώνοι του DNA τους. Στη συνέχεια, δημιουργήθηκαν EB από τα κύτταρα αυτά όπως και στα προηγούμενα πειράματα (2 ημέρες ως κρεμάμενες σταγόνες και τις επόμενες 3 σε εναιώρημα). Μετά από αυτές τις 5 ημέρες, τα EB μεταφέρθηκαν σε κατάλληλα τρυβλία με γυάλινο πυθμένα και αφέθηκαν να προσκολληθούν και να εκπτυχθούν για ακόμα 2 ημέρες. Σε αυτά τα EB, η παρουσία BrdU⁺ πυρήνων θα υποδείκνυε πραγματικά την ύπαρξη κυττάρων LRC που θα διαιρούνταν συνεχώς με NTRS δηλ. ασύμμετρα σε κάθε διαίρεσή τους. Αντιθέτως, η απουσία BrdU στα κύτταρα των EB μπορεί να εξηγηθεί μόνο με τη σταδιακή διάχυση της σήμανσης (σε κάθε συμμετρική κυτταρική διαίρεση το κάθε θυγατρικό κληρονομεί το μισό BrdU του μητρικού κυττάρου) που καταλήγει σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα με το πέρασ λίγων διαιρέσεων⁽⁹⁹⁻¹⁰¹⁾. Ως θετικός μάρτυρας της παραπάνω διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα το οποίο σημάνθηκε εκ νέου την

προηγούμενη ημέρα (ημέρα 6) με το ανάλογο BrUTP. Έπειτα από ανοσοφθορισμό με BrdU αντίσωμα προέκυψε παρουσία έντονης χρώσης μόνο στο θετικό μάρτυρα (Εικόνα 3.40). Σε μικρό δείγμα (5 από τα 19 EB) παρατηρήθηκε μια μικρή συστάδα (<10 κύτταρα) γειτονικών κυττάρων (cluster) με αμυδρή έντασης BrdU+ χρώση (Εικόνα 3.40). Οι πυρήνες των κυττάρων αυτών ήταν μικρότεροι των υπόλοιπων κυττάρων του EB και, επίσης, απόλυτα σφαιρικοί (Εικόνα 3.40). Από τις παρατηρήσεις αυτές προκύπτει: α) απουσία LRC πληθυσμού, β) η παρουσία των λίγων ασθενώς θετικών BrdU κυττάρων αποτελεί μάλλον εξαίρεση και όχι τον κανόνα, αφού δεν ακολουθείται από την πλειονότητα των EB και γ) ο υπερβολικά μικρός αριθμός των ασθενώς θετικών BrdU κυττάρων σε σχέση με το συνολικό αριθμό των κυττάρων του εκάστοτε EB καθιστά αδύνατη την πιθανότητα οι διαιρέσεις τους να απαρτίζουν το σύνολο των ΑΚΔ που βρέθηκαν από τους Elabd *et al.*,⁽⁴⁹⁾. Συνεπώς, κανένα μη διαφοροποιημένο κύτταρο με «αθάνατο» κλώνο DNA από τα αρχικά EBK δεν διατηρήθηκε κατά την πρόοδο της διαφοροποίησης και ως εκ τούτου η θεμελιώδης βιολογική τελεονομία του NRTS ή/και ΑΚΔ (δηλαδή η διατήρηση ενός αδιαφοροποίητου ή μερικός διαφοροποιημένου υποπληθυσμού από τον οποίο θα εκπορεύονται τα προς τελική διαφοροποίηση κύτταρα) δεν υφίσταται.

Τα παραπάνω συμπεράσματα, κυρίως σε ότι αφορά τα μεμονωμένα περιστατικά ασθενούς BrdU χρώσης σε 7ης ημέρας διαφοροποίησης EB, μπορεί να επισκιάζουν ένα βιολογικό γεγονός το οποίο θα πρέπει να αποσαφηνιστεί. Πιο συγκεκριμένα, τα εν λόγω κύτταρα ενδέχεται να προέκυψαν είτε από κύτταρα που αποσύρθηκαν από τον κύκλο με το πέρασμα λίγων διαιρέσεων (κι έτσι να δικαιολογείται η διατήρηση της μικρής έντασης BrdU σήμανσης), είτε να απαρτίζουν ένα πληθυσμό προγονικών κυττάρων (δηλαδή κυττάρων που αφού δημιουργήθηκαν κατά τη 2^η-4^η ημέρα της διαφοροποίησης, από συμμετρικές διαιρέσεις, και η αρχική τους σήμανση είχε αραιωθεί αρκετά, στη συνέχεια ξεκίνησαν τις ΑΚΔ με NTRS). Η πρώτη πιθανότητα εκ των πραγμάτων δεν μπορεί να συνηγορήσει δεδομένου ότι η ΑΚΔ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των EBK. Η δεύτερη όμως είναι μια ενδιαφέρουσα πιθανότητα και διερευνήθηκε περαιτέρω τροποποιώντας το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε προηγουμένως, ώστε η περίοδος της παρατεταμένης σήμανσης με το ανάλογο της θυμιδίνης (BrdU) να περιλαμβάνει τον σχηματισμό EB (ημέρα 2 της διαφοροποίησης). Σκοπός αυτής της προσέγγισης είναι η σήμανση των πρόδρομων βλαστικών κυττάρων (progenitor stem cells -PSC), εάν υπάρχουν, από τα οποία δυνητικά θα προκύψουν οι διαφοροποιημένοι πληθυσμοί. Έτσι η εύρεση LRC θα πιστοποιεί την ύπαρξη PSC, θα αποσαφηνίζει την παρουσία ΑΚΔ και θα επιβεβαιώνει το προηγούμενο αποτέλεσμα. Στα δείγματα λοιπόν που προέκυψαν με τη μέθοδο αυτή,

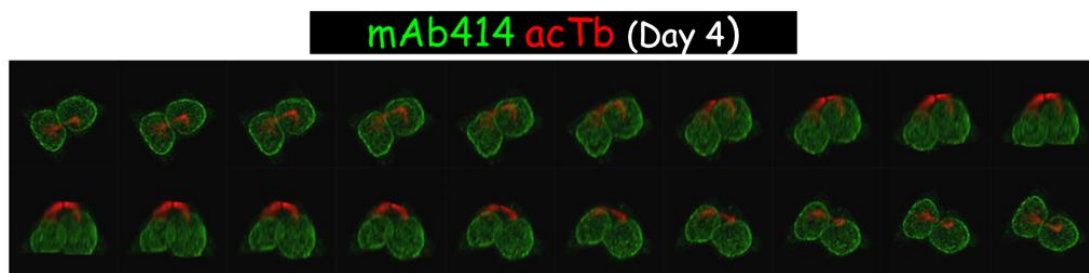
βρέθηκαν παρόμοια ασθενώς χρωσμένα κύτταρα με αυτά της αρχικής προσέγγισης και, μάλιστα, σε ανάλογα επίπεδα (σε 6 από τα 23 EB που διερευνήθηκαν) (Εικόνα 3.40). Με άλλα λόγια, η διαφοροποίηση των EBK δεν πραγματοποιείται μέσω LRC υποπληθυσμών (είτε αμιγώς, είτε πρόδρομων BK) που διαιρούνται συστηματικά με ΑΚΔ. Συνυπολογίζοντας όλα τα παραπάνω ευρήματα υποστηρίζουμε την άποψη πως τα διαφοροποιούμενα EBK ποντικού σύμφωνα με το δημοσιευμένο πρωτόκολλο των Elabd *et al.*,⁽⁴⁹⁾ δεν εμφανίζουν καμία γνωστή μορφή ασυμμετρίας.



Εικόνα 3.40 Απουσία LRC πληθυσμού στις τριδιάστατες EB διαφοροποιήσεις των κυττάρων E14. Αντιπροσωπευτικές εικόνες προσκολλημένων EB (7^η ημέρα διαφοροποίησης) με διαφορετικές περιόδους σήμανσης του DNA τους με ανάλογο θυμιδίνης (BrdU, βλέπε κείμενο). Κλίμακα 20μm στα EB και 5μm στις λεπτομέρειες.

3.2.8.6 Μελέτη κατανομής των νουκλεοπορινών της οικογένειας Nup84/Nup107 σε διαφοροποιημένα θυγατρικά κύτταρα

Για να υποστηριχθεί πλήρως το παραπάνω συμπέρασμα θεωρήθηκε πως πρέπει να ολοκληρωθεί ο έλεγχος του δημοσιευμένου πρωτοκόλλου και για μια σειρά άλλων, ενδεχόμενων, αυτή τη φορά, μορφών ασυμμετρίας. Έτσι, στη συνέχεια μελετήθηκε η συγκρότηση των πυρηνικών φακέλων στα θυγατρικά κύτταρα που προέκυψαν από το πρωτόκολλο των Elabd *et al.*,⁽⁴⁹⁾ σε δείγματα 4^{ης} και 8^{ης} ημέρας διαφοροποίησης, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρες δείγματα αδιαφοροποίητων EBK που προέκυψαν ακολουθώντας το τελικό σκέλος του παραπάνω πρωτοκόλλου. Στα δείγματα αυτά, μελετήθηκε η σύσταση των πυρηνικών πόρων ως προς την παρουσία μελών της οικογένειας NUP84/NUP107 που αναγνωρίζει το αντίσωμα mAb414 για τυχόν ασυμμετρίες όπως και στο παρελθόν (βλέπε Εικόνα 3.23 και συναφές κείμενο στην ενότητα 3.2.5). Με τον τρόπο αυτό μπορούμε ποιοτικά να διαγνώσουμε τυχόν διαφορές στη σύσταση ή/και ταχύτητα σχηματισμού των πυρηνικών φακέλων σε κάθε ζεύγος πραγματικών θυγατρικών που βρίσκονται κυρίως στην G1 φάση (παρουσία σύνδεσης με μικρό μεσόσωμα). Από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής διαπιστώσαμε πως ακόμα και στα δείγματα μάρτυρες αδιαφοροποίητων EBK οι πυρήνες μεταξύ δυο θυγατρικών εμφανίζουν αξιοσημείωτες διαφορές. Πολύ συχνά ο ένας πυρήνας κατείχε μεγαλύτερο όγκο από τον άλλο ή/και εμφάνιζε διαφορές στη σύστασή του της τάξης του ~13% κατά μέσο όρο (Εικόνες 3.41



Εικόνα 3.41 Θυγατρικά κύτταρα E14 σχηματίζουν ανισομεγέθους πυρήνες. Στιγμιότυπα περιστροφής 180° επί του άξονα y της τρισδιάστατης αναπαράστασης του έμμεσου ανοσοφθορισμού ενός ζεύγους θυγατρικών κυττάρων (στην 4^η ημέρα διαφοροποίησης) σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Elabd *et al.*,⁽⁴⁹⁾ χρωσμένων με αντισώματα έναντι του mAb414 (νουκλεοπορίνες, πράσινο) και ακετυλιωμένης τουμπουλίνης (κόκκινο). Στην πρώτη σειρά εμφανίζονται διαδοχικά στιγμιότυπα της περιστροφής από 0 έως ~90° και στη δεύτερη από ~90° έως 180°. Παρατηρείτε ότι το δεξιό-θυγατρικό κύτταρο φέρει μεγαλύτερου μεγέθους πυρήνα από το αριστερό.

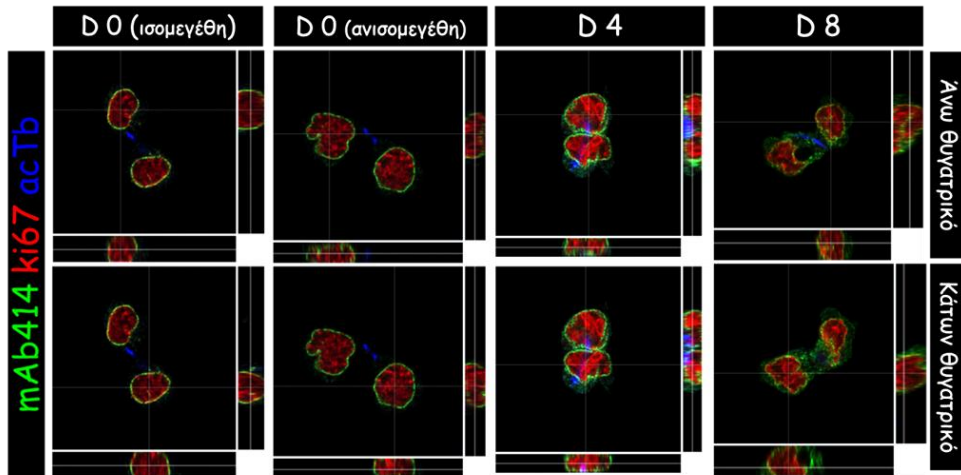
και 3.42, βλέπε παρακάτω). Επίσης, στα διαφοροποιημένα δείγματα, λόγω του αυξημένου κυτταρόπλασματικού χώρου, παρατηρήσαμε αυξημένη ένταση διάχυτης κυτταροπλασματικής χρώσης παράλληλα με την απώλεια της σφαιρικότητας στο σχήμα των πυρήνων (σύγκρινε τα δείγματα 0 και 8^{ης} ημέρας διαφοροποίησης στις Εικόνες 3.42 και

3.43). Στον Πίνακα 3.5 παρατίθενται αναλυτικά τα αποτελέσματα της παραπάνω ποσοτικής ανάλυσης, όπου φαίνεται τόσο το τεράστιο εύρος διαφορών μεταξύ των πυρήνων δυο θυγατρικών κυττάρων όσο και η ανεξαρτησία του παραπάνω φαινομένου από το βαθμό διαφοροποίησης των κυττάρων. Ένα επιπλέον στοιχείο που διερευνήθηκε ενδελεχώς στις απεικονίσεις των παραπάνω δειγμάτων ήταν και η κατανομή των πυρηνικών πόρων. Σε διάφορες (κυρίως παθολογικές) καταστάσεις παρατηρούνται εκτεταμένα «κενά» στον πυρηνικό φάκελο, δηλαδή μεγάλες περιοχές χωρίς παρουσία πυρηνικών πόρων (ενδεικτικά αναφέρονται ⁽⁷³⁾ ⁽⁷⁴⁾). Για την ανάλυση αυτή επιστρατεύτηκε ειδικό λογισμικό για την καλύτερη προβολή –με δυνατότητα αξιολόγησης– της κατανομής του αντισώματος mAb414 (Εικόνα 3.45). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής συμφωνούν απόλυτα με τα προηγούμενα, δηλαδή οι όποιες σποραδικές ανακολουθίες παρατηρήθηκαν ήταν σε ποιοτικά και ποσοτικά μεγέθη εφάμιλλες μεταξύ των κυττάρων ελέγχου (αδιαφοροποίητα κύτταρα E14) και των διαφοροποιημένων δειγμάτων.

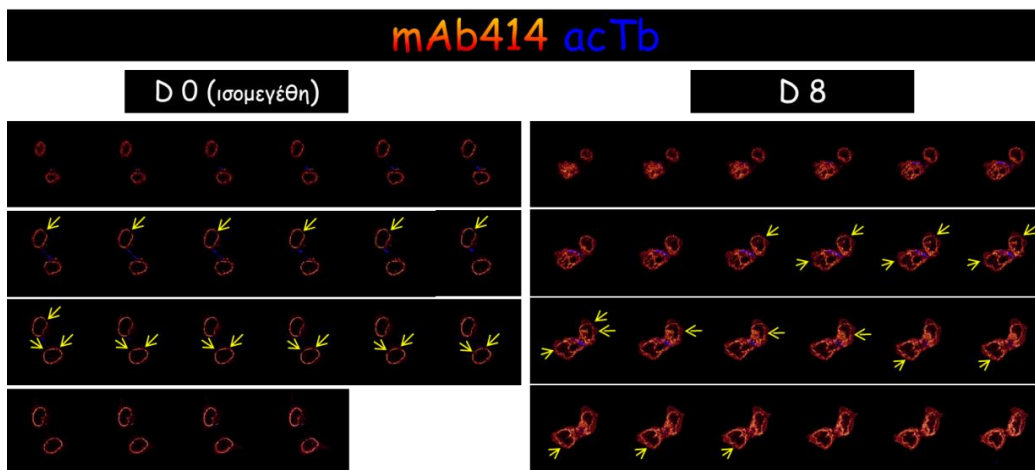
Ανάλυση διαφορών στην ένταση του mAb414 στους πυρήνες θυγατρικών κυττάρων			
Δείγματα	Ημέρα 0	Ημέρα 4	Ημέρα 8
Αριθμός δειγμάτων	37	34	31
Μέσος όρος (%)	13,4	13,2	10,4
Τυπική απόκλιση (%)	±8,5	±6,6	±8,1
Μέση τιμή (%)	11,5	12,9	9,6
Μέγιστο (%)	31,7	28,1	27,4
Ελάχιστο (%)	0,7	0,3	0,1

Πίνακας 3.5 Συγκριτικά αποτελέσματα της ανάλυσης των διαφορών στην ένταση του ανοσοφθορισμού νουκλεοπορινών (mAb414) μεταξύ πυρήνων θυγατρικών κυττάρων που προέκυψαν από το πρωτόκολλο διαφοροποίησης των Elabd *et al.*,⁽⁴⁹⁾ κατά τις ημέρες που αναγράφονται (βλέπε κείμενο). Παρατηρείται μεγάλο εύρος ετερογένεια μεταξύ των πυρήνων θυγατρικών κυττάρων στην κάθε ομάδα δειγμάτων, η οποία είναι ανεξάρτητη του βαθμού διαφοροποίησης.

Στην ανάλυση των παραπάνω δειγμάτων παράλληλα με το αντίσωμα για τις νουκλεοπορίνες (mAb414) χρησιμοποιήθηκε και αυτό για την πρωτεΐνη Ki67. Το Ki67 είναι χαρακτηριστικός δείκτης πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων και εμφανίζει συγκεκριμένο πρότυπο πυρηνικής κατανομής ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκεται το κάθε κύτταρο⁽¹⁰²⁾. Με τον τρόπο αυτό μπορούσαμε να επιβεβαιώσουμε τη φάση του κυτταρικού κύκλου που βρισκόταν το εκάστοτε θυγατρικό κύτταρο, να ξεχωρίσουμε και αναλύσουμε τα πιο πρώιμα στην G1 φάση ζευγάρια θυγατρικών κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα συνέβαλλε ώστε τα όρια του πυρήνα να γίνουν πιο διακριτά.



Εικόνα 3.42 Κατανομή των νουκλεοπορινών της οικογένειας Nup84/Nup107 (mAb414, πράσινο) στους πυρήνες θυγατρικών κυττάρων που προέκυψαν από το πρωτόκολλο των Elabd *et al.*,⁽⁴⁹⁾ κατά τις ημέρες που αναγράφονται (βλέπε κείμενο). Στη σειρά φωτογραφιών παρουσιάζονται απεικονίσεις με xy, xz και yz προβολές αντιπροσωπευτικών δειγμάτων για κάθε ημέρα διαφοροποίησης που διερευνήθηκε. Για την ημέρα 0 παραθέτονται δυο δείγματα, ένα με ίσου μεγέθους πυρήνες μεταξύ των θυγατρικών κυττάρων και ένα με ανισομεγέθη πυρήνες.

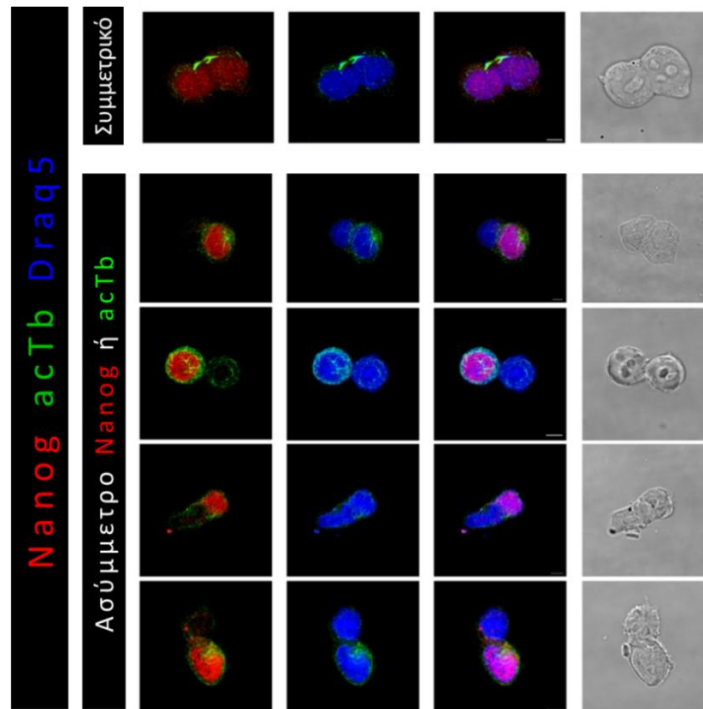


Εικόνα 3.43 Ποιοτικός έλεγχος της κατανομής των νουκλεοπορινών της οικογένειας Nup84/Nup107 (mAb414, διαβαθμισμένο ψευδόχρωμα «glowover») στους πυρηνικούς φακέλους θυγατρικών κυττάρων. Παρουσιάζεται η ανάλυση όλων των τομών (βήμα 0,2μm) δυο δειγμάτων της Εικόνας 3.42. Περιοχές που εμφανίζουν μικρά κενά χωρίς πυρηνικούς πόρους έχουν σημειωθεί με κίτρινα βέλη. Παρατηρούμε πλήρη αντιστοιχία στη συχνότητα και το μέγεθος των κενών του πυρηνικού φακέλου μεταξύ θυγατρικών κυττάρων και βαθμού διαφοροποίησης.

3.2.8.7 Μελέτη της κατανομής του Nanog σε τροποποίηση του πρωτοκόλλου διαφοροποίησης

Ολοκληρώνοντας τον έλεγχο του πρωτοκόλλου των Elabd *et al.*, αξιοποιήσαμε τη δυνατότητα που παρέχει για τον άμεσο έλεγχο κυτταρικών ζευγών (δηλαδή τα τελευταία στάδια του πρωτοκόλλου) σε πειράματα διδιάστατης διαφοροποίησης EBK με απλή αφαίρεση LIF⁽⁴⁹⁾. Τα δείγματα που προέκυψαν 24 και 48 ώρες από την έναρξη της διαφοροποίησης μελετήθηκαν για πιθανή ασύμμετρη απώλεια του παράγοντα πολυδυναμίας Nanog. Όπως ήταν αναμενόμενο, ο αριθμός των Nanog θετικών πυρήνων τη

δεύτερη ημέρα διαφοροποίησης ήταν δραματικά μικρότερος από τα αντίστοιχα δείγματα της πρώτης ημέρας. Ωστόσο, και στις δυο περιπτώσεις η κατανομή αυτού του μεταγραφικού παράγοντα ήταν απόλυτα συμμετρική σε όλα τα πραγματικά ζεύγη θυγατρικών κυττάρων (παρουσία σύνδεσης με μεσόσωμα) (Εικόνα 3.44). Στα υπόλοιπα ζεύγη κυττάρων (απουσία μεσοσώματος) βρέθηκαν πράγματι αρκετές ατυπίες-ασυμμετρίες. Αυτές δεν αφορούσαν μόνο τον παράγοντα Nanog αλλά, επιπλέον, την κατανομή/παρουσία/ποσότητα της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης. Υπενθυμίζεται εδώ πως σε όλα τα πειράματα μελέτης κυτταρικών ζευγών που πραγματοποιήσαμε, ο ταυτόχρονος ανοσοεντοπισμός της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης με τον εκάστοτε παράγοντα (στην προκειμένη περίπτωση με το Nanog) πραγματοποιείται για την ανάδειξη των μεσοσωμάτων και κατ' επέκταση τη διάκριση των πραγματικών θυγατρικών κυττάρων. Η τελευταία αυτή παρατήρηση δεν μας ξενίζει δεδομένου ότι αποτελεί ένα φαινόμενο που έχουμε παρατηρήσει ξανά στο παρελθόν (βλέπε Εικόνα 3.35). Επιπλέον, η απουσία μεσοσώματος στα ζεύγη κυττάρων που προκύπτουν με το πρωτόκολλο των Elabd *et al.*, τα καθιστά δυνητικά τυχαία (διαπιστώθηκαν απολύτως τυχαία σε ποσοστό 25-30% σύμφωνα με το δείκτη PCNA ⁽⁴⁹⁾ και βλέπε Πίνακα 3.3) και άρα δύναται να εμφανίζουν πολλαπλές διαφορές μεταξύ τους. Η κατανομή της πρωτεΐνης της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης και του PCNA είναι εξαιρετικά παραδείγματα για την ορθότητα του παραπάνω συμπεράσματος. Ανήκουν στην κατηγορία των *housekeeping* γονιδίων και δεν θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν στα ασύμμετρα διαχωριζόμενα μόρια. Το PCNA έχει συγκεκριμένη κατανομή ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου ενώ η τουμπουλίνη πολυμερίζεται και ακετυλιώνεται ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου, που σε μεγάλο βαθμό καθορίζονται από τη φάση στην οποία βρίσκεται ^(96,103,104). Έτσι, τυχόν διαφορές αυτών των μορίων σε κυτταρικά ζεύγη δεν θα μπορούσαν να αποδοθούν σε ΑΚΔ αλλά στην παρουσία τυχαίων ζευγών σε διαφορετική φάση του κυτταρικού κύκλου. Αυτές οι ενδογενείς ασυμμετρίες του συστήματος αυτού θα πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν για την ορθή αξιολόγηση των παραγόντων που σχετίζονται με την ΑΚΔ. Στην παρούσα ανάλυση, η παρατήρηση αυτή –ή όπως έχει διατυπωθεί σε προηγούμενες παραγράφους– αναδεικνύει το μειονέκτημα των κριτηρίων αξιολόγησης της εργασίας των Elabd *et al.*, και προσδιορίζει την επιστημονική βάση της ασυμφωνίας των αποτελεσμάτων μας ⁽⁴⁹⁾. Καταλήγοντας, η ταυτόχρονη ανάπτυξη των τριών διαφορετικών δερμάτων (ενδό- μεσό- και εξώδερμα) κατά τη διαφοροποίηση EBK (Εικόνα 3.10) θα πρέπει να εξηγείται με διαφορετικό της ΑΚΔ τρόπο.



Εικόνα 3.44 Συμμετρική κατανομή του μεταγραφικού παράγοντα πολυδυναμίας Nanog σε ζεύγη πραγματικών θυγατρικών κυττάρων. Ζεύγη κυττάρων που παρήχθησαν με παραλλαγή του πρωτοκόλλου των Elabd *et al.*,⁽⁴⁹⁾ (βλέπε κείμενο) χρωσμένα με αντι-Nanog αντίσωμα παρουσιάζουν πάντα συμμετρική κατανομή στα φέροντα μεσόσωμα θυγατρικά κύτταρα, ενώ ασύμμετρη κατανομή παρατηρείται μόνο στις περιπτώσεις ζευγών που δεν συνδέονται από μεσόσωμα. Επιπλέον, παρατηρούνται ατυπίες (ασύμμετρη κατανομή) στα μη φέροντα μεσόσωμα ζεύγη κυττάρων ως προς την ακετυλιωμένη τουμπουλίνη. Κλίμακα 5 μm.

3.2.9 Διερεύνηση της συμβολής του κυτταρικού διαχωρισμού (*cell sorting*) στις διαφοροποιήσεις EBK

Αναζητώντας αυτή την εναλλακτική ερμηνεία στραφήκαμε στη διεθνή βιβλιογραφία και πιο συγκεκριμένα προς την *in vivo* διαφοροποίηση των EBK. Σε μια ανασκόπηση των πρώτων σταδίων της εμβρυογένεσης του ποντικού παρατηρήθηκε πως οι φερόμενες ως πρώτες ΑΚΔ (κατά το στάδιο του μοριδίου) δεν έχουν μελετηθεί σε βάθος και πως νεότερες εργασίες έρχονται να τις αμφισβητήσουν^(105–108). Χαρακτηριστικό είναι και το συμπέρασμα που παρατίθεται σε μία από αυτές⁽¹⁰⁷⁾: «Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η επανεξέταση κλασικών δεδομένων με σύγχρονες τεχνικές παρακολούθησης κυττάρων σε ακέραια έμβρυα είναι απαραίτητη για να **επιβεβαιωθεί εάν η τρέχουσα γνώση της φυσιολογικής και ακέραιης (εμβρυικής) ανάπτυξης είναι ορθή**». Κάτι τέτοιο αφήνει ανοιχτό το ενδεχόμενο να συμβαίνει και εκεί ότι και σε μια πλειάδα άλλων *in vivo* περιπτώσεων (σε μεγάλο εύρος ειδών, κυρίως κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης) διαχωρισμού κυτταρικών υποτύπων (*cell sorting*) σε συγκεκριμένες θέσεις, όχι μέσω ΑΚΔ, αλλά μέσω διαφορών στο αναπτυξιακό δυναμικό ή/και στην μεμβρανική τους τάση (ΜΤ,

cortical tension) (ανασκοπείται στα ^(109,110)). Χαρακτηριστικότερη αυτών είναι η περίπτωση του διαχωρισμού των τριών δερμάτων (ενδόδερμα, μεσόδερμα και εξώδερμα) σε έμβρυα Zebrafish⁽¹¹¹⁾. Εκεί, έδειξαν πως τα κύτταρα των τριών δερμάτων καταλαμβάνουν συγκεκριμένες θέσεις οι οποίες καθορίζονται από φυσικές ιδιότητες (διαφορές στη MT τους) ανταποκρινόμενες στο διαφορετικό αναπτυξιακό δυναμικό τους. Αντίστοιχη μελέτη στα έμβρυα του ποντικού δεν υπάρχει. Ωστόσο, στο επίπεδο της *in vitro* διαφοροποίησης EBK ποντικού προς τα τρία δέρματα η παραπάνω παρατήρηση επιβεβαιώνεται πλήρως⁽¹¹²⁻¹¹⁴⁾. Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, κατά την τρισδιάστατη EB διαφοροποίηση των EBK, η συγκεκριμένη θέση που καταλαμβάνει κάθε κύτταρο υπαγορεύεται από το αναπτυξιακό δυναμικό του, δηλαδή τα προ-ενδοδερμικά στην επιφάνεια του EB, τα προ-εξωδερμικά στο κέντρο του και τα προ-μεσοδερμικά ενδιάμεσα.

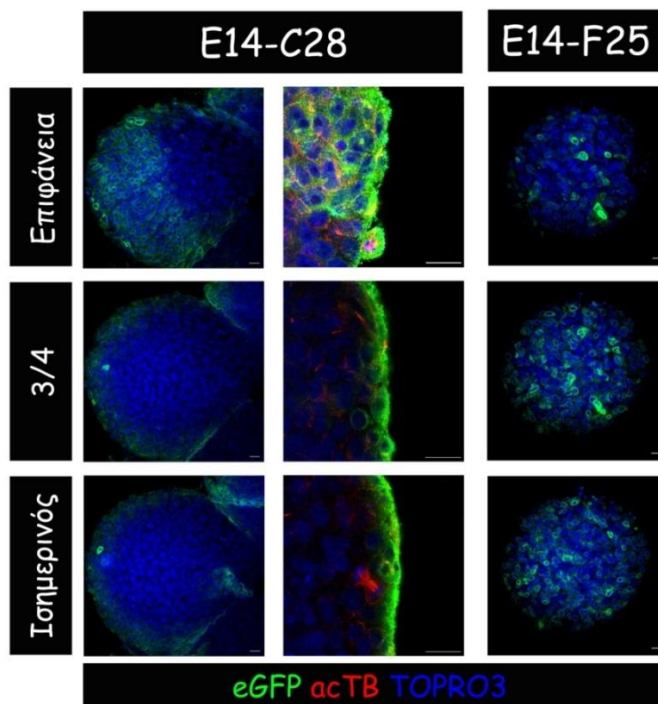
Σε μια προσπάθεια να διερευνήσουμε την ύπαρξη μιας τέτοιας πιθανότητας κατά τον διαχωρισμό των αντίστοιχων δερμάτων στα διαφοροποιούμενα κύτταρα E14, όπου διαπιστώσαμε ότι απουσιάζουν οι ΑΚΔ, κάναμε χρήση κάποιων κλώνων του εργαστηρίου μας, οι οποίοι προέρχονται από διαμολυσμένα κύτταρα E14 με επισωματικό φορέα που κωδικοποιεί το φυσιολογικό ή μεταλλαγμένες μορφές του γονιδίου *LBR* ως πρωτεΐνη σύντηξης με eGFP (πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη).

3.2.9.1 Μελέτη του κυτταρικού διαχωρισμού κατά το σχηματισμό των EB

Ο πρώτος κύκλος πειραμάτων για τη διερεύνηση του κυτταρικού διαχωρισμού ως μέσο προαγωγής της ετερογένειας που προκύπτει στις διαφοροποιήσεις των EBK ξεκίνησε με το σχηματισμό χιμαιρικών EB. Τα χιμαιρικά EB σχηματίστηκαν έπειτα από ανάμιξη μονήρη κυττάρων E14 και κυττάρων ενός εκ των κλώνων C28 και F25, σε διάφορες στοιχειομετρικές αναλογίες. Οι κλώνοι αυτοί έχουν προέλθει από τα κύτταρα E14 με τον C28 να υπερεκφράζει το *LBR^{icj}-GFP*, ενώ ο F25 το *LBR-GFP*. Ο κλώνος C28, αν και γνωρίζουμε ότι εκφράζει παρεμφερή επίπεδα Nanog : Oct4 με τα κύτταρα E14 και ως εκ τούτου παραμένει βλαστικός, έχει χάσει τη δυνατότητα να αναπτύσσεται σε τρισδιάστατες σφαιροειδείς αποικίες, όπως τα πατρικά E14 κύτταρα. Ο φαινότυπος αυτός θα μπορούσε να οφείλεται σε μειωμένη MT. Επίσης, μας είναι γνωστό ότι ο εν λόγω κλώνος δεν είναι ικανός να σχηματίσει φυσιολογικά EB σε GMEM καλλιεργητικό μέσο (διαφοροποίηση προς και τα τρία δέρματα), ενώ ανταποκρίνεται στη δημιουργία EB με σαφή μεσοενδοδερμική κατεύθυνση (δημιουργία EB σε IMDM περιβάλλον) χωρίς ατυπίες. Επιπλέον, εμφανίζει μια τάση να διαφοροποιείται προς ενδόδερμα συγκρινόμενος πάντα με τα πατρικά κύτταρα

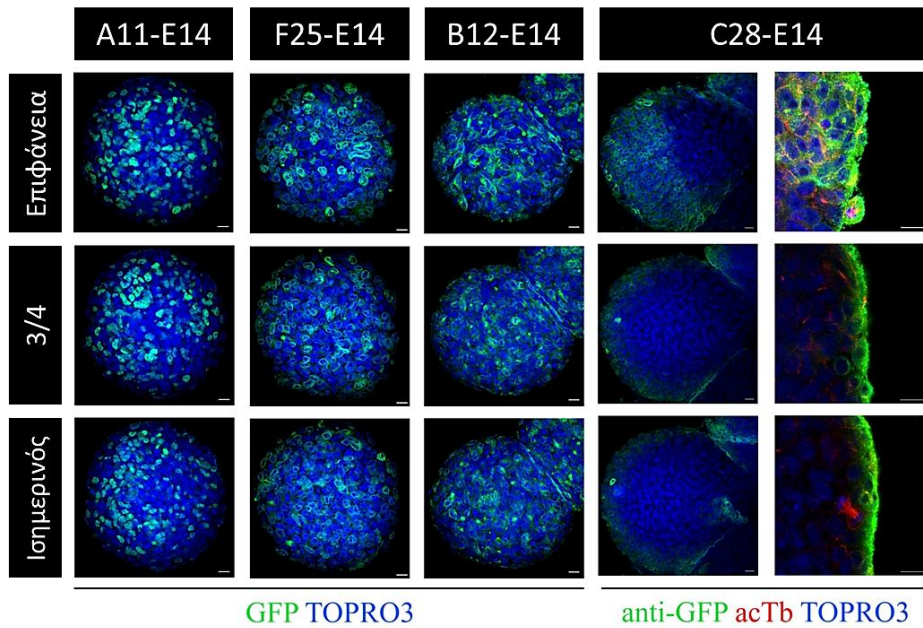
E14 στις ίδιες συνθήκες διαφοροποίησης. Υπενθυμίζεται εδώ πως ο κλώνος C28 κατασκευάστηκε ως ανάλογο των icj ποντικών, οι οποίοι κατά την εμβρυογένεσή τους εμφανίζουν ατυπίες, κατά κύριο λόγο, σε εξωδερματικής προέλευσης ιστούς(115). Συνδυάζοντας τα παραπάνω δεδομένα, ίσως η μειωμένη MT, αν πράγματι υφίσταται, να καθιστά αδύνατη τη δημιουργία κυτταρικών συσσωματωμάτων (*cellular aggregates*) με αυξημένης MT κύτταρα στον πυρήνα και άρα EB σε GMEM τα οποία να μπορούν να διαφοροποιηθούν και προς εξωδερμικούς ιστικούς τύπους. Από την άλλη, ο κλώνος F25 υπερεκφράζει το αγρίου τύπου LBR γονίδιο συζευγμένο με GFP (LBR-GFP). Εμφανίζει διαφορετικό λόγο Nanog : Oct4 και έχει την τάση να υπερεκφράζει ιστοειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες εξωδερματικού τύπου στη διαφοροποίησή του, παρά το γεγονός ότι μπορεί να διαφοροποιηθεί προς όλες τις κατευθύνσεις.

Οι χμαιρικές EB διαφοροποιήσεις πραγματοποιήθηκαν σε IMDM μέσο για τα κύτταρα E14 με τον κλώνο C28 και σε GMEM μέσο μεταξύ κυττάρων E14 και F25. Τα EB που σχηματίστηκαν μονιμοποιήθηκαν και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία. Στα χμαιρικά EB μεταξύ των κυττάρων E14 και C28 διαπιστώθηκε ότι τα GFP⁺ κύτταρα (C28) σχηματίζουν ένα κέλυφος εσωκλείοντας τα GFP⁻ (E14) κύτταρα (Εικόνα 3.45). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει: (α) την τάση διαφοροποίησης των κυττάρων του κλώνου C28 προς ενδόδερμα, (β) τη συναφή βιβλιογραφία^(113,114) και (γ) την υπόθεση της συμβολής του κυτταρικού διαχωρισμού στις τρισδιάστατες διαφοροποιήσεις EBK. Στα υπόλοιπα χμαιρικά EB (μεταξύ κυττάρων E14 και F25) τα GFP⁺ κύτταρα (F25) φαίνεται πως αναμειγνύονται πλήρως με τα GFP⁻ κύτταρα (E14), με αρκετά GFP⁺ κύτταρα να εμφανίζουν ένα πιο κεντρικό εντοπισμό. Η παρατήρηση αυτή, σε συνδυασμό με την ενδογενή τάση του κλώνου F25 για διαφοροποίηση προς νευρο-εξωδερμικού τύπου ιστούς (πληροφορίες του εργαστηρίου μας), ερμηνεύτηκε ως ένδειξη κυτταρικού διαχωρισμού επί τη βάση των διαφορών στο αναπτυξιακό δυναμικό μεταξύ E14 και F25 κυττάρων. Αξίζει να σημειωθεί πως με την παρούσα υλικοτεχνική υποδομή δεν είναι δυνατό να εξεταστεί εάν τα κύτταρα του κλώνου F25 έχουν μεγαλύτερη MT από αυτά των E14, και άρα να αποδοθεί η ερμηνεία του κυτταρικού διαχωρισμού σε διαφορές στην MT προκειμένου περί χμαιρικών EB μεταξύ F25-E14 κυττάρων.



Εικόνα 3.45 Χιμαιρικά EB μεταξύ κυττάρων E14 και των κλώνων C28 και F25. Παρατίθενται τρεις τομές από το εκάστοτε χιμαιρικό EB σε μικρή μεγέθυνση και σε μεγαλύτερη για τον κλώνο C28 (μεσαία στήλη). Παρατηρείται η αποκλειστική παρουσία των GFP⁺ κυττάρων (C28) στην εξωτερική στοιβάδα των χιμαιρικών EB E14-C28. Κλίμακα εκατέρωθεν 50μm και 20μm στο μέσον.

Για την καλύτερη αξιολόγηση αλλά και επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων θεωρήθηκε πως στην ανάλυση θα έπρεπε να προστεθεί και μια αντίστοιχη ανάλυση επιπλέον κυτταρικών σειρών τόσο σε IMDM όσο και GMEM καλλιεργητικό μέσο. Για το λόγω αυτό, σχηματίστηκαν χιμαιρικά EB μεταξύ κυττάρων E14 και κυττάρων των κλώνων F25, B12 και A11 σε διάφορες στοιχειομετρίες μεταξύ τους και στα δύο καλλιεργητικά υλικά (IMDM και GMEM). Σημειώνεται εδώ, πως ο κλώνος A11 εκφράζει σταθερά την HP1γ-eGFP χωρίς να επηρεάζει/διαφοροποιεί τα κύτταρα αυτά από τα πατρικά κύτταρα E14 σε κανένα μετρίσιμο βαθμό (πληροφορίες του εργαστηρίου μας) και πως ο κλώνος B12 υπερεκφράζει το *LBR^{Greenberg}-GFP*. Στην Εικόνα 3.46 παρατίθενται ενδεικτικά παραδείγματα EB σε IMDM περιβάλλον με αναλογία 2:1, δηλαδή ανάμειξη διπλάσιων κυττάρων του εκάστοτε κλώνου σε σχέση με τα κύτταρα E14. Συγκεντρωτικά, από προηγούμενα αλλά και τα παραπάνω πειράματα προκύπτει πως ο κλώνος C28, ο μόνος με σαφή ένδειξη μειωμένης MT, διαχωρίζεται επιλεκτικά στην εξωτερική στοιβάδα των διαφοροποιούμενων EB, ενώ όλοι οι υπόλοιποι εμφανίζουν απόλυτα τυχαία κατανομή σε IMDM διαφοροποιήσεις (Εικόνα 3.46). Σε GMEM καλλιεργητικό μέσο και σε αναλογία 1:1 ο F25 φαίνεται να εμφανίζει μια σχετικά πιο έκκεντρη κατανομή (Εικόνα 3.45), με τους λοιπούς κλώνους να εμφανίζουν τυχαία ανάμειξη με τα κύτταρα E14 (δεν παρουσιάζονται).



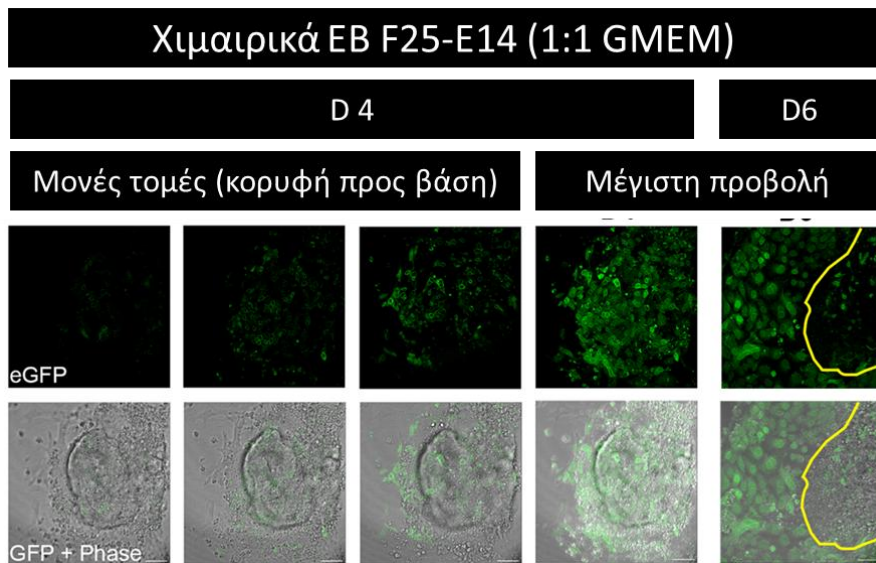
Εικόνα 3.46 Κυτταρικός διαχωρισμός παρατηρείται μόνο στα χιμαιρικά EB μεταξύ C28-E14 κυττάρων. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα 2^{ης} ημέρας χιμαιρικών EB σε IMDM περιβάλλον και αναλογία 2:1 (κύτταρα κλώνου προς κύτταρα E14). Παρατίθενται τρεις τομές από το εκάστοτε χιμαιρικό EB, ενώ για τα χιμαιρικά EB του κλώνου C28 η τελευταία στήλη παρουσιάζει μεγαλύτερης μεγέθυνσης απεικονίσεις όπου αναδεικνύεται ο κυτταρικός διαχωρισμός των κυττάρων C28 στην εξωτερική στοιβάδα. Κλίμακα 50μm εκτός από την τελευταία στήλη 20μm.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται σαφές ότι η θέση των GFP⁺ κυττάρων (κύτταρα κλώνων) ακολουθεί το αναπτυξιακό τους δυναμικό. Η χρήση του κλώνου A11 ως αρνητικού μάρτυρα, επιβεβαίωσε στο ακέραιο την υπόθεση του κυτταρικού διαχωρισμού με την απόλυτα τυχαία ανάμειξή του με τα κύτταρα E14 σε όλες τις στοιχειομετρικές αναλογίες και περιβάλλοντα διαφοροποίησης (IMDM και GMEM). Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει πραγματοποιηθεί ένα αντίστοιχο πείραμα δημιουργίας χιμαιρικών EB μεταξύ «φυσιολογικών» EBK (Smo^{+/+}) και EBK από Smo^{-/-} ποντίκι⁽¹¹²⁾. Τα μεταλλαγμένα αυτά EBK (Smo^{-/-}) δεν είναι ικανά να διαφοροποιηθούν προς εξωδερματικής κατεύθυνσης ιστικούς τύπους μιας και το μονοπάτι του Shh είναι ανενεργό στα κύτταρα αυτά. Τα χιμαιρικά λοιπόν EB που περιγράφονται σε αυτή την εργασία εμφανίζουν πανομοιότυπο φαινότυπο με τα δικά μας (EB μεταξύ κυττάρων E14 και του κλώνου C28) διαχωρίζοντας τα Smo^{-/-} EBK στην επιφάνεια των EB και τα «φυσιολογικά» EBK στο εσωτερικό⁽¹¹²⁾. Το εντυπωσιακό σε αυτή τη συσχέτιση είναι ότι από λειτουργική σκοπιά τα Smo^{-/-} EBK και ο C28 έχουν σαφείς διαφορές (το σηματοδοτικό μονοπάτι Shh είναι ενεργό στον C28, βλέπε παρακάτω) αλλά το αναπτυξιακό τους δυναμικό είναι πανομοιότυπο. Επιπλέον, σε δυο άλλες εργασίες, που διερευνούν επίσης το φαινόμενο του κυτταρικού διαχωρισμού σε διαφοροποιήσεις EBK μέσω χιμαιρικών EB, διαπιστώθηκαν ανάλογα αποτελέσματα με αυτά του C28 (στα

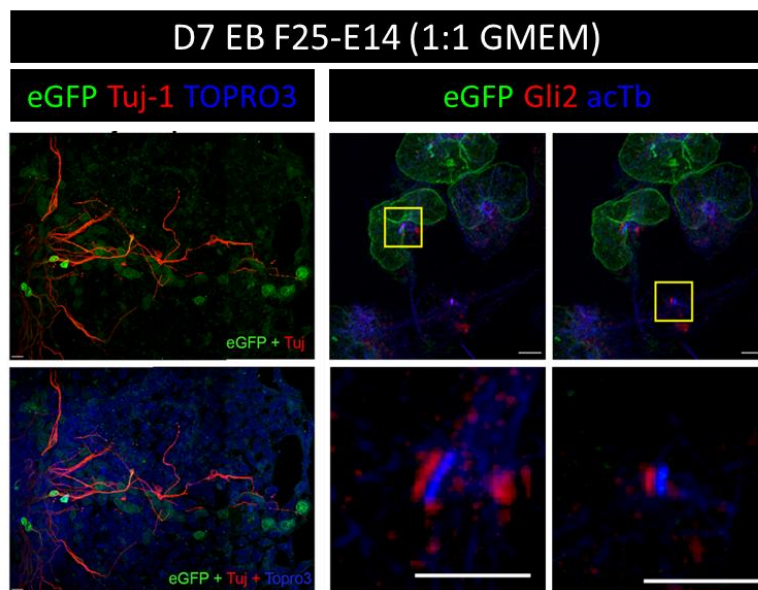
χμαιοικά EB με κύτταρα E14), επιβεβαιώνοντας άλλη μια φορά τα αποτελέσματά μας αλλά και τη συμβολή του κυτταρικού διαχωρισμού στις διαφοροποιήσεις των EBK^(113,114).

3.2.9.2 Μελέτη του κυτταρικού διαχωρισμού κατά τη διαφοροποίηση των EB

Στον δεύτερο κύκλο πειραμάτων διερευνήθηκε η παρουσία κυτταρικού διαχωρισμού κατά τη διαφοροποίηση των EBK μετά το σχηματισμό των EB. Αρχικά ελέγχθηκε η πορεία της διαφοροποίησης των χμαιοικών EB μεταξύ κυττάρων E14-F25 σε στοχευμένες διαφοροποιήσεις νευρο-εξωδερμικής κατεύθυνσης. Πιο αναλυτικά, μετά τον σχηματισμό τους (με την κλασική μέθοδο των αιωρούμενων σταγονιδίων για 2 ημέρες) κάποια χμαιοικά EB μεταφέρθηκαν σε κατάλληλα επιστρωμένα τρυβλία με γυάλινο πυθμένα για να προσκολληθούν και να εκπτυχθούν-διαφοροποιηθούν παρουσία ρετινοϊκού οξέος, ενώ τα υπόλοιπα διατηρήθηκαν σε εναίωρημα (πάλι παρουσία ρετινοϊκού οξέος) για 3 ημέρες και μεταφέρθηκαν για να προσκολληθούν την 5η ημέρα διαφοροποίησης. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψαν ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις σε μορφολογικό αλλά και μοριακό επίπεδο. Γενικά, με την πρόσδεση ενός EB στο τρυβλίο αρχίζει σταδιακά η μετανάστευση κυττάρων περιφερικά από αυτό στον πυθμένα του τρυβλίου. Στα συγκεκριμένα χμαιοικά EB, κατά την 4η ημέρα, η πλειονότητα των κυττάρων στη βάση των EB, αλλά και αυτών που μετανάστευσαν πρώτα περιμετρικά των EB, ήταν GFP⁺, δηλαδή, κύτταρα του κλώνου F25 (Εικόνα 3.47). Στη συνέχεια, τα GFP⁺ κύτταρα επεκτάθηκαν πέραν της περιμέτρου του εναπομείναντος EB (είτε νέα κύτταρα F25 είτε απόγονοι των ήδη υπάρχοντων) και άρχισαν να αλλάζουν μορφολογία (ημέρα 6) σε πιο διαφοροποιημένα κύτταρα (πεπλατυσμένα ή επιμήκη κύτταρα που είχαν αποκτήσει μεμβρανικές απολήξεις) (Εικόνα 3.47). Συμπερασματικά, διαπιστώθηκε ένας πολύ δυναμικός κυτταρικός διαχωρισμός παράλληλα με την πρόοδο της διαφοροποίησης όπου τα κύτταρα του κλώνου F25 πρωτοστατούν στην εκτός EB περιοχή. Στη συνέχεια, ο ανοσοφθορισμός που ακολούθησε την 7η ημέρα έναντι του νευρωνικού μάρτυρα TUJ-1 κατέδειξε την επιτυχή διαφοροποίηση των εν λόγω χμαιοικών EB με την πλειοψηφία των TUJ-1⁺ κυττάρων να είναι ταυτόχρονα και GFP⁺ (Εικόνα 3.48). Τα κύτταρα αυτά (Tuj-1⁺/GFP⁺) βρέθηκαν στην πλειοψηφία τους στην εξωτερική στοιβάδα δίπλα από τη βάση των EB. Έφεραν ιδιαίτερα επιμήκη άξονες νευρωνικού τύπου που εκτείνονται με φορά από τη βάση του EB κάθετα προς τα έξω συνδέοντας διαδοχικούς νευρώνες σχεδόν αποκλειστικά Tuj-1⁺/GFP⁺ κυττάρων.



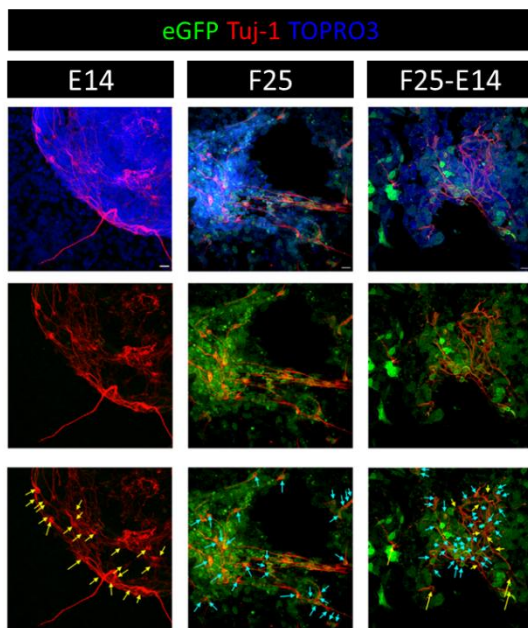
Εικόνα 3.47 Κυτταρικός διαχωρισμός στη διαφοροποίηση των χιμαιρικών EB μεταξύ F25-E14 κυττάρων. Κατά τη διαφοροποίηση των χιμαιρικών F25-E14 EB με αναλογία 1:1 σε GMEM περιβάλλον, τα κύτταρα του κλώνου F25 διαχωρίζονται στη βάση του EB και μεταναστεύουν πρώτα περιφερικά του προσκολλημένου EB στον πυθμένα του τρυβλίου. Στο δείγμα δεξιά η κίτρινη γραμμή διαγράφει τα όρια του εναπομείναν EB.



Εικόνα 3.48 Τα χιμαιρικά F25-E14 EB διαφοροποιούνται επιτυχώς προς νευροεξώδερμα με την πλειονότητα των προκυπτόμενων νευρώνων να απαρτίζονται από κύτταρα του κλώνου F25 (βλέπε κείμενο). Αντιπροσωπευτικές εικόνες χιμαιρικών EB (F25-E14 με αναλογία σχηματισμού 1:1, σε GMEM +PO) για τον νευρωνικό μάρτυρα Tuj-1 (αριστερά) και το Gli2, τελεστή του σηματοδοτικού μονοπατιού Shh (δεξιά). *Αριστερά:* παρατηρείται eGFP θετικότητα στην πλειονότητα των νευρώνων (Tuj-1⁺ κυττάρων), που βρίσκονται στη βάση ή την εκτός EB περιοχή. Επίσης, οι άξονές τους εκτείνονται κάθετα στο EB και να συνδέουν διαδοχικούς νευρώνες της εκτός EB περιοχής. *Δεξιά:* στα κύτταρα της εκτός EB περιοχής διακρίνεται η ενεργότητα του μονοπατιού Shh σε όλα τα κύτταρα με τη διαφορά ότι τα κύτταρα του κλώνου F25 σχηματίζουν μεγαλύτερες ΠΒ και άρα ισχυρότερης έντασης μεταγωγή σήματος. Κλίμακα 20μm αριστερά, 5μm πάνω δεξιά και 1μm κάτω δεξιά.

Στα υπόλοιπα EB σε περιβάλλον GMEM (αυτούσιων E14, F25 και χιμαιρικών E14-F25 κυττάρων) που μεταφέρθηκαν την 5^η ημέρα για προσκόλληση και παρατηρήθηκαν την 7^η για το δείκτη Tuj-1 διαπιστώθηκε και πάλι η αυξημένη ικανότητα των F25 κυττάρων

έναντι των E14 να διαφοροποιούνται προς νευρώνες. Πιο συγκεκριμένα, τα EB των E14 βρέθηκαν να αναπτύσσονται σε μέγεθος περισσότερο από τα αντίστοιχα των F25 ή τα χμιαρικά και να διατηρούν τη μορφολογία ενός τεράστιου EB το οποίο περιβάλλεται από ένα μονοστρωματικό «χαλί» κυττάρων στον πυθμένα του τρυβλίου που εκτείνεται σε απόσταση τουλάχιστον όση και η ακτίνα του EB (Εικόνα 3.49). Επιπλέον, στα EB των E14 κυττάρων οι νευρώνες που αναπτύχθηκαν βρέθηκαν σχεδόν αποκλειστικά στην περιφέρειά του και μάλιστα στην πλειονότητά τους κοντά στη βάση του EB. Οι άξονές τους εκτείνονται παράλληλα, επαπτόμενοι στην επιφάνεια των EB, και συνδέουν διαδοχικούς νευρώνες, ενώ σε ελάχιστες περιπτώσεις εκτείνονταν κάθετα στην επιφάνεια του EB προς την περιβάλλουσα μονή στοιβάδα κυττάρων. Τα αντίστοιχα χμιαρικά EB και αυτά του κλώνου F25, αν και μικρότερα σε μέγεθος, έχαναν γρήγορα τη μορφολογία του EB από τη μετανάστευση των κυττάρων στον πυθμένα του τρυβλίου (Εικόνα 3.49). Εκεί, έξω από τα EB, οι νευρώνες βρέθηκαν περισσότεροι (συγκριτικά με αυτούς των αντίστοιχα διαφοροποιημένων κυττάρων E14), με τους άξονές τους να εκτείνονται κι αυτοί παράλληλα συνδέοντας διαδοχικούς νευρώνες, αλλά, κάθετα των EB (με φορά από τη βάση/επιφάνεια του EB προς τα έξω). Συγκριτικά, οι νευρώνες που αναπτύχθηκαν στα EB των κυττάρων E14 ήταν λιγότεροι από αυτούς των EB του κλώνου F25 (Εικόνα 3.49). Η παραπάνω αναλογία φαίνεται να μειώνεται ακόμα περισσότερο στα χμιαρικά EB, όπου οι $Tuj-1^+/eGFP^+$ νευρώνες υπερτερούν αισθητά των $Tuj-1^+/eGFP^-$ (Εικόνες 3.48 και 3.49).

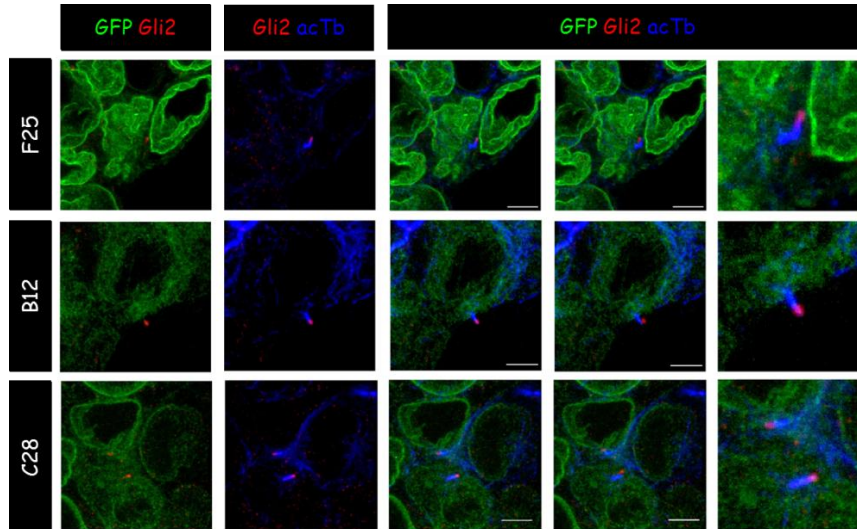


Εικόνα 3.49 Τα κύτταρα του κλώνου F25 διαφοροποιούνται προς νευροεξώδερμα με καλύτερη απόδοση από ότι τα κύτταρα E14 σε αυτούσια ή χμιαρικά EB (βλέπε κείμενο). Αντιπροσωπευτικές εικόνες του δείκτη Tuj-1 στα EB των αναγραφόμενων συστάσεων. Παρατηρείται πως τα κύτταρα του κλώνου F25 διαφοροποιούνται προς νεύρο (τυρκουάζ βέλη) με μεγαλύτερη απόδοση από ότι τα κύτταρα E14 (κίτρινα βέλη), με τη διαφορά αυτή να αναδεικνύεται πιο καθαρά στα F25-E14 χμιαρικά EB. Κλίμακα 20 μ m.

Τη διαφορά αυτή στο δυναμικό ή την απόδοση της διαφοροποίησης ίσως να δικαιολογεί μια άλλη διαφορά που παρατηρήσαμε στους αρχικούς αδιαφοροποίητους

πληθυσμούς των κυττάρων E14 και F25. Στα αδιαφοροποίητα κύτταρα F25 το μονοπάτι Shh είναι ενεργό και οι ΠΒ τους μεγαλύτερες σε μήκος (Εικόνα 3.50). Το μονοπάτι αυτό είναι απαραίτητο για την τελική διαφοροποίηση των EBK προς νευρώνες ($Nestin^+$ και $Tuj-1^+$) και τυχόν απώλειά του οδηγεί σε μερική διαφοροποίηση προς την εξωδερμική κατεύθυνση ($Nestin^{+/-}$ και $Tuj-1^-$)⁽¹¹²⁾. Έτσι, στα χημειρικά δείγματα της 7^{ης} ημέρας διαφοροποίησης πραγματοποιήθηκε έλεγχος για τυχόν διαφορές στην ενεργότητα του μονοπατιού Shh. Πράγματι, στα κύτταρα της περιφέρειας διαπιστώθηκε τόσο η αριθμητική υπεροχή των GFP^+ κυττάρων έναντι των GFP^- (κύτταρα F25 και E14, αντίστοιχα), όσο και η ποιοτική υπεροχή της έντασης του Gli2 (τελεστή του σηματοδοτικού μονοπατιού Shh) στις μεγαλύτερες ΠΒ των διαφοροποιημένων κυττάρων του κλώνου F25 συγκριτικά με τα αντίστοιχα γειτονικά κύτταρα E14 (Εικόνα 3.48). Με την παρατήρηση αυτή ενισχύεται η άποψη πως ο κυτταρικός διαχωρισμός πληθυσμών με διαφορετικό αναπτυξιακό δυναμικό συμβάλλει καθοριστικά στην πρόοδο και την απόδοση (efficiency) της διαφοροποίησης των EBK.

Αξίζει στο σημείο αυτό να επισημανθεί ότι η παραπάνω διαφορά στην ενεργότητα του σηματοδοτικού μονοπατιού Shh μεταξύ των αδιαφοροποίητων κυττάρων E14 και του κλώνου F25, διαπιστώθηκε και στους άλλους κλώνους του εργαστηρίου μας πλην του A11 (Εικόνα 3.50 και πληροφορίες που δεν παρουσιάζονται). Η παρατήρηση αυτή ενισχύει τα ευρήματα του εργαστηρίου μας για τις διαφορές στην βλαστικότητα των κλώνων με τα πατρικά κύτταρα E14 (οι κλώνοι συμπεριφέρονται ως *primed* EBK). Σε μοριακό πάντως επίπεδο, αναλύοντας εκ νέου παλαιότερα αποτελέσματα δοκιμασίας μικροσυστοιχιών DNA του εργαστηρίου μας, προέκυψε πως το μεταγραφικό προφίλ τόσο των ανενεργών κυττάρων E14 όσο και των ενεργών κλώνων C28, B12 και F25 ως προς το μονοπάτι Shh είναι παρόμοιο (Πίνακας 3.6). Το εύρημα αυτό ίσως επιτρέπει μια εναλλακτική ερμηνεία, ότι δηλαδή το μονοπάτι Shh προφανώς συγκαταλέγεται σε αυτά που αναστέλλονται δυναμικά κατά την καλλιέργεια EBK σε συνθήκες αυτο-ανανέωσης και άρα η αποσιώπησή του θα μπορούσε να είναι δείκτης της κατάστασης πολυδυναμίας (συζητείται εκτενώς στην ενότητα 4.7).



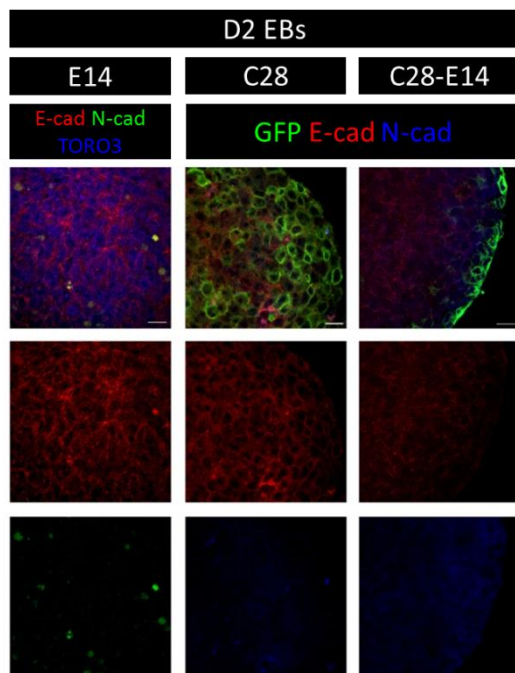
Εικόνα 3.50 Το σηματοδοτικό μονοπάτι Shh βρέθηκε ενεργό στους αδιαφοροποιητούς κλώνους F25, B12 και C28. Στα τρίχρωμα εικονίδια η μεσαία στήλη φέρει μετατοπισμένη επικάλυψη του κόκκινου ψευδοχρώματος και η ακραία δεξιά παραθέτει λεπτομέρεια της αρχικής. Κλίμακα 5μm.

Γονίδιο	E14 - F25	E14 - B12	E14 - C28
Smo	<1,52	<1,42	<1,9
Ptch1	<1,23	>1,8	<1,01
Gli1	<1,59	<1,07	<1,31
Gli2	<1,11	<1,03	<1,33
Gli3	<1,19	<1,12	<1,14

Πίνακας 3.6 Συγκριτικά αποτελέσματα της ανάλυσης μικροσυστοιχιών DNA του εργαστηρίου μας σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης των βασικών γονιδίων που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι Shh μεταξύ των κυττάρων E14 και των κλώνων του *LBR*. Πέραν της παραπλήσιας έκφρασης των περισσότερων γονιδίων, παρατηρούμε ότι σε καμία περίπτωση δεν υπάρχει ουσιαστική διαφορά (της τάξης του διπλάσιου- 2-fold change) μεταξύ τους, ενώ οι κλώνοι –σχεδόν απόλυτα– βρέθηκαν να εκφράζουν τα εν λόγω γονίδια σε μεγαλύτερα επίπεδα από ότι τα κύτταρα E14.

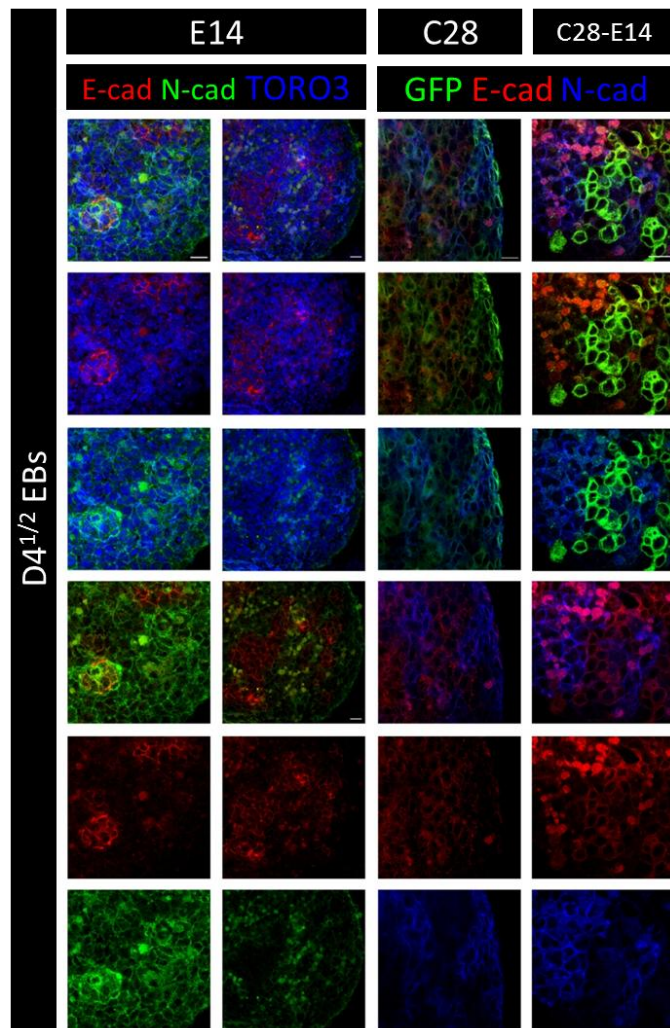
Στη συνέχεια μελετήθηκε η πορεία της διαφοροποίησης έπειτα από τον επιλεκτικό διαχωρισμό του κλώνου C28 σε χμαιρικά EB μαζί με κύτταρα E14. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν τρισδιάστατες διαφοροποιήσεις E14 και C28 κυττάρων αλλά και χμαιρικών μεταξύ αυτών. Όπως και στην περίπτωση του κλώνου F25 παραπάνω, μελετήθηκαν τα μορφολογικά αλλά και τα μοριακά χαρακτηριστικά των διαφοροποιήσεων μετά το σχηματισμό των EB. Η μοριακή ανάλυση περιελάμβανε τον εντοπισμό αλλά και την κατανομή των μορίων E- και N-cadherin στα παραπάνω EB κατά τη 2η και 4η ημέρα διαφοροποίησης. Είναι γνωστό πως τα EBK εκφράζουν την E- ισομορφή, την οποία και αντικαθιστούν με την N- ισομορφή όταν διαφοροποιούνται⁽¹¹⁶⁾. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν αρκετά πολύπλοκα. Η διαφοροποίηση του κλώνου C28 βρέθηκε να διαφέρει από αυτή των κυττάρων E14 και επιπλέον η συμπεριφορά τους να είναι

διαφορετική από τις χμαιορικές διαφοροποιήσεις. Πιο αναλυτικά, κατά τη 2^η ημέρα διαφοροποίησης τα κύτταρα E14 είχαν αισθητά πιο διάχυτη περιμεμβρανική-κυτταροπλασματική E-cadherin από τα κύτταρα του κλώνου C28, ενώ απουσίαζε η N-μορφή και από τα δυο κυτταρικά συστήματα (Εικόνα 3.51). Στα χμαιορικά όμως EB παρατηρήθηκε ακόμα πιο ασθενής και διάχυτη E-cadherin στα κύτταρα E14 και απουσία από τα κύτταρα του κλώνου C28 (Εικόνα 3.51). Επιπλέον, η N- μορφή εντοπίστηκε πολύ αμυδρά στην εξωτερική επιφάνεια των EB με βάθος ~4 κύτταρα, στην περιοχή δηλαδή που εδρεύουν τα κύτταρα του κλώνου C28 (Εικόνες 3.46, 3.51 και 3.53). Οι διαφορές την επόμενη ημέρα μελέτης (ημέρα 4½ της διαφοροποίησης) εμφανίστηκαν πιο έντονες. Στα EB των κυττάρων E14 και οι δυο μορφές cadherin εμφανίζουν ειδικό και έντονο μεμβρανικό εντοπισμό, με τα κύτταρα της εξωτερικής στοιβάδας να φέρουν αποκλειστικά την N- μορφή και στο εσωτερικό του EB οι E- και N- μορφές να αλληλοαποκλείονται (Εικόνα 3.52). Τα EB του κλώνου C28 διαφέρουν από τα παραπάνω στο ότι η εξωτερική στοιβάδα των EB έχει σε ένα πολύ μικρό ποσοστό κύτταρα που εκφράζουν E-cadherin και επιπλέον τα κύτταρα που εκφράζουν την N- μορφή εμφανίζουν παράλληλα πολύ πιο έντονο σήμα GFP (Εικόνα 3.52).



Εικόνα 3.51 Κατανομή E- και N-cadherin σε EB των αναγραφόμενων συστάσεων. Αντιπροσωπευτικές εικόνες EB κυττάρων E14, C28 και χμαιορικών E14-C28 για τις E- και N-cadherin κατά τη 2^η ημέρα διαφοροποίησης σε IMDM περιβάλλον (βλέπε κείμενο). Κλίμακα 20μm.

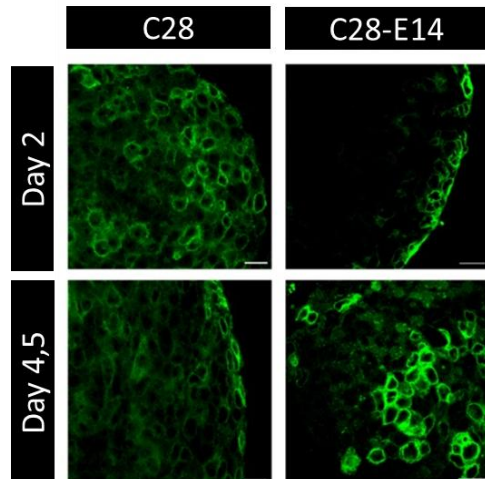
Εικόνα 3.52 Κατανομή E- και N-cadherin σε EB των αναγραφόμενων συστάσεων. Αντιπροσωπευτικές εικόνες EB κυττάρων E14, C28 και χμαιοτικών E14-C28 για τις E- και N-cadherin κατά τη 4^{1/2} ημέρα διαφοροποίησης σε IMDM περιβάλλον (βλέπε κείμενο). Κλίμακα 20μm.



Η εικόνα, τέλος, στα χμαιοτικά EB είναι πολύ διαφορετική. Τα κύτταρα της εξωτερικής στοιβάδας δεν αποτελούνται αποκλειστικά από GFP⁺ κύτταρα, ενώ στο εσωτερικό των EB έχουν εισέλθει κύτταρα του κλώνου C28 αλλά με ιδιαίτερα εξασθετισμένο GFP σήμα (Εικόνες 3.52 και 3.53). Οι E- και N- ισομορφές cadherin διατηρούν τη μη συνέκφρασή τους αλλά παρατηρείται απόλυτη ταύτιση της έκφρασης της N- ισομορφής από τα GFP⁻ κύτταρα. Επιπλέον, τα κύτταρα C28 με έντονο GFP της εξωτερικής στοιβάδας βρέθηκαν να συν-εκφράζουν E-cadherin.

Το συμπέρασμα που προκύπτει από τα παραπάνω δεδομένα είναι πως η αρχική διαφορά του αναπτυξιακού δυναμικού μεταξύ δυο ομοιογενών πληθυσμών (κύτταρα E14 και C28) που αναμειγνύονται σε χμαιοτικές καλλιέργειες διαφοροποίησης (μέσω EB) τα αναγκάζει να διαχωρίζονται τοπολογικά στα EB. Σε αυτόν το κυτταρικό διαχωρισμό (cell sorting) ενδεχομένως συμβάλει και η διαφορά της μεμβρανικής τους τάσης (MT, cortical tension) (βλέπε προηγούμενη ενότητα). Με την πρόοδο της διαφοροποίησης, καθένας από αυτούς τους πληθυσμούς διαφοροποιείται περαιτέρω και επηρεάζεται διαφορετικά από τα

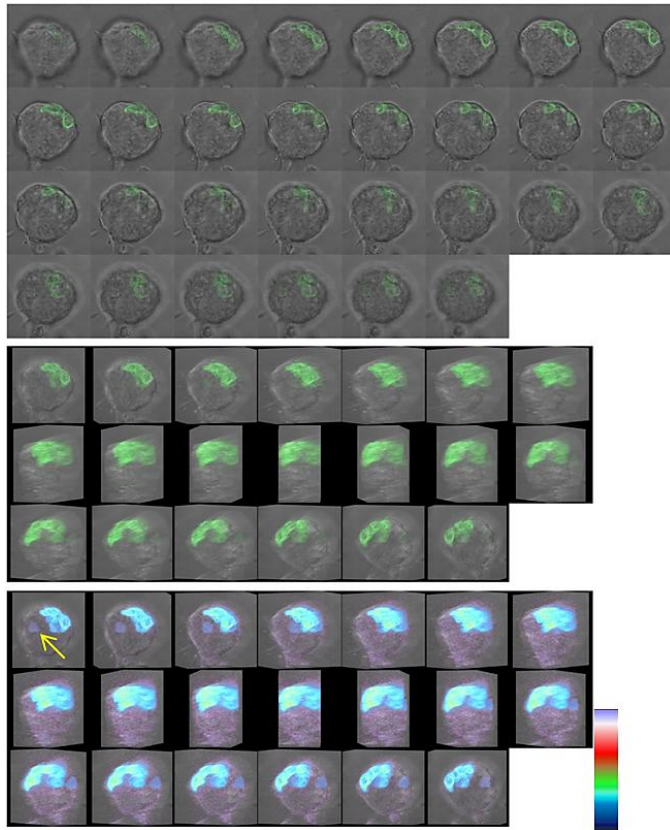
γεινιάζοντα κύτταρα (σύγκρινε τα κύτταρα του κλώνου C28 στα αυτούσια και τα χιμαιρικά EB ως προς την παρουσία E- και N- cadherin κατά τη 2η ημέρα διαφοροποίησης στην Εικόνα 3.51). Οι νέοι πληθυσμοί που προκύπτουν συνεχίζουν να διαχωρίζονται τοπολογικά (βλέπε τα κύτταρα του κλώνου C28 με βάση την ένταση του GFP που εκφράζουν κατά την 4η ημέρα διαφοροποίησης στην Εικόνα 3.52).



Εικόνα 4.53 Κατανομή των κυττάρων του κλώνου C28 σε αυτούσιας και χιμαιρικές διαφοροποιήσεις μέσω EB. Αντιπροσωπευτικές απεικονίσεις EB των αναγραφόμενων συστάσεων σε IMDM περιβάλλον. Παρατηρείται ο κυτταρικός διαχωρισμός του κλώνου C28 τόσο σε σχέση με τα κύτταρα E14 στις χιμαιρικές διαφοροποιήσεις από μόλις τη 2^η ημέρα διαφοροποίησης όσο και μεταξύ τους, δηλαδή C28 κυττάρων με έντονη και ασθενή παρουσία GFP (βλέπε κείμενο). Κλίμακα 20μm.

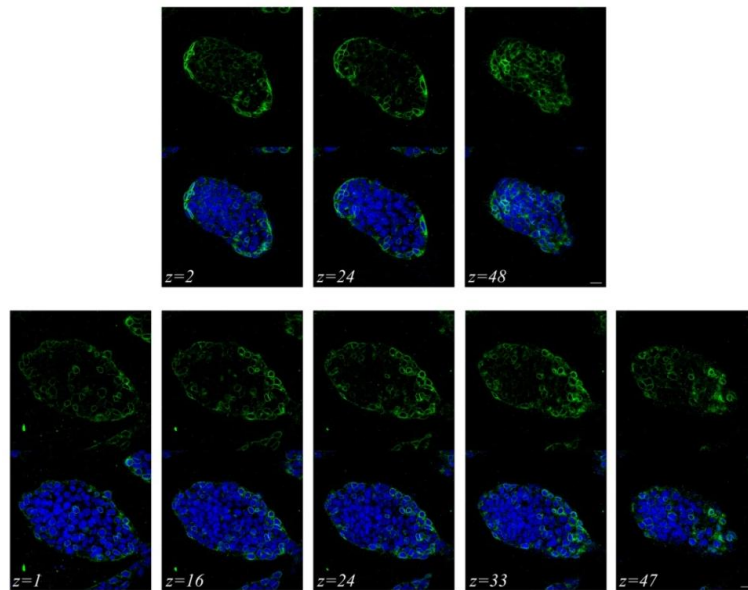
3.2.9.3. Μελέτη του κυτταρικού διαχωρισμού στην αδιαφοροποίητη κατάσταση

Ο κυτταρικός διαχωρισμός βασίζεται σε φυσικές (κυρίως μηχανικές) ιδιότητες των κυττάρων και είναι ανεξάρτητος από το αναπτυξιακό στάδιο των κυττάρων που διαχωρίζονται (ανασκοπείται εκτενώς στο ⁽¹¹⁰⁾). Με τα πειράματα που περιγράφηκαν στις παραπάνω δυο ενότητες διερευνήθηκε η συμβολή του κατά την *in vitro* διαφοροποίηση EBK. Ωστόσο, με δεδομένη τη συμπεριφορά των κλώνων του LBR ως *primed* EBK (πληροφορίες του εργαστηρίου μας που επιβεβαιώνονται από τα παραπάνω πειράματα) διερευνήθηκε η παρουσία κυτταρικού διαχωρισμού σε αντίστοιχα με τα προηγούμενα μείγματα κυττάρων, όμως αυτή τη φορά σε συνθήκες αυτο-ανανέωσης. Έτσι θα μπορέσουμε να εξακριβώσουμε εάν οι διαφορές στο αναπτυξιακό δυναμικό των κλώνων έναντι των πατρικών E14 είναι επαρκείς ώστε να προκαλέσουν το διαχωρισμό τους χωρίς εξωγενή πίεση (απουσία μηνυμάτων διαφοροποίησης) και, μάλιστα, σε ένα περιβάλλον όπου η δυνατότητα διεξαγωγής ΑΚΔ απουσιάζει.



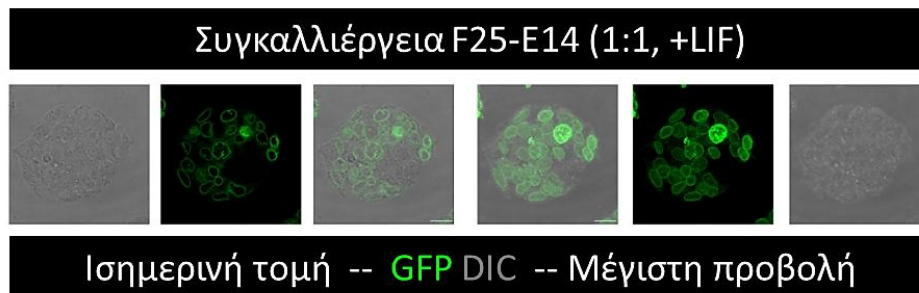
Εικόνα 3.54 Συγκαλλιέργεια κυττάρων E14 και του κλώνου C28 σε συνθήκες αυτο-ανανέωσης. Καταγραφή της θέσης των κυττάρων του κλώνου C28 σε σχέση με τα κύτταρα E14 μετά από 24 ώρες έκπτυξης σε πραγματικό χρόνο. Παρατηρείται η κατανομή των κυττάρων C28 στην περιφέρεια της αποικίας τόσο από τομές της αποικίας (κορυφαίο σύνολο εικόνων), όσο και στην τριδιάστατη αναπαράγωγή της (μεσαίο και κατώτερο σύνολο εικόνων σταδιακής προβολής 0°-180° επί του y άξονα). Η κάτω τριδιάστατη αναπαράγωγή φέρει πολύχρωμη αναπαράσταση του GFP σήματος όπως καταγράφηκε αρχικά σύμφωνα με τον οδηγό στα δεξιά για την καλύτερη αποτύπωση του φαινομένου (καθιστά διακριτά και τα πιο ασθενή GFP⁺ κύτταρα, βλέπε κίτρινο βέλος).

Σε πρώτη φάση, δοκιμάστηκε μια συγκαλλιέργεια αδιαφοροποίητων κυττάρων E14 και του κλώνου C28 (του κλώνου με μειωμένη MT) σε διάφορες στοιχειομετρικές αναλογίες. Στις χμιαϊκές αποικίες που προέκυψαν τα GFP⁺ κύτταρα είχαν μια χαρακτηριστική κατανομή αποκλειστικά και μόνο στην επιφάνειά τους, τόσο στη ζωντανή παρακολούθηση μετά από 24 ώρες έκπτυξης (Εικόνα 3.54), όσο και σε μονιμοποιημένα δείγματα 48 ωρών (Εικόνα 3.55). Το αποτέλεσμα αυτό σε συνδυασμό με τα προηγούμενα (χμιαϊκά EB), δείχνει ξεκάθαρα πως τα EBK με διαφορετικό αναπτυξιακό δυναμικό διαχωρίζονται ανεξάρτητα από τα εξωτερικά ερεθίσματα, είτε αυτά προάγουν την αυτο-ανανέωση, είτε τη διαφοροποίηση. Επιπλέον, επιβεβαιώνουν και εμπλουτίζουν προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας σχετικά με την *primed* βλαστική κατάσταση του κλώνου C28 προς ενδόδερμα.



Εικόνα 3.55 Συγκαλλιέργεια κυττάρων E14 και του κλώνου C28 σε συνθήκες αυτο-ανανέωσης. Καταγραφή της θέσης των κυττάρων του κλώνου C28 σε σχέση με τα κύτταρα E14 μετά από 48 ώρες έκπτυξης σε μονιμοποιημένα δείγματα. Όπως και στην Εικόνα 3.54 παρατηρείται ο διαχωρισμός των κυττάρων του κλώνου C28 από τα κύτταρα E14 στη βασική και εξωτερική επιφάνεια των αποικιών. Κλίμακα 20μm.

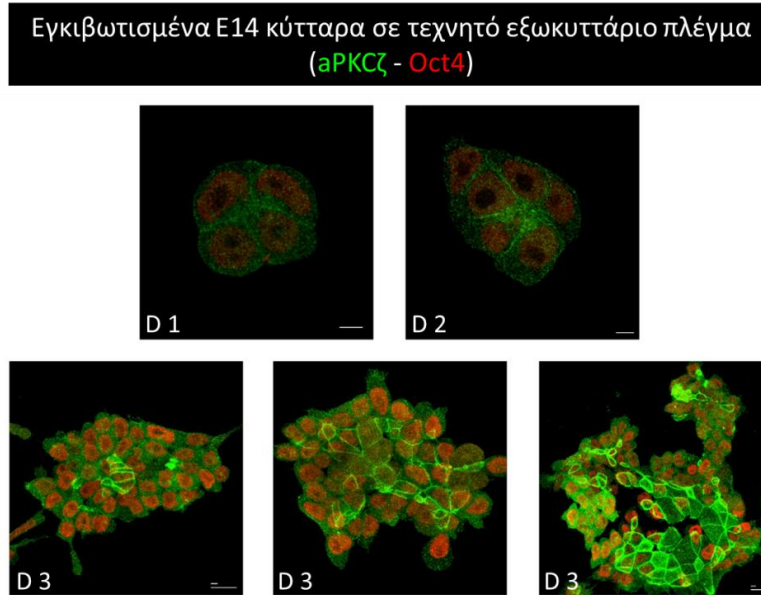
Κατά ανάλογο τρόπο διερευνήθηκε η συγκαλλιέργεια μεταξύ κυττάρων E14 και F25. Σε αυτή την περίπτωση δεν είναι δυνατή η αξιολόγηση της συμβολής της MT στον κυτταρικό διαχωρισμό των δυο κυτταρικών τύπων και αυτό διότι δεν υπάρχει ένδειξη διαφοροποίησης του κλώνου F25 από τα πατρικά κύτταρα E14, τα οποία ως EBK έχουν αυξημένη MT (ανασκοπείται στο ⁽¹¹⁷⁾). Κρίνοντας πάντως από το αποτέλεσμα του σχηματισμού των χιμαιρικών EB μεταξύ κυττάρων F25-E14 σε GMEM περιβάλλον, ενδεχομένως να υφίσταται μια μικρή διαφορά υπέρ των κυττάρων του κλώνου F25, και αυτό διότι παρατηρήθηκε ο μερικώς έκκεντρος εντοπισμός των κυττάρων F25 στα χιμαιρικά EB (βλέπε Εικόνα 3.45 και συναφές κείμενο). Ωστόσο, δεν πρέπει να παραβλεφθεί ότι η διαπίστωση αυτή έγινε σε διαφοροποιούμενα κύτταρα. Στην αδιαφοροποίητη τώρα κατάσταση, η συγκαλλιέργεια των κυττάρων F25 με τα E14 έδειξε πράγματι το ίδιο πρότυπο με αυτό της 2^{ης} ημέρας χιμαιρικών EB σε GMEM, δηλαδή ένα σχετικά πιο έκκεντρο εντοπισμό των κυττάρων του κλώνου F25 (Εικόνα 3.56). Συνεπώς, παρατηρούμε για μια ακόμα φορά κυτταρικό διαχωρισμό σε συνθήκες αυτο-ανανέωσης (απουσία ΑΚΔ), αν και πιο ήπιο από την περίπτωση του κλώνου C28.



Εικόνα 3.56 Κατανομή των κυττάρων του κλώνου F25 σε συγκαλλιέργειες με κύτταρα E14 σε συνθήκες αυτο-ανανέωσης. Παρατηρείται μια σχετικά πιο έντονη κατανομή των κυττάρων του κλώνου F25 συγκριτικά με τα πατρικά κύτταρα E14, όπως και στα αντίστοιχα χημειρικά EB (βλέπε αντίστοιχο κείμενο και Εικόνα 3.45). Κλίμακα 20 μ m.

3.2.10 Διερεύνηση του πρωτοκόλλου έκπτυξης EBK των Bedzhon & Zernika-Goetz

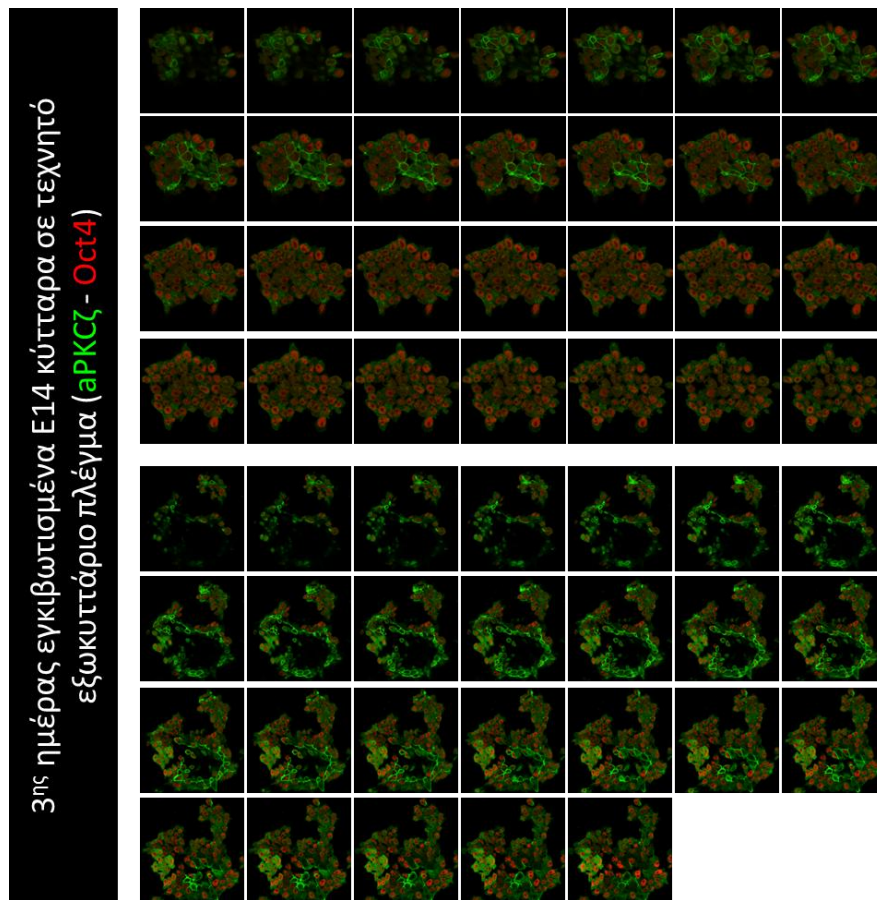
Στο πρόσφατο παρελθόν, δημοσιεύτηκε μια μελέτη EBK ποντικού τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* περιβάλλον⁽¹¹⁸⁾. Ένα από τα ευρήματα της εν λόγω δημοσίευσης ήταν και η ανακάλυψη ενός νέου τρόπου έκπτυξης (πρωτοκόλλου) «εγκιβωτισμένων» EBK σε τεχνητό εξωκυττάριο πλέγμα (*matrigel matrix*), συνθήκη που προσιδιάζει την *in vivo* εμβρυονική ανάπτυξη σε *in vitro* περιβάλλον. Κατά τον έλεγχο της εμβυογένεσης (*in vivo*) παρατήρησαν ότι στα συναθροισμένα σε σφαιρική δομή EBK αρχίζει να σχηματίζεται ένας αυλός στο κέντρο (σχηματισμός ροζέτας), με ταυτόχρονη εμφάνιση κορυφο-βασικής πολικότητας (*apico-basal polarity*) στα EBK που «βλέπουν» στον αυλό. Η δυνατότητα αναπαραγωγής *in vitro* του φαινομένου αυτού ήταν το έναυσμα για να πραγματοποιήσουμε μια σειρά αντίστοιχων πειραμάτων (στο βαθμό του δυνατού, από υλικοτεχνική άποψη) διερευνώντας την παρουσία ΑΚΔ που μπορεί να προκύπτουν με την εμφάνιση της κορυφο-βασικής πολικότητας. Δυστυχώς, το διαθέσιμο *matrigel matrix* του εργαστηρίου μας (μεταξύ άλλων) είναι διαφορετικό από αυτό της δημοσίευσης κι έτσι δεν κατέστη δυνατή η πιστή αναπαραγωγή του προτεινόμενου πρωτοκόλλου. Παρ' όλα αυτά, διερευνήσαμε την πρόοδο των EBK σε «προσαρμοσμένο» πρωτόκολλο και παρατηρήσαμε πως τα κύτταρα παραμένουν βλαστικά για 72 ώρες (Oct4 θετικά) απουσία LIF και αποκτούν κορυφο-βασική πολικότητα (έντονος μεμβρανικός εντοπισμός aPKCζ στην κορυφαία μεμβρανική επιφάνεια κυττάρων της ανώτερης στοιβάδας), όπως και στη δημοσίευση (Εικόνες 3.57, 3.58 και 3.59)⁽¹¹⁸⁾. Από την άλλη, τα EBK δεν αναπτύσσονται σε μορφή ροζέτας, αλλά σαν μια άμορφη τρισδιάστατη καλλιέργεια (Εικόνες 3.57, 3.58 και 3.59).



Εικόνα 3.57 Εμφάνιση πολικότητας σε EBK μετά από έκπτυξή τους σε τρισδιάστατο εξωκυττάριο πλέγμα (matrigel matrix). Εγκιβωτισμένα EBK σε τρισδιάστατο εξωκυττάριο πλέγμα (matrigel matrix) χωρίς LIF σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Bedzhov και Zernicka-Goetz⁽¹¹⁸⁾ εμφανίζουν πολικότητα χωρίς να χάνουν τη βλαστικότητα τους (βλέπε κείμενο). Κλίμακα 5μm στην πρώτη σειρά και 5μm η μικρή και 20μm η μεγάλη στην κάτω σειρά.

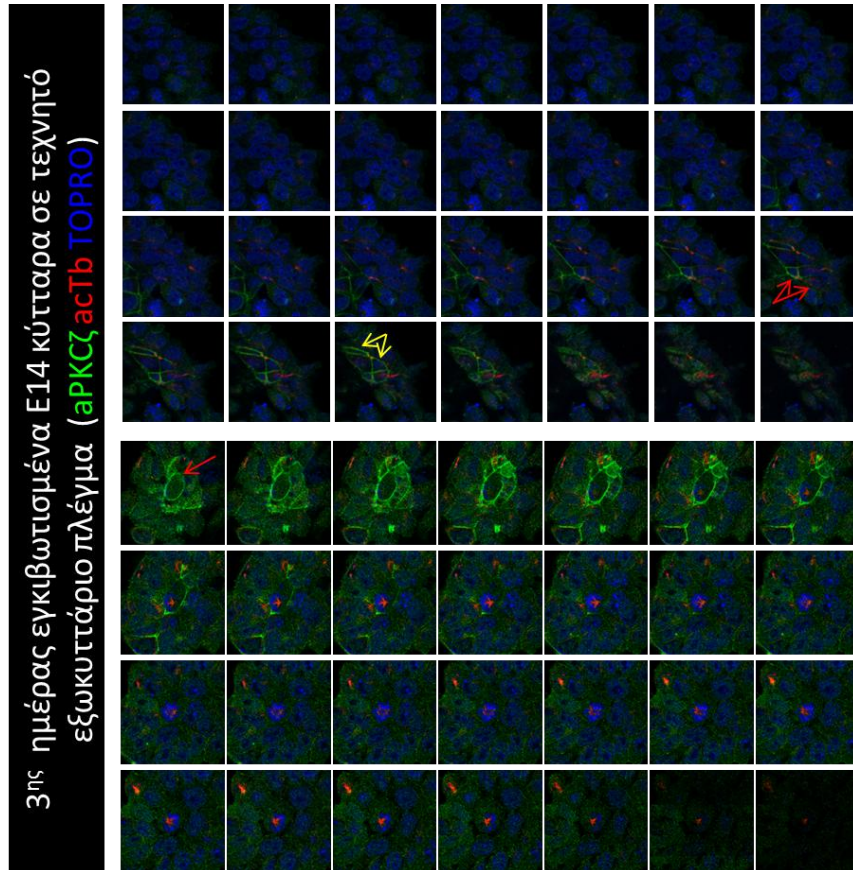
Υπενθυμίζεται εδώ πως βασική αρχική προϋπόθεση για μια ΑΚΔ είναι η παρουσία κορυφο-βασικής πολικότητας (ενδεικτικά ^(19,47)). Κάτι τέτοιο παρατηρήθηκε και μάλιστα προοδευτικά (από τη 2η ημέρα), στην κορυφαία στοιβάδα πολλών EBK, σε αντίθεση με την έκφραση του δείκτη πολυδυναμίας Oct4 ο οποίος σταδιακά (από την 3η ημέρα) αρχίζει να χάνεται αποκλειστικά στα κύτταρα που βρίσκονται στη βάση του τρυβλίου (Εικόνες 3.57 και 3.58). Στην ανάλυσή μας διερευνήσαμε και τη θέση της ατράκτου, δηλαδή την πιθανότητα ΑΚΔ, στα πολωμένα μιτωτικά κύτταρα κατά την 3^η ημέρα έκπτυξης. Πράγματι, πολλά διαιρούμενα κύτταρα εμφανίζουν στοιχισμένη άτρακτο με βάση την κορυφο-βασική πολικότητα (Εικόνα 3.59, κάτω). Επιπλέον, αρκετά από τα πρώιμα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν (και παραμένουν συνδεδεμένα με μεσόσωμα) έχουν κληρονομήσει ασύμμετρα την πρωτεΐνη αPKCζ (Εικόνα 3.59, άνω). Συνεπώς, τα κύτταρα αυτά πραγματοποιούν ΑΚΔ. Συνηγορητική προς το τελευταίο, είναι και η παρατήρηση πως στα δείγματα της ίδιας ημέρας τα κορυφαία κύτταρα (*apical cells*) διατηρούν τη βλαστικότητά τους (Oct4 θετικά) σε αντιδιαστολή με πολλά βασικά (*basal cells*) τα οποία βρέθηκαν ασθενώς θετικά (με μεγάλους πυρήνες) ή αρνητικά για τον παράγοντα Oct4 (Εικόνα 3.58). Πάντως, αξιοσημείωτη είναι και η πιθανότητα της μη παρουσίας ΑΚΔ αλλά ανάκτησης διαφορετικής κυτταρικής τύχης δυο αδελφών κυττάρων λόγω διαφορετικής ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών μέσω των ΠΒ τους. Αυτό δικαιολογείται από την έντονη

παρουσία ΠΒ στην κορυφαία θέση των κυττάρων της ανώτερης στοιβάδας και τη σχετική απουσία από τα κύτταρα κατώτερων στοιβάδων (Εικόνα 3.60).

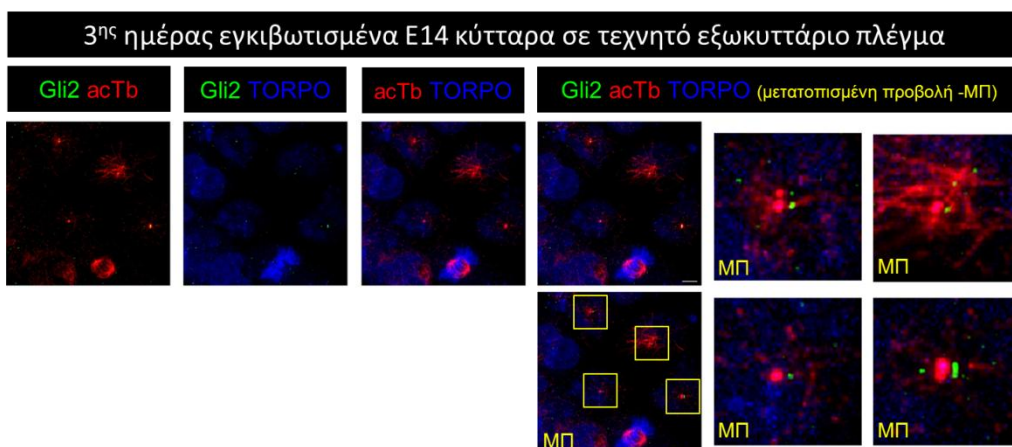


Εικόνα 3.58 Παράθεση όλων των τομών για δυο από τα δείγματα της Εικόνας 3.57. Παρατηρείται έντονος μεμβρανικός εντοπισμός της aPKCζ πρωτεΐνης τις κορυφαίες επιφάνειες/κύτταρα της αποικίας και ταυτόχρονα απώλεια ή μείωση της παρουσίας Oct4 από τα κύτταρα του πυθμένα (τα οποία εμφανίζουν σε πολλές περιπτώσεις και αυξημένου μεγέθους πυρήνες) (βλέπε κείμενο).

Έτσι, εκτός της διαφοράς στην παρουσία ΠΒ στα κορυφαία έναντι των βασικότερων κυττάρων, είναι προφανής και η διαφορά στην δυνατότητα πρόσβασης στα αντίστοιχα μηνύματα. Στα μηνύματα αυτά ίσως συγκαταλέγονται και ο βαθμός προσκόλλησης (*adhesion*) μεταξύ των κορυφαίων κυττάρων/επιφανειών με τα βασικά κύτταρα/επιφάνειες. Τέτοιες διαφορές έχει δειχθεί ότι επηρεάζουν τις κυτταρικές διαιρέσεις προάγοντας φαινόμενα NRTS/ΑΚΔ σε ΒΚ σκελετικών μυών ποντικού⁽¹¹⁹⁾. Τέλος, όσο ενδιαφέροντα κι αν φαίνονται τα παραπάνω ευρήματα, η έκπτυξη ΕΒΚ υπό τις παραπάνω συνθήκες παραμένει ασαφής, εγείροντας δικαιολογημένα ερωτηματικά ως προς τη βιολογική ερμηνεία της διαδικασίας που (αναγκαστικά) ακολουθήσαμε.



Εικόνα 3.59 Ενδείξεις ΑΚΔ στα κύτταρα του πρωτοκόλλου των Bedzhon και Zernicka-Goetz⁽¹¹⁸⁾. Παράθεση όλων των τομών δειγμάτων μετά από 3 ημέρες έκπτυξης σε τρισδιάστατο εξωκυττάριο πλέγμα (matrigel matrix) έπειτα από ανοσοφθορισμό για aPKCζ και ακετυλιωμένη τουμποουλίνη (βλέπε κείμενο). *Άνω τομές:* ασύμμετρη κατανομή (προϊόν ΑΚΔ) της aPKCζ πρωτεΐνης σε περιπτώσεις θυγατρικών κυττάρων που συνδέονται ακόμα με μεσόσωμα (κόκκινα βέλη) ή συμμετρική κατανομή σε άλλα ζεύγη θυγατρικών κυττάρων (κίτρινα βέλη). *Κάτω τομές:* παρατηρείται η στοίχιση της μιτοτικής ατρακτού με βάση την πολικότητα (απαραίτητη προϋπόθεση για ΑΚΔ) στο κύτταρο που δείχνει το κόκκινο βέλος.



Εικόνα 3.60 Τα κορυφαία και πολωμένα κύτταρα του πρωτοκόλλου των Bedzhon και Zernicka-Goetz⁽¹¹⁸⁾ σχηματίζουν ΠΒ και εμφανίζουν ενεργοποιημένο το σηματοδοτικό μονοπάτι Shh. Ανοσοφθορισμός σε δείγματα ΕΒΚ καλλιιεργημένων για 3 ημέρες με το παραπάνω πρωτόκολλο έναντι του τελεστή Gli2 του σηματοδοτικού μονοπατιού Shh μαζί με ακετυλιωμένη τουμποουλίνη. Παρατηρείται ότι, σχεδόν αποκλειστικά, στα κορυφαία (πολωμένα) κύτταρα της αποικίας σχηματίζονται ΠΒ, οι οποίες είναι θετικές για την πρωτεΐνη Gli2 (βλέπε κείμενο). Κλίμακα 5μm.

Κεφάλαιο 4 Συζήτηση

Με βάση τα αποτελέσματα που περιγράφηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο η παρούσα διδακτορική διατριβή συνεισφέρει επτά παρατηρήσεις-συμπεράσματα στα δημοσιευμένα δεδομένα του πεδίου των ΒΚ και πιο συγκεκριμένα σε ότι αφορά την παρουσία ΑΚΔ κατά τη διαφοροποίηση ΒΚ. Στις ενότητες που ακολουθούν τα παρακάτω σημεία συζητούνται αναλυτικά σε συνάρτηση με τη διεθνή βιβλιογραφία.

1. *Η ΑΚΔ σε in vitro καλλιέργειες λευχαιμικών κυτταρικών σειρών και νωπά δείγματα ασθενών.*
2. *Η ΑΚΔ στα πρώτα στάδια διαφοροποίησης EBK ποντικού.*
3. *Η υπόθεση της ανάκτησης διαφορετικής κυτταρικής τύχης μέσω της ετερόχρονης ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού Shh από τις ΠΒ διαφοροποιούμενων EBK.*
4. *Τα EBK διαφοροποιούνται σε τρεις διαστάσεις απουσία NRTS.*
5. *Η υπόθεση της συμβολής του κυτταρικού διαχωρισμού στις διαφοροποιήσεις των EBK.*
6. *ΑΚΔ παρατηρούνται κατά την έκπτυξη εγκιβωτισμένων EBK σε τρισδιάστατο εξωκυττάριο πλέγμα*
7. *Ανάδειξη πρότυπων δεικτών πολυδυναμίας.*

4.1 Η ΑΚΔ σε in vitro καλλιέργειες λευχαιμικών κυτταρικών σειρών και νωπά δείγματα ασθενών.

Η ΑΚΔ στις νεοπλασίες, όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 1.4, τείνει να υποαντιπροσωπεύεται, εάν όχι εξαλείφεται, συγκριτικά με τον αντίστοιχο φυσιολογικό υγιή ιστό. Ιδιαίτερες προσπάθειες αποσαφήνισης της σχέσης των ΑΚΔ με τη νεοπλασία έχουν καταγραφεί στην περίπτωση των λευχαιμιών. Εκεί, παρατηρήθηκε πως η απώλεια ΑΚΔ όχι μόνο συμβάλει στην εξέλιξη της νόσου αλλά ίσως συμβάλλει ουσιαστικά στην καρκινική εξαλλαγή (περιγράφονται στην ενότητα 1.4). Στην παρούσα μελέτη δεν διαπιστώθηκαν ΑΚΔ παρά τις βιβλιογραφικές προσδοκίες, κυρίως σε ότι αφορά τις κυτταρικές σειρές HL60 και Jurkat^(53,60). Επιπλέον, ούτε στα νωπά δείγματα λευχαιμικών ασθενών καταγράψαμε ΑΚΔ, αλλά σε αυτή την περίπτωση η αιτία προφανώς οφείλεται στην μη ενδεδειγμένη (για υλικοτεχνικούς λόγους) έκπτυξη των δειγμάτων. Κάτι τέτοιο όμως δεν αφορά τα αντίστοιχα δείγματα τα οποία μονιμοποιήθηκαν και επεξεργάστηκαν άμεσα. Ωστόσο, ακόμα κι εκεί ο αριθμός των διαιρούμενων κυττάρων που προέκυψε ήταν πολύ μικρός για να στοιχειοθετήσει ένα ουσιαστικό συμπέρασμα. Σε αυτό ίσως συνέβαλε

το ότι η ανανέωση των αιμοποιητικών κυττάρων πραγματοποιείται σε συγκεκριμένο θώκο και τα αντίστοιχα μιτωτικά κύτταρα να μην συμπεριλαμβάνονταν στις δειγματοληψίες.

Παρ' όλα αυτά, από την παραπάνω μελέτη προέκυψαν δυο αξιόλογες παρατηρήσεις. Κατά την ανάλυση παρασκευασμάτων (μέσω cytospin) των κυττάρων HL60 διαπιστώθηκαν κύτταρα με διαρρηγμένο μεσόσωμα αλλά και μεταφασικά κύτταρα με ασύμμετρη στοίχιση της ατράκτου (βλέπε Εικόνες 3.3 και 3.5). Το πρώτο, σύμφωνα με την δημοσίευση του Matsuhisa *et al.*,⁽⁵³⁾ θα μπορούσε να αποτελεί αποτέλεσμα της άνισης φυγόκεντρης δύναμης που ασκείται στα ανισομεγέθη θυγατρικά κύτταρα μιας ΑΚΔ κατά τη διαδικασία του cytospin. Επιπλέον, η δεύτερη παρατήρηση ενισχύει την πιθανότητα ΑΚΔ και μάλιστα με σχηματισμό θυγατρικών κυττάρων διαφορετικού μεγέθους, δεδομένου ότι η θέση της μεταφασικής ατράκτου οριοθετεί τη σύσταση του συσταλού δακτυλίου μέσω του οποίου διχοτομείται το μητρικό κύτταρο στα δυο θυγατρικά (ενδεικτικά αναφέρονται ^(56,57)). Οι δυο αυτές διαπιστώσεις θα οδηγούσαν σε λανθασμένο συμπέρασμα εάν δεν διερευνούσαμε τις διαιρέσεις των κυττάρων HL60 σε πραγματικό χρόνο. Στα πειράματα αυτά διαπιστώθηκαν συνεχείς κινήσεις της μεταφασικής ατράκτου, που κάλυπταν όλο τον όγκο του κυττάρου, έως ότου αυτή στοιχηθεί σε μια απόλυτα συμμετρική θέση, μόλις πριν την έναρξη της ανάφασης. Υπενθυμίζεται εδώ πως τα παραπάνω πειράματα πραγματοποιήθηκαν πριν δημοσιευτούν δυο εξαιρετικές δημοσιεύσεις οι οποίες παρατήρησαν το παραπάνω φαινόμενο σε άλλες κυτταρικές σειρές και κατάφεραν να το ερμηνεύσουν σημαντικά σε μοριακό επίπεδο^(56,59). Συμπερασματικά, λοιπόν, αναδεικνύεται η αναγκαιότητα διερεύνησης ενός φαινομένου με όλους τους ενδεδειγμένους τρόπους πριν την εξαγωγή συμπερασμάτων όσο ισχυρές κι αν είναι οι επιμέρους πειραματικές ενδείξεις.

4.2 Η ΑΚΔ στα πρώτα στάδια διαφοροποίησης EBK ποντικού.

Η πιθανότητα παρουσίας ΑΚΔ κατά τα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης των EBK ποντικού μελετήθηκε διεξοδικά τόσο σε τυχαίες όσο και σε στοχευμένες διαφοροποιήσεις νευροεξωδερμικής κατεύθυνσης. Η αναζήτηση ΑΚΔ διενεργήθηκε από τη μια με βάση τους κλασικούς μάρτυρες ΑΚΔ που αφορούν στην πολικότητα, τη θέση (στοίχιση) της μιτωτικής ατράκτου, τον ΚΚΤ Numb και το μέγεθος των προκυπτόμενων θυγατρικών κυττάρων (βλέπε ενότητα 3.2.2). Από την άλλη, μελετήσαμε τις πιθανότητες ασύμμετρης απώλειας δεικτών πολυδυναμίας ή ασύμμετρης ανάκτησης ιστοειδικών μεταγραφικών παραγόντων μαζί με μια σειρά άλλων παραγόντων (λ.χ. τις νουκλεοπορίνες, η βασική υπό διερεύνηση υπόθεση

της παρούσας διδακτορικής διατριβής), οι οποίοι θα μπορούσαν να διαδραματίσουν ουσιαστικό ρόλο στις ΑΚΔ (βλέπε ενότητες 3.2.3, 3.2.5 και 3.2.6). Όλες οι παραπάνω προσεγγίσεις κατέληξαν στερεότυπα στο συμπέρασμα της απουσίας ΑΚΔ στα υπό διερεύνηση δείγματα. Η απόλυτη ομοφωνία τόσων διαφορετικών μαρτύρων ίσως να είναι και η μεγαλύτερη πιστοποίηση για το εξαγόμενο συμπέρασμα. Όμως, από μια διαφορετική οπτική γωνία θα μπορούσε κάποιος να ισχυριστεί, βασισμένος στη διεθνή βιβλιογραφία όπως παρουσιάστηκε στο εισαγωγικό κεφάλαιο, ότι τα αποτελέσματα αυτά ή η στρατηγική προσέγγισης δεν είναι αρκετά ή ισχυρά ώστε να αποκλεισθεί η χρήση ΑΚΔ στις διαιρέσεις των διαφοροποιούμενων EBK ποντικού.

Σε ότι αφορά τον πειραματικό σχεδιασμό, επισημαίνεται ότι περιλαμβάνει τους πλέον ενδεδειγμένους κλασσικούς δείκτες μιας ΑΚΔ, συνοδευόμενους από τους πιο χαρακτηριστικούς και αναμενόμενους για το πειραματικό μοντέλο των EBK του ποντικού (π.χ. διερεύνηση δεικτών πολυδυναμίας). Επιπλέον, ο ικανός αριθμός δειγμάτων με τη στοχευμένη παρατήρηση σε μιτωτικά ή διαπιστωμένα θυγατρικά κύτταρα, ανάλογα με τη δράση του εκάστοτε δείκτη, αποκλείει την υποεκτίμηση του υπό παρατήρηση φαινομένου, ακόμα και στην περίπτωση που αυτό ήταν δυναμικό. Με δεδομένο ότι το ερώτημα που διερευνήθηκε έγκειται στο εάν τα EBK διαιρούνται με ΑΚΔ κατά τη διαφοροποίησή τους, οφείλαμε να περιορίσουμε το χρονικό εύρος της παρατήρησης στις δυο πρώτες ημέρες διαφοροποίησης. Μετά τη δεύτερη ημέρα τα κύτταρα έχουν πραγματοποιήσει περίπου τέσσερις κυτταρικές διαιρέσεις και έχουν χάσει την πολυδυναμία τους (βρέθηκαν αρνητικά για τους κλασσικούς δείκτες βλαστικότητας Nanog και Oct4). Παρ' όλα αυτά, σε περιορισμένο αριθμό πειραμάτων διερευνήθηκε η πιθανότητα παρουσίας ΑΚΔ σε επόμενες ημέρες διαφοροποίησης αλλά και πάλι με αρνητικά αποτελέσματα (δεδομένα που δεν παρουσιάζονται), αποκλείοντας έτσι την περίπτωση ΑΚΔ από τα προγονικά κύτταρα (progenitor cells) εάν όντως σχηματίζονται στα πρωτόκολλα διαφοροποίησης που χρησιμοποιήθηκαν.

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν ουσιαστικά μόνο τρεις συναφείς μελέτες^(49,69,120). Η πρώτη αφορά ανθρώπινα EBK, κάνει χρήση αντίστοιχων πρωτοκόλλων διαφοροποίησης με αυτά που χρησιμοποιήσαμε και, μελετώντας ένα και μόνο δείκτη (Oct4), καταλήγει στο ίδιο συμπέρασμα με αυτό της παρούσας εργασίας⁽⁶⁹⁾. Η δεύτερη παρουσιάζει ένα τρόπο (πρωτόκολλο) προτροπής των EBK ποντικού σε ΑΚΔ, όπου εκ των πραγμάτων αναδεικνύεται πως από μόνα τους (τα EBK) δεν πραγματοποιούν ΑΚΔ⁽¹²⁰⁾. Τέλος, στην τρίτη δημοσίευση προβάλλεται επίσης ένα πρωτότυπο πρωτόκολλο

διαφοροποίησης EBK του ανθρώπου και του ποντικού(49), στο οποίο παρατήρησαν ΑΚΔ, αλλά η αναπαραγωγή του στο εργαστήριό μας δεν επιβεβαιώνεται (σχολιάζεται εκτενώς παρακάτω στην ενότητα 4.4). Υπενθυμίζεται εδώ ότι κατά την περίοδο που ξεκίνησαν στο εργαστήριό μας τα πρώτα πειράματα διερεύνησης ΑΚΔ σε EBK ποντικού υπήρχε μόνο η πρώτη από τις παραπάνω δημοσιεύσεις παράλληλα με μια πλειάδα άλλων που καθιστούσαν υπαρκτή την ΑΚΔ σε *in vitro* καλλιέργειες. Πιο αναλυτικά, σχεδόν ανεξαιρέτως, όλες οι ανασκοπήσεις που αφορούσαν στις ΑΚΔ ξεκινούσαν εισαγωγικά με το δόγμα ότι τα ΒΚ διαιρούνται ασύμμετρα με το ένα από τα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν να παραμείνει βλαστικό ενώ το άλλο να διαφοροποιείται (ενδεικτικά παραθέτονται οι ανασκοπήσεις^(8,15,25)). Στη συνέχεια, ανάλογα με τη θεματολογία της εκάστοτε ανασκόπησης ανέλυαν λεπτομερώς τα αντίστοιχα μοντέλα ΑΚΔ που απαντώνται στη φύση. Από την άλλη, δεν υπάρχει –ακόμα και σήμερα– καμία *in vitro* μελέτη που να έχει καταγράψει, αδιαμφισβήτητα, μια ΑΚΔ. Αντιθέτως, υπάρχουν αρκετές δημοσιεύσεις που υπαινίσσονται την ύπαρξη ΑΚΔ για να εξηγήσουν τα αποτελέσματά τους (χωρίς να δείχνουν μια, λ.χ. τα^(100,121), άλλες δείχνουν ή υπονοούν ΑΚΔ αλλά με αναξιόπιστα κριτήρια αξιολόγησης^(53,122–124), ενώ, τέλος, υπάρχουν και αρκετές *in vitro* μελέτες με πιστοποιημένες ΑΚΔ αλλά σε ιδιαίτερα κυτταρικά συστήματα που τα ευρήματά τους δεν μπορούν να γενικευθούν στο σύνολο του *in vitro* περιβάλλοντος (λ.χ.⁽¹²⁰⁾, και οι πολλές εργασίες του εργαστηρίου του J.L. Sherley όπως^(125–127)). Συγκεντρωτικά, με μια ανιδιοτελή κριτική μελέτη όλα τα παραπάνω βιβλιογραφικά αποτελέσματα συνηγορούν με αυτά της παρούσας διατριβής ως προς την απουσία ΑΚΔ σε *in vitro* συνθήκες καλλιέργειας.

Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο, με αφορμή τα πρώτα αρνητικά αποτελέσματα ως προς την *in vitro* χρήση ΑΚΔ στα διαφοροποιούμενα EBK ποντικού, διενεργήθηκε μια εκτεταμένη βιβλιογραφική ανασκόπηση για την αποσαφήνιση/εξήγηση των ευρημάτων αυτών. Όλα τα κλασσικά μοντέλα ΑΚΔ αφορούν κυρίως σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους από τρεις κατηγορίες αναπτυξιακών επιπέδων (σε *in vivo* ή *ex vivo* συνθήκες καλλιέργειας): (1) ζυγωτό (*C. elegance*), (2) εμβρυογένεση (*Drosophila*, ποντικό) και (3) ενήλικα ΒΚ (π.χ. τα κύτταρα *satellite* ποντικού ή τα ΑιΒΚ). Η μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης ΑΚΔ από τα διαθέσιμα κυτταρικά συστήματα του εργαστηρίου μας ήταν στα EBK ποντικού, που μπορούν σε *in vitro* συνθήκες να διαφοροποιηθούν προς όλες τις ιστικές κατευθύνσεις με μεγάλη ή ικανοποιητική επιτυχία. Έτσι, στη θεωρητική αυτή διερεύνηση αναζητήθηκε επίσης η εμφάνιση της πρώτης ΑΚΔ κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης του ποντικού *in vivo*. Ο

ICM πληθυσμός σχηματίζεται κατά τη $2^{1/2} - 3^{1/2}$ ημέρα μετά τη γονιμοποίηση μέσω δυο «κυμάτων» ΑΚΔ (ενδεικτικές ανασκοπήσεις ^(108,128)). Τα κύτταρα αυτά σχηματίζουν την επόμενη ημέρα ($4^{1/2}$) την επιβλάστη από όπου μετά την εμφύτευσή της στη μήτρα θα προκύψουν τα τρία δέρματα (ενδό-, μεσό- και εξώδερμα), οι πρόγονοι όλων των ιστών του εμβρύου. Όταν τα κύτταρα της ICM απομονωθούν και εκπτυχθούν *in vitro*, δημιουργούν τις εμβρυονικές βλαστικές κυτταρικές σειρές (σαν τα κύτταρα E14 του εργαστηρίου μας) με τις οποίες διενεργείται παγκοσμίως η *in vitro* έρευνα στο πεδίο των ΕΒΚ. Μια πιο ενδελεχής μελέτη της πιο πρόσφατης σχετικής βιβλιογραφίας αναδεικνύει την μάλλον πλήρη απουσία ΑΚΔ τόσο κατά τη δημιουργία της ICM όσο και του σχηματισμού των τριών δερμάτων (105–108). Χαρακτηριστική είναι μια πολύ πρόσφατη δημοσίευση όπου στα πλαίσια ανασκόπησης του πεδίου αναδεικνύει την έλλειψη ουσιαστικών αποδείξεων και για τα τρία χαρακτηριστικά μιας ΑΚΔ (πολικότητα, στοίχιση ατράκτου και ασύμμετρη κατανομή ΚΚΤ) ⁽¹⁰⁸⁾. Επίσης, ενδεικτικό είναι και το συμπέρασμα άλλης εργασίας⁽¹⁰⁷⁾ όπου αναφέρει χαρακτηριστικά: «*Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η επανεξέταση κλασικών δεδομένων με σύγχρονες τεχνικές παρακολούθησης κυττάρων σε ακέραια έμβρυα είναι απαραίτητη για να επιβεβαιωθεί εάν η τρέχουσα γνώση της φυσιολογικής και ακέραρης (εμβρυικής) ανάπτυξης είναι ορθή*». Οι παρατηρήσεις αυτές αναδεικνύουν την βιβλιογραφικός εσφαλμένη αντίληψη για την έκταση αλλά και την πραγματική χρήση ΑΚΔ στη φύση. Επιπλέον, υποστηρίζουν τα ευρήματα της παρούσας μελέτης και έτσι η *in vitro* αλλά και *in vivo* απουσία ΑΚΔ σε τόσο πρώιμα στάδια της ανάπτυξης θα πρέπει να θεωρείται δεδομένη. Τέλος, σε ότι αφορά την *in vivo* παρουσία ΑΚΔ, αυτή παρατηρείται σε μεταγενέστερα στάδια της εμβρυογένεσης, κατά την οργανογένεση, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα την νευρογένεση (μεταξύ 12^{ης} και 16^{ης} εμβρυονικής ημέρας ανάπτυξης).

4.3 Η υπόθεση της ανάκτησης διαφορετικής κυτταρικής τύχης μέσω της ετερόχρονης ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού Shh από τις ΠΒ διαφοροποιούμενων ΕΒΚ

Στο πεδίο των ΑΚΔ υπάρχει και μια ιδιαίτερη άποψη σύμφωνα με την οποία δεν υπάρχουν συμμετρικές διαιρέσεις παρά μόνο ασύμμετρες, υπό την προϋπόθεση ότι αφορά κύτταρα που φέρουν κεντροσώματα (σχεδόν το σύνολο των κυττάρων των ανώτερων θυλαστικών) (παρατίθεται η πλέον ενδεικτική πρώτη αναφορά ⁽¹⁴⁾). Η άποψη αυτή αιτιολογείται από τη βιολογία των κεντροσωμάτων, όπου σε κάθε κυτταρική διαίρεση το ένα θυγατρικό κύτταρο θα κληρονομήσει το μητρικό κεντρόσωμα και το αδελφό του το

θυγατρικό κεντρόσωμα. Δεδομένου ότι μεταξύ μητρικού και θυγατρικού κεντροσώματος υπάρχουν δομικές διαφορές η εκάστοτε διαίρεση μπορεί να θεωρηθεί ως ασύμμετρη. Στο πεδίο των ΒΚ η διαφορά αυτή μεταξύ δυο θυγατρικών μπορεί να είναι ουσιαστική. Για χρόνια η βιολογική τελεονομία της δομικής αυτής διαφοράς ήταν άγνωστη, όμως είχε παρατηρηθεί ότι σε πολλές περιπτώσεις ΑΚΔ τα κεντροσώματα (μητρικό-θυγατρικό) κληρονομούνται στα θυγατρικά κύτταρα με στερεότυπο και όχι τυχαίο τρόπο, υποδηλώνοντας την ύπαρξη ενός άγνωστου μηχανισμού (βλέπε ενότητα 1.3). Ακόμα και σήμερα ένας τέτοιος μηχανισμός παραμένει άγνωστος αλλά το 2009 δημοσιεύτηκε μια σημαντική παρατήρηση από τους Anderson & Stearns⁽⁷⁶⁾ και αφορά στη δυνητική διαφορά που μπορεί να προκύψει μεταξύ δυο αδελφών κυττάρων από τον ετερόχρονο σχηματισμό των ΠΒ τους. Το θυγατρικό κύτταρο που κληρονομεί το μητρικό κεντρόσωμα σχηματίζει πρώτο την ΠΒ του, ενώ το άλλο θυγατρικό κύτταρο θα την αναπτύξει αργότερα, περιμένοντας το θυγατρικό του κεντρόσωμα να ωριμάσει. Έτσι, η ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών μέσω της ΠΒ γίνεται με τη σειρά της ετερόχρονα. Αυτό, υπό προϋποθέσεις, μπορεί να προσδώσει διαφορές στην κυτταρική τύχη δυο αδελφών κυττάρων. Οι προϋποθέσεις αφορούν κυρίως στον τύπο των κυττάρων, τη δράση των σηματοδοτικών μονοπατιών που δρουν μέσω ΠΒ και στη διαθεσιμότητα του εκάστοτε συνδέτη (*ligant*) τους. Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής τα ΕΒΚ που χρησιμοποιήθηκαν ελέγχθηκαν ενδελεχώς για το εάν ανταποκρίνονται στις παραπάνω προϋποθέσεις. Επιπλέον, ελέγχθηκαν και για το εάν οι διαφορετικοί τύποι κυττάρων που προκύπτουν στην πορεία της διαφοροποίησής τους εξηγείται από μετα-μιτωτική ανάκτηση διαφορετικής κυτταρικής τύχης (δηλ. χωρίς να έχει προηγηθεί μια κλασσική ΑΚΔ).

Πριν τη συζήτηση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, θα ήταν σκόπιμο να διευκρινιστεί μια σειρά συναφών ζητημάτων με σαφή χρονολογική σειρά. Όταν αξιολογήθηκαν τα πειράματα που αφορούν στην παραπάνω ενότητα (απουσία ΑΚΔ στις *in vitro* διαφοροποιήσεις ΕΒΚ ποντικού) αναζητήθηκαν εναλλακτικές υποθέσεις εργασίας για να εξηγηθεί πως εμφανίζονται ταυτόχρονα διαφορετικοί τύποι κυττάρων στην πορεία μιας διαφοροποίησης ΕΒΚ. Στη διεθνή βιβλιογραφία ήταν γνωστό πως τα ΕΒΚ του ανθρώπου σχηματίζουν ΠΒ, είναι λειτουργικές (δρουν μέσω αυτών τα σηματοδοτικά μονοπάτια *Shh*, *Wnt* και *PDGF*) και πως σε αυτές εντοπίζεται ο κορμός του δικτύου πολυδυναμίας (*Nanog/Oct4/Sox2*)^(79,86). Για τα ΕΒΚ του ποντικού δεν υπήρχε ακόμα βιβλιογραφικό δεδομένο, με εξαίρεση ένα πρωτόκολλο διαφοροποίησης ΕΒΚ ποντικού προς πολυβλεφαριδικά κύτταρα (*multi-ciliated cells*), χωρίς να εξετάζουν τα πατρικά ΕΒΚ παρά μόνο τα διαφοροποιημένα

παράγωγά τους⁽¹²⁹⁾. Για τους λόγους αυτούς διερευνήθηκε η πιθανότητα ανάκτηση διαφορετικής κυτταρικής τύχης από τα διαφοροποιούμενα ΕΚΒ, αφού πρώτα διαπιστώθηκε τόσο η ύπαρξη ΠΒ όσο και η ετερόχρονη εμφάνιση των ΠΒ σε ζεύγη θυγατρικών κυττάρων (Εικόνα 3.26). Ο έλεγχος που ακολούθησε για το Shh, πιο γνωστό σηματοδοτικό μονοπάτι που λειτουργεί μέσω των ΠΒ, κατέδειξε πως το παραπάνω μονοπάτι ήταν ανενεργό στα αυτο-ανανεούμενα ΕΚΒ τύπου E14 (Εικόνα 3.28). Επιπλέον, δεν κατέστη δυνατή η ενεργοποίηση του μονοπατιού ούτε έπειτα από την επίδραση χημικού ενεργοποιητή του μονοπατιού (SAG, Εικόνα 3.28). Η απουσία δράσης του μονοπατιού Shh στα ΕΚΒ δεν βρέθηκε να οφείλεται σε έλλειψη του συνδέτη Shh μιας και το καλλιεργητικό μέσο εμπεριέχει ικανή ποσότητα για να ενεργοποιήσει το συγκεκριμένο μονοπάτι σε άλλα κύτταρα, όπως τα κύτταρα των κλώνων του *LBR* (Εικόνα 3.50). Επίσης, δεν παρατηρήθηκε απουσία ή υποέκφραση των τελεστών του σηματοδοτικού αυτού μονοπατιού, όπως προκύπτει από τα συγκριτικά αποτελέσματα της έκφρασής τους στα κύτταρα E14 με αυτά των κλώνων του *LBR* από την ανάλυση παλαιότερων δεδομένων μικροσυστοιχιών DNA του εργαστηρίου μας (Πίνακας 3.6). Η μη ενεργοποίηση του μονοπατιού Shh παρέμεινε ακόμα και κατά τη διάρκεια των δυο πρώτων ημερών διαφοροποίησης, δηλαδή καθ' όλης της περιόδου ενδιαφέροντος της παρούσας μελέτης. Η νωρίτερη ένδειξη ενεργοποίησης του μονοπατιού αυτού παρατηρήθηκε κατά τη 2^η ημέρα διαφοροποίησης παρουσία PO και SAG (Εικόνα 3.28). Με τα δεδομένα αυτά, η πιθανότητα –εναλλακτικής των ΑΚΔ– εξήγησης της ετερογένειας των διαφοροποιούμενων ΕΚΒ μέχρι και τη 2^η ημέρα διαφοροποίησης από την ετερόχρονη ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών στις ΠΒ θυγατρικών κυττάρων δεν είναι εφικτή. Παρ' όλα αυτά, διερευνήθηκε σε βάθος το φαινόμενο της ετερόχρονης σύνθεσης και ενεργοποίησης των ΠΒ σε ζεύγη θυγατρικών ΕΚΒ, διαφοροποιημένων στις παραπάνω συνθήκες. Πράγματι, στα ζεύγη αυτά παρατηρήθηκε ετερόχρονη εμφάνιση ΠΒ αλλά η διάρκεια διαφαίνεται περιορισμένη όπως και το προβάδισμα στην ενεργοποίηση του μονοπατιού Shh (Εικόνα 3.29 και συναφές κείμενο στην ενότητα 3.2.7.2). Υπενθυμίζεται εδώ ότι η διάρκεια της παρουσίας σύνδεσης των θυγατρικών κυττάρων με μεσόσωμα διαρκεί λιγότερο από 3 ώρες⁽⁹¹⁾ και πως με την πρόοδο του κύκλου (ουσιαστικά της G1 φάσης) το μεσόσωμα γίνεται ολοένα πιο επίμηκες και λεπτό (π.χ. Εικόνα 3.38). Συμπερασματικά, λοιπόν, η ταχύτητα ανάπτυξης αλλά και ενεργοποίησης της ΠΒ του θυγατρικού κυττάρου που κληρονόμησε το θυγατρικό κεντρόσωμα είναι τέτοια που δεν φαίνεται να υπολείπεται ουσιαστικά του έτερου θυγατρικού.

Τα παραπάνω συμπεράσματα συμφωνούν με την αρχική ανακάλυψη του φαινομένου της ετερόχρονης εμφάνισης ΠΒ μεταξύ θυγατρικών κυττάρων^(76,77) και αναδεικνύουν την ιδιαίτερη ισορροπία σηματοδοτικών δικτύων που διέπουν τη βλαστική κατάσταση (ενδεικτικά αναφέρεται το ⁽¹³⁰⁾). Αναφορικά με τη βλαστική κατάσταση θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι παρατηρήσεις αυτές είναι σύμφωνες με την *in vivo* συμπεριφορά του *Gli2* (πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης) στην ICM τόσο σε πρώιμες όσο και σε όψιμες βλαστοκύστες, δηλαδή στα αδιαφοροποίητα πολυδύναμα κύτταρα από τα οποία προέρχονται και τα EBK που χειριζόμαστε (ανάλυση στους συμπληρωματικούς πίνακες του ⁽¹³¹⁾). Πρέπει επίσης να υπογραμμιστεί ότι παρόμοια συμπεριφορά εμφανίζει και ο τελεστής PDGFRα του σηματοδοτικού μονοπατιού PDGF, το οποίο ενεργοποιείται μέσω των ΠΒ. Ο PDGFRα αρχίζει να εκφράζεται σε χαμηλό βαθμό σε κάποια από τα κύτταρα της ICM (πρώιμες βλαστοκύστες), τα οποία στη συνέχεια μεταναστεύουν στην επιφάνειά της και διαφοροποιούνται προς πρώιμο εξώδερμα (όψιμες βλαστοκύστες), με την ταυτόχρονη δραματική αύξηση των επιπέδων έκφρασής του^(107,132,133). Με άλλα λόγια τα πραγματικά EBK, δηλαδή τα κύτταρα της ICM, διατηρούν ανενεργά τα βασικά μονοπάτια που δρουν μέσω των ΠΒ. Επιπλέον, και ειδικότερα για το σηματοδοτικό μονοπάτι *Shh*, έχει αποδειχθεί ότι: (α) η εμβρυική ανάπτυξη *Smo*^{-/-} ποντικών είναι φυσιολογική στα πρώτα στάδιά της (δηλαδή υπό απόλυτη απουσία της σηματοδότησης *Shh*), (β) είναι δυνατή η παρασκευή των αντίστοιχων EBK από τα έμβρυα αυτά και (γ) το *Shh* μονοπάτι είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική ανάπτυξη και επιβίωση του εμβρύου από την 9^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση και έπειτα, δηλαδή μια ημέρα αργότερα (8^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση) από τη αντίστοιχη ανάγκη ύπαρξης ΠΒ στα έμβρυα ποντικού^(112,134-136).

Από την άλλη, τα αποτελέσματά μας έρχονται σε αντίθεση με μια νεότερη εργασία, τη μοναδική στην οποία εξετάστηκε το σηματοδοτικό μονοπάτι *Shh* σε ΠΒ EBK⁽¹³⁷⁾. Στη δημοσίευση αυτή, το μονοπάτι *Shh* βρέθηκε ενεργό στα αδιαφοροποίητα EBK ποντικού. Ωστόσο, σχετικά με τη μελέτη αυτή θα πρέπει να επισημανθούν τρεις βασικές παρατηρήσεις: (α) Τα EBK που χρησιμοποιήσαν ήταν ένας εμπορικά διαθέσιμος κλώνος EBK τύπου E14, επιλεγμένος για μια γονιδιακή παγίδα (*gene trap*) στη γονιδιακή περιοχή του *Gli2*, τα οποία διαμολύνθηκαν και επιλέχθηκαν (*re-selected*) εκ νέου, από τους συγγραφείς, για τουλάχιστον μια ακόμη φορά. (β) Τα κύτταρα που τελικώς παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν δεν ελέγχθηκαν για τη βλαστικότητά τους. Τέλος, (γ) δεν έγινε συγκριτική χρήση των πατρικών κυττάρων E14 (ως μάρτυρες) σε καμία από τις

αναλύσεις τους. Οι παραπάνω αστοχίες στον πειραματικό σχεδιασμό των Santos & Reiter δεν επιτρέπουν την άμεση συσχέτιση/σύγκριση των αποτελεσμάτων τους με αυτά της παρούσας διατριβής⁽¹³⁷⁾.

Ένα επιπλέον στοιχείο που προέκυψε από τη διερεύνηση της παρουσίας και δράσης των ΠΒ στα ΕΒΚ ποντικού είναι η έντονη διαφοροποίησή τους σε σχέση με τις αντίστοιχες των ανθρώπινων ΕΒΚ. Όπως προαναφέρθηκε, οι ΠΒ των ανθρώπινων ΕΒΚ είναι πλήρως λειτουργικές (τουλάχιστον για τα πλέον γνωστά σηματοδοτικά μονοπάτια, Shh, Wnt και PDGF) και, επιπλέον, σε αυτές εντοπίζονται τα κεντρικά μόρια του δικτύου πολυδυναμίας (Nanog, Oct4 και Sox2)^(78,79,86). Στην παρούσα μελέτη, τόσο οι δείκτες πολυδυναμίας Nanog και Sox2 (το Oct4 ήταν αδύνατο να διερευνηθεί για υλικοτεχνικούς λόγους) όσο και το σηματοδοτικό μονοπάτι Shh βρέθηκαν να απουσιάζουν. Η πιθανότερη εξήγηση για την παραπάνω διαφορά που μπορεί να παρατεθεί αφορά στην τεράστια διαφορά μεταξύ των *in vivo* ΕΒΚ από τα οποία προέκυψαν οι ανθρώπινες και οι ποντικίσιας σειρές. Το ζυγωτό του ποντικού είναι ένα ακεντροσωμικό (δεν φέρει κεντροσώματα) κύτταρο, σε αντίθεση με τα περισσότερα έμβρυα θηλαστικών οργανισμών συμπεριλαμβανομένων και των υπολοίπων τρωκτικών (λ.χ. αρουραίων). Για το λόγο αυτό οι πρώτες εμρυονικές διαιρέσεις τους προσιδιάζουν τις μιωτικές του ωαρίου και σταδιακά από την 3^η -4^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, όπου αρχίζει σταδιακά η *de novo* σύνθεση κεντροσωμάτων, οι διαιρέσεις συγκλίνουν περισσότερο προς μιωτικές⁽¹³⁸⁾. Η παρουσία κεντροσωμάτων στο σύνολο των κυττάρων του εμβρύου παρατηρείται μετά το στάδιο των όψιμων βαλαστοκύστεων. Συνεπώς, τα ΕΒΚ του ποντικού που χρησιμοποιούνται *in vitro* ως παράγωγα της ICM (της 3,5 ημέρας μετά τη γονιμοποίηση) μπορεί να φέρουν κεντροσώματα αλλά δεν αποκλείεται να υπολείπονται άλλων παραγόντων ώστε να μην είναι απολύτως λειτουργικά όπως τα αντίστοιχα των ανθρώπινων ΕΒΚ.

Το τελευταίο στοιχείο που αξίζει να σημειωθεί στην ενότητα αυτή, το οποίο συνδέεται άμεσα με τις διαφορές μεταξύ των ΕΒΚ του ανθρώπου και του ποντικού, είναι και αυτό της παρουσίας της πυρηνικής λαμίνης Α αποκλειστικά και μόνο στα κεντροσώματα των ποντικίσιας κυττάρων. Μια σειρά ανθρώπινων κυτταρικών σειρών από όλο το αναπτυξιακό φάσμα που εξετάστηκε βρέθηκε αρνητική ως προς την παρουσία λαμίνης Α στα κεντροσώματα καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, σε αντίθεση με τα ποντικίσια ΕΒΚ (Εικόνα 3.30 και πληροφορίες που δεν παρουσιάζονται). Η βιολογική σημασία του παραπάνω συνεντοπισμού αλλά και της έντονης παρουσίας νουκλεοπορινών στη βάση των ΠΒ (βλέπε ενότητα 3.2.7) μπορεί να παραμένει άγνωστη, όμως, η βιολογική της σημασία

ενδέχεται να είναι σημαντική. Αναφορικά με το τελευταίο, παρ' ότι τα κύτταρα του αιμοποιητικού δεν σχηματίζουν ΠΒ, έχει δειχθεί ότι η ανοσολογική σύναψη (immunological synapse), των ενεργών κυττάρων Τ, λειτουργεί ως ένα είδος ΠΒ (η αγκυροβόληση του κεντροσώματος στην εσωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων Τ πραγματοποιείται χωρίς όμως να ακολουθείται από επιμήκυνση του αξονιατίου) η οποία διαμεσολαβεί τη σηματοδότηση του μονοπατιού Shh^(139,140). Εκεί, πολύ πρόσφατα αναδείχτηκε ο καθοριστικός ρόλος της λαμίνης Α στην ανοσοποιητική απόκριση ως κύριου ρυθμιστή του πολυμερισμού της F-ακτίνης, ένα σημαντικό στάδιο στο σχηματισμό της ανοσολογικής σύναψης⁽¹⁴¹⁾.

4.4 Τα EBK διαφοροποιούνται σε τρεις διαστάσεις απουσία NRTS

Η πιο σχετική βιβλιογραφική αναφορά για ΑΚΔ στο πεδίο των EBK ποντικού είναι αδιαμφισβήτη η εργασία των Elabd *et. al.*,⁽⁴⁹⁾. Η συγκεκριμένη δημοσίευση είναι η πρώτη που ισχυρίζεται πως τα EBK διαφοροποιούνται με ΑΚΔ και μάλιστα οι διαιρέσεις αυτές συνοδεύονται από το σχετικά σπάνιο, αλλά και αμφιλεγόμενο για δεκαετίες, φαινόμενο του NRTS (βλέπε ενότητα 1.3). Η διαφωνία των αποτελεσμάτων μας με αυτά της παραπάνω εργασίας έχει προαναφερθεί επανειλημμένα στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων (ενότητα 3.2.8). Στα πλαίσια όμως της παρούσας συζήτησης θα ήταν σκόπιμο να σχολιαστούν τα βασικά σημεία απόκλισης μεταξύ των ευρημάτων μας και της εν λόγω μελέτης⁽⁴⁹⁾:

- i. Η μέθοδος χρώσης και η αξιολόγηση (μη-αυτοποιημένη άμεση παρατήρηση οπτικών πεδίων μεγάλης ανάλυσης σε τρεις διαστάσεις -x,y,z,) που ακολουθήθηκαν από το εργαστήριό μας ως προς την παρουσία/απουσία του BrdU δεν παρήγαγε αναληθώς θετικά αποτελέσματα, σε αντιδιαστολή με τους Elabd *et. al.*, οι οποίοι διαπίστωσαν το φαινόμενο του NRTS σε αδιαφοροποίητα EBK και φυσιολογικούς ινοβλάστες, έπειτα από πειράματα μικρής διάρκειας ανίχνευσης (*short chase period*) με BrdU, CldU ή IdU και αυτοματοποιημένη μέθοδο αξιολόγησης ανοσοφθορισμών.
- ii. Οι Elabd *et. al.*, προτείνουν ένα ιδιαίτερα «στρεσογόνο» σύστημα για τα κύτταρα που προκύπτουν. Περαιτέρω έκπτυσή τους, στην τόσο αραιή προτεινόμενη συγκέντρωση, δεν είναι εφικτή. Προσπαθήσαμε κατ' επανάληψη να εξετάσουμε τα κύτταρα του παραπάνω πρωτοκόλλου σε βάθος χρόνου (επιπλέον 24 ώρες έκπτυξης) και διαπιστώναμε απουσία αναπτυσσόμενων κυττάρων-αποικιών ή σπάνια παρουσία μονήρη πεπλατυσμένων κυττάρων με τεράστιου μεγέθους

πυρήνες (προφανώς κύτταρα σε φάση G0). Ενδεχομένως, με την προτεινόμενη μεθοδολογία να είναι δυνατή η ολοκλήρωση του κυτταρικού κύκλου μόνο από τα κύτταρα που βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο του κυτταρικού κύκλου (τη στιγμή της αραϊής επίστρωσης), οδηγώντας σε θάνατο ή έξοδο από τον κύκλο στα υπόλοιπα, ακόμα και στα μόλις σχηματισμένα θυγατρικά κύτταρα. Επιπρόσθετα και συνηγορητικά ως προς την προηγούμενη ερμηνεία μας, η προσαρμοσμένη χρήση του εν λόγω πρωτοκόλλου σε αδιαφοροποίητα ή διαφοροποιούμενα EBK κατέδειξε παράξενες, απρόσμενες και αδικαιολόγητες ασυμμετρίες (βλέπε Εικόνες 3.35 και 3.44).

- iii. Παρά το γεγονός ότι χρησιμοποίησαν αυστηρά κριτήρια για να διακρίνουν τα τυχαία κυτταρικά ζεύγη από τα πραγματικά θυγατρικά κύτταρα και ότι αξιολόγησαν επίσης το πειραματικό/διαδικαστικό σφάλμα, όταν το δείγμα δεν αποτελείται από μιτωτικά κύτταρα (θα μπορούσαν να επιλεγθούν προς ανάλυση μονήρη κύτταρα στη φάση της ανάφασης ή τελόφασης), είναι αδύνατον να εξαλειφθεί η πιθανότητα δειγματοληψίας τυχαίων κυτταρικών ζευγών. Αντιθέτως, η αξιολόγηση που ακολουθήθηκε από την παρούσα διδακτορική διατριβή, με την προσθήκη ενός επιπλέον κριτηρίου αξιολόγησης, κατέστησε απολύτως δυνατή τη διάκριση μεταξύ τυχαίων κυτταρικών ζευγών και πραγματικών θυγατρικών κυττάρων. Το κριτήριο αυτό ήταν η παρουσία σύνδεσης με μεσόσωμα των κυτταρικών ζευγών που προέκυψαν ακλουθώντας την παραπάνω διαδικασία. Επιπλέον, με τον τρόπο αυτό έπαυε η αναγκαιότητα τόσο της «στρεσογόνου» αραϊής έκπτυξης, που, ως γνωστόν, δεν συνάδει με φυσιολογική ανάπτυξη EBK όσο και της αναζήτησης μιτωτικών κυττάρων προχωρημένου σταδίου (ανάφαση-τελόφαση) η οποία θα απαιτούσε ανάλυση τεράστιου δείγματος, δεδομένης της σχετικής σπανιότητας των μιτωτικών κυττάρων.
- iv. Αδιαμφισβήτητα, το σημαντικότερο στοιχείο της εργασίας των Elabd *et al.*, ήταν τα πειράματα σε πραγματικό χρόνο. Ωστόσο, η επιλεκτική δειγματοληψία, παρ' ότι αντικειμενικά αναπόφευκτη, υπονομεύει όχι μόνο τα αποτελέσματα που προέκυψαν αλλά και τη χρησιμότητα του προτεινόμενου πρωτοκόλλου συνολικά. Κακοπροαίρετα, θα μπορούσε κανείς να υποστηρίξει ότι ακόμα και τα πειράματα αυτά κινούνται εντός των ορίων του πειραματικού σφάλματος (μόνο 28 διαιρέσεις με NRTS από τις 826 που βιντεοσκοπήθηκαν, δηλαδή περίπου το 3,4% των κυτταρικών διαιρέσεων) της διαδικασίας που προσδιόρισαν στο 5%. Κάτι τέτοιο βέβαια θα προϋπόθετε την αξιολόγηση σχεδόν αποκλειστικά των λανθάνων

θετικών δειγμάτων, πράγμα που δεν συνέβη. Από την άλλη, σχετικά με τη χρησιμότητα της εν λόγω δοκιμασίας, αναλογιζόμενοι και το σχόλιο *ii* παραπάνω, η βιολογική σημασία της παραπάνω δοκιμασίας θα πρέπει να παραδεχθούμε πως είναι περιορισμένη. Ακόμα κι αν τα δείγματα που προκύπτουν αντικατοπτρίζουν πραγματικά τα γεγονότα που διαδραματίζονται στο EB πριν τη χημική του διάσπαση, είναι αδύνατο να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των γεγονότων που έπονται. Με άλλα λόγια, στην καλύτερη περίπτωση, αποτελεί απλά ένα στιγμιότυπο της διαφοροποίησης ενός EB.

- v. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, συμπεριλαμβανομένης και της ανάλυσης του PCNA, καταδεικνύουν την πιθανότητα καταγραφής ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων με τη δοκιμασία των Elabd *et al.*, και τα κριτήριά τους. Σε απόλυτους αριθμούς, οι μετρήσεις του NRTS φαινομένου από την παρούσα μελέτη βρέθηκαν ελαφρώς μικρότερες συγκριτικά με της παραπάνω δημοσίευσης. Σε μεγάλο βαθμό κάτι τέτοιο διαφαίνεται να οφείλεται στο γεγονός ότι στην περίπτωση των Elabd *et al.*, υπήρξαν μετρήσιμα πειραματικά σφάλματα. Πιο συγκεκριμένα, στις καλλιέργειες αρνητικών μαρτύρων (αδιαφοροποίητα EBK και φυσιολογικοί ινοβλάστες) βρέθηκε ασύμμετρη κατανομή σήμανσης BrdU (δηλ. NRTS) αλλά και εναπόθεση μη μονήρη κυττάρων σε ποσοστό ~5% για κάθε περίπτωση. Ωστόσο, παρά την καταμέτρηση των παραπάνω δυο σφαλμάτων, οι συγγραφείς απέφυγαν να παραδεχθούν ότι μπορεί να συνυπάρχουν, ώστε να τα συνυπολογίσουν στα συγκεντρωτικά τους αποτελέσματα. Έτσι, εάν αφαιρεθεί το ~10% του σφάλματος από το 36% του NRTS φαινομένου που μετρήθηκε στα EBK ποντικού, το αποτέλεσμα που προκύπτει συγκλίνει απόλυτα με τα ευρήματά της παρούσας μελέτης. Συνεπώς, και οι δυο εργασίες μετρήσανε ουσιαστικά το ίδιο φαινόμενο, αλλά η καθεμία το ερμήνευσε διαφορετικά.
- vi. Τέλος, υπάρχουν και δυο αναπάντητα στοχαστικά ερωτήματα που προκύπτουν από την εργασία των Elabd *et al.* Πρώτον, *εμπεριέχει πειραματικό σφάλμα ο ανοσοφθορισμός έναντι του IdU αναλόγου;* Και αυτό διότι η βραχυπρόθεσμη ανίχνευση του CIdU (η ίδια διαδικασία με το IdU) μπορεί να βρέθηκε ασύμμετρη στο 2,9% των περιπτώσεων, η αντίστοιχη του IdU σύμφωνα με την Εικόνα 2i της εν λόγω δημοσίευσης για όμοια δείγματα ήταν 0%, ενώ στα πειράματα σε πραγματικό χρόνο μετρήθηκε στο 4,4%... Και δεύτερο, *τι είδους πρόγραμμα διαφοροποίησης ακολουθούν τα υπόλοιπα θυγατρικά κύτταρα;* Οι συγγραφείς της παραπάνω μελέτης ισχυρίζονται ότι εξηγούν τι (αλλά και πώς ή ενδεχομένως γιατί) συμβαίνει

στα θυγατρικά κύτταρα που διαιρούνται ασύμμετρα με την ταυτόχρονη κληρονόμηση του νεοσυντεθέν DNA και λ.χ. του μεταγραφικού παράγοντα Brachyury από το ένα θυγατρικό κύτταρο και το DNA εκμαγείο από το άλλο. Παρ' όλα αυτά, αφήνουν εντελώς ασχολίαστο το ~20% των διαιρέσεων όπου δεν εμφανίζουν το φαινόμενο του NRTS αλλά που κατανέμουν τον παράγοντα Brachyury ασύμμετρα, ή το ~10% των περιπτώσεων θυγατρικών με NRTS και αντίθετη ασυμμετρία ως προς το Brachyury (δηλαδή ταυτόχρονη κληρονόμηση DNA εκμαγείου και Brachyury), ή ακόμα και το τουλάχιστον 15% των ΑΚΔ όπου το ένα θυγατρικό κύτταρο κληρονομεί ταυτόχρονα το νεοσυντεθέν DNA και τους Brachyury (μεσόδερμα) και GATA4 (ενδόδερμα) μεταγραφικούς παράγοντες.

Ανεξάρτητα πάντως από το αποτέλεσμα της παραπάνω -ενδεχομένως και ατέρμονης- επιχειρηματολογίας για την ορθότητα των αποτελεσμάτων μεταξύ της παρούσας εργασίας και αυτής των Elabd *et al.*,⁽⁴⁹⁾ επιχειρήθηκε και μια εναλλακτική πειραματική διαδικασία κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μας για να αποσαφηνιστεί η παραπάνω διαμάχη⁽⁹⁹⁻¹⁰¹⁾. Η πρόθεση ήταν να βρεθεί ένας διαφορετικός τρόπος προσέγγισης τόσο θεωρητικά όσο και μεθοδολογικά, ώστε να παρακάμψει αυτή την αντιπαράθεση επί του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου και μεθόδου αξιολόγησης. Έτσι πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα εκτεταμένης BrdU σήμανσης με τη διερεύνηση της παρουσίας LRC πληθυσμού έπειτα από το σχηματισμό EB (βλέπε ενότητα 3.2.8.5). Αντικειμενικά, το αποτέλεσμα αυτό αποδεικνύει στην ολότητά του την απουσία LRC πληθυσμού είτε αυτός αποτελούνταν από EBK είτε από πρώιμα πρόδρομα κύτταρα (*early progenitor cells*). Υπενθυμίζεται εδώ ότι ένας LRC πληθυσμός υποδηλώνει τη διαρκή χρήση ΑΚΔ από μερίδα κυττάρων ενός πληθυσμού, όπως υπονοούν τα ευρήματα της εν λόγω δημοσίευσης για τα διαφοροποιούμενα EBK (διαπίστωσαν ΑΚΔ σε κάθε ημέρα διαφοροποίησης που μελέτησαν). Η σημασία της απουσίας LRC κυττάρων επιβεβαιώνει απόλυτα τη γενικότερη αντίληψη σχετικά με την *in vitro* διαφοροποίηση των EBK. Σε καμία βιβλιογραφική αναφορά δεν έχει παρατηρηθεί παρουσία πολυδύναμων κυττάρων σε διαφοροποιημένα EBK, ούτε έχει καταφέρει κανείς να σταματήσει ή να διατηρήσει τη διαφοροποίηση σε τόσο πρώιμα στάδια. Κατά συνέπεια, το πείραμα αυτό έρχεται να επιβεβαιώσει τόσο τον πειραματικό σχεδιασμό και τα αποτελέσματά μας στο πρωτόκολλο των Elabd *et al.*,⁽⁴⁹⁾ όσο και τα υπόλοιπα ευρήματά μας που καταδεικνύουν απουσία ΑΚΔ κατά τη διαφοροποίηση EBK (σχολιάζεται στην ενότητα 4.2).

4.5 Η υπόθεση της συμβολής του κυτταρικού διαχωρισμού στις διαφοροποιήσεις των ΕΒΚ

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μεγάλο ενδιαφέρον στη διερεύνηση φυσικών κυτταρικών ιδιοτήτων και πώς αυτές επηρεάζουν τη βιολογία ενός κυττάρου είτε ως αυτόνομη οντότητα είτε ως μέρος ενός συνόλου (αποικία, συσσωμάτωμα ή ιστός). Στις φυσικές αυτές ιδιότητες συγκαταλέγονται από δυνάμεις μηχανικής υφής έως την πολύ ιδιαίτερη *αυξητική* πυρήνων (*auxetic nuclei*) και χαρακτηρίζονται από παραμέτρους όπως *ελαστικότητα*, *ακαμψία*, *MT*, *αυξητικότητα* (*elasticity, stiffness, cortical tension, auxeticity*) κ.ά. Αδιαμφισβήτητα, στη ραγδαία αυτή πρόοδο αλληλο-συνέβαλλαν δυο βασικές παράμετροι. Η άμεση επιρροή τους στη βιολογία των ΒΚ και η ανάπτυξη νέων πειραματικών εργαλείων (π.χ. τρυβλία με περιορισμένες επιφάνειες συγκεκριμένης ακαμψίας/ελαστικότητας ή επίστρωσης). Έτσι, η μηχανο-μεταγωγική σηματοδότηση (*mechanotransduction*) εισέβαλλε στη βιολογία/βιβλιογραφία της διαφοροποίησης των ΒΚ και ανέδειξε ότι η θέση ενός κυττάρου (*in vivo* ή *in vitro*) συμβάλλει στον καθορισμό της τύχης του αντί μόνο να καθορίζεται από τη μεταφραστική του δυναμική. Χαρακτηριστικότερο ίσως παράδειγμα της σχέσης μεταξύ κυτταρικής θέσης με την κυτταρική τύχη, αποτελεί η ικανότητα των βλαστομεριδίων της πρώιμης βλαστοκύστης του ποντικού να προσαρμόζονται στο νέο περιβάλλον (αλλάζουν κυτταρική τύχη) όταν βρεθούν (τεχνητά) από το εσωτερικό της βλαστοκύστης στην επιφάνεια ή το αντίθετο (ανασκοπείται επαρκώς στο (108)). Άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η διαφορετική πορεία διαφοροποίησης που ακολουθούν τα ανθρώπινα μεσενχυματικά ΒΚ όταν αναπτύσσονται σε διαφορετικής ελαστικότητας επιφάνειες αλλά με το ίδιο θρεπτικό υλικό αυτο-ανανέωσης: στις πιο ελαστικές (0,1-1kPa, που προσιδιάζουν τον εγκεφαλικό ιστό) διαφοροποιούνται προς νεύρο, σε ενδιάμεσες (8-17kPa, που προσιδιάζουν το μυϊκό ιστό) παρατηρείται μυογένεση και σε άκαμπτες επιφάνειες (25-40kPa, που προσιδιάζουν το κολλαγονούχο οστό) προάγεται η οστεογένεση⁽¹⁴²⁾. Επιπλέον, διάφορες αντίστοιχες φυσικές παράμετροι έχει δειχθεί ότι επηρεάζουν την έκπτυξη αλλά και τη διαφοροποίηση των ΕΒΚ ποντικού (^(143,144) και η ανασκόπηση ⁽¹⁴⁵⁾) ή ανθρώπου⁽¹⁴⁶⁾. Τέλος, μόνο τυχαία δεν θα πρέπει να θεωρείται η πρόσφατη παρατήρηση στη μικρομηχανική των ιστών του ανθρώπου, όπου η αφθονία κολλαγόνων του εξωκυττάρου πλέγματος και η πυρηνική λαμίνη Α σχετίζονται ανάλογα με την ελαστικότητα ακλουθώντας εκθετική κλίμακα⁽¹⁴⁷⁾. Τα παραπάνω, δηλ. η εναρμόνιση του μηχανικού περιβάλλοντος (π.χ. σύσταση εξωκυττάρου πλέγματος ιστού) και της κυτταρικής τύχης (πορεία διαφοροποίησης) των κυττάρων που

τον απαρτίζουν, θα πρέπει να υφίστανται και κατά τη δημιουργία τους (οργανογένεση). Κατά την εμβρυική ανάπτυξη, στους υπό διαμόρφωση ιστούς δεν έχουν προκύψει ακόμα τα διακριτά όρια των περιοχών που θα καταβάλει ο εκάστοτε κυτταρικός υποτύπος και στη δυναμική αυτή διαδικασία είναι γνωστό ότι συμβάλει ο κυτταρικός διαχωρισμός. Ο κυτταρικός διαχωρισμός περιγράφει τόσο το διαχωρισμό ενός ανάμεικτου πληθυσμού κυττάρων με διαφορετικές ιδιότητες σε συγκεκριμένες θέσεις όσο και την ενεργή διατήρηση της προκυπτόμενης κατάστασης⁽¹¹⁰⁾. Με άλλα λόγια, μέσω του κυτταρικού διαχωρισμού πραγματοποιείται η εναπόθεση κυττάρων σε διακριτά περιβάλλοντα και αυτά ανταποκρινόμενα διαφοροποιούνται αναλόγως. Χαρακτηριστικά παραδείγματα κυτταρικού διαχωρισμού (επί τη βάση διαφορών της MT με τα γειτονικά κύτταρα) αποτελούν ο διαχωρισμός των τριών δερμάτων σε έμβρυα *Zebrafish* και *Xenopus* αλλά και μια σειρά επιθηλίων του εμβρύου της *Drosophila* (ανασκοπούνται στα ^(109,110)).

Με όλα τα παραπάνω υπόψη και δεδομένης της απουσίας εναλλακτικής ερμηνείας (δεν βρέθηκε ΑΚΔ ή μετα-μιτωτική ανάκτηση διαφορετικής κυτταρικής τύχης μέσω της ετερόχρονης ενεργοποίησης των ΠΒ) θεωρήθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί η συμβολή του κυτταρικού διαχωρισμού στη δημιουργία της ετερογένειας που διέπει τις διαφοροποιήσεις των ΕΒΚ. Για το σκοπό αυτό αξιοποιήθηκαν μεταλλαγμένες κυτταρικές σειρές ΕΒΚ του εργαστηρίου μας σε πειράματα συγκαλλιέργειας και χιμαιρικών τρισδιάστατων διαφοροποιήσεων μαζί με τα πατρικά ΕΚΒ. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στην ενότητα 3.2.9 διαπιστώθηκε πράγματι κυτταρικός διαχωρισμός μεταξύ ετερογενών καλλιιεργειών διαφοροποίησης ΕΒΚ με διαφορετικό αναπτυξιακό δυναμικό (πατρικά κύτταρα E14 και μεταλλαγμένοι κλώνοι). Στην περίπτωση του κλώνου C28, όπου υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις για τη μειωμένη του MT σε σχέση με τα πατρικά κύτταρα E14, το φαινόμενο ήταν έντονο άμεσα (βλέπε Εικόνες 3.45-6 και 3.51-3), αλλά και στην περίπτωση ανάμειξης του κλώνου F25 με τα κύτταρα E14 το αποτέλεσμα (διαφοροποίηση νευροεξωδεμικής κατεύθυνσης) ήταν εξίσου ξεκάθαρο (βλέπε Εικόνες 3.45 και 3.47-8). Γενικά, διαπιστώθηκε ότι πραγματοποιείται κυτταρικός διαχωρισμός καθ' όλη τη διάρκεια της διαφοροποίησης, δηλαδή τόσο στο αρχικό μείγμα κυττάρων όσο και στα διαφοροποιούμενα παράγωγα αυτών. Για παράδειγμα, τα κύτταρα C28 στα χιμαιρικά ΕΒ με τα κύτταρα E14 διαχωρίζονται αρχικά (2^η ημέρα διαφοροποίησης) στην εξωτερική στοιβάδα των ΕΒ και στη συνέχεια (4^η ημέρα διαφοροποίησης) μέρος αυτών (με ασθενέστερο σήμα GFP) διαχωρίζονται πιο εσωτερικά (βλέπε Εικόνα 3.53). Με άλλα λόγια διαφαίνεται μια δυναμική διαδικασία όπου κύτταρα με διαφορετικό αναπτυξιακό

δυναμικό τείνουν να διαχωρίζονται σε συγκεκριμένες θέσεις εξαρτώμενα από την καταγωγή τους. Κάτι τέτοιο ευσταθεί μόνο αν δεχθούμε ότι η θέση που καταλαμβάνει ένα κύτταρο υπαγορεύει σε μεγάλο βαθμό την τύχη που θα ακολουθήσει. Το φαινόμενο αυτό έχει καταγραφεί και επιβεβαιώνεται και από άλλους⁽¹¹²⁻¹¹⁴⁾. Επιπλέον και συνηγορητικά, παρατηρήθηκε μια εναρμόνιση της πορείας της διαφοροποίησης ανάλογα με το περιβάλλον. Τα ίδια κύτταρα, π.χ. του κλώνου C28, εκφράζουν τις E- και N- cadherin με διαφορετικό τρόπο όταν διαφοροποιούνται σε αυτούσια ή χιμαιρικά EB (σύγκρινε αντίστοιχους ανοσοφθορισμούς στις Εικόνες 3.51-2).

Συγκεντρωτικά, λοιπόν, από τα αποτελέσματα των πειραμάτων της ενότητας 3.2.9 προκύπτει πως η διαφοροποίηση μέσω EB επηρεάζεται από τη σύσταση του EB (εάν αποτελείται από ένα κυτταρικό τύπο ή μείγμα περισσότερων), το αναπτυξιακό δυναμικό των κυττάρων που το απαρτίζουν, ενώ φαίνεται πολύ πιθανό πως οι διαφορετικά διαφοροποιούμενοι κυτταρικοί υποτύποι –είτε οι αρχικοί, είτε αυτοί που σταδιακά εμφανίζονται– διαχωρίζονται και δεν προκύπτουν *in situ* λ.χ. μέσω ΑΚΔ. Τέλος, ο κυτταρικός διαχωρισμός είναι ανεξάρτητος της διαφοροποίησης. Πραγματοποιείται ακόμα και στην ανάμειξη ετερογενών EBK υπό συνθήκες αυτοανανέωσης (Εικόνες 3.54-6) με τις διαφορές στη MT να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο (το φαινόμενο είναι πιο έντονο μεταξύ κυττάρων του κλώνου C28 και των E14 όπου ο C28 θεωρούμε ότι παρουσιάζει αισθητά μειωμένη MT σε σχέση με τα κύτταρα E14).

4.6 Η έκπτυξη εγκιβωτισμένων EBK σε τρισδιάστατο εξωκυττάριο πλέγμα συνοδεύεται από ΑΚΔ

Όλες οι μελέτες στο πεδίο της ΑΚΔ έχουν αναδείξει την παρουσία πολικότητας ως το κατεξοχήν απαραίτητο αρχικό προαπαιτούμενο για την πραγματοποίηση μιας ΑΚΔ. Η μόνη εξαίρεση ΑΚΔ που έχει καταγραφεί αφορά στις μωτικές διαιρέσεις των ωαρίων. Με αυτό ως δεδομένο, η πρόσφατη μελέτη των Bedzhon & Zernicka-Goetz⁽¹¹⁸⁾ οι οποίοι ανέπτυξαν ένα πρωτόκολλο έκπτυξης EBK σε συνθήκες που προσιδιάζουν την *in vivo* ανάπτυξη της όψιμης βλαστοκύστης με εμφανή κορυφο-βασική πολικότητα από συγκεκριμένο υποπληθυσμό, θα μπορούσε να διερευνηθεί ως ένα πιθανό σύστημα μελέτης ΑΚΔ σε EBK ποντικού. Παρά την αναγκαία απόκλιση από το παραπάνω πρωτόκολλο (για υλικοτεχνικούς κι όχι επιστημονικούς λόγους) η έκπτυξη εγκιβωτισμένων EBK σε εξωκυττάριο πλέγμα εξώθησε τα κύτταρα της ανώτερης στοιβάδας να αναπτύξουν έντονα χαρακτηριστικά πολικότητας (Εικόνες 3.57-9). Επιπλέον, οι δοκιμασίες μας

επιβεβαίωσαν τη διατήρηση της πολυδυναμίας απουσία LIF κατά τις πρώτες ημέρες έκπτυξης που παρουσιάστηκε στην παραπάνω δημοσίευση (Εικόνες 3.58-9). Αυτό που δεν κατέστη δυνατό ήταν η αναπαραγωγή των μορφολογικών χαρακτηριστικών της καλλιέργειάς τους. Δηλαδή, δεν επετεύχθη ο χαρακτηριστικός σχηματισμός ροζέτας αλλά μία άμορφη, μερικώς τρισδιάστατη αποικία κυττάρων (Εικόνα 3.57). Ωστόσο, η πρωτεΐνη aPKCζ εντοπίστηκε αποκλειστικά στην κορυφαία μεμβρανική επιφάνεια των κυττάρων της ανώτερης στοιβάδας ακόμα και κατά τη διάρκεια της μίτωσης (Εικόνες 3.57-9). Το τελευταίο αυτό χαρακτηριστικό συνοδεύτηκε σε αρκετές περιπτώσεις από την κάθετη στοίχιση της μιτωτικής ατράκτου ή την ασύμμετρη κατανομή της aPKCζ στα θυγατρικά κύτταρα (Εικόνα 3.59). Συνεπώς στο σύστημα αυτό υπήρχαν κύτταρα τα οποία πληρούσαν τουλάχιστον τα δυο από τα τρία βασικά χαρακτηριστικά μιας ΑΚΔ. Επιπρόσθετα, η παρατήρηση ότι τα πλέον βασικά κύτταρα (κατά την 3^η ημέρα έκπτυξης) είχαν χάσει αισθητά ή απόλυτα την παρουσία Oct4 πρωτεΐνης, ενδεχομένως να αποτελεί το αποτέλεσμα αυτών των ΑΚΔ (Εικόνα 3.58). Σε αυτή την κατεύθυνση συνηγορεί και η σχεδόν αποκλειστική παρουσία ενεργών ΠΒ (τουλάχιστον για το σηματοδοτικό μονοπάτι Shh) στα κορυφαία κύτταρα (Εικόνα 3.60).

Τα παραπάνω ενδιαφέροντα ευρήματα στο προσαρμοσμένο πρωτόκολλο των Bedzhov & Zernicka-Goetz⁽¹¹⁸⁾, αποτελούν μια πρώτη πραγματική ένδειξη ΑΚΔ σε *in vitro* περιβάλλον. Ωστόσο, δεν θα πρέπει να υποβαθμιστεί το γεγονός ότι η συγκεκριμένη διαδικασία δεν αποτελεί πρωτόκολλο κλασικής διαφοροποίησης ΕΒΚ. Με βάση τα αποτελέσματα της δημοσίευσης τα ΕΒΚ συνεχίζουν παρεμφερή πορεία με αυτή της *in vivo* ανάπτυξης της ώριμης βλαστοκύστης (επιβλάστης) μεταξύ των σταδίων μόλις πριν και αμέσως μετά την εμφύτευση. Με άλλα λόγια, η δοκιμασία αυτή αναδεικνύει τη δυνατότητα των ΕΒΚ να αναπαραγάγουν *in vitro* τις μορφογενετικές διαδικασίες της επιβλάστης στη μετάβαση από μια σφαίρα κυττάρων σε ένα πολωμένο επιθήλιο χρονικά, ενδεχομένως μηχανιστικά και ταυτόχρονα αυτόνομα. Έτσι, είναι λογική η διατήρηση της πολυδυναμίας που αρχικά παρατηρήσαμε, αλλά παραμένει απόλυτα αχαρτογράφητη η περεταίρω πορεία ανάπτυξης των κυττάρων της διαδικασίας. Αδιαμφισβήτητα το προτεινόμενο σύστημα εκτός από ενδιαφέρον είναι και αρκετά ελπιδοφόρο ώστε να αποτελέσει ένα σύστημα *in vitro* μελέτης ΑΚΔ ΕΒΚ.

Τέλος, με αφορμή τα παραπάνω ευρήματα αξίζει να σημειωθούν δυο παρατηρήσεις. Η πρώτη αφορά στην πιθανότητα συμβολής του εξωκυττάρου πλέγματος στην προαγωγή ΑΚΔ. Έχει δειχθεί πως διαφορές στο εύρος έκθεσης ενός ΒΚ στο

εξωκυττάριο πλέγμα μπορεί να ληφθεί ως εξωγενές σήμα (extrinsic signal) για την στοίχιση της ατράκτου και εμπλέκεται στο πρότυπο διαχωρισμού του γενομικού υλικού και την τύχη των θυγατρικών κυττάρων⁽¹¹⁹⁾. Τα ευρήματα αυτά ίσως βρίσκουν εφαρμογή στο σύστημα που μελετήσαμε και έτσι να εξηγείται η παρουσία ΑΚΔ. Η δεύτερη παρατήρηση αφορά στην πιθανότητα συγκερασμού μιας σειράς δεδομένων για την εξήγηση της *in vitro* εμφάνισης ΑΚΔ και της ετερογένειας γενικότερα των κυττάρων που προκύπτουν από την παραπάνω δοκιμασία. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα εξής: α) η πρώτη παρατήρηση, β) η ασύμμετρη παρουσία ενεργών ΠΒ στα κορυφαία κύτταρα της 3^{ης} ημέρας έκπτυξης, γ) η πιθανότητα κυτταρικού διαχωρισμού με βάση τις διαφορές στη ΜΤ μεταξύ των ανώτερων ή κατώτερων στοιβάδων, όπου εκεί ο κυτταροσκελετός θα πρέπει να εξισορροπήσει μηχανικά τις διαφορετικές ανάγκες (η ανώτερη μεμβράνη έρχεται σε επαφή με το εξωκυττάριο πλέγμα και η βασική με τα γειτονικά κύτταρα για τα κορυφαία κύτταρα ενώ, στα κύτταρα του πυθμένα, η βασική τους μεμβράνη εφάπτεται με το τρυβλίο και η ανώτερη με άλλα κύτταρα) και, τέλος, δ) τις ενδεχόμενες διαφορές (ποιοτικές ή/και ποσοτικές) στα ερεθίσματα που έχουν πρόσβαση τα εξωτερικά από τα εσωτερικά κύτταρα. Όλες αυτές οι παράμετροι ενδέχεται να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο (άλλες μικρότερο και άλλες μεγαλύτερο) στο τελικό αποτέλεσμα. Η αποσαφήνιση των παραπάνω θα μπορούσε κάλλιστα να αποτελέσει μια ξεχωριστή κι ενδιαφέρουσα διδακτορική διατριβή, η οποία θα προσέθετε ουσιαστικά στη βιολογία των ΕΒΚ.

4.7 Ανάδειξη πρότυπων δεικτών πολυδυναμίας

Η παρούσα διδακτορική διατριβή δεν αποσκοπούσε στην ταυτοποίηση νέων δεικτών πολυδυναμίας. Ωστόσο, από τα αποτελέσματα που προέκυψαν δικαιολογείται να υποστηρίξει την πιθανή ανακάλυψη δυο νέων εναλλακτικών δεικτών της βλαστικής κατάστασης. Ο πρώτος δείκτης απορρέει από την παρατήρηση των διαφορετικών κινήσεων που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της μίτωσης των αδιαφοροποίητων από τα διαφοροποιημένα ΕΒΚ (Εικόνα 3.16). Η μη κατοπτρική κίνηση (ΜΚΚ) των πόλων της μιτωτικής ατράκτου κατά τη διάρκεια της ανάφασης αποτελεί αποκλειστικό χαρακτηριστικό της αδιαφοροποίητης κατάστασης. Από τη δεύτερη ημέρα καλλιέργειας απουσία LIF (με ή χωρίς προσθήκη ΡΟ), όπου όλα τα κύτταρα έχουν βγει με βεβαιότητα από τη βλαστική κατάσταση, καταγράφηκαν ομοιόμορφες κατοπτρικές κινήσεις (ΚΚ) των πόλων της ατράκτου κατά την ανάφαση. Το απρόσμενο αυτό εύρημα δεν μπορεί να εξηγηθεί εύκολα, πόσο μάλλον όταν δεν υπάρχει σχετική βιβλιογραφία. Κάποιες αντίστοιχες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί αφορούσαν μη βλαστικές κυτταρικές

σειρές και αποσκοπούσαν στη διερεύνηση και εξήγηση της πραγματοποίησης συμμετρικών διαιρέσεων^(56,59). Η μόνη αναφορά η οποία μελετά κινήσεις κεντροσωμάτων και μάλιστα σχετίζεται με ΑΚΔ, αφορά στα SOP κύτταρα της *Drosophila*⁽¹⁴⁸⁾. Η διαφοροποίηση των SOP κυττάρων της *Drosophila* αποτελούν το κατ' εξοχήν μοντέλο ΑΚΔ σε μη βλαστικά κύτταρα. Σε αυτά τα κύτταρα καταγράφηκε η ασύμμετρη κίνηση των κεντροσωμάτων αλλά αμέσως μετά τη μίτωση και, επιπλέον, η συμβολή της στην ανάκτηση διαφορετικής κυτταρικής τύχης από τα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως μελετώντας το παραπάνω φαινόμενο των ΜΚΚ/ΚΚ παρατηρήσαμε και μια επίσης αναπάντεχη ασυμμετρία στη δομή της ατράκτου στις περισσότερες μεταφασικές ατράκτους. Η ασυμμετρία αυτή δεν ήταν της μορφής που παρατηρήσαμε στα λευχαιμικά κύτταρα, δηλαδή ασυμμετρία θέσης (Εικόνα 3.5) αλλά αυτής καθ' εαυτής της δομής της. Ο ένας πόλος βρισκόταν πιο κοντά στο μεταφασικό δίσκο (metaphase plate) από τον άλλο ενώ και το μέγεθος της ατράκτου παρουσίαζε μεγάλες αποκλίσεις από κύτταρο σε κύτταρο (Εικόνα 3.17). Κάτι αντίστοιχο δεν αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία και ειδικότερα σε επίπεδο ανασκοπήσεων (ενδεικτικά⁽⁶⁷⁾). Παρ' όλα αυτά, διαφορές στο μέγεθος της ατράκτου έχουν καταγραφεί στα βλαστομερίδια των πρώιμων βλαστοκύστεων (στάδιο του μοριδίου) και δομικές ασυμμετρίες στα κορυφαία πρόδρομικά νευρωνικά κύτταρα του ποντικίσου νεοφλοιού (apical progenitors of mouse neocortex)^(149,150). Πλέον αυτών των τριών αναφορών δεν παρατηρήθηκε άλλη σχετική εργασία και αυτό αιτιολογείται από τη δυσκολία καταγραφής σε πραγματικό χρόνο φθορίζουσες πρωτεΐνες σε ευαίσθητα κύτταρα όπως τα βλαστικά (ενδεικτικά⁽¹⁵¹⁾). Στο γεγονός αυτό οφείλεται και η παρουσία μόνο μιας δημοσίευσης με καταγραφή διαιρέσεων φθορίζουσων ΕΒΚ σε πραγματικό χρόνο⁽¹²⁰⁾. Σε αυτή την εργασία μάλιστα παρατηρούν και ΑΚΔ, υπό τις πρωτότυπες συνθήκες που διαμόρφωσαν. Από την παρατήρηση των στιγμιότυπων των κυτταρικών τους διαιρέσεων σε αδιαφοροποίητα ΕΒΚ ποντικού φαίνεται πως επιβεβαιώνεται το εύρημά μας της ΜΚΚ, χωρίς βεβαίως να μπορεί να στοιχειοθετηθεί ποιοτικά.

Ο δεύτερος πρωτότυπος δείκτης πολυδυναμίας ΕΒΚ που αναδείχθηκε από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας είναι η απουσία (και ανικανότητα) ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού Shh. Η βλαστική κατάσταση είναι γνωστό πως διέπεται από μια υπερβολική μεταγραφική δραστηριότητα ταυτόχρονα με την καταστολή πλειάδας σηματοδοτικών μονοπατιών, η ενεργοποίηση των οποίων θα οδηγούσε στην απώλειά της (διαφοροποίηση). Ένα μικρό ποσοστό συνδετών (*ligands*) αναγνωρίζουν τους υποδοχείς

τους αποκλειστικά στη μεμβράνη των ΠΒ. Αν και λίγοι, είναι ιδιαίτερα σημαντικοί και ο αριθμός τους το τελευταίο διάστημα συνεχώς αυξάνει, γεγονός που καταδεικνύει το αυξημένο ενδιαφέρον για τη βιολογία της ΠΒ. Έτσι, πλέον των γνώριμων σηματοδοτικών μονοπατιών Shh, Wnt και PDGF έρχονται να προστεθούν τα μονοπάτια των TGF-β, Notch, mTOR, RTK (receptor tyrosine kinase)^(78,152-156). Με δεδομένα (α) την απουσία δράσης όλων των γνωστών σηματοδοτικών μονοπατιών, εκτός του FGF2, στα *in vivo* EBK της ICM και (β) τη δράση όλων των παραπάνω στην *in vitro* διαφοροποίηση των EBK, η μη ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Shh που διαπιστώσαμε, εκτός από δικαιολογημένη, θα πρέπει να θεωρηθεί και ικανή ώστε να αποτελέσει νέο δείκτη βλαστικότητας των EBK.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η παρουσία του Gli2, τελεστή του σηματοδοτικού μονοπατιού Shh, η παρουσία του οποίου στο άπω άκρο της ΠΒ υποδηλώνει ενεργοποίηση του μονοπατιού. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε σε διάφορα κυτταρικά συστήματα, καλύπτοντας όλο το αναπτυξιακό φάσμα: αδιαφοροποίητα EBK, διαφοροποιούμενα EBK πρώιμων και όψιμων σταδίων, κλώνους EBK που παραμένουν *naive* ή *primed*, κύτταρα MEFs, και ενήλικα BK. Απουσία ενεργής σηματοδότησης Shh παρατηρήθηκε στα αδιαφοροποίητα EBK, στον *naive* κλώνο EBK A11 (καλλιεργημένο έως ~16 περάσματα) και τα διαφοροποιούμενα κύτταρα E14 των δυο πρώτων ημερών διαφοροποίησης (Εικόνα 3.28 και πληροφορίες που δεν παρουσιάζονται). Αντιθέτως, διαφοροποιούμενα EBK παρουσία SAG (από τη δεύτερη ημέρα διαφοροποίησης παρουσία PO), ο κλώνος A11 πεπερασμένης καλλιέργειας (>19 περάσματα, όπου παρατηρούνται σημαντικές ατυπίες), οι *primed* κλώνοι (F25, B12 και C28) και τα πιο προηγμένα αναπτυξιακά συστήματα (MEFs και ενήλικα BK) παρουσίαζαν ενεργοποιημένο το εν λόγω σηματοδοτικό μονοπάτι (Εικόνες 3.27-8 και 3.50 και πληροφορίες που δεν παρουσιάζονται).

Τέλος, ενισχυτικά με την εκτίμηση της απουσίας σηματοδότησης Shh ως δείκτη βλαστικότητας, τα ευρήματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τη διεθνή βιβλιογραφία όπως αναπτύχθηκε εκτενώς στην ενότητα 4.3 (συμπεριλαμβάνεται και η εξαίρεση μιας αναφοράς).

Κεφάλαιο 5 Συμπεράσματα

Συμπεράσματα

1. Η έκπτυξη και η διαφοροποίηση λευχαιμικών κυτταρικών σειρών (HL60, HuT78 και Jurkat) σε *in vitro* συνθήκες καλλιέργειας πραγματοποιείται αποκλειστικά μέσω συμμετρικών διαιρέσεων.
2. Στα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης EBK ποντικού (τυχαία ή στοχευμένη, σε δυο ή τρεις διαστάσεις) σε *in vitro* συνθήκες δεν παρατηρούνται ΑΚΔ. Η κατανομή στοιχείων πολικότητας, ΚΚΤ, πολυδυναμίας, ιστοειδικότητας, επιγενετικής σήμανσης, πυρηνικού φακέλου αλλά και του εκμαγείου DNA στα θυγατρικά κύτταρα γίνεται με απόλυτα συμμετρικό τρόπο.
3. Η μεταφασική άτρακτος των αδιαφοροποίητων EBK ποντικού εμφανίζει έντονα στοιχεία δομικής ασυμμετρίας και οι κινήσεις των πόλων της στο στάδιο της ανάφασης είναι επίσης ασύμμετρες.
4. Τα EBK ποντικού συνθέτουν ΠΒ και ο σχηματισμός τους είναι ετερόχρονος στα θυγατρικά κύτταρα. Σε αντίθεση με τα EBK του ανθρώπου, στις ΠΒ των αυτοανανεούμενων EBK ποντικού δεν εντοπίζονται οι παράγοντες πολυδυναμίας Nanog και Sox2, ενώ το σηματοδοτικό μονοπάτι Shh βρέθηκε ανενεργό ακόμα και κατά τα πρώιμα στάδια της διαφοροποίησής τους (υπό -LIF ±PO συνθήκες). Το εν λόγω μονοπάτι ενεργοποιείται όχι νωρίτερα από τη 2^η ημέρα διαφοροποίησης (υπό -LIF +PO +SAG συνθήκες).
5. Κατά τη διαφοροποίηση EBK ποντικού δεν παρατηρείται διαφορετική μεταμιτωτική ανάκτηση κυτταρικής τύχης μέσω του ετερόχρονου σχηματισμού και ενεργοποίησης των ΠΒ μεταξύ θυγατρικών κυττάρων.
6. Τα EBK ποντικού διαχωρίζονται (*cell sorting*) τοπολογικά σε συγκεκριμένες θέσεις ανάλογα με το αναπτυξιακό δυναμικό τους τόσο στην αδιαφοροποίητη κατάσταση όσο και κατά τη διαφοροποίησή τους. Με τον τρόπο αυτό ίσως εξηγείται η ετερογένεια που διέπει τις διαφοροποιήσεις τους.
7. Σε ιδιαίτερες *in vitro* συνθήκες έκπτυξης (εγκιβωτισμένη έκπτυξη σε εξωκυττάριο πλέγμα -3D *matrigel matrix*) τα EBK ποντικού πραγματοποιούν ΑΚΔ.
8. Οι ασύμμετρες κινήσεις των πόλων της ατράκτου στο στάδιο της ανάφασης και η απουσία ενεργούς σηματοδότησης Shh από τα αδιαφοροποίητα EBK ποντικού μπορούν να προταθούν ως εναλλακτικοί δείκτες βλαστικότητας.

Κεφάλαιο 6 Περίληψη

6.1 Περίληψη

Πυρηνο-κυτταροπλασματική κυκλοφορία σε ασύμμετρα διαιρούμενα βλαστικά κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος: πιθανός ρόλος στην παθογένεση της λευχαιμίας

ΚΑΡΑΚΑΪΔΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση (ΑΚΔ) αποτελεί ένα ιδιαίτερο τύπο κυτταρικής διαίρεσης που απαντάται σε πολλά είδη στη φύση, υπό μια εξαιρετικά συντηρημένη διαδικασία. Το προϊόν μιας ΑΚΔ είναι δυο διακριτά θυγατρικά κύτταρα, όπου, τουλάχιστον το ένα, διαφέρει και από το μητρικό. Η χρήση ΑΚΔ από τα βλαστικά κύτταρα επικεντρώνει το ερευνητικό ενδιαφέρον διότι διατηρεί έναν υποπληθυσμό κυττάρων σε υποδεέστερο αναπτυξιακό επίπεδο (πιο βλαστικό) απ' ό,τι τα γειτονικά κύτταρα του ιστού. Όλα τα κλασικά πρότυπα μελέτης ΑΚΔ αφορούν συγκεκριμένους *in vivo* κυτταρικούς υποτύπους από όλο το αναπτυξιακό φάσμα (έμβρυα και ενήλικα ζώα). Βιβλιογραφικά ωστόσο, η χρήση ΑΚΔ υπό *in vitro* συνθήκες καλλιέργειας επιδέχεται πολλαπλών ερμηνειών, διατηρώντας ασαφή τη συνεισφορά της στην ετερογένεια που χαρακτηρίζει τις εν λόγω διαφοροποιήσεις.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή επιχειρήθηκε η αποσαφήνιση της παρουσίας ΑΚΔ σε μια σειρά διαφοροποιήσιμων κυτταρικών συστημάτων (λευχαιμικές κυτταρικές σειρές, νωπά δείγματα αντίστοιχων ασθενών και εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ΕΒΚ) ποντικού). Στις διαφοροποιήσεις των κυττάρων αυτών πραγματοποιήθηκε ενδελεχής έλεγχος κλασικών δεικτών για όλα τα στάδια μιας ΑΚΔ. Επιπλέον, διερευνήθηκαν και άλλοι παράγοντες ως προς την συμμετρική ή ασύμμετρη κατανομή τους λ.χ. δείκτες πολυδυναμίας ή νουκλεοπορίνες (η βασική υπό διερεύνηση υπόθεση της παρούσας διατριβής). Σε ό,τι αφορά τα ΕΒΚ πραγματοποιήθηκαν τυχαίες και στοχευμένες διαφοροποιήσεις τόσο σε δύο όσο και σε τρεις διαστάσεις. Στις τρισδιάστατες διαφοροποιήσεις ΕΒΚ εξετάστηκε επίσης η πιθανότητα εμφάνισης του σπάνιου φαινομένου NRTS (non-random template segregation).

Το στερεότυπο αποτέλεσμα που προέκυψε από όλα τα παραπάνω συστήματα και συνθήκες μελέτης ήταν η χρήση αποκλειστικά συμμετρικών διαιρέσεων από τα *in vitro* διαφοροποιούμενα κύτταρα. Η παραπάνω συμμετρία διατηρήθηκε και στην ποιοτική ανάλυση της σύστασης των πυρηνικών φακέλων σε ζεύγη θυγατρικών κυττάρων. Παρόλα

αυτά, καταγράφηκαν ασυμμετρίες στη δομή και τις κινήσεις της μιτωτικής ατράκτου κατά τη διάρκεια της ανάφασης των αδιαφοροποίητων EBK.

Ως επακόλουθο του παραπάνω αποτελέσματος προέκυψε η αναζήτηση εναλλακτικής ερμηνείας διερευνώντας αρχικά την πιθανότητα μετα-μιτωτικής ανάκτησης διαφορετικής κυτταρικής τύχης μέσω του ετερόχρονου σχηματισμού πρωταρχικών βλεφαρίδων (PB) και κατ' επέκταση ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού Sonic Hedgehog (Shh) μεταξύ θυγατρικών κυττάρων. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε στα EBK αφού πρώτα ταυτοποιήθηκε η παρουσία PB σε EBK ποντικού αλλά και ο ετερόχρονος σχηματισμός τους σε ζεύγη αδελφών κυττάρων. Οι PB των αδιαφοροποίητων ή πρώιμα διαφοροποιημένων EBK φαίνεται πως δεν χρησιμοποιούνται από το σηματοδοτικό μονοπάτι Shh. Έτσι, στη συνέχεια, διερευνήθηκε η επίδραση του κυτταρικού διαχωρισμού (cell sorting), στην ετερογένεια των διαφοροποιήσεων των EBK. Σε αυτή την κατεύθυνση πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων συγκαλλιέργειας και χιμαιρικών διαφοροποιήσεων μεταξύ πατρικών EBK και μεταλλαγμένων κλώνων αυτών ως προς διάφορες μορφές του γονιδίου *LBR*. Τα πειράματα αυτά ανέδειξαν ότι η δυναμική διαδικασία του κυτταρικού διαχωρισμού μεταξύ EBK με διαφορετικό αναπτυξιακό δυναμικό συνεισφέρει καταλυτικά στη θέση που καταλαμβάνει ένα κύτταρο σε μια καλλιέργεια (αποικία ή εμβρυονικό σωματίο), τη μεταγραφική του δραστηριότητα αλλά και το τελικό αποτέλεσμα (απόδοση-efficiency) μιας διαφοροποίησης εξαρτώμενο από το αρχικό περιβάλλον (σύσταση αρχικού μείγματος κυττάρων και καλλιεργητικό μέσο).

Συγκεντρωτικά διαπιστώθηκε ότι η ετερογένεια που παρατηρείται στις *in vitro* διαφοροποιήσεις δεν μπορεί να αποδοθεί σε ΑΚΔ ή στην μετα-μιτωτική ανάκτηση διαφορετικής κυτταρικής τύχης μέσω της συμβολής της σηματοδότησης των PB αλλά στην δυναμική διαδικασία του κυτταρικού διαχωρισμού. Η απουσία ΑΚΔ στις παραπάνω *in vitro* συνθήκες διαφοροποίησης των EBK δεν αναιρεί τα ογκώδη βιβλιογραφικά δεδομένα χρήσης ΑΚΔ από αντίστοιχα κύτταρα *in vivo*. Η διαφορά εντοπίστηκε στις συνθήκες έκπτυξης. Όταν το *in vitro* περιβάλλον προσαρμοστεί (εγκυβωτισμένη έκπτυξη σε εξωκυττάριο πλέγμα), ώστε τα κύτταρα να εκτελούν τις μορφογενετικές διαδικασίες που ακολουθούν *in vivo* (επιβλάστη) αυτόνομα, τότε μέρος αυτών διαιρείται πράγματι ασύμμετρα. Τέλος, από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας διαπιστώθηκε ότι οι ιδιαίτερες κινήσεις της αναφασικής ατράκτου και η απουσία της σηματοδότησης Shh από τα αδιαφοροποίητα EBK μπορούν να προταθούν ως πιθανοί εναλλακτικοί δείκτες βλαστικότητας των *in vitro* καλλιεργούμενων EBK.

6.2 Abstract

Nucleo-cytoplasmic trafficking in asymmetrically dividing hematopoietic stem cells: putative role in leukemogenesis

KARAKAIDOS PANAGIOTIS

Asymmetric cell division (ACD) is a unique mode of division which occurs in a wide range of species under a highly conserved mechanism. The outcome of an ACD is the generation of two distinct daughter cells, where at least one is also different from the mother cell. The use of ACDs by stem cells (SCs) focuses the research interest, since it enables the conservation of a subpopulation at an inferior developmental state (closer to pluripotency) compared to the rest neighboring cells of the tissue. All the classical models of ACD concern distinct *in vivo* cellular subtypes from the entire developmental repertoire (from embryos to adults). However, the use of ACD by SCs under *in vitro* culturing conditions allows multiple interpretations, maintaining its contribution to the heterogeneity that characterizes SC-differentiation unclear.

The present work attempted to clarify if ACD are utilized *in vitro* through a range of differentiable cellular systems (leukemic cell lines and relevant patient samples and mouse embryonic SCs -ESCs). These differentiations were thoroughly investigated for the presence of ACDs with a wide range of markers. These include classical ACD markers for all the steps of an ACD process and, also, other factors that could indicate an ACD event (e.g. distribution of pluripotency or lineage specific factors). Similarly, the nuclear envelope assembly and composition were also investigated through the distribution of nucleoporins in daughter cells (the major target of this work). Regarding ESCs, several types of differentiation schemes (stochastic and targeted differentiations in two or three dimensional cultures) were employed and the investigation covered additionally the possibility of NRTS (non-random template segregation) bearing ACDs.

The consistent result of the above analysis favors the use of purely symmetric cell divisions by the *in vitro* differentiating cells. This symmetry was also evident in the quantitative analysis of nuclear envelope composition in daughter cell pairs. However, structural and mobility asymmetries were recorded in the mitotic spindles or anaphase/telophase moves of self-renewing ESC divisions.

As a consequence of the above results, an alternative explanation was pursued. Thus, initially, we investigated the possibility of post-mitotic differential fate acquisition

through the asynchronous assembly of primary cilia (pc) between daughter cells that could lead to unequal activation of pc mediated signaling like Sonic Hedgehog (Shh). This was conducted once it was verified that ESCs in vitro assemble pc that emerge asynchronously in daughter cells. This analysis revealed that the Shh signaling pathway is inactive in both self-renewing and early differentiating ESCs. Thus, the contribution of cell sorting to the observed heterogeneity of ESC differentiation was investigated next. Towards this direction, a series of experiments was conducted including co-cultures and chimeric differentiations of mixed cellular populations comprised of parental E14 cells and clones of them that overexpress distinct parts of the *LBR* gene. These experiments highlighted that the dynamic process of cell sorting between ESCs of differential developmental potential contributes decisively to the allocation of a cell (within the colony or embryoid body), its transcriptional activity and the final outcome (efficiency) of the differentiation in a context-dependent manner (composition of the initial mixture of cells and growth medium).

Collectively, we anticipate that the heterogeneity of an in vitro differentiation cannot be attributed to ACDs or post-mitotic differential fate acquisition (via pc's mediated signaling) but to the dynamic process of cell sorting. The absence of ACDs in the examined in vitro differentiations of ESCs doesn't contradict the numerous relevant reports on ACD utilization from their in vivo counterparts. This seemingly differential behavior stems on the differences of the two microenvironments (in vivo vs. in vitro). When the in vitro setting is adjusted appropriately (embedded cells in matrigel matrix), rendering ESCs able to follow the in vivo morphogenetic processes autonomously, then some of them divide indeed asymmetrically. Finally, according to the results of this desoertation, both the "unusual" moves of the mitotic spindle (during anaphase) and the absence of Shh activity in self-renewing ESCs could potentially be suggested as candidate markers of pluripotency.

Κεφάλαιο 7 Βιβλιογραφία

Λίστα βιβλιογραφικών αναφορών:

1. Horvitz HR, Herskowitz I. Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs, that is the question. *Cell*. 1992;68(2):237–55.
2. Lillie FR. The organization of the egg of *Unio*, based on a study of its maturation, fertilization, and cleavage. *J Morphol*. 1901;17:227–92.
3. Conklin EG. The organization and cell lineage of the ascidian egg. *J Acad Nat Sci Phila*. 1905;13:1–119.
4. Rhyu MS, Jan LY, Jan YN. Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell*. 1994;76(3):477–91.
5. Kempfues KJ, Priess JR, Morton DG, Cheng NS. Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell*. 1988;52(3):311–20.
6. Knoblich JA. Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division. *Cell* 2008;132(4):583–97.
7. Knoblich J a. Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010 11(12):849–60.
8. Inaba M, Yamashita YM. Asymmetric Stem Cell Division: Precision for Robustness. *Cell Stem Cell* 2012;11(4):461–9.
9. Charville GW, Rando T a. The mortal strand hypothesis: Non-random chromosome inheritance and the biased segregation of damaged DNA. *Semin Cell Dev Biol* 2013;24(8-9):653–60.
10. Evano B, Tajbakhsh S. Sorting DNA with asymmetry: A new player in gene regulation? *Chromosom Res*. 2013;21(3):225–42.
11. Nigg E a., Stearns T. The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nat Cell Biol* 2011;13(10):1154–60.
12. Pelletier L, Yamashita YM. Centrosome asymmetry and inheritance during animal development. *Curr Opin Cell Biol* 2012;24(4):541–6.
13. Chen C-T, Ettinger AW, Huttner WB, Doxsey SJ. Resurrecting remnants: the lives of post-mitotic midbodies. *Trends Cell Biol* 2013;23(3):118–28.
14. Tajbakhsh S, Gonzalez C. Biased segregation of DNA and centrosomes: moving together or drifting apart? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009 Nov;10(11):804–10.
15. Roubinet C, Cabernard C. Control of asymmetric cell division. *Curr Opin Cell Biol* 2014;31:84–91.
16. Lerit DA, Smyth JT, Rusan NM. Organelle asymmetry for proper fitness, function, and fate. *Chromosom Res* 2013;21(3):271–86.
17. Schroeder T. Asymmetric Cell Division in Normal and Malignant Hematopoietic Precursor Cells. *Cell Stem Cell*. 2007;1(5):479–81.
18. Wu M, Kwon HY, Rattis F, Blum J, Zhao C, Ashkenazi R, et al. Imaging hematopoietic precursor division in real time. *Cell Stem Cell* 2007 1(5):541–54.
19. Siller KH, Doe CQ. Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol* 2009 Apr;11(4):365–74.
20. Morin X, Bellaïche Y. Mitotic Spindle Orientation in Asymmetric and Symmetric Cell Divisions during Animal Development. *Dev Cell* 2011;21(1):102–19.
21. Nance J, Zallen JA. Elaborating polarity: PAR proteins and the cytoskeleton. *Development* 2011;138(5):799–809.
22. Ralph A. Neumuller and Juergen A. Knoblich. Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes & Dev* 2009 23(23):2675.
23. Chia W, Somers WG, Wang H. *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions: cell cycle regulators, asymmetric protein localization, and tumorigenesis. *J Cell Biol* 2008 Jan 28 180(2):267–72.
24. Yamashita YM. Cell adhesion in regulation of asymmetric stem cell division. *Curr Opin Cell Biol* 2010 22(5):605–10.
25. Yamashita YM, Yuan H, Cheng J, Hunt AJ. Polarity in stem cell division: asymmetric stem cell division in tissue homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010 2(1):a001313.
26. Gómez-López S, Lerner RG, Petritsch C. Asymmetric cell division of stem and progenitor cells during homeostasis and cancer. *Cell Mol Life Sci* 2014;71(4):575–97.
27. Tsunekawa Y, Britto JM, Takahashi M, Polleux F, Tan S-S, Osumi N. Cyclin D2 in the basal process of neural progenitors is linked to non-equivalent cell fates. *EMBO J* 2012;31(8):1879–92.
28. Lange C, Calegari F. Cdks and cyclins link G1 length and differentiation of embryonic, neural and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle*. 2010;9(10):1893–900.
29. Tsunekawa Y, Osumi N. How to keep proliferative neural stem/progenitor cells: A critical role of asymmetric inheritance of cyclin D2. *Cell Cycle*. 2012;11(19):3550–4.
30. Chang JT, Palanivel VR, Kinjyo I, Schambach F, Intlekofer AM, Banerjee A, et al. Asymmetric T Lymphocyte Adaptive Immune Responses. *Science* 2007;315:1687–91.
31. Oliaro J, Van Ham V, Sacirbegovic F, Pasam A, Bomzon Z, Pham K, et al. Asymmetric Cell Division of T Cells upon Antigen Presentation Uses Multiple Conserved Mechanisms. *J Immunol* 2010 Jun 7.
32. Chang JT, Ciocca ML, Kinjyo I, Palanivel VR, McClurkin CE, Dejong CS, et al. Asymmetric Proteasome

- Segregation as a Mechanism for Unequal Partitioning of the Transcription Factor T-bet during T Lymphocyte Division. *Immunity* 2011 Apr 22;34(4):492–504.
33. Congdon KL, Reya T. Divide and conquer: how asymmetric division shapes cell fate in the hematopoietic system. *Curr Opin Immunol* 2008 20(3):302–7.
 34. Fürthauer M, González-Gaitán M. Endocytosis, asymmetric cell division, stem cells and cancer: unus pro omnibus, omnes pro uno. *Mol Oncol* 2009 3(4):339–53.
 35. Xie J, Wooten M, Tran V, Chen B-C, Pozmanter C, Simbolon C, et al. Histone H3 Threonine Phosphorylation Regulates Asymmetric Histone Inheritance in the Drosophila Male Germline. *Cell* 2015 Nov 5;163(4):920–33.
 36. Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* 1975 May 15;255(5505):197–200.
 37. Lansdorp PM. Immortal strands? Give me a break. *Cell* 2007 Jun 29;129(7):1244–7.
 38. Lew DJ, Burke DJ, Dutta A. The immortal strand hypothesis: how could it work? *Cell* 2008;133(1):21–3.
 39. Takeshita H. Asymmetric cortical and nuclear localizations of WRM-1/ -catenin during asymmetric cell division in *C. elegans*. *Genes Dev* 2005 Aug 1;19(15):1743–8.
 40. Hanahan D, Weinberg R a. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 Jan 7;100(1):57–70.
 41. Hawkins ED, Russell SM. Upsides and downsides to polarity and asymmetric cell division in leukemia. *Oncogene* 2008 Dec 24;27(55):7003–17.
 42. Powell AE, Shung C-Y, Saylor KW, Müllendorff K a, Müllendorff K a, Weiss JB, et al. Lessons from development: A role for asymmetric stem cell division in cancer. *Stem Cell Res* 2010 Jan;4(1):3–9.
 43. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Vol. 292, *Nature*. 1981. p. 154–6.
 44. A van S, I O. Stem cell research: Trends in and perspectives on the evolving international landscape. *Stem Cell Res*. 2014;36:6–10.
 45. Zipori D. Biology of Stem Cells and the Molecular Basis of the Stem State [Internet]. *Stem Cell Biology and Regenerative Medicine*. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. 151-175.
 46. Doe CQ. Neural stem cells: balancing self-renewal with differentiation. *Development* 2008 135(9):1575–87.
 47. Li R. The Art of Choreographing Asymmetric Cell Division. *Dev Cell* 2013;25(5):439–50. 3
 48. Kalmar T, Lim C, Hayward P, Muñoz-Descalzo S, Nichols J, Garcia-Ojalvo J, et al. Regulated fluctuations in nanog expression mediate cell fate decisions in embryonic stem cells. *PLoS Biol* 2009;7(7):e1000149.
 49. Elabd C, Cousin W, Chen RY, Chooljian MS, Pham JT, Conboy IM, et al. DNA methyltransferase-3-dependent nonrandom template segregation in differentiating embryonic stem cells. *J Cell Biol*. 2013;203(1):73–85.
 50. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. 2344 p.
 51. Maison C, Horstmann H, Georgatos SD. Regulated docking of nuclear membrane vesicles to vimentin filaments during mitosis. *J Cell Biol* 1993 Dec 1;123(6 Pt 1):1491–505.
 52. Meier J, Georgatos SD. Type B lamins remain associated with the integral nuclear envelope protein p58 during mitosis: implications for nuclear reassembly. *EMBO J* 1994 Apr 15;13(8):1888–98.
 53. T M. Asymmetric cell division in human leukemic promyelocytic cells (HL60). *cell Biol Int*. 1995;
 54. Tsiftoglou a S, Robinson SH. Differentiation of leukemic cell lines: a review focusing on murine erythroleukemia and human HL-60 cells. *Int J Cell Cloning* 1985 Nov;3(6):349–66.
 55. Birnie GD. The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation. *Br J Cancer Suppl* 1988 Dec;9:41–5.
 56. Kiyomitsu T, Cheeseman IM. Chromosome- and spindle-pole-derived signals generate an intrinsic code for spindle position and orientation. *Nat Cell Biol* 2012;14(3):311–7.
 57. Huei Tan C, Gasic I, Huber-Reggi SP, Dudka D, Barisic M, Maiato H, et al. The equatorial position of the metaphase plate ensures symmetric cell divisions. *Elife* 2015;4:e05124.
 58. Thorpe PH, Bruno J, Rothstein R. Kinetochore asymmetry defines a single yeast lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(16):6673–8.
 59. Collins ES, Balchand SK, Faraci JL, Wadsworth P, Lee W-L. Cell cycle-regulated cortical dynein/dynactin promotes symmetric cell division by differential pole motion in anaphase. *Mol Biol Cell* 2012;23(17):3380–90.
 60. Filby A, Perucha E, Summers H, Rees P, Chana P, Heck S, et al. An imaging flow cytometric method for measuring cell division history and molecular symmetry during mitosis. *Cytometry A* 2011;79(7):496–506.
 61. Wodarz D. Stem cell regulation and the development of blast crisis in chronic myeloid leukemia: Implications for the outcome of Imatinib treatment and discontinuation. *Med Hypotheses* 2008;70(1):128–36.
 62. Marciniak-Czochra A, Stiehl T, Ho AD, Jäger W, Wagner W. Modeling of Asymmetric Cell Division in Hematopoietic Stem Cells—Regulation of Self-Renewal Is Essential for Efficient Repopulation. *Stem Cells Dev*. 2009 Apr;18(3):377–86.

63. Traulsen A, Pacheco JM, Dingli D. Reproductive fitness advantage of BCR-ABL expressing leukemia cells. *Cancer Lett.* 2010;294(1):43–8.
64. Ito T, Kwon HY, Zimdahl B, Congdon KL, Blum J, Lento WE, et al. Regulation of myeloid leukaemia by the cell-fate determinant Musashi. *Nature* 2010 Aug 5 [cited 2011 Apr 11];466(7307):765–8.
65. Kharas MG, Lengner CJ, Al-Shahrour F, Bullinger L, Ball B, Zaidi S, et al. Musashi-2 regulates normal hematopoiesis and promotes aggressive myeloid leukemia. *Nat Med* 2010;16(8):903–8.
66. Eckersley-Maslin MA, Bergmann JH, Lazar Z, Spector DL. Lamin A/C is Expressed in Pluripotent Mouse Embryonic Stem Cells. *Nucleus* 2013;4(1):53–60.
67. Goshima G, Scholey JM. Control of mitotic spindle length. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2010 Nov 10 [cited 2011 Jun 28];26:21–57.
68. Liu J, Desai A, Onuchic JN, Hwa T. An integrated mechanobiochemical feedback mechanism describes chromosome motility from prometaphase to anaphase in mitosis. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105(37):13752–7.
69. Zwaka TP, Thomson J a. Differentiation of human embryonic stem cells occurs through symmetric cell division. *Stem Cells* 2005 Feb 23(2):146–9.
70. Chambers I, Silva J, Colby D, Nichols J, Nijmeijer B, Robertson M, et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 2007;450(7173):1230–4.
71. Torres-Padilla M-E, Chambers I. Transcription factor heterogeneity in pluripotent stem cells: a stochastic advantage. *Development* 2014;141(11):2173–81.
72. Faddah D a., Wang H, Cheng AW, Katz Y, Buganim Y, Jaenisch R. Single-cell analysis reveals that expression of nanog is biallelic and equally variable as that of other pluripotency factors in mouse escs. *Cell Stem Cell* 2013;13(1):23–9.
73. Tran D, Chalhoub A, Schooley A, Zhang W, Ngsee JK. A mutation in VAPB that causes amyotrophic lateral sclerosis also causes a nuclear envelope defect. *J Cell Sci* 2012;125(12):2831–6.
74. Sur I, Neumann S, Noegel A a. Nesprin-1 role in DNA damage response. *Nucleus* 2014;5(2):1–19.
75. Markaki Y, Christogianni A, Politou AS, Georgatos SD. Phosphorylation of histone H3 at Thr3 is part of a combinatorial pattern that marks and configures mitotic chromatin. *J Cell Sci* 2009 Aug 15 122(Pt 16):2809–19.
76. Anderson CT, Stearns T. Centriole age underlies asynchronous primary cilium growth in mammalian cells. *Curr Biol* 2009;19(17):1498–502.
77. Piotrowska-Nitsche K, Caspary T. Live imaging of individual cell divisions in mouse neuroepithelium shows asymmetry in cilium formation and Sonic hedgehog response. *Cilia.* 2012;1(1):6.
78. Satir P, Pedersen LB, Christensen ST. The primary cilium at a glance. *J Cell Sci* 2010;123(4):499–503.
79. Awan A, Oliveri RS, Jensen PL, Christensen ST, Andersen CY. Immunofluorescence and mRNA Analysis of Human Embryonic Stem Cells (hESCs) Grown Under Feeder-Free Conditions. In: Turksen K, editor. *Human Embryonic Stem Cell Protocols*, NJ: Humana Press; 2010. p. 195–210. (Methods in Molecular Biology; vol. 584).
80. Kee HL, Dishinger JF, Lynne Blasius T, Liu C-J, Margolis B, Verhey KJ. A size-exclusion permeability barrier and nucleoporins characterize a ciliary pore complex that regulates transport into cilia. *Nat Cell Biol* 2012;14(4):431–7.
81. Hurd TW, Fan S, Margolis BL. Localization of retinitis pigmentosa 2 to cilia is regulated by Importin beta2. *J Cell Sci* 2011;124(Pt 5):718–26.
82. Dishinger JF, Kee HL, Jenkins PM, Fan S, Hurd TW, Hammond JW, et al. Ciliary entry of the kinesin-2 motor KIF17 is regulated by importin-beta2 and RanGTP. *Nat Cell Biol* 2010;12(7):703–10.
83. Reiter JF, Blacque OE, Leroux MR. The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. *EMBO Rep* 2012;13(7):608–18.
84. Verhey KJ, Dishinger J, Kee HL. Kinesin motors and primary cilia. *Biochem Soc Trans.* 2011;39(5):1120–5.
85. Fan S, Margolis B. The Ran importin system in cilia trafficking. *Organogenesis* 2011;7(3):147–53.
86. Kiprilov EN, Awan A, Desprat R, Velho M, Clement CA, Byskov AG, et al. Human embryonic stem cells in culture possess primary cilia with hedgehog signaling machinery. *J Cell Biol* 2008;180(5):897–904.
87. Kim J, Kato M, Beachy P a. Gli2 trafficking links Hedgehog-dependent activation of Smoothened in the primary cilium to transcriptional activation in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(51):21666–71.
88. Clement C a, Kristensen SG, Møllgård K, Pazour GJ, Yoder BK, Larsen L a, et al. The primary cilium coordinates early cardiogenesis and hedgehog signaling in cardiomyocyte differentiation. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 17):3070–82.
89. Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science.* 2007;317(5836):372–6.
90. Paridaen JTML, Wilsch-Bräuninger M, Huttner WB. Asymmetric Inheritance of Centrosome- Associated Primary Cilium Membrane Directs Ciliogenesis after Cell Division. *Cell* 2013;155(2):333–44.
91. Ettinger AW, Wilsch-Bräuninger M, Marzesco A-M, Bickle M, et al. Proliferating versus differentiating stem and cancer cells exhibit distinct midbody-release behaviour. *Nat Commun* 2011;2:503.

92. Dang SM, Kyba M, Perlingeiro R, Daley GQ, Zandstra PW. Efficiency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cells in different culture systems. *Biotechnol Bioeng* 2002;78(4):442–53.
93. Lee MY, Cagavi Bozkulak E, Schliffke S, Amos PJ, Ren Y, Ge X, et al. High density cultures of embryoid bodies enhanced cardiac differentiation of murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;416(1-2):51–7.
94. Singh AM, Chappell J, Trost R, Lin L, et al. Cell-Cycle Control of Developmentally Regulated Transcription Factors Accounts for Heterogeneity in Human Pluripotent Cells. *Stem Cell Reports* 2013;1(6):532–44.
95. Pauklin S, Vallier L. The Cell-Cycle State of Stem Cells Determines Cell Fate Propensity. *Cell* 2013;155(1):135–47.
96. Muck J, Zink D. Nuclear organization and dynamics of DNA replication in eukaryotes. *Front Biosci* 2009;14:5361–71.
97. Klattenhoff CA, Scheuermann JC, Surface LE, Bradley RK, Fields PA, Steinhauser ML, et al. Braveheart, a Long Noncoding RNA Required for Cardiovascular Lineage Commitment. *Cell* 2013;152(3):570–83.
98. Cagavi E, Bartulos O, Suh CY, Sun B, Yue Z, Jiang Z, et al. Functional Cardiomyocytes Derived from Isl1 Cardiac Progenitors via Bmp4 Stimulation. *PLoS One* 2014;9(12):e110752.
99. Fernandez-Gonzalez R, Illa-Bohaca I, Shelton DN, Welm BE, Barcellos-Hoff MH, Ortiz-de-Solorzano C. In Situ Analysis of Cell Populations: Long-Term Label-Retaining Cells. In: Conboy IM, Schaffer D V., Barcellos-Hoff MH, Li S, editors. *Protocols for Adult Stem Cells 2010*. p. 1–28.
100. Kiel MJ, He S, Ashkenazi R, Gentry SN, Teta M, Kushner JA, et al. Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain BrdU. *Nature*. 2007;449(7159):238–42.
101. Meinhardt A, Spicher A, Roehrich M-E, Glauche I, Vogt P, Vassalli G. Immunohistochemical and flow cytometric analysis of long-term label-retaining cells in the adult heart. *Stem Cells Dev* 2011 Feb;20(2):211–22.
102. Becker KA, Ghule PN, Therrien JA, Lian JB, et al. Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *J Cell Physiol* 2006 Dec;209(3):883–93.
103. Janke C. The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, and functions. *J Cell Biol* 2014;206(4):461–72.
104. Song Y, Brady ST. Post-translational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules. *Trends Cell Biol* 2015 Mar;25(3):125–36.
105. Dard N, Louvet-Vallee S, Maro B. Orientation of mitotic spindles during the 8- to 16-cell stage transition in mouse embryos. *PLoS One* 2009;4(12):e8171.
106. McDole K, Xiong Y, Iglesias P a, Zheng Y. Lineage mapping the pre-implantation mouse embryo by two-photon microscopy, new insights into the segregation of cell fates. *Dev Biol* 2011 Jul 15;355(2):239–49.
107. Yamanaka Y, Lanner F, Rossant J. FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development* 2010 Mar137(5):715–24.
108. Wennekamp S, Mesecke S, Nédélec F, Hiiragi T. A self-organization framework for symmetry breaking in the mammalian embryo. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14(7):454–61.
109. Gorfinkiel N, Blanchard GB. Dynamics of actomyosin contractile activity during epithelial morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 2011;23(5):531–9.
110. Krens SFG, Heisenberg C-P. Cell sorting in development. *Curr Top Dev Biol* 2011;95:189–213.
111. Krieg M, Arboleda-Estudillo Y, Puech P-H, Käfer J, Graner F, Müller DJ, et al. Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish. *Nat Cell Biol*. 2008;10(4):429–36.
112. Maye P, Becker S, Siemen H, Thorne J, Byrd N, Carpentino J, et al. Hedgehog signaling is required for the differentiation of ES cells into neuroectoderm. *Dev Biol* 2004;265(1):276–90.
113. Rula ME, Cai KQ, Moore R, Yang D-H, et al. Cell autonomous sorting and surface positioning in the formation of primitive endoderm in embryoid bodies. *genesis* 2007 Jun;45(6):327–38.
114. Moore R, Cai KQ, Escudero DO, Xu X-X. Cell adhesive affinity does not dictate primitive endoderm segregation and positioning during murine embryoid body formation. *Genesis* 2009;47(9):579–89.
115. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Samuels R, Schweitzer P a, et al. Mutations at the mouse ichthyosis locus are within the lamin B receptor gene: a single gene model for human Pelger-Huët anomaly. *Hum Mol Genet* 2003;12(1):61–9.
116. Pieters T, van Roy F. Role of cell-cell adhesion complexes in embryonic stem cell biology. *J Cell Sci* 2014;127(12):2603–13.
117. Li D, Chowdhury F, Cheng J, Wang N, Wang F, Zhou J. Role of mechanical factors in fate decisions of stem cells. *Regen Med*. 2011;6(2):229–40.
118. Bedzhov I, Zernicka-Goetz M. Self-Organizing Properties of Mouse Pluripotent Cells Initiate Morphogenesis upon Implantation. *Cell* 2014;156(5):1032–44.
119. Yennek S, Burute M, Théry M, Tajbakhsh S. Cell Adhesion Geometry Regulates Non-Random DNA Segregation and Asymmetric Cell Fates in Mouse Skeletal Muscle Stem Cells. *Cell Rep* 2014;7(4):961–70.
120. Habib SJ, Chen B, Tsai F, Anastassiadis K, Meyer T, Betzig E, et al. Asymmetric Stem Cell Division in Vitro. *Science* 2013;1424(March):1445–8.

121. Takano H. Asymmetric Division and Lineage Commitment at the Level of Hematopoietic Stem Cells: Inference from Differentiation in Daughter Cell and Granddaughter Cell Pairs. *J Exp Med* 2004;199(3):295–302.
122. Izumi H, Kaneko Y. Evidence of asymmetric cell division and centrosome inheritance in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(44):18048–53.
123. Dey-Guha I, Wolfer A, Yeh AC, G Albeck J, Darp R, Leon E, et al. Asymmetric cancer cell division regulated by AKT. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(31):12845–50.
124. Dey-Guha I, Alves CP, Yeh AC, Salony, Sole X, Darp R, et al. A Mechanism for Asymmetric Cell Division Resulting in Proliferative Asynchronicity. *Mol Cancer Res* 2015 Feb 1;13(2):223–30.
125. Noh M, Smith JL, Huh YH, Sherley JL. A resource for discovering specific and universal biomarkers for distributed stem cells. *PLoS One* 2011;6(7):e22077.
126. Taghizadeh R, Noh M, Huh YH, Ciusani E, Sigalotti L, Maio M, et al. CXCR6, a Newly Defined Biomarker of Tissue-Specific Stem Cell Asymmetric Self-Renewal, Identifies More Aggressive Human Melanoma Cancer Stem Cells. *PLoS One* 2010;5(12):e15183.
127. Huh YH, King J, Cohen J, Sherley JL. SACK-Expanded Hair Follicle Stem Cells Display Asymmetric Nuclear Lgr5 Expression With Non-Random Sister Chromatid Segregation. *Sci Rep* 2011;1.
128. Johnson MH. From Mouse Egg to Mouse Embryo: Polarities, Axes, and Tissues. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2009;25(1):483–512.
129. Nishimura Y, Hamazaki TS, Komazaki S, Kamimura S, Okochi H, Asashima M. Ciliated cells differentiated from mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(5):1381–8.
130. Pauklin S, Pedersen R a., Vallier L. Mouse pluripotent stem cells at a glance. *J Cell Sci*. 2011;124(22):3727–32.
131. Tang F, Barbacioru C, Bao S, Lee C, Nordman E, Wang X, et al. Tracing the Derivation of Embryonic Stem Cells from the Inner Cell Mass by Single-Cell RNA-Seq Analysis. *Cell Stem Cell* 2010;6(5):468–78.
132. Grabarek JB, Zyzyńska K, Saiz N, Piliszek A, et al. Differential plasticity of epiblast and primitive endoderm precursors within the ICM of the early mouse embryo. *Development* 2012;139(1):129–39.
133. Plusa B, Piliszek A, Frankenberg S, Artus J, Hadjantonakis A-K. Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development* 2008;135(18):3081–91.
134. Bangs FK, Schrode N, Hadjantonakis A-K, Anderson K V. Lineage specificity of primary cilia in the mouse embryo. *Nat Cell Biol* 2015;17(2):113–22.
135. Bazzi H, Anderson K V. Acentriolar mitosis activates a p53-dependent apoptosis pathway in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci* 2014;111(15):E1491–500.
136. Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, Murcia NS, Niswander L, Anderson K V. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 2003 Nov 6;426(6962):83–7.
137. Santos N, Reiter JF. A central region of Gli2 regulates its localization to the primary cilium and transcriptional activity. *J Cell Sci* 2014 Apr 1;127(7):1500–10.
138. Courtois A, Schuh M, Ellenberg J, Hiiragi T. The transition from meiotic to mitotic spindle assembly is gradual during early mammalian development. *J Cell Biol* 2012;198(3):357–70.
139. de la Roche M, Ritter AT, Angus KL, Dinsmore C, Earnshaw CH, Reiter JF, et al. Hedgehog signaling controls T cell killing at the immunological synapse. *Science* 2013;342(6163):1247–50.
140. Le Borgne M, Shaw AS. Do T cells have a cilium? *Science* 2013;342(6163):1177–8.
141. Gonzalez-Granado JM, Silvestre-Roig C, Rocha-Perugini V, Trigueros-Motos L, Cibrian D, Morlino G, et al. Nuclear Envelope Lamin-A Couples Actin Dynamics with Immunological Synapse Architecture and T Cell Activation. *Sci Signal* 2014;7(322):ra37–ra37.
142. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*. 2006;126(4):677–89.
143. Chowdhury F, Na S, Li D, Poh Y-C, Tanaka TS, Wang F, et al. Material properties of the cell dictate stress-induced spreading and differentiation in embryonic stem cells. *Nat Mater* 2010;9(1):82–8.
144. Pagliara S, Franze K, McClain CR, Wylde GW, Fisher CL, Franklin RJM, et al. Auxetic nuclei in embryonic stem cells exiting pluripotency. *Nat Mater* 2014;13(6):638–44.
145. Murphy WL, McDevitt TC, Engler AJ. Materials as stem cell regulators. *Nat Mater* 2014;13(6):547–57.
146. Warmflash A, Sorre B, Etoc F, Siggia ED, Brivanlou AH. A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells. *Nat Methods* 2014;11(8):847–54.
147. Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, Harada T, Dingal PCDP, Pinter J, et al. Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation. *Science* 2013;341(6149):1240104–1240104.
148. Jauffred B, Llense F, Sommer B, Wang Z, Martin C, Bellaiche Y. Regulation of centrosome movements by Numb and the Collapsin Response Mediator Protein during *Drosophila* sensory progenitor asymmetric division. *Development* 2013;140(13):2657–68.
149. Delaunay D, Cortay V, Patti D, Knoblauch K, Dehay C. Mitotic spindle asymmetry: A Wnt/PCP-regulated mechanism generating asymmetrical division in cortical precursors. *Cell Rep*. 2014;6(2):400–14.
150. Delaunay D, Robini MC, Dehay C. Mitotic spindle asymmetry in rodents and primates: 2D vs. 3D

- measurement methodologies. *Front Cell Neurosci* 2015;9(February):1–11.
151. Pampalona J, Januschke J, Sampaio P, Gonzalez C. Time-lapse recording of centrosomes and other organelles in *Drosophila* neuroblasts. *Methods in Cell Biology*. 2015. 129:301-315
 152. Boehlke C, Kotsis F, Patel V, Braeg S, Voelker H, Bredt S, et al. Primary cilia regulate mTORC1 activity and cell size through Lkb1. *Nat Cell Biol* 2010;12(11):1115–22.
 153. Christensen ST, Clement C a., Satir P, Pedersen LB. Primary cilia and coordination of receptor tyrosine kinase (RTK) signalling. *J Pathol*. 2012;226:172–84.
 154. Ezratty EJ, Stokes N, Chai S, Shah AS, Williams SE, Fuchs E. A Role for the Primary Cilium in Notch Signaling and Epidermal Differentiation during Skin Development. *Cell* 2011;145(7):1129–41.
 155. Clement C, Ajbro K, Koefoed K, Vestergaard M, Veland I, HenriquesdeJesus M, et al. TGF- β Signaling Is Associated with Endocytosis at the Pocket Region of the Primary Cilium. *Cell Rep* 2013;3(6):1806–14.
 156. Leitch CC, Lodh S, Prieto-Echagüe V, Badano JL, Zaghoul N a. Basal body proteins regulate Notch signaling through endosomal trafficking. *J Cell Sci* 2014;127(2014):2407–19.