



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**Καθοριστικοί παράγοντες της Ασύμμετρης Κυτταρικής Διαίρεσης:
Ο ρόλος της Πυρηνικής Λάμινας.**

ΠΟΤΣΗ ΝΤΙΑΝΑ-ΜΑΡΙΑ

Βιολόγος

Διδακτορική διατριβή

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**Καθοριστικοί παράγοντες της Ασύμμετρης Κυτταρικής Διαίρεσης:
Ο ρόλος της Πυρηνικής Λάμινας.**

ΠΟΤΣΗ ΝΤΙΑΝΑ-ΜΑΡΙΑ

Βιολόγος

Διδακτορική διατριβή

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017

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

Ημερομηνία αίτησης της κ. Πότση Ντιάνας-Μαρίας: 1-2-2011

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 705*/8-2-2011

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Γεωργάτος Σπυρίδων Καθηγητής Βιολογίας

Μέλη

Κούκλης Παναγιώτης Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας

Φώτσης Θεόδωρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 15-3-2011

«Καθοριστικοί παράγοντες της ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης: ο ρόλος της πυρηνικής λάμινας»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 791*/1-11-2016

1. Γεωργάτος Σπυρίδων, Καθηγητής Βιολογίας, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Φώτσης Θεόδωρος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Κωλέττας Ευάγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Παπαμαρκάκη Θωμάη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Τζαβάρας Θεόδωρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Χριστοφορίδης Σάββας, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Κούκλης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 11-11-2016

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Πασχόπουλος Μηνάς

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



Στο ξενιτεμένο μου πουλί, τον αδερφό μου.

«Ένας μονάχα τρόπος υπάρχει να σωθείς: να σώσεις.. ή ακόμα και αυτό φτάνει, ν' αγωνιστείς για να σώσεις. Κι ακόμα ετούτο: πως ο κόσμος δεν είναι φάντασμα, είναι αληθινός, κι η ψυχή του ανθρώπου δεν είναι, όπως μου αρμήνευσε ο Βούδας, ντυμένη με άνεμο, είναι ντυμένη με κρέας.

Μα όταν μοχτούσα να πάρω απόφαση, το μυαλό, θυμούμαι, αντιστέκονταν πολύ.. ήταν ακόμα τυλιμένο με το κίτρινο ράσο του Βούδα: "Αυτό που σκοπεύεις να κάμεις, έλεγε στην καρδιά μου, είναι μάταιο.. ο κόσμος όπως τον λαχταρίζεις, να μην πεινάει, να μην κρυώνει, να μην αδικιέται κανένας, δεν υπάρχει, δε θα υπάρξει ποτέ" Μα η καρδιά, την άκουγα βαθιά μου να του αποκρίνεται: "Δεν υπάρχει, μα θα υπάρξει, γιατί το θέλω.. σε κάθε χτυποκάρδι μου το πεθυμώ και το θέλω. Πιστεύω σ' έναν κόσμο που δεν υπάρχει.. μα πιστεύοντας τον, τον δημιουργώ.. ΑΝΥΠΑΡΧΤΟ ΛΕΜΕ Ο,ΤΙ ΔΕΝ ΠΕΘΥΜΗΣΑΜΕ ΑΡΚΕΤΑ"

Η απόκριση ετούτη της καρδιάς με ανατάραξε.. αν είναι αλήθεια αυτό που λέει, τι φοβερή ευθύνη έχει ο άνθρωπος για όλες τις αδικίες και τις ντροπές του κόσμου.»

"Ιθάκη δεν υπάρχει. Υπάρχει μονάχα η θάλασσα, κι ένα караβάκι μικρό σαν το κορμί του ανθρώπου κι ο καπετάνιος ο Νους. Στέκεται αυτός στην κοκαλένια καμπίνα του, άντρας μαζί και γυναίκα, και σπέρνει και γεννάει. Γεννάει τις θλίψεις και τις χαρές, τις ομορφιές, τις αρετές και τις περιπέτειες, όλη τη φαντασμαγορία του κόσμου, την αιματηρή κι αγαπημένη.."

Νίκος Καζαντζάκης, «Αναφορά στον Γκρέκο»

Ευχαριστίες

Η παρούσα 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 2011-2016, 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).

Φτάνοντας στο τέλος της επίπονης, αλλά ταυτόχρονα άκρως απολαυστικής πορείας του διδακτορικού, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους αυτούς που με τον τρόπο τους με βοήθησαν, άμεσα ή έμμεσα, στην ολοκλήρωση της.

Πρώτον απ' όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διατριβής μου, τον Καθηγητή κ. Σπύρο Γεωργάτο, ο οποίος μου άνοιξε την πόρτα ενός από τους πιο γοητευτικούς μικρόκοσμους αυτού του κόσμου, αυτόν του πυρήνα του κυττάρου. Δε θα πάψω ποτέ να μαγεύομαι από το πως τόσα πολλά χωράνε σε κάτι τόσο μικρό, παρότι γνωρίζω ότι ακόμα και το πιο μακρινό αστέρι του Σύμπαντος εκδηλώνεται στα πράγματα που βρίσκονται γύρω μας, όπως σοφά είπε ο Paulo Coelho στο «Εγχειρίδιο του Πολεμιστή του φωτός». Τον ευχαριστώ λοιπόν για όλα! Για την πολύτιμη βοήθεια, την καθοδήγηση και την επιστημονική, πνευματική και ηθική υποστήριξη του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής τριμελούς επιτροπής τον Καθηγητή, Δρ. Θεόδωρο Φώτση και τον Επίκουρο Καθηγητή, Δρ. Κούκλη Παναγιώτη για τις καίριες υποδείξεις και την άψογη συνεργασία τους, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τους Καθηγητές Δρ. Σάββα Χριστοφορίδη, Δρ. Ευάγγελο Κωλέττα, Δρ. Θεόδωρο Τζαβάρα και Δρ. Θωμάη Παπαμαρκάκη για την τιμή που μου έκαναν.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, όλα τα μέλη, παλιά και νέα, αρχικά του ITE/IBE, του εργαστηρίου Βιολογίας καθώς και τα μέλη των εργαστηρίων

της Βιολογικής Χημείας για την άψογη συνεργασία και αλληλοϋποστήριξη καθώς και για το φιλικό περιβάλλον.

Για τα μέλη της ομάδας μας, καθώς επίσης και τους guests μας (Βιολέττα και Γιάννη σ' εσάς αναφέρομαι..!), τα λόγια είναι περιττά. Αν μπορούσα να αποτυπώσω το μέσα μου για εσάς, θα έφτιαχνα τον πιο μεγάλο και πολύχρωμο καμβά του κόσμου! Μαμά-Νατάσα, Μέμη, «Ελευθεράκη», Βιολέττα, Γιάννη, Κατερινιώ, Φανούλα.. ΣΑΣ ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ!!! Για όλα..

Τέλος, το πιο θερμό ευχαριστώ του κόσμου θέλω να το απευθύνω στους γονείς, τον αδερφό, τη γιαγιά και τον γλυκουργάκο μου. Είμαι κομμάτι όλων σας και είστε όλοι κομμάτι μου.. Μαμά μου, εσύ να μη ξεχνάς πως είμαι η προέκταση της ψυχής σου.. Σας αγαπώ..

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες

1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Μορφολογία, δομική οργάνωση και λειτουργία του κυτταρικού πυρήνα.....	9
1.1.1 Η οργάνωση και λειτουργία του πυρηνικού φακέλου.....	9
1.2 Η πυρηνική λάμινα.	11
1.2.1 Δομική οργάνωση των λαμινών.	11
1.2.2 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των λαμινών.....	13
1.2.3 Πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης που αλληλεπιδρούν με την πυρηνική λάμινα.....	13
1.2.4 Η δυναμική των λαμινών.....	17
1.2.4.1 Η δυναμική των λαμινών κατά τη μεσόφαση.....	17
1.2.4.2 Η δυναμική των λαμινών κατά τη μίτωση.....	18
1.2.4.3 Οι λειτουργίες των λαμινών στην αρχιτεκτονική του πυρήνα και του κυττάρου.....	20
1.2.4.4 Η λειτουργία των λαμινών στην οργάνωση του κυτταροσκελετού.....	22
1.2.4.5 Η συμμετοχή των λαμινών στις λειτουργίες του πυρήνα.....	24
1.3 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση.....	27
1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά της ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης.....	27
1.3.2 Πρότυπα ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης.....	28
1.3.2.1 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση της νευροβλάστης της Drosophila.....	28
1.3.2.2 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση των αρσενικών γαμετικών βλαστικών κυττάρων της Drosophila.....	34
1.3.2.3 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση των προγονικών κυττάρων της επιδερμίδας στα θηλαστικά.....	35
1.3.3 Άλλα συστήματα που διαιρούνται με ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση.....	37
1.4 Ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση και εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα.....	40
1.5 Σκοπός.....	42
2. Υλικά και μέθοδοι.....	43

2.1 Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων.....	45
2.1.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών.....	45
2.1.2 Διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων.....	45
2.1.2.1 Διαφοροποίηση σε δύο διαστάσεις (2D).....	45
2.1.2.2 Διαφοροποίηση σε τρεις διαστάσεις (3D).....	46
2.1.3 Δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών βλαστικών κυττάρων.....	46
2.1.4 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με ηλεκτροδιαπίδυση (Electroporation).....	47
2.1.5 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με πολυ-αιθυλενιμίνη.....	47
2.2 Μέθοδοι γενετικής μηχανικής.....	48
2.2.1 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων επιδεκτικών στον μετασχηματισμό.....	48
2.2.2 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων.....	48
2.2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μικρής κλίμακας.....	49
2.2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας.....	49
2.2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.....	50
2.2.6 Απομόνωση θραυσμάτων DNA από πηκτή αгарόζης.....	50
2.2.7 Πέψη πλασμιδίων με ένζυμα περιορισμού.....	50
2.2.8 Συρραφή τμημάτων DNA (Ligation).....	50
2.2.9 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	50
2.3 Μορφολογικές Μέθοδοι.....	51
2.3.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε επιστρωμένα κύτταρα.....	51
2.3.2 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε EBs.....	52
2.3.3.1 Καταγραφή κυτταρικών διαιρέσεων σε πραγματικό χρόνο στο φάσμα του ορατού.....	52

2.3.3.2 Βιντεοσκόπηση κυτταρικών διαιρέσεων εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων διαμολυσμένων H2B-mCherry.....	53
2.3.4 Ποσοτικοποίηση έντασης φθορισμού σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού.....	53
2.3.5 Παρακολούθηση (βιντεοσκόπηση) κυτταρικών διαιρέσεων σε πραγματικό χρόνο.....	54
2.3.6 Μέθοδος ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτοσκίαση (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP).....	54
3. Αποτελέσματα.....	57
3.1 Διερεύνηση της παρουσίας ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού.....	59
3.1.1 Μορφολογικές παρατηρήσεις στις δισδιάστατες καλλιέργειες αδιαφοροποιήτων και διαφοροποιούμενων εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων τύπου E14.....	60
3.1.2 Μελέτη κλασσικών δεικτών ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης σε διαφοροποιήσεις εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων τύπου E14.....	63
3.1.3 Μελέτη κατανομής δεικτών πολυδυναμίας σε θυγατρικά κύτταρα διαφοροποιούμενων εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων τύπου E14.....	64
3.1.4 Μελέτη της κατανομής των λαμινών A- & B-τύπου σε θυγατρικά κύτταρα διαφοροποιούμενων εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων τύπου E14.....	65
3.1.5 Διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων τύπου E14 προς καρδιομυοκύτταρα.....	67
3.1.6 Μελέτη της κατανομής του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 και του πρότυπου εντοπισμού του PCNA σε διαφοροποιημένα προς καρδιομυοκύτταρα θυγατρικά κύτταρα.....	69

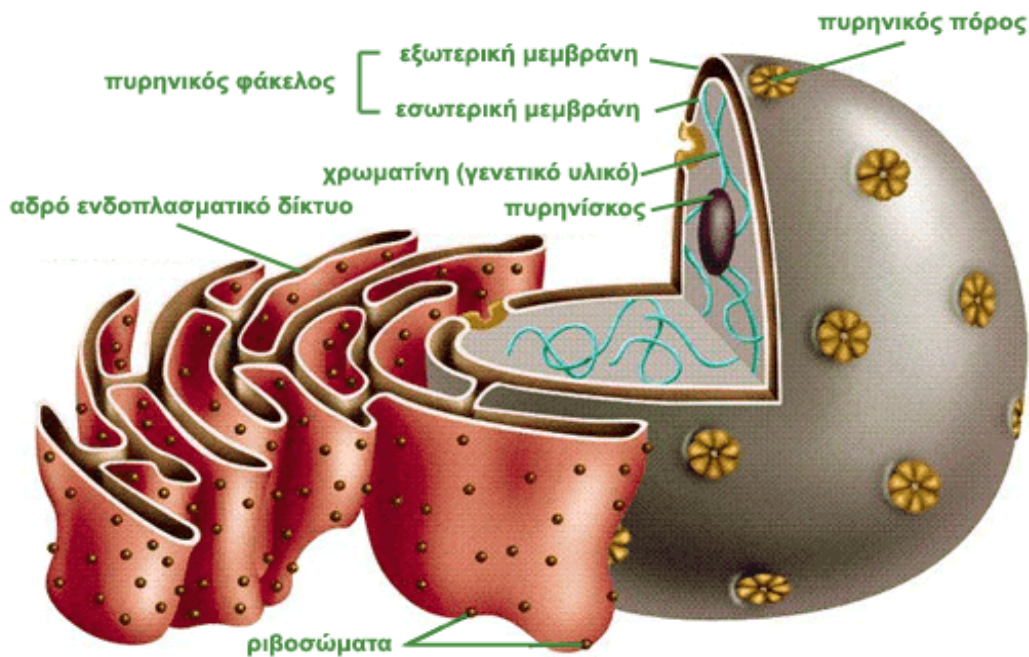
3.1.7 Μελέτη της κατανομής των λαμινών A- & B-τύπου σε θυγατρικά κύτταρα διαφοροποιούμενων προς μεσόδερμα βλαστικών κυττάρων τύπου E14.....	71
3.2 Υπερέκφραση των λαμινών A- και B-τύπου στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού τύπου E14 και διερεύνηση παρουσίας ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων.....	74
3.2.1 Υπερέκφραση των λαμινών A- και B-τύπου σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού και μελέτη κλασσικών δεικτών ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης.....	74
3.2.2 Υπερέκφραση των λαμινών A- και B-τύπου σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού και πολυδυναμία.....	78
3.2.3 Μορφολογικές παρατηρήσεις στις τρισδιάστατες καλλιέργειες των σταθερών κυτταρικών σειρών στις οποίες υπερεκφράζονται οι λαμίνες A- και B-τύπου.....	82
3.2.4 Μελέτη της κατανομής του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 και της κατανομής των υπερεκφρασμένων λαμινών A- & B-τύπου σε θυγατρικά κύτταρα διαφοροποιούμενων προς καρδιομυοκύτταρα.....	84
3.2.5 Μελέτη της δυναμικής των λαμινών A- και B-τύπου.....	85
4. Συζήτηση.....	89
4.1 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση στα πρώτα στάδια διαφοροποίησης εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ποντικού.....	91
4.2 Ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση και εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα κατά τη διαφοροποίηση σε τρεις διαστάσεις.....	93
4.3 Ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση και δυναμική των πυρηνικών λαμινών A- και B-τύπου.....	95
5. Συμπεράσματα.....	99
6. Περίληψη - Summary.....	103
7. Βιβλιογραφία.....	109

1. Εισαγωγή

1.1 Μορφολογία, δομική οργάνωση και λειτουργία του κυτταρικού πυρήνα.

1.1.1 Η οργάνωση και λειτουργία του πυρηνικού φακέλου.

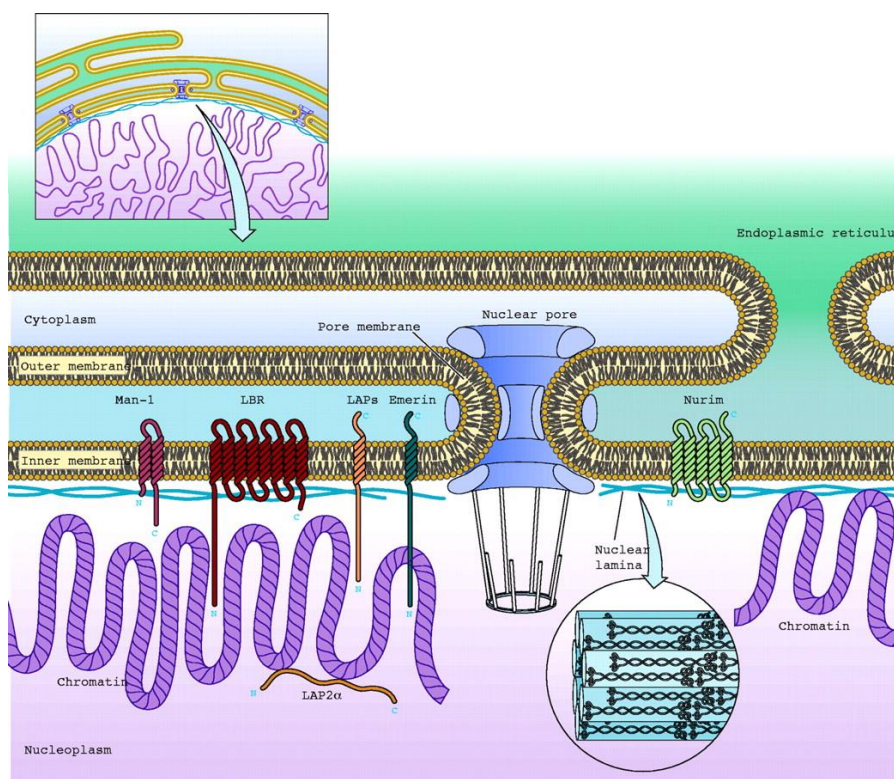
Η οργάνωση του γενετικού υλικού σε ένα διακριτό διαμέρισμα, τον πυρήνα, αποτελεί τη βασικότερη διαφορά μεταξύ ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών κυττάρων. Στον πυρήνα εμπεριέχονται τα χρωμοσώματα και πραγματοποιούνται ζωτικής σημασίας διαδικασίες, όπως η αντιγραφή του DNA, η μεταγραφή και η επεξεργασία του RNA, καθώς και η συγκρότηση των ριβοσωμάτων. Οι λειτουργίες αυτές εξαρτώνται άμεσα από τη δομική του οργάνωση (Εικ.1.1).



Εικόνα 1.1 Ο πυρήνας. (τροποποίηση από www.ualr.edu/)

Ο πυρήνας χωρίζεται από το κυτταρόπλασμα μέσω του πυρηνικού φακέλου, ο οποίος αποτελείται από τρία διακριτά δομικά στοιχεία: την πυρηνική μεμβράνη, το σύμπλεγμα των πυρηνικών πόρων και την πυρηνική λάμινα⁽¹⁾ (Εικ. 1.2). Η πυρηνική μεμβράνη είναι διπλή και αποτελείται από δυο «μονάδες μεμβράνης» (unit membrane): την εξωτερική

πυρηνική μεμβράνη (ONM), η οποία είναι επέκταση του ενδοπλασματικού δικτύου, με το οποίο και μοιράζεται βιοχημικές και λειτουργικές ιδιότητες και την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη (INM), η οποία διαφοροποιείται σημαντικά και περιέχει συγκεκριμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες. Μεταξύ των μεμβρανών υπάρχει ένας αυλός (luminal space) ~100nm σε πλάτος. Οι δύο αυτές μεμβράνες συντήκονται στα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων (NPCs), τα οποία ρυθμίζουν την μετακίνηση μακρομορίων μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος ⁽²⁾. Στην πυρηνοπλασματική επιφάνεια της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης εντοπίζεται ένα δίκτυο ινιδίων, η πυρηνική λάμινα. Η λάμινα παρέχει δομική στήριξη στον πυρήνα, διατηρώντας το σχήμα του και εξασφαλίζοντας το κατάλληλο περιβάλλον για τη διεκπεραίωση βασικών λειτουργιών ⁽³⁾.



Εικόνα 1.2 Οργάνωση του πυρηνικού φακέλου. Στο σχήμα φαίνονται η εσωτερική και εξωτερική πυρηνική μεμβράνη, τα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων και ο αυλός του ενδοπλασματικού δικτύου. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου συντίθενται στα ριβοσώματα του ενδοπλασματικού δικτύου, μετακινούνται κατά μήκος της εξωτερικής πυρηνικής μεμβράνης και των συμπλεγμάτων των πυρηνικών πόρων και αγκυροβολούν την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη (Voelta et al, 2002).

1.2 Η πυρηνική λάμινα.

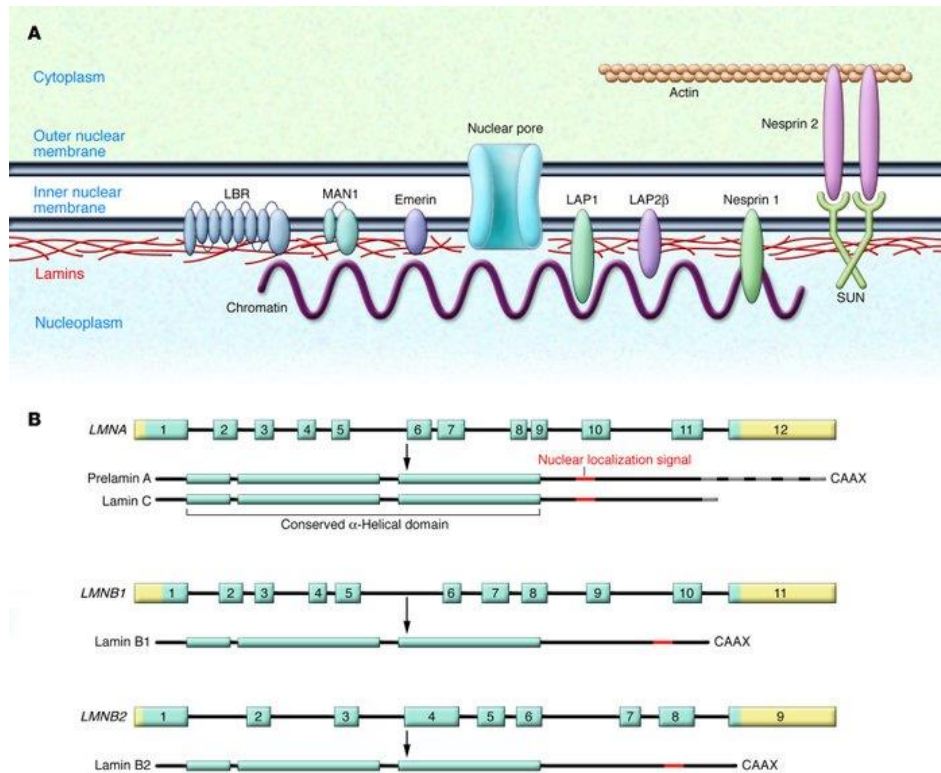
1.2.1 Δομική οργάνωση των λαμινών.

Η πυρηνική λάμινα είναι ένα ινώδες δίκτυο, αποτελούμενο από ινώδη στοιχεία διαμέτρου 10nm και μοριακής μάζας 60 έως 80kD, τις λαμίνες, καθώς και από τις πρωτεΐνες που συνδέονται με αυτές, συμπεριλαμβάνοντας πολλές αναπόσπαστες πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης, πρωτεΐνες-τροποποιητές της χρωματίνης, μεταγραφικούς καταστολείς και δομικές πρωτεΐνες (Εικ. 1.3Α).

Οι λαμίνες ανήκουν στην οικογένεια V της υπερ-οικογένειας των ενδιάμεσων ινιδίων ⁽⁴⁾ και, όπως όλες οι πρωτεΐνες αυτού του είδους, αποτελούνται από τρία τμήματα: ένα κεντρικό με δευτεροταγή δομή α-έλικας (central rod domain), το οποίο πλαισιώνεται από ένα αμινοτελικό τμήμα και ένα καρβοξυτελικό τμήμα. Η κεντρική ελικοειδής περιοχή καταλαμβάνει σχεδόν το μισό μήκος του μορίου (περίπου 350 αμινοξέα) και αποτελείται από τέσσερις α-έλικες (1A, 1B, 2A και 2B), οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με τρεις μικρές μη ελικοειδείς αλληλουχίες (L1, L12 και L2), διατηρημένες σε μήκος και αλληλουχία στις λαμίνες ⁽⁵⁾. Το αμινοτελικό τμήμα των λαμινών ποικίλει σε μέγεθος, ενώ το καρβοξυτελικό τμήμα τους περιέχει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) ⁽⁶⁾, μια περιοχή Ig ^(7,8) και ένα μοτίβο CAAX, το οποίο υφίσταται μετα-μεταφραστική τροποποίηση ^(9,10) (Εικ. 1.3B).

Οι λαμίνες διακρίνονται σε A και B τύπου, σύμφωνα με τα πρότυπα έκφρασής τους, την συμπεριφορά τους κατά τη μίτωση και τα βιοχημικά τους χαρακτηριστικά ⁽⁴⁾. Από το εναλλακτικό μάτισμα του αντίστοιχου RNA προκύπτουν διάφορες ισομορφές λαμινών. Το γονιδίωμα των θηλαστικών περιέχει τρία γονίδια λαμινών (LMNA, LMNB1 και LMNB2), τα οποία κωδικοποιούν συνολικά επτά ισομορφές. Το γονίδιο LMNA μέσω εναλλακτικού ματίσματος παράγει τέσσερις ισομορφές: τις δυο κύριες λαμίνες A και C και τις δυο ισομορφές C2 και AΔ10 ^(11,12). Οι λαμίνες A και C είναι πανομοιότυπες στα πρώτα 566 αμινοξέα, αλλά από τη λαμίνη C απουσιάζουν 98 αμινοξέα από το καρβοξυτελικό τμήμα, τα οποία βρίσκονται στην προ-λαμίνη A (πρόδρομη μορφή της λαμίνης A) και περιέχουν μια αλληλουχία έξι αμινοξέων ⁽⁴⁾ (Εικ. 1.3B). Επιπλέον, από τη λαμίνη C απουσιάζει το μοτίβο CAAX, το οποίο τροποποιείται με φαρνεσυλίωση και

καρβοξυμεθυλίωση, και υποβοηθά την αγκυροβόληση των λαμινών στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη. Στις λαμίνες τύπου B ανήκουν οι B1 και B2, οι οποίες κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια (LMNB1 και LMNB2)⁽¹³⁾ και η B3, η οποία προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου LMNB2 και εκφράζεται μόνο στα σπερματοκύτταρα⁽¹⁴⁾.



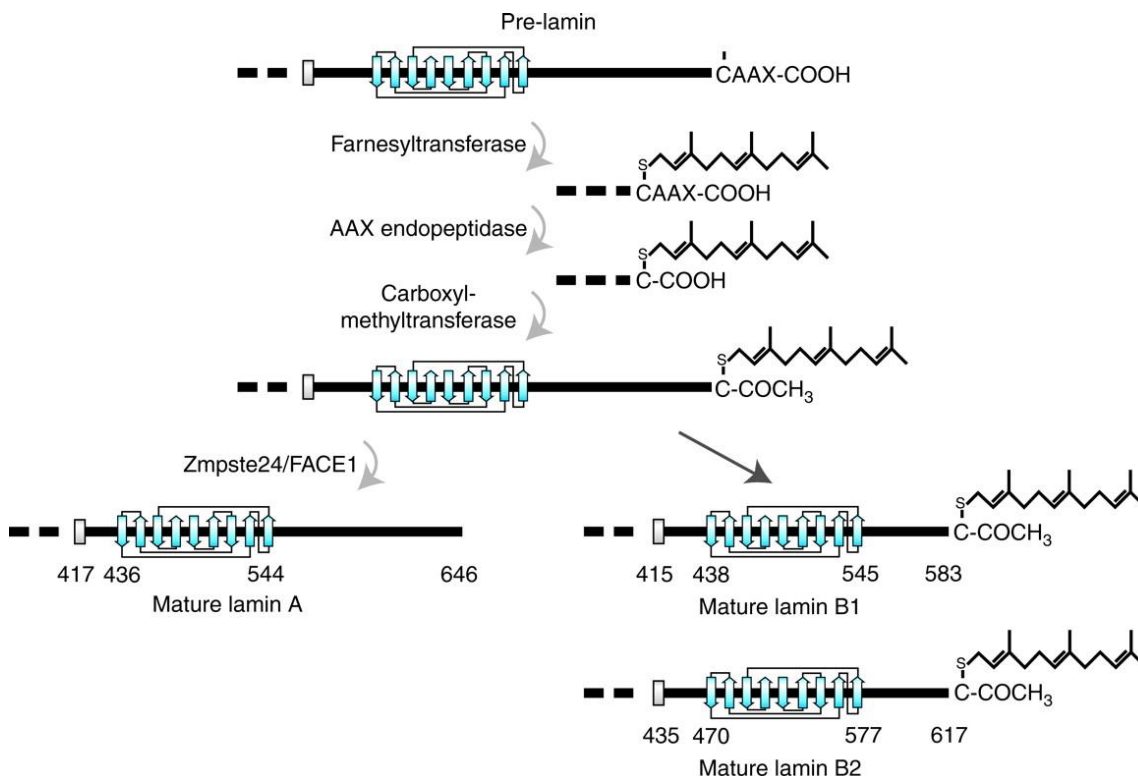
Εικόνα 1.3Α&Β Οι πυρηνικές λαμίνες και η δομή τους. Στον άνθρωπο τρία γονίδια κωδικοποιούν τις λαμίνες. Το γονίδιο LMNA στο χρωμόσωμα 1q21.2 κωδικοποιεί τις λαμίνες τύπου A, παράγοντας μέσω εναλλακτικού ματίσματος την προλαμίνη A και τη λαμίνη C, τις δύο κύριες ισομορφές. Η προλαμίνη A έχει 98 μοναδικά αμινοξέα στο καρβοξυτελικό της άκρο και η λαμίνη C 6 (γκρι ρίγες). Το γονίδιο LMNB1 στο χρωμόσωμα 5q23.3–q31.1 κωδικοποιεί τη λαμίνη B1, και το γονίδιο LMNB2 στο χρωμόσωμα 19p13.3 τη λαμίνη B2, τις λαμίνες τύπου B. Όλες οι λαμίνες διαθέτουν το συντηρημένο κεντρικό ραβδοειδές τμήμα α-έλικας, ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού στο καρβοξυτελικό τμήμα των μορίων (κόκκινη σήμανση), μια περιοχή IgG και το συντηρημένο μοτίβο CAAX το οποίο φαρνεσυλιώνεται.

Συγκρίνοντας τις λαμίνες τύπου A και B προκύπτουν οι εξής διαφορές: α) οι λαμίνες τύπου B έχουν όξινο ισοηλεκτρικό σημείο, ενώ οι λαμίνες τύπου A έχουν ουδέτερο, β)

στη μίτωση, όταν ο πυρηνικός φάκελος διασπάται και η πυρηνική λάμινα αποικοδομείται, οι λαμίνες τύπου A διαλυτοποιούνται και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, ενώ οι λαμίνες τύπου B παραμένουν συνδεδεμένες με μεμβρανικά τμήματα ⁽¹⁾. Επίσης, επικρατεί η άποψη ότι οι λαμίνες τύπου A δεν εκφράζονται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, αλλά εκφράζονται βάσει καθορισμένων χωρο-χρονικών προτύπων κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, ενώ οι λαμίνες τύπου B είναι παρούσες σχεδόν σε όλα τα είδη κυττάρων. Πρόσφατα απεδείχθη πως τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα του ποντικού εκφράζουν ανιχνεύσιμες, παρότι χαμηλές, ποσότητες λαμίνης A/C τόσο σε επίπεδο RNA όσο και σε επίπεδο πρωτεϊνών ⁽¹⁵⁾. Μία ακόμα μελέτη απέδειξε πως η ταυτόχρονη απουσία των λαμινών B1 και B2 σε κερατινοκύτταρα ποντικού, δεν έχει καμία επίδραση στον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των κυττάρων της επιδερμίδας και του τριχωτού τους ⁽¹⁶⁾.

1.2.2 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των λαμινών.

Οι λαμίνες τροποποιούνται μετα-μεταφραστικά με διάφορους τρόπους. Με εξαίρεση την λαμίνη C των θηλαστικών και της *Drosophila melanogaster*, όλες οι λαμίνες περιέχουν το μοτίβο CAAX (κυστεΐνη, δύο αλειφατικά αμινοξέα, οποιοδήποτε αμινοξύ) στο καρβοξυτελικό τους άκρο, το οποίο αποτελεί θέση φαρνεσυλίωσης της πρωτεΐνης. Η φαρνεσυλίωση πραγματοποιείται σε τρία διαδοχικά στάδια και φαίνεται ότι διευκολύνει τον εντοπισμό και τη συγκράτηση των πρωτεϊνών στον πυρηνικό φάκελο. Όταν η λαμίνη A εισέλθει στον πυρήνα, το τελικό αα-καρβοξυμεθύλ (AAX) μαζί με τα τελευταία 18 αμινοξέα της πρωτεΐνης αποκόπτονται, σε αντιδιαστολή με τη λαμίνη B όπου το μοτίβο φαρνεσυλίωσης παραμένει και στην ώριμη μορφή της πρωτεΐνης (Εικ. 1.4). Επιπρόσθετα, οι λαμίνες φωσφορυλιώνονται από ποικίλες κινάσες. Τρεις από αυτές είναι η CDC2, η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) και η πρωτεϊνική κινάση A (PKA), οι οποίες ρυθμίζουν τις ιδιότητες των λαμινών ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.



Εικ. 1.4 Στάδια ωρίμανσης των λαμινών A, B1 και B2. Η διαδικασία ωρίμανσης των λαμινών πραγματοποιείται σε 4 στάδια: (1) προσθήκη μιας φαρνεσυλομάδας στο κατάλοιπο της κυστεΐνης του μοτίβου -CAAX της προλαμίνης A, προλαμίνης B1 και προλαμίνης B2 από μία φαρνεσυλοτρανσφεράση, (2) απομάκρυνση των τελευταίων τριών καταλοίπων (-AAX) από μία AAX ενδοπεπτιδάση ^(20,21), (3) μεθυλίωση της καρβοξυλομάδας (-COOH) από μία καρβοξυλική μεθυλοτρανσφεράση ^(22,23), (4) απομάκρυνση 15 αμινοξέων από το καρβοξυτελικό άκρο της λαμίνης A, συμπεριλαμβανομένης της φαρνεσυλιωμένης και καρβοξυμεθυλιωμένης κυστεΐνης, από την μεταλλοπρωτεάση Zmpste24/FACE1 ⁽²⁴⁾. Το τελευταίο αυτό στάδιο της πρωτεόλυσης δε συμβαίνει στις λαμίνες τύπου B και, κατά συνέπεια, παραμένουν φαρνεσυλιωμένες ⁽²⁵⁾.

1.2.3 Πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης που αλληλεπιδρούν με την πυρηνική λάμινα.

Οι πολλαπλοί ρόλοι των λαμινών διαμεσολαβούνται από αλληλεπιδράσεις τους με τις πολυάριθμες πρωτεΐνες που προσδένονται σε αυτές, τόσο στην περιφέρεια του πυρήνα όσο και στο πυρηνόπλασμα. Οι περισσότερες πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης προσδένονται είτε άμεσα είτε έμμεσα στις λαμίνες. Για παράδειγμα, οι λαμίνες προσδένουν *in vitro* τις εξής πρωτεΐνες: emerlin, MAN-1, τον

υποδοχέα της λαμίνης B (LBR), τα σχετιζόμενα με τη λάμινα πολυπεπτίδια 1 και 2 (lamina associated polypeptides, LAP1, LAP2), τη nesprin-1a, την otefin, την πρωτεΐνη Young Arrest (YA) και την SUN-1. Οι πέντε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου που περιγράφονται στη συνέχεια, είναι γνωστό ότι είτε εμπλέκονται σε κληρονομικές ασθένειες είτε αποτελούν πιθανούς τροποποιητές της λειτουργίας των λαμινών (Εικ. 1.5).

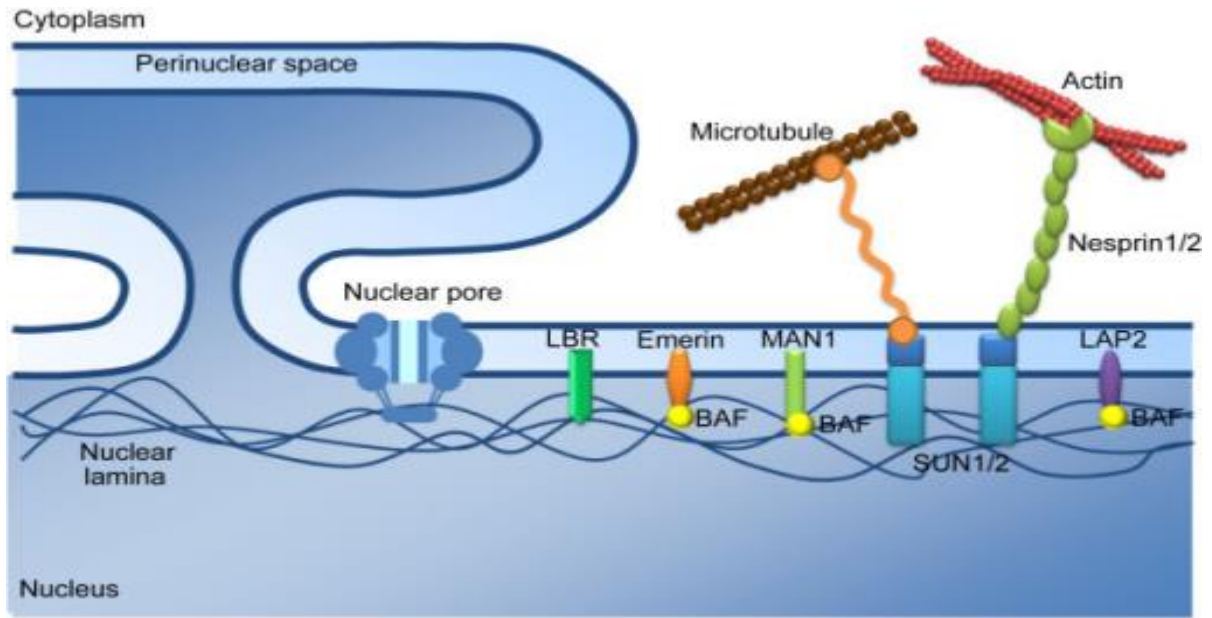
Τα σχετιζόμενα με την λάμινα πολυπεπτίδια (LAPs) ταυτοποιήθηκαν αρχικά μέσω της συσχέτισής τους με τμήματα της λάμινας. Η οικογένεια LAP2 είναι η καλύτερα χαρακτηρισμένη. Υπάρχουν έξι ισομορφές LAP2 που προκύπτουν με εναλλακτικό μάτισμα του RNA (LAP2α, β, γ, δ, ε και φ), πέντε εκ των οποίων είναι τύπου II μεμβρανικές πρωτεΐνες και μοιράζονται μία κοινή διαμεμβρανική περιοχή στο καρβοξυτελικό τους άκρο καθώς και ποικίλες πυρηνοπλάσματικές περιοχές στο αμινοτελικό τους άκρο ⁽²⁶⁾. Τα σχετιζόμενα με τη μεμβράνη LAP2 πολυπεπτίδια προσδένονται πρωταρχικά στις λαμίνες τύπου B ^(27,28), εκφράζονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, και είναι απαραίτητα για την επιβίωση των κυττάρων ⁽²⁹⁾. Η ισομορφή LAP2α δεν διαθέτει διαμεμβρανική περιοχή και αντ' αυτού περιέχει μια μακριά LAP2α ειδική περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο. Αυτή η πρωτεΐνη βρίσκεται στο πυρηνόπλασμα και όχι στην πυρηνική μεμβράνη ⁽³⁰⁾, όπου και προσδένεται στις λαμίνες τύπου A ⁽³⁰⁾.

Η πρωτεΐνη emerlin είναι επίσης μία τύπου II μεμβρανική πρωτεΐνη με μία διαμεμβρανική περιοχή 11 αμινοξέων στο καρβοξυτελικό άκρο και ένα μεγαλύτερο υδροφιλικό αμινοτελικό τμήμα το οποίο προεκτείνεται προς το πυρηνόπλασμα ^(31,32). Η emerlin προσδένεται σε όλες τις λαμίνες αλλά δείχνει μια ιδιαίτερη προτίμηση στην λαμίνη C ⁽³³⁾, ενώ τα μοτίβα έκφρασής της στα σπονδυλωτά ομοιάζουν προς την έκφραση των λαμινών τύπου A ⁽³⁴⁾. Κύριες λειτουργίες της πρωτεΐνης αυτής είναι η αγκυροβόληση της πυρηνικής λάμινας στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη κατά την μεσόφαση και η «αντιστρεπτή αποικοδόμηση» του πυρηνικού φακέλου κατά την μίτωση. Η πρωτεΐνη MAN1 αποτελείται από ένα αμινοτελικό τμήμα 470 αμινοξέων, ακολουθούμενο από δυο διαμεμβρανικές περιοχές και ένα καρβοξυτελικό τμήμα το οποίο προεκτείνεται προς το πυρηνόπλασμα. Η MAN1 διαθέτει μια περιοχή ομόλογη με εκείνη των πρωτεϊνών LAP2 και emerlin, η οποία καλείται LEM. Η περιοχή αυτή περιέχει μια διατηρημένη αλληλουχία 40 αμινοξέων, βρίσκεται πλησίον ή εντός του

αμινοτελικού τμήματος των πρωτεϊνών και αποτελείται από δυο α-έλικες οι οποίες διαχωρίζονται από μια στροφή ⁽³⁵⁾. Οι LEM περιοχές προσδένονται στις λαμίνες και εμπλέκονται στη σύνδεση των πρωτεϊνών με τον παράγοντα BAF και επομένως με τη χρωματίνη ^(14,36).

Ο υποδοχέας της λαμίνης B (LBR) είναι μία πρωτεΐνη της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης, εξελικτικά συντηρημένη σε όλα τα μετάρζωα. Αναγνωρίστηκε ως μία πρωτεΐνη που είχε την ικανότητα να συνδέεται στη λαμίνη B ⁽³⁷⁾. Όπως και άλλες πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης, ο LBR φαίνεται να αποτελεί τμήμα ενός μεγάλου πρωτεϊνικού συμπλόκου το οποίο περιέχει, εκτός του LBR, τις λαμίνες A και B, μία ειδική κινάση, μία άλλη διαμεμβρανική πρωτεΐνη (p18) και μία πρωτεΐνη (p34/p32) η οποία συνδέεται με τον παράγοντα ματίσματος 2 (splicing factor 2/SF2) ⁽³⁸⁾.

Οι nesprins είναι μια αξιοσημείωτη οικογένεια πρωτεϊνών λόγω του τεράστιου μεγέθους κάποιων ισομορφών, που προέκυψαν μέσω εναλλακτικού ματίσματος (μπορούν να είναι > 800kDa). Οι nesprins διαθέτουν πολλαπλά ομαδοποιημένα αντίγραφα σπεκτρίνης κατά μήκος του πυρήνα της πρωτεΐνης, αμινοτελικές ομόλογες περιοχές καλπονίνης και μία συντηρημένη καρβοξυτελική μεμβρανική περιοχή, την C-terminal Klarsicht, ANC-1 και Syne Homology (KASH) ⁽³⁹⁻⁴¹⁾. Λόγω της KASH περιοχής οι nesprins προσδένονται ειδικά στον πυρηνικό φάκελο. Οι nesprin-1 ισομορφές είναι οι CPG2, syne-1, myne-1 και Enaptin, ενώ οι nesprin-2 ισομορφές είναι οι syne-2 και NUANCE ^(39,40,42-44). Τόσο οι nesprins-1 όσο και οι nesprins-2, βρίσκονται και στην εσωτερική και στην εξωτερική πυρηνική μεμβράνη και μπορούν να προσδένονται με την ακτίνη. Τέλος, οι nesprins προσδένονται στις λαμίνες A και C, καθώς και στην emerin, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, και ο εντοπισμός τους στον πυρηνικό φάκελο εξαρτάται από την έκφραση των λαμινών τύπου A ^(42,44,45). Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε μία τρίτη ισομορφή nesprins, η nesprin-3, η οποία δε διαθέτει περιοχή πρόσδεσης στην ακτίνη, αλλά προσδένεται στην πλεκτίνη, η οποία μπορεί να σχετιστεί με τα ενδιάμεσα ινίδια ⁽⁴⁶⁾.



Εικόνα 1.5 Τα τρία επίπεδα των πρωτεϊνών του πυρηνικού φακέλου. Οι πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης, συμπεριλαμβανομένων των SUN1, LAP2, Emerin, MAN1 και LBR, σχετίζονται κυρίως με την πυρηνική λάμινα.

1.2.4 Η δυναμική των λαμινών.

1.2.4.1 Η δυναμική των λαμινών κατά τη μεσόφαση.

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών υποστηρίζει ότι, κατά τη μεσόφαση, πέραν του προφανούς εντοπισμού των λαμινών στην περιφέρεια του πυρήνα, οι λαμίνες μπορούν να εντοπιστούν και σε πυρηνοπλασματικές περιοχές. Κατά συνέπεια, μπορούμε να διακρίνουμε τρία επίπεδα οργάνωσης της λάμινας:

α) Οι σχετιζόμενες με την πυρηνική μεμβράνη λαμίνες. Με τη χρήση της μεθόδου ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτοσκίαση (FRAP) και έπειτα από πειράματα απώλειας φθορισμού (FLIP), προέκυψε ότι οι λαμίνες A και B1 είναι σχεδόν απόλυτα ακινητοποιημένες (δηλαδή, πολύ ισχυρά συνδεδεμένες μεταξύ τους), ενώ η λαμίνη C είναι περισσότερο κινητική ⁽⁴⁷⁾.

β) Οι οργανωμένες σε ενδοπυρηνικές αυλακώσεις και ενδοπυρηνικά συσσωματώματα λαμίνες. Έπειτα από πειράματα υπερέκφρασης της λαμίνης A, παρατηρήθηκε ένας

αυξανόμενος σχηματισμός ενδο- και διαπυρηνικών καναλιών. Στη συνέχεια, κι έπειτα από πειράματα ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτοσκίαση (FRAP), αποδείχθηκε ότι τα κανάλια αυτά είναι σταθερά και παρουσιάζουν πολύ μικρή ανάκτηση του φθορισμού τους, όμοια με εκείνη των σχετιζόμενων με την πυρηνική μεμβράνη λαμινών ⁽⁴⁸⁾. Σε κατάλληλα πειραματικά συστήματα, η υπερέκφραση των λαμινών A, B1 ή B2, αλλά όχι της λαμίνης C, οδηγούν σε μεγέθυνση της πυρηνικής μεμβράνης ⁽⁴⁹⁾, η οποία ακολουθείται από αναδίπλωση του πυρήνα και αύξηση των πυρηνικών εγκολπώσεων ⁽⁵⁰⁾.

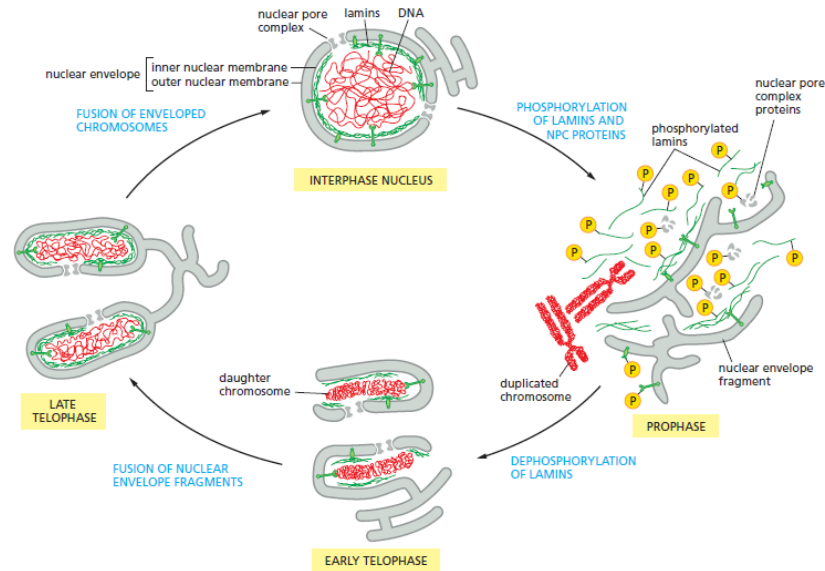
γ) Οι πυρηνοπλασματικές λαμίνες. Η χρήση διαφόρων τεχνικών φωτοσκίασης αποκάλυψε ότι ένα σημαντικό μέρος των ενδοπυρηνικών λαμινών, ορατό ως διάχυτος πυρηνοπλασματικός φθορισμός, ενσωματώνεται σταθερά στο εσωτερικό του πυρήνα, ως ένα διάσπαρτο, όμοιο με πέπλο, πυρηνοπλασματικό δίκτυο λαμινών ^(48,51). Ιδιαίτερη εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι παρατηρείται μεγάλη ενδοκυτταρική ποικιλία στη διατήρηση του φθορισμού, έπειτα από διαμόλυνση κυττάρων με GFP-λαμίνη C, η οποία είναι πιο διακριτή από εκείνη των διαμολυσμένων με GFP-λαμίνη A ⁽⁴⁷⁾.

1.2.4.2 Η δυναμική των λαμινών κατά τη μίτωση.

Οι πιο δραματικές αλλαγές στην αρχιτεκτονική των λαμινών προκύπτουν κατά την κυτταρική διαίρεση (Εικ. 1.6). Κατά τη μετάβαση από την πρόφαση στην προμετάφαση η πυρηνική μεμβράνη και η λάμινα αποδιατάσσονται. Για ένα μεγάλο διάστημα θεωρούταν ότι η φωσφορυλίωση των λαμινών από την κινάση cdk1, ανάμεσα σε άλλες, αποτελεί την έναρξη της διάσπασης του πυρηνικού φακέλου ^(17,52). Πρόσφατα προτάθηκε πως στο τέλος της πρόφασης οι μικροσωληνίσκοι προσδένονται στην πυρηνική μεμβράνη μέσω της δυνείνης και αποσπών μεμβρανικά τμήματα από τον πυρήνα. Ως αποτέλεσμα, ο πυρηνικός φάκελος διαρρηγνύεται μερικώς, επιτρέποντας στις κινάσες να εισέλθουν στον πυρήνα και να φωσφορυλιώσουν τα μόρια της λαμίνης, τα οποία και διαλυτοποιούνται ^(53,54). Επομένως, ο συνδυασμός της φωσφορυλίωσης και του ελκυσμού –και όχι της διάρρηξης- της μεμβράνης αποτελεί το λογικότερο σενάριο για την έναρξη της μίτωσης. Στα κύτταρα των θηλαστικών η απόσπαση των λαμινών

τύπου A από την πυρηνική μεμβράνη ξεκινά στην πρώιμη πρόφαση, ενώ οι λαμίνες τύπου B αποσπώνται αργότερα ⁽⁵³⁾. Άλλη μελέτη έδειξε ότι οι λαμίνες τύπου A διαλυτοποιούνται και διασπείρονται εντελώς μέσα στο κυτταρόπλασμα, ενώ ψήγματα των λαμινών τύπου B παραμένουν συνδεδεμένα με δομές της πυρηνικής μεμβράνης ⁽¹⁾. Η άποψη αυτή τέθηκε υπό αμφισβήτηση, καθώς πρόσφατες μελέτες με εξωγενή GFP-λαμίνη B1 προτείνουν ότι οι λαμίνες τύπου B διαλυτοποιούνται κατά την έναρξη της μίτωσης ⁽⁵⁵⁾. Εντούτοις, το εάν οι ενδογενείς λαμίνες τύπου B αποσπώνται από την πυρηνική μεμβράνη κατά τη μίτωση, παραμένει άγνωστο.

Η ανασυγκρότηση της λάμινας ξεκινάει με την σύνδεση των LAP2α και BAF με τα άκρα των χρωμοσωμάτων, συνοδευόμενα από τον υποδοχέα της λαμίνης B (LBR) και ένα μικρό τμήμα της *emerin* ⁽⁵⁶⁾, ακολουθούμενο από την LAP2β ^(25,56). Ξεκινώντας στην τελόφαση, η λαμίνη τύπου B (επανα)συνδέεται με τμήματα της μεμβράνης, τα οποία ακόμα δεν περιβάλλουν τα χρωμοσώματα. Αυτή η ανασυγκρότηση της λαμίνης τύπου B προκύπτει αμέσως μετά την εμφάνιση της LAP2β γύρω από την χρωματίνη ⁽²⁵⁾. Μόνο στην προχωρημένη τελόφαση/ κυττοκίνηση επανασυγκροτείται η λαμίνη τύπου B ως δομή της πυρηνικής μεμβράνης. Επίσης, και τα τρία μόρια των λαμινών τύπου A δεν κινούνται προς τον νεοσχηματισμένο πυρήνα μέχρις ότου ολοκληρωθεί η κυττοκίνηση ⁽⁴⁸⁾, όταν ο όγκος των λαμινών τύπου A μεταφέρεται στο εσωτερικό του πυρήνα μέσω των νεοσχηματισμένων συμπλεγμάτων των πυρηνικών πόρων ⁽⁵⁷⁾.



Εικόνα 1.6 Η αποδιάταξη και ανασυγκρότηση του πυρηνικού φακέλου και της πυρηνικής λάμινας κατά τη μίτωση.

1.2.4.3 Οι λειτουργίες των λαμινών στην αρχιτεκτονική του πυρήνα και του κυττάρου.

Οι λαμίνες, ως βασικές δομικές πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης, παίζουν σημαντικό ρόλο στην αγκυροβόληση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών του πυρηνικού φακέλου. Τα συμπλέγματα που σχηματίζουν οι λαμίνες με αυτές τις πρωτεΐνες έχουν τουλάχιστον τρεις είτε καλά προσδιορισμένες είτε ανακλύπτουσες λειτουργίες στη διατήρηση της αρχιτεκτονικής του κυττάρου (Εικ. 1.7).

Ο νηματώδης σκώληκας *C. Elegans* αποτελεί βασικό σύστημα για την κατανόηση της φύσης των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων που οργανώνονται γύρω από τις λαμίνες. Ο *C. Elegans* εκφράζει μόνο έναν τύπο λαμίνης Β-τύπου, την Ce-λαμίνη. Πειράματα αποσιώπησης της Ce-λαμίνης, μέσω επεμβατικού RNA (RNAi), είχαν ως αποτέλεσμα μορφολογικά ελαττώματα στον πυρήνα καθώς και ελαττώματα στη διαδικασία της μίτωσης. Η αποσιώπηση της Ce-λαμίνης οδηγεί στην λανθασμένη τοποθέτηση των Ce-MAN και Ce-emerin στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Μία ακόμα πρωτεΐνη η οποία δεν εντοπίζεται πλέον στον πυρηνικό φάκελο, εξαιτίας της

αποσιώπησης της Ce-λαμίνης, είναι ο πρωτεϊνικός παράγοντας Ce-BAF. Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι πειράματα αποσιώπησης των Ce-MAN και Ce-emerin οδηγούν σε απεντοπισμό του BAF από την πυρηνικό φάκελο. Και τα τρία αυτά πειράματα αποσιώπησης μέσω επεμβατικού RNA, έχουν ως αποτέλεσμα πανομοιότυπους θνησιγενείς μιτωτικούς φαινοτύπους, συμπεριλαμβάνοντας τον σχηματισμό κατά την ανάφαση γεφυρών χρωματίνης και ανευπλοειδία ⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η Ce-λαμίνη είναι κεντρικό δομικό στοιχείο ενός συμπλέγματος, που συμπεριλαμβάνει τις Ce-MAN1, Ce-emerin και τον Ce-BAF, το οποίο είναι ουσιαστικής σημασίας για τον διαχωρισμό της χρωματίνης κατά τη μίτωση.

Στα θηλαστικά, η σχέση των λαμινών με τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου έχει διερευνηθεί χρησιμοποιώντας κύτταρα ποντικών KO (knockout). Τα ποντίκια αυτά δημιουργήθηκαν με παρεμβολή μορίων RNA ή με τη χρήση επικρατούντων αρνητικών μεταλλαγμάτων, τα οποία διαταράζουν τη συνοχή των ινιδίων της λαμίνης. Με αυτές τις πειραματικές προσεγγίσεις κατέστη προφανές ότι υπάρχουν διακριτά συμπλέγματα των λαμινών τύπου A και B με τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, παρότι μπορεί να υπάρχει αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των δύο. Έχει αποδειχθεί ότι η λαμίνη τύπου A προσδένεται στην emerin *in vitro* και το σημείο πρόσδεσής της έχει χαρτογραφηθεί ως αλληλουχίες κοινές μεταξύ των λαμινών A και C ^(61,62). Όμοια, το σημείο πρόσδεσης των λαμινών A/C στην emerin χαρτογραφήθηκε σε αλληλουχίες στο μέσο της πυρηνοπλασματικής της περιοχής ⁽⁶³⁾. Στην περίπτωση απουσίας των λαμινών, η emerin, σε αντίθεση με την LAP2β, απεντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο ^(33,64,65), γεγονός που υποδεικνύει ότι η emerin και η LAP2β συνδέονται στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη μέσω διαφορετικών συμπλεγμάτων με τις λαμίνες. Συνηγορητικά σε αυτό λειτουργεί και το εύρημα ότι η LAP2β συνδέεται στις λαμίνες τύπου B *in vitro* ⁽⁶⁶⁾ και μία μετάλλαξη της λαμίνης B1, η οποία έχει ως αποτέλεσμα να διαρρηγνύονται τα ινίδια της λαμίνης B, οδηγεί σε απεντοπισμό της LAP2β ⁽⁶⁷⁾.

Ενώ η emerin και η LAP2β φαίνεται να υπάρχουν σε διακριτά συμπλέγματα λαμινών και οι δύο προσδένονται στον παράγοντα BAF μέσω των περιοχών LEM (ομόλογη περιοχή της πρωτεΐνης MAN1, με τις πρωτεΐνες LAP2 και emerin), όπως συμβαίνει και με την πρωτεΐνη MAN1. Πειράματα FRET αποκάλυψαν ότι ο παράγοντας BAF αλληλεπιδρά άμεσα με την emerin στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη ⁽⁶⁸⁾. Πειράματα

παρανοηματικών μεταλλάξεων (missense mutations) του παράγοντα BAF σε ανθρώπινα κύτταρα είχαν ως αποτέλεσμα την αναστολή του σχηματισμού των emerín, LAP2β και της λαμίνης Α-τύπου στους τροποποιημένους πυρήνες. Σε συμφωνία με το παραπάνω εύρημα, μία άλλη μελέτη απέδειξε πως η πρωτεΐνη emerín που φέρει μεταλλάξεις στην περιοχή LEM, δεν προσδένεται στον πυρηνικό φάκελο μετά τη μίτωση ⁽⁶³⁾. Όμοια, πεπτίδια τα οποία περιλαμβάνουν την LEM περιοχή της LAP2β αναστέλλουν τον σχηματισμό της λάμινας ⁽²⁷⁾.

Συνεπώς, όπως και στον *C. Elegans*, τα συμπλέγματα του πρωτεϊνικού παράγοντα BAF φαίνεται πως παίζουν σημαντικό ρόλο στη δομή των κυττάρων των θηλαστικών.

1.2.4.4 Η λειτουργία των λαμινών στην οργάνωση του κυτταροσκελετού.

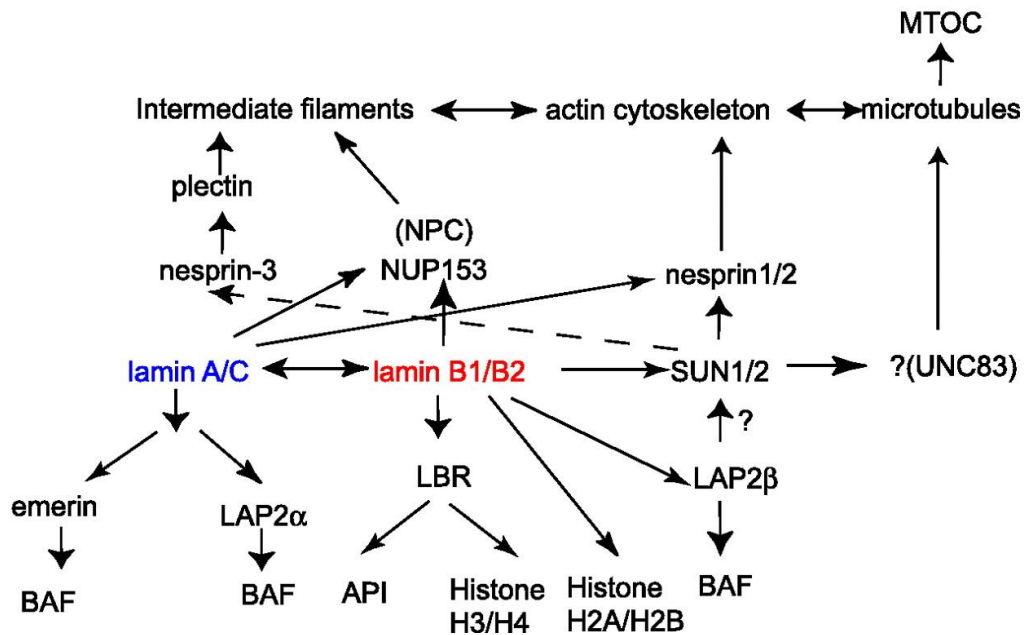
Η nesprin-1 συνδέεται *in vitro* τόσο στην emerín όσο και στην λαμίνη τύπου-Α ⁽⁴³⁾. Επιπλέον, συμπεριφέρεται ως πρωτεΐνη πρόσδεσης της ακτίνης τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* ⁽⁶⁹⁾. Επίσης, και η nesprin-2 συνδέεται *in vitro* στις λαμίνες τύπου-Α και στην emerín, και ο εντοπισμός της στον πυρηνικό φάκελο εξαρτάται από την έκφραση της λαμίνης A/C ^(41,70). Η παρουσία της nesprin-2 σε συμπλέγματα της λαμίνης A/C είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της emerín στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη ⁽⁷⁰⁾. Παρόλα αυτά, οι nesprins-1 και -2, ενδέχεται να συνδέονται στον πυρηνικό φάκελο και μέσω συμπλεγμάτων που δε περιλαμβάνουν λαμίνες τύπου Α. Και οι δύο αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη SUN1, της οποίας ο εντοπισμός στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη δεν εξαρτάται από τις λαμίνες τύπου Α, υποδεικνύοντας πως υπάρχουν διακριτά συμπλέγματα λαμινών-nesprin και SUN1-nesprin ^(70,71).

Τέλος, η emerín αλληλεπιδρά με τις α- και β-ακτίνες ⁽⁷²⁾. Πειράματα πρωτεομικής ανάλυσης χαρακτήρισαν την ακτίνη ως μία νέα πρωτεΐνη πρόσδεσης της emerín. Η ίδια μελέτη αποκάλυψε πως η emerín προσδένεται και σταθεροποιείται στα άκρα της f-ακτίνης, αυξάνοντας συνεπώς το σχηματισμό του ινιδίου *in vitro*, σε πολύ μεγάλο βαθμό ⁽⁷³⁾. Αυτά τα ευρήματα αυτά υπέδειξαν πως η emerín διαμεσολαβεί την συναρμολόγηση ενός φλοιώδους κυτταροσκελετού ακτίνης στον πυρηνικό φάκελο ^(74,75).

Ενώ στον σκώληκα *C. elegans* η πρόσδεση των λαμινών στους μικροσωληνίσκους και το οργανωτικό τους κέντρο διαμεσολαβείται από τις πρωτεΐνες UNC-84 και UNC-83 ⁽⁷⁶⁾, στα θηλαστικά δεν έχει αποδειχθεί μια άμεση φυσική σχέση μεταξύ λαμινών και μικροσωληνίσκων. Έχει αποδειχθεί στη *Drosophila* μια τέτοια σχέση μέσω του γονιδίου Klarsicht ⁽⁷⁷⁾.

Βιοχημικές μελέτες και πειράματα κυτταρικής ελαστικότητας υποδεικνύουν μια φυσική συσχέτιση των πρωτεϊνών των ενδιάμεσων ινιδίων του κυτταροπλάσματος με τις λαμίνες, μέσω των συμπλεγμάτων των πυρηνικών πόρων ^(78,79). Η πρόσδεση της desmin στα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων φαίνεται να διαμεσολαβεί την πρόσδεση του σαρκομερούς στη χρωματίνη μέσω των λαμινών, και όταν τα καρδιομυοκύτταρα εκτείνονται, παρατηρούνται αλλαγές στην χωροδιάταξη τόσο του δικτύου desmin-λαμίνης κι ενδιάμεσων ινιδίων όσο και του δικτύου της σχετιζόμενης με τον πυρηνικό φάκελο χρωματίνης ⁽⁷⁸⁾.

Cytoskeleton/nucleoskeleton interactions



Εικόνα 1.7 Κυτταροσκελετικές / Πυρηνοσκελετικές αλληλεπιδράσεις. Υπάρχουν αυξανόμενα δεδομένα ότι οι λαμίνες διαδραματίζουν ένα βασικό ρόλο όχι μόνο στην πυρηνική αλλά και στην συνολική κυτταροσκελετική οργάνωση. Οι λαμίνες προσδένονται στα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων, στην

emerin, στις nesprins και στην SUN1, και αυτές τις συνδέουν με τις πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων, τους μικροσωληνίσκους και την ακτίνη.

1.2.4.5 Η συμμετοχή των λαμινών στις λειτουργίες του πυρήνα.

Οι λαμίνες, καθώς και οι σχετιζόμενες με αυτές πρωτεΐνες, εμπλέκονται στη διατήρηση του σχήματος και της μηχανικής ακεραιότητας του πυρήνα. Εμπλέκονται επίσης και στις περισσότερες δραστηριότητες του πυρήνα, όπως είναι η οργάνωση της χρωματίνης, η αντιγραφή του DNA, η ρύθμιση της μεταγραφής και η επεξεργασία του RNA, συνδέοντας τον πυρήνα με όλα τα κύρια κυτταροσκελετικά δίκτυα, την απόπτωση την μείωση και την μίτωση.

Δύο από τα κύρια στοιχεία που καθορίζουν το σχήμα του πυρήνα και τα οποία του παρέχουν την μηχανική του ισχύ, είναι η πυρηνική λάμινα και η χρωματίνη. Οι λαμίνες πιθανόν να παρέχουν την κύρια μηχανική υποστήριξη στον πυρήνα διότι οι αλλαγές στη σύσταση της πυρηνικής λάμινας έχουν σημαντική επίδραση στην μηχανική απόκριση και του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος ^(80,81). Τέτοιες αλλαγές μπορούν επίσης να έχουν ως αποτέλεσμα μηχανικά επαγόμενες αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων.

Υπάρχουν αρκετά πειραματικά δεδομένα υποστηρικτικά της άποψης πως οι λαμίνες απαιτούνται για την αντιγραφή του DNA:

α) Στην πρώιμη S φάση η λαμίνη A συνεντοπίζεται με σημεία αντιγραφής του DNA ⁽⁸²⁾, και στο τέλος της S φάσης η λαμίνη B συνεντοπίζεται με τα σημασμένα με PCNA σημεία σύνθεσης του DNA ⁽⁸³⁾.

β) Ινοβλάστες ποντικού με αποσιωπημένες τις λαμίνες A και C, αντιγράφουν το DNA τους με ένα χαμηλότερο ρυθμό από εκείνον των ινοβλαστών ποντικών αγρίου τύπου. Η έκφραση εξωγενούς λαμίνης A στα μεταλλαγμένα κύτταρα αποκαθιστά το φυσιολογικό ρυθμό αντιγραφής του DNA ⁽⁸⁴⁾.

γ) Ανοσοκατακρήμνιση της διαλυτής λαμίνης B3 από εκχυλίσματα του υπό συναρμολόγηση πυρήνα του αμφιβίου *Xenopus* έχει ως αποτέλεσμα ανεπαρκείς πυρήνες όσον αφορά το να αντιγράψουν το συναρμολογημένο DNA ^(80,85). Η προσθήκη της B3

στα κατακρημνισμένα εκχυλίσματα αποκαθιστά την ικανότητα των πυρήνων αυτών να αντιγράψουν το DNA τους⁽²⁾.

δ) Η έκφραση της ανθρώπινης λαμίνης A ή της λαμίνης B3 του *Xenopus*, στις οποίες έχει αποκοπεί το αμινοτελικό άκρο, έχουν ως συνέπεια τη συσσωματοποίηση της λαμίνης και την αναχαίτιση της φάσης επιμήκυνσης της αλυσίδας κατά την αντιγραφή του DNA^(51,86).

Στη *Drosophila*, κατά τη μεσόφαση, οι περιοχές του πυρήνα στις οποίες η χρωματίνη είναι συμπυκνωμένη και τα επίπεδα μεταγραφής χαμηλότερα σχετίζονται με την πυρηνική λάμινα⁽⁸⁷⁾. Σε θηλυκά κύτταρα θηλαστικών το ανενεργό χρωμόσωμα X συνδέεται στενά με την πυρηνική λάμινα. Επιπρόσθετα, τα φτωχά σε γονίδια χρωμοσώματα είναι τοποθετημένα περιφερειακά, ενώ τα πλούσια σε γονίδια χρωμοσώματα είναι τοποθετημένα πιο κεντρικά^(88,89).

Οι λαμίνες σχετίζονται άμεσα με τη ρύθμιση της δραστηριότητας της RNA πολυμεράσης II. Υπερέκφραση των λαμινών A και C σε κύτταρα HeLa προκαλεί μείωση της εξαρτώμενης από την RNA πολυμεράση II έκφρασης σε αυτά⁽⁹⁰⁾.

Οι λαμίνες ρυθμίζουν συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες, αλληλεπιδρώντας άμεσα ή έμμεσα με αυτούς, και προσδένουν τον παράγοντα BAF είτε απευθείας είτε μέσω των LEM περιοχών. Αυτό το τρίπτυχο αλληλεπιδράσεων απαιτείται για τη συγκρότηση του πυρήνα και την οργάνωση της χρωματίνης⁽⁹¹⁾. Το κεντρικό τμήμα των ανθρώπινων λαμινών A και C προσδένεται άμεσα στον μεταγραφικό παράγοντα MOK-2 και ρυθμίζει τον εντοπισμό του^(92,93). Η πρωτεΐνη OCT-1 της οικογένειας πρωτεϊνών POU σχετίζεται με την πυρηνική λάμινα μέσω της καταστολής του γονιδίου της κολλαγενάσης, το οποίο και ενεργοποιείται όταν η πρωτεΐνη αυτή αποσπάται από την πυρηνική λάμινα κατά τη διαδικασία της γήρανσης⁽⁹⁴⁾.

Επιπλέον, οι λαμίνες αλληλεπιδρούν έμμεσα και με άλλους μεταγραφικούς ρυθμιστές, μέσω των σχετιζόμενων με αυτές πρωτεϊνών. Κάποιες από τις πλέον μελετημένες αλληλεπιδράσεις είναι αυτή της λαμίνης Dm0 και YA στη *Drosophila*, η οποία απαιτείται για τη μετάβαση από τη μείωση στη μίτωση⁽⁹⁵⁾.

Ο ρόλος των λαμινών στο μάτισμα του RNA διερευνάται ακόμη. Έχει αποδειχθεί ότι σε κύτταρα αρουραίου αλλά και ανθρώπινα, τόσο η λαμίνη A όσο και η λαμίνη B συνεντοπίζονται με τους παράγοντες ματίσματος SC35 και U5-116 kD ⁽⁹⁶⁾. Σε αντιπαράβολή με αυτό, ινοβλάστες ποντικού υπολειμματικές για τις λαμίνες A και C έχουν συμπλέγματα παραγόντων ματίσματος με φυσιολογική κατανομή και μορφολογία, διατηρώντας τον συσχετισμό τους με το πυρηνικό περιβάλλον ⁽⁹⁷⁾.

1.3 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση.

1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά της ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης.

Ως ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση ορίζεται ως η διαίρεση κατά την οποία προκύπτουν δυο ανόμοια θυγατρικά κύτταρα, που έχουν διαφορετικό μέγεθος ή διακριτή κυτταρική τύχη. Εικάζεται ότι η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση αποτελεί βασική ιδιότητα των βλαστικών κυττάρων. Ένα εκ των δύο θυγατρικών κυττάρων παραμένει όμοιο με το μητρικό (βλαστικό) και εξασφαλίζει την ανανέωση της βλαστικής του ταυτότητας καθώς και τη συνέχιση της ασύμμετρης διαίρεσής του. Τα άλλο θυγατρικό κύτταρο, που διαφοροποιείται, συνεισφέρει στη δημιουργία νέων κυτταρικών τύπων. Σε κάποιες περιπτώσεις ενδογενείς παράγοντες του μητρικού κυττάρου οδηγούν σε ασύμμετρη κατανομή παραγόντων που ρυθμίζουν την κυτταρική τύχη ή/και οργανιδίων, έπειτα από την πόλωση του μητρικού κυττάρου και της αντίστοιχης στοίχισης της μιτωτικής ατράκτου αποκλειστικά στο ένα εκ των θυγατρικών κυττάρων. Σε άλλες όμως περιπτώσεις, το καθεστώς απόκτησης διαφορετικής κυτταρικής τύχης εξαρτάται από το διαφορετικό μικροπεριβάλλον, λόγω των σημάτων από τα γειτονικά κύτταρα. Αυτοί είναι οι δύο τύποι ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων που ονομάζονται ενδογενής (intrinsic) και εξωγενής (extrinsic). Ανεξάρτητα από τον τύπο, η διαδικασία της ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης χωρίζεται σε τρεις αλληλοσυνδεόμενες φάσεις: την κυτταρική πόλωση, τη στοίχιση της ατράκτου και τον ασύμμετρο διαχωρισμό των καθοριστικών παραγόντων της κυτταρικής τύχης και σε κάποιες περιπτώσεις του πρότυπου DNA^(98,99).

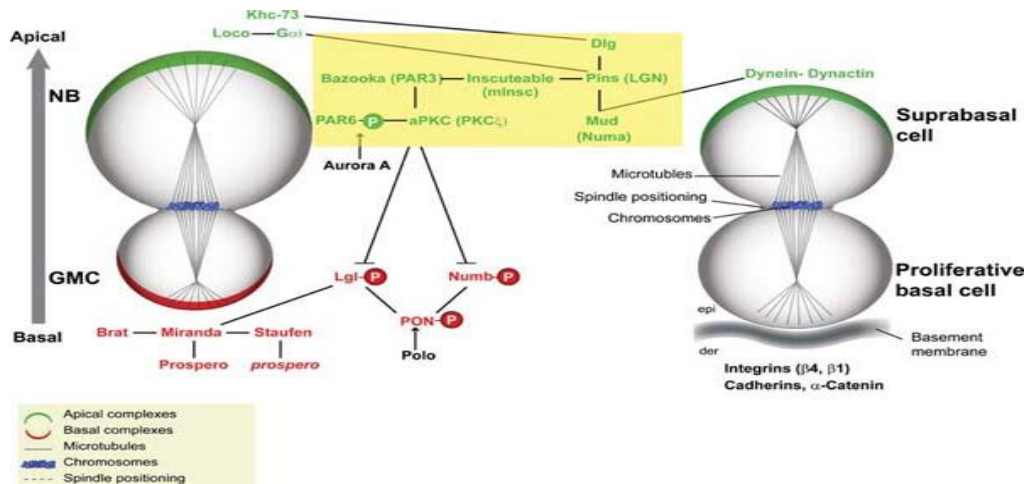
Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι το DNA εκμαγείο σε ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις των ενήλικων βλαστικών κυττάρων διαχωρίζεται επιλεκτικά στο ένα εκ των δυο θυγατρικών κυττάρων κατά την ασύμμετρη διαίρεση^(100,101). Παρόμοιο επιλεκτικό διαχωρισμό φαίνεται επίσης να ακολουθούν και τα κεντροσώματα (μητρικό και θυγατρικό), τα οποία σε ορισμένους τύπους ασύμμετρα διαιρούμενων κυττάρων φαίνεται ότι διαχωρίζονται επιλεκτικά^(102,103). Τέλος, το κύτταρο που θα παραμείνει

βλαστικό εκ των δυο θυγατρικών κυττάρων συνήθως κληρονομεί επιλεκτικά το υπολειπόμενο μεσόσωμα με το τέλος της κυττοκίνησης⁽¹⁰⁴⁾.

1.3.2 Πρότυπα ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης.

1.3.2.1 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση της νευροβλάστης της *Drosophila*.

Οι μελέτες των μηχανισμών που ρυθμίζουν την ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση της νευροβλάστης της *Drosophila* έχουν συνεισφέρει σημαντικά στην καθιέρωση παραδειγμάτων και την ταυτοποίηση των μοριακών συστατικών που ελέγχουν την ασύμμετρη διαίρεση σε πιο πολύπλοκα συστήματα βλαστικών κυττάρων⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁸⁾. Οι νευροβλάστες είναι πρόδρομα βλαστικά κύτταρα από τα οποία προκύπτουν όλα τα μέρη του κεντρικού νευρικού συστήματος. Κατά τα στάδια της προνύμφης και της χρυσαλίδας, οι διαιρέσεις των νευροβλαστών επαναλαμβάνονται προκειμένου να παράγουν ενήλικους νευρώνες. Στο στάδιο του εμβρύου οι νευροβλάστες διαιρούνται κάθετα στο επίπεδο του νευροεπιθηλίου ώστε να παραχθεί μία άλλη κατακόρυφα προσανατολισμένη νευροβλάστη και ένα μικρότερο τοποθετημένο στη βάση της γλοιακό μητρικό κύτταρο (GMC, ganglion mother cell), το οποίο θα διαφοροποιηθεί σε νευρώνες ή γλοία. Η πολικότητα κορυφής-βάσης της μητρικής νευροβλάστης κληρονομείται εξαιτίας της τοποθέτησής της στο νευροεπιθήλιο και συνδέεται με την ασύμμετρη κατανομή των συστατικών του κυττάρου. Απεδείχθη ότι οι νευροβλάστες είναι ασύμμετρα διαιρούμενα βλαστικά κύτταρα από τα οποία προκύπτουν πολυάριθμοι κυτταρικοί τύποι^(106,109).



Εικόνα 1.8 Ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση της νευροβλάστης της *Drosophila* (αριστερά) και του επιθηλίου των θηλαστικών (δεξιά).

Αρκετές πτυχές της ενδογενούς πολικότητας συμβάλλουν στην ασύμμετρη διαίρεση των νευροβλαστών:

α) Οι καθοριστικοί παράγοντες της κυτταρικής τύχης διαχωρίζονται στη βάση του φλοιού της διαιρούμενης νευροβλάστης, έχοντας ως αποτέλεσμα τη διατάραξη της συμμετρίας του μητρικού κυττάρου πριν την διαίρεση.

β) Η μιτωτική άτρακτος ευθυγραμμίζεται κατά μήκος του άξονα κορυφής-βάσης ώστε να εξασφαλιστεί ο ακριβής διαχωρισμός αυτών των καθοριστικών παραγόντων της κυτταρικής τύχης στο κατάλληλο θυγατρικό κύτταρο.

γ) Η ασύμμετρη τοποθέτηση της ατράκτου κατά τη ανάφαση έχει ως αποτέλεσμα τα θυγατρικά κύτταρα όχι μόνο να αποκτήσουν διαφορετική τύχη, αλλά και να διαφέρουν ως προς το μέγεθος.

Αυτού του είδους η ενδογενής κυτταρική πολικότητα φαίνεται ότι είναι ο κύριος μηχανισμός της ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης των νευροβλαστών. Παρόλα αυτά, κάποιες μελέτες προτείνουν ότι εξωγενή σήματα από το υπερκείμενο επιθήλιο διευκολύνουν την κατάλληλη τοποθέτηση των καθοριστικών παραγόντων της κυτταρικής τύχης⁽¹¹⁰⁾. Νευροβλάστες οι οποίες εξακολουθούν να βρίσκονται σε επαφή με τα επιθηλιακά κύτταρα πάντα θα παράγουν, κατά τη διαίρεσή τους, γλοιακά μητρικά

κύτταρα αντιδιαμετρικά του σημείου επαφής της νευροβλάστης με το επιθήλιο. Αντίθετα, απομονωμένες νευροβλάστες παράγουν γλοιακά μητρικά κύτταρα σε τυχαίες θέσεις κατά μήκος του περιβλήματος της νευροβλάστης. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι εμβρυονικές νευροβλάστες απαντούν σε σήματα του παρακείμενου επιθηλίου, ώστε να συγκεκριμενοποιήσουν τον σωστό προσανατολισμό της ατράκτου και την τοποθέτηση στον φλοιό των καθοριστικών παραγόντων της κυτταρικής τύχης.

Ο διαχωρισμός των καθοριστικών παραγόντων της κυτταρικής τύχης στο θυγατρικό γλοιακό μητρικό κύτταρο ρυθμίζεται από μία αμοιβαία τοποθέτηση τεσσάρων πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων: δύο συμπλέγματα που εντοπίζονται στον κορυφαίο φλοιό και δύο που εντοπίζονται στον βασικό φλοιό (Εικ.1.8).

Τα συμπλέγματα της βασικής επιφάνειας που θα κληρονομηθούν από το γλοιακό μητρικό κύτταρο τοποθετούν ασύμμετρα τρεις κύριους παράγοντες: τον Prospero, την Brat και τον Numb, οι οποίοι αναστέλλουν την αυτοανανέωση και προάγουν την διαφοροποίηση ⁽¹¹¹⁾. Ένας βασικός ρυθμιστής της διαφοροποίησης του γλοιακού μητρικού κυττάρου είναι ο μεταγραφικός παράγοντας Prospero ⁽¹¹²⁻¹¹⁵⁾. Η πρωτεΐνη προσαρμογέας Miranda (Mira) συνδέει την πρωτεΐνη πρόσδεσης του dsRNA Staufen, η οποία με τη σειρά της είναι δεσμευμένη στο *prospero* mRNA. Η Mira επίσης σχετίζεται με την πρωτεΐνη Prospero και διευκολύνει τον ασύμμετρο εντοπισμό του μεταφραστικού καταστολέα Brain tumor ^(110,116,117). Έπειτα από τον διαχωρισμό της στο γλοιακό μητρικό κύτταρο η Mira αποδομείται, επιτρέποντας την αποδέσμευση των Pros, Staufen και Brat.

Το δεύτερο σύμπλεγμα της βασικής επιφάνειας περιέχει τον ανταγωνιστικό παράγοντα του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch, τον Numb, και τον προσαρμογέα του Numb, Pon. Η υιοθέτηση διαφορετικής κυτταρικής τύχης από το θυγατρικό κύτταρο που εμπεριέχει τον παράγοντα Numb, θεωρείται ότι κατά κύριο λόγο έχει προκύψει από την ικανότητα του Numb να προσδένεται στην κυτταροπλασματική περιοχή του Notch και να ανταγωνίζεται το σήμα του στο γλοιακό μητρικό κύτταρο ^(118,119).

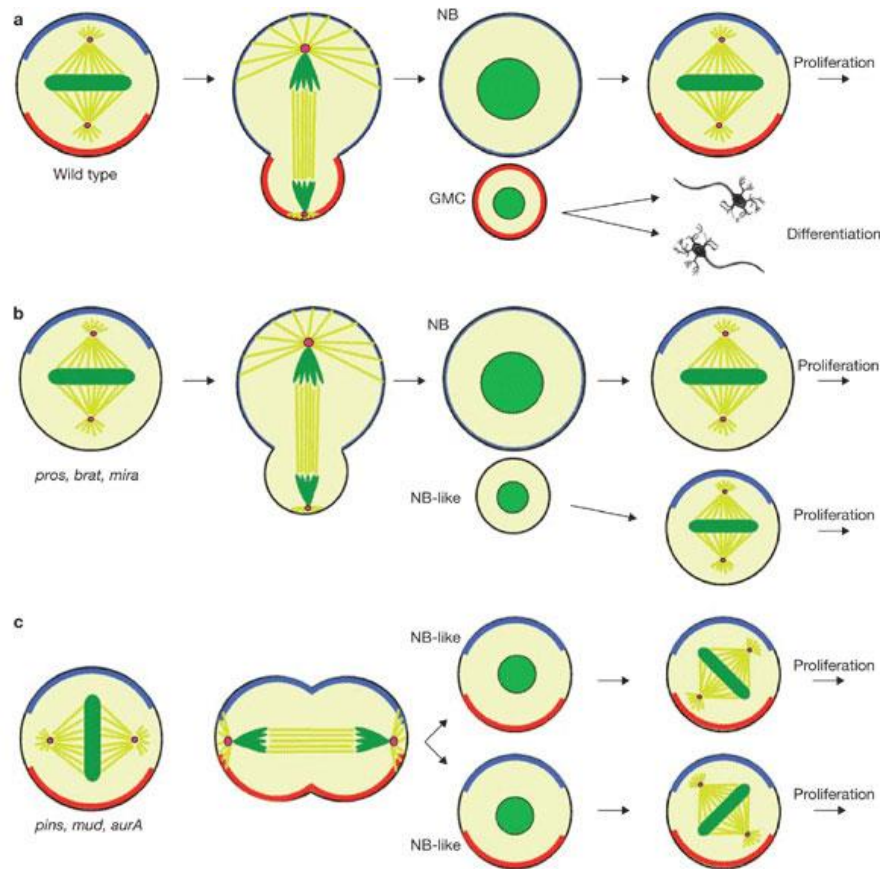
Όσον αφορά τα συμπλέγματα της κορυφαίας επιφάνειας, οι εξελικτικά διατηρημένες πρωτεΐνες PAR λειτουργούν ως κύρια μέρη του μηχανισμού της κυτταρικής πολικότητας στα ζώα, από τον σκώληκα *C.elegans* έως τον άνθρωπο ⁽¹²⁰⁾. Το σύμπλοκο PAR, το

οποίο περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Bazooka/Par-3, Par-6 και την aPKC (atypical Protein kinase C), είναι το πρώτο που τοποθετείται κατά μήκος του κυτταρικού φλοιού της νευροβλάστης. Αρχικά, το σύμπλοκο PAR εμπλέκεται στην πρόσληψη της πρωτεΐνης προσαρμογέα Inscuteable (Insc), ρόλος της οποίας είναι να θεμελιώσει την πολικότητα της νευροβλάστης και να διευκολύνει την κατάλληλη στοίχιση της ατράκτου, προσδένοντας τον έναν πόλο της ατράκτου στον κορυφαίο φλοιό και ευθυγραμμίζοντάς τον κατά μήκος του άξονα κορυφής-βάσης ⁽¹²¹⁻¹²⁵⁾. Το σύμπλοκο PAR παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της κυτταρικής τύχης, αποκλείοντας τα συμπλέγματα της βασικής επιφάνειας από τον κορυφαίο φλοιό, εν μέρει φωσφορυλιώνοντας και απενεργοποιώντας την Lgl (Lethal giant larva), η οποία είναι υπεύθυνη για την σωστή τοποθέτηση των Pon και Mira στον βασικό φλοιό ⁽¹¹⁷⁾. Η φωσφορυλίωση της Lgl από την aPKC οδηγεί στην αποδέσμευσή της από το σύμπλοκο, και την αντικατάστασή της από την Bazooka/Par-3, και τελικά σε μία αλλαγή στην εξειδίκευση του υποστρώματος ⁽¹²⁶⁾.

Το δεύτερο σύμπλεγμα κορυφαίας επιφάνειας εμπεριέχει την πρωτεΐνη Pins (Partner of Inscuteable), τις Loco και Gai, μία υπομονάδα των ετεροτριμερών G πρωτεϊνών ^(122,125,127). Η Insc γεφυρώνει τα δύο συμπλέγματα της κορυφαίας επιφάνειας, με την πρόσδεσή της και στην Bazooka/Par-3 και στην Pins. Η Pins συσχετίζεται με την mud (mushroom body effect), η οποία είναι απαραίτητη για τη σωστή στοίχιση της μιτωτικής ατράκτου ⁽¹²⁸⁾. Η πρωτεΐνη Dlg (Discs Large) αλληλεπιδρά με την Khc-73 πρωτεΐνη των αστρικών μικροσωληνίσκων ώστε να επάγουν την πολικότητα των επιφανειών ⁽¹²⁹⁾. Το σύμπλεγμα Pins διαμεσολαβεί στον σχηματισμό και τη στοίχιση της ατράκτου, για να επιβεβαιώσει ότι ο μιτωτικός δίσκος βρίσκεται σε ορθή γωνία με τον άξονα κορυφής-βάσης. Τελικά, η μιτωτική άτρακτος μετακινείται προς τον βασικό φλοιό, έχοντας ως αποτέλεσμα ένα μακρύτερο τμήμα της ατράκτου να βρίσκεται στο θυγατρικό κύτταρο της κορυφαίας επιφάνειας.

Πέραν των παραπάνω συμπλεγμάτων, πρόσφατα δεδομένα υπέδειξαν ότι στοιχεία του μηχανισμού του κυτταρικού κύκλου μπορούν επίσης να επηρεάσουν τον ασύμμετρο εντοπισμό πρωτεϊνών και την εξειδικευμένη κυτταρική τύχη των θυγατρικών κυττάρων. Η ανάλυση εμβρύων που έφεραν αρνητικά ή υπομορφικά αλλήλια της κινάσης cdc2, η

οποία είναι υπεύθυνη για την μετάβαση από την G2 φάση στην μίτωση, κατέδειξε τη λανθασμένη τοποθέτηση των συμπλεγμάτων της κορυφαίας, αλλά και της βασικής επιφάνειας, έχοντας ως συνέπεια συμμετρικές διαιρέσεις των νευροβλαστών ⁽¹³⁰⁾. Παρομοίως, μεταλλάξεις στις κινάσες Aurora A και Polo, οι οποίες είναι κεντροσωμικές πρωτεΐνες, οδηγούν σε συμμετρικές διαιρέσεις, καθώς διαταράσσεται ο εντοπισμός των Numb και Pon στη βασική επιφάνεια του κυττάρου και αυξάνονται οι νευροβλάστες που αυτοανανεώνονται εις βάρος των νευρώνων. Ο υπερπολλαπλασιασμός μπορεί να αντιστραφεί, παρότι όχι τελείως, με υπερέκφραση αγρίου τύπου Numb ^(110,119). Όμοια, και η μείωση του Notch σε νευροβλάστες με μεταλλάξεις στις κινάσες Aurora A και Polo μπορεί να καταστείλλει τον υπερπολλαπλασιασμό τους (Εικ. 1.9).



Εικόνα 1.9 α) Οι αγρίου τύπου νευροβλάστες της *Drosophila* στο στάδιο της προνύμφης διαιρούνται ασύμμετρα και το αποτέλεσμα αυτής τους της διαίρεσης είναι μία νευροβλάστη κι ένα γλοιακό μητρικό κύτταρο. **β)** Στις μεταλλαγμένες για τα *pros*, *brat* ή *mira* νευροβλάστες, το γλοιακό μητρικό κύτταρο δεν ορίζεται ειδικώς με σωστό τρόπο, και κατά συνέπεια συμπεριφέρεται όμοια με μία νευροβλάστη, έχοντας

ως αποτέλεσμα έναν υπέρογκο αριθμό κυττάρων που παραμένουν αδιαφοροποίητα. γ) Στις μεταλλαγμένες σε γονίδια που ελέγχουν τον προσανατολισμό της μιτωτικής ατράκτου νευροβλάστες, π.χ. στα *mushroom body defect (mud)*, *aurora A(aurA)* ή *partner of inscuteable (pins)*, η μιτωτική άτρακτος δε στοιχίζεται με τον εντοπισμό του συμπλέγματος PAR–aPKC και τους παράγοντες καθορισμού της κυτταρικής τύχης, έχοντας ως αποτέλεσμα τον μη-φυσιολογικό καταμερισμό τους. Κατά συνέπεια, κανένα από τα θυγατρικά κύτταρα δεν αποκτά την τύχη του γλοιακού μητρικού κυττάρου. Αποτυγχάνουν να διαιρεθούν και συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται. Κίτρινο: μιτωτική άτρακτος, Πράσινο: DNA, Κόκκινες τελείες: κεντροσώματα.

Η κινάση Polo φωσφορυλιώνει την Pon, η οποία είναι σημαντική για τον σωστό εντοπισμό του Numb. Επιπλέον, πρόσφατα δεδομένα αποσαφήνισαν τον μηχανισμό με τον οποίο λειτουργεί η Aurora A ώστε το γλοιακό μητρικό κύτταρο να κληρονομήσει τον παράγοντα Numb. Η Aurora A φωσφορυλιώνει την Par-6, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της aPKC, τη φωσφορυλίωση της Lgl και την αντικατάστασή της από την Bazooka/Par-3. Το νέο αυτό σύμπλεγμα έχει μια τροποποιημένη εξειδίκευση, η οποία καθιστά ικανή την aPKC να προσδεθεί και να φωσφορυλιώσει τον παράγοντα Numb, έχοντας ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση του Numb στη βασική επιφάνεια του κυττάρου ⁽¹²⁶⁾. Επομένως, οι μηχανισμοί που συνδέουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου προς τον ασύμμετρο εντοπισμό του Numb, φαίνεται να υπάρχουν για να διασφαλίσουν την ενεργοποίηση του Notch μόνο στο θυγατρικό κύτταρο της νευροβλάστης, του οποίου η τύχη θα είναι αυτή της αυτοανανέωσης (Εικ. 1.9).

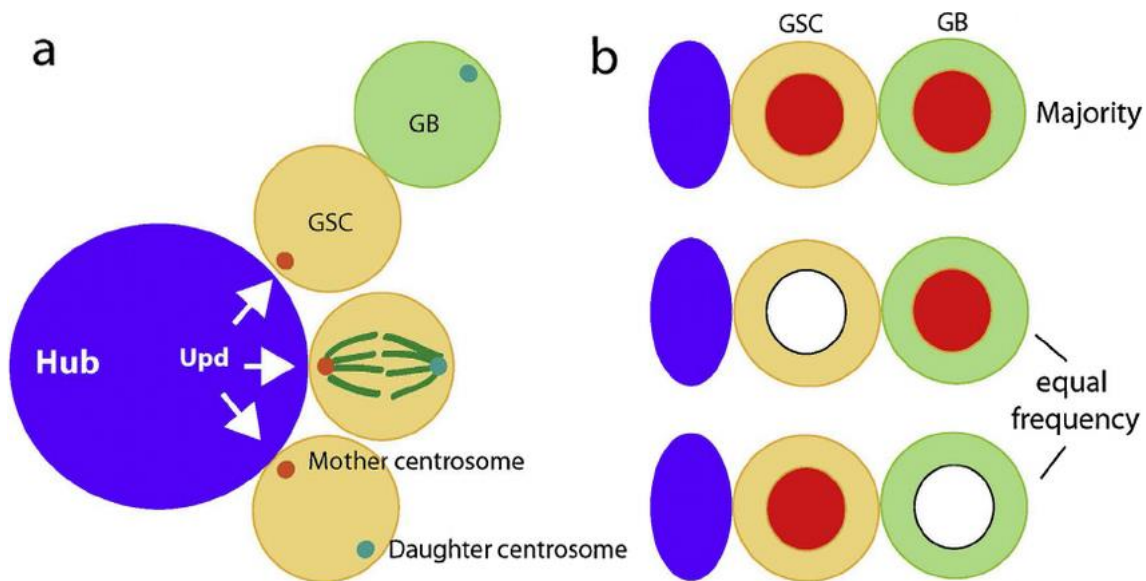
1.3.2.2 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση των αρσενικών γαμετικών βλαστικών κυττάρων της *Drosophila*.

Η ασύμμετρη διαίρεση των αρσενικών γαμετικών βλαστικών κυττάρων της *Drosophila* ρυθμίζεται κατά κύριο λόγο από την εγγύτητα των εξωτερικών σημάτων.

Στα κύτταρα αυτά η μιτωτική άτρακτος προσανατολίζεται κάθετα σε μία συστάδα υποστηρικτικών κυττάρων, τα hub, τα οποία εκκρίνουν τον παράγοντα αυτοανανέωσης Unpaired ⁽¹³¹⁾. Ο Upd είναι ένα μόριο που ανήκει στις κυτοκίνες, το οποίο προσδένει τον διαμεμβρανικό υποδοχέα Domeless (Dome), έχοντας ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του εξαιρετικά διατηρημένου σηματοδοτικού μονοπατιού JAK-STAT, το οποίο είναι

απαραίτητο για τη διατήρηση των γαμετικών και σωματικών βλαστικών κυττάρων στους όρχεις ⁽¹³²⁾. Οι αγρίου τύπου αρσενικοί γαμέτες διαιρούνται μόνιμα ασύμμετρα, δίνοντας ένα θυγατρικό κύτταρο το οποίο διατηρεί τη βλαστική του ταυτότητα και παραμένει παρακείμενα των hub, και ένα άλλο θυγατρικό το οποίο εκτοπίζεται από το περιβάλλον των hub και ξεκινάει τη διαδικασία της διαφοροποίησης ως μία γονιαλοβλάστη (Εικ. 1.10).

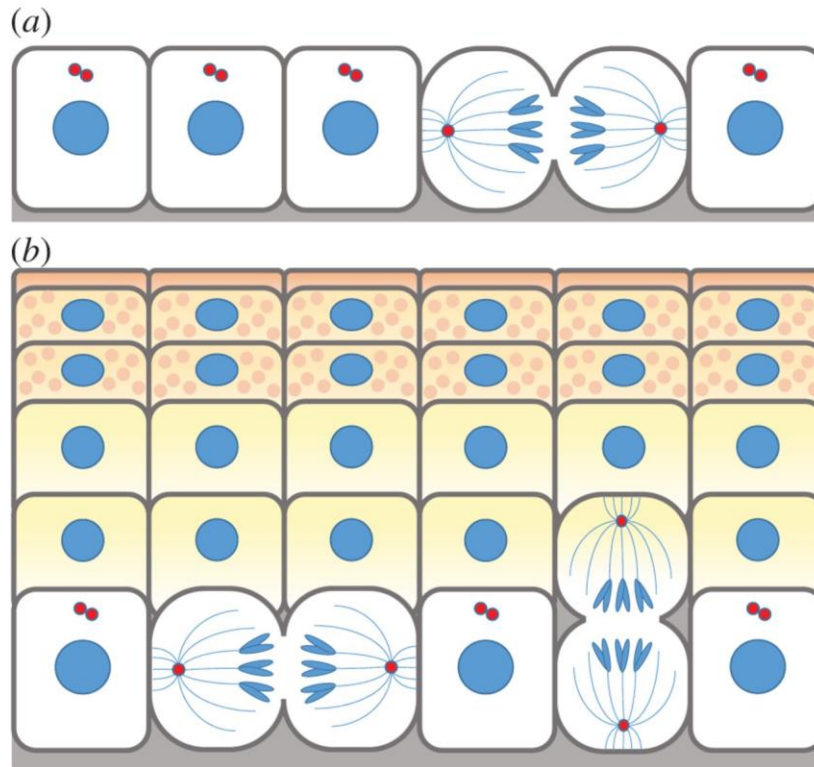
Επομένως, η αυτοανανέωση και η διαφοροποίηση των θυγατρικών κυττάρων των γαμετικών βλαστικών κυττάρων ελέγχεται στενά από την τοποθέτησή τους μέσα σε ένα πολύ καλά προσδιορισμένο περιβάλλον (θώκο) ⁽¹³³⁾. Η έκφραση του *Upd* και η έκκρισή του από τα κύτταρα hub πρέπει να ρυθμίζεται αυστηρά, καθώς η εκτοπική έκφρασή του στα πρώιμα γαμετικά κυτταρά ⁽¹³²⁾ ή οι ενεργοποιημένες μορφές του JAK-STAT στα σωματικά κύτταρα, οδηγούν σε υπερπολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων και τον σχηματισμό όγκων γαμετικών κυττάρων.



Εικόνα 1.10 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση των αρσενικών γαμετικών βλαστικών κυττάρων της *Drosophila*.

1.3.2.3 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση των προγονικών κυττάρων της επιδερμίδας στα θηλαστικά.

Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε έμβρυα ποντικού, αλλά και σε κύτταρα της επιδερμίδας *in vitro*, απέδειξαν ότι τα προγονικά κύτταρα που βρίσκονται στη βασική στοιβάδα της επιδερμίδας μπορούν να διαιρεθούν συμμετρικά παράγοντας περισσότερα βλαστικά κύτταρα, καθώς επίσης και ασύμμετρα δίνοντας ένα στρωματοποιημένο επιθήλιο. Μία ασύμμετρη διαίρεση παράγει ένα «βασικό» κύτταρο, το οποίο αυτό-ανανεώνεται παραμένει σε επαφή με την πλαγιοβασική μεμβράνη, και ένα ακόμα, αποκομμένο, «πάνω από τη βάση» κύτταρο, το οποίο εκτοπίζεται κατακόρυφα προς την επιφάνεια της επιδερμίδας ⁽¹³⁴⁾ (Εικ. 1.11). Ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις έχουν επίσης παρατηρηθεί στην εσωτερική βασική στοιβάδα του οισοφαγικού επιθηλίου ⁽¹³⁵⁾. Πολλοί από τους παράγοντες που ρυθμίζουν την πολικότητα και κατ' επέκταση τις ασύμμετρες διαιρέσεις στη νευροβλάστη της *Drosophila*, έχουν ορθόλογα στα προγονικά επιθηλιακά κύτταρα των θηλαστικών. Παρόλα αυτά, και αντίθετα με την περίπτωση της *Drosophila* όπου οι πρωτεΐνες της κορυφαίας επιφάνειας κληρονομούνται από το βλαστικό θυγατρικό κύτταρο της διαιρεμένης νευροβλάστης, τα συμπλέγματα της κορυφαίας επιφάνειας σχηματίζονται αντιδιαμετρικά της βασικής μεμβράνης και κατανέμονται στο «πάνω από τη βάση» κύτταρο, το οποίο πρόκειται να διαφοροποιηθεί.



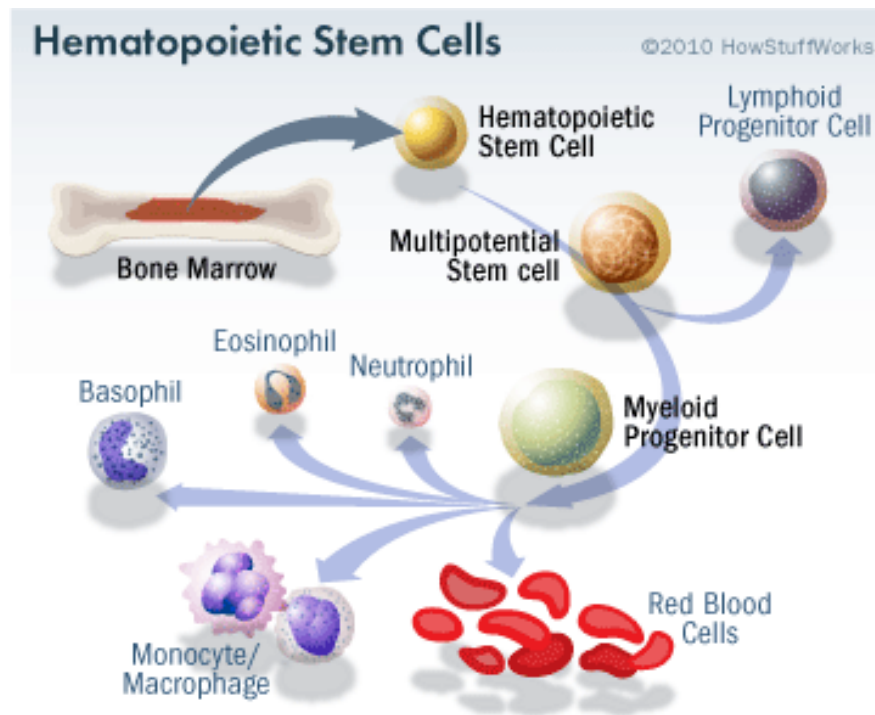
Εικόνα 1.11 Στρωματοποίηση της επιδερμίδας μέσω προσανατολισμένων διαιρέσεων. α) Στα πρώιμα στάδια της εμβρυονικής ανάπτυξης, τα προγονικά κύτταρα της επιδερμίδας διαιρούνται έχοντας την μιτωτική του άτρακτο παράλληλη με την βασική μεμβράνη. β) Όσο εξελίσσονται οι διαδικασίες στρωματοποίησης και διαφοροποίησης, αρχίζουν να επικρατούν οι κάθετα προσανατολισμένες διαιρέσεις, αντιστοιχώντας στο 70% όλων των διαιρέσεων στα κρίσιμα αυτά στάδια της εμβρυογένεσης. Οι κάθετες διαιρέσεις παράγουν ένα βασικά τοποθετημένο προγονικό κύτταρο και ένα διαφοροποιημένο κύτταρο τοποθετημένο στο επίπεδο πάνω από το βασικό. Αυτή η απόκτηση διαφορετικής κυτταρικής τύχης προσδιορίζει τη ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση στην επιδερμίδα.

1.3.3 Άλλα συστήματα που διαιρούνται με ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση.

Ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις έχουν καταγραφεί και σε άλλους ιστούς, παρότι οι παράγοντες που καθορίζουν την απόκτηση διαφορετικής τύχης από τα θυγατρικά κύτταρα, οι μηχανισμοί που προσανατολίζουν τις μιτωτικές ατράκτους και η επίδραση από εξωγενείς παράγοντες παραμένουν εν μέρει αδιευκρίνιστα. Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch και/ή η ασύμμετρη κατανομή του παράγοντα Numb, αποτελούν κοινό χαρακτηριστικό πολλών συστημάτων βλαστικών κυττάρων. Τέτοια συστήματα είναι τα παρακάτω:

α) Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα.

Παρότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch δεν είναι απολύτως απαραίτητο για τη φυσιολογική αιμοποίηση, έχει αποδειχθεί ότι το Notch ρυθμίζει την τύχη των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων εμποδίζοντας τη διαφοροποίηση⁽¹³⁶⁾. (Εικ. 1.12)

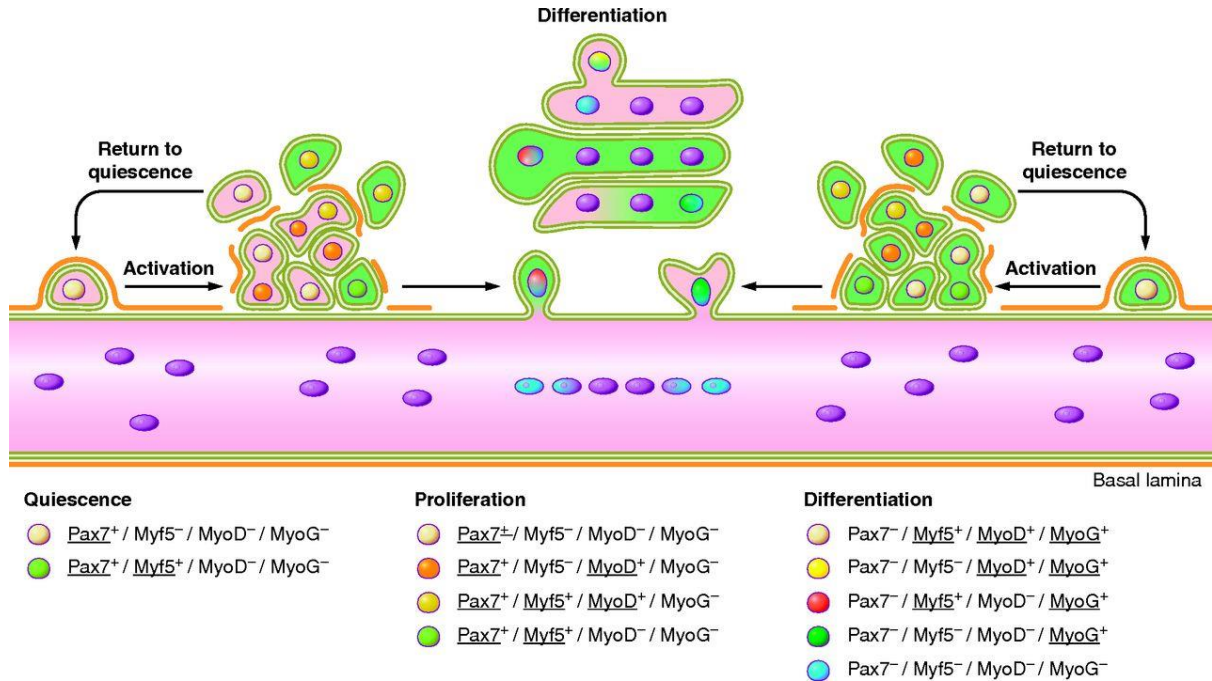


Εικόνα 1.12 Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα.

β) Μυϊκά βλαστικά κύτταρα.

Τα δορυφορικά κύτταρα διατηρούν την παραγωγή των μυοβλαστών κατά την ανάπτυξη και προάγουν την επιδιόρθωση του ιστού έπειτα από τραυματισμό, λειτουργώντας στην πραγματικότητα ως μυϊκά βλαστικά κύτταρα. Τα δορυφορικά κύτταρα βρίσκονται κάτω από τη βασική μεμβράνη, στις ώριμες μυϊκές ίνες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες βρίσκονται σε ηρεμία, αλλά μπορεί να επαχθεί η είσοδός τους στον κυτταρικό κύκλο έπειτα από τραυματισμό. Ο διαφορετικός εντοπισμός πρωτεϊνών όπως ο παράγοντας Numb και η επαγόμενη έκφραση γονιδίων διαφοροποίησης όπως το Myf5⁽¹³⁷⁾, στα θυγατρικά κύτταρα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, έχει επίσης καταγραφεί

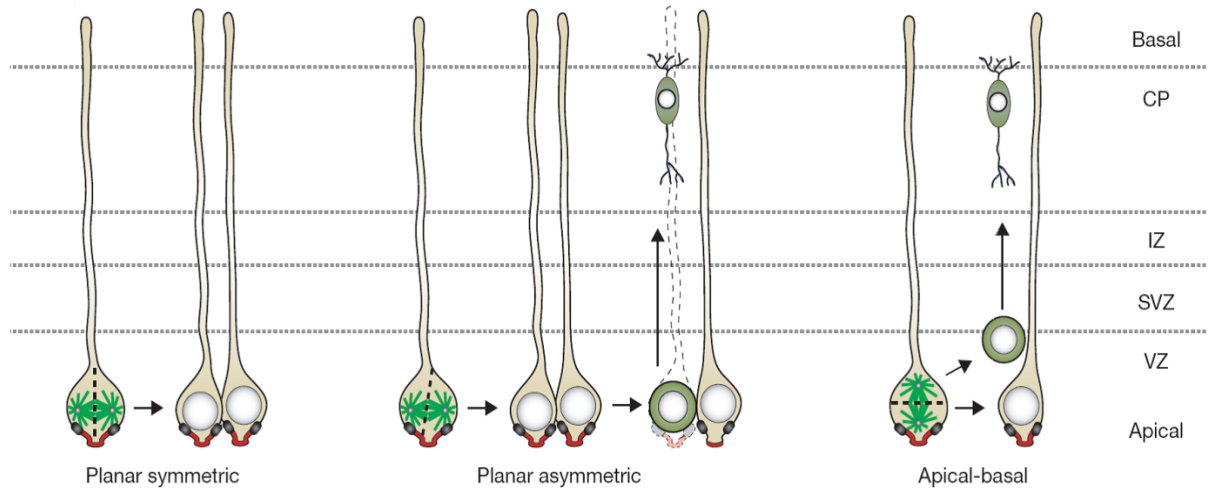
παρέχοντας στοιχεία υποστηρικτικά της ασύμμετρης διαίρεσης των προγονικών μυϊκών κυττάρων. (Εικ. 1.13)



Εικόνα 1.13 Ενεργοποίηση, διαφοροποίηση και σύντηξη των δορυφορικών κυττάρων.

γ) Προγονικά νευρικά κύτταρα θηλαστικών.

Ασύμμετρες διαιρέσεις προκύπτουν στην κοιλιακή ζώνη του εγκεφαλικού φλοιού των θηλαστικών, καθώς και στο νευροεπιθήλιο του αμφιβληστροειδούς χιτώνα των σπονδυλωτών ⁽¹⁰⁷⁾. Κατά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης παρατηρούνται αρχικά συμμετρικές διαιρέσεις, πιθανόν για να αυξήσουν τη δεξαμενή των προγονικών νευρικών κυττάρων, ενώ οι ασύμμετρες διαιρέσεις προκύπτουν αργότερα και το αποτέλεσμα τους είναι η δημιουργία διαφοροποιημένων νευρώνων. Παρότι σε πολλά συστήματα ο προσανατολισμός της μιτωτικής ατράκτου είναι ενδεικτικός του εάν η διαίρεση θα είναι συμμετρική ή ασύμμετρη, δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα ο βαθμός συσχετισμού του προσανατολισμού της μιτωτικής ατράκτου με τον καθορισμό της κυτταρικής τύχης, στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα των σπονδυλωτών. (Εικ. 1.14)



Εικόνα 1.14 Σχηματική αναπαράσταση της θέσης και του τρόπου διαίρεσης των εμβρυονικών νευρικών βλαστικών κυττάρων.

1.4 Ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση και εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα.

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα είναι πολυδύναμα κύτταρα, ικανά να αυτό-ανανεώνονται επ' άπειρον και να διαφοροποιούνται προς όλες τις ιστικές κατευθύνσεις. Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα του ποντικού προέρχονται από τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας της πρώιμης βλαστοκύστης (3,5 ημερών μετά τη γονιμοποίηση). Από την ανακάλυψη του πρωτοκόλλου σχηματισμού τους ξεκίνησε μια νέα εποχή στο πεδίο της αναπτυξιακής βιολογίας ⁽¹³⁸⁾. Παρόλα αυτά, και ιδιαίτερα στη βιβλιογραφία της ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης υπάρχει μία ασάφεια όσον αφορά τον προσδιορισμό του όρου της βλαστικότητας, καθώς χρησιμοποιείται ομοιόμορφα για να περιγραφούν διαφορετικές περιπτώσεις κυτταρικών τύπων από όλο το εύρος του αναπτυξιακού φάσματος. Πιο αναλυτικά, ως βλαστικά κύτταρα περιγράφονται συχνά τόσο τα εμβρυονικά όσο και τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα, χωρίς σαφή διαχωρισμό. Επιπλέον και κατ' επέκταση του προηγούμενου, στον όρο συγκαταλέγονται τα πραγματικά (*in vivo*) εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, τα *ex vivo* παράγωγά τους (δηλαδή τα *in vitro* καλλιεργούμενα), αλλά και τα προγονικά κύτταρα (progenitor cells) των διαφόρων ιστικών τύπων που απαντώνται *in vivo* και *in vitro*. Τα πρότυπα των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων που περιγράφηκαν σε προηγούμενη ενότητα μπορούν να χαρακτηριστούν βλαστικά αλλά η παρουσία ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων κατά την *in vitro* διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων παραμένει ανεξιχνίαστη, παρά τη βιβλιογραφική αίσθηση περί του αντιθέτου. Παρά τη συχνότητα με την οποία διαπιστώνονται ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις σε βλαστικά κύτταρα, στην πραγματικότητα οι μελέτες διερεύνησης ασυμμετριών σε διαφοροποιούμενα πολυδύναμα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα σπανίζουν. Επιπλέον, 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 κλασσικών δεικτών ασυμμετρίας, αναδεικνύει την βιβλιογραφική ασάφεια του γενικότερου πεδίου της ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης των βλαστικών κυττάρων *in vitro*. Έτσι, δημιουργείται λανθασμένα η αίσθηση ότι τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα διαιρούνται πάντα με ασύμμετρο τρόπο. Η μεγάλη

λειτουργική σημασία αυτού του τύπου διαιρέσεων *in vivo*, όμως, επιβάλλει τη διερεύνηση του φαινομένου στο *in vitro* περιβάλλον των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων.

1.5 Σκοπός

Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση αποτελεί μια θεμελιώδη βιολογική διαδικασία μέσω της οποίας βλαστικά ή πολυδύναμα προγονικά κύτταρα αναπαράγουν τον εαυτό τους, δίνοντας ταυτόχρονα απογόνους που μπορούν να διαφοροποιηθούν προς διάφορες ιστικές κατευθύνσεις. Το φαινόμενο έχει μελετηθεί επισταμένα σε εξελικτικώς κατώτερους οργανισμούς, αλλά ορισμένα κρίσιμα ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα σε ό,τι αφορά τα ανώτερα είδη. Η παρούσα μελέτη αφορά ένα τέτοιο ερώτημα και εστιάζεται στη διερεύνηση τυχόν ασυμμετριών στην πυρηνική λάμινα, μια ινιδιακής φύσεως δομή που επηρεάζει την αρχιτεκτονική του πυρήνα και φαίνεται να συμμετέχει στη γονιδιακή αποσιώπηση σε όλα τα μετάζωα. Στόχος είναι να προσδιοριστούν επακριβώς τυχόν ποσοτικές ή ποιοτικές διαφοροποιήσεις στο «μείγμα» Α- και Β-τύπου λαμινών στον πυρήνα ενός κυττάρου που διαιρείται ασύμμετρα, σε σχέση με ένα κύτταρο του ιδίου τύπου το οποίο διαιρείται συμμετρικά. Περαιτέρω, αυτό που ενδιαφέρει ιδιαιτέρως σε αυτή τη μελέτη είναι να διερευνηθεί αν δομικές ασυμμετρίες, που επηρεάζουν τη μικρο-αρχιτεκτονική της πυρηνικής λάμινας, τροποποιούν τη δυναμική συμπεριφορά της, δηλαδή την αντιστρεπτή αποικοδόμηση την οποία υφίσταται αυτή η δομή κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Τέτοιες ασυμμετρίες, εάν πιστοποιηθούν και καταγραφούν επακριβώς, θα αποτελέσουν οδηγία σημεία για την πρόιμη ανίχνευση ασύμμετρα διαιρούμενων κυττάρων και αξιόπιστους δείκτες για την παρακολούθηση των αρχικών φάσεων της κυτταρικής διαφοροποίησης σε ετερογενείς κυτταρικούς πληθυσμούς πριν αυτό γίνει εμφανές φαινοτυπικά.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων

2.1.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών.

Οι κυτταρικές σειρές HeLa, MEL και COS αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας 37°C και ατμόσφαιρας εμπλουτισμένης σε 5% CO₂. Το θρεπτικό μέσο το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών ήταν DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) εμπλουτισμένο με 2mM L-γλουταμίνη, 2mM πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και 10% FCS (Fetal Calf Serum).

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού (E14) τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα εργασία ήταν ευγενική χορηγία του εργαστηρίου του Austin Smith (Cambridge University). Το θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια αυτών των κυττάρων ήταν GMEM (Glasgow modified Eagle's medium) εμπλουτισμένο με 15% FCS, 2mM L-γλουταμίνη, 0.1mM απαραίτητα αμινοξέα, 1mM πυροσταφυλικό νάτριο και 2mM πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Επίσης, στην καλλιέργεια των κυττάρων προστίθεται β-μερκαπτοαιθανόλη σε τελική συγκέντρωση 1μM και LIF (Leukemia Inhibitor Factor), που είναι απαραίτητα για την διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης των βλαστικών κυττάρων. Για τη παρασκευή του LIF, υπερεκφράσαμε το αντίστοιχο DNA σε COS κύτταρα και συλλέξαμε την εκκρινόμενη πρωτεΐνη από το καλλιεργητικό μέσο.

2.1.2 Διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων.

2.1.2.1 Διαφοροποίηση σε δύο διαστάσεις (2D).

Τα εμβρυονικά βλαστικά διαφοροποιήθηκαν σε δυο διαστάσεις (2D) στοχευμένα σε νευροεξοδερμική κατεύθυνση, απουσία LIF και 2-β-μερκαπτοαιθανόλης με ταυτόχρονο εμπλουτισμό του με 1μM ρετινοϊκού οξέος. Μετά τη θρυψινοποίηση, τα κύτταρα καταμετρήθηκαν (χρήση αιμοκυτταρόμετρου) και επιστρώθηκαν ~ 300.000 κύτταρα ανά τρυβλίο 60mm διαμέτρου. Το θρεπτικό μέσο άλλαξε σε καθημερινή βάση για όσο διαρκούσε η εκάστοτε διαφοροποίηση.

2.1.2.2 Διαφοροποίηση σε τρεις διαστάσεις (3D).

Για τη διαφοροποίηση προς καρδιομυοκύτταρα ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο διαφοροποίησης σε τρεις διαστάσεις (3D) (κρεμάμενες σταγόνες). Πιο συγκεκριμένα, 500 μονήρη κύτταρα ανά 20μl θρεπτικού μέσου αφέθηκαν υπό μορφή «κρεμάμενων» σταγόνων (hanging drops) για διάστημα δυο ημερών ώστε να σχηματίσουν εμβρυοειδή σωματίδια (embryoid bodies, EBs). Τη δεύτερη ημέρα, ~100 EB συλλέγονταν σε βακτηριολογικά τρυβλία διαμέτρου 35mm 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 την ανάπτυξη των σωματιδίων χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) εμπλουτισμένο με 15% FCS, 2mM L-γλουταμίνη, 2mM πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και 15mM α-μονοθειογλυκερόλη, το οποίο ανανεωνόταν κάθε δυο ημέρες. Στη συνέχεια, τα σχηματιζόμενα εμβρυοειδή σωματίδια μεταφέρθηκαν σε βακτηριολογικά τρυβλία για πέντε επιπλέον μέρες. Ανάλογα με τον εκάστοτε πειραματικό σχεδιασμό, σε αρκετές περιπτώσεις μισή, μια ή περισσότερες ημέρες πριν την παρατήρηση των EBs, αυτά μεταφέρονταν σε τρυβλία (με γυάλινο πυθμένα ή καλυπτρίδες) επιστρωμένα με ζελατίνη ώστε να προσκολληθούν και εκπτυχθούν εκεί.

Σε ένα μεγάλο κύκλο πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν τρισδιάστατες διαφοροποιήσεις σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Elabd et al., 2013 ⁽¹³⁹⁾. Η διαδικασία ήταν παρόμοια με αυτή που περιγράφηκε με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν 1000 κύτταρα αντί 600 ανά κρεμάμενη σταγόνα. Η θρυψινοποίηση των EBs πραγματοποιούνταν ~12 ώρες πριν το επιθυμητό χρονικό σημείο παρατήρησής τους, 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.

2.1.3 Δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών βλαστικών κυττάρων.

Για τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα αντίστοιχα πλασμίδια και διαμοιράστηκαν σε τρυβλίο έξι φρεατίων. Για 12-15 μέρες

χορηγήθηκε στα κύτταρα 1.5μg/ml πουρομυκίνης έως ότου να σχηματιστούν κλωνογενείς αποικίες ικανοποιητικού μεγέθους. Οι σχηματιζόμενες αποικίες συλλέχτηκαν και καθεμία μεταφέρθηκε σε φρεάτιο τρυβλίου 96 φρεατίων χωρίς την προσθήκη αντιβιοτικού. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού μέσου και προσθήκη αντιβιοτικού στο ήμισυ της τελικής συγκέντρωσης. Όταν τα κύτταρα αναπτυχθούν αρκετά, ώστε να καλύψουν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, μεταφέρονται διαδοχικά σε τρυβλίο 24 φρεατίων, 12 φρεατίων, 6 φρεατίων και τελικώς σε τρυβλίο 60mm. Οι κλώνοι ελέγχθηκαν για τη παρουσία του αντίστοιχου πλασμιδίου είτε με παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο (έλεγχος φθορισμού των αποικιών), είτε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (με χρήση πριμοδοτικών αλληλουχιών οι οποίες καλύπτουν τόσο το ένθεμα όσο και τη φθορίζουσα πρωτεΐνη EGFP).

2.1.4 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με ηλεκτροδιαπίδυση (Electroporation).

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου ώστε να διαταραχθεί προσωρινά η φωσφολιπιδιακή διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα πολικά μόρια (όπως τα νουκλεϊκά οξέα) να εισέλθουν στο κύτταρο. Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ECM630 (BTX Inc.) και οι αντίστοιχες ειδικές κυψελίδες (cuvettes-BTX 640). 1.2x10⁶ κύτταρα και 10μg πλασμιδίου αραιώθηκαν σε τελικό όγκο 400μl DMEM και υπέστησαν ηλεκτροδιαπίδυση υπό των ακόλουθων συνθηκών: 260V (ισχύς ρεύματος), 850μF (χωρητικότητα) και 725Ω (αντίσταση). Στην περίπτωση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, 5x10⁶ κύτταρα αραιώθηκαν με 20μg πλασμιδίου σε τελικό όγκο 400μl GMEM και χρησιμοποιήθηκαν οι εξής παράμετροι: 200V, 950μF και 0Ω.

2.1.5 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με πολυ-αιθυλενιμίνη.

Η πολυ-αιθυλενιμίνη (Poly-ethylenimine, PEI) είναι ένα συνθετικό, πολυμερές κατιόν με ιδιότητα να συμπυκνώνει το DNA σε θετικά φορτισμένα σωματίδια. Τα σωματίδια αυτά συνδέονται με ανιονικά κατάλοιπα της επιφάνειας του κυττάρου και εισέρχονται σε αυτό με ενδοκύτωση. Για τη διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών, τα κύτταρα διαχωρίστηκαν μια μέρα πριν ώστε η πυκνότητά τους να είναι περίπου 50% την ημέρα εφαρμογής του PEI. Την επόμενη μέρα 1.6μg πλασμιδίου αναμείχθηκαν με 0.72μl

διαλύματος PEI συγκεντρώσεως 0.45% w/v, αφέθηκαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματιστούν τα συσσωματώματα και αναμείχθηκαν με τα κύτταρα για περίπου 4-5 ώρες.

2.2 Μέθοδοι γενετικής μηχανικής.

2.2.1 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων επιδεκτικών στον μετασχηματισμό.

Τα βακτήρια ανασύρθηκαν από βακτηριακό μητρικό απόθεμα (στοκ) διαλύματος γλυκερόλης και επιστρώθηκαν σε τρυβλίο στερεού άγαρ. Ακολούθησε ολονύχτια επώαση σε θερμοκρασία 37°C. Κατόπιν, μία μονή αποικία επιλέχθηκε για εμβολισμό 3ml Luria Broth και αφέθηκε για ολονύχτια ανάπτυξη. Από την παραπάνω καλλιέργεια 2.5ml εμβολιάστηκαν σε 250ml LB και επώαστηκαν σε θερμοκρασία 37°C έως ότου η οπτική πυκνότητα, στα 600 nm, να προσεγγίσει τις 0.6 μονάδες. Στη συνέχεια, τα βακτήρια τοποθετήθηκαν στον πάγο για 5 λεπτά και φυγοκεντρήθηκαν στα 4000g για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 30 ml παγωμένου διαλύματος TFB I (100mM RbCl, 50mM MnCl₂, 30mM οξικό κάλιο, 10mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη, pH5.8). Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 1.5 ώρα και φυγοκέντρωση στα 4000g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 40C. Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 4 ml παγωμένου διαλύματος TFB II (10mM MOPS, 10mM RbCl, 75mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη, pH6.8). Τέλος, το αιώρημα διαμοιράστηκε σε αποστειρωμένα μικροσωληνάρια τα οποία ψύχθηκαν για 15 δευτερόλεπτα σε υγρό άζωτο και εν συνεχεία τα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία - 800C.

2.2.2 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων.

Ο μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων έγινε σύμφωνα με την μέθοδο του Sambrook. Πιο συγκεκριμένα, 3ng πλασμιδιακού φορέα με το αντίστοιχο ένθεμα προστέθηκαν σε 100μl κυτταρικού αιωρήματος και ακολούθησε επώαση στον πάγο για 20 λεπτά και θερμικό σοκ στους 42°C για 1 λεπτό. Κατόπιν, έγινε προσθήκη 1ml LB και

ανάπτυξη των βακτηρίων για 1 ώρα στους 37°C σε τροχιακό επωαστήρα. Η βακτηριακή καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στα 5000g και το βακτηριακό ίζημα αφού επαναδιαλύθηκε σε 200μl LB, επιστρώθηκε σε τρυβλία στερεού LB τα οποία περιείχαν αμπικιλίνη ή καναμυκίνη ανάλογα με το γονίδιο ανθεκτικότητας που φέρουν οι πλασμιδιακοί φορείς. Τέλος, τα τρυβλία επώαστηκαν ολονύχτια στους 37°C και μονές αποικίες επιλέχθηκαν για πιστοποίηση.

2.2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μικρής κλίμακας.

Μια μονή αποικία ανασύρθηκε από τρυβλίο στερεού άγαρ και αναπτύχθηκε σε 3ml LB με την προσθήκη του κατάλληλου αντιβιοτικού ανά περίπτωση, σε τροχιακό επωαστήρα (37°C, ολονύχτια ανάδευση). Σε φυγοκεντρικό σωληνάριο τοποθετήθηκαν 1.5ml της καλλιέργειας και φυγοκεντρήθηκαν στις 12000g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl διαλύματος PI (50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA, 100μg/ml RNase). Στο εναιώρημα προστέθηκαν 100μl διαλύματος PII (0.2N NaOH, 1% w/v SDS), 100μl διαλύματος PIII (3M CH₃COONa pH 5.5) και το υλικό φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στα 13000g σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο φυγοκεντρικό σωληνάριο, όπου προστέθηκε 1ml διαλύματος 100% παγωμένης αιθανόλης και ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 13000g για 15 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1ml διαλύματος 70% παγωμένης αιθανόλης. Ακολούθησε φυγοκέντρωση όπως παραπάνω. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, το ίζημα αφέθηκε να ξηραθεί πλήρως σε θερμοκρασία δωματίου, επαναιωρήθηκε σε 30μl δις απεσταγμένου H₂O και διατηρήθηκε στους -20°C.

2.2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας.

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιήθηκε το πακέτο (kit) Nucleobond PC 100, το οποίο αποτελεί τροποποιημένη μέθοδο της αλκαλικής λύσης των βακτηρίων με πρόσδεση του πλασμιδιακού DNA σε ειδική στήλη χρωματογραφίας. Η χρήση του πακέτου έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Θραύσματα DNA αναλύθηκαν σε πηκτές 1-3% αγαρόζης, ανάλογα με το μέγεθος των θραυσμάτων DNA προς ανάλυση. Η σκόνη αγαρόζης διαλύθηκε κατόπιν βρασμού σε διάλυμα 1xTAE και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα 1xTAE. Οι πηκτές αγαρόζης περιείχαν 0.5mg/ml βρωμιούχου αιθιδίου ώστε τα θραύσματα του DNA να είναι ορατά μετά από έκθεση σε υπεριώδες φως.

2.2.6 Απομόνωση θραυσμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης.

Η διαδικασία έγινε με το πακέτο (kit) Nucleobond gel extraction, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.2.7 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.

2.2.8 Συρραφή τμημάτων DNA (Ligation).

Για να ολοκληρωθούν οι κατασκευές, τα δύο τμήματα DNA (φορέας και ένθεμα) τα οποία περιέχουν πλέον αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα, αφέθηκαν να συνδεθούν παρουσία DNA λιγάσης, η οποία καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών. Χρησιμοποιήθηκε T4 DNA λιγάση (Takara ή NEB) και το μίγμα αντίδρασης (20μl) περιείχε το ένθεμα και τον γραμμικό φορέα σε μοριακή αναλογία 3:1. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για ~16 ώρες σε θερμοκρασία 4°C.

2.2.9 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Οι πλασμιδιακές κατασκευές, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη είναι οι εξής δύο:

- huLaminA, με
Ένθεμα 2.500bp
5' πριμοδοτική ακολουθία: 5'-CCG CTC GAG ATG GCG ACT GCG- 3'
3' πριμοδοτική ακολουθία : 5'-CGC GGA TCC CAT AAT TGC ACA
GCT-3'
- huLaminB1, με
Ένθεμα 2.777bp
5' πριμοδοτική ακολουθία: 5'-GGAAGATCTATGGAGACCCCGTCA-
3'
3' πριμοδοτική ακολουθία: 5'-CCGGAATTCCATGATGCTGCAGTT-3'

Η huLaminA εισήχθη στο φορέα pEGFP-N3 και η huLaminB1 στο φορέα pEGFP-N2. Και οι δύο αυτές κατασκευές εισήχθησαν στο φορέα pPyCAGIP για τη διαμόλυνση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων.

Ακολουθήθηκαν το παρακάτω πρόγραμμα κυκλοποίησης:

Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 2 λεπτά - Αποδιάταξη (denaturing) : 98°C για 20 δευτερόλεπτα - Υβριδισμός (annealing) : 70 °C για 30 δευτερόλεπτα - Σύνθεση (extension) : 72 °C για 30 δευτερόλεπτα – Για 30 κύκλους - Τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 3 λεπτά.

Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύθηκαν σε πηκτή αгарόζης και εφόσον πιστοποιήθηκε το σωστό μέγεθος της κατασκευής, καθαρίστηκαν από τις προσμίξεις της αντίδρασης με το πακέτο (kit) Nucleobond PCR purification.

2.3 Μορφολογικές Μέθοδοι.

2.3.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε επιστρωμένα κύτταρα.

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός έγινε σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των Maison et al., (1993) και Meier and Georgatos, (1994). Πιο αναλυτικά, κύτταρα τα οποία αναπτύχθηκαν σε καλυπτρίδες μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 1 - 4% φορμαλδεΰδης αραιωμένη σε PBS για 10 λεπτά. Ακολούθησαν εκπλύσεις με PBS και το μέσο μονιμοποίησης εξουδετερώθηκε μετά από επώαση 5 λεπτών σε διάλυμα 5mM γλυκίνης διαλυτοποιημένης σε PBS. Τα δείγματα εκπλύθηκαν με PBS και επώαστηκαν για 15

λεπτά σε διάλυμα A (150mM NaCl, 20mM HEPES pH 7.4, 2mM MgCl₂, 0.1mM EGTA, 0.2% Triton X-100, 0.5% FSG). Το πρωτεΐν αντίσωμα, αραιωμένο στην κατάλληλη συγκέντρωση, προστέθηκε στις καλυπτρίδες και ακολούθησε επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε θάλαμο υψηλής υγρασίας. Τα δείγματα εκπλύθηκαν με διάλυμα A, ακολούθησε επώαση με το δευτερεύον αντίσωμα και πλύσεις κατά τον ίδιο τρόπο. Στο πέρας της διαδικασίας έγινε μετα-μονιμοποίηση με διάλυμα 4% φορμαλδεΰδης σε PBS για 10 λεπτά και έκπλυση με PBS. Η χρώση του DNA έγινε με χρήση με DAPI, TOPRO-3 ή PI. Τέλος, οι καλυπτρίδες εκπλύθηκαν με PBS και αφού προστέθηκε Vectashield (διάλυμα μείωσης της απώλειας φθορισμού), επιστρώθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Τα δείγματα εξετάστηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica SP5 TCSII ή Zeiss LSM780. Τα αντισώματα και οι αντίστοιχες αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Όνομα	Εταιρία	Μονιμοποίηση	Αραίωση
α-τουμπουλίνη	DSHB	4% Φορμαλδεΰδη	1:200
Numb	Abcam	4% Φορμαλδεΰδη	1:200
Par6	Abcam	4% Φορμαλδεΰδη	1:200
Λαμίνη A	Παρασκευή του εργαστηρίου μας	1 ή 4% Φορμαλδεΰδη	1:600
Λαμίνη B	Παρασκευή του εργαστηρίου μας	4% Φορμαλδεΰδη	1:600
aPKCζ	Santa Cruz	4% Φορμαλδεΰδη	1:300
ακετυλιωμένη τουμπουλίνη	Sigma Aldrich	4% Φορμαλδεΰδη	1:5000
Nanog	Santa Cruz	4% Φορμαλδεΰδη	1:300
Oct3/4	Santa Cruz	4% Φορμαλδεΰδη	1:300
PCNA	Santa Cruz	Μεθανόλη	1:200
Brachyury	Santa Cruz	4% Φορμαλδεΰδη	1:100
GATA4	Santa Cruz	4% Φορμαλδεΰδη	1:50

2.3.2 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε EBs.

Τα EBs που διερευνήθηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό μπορεί να ήταν σε εναιώρημα ή ήδη προσκολλημένα σε γυάλινες επιφάνειες. Και στις δύο περιπτώσεις

ακολουθήθηκε η ίδια τροποποιημένη διαδικασία του πρωτοκόλλου της προηγούμενης παραγράφου. Ακολουθούν επιγραμματικά οι τροποποιήσεις: Η μονιμοποίηση των ΕΒ 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 ΜΜΕΘ για 1 ώρα. Το τελευταίο ακολούθησε ένα επιπλέον στάδιο επώασης με νέο διάλυμα ΜΜΕΘ αυξημένης περιεκτικότητας σε Triton X-100 (0,5%) για 30 λεπτά. Τέλος η επώαση του πρωτεύοντος αντισώματος ήταν ολονύκτια στους 4°C. Τα δείγματα εξετάστηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica SP5 TCII.

2.3.3 Καταγραφή κυτταρικών διαιρέσεων σε πραγματικό χρόνο.

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

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°C. 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 20 δευτερόλεπτα για τα κύτταρα E14.

2.3.3.2 Βιντεοσκόπηση κυτταρικών διαιρέσεων εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων διαμολυσμένων H2B-mCherry.

Η καταγραφή μιτωτικών διαιρέσεων σε πραγματικό χρόνο κυττάρων E14 (αδιαφοροποίητων ή διαφοροποιούμενων) που είχαν ήδη (τουλάχιστον 24 ώρες πριν)

διαμολυνθεί με τον κατάλληλο φορέα για την έκφραση της πρωτεΐνης 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°C) 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°C. Τα κύτταρα που επιλέγονταν για βιντεοσκόπηση ήταν συνήθως ήδη στη μετάφαση και αναγνωρίζονταν οπτικά από τον χαρακτηριστικό σχηματισμό 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 Ποσοτικοποίηση έντασης φθορισμού σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού.

Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού αναπτύχθηκαν σε καλυπτρίδες επιστρωμένες με ζελατίνη και υπέστησαν έμμεσο ανοσοφθορισμό με χρήση των αντισωμάτων Nanog και Oct3/4. Τα δείγματα εξετάστηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο, λήφθηκαν διαδοχικές τομές και συνδυάστηκαν σε «προβολή μέσου όρου έντασης» (average projection). Η ένταση φθορισμού του αντισώματος για κάθε κύτταρο μετρήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Fiji (Johannes Schindelin et al). Σε διαδοχικά πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού από καλλιέργειες κυττάρων οι οποίες αναπτύχθηκαν ανεξάρτητα καταμετρήθηκαν σημαντικοί αριθμοί κυττάρων.

2.3.5 Μορφομετρικές μετρήσεις σε εμβρυοειδή σωματίδια.

Κατά τη δεύτερη και έβδομη ημέρα της διαφοροποίησης, «κρεμάμενες» σταγόνες ελέγχθησαν για το σχηματισμό εμβρυοειδούς σωματιδίου. Οι σταγόνες εξετάσθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο Leica DMI6000B με χρήση 10x αντικειμενικού φακού και ο σχηματισμός ή μη εμβρυοειδούς σωματιδίου ελέγχθηκε για 100 σταγόνες σε 2 ανεξάρτητα πειράματα διαφοροποίησης. Για τη μέτρηση της επιφανείας (εμβαδού) των εμβρυοειδών σωματιδίων, τα σωματίδια εξετάσθηκαν κατά την έκτη ημέρα της διαφοροποίησης σε οπτικό μικροσκόπιο Leica DMI6000B με χρήση 10x αντικειμενικού φακού. Η επιφάνεια των σωματιδίων μετρήθηκε για όσο το δυνατόν περισσότερα εμβρυοειδή σωματίδια στο ισημερινό τους επίπεδο, με χρήση του προγράμματος Fiji.

2.3.6 Μέθοδος ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτοσκίαση (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP).

Κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη σε χιμαιρική μορφή με την πρωτεΐνη EGFP αναπτύχθηκαν σε δισκία με γυάλινη βάση (MatTek) και τοποθετήθηκαν στη βάση του μικροσκοπίου (η συνολική διάταξη βρίσκεται σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας, 37°C). Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες παράμετροι: φακός μεγέθυνσης 63x και laser Argon/Neon ισχύος 135 mW.

Για τις μεμβρανικές πρωτεΐνες στις καλλιέργειες των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων η σάρωση του δείγματος ήταν προς δύο κατευθύνσεις και είχε συχνότητα σάρωσης 400 Hz, η ανάλυση της εικόνας στα 512x512pixels, το διάφραγμα της δέσμης (pinhole) ορίστηκε στις 3.99 μονάδες Airy (AU), η μεγέθυνση (zoom) κυμάνθηκε από 7 έως 10 και η ισχύς δέσμης του laser στο 10% της μέγιστης ισχύος σε όλη την διάρκεια του πειράματος, εκτός από την στιγμή της φωτοσκίασης που ήταν σε μέγιστη ισχύ (100%). Αφού επιλέχθηκε το ζεύγος κύτταρων προς ανάλυση, ορίστηκαν δύο ίδιες περιοχές ενδιαφέροντος (Region of Interest, ROI) όπου θα προκληθεί η φωτοσκίαση. Ως ROI για καθένα από τα δύο κύτταρα χρησιμοποιήθηκε μια ζώνη του πυρηνικού φακέλου ύψους

1-5 μ m και μήκους 2-5 μ m, ίδια για κάθε θυγατρικό αλλά προσαρμοσμένη ανά ζεύγος κυττάρων. Συνολικά ελήφθησαν 5 εικόνες πριν τη φωτοσκίαση για 32sec (pre-bleach images), ακολούθησαν συνολικά πέντε στιγμιαίες φωτοσκιάσεις για 6.5sec και λήψη 16 εικόνων για 307sec (post-bleach images). Κατόπιν ορίστηκαν ακόμη τρεις ROIs για κάθε ένα από τα θυγατρικά κύτταρα: μια ομοίου μεγέθους με τη περιοχή φωτοσκίασης που δεν υπέστη φωτοσκίαση, το σύνολο της περιοχής που κατανέμεται η πρωτεΐνη που αναλύεται (ο πυρηνικός φάκελος, το πυρηνόπλασμα και το κυτταρόπλασμα) καθώς και μια περιοχή κατά την οποία δεν εντοπίζεται η πρωτεΐνη που αναλύεται ώστε να καταγραφεί ο θόρυβος (background). Οι περιοχές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση των δεδομένων (data normalization).

3. Αποτελέσματα

3.1 Διερεύνηση της παρουσίας ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού.

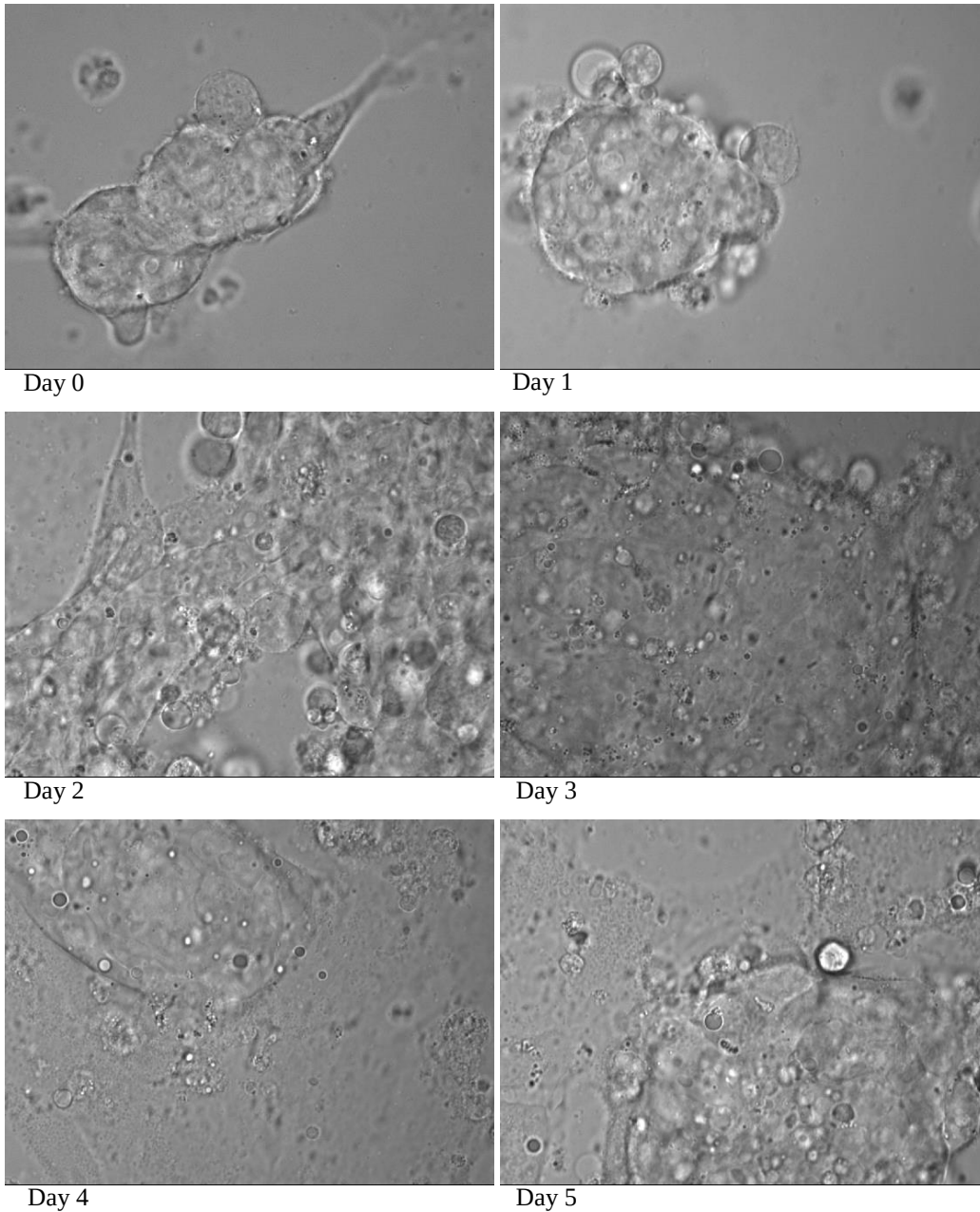
Το σύστημα που επιλέχθηκε για τη μελέτη της ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης ήταν τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού τύπου E14. Οι δύο βασικές ιδιότητες των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων είναι η αυτο-ανανέωση και η πολυδυναμία. Η έκπτυξη τους μπορεί να συνεχίζεται απεριόριστα υπό *in vitro* συνθήκες παρουσία του παράγοντα LIF. Η διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων ποντικού μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες τεχνικές. Τα πολυδύναμα αυτά κύτταρα μπορούν 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). Επαγωγή της διαφοροποίησης προς συγκεκριμένους ιστικούς τύπους μπορεί να επιτευχθεί με την προσθήκη παραγόντων και φαρμάκων, όπως το ρετινοϊκό οξύ (retinoic acid, RA) και αυξητικών παραγόντων.

Η κυριότερη μέθοδος διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων είναι η τρισδιάστατη καλλιέργεια τους και η δημιουργία εμβρυοειδών σωματιδίων (embryoid bodies, EBs) με τη διαδικασία της «κρεμάμενης σταγόνας». Τα εμβρυοειδή σωματίδια δημιουργούνται με την απομάκρυνση του LIF. Κατ' αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται ο σχηματισμός κυτταρικών συσσωματωμάτων σε μορφή εναιωρήματος, η εξέλιξη της διαφοροποίησης των οποίων φαίνεται να ακολουθεί την διαδικασία της εμβρυογένεσης. Μία ακόμη μέθοδος διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων είναι η διαφοροποίηση σε καλλιέργεια δύο διαστάσεων (2D culture). Υπάρχουν δυο εναλλακτικοί τρόποι δισδιάστατης διαφοροποίησης: α) τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα καλλιεργούνται και διαφοροποιούνται σε άμεση επαφή με στρωματικά κύτταρα ⁽¹⁴⁰⁾ και β) τα διαφοροποιημένα βλαστικά κύτταρα καλλιεργούνται σε μονοστοιβάδα (monolayer) πάνω σε πρωτεΐνες εξωκυτταρικού υποστρώματος (όπως collagen IV, matrigel, κλπ.) ⁽¹⁴¹⁾. Στην παρούσα μελέτη χαρακτηρίστηκε η κατευθυνόμενη διαφοροποίηση με την επίδραση ρετινοϊκού οξέος (-LIF, + Ρετινοϊκό οξύ) σε καλλιέργειες δυο διαστάσεων. Ακολούθησε

ο έλεγχος τρισδιάστατων καλλιιεργειών διαφοροποίησης κυττάρων E14, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα διερεύνησης ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων.

3.1.1 Μορφολογικές παρατηρήσεις στις διςδιάστατες καλλιέργειες αδιαφοροποίητων και διαφοροποιούμενων εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων τύπου E14.

Η έναρξη της διαφοροποίησης των κυττάρων E14 επιβεβαιώθηκε μέσω της παρατήρησης ζωντανών κυττάρων σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων και σε μονιμοποιημένα δείγματα, χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει τον δείκτη πολυδυναμίας Nanog. Μορφολογικά, τα αδιαφοροποίητα E14 αναπτύσσονται σε τρισδιάστατες αποικίες σφαιρικού σχήματος, με τα κύτταρα να έχουν επίσης σφαιρική μορφολογία και σχετικά περιορισμένο κυτταρόπλασμα (Εικ. 3.1). Η αφαίρεση του παράγοντα LIF από το καλλιιεργητικό μέσο και η ταυτόχρονη προσθήκη ρετινοϊκού οξέος σε αυτό, έχουν 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 (Εικ. 3.1)

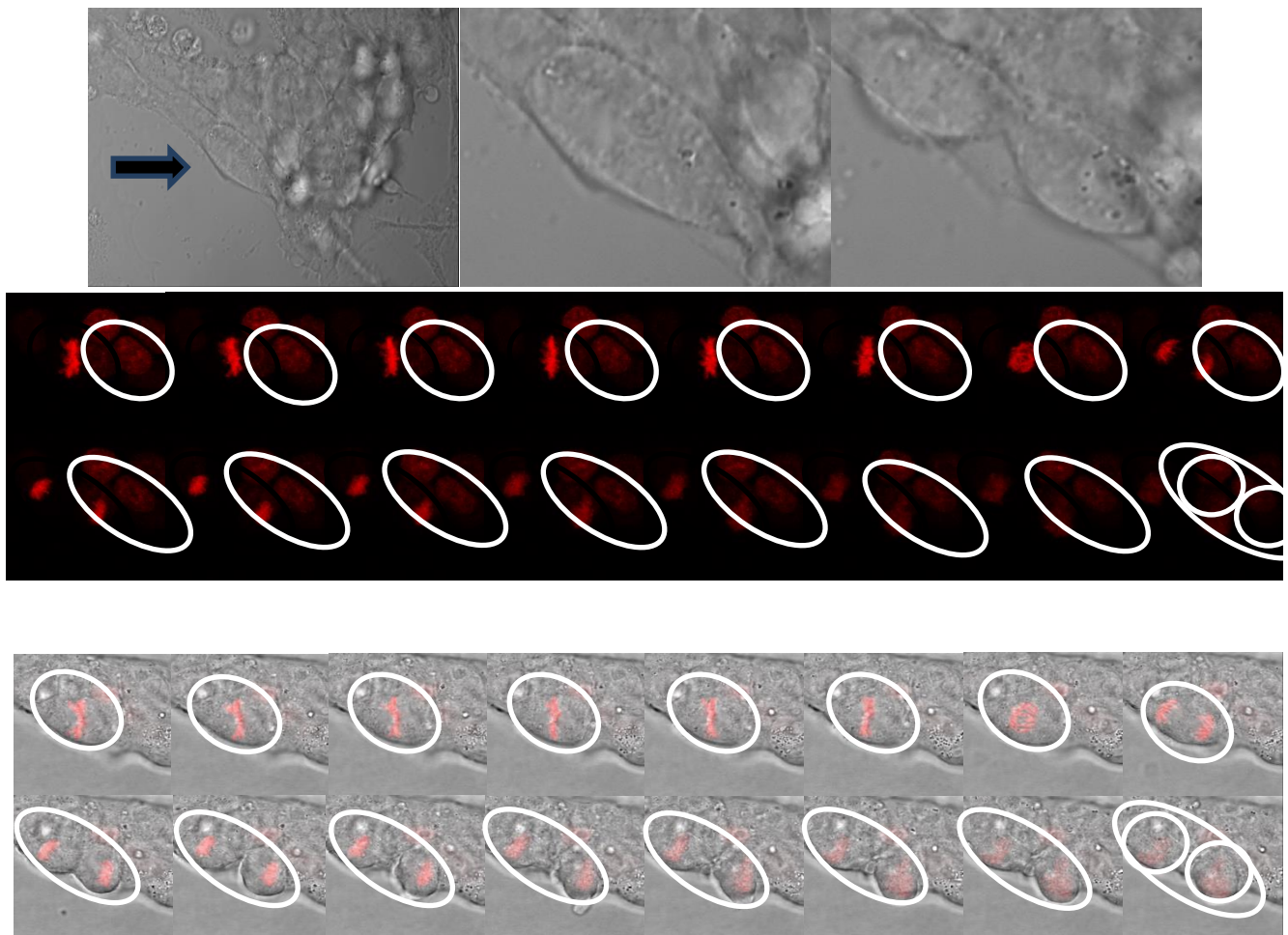


Εικόνα 3.1 Εικόνες από μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων που δείχνουν την ανάπτυξη E14 κυττάρων υπό συνθήκες αυτό-ανανέωσης (+LIF) και διαφοροποίησης (-LIF, +Ρετινοϊκό οξύ) σε κάθε ημέρα καλλιέργειας.

Για να γίνει σαφέστερη η πορεία της κυτταρικής διαίρεσης, τόσο σε συνθήκες αυτοανανέωσης όσο και συνθήκες διαφοροποίησης (-LIF, +Ρετινοϊκό οξύ), κρίθηκε

απαραίτητο να σημανθούν τα χρωμοσώματα χρησιμοποιώντας φθορίζουσες ιστόνες. Για αυτό το σκοπό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαμόλυνσης με την ιστόνη H2B mCherry, ώστε να σημανθούν τα μιτωτικά χρωμοσώματα. Στόχος των πειραμάτων αυτών ήταν η παρατήρηση της διαίρεσης διαμολυσμένων βλαστικών κυττάρων τύπου E14 σε πραγματικό χρόνο (Εικ. 3.2A&B).

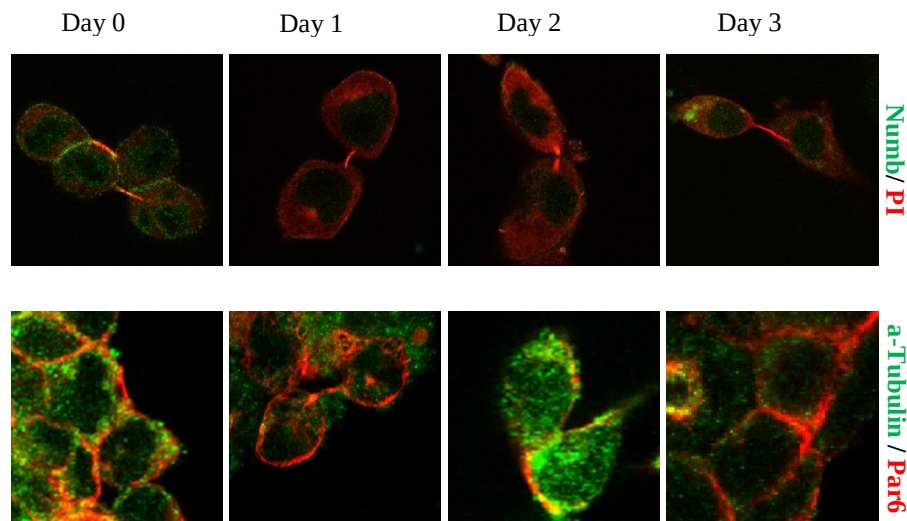
Για να γίνει σαφέστερη η πορεία της κυτταρικής διαίρεσης, τόσο σε συνθήκες αυτοανανέωσης όσο και συνθήκες διαφοροποίησης (-LIF, +Ρετινοϊκό οξύ), κρίθηκε απαραίτητο να σημανθούν τα χρωμοσώματα χρησιμοποιώντας φθορίζουσες ιστόνες. Για αυτό το σκοπό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαμόλυνσης με την ιστόνη H2B mCherry, ώστε να σημανθούν τα μιτωτικά χρωμοσώματα. Στόχος των πειραμάτων αυτών ήταν η παρατήρηση της διαίρεσης διαμολυσμένων βλαστικών κυττάρων τύπου E14 σε πραγματικό χρόνο (Εικ. 3.2A&B).



Εικόνα 3.2Α Καταγραφή διαιρέσεων αδιαφοροποίητων κυττάρων E14 σε πραγματικό χρόνο. Διαδοχικά στιγμιότυπα από βιντεοσκόπηση, σε μέγιστη προβολή.

3.1.2 Μελέτη κλασικών δεικτών ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης σε διαφοροποιήσεις εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων τύπου E14.

Η παρουσία ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων στις παραπάνω καλλιέργειες διερευνήθηκε παρακολουθώντας την κατανομή τυπικών δεικτών ασυμμετρίας, όπως του Numb, ο οποίος αποτελεί τον πιο γνωστό παράγοντα κυτταρικής τύχης, και της πρωτεΐνης πολικότητας Par6 (Εικ. 3.3).



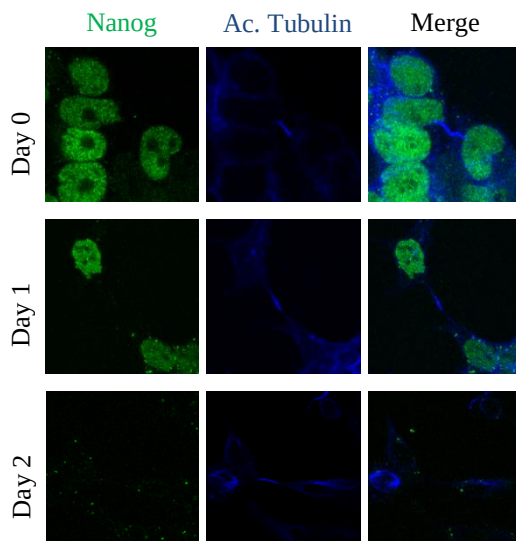
Εικόνα 3.3 Συμμετρική κατανομή των Numb και Par6 σε αδιαφοροποίητα (ημέρα 0) και διαφοροποιούμενα (-LIF+Ρετινοϊκό οξύ) διαιρούμενα κύτταρα E14. Ενδεικτικές απεικονίσεις των Numb (πράσινο) / PI (κόκκινο) και Par6 / α -τουμπουλίνης (κόκκινο).

Το αποτέλεσμα που προέκυψε από τον ενδεδειγμένο έλεγχο ικανού αριθμού (>100 κυττάρων ανά παράγοντα και ανά ημέρα μελέτης) μιτωτικών και θυγατρικών κυττάρων στις συνθήκες διαφοροποίησης που χρησιμοποιήσαμε (-LIF, +Ρετινοϊκό οξύ), ήταν το ίδιο: Τα διαφοροποιούμενα κύτταρα E14 δεν εμφάνιζαν πολικότητα ούτε ασύμμετρη κατανομή του παράγοντα Numb και τα θυγατρικά κύτταρα ήταν ισομεγέθη. Επομένως, σύμφωνα με τους κλασσικούς δείκτες της ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης, δεν

παρατηρήθηκε καμίας μορφής ασυμμετρία κατά τα πρώιμα στάδια της διαφοροποίησης των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ποντικού.

3.1.3 Μελέτη κατανομής δεικτών πολυδυναμίας σε θυγατρικά κύτταρα διαφοροποιούμενων εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων τύπου E14.

Ως πιθανός εναλλακτικός δείκτης ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης στα βλαστικά κύτταρα ποντικού εξετάσθηκε η ασύμμετρη απώλεια ενός βασικού δείκτη/παράγοντα πολυδυναμίας, του Nanog. Η έκφραση και ο εντοπισμός του, μελετήθηκαν ενδεδειγμένα σε ζεύγη θυγατρικών κυττάρων E14 κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών της διαφοροποίησης (-LIF, +Ρετινοϊκό οξύ). Τα ζεύγη των θυγατρικών κυττάρων που μελετήθηκαν ήταν 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 το Nanog στα κύτταρα αυτά κατέδειξαν πως ο εν λόγω δείκτης παρουσιάζεται ασθενώς διάχυτος κυτταροπλασματικός, ενώ στα μεσοφασικά πολυδύναμα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα τα επίπεδα του Nanog εμφανίζουν τις κλασσικές διακυμάνσεις από κύτταρο σε κύτταρο ^(142,143). Από τα αποτελέσματα της παραπάνω ανάλυσης δεν προέκυψε καμία ασυμμετρία ως προς την απώλεια των δεικτών πολυδυναμίας (Εικ. 3.4).



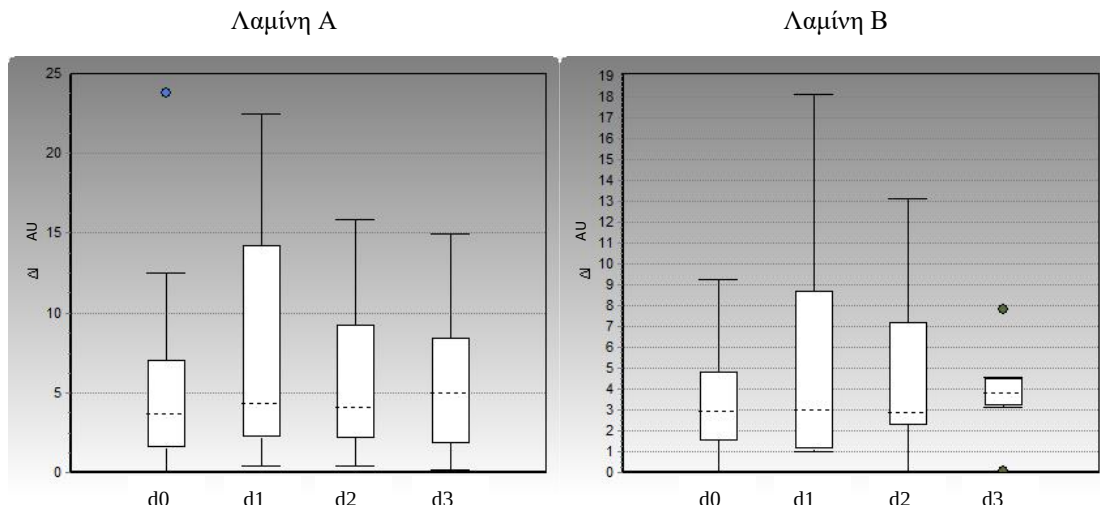
Εικόνα 3.4 Συμμετρική κατανομή του Nanog, σε διαφοροποιούμενα κύτταρα E14 κατά τις ημέρες 0-2. (κλίμακα 5μm στα θυγατρικά κύτταρα).

3.1.4 Μελέτη της κατανομής των λαμινών Α- & Β-τύπου σε θυγατρικά κύτταρα διαφοροποιούμενων εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων τύπου E14.

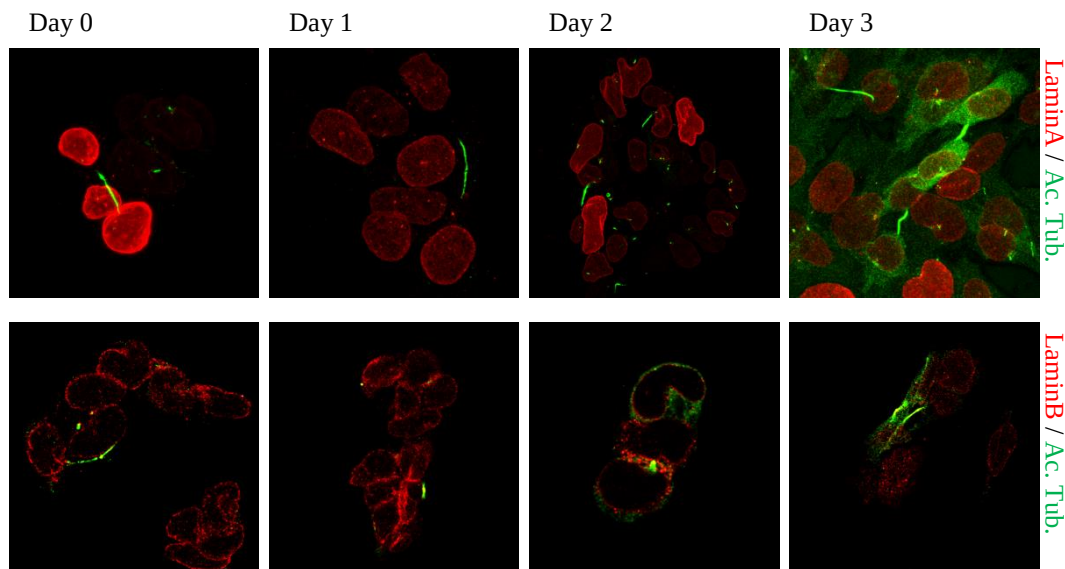
Στα παρακάτω πειράματα μελετήθηκε και η υπόθεση εργασίας της παρούσας διατριβής ως προς την πιθανή ασύμμετρη κατανομή των λαμινών ή της ετερόχρονης συγκρότησης του πυρηνικού φακέλου στα δύο θυγατρικά κύτταρα. Μελετήθηκε η σύσταση και η ποιότητα της πυρηνικής λάμινας, χρησιμοποιώντας μια σειρά ειδικών αντισωμάτων που αναγνωρίζουν όλες τις ισομορφές των λαμινών Α και Β-τύπου, τόσο σε αδιαφοροποίητα όσο και σε διαφοροποιημένα (-LIF, +Ρετινοϊκό οξύ) κύτταρα E14. Τα κυτταρικά παρασκευάσματα ελέγχθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο σε διαδοχικές τομές, οι οποίες συνδυάστηκαν σε «προβολή μέσου όρου έντασης» (average projection). Στόχος μας ήταν να εκτιμηθεί εάν το «μητρικό» και το «θυγατρικό» κύτταρο περιέχουν Α- και Β-τύπου λαμίνες σε όλη την έκταση της λάμινας, ή εάν εμφανίζονται τοπικές ανομοιογένειες με τη μορφή «παχύνσεων», «ελλειμμάτων», ή «προσεκβολών» στο εσωτερικό του πυρήνα (Εικ. 3.7). Πραγματοποιήθηκε επίσης ποσοτική ανάλυση της έντασης του φθορισμού των κυτταρικών παρασκευασμάτων, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Fiji (Johannes Schindelin et al.) για την καλύτερη αξιολόγησή τους (Εικ 3.5 & 3.6).

	Λαμίνη Α				Λαμίνη Β			
	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 3	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 3
Αρ. δειγμάτων	44	26	28	34	38	10	14	14
Μέση ένταση	51.73	74.14	57.53	51.95	32.49	28.39	37.23	30.24
Ελάχιστη ένταση	25.290	27.690	16.450	14.007	19.770	14.565	14.493	16.740
Μέγιστη ένταση	131.220	204.520	123.998	96.266	50.880	50.232	62.740	42.765

Εικόνα 3.5 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της ανάλυσης των διαφορών στην ένταση του ανοσοφθορισμού των λαμινών Α- & Β-τύπου, μεταξύ πυρήνων θυγατρικών κυττάρων.



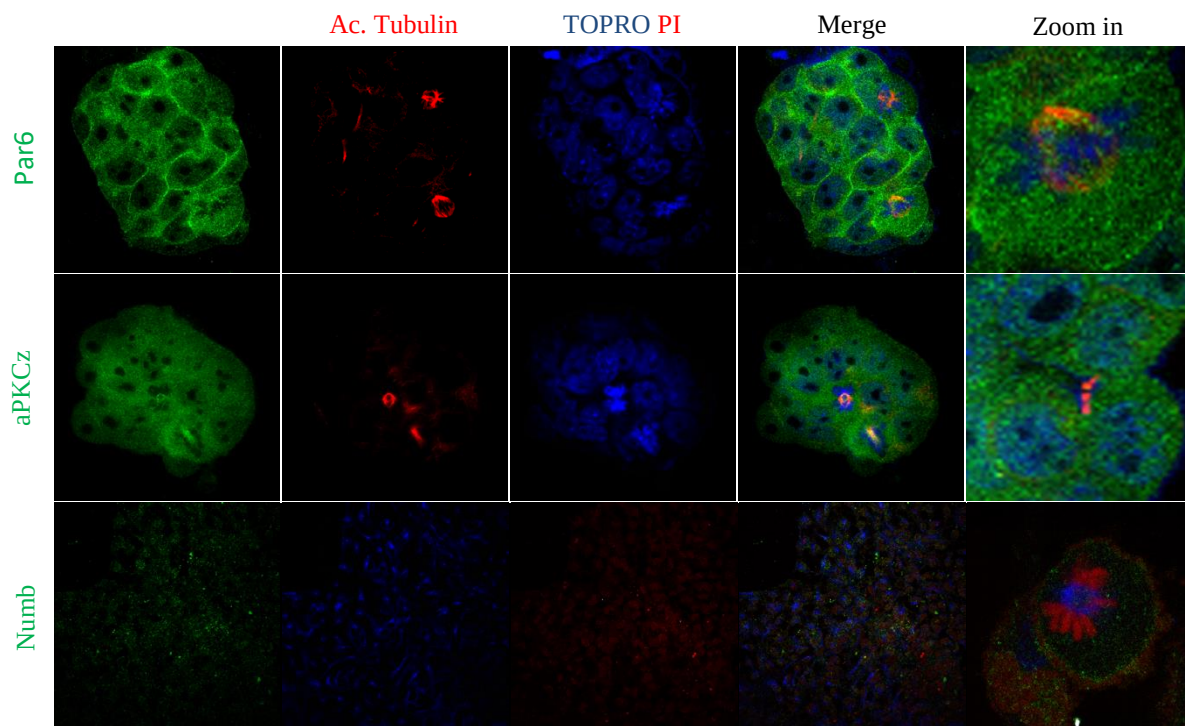
Εικόνα 3.6 Σχηματική απεικόνιση των διαφορών στην ένταση του φθορισμού των αντίστοιχων λαμινών, μεταξύ των θυγατρικών κυττάρων, ανά ημέρα διαφοροποίησης (-LIF, +Ρετινοϊκό οξύ). Φαίνεται πως κατά την πρώτη ημέρα διαφοροποίησης, το εύρος των διαφορών της έντασης μεταξύ θυγατρικών κυττάρων σε επίπεδο πληθυσμού είναι μεγαλύτερο. Στη συνέχεια όμως εξισσοροπείται και ομοιάζει εκείνο της αρχικής – υπό φυσιολογικές συνθήκες - καλλιέργειας.



Εικόνα 3.7 Η συμμετρία των διαιρούμενων κυττάρων E14 διαπιστώνεται και στην κατανομή των λαμινών Α- & Β-τύπου.

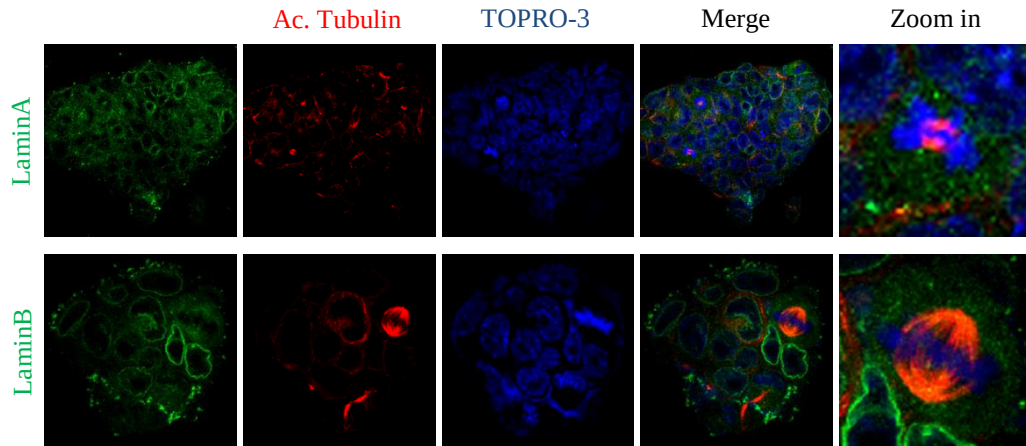
3.1.5 Διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων τύπου E14 προς καρδιομυοκύτταρα.

Η απουσία ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων στην τυπική (δισδιάστατη, 2D) καλλιέργεια των κυττάρων E14 μας οδήγησε στο να υιοθετήσουμε ένα εναλλακτικό σύστημα μελέτης, το οποίο περιλαμβάνει τη διαφοροποίηση μέσω της δημιουργίας εμβρυονικών σωματιδίων (τρισδιάστατη καλλιέργεια, 3D). Πραγματοποιήθηκαν πειράματα 3D διαφοροποίησης προς μεσόδερμα και συγκεκριμένα υπό συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη καρδιομυοκυττάρων. Στο σύστημα αυτό ως δείκτες ασύμμετρης διαίρεσης επιλέχθηκαν ο παράγοντας κυτταρικής τύχης Numb και οι πρωτεΐνες πολικότητας aPKCζ και Par6, οι οποίες εντοπίστηκαν μέσω ειδικών αντισωμάτων (Εικ.3.8).



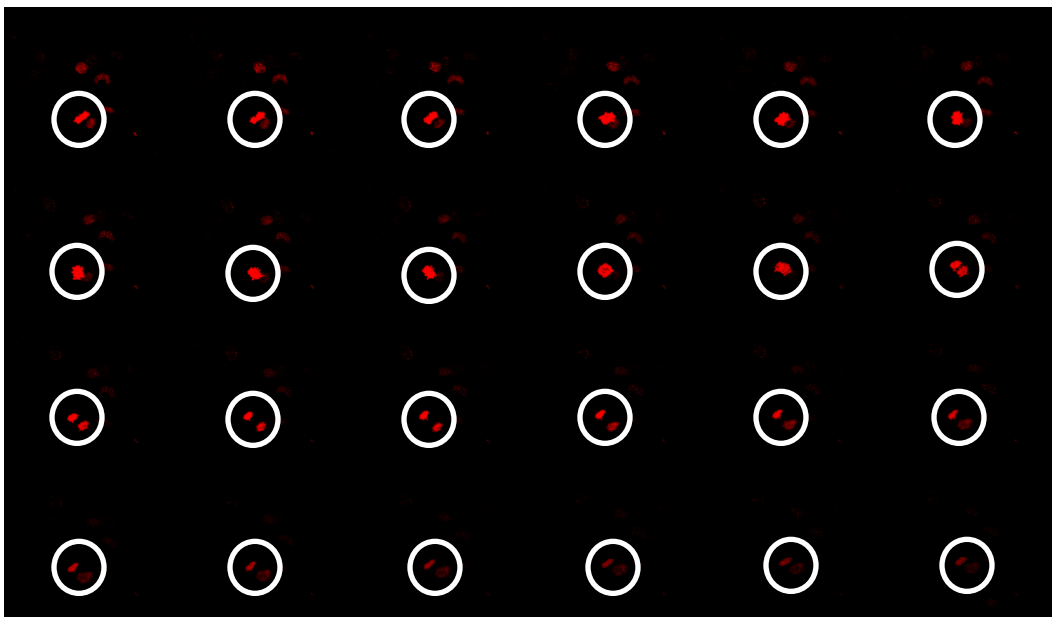
Εικόνα 3.8 Έμμεσος ανοσοφθορισμός εμβρυοειδών σωματιδίων έναντι των πρωτεϊνών aPKCζ και Par6 (πράσινο) σε συνδυασμό με ακετυλιωμένη τουμπουλίνη (μπλε για τον Numb, κόκκινη για τις Par6 και aPKCζ) και TOPRO-3 (PI για τον Numb), κατά τη 4^η ημέρα επαγόμενης διαφοροποίησης.

Όπως ήταν φυσικό, και σε αυτό το σύστημα μελετήθηκε η υπόθεση εργασίας της παρούσας διατριβής, ως προς την πιθανή ασύμμετρη κατανομή των λαμινών ή της ετερόχρονης συγκρότησης του πυρηνικού φακέλου στα δύο θυγατρικά κύτταρα (Εικ. 3.9).



Εικόνα 3.9 Έμμεσος ανοσοφθορισμός εμβρυοειδών σωματιδίων έναντι των πρωτεϊνών LaminA και LaminB (πράσινο) σε συνδυασμό με ακετυλιωμένη τουμπουλίνη (κόκκινο) και TOPRO-3 (μπλε), κατά τη 4^η ημέρα επαγόμενης διαφοροποίησης.

Επιπλέον, για την περαιτέρω μελέτη της κυτταρικής διαίρεσης των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων υπό τις συνθήκες 3D καλλιέργειας σε πραγματικό χρόνο, επιχειρήσαμε να σημάνουμε τα μιτωτικά χρωμοσώματα ενσωματώνοντας φθορίζουσα ιστόνη H2B (Εικ.3.10).



Εικόνα 3.10 Διαμολυσμένα κύτταρα E14, υπό συνθήκες 3D καλλιέργειας, που εκφράζουν τη ιστόνη H2B, συνεξευγμένη με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry. Στη σειρά των εικόνων απεικονίζονται τα στάδια της μίτωσης, όπως καταγράφονται μέσω της παρατήρησης σε πραγματικό χρόνο, παρατηρώντας τη διάταξη των χρωμοσωμάτων.

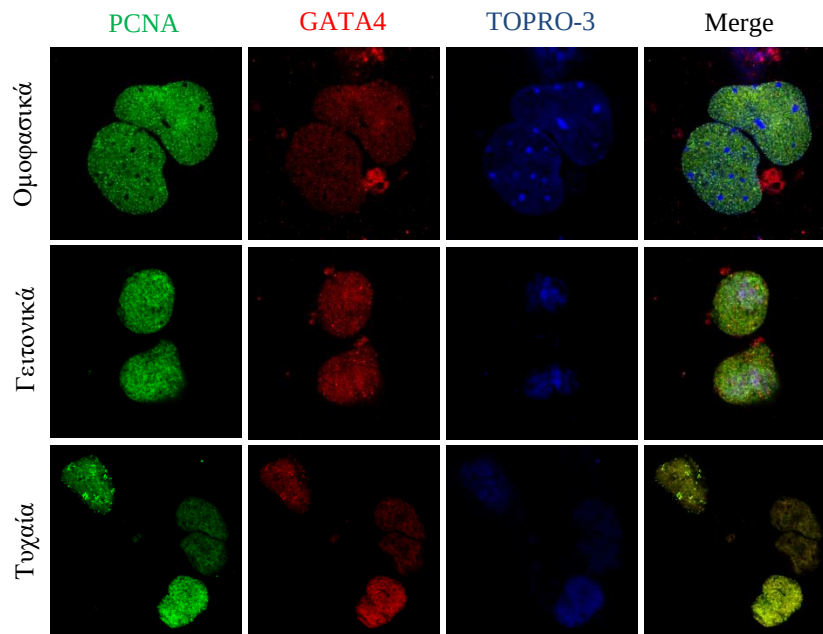
3.1.6 Μελέτη της κατανομής του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 και του πρότυπου εντοπισμού του PCNA σε διαφοροποιημένα προς καρδιομυοκύτταρα θυγατρικά κύτταρα.

Λόγω του μεγάλου μεγέθους των εμβρυονικών σωματιδίων καθώς και της πληθώρας των κυττάρων σε κάθε αποικία, χρησιμοποιώντας το σύστημα της διαφοροποίησης 3D και διατηρώντας τα EBs ακέραια, δεν ήταν εύκολο να διακρίνουμε τί ακριβώς συμβαίνει στο επίπεδο των θυγατρικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό, στη συνέχεια των πειραμάτων μας χρησιμοποιήσαμε το πρωτόκολλο των Elabd et al..

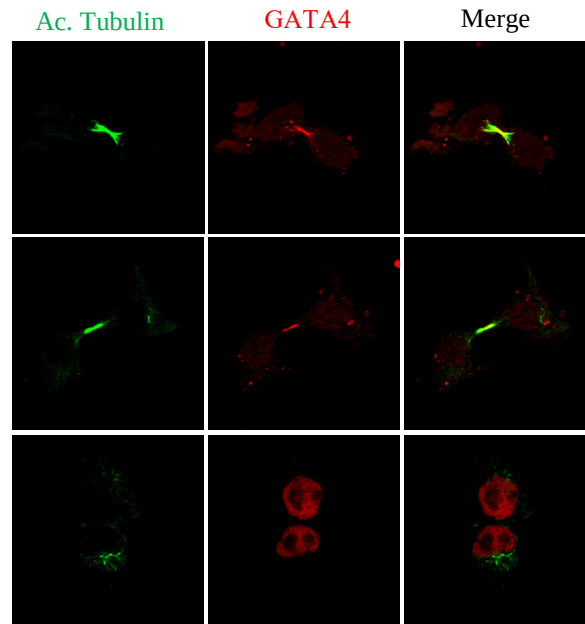
Δεδομένου ότι θέλαμε να ταυτοποιήσουμε τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκεται το εκάστοτε κύτταρο σε ένα ζεύγος κυττάρων, για να καθοριστεί με σαφήνεια τόσο το ποσοστό των θυγατρικών κυττάρων όσο και μια πιθανή διαφορά στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου μεταξύ τους, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων σε αντίστοιχα δείγματα χρησιμοποιώντας ως δείκτη το PCNA (proliferation cell nuclear antigen, υπομονάδα της DNA πολυμεράσης δ) (Εικ. 3.10). Το PCNA έχει χαρακτηριστικό πρότυπο εντοπισμού ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου, ενώ απουσιάζει από τα τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα που έχουν αποσυρθεί από τον κυτταρικό κύκλο (φάση G0) ⁽¹⁴⁴⁾. 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 πρόιμη S ή πρόιμη S και μέση S κ.ο.κ.) και τυχαία (διαφορά πλέον της μίας υποφάσης, λ.χ. G1 και ώριμης S) (Εικ.11).

Η τρισδιάστατη διαφοροποίηση μέσω εμβρυονικών σωματιδίων σε μέσο IMDM είναι γνωστό ότι προάγει τη μεσοδερμικής κατεύθυνσης διαφοροποίηση, ενώ παράλληλα με την εμφάνιση συσταλτών καρδιομυοκυττάρων, κατά την 7^η-9^η ημέρα διαφοροποίησης, ενεργοποιείται ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4 ⁽¹⁴⁵⁾. Έτσι, τα δείγματα που προέκυψαν την 7^η ημέρα διαφοροποίησης μελετήθηκαν και ως προς την παρουσία αλλά και την κατανομή του GATA4 ⁽¹³⁹⁾ (Εικ. 11 & 12).

Αξιολογώντας κατ' αυτό τον τρόπο τα πειράματά μας, προέκυψε ότι η πλειονότητα των κυτταρικών ζευγών που προκύπτουν είναι προφανώς θυγατρικά (με ή χωρίς μεσόσωμα). Τα ζευγάρια που συνδέονταν μεταξύ τους με το μεσόσωμα 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. Ο μεταγραφικός παράγοντας GATA4 δεν βρέθηκε να διαχωρίζεται ασύμμετρα σε κανένα από τα κυτταρικά ζεύγη θυγατρικών κυττάρων (συνδεδεμένων ή μη με μεσόσωμα).



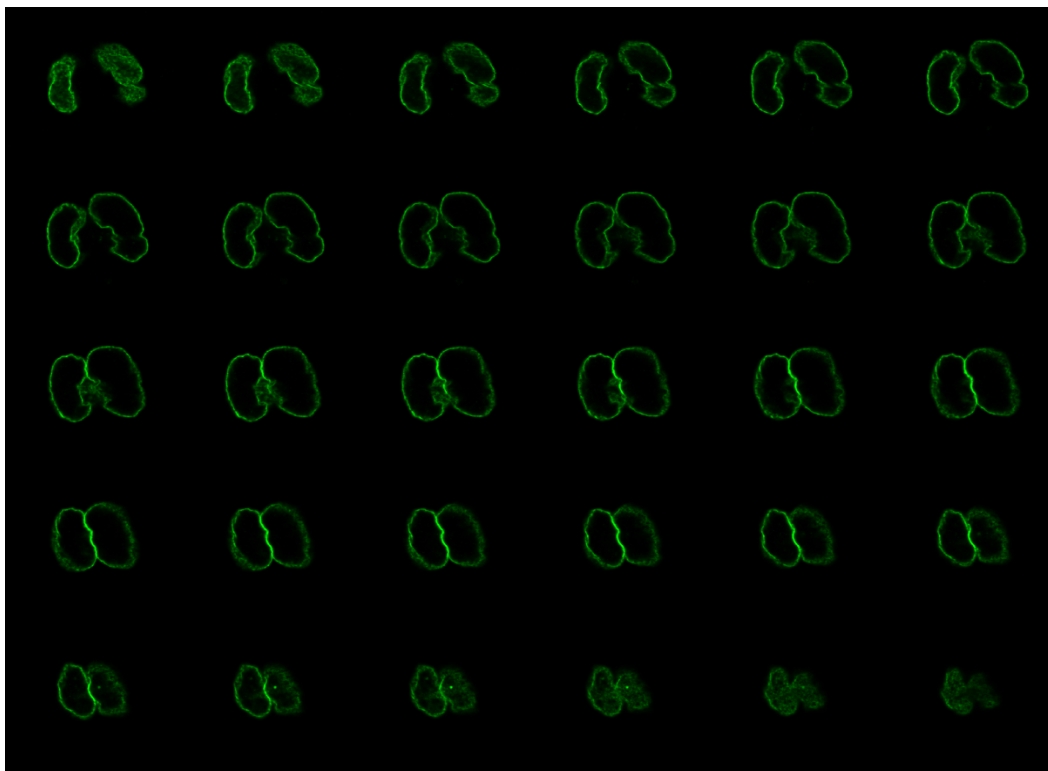
Εικόνα 3.11 Κατανομή του PCNA σε ζεύγη κυττάρων όπως παρασκευάστηκαν ακολουθώντας το πρωτόκολλο των Elabd et al.. Παρατηρείται συμμετρική κατανομή του ιστοειδικού μεταγραφικού παράγοντα GATA4 σε ζεύγη θυγατρικών κυττάρων και των τριών τύπων κατανομής του PCNA.



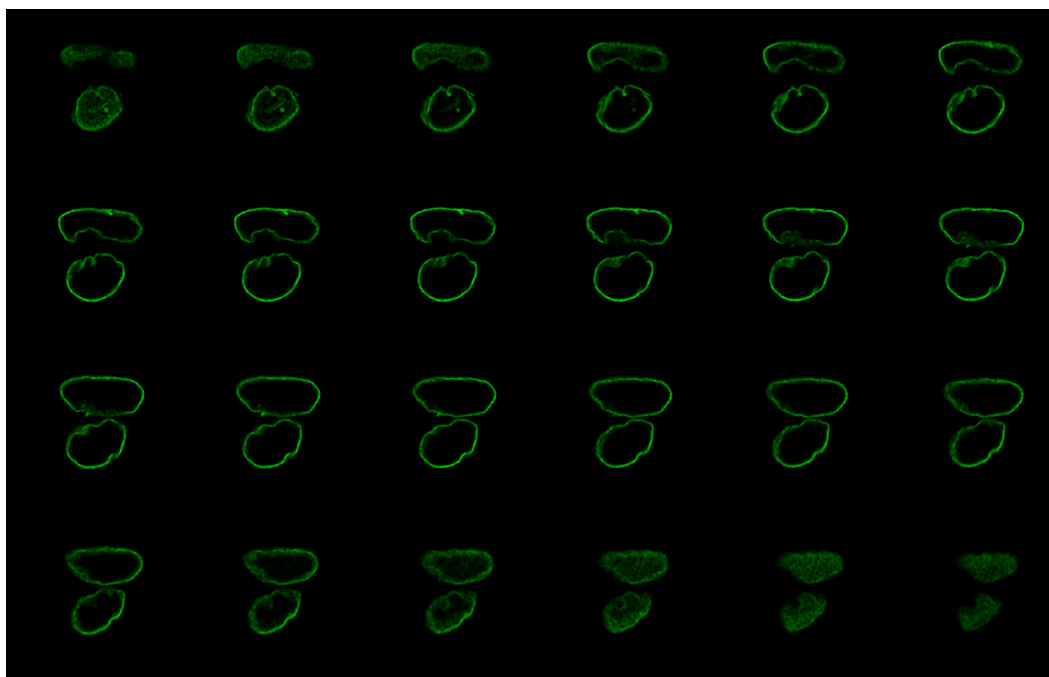
Εικόνα 3.12 Συμμετρική κατανομή του ιστοειδικού μεταγραφικού παράγοντα GATA4 σε ζεύγη θυγατρικών κυττάρων συνδεδεμένων ή μη με μεσόσωμα.

3.1.7 Μελέτη της κατανομής των λαμινών A- & B-τύπου σε θυγατρικά κύτταρα διαφοροποιούμενων προς μεσόδερμα βλαστικών κυττάρων τύπου E14.

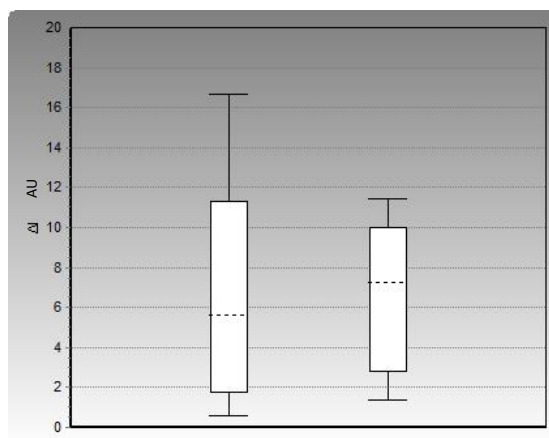
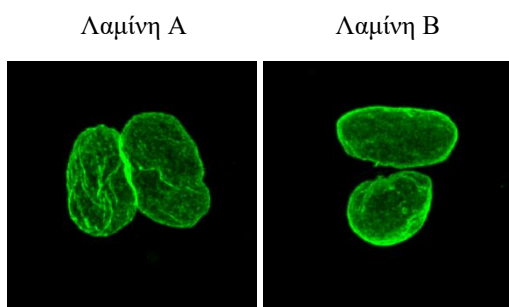
Στη συνέχεια μελετήθηκε η συγκρότηση των πυρηνικών φακέλων στα θυγατρικά κύτταρα που προέκυψαν από το πρωτόκολλο των Elabd et al., σε δείγματα της 7.5^{ης} ημέρας διαφοροποίησης, ακολουθώντας το τελικό σκέλος του παραπάνω πρωτοκόλλου. Στα δείγματα αυτά, μελετήθηκε η σύσταση της πυρηνικής λάμινας, ως προς την παρουσία των λαμινών A- και B- τύπου (Εικ. 3.13A & B). Με τον τρόπο αυτό μπορούμε ποιοτικά να διαγνώσουμε τυχόν διαφορές στη σύσταση ή/και ταχύτητα σχηματισμού των πυρηνικών φακέλων σε κάθε ζεύγος θυγατρικών. Από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής διαπιστώσαμε επίσης, πως η κατανομή των πυρηνικών λαμινών είναι συμμετρική κι ότι η διαφορά έντασης του φθορισμού των αντισωμάτων μεταξύ των θυγατρικών κυττάρων καθώς και το εύρος των διαφορών της έντασης μεταξύ τους σε επίπεδο πληθυσμού, είναι μικρά (Εικ. 3.15).



Εικόνα 3.13Α Διαδοχικά στιγμιότυπα ενός ζεύγους κυττάρων, με χρωσμένο αντίσωμα έναντι της λαμίνης Α-τύπου.



Εικόνα 3.13Β Διαδοχικά στιγμιότυπα ενός ζεύγους κυττάρων, με χρωσμένο αντίσωμα έναντι της λαμίνης Β-τύπου.



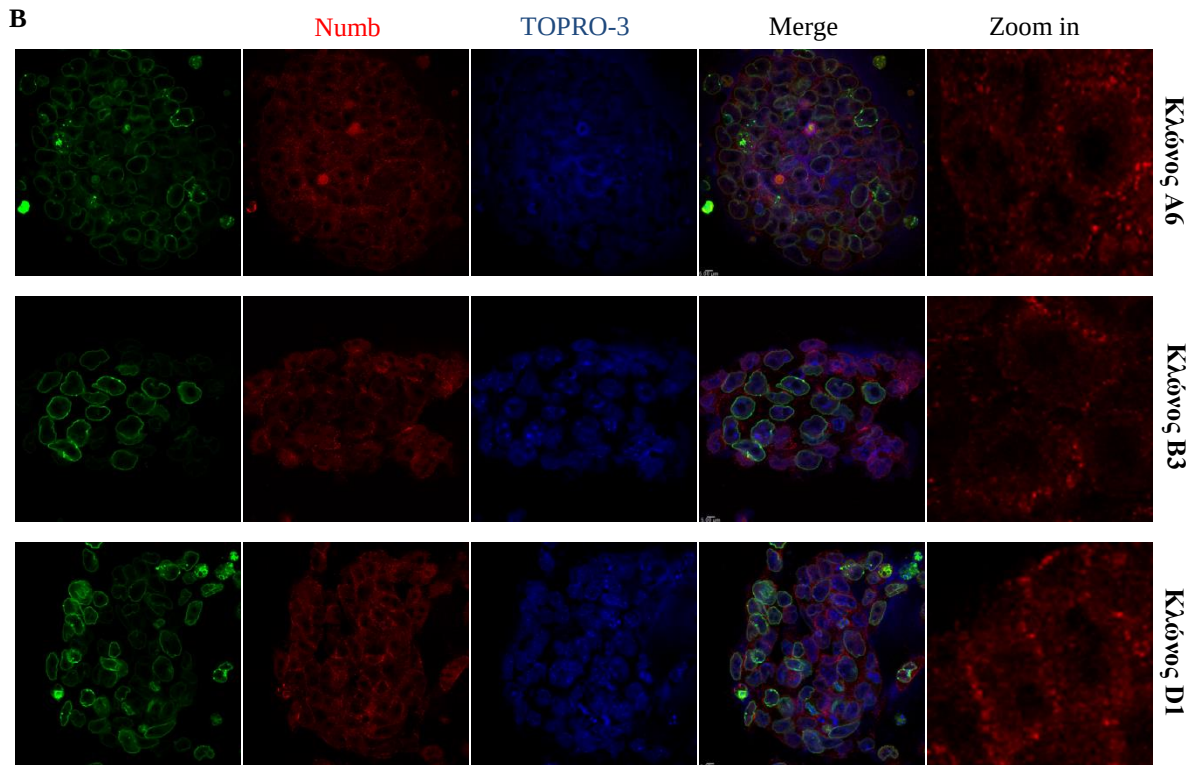
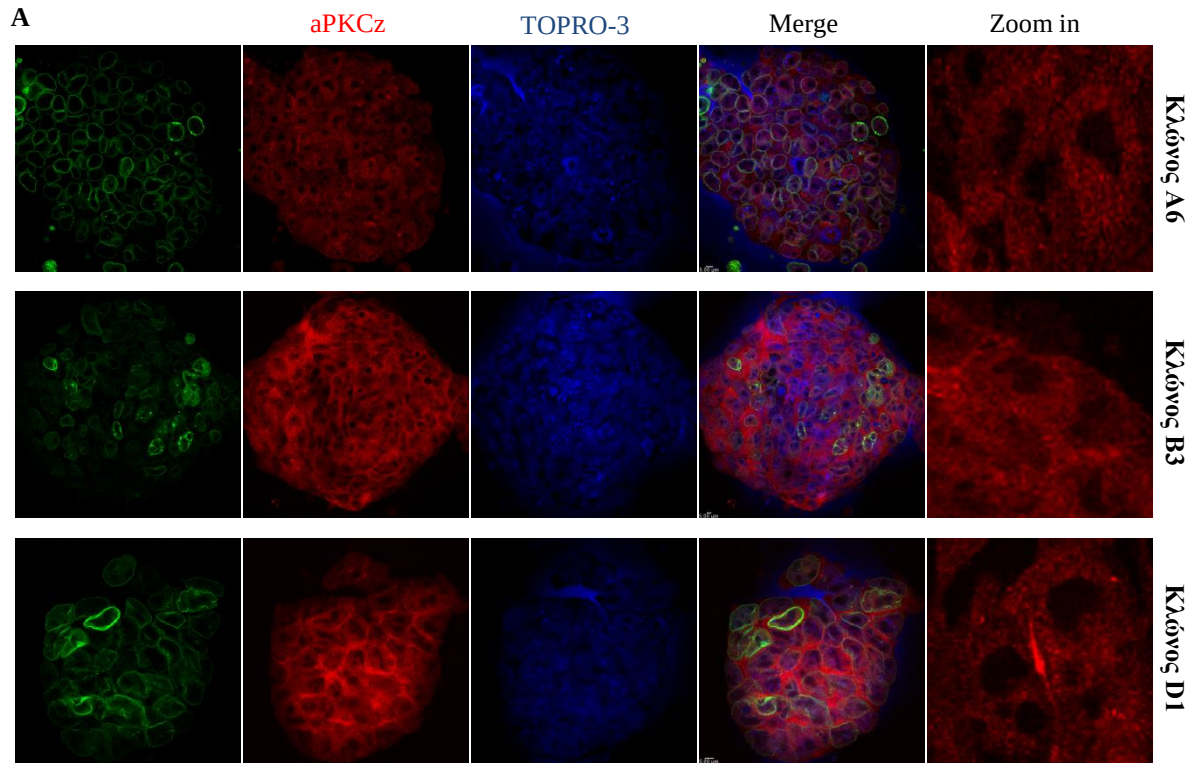
Εικόνα 3.14 Μέγιστη προβολή των τομών που παρατέθηκαν ξεχωριστά στα προηγούμενα σκέλη της εικόνας 3.13 και σχηματική απεικόνιση του εύρους των διαφορών της έντασης μεταξύ θυγατρικών κυττάρων σε επίπεδο πληθυσμού κατά την 7.5 ημέρα διαφοροποίησης.

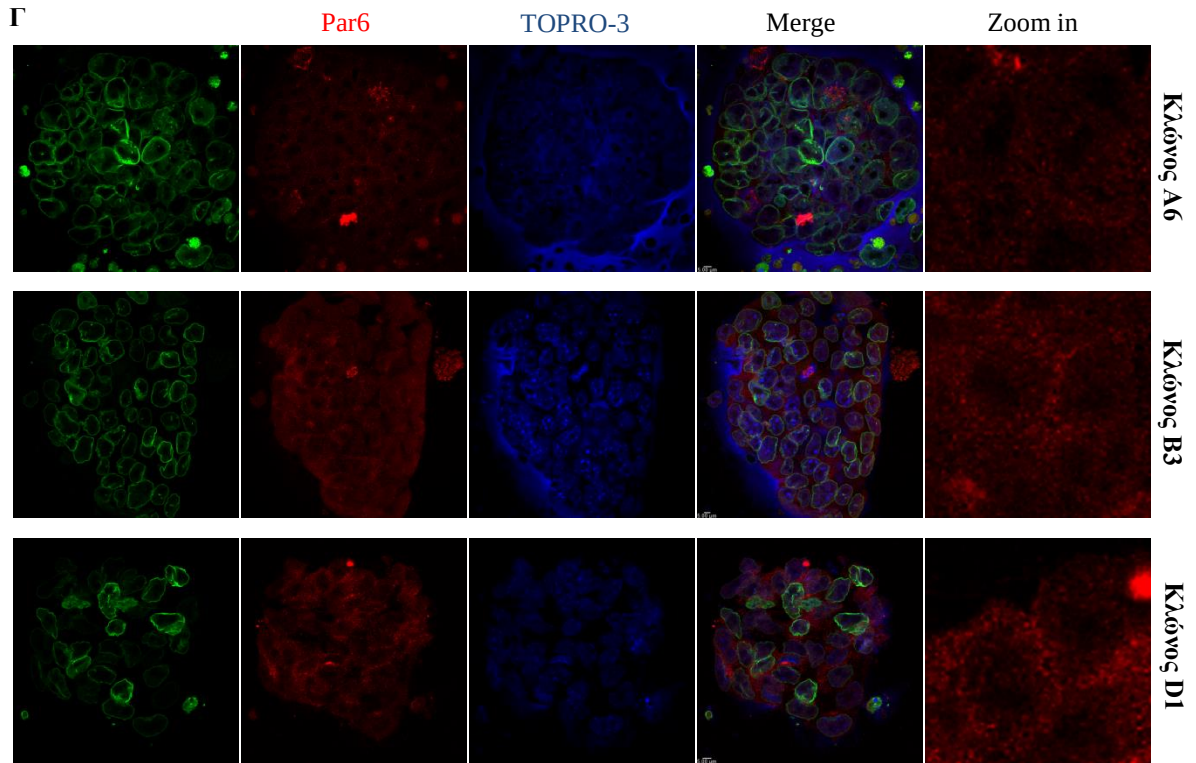
3.2 Υπερέκφραση των λαμινών A- και B-τύπου στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού τύπου E14 και διερεύνηση παρουσίας ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων.

Για να επιτύχουμε την παρατήρηση των πυρηνικών λαμινών *in vivo*, και να χαρτογραφηθεί η πορεία αποικοδόμησης και επανασυγκρότησής τους στη διάρκεια της μίτωσης, κατασκευάσαμε σταθερές σειρές κυττάρων που εκφράζουν GFP-λαμίνες A- και B-τύπου. Διαιρούμενα κύτταρα των σειρών αυτών θα αναλυθούν και με την τεχνική FRAP (fluorescence recovery after photobleaching), για να μετρηθεί επακριβώς η δυναμική των πυρηνικών λαμινών. Αποδίδουμε ιδιαίτερη σημασία σε αυτή τη μελέτη, δεδομένου ότι, πολλές φορές, διαφορές που είναι λανθάνουσες στο επίπεδο της αδρής μορφολογίας εκδηλώνονται με πολύ σαφέστερο και δραματικό τρόπο όταν μετρηθούν ποσοτικές παράμετροι, όπως το «μη-κινητικό κλάσμα» (immobile fraction) και ο χρόνος ημισείας ανάκτησης του φθορισμού (fluorescence recovery half-time) στο FRAP.

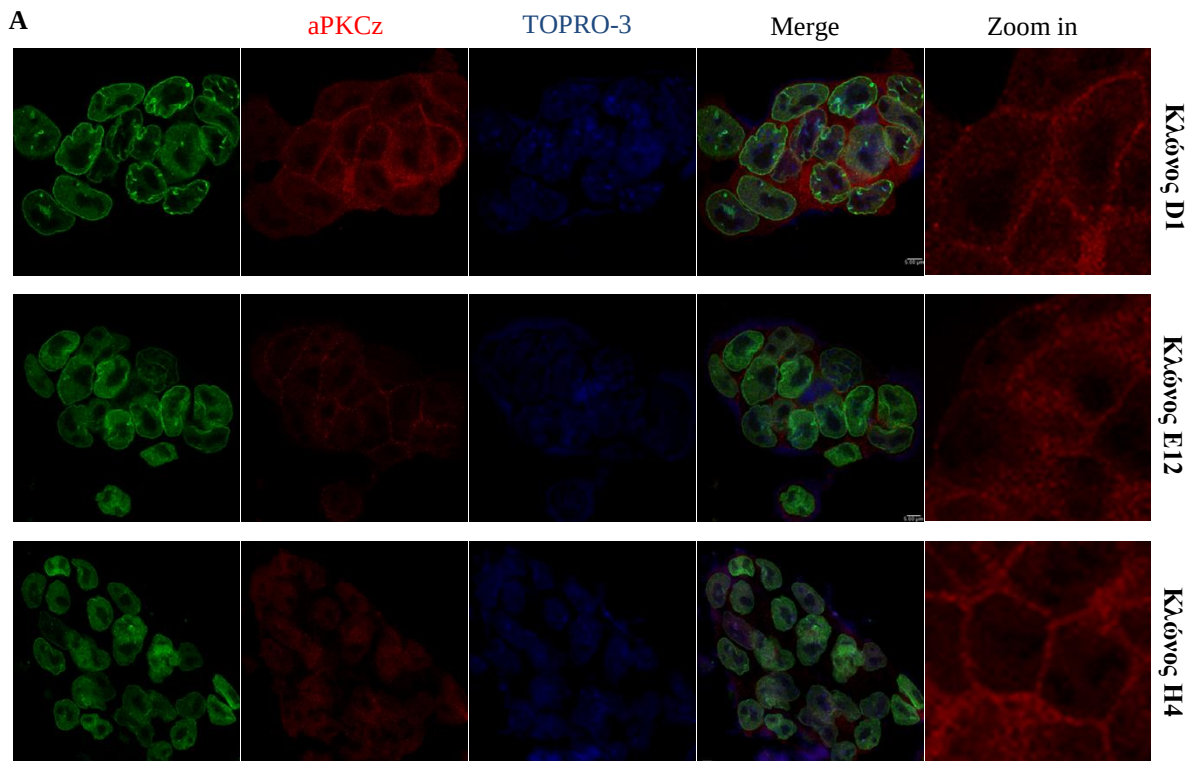
3.2.1 Υπερέκφραση των λαμινών A- και B-τύπου σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού και μελέτη κλασσικών δεικτών ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης.

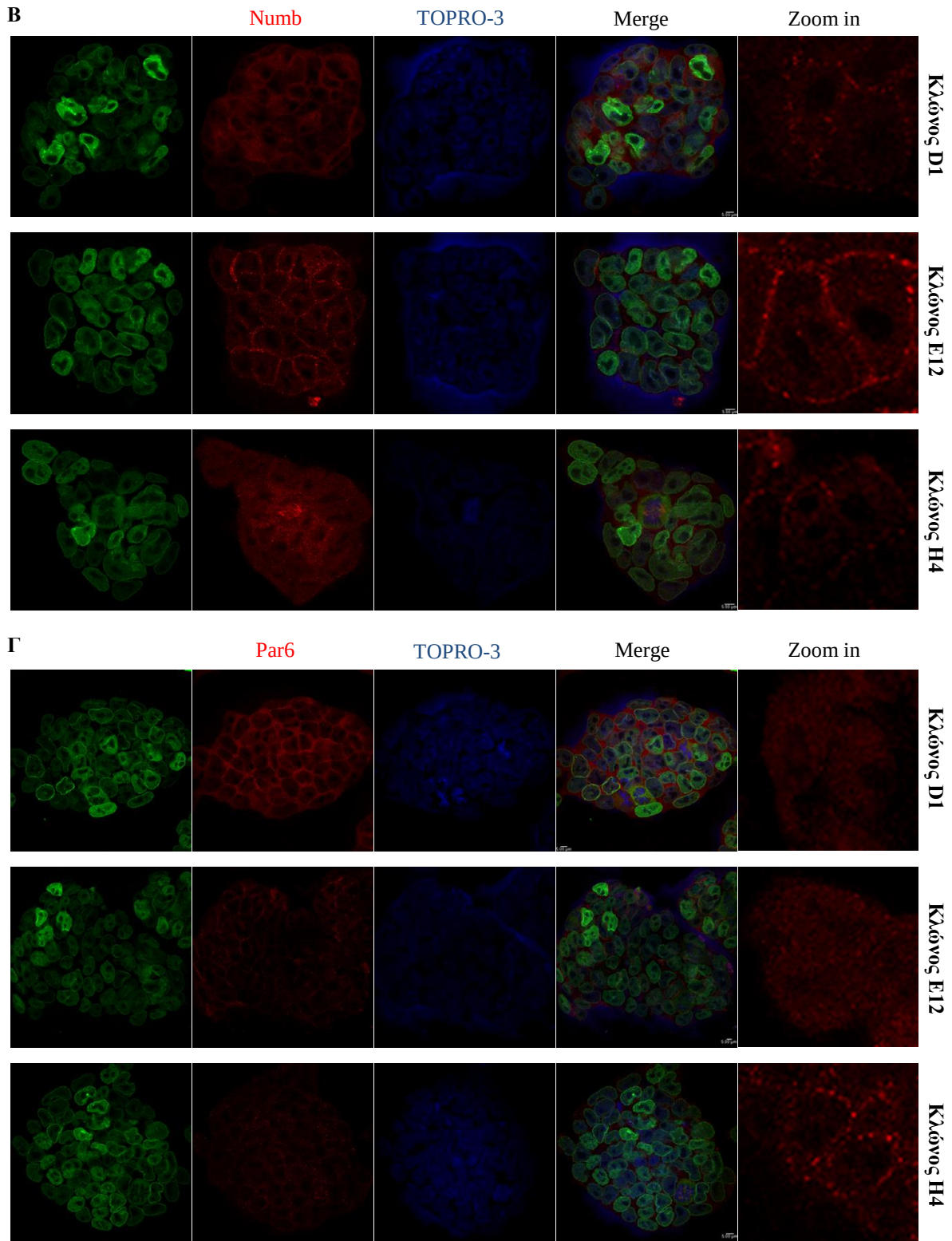
Τα πρώτα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στις σταθερές κυτταρικές που κατασκευάσαμε αφορούσαν τη διερεύνηση τυχόν ασυμμετριών μεταξύ των θυγατρικών κυττάρων. Ως δείκτες ασύμμετρης διαίρεσης για τους κλώνους A6, B3, D1 (της σταθερής κυτταρικής σειράς στην οποία υπερεκφράζεται η λαμίνη A-τύπου) και τους κλώνους D1, E12, H4 (της σταθερής κυτταρικής σειράς στην οποία υπερεκφράζεται η λαμίνη B-τύπου) επιλέχθηκαν ο παράγοντας κυτταρικής τύχης Numb και οι πρωτεΐνες πολικότητας aPKCζ και Par6, οι οποίες εντοπίστηκαν μέσω ειδικών αντισωμάτων (Εικ. 3.15A, B&Γ και Εικ. 3.16A, B&Γ).





Εικόνα 3.15 Κατανομή των πρωτεϊνών Numb, aPKCζ και Par6 (κόκκινο) στους κλώνους της σταθερής κυτταρικής σειράς στην οποία υπερεκφράζουμε την λαμίνη Α.

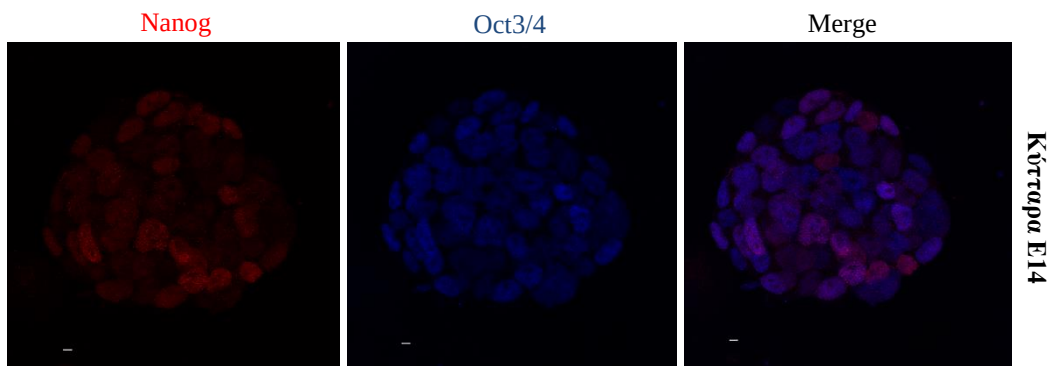


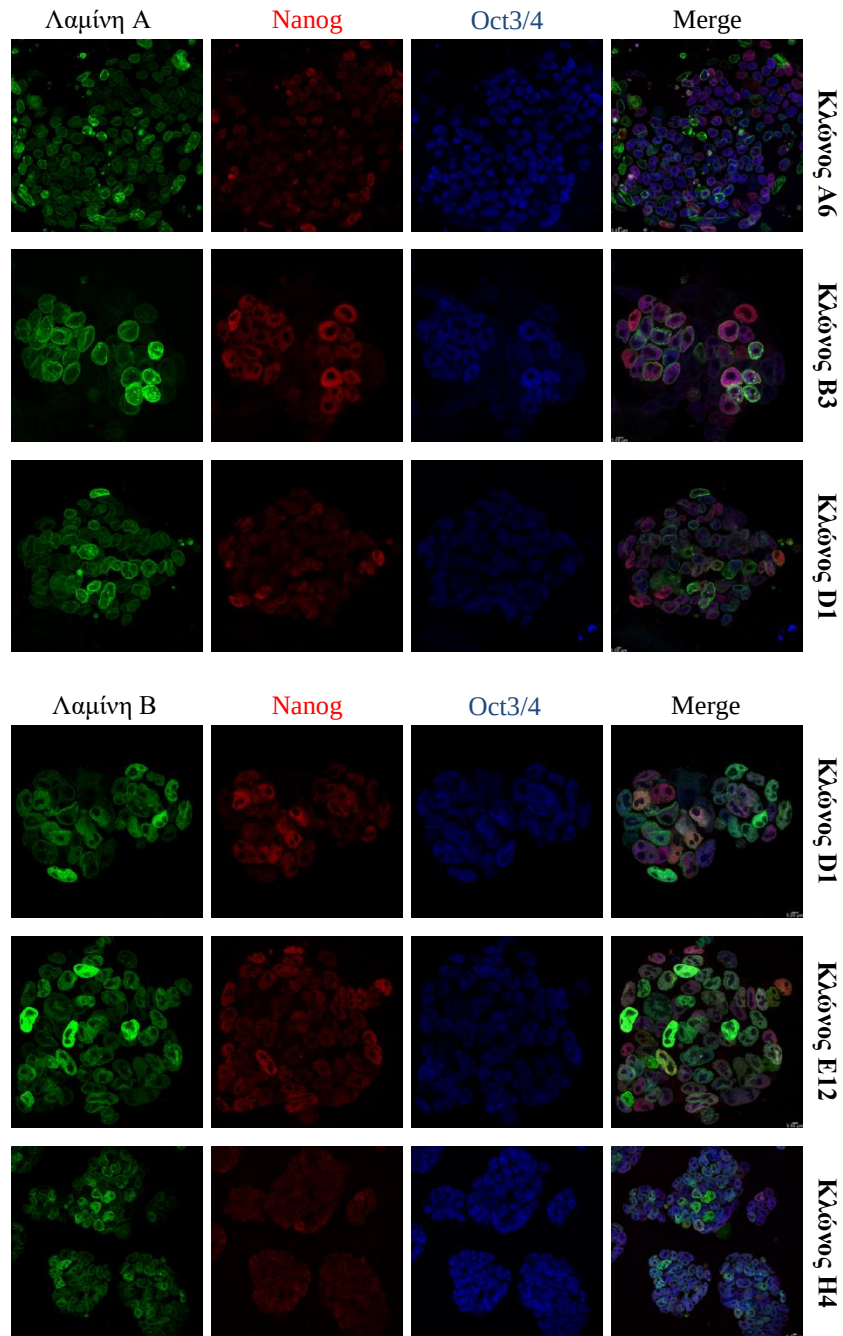


Εικόνα 3.16 Κατανομή των πρωτεϊνών Numb, aPKCζ και Par6 (κόκκινο) στους κλώνους της σταθερής κυτταρικής σειράς στην οποία υπερεκφράζουμε την λαμίνη B.

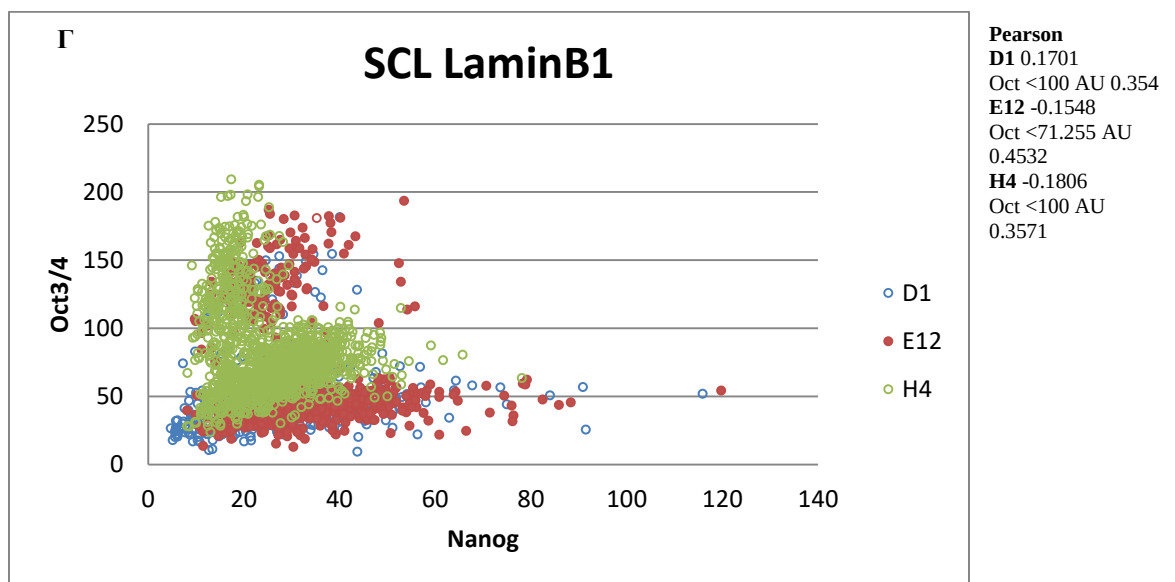
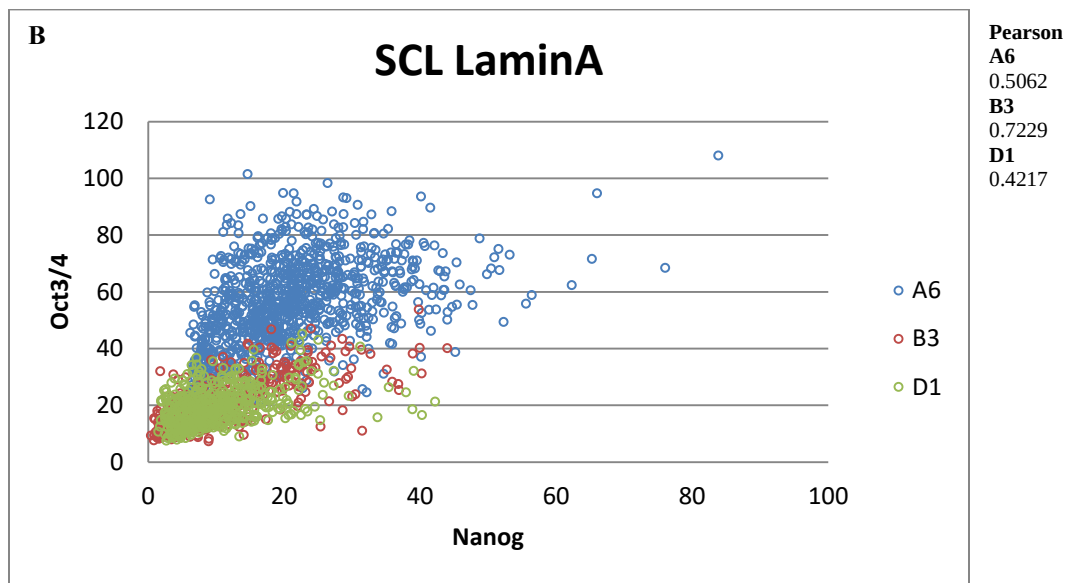
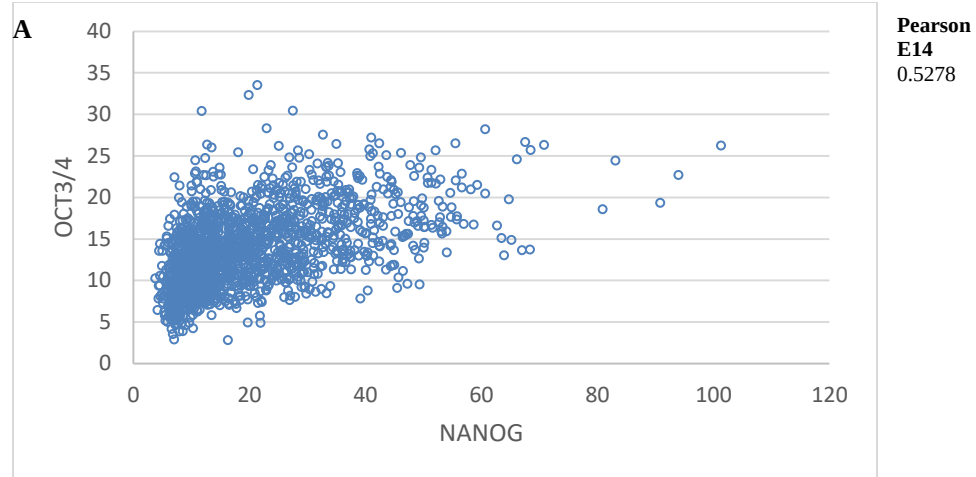
3.2.2 Υπερέκφραση των λαμινών A- και B-τύπου σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού και πολυδυναμία.

Αρχικά μελετήθηκε αν η υπερέκφραση των λαμινών A- και B-τύπου επηρεάζει την πολυδυναμία των κυττάρων. Μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση της πρωτεΐνης Nanog παρουσιάζει χαρακτηριστικές διακυμάνσεις στην αδιαφοροποίητη κατάσταση των βλαστικών κυττάρων ⁽¹⁴⁶⁾. Είναι γνωστό ότι στην αδιαφοροποίητη κατάσταση τα επίπεδα έκφρασης των Oct4 και Nanog συσχετίζονται και η συσχέτιση αυτή αναπαριστάται άμεσα από τον συντελεστή Pearson (r). Όσο πιο μεγάλη είναι η τιμή του r , τόσο πιο πολυδύναμα θεωρούνται τα κύτταρα ⁽¹⁴⁶⁾. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού έναντι των μεταγραφικών παραγόντων Nanog και Oct4, δύο από τις σημαντικότερες πρωτεΐνες προσδιορισμού της βλαστικότητας των κυττάρων (Εικ. 3.17A, B& Γ). Ακολούθησε ποσοτικοποίηση της έντασης φθορισμού και στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων. Υπολογίζοντας το συντελεστή συσχέτισης Pearson για κάθε κλώνο διαπιστώσαμε ότι οι συντελεστές συσχέτισης των κλώνων που υπερεκφράζουν τη λαμίνη A δεν αποκλίνουν από εκείνον των E14 κυττάρων, ενώ στην περίπτωση των κλώνων που υπερεκφράζουν τη λαμίνη B οι συντελεστές παρουσιάζουν σημαντική μείωση (Εικ. 3.18A, B& Γ).



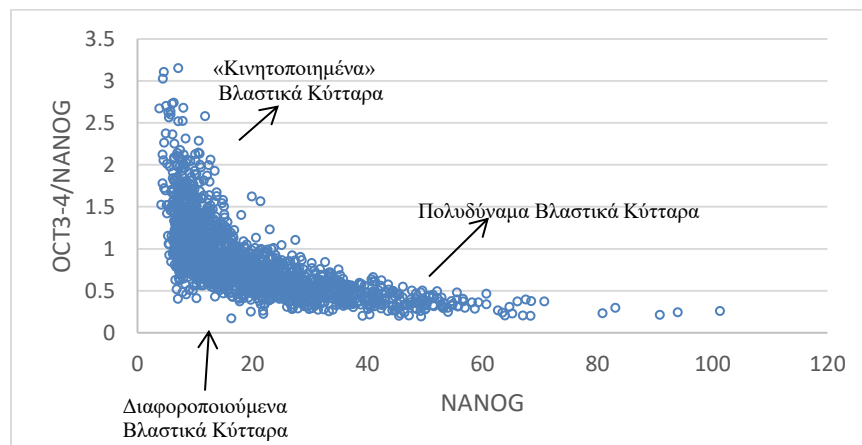


Εικόνα 3.17 Επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών Nanog και Oct4 σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα τα οποία υπερεκφράζουν λαμίνες A- και B-τύπου. Έμμεσος ανοσοφθορισμός των κυττάρων έναντι των πρωτεϊνών Nanog (κόκκινο) και Oct4 (μπλε).

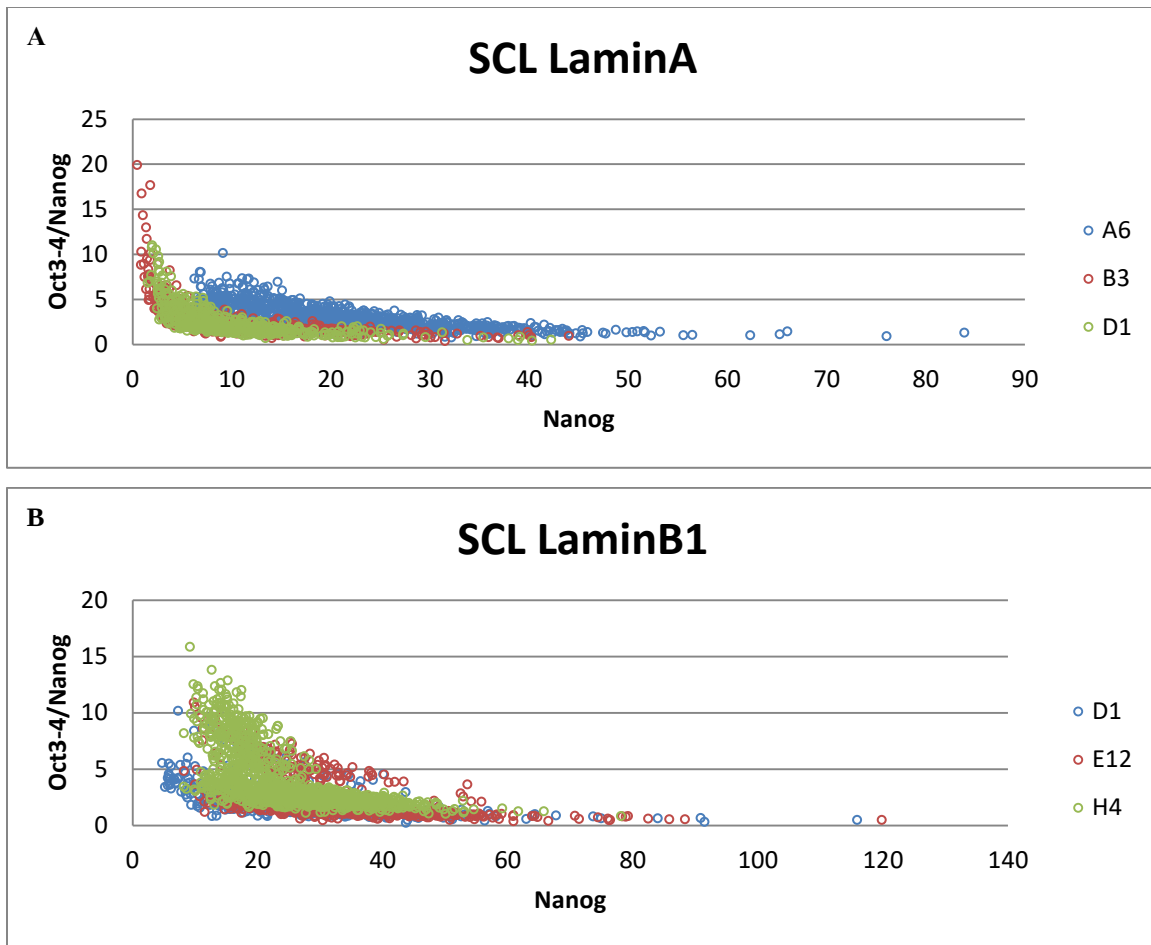


Εικόνα 3.18 Επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών Nanog και Oct4 σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα τα οποία υπερεκφράζουν λαμίνες Α- και Β-τύπου. Διαγράμματα συσχέτισης των πρωτεϊνών Nanog και Oct4 και υπολογισμός του συντελεστή συσχέτισης Pearson για κάθε περίπτωση.

Αν αναπαρασταθεί γραφικά ο λόγος Oct4:Nanog συναρτήσει των επιπέδων έκφρασης του Nanog, διαπιστώνεται ότι η πλειονότητα των κυττάρων βρίσκεται στην περιοχή που αντιπροσωπεύει τη βασική κατάσταση (ground state) κι ελάχιστα εκτείνονται προς την περιοχή των διαφοροποιούμενων. Όταν ο λόγος Oct4:Nanog είναι πολύ κοντά σε αυτή την τιμή, τα κύτταρα εμφανίζουν μεγάλη διακύμανση των επιπέδων Nanog, ενώ όταν τα επίπεδα του Nanog είναι κάτω από ένα συγκεκριμένο όριο, τα κύτταρα εμφανίζουν ποικίλες τιμές λόγου Oct4:Nanog. Επομένως, σε μια καλλιέργεια εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων μπορούν να διακριθούν τρεις υποπληθυσμοί: α) κύτταρα με υψηλή συσχέτιση Oct4 προς Nanog, κοντά στη βασική κατάσταση τα οποία αντιστοιχούν στα πολυδύναμα κύτταρα, β) κύτταρα με χαμηλά επίπεδα έκφρασης Nanog και υψηλή τιμή του λόγου Oct4:Nanog, τα οποία αντιστοιχούν στα «κινητοποιημένα» βλαστικά κύτταρα (lineage-primed cells) και γ) κύτταρα με χαμηλά επίπεδα έκφρασης τόσο Nanog όσο και Oct4, κάτω από τη βασική κατάσταση, τα οποία αντιστοιχούν στα κύτταρα που τείνουν προς διαφοροποίηση (Εικ. 3.19). Εφαρμόζοντας τις παραπάνω συσχετίσεις στις αποικίες των κλώνων που υπερεκφράζουν τη λαμίνη Β, διαπιστώνεται μία αύξηση των «κινητοποιημένων» κυττάρων με παράλληλη μείωση του ποσοστού των πολυδύναμων (εικόνα 3.20Α&Β), σε αντίθεση με τους κλώνους που υπερεκφράζουν τη λαμίνη Α, οι οποίοι διατηρούν το προφίλ των προγονικών κυττάρων E14.



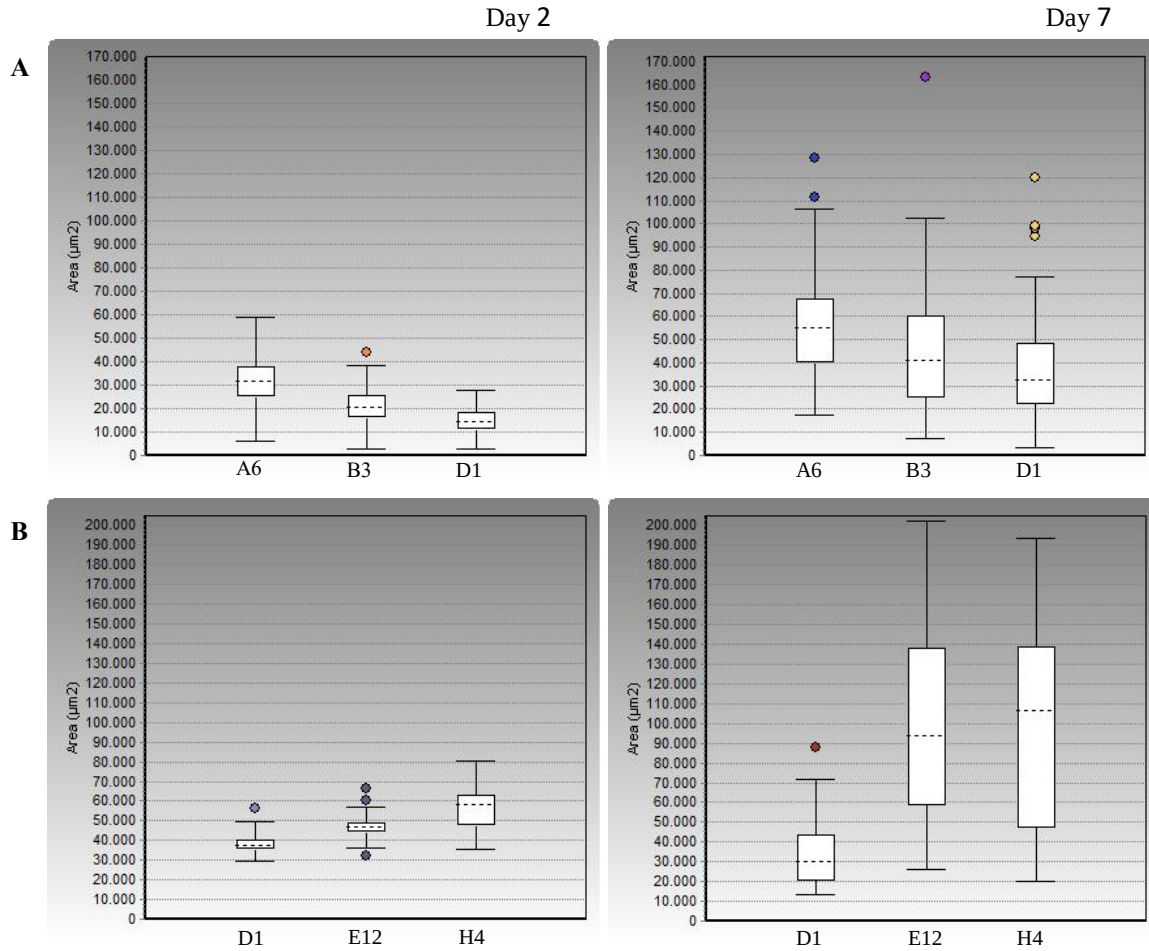
Εικόνα 3.19 Διάγραμμα του λόγου Oct4:Nanog έναντι των επιπέδων Nanog, όπου διαχωρίζονται οι τρεις υποπληθυσμοί των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων.



Εικόνα 3.20 Επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών Nanog και Oct4 σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα τα οποία υπερεκφράζουν λαμίνες Α- και Β-τύπου. Σχηματικό διάγραμμα του λόγου Oct4:Nanog έναντι των επιπέδων Nanog για τα κύτταρα που υπερεκφράζουν λαμίνες Α- και Β-τύπου.

3.2.3 Μορφολογικές παρατηρήσεις στις τρισδιάστατες καλλιέργειες των σταθερών κυτταρικών σειρών στις οποίες υπερεκφράζονται οι λαμίνες Α- και Β-τύπου.

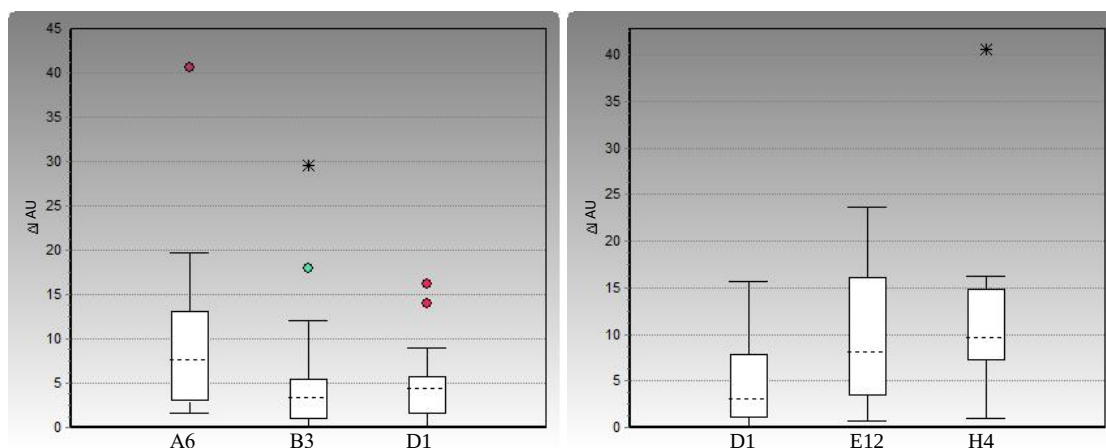
Δεδομένου ότι στη συνέχεια των πειραμάτων μας θα διερευνήσουμε την κατανομή των λαμινών στα θυγατρικά κύτταρα όλων των κλώνων που θα προκύψουν μέσω του πρωτοκόλλου Elabd et al., θεωρήσαμε σκόπιμο να παρατηρήσουμε την ανάπτυξη των EBs κατά τη διαφοροποίησή τους. Για τον λόγο αυτό αναλύσαμε ποσοτικά το μέγεθός τους κατά τη 2^η και 7^η μέρα διαφοροποίησής τους (Εικ. 3.21Α & Β).



Εικόνα 3.21 Σχηματική απεικόνιση της ανάπτυξης των κλώνων των σταθερών κυτταρικών σειρών που υπερεκφράζουν τις λαμίνες Α-τύπου (Α) και Β-τύπου (Β), υπό συνθήκες 3D διαφοροποίησης κατά τη 2^η και την 7^η ημέρα. Το μέγεθος των EBs μεταξύ των κλώνων της ίδιας κυτταρικής σειράς διαφέρει, αλλά η ανάπτυξή τους συνεχίζεται κανονικά. Σε όλους τους κλώνους που υπερεκφράζεται η λαμίνη Α-τύπου, ο μέσος όρος της τιμής της επιφάνειας των EBs σχεδόν διπλασιάζεται, κάτι το οποίο ισχύει και για τους κλώνους E12 και H4 που υπερεκφράζουν τη λαμίνη Β-τύπου. Η μόνη διαφορά που προκύπτει αφορά τον κλώνο D1 που υπερεκφράζει τη λαμίνη Β-τύπου, στον οποίο φαίνεται να μειώνεται η μέση τιμή της επιφάνειας των EBs του. Η μείωση αυτή πιθανόν να οφείλεται στον κυτταρικό θάνατο και την επακόλουθη αποδιάταξη των EBs.

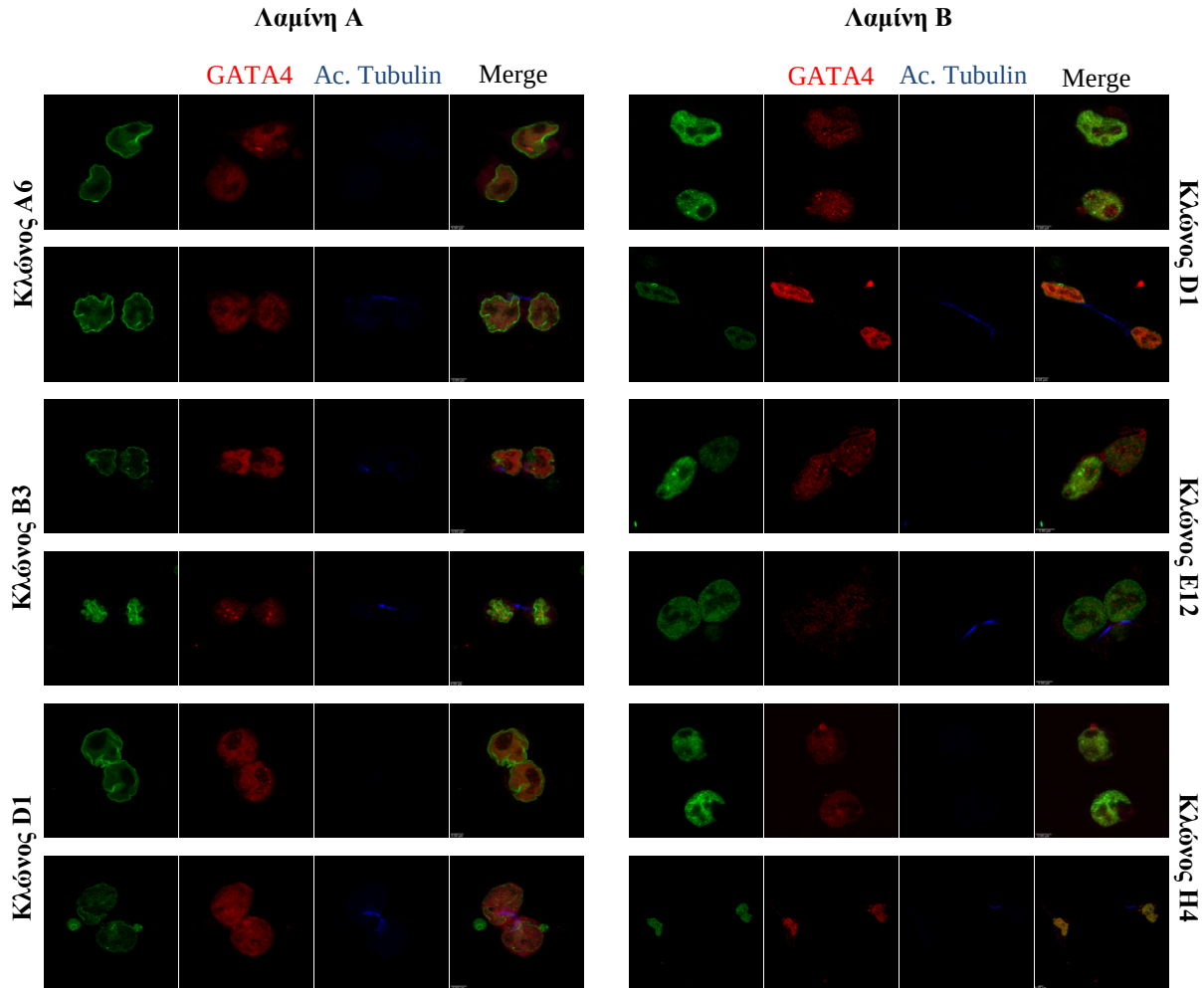
3.2.4 Μελέτη της κατανομής του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 και της κατανομής των υπερεκφρασμένων λαμινών A- & B-τύπου σε θυγατρικά κύτταρα διαφοροποιούμενων προς καρδυομυοκύτταρα.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η σύσταση της πυρηνικής λάμινας στα θυγατρικά κύτταρα που προέκυψαν από το πρωτόκολλο των Elabd et al., σε δείγματα της 7,5^{ης} ημέρας διαφοροποίησης, ακολουθώντας το τελικό σκέλος του παραπάνω πρωτοκόλλου. Στα θυγατρικά κύτταρα ποσοτικοποιήθηκαν οι υπερεκφρασμένες λαμίνες A- και B-τύπου, όπως ακριβώς έγινε για τις ενδογενείς λαμίνες στην περίπτωση των E14 κυττάρων. Από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής διαπιστώσαμε επίσης ότι η κατανομή των υπερεκφρασμένων πυρηνικών λαμινών είναι συμμετρική και ότι η διαφορά έντασης του φθορισμού μεταξύ των θυγατρικών κυττάρων καθώς και το εύρος των διαφορών της έντασης μεταξύ τους σε επίπεδο πληθυσμού, είναι μικρά (Εικ. 3.22). Τέλος, στα δείγματα αυτά μελετήθηκε η κατανομή του μεταγραφικού παράγοντα GATA4, χωρίς να παρατηρηθούν τυχόν ασυμμετρίες ως προς την έκφρασή του (Εικ. 3.23).



Εικόνα 3.22 Σχηματική απεικόνιση του εύρους των διαφορών στην ένταση του φθορισμού μεταξύ των θυγατρικών κυττάρων, υπό συνθήκες 3D διαφοροποίησης κατά την 7,5^η ημέρα. Γενικά, το εύρος που καταγράφηκε ήταν μικρό για τους κλώνους A6, B3 (που υπερεκφράζουν τη λαμίνη A-τύπου) και τους κλώνους D1 και H4 (που υπερεκφράζουν τη λαμίνη B-τύπου). Και στις δύο όμως σειρές υπάρχει ένας κλώνος (D1, που υπερεκφράζει τη λαμίνη A-τύπου, και H4, που υπερεκφράζει τη λαμίνη

B-τύπου), στα ποσοτικοποιημένα δείγματα του οποίου υπάρχει ένα ζευγάρι θυγατρικών κυττάρων των οποίων η διαφορά είναι σχεδόν διπλάσια.



Εικόνα 3.23 Ζεύγη θυγατρικών κυττάρων (συζευγμένων ή μη με μεσόσωμα) των σταθερών κυτταρικών σειρών που υπερεκφράζουν τις λαμίνες Α- και Β-τύπου. Παρατηρείται συμμετρική κατανομή του ιστοειδικού μεταγραφικού παράγοντα GATA4 σε όλους τους κλώνους και για τις δύο περιπτώσεις.

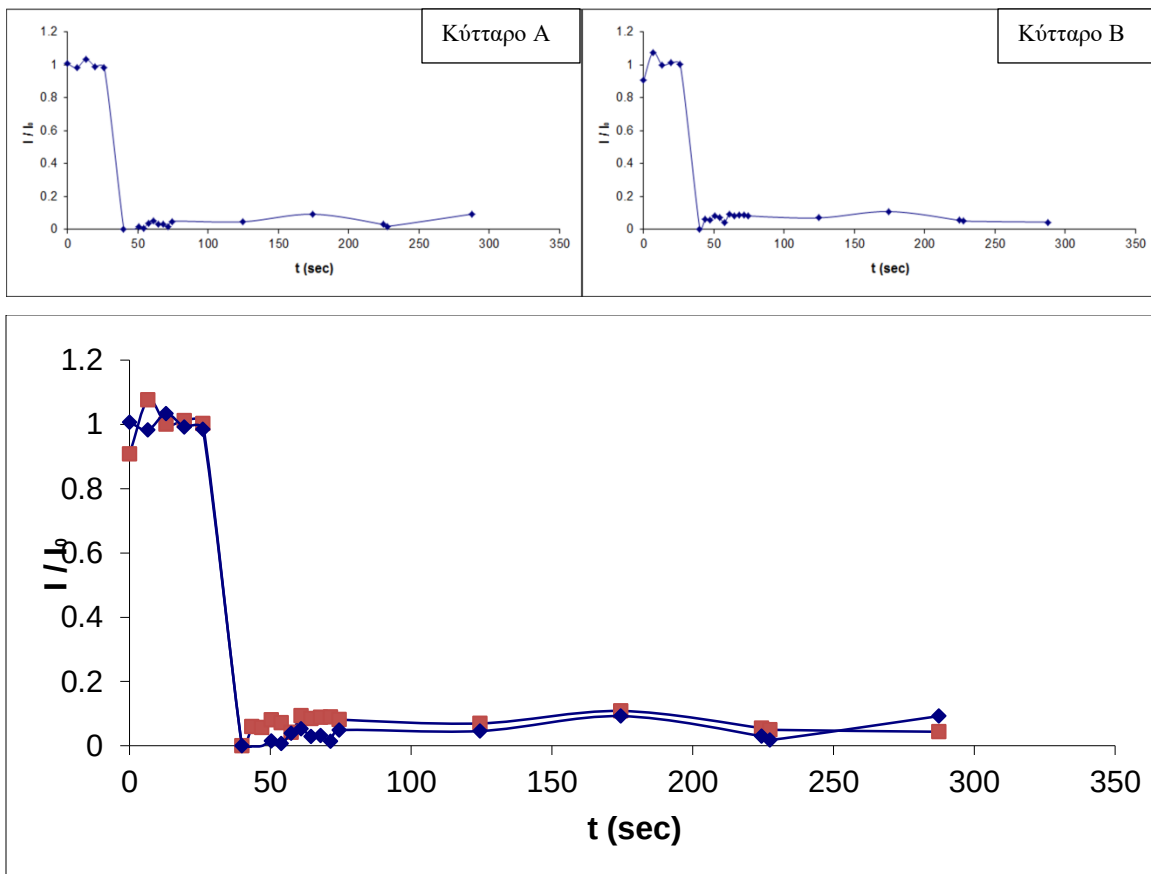
3.2.5 Μελέτη της δυναμικής των λαμινών Α- και Β-τύπου.

Προκειμένου να μελετηθεί η κινητική θυγατρικών κυττάρων των κλώνων που υπερεκφράζουν τις λαμίνες Α- και Β-τύπου, πραγματοποιήθηκαν πειράματα FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching). Δεδομένου ότι το δίκτυο της πυρηνικής

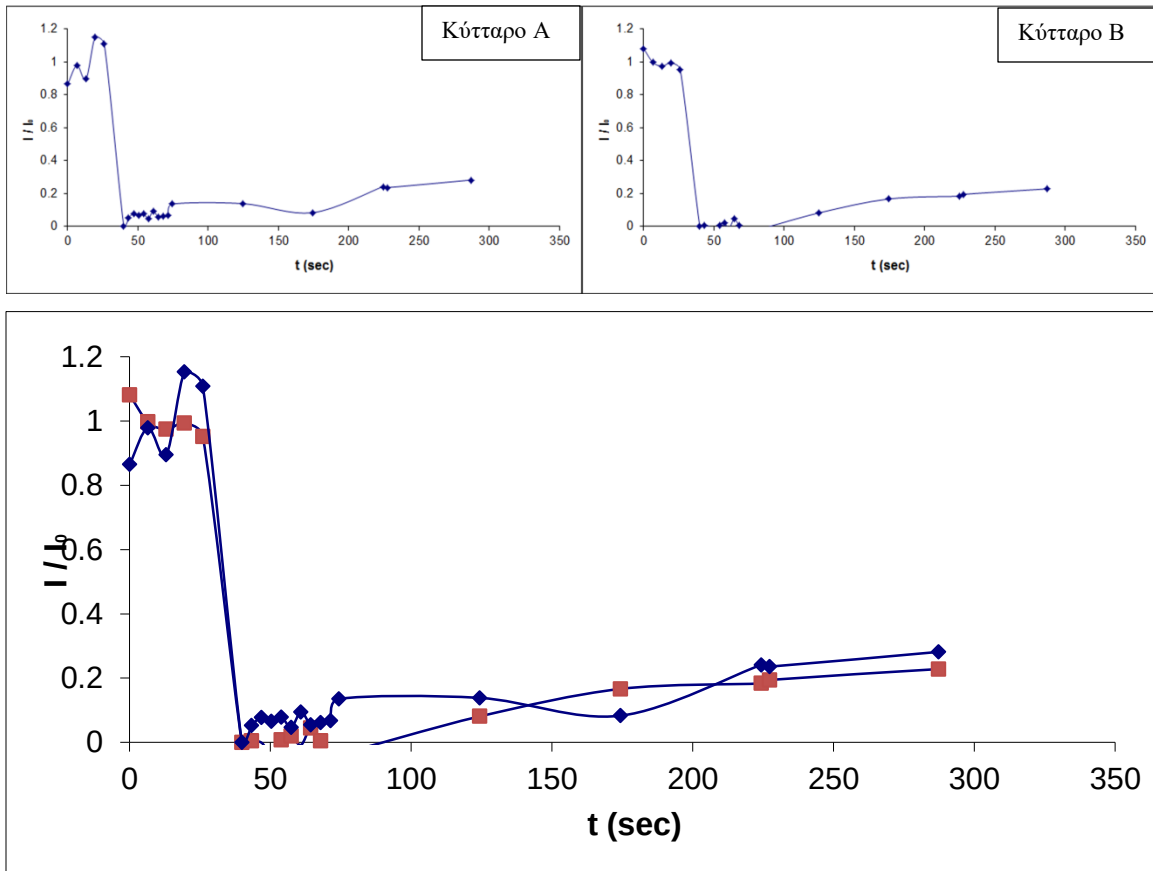
λάμινας είναι μια σταθερή και συμπαγής δομή, η συγκέντρωση ενός ικανού για στατιστική ανάλυση αριθμού πειραμάτων, είναι μια χρονοβόρα διαδικασία. Αυτό σε συνδυασμό με την επιθυμία μας να παρατηρήσουμε την κινητική θυγατρικών κυττάρων κατά την πρώιμη G1, αποτελεί μία ιδιαίτερη πρόκληση.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα καμπυλών ανάκτησης φθορισμού (μετά από κανονικοποίηση) των δύο θυγατρικών κυττάρων για καθεμία από τις σταθερές σειρές που κατασκευάσαμε, παρουσιάζεται στην εικόνα 3.23. Αυτό που προκύπτει από τα πρώιμα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων είναι ότι πρόκειται για δομές στις οποίες η ανάκτηση του φθορισμού της φωτοσκιασμένης περιοχής είναι πολύ μικρή, έως ελάχιστη, γεγονός που αντικατοπτρίζεται στο πολύ μικρό κινητικό κλάσμα που παρουσιάζουν.

Λαμίνη A



Λαμίνη Β



Εικόνα 3.23 Πειράματα FRAP. Χαρακτηριστικές καμπύλες ανάκτησης φθορισμού θυγατρικών κυττάρων μετά από φωτοσάσησκίαση των πυρηνικών λαμινών Α- και Β-τύπου. Προβάλλονται οι ξεχωριστές καμπύλες ανάκτησης φθορισμού του κάθε θυγατρικού κυττάρου (μικρότερου μεγέθους γραφήματα) και η κοινή απεικόνισή τους (μεγαλύτερου μεγέθους γραφήματα).

4. Συζήτηση

4.1 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση στα πρώτα στάδια διαφοροποίησης εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ποντικού.

Η πιθανότητα παρουσίας ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης κατά τα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ποντικού μελετήθηκε διεξοδικά σε στοχευμένες διαφοροποιήσεις νευροεξωδερμικής κατεύθυνσης. Η αναζήτησή της διενεργήθηκε σε δύο άξονες: Ο πρώτος περιελάμβανε την μελέτη των κλασικών μαρτύρων ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων που αφορούν στην πολικότητα, τη θέση (στοίχιση) της μιτωτικής ατράκτου, τον παράγοντα Numb και το μέγεθος των προκύπτωμενων θυγατρικών κυττάρων; ο δεύτερος αφορούσε τις πιθανότητες ασύμμετρης απώλειας δεικτών πολυδυναμίας ή ασύμμετρης ανάκτησης ιστοειδικών μεταγραφικών παραγόντων και δομικών πρωτεϊνών (λ.χ. τις πυρηνικές λαμίνες), οι οποίοι θα μπορούσαν να διαδραματίσουν ουσιαστικό ρόλο στις ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις. Οι προαναφερθείσες προσεγγίσεις κατέληξαν στερεότυπα στο συμπέρασμα ότι οι ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις απουσίαζαν. Ο ικανός αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν και η απόλυτη συμφωνία των πολλών διαφορετικών μαρτύρων έπειτα από ενδελεχή έλεγχο και λεπτομερή παρατήρηση παρέχουν μια δικλείδα ασφαλείας όσον αφορά τα ερευνητικά μας αποτελέσματα. Όμως, βασισμένος κάποιος στη διεθνή βιβλιογραφία όπως παρουσιάστηκε στο εισαγωγικό κεφάλαιο, θα μπορούσε να θεωρήσει ότι τα αποτελέσματα αυτά ή η στρατηγική προσέγγισης δεν είναι αρκετά ή ισχυρά ώστε να αποκλεισθεί η ύπαρξη ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων στις διαιρέσεις των διαφοροποιούμενων εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ποντικού.

Κατά την περίοδο που ξεκίνησαν στο εργαστήριό μας τα πρώτα πειράματα διερεύνησης της ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού υπήρχε μόνο η πρώτη από τις δημοσιεύσεις που συζητούνται παρακάτω. Παρόλα ταύτα, σχεδόν όλες οι ανασκοπήσεις που αφορούσαν στις ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις ξεκινούσαν με το δόγμα ότι τα βλαστικά κύτταρα διαιρούνται ασύμμετρα με το ένα από τα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν να παραμένει βλαστικό ενώ το άλλο να διαφοροποιείται. Στη συνέχεια, ανάλογα με τη θεματολογία της εκάστοτε ανασκόπησης ανέλυναν λεπτομερώς τα αντίστοιχα μοντέλα ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων που

απαντώνται στη φύση. Τελικώς, όμως, δεν υπάρχει καμία *in vitro* μελέτη που να έχει καταγράψει μία τέτοια διαίρεση σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Αντιθέτως, υπήρχαν και αρκετές δημοσιεύσεις που υπαινίσσονται την ύπαρξη ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων για να εξηγήσουν τα αποτελέσματά τους, χωρίς όμως να παρέχουν αδιαμφισβήτητα στοιχεία.

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν ουσιαστικά μόνο τρεις συναφείς μελέτες^(139,147,148). Η πρώτη αφορά ανθρώπινα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, κάνει χρήση αντίστοιχων πρωτοκόλλων διαφοροποίησης με αυτά που χρησιμοποιήσαμε και, μελετώντας έναν μόνο δείκτη (Oct4), καταλήγει στο ίδιο συμπέρασμα με αυτό της δεύτερης. Η δεύτερη παρουσιάζει ένα πρωτόκολλο επαγωγής των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ποντικού σε ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις, για να καταλήξει πως χωρίς επαγωγή δεν τις πραγματοποιούν. Τέλος, στην τρίτη δημοσίευση προβάλλεται επίσης ένα πρωτότυπο πρωτόκολλο διαφοροποίησης εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων του ανθρώπου και του ποντικού, στο οποίο παρατήρησαν ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις. Η αναπαραγωγή του στο εργαστήριό μας δεν επιβεβαιώνεται.

Συγκεντρωτικά, μπορούμε να πούμε πως όλα τα παραπάνω βιβλιογραφικά αποτελέσματα συνηγορούν με αυτά της παρούσας διατριβής ως προς την απουσία ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων υπό *in vitro* συνθήκες καλλιέργειας.

Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο, εξαιτίας των πρώτων αρνητικών αποτελεσμάτων ως προς την *in vitro* χρήση ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων στα διαφοροποιούμενα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού, διενεργήθηκε μια εκτεταμένη βιβλιογραφική ανασκόπηση για την αποσαφήνιση/εξήγηση των ευρημάτων αυτών. Όλα τα κλασσικά μοντέλα ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων αφορούν κυρίως σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους από τρεις κατηγορίες αναπτυξιακών συστημάτων (σε *in vivo* ή *ex vivo* συνθήκες καλλιέργειας): (1) ζυγωτό (*C. elegans*), (2) έμβρυο (*Drosophila*, ποντικό) και (3) βλαστικά κύτταρα ενηλίκου (π.χ. τα κύτταρα *satellite* ποντικού). Έτσι, στη θεωρητική αυτή διερεύνηση αναζητήθηκε η καταγραφή της πρώτης ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης 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 «ροών» ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων. Συνολικά 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), δηλαδή 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 η *in vitro* έρευνα στο πεδίο των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων. Μια πιο ενδελεχής μελέτη της πιο πρόσφατης σχετικής βιβλιογραφίας αναδεικνύει την πλήρη απουσία ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων τόσο κατά τη δημιουργία της ICM όσο και κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των τριών δερμάτων ⁽¹⁴⁹⁾. Χαρακτηριστική είναι μια πολύ πρόσφατη ανασκόπηση του πεδίου, η οποία αναδεικνύει την έλλειψη ουσιαστικών αποδείξεων και για τα τρία χαρακτηριστικά μιας ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης (πολικότητα, στοίχιση ατράκτου και ασύμμετρη κατανομή παραγόντων καθορισμού της κυτταρικής τύχης. Οι παρατηρήσεις των προαναφερθεισών εργασιών αναδεικνύουν την βιβλιογραφικώς εσφαλμένη άποψη για την ύπαρξη ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων στη φύση. Επιπλέον, υποστηρίζουν τα ευρήματα της παρούσας μελέτης και έτσι η *in vitro* αλλά και *in vivo* απουσία ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων σε τόσο πρώιμα στάδια της ανάπτυξης θα πρέπει να θεωρείται δεδομένη. Τέλος, σε ότι αφορά την *in vivo* παρουσία ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων, αυτή έχει παρατηρηθεί σε μεταγενέστερα στάδια της εμβρυογένεσης, κατά την οργανογένεση, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα την νευρογένεση (μεταξύ 12^{ης} και 16^{ης} εμβρυονικής ημέρας ανάπτυξης).

4.2 Ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση και εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα κατά τη διαφοροποίηση σε τρεις διαστάσεις.

Η πιο σχετική βιβλιογραφική αναφορά ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων στο πεδίο των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ποντικού είναι η εργασία των Elabd et. al.. Η συγκεκριμένη δημοσίευση είναι η πρώτη που ισχυρίζεται πως τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ανθρώπου και ποντικού διαφοροποιούνται με ασύμμετρες κυτταρικές

διαιρέσεις. Η διαφωνία των αποτελεσμάτων μας με αυτά της παραπάνω εργασίας έχει προαναφερθεί, είναι όμως σκόπιμο να σχολιαστούν τα σημεία απόκλισης μεταξύ των ευρημάτων μας και της εν λόγω μελέτης:

- Οι Elabd et. al., προτείνουν ένα ιδιαίτερα «στρεσογόνο» σύστημα για τα κύτταρα που προκύπτουν. Περαιτέρω έκπτυξή 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 μονήρων 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 αραιής επίστρωσης), οδηγώντας σε θάνατο ή έξοδο από τον κύκλο στα υπόλοιπα, ακόμα και στα μόλις σχηματισμένα θυγατρικά κύτταρα.
- Παρά το γεγονός ότι χρησιμοποίησαν αυστηρά κριτήρια για να διακρίνουν τυχαία κυτταρικά ζεύγη από πραγματικά θυγατρικά κύτταρα και παρότι αξιολόγησαν επίσης το πειραματικό/διαδικαστικό σφάλμα, όταν το δείγμα δεν αποτελείται από μιτωτικά κύτταρα, είναι αδύνατον να αποκλειστεί η πιθανότητα 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 ακολουθώντας την παραπάνω διαδικασία. Επιπλέον, με τον τρόπο αυτό επιλήθηκε το πρόβλημα που προέκυπτε από την τόσο «στρεσογόνα» αραιή έκπτυξή τους, που, ως γνωστόν, δεν συνάδει με φυσιολογική ανάπτυξη εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων όσο και της αναζήτησης μιτωτικών κυττάρων προχωρημένου σταδίου (ανάφαση-τελόφαση) η οποία θα απαιτούσε ανάλυση τεράστιου δείγματος, δεδομένης της σχετικής σπανιότητας των μιτωτικών κυττάρων.

Η εφαρμογή αυτού του πρωτοκόλλου και στις σταθερές κυτταρικές σειρές που υπερεκφράζουν τις λαμίνες A- και B-τύπου επίσης δεν οδήγησε στην εύρεση ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων μεταξύ θυγατρικών κυττάρων.

Συνολικά, η χρήση του πρωτοκόλλου των Elabd et al., ενίσχυσε τα αποτελέσματά μας προς την αντίθετη κατεύθυνση: δεν καταγράφηκε καμία απολύτως ασυμμετρία στην κατανομή των πρωτεϊνών-δεικτών ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων (Numb, Par6, aPKCz), των παραγόντων πολυδυναμίας (Nanog, Oct3/4) και των ιστοειδικών μεταγραφικών παραγόντων (GATA4), καθώς επίσης και στη σύσταση των πυρηνικών φακέλων και στην κατανομή των πυρηνικών λαμινών A- και B-τύπου.

4.3 Ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση και δυναμική των πυρηνικών λαμινών A- και B-τύπου.

Η χρήση των τεχνικών καταγραφής των διακυμάνσεων του φθορισμού (FRAP, FLIP, FCS κα) έχει επιτρέψει την μελέτη των κυτταρικών φαινομένων σε πραγματικό χρόνο. Ωστόσο, σε πολλές από τις «F-τεχνικές» οι βιολογικές επιφάνειες θεωρούνται απλά επίπεδες ή σφαιρικές. Η επίδραση, όμως, της γεωμετρίας της επιφάνειας στην κινητική διαφόρων πρωτεϊνών δεν μπορεί να αγνοηθεί, καθώς η διάχυση μεμβρανικών πρωτεϊνών είναι αρκετά διαφορετική από αυτή των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών ή αυτών του αυλού του ενδοπλασματικού δικτύου, με διαφορά των χρόνων ημι-ανάκτησης να πλησιάζει ακόμη και τις τέσσερις τάξεις μεγέθους ⁽¹⁵⁰⁾. Ο πυρηνικός φάκελος είναι μια εξαιρετικά ασύμμετρη βιολογική διεπιφάνεια καθώς η καμπυλότητά του ποικίλει από περιοχή σε περιοχή. Ο αριθμός και η γεωμετρία των δεξαμενών του ενδοπλασματικού δικτύου που συνδέονται στην εξωτερική επιφάνεια του πυρηνικού φακέλου ποικίλει σημαντικά, επηρεάζοντας την εισροή μορίων από το ενδοπλασματικό δίκτυο προς την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη. Αν σε αυτά συνυπολογίσουμε το γεγονός ότι οι πυρηνικές μεμβράνες συνδέονται άμεσα με μακρομοριακές δομές οι οποίες κατανέμονται ανομοιογενώς, όπως το δίκτυο της πυρηνικής λάμινας και η ετεροχρωματίνη, ο βαθμός πολυπλοκότητας του συστήματος αυξάνεται ακραία. Με δεδομένη αυτήν την πολυπλοκότητα είναι ίσως παράδοξο ότι οι μέχρι τώρα μελέτες

σχετικά με τη δυναμική των πρωτεϊνών της πυρηνικής μεμβράνης δεν ανίχνευσαν ποσοτικές διαφορές οφειλόμενες στις παραπάνω ασυμμετρίες.

Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω, για να μελετήσουμε συστηματικά τη δυναμική των πυρηνικών λαμινών A- και B-τύπου, χρησιμοποιήσαμε την τεχνική FRAP. Η τεχνική της ανάκτησης φθορισμού έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε πολλές μελέτες, επιτρέποντας την άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων μας με εκείνα άλλων. Επιπλέον, επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των δυναμικών παραμέτρων υπό συνθήκες υψηλής ανάλυσης, σημαντικό για την αξιοπιστία των δεδομένων. Παρά τα πλεονεκτήματά της, όμως, η τεχνική FRAP έχει και τους περιορισμούς της⁽¹⁵¹⁾.

Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στον ρόλο της πυρηνικής λάμινας στις ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις και, μεταξύ άλλων, συμπεριλαμβάνει τη μελέτη της κινητικής της. Για τον λόγο αυτό κατασκευάσαμε τις δύο κυτταρικές σειρές στις οποίες υπερεκφράζονται οι λαμίνες A- και B-τύπου. Με αντικειμενικό σκοπό την καταγραφή κάποιας ασυμμετρίας μεταξύ θυγατρικών κυττάρων, έπρεπε να μελετήσουμε κύτταρα τα οποία να είναι μεταξύ τους θυγατρικά και να βρίσκονται στην πρώιμη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, κατά την οποία έχει μόλις ανασυγκροτηθεί ο πυρηνικός φάκελος, και κατά συνέπεια το δίκτυο της πυρηνικής λάμινας. Επομένως και προκειμένου να «καλύψουμε» αυτά τα δύο σημεία ενδιαφέροντος, επιλέγαμε κύτταρα των οποίων η μορφή αντιστοιχούσε στην πρώιμη G1 φάση και χρησιμοποιούσαμε μία ROI σε σχήμα παραλληλόγραμμου, σταθερού ύψους 2μm, αλλά προσαρμοσμένου μήκους (το οποίο συμπεριελάμβανε και τα δύο θυγατρικά κύτταρα) για κάθε ζεύγος κυττάρων. Οι καμπύλες ανάκτησης φθορισμού που προέκυψαν με αυτές τις παραμέτρους, δεν μας επέτρεψαν να εξάγουμε σαφή συμπεράσματα. Δεδομένης της ανομοιομορφίας «χωροταξικής» κατανομής των συστατικών του πυρήνα των κυττάρων, σε μία ROI που εκτείνεται κατά μήκος του είναι δυνατόν να συμπεριληφθούν περιοχές διαφορετικής «σύστασης» (περιοχές που εμφανίζονται πυρηνίσκοι ή πτυχώσεις/αυλακώσεις της πυρηνικής λάμινας). Για τον λόγο αυτό, προσαρμόσαμε τις παραμέτρους που αφορούν την ROI. Η νέα σειρά πειραμάτων FRAP πραγματοποιείται σε κύτταρα των σταθερών κυτταρικών σειρών, διαμολυσμένα μέσω ηλεκτροδιαπίδυσης με την φθορίζουσα ιστόνη H2B, ώστε να εξασφαλίσουμε μέσω των χρωμοσωμάτων τη μεταξύ τους «συγγένεια»

και να προσδιορίσουμε επακριβώς σε ποια φάση του κυτταρικού κύκλου βρίσκονται. Η ROI που χρησιμοποιείται περιλαμβάνει ένα μικρό τμήμα του πυρηνικού φακέλου στο οποίο είναι ευδιάκριτος ο «δακτύλιος» της πυρηνικής λάμινας και είναι προσαρμοσμένου μεγέθους για κάθε ζεύγος κυττάρων, αλλά ακριβώς η ίδια σε διαστάσεις. Τα πειράματα αυτά βρίσκονται σε εξέλιξη και δε μπορούμε να εξάγουμε, προς το παρόν, ασφαλή συμπεράσματα. Η μεγάλη διάρκεια του κάθε FRAP πειράματος, η κινητικότητα που εμφανίζουν τα κύτταρα καθώς επίσης και η δύσκολη εύρεση τελοφασικών κυττάρων επιτυχώς διαμολυσμένων με την φθορίζουσα ιστόνη H2B, δυσχεραίνουν τη συγκέντρωση μεγάλου αριθμού πειραμάτων.

5. Συμπεράσματα

Συμπεράσματα

- Στα πρώτα στάδια της στοχευμένης και σε δύο διαστάσεις διαφοροποίησης εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ποντικού σε *in vitro* συνθήκες δεν παρατηρούνται ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις. Η κατανομή στοιχείων πολικότητας, καθοριστικών παραγόντων κυτταρικής τύχης, παραγόντων πολυδυναμίας, μαρτύρων ιστοειδικότητας και των πρωτεϊνών του πυρηνικού φακέλου στα θυγατρικά κύτταρα γίνεται με απόλυτα συμμετρικό τρόπο.
- Κατά τη τρισδιάστατη διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ποντικού προς μεσόδερμα σε *in vitro* συνθήκες παρατηρείται ό,τι και στην περίπτωση της διαφοροποίησης σε δύο διαστάσεις.
- Η λεπτομερής μελέτη της κινητικής των θυγατρικών κυττάρων προϋποθέτει μεγάλο αριθμό πειραμάτων FRAP υπό κατάλληλες πειραματικές συνθήκες.

6. Περίληψη

Καθοριστικοί παράγοντες της Ασύμμετρης Κυτταρικής Διαίρεσης:

Ο ρόλος της Πυρηνικής Λάμινας.

Πότση Ντιάνα-Μαρία

Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση αποτελεί μια θεμελιώδη βιολογική διαδικασία μέσω της οποίας βλαστικά ή πολυδύναμα προγονικά κύτταρα αναπαράγουν τον εαυτό τους, δίνοντας ταυτόχρονα απογόνους που μπορούν να διαφοροποιηθούν προς διάφορες ιστικές κατευθύνσεις. Το φαινόμενο έχει μελετηθεί επισταμένα σε εξελικτικώς κατώτερους οργανισμούς, αλλά ορισμένα κρίσιμα ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα σε ό,τι αφορά τα ανώτερα είδη.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αφορά ένα τέτοιο ερώτημα και εστιάζεται στη διερεύνηση τυχόν ασυμμετριών στην πυρηνική λάμινα, μια ινιδιακής φύσεως δομή που επηρεάζει την αρχιτεκτονική του πυρήνα και φαίνεται να συμμετέχει στη γονιδιακή αποσιώπηση σε όλα τα μετάζωα. Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα E14 από ποντίκια. Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (EBK, embryonic stem cells, ESCs) έχουν την ιδιότητα της απεριόριστης αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησης προς όλες τις ιστικές κατευθύνσεις. Στόχος μας ήταν η καταγραφή ασύμμετρων κυτταρικών και η ανίχνευση ποσοτικών ή ποιοτικών διαφορών στο «μείγμα» Α- και Β-τύπου λαμινών στα θυγατρικά κύτταρα. Τα κύτταρα E14 μελετήθηκαν τόσο στην αδιαφοροποίητη όσο και στη διαφοροποιημένη κατάσταση. Κατά τη διάρκεια των διαφοροποιήσεων πραγματοποιήθηκε ενδελχής έλεγχος κλασσικών δεικτών για όλα τα στάδια μιας ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης και διερευνήθηκαν άλλοι παράγοντες ως προς την συμμετρική ή ασύμμετρη κατανομή τους, μεταξύ των οποίων και οι λαμίνες Α- και Β-τύπου. Πραγματοποιήθηκαν τυχαίες και στοχευμένες διαφοροποιήσεις τόσο σε δύο όσο και σε τρεις διαστάσεις.

Παρατηρήθηκε συστηματικά ότι τα κύτταρα E14διαιρούνται πάντοτε με συμμετρικό τρόπο. Επομένως, εστιάσαμε την προσοχή μας σε τυχόν δομικές ασυμμετρίες, που επηρεάζουν τη μικρο-αρχιτεκτονική της πυρηνικής λάμινας ή τροποποιούν τη δυναμική συμπεριφορά της, δηλαδή την αντιστρεπτή αποικοδόμηση την οποία υφίσταται αυτή η δομή κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Για να μελετήσουμε με περισσότερη λεπτομέρεια τη δυναμική των πυρηνικών λαμινών, αναπτύξαμε δύο κυτταρικές σειρές στις οποίες υπερεκφράζονται οι πρωτεΐνες αυτές και χρησιμοποιήσαμε την τεχνική FRAP. Έχοντας ως άξονα την καταγραφή κάποιας ασυμμετρίας μεταξύ θυγατρικών κυττάρων, έπρεπε να μελετήσουμε κύτταρα τα οποία είναι μεταξύ τους θυγατρικά και βρίσκονται στην πρώιμη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, κατά την οποία ανασυγκροτείται ο πυρηνικός φάκελος, και κατά συνέπεια το δίκτυο της πυρηνικής λάμινας. Η σειρά πειραμάτων FRAP πραγματοποιείται στα κύτταρα των σταθερών κυτταρικών σειρών, διαμολυσμένα μέσω ηλεκτροδιαπίδυσης με την φθορίζουσα ιστόνη H2B. Τα πειράματα αυτά βρίσκονται σε εξέλιξη.

SUMMARY

Defining determinants of Asymmetric Cell Division:

The role of nuclear lamina.

Potsi Diana-Maria

The asymmetric cell division constitutes a fundamental biological process through which pluripotent stem cells or progenitor cells can both divide (through mitosis) to produce more stem cells and differentiate into all the specialized cells - ectoderm, endoderm and mesoderm. This kind of division has been thoroughly investigated in evolutionarily simple organisms. However, some critical queries concerning the higher species remain unanswered.

This thesis refers to such a query focusing on possible asymmetries in the nuclear lamina, a dense fibrillar network on the surface of the nucleus that affects the architecture of the organelle and seems to participate in the control of gene expression in all metazoans. In the experiments we conducted we used E14 mouse embryonic stem cells. Embryonic stem cells possess the ability of self-renewing indefinitely in the undifferentiated state and differentiate into any cell type. Our goal was to monitor asymmetric cell divisions in this cellular system and determine any quantitative or qualitative differences of A- and B-type lamins. Cells were studied not only in an undifferentiated state but also in a differentiated one. Classic markers of the asymmetric cell division and other cellular elements, such as lamins, were scrutinized during the differentiation procedure, focusing on their symmetric or asymmetric distribution. We carried out both random and directed differentiation experiments in two (2) and three (3) dimensions.

Exhausting analysis showed that E14 cells always divide by symmetric divisions. Therefore, we wanted to examine whether there are any structural asymmetries that affect the micro-architecture of the nuclear lamina or modify its dynamic behavior during

mitosis. In order to thoroughly study the dynamic of both A- and B-type lamins, we constructed two cell lines that overexpress these proteins and used them in FRAP experiments. Having as our main aim the monitoring of an asymmetry between two daughter cells, we had to examine actual daughter cells in the stage of early G1 of the cell cycle, during which the nuclear envelope and, therefore, the nuclear lamina, is reorganized. Lamin-overexpressing cells were transfected with the H2B m-cherry plasmid, to ensure that the cells analysed were genuine daughter. These experiments are in progress.

7. Βιβλιογραφία

1. Gerace L, Blobel G. The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* . 1980; 19: 277–87
2. Zhang C, Jenkins H, Goldberg MW, Allen TD, and Hutchison CJ. Nuclear lamina and nuclear matrix organization in sperm pronuclei assembled in *Xenopus* egg extract. *J Cell Sci*, 1996, 109: 2275– 2286
3. Foisner R. Cell Cycle Dynamics of the Nuclear Envelope. *The scientific world journal*, 2003, 3, 1–20
4. Fisher D.Z., Chaudhary N., Blobel G. CDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(17):6450-4
5. Stuurman N, Heins S, Aebi U. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol* . 1998; 122: 42–66
6. Frangioni JV and Neel BG. Use of a general purpose mammalian expression vector for studying intracellular protein targeting: identification of critical residues in the nuclear lamin A/C nuclear localization signal. *J Cell Sci*, 1993, 105: 481–488
7. Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds. *Annu Rev Biochem* . 2004; 74: 749–89
8. Krimm I, Ostlund C, Gilquin B, Couprie J, Hossenlopp P, Mornon JP, Bonne G, Courvalin JC, Worman HJ, Zinn-Justin S. The Ig-like structure of the C-terminal domain of lamin a/c, mutated in muscular dystrophies, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy. *Structure* . 2002; 10: 811–23
9. Krohne G, Waizenegger I, and Heger TH. The conserved carboxy-terminal cysteine of nuclear lamins is essential for lamin association with the nuclear envelope. *J Cell Biol* , 1989,109: 2003–2011
10. Vorburger K, Kitten GT, and Nigg EA. Modification of nuclear lamin proteins by a mevalonic acid derivative occurs in reticulocyte lysates and requires the cysteine residue of the C-terminal CXXM motif. *EMBO J*, 1989, 8: 4007–4013
11. Furukawa K, Inagaki H, and Hotta Y. Identification and cloning of an mRNA coding for a germ cell-specific A-type lamin in mice. *Exp Cell Res*, 1994, 212: 426–430
12. MachielsBM,ZorencAHG,EndertJM,KuijpersHJH,vanEys GJJM, Ramaekers FCS, and Broers JLV. An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10. *J Biol Chem*, 1996, 271: 9249–9253
13. Biamonti G, Giacca M, Perini G, Contreas G, Zentilin L, Weighardt F, Guerra M, Della Valle G, Saccone S, Riva S, and Falaschi A. The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. *Mol Cell Biol*, 1992, 12: 3499–3506
14. Furukawa K. LAP2 binding protein 1 (L2BP1/BAF) is a candidate mediator of LAP2-chromatin interaction. *J Cell Sci*, 1999, 112: 2485–2492
15. Melanie A. Eckersley-Maslin,^{1,2} Jan H. Bergmann,¹ Zsolt Lazar,¹ and David L. Spector^{1,2,*} Lamin A/C is Expressed in Pluripotent Mouse Embryonic Stem Cells Nucleus. 2013 Jan 1; 4(1): 53–60

16. Shao H, Yang,¹ Sandy Y, Chang,¹ Liya Yin,¹ Yiping Tu,¹ Yan Hu,¹ Yuko Yoshinaga,³ Pieter J. de Jong,³ Loren G. Fong,^{1,*} and Stephen G. Young^{1,2,*} An absence of both lamin B1 and lamin B2 in keratinocytes has no effect on cell proliferation or the development of skin and hair *Hum Mol Genet.* 2011 Sep 15; 20(18): 3537–3544
17. Peter M, Nakagawa J, Dore'e M, Labbe' JC, and Nigg EA. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell*, 1990, 61: 591–602
18. Collas P, Thompson L, Fields AP, Poccia DL, and Courvalin JC. Protein kinase C-mediated interphase lamin B phosphorylation and solubilization. *J Biol Chem*, 1997, 272: 21274–21280
19. Steen RL, Martins SB, Tasken K, and Collas P. Recruitment of protein phosphatase 1 to the nuclear envelope by A-kinase anchoring protein AKAP¹⁴⁹ is a prerequisite for nuclear lamina assembly. *J Cell Biol*, 2000, 150: 1251–1262
20. Farnsworth CC, Wolda SL, Gelb MH, and Glomset JA. Human lamin B contains a farnesylated cysteine residue. *J Biol Chem*, 1989, 264: 20422–20429
21. Sinensky M, Fantle K, Trujillo M, McLain T, Kupfer A, and Dalton M. The processing pathway of prelamin A. *J Cell Sci*, 1994, 107: 61–67
22. ChelskyD,OlsonJF,andKoshlandDEJr.Cell cycle-dependent methyl esterification of lamin B. *J Biol Chem*, 1987, 262: 4303–4309
23. Chelsky D, Sobotka C, and O'Neill CL. Lamin B methylation and assembly into the nuclear envelope. *J Biol Chem*, 1989, 264: 7637
24. Bergo MO, Gavino B, Ross J, Schmidt WK, Hong C, Kendall LV, Mohr A, Meta M, Genant H, Jiang Y, Wisner ER, Van Bruggen N, Carano RA, Michaelis S, Griffey SM, and Young SG. Zmpste24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 13049–13054
25. Dechat T, Gajewski A, Korbei B, Gerlich D, Daigle N, Haraguchi T, Furukawa K, Ellenberg J, and Foissner R. LAP2alpha and BAF transiently localize to telomeres and specific regions on chromatin during nuclear assembly. *J Cell Sci*, 2004, 117: 6117–6128
26. Harris CA, Andryuk PJ, Cline SW, Mathew S, Siekierka JJ, and Goldstein G. Structure and mapping of the human thymopoietin (TMPO) gene and relationship of human TMPO beta to rat lamin-associated polypeptide 2. *Genomics*, 1995, 28: 198–205
27. Gant TM, Harris CA, and Wilson KL. Roles of LAP2 proteins in nuclear assembly and DNA replication: truncated LAP2beta proteins alter lamina assembly, envelope formation, nuclear size, and DNA replication efficiency in *Xenopus laevis* extracts. *J Cell Biol*, 1999, 144: 1083–1096
28. Yang L, Guan T, and Gerace L. Lamin-binding fragment of LAP2 inhibits increase in nuclear volume during the cell cycle and progression into S phase. *J Cell Biol*, 1997,139: 1077–1087

29. Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, and Weber K. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci*, 2001, 114: 4557–4565
30. Dechat T, Vlcek S, and Foisner R. Lamina-associated polypeptide 2 isoforms and related proteins in cell cycle-dependent nuclear structure dynamics. *J Struct Biol*, 2000, 129: 335–345
31. Manilal S, Nguyen TM, Sewry CA, and Morris GE. The EmeryDreifuss muscular dystrophy protein, emerin, is a nuclear membrane protein. *Hum Mol Genet*, 1996,5: 801–808
32. Nagano A, Koga R, Ogawa M, Kurano Y, Kawada J, Okada R, Hayashi YK, Tsukahara T, and Arahata K. Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet*, 1996, 12: 254–259
33. Vaughan A, Alvarez-Reyes M, Bridger JM, Broers JL, Ramaekers FC, Wehnert M, Morris GE, Whitfield WGF, and Hutchison CJ. Both emerin and lamin C depend on lamin A for localization at the nuclear envelope. *J Cell Sci*, 2001,114: 2577–2590
34. Gareiss M, Eberhardt K, Kruger E, Kandert S, Bohm C, Zentgraf H, Muller CR, and Dabauvalle MC. Emerin expression in early development of *Xenopus laevis*. *Eur J Cell Biol* , 2005,84: 295–309
35. Lin F, Blake DL, Callebaut I, Skerjanc IS, Holmer L, McBurney MW, Paulin-Levasseur M, and Worman HJ. MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated polypeptide 2 and emerin. *J Biol Chem* , 2000,275: 4840– 4847
36. Liu J, Lee KK, Segura-Totten M, Neufeld E, Wilson KL, and Gruenbaum Y. MAN1 and emerin have overlapping function(s) essential for chromosome segregation and cell division in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2003,100: 4598–4603
37. Worman HJ, Yuan J, Blobel G, and Georgatos SD. A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 8531–8534
38. Yuan J, Simos G, Blobel G, Georgatos SD. Binding of lamin A to polynucleosomes. *J Biol Chem* . 1991; 266: 9211–5
39. Apel ED, Lewis RM, Grady RM, and Sanes JR. Syne-1, a dystrophin- and Klarsicht-related protein associated with synaptic nuclei at the neuromuscular junction. *J Biol Chem*, 2000, 275: 31986–31995
40. Zhang Q, Skepper JN, Yang F, Davies JD, Hegyi L, Roberts RG, Weissberg PL, Ellis JA, and Shanahan CM. Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *J Cell Sci*, 2001, 114: 4485– 4498
41. Zhang Q, Ragnauth CD, Skepper JN, Worth NF, Warren DT, Roberts RG, Weissberg PL, Ellis JA, and Shanahan CM. Nesprin-2 is a multi-isomeric protein that

binds lamin and emerin at the nuclear envelope and forms a subcellular network in skeletal muscle. *J Cell Sci*, 2005, 118: 673–687

42. Cottrell JR, Borok E, Horvath TL, and Nedivi E. CPG2: a brain and synapse-specific protein that regulates the endocytosis of glutamate receptors. *Neuron*, 2004, 44: 677–690

43. Mislow J, Holaska J, Kim M, Lee K, Segura-Totten M, Wilson K, and McNally E. Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro. *FEBS Lett*, 2002, 525: 135

44. Zhang Q, Ragnauth C, Greener MJ, Shanahan CM, and Roberts RG. The nesprins are giant actin-binding proteins, orthologous to *Drosophila* melanogaster muscle protein MSP-300. *Genomics*, 2002, 80: 473–481

45. Libotte T, Zaim H, Abraham S, Padmakumar VC, Schneider M, Lu W, Munck M, Hutchison C, Wehnert M, Fahrenkrog B, Sauder U, Aebi U, Noegel AA, and Karakesisoglou I. Lamin A/C-dependent localization of Nesprin-2, a giant scaffold at the nuclear envelope. *Mol Biol Cell*, 2005, 16: 3411–3424

46. Wilhelmsen K, Litjens SH, Kuikman I, Tshimbalanga N, Janssen H, van den Bout I, Raymond K, and Sonnenberg A. Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J Cell Biol*, 2005, 171: 799–810

47. Broers JL, Peeters EA, Kuijpers HJ, Endert J, Bouten CV, Oomens CW, Baaijens FP, and Ramaekers FC. Decreased mechanical stiffness in LMNA-_____ cells is caused by defective nucleocytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies. *Hum Mol Genet*, 2004, 13: 2567–2580

48. Broers JLV, Machiels BM, van Eys GJJ, Kuijpers HJH, Manders EMM, van Driel R, and Ramaekers FCS. Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. *J Cell Sci*, 1999, 112: 3463–3475

49. Prufert K, Vogel A, and Krohne G. The lamin CxxM motif promotes nuclear membrane growth. *J Cell Sci*, 2004, 117: 6105–6116

50. McClintock D, Gordon LB, and Djabali K. Hutchinson-Gilford progeria mutant lamin A primarily targets human vascular cells as detected by an anti-Lamin A G608G antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 2154–2159

51. Moir RD, Spann TP, Lopez-Soler RI, Yoon M, Goldman AE, Khuon S, and Goldman RD. Review: the dynamics of the nuclear lamins during the cell cycle—relationship between structure and function. *J Struct Biol*, 2000, 129: 324–334

52. Ward GE and Kirschner MW. Identification of cell-cycle regulated phosphorylation sites on nuclear lamin C. *Cell*, 1990, 61: 561–577

53. Georgatos SD¹, Pyrpassopoulou A, Theodoropoulos PA. Nuclear envelope breakdown in mammalian cells involves stepwise lamina disassembly and microtubule-driven deformation of the nuclear membrane. *J Cell Sci*. 1997 Sep;110 (Pt 17):2129–40

54. Beaudouin J, Gerlich D, Daigle N, Eils R, and Ellenberg J. Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina. *Cell*, 2002, 108: 83–96,
55. Daigle N, Beaudouin J, Hartnell L, Imreh G, Hallberg E, Lippincott-Schwartz J, and Ellenberg J. Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells. *J Cell Biol*, 2001, 154: 71–84
56. Haraguchi T, Koujin T, Hayakawa T, Kaneda T, Tsutsumi C, Imamoto N, Akazawa C, Sukegawa J, Yoneda Y, and Hiraoka Y. Live fluorescence imaging reveals early recruitment of emerin, LBR, RanBP2, and Nup153 to reforming functional nuclear envelopes. *J Cell Sci*, 2000, 113: 779–794
57. Chaudhary N and Courvalin JC. Stepwise reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *J Cell Biol* 122: 295–306, 1993
58. Liu J, Ben-Shahar TR, Riemer D, Treinin M, Spann P, Weber K, Fire A, and Gruenbaum Y. Essential roles for *Caenorhabditis elegans* lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes. *Mol Biol Cell*, 2000, 11: 3937–3947
59. Liu R, Liu H, Chen X, Kirby M, Brown PO, and Zhao K. Regulation of CSF1 promoter by the SWI/SNF-like BAF complex. *Cell*, 2001, 106: 309–318
60. Zheng R, Ghirlando R, Lee MS, Mizuuchi K, Krause M, and Craigie R. Barrier-to-autointegration factor (BAF) bridges DNA in a discrete, higher-order nucleoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 8997–9002
61. Clements L, Manilal S, Love DR, and Morris GE. Direct interaction between emerin and lamin A. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 267: 709–714
62. Sakaki M, Koike H, Takahashi N, Sasagawa N, Tomioka S, Arahata K, and Ishiura S. Interaction between emerin and nuclear lamins. *J Biochem*, 2001, 129: 321–327
63. Haraguchi T, Koujin T, Segura-Totten M, Lee KK, Matsuoka Y, Yoneda Y, Wilson KL, and Hiraoka Y. BAF is required for emerin assembly into the reforming nuclear envelope. *J Cell Sci*, 2001, 114: 4575–4585
64. Muchir A, van Engelen BG, Lammens M, Mislow JM, McNally E, Schwartz K, and Bonne G. Nuclear envelope alterations in fibroblasts from LGMD1B patients carrying nonsense Y259X heterozygous or homozygous mutation in lamin A/C gene. *Exp Cell Res*, 2003, 291: 352–362
65. Sullivan T, Escalante-Alcalde D, Bhatt H, Anver M, Bhat N, Nagashima K, Stewart CL, and Burke B. Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol*, 1999, 147: 913–920
66. Schirmer EC, Guan T, and Gerace L. Involvement of the lamin rod domain in heterotypic lamin interactions important for nuclear organization. *J Cell Biol*, 2001, 153: 479–489

67. Mansharamani M and Wilson KL. Direct binding of nuclear membrane protein MAN1 to emerin in vitro and two modes of binding to barrier-to-autointegration factor. *J Biol Chem* , 2005,280: 13863–13870
68. Shimi T, Koujin T, Segura-Totten M, Wilson KL, Haraguchi T, and Hiraoka Y. Dynamic interaction between BAF and emerin revealed by FRAP, FLIP, and FRET analyses in living HeLa cells. *J Struct Biol*, 2004, 147: 31–41
69. Padmakumar VC, Abraham S, Braune S, Noegel AA, Tunggal B, Karakesisoglou I, and Korenbaum E. Enaptin, a giant actinbinding protein, is an element of the nuclear membrane and the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res*, 2004, 295: 330–339
70. PadmakumarVC,LibotteT,LuW,ZaimH,AbrahamS,Noegel AA, Gotzmann J, Foisner R, and Karakesisoglou I. The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J Cell Sci*, 2005, 118: 3419–3430
71. Crisp M, Liu Q, Roux K, Rattner JB, Shanahan C, Burke B, Stahl PD, and Hodzic D. Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol*, 2006, 172: 41–53
72. Lattanzi G, Cenni V, Marmiroli S, Capanni C, Mattioli E, Merlini L, Squarzoni S, and Maraldi NM. Association of emerin with nuclear and cytoplasmic actin is regulated in differentiating myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 303: 764–770
73. Holaska JM, Kowalski AK, and Wilson KL. Emerin caps the pointed end of actin filaments: evidence for an actin cortical network at the nuclear inner membrane. *PLoS Biol* , 2004,2: E231
74. Maraldi NM, Lattanzi G, Marmiroli S, Squarzoni S, and Manzoli FA. New roles for lamins, nuclear envelope proteins and actin in the nucleus. *Adv Enzyme Regul*, 2004, 44: 155–172
75. Wilson KL, Holaska JM, de Oca RM, Tifft K, Zastrow M, Segura-Totten M, Mansharamani M, and Bengtsson L. Nuclear membrane protein emerin: roles in gene regulation, actin dynamics and human disease. *Novartis Found Symp* , 2005,264: 51–62
76. Starr DA, Hermann GJ, Malone CJ, Fixsen W, Priess JR, Horvitz HR, and Han M. unc-83 encodes a novel component of the nuclear envelope and is essential for proper nuclear migration. *Development*, 2001, 128: 5039–5050
77. Patterson K, Molofsky AB, Robinson C, Acosta S, Cater C, and Fischer JA. The functions of Klarsicht and nuclear lamin in developmentally regulated nuclear migrations of photoreceptor cells in the *Drosophila* eye. *Mol Biol Cell*, 2004, 15: 600–610
78. Bloom S, Lockard VG, and Bloom M. Intermediate filament-mediated stretch-induced changes in chromatin: a hypothesis for growth initiation in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, 28: 2123–2127
79. Tolstonog GV, Sabasch M, and Traub P. Cytoplasmic intermediate filaments are stably associated with nuclear matrices and potentially modulate their DNA-binding function. *DNA Cell Biol*, 2002, 21: 213–239

80. Newport JW and Forbes DJ. The nucleus: structure, function, and dynamics. *Annu Rev Biochem*, 1987, 56: 535–565
81. Lammerding J, Schulze PC, Takahashi T, Kozlov S, Sullivan T, Kamm RD, Stewart CL, and Lee RT. Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J Clin Invest*, 2004, 113: 370–378
82. Kennedy BK, Barbie DA, Classon M, Dyson N, and Harlow E. Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells. *Genes Dev* , 2000,14: 2855–2868
83. Moir RD, Montag-Lowy M, and Goldman RD. Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication. *J Cell Biol* 1994, 125: 1201–1212,
84. Johnson BR, Nitta RT, Frock RL, Mounkes L, Barbie DA, Stewart CL, Harlow E, and Kennedy BK. A-type lamins regulate retinoblastoma protein function by promoting subnuclear localization and preventing proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2004,101: 9677–9682
85. Meier J, Campbell KHS, Ford CC, Stick R, and Hutchison CJ. The role of lamin LIII in nuclear assembly and DNA replication in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *J Cell Sci*, 1991, 98: 271–279
86. Spann TP, Moir RD, Goldman AE, Stick R, and Goldman RD. Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *J Cell Biol*, 1997, 136: 1201–1212
87. Marshall WF, Sedat JW. Nuclear architecture. *Results Probl Cell Differ* . 1999; 25: 283–301
88. Heard E, Bickmore W. The ins and outs of gene regulation and chromosome territory organisation. *Curr Opin Cell Biol* . 2007; 19: 311–6
89. Kalverda B, Röling MD, Fornerod M. Chromatin organization in relation to the nuclear periphery. *FEBS Lett* . 2008; 582: 2017–22
90. Kumaran RI, Muralikrishna B, Parnaik VK. Lamin A/C speckles mediate spatial organization of splicing factor compartments and RNA polymerase II transcription. *J Cell Biol* . 2002; 159: 783–93
91. Margalit A, Segura-Totten M, Gruenbaum Y, Wilson KL. Barrier-to-autointegration factor is required to segregate and enclose chromosomes within the nuclear envelope and assemble the nuclear lamina. *Proc Natl Acad Sci USA* . 2005; 102: 3290–5. 89
92. Dreuillet C, Tillit J, Kress M, Ernoul-Lange M. In vivo and in vitro interaction between human transcription factor MOK2 and nuclear lamin A/C. *Nuc Acids Res* . 2002; 30: 4634–42
93. Lloyd DJ, Trembath RC, Shackleton S. A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum Mol Genet* . 2002; 11: 769–77.

94. Imai SI, Nishibayashi S, Takao K, Tomifuji M, Fujino T, Hasegawa M, Takano T. Dissociation of Oct-1 from the nuclear peripheral structure induces the cellular aging-associated collagenase gene expression. *Mol Biol Cell* . 1997; 8: 2407–19. 110
95. Melcer S, Gruenbaum Y, Krohne G. Invertebrate lamins. *Exp Cell Res* . 2007; 313: 2157–66
96. Jagatheesan G, Thanumalayan S, Muralikrishna B, Rangaraj N, Karande AA, Parnaik VK. Colocalization of intranuclear lamin foci with RNA splicing factors. *J Cell Sci* . 1999; 112: 4651–61. 127
97. Vecerová J, Koberna K, Malinsky J, Soutoglou E, Sullivan T, Stewart CL, Raska I, Misteli T. Formation of nuclear splicing factor compartments is independent of lamins A/C. *Mol Biol Cell* . 2004; 15: 4904–10
98. Knoblich JA. Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division. *Cell* [Internet]. 2008;132(4):583–97
99. Inaba M, Yamashita YM. Asymmetric Stem Cell Division: Precision for Robustness. *Cell Stem Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;11(4):461–9
100. Charville GW, Rando T a. The mortal strand hypothesis: Non-random chromosome inheritance and the biased segregation of damaged DNA. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;24(8-9):653–60
101. Evano B, Tajbakhsh S. Sorting DNA with asymmetry: A new player in gene regulation? *Chromosom Res*. 2013;21(3):225–42
102. Nigg E a., Stearns T. The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nat Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;13(10):1154–60
103. Pelletier L, Yamashita YM. Centrosome asymmetry and inheritance during animal development. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;24(4):541–6
104. Chen C-T, Ettinger AW, Huttner WB, Doxsey SJ. Resurrecting remnants: the lives of post-mitotic midbodies. *Trends Cell Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;23(3):118–28
105. Chia, W., Somers, W.G., and Wang, H. *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions: cell cycle regulators, asymmetric protein localization, and tumorigenesis. *J Cell Biol*, 2008, 180, 267–272
106. Doe CQ. Neural stem cells: balancing self-renewal with differentiation. *Development* [Internet]. 2008 May [cited 2011 Jul 17];135(9):1575–87
107. Gonczy, P. (2008). Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 355–366.
108. Yu, F., Kuo, C.T., and Jan, Y.N. (2006). *Drosophila* neuroblast asymmetric cell division: recent advances and implications for stem cell biology. *Neuron* 51, 13–20
109. Schmid, A., Chiba, A., and Doe, C.Q. (1999). Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets. *Development* 126, 4653–4689

110. Lee Lee, C.Y., Andersen, R.O., Cabernard, C., Manning, L., Tran, K.D., Lanskey, M.J., Bashirullah, A., and Doe, C.Q. (2006). Drosophila Aurora-A kinase inhibits neuroblast self-renewal by regulating aPKC/Numb cortical polarity and spindle orientation. *Genes Dev* 20, 3464–3474
111. Bowman, S.K., Rolland, V., Betschinger, J., Kinsey, K.A., Emery, G., and Knoblich, J.A. The tumor suppressors Brat and Numb regulate transit-amplifying neuroblast lineages in Drosophila. *Dev Cell*, 2008, 14, 535–546
112. Hirata, J., Nakagoshi, H., Nabeshima, Y., and Matsuzaki, F.. Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during Drosophila development. *Nature*, 1995, 377, 627–630
113. Knoblich, J.A., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division. *Nature*, 1995,. 377, 624–627
114. Spana, E.P., and Doe, C.Q. (1995). The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in Drosophila. *Development* 121, 3187–3195
115. Vaessin, H., Grell, E., Wolff, E., Bier, E., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1991). Prospero is expressed in neuronal precursors and encodes a nuclear protein that is involved in the control of axonal outgrowth in Drosophila. *Cell* 67, 941–953
116. Bello, B., Reichert, H., and Hirth, F.). The brain tumor gene negatively regulates neural progenitor cell proliferation in the larval central brain of Drosophila. *Development*, 2006, 133, 2639–2648
117. Betschinger, J., Eisenhaber, F., and Knoblich, J.A.. Phosphorylation-induced autoinhibition regulates the cytoskeletal protein Lethal (2) giant larvae. *Curr Biol*, 2005, 15, 276–282
118. Berdnik, D., Torok, T., Gonzalez-Gaitan, M., and Knoblich, J.A. The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in Drosophila. *Dev Cell* , 2002, 3, 221–231
119. Wang, H., Somers, G.W., Bashirullah, A., Heberlein, U., Yu, F., and Chia, W. (2006). Aurora-A acts as a tumor suppressor and regulates self-renewal of Drosophila neuroblasts. *Genes Dev* 20, 3453–3463
120. Macara, I.G. Par proteins: partners in polarization. *Curr Biol*, 2004), 14, R160–162.
121. Kraut, R., Chia, W., Jan, L.Y., Jan, Y.N., and Knoblich, J.A. Role of inscuteable in orienting asymmetric cell divisions in Drosophila. *Nature*, 1996, 383, 50–55
122. Parmentier, M.L., Woods, D., Greig, S., Phan, P.G., Radovic, A., Bryant, P., and O’Kane, C.J. (2000). Rapsynoid/partner of inscuteable controls asymmetric division of larval neuroblasts in Drosophila. *J Neurosci* 20, RC84
123. Roegiers, F., and Jan, Y.N. (2004). Asymmetric cell division. *Curr Opin Cell Biol* 16, 195–205.

124. Schober, M., Schaefer, M., and Knoblich, J.A. (1999). Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 402, 548–551
125. Yu, F., Morin, X., Cai, Y., Yang, X., and Chia, W. (2000). Analysis of partner of inscuteable, a novel player of *Drosophila* asymmetric divisions, reveals two distinct steps in inscuteable apical localization. *Cell* 100, 399–409
126. Wirtz-Peitz, F., Nishimura, T., and Knoblich, J. A. (2008). Linking cell cycle to asymmetric division: Aurora-A phosphorylates the Par complex to regulate Numb localization. *Cell* 135, 161–173
127. Schaefer, M., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Knoblich, J.A. (2000). A protein complex containing Inscuteable and the Galphai-binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Curr Biol* 10, 353–362
128. Izumi, Y., Ohta, N., Hisata, K., Raabe, T., and Matsuzaki, F. *Drosophila* Pins-binding protein Mud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization. *Nat Cell Biol*, 2006, 8, 586–593
129. Siegrist, S.E., and Doe, C.Q. (2005). Microtubule-induced Pins/Galphai cortical polarity in *Drosophila* neuroblasts. *Cell* 123, 1323–1335
130. Tio, M., Udolph, G., Yang, X., and Chia, W. (2001). cdc2 links the *Drosophila* cell cycle and asymmetric division machineries. *Nature* 409, 1063–1067
131. Yamashita, Y.M., Fuller, M.T., and Jones, D.L. Signaling in stem cell niches: lessons from the *Drosophila* germline. *J Cell Sci*, 2005, 118, 665–672
132. Tulina, N., and Matunis, E. (2001). Control of stem cell self-renewal in *Drosophila* spermatogenesis by JAK-STAT signaling. *Science* 294, 2546–2549
133. Jones, D.L., and Wagers, A.J. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. 9, 11–21
134. Smart, I.H. (1970). Variation in the plane of cell cleavage during the process of stratification in the mouse epidermis. *Br J Dermatol* 82, 276–282
135. Seery, J.P., and Watt, F.M. (2000). Asymmetric stem-cell divisions define the architecture of human oesophageal epithelium. *Curr Biol* 10, 1447–1450
136. Duncan, A.W., Rattis, F.M., DiMascio, L.N., Congdon, K.L., Pazianos, G., Zhao, C., Yoon, K., Cook, J.M., Willert, K., Gaiano, N., and Reya, T. Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol*, 2005, 6, 314–322
137. Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., and Rudnicki, M.A. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell*, 2007, 129, 999–1010
138. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981. p. 154–6
139. 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* [Internet]. 2013;203(1):73–85

140. Nakano T., Kodama H. and Honjo T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science*, 1994, 265, 1098-1101
141. Nishikawa S., Nishikawa S., Hirashima M., Matsuyoshi N. and Kodama H. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development*, 1998, 125, 1747-1757
142. Chambers I, Silva J, Colby D, Nichols J, Nijmeijer B, Robertson M, et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* [Internet]. 2007;450(7173):1230–4
143. Torres-Padilla M-E, Chambers I. Transcription factor heterogeneity in pluripotent stem cells: a stochastic advantage. *Development* [Internet]. 2014;141(11):2173–81
144. Muck J, Zink D. Nuclear organization and dynamics of DNA replication in eukaryotes. *Front Biosci (Landmark Ed)* [Internet]. 2009;14:5361–71
145. 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* [Internet]. 2014;9(12):e110752
146. Kalmar T, Lim C, Hayward P, Muñoz-Descalzo S, Nichols J, Garcia-Ojalvo J, Martinez Arias A. Regulated fluctuations in nanog expression mediate cell fate decisions in embryonic stem cells. *PLoS Biol*, 2009, 7, 7, 1-7
147. Zwaka TP, Thomson J a. Differentiation of human embryonic stem cells occurs through symmetric cell division. *Stem Cells* [Internet]. 2005 Feb [cited 2011 Jun 13];23(2):146–9
148. Habib SJ, Chen B, Tsai F, Anastassiadis K, Meyer T, Betzig E, et al. Asymmetric Stem Cell Division in Vitro. *Science* (80-). 2013;1424(March):1445–8.
149. Yamanaka Y, Lanner F, Rossant J. FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development* [Internet]. 2010 Mar [cited 2010 Jul 16];137(5):715–24
150. Feder TJ, Brust-Mascher I, Slattery JP, Baird B, Webb WW. Constrained diffusion or immobile fraction on cell surfaces: a new interpretation. *Biophys J.*, 1996, 70,6, 2767-2773
151. Bates IR, Wiseman PW, Hanrahan JW. Investigating membrane protein dynamics in living cells. *Biochem Cell Biol*, 2006, 84, 6, 825-831