



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΚΑΙ ΑΣΥΜΜΕΤΡΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΙΡΕΣΗ

*Διακριτές λειτουργίες της Haspin κατά την διάρκεια της αυτο-ανανέωσης
και της διαφοροποίησης των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων*

**ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ ΚΑΡΑΝΙΚΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΚΑΙ ΑΣΥΜΜΕΤΡΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΙΡΕΣΗ

*Διακριτές λειτουργίες της Haspin κατά την διάρκεια της αυτο-ανανέωσης
και της διαφοροποίησης των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων*

**ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ ΚΑΡΑΝΙΚΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018

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

Ημερομηνία αίτησης της κ. Καράνικα Ελευθερίας: 29-8-2012

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 744^α/23-10-2012

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

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

Μέλη

Φώτης Θεόδωρος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Κούκλης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 21-12-2012

«Επιγενετικοί ρυθμιστές και ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση-Διακριτές λειτουργίες της Haspin κατά την διάρκεια της αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησης των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 838^α/13-2-2018

Γεωργάτος Σπυρίδων	Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φριλίγγος Ευστάθιος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φώτης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κωλέττας Ευάγγελος	Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Κυτταρικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πολίτου Αναστασία	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χριστοφορίδης Σάββας	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κούκλη Παναγιώτη	Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 28-2-2018

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Η Γραμματέας του Τμήματος



ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενικής Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοϊατρικής Έρευνας (ΙΤΕ-ΙΜΒΒ), κατά τη χρονική περίοδο 2013-2018, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σπύρου Γεωργάτου. Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική μου διατριβή, η οποία αποτελεί ένα μεγάλο κομμάτι των σπουδών μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους με βοήθησαν για την ολοκλήρωσή της.

Ένα μεγάλο μέρος της συγκεκριμένης δουλειάς στηρίχτηκε σε συνεργασίες με άλλες ερευνητικές ομάδες. Στο σημείο αυτό, θέλω να ευχαριστήσω για τη βοήθεια και το χρόνο που μας αφιέρωσαν: τον Δρ. Στέλλα για τα πειράματα *in vivo* διαφοροποίησης και σχηματισμό τερατωμάτων που πραγματοποιήθηκαν στην Ακαδημία Αθηνών, καθώς και για τη διεξαγωγή δοκιμασιών με κυτταρομετρία ροής, τον Δρ. Μαρκόπουλο και τον Δρ. Βαρθολομάτο στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων.

Ιδιαίτερα ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον επιβλέποντα μου, κ. Γεωργάτο, τον «μπαμπά» της εργαστηριακής μας ομάδας, όπως πολλές φορές έχει αποκαλέσει τον εαυτό του σε εμάς τα «παιδιά» του. Εγώ όμως θα τον αποκαλέσω Δάσκαλο μου, ο οποίος είναι αστείρευτη πηγή γνώσεων και μόνο κερδισμένος βγαίνει όποιος στέκεται δίπλα του. Ο δάσκαλος που με έμαθε πολλά και ακόμα με μαθαίνει, χωρίς να περιορίζεται μόνο σε γνώσεις επιστημονικού ενδιαφέροντος. Θα συμφωνήσω μαζί του ότι μεγάλωσα στα χέρια του...ήρθα νήπιο και προσπάθησα να εξελιχθώ...Τώρα, αν πέρασα την τάξη, μόνο ο ίδιος ξέρει... Τον ευχαριστώ για τις αμέτρητες ώρες που μου αφιέρωσε για τη συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής τριμελούς επιτροπής τον Καθηγητή κ. Θεόδωρο Φώτση και τον Επίκουρο Καθηγητή, κ. Παναγιώτη Κούκλη, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, κ. Σάββα Χριστοφορίδη, κ. Ευάγγελο Κωλέττα και κ. Ευαστάθιο Φριλίγγο για την τιμή που μου έκαναν. Ιδιαιτέρως θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Αναστασία Πολίτου για την καίρια συμβολή της στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων μας.

Δεν μπορώ να μην ευχαριστήσω την εργαστηριακή μου οικογένεια, τους ανθρώπους που ζω την καθημερινότητα μου μαζί τους, μοιράζομαι τις ανησυχίες μου, τα άγχη μου, τις στεναχώριες μου και ξέρω ότι είναι εκεί, δίπλα μου να με ακούσουν και να με βοηθήσουν. Δεν ξέρω αν μέσα από λέξεις καταφέρω να μεταφέρω όλα όσα νιώθω για τα συγκεκριμένα άτομα: τη μανούλα του εργαστηρίου, το *Νατασούλι μου*, που μου μετέδωσε τις γνώσεις της ως πιο έμπειρη, αλλά έγινε και το φιλαράκι μου στην πορεία αυτού του πρότζεκτ, στο οποίο με μια τέλεια συνεργασία καταφέραμε να το φέρουμε εις πέρας· το *Ελευθεράκι*, το άτομο με το οποίο πάντα η δουλειά και οι πολύωρες αναμονές είναι διασκέδαση· το *Ντιανούλι*, που προσφέρει πάντα μια εύθυμη νότα και είναι η ήρεμη δύναμη στην καθημερινότητα μας· την *Κατερίνα*, τη *genius* της ομάδας μας που χωρίς τις γνώσεις και την εργατικότητα της η συγκεκριμένη δουλειά θα ήταν μισή και τέλος, το νεότερο μέλος αυτής της οικογένειας, τη *Φανή*.

Τα μέλη της οικογένειας μου δεν περιορίζονται όμως στο SG Lab! Δεν μπορώ να παραλείψω το *Γιάννη μου*, ο άνθρωπος που είναι πάντα δίπλα μου να με ακούσει, να με ηρεμήσει και να

με εμψυχώσει σε στιγμές απόγνωσης· τη *Βιολέττα μου*, τη «δασκάλα» στα προπτυχιακά μου χρόνια την οποία θαύμαζα και έγινε η καλύτερη μου φίλη. Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους φίλους μου *Δημήτρη*, *Μπάμπη* και *Δώρα* που ο καθένας με στήριξε με το δικό του τρόπο και έδειξε κατανόηση για τις προτεραιότητες που έβαλα.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου και στην υπόλοιπη οικογένεια μου. Χωρίς την υποστήριξή τους, τόσο ηθική όσο και οικονομική, όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου δεν θα είχα καταφέρει τίποτα. Ένα μόνο ευχαριστώ μέσα από αυτές τις γραμμές είναι πολύ λίγο για να τους εκφράσω την ευγνωμοσύνη και το σεβασμό μου για εκείνους. Τους ευχαριστώ που είναι πάντα δίπλα μου στις επιτυχίες αλλά πάνω από όλα στις αποτυχίες μου. Το ελάχιστο που μπορώ να κάνω για αυτούς είναι να τους αφιερώσω αυτές τις σελίδες που ακολουθούν όπου παρατίθεται ο λόγος του άγχους και της αγωνίας τόσων χρόνων. Οπότε...

...στους πολυαγαπημένους μου γονείς

Περιεχόμενα

<i>Ευχαριστίες</i>	1
<i>1. Εισαγωγή</i>	7
1.1. Η Haspin, μια ιδιαίτερη μιτωτική κινάση	7
1.1.1 Τα δομικά χαρακτηριστικά της Haspin	7
1.1.2 Οι λειτουργίες της Haspin	9
1.1.3 Ανοιχτά ερωτήματα.....	16
1.2 Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ως πειραματικό μοντέλο για τη μελέτη της λειτουργίας της Haspin.....	17
1.2.1. Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και οι βασικές ιδιότητες τους	17
1.2.3. Κυτταρικός κύκλος των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων	21
1.3. Ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση	22
Γενικά χαρακτηριστικά της ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης.....	22
<i>Σκοπός</i>	25
<i>2. Υλικά και Μέθοδοι</i>	29
2.1 Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων.....	29
2.1.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών	29
2.1.2 <i>In vitro</i> διαφοροποίηση κυτταρικών σειρών	30
2.1.3 <i>In vivo</i> διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (σχηματισμός τερατωμάτων).....	31
2.1.4 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με ηλεκτροδιάτρηση.....	32
2.1.5 Δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών βλαστικών κυττάρων	32
2.2 Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας.....	34
2.2.1 Απομόνωση ολικού RNA και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time qPCR)	34
2.2.3 Αλληλούχηση RNA (RNA Sequencing).....	35
2.2.4 Αλληλούχηση μικρών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (Amplicon Sequencing).....	35
2.3 Μορφολογικές μέθοδοι.....	36
2.3.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κύτταρα επιστρωμένα σε γυάλινες επιφάνειες.....	36
2.3.2 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε εμβρυοειδή σωματίδια	37
2.3.3 Συνεστιακή μικροσκοπία	38
2.3.4 Μελέτη κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρίας ροής (FACS assays).	38
2.3.5 Ποσοτικοποίηση θετικών κυττάρων ως προς τους βασικού δείκτες διαφοροποίησης EBs μέσω κυτταρομετρίας ροής (FACS).	38

<i>2.4 Στατιστική ανάλυση</i>	39
<i>3. Αποτελέσματα</i>	43
3.1 Ο ρόλος της καταλυτικής περιοχής της Haspin	43
3.1.1 Επιδράσεις του 5-ITu στην κυτταρική διαίρεση.....	44
3.1.2 Επιδράσεις του 5-ITu στη γονιδιακή έκφραση.....	55
3.1.3 Επιδράσεις του 5-ITu στη διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ..	59
3.1.4 Επιδράσεις του 5-ITu στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου	64
3.2 Συνέπειες της απαλοιφής και της υπερέκφρασης της Haspin	68
3.2.1 Ατυπίες κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης	69
3.2.2 Επιδράσεις στην πολυδυναμία και τη διαφοροποίηση.....	78
3.3 Επιδράσεις στη γονιδιακή έκφραση	83
<i>4. Συζήτηση</i>	95
4.1 Ο ρόλος της Haspin στη μίτωση	95
4.2 Η Haspin ως ρυθμιστής της μεταγραφής.....	95
<i>Περίληψη</i>	101
<i>Summary</i>	103
<i>Βιβλιογραφία</i>	105

1. Εισαγωγή

1. Εισαγωγή

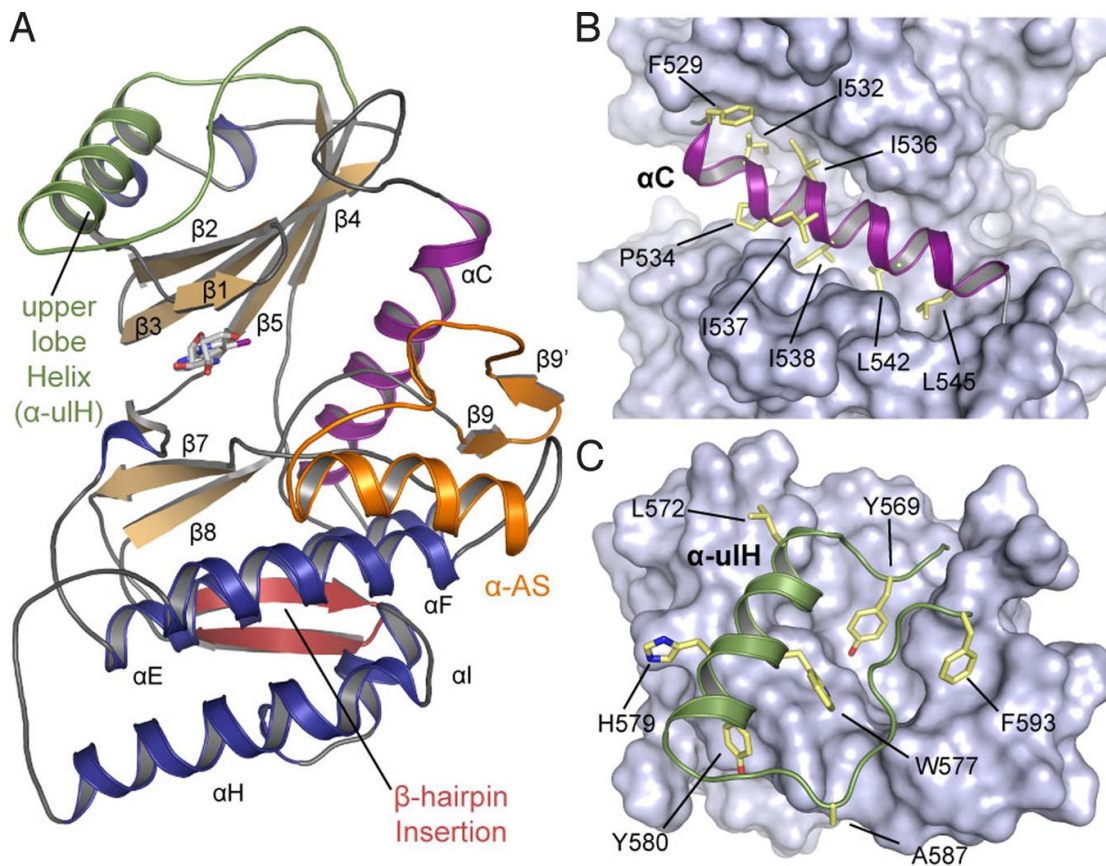
1.1. Η Haspin, μια ιδιαίτερη μιτωτική κινάση

Η Haspin αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στις απλοειδείς σπερματίδες του ποντικού από τον Tanaka και τους συνεργάτες του με αφαιρετική κλωνοποίηση (subtracted Library screening, βλέπε (1)). Επειδή η έκφρασή της μειώνεται κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των σπερματιδίων, η συγκεκριμένη πρωτεΐνη ονομάστηκε Haspin (Haploid germ cell-specific nuclear protein), ενώ το γονίδιο που την κωδικοποιεί *Gsg2* (Germ cell Specific gene 2). Στις αρχικές μελέτες, το mRNA της Haspin εντοπίστηκε αποκλειστικά στους γαμέτες και όχι σε άλλους ιστούς όπως εγκέφαλος, σπλήνας, καρδιά και ωοθήκες ποντικού. Ωστόσο αργότερα, αποδείχθηκε ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται επίσης σε ωοκύτταρα και σε σωματικά κύτταρα (2,3) αλλά σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα (4). Η ανθρώπινη Haspin αποτελείται από 798 αμινοξέα, ενώ του ποντικού από 754 και έχουν ομολογία 66% στο σύνολο της αμινοξικής αλληλουχίας τους με ένα ποσοστό ομολογίας 83% στο καρβοξυτελικό τους τμήμα (5,6). Στα θηλαστικά, η πρωτεΐνη έχει μοριακή μάζα μεταξύ 83 και 87 kDa και αποτελείται από δύο διακριτές περιοχές: μια αμινο-τελική και μια καρβοξυ-τελική. Το αμινο-τελικό τμήμα περιέχει σήματα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal-NLS), πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης και μια περιοχή η οποία παρουσιάζει περιορισμένη ομολογία με τον παράγοντα MEF2B (Myoocyte-specific Enhancer Factor -MEF 2B). Το καρβοξυ-τελικό τμήμα διαθέτει ένα μοτίβο «φερμουάρ λευκίνης» και μια περιοχή που εμφανίζει ομολογία με τη CDC2 κινάση, καθώς και αρκετές άλλες ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες (ePKs) (6,7).

1.1.1 Τα δομικά χαρακτηριστικά της Haspin

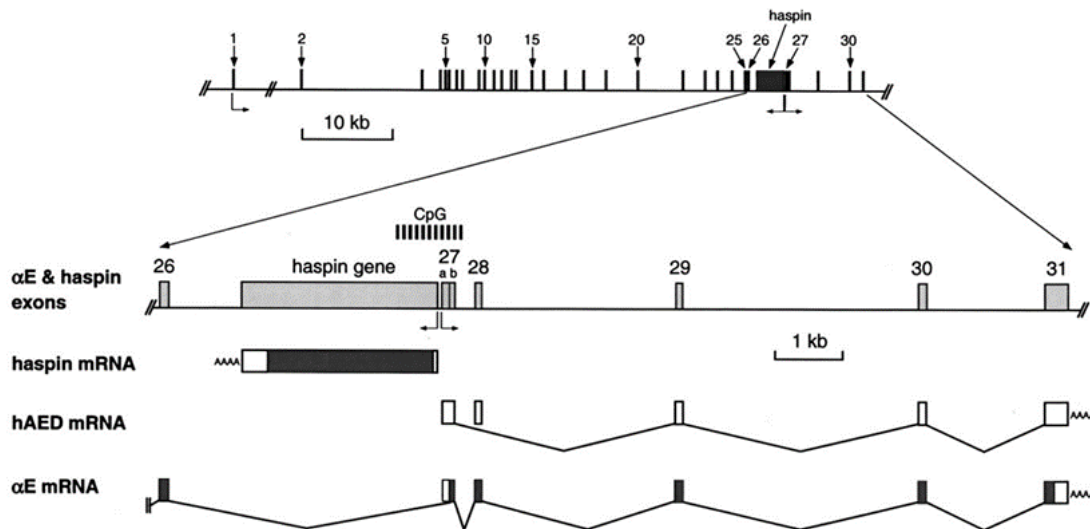
Δομικές, βιοχημικές και μορφολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η περιοχή της Haspin, η οποία είναι ομόλογη με άλλες κινάσες (kinase domain), περιέχει δυο λοβούς (lobes) και μπορεί να φωσφορυλιώσει πρωτεϊνικά υποστρώματα *in vitro* και *in vivo*. Ορισμένες δομικές ενθέσεις που υπάρχουν στο μόριο παρέχουν στην πρωτεΐνη τη διαμόρφωση μιας σταθερά ενεργής κινάσης. Διαφορές από άλλες κινάσες παρατηρούνται και στο ενεργό κέντρο της Haspin. Πιο

συγκεκριμένα, ενώ οι περισσότερες κινάσες περιέχουν ένα εξαιρετικά συντηρημένο μοτίβο DFG (ασπαρτικό- φαινυλαλανίνη- γλυκίνη), το μοτίβο αυτό στη Haspin διαφοροποιείται σε DYT (ασπαρτικό- τυροσίνη- θρεονίνη) (8–11). Δεδομένου ότι η Haspin στερείται ορισμένων χαρακτηριστικών μοτίβων που υπάρχουν σε άλλες πρωτεϊνικές κινάσες, ταξινομείται ως μια άτυπη κινάση σερίνης-θρεονίνης.



Εικόνα 1.1. Δομικά χαρακτηριστικά της Haspin. (A) Απεικόνιση της δευτεροταγούς δομής της Haspin με τις χαρακτηριστικές ενθέσεις της. Με πράσινο αναπαρίσταται η ελικοειδής δομή α -ulH, με κίτρινο το ενεργό κέντρο α -AS και με σκούρο κόκκινο η δομή φουρκέτας β -hairpin. (B) Λεπτομερής αναπαράσταση της έλικας αC ($\mu\omega\beta$), η οποία περιβάλλεται από υδροφοβικά κατάλοιπα. (C) Αλληλεπιδράσεις των συντηρημένων αρωματικών καταλοίπων με την α -ulH (8).

Το γονίδιο της Haspin, *Gsg2* έχει ασυνήθη χαρακτηριστικά: εντοπίζεται μέσα σε ένα ιντρόνιο ενός άλλου γονιδίου, το *ItgaE*, που κωδικοποιεί την Integrin α E και στερείται ιντρονίων (5,6). Το *Gsg2* στον άνθρωπο κωδικοποιεί ένα μετάγραφο 2.8 kb (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2. Το γονίδιο της *Haspin* εντοπίζεται σε ιντρόνιο της *Integrin α E*. Στην πρώτη γραμμή απεικονίζεται η δομή του γονιδίου της α E και η θέση στην οποία εντοπίζεται το γονίδιο της *Haspin* στον άνθρωπο. Σε οριζόντιες γραμμές φαίνονται τα ιντρόνια και σε πλαίσια οι περιοχές των εξονίων. Στις κάτω γραμμές αναπαρίστανται τα μετάγραφα των γονιδίων (5).

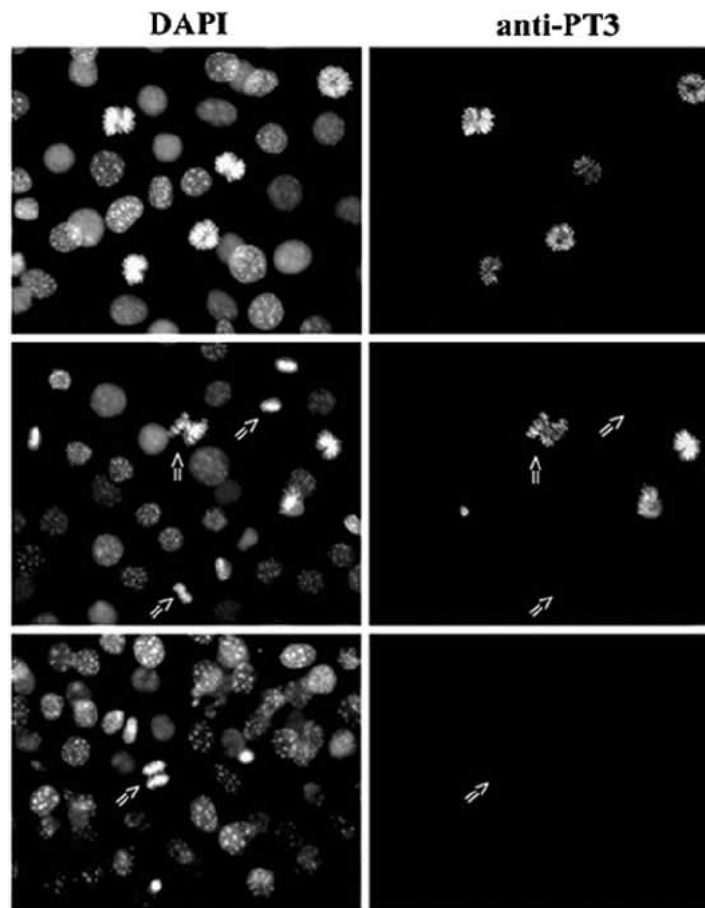
Η *Haspin* είναι αρκετά συντηρημένη σε όλα τα μεγάλα ευκαρυωτικά φύλα. Η ομολογία της σε θηλαστικά, ασπόνδυλα, ψάρια, αμφίβια, φυτά και μύκητες (όπως τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* η οποία εκφράζει δυο παράλογα, τα *Alk1* και *Alk2*) μαρτυρεί ίσως μια κοινή εξελικτική αφετηρία (9).

1.1.2 Οι λειτουργίες της *Haspin*

Η πρώτη υπόθεση που διατυπώθηκε όσον αφορά τη λειτουργία της *Haspin* ήταν η εμπλοκή της στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των γαμετών. Η υπόθεση αυτή βασίστηκε στην

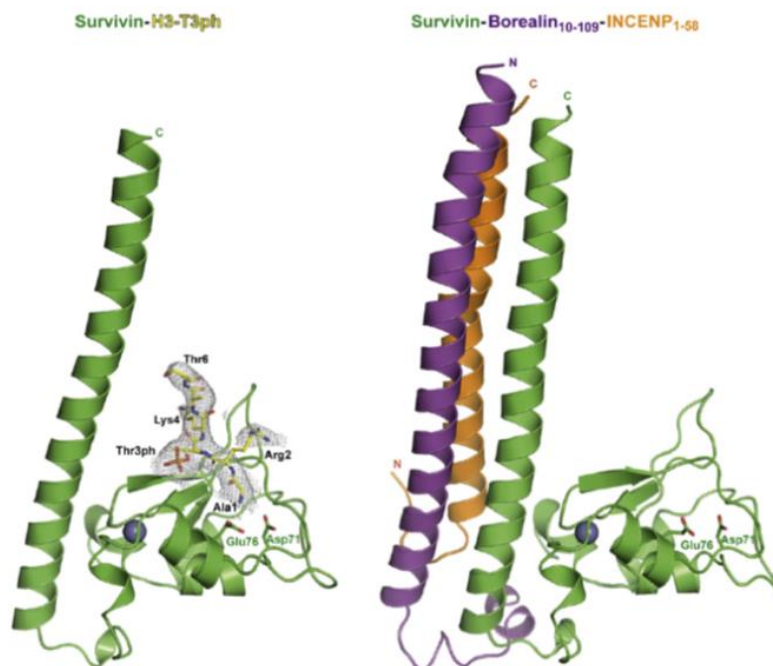
παρατήρηση ότι όταν η Haspin υπερεκφράζεται, ο κυτταρικός κύκλος των κυττάρων καθυστερεί στη φάση G1 (1).

Τρία βιβλιογραφικά ορόσημα έχουν διαμορφώσει την εικόνα που έχουμε σήμερα για τη λειτουργία της Haspin. Το 2004, η Polioudaki και οι συνεργάτες της περιέγραψαν την αντιστρεπτή φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 στη θρεονίνη-3 (H3T3ph), μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση, η οποία εμφανίζεται ειδικά κατά τη διάρκεια της μίτωσης (12). Η H3T3ph εντοπίστηκε στα κεντρομερίδια μεταφασικών χρωμοσωμάτων, γεγονός το οποίο υποδηλώνει έναν πιθανό ρόλο στη σωστή διάταξη των χρωμοσωμάτων (congression).



Εικόνα 1.3. Εντοπισμός της H3T3ph κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Έμμεσος ανοσοφθορισμός κυττάρων με αντίσωμα που αναγνωρίζει την H3T3ph. Μιτωτικά κύτταρα που βρίσκονται στην πρόφαση έως και στην ανάφαση είναι θετικά στο σήμα της H3T3ph, ενώ τα βέλη δείχνουν τα αναφασικά ή τελοφασικά κύτταρα τα οποία δεν εμφανίζουν το συγκεκριμένο σήμα (12).

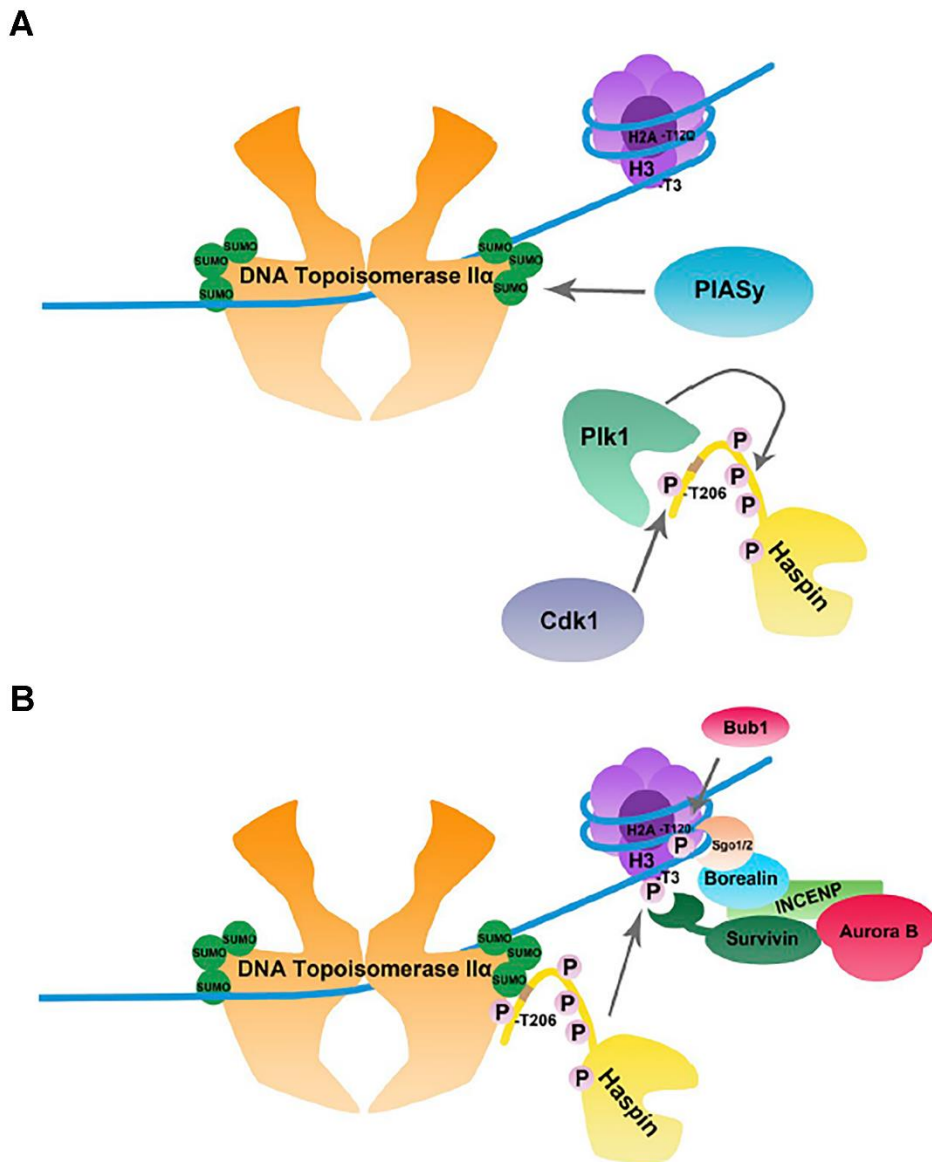
Το 2005, ο Higgins και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι η Haspin είναι αποκλειστικά υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση της H3T3 (13). Αργότερα, μια ακόμη μελέτη έδειξε πως η φωσφορυλίωση αυτή είναι μέρος ενός μοτίβου που περιλαμβάνει επίσης την H3K4me3 και H3R8me2 (PMM) (10). Τέλος, το 2010-2011, αρκετές ερευνητικές ομάδες ανακάλυψαν ανεξάρτητα ότι η H3T3ph παρέχει μια θέση πρόσδεσης για την πρωτεΐνη Survivin. Η Survivin είναι μέρος του συμπλόκου Chromosomal Passenger (CPC) που περιέχει επίσης τις πρωτεΐνες INCENP, Borealin και τη μιτωτική κινάση Aurora B (Εικόνα 1.4). Δοκιμασίες κατακρήμνισης (pull down) με τροποποιημένα πεπτίδια της ιστόνης H3 έδειξαν ότι η Survivin προσδένεται ισχυρά μόνο στα πεπτίδια τα οποία περιείχαν την H3T3ph. Παρόλα αυτά, η H3T3ph δεν είναι απαραίτητη για τη πρόσδεση στη χρωματίνη, αλλά ούτε και για τη δραστηριότητα του CPC καθ' αυτή. Μελέτες σε *fission yeast* και σε ανθρώπινα κύτταρα έδειξαν ότι η Haspin συνεργάζεται με την Bub1 η οποία φωσφορυλιώνει την θρεονίνη-120 στην ιστόνη H2A (H2AT120/121 στη ζύμη), ώστε να στρατολογηθεί το CPC στο κεντρομερίδιο (14–18).



Εικόνα 1.4. Η Survivin μεσολαβεί για την αλληλεπίδραση του CPC με την H3T3ph. Στα αριστερά απεικονίζεται ολόκληρη η δομή της Survivin και η περιοχή BIR όπου προσδένεται η H3T3ph. Στα δεξιά φαίνεται η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου CPC, όπου στην Survivin προσδένονται οι πρωτεΐνες Borealin και INCENP, αντίθετα από το σημείο πρόσδεσης της H3T3ph (14).

Η H3T3ph δεν ανιχνεύεται στη διάρκεια της μεσόφασης. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι η Haspin αυτο-καταστέλλεται (autoinhibition) μέσω της σύνδεσης του αμινο-τελικού της τμήματος Haspin Basic Inhibitory Segment ή HBIS στο ενεργό κέντρο της καταλυτικής της περιοχής (19). Η αυτο-καταστολή εξουδετερώνεται όταν η Cdk1 φωσφορυλιώσει το HBIS (στη θρεονίνη-206 στο βάτραχο και στη θρεονίνη-128 στον άνθρωπο). Το φωσφορυλιωμένο τμήμα αναγνωρίζεται από την Polo-like kinase 1 (Plk1/Plx1), η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει άλλες θέσεις στην ίδια περιοχή. Η φωσφορυλίωση του HBIS σε πολλά κατάλοιπα του, προκαλεί τη μετατόπιση του από το ενεργό κέντρο της Haspin με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή της.

Η Haspin μεταφέρεται στο κεντρομερίδιο μέσω της τροποποιημένης τοποϊσομεράσης II (TopoII) μέσω σουμοϋλίωσης (SUMOylation). Ωστόσο, αναστολή της SUMOylation ή τροποποίηση τμημάτων της συγκεκριμένης περιοχής της τοποϊσομεράσης II, δεν επηρεάζει τη δέσμευση της Haspin στο κεντρομερίδιο. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί που συμμετέχουν προκειμένου να επιστρατευτεί η Haspin στα χρωμοσώματα. Ένας τέτοιος μηχανισμός είναι μέσω της αλληλεπίδρασης με τον συμπαράγοντα της Cohesin, Pds5 (18,20). Όπως αναπαρίσταται στην Εικόνα 1.5, ο μηχανισμός αυτός απαιτεί δυο στάδια. Αρχικά, η κεντρομεριδιακή DNA τοποϊσομεράση IIα τροποποιείται μέσω SUMOylation στο καρβοξυτελικό τμήμα της μέσω της E3 λιγάσης PIASy και η Haspin φωσφορυλιώνεται στη θρεονίνη-206 από την κινάση Cdk1. Στη συνέχεια, η Plk1 αλληλεπιδρά με τη φωσφορυλιωμένη θρεονίνη-206, και φωσφορυλιώνει επιπλέον θέσεις στη Haspin καθιστώντας την ενεργή. Στη συνέχεια, η τροποποιημένη τοποϊσομεράση IIα αλληλεπιδρά με την ενεργή πλέον Haspin στο κεντρομερίδιο, η οποία φωσφορυλιώνει την ιστόνη H3 (μωβ) στη θρεονίνη-3. Η φωσφορυλιωμένη θρεονίνη-3 στρατολογεί το CPC στο κεντρομερίδιο μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με τη Survivin. Επιπλέον, η κινάση Bub1, φωσφορυλιώνοντας την H2A (σκούρο μωβ) στη θρεονίνη-120, παρέχει μια θέση πρόσδεσης στις Shugoshin 1/2 (Sgo1/2) οι οποίες αλληλεπιδρούν με την Borealin, συνεισφέροντας έτσι στη στρατολόγηση του CPC.

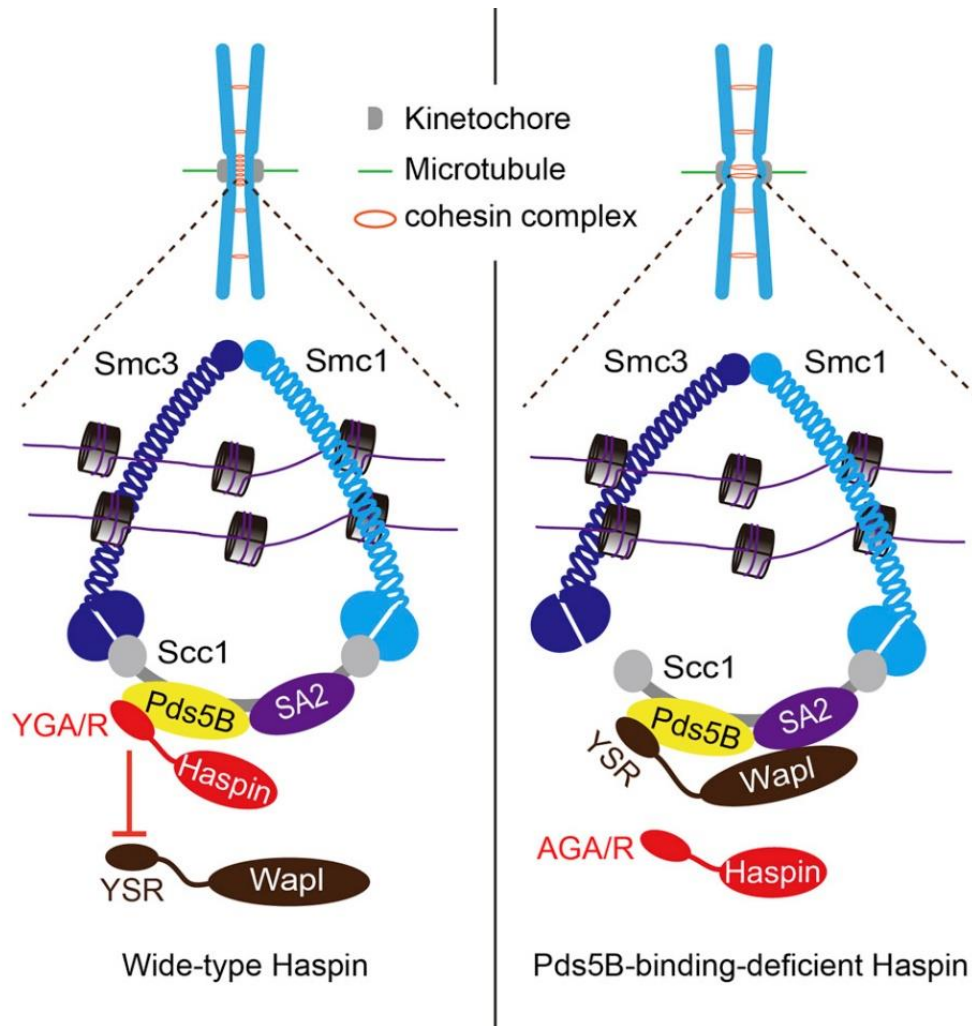


Εικόνα 1.5. Μοντέλο στρατολόγησης της *Haspin* στο κεντρομερίδιο μέσω της σουμοϋλιωμένη τοποϊσομεράσης *IIα*. *A)* Η τοποϊσομεράση *IIα* υφίσταται *SUMOylation*, η *Plk1* φωσφορυλιώνει επιπλέον θέσεις στη *Haspin* καθιστώντας την ενεργή. *B)* Η *SUMOylated* τοποϊσομεράση *IIα* στρατολογεί την ενεργή *Haspin* στο κεντρομερίδιο, η οποία φωσφορυλιώνει την ιστόνη *H3* (μωβ) στη θρεονίνη-3 και αυτή με τη σειρά της στρατολογεί το *CPC* στο κεντρομερίδιο αλληλεπιδρώντας με τη *Survivin*. Επιπλέον, η *H2AT120rh* (σκούρο μωβ) μέσω της *Bub1*, παρέχει μια θέση πρόσδεσης στις *Sgo1/2* οι οποίες συνδέονται με την *Borealin*, συνεισφέροντας έτσι στη στρατολόγηση του *CPC* (20).

Επιπλέον πειραματικές μελέτες απέδειξαν ότι η επώαση σωματικών κυττάρων με ειδικούς αναστολείς της Haspin ή η αποσιώπηση της μέσω siRNA προκαλεί μερική αποσύνδεση της Aurora B από το κεντρομερίδιο και μετατόπισή της στα σκέλη των χρωμοσωμάτων (10,13,15,21).

Η αποδέσμευση της Aurora B από το κεντρομερίδιο επηρεάζει με τη σειρά της τη διάταξη των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μετάφασης. Η Aurora B είναι απαραίτητη για τη διόρθωση σφαλμάτων (error correction) στα σημεία σύνδεσης ανάμεσα στα χρωμοσώματα και τους μικροσωληνίσκους της ατράκτου, καθώς επίσης και την ενεργοποίηση του μηχανισμού SAC (spindle assembly checkpoint-SAC) (22).

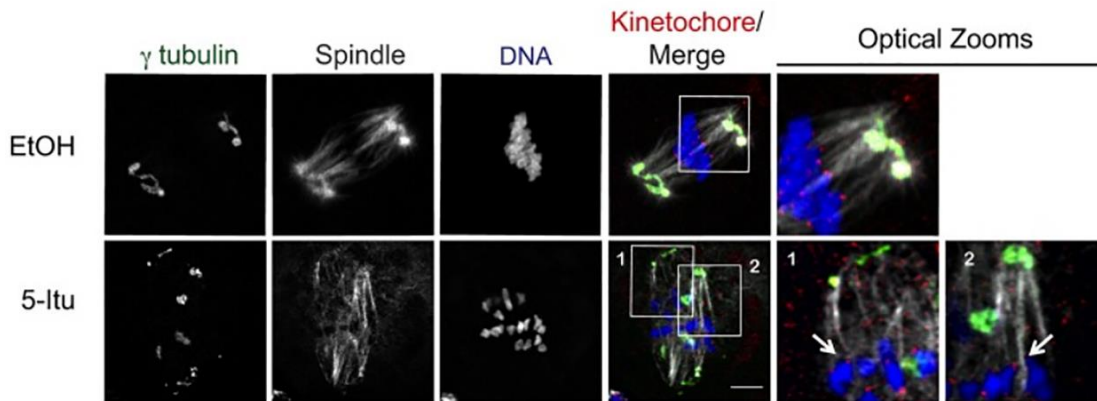
Μια ακόμη μιτωτική λειτουργία στην οποία συμμετέχει η Haspin είναι η σύνδεση μεταξύ των αδελφών χρωματίδων. Κατά την πρόφαση και προμετάφαση, το σύμπλοκο των Cohesins αποδεσμεύεται από τα χρωμοσωμικά σκέλη με τη μεσολάβηση της Polo-1like κινάσης και της ανταγωνιστικής δράσης του παράγοντα Wapl. Ο παράγοντας Wapl δεσμεύεται στην πρωτεΐνη Pds5, η οποία είναι συστατικό στοιχείο του συμπλόκου Cohesins. Ωστόσο, η Haspin συνδέεται με την Pds5B μέσω του αμινο-τελικού της τμήματος στο συντηρημένο μοτίβο YGA/R και εκτοπίζει τον Wapl, γεγονός το οποίο έχει ως συνέπεια την παραμονή του συμπλόκου των Cohesins στη χρωματίνη στην κεντρομεριαδική περιοχή (23). Κύτταρα Haspin-KO ή κύτταρα στα οποία έχει παρεμποδιστεί η σύνδεση Haspin-Pds5B, αδυνατούν να διατηρήσουν το σύμπλοκο Cohesins στο κεντρομερίδιο, με αποτέλεσμα τον πρόωρο διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων.



Εικόνα 1.6. Μηχανισμός αλληλεπίδρασης της *Haspin* με το σύμπλοκο των *Cohesins*. Στην περιοχή του κεντρομεριδίου, η *Haspin* συνδέεται με τον παράγοντα *Pds5* μέσω του μοτίβου *YGA/R* (wild-type, αριστερά), ανταγωνιζόμενη τον παράγοντα *Wapl*, ο οποίος προκαλεί αποσύνδεση του συμπλόκου *Cohesins* από τη χρωματίνη στα σκέλη των χρωμοσωμάτων. Αλλαγή του μοτίβου *YGA/R* σε *AGA/R* (δεξιά) καταστρέφει τη σύνδεση του *Pds5B* επιτρέποντας τη σύνδεση του *Wapl* στο σύμπλοκο των *Cohesins*. Στη συνέχεια, η *Haspin* εκτοπίζεται και η σύνδεση των *Cohesins* μεταξύ των χρωματίδων στο κεντρομερίδιο αποδυναμώνεται προκαλώντας πρόωρο διαχωρισμό τους (23).

Τέλος, η *Haspin* συμμετέχει στην οργάνωση της μιτωτικής ατράκτου κατά τη μείωση των θηλυκών γαμετών (24). Η άτρακτος στα ωοκύτταρα δεν περιέχει τυπικά κεντροσωμάτια, αλλά ένα πλήθος κέντρων οργάνωσης των μικροσωληνίσκων (microtubule organizing centers - MTOCs) που εντοπίζονται στους δυο πόλους. Η *Haspin* διαμεσολαβεί στη στρατολόγηση της

Aurora C, η οποία με τη σειρά της υποβοηθεί την συσσώρευση των MTOCs και τη δημιουργία οργανωμένων «πόλων», από τους οποίους ξεκινάει η συγκρότηση της ατράκτου.



Εικόνα 1.7. Η αναστολή της Haspin προκαλεί τη δημιουργία μη εστιασμένων πόλων της ατράκτου στη μετάφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης. Ωοκύτταρα ποντικού επώαστηκαν *in vitro* με τον αναστολέα της Haspin, 5-ITu για 7 ώρες. Ενώ σε ωοκύτταρα ελέγχου εμφανίστηκαν μόνο δυο σταθεροί και λειτουργικοί πόλοι, σε μεταφασικά κύτταρα όπου έχουν επωαστεί με 5-ITu παρουσιάστηκαν πολλαπλά MTOCs. Με μπλε απεικονίζεται το DNA, με κόκκινο τα κεντρομερίδια (CREST), με πράσινο η γ -tubulin των MTOCs και γκρι οι μικροσωληνίσκοι της ατράκτου (24).

1.1.3 Ανοιχτά ερωτήματα

Παρά την πληθώρα πληροφοριών, πολλά ερωτήματα για τον φυσιολογικό ρόλο της Haspin παραμένουν αναπάντητα. Πρώτον, η Haspin εκφράζεται σε μη διαιρούμενα κύτταρα, όπως οι απλοειδείς σπερματίδες και τα εμπύρηννα ερυθροκύτταρα (1,12). Δεύτερον, τα παράλογα *ALK1* και *ALK2* στο ζυμομύκητα δεν λειτουργούν ως κινάσες της ιστόνης H3, αλλά εμπλέκονται στον έλεγχο της πολικότητας (25,26). Τέλος, έμβρυα από τα οποία έχει απαλειφθεί το γονίδιο της Haspin αναπτύσσονται φυσιολογικά χωρίς να εμφανίζουν ανατομικές ή λειτουργικές ανωμαλίες, εκτός από ορισμένες ατυπίες που παρατηρούνται στους όρχεις (27). Οι παρατηρήσεις αυτές, και ιδιαίτερα η τελευταία, υποδηλώνουν ότι η Haspin εξυπηρετεί κάποια ιστο-ειδική λειτουργία.

Προκειμένου να διερευνηθεί η παραπάνω υπόθεση εργασίας, χρησιμοποιήσαμε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού, τα οποία παρουσιάζουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά αυτό-ανανέωσης, τυχαίου πολλαπλασιασμού και ικανότητα διαφοροποίησης προς όλους τους ιστούς.

1.2 Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ως πειραματικό μοντέλο για τη μελέτη της λειτουργίας της *Haspin*.

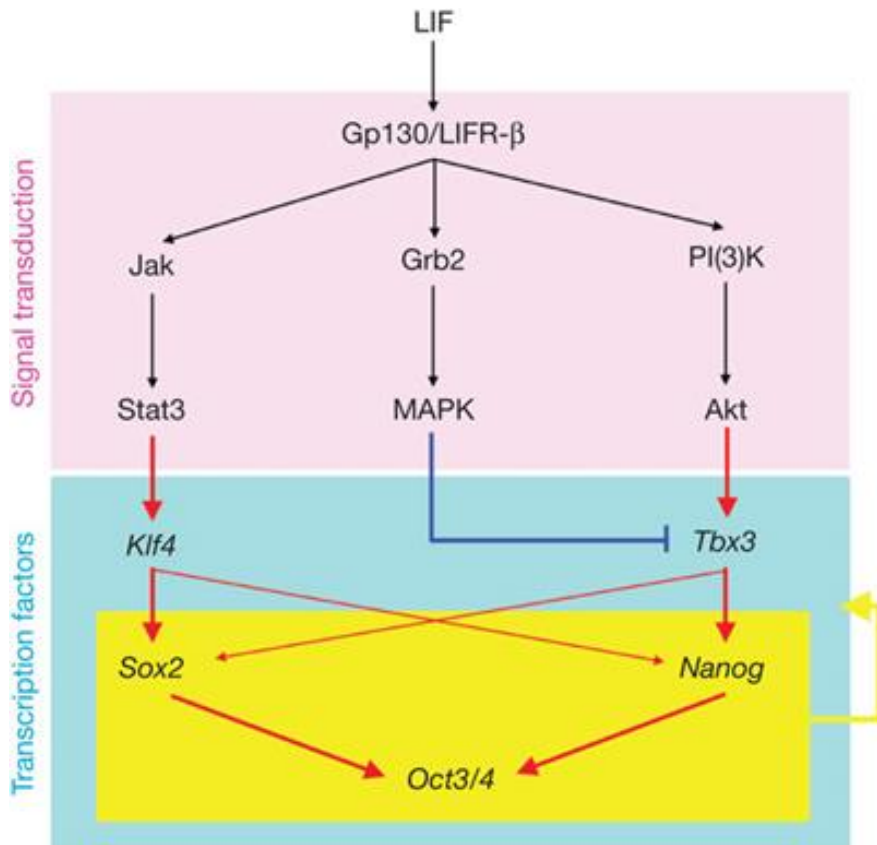
1.2.1. Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και οι βασικές ιδιότητες τους

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (Embryonic Stem Cells, ESCs) προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα (Inner Cell Mass, ICM) που δημιουργείται στο στάδιο της βλαστοκύστης (28–30). Τα κύτταρα αυτά έχουν δυο χαρακτηριστικές ιδιότητες: α) την πολυδυναμία και β) την αυτό-ανανέωση. Τα δυο αυτά χαρακτηριστικά συνδυάζονται με ένα ιδιόμορφο μεταγραφικό καθεστώς και έναν ασυνήθη κυτταρικό κύκλο (31,32).

Με τον όρο «πολυδυναμία» (pluripotency) περιγράφεται η ικανότητα των κυττάρων να δημιουργούν ιστούς που περιέχουν και τις τρεις βλαστικές στιβάδες (ενδόδερμα, μεσόδερμα, εξώδερμα) στο έμβryo ή *in vitro*. Ένα πολυδύναμο κύτταρο δεν έχει προκαθορισμένο πρόγραμμα, έχει ένα «κενό μητρώο» (33,34). Τα έμβρυα θηλαστικών αναπτύσσονται από μια μικρή ομάδα 10-20 πολυδύναμων κυττάρων τα οποία σχηματίζονται λίγες ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Τα γονίδια *Oct3/4*, *Sox2* και *Nanog* αντιπροσωπεύουν τους βασικούς δείκτες πολυδυναμίας. Το *Oct3/4* (POU domain) όπως και το *Sox2* (SRY-related HMG-box) είναι μεταγραφικοί παράγοντες σημαντικοί για τη διατήρηση της πολυδυναμίας στην ICM *in vivo* και *in vitro*. Το *Sox2* συνεργάζεται με το *Oct3/4* προκειμένου να ενεργοποιηθεί η έκφραση πολλών γονιδίων τα οποία ρυθμίζουν την πολυδυναμία (35–40). Ένα από αυτά είναι το *Nanog*. Το *Nanog* πρωτοεκφράζεται στο στάδιο του μοριδίου, συσσωρεύεται στο στάδιο της βλαστοκύστης και η έκφρασή του υποχωρεί λίγο πριν την εμφύτευση. Η υπερέκφραση του *Nanog* είναι ικανή να παρακάμψει την εξάρτηση των βλαστικών κυττάρων που καλλιεργούνται

in vitro από τον παράγοντα LIF (leukemia inhibitory factor), που διατηρεί την πολυδυναμία των βλαστικών κυττάρων στην καλλιέργεια. Αντίστροφα, η απουσία *Nanog* επάγει την τυχαία διαφοροποίηση (36,41).

Στις αρχικές απόπειρες απομόνωσης και καλλιέργειας των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, η διατήρηση της πολυδυναμίας και της ικανότητας αυτο-ανανέωσης τους επιτυγχάνονταν με βάση ένα εμπειρικό πρωτόκολλο. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα βλαστοκύστης καλλιεργούνταν πάνω σε μια στοιβάδα “τροφικών” κυττάρων (feeder cells, ινοβλάστες, στα οποία έχει σταματήσει η διαδικασία της μίτωσης) και προσθέτοντας ορό στο καλλιεργητικό μέσο. Τα τροφικά κύτταρα (feeder cells) έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν έναν βασικό παράγοντα, την κυτοκίνη LIF (leukemia inhibitory factor) (42). Όταν ο LIF συνδεθεί στον μεμβρανικό υποδοχέα Gp130/LIFR-β ενεργοποιούνται παράλληλα τρία συστήματα πρωτεϊνικών κινασών: 1) το σύστημα της κινάσης Janus (JAK), 2) το σύστημα των κινασών MAP/ERK και 3) το σύστημα των κινασών PI(3)K/Akt (Εικόνα 1.8). Στο μονοπάτι της JAK μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Stat3, επάγεται η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Klf4 και μέσω αυτού η μεταγραφή του γονιδίου *Sox2*. Τα άλλα δύο μονοπάτια επηρεάζουν τη μεταγραφή του γονιδίου *Nanog*, μέσω της αδρανοποίησης ή της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Tbx3, αντίστοιχα. Η επαγωγή των Klf4/Tbx3 με τεχνητό τρόπο εξασφαλίζει την αυτο-ανανέωση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ακόμη και απουσία του LIF. Άρα, οι Klf4/Tbx3 θα πρέπει να συμμετέχουν στη σηματοδότηση μέσω LIF (43,44).



Εικόνα 1.8. Σηματοδοτικές οδοί που ενεργοποιούνται από την πρόσδεση του παράγοντα LIF στον υποδοχέα Gp130/LIFR-β (τροποποιημένη εικόνα από (39)).

Έκτοπη έκφραση αυτών των παραγόντων και συνδυασμός τους με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον επαναπρογραμματισμό διαφοροποιημένων κυττάρων ποντικού και ανθρώπου σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (Induced Pluripotent Stem Cells, iPS) (45–50).

Ορισμένοι επιγενετικοί ρυθμιστές εμπλέκονται στη διατήρηση της πολυδυναμίας των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων. Τα σύμπλοκα πρωτεϊνών Polycomb και Trithorax ρυθμίζουν την έκφραση πολυάριθμων αναπτυξιακά σημαντικών γονιδίων μέσω ιστονικών τροποποιήσεων (51). Το πρώτο σύμπλοκο τρι-μεθυλιώνει την ιστόνη H3 στη λυσίνη-27 (H3K27me3), με αποτέλεσμα την στρατολόγηση άλλων συμπλόκων τα οποία επάγουν τη συμπύκνωση της χρωματίνης. Αντίθετα, το σύμπλοκο Trithorax μεθυλιώνει την ιστόνη H3 στη λυσίνη-4 (H3K4me) και προωθεί τη μεταγραφή. Οι παράγοντες αυτοί διαμορφώνουν ζώνες

εντός του γονιδιώματος των πολυδύναμων κυττάρων οι οποίες είτε είναι κατεσταλμένες είτε ενεργοποιημένες περιοχές (52). Ωστόσο, στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα υπάρχουν χρωματινικές περιοχές στις οποίες συνυπάρχουν και οι δυο τροποποιήσεις της ιστόνης H3 (bivalent modifications) (53). Οι περιοχές αυτές διατηρούν σε «ετοιμότητα» τα ιστο-ειδικά γονίδια, που ενεργοποιούνται όμως κατά την έξοδο των κυττάρων από την κατάσταση πολυδυναμίας (53–55).

Η αυτο-ανανέωση (self-renewal) είναι η ικανότητα των βλαστικών κυττάρων να διαιρούνται και να παράγουν περισσότερα βλαστικά κύτταρα, προκειμένου να διατηρηθεί μια «δεξαμενή» αδιαφοροποίητων κυττάρων (44). Ωστόσο, δεν έχουν υποστεί αθανατοποίηση (immortality) και δεν εμφανίζουν σημάδια γήρανσης όπως άλλες πρώιμες κυτταρικές σειρές. Κατά τις πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, τα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν είναι πανομοιότυπα μεταξύ τους. Δηλαδή, ύστερα από κάθε διαίρεση προκύπτουν δύο όμοια εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως συμμετρική αυτο-ανανέωση, σε αντιδιαστολή με την ασύμμετρη διαίρεση όπου τα προϊόντα είναι ένα βλαστικό και ένα προγονικό κύτταρο, το οποίο θα εισέλθει σε πορεία διαφοροποίησης.

Τα προγράμματα αυτο-ανανέωσης περιλαμβάνουν δίκτυα που εξισορροπούν πρωτο-ογκογονίδια (proto-oncogenes), ρυθμιστικά ογκοκατασταλτικά γονίδια (gate-keeping tumor suppressors) και συστατικά ογκοκατασταλτικά γονίδια (care-taking tumor suppressors). Αυτοί οι ενδογενείς μηχανισμοί ρυθμίζονται από εξωγενή σήματα που προέρχονται από τον θώκο (niche), δηλαδή το μικροπεριβάλλον μέσα στο οποίο αναπτύσσονται τα βλαστικά κύτταρα. Η ανάγκη αναγέννησης των ιστών προκαλεί μεταβολές στην κατάσταση του κυτταρικού κύκλου και στο αναπτυξιακό δυναμικό των βλαστικών κυττάρων ενεργοποιώντας διαφορετικά προγράμματα αυτο-ανανέωσης σε διαφορετικά στάδια του κύκλου ζωής. Για παράδειγμα, συστήματα όπως τα προγονικά νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου και του αμφιβληστροειδούς χιτώνα, των νευροβλαστών στη *Drosophila* καθορίζουν χρονικά τον κάθε τύπο νευρώνα που θα δημιουργηθεί κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησής τους (56–58).

Η αυτο-ανανέωση δεν είναι μοναδική ιδιότητα των βλαστικών κυττάρων. Ορισμένοι τύποι προγονικών και διαφοροποιημένων κυττάρων, όπως τα προγονικά νευρικά κύτταρα και τα

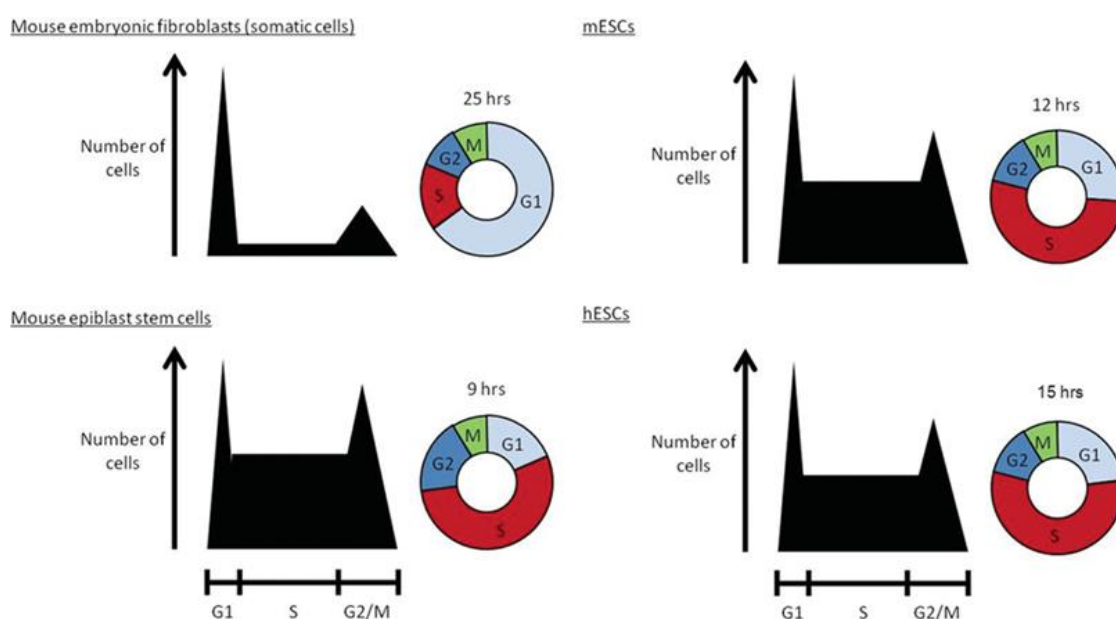
λεμφοκύτταρα, μπορούν επίσης να αυτο-ανανεωθούν (59). Η αυτο-ανανέωση των ιστο-ειδικών βλαστικών κυττάρων εξαρτάται από μιτογόνους μηχανισμούς που ρυθμίζουν τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S, στην οποία εμπλέκονται οι οδοί των p16Ink4a-Rb και p19Arf-p53 (60,61).

Τέλος, ένα βασικό χαρακτηριστικό των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων είναι ότι «αμφιταλαντεύονται» μεταξύ δυο καταστάσεων, της αρχικής (naïve state) και της προχωρημένης (primed state). Οι καταστάσεις αυτές αντιστοιχούν σε δυο αναπτυξιακά στάδια του εμβρύου, δηλαδή το προ- και το μετα-εμφυτευτικό στάδιο της βλαστοκύστης. Η προ-εμφυτευτική βλαστοκύστη περιέχει την ICM, η οποία θα σχηματίσει δυο στοιβάδες, την επιβλάστη και την υποβλάστη. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, τα κύτταρα της επιβλάστης «ωριμάζουν» υιοθετώντας ένα διαφορετικό πρότυπο γονιδιακής έκφρασης. Ένα χαρακτηριστικό της διαδικασίας αυτής είναι η αδρανοποίηση του ενός από τα δυο X χρωμοσώματα που υπάρχει στα θηλυκά, όπως συμβαίνει σε όλα τα σωματικά κύτταρα του ενήλικου ζώου. Όταν τα κύτταρα της προ-εμφυτευτικής βλαστοκύστης διαχωρίζονται για να καλλιεργηθούν *in vitro* και να σχηματίσουν τον πληθυσμό που αποκαλείται εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, είναι ικανά να διατηρήσουν είτε το ανώριμο προφίλ ή να εισέλθουν στην προχωρημένη κατάσταση. Το γεγονός αυτό είναι ανάλογο με τις ιδιαιτερότητες της εμβρυολογικής ανάπτυξης του κάθε είδους. Για παράδειγμα, στον ποντικό η μετάβαση από το προ- στο μετα-εμφυτευτικό στάδιο περιλαμβάνει τον σχηματισμό του λεγόμενου «εμβρυικού κυλίνδρου» (egg cylinder) και πολλές φορές καθυστερεί για μεγάλο χρονικό διάστημα ενόσω το έμβryo παραμένει σε μια αναπτυξιακά «παγωμένη» κατάσταση (diapause). Κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται στο έμβryo του ανθρώπου (62).

1.2.3. Κυτταρικός κύκλος των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από έναν ασυνήθη κυτταρικό κύκλο. Διαιρούνται πολύ γρήγορα με χρόνο διπλασιασμού 8-10 ώρες στον ποντικό και 8-16 ώρες στον άνθρωπο. Η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ελέγχεται από μηχανισμούς οι οποίοι εξασφαλίζουν την ταχεία αντιγραφή και τον ακριβή διαμοιρασμό του γενετικού υλικού στα θυγατρικά κύτταρα. Τα βλαστικά κύτταρα διατηρούν τα αυξημένα

επίπεδα των CDK2, cyclin A/cyclin E, που τους επιτρέπουν την ταχεία είσοδο στη φάση S. Η μεγαλύτερη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου καλύπτεται από τη φάση S (περίπου σε ποσοστό 60%), ενώ οι φάσεις G1 και G2 είναι πολύ σύντομες (63,64). Όταν τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα διαφοροποιηθούν, η διάρκεια της G1 φάσης επιμηκύνεται (μεγαλύτερη από 16 ώρες) και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τους μειώνεται, όπως στα σωματικά κύτταρα.



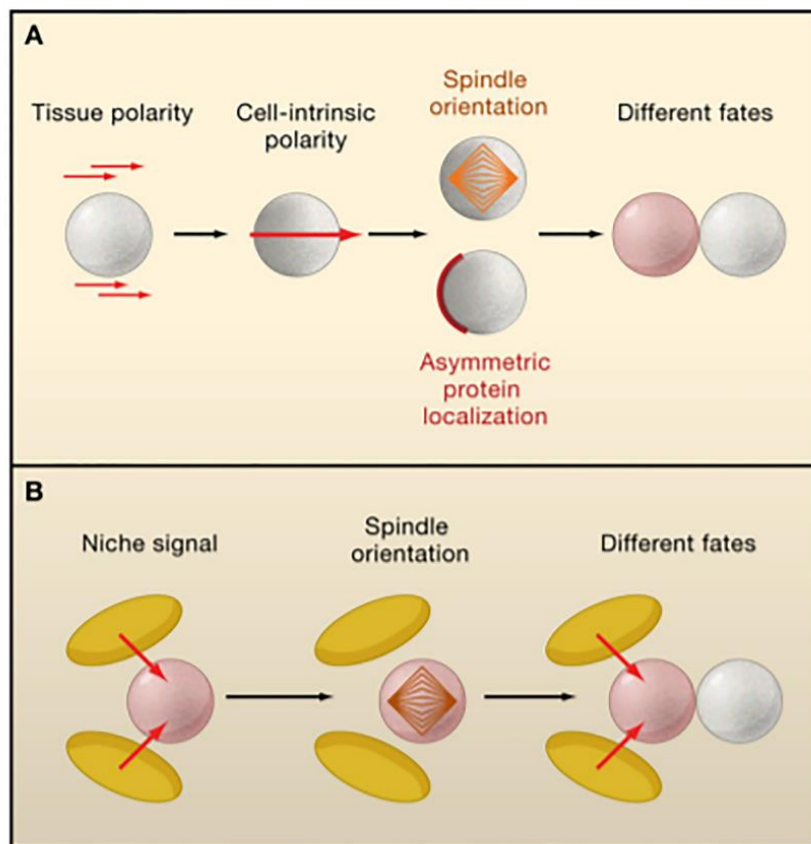
Εικόνα 1.10. Εκτεταμένη φάση S των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων. Σχηματική απεικόνιση του κυτταρικού κύκλου σωματικών και αδιαφοροποίητων βλαστικών κυττάρων. Επισημαίνεται η διαφορά μεταξύ της φάσης S και της G1 μεταξύ των κυτταρικών σειρών (65).

1.3. Ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση

Γενικά χαρακτηριστικά της ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης

Πολλοί πληθυσμοί βλαστικών κυττάρων υφίστανται συμμετρικές, αλλά ταυτόχρονα και ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις. Οι διαιρέσεις αυτές συμβαίνουν είτε με τυχαίο τρόπο είτε

ως απάντηση σε σήματα από το περιβάλλον. Οι συμμετρικές διαιρέσεις υπερτερούν υπό συνθήκες έκπτυξης των βλαστικών κυττάρων, όπως σε περιπτώσεις επαγόμενης διαφοροποίησης και ύστερα από τραυματισμό. Αντίθετα, σε καταστάσεις «ηρεμίας» οι ασύμμετρες διαιρέσεις επιτρέπουν στα βλαστικά κύτταρα να διατηρήσουν ισορροπία μεταξύ των βλαστικών και των διαφοροποιημένων κυττάρων. Για παράδειγμα, στη *Drosophila* οι νευροβλάστες διαιρούνται ασύμμετρα επιτυγχάνοντας το διαχωρισμό της aPKCζ στο θυγατρικό κύτταρο το οποίο θα παραμείνει βλαστικό, ενώ τους παράγοντες Numb, Prospero και Brat σε εκείνο το οποίο θα διαφοροποιηθεί (66–68). Επίσης, βλαστικά κύτταρα θηλαστικών όπως νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος, η βασική στιβάδα της επιδερμίδας, ο σκελετικός μυϊκός ιστός κ.ά. διαιρούνται ασύμμετρα υπό ορισμένες συνθήκες (69,70). Επομένως, η ασύμμετρη διαίρεση θα πρέπει μάλλον να θεωρηθεί ως ένας εναλλακτικός (facultative) τρόπος κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ο οποίος ενεργοποιείται επιλεκτικά οσάκις χρειάζεται να δημιουργηθούν νέοι κυτταρικοί τύποι.



Εικόνα 1.11. Μηχανισμοί επαγωγής ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης (67).

Στις ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις καθοριστικό ρόλο έχει η πολικότητα των θυγατρικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της διαίρεσης ως αποτέλεσμα διαφορετικών σημάτων από το περιβάλλον. Ο προσανατολισμός της μιτωτικής ατράκτου μπορεί να καθορίσει τις θέσεις των θυγατρικών κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του θώκου και την αναπτυξιακή τύχη του κάθε κυττάρου. Για παράδειγμα, τα σπερματογόνια στη *Drosophila* διαιρούνται ασύμμετρα σύμφωνα με τον κάθετο προσανατολισμό της ατράκτου και το περιβάλλον με το οποίο γειτνιάζει το κάθε θυγατρικό κύτταρο (71). Πιο συγκεκριμένα, το θυγατρικό κύτταρο το οποίο μετακινείται αντίθετα από το θώκο τείνει να διαφοροποιηθεί, ενώ εκείνο το οποίο βρίσκεται πλησίον του θώκου παραμένει βλαστικό. Ο προσανατολισμός της μιτωτικής ατράκτου καθορίζεται από τον προσανατολισμό του κεντροσώματος (72). Το μητρικό κεντρόσωμα εγκαθίσταται στην κορυφαία επιφάνεια (πλησίον του hub) και το θυγατρικό κεντρόσωμα εγκαθίσταται στη βασική επιφάνεια (μακριά από το hub) (71). Τα σπερματογόνια έχουν ένα σημείο ελέγχου στη διάρκεια προσανατολισμού της ατράκτου, το οποίο δεν επιτρέπει στα κύτταρα να διαιρεθούν εάν τα κεντροσώματα δεν έχουν τοποθετηθεί στην κορυφαία και τη βασική επιφάνεια, αντίστοιχα (72).

Σκοπός

Οι στόχοι της μελέτης ήταν οι εξής:

- ❖ Η διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου της Haspin στην αυτο-ανανέωση και την έκπτυξη των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων.
- ❖ Η λεπτομερής εξέταση του ρόλου που διαδραματίζει η Haspin κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης.
- ❖ Ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης σε γενωμικό επίπεδο σε κύτταρα στα οποία απουσιάζει ή υπερεκφράζεται η συγκεκριμένη πρωτεΐνη.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων

2.1.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού (E14T) ήταν ευγενική χορηγία του εργαστηρίου του Austin Smith (Cambridge University). Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σε ειδικό διαμορφωμένο χώρο ο οποίος διατηρείται στείρος και ο χειρισμός τους πραγματοποιείται εντός μιας εστίας κάθετης νηματικής ροής. Τα κύτταρα διατηρούνται σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37° C, η ατμόσφαιρα είναι εμπλουτισμένη με σταθερή συγκέντρωση CO₂ 5% και υπάρχουν κατάλληλες συνθήκες υγρασίας. Η καλλιέργεια των E14T δεν απαιτεί συν-καλλιέργεια με τροφικά κύτταρα για την διατήρηση της αυτοανανέωσης και της πολυδυναμίας τους. Απαιτείται μόνο επίστρωση των τρυβλίων με 0.1% διάλυμα ζελατίνης.

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται στην καλλιέργεια των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων GMEM (Glassgow Modified Eagle's Medium) είναι εμπλουτισμένο με 15% εμβρυϊκό ορό βοός (Fetal Bovine Serum, FBS), L-γλουταμίνη 2mM, 0.1 mM μη απαραίτητα αμινοξέα (MEM Non-Essential Amino Acids, MNEA), πυροσταφιλικό νάτριο 1mM, πενικιλίνη 100 units/ml και στρεπτομυκίνη 0,1 mg/ml. Στην καλλιέργεια των κυττάρων προστίθεται β-μερκαπτοαιθανόλη 0,1mM και LIF (Leukemia Inhibitor Factor) που είναι απαραίτητα για την διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης των βλαστικών κυττάρων. Η παρασκευή του γίνεται με υπερέκφραση του αντίστοιχου πλασμιδιακού DNA που φέρει το γονίδιο για την έκφραση του παράγοντα LIF σε κύτταρα Cos και συλλέγεται η εκκρινόμενη πρωτεΐνη από το καλλιεργητικό μέσο. Στη συνέχεια, το υλικό που συλλέχθηκε τιτλοποιείται από ξεχωριστά πειράματα σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα προκειμένου να επιλεγεί η ιδανική συγκέντρωση του.

Άλλες κυτταρικές σειρές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή είναι επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπου HeLa και μια ιδιαίτερη κυτταρική σειρά μυοβλαστών ποντικού, C2C12. Καλλιεργούνται στις ίδιες συνθήκες με τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Το καλλιεργητικό μέσο το οποίο χρησιμοποιείται είναι DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) εμπλουτισμένο με 10% εμβρυικό ορό μόσχου (Fetal Calf Serum, FCS), 2mM L-γλουταμίνη και 2mM πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη.

2.1.2 *In vitro* διαφοροποίηση κυτταρικών σειρών

2.1.2.1 Διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων σε τρεις διαστάσεις

Τα κύτταρα διαφοροποιούνται σε τρεις διαστάσεις (3D) με την τεχνική των «κρεμάμενων σταγόνων» (hanging drops). Αρχικά, τα κύτταρα αφού τρυψινοποιηθούν, 500 μονήρη κύτταρα ανά 20 μl αφήνονται υπό μορφή «κρεμάμενης σταγόνας». Υπό τη μορφή αυτή καλλιεργούνται για διάστημα 2 ημερών ώστε να σχηματιστούν τα εμβρυοειδή σωματίδια (Embryoid bodies, EBs). Τα σχηματιζόμενα σωματίδια μεταφέρονται σε βακτηριακά τρυβλία για περαιτέρω διαφοροποίηση.

Για την ανάπτυξη των σωματιδίων προς διαφοροποίηση μεσοδερμικής κατεύθυνσης, χρησιμοποιείται IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) εμπλουτισμένο με 15% FBS, 2mM πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, 2mM L-γλουταμίνη και 450 mmol/L α-μονοθειογλυκερόλη (1-Thioglycerol, MTG) χωρίς την προσθήκη LIF. Το θρεπτικό μέσο ανανεώνεται μετά την 5^η ημέρα διαφοροποίησης ανά δυο ημέρες καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Σε ένα κύκλο πειραμάτων χρειάστηκε να ακολουθηθεί το παραπάνω πρωτόκολλο με βάση τη δημοσίευση του (73). Σύμφωνα με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο ακολουθείται παρόμοια διαδικασία διαφοροποίησης, όπως με αυτή που περιγράφηκε. Στη συνέχεια, τα σχηματιζόμενα εμβρυοειδή σωματίδια τρυψινοποιούνται, προκειμένου να γίνουν μονήρη κύτταρα και επιστρώνονται αραιά (10-20 κύτταρα/mm²) σε επιστρωμένες καλυπτρίδες με ζελατίνη. Τα

δείγματα μονιμοποιούνται περίπου 12 ώρες αργότερα όπου τα μονήρη κύτταρα έχουν πραγματοποιήσει την πρώτη κυτταρική τους διαίρεση και είναι πλέον ζεύγη.

2.1.2.2 Διαφοροποίηση μυοβλαστών ποντικού

Οι μυοβλάστες C2C12 είναι μια κυτταρική σειρά μερικώς διαφοροποιημένων κυττάρων, τα οποία έχουν την ιδιότητα να διαφοροποιηθούν περαιτέρω σχηματίζοντας συστελλόμενους μυοσωληνίσκους. Η διαφοροποίηση τους επιτυγχάνεται με μείωση του ορού στο καλλιεργητικό μέσο. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλίο και αναπτύσσονται έως ότου η πυκνότητα τους προσεγγίσει το 90%. Τότε, το θρεπτικό μέσο τους αντικαθίσταται με μειωμένη περιεκτικότητα ορού (1%). Μέχρι την 3^η ημέρα διαφοροποίησης το θρεπτικό διαφοροποίησης αντικαθίσταται κάθε 24 ώρες, ενώ μετέπειτα κάθε 12 ώρες. Μέσω της διαδικασίας αυτής, οι μονοπυρηνικοί μυοβλάστες συντήκονται και σχηματίζουν πολυπυρηνικούς μυοσωληνίσκους.

2.1.3 *In vivo* διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (σχηματισμός τερατωμάτων)

Ο σχηματισμός τερατωμάτων εκπονήθηκε σε συνεργασία με τον δρ. Δ. Στέλλα στο εργαστήριο του κ. Α. Κλινάκη, στην Ακαδημία Αθηνών (IBEAA).

Κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία και επώαστηκαν με τον αναστολέα 5-ITu για 26 ώρες, σε συγκέντρωση 1μM. Στη συνέχεια, τα κύτταρα κάθε συνθήκης τρυψινοποιήθηκαν προκειμένου να προκύψουν μονήρη κύτταρα. Μετρήθηκαν 1×10^6 κύτταρα και αφού επαναιωρήθηκαν σε 0.5ml διαλύματος PBS ενέθηκαν υποδόρια στο μηρό ανοσοκατεστελεμένων SCID ποντικών. Στον αριστερό μηρό κάθε ποντικού εισήχθησαν κύτταρα τα οποία πρώτα είχαν επωαστεί με 5-ITu και στον δεξιό μηρό κύτταρα ελέγχου. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 8 ενήλικα πειραματόζωα τα οποία κρατούνται σε χώρο υπό αυστηρά στείρες συνθήκες. Περίπου 4 εβδομάδες μετά την έγχυση των κυττάρων, μια ομάδα τεσσάρων ποντικών θυσιάστηκε προκειμένου να αναλυθεί η πορεία της διαφοροποίησης. Μετά από 8 εβδομάδες θυσιάστηκαν

τα υπόλοιπα πειραματόζωα και αναλύθηκαν τα αποτελέσματα. Οι όγκοι που προέκυψαν χρώσθηκαν με αιματοξυλίνη και ηωσίνη για περαιτέρω ανάλυση.

2.1.4 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με ηλεκτροδιάτρηση

Η συνήθης και επιτυχής μέθοδος διαμόλυνσης των βλαστικών εμβρυονικών κυττάρων είναι η ηλεκτροδιάτρηση. Η ηλεκτροδιάτρηση είναι μια τεχνική εισαγωγής επιλεγμένου DNA σε κύτταρα. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου προκειμένου 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). Για τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, 5×10^6 κύτταρα αραιώθηκαν με 20 μg πλασμιδίου σε τελικό όγκο 400 μl GMEM και χρησιμοποιήθηκαν οι εξής παράμετροι : 200V, 950 μF και 0 Ω .

2.1.5 Δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών βλαστικών κυττάρων

2.1.5.1 Δημιουργία σταθερής σειράς υπερεκφράζοντας τη Haspin

Για τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών τα κύτταρα διαμολύνονται με τα αντίστοιχα πλασμίδια και διαμοιράζονται σε τρυβλίο έξι φρεατίων. Μετά από 24 ώρες από τη διαμόλυνση χορηγείται στα κύτταρα αντιβιοτικό επιλογής, πουρομυκίνη (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) για 12-15 ημέρες έως ότου σχηματιστούν κλωνογενείς αποικίες ικανοποιητικού μεγέθους. Οι σχηματιζόμενες αποικίες συλλέγονται και καθεμία μεταφέρεται σε φρεάτιο τρυβλίου 96 φρεατίων και αναπτύσσονται κλωνογενώς. Πραγματοποιείται αλλαγή του θρεπτικού μέσου και προσθήκη αντιβιοτικού καθημερινά. 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 ελέγχονται για την παρουσία του αντίστοιχου πλασμιδίου.

2.1.5.2 Δημιουργία σταθερής σειράς αποκόπτοντας το γονίδιο της *Haspin*

Η απαλοιφή πραγματοποιείται με τη μέθοδο CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Τα CRISPR είναι τμήματα προκαρυωτικού DNA τα οποία περιέχουν βραχείες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες βάσεων και παίζουν βασικό ρόλο στο αμυντικό σύστημα των βακτηρίων. Αποτελούν τη βάση μιας τεχνολογίας επεξεργασίας του γονιδιώματος που επιτρέπει τη μόνιμη τροποποίηση των γονιδίων μέσα στον οργανισμό. Η νουκλεάση Cas9, αφού εισαχθεί στο κύτταρο, οδηγείται από ένα συνθετικό RNA οδηγό (guide-gRNA) προκειμένου να κόψει το DNA στην επιθυμητή θέση επιτρέποντας την απομάκρυνση των γονιδίων και / ή την προσθήκη νέων.

Για την εκτέλεση του πειραματικού σχεδίου χρησιμοποιούνται κατάλληλοι πλασμιδιακοί φορείς που στοχεύουν ειδικά το συγκεκριμένο γονίδιο από την εταιρία Santa Cruz (με κωδικούς sc-420703-NIC και sc-437281 για το πλασμίδιο ελέγχου). Τα συγκεκριμένα πλασμίδια είναι διαφορετικά μεταξύ τους, το καθένα κωδικοποιεί μια μεταλλαγμένη μορφή της νουκλεάσης Cas9 καθώς και ένα μοναδικό τμήμα 20 νουκλεοτιδίων τα οποία είναι ειδικά για την αλληλουχία του γονιδίου-στόχου (RNA οδηγοί-guide RNA) (βλέπε παρακάτω πίνακα). Το ένα από τα δυο πλασμίδια περιέχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη για την επιλογή των κλώνων και το άλλο έναν μάρτυρα GFP για επιβεβαίωση της διαμόλυνσης.

Guide RNAs for Haspin gene
1) CAGCGACGTAACGAGTCGC
2) AAGGCGCGCTTCAGGTTCGG

Διαμολύνονται εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα με το αντιδραστήριο UltraCruz transfection Reagent, ταυτόχρονα με τα δυο πλασμίδια που περιγράφεται παραπάνω και αφήνονται στην καλλιέργεια ώστε να ανακάμψουν για 24 ώρες, και να εκφράσουν το γονίδιο ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη. Την επόμενη μέρα, προστίθεται 1.5μg/ml του αντιβιοτικού στο θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα καλλιεργούνται παρουσία του για 72 ώρες. Τα κύτταρα που δεν εκφράζουν το γονίδιο ανθεκτικότητας δεν επιβιώνουν. Ακολουθεί απομάκρυνση του αντιβιοτικού από το θρεπτικό μέσο για περίπου 10 ημέρες. Όταν τα κύτταρα αναπτυχθούν

αρκετά, ώστε να σχηματιστούν αποικίες και καλύψουν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, μεταφέρονται διαδοχικά σε τρυβλίο 24 φρεατίων, 12 φρεατίων, 6 φρεατίων και τελικώς σε τρυβλίο 60mm. Οι κλώνοι ελέγχονται για την παρουσία ή απουσία του γονιδίου της Haspin μέσω ελέγχου της παρουσίας ή μη της φωσφορυλίωσης H3T3.

2.1.5.3 Παροδική αποσιώπηση της Haspin σε κύτταρα HeLa

Για τις δοκιμασίες αποσιώπησης της Haspin χρησιμοποιήθηκαν οι εξής αλληλουχίες siRNAs (AM 1093, 141030, 242467) και αλληλουχία ελέγχου RNA (AM4642) από την Ambion. Οι αλληλουχίες αυτές σε συγκέντρωση 20 nM διαμολύνθηκαν σε κύτταρα HeLa με το αντιδραστήριο Lipofectamine RNAiMAX από την Invitrogen, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν και αναλύθηκαν μετά από 48-72 hours.

2.2 Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας

2.2.1 Απομόνωση ολικού RNA και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time qPCR)

Η απομόνωση του ολικού RNA και η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με τη Δρ. Κατερίνα Σουσανά.

Η απομόνωση του ολικού RNA και η κατασκευή του cDNA πραγματοποιήθηκαν με το RNeasy protect mini kit (Qiagen) και το PrimeScript RT Reagent Kit με gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Takara), αντίστοιχα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η qPCR πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα CFXConnect instrument (Biorad) με SYBR Fast Master Mix (2x) Universal (KAPA) και η ανάλυση των δεδομένων και η στατιστική τους έγινε στο πρόγραμμα qbase+ (Biogazelle) σύμφωνα με το MIQE guidelines.

Ο πίνακας 1 περιέχει όλους τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Πίνακας 1. Αναλυτική λίστα των πριμοδοτικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν

Γονίδιο	5' αλληλουχία	3' αλληλουχία
Nanog	CCAGTGGAGTATCCCAGCAT	GTTGGTCCAGGTCTGGTTGT
Oct3/4	TGGGCTAGAGAAGGATGTGG	TGGGAAAGGTGTCCCTGTAG
Klf4	GACTAACCGTTGGCGTGAGG	GTCTAGGTCCAGGAGGTCGT
Sox2	AAAGGGTTCTTGCTGGGTTT	AAACAAGACCACGAAAACGG
Mouse and Human Haspin	ATGCTGAAAAGGTTTATGGGGA	GGCAGGATTTCCCTCAAAGGTTT
Dazl	GCCCGCAAAAGAAGTCTGTG	ACCAACAACCCCCTGAGATG
Scml2	CCACTGGGGTACACACTGAAT	CAGCTCCAATTGTGGCAGGA

2.2.3 Αλληλούχηση RNA (RNA Sequencing)

Η αλληλούχηση RNA πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με τη Δρ. Κατερίνα Σουσανά και τον Dr. Benes Vladimir (Genomics Core Facility, EMBL Heidelberg). Η αλληλούχηση των 75 bp πραγματοποιήθηκε στο NextSeq 500 (Illumina). Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με Δρ. Κατερίνα Σουσανά, Δρ. Παντελής Τοπάλης και τον Δρ. Γεώργιο Σφήκα στην πλατφόρμα Chipster.

2.2.4 Αλληλούχηση μικρών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (Amplicon Sequencing)

Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με τη Δρ. Κατερίνα Σουσανά και τον Dr. Benes Vladimir (Genomics Core Facility, EMBL Heidelberg). Η απομόνωση του γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με γνωστά πρωτόκολλα. Η περιοχή ενδιαφέροντος ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας τους παρακάτω εκκινητές και την πολυμεράση Kara HiFi hot start (KK2601).

For	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTCGAACGTACGCGGCGAGG
Rev	CTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTCTGCGGGAGCCGAGGTC

Τα προϊόντα μεγέθους 250bp αλληλουχίστηκαν στην πλατφόρμα MiSeq (Illumina). Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με τη Δρ. Κατερίνα Σουσανά και τον Δρ. Γεώργιο Σφήκα χρησιμοποιώντας τον δημοσιευμένο αλγόριθμο CRISPResso.

2.3 Μορφολογικές μέθοδοι

2.3.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κύτταρα επιστρωμένα σε γυάλινες επιφάνειες

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός έγινε σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των (74,75). Πιο αναλυτικά, τα κύτταρα έχουν επιστρωθεί μια ή δυο ημέρες πριν σε γυάλινες καλυπτρίδες, μονιμοποιούνται σε διάλυμα 1 ή 4% φορμαλδεΰδης αραιωμένης σε PBS για 10 λεπτά ή σε κρύα μεθανόλη για 6 λεπτά. Το μέσο και ο χρόνος επώασης της μονιμοποίησης των κυττάρων εξαρτάται από το εκάστοτε αντίσωμα το οποίο θα χρησιμοποιηθεί. Ακολουθούν πλύσεις με PBS και στη συνέχεια επώαση του δείγματος για 10 λεπτά με διάλυμα γλυκίνης 5mM διαλυτοποιημένης σε PBS, προκειμένου να εξουδετερωθεί το μέσο μονιμοποίησης. Τα δείγματα εκπλύονται με PBS και εν συνεχεία επωάζονται για 15 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα A το οποίο είναι ικανό να αποκλείει μη ειδικές θέσεις. Το συγκεκριμένο διάλυμα περιέχει 150mM NaCl, 20mM Tris-HCl, 2mM MgCl₂, 0.1mM EGTA, 0.2% Triton X-100, 0.5% Fish skin gelatin (FSG). Ακολουθεί επώαση 1 ώρας με το πρωτεύον αντίσωμα το οποίο έχει αραιωθεί στο διάλυμα A αποκλεισμού ειδικών θέσεων σε κατάλληλη συγκέντρωση σε θερμοκρασία δωματίου και σε θάλαμο υψηλής υγρασίας. Μετά από τρεις πλύσεις με το διάλυμα A τα δείγματα επωάζονται με αντίστοιχο δευτερεύον φθορίζον αντίσωμα στις ίδιες συνθήκες με το πρωτεύον αλλά ο χρόνος επώασης είναι 45 λεπτά. Τα δείγματα εκπλύονται τρεις φορές με το διάλυμα A και άλλες τρεις με PBS έτσι ώστε να ακολουθήσει η χρώση του DNA χρωστικές όπως DAPI, TOPRO-3 είτε ιωδιούχο προπίδιο (PI-propidium iodide) ανάλογα με τις απαιτήσεις του πειράματος. Τέλος, οι καλυπτρίδες εκπλύονται με PBS και αφού καλυφθούν με ένα διάλυμα (Vectashield) το οποίο προστατεύει το δείγμα από την απώλεια του φθορισμού κατά την παρατήρηση, τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Τα δείγματα διατηρούνται στους 4° C και εξετάζονται σε συνεστιακό μικροσκόπιο (Confocal microscope Leica SP5 TCI).

Πίνακας 2. Αναλυτική λίστα των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν

Αντίσωμα	Εταιρία	Μονιμοποίηση	Αραίωση
H3T3ph	Παρασκευή του εργαστηρίου μας	4% φορμαλδεΰδη	1:750
H3K9me3	Novus Biologicals	4% φορμαλδεΰδη	1:200
H3K27me3	Upstate	4% φορμαλδεΰδη	1:400
Nanog	Abcam	4% φορμαλδεΰδη	1:300
Oct-3/4	Santa Cruz	4% φορμαλδεΰδη	1:300
Brachyury	Santa Cruz	4% φορμαλδεΰδη	1:50
Gata 4	Santa Cruz	4% φορμαλδεΰδη	1:100
Nestin	Developmental Studies Hybridoma Bank	4% φορμαλδεΰδη	1:200
Klf4	Abcam	4% φορμαλδεΰδη	1:1000
Aurora B	Abcam	4% φορμαλδεΰδη	1:1000
CREST	A. Tzioufas, Πανεπιστήμιο Αθηνών	1 ή 4% φορμαλδεΰδη	1:300
INCENP	Active Motif	4% φορμαλδεΰδη	1:500
PCNA	Santa Cruz	Μεθανόλη	1:200
α -Tubulin	Sigma-Aldrich	4% φορμαλδεΰδη	1:5000
aPKCζ	Santa Cruz	4% φορμαλδεΰδη	1:300
Desmin	Παρασκευή του εργαστηρίου μας	4% φορμαλδεΰδη	1:500
BrdU	Novus Biologicals	70% Αιθανόλη	1:1000
HP1 α	Millipore	4% φορμαλδεΰδη	1:1000
Lamin A	Παρασκευή του εργαστηρίου μας	1 & 4% φορμαλδεΰδη	1:600
Lamin B	Παρασκευή του εργαστηρίου μας	4% φορμαλδεΰδη	1:600

2.3.2 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε εμβρυοειδή σωματίδια

Τα εμβρυοειδή σωματίδια αναπτύχθηκαν σε καλυπτρίδες επιστρωμένες με ζελατίνη μια ή δυο μέρες πριν την ημέρα παρατήρησης. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται στα εμβρυοειδή σωματίδια είναι παρόμοιο με τον έμμεσο ανοσοφθορισμό των απλών κυττάρων αλλά με κάποιες διαφορές στους χρόνους επώασης. Τα εμβρυοειδή σωματίδια μονιμοποιούνται για 30 λεπτά και ακολουθούν πλύσεις με PBS με 5 λεπτά επώαση η καθεμία και ακολουθεί εξουδετέρωση της φορμαλδεΰδης για 30 λεπτά. Η επώαση με το διάλυμα A διαρκεί για 1 ώρα και στη συνέχεια τα σωματίδια επωάζονται για ακόμα 30 λεπτά με διάλυμα αυξημένης περιεκτικότητας σε Triton X-100 (0.5%). Τα δείγματα επωάζονται με το πρωτεύον αντίσωμα ολονύκτια στους 4° C σε θάλαμο υψηλής υγρασίας, εκπλύονται με το διάλυμα A και εν συνεχεία επωάζονται με το

δευτερεύον αντίσωμα για 45 λεπτά. Οι ακόλουθες πλύσεις και η χρώση του DNA είναι ίδια με τον ανοσοφθορισμό σε κύτταρα.

Κάποιες συνθήκες πειραμάτων απαιτούσαν τα εμβρυοειδή σωματίδια να χρωσθούν όντας σε εναιώρημα και όχι να επιστρωθούν σε γυάλινη επιφάνεια. Το πρωτόκολλο σε αυτήν την περίπτωση είναι το ίδιο με αυτό του έμμεσου ανοσοφθορισμού των εμβρυοειδών σωματίων με τη διαφορά ότι η κάθε επώαση θα πρέπει να πραγματοποιείται σε επιφάνεια που δεν επιτρέπει την προσκόλληση των κυττάρων.

2.3.3 Συνεστιακή μικροσκοπία

Τα δείγματα εξετάστηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica TCS-SP1 και Leica SP5 TCSII ενώ οι φωτογραφίες αναλύθηκαν με χρήση των λογισμικών Fiji (NIH Image), LAS AF Lite (Leica) ή Adobe Photoshop (Adobe) Software.

2.3.4 Μελέτη κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρίας ροής (FACS assays).

Για τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιούνται στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής. Πιο συγκεκριμένα, περίπου 1×10^6 αδιαφοροποίητα κύτταρα εκπλένονται με διάλυμα PBS και τρυψινοποιούνται ώστε να προκύψουν μονήρη κύτταρα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται με διάλυμα το οποίο περιέχει ιωδιούχο προπίδιο (PI) για 20-30 λεπτά για τη χρώση του DNA. Το συγκεκριμένο διάλυμα παρασκευάζεται από το εργαστήριο του κ. Βαρθολομάτου από όπου έγινε και η δωρεά.

2.3.5 Ποσοτικοποίηση θετικών κυττάρων ως προς τους βασικού δείκτες διαφοροποίησης EBs μέσω κυτταρομετρίας ροής (FACS).

Πραγματοποιείται συλλογή των εμβρυοειδή σωματιδίων την ημέρα 4 της διαφοροποίησης, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο, ακολουθούν εκπλύσεις με PBS και προστίθεται διάλυμα

Accumax για 1-3 λεπτά ώστε να διασπασθούν τα EBs και τα κύτταρα να είναι μονήρη. Ακολουθεί έμμεσος ανοσοφθορισμός σύμφωνα με το πρωτόκολλο για τα εμβρυοειδή σωμάτια που ήδη περιγράφηκε. Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται στον πάγο και οι εκπλύσεις των ενδιάμεσων σημείων πραγματοποιούνται με διάλυμα PBS-Triton. Το διάλυμα Α περιέχει 0.5% περιεκτικότητα σε Triton-X100 και το πρώτο αντίσωμα επωάζεται ολονύκτια στους 4° C. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε κυτταρομετρητή BD FACSCALIBUR. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό Cellquest. Για την περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων από το ποσοστό των θετικών κυττάρων αφαιρέθηκε το ποσοστό ψευδώς θετικών λόγω αυτοφθορισμού και θορύβου των δευτερογενών αντισωμάτων (negative controls), ώστε να πραγματοποιηθεί κανονικοποίηση των δειγμάτων.

2.4 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των μορφολογικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το SPSS. Η μέθοδος που επιλέχθηκε σε κάθε περίπτωση προσαρμόστηκε ανάλογα με τα δεδομένα.

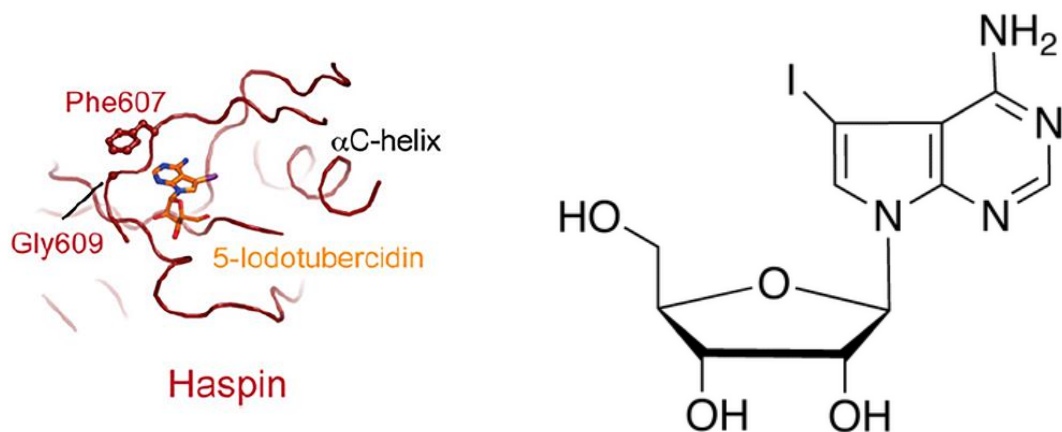
Η στατιστική σημαντικότητα (p value) σε κάθε περίπτωση παρουσιάζεται με αστερίσκους και ειδικότερα * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ και *** $p < 0.001$.

3. Αποτελέσματα

3. Αποτελέσματα

3.1 Ο ρόλος της καταλυτικής περιοχής της Haspin

Επιχειρήσαμε να παρέμβουμε στη λειτουργία της μιτωτικής κινάσης Haspin, που είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση της θρεονίνης-3 της ιστόνης 3 (H3T3ph), προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της στη διάρκεια της μίτωσης. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ένας μικρομοριακός χημικός αναστολέας της Haspin 5-Iodotubercidin (5-ITu). Ο 5-ITu συνδέεται στη θέση πρόσδεσης του ATP και καταστέλλει την ενζυματική δραστηριότητα της κινάσης (IC_{50} 5–9 nM) (8,76).



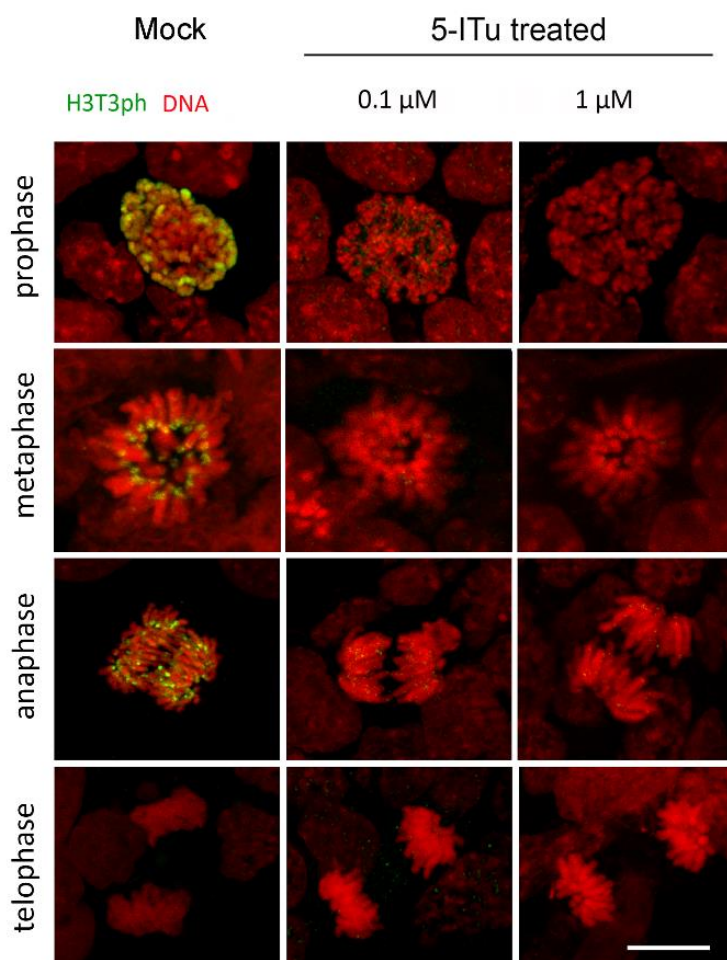
Εικόνα 3.1. Αναπαράσταση της στερεοχημικής δομής της Haspin και της θέσης στην οποία δεσμεύεται ο 5-ITu (76). Στα δεξιά αναπαρίσταται ο χημικός τύπος του αναστολέα 5-Iodotubercidin.

Ωστόσο, η συγκεκριμένη χημική ένωση αναστέλλει και άλλες κινάσες όπως για παράδειγμα τη CLK (Cdc2-like kinase), τη DYRK (dual-specificity tyrosine regulated kinase) και σε μικρότερο βαθμό τη Cdk1/Cyclin B, χωρίς να επηρεάζει τις κινάσες της οικογένειας Aurora. Επί τη βάση ειδικών δοκιμασιών (ΔT_m assays), με τις οποίες μετράται η συγγένεια των αναστολέων μέσω της αύξησης της σταθερότητας του συμπλόκου της πρωτεΐνης με τον

αναστολέα κατά τη σύνδεση τους, αποδεικνύεται ότι η αλληλεπίδραση του 5-ITu με τις προαναφερθείσες κινάσες είναι σχετικά ασθενής. Ο 5-ITu αναστέλλει την καταλυτική δράση της Haspin, χωρίς να επηρεάζονται οι αλληλεπιδράσεις της με άλλες πρωτεΐνες (11).

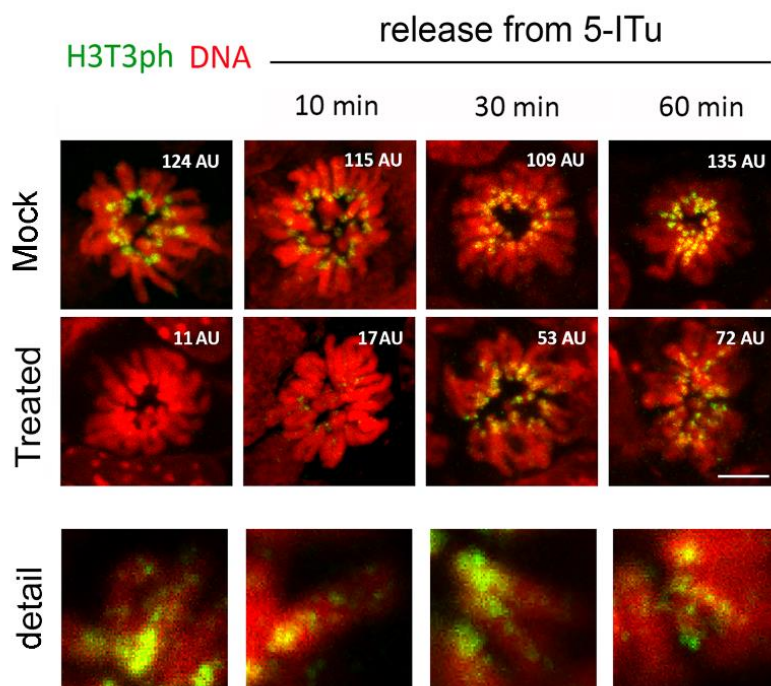
3.1.1 Επιδράσεις του 5-ITu στην κυτταρική διαίρεση

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (21), ο αναστολέας χρησιμοποιείται στα κύτταρα θηλαστικών σε συγκεντρώσεις από 0.1μM έως 1μM. Διαπιστώσαμε ότι στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ο 5-ITu προκαλεί πλήρη αναστολή της H3T3rh τόσο στη μεγαλύτερη όσο στη μικρότερη συγκέντρωση (*Εικόνα 3.2*).



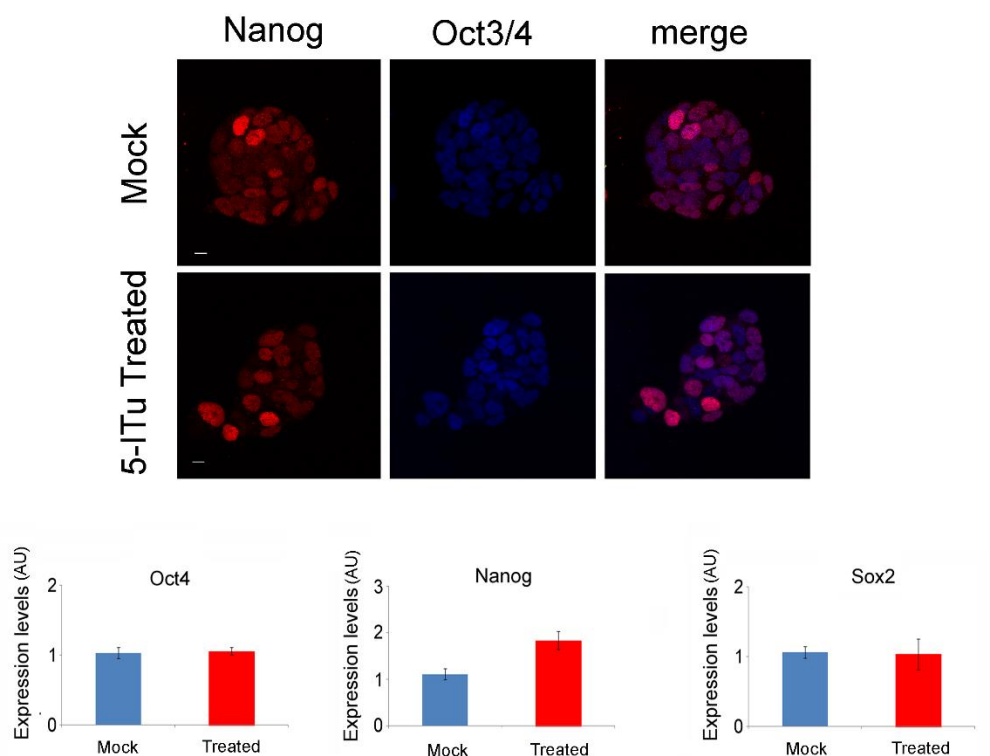
Εικόνα 3.2. Αναστολή της Haspin με τον ειδικό αναστολέα, 5-ITu. Στιγμιότυπα των φάσεων της μίτωσης στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα μετά από επώαση με τον αναστολέα σε συγκεντρώσεις 0.1 μ M και 1 μ M. Κλίμακα 5 μ m.

Η αναστολή της Haspin είναι αντιστρεπτή, καθώς η απομάκρυνσή του 5-ITu από το θρεπτικό μέσο έχει ως αποτέλεσμα την επανεμφάνιση της H3T3ph στα μεταφασικά κύτταρα. Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης επανέρχονται στα φυσιολογικά κατά 50% περίπου, σε χρονικό διάστημα μικρότερο των 30 λεπτών. Το σήμα επανεμφανίζεται κυρίως στην περιοχή του κεντρομεριδίου· ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρούνται περιοχές με πιο ασθενή φθορισμό στα σκέλη των χρωμοσωμάτων (Εικόνα 3.3, λεπτομέρεια). Δεδομένης της εξαιρετικά χαμηλής έκφρασης της Haspin στα σωματικά κύτταρα (4) και της μη διαθεσιμότητας κατάλληλων αντισωμάτων, αυτές οι παρατηρήσεις παρέχουν μια πρώτη ένδειξη ότι η ενεργή μορφή της ενδογενούς πρωτεΐνης εντοπίζεται πρωτίστως, αλλά όχι αποκλειστικά, στο κεντρομερίδιο.



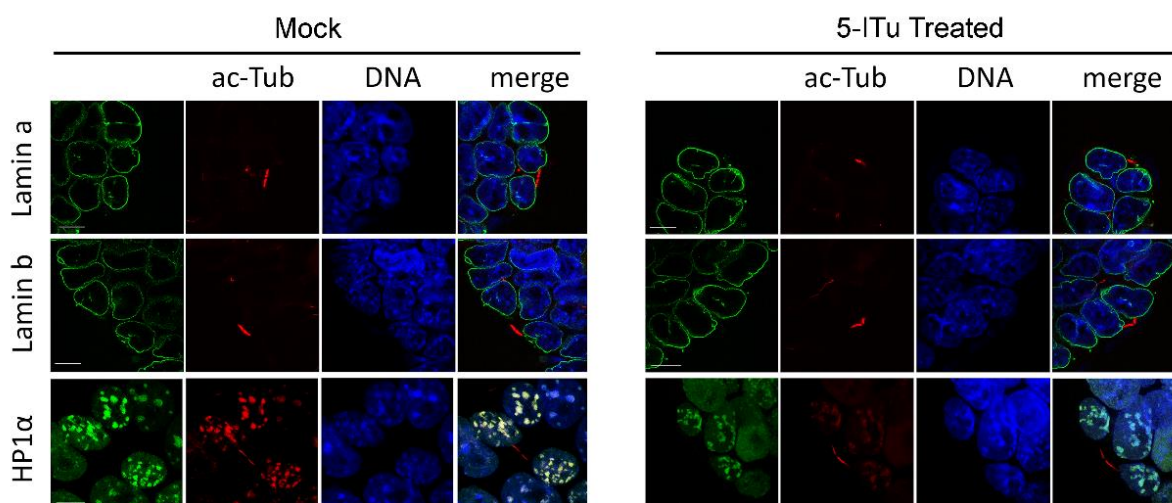
Εικόνα 3.3. Η αντιστρεπτή δράση του αναστολέα της *Haspin*. Αντιπροσωπευτικά στιγμιότυπα μεταφάσεων σε κύτταρα που έχουν επωαστεί με 5-ITu και μετά καλλιεργηθεί απουσία του σε διάστημα 10, 30 και 60 λεπτών. Η κάτω σειρά δείχνει περιοχές των χρωμοσωμάτων σε μεγαλύτερη μεγέθυνση. Κλίμακα 5μm. $n > 100$, όπου n ο αριθμός των μεταφασικών κυττάρων που μετρήθηκε σε κάθε χρονικό στιγμιότυπο. Οι αριθμοί επάνω δεξιά σε κάθε πλαίσιο αντιπροσωπεύει την ένταση του σήματος της H3T3ph σε Arbitrary Units (AU).

Πειράματα qRT-PCR και εμμέσου ανοσοφθορισμού δείχνουν μια μικρή αύξηση στην έκφραση του παράγοντα πολυδυναμίας Nanog, σε αντίθεση με το Oct4 και το Sox2 τα οποία δεν εμφανίζουν μεταβολή στην έκφρασή τους. Η αύξηση αυτή δεν είναι όμως στατιστικά σημαντική (Εικόνα 3.4). Κατά συνέπεια, ο 5-ITu δεν φαίνεται να επηρεάζει την κατάσταση πολυδυναμίας των βλαστικών κυττάρων.



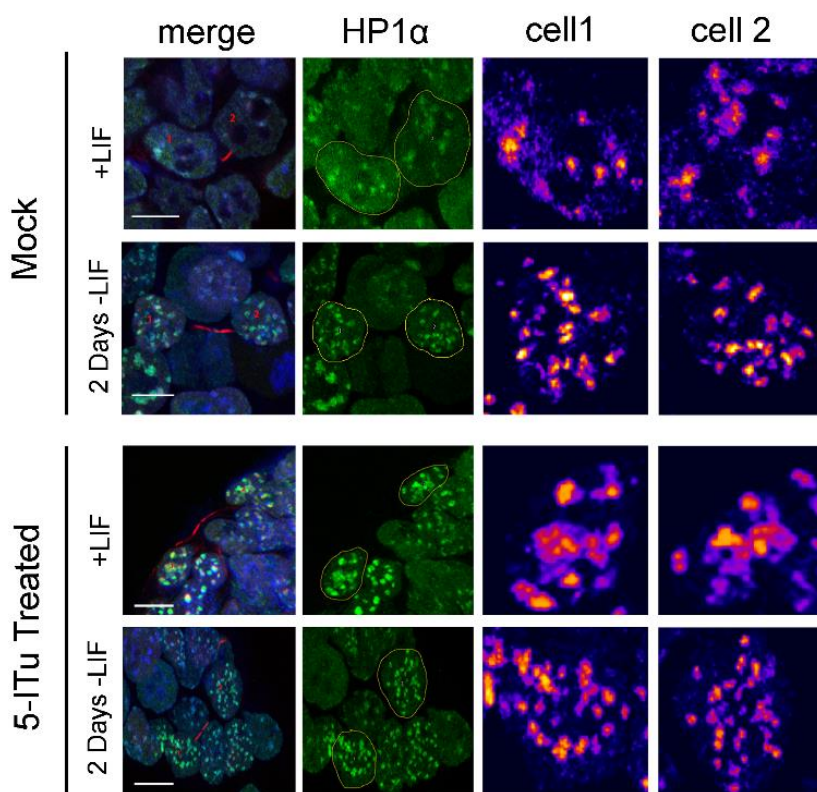
Εικόνα 3.4. Έλεγχος πολυδυναμίας των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ύστερα από την αναστολή της Haspρίν μέσω του 5-ITu. Έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντισώματα που αναγνωρίζουν τους δείκτες Nanog και Oct3/4 (επάνω). Κλίμακα 10μm. Επίπεδα έκφρασης των Nanog, Oct3/4 και Sox2 σε κύτταρα τα οποία έχουν επωαστεί με τον 5-ITu, με qRT-PCR (κάτω) σε μονάδες Arbitrary Units (AU).

Κύτταρα τα οποία έχουν επωαστεί με τον 5-ITu ολοκληρώνουν τη μίτωση χωρίς εμφανή προβλήματα στον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και την ανασυγκρότηση των πυρήνων στα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν. Ο διαχωρισμός χρωματινικών πρωτεϊνών (π.χ. HP1α) και πρωτεϊνών του πυρηγικού φακέλου (Lamin A και B) στα θυγατρικά κύτταρα ακολουθεί επίσης τα γνωστά πρότυπα (Εικόνα 3.5).



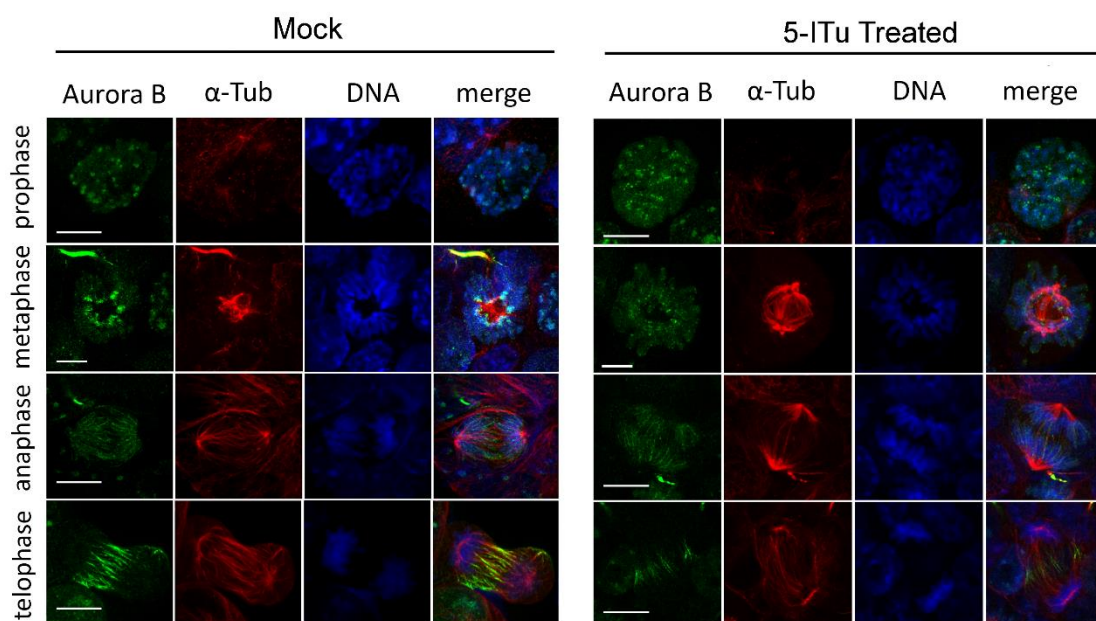
Εικόνα 3.5. Η αναστολή της Haspin δεν επιδρά στην οργάνωση της χρωματίνης και του πυρηνικού φακέλου στα θυγατρικά κύτταρα μετά τη μίτωση. Χρώση θυγατρικών κυττάρων που έχουν επωαστεί με 5-ITu, μέσω εμμέσου ανοσοφθορισμού για τις πρωτεΐνες Lamin A και B, HP1α. Κλίμακα 5μm. $n > 50$, όπου n ο αριθμός των ζευγών θυγατρικών κυττάρων που μελετήθηκαν ύστερα από χρώση κάθε αντισώματος σε κάθε συνθήκη.

Με πιο ενδελεχή έλεγχο, οι ετεροχρωματικές εστίες των κυττάρων που έχουν επωαστεί με τον αναστολέα παρουσιάζουν διαφορετική μορφή από εκείνη των κυττάρων ελέγχου. Ανάλυση μέσω του προγράμματος *FiJI*, με το οποίο η εικόνα του κάθε ζεύγους κυττάρων μετατρέπεται σε χάρτη επιφανείας (surface plot), δείχνει ότι τα κύτταρα στα οποία έχει ανασταλεί η Haspin εμφανίζουν περισσότερες σε αριθμό και μικρότερες σε μέγεθος ετεροχρωματικές εστίες συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου (Εικόνα 3.6). Αν και το γεγονός αυτό υποδηλώνει μια πιθανή «μετάβαση» από την πρωταρχική (*naïve*) στην προχωρημένη (*primed*) κατάσταση (βλέπε Εισαγωγή), άλλες ατυπίες δεν παρατηρούνται.



Εικόνα 3.6. Η αναστολή της *Haspin* επηρεάζει μερικώς την οργάνωση της χρωματίνης μετά τη **μίτωση**. Προφίλ ετεροχρωματικών εστιών στα δυο θυγατρικά κύτταρα παρουσία και απουσία του LIF και 5-ITu, όπως φαίνεται μετά από χρώση που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη HP1α. Στα δεξιά παρουσιάζονται οι αντίστοιχοι χάρτες επιφανείας των δυο κυττάρων. Κλίμακα 10μm. $n > 25$, όπου n ο αριθμός των ζευγών θυγατρικών που μελετήθηκαν και αναλύθηκαν μέσω του προγράμματος Fiji.

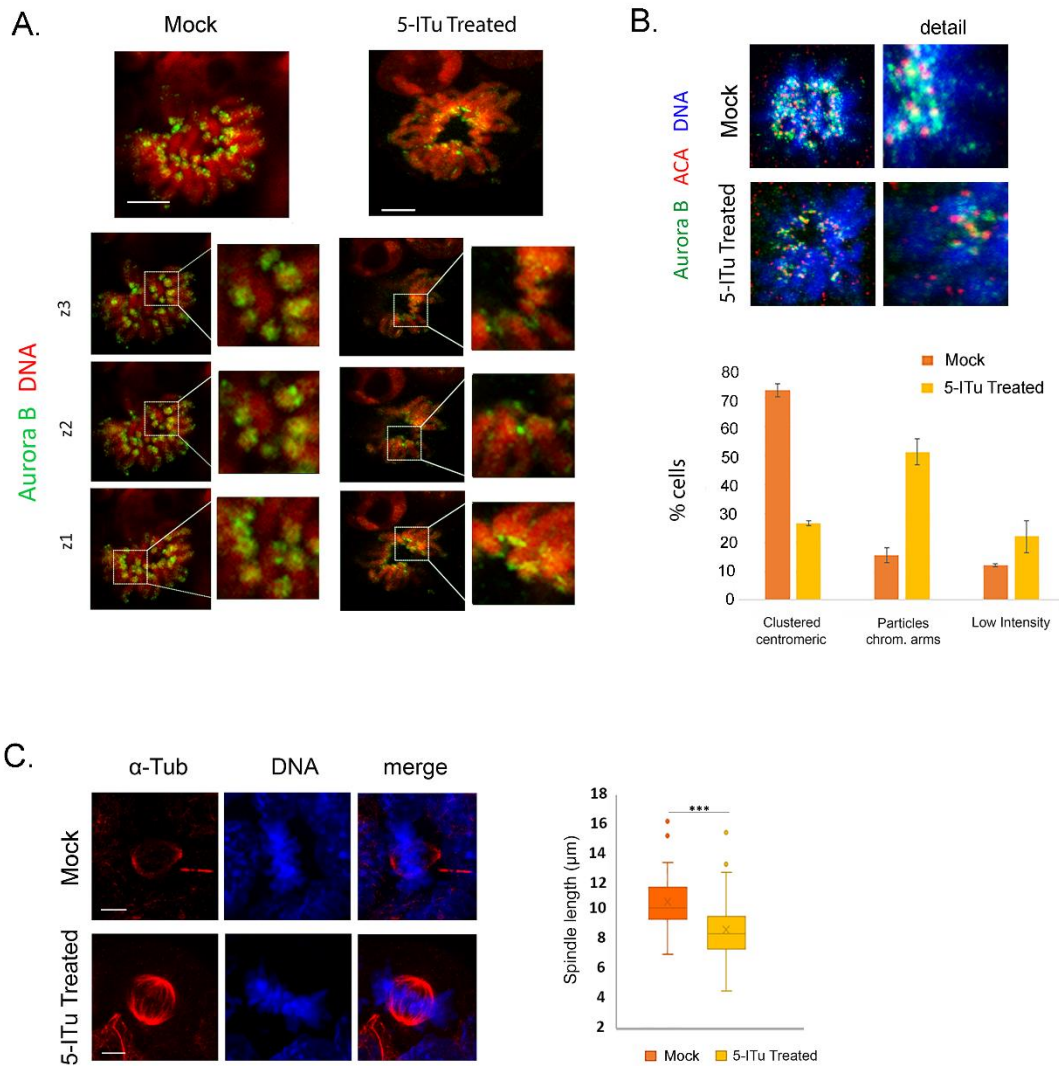
Ωστόσο, η έλλειψη της H3T3ph επιδρά σημαντικά στον εντοπισμό του συμπλόκου CPC (Centromere Passenger Complex) κατά τη διάρκεια της μετάφασης, όπως προκύπτει από την κατανομή της Aurora B. Συγκεκριμένα, η επώαση των κυττάρων με 5-ITu προκαλεί μερική μετακίνηση της Aurora B από το κεντρομερίδιο στα χρωμοσωμικά σκέλη, όπως έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7. Η αναστολή της Haspin απεντοπίζει μερικώς την Aurora B από το κεντρομερίδιο κατά τη διάρκεια της μετάφασης. Οι εικόνες δείχνουν στιγμιότυπα μιτωτικών κυττάρων μετά από χρώση με αντισώματα που αναγνωρίζουν την Aurora B και την α -Tubulin. Κλίμακα 5 μ m.

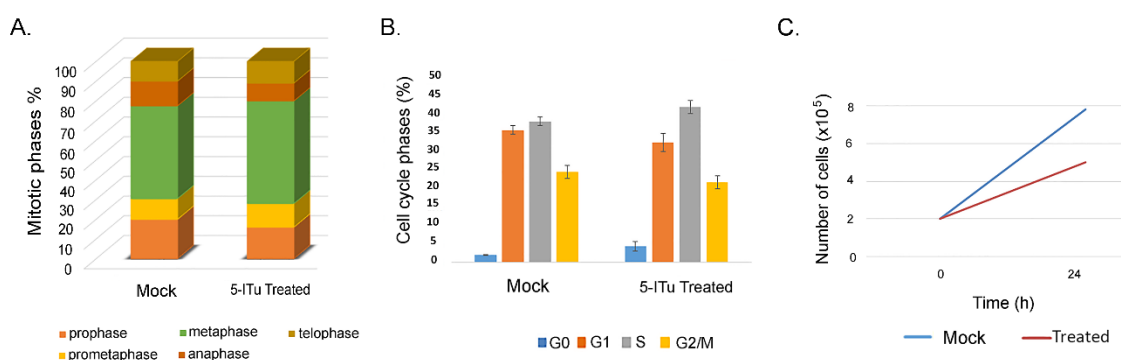
Πιο αναλυτική καταγραφή της κατανομής της Aurora B παρουσία/απουσία 5-ITu αποκαλύπτει ότι η πρωτεΐνη εντοπίζεται είτε σε ευμεγέθη συσσωματώματα που συμπίπτουν με το κεντρομερίδιο (Clustered, centromeres), είτε σε κοκκία που εντοπίζονται στα χρωμοσωμικά σκέλη (Particles, chromosome arms). Επίσης, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι περίπου 20% των κυττάρων εμφανίζει πολύ ασθενές σήμα Aurora B (low intensity), όπως έχει ήδη αναφερθεί από τους Baron και τους συνεργάτες του (77).

Η δομή της μιτωτικής ατράκτου στα κύτταρα που έχουν επωαστεί με τον 5-ITu εμφανίζει ατυπίες. Συγκεκριμένα, στα κύτταρα αυτά η απόσταση μεταξύ των πόλων της μιτωτικής ατράκτου είναι περίπου 20% μικρότερη συγκριτικά με αυτή των κυττάρων ελέγχου (Εικόνα 3.8).



Εικόνα 3.8. Η αναστολή της *Haspin* προκαλεί μεταβολές στην κατανομή της *Aurora B* και στην οργάνωση της μιτωτικής ατράκτου. (A,B) Κατανομή της *Aurora B* σε σχέση με τη θέση του κεντρομεριδίου σε κύτταρα τα οποία έχουν επωαστεί με τον αναστολέα 5-ITu. Για μεγαλύτερη ευκρίνεια αναπαρίστανται η μεγίστη προβολή (*maximum projection*) και τρεις τομές κάθε κυττάρου (z1, z2, z3). Στα δεξιά κάθε συνθήκης υπάρχουν εικόνες σε μεγαλύτερη μεγέθυνση. Κλίμακα 5μm. Το ιστόγραμμα απεικονίζει τα ποσοστά μεταφασικών κυττάρων στα οποία η *Aurora B* κατανέμεται στις κατηγορίες που αναφέρονται στο κυρίως κείμενο (*Clustered centromeres*, *Particles chromosome arms* και *Low intensity*). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω χ^2 και $p=1.2 \times 10^{-14}$. (C) Απεικόνιση της μιτωτικής ατράκτου σε μεταφασικά κυττάρω επωασμένα με τον αναστολέα 5-ITu. Κλίμακα 5μm. Διάγραμμα (*box plot*) που απεικονίζει την απόσταση μεταξύ των πόλων της ατράκτου σε κάθε συνθήκη, σε σχέση με εκείνη των κυττάρων ελέγχου με $p=9.4 \times 10^{-15}$.

Παρόλα αυτά, σε επίπεδο κυτταρικού κύκλου και ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων δεν παρουσιάζονται εμφανείς αποκλίσεις. Τα ποσοστά προφασικών, προμεταφασικών, μεταφασικών, αναφασικών και τελοφασικών είναι περίπου τα ίδια με εκείνα των κυττάρων ελέγχου, με εξαίρεση μια μικρή αύξηση στη διάρκεια της μετάφασης. Σε συνάρτηση με αυτό, η καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων δείχνει επίσης μια μικρή καθυστέρηση όταν η Hasprin αναστέλλεται (Εικόνα 3.9).

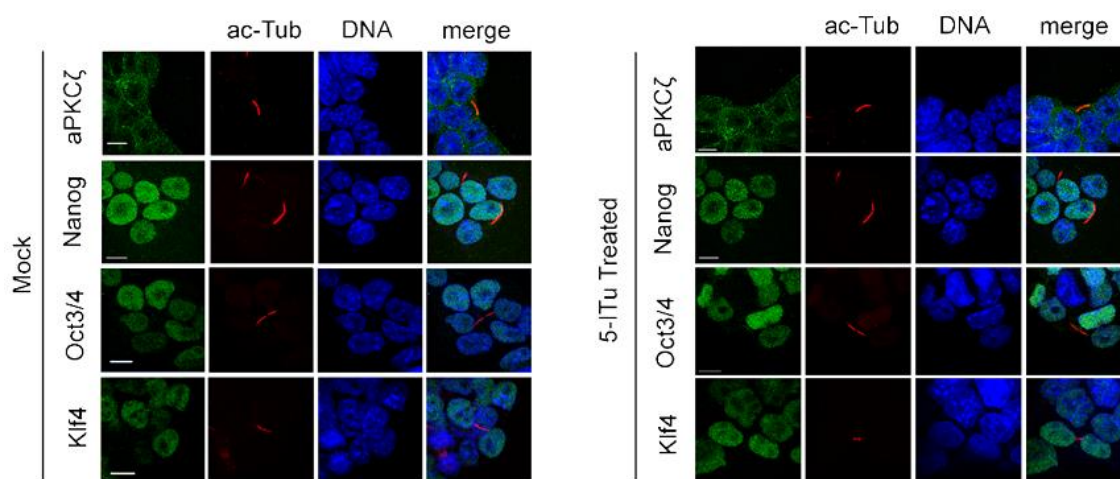


Εικόνα 3.9. *Επιδράσεις της αναστολής της Hasprin στην πρόοδο της μίτωσης, τον κυτταρικό κύκλο και την κινητική ανάπτυξης των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων. (Α) Ποσοστά φάσεων της μίτωσης. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χ^2 , με $p = 2.3 \times 10^{-1}$. (Β) Ιστόγραμμα που απεικονίζει τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής (FACs). (C) Καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων.*

Τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν προς κάθε τύπο εμβρυονικού δέρματος, με αφαίρεση του LIF από το καλλιεργητικό μέσο. Στις συνθήκες διαφοροποίησης απαντώνται υποπληθυσμοί διαφόρων κυτταρικών τύπων, γεγονός που έχει ερμηνευθεί ως μια ένδειξη ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης (βλέπε *Εισαγωγή*). Για αυτόν ακριβώς το λόγο διερευνήσαμε την παρουσία ασύμμετρα διαιρούμενων κυττάρων τόσο στην αδιαφοροποίητη όσο και στη διαφοροποιημένη κατάσταση.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε μονιμοποιημένα δείγματα με τη χρήση αντισώματος που αναγνωρίζει την κινάση aPKCζ (έναν κλασικό δείκτη ασυμμετρίας). Επιπλέον, μελετήθηκε η

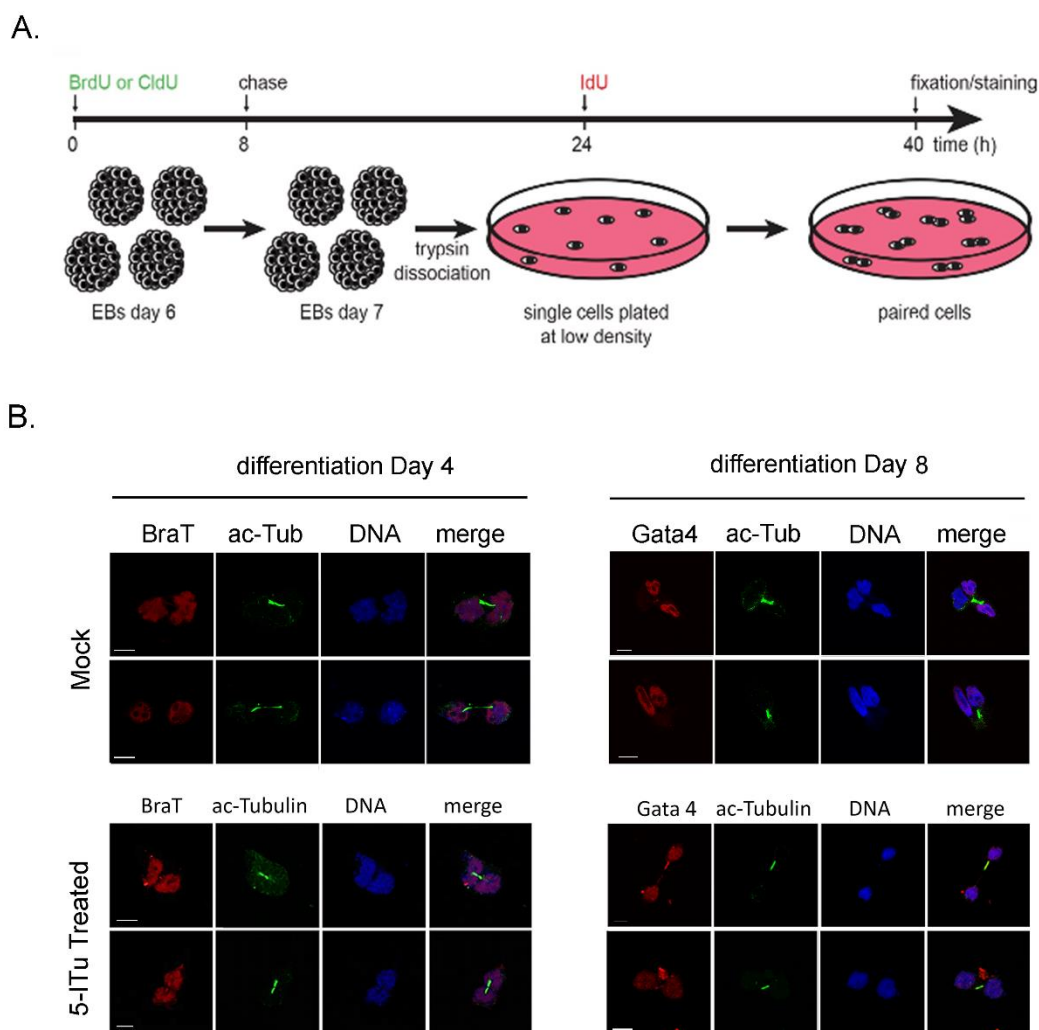
κατανομή των παραγόντων πολυδυναμίας Nanog, Oct3/4 και Klf4. Για την καλύτερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων, εξετάστηκαν ζεύγη κυττάρων που παρέμεναν συνδεδεμένα με μεσόσωμα (midbody), ώστε να προσδίδεται μια σχετική βεβαιότητα ότι πρόκειται περί θυγατρικών. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.10, δεν παρατηρήθηκε ανισομερής κατανομή των δεικτών aPKCζ, Nanog, Oct4, Klf4 σε κύτταρα ελέγχου ή κύτταρα που είχαν επωαστεί με τον 5-ITu, ανεξάρτητα από την κατάσταση της διαφοροποίησης. Ανάλογα πειράματα σε ένα άλλο σύστημα κυττάρων που μπορεί να διαφοροποιηθεί εν μέρει *in vitro*, τα μυογενή κύτταρα C2C12, έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα.



Εικόνα 3.10. Η αναστολή της Haspin δεν επηρεάζει το πρότυπο της κυτταρικής διαίρεσης στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Οι εικόνες απεικινίζουν ζεύγη θυγατρικών κυττάρων που συνδέονται με μεσόσωμα μετά από χρώση με αντισώματα που αναγνωρίζουν τους δείκτες aPKCζ, Nanog, Oct4 και Klf4. Κλίμακα 5μm. n>30, όπου n ο αριθμός ζευγών κυττάρων που μελετήθηκαν σε κάθε κατηγορία αντισώματος σε κάθε συνθήκη.

Σε μια σχετικά πρόσφατη δημοσίευση (73), έχει αναφερθεί ότι τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ανθρώπου και ποντικού διαιρούνται ασύμμετρα κατά την 7η ημέρα της διαφοροποίησής τους. Επιπρόσθετα, στο πειραματικό πρωτόκολλο των Elabd et al η διαφοροποίηση έγινε σε τρεις διαστάσεις με τη δημιουργία εμβρυοειδών σωματίων (Embryoid bodies, EBs), τρυψινοποίηση και μελέτη μονήρων κυττάρων σε διασπορά.

Χρησιμοποιώντας το συγκεκριμένο πρωτόκολλο μελετήθηκε την κατανομή των δεικτών Brachyury (BraT) και Gata4, σε κύτταρα ελέγχου και κύτταρα που έχουν επωαστεί με τον 5-ITu. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.11 οδηγούν στο συμπέρασμα ότι δεν παρατηρούνται ασυμμετρίες υπό τις συνθήκες που πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος.



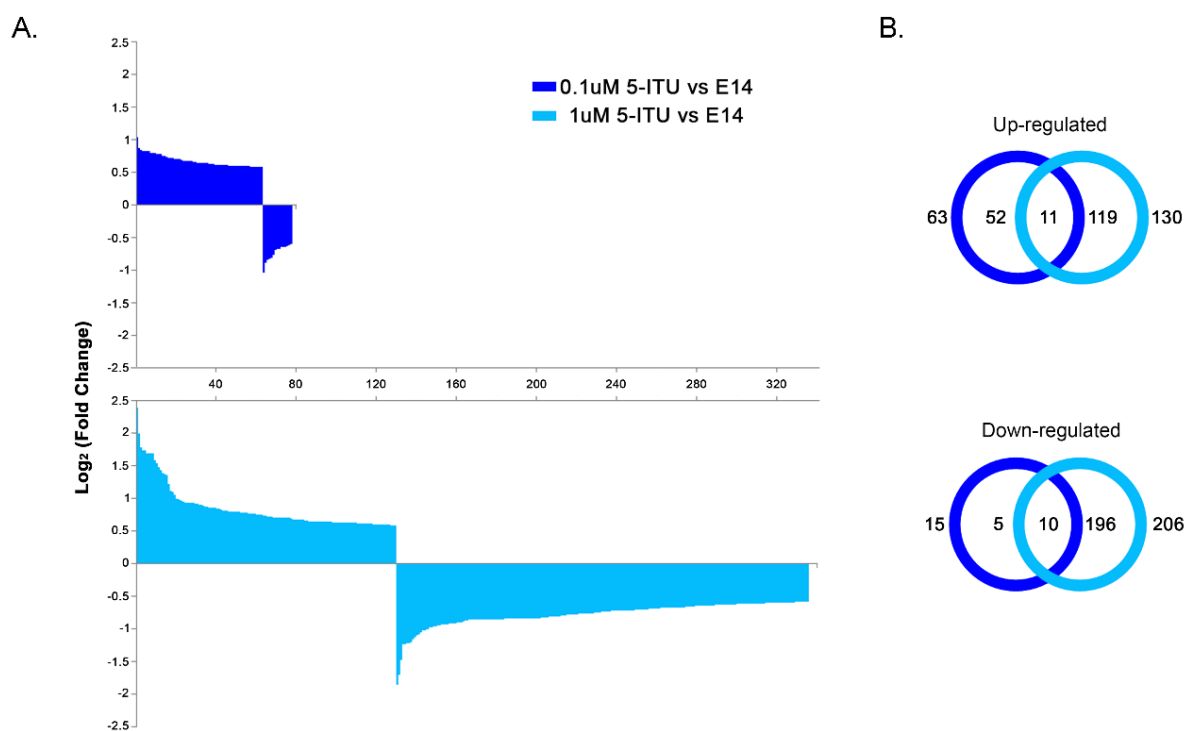
Εικόνα 3.11. Η αναστολή της *Haspin* δεν επηρεάζει το πρότυπο της κυτταρικής διαίρεσης στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα κατά τη διαφοροποίηση. A) Αναπαράσταση του πρωτοκόλλου των *Elabd et al.* (B) Εικόνες κυττάρων που συνδέονται με μεσόσωμα μετά από χρώση με αντισώματα που αναγνωρίζουν τους δείκτες *BraT* και *Gata4*. Κλίμακα 5 μ m. $n > 30$, όπου n ο αριθμός των ζευγών θυγατρικών κυττάρων που μετρήθηκαν και μελετήθηκαν για κάθε αντίσωμα σε κάθε συνθήκη.

Από το σύνολο των πειραμάτων που περιγράφηκαν παραπάνω προκύπτει ότι η Haspin δεν εμπλέκεται στην ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση, η οποία εξάλλου δεν παρατηρείται στο συγκεκριμένο πειραματικό σύστημα και υπό τις πειραματικές συνθήκες που αναλύθηκαν προηγουμένως.

3.1.2 Επιδράσεις του 5-ITu στη γονιδιακή έκφραση

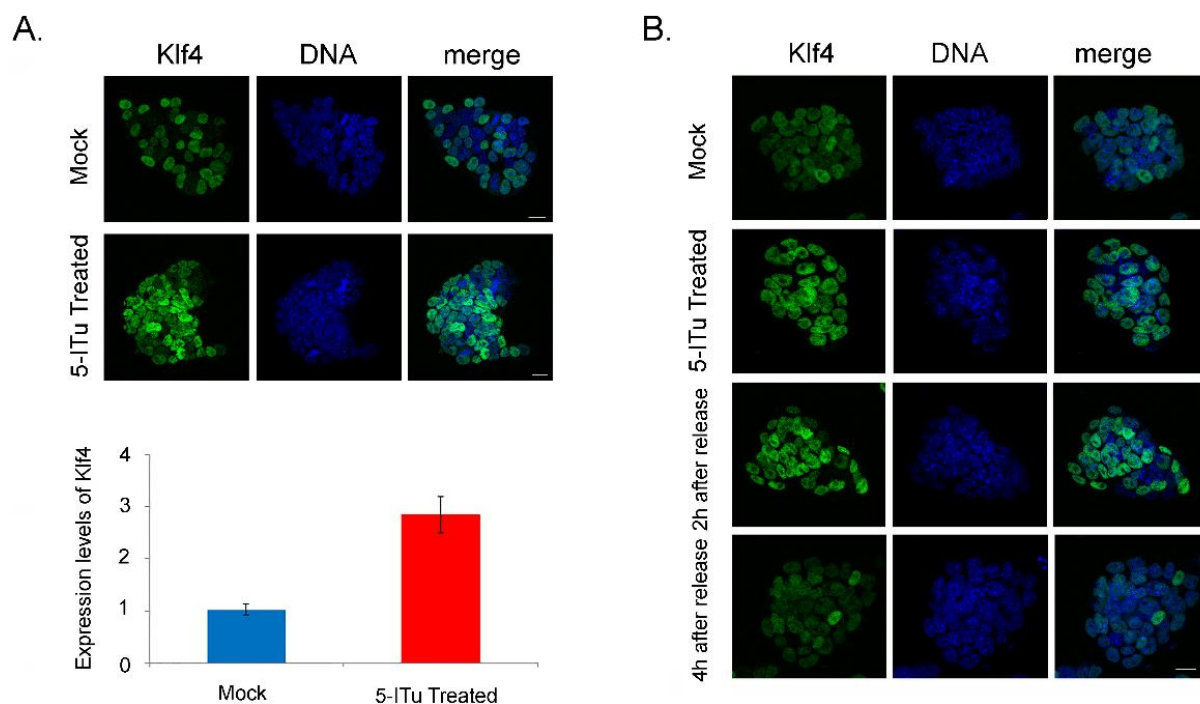
Για να διερευνηθούν σε μεγαλύτερο βάθος οι επιδράσεις σε μεγαλύτερη λεπτομέρεια τις επιδράσεις του αναστολέα της Haspin, αναλύθηκαν κύτταρα που είχαν επωαστεί με 5-ITu σε συγκεντρώσεις 0.1μM και 1μM με μικροσυστοιχίες DNA (DNA microarrays). Με τη μέθοδο αυτή συγκρίνονται τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων με εκείνα των κυττάρων ελέγχου σε όλη την έκταση του γονιδιώματος.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.12 δείχνουν ότι ένας ικανοποιητικός αριθμός γονιδίων επηρεάζεται από τον αναστολέα της Haspin. Παρουσία 0.1μM 5-ITu, σε 63 γονίδια παρατηρείται αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας κατ' ελάχιστο 1,5 φορές, ενώ σε 15 γονίδια παρατηρείται μείωση. Επίσης, παρουσία 1μM 5-ITu, 130 γονίδια αυξάνουν την έκφρασή τους, ενώ 206 γονίδια τη μειώνουν. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί η αύξηση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα πολυδυναμίας Klf4 κατά 1,7 φορές.



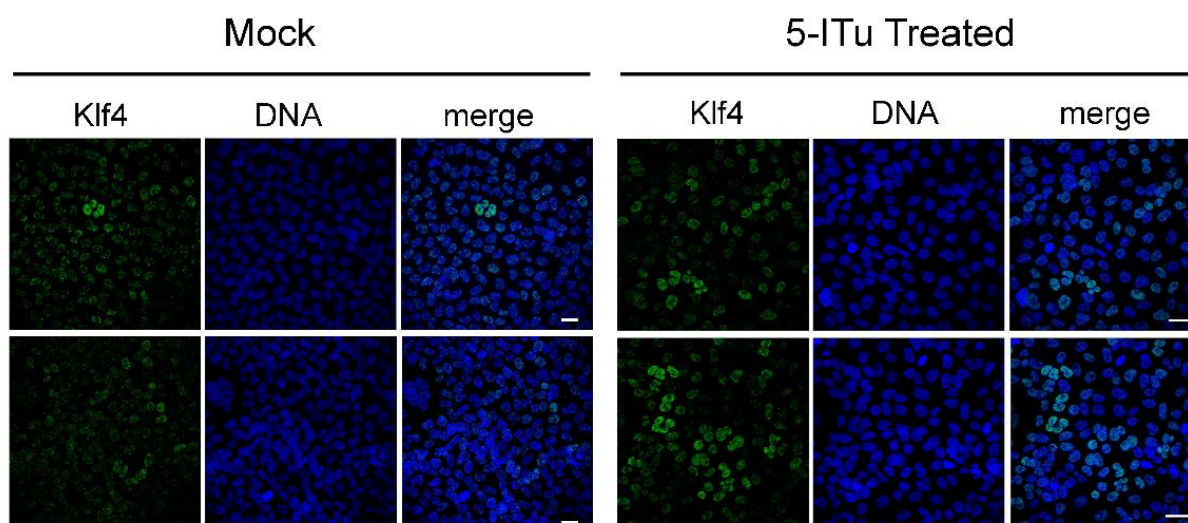
Εικόνα 3.12. Επίπεδα έκφρασης ύστερα από ανάλυση σε μικροσυστοιχίες DNA. (Α) Γονίδια τα οποία έχουν επηρεαστεί σε κύτταρα επωασμένα με 0.1μM (σκούρο μπλε) και 1μM (ανοιχτό μπλε) αναστολέα, αντίστοιχα. (Β) Διαγράμματα Venn που παρουσιάζουν τα κοινά γονίδια τα οποία επηρεάζονται στις δυο συγκεντρώσεις του αναστολέα.

Η αύξηση των επιπέδων του Klf4 επιβεβαιώνεται με πειράματα qRT-PCR και εμμέσου ανοσοφθορισμού. Τα πειράματα αυτά δείχνουν επίσης ότι η αύξηση των επιπέδων του Klf4 είναι αντιστρεπτή, εφόσον όταν ο 5-ΙΤυ απομακρυνθεί από το θεραπευτικό μέσο τα επίπεδα του εν λόγω παράγοντα επανέρχονται στο «φυσιολογικό» (Εικόνα 3.13).



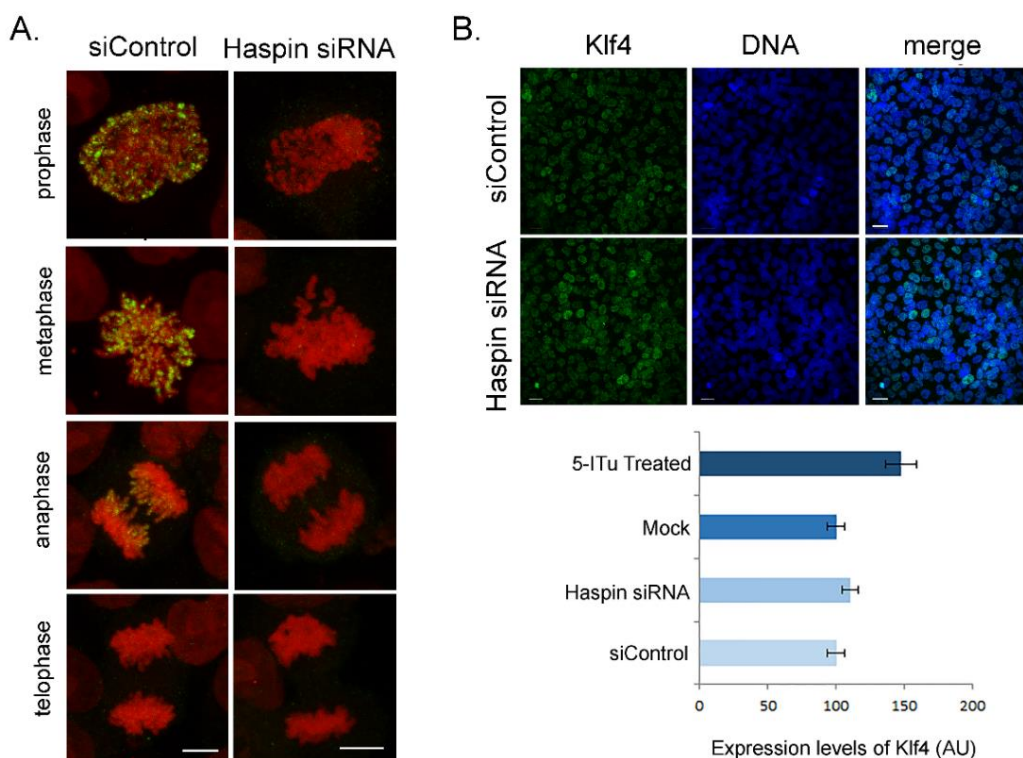
Εικόνα 3.13. Η αναστολή της *Haspin* αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του *Klf4* στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. (A) Επίπεδα έκφρασης του *Klf4* ύστερα από 26 ώρες επώασης με 5-ITu με έμμεσο ανοσοφθορισμό και qRT-PCR, με $p < 0.001$. (B) Αποκατάσταση των επιπέδων έκφρασης του *Klf4*, ύστερα από απομάκρυνση του αναστολέα από το θρεπτικό μέσο για 2 και 4 ώρες. Κλίμακα 10μm.

Η υπερέκφραση του *Klf4* μετά από την επώαση του 5-ITu επιβεβαιώνεται επίσης όταν τα πειράματα πραγματοποιηθούν σε μια συμβατική κυτταρική σειρά, τα επιθηλιακά κύτταρα HeLa (Εικόνα 3.14).



Εικόνα 3.14. Η αναστολή της *Haspin* αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του *Klf4* στα κύτταρα *HeLa*. Έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντίσωμα που αναγνωρίζει τον *Klf4* σε κύτταρα *HeLa* τα οποία έχουν επωαστεί με 5-ITu. Κλίμακα 10μm.

Για να διευκρινιστεί εάν η αύξηση του *Klf4* οφείλεται στην αναστολή της *Haspin* καθαυτής ή σε κάποια πλειοτροπική δραστηριότητα του 5-ITu πραγματοποιήθηκαν πειράματα με siRNA. Τα πειράματα αυτά έγιναν σε κύτταρα *HeLa* λόγω της άμεσης διαθεσιμότητας κατάλληλων αντιδραστηρίων που αντιστοιχούν στο mRNA της ανθρώπινης *Haspin* (Εικόνα 3.15). Όπως φαίνεται στο ιστόγραμμα της Εικόνας 3.15.B, η αύξηση των επιπέδων του *Klf4* είναι μάλλον αποτέλεσμα της δράσης του 5-ITu και δεν οφείλεται στην αναστολή της *Haspin*.

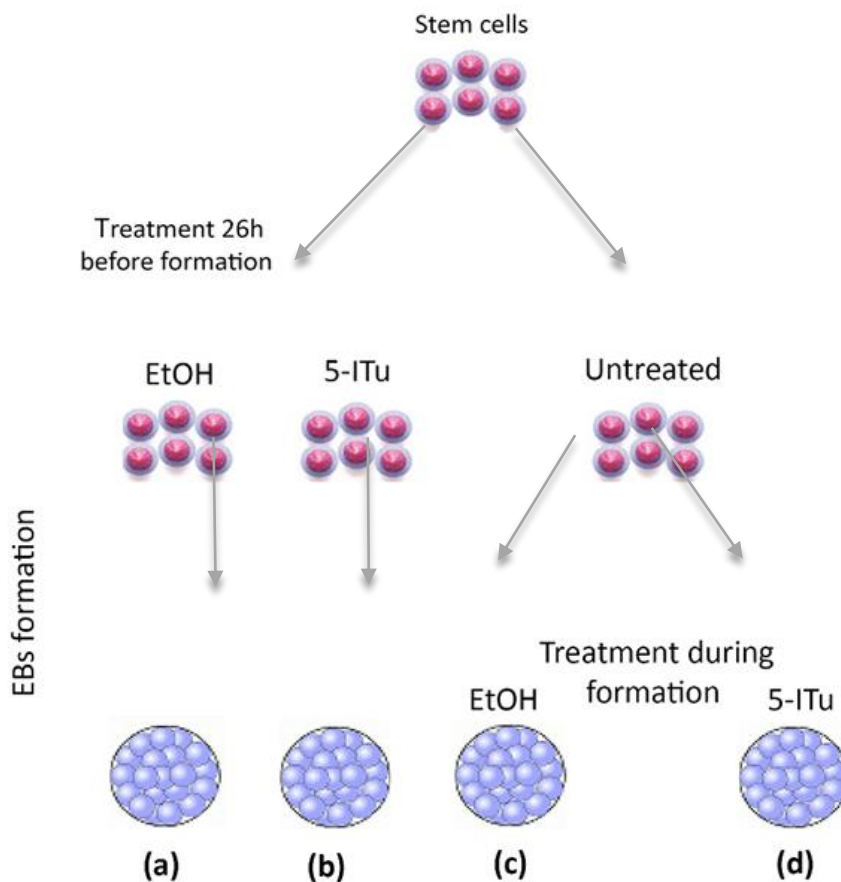


Εικόνα 3.15. Η αύξηση των επιπέδων του *Klf4* οφείλεται στην πλειοτροπική δράση του 5-ITu (A) Ανίχνευση της H3T3rh μιτωτικών κυττάρων HeLa τα οποία έχουν διαμολυνθεί με siRNA που καταστέλλει την έκφραση της *Haspin*. Κλίμακα 5μm. (B) Έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντίσωμα για τον *Klf4* στις δυο κατηγορίες κυττάρων. Κλίμακα 10μm. Διάγραμμα που απεικονίζει τα επίπεδα έκφρασης του *Klf4* στις παραπάνω κατηγορίες ύστερα από ποσοτικοποίηση της έντασης του φθορισμού.

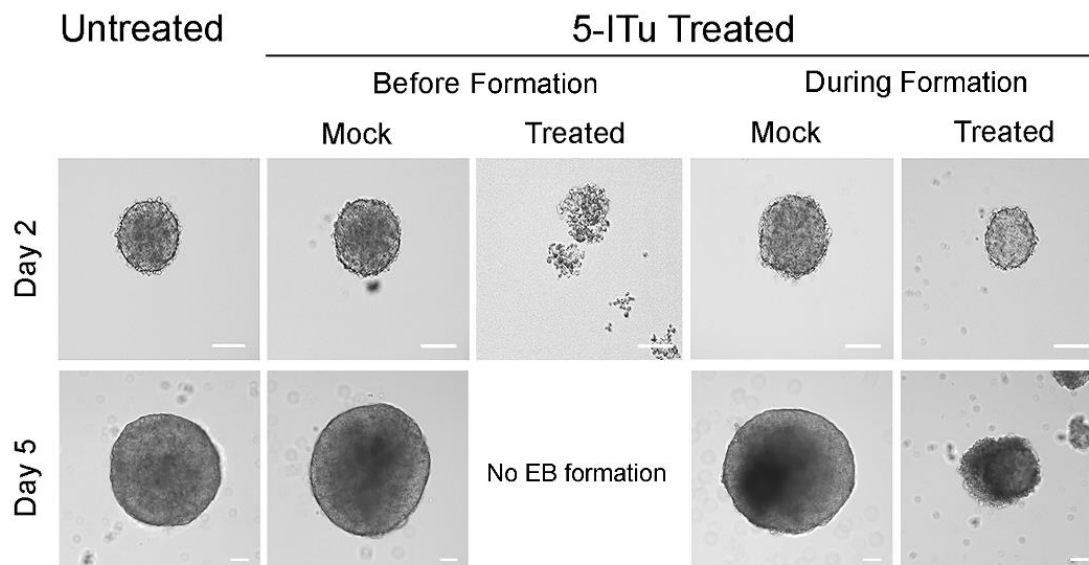
3.1.3 Επιδράσεις του 5-ITu στη διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων

Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο *Klf4* είναι ένας παράγοντας πολυδυναμίας, δημιουργήθηκε το ερώτημα εάν η έλλειψη της H3T3rh στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα επηρεάζει τη διαφοροποίηση *in vitro*. Για να απαντηθεί το ερώτημα αυτό, πραγματοποιήθηκαν *in vitro* διαφοροποιήσεις σε τρεις διαστάσεις. Μετά την αφαίρεση του παράγοντα LIF και την καλλιέργεια των κυττάρων σε «κρεμάμενες σταγόνες» τα βλαστικά κύτταρα σχηματίζουν εμβρυοειδή σωματίδια, EBs. Όταν το πείραμα αυτό επαναληφθεί παρουσία/απουσία 5-ITu υπό τις συνθήκες οι οποίες περιγράφονται στην Εικόνα 3.16 παρατηρούνται τα εξής: α) κύτταρα ελέγχου τα οποία επωάζονται μόνο με τον διαλύτη του αναστολέα (αιθανόλη) για 26 ώρες πριν

την επαγωγή της διαφοροποίησης σχηματίζουν φυσιολογικά EBs (1η κατηγορία)· β) κύτταρα τα οποία επωάζονται με τον αναστολέα για 26 ώρες, πριν την επαγωγή της διαφοροποίησης, δεν σχηματίζουν EBs (2η κατηγορία)· γ) κύτταρα ελέγχου τα οποία επωάζονται με αιθανόλη κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης σχηματίζουν φυσιολογικά EBs (3η κατηγορία)· και δ) κύτταρα τα οποία επωάζονται με τον αναστολέα κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης σχηματίζουν σχετικά μικρά EBs (4η κατηγορία) (Εικόνα 3.17).

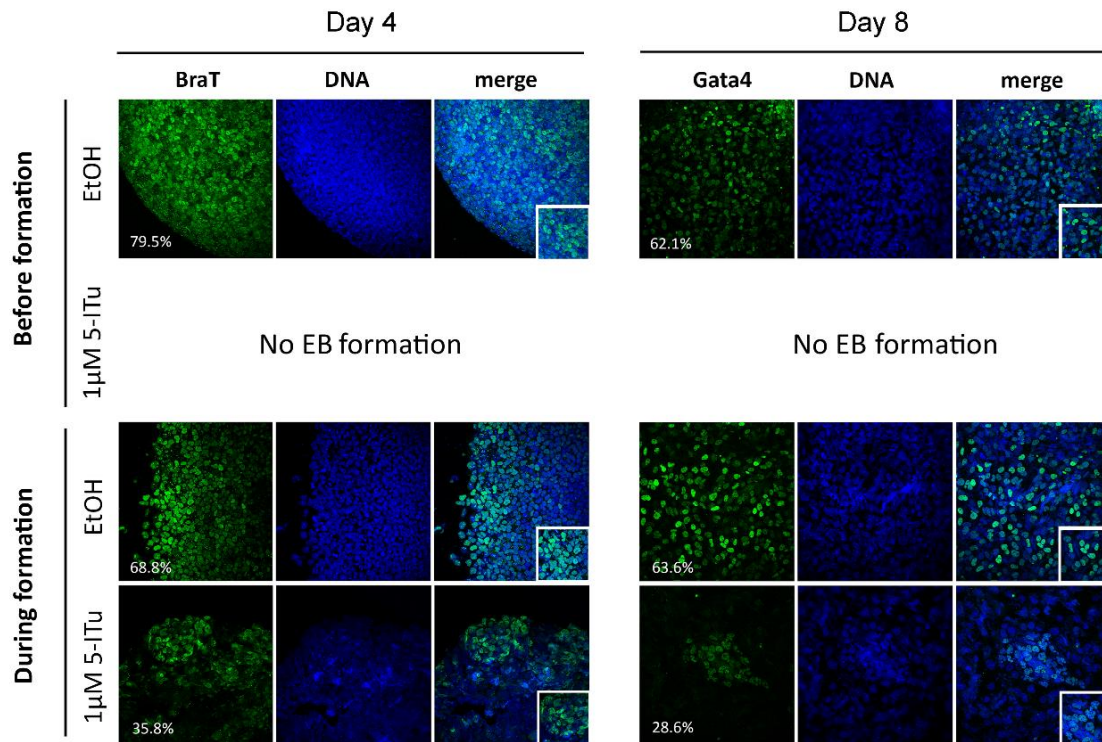


Εικόνα 3.16. Αναπαράσταση της πορείας διαφοροποίησης μετά από επίδραση του αναστολέα 5-ITu. Παρουσιάζονται οι τέσσερις κατηγορίες των εμβρυοειδών σωματίων (a,b,c,d).



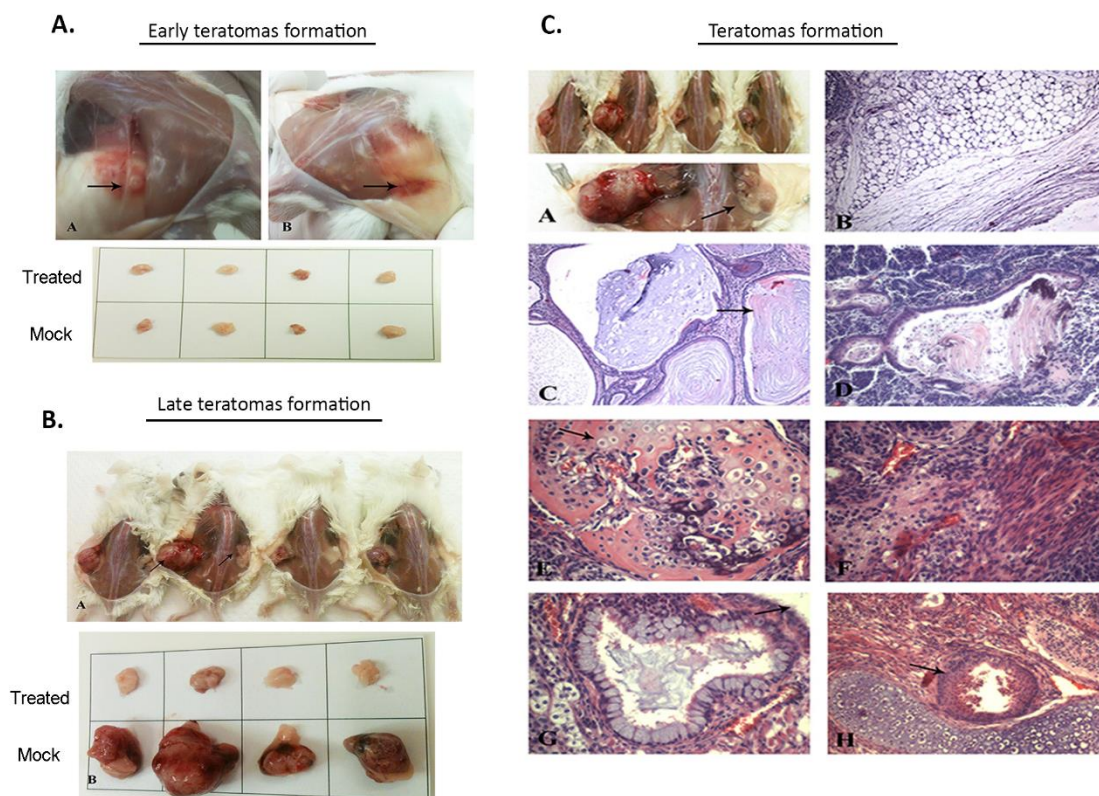
Εικόνα 3.17. Πορεία διαφοροποίησης εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων παρουσία του αναστολέα της Haspin. Αντιπροσωπευτικά προφίλ των EBs που προκύπτουν από κάθε κατηγορία με βάση το σχεδιάγραμμα της Εικόνας 3.14. (n=5, όπου n ο αριθμός των πειραμάτων διαφοροποίησης) Κλίμακα 50μm.

Προκειμένου περί EBs τα οποία σχηματίζονται παρουσία του 5-ITu κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης (4^η κατηγορία), ο έλεγχος με έμμεσο ανοσοφθορισμό αποκαλύπτει ότι πρώιμοι δείκτες διαφοροποίησης, όπως ο Brachyury (BraT) και ο Gata4, εκφράζονται σε μικρότερο ποσοστό από ότι στα κύτταρα ελέγχου (Εικόνα 3.18). Από το σύνολο των αποτελεσμάτων αυτών προκύπτει ότι ο 5-ITu επηρεάζει τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων, ιδιαίτερα όταν επιδρά πριν τον σχηματισμό των EBs.



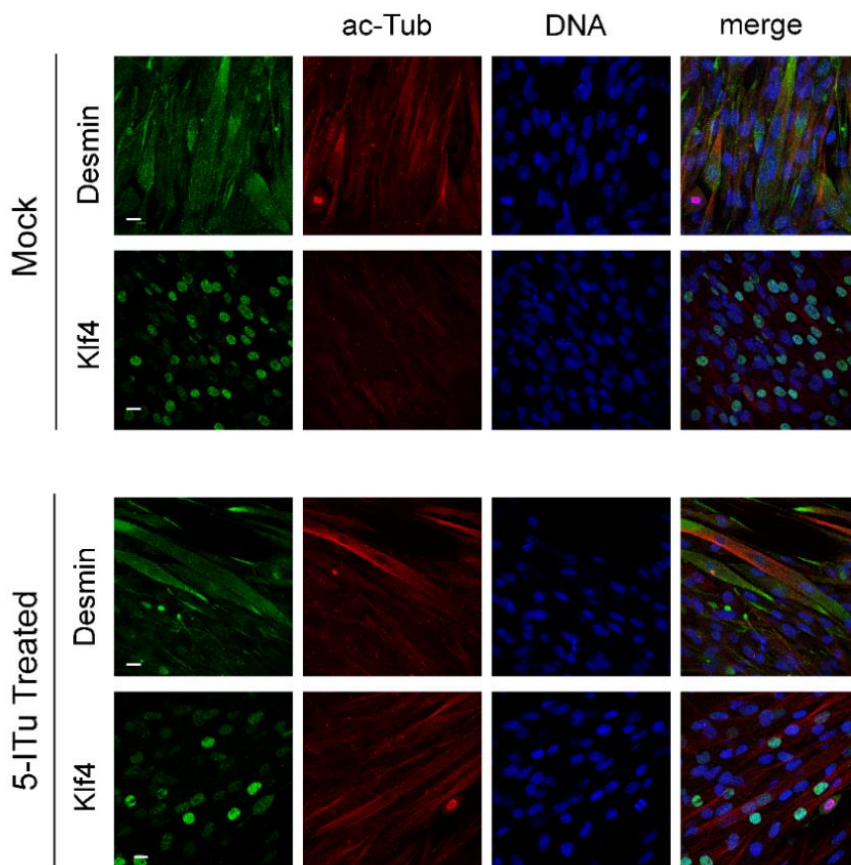
Εικόνα 3.18. Έλεγχος έκφρασης ιστο-ειδικών δεικτών σε διαφοροποιημένα κύτταρα κάθε κατηγορίας. Χρώση των EBs με ειδικά αντισώματα που αναγνωρίζουν τους δείκτες *BraT* και *Gata4*. Ο αριθμός κάτω αριστερά αντιπροσωπεύει το ποσοστό επί τοις εκατό των *BraT* και *Gata4* θετικών κυττάρων. ($n=3$, όπου n ο αριθμός των πειραμάτων διαφοροποίησης). Κλίμακα 50 μm .

Τα αποτελέσματα της *in vitro* διαφοροποίησης επιβεβαιώνονται με πειράματα *in vivo* (σχηματισμός τερατωμάτων). Πιο συγκεκριμένα, σε 8 ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια ενέθηκαν υποδόρια κύτταρα τα οποία είχαν επωαστεί με τον αναστολέα της Haspin για 26 ώρες (αριστερός μηρός) και κύτταρα ελέγχου (δεξιός μηρός). Αρχικά, ένα μήνα μετά, 4 ζώα θυσιάστηκαν ώστε να ελεγχθεί η πορεία της διαφοροποίησης όταν ο σχηματισμός των τερατωμάτων είναι στα αρχικά του στάδια. Τα υπόλοιπα 4 ζώα θυσιάστηκαν μετά τη συμπλήρωση 8 με 10 εβδομάδων, στο τελικό στάδιο της διαφοροποίησης όπου τα τερατώματα έχουν σχηματιστεί πλήρως. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.17, όγκοι σχηματίζονται μόνο στο μηρό των ζώων όπου ενέθηκαν τα κύτταρα ελέγχου (Εικόνα 3.19.A). Ιστολογική ανάλυση δείχνει ότι τα τερατώματα περιέχουν παράγωγα και των τριών βλαστικών δερμάτων.



Εικόνα 3.19. Η αναστολή της *Haspin* εμποδίζει το σχηματισμό τερατωμάτων κατά την *in vivo* διαφοροποίηση. A) *Early teratoma formation*: Ανατομική περιοχή έγχυσης των κυττάρων στο ζώο και μέγεθος των όγκων μετά από ένα μήνα διαφοροποίησης. B) *Late teratoma formation*: Μέγεθος όγκων 2 μήνες μετά την έγχυση. C) Χρώση με αιμοτοξυλίνη και ηωσίνη για αναγνώριση των τριών δερμάτων.

Διαπιστώθηκε ότι οι επιδράσεις του 5-ITu στη διαφοροποίηση αφορούν ειδικά τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Το συμπέρασμα αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι η επαγωγή του σχηματισμού μυοσωληνίσκων από μερικώς διαφοροποιημένες μυοβλάστες C2C12 παρουσία/απουσία του 5-ITu δίνει και στις δυο περιπτώσεις παρόμοια αποτελέσματα (Εικόνα 3.20).



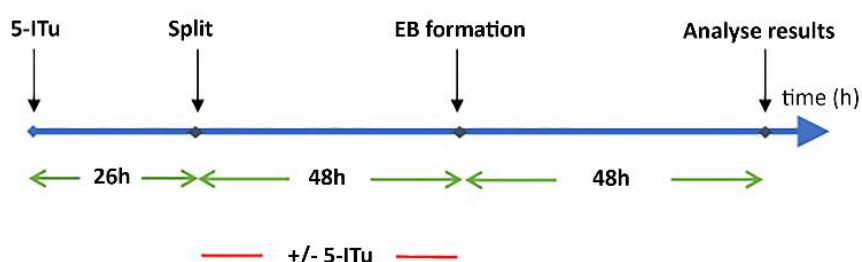
Εικόνα 3.20. Η αναστολή της *Haspin* δεν επιδρά στη διαφοροποίηση των μυοβλαστών *C2C12*. Χρώση διαφοροποιημένων κυττάρων *C2C12* την ημέρα 6 με αντισώματα που αναγνωρίζουν *Desmin*, *Klf4* και *ac-Tub*.. Κλίμακα 10 μ m.

3.1.4 Επιδράσεις του 5-ITu στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου

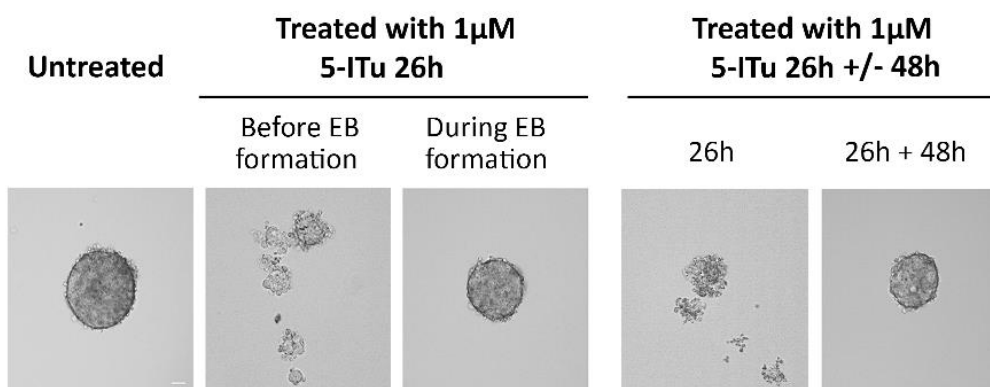
Για να δοθεί μια καλύτερη ερμηνεία στα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων, πραγματοποιήθηκαν νέες σειρές πειραμάτων όπου αφού τα κύτταρα έχουν προεπωαστεί για 26 ώρες με 5-ITu στη συνέχεια, τρυψινοποιούνται και αφήνονται να αναπτυχθούν περαιτέρω απουσία 5-ITu. Σε μια δεύτερη ομάδα δειγμάτων, η αρχική επώαση και τρυψινοποίηση πραγματοποιείται όπως και παραπάνω αλλά στη συνέχεια ο αναστολέας απομακρύνθηκε μετά την τρυψινοποίηση. Τέλος, σε μια ομάδα δειγμάτων τα κύτταρα επώαστηκαν μόνο με διαλύτη (κύτταρα ελέγχου). Στο τέλος αυτής της διαδικασίας, ο παράγοντας LIF αφαιρέθηκε από το μέσο και τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε κρεμάμενες

σταγόνες ώστε να σχηματιστούν EBs. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.21.B, όταν ο 5-ITu παραμένει για 48 ώρες στο καλλιεργητικό μέσο τα EBs σχηματίζονται φυσιολογικά. Αντιθέτως, όταν ο 5-ITu αφαιρεθεί από το μέσο μετά την τρυψινοποίηση δεν σχηματίζονται EBs. Η παρατήρηση αυτή θυμίζει τα αποτελέσματα που προέκυψαν όταν ο 5-ITu προστέθηκε κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης (βλέπε Εικόνα 3.17).

A.



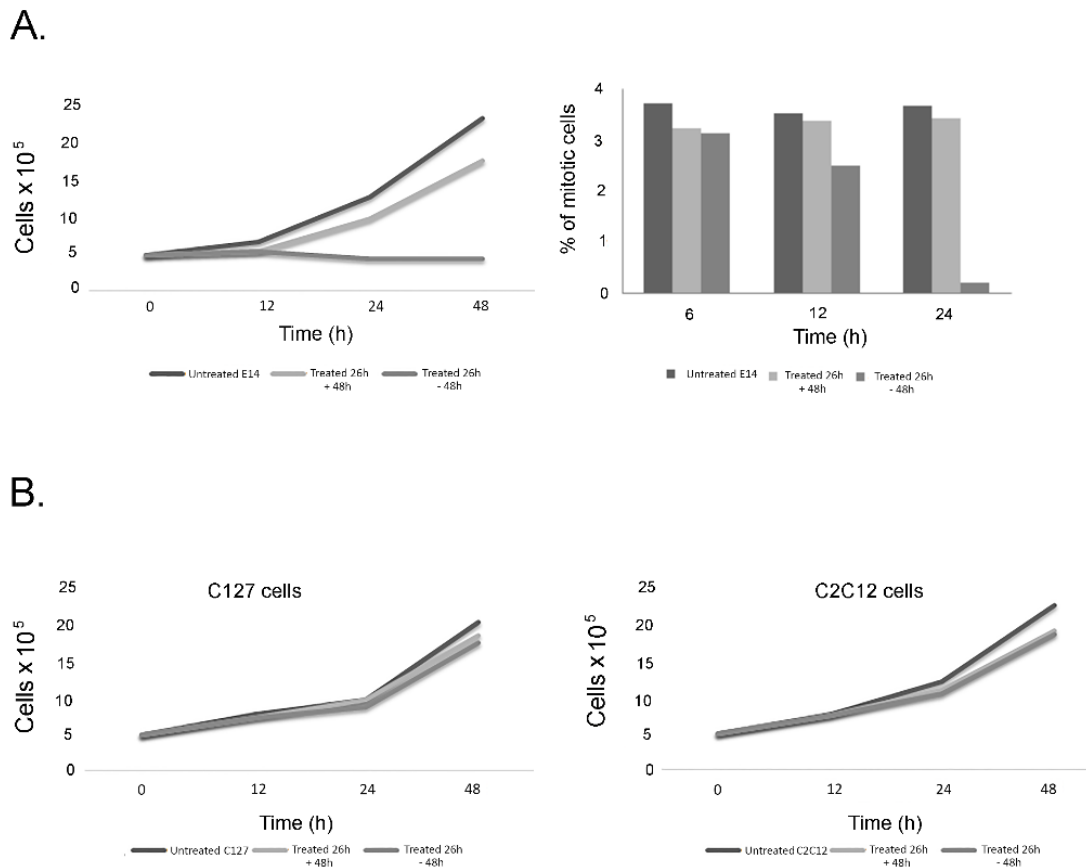
B.



Εικόνα 3.21. (A) Χρονοδιάγραμμα της πειραματικής πορείας παρουσία και απουσία του 5-ITu στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. (B) Προφίλ των EBs τα οποία σχηματίζονται σε κάθε περίπτωση ύστερα από την αφαίρεση του 5-ITu. Κλίμακα 50 μ m.

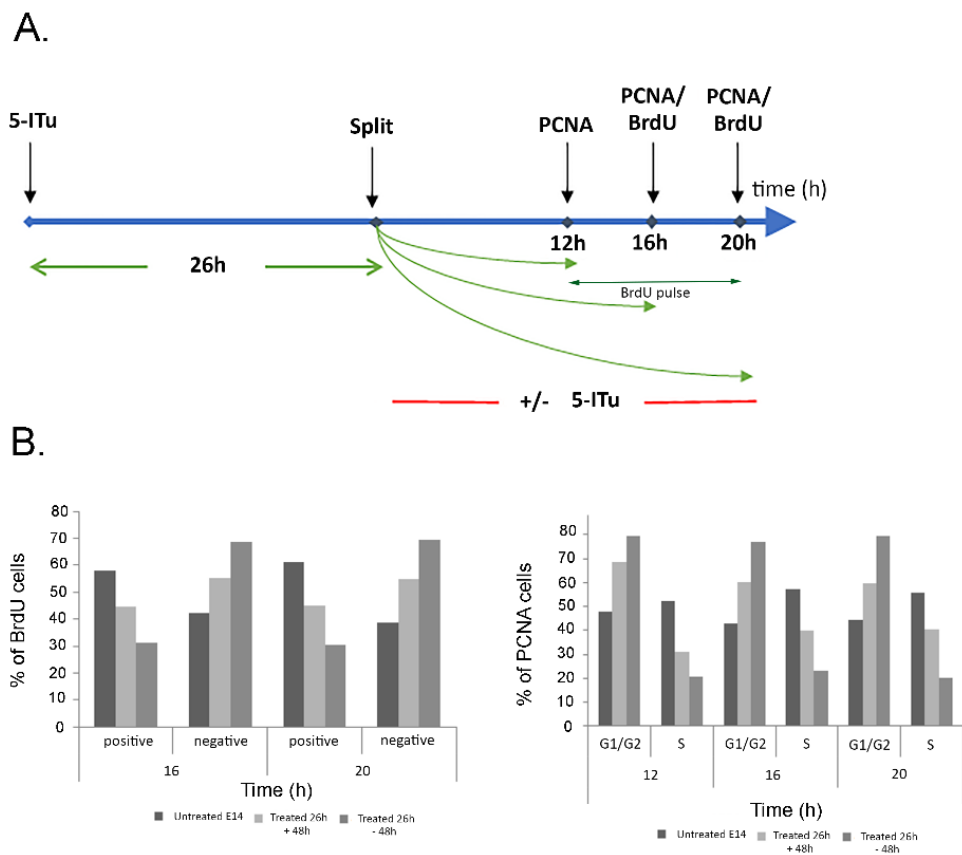
Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα κύτταρα συμπεριφέρονται φυσιολογικά όταν ο αναστολέας είναι συνεχώς παρών, αλλά παρουσιάζουν δυσλειτουργίες όταν επωαστούν αρχικά με τον 5-ITu και αυτός έπειτα απομακρυνθεί από το μέσο.

Ανεξάρτητα από τη διαδικασία της διαφοροποίησης, μετρήθηκε επίσης και η κυτταρική ανάπτυξη των κυττάρων που καλλιεργούνται παρουσία LIF, μετά από επώαση με τον 5-ITu για 26 ώρες και αφαίρεση του για 48 ώρες. Παρατηρήθηκε ότι υπό αυτές τις συνθήκες τα κύτταρα δεν αναπτύσσονται φυσιολογικά και ο μιτωτικός τους δείκτης είναι αμελητέος. Αυτό δεν συμβαίνει στην περίπτωση που μετά την αρχική επώαση με τον 5-ITu, ο παράγοντας συνεχίζει να είναι παρών στο καλλιεργητικό μέσο (Εικόνα 3.22.A). Δεν λήφθηκαν παρόμοια αποτελέσματα όταν ακολουθήθηκε το ίδιο πειραματικό πρωτόκολλο σε κύτταρα C127 και C2C12. Το γεγονός αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι οι επιδράσεις του αναστολέα της Haspin είναι ειδικές για τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (Εικόνα 3.22.B).



Εικόνα 3.22. Οι επιδράσεις του αναστολέα της Haspin είναι ειδικές για τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (A) Καμπύλη ανάπτυξης και ποσοστό μιτωτικών κυττάρων στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα υπό τις συνθήκες που περιγράφονται στην εικόνα 3.19. (B) Καμπύλη ανάπτυξης των κυτταρικών σειρών C127 και C2C12 υπό τις συνθήκες που ακολουθήθηκαν στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα.

Για να ελεγχθεί εάν η μη φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων που καλλιεργούνται παρουσία ή απουσία 5-ITu οφείλεται σε μειωμένη είσοδο τους στην S φάση καταγράφηκε καταρχήν το πρότυπο κατανομής της πρωτεΐνης PCNA. Παράλληλα, μελετήθηκε η ενσωμάτωση BrdU (ενός αναλόγου της θυμιδίνης) η οποία συμβαίνει ειδικά κατά τη διάρκεια της S φάσης. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.23, η συνεχής παρουσία του 5-ITu στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα είναι απαραίτητη για τη δίοδο από το σημείο ελέγχου της G1 και την είσοδο στη φάση S (G1/S checkpoint).

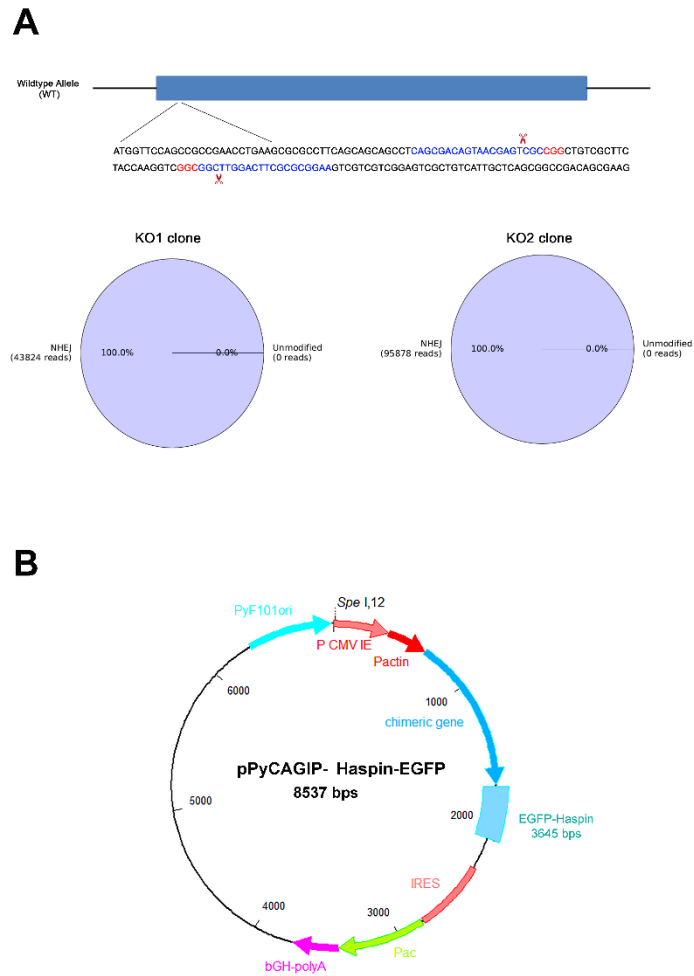


Εικόνα 3.23. Η συνεχής παρουσία του 5-ITu είναι απαραίτητη για την είσοδο των κυττάρων στη φάση S (A) Χρονοδιάγραμμα πειραματικής πορείας προκειμένου να μελετηθεί η είσοδος των κυττάρων στην S φάση με καταγραφή (B) του προφίλ κατανομής του PCNA και της ενσωμάτωσης BrdU στα κύτταρα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο συγκεκριμένος αναστολέας για τη Haspin, αν και παρουσιάζει ενδιαφέρον, δεν προσφέρεται για να απαντηθούν τα ερωτήματα που έχουν τεθεί στην αρχή της παρούσας μελέτης.

3.2 Συνέπειες της απαλοιφής και της υπερέκφρασης της Haspin

Δεδομένου ότι ο 5-ITu παρουσιάζει πλειοτροπικές δράσεις, ακολουθήθηκαν δύο εναλλακτικές παράλληλες πορείες ώστε να απαντηθούν τα ερωτήματα της μελέτης: α) απαλείφθηκε το γονίδιο Gsg2 από τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και β) υπερεκφράστηκε το γονίδιο της ανθρώπινης Haspin συντηγμένο με το μόριο της πράσινης φθορίζουσας χρωστικής. Η απαλοιφή του γονιδίου πραγματοποιήθηκε μέσω της τεχνολογίας με CRISP/Cas9 (78), ενώ για την υπερέκφραση επιλέχθηκε κατάλληλος επισωματικός φορέας τόσο για την παροδική διαμόλυνση όσο και για τη δημιουργία σταθερών σειρών. (Εικόνα 3.24). Με τον τρόπο αυτό αυξήθηκε τόσο την καταλυτική όσο και την ενδοκυττάρια συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Τα κύτταρα στα οποία έχει απαλειφθεί η Haspin (KO κύτταρα, KnockOut cells) και τα κύτταρα στα οποία υπερεκφράζεται η πρωτεΐνη (OE κύτταρα, OverExpressed cells) μελετήθηκαν συστηματικά προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της στην κυτταρική διαίρεση και στη γονιδιακή έκφραση.

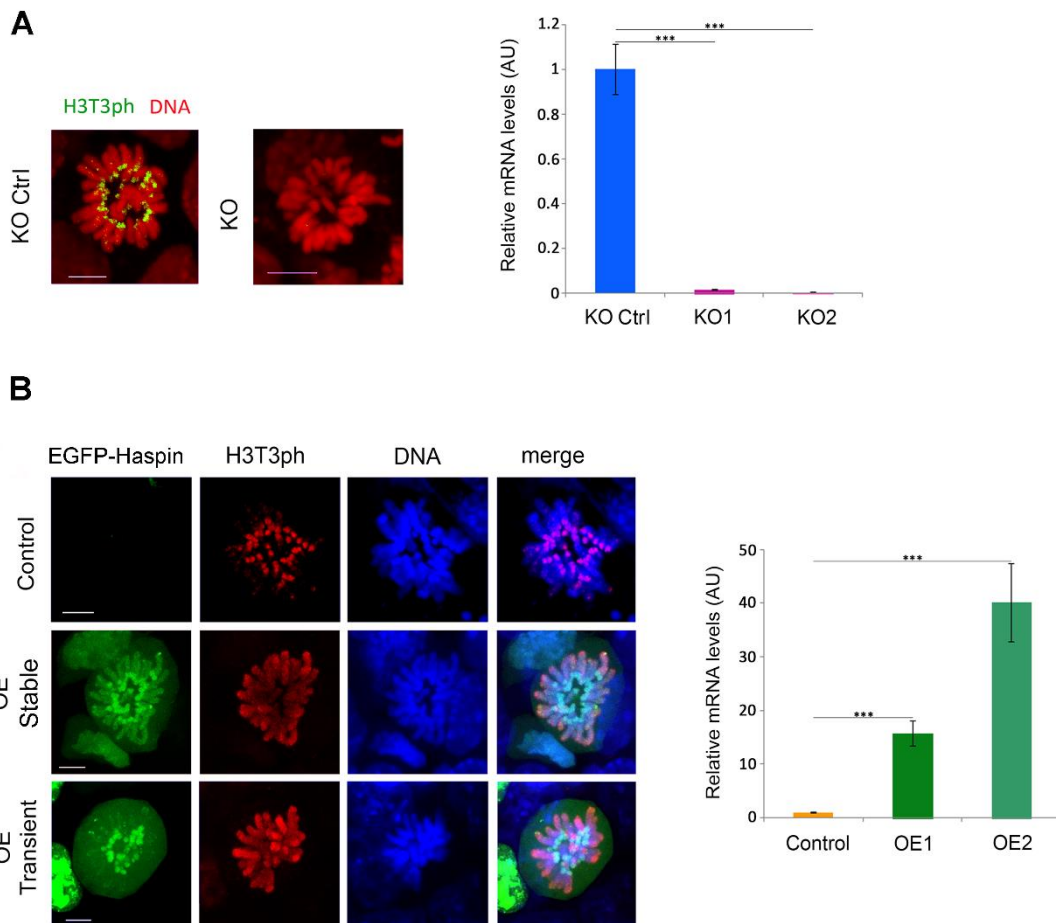


Εικόνα 3.24. A) Περιοχές στις οποίες αποκόπτεται η αλληλουχία του γονιδίου *GSG2* από την ενδοκλεάση *Cas9* ώστε να κατασκευαστεί σταθερή κυτταρική σειρά όπου έχει το γονίδιο της *Haspin* έχει διαταραχθεί μέσω του *non-homologous end joining*, μηχανισμού επιδιόρθωσης των κυττάρων. B) Ο πλασμιδιακός φορέας με τον οποίο διαμολύνθηκαν τα *E14* κύτταρα προκειμένου να κατασκευαστεί η σταθερή κυτταρική σειρά υπερέκφρασης τη *Haspin*.

3.2.1 Ατυπίες κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης

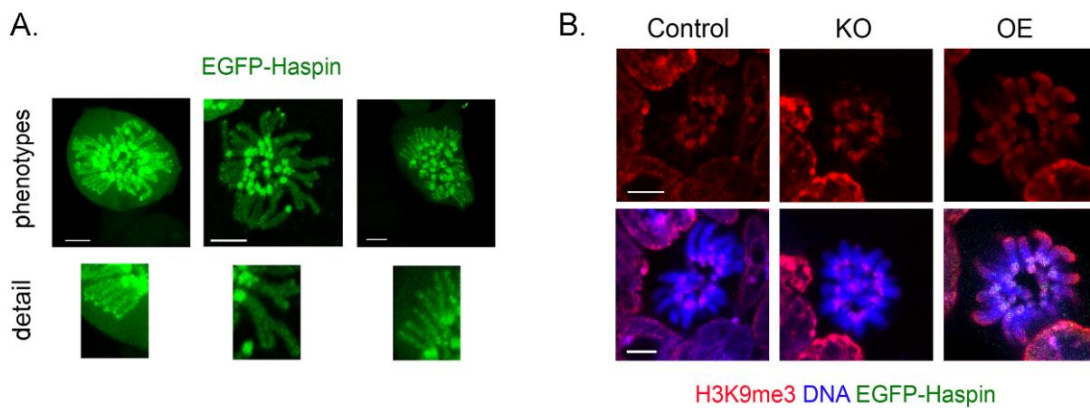
Όπως αναμένεται, στα κύτταρα KO η H3T3rh δεν ανιχνεύεται (Εικόνα 3.25), επιβεβαιώνοντας το γεγονός ότι η *Haspin* ευθύνεται αποκλειστικά για τη δημιουργία της συγκεκριμένης τροποποίησης. Ωστόσο, τα κύτταρα OE δίνουν ένα εντυπωσιακό αποτέλεσμα: ο εντοπισμός της εξωγενούς *Haspin* είναι κατά βάση κεντρομεριδιακός, σε συμφωνία με ότι αναφέρεται στη

βιβλιογραφία (79) · ωστόσο, η H3T3ph μετατοπίζεται από την κεντρομεριδιακή περιοχή στα χρωμοσωμικά σκέλη. Παρόμοια μετατόπιση της H3T3ph έχει καταγραφεί ύστερα από μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη Repo-Man, μια ρυθμιστική υπομονάδα της φωσφατάσης 1-PP1, η οποία απο-φωσφορυλιώνει ειδικά την ιστόνη H3 (80). Το ίδιο έχει διαπιστωθεί στα ζυγωτά ανθρώπου μετά τη γονιμοποίηση, μια φάση της εμβρυϊκής ανάπτυξης όπου τα επίπεδα της PP1 είναι χαμηλά (81). Από το σύνολο αυτών των αποτελεσμάτων, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η περίσσεια της Haspin πιθανότατα διαταράσσει την ισορροπία μεταξύ κινάσης/φωσφατάσης και οδηγεί σε έκτοπη φωσφορυλίωση της ιστόνης H3.



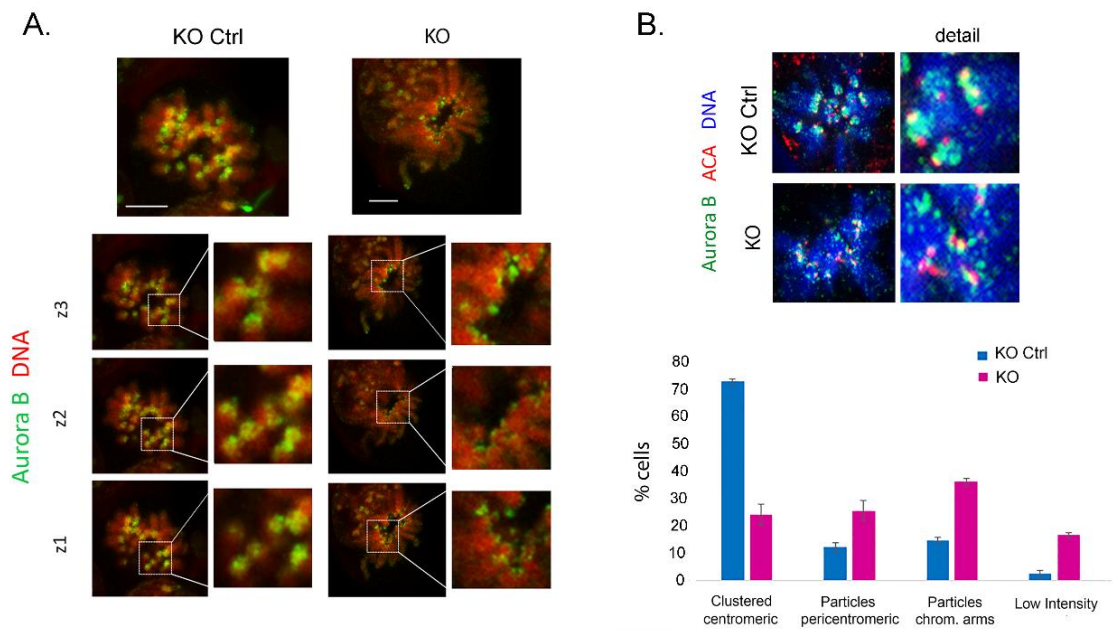
Εικόνα 3.25. Φαινότυποι των μιτωτικών κυττάρων KO και OE. (A) Απουσία του σήματος H3T3ph σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα στα οποία το γονίδιο της Haspin έχει απαλειφθεί. (B) κατανομή της Haspin και της H3T3ph σε κύτταρα τα οποία υπερεκφράζουν μόνιμα (stable) ή παροδικά (transient) EGFP-Haspin. Κλίμακα 5μm. Τα ιστογράμματα στο (A) και στο (B) απεικονίζουν τα επίπεδα του mRNA της Haspin σε KO και OE κύτταρα μέσω qRT-PCR.

Ανεξάρτητα από το παραπάνω, η έκτοπη φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 φαίνεται ότι επηρεάζει τη δομική οργάνωση των χρωμοσωμάτων, διότι όταν υπερεκφράζεται η Haspin οι αδελφές χρωματίδες είναι σε πολλές περιπτώσεις αποσυνδεδεμένες ή μια από την άλλη και εμφανίζονται «τεταμένες» (“stretched”) (Εικόνα 3.26.A, φαινότυποι). Συνηγορητικά ως προς αυτήν την ερμηνεία, ενώ στα κύτταρα KO και τα κύτταρα ελέγχου η H3K9me3, μια άλλη τροποποιημένη μορφή H3, εντοπίζεται στην περικεντρομεριδιακή περιοχή, στα κύτταρα OE η H3K9me3 διασπείρεται στα χρωμοσωμικά σκέλη (Εικόνα 3.26.B).



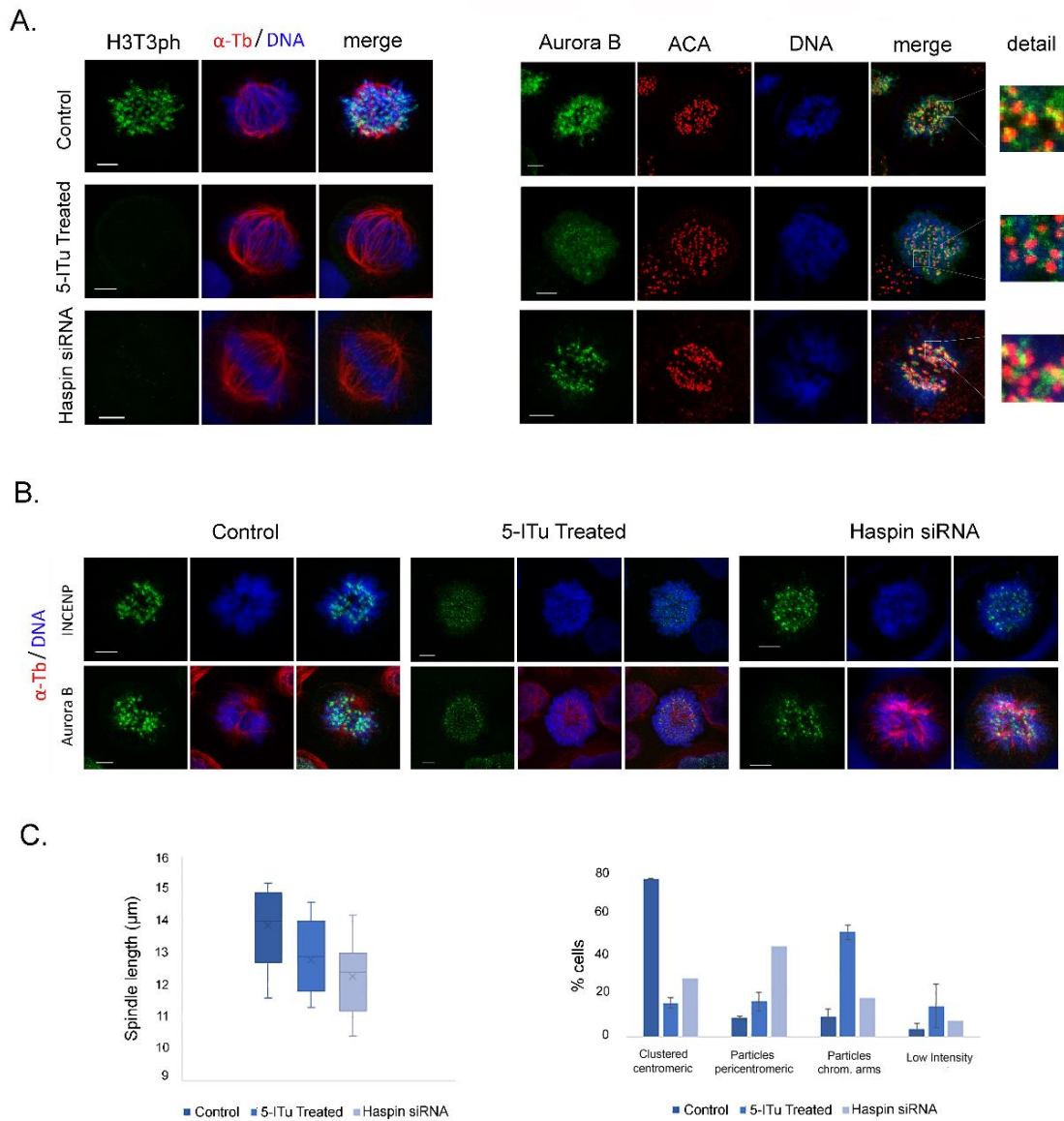
Εικόνα 3.26. Αλλαγές στην οργάνωση των χρωμοσωμάτων μετά από απαλοιφή ή υπερέκφραση της *Haspin* (A) Προφίλ μιτωτικών OE κυττάρων στα οποία παρατηρούνται ατυπίες στα χρωμοσώματα, (B) εντοπισμός της H3K9me3 στα κύτταρα KO και OE. Κλίμακα 5μm.

Πιο ενδελεχής έλεγχος των δειγμάτων αποκαλύπτει ότι στα κύτταρα KO τα μεγάλα συσσωματώματα που σχηματίζει η Aurora B στα φυσιολογικά κύτταρα διασπώνται σε μικρότερα θραύσματα, τα οποία μετατοπίζονται προς τα χρωμοσωμικά σκέλη (κατηγορία «particles, centromeres») (Εικόνα 3.27).



Εικόνα 3.27. Μερικός απεντοπισμός της Aurora B στα KO κύτταρα. (A,B) Κατανομή της Aurora B σε σχέση με τη θέση του κεντρομεριδίου σε κύτταρα KO. Ο έλεγχος των κυττάρων έγινε όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.8. ($p=2.6E-10$).

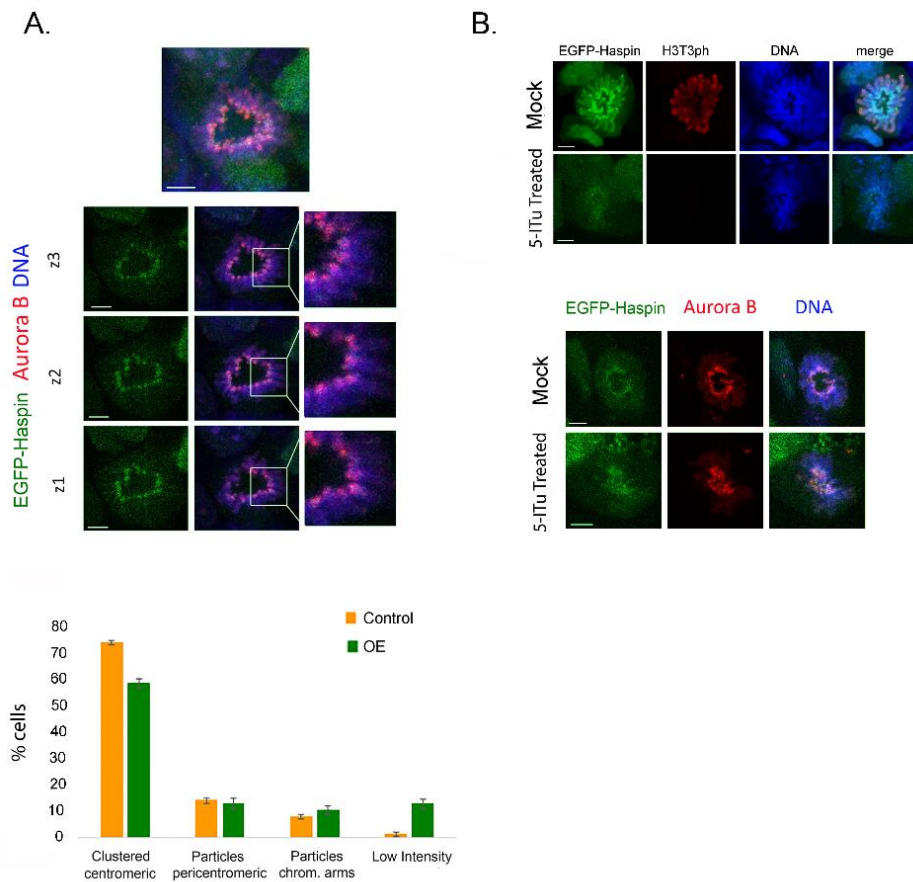
Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν ύστερα από αποσιώπηση της Haspin με siRNA σε κύτταρα HeLa (Εικόνα 3.28). Αυτά τα δεδομένα επιβεβαιώνουν προηγούμενες μελέτες (82) και υποδεικνύουν ότι απουσία της H3T3rh μια υπολειμματική δεξαμενή CPC παραμένει συνδεδεμένη με το εγγύς κεντρομερές/κινητοχώρο. Κατά πάσα πιθανότητα αυτή η σύνδεση που δεν σχετίζεται με την H3T3rh διαμεσολαβείται από τη Sgo1/2-H2AT120rh η οποία συνδέεται στην υπομονάδα του CPC Borealin (18,82). Σε κάθε περίπτωση, δεδομένου ότι η «υπολειμματική» Aurora B δεν σχηματίζει συσσωματώματα όταν απουσιάζει η Haspin, είναι πιθανόν ότι η συγκεκριμένη κινάση (ή η τροποποίηση που καταλύει) να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη συσσώρευση μεμονωμένων CPC στο κεντρομερίδιο.



Εικόνα 3.28. Μερικός απεντοπισμός του CPC και μεταβολές στη δομική οργάνωση της μιτωτικής ατράκτου, ύστερα από αποσιώπηση της *Haspin* σε κύτταρα *HeLa*. (A,B) Ανίχνευση του σήματος *H3T3ph*, του εντοπισμού της *Aurora B* και της *INCENP* σε κύτταρα επωασμένα με τον αναστολέα και με *siRNA*. Κλίμακα 5μm. (C) Διαγράμματα τα οποία απεικονίζουν τη δια-πολική απόσταση της μιτωτικής ατράκτου ($p=8.5E-0.5$) και τη διασπορά της *Aurora B* ($p=1.7E-10$) ύστερα από κάθε συνθήκη στα κύτταρα *HeLa*.

Στα κύτταρα OE η *Aurora B* εντοπίζεται κυρίως στο κεντρομερίδιο (Εικόνα 3.29), παρά το γεγονός ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της *H3T3ph* έχει μετατοπιστεί στα σκέλη των

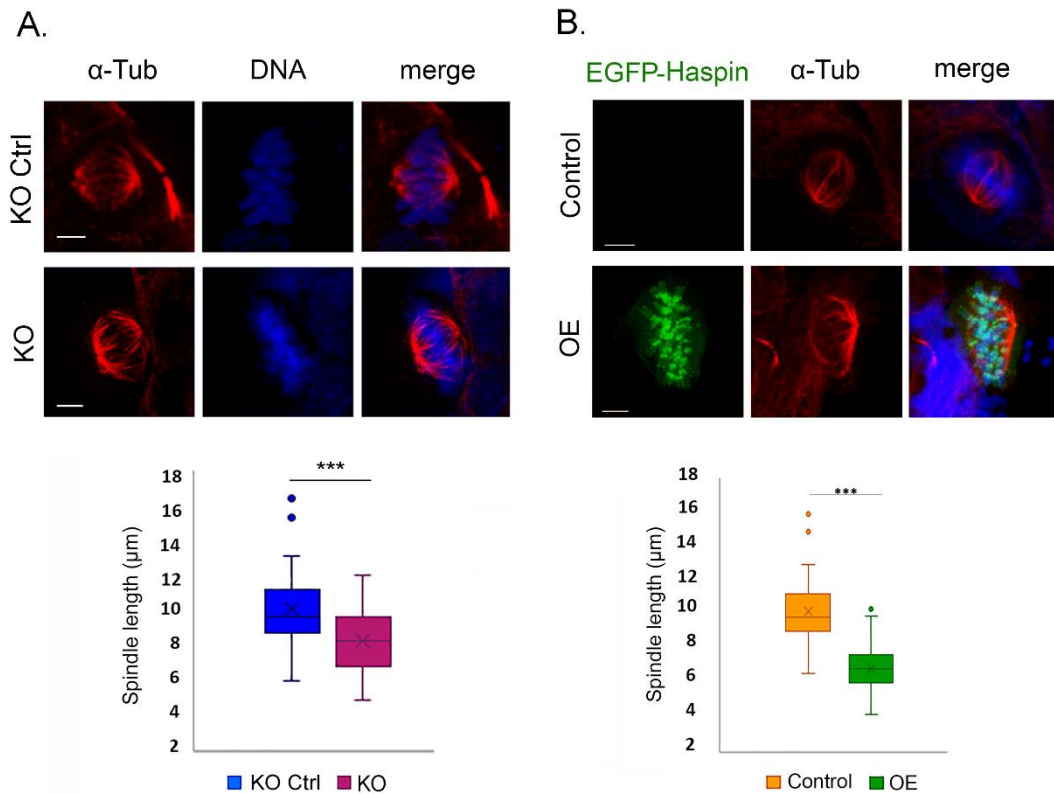
χρωμοσωμάτων. Επώαση των κυττάρων ΟΕ με 5-ITu, που όπως αποδείχθηκε προκαλεί απαλοιφή της H3T3ph, δεν επηρεάζει τον εντοπισμό της Aurora B στην κεντρομεριδιακή περιοχή. Αυτό το γεγονός αποτελεί μια επιπλέον ένδειξη για την ύπαρξη ενός μηχανισμού αγκυροβόλησης του CPC στο εγγύς κεντρομερίδιο που είναι ανεξάρτητος από την H3T3ph.



Εικόνα 3.29. Εντοπισμός της Aurora B στο κεντρομερές στα ΟΕ κύτταρα. (A,B) Κατανομή της Aurora B σε σχέση με τη θέση του κεντρομεριδίου σε κύτταρα ΟΕ. Ο έλεγχος των κυττάρων έγινε όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.8. ($p=1.2E-30$).

Η μελέτη της μιτωτικής ατράκτου στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές αποκαλύπτει ότι τα κύτταρα ΚΟ εμφανίζουν μικρότερη δια-πολική απόσταση συγκριτικά με αυτή των κυττάρων ελέγχου (Εικόνα 3.30). Παρόλα αυτά, παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν επίσης ύστερα από

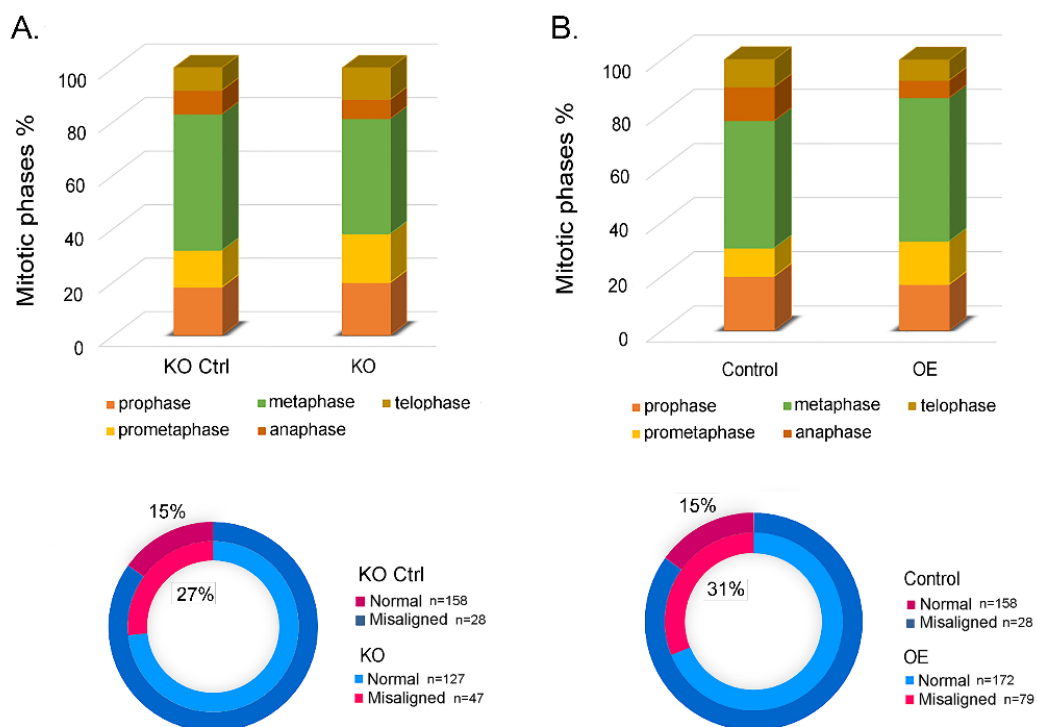
έλεγχου κυττάρων OE (Εικόνα 3.30), γεγονός που υποδηλώνει ότι η σωστή γεωμετρία της ατράκτου απαιτεί ακριβή «δοσολογία» της κινάσης Haspin στα βλαστικά κύτταρα. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνεται ύστερα από διαμόλυνση κυττάρων HeLa με siRNA (Εικόνα 3.28C).



Εικόνα 3.30. Μεταβολές της οργάνωσης της μιτωτικής ατράκτου σε KO και OE κύτταρα. Προφίλ της μιτωτικής ατράκτου σε μεταφασικά κυττάρα KO (A) και OE (B). Κλίμακα 5 μm . Διαγράμματα (box plots) που απεικονίζουν την απόσταση μεταξύ των πόλων της ατράκτου σε κάθε συνθήκη, σε σχέση με εκείνη των κυττάρων ελέγχου ($p=1.7E-0.5$ για τα KO κύτταρα και $p=1.2E-30$ για τα OE κύτταρα).

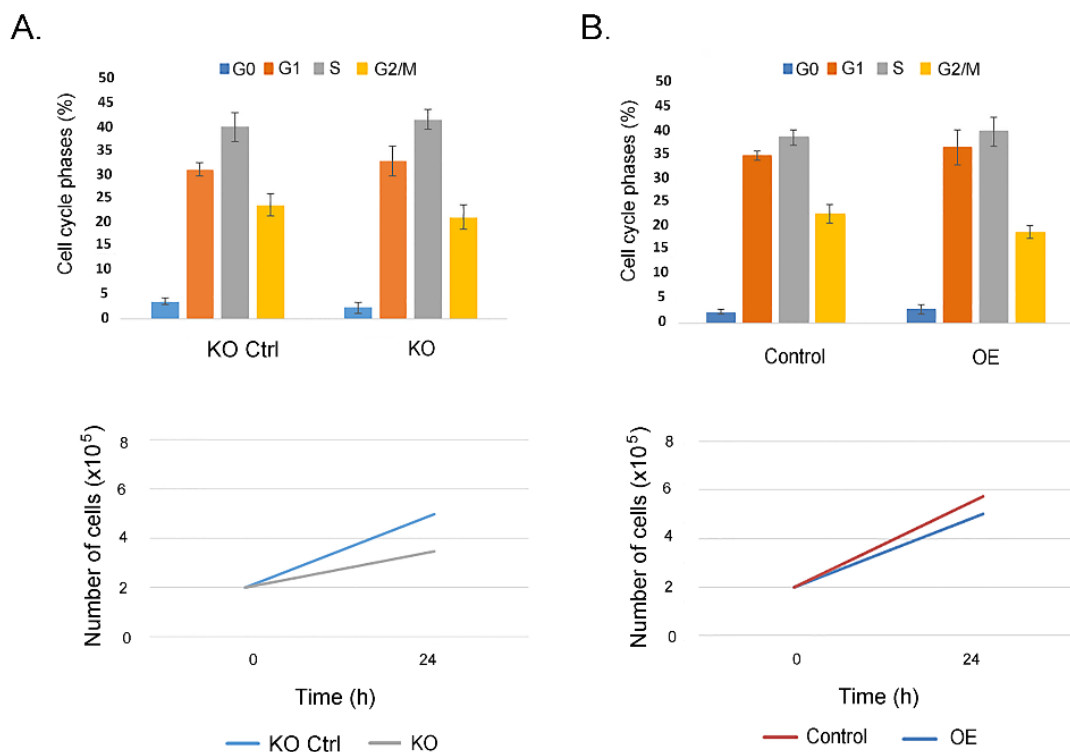
Ο έλεγχος των μεταφασικών κυττάρων δείχνει ότι η συχνότητα των μη ευθυγραμμισμένων χρωμοσωμάτων στα κύτταρα KO και OE είναι περίπου διπλάσια σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να εξηγηθεί από το μερικό απεντοπισμό της Aurora B και την αλλοιωμένη γεωμετρία της ατράκτου (Εικόνα 3.30 διαγράμματα). Παρά τις ατυπίες που

παρουσιάζονται στη διάταξη των χρωμοσωμάτων, η έλλειψη και η περίσσεια Haspin δεν φαίνεται να προκαλούν καθυστέρηση στη διάρκεια της μίτωσης, όπως έχει αναφερθεί προκειμένου περί σωματικών κυττάρων (83). Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι τα ποσοστά προφασικών, μεταφασικών, αναφασικών και τελοφασικών κυττάρων στις σειρές KO και OE δε διαφέρουν σημαντικά από εκείνα των κυττάρων ελέγχου. Επίσης, η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα KO και OE δεν επηρεάζεται (Εικόνα 3.31, ιστογράμματα).



Εικόνα 3.31. Η υπερέκφραση και η απαλοιφή της Haspin δεν επηρεάζουν σημαντικά τη διάρκεια της μίτωσης, παρά τα ποσοστά μη φυσιολογικά διατεταγμένων χρωμοσωμάτων. (A,B) Ποσοστά προφασικών, προμεταφασικών, μεταφασικών, αναφασικών και τελοφασικών κυττάρων KO και OE (επάνω) ($p=1.3E-01$ για τα KO κύτταρα και $p=4.1E-0.2$ για τα κύτταρα OE). Διαγράμματα που απεικονίζουν τα ποσοστά των μη φυσιολογικών χρωμοσωμάτων των KO και OE κυττάρων στη διάρκεια της μίτωσης (κάτω).

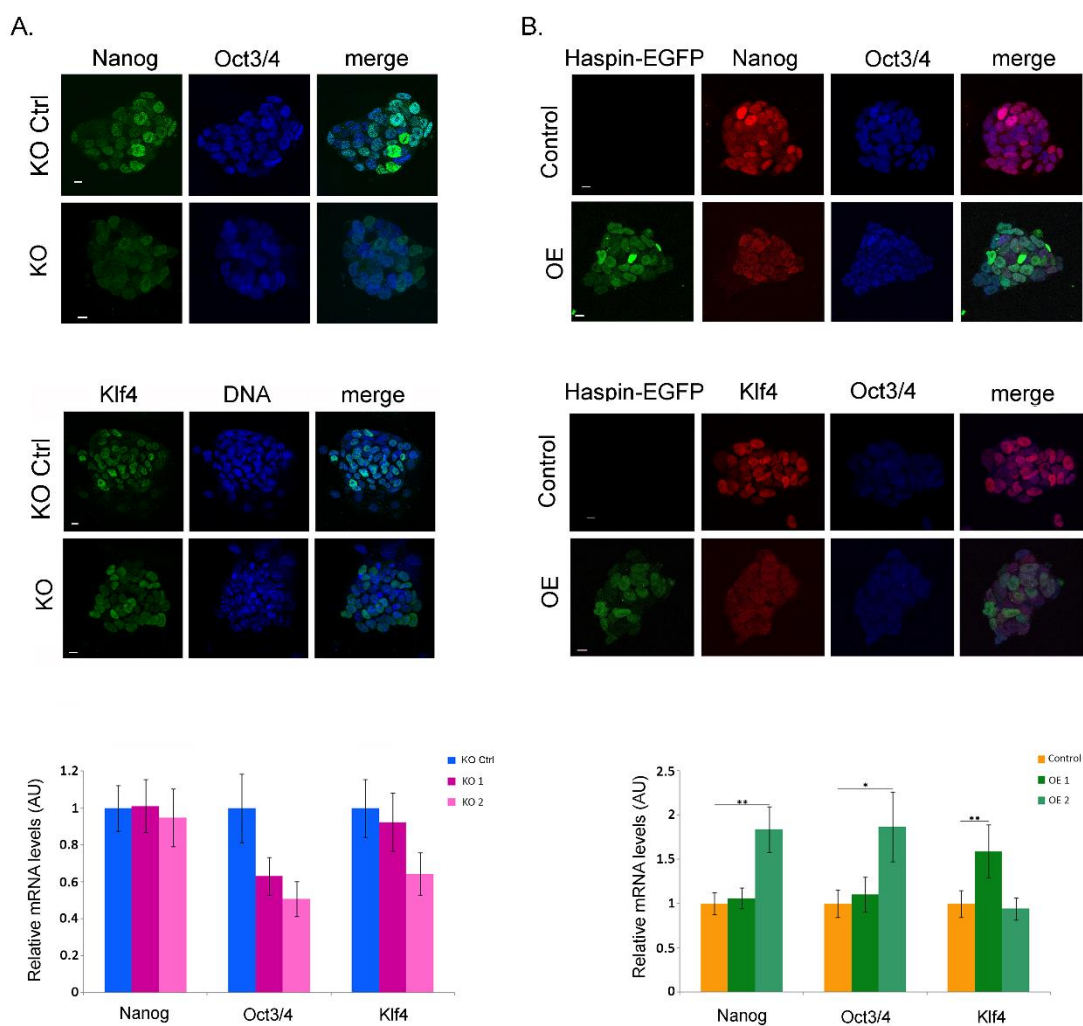
Τέλος, ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων ΚΟ και ΟΕ δεν εμφανίζει σημαντική μεταβολή συγκριτικά με το ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων ελέγχου (*Εικόνα 3.32, καμπύλες ανάπτυξης*). Συνδυάζοντας αυτά τα αποτελέσματα, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η Haspin δεν είναι απαραίτητη για την αυτο-ανανέωση και την έκπτυξη των βλαστικών κυττάρων. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι τα κύτταρα ΚΟ και ΟΕ είναι ικανά να πολλαπλασιαστούν αρκετές φορές στην καλλιέργεια, χωρίς να παρουσιάζουν εμφανείς αλλαγές στην αρχιτεκτονική τους ή να χάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους.



Εικόνα 3.32. Η μη φυσιολογική διάταξη των χρωμοσωμάτων δεν επηρεάζει την έκπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των ΚΟ και ΟΕ κυττάρων. (A,B) Διαγράμματα που απεικονίζουν τα ποσοστά φάσεων του κυτταρικού κύκλου (επάνω). Καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων ΚΟ και ΟΕ (κάτω).

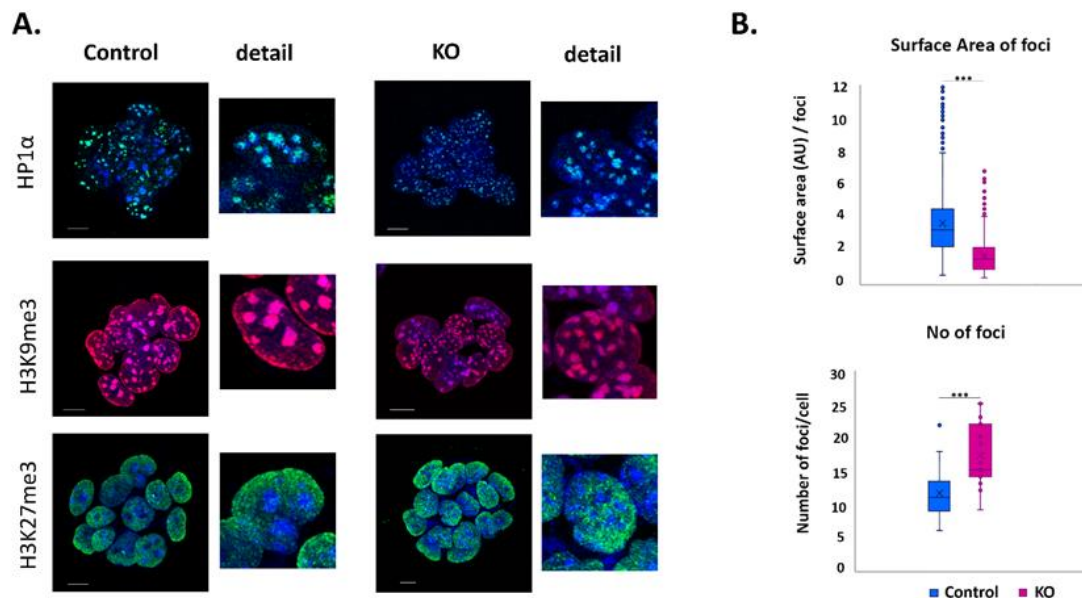
3.2.2 Επιδράσεις στην πολυδυναμία και τη διαφοροποίηση

Πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού των κυττάρων KO και OE με αντισώματα που αναγνωρίζουν Nanog και Oct4 δημιουργεί την εντύπωση ότι οι συγκεκριμένοι παράγοντες πολυδυναμίας εκφράζονται σε χαμηλότερα επίπεδα. Ωστόσο, πειράματα qRT-PCR δείχνουν ότι οι διαφορές στα επίπεδα έκφρασης (τουλάχιστον σε επίπεδα mRNA) των μεταγραφικών παραγόντων δεν είναι στατιστικά σημαντικές και/ή δεν παρατηρούνται σε όλους τους κλώνους (Εικόνα 3.33).

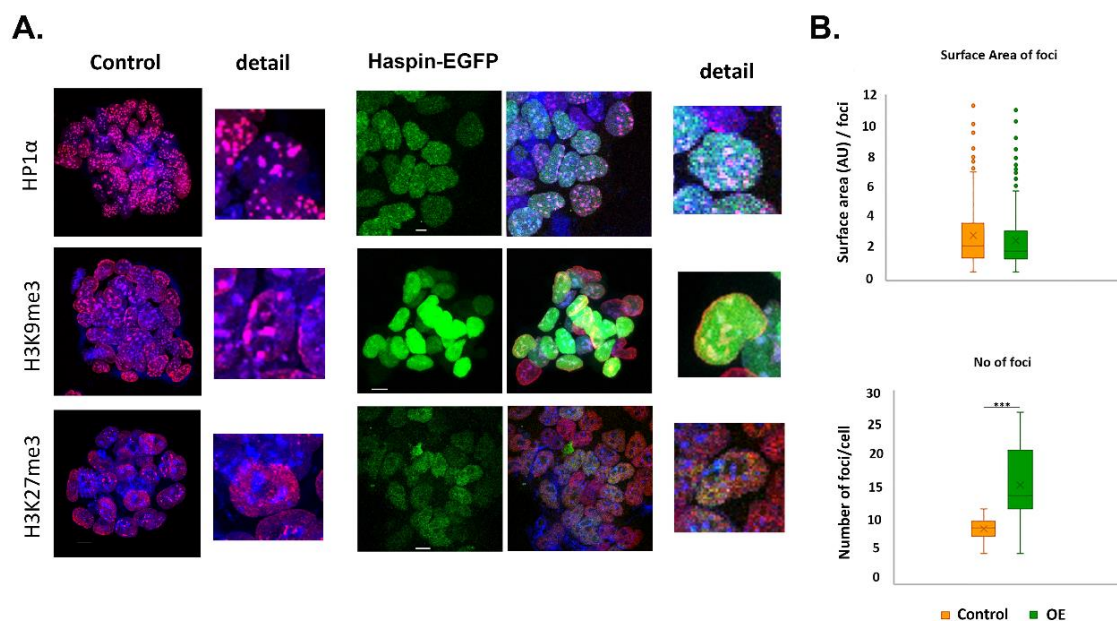


Εικόνα 3.33. Η απαλοιφή ή η υπερέκφραση της *Haspin* δεν επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης των παραγόντων πολυδυναμίας. (A) Χρώση με αντισώματα που αναγνωρίζουν *Nanog*, *Oct4* και *Klf4*. Κλίμακα 10μm. (B) Επίπεδα έκφρασης των παραπάνω παραγόντων με qRT-PCR στα κύτταρα KO και OE.

Οι πυρήνες των κυττάρων KO περιέχουν μικρότερες και περισσότερες σε αριθμό ετεροχρωματινικές εστίες συγκριτικά με τους πυρήνες των κυττάρων ελέγχου καθώς και των κυττάρων OE. Μια πιθανή ερμηνεία για αυτό, που συνδυάζεται με ευρήματα που προκύπτουν από τον έμμεσο ανοσοφθορισμό (βλέπε *Εικόνα 3.33*), είναι ότι η Haspin ευοδώνει τη «μετάβαση» από την πρωταρχική (*naïve*) στην προχωρημένη (*primed*) κατάσταση (*Εικόνα 3.34*; βλέπε επίσης (62)). Παρόλα αυτά, χαρτογράφηση του επιγενετικού τοπίου μέσω αντισωμάτων που αναγνωρίζουν τις τροποποιήσεις H3K27me3, H3K9me3 και την ετεροχρωματινική πρωτεΐνη HP1α δεν αποκαλύπτει μείζονες αλλαγές ανάμεσα στα κύτταρα KO και τα κύτταρα ελέγχου (*Εικόνα 3.34 και 3.35*). Λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο των αποτελεσμάτων μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι στο συμπέρασμα ότι η Haspin δεν εμπλέκεται άμεσα στη διατήρηση του καθεστώτος πολυδυναμίας. Προφανώς, ήσσονος σημασίας επιδράσεις στη σταθερότητα των πρωτεϊνών Nanog και Oct4 ή τη μικρο-ετερογένεια της χρωματίνης δεν μπορούν να αποκλειστούν.

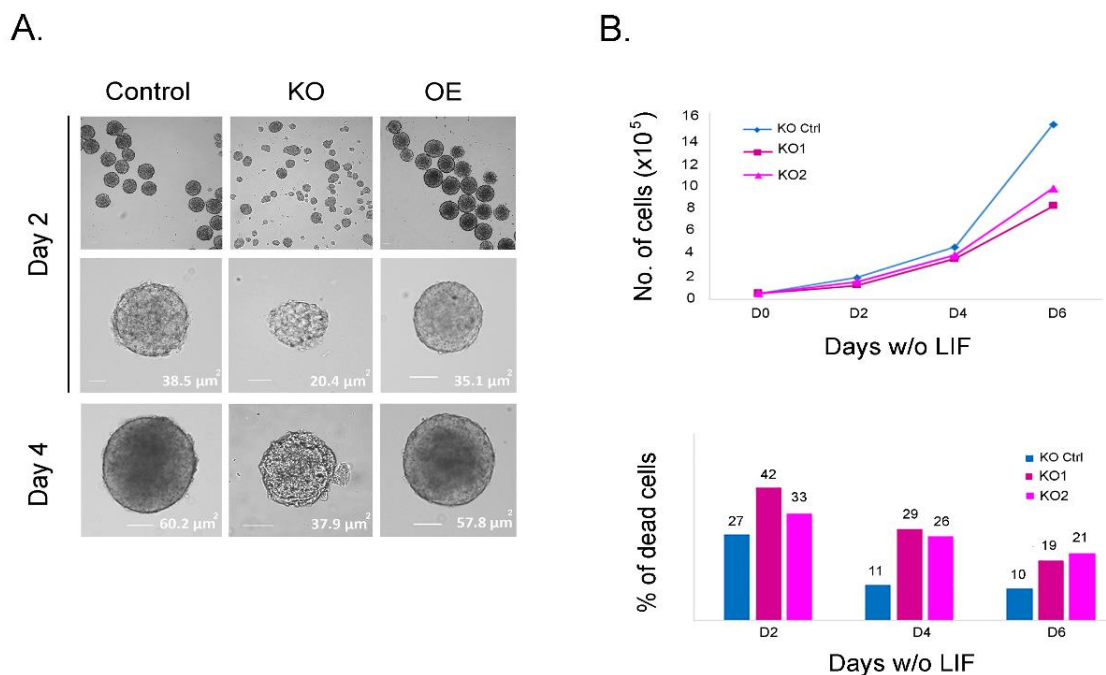


Εικόνα 3.34. *Επιδράσεις της απαλοιφής της Haspin στην οργάνωση της χρωματίνης.* (A) Χρώση των κυττάρων KO με αντισώματα που αναγνωρίζουν τις τροποποιήσεις H3K9me3, H3K27me3 και της ετεροχρωματινικής πρωτεΐνης HP1α. (B) Τα διαγράμματα απεικονίζουν τον αριθμό και το μέγεθος των ετεροχρωματινικών εστιών των κυττάρων KO σε σύγκριση με των κυττάρων ελέγχου ($p=3.4E-94$ για το μέγεθος και $p=2.3E-0.5$ για τον αριθμό των ετεροχρωματινικών εστιών).



Εικόνα 3.35. Επιδράσεις της υπερέκφρασης της Haspin στην οργάνωση της χρωματίνης. (A) Χρώση των κυττάρων OE με αντισώματα που αναγνωρίζουν τις τροποποιήσεις H3K9me3, H3K27me3 και της ετεροχρωματινικής πρωτεΐνης HP1α. (B) Τα διαγράμματα απεικονίζουν τον αριθμό και το μέγεθος των ετεροχρωματινικών εστιών των κυττάρων OE σε σύγκριση με των κυττάρων ελέγχου ($p=1.3E-0.1$ για το μέγεθος και $p=1.1E-0.5$ για τον αριθμό των ετεροχρωματινικών εστιών).

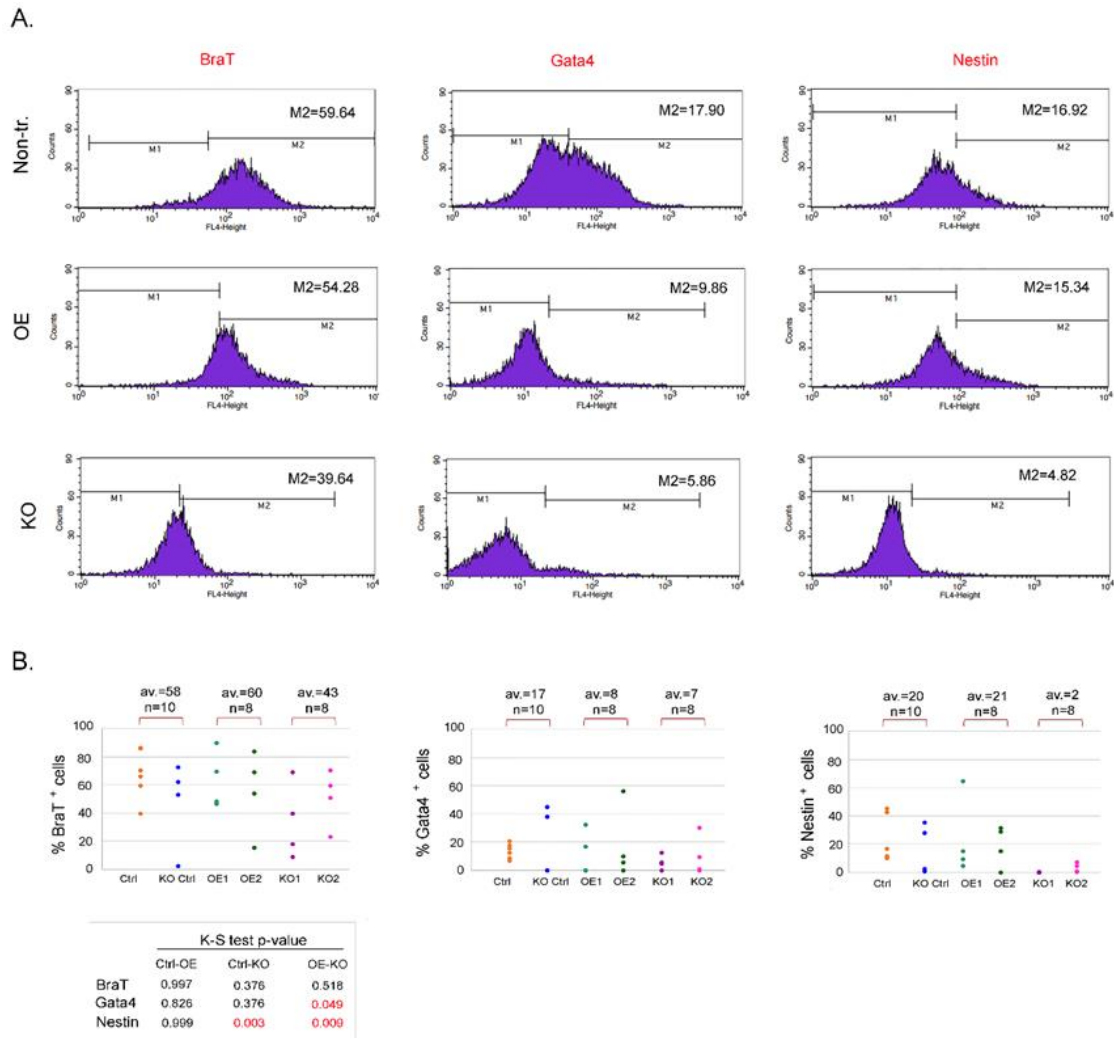
Η απομάκρυνση του παράγοντα LIF από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και επαγωγή της διαφοροποίησης μέσω της τεχνικής των «κρεμάμενων σταγόνων», οδηγεί στη δημιουργία EBs (Εικόνα 3.36). Τα EBs τα οποία προκύπτουν από κύτταρα KO είναι σημαντικά μικρότερα σε μέγεθος, σε σύγκριση με εκείνα των κυττάρων OE και των κυττάρων ελέγχου. Επιπροσθέτως, ενώ τα τελευταία αναπτύσσονται φυσιολογικά τις πρώτες 6 μέρες της διαφοροποίησης, τα πρώτα καθυστερούν στην ανάπτυξή τους και αποσυντίθενται σταδιακά εντός 10 ημερών. Η μη φυσιολογική ανάπτυξη των EBs τα οποία δεν περιέχουν Haspin συμβαδίζει με το γεγονός ότι τα κύτταρα KO παρουσιάζουν βραδύτερο ρυθμό ανάπτυξης στην αδιαφοροποίητη κατάσταση (βλέπε Εικόνα 3.33.A). Ένα άλλο σημείο που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι όμως ότι η επεξεργασία του γονιδίου της Haspin με CRISPR/Cas9 καταστρέφει αναγκαστικά το γονίδιο της Integrin αE. Η έλλειψη της Integrin αE μπορεί να οδηγεί σε χαλάρωση των διακυτταρικών συνδέσεων (dissociation) και διάσπαση των EBs σε κάποιο στάδιο της διαφοροποίησης.



Εικόνα 3.36. Η απαλοιφή της *Haspin* από το γονιδίωμα των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων προκαλεί μη φυσιολογικό σχηματισμό EBs. (A) Προφίλ των EBs που προκύπτουν από κύτταρα KO και OE. Κλίμακα 50 μ m. (B) Διαγράμματα που αποδεικνύουν τη σταδιακή αποσύνθεση των EBs τα οποία προκύπτουν από τα κύτταρα KO. (n=4, όπου n ο αριθμός των πειραμάτων διαφοροποίησης).

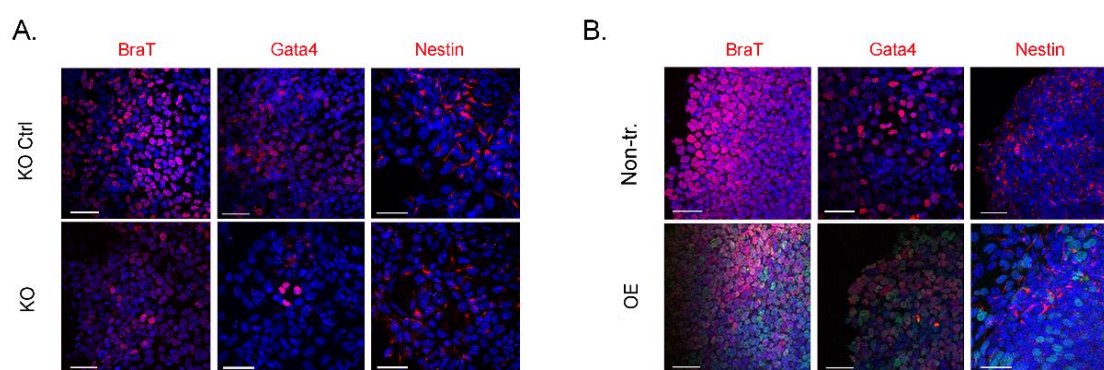
Εξετάστηκαν την έκφραση πρωίμων ιστο-ειδικών δεικτών σε EBs κατά την ημέρα 4 (όταν τα EBs είναι ακόμα ακέραια και βρίσκονται σε φάση ανάπτυξης), χρησιμοποιώντας αντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν τον Branchyury (BraT), Gata4 και Nestin. Όπως συμβαίνει συχνά σε *in vitro* δοκιμασίες μη κατευθυνόμενης διαφοροποίησης, αυτά τα πειράματα έδειξαν διακυμάνσεις στα επίπεδα έκφρασης, δημιουργώντας δυσκολίες στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Για αυτό το λόγο οι δοκιμασίες επαναλήφθηκαν αρκετές φορές, τρυψινοποιώντας τα EBs και αναλύοντας το σύνολο των κυτταρικών πληθυσμών με κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 3.37). Σύγκριση των ποσοστών των BraT/Gata4/Nestin-θετικών κυττάρων με το *Kolmogorov-Smirnov test* αποκαλύπτει ότι ο αριθμός των κυττάρων που εκφράζουν τον μεσοδερματικό και ενδοδερματικό δείκτη στις ομάδες KO και OE δεν διαφέρει σημαντικά από εκείνο των κυττάρων ελέγχου. Παρόλα αυτά, η διαφοροποίηση προς νευροεξώδερμα φαίνεται να επηρεάζεται στα κύτταρα KO. Το αποτέλεσμα αυτό πρέπει να

ερμηνευθεί με προσοχή δεδομένου του πολύ μικρού αριθμού Nestin-θετικών κυττάρων τις 4 πρώτες ημέρες διαφοροποίησης.



Εικόνα 3.37. Η έλλειψη της *Haspin* ίσως να επηρεάζει τη διαφοροποίηση προς εξώδερμα. Καμπύλες κυτταρομετρίας ροής και διαγράμματα που απεικονίζουν τα ποσοστά θετικών *BraT*⁺, *Gata4*⁺ και *Nestin*⁺ κυττάρων των EBs που προκύπτουν από κύτταρα KO και OE. Η αξιολόγηση των ποσοτικών αποτελεσμάτων έγινε με το Kolmogorov-Smirnov test.

Τα EBs εξετάστηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό έτσι ώστε να διαμορφωθεί μια πιο συγκεκριμένη εικόνα της ιστο-ειδικής έκφρασης των κυττάρων KO και OE. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.38 δείχνουν αρκετές ατυπίες, όπως ετερογενή έκφραση και σχετικά μικρότερη ένταση σήματος των BraT, Gata4 και Nestin. Από το σύνολο αυτών των παρατηρήσεων προκύπτει ότι, παρόλο που η διαφοροποίηση των κυττάρων δεν επηρεάζεται σημαντικά, τα κύτταρα KO και OE ακολουθούν ένα μη φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης ιστο-ειδικών δεικτών. Για την καλύτερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων θα χρειαστεί ποσοτικοποίηση της έκφρασης των συγκεκριμένων δεικτών με άλλες μεθόδους (π.χ. western blotting).

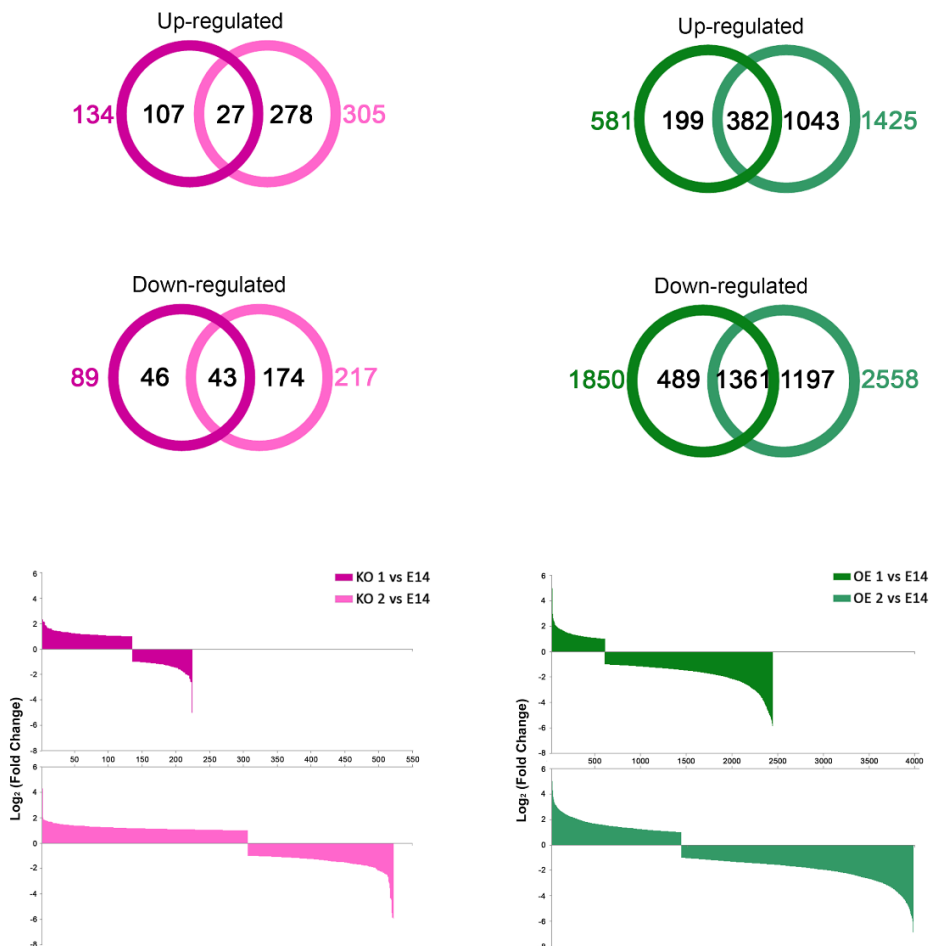


Εικόνα 3.38. Τα κύτταρα KO και OE παρουσιάζουν ατυπίες στην έκφραση ιστο-ειδικών δεικτών. (A) χρώση των EBs που προκύπτουν από κύτταρα KO και OE με αντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν τους δείκτες *Brachyury*, *Gata4* και *Nestin*. Κλίμακα 50 μ m.

3.3 Επιδράσεις στη γονιδιακή έκφραση

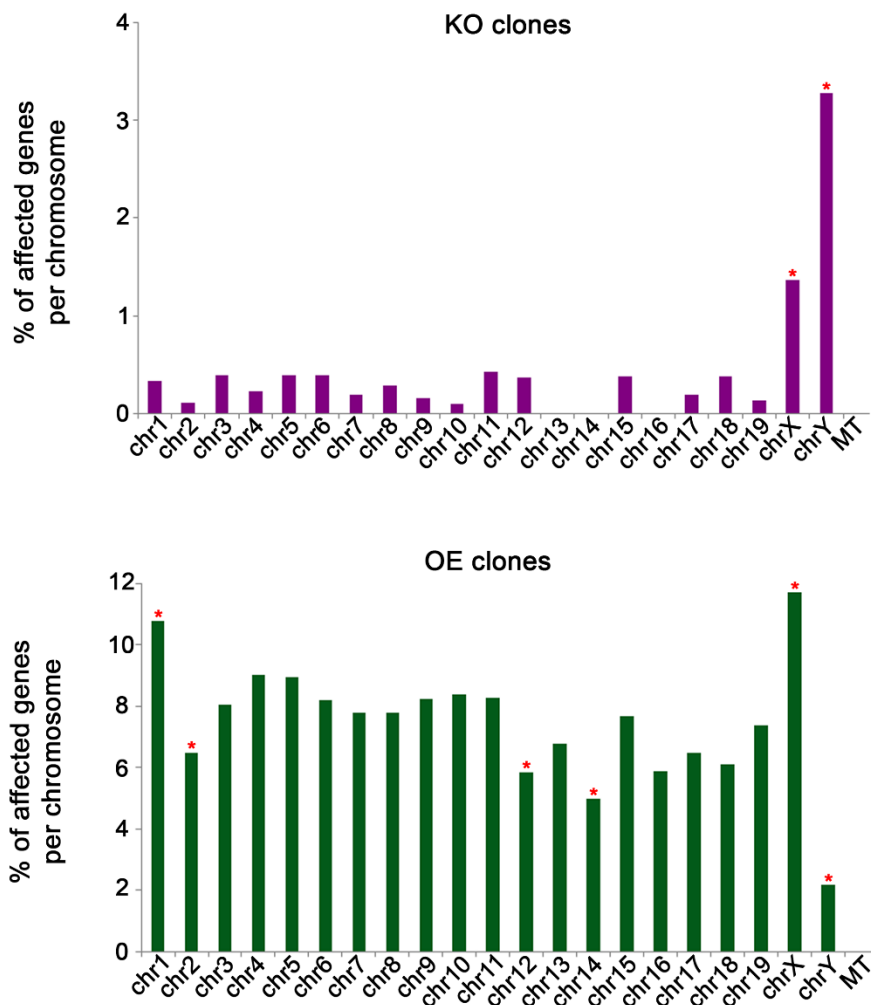
Προκειμένου να διασαφηνιστεί αν η απουσία ή η περίσσεια της *Haspin* ευοδώνει ή αναστέλλει μια συγκεκριμένη αναπτυξιακή διαδικασία, αναλύθηκαν τα κύτταρα KO και OE με αλληλούχηση RNA (RNA sequencing). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.39, ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων επηρεάζεται ύστερα από την απαλοιφή του γονιδίου της *Haspin* ή

υπερέκφρασή της. Υιοθετώντας έναν ουδό με p -value <0.05 και διαφορές στα επίπεδα έκφρασης >2 (fold difference) σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου, στην αναλογία των γονιδίων των οποίων η έκφραση αυξάνεται (upregulated genes) προς εκείνα στα οποία μειώνεται (downregulated genes) κυμαίνεται από ~ 1.4 (στα κύτταρα KO) μέχρι ~ 0.4 (στα κύτταρα OE). Αυτό υποδηλώνει ότι η Haspin έχει μια συνολικά κατασταλτική επίδραση στη μεταγραφή. Περαιτέρω, εάν δεν λάβουμε υπόψη τα γονίδια που διαφέρουν στους δυο κλώνους των κυττάρων KO και OE, εστιάζοντας αποκλειστικά στα κοινά γονίδια (βλέπε Venn diagrams) παρατηρούμε ότι τόσο η απαλοιφή όσο και η υπερέκφραση της Haspin έχουν κυρίως κατασταλτική επίδραση στη μεταγραφή. (Θα επανέλθουμε σε αυτό το σημείο αμέσως παρακάτω).



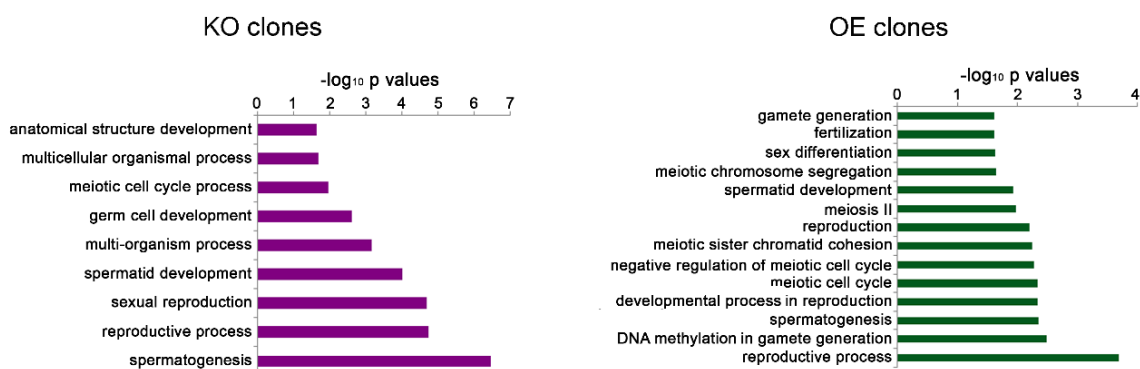
Εικόνα 3.39. Διαφορές των επιπέδων έκφρασης γονιδίων ύστερα από ανάλυση με αλληλούχηση RNA (RNA sequencing) (A) Διαγράμματα Venn που απεικονίζουν τα γονίδια στα οποία επηρεάζεται η έκφρασή τους κατά την αποσιώπηση ή υπερέκφραση της Haspin (B).

Τα γονίδια των οποίων η έκφρασή τους μεταβάλλεται από την υπερέκφραση της Haspin μπορούν να εντοπιστούν σε όλα τα χρωμοσώματα του ποντικού. Ωστόσο, σύμφωνα με το *Fisher exact test*, η κατανομή τους δεν είναι σε όλες τις περιπτώσεις τυχαία και εμφανίζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση προκειμένου περί των χρωμοσωμάτων 1, 2, 12, 14, X και Y. Η απαλοιφή της Haspin δείχνει μια πιο ξεκάθαρη εικόνα, καθώς η στατιστικά σημαντική κατανομή των επηρεασμένων γονιδίων αφορά μόνο τα δυο φυλετικά χρωμοσώματα X και Y (Εικόνα 3.40).

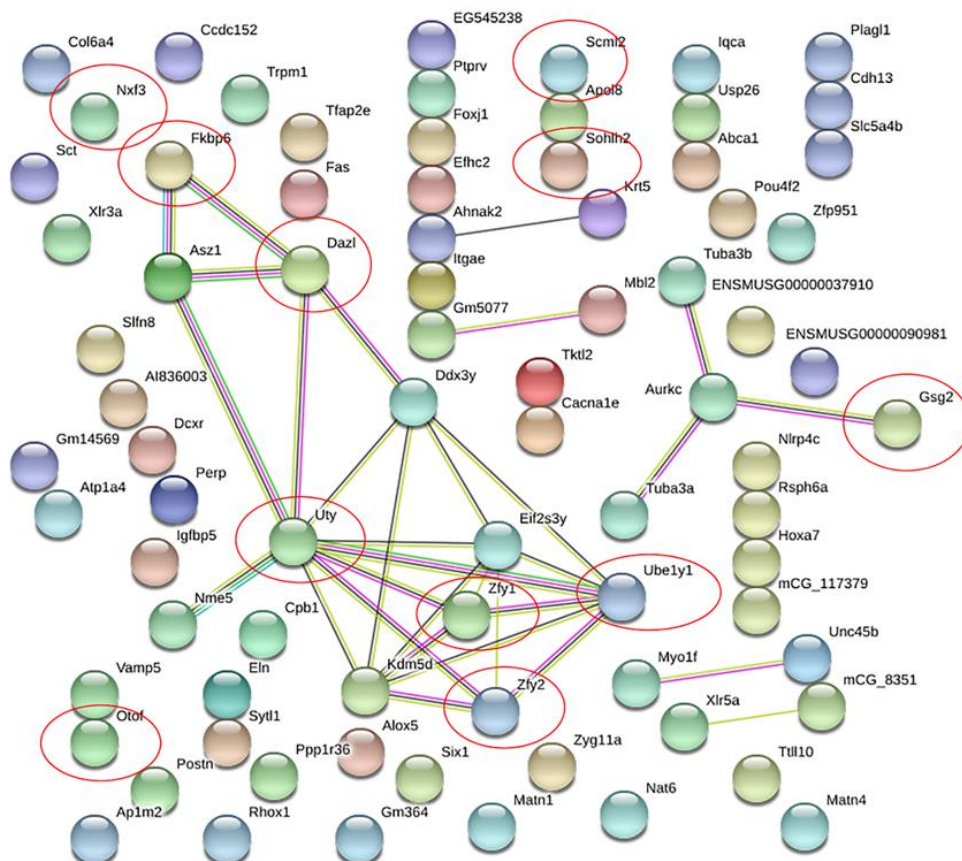


Εικόνα 3.40. Ιστογράμματα τα οποία δείχνουν την κατανομή των επηρεασμένων γονιδίων στα χρωμοσώματα του ποντικού. Η συσχέτιση των κατανομών των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με *Fisher exact test*.

Σε συμφωνία με την επιλεκτική σχέση που δείχνουν τα επηρεασμένα γονίδια με τα φυλετικά χρωμοσώματα ανάλυση με Gene Ontology (GO) αποκάλυψε ότι πολλά από αυτά κωδικοποιούν παράγοντες που εμπλέκονται στη γαμετογένεση (Εικόνα 3.41 και 3.42).

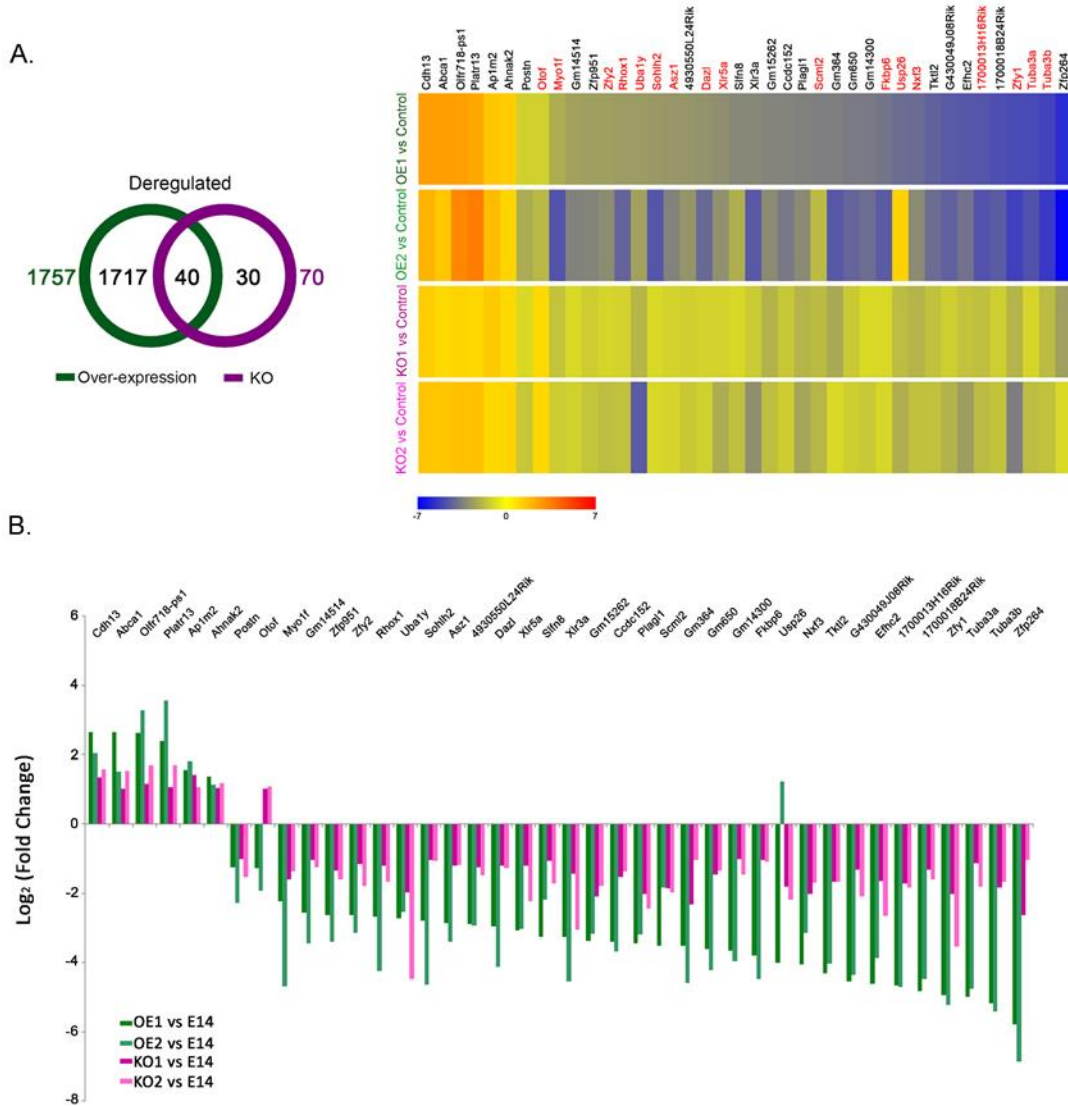


Εικόνα 3.41. Ιστογράμματα που απεικονίζουν τη συσχέτιση των επηρεασμένων γονιδίων των κυττάρων ΚΟ και ΟΕ με τη γαμετογένεση.



Εικόνα 3.42. Ανάλυση string με την οποία αναπαρίσταται το δίκτυο συσχέτισης μεταξύ των επηρεασμένων γονιδίων στα KO τα πιο ευρέως συσχετιζόμενα γονίδια ανήκουν στο αναπτυξιακό σύστημα των αρσενικών γαμετών.

Στη συνέχεια, για να περιοριστεί ο αχανής αριθμός γονιδίων και για να γίνει πιο εύκολη η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε σύγκριση των γονιδίων των οποίων η έκφραση αλλάζει σημαντικά τόσο στα κύτταρα KO όσο και στα OE. Η κατηγορία αυτή αποτελείται από 40 κοινά γονίδια (Εικόνα 3.43), εκ των οποίων 33 μειώνουν την έκφρασή τους, 6 στην κατηγορία στα οποία η έκφρασή τους αυξάνεται και 1 που εκφράζεται διαφορετικά στα KO και OE κύτταρα. Το γονίδιο αυτό είναι το *Otof* (84,85).

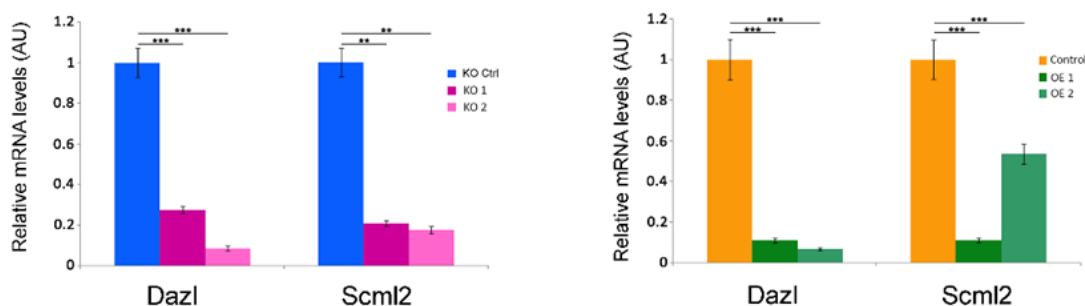


Εικόνα 3.43. (Α) Διάγραμμα Venn το οποίο δείχνει τα κοινά γονίδια τα οποία επηρεάζονται στα κύτταρα KO και OE. Χάρτης (heat map) που σκιαγραφεί τις διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των κοινών γονιδίων που επηρεάζονται σε λογαριθμική κλίμακα (B) Ιστόγραμμα που απεικονίζει τις διαφορές στα επίπεδα έκφρασης που επηρεάζονται στα κύτταρα KO και OE σε λογαριθμική κλίμακα.

Στα downregulated γονίδια συμπεριλαμβάνονται: α) τα *Zfy1/2*, δυο γονίδια που εντοπίζονται στο Y χρωμόσωμα και εμπλέκονται στη σπερμιόγνεση (86–88) β) το *Uba1y*, ένα γονίδιο το οποίο επίσης εντοπίζεται στο Y χρωμόσωμα και εμπλέκεται στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των διαφοροποιούμενων σπερματογονίων (89) γ) το *Sohlh2*, ένα ειδικό

γονίδιο για τα γαμετικά κύτταρα (90–92), δ) το *Nxf3*, το οποίο εντοπίζεται στο X χρωμόσωμα και εκφράζεται ειδικά στα κύτταρα Sertoli (93,94) και ε) το *Fkbp6*, ένα ειδικό γονίδιο της μείωσης (95).

Επίσης, ανάμεσα στα 40 κοινά γονίδια ανιχνεύεται το *Scml2*, το οποίο εντοπίζεται στο X χρωμόσωμα και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που συνδέεται στο σύμπλοκο Polycomb και συμμετέχει στον επιγενετικό έλεγχο των γαμετών μέσω ουβικιτινυλίωσης της ιστόνης H2A (96,97) και το *Dazl*, ένα γονίδιο που εμπλέκεται στην ανάπτυξη των γαμετικών κυττάρων (98–100). Η μείωση της έκφρασης αυτών των δυο ρυθμιστικών γονιδίων επιβεβαιώνεται με πειράματα qRT-PCR (Εικόνα 3.44).



Εικόνα 3.44. Η απαλοιφή και η υπερέκφραση της *Haspin* μειώνει την έκφραση των *Dazl* και *Scml2*. Επίπεδα έκφρασης των παραγόντων αυτών με qRT-PCR στα κύτταρα KO και OE.

Ένα άλλο στοιχείο στο υποσύνολο γονιδίων που επηρεάζονται στα KO κύτταρα είναι ο ρυθμιστής του γονιδίου *EIF2S3Y*, το οποίο, μαζί με το *SRY*, ρυθμίζει το πρόγραμμα της γαμετογένεσης (101–103). Τέλος, στην ομάδα των γονιδίων τα οποία δείχνουν σημαντικά μειωμένη έκφραση στους δυο τύπους κυττάρων είναι το *Zfp264*, το οποίο εντοπίζεται σε περιοχή γενωμικής αποτύπωσης και εκφράζεται στους όρχεις (104) καθώς επίσης και το γονίδιο της Aurora C το οποίο επηρεάζεται στα κύτταρα OE.

Η αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων ChIP για συγκεκριμένες τροποποιήσεις αποκάλυψε ότι τα ορχεο-ειδικά γονίδια περιέχουν στην αρχή του γονιδίου και πιθανώς στους υποκινητές τους H3K4me₃, μια τροποποίηση η οποία γειτνιάζει άμεσα με την H3T3ph, (βλέπε. *ENCODE*, *ENCSR000CCW*). Περαιτέρω ανάλυση, με πιο αυστηρά κριτήρια μειώνοντας το fold, έδειξε ότι τα γονίδια που επηρεάζονται από τη Haspin αποτελούν στοιχεία ενός καλά εδραιωμένου δικτύου γονιδίων τα οποία έχουν λειτουργική σχέση μεταξύ τους. Το δίκτυο αυτό αποκαλύπτεται μέσω του αλγόριθμου STRING και της βάσης δεδομένων που αφορά τις αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών (105). Κεντρικά στοιχεία σε αυτό το δίκτυο είναι τα γονίδια *KDM5D* και το *Uty* που παρουσιάζουν δραματική μείωση στην έκφραση τους (>6 φορές) στα κύτταρα ΚΟ. Ο παράγοντας JARID1D απομεθυλιώνει την H3K4me_{2,3}, ενώ ο UTY είναι παρόμοιος με τον UTX και JAMJD3, δυο γνωστές απομεθυλάσες της H3K27me₃. Αντίθετα με τον UTX και τον JAMJD3, ο παράγοντας UTY έχει αποδειχθεί ότι έχει δραστηριότητα ιστονικής απομεθυλάσης *in vivo* και μπορεί να λειτουργεί ως «μιμητικό» άλλων απομεθυλασών που επηρεάζουν την H3K27me₃ (106,107).

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την αλληλούχηση RNA αποκαλύπτουν μια εκλεκτική σχέση της Haspin με τη διαφοροποίηση των αρσενικών γαμετικών κυττάρων, πράγμα που συμφωνεί με το γεγονός ότι η Haspin εντοπίστηκε αρχικά σε απλοειδείς μη διαιρούμενες σπερματίδες (1). Αυτό όμως έρχεται σε αντίθεση με το γεγονός ότι η Haspin είναι ενεργή μόνο κατά τη διάρκεια της μίτωσης και αυτό-καταστέλλεται στη διάρκεια της μεσόφασης στα σωματικά κύτταρα (19). Πιστεύεται ότι η άρση της αυτο-αναστολής της Haspin απαιτεί διαδοχική φωσφορυλίωση της αμινο-τελικής περιοχής της από τις κινάσες Cdk1 και Polo (Plk1), οι οποίες ενεργοποιούνται στην αρχή της φάσης της μίτωσης. Από τα παραπάνω προκύπτουν επομένως τα ακόλουθα ερωτήματα: α) εάν η Haspin λειτουργεί καταλυτικά και φωσφορυλιώνει την H3T3 στον πυρήνα των σπερματίδων και β) εάν η συγκεκριμένη τροποποίηση συσχετίζεται με άλλες ιστονικές τροποποιήσεις σε αυτό το σύστημα.

Προκειμένου να απαντηθούν τα συγκεκριμένα ερωτήματα, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων σε όρχεις ποντικού. Τα πειράματα αυτά βρίσκονται σε εξέλιξη, όμως τα πρώτα αποτελέσματα δείχνουν ότι πράγματι το σήμα της H3T3ph εντοπίζεται στα γαμετικά κύτταρα. Η H3T3ph ανιχνεύεται σε σχετικά «χαλαρές» περιοχές της χρωματίνης που είναι εμπλουτισμένες σε H3K27me₃, αλλά δεν περιέχουν H3K9me₃ και HP1α.

Για να εξακριβωθεί ο ακριβής ρόλος των συνδυαστικών τροποποιήσεων στα κατάλοιπα θρεονίνη-3, λυσίνη-4 και λυσίνη-27 που εμφανίζονται στην αμινο-τελική περιοχή της ιστόνης H3 θα απαιτηθούν περαιτέρω πειράματα και ιδιαίτερα δοκιμασίες ChIP-seq.

4. Συζήτηση

4. Συζήτηση

4.1 Ο ρόλος της Haspin στη μίτωση

Η Haspin εμπλέκεται σε μια ποικιλία μιτωτικών διαδικασιών, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η ευθυγράμμιση των χρωμοσωμάτων, η διασύνδεση των κεντρομεριδίων στις αδελφές χρωματίδες και η συγκρότηση της μιτωτικής ατράκτου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που περιγράφηκαν παραπάνω αποδεικνύεται ότι, παρά τη συμμετοχή της σε όλες αυτές τις διαδικασίες, η Haspin δεν είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της πολυδυναμίας και την έκπτυξη των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων υπό συνθήκες *in vitro* καλλιέργειας. Ωστόσο, είναι πιθανό ότι η έλλειψη της Haspin εν μέρει να αντισταθμίζεται από έναν μηχανισμό που περιλαμβάνει την κινάση Bub1. Είναι γνωστό ότι η Bub1 φωσφορυλιώνει την ιστόνη H2A στη θρεονίνη-120 (H2AT120ph), δημιουργώντας μια θέση πρόσδεσης για τις Sgo1/2. Οι πρωτεΐνες αυτές συνδέονται με τη Borealin, με αποτέλεσμα την πρόσδεση του CPC στο εγγύς κεντρομερές/κινητοχώρο (16,18). Όταν ο μηχανισμός αυτός που εξαρτάται από τη Bub1 δεν επαρκεί για τον αποτελεσματικό έλεγχο της διάταξης των χρωμοσωμάτων, προφανώς ο διαχωρισμός των αδελφών χρωματίδων σε ένα ποσοστό κυττάρων δεν γίνεται φυσιολογικά. Τα κύτταρα που εμφανίζουν ελλείμματα ή περίσσεια γενετικού υλικού πιθανόν αποπίπτουν μετά την έξοδο τους από τη μίτωση, δημιουργώντας έτσι μια υστέρηση στο ρυθμό πολλαπλασιασμού. Ωστόσο, το υπόλοιπο του κυτταρικού πληθυσμού συνεχίζει να πολλαπλασιάζεται, ενώ ταυτόχρονα διατηρεί το αναπτυξιακό του δυναμικό. Αυτό οφείλεται στη «στατιστική μηχανική» η οποία χαρακτηρίζει την πολυδύναμη κατάσταση (108): σε αντίθεση με τα διαφοροποιημένα κύτταρα, τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα αποτελούνται από ετερογενείς υποπληθυσμούς που παρουσιάζουν ποικίλα προφίλ γονιδιακής έκφρασης. Οι υποπληθυσμοί αυτοί βρίσκονται σε διάφορες αντιστρεπτές μικροκαταστάσεις (microstates). Επομένως, η εξάλειψη ενός υποπληθυσμού αναπληρώνεται λειτουργικά από την επιστράτευση ενός άλλου χωρίς να δημιουργούνται εμφανή προβλήματα στη διαδικασία διαφοροποίησης.

4.2 Η Haspin ως ρυθμιστής της μεταγραφής

Εκτός από τον ρόλο της στη μίτωση, υπάρχουν πλέον αρκετές ενδείξεις ότι η Haspin λειτουργεί ως επιγενετικός ρυθμιστής κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης. Λόγω της διαφορικής

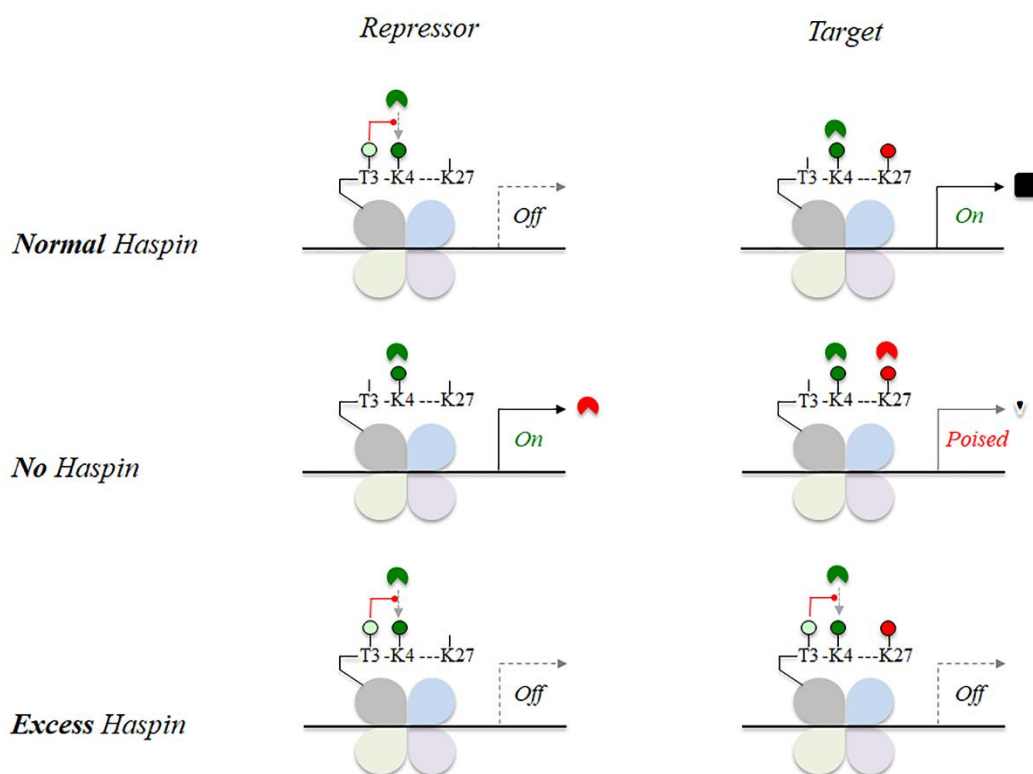
μεθυλίωσης της 5' περιοχής του γονιδίου *Gsg2* (109), τα επίπεδα έκφρασης της *Haspin* στα σωματικά κύτταρα είναι πάρα πολύ χαμηλά (4), σε αντίθεση με τους αρσενικούς γαμέτες, στους οποίους είναι πολύ υψηλότερη (1). Για αυτό και δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι ποντίκια στα οποία έχει απαλειφθεί το γονίδιο *Gsg2* δεν εμφανίζουν προβλήματα στην οργανογένεση, αλλά μόνο στους όρχεις (27).

Τα αποτελέσματα από την αλληλούχηση RNA που παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή δείχνουν ότι ορισμένα αναπτυξιακά ρυθμιζόμενα και ορχεο-ειδικά γονίδια μειώνουν τη μεταγραφική τους δραστηριότητα μετά την υπερέκφραση ή την απαλοιφή της *Haspin*. Το γεγονός αυτό μπορεί να ερμηνευθεί με δυο τρόπους. Πρώτον, η *Haspin*, αλλά και η H3T3ph για την οποία είναι υπεύθυνη, μπορεί να λειτουργούν βέλτιστα σε μια συγκεκριμένη «δοσολογία» (“dosage” effect)· εναλλακτικά, η H3T3ph ίσως να είναι μέρος ενός σύνθετου επιγενετικού διακόπτη, ο οποίος ενεργοποιείται υπό συγκεκριμένες αναπτυξιακές συνθήκες.

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η H3T3ph και η H3K4me3 συνυπάρχουν στην αμινοτελική περιοχή της ιστόνης H3 (10), όπως επίσης συμβαίνει με τα «ανταγωνιστικά» σήματα H3S10ph και H3K9me3 (110–112). Παρά το γεγονός ότι ο υποπληθυσμός των μορίων της ιστόνης H3 που φέρει ταυτόχρονα και τις δυο τροποποιήσεις (phospho- and methyl-mark) είναι πιθανότατα πολύ μικρός (λόγω της διαφορετικής εναλλαγής- «turnover»- μεταξύ φωσφορυλίωσης και μεθυλίωσης), ο συνδυασμός των H3T3ph/H3K4me3 ίσως να λειτουργεί είτε ως ένας διαδικός διακόπτης (binary switch), είτε ως μια αμφίσημη τροποποίηση (bivalent modification), όπως συμβαίνει με τον συνδυασμό των H3K4me3/H3K27me3. Οι αμφίσημες ιστονικές τροποποιήσεις, που είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των πολυδύναμων κυττάρων και των κυττάρων της γαμετικής σειράς, θεωρείται ότι διατηρούν μια κατάσταση μεταγραφικής ετοιμότητας (“poised state”) για όσο χρονικό διάστημα τα κύτταρα είναι αδιαφοροποίητα (113).

Το γεγονός ότι τόσο η απουσία όσο και η περίσσεια της *Haspin* προκαλούν μείωση της μεταγραφής των ορχεο-ειδικών γονιδίων μπορεί να ερμηνευθεί μέσω μιας αλληλεπίδρασης μεταξύ των H3T3ph, H3K4me3 και H3K27me3 καθώς και ζευγών μεταγραφικών ενεργοποιητών/καταστολέων. Η ιδέα αυτή, που απεικονίζεται διαγραμματικά στην *Εικόνα 4.1*, βασίζεται σε δυο υποθέσεις: α) ότι η προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας στην θρεονίνη-3 εξασθενεί την αλληλεπίδραση της H3K4me3 με ένα ενεργοποιητικό σύμπλοκο (histone code

reader), αλλά δεν επηρεάζει απαραίτητα τη σύνδεση ενός κατασταλτικού παράγοντα σε ένα σχετικά απομακρυσμένο κατάλοιπο μεθυλιωμένης λυσίνης, β) ότι ενώ υπό φυσιολογικές συνθήκες μόνο ένας μικρός πληθυσμός ιστόνης H3 είναι φωσφορυλιωμένος, ένας μεγαλύτερος πληθυσμός τροποποιείται όταν υπερεκφράζεται η Haspin.



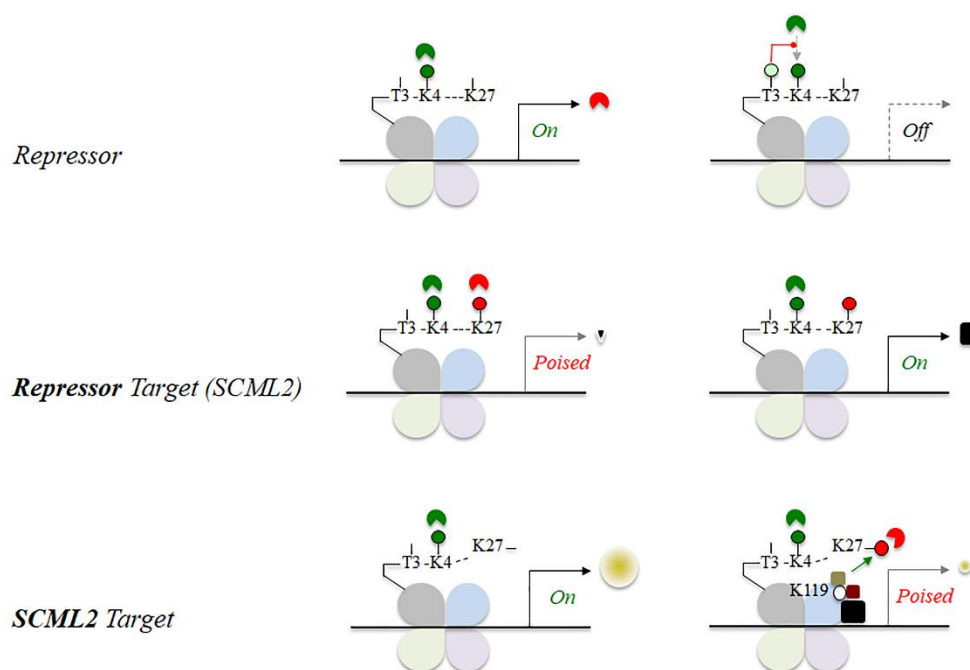
Εικόνα 4.1 Πιθανοί μηχανισμοί γονιδιακής ρύθμισης από την κινάση Haspin. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η Haspin φωσφορυλιώνει την ιστόνη H3 στην περιοχή του υποκινητή ενός κατασταλτικού γονιδίου, με συνέπεια να μην παράγεται ο καταστολέας και το γονίδιο-στόχος να μεταγράφεται. Αυτό δεν συμβαίνει όταν η Haspin λείπει. Στην περίπτωση που η Haspin υπερεκφράζεται, δεν παράγεται μεν ο καταστολέας, αλλά δεν μεταγράφεται και το γονίδιο-στόχος λόγω υπερ-φωσφορυλίωσης της ιστόνης H3 στο δικό του υποκινητή.

Βασιζόμενοι σε αυτές τις υποθέσεις και λαμβάνοντας υπόψη ότι η κατανομή των επηρεασμένων γονιδίων σχετίζεται με το χρωμόσωμα Y, προκύπτει η υπόθεση ότι η Haspin ίσως λειτουργεί ως ένας παράγοντας άρσης της καταστολής ειδικών γονιδίων που ρυθμίζουν τη σπερμιόγνεση μέσω της καταστολής κατασταλτικών γονιδίων (βλέπε. *Εικόνα 4.2 και 4.3*).

Η υπόθεση που προτείνεται υποστηρίζεται από μια σειρά δομικών και βιοχημικών δεδομένων. Η φωσφορυλίωση της θρεονίνης-3 μειώνει τη δέσμευση της διπλής διπλού χρωμοτομέα του παράγοντα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης CHD1 στην H3K4me3 περίπου 25 φορές (114). Ωστόσο, η φωσφορυλίωση της Ser-10 H3 δεν επηρεάζει σε αυτή την αλληλεπίδραση. Παρόμοια δεδομένα έχουν προκύψει σε σχέση με την πρόσδεση των PHD finger proteins (για παράδειγμα DIDO3, ING2, MLL5, RAG2 και TAF3), καθώς και της υπομονάδας TTD της απομεθυλάσης 4 A στην H3K4me3 (61,115–117).

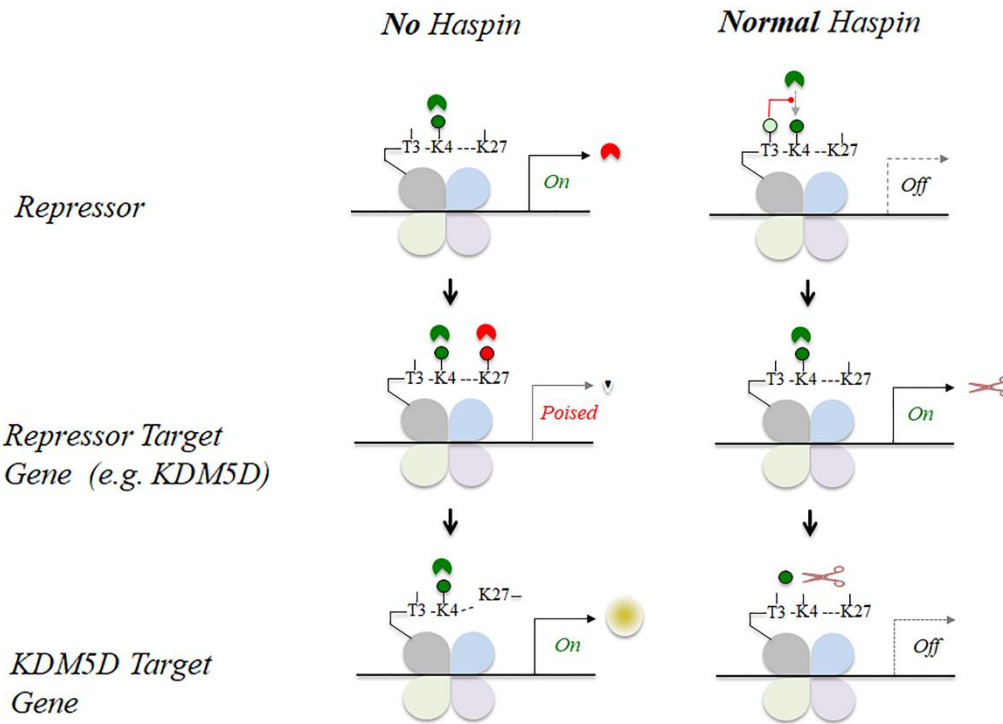
Παρόλα αυτά, η αλληλεπίδραση των H3T3rh-H3K4me3 δεν χρειάζεται απαραίτητα να είναι ανταγωνιστική. Υπάρχουν παραδείγματα όπου τα γειτονικά σήματα φωσφορυλίωσης και μεθυλίωσης δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή δρουν συνεργιστικά. Για παράδειγμα, η πρόσδεση της περιοχής ATRX-DNMT3-DNMT3L (ADD) της πρωτεΐνης ATRX στην H3K9me3 δεν επηρεάζεται από τη φωσφορυλίωση της S10H3, ενώ η πρόσδεση της PWWP του BRPF1 στη H3.3K36me3 ενισχύεται σχεδόν 2 φορές με τη φωσφορυλίωση της γειτονικής τυροσίνης-41 (118). Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί, ενώ η Haspin έχει κυρίως ένα κατασταλτικό ρόλο στο σύνολο των γονιδίων, ένα ποσοστό από αυτά αυξάνουν την έκφρασή τους στα κύτταρα KO και OE.

Ένας μεταγραφικός ρυθμιστής η έκφραση του οποίου επηρεάζεται από τη Haspin είναι το SCML2 (Εικόνα 4.2). Ο παράγοντας αυτός σχετίζεται με το σύμπλοκο Polycomb (PRC1) και μεσολαβεί για την ουβικιτινυλίωση της ιστόνης H2A στη λυσίνη-119 (96,119,120). Η τροποποιημένη H2A παρέχει μια θέση πρόσδεσης για ένα άλλο σύμπλοκο Polycomb (Jarid2-Aebp2-containing PRC2), το οποίο μεθυλιώνει τη λυσίνη-27 στην ιστόνη H3 (121) και προκαλεί αποσιώπηση γονιδίων που είναι ενεργά στα σωματικά κύτταρα. Παράλληλα, το SCML2 αποτρέπει την ουβικιτινυλίωση της H2A στη λυσίνη-119 στα γονίδια των φυλετικών χρωμοσωμάτων (96).



Εικόνα 4.2 Ρύθμιση της μεταγραφής στην περίπτωση που το γονίδιο στόχος του καταστολέα είναι ένα άλλο κατασταλτικό γονίδιο όπως το SCML2, το οποίο δρα μέσω του συμπλόκου PRC1.

Ένα άλλο γονίδιο το οποίο επηρεάζεται από τη από τη Haspin είναι το JARID1D. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την πρωτεΐνη KMD5D, η οποία ο απομεθυλιώνει την H3K4me_{2,3}. Η απομεθυλίωση της H3K4me₃ μπορεί να προκαλεί εκλεκτική αποσιώπηση/ενεργοποίηση ορχεο-ειδικών γονιδίων κατά τη διάρκεια της σπερμιογένεσης (Εικόνα 4.3).



Εικόνα 4.3 Ρύθμιση της μεταγραφής στην περίπτωση που το γονίδιο-στόχος του καταστολέα είναι μια απομεθυλάση της $H3K4me3$, όπως το $KDM5D$. Οι δράσεις αυτές της *Haspin* δεν συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της μεσόφασης στα σωματικά κύτταρα γιατί το ένζυμο αυτό-αναστέλλεται, αλλά λαμβάνουν χώρα στις απλοειδείς σπερματίδες όπου η *Haspin* είναι ενεργή.

Για να εκτιμηθεί η εγκυρότητα αυτών των υποθέσεων, πρέπει να διερευνηθεί διεξοδικά η ρύθμιση των ορχεο-ειδικών γονιδίων από τα ζεύγη καταστολέων/ενεργοποιητών, τα οποία δρουν μέσω των $H3T3ph$ / $H3K4me3$ και $H3K27me3$.

Περίληψη

Η άτυπη πρωτεϊνική κινάση Haspin είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 στη θρεονίνη 3 (H3T3ph). Κατά τη διάρκεια της μίτωσης, η H3T3ph εντοπίζεται στα κεντρομερίδια, παρέχοντας μια θέση πρόσδεσης για το σύμπλοκο CPC (Chromosomal Passenger Complex). Παρότι η σύνδεση του συμπλόκου CPC στο κεντρομερίδιο είναι σημαντική για τη σωστή διάταξη των χρωμοσωμάτων και τον διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων, ποντίκια στα οποία το γονίδιο της Haspin έχει αδρανοποιηθεί (KnockOut-KO) αναπτύσσονται φυσιολογικά χωρίς να παρουσιάζουν σημαντικά ελλείμματα, εκτός από κάποιες ανωμαλίες που παρατηρούνται στους όρχεις. Για να διαχωριστούν οι ζωτικές και μη ζωτικές λειτουργίες της Haspin, εξετάστηκαν εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού στα οποία έχει απαλειφθεί ή υπερεκφράζεται η συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η Haspin δεν είναι απαραίτητη για την αυτο-ανανέωση και την έκπτυξη των πολυδύναμων κυττάρων. Παρόλα αυτά, η απουσία της επηρεάζει την *in vitro* διαφοροποίηση και η αστάθμητη έκφρασή της επηρεάζει σοβαρά την έκφραση ορχεο-ειδικών γονιδίων. Επί τη βάση αυτών και άλλων συνηγορητικών στοιχείων, προτείνεται ότι η φωσφορυλίωση της θρεονίνης-3 από τη Haspin, μαζί με την τρι-μεθυλίωση της λυσίνης-4 στην ιστόνη H3 (H3K4me3), λειτουργούν ως ένας επιγενετικός «διακόπτης», που ρυθμίζει την έκφραση αναπτυξιακά σημαντικών γονιδίων κατά τη διάρκεια της σπερμιογένεσης

Summary

The atypical protein kinase Haspin is responsible for mitotic phosphorylation of Histone H3 at threonine-3 (H3T3ph). During mitosis, H3T3ph localizes in the inner centromere and it is thought to provide a docking site for the Chromosomal Passenger Complex (CPC). Although CPC targeting to the centromere is critical for the control of chromosome congression and sister-chromatid segregation, Haspin-knockout mice develop normally and do not exhibit major defects, except for testicular anomalies. To distinguish between essential and non-essential functions of Haspin, we have examined mouse embryonic stem cells lacking or overexpressing this protein. The results show that Haspin is not essential for the population expansion of naïve pluripotent cells. However, the lack of Haspin compromises the *in vitro* differentiation and its inappropriate expression affects severely the expression of testis-specific genes. According to these data and in combination with observations, we suggest that H3T3ph along with H3K4me3, function as an epigenetic switch that regulates the expression of testis-specific genes during spermiogenesis.

Βιβλιογραφία

1. Tanaka H, Yoshimura Y, Nozaki M, Yomogida K, Tsuchida J, Tosaka Y, et al. Identification and characterization of a haploid germ cell-specific nuclear protein kinase (Haspin) in spermatid nuclei and its effects on somatic cells. *J Biol Chem*. 1999;274(24):17049–57.
2. Higgins JMG. The Haspin gene: Location in an intron of the Integrin α E gene, associated transcription of an Integrin α E-derived RNA and expression in diploid as well as haploid cells. *Gene*. 2001;267(1):55–69.
3. Nguyen AL, Gentilello AS, Balboula AZ, Shrivastava V, Ohring J, Schindler K. Phosphorylation of threonine 3 on histone H3 by haspin kinase is required for meiosis I in mouse oocytes. *J Cell Sci* [Internet]. 2014;127(23):5066–78. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.158840>
4. Hindriksen S, Bramer AJ, Truong MA, Vromans MJM, Post JB, Verlaan-Klink I, et al. Baculoviral delivery of CRISPR/Cas9 facilitates efficient genome editing in human cells. *PLoS One*. 2017;12(6):1–25.
5. Higgins JMG. The Haspin gene: location in an intron of the Integrin α E gene, associated transcription of an Integrin α E-derived RNA and expression in diploid as well as haploid cells. *Gene* [Internet]. 2001;267(1):55–69. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111901003870>
6. Tanaka H, Iguchi N, Nakamura Y, Kohroki J, de Carvalho CE, Nishimune Y. Cloning and characterization of human haspin gene encoding haploid germ cell-specific nuclear protein kinase. *Mol Hum Reprod*. 2001;7(3):211–8.
7. Higgins JM. Haspin-like proteins: a new family of evolutionarily conserved putative eukaryotic protein kinases. *Protein Sci* [Internet]. 2001;10:1677–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1110/ps.49901>
8. Eswaran J, Patnaik D, Filippakopoulos P, Wang F, Stein RL, Murray JW, et al. Structure and functional characterization of the atypical human kinase haspin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:20198–203.
9. Higgins JMG. Cellular and Molecular Life Sciences Structure , function and evolution

- of haspin and haspin- related proteins , a distinctive group of eukaryotic protein kinases. 2003;60:446–62.
10. Markaki Y, Christogianni A, Politou AS, Georgatos SD. Phosphorylation of histone H3 at Thr3 is part of a combinatorial pattern that marks and configures mitotic chromatin. *J Cell Sci* [Internet]. 2009 Aug 15 [cited 2014 Jun 10];122(16):2809–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19622635>
 11. Villa F, Capasso P, Tortorici M, Forneris F, de Marco A, Mattevi A, et al. Crystal structure of the catalytic domain of Haspin, an atypical kinase implicated in chromatin organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009;106(48):20204–9. Available from: <http://www.pnas.org/content/106/48/20204.long>
 12. Polioudaki H. Mitotic phosphorylation of histone H3 at threonine 3. *FEBS Lett* [Internet]. 2004;560(1–3):39–44. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014579304000602>
 13. Dai J, Sultan S, Taylor SS, Higgins JMG. The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev*. 2005;19:472–88.
 14. Jeyaprakash AA, Basquin C, Jayachandran U, Conti E. Structural basis for the recognition of phosphorylated histone H3 by the Survivin subunit of the chromosomal passenger complex. *Structure* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;19(11):1625–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2011.09.002>
 15. Wang F, Ulyanova NP, Daum JR, Patnaik D, Kateneva A V, Gorbsky GJ, et al. Haspin inhibitors reveal centromeric functions of Aurora B in chromosome segregation. *J Cell Biol* [Internet]. 2012 Oct 15 [cited 2014 Jul 10];199(2):251–68. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3471242&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 16. Bekier ME, Mazur T, Rashid MS, Taylor WR. Borealin dimerization mediates optimal CPC checkpoint function by enhancing localization to centromeres and kinetochores. *Nat Commun*. 2015;6(November).
 17. Kelly AE, Ghenoiu C, Xue JZ, Zierhut C, Kimura H, Funabiki H. Survivin Reads Phosphorylated Histone H3 Threonine 3 to Activate the Mitotic Kinase Aurora B.

- Science (80-) [Internet]. 2010 Oct 8;330(6001):235–9. Available from:
<http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1189505>
18. Yamagishi Y, Honda T, Tanno Y, Watanabe Y. Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation. *Science* [Internet]. 2010 Oct 8;330(6001):239–43. Available from:
<http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.M113.034819>
 19. Ghenoiu C, Wheelock MS, Funabiki H. Autoinhibition and polo-dependent multisite phosphorylation restrict activity of the histone H3 kinase haspin to mitosis. *Mol Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;52(5):734–45. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.002>
 20. Yoshida MM, Ting L, Gygi SP, Azuma Y. SUMOylation of DNA topoisomerase II α regulates histone H3 kinase Haspin and H3 phosphorylation in mitosis. *J Cell Biol*. 2016;213(6):665–78.
 21. De Antoni A, Maffini S, Knapp S, Musacchio A, Santaguida S. A small-molecule inhibitor of Haspin alters the kinetochore functions of Aurora B. *J Cell Biol* [Internet]. 2012 Oct 15 [cited 2014 Jul 23];199(2):269–84. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3471222&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 22. Funabiki H, Wynne DJ. *NIH Public Access*. 2014;122(3):135–58.
 23. Zhou L, Liang C, Chen Q, Zhang Z, Zhang B, Yan H, et al. The N-Terminal Non-Kinase-Domain-Mediated Binding of Haspin to Pds5B Protects Centromeric Cohesion in Mitosis. *Curr Biol*. 2017;27(7):992–1004.
 24. Balboula AZ, Nguyen AL, Gentilello AS, Quartuccio SM, Drutovic D, Solc P, et al. Haspin kinase regulates microtubule-organizing center clustering and stability through Aurora kinase C in mouse oocytes. *J Cell Sci* [Internet]. 2016;129(19):3648–60. Available from: <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.189340>
 25. Panigada D, Grianti P, Nespoli A, Rotondo G, Castro DG, Quadri R, et al. Yeast haspin kinase regulates polarity cues necessary for mitotic spindle positioning and is required to tolerate mitotic arrest. *Dev Cell* [Internet]. 2013 Sep 16;26(5):483–95. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580713004218>

26. Panigada D, Grianti P, Nespoli A, Rotondo G, GalloCastro D, Quadri R, et al. Yeast haspin kinase regulates polarity cues necessary for mitotic spindle positioning and is required to tolerate mitotic arrest. *Dev Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;26(5):483–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2013.07.013>
27. Shimada M, Goshima T, Matsuo H, Johmura Y, Haruta M, Murata K, et al. Essential role of autoactivation circuitry on Aurora B-mediated H2AX-pS121 in mitosis. *Nat Commun* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;7(May):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms12059>
28. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981. p. 154–6.
29. Thomson JA, Itskovitz-eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. 2007;1145(1998):1145–8.
30. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1981;78(12):7634–8. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.78.12.7634>
31. Shenghui H, Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 2009;25(1):377–406. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.042308.113248>
32. Martello G, Smith A. The Nature of Embryonic Stem Cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 2014;30(1):647–75. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cellbio-100913-013116>
33. Niwa H. How is pluripotency determined and maintained? *Development* [Internet]. 2007;134(4):635–46. Available from: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.02787>
34. Silva J, Smith A. Capturing Pluripotency. *Cell*. 2008;132(4):532–6.
35. Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev*.

- 1995;9(21):2635–45.
36. Silva J, Nichols J, Theunissen TW, Guo G, van Oosten AL, Barrandon O, et al. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009 Aug 21 [cited 2014 Aug 18];138(4):722–37. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3437554&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 37. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*. 1998;95(3):379–91.
 38. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*. 2003;17(1):126–40.
 39. Niwa H, Smith AG, Miyazaki J. No Title. *Nat Genet* [Internet]. 2000 Apr 1;24(4):372–6. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/74199>
 40. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6):625–35.
 41. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, et al. The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells avoid such ethical issues is to generate pluripotent cells directly from somatic stem and other cells. The first step toward this goal is to understand molec. *Cell* [Internet]. 2003;113(5):631–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787504>
 42. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* [Internet]. 1988;336(6200):688–90. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/336688a0>
 43. Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009 Jul 2 [cited 2014 Oct 8];460(7251):118–22. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19571885>

44. Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* [Internet]. 1998;12(13):2048–60. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=316954&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
45. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 2007;131(5):861–72.
46. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;126(4):663–76.
47. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007;448(7151):313–7.
48. Wernig M, Meissner A, Cassady JP, Jaenisch R. c-Myc Is Dispensable for Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2008;2(1):10–2.
49. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* (80-). 2007;318(5858):1917–20.
50. Jaenisch R, Young R. Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Cell*. 2008;132(4):567–82.
51. Schuettengruber B, Bourbon HM, Di Croce L, Cavalli G. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell*. 2017;171(1):34–57.
52. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*. 2007;448(7153):553–60.
53. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, et al. A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell*. 2006;125(2):315–26.

54. Azuara V, Perry P, Sauer S, Spivakov M, Jørgensen HF, John RM, et al. Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol.* 2006;8(5):532–8.
55. Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature.* 2006;441(7091):349–53.
56. Desai AR, McConnell SK. Progressive restriction in fate potential by neural progenitors during cerebral cortical development. *Development.* 2000;127(13):2863–72.
57. Livesey FJ, Cepko CL. Vertebrate neural cell-fate determination: Lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(2):109–18.
58. Pearson BJ, Doe CQ. Regulation of neuroblast competence in *Drosophila*. *Nature.* 2003;425(6958):624–8.
59. Lugt NMT Van Der, Jos D, Linders K, Roon M Van, Robanus-maandag E. Posterior transformation , neurological abnormalities , and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene. *Development.* 1994;121(1):67–76.
60. Meletis K. P53 Suppresses the Self-Renewal of Adult Neural Stem Cells. *Development* [Internet]. 2005;133(2):363–9. Available from: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.02208>
61. Liu Y, Elf SE, Miyata Y, Sashida G, Liu Y, Huang G, et al. p53 Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence. *Cell Stem Cell.* 2010;4(1):37–48.
62. Meshorer E, Yellajoshula D, George E, Scambler PJ, Brown DT, Misteli T. Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Dev Cell.* 2006;10(1):105–16.
63. Burdon T, Smith A, Savatier P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol.* 2002;12(9):432–8.
64. Stead E, White J, Faast R, Conn S, Goldstone S, Rathjen J, et al. Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities. *Oncogene.* 2002;21(54):8320–33.

65. Hindley C, Philpott A. The cell cycle and pluripotency. *Biochem J* [Internet]. 2013;451(2):135–43. Available from:
<http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20121627>
66. Lee M, Chang J, Chang S, Lee KS, Rhee K. Asymmetric spindle pole formation in CPAP-depleted mitotic cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014 Feb 21 [cited 2014 Jul 24];444(4):644–50. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24491538>
67. Knoblich JA. Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division. *Cell*. 2008;132(4):583–97.
68. Hawkins ED, Russell SM. Upsides and downsides to polarity and asymmetric cell division in leukemia. *Oncogene*. 2008;27(55):7003–17.
69. Huttner WB, Kosodo Y. Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Curr Opin Cell Biol*. 2005;17(6):648–57.
70. Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA. Asymmetric Self-Renewal and Commitment of Satellite Stem Cells in Muscle. *Cell*. 2007;129(5):999–1010.
71. Yamashita YM, Fuller MT. Asymmetric centrosome behavior and the mechanisms of stem cell division. *J Cell Biol* [Internet]. 2008 Jan 28 [cited 2014 Jul 24];180(2):261–6. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2213579&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
72. Cheng J, Türkel N, Hemati N, Fuller MT, Hunt AJ, Yamashita YM. Centrosome misorientation reduces stem cell division during ageing. *Nature*. 2008;456(7222):599–604.
73. 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 Oct 14 [cited 2014 Jul 24];203(1):73–85. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3798252&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

74. Maison C, Horstmann H, Georgatos SD. Regulated docking of nuclear membrane vesicles to vimentin filaments during mitosis. *J Cell Biol.* 1993;123(6 I):1491–505.
75. Meier J, Georgatos SD. Type B lamins remain associated with the integral nuclear envelope protein p58 during mitosis: implications for nuclear reassembly. *EMBO J [Internet].* 1994;13(8):1888–98. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=395030&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
76. Balzano D, Santaguida S, Musacchio A, Villa F. A general framework for inhibitor resistance in protein kinases. *Chem Biol [Internet].* Elsevier Ltd; 2011 Aug 26 [cited 2014 Jul 24];18(8):966–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21867912>
77. Baron AP, Schubert C Von, Cubizolles F, Siemeister G, Hitchcock M, Mengel A, et al. Probing the catalytic functions of Bub1 kinase using the small molecule inhibitors. 2016;1–26.
78. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (80-).* 2014;346(6213).
79. Dai J, Sultan S, Taylor SS, Higgins JMG. The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. 2005;472–88.
80. Qian J, Lesage B, Beullens M, Van Eynde A, Bollen M. PP1/Repo-Man Dephosphorylates Mitotic Histone H3 at T3 and Regulates Chromosomal Aurora B Targeting. *Curr Biol [Internet].* Elsevier Ltd; 2011;21(9):766–73. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982211003514>
81. Van De Werken C, Avo Santos M, Laven JSE, Eleveld C, Fauser BCJM, Lens SMA, et al. Chromosome segregation regulation in human zygotes: Altered mitotic histone phosphorylation dynamics underlying centromeric targeting of the chromosomal passenger complex. *Hum Reprod.* 2015;30(10):2275–91.
82. Bekier ME, Mazur T, Rashid MS, Taylor WR. Borealin dimerization mediates optimal CPC checkpoint function by enhancing localization to centromeres and kinetochores. *Nat Commun.* 2015;6:1–27.

83. Dai J, Sullivan B a, Higgins JMG. Regulation of mitotic chromosome cohesion by Haspin and Aurora B. *Dev Cell* [Internet]. 2006 Nov [cited 2014 Jul 18];11(5):741–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17084365>
84. Roux I, Safieddine S, Nouvian R, Grati M, Simmler MC, Bahloul A, et al. Otoferlin, Defective in a Human Deafness Form, Is Essential for Exocytosis at the Auditory Ribbon Synapse. *Cell*. 2006;127(2):277–89.
85. Smith MK, Wakimoto BT. Complex regulation and multiple developmental functions of misfire, the *Drosophila melanogaster* ferlin gene. *BMC Dev Biol*. 2007;7:1–15.
86. Nakasuji T, Ogonuki N, Chiba T, Kato T, Shiozawa K, Yamatoya K, et al. Complementary Critical Functions of Zfy1 and Zfy2 in Mouse Spermatogenesis and Reproduction. *PLoS Genet*. 2017;13(1):1–20.
87. Vernet N, Mahadevaiah SK, Yamauchi Y, Decarpentrie F, Mitchell MJ, Ward MA, et al. Mouse Y-Linked Zfy1 and Zfy2 Are Expressed during the Male-Specific Interphase between Meiosis I and Meiosis II and Promote the 2nd Meiotic Division. *PLoS Genet*. 2014;10(6).
88. Vernet N, Mahadevaiah SK, de Rooij DG, Burgoyne PS, Ellis PJI. Zfy genes are required for efficient meiotic sex chromosome inactivation (MSCI) in spermatocytes. *Hum Mol Genet*. 2016;25(24):5300–10.
89. Lévy N, Navarro A, Bishop CE, Mitchell MJ. The ubiquitin-activating enzyme E1 homologous genes on the mouse Y Chromosome (Ube1y) represent one functional gene and six partial pseudogenes. *Mamm Genome*. 2000;11(2):164–8.
90. Park M, Lee Y, Jang H, Lee O, Park S, Kim J, et al. SOHLH2 is essential for synaptonemal complex formation during spermatogenesis in early postnatal mouse testes. *Nat Publ Gr* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;(July 2015):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep20980>
91. Zhang X, Zhang H, Gao Q, Ji S, Bing L, Hao J. Sohlh2 inhibits the apoptosis of mouse primordial follicle oocytes via C-kit / PI3K / Akt / Foxo3a signalling pathway. *Reprod Biomed Online* [Internet]. Reproductive Healthcare Ltd.; 2015;30(5):514–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.01.015>

92. Song B, Zhang Y, He XJ, Du WD, Ruan J, Zhou FS, et al. Association of genetic variants in SOHLH1 and SOHLH2 with non-obstructive azoospermia risk in the Chinese population. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2015;184:48–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.11.003>
93. Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiol Rev* [Internet]. 2013;93(1):23–67. Available from: <http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00043.2011>
94. Zhou J, Pan J, Eckardt S, Leu NA, Mclaughlin KJ, Wang PJ. Nxf3 is expressed in Sertoli cells, but is dispensable for spermatogenesis. *Mol Reprod Dev*. 2011;78(4):241–9.
95. Crackower MA, Kolas NK, Noguchi J, Sarao R, Kaneko H, Kobayashi E, et al. Essential Role of Fkbp6 in Male Fertility and Homologous Chromosome Pairing in Meiosis. 2010;300(5623):1291–5.
96. Hasegawa K, Sin HS, Maezawa S, Broering TJ, Kartashov A V., Alavattam KG, et al. SCML2 Establishes the Male Germline Epigenome through Regulation of Histone H2A Ubiquitination. *Dev Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;32(5):574–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.014>
97. Luo M, Zhou J, Leu NA, Abreu CM, Wang J. Polycomb Protein SCML2 Associates with USP7 and Counteracts Histone H2A Ubiquitination in the XY Chromatin during Male Polycomb Protein SCML2 Associates with USP7 and Counteracts Histone H2A Ubiquitination in the XY Chromatin during Male Meiosis. 2016;(November).
98. Xu X, Tan X, Lin Q, Schmidt B, Engel W, Pantakani DVK. Mouse Dazl and its novel splice variant functions in translational repression of target mRNAs in embryonic stem cells. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;1829(5):425–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.12.010>
99. Kleene KC. Connecting cis -elements and trans -factors with mechanisms of developmental regulation of mRNA translation in meiotic and haploid mammalian spermatogenic cells.
100. Chen HH, Welling M, Bloch DB, Muñoz J, Mientjes E, Chen X, et al. DAZL limits pluripotency, differentiation, and apoptosis in developing primordial germ cells. *Stem*

- Cell Reports. 2014;3(5):892–904.
101. Li N, Mu H, Zheng L, Li B, Wu C, Niu B. EIF2S3Y suppresses the pluripotency state and promotes the proliferation of mouse embryonic stem cells. 2016;7(10).
 102. Yamauchi Y, Riel JM, Ruthig VA, Ortega EA, Mitchell MJ, Ward MA. Two genes substitute for the mouse Y chromosome for spermatogenesis and reproduction. *Science* (80-) [Internet]. 2016 Jan 29;351(6272):514–6. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.aad1795>
 103. Yamauchi Y, Riel JM, Ruthig V, Ward MA. Mouse Y-Encoded Transcription Factor Zfy2 Is Essential for Sperm Formation and Function in Assisted Fertilization. *PLoS Genet*. 2015;11(12):1–18.
 104. Kim J, Bergmann A, Wehri E, Lu X, Stubbs L. Imprinting and evolution of two Kruppel-type zinc-finger genes, ZIM3 and ZNF264, located in the PEG3/USP29 imprinted domain. *Genomics*. 2001;77(1–2):91–8.
 105. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(D1):D447–52.
 106. Walport LJ, Hopkinson RJ, Vollmar M, Madden SK, Gileadi C, Oppermann U, et al. Human UTY(KDM6C) is a male-specific Nε-methyl lysyl demethylase. *J Biol Chem*. 2014;289(26):18302–13.
 107. Shpargel KB, Sengoku T, Yokoyama S, Magnuson T. UTX and UTY Demonstrate Histone Demethylase-Independent Function in Mouse Embryonic Development. *PLoS Genet*. 2012;8(9).
 108. Macarthur BD, Lemischka IR. Statistical mechanics of pluripotency. *Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;154(3):484–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.024>
 109. Sato S, Maeda C, Hattori N, Yagi S, Tanaka S, Shiota K. DNA methylation-dependent modulator of Gsg2/Haspin gene expression. *J Reprod Dev* [Internet]. 2011 Sep;57(4):526–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21606629>
 110. Fischle W, Boo ST, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia BA, Shabanowitz J, et al.

- Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*. 2005;438(7071):1116–22.
111. Hirota T, Lipp JJ, Toh BH, Peters JM. Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature*. 2005;438(7071):1176–80.
 112. Rea S, Eisenhaber F, O’Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, et al. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*. 2000;406(6796):593–9.
 113. Vastenhouw NL, Schier AF. Bivalent histone modifications in early embryogenesis. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;24(3):374–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2012.03.009>
 114. Flanagan JF, Mi LZ, Chruszcz M, Cymborowski M, Clines KL, Kim Y, et al. Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature*. 2005;438(7071):1181–5.
 115. Garske AL, Oliver SS, Wagner EK, Musselman CA, Garcia BA, Kutateladze TG, et al. *NIH Public Access*. 2010;6(11):283–90.
 116. Varier R a, Outchkourov NS, de Graaf P, van Schaik FM a, Ensing HJL, Wang F, et al. A phospho/methyl switch at histone H3 regulates TFIID association with mitotic chromosomes. *EMBO J* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010;29(23):3967–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2010.261>
 117. Ali M, Rincon-arano H, Rothbart S, Parkhurst S, Ali M, Rincón-arano H, et al. Molecular basis for chromatin binding and regulation of MLL5 Molecular basis for chromatin binding and regulation of MLL5. 2015;(July).
 118. Andrews FH, Strahl BD, Kutateladze TG. Insights into newly discovered marks and readers of epigenetic information. *Nat Chem Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;12(9):662–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.2149>
 119. Endoh M, Endo TA, Endoh T, Isono K ichi, Sharif J, Ohara O, et al. Histone H2A mono-ubiquitination is a crucial step to mediate PRC1-dependent repression of developmental genes to maintain ES cell identity. *PLoS Genet*. 2012;8(7).
 120. Bonasio R, Lecona E, Narendra V, Voigt P, Parisi F, Kluger Y, et al. Interactions with

RNA direct the Polycomb group protein SCML2 to chromatin where it represses target genes. *Elife*. 2014;3:e02637.

121. Kalb R, Latwiel S, Baymaz HI, Jansen PWTC, Müller CW, Vermeulen M, et al. Histone H2A monoubiquitination promotes histone H3 methylation in Polycomb repression. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;21(6):569–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2833>

