



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΟΡΙΑΚΗ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

***Ο ρόλος της πρωτεΐνης του LBR και των λαμινών τύπου
A στη χρωματινική δομή και στην πυρηνική περιφέρεια
διαφοροποιημένων κυττάρων ποντικού***

ΜΑΡΤΖΙΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΟΡΙΑΚΗ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

Ο ρόλος της πρωτεΐνης του LBR και των λαμινών τύπου
A στη χρωματινική δομή και την πυρηνική περιφέρεια
διαφοροποιημένων κυττάρων ποντικού

ΜΑΡΤΖΙΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021

Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Τμήματος της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών (IMBB-ITE) υπό την επίβλεψη της Αν. Καθηγήτριας κ. Πολίτου Αναστασίας, κατά το χρονικό διάστημα 2019-2021. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω την κ. Πολίτου για την επιστημονική καθοδήγησή της, τις σημαντικές συμβουλές της και για την άριστη συνεργασία που είχαμε τα τελευταία χρόνια που βρίσκομαι στο εργαστήριο.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της πενταμελούς εξεταστικής επιτροπής τον Καθ. κ. Ευστάθιο Φριλίγγο, την Καθ. κ. Θωμαΐδα Παπαμαρκάκη και τον Επ.Καθ. κ. Δημήτριο Λιακόπουλο που δέχτηκαν να αξιολογήσουν την παρούσα εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθ. κ. Σπύρο Γεωργάτο για τις πολύ σημαντικές γνώσεις που μου πρόσφερε στις συναντήσεις μας και τις καίριες επιστημονικές παρεμβάσεις του.

Επιπλέον, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Δρ. Κατερίνα Σουψανά για την πολύτιμη βοήθεια και συνεισφορά της σε όλα τα επίπεδα της παρούσας μελέτης, καθώς και για τις γνώσεις της που μοιράστηκε μαζί μου. Επίσης ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την συνεργασία μας και τα μέλη του εργαστηρίου του κ. Γεωργάτου για τη βοήθειά τους σε ότι χρειάστηκα. Ολοκληρώνοντας, ευχαριστώ πολύ τον Δρ. Μαρκόπουλο Γιώργο για τη διεξαγωγή των πειραμάτων κυτταρομετρίας ροής, καθώς και τον Δρ. Γιώργο Σφήκα για την πολύτιμη βοήθειά του στη βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων.

«Το σωστά ορισμένο πρόβλημα

είναι κατά το ήμισυ λυμένο»

Albert Einstein

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT	11
1. Εισαγωγή	14
1.1 Ο πυρήνας και το γενετικό υλικό των κυττάρων.....	16
1.1.1 Δομή του πυρήνα.....	16
1.1.2 Νουκλεόσωμα και ιστονικός κώδικας	18
1.2 Αρχιτεκτονική της χρωματίνης	19
1.2.1 Κλίμακα οργάνωσης της χρωματίνης	19
1.2.2 Συμβατική πυρηνική αρχιτεκτονική	22
1.2.3 Διασυνδεδεμένες με τη λάμινα επικράτειες (Lamina Associated Domains, LADs).....	23
1.3 Η περιφέρεια του πυρήνα	27
1.3.1 Η πυρηνική λάμινα	27
1.3.1.1 Λαμίνες τύπου A	30
1.3.2 Πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου	31
1.3.2.1 Ο υποδοχέας της λαμίνης B (LBR)	35
1.3.3 Πυρηνικός φάκελος και ασθένειες	39
1.4 Ανεστραμμένη πυρηνική αρχιτεκτονική	41
1.4.1 Το παράδειγμα του αμφιβληστροειδούς των νυκτόβιων θηλαστικών	41
Σκοπός	45
2. Υλικά και Μέθοδοι	46
2.1 Μέθοδοι Καλλιέργειας Κυττάρων.....	48
2.1.1 Βιολογικό σύστημα	48
2.1.2 Καλλιέργεια κυττάρων	48
2.1.3 Διαμόλυνση μέσω πολύ-αιθυλενιμίνης.....	49

2.1.4 Κατασκευή Knock Out σταθερών κυτταρικών σειρών μέσω CRISPR/Cas9n	50
2.2 Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας	54
2.2.1 Απομόνωση γενωμικού DNA.....	54
2.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	55
2.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	57
2.2.4 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	57
2.2.5 Amplicon Sequencing	57
2.2.6 Απομόνωση ολικού RNA	57
2.2.6.1 Υπολογισμός συγκέντρωσης και ποιότητας RNA	58
2.2.7 Μετατροπή του ολικού RNA σε cDNA	58
2.2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time qPCR)	58
2.2.9 Αλληλούχιση RNA (RNA Sequencing) και βιοπληροφορική ανάλυση.....	59
2.3 Μορφολογικές Μέθοδοι	59
2.3.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός επιστρωμένων κυττάρων.....	59
2.3.2 Συνεστιακή Μικροσκοπία	62
2.3.3 Ποσοτικοποίηση έντασης φθορισμού και καταμέτρηση αριθμού εστιών ετεροχρωματίνης.....	62
2.4 Μέθοδοι Μελέτης Αναπτυξιακού Δυναμικού	63
2.4.1 Μελέτη κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής (FACS).....	63
2.4.2 Μέτρηση ρυθμού πολλαπλασιασμού	64
2.4.3 Μέτρηση μιτωτικού δείκτη.....	64
2.5 Βιοχημικές Μέθοδοι	64
2.5.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS PAGE.....	64
2.5.2 Χρώση πηκτών ακρυλαμιδίου	65
2.5.3 Ανοσοαποτύπωση κατά Western	65

2.6 Στατιστική Ανάλυση.....	66
3. Αποτελέσματα.....	67
Μέρος Α: Μελέτη της απαλοιφής του γονιδίου mLMNA	69
A1. Απαλοιφή του γονιδίου mLMNA	69
A2. Συνέπειες της απαλοιφής στο αναπτυξιακό δυναμικό	74
A3. Μορφολογική ανάλυση	76
A4. Επιδράσεις της απαλοιφής στη γονιδιακή έκφραση	88
Μέρος Β: Μελέτη της απαλοιφής του γονιδίου mLBR	92
B1. Απαλοιφή του γονιδίου mLBR	92
B2. Συνέπειες της απαλοιφής στο αναπτυξιακό δυναμικό	96
B3. Μορφολογική ανάλυση.....	99
B4. Επιδράσεις της απαλοιφής στη γονιδιακή έκφραση	104
Μέρος Γ: Μελέτη της ταυτόχρονης απαλοιφής των γονιδίων mLMNA και mLBR	107
Γ1. Συνδυαστική απαλοιφή των γονιδίων mLMNA και mLBR.....	107
Γ2. Συνέπειες της απαλοιφής στο αναπτυξιακό δυναμικό	109
Γ3. Μορφολογική ανάλυση	111
4. Συζήτηση	128
4.1 Η απουσία του LBR μειώνει τον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων, ενώ η επιπλέον έλλειψη της Lam ⁱⁿ A/C επηρεάζει σημαντικά το αναπτυξιακό δυναμικό.....	132
4.2 Η απαλοιφή των λαμινών τύπου A αυξάνει την τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 στην ιστόνη H3.....	133
4.3 Οι μεμονωμένες απαλοιφές των γονιδίων mLBR και mLMNA επηρεάζουν τη μεταγραφή παραγόντων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και της κυτταρικής προσκόλλησης.....	135

4.4 Η συνδυαστική απαλοιφή των γονιδίων mLBR και mLMNA επιφέρει τον απεντοπισμό πρωτεϊνών από τμήματα της πυρηνικής περιφέρειας.....	137
4.5 Η ταυτόχρονη απουσία των LBR και Lamin A/C συνδυάζεται με ατελή συγχώνευση των ετεροχρωματικών εστιών σε μερικούς πυρήνες των NIH κυττάρων.....	140
4.6 Συμπεράσματα και μελλοντικοί πειραματικοί σχεδιασμοί.....	143
5. Βιβλιογραφία.....	145
6. Παράρτημα	164

Περίληψη

Ο πυρήνας αποτελεί το χαρακτηριστικότερο κυτταρικό οργανίδιο και ένα από τα λίγα που φέρουν διπλή μεμβράνη. Η ετερογένεια που παρατηρείται μεταξύ των μεμβρανών του πυρηνικού φακέλου οφείλεται κυρίως στις πρωτεΐνες που διαθέτουν. Συγκεκριμένα, η εσωτερική πυρηνική μεμβράνη αποτελεί ένα εξαιρετικό εξειδικευμένο μεμβρανικό διαμέρισμα, όπου εντοπίζονται πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν ποικιλοτρόπως με τη χρωματίνη και τις λαμίνες. Οι τελευταίες είναι ενδιάμεσα ινίδια που σχηματίζουν δίκτυα στην πυρηνοπλάσματική πλευρά της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης τα οποία ονομάζονται πυρηνική λάμινα και συμμετέχουν σε πολλές σημαντικές διεργασίες του DNA.

Το μεγαλύτερο μέρος του πυρηνοπλάσματος καταλαμβάνουν οι ευχρωματινικές και ετεροχρωματινικές αλληλουχίες του DNA. Η τοποθέτησή τους εντός του πυρήνα είναι πολύ σημαντική για τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου και ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από την πυρηνική περιφέρεια. Συγκεκριμένα, η εκτεταμένη πρόσδεση της χρωματίνης στον πυρηνικό φάκελο καθορίζει την συμβατική πυρηνική αρχιτεκτονική, στην οποία η ετεροχρωματίνη εντοπίζεται κυρίως στα όρια του πυρήνα και η ευχρωματίνη στο εσωτερικό του. Επιπλέον, η περιφέρεια του πυρήνα ρυθμίζει σημαντικά το επιγενετικό τοπίο και την συντονισμένη γονιδιακή αποσιώπηση, ιδίως στην διαδικασία της διαφοροποίησης. Μελέτες σε πυρήνες με διαταραγμένη την συμβατική χρωματινική δομή έχουν αναδείξει δύο κύριες πρωτεΐνες πρόσδεσης της χρωματίνης στην περιφέρεια του πυρήνα, τον LBR και την Lamin A/C.

Στην παρούσα εργασία το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στις δύο αυτές πρωτεΐνες και μελετήθηκαν οι απαλοιφές τους τόσο μεμονωμένα όσο και συνδυαστικά σε κύτταρα NIH/3T3. Οι περισσότερες μεταβολές, τόσο στην κατανομή των πρωτεϊνών του πυρηνικού φακέλου όσο και στο χρωματινικό τοπίο, παρατηρήθηκαν στην ταυτόχρονη απουσία των Lamin A/C και LBR. Η συνδυαστική έλλειψη τους από την πυρηνική περιφέρεια συνδυάστηκε με ασυνέχεια στην κατανομή πρωτεϊνών του πυρηνικού φακέλου και μεταβολή της συμβατικής πυρηνικής αρχιτεκτονικής σε διαφοροποιημένα κύτταρα.

Παρόλο που η πυρηνική περιφέρεια είναι από τα πολυπλοκότερα μέρη του κυττάρου, αποτελεί πρόκληση η διευκρίνιση των ρόλων της στην χρωματινική δομή και είναι πολύ πιθανό οι πρωτεΐνες των LBR και Lamina A/C να συμμετέχουν καθοριστικά σε αυτή.

Abstract

The nucleus is the most characteristic cellular organelle and one of the few that bear a double membrane. The observed heterogeneity between the membranes of the nuclear envelope is mostly due to their proteins. In particular, the inner nuclear membrane is an extremely specialized membrane compartment, which includes proteins that interact in various ways with chromatin and lamins. The latter are intermediate filaments that form networks in the nucleoplasmic side of the inner nuclear membrane, called nuclear lamina and are involved in many important DNA processes.

Most of the nucleoplasm is occupied by euchromatic and heterochromatic DNA sequences. Their placement inside the nucleus is very important for normal cell function and is largely regulated by the nuclear periphery. Particularly, the extensive chromatin binding to the nuclear envelope determines the conventional nuclear architecture, in which heterochromatin is located mostly at the boundaries of the nucleus and the euchromatin within it. Moreover, the nuclear periphery significantly regulates the epigenetic landscape and coordinated genome silencing, especially during the differentiation process. Studies in nuclei with disrupted conventional chromatin structure have identified two major tethers of chromatin in the nuclear periphery, LBR and Lamin A/C.

This current study focuses on these two proteins and their deletion studied both individually and in combination, in NIH/3T3 cells. Most of the changes in the distribution of the nuclear envelope proteins and in the chromatin landscape, were observed in the simultaneous absence of Lamin A/C and LBR. Their combined lack from the nuclear periphery was associated with discontinuity in the localization of proteins in the nuclear envelope and variation of conventional nuclear architecture in differentiated cells. Although the nuclear periphery is one of the most complex parts of the cell, it is challenging to clarify its' roles in chromatin structure, and it is highly likely that the LBR and Lamin A/C participate crucially in that.

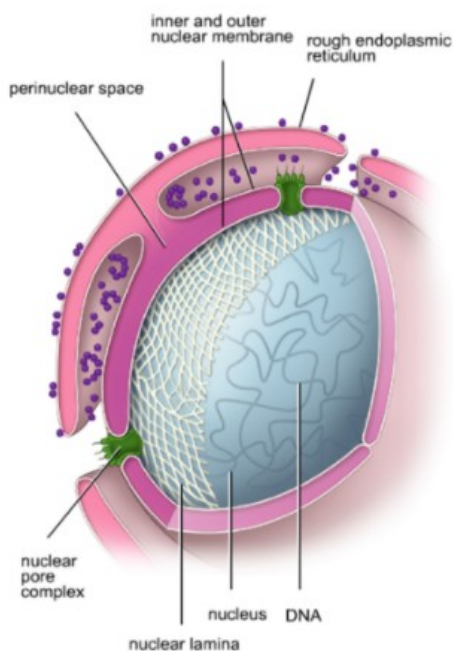
1. Εισαγωγή

1.1 Ο πυρήνας και το γενετικό υλικό των κυττάρων

1.1.1 Δομή του πυρήνα

Η ύπαρξη του πυρήνα στα ευκαρυωτικά κύτταρα διαχωρίζει τις διαδικασίες της μεταγραφής και μετάφρασης προάγοντας νέες κυτταρικές λειτουργίες και αντιπροσωπεύοντας μία από τις μεγαλύτερες εξελικτικές μεταβάσεις. Η συνεχής μελέτη του δείχνει πως δεν αποτελεί απλά ένα διαπερατό οργανίδιο αποθήκευσης της γενετικής πληροφορίας, αλλά ένα σύνθετα οργανωμένο ρυθμιστικό κέντρο του ευκαρυωτικού κυττάρου, συμβάλλοντας καθοριστικά στην εξελικτική του επιτυχία. Αν και αποτελεί το χαρακτηριστικότερο μεμβρανικό οργανίδιο, δεν φέρει εσωτερικό σύστημα μεμβρανών και διαμερισματοποιείται από περιοχές με ιδιαίτερη ριβονουκλεοπρωτεϊνική σύσταση, όπως ο πυρηνίσκος όπου μεταγράφεται και τροποποιείται το ριβοσωμικό RNA (Pederson, 2011).

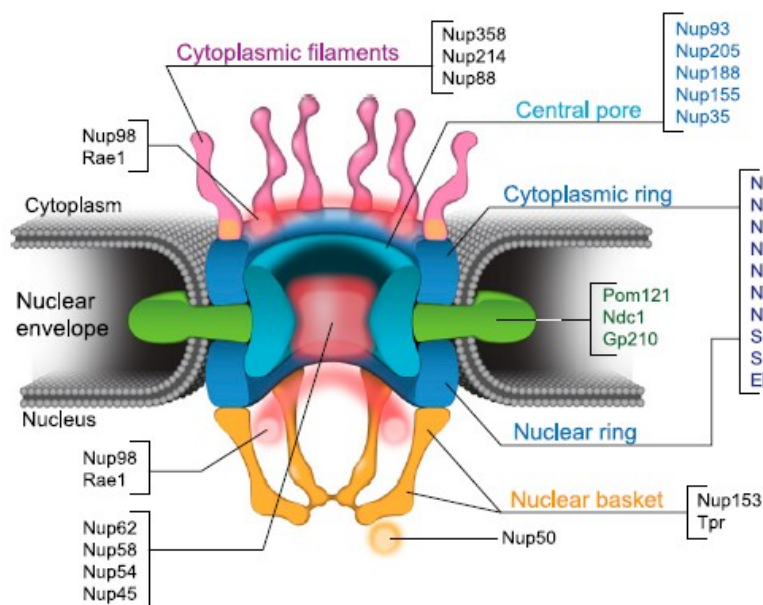
Κάποιες από τις σημαντικές δομές του είναι ο πυρηνικός φάκελος (Nuclear Envelope, NE) και τα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων (Nuclear Pore Complexes, NPCs). Ο πυρηνικός φάκελος είναι ένα ασύμμετρο σύστημα μεμβρανών, τόσο λιπιδικά αλλά κυρίως πρωτεϊνικά. Αποτελείται από την εξωτερική πυρηνική μεμβράνη (Outer Nuclear Membrane, ONM) που



Εικόνα 1: Η απεικόνιση βασικών δομών του πυρήνα (<https://www.w3spoint.com/nucleus>).

αποτελεί συνέχεια του αδρού ενδοπλασματικού, την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη (Inner Nuclear Membrane, INM) που αλληλεπιδρά άμεσα με το νουκλεόπλασμα και τέλος τη μεμβράνη των πυρηνικών πόρων που είναι το σημείο καμπύλωσης μεταξύ των ONM και INM. Και οι τρεις περιοχές αποτελούν συνέχεια μίας ενιαίας μεμβράνης, ενώ λόγω διαφορετικού πρωτεϊνικού φορτίου και λειτουργιών θεωρούνται ως ξεχωριστά μεμβρανικά συστήματα (εικόνα 1) (Hetzer, 2010). Τα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων, είναι οι μόνοι

δίαυλοι επικοινωνίας μεταξύ του πυρήνα και των υπόλοιπων κυτταρικών διαμερισμάτων, με το μοριακό τους βάρος στα σπονδυλωτά να φτάνει μέχρι και τα 120MDa. Καθένα τους αποτελείται από 30 διαφορετικές πρωτεΐνες, τις νουκλεοπορίνες (Nucleoporins, Nups), που οι περισσότερες εξ αυτών απαντώνται σε τουλάχιστον οχτώ αντίγραφα, που διατάσσονται με οχταεδρική συμμετρία γύρω από ένα κεντρικό δίαυλο μεταφοράς (Alber et al., 2007). Άξιο αναφοράς πως από το σύνολο των νουκλεοπορινών, μόνο τρεις είναι διαμεμβρανικές (Pom121, Ndc1 και Gp210) και συμμετέχουν στον εντοπισμό των συμπλόκων αυτών στον πυρηνικό φάκελο των θηλαστικών (εικόνα 2) (Hoelz et al., 2011). Επίσης, εντοπίζονται και περιφερειακοί δίαυλοι με μικρότερη διάμετρο που πιθανώς εξυπηρετούν στην διακίνηση των διαμεμβρανικών παραγόντων του πυρηνικού φακέλου (Mudumbi et al., 2020). Πέρα από τον ρόλο τους στην μεταφορά, φαίνεται πως οι πυρηνικοί πόροι συμμετέχουν ενεργά στην χωρική τοποθέτηση του γονιδιώματος, καθώς και σε βασικές διαδικασίες του όπως η αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA (Ibarra & Hetzer, 2015).



Εικόνα 2: Η δομή του πυρηνικού πόρου και η μοριακή του σύσταση. Αναφέρονται οι επιμέρους πρωτεΐνες του συμπλέγματος χρωματισμένες αναλόγως την δομή στην οποία εντοπίζονται (Ibarra & Hetzer, 2015).

1.1.2 Νουκλεόσωμα και ιστονικός κώδικας

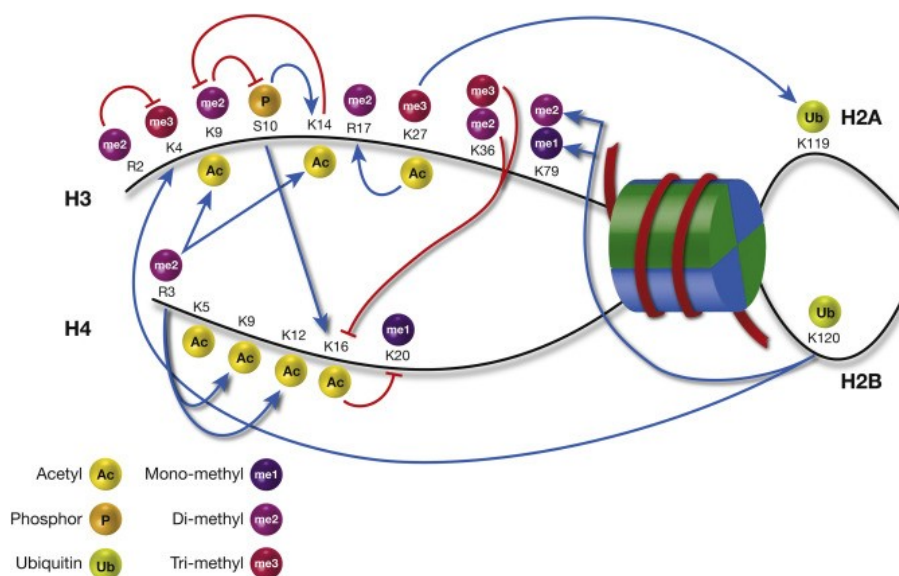
Το μέγεθος του πυρήνα που περιγράφηκε παραπάνω δεν ξεπερνάει τα 10μm, κάτι που αποτελεί βασική πρόκληση για την λειτουργική αποθήκευση του DNA και την ορθή επιτέλεση των διαδικασιών της αντιγραφής, μεταγραφής και επιδιόρθωσής του. Για τον λόγο αυτό το DNA συναντάται στον πυρήνα με την μορφή της χρωματίνης, του συμπλόκου δηλαδή με πρωτεΐνες που ονομάζονται ιστόνες και οι οποίες μεταξύ άλλων συμπυκνώνουν ικανοποιητικά το γενετικό υλικό.

Οι ιστόνες είναι εξαιρετικά συντηρημένες μεταξύ των ευκαρυωτών, έχουν μικρό μέγεθος και ισχυρά θετικό φορτίο. Διαθέτουν ένα υδρόφοβο κεντρικό τμήμα με χαρακτηριστική αναδίπλωση (histone fold) και ένα εύκαμπτο αμινοτελικό άκρο (ιστονική ουρά) που δέχεται πλήθος μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων (Arents & Moudrianakis, 1995). Η επαναλαμβανόμενη μονάδα της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα, ένα οκταμερές των ιστονών H2A, H2B, H3 και H4, γύρω από το οποίο περιελίσσεται αριστερόστροφα DNA μήκους 146 ζευγών βάσεων, πραγματοποιώντας δύο πλήρεις περιστροφές. Στο οκταμερές αυτό, οι ιστόνες H3 και H4 μέσω των κεντρικών τους τμημάτων σχηματίζουν ένα τετραμερές που αλληλεπιδρά με ασθενείς δεσμούς με δύο διμερή H2A-H2B (Richmond & Davey, 2003, Khorasanizadeh, 2004). Τέλος, εντοπίζεται και η συνδετική ιστόνη H1 που σταθεροποιεί τη συνολική δομή και μειώνει τη δυναμική ολίσθηση του οκταμερούς κατά μήκος του DNA (Zlatanova et al., 1998).

Η χρωματίνη είναι εξαιρετικά λειτουργική δομή λόγω της μεγάλης πλαστικότητας που διαθέτει η οποία οφείλεται στις πολλαπλές τροποποιήσεις των ιστονικών ουρών. Οι τροποποιήσεις αυτές είναι επιγενετικές αλλαγές και αποτελούν έναν θεμελιώδη μηχανισμό αναδιοργάνωσης της χρωματίνης, που εκτός τη γονιδιακή έκφραση αφορά και όλες τις υπόλοιπες λειτουργίες του DNA (Kouzarides, 2007).

Αναλυτικότερα, οι ιστονικές ουρές προεξέχουν του νουκλεοσώματος και δέχονται πληθώρα ομοιοπολικών τροποποιήσεων όπως μεθυλίωση, ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, ουβικουιπινίλωση και σουμοϋλίωση (εικόνα 3). Οι αλλαγές αυτές πραγματοποιούνται από εξειδικευμένα ένζυμα σε συγκεκριμένα κατάλοιπα και φαίνεται πως λειτουργούν συνδυαστικά, αποτελώντας στο σύνολό τους τον ιστονικό κώδικα. Οι τροποποιήσεις

αναγνωρίζονται μέσω ειδικών μοτίβων από πρωτεΐνες «αναγνώστες» (readers) που στρατολογούν παράγοντες με επιτελικό ρόλο, «αποκρυπτογραφώντας» με αυτό τον τρόπο τον ιστονικό κώδικα (Turner, 2002). Για παράδειγμα, η μεθυλιωμένη λυσίνη 9 της H3 (meK9H3) αναγνωρίζεται μέσω του μοτίβου “chromodomain” της πρωτεΐνης HP1 η οποία προάγει την συμπύκνωση της χρωματινικής δομής. Επίσης, η πρωτεΐνη Polycomb αναγνωρίζει ειδικά την 3meK27H3 μέσω του ίδιου μοτίβου και επάγει την γονιδιακή αποσιώπηση (Daniel et al., 2005, Richards & Elgin, 2002). Αντίθετα, η τροποποίηση 3meK4H3 προάγει την μεταγραφική ενεργοποίηση προκαλώντας την ταυτόχρονη υπομεθυλίωση και ακετυλίωση γειτονικών καταλοίπων της ιστόνης H3 (Zegerman et al., 2002).



Εικόνα 3: Απεικόνιση βασικών ιστονικών τροποποιήσεων και η ρύθμιση που προκύπτει από κάποιους συνδυασμούς τους. Οι κόκκινες γραμμές συμβολίζουν την καταστολή και οι μπλε γραμμές την προώθηση των αντίστοιχων τροποποιήσεων (Simonet et al., 2016).

1.2 Αρχιτεκτονική της χρωματίνης

1.2.1 Κλίμακα οργάνωσης της χρωματίνης

Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης γίνεται εμφανέστατη στην διάρκεια της μίτωσης, με τον σχηματισμό των πλήρως συμπυκνωμένων μεταφασικών χρωμοσωμάτων (Jansen & Verstrepen, 2011). Μάλιστα, στους μεσοφασικούς πυρήνες η πλαστικότητα της χρωματίνης είχε παρατηρηθεί πολύ νωρίς, ήδη

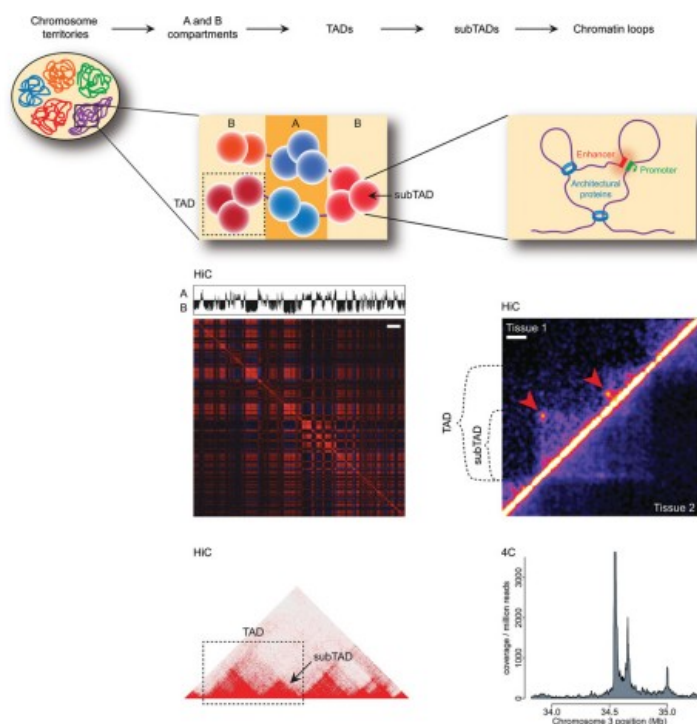
από το 1928, όταν ο Emil Heitz εισήγαγε τον όρο της ετεροχρωματίνης για να περιγράψει πυρηνικές περιοχές που παρέμεναν έντονα χρωματισμένες σε όλη την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Τις επόμενες δεκαετίες θα ακολουθήσουν ανακαλύψεις όπως η δομή του DNA και του νουκλεοσώματος, αλλά και προτεινόμενα μοντέλα για τις ανώτερες δομές αυτών, όπως το μοντέλο του «ζικ-ζακ» και το «σωληνοειδές» μοντέλο (Robinson et al., 2006).

Ωστόσο, τα τελευταία δεκαπέντε χρόνια έχει αναθεωρηθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό η αρχιτεκτονική της χρωματίνης, με τις μεθόδους 3C (Chromosome Conformation Capture) να συμβάλλουν καθοριστικά σε αυτό. Οι 3C τεχνικές μελετούν ποσοτικά τις χρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις διαφόρων εκτάσεων και διακριτικής ικανότητας, ενώ μαζί με σύγχρονες τεχνικές ανοσοκατακρήμνισης (ChIP) απέδειξαν πως η χρωματίνη δεν ακολουθεί κάποια κανονική δομή (de Wit & de Laat, 2012, Liu et al., 2007). Αντίθετα, η αυτοοργάνωσή της γίνεται σε διάφορα επίπεδα, ως συνέπεια των χρωματινικών αλληλεπιδράσεων που προκύπτουν από το σχηματισμό των χρωματινικών βρόχων (chromatin loops) και υποδεικνύουν μία οργάνωση μορφοκλασματικού τύπου (Dekker et al., 2013, Lieberman-Aiden et al., 2009).

Στην οργάνωση αυτή, τα αλληλόμορφα του κάθε χρωμοσώματος καταλαμβάνουν συγκεκριμένες ακτινωτές θέσεις στον πυρήνα που ονομάζονται χρωμοσωμικές επικράτειες (chromosomes territories) και φαίνεται πως υπάρχουν σε όλους τους ευκαρυωτικούς πυρήνες. Τα όρια των θέσεων αυτών δεν είναι ακριβή, διαφέρουν μεταξύ των κυτταρικών τύπων, ενώ καθορίζονται από πολλούς παράγοντες όπως η γονιδιακή πυκνότητα, το μέγεθος και η μεταγραφική δραστηριότητα του κάθε χρωμοσώματος. Βέβαια τα χρωμοσώματα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, όπως στις ετεροχρωματινικές εστίες (foci) όπου συμπυκνώνονται περιοχές των κεντρομεριδίων, αλλά και στα «εργοστάσια μεταγραφής» όπου εκφράζονται γονίδια διαφορετικών χρωμοσωμάτων από την ίδια μεταγραφική μηχανή (Fraser et al., 2015).

Οι περιοχές των χρωμοσωμάτων ανήκουν είτε στο χρωματινικό διαμέρισμα A είτε στο B (chromatin compartments), σύγχρονοι όροι που περιγράφουν την ευχρωματίνη και ετεροχρωματίνη αντίστοιχα. Το διαμέρισμα A περιλαμβάνει αποσυμπυκνωμένες περιοχές της χρωματίνης πλούσιες σε σύντομες επαναλήψεις (στοιχεία SINEs) και γονίδια, ενώ φέρει χαρακτηριστικές τροποποιήσεις της ευχρωματίνης (Euchromatin, EC) όπως

3meK4H3, 3meK36H3 και acK27H3. Το χρωματινικό διαμέρισμα Β αφορά συμπυκνωμένες χρωμοσωμικές περιοχές φτωχές σε γονίδια και μεγάλες δορυφορικές επαναλήψεις που εντοπίζονται στις περικεντρομεριδικές αλληλουχίες (Lieberman-Aiden et al., 2009, Solovei et al., 2016). Αυτού του είδους οι περιοχές χωρίζονται περαιτέρω στη συστατική (constitutive heterochromatin, cHC) και την περιστασιακή ετεροχρωματίνη (facultive heterochromatin, fHC). Η πρώτη περιλαμβάνει αλληλουχίες των κεντρομερών και τελομερών πλούσιες σε 2,3meK9H3, διαθέτει ελάχιστα γονίδια και παραμένει μεταγραφικά αποσιωπημένη σε όλη τη διάρκεια της μεσόφασης, ανεξαρτήτως κυτταρικού τύπου ή αναπτυξιακού σταδίου. Η δεύτερη είναι πλούσια σε 3meK27H3 και εμπεριέχει γονίδια των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο ή το στάδιο της μεσόφασης (Eberhart et al., 2013).



Εικόνα 4: Τα επίπεδα οργάνωσης της χρωματινικής δομής σε σχηματική αναπαράσταση (πάνω) και από δεδομένα θερμικών χαρτών (heatmaps, κάτω) από Hi-C και 4C μεθόδους (είδη 3C τεχνικών). Με κόκκινο βέλος αναπαριστώνται οι θέσεις των βρόχων (Denker & de Laat, 2016).

Οι χρωμοσωμικές περιοχές ανεξαρτήτως του χρωματινικού διαμερίσματος στο οποίο ανήκουν σχηματίζουν τοπικά τρισδιάστατες δομές που ονομάζονται τοπολογικά διασυνδεδεμένες επικράτειες (Topologically

Associated Domains, TADs). Η κάθε μία από αυτές αποτελεί μία συλλογή βρόχων από αλληλουχίες του ίδιου χρωμοσώματος, που οργανώνονται με μεγάλη συχνότητα εσωτερικών αλληλεπιδράσεων και σταθεροποιούνται από σύμπλοκα των CTCF και cohesin. Με αυτό τον τρόπο κάθε TAD θεωρείται ως ένας διακριτός και αυτόνομος σχηματισμός, ενώ οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους είναι περιορισμένες (εικόνα 4) (Dixon et al., 2012). Συνεχείς μελέτες δείχνουν πως για την δημιουργία και διατήρηση των TADs συμμετέχουν και επιπλέον στοιχεία όπως η RNA πολυμεράση, μεταγραφικοί παράγοντες αλλά και το μεταγραφόμενο RNA (Bonev et al., 2017). Μάλιστα, τα γονίδια που φέρουν οι δομές αυτές τείνουν να εκφράζονται παράλληλα στην διαφοροποίηση ή σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες και τουλάχιστον για ένα μέρος των TADs, η γονιδιακή έκφραση φαίνεται πως συμβάλλει καθοριστικά στην διατήρησή τους. Άλλωστε, μία βασική εξήγηση της δημιουργίας των σχηματισμών αυτών είναι πως εξυπηρετούν τις χωρικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ υποκινητών, ενισχυτών και άλλων ρυθμιστικών στοιχείων της μεταγραφικής διαδικασίας (Rada-Iglesias et al., 2018).

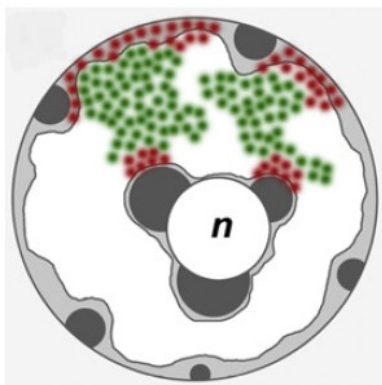
Τέλος, στα τελευταία επίπεδα της χρωματινικής οργάνωσης συναντάμε αλληλεπιδράσεις της ετεροχρωματίνης με την πυρηνική περιφέρεια και την περιφέρεια των πυρηνίσκων που αναλύονται παρακάτω, αλλά και αλληλεπιδράσεις που σχετίζονται με την μεταγραφική μηχανή όπως είναι τα «εργοστάσια μεταγραφής» (Fraser et al., 2015).

1.2.2 Συμβατική πυρηνική αρχιτεκτονική

Οι πυρήνες των περισσότερων διαφοροποιημένων κυττάρων έχουν ένα κοινό πρότυπο γονιδιωματικής αρχιτεκτονικής που βασίζεται στον διαχωρισμό και την χωρική τοποθέτηση της ευχρωματίνης και ετεροχρωματίνης (Solovei et al., 2016). Μάλιστα, στους ανώτερους οργανισμούς η πυρηνική περιφέρεια έχει σημαντικό ρόλο στην τοπολογία της χρωματίνης, καθορίζοντας στους περισσότερους πυρήνες την συμβατική πυρηνική αρχιτεκτονική. Σε αυτή, η ετεροχρωματίνη κατανέμεται κυρίως στην περιφέρεια του πυρήνα και των πυρηνίσκων, ενώ η ευχρωματίνη καταλαμβάνει περιοχές στο εσωτερικό του πυρηνοπλάσματος και εγγύς των πυρηνικών πόρων (εικόνα 5). Η εκτεταμένη πρόσδεση της χρωματίνης στην

περιφέρεια του πυρήνα εξυπηρετεί στην ορθή αναδίπλωση των χρωμοσωμάτων και τη λειτουργική κατανομή μεταξύ των ετεροχρωματικών εστιών και της ευχρωματίνης στο εσωτερικό του πυρήνα (Rullens & Kind, 2021).

□ EC □ HC ■ cHC ■ Gene-poor loci ■ Gene-rich loci (n) Nucleolus



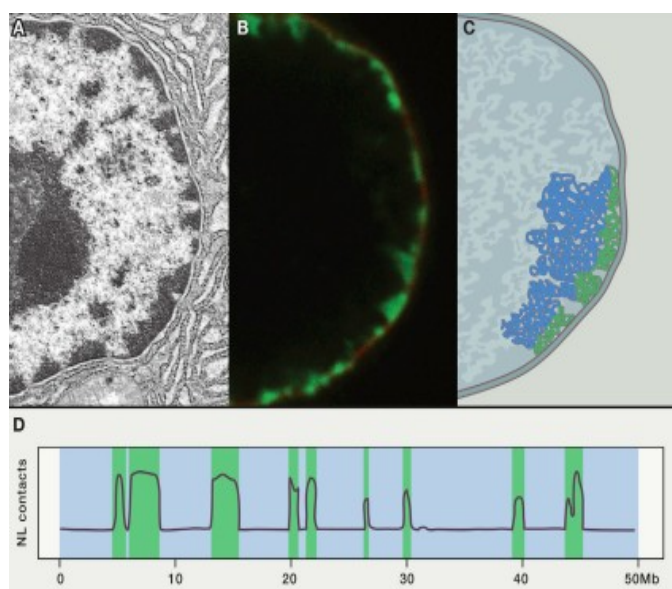
Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της συμβατικής αρχιτεκτονικής και της χωρικής κατανομής μεταξύ ευχρωματίνης και ετεροχρωματίνης. Η ετεροχρωματίνη καταλαμβάνει κυρίως την περιφέρεια εκτοπίζοντας στο εσωτερικό την ευχρωματίνη (Feodorova et al., 2020).

Αν και η χωρική κατανομή της ευχρωματίνης και ετεροχρωματίνης καθορίζεται από την πυρηνική περιφέρεια, ο μεταξύ τους διαχωρισμός πραγματοποιείται αποκλειστικά και μόνο από την ετεροχρωματίνη. Αναλυτικότερα, η δημιουργία και διατήρηση των χρωματινικών διαμερισμάτων επιτελείται από τις ισχυρές ελκτικές δυνάμεις μεταξύ της συστατικής ετεροχρωματίνης, ενώ στη διαδικασία αυτή δεν συμμετέχουν καθόλου οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ευχρωματινικών περιοχών (Falk et al., 2019, Penagos-Puig & Furlan-Magaril, 2020).

1.2.3 Διασυνδεδεμένες με τη λάμινα επικράτειες (Lamina Associated Domains, LADs)

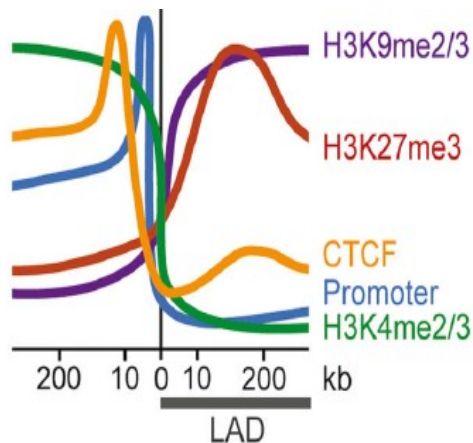
Αν και η αλληλεπίδραση της ετεροχρωματίνης με τον πυρηνικό φάκελο ήταν γνωστή για πολλά χρόνια, ο Van Steensel και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που χαρακτήρισαν τις περιοχές αυτές σε μεταζωικά κύτταρα μέσω της μεθόδου DamID (DNA adenine methyltransferase identification). Η εσωτερική πυρηνική μεμβράνη των κυττάρων αυτών επενδύεται από ένα δίκτυο

ενδιαμέσων ινιδίων που ονομάζεται πυρηνική λάμινα (Nuclear Lamina, NL) και για την οποία γίνεται εκτενέστερη αναφορά παρακάτω. Λόγω της εκτεταμένης αλληλεπίδρασης της χρωματίνης με το συγκεκριμένο πρωτεϊνικό δίκτυο, οι αλληλουχίες αυτές ονομάστηκαν «διασυνδεδεμένες με τη λάμινα επικράτειες» (Lamina Associated Domains, LADs) (εικόνα 6) (Guellen et al., 2008). Αξιοσημείωτο είναι πως οι αλληλουχίες των LADs καταλαμβάνουν τον μεγαλύτερο όγκο της περιφέρειας του πυρήνα, συγκριτικά με το δίκτυο των λαμινών και με άλλες σχετιζόμενες πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου (Turgay et al., 2017).



Εικόνα 6: Η πρόσδεση της ετεροχρωματίνης στην πυρηνική περιφέρεια. A) Απεικόνιση της συμβατικής αρχιτεκτονικής μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. B) Οπτικοποίηση των LADs μέσω της μεθόδου Dam (πράσινο: LADs, κόκκινο: Lamin B1). C) Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων ενός χρωμοσώματος (μπλε χρώμα) μέσω των LADs (πράσινο χρώμα) με την περιφέρεια του πυρήνα. D) Ταυτοποίηση των LADs μέσω της μεθόδου DamID (van Steensel & Belmont, 2017).

Αναφορικά με τα LADs των θηλαστικών, το μέγεθος τους ποικίλει με τον μέσο όρο να κυμαίνεται στα 0.5-1mb, έχουν χαμηλή γονιδιακή πυκνότητα με τα περισσότερα από τα γονίδια να αποσιωπώνται ή να εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα και είναι πλούσια σε τροποποιήσεις της ετεροχρωματίνης. Στα όριά τους εντοπίζονται θέσεις αναγνώρισης από την πρωτεΐνη CTCF, ενώ αυξάνεται ο εντοπισμός των υποκινητών και της RNA πολυμεράσης II, υποδεικνύοντας πως τα σύνορά τους πιθανώς να λειτουργούν ως μονωτές μεταξύ αποσιωπημένων και μεταγραφικά ενεργών περιοχών (εικόνα 7) (Briand & Collas, 2020).

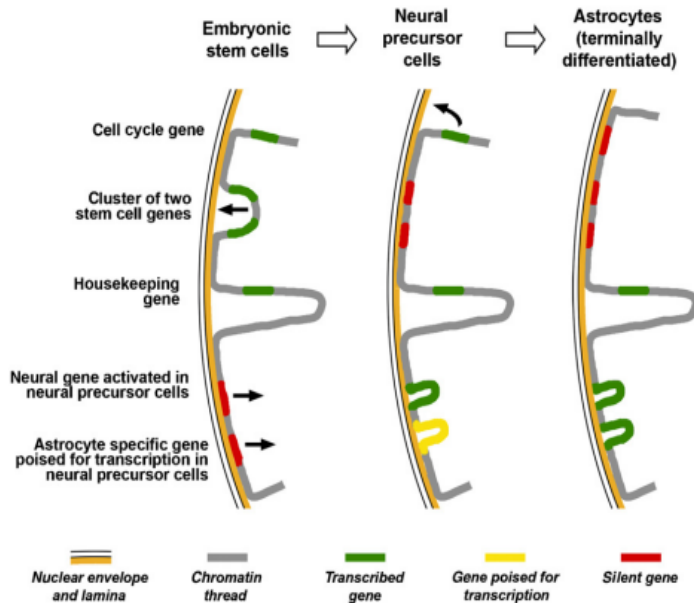


Εικόνα 7: Η μεταβολή ρυθμιστικών στοιχείων στα όρια των LADs (Briand & Collas, 2020).

Η σημαντικότητα των LADs έγκειται στο γεγονός πως υπάρχουν σε όλα τα χρωμοσώματα και μπορούν να καλύψουν μέχρι και το 40% του γονιδιώματος ενός κυττάρου. Ενώ κάθε LAD μεμονωμένα φέρει λίγα γονίδια, με την εναλλαγή τους από και προς την πυρηνική περιφέρεια μπορούν στο σύνολό τους να ρυθμίσουν την έκφραση χιλιάδων γονιδίων (Kind et al., 2015). Σε αυτές τις μεταβάσεις δεν μετατοπίζεται ένα ολόκληρο LAD, αλλά τις περισσότερες φορές μόνο οι περιοχές που βρίσκονται στα όριά του. Οι περιοχές που μένουν αναπόσπαστες καλούνται cLADs (constitutive LADs), είναι πλούσιες σε συστατική ετεροχρωματίνη και είναι κοινές μεταξύ των κυτταρικών τύπων. Αντίθετα, οι αλληλουχίες στα σύνορα των LADs ονομάζονται fLADs (facultive LADs), και έχουν την ικανότητα μετατόπισης από και προς τον πυρηνικό φάκελο. Είναι πλούσιες σε στοιχεία της περιστασιακής ετεροχρωματίνης, έχουν μεγαλύτερη γονιδιακή πυκνότητα από τα cLADs και διαφέρουν μεταξύ κυτταρικών τύπων αλλά και φάσεων του κυτταρικού κύκλου (Meuleman et al., 2012).

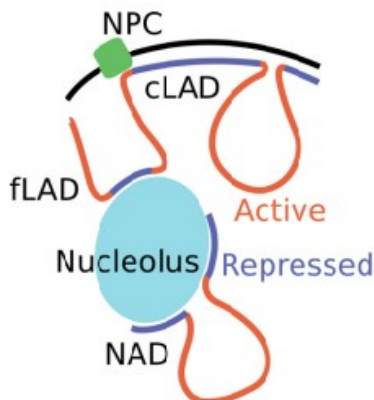
Από τα παραπάνω προκύπτει ο διττός ρόλος των LADs, με τα cLADs να αποτελούν αναπόσπαστο στοιχείο της πυρηνικής περιφέρειας έχοντας διαρθρωτικό ρόλο στην αρχιτεκτονική των χρωμοσωμάτων, ενώ τα fLADs με τη μετατόπισή τους συμμετέχουν καθοριστικά στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Harr et al., 2015). Είναι ενδιαφέρον πως στα mESCs (εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού) κυριαρχούν μόνο τα cLADs, ενώ η ανίχνευση των fLADs ξεκινάει στην διαφοροποίηση. Επιπλέον, τα τελευταία φέρουν πλήθος αναπτυξιακών γονιδίων, ενισχύοντας την υπόθεση πως με την μετάβασή τους ρυθμίζουν το αναπτυξιακό μεταγραφικό πρόγραμμα των κυττάρων (εικόνα 8)

(Peric-Hupkes et al., 2010).



Εικόνα 8: Ένα παράδειγμα μεταβολών της τοποθέτησης και μεταγραφικής κατάστασης των LADs στην νευρική διαφοροποίηση. Διακρίνεται η βαθμιαία αποσιώπηση γονιδίων της βλαστικότητας και του πολλαπλασιασμού, με παράλληλη αποδέσμευση από την πυρηνική λάμινα και ενεργοποίηση νευρωνικών και ειδικών για τα αστροκύτταρα γονιδίων (Joffe et al., 2010).

Η ρύθμιση των LADs είναι αρκετά πολύπλοκη και συνεχόμενες μελέτες δείχνουν πως η μετάβαση προς και από την πυρηνική περιφέρεια δεν σχετίζεται πάντα με τη γονιδιακή αποσιώπηση και την μεταγραφική ενεργοποίηση αντίστοιχα. Για αυτό το λόγο θα μπορούσε η πυρηνική περιφέρεια να θεωρηθεί ως ένα μέσο παγίδευσης της αποσιωπημένης χρωματίνης, όπου συμπυκνώνεται περαιτέρω και αποκλείεται από τη μεταγραφική μηχανή. Από την άλλη, η μετεγκατάσταση των LADs στο εσωτερικό του πυρήνα δεν προκαλεί άμεσα την μεταγραφική ενεργοποίηση, αλλά αυξάνει τις πιθανότητες της να αλληλεπιδράσει με μεταγραφικούς ενεργοποιητές (Rullens & Kind, 2021).



Εικόνα 9: Η τοποθέτηση των cLADs, fLADs και NADs μεταξύ πυρηνικού φακέλου και πυρηνίσκου (τροποποιημένη εικόνα από Pombo & Dillon, 2015).

Η πολυπλοκότητα των LADs οφείλεται σε δύο κύρια χαρακτηριστικά τους, την μεγάλη ετερογένεια και την στοχαστική τους κατανομή στους μεταμιτωτικούς πυρήνες. Αναφορικά με το πρώτο, τα LADs παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των κυττάρων ενός πληθυσμού, ενώ φαίνεται πως ακόμα και τα ίδια αλληλόμορφα φέρουν διαφορετικές αλληλουχίες των LADs. Επίσης εμπεριέχουν υποκινητές διαφόρων μεταγραφικών καταστάσεων αλλά και γονίδια που εκφράζονται φυσιολογικά και συνθέτουν μία υποκατηγορία των LADs που ονομάζονται ευχρωματινικά LADs (eLADs) (Briand & Collas, 2020). Σχετικά με την στοχαστικότητα των LADs, έχει αποδειχθεί πως αλληλεπικαλύπτονται εντυπωσιακά με τα NADs (Nucleolus Associated Domains), ετεροχρωματινικές αλληλουχίες που συνδέονται με την περιφέρεια των πυρηνίσκων. Ο πυρηνικός φάκελος και οι πυρηνίσκοι πιθανώς να αποτελούν εναλλάξιμες θέσεις δέσμησης της ετεροχρωματίνης, η οποία στα μεταμιτωτικά κύτταρα μετακινείται με μεγάλη τυχαιότητα μεταξύ αυτών (Kind et al., 2015). Η περίπτωση των NADs είναι αρκετά ενδιαφέρουσα καθώς οι πυρηνίσκοι αλληλεπιδρούν με αλληλουχίες της πυρηνικής περιφέρειας, χωρίς όμως να μοιράζονται με αυτή παρόμοιες πρωτεΐνες ή παράγοντες (εικόνα 9). Για τον λόγο αυτό αποτελούν πεδίο έρευνας για τη μελέτη πρωτεϊνικών μοτίβων ή μηχανισμών που μεσολαβούν στη δέσμηση των NADs, που πιθανώς να ισχύουν και στην περίπτωση της περιφερικής ετεροχρωματίνης (Bizhanova & Kaufman, 2021).

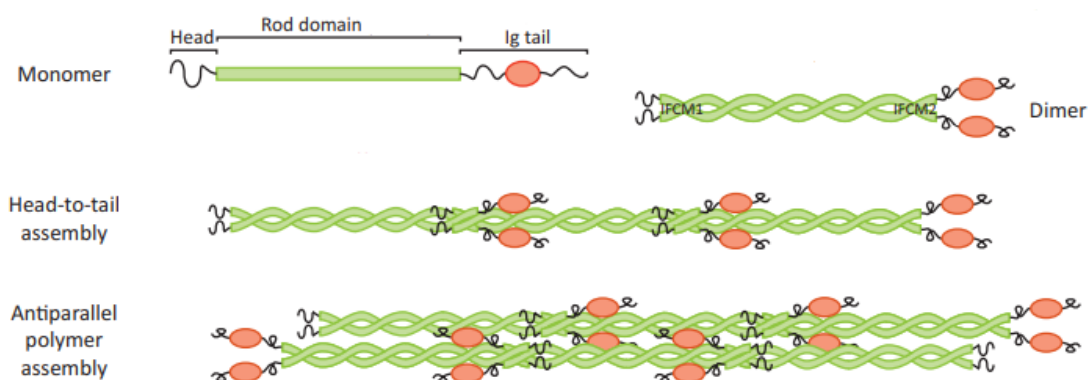
1.3 Η περιφέρεια του πυρήνα

1.3.1 Η πυρηνική λάμινα

Οι λαμίνες είναι τα μοναδικά μη κυτταροπλασματικά ενδιάμεσα ινίδια και επενδύουν την πυρηνοπλασματική πλευρά του πυρηνικού φακέλου των μεταζωικών κυττάρων, δημιουργώντας ένα πολυμερές δίκτυο στην περιφέρεια του πυρήνα. Ανήκουν στην οικογένεια των ινιδίων τύπου V και ακολουθούν το δομικό πρότυπο οργάνωσης των ενδιάμεσων ινιδίων του κυτταροπλάσματος (Gerace & Huber, 2012).

Αποτελούνται από ένα αμινοτελικό άκρο ποικίλου μεγέθους, ενώ το

κύριο τμήμα περιλαμβάνει τέσσερις α έλικες. Στην καρβοξυτελική ουρά εντοπίζεται ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS), μία σφαιρική περιοχή IgG που *in vitro* δεσμεύει νουκλεοσώματα και ένα μοτίβο CAAX που τροποποιείται μεταμεταφραστικά (C: κυστεΐνη, A: αλειφατικό αμινοξύ, X: οποιοδήποτε αμινοξύ) (Gruenbaum & Medalia, 2015). Ο ομοδιμερισμός των λαμινών επιτελείται μέσω των α ελίκων σε μία δομή που καλείται «σπειρωμένο σπείραμα» και με παράλληλη κατεύθυνση, ενώ στα επόμενα στάδια του πολυμερισμού τα μόρια συγκροτούνται αντιπαράλληλα (εικόνα 10) (de Leeuw et al., 2018). Το νηματώδες δίκτυο των λαμινών αλληλεπιδρά εκτεταμένα με τα LADs και με τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης (Nuclear Envelope Transmembrane Proteins, NETs), δημιουργώντας δομές συμπλόκων.

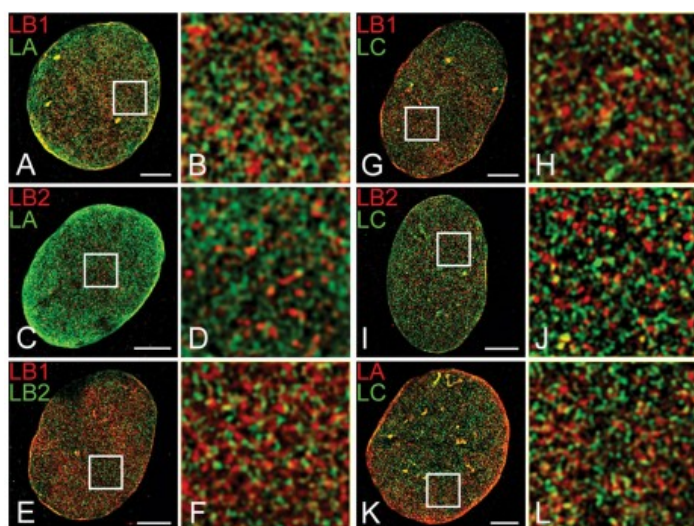


Εικόνα 10: Τα βασικά αμινοξικά τμήματα των λαμινών (αμινοτελική κεφαλή, κεντρική περιοχή ελίκων και καρβοξυτελική ουρά της IgG περιοχής) και ο προσανατολισμός τους στα στάδια του πολυμερισμού της πυρηνικής λάμινας (τροποποιημένη εικόνα από Davidson & Lammerding, 2014).

Τα θηλαστικά φέρουν τρία γονίδια λαμινών που παράγουν συνολικά επτά ισομορφές. Από αυτές, οι κυριότερες είναι οι Lamin A και Lamin C που προκύπτουν μέσω εναλλακτικού ματίσματος από το γονίδιο LMNA και οι Lamin B1 και Lamin B2 προερχόμενες από τα γονίδια LMNB1 και LMNB2 αντίστοιχα (Melcer et al., 2007). Οι παραπάνω ισομορφές διαχωρίζονται βάσει βιοχημικών αλλά και άλλων χαρακτηριστικών τους σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις λαμίνες τύπου A και τύπου B. Η χαρακτηριστικότερη διαφορά αυτών είναι πως οι τελικώς τροποποιημένες λαμίνες τύπου B είναι μόνιμα

φαρνεσυλιωμένες, μία τροποποίηση που τους προσδίδει λιπόφιλο χαρακτήρα και μεσολαβεί στην σύνδεσή τους με την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη. Αντίθετα, οι λαμίνες τύπου A δεν φέρουν αυτή την αλειφατική ομάδα και η σύνδεσή τους με την περιφέρεια του πυρήνα φαίνεται να υλοποιείται μέσω συγκεκριμένων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών του πυρηνικού φακέλου (Shimi et al., 2008).

Είναι φανερό πως οι λαμίνες καθορίζουν τη δομική ακεραιότητα και μηχανική στήριξη του πυρήνα, ωστόσο από τη συνεχή μελέτη τους προκύπτει πως εμπλέκονται σε πολλές επιπλέον λειτουργίες, όπως στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και της χρωματινικής δομής, αλλά και στην επιδιόρθωση και αντιγραφή του DNA. Βέβαια, ο τρόπος συμμετοχής τους σε αυτά παραμένει ασαφής, λόγω της πολυπλοκότητας των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στην περιφέρεια του πυρήνα και των δυσκολιών της δομικής μελέτης των λαμινών (de Leeuw et al., 2018). Ωστόσο, η ανάπτυξη απεικονιστικών μεθόδων μικροσκοπίας έχει βοηθήσει καταλυτικά στο πεδίο αυτό φέρνοντας σημαντικές ανακαλύψεις, όπως το ότι ο κάθε υποτύπος των λαμινών δημιουργεί το δικό του αυτοτελές δίκτυο που αλληλεπιδρά όμως εκτεταμένα με αυτά των υπόλοιπων λαμινών (εικόνα 11) (Shimi et al., 2015). Επιπλέον, συναρτήσει της συγκέντρωσής της, κάθε λαμίνη συνθέτει δίκτυα διαφορετικών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών, ενώ κατά την αναπτυξιακή διαδικασία αλληλεπιδρά με διαφορετικές πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης, μεταβάλλοντας τα χαρακτηριστικά του πυρήνα (Briand & Collas, 2020).



Εικόνα 11: Η κατανομή των κύριων υποτύπων των λαμινών σε όλους τους συνδυασμούς (A-L) σε κύτταρα MEFs (mouse embryo fibroblasts) μέσω 3D-SIM (3D-structured illumination microscopy). Φαίνεται πως κάθε λαμίνη σχηματίζει το δικό της αυτοτελές δίκτυο, ενώ μόνο σε μερικά σημεία συνεντοπίζονται οι δύο εκάστοτε υποτύποι (Shimi et al., 2015).

Η Lamin B1 εκφράζεται στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους σε όλη τη διάρκεια της διαφοροποίησης και συμμετέχει ιδιαίτερα στην ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος, μέσω της ελαστικότητας που προσδίδει στους πυρήνες κατά τη μετανάστευση των νευρικών κυττάρων. Από την άλλη, η Lamin A/C εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στα πολυδύναμα κύτταρα, ενώ η παρουσία της γίνεται εμφανής στην κυτταρική διαφοροποίηση, προσδίδοντας στους πυρήνες ακαμψία και αντίσταση στη μηχανική καταπόνηση. Η παρουσία της συνοδεύεται με την αύξηση της ετεροχρωματίνης στην περιφέρεια του πυρήνα και σε συνδυασμό με τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την διαφοροποίηση και ιστική ανάπτυξη (Wong & Stewart, 2020).

1.3.1.1 Λαμίνες τύπου A

Οι λαμίνες τύπου A λόγω της μη φαρνεσυλίωσής τους είναι περισσότερο υδατοδιαλυτές και λόγω αυτού έχουν την ιδιαιτερότητα να εντοπίζονται και στο νουκλεόπλασμα (Moir et al., 2000). Βέβαια η πρόδρομη μορφή της Lamin A (Pre-Lamin A) ακολουθεί όμοια με τις λαμίνες τύπου B διαδικασία τροποποίησης στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Ωστόσο, στο τελευταίο στάδιο της τροποποίησης η μεταλλοπρωτεΐνωση Zmpste24 αφαιρεί τα τελευταία δεκαπέντε κατάλοιπα και παράγει το τελικό προϊόν χωρίς την πρένυλο ομάδα. Η σημαντικότητα της αφαίρεσης της φαρνεσυλο ομάδας αναδεικνύεται στο σύνδρομο προγηρίας Hutchinson-Gilford (HGPS), όπου η αντίστοιχη μεταλλαγμένη Lamin A (LA50/progerin) διατηρεί την τροποποίηση προκαλώντας εκτεταμένες πυρηνικές παραμορφώσεις και επιγενετικές μεταβολές (Broers et al., 2006).

Αναφορικά με τις LaminA/C στο εσωτερικό του πυρήνα, αποτελούν ένα δευτερογενές κλάσμα των λαμινών τύπου A που διαφέρει αρκετά από το αντίστοιχο της πυρηνικής περιφέρειας. Οι συγκεκριμένες λαμίνες δημιουργούν αραιά δίκτυα που εκτείνονται σε όλο τον πυρήνα, ενώ εντοπίζονται και εστίες πυκνής δόμησής τους (Broers et al., 1999, Shimi et al., 2008). Για τις τελευταίες, υπάρχουν ενδείξεις πως συμμετέχουν στην επιδιόρθωση και αντιγραφή του DNA, ενώ τα πρώτα σχετίζονται εξίσου με την ετεροχρωματίνη και ευχρωματίνη (Kennedy et al., 2000).

Το πιθανότερο είναι πως οι πυρηνοπλάσματικές Lamin A/C προκύπτουν κατά την διάρκεια της μίτωσης. Η Lamin A/C φωσφορυλιώνεται κατά την αποσυναρμολόγηση της πυρηνικής λάμινας στην αρχή της μίτωσης και στην διάρκεια ανασυγκρότησης του πυρηνικού φακέλου είναι πιθανό κάποια από τα φωσφορυλιωμένα μόριά της να αλληλεπιδρούν με χρωματινικές πρωτεΐνες και να καθλώνονται εκεί. Κάτι παρόμοιο μπορεί να συμβαίνει και για τα νεοσυντιθέμενα μόρια, όπου ο συνδυασμός τροποποίησης και αλληλεπίδρασης με παράγοντες στο εσωτερικό του πυρήνα να ακινητοποιεί τα μόρια πριν πολυμεριστούν στην περιφέρειά του (Naetar et al., 2017).

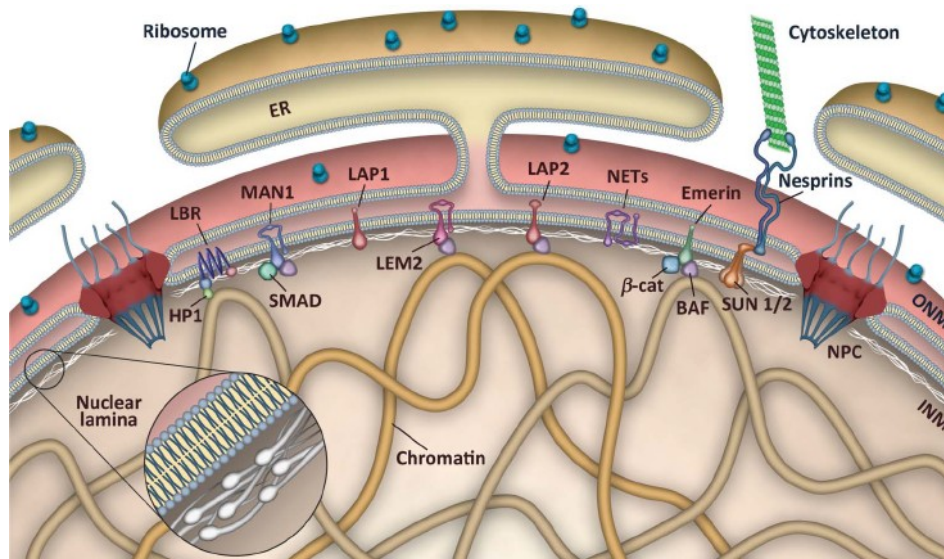
Πειράματα ChIP έναντι της Lamin A/C προσδιόρισαν χρωματινικές αλληλουχίες που συσχετίστηκαν με το πυρηνοπλάσματικό κλάσμα της και περιελάμβαναν μεταγραφόμενα γονίδια και τροποποιήσεις της ευχρωματίνης. Επιπλέον, οι αλληλουχίες αυτές αλληλεπικαλύφθηκαν με αντίστοιχες έναντι της πρωτεΐνης Lap2a. Η τελευταία αλληλεπιδρά έμμεσα με την χρωματίνη στο πυρηνόπλασμα, ενώ σε συνεργασία με την Lamin A/C ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων στο εσωτερικό του πυρήνα (Dechat et al., 2000, Gesson et al., 2016). Μάλιστα, στο πλαίσιο συμμετοχής της Lamin A/C στην μεταγραφική ενεργοποίηση, μία σημαντική εργασία ανέφερε τον συνεντοπισμό της με τον μεταγραφικό παράγοντα c-Jun σε περιοχές ενισχυτών μεταγραφόμενων γονιδίων, αναδεικνύοντας τη σημαντικότητα των λαμινών τύπου A στη γονιδιακή έκφραση (Ikegami et al., 2020).

1.3.2 Πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου

Οι περισσότερες πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου είναι ενσωματωμένες σε αυτόν, ενώ αποτελούν το 10% των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών όλου του κυττάρου (Mudumbi et al., 2020). Επίσης κατανέμονται διαφορετικά στις δύο ομόκεντρες μεμβράνες του, με την εξωτερική μεμβράνη να φέρει πρωτεΐνες του ER, ενώ στην εσωτερική μεμβράνη εντοπίζονται οι περισσότερες εξ αυτών και μάλιστα με μοναδικά χαρακτηριστικά (Schirmer & Foisner, 2007). Μάλιστα, ο ρυθμός ανακάλυψής τους τα τελευταία χρόνια είναι πολύ μεγαλύτερος από αυτόν του χαρακτηρισμού τους (Wilson & Berk, 2010). Η πλειονότητα των πρωτεϊνών της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης μπορεί

να αλληλεπιδρά με τη χρωματίνη, τις λαμίνες, είτε και με τα δύο μαζί (Wilson & Foisner, 2010). Επιπλέον, οι περισσότερες διαπερνούν τουλάχιστον μία φορά την εσωτερική μεμβράνη και προβάλλουν το αμινοτελικό τους άκρο στο πυρηνόπλασμα, μέσω του οποίου συμμετέχουν στην πρόσδεση της χρωματίνης και σε αλληλεπιδράσεις με άλλα στοιχεία της περιφέρειας του πυρήνα (Georgatos, 2001).

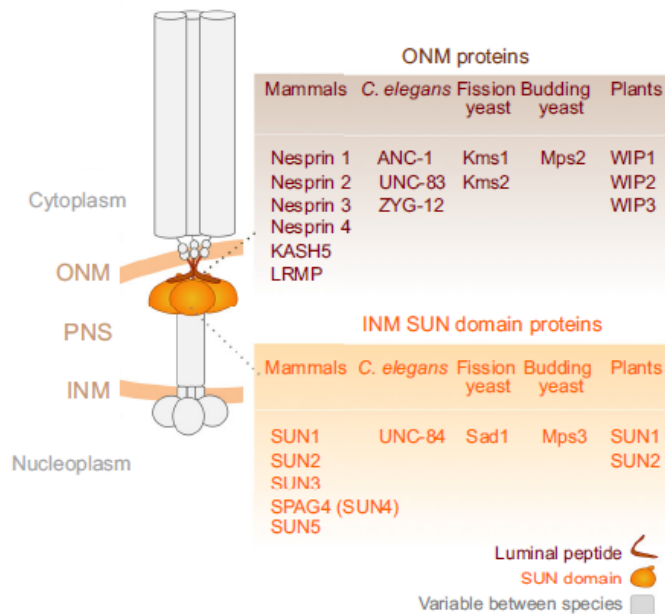
Στα θηλαστικά φαίνεται πως οι πρωτεΐνες αυτές εκφράζονται ιστοειδικά, καθώς μυς, συκώτι και λευκοκύτταρα μοιράζονται μόλις το 16% του πρωτεώματος της πυρηνικής περιφέρειας (Korfali et al., 2012). Επιπλέον, ασθένειες που συνδέονται με μεταλλάξεις αυτών, παρουσιάζουν συνήθως παθολογία ειδική για συγκεκριμένους ιστούς (Worman & Schirmer, 2015). Κάποιες από τις πιο μελετημένες πρωτεΐνες αυτού του είδους είναι ο υποδοχέας της λαμίνης Β (LBR), με τον οποίο ασχολήθηκε η συγκεκριμένη μελέτη, η emerin, η Man1, αλλά και τα σχετιζόμενα με την λάμινα πολυπεπίδια Lap1 και Lap2 (Georgatos, 2001). Οι τέσσερις τελευταίες περιλαμβάνουν τον τομέα LEM, μία δομή έλικας-στροφής-έλικας που δεσμεύει τον παράγοντα BAF μέσω του οποίου συνδέονται με τη χρωματίνη (εικόνα 12) (Laguri et al., 2001). Πέραν του τομέα LEM, οι πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης αλληλεπιδρούν ποικιλοτρόπως με την χρωματίνη, ενώ παράλληλα δημιουργούν πρωτεϊνικά σύμπλοκα μεταξύ τους που περιλαμβάνουν επιπλέον τις λαμίνες τύπου Α ή Β. Μέσω αυτών των πρωτεϊνικών συμπλόκων επιτυγχάνεται η στόχευση των LADs στην περιφέρεια του πυρήνα, τα οποία μπορεί να περιλαμβάνουν μέχρι και το 1/3 του γονιδιώματος. Εξαιτίας αυτού οι μηχανισμοί είναι αρκετά πολύπλοκοι και συμπεριλαμβάνουν πλήθος παραγόντων (νουκλεοτιδικές επαναλήψεις, ιστονικές τροποποιήσεις, χρωματινικές πρωτεΐνες, ένζυμα, μεταγραφικοί παράγοντες) (εικόνα 12) (Briand & Collas, 2020).



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση των πρωτεϊνών της περιφέρειας του πυρήνα. Απεικονίζονται τα ριβοσώματα και οι Nesprins που εντοπίζονται στην εξωτερική πυρηνική μεμβράνη και μερικές από τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης. Οι τελευταίες σχηματίζουν σύμπλοκα με τις λαμίνες και αλληλεπιδρούν με την χρωματίνη είτε άμεσα είτε μέσω χρωματινικών πρωτεϊνών (HP1, BAF) και μεταγραφικών παραγόντων (Smad, β-cat) (Dobrzynska et al., 2016).

Στα όρια του πυρήνα εδράζεται ένα ακόμα σημαντικό σύστημα πρωτεϊνών που ονομάζεται LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton). Όπως φανερώνεται από την ονομασία του συνδέει τα κυτταροπλασματικά ινίδια με τις πυρηνικές λαμίνες, ενώ τα πρωτεϊνικά συστατικά του ανήκουν σε δύο συντηρημένες οικογένειες πρωτεϊνών, τις SUN και KASH πρωτεΐνες (Crisp et al., 2005). Οι πρώτες είναι διαμεμβρανικά στοιχεία της εσωτερικής μεμβράνης του πυρήνα που το αμινοτελικό τους άκρο συνδέεται με τη χρωματίνη και την πυρηνική λάμινα, ενώ το καρβοξυτελικό τους άκρο εντοπίζεται στον περιπυρηνικό χώρο (Perinuclear Space, PNS) και φέρει τον τομέα SUN (Razafsky & Hodzic, 2009). Από την άλλη, οι KASH πρωτεΐνες βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη όπου το N-τελικό τους άκρο προσδένεται με όλα τα είδη του κυτταροσκελετού και το C-τελικό τους άκρο φέρει την περιοχή KASH (εικόνα 13). Παρόλο που σε κάθε ιστό εκφράζονται διαφορετικά μέλη ή ισομορφές των πρωτεϊνών αυτών, σε όλες τις περιπτώσεις κυριαρχεί η αλληλεπίδραση μεταξύ των SUN και KASH περιοχών στον περιπυρηνικό χώρο (Starr & Fridolfsson, 2010). Μέσω του συστήματος αυτού μπορούν να μεταφέρονται μηχανικά σήματα από το

περιβάλλον του κυττάρου άμεσα στον πυρήνα, ρυθμίζοντας τη γονιδιακή έκφραση ως απόκριση σε κάποιο ερέθισμα (mechanotransduction), ενώ συμβάλλει σημαντικά στη δομική ακεραιότητα του πυρήνα κατά την κυτταρική κίνηση και μετανάστευση (Chang et al., 2015, Bouzid et al., 2019).



Εικόνα 13: Δομική αναπαράσταση του συμπλέγματος LINC κατά μήκος των μεμβρανών του πυρηνικού φακέλου. Αναφέρονται μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών SUN και KASH στα διάφορα είδη. Όλες τους φέρουν τον τομέα SUN που τριμερίζεται και συνδέεται ισχυρά με τρεις τομείς KASH στον PNS (Jahed et al., 2016).

Άξιο αναφοράς είναι πως το LINC και τα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων (NPCs) είναι τα μόνα σύμπλοκα που συνδέουν τις μεμβράνες του πυρηνικού φακέλου και διατηρούν την μεταξύ τους απόσταση μεταξύ 30-50nm (Sosa et al., 2012). Αξιοσημείωτο είναι πως κύτταρα HeLa με αποσιώπηση των Sun1/2 παρουσίασαν κατά τόπους μεγάλες επεκτάσεις του περιπυρηνικού χώρου, ενώ τα NPCs πιθανώς συμμετείχαν στην ακεραιότητα των περιοχών που εμφάνισαν φυσιολογική δομή (Crisp et al., 2005). Αν και έχουν προταθεί κάποιοι μηχανισμοί, είναι ακόμα αρκετά ασαφείς οι συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις (Jahed et al., 2016).

Έχει βρεθεί πως η πρωτεΐνη Sun1 συνεντοπίζεται με τα NPCs, ανεξαρτήτως της αλληλεπίδρασής της με τον τομέα KASH. Επιπλέον η Sun1 συνδέεται με την Nup121 και πιθανώς συμμετέχει στην μεσοφασική συναρμολόγηση των NPCs, μέσω τοπικής σύμπτυξης των πυρηνικών μεμβρανών (Liu et al., 2007). Βέβαια, στη δημιουργία και κατανομή των NPCs συμμετέχουν και άλλες πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης, με

έναν τρόπο αρκετά αιγιματικό (Rothballer & Kutay, 2013). Φαίνεται λοιπόν πως στοιχεία του συμπλέγματος LINC συμμετέχουν στον εντοπισμό των NPCs, ενώ και τα δύο στο σύνολό τους καθορίζουν την αρχιτεκτονική του πυρηνικού φακέλου με μηχανισμούς που μόλις ξεκίνησαν να αποκαλύπτονται (Jahed et al., 2016). Να σημειωθεί πως στη δομική ακεραιότητα του πυρηνικού φακέλου και τη φυσιολογική κατανομή των παραγόντων του συμμετέχουν και οι λαμίνες. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της Lamin A/C που αλληλεπιδρά με στοιχεία των NPCs και του συμπλέγματος LINC, ενώ έχει αποδειχθεί πως η Lamin C συνεντοπίζεται ειδικά με τους πυρηνικούς πόρους (Lussi et al., 2011, Al-Haboubi et al., 2011, Haque et al., 2006). Προς υπεράσπιση αυτών, μυοβλάστες, πρωτογενείς ινοβλάστες, αλλά και MEFs από ποντίκια $LMNA^{-/-}$, παρουσίασαν σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό ασυνέχεια στο πρότυπο κατανομής πλήθους πρωτεϊνών της πυρηνικής περιφέρειας. Παράλληλα, μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας παρατηρήθηκε στις περιοχές της ασυνέχειας εκτεταμένη απομάκρυνση μεταξύ των πυρηνικών μεμβρανών και διεύρυνση του περιπυρηνικού χώρου, γεγονός που προτάθηκε ως το βασικό αίτιο του απεντοπισμού των στοιχείων της περιφέρειας (Sullivan et al., 1999, Thanisch et al., 2017).

Τέτοιου είδους ατυπίες παρουσιάζουν και δερματικοί ινοβλάστες από ασθενείς με EDMD (Emery Dreifuss Muscular Dystrophy) και σύνδρομο FPLD (Familial Partial Lipodystrophy), ασθενειών που σχετίζονται με μεταλλάξεις στο γονίδιο LMNA (Ognibere et al., 1999, Vigouroux et al., 2001). Ολοκληρώνοντας, γίνεται φανερό πως τα σύμπλοκα των NPCs και LINC σε συνεργασία με την Lamin A/C συμμετέχουν στην ακεραιότητα των πυρηνικών μεμβρανών και συμβάλλουν στη φυσιολογική κατανομή των πρωτεϊνών της περιφέρειας του πυρήνα.

1.3.2.1 Ο υποδοχέας της λαμίνης B (LBR)

Ο υποδοχέας της λαμίνης B (Lamin B Receptor, LBR) αποτελεί την καλύτερα μελετημένη και μία από τις χαρακτηριστικότερες πρωτεΐνες της πυρηνικής περιφέρειας, ενώ είναι εξαιρετικά διατηρημένη μεταξύ των μεταζωικών κυττάρων (Olins et al., 2010). Η πρώτη απομόνωσή της έγινε σε ερυθροκύτταρα γαλοπούλας και η ισχυρή αλληλεπίδρασή της με την Lamin

B1 της απέδωσε και το συγκεκριμένο όνομα (Worman et al., 1988, Worman et al., 1990a). Το μεγαλύτερο μέρος της αμινοξικής αλληλουχίας καταλαμβάνουν τα οχτώ προβλεπόμενα διαμεμβρανικά της τμήματα, που πλαισιώνονται από τα N-τελικό και C-τελικό υδρόφιλα άκρα τα οποία προβάλλουν στο πυρηνόπλασμα (Worman et al., 1990b).

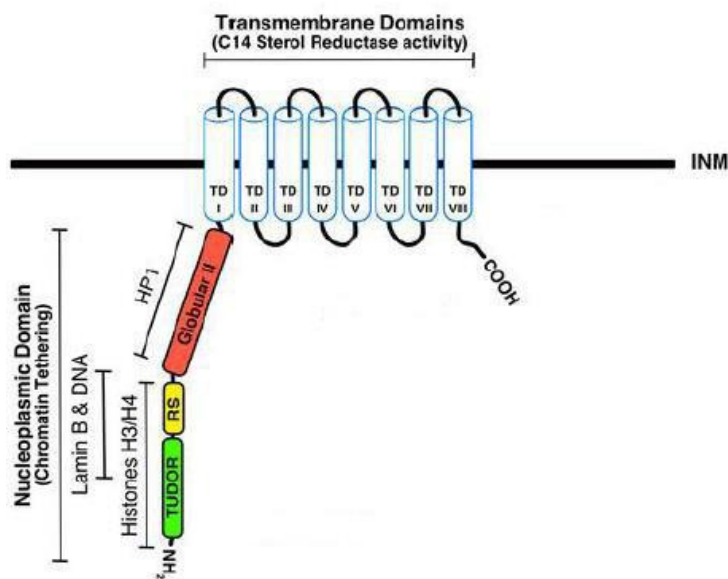
Το διαμεμβρανικό μέρος του LBR παρουσιάζει αρκετή ομολογία με αναγωγάσες στερολών φυτικών και ζωικών κυττάρων, ενώ έχει ενεργότητα C14 αναγωγάσης της χοληστερόλης, συμμετέχοντας με τον συμπάραγοντα NADPH στη βιοσύνθεσή της (Holmer et al., 1998, Silve et al., 1998). Παρόλο που ο κύριος εντοπισμός του δεν είναι στο ER και το γονίδιό του δεν φέρει στοιχεία ρύθμισης από την χοληστερόλη (sterol response element), ο LBR πιθανό να έχει σημαντικό ρόλο στην σύνθεση της χοληστερόλης σε ανθρώπινα κύτταρα (Tsai et al., 2016).

Από την άλλη, το αμινοτελικό άκρο του LBR είναι υπεύθυνο για τις περισσότερες λειτουργίες του, όπως για τον ολιγομερισμό του αλλά και για τις αλληλεπιδράσεις του με στοιχεία της περιφέρειας του πυρήνα, οι σημαντικότερες εκ των οποίων είναι με την πυρηνική λάμινα και τη χρωματίνη (Makatsori et al., 2004). Δομικά αποτελείται από τρία διακριτά τμήματα (εικόνα 14). Το πρώτο φέρει ένα μοτίβο που μοιάζει πολύ με αυτό των δομών Tudor, καθώς υιοθετεί την αντίστοιχη δομή, αλλά ο αρωματικός του κλωβός διαφέρει από τον αντίστοιχο των κλασικών δομών αυτού του είδους. Για αυτό τον λόγο δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά άμεσα με τα μεθυλιωμένα αμινοτελικά άκρα των H3 και H4 ιστονών, αλλά προσδένεται στο κεντρικό τμήμα της ιστόνης H3, ανεξαρτήτως τροποποιήσεών της. Με αυτό τον τρόπο είναι πιθανό το συγκεκριμένο τμήμα του LBR να λειτουργεί ως θέση αναδίπλωσης και δέσμευσης της ιστόνης H3 (“histone chaperone-like platform”) (Liokatis et al., 2012).

Έπειτα ακολουθεί ένα συνδετικό τμήμα πλούσιο σε διπεπτίδια Arg-Ser (RS περιοχή) που ανήκει στις εγγενώς εύκαμπτες περιοχές (Nikolakaki et al., 1996). Το μοτίβο των RS διπεπτιδίων φωσφορυλιώνεται από τις κινάσες $p34^{cdc2}$, PKA και η SRPK1. Η πρώτη είναι βασική μιτωτική κινάση που ρυθμίζει την αποδιοργάνωση και αναδιοργάνωση της πυρηνικής λάμινας κατά την διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης (Takano et al., 2004). Η PKA συμμετέχει στον εντοπισμό του LBR στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη, ενώ

η SRPK1 ρυθμίζει τον ολιγομερισμό του και την αλληλεπίδρασή του με άλλους πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου (Ghosh & Adams, 2011, Paroutsoroulou et al., 1999). Να σημειωθεί πως το RS μοτίβο συναντάται συχνά στους παράγοντες ματίσματος, όπου η φωσφορυλίωσή του ρυθμίζει τη συγκρότηση των συμπλόκων τους. Μάλιστα, στα πτηνά το μοτίβο αυτό του LBR αλληλεπιδρά με τον παράγοντα ρ32 που ρυθμίζει σημαντικά τις πρωτεϊνικές του αλληλεπιδράσεις και που είναι ομόλογος με την πρωτεΐνη ματίσματος SF2 του ανθρώπου (Simos & Georgatos, 1994, Olins et al., 2010). Τέλος να σημειωθεί πως το συνδετικό τμήμα του RS αλληλεπιδρά με τη χρωματίνη και συγκεκριμένα με ολιγομερή των H3-H4, ενώ συμμετέχει και στην ισχυρή σύνδεση του LBR με την Lamin B (Liokatis et al., 2012).

Το τελευταίο τμήμα του N-τελικού άκρου αποτελείται από μία περιοχή (second globular domain) η οποία δεν κατατάσσεται σε συγκεκριμένη κατηγορία δομικών μοτιβών. Και αυτή έχει δειχθεί πως αλληλεπιδρά με τη χρωματίνη, αλλά και με τις πρωτεΐνες HP1 (heterochromatin protein 1) και MeCP2 (methyl CpG binding protein 2). Με την πρώτη, η αλληλεπίδραση πραγματοποιείται πιθανά μέσω των τετραμερών H3-H4, ενώ η MeCP2 συνδέεται άμεσα φέρνοντας σε επαφή τον LBR με μεθυλιωμένες νησίδες CpG του DNA και προσελκύοντας αποακετυλάσες ιστονών, προάγοντας τοπικά την ετεροχρωματινοποίηση (Ye et al., 1997, Polioudaki et al., 2001, Guarda et al., 2009).



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση των αμινοξικών τμημάτων του LBR. Σημειώνονται μερικοί από τους παράγοντες που αλληλεπιδρούν με τον LBR στις αντίστοιχες δομικές περιοχές (τροποποιημένη εικόνα από Nikolakaki et al., 2017).

Ο LBR λόγω των διαφορετικών λειτουργιών μεταξύ του αμινοτελικού άκρου και του διαμεμβρανικού τμήματός του, μπορεί να θεωρηθεί ως ένα είδος «χιμαιρικής» πρωτεΐνης που έχει προκύψει από την ένωση δύο ξεχωριστών γονιδίων (Schuler et al., 1994). Ωστόσο, είναι πιθανό οι αμινοξικές αυτές περιοχές να συμμετέχουν από κοινού στον ολιγομερισμό του LBR (microdomains) και στις πυρηνοπλασματικές λειτουργίες του (Nikolakaki et al., 2017).

Σημαντικό ρόλο στον εντοπισμό του LBR έχουν τα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων και συγκεκριμένα οι πλευρικοί δίαυλοι μεταφοράς τους, μέσω των οποίων εισάγεται ο LBR στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη (Zuleger et al., 2011, Mudumbi et al., 2020). Η ακινητοποίηση στο συγκεκριμένο σημείο του πυρηνικού φακέλου επιτελείται από αλληλεπιδράσεις του με τη χρωματίνη και την πυρηνική λάμινα, μέσω ενός μηχανισμού «διάχυσης-συγκράτησης» (Ungricht et al., 2015). Εκτός του κύριου ακινητοποιημένου κλάσματος, εντοπίζεται και ένα δευτερεύον μικρότερο κλάσμα στο ER. Ωστόσο, η δυναμική του LBR στην πυρηνική περιφέρεια είναι αρκετά πολύπλοκη και καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τις δομικές ανομοιομορφίες που παρουσιάζει ο πυρηνικός φάκελος και η διεπαφή του με το ER (Giannios et al., 2017).

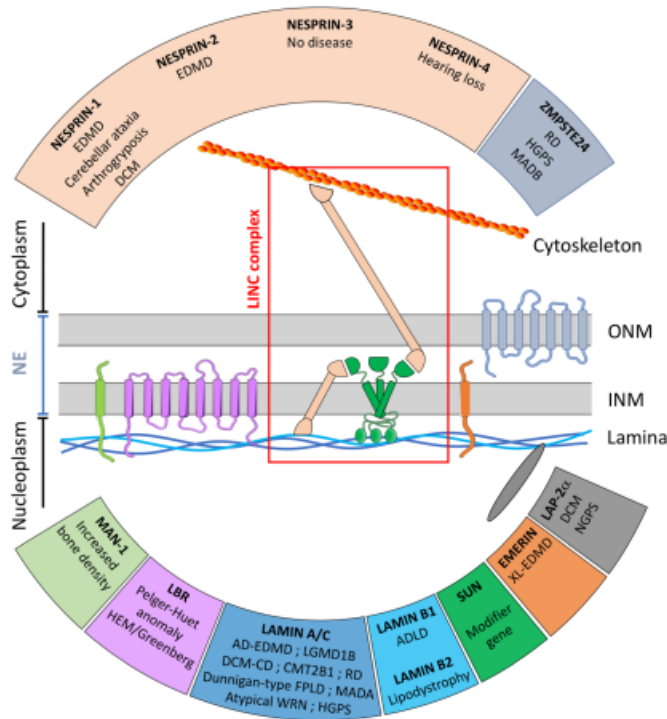
Επιπλέον, είναι σημαντικό να σημειωθεί η συμμετοχή του LBR και σε άλλες λειτουργίες στα όρια του πυρήνα, όπως στην ανασυγκρότηση του πυρηνικού φακέλου μετά την μίτωση (Anderson et al., 2009, Lu et al., 2010). Επίσης, πρόσφατες μελέτες έχουν συσχετίσει τη μειωμένη έκφραση των LBR και Lamin B1 με την κυτταρική γήρανση. Οι αλλαγές των παραγόντων αυτών προκάλεσαν ανακατανομή των LADs και τη δημιουργία ετεροχρωματινικών εστιών που είχαν σαν αποτέλεσμα την αποσιώπηση γονιδίων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (senescence-associated heterochromatin foci). Παράλληλα, αλληλουχίες υποκινητών αποσπάρθηκαν από την πυρηνική περιφέρεια και ενεργοποιήθηκαν μεταγραφικά, εκφράζοντας ειδικά προϊόντα της κυτταρικής γήρανσης (senescence-associated secretory phenotype) (En A. et al., 2020, Castro-Obregón, 2020).

1.3.3 Πυρηνικός φάκελος και ασθένειες

Η σημαντικότητα των αλληλεπιδράσεων της χρωματίνης με την περιφέρεια του πυρήνα αποκαλύπτεται από ένα φάσμα ανθρώπινων ασθενειών που καλούνται «φακελοπάθειες» (envelopathies). Ο όρος περιλαμβάνει οποιαδήποτε ασθένεια σχετίζεται με μεταλλάξεις των λαμινών, αλλά και γενικότερα των πρωτεϊνών που εδράζονται στις μεμβράνες του πυρηνικού φακέλου (εικόνα 15) (Janin et al., 2017). Οι περισσότερες μεταλλάξεις αυτών είναι αυτοσωμικώς επικρατείς και συνήθως προκαλούν εκφυλισμό του μεσεγχυματικού ιστού όπως του μυός, της καρδιάς, των νευρώνων, των λιποκυττάρων και του δέρματος (Verstraeten et al., 2007). Ασθένειες που σχετίζονται με τον LBR ή την Lamin B1, που είναι απαραίτητες στην προγεννητική ανάπτυξη, είναι συνήθως θανατηφόρες πριν την γέννηση του εμβρύου. Από την άλλη, παθήσεις που αφορούν την Lamin A/C, παρουσιάζουν την παθολογία τους μερικές βδομάδες μετά την γέννησή του ασθενούς (Wong & Stewart, 2020).

Μία πολύ σημαντική κατηγορία των φακελοπαθειών είναι οι ασθένειες που σχετίζονται συγκεκριμένα με μεταλλάξεις του γονιδίου LMNA ή πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την Lamin A/C, όπως είναι η emerin (Worman & Bonne, 2007). Οι ασθένειες αυτές καλούνται λαμινοπάθειες (Laminopathies) και περιλαμβάνουν περίπου 30 κληρονομήσιμες ασθένειες που κατηγοριοποιούνται σε διαταραχές των σκελετικών μυών, λιποδυστροφίες, περιφερικές νευροπάθειες και συστηματικές ή πρόωρες γηράνσεις, όπως το σύνδρομο Hutchinson-Gilford (HGPS) (Worman, 2011). Οι παθήσεις αυτές σχετίζονται με περίπου 500 διαφορετικές μεταλλάξεις του γονιδίου LMNA, όπου σε πολλές από αυτές παρατηρούνται εκτεταμένες παραμορφώσεις στα όρια του πυρήνα και αλλαγές στην κατανομή των LADs (Wong & Stewart, 2020). Ωστόσο, Hi-C αναλύσεις έχουν δείξει πως οι αλλαγές των LADs είναι σχετικά περιορισμένες αναλογικά με τις μεταβολές στο επιγενετικό τοπίο και μεταξύ των χρωματινικών διαμερισμάτων A και B (Briand & Collas, 2020, McCord et al., 2012). Οι πιθανοί μηχανισμοί των λαμινοπαθειών περιλαμβάνουν τη γονιδιακή έκφραση και τη μηχανική στήριξη του πυρήνα, με την μεταξύ τους διάκριση να είναι αρκετά δύσκολη. Βέβαια, τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί ως πιθανότερο το μοντέλο της μηχανικής

μεταγωγής σήματος (mechanotransduction) που συνδέει και τους δύο παραπάνω μηχανισμούς (Maurer & Lammerding, 2019).



Εικόνα 15: Παρουσιάζονται μερικές από τις πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου με διαφορετικό χρώμα, ενώ στο αντίστοιχο πλαίσιο αναφέρονται κάποιες από τις παθήσεις με τις οποίες σχετίζονται (Janin et al., 2017).

Πολλές από τις παθολογίες των φακελοπαθειών αλληλεπικαλύπτονται σε μεγάλο βαθμό μεταξύ τους, υποδηλώνοντας τις κοινές λειτουργίες των λαμινών και των πρωτεϊνών του πυρηνικού φακέλου στην περιφέρεια του πυρήνα (Janin et al., 2017). Επίσης, το μεγάλο φάσμα των φαινοτύπων μπορεί εν μέρει να αιτιολογηθεί από την πολυλειτουργικότητα της πυρηνικής λάμινας και την συμμετοχή της όχι μόνο στην χρωματινική δομή και τη γονιδιακή έκφραση, αλλά και στη μηχανική στήριξη του πυρήνα και την αντιγραφή του DNA (Worman & Schirmer, 2015). Ολοκληρώνοντας, να σημειωθεί πως παρόλο που οι φακελοπάθειες θεωρούνται αρκετά σπάνιες, υπάρχουν δύο κυρίως λόγοι που μελετώνται διεξοδικά. Ο πρώτος είναι διότι αποτελούν μοντέλα για τη μελέτη όλων των παραπάνω πυρηνικών λειτουργιών, ενώ ο δεύτερος επειδή αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό ποσοστό της παθοφυσιολογίας των πιο σύγχρονων κοινών παθήσεων, όπως

η παχυσαρκία, οι καρδιαγγειακές νόσοι, και η γήρανση (Wong & Stewart, 2020).

1.4 Ανεστραμμένη πυρηνική αρχιτεκτονική

1.4.1 Το παράδειγμα του αμφιβληστροειδούς των νυκτόβιων θηλαστικών

Η εναπόθεση της ετεροχρωματίνης στον πυρηνικό φάκελο καθορίζει σημαντικά τη χρωματική κατανομή και την επιγενετική κατάσταση του πυρήνα. Περιπτώσεις μεταβολών της κατανομής των LADs έχουν συσχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις, όπως με τις φακελοπάθειες και την επαγόμενη κυτταρική γήρανση. Ωστόσο, τέτοιου είδους αλλαγές παρατηρούνται και σε φυσιολογικές διαδικασίες, όπως στη διάρκεια της αναπτυξιακής διαδικασίας (Hoskins et al., 2021). Για παράδειγμα, στη διαφοροποίηση των οσφρητικών νευρώνων και των δενδριτικών κύτταρων Purkinje των ποντικών, σημειώνονται χρωματικές ανακατανομές στην περιφέρεια και το εσωτερικό του πυρήνα (Solovei et al., 2004, Clowney et al., 2012).

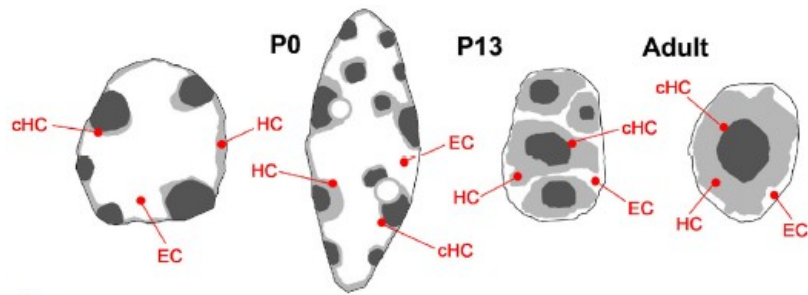
Ένα παρόμοιο παράδειγμα αποτελεί και η αναπτυξιακή διαδικασία των ραβδίων κύτταρων του αμφιβληστροειδούς των νυκτόβιων θηλαστικών. Τα τελικώς διαφοροποιημένα ραβδία εμφανίζουν τόσο εκτεταμένες χρωματικές αλλαγές, που παρουσιάζουν ένα χρωμοσωμικό τοπίο αντίθετο του συμβατικού που ονομάζεται ανεστραμμένη πυρηνική αρχιτεκτονική. Στη διάρκεια αυτής της αναδιαμόρφωσης, αποσπάται όλη η ετεροχρωματίνη της περιφέρειας και συγκεντρώνεται γύρω από τις ετεροχρωματικές εστίες, οι οποίες βαθμιαία ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα μοναδικό χρωμοκέντρο (Solovei et al., 2009). Γύρω από αυτό εντοπίζεται ένα στρώμα περιστασιακής ετεροχρωματίνης και τέλος μία ευχρωματική ζώνη περιφερικά του πυρήνα (εικόνα 16) (Feodorova et al., 2020).

Αυτή η μη συμβατική αρχιτεκτονική μετατρέπει τους πυρήνες των ραβδίων σε «μικροφακούς» μειώνοντας τον σκεδασμό του φωτός και διευκολύνοντας σημαντικά τη νυχτερινή όραση (Solovei et al., 2009). Από τον συνδυασμό μικροσκοπίας και Hi-C τεχνικών προκύπτει πως στα κύτταρα αυτά υπάρχουν κανονικά όλα τα επίπεδα της χρωματικής οργάνωσης και των επιγενετικών τροποποιήσεων. Αντίθετα, μεταβάλλονται σημαντικά η

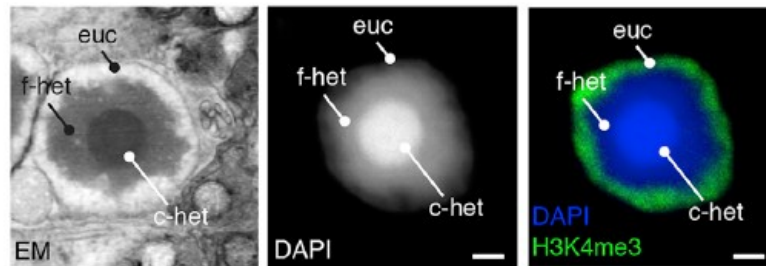
τοπολογία της χρωματίνης και η πυκνότητα της ετεροχρωματίνης (Feodorova et al., 2020, Eberhart et al., 2013)

Αν και τα κύτταρα αυτά είναι πλήρως λειτουργικά με ικανοποιητική μεταγραφική δραστηριότητα, μελέτες από 120 διαφορετικά είδη έδειξαν πως η ανεστραμμένη αρχιτεκτονική παρατηρείται αποκλειστικά και μόνο στα νυκτόβια είδη, ενώ οι λόγοι για τους οποίους προτιμάται από τα κύτταρα η συμβατική αρχιτεκτονική είναι ακόμα άγνωστοι (Siegert et al., 2012, Joffe et al., 2013). Πιθανώς στην ανεστραμμένη διάταξη να παρεμποδίζονται η ενδο- και διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις που απαιτούνται στη μεταγραφική διαδικασία, εξαιτίας της περιορισμένης τοποθέτησης της ευχρωματίνης περιφερικά του πυρήνα. Επίσης, η συσσώρευση όλης της ετεροχρωματίνης σε μία μόνο εστία, αποτρέπει τη διάσπαρτη κατανομή της εντός του πυρήνα, μειώνοντας πιθανώς τη δυναμική της και την αλληλεπίδρασή της με πρωτεΐνες αναδιαμόρφωσης και μεταγραφικής ρύθμισης (Feodorova et al., 2020, Solovei et al., 2016).

Όταν οι μελέτες εστίασαν στην πυρηνική περιφέρεια των ραβδίων, αποκαλύφθηκε πως συγκρινόμενα με τους περισσότερους κυτταρικούς τύπους στερούνται δύο βασικών πρωτεϊνών, του LBR και της Lamin A/C. Ταυτόχρονα, εκτεταμένες μελέτες σε ιστούς του ποντικού στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια έδειξαν πως εκφράζεται τουλάχιστον μία από αυτές. Επίσης, φαίνεται πως η έκφρασή τους είναι συντονισμένη, με τον LBR να εκφράζεται εντονότερα σε πολυδύναμα κύτταρα και στην αρχή της διαφοροποίησης και η παρουσία της Lamin A/C να έπεται στα επόμενα αναπτυξιακά στάδια. Συγκεκριμένα στην ανάπτυξη του αμφιβληστροειδούς του ποντικού, ενώ στα υπόλοιπα κύτταρα μειώνεται σταδιακά η έκφραση του LBR και αυξάνεται της Lamin A/C, στα ραβδία δεν ενεργοποιείται ποτέ η έκφραση της Lamin A/C, ενώ η μείωση του LBR συμπίπτει με την αναδιοργάνωση της χρωμοσωμικής δομής. Επομένως, παρόλη την πολυπαραγοντικότητα του πυρηνικού φακέλου, αρκεί η ικανοποιητική παρουσία του LBR ή της Lamin A/C ώστε να διατηρηθεί η συμβατική πυρηνική αρχιτεκτονική που συναντάται στην συντριπτική πλειοψηφία των κυττάρων (Solovei et al., 2013).



A.



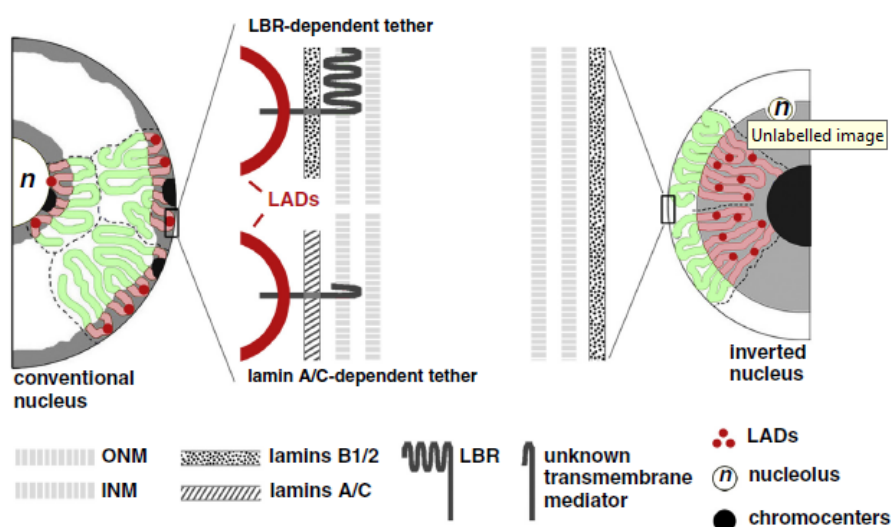
B.

Εικόνα 16: Η κατανομή των τύπων της χρωματίνης σε συμβατικούς και ανεστραμμένους πυρήνες. Α) Σχηματική αναπαράσταση της κατανομής της ευχρωματίνης (EC), συστατικής (cHC) και περιστασιακής (HC) ετεροχρωματίνης σε συμβατικό πυρήνα και στην διάρκεια της διαφοροποίησης των ραβδίων κυττάρων. Β) Η ανεστραμμένη αρχιτεκτονική σε πυρήνες ραβδίων όπως αποτυπώνεται από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (EM) και συνεστιακή μικροσκοπία με την χρήση του DAPI για την σήμανση του DNA και της ευχρωματινικής τροποποίησης 3meK4H3 (τροποποιημένη εικόνα από Norrie et al., 2019, Falk et al., 2019).

Σημαντικά συμπεράσματα προέκυψαν και από διαγονιδιακά Knock out ποντίκια για τις LBR και Lamin A/C. Σε LBR^{-/-} ποντίκια πυρήνες που δεν εξέφραζαν φυσιολογικά Lamin A/C παρουσίασαν στο σύνολό τους ανεστραμμένη αρχιτεκτονική, ενώ αντίστοιχα σε Lamin A/C^{-/-} ποντίκια πυρήνες που δεν παρήγαγαν LBR εμφάνισαν τόσο ανεστραμμένη όσο και μερικώς ανεστραμμένη ή συμβατική αρχιτεκτονική. Παράλληλα, έκτοπη έκφραση του LBR σε τελικώς διαφοροποιημένα ραβδία επανέφερε την συμβατική τοπολογία, ενώ η έκφραση της Lamin A/C δεν την αποκατέστησε πλήρως (Solovoi et al., 2013). Άρα, η απουσία και των δύο προκαλεί τις περισσότερες φορές και όχι πάντα ανεστραμμένη αρχιτεκτονική, καθώς φαίνεται πως η Lamin A/C συνεργάζεται και με άλλους παράγοντες για την πρόσδεση της ετεροχρωματίνης στην πυρηνική περιφέρεια.

Καταλήγοντας, τα θηλαστικά περιλαμβάνουν δύο κύριους μηχανισμούς πρόσδεσης της χρωματίνης στην περιφέρεια, το “A-tether” και “B-tether” που

δρουν σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και με ανεξάρτητο τρόπο το καθένα. Ο “B-tether” περιλαμβάνει τον LBR, ενώ το “A-tether” έχει πολυπλοκότερη σύνθεση, εμπεριέχοντας την Lamin A/C αλλά και συνεργαζόμενες πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης, που ποικίλουν αναλόγως με τον ιστό και τον κυτταρικό τύπο (εικόνα 17) (Solovei et al., 2013, Thanisch et al., 2017).



Εικόνα 17: Παρουσιάζονται τα LBR και Lamin A/C εξαρτώμενα συστήματα για την δέσμευση των LADs και τη διατήρηση της συμβατικής πυρηνικής αρχιτεκτονικής. Για τον σκοπό αυτό ο LBR συνεργάζεται με τις λαμίνες τύπου B, ενώ η Lamin A/C με άγνωστες μέχρι στιγμής πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου. Αρκεί η ύπαρξη ενός εκ των δύο για την εγκαθίδρυση της συμβατικής δομής, ενώ στους ανεστραμμένους πυρήνες απουσιάζουν και οι δύο πρωτεΐνες από την περιφέρεια (Solovei et al., 2016).

Βέβαια, παραμένουν ακόμα αρκετά ανοιχτά ερωτήματα σχετικά με τους μηχανισμούς διατήρησης της συμβατικής αρχιτεκτονικής και του ρόλου της στη φυσιολογία του κυττάρου. Μία σημαντική *in silico* μελέτη έδειξε πως η πλήρης διαγραφή των συνδέσεων μεταξύ χρωματίνης και πυρηνικής περιφέρειας επιφέρει χρωματινική κατανομή ίδια με αυτή των ραβδίων κυττάρων, αναδεικνύοντας τη σημαντικότητα του πυρηνικού φακέλου στη χρωματινική δομή (Falk et al., 2019). Ολοκληρώνοντας, φαίνεται πως η περιφέρεια είναι από τις πολυπλοκότερες δομές του πυρήνα, ενώ αποτελεί πρόκληση η διευκρίνιση των ρόλων της και των πρωτεϊνικών της λειτουργιών, ειδικότερα των LBR και Lamin A/C.

Σκοπός

Η παρούσα μελέτη συμπεριλαμβάνεται στο γενικότερο πλαίσιο έρευνας της αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών του πυρηνικού φακέλου και της πυρηνικής λάμινας, καθώς και της συμμετοχής τους στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και της χρωματινικής κατανομής. Η μελέτη εστιάζεται στην απαλοιφή των Lamin A/C και LBR σε διαφοροποιημένα κύτταρα και την ανάλυση της επίδρασής της στην πυρηνική περιφέρεια και τη χρωματινική δομή. Ειδικότερα, οι στόχοι της εργασίας περιλαμβάνουν:

A) Κατασκευή σταθερών κυτταρικών σειρών NIH/3T3 με πλήρη απαλοιφή των LBR και Lamin A/C, τόσο μεμονωμένα όσο και συνδυαστικά, μέσω της μεθόδου CRISPR/Cas9n.

B) Μελέτη της επίδρασης της απαλοιφής των γονιδίων mLBR και mLamina στη βιωσιμότητα και το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων.

Γ) Μελέτη της οργάνωσης της πυρηνικής περιφέρειας και της χρωματινικής κατανομής, καθώς και διερεύνηση του επιγενετικού τοπίου και της μεταγραφικής δραστηριότητας των κυττάρων που δεν εκφράζουν LBR ή/και Lamin A/C.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Μέθοδοι Καλλιέργειας Κυττάρων

2.1.1 Βιολογικό σύστημα

Το in vitro σύστημα που επιλέχθηκε στην συγκεκριμένη μελέτη ήταν κύτταρα της σταθερής σειράς NIH/3T3 που αποτελούν αθανатоποιημένους εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού. Είναι υπερτριπλοειδή κύτταρα, ενώ η ποσότητα των αλληλομόρφων διαφέρει στον πληθυσμό, με το 60% των κυττάρων να φέρει τέσσερα αλληλόμορφα για κάθε χρωμόσωμα, το 10% πέντε και περίπου το 1% των κυττάρων έξι αλληλόμορφα (Leibiger et al., 2013). Έχουν χαρακτηριστική ινοβλαστική μορφολογία με χρόνο διπλασιασμού περίπου 20-25 ώρες, διαμολύνονται σχετικά εύκολα και οι συνθήκες ανάπτυξής τους είναι παρόμοιες με αυτές των περισσότερων διαφοροποιημένων κυττάρων.

2.1.2 Καλλιέργεια κυττάρων

Η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας και σε επωαστικό κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία 37°C, ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με CO₂ σε σταθερή συγκέντρωση 5% και κατάλληλες συνθήκες υγρασίας. Όλοι οι χειρισμοί έγιναν εντός εστίας κάθετης νηματικής ροής (vertical laminar flow hood, biosafety cabinet II) με τις προβλεπόμενες διαδικασίες για στείρες συνθήκες εργασίας. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν DMEM-High Glucose & Sodium pyruvate (Dulbecco's Modified Eagle Medium, PAN Biotech, P04-03600), το οποίο καθίσταται πλήρες (DMEM Full) έπειτα από εμπλουτισμό με 10%(v/v) ή 15%(v/v) FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco, 10270-106), Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (Biowest, L0022-100) και 2mM L-γλουταμίνη (Biosera, XC-T1715/100).

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιούνταν όταν αυτά είχαν καλύψει περίπου το 80%-90% της επιφάνειας του πιάτου καλλιέργειας (48hrs). Η διαδικασία περιελάμβανε πλύση των κυττάρων δύο φορές με διάλυμα PBS (Biosera, LM-S2041/500), προσθήκη κατάλληλου όγκου διαλύματος θρυψίνης/EDTA 0.05% (Biosera, LM-T1705/500, αραιωμένη 1:1 σε PBS) και επώαση στους 37°C για 2-3min, με σκοπό την αποκόλληση των

κυττάρων από την επιφάνεια του πιάτου καλλιέργειας. Στη συνέχεια, προσθήκη κατάλληλης ποσότητας πλήρους θρεπτικού μέσου για την απενεργοποίηση της θρυψίνης και επαναιώρηση του μίγματος, ώστε να δημιουργηθούν μονήρη κύτταρα. Από το συγκεκριμένο εναιώρημα μεταφέρονταν κατάλληλος όγκος κυττάρων σε νέο πιάτο καλλιέργειας, όπου και συμπληρώνονταν ποσότητα φρέσκου πλήρους θρεπτικού μέσου. Τέλος, ακολουθούσε επώαση στον επωαστικό κλίβανο μέχρι τα κύτταρα να καλύψουν ξανά το 80%-90% της επιφάνειας πιάτου. Οι όγκοι των παραπάνω βημάτων ήταν κάθε φορά ανάλογοι των διαστάσεων των πιάτων και της αραιώσης του εκάστοτε κυτταρικού πληθυσμού. Η μακράς διάρκειας διατήρηση των κυττάρων πραγματοποιούνταν όταν τα κύτταρα είχαν καλύψει μέχρι το 80% της επιφάνειας του πιάτου καλλιέργειας και σε διάλυμα αποθήκευσης (Freezing Medium) που περιείχε 90%v/v πλήρες θρεπτικό υλικό και 10%v/v διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, CalBiochem, 317275-500ML), που λειτουργεί ως κρυοπροστατευτικό. Η αποθήκευση γινόταν σε κρυοφιαλίδια που τοποθετούνταν σε ειδική συσκευή παρουσία ισοπροπανόλης η οποία εξασφάλιζε την σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας με ρυθμό 1°C/5min. Τέλος, μετά από 24hr, τα κρυοφιαλίδια μεταφέρονταν στα δοχεία του υγρού αζώτου σε θερμοκρασία -192°C για μακρά αποθήκευση.

Τέλος, στη διαδικασία ανάκτησης των κυττάρων από το υγρό άζωτο το κρυοφιαλίδιο τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 1-2min, μέχρι να ξεπαγώσει το μεγαλύτερο μέρος του διαλύματος. Έπειτα, προστίθονταν πλήρες θρεπτικό υλικό προθερμασμένο στους 37°C και το τελικό διάλυμα των κυττάρων τοποθετούνταν σε πιάτο καλλιέργειας, όπου συμπληρώνονταν με κατάλληλο όγκο DMEM Full. Την επόμενη ημέρα ανανεώνονταν το θρεπτικό υλικό για την απομάκρυνση της εναπομείνουσας ποσότητας του DMSO.

2.1.3 Διαμόλυνση μέσω πολύ-αιθυλενιμίνης

Το μέσο της διαμόλυνσης που επιλέχθηκε ήταν η πολύ-αιθυλενιμίνη (PEI), ένα συνθετικό κατιονικό πολυμερές με βάση την αμίνη που δημιουργεί θετικά φορτισμένα σωματίδια γύρω από το DNA. Τα τελευταία εισέρχονται στο κύτταρο μέσω ενδοκυττάρωσης και λόγω οσμωτικής διόγκωσης

απελευθερώνουν το DNA στο κυτταρόπλασμα.

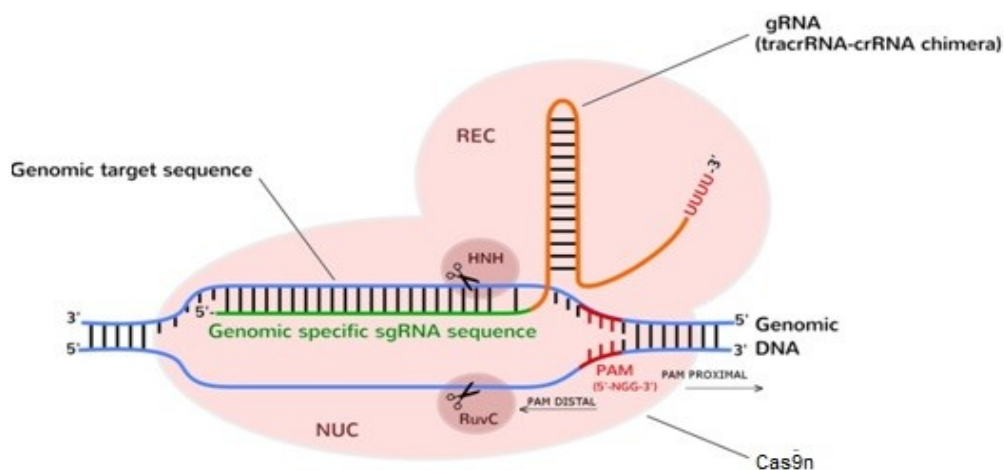
Τα κύτταρα επιστρώθηκαν την προηγούμενη ημέρα, με σκοπό την ημέρα του πειράματος η πυκνότητά τους να μην ξεπερνάει το 50%-60% της επιφάνειας του πιάτου. Η διαδικασία για ένα πιάτο διαστάσεων 35mm περιελάμβανε την ανάμιξη 2μg πλασμιδιακού DNA με 25μL DMEM Free (θρεπτικό μέσο χωρίς ορό). Σε δεύτερο φιαλίδιο, προστέθηκαν 75μL DMEM Free με 0.9μL διαλύματος working PEI (9μL PEI+500μL αποστειρωμένο νερό καλλιέργειας). Το διάλυμα με το πολυμερές PEI προστέθηκε σε αυτό του πλασμιδιακού DNA και ακολούθησε επώαση 30min/r.t.. Μετά το τέλος της επώασης, το τελικό μείγμα προστέθηκε στα κύτταρα με τη μορφή σταγόνων σε όλη την επιφάνεια του πιάτου και αφού σε αυτό είχε πρώτα ανανεωθεί το θρεπτικό μέσο και είχε προστεθεί 1mL DMEM Full. Τα κύτταρα επώαστηκαν στον κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας για 4hrs. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού μέσου και προσθήκη 2mL DMEM Full. Τέλος, τα κύτταρα αφέθηκαν να εκφράσουν τα πλασμίδια για τουλάχιστον 24hrs.

2.1.4 Κατασκευή Knock Out σταθερών κυτταρικών σειρών μέσω CRISPR/Cas9n

Για την σίγαση της έκφρασης των γονιδίων στόχων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος CRISPR/Cas9n του βακτηρίου *S.Pyogenes*. Τα δύο βασικά στοιχεία του συστήματος είναι η μεταλλαγμένη κασπάση 9 (Cas9-nickase) και ο guide RNA (gRNA). Ο gRNA αποτελεί τα πρώτα 20 νουκλεοτίδια ενός χιμαιρικού μορίου RNA τα οποία υβριδίζονται με την εκάστοτε DNA αλληλουχία ενδιαφέροντος και όπου στρατολογούν την Cas9n. Η μετάλλαξη της τελευταίας έχει ως αποτέλεσμα η περιοχή RuvC να χάνει την ενεργότητα νουκλεάσης και άρα η Cas9n να υδρολύει το DNA μόνον στη μία από τις δύο αλυσίδες, μέσω της περιοχής HNH (Gaj et al., 2013). Τέλος, η περιοχή PI αλληλεπιδρά με την αλληλουχία PAM (5'-NGG-3') του DNA στόχου, που είναι απαραίτητη προϋπόθεση να εδράζεται καθοδικά της συμπληρωματικής αλληλουχίας που υβριδοποιείται με το gRNA (εικόνα 18).

Σκοπός είναι η δημιουργία μίας δίκλωνης θραύσης, επομένως πρέπει να εκφραστούν δύο σύμπλοκα "gRNA-Cas9n" που να προσδεθεί το καθένα στους διαφορετικούς κλώνους του DNA και σε απόσταση λιγότερη των 20

νουκλεοτιδίων, αυξάνοντας σημαντικά την ειδικότητα του συστήματος (Ran et al., 2013). Το ευκαρυωτικό κύτταρο επιστρατεύει δύο βασικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης των δίκλωνων θραύσεων, με τον έναν από αυτούς να είναι η «μη ομόλογη σύνδεση άκρων» (Non-homologous end Joining, NHEJ) που παίρνει μέρος κυρίως πριν από την φάση S. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός είναι αρκετά επιρρεπής σε λάθη, προσθέτοντας ή αφαιρώντας νουκλεοτίδια (indels, insertions or deletions) και σε περιπτώσεις μεταλλαγών αλλαγής του πλαισίου ανάγνωσης προκύπτει τις περισσότερες φορές ένα πρόωρο κωδικόνιο λήξης (premature translation-termination codon, PTC), που είναι και το ζητούμενο στις περιπτώσεις απαλοιφής. Ακολούθως, το PTC αναγνωρίζεται από τον μηχανισμό NMD (Nonsense Mediated mRNA Decay) που πυροδοτεί παράγοντες για την άμεση καταστροφή του mRNA, πριν αυτό προλάβει να μεταφραστεί (Popp & Maquat, 2016).



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση του συμπλόκου gRNA-Cas9n στην DNA αλληλουχία στόχο. Διακρίνονται οι περιοχές HNH και RuvC με ενεργότητα ενδονουκλεάσης και η αλληλουχία PAM (igtrcn.org).

Συγκεκριμένα για την απαλοιφή των γονιδίων της Lamin A (mLMNA) και του υποδοχέα της λαμίνης B (mLBR) του ποντικού, χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pSpCas9(BB)-2A-GFP (48138, Addgene) και pSpCas9(BB)-2A-Puro (62988, Addgene), στους οποίους κλωνοποιήθηκε το κατάλληλο εκάστοτε ζεύγος gRNAs. Εκτός από τα διαφορετικά gRNAs, τα δύο

πλασμίδια έχουν και την επιπλέον διαφορά ότι το ένα διαθέτει γονίδιο έκφρασης της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP, ενώ το άλλο γονίδιο ανθεκτικότητας έναντι του αντιβιοτικού της πουρομυκίνης. Τα gRNAs σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος της εταιρίας ATUM και περιλαμβάνονται στον πίνακα 1.

gRNA	Αλληλουχία
LMNA gRNA ₁	GGCCCGGCTCAAGGACCTCG
LMNA gRNA ₂	CAACAAGTCCCCCTCCTTCT
LBR gRNA ₁	TCCCCGGGCAGAGCACCGAA
LBR gRNA ₂	AACGTGATCTTGAGCGGCTG

Πίνακας 1: Οι αλληλουχίες των gRNAs που χρησιμοποιήθηκαν για την απαλοιφή των γονιδίων mLBR και mLMNA.

Για τη δημιουργία των σταθερών σειρών LBR Knock out (LR KO) και LMNA Knock out (LA KO), κύτταρα NIH/3T3 διαμολύνθηκαν με τους ανασυνδυασμένους φορείς που έφεραν τα gRNA₁mLBR, gRNA₂mLBR και τα gRNA₁mLMNA, gRNA₂mLMNA, αντίστοιχα. Η δημιουργία του διπλού Knock out (LBR & LMNA) πραγματοποιήθηκε με δύο διαφορετικούς τρόπους, επηρεάζοντας την έκφραση των γονιδίων με διαφορετική χρονική σειρά κάθε φορά. Στη d-LA-LR KO κυτταρική σειρά, χρησιμοποιήθηκε ένας κλώνος της LA KO σειράς (LA KO1), με μηδενική έκφραση της LMNA. Αφού η σειρά είχε εγκαθιδρυθεί, προστέθηκαν στη συνέχεια τα πλασμίδια που έφεραν τα gRNA₁mLBR και gRNA₂mLBR και η διαδικασία επιλογής επαναλήφθηκε. Ομοίως, στη d-LR-LA KO σειρά, χρησιμοποιήθηκε ένας κλώνος της LR KO σειράς (LR KO1), στον οποίο είχε απαλειφθεί το γονίδιο του LBR και προστέθηκαν τα gRNAs που αντιστοιχούσαν στο γονίδιο της Lamin A. Οι ακριβείς συνθήκες καλλιέργειας για κάθε κυτταρική σειρά παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

Είδος κυτταρικών πληθυσμών	Όνομα Κυττάρων	Συνθήκες Καλλιέργειας
Control: WT NIH/3T3	CTRL 10%	DMEM Full 10%FBS
LA KO	LA KO1	
(NIH LMNA Single KO)	LA KO2	
Control: WT NIH/3T3	CTRL 15%	DMEM Full 15%FBS
LR KO	LR KO1	
(NIH LBR Single KO)	LR KO2	
Control	LA KO1	DMEM Full 10%FBS
d-LA-LR KO	d-LA-LR KO1	DMEM Full 15%FBS
(NIH Double KO: LMNA - LBR)	d-LA-LR KO2	
Control	LR KO1	DMEM Full 15%FBS
d-LR-LA KO	d-LR-LA KO1	
(NIH Double KO: LBR - LMNA)	d-LR-LA KO2	

Πίνακας 2: Οι κυτταρικοί πληθυσμοί που περιλαμβάνονται στη συγκεκριμένη μελέτη και οι αντίστοιχες συνθήκες καλλιέργειάς τους.

Σε πρώτο στάδιο καταγράφηκε καμπύλη αντοχής κυττάρων NIH/3T3 αγρίου τύπου στο αντιβιοτικό πουρομυκίνη με συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από 0.5 έως 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Επιλέχθηκε η συγκέντρωση 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, που θανατώνει το σύνολο των κυττάρων σε περίπου 3 ημέρες. Έπειτα, οι κατάλληλοι κυτταρικοί πληθυσμοί διαμολύνθηκαν με τους αντίστοιχους πλασμιδιακούς φορείς μέσω PEI. Η διαδικασία που ακολούθησε ήταν κοινή μεταξύ των σταθερών κυτταρικών σειρών που δημιουργήθηκαν. Αναλυτικότερα, την επόμενη ημέρα της διαμόλυνσης, τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (ZEISS Axiovert S100) για να ελεγχθεί η επιτυχία της διαμόλυνσης, μέσω του φθορισμού της πρωτεΐνης GFP. Την ίδια ημέρα προστέθηκε στα κύτταρα πουρομυκίνη και η διαδικασία της επιλογής διήρκησε 3 ημέρες. Τα κύτταρα που επιβίωσαν αφέθηκαν να πολλαπλασιαστούν μέχρι να καλύψουν το 90% της επιφάνειας του πιάτου καλλιέργειας, αφού πρώτα απομακρύνθηκε το αντιβιοτικό από το θρεπτικό μέσο. Στον κυτταρικό πληθυσμό που προέκυψε πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που στοχεύθηκε από το σύστημα CRISPR/Cas9n, με σκοπό να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της

απαλοιφής της. Ακολούθησε η μεταφορά των κυττάρων σε πιάτο καλλιέργειας 96 φρεατίων, τοποθετώντας 0.5 κύτταρα ανά φρεάτιο (τα κύτταρα μετρήθηκαν με τη χρήση αιμοκυτταρομέτρου NEUBAUER), με σκοπό την δημιουργία κλώνων. Παρακολουθήθηκε σε καθημερινή βάση η ανάπτυξη των κλώνων, οι οποίοι σταδιακά μεταφέρονταν σε μεγαλύτερα πιάτα καλλιέργειας (24-well, 12-well, 6-well) και τελικά σε πιάτα 60mm, όπου, μετά από ένα ακόμα διαχωρισμό, αποθηκεύθηκαν.

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, οι κλώνοι ελέγχονταν μέσω ανοσοφθορισμού με αντίσωμα για την εκάστοτε πρωτεΐνη ενδιαφέροντος και διατηρήθηκαν στην καλλιέργεια μόνον αυτοί στους οποίους δεν ανιχνεύτηκε πρωτεΐνη. Τελικά, από κάθε σταθερή κυτταρική σειρά επιλέχθηκαν δύο κλώνοι με επιβεβαιωμένη την απαλοιφή του γονιδίου στόχου για να μελετηθούν οι επιδράσεις της απαλοιφής των LBR και Lamin A/C μεμονωμένα αλλά και συνδυαστικά.

2.2 Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας

2.2.1 Απομόνωση γενωμικού DNA

Στο πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε πραγματοποιήθηκε οργανική εκχύλιση του DNA με την χρήση φαινόλης, ενώ η κατακρήμνισή του έγινε παρουσία ισοπροπανόλης και τέλος η έκπλυσή του και ο καθαρισμός του με χρήση 70% αιθανόλης.

Αναλυτικότερα, αφού αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και εκπλύθηκαν τα κύτταρα δύο φορές με PBS (πιάτο κυτταροκαλλιέργειας διαστάσεων 35mm, 90% confluent), προστέθηκε σε αυτά 300μL Lysis Buffer (100mM Tris-HCl pH 8.5, 5mM EDTA, 0.2%w/v SDS, 200mM NaCl). Έπειτα, το μείγμα μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο όπου και προστέθηκε RNase A σε τελική συγκέντρωση 0.1mg/mL και επωάστηκε στους 37°C, O/N. Ακολούθησε προσθήκη πρωτεΐνάσης K σε συγκέντρωση 0.1mg/mL και επώαση στους 55°C για 2hrs. Στη συνέχεια, ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 16000rcf για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο, όπου προστέθηκε ίσος όγκος φαινόλης, επωάστηκε για 10min/r.t.

υπό ανάδευση και φυγοκεντρήθηκε στα 16000rcf/5min σε θερμοκρασία δωματίου. Επόμενο βήμα ήταν η προσεκτική αναρρόφηση της επάνω φάσης του μείγματος και η μεταφορά του σε νέο φιαλίδιο, με την προσθήκη 1mL ισοπροπανόλης. Μετά από ήπια ανάδευση, ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 16000rcf/30min σε θερμοκρασία δωματίου και αναρρόφηση του υπερκειμένου. Το ίζημα εκπλύθηκε με 1mL 70% αιθανόλης και φυγοκεντρήθηκε στα 16000rcf/30min σε θερμοκρασία δωματίου. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και ακολούθησε ξήρανση του ιζήματος και επαναδιάλυσή του σε 30-100μL ddH₂O. Το δείγμα αφέθηκε στους 4°C O/N για τη σωστή ενυδάτωσή του και την επόμενη ημέρα φωτομετρήθηκε. Από την απορρόφηση στα 260nm υπολογίστηκε η ακριβής συγκέντρωση του δείγματος, το οποίο στο τέλος τοποθετήθηκε στους -20°C για μακρά αποθήκευση.

2.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Αρχικά, σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές εκατέρωθεν των περιοχών που στοχεύθηκαν από το σύστημα CRISPR/Cas9n μέσω του προγράμματος primer-blast (πίνακας 3). Τα προγράμματα, αλλά και οι συνθήκες των αντιδράσεων PCR παρουσιάζονται αναλυτικά στους πίνακες 4-7.

Εκκινητής	Νουκλεοτιδική Αλληλουχία
ForLBR	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT TGTGCCCTTTCCCTTTCTAGCCT
RevLBR	CTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT AGCGGAGTCAGCTTAACTTGCAGA
ForLMNA	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT GACCGCAGAGAGGTCCCATC
RevLMNA	CTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT GACCGAATGATATGTCCGACCA

Πίνακας 3: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν. Με μαύρο διακρίνονται οι αλληλουχίες που υβριδοποιούνται στους γενετικούς τόπους ενδιαφέροντος. Με κόκκινο επισημαίνονται τα ειδικά άκρα των εκκινητών, τα οποία είναι απαραίτητα για την προσθήκη των adaptors/barcodes κατά το δεύτερο κύκλο PCR, πριν την πραγματοποίηση του amplifon sequencing.

Αντιδραστήριο	Τελική Συγκέντρωση
2X KAPA HiFi Ready Mix	1X
For LBR primer	0.1μM
Rev LBR primer	0.1μM
DMSO	5%
gDNA	50ng
ddH ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο 50μL

Πίνακας 4: Η αντίδραση PCR για τους κλώνους των LA και LR KO κυτταρικών σειρών.

Στάδιο	Συνθήκη	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C/3min	1
Αποδιάταξη	98°C/30sec	35
Υβριδοποίηση	65°C/30sec	
Σύνθεση	72°C/30sec	
Τελική επέκταση	72°C/2min	1

Πίνακας 5: Οι συνθήκες PCR για τους κλώνους της LA και LR KO κυτταρικών σειρών.

Αντιδραστήριο	Τελική Συγκέντρωση
2X KAPA HiFi Ready Mix	1X
For LBR primer	0.075μM
Rev LBR primer	0.075μM
DMSO	5%
gDNA	50ng
ddH ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο 50μL

Πίνακας 6: Η αντίδραση PCR για τους κλώνους της d-LA-LR KO κυτταρικής σειράς.

Στάδιο	Συνθήκη	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C/3min	1
Αποδιάταξη	98°C/30sec	45
Υβριδοποίηση	68°C/30sec	
Σύνθεση	72°C/45sec	

Τελική επέκταση	72°C/2min	1
-----------------	-----------	---

Πίνακας 7: Οι συνθήκες PCR για τους κλώνους της d-LA-LR KO κυτταρικής σειράς.

2.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτμη αγαρόζης

Τα δείγματα κλώνων και από τις τρεις σταθερές κυτταρικές σειρές (LA KO, LR KO & d-LA-LR KO) ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 3%w/v παρασκευασμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (0.04M Tris-CH₃COOH, 10mM EDTA) που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 10μg/mL. Τα προϊόντα της PCR προετοιμάστηκαν κατάλληλα με την ανάμιξή τους σε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης Orange Loading Buffer (Jena Bioscience, 112.840) σε τελική συγκέντρωση 1X, ενώ χρησιμοποιήθηκε και ένας μάρτυρας 50bp DNA Ladder (NIPPON Genetics EUROPE GmbH, 09 5017 1507). Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν στα 90V, 500mA για 1hr.

2.2.4 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Τα προϊόντα PCR των δειγμάτων της d-LA-LR KO κυτταρικής σειράς απομονώθηκαν με τη χρήση του kit “PCR Clean up/Gel Extraction kit” (Macherey Nagel, #740609.50).

2.2.5 Amplicon Sequencing

Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε στο Genomics Core Facility του EMBL-Heidelberg. Η βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε από τους Δρες. Κατερίνα Σουψανά και Γιώργο Σφήκα, σε ειδικά σχεδιασμένη υπολογιστική πλατφόρμα χρησιμοποιώντας το δημοσιευμένο αλγόριθμο CRISPResso (Pinello et al., 2016).

2.2.6 Απομόνωση ολικού RNA

Κάθε κλώνος των σταθερών κυτταρικών σειρών, αλλά και κύτταρα CTRL 10% και CTRL 15%, διαχωρίστηκαν το καθένα σε 3x60mm πιάτα καλλιέργειας (τρία βιολογικά δείγματα για κάθε περίπτωση), τα οποία

αφέθηκαν να αναπυχθούν μέχρι να καλύψουν το 90% της επιφάνειας του πιάτου. Έπειτα, τα κύτταρα εκπλύθηκαν 3 φορές με PBS και αποκολλήθηκαν από το πιάτο με 1mL διαλύματος θρυψίνης (αραιωμένη 1:1 σε PBS). Σε αυτό προστέθηκε 1mL DMEM Full και αφού το διάλυμα των κυττάρων επαναιωρήθηκε, ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1000rpm για 2-3min. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύθηκε σε 1mL PBS και τοποθετήθηκαν σε πάγο. Η διαδικασία συνεχίστηκε εκτός θαλάμου κάθετης νηματικής ροής και κάτω από κατάλληλες συνθήκες, όπου τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε αντίστοιχα φιαλίδια και επαναλήφθηκε φυγοκέντρηση στις 1000rpm/2min. Αναρροφήθηκε προσεκτικά το υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων αποθηκεύτηκε στους -20°C. Για την απομόνωση του RNA, χρησιμοποιήθηκε το Kit της Invitrogen (Invitrogen, RNA Mini Kit 2042661) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή ενώ η αξιολόγηση των δειγμάτων RNA πραγματοποιήθηκε από τη Δρ. Κατερίνα Σουψανά.

2.2.6.1 Υπολογισμός συγκέντρωσης και ποιότητας RNA

Η ποσοτικοποίηση του ολικού RNA έγινε με την χρήση φωτομέτρου nanodrop (Thermo). Η ποιότητα του RNA αξιολογήθηκε με τη χρήση του Bioanalyzer (Agilent) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μόνο δείγματα με RIN>9 χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω.

2.2.7 Μετατροπή του ολικού RNA σε cDNA

Η μετατροπή πραγματοποιήθηκε με το kit iScript (Biorad, 1708890) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time qPCR)

Η qRT-PCR πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με τη Δρ. Κατερίνα Σουψανά με τη χρήση του SYBR Fast Master Mix (2x) Universal qPCR (KAPA, KK 4602), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, στο μηχάνημα CFXConnect (Biorad). Τα γονίδια αναφοράς επιλέχθηκαν από ένα πάνελ

γονιδίων και με τη χρήση του αλγορίθμου geNorm (PrimerDesign). Η ανάλυση των δεδομένων και η στατιστική τους επεξεργασία (one way Anova και Tukey-Kramer post-test) έγινε στο πρόγραμμα qbase⁺ (Biogazelle) σύμφωνα με τα MIQE guidelines, ενώ πραγματοποιήθηκε σχετική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων μέσω της μεθόδου ΔCt ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Γονίδιο	Forward Primer	Reverse Primer
LBR (PrimerDesign)	AAGGAGATGAGGAGGGAAATTC	CGGCGTAGCGTTCTTCTC
LMNA (Primer-Blast)	AGTGAGAAGCGCACATTGGA	TATCGATCTCCACAAGCCGC

Πίνακας 8: Οι αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην qRT-PCR.

2.2.9 Αλληλούχιση RNA (RNA Sequencing) και βιοπληροφορική ανάλυση

Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε στο Genomics Core Facility, EMBL-Heidelberg. Η βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε από τους Δρες. Κατερίνα Σουψανά και Γιώργο Σφήκα, στην ειδικά σχεδιασμένη υπολογιστική πλατφόρμα Chipster (Kallio et al., 2011). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω των προγραμμάτων VolcanoR και g:Profiler.

2.3 Μορφολογικές Μέθοδοι

2.3.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός επιστρωμένων κυττάρων

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε βασίστηκε στα δημοσιευμένα πρωτόκολλα των Maison et al. (1993) και Meier & Georgatos (1994). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες με ή χωρίς την επίστρωση 0.1% gelatin (Gelatin from bovine skin) και την επόμενη ημέρα υποβλήθηκαν στη διαδικασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού.

Αναλυτικότερα, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν είτε σε 1% ή 4% διάλυμα φορμαλδεΐδης αραιωμένης σε PBS για 5min ή 10min, είτε σε παγωμένη μεθανόλη για 6min στους -20°C . Η επιλογή του μέσου μονιμοποίησης των κυττάρων, αλλά και οι συνθήκες επώασης, επιλέχθηκαν ανάλογα με το πρωτογενές αντίσωμα. Έπειτα, ακολούθησαν πλύσεις με PBS και για τα κύτταρα που μονιμοποιήθηκαν με φορμαλδεΐδη προστέθηκε επιπλέον ρυθμιστικό διάλυμα απενεργοποίησης (0.07gr γλυκίνης σε 50mL PBS) για 10min. Έγινε έκπλυση των κυττάρων με PBS και προστέθηκε διάλυμα παρεμπόδισης για τουλάχιστον 15min (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl, 2mM MgCl_2 , 0.1mM EGTA, 0.2% Triton X-100, 0.5% Fish skin gelatin). Ακολούθησε η επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα, κατάλληλα αραιωμένο σε διάλυμα παρεμπόδισης, για 1hr σε θερμοκρασία δωματίου και σε θάλαμο με υψηλή υγρασία (πίνακας 9). Η διαδικασία συνεχίστηκε με έκπλυση των κυττάρων 3 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα παρεμπόδισης, με το τελευταίο στάδιο έκπλυσης να διαρκεί 15min. Έπειτα προστέθηκε το δευτερογενές αντίσωμα και αυτό κατάλληλα αραιωμένο σε διάλυμα παρεμπόδισης και αφέθηκε για 45min σε θάλαμο προστατευμένο από το φως και με υψηλή υγρασία (πίνακας 10). Ακολούθησαν δύο εκπλύσεις με το διάλυμα παρεμπόδισης και δύο ακόμα με PBS. Τελευταίο στάδιο της διαδικασίας ήταν η σήμανση του DNA με χρωστικές όπως Dapi, TO-PRO-3 και ιωδιούχο προπίδιο (PI). Και τα τρία ήταν διαλυμένα σε PBS, με αραιώσεις και συνθήκες επώασης που αναφέρονται στον πίνακα 11. Πριν τη χρήση του PI, τα κύτταρα επώαστηκαν με διάλυμα Rnase A συγκέντρωσης 2.5mg/mL διαλυμένη σε PBS και ακολούθησε επώαση για 45min στους 37°C απουσία φωτός.

Τέλος, μετά τη χρώση του DNA στις καλυπτρίδες προστέθηκε Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες, όπου σταθεροποιήθηκαν με χρήση βερνικιού. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους 4°C , απουσία φωτός και παρατηρήθηκαν είτε σε μικροσκόπιο φθορισμού (ZEISS axiovert S100), είτε σε συνεστιακό μικροσκόπιο (Leica SP5 TCSII).

Αντίσωμα	Ξενιστής	Αραιώση	Μονιμοποίηση	Κατασκευαστής
----------	----------	---------	--------------	---------------

Anti-Lamin A	Rabbit	1:1000	4%FA/10min	Simos & Georgatos, (1992) Meier & Georgatos, (1994)
Anti-Lamin B1	Rabbit	1:1000	4%FA/10min	Simos & Georgatos, (1992) Meier & Georgatos, (1994)
Anti-Lamin B2	Mouse	1:50	4%FA/10min	ZYMED 51101933
Anti-3meK9H3	Mouse	1:400	4%FA/5min	NOVUS NBP1-30141
Anti-3meK4H3	Rabbit	1:1000	4%FA/5min	Active Motif #39159
Anti- α Tubulin	Mouse	1:5000	4%FA/10min	Sigma T-5168
Anti-Nups	Mouse	1:500	1%FA/10min	Abcam ab50008
Anti-LBR	Rabbit	1:100	1%FA/5min	Παρασκευή του εργαστηρίου
Anti-Lap2b	Rabbit	1:100	1%FA/10min	Maison et al., (1995)
Anti-H3T3ph	Rabbit	1:700	4%FA/10min	Polioudaki et al., (2004)
Anti- γ H2Ax S139ph	Mouse	1:2000	4%FA/10min	Millipore 05-636-I
Anti-PCNA	Mouse	1:100	Methanol/6min/-20°C	Santa Cruz (PC 10) SC-56
Anti-HP1 α	Mouse	1:1000	4%FA/10min	Millipore MAB 3584
Anti-HP1 γ	Mouse	1:1000	4%FA/10min	Millipore MAB 3450
Anti- γ Tubulin	Mouse	1:1000	4%FA/10min	Sigma T5326
ACA	Human	1:100	1%FA/10min	Δωρεά Θ. Τζιούφα, ΕΚΠΑ

Πίνακας 9: Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν.

Δευτερογενές Αντίσωμα	Ξενιστής	Αραίωση	Κατασκευαστής
Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 488	goat	1:400	Invitrogen A11008
Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 568	goat	1:400	Invitrogen A11011
Anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 488	goat	1:400	Invitrogen A11029
Anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 568	donkey	1:400	Invitrogen A11004
Anti-Rat 568 IgG, Alexa Fluor 568	goat	1:400	Invitrogen A11077
Anti-Human IgG, Alexa Fluor 568	goat	1:400	Invitrogen A21090

Πίνακας 10: Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν.

Χρωστική DNA	Αραίωση	Συνθήκες Επώασης
TO-PRO 3 Invitrogen T3605	1:5000	40min/RT απουσία φωτός
Dapi	1:10000	30min/RT/37°C απουσία φωτός
PI Sigma Aldrich P4170	1:400	30min/RT απουσία φωτός

Πίνακας 11: Οι χρωστικές DNA που χρησιμοποιήθηκαν.

2.3.2 Συνεστιακή Μικροσκοπία

Τα δείγματα εξετάστηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica SP5 TCSII με πηγή Laser αργού (Argon) και με τη χρήση των αντικειμενικών φακών 63X(oil) και 100X(oil). Ακολουθήθηκε αμφίδρομη διαδοχική σάρωση με συχνότητα 400Hz, μέσο όρο σάρωσης ανά γραμμή pixel δύο, ενώ το διάφραγμα της δέσμης (pinhole) ορίστηκε στη 1 μονάδα Airy (AU). Η ισχύς της δέσμης του laser ορίστηκε στο 10% της μέγιστης ισχύος, ενώ η ισχύς των φωτοπολλαπλασιαστών των laser 488nm, 561nm και 633nm κυμάνθηκε μεταξύ 30%-50%. Τέλος, η ανάλυση των εικόνων ήταν 512x512 pixels και οι οπτικές τομές πάχους 0.42μm. Οι φωτογραφίες των δειγμάτων αναλύθηκαν περαιτέρω και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με χρήση των προγραμμάτων LAS X (Leica), Fiji (NIH Image) και Adobe Photoshop CC 2017.

2.3.3 Ποσοτικοποίηση έντασης φθορισμού και καταμέτρηση αριθμού εστιών ετεροχρωματίνης

Κύτταρα επιστρώθηκαν σε καλυπτρίδες και την επόμενη ημέρα υποβλήθηκαν σε έμμεσο ανοσοφθορισμό. Τα μονιμοποιημένα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο με φακό 100X(oil) και συλλέχθηκαν διαδοχικές οπτικές τομές (βήμα 0.42μm). Η μέτρηση της έντασης του φθορισμού πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Fiji. Οι κατάλληλες οπτικές τομές συνδυάστηκαν και προβλήθηκε ο μέσος όρος έντασης του φθορισμού τους σε arbitrary units (0-255AU). Για τη μέτρηση του σήματος που αντιστοιχεί σε όλο τον πυρήνα, χρησιμοποιήθηκαν τομές από όλο το εμβαδόν του πυρήνα, από τον έναν πόλο μέχρι και τον άλλον. Για τη

μέτρηση της έντασης του σήματος που αφορά την περιφέρεια του πυρήνα, χρησιμοποιήθηκαν 2-3 τομές πριν και μετά τον ισημερινό του πυρήνα. Τέλος, για την ένταση των ετεροχρωματικών εστιών (foci) χρησιμοποιήθηκαν τομές κατάλληλες για κάθε μεμονωμένη εστία. Σε κάθε περίπτωση, η περιοχή ενδιαφέροντος (region of interest, ROI) ορίζονταν με ελεύθερη σχεδίαση και η τιμή αντιστοιχούσε σε ένταση φθορισμού ανά μονάδα επιφάνειας. Μετρήσεις καταγράφηκαν από τρία διαδοχικά και ανεξάρτητα πειράματα, υπό τις ίδιες συνθήκες (τόσο στη διαδικασία του ανοσοφθορισμού, όσο και στις διαδικασίες παρατήρησης και επεξεργασίας των εικόνων). Τέλος, η καταμέτρηση των εστιών ετεροχρωματικής πραγματοποιήθηκε με βάση τη χρώση του αντισώματος έναντι της τριμεθυλιωμένης λυσίνης 9 της ιστόνης H3 (3meK9H3).

2.4 Μέθοδοι Μελέτης Αναπτυξιακού Δυναμικού

2.4.1 Μελέτη κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής (FACS)

Επιστρώθηκαν σε 6-wells τριπλά δείγματα από κάθε κυτταρικό πληθυσμό με παρόμοιο αριθμό κυττάρων και κάθε δείγμα διαχωρίστηκε περαιτέρω σε δύο τεχνικά δείγματα (σύνολο έξι μετρήσεις για κάθε πληθυσμό). Τα κύτταρα αφέθηκαν να αναπτυχθούν μέχρι να καλύψουν το 60%-70% της επιφάνειας του πιάτου καλλιέργειας. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε πλύση των κυττάρων 3 φορές με 2mL διαλύματος PBS και προστέθηκε 0.5mL διαλύματος θρυψίνης/EDTA 0.05% (διαλυμένη 1/1 σε PBS) και επώαση στους 37°C για 2-3min. Αφού αποκολλήθηκαν τα κύτταρα από το πιάτο και έγιναν μονήρη, προστέθηκε 0.5mL διαλύματος PBS + 2%FBS, για την απενεργοποίηση της θρυψίνης. Για τη χρώση του DNA τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και επώαστηκαν παρουσία διαλύματος που περιείχε ιωδιούχο προπύδιο (PI) για 30min, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε από τους Vartholomatos et al. (2015). Η διαδικασία της κυτταρομετρίας ροής πραγματοποιήθηκε από το Δρ. Γ. Μαρκόπουλο στο Αιματολογικό εργαστήριο του Π.Γ.Ν.Ι. (Υπεύθυνος Δρ. Γ. Βαρθολομάτος).

2.4.2 Μέτρηση ρυθμού πολλαπλασιασμού

Για την καταγραφή του ρυθμού πολλαπλασιασμού, σε πιάτα καλλιέργειας 12well επιστρώθηκαν 5×10^4 ή 10^5 κύτταρα ανά φρεάτιο και μετρήθηκε το σύνολό τους μετά από 24, 48 και 72hrs με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου (Olympus CK2). Η διαδικασία της μέτρησης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αιμοκυτταρομέτρου NEUBAUER, ενώ στη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Trypan blue, συγκέντρωσης 0.4% (Sigma), η οποία επώαστηκε με το διάλυμα των κυττάρων για 2min. Σε κάθε χρονικό σημείο και για κάθε κυτταρικό πληθυσμό οι μετρήσεις επαναλαμβάνονταν 4 ή 6 φορές.

2.4.3 Μέτρηση μιτωτικού δείκτη

Για τη μέτρηση του μιτωτικού δείκτη, κύτταρα επιστρώθηκαν σε καλυπτρίδες και αφέθηκαν να αναπτυχθούν για 24hrs. Την επόμενη ημέρα, πραγματοποιήθηκε μονιμοποίησή τους με διάλυμα φορμαδεΐδης 4% και χρώση του DNA με τη χρωστική DAPI. Έπειτα, τα δείγματα των κυττάρων παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (ZEISS Axiovert S100) με τη χρήση φακού 40X (oil) και έγινε καταμέτρηση και διαχωρισμός τους σε μεσοφασικά και μιτωτικά, σύμφωνα με την μορφολογία του DNA τους. Για κάθε κυτταρικό πληθυσμό η διαδικασία επαναλήφθηκε πέντε φορές.

2.5 Βιοχημικές Μέθοδοι

2.5.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS PAGE

Για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα SDS-page 12%, κατάλληλο για το μέγεθός τους. Κύτταρα από πιάτο διαστάσεων 60mm και όταν αυτά είχαν καλύψει το 90% της επιφάνειάς του, αποκολλήθηκαν από το πιάτο με τη χρήση θρυψίνης και επαναιωρήθηκαν σε 100μL διαλύματος Laemmli 2X (10mM Tris-HCl pH 7, 4.6% SDS, 20% γλυκερόλη, 0.1%w/v μπλε τη βρωμοφαινόλης, 50mM DTT). Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στους 100°C/5min και αποθήκευσή τους στους -20°C.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τάση 180V, παρουσία Electrode Buffer (0.025M Tris-Base, 0.192M γλυκίνη, SDS 0.1%), μέχρι τα δείγματα να διατρέξουν όλη την επιφάνεια του πηκτώματος.

2.5.2 Χρώση πηκτών ακρυλαμιδίου

Η χρώση πραγματοποιήθηκε με την χρήση διαλύματος Coomassie Blue G250 (50% μεθανόλη, 12% οξικού οξέος, 0.1% Coomassie Brilliant Blue G250). Απορρίφθηκε η περίσσεια χρωστικής και η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με διάλυμα που αποτελούνταν από 10% μεθανόλη και 10% οξικό οξύ.

2.5.3 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Το πρώτο στάδιο της διαδικασίας περιελάμβανε την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων και στην συνέχεια ακολούθησε η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πηκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου. Η διαδικασία έγινε σε ειδική συσκευή παρουσία ειδικού διαλύματος μεταφοράς (Transfer buffer: 20% μεθανόλης σε electrode buffer). Χρησιμοποιήθηκε διηθητικό χαρτί Whatman και το πηκτωμα τοποθετήθηκε στον αρνητικό πόλο της συσκευής, ενώ η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στο θετικό πόλο. Η διαδικασία μεταφοράς πραγματοποιήθηκε υπό τάση 80V για 1.5hrs. Μετά το τέλος της παραπάνω διαδικασίας, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εκπλύθηκε με διάλυμα έκπλυσης (20mM Tris-HCl pH 7.4, 155mM NaCl, 0.1% Tween-20) και επώαστηκε O/N υπό ανάδευση σε διάλυμα παρεμπόδισης (blocking buffer: 5% σκόνη γάλακτος (καζεΐνη) διαλυμένη σε διάλυμα έκπλυσης). Την επόμενη μέρα, αφού η μεμβράνη εκπλύθηκε μια φορά, για να απομακρυνθεί το διάλυμα παρεμπόδισης, επώαστηκε με το πρωτογενές αντίσωμα για 3hrs σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθησαν 4 εκπλύσεις των 10min με διάλυμα έκπλυσης και προσθήκη του δευτερογενούς αντισώματος για 1hr, υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (πίνακας 12). Τέλος, πραγματοποιήθηκαν 6 εκπλύσεις των 5min και η ανίχνευση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος σε φωτογραφικό φιλμ, με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL) σύμφωνα με τις

οδηγίες του κατασκευαστή (Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, 34095).

Αντισώματα	Ξενιστής	Αραίωση	Εταιρία
Anti-Lamin A	Rabbit	1:2500	Simos & Georgatos, 1992 Meier & Georgatos, 1994
Anti-Tubulin a	Mouse	1:5000	Sigma T-5168
Anti-GAPDH	Mouse	1:500	Millipore
Anti-Rabbit IgG,HRP	Goat	1:10000	Invitrogen 65-6120
Anti-Mouse IgG,HRP	Goat	1:3000	Invitrogen

Πίνακας 12: Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοαποτύπωση κατά Western.

2.6 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε από τη Δρ. Σουψανά Κατερίνα μέσω του στατιστικού πακέτου SPSS. Σε κάθε περίπτωση επιλέχθηκε το στατιστικό τεστ που ήταν καταλληλότερο σύμφωνα με τη φύση των δεδομένων. Η στατιστική σημαντικότητα (p value) παρουσιάζεται στα γραφήματα με αστερίσκους που εκπροσωπούν τις εξής περιπτώσεις: * για $p < 0.05$, ** για $p < 0.01$ και *** για $p < 0.001$.

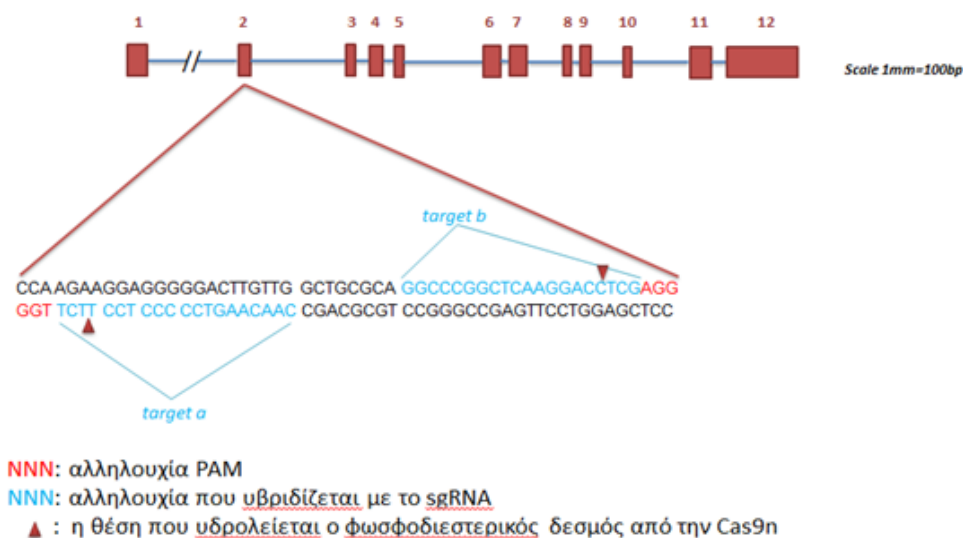
3. Αποτελέσματα

Μέρος A: Μελέτη της απαλοιφής του γονιδίου mLMNA

Σε αυτό το σημείο να αναφερθεί πως οι σταθερές κυτταρικές σειρές LR KO και d-LA-LR KO κατασκευάστηκαν εξ ολοκλήρου στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης, ενώ η d-LR-LA KO σειρά κατασκευάστηκε παράλληλα από την προπτυχιακή φοιτήτρια Βασιλική Τάσσου. Τέλος, η δημιουργία της LA KO σταθερής σειράς είχε γίνει στο πλαίσιο της πτυχιακής εργασίας του Π. Μάρτζιου και είχε προχωρήσει μέχρι ενός ορισμένου σημείου κατά την επιλογή των κλώνων και του χαρακτηρισμού τους.

A1. Απαλοιφή του γονιδίου mLMNA

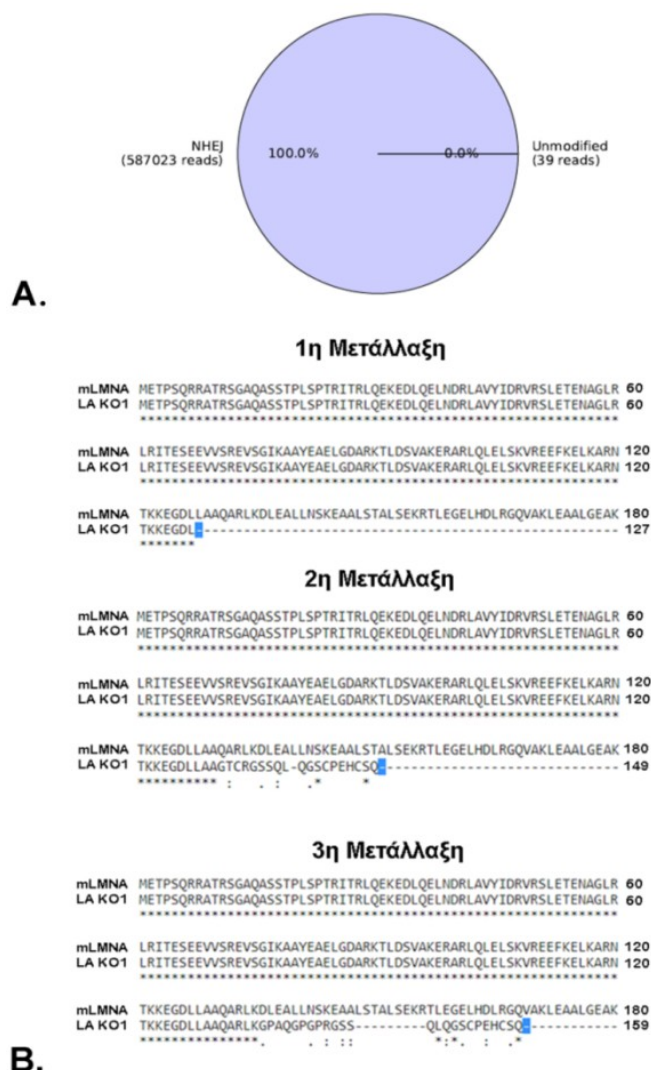
Για την περίπτωση του γονιδίου mLMNA που εδράζεται στο χρωμόσωμα 3 του ποντικού, στοχεύθηκαν αλληλουχίες εντός του εξωνίου 2 που απεικονίζονται παρακάτω στην εικόνα 19. Στη διαδικασία της γονιδιακής σίγασης προτιμάται να στοχεύονται τα πρώτα εξώνια του γονιδίου, ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποσιώπησή του και να αποφευχθεί η έκφραση περικομμένων πρωτεϊνών. Το εξώνιο 2 εμπεριέχεται σε όλα τα mRNAs που προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα, επομένως με τη στόχευσή του απαλείφονται όλες οι λαμίνες τύπου A που εκφράζονται στα σωματικά κύτταρα.



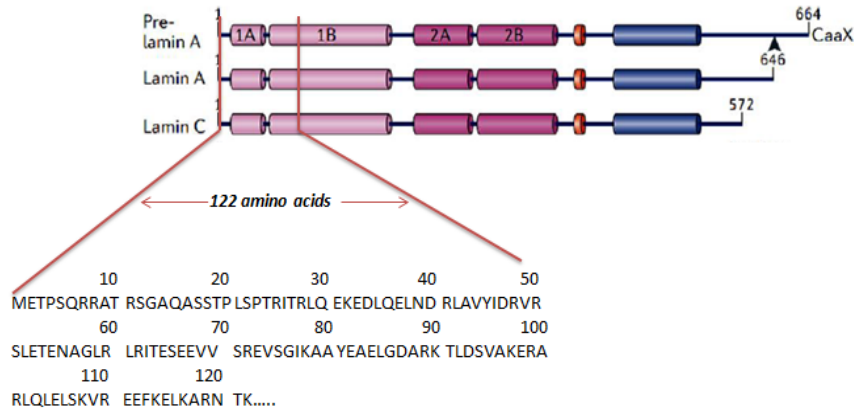
Εικόνα 19: Απεικόνιση του γονιδιακού τύπου και των εξωνίων του mLMNA και οι αλληλουχίες που επιλέχθηκαν να στοχευθούν από το σύστημα CRISPR/Cas9n, ID:

ENSMUSG00000029699.12, Πηγή: Ensemble, Γονιδιακός τόπος: χρωμόσωμα 3: 88,480,146-88,509,956.

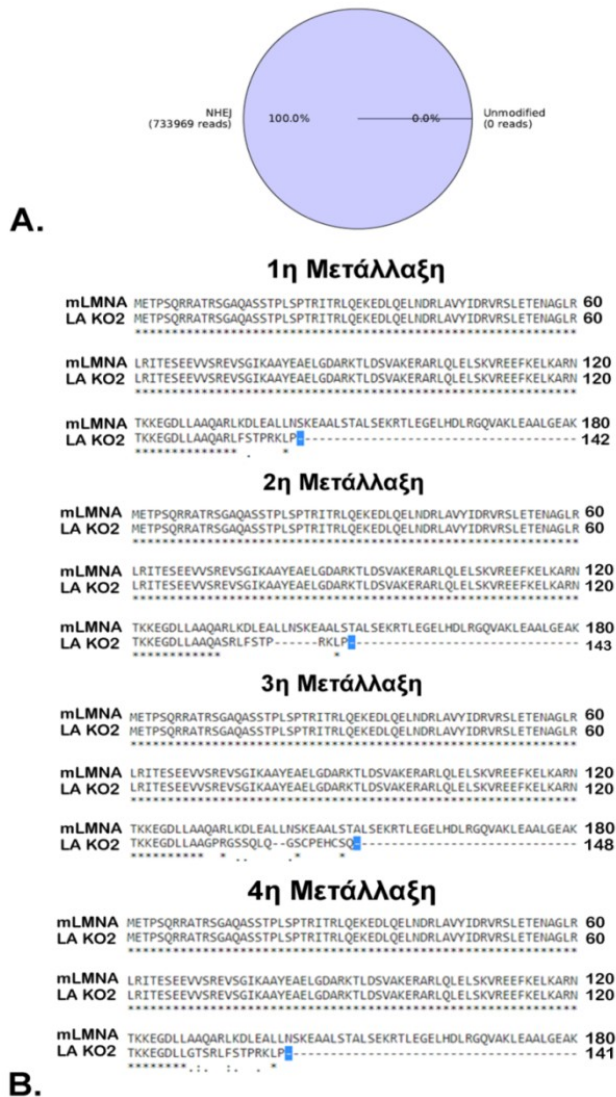
Για την αναγνώριση της εκάστοτε μετάλλαξης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του “amplicon sequencing”. Σε κάθε κλώνο οι μεταλλάξεις και η θέση του πρόωρου κωδικονίου λήξης είναι διαφορετικά μεταξύ των αλληλομόρφων. Συγκεκριμένα για τον κλώνο LA KO1 δεν ανιχνεύθηκαν αλληλουχίες αγρίου τύπου στο σημείο στόχευσης, ενώ προέκυψαν τρεις βασικές μεταλλάξεις (λόγω υπερτριπλοειδίας των κυττάρων), οι αμινοξικές αλληλουχίες των οποίων είχαν μήκος 127, 149 και 159 αμινοξέα, με το κωδικόνιο λήξης να προκύπτει κάθε φορά εντός της 1B α-ελικοειδούς επικράτειας της πρωτεΐνης (εικόνα 20 & 21).



Εικόνα 20: Α) Γράφημα πίτας με τον αριθμό και τα αντίστοιχα ποσοστά των αλληλουχιών του γονιδίου mLMNA που τροποποιήθηκαν από το CRISPR/Cas9n αλλά και των αλληλουχιών αγρίου τύπου (unmodified) για τον κλώνο LA KO1. Β) Οι αμινοξικές αλληλουχίες των τριών κύριων μεταλλάξεων που φέρει το γονίδιο mLMNA του κλώνου LA KO1, όπως αυτές προέκυψαν από το “amplicon sequencing”.



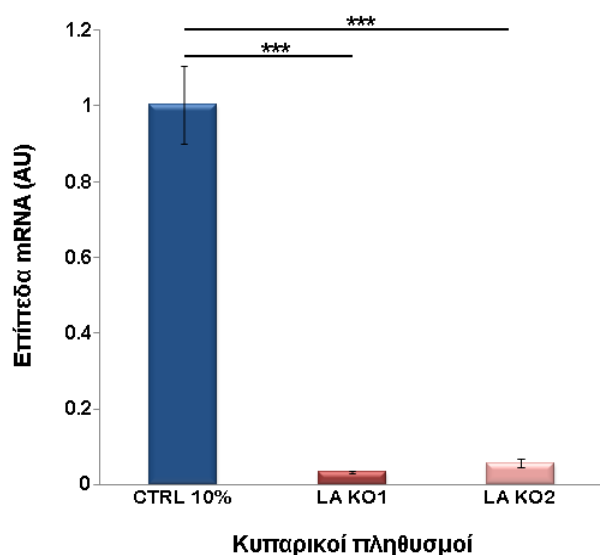
Εικόνα 21: Απεικόνιση των αμινοξικών τμημάτων της pre-lamin A, Lamin A και Lamin C. Παρουσιάζεται η προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία από την παρέμβαση του συστήματος CRISPR/Cas9n.



Εικόνα 22: Α) Γράφημα πίτας με τον αριθμό και τα αντίστοιχα ποσοστά των αλληλουχιών του γονιδίου mLMNA που τροποποιήθηκαν από το CRISPR/Cas9n αλλά και των αλληλουχιών αγρίου τύπου (unmodified) για τον κλώνο LA KO1. Β) Οι αμινοξικές αλληλουχίες των τεσσάρων κύριων μεταλλάξεων που φέρει το γονίδιο mLMNA του κλώνου LA KO2, όπως αυτές προέκυψαν από το “amplicon sequencing”.

Αντίστοιχα για τον κλώνο LA KO2 η ανάλυση προσδιόρισε τέσσερις βασικές μεταλλάξεις που αφορούσαν διαγραφές μεγέθους 13-19 νουκλεοτιδίων και οι οποίες αλληλεπικαλύπτονταν σε μεγάλο βαθμό. Οι αντίστοιχες αμινοξικές αλληλουχίες που παρατίθενται παραπάνω είχαν μήκος 142, 143, 148 και 141 αμινοξέα, με την πρωτεϊνική σύνθεση να διακόπτεται κάθε φορά εντός της 1B α-ελικοειδούς επικράτειας της πρωτεΐνης (εικόνα 22 & 21).

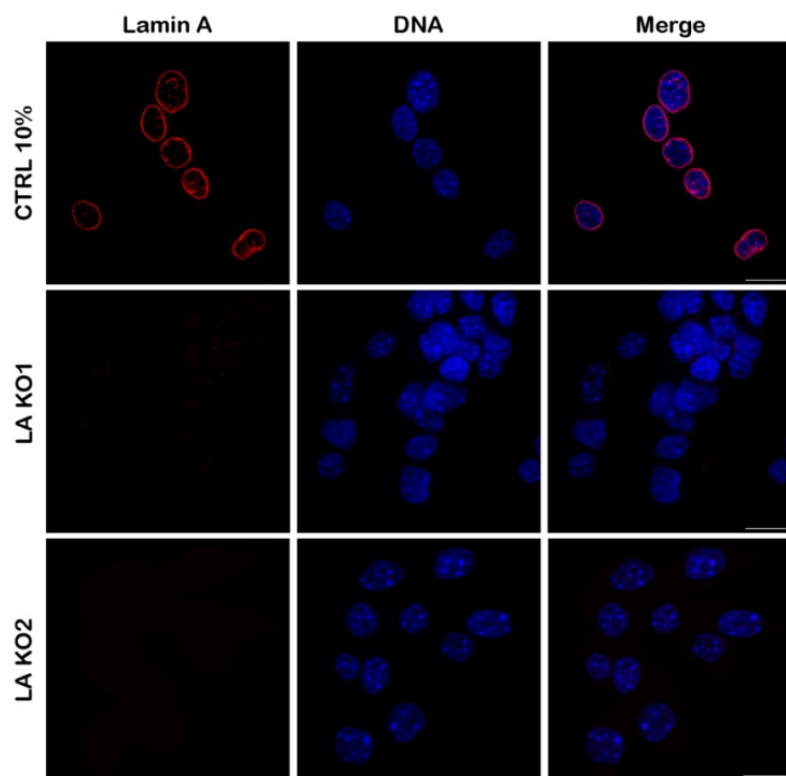
Έπειτα εξετάστηκε η έκφραση του γονιδίου σε μεταγραφικό επίπεδο μέσω qRT-PCR. Λόγω του μηχανισμού NMD που προαναφέρθηκε (παράγραφος 2.1.4) οι παραπάνω αμινοξικές αλληλουχίες δεν θα παραχθούν, με τον μηχανισμό να διασφαλίζει την μείωση του μεγαλύτερου ποσοστού των συγκεκριμένων mRNAs. Αναλυτικότερα, για τον κλώνο LA KO1 η έκφραση μειώθηκε στο 3%, ενώ του κλώνου LA KO2 στο 6% συγκριτικά με την έκφραση των κυττάρων CTRL 10% (κύτταρα NIH WT παρουσία 10% ορού), με τα επίπεδα της μείωσης να είναι ικανοποιητικά στα πλαίσια της γονιδιακής απαλοιφής (εικόνα 23).



Εικόνα 23: Τα σχετικά επίπεδα mRNA του γονιδίου mLMNA μεταξύ των κυτταρικών πληθυσμών CTRL 10%, LA KO1 και LA KO2 (απεικονίζεται το τυπικό σφάλμα σε κάθε περίπτωση).

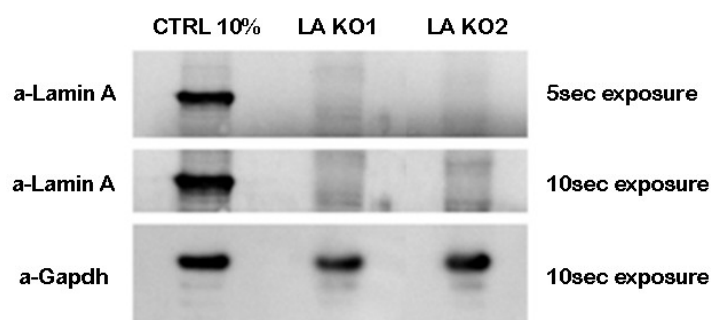
Τέλος, επιβεβαιώθηκε η απαλοιφή του γονιδίου mLMNA σε πρωτεϊνικό επίπεδο, μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Συγκεκριμένα, κύτταρα των δύο κλώνων αλλά και κύτταρα CTRL

10% υποβλήθηκαν σε έμμεσο ανοσοφθορισμό με αντίσωμα έναντι της Lamin A και όπως φαίνεται στην εικόνα 24 και οι δύο κλώνοι εμφάνισαν αρνητικό σήμα φθορισμού.



Εικόνα 24: Η κατανομή της πρωτεΐνης Lamin A μεταξύ των πληθυσμών CTRL 10%, LA KO1 και LA KO2 (κόκκινο: Lamin A, μπλε: TOPRO, scale bar: 10µm).

Επιπλέον, από τους παραπάνω πληθυσμούς απομονώθηκε κυτταρικό εκχύλισμα και για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνικών συστατικών πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου συγκέντρωσης 12%w/v. Για την ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της Lamin A, αλλά και του ενζύμου Gapdh που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης. Όπως αναμένονταν, στα κύτταρα CTRL 10% εντοπίστηκε ζώνη μεγέθους 72.3 kDa που αντιστοιχεί στην Lamin A, η οποία απουσίαζε πλήρως και από τους δύο knock out κλώνους, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα του έμμεσου ανοσοφθορισμού (εικόνα 25).

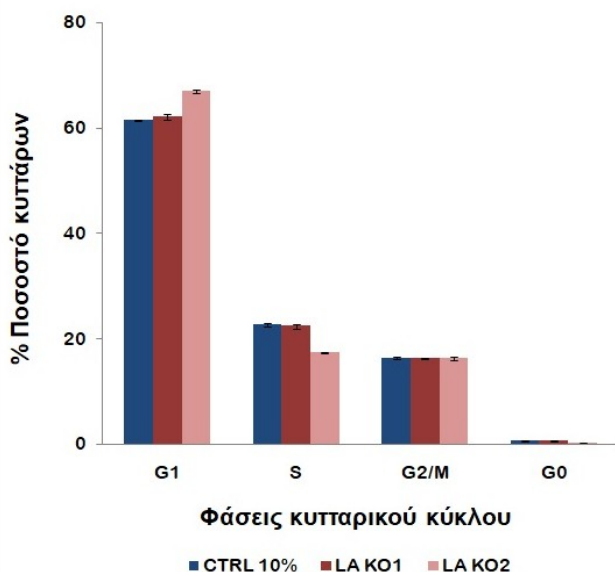


Εικόνα 25: Το φωτογραφικό φιλμ της ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε διαφορετικούς χρόνους έκθεσης με αντίσωμα έναντι της Lamin A και του Gapdh σε κύτταρα CTRL 10%, LA KO1 και LA KO2.

Όλα τα παραπάνω δεδομένα, τόσο σε επίπεδο γονοτύπου αλλά όσο και σε επίπεδο μεταγραφώματος και πρωτεΐνης, επιβεβαιώνουν στο σύνολό τους ότι στους κλώνους LA KO1 και LA KO2 έχει πραγματοποιηθεί απαλοιφή του γονιδίου στόχου και τα κύτταρα των πληθυσμών αυτών δεν εκφράζουν τις λαμίνες τύπου A.

A2. Συνέπειες της απαλοιφής στο αναπτυξιακό δυναμικό

Στα πλαίσια χαρακτηρισμού της LA KO κυτταρικής σειράς μελετήθηκε η πιθανή επίδραση της απαλοιφής της Lamin A/C στο πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων NIH και η εμπλοκή του σε μηχανισμούς του κυτταρικού κύκλου. Μελέτες κυρίως σε ανθρώπινα κύτταρα έχουν συσχετίσει την έκφραση της Lamin A/C με την πυκνότητα των πυρηνικών πόρων και τον ρυθμό πολλαπλασιασμού, ενώ μειωμένη έκφρασή της έχει αναφερθεί σε επιθετικότερες μορφές καρκίνου (Venables et al., 2001, Maeshima et al., 2006). Στα πλαίσια αυτά, πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής μεταξύ των LA KO κλώνων και κυττάρων CTRL 10% για τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Αρχικά να αναφερθεί πως δεν υπήρξε αξιόλογο ποσοστό κυττάρων στην φάση G0 και τα ποσοστά που παρουσίασαν οι δύο κλώνοι ήταν παρόμοια με αυτά των κυττάρων CTRL 10%. Μόνο ο κλώνος LA KO2 παρουσίασε μία διαφοροποίηση λιγότερη του 5% στις φάσεις G1 και S, χωρίς όμως η διαφορά να θεωρηθεί αξιόλογη (εικόνα 26).

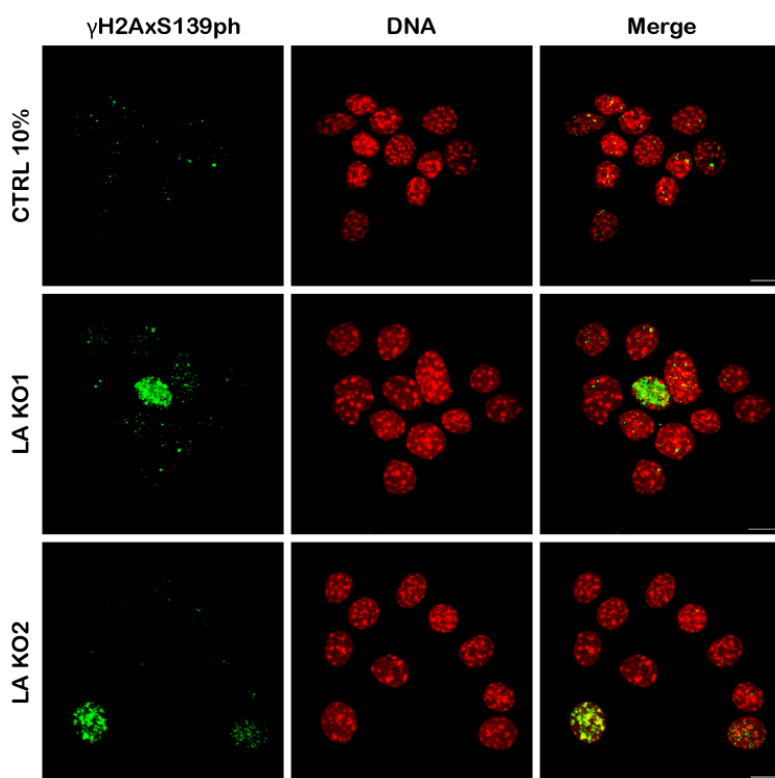


Εικόνα 26: Τα ποσοστά των κυττάρων της LA KO σειράς και κυττάρων CTRL 10% στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου όπως προέκυψαν από την κυτταρομετρία ροής (απεικονίζεται το τυπικό σφάλμα σε κάθε περίπτωση).

Στα πλαίσια άλλης εργασίας είχε μελετηθεί ο ρυθμός ανάπτυξης των πληθυσμών και είχε υπολογιστεί ο μιτωτικός τους δείκτης, χωρίς όμως να παρουσιάζονται αξιόλογες μεταβολές. Συγκεκριμένα, οι KO κλώνοι σημείωσαν μία αύξηση των μιτωτικών δεικτών (παράρτημα, εικόνα 6.1), που σημαίνει μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων στην φάση της μίτωσης, είτε λόγω κάποιας καθυστέρησης σε κάποιο από τα στάδια αυτής, είτε λόγω πρώιμης ολοκλήρωσης κάποιου σταδίου της μεσόφασης. Ωστόσο, οι μεταβολές δεν ήταν εκτεταμένες και ούτε στατιστικώς σημαντικές. Επιπλέον μελετήθηκε η μορφολογία της μιτωτικής ατράκτου μέσω της α Tubulin και δεν παρατηρήθηκαν ατυπίες σε καμία από τις φάσεις της μίτωσης (δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

Ολοκληρώνοντας, εξετάστηκε η πιθανή συσχέτιση της Lamin A με βλάβες του DNA και καθυστέρηση του κυτταρικού κύκλου, μέσω της φωσφορυλιωμένης H2Ax στην σερίνη 139 που αποτελεί χαρακτηριστική ιστονική τροποποίηση σχετιζόμενη με αλλοιώσεις του DNA. Από τη μορφολογική μελέτη δεν προέκυψαν διαφορές μεταξύ των κυτταρικών πληθυσμών, με τους πυρήνες να εμφανίζουν περιορισμένη έκφραση της γ H2Ax, ενώ διακρίθηκαν και πυρήνες με αυξημένη παρουσία της σε όλο το πυρηνόπλασμα που αφορούσαν αποπτωτικά κύτταρα του πληθυσμού (εικόνα 27). Φαίνεται λοιπόν πως τα κύτταρα με απουσία της Lamin A/C

παρουσιάζουν φυσιολογικό ρυθμό ανάπτυξης και πως δεν επηρεάζεται κάποιο στάδιο της κυτταρικής διαίρεσης.

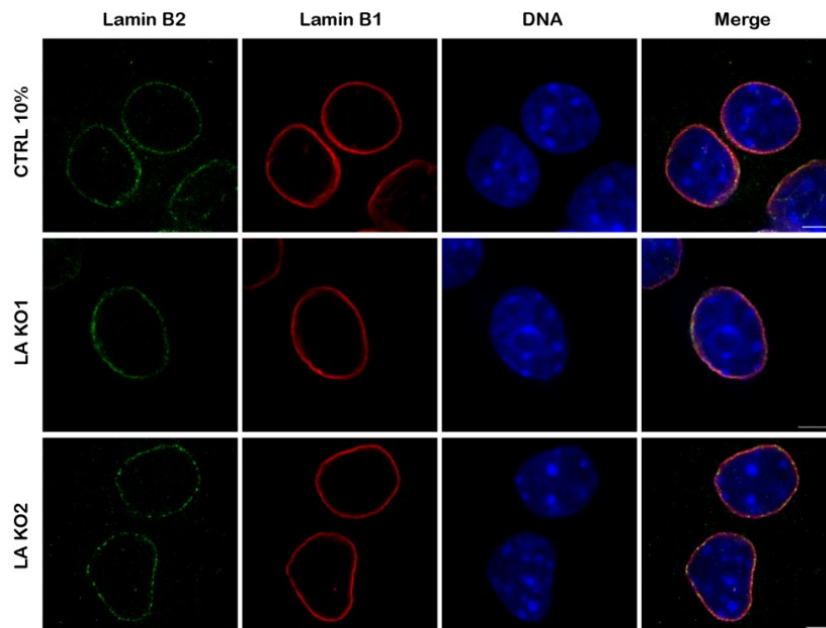


Εικόνα 27: Ο εντοπισμός της φωσφορυλιωμένης H2Ax ιστόνης μεταξύ των πληθυσμών LA KO1, LA KO2 και κυτάρων CTRL 10% (πράσινο: γH2AxS139ph, κόκκινο: TOPRO, scale bar: 10μm).

A3. Μορφολογική Ανάλυση

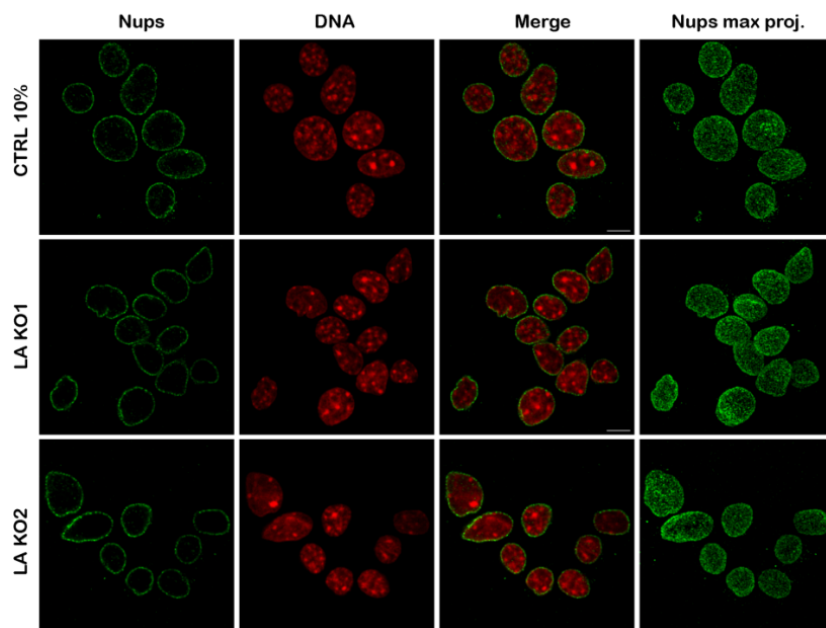
Μεγάλο μέρος της μελέτης αποτέλεσε η μορφολογική ανάλυση των παραπάνω κλώνων και πιθανών αλλαγών που θα προκαλούσε η έλλειψη των λαμινών τύπου A σε χαρακτηριστικά της χρωματίνης, αλλά και σε παράγοντες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης και της πυρηνικής λάμινας.

Όπως έχει αναφερθεί, η κάθε λαμίνη μέσω ομοπολυμερισμού δημιουργεί το δικό της αυτοτελές δίκτυο, τέτοια δίκτυα όμως αλληλεπιδρούν εκτεταμένα μεταξύ τους (Turgay et al., 2017). Για αυτό εξετάστηκε η κατανομή παραγόντων της πυρηνικής λάμινας, όπως ο εντοπισμός των Lamini B1 και Lamini B2, χωρίς όμως να παρατηρούνται διαφορές στις κατανομές των δύο πρωτεϊνών (εικόνα 28).

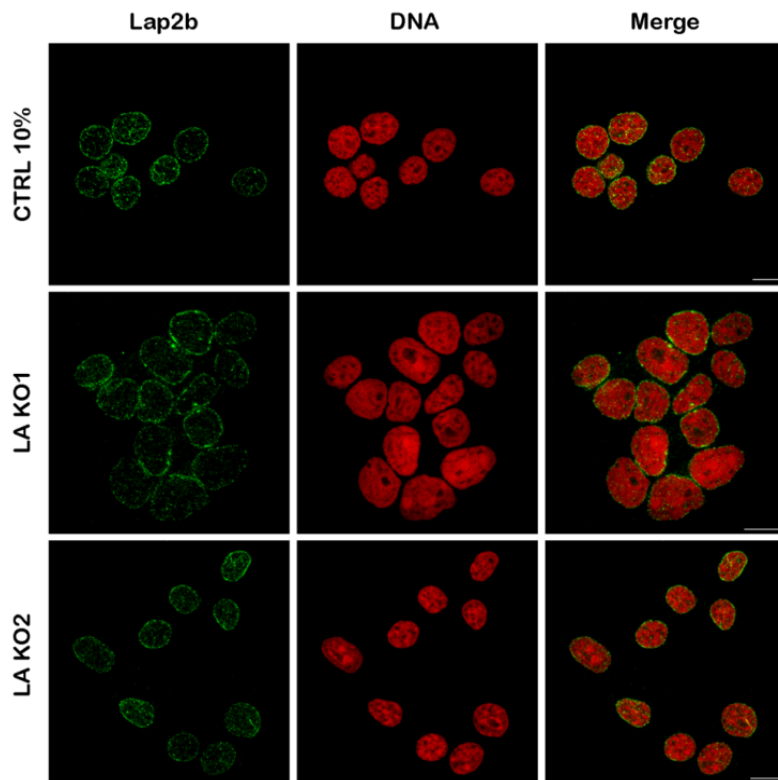


Εικόνα 28: Το πρότυπο κατανομής των Lamin B2 και Lamin B1 μεταξύ των πληθυσμών LA KO1, LA KO2 και κυττάρων CTRL 10% (πράσινο: Lamin B2, κόκκινο: Lamin B1, μπλε: TOPRO, scale bar: 5μm).

Ταυτόχρονα, καταγράφηκε η τοπολογία και άλλων παραγόντων της πυρηνικής περιφέρειας, όπως των συμπλεγμάτων των πυρηνικών πόρων, της πρωτεΐνης Lap2b και του LBR.

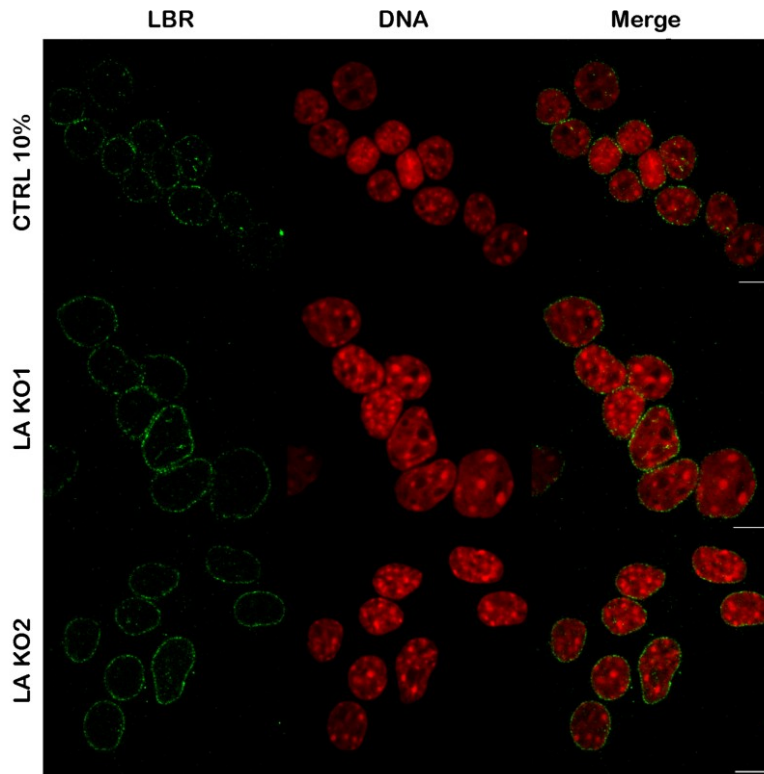


Εικόνα 29: Το πρότυπο κατανομής του συμπλέγματος των πυρηνικών πόρων από οπτική τομή στο ισημερινό επίπεδο και από μέγιστη προβολή μεταξύ των πληθυσμών LA KO1, LA KO2 και κυττάρων CTRL 10% (πράσινο: Nups, κόκκινο: TOPRO, scale bar: 8μm).



Εικόνα 30: Το πρότυπο κατανομής της Lap2b μεταξύ των πληθυσμών LA KO1, LA KO2 και κυττάρων CTRL 10% (πράσινο: Lap2b, κόκκινο: PI, scale bar: 10μm).

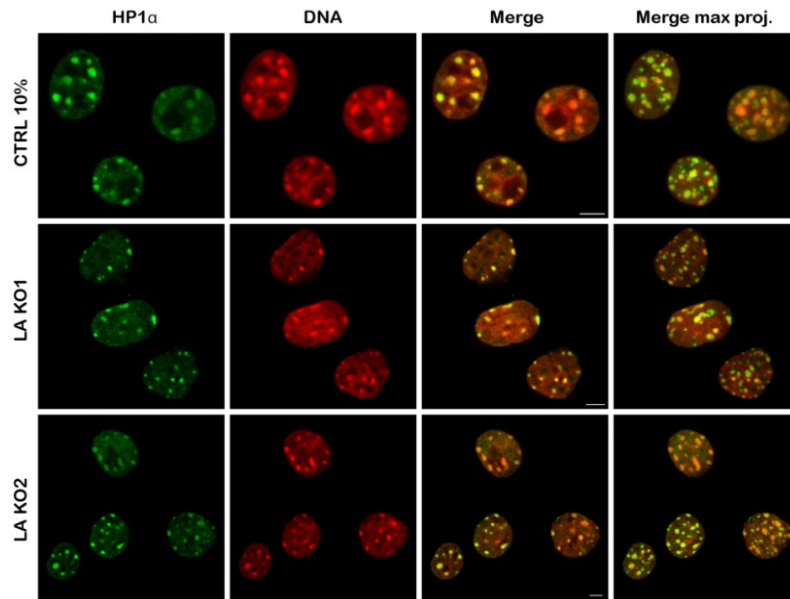
Σε αντιδιαστολή με τα βιβλιογραφικά δεδομένα της παραγράφου 1.3 της εισαγωγής, η απουσία της Lamin A/C από τα όρια του πυρήνα των NIH κυττάρων δεν συσχετίστηκε με ατυπίες ως προς την κατανομή των πυρηνικών πόρων. Το ίδιο προκύπτει και για την Lap2b, που παρουσίασε την αναμενόμενη κατανομή στην περιφέρεια του πυρήνα μεταξύ των μελετώμενων κυτταρικών πληθυσμών (εικόνα 29 & 30). Σχετικά με τον εντοπισμό του LBR, τα ολιγομερή που σχηματίζει στην εσωτερική μεμβράνη του πυρήνα παρατηρήθηκαν τόσο στα κύτταρα CTRL 10% όσο και στα κύτταρα των δύο knock out πληθυσμών. Μάλιστα, στην πυρηνική περιφέρεια των κλώνων παρατηρήθηκε ελαφρώς εντονότερη παρουσία του LBR, μία διαφοροποίηση που εμφάνισαν όλα τα κύτταρα των LA KO πληθυσμών και που παρατηρήθηκε αρκετές φορές μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού. Ωστόσο, με τις συγκεκριμένες συνθήκες του πειράματος και τη χρήση της συνεστιακής μικροσκοπίας δεν ήταν ευδιάκριτη και εύκολα ανιχνεύσιμη η συγκεκριμένη διαφορά της κατανομής του LBR (εικόνα 31).



Εικόνα 31: Ο εντοπισμός του LBR μεταξύ των πληθυσμών LA KO1, LA KO2 και κυτάρων CTRL 10% (πράσινο: LBR, κόκκινο: TOPRO, scale bar: 8μm).

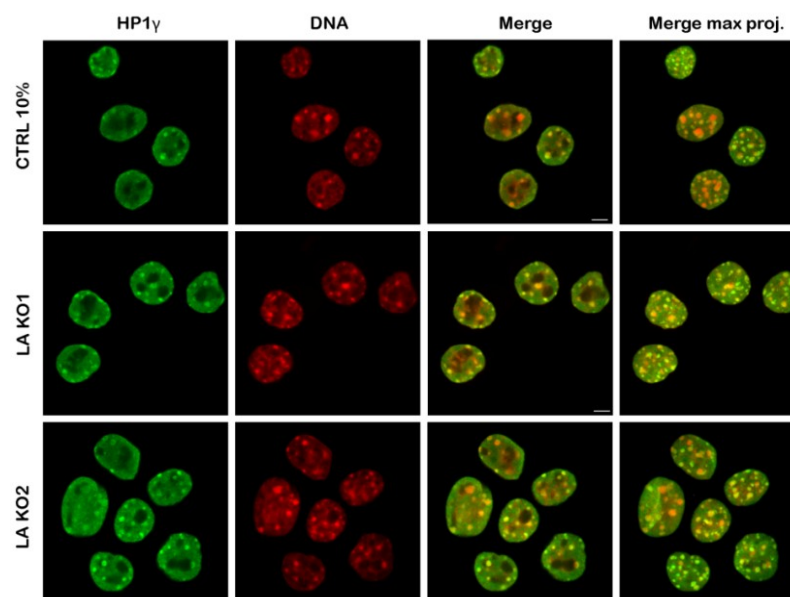
Στο τελευταίο στάδιο της μορφολογικής ανάλυσης, μελετήθηκε η δυναμική και τα επιγενετικά χαρακτηριστικά της χρωματίνης, όχι μόνο εγγύς του πυρηνικού φακέλου, αλλά και στο σύνολο του πυρήνα. Αρχικά, ταυτοποιήθηκε η κατανομή των πρωτεϊνών HP1α και HP1γ, χρωματινικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν με αρκετά πολύπλοκο τρόπο στην δημιουργία και διατήρηση της επιγενετικής κατάστασης και δομής της χρωματίνης. Η HP1α σχετίζεται κυρίως με την ετεροχρωματίνη και εντοπίζεται στα κεντρομερή και τελομερή των χρωμοσωμάτων, ενώ αλληλεπιδρά με τον LBR στην περιφέρεια του πυρήνα (Lomberk et al., 2006). Αντίθετα, η HP1γ συσχετίζεται τόσο με ευχρωματινικές περιοχές όσο και με τις ετεροχρωματινικές εστίες (foci) (Minc et al., 2000).

Όπως φαίνεται, η HP1α κατανέμεται σε όλη την έκταση του πυρήνα, ενώ συγκεντρώνεται εντονότερα στις ετεροχρωματινικές εστίες, όπου συνεντοπίζεται με την έντονα συμπυκνωμένη δομή του DNA (εικόνα 32).



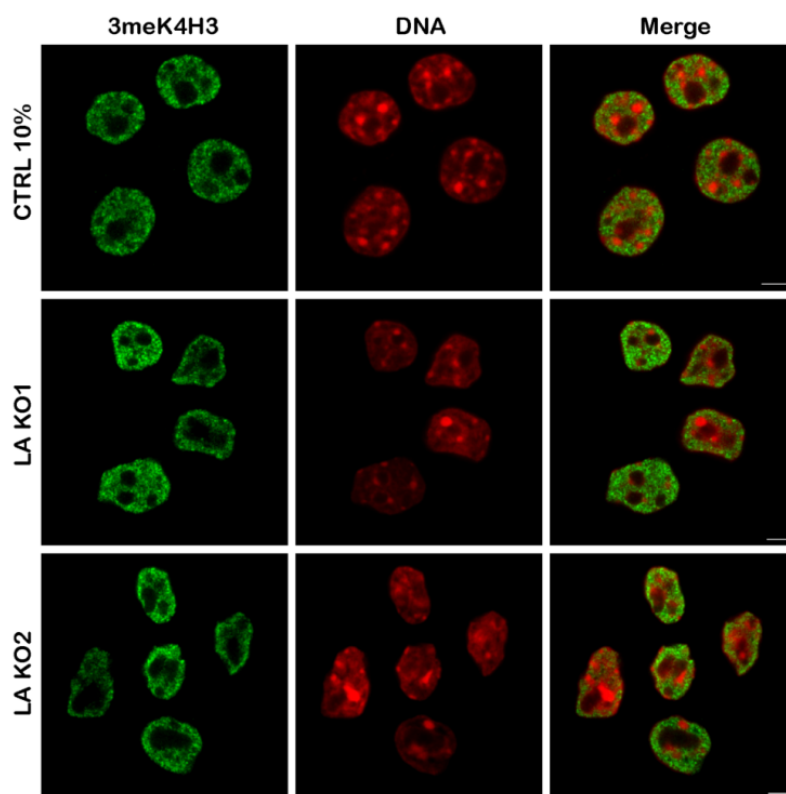
Εικόνα 32: Το πρότυπο κατανομής της HP1α από οπτική τομή στο ισημερινό επίπεδο και από μέγιστη προβολή μεταξύ των πληθυσμών LA KO1, LA KO2 και κυττάρων CTRL 10% (πράσινο: HP1α, κόκκινο: TOPRO, scale bar: 5μm).

Σχετικά με την HP1γ, το πρότυπο κατανομής είναι παρόμοιο με αυτό της HP1α, με την διαφορά πως εντοπίζεται εντονότερα στο πυρηνόπλασμα εξαιτίας του συσχετισμού της με την ευχρωματίνη. Και στις δύο περιπτώσεις το πρότυπο κατανομής δεν διαφοροποιήθηκε συναρτήσει της έλλειψης της Lamina A/C από την πυρηνική λάμινα (εικόνα 32 & 33). Τέλος να αναφερθεί πως υπάρχουν πυρήνες όπου και οι δύο πρωτεΐνες δεν έχουν προλάβει να ενσωματωθούν στις ετεροχρωματινικές εστίες, καθώς τα κύτταρα αυτά βρίσκονται πριν ή στην διάρκεια της φάσης S.



Εικόνα 33: Το πρότυπο κατανομής της HP1γ από οπτική τομή στο ισημερινό επίπεδο και από μέγιστη προβολή μεταξύ των πληθυσμών LA KO1, LA KO2 και κυττάρων CTRL 10% (πράσινο: HP1γ, κόκκινο: TOPRO, scale bar: 5μm).

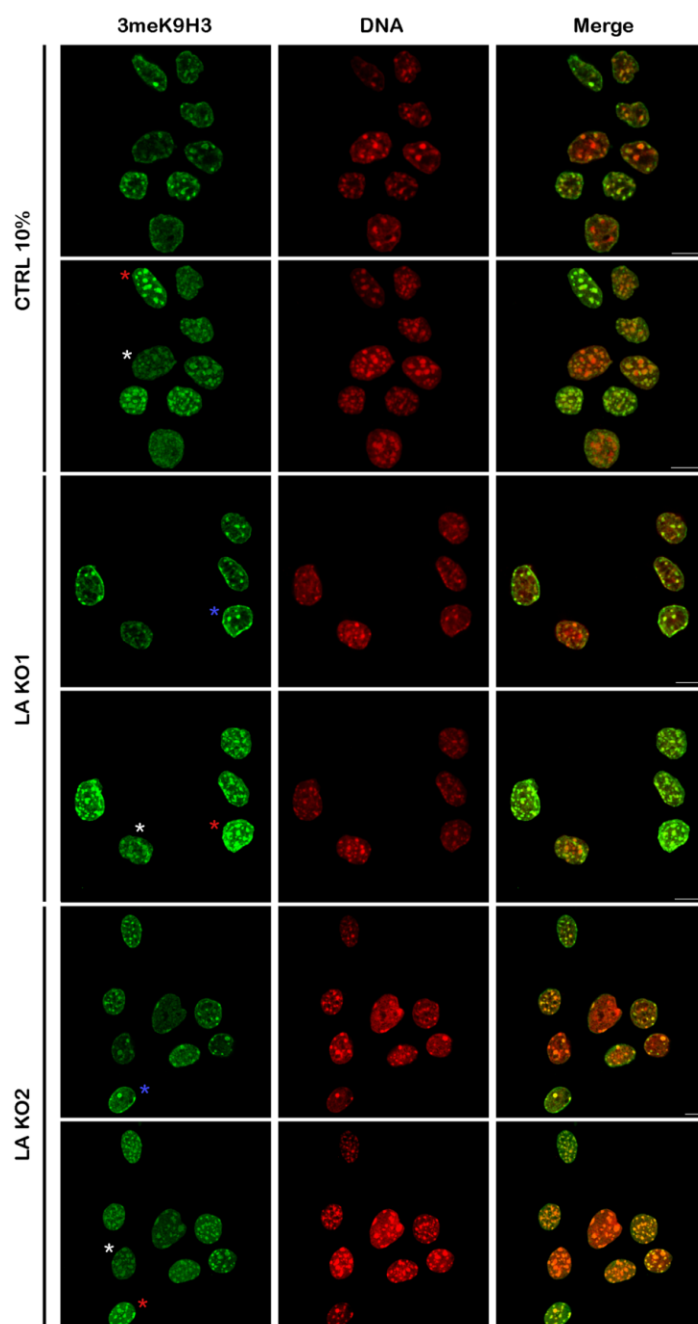
Ολοκληρώνοντας την μορφολογική μελέτη της χρωματίνης, εξετάστηκε η κατανομή των επιγενετικών τροποποιήσεων της 3meK4H3 και 3meK9H3. Υπενθυμίζεται πως η πρώτη αποτελεί χαρακτηριστική τροποποίηση της ευχρωματίνης, ενώ η τριμεθυλιωμένη λυσίνη 9 της ίδιας ιστόνης, προσιδιάζει στην μεταγραφικά ανενεργή κατάσταση της χρωματίνης.



Εικόνα 34: Το πρότυπο κατανομής της 3meK4H3 μεταξύ των πληθυσμών LA KO1, LA KO2 και κυττάρων CTRL 10% (πράσινο: 3meK4H3, κόκκινο: TOPRO, scale bar: 5μm).

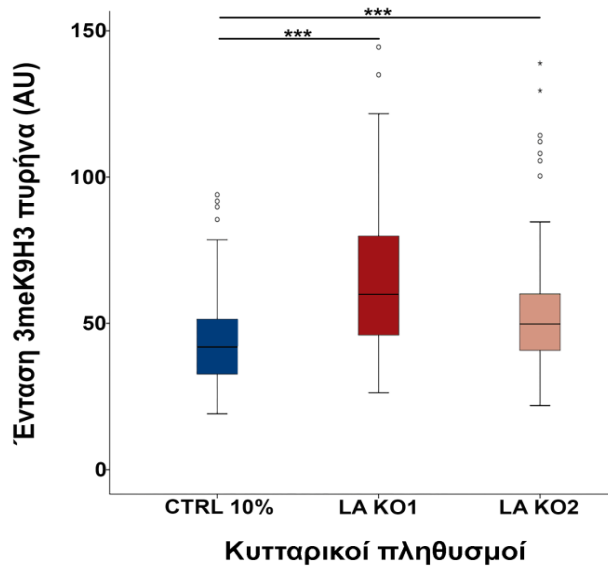
Όπως φαίνεται στην εικόνα 34, η τροποποίηση της 3meK4H3 δεν παρουσίασε διαφορές στην κατανομή μεταξύ των πληθυσμών, καταλαμβάνοντας σχεδόν όλη την έκταση του πυρήνα και απουσιάζοντας από τα όρια του πυρήνα και την περιφέρεια των πυρηνίσκων, όπου είναι εγκατεστημένη η ετεροχρωματίνη των LADs και NADs αντίστοιχα.

Η 3meK9H3 συσσωρεύεται εντονότερα στις ετεροχρωματινικές εστίες, ενώ κατανέμεται και στο πυρηνόπλασμα, καθώς η χρωματίνη ανεξαρτήτως της μεταγραφικής της κατάστασης φέρει μεθυλιωμένα κατάλοιπα της K9H3. Η πρώτη παρατήρηση που έγινε και αφορούσε όλους τους εξεταζόμενους κυτταρικούς πληθυσμούς ήταν η μεγάλη διακύμανση των επιπέδων της τριμεθυλιωμένης K9H3 μεταξύ των κυτάρων, με τους ΚΟ κλώνους να παρουσιάζουν αρκετά υψηλότερα επίπεδα της συγκεκριμένης τροποποίησης (εικόνα 35).

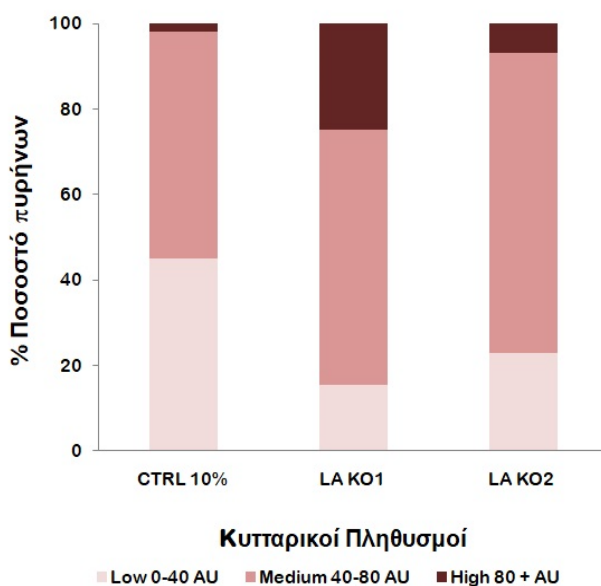


Εικόνα 35: Η κατανομή της 3meK9H3 μεταξύ των πληθυσμών LA KO1, LA KO2 και κυτάρων CTRL 10% (πράσινο: 3meK9H3, κόκκινο: TOPRO, scale bar: 10μm). Για κάθε κυτταρικό πληθυσμό, παρουσιάζεται οπτική τομή του ισημερινού επιπέδου και μέγιστη προβολή τομών από όλο το εμβαδόν του πυρήνα. Άσπρος αστερίσκος: χαμηλή ένταση φθορισμού 3meK9H3 (0-40AU), μπλε αστερίσκος: μέτρια ένταση φθορισμού 3meK9H3 (40-80AU), κόκκινος αστερίσκος: υψηλή ένταση φθορισμού 3meK9H3 (>80AU).

Με σκοπό την περαιτέρω ανάλυση, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της έντασης του σήματος φθορισμού από το σύνολο του πυρήνα, από την περιφέρειά του και από τις ετεροχρωματινικές εστίες, μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας. Επιπρόσθετα το σήμα του φθορισμού κατηγοριοποιήθηκε αναλόγως την περίπτωση, σε χαμηλής, μεσαίας και υψηλής έντασης.



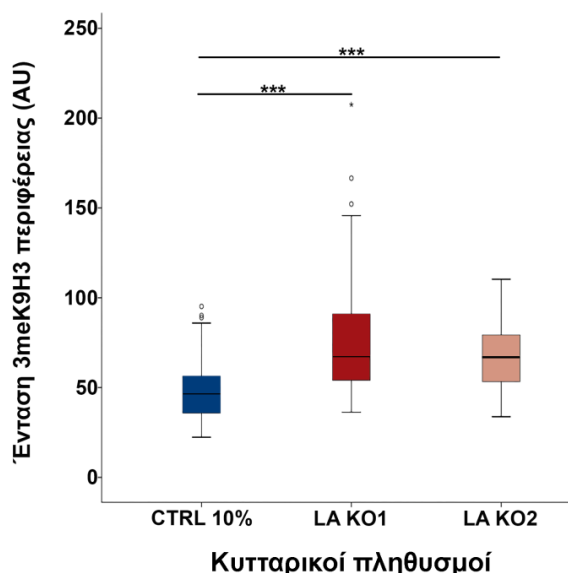
Εικόνα 36: Διάγραμμα box blot της έντασης του φθορισμού της 3meK9H3 όλου του πυρήνα σε αυθαίρετες μονάδες (Arbitrary Units, 0-250 AU). Συγκρίνονται οι κυτταρικοί πληθυσμοί LA KO1, LA KO2 και CTRL 10%.



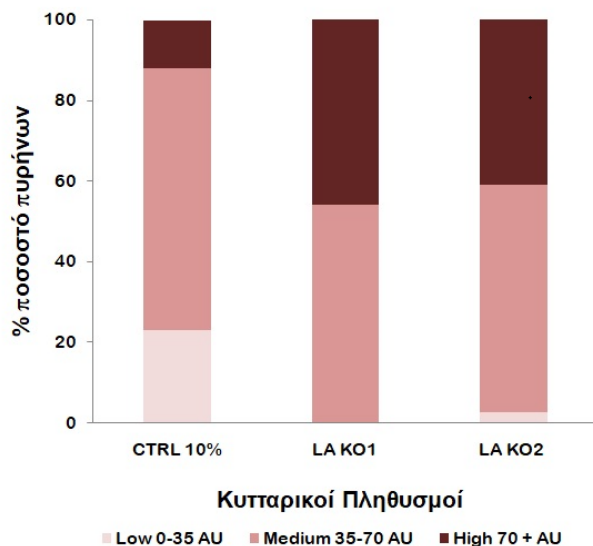
Εικόνα 37: Διάγραμμα με τα ποσοστά των πυρήνων μικρής έντασης (Low, 0-40AU), μεσαίας έντασης (Medium 40-80 AU) και υψηλής έντασης του φθορισμού (>80AU) της 3meK9H3 όλου του πυρήνα. Συγκρίνονται οι κυτταρικοί πληθυσμοί LA KO1, LA KO2 και CTRL 10%.

Όπως φαίνεται, επιβεβαιώθηκαν οι αρχικές παρατηρήσεις, πως και οι δύο κλώνοι εμφανίζουν αρκετά αυξημένα ποσοστά της συγκεκριμένης τροποποίησης. Αναλυτικότερα, για όλο τον πυρήνα τα κύτταρα CTRL 10% παρουσίασαν μέσο όρο έντασης φθορισμού 43.5 AU, ενώ ο LA KO1 64.4 AU και ο LA KO2 52.5 AU. Επιπλέον, στην κατηγοριοποίηση της έντασης του φθορισμού, το 45% των πυρήνων CTRL 10% εμφάνισαν χαμηλή ένταση, το 53% μεσαίας τάξης ένταση και μόλις το 2% υψηλή ένταση. Αντίθετα, στους κλώνους τα ποσοστά των πυρήνων χαμηλής έντασης φθορισμού μειώθηκαν σημαντικά, ενώ αυξήθηκαν τα αντίστοιχα ποσοστά μεσαίας έντασης και ιδιαίτερα αυτά υψηλής έντασης (εικόνα 36 & 37).

Οι παραπάνω μετρήσεις συμπεριλαμβάνουν και μη ετεροχρωματικές περιοχές με διάφορους βαθμούς χρωματικής συμπύκνωσης. Ωστόσο, οι περιοχές αυτές δεν μπορούν να αγνοηθούν εφόσον φέρουν την τροποποίηση της 3meK9H3, ωστόσο λόγω της μεταβλητότητάς τους οι μετρήσεις επικεντρώθηκαν περισσότερο στην ετεροχρωματίνη, που όπως φαίνεται και παρακάτω ήταν εμφανέστερη η αύξηση των επιπέδων της 3meK9H3 που παρουσίασαν οι ΚΟ κλώνοι.

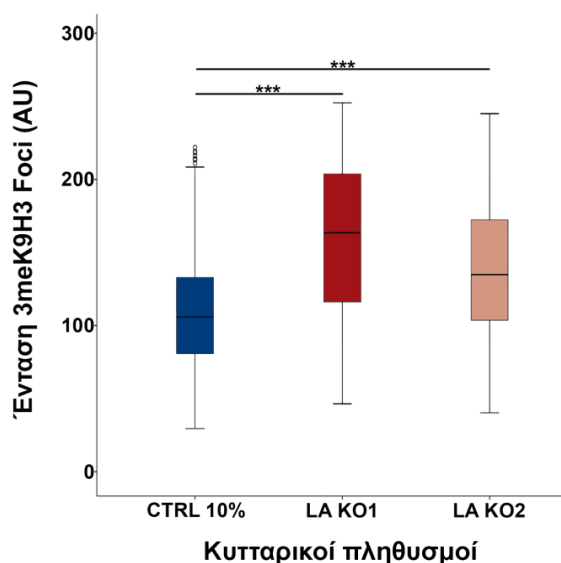


Εικόνα 38: Διάγραμμα box blot της έντασης του φθορισμού της 3meK9H3 της περιφέρειας του πυρήνα σε αυθαίρετες μονάδες (Arbitrary Units, 0-250 AU). Συγκρίνονται οι κυτταρικοί πληθυσμοί LA KO1, LA KO2 και CTRL 10%.

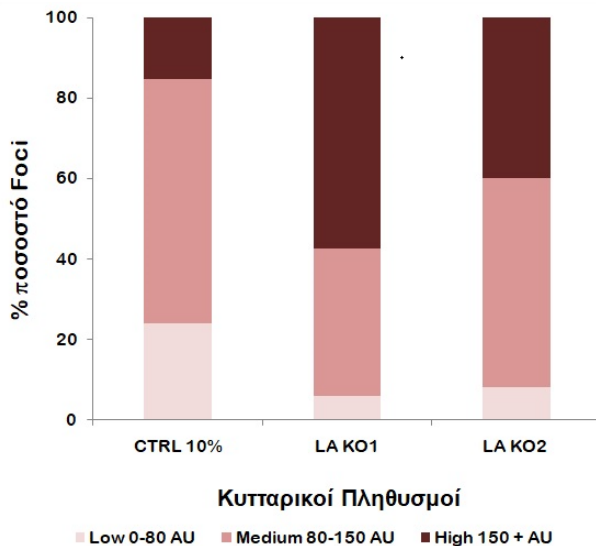


Εικόνα 39: Διάγραμμα με τα ποσοστά των πυρήνων μικρής έντασης (Low, 0-35AU), μεσαίας έντασης (Medium 35-70 AU) και υψηλής έντασης φθορισμού (>70AU) της 3meK9H3 της περιφέρειας του πυρήνα. Συγκρίνονται οι κυτταρικοί πληθυσμοί LA KO1, LA KO2 και CTRL 10%.

Σχετικά με την πυρηνική περιφέρεια, οι κλώνοι παρουσίασαν και εκεί αξιοσημείωτη αύξηση της τροποποίησης, με τον LA KO1 να αυξάνει την ένταση του φθορισμού κατά 56% και τον LA KO2 κατά 40%, συγκριτικά με τον μέσο όρο των CTRL 10% (εικόνα 38). Επιπλέον, οι πυρήνες των κλώνων με χαμηλά ποσοστά της 3meK9H3 σχεδόν μηδενίστηκαν, ενώ μικρή μείωση εμφάνισαν και οι πυρήνες με μεσαία ποσοστά της τροποποίησης. Αντίθετα, οι πυρήνες με υψηλά επίπεδα της 3meK9H3 αυξήθηκαν σημαντικά και κυμάνθηκαν στο 46% και 41% για τους κλώνους LA KO1 και LA KO2, συγκριτικά με το 12% που εμφάνισαν τα κύτταρα ελέγχου (εικόνα 39).

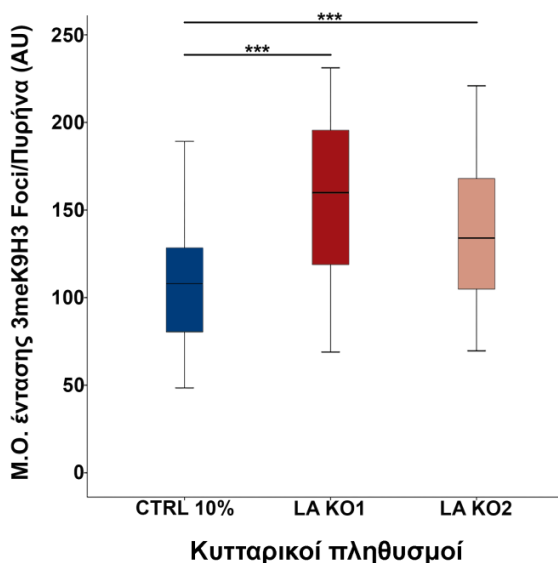


Εικόνα 40: Διάγραμμα box blot της έντασης του φθορισμού της 3meK9H3 των ετεροχρωματικών εστιών (foci) σε αυθαίρετες μονάδες (Arbitrary Units, 0-250 AU). Συγκρίνονται οι κυτταρικοί πληθυσμοί LA KO1, LA KO2 και CTRL 10%.



Εικόνα 41: Διάγραμμα με τα ποσοστά των ετεροχρωματινικών εστιών (foci) μικρής έντασης (Low, 0-80AU), μεσαίας έντασης (Medium 80-150 AU) και υψηλής έντασης φθορισμού (>150AU) της 3meK9H3. Συγκρίνονται οι κυτταρικοί πληθυσμοί LA KO1, LA KO2 και CTRL 10%.

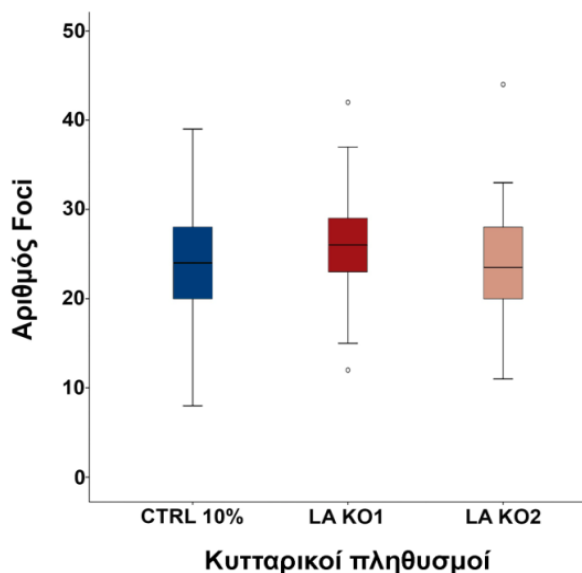
Τα αυξημένα επίπεδα της 3meK9H3 επιβεβαιώθηκαν και στην περίπτωση των ετεροχρωματινικών εστιών. Η διασπορά των τιμών της έντασης του φθορισμού ήταν μεγάλη και για τους τρεις πληθυσμούς, ενώ ο μέσος όρος για τον LA KO1 υπολογίστηκε στα 160 AU, για τον LA KO2 στα 139 AU και για τα κύτταρα CTRL 10% 109 AU (εικόνα 40). Επίσης, οι κλώνοι παρουσίασαν μειωμένα ποσοστά ετεροχρωματινικών εστιών με χαμηλά και μεσαία επίπεδα 3meK9H3, ενώ σημειώθηκε μεγάλη αύξηση στα αντίστοιχα ποσοστά υψηλών επιπέδων της 3meK9H3, παρόμοια με αυτή που καταγράφηκε στην περιφέρεια του πυρήνα (εικόνα 41).



Εικόνα 42: Διάγραμμα box blot της έντασης του φθορισμού της 3meK9H3 των ετεροχρωματινικών εστιών (foci) ανά πυρήνα σε αυθαίρετες μονάδες (Arbitrary Units, 0-250 AU). Συγκρίνονται οι κυτταρικοί πληθυσμοί LA KO1, LA KO2 και CTRL 10%.

Επιπλέον, υπολογίστηκε ο μέσος όρος έντασης φθορισμού των ετεροχρωματικών εστιών για κάθε πυρήνα και συγκρίθηκαν οι τιμές των πυρήνων μεταξύ των εξεταζόμενων κυτταρικών πληθυσμών. Να σημειωθεί πως τόσο η διασπορά των τιμών όσο και οι μέσοι όροι ήταν σχεδόν ίδιοι με αυτούς που παρουσίασαν οι ετεροχρωματικές εστίες στο διάγραμμα της εικόνας 41 (εικόνα 42). Το γεγονός αυτό σημαίνει πως τα ποσοστά της 3meK9H3 διαφοροποιήθηκαν διαπυρηνικά και όχι ενδοπυρηνικά και πως τα αυξημένα ποσοστά της μεθυλίωσης αφορούσαν το σύνολο των ετεροχρωματικών εστιών για κάθε πυρήνα.

Τέλος, στα πλαίσια μελέτης των επιπέδων της τριμεθυλιωμένης K9H3, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση του αριθμού των ετεροχρωματικών εστιών και δεν παρουσιάστηκε κάποια διαφοροποίηση μεταξύ των εξεταζόμενων κυτταρικών πληθυσμών (εικόνα 43). Να αναφερθεί πως οι αριθμοί των πυρήνων και ετεροχρωματικών εστιών που μετρήθηκαν, οι επαναλήψεις των πειραμάτων που έγιναν αλλά και τα στατιστικά τεστ που ακολουθήθηκαν αναφέρονται αναλυτικά στο παράρτημα (πίνακας 6.5 & 6.6).



Εικόνα 43: Διάγραμμα box blot του αριθμού των ετεροχρωματικών εστιών (foci) ανά πυρήνα. Συγκρίνονται οι κυτταρικοί πληθυσμοί LA KO1, LA KO2 και CTRL 10%.

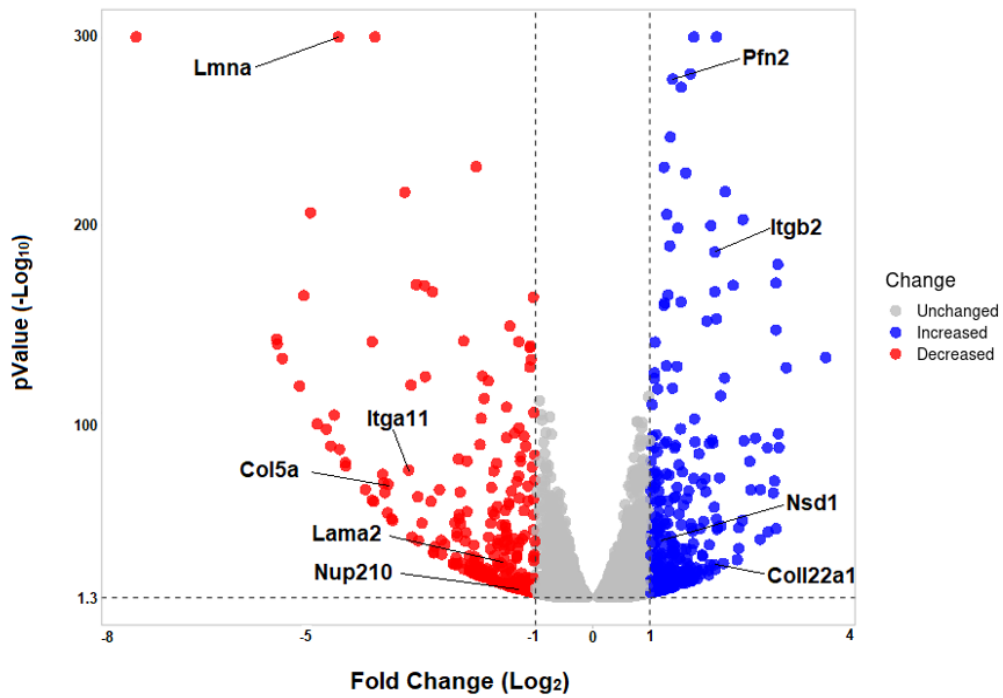
Συμπερασματικά, από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει πως οι KO κλώνοι εμφανίζουν την μεγαλύτερη αύξηση των ποσοστών της 3meK9H3 στην περιφέρεια του πυρήνα, ενώ έπεται αυτή των ετεροχρωματικών εστιών και τέλος ολόκληρου του πυρήνα. Επίσης, και στις τρεις περιπτώσεις την

μεγαλύτερη αύξηση εκδήλωσε ο LA KO1 κλώνος, ο οποίος εμφάνισε και αρκετά μεγάλη διασπορά στις τιμές της έντασης του φθορισμού. Να αναφερθεί πως οι μετρήσεις ήταν ανεξάρτητες του μεγέθους ή του αριθμού των ετεροχρωματινικών εστιών, καθώς μέσω του προγράμματος Fiji η μετρούμενη ένταση φθορισμού υπολογίζονταν ανά μονάδα επιφάνειας ROI (region of interest). Επομένως, η αυξημένη ένταση φθορισμού που παρουσιάζουν οι κλώνοι οφείλεται αποκλειστικά στην αυξημένη τριμεθυλίωση της K9H3.

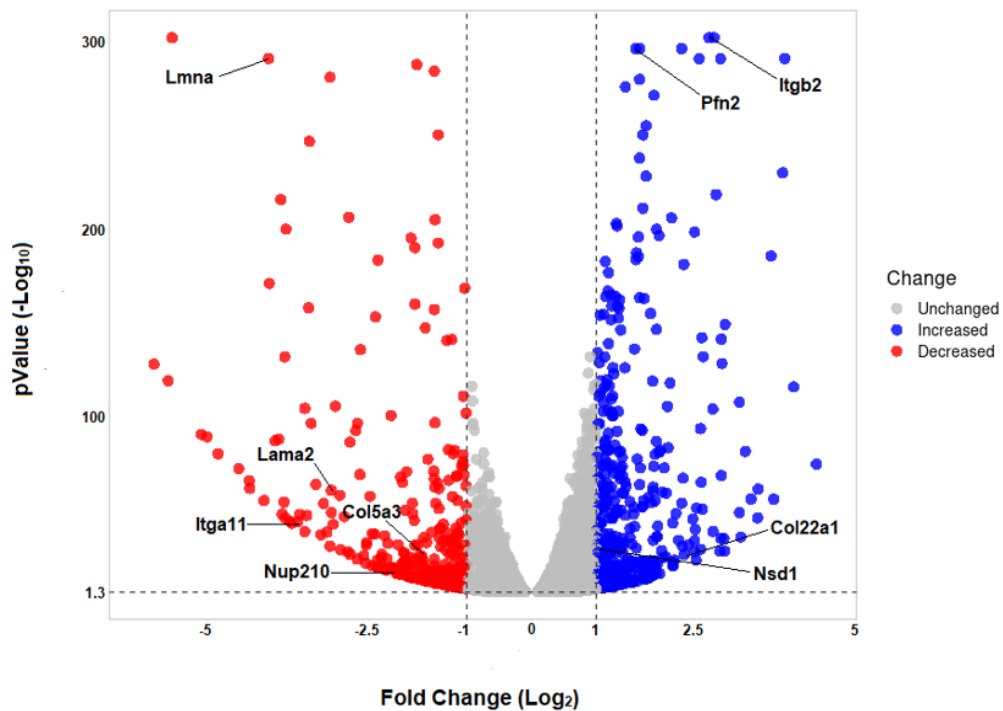
A4. Επιδράσεις της απαλοιφής στη γονιδιακή έκφραση

Προκειμένου να μελετηθεί η γονιδιακή έκφραση απουσία των λαμινών τύπου A πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση RNA (RNA Sequencing) μεταξύ των κυτταρικών πληθυσμών CTRL 10%, LA KO1 και LA KO2. Η σχετική έκφραση των γονιδίων ποσοτικοποιήθηκε σε λογαριθμική κλίμακα με βάση το 2 (Log_2FC) και ως όριο του λόγου της διαφορικής έκφρασης συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου (CTRL 10%) ορίστηκε η τιμή $|\text{Log}_2\text{FC}| \geq 1$, ενώ ως όριο στατιστικής σημαντικότητας η τιμή $p\text{-value} \leq 0.05$.

Στον κλώνο LA KO1 διαφοροποιήθηκε η έκφραση σε 707 γονίδια και στον LA KO2 σε 933 γονίδια. Τα γονίδια των οποίων άλλαξε η έκφραση και στους δύο knock out κλώνους ήταν 419, από τα οποία 219 γονίδια υπερεκφράστηκαν, 180 υποεκφράστηκαν, ενώ σε 23 γονίδια η μεταβολή ήταν αντίθετη. Παρακάτω στις εικόνες 44 και 45 παρουσιάζονται τα κοινά γονίδια μεταξύ των δύο κλώνων σε διάγραμμα volcano plot, σύμφωνα με τις τιμές $p\text{-value}$ και Log_2FC για το καθένα γονίδιο.



Εικόνα 44: Διάγραμμα volcano plot των κοινών γονιδίων μεταξύ των KO κλώνων και η κατανομή τους σύμφωνα με την έκφρασή τους στον κυτταρικό πληθυσμό LA KO1. Στον οριζόντιο άξονα αντιστοιχούν οι τιμές Log₂FC και στον κάθετο άξονα οι τιμές του αρνητικού δεκαδικού λογάριθμου των τιμών pvalue. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει ένα γονίδιο και με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια που υπερεκφράζονται στατιστικά σημαντικά και με κόκκινο τα αντίστοιχα που υποεκφράζονται ($|\log_2FC| \geq 1$ και $-\log_{10}pvalue \geq 1.3$).



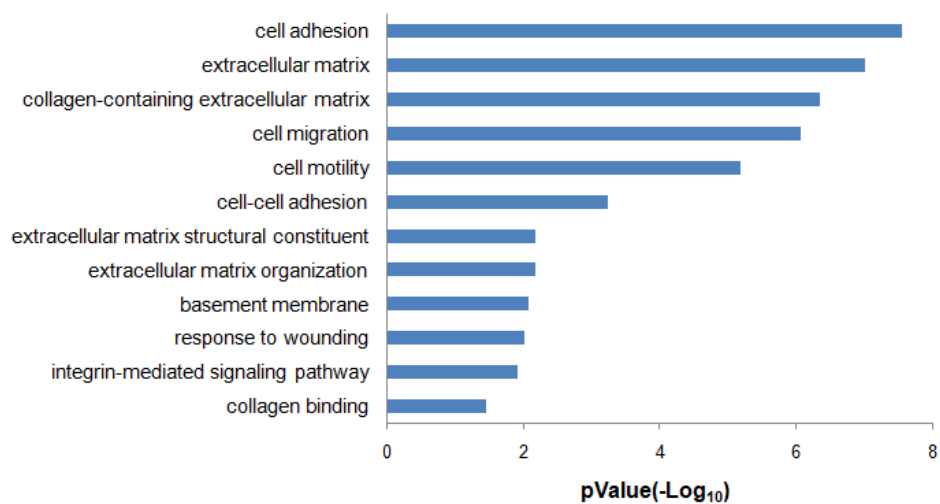
Εικόνα 45: Διάγραμμα volcano plot των κοινών γονιδίων μεταξύ των LA KO κλώνων και η κατανομή τους σύμφωνα με την έκφρασή τους στον κυτταρικό πληθυσμό LA KO2. Στον οριζόντιο άξονα αντιστοιχούν οι τιμές Log_2FC και στον κάθετο άξονα οι τιμές του αρνητικού δεκαδικού λογάριθμου των τιμών p value. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει ένα γονίδιο και με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια που υπερεκφράζονται στατιστικά σημαντικά και με κόκκινο τα αντίστοιχα που υποεκφράζονται ($|\text{log}_2\text{FC}| \geq 1$ και $-\text{log}_{10}p\text{value} \geq 1.3$).

Δεν σημειώθηκαν αλλαγές στην έκφραση πρωτεϊνών της πυρηνικής λάμινας ή παραγόντων του πυρηνικού φακέλου. Επίσης, δεν διαφοροποιήθηκαν ως προς τη μεταγραφική τους δραστηριότητα γονίδια που σχετίζονται άμεσα με την επιγενετική κατάσταση της χρωματίνης και τη δυναμική της, με εξαίρεση τις πρωτεΐνες Nur210 και Nsd1. Η πρώτη είναι μία από τις τρεις διαμεμβρανικές νουκλεοπορίνες των NPCs και της οποίας μειώθηκε η έκφραση στους KO κλώνους (Greber et al., 1990). Αντίθετα, η Nsd1 (Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1) που υπερεκφράστηκε ανήκει σε μία μεγάλη οικογένεια μεθυλοτρανσφερασών των θηλαστικών και πιθανώς καταλύει την μονο- και διμεθυλίωση της K36H3, με μηχανισμό που δεν είναι γνωστός προς το παρόν (Wagner et al., 2012).

Πέραν των παραπάνω, μεταβολή στην έκφρασή τους παρουσίασε πλήθος γονιδίων σχετικών με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, καθώς και την κυτταρική προσκόλληση και κίνηση. Στις εικόνες 44 και 45 σημειώνεται το γονίδιο mLMNA που αποτέλεσε στόχος απαλοιφής και ενδεικτικά μερικά γονίδια κολλαγόνων και λαμινίνης (Col5a3, Col22a1, Lama2), βασικών συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας. Επιπλέον αναφέρονται και γονίδια ιντεγκρινών (Itga11, Itgb2) που αποτελούν σημαντικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες προσκόλλησης. Να σημειωθεί πως αύξηση στην έκφρασή της παρουσίασε η πρωτεΐνη profilin2 (Pfn2) η οποία αλληλεπιδρά με διάφορους υποτύπους της ακτίνης και διευκολύνει την συναρμολόγησή της στην διάρκεια της κυτταρικής μετανάστευσης (Mouneimne et al., 2012).

Για τα κοινά γονίδια των LA KO κλώνων πραγματοποιήθηκε ανάλυση γονιδιακής οντολογίας (Gene Ontology, GO), από την οποία προέκυψαν κατηγορίες γονιδίων σχετικές με την σύσταση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, τις διακυτταρικές συνδέσεις, την κυτταρική προσκόλληση και κινητικότητα (εικόνα 46). Υπενθυμίζεται πως τα κύτταρα των LA KO πληθυσμών είναι εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού. Τα κύτταρα αυτά έχουν την

ικανότητα μετακίνησης και αποτελούν τον κύριο τύπο κυττάρου του συνδετικού ιστού με βασική λειτουργία την σύνθεση της θεμέλιας ουσίας και του δομικού στρώματος των ιστών, ενώ συμμετέχουν και στην επούλωση πληγών.

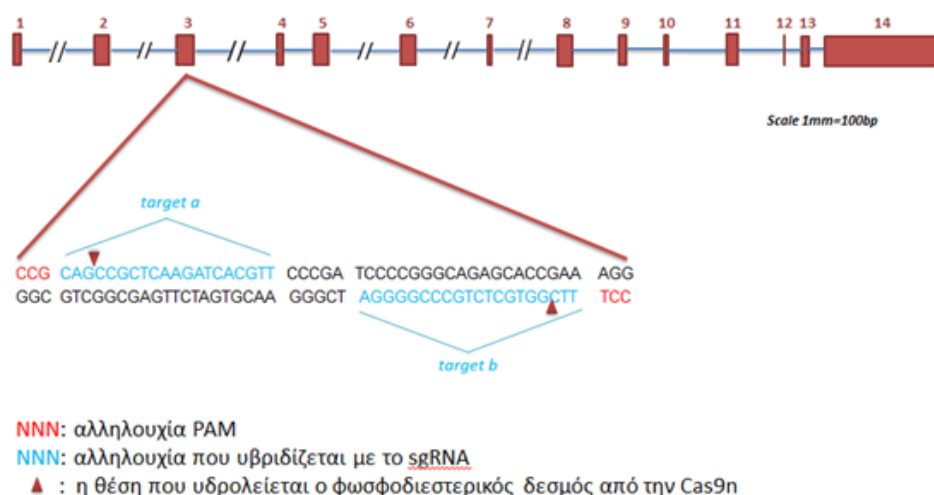


Εικόνα 46: Διάγραμμα με μερικές επιλεγμένες κατηγορίες όπου υπάρχει στατιστικά σημαντικός εμπλουτισμός των κοινών γονιδίων μεταξύ των LA KO κλώνων. Στον κάθετο άξονα αναφέρονται οι κατηγορίες και στον οριζόντιο άξονα οι τιμές του αρνητικού δεκαδικού λογάριθμου του pValue.

Μέρος B: Μελέτη της απαλοιφής του γονιδίου mLBR

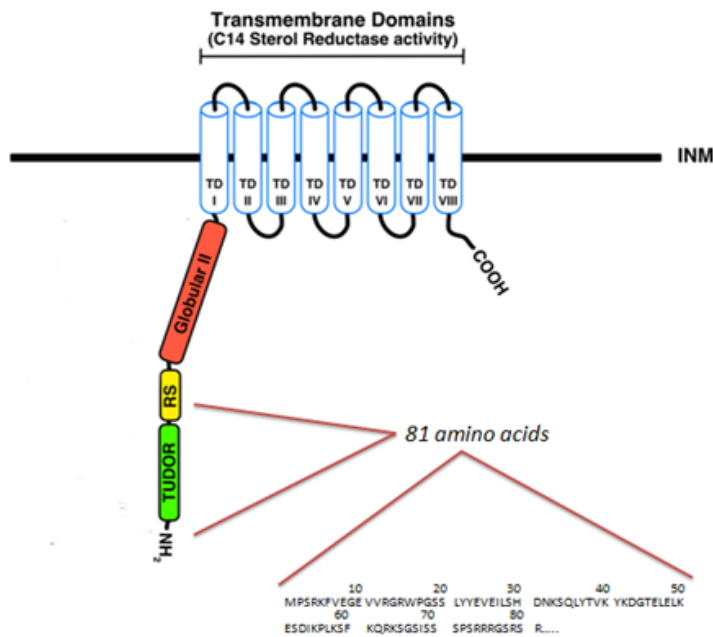
B1. Απαλοιφή του γονιδίου mLBR

Όμοια, όπως και στην περίπτωση του γονιδίου mLNA, σε κύτταρα NIH στοχεύθηκε το γονίδιο του υποδοχέα της λαμίνης B για την πλήρη απαλοιφή του μέσω του CRISPR/Cas9n. Το συγκεκριμένο γονίδιο εδράζεται στο χρωμόσωμα 1 του ποντικού και τα gRNAs που δημιουργήθηκαν ήταν συμπληρωματικά για αλληλουχίες εντός του εξωνίου 3 (εικόνα 47). Η περιοχή μεταλλαξιγένεσης σε επίπεδο πρωτεΐνης αντιστοιχεί εντός του RS τμήματος (εικόνα 48).



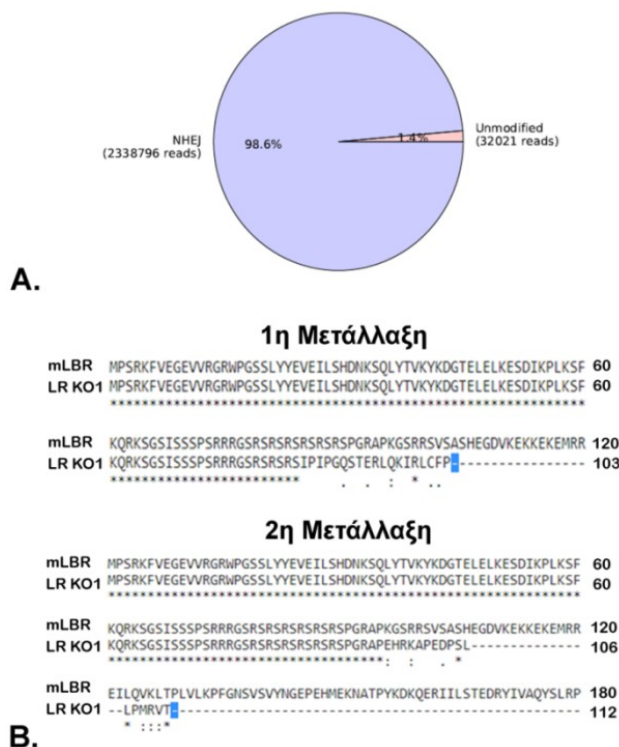
Εικόνα 47: Απεικόνιση του γονιδιακού τόπου και των εξωνίων του mLBR και οι αλληλουχίες που επιλέχθηκαν να στοχευθούν από το σύστημα CRISPR/Cas9n, ID: ENSMUSG0000004880.11, Πηγή: Ensemble, Γονιδιακός τόπος: χρωμόσωμα 1: 181,815,335-181,843,046.

Πρέπει να αναφερθεί πως στην διάρκεια κατασκευής της σταθερής σειράς (παράγραφος 2.1.4), οι εξεταζόμενοι κλώνοι παρουσίασαν αδυναμία στον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους και για αυτό αυξήθηκε η συγκέντρωση του ορού στο θρεπτικό μέσο στα 15%v/v. Σταδιακά επανήλθε το αναπτυξιακό δυναμικό και η νέα αυτή συνθήκη καθιερώθηκε στους κλώνους της LR KO σειράς, ενώ παράλληλα καλλιεργήθηκαν και κύτταρα NIH WT στις ίδιες συνθήκες (CTRL 15%). Στους κλώνους που επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη πραγματοποιήθηκε γονοτυπική ανάλυση για την αναγνώριση της εκάστοτε μετάλλαξης, μέσω “amplicon sequencing”.

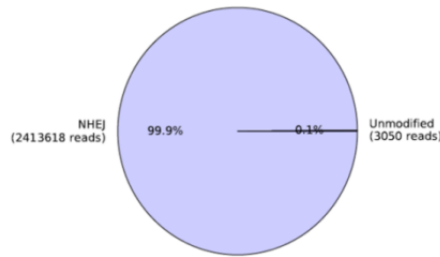


Εικόνα 48: Απεικόνιση των αμινοξικών τμημάτων του LBR. Παρουσιάζεται η προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία μετά την παρέμβαση του συστήματος CRISPR/Cas9n (τροποποιημένη εικόνα από Nikolakaki et al., 2017).

Για τον LR KO1 πληθυσμό προέκυψαν αγρίου τύπου αλληλουχίες στο σημείο στόχευσης του mLBR γονιδίου, ωστόσο θεωρήθηκαν αμελητέες. Επιπλέον προέκυψαν δύο βασικές μεταλλάξεις, των οποίων οι αμινοξικές αλληλουχίες είχαν μήκος 103 και 112 αμινοξέα, με το κωδικόνιο λήξης να προκύπτει κάθε φορά στην αρχή του “second globular domain” (εικόνα 49 & 48).



Εικόνα 49: Α) Γράφημα πίτας με τον αριθμό και τα αντίστοιχα ποσοστά των αλληλουχιών του γονιδίου mLBR που τροποποιήθηκαν από το CRISPR/Cas9n αλλά και των αλληλουχιών αγρίου τύπου (unmodified) για τον κλώνο LR KO1. Β) Οι αμινοξικές αλληλουχίες των δύο κύριων μεταλλάξεων που φέρει το γονίδιο mLBR του κλώνου LR KO1, όπως αυτές προέκυψαν από το amplicon sequencing.



A.

1η Μετάλλαξη

mLBR MPSRK FVEGEVVRGRWPGSSLYYEVEILSHDNKSQLYTVKYKDGTELELKESDIXPLKSF 60
 LR KO2 MPSRK FVEGEVVRGRWPGSSLYYEVEILSHDNKSQLYTVKYKDGTELELKESDIXPLKSF 60

mLBR KQRKSGSISSSPSRRRGRSRSRSRSRSPGRAPKGSRRSVASHEGDVKEKKEKEMRR 120
 LR KO2 KQRKSGSISSSPSRRRGRSRSRTPFIPGQSTERLQKIRLCPF 103

2η Μετάλλαξη

mLBR MPSRK FVEGEVVRGRWPGSSLYYEVEILSHDNKSQLYTVKYKDGTELELKESDIXPLKSF 60
 LR KO2 MPSRK FVEGEVVRGRWPGSSLYYEVEILSHDNKSQLYTVKYKDGTELELKESDIXPLKSF 60

mLBR KQRKSGSISSSPSRRRGRSRSRSRSRSPGRAPKGSRRSVASHEGDVKEKKEKEMRR 120
 LR KO2 KQRKSGSISSSPSRRRGRSRLQKIRLCPF 90

3η Μετάλλαξη

mLBR MPSRK FVEGEVVRGRWPGSSLYYEVEILSHDNKSQLYTVKYKDGTELELKESDIXPLKSF 60
 LR KO2 MPSRK FVEGEVVRGRWPGSSLYYEVEILSHDNKSQLYTVKYKDGTELELKESDIXPLKSF 60

mLBR KQRKSGSISSSPSRRRGRSRSRSRSRSPGRAPKGSRRSVASHEGDVKEKKEKEMRR 120
 LR KO2 KQRKSGSISSSPSRRRGRSRSRSPV-----LPGQSTERLQK-IRLCPF 100

4η Μετάλλαξη

mLBR MPSRK FVEGEVVRGRWPGSSLYYEVEILSHDNKSQLYTVKYKDGTELELKESDIXPLKSF 60
 LR KO2 MPSRK FVEGEVVRGRWPGSSLYYEVEILSHDNKSQLYTVKYKDGTELELKESDIXPLKSF 60

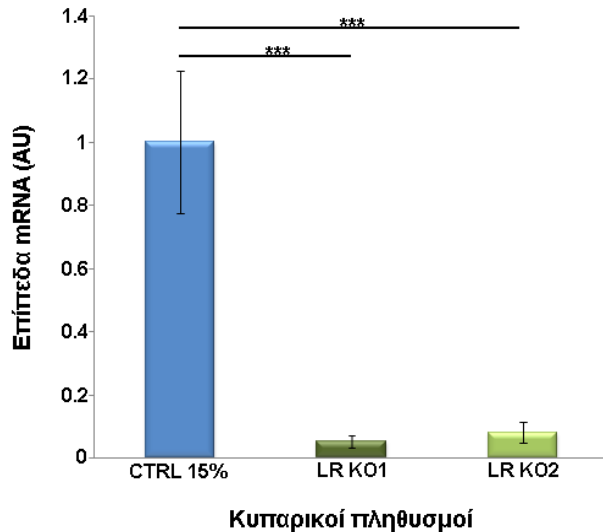
mLBR KQRKSGSISSSPSRRRGRSRSRSRSRSPGRAPKGSRRSVASHEGDVKEKKEKEMRR 120
 LR KO2 KQRKSGSISSSPSRRRGRSRSRSRSPGHRKAPEDPSLLPHRV 108

B.

Εικόνα 50: Α) Γράφημα πίτας με τον αριθμό και τα αντίστοιχα ποσοστά των αλληλουχιών του γονιδίου mLBR που τροποποιήθηκαν από το CRISPR/Cas9n αλλά και των αλληλουχιών αγρίου τύπου (unmodified) για τον κλώνο LR KO2. Β) Οι αμινοξικές αλληλουχίες των τεσσάρων κύριων μεταλλάξεων που φέρει το γονίδιο mLBR του κλώνου LR KO2, όπως αυτές προέκυψαν από το amplicon sequencing.

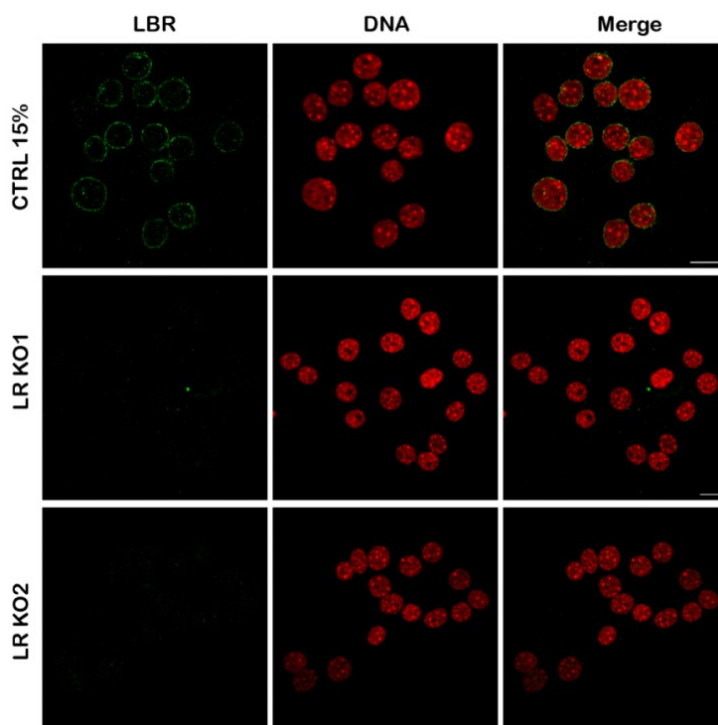
Σχετικά με τον δεύτερο κλώνο (LR KO2), από την ανάλυση προέκυψαν τέσσερις διαφορετικές μεταλλάξεις με παρόμοια ποσοστά, που πιθανώς να αναφέρονταν στα τέσσερα αλληλόμορφα του χρωμοσώματος 1 που έφερε το αρχικό κύτταρο του πληθυσμού. Οι αντίστοιχες αμινοξικές αλληλουχίες είχαν μήκος 103, 90, 100 και 108 αμινοξέα, με την πρωτεϊνική σύνθεση να διακόπτεται είτε στο τέλος του RS τμήματος είτε στην αρχή του “second globular domain” (εικόνα 50).

Ακολούθησε έλεγχος των επιπέδων του mRNA του γονιδίου mLBR μέσω Real Time qPCR μεταξύ των κλώνων και κυττάρων CTRL 15%. Όπως αναμένονταν, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στους knock out κλώνους, με την έκφραση του LR KO1 να μειώνεται στο 5%, ενώ του LR KO2 στο 8%, συγκριτικά με τα επίπεδα mRNA των κυττάρων ελέγχου, όπου λόγω σχετικής ποσοτικοποίησης ορίστηκαν στη μονάδα (εικόνα 51).



Εικόνα 51: Τα σχετικά επίπεδα mRNA του γονιδίου mLRB μεταξύ των πληθυσμών CTRL 15%, LR KO1 και LR KO2 (απεικονίζεται το τυπικό σφάλμα σε κάθε περίπτωση).

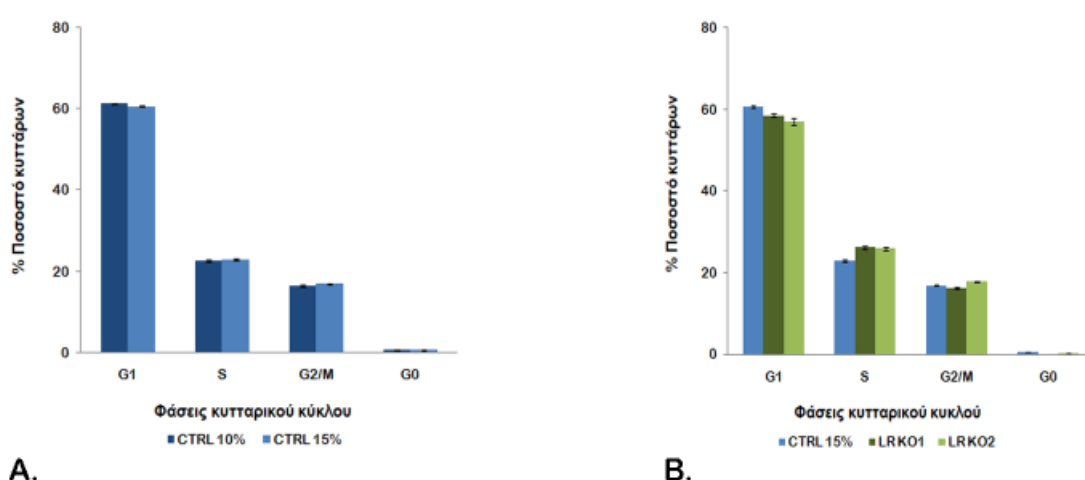
Ολοκληρώνοντας τη μελέτη της γονιδιακής απαλοιφής, ταυτοποιήθηκε η απουσία του LBR μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας. Και οι δύο κλώνοι δεν εμφάνισαν κάποιο σήμα έναντι της πρωτεΐνης του LBR, σε αντίθεση με τα κύτταρα CTRL 15%, όπου παρατηρήθηκε η αναμενόμενη περιφερική κατανομή (εικόνα 52). Η συγκεκριμένη παρατήρηση, συνηγορεί μαζί με όλα τα παραπάνω, ότι στους κλώνους LR KO1 και LR KO2 έχει πραγματοποιηθεί πλήρης απαλοιφή του LBR.



Εικόνα 52: Η κατανομή της πρωτεΐνης LBR μεταξύ των πληθυσμών CTRL 15%, LR KO1 και LR KO2 (πράσινο: LBR, κόκκινο: TOPRO, scale bar: 10μm).

B.2 Συνέπειες της απαλοιφής στο αναπτυξιακό δυναμικό

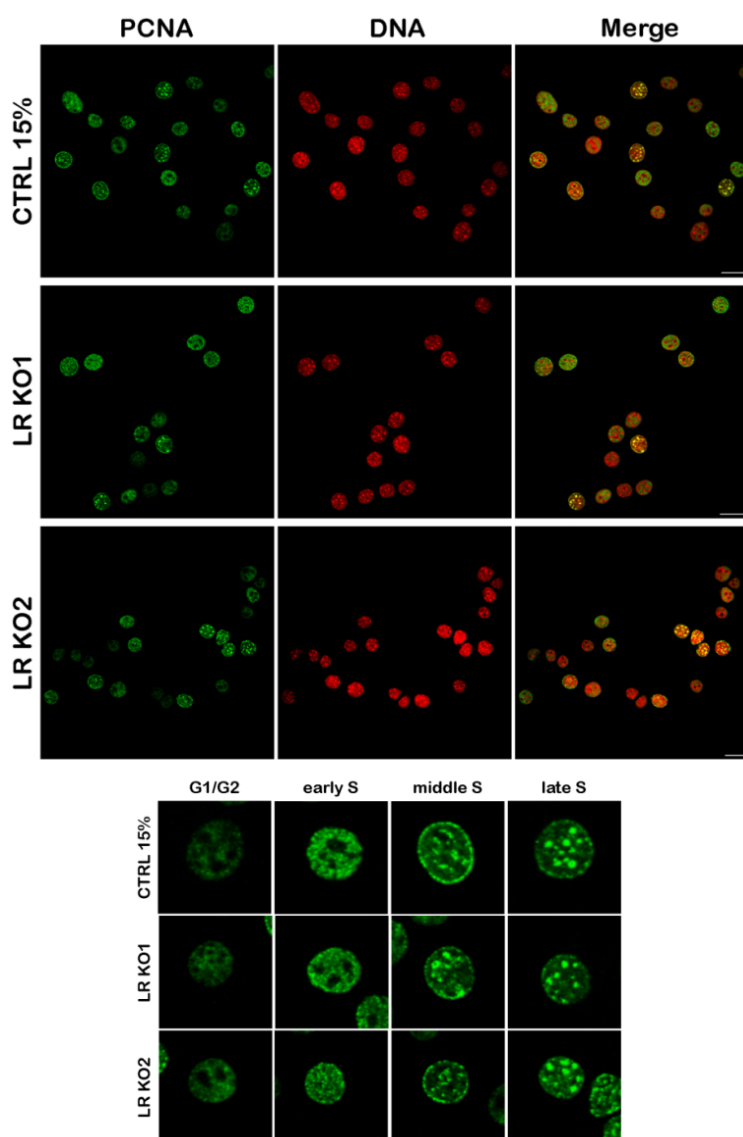
Στο συγκεκριμένο στάδιο της μελέτης αναλύθηκαν τα κύτταρα απουσία του LBR σχετικά με την ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται, καθώς είναι γνωστό πως ο LBR συμμετέχει στην μίτωση και συγκεκριμένα στην ανασυγκρότηση του πυρηνικού φακέλου (Lu et al., 2010). Μέσω κυτταρομετρίας ροής μελετήθηκαν οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου, ενώ υπολογίστηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού αλλά και το ποσοστό των μιτωτικών κυττάρων.



Εικόνα 53: A) Τα ποσοστά των κυττάρων ελέγχου CTRL 10% και CTRL 15% στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου όπως προέκυψαν από την κυτταρομετρία ροής. B) Τα ποσοστά των κυττάρων της LR KO σειράς και κυττάρων CTRL 15% στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου όπως προέκυψαν από την κυτταρομετρία ροής. Απεικονίζεται το τυπικό σφάλμα σε κάθε περίπτωση.

Αρχικά συγκρίθηκαν τα κύτταρα NIH WT παρουσία 10% και 15% ορού, όπου δεν σημειώθηκε κάποια διαφορά, δείχνοντας πως η αλλαγή στην συγκέντρωση των αυξητικών παραγόντων δεν επέφερε κάποια μεταβολή στον κυτταρικό κύκλο (εικόνα 53A). Πιθανώς η παρουσία 10% ορού να αρκεί ώστε τα κύτταρα να φτάσουν το ανώτερο του πολλαπλασιαστικού δυναμικού τους. Οι LR KO κλώνοι εμφάνισαν μία παρόμοια μεταβολή συγκρινόμενοι με κύτταρα CTRL 15% στις φάσεις G1 και S, όπου στην πρώτη παρουσίασαν μία μείωση γύρω στο 3% και στη δεύτερη μία αύξηση του ίδιου ποσοστού (εικόνα 53B). Παρόλο που οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, επειδή η μεταβολή ήταν επαναλαμβανόμενη μελετήθηκε περαιτέρω η φάση S για πιθανές ατυπίες στην διαδικασία αντιγραφής του DNA, ειδικότερα της

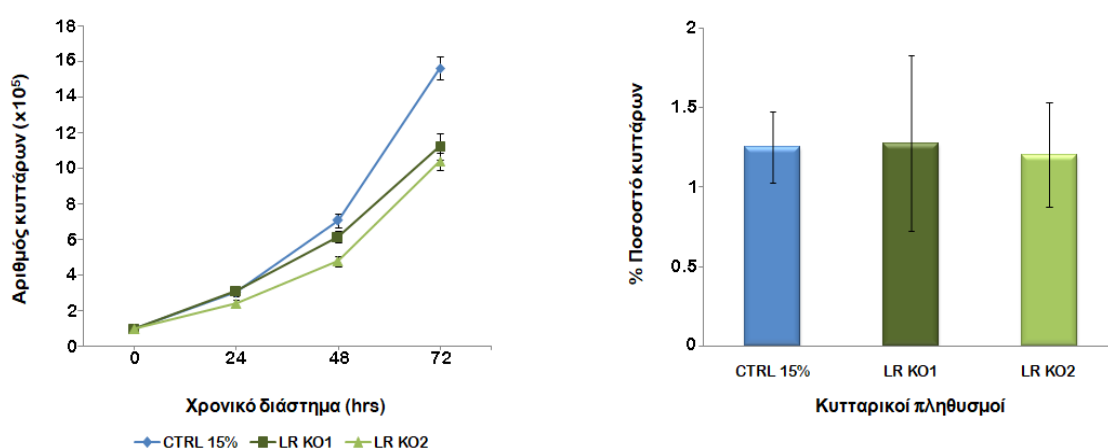
ετεροχρωματίνης που αντιγράφεται στην περιφέρεια του πυρήνα. Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης PCNA (πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων) και μέσω ανοσοφθορισμού αναλύθηκαν μορφολογικά τα στάδια της φάσης S. Ωστόσο, όπως διακρίνεται στην εικόνα 54 δεν παρατηρήθηκε κάποια ατυπία στο χωροχρονικό πρότυπο κατανομής του PCNA.



Εικόνα 54: Επάνω panel: Η κατανομή του PCNA σε μεσοφασικά κύτταρα των πληθυσμών LR KO1, LR KO2 και CTRL 15%. Κάτω panel: Η κατανομή του PCNA στα στάδια της φάσης S μεταξύ των LR KO1, LR KO2 και CTRL 15%. (πράσινο: PCNA, κόκκινο: TOPRO, scale bar: 20μm).

Στην συνέχεια της μελέτης του κυτταρικού κύκλου, κατασκευάστηκε η καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων για χρονική διάρκεια 72 ωρών και υπολογίστηκε ο μιτωτικός τους δείκτης. Σχετικά με τον ρυθμό ανάπτυξης, οι

κλώνοι παρουσίασαν μία άξιας αναφοράς μείωση, η οποία ήταν στατιστικώς σημαντική και για τους δύο κλώνους στις 72 ώρες (εικόνα 55A). Παράλληλα, οι μιτωτικοί τους δείκτες δεν διαφοροποιήθηκαν (εικόνα 55B), ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια ατυπία της μιτωτικής ατράκτου σύμφωνα με το πρότυπο κατανομής της α Tubulin (δεδομένα δεν παρουσιάζονται).



A.

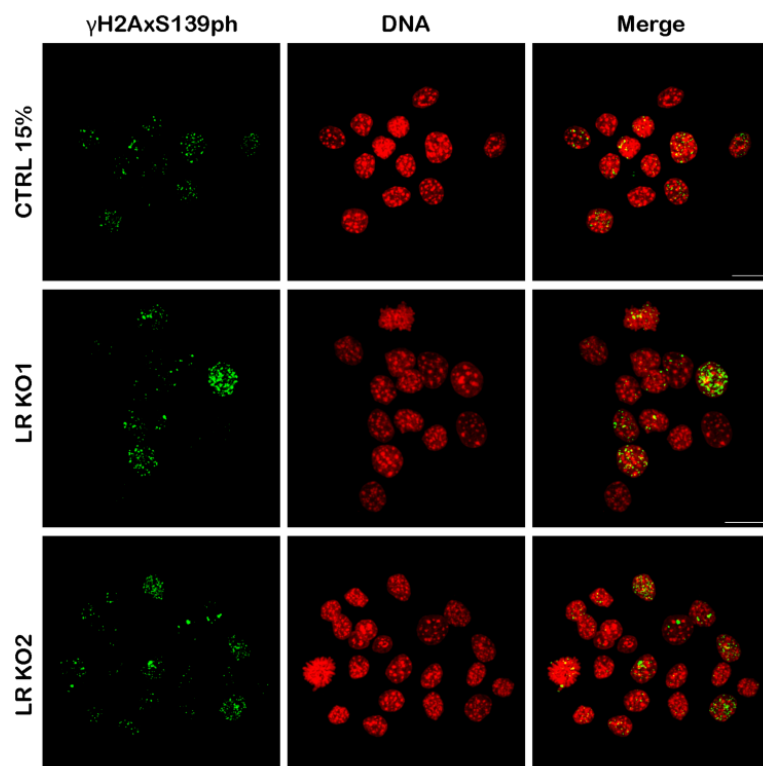
B.

Εικόνα 55: A) Η καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων της LR KO σειράς και κυττάρων CTRL 15% όπως καταγράφηκε στις 24, 48 και 72 ώρες. Εμφανίζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά στις 72 ώρες και για τους δύο κλώνους. B) Το ποσοστό των μιτωτικών κυττάρων μεταξύ των πληθυσμών της LR KO σειράς και κυττάρων CTRL 15%. Απεικονίζεται το τυπικό σφάλμα σε κάθε περίπτωση. Οι αριθμοί των κυττάρων που καταμετρήθηκαν, οι επαναλήψεις των πειραμάτων και τα στατιστικά τεστ που ακολουθήθηκαν αναφέρονται στο παράρτημα (πίνακες 6.7 - 6.10).

Αν και στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά αυξήθηκε η συγκέντρωση του ορού στο θρεπτικό μέσο, οι επιλεγμένοι κλώνοι παρουσίασαν μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης, χωρίς όμως να επιβεβαιώνεται κάποια καθυστέρηση στη φάση της μίτωσης λόγω έλλειψης του LBR. Για τον λόγο αυτό εξετάστηκαν ως πιθανό αίτιο οι βλάβες του DNA. Στο πλαίσιο αυτό πραγματοποιήθηκε ανοσολογική ανίχνευση της τροποποίησης γH2AxS139ph και δεν σημειώθηκαν ουσιαστικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των κυτταρικών πληθυσμών (εικόνα 56).

Ωστόσο, το μειωμένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό μπορεί να οφείλεται σε κάποιο στάδιο της μεσόφασης, όπως στην φάση S που αναλύθηκε παραπάνω. Να σημειωθεί πως στα πειράματα μελέτης του αναπτυξιακού

δυναμικού τα κύτταρα δεν είναι συγχρονισμένα. Άρα, η μικρή καθυστέρηση που εμφανίζουν οι κλώνοι στην φάση S μπορεί να συσσωρεύεται μεταξύ των κύκλων διαίρεσης και μετά από 72 ώρες (3 κύκλοι διαίρεσης) να γίνεται εμφανής στον ρυθμό πολλαπλασιασμού. Επίσης, η καθυστέρηση της φάσης S που πιθανώς να ήταν μεγαλύτερη αν επανέρχονταν ο ορός του θρεπτικού μέσου στο 10%.

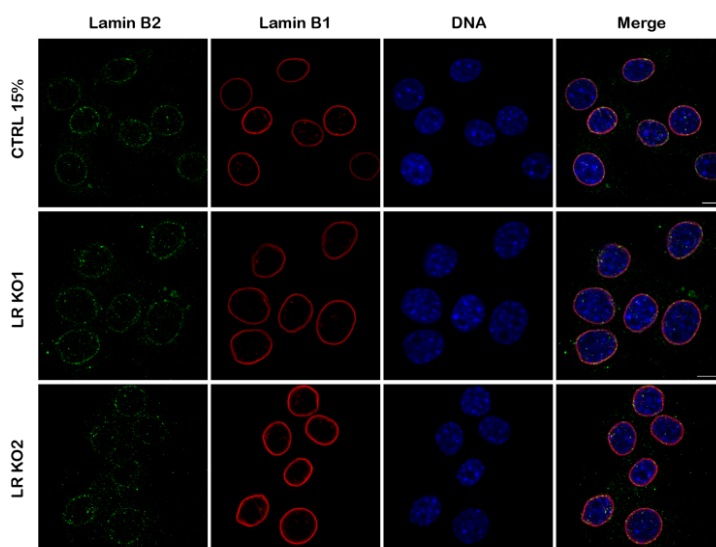


Εικόνα 56: Η ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης H2Ax ιστόνης μεταξύ των πληθυσμών LR KO1, LR KO2 και κυττάρων CTRL 15% (πράσινο: γH2AxS139ph, κόκκινο: TOPRO, scale bar: 15μm).

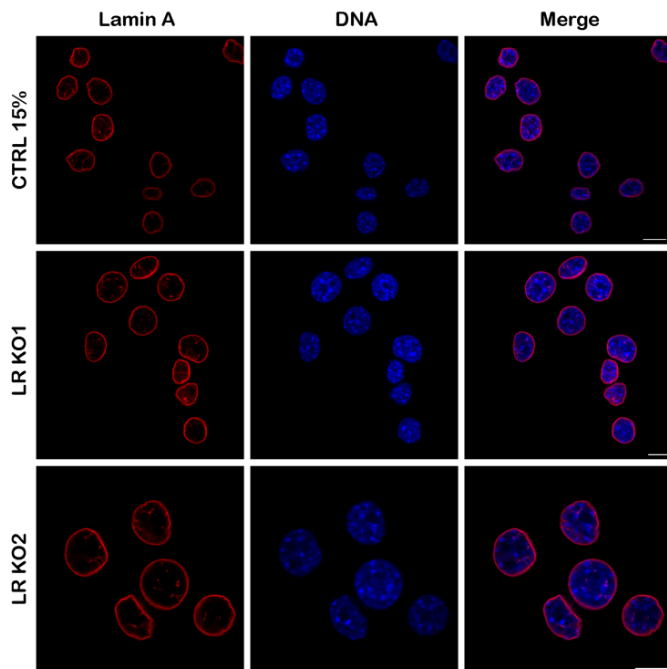
B3. Μορφολογική Ανάλυση

Οι ίδιοι παράγοντες που μελετήθηκαν μορφολογικά στους LA KO κλώνους ελέγχθηκαν και στην περίπτωση της LR KO κυτταρικής σειράς, όπως πρωτεΐνες της πυρηνικής περιφέρειας και χαρακτηριστικά της χρωματινικής δομής που πιθανώς να επηρεάστηκαν από την απαλοιφή του LBR. Αρχικά, διερευνήθηκε η συνοχή της πυρηνικής λάμινας χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των Lamin B1, Lamin B2 και Lamin A. Όπως φαίνεται παρακάτω δεν σημειώθηκε κάποια μεταβολή στο δίκτυο ινιδίων της Lamin A στην περιφέρεια του πυρήνα, ενώ δεν φάνηκε να επηρεάζεται και η κατανομή των λαμινών τύπου B, που αποτελούν τον κύριο

παράγοντα καθήλωσης του LBR στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη (εικόνα 57 & 58).



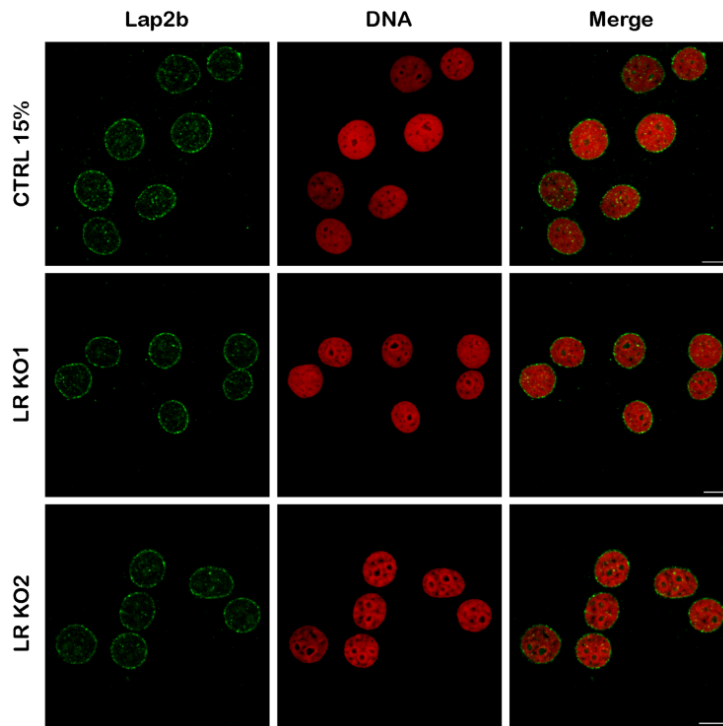
Εικόνα 57: Το πρότυπο κατανομής των Lamin B2 και Lamin B1 μεταξύ των πληθυσμών LR KO1, LR KO2 και κυττάρων CTRL 15% (πράσινο: Lamin B2, κόκκινο: Lamin B1, μπλε: TOPRO, scale bar: 8μm).



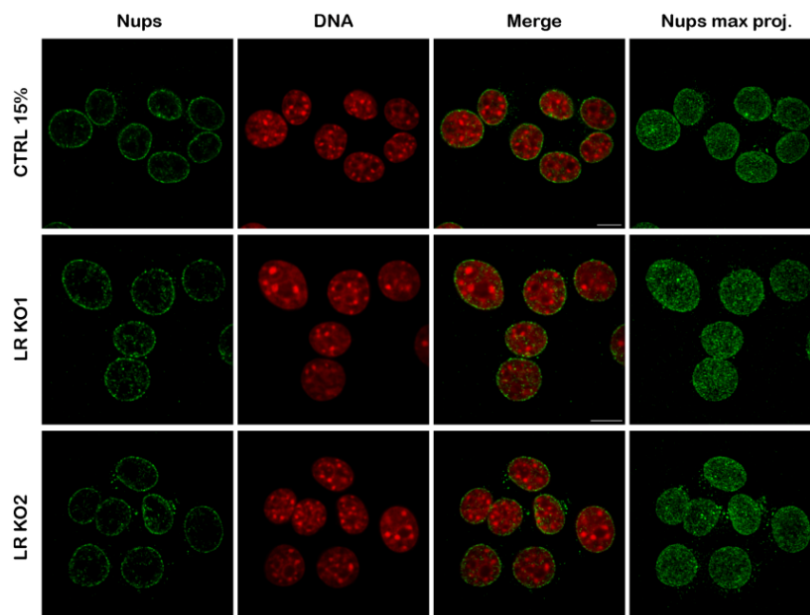
Εικόνα 58: Το πρότυπο κατανομής της Lamin A μεταξύ των πληθυσμών LR KO1, LR KO2 και κυττάρων CTRL 15% (κόκκινο: Lamin A, μπλε: TOPRO, scale bar: 10μm).

Ελέγχθηκαν ακόμα η Lap2b και τα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων. Παρατηρώντας οπτικές τομές όλου του πυρήνα δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφοροποίηση μεταξύ των κλώνων και των κυττάρων ελέγχου, ενώ

παρέμεινε ίδιος ο εντοπισμός των Nups, παρότι την απουσία του LBR (εικόνα 59 & 60).

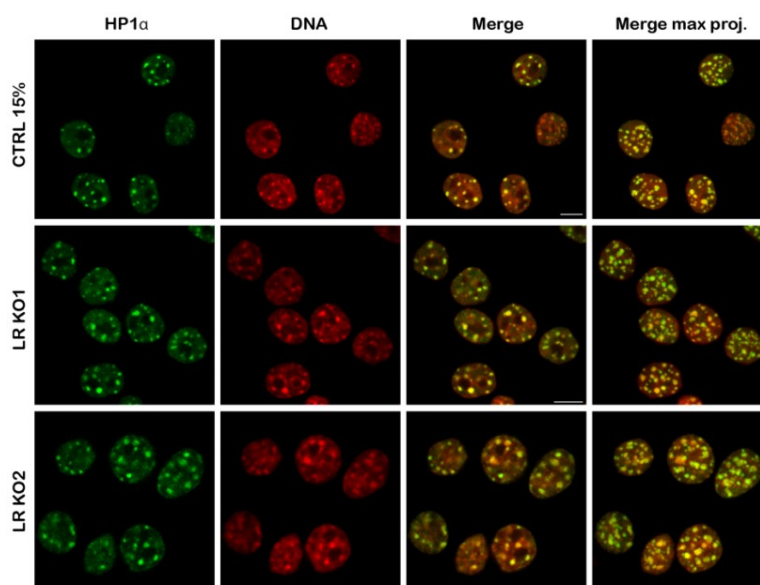


Εικόνα 59: Το πρότυπο κατανομής της Lap2b μεταξύ των πληθυσμών LR KO1, LR KO2 και κυτάρων CTRL 15% (πράσινο: Lap2b, κόκκινο: PI, scale bar: 8).

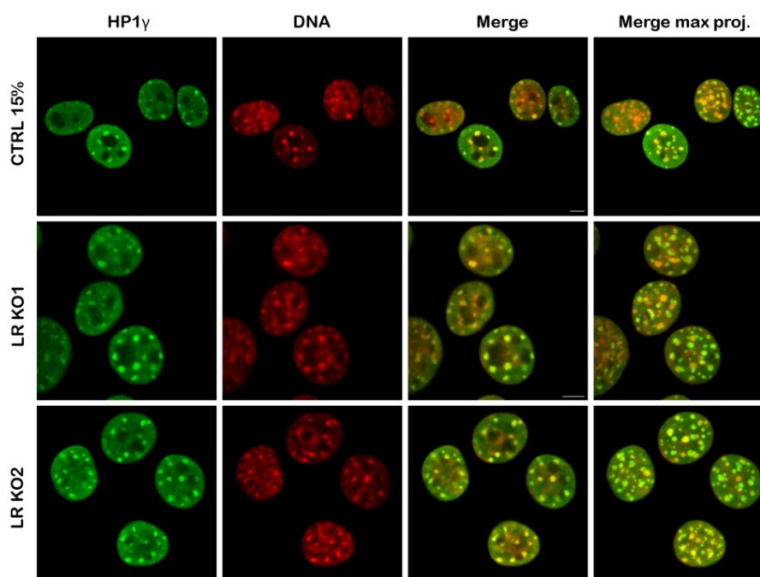


Εικόνα 60: Το πρότυπο κατανομής του συμπλέγματος των πυρηνικών πόρων από οπτική τομή στο ισημερινό επίπεδο και από μέγιστη προβολή μεταξύ των πληθυσμών LR KO1, LR KO2 και κυτάρων CTRL 15% (πράσινο: Nups, κόκκινο: TOPRO, scale bar: 8μm).

Στο τελευταίο μέρος, μελετήθηκε η χρωματίνη με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών HP1α και HP1γ, αλλά και των επιγενετικών τροποποιήσεων 3meK9H3 και 3meK4H3. Υπενθυμίζεται πως ο LBR αλληλεπιδρά έμμεσα με την HP1 αλλά και με μεθυλιωμένες νησίδες CpG του DNA μέσω της MeCP2. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε κάποια ανωμαλία στο πρότυπο κατανομής των HP1α και γ στους πυρήνες των LR KO κλώνων (εικόνα 61 & 62).

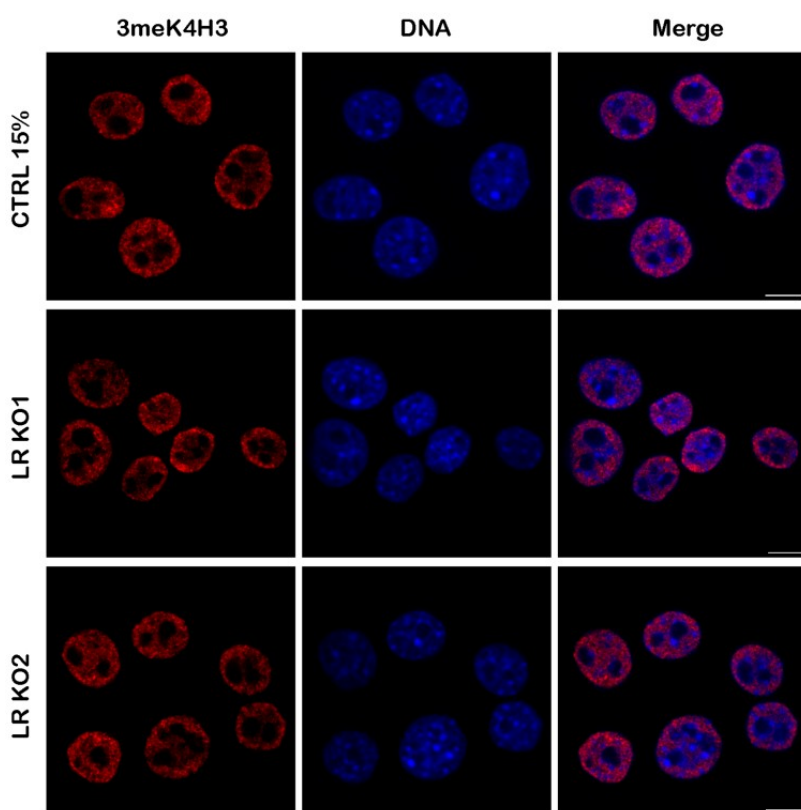


Εικόνα 61: Το πρότυπο κατανομής της HP1α από οπτική τομή στο ισημερινό επίπεδο και από μέγιστη προβολή μεταξύ των πληθυσμών LR KO1, LR KO2 και κυτάρων CTRL 15% (πράσινο: HP1α, κόκκινο: TOPRO, scale bar: 8μm).

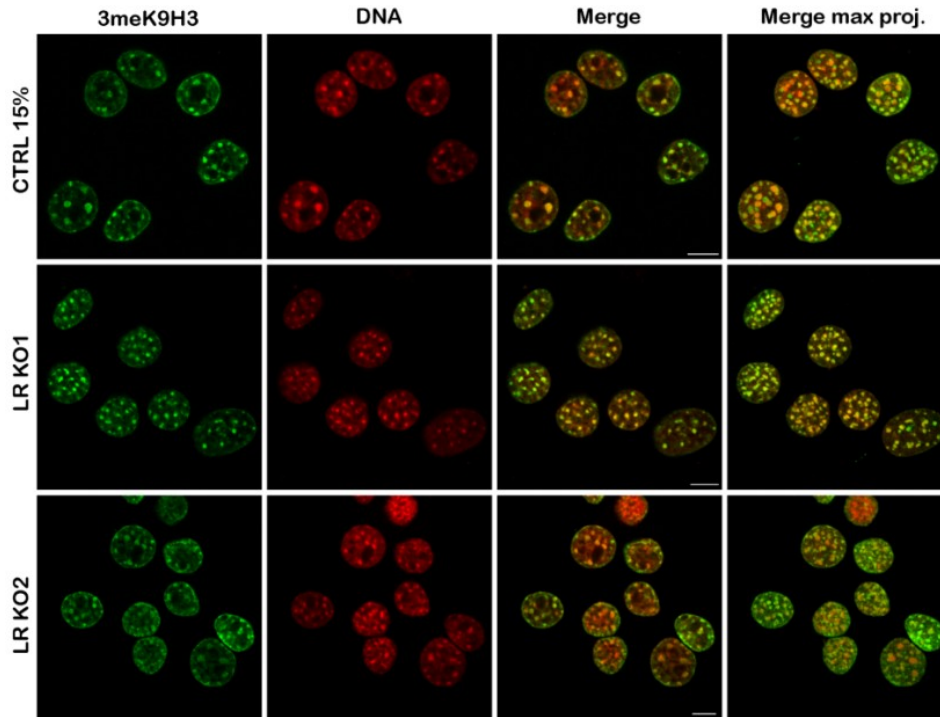


Εικόνα 62: Το πρότυπο κατανομής της HP1γ από οπτική τομή στο ισημερινό επίπεδο και από μέγιστη προβολή μεταξύ των πληθυσμών LR KO1, LR KO2 και κυττάρων CTRL 15% (πράσινο: HP1α, κόκκινο: TOPRO, scale bar: 5μm).

Το ίδιο ισχύει και για τις περιπτώσεις των τροποποιήσεων 3meK4H3 και 3meK9H3. Η πρώτη παρουσίασε το αναμενόμενο πρότυπο κατανομής, εντοπιζόμενη σε ευχρωματινικές περιοχές και αποκλειόμενη από μεταγραφικά ανενεργές περιοχές (εικόνα 63). Αντίστοιχα για την 3meK9H3, δεν παρουσιάστηκαν ατυπίες ως προς τον εντοπισμό της στις ετεροχρωματινικές εστίες και εγγύς του πυρηνικού φακέλου (εικόνα 64).



Εικόνα 63: Το πρότυπο κατανομής της 3meK4H3 από οπτική τομή στο ισημερινό επίπεδο του μεταξύ των πληθυσμών LR KO1, LR KO2 και κυττάρων CTRL 15% (κόκκινο: 3meK4H3, μπλε: TOPRO, scale bar: 8μm).



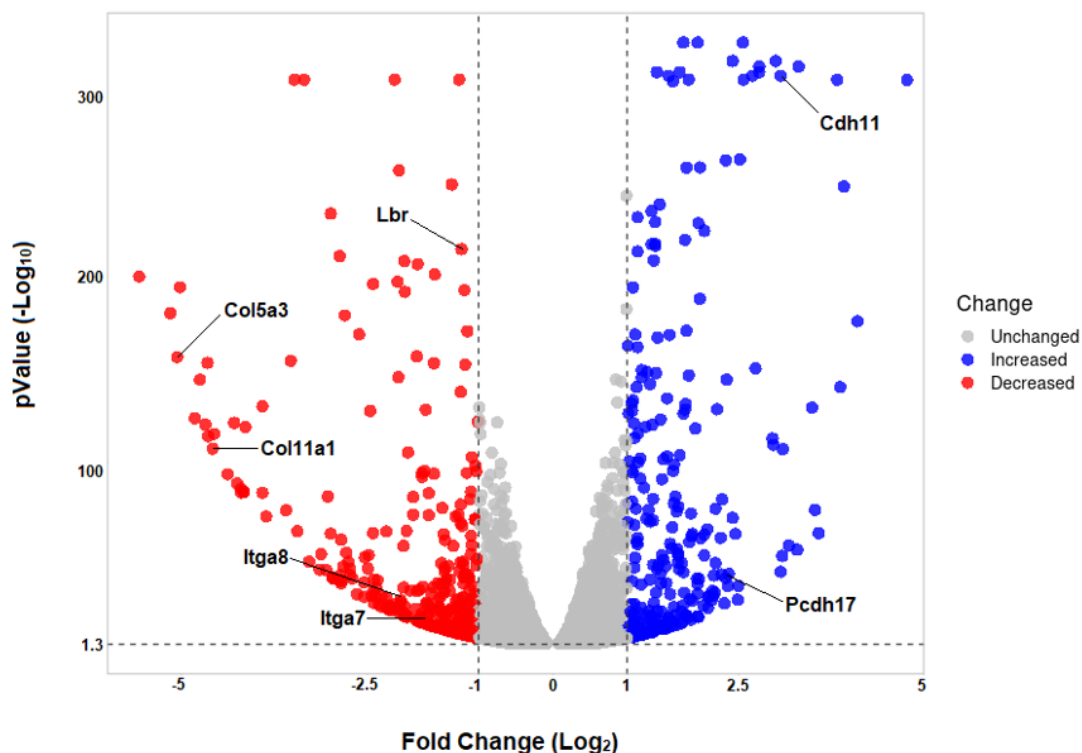
Εικόνα 64: Το πρότυπο κατανομής της 3meK9H3 από οπτική τομή στο επίπεδο του ισημερινού και από μέγιστη προβολή μεταξύ των πληθυσμών LRKO1, LRKO2 και κυττάρων CTRL 15% (πράσινο: 3meK9H3, κόκκινο: TOPRO, scale bar: 8μm).

B4. Επιδράσεις της απαλοιφής στη γονιδιακή έκφραση

Λόγω τεχνικών προβλημάτων μελετήθηκε το μεταγραφικό προφίλ μόνο του ενός LR KO κλώνου, συγκρινόμενου με τα κύτταρα ελέγχου CTRL 15%, μέσω αλληλούχισης RNA (RNA Sequencing). Και σε αυτή την περίπτωση ως όριο της διαφορικής έκφρασης ορίστηκε η τιμή $|\log_2FC| \geq 1$ και ως κατώφλι στατιστικής σημαντικότητας η τιμή $pvalue \leq 0.05$.

Συγκεκριμένα, η απαλοιφή του LBR στον LR KO1 κλώνο προκάλεσε την αλλαγή στην έκφραση 665 γονιδίων, από τα οποία 286 γονίδια αύξησαν την έκφρασή τους και 376 υποεκφράστηκαν. Σημαντικό να αναφερθεί πως το 40% των γονιδίων που μετέβαλαν την έκφρασή τους απουσία της Lamin A/C επηρεάστηκαν και στην περίπτωση του κλώνου LR KO1. Στην εικόνα 65 παρουσιάζεται η κατανομή των γονιδίων σύμφωνα με τις τιμές $pvalue$ και \log_2FC σε διάγραμμα volcano plot. Και σε αυτή την περίπτωση η απουσία του LBR δεν προκάλεσε μεταβολή στην έκφραση πρωτεϊνών που εντοπίζονται στην πυρηνική περιφέρεια και γονιδίων που σχετίζονται άμεσα με το επιγενετικό τοπίο του πυρήνα και την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης.

Επίσης, η απαλοιφή του LBR δεν επέφερε μεταβολές στην έκφραση ενζύμων σχετικών με την βιοσύνθεση της χοληστερόλης αλλά ούτε και της αναγωγάσης DHCR14 που καταλύει την ίδια αντίδραση με τον LBR (Tsai et al., 2016).

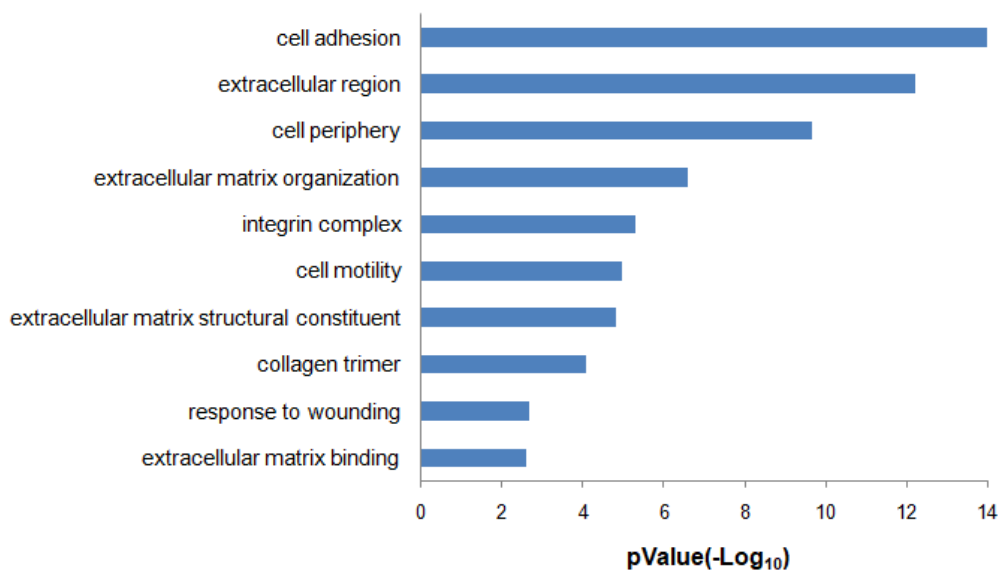


Εικόνα 65: Διάγραμμα volcano plot των γονιδίων του LR KO1 κλώνου και η κατανομή τους σύμφωνα με την διαφορική έκφρασή τους και την στατιστική σημαντικότητα αυτής. Στον οριζόντιο άξονα αντιστοιχούν οι τιμές Log_2FC και στον κάθετο άξονα οι τιμές του αρνητικού δεκαδικού λογάριθμου των τιμών p value. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει ένα γονίδιο και με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια που υπερεκφράζονται στατιστικά σημαντικά και με κόκκινο τα αντίστοιχα που υποεκφράζονται ($|\text{log}_2\text{FC}| \geq 1$ και $-\log_{10}p\text{value} \geq 1.3$).

Αντίθετα, μεταξύ των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων εντοπίστηκαν πολλά γονίδια σχετικά με την σύσταση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως επίσης και με την κυτταρική προσκόλληση. Στην εικόνα 65 αναφέρεται η διαφορική έκφραση του γονιδίου mLBR αλλά και γονιδίων σχετιζόμενων με την εξωκυττάρια ουσία (Col11a1, Col5a3) και κυτταρική προσκόλληση (Itga8, Itga7, Cdh11).

Οι παραπάνω παρατηρήσεις επιβεβαιώθηκαν από αναλύσεις γονιδιακής οντολογίας (Gene Ontology, GO), όπου έδειξαν πως υπάρχει στατιστικά σημαντικός εμπλουτισμός σε κατηγορίες γονιδίων που αφορούν

την θεμέλια ουσία και που σχετίζονται με την προσκόλληση και την διακυτταρική σύνδεση (εικόνα 66). Επισημαίνεται πως σχετικές κατηγορίες γονιδίων σημειώθηκαν και στην περίπτωση της απαλοιφής των λαμινών τύπου A.



Εικόνα 66: Διάγραμμα με μερικές επιλεγμένες κατηγορίες όπου υπάρχει στατιστικά σημαντικός εμπλουτισμός των διαφορεικά εκφραζόμενων γονιδίων του LR KO1 κλώνου. Στον κάθετο άξονα αναφέρονται οι κατηγορίες και στον οριζόντιο άξονα οι τιμές του αρνητικού δεκαδικού λογάριθμου του pValue.

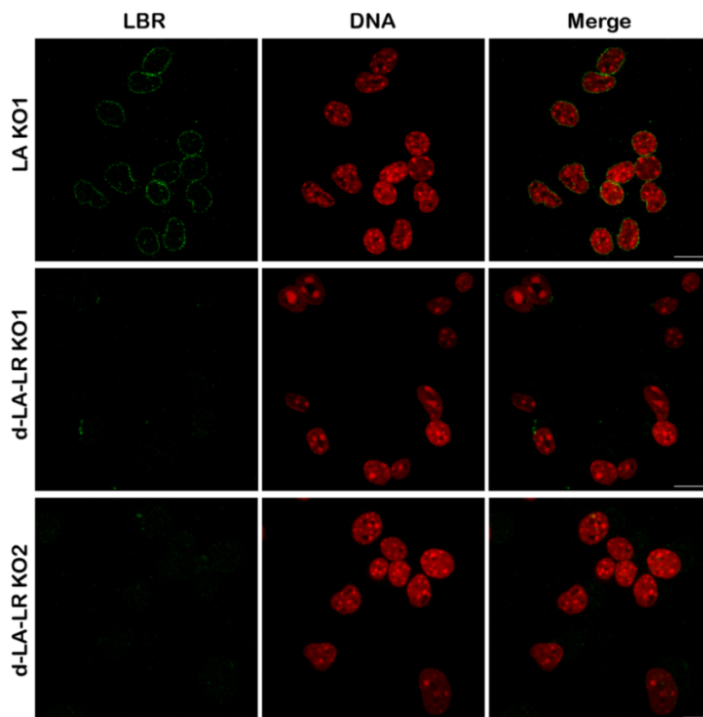
Μέρος Γ: Μελέτη της ταυτόχρονης απαλοιφής των γονιδίων *mLMNA* και *mLBR*

Γ1. Συνδυαστική απαλοιφή των γονιδίων *mLMNA* και *mLBR*

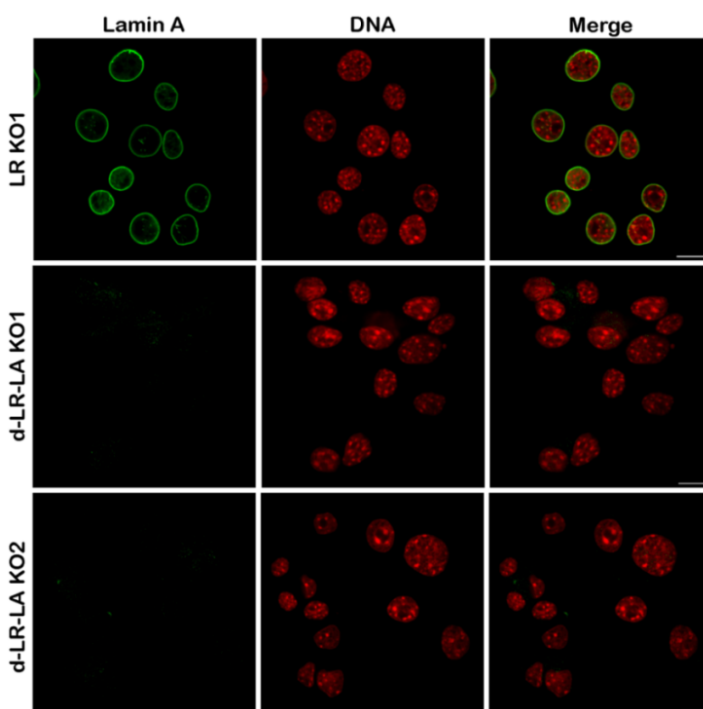
Στο τρίτο μέρος της παρούσας εργασίας διερευνήθηκαν οι συνέπειες της παράλληλης απαλοιφής του *LBR* και των λαμινών τύπου A. Στα πλαίσια της μεταλλαξιγένεσης, χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια gRNAs που στόχευσαν τις περιοχές των γονιδίων που αναφέρθηκαν στις παραγράφους A1 και B1 των αποτελεσμάτων.

Επισημαίνεται πως κατασκευάστηκαν δύο σταθερές κυτταρικές σειρές, όπου επηρεάστηκε η έκφραση των γονιδίων με διαφορετική χρονική σειρά, καθώς είναι πιθανό τα κύτταρα να εμφανίσουν διαφορετικούς φαινοτύπους εξαιτίας της σειράς με την οποία εγκαθιδρύθηκε η απαλοιφή των πρωτεϊνών. Στη σταθερή σειρά d-LA-LR KO πρώτα αποσιωπήθηκε το γονίδιο *mLMNA* και έπειτα το γονίδιο *mLBR*, ενώ για τη σειρά d-LR-LA KO πραγματοποιήθηκε το αντίστροφο. Λόγω των χρονικών περιορισμών και στις δύο περιπτώσεις η απαλοιφή ελέγχθηκε μόνο σε επίπεδο πρωτεΐνης, μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού. Για τη σταθερή σειρά d-LA-LR KO αρκούσε να ελεγχθεί η απουσία του *LBR* στους εξεταζόμενους κλώνους, ενώ στην d-LR-LA KO χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Lamin A.

Σύμφωνα με τα παρακάτω, οι επιλεγμένοι double KO κλώνοι δεν παρουσίασαν σήμα φθορισμού, ενώ οι κλώνοι LA KO1 και LR KO1 αποτέλεσαν μάρτυρες των d-LA-LR KO και d-LR-LA KO σειρών, εφόσον στα κύτταρα αυτών των κλώνων επηρεάστηκε η έκφραση των *LBR* και Lamin A αντίστοιχα (εικόνα 67 & 68).



Εικόνα 67: Η κατανομή της πρωτεΐνης LBR μεταξύ των πληθυσμών LAKO1, d-LA-LRKO1 και d-LA-LR KO2 (πράσινο: LBR, κόκκινο: TOPRO, scale bar: 10μm).

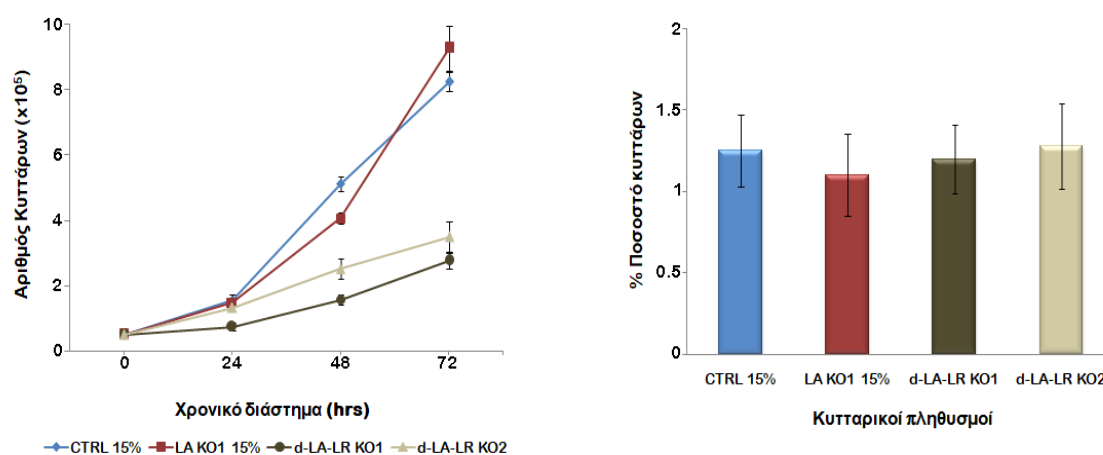


Εικόνα 68: Η κατανομή της πρωτεΐνης Lamin A μεταξύ των πληθυσμών LR KO1, d-LR-LA KO1 και d-LR-LA KO2 (πράσινο: Lamin A, κόκκινο: TOPRO, scale bar: 10μm).

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν ενδείξεις, πως τουλάχιστον σε επίπεδο πρωτεΐνης, έχει επηρεαστεί η έκφραση των γονιδίων mLBR και mLAMNA, με τους διπλούς knock out κλώνους να παρουσιάζουν μηδενικό σήμα φθορισμού.

Γ2. Συνέπειες της απαλοιφής στο αναπτυξιακό δυναμικό

Όπως στη μεμονωμένη απαλοιφή, έτσι και στα πλαίσια της διπλής απαλοιφής διερευνήθηκε η επίδραση της ταυτόχρονης απουσίας των LBR και Lamir A/C στον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τον ρυθμό πολλαπλασιασμού και τον μιτωτικό δείκτη και για τις δύο double knock out κυτταρικές σειρές.



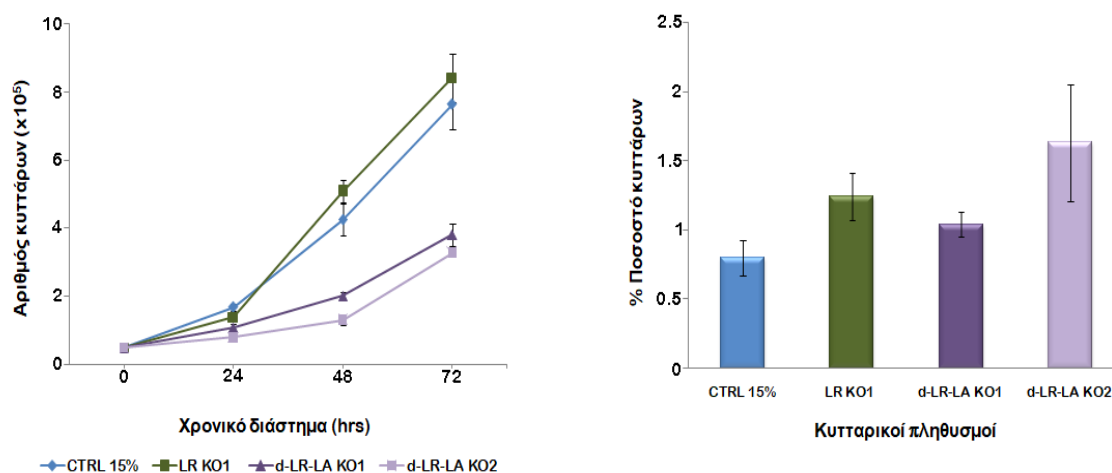
A.

B.

Εικόνα 69: Α) Η καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων της d-LA-LR KO σειράς και κυττάρων ελέγχου του κλώνου LA KO1 15% και CTRL 15% όπως καταγράφηκε στις 24, 48 και 72 ώρες. Εμφανίζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά για τους κλώνους d-LA-LR KO1 & d-LA-LR KO2 στις 48 και 72 ώρες. Β) Το ποσοστό των μιτωτικών κυττάρων μεταξύ των πληθυσμών της d-LA-LR KO σειράς και κυττάρων ελέγχου του κλώνου LA KO1 15% και CTRL 15%. Απεικονίζεται το τυπικό σφάλμα σε κάθε περίπτωση. Οι αριθμοί των κυττάρων που καταμετρήθηκαν, οι επαναλήψεις των πειραμάτων και τα στατιστικά τεστ που ακολουθήθηκαν αναφέρονται στο παράρτημα (πίνακες 6.11, 6.13, 6.15, 6.17).

Επειδή οι διπλοί knock out κλώνοι καλλιεργούνται παρουσία 15% ορού, καλλιεργήθηκε και ο κλώνος LA KO1 στις ίδιες συνθήκες για τα πειράματα του αναπτυξιακού δυναμικού, ώστε να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα. Αναφορικά με το μιτωτικό δείκτη, οι κλώνοι της d-LA-LR KO σειράς δεν εμφάνισαν κάποια σημαντική διαφοροποίηση, όπως αντίστοιχα δεν είχαν εμφανίσει και οι κλώνοι της LA KO σειράς (εικόνα 69B & εικόνα 6.1B). Αντίθετα, παρατηρήθηκε σημαντικά μειωμένη ανάπτυξη και των δύο κλώνων, ιδίως μετά τις 24 ώρες που ήταν στατιστικώς σημαντική (εικόνα

69A), ενώ να σημειωθεί πως η μεμονωμένη απαλοιφή του γονιδίου mLINA δεν ήταν αρκετή για να προκαλέσει τέτοια μεταβολή στο αναπτυξιακό δυναμικό (εικόνα 6.1A).



A.

B.

Εικόνα 70 A) Η καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων της d-LR-LA KO σειράς και κυττάρων ελέγχου του κλώνου LR KO1 και CTRL 15% όπως καταγράφηκε στις 24, 48 και 72 ώρες. Εμφανίζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά για τους κλώνους d-LR-LA KO1 & d-LR-LA KO2 στις 48 και 72 ώρες. B) Το ποσοστό των μιτωτικών κυττάρων μεταξύ των πληθυσμών της d-LR-LA KO σειράς και κυττάρων ελέγχου του κλώνου LR KO1 και CTRL 15%. Εμφανίζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των πληθυσμών d-LR-LA KO1 & d-LR-LA KO2, CTRL 15% & d-LR-LA KO1 και CTRL 15% & d-LR-LA KO2. Απεικονίζεται το τυπικό σφάλμα σε κάθε περίπτωση. Οι αριθμοί των κυττάρων που καταμετρήθηκαν, οι επαναλήψεις των πειραμάτων και τα στατιστικά τεστ που ακολουθήθηκαν αναφέρονται στο παράρτημα (πίνακες 6.12, 6.14, 6.16, 6.17).

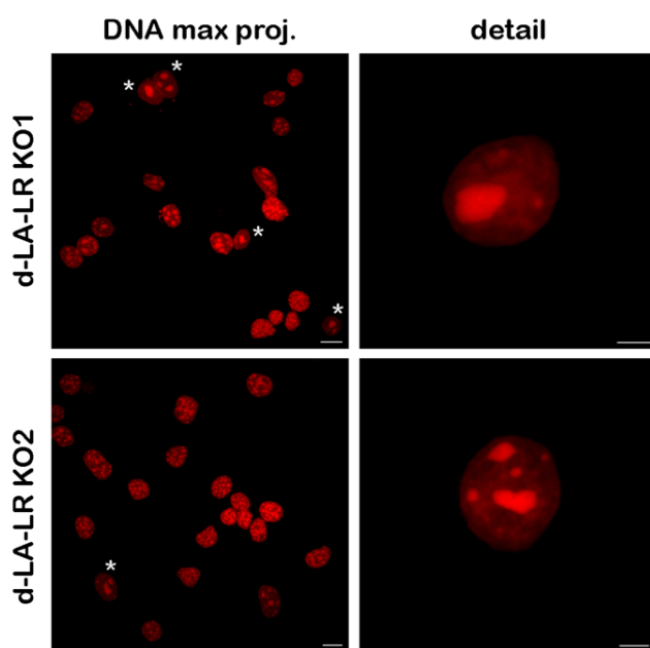
Τα αντίστοιχα πειράματα για την d-LR-LA KO σειρά πραγματοποιήθηκαν από τη προπτυχιακή φοιτήτρια Βασιλική Τάσσου. Και σε αυτή τη περίπτωση, οι δύο κλώνοι εμφάνισαν στατιστικώς σημαντική μείωση στον ρυθμό πολλαπλασιασμού μετά τις 24 ώρες, με την καμπύλη ανάπτυξης να είναι αρκετά παρόμοια με αυτή της d-LA-LR KO σειράς (εικόνα 70A). Όσον αφορά τα ποσοστά των μιτωτικών κυττάρων, οι κλώνοι μεταξύ τους παρουσίασαν αρκετά μεγάλη διαφορά που ήταν στατιστικώς σημαντική, ενώ τα κύτταρα CTRL 15% εμφάνισαν σημαντικά μειωμένο μιτωτικό δείκτη σε σχέση με τους κλώνους αλλά και με προηγούμενα πειράματα (εικόνα 70B & 55B). Ο μειωμένος μιτωτικός δείκτης υποδηλώνει μικρότερο ποσοστό κυττάρων στη φάση της μίτωσης, που μπορεί να οφείλεται είτε σε πρόωρη

ολοκλήρωση της μίτωσης είτε σε καθυστέρηση κάποιου σταδίου της μεσόφασης. Ωστόσο πειράματα κυτταρομετρίας ροής μεταξύ των πληθυσμών CTRL 10% και CTRL 15% δεν έδειξαν διαφοροποιήσεις στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου (εικόνα 53A), ενώ γίνεται φανερό πως λόγω της μεγάλης διακύμανσης των τιμών του μιτωτικού δείκτη δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο ασφαλές συμπέρασμα.

Με τα μέχρι στιγμής δεδομένα, φαίνεται πως οι μεμονωμένες απαλοιφές των LBR και Lamina A/C δεν επηρεάζουν κάποια από τις διαδικασίες της μίτωσης σε κύτταρα NIH. Σχετικά με την υπόλοιπη μεσόφαση, η απουσία των λαμινών τύπου A δεν επιφέρει κάποια αλλαγή στον ρυθμό ανάπτυξης, σε αντίθεση με την απαλοιφή του LBR που μειώνει τον ρυθμό ανάπτυξης ακόμα και παρουσία 15% ορού και επιφέρει μία μικρή καθυστέρηση των κυττάρων στην φάση S. Τέλος, η επιπλέον απαλοιφή είτε της Lamina A είτε του LBR προκαλεί ακόμα μεγαλύτερη μεταβολή στον ρυθμό πολλαπλασιασμού.

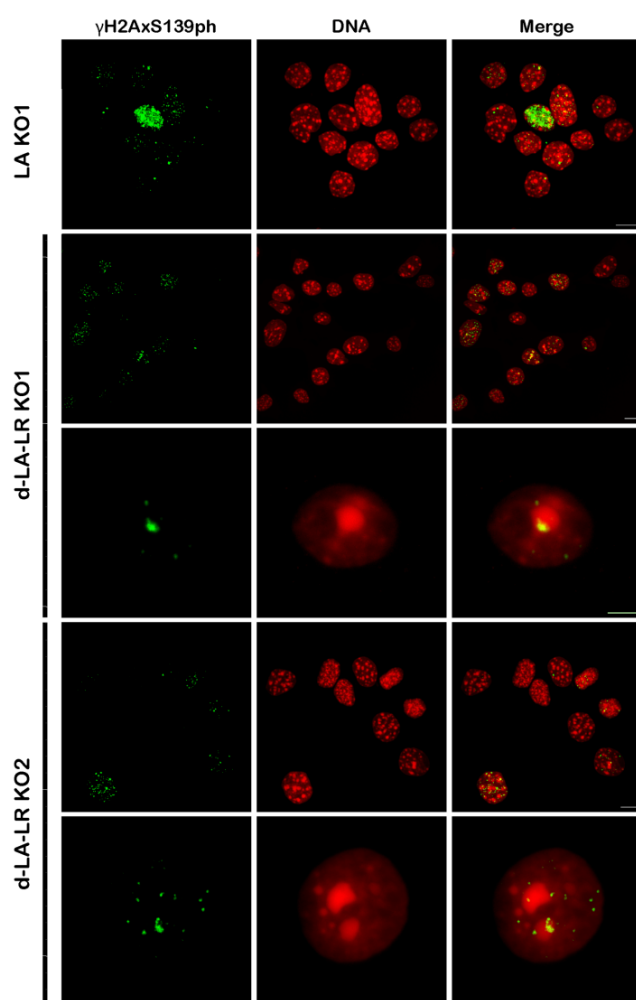
Γ3. Μορφολογική Ανάλυση

Σε πρώτο στάδιο, πραγματοποιήθηκε σήμανση του DNA με TO-PRO 3 και παρατηρήθηκαν οι πυρήνες των κυττάρων της d-LA-LR KO σειράς ως προς το χρωματινικό τους τοπίο.



Εικόνα 71: Σήμανση του DNA με TOPRO και μέγιστη απεικόνιση όλων των οπτικών τομών μεταξύ των πληθυσμών d-LA-LR KO1 και d-LA-LR KO2 (scale bar 10μm). Με αστερίσκο σημαίνονται οι πυρήνες που εμφανίζουν μειωμένες και μεγάλες σε μέγεθος ετεροχρωματινικές εστίες, ενώ δεξιά φαίνεται λεπτομερώς ένας τέτοιος πυρήνας για κάθε κλώνο (scale bar 3μm).

Υπενθυμίζεται πως στον ποντικό περικεντρομεριδιακές αλληλουχίες και τελομερή συγκεντρώνονται σε ανεξάρτητες ετεροχρωματινικές εστίες που αλληλεπιδρούν με τον πυρηνικό φάκελο και την περιφέρεια των πυρηνίσκων (Eberhart et al., 2013). Οι εστίες ετεροχρωματινής των NIH κυττάρων κατανέμονται σε όλο το πυρηνόπλασμα και ο αριθμός τους κυμαίνεται σε 24 foci/πυρήνα (εικόνα 43). Ωστόσο, και οι δύο κλώνοι που επιλέχθηκαν για μελέτη εμφάνισαν πυρήνες με διαφορετική πυρηνική αρχιτεκτονική, φέροντας 2 ή 3 κύριες εστίες μεγάλου μεγέθους, που εντοπίζονταν προς το κέντρο του πυρήνα και περιφερικά του πυρηνίσκου. Να σημειωθεί πως οι πυρήνες αυτοί



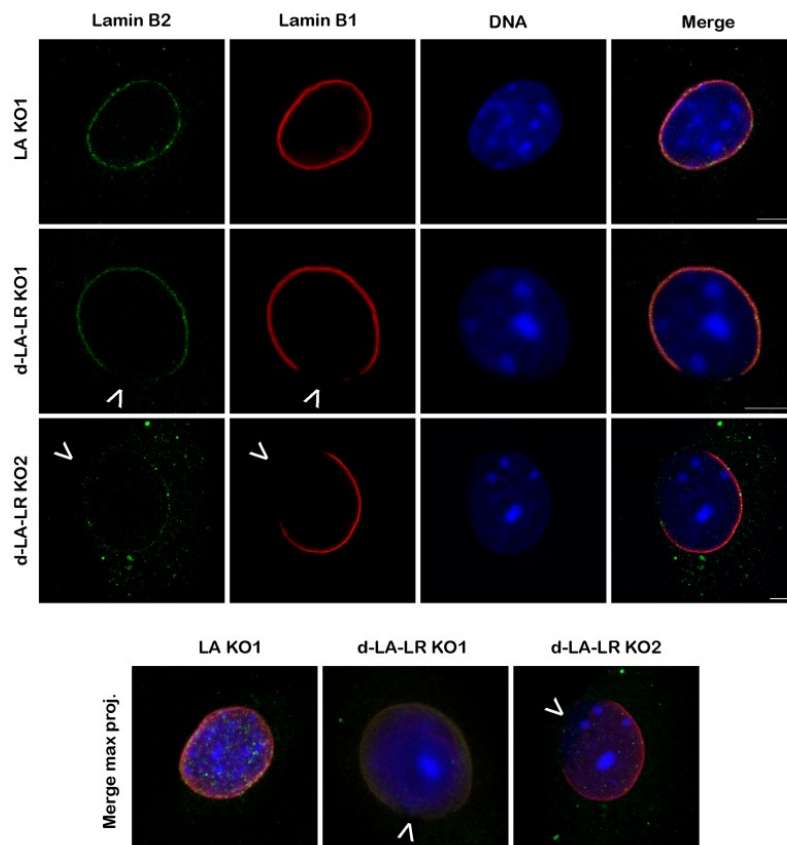
Εικόνα 72: Η ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης H2Ax ιστόνης μεταξύ των πληθυσμών LAKO1, d-LA-LRKO1 και d-LA-LR KO2 (πράσινο: γH2AxS139ph, κόκκινο: TOPRO). Απεικόνιση μέγιστης προβολής μεσοφασικών κυττάρων (scale bar 10μm) και πυρήνα με το φαινότυπο των μειωμένων ετεροχρωματινικών εστιών (scale bar 4μm).

εμφανίζονταν με πολύ χαμηλότερη συχνότητα από τους πυρήνες με φυσιολογική χρωματινική κατανομή, ωστόσο ο φαινότυπος ήταν επαναλαμβανόμενος και για τους δύο κλώνους (εικόνα 71).

Εξαιτίας του σημαντικά χαμηλού ρυθμού πολλαπλασιασμού των κλώνων, εξετάστηκε εάν ο φαινότυπος αυτός σχετίζεται με αποπτωτικό θάνατο και οι εστίες συμπύκνωσης της χρωματινής αφορούν αποπτωτικά λοβία. Ωστόσο, σε μορφολογικά πειράματα παρουσία cisplatin τα αποπτωτικά λοβία του DNA που παρατηρήθηκαν ήταν σφαιρικά, πολύ έντονα συμπυκνωμένα, ενώ έλειπαν οι υπόλοιπες δομές του πυρήνα, χωρίς να δείχνουν ομοιότητα

με τις ετεροχρωματινικές εστίες των double knock out κλώνων (δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Δεδομένα προς αυτή την κατεύθυνση παρέχονται και από πειράματα ανίχνευσης της τροποποίησης γH2Ax που δεν σημειώθηκε διαφοροποίηση, ειδικότερα στους πυρήνες με τον συγκεκριμένο φαινότυπο (εικόνα 72). Τέλος, να αναφερθεί πως σε πειράματα που έπονται, ο πυρηνικός φάκελος φαίνεται άθικτος, χωρίς να υπάρχουν στοιχεία συσχετισμού του φαινοτύπου με κάποιο από τα στάδια του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου.

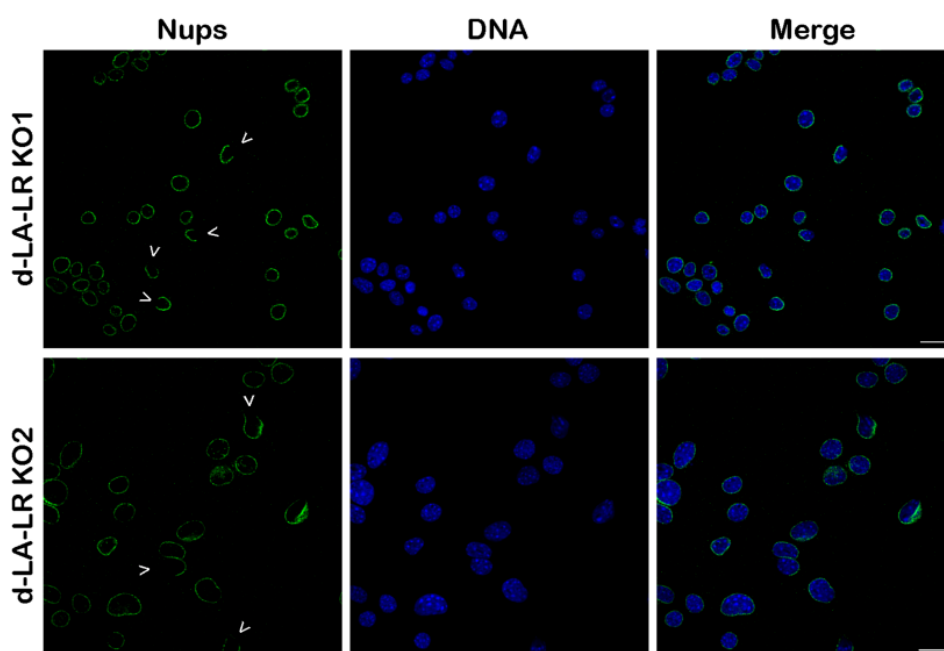
Σε επόμενο βήμα της μελέτης ελέγχθηκε η ακεραιότητα της πυρηνικής λάμινας, σημαίνοντας τις πρωτεΐνες Lamin B1 και Lamin B2.



Εικόνα 73: Η κατανομή των Lamin B2 και Lamin B1 μεταξύ των πληθυσμών LA KO1, d-LA-LR KO1 και d-LA-LR KO2 (πράσινο: Lamin B2, κόκκινο: Lamin B1, μπλε: TOPRO, scale bar 5μm). Απεικόνιση μεσοφασικού πυρήνα στο επίπεδο του ισημερινού και σε μέγιστη προβολή. Με τα βελόνια διακρίνονται οι ασυνέχειες στην κατανομή των Lamin B2 και Lamin B1.

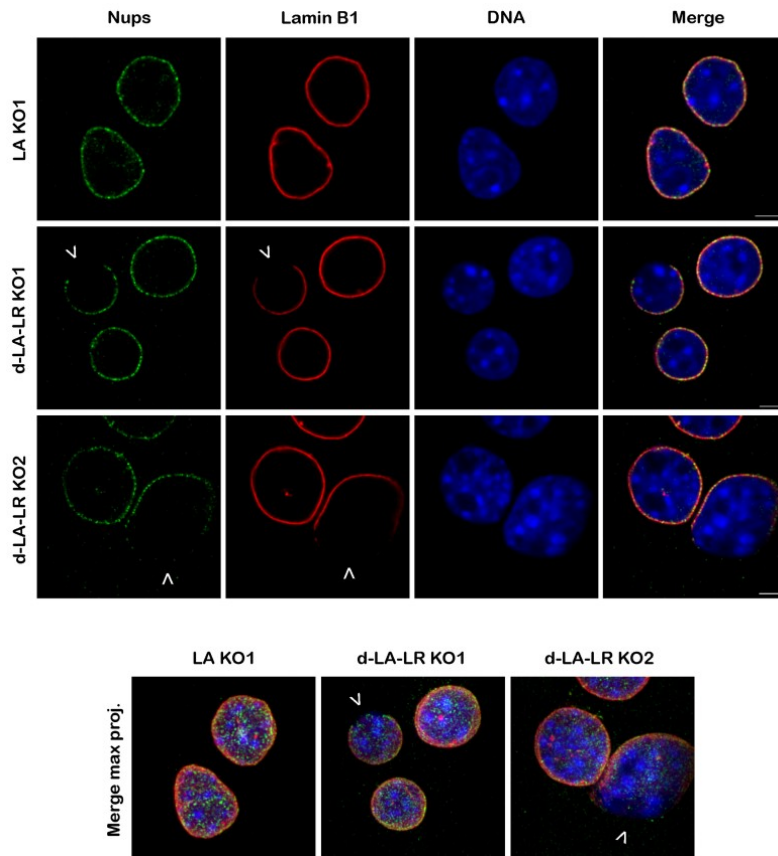
Όπως παρατηρείται, παρουσιάζεται μία ασυνέχεια στην κατανομή των Lamina B1 και Lamina B2, όπου συνεντοπίζεται η μία με την άλλη και για τους δύο κλώνους. Επίσης, η ασυνέχεια αυτή δεν αφορά μόνο το ισημερινό επίπεδο του πυρήνα, αλλά μία ολόκληρη περιοχή της πυρηνικής μεμβράνης, το μέγεθος της οποίας δεν είναι σταθερό (εικόνα 73).

Έπειτα εξετάστηκε αν η ασυνέχεια αυτή αφορά μόνο τις πυρηνικές λαμίνες ή σχετίζεται και με άλλες πρωτεΐνες στα όρια του πυρήνα. Εντυπωσιακά ήταν τα αποτελέσματα της σήμανσης των πυρηνικών πόρων, όπου και εδώ παρουσιάζεται ασυνέχεια στον εντοπισμό τους και μάλιστα με μεγάλη συχνότητα (εικόνα 74). Να σημειωθεί πως για τη σήμανσή τους χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα που αναγνωρίζει τις επαναλήψεις φαινυλαλανίνης-γλυκίνης (FG επαναλήψεις) που φέρουν οι περισσότερες νουκλεοπορίνες στο μόριό τους, σημαίνοντας το σύνολο του συμπλέγματος των πόρων και όχι κάποια μεμονωμένη νουκλεοπορίνη. Σημαντική παρατήρηση ήταν πως η ατυπία αυτή στην πυρηνική περιφέρεια δεν σχετίζεται με τον φαινότυπο των ετεροχρωματινικών εστιών που περιγράφηκε παραπάνω.

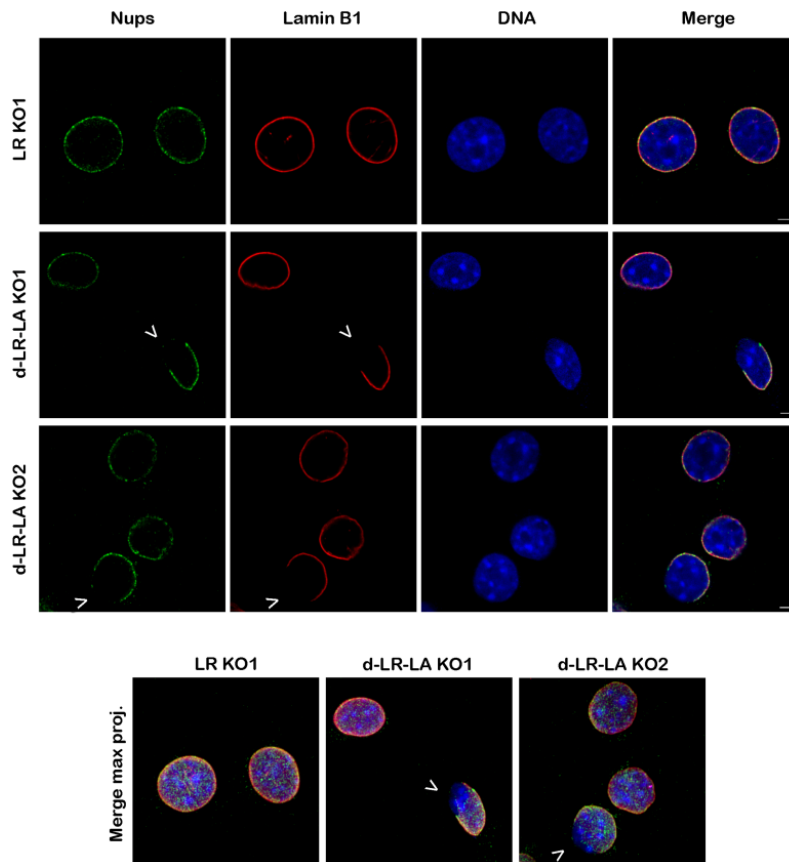


Εικόνα 74: Η κατανομή των Nups μεταξύ των πληθυσμών LA KO1, d-LA-LR KO1 και d-LA-LR KO2 (πράσινο: Nups, μπλε: TOPRO, scale bar 15μm). Με τα βελάκια διακρίνονται οι πυρήνες που παρουσιάζουν ασυνέχεια στην κατανομή του συμπλέγματος των πυρηνικών πόρων.

Για να ελεγχθεί αν η ασυνέχεια συνεντοπίζεται με αυτή των λαμινών, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη σήμανση των Nups και της Lamin B1. Όπως φαίνεται παρακάτω, επιβεβαιώθηκαν οι υποψίες μας καθώς οι περιοχές της πυρηνικής μεμβράνης όπου δεν έφεραν στην πυρηνοπλάσματική τους πλευρά λαμίνες, δεν περιείχαν ούτε πυρηνικούς πόρους. Το φαινότυπο αυτό, της έλλειψης πρωτεϊνικών παραγόντων από τμήματα της πυρηνικής περιφέρειας, ονομάσαμε ως «ασυμμετρία» η οποία επιβεβαιώθηκε και από τους κλώνους της δεύτερης double knock out σειράς (εικόνα 75 & 76).

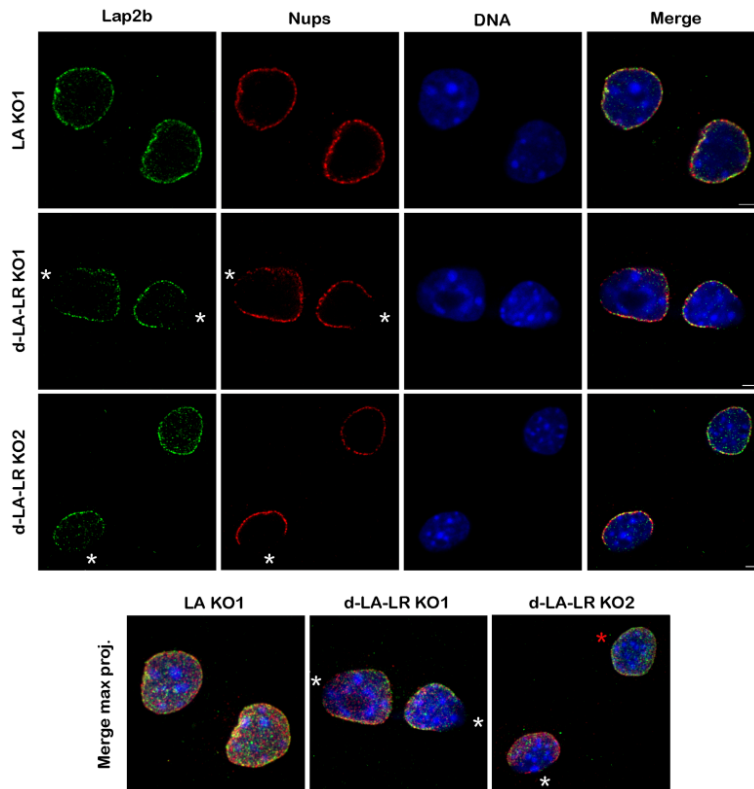


Εικόνα 75: Η κατανομή των Nups και Lamin B1 μεταξύ των πληθυσμών LA KO1, d-LA-LR KO1 και d-LA-LR KO2 (πράσινο: Nups, κόκκινο: Lamin B1, μπλε: TOPRO, scale bar 5μm). Απεικόνιση μεσοφασικών πυρήνων στο επίπεδο του ισημερινού και σε μέγιστη προβολή. Με τα βελάκια διακρίνονται ο συνεντοπισμός της ασυνέχειας των Nups και Lamin B1.



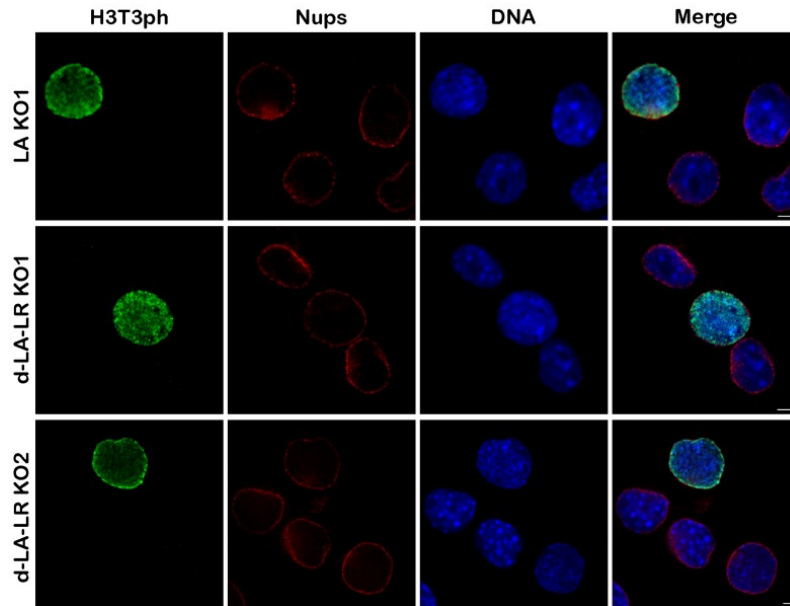
Εικόνα 76: Η κατανομή των Nups και Lamin B1 μεταξύ των πληθυσμών LR KO1, d-LR-LA KO1 και d-LR-LA KO2 (πράσινο: Nups, κόκκινο: Lamin B1, μπλε: TOPRO, scale bar 5μm). Απεικόνιση μεσοφασικών πυρήνων στο επίπεδο του ισημερινού και σε μέγιστη προβολή. Με τα βελόνια διακρίνονται ο συνεντοπισμός της ασυνέχειας των Nups και Lamin B1.

Η τελευταία πρωτεΐνη που εξετάστηκε ήταν η Lap2b, όπου επιβεβαιώθηκε η ασυμμετρία και ταυτίστηκε με αυτή των Nups (εικόνα 77). Ανακεφαλαιώνοντας, τον φαινότυπο επιβεβαίωσαν τέσσερις πρωτεΐνες της περιφέρειας του πυρήνα, που αλληλεπιδρούν με διαφορετικούς τρόπους με τον πυρηνικό φάκελο. Η Lap2b που διαπερνά την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη, οι Lamin B1 και B2 που έρχονται σε στενή επαφή με αυτή και τα Nups, που αλληλεπιδρούν με την μεμβράνη των πόρων και έρχονται σε άμεση επαφή με την εσωτερική και εξωτερική πυρηνική μεμβράνη. Πιθανώς στις περιοχές αυτές του πυρηνικού φακέλου να υπάρχει κάποιο σφάλμα στο σύνολο των μεμβρανών του και να είναι πιθανή η ασυμμετρία και άλλων πρωτεϊνών που εντοπίζονται φυσιολογικά εκεί.



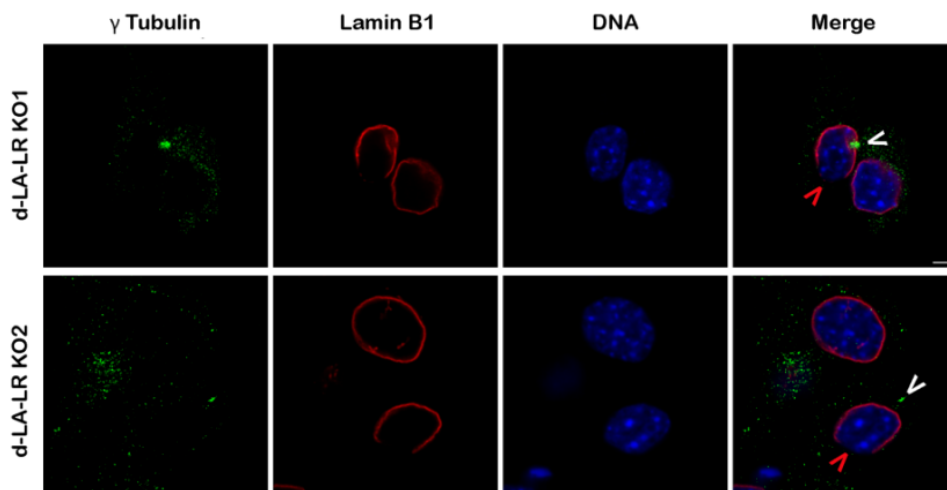
Εικόνα 77: Η κατανομή των Nups και Lap2b μεταξύ των πληθυσμών LA KO1, d-LA-LR KO1 και d-LA-LR KO2 (πράσινο: Lap2b, κόκκινο: Nups, μπλε: TOPRO, scale bar 5μm). Απεικόνιση μεσοφασικών πυρήνων στο επίπεδο του ισημερινού και σε μέγιστη προβολή. Με τους άσπρους αστερίσκους διακρίνεται ο συνεντοπισμός της ασυνέχειας των Nups και Lap2b. Με κόκκινο αστερίσκο φαίνεται ένας πυρήνας όπου παρουσιάζει ασυμμετρία στον ένα πόλο και διακρίνεται με μέγιστη προβολή.

Οι Yuxuan Guo και Yixian Zheng σε μία σημαντική τους μελέτη ανέφεραν ανομοιόμορφη κατανομή των Nups σε κύτταρα MEFs και EDFC (ESC-derived fibroblast-like cells), όπου είχαν διαγραφεί τα γονίδια LMNA, LMNB1 και LMNB2. Τα ποσοστά των ασύμμετρων πυρήνων αυξάνονταν δραματικά στο τέλος της φάσης G2 και στην πρόφαση, όπου τα Nups συγκεντρώνονταν στην πλευρά των διπλασιασμένων κεντροσωματίων. Η μελέτη κατέληγε πως η ασυμμετρία απουσία λαμινών οφείλεται στις δυνάμεις που ασκούν οι μικροσωληνίσκοι μέσω της δυνεΐνης και η οποία συνδέεται στα Nups με την βοήθεια της πρωτεΐνης BICD2 (Guo & Zheng, 2015). Προκειμένου να ελεγχθεί ένας τέτοιος μηχανισμός στην δική μας περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε η σήμανση της φωσφορυλιωμένης θρεονίνης 3 της H3, τροποποίηση χαρακτηριστική της μίτωσης που εντοπίζεται εντονότερα στα κεντρομερίδια από την αρχή της πρόφασης έως και την ανάφαση. Ταυτοχρόνως, σημάνθηκε η γ-τουμπουλίνη με σκοπό να ανιχνευθεί η θέση του κεντροσώματος ως προς τους ασύμμετρους πυρήνες.



Εικόνα 78: Κατανομή των πυρηνικών πόρων και της τροποποίησης H3T3ph σε προφασικά κύτταρα των πληθυσμών LA KO1, d-LA-LR KO1 και d-LA-LR KO2 (πράσινο: H3T3ph, κόκκινο: Nups, μπλε: TOPRO, scale bar 5μm).

Δεν παρατηρήθηκε κανένας προφασικός πυρήνας να είναι ασύμμετρος, στο σύνολο των πληθυσμών και των δύο κλώνων (εικόνα 78). Ταυτόχρονα, η θέση του κεντροσωματίου ήταν σχεδόν αντιδιαμετρική της ασύμμετρης περιοχής του πυρηνικού φακέλου, χωρίς να εντοπίζεται στην πλευρά της ασυνέχειας ή κοντά σε αυτήν (εικόνα 79). Πιθανώς η ασυμμετρία να εμφανίζεται σε κάποιο άλλο στάδιο του κυτταρικού κύκλου από αυτό που ανέφεραν οι Yuxuan Guo & Yixian Zheng και ο μηχανισμός να εμπλέκει τους μικροσωληνίσκους.

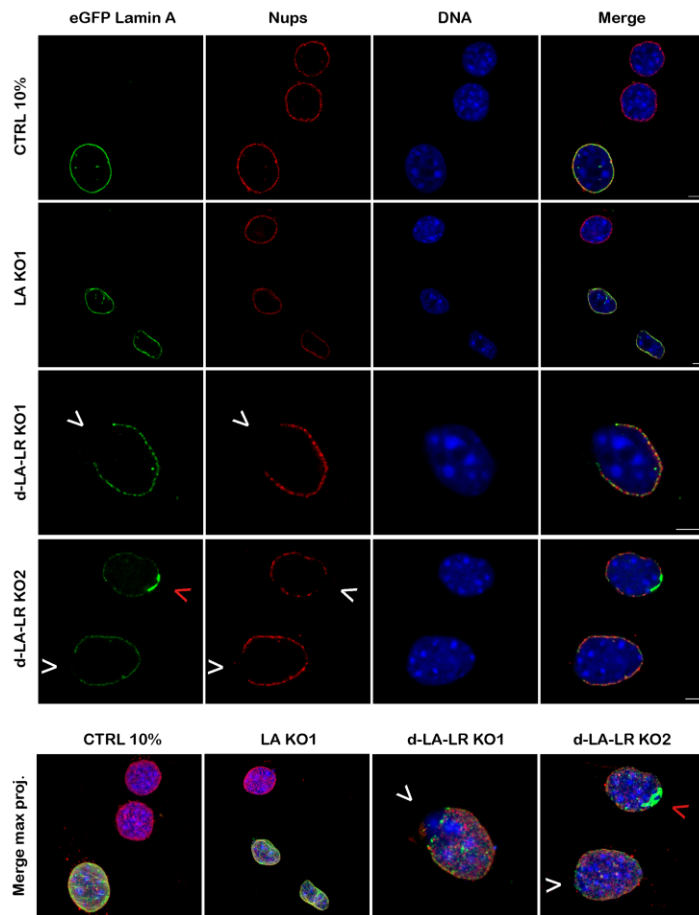


Εικόνα 79: Η θέση των κεντροσωμάτων στους ασύμμετρους πυρήνες για τους πληθυσμούς d-LA-LR KO1 και d-LA-LR KO2 (πράσινο: γ Tubulin, κόκκινο: Lamin B1, μπλε: TOPRO, scale bar 5). Με το άσπρο βέλος διακρίνεται το κεντροσωμάτιο και με κόκκινο η ασυμμετρία της Lamin B1.

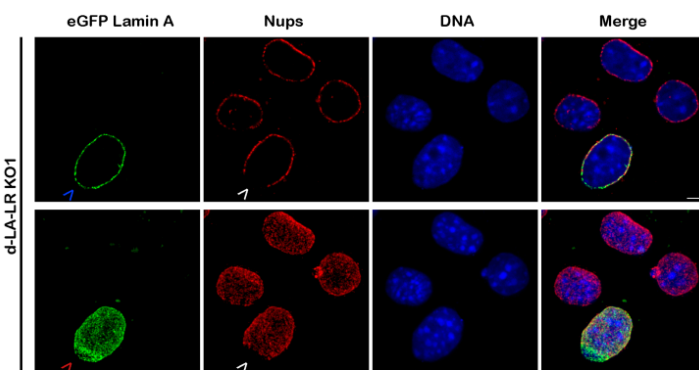
Μία άλλη σημαντική μελέτη που χρησιμοποίησε κύτταρα ποντικού διαγράφοντας συνδυασμούς των λαμινών κατέληξε στο συμπέρασμα πως σε διαφοροποιημένα κύτταρα αν μία λαμίνη εκφράζεται σε ικανοποιητικά επίπεδα, αρκεί ώστε να εξασφαλίσει την ορθή συναρμολόγηση των υπόλοιπων λαμινών και την ομοιόμορφη κατανομή των πυρηνικών πόρων (Guo et al., 2014). Για παράδειγμα, σε κύτταρα EDFCs η Lamin B1 είναι η κυρίαρχη της λάμινας και απαιτείται για την σωστή οργάνωση των υπόλοιπων στοιχείων, ενώ σε κύτταρα MEFs μόνο η διαταραχή της Lamin A/C προκαλεί ασυμμετρία, όπου τα επίπεδα έκφρασής της είναι πολύ μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα των EDFCs.

Στην προσπάθεια ελέγχου της υπόθεσης αυτής, πραγματοποιήθηκε έκτοπη έκφραση των Lamin A/C, LBR και Lamin B1 με ταυτόχρονη σήμανση των Nups. Χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pEGFPN2Lamin A, pEGFPN2LBR και pEGFPN3Lamin B1 που αφέθηκαν να εκφραστούν για 24 ώρες. Αν ισχύουν τα παραπάνω θα επανέλθει η φυσιολογική κατανομή και στις τρεις περιπτώσεις. Βέβαια, στην περίπτωση της Lamin B1 υπάρχει και η ενδογενής έκφραση, επομένως η υπερέκφρασή της είναι πιθανό να επαναφέρει τον φαινότυπο σύμφωνα με την εργασία των Guo et al. (2014).

Βασιζόμενοι σε αυτή την έρευνα, υποθέσαμε πως στην δική μας περίπτωση οι Lamin A/C και Lamin B1 είναι το ίδιο κυρίαρχες στην πυρηνική λάμινα των NIH κυττάρων και πως η έλλειψη του LBR διαταράσσει την οργάνωση της Lamin B1, αν και μορφολογικά δεν φάνηκε κάποια διαφοροποίηση. Σύμφωνα με αυτό, τα κύτταρα LA KO δεν παρουσιάζουν ασυμμετρία λόγω της παρουσίας της Lamin B1, ενώ στα LR KO κύτταρα η απουσία του LBR αποδυναμώνει το δίκτυο της Lamin B1, ωστόσο η παρουσία της Lamin A/C αποτρέπει την ασυμμετρία. Τέλος, στους double knock out κλώνους δεν υπάρχει η Lamin A/C και ταυτόχρονα λόγω απουσίας του LBR η Lamin B1 είναι αποδιοργανωμένη σε βαθμό που να μην μπορεί να διατηρήσει την φυσιολογική κατανομή των υπόλοιπων στοιχείων.



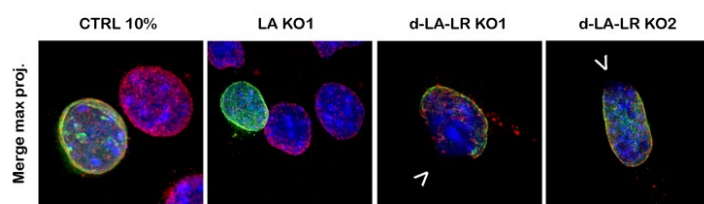
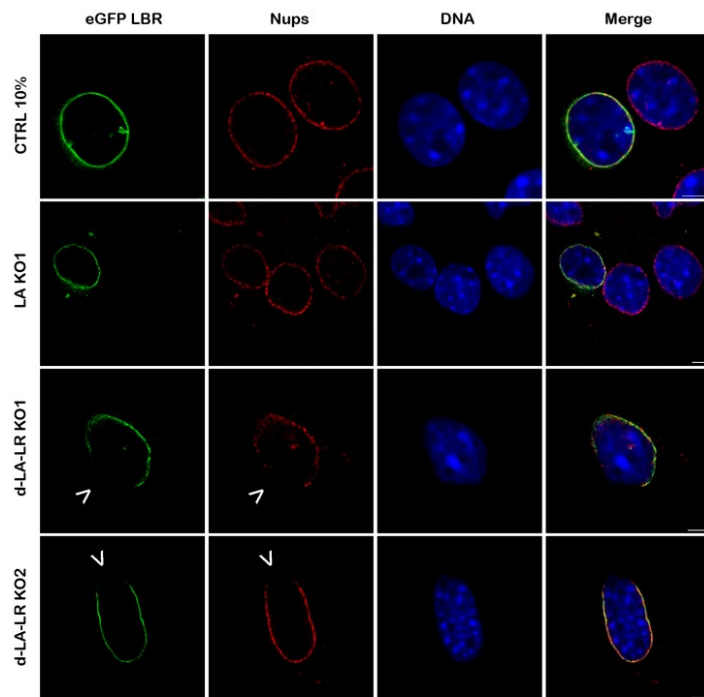
A.



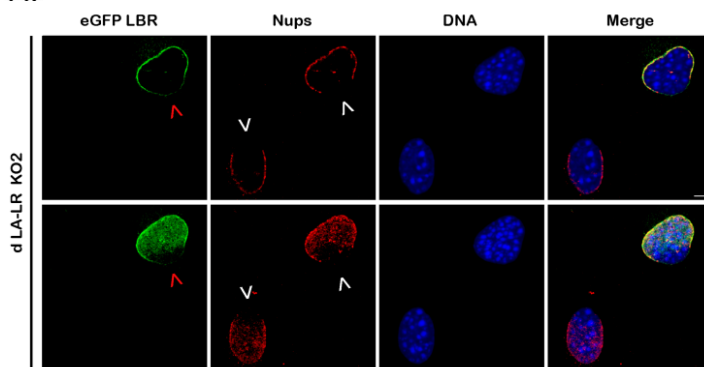
B.

Εικόνα 80: Η κατανομή της εξωγενούς εκφρασμένης Lamin A και των πυρηνικών πόρων μεταξύ των πληθυσμών CTRL 10%, LA KO1, d-LA-LR KO1 και d-LA-LR KO2 (πράσινο: eGFP Lamin A, κόκκινο: Nups, μπλε: TOPRO, scale bar 5μm). A: με άσπρο βέλος διακρίνονται οι πυρήνες που είναι ταυτοχρόνως ασύμμετροι για Lamin A και Nups, ενώ με κόκκινο βέλος διακρίνεται ένας πυρήνας ασύμμετρος ως προς τα Nups αλλά με έντονη κατανομή της Lamin A στην περιοχή της ασυμμετρίας. B: Με άσπρο βέλος διακρίνεται η ασυμμετρία των Nups, με μπλε βέλος η ομοιόμορφη κατανομή της Lamin A στο επίπεδο του ισημερινού ενώ με κόκκινο η έντονη σήμανση της Lamin A μετά από μέγιστη προβολή για έναν πυρήνα του κλώνου d-LA-LR KO1.

Όπως διακρίνεται, τα επίπεδα της έκτοπα εκφρασμένης Lamin A διέφεραν μεταξύ των κυττάρων, ενώ και στους δύο κλώνους εντοπίστηκαν πυρήνες όπου παρέμεναν ασύμμετροι ως προς την κατανομή τόσο των Nups, όσο και της Lamin A. Επίσης, παρατηρήθηκαν περιπτώσεις όπου ο εντοπισμός της Lamin A ήταν συμμετρικός παρουσιάζοντας όμως ανώμαλη κατανομή στην περιοχή της ασυνέχειας των Nups (εικόνα 80).



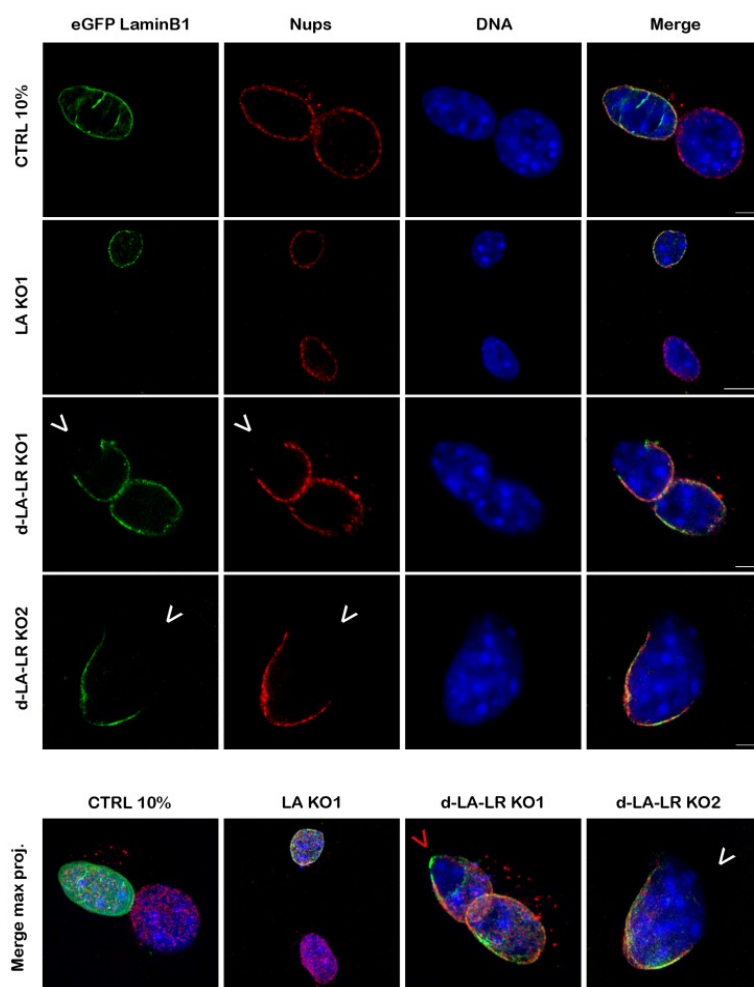
A.



B.

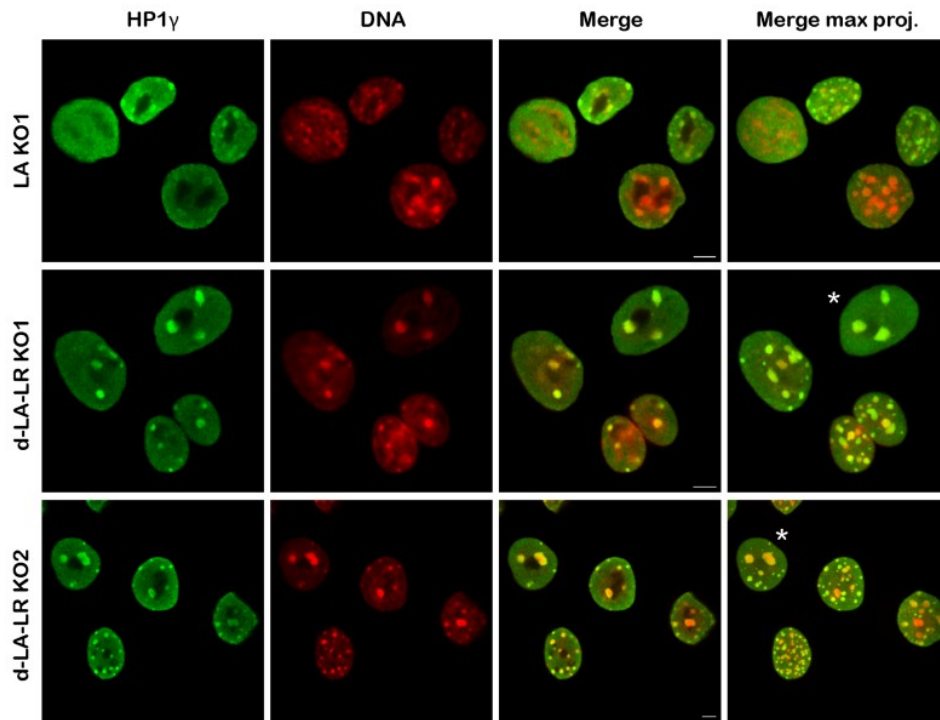
Εικόνα 81: Η κατανομή του εξωγενούς εκφρασμένου LBR και των πυρηνικών πόρων μεταξύ των πληθυσμών CTRL 10%, LA KO1, d-LA-LR KO1 και d-LA-LR KO2 (πράσινο: eGFPLBR, κόκκινο: Nups, μπλε: TOPRO, scale bar 5μm). A: με άσπρο βέλος διακρίνονται οι πυρήνες που είναι ταυτόχρονα ασύμμετροι για LBR και Nups, από οπτική τομή στον ισημερινό και από μέγιστη προβολή. B: Με άσπρο βέλος διακρίνεται η ασυμμετρία των Nups, ενώ με κόκκινο η κατανομή του LBR στο επίπεδο του ισημερινού και σε μέγιστη προβολή για έναν πυρήνα του κλώνου d-LA-LR KO2.

Και στην περίπτωση του LBR διατηρήθηκε ο φαινότυπος της ασυμμετρίας. Επίσης, εντοπίστηκαν ελάχιστες περιπτώσεις του d-LA-LR KO2 κλώνου όπου στην περιοχή της ασυμμετρίας εντοπίστηκε ασθενώς ο LBR (εικόνα 81B). Τέλος και η Lamin B1 απέτυχε να αναστρέψει την ασυμμετρία, ενώ εντοπίστηκαν και πυρήνες του d-LA-LR KO1 κλώνου όπου η Lamin B1 ήταν συμμετρική στο ισημερινό επίπεδο, αλλά απεντοπίστηκε από μεγάλο τμήμα του πυρηνικού φακέλου (εικόνα 82 κόκκινο βέλος).



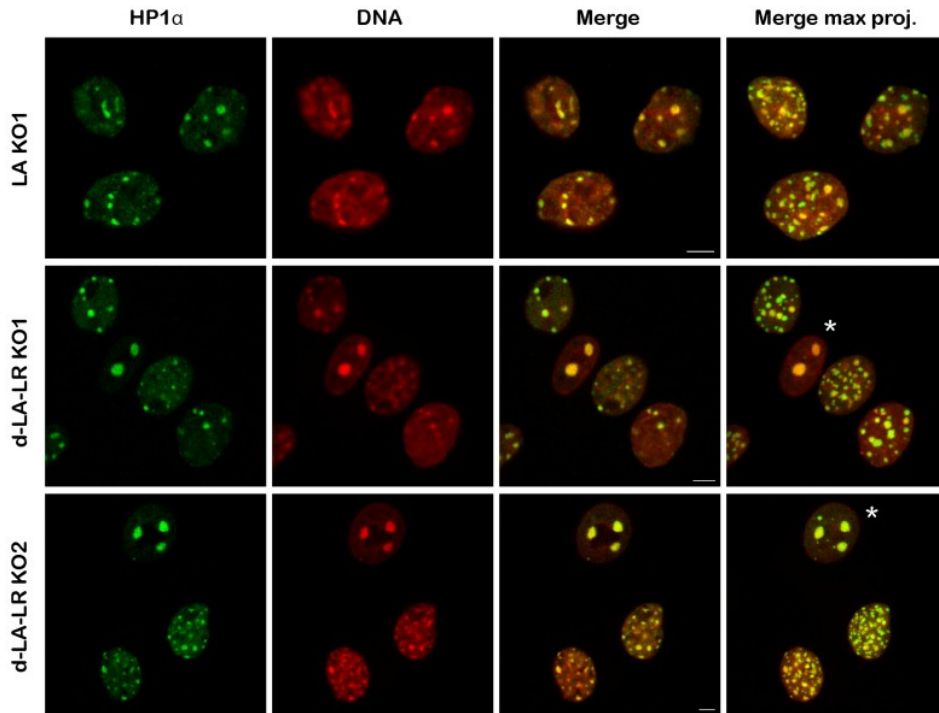
Εικόνα 82: Η κατανομή της εξωγενούς εκφρασμένης Lamin B1 και των πυρηνικών πόρων μεταξύ των πληθυσμών CTRL 10%, LA KO1, d-LA-LR KO1 και d-LA-LR KO2 (πράσινο: eGFP Lamin B1, κόκκινο: Nups, μπλε: TOPRO, scale bar 5μm). A: με άσπρο βέλος διακρίνονται οι πυρήνες που είναι ταυτοχρόνως ασύμμετροι για Lamin B1 και Nups, από οπτική τομή στον ισημερινό και από μέγιστη προβολή. B: Με άσπρο βέλος διακρίνεται η ασυμμετρία των Nups, ενώ με κόκκινο η κατανομή της Lamin B1 σε μέγιστη προβολή για έναν πυρήνα του κλώνου d-LA-LR KO1.

Συμπερασματικά, κανένας από τους τρεις διαμολυσμένους παράγοντες δεν επανέφερε την ομοιόμορφη κατανομή των Nups, τουλάχιστον στις συγκεκριμένες συνθήκες του πειράματος. Μία σημαντική πληροφορία που προέκυψε ήταν πως τον φαινότυπο της ασύμμετρης κατανομής ακολουθούν και οι Lamin A/C και LBR. Επίσης, και στις τρεις περιπτώσεις βρέθηκαν σε μικρή συχνότητα πυρήνες όπου στην ασύμμετρη περιοχή της πυρηνικής μεμβράνης εντοπίστηκαν οι εξωγενώς εκφρασμένες πρωτεΐνες αλλά με ανώμαλο πρότυπο κατανομής. Το εύρημα αυτό είναι σημαντικό, αφού είναι πιθανό ο χρόνος διαμόλυνσης και τα επίπεδα έκφρασης να μην επαρκούσαν για την ολική επαναφορά της φυσιολογικής κατανομής.



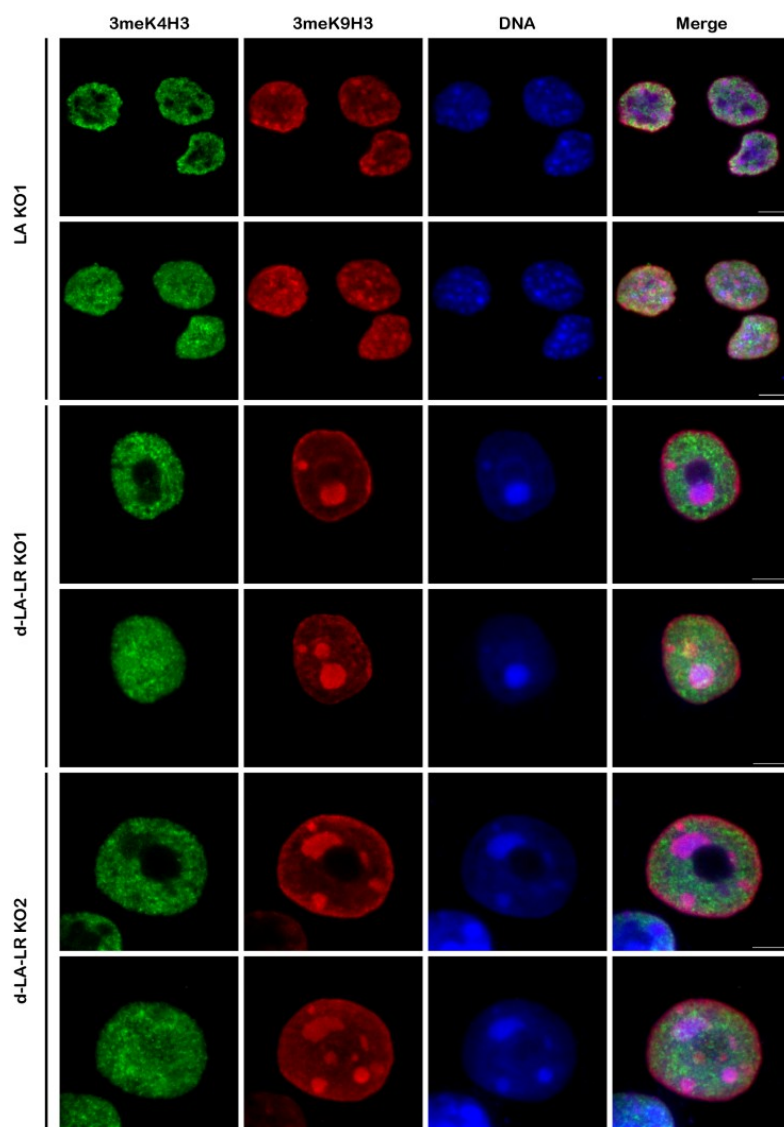
Εικόνα 83: Η κατανομή της HP1γ μεταξύ των πληθυσμών LA KO1, d-LA-LR KO1 και d-LA-LR KO2 (πράσινο HP1γ, κόκκινο: TOPRO scale bar 5μm). Με αστερίσκο διακρίνεται ο εντοπισμός της HP1γ σε πυρήνες με μειωμένες ετεροχρωματικές εστίες.

Σχετικά με τον φαινότυπο των ετεροχρωματικών εστιών που αναφέρθηκε στην αρχή της παραγράφου, εξετάστηκαν διάφορα στοιχεία της ευχρωματίνης και ετεροχρωματίνης, με σκοπό να μελετηθεί αναλυτικότερα το χρωματινικό πεδίο στα κύτταρα αυτά. Στην απεικόνιση μέγιστης προβολής των οπτικών τομών των εικόνων 83 και 84 γίνεται εύκολα αντιληπτή η εκτεταμένη διαφοροποίηση της χρωματινικής αρχιτεκτονικής που παρουσιάζουν κάποιοι από τους πυρήνες των double KO κλώνων σχετικά με τον αριθμό, το μέγεθος και την τοποθέτηση των ετεροχρωματικών εστιών τους.



Εικόνα 84: Η κατανομή της HP1α μεταξύ των πληθυσμών LA KO1, d-LA-LR KO1 και d-LA-LR KO2 (πράσινο HP1α, κόκκινο: TOPRO scale bar 5μm). Με αστερίσκο διακρίνεται ο εντοπισμός της HP1α με μειωμένες ετεροχρωματινικές εστίες.

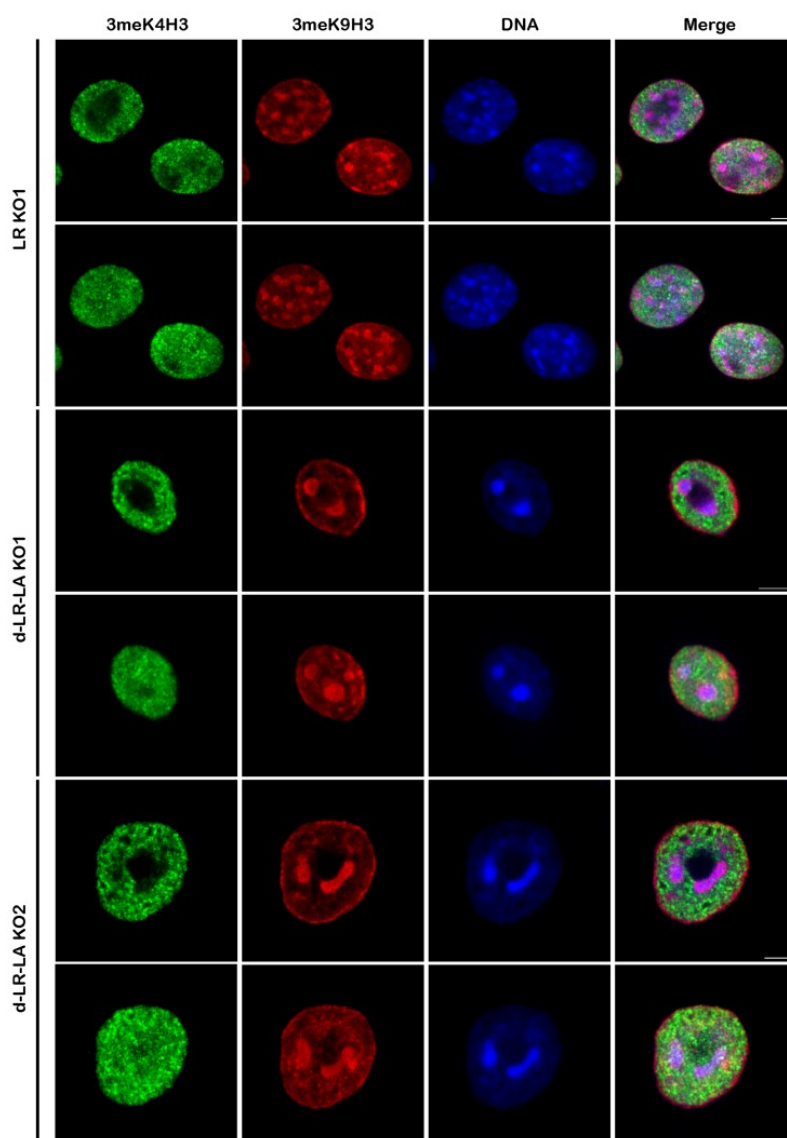
Στους πυρήνες αυτούς, η HP1α εντοπίστηκε έντονα στις ετεροχρωματινικές εστίες, ενώ περιορίστηκε σημαντικά η κατανομή της στο πυρηνόπλασμα, σε σύγκριση με τους πυρήνες που δεν διαφοροποιήθηκαν ως προς την χρωματινική αρχιτεκτονική. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί και με την χρώση του DNA, όπου παρατηρήθηκε μειωμένη ένταση του φθορισμού ενδιάμεσα των ετεροχρωματινικών εστιών, πιθανώς λόγω μεγαλύτερης αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης στις περιοχές αυτές (εικόνα 84). Ωστόσο, αυτό δεν επιβεβαιώθηκε από την κατανομή της HP1γ, που δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο πρότυπο κατανομής της μεταξύ των ετεροχρωματινικών περιοχών (εικόνα 83). Για την περαιτέρω μελέτη των παρατηρήσεων αυτών προχωρήσαμε σε ανοσολογική σήμανση των επιγενετικών τροποποιήσεων 3meK9H3 και 3meK4H3.



Εικόνα 85: Η σήμανση των 3meK4H3 και 3meK9H3 μεταξύ των πληθυσμών LA KO1, d-LA-LR KO1 και d-LA-LR KO2 (πράσινο: 3meK4H3, κόκκινο: 3meK9H3, μπλε: TOPRO scale bar 5μm). Για κάθε πληθυσμό παρουσιάζεται ένα στιγμιότυπο από το επίπεδο του ισημερινού και από μέγιστη προβολή.

Αν και από τη σήμανση του DNA φαίνεται περισσότερο αποσυμπυκνωμένη η χρωματίνη μεταξύ των ετεροχρωματικών εστιών, η κατανομή της 3meK4H3 δεν μεταβλήθηκε και ακολούθησε το αναμενόμενο πρότυπο ανεξαρτήτως του φαινοτύπου. Αντίθετα, στους πυρήνες με τον μειωμένο αριθμό των εστιών της ετεροχρωματικής παρατηρήθηκε έντονη μεθυλίωση της K9H3 στην περιφέρεια του πυρήνα και των πυρηνίσκων. Πολύ σημαντικό είναι πως ο έντονος εντοπισμός της 3meK9 παρουσιάζονταν μόνο στους πυρήνες με τον συγκεκριμένο φαινότυπο (εικόνα 85). Πιθανώς η ταυτόχρονη απουσία των Lamin A/C και LBR ωθεί σε μερική συγχώνευση των ετεροχρωματικών εστιών και για αυτό παρατηρούνται πολύ λίγες σε αριθμό

και μεγάλες σε μέγεθος εστίες ετεροχρωματίνης, οι οποίες εντοπίζονται προς το κέντρο του πυρήνα και περιφερικά των πυρηνίσκων. Ωστόσο δεν άλλαξε ο εντοπισμός της περιφερικής χρωματίνης, όπου εμφάνισε περαιτέρω συμπύκνωση παρουσιάζοντας υψηλά επίπεδα 3meK9H3, χωρίς όμως να είναι γνωστό αν μεταβάλλεται η ποσότητά ή οι αλληλουχίες της.



Εικόνα 86: Η σήμανση των 3meK4H3 και 3meK9H3 μεταξύ των πληθυσμών LR KO1, d-LR-LA KO1 και d-LR-LA KO2 (πράσινο: 3meK4H3, κόκκινο: 3meK9H3, μπλε: TOPRO scale bar 5μm). Για κάθε πληθυσμό παρουσιάζεται ένα στιγμιότυπο από το επίπεδο του ισημερινού και από μέγιστη προβολή.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις αναπαράχθηκαν και από την δεύτερη double KO σειρά, θυμίζοντας αρκετά ατελώς ανεστραμμένη πυρηνική αρχιτεκτονική, που παρουσιάζουν οι πυρήνες των ραβδίων κυττάρων

νυκτόβιων θηλαστικών (εικόνα 86) (Solovei et al., 2009). Στους τελευταίους, η 3meK9H3 εντοπίζεται έντονα στο μοναδικό χρωμοκέντρο του πυρήνα και δεν σχετίζεται καθόλου με την περιφέρεια, σε αντίθεση με τις δικές μας μορφολογικές παρατηρήσεις, όπου η περιφέρεια του πυρήνα συνεχίζει να αλληλεπιδρά με την ετεροχρωματίνη (Eberhart et al., 2013).

Καταλήγοντας, η ταυτόχρονη απαλοιφή πιθανώς να προκαλεί μία ανολοκλήρωτη ανεστραμμένη πυρηνική αρχιτεκτονική, η οποία όμως παρατηρείται σε ένα μόνο μέρος του κυτταρικού πληθυσμού. Οι πυρήνες αυτοί μορφολογικά παρουσιάζουν μειωμένο αριθμό ετεροχρωματινικών εστιών με μεγάλο μέγεθος, ενώ παράλληλα διατηρείται η ετεροχρωματίνη στις περιφέρειες των πυρηνίσκων και του πυρήνα. Τέλος, αξιοσημείωτη ήταν η παρατήρηση πως η περιφερική χρωματίνη έφερε έντονη τριμεθυλίωση της K9H3 που μπορεί να σχετίζεται με μεγαλύτερο βαθμό χρωμοσωμικής συμπύκνωσης στην περιφέρεια του πυρήνα.

4. Συζήτηση

Ο όρος της ετεροχρωματίνης εισήχθη από τον Emil Heitz ήδη από το 1928, βάζοντας τα θεμέλια για τη μελέτη της πυρηνικής αρχιτεκτονικής πολύ πριν γίνει γνωστή η βιομοριακή σύσταση του γενετικού υλικού και η δομή του DNA. Από τότε έχουν γνωστοποιηθεί πολλά χαρακτηριστικά της χρωματίνης και των ρόλων της στη γονιδιακή έκφραση και τη διατήρηση της κυτταρικής ταυτότητας. Τα τελευταία όμως δεκαπέντε χρόνια έχουν γίνει άλματα στην κατανόηση της γονιδιωματικής αρχιτεκτονικής, με νέους όρους όπως τα χρωματινικά διαμερίσματα, οι τοπολογικά διασυνδεδεμένες επικράτειες (TADs) και οι διασυνδεδεμένες με τη λάμινα επικράτειες (LADs). Σε αυτή την πρόοδο συνέβαλε καθοριστικά η ανάπτυξη νέων μεθόδων τόσο μικροσκοπίας αλλά και των τεχνικών 3C που μελετούν τις χρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις (Dixon et al., 2012). Από αυτές, έχει προκύψει πως τα επίπεδα της χρωματινικής οργάνωσης είναι λειτουργικά αυτόνομα, και οργανώνονται υπό το πρίσμα των χρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων, συντελώντας σε μία δομή μορφοκλασματικού τύπου (fractal) (Lieberman Aiden et al., 2009).

Ο διαχωρισμός μεταξύ ευχρωματίνης και ετεροχρωματίνης συντελείται κυρίως μέσω των ισχυρών ελκτικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών ετεροχρωματινικών αλληλουχιών (Falk et al., 2019). Επίσης, η χωρική τους τοποθέτηση είναι πολύ σημαντική για τη φυσιολογική λειτουργία του κυτάρου και επιτελείται από πυρηνικές δομές εκτεταμένης αλληλεπίδρασης με τη χρωματίνη (tethering points), όπως οι περιοχές μεταγραφής και συρραφής των RNA, οι περιφέρειες των πυρηνίσκων και ο πυρηνικός φάκελος. Ο τελευταίος μάλιστα αποτελεί και την σημαντικότερη από αυτές και η σύνδεσή του με τη χρωματίνη μέσω των LADs εξυπηρετεί στη διατήρηση της συμβατικής αρχιτεκτονικής, όπου η ετεροχρωματίνη εντοπίζεται στην περιφέρεια του πυρήνα και η ευχρωματίνη προς το εσωτερικό του. Ωστόσο η περιφέρεια του πυρήνα φαίνεται ότι υπηρετεί πολυπλοκότερους σκοπούς, όπως την προγραμματισμένη γονιδιακή αποσιώπηση κατά τη διαφοροποίηση και τη διαμόρφωση και συντήρηση ολόκληρου του ετεροχρωματινικού πεδίου (Penagos-Puig & Furlan-Magaril, 2020).

Στην πολυπλοκότητα των ρόλων αυτών συμβάλλει και η πολυδιάστατη δομή του πυρηνικού φακέλου, μία διπλοστοιβάδα μεμβρανών που φέρει μεγάλο πρωτεϊνικό φορτίο με πληθώρα ιδιοτήτων. Πολύ χρήσιμο μοντέλο στη

μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πυρηνικής περιφέρειας και χρωματίνης αποτέλεσαν τα ραβδία κύτταρα νυκτόβιων θηλαστικών, που παρουσιάζουν ανεστραμμένη πυρηνική αρχιτεκτονική. Η μελέτη των συγκεκριμένων κυττάρων ανέδειξε δύο βασικούς μηχανισμούς πρόσδεσης της ετεροχρωματίνης στην περιφέρεια. Ο πρώτος περιλαμβάνει την Lamin A/C (A-tether) μαζί με διάφορες πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης που ποικίλουν αναλόγως με τον κυτταρικό ιστό και το αναπτυξιακό στάδιο. Στο δεύτερο μηχανισμό κυριαρχεί ο LBR (B-tether) έχοντας σημαντικό ρόλο σε πολυδύναμα και αδιαφοροποίητα κύτταρα (Solovei et al., 2013).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του χρωματινικού πεδίου συναρτήσει της πυρηνικής περιφέρειας σε διαφοροποιημένα κύτταρα. Ως βιολογικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα NIH/3T3 που εκφράζουν τόσο LBR όσο και Lamin A/C και αποσιωπήθηκε πλήρως η έκφρασή τους, είτε μεμονωμένα είτε συνδυαστικά, μέσω της μεθόδου CRISPR/Cas9n. Σε κάθε περίπτωση μελετήθηκε η χρωματινική κατανομή και η επιγενετική σύσταση του πυρήνα, ο εντοπισμός των πρωτεϊνών της πυρηνικής περιφέρειας και η πρόσδεσή της με τη χρωματίνη, καθώς και η μεταγραφική δραστηριότητα στα πλαίσια της χρωματινικής αναδιαμόρφωσης.

Μία ανασκόπηση των αποτελεσμάτων δείχνει πως οι περισσότερες μεταβολές, τόσο στην κατανομή των πρωτεϊνών του πυρηνικού φακέλου όσο και στο χρωματινικό τοπίο, συμβαίνουν με την ταυτόχρονη απουσία των Lamin A/C και LBR. Υπενθυμίζεται πως σε αυτές τις περιπτώσεις η απαλοιφή επιβεβαιώθηκε μόνο σε πρωτεϊνικό επίπεδο, με το ενδεχόμενο ένα μέρος των διαφοροποιήσεων να οφείλονται σε κάποια μεταλλαγή που δεν ανιχνεύτηκε. Μάλιστα, κάτι τέτοιο θα θύμιζε πολύ τις περιπτώσεις μερικών λαμινοπαθειών που αναφέρθηκαν στην εισαγωγή (παράγραφος 1.3.2), όπου μεταλλάξεις της Lamin A/C είναι υπεύθυνες για την ασυνέχεια στην κατανομή πλήθους παραγόντων του πυρηνικού φακέλου. Βέβαια, οι φαινότυποι των double knock out κυττάρων επιβεβαιώθηκαν από τέσσερις διαφορετικούς κλώνους που προήρθαν από δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές, μειώνοντας σημαντικά το παραπάνω ενδεχόμενο.

4.1 Η απουσία του LBR μειώνει τον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων, ενώ η επιπλέον έλλειψη της Lamin A/C επηρεάζει σημαντικά το αναπτυξιακό δυναμικό

Σχετικά με το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων δεν επηρεάστηκε ο μιτωτικός δείκτης στις περισσότερες περιπτώσεις της απαλοιφής, παρόλο που ο LBR έχει συνδεθεί στενά με την ανασυγκρότηση του πυρηνικού φακέλου. Εξαίρεση αποτελούν τα κύτταρα d-LR-LA KO όπου το ποσοστό των μιτωτικών κυττάρων διαφοροποιήθηκε αρκετά μεταξύ των εξεταζόμενων πληθυσμών (εικόνα 70B). Επιπλέον, στο πείραμα αυτό τα κύτταρα CTRL 15% παρουσίασαν μειωμένο μιτωτικό δείκτη, ο οποίος όμως δεν επιβεβαιώθηκε από την καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων και από πειράματα κυτταρομετρίας ροής. Για τον λόγο αυτό και εξαιτίας της μεγάλης διακύμανσης των τιμών θα πρέπει να επαναληφθούν οι συγκεκριμένες μετρήσεις προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

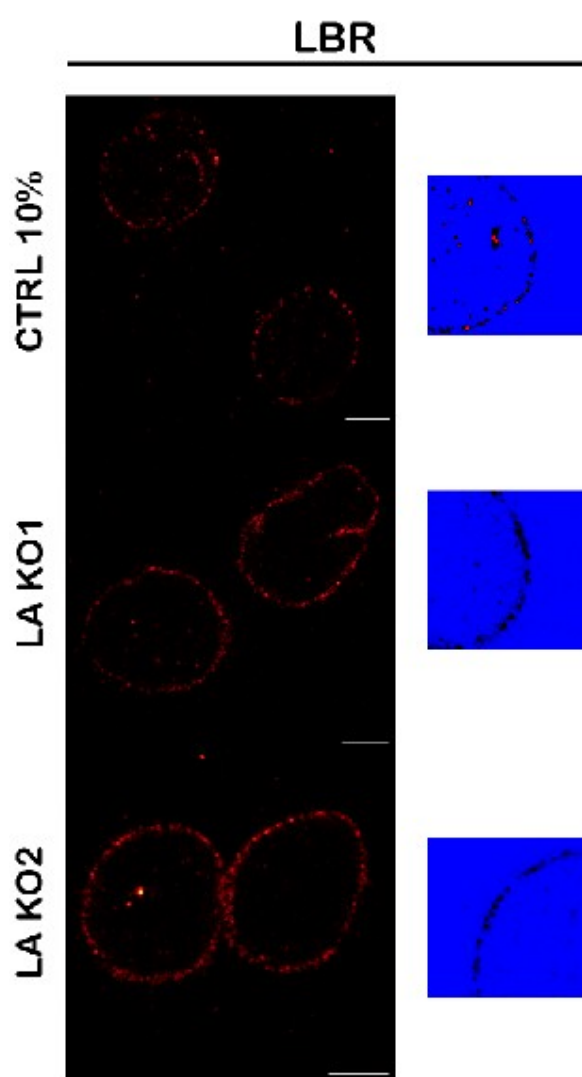
Αναφορικά με τη μεσόφαση, μειωμένη ανάπτυξη παρουσίασαν τα κύτταρα απουσία του LBR (εικόνα 55A), ενώ μέσω κυτταρομετρίας ροής δείχθηκε πως πιθανώς αυτό να οφείλεται σε μία μικρή αλλά επαναλαμβανόμενη καθυστέρηση στην φάση S, χωρίς όμως μορφολογικά να παρατηρείται κάποια ατυπία στην αντιγραφή του DNA (εικόνα 53B & 54). Καθυστέρηση στην ανάπτυξη εμφάνισαν και οι double knock out κλώνοι, όπου μάλιστα επηρεάστηκε ακόμα περισσότερο η καμπύλη ανάπτυξης (εικόνα 69A & 70A). Σημαντική παρατήρηση, πως σε οποιαδήποτε κυτταρική σειρά αποσιωπήθηκε ο LBR επηρεάστηκε το πολλαπλασιαστικό δυναμικό, ακόμα και παρουσία αυξημένου ορού. Πιθανώς η καθυστέρηση της φάσης S αθροίζεται μεταξύ των κύκλων διαίρεσης, ενώ η επιπλέον απαλοιφή της Lamin A/C εντείνει την παραμονή στην φάση S ή επηρεάζει σε συνδυασμό με τον LBR κάποιο άλλο στάδιο της μεσόφασης.

Θα μπορούσαν να επαναληφθούν τα μορφολογικά πειράματα για τα κύτταρα LR KO παρουσία 10% ορού και να μελετηθούν περαιτέρω τα στάδια της φάσης S, ιδίως των σταδίων που αντιγράφεται η ετεροχρωματίνη της περιφέρειας. Επίσης, για τα κύτταρα double knock out θα πρέπει να εξεταστούν τα στάδια του κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρίας ροής, με

σκοπό να διευκρινιστεί το σημείο της μεσόφασης στο οποίο οφείλεται ο σημαντικά μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης των συγκεκριμένων κυττάρων.

4.2 Η απαλοιφή των λαμινών τύπου A αυξάνει την τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 στην ιστόνη H3.

Σχετικά με τις μεμονωμένες απαλοιφές των Lamina A/C και LBR, στα κύτταρα LR KO δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην κατανομή των πρωτεϊνών του πυρηνικού φάκελου και της πυρηνικής λάμινας που μελετήθηκαν, αλλά



Εικόνα 87: Η κατανομή των ολιγομερών του LBR μεταξύ των πληθυσμών LA KO1, LA KO2 και κυττάρων CTRL 10%. (scale bar: 5).

ούτε και στην χρωματινική αρχιτεκτονική. Αντίθετα, στα LA KO κύτταρα διαφοροποιήθηκε ελαφρώς ο εντοπισμός του LBR και αυξήθηκαν σημαντικά τα επίπεδα της τριμεθυλιωμένης K9H3. Αν και η κατανομή των λαμινών τύπου B και της Lap2b παρέμεινε ίδια, ο LBR που αλληλεπιδρά εκτεταμένα με αυτές φάνηκε να διαφοροποιείται στην περιφέρεια όλων των πυρήνων της LA KO σειράς. Παρατηρήθηκε αυξημένη παρουσία του στον πυρηνικό φάκελο η οποία όμως δεν ήταν εύκολα παρατηρήσιμη σε μορφολογικό επίπεδο (εικόνα 87). Στην προσπάθεια αναλυτικότερης μελέτης της κατανομής του LBR, πραγματοποιήθηκαν πειράματα υπερδιακριτικής μικροσκοπίας (Stimulate demission

depletion microscopy, STED), ωστόσο λόγω τεχνικών προβλημάτων δεν

εξήχθησαν συμπεράσματα. Επίσης, από την ανάλυση του μεταγραφικού προφίλ των LA KO κλώνων δεν προέκυψε αύξηση στην έκφραση του LBR αλλά ούτε μεταβολή στην έκφραση κάποιου στοιχείου της πυρηνικής περιφέρειας που να σχετίζεται άμεσα με την εντονότερη παρουσία του στον πυρηνικό φάκελο.

Είναι σημαντικό να επαναληφθούν τα πειράματα STED, ώστε να μελετηθούν με μεγαλύτερη ευκρίνεια τα ολιγομερή του LBR (microdomains), που πιθανώς να είναι περισσότερα και μεγαλύτερα σε μέγεθος στην εσωτερική μεμβράνη των πυρήνων LA KO. Επιπλέον, θα πρέπει να προσδιοριστούν τα πρωτεϊνικά του επίπεδα, τόσο στο σύνολο του κυττάρου όσο και μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος, ώστε να προσδιοριστεί αν επηρεάζεται η αποδόμησή του ή εμπλέκεται κάποιος μηχανισμός που καθλώνει περισσότερα μόρια LBR από το ενδοπλασματικό δίκτυο στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη.

Το στοιχείο που διαφοροποιήθηκε σημαντικά στην LA KO σειρά αφορούσε τα επίπεδα της 3meK9H3, χαρακτηριστικής τροποποίησης της συστατικής ετεροχρωματίνης. Λόγω των ιδιομορφιών που παρουσιάζουν οι πυρηνίσκοι, δεν μελετήθηκαν τα επίπεδα της 3meK9H3 των NADs αλληλουχιών, αν και συμπεριλήφθηκαν στις μετρήσεις έντασης φθορισμού της 3meK9H3 όλου του πυρήνα. Τα μεγαλύτερα επίπεδα της 3meK9H3 σημειώθηκαν στην περιφέρεια του πυρήνα όπου εντοπίζεται η ετεροχρωματίνη των LADs και στις ετεροχρωματινικές εστίες (εικόνα 36-42). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, πως παρόλο που η HP1α αλληλεπιδρά με την 3meK9H3 δεν διαφοροποιήθηκε η κατανομή της, τουλάχιστον μορφολογικά.

Γενικότερα η μεθυλίωση της K9H3 συμμετέχει σε πολλές διαδικασίες της φυσιολογίας της χρωματίνης αλλά και του πυρήνα στο σύνολό του. Για τον λόγο αυτό πιθανώς ο μηχανισμός του φαινοτύπου να περιλαμβάνει πολλούς παράγοντες, όπως ένζυμα τροποποίησης της λυσίνης 9 της H3 αλλά και κοντινών καταλοίπων, χρωματινικές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες της πυρηνικής περιφέρειας. Σίγουρα θα πρέπει να μελετηθούν και άλλες τροποποιήσεις που συσχετίζονται με την συστατική ετεροχρωματίνη, όπως η 2meK36H3, αλλά και τροποποιήσεις της περιστασιακής ετεροχρωματίνης (3meK27H3), με σκοπό να διερευνηθεί εάν ο φαινότυπος είναι ειδικός για την συγκεκριμένη τροποποίηση ή αφορά γενικότερα την συμπύκνωση των

μεταγραφικά ανενεργών περιοχών. Επιπλέον, θα μπορούσαν να εξεταστούν τα επίπεδα και άλλων τροποποιήσεων της H3, ανεξαρτήτως χρωματικού διαμερίσματος, που μπορεί να προωθούν ή να καταστέλλουν την τριμεθυλίωση της K9H3. Τέλος, είναι αναγκαίο να μελετηθούν τα ένζυμα τροποποίησης της K9H3me3 αλλά και στοιχεία που συσχετίζονται με την ενεργότητα των ενζύμων αυτών.

Σχετικά με τη σύνδεση της 3meK9H3 με την LaminA/C, είναι γνωστό πως εμπλέκονται έντονα με τη χρωματική οργάνωση στα όρια του πυρήνα, ενώ αρκετές είναι και οι περιπτώσεις όπου ο εντοπισμός των LADs καθορίζεται από την μεθυλίωση της K9H3 (Harr et al., 2015). Βέβαια, δεν υπάρχουν δεδομένα που να εμπλέκουν άμεσα την τροποποίηση αυτή με την λειτουργία της LaminA/C. Οι μόνες περιπτώσεις συμμετοχής και των δύο σε κάποιο φαινότυπο είναι στις περιπτώσεις των λαμινοπαθειών, όπου σε πολλές έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις της LaminA/C παράλληλα με εκτεταμένη απώλεια της 3meK9H3 από το σύνολο της χρωματίνης (Luperchio et al., 2014). Ωστόσο, η σύνδεση μεταξύ των μεταλλάξεων της LaminA/C και των καθολικών επιπέδων της 3meK9H3 παραμένουν ασαφή.

4.3 Οι μεμονωμένες απαλοιφές των γονιδίων mLBR και mLINA επηρεάζουν τη μεταγραφή παραγόντων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και της κυτταρικής προσκόλλησης

Παρόλο που ο LBR και η Lamin A/C είναι κύρια συστατικά της πυρηνικής περιφέρειας, οι μεμονωμένες απαλοιφές τους δεν επέφεραν μεταβολές στην έκφραση άλλων παραγόντων του πυρηνικού φακέλου και της πυρηνικής λάμινας. Επίσης, αν και ρυθμίζουν συντονισμένα την γονιδιακή αποσιώπηση και τη χρωματική κατανομή, οι απουσίες τους δεν προκάλεσαν αλλαγές στη μεταγραφική δραστηριότητα γονιδίων που σχετίζονται με το επιγενετικό τοπίο και τη χρωματική δομή.

Ωστόσο, στην περίπτωση των LA KO κλώνων σημειώθηκε μεταβολή στην έκφραση των πρωτεϊνών Nup210 και Nsd1. Η Nup210 είναι μία διαμεμβρανική νουκλεοπορίνη που το μεγαλύτερο αμινοξικό της τμήμα εδράζεται στον περιπυρηνικό χώρο και διαθέτει μία περιοχή 23 καταλοίπων

που εμπλέκονται στον σχηματισμό νέων NPCs, λειτουργώντας ως παράγοντας σύντηξης μεμβρανών (Greber et al., 1990, Drummond & Wilson, 2002). Επιπλέον η έκφρασή της διαφέρει μεταξύ των κυτταρικών τύπων του ποντικού και πιθανώς να έχει συγκεκριμένες λειτουργίες ανά κυτταρικό τύπο (Olsson et al., 2003, Stavru et al., 2006). Για παράδειγμα, είναι πιθανό να λειτουργεί ως θέση αλληλεπίδρασης αναδιαμορφωτών της χρωματίνης, καθώς έχει αναφερθεί πως απώλειά της μειώνει τα ολικά επίπεδα της acK27H3 και προκαλεί περαιτέρω συμπυκνωμένες δομές χρωματίνης (Hong et al., 2021). Η Nsd1 είναι υπεύθυνη για τις me/2meK36H3 και αλληλεπιδρά με υποκινητές πολλών γονιδίων συμμετέχοντας στην ρύθμιση διάφορων διαδικασιών όπως η κυτταρική ανάπτυξη και ο καρκίνος (Lucio-Eterovic et al., 2010). Σχετικά με τις μεθυλιώσεις της λυσίνης 36 της ιστόνης H3 είναι πολύ λίγα γνωστά και συγκεκριμένα στον άνθρωπο εμπλέκεται στην σύνδεση μεταξύ των διαδικασιών της μεταγραφής και του ματίσματος (Sims & Reinberg, 2009). Οι δύο παραπάνω πρωτεΐνες θα μπορούσαν να μελετηθούν περαιτέρω για την πιθανή συμμετοχή τους στον φαινότυπο της αυξημένης τριμεθυλίωσης της K9H3 που παρουσιάζουν οι LA KO κλώνοι.

Ένα πολύ σημαντικό εύρημα της μεταγραφικής ανάλυσης των KO κλώνων ήταν πως τόσο η απαλοιφή του LBR όσο και των λαμινών τύπου A σε κύτταρα NIH, προκαλούν αλλαγές στη μεταγραφική δραστηριότητα γονιδίων σχετικών με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, την κυτταρική προσκόλληση και κίνηση. Τα κύτταρα NIH είναι ινοβλάστες ποντικού, επομένως επηρεάζεται η βασική λειτουργία τους που είναι η σύνθεση της θεμέλιας ουσίας των ιστών και σημαντικές ικανότητές τους όπως η έντονη προσκόλληση και μετακίνηση.

Η απώλεια του γονιδίου LMNA έχει συσχετιστεί με αλλαγές στη μεταγραφή γονιδίων σχετικών με τη μυϊκή και καρδιακή διαφοροποίηση στα πρώτα μόνο μεταγεννητικά στάδια της ανάπτυξης του ποντικού (Kubben et al., 2011). Στη μελέτη των Solovei et al. (2013) η απαλοιφή των LBR και Lamina A/C σε πρώιμα κύτταρα μυοβλαστών επηρέασε με αντίθετο τρόπο τη μεταγραφή πολλών μυϊκών γονιδίων. Άξιο αναφοράς πως και στις δύο περιπτώσεις απαλοφών επηρεάστηκαν σημαντικά, γονίδια σχετικά με τον εξωκυττάριο χώρο, την θεμέλια ουσία και το κολλαγόνο, ενώ σε πλήρη διαφοροποιημένο μύοι οι αλλαγές ήταν ελάχιστες. Τα αποτελέσματα αυτά

συμφωνούν με τη δική μας μεταγραφική ανάλυση, με την διαφορά πως οι μεταβολές αυτές συμβαίνουν σε τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα όπως τα NIH. Επίσης, μία σημαντική εργασία ανέφερε πως μετάλλαξη του γονιδίου mLMNA σχετική με το σύνδρομο της προγηρίας HGPS προκαλεί σημαντικές αλλαγές στην μεταγραφή γονιδίων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας σε κύτταρα εμβρυικών ινοβλαστών ποντικού (MEFs). Μάλιστα, θεωρήθηκε πως ένα μέρος των φαινοτύπων της προγηρίας πιθανώς να οφείλεται στην ελλιπή θεμέλια ουσία που προκαλεί διακοπή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και ατυπίες στις δομές των ιστών (Hernandez et al., 2010).

Σίγουρα θα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω η επίδραση των LBR και Lamin A/C στην σύσταση της θεμέλιας ουσίας όπως επίσης και στην ικανότητα των κυττάρων NIH στην προσκόλληση και μετανάστευση. Επιπλέον, ανεξάρτητα της γονιδιακής ρύθμισης, είναι πιθανό η απουσία της Lamin A/C να διαταράσσει το σύμπλεγμα LINC και την οργάνωση του κυτταροσκελετού, όπως έχει αναφερθεί σε κύτταρα MEFs και NIH κατά την διαδικασία της κυτταρικής μετακίνησης (Huben et al., 2009). Βέβαια από τη μορφολογική παρατήρηση της α Tubulin σε LA KO κύτταρα δεν προέκυψε κάποια διαφοροποίηση (εικόνα 6.2 & 6.3). Ωστόσο θα μπορούσαν να μελετηθούν πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού που συνδέονται με την πυρηνική μεμβράνη καθώς και ο πολυμερισμός/αποπολυμερισμός της ακτίνης στην περιφέρεια του κυττάρου.

4.4 Η συνδυαστική απαλοιφή των γονιδίων mLBR και mLMNA επιφέρει τον απεντοπισμό πρωτεϊνών από τμήματα της πυρηνικής περιφέρειας

Η ταυτόχρονη απουσία των Lamin A/C και LBR προκάλεσε ασυνέχεια στην κατανομή πλήθους παραγόντων που σχετίζονται με διαφορετικούς τρόπους με τις μεμβράνες του πυρηνικού φακέλου, δημιουργώντας έναν φαινότυπο που ονομάστηκε ασυμμετρία (εικόνα 73-77). Όπως σημειώθηκε στην εισαγωγή (παράγραφος 1.3.2), μεταβολές στην συνοχή της πυρηνικής περιφέρειας των θηλαστικών έχουν συσχετιστεί με μεταλλάξεις στις LaminA/C και Emerin, που αφορούν ασθένειες όπως η EDMD και το σύνδρομο FPLD. Δερματικοί ινοβλάστες ασθενών με τις παραπάνω λαμινοπάθειες εμφάνισαν

αρκετές πυρηνικές ανωμαλίες συμπεριλαμβανομένων και στοιχείων της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης (Ognibene et al., 1999, Vigouroux et al., 2001). Επιπλέον, η πλειοψηφία των ατυπιών αυτών εμφανίζεται σε ινοβλαστικά κύτταρα, ενώ το αίτιο της ασυμμετρίας πιθανώς να είναι ο εκτεταμένος διαχωρισμός μεταξύ των μεμβρανών του πυρηνικού φακέλου σε συγκεκριμένα σημεία (Tranisch et al., 2017).

Βέβαια, στις δικές μας αναλύσεις δεν υπήρξε η δυνατότητα σήμανσης των μεμβρανών του πυρηνικού φακέλου για να επιβεβαιώσουμε κάτι τέτοιο. Επίσης, παρόλο που τα NIH κύτταρα είναι ινοβλάστες, η απουσία της Lamin A/C δεν ήταν αρκετή για την εμφάνιση της ασυμμετρίας. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός πως το σύστημά μας είναι *in vitro* και επίσης λόγω διαφορετικής σύστασης της πυρηνικής λάμινας, να είναι αναγκαία η επιπλέον απαλοιφή και του LBR για την εμφάνιση της ασυμμετρίας.

Σχετικά με τον μηχανισμό, βασιζόμενοι στην μελέτη των Guo & Zheng (2015), πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις που έδειξαν αρκετά μειωμένα ποσοστά των ασύμμετρων πυρήνων παρουσία του φαρμάκου nocodazole (αναστολέας του πολυμερισμού των μικροσωληνίσκων) (δεδομένα δεν παρουσιάζονται) γεγονός που σημαίνει ότι οι μικροσωληνίσκοι είναι πιθανό να συμβάλλουν ως ένα βαθμό στον φαινότυπο της ασυμμετρίας. Ωστόσο πρέπει να πραγματοποιηθούν αρκετά ακόμα πειράματα για τον σκοπό αυτό. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η τροποποίηση H3T3^{rh} και αποδείχθηκε πως η ασυμμετρία δεν συμβαίνει στην πρόφαση, σε αντίθεση με όσα διατείνονται οι Guo & Zheng. Θα μπορούσε ο φαινότυπος να προκύπτει στην τελόφαση/κυττοκίνηση και να γίνεται παρατηρήσιμος κυρίως στην αρχή της φάσης G1, όπως ανέφεραν σε μία μελέτη τους οι Moeshima et al. (2006), χρησιμοποιώντας κύτταρα HeLa.

Ανεξαρτήτως μηχανισμού και σταδίου του κυτταρικού κύκλου, η δική μας υπόθεση βασίστηκε σε μία εργασία των Guo et al. (2014), που απέδειξαν ότι σε διαφοροποιημένα κύτταρα ποντικού οποιαδήποτε λαμίνη εκφράζεται σε ικανοποιητικά επίπεδα αρκεί ώστε να εξασφαλίσει την ορθή κατανομή των NPCs και των υπόλοιπων παραγόντων της περιφέρειας του πυρήνα. Σύμφωνα με αυτά, υποθέσαμε πως τα NIH κύτταρα εκφράζουν σε παρόμοια επίπεδα τις Lamin A/C και Lamin B1 και στις μεμονωμένες απαλοιφές υπάρχει είτε η μία είτε η άλλη, ώστε να διασφαλίσει την ορθή πρωτεϊνική σύσταση της

πυρηνικής περιφέρειας. Αντίθετα, στα double KO απουσιάζει η Lamin A/C και παράλληλα η έλλειψη του LBR προκαλεί αποδυνάμωση του δικτύου της Lamin B1, η οποία αδυνατεί να διατηρήσει την ομοιόμορφη κατανομή των στοιχείων του πυρηνικού φακέλου. Στα πλαίσια αυτά, πραγματοποιήθηκε έκτοπη έκφραση των Lamin A/C, LBR και Lamin B1, ωστόσο δεν παρατηρήθηκε επαναφορά της φυσιολογικής κατανομής. Βέβαια, υπήρξαν ενδείξεις πως το χρονικό περιθώριο αλλά και τα επίπεδα έκφρασης πιθανώς να μην ήταν αρκετά.

Ολοκληρώνοντας, θα πρέπει να συγκριθούν τα επίπεδα μεταξύ των Lamin A/C και Lamin B1 και να μελετηθούν τα δίκτυα που σχηματίζουν, ώστε να προσδιοριστούν οι ρόλοι τους στην κατανομή των NPCs και άλλων παραγόντων της πυρηνικής περιφέρειας των NIH κυττάρων. Για την εμπλοκή της Lamin A/C στον φαινότυπο θα μπορούσε να γίνει έκτοπη έκφρασή της στους double KO κλώνους, ενώ για τον έλεγχο των Lamin B1 και LBR θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μερική αποσιώπησή τους στους LA KO κλώνους.

Επιπλέον οι μελέτες μπορούν να επικεντρωθούν και στη νουκλεοπορίνη 210, της οποίας μειώθηκε σημαντικά η έκφραση και στους δύο LA KO κλώνους. Σε περίπτωση που υποεκφράζεται και στους double KO κλώνους θα μπορούσε να μελετηθεί μελλοντικά για την εμπλοκή της στην ασυμμετρία. Βέβαια η απαλοιφή της Nup210 σε κύτταρα NIH/3T3 δεν επηρέασε την κατανομή της POM121 (η δεύτερη διαμεμβρανική νουκλεοπορίνη) και τον εντοπισμό των NPCs (Eriksson et al., 2004). Ωστόσο θα ήταν πιθανό η μειωμένη έκφρασή της σε συνδυασμό με τις απουσίες των Lamin A/C και LBR να καθυστερεί τον σχηματισμό νέων πυρηνικών πόρων μετά την μίτωση και να επηρεάζεται η κατανομή τους.

Τέλος, είναι ενδιαφέρον να μελετηθεί η χρωματίνη στις περιοχές της ασυμμετρίας του πυρηνικού φακέλου, όπως και οι παράγοντες που συμμετέχουν στην πρόσδεσή της στις περιοχές αυτές, συναρτήσει των απουσιών του LBR και της Lamin A/C. Η σήμανση του DNA μέσω της χρωστικής DAPI έδειξε φυσιολογική κατανομή της χρωματίνης στις περιοχές της ασυμμετρίας, ωστόσο είναι σημαντικό να μελετηθούν τα επιγενετικά χαρακτηριστικά της και ο βαθμός συμπύκνωσής της.

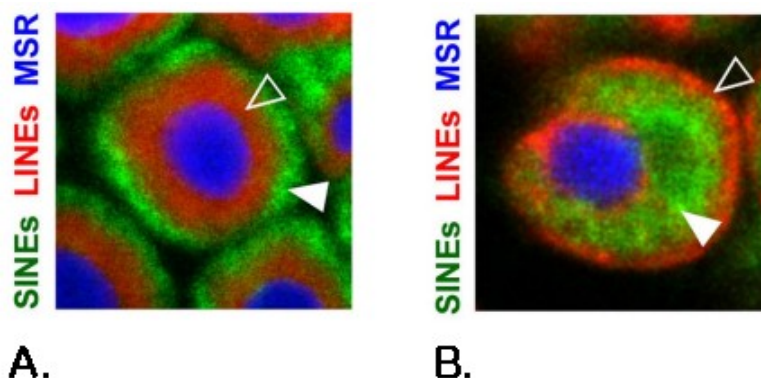
4.5 Η ταυτόχρονη απουσία των LBR και Lamin A/C συνδυάζεται με ατελή συγχώνευση των ετεροχρωματινικών εστιών σε μερικούς πυρήνες των NIH κυττάρων

Σχετικά με τη χρωματινική κατανομή στους double KO κλώνους, η συγχώνευση των ετεροχρωματινικών εστιών στο κέντρο του πυρήνα θύμισε αρκετά μερική αναστροφή της πυρηνικής αρχιτεκτονικής. Στους πυρήνες με αυτό το φαινότυπο παρατηρήθηκαν λίγες ετεροχρωματινικές εστίες μεγάλου μεγέθους και ιδιαίτερα έντονη παρουσία της 3meK9H3 στην περιφέρεια του πυρήνα. Επίσης, η HP1α εντοπίστηκε έντονα στις λίγες ετεροχρωματινικές εστίες και μειώθηκε η κατανομή της στην υπόλοιπη χρωματίνη του πυρήνα (εικόνα 84 & 85).

Το συγκεκριμένο χρωματινικό τοπίο εμφανίστηκε με μικρή συχνότητα στους double KO πληθυσμούς και λόγω του μειωμένου ρυθμού ανάπτυξης τους εξετάστηκε μήπως σχετίζεται με την απόπτωση. Ωστόσο, οι δομές των αποπτωτικών λοβίων που σχηματίζουν τα κύτταρα NIH δεν έμοιαζαν με τις ετεροχρωματινικές εστίες των double knock out κλώνων, οι οποίοι δεν παρουσίασαν βλάβες στο DNA τους και διέθεταν άθικτο πυρηνικό φάκελο. Μία ιδέα είναι πως θα μπορούσε η μερική αναστροφή να σχετίζεται με την ποσότητα της χρωματίνης που εμπεριέχεται στα υπερτριπλοειδή NIH κύτταρα. Οι πυρήνες με μεγαλύτερη ποσότητα αλληλομόρφων διαθέτουν και περισσότερες ετεροχρωματινικές εστίες, οι οποίες βρίσκονται σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους και απουσία των Lamin A/C και LBR θα μπορούσαν ευκολότερα να συνενωθούν και να προκύψει ένας τέτοιος φαινότυπος. Μία άλλη άποψη είναι πως οι συνεχείς κυτταρικές διαιρέσεις δεν επιτρέπουν την ολοκληρωμένη συγχώνευση των ετεροχρωματινικών εστιών, όπως στην περίπτωση των *LBR*^{-/-} θυμοκυττάρων που παρουσιάζουν μερική αναστροφή (Falk et al., 2019).

Στην εργασία των Solovei et al. (2013), σε πολλούς κυτταρικούς τύπους η αποσιώπηση είτε της Lamin A/C είτε του LBR, αναλόγως με το ποιά εκφράζονταν στην περιφέρεια, προκάλούσε μερική αναστροφή της χρωματίνης. Ταυτοχρόνως, η έκτοπη έκφραση της Lamin A/C σε ραβδία κύτταρα ποντικού δεν επανέφερε την συμβατική αρχιτεκτονική, αλλά μόνο ένα έντονο «στρώμα» ετεροχρωματίνης στην περιφέρεια του πυρήνα, που μοιάζει

εντυπωσιακά με τον δικό μας φαινότυπο (εικόνες 85, 86 & 88) (Falk et al., 2019). Γίνεται λοιπόν αντιληπτό πως υπάρχουν και άλλοι παράγοντες της περιφέρειας του πυρήνα που εμποδίζουν την πλήρη αναστροφή της χρωματινικής διάταξης.



Εικόνα 88: Η κατανομή μεταξύ ευχρωματίνης και ετεροχρωματίνης σε πυρήνα ώριμου ραβδίου (A) και σε αντίστοιχο πυρήνα με έκτοπη έκφραση της Lamina A (B). Απεικονίζονται μέσω FISH οι αλληλουχίες MSR (major satellite repeats) που αντιπροσωπεύουν την συστατική ετεροχρωματίνη, οι αλληλουχίες LINEs (long interspersed nuclear elements) που εκπροσωπούν την περιστασιακή ετεροχρωματίνη και οι αλληλουχίες SINEs (short interspersed nuclear elements) που εμπεριέχονται στην ευχρωματίνη. Με τα βέλη απεικονίζεται η επαναφορά της ετεροχρωματίνης στην περιφέρεια του πυρήνα παρουσία της Lamina A, χωρίς όμως να μεταβάλλεται το κεντρικό χρωμοκέντρο (τροποποιημένη εικόνα από Falk et al., 2019).

Να σημειωθεί πως τέτοιου τύπου αναδιαμορφώσεις συναντώνται *in vivo* σε αναπτυξιακά στάδια αρκετών κυτταρικών τύπων (Joffe et al., 2010). Για παράδειγμα, δενδριτικά κύτταρα Purkinje στην μεταγεννητική ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας ποντικών μετατοπίζουν περικεντρομεριδιακές περιοχές προς το εσωτερικό του πυρήνα παρουσιάζοντας μερικώς ανεστραμμένη αρχιτεκτονική (Solovei et al., 2004). Οι ανεστραμμένες δομές εξυπηρετούν διαφορετικούς σκοπούς κάθε φορά, όπως την νυκτόβια όραση των ποντικών στην περίπτωση των ραβδίων κυττάρων, τη φυσιολογική διαφοροποίηση των νευρώνων της παρεγκεφαλίδας για τα κύτταρα Purkinje και την προστασία του DNA από βλάβες στην περίπτωση των ώριμων σπερματοζωαρίων. Ωστόσο, οι μηχανισμοί που επάγουν τις αλλαγές αυτές πιθανώς να είναι οι ίδιοι, όπως η διακοπή της αλληλεπίδρασης μεταξύ χρωματίνης και πυρηνικού φακέλου και η ισχυρή ελκτική δύναμη μεταξύ των ετεροχρωματινικών εστιών,

που επάγουν την συμπύκνωση και εντοπισμό της ετεροχρωματίνης στο κέντρο του πυρήνα.

Καταλήγοντας, θα πρέπει να προσδιοριστούν το μέγεθος και ο αριθμός των ετεροχρωματικών εστιών στους double KO κλώνους. Επίσης, θα πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω τα επιγενετικά χαρακτηριστικά της χρωματίνης και η δυναμική της HP1 στις ετεροχρωματικές εστίες των ατελώς ανεστραμμένων πυρήνων. Ένα σημαντικό ερώτημα εγείρεται σχετικά με τα στοιχεία της πυρηνικής περιφέρειας που αποτρέπουν την ολική αναστροφή. Γνωρίζουμε πως το σύμπλοκο του A-tether μάλλον εμπεριέχει και άλλες πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης που αλληλεπιδρούν με την Lamin A και διαφέρουν αναλόγως με τον κυτταρικό τύπο (Thanisch et al., 2017). Μία παραδοχή βασιζόμενη στα παραπάνω, είναι ότι τα NIH κύτταρα διαθέτουν και άλλες συνεργαζόμενες πρωτεΐνες με την Lamin A/C (Man1, Emerin), όπου δεσμεύουν ετεροχρωματικές αλληλουχίες στην περιφέρεια. Αντίθετα, θα μπορούσε στα ραβδία κύτταρα το A-tether να αποτελείται μόνο από την Lamin A/C και με την αποσιώπησή της να επιτελείται η πλήρης αναστροφή, αν και μέχρι σήμερα δεν έχουμε πληροφορίες σχετικά με την πρωτεωμική της περιφέρειας των ραβδίων πυρήνων.

Στο πλαίσιο αυτό, ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας που θα μπορούσε να μελετηθεί είναι ο μεταγραφικός καταστολέας Casz1, που είναι απαραίτητος για την δημιουργία και διατήρηση της χρωματινικής δομής των ώριμων ραβδίων. Επίσης η έκφρασή του αρκεί ώστε να συγκεντρώσει την ετεροχρωματίνη στο κέντρο των NIH κυτάρων, έχοντας πιθανώς έναν γενικό ρόλο στην αναστροφή της χρωματίνης (Mattar et al., 2018). Θα ήταν χρήσιμο να μελετηθούν οι γονιδιακοί του στόχοι, για να διερευνηθεί αν συμμετέχει στην αποσιώπηση των πρωτεϊνών του συμπλόκου A-tether. Επίσης, θα μπορούσε ο Casz1 να λειτουργεί και με έναν εναλλακτικό τρόπο, ιδίως λόγω του αινιγματικού εντοπισμού του με την ευχρωματίνη στην περιφέρεια των ραβδίων πυρήνων, παρόλο που λειτουργεί ως καταστολέας. Σε μία πρόσφατη *in silico* μελέτη υποστηρίζεται πως οι πρωτεΐνες της πυρηνικής περιφέρειας αρκεί να μπορούν να συνδεθούν με τη χρωματίνη, ανεξαρτήτως επιγενετικών τροποποιήσεων, ώστε να διατηρήσουν τα LADs στο πυρηνικό χείλος (MacPherson et al., 2020). Σύμφωνα με αυτή την ιδέα, ο Casz1 θα μπορούσε να δικαιολογήσει τον εντοπισμό του στην πυρηνική περιφέρεια των ραβδίων,

όπου συνδεόμενος στο DNA να εμποδίζει τις οποιεσδήποτε αλληλεπιδράσεις με την πυρηνική λάμινα, απωθώντας τη χρωματίνη από την περιφέρεια και προωθώντας την τοποθέτηση και σύμπτυξή της στο εσωτερικό του πυρήνα.

4.6 Συμπεράσματα και μελλοντικοί πειραματικοί σχεδιασμοί

Ανακεφαλαιώνοντας, οι μεμονωμένες απαλοιφές των LBR και Lamin A/C δεν επέφεραν σημαντικές διαφορές στην κατανομή των πρωτεϊνών του πυρηνικού φακέλου και στην τοπολογία της χρωματίνης, ιδίως στην περίπτωση απουσίας του LBR, όπου το κυτταρικό σύστημα φάνηκε να μην επηρεάζεται καθόλου. Εν μέρει, τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να δικαιολογηθούν από την ιδέα της αλληλοεπικάλυψης των πρωτεϊνικών λειτουργιών της πυρηνικής περιφέρειας. Σύμφωνα με αυτή, οι πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης και της πυρηνικής λάμινας αλληλεπιδρούν ποικιλοτρόπως με τη χρωματίνη και διαθέτουν πολλές κοινές ιδιότητες και λειτουργίες. Επομένως, η απαλοιφή ενός παράγοντα καλύπτεται από τις αντιροπτιστικές αλληλεπιδράσεις στην περιφέρεια του πυρήνα.

Αντίθετα, η ταυτόχρονη απαλοιφή των LBR και Lamin A/C προκάλεσε εκτεταμένες αλλαγές τόσο στον πυρηνικό φάκελο όσο και στην τοποθέτηση της χρωματίνης εντός του πυρήνα. Η μερική αναστροφή που παρατηρείται, αποτελεί ισχυρή ένδειξη πως σε διαφοροποιημένα κύτταρα η ταυτόχρονη απουσία των LBR και Lamin A/C προκαλεί εκτεταμένες αναδιατάξεις της χρωματίνης, όπως αυτές που συμβαίνουν στην διαφοροποίηση και ανοίγει τον δρόμο για περαιτέρω μελέτη των αρχών της πυρηνικής αρχιτεκτονικής των θηλαστικών συναρτήσει των δύο αυτών πρωτεϊνών.

Στο απώτερο μέλλον, στις knock out κυτταρικές σειρές μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι όπως η BioID (proximity-dependent biotin identification) για τον χαρακτηρισμό του πρωτεώματος της πυρηνικής περιφέρειας, η DamID για την αλληλούχιση των LADs και η FRIC (Fluorescent Ratiometric Imaging of Chromatin), που καταγράφει την αναδιοργάνωση της χρωματίνης σε ζωντανά κύτταρα. Οι τεχνικές αυτές σε συνδυασμό με την ανάλυση RNA Seq αναμένεται να δώσουν σημαντικές απαντήσεις για τον

τρόπο που η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης καθορίζει την γονιδιακή έκφραση συναρτήσει των πρωτεϊνών της πυρηνικής περιφέρειας.

5. Βιβλιογραφία

- Alber F., Dokudovskaya S., Veenhoff L. M., Zhang W., Kipper J., Devos D., Suprpto A., Karni-Schmidt O., Williams R., Chait B. T., Sali A. & Rout M. P. (2007). The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature*, 450(7170), 695–701.
- Al-Haboubi T., Shumaker D. K., Köser J., Wehnert M. & Fahrenkrog B. (2011). Distinct association of the nuclear pore protein Nup153 with A- and B-type lamins. *Nucleus*, 2(5), 500–509.
- Anderson D. J., Vargas J. D., Hsiao J. P. & Hetzer M. W. (2009). Recruitment of functionally distinct membrane proteins to chromatin mediates nuclear envelope formation in vivo. *Journal of Cell Biology*, 186(2), 183–191.
- Arents G. & Moudrianakis E. N. (1995). The Histone Fold: A Ubiquitous Architectural Motif Utilized in DNA Compaction and Protein Dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(24), 11170–11174.
- Bizhanova A. & Kaufman P. D. (2021). Close to the edge: Heterochromatin at the nucleolar and nuclear peripheries. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1864(1), 194666.
- Bonev B., Mendelson Cohen N., Szabo Q., Fritsch L., Papadopoulos G. L., Lubling Y., Xu X., Lv X., et al., (2017). Multiscale 3D Genome Rewiring during Mouse Neural Development. *Cell*, 171(3), 557–572.
- Bouzid T., Kim E., Riehl B. D., Esfahani A. M., Rosenbohm J., Yang R., Duan B. & Lim J. Y. (2019). The LINC complex, mechanotransduction, and mesenchymal stem cell function and fate. *Journal of Biological Engineering*, 13(1).
- Briand N. & Collas P. (2020). Lamina-associated domains: peripheral matters and internal affairs. *Genome Biology*, 21(1).
- Broers J. L. V., Ramaekers F. C. S., Bonne G., Yaou R. B., & Hutchison C. J. (2006). Nuclear Lamins: Laminopathies and Their Role in Premature Ageing. *Physiological Reviews*, 86(3), 967–1008.
- Broers J. L., Machiels B. M., van Eys G. J., Kuijpers H. J., Manders E. M., vanDriel R. & Ramaekers F. C. (1999). Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. *J. Cell Sci.* 112, 3463-3475.

- Castro-Obregón S. (2020). Lamin B receptor: role on chromatin structure, cellular senescence and possibly aging. *Biochemical Journal*, 477(14), 2715–2720.
- Chang W., Worman H. J. & Gundersen G. G. (2015). Accessorizing and anchoring the LINC complex for multifunctionality. *Journal of Cell Biology*, 208(1), 11–22.
- Clowney E., LeGros M., Mosley C., Clowney F., Markenskoff-Papadimitriou E., Myllys M., Barnea G., Larabell C. & Lomvardas S. (2012). Nuclear Aggregation of Olfactory Receptor Genes Governs Their Monogenic Expression. *Cell*, 151(4), 724–737.
- Columbaro M., Capanni C., Mattioli E., Novelli G., Parnaik V. K., Squarzoni S., Maraldi N. M. & Lattanzi G. (2005). Rescue of heterochromatin organization in Hutchinson-Gilford progeria by drug treatment. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(22).
- Crisp M., Liu Q., Roux K., Rattner J., Shanahan C., Burke B., Stahl P. D. & Hodzic D. (2005). Coupling of the nucleus and cytoplasm: Role of the LINC complex. *Journal of Cell Biology*, 172(1), 41–53.
- Daniel J. A., Pray-Grant M. G. & Grant P. A. (2005). Effector Proteins for Methylated Histones: An Expanding Family. *Cell Cycle*, 4(7), 919–926.
- Davidson P. M. & Lammerding J. (2014). Broken nuclei – lamins, nuclear mechanics, and disease. *Trends in Cell Biology*, 24(4), 247–256.
- de Leeuw R., Gruenbaum Y. & Medalia O. (2018). Nuclear Lamins: Thin Filaments with Major Functions. *Trends in Cell Biology*, 28(1), 34–45.
- de Wit E. & de Laat W. (2012). A decade of 3C technologies: insights into nuclear organization. *Genes & Development*, 26(1), 11–24.
- Dechat T., Korbei B., Vaughan O. A., Vlcek S., Hutchison C. J. & Foisner R. (2000). Lamina-associated polypeptide 2alpha binds intranuclear A-type lamins. *J. Cell Sci.* 113, 3473-3484.
- Dekker J., Marti-Renom M. A. & Mirny L. A. (2013). Exploring the three-dimensional organization of genomes: interpreting chromatin interaction data. *Nature Reviews Genetics*, 14(6), 390–403.
- Denker A. & de Laat W., (2016). The second decade of 3C technologies: detailed insights into nuclear organization. *Genes & Development*, 30(12), 1357–1382.

- Dixon J. R., Selvaraj S., Yue F., Kim A., Li Y., Shen Y., Hu M., Liu J. S. & Ren B., (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, 485(7398), 376–380.
- Dobrzynska A., Gonzalo S., Shanahan C. & Askjaer P. (2016). The nuclear lamina in health and disease. *Nucleus*, 7(3), 233–248.
- Drummond S. P. & Wilson K. L. (2002). Interference with the cytoplasmic tail of gp210 disrupts “close apposition” of nuclear membranes and blocks nuclear pore dilation. *Journal of Cell Biology*, 158(1), 53–62.
- Eberhart A., Feodorova Y., Song C., Wanner G., Kiseleva E., Furukawa T., Kimura, H., Schotta G. et al., (2013). Epigenetics of eu- and heterochromatin in inverted and conventional nuclei from mouse retina. *Chromosome Research*, 21(5), 535–554.
- En A., Takauji Y., Ayusawa D. & Fujii M. (2020). The role of lamin B receptor in the regulation of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Experimental Cell Research*, 390(1), 111927.
- Eriksson C., Rustum C. & Hallberg E. (2004). Dynamic properties of nuclear pore complex proteins in gp210 deficient cells. *FEBS Letters*, 572(1–3), 261–265.
- Falk M., Feodorova Y., Naumova N., Imakaev M., Lajoie B. R., Leonhardt H., Joffe B., Dekker, et al., (2019). Heterochromatin drives compartmentalization of inverted and conventional nuclei. *Nature*, 570(7761), 395–399.
- Feodorova Y., Falk M., Mirny L. A. & Solovei I. (2020). Viewing Nuclear Architecture through the Eyes of Nocturnal Mammals. *Trends in Cell Biology*, 30(4), 276–289.
- Fraser J., Williamson I., Bickmore W. A. & Dostie J. (2015). An Overview of Genome Organization and How We Got There: from FISH to Hi-C. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 347–372.
- Gaj T., Gersbach C. A. & Barbas C. F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31(7), 397–405.
- Georgatos S. D. (2001). NEW EMBO MEMBER’S REVIEW: The inner nuclear membrane: simple, or very complex? *The EMBO Journal*, 20(12), 2989–2994.

- Gerace L. & Huber M. D. (2012). Nuclear lamina at the crossroads of the cytoplasm and nucleus. *Journal of Structural Biology*, 177(1), 24–31.
- Gesson K., Rescheneder P., Skoruppa M. P., von Haeseler A., Dechat T. & Foisner R. (2016). A-type lamins bind both hetero- and euchromatin, the latter being regulated by lamina-associated polypeptide 2 alpha. *Genome Research*, 26(4), 462–473.
- Ghosh G. & Adams J. A. (2011). Phosphorylation mechanism and structure of serine-arginine protein kinases. *FEBS Journal*, 278(4), 587–597.
- Giannios I., Chatzantonaki E. & Georgatos S. (2017). Dynamics and Structure-Function Relationships of the Lamin B Receptor (LBR). *PLOS ONE*, 12(1), e0169626.
- Greber U.F., Senior A. & Gerace L. (1990). A major glycoprotein of the nuclear pore complex is a membrane-spanning polypeptide with a large luminal domain and a small cytoplasmic tail. *EMBO J.* 9:1495–1502.
- Gruenbaum Y. & Medalia O. (2015). Lamins: the structure and protein complexes. *Current Opinion in Cell Biology*, 32, 7–12.
- Guarda A., Bolognese F., Bonapace I. M. & Badaracco G. (2009). Interaction between the inner nuclear membrane lamin B receptor and the heterochromatic methyl binding protein, MeCP2. *Experimental Cell Research*, 315(11), 1895–1903.
- Guelen L., Pagie L., Brasset E., Meuleman W., Faza M. B., Talhout W., Eussen B. H., de Klein A., Wessels L., de Laat W. & van Steensel B. (2008). Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature*, 453(7197), 948–951.
- Guerreiro I. & Kind J. (2019). Spatial chromatin organization and gene regulation at the nuclear lamina. *Current Opinion in Genetics & Development*, 55, 19–25.
- Guo Y. & Zheng Y. (2015). Lamins position the nuclear pores and centrosomes by modulating dynein. *Molecular Biology of the Cell*, 26(19), 3379–3389.
- Guo Y., Kim Y., Shimi T., Goldman R. D. & Zheng Y. (2014). Concentration-dependent lamin assembly and its roles in the localization of other nuclear proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 25(8), 1287–1297.

- Haque F., Lloyd D. J., Smallwood D. T., Dent C. L., Shanahan C. M., Fry A. M., Trembath R. C. & Shackleton S. (2006). SUN1 Interacts with Nuclear Lamin A and Cytoplasmic Nesprins To Provide a Physical Connection between the Nuclear Lamina and the Cytoskeleton. *Molecular and Cellular Biology*, 26(10), 3738–3751.
- Harr J. C., Luperchio T. R., Wong X., Cohen E., Wheelan S. J. & Reddy K. L. (2015). Directed targeting of chromatin to the nuclear lamina is mediated by chromatin state and A-type lamins. *Journal of Cell Biology*, 208(1), 33–52.
- Hernandez L., Roux K. J., Wong E. S. M., Mounkes L. C., Mutalif R., Navasankari R., Rai B., Cool S., Jeong J.-W., Wang H., Lee H.-S., Kozlov S., Grunert M., Keeble T., Jones C. M., Meta M. D., Young S. G., Daar I. O., Burke B., ... Stewart C. L. (2010). Functional coupling between the extracellular matrix and nuclear lamina by wnt signaling in progeria. *Developmental Cell*, 19(3), 413–425.
- Hetzer M. W. (2010). The Nuclear Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(3), a000539–a000539.
- Hoelz A., Debler E. W. & Blobel G. (2011). The Structure of the Nuclear Pore Complex. *Annual Review of Biochemistry*, 80(1), 613–643.
- Holmer L., Pezhman A. & Worman H. J. (1998). The Human Lamin B Receptor/Sterol Reductase Multigene Family. *Genomics*, 54(3), 469–476.
- Hong S. H., Son K. H., Ha S. Y., Wee T. I., Choi S. K., Won J. E., Han H. D., Ro Y., Park Y.-M., Eun J. W., Nam S. W., Han J.-W., Kang K. & You J. S. (2021). Nucleoporin 210 serves a key scaffold for SMARCB1 in liver cancer. *Cancer Research*, 81(2), 356–370.
- Hoskins V. E., Smith K. & Reddy K. L. (2021). The shifting shape of genomes: dynamics of heterochromatin interactions at the nuclear lamina. *Current Opinion in Genetics & Development*, 67, 163–173.
- Houben F., Willems C. H. M. P., Declercq I. L. J., Hochstenbach K., Kamps M. A., Snoeckx L. H. E. H., Ramaekers F. C. S. & Broers, J. L. V. (2009). Disturbed nuclear orientation and cellular migration in A-type lamin deficient cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793(2), 312–324.
- Ibarra A. & Hetzer M. W. (2015). Nuclear pore proteins and the control of genome functions. *Genes & Development*, 29(4), 337–349.

- Ikegami K., Secchia S., Almakki O., Lieb J. D., & Moskowitz I. P. (2020). Phosphorylated Lamin A/C in the Nuclear Interior Binds Active Enhancers Associated with Abnormal Transcription in Progeria. *Developmental Cell*, 52(6), 699–713.e11.
- Jahed Z., Soheilypour M., Peyro M. & Mofrad M. R. K. (2016). The LINC and NPC relationship – it's complicated! *Journal of Cell Science*. Published.
- Janin A., Bauer D., Ratti F., Millat G. & Méjat A. (2017). Nuclear envelopathies: a complex LINC between nuclear envelope and pathology. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 12(1).
- Jansen A. & Verstrepen K. J. (2011). Nucleosome Positioning in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(2), 301–320.
- Joffe B., Leonhardt H. & Solovei I. (2010). Differentiation and large scale spatial organization of the genome. *Current Opinion in Genetics & Development*, 20(5), 562–569.
- Joffe B., Peichl L., Hendrickson A., Leonhardt H. & Solovei I. (2013). Diurnality and Nocturnality in Primates: An Analysis from the Rod Photoreceptor Nuclei Perspective. *Evolutionary Biology*, 41(1), 1–11.
- Kallio M. A., Tuimala J. T., Hupponen T., Klemelä P., Gentile M., Scheinin I., Koski M., Käki J. & Korpelainen E. I. (2011). Chipster: user-friendly analysis software for microarray and other high-throughput data. *BMC Genomics*, 12(1).
- Kennedy B. K., Barbie D. A., Classon M., Dyson N. & Harlow E. (2000). Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells. *Genes Dev.* 14, 2855-2868.
- Khorasanizadeh S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*, 116(2), 259-72.
- Kind J., Pagie L., de Vries S., Nahidiazar L., Dey S., Bienko M., Zhan Y., Lajoie B., de Graaf C., Amendola M., Fudenberg G., Imakaev M., Mirny L., Jalink K., Dekker J., van Oudenaarden A. & van Steensel B. (2015). Genome-wide Maps of Nuclear Lamina Interactions in Single Human Cells. *Cell*, 163(1), 134–147.

- Korfali N., Wilkie G. S., Swanson S. K., Srsen V., de las Heras J., Batrakou D. G., Malik P., Zuleger N., Kerr A. R., Florens L. & Schirmer E. C. (2012). The nuclear envelope proteome differs notably between tissues. *Nucleus*, 3(6), 552–564.
- Kouzarides T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693-705.
- Kubben N., Voncken J. W., Konings G., van Weeghel M., van den Hoogenhof M. M., Gijbels M., van Erk A., Schoonderwoerd K., van den Bosch B., Dahlmans V., Calis C., Houten S. M., Misteli T. & Pinto Y. M. (2011). Post-natal myogenic and adipogenic developmental: defects and metabolic impairment upon loss of A-type lamins: Defects and metabolic impairment upon loss of A-type lamins. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 2(3), 195–207.
- Laguri C., Gilquin B., Wolff N., Romi-Lebrun R., Courchay K., Callebaut I., Worman H. J. & Zinn-Justin S. (2001). Structural Characterization of the LEM Motif Common to Three Human Inner Nuclear Membrane Proteins. *Structure*, 9(6), 503–511.
- Leibiger C., Kosyakova N., Mkrtychyan H., Gleib M., Trifonov V. & Liehr T. (2013). First Molecular Cytogenetic High Resolution Characterization of the NIH 3T3 Cell Line by Murine Multicolor Banding. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 61(4), 306–312.
- Lieberman-Aiden E., van Berkum N. L., Williams L., Imakaev M., Ragoczy T., Telling A., Amit I., Lajoie B. R., Sabo P. J., Dorschner M. O., Sandstrom R., Bernstein B., Bender M. A., Groudine M., Gnirke A., Stamatoyannopoulos J., Mirny L. A., Lander E. S. & Dekker J. (2009). Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome. *Science*, 326(5950), 289–293.
- Liokatis S., Edlich C., Soupsana K., Giannios I., Panagiotidou P., Tripsianes K., Sattler M., Georgatos S. D. & Politou A. S. (2012). Solution Structure and Molecular Interactions of Lamin B Receptor Tudor Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 287(2), 1032–1042.
- Liu F., Tøstesen E., Sundet J. K., Jenssen T. K., Bock C., Jerstad G. I. & Hovig E. (2007). The human genomic melting map. *PLoS computational biology*, 3(5), e93.

- Liu Q., Pante N., Misteli T., Elsagga M., Crisp M., Hodzic D., Burke B. & Roux K. J. (2007). Functional association of Sun1 with nuclear pore complexes. *Journal of Cell Biology*, 178(5), 785–798.
- Lomberk G., Bensi D., Fernandez-Zapico M. E. & Urrutia R. (2006). Evidence for the existence of an HP1-mediated subcode within the histone code. *Nature Cell Biology*, 8(4), 407–415.
- Lu X., Shi Y., Lu Q., Ma Y., Luo J., Wang Q., Ji J., Jiang Q. & Zhang C. (2010). Requirement for Lamin B Receptor and Its Regulation by Importin β and Phosphorylation in Nuclear Envelope Assembly during Mitotic Exit. *Journal of Biological Chemistry*, 285(43), 33281–33293.
- Lucio-Eterovic A. K., Singh M. M., Gardner J. E., Veerappan C. S., Rice J. C. & Carpenter P. B. (2010). Role for the nuclear receptor-binding SET domain protein 1 (NSD1) methyltransferase in coordinating lysine 36 methylation at histone 3 with RNA polymerase II function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(39), 16952–16957.
- Luperchio T. R., Wong X. & Reddy K. L. (2014). Genome regulation at the peripheral zone: lamina associated domains in development and disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 25, 50–61.
- Lussi Y. C., Hügi I., Laurell E., Kutay U. & Fahrenkrog B. (2011). The nucleoporin Nup88 is interacting with nuclear lamin A. *Molecular Biology of the Cell*, 22(7), 1080–1090.
- MacPherson Q., Beltran B. & Spakowitz A. J. (2020). Chromatin Compaction Leads to a Preference for Peripheral Heterochromatin. *Biophysical Journal*, 118(6), 1479–1488.
- Maeshima K., Yahata K., Sasaki Y., Nakatomi R., Tachibana T., Hashikawa T., Imamoto F. & Imamoto N. (2006). Cell-cycle-dependent dynamics of nuclear pores: pore-free islands and lamins. *Journal of Cell Science*, 119(21), 4442–4451.
- Maison C., Horstmann H. & Georgatos S. D. (1993). Regulated docking of nuclear membrane vesicles to vimentin filaments during mitosis. *Journal of Cell Biology*, 123(6), 1491–1505.
- Makatsori D., Kourmouli N., Polioudaki H., Shultz L. D., Mclean K., Theodoropoulos P. A., Singh P. B. & Georgatos S. D. (2004). The Inner

Nuclear Membrane Protein Lamin B Receptor Forms Distinct Microdomains and Links Epigenetically Marked Chromatin to the Nuclear Envelope. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25567–25573.

- Mattar P., Stevanovic M., Nad I. & Cayouette M. (2018). Casz1 controls higher-order nuclear organization in rod photoreceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(34), E7987–E7996.
- Maurer M. & Lammerding J. (2019). The Driving Force: Nuclear Mechanotransduction in Cellular Function, Fate, and Disease. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 21(1), 443–468.
- McCord R. P., Nazario-Toole A., Zhang H., Chines P. S., Zhan Y., Erdos M. R., Collins F. S., Dekker J. & Cao K. (2012). Correlated alterations in genome organization, histone methylation, and DNA-lamin A/C interactions in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Genome Research*, 23(2), 260–269.
- Meier J. & Georgatos S. (1994). Type B lamins remain associated with the integral nuclear envelope protein p58 during mitosis: implications for nuclear reassembly. *The EMBO Journal*, 13(8), 1888–1898.
- Melcer S., Gruenbaum Y. & Krohne G. (2007). Invertebrate lamins. *Experimental Cell Research*, 313(10), 2157–2166.
- Meuleman W., Peric-Hupkes D., Kind J., Beaudry J. B., Pagie L., Kellis M., Reinders M., Wessels L. & van Steensel B. (2012). Constitutive nuclear lamina-genome interactions are highly conserved and associated with A/T-rich sequence. *Genome Research*, 23(2), 270–280.
- Mimura Y., Takagi M., Clever M. & Imamoto N. (2016b). ELYS regulates the localization of LBR by modulating its phosphorylation state. *Journal of Cell Science*. Published.
- Minc E., Courvalin J. C. & Buendia B. (2000). HP1 γ associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 90(3–4), 279–284.
- Moir R. D., Spann T. P., Lopez-Soler R. I., Yoon M., Goldman A. E., Khuon S. & Goldman, R. D. (2000). Review: The Dynamics of the Nuclear Lamins during the Cell Cycle— Relationship between Structure and Function. *Journal of Structural Biology*, 129(2–3), 324–334.

- Mouneimne G., Hansen S. D., Selfors L. M., Petrak L., Hickey M. M., Gallegos L. L., Simpson K. J., Lim J., Gertler F. B., Hartwig J. H., Mullins R. D. & Brugge J. S. (2012). Differential remodeling of actin cytoskeleton architecture by profilin isoforms leads to distinct effects on cell migration and invasion. *Cancer Cell*, 22(5), 615–630.
- Mudumbi K. C., Czapiewski R., Ruba A., Junod S. L., Li Y., Luo W., Ngo C., Ospina V., Schirmer E. C. & Yang W. (2020). Nucleoplasmic signals promote directed transmembrane protein import simultaneously via multiple channels of nuclear pores. *Nature Communications*, 11(1).
- Naetar N., Ferraioli S., & Foisner R. (2017). Lamins in the nuclear interior – life outside the lamina. *Journal of Cell Science*, 130(13), 2087–2096.
- Nikolakaki E., Mylonis I. & Giannakouros T. (2017). Lamin B Receptor: Interplay between Structure, Function and Localization. *Cells*, 6(3), 28.
- Nikolakaki E., Simos G., Georgatos S. D. & Giannakouros T. (1996). A Nuclear Envelope-associated Kinase Phosphorylates Arginine-Serine Motifs and Modulates Interactions between the Lamin B Receptor and Other Nuclear Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 271(14), 8365–8372.
- Norrie J. L., Lupo M. S., Xu B., al Diri I., Valentine M., Putnam D., Griffiths L., Zhang J., Johnson D., Easton J., Shao Y., Honnell V., Frase S., Miller S., Stewart V., Zhou X., Chen X. & Dyer M. A. (2019). Nucleome Dynamics during Retinal Development. *Neuron*, 104(3), 512–528.e11.
- Ognibene A., Sabatelli P., Petrini S., Squarzone S., Riccio M., Santi S., Villanova M., Palmeri S., Merlini L. & Maraldi N. (1999). Nuclear changes in a case of X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Muscle & Nerve*, 22(7), 864–869.
- Olins A. L., Rhodes G., Welch D. B. M., Zwerger M. & Olins D. E. (2010). Lamin B receptor. *Nucleus*, 1(1), 53–70.
- Olsson M., Schéele S. & Ekblom P. (2004). Limited expression of nuclear pore membrane glycoprotein 210 in cell lines and tissues suggests cell-type specific nuclear pores in metazoans. *Experimental Cell Research*, 292(2), 359–370.

- Papoutsopoulou S., Nikolakaki E. & Giannakouros T. (1999). SRPK1 and LBR Protein Kinases Show Identical Substrate Specificities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 255(3), 602–607.
- Pederson T. (2011). *The Nucleus Introduced*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 3(5), a000521–a000521.
- Penagos-Puig A. & Furlan-Magaril M. (2020). Heterochromatin as an Important Driver of Genome Organization. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8.
- Peric-Hupkes D., Meuleman W., Pagie L., Bruggeman S. W., Solovei I., Brugman W., Gräf S., Flicek P., Kerkhoven R. M., van Lohuizen M., Reinders M., Wessels L. & van Steensel B. (2010). Molecular Maps of the Reorganization of Genome-Nuclear Lamina Interactions during Differentiation. *Molecular Cell*, 38(4), 603–613.
- Pinello L., Canver M. C., Hoban M. D., Orkin S. H., Kohn D. B., Bauer D. E. & Yuan G. C. (2016). Analyzing CRISPR genome-editing experiments with CRISPResso. *Nature Biotechnology*, 34(7), 695–697.
- Polioudaki H., Kourmouli N., Drosou V., Bakou A., Theodoropoulos P. A., Singh P. B., Giannakouros T. & Georgatos S. D. (2001). Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO Reports*, 2(10), 920–925.
- Pombo A. & Dillon N. (2015). Three-dimensional genome architecture: players and mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(4), 245–257.
- Popp M. W. & Maquat L. E. (2016). Leveraging Rules of Nonsense-Mediated mRNA Decay for Genome Engineering and Personalized Medicine. *Cell*, 165(6), 1319–1322.
- Rada-Iglesias A., Grosveld F. G. & Papantonis A. (2018). Forces driving the three-dimensional folding of eukaryotic genomes. *Molecular Systems Biology*, 14(6).
- Ran F., Hsu P., Lin C. Y., Gootenberg J., Konermann S., Trevino A., Scott, D., Inoue A., Matoba S., Zhang Y. & Zhang F. (2013). Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell*, 155(2), 479–480.

- Razafsky D. & Hodzic D. (2009). Bringing KASH under the SUN: the many faces of nucleo-cytoskeletal connections. *Journal of Cell Biology*, 186(4), 461–472.
- Richards E.J. & Elgin S.C.R. (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell*, 108, 489–500.
- Richmond T. J. & Davey C. A. (2003). The Structure of DNA in the Nucleosome Core. *Nature*, 423 (6936), 145–150.
- Robinson P. J. J., Fairall L., Huynh V. A. T. & Rhodes D. (2006). EM measurements define the dimensions of the “30-nm” chromatin fiber: Evidence for a compact, interdigitated structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17), 6506–6511.
- Rothballer A. & Kutay U. (2013). Poring over pores: nuclear pore complex insertion into the nuclear envelope. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(6), 292–301.
- Rullens P. M. & Kind J. (2021). Attach and stretch: Emerging roles for genome–lamina contacts in shaping the 3D genome. *Current Opinion in Cell Biology*, 70, 51–57.
- Schirmer E. C. & Foisner R. (2007). Proteins that associate with lamins: Many faces, many functions. *Experimental Cell Research*, 313(10), 2167–2179.
- Schuler E., Lin F., & Worman H. (1994). Characterization of the human gene encoding LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 269(15), 11312–11317.
- Shimi T., Kittisopikul M., Tran J., Goldman A. E., Adam S. A., Zheng Y., Jaqaman K. & Goldman R. D. (2015). Structural organization of nuclear lamins A, C, B1, and B2 revealed by superresolution microscopy. *Molecular Biology of the Cell*, 26(22), 4075–4086.
- Shimi T., Pflieger K., Kojima S. I., Pack C. G., Solovei I., Goldman A. E., Adam S. A., Shumaker D. K., Kinjo M., Cremer T. & Goldman R. D. (2008). The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription. *Genes & Development*, 22(24), 3409–3421.

- Siegert S., Cabuy E., Scherf B. G., Kohler H., Panda S., Le Y. Z., Fehling H. J., Gaidatzis D., Stadler M. B. & Roska B. (2012). Transcriptional code and disease map for adult retinal cell types. *Nature Neuroscience*, 15(3), 487–495.
- Silve S., Dupuy P. H., Ferrara P. & Loison G. (1998). Human lamin B receptor exhibits sterol C14-reductase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1392(2–3), 233–244.
- Simonet N. G., Rasti G. & Vaquero A. (2016). The Histone Code and Disease: Posttranslational Modifications as Potential Prognostic Factors for Clinical Diagnosis. In *Epigenetic Biomarkers and Diagnostics* (pp. 417-445).
- Simos G. & Georgatos S. D. (1994). The lamin B receptor-associated protein p34 shares sequence homology and antigenic determinants with the splicing factor 2-associated protein p32. *FEBS Letters*, 346(2–3), 225–228.
- Sims R. J., 3rd, & Reinberg D. (2009). Processing the H3K36me3 signature. *Nature Genetics*, 41(3), 270–271.
- Solovei I., Grandi N., Knoth R., Volk B. & Cremer T. (2004). Positional changes of pericentromeric heterochromatin and nucleoli in postmitotic Purkinje cells during murine cerebellum development. *Cytogenetic and Genome Research*, 105(2–4), 302–310.
- Solovei I., Kreysing M., Lanctôt C., Kösem S., Peichl L., Cremer T., Guck J. & Joffe B. (2009). Nuclear Architecture of Rod Photoreceptor Cells Adapts to Vision in Mammalian Evolution. *Cell*, 137(2), 356–368.
- Solovei I., Thanisch K. & Feodorova Y. (2016). How to rule the nucleus: divide et impera. *Current Opinion in Cell Biology*, 40, 47–59.
- Solovei I., Wang A., Thanisch K., Schmidt C., Krebs S., Zwerger M., Cohen T., Devys D., Foisner R., Peichl L., Herrmann H., Blum H., Engelkamp D., Stewart C., Leonhardt H. & Joffe B. (2013). LBR and Lamin A/C Sequentially Tether Peripheral Heterochromatin and Inversely Regulate Differentiation. *Cell*, 152(3), 584–598.

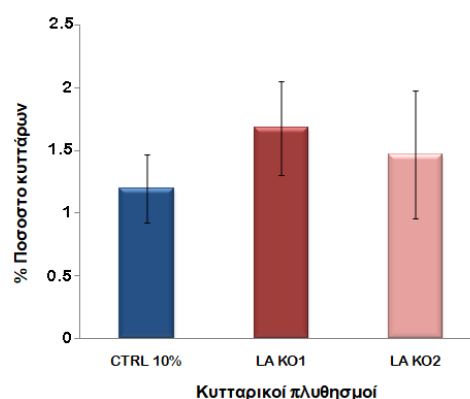
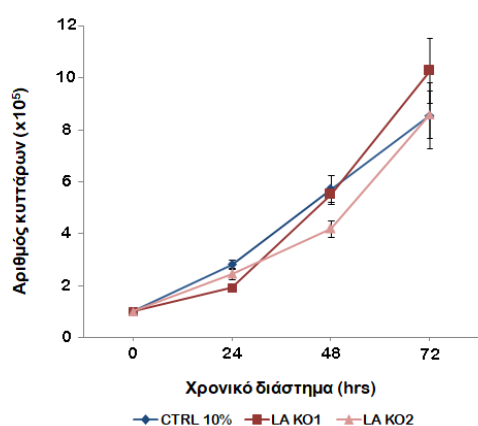
- Sosa B., Rothballer A., Kutay U. & Schwartz T. (2012). LINC Complexes Form by Binding of Three KASH Peptides to Domain Interfaces of Trimeric SUN Proteins. *Cell*, 149(5), 1035–1047.
- Starr D. A. & Fischer J. A. (2005). KASH 'n Karry: The KASH domain family of cargo-specific cytoskeletal adaptor proteins. *BioEssays*, 27(11), 1136–1146.
- Starr D. A. & Fridolfsson H. N. (2010). Interactions Between Nuclei and the Cytoskeleton Are Mediated by SUN-KASH Nuclear-Envelope Bridges. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 26(1), 421–444.
- Stavru F., Nautrup-Pedersen G., Cordes V. C. & Görlich D. (2006). Nuclear pore complex assembly and maintenance in POM121- and gp210-deficient cells. *The Journal of Cell Biology*, 173(4), 477–483.
- Subramanian K., Weigert M., Borsch O., Petzold H., Garcia-Ulloa A., Myers E. W., Ader M., Solovei I. & Kreysing M. (2019). Rod nuclear architecture determines contrast transmission of the retina and behavioral sensitivity in mice. *ELife*, 8.
- Sullivan T., Escalante-Alcalde D., Bhatt H., Anver M., Bhat N., Nagashima, K., Stewart C. L. & Burke B. (1999). Loss of α -Type Lamin Expression Compromises Nuclear Envelope Integrity Leading to Muscular Dystrophy. *Journal of Cell Biology*, 147(5), 913–920.
- Takano M., Koyama Y., Ito H., Hoshino S., Onogi H., Hagiwara M., Furukawa K., & Horigome T. (2004). Regulation of Binding of Lamin B Receptor to Chromatin by SR Protein Kinase and cdc2 Kinase in *Xenopus* Egg Extracts. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 13265–13271.
- Thanisch K., Song C., Engelkamp D., Koch J., Wang A., Hallberg E., Foisner R., Leonhardt H., Stewart C. L., Joffe B. & Solovei I. (2017). Nuclear envelope localization of LEMD2 is developmentally dynamic and lamin A/C dependent yet insufficient for heterochromatin tethering. *Differentiation*, 94, 58–70.
- Tsai P. L., Zhao C., Turner E. & Schlieker C. (2016). The Lamin B receptor is essential for cholesterol synthesis and perturbed by disease-causing mutations. *ELife*, 5.

- Turgay Y., Eibauer M., Goldman A. E., Shimi T., Khayat M., Ben-Harush K., Dubrovsky-Gaupp A., Sapra K. T., Goldman R. D. & Medalia O. (2017). The molecular architecture of lamins in somatic cells. *Nature*, 543(7644), 261–264.
- Turner B. M. (2002). Cellular Memory and the Histone Code. *Cell*, 111(3), 285–291.
- Ungricht R., Klann M., Horvath P. & Kutay U. (2015). Diffusion and retention are major determinants of protein targeting to the inner nuclear membrane. *Journal of Cell Biology*, 209(5), 687–704.
- van Steensel B. & Belmont A. S. (2017). Lamina-Associated Domains: Links with Chromosome Architecture, Heterochromatin, and Gene Repression. *Cell*, 169(5), 780–791.
- Vartholomatos G., Alexiou G. A., Stefanaki K., Lykoudis E. G., Tseka G., Tzoufi M., Sfakianos G. & Prodromou N. (2015). The value of cell cycle analysis by propidium-iodine staining of CD56+ cells in pediatric brain tumors. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 133, 70–74.
- Venables R. S., McLean S., Luny D., Moteleb E., Morley S., Quinlan R. A., Lane E. B. & Hutchison C. J. (2001). Expression of individual lamins in basal cell carcinomas of the skin. *British Journal of Cancer*, 84(4), 512–519.
- Verstraeten V.L.R.M., Broers J.L.V, Ramaekers F.C.S. & van Steensel M.A.M. (2007). The Nuclear Envelope, a Key Structure in Cellular Integrity and Gene Expression. *Current Medicinal Chemistry*, 14(11), 1231–1248.
- Vigouroux C., Auclair M., Dubosclard E., Pouchelet M., Capeau J., Courvalin J. C. & Buendia B. (2001). Nuclear envelope disorganization in fibroblasts from lipodystrophic patients with heterozygous R482Q/W mutations in the lamin A/C gene. *Journal of Cell Science*, 114(24), 4459–4468.
- Wagner E. J. & Carpenter P. B. (2012). Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(2), 115–126.
- Wilson K. L. & Berk J. M. (2010). The nuclear envelope at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(12), 1973–1978.

- Wilson K. L. & Foisner R. (2010). Lamin-binding Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(4), a000554.
- Wong X. & Stewart C. L. (2020). The Laminopathies and the Insights They Provide into the Structural and Functional Organization of the Nucleus. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 21(1), 263–288.
- Worman H. J. & Bonne G. (2007). “Laminopathies”: A wide spectrum of human diseases. *Experimental Cell Research*, 313(10), 2121–2133.
- Worman H. J. & Schirmer E. C. (2015). Nuclear membrane diversity: underlying tissue-specific pathologies in disease? *Curr. Opin. Cell Biol.* 34, 101–112.
- Worman H. J. (2011). Nuclear lamins and laminopathies. *The Journal of Pathology*, 226(2), 316–325.
- Worman H. J., Evans C. D. & Blobel G. (1990) a. The lamin B receptor of the nuclear envelope inner membrane: a polytopic protein with eight potential transmembrane domains. *The Journal of Cell Biology*, 111(4), 1535-1542.
- Worman H. J., Evans C. D. & Blobel G. (1990) b. The lamin B receptor of the nuclear envelope inner membrane: a polytopic protein with eight potential transmembrane domains. *Journal of Cell Biology*, 111(4), 1535–1542.
- Worman H. J., Yuan J., Blobel G. U. N. T. E. R. & Georgatos S. D. (1988). A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(22), 8531-8534.
- Ye Q., Callebaut I., Pezhman A., Courvalin J. C. & Worman H. J. (1997). Domain-specific Interactions of Human HP1-type Chromodomain Proteins and Inner Nuclear Membrane Protein LBR. *Journal of Biological Chemistry*, 272(23), 14983–14989.
- Zegerman P., Canas B., Pappin D. & Kouzarides T. (2002). Histone H3 lysine 4 methylation disrupts binding of nucleosome remodelling and deacetylase (NuRD) repressor complex. *J. Biol. Chem.*, 277, 11621–11624.

- Zlatanova J., Leuba S. H. & Van Holde K. (1998). Chromatin fiber structure: morphology, molecular determinants, structural transitions. *Biophysical journal*, 74(5), 2554-2566.
- Zuleger N., Kelly D. A., Richardson A. C., Kerr A. R. W., Goldberg M. W., Goryachev A. B. & Schirmer E. C. (2011). System analysis shows distinct mechanisms and common principles of nuclear envelope protein dynamics. *Journal of Cell Biology*, 193(1), 109–123.

6.Παράρτημα



A.

B.

Εικόνα 6.1: Α) Η καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων της LA KO σειράς και κυττάρων CTRL 10% όπως καταγράφηκε στις 24, 48 και 72 ώρες. Β) Το ποσοστό των μιτωτικών κυττάρων μεταξύ των πληθυσμών της LA KO σειράς και κυττάρων CTRL 10% (απεικονίζεται το τυπικό σφάλμα σε κάθε περίπτωση).

Ρυθμός Πολλαπλασιασμού LA KO								
Εικ. 6.1A								
Αριθμός επιστρωμένων κυττάρων								
100.000								
Αριθμός Πειραμάτων								
CTRL 10%			LA KO1			LA KO2		
24hrs	48hrs	72hrs	24hrs	48hrs	72hrs	24hrs	48hrs	72hrs
4	4	4	4	4	4	4	4	4

Πίνακας 6.1: Ο αριθμός των επιστρωμένων κυττάρων και των πειραμάτων στον υπολογισμό του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυτταρικών πληθυσμών της LA KO κυτταρικής σειράς.

Πείραμα	Χρονικό Διάστημα	Κυτταρικοί Πληθυσμοί	P Value	Στατιστικό Τεστ
Ρυθμός Πολλαπλασιασμού LA KO Εικ. 6.1A	24hrs	CTRL 10% vs LA KO1	1.78E-02	One way Anova (1.79E-2) with Levene test > 0.05 and Brown-Forsythe test <0.05, Bonferroni post-hoc test
		CTRL 10% vs LA KO2	5.75E-01	
		LA KO1 vs LA KO2	1.75E-01	
	48hrs	CTRL 10% vs LA KO1	1.00E+00	One way Anova (5.89E-2) with Levene test > 0.05 and Brown-Forsythe test >0.05, Bonferroni post-hoc test
		CTRL 10% vs LA KO2	8.96E-02	
		LA KO1 vs	1.51E-	

	72hrs	LA KO2	01	One way Anova (5.17E-1) with Levene test > 0.05 and Brown-Forsythe test >0.05, Bonferroni post-hoc test
		CTRL 10% vs LA KO1	9.72E-01	
		CTRL 10% vs LA KO2	1.00E+00	
		LA KO1 vs LA KO2	1.00E+00	

Πίνακας 6.2: Τα στατιστικά τεστ και οι τιμές pvalue της καταμέτρησης του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυτταρικών πληθυσμών της LA KO κυτταρικής σειράς. Με κόκκινο σημειώνονται οι τιμές p Value<0.05.

Εικ. 6.1B	Μιτωτικός Δείκτης LA KO						Αριθμός Πειραμάτων
	Αριθμός Πυρήνων						
	CTRL 10%		LA KO1		LA KO2		
	1159		1162		1202		
	Πείραμα		Πείραμα		Πείραμα		
	1 ^ο	239	1 ^ο	242	1 ^ο	238	
	2 ^ο	213	2 ^ο	264	2 ^ο	232	
	3 ^ο	242	3 ^ο	200	3 ^ο	206	
	4 ^ο	210	4 ^ο	220	4 ^ο	245	
	5 ^ο	255	5 ^ο	236	5 ^ο	281	
						5	

Πίνακας 6.3: Ο αριθμός των πυρήνων και των πειραμάτων στον υπολογισμό του μιτωτικού δείκτη των κυτταρικών πληθυσμών της LA KO κυτταρικής σειράς.

Πείραμα	Κυτταρικοί Πληθυσμοί	p Value	Στατιστικό Τεστ
Μιτωτικός Δείκτης LA KO Εικ. 6.1B	CTRL 10% vs LA KO1	3.85E-01	Chi-square test
	CTRL 10% vs LA KO2	6.60E-01	
	LA KO1 vs LA KO2	6.61E-01	

Πίνακας 6.4: Το στατιστικό τεστ και οι τιμές pvalue της καταμέτρησης του μιτωτικού δείκτη των κυτταρικών πληθυσμών της LA KO κυτταρικής σειράς.

Εικ. 40 & Εικ. 41	Ένταση φθορισμού 3meK9H3 Foci						Αριθμός Πειραμάτων
	Αριθμός Foci			Αριθμός Πυρήνων			
	CTRL 10%	LA KO1	LA KO2	CTRL 10%	LA KO1	LA KO2	
	1452	1564	1463	60	60	60	3
Εικ. 36 & Εικ. 37	Ένταση φθορισμού 3meK9H3 Πυρήνα						Αριθμός Πειραμάτων
	Αριθμός Πυρήνων						
	CTRL 10%		LA KO1		LA KO2		
	200		206		200		3

Εικ. 38 & Εικ. 39	Ένταση φθορισμού 3meK9H3 Περιφέρειας			Αριθμός Πειραμάτων
	Αριθμός Πυρήνων			
	CTRL 10%	LA KO1	LA KO2	
	120	120	120	3
Εικ. 42	Μ.Ο. έντασης φθορισμού 3meK9H3 Foci/Πυρήνα			Αριθμός Πειραμάτων
	Αριθμός Πυρήνων			
	CTRL 10%	LA KO1	LA KO2	
	60	60	60	3
Εικ. 43	Αριθμός Foci			Αριθμός Πειραμάτων
	Αριθμός Πυρήνων			
	CTRL 10%	LA KO1	LA KO2	
	60	60	60	3

Πίνακας 6.5: Ο αριθμός των πυρήνων και των ετεροχρωματικών εστιών (Foci) στην καταμέτρηση του αριθμού των Foci και του υπολογισμού της έντασης φθορισμού του σήματος της 3meK9H3.

Πείραμα	Κυτταρικοί Πληθυσμοί	p Value	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟ ΤΕΣΤ
Ένταση φθορισμού 3meK9H3 Foci Εικ. 40	CTRL 10% vs LA KO1	5.10E-09	One way Anova (3.46E-192) with Levene test < 0.05 and Welch test <0.05, Tukey post-hoc test
	CTRL 10% vs LA KO2	5.10E-09	
	LA KO1 vs LA KO2	5.10E-09	
Μ.Ο. έντασης φθορισμού 3meK9H3 Foci/Πυρήνα Εικ. 42	CTRL 10% vs LA KO1	5.92E-09	One way Anova (1.4E-9) with Levene test < 0.05 and Welch test <0.05, Tukey post-hoc test
	CTRL 10% vs LA KO2	1.06E-04	
	LA KO1 vs LA KO2	4.00E-02	
Ένταση φθορισμού 3meK9H3 Περιφέρειας Εικ. 39	CTRL 10% vs LA KO1	5.10E-09	One way Anova (9.58E-19) with Levene test < 0.05 and Welch test <0.05, Tukey post-hoc test
	CTRL 10% vs LA KO2	5.57E-09	
	LA KO1 vs LA KO2	1.34E-02	
Ένταση φθορισμού 3meK9H3 Πυρήνα Εικ. 36	CTRL 10% vs LA KO1	5.10E-09	One way Anova (2.29E-24) with Levene test < 0.05 and Welch test <0.05, Tukey post-hoc test
	CTRL 10% vs LA KO2	2.40E-05	
	LA KO1 vs LA KO2	6.51E-09	
Αριθμός Foci Εικ. 43	CTRL 10% vs LA KO1	0.09	One way Anova (0.09)
	CTRL 10% vs LA KO2	0.09	
	LA KO1 vs	0.09	

	LA KO2		
--	--------	--	--

Πίνακας 6.6: Τα στατιστικά τεστ και οι τιμές pvalue στην καταμέτρηση του αριθμού των Foci και του υπολογισμού της έντασης φθορισμού του σήματος της 3meK9H3. Με κόκκινο σημειώνονται οι τιμές p Value<0.05.

Ρυθμός Πολλαπλασιασμού LR KO								
Εικ. 55A								
Αριθμός επιστρωμένων κυττάρων								
100.000								
Αριθμός Πειραμάτων								
CTRL 15%			LR KO1			LR KO2		
24hrs	48hrs	72hrs	24hrs	48hrs	72hrs	24hrs	48hrs	72hrs
4	4	4	4	4	4	4	4	4

Πίνακας 6.7: Ο αριθμός των επιστρωμένων κυττάρων και των πειραμάτων στον υπολογισμό του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυτταρικών πληθυσμών της LR KO κυτταρικής σειράς.

Πείραμα	Χρονικό Διάστημα	Κυτταρικοί Πληθυσμοί	P Value	Στατιστικό Τεστ
Ρυθμός Πολλαπλασιασμού LR KO Εικ. 55A	24hrs	CTRL 15% vs LR KO1	1.00E+00	One way Anova (6.94E-2) with Levene test > 0.05 and Brown-Forsythe test >0.05, Bonferroni post-hoc test
		CTRL 15% vs LR KO2	1.71E-01	
		LR KO1 vs LR KO2	1.07E-01	
	48hrs	CTRL 15% vs LR KO1	2.55E-01	One way Anova (3.09E-3) with Levene test > 0.05 and Brown-Forsythe test <0.05, Bonferroni post-hoc test
		CTRL 15% vs LR KO2	2.85E-03	
		LR KO1 vs LR KO2	5.43E-02	
	72hrs	CTRL 15% vs LR KO1	2.85E-03	One way Anova (5.79E-4) with Levene test > 0.05 and Brown-Forsythe test <0.05, Bonferroni post-hoc test
		CTRL 15% vs LR KO2	8.21E-04	
		LR KO1 vs LR KO2	1.00E+00	

Πίνακας 6.8: Τα στατιστικά τεστ και οι τιμές pvalue της καταμέτρησης του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυτταρικών πληθυσμών της LR KO κυτταρικής σειράς. Με κόκκινο σημειώνονται οι τιμές p Value<0.05.

Εικ. 55B	Μιτωτικός Δείκτης LR KO			Αριθμός Πειραμάτων
	Αριθμός Πυρήνων			
	CTRL 15%	LR KO1	LR KO2	

	2861		1233		1246		
	Πείραμα		Πείραμα		Πείραμα		
	1°	554	1°	212	1°	216	
	2°	581	2°	268	2°	259	
	3°	570	3°	257	3°	265	
	4°	575	4°	274	4°	253	
	5°	581	5°	222	5°	253	5

Πίνακας 6.9: Ο αριθμός των πυρήνων και των πειραμάτων στον υπολογισμό του μιτωτικού δείκτη των κυτταρικών πληθυσμών της LR KO κυτταρικής σειράς.

Πείραμα	Κυτταρικοί Πληθυσμοί	p Value	Στατιστικό Τεστ
Μιτωτικός Δείκτης LR KO Εικ. 55B	CTRL 15% vs LR KO1	9.18E-01	Chi-square test
	CTRL 15% vs LR KO2	8.85E-01	
	LR KO1 vs LR KO2	8.34E-01	

Πίνακας 6.10: Το στατιστικό τεστ και οι τιμές pvalue της καταμέτρησης του μιτωτικού δείκτη των κυτταρικών πληθυσμών της LR KO κυτταρικής σειράς.

Ρυθμός Πολλαπλασιασμού d-LA-LR KO Εικ. 69A											
Αριθμός επιστρωμένων κυττάρων											
50.000											
Αριθμός Πειραμάτων											
CTRL 15%			LA KO1 15%			d-LA-LR KO1			d-LA-LR KO2		
24hr	48hr	72hr	24hr	48hr	72hr	24hr	48hr	72hr	24hr	48hr	72hr
s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Πίνακας 6.11: Ο αριθμός των επιστρωμένων κυττάρων και των πειραμάτων στον υπολογισμό του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυτταρικών πληθυσμών της d-LA-LR KO κυτταρικής σειράς.

Ρυθμός Πολλαπλασιασμού d-LR-LA KO Εικ. 70A											
Αριθμός επιστρωμένων κυττάρων											
50.000											
Αριθμός Πειραμάτων											
CTRL 15%			LR KO1			d-LR-LA KO1			d-LR-LA KO2		
24hr	48hr	72hr	24hr	48hr	72hr	24hr	48hr	72hr	24hr	48hr	72hr
s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Πίνακας 6.12: Ο αριθμός των επιστρωμένων κυττάρων και των πειραμάτων στον υπολογισμό του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυτταρικών πληθυσμών της d-LR-LA KO κυτταρικής σειράς.

Πείραμα	Χρονικό Διάστημα	Κυτταρικοί Πληθυσμοί	P Value	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟ ΤΕΣΤ
Ρυθμός Πολλαπλασιασμού d-LA-LR KO Εικ. 69A	24hrs	CTRL 10% vs LA KO1 15%	1.00E+00	One way Anova (5.4E-03) with Levene test > 0.05 and Brown-Forsythe test <0.05, Bonferroni post-hoc test
		CTRL 10% vs d-LA-LR KO1	8.51E-03	
		CTRL 10% vs d-LA-LR KO2	1.00E+00	
		LA KO1 15% vs d-LA-LR KO1	1.60E-02	
		LA KO1 15% vs d-LA-LR KO2	1.00E+00	
		d-LA-LR KO1 vs d-LA-LR KO2	8.50E-02	
	48hrs	CTRL 10% vs LA KO1 15%	2.40E-02	One way Anova (2.3E-9) with Levene test > 0.05 and Brown-Forsythe test <0.05, Bonferroni post-hoc test
		CTRL 10% vs d-LA-LR KO1	3.57E-09	
		CTRL 10% vs d-LA-LR KO2	5.32E-07	
		LA KO1 15% vs d-LA-LR KO1	1.00E-06	
		LA KO1 15% vs d-LA-LR KO2	5.31E-04	
		d-LA-LR KO1 vs d-LA-LR KO2	5.46E-02	
	72hrs	CTRL 10% vs LA KO1 15%	7.66E-01	One way Anova (1.5E-9) with Levene test > 0.05 and Brown-Forsythe test <0.05, Bonferroni post-hoc test
		CTRL 10% vs d-LA-LR KO1	3.29E-07	
		CTRL 10% vs d-LA-LR KO2	3.00E-06	
		LA KO1 15% vs d-LA-LR	1.95E-08	

	KO1	
	LA KO1 15% vs d-LA-LR KO2	1.32E-07
	d-LA-LR KO1 vs d-LA-LR KO2	1.00E+00

Πίνακας 6.13: Τα στατιστικά τεστ και οι τιμές pvalue της καταμέτρησης του ρυθμού πολλαπλασιασμού της σταθερής κυτταρικής σειράς d-LA-LR KO. Με κόκκινο σημειώνονται οι τιμές $p \text{ Value} < 0.05$.

Πείραμα	Χρονικό Διάστημα	Κυτταρικοί Πληθυσμοί	P Value	Στατιστικό Τεστ
Ρυθμός Πολλαπλασιασμού d-LR-LA KO Εικ. 70A	24hrs	CTRL 15% vs LR KO1	2.53E-01	One way Anova (1.1E-5) with Levene test > 0.05 and Brown-Forsythe test <0.05, Bonferroni post-hoc test
		CTRL 15% vs d-LR-LA KO1	1.22E-03	
		CTRL 15% vs d-LR-LA KO2	1.00E-05	
		LR KO1 vs d-LR-LA KO1	1.71E-01	
		LR KO1 vs d-LR-LA KO2	1.22E-03	
		d-LR-LA KO1 vs d-LR-LA KO2	2.53E-01	
	48hrs	CTRL 15% vs LR KO1	4.10E-01	One way Anova (4.512E-8) with Levene test > 0.05 and Brown-Forsythe test <0.05, Bonferroni post-hoc test
		CTRL 15% vs d-LR-LA KO1	2.95E-04	
		CTRL 15% vs d-LR-LA KO2	8.00E-06	
		LR KO1 vs d-LR-LA KO1	4.00E-06	
		LR KO1 vs d-LR-LA KO2	1.77E-07	
		d-LR-LA KO1 vs d-LR-LA KO2	6.78E-01	
	72hrs	CTRL 15% vs LR KO1	1.00E+00	One way Anova (1.0E-6) with Levene test > 0.05 and Brown-Forsythe test <0.05, Bonferroni post-hoc test
		CTRL 15% vs d-LR-LA KO1	4.44E-04	

		CTRL 15% vs d-LR-LA KO2	9.50E-05	
		LR KO1 vs d- LR-LA KO1	4.70E-05	
		LR KO1 vs d- LR-LA KO2	1.10E-05	
		d-LR-LA KO1 vs d-LR-LA KO2	1.00E+00	

Πίνακας 6.14: Τα στατιστικά τεστ και οι τιμές pvalue της καταμέτρησης του ρυθμού πολλαπλασιασμού της σταθερής κυτταρικής σειράς d-LR-LA KO. Με κόκκινο σημειώνονται οι τιμές p Value<0.05.

Εικ.69B	Μιτωτικός Δείκτης d-LA-LR KO									Αριθμός Πειραμάτων
	Αριθμός Πυρήνων									
	CTRL 15%		LA KO1 15%		d-LA-LR KO1		d-LA-LR KO2			
	2861		2885		2896		2870			
	Πείραμα		Πείραμα		Πείραμα		Πείραμα			
	1°	554	1°	564	1°	565	1°	565		
	2°	581	2°	587	2°	574	2°	584		
	3°	570	3°	576	3°	571	3°	570		
	4°	575	4°	571	4°	582	4°	565		
	5°	581	5°	587	5°	604	5°	586		

Πίνακας 6.15: Ο αριθμός των πυρήνων και πειραμάτων στον υπολογισμό του μιτωτικού δείκτη των κυτταρικών πληθυσμών της d-LA-LR KO κυτταρικής σειράς.

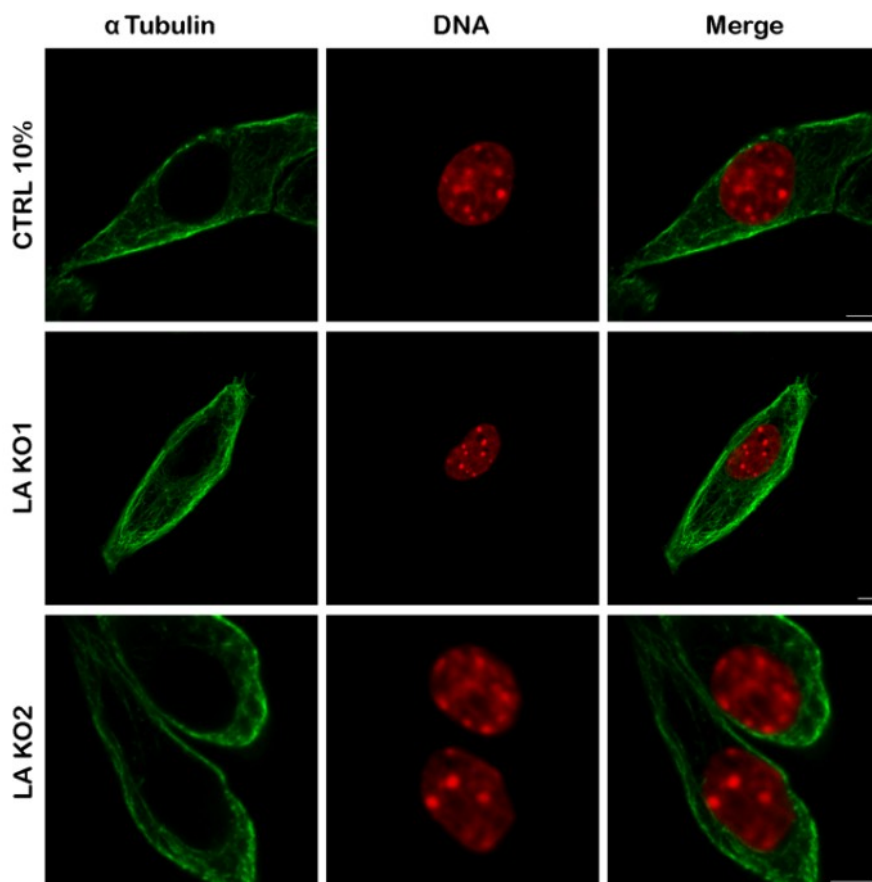
Εικ. 70B	Μιτωτικός Δείκτης d-LR-LA KO									Αριθμός Πειραμάτων
	Αριθμός Πυρήνων									
	CTRL 15%		LR KO1		d-LR-LA KO1		d-LR-LA KO2			
	2871		2966		2979		2991			
	Πείραμα		Πείραμα		Πείραμα		Πείραμα			
	1°	556	1°	582	1°	585	1°	582		
	2°	570	2°	573	2°	591	2°	597		
	3°	569	3°	603	3°	594	3°	577		
	4°	596	4°	616	4°	603	4°	616		
	5°	580	5°	592	5°	606	5°	619		

Πίνακας 6.16: Ο αριθμός των πυρήνων και πειραμάτων στον υπολογισμό του μιτωτικού δείκτη των κυτταρικών πληθυσμών της d-LR-LA KO κυτταρικής σειράς.

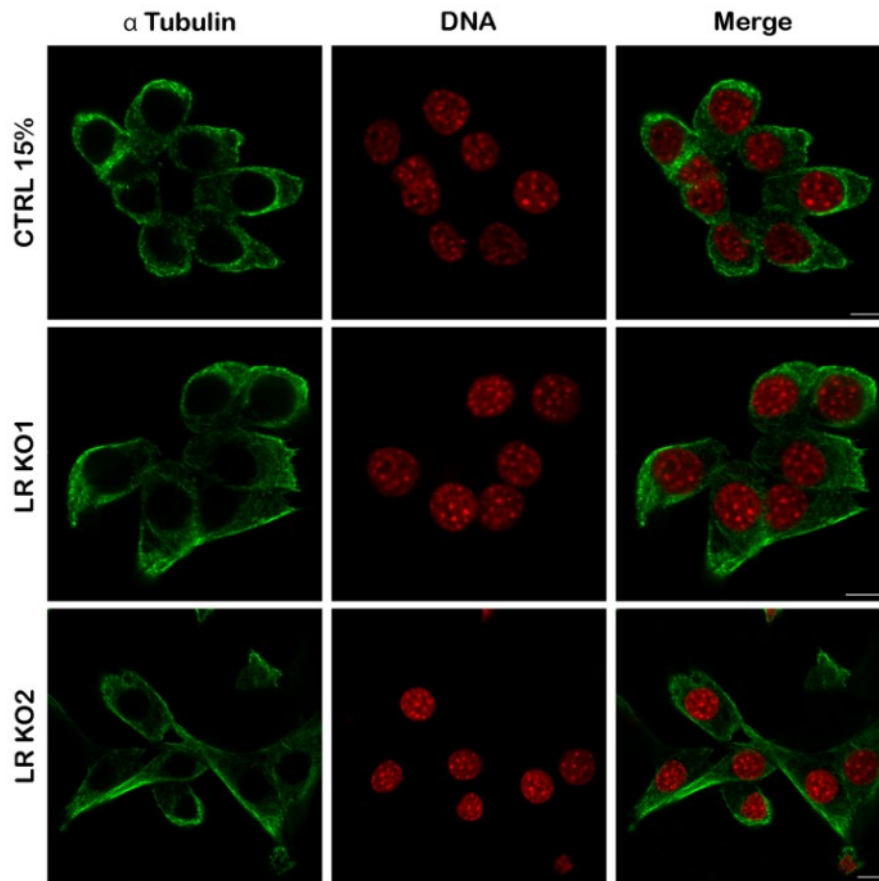
Πείραμα	Κυτταρικοί Πληθυσμοί	p Value	Στατιστικό Τεστ
Μιτωτικός Δείκτης	CTRL 10% vs LA KO1 15%	6.01E-01	Chi-square test

d-LA-LR KO Εικ 69B	LA KO1 15% vs d-LA-LR KO1	7.24E-01	
	LA KO1 15% vs d-LA-LR KO2	5.30E-01	
	d-LA-LR KO1 vs d-LA-LR KO2	7.83E-01	
Μιτωτικός Δείκτης d-LR-LA KO Εικ 70B	CTRL 15% vs LR KO1	9.10E-02	Chi-square test
	LR KO1 vs d-LR-LA KO1	4.53E-01	
	LR KO1 vs d-LR-LA KO2	2.06E-01	
	d-LR-LA KO1 vs d-LR-LA KO2	4.46E-02	

Πίνακας 6.17: Τα στατιστικά τεστ και οι τιμές pvalue της καταμέτρησης του μιτωτικού δείκτη των κυτταρικών πληθυσμών των σειρών d-LA-LR KO και d-LR-LA KO. Με κόκκινο σημειώνονται οι τιμές $p \text{ Value} < 0.05$.



Εικόνα 6.2: Η κατανομή α Tubulin σε μεσοφασικά κύτταρα μεταξύ των πληθυσμών LR KO1, LR KO2 και κυττάρων CTRL 15% (πράσινο: α Tubulin, κόκκινο: TOPRO, scale bar: 10 μ m).



Εικόνα 6.3: Το δίκτυο των μικροσωληνίσκων της α Tubulin μεταξύ των πληθυσμών LA KO1, LA KO2 και κυττάρων CTRL 10% (πράσινο: α Tubulin, κόκκινο: TOPRO, scale bar: 5 μ m).

