



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

**ΜΙΤΩΤΙΚΗ ΠΡΟΣΗΜΕΙΩΣΗ ΣΤΑ ΕΜΒΡΥΟΝΙΚΑ
ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ: ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ
ΜΙΤΩΤΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ HASPIN**

*MITOTIC BOOKMARKING IN EMBRYONIC STEM CELLS: STUDY OF
THE ROLE OF HASPIN MITOTIC KINASE*

Βλατάκη Αικατερίνη

Επιβλέπων Καθηγητής Βιολογικής Χημείας & Μέλος ΔΕΠ στην Ιατρική Σχολή
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων: Σπυρίδων Γεωργάτος

Εργαστήριο βλαστικών κυττάρων και χρωματίνης

Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας & Βιοτεχνολογίας (IMBB) - Τμήμα Βιοϊατρικών
Ερευνών Ιωαννίνων (ΤΒΕΙ) -ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ (ΙΤΕ)

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ
ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2021**

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας διεξήχθη υπό την επίβλεψη του καθηγητή Γεωργάτου Σπύρου στο εργαστήριο «Βλαστικών Κυττάρων και Χρωματίνης», το οποίο στεγάζει το Τμήμα Βιοϊατρικών Ερευνών Ιωαννίνων (ΤΒΕΙ) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ) και υποβλήθηκε στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Ο κ. Γεωργάτος Σπύρος, καθηγητής του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και επικεφαλής της ερευνητικής ομάδας στο ΙΤΕ, ως επιβλέπων της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, μου ανέθεσε το θέμα, μου παρείχε όλα τα απαραίτητα υλικά για την πραγματοποίηση των πειραμάτων και με καθοδήγησε τόσο εκπαιδευτικά όσο και ερευνητικά. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριό του, για το χρόνο που μου αφιέρωσε και για την πολύτιμη βοήθειά του.

Ιδιαίτερα οφείλω ευχαριστήσω στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Καράνικα Ελευθερία, η οποία από τους πρώτους κιόλας μήνες με βοήθησε να προσαρμοστώ στο εργαστήριο, ανέλαβε την εκπαίδευσή μου, με καθοδήγησε σ' αυτήν τη δύσκολη πορεία που ακολούθησε κατά τη διάρκεια της διατριβής και δε σταμάτησε λεπτό να με εμψυχώνει όταν τα πράγματα δεν πήγαιναν καλά. Της οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ που ήταν πάντα πρόθυμη να με συμβουλέψει είτε ως δασκάλα, είτε ως φίλη... Και της οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ που ήταν πάντα εκεί!

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τις μεταδιδακτορικές ερευνήτριες Χριστογιάννη Νατάσα, Χατζαντωνάκη Ελευθερία και Πότση Ντιάνα-Μαρία για την πολύτιμη βοήθειά τους όλο αυτό το διάστημα αλλά και για την ψυχολογική υποστήριξη.

Δε μπορώ να παραλείψω τη βαρύτιμη συμβολή της κυρίας Πολίτου Αναστασίας και της μεταδιδακτορικής ερευνήτριας Σουψανά Κατερίνας για την παραχώρηση του εργαστηριακού τους χώρου και τη βοήθειά τους στην διαδικασία της κλωνοποίησης των πλασμιδίων γι' αυτή τη μελέτη.

Ευχαριστώ πολύ το εργαστήριο του κυρίου Θάνου Δημήτρη στην Ακαδημία Αθηνών που ανταποκρίθηκαν άμεσα και μας έστειλαν τις κωδικές αλληλουχίες που ζητήσαμε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής πενταμελούς επιτροπής μου, τον κύριο Ευστάθιο Φριλίγγο, την κυρία Θωμαΐς Παπαμαρκάκη, την κυρία Πολίτου Αναστασία και τον κύριο Δημήτρη Λιακόπουλο οι οποίοι δέχθηκαν να συμμετάσχουν στην αξιολόγηση της μεταπτυχιακής διατριβής μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη	4
Abstract	5
1. Εισαγωγή	6
1.1 Μία επισκόπηση στη μιτωτική προσημείωση	6
1.2 Η κυτταρική μνήμη κατά τη διάρκεια της μίτωσης	7
1.3 Παράγοντες μιτωτικής προσημείωσης: Επιγενετικοί μεταγραφικοί παράγοντες και επιγενετικά σημάδια	10
1.3.1 Επιγενετικά σήματα, οι αναγνώστες και οι συγγραφείς τους	10
1.3.2 Μιτωτική προσημείωση από μεταγραφικούς παράγοντες	12
1.4 Περιορισμοί στη μιτωτική προσημείωση που προκύπτουν κατά τη μίτωση	13
1.4.1 Φωσφορυλίωση μεταγραφικών παραγόντων κατά τη μίτωση	13
1.4.2 Μιτωτική συμπίκνωση, προσβασιμότητα χρωματίνης και παράγοντες μιτωτικής προσημείωσης	14
1.4.3 Η τροποποίηση των ιστονών κατά τη μίτωση	15
1.5 Haspin, μια μιτωτική κινάση	16
1.5.1 Η δομή της Haspin	16
1.5.2 Οι λειτουργίες της Haspin	17
1.6 Η δέσμευση και οι τρόποι δράσης των παραγόντων μιτωτικής προσημείωσης	17
1.6.1 Ειδική πρόσδεση των παραγόντων μιτωτικής προσημείωσης	18
1.6.2 Η στρατολόγηση των παραγόντων μιτωτικής προσημείωσης στα χρωμοσώματα	18
1.7 Η ενεργοποίηση των γονιδίων αμέσως μετά τη μίτωση	20
1.8 Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ως πειραματικό μοντέλο για τη μελέτη της μιτωτικής προσημείωσης.	21
1.8.1 Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και οι βασικές ιδιότητες τους.	22
2. Σκοπός	24
3. Υλικά και Μέθοδοι	25
3.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών	25
3.2 Κλωνοποίηση	25
3.2.1 Προετοιμασία των cDNA ενδιαφέροντος	25
3.2.1.1 Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	25
3.2.1.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης	26
3.2.1.3 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αгарόζης	26
3.2.1.4 Αντίδραση πέψης με δύο περιοριστικά ένζυμα για τα cDNAs (διπλή πέψη)	27
3.2.2 Προετοιμασία των πλασμιδιακών φορέων	27
3.2.2.1 Βακτηριακά στελέχη και πλασμιδιακοί φορείς	27
3.2.2.2 Αντίδραση πέψης με δύο περιοριστικά ένζυμα για τους πλασμιδιακούς φορείς (διπλή πέψη)	28
3.2.2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης	29

3.2.2.4 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης	29
3.2.2.5 Αποφωσφορυλίωση πλασμιδιακού φορέα	29
3.2.3 Αντίδραση συγκόλλησης	29
3.3 Κατασκευή επιδεκτικών βακτηρίων	30
3.4 Μετασηματισμός βακτηρίων DH10B	30
3.5 Επιλογή αποικιών και απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή και μεσαία κλίμακα	30
3.6 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών	31
3.6.1 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με ηλεκτροδιάτρηση	31
3.6.2 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με αντιδραστήρια επιμόλυνσης	31
3.7 Δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων απαλοϊφώντας το γονίδιο της Haspin	31
3.8 Μορφολογικές μέθοδοι	32
3.8.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κύτταρα επιστρωμένα σε γυάλινες επιφάνειες	32
3.8.2 Απεικόνιση ζωντανών κυττάρων	33
3.8.3 Συνεστιακή μικροσκοπία	33
4. Αποτελέσματα	34
4.1 Κατανομή μεταγραφικών ρυθμιστών κατά τη διάρκεια της μίτωσης	34
4.1.1 Καταγραφή της κατανομής μεταγραφικών ρυθμιστών μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού (μελέτη ενδογενής έκφρασης)	34
4.1.2 Καταγραφή της κατανομής μεταγραφικών ρυθμιστών μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού (μέσω έκτοπης έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων)	42
4.1.3 Καταγραφή της κατανομής του μεταγραφικού παράγοντα Oct4 σε σταθερή κυτταρική σειρά	49
4.1.3 Καταγραφή της κατανομής μεταγραφικών ρυθμιστών σε πραγματικό χρόνο	51
5. Συζήτηση	53
6. Βιβλιογραφία	55

Περίληψη

Κατά τη διάρκεια της μίτωσης, η μεταγραφική διακόπτεται, η χρωματίνη συμπυκνώνεται και οι περισσότεροι μεταγραφικοί παράγοντες (ΜΠ), αναφέρεται ότι, αποκλείονται από τα χρωμοσώματα. Ωστόσο, πώς τα θυγατρικά κύτταρα αποκαθιστούν το αρχικό πρόγραμμα μεταγραφής; Πρόσφατες μελέτες υποδηλώνουν ότι ένα επιλεγμένο σύνολο ΜΠ παραμένει δεσμευμένο στα μιτωτικά χρωμοσώματα, γεγονός που υποδεικνύει έναν πιθανό μηχανισμό για τη διατήρηση των μεταγραφικών προγραμμάτων μέσω του κυτταρικού κύκλου που ονομάζεται μιτωτική προσημείωση. Επιπλέον, η Haspin, μία μιτωτική κινάση η οποία είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση της θρεονίνης 3 στην ιστόνη H3 (H3T3ph), και η οποία αποτελεί κύρια μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας τα τελευταία χρόνια, παίρνει μέρος σε διάφορες διαδικασίες της μίτωσης, όπως είναι η συγκρότηση της μιτωτικής ατράκτου, η σύνδεση μεταξύ των κεντρομεριδίων στις αδελφές χρωματίδες και η ευθυγράμμιση των χρωμοσωμάτων. Στην παρούσα μελέτη, αναστέλλεται η έκφραση της κινάσης αυτής, και αναφέρουμε το κατά πόσο αυτή η αναστολή παίζει ρόλο στην προσημείωση των ΜΠ κατά τη μίτωση. Παράλληλα, γνωστοποιούμε ότι πολλοί ΜΠ παραμένουν συνδεδεμένοι με τα μιτωτικά χρωμοσώματα στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού, καθώς και, ότι ο αποκλεισμός των ΜΠ από αυτά, κάτι που είχε περιγραφεί στο παρελθόν, οφείλεται σε μεγάλο βαθμό σε τεχνικό σφάλμα εξαιτίας της μονιμοποίησης των κυττάρων κατά την επεξεργασία τους. Η φύση του τεχνικού σφάλματος παρακινεί την προσεκτική επανεξέταση του ρόλου των ΜΠ στη μιτωτική προσημείωση.

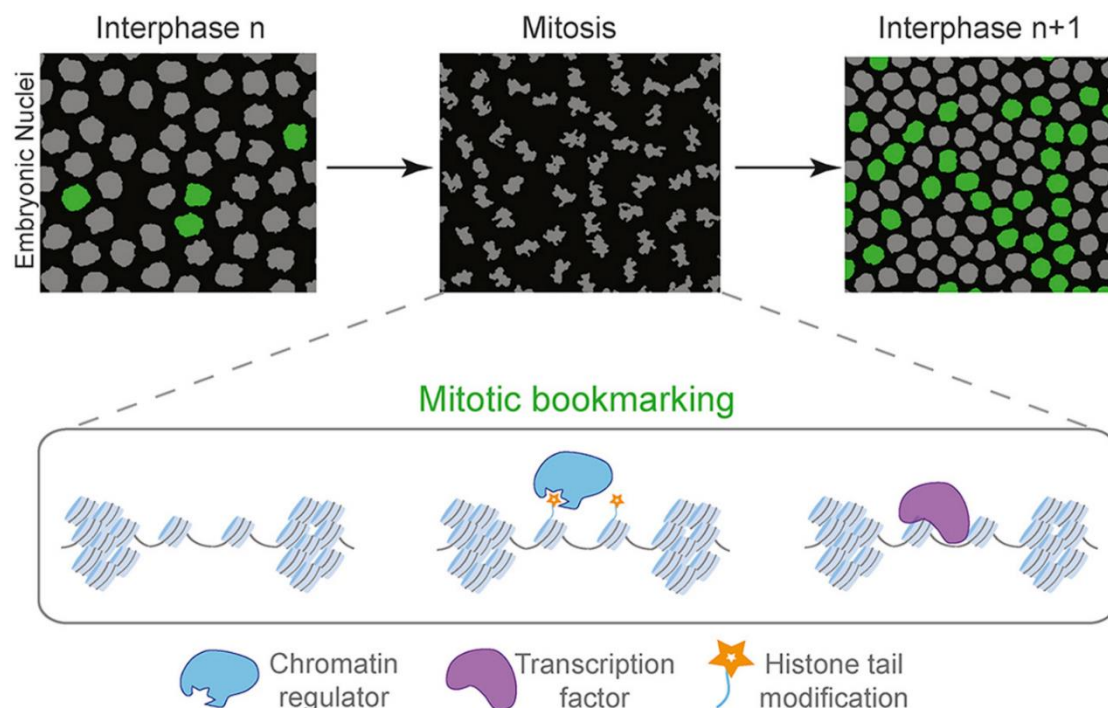
Abstract

During mitosis, transcription is disrupted, chromatin is condensed, and most transcription factors (TFs) are reported to be excluded from chromosomes. However, how do daughter cells re-establish the original transcription program? Recent studies suggest that a selected set of TFs remains bound on mitotic chromosomes, suggesting a potential mechanism for maintaining transcriptional programs through the cell cycle termed as mitotic bookmarking. In addition, Haspin, a mitotic kinase who is responsible for phosphorylation of threonine 3 at histone H3 (H3T3ph) and which is a main study of our research team in recent years, is involved in various mitotic processes such as the formation of the mitotic spindle, the interconnection of centromere in sister chromatids, and the alignment of chromosomes. In the present study, the expression of this kinase is inhibited, and we report whether this inhibition plays a role on the bookmarking of TFs during mitosis. At the same time, we report that many TFs remain associated with mitotic chromosomes in mouse embryonic stem cells, and that the fact that TFs are excluded from them, evidence described in the past, is largely a fixation artifact. The nature of the cross-linking artifact prompts a careful re-examination of the role of TFs in mitotic bookmarking.

1. Εισαγωγή

1.1 Μία επισκόπηση στη μιτωτική προσημείωση

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα διακρίνονται για την σταθερότητα του γονιδιώματός τους, διατηρώντας μια σταθερή και οργανωμένη δομή, τη χρωματίνη. Ολόκληρο το γονιδίωμα πρέπει να αντιγραφεί με εξαιρετική ακρίβεια κατά την κυτταρική διαίρεση, καθώς και η διαμόρφωση της χρωματίνης να αναπαραχθεί σε νέα μόρια DNA στα δυο πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα που θα προκύψουν. Κατά τη διάρκεια της μίτωσης, οι αλλαγές που πραγματοποιούνται στον πυρήνα, τη χρωματίνη καθώς και στους ρυθμιστές της, οδηγούν στην κατάργηση ρυθμιστικών διαδικασιών πολλών γονιδίων, γεγονός που προκαλεί στα κύτταρα μια “κρίση ταυτότητας”. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της μίτωσης, ένας μεγάλος αριθμός ρυθμιστών της μεταγραφής είναι ικανός να δεσμεύεται στους γονιδιωματικούς στόχους τους. Αυτοί οι ρυθμιστές, γνωστοί ως «παράγοντες μιτωτικής προσημείωσης» (mitotic bookmarking factors), περιλαμβάνουν μεταγραφικούς παράγοντες (ΜΠ, transcription factors) αλλά και τροποποιητές της χρωματίνης (chromatin regulators/histone tail modification), οι οποίοι μεταδίδουν γονιδιακές ρυθμιστικές πληροφορίες από το μητρικό κύτταρο στα θυγατρικά του [1] (Εικ. 1.1).



Εικόνα 1.1 Η μεταβίβαση της κατάστασης της χρωματίνης από το μητρικό στα θυγατρικά κύτταρα. Μεταξύ των γνωστών ενεργών υποστηρικτικών της μιτωτικής μνήμης, υπάρχουν τρεις κατηγορίες ρυθμιστών: επιγενετικά σημάδια στις ιστόνες (histone tail modifications)/ ρυθμιστές χρωματίνης (chromatin regulators), γενικοί ΜΠ και ειδικοί ΜΠ αλληλουχίας (transcription factors) [1].

Η υπόθεση της μιτωτικής προσημείωσης ξεκίνησε στα τέλη της δεκαετίας του 1970, ύστερα από την παρατήρηση κυττάρων που βρίσκονταν στη μετάφαση. Τα κύτταρα σε αυτή τη φάση του κυτταρικού κύκλου παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στη μετουσίωση του DNA και αυξημένα επίπεδα μονόκλωνου DNA σε σχέση με τη μεσόφαση [2, 3, 4]. Τα χαρακτηριστικά

αυτά σχετίζονται άμεσα με τη γονιδιακή ρύθμιση, καθώς η παρουσία ενεργών υποκινητών κατά τη μεσόφαση υποδηλώνει ξετύλιγμα της διπλής έλικας του DNA κατά τη μίτωση και ενδείξεις πρόσδεσης ΜΠ πάνω σε αυτό [5, 6]. Αυτές ήταν οι πρώτες μελέτες, οι οποίες οδήγησαν στη γέννηση του πεδίου της μιτωτικής προσημείωσης, και υποδηλώνουν ότι ο πολλαπλασιασμός μιας ανοιχτής δομής χρωματινης, που σχετίζεται με τη δέσμευση ΜΠ, μπορεί να διευκολύνει την άμεση επανενεργοποίηση της μεταγραφής στη μεσόφαση. Εν συνεχεία, αυτό οδήγησε στην έννοια των “παραγόντων μιτωτικής προσημείωσης” [7]. Με την πάροδο του χρόνου, ένας αριθμός γενικών και καθολικών ρυθμιστών μεταγραφής έχουν προταθεί να λειτουργούν ως παράγοντες μιτωτικής προσημείωσης, όπως για παράδειγμα οι Esrrb, Klf4, c-Myc, Sox2 κ.ά. [8, 9, 10, 11, 12]. Έτσι, ανοίγεται ένας νέος δρόμος για την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι ΜΠ όχι μόνο καθιερώνουν, αλλά και διατηρούν ένα μεταγραφικό προφίλ εξειδικευμένο για τον κάθε κυτταρικό τύπο καθ’ όλη την κυτταρική διαίρεση.

1.2 Η κυτταρική μνήμη κατά τη διάρκεια της μίτωσης

Κάθε ευκαρυωτικό κύτταρο, καθ’ όλη τη διάρκεια του κυτταρικού του κύκλου, είναι υποχρεωμένο να αντιγράψει και να κληροδοτήσει στους απογόνους του το γονιδιώμα του με μεγάλη ακρίβεια. Οι κυτταρικοί φαινότυποι μπορούν να μεταβιβαστούν σταθερά τόσο κατά τις πολυάριθμες κυτταρικές διαιρέσεις, όσο και κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και διαφοροποίησης του κάθε κυττάρου [13]. Η ικανότητα αυτή των κυττάρων, να διατηρούν το φαινότυπο τους, έχει χαρακτηριστεί ως επιγενετική «κυτταρική μνήμη» και κατέχει σημαντικό ρόλο στην συντήρηση σταθερών προτύπων γονιδιακής έκφρασης [14]. Οι αναπτυξιακές μεταβάσεις και η διαφοροποίηση των κυττάρων καθοδηγούνται από ΜΠ, οι οποίοι εγκαθιδρύουν συγκεκριμένα πρότυπα μεταγραφής στα κύτταρα [15]. Η απόκτηση της κυτταρικής ταυτότητας λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της μίτωσης, όπως συμβαίνει τόσο κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, όταν εκατομμύρια διαφοροποιημένα κύτταρα δημιουργούνται από ένα μόνο γονιμοποιημένο ωάριο, όσο και κατά την ενηλικίωση, όταν η ενεργοποίηση των βλαστικών κυττάρων ενισχύει τον πληθυσμό των διαφοροποιημένων κυττάρων [16, 17].

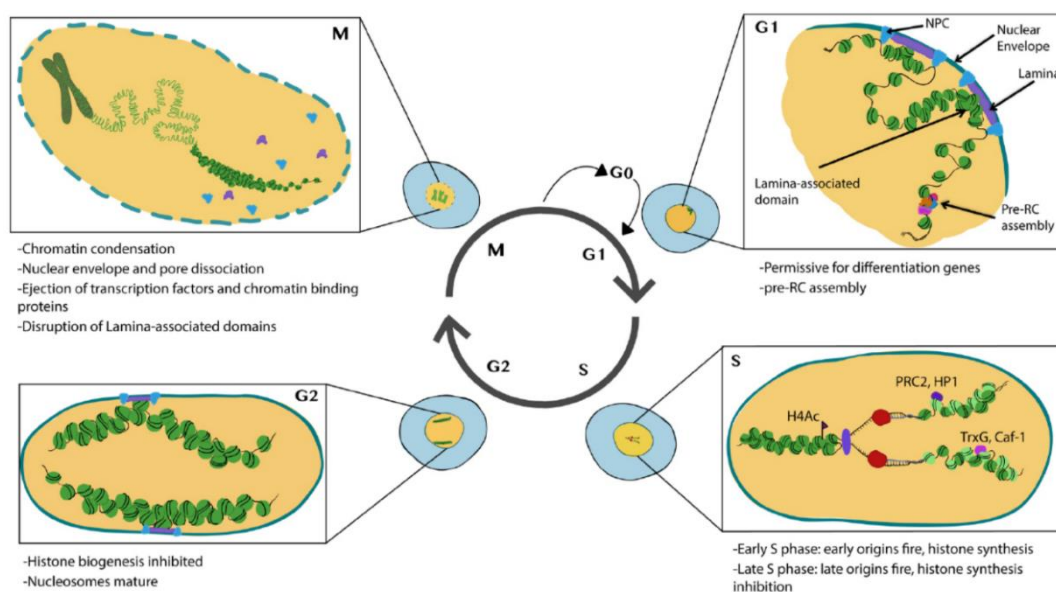
Η κυτταρική διαίρεση εξασφαλίζει τη διατήρηση του «πεπρωμένου» του κυττάρου. Η αντιγραφή και η μίτωση είναι δυο διαδικασίες του κυτταρικού κύκλου που επηρεάζουν ουσιαστικά τα μοριακά γεγονότα που σχετίζονται με τη γονιδιακή ρύθμιση, συμπεριλαμβανομένων αλλαγών που δέχονται τα νουκλεοσώματα σε περιοχές δέσμευσης των ΜΠ [18, 19, 20, 21]. Ενώ, η αντιγραφή (φάση S του κυτταρικού κύκλου) έχει εκτεταμένη διάρκεια, όπου το DNA χαλαρώνει, προκειμένου να προσδεθούν πάνω του οι παράγοντες και τα ένζυμα της αντιγραφής, αντίθετα, η μίτωση αποτελεί μία ξαφνική και σύντομη διαδικασία. Κατά τη μίτωση, ο πυρήνας και η χρωματινη υφίστανται δραματική αναδιοργάνωση, καθώς δομές όπως ο πυρηνικός φάκελος αποσυναρμολογούνται και το DNA συσπειρώνεται σχηματίζοντας τα συμπαγή, μιτωτικά χρωμοσώματα [22, 23].

Κατά τη συμπύκνωση της χρωματινης, η μεταγραφή μειώνεται δραματικά και σχεδόν όλες οι πρωτεΐνες που προσδέονται στη διπλή έλικα του DNA απομακρύνονται. Ωστόσο, όμως, ένας αριθμός γονιδίων εκφράζεται σε υψηλότερο βαθμό στη μίτωση παρά στη μεσόφαση (μιτωτική μεταγραφή) [24]. Πιο συγκεκριμένα, διάφοροι μιτωτικοί μηχανισμοί συγκλίνουν ταυτόχρονα σε μια κοινή ενέργεια: την απενεργοποίηση πολλών ΜΠ και κατά συνέπεια τη δραστική μείωση της μεταγραφικής διαδικασίας [22, 25, 26, 27, 28].

Παρ’ όλ’ αυτά, μετά τη μίτωση, πρέπει να αποκατασταθεί το προηγούμενο πρότυπο τόσο των γονιδίων που έχουν αποσιωπηθεί, όσο και των γονιδίων που συνεχίζουν να εκφράζονται. Από

την άλλη μεριά, ένα υποσύνολο παραγόντων μπορεί και παραμένει πάνω στα μιτωτικά χρωμοσώματα, προσφέροντας, έτσι, μία μοριακή προσημείωση η οποία θα κατευθύνει τη σωστή επανασυναρμολόγηση της χρωματίνης [24]. Αντίθετα, κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, τα κύτταρα τα οποία πολλαπλασιάζονται, διατηρούν μια πολύ δυναμική χρωματίνη.

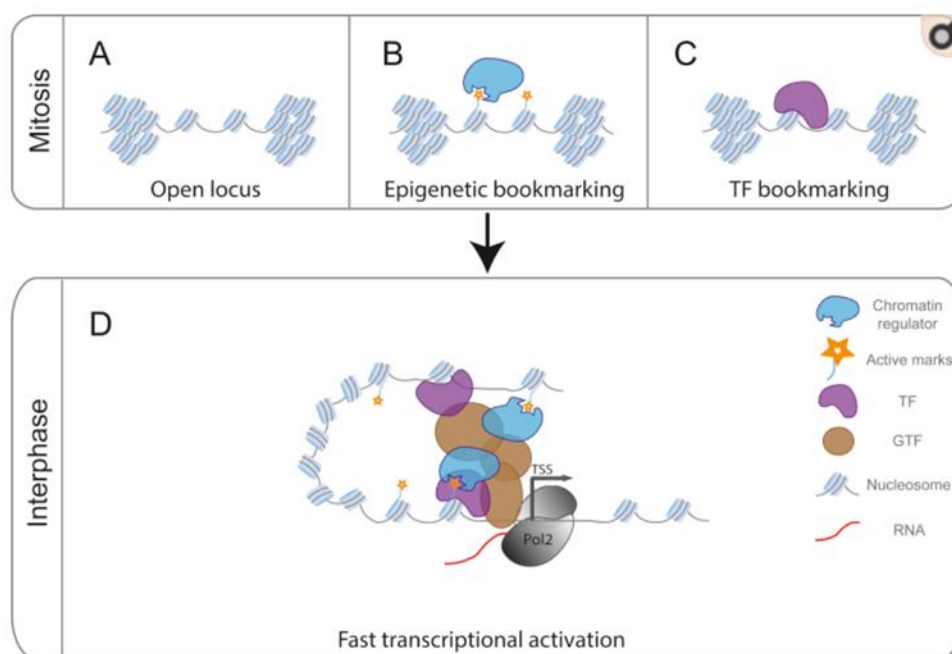
Κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, θα πρέπει να σημειωθεί, πως δύο σημαντικά γεγονότα λαμβάνουν χώρα στο κύτταρο, τα οποία επιτρέπουν τη συνολική μεταβολή της χρωματίνης. Πρώτον, η ενσωμάτωση νέων ιστονών στο νεοσυντιθέμενο DNA που πραγματοποιείται κατά τη φάση S, γεγονός που προϋποθέτει την αποκατάσταση των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων (Post-translational modifications, PTMs) των ιστονών. Δεύτερον, η πυρηνική αρχιτεκτονική καταρρέει, καθώς και τμήματα της χρωματίνης ή τμήματα που αλληλεπιδρούν με το εσωτερικό του πυρήνα ή της περιφέρειας, έχοντας ως συνέπεια πολλά σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και μεταγραφικά σύμπλοκα να διαχωρίζονται από αυτήν [25]. Στην εικόνα 1.2, αναπαρίστανται οι βασικές διαδικασίες που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια του κυτταρικού του κύκλου (Εικ.1.2).



Εικόνα 1.2. Κύρια χαρακτηριστικά της χρωματίνης και αλλαγές που υφίσταται ο πυρήνας κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Τα κύτταρα σε φάση G1 εμφανίζουν πυρηνικές υποπεριοχές οι οποίες συνδέονται με τους πυρηνικούς πόρους και με τις πυρηνικές λαμίνες. Τα προ-αντιγραφικά σύμπλοκα (pre-replication complex, Pre-RCs) σχηματίζονται κατά προτίμηση σε προσβάσιμη χρωματίνη. Κατά τη διάρκεια της φάσης S μεταγράφονται και συντίθενται οι ιστόνες, το DNA αναδιπλασιάζεται και τόσο νέα (ανοιχτό πράσινο) όσο και ανακυκλωμένα (σκούρο πράσινο) νουκλεοσώματα συναρμολογούνται για να σχηματίσουν θυγατρικά μόρια χρωματίνης. Κατά τη διάρκεια της G2 αναστέλλεται η ωρίμανση των νουκλεοσωμάτων και η βιοσύνθεση των ιστονών. Κατά τη διάρκεια της μίτωσης, τα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται και πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες και πρωτεΐνες πρόσδεσης της χρωματίνης απομακρύνονται από αυτήν. Ο πυρηνικός φάκελος καταρρέει διαταράσσοντας τις πυρηνικές υποπεριοχές που προσδέονται με λαμίνες [25].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ταυτότητα των κυττάρων καθορίζεται από τη γονιδιακή έκφραση αλλά και τη διαμόρφωση της χρωματίνης, τα οποία εποπτεύονται συνεχώς από βασικούς ΜΠ,

γνωστοί ως κύριοι ρυθμιστές [29]. Κατά τη μίτωση, αυτό το αυστηρά ελεγχόμενο σύστημα είναι προσωρινά αποσταθεροποιημένο, όταν πραγματοποιούνται δραματικές μοριακές αλλαγές [6, 28, 30]. Η χρωματίνη λειτουργεί ως πλατφόρμα για πολλά κυτταρικά σήματα που επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση. Η διαμόρφωση της χρωματίνης μέσω των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων (PTMs) στις αμινοτελικές ουρές των ιστονών και οι ομοιοπολικές τροποποιήσεις των νουκλεοτιδίων μπορεί να επηρεάσουν το μεταγραφικό πρόγραμμα ενός κυττάρου, το οποίο τελικά, επηρεάζει την κυτταρική συμπεριφορά και τη μοίρα αυτού. Πιο συγκεκριμένα, ορισμένες τροποποιήσεις στη χρωματίνη μετατρέπονται σε μεταγραφικές οδηγίες, και μέσω της αλληλεπίδρασης τους με ειδικές πρωτεΐνες που τις αναγνωρίζουν, όπως είναι οι *συγγραφείς* (*writers*), οι *αναγνώστες* (*readers*) και οι *διορθωτές* (*erasers*), οι οποίοι αποτελούν κεντρικά στοιχεία στην κατανόηση της φυσιολογίας των κυττάρων [31]. Οι πρωτεΐνες αυτές προσδένονται, άλλοτε ανεξάρτητα, άλλοτε σε συνδυασμό μεταξύ τους, δημιουργώντας ένα πλήθος συμπλοκών αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, τα οποία αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με συμπλέγματα ΜΠ δίνοντας σήματα ενεργοποίησης ή καταστολής της μεταγραφής [32]. Στην *εικόνα 1.3* περιγράφονται ορισμένοι πιθανοί μηχανισμοί μιτωτικής προσημείωσης που συμβαίνουν κατά τη μίτωση (*Εικ.1.3*). Παρ' όλ' αυτά, ο τρόπος με τον οποίο τα συγκεκριμένα προγράμματα ρύθμισης, κάθε τύπου κυττάρου, αποκαθίστανται πιστά στα θυγατρικά κύτταρα αποτελεί ένα θεμελιώδες - αλλά ακόμα αναπάντητο - ερώτημα στη βιολογία. Όμως, η μερική διατήρηση συγκεκριμένων ενεργών ή κατασταλτικών σημάτων πάνω στις ιστονές, επιτρέπουν την ταχεία στρατολόγηση των αντίστοιχων *αναγνώστων* και *συγγραφέων* ιστονών κατά την είσοδο του κυττάρου στην G1, διασφαλίζοντας την αυτο-διαίωσιση των καταστάσεων γονιδιακής έκφρασης [33, 34, 35]



Εικόνα 1.3. Συντήρηση μνήμης ενεργών γονιδίων / μεταγραφικής μνήμης. Μηχανισμοί μιτωτικής προσημείωσης που εμφανίζονται σε υποκινητές ή/ και ενισχυτές. *A)* Η περιοχή που έχει υποστεί μεταγραφή παραμένει μερικώς προσβάσιμη κατά τη διάρκεια της μίτωσης, διευκολύνοντας έτσι τη μετα-μιτωτική επανενεργοποίησή της. *B)* Τα σημάδια στις ιστονές και οι ρυθμιστές της χρωματίνης (αναγνώστες, συγγραφείς) δεσμεύουν τη μιτωτική χρωματίνη όταν βρίσκεται σε ενεργή κατάσταση, επομένως «προσημειώνουν» συγκεκριμένες θέσεις για επακόλουθη μεταγραφική ενεργοποίηση. *C)* ΜΠ μπορούν να συνδεθούν σε ένα υποσύνολο των στόχων τους κατά τη διάρκεια της μίτωσης, ευνοώντας κατά συνέπεια

την ενεργοποίησή τους με το πέρας της μίτωσης. D) Μέσω ενεργοποίησης ενισχυτή/ υποκινητή, όλοι οι μηχανισμοί που απεικονίζονται (A-C) οδηγούν σε ταχεία μετα-μιτωτική μεταγραφική ενεργοποίηση. [1]

Επιπλέον, ορισμένες μελέτες τεκμηριώνουν ότι επιλεγμένοι ΜΠ παραμένουν συνδεδεμένοι με τη μιτωτική χρωματίνη, διευκολύνοντας την ταχεία επανενεργοποίηση κρίσιμων γονιδίων για την αντίστοιχη κυτταρική ταυτότητα [36, 37, 38]. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός πως οι ΜΠ που έχουν αναφερθεί ως προσημειωτές είναι, είτε κύριοι ρυθμιστές της ταυτότητας των κυττάρων, όπως ο GATA1 σε αιμοποιητικά κύτταρα [38], και / ή «πρωτοπόροι» παράγοντες (ή βοηθητικοί, pioneer factors) - που μπορούν να δεσμεύσουν «δυσπρόσιτες» νουκλεοσωμικές περιοχές [39] όπως ο FoxA1 σε προγονικά ηπατικά κύτταρα [36]. Συλλογικά, τα παραπάνω υποδηλώνουν πως τόσο οι επιγενετικοί όσο και οι μηχανισμοί προσημείωσης των ΜΠ συμβάλλουν στην πιστή διάδοση της ταυτότητας των κυττάρων μετά την κυτταρική διαίρεση. Στα βλαστικά κύτταρα, οι ΜΠ που παραμένουν συνδεδεμένοι στη μιτωτική χρωματίνη είναι οι Oct4, Sox2, EsrrB και Klf4 [8, 9].

1.3 Παράγοντες μιτωτικής προσημείωσης: Επιγενετικοί μεταγραφικοί παράγοντες και επιγενετικά σημάδια

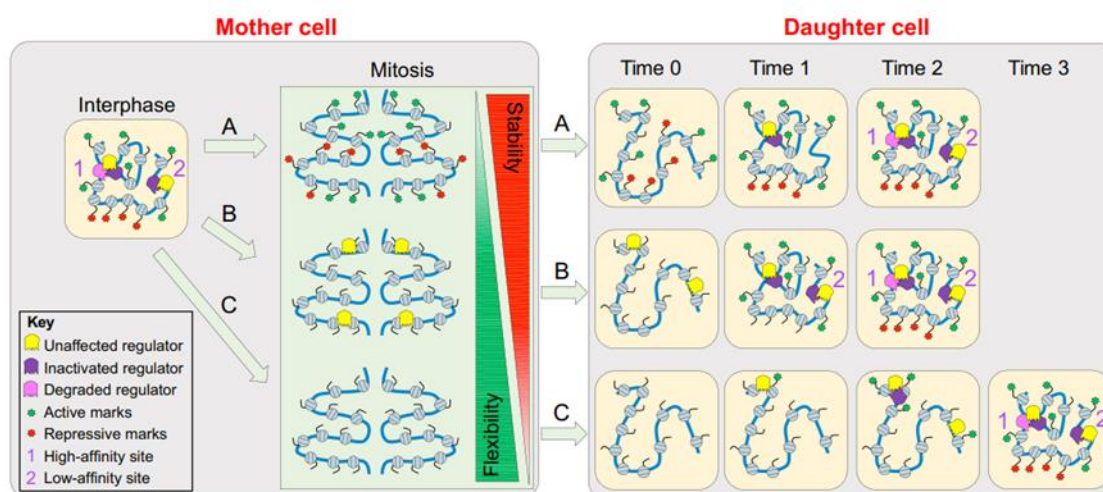
Είναι σημαντικό για τα κύτταρα να «θυμούνται» τις καταστάσεις της γονιδιακής τους έκφρασης προκειμένου να διατηρήσουν τις αποφάσεις για την τύχη των κυττάρων που θα προκύψουν καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης. Η μεταβίβαση της κατάστασης της χρωματίνης από το μητρικό στα θυγατρικά κύτταρα είναι πιθανό να συμβεί με άμεσο ή με έμμεσο τρόπο (παθητικά). Τρεις κατηγορίες ρυθμιστών είναι γνωστές προκειμένου να συμβάλλουν ενεργά στη μιτωτική μνήμη ενός κυττάρου. Οι κατηγορίες αυτές είναι: α) τα επιγενετικά σημάδια των ιστονών (histone tail modifications) / οι ρυθμιστές χρωματίνης (chromatin regulators), β) οι γενικοί ΜΠ (transcription factors) και γ) οι ειδικοί ΜΠ αλληλουχίας (sequence specific transcription factors).

Αρχικά, ήταν γνωστό ότι στην κυτταρική μνήμη συμμετείχαν διαδικασίες όπως η μεθυλίωση του DNA και η διατήρηση συγκεκριμένων δομών στη χρωματίνη [40, 41]. Πλέον, οι ΜΠ καθώς και τα ένζυμα επιγενετικής τροποποίησης της χρωματίνης (ακετυλάσες, αποακετυλάσες, μεθυλάσες και απομεθυλάσες ιστονών), είναι γνωστοί ως «παράγοντες μιτωτικής προσημείωσης» και έχει αναγνωρισθεί ότι μεταφέρουν πληροφορίες για τη γονιδιακή ρύθμιση από το μητρικό κύτταρο στα θυγατρικά του, καθώς δεσμεύονται σε ρυθμιστικά στοιχεία της χρωματίνης κατά τη διάρκεια της μίτωσης [7, 42]. Αν και οι επιγενετικοί μηχανισμοί έχουν συνδεθεί κυρίως με τη διατήρηση της αποσιώπησης των γονιδίων [43, 44], υπάρχουν ενδείξεις για μια μνήμη της γονιδιακής δραστηριότητας, όπου η πιθανότητα να μεταγραφεί ένα συγκεκριμένο γονίδιο, μετά από μίτωση, είναι σημαντικά υψηλότερη σε κύτταρα που προέρχονται από γονικά κύτταρα στα οποία είχε πραγματοποιηθεί μεταγραφή αυτού του γονιδίου, σε σύγκριση με κύτταρα στα οποία δεν είχε συμβεί αυτό [45, 46, 47]. Επιπλέον, μελέτες δείχνουν, πώς ενδέχεται οι μεταγραφικοί παράγοντες να οργανώνονται σε κυκλώματα αυτο-ενίσχυσης με αποτέλεσμα την κωδικοποίηση επαρκών πληροφοριών για την αποτελεσματική αποκατάσταση των κατάλληλων μοτίβων μεταγραφής στα θυγατρικά κύτταρα [48, 49].

1.3.1 Επιγενετικά σημάδια, οι αναγνώστες και οι συγγραφείς τους

Ο όρος «επιγενετικό σημάδι» περιορίζεται σε εκείνα τα χαρακτηριστικά της χρωματίνης που: (1) επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου, (2) διατηρούνται, συνεχώς, τόσο μέσω αντιγραφής όσο και μίτωσης και (3) είναι ανεξάρτητα από τους μηχανισμούς που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία τους (ένζυμα τροποποίησης χρωματίνης). Η μιτωτική συμπεριφορά ορισμένων

ρυθμιστών της μεταγραφής κατευθύνει άμεσα την επανενεργοποίηση των γονιδίων, με το πέρας της μίτωσης. Η αρχιτεκτονική της χρωματίνης σε μεσοφασικά κύτταρα εξαρτάται από το πού και πώς διάφοροι ρυθμιστές αλληλεπιδρούν με τοποθεσίες υψηλής και χαμηλής συγγένειας στη χρωματίνη, η οποία υιοθετεί μια συγκεκριμένη τρισδιάστατη οργάνωση και μπορεί να τροποποιηθεί είτε με ενεργά, είτε με κατασταλτικά σημάδια. Έτσι, κατά τη διάρκεια της μίτωσης, εξετάζονται τρία σενάρια. Πρώτον, τα σημάδια στη χρωματίνη μπορούν να διατηρηθούν, δεύτερον, η πρόσδεση συγκεκριμένων ρυθμιστών (παράγοντες μιτωτικής προσημείωσης) μπορεί να διατηρηθεί, ή τρίτον, όλα τα προηγούμενα σημάδια γονιδιακής ρύθμισης ενδέχεται να χαθούν. Στην εικόνα 1.4 απεικονίζεται ένα γενικευμένο αποτέλεσμα κάθε σεναρίου, που υπογραμμίζει τις διαφορετικές ταχύτητες και τη σειρά επανενεργοποίησης μετά από κάθε μιτωτικό σενάριο. Πιο συγκεκριμένα, στο πρώτο (A) και δεύτερο (B) σενάριο, οι ρυθμιστές γονιδίων βρίσκουν τους στόχους τους πιο αποτελεσματικά από ότι στο τρίτο (C), το οποίο βασίζεται στην εγγενή ικανότητα αυτο-οργάνωσης των ρυθμιστικών δικτύων των γονιδίων. Τα σενάρια A και B παρέχουν, έτσι, μια μιτωτική μνήμη που ενεργοποιεί την επανενεργοποίηση γονιδίων και, συνεπώς, την σταθερότητα. Ωστόσο, στα σενάρια B και C, η εξαφάνιση συγκεκριμένων ρυθμιστών αρκεί για να χαθεί τόσο η λειτουργία τους όσο και η μνήμη της λειτουργίας τους: υπάρχει έτσι μεγαλύτερη ευελιξία σε σχέση με το σενάριο A. Το σενάριο B, το οποίο αντιπροσωπεύει μία μιτωτική προσημείωση, αντικατοπτρίζει τα πλεονεκτήματα της ρύθμισης που συμβαίνει στα δύο σενάρια A και C [7].



Εικόνα 1.4. Μεταβίβαση της αρχιτεκτονικής της ρύθμισης γονιδίων από το μητρικό στα θυγατρικά κύτταρα. Στα κίτρινα πλαίσια απεικονίζεται η αρχιτεκτονική της χρωματίνης στα μεσοφασικά κύτταρα. Τα έγχρωμα εικονίδια τύπου *Pac-man* αναπαριστούν τους διάφορους ρυθμιστές γονιδίων που αλληλεπιδρούν με τη χρωματίνη, η οποία μπορεί να τροποποιηθεί είτε με ενεργά (πράσινα) είτε με κατασταλτικά (κόκκινα) σημάδια. Η φάση της μίτωσης απεικονίζεται στο πράσινο πλαίσιο. Διερευνούνται τρία σενάρια: (A) τα σημάδια στη χρωματίνη μπορούν να διατηρηθούν, (B) η πρόσδεση συγκεκριμένων ρυθμιστών (παράγοντες μιτωτικής προσημείωσης) μπορεί να διατηρηθεί, ή (C) όλα τα προηγούμενα σημάδια γονιδιακής ρύθμισης ενδέχεται να χαθούν [7].

Μπορούμε να διακρίνουμε δύο μηχανισμούς μιτωτικής προσημείωσης σε επιγενετικό επίπεδο: είτε μέσω τροποποίησης στις ουρές των ιστονών (επιγενετικό σήμα), το οποίο προστατεύεται

ή όχι από ένζυμα τύπου *αναγνώστη*, είτε μέσω αποκατάστασης των επιγενετικών σημάτων, μετά τη μίτωση, από ένζυμα τύπου *συγγραφείς* της χρωματίνης.

Ένας εξαιρετικά ελεγχόμενος καταρράκτης μεταγραφικών παραγόντων καθορίζει τα αρχικά πρότυπα έκφρασης ενός γονιδίου. Στη συνέχεια, αυτές οι καταστάσεις έκφρασης διατηρούνται ή «ενθυμούνται» από επιγενετικούς μηχανισμούς κυτταρικής μνήμης. Δυο βασικές ομάδες πρωτεϊνών που συμμετέχουν στους συγκεκριμένους μηχανισμούς μνήμης είναι οι πρωτεΐνες της ομάδας Polycomb (Polycomb group proteins, PcG) και της ομάδας Trithorax (Trithorax group proteins, TrxG) οι οποίες είναι ζωτικής σημασίας για αυτά τα σταθερά και κληρονομικά πρότυπα γονιδιακής έκφρασης [44].

Σε επίπεδο επιγενετικής, συντηρημένα πολυπαραγοντικά σύμπλοκα TrxG μεσολαβούν προκειμένου να δοθούν σήματα ενεργής μεταγραφικής κατάστασης [50, 51]. Μέρος της, άριστα χαρακτηρισμένης, λειτουργίας του συμπλέγματος TrxG, είναι και η δραστηρότητά του ως μεθυλοτρανσφεράση των ιστονών που οδηγεί σε τριμεθυλίωση του καταλοίπου της λυσίνης 4 στις ουρές της ιστόνης H3 (H3K4me3). Παρ' όλ' αυτά, το κατά πόσο η H3K4me3 χαρακτηρίζεται ως επιγενετικό σήμα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης βρίσκεται ακόμη υπό έρευνα. Για παράδειγμα, σε έμβρυα της *D. melanogaster*, η H3K4me3 δεν φαίνεται να παραμένει διατηρημένη κατά τη διάρκεια της αντιγραφής [52], ενώ παράλληλα έχει δειχθεί πως διατηρείται σε ορισμένους γενετικούς τόπους κατά τη διάρκεια της μίτωσης [53]. Ένα άλλο παράδειγμα οργανισμού που χρησιμοποιείται ως μοντέλο, είναι τα έμβρυα *Xenopus laevis*, στα οποία μέσω πειραμάτων πυρηνικής μεταφοράς παρουσίασαν ότι η H3K4me3 ήταν συνδεδεμένη σε λειτουργικό επίπεδο με τη μνήμη ενεργών μεταγραφικών καταστάσεων [46].

Αντίθετα, οι πρωτεΐνες PcG γενικά διατηρούν την καταστολή των γονιδίων. Τα γονίδια Polycomb-group (PcG), με το (Polycomb repressive complex 1 or 2) PRC1 και PRC2 να αποτελούν τα κύρια σύμπλοκα της κατηγορίας αυτής, κωδικοποιούν πρωτεΐνες της χρωματίνης οι οποίες εμπλέκονται σε σταθερή και κληρονομική μεταγραφική αποσιώπηση. Οι πρωτεΐνες PcG συμμετέχουν σε διακριτά πολυμερή σύμπλοκα που τοποθετούνται ή δεσμεύονται σε συγκεκριμένες ιστονικές τροποποιήσεις, προκειμένου να αποτρέψουν την ενεργοποίηση γονιδίων και να διατηρήσουν σε καταστολή κάποιες περιοχές της χρωματίνης [54]. Πιο συγκεκριμένα, τα δύο σύμπλοκα απαιτούνται για διαφορετικά στάδια στην καταστολή της γονιδιακής έκφρασης [55, 56, 57, 58]. Το PRC2 έχει δραστηρότητα τροποποίησης ιστόνης, μεθυλιώνοντας την H3K27 σε γονίδια που στοχεύουν στην αποσιώπηση [59, 60, 61, 62, 63]. Ενώ, το σύμπλοκο PRC1 μπορεί να αναγνωρίσει και να δεσμευτεί σε αυτήν την τροποποίηση και να προκαλέσει κατάλληλες δομικές αλλαγές στη χρωματίνη. Επιπρόσθετα, το PRC1 είναι σε θέση να μονο-ουβιτινυλιώσει την H2AK118/119 σε θέσεις στόχους [64]. Και τα δύο σύμπλοκα είναι αρκετά συντηρημένα όχι μόνο σε όλα τα μετάζωα [65], αλλά και στα φυτά [66].

1.3.2 Μιτωτική προσημείωση από μεταγραφικούς παράγοντες

Μέσω της περιγραφής ολόκληρου του προφίλ του γονιδιώματος και της παρακολούθησης ζωντανών κυττάρων σε πραγματικό χρόνο, έχουν αποκαλυφθεί διάφοροι πολυδύναμοι ΜΠ οι οποίοι έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται σε μιτωτικά χρωμοσώματα σε καλλιέργειες διαιρούμενων εμβρυικών βλαστικών κυττάρων (ESCs) [7,67]. Μέχρι στιγμής, μεταξύ των ΜΠ που προσδένονται στα μιτωτικά χρωμοσώματα, κατά την ανάπτυξη, είναι και οι *Essrb* και *Klf4* σε διαιρούμενα κύτταρα βλαστομερών ποντικού [8, 9], αλλά και ο *HNF1B* (hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B, *HNF1B* ή transcription factor 2, *TCF2*), ο οποίος έχει δειχθεί ότι παραμένει στη χρωματίνη κατά τη διάρκεια της νεφρικής ανάπτυξης στα ποντίκια [12]. Είναι ενδιαφέρον πως, η πλειονότητα των γνωστών ΜΠ που παραμένουν στα μιτωτικά χρωμοσώματα, όπως είναι για παράδειγμα ορισμένοι παράγοντες πολυδυναμίας (π.χ. *Oct4/Sox2/Klf4*) λειτουργούν ως “βοηθοί” [68]. Οι “βοηθοί” ανήκουν σε μια συγκεκριμένη

κατηγορία ΜΠ, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να προσεγγίζουν τους DNA-στόχους τους ακόμα και σε συμπαγείς νουκλεοσωμικές περιοχές, ανοίγοντας, έτσι, το δρόμο σε κλασικούς, μη πρωτοπόρους ΜΠ προς τους στόχους τους [69]. Το ερώτημα όμως που γεννάται είναι αν ενδέχεται οι βοηθητικοί παράγοντες να έχουν εγγενείς ιδιότητες για τη δέσμευση της χρωματίνης κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Ωστόσο, προς το παρόν δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες όσον αφορά τη λειτουργική σημασία των βοηθητικών παραγόντων στη μιτωτική μνήμη, κατά την ανάπτυξη των πολυκύτταρων οργανισμών. Από την άλλη μεριά, εντυπωσιάζει το γεγονός πως, ο βοηθητικός παράγοντας Zelda, ο οποίος είναι ένας απαραίτητος ενεργοποιητής του γονιδιώματος κατά τα πρώιμα στάδια του ζυγωτού σε έμβρυα της *D. melanogaster*, δεν παραμένει ενεργός κατά τη διάρκεια της μίτωσης και δεν συμβάλλει στη μιτωτική μνήμη [70]. Αυτό φανερώνει ότι η μιτωτική προσημείωση δεν αποτελεί γενικό χαρακτηριστικό όλων των βοηθητικών παραγόντων, ή εναλλακτικά, ότι ο Zelda δεν είναι ένας παράγοντας βοηθός.

1.4 Περιορισμοί στη μιτωτική προσημείωση που προκύπτουν κατά τη μίτωση

Ένας μεγάλος αριθμός αλλαγών στη χρωματίνη μπορεί να αλλάξει την ικανότητα πρόσδεσης των ρυθμιστικών γονιδίων κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Η διάσπαση του πυρηνικού φακέλου, για παράδειγμα, οδηγεί σε μείωση της αποτελεσματικής συγκέντρωσης των ρυθμιστών και αυξάνει την ελεύθερη διάχυσή τους. Η οργάνωση των νουκλεοσωμάτων τροποποιείται επίσης, με ορισμένα νουκλεοσώματα να καταλαμβάνουν ρυθμιστικές περιοχές. Παρ' όλ' αυτά, πολλές ρυθμιστικές περιοχές παραμένουν συνολικά προσβάσιμες και ορισμένοι παράγοντες μιτωτικής προσημείωσης, είναι σε θέση να δεσμεύσουν τους στόχους τους κατά τη διάρκεια της μίτωσης, οδηγώντας σε γρηγορότερη επανενεργοποίηση της μεταγραφικής διαδικασίας στη μεσόφαση που ακολουθεί [7].

1.4.1 Φωσφορυλίωση μεταγραφικών παραγόντων κατά τη μίτωση

Η διαδικασία της μίτωσης συνεπάγεται με δραστική μείωση των επιπέδων μεταγραφής, η οποία οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη στοχευμένη φωσφορυλίωση και κατόπιν απενεργοποίηση πολλών ΜΠ [27, 30, 71]. Τόσο όμως οι ΜΠ που προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του γονιδιώματος όσο και ορισμένοι τροποποιητές της χρωματίνης, μπορούν να υποβληθούν σε υπερ-φωσφορυλίωση κατά τη μίτωση, με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση ή την απενεργοποίησή τους. Τέτοια παραδείγματα συμπεριλαμβάνουν την απενεργοποίηση σημαντικών αναπτυξιακών ρυθμιστών, όπως το Oct4 (επίσης γνωστό ως Pou5f1) και το Sox2, ή ορισμένων τροποποιητών χρωματίνης, όπως ο Brg1 (Smarca4) [72, 73, 74].

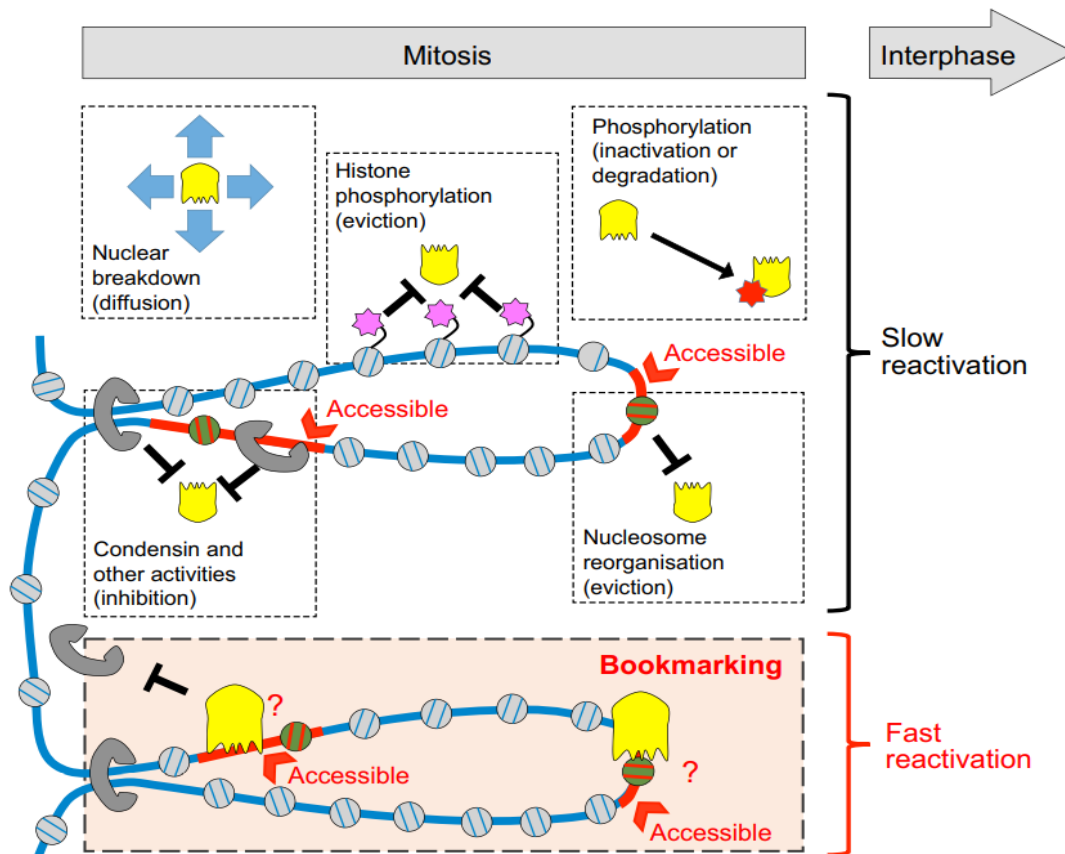
Ωστόσο, αν αυτή η απενεργοποίηση διαμέσου φωσφορυλίωσης ρυθμίζεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ή σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων παραμένει άγνωστο. Παράδειγμα αποτελεί ο βασικός μεταγραφικός παράγοντας TBP (TATA-binding protein), για τον οποίο έχει δειχθεί ότι, διατηρεί την ικανότητα δέσμευσης της μιτωτικής χρωματίνης. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα πως ίσως ο TBP να αντιπροσωπεύει έναν εξαιρετικά πιθανό παράγοντα για την προσημείωση των ενεργών υποκινητών [75, 76, 77]. Παρόλα αυτά, δεν έχει αποδειχθεί ακόμη η σχέση του με τα μιτωτικά χρωμοσώματα [78, 79, 80]. Φαίνεται λοιπόν πως η μιτωτική προσημείωση ίσως να είναι μια ρυθμιζόμενη ιδιότητα. Αντιθέτως, σε κύτταρα στα οποία οι παράγοντες μιτωτικής προσημείωσης δεν εκφράζονται ενδογενώς, μία έκτοπη έκφρασή τους συνοδεύεται συχνά από πιθανή πρόσδεσή τους στα μιτωτικά χρωμοσώματα, υποδηλώνοντας ότι είναι ένα εγγενές χαρακτηριστικό ορισμένων πρωτεϊνών [9, 11].

1.4.2 Μιτωτική συμπύκνωση, προσβασιμότητα χρωματίνης και παράγοντες μιτωτικής προσημείωσης

Αρκετοί είναι οι λόγοι για τους οποίους ένας γονιδιακός ρυθμιστής δε δύναται να προσδεθεί σε κάποιο γονιδιακό τόπο. Ένα τέτοιο παράδειγμα αφορά τη διάσπαση του πυρηνικού φακέλου, γεγονός που οδηγεί στην αύξηση του όγκου εντός του πυρήνα όπου οι γονιδιακοί ρυθμιστές μπορούν να διαχυθούν με αποτέλεσμα τη μείωση της τοπικής τους συγκέντρωσης. Ακόμη, ο σχηματισμός των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση έχει ως συνέπεια τη δραστική αναδιοργάνωση της χρωματίνης από 2 έως και 4 φορές κάτω σε σχέση με την χρωματίνη της μεσόφασης [81, 82]. Επιπλέον, τα νουκλεοσώματα φωσφορυλιώνονται και υποακετυλιώνονται, με συνέπεια τη μετατόπιση της θέσης τους και την κατάληψη των θέσεων έναρξης μεταγραφής, ανταγωνιζόμενα έτσι, το μηχανισμό της μεταγραφής [83]. Έτσι, κατά τη διάρκεια της μίτωσης, η χρωματίνη υιοθετεί μια κατάσταση που δεν ευνοεί τη δέσμευση των ΜΠ, την επικοινωνία ενισχυτών-υποκινητών αλλά ούτε και τη μεταγραφική δραστηριότητα. Επομένως, οι ρυθμιστικές περιοχές όλων των ενεργών γονιδίων που απαντώνται στη μεσόφαση διατηρούνται σε προσβάσιμη κατάσταση και κατά τη διάρκεια της μίτωσης [12, 84, 85, 86].

Μία τέτοια παρατήρηση οδηγεί σε τρεις κύριες, πιθανοφανείς, συνέπειες. Αρχικά, φαίνεται ότι οι θέσεις έναρξης μεταγραφής των γονιδίων που καταλαμβάνουν τα νουκλεοσώματα, κατά τη μίτωση, είναι παρ' όλ' αυτά προσβάσιμες για τους διάφορους παράγοντες και, κατά πάσα πιθανότητα, το γονιδίωμα στις επικείμενες περιοχές καθίσταται εύθραστο [83, 87]. Δεύτερον, είναι πιθανό, η μιτωτική προσημείωση από ΜΠ να είναι δυναμικά πιο διαδεδομένη από ό,τι μέχρι τώρα αναμενόταν και να είναι άμεσα υπεύθυνη για τη διατήρηση σε προσβάσιμη κατάσταση των ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων. Υποστηρίζοντας αυτήν την άποψη, έχει αποδειχθεί πως δύο μιτωτικοί παράγοντες προσημείωσης, ο TBP και ο Hsf2, στρατολογούν τοπικά την PP2a, μια φωσφατάση που απενεργοποιεί τις συμπυκνίνες (condensins), οι οποίες είναι βασικοί παράγοντες στο σχηματισμό συμπυκνωμένων μιτωτικών χρωμοσωμάτων [23, 77, 88]. Μία τρίτη συνέπεια που προκύπτει, αφορά τις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων των συμπυκνινών, καθώς έχει δειχθεί ότι αυτές είναι εμπλουτισμένες, τόσο κατά τη μεσόφαση όσο και κατά τη μίτωση [89, 90], γεγονός που επηρεάζει άμεσα την οργάνωση των νουκλεοσωμάτων αλλά και την πρόσδεση των ΜΠ, είτε παθητικά, ως στερεοχημικό εμπόδιο, είτε προκαλώντας θετική συστροφή του DNA [23].

Είναι γνωστό πως η θετική περιέλιξη είναι ικανή όχι μόνο να αναστείλει τη δέσμευση των ΜΠ αλλά ακόμη έχει συσχετιστεί με τη μερική αποσυναρμολόγηση του οκταμερούς των ιστονών [91]. Επομένως, πέρα από τη συμβολή τους στη συμπύκνωση των ινιδίων χρωματίνης, παραδόξως, οι συμπυκνίνες θα μπορούσαν τόσο να ευνοούν τα εύθραυστα νουκλεοσώματα όσο και να συμβάλλουν στην τοπική προσβασιμότητα της χρωματίνης σε ρυθμιστικές περιοχές, ενώ παράλληλα αναστέλλουν τη σύνδεση των ΜΠ. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι κατά τη διάρκεια των διαφορετικών φάσεων της μίτωσης ποικίλλει και το επίπεδο συμπύκνωσης των χρωμοσωμάτων αλλά και οι διαφορετικές περιοχές μεταξύ των χρωματίδων [81], όπως επίσης εμφανίζεται μία δυναμική σχέση μεταξύ ορισμένων παραγόντων της μίτωσης (όπως η συμπυκνίνη I (condensin I) και η τοποϊσομεράση II), με το κυτοσόλιο [92, 93]. Άρα, τα νουκλεοσώματα στα μιτωτικά χρωμοσώματα δεν είναι απαραίτητα πακεταρισμένα και ενσωματωμένα σε στατικά ινίδια χρωματίνης. Εν αντιθέσει, είναι εγγενώς δυναμικές δομές επιτρέποντας έτσι στους παράγοντες μιτωτικής προσημείωσης να συνδέονται και να επηρεάζουν τοπικά, βασικές ιδιότητες της χρωματίνης [94]. Στην εικόνα 1.5 παρουσιάζονται οι περιορισμοί που προαναφέρθηκαν (Εικ.1.5).



Εικόνα 1.5. Οι περιορισμοί στη μιτωτική προσημείωση. Τα κίτρινα εικονίδια απεικονίζουν τους ρυθμιστές των γονιδίων κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Με κόκκινο αστέρι αναπαρίσταται η διαδικασία της φωσφορυλίωσης. Με ροζ αστέρια στις ουρές των ιστονών περιγράφεται η συνολική φωσφορυλίωση της χρωματίνης. Οι γκριζοί μισοί δακτύλιοι κατοπτρίζουν τις συμπυκνίνες (condensins) και με πράσινο χρώμα φαίνονται τα νουκλεοσώματα. Οι κόκκινες περιοχές πάνω στα μπλε μόρια του DNA σημαίνουν περιοχές που ήταν προηγουμένως ενεργές και τα κόκκινα βέλη αναφέρονται σε ρυθμιστικές περιοχές που παραμένουν συνολικά προσβάσιμες, ενώ στο κάτω πλαίσιο παρουσιάζεται η γρήγορη επανενεργοποίηση της μεταγραφής στην ακόλουθη μεσόφαση [7].

1.4.3 Η τροποποίηση των ιστονών κατά τη μίτωση

Η φωσφορυλίωση των ιστονών είναι μια από τις πιο συχνές επιγενετικές τροποποιήσεις κατά τη διάρκεια της μίτωσης [95]. Η φωσφορυλίωση της ιστόνης H3, η οποία συνήθως πραγματοποιείται στο γειτονικό κατάλοιπο λυσίνης, όπως έχει δείχθει, εμποδίζει την πρόσδεση συγκεκριμένων αναγνώστων, όπως είναι, οι TFIID (Transcription factor II D), HP1 (heterochromatin protein 1) και Eed (Polycomb protein EED), στις μεθυλιωμένες H3K4, H3K9 και H3K27, αντίστοιχα [80, 96, 97, 98]. Κάτι τέτοιο οδηγεί στο γεγονός πως κατά τη διάρκεια της μίτωσης, ακόμη και η επιγενετική ρύθμιση της ιδιοστατικής (HP1) και της εναλλακτικής (Eed) ετεροχρωματίνης μπορεί εν μέρει να αποσταθεροποιηθεί. Συνεπώς, ο μηχανισμός με τον οποίο οι ιστόνες αποφωσφορυλιώνονται στα θυγατρικά κύτταρα ώστε να επιτραπεί η στρατολόγηση των ρυθμιστών της ετεροχρωματίνης αντιπροσωπεύει μια σημαντική πτυχή για το πως διατηρείται η γονιδιακή ρύθμιση αμέσως μετά τη διαίρεση [99]. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση των H3T3 και H3S10 κατά τη μίτωση έχει ως συνέπεια την αποακετυλίωση της ιστόνης H4 στο κατάλοιπο της λυσίνης 16 [100, 101], αν και, γενικά είναι γνωστό πως, η ακετυλίωση ιστονών μειώνεται στο πλαίσιο της μιτωτικής φάσης [102, 103]. Παρ' όλ' αυτά,

ένα μεγάλο υποσύνολο ρυθμιστικών περιοχών διατηρεί υψηλά επίπεδα ακετυλιωμένης H3K27 κατά τη μίτωση [9, 103] και η ακετυλοτρανσφεράση ιστόνης p300 έχει αποδειχθεί ότι διατηρεί την σύνδεσή της με τη μιτωτική χρωματίνη [104, 105].

Επιπλέον, το 2014 οι Wilkins, Bryan J. και οι συνεργάτες τους έδειξαν πως η διαγραφή δύο ομολόγων της μιτωτικής κινάσης Haspin (alk1/2D) οδήγησε σε εξασθένηση της φωσφορυλίωσης της H3S10. Η φωσφορυλίωση της H3S10 απαιτείται, άμεσα ή έμμεσα, για τη στρατολόγηση της αποακετυλάσης των ιστονών Hst2p στη χρωματίνη που συμπυκνώνεται. Έδειξαν, λοιπόν, πως κατά τη διάρκεια της πρώιμης μίτωσης, η φωσφορυλίωση της H3T3 από τη Haspin και στη συνέχεια της H3S10 από το σύμπλοκο Chromosomal Passenger (CPC) ήταν υπεύθυνη για τη στρατολόγηση της Hst2p στα νουκλεοσώματα και την αποακετυλίωση του καταλοίπου 16 της λυσίνης στην H4. Κατά συνέπεια, η ουρά της H4 αρχίζει να αλληλεπιδρά με γειτονικά νουκλεοσώματα, προωθώντας την συμπύκνωση της χρωματίνης [100]. Τα συγκεκριμένα δεδομένα αποτελούν σημαντικά στοιχεία τα οποία θα μπορούσαν να βοηθήσουν στη μελέτη της μιτωτικής προσημείωσης. Θα ήταν ενδιαφέρουσα η έρευνα του φαινομένου αυτού από την σκοπιά των μιτωτικών κινασών και κατά πόσο η λειτουργία τους μπορεί να επηρεάσει την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων στη χρωματίνη σε διαφορετικές στιγμές του κυτταρικού κύκλου. Στην συγκεκριμένη εργασία, το ενδιαφέρον μας επικεντρώθηκε στη μιτωτική κινάση Haspin, όπου θα αναλυθεί περαιτέρω στα *Αποτελέσματα*.

1.5 *Haspin, μια μιτωτική κινάση*

Η ταυτοποίηση της μιτωτικής κινάσης Haspin έγινε για πρώτη φορά από τον Tanaka και τους συνεργάτες του, με αφαιρετική κλωνοποίηση (subtracted Library screening, βλέπε), στις απλοειδείς σπερματίδες του ποντικού [114]. Το όνομα Haspin (Haploid germ cell-specific nuclear protein) προέρχεται από τον εντοπισμό της έκφρασής της στις σπερματίδες, η οποία έκφραση μειώνεται καθώς οι τελευταίες ωριμάζουν. Το γονίδιο που την κωδικοποιεί ονομάζεται Gsg2 (Germ cell Specific gene 2). Αρχικά, είχε δείχθει ότι το mRNA της Haspin εντοπίζεται αποκλειστικά στους γαμέτες αλλά όχι σε άλλους ιστούς όπως ο εγκέφαλος, ο σπλήνας, η καρδιά ή οι ωοθήκες ποντικού. Ωστόσο σε βάθος χρόνου, αποδείχθηκε ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται επίσης τόσο σε ωοκύτταρα όσο και σε σωματικά κύτταρα [115, 116] αλλά σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα [117].

1.5.1 *Η δομή της Haspin*

Σύμφωνα με δομικές, βιοχημικές και μορφολογικές μελέτες φαίνεται ότι η περιοχή της Haspin, η οποία παρουσιάζει ομολογία με άλλες κινάσες (kinase domain), περιέχει δυο λοβούς (lobes) και μπορεί να φωσφορυλιώσει πρωτεϊνικά υποστρώματα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Ορισμένες δομικές ενθέσεις που υπάρχουν στο μόριο παρέχουν στην πρωτεΐνη τη διαμόρφωση μιας σταθερά ενεργής κινάσης. Αυτό που την κάνει να διαφοροποιείται από άλλες κινάσες είναι το ενεργό κέντρο της Haspin. Πιο συγκεκριμένα, ενώ οι περισσότερες κινάσες περιέχουν ένα εξαιρετικά συντηρημένο μοτίβο DFG (ασπαρτικό- φαινυλαλανίνη- γλυκίνη), το μοτίβο αυτό στη Haspin διαφοροποιείται σε DYT (ασπαρτικό- τυροσίνη- θρεονίνη) [118, 119, 120, 121]. Δεδομένου ότι η Haspin στερείται ορισμένων χαρακτηριστικών μοτίβων που υπάρχουν σε άλλες πρωτεϊνικές κινάσες, ταξινομείται ως μια άτυπη κινάση σερίνης-θρεονίνης [118].

1.5.2 Οι λειτουργίες της Haspin

Αρχικά είχε διατυπωθεί πως η λειτουργία της Haspin σχετίζεται με την εμπλοκή της στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των γαμετών. Η υπόθεση αυτή βασίστηκε στην παρατήρηση ότι όταν η Haspin υπερεκφράζεται, ο κυτταρικός κύκλος των κυττάρων καθυστερεί στη φάση G1 [114]. Παρ' όλ' αυτά, η εικόνα που έχει διαμορφωθεί ως σήμερα για τη λειτουργία της Haspin είναι διαφορετική. Το 2004, η Poliouadaki και οι συνεργάτες της περιέγραψαν την αντιστρεπτή φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 στη θρεονίνη-3 (H3T3ph), μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση, η οποία εμφανίζεται ειδικά κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Η H3T3ph εντοπίστηκε στα κεντρομερίδια μεταφασικών χρωμοσωμάτων, γεγονός το οποίο υποδηλώνει έναν πιθανό ρόλο στη σωστή διάταξη των χρωμοσωμάτων (congression) [122]. Το 2005, αποδείχθηκε από τον Higgins και τους συνεργάτες του ότι η Haspin είναι αποκλειστικά υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση της H3T3 [123]. Η λειτουργία της, όμως, δε σταματά εκεί καθώς, αργότερα, μια ακόμη μελέτη έδειξε πως η φωσφορυλίωση της H3T3 είναι μέρος ενός μοτίβου που περιλαμβάνει επίσης την H3K4me3 και H3R8me2 (PMM) [120]. Τέλος, αρκετές ερευνητικές ομάδες το 2010-2011 ανακάλυψαν, ανεξάρτητα, ότι η H3T3ph παρέχει μια θέση πρόσδεσης για την πρωτεΐνη Survivin. Η Survivin είναι μέρος ενός συμπλόκου, γνωστό ως CPC που περιέχει επίσης τις πρωτεΐνες INCENP, Borealin και τη μιτωτική κινάση AurKb (Aurora Kinase b). Δοκιμασίες κατακρήμνισης (pull down) με τροποποιημένα πεπτίδια της ιστόνης H3 έδειξαν ότι η Survivin προσδένεται ισχυρά μόνο στα πεπτίδια τα οποία περιέχουν τη H3T3ph. Ωστόσο, η H3T3ph δεν είναι απαραίτητη για να προσδεθεί στη χρωματίνη το CPC, αλλά ούτε και για τη δραστηριότητά του. Επιπλέον, μελέτες σε μικροοργανισμούς fission yeast αλλά και σε ανθρώπινα κύτταρα απέδειξαν ότι η Haspin συνεργάζεται με την Bub1 η οποία φωσφορυλιώνει την θρεονίνη-120 στην ιστόνη H2A (H2AT120/121 στη ζύμη), ώστε να στρατολογηθεί το CPC στο κεντρομερίδιο [124, 125, 126, 127, 128].

Επιπροσθέτως, μελέτες των Tanaka και Shimada και των συνεργατών τους, το 1999 και το 2016 αντιστοίχως, δείχνουν πως η ολική γονιδιακή αποσιώπηση της Haspin (knock-out) σε ποντίκια οδηγεί μόνο σε ανωμαλίες των όρχεων, καθώς είναι ένα ένζυμο που εκφράζεται κυρίως σε όρχεις [129, 130]. Φαίνεται πως απουσία της Haspin, και συνεπώς και της H3T3ph, αρκετά γονίδια ειδικά για τους όρχεις και μεταγραφικοί ρυθμιστές που εμπλέκονται στη σπερματογένεση (μεταξύ αυτών ASZ1, DDX3Y, Scml2, Sohlh2, Dazl, Zfy1/2) δεν ρυθμίζονται. Τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια έχουν συνδεθεί άμεσα με σοβαρή σπερματογονική ανεπάρκεια αλλά και υπογονιμότητα σε άνδρες [131, 132, 133] ή / και πιστεύεται ότι εμπλέκονται σε ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια της σπερματογονικής ανάπτυξης [134].

Ένας πιθανός μεταγραφικός ρυθμιστής του οποίου η έκφραση ρυθμίζεται από τη φωσφορυλίωση της Haspin είναι ο SCML2. Αυτός ο παράγοντας συσχετίζεται με το σύμπλοκο Polycomb (PRC1) και μεσολαβεί για την ουβικουιτινίωση της ιστόνης H2A στη λυσίνη-119 [133, 135, 136]. Η τροποποιημένη H2A παρέχει μια θέση δέσμευσης για ένα άλλο σύμπλοκο Polycomb (Jarid2-Aebp2 που περιέχει PRC2), το οποίο μεθυλιώνει την trans λυσίνη-27 στην ιστόνη H3 και έχει ως αποτέλεσμα την αποσιώπηση σωματικών γονιδίων [137]. Παράλληλα, το SCML2 εμποδίζει την ουβικουιτινίωση στη λυσίνη-119 της ιστόνης H2A σε γονίδια που σχετίζονται με τα χρωμοσώματα του φύλου [133].

1.6 Η δέσμευση και οι τρόποι δράσης των παραγόντων μιτωτικής προσημείωσης

Στις περισσότερες μελέτες που σχετίζονται με τη μιτωτική προσημείωση φαίνεται η υπό μελέτη πρωτεΐνη να καλύπτει τα μιτωτικά χρωμοσώματα. Παρ' όλο που οι τεχνικές μικροσκοπίας

έχουν επιτρέψει την ταχεία αναγνώριση του εντοπισμού ρυθμιστών που έχουν τη δυνατότητα προσημείωσης, έχει χαρακτηριστεί συνολικά η πρόσδεση μόνο ορισμένων ΜΠ, που στοχεύουν συγκεκριμένες αλληλουχίες, κατά τη μίτωση. Μεταξύ αυτών των παραγόντων είναι και οι Gata1 (ερυθροβλάστες) [38], FoxA1 (ηπατοκύτταρα) [36] Myc (από εμβρυικά κύτταρα της *D. melanogaster*) [10] και διάφοροι παράγοντες πολυδυναμίας όπως, ο Esrrb, το Oct4, το Sox2 και ο Klf4 (εμβρυικά βλαστικά κύτταρα) [8, 9].

1.6.1 Ειδική πρόσδεση των παραγόντων μιτωτικής προσημείωσης

Έχει αποδειχθεί πως μόνο ένα υποσύνολο των παραγόντων μιτωτικής προσημείωσης παραμένει δεσμευμένο στην αλληλουχία στόχο του κατά τη μίτωση: αυτοί οι παράγοντες εμφανίζουν μία επιλεκτικότητα στην πρόσδεση η οποία κυμαίνεται από 10% των στόχων για προσημείωση (Gata1, FoxA1 και Esrrb) έως 40 με 70% (Myc, Klf4, Sox2 και Oct4). Ακόμη, για τους περισσότερους από αυτούς τους παράγοντες (Gata1, FoxA1, Esrrb και Myc) η δέσμευσή τους εμφανίζεται χαμηλότερη κατά τη φάση της μίτωσης σε σύγκριση με αυτήν κατά τη διάρκεια της μεσόφασης. Για παράδειγμα, το Sox2 δεν εμφανίζει δράση παράγοντα μιτωτικής προσημείωσης ειδικής αλληλουχίας, σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού (embryonic stem cells, ESCs), πέρα από, περίπου, δώδεκα τύπους, σύμφωνα με την μελέτη των Deluz et al. το 2016 [11]. Από την άλλη, όμως, το 2017 οι Liu et al. απέδειξαν τη μιτωτική δέσμευση του Sox2 σε σχεδόν τους μισούς από τους χιλιάδες στόχους που έχει ο παράγοντας αυτός κατά τη μεσόφαση [9].

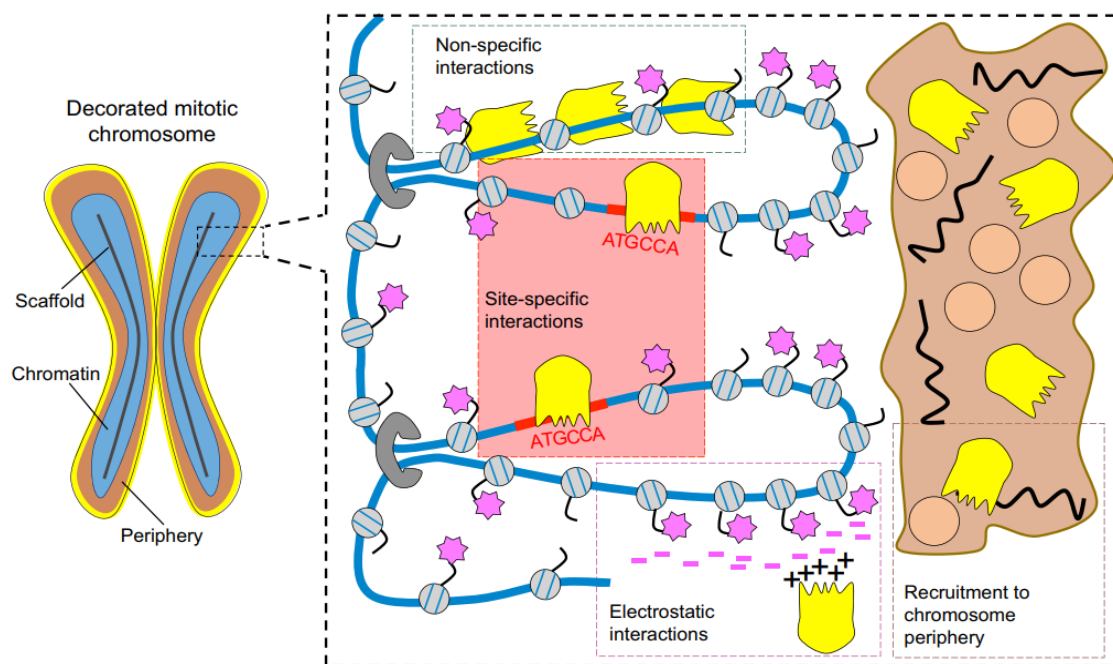
Παραμένει όμως το ερώτημα με ποιο τρόπο και για ποιο λόγο μόνο ένα υποσύνολο των στόχων, ενός ΜΠ, που συναντάμε στη μεσόφαση είναι κατειλημμένοι κατά τη μίτωση. Μήπως, η καθιέρωση ισχυρών και ειδικών αλληλεπιδράσεων DNA θα μπορούσε να διαδραματίσει καθοριστικό ρόλο στη μιτωτική προσημείωση; Σε μία μελέτη τους το 2016 ο Festuccia και οι συνεργάτες του, απέδειξαν πως η εισαγωγή μοτίβων έκτοπης για το Esrrb στο γονιδίωμα είναι απαραίτητες για την καθιέρωση περιοχών οι οποίες μπορούν να προσημειωθούν από τον ΜΠ Esrrb [8]. Έτσι, αποδεικνύεται πως, οι αλληλεπιδράσεις με ειδικές αλληλουχίες DNA είναι απαραίτητες για την πρόσδεση των ΜΠ κατά τη μίτωση. Επιπλέον, η επιλεκτική μνήμη βασίζεται στην ιδιότητα κάθε θέσης πρόσδεσης να αλληλεπιδρά με το περιβάλλον της χρωματίνης εκείνης της περιοχής και να συνδέονται με δραστηριότητες που συμβαίνουν κατά τη μίτωση. Ωστόσο, η προσημείωση από τους ΜΠ Oct4, Klf4 και Sox2, δε φαίνεται να παρουσιάζει κάποια προτίμηση για περιοχές που διαθέτουν συγκεκριμένα σημεία πρόσδεσης. Εντυπωσιάζει πάντως το γεγονός, πως, οι περιοχές που προσημειώνονται από αυτούς τους τρεις προαναφερθέντες παράγοντες, είναι ιδιαίτερα εμπλουτισμένες με αλληλουχίες ειδικές για την πρόσδεση του Esrrb, ενώ άλλες αλληλουχίες που χάνουν τη δέσμευσή τους δεν είναι [9]. Ως εκ τούτου, κάποιοι παράγοντες μιτωτικής προσημείωσης, όπως είναι ο Esrrb, θα μπορούσαν να διαδραματίσουν πρωταρχικό ρόλο σε γονιδιακό επίπεδο, στην ανακατανομή, πολλών άλλων ΜΠ κατά τη διάρκεια της μίτωσης.

1.6.2 Η στρατολόγηση των παραγόντων μιτωτικής προσημείωσης στα χρωμοσώματα

Οι ΜΠ που συμμετέχουν στη μιτωτική προσημείωση φαίνονται να “διακοσμούν” τα χρωμοσώματα, όπως έχει δειχθεί μέσω μικροσκοπίας, καθώς για την πρόσδεση των διάφορων ΜΠ πάνω στη μιτωτική χρωματίνη είναι απαραίτητη η παρουσία μίας περιοχής δέσμευσης του DNA. Τέτοια παραδείγματα είναι παράγοντες πολυδυναμίας αλλά και άλλοι ρυθμιστές όπως ο HNF1b (HNF1 homeobox B ή transcription factor 2, TCF2) [8, 11, 12]. Ωστόσο, παραπάνω του ενός τρόπου διατήρησης της μνήμης στα χρωμοσώματα μπορεί να παρέχουν σήματα προσημείωσης. Όπως αναπαρίστανται στην εικόνα 1.6 (Εικόνα 1.6), η βάση της μη ειδικής

αλληλεπίδρασης (non-specific interactions) μεταξύ ρυθμιστών γονιδίων και χρωμοσωμάτων βρίσκεται κάτω από τρία κύρια ενδεχόμενα: (1) μέσω μη ειδικών αλληλεπιδράσεων DNA – νουκλεοσωμάτων, (2) μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με φωσφορικές ομάδες που έχουν προστεθεί στις ουρές των ιστονών H3, (3) μέσω στρατολόγησης στην περιφέρεια του χρωμοσώματος, που είναι ένα διαμέρισμα πλούσιο σε πρωτεΐνες και μόρια RNA.

Επιπροσθέτως, οι ρυθμιστές γονιδίων ενδεχομένως να στρατολογούνται σε συγκεκριμένες περιοχές (site-specific interactions) της χρωματίνης, είτε μέσω αλληλεπιδράσεων με συγκεκριμένα μοτίβα βάσεων πάνω στο DNA (base-specific interactions) (π.χ. μεταγραφικοί παράγοντες), είτε μέσω αλληλεπιδράσεων με συγκεκριμένες τροποποιήσεις ιστονών ή DNA (π.χ. αναγνώστες χρωματίνης). Ωστόσο, μόνον η τελευταία, συγκεκριμένης τοποθεσίας, αλληλεπίδραση (site-specific interactions) μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα γνήσιο παράγοντα μιτωτικής προσημείωσης. Ως εκ τούτου, αλληλεπιδράσεις, τόσο ειδικές όσο και μη ειδικές, μπορούν να συντελέσουν στη μιτωτική σύνδεση των ΜΠ [7] (Εικ. 1.6). Επιπλέον, μη συμβατικοί μηχανισμοί θα μπορούσαν επίσης να παίζουν ρόλο στον εντοπισμό των παραγόντων κατά τη μίτωση. Ύστερα από απομόνωση πυρήνων ESCs ποντικού E14T παρατηρήθηκε πως δεν έχασαν την ικανότητα σηματοδότησής τους επιβεβαιώνοντας την “διακόσμηση” των χρωμοσωμάτων με τους ΜΠ [11, 12]. Επίσης, καθώς οι περιοχές δέσμευσης DNA που περιλαμβάνουν οι παράγοντες μιτωτικής προσημείωσης τείνουν να εμφανίζουν ομάδες θετικά φορτισμένων αμινοξέων, θα μπορούσαν να συνδεθούν με τα χρωμοσώματα μέσω μη ειδικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με την αρνητικά φορτισμένη υπερφωσφορυλιωμένη χρωματίνη [106]. Γενικότερα, μέχρι τώρα έχει περιγραφεί η παρουσία ρυθμιστών γονιδίων στην περιφέρεια των χρωμοσωμάτων, μια περιοχή στην οποία συσσωρεύονται «στρώσεις» πρωτεϊνών και μορίων RNA κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης [107, 108].



Εικ. 1.6. Διαφορετικοί τρόποι στρατολόγησης των ΜΠ στα μιτωτικά χρωμοσώματα. Τα μιτωτικά χρωμοσώματα (αριστερά) αποτελούνται από μία κύρια σκαλωσιά κατά μήκος του άξονα του χρωμοσώματος (axial scaffold) (μαύρη γραμμή), τη χρωματίνη (μπλε) και ένα περιφερειακό διαμέρισμα (καφέ). Μέσω μικροσκοπίας, όπως απεικονίζονται, ορισμένοι ρυθμιστές γονιδίων «διακοσμούν» συνολικά τα μιτωτικά χρωμοσώματα (κίτρινη στιβάδα). Παραπάνω φαίνονται με κίτρινα εικονίδια τύπου *Racmap* οι ρυθμιστές γονιδίων. Η μη ειδική αλληλεπίδραση (non-specific interactions) μεταξύ αυτών και των

χρωμοσωμάτων διακρίνονται σε τρεις κύριες περιπτώσεις: (1) μη ειδική αλληλεπίδραση DNA – νουκλεοσωμάτων, (2) ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φωσφορικών ομάδων (ροζ αστέρια) στις ουρές των ιστονών H3 και των ρυθμιστών, (3) στρατολόγηση πρωτεϊνών (πορτοκαλί κύκλοι) και μορίων RNA (μαύρες γραμμές) στην περιφέρεια του χρωμοσώματος. Επιπλέον στο κόκκινο πλαίσιο παρουσιάζεται η στρατολόγηση των ρυθμιστών σε συγκεκριμένες περιοχές (site-specific interactions) της χρωματίνης [7].

1.7 Η ενεργοποίηση των γονιδίων αμέσως μετά τη μίτωση

Μετά τη μίτωση η επανενεργοποίηση των γονιδίων θεωρείται πως επιταχύνεται από τους παράγοντες μιτωτικής προσημείωσης, κατά τη διάρκεια της πρώιμης φάσης G1 (Εικ. 1.3). Αυτό ωστόσο έχει αποδειχθεί σαφώς, για ορισμένους μόνο παράγοντες. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η πρωτεΐνη αναγνώστης της χρωματίνης Brd4, η οποία αναγνωρίζει και δεσμεύει ακετυλιωμένες ιστόνες και κατέχει βασικό ρόλο στη μετάδοση της επιγενετικής μνήμης τόσο σε κυτταρικό επίπεδο όσο και στη ρύθμιση της μεταγραφής. Ο παράγοντας Brd4 παραμένει συνδεδεμένος με την ακετυλιωμένη χρωματίνη καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου παρέχοντας, έτσι, με το πέρας της μίτωσης την επιγενετική μνήμη για τη γονιδιακή έκφραση στη φάση G1, μέσω διατήρησης της κατάστασης της ακετυλιωμένης χρωματίνης και της δομής της [109, 110, 111]. Επιπλέον, μελέτες των Zhao, Rui, et al. γι' αυτήν την πρωτεΐνη δείχνουν, μέσω παρατήρησης ζωντανών κυττάρων σε πραγματικό χρόνο, και με τη χρήση ενός τεχνητού στόχου του ΜΠ, ότι τη μίτωση ακολουθεί η γρήγορη αποσυμπύκνωση της χρωματίνης και η συνέχιση της μεταγραφικής διαδικασίας [47]. Παρόμοιο παράδειγμα αποτελεί η ιστονική μεθυλοτρανσφεράση MLL1 (myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 1, ή Histone-lysine N-methyltransferase 2A, KMT2A), για την οποία οι Blobel, Gerd A., et al. έδειξαν ότι σε αρκετές κυτταρικές σειρές, η στρατολόγηση αυτού του παράγοντα σε υποκινητές ενεργών γονιδίων είχε άμεση σχέση με την επιταχυνόμενη επανενεργοποίηση της μεταγραφής κατά την είσοδο του κυττάρου στη μεσόφαση [78]. Ακόμη, στα γονίδια που προσημειώνονται από το Gata1 επανενεργοποιείται η μεταγραφή ταχύτερα κατά τη μετάβαση του θυγατρικού κυττάρου στη φάση G1 (M-G1) παρουσία του Gata [38], και τα γονίδια που ενεργοποιούνται από τον Esrrb κατά την πρώιμη G1 συναντώνται κοντά σε περιοχές που έχουν προσημειωθεί [8].

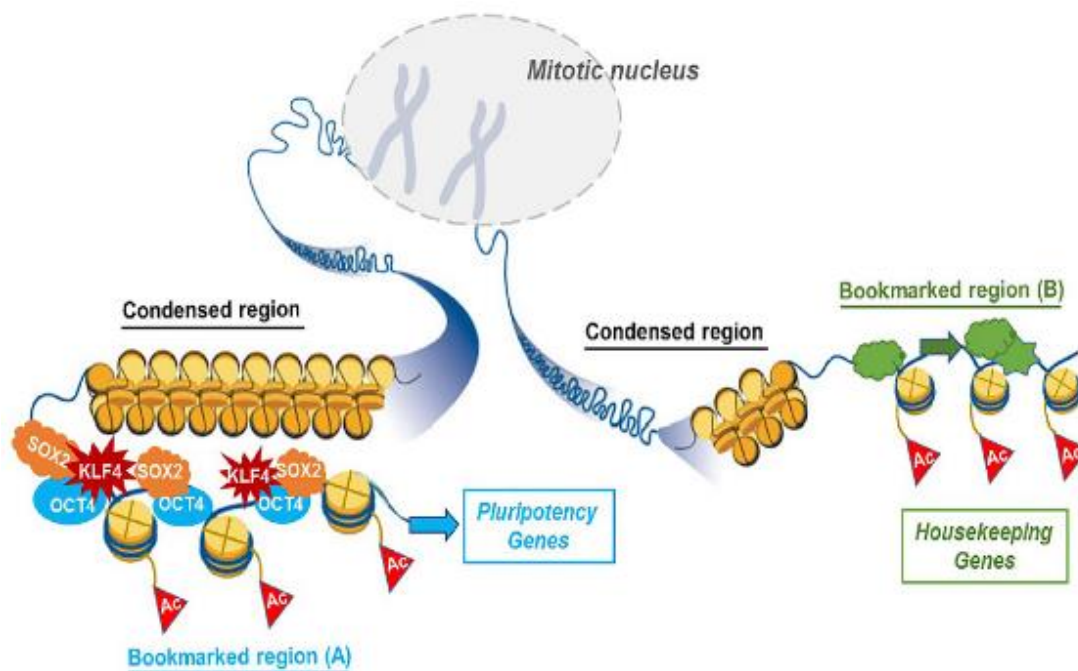
Φαίνεται, λοιπόν, πώς οι ΜΠ που προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες συνδέονται με την επανενεργοποίηση γονιδίων αμέσως μετά τη μίτωση. Ωστόσο, οι μηχανισμοί με τους οποίους οι παράγοντες μιτωτικής προσημείωσης επιτυγχάνουν επανενεργοποίηση των γονιδίων στην ακόλουθη μεσόφαση είναι ελάχιστα κατανοητοί. Μια υπόθεση θα ήταν πως, οι παράγοντες προσημείωσης παραμένοντας δεσμευμένοι στους στόχους τους κατά τη διάρκεια της μίτωσης, επιταχύνουν την επανασυναρμολόγηση των ρυθμιστικών συμπλοκών στους υποκινητές και στους ενισχυτές, προωθώντας έτσι ταχύτερα τη μεταγραφική απόκριση. Όπως όμως συμβαίνει και στη μεσόφαση, η πρόσδεση των ΜΠ στη μιτωτική χρωματίνη είναι μία δυναμική διαδικασία, με τον χρόνο παραμονής των παραγόντων να κυμαίνεται στην τάξη των δευτερολέπτων [94]. Κατά τη μίτωση, η κινητική της δέσμωσης και αποδέσμωσης των ΜΠ στη χρωματίνη δεν μεταβάλλεται σημαντικά [8, 11, 12, 36, 112, 113]. Όμως η λειτουργία της μιτωτικής προσημείωσης από ΜΠ ειδικούς για συγκεκριμένες αλληλουχίες, δεν μπορεί να επιτευχθεί απλά με τη μεταφορά ακίνητων παραγόντων που καταλαμβάνουν θέσεις, σταθερά, σε ρυθμιστικά στοιχεία καθ' όλη τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης. Πιθανώς, η δυναμική αλληλεπίδραση των παραγόντων προσημείωσης με συγκεκριμένα ρυθμιστικά στοιχεία της χρωματίνης συμβάλλει στη διατήρηση μιας συνολικής προσβασιμότητας. Υπό αυτήν την έννοια, η δραστηριότητα των ΜΠ στη μίτωση δεν θα ήταν διαφορετική από αυτήν της μεσόφασης. Τέλος, η συνολική επικάλυψη των χρωμοσωμάτων θα μπορούσε επίσης να είναι λειτουργική, είτε εξυπηρετώντας έναν δομικό ρόλο, είτε απλώς αυξάνοντας την τοπική

συγκέντρωση των ρυθμιστών της μεταγραφής του DNA, μειώνοντας έτσι τον χρόνο αναζήτησης για θέσεις σύνδεσης κατά την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης [7].

1.8 Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ως πειραματικό μοντέλο για τη μελέτη της μιτωτικής προσημείωσης.

Με την έξοδο από τη μίτωση πολλά χαρακτηριστικά της χρωματίνης έχουν χαθεί, εξαιτίας της διακοπής της μεταγραφικής διαδικασίας, γεγονός που προκαλεί μια κρίση ταυτότητας στα κύτταρα. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα βλαστικά κύτταρα καθώς πέρα από το γεγονός ότι χαρακτηρίζονται από ένα σύντομο κυτταρικό κύκλο, έχουν και την ανάγκη να διατηρήσουν την ισορροπία μεταξύ της κατάστασης αυτοανανέωσης και διαφοροποίησής τους. Σε συμφωνία με άλλες μελέτες [8, 11, 12], ο Liu και οι συνεργάτες του αποκάλυψαν πως τόσο ορισμένα σημάδια ιστονών, όσο και κάποιοι ρυθμιστές των βλαστικών κυττάρων παραμένουν συνδεδεμένοι με συγκεκριμένες γονιδιωματικές περιοχές κατά τη διαδικασία της μίτωσης, το φαινόμενο της μιτωτικής προσημείωσης. Πιο συγκεκριμένα, οι κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες της πολυδυναμίας, οι Oct4, Sox2 και Klf4, αλλά και η H3K27ac προσημειώνονται σε ενισχυτές γονιδίων που αφορούν την πολυδυναμία. Έτσι προωθείται ο πιστός πολλαπλασιασμός κυττάρων με την ιδιότητα της βλαστικότητας μετά την κυτταρική διαίρεση, ωστόσο, όμως, κάτι τέτοιο δε φαίνεται να συμβαίνει με τους Nanog και Rex1. Από την άλλη μεριά, οι υποκινητές των διαχειριστικών γονιδίων (housekeeping genes) φαίνεται να είναι προσημειωμένοι μόνο από την H3K27ac καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Εικ. 1.7) [9].

Το 2016 ο Shin και οι συνεργάτες του δείχνουν πώς μέσω φωσφορυλίωσης/αποφωσφορυλίωσης του Oct4 πραγματοποιείται η μιτωτική προσημείωση αυτού του παράγοντα σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Κατά τη διάρκεια της φάσης G2/M η AurKb φωσφορυλιώνει τον ΜΠ Oct4 στο κατάλοιπο S229, οδηγώντας στην αποδέσμευσή του από την χρωματίνη. Αντίθετα, καθώς το κύτταρο μεταβαίνει από τη φάση M στη G1 η πρωτεΐνη φωσφατάση 1 (PP1) προσδένεται στον Oct4 και τον αποφωσφορυλιώνει στο κατάλοιπο S229. Αυτό το μοτίβο φωσφορυλίωσης / αποφωσφορυλίωσης του Oct4 επαναφέρει τη μεταγραφή, η οποία βασίζεται σ' αυτόν τον παράγοντα, έτσι ώστε να διατηρηθεί η πολυδυναμία και ο κυτταρικό κύκλος που καθορίζει την ταυτότητα των ESC [73]. Παρομοίως, το ίδιο χρονικό διάστημα ο Qi και οι συνεργάτες του δείχνουν πως ένας άλλος κύριος ρυθμιστής της πολυδυναμίας, ο Sox2, αποτελεί απόδειξη μιτωτικής προσημείωσης. Με αντίστοιχο τρόπο, όπως και στην προηγούμενη μελέτη δύο κατάλοιπα αυτού του παράγοντα, το Ser220 και το Ser251, αποτελούν τοποθεσίες που ταυτοποιήθηκαν για φωσφορυλίωση κατά τη μίτωση στον Sox2 από την κινάση AurKA (Aurora kinase A), κατά τη διάρκεια της μίτωσης, μια διαδικασία σημαντική για τη διατήρηση της ταυτότητας των καρκινικών βλαστικών κυττάρων [72].



Εικόνα 1.7 Η μιτωτική προσημείωση για τη διατήρηση της ταυτότητας των βλαστικών κυττάρων. Οι ΜΠ Oct4, Sox2 και Klf4 (OSK) μαζί με την H3K27ac είναι σημαντικοί για την προσημείωση ενισχυτών γονιδίων πολυδυναμίας (A), ενώ η H3K27ac (με άλλους ΜΠ προσημείωσης) είναι σημαντική για την προσημείωση υποκινητών διαχειριστικών γονιδίων (B) [157].

1.8.1 Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και οι βασικές ιδιότητες τους.

Η απομόνωση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (Embryonic Stem Cells, ESCs) γίνεται από την εσωτερική κυτταρική μάζα (Inner Cell Mass, ICM) η οποία δημιουργείται στο στάδιο της βλαστοκύστης [138, 139, 140]. Τα κύτταρα αυτά έχουν δυο χαρακτηριστικές ιδιότητες: α) την πολυδυναμία και β) την αυτο-ανανέωση. Αυτά τα δυο χαρακτηριστικά συνδυάζονται με ένα ιδιόμορφο μεταγραφικό καθεστώς και έναν γρήγορο κυτταρικό κύκλο με μια σύντομη φάση G1 [141, 142].

Αρχικά, με τον όρο «πολυδυναμία» (pluripotency) περιγράφεται η ικανότητα των κυττάρων να δημιουργούν ιστούς που περιέχουν και τις τρεις βλαστικές στιβάδες (ενδόδερμα, μεσόδερμα, εξώδερμα) στο έμβryo ή *in vitro*. Αυτό είναι δυνατό καθώς, ένα πολυδύναμο κύτταρο δεν έχει προκαθορισμένο πρόγραμμα, αλλά έχει ένα «κενό μητρώο» [143, 144]. Τα γονίδια Oct3/4, Sox2 και Nanog αντιπροσωπεύουν τους βασικούς δείκτες πολυδυναμίας. Το Oct4 (POU domain) όπως και το Sox2 (SRY-related HMG-box) είναι μεταγραφικοί παράγοντες σημαντικοί για τη διατήρηση της πολυδυναμίας στην ICM *in vivo* και *in vitro*. Το Sox2 συνεργάζεται με το Oct4 προκειμένου να ενεργοποιηθεί η έκφραση πολλών γονιδίων τα οποία ρυθμίζουν την πολυδυναμία [145, 146, 147, 148, 149, 150]. Ένα από αυτά τα γονίδια είναι και το Nanog. Η έκφραση του Nanog αρχίζει κατά το στάδιο του μοριδίου, στη συνέχεια συσσωρεύεται στο στάδιο της βλαστοκύστης και τελικά η έκφρασή του υποχωρεί λίγο πριν την εμφύτευση [146]. Στο μονοπάτι της JAK μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Stat3, επάγεται η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Klf4 και μέσω αυτού η μεταγραφή του γονιδίου Sox2. Τα άλλα δύο μονοπάτια επηρεάζουν τη μεταγραφή του γονιδίου Nanog, μέσω της αδρανοποίησης ή της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Tbx3, αντίστοιχα. Η επαγωγή των Klf4/Tbx3 με τεχνητό τρόπο εξασφαλίζει την αυτο-ανανέωση των εμβρυονικών

βλαστικών κυττάρων ακόμη και απουσία του LIF. Άρα, οι Klf4/Tbx3 θα πρέπει να συμμετέχουν στη σηματοδότηση μέσω LIF [151, 152].

Επίσης, στη διατήρηση της πολυδυναμίας των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων εμπλέκονται ορισμένοι επιγενετικοί ρυθμιστές. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται και τα σύμπλοκα πρωτεϊνών Polycomb και Trithorax, τα οποία ρυθμίζουν την έκφραση πολυάριθμων αναπτυξιακά σημαντικών γονιδίων μέσω ιστονικών τροποποιήσεων [51]. Αυτοί οι παράγοντες διαμορφώνουν ζώνες εντός του γονιδιώματος των πολυδύναμων κυττάρων οι οποίες είτε είναι κατεσταλμένες είτε ενεργοποιημένες περιοχές [153]. Ωστόσο, στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα υπάρχουν χρωματινικές περιοχές στις οποίες συνυπάρχουν και οι δυο προαναφερθείσες τροποποιήσεις της ιστόνης H3 (bivalent modifications) [154]. Οι περιοχές αυτές διατηρούν σε «ετοιμότητα» τα ιστο-ειδικά γονίδια, που ενεργοποιούνται όμως κατά την έξοδο των κυττάρων από την κατάσταση πολυδυναμίας [154, 155, 156].

Λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω, τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα αποτελούν ένα εξαιρετικό μοντέλο προκειμένου να μελετηθεί η μιτωτική προσημείωση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων απαραίτητων για τη βλαστικότητα αλλά και την ικανότητα διαφοροποίησής τους σε άλλους ιστούς.

2. Σκοπός

Στόχος της συγκεκριμένης μελέτης είναι να εξετασθεί η κατανομή συγκεκριμένων μεταγραφικών ρυθμιστών κατά τη διάρκεια της μίτωσης ύστερα από αποσιώπηση ή αναστολή της μιτωτικής κινάσης Haspin σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού. Σύμφωνα με παλιότερες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό μας, η Haspin καταλύει τη φωσφορυλίωση της θρεονίνης-3 και επιπλέον συνυπάρχει σε μια σύνθετη μιτωτική τροποποίηση της ιστόνης H3, που περιλαμβάνει φωσφορυλίωση της θρεονίνης-3, τριμεθυλίωση της λυσίνης-4 και διμεθυλίωση της αργινίνης-8 (συντομογραφικά PMM). Ύστερα από απαλοιφή της Haspin στα βλαστικά κύτταρα με επεξεργασία CRISPR/Cas9 παρόλο που δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στη διαδικασία της αυτο-ανανέωσης, φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση πολλών γονιδίων, όπως αποδεικνύεται με αλληλούχιση RNA (RNAseq). Το ερώτημα που προκύπτει είναι εάν η αλλαγή του προτύπου γονιδιακής έκφρασης οφείλεται στη μη έγκαιρη ή την «άναρχη» (επανα)ενεργοποίηση προσημειωμένων γονιδίων μετά το τέλος της κυτταρικής διαίρεσης.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού (E14T) ήταν ευγενική χορηγία του εργαστηρίου του Austin Smith (Cambridge University). Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σε ειδικό διαμορφωμένο χώρο ο οποίος διατηρείται στείρος και ο χειρισμός τους πραγματοποιείται εντός μιας εστίας κάθετης νηματικής ροής. Τα κύτταρα διατηρούνται σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37° C, η ατμόσφαιρα είναι εμπλουτισμένη με σταθερή συγκέντρωση CO₂ 5% και υπάρχουν κατάλληλες συνθήκες υγρασίας. Η καλλιέργεια των E14T δεν απαιτεί συν-καλλιέργεια με τροφικά κύτταρα για την διατήρηση της αυτο-ανανέωσης και της πολυδυναμίας τους. Απαιτείται μόνο επίστρωση των τρυβλίων με 0.1% διάλυμα ζελατίνης. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται στην καλλιέργεια των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων GMEM (Glasgow Modified Eagle's Medium) είναι εμπλουτισμένο με 15% εμβρυϊκό ορό βοός (Fetal Bovine Serum, FBS), L-γλουταμίνη 2mM, 0.1 mM μη απαραίτητα αμινοξέα (MEM Non-Essential Amino Acids, MNEA), πυροσταφιλικό νάτριο 1mM, πενικιλίνη 100 units/ml και στρεπτομυκίνη 0,1 mg/ml. Στην καλλιέργεια των κυττάρων προστίθεται β-μερκαπτοαιθανόλη 0,1mM και LIF (Leukemia Inhibitor Factor) που είναι απαραίτητα για την διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης των βλαστικών κυττάρων. Η παρασκευή του παράγοντα LIF γίνεται με υπερέκφραση του αντίστοιχου πλασμιδιακού DNA που φέρει το γονίδιο για την έκφρασή του σε κύτταρα COS και συλλέγεται η εκκρινόμενη πρωτεΐνη από το καλλιεργητικό μέσο. Στη συνέχεια, το υλικό που συλλέχθηκε τιτλοποιείται από ξεχωριστά πειράματα σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα προκειμένου να επιλεγεί η ιδανική συγκέντρωσή του.

Μία άλλη κυτταρική σειρά η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι μία σταθερή κυτταρική σειρά εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων στην οποία διατηρείται η έκφραση ενός από των δεικτών πολυδυναμίας, του Oct4. Σε αυτά τα κύτταρα η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) εκφράζεται υπό τον έλεγχο του ενισχυτή του γονιδίου Oct4. Η σταθερή κυτταρική σειρά εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων Oct4-GFP καλλιεργείται υπό τις ίδιες συνθήκες με τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα E14 που προαναφέρθηκαν.

3.2 Κλωνοποίηση

Το εργαστήριο του κυρίου Θάνου Δημήτρη στην Ακαδημία Αθηνών μας παραχώρησε τις κωδικές αλληλουχίες των γονιδίων των μεταγραφικών παραγόντων Oct4, Nanog, Sox2, Klf4, c-Myc και Max μέσα σε πλασμιδιακούς φορείς. Τα cDNAs των Oct4, Sox2, c-Myc και Max κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς pEGFP-N2, ενώ τα αντίστοιχα των Nanog και Klf4 σε πλασμιδιακούς φορείς pEGFP-N3. Ο σχεδιασμός των νέων ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που φέρουν τα cDNAs ενδιαφέροντος πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος “SnapGene”.

3.2.1 Προετοιμασία των cDNA ενδιαφέροντος

3.2.1.1 Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Προκειμένου να απομονωθούν τα cDNAs ενδιαφέροντος από τα πλασμίδια που μας παραχώρησαν, πραγματοποιήθηκε PCR με εκκινητές που σχεδιάστηκαν μέσω του προγράμματος “SnapGene” (Πίνακας 3.1, 3.2 και 3.3).

Πίνακας 3.1 Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των cDNAs.

<u>Gene</u>	<u>Fr</u>	<u>Rv</u>
pEGFP-N2 - Oct4	5'-CCG CTCGAG atgGCTGGACACCTGGCTTC-3'	5'-G GAATTC GTTTGAATGCATGGGAGAGCCC-3'
pEGFP-N2 - Sox2	5'-CCG CTCGAG ATGTATAACATGATGGAGACGGAGC-3'	5'-G GAATTC CATGTGCGACAGGGGAG-3'
pEGFP-N2 - Klf4	5'-CCG CTCGAG ATGAGGCAGCCACCTGGC-3'	5'-G GAATTC AAAGTGCCTCTTCATGTGTAAGGC-3'
pEGFP-N2 - c-Myc	5'-CCG CTCGAG ATGCCCTCAACGTGAACCTT-3'	5'-G GAATTC TGCACCAGAGTTTCGAAGCTG-3'
pEGFP-N2 - Max	5'-CCG CTCGAG ATGAGCGATAACGATGACATCGAGG-3'	5'-G GAATTC GCTGGCCTCCATCCGGAG-3'
pEGFP-N3 - Nanog	5'- cccAAGCTT ATGAGTGTGGTCTTCTG-3'	5'- cgGGATCC TCTCGAGATTTACCTGGTG-3'
pEGFP-N3-KLF4	5- cccAAGCTT cat ATGAGGCAGCCA -3	5- cgGGATCC AAAGTGCCTCTTCATGTGTA -3

Πίνακας 3.2 Η αντίδραση της PCR

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση
2x KAPA HiFi Hot Start Ready Mix	1x
Forward primer	10μM
Reverse primer	10μM
Template DNA	50ng/μl
ddH ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο 50μL

Πίνακας 3.3 Το πρόγραμμα της PCR

Στάδια	Συνθήκες	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C / 3min	1
Αποδιάταξη	98°C / 20sec	35
Υβριδοποίηση	65°C / 15sec	35
Σύνθεση	72°C / 2min	35
Τελική επέκταση	72°C / 2min	1

3.2.1.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης σύστασης 1% w/v παρασκευασμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (0,04M Tris-οξικό, 0,001M EDTA) που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 10μg/ml.

3.2.1.3 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αгарόζης

Ακολούθησε η ανάκτηση του DNA από το πήκτωμα αгарόζης και ο καθαρισμός του σύμφωνα με το πρωτόκολλο του “Nucleospin Gel and PCR clean up kit” (Macherey Nagel). Έπειτα μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση του DNA για την εύρεση της συγκέντρωσής του.

3.2.1.4 Αντίδραση πέψης με δύο περιοριστικά ένζυμα για τα cDNAs (διπλή πέψη)

Για να ενσωματωθούν τα προϊόντα της PCR στους πλασμιδιακούς φορείς που έχουν επιλεγεί, θα χρειαστεί να κοπούν έκαστοι με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα ώστε να δημιουργηθούν τα κατάλληλα μονόκλωνα και συμπληρωματικά μεταξύ τους άκρα. Η αντίδραση της διπλής πέψης πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 90 λεπτά και φαίνεται στον Πίνακα 3.4.

Πίνακας 3.4 Αντίδραση διπλής πέψης

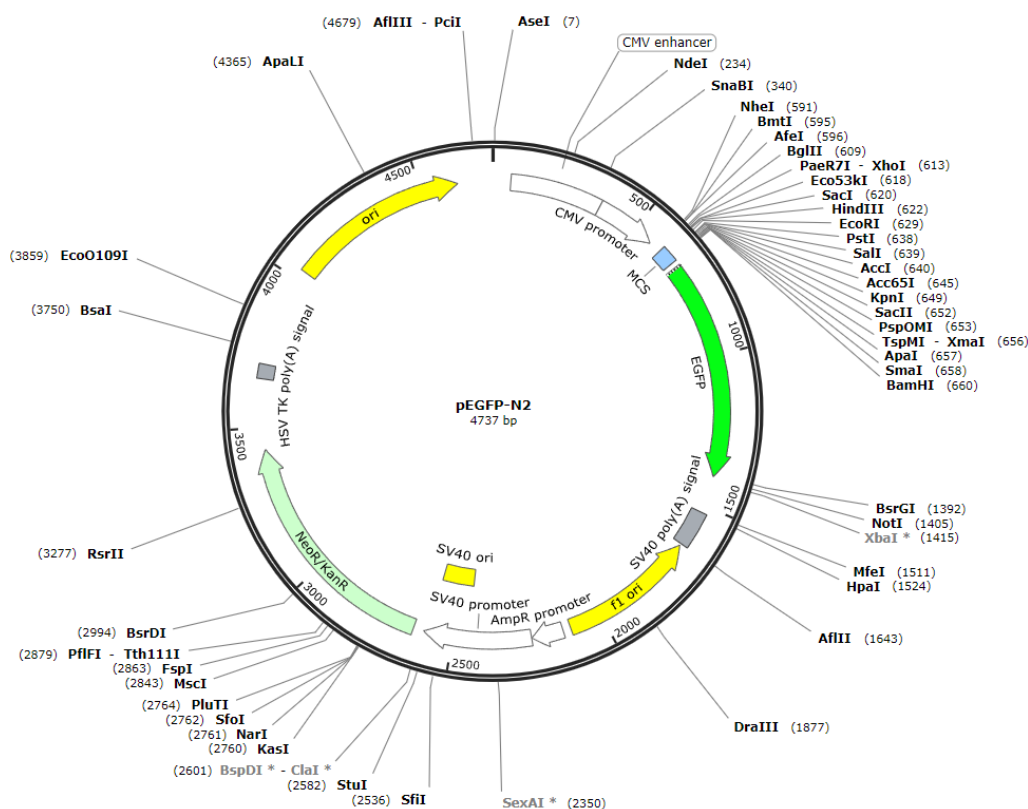
Όγκος	Αντιδραστήρια
30μl	insert
1 μl	EcoRI / BamHI
1 μl	XhoI / HindIII
4 μl	BSA 10x
4 μl	3.1 Buffer 10x
40 μl	Total Volume

Το προϊόν που προκύπτει από την αντίδραση διπλής πέψης στη συνέχεια υφίσταται καθαρισμό, με το kit που προαναφέρθηκε, και φωτομετρείται για την εύρεση της συγκέντρωσής του.

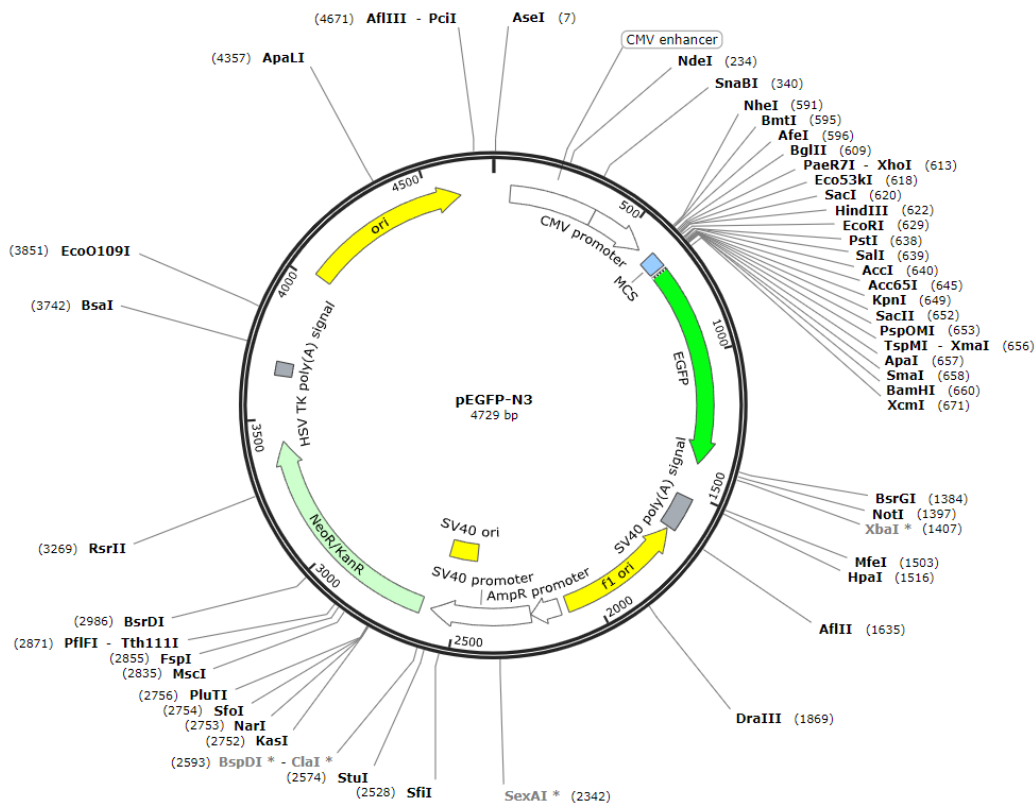
3.2.2 Προετοιμασία των πλασμιδιακών φορέων

3.2.2.1 Βακτηριακά στελέχη και πλασμιδιακοί φορείς

Για την κλωνοποίηση και την απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος DH10B του βακτηρίου *E. coli* το οποίο είναι αρκετά επιδεκτικό σε μετασχηματισμό και συνιστάται για την κλωνοποίηση ένθετων αλληλουχιών DNA.



Εικόνα 3.1. Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα *pEGFP-N2*. Ο πολυσυνδέτης (MCS) προηγείται του γονιδίου έκφρασης της *EGFP* πρωτεΐνης.



Εικόνα 3.2. Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα *pEGFP-N3*. Ο πολυσυνδέτης (MCS) προηγείται του γονιδίου έκφρασης της *EGFP* πρωτεΐνης.

3.2.2.2 Αντίδραση πέψης με δύο περιοριστικά ένζυμα για τους πλασμιδιακούς φορείς (διπλή πέψη)

Για την ενσωμάτωση των προϊόντων της PCR (inserts) στον πλασμιδιακό φορέα πραγματοποιήθηκαν διπλές ενζυμικές πέψεις με διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα για τους *pEGFP-N2* και *pEGFP-N3*. Πιο συγκεκριμένα, οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι *EcoRI* και *XhoI* για την πέψη του πλασμιδιακού φορέα *pEGFP-N2*, ενώ για τον πλασμιδιακό φορέα *pEGFP-N3* οι *BamHI* και *HindIII* (Πίνακας 3.5). Οι αντιδράσεις πέψης πραγματοποιήθηκαν στους 37°C για 90 λεπτά σύμφωνα με το μίγμα που φαίνεται στον Πίνακα 3.5.

Πίνακας 3.5 Αντιδράσεις διπλής πέψης των πλασμιδιακών φορέων pEGFP-N2 και pEGFP-N3.

pEGFP-N2		pEGFP-N3	
Όγκος	Αντιδραστήρια	Όγκος	Αντιδραστήρια
2 μl	Plasmid	6 μl	Plasmid
1 μl	EcoRI	1 μl	HindIII
1 μl	XhoI	1 μl	BamHI
3 μl	BSA 10x	3 μl	BSA 10x
3 μl	3.1 Buffer 10x	3 μl	3.1 Buffer 10x
20 μl	ddH ₂ O	16 μl	ddH ₂ O
30 μl	Total Volume	30 μl	Total Volume

3.2.2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης

Τα προϊόντα των ενζυμικών πέψεων ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης σύστασης 1% w/v παρασκευασμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (0,04M Tris-οξικό, 0,001M EDTA) που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 10 μg/ml.

3.2.2.4 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αгарόζης

Ακολούθησε η ανάκτηση του DNA από το πήκτωμα αгарόζης και ο καθαρισμός του σύμφωνα με το πρωτόκολλο του “Nucleospin Gel and PCR clean up kit” (Macherey Nagel). Αφού το DNA απομονωθεί και καθαριστεί φωτομετρείται για την εύρεση της συγκέντρωσής του.

3.2.2.5 Αποφωσφορυλίωση πλασμιδιακού φορέα

Για να αποφευχθεί η επανασυγκόλληση του γραμμικού, πλέον, DNA οι φορείς κλωνοποίησης αποφωσφορυλίωθηκαν με τη χρήση του ενζύμου Calf-intestinal alkaline phosphatase (CIAP). Η αντίδραση (Πίνακας 3.6) πραγματοποιήθηκε στους 37 °C για 60 λεπτά. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης μπορεί να αποθηκευτεί στους -20 °C και να χρησιμοποιηθεί για μελλοντική χρήση.

Πίνακας 3.6 Αντίδραση αποφωσφορυλίωσης των πλασμιδιακών φορέων pEGFP-N2 και pEGFP-N3.

Όγκος	Αντιδραστήρια
30 μl	Vector
1 μl	CIAP
4 μl	Buffer CIAP 10x
5 μl	ddH ₂ O
40 μl	Total Volume

3.2.3 Αντίδραση συγκόλλησης

Η αντίδραση συγκόλλησης πραγματοποιήθηκε με τη δράση του ενζύμου T4 DNA λιγάση (Clontech) σε συνδυασμό με το συνοδευτικό διάλυμα συγκεντρωμένο κατά 10 φορές. Έγινε ανάμιξη 100ng του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-N2 / pEGFP-N3 με 100-200ng από το τμήμα

DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί. Προστέθηκε 1μl ενζύμου, 2μl του συνοδευτικού διαλύματος και ddH₂O έως τελικού όγκου 20μl. Το μίγμα επώαστηκε στους 16°C για 16 ώρες (overnight) και την επόμενη μέρα χρησιμοποιήθηκε αμέσως για το μετασχηματισμό των επιδεκτικών κυττάρων.

3.3 Κατασκευή επιδεκτικών βακτηρίων

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον σχηματισμό των επιδεκτικών κυττάρων, δηλαδή κυττάρων που έχουν την δυνατότητα να ενσωματώνουν ξένο γενετικό υλικό, περιλαμβάνει τον εμβολιασμό θρεπτικού υλικού Luria Broth (LB) (10g/L NaCl, 10g/L bacto-tryptone, 5g/L yeast extract) με κύτταρα DH10B και επώαση τους στους 37°C υπό ανάδευση για 12-16 ώρες (overnight). Στη συνέχεια, 250ml LB εμβολιάζονται με 1ml αυτής της καλλιέργειας και ακολουθεί επώαση στους 37°C, μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα φθάσει ~0,3. Αμέσως μετά η καλλιέργεια τοποθετείται στον πάγο για 3 λεπτά ώστε να σταματήσει η ανάπτυξη των κυττάρων και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0°C στα 8000rpm (Heraeus #Megafuge 10R) για 5 λεπτά. Μετά την απόρριψη του υπερκειμένου, τα κύτταρα επαναδιαλύονται με τη χρήση vortex σε παγωμένο διάλυμα 60ml 100mM MgCl₂. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0°C στα 8000rpm για 5 λεπτά και επαναδιάλυση του ιζήματος με τη χρήση vortex σε παγωμένο διάλυμα 60ml 100 mM CaCl₂. Τα κύτταρα παραμένουν στον πάγο για 20 λεπτά και ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0°C, στα 8000 rpm, για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και τελικά τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 12ml CaCl₂ 86mM, 12.3% γλυκερόλης. Τα κύτταρα είναι έτοιμα να δεχθούν DNA και φυλάσσονται σε φιαλίδια ανά 200μl στους -80°C.

3.4 Μετασχηματισμός βακτηρίων DH10B

Ο μετασχηματισμός των επιδεκτικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση θερμικού σοκ. Με αυτόν τον τρόπο είναι η δυνατή η παραγωγή υψηλών ποσοτήτων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Στο αιώρημα των επιδεκτικών βακτηρίων DH10B (100μl) προστίθενται 10μl του μίγματος της αντίδρασης συγκόλλησης και ακολουθεί επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια το μίγμα των βακτηρίων και DNA υπόκειται σε θερμικό σοκ στους 42°C για 1 λεπτό. Ακολουθεί προσθήκη 1ml θρεπτικού μέσου LB και επώαση στους 37°C για 1 ώρα έτσι ώστε τα μετασχηματισμένα πλέον βακτήρια να εκφράσουν το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό. Επόμενο βήμα είναι η φυγοκέντρηση του αιωρήματος στα 5000rpm (erppendorf #5415D) για 5 λεπτά και η απομάκρυνση του υπερκειμένου. Το ίζημα επαναωρεείται σε 100μl φρέσκου θρεπτικού υλικού LB και επιστρώνεται σε πιάτα με θρεπτικό υλικό LB/άγαρ παρουσία καναμυκίνης (50μg/ml). Με τον τρόπο αυτό γίνεται η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων έναντι των βακτηρίων που δεν έχουν προσλάβει το πλασμίδιο. Τα τρυβλία φυλάσσονται στους 37°C για 12-16 ώρες, έτσι ώστε να πολλαπλασιαστούν τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα.

3.5 Επιλογή αποικιών και απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή και μεσαία κλίμακα

Μετά την ανάπτυξη των μετασχηματισμένων βακτηρίων σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο επιλέγεται μια μονήρης αποικία και εμβολιάζεται σε διάλυμα θρεπτικού υλικού ανάπτυξης LB

παρουσία του αντιβιοτικού καναμυκίνης (50μg/ml). Το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 12-16 ώρες υπό ανάδευση (200 rpm).

Η απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων σε μικρή και μεσαία κλίμακα πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας το πρωτόκολλο του kit NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid), Macherey-Nagel και NucleoBond® Xtra Midi.

3.6 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών

3.6.1 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με ηλεκτροδιάτρηση

Η συνήθης και επιτυχής μέθοδος διαμόλυνσης των βλαστικών εμβρυονικών κυττάρων είναι η ηλεκτροδιάτρηση. Η ηλεκτροδιάτρηση είναι μια τεχνική εισαγωγής επιλεγμένου DNA στο εσωτερικό των κυττάρων. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου προκειμένου να διαταραχθεί προσωρινά η φωσφολιπιδιακή διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα πολικά μόρια (όπως τα νουκλεϊκά οξέα) να εισέλθουν στο κύτταρο. Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ECM630 (BTX Inc.) και οι αντίστοιχες ειδικές κυψελίδες (cuvettes-BTX 640). Για τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, 5x10⁶ κύτταρα αραιώθηκαν με 20 μg πλασμιδίου σε τελικό όγκο 400μl GMEM και χρησιμοποιήθηκαν οι εξής παράμετροι : 200V, 950μF και 0Ω.

3.6.2 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με αντιδραστήρια επιμόλυνσης

Ακόμη, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων με πλασμιδιακούς φορείς μέσω ειδικών αντιδραστηρίων επιμόλυνσης. Το πρώτο αντιδραστήριο ήταν το “UltraCruz Transfection Reagent: sc-395793”, από την εταιρεία Santa Cruz Biotechnology, το οποίο χρησιμοποιήθηκε όπως περιγράφεται από το πρωτόκολλο εφαρμογής που παρέχει η εταιρεία. Ενώ το δεύτερο αντιδραστήριο ήταν το “Xfect Transfection Reagent (cat. No. 631317)”, από την εταιρεία Takara Bio Company, το οποίο επίσης χρησιμοποιήθηκε με βάση τις οδηγίες πρωτοκόλλου που είναι διαθέσιμες.

3.7 Δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων απαλοίφοντας το γονίδιο της Haspin

Η απαλοιφή πραγματοποιείται με τη μέθοδο CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Τα CRISPR είναι τμήματα προκαρυωτικού DNA τα οποία περιέχουν βραχείες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες βάσεων και παίζουν βασικό ρόλο στο αμυντικό σύστημα των βακτηρίων. Αποτελούν τη βάση μιας τεχνολογίας επεξεργασίας του γονιδιώματος που επιτρέπει τη μόνιμη τροποποίηση των γονιδίων μέσα στον οργανισμό. Η νουκλεάση Cas9, αφού εισαχθεί στο κύτταρο, οδηγείται από ένα συνθετικό RNA οδηγό (guideRNA) προκειμένου να κόψει το DNA στην επιθυμητή θέση επιτρέποντας την απομάκρυνση των γονιδίων και / ή την προσθήκη νέων. Για την εκτέλεση του πειραματικού σχεδίου χρησιμοποιούνται κατάλληλοι πλασμιδιακοί φορείς που στοχεύουν ειδικά το συγκεκριμένο γονίδιο από την εταιρία Santa Cruz (με κωδικούς sc-420703-NIC και sc-437281 για το πλασμίδιο ελέγχου). Τα συγκεκριμένα πλασμίδια είναι διαφορετικά μεταξύ τους, το καθένα κωδικοποιεί μια μεταλλαγμένη μορφή της νουκλεάσης Cas9 καθώς και ένα μοναδικό τμήμα 20 νουκλεοτιδίων τα οποία είναι ειδικά για την αλληλουχία του γονιδίου-στόχου (RNA οδηγοί-guide RNA) (Πίνακας 3.7). Το ένα από τα δυο πλασμίδια περιέχει ένα γονίδιο

ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη για την επιλογή των κλώνων και το άλλο έναν μάρτυρα GFP για επιβεβαίωση της διαμόλυνσης.

Πίνακας 3.7 Οι αλληλουχίες των RNA οδηγών

Guide RNAs for Haspin gene
1) CAGCGACGTAACGAGTCGC
2) AAGGCGCGCTTCAGGTTTCGG

Διαμολύνονται εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα με το αντιδραστήριο UltraCruz transfection Reagent, ταυτόχρονα με τα δυο πλασμίδια που περιγράφεται παραπάνω και αφήνονται στην καλλιέργεια ώστε να ανακάμψουν για 24 ώρες, και να εκφράσουν το γονίδιο ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη. Την επόμενη μέρα, προστίθεται 1.5μg/ml του αντιβιοτικού στο θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα καλλιεργούνται παρουσία του για 72 ώρες. Τα κύτταρα που δεν εκφράζουν το γονίδιο ανθεκτικότητας δεν επιβιώνουν. Ακολουθεί απομάκρυνση του αντιβιοτικού από το θρεπτικό μέσο για περίπου 10 ημέρες. Όταν τα κύτταρα αναπτυχθούν αρκετά, ώστε να σχηματιστούν αποικίες και καλύψουν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, μεταφέρονται διαδοχικά σε τρυβλίο 24 φρεατίων, 12 φρεατίων, 6 φρεατίων και τελικώς σε τρυβλίο 60mm. Οι κλώνοι ελέγχονται για την παρουσία ή απουσία του γονιδίου της Haspin μέσου ελέγχου της παρουσίας ή μη της φωσφορυλίωσης H3T3.

3.8 Μορφολογικές μέθοδοι

3.8.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε κύτταρα επιστρωμένα σε γυάλινες επιφάνειες

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός έγινε σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των αναφορών 158 και 159. Πιο αναλυτικά, τα κύτταρα έχουν επιστρωθεί μια ή δυο ημέρες πριν σε γυάλινες καλυπτρίδες, μονιμοποιούνται σε διάλυμα 4% φορμαλδεΰδης αραιωμένης σε PBS για 10 λεπτά. Το μέσο και ο χρόνος επώασης της μονιμοποίησης των κυττάρων εξαρτάται από το εκάστοτε αντίσωμα το οποίο θα χρησιμοποιηθεί. Ακολουθούν πλύσεις με PBS και στη συνέχεια επώαση του δείγματος για 10 λεπτά με διάλυμα γλυκίνης 5mM διαλυτοποιημένης σε PBS, προκειμένου να εξουδετερωθεί το μέσο μονιμοποίησης. Τα δείγματα εκπλύονται με PBS και εν συνεχεία επωάζονται για 15 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα Α το οποίο είναι ικανό να αποκλείει μη ειδικές θέσεις. Το συγκεκριμένο διάλυμα περιέχει 150mM NaCl, 20mM TrisHCl, 2mM MgCl₂, 0.1mM EGTA, 0.2% Triton X-100, 0.5% Fish skin gelatin (FSG). Ακολουθεί επώαση 1 ώρας με το πρωτεΐν αντίσωμα το οποίο έχει αραιωθεί στο διάλυμα Α αποκλεισμού ειδικών θέσεων σε κατάλληλη συγκέντρωση σε θερμοκρασία δωματίου και σε θάλαμο υψηλής υγρασίας. Μετά από τρεις πλύσεις με το διάλυμα Α τα δείγματα επωάζονται με αντίστοιχο δευτερεύον φθορίζον αντίσωμα στις ίδιες συνθήκες με το πρωτεΐν αντίσωμα αλλά ο χρόνος επώασης είναι 45 λεπτά. Τα δείγματα εκπλύονται τρεις φορές με το διάλυμα Α και άλλες τρεις με PBS έτσι ώστε να ακολουθήσει η χρώση του DNA χρωστικές όπως DAPI, TOPRO-3 είτε ιωδιούχο προπίδιο (PI-propidium iodide) ανάλογα με τις απαιτήσεις του πειράματος. Τέλος, οι καλυπτρίδες εκπλύονται με PBS και αφού καλυφθούν με ένα διάλυμα (Vectashield) το οποίο προστατεύει το δείγμα από την απώλεια του φθορισμού κατά την παρατήρηση, τοποθετούνται σε

αντικειμενοφόρους πλάκες. Τα δείγματα διατηρούνται στους 4°C και εξετάζονται σε συνεστιακό μικροσκόπιο (Confocal microscope Leica SP5 TCSII).

Πίνακας 3.8

Αντίσωμα	Εταιρεία	Μονιμοποίηση	Αραίωση
H3T3ph	Παρασκευή του εργαστηρίου μας	4% φορμαλδεΰδη	1:750
H3K9me3	Novus Biologicals	4% φορμαλδεΰδη	1:200
Nanog	Abcam	4% φορμαλδεΰδη	1:300
Oct4	Santa Cruz	4% φορμαλδεΰδη	1:300
Klf4	Abcam	4% φορμαλδεΰδη	1:1000
Sox2	Abcam	4% φορμαλδεΰδη	1:500

3.8.2 Απεικόνιση ζωντανών κυττάρων

Για όλα τα πειράματα απεικόνισης ζωντανών κυττάρων τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε πιάτο με γυάλινη πλάκα με επικάλυψη ζελατίνης (μ-Dish 35 mm, high Glass Bottom, #1.5 polymer coverslip, tissue culture treated, sterilized, cat. No 81158) και παρατηρήθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο.

3.8.3 Συνεστιακή μικροσκοπία

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

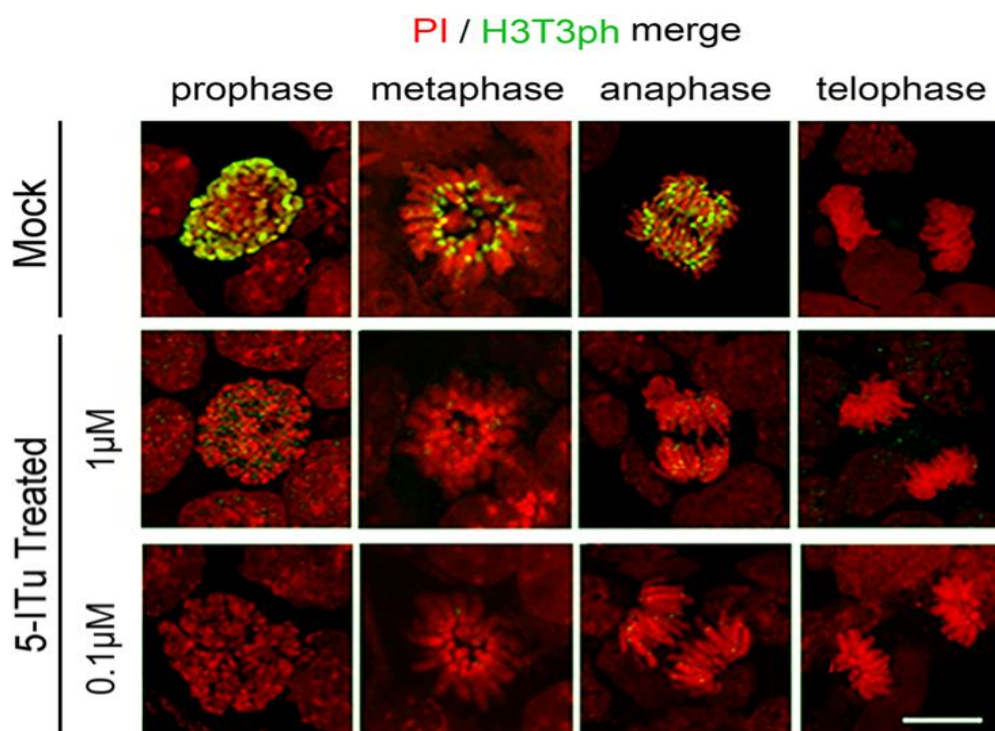
4. Αποτελέσματα

4.1 Κατανομή μεταγραφικών ρυθμιστών κατά τη διάρκεια της μίτωσης

4.1.1 Καταγραφή της κατανομής μεταγραφικών ρυθμιστών μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού (μελέτη ενδογενούς έκφρασης)

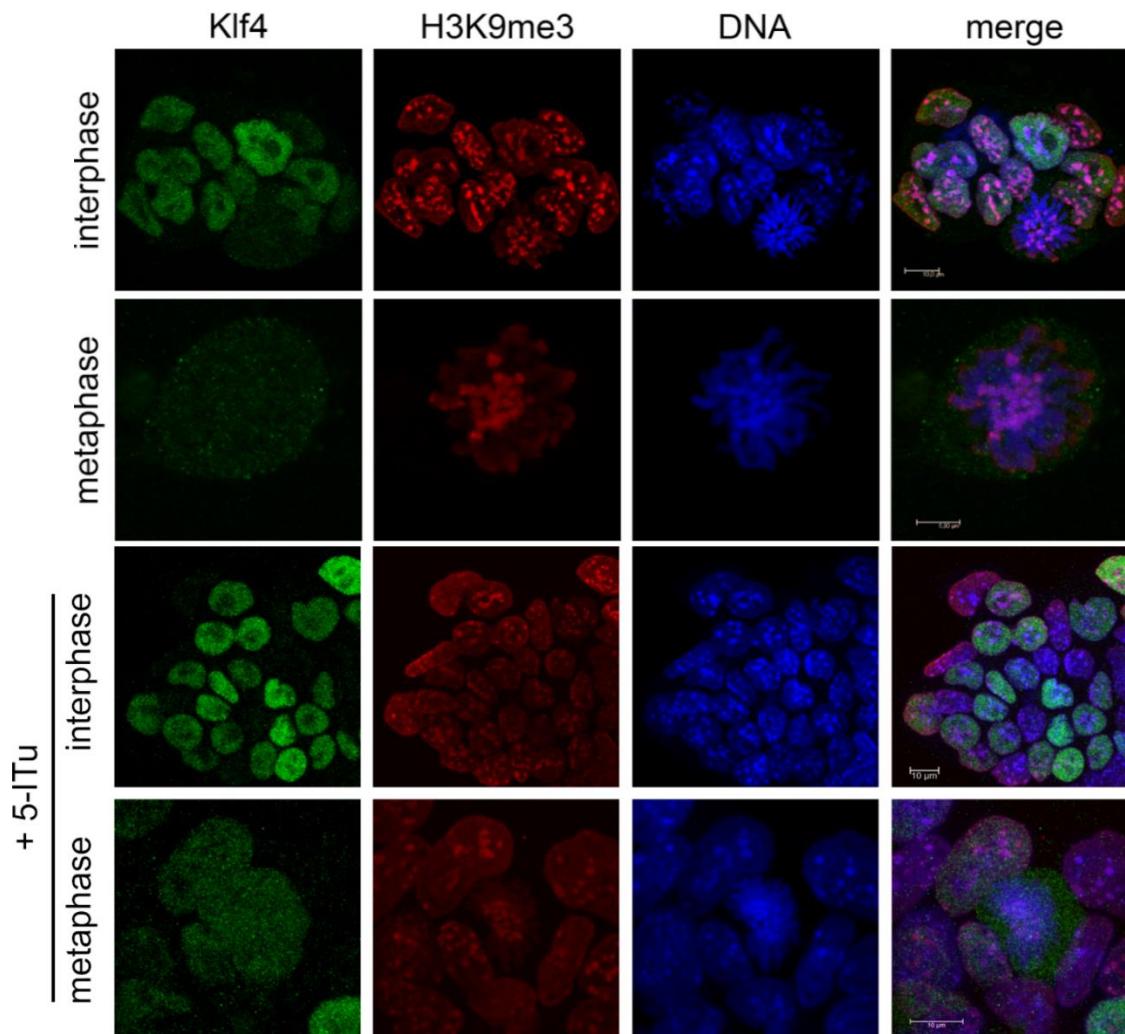
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, και όπως ήδη έχει αναφερθεί στην *Εισαγωγή*, στις περισσότερες μελέτες που αφορούν τη μιτωτική προσημείωση, έχει παρατηρηθεί πως ρυθμιστικές πρωτεΐνες φαίνεται να “καλύπτουν” τα μιτωτικά χρωμοσώματα. Ωστόσο, παρ’ όλο που οι τεχνικές μικροσκοπίας έχουν επιτρέψει την ταχεία ταυτοποίηση ρυθμιστών της μεταγραφής με δυνατότητα προσημείωσης, έχει χαρακτηριστεί εκτενώς η μιτωτική δέσμευση ορισμένων μόνο μεταγραφικών παραγόντων που είναι ειδικοί ως προς κάποια συγκεκριμένη αλληλουχία. Μεταξύ άλλων έχουν περιγραφεί και αρκετοί παράγοντες πολυδυναμίας όπως οι Esrrb, Oct4, Sox2 και Klf4 σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα.

Στην παρούσα μελέτη, αρχικά παρατηρήθηκε το πρότυπο κατανομής των μεταγραφικών παραγόντων Klf4, Nanog, Oct4, Sox2 και Max, πάνω στα μιτωτικά χρωμοσώματα μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού, σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού (E14T). Σε πρώτη φάση, μελετήθηκε η κατανομή των συγκεκριμένων παραγόντων σε εμβρυονικά κύτταρα σε φυσιολογικές συνθήκες μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού και παρατηρήθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία. Σε δεύτερη φάση, οι μεταγραφικοί παράγοντες μελετήθηκαν ύστερα από αναστολή της μιτωτικής κινάσης Haspin, με τη χρήση ειδικού αναστολέα, γνωστός ως 5-ITu, με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου της κινάσης στο πρότυπο κατανομής των μεταγραφικών παραγόντων ενδιαφέροντος κατά τη μιτωτική προσημείωση. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [160], ο αναστολέας χρησιμοποιείται στα κύτταρα θηλαστικών σε συγκεντρώσεις από 0.1μM έως 1μM. Πρόσφατες μελέτες στο εργαστήριό μας έδειξαν πως στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ο 5-ITu προκαλεί πλήρη αναστολή της H3T3ph τόσο στη μεγαλύτερη όσο στη μικρότερη συγκέντρωση, όπως φαίνεται και στην *εικόνα 4.1* (*Εικόνα 4.1*) [161]. Σημειώνεται πως στην περίπτωση του παράγοντα Max δεν ήταν διαθέσιμο κάποιο αντίσωμα για την παρατήρηση της ενδογενούς έκφρασής του.



Εικόνα 4.1. Ανίχνευση H3T3ph σε διαφορετικές φάσεις της μίτωσης μετά την επεξεργασία των κυττάρων E14T με 5-ITu (0,1μM/1,0μM, 90min). Παρατηρείται ότι το σήμα H3T3ph εξαφανίζεται με επώαση των κυττάρων με τον αναστολέα της Haspin,. Για τη χρώση του DNA χρησιμοποιήθηκε ιωδιούχο προπίδιο (PI). Κλίμακα μπάρας: 5μm [161].

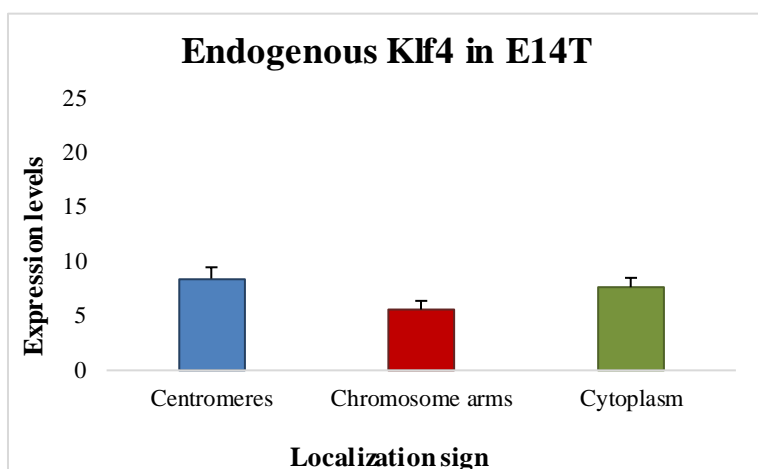
Πιο συγκεκριμένα, εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και μέσω έμμεσου ανοσοσφθορισμού χρώστηκαν με αντισώματα έναντι του παράγοντα Klf4. Στη συνέχεια, μελετήθηκαν κύτταρα καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, τόσο στη μεσόφαση, όσο και στη μίτωση. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν οι μεταγραφικοί παράγοντες ως προς τον εντοπισμό τους επάνω στη χρωματίνη. Η χρήση του αντισώματος έναντι της H3K9me3 βοήθησε ώστε να διακρίνουμε σε ποια περιοχή της χρωματίνης (ευχρωματίνη ή ετεροχρωματίνη) εντοπίζεται ο εκάστοτε μεταγραφικός παράγοντας. Αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιήθηκε σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ύστερα από επώαση τους με τον ειδικό αναστολέα της Haspin, 5-ITu.



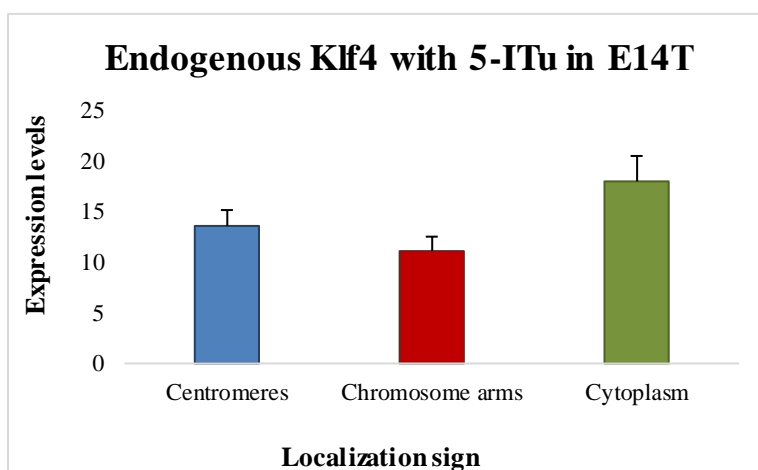
Εικόνα 4.2. Η κατανομή του μεταγραφικού παράγοντα Klf4 ενδογενώς σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Κατανομή της ενδογενούς έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Klf4 με έμμεσο ανοσοσφθορισμό κατά τη μεσόφαση και τη φάση της μίτωσης με και χωρίς 5-ITu. Κλίμακα μπάρας: 10μm (interphase, metaphase με 5-ITu) και 5μm (metaphase).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με καταγραφή της έντασης της ενδογενούς έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Klf4 σε τρεις διαφορετικές περιοχές του κυττάρου, α) στα κεντρομερίδια, β) στα χρωμοσωμικά σκέλη και γ) στο κυτταρόπλασμα. Οι τιμές έντασης έκφρασης συγκρίθηκαν με εκείνες των κυττάρων όπου η λειτουργία της Haspin έχει ανασταλεί για 24 ώρες (Εικόνα 4.3). Όπως απεικονίζεται στις εικόνες και τα διαγράμματα, η έκφραση του Klf4 δεν επηρεάζεται παρουσία του 5-ITu αναστολέα.

A.

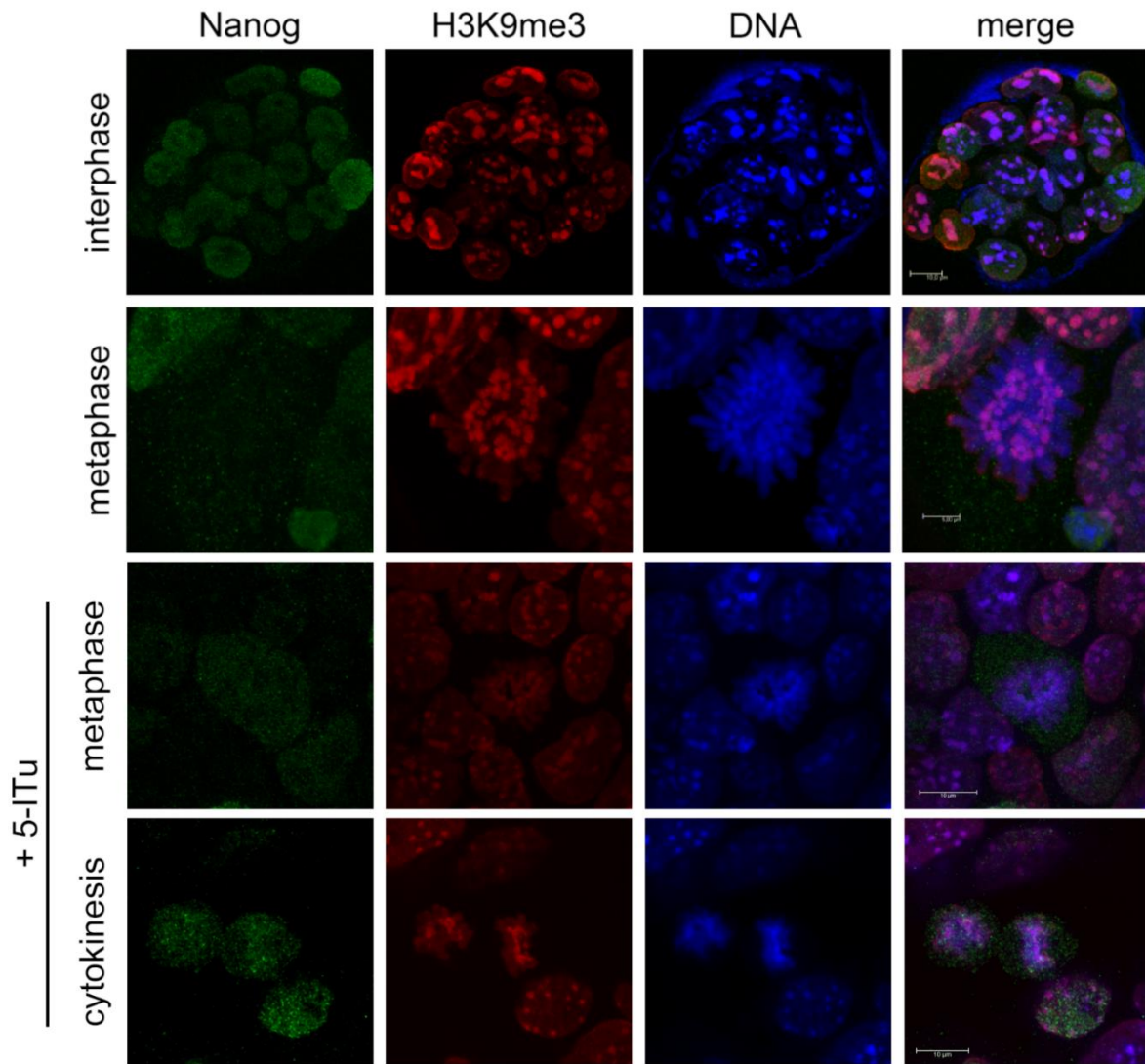


B.



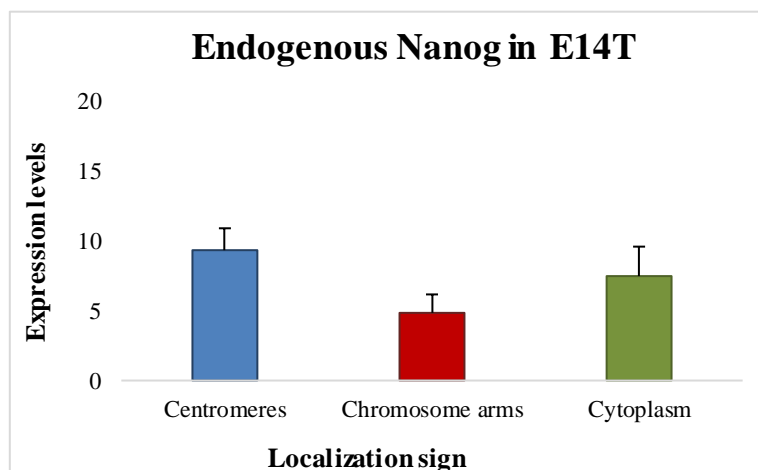
Εικόνα 4.3. Η κατανομή του μεταγραφικού παράγοντα Klf4 ενδογενώς σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Τα επίπεδα της ενδογενούς έκφρασης του Klf4 με (A) και χωρίς 5-Itu (B), μελετήθηκαν και αναλύθηκαν μέσω του προγράμματος Fiji, για τα επιμέρους διαμερίσματα που μελετώνται. Στην καταμέτρηση συμπεριλαμβάνονται 10 κύτταρα στα οποία ο Klf4 εντοπίζεται στα κεντρομερίδια (centromeres), κατά μήκος των χρωμοσωμάτων (chromosome arms) και στο κυτταρόπλασμα (cytoplasm). Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τιμή SEM των ανεξάρτητων βιολογικών πειραμάτων.

Στη συνέχεια, με αντίστοιχο τρόπο μελετήθηκε η ενδογενής έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Nanog κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, παρουσία ή μη του αναστολέα της κινάσης Haspin.

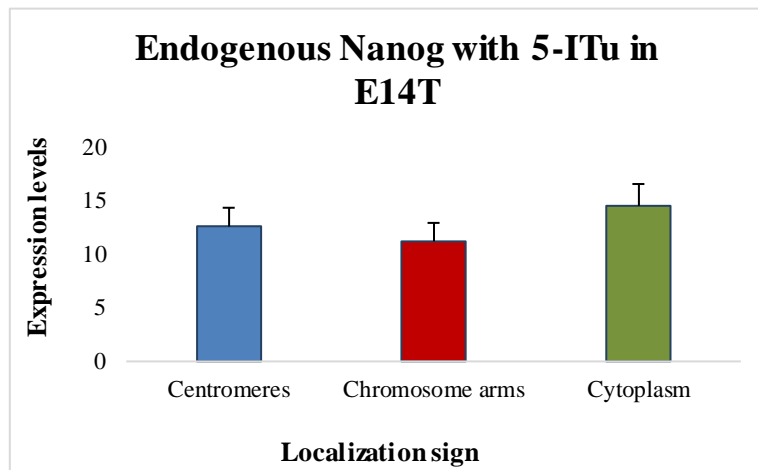


Εικόνα 4.4. Η κατανομή του μεταγραφικού παράγοντα *Nanog* ενδογενώς σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Κατανομή της ενδογενούς έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα *Nanog* με έμμεσο ανοσοφθορισμό κατά τη μεσόφαση, τη φάση της μίτωσης και της κυτταροκίνησης με και χωρίς 5-ITu. Κλίμακα μπάρας: 10 μ m (interphase, metaphase με 5-ITu, cytokinesis) και 5 μ m (metaphase).

A.

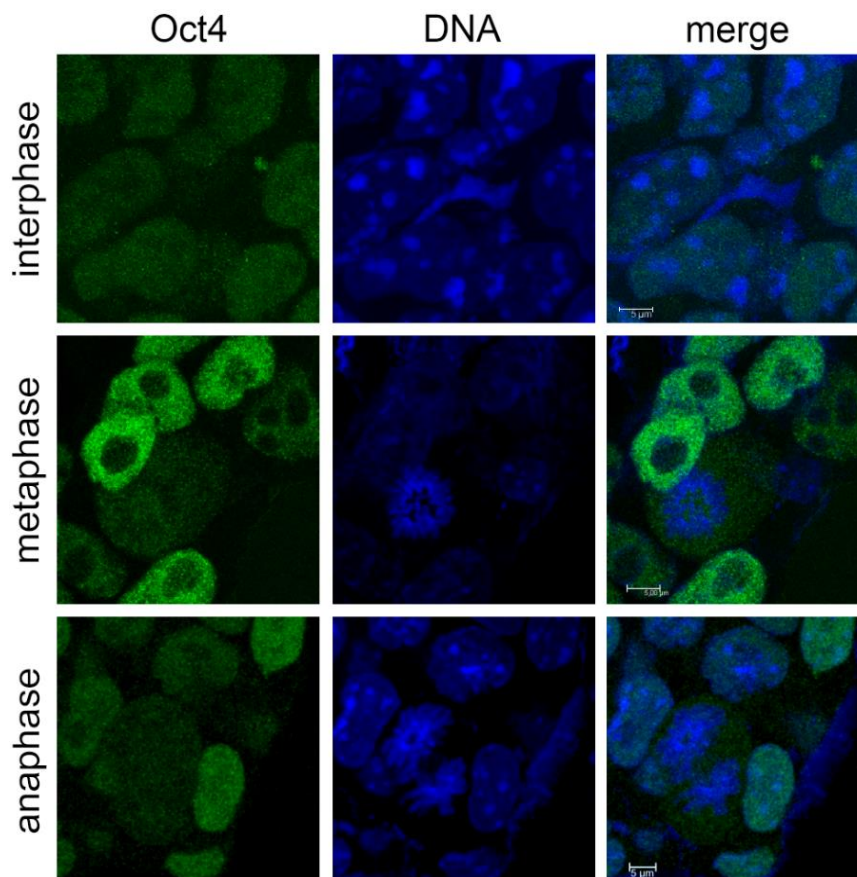


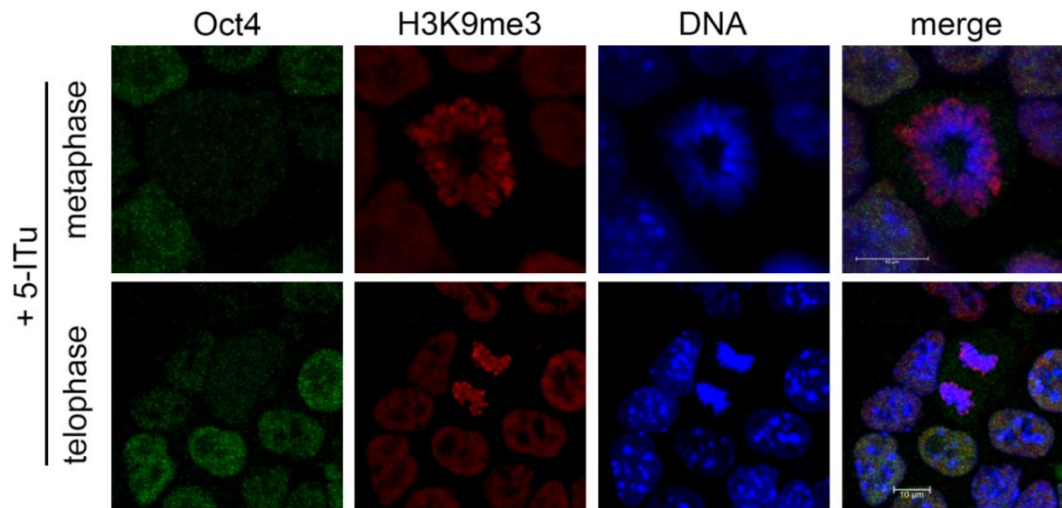
B.



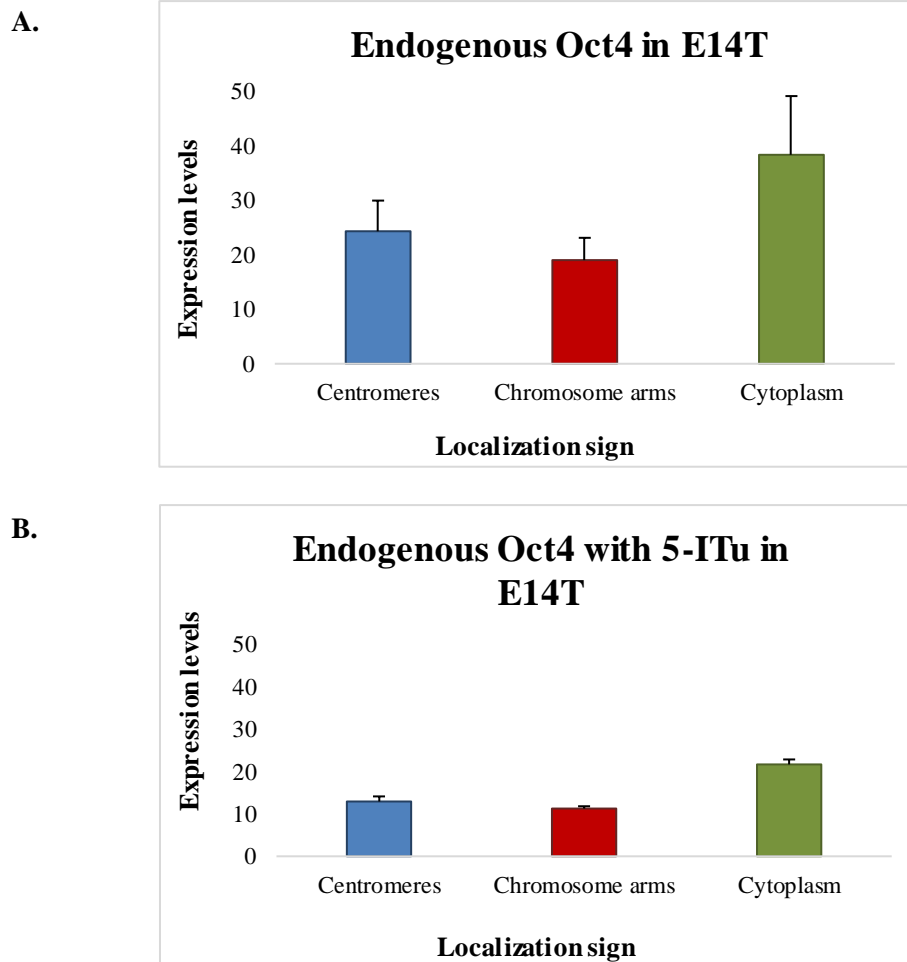
Εικόνα 4.5. Η κατανομή του μεταγραφικού παράγοντα *Nanog* ενδογενώς σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Τα επίπεδα της ενδογενούς έκφρασης του *Nanog* με (A) και χωρίς 5-*Itu* (B), μελετήθηκαν και αναλύθηκαν μέσω του προγράμματος Fiji, για τα επιμέρους διαμερίσματα που μελετώνται. Στην καταμέτρηση συμπεριλαμβάνονται $n > 10$ κύτταρα, όπου n ο αριθμός των κυττάρων, στα οποία ο *Nanog* εντοπίζεται στα κεντρομερίδια (*centromeres*), κατά μήκος των χρωμοσωμάτων (*chromosome arms*) και στο κυτταρόπλασμα (*cytoplasm*). Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τιμή SEM των ανεξάρτητων βιολογικών πειραμάτων.

Με αντίστοιχο τρόπο μελετήθηκε η ενδογενής έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Oct4 κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, παρουσία ή μη του αναστολέα της Haspin.





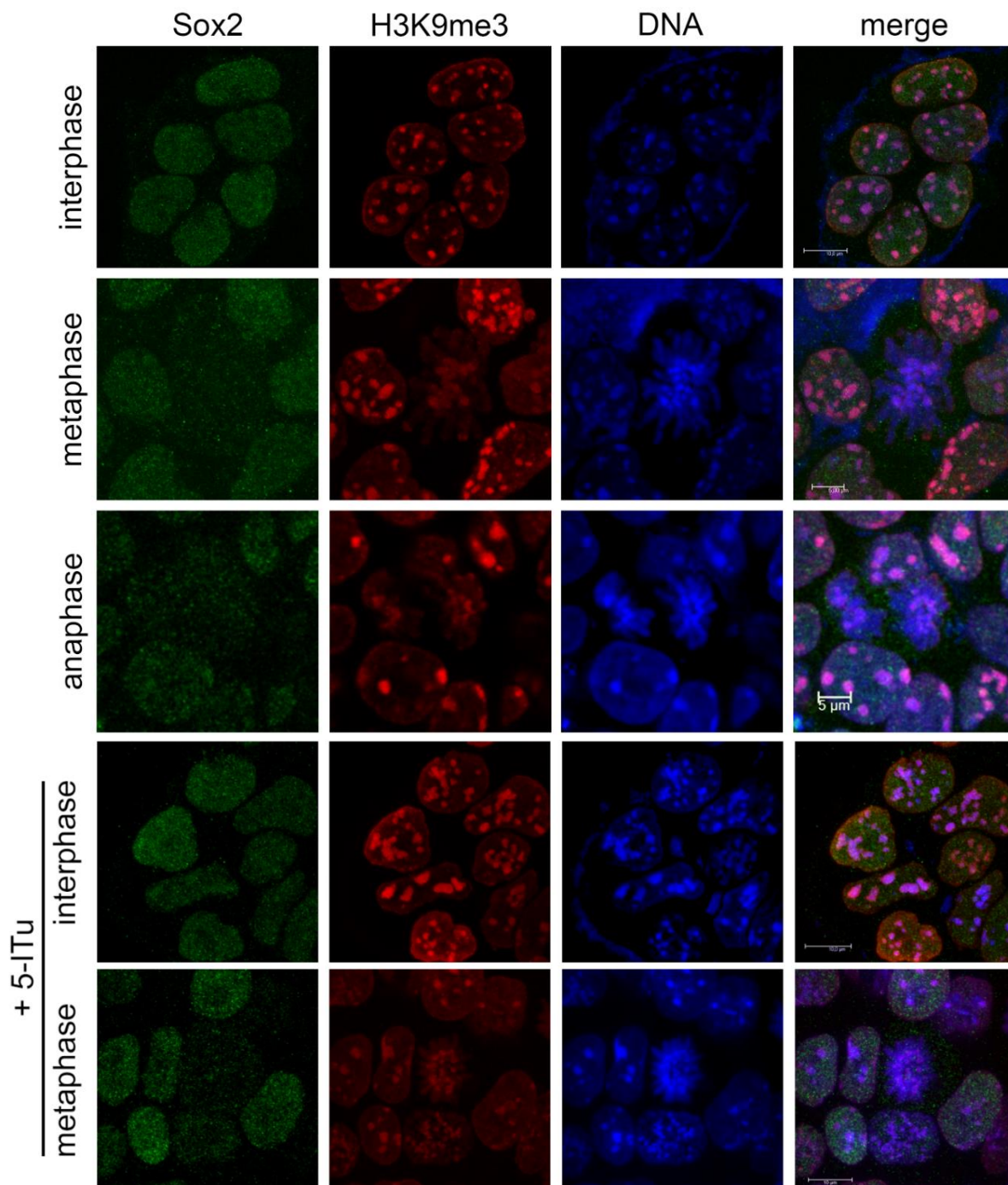
Εικόνα 4.6. Η κατανομή του μεταγραφικού παράγοντα *Oct4* ενδογενώς σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Κατανομή της ενδογενούς έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα *Oct4* με έμμεσο ανοσοφθορισμό κατά τη μεσόφαση και τη φάση της μίτωσης και της ανάφασης με και χωρίς 5-ITu. Κλίμακα μπάρας: 10μm (metaphase και telophase με 5-ITu) και 5μm (interphase, metaphase, anaphase).



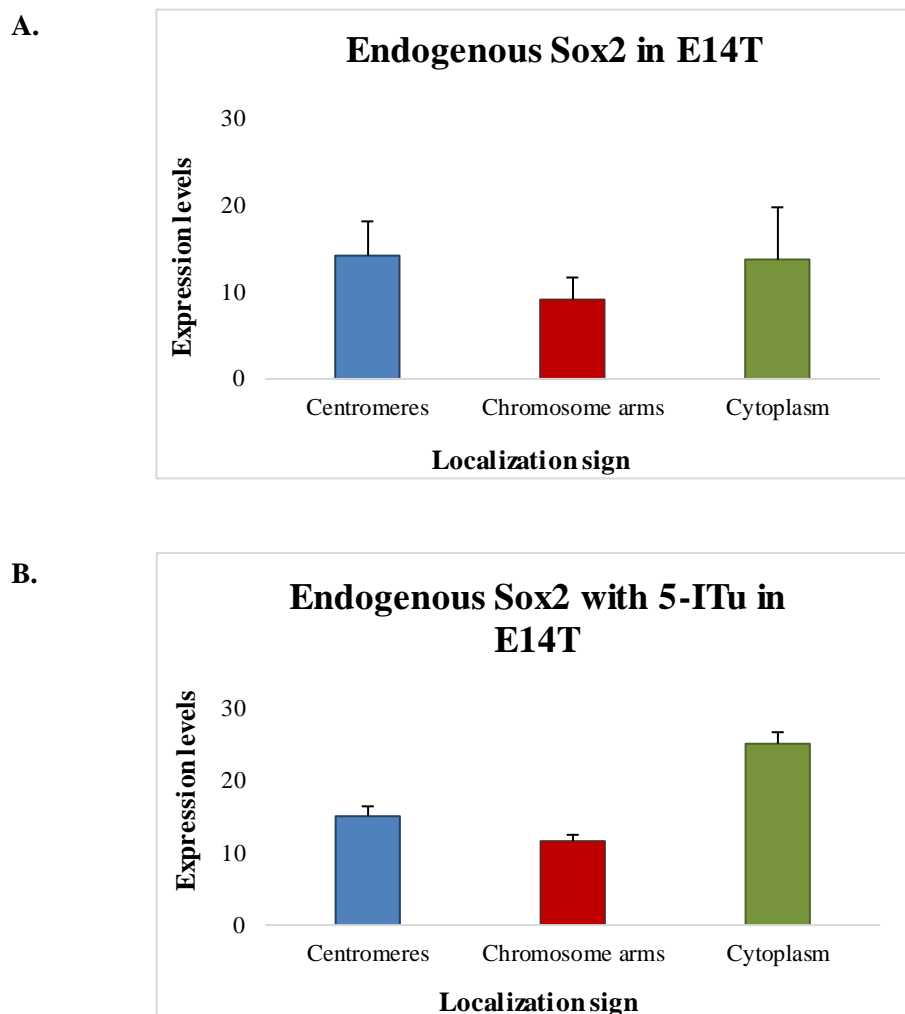
Εικόνα 4.7. Η κατανομή του μεταγραφικού παράγοντα *Oct4* ενδογενώς σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Τα επίπεδα της ενδογενούς έκφρασης του *Oct4* με και χωρίς 5-ITu, μελετήθηκαν και αναλύθηκαν μέσω του προγράμματος Fiji, για τα επιμέρους διαμερίσματα που μελετώνται. Στην καταμέτρηση

συμπεριλαμβάνονται $n > 10$ κύτταρα, όπου n ο αριθμός των κυττάρων, στα οποία ο *Oct4* εντοπίζεται στα κεντρομερίδια (*centromeres*), κατά μήκος των χρωμοσωμάτων (*chromosome arms*) και στο κυτταρόπλασμα (*cytoplasm*). Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τιμή SEM των ανεξάρτητων βιολογικών πειραμάτων.

Στη συνέχεια, με αντίστοιχο τρόπο μελετήθηκε η ενδογενής έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *Sox2* κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, παρουσία ή μη του αναστολέα της Haspin.



Εικόνα 4.8. Η κατανομή του μεταγραφικού παράγοντα Sox2 ενδογενώς σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Α) Κατανομή της ενδογενούς έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Sox2 με έμμεσο ανοσοφθορισμό κατά τη μεσόφαση και τη φάση της μίτωσης με και χωρίς 5-ITu. Κλίμακα μπάρας: 10μm (interphase, interphase και metaphase με 5-ITu) και 5μm (metaphase, anaphase).



Εικόνα 4.9. Η κατανομή του μεταγραφικού παράγοντα Sox2 ενδογενώς σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Τα επίπεδα της ενδογενούς έκφρασης του Sox2 με και χωρίς 5-ITu, μελετήθηκαν και αναλύθηκαν μέσω του προγράμματος Fiji, για τα επιμέρους διαμερίσματα που μελετώνται. Στην καταμέτρηση συμπεριλαμβάνονται $n > 10$ κύτταρα, όπου n ο αριθμός των κυττάρων, στα οποία ο Sox2 εντοπίζεται στα κεντρομερίδια (centromeres), κατά μήκος των χρωμοσωμάτων (chromosome arms) και στο κυτταρόπλασμα (cytoplasm). Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τιμή SEM των ανεξάρτητων βιολογικών πειραμάτων.

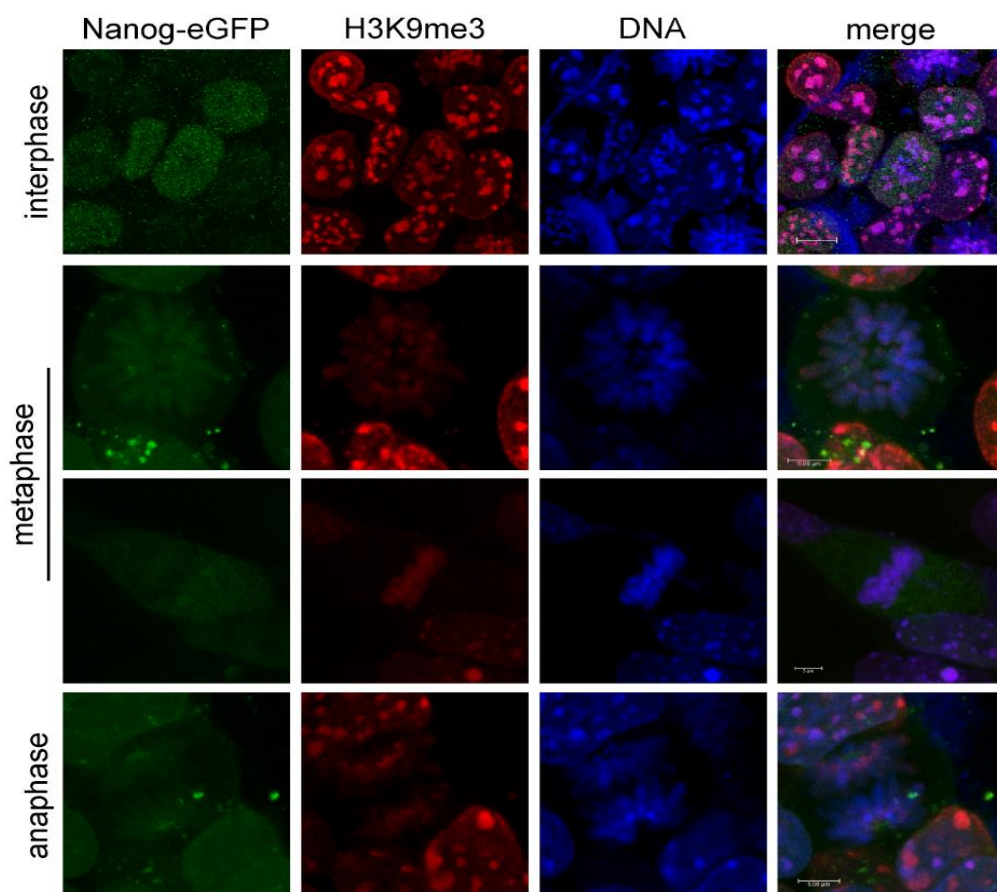
Σε αντίθεση με τις μέχρι τώρα παρατηρήσεις μας, είδαμε ότι ο εντοπισμός του μεταγραφικού παράγοντα Sox2, εμφανίζει μια μικρή μείωση στις περιοχές των κεντρομεριδίων και των χρωμοσωμικών σκελών στα κύτταρα όπου έχει ανασταλεί η δράση της Haspin. Τα δεδομένα αυτά προκύπτουν ύστερα από την καταγραφή της έντασης του Sox2, όπως αναπαρίσταται στην εικόνα 4.9.

4.1.2 Καταγραφή της κατανομής μεταγραφικών ρυθμιστών μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού (μέσω έκτοπης έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων)

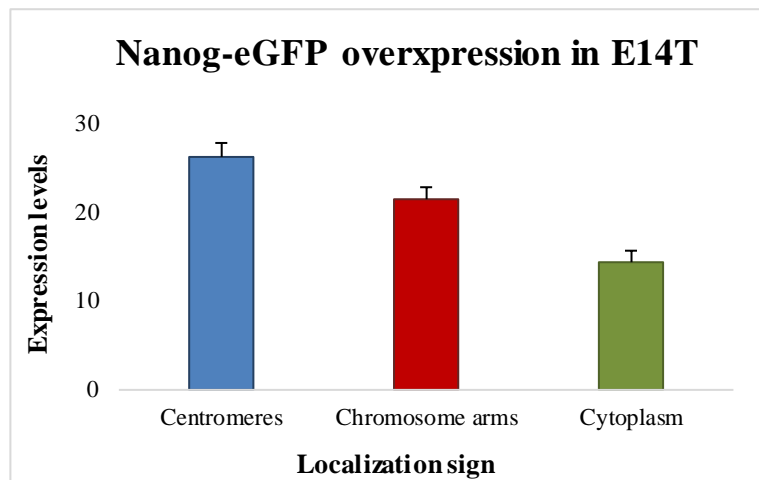
Σε δεύτερη φάση, κατασκευάστηκαν μέσω μεθόδων ανασυνδυασμού και κλωνοποίησης πλασμίδια με τις κωδικές περιοχές των γονιδίων Nanog, Oct4, Sox2 και Max τα οποία είναι συζευγμένα με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (η κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου με το γονίδιο του Klf4 δυστυχώς δεν ήταν επιτυχημένη).

Στη συνέχεια, με αυτά τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια έγινε διαμόλυνση των E14T κυττάρων στα οποία μετά από 48 ώρες καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός για τη σήμανση της χρωματίνης. Παράλληλα, κύτταρα που διαμολύνθηκαν με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια καλλιιεργήθηκαν για 24 ώρες με τον αναστολέα 5-ITu προτού μονιμοποιηθούν για τον έμμεσο ανοσοφθορισμό. Σκοπός ήταν η υπερέκφραση του κάθε μεταγραφικού παράγοντα στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ώστε να μελετηθεί το πρότυπο κατανομής τους κατά τη μιτωτική προσημείωση και κατά πόσο αυτό το πρότυπο επηρεάζεται από την αναστολή της H3T3rh. Σημειώνεται πως στην περίπτωση της υπερέκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων Nanog και Oct4 στα E14T κύτταρα σε συνδυασμό με την καλλιέργειά τους με τον αναστολέα 5-ITu, ύστερα από επαναλαμβανόμενες προσπάθειες δεν κατάφεραν να συλλεχθούν εικόνες κατάλληλες για μελέτη και επεξεργασία μέσω του προγράμματος Fiji.

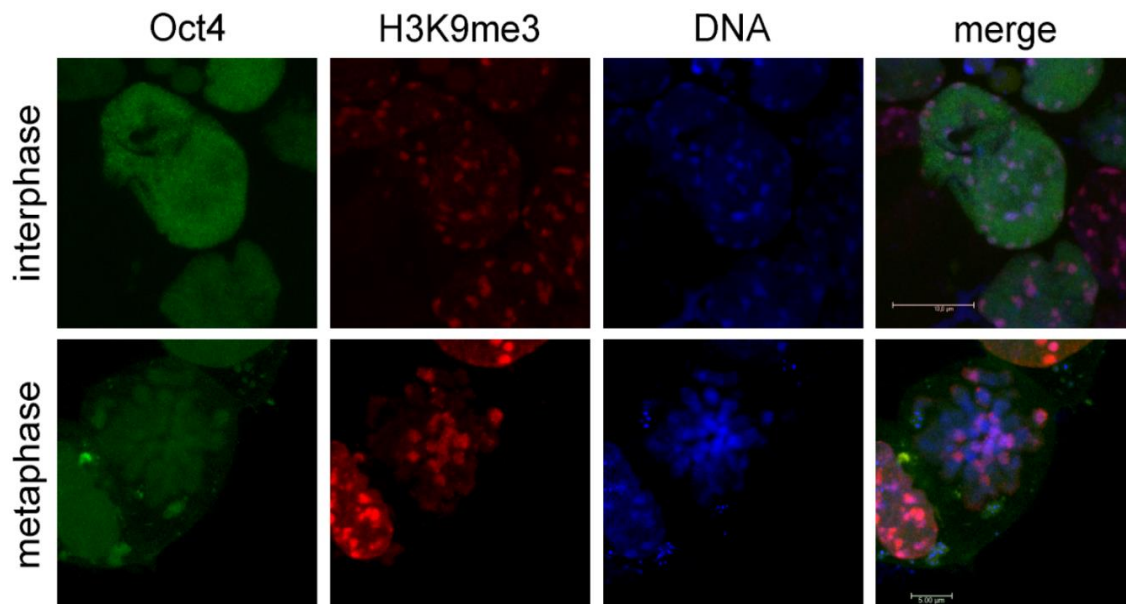
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε, όπως στα προηγούμενα πειράματα, μέσω καταγραφής της έντασης της έκφρασης του εκάστοτε μεταγραφικού παράγοντα στις περιοχές των κεντρομεριδίων, στα χρωμοσωμικά σκέλη και στο κυτταρόπλασμα.



Εικόνα 4.10. Η κατανομή μεταγραφικού παράγοντα Nanog ύστερα από υπερέκφρασή του σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Κατανομή της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Nanog με έμμεσο ανοσοφθορισμό κατά τη μεσόφαση, τη φάση της μίτωσης και της ανάφασης. Κλίμακα μπάρας: 10 μ m (interphase) και 5 μ m (metaphase, anaphase).

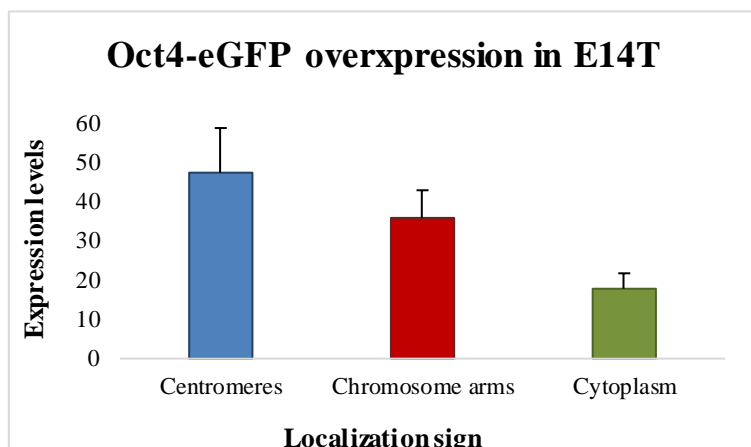


Εικόνα 4.11. Η κατανομή μεταγραφικού παράγοντα *Nanog* ύστερα από υπερέκφρασή του σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Τα επίπεδα της έκφρασης του *Nanog* ύστερα από υπερέκφρασή του, μελετήθηκαν και αναλύθηκαν μέσω του προγράμματος Fiji, για τα επιμέρους διαμερίσματα που μελετώνται. Στην καταμέτρηση συμπεριλαμβάνονται $n > 10$ κύτταρα, όπου n ο αριθμός των κυττάρων, στα οποία ο *Nanog* εντοπίζεται στα κεντρομερίδια (*centromeres*), κατά μήκος των χρωμοσωμάτων (*chromosome arms*) και στο κυτταρόπλασμα (*cytoplasm*). Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τιμή SEM των ανεξάρτητων βιολογικών πειραμάτων.



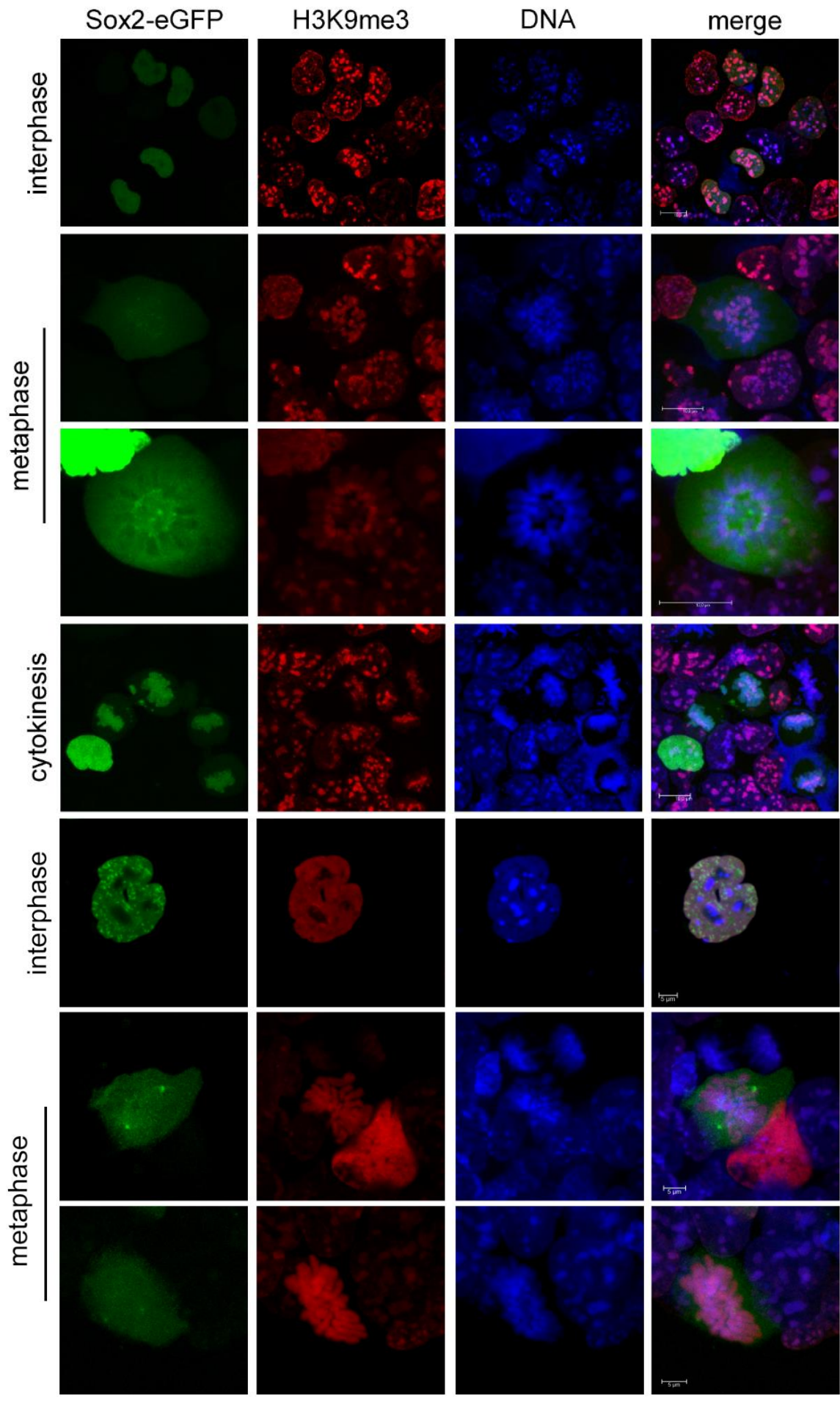
Εικόνα 4.12. Η κατανομή μεταγραφικού παράγοντα *Oct4* ύστερα από υπερέκφρασή του σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Α) Κατανομή της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα *Oct4* με έμμεσο ανοσοφθορισμό κατά τη μεσόφαση και τη φάση της μίτωσης. Κλίμακα μπάρας: 10 μm (*interphase*) και 5 μm (*metaphase*).

Στην εικόνα 4.12 απεικονίζονται μεσοφασικά και μιτωτικά κύτταρα που εκφράζουν τον παράγοντα Oct4, ύστερα από έκτοπη έκφραση.



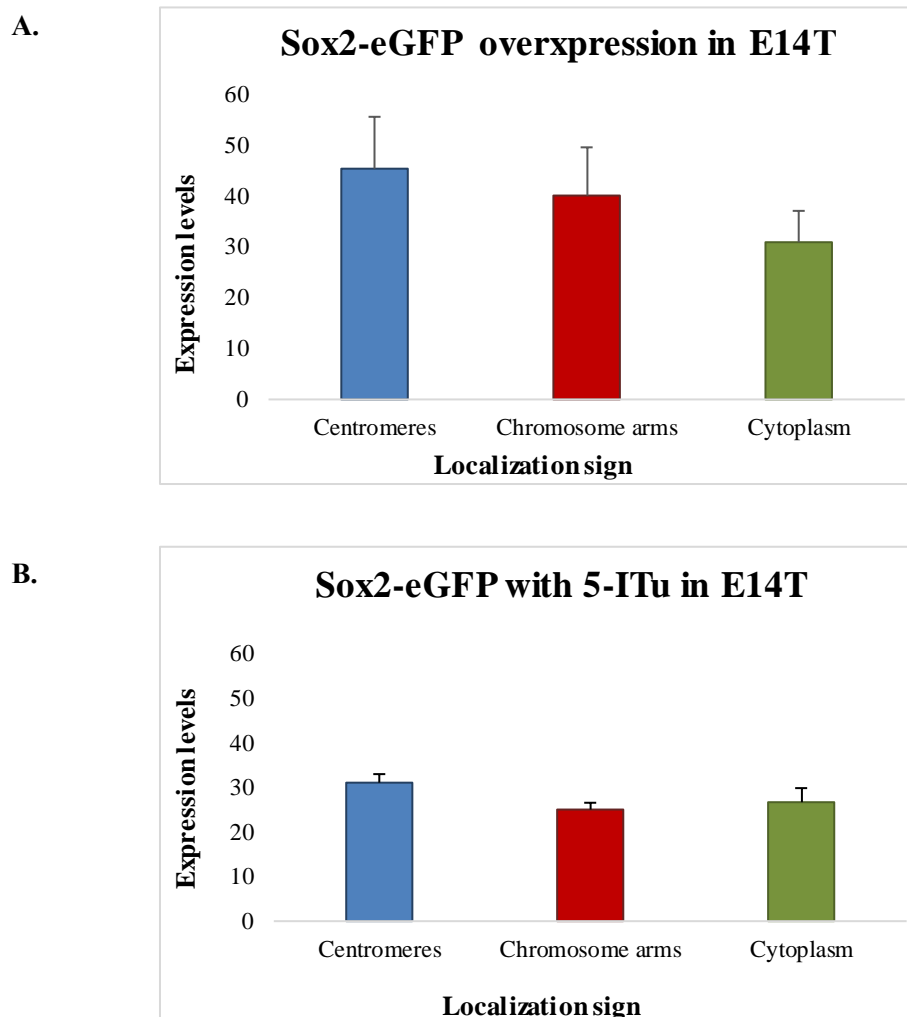
Εικόνα 4.13. Η κατανομή μεταγραφικού παράγοντα Oct4 ύστερα από υπερέκφρασή του σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Τα επίπεδα της έκφρασης του Oct4 ύστερα από υπερέκφρασή του, μελετήθηκαν και αναλύθηκαν μέσω του προγράμματος Fiji, για τα επιμέρους διαμερίσματα που μελετώνται. Στην καταμέτρηση συμπεριλαμβάνονται 10 κύτταρα, στα οποία ο Oct4 εντοπίζεται στα κεντρομερίδια (centromeres), κατά μήκος των χρωμοσωμάτων (chromosome arms) και στο κυτταρόπλασμα (cytoplasm). Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τιμή SEM των ανεξάρτητων βιολογικών πειραμάτων.

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα της εικόνας 4.13, το μεγαλύτερο ποσοστό της έκφρασης του Oct4, εντοπίζεται στα κεντρομερίδια, όπως παρατηρήσαμε και στον παράγοντα Nanog.



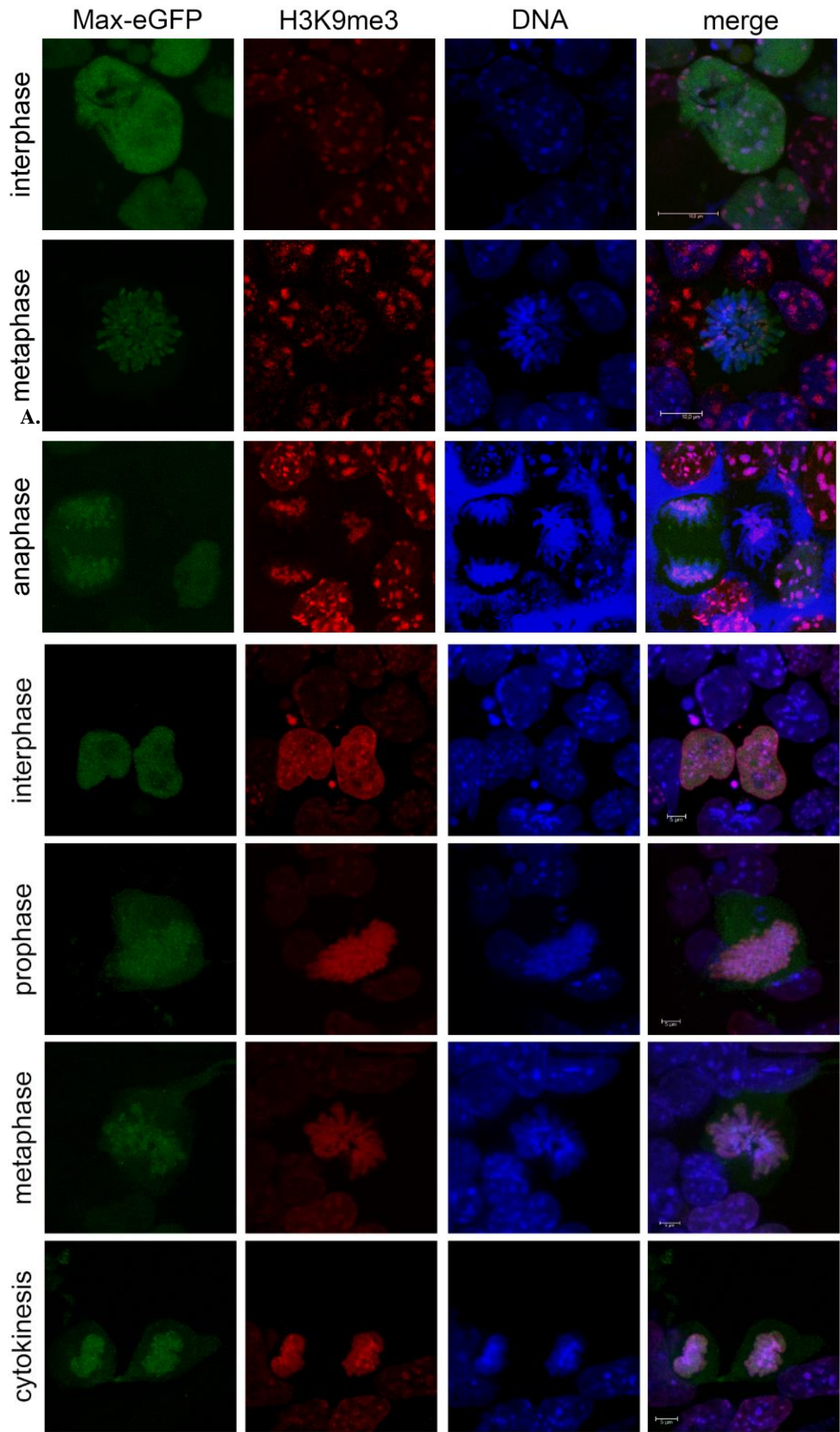
5-ITu

Εικόνα 4.14. Η κατανομή μεταγραφικού παράγοντα Sox2 ύστερα από υπερέκφρασή του σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Κατανομή της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Sox2 με έμμεσο ανοσοφθορισμό με και χωρίς 5-ITu. Κλίμακα μπάρας: 10μm (interphase, cytokinesis) και 5μm (metaphase).



Εικόνα 4.15. Η κατανομή μεταγραφικού παράγοντα Sox2 ύστερα από υπερέκφρασή του σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Τα επίπεδα της έκφρασης του Sox2 ύστερα από υπερέκφρασή του με και χωρίς 5-ITu, μελετήθηκαν και αναλύθηκαν μέσω του προγράμματος Fiji, για τα επιμέρους διαμερίσματα που μελετώνται. Στην καταμέτρηση συμπεριλαμβάνονται $n > 10$ κύτταρα, όπου n ο αριθμός των κυττάρων, στα οποία ο Sox2 εντοπίζεται στα κεντρομερίδια (centromeres), κατά μήκος των χρωμοσωμάτων (chromosome arms) και στο κυτταρόπλασμα (cytoplasm). Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τιμή SEM των ανεξάρτητων βιολογικών πειραμάτων.

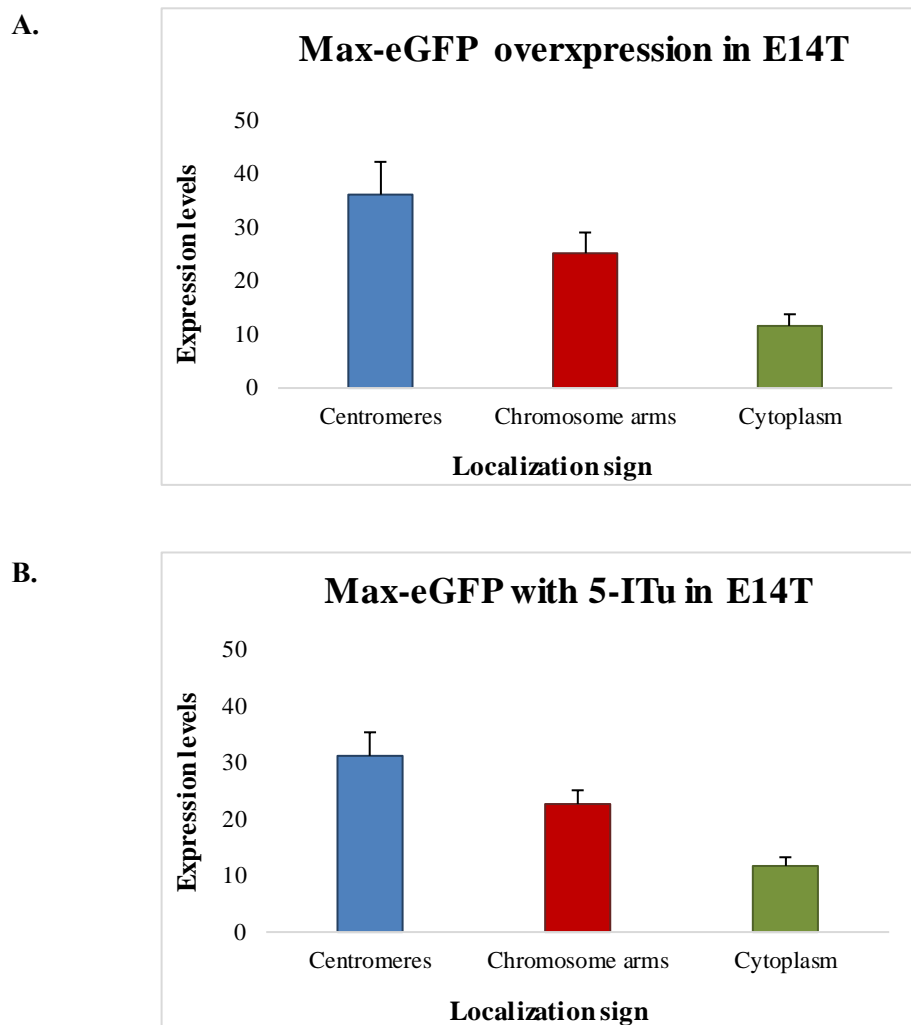
Εν συνεχεία, εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα διαμολύνθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα που φέρει τον παράγοντα Max. Οι εικόνες και οι μετρήσεις της έκφρασης του συγκεκριμένου παράγοντα απεικονίζονται στις εικόνες 4.16 και 4.17 με και χωρίς την παρουσία του αναστολέα 5-ITu.



A.

5-ITu

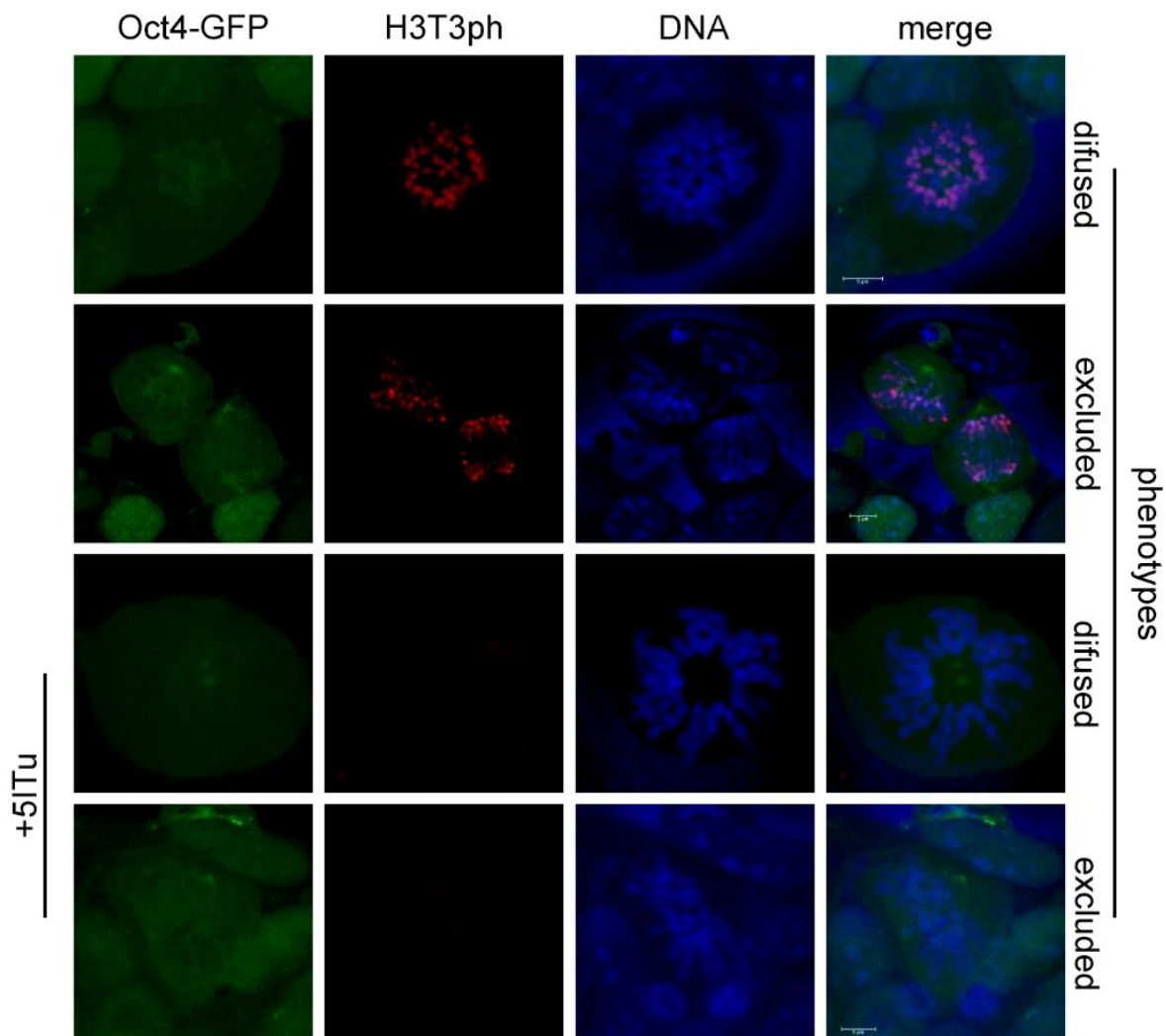
Εικόνα 4.16. Η κατανομή μεταγραφικού παράγοντα Max ύστερα από υπερέκφραση σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Κατανομή της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Max με έμμεσο ανοσοφθορισμό με και χωρίς 5-ITu. Κλίμακα μπάρας: 10μm (χωρίς 5-ITu) και 5μm (με 5-ITu).



Εικόνα 4.17. Η κατανομή μεταγραφικού παράγοντα Max ύστερα από υπερέκφραση σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Τα επίπεδα της έκφρασης του Max ύστερα από υπερέκφρασή του με και χωρίς 5-ITu, μελετήθηκαν και αναλύθηκαν μέσω του προγράμματος Fiji, για τα επιμέρους διαμερίσματα που μελετώνται. Στην καταμέτρηση συμπεριλαμβάνονται $n > 10$ κύτταρα, όπου n ο αριθμός των κυττάρων, στα οποία ο Max εντοπίζεται στα κεντρομερίδια (*centromeres*), κατά μήκος των χρωμοσωμάτων (*chromosome arms*) και στο κυτταρόπλασμα (*cytoplasm*). Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τιμή SEM των ανεξάρτητων βιολογικών πειραμάτων.

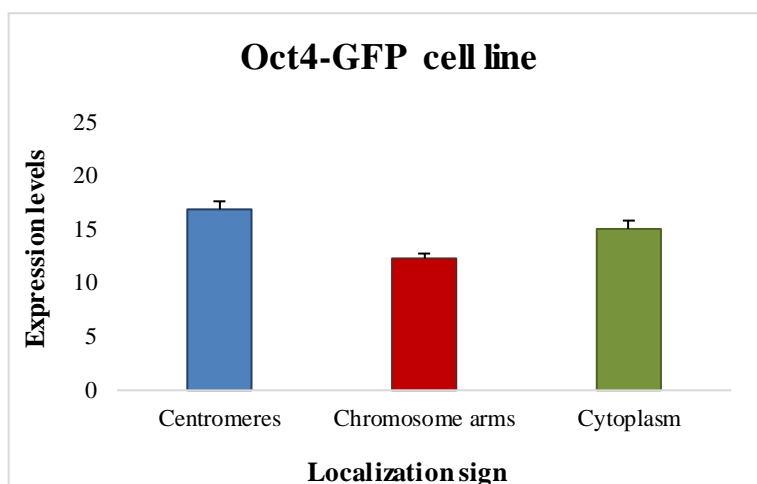
4.1.3 Καταγραφή της κατανομής του μεταγραφικού παράγοντα Oct4 σε σταθερή κυτταρική σειρά

Σε συνέχεια των προηγούμενων πειραμάτων πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός για την H3T3ph σε μία σταθερή κυτταρική σειρά εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, που διαθέτει το εργαστήριό μας, στην οποία ο μεταγραφικός παράγοντας Oct4 εκφράζεται σταθερά και είναι συζευγμένος με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP. Συνεπώς είναι εφικτή ή παρακολούθηση του εντοπισμού του εν λόγω μεταγραφικού παράγοντα οποιαδήποτε στιγμή μέσα στο κύτταρο. Ακόμη, τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν παρουσία του αναστολέα 5-ITu για 24 ώρες και έπειτα σημάνθηκαν για την H3T3ph μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού.

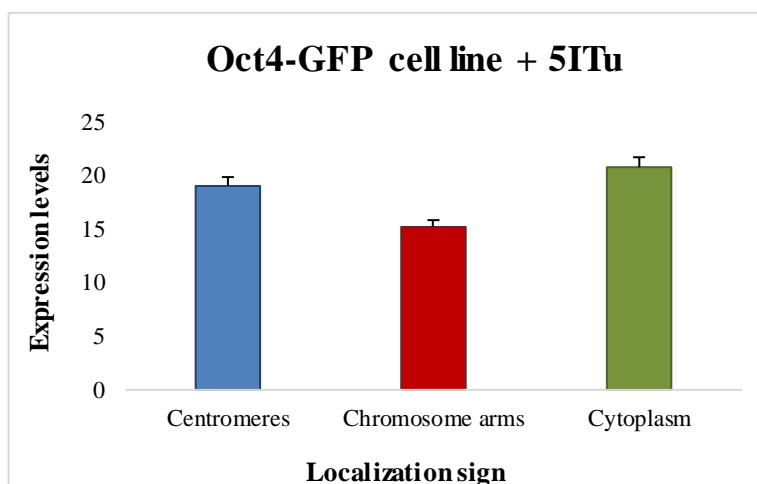


Εικόνα 4.18. Η κατανομή μεταγραφικού παράγοντα Oct4 ενδογενώς σε σταθερή κυτταρική σειρά εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων. Κατανομή της ενδογενούς έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Oct4 με έμμεσο ανοσοφθορισμό με και χωρίς 5-ITu. Κλίμακα μπάρας: 10μm (χωρίς 5-ITu) και 5μm (με 5-ITu).

A.



B.



Εικόνα 4.19. Η κατανομή μεταγραφικού παράγοντα *Oct4* ενδογενώς σε σταθερή κυτταρική σειρά εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων. Τα επίπεδα της ενδογενούς έκφρασης του *Oct4* με και χωρίς 5-ITu, μελετήθηκαν και αναλύθηκαν μέσω του προγράμματος Fiji, για τα επιμέρους διαμερίσματα που μελετώνται. Στην καταμέτρηση συμπεριλαμβάνονται $n > 10$ κύτταρα, όπου n ο αριθμός των κυττάρων, στα οποία ο *Oct4* εντοπίζεται στα κεντρομερίδια (*centromeres*), κατά μήκος των χρωμοσωμάτων (*chromosome arms*) και στο κυτταρόπλασμα (*cytoplasm*). Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τιμή SEM των ανεξάρτητων βιολογικών πειραμάτων.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έως τώρα από την μελέτη μας δεν μας οδήγησαν σε κάποιο σαφές αποτέλεσμα, για το εάν η αναστολή της Haspin είναι ικανή να επηρεάσει τη μιτωτική προσημείωση των μεταγραφικών παραγόντων Klf4, Oct4, Nanog και Max τόσο στην ενδογενή, όσο και στην έκτοπη έκφρασή τους. Οι συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες παραμένουν «προσκολλημένοι» στη χρωματίνη κατά τη διάρκεια της μίτωσης παρουσία ή μη του αναστολέα 5-ITu. Προκειμένου να μελετήσουμε περαιτέρω το συγκεκριμένο φαινόμενο στο δικό μας κυτταρικό μοντέλο, επιχειρήσαμε να παρακολουθήσουμε την πορεία των μεταγραφικών παραγόντων σε πραγματικό χρόνο, όπως θα αναλύσουμε στη συνέχεια.

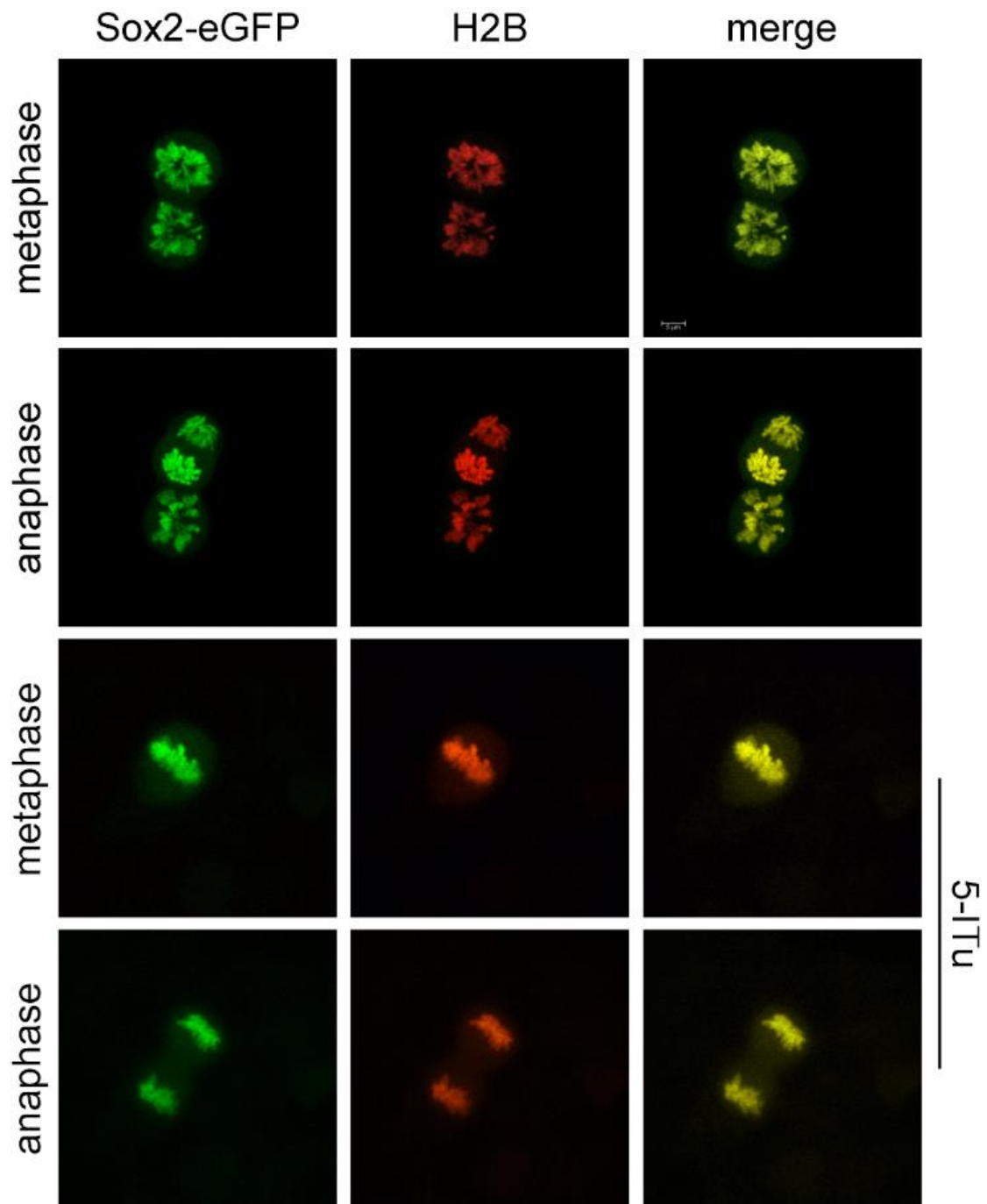
4.1.3 Καταγραφή της κατανομής μεταγραφικών ρυθμιστών σε πραγματικό χρόνο

Έρευνες σχετικά με την παραμονή των μεταγραφικών παραγόντων πάνω στη χρωματίνη κατά τη διάρκεια της μίτωσης θα απαιτούσαν πολλαπλές δοκιμές μονιμοποίησης και διασταύρωσής τους με απεικόνιση ζωντανών κυττάρων σε πραγματικό χρόνο. Πράγματι, η μονιμοποίηση μέσω φορμαλδεΰδης μπορεί να οδηγήσει, λόγω τεχνικού σφάλματος, σε εκτόπιση ορισμένων μεταγραφικών παραγόντων από τα μιτωτικά χρωμοσώματα, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [12, 112].

Για το λόγο αυτό, με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που προαναφέρθηκαν έγινε διαμόλυνση των E14T κυττάρων και κατόπιν από 48 ώρες καλλιέργειας τα κύτταρα παρατηρήθηκαν ζωντανά στο συνεστιακό μικροσκόπιο σε ειδικά τρυβλία. Παράλληλα, κύτταρα που διαμολύνθηκαν με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες με τον αναστολέα 5-ITu προτού πραγματοποιηθεί η απεικόνιση τους σε πραγματικό χρόνο. Σκοπός ήταν να εξακριβωθεί εάν πράγματι η μονιμοποίηση των κυττάρων επηρεάζει τον εντοπισμό των ΜΠ και να συγκριθούν με τα αποτελέσματα από την απεικόνιση των ζωντανών κυττάρων. Σημειώνεται πως για τους μεταγραφικούς παράγοντες Klf4, Nanog, Oct4 και Max οι προσπάθειες απεικόνισης ζωντανών κυττάρων ύστερα από την έκτοπη έκφρασή των παραγόντων δεν είχαν επιτυχή αποτελέσματα.

Η μιτωτική διατήρηση των μεταγραφικών παραγόντων δε συνδέεται άμεσα με μια λειτουργία προσημείωσης. Πιο συγκεκριμένα, το γεγονός ότι κάποιος παράγοντας παραμένει πάνω στα χρωμοσώματα κατά τη μίτωση δε σημαίνει ότι είναι και προσημειωμένος, δηλαδή ότι ανήκει στη «μνήμη» του προτύπου κατανομής. Για να αποδειχθεί ακράδαντα ότι ένας μιτωτικά διατηρημένος παράγοντας εμπλέκεται στη «μνήμη», πρέπει να εξεταστούν οι συνέπειες της παροδικής διαγραφής του, κατά τη μίτωση, στη δυναμική της μετα-μιτωτικής μεταγραφικής ενεργοποίησης. Τέτοιου είδους πειράματα είναι πολλά υποσχόμενα και μέχρι στιγμής δεν έχουν πραγματοποιηθεί σε έμβρυα. Ωστόσο, πειράματα τύπου knock-down σε υπογήφιους παράγοντες μιτωτικής προσημείωσης, έχουν πραγματοποιηθεί σε κύτταρα συγχρονισμένα στη μίτωση [11, 27, 162]. Η διαγραφή του αιματοποιητικού παράγοντα μεταγραφής GATA1 κατά τη μιτωτική φάση σε πρόδρομα κύτταρα ερυθροειδούς καθυστερεί την επανενεργοποίηση προσημειωμένων γονιδίων που θα καθορίσουν το γενεαλογικό τύπο αυτών των κυττάρων [38].

Παρατήρηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων σε πραγματικό χρόνο πραγματοποιήθηκε ύστερα από διαμόλυνση τους με τον πλασμιδιακό φορέα που φέρει τον παράγοντα Sox2, παρουσία ή μη του 5-ITu αναστολέα. Στιγμιότυπα φαίνονται στην *εικόνα 4.20*. Συνδιαμόλυνση των κυττάρων με πλασμιδιακό φορέα που φέρει την ιστόνη H2B συζευγμένη με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry, διευκόλυνε την παρατήρηση των κυττάρων κατά τη διάρκεια της καταγραφής των στιγμιότυπων.



Εικόνα 4.20. Η κατανομή μεταγραφικού παράγοντα Sox2 ύστερα από υπερέκφρασή του σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα σε απεικόνιση ζωντανών κυττάρων. Κατανομή της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Sox2 σε απεικόνιση ζωντανών κυττάρων με και χωρίς 5-ITu. Κλίμακα μπάρας: 5μm.

Η παραπάνω εικόνα δείχνει πως ο μεταγραφικός παράγοντας Sox2 εξακολουθεί να εντοπίζεται στην περιοχή των χρωμοσωμάτων τόσο παρουσία όσο και απουσία της λειτουργίας της Haspin. Τα αποτελέσματα αυτά, αν και δεν είναι πλήρως ολοκληρωμένα, έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των μονιμοποιημένων κυττάρων.

5. Συζήτηση

Οι παράγοντες μιτωτικής προσημείωσης, όπως έχει ήδη συζητηθεί, γενικά θεωρούνται ως επιταχυντές της επανενεργοποίησης γονιδίων κατά την είσοδο του κυττάρου στη μεσοφάση και, γενικά ελέγχουν ένα υποσύνολο γονιδίων στόχων που καθορίζουν τη μοριακή ταυτότητα του κυττάρου. Επιπλέον, έχουν προταθεί πρόσθετες λειτουργίες για τους δεσμευμένους μεταγραφικούς παράγοντες στη μιτωτική χρωματίνη, είτε αυτές αφορούν την προετοιμασία των κυττάρων για τη μελλοντική επιλογή της ταυτότητάς τους, είτε για τον έλεγχο άλλων ιδιοτήτων της χρωματίνης.

Παράλληλα, η μιτωτική κινάση Haspin εμπλέκεται σε μια ποικιλία μιτωτικών διαδικασιών, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η ευθυγράμμιση των χρωμοσωμάτων, η διασύνδεση των κεντρομεριδίων στις αδελφές χρωματίδες και η συγκρότηση της μιτωτικής ατράκτου. Σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριό μας αποδεικνύεται ότι, παρά τη συμμετοχή της σε όλες αυτές τις διαδικασίες, η Haspin δεν είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της πολυδυναμίας και την έκπτωση των ESCs υπό συνθήκες *in vitro* καλλιέργειας [161]. Ωστόσο, είναι πιθανό ότι η έλλειψη της Haspin εν μέρει να αντισταθμίζεται από έναν μηχανισμό που περιλαμβάνει την κινάση Bub1. Είναι γνωστό ότι η Bub1 φωσφορυλιώνει την ιστόνη H2A στη θρεονίνη-120 (H2AT120ph), δημιουργώντας μια θέση πρόσδεσης για τις Sgo1/2. Οι πρωτεΐνες αυτές συνδέονται με τη Borealin, με αποτέλεσμα την πρόσδεση του CPC στο εγγύς κεντρομερές/κινητοχώρο [126, 163].

Καθώς, λοιπόν, τόσο η Haspin όσο και οι παράγοντες προσημείωσης συναντώνται στη μίτωση θα ήταν ενδιαφέρουσα η μελέτη κάποιας πιθανής συσχέτισης μεταξύ των στοιχείων αυτών για την επιτέλεση των προαναφερθέντων διαδικασιών. Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τον εντοπισμό της κατανομής των μεταγραφικών ρυθμιστών Klf4, Nanog, Oct4, Sox2 και Max κατά τη διάρκεια της μίτωσης ύστερα από αναστολή της μιτωτικής κινάσης Haspin. Πράγματι, με τα αποτελέσματα που προέκυψαν τόσο από τα πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού όσο και από τα πειράματα της απεικόνισης ζωντανών κυττάρων στα ESCs ποντικού, φαίνεται ο αναστολέας να μην επηρεάζει την κατανομή των ΜΠ που εξετάστηκαν. Πιο συγκεκριμένα, η απεικόνιση του προτύπου κατανομής των Klf4, Nanog, Oct4 και Sox2, όπως αυτοί εκφράζονται ενδογενώς, στα ESCs εμφανίζεται ίδια στις περιπτώσεις με και χωρίς τον αναστολέα της Haspin. Ωστόσο, επιθυμώντας να επιβεβαιωθεί ένα τέτοιο αποτέλεσμα πραγματοποιήθηκε η διαμόλυνση των κυττάρων αυτών με πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν αυτούς τους ΜΠ. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την έκτοπη έκφραση αυτών των παραγόντων δε διαφέρουν από αυτά της ενδογενούς. Πιθανώς, η ανάλυση περισσότερων κυττάρων σε κάθε περίπτωση που μελετήθηκε ίσως δώσει ένα πιο ξεκάθαρο αποτέλεσμα. Εντούτοις, περεταίρω παρόμοια πειράματα θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν σε μία σταθερή κυτταρική σειρά ESCs που διατίθεται στο εργαστήριο και στην οποία έχει απαλειφεί το γονίδιο της Haspin, ως επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της δράσης του αναστολέα.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί στην εισαγωγή, έχει αποδειχθεί πως μόνο ένα υποσύνολο των παραγόντων μιτωτικής προσημείωσης παραμένει δεσμευμένο στην αλληλουχία στόχο του κατά τη μίτωση: αυτοί οι παράγοντες εμφανίζουν μία επιλεκτικότητα στην πρόσδεση η οποία κυμαίνεται από 10% των στόχων για προσημείωση (Gata1, FoxA1 και Esrrb) έως 40 με 70% (Myc, Klf4, Sox2 και Oct4). Ακόμη, για τους περισσότερους από αυτούς τους παράγοντες (Gata1, FoxA1, Esrrb και Myc) η δέσμευσή τους εμφανίζεται χαμηλότερη κατά τη φάση της μίτωσης σε σύγκριση με αυτήν κατά τη διάρκεια της μεσόφασης. Επομένως, δεν θα πρέπει να αγνοήσουμε το γεγονός πως είναι πιθανό να επηρεάζεται ένα μικρό υποσύνολο των κυττάρων

και όχι το σύνολο του πληθυσμού. Μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων προς μελέτη και βελτιστοποίηση της μεθόδου παρατήρησης είναι κάποιες μελλοντικές προτάσεις για τη μελέτη της μιτωτικής προσημείωσης στο μοντέλο των συγκεκριμένων εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι, η μονιμοποίηση των κυττάρων με αλδεΐδες (που προηγείται της ανοσο-σήμανσης) προκαλεί η ίδια την αποσύνδεση διάφορων ρυθμιστικών πρωτεϊνών από τη μιτωτική χρωματίνη [12]. Για παράδειγμα, ο GATA1, ένας κύριος ρυθμιστής για την παραγωγή κυττάρων της ερυθροειδούς σειράς, είχε προηγουμένως αναφερθεί ότι αποκλείεται από τα μιτωτικά χρωμοσώματα με ανοσοφθορισμό [164]. Μερικά χρόνια αργότερα, η ομάδα του Blobel έδειξε, μέσω απεικόνισης ζωντανών κυττάρων και ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης, ότι ο GATA1, στην πραγματικότητα, παρέμεινε δεσμευμένος στις περιοχές-στόχους του κατά τη διάρκεια της μίτωσης [38]. Όπως αναφέρθηκε, χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός απεικόνισης μονιμοποιημένων έναντι ζωντανών κυττάρων. Ως αποτέλεσμα αναφέρουμε ότι ο ευρέως παρατηρούμενος αποκλεισμός των ΜΠ από τα μιτωτικά χρωμοσώματα, στην παρούσα μελέτη, οφείλεται κυρίως σε τεχνικό σφάλμα λόγω μονιμοποίησης των κυττάρων με φορμαλδεΐδη. Το Sox2, για παράδειγμα, φαίνεται είτε να αποκλείεται από τα χρωμοσώματα είτε να δίνει ένα πιο διάχυτο σήμα μετά από τη χημική μονιμοποίηση μέσω φορμαλδεΐδης, αλλά είναι πολύ εμπλουτισμένο στα μιτωτικά χρωμοσώματα όπως προσδιορίζεται από την απεικόνιση των ζωντανών κυττάρων.

Η απαλοιφή της Haspin στα ESCs δεν προκαλεί μείζονες αλλαγές στη διαδικασία της αυτό-ανανέωσης, αλλά επηρεάζει την έκφραση πολλών γονιδίων, όπως αποδεικνύεται με αλληλούχηση RNA (RNAseq) [161]. Έτσι, το ερώτημα που προκύπτει είναι εάν η αλλαγή του προτύπου γονιδιακής έκφρασης οφείλεται στη μη έγκαιρη ή την «άναρχη» (επανα)ενεργοποίηση προσημειωμένων γονιδίων μετά το τέλος της κυτταρικής διαίρεσης. Απαραίτητες γίνονται, λοιπόν, περαιτέρω μελέτες που αφορούν την ενεργοποίηση των γονιδίων αμέσως μετά την μίτωση στα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν. Για παράδειγμα μπορεί να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος του παράγοντα TAF3 (μέρος του συμπλέγματος TFIIID) ο οποίος αναγνωρίζει την H3K4me3, καθώς αυτή η μεθυλίωση αποτελεί ιστονικό σημάδι που σχετίζεται με ενεργά μεταγραφικά γονίδια [165]. Ενώ, ακόμη μπορούν να ελεγχθούν παράγοντες οι οποίοι επάγουν ιστο-ειδικά γονίδια, σαν τον FoxA1, που συναντάται σε προγονικά ηπατικά κύτταρα [36] ή, και παράγοντες οι οποίοι επάγουν την έκφραση γονιδίων κατά τη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, δηλαδή αμέσως μετά τη μίτωση, όπως είναι π.χ. οι Jun και Fos [166]. Ωστόσο, όπως συζητήθηκε παραπάνω, κατά τη διάρκεια της μίτωσης η φωσφορυλίωση των ιστονών είναι μια συνήθης επιγενετική τροποποίηση, η οποία σε ορισμένες περιπτώσεις αποτελεί εμπόδιο για την πρόσδεση ΜΠ, όπως οι TFIIID [80]. Συνεπώς, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διαχωριστεί η λειτουργία τέτοιων ρυθμιστών χρωματίνης κατά τη διάρκεια της μίτωσης και να δοθεί φως στον πιθανό ρόλο τους στη διατήρηση της προσβασιμότητας του DNA και της αναδιαμόρφωσης των νουκλεοσωμάτων.

6. Βιβλιογραφία

1. Bellec, Maëlle, Ovidiu Radulescu, and Mounia Lagha. "Remembering the past: Mitotic bookmarking in a developing embryo." *Current opinion in systems biology* 11 (2018): 41-49.
2. Darzynkiewicz, Z., et al. "Different sensitivity of DNA in situ in interphase and metaphase chromatin to heat denaturation." *The Journal of cell biology* 73.1 (1977): 128-138.
3. Darzynkiewicz, Z., et al. "Interphase and metaphase chromatin: Different stainability of DNA with acridine orange after treatment at low pH." *Experimental cell research* 110.1 (1977): 201-214.
4. Juan, Gloria, Wen Pan, and Zbigniew Darzynkiewicz. "DNA segments sensitive to single-strand-specific nucleases are present in chromatin of mitotic cells." *Experimental cell research* 227.2 (1996): 197-202.
5. Gazit, Bruria, et al. "Active genes are sensitive to deoxyribonuclease I during metaphase." *Science* 217.4560 (1982): 648-650.
6. Martínez-Balbás, Marian A., et al. "Displacement of sequence-specific transcription factors from mitotic chromatin." *Cell* 83.1 (1995): 29-38.
7. Festuccia, Nicola, et al. "Mitotic bookmarking in development and stem cells." *Development* 144.20 (2017): 3633-3645.
8. Festuccia, Nicola, et al. "Mitotic binding of Esrrb marks key regulatory regions of the pluripotency network." *Nature cell biology* 18.11 (2016): 1139-1148.
9. Liu, Yiyuan, et al. "Widespread mitotic bookmarking by histone marks and transcription factors in pluripotent stem cells." *Cell reports* 19.7 (2017): 1283-1293.
10. Yang, Jingping, et al. "A subset of Drosophila Myc sites remain associated with mitotic chromosomes colocalized with insulator proteins." *Nature communications* 4.1 (2013): 1-9.
11. Deluz, Cédric, et al. "A role for mitotic bookmarking of SOX2 in pluripotency and differentiation." *Genes & development* 30.22 (2016): 2538-2550.
12. Teves, Sheila S., et al. "A dynamic mode of mitotic bookmarking by transcription factors." *Elife* 5 (2016): e22280.
13. Alberts, B. et al. *Molecular Biology of the Cell* (Garland, New York and London, 1994).
14. Weintraub, H. Assembly and propagation of repressed and depressed chromosomal states. *Cell* 42, 705–711 (1985).
15. Spitz, François, and Eileen EM Furlong. "Transcription factors: from enhancer binding to developmental control." *Nature reviews genetics* 13.9 (2012): 613-626.
16. Holtzer, H., et al. "The cell cycle, cell lineages, and cell differentiation." *Current topics in developmental biology* 7 (1972): 229-256.
17. Soufi, Abdenour, and Stephen Dalton. "Cycling through developmental decisions: how cell cycle dynamics control pluripotency, differentiation and reprogramming." *Development* 143.23 (2016): 4301-4311.
18. Alabert, Constance, and Anja Groth. "Chromatin replication and epigenome maintenance." *Nature reviews Molecular cell biology* 13.3 (2012): 153-167.

19. Chen, Xinyue, Amaleah Hartman, and Shangqin Guo. "Choosing cell fate through a dynamic cell cycle." *Current Stem Cell Reports* 1.3 (2015): 129-138.
20. Steffen, Philipp A., and Leonie Ringrose. "What are memories made of? How Polycomb and Trithorax proteins mediate epigenetic memory." *Nature reviews molecular cell biology* 15.5 (2014): 340-356.
21. Owens, Nick, et al. "CTCF confers local nucleosome resiliency after DNA replication and during mitosis." *Elife* 8 (2019): e47898.
22. de Castro, Ines J., Ezgi Gokhan, and Paola Vagnarelli. "Resetting a functional G1 nucleus after mitosis." *Chromosoma* 125.4 (2016): 607-619.
23. Hirano, Tatsuya. "Chromosome dynamics during mitosis." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7.6 (2015): a015792.
24. Michelotti, Emil F., Suzanne Sanford, and David Levens. "Marking of active genes on mitotic chromosomes." *Nature* 388.6645 (1997): 895-899.
25. Ma, Yiqin, Kiriaki Kanakousaki, and Laura Buttitta. "How the cell cycle impacts chromatin architecture and influences cell fate." *Frontiers in genetics* 6 (2015): 19.
26. Maeshima, Kazuhiro, and Mikhail Eltsov. "Packaging the genome: the structure of mitotic chromosomes." *Journal of biochemistry* 143.2 (2008): 145-153.
27. Palozola, Katherine C., et al. "Mitotic transcription and waves of gene reactivation during mitotic exit." *Science* 358.6359 (2017): 119-122.
28. Wang, Fangwei, and Jonathan MG Higgins. "Histone modifications and mitosis: countermarks, landmarks, and bookmarks." *Trends in cell biology* 23.4 (2013): 175-184.
29. Natoli, Gioacchino. "Maintaining cell identity through global control of genomic organization." *Immunity* 33.1 (2010): 12-24.
30. Gottesfeld, Joel M., and Douglass J. Forbes. "Mitotic repression of the transcriptional machinery." *Trends in biochemical sciences* 22.6 (1997): 197-202.
31. Gillette, Thomas G, and Joseph A Hill. "Readers, writers, and erasers: chromatin as the whiteboard of heart disease." *Circulation research* vol. 116,7 (2015): 1245-53.
32. Jenuwein, Thomas, and C. David Allis. "Translating the histone code." *Science* 293.5532 (2001): 1074-1080.
33. Kouskouti, Antigone, and Iannis Talianidis. "Histone modifications defining active genes persist after transcriptional and mitotic inactivation." *The EMBO journal* 24.2 (2005): 347-357.
34. Margueron, Raphaël, and Danny Reinberg. "Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information." *Nature Reviews Genetics* 11.4 (2010): 285-296.
35. Zaidi, Sayyed K., et al. "Mitotic bookmarking of genes: a novel dimension to epigenetic control." *Nature reviews genetics* 11.8 (2010): 583-589.
36. Caravaca, Juan Manuel, et al. "Bookmarking by specific and nonspecific binding of FoxA1 pioneer factor to mitotic chromosomes." *Genes & development* 27.3 (2013): 251-260.
37. Kadauke, Stephan, and Gerd A. Blobel. "Mitotic bookmarking by transcription factors." *Epigenetics & chromatin* 6.1 (2013): 1-10.

38. Kadauke, Stephan, et al. "Tissue-specific mitotic bookmarking by hematopoietic transcription factor GATA1." *Cell* 150.4 (2012): 725-737.
39. Zaret, Kenneth S., and Jason S. Carroll. "Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression." *Genes & development* 25.21 (2011): 2227-2241.
40. Martienssen, Robert A., and Eric J. Richards. "DNA methylation in eukaryotes." *Current opinion in genetics & development* 5.2 (1995): 234-242.
41. Groudine, Mark, and Harold Weintraub. "Propagation of globin DNAase I-hypersensitive sites in absence of factors required for induction: a possible mechanism for determination." *Cell* 30.1 (1982): 131-139.
42. Carlberg, Carsten, and Ferdinand Molnár. "Chromatin Modifiers." *Mechanisms of Gene Regulation*. Springer, Dordrecht, 2014. 125-141.
43. Reik, Wolf. "Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development." *Nature* 447.7143 (2007): 425-432.
44. Steffen, P., Ringrose, L. What are memories made of? How Polycomb and Trithorax proteins mediate epigenetic memory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 340–356 (2014).
45. Ferraro, Teresa, et al. "Transcriptional memory in the Drosophila embryo." *Current Biology* 26.2 (2016): 212-218.
46. Hörmanseder, Eva, et al. "H3K4 methylation-dependent memory of somatic cell identity inhibits reprogramming and development of nuclear transfer embryos." *Cell Stem Cell* 21.1 (2017): 135-143.
47. Zhao, Rui, et al. "Gene bookmarking accelerates the kinetics of post-mitotic transcriptional re-activation." *Nature cell biology* 13.11 (2011): 1295-1304
48. Egli, Dieter, Garrett Birkhoff, and Kevin Eggan. "Mediators of reprogramming: transcription factors and transitions through mitosis." *Nature reviews Molecular cell biology* 9.7 (2008): 505-516.
49. Ptashne, Mark. "Epigenetics: core misconception." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.18 (2013): 7101-7103.
50. Piunti, Andrea, and Ali Shilatifard. "Epigenetic balance of gene expression by Polycomb and COMPASS families." *Science* 352.6290 (2016).
51. Schuettengruber, Bernd, et al. "Genome regulation by polycomb and trithorax: 70 years and counting." *Cell* 171.1 (2017): 34-57.
52. Petruk, Svetlana, et al. "TrxG and PcG proteins but not methylated histones remain associated with DNA through replication." *Cell* 150.5 (2012): 922-933.
53. Black, Kathryn L., et al. "Chromatin proteins and RNA are associated with DNA during all phases of mitosis." *Cell discovery* 2.1 (2016): 1-14.
54. Grossniklaus, Ueli, and Renato Paro. "Transcriptional silencing by polycomb-group proteins." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6.11 (2014): a019331.
55. Eagen, Kyle P., Erez Lieberman Aiden, and Roger D. Kornberg. "Polycomb-mediated chromatin loops revealed by a subkilobase-resolution chromatin interaction map." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114.33 (2017): 8764-8769.

56. Entrevan, Marianne, Bernd Schuettengruber, and Giacomo Cavalli. "Regulation of genome architecture and function by polycomb proteins." *Trends in cell biology* 26.7 (2016): 511-525.
57. Li, Li, et al. "Widespread rearrangement of 3D chromatin organization underlies polycomb-mediated stress-induced silencing." *Molecular cell* 58.2 (2015): 216-231.
58. Schwartz, Yuri B., and Giacomo Cavalli. "Three-dimensional genome organization and function in *Drosophila*." *Genetics* 205.1 (2017): 5-24.
59. Agger, Karl, et al. "UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development." *Nature* 449.7163 (2007): 731-734.
60. Czermin, Birgit, et al. "*Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites." *Cell* 111.2 (2002): 185-196.
61. Cao, Ru, et al. "Role of hPHF1 in H3K27 methylation and Hox gene silencing." *Molecular and cellular biology* 28.5 (2008): 1862-1872.
62. He, Chongsheng, et al. "Reprogramming of H3K27me3 is critical for acquisition of pluripotency from cultured *Arabidopsis* tissues." (2012): e1002911.
63. Cruz-Molina, Sara, et al. "PRC2 facilitates the regulatory topology required for poised enhancer function during pluripotent stem cell differentiation." *Cell stem cell* 20.5 (2017): 689-705.
64. Bratzel, Fabian, et al. "Keeping cell identity in *Arabidopsis* requires PRC1 RING-finger homologs that catalyze H2A monoubiquitination." *Current biology* 20.20 (2010): 1853-1859.
65. Whitcomb, Sarah J., et al. "Polycomb Group proteins: an evolutionary perspective." *Trends in Genetics* 23.10 (2007): 494-502.
66. Köhler, Claudia, and Lars Hennig. "Regulation of cell identity by plant Polycomb and trithorax group proteins." *Current opinion in genetics & development* 20.5 (2010): 541-547.
67. Raccaud, Mahé, and David M. Suter. "Transcription factor retention on mitotic chromosomes: regulatory mechanisms and impact on cell fate decisions." *FEBS letters* 592.6 (2018): 878-887.
68. Soufi, Abdenour, et al. "Pioneer transcription factors target partial DNA motifs on nucleosomes to initiate reprogramming." *Cell* 161.3 (2015): 555-568.
69. Iwafuchi-Doi, Makiko, and Kenneth S. Zaret. "Cell fate control by pioneer transcription factors." *Development* 143.11 (2016): 1833-1837.
70. Dufourt, Jeremy, et al. "Temporal control of transcription by Zelda in living *Drosophila* embryos." *bioRxiv* (2018): 282426.
71. Prescott, D. M., and M. A. Bender. "Synthesis of RNA and protein during mitosis in mammalian tissue culture cells." *Experimental cell research* 26.2 (1962): 260-268.
72. Qi, Dandan, et al. "Mitotic phosphorylation of SOX2 mediated by Aurora kinase A is critical for the stem-cell like cell maintenance in PA-1 cells." *Cell Cycle* 15.15 (2016): 2009-2018.
73. Shin, Jihoon, et al. "Aurkb/PP1-mediated resetting of Oct4 during the cell cycle determines the identity of embryonic stem cells." *Elife* 5 (2016): e10877.

74. Sif, Saïd, et al. "Mitotic inactivation of a human SWI/SNF chromatin remodeling complex." *Genes & development* 12.18 (1998): 2842-2851.
75. Chen, Danyang, et al. "TBP dynamics in living human cells: constitutive association of TBP with mitotic chromosomes." *Molecular biology of the cell* 13.1 (2002): 276-284.
76. Christova, Rossitza, and Thomas Oelgeschläger. "Association of human TFIID–promoter complexes with silenced mitotic chromatin in vivo." *Nature cell biology* 4.1 (2002): 79-82.
77. Xing, Hongyan, Nathan L. Vanderford, and Kevin D. Sarge. "The TBP–PP2A mitotic complex bookmarks genes by preventing condensin action." *Nature cell biology* 10.11 (2008): 1318-1323.
78. Blobel, Gerd A., et al. "A reconfigured pattern of MLL occupancy within mitotic chromatin promotes rapid transcriptional reactivation following mitotic exit." *Molecular cell* 36.6 (2009): 970-983.
79. Komura, Jun-ichiro, Hironobu Ikehata, and Tetsuya Ono. "Chromatin fine structure of the c-MYC insulator element/DNase I-hypersensitive site I is not preserved during mitosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.40 (2007): 15741-15746.
80. Varier, Radhika A., et al. "A phospho/methyl switch at histone H3 regulates TFIID association with mitotic chromosomes." *The EMBO journal* 29.23 (2010): 3967-3978.
81. Llères, David, et al. "Quantitative analysis of chromatin compaction in living cells using FLIM–FRET." *Journal of Cell Biology* 187.4 (2009): 481-496.
82. Vagnarelli, Paola. "Mitotic chromosome condensation in vertebrates." *Experimental cell research* 318.12 (2012): 1435-1441.
83. Kelly, Theresa K., et al. "H2A. Z maintenance during mitosis reveals nucleosome shifting on mitotically silenced genes." *Molecular cell* 39.6 (2010): 901-911.
84. Blythe, Shelby A., and Eric F. Wieschaus. "Establishment and maintenance of heritable chromatin structure during early Drosophila embryogenesis." *Elife* 5 (2016): e20148.
85. Hsiung, Chris C-S., et al. "Genome accessibility is widely preserved and locally modulated during mitosis." *Genome research* 25.2 (2015): 213-225.
86. Xu, Jin, et al. "Landscape of monoallelic DNA accessibility in mouse embryonic stem cells and neural progenitor cells." *Nature genetics* 49.3 (2017): 377.
87. Xi, Yuanxin, et al. "Nucleosome fragility reveals novel functional states of chromatin and poises genes for activation." *Genome research* 21.5 (2011): 718-724.
88. Xing, Hongyan, et al. "Mechanism of hsp70i gene bookmarking." *Science* 307.5708 (2005): 421-423.
89. Downen, Jill M., et al. "Multiple structural maintenance of chromosome complexes at transcriptional regulatory elements." *Stem cell reports* 1.5 (2013): 371-378.
90. Sutani, Takashi, et al. "Condensin targets and reduces unwound DNA structures associated with transcription in mitotic chromosome condensation." *Nature communications* 6.1 (2015): 1-13.
91. Levchenko, Vladislav, Beverly Jackson, and Vaughn Jackson. "Histone release during transcription: displacement of the two H2A– H2B dimers in the nucleosome is dependent on different levels of transcription-induced positive stress." *Biochemistry* 44.14 (2005): 5357-5372.

92. Christensen, Morten O., et al. "Dynamics of human DNA topoisomerases II α and II β in living cells." *The Journal of cell biology* 157.1 (2002): 31-44.
93. Gerlich, Daniel, et al. "Condensin I stabilizes chromosomes mechanically through a dynamic interaction in live cells." *Current Biology* 16.4 (2006): 333-344.
94. Chen, Danyang, et al. "Condensed mitotic chromatin is accessible to transcription factors and chromatin structural proteins." *The Journal of cell biology* 168.1 (2005): 41-54.
95. Sawicka, Anna, and Christian Seiser. "Histone H3 phosphorylation—a versatile chromatin modification for different occasions." *Biochimie* 94.11 (2012): 2193-2201.
96. Fischle, Wolfgang, et al. "Regulation of HP1–chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation." *Nature* 438.7071 (2005): 1116-1122.
97. Hirota, Toru, et al. "Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin." *Nature* 438.7071 (2005): 1176-1180.
98. Lau, Priscilla Nga Ieng, and Peter Cheung. "Histone code pathway involving H3 S28 phosphorylation and K27 acetylation activates transcription and antagonizes polycomb silencing." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.7 (2011): 2801-2806.
99. De Castro, Inês J., et al. "Repo-Man/PP1 regulates heterochromatin formation in interphase." *Nature communications* 8.1 (2017): 1-16.
100. Wilkins, Bryan J., et al. "A cascade of histone modifications induces chromatin condensation in mitosis." *Science* 343.6166 (2014): 77-80.
101. Kruhlak, Michael J., et al. "Regulation of global acetylation in mitosis through loss of histone acetyltransferases and deacetylases from chromatin." *Journal of Biological Chemistry* 276.41 (2001): 38307-38319.
102. McManus, Kirk J., and Michael J. Hendzel. "The relationship between histone H3 phosphorylation and acetylation throughout the mammalian cell cycle." *Biochemistry and cell biology* 84.4 (2006): 640-657.
103. Hsiung, Chris C-S., et al. "A hyperactive transcriptional state marks genome reactivation at the mitosis–G1 transition." *Genes & development* 30.12 (2016): 1423-1439.
104. Wong, Madeline M., et al. "Promoter-bound p300 complexes facilitate post-mitotic transmission of transcriptional memory." *PloS one* 9.6 (2014): e99989.
105. Zaidi, Sayyed K., et al. "Mitotic partitioning and selective reorganization of tissue-specific transcription factors in progeny cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100.25 (2003): 14852-14857.
106. Stawiski, Eric W., Lydia M. Gregoret, and Yael Mandel-Gutfreund. "Annotating nucleic acid-binding function based on protein structure." *Journal of molecular biology* 326.4 (2003): 1065-1079.
107. Booth, Daniel G., et al. "3D-CLEM reveals that a major portion of mitotic chromosomes is not chromatin." *Molecular cell* 64.4 (2016): 790-802.71.
108. Ohta, Shinya, et al. "The protein composition of mitotic chromosomes determined using multiclassifier combinatorial proteomics." *Cell* 142.5 (2010): 810-821.
109. Patel, Mira C., et al. "BRD4 coordinates recruitment of pause release factor P-TEFb and the pausing complex NELF/DSIF to regulate transcription elongation of interferon-stimulated genes." *Molecular and cellular biology* 33.12 (2013): 2497-2507. 73.

110. Wu, Shwu-Yuan, et al. "Phospho switch triggers Brd4 chromatin binding and activator recruitment for gene-specific targeting." *Molecular cell* 49.5 (2013): 843-857.
111. Wang, Ranran, et al. "Bromodomain protein Brd4 associated with acetylated chromatin is important for maintenance of higher-order chromatin structure." *Journal of Biological Chemistry* 287.14 (2012): 10738-10752.
112. Pallier, Coralie, et al. "Association of chromatin proteins high mobility group box (HMGB) 1 and HMGB2 with mitotic chromosomes." *Molecular biology of the cell* 14.8 (2003): 3414-3426.
113. Pockwinse, Shirwin M., et al. "Live cell imaging of the cancer-related transcription factor RUNX2 during mitotic progression." *Journal of cellular physiology* 226.5 (2011): 1383-1389.
114. Koga, Minoru, et al. "Isolation and characterization of a haploid germ cell-specific novel complementary deoxyribonucleic acid; testis-specific homologue of succinyl CoA: 3-Oxo acid CoA transferase." *Biology of reproduction* 63.6 (2000): 1601-1609.
115. Higgins, Jonathan MG. "The Haspin gene: location in an intron of the Integrin α E gene, associated transcription of an Integrin α E-derived RNA and expression in diploid as well as haploid cells." *Gene* 267.1 (2001): 55-69.
116. Nguyen, Alexandra L., et al. "Phosphorylation of threonine 3 on histone H3 by haspin kinase is required for meiosis I in mouse oocytes." *Journal of cell science* 127.23 (2014): 5066-5078.
117. Hindriksen, Sanne, et al. "Baculoviral delivery of CRISPR/Cas9 facilitates efficient genome editing in human cells." *PloS one* 12.6 (2017): e0179514.
118. Eswaran, Jeyanthi, et al. "Structure and functional characterization of the atypical human kinase haspin." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.48 (2009): 20198-20203.
119. Higgins, J. M. G. "Structure, function and evolution of haspin and haspinrelated proteins, a distinctive group of eukaryotic protein kinases." *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 60.3 (2003): 446-462.
120. Markaki, Yolanda, et al. "Phosphorylation of histone H3 at Thr3 is part of a combinatorial pattern that marks and configures mitotic chromatin." *Journal of cell science* 122.16 (2009): 2809-2819.
121. Villa, Fabrizio, et al. "Crystal structure of the catalytic domain of Haspin, an atypical kinase implicated in chromatin organization." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.48 (2009): 20204-20209.
122. Polioudaki, Hara, et al. "Mitotic phosphorylation of histone H3 at threonine 3." *FEBS letters* 560.1-3 (2004): 39-44.
123. Dai, Jun, et al. "The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment." *Genes & development* 19.4 (2005): 472-488.
124. Jeyaprakash, A. Arockia, et al. "Structural basis for the recognition of phosphorylated histone h3 by the survivin subunit of the chromosomal passenger complex." *Structure* 19.11 (2011): 1625-1634.
125. Wang, Fangwei, et al. "Haspin inhibitors reveal centromeric functions of Aurora B in chromosome segregation." *Journal of Cell Biology* 199.2 (2012): 251-268.

126. Bekier, Michael E., et al. "Borealin dimerization mediates optimal CPC checkpoint function by enhancing localization to centromeres and kinetochores." *Nature communications* 6.1 (2015): 1-12.
127. Kelly, Alexander E., et al. "Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine 3 to activate the mitotic kinase Aurora B." *Science* 330.6001 (2010): 235-239.
128. Maiolica, Alessio, et al. "Modulation of the chromatin phosphoproteome by the Haspin protein kinase." *Molecular & cellular proteomics* 13.7 (2014): 1724-1740.
129. Tanaka, Hiromitsu, et al. "Identification and characterization of a haploid germ cell-specific nuclear Protein Kinase (haspin) in spermatid nuclei and its effects on somatic cells." *Journal of Biological Chemistry* 274.24 (1999): 17049-17057.
130. Shimada, Midori, et al. "Essential role of autoactivation circuitry on Aurora B-mediated H2AX-pS121 in mitosis." *Nature communications* 7.1 (2016): 1-11.
131. Reynolds, Nicola, and Howard J. Cooke. "Role of the DAZ genes in male fertility." *Reproductive biomedicine online* 10.1 (2005): 72-80.
132. Navarro-Costa, Paulo, et al. "Incorrect DNA methylation of the DAZL promoter CpG island associates with defective human sperm." *Human reproduction* 25.10 (2010): 2647-2654.
133. Hasegawa, Kazuteru, et al. "SCML2 establishes the male germline epigenome through regulation of histone H2A ubiquitination." *Developmental cell* 32.5 (2015): 574-588.
134. Lecona, E., et al. "Polycomb Protein SCML2 Regulates the Cell Cycle by Binding and." (2013).
135. Endoh, Mitsuhiro, et al. "Histone H2A mono-ubiquitination is a crucial step to mediate PRC1-dependent repression of developmental genes to maintain ES cell identity." *PLoS Genet* 8.7 (2012): e1002774.
136. Bonasio, Roberto, et al. "Interactions with RNA direct the Polycomb group protein SCML2 to chromatin where it represses target genes." *Elife* 3 (2014): e02637.
137. Kalb, Reinhard, et al. "Histone H2A monoubiquitination promotes histone H3 methylation in Polycomb repression." *Nature structural & molecular biology* 21.6 (2014): 569-571.
138. Evans, Martin J., and Matthew H. Kaufman. "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." *nature* 292.5819 (1981): 154-156.
139. Thomson, James A., et al. "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." *science* 282.5391 (1998): 1145-1147.
140. Martin, Gail R. "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78.12 (1981): 7634-7638.
141. Shenghui, H. E., Daisuke Nakada, and Sean J. Morrison. "Mechanisms of stem cell self-renewal." *Annual Review of Cell and Developmental* 25 (2009): 377-406.
142. Martello, Graziano, and Austin Smith. "The nature of embryonic stem cells." *Annual review of cell and developmental biology* 30 (2014): 647-675.
143. Niwa, Hitoshi. "How is pluripotency determined and maintained?" (2007): 635-646.
144. Silva, Jose, and Austin Smith. "Capturing pluripotency." *Cell* 132.4 (2008): 532-536.

145. Yuan, Huabing, et al. "Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3." *Genes & development* 9.21 (1995): 2635-2645.
146. Silva, Jose, et al. "Nanog is the gateway to the pluripotent ground state." *Cell* 138.4 (2009): 722-737.
147. Nichols, Jennifer, et al. "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4." *Cell* 95.3 (1998): 379-391.
148. Avilion, Ariel A., et al. "Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function." *Genes & development* 17.1 (2003): 126-140.
149. Niwa, Hitoshi, Jun-ichi Miyazaki, and Austin G. Smith. "Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells." *Nature genetics* 24.4 (2000): 372-376.
150. Masui, Shinji, et al. "Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells." *Nature cell biology* 9.6 (2007): 625-635.
151. Niwa, Hitoshi, et al. "A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells." *Nature* 460.7251 (2009): 118-122.
152. Niwa, Hitoshi, et al. "Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3." *Genes & development* 12.13 (1998): 2048-2060.
153. Mikkelsen, Tarjei S., et al. "Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells." *Nature* 448.7153 (2007): 553-560.
154. Bernstein, Bradley E., et al. "A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells." *Cell* 125.2 (2006): 315-326.
155. Azuara, Véronique, et al. "Chromatin signatures of pluripotent cell lines." *Nature cell biology* 8.5 (2006): 532-538.
156. Boyer, Laurie A., et al. "Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells." *nature* 441.7091 (2006): 349-353.
157. Huang, Xin, and Jianlong Wang. "Mitotic bookmarking: Maintaining the stem cell identity during mitosis." *Cell stem cell* 20.6 (2017): 741-742.
158. Maison, Christèle, Heinz Horstmann, and Spyros D. Georgatos. "Regulated docking of nuclear membrane vesicles to vimentin filaments during mitosis." *The Journal of cell biology* 123.6 (1993): 1491-1505.
159. Meier, Jurgen, and Spyros D. Georgatos. "Type B lamins remain associated with the integral nuclear envelope protein p58 during mitosis: implications for nuclear reassembly." *The EMBO Journal* 13.8 (1994): 1888-1898.
160. De Antoni, Anna, et al. "A small-molecule inhibitor of Haspin alters the kinetochore functions of Aurora B." *Journal of Cell Biology* 199.2 (2012): 269-284.
161. Karanika, Eleftheria, et al. "Haspin-dependent and independent effects of the kinase inhibitor 5-Iodotubercidin on self-renewal and differentiation." *Scientific reports* 10.1 (2020): 1-13.
162. Teves, Sheila S., et al. "A stable mode of bookmarking by TBP recruits RNA polymerase II to mitotic chromosomes." *Elife* 7 (2018): e35621
163. Yamagishi, Yuya, et al. "Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation." *Science* 330.6001 (2010): 239-243.

164. Xin, Li, et al. "Exploring cellular memory molecules marking competent and active transcriptions." *BMC molecular biology* 8.1 (2007): 1-9.
165. Vermeulen, Michiel, et al. "Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4." *Cell* 131.1 (2007): 58-69.
166. Cook, Simon J., Natasha Aziz, and Martin McMahon. "The repertoire of fos and jun proteins expressed during the G1 phase of the cell cycle is determined by the duration of mitogen-activated protein kinase activation." *Molecular and Cellular Biology* 19.1 (1999): 330-341.