







**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ  
ΚΥΤΤΑΡΩΝ: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ  
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ  
ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ - ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΦΑΚΕΛΟΥ**

**ΙΩΑΝΝΗΣ ΓΙΑΝΝΙΟΣ**  
Βιοχημικός - Βιοτεχνολόγος

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013**



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



**Ημερομηνία αίτησης του κ. Γιαννιού Ιωάννη:** 16-3-2005

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 557<sup>α</sup>/24-5-2005

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Γεωργάτος Σπυρίδων Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Λαζαρίδης Ιωάννης Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Murphy Carol Ερευνήτρια Β' Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 24-6-2005

*«Κατευθυνόμενη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων: ο ρόλος των επιγενετικών τροποποιήσεων και των αλληλεπιδράσεων χρωματίνης-πυρηνικού φακέλου»*

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ :** 744<sup>α</sup>/23-10-2012

<b>Γεωργάτος Σπυρίδων</b>	Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Φώτης Θεόδωρος</b>	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Λαζαρίδης Ιωάννης</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Πατρών
<b>Παπαμαρκάκη Θωμάς</b>	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Κούκλης Παναγιώτης</b>	Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Πολίτου Αναστασία</b>	Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Murphy Carol</b>	Ερευνήτρια Β' Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 14-12-2012

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

**Μαργαρίτα Τζαφλίδου**

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής

**Η Γραμματέας της Σχολής**

**ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ**







*‘Το αν γίνω ο ήρωας της ζωής μου, ή αν αυτή η θέση καταληφθεί από κάποιον άλλον, θα το δείξουν οι παρακάτω σελίδες’.*  
*Έτσι αρχίζει ο David Copperfield, έτσι αρχίζει η ζωή του κάθε ανθρώπου.*



## Περιεχόμενα

<b>1. Εισαγωγή</b>	1
<b>1.1 Μορφολογία, δομική οργάνωση και λειτουργία του κυτταρικού πυρήνα</b>	3
1.1.1 Η οργάνωση και λειτουργία του πυρηνικού φακέλου	3
1.1.2 Η εσωτερική πυρηνική μεμβράνη	3
1.1.3 Η πυρηνική λάμινα	7
1.1.4 Τα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων	11
1.1.5 Η οργάνωση της χρωματίνης	13
1.1.6 Η οργάνωση του πυρήνα στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα	18
<b>1.2 Ο υποδοχέας της λαμίνης B (Lamin B Receptor)</b>	21
1.2.1 Το γονίδιο του υποδοχέα της λαμίνης B (LBR)	21
1.2.2 Το σύμπλοκο του υποδοχέα LBR	22
1.2.3 Τοπολογία του LBR	24
1.2.4 Ο λειτουργικός ρόλος του LBR	26
1.2.5 Δυναμική της πρωτεΐνης	28
<b>1.3 Ασθένειες που σχετίζονται με τον LBR</b>	31
1.3.1 Ασθένειες που σχετίζονται με τον πυρηνικό φάκελο (λαμινοπάθειες)	31
1.3.2 Η ανωμαλία Pelger – Huet (PHA)	41
1.3.3 Η επίκτητη ανωμαλία Pelger – Huet (acquired PHA)	46
1.3.4 Η ιχθύωση στα ποντίκια (ichthyosis)	48
1.3.5 Η δυσπλασία Greenberg (HEM ή Greenberg dysplasia)	51
1.3.6 Ανωμαλίες κατά την έκφραση της πρωτεΐνης in vitro (η περίπτωση των U2OS κυττάρων)	53
<b>1.4 Σκοπός</b>	59
<b>2. Υλικά και μέθοδοι</b>	61
<b>2.1 Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων</b>	63
2.1.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών	63
2.1.2 Διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων	63
2.1.3 Δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών βλαστικών κυττάρων	64
2.1.4 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με ηλεκτροδιαπίδυση (Electroporation)	65
2.1.5 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με πολύ-αιθυλενιμίνη	65
<b>2.2 Μέθοδοι γενετικής μηχανικής</b>	65
2.2.1 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων επιδεκτικών στον μετασχηματισμό	65
2.2.2 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων	66
2.2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μικρής κλίμακας	66
2.2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας	67
2.2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	67

2.2.6 Απομόνωση θραυσμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης	67
2.2.7 Συρραφή τμημάτων DNA (Ligation)	67
2.2.8 Απομόνωση ολικού RNA	68
2.2.9 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	68
2.2.10 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR)	70
<b>2.3 Μορφολογικές Μέθοδοι</b>	70
2.3.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε επιστρωμένα κύτταρα	70
2.3.2 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε εμβρυοειδή σωματίδια	71
2.3.3 Ποσοτικοποίηση έντασης φθορισμού σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού	72
2.3.4 Μορφομετρικές μετρήσεις σε εμβρυοειδή σωματίδια	72
2.3.5 Μέθοδοι ελέγχου κυτταρικής επιβίωσης	73
2.3.6 Μελέτη του κυτταρικού κύκλου εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής (FACs assays)	73
2.3.7 Υπερδιακριτική μικροσκοπία (Stimulated emission depletion microscopy, STED)	73
2.3.8 Μέθοδος ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτοσκίαση (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP)	74
2.3.9 Μέθοδος απώλειας φθορισμού μετά από φωτοσκίαση (Fluorescence Loss in Photobleaching, FLIP)	75
<b>3. Αποτελέσματα</b>	79
<b>3.1 Μεταλλάγματα-κατασκευές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη</b>	81
<b>3.2 Υπερέκφραση του αγρίου τύπου LBR σε κυτταρικές σειρές</b>	81
<b>3.3 Υπερέκφραση αγρίου τύπου LBR σε κύτταρα HeLa</b>	82
<b>3.4 Δυναμική του αγρίου τύπου LBR όπως αποκαλύπτεται με πειράματα ανάκτησης φθορισμού</b>	83
3.4.1 Προσδιορισμός της «πραγματικής» περιοχής ενδιαφέροντος φωτοσκίασης (Effective Region of Interest)	85
3.4.2 Γεωμετρία της περιοχής ενδιαφέροντος	87
3.4.3 Πειράματα ανάκτησης φθορισμού με χρήση κυκλικών περιοχών ενδιαφέροντος	88
3.4.4 Πειράματα ανάκτησης φθορισμού με χρήση καμπυλόγραμμων περιοχών ενδιαφέροντος	91
3.4.5 Σύσχετιση ποσοστού υπερέκφρασης της πρωτεΐνης και κινητικού κλάσματος	93
3.4.6 Προσδιορισμός του κινητικού κλάσματος κατά μήκος της περιοχής φωτοσκίασης (bleach profile FRAP)	93
3.4.7 Πειράματα ανάκτησης φθορισμού σε υποπεριοχές του πυρηνικού φάκελου	95
<b>3.5 Υπερέκφραση μεμβρανικών μεταλλαγμάτων σε HeLa κύτταρα και Μελέτη της δυναμικής τους</b>	98
3.5.1 Μελέτη της δυναμικής των ΔTMVIII,CT και ΔTMV-VIII,CT μεταλλαγμάτων	99
3.5.2 Μελέτη της δυναμικής άλλων μεμβρανικών μεταλλαγμάτων	101
<b>3.6 Υπερέκφραση «διαλυτών» μεταλλαγμάτων σε HeLa κύτταρα και μελέτη της</b>	

δυναμικής τους	102
3.6.1 Μελέτη της δυναμικής της αμινοτελικής περιοχής της πρωτεΐνης (TDRSGD)	103
3.6.2 Μελέτη της δυναμικής άλλων διαλυτών μεταλλαγμάτων	103
<b>3.7 Δημιουργία και χαρακτηρισμός σταθερών κυτταρικών σειρών βλαστικών κυττάρων ποντικού οι οποίες υπερεκφράζουν τον LBR</b>	106
3.7.1 Υπερέκφραση του LBR σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού και πολυδυναμία	106
3.7.2 Υπερέκφραση του LBR σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και κυτταρικός κύκλος	109
<b>3.8 Η υπερέκφραση του LBR σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα επηρεάζει τις διακυμάνσεις και τα επίπεδα του Nanog</b>	109
<b>3.9 Μελέτη της δυναμικής του LBR σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα</b>	114
<b>3.10 Υπερέκφραση του LBR σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και κυτταρική επιβίωση</b>	114
<b>3.11 Διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων που εκφράζουν LBR προς καρδιομυοκύτταρα</b>	116
<b>3.12 Διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων που εκφράζουν LBR προς νευρωνικά κύτταρα</b>	118
<b>4. Συζήτηση</b>	121
4.1 Η δυναμική της πρωτεΐνης LBR αντικατοπτρίζει την ασυμμετρία του πυρηγικού φακέλου	123
4.2 Αποκοπή των διαμεμβρανικών τμημάτων του LBR αλλοιώνει την δυναμική και τις λειτουργικές ιδιότητες της πρωτεΐνης	127
4.3 Η συνεισφορά περιοχών του LBR στον εντοπισμό και τη δυναμική της πρωτεΐνης	128
4.4 Ο λειτουργικός ρόλος του LBR κατά τη διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων	129
<b>5. Περίληψη – abstract</b>	133
<b>6. Παράρτημα</b>	137
<b>6.1 Μέθοδος ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτοσκίαση (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP)</b>	139
6.1.1 Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων	140
6.1.2 Παράγοντες ελέγχου για τη διεξαγωγή FRAP πειραμάτων	143
6.1.3 Ανάλυση FRAP δεδομένων	145
6.1.3.1 Αναλυτικά μοντέλα	146
6.1.3.1.1 Διάχυση	146
6.1.3.1.2 Διάχυση και πρόσδεση	147
6.1.3.2 Αριθμητικά μοντέλα	148
6.1.3.3 Προσομοιώσεις FRAP	149
<b>6.2 Υπερδιακριτική μικροσκοπία (Stimulated emission depletion microscopy,</b>	

<b>STED)</b>	151
6.2.1 Βασικές αρχές της μικροσκοπίας STED	153
6.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη διακριτική ικανότητα της μικροσκοπίας STED	155
6.2.2.1 Επιλογή του φθορισμογόνου	156
6.2.2.2 Χρώση των δειγμάτων	156
6.2.2.3 Δείκτης διάθλασης (Refractive Index Matching)	157
<b>6.3 Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ESCs)</b>	158
6.3.1 Προέλευση και ιδιότητες των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων	158
6.3.2 Χαρακτηριστικά των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων	159
6.3.3 Πολυδυναμία και αυτοανανέωση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων	160
6.3.4 In vitro διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων	162
<b>7. Βιβλιογραφία</b>	165

# *Εισαγωγή*





## 1.1 Μορφολογία, δομική οργάνωση και λειτουργία του κυτταρικού πυρήνα

### 1.1.1 Η οργάνωση και λειτουργία του πυρηνικού φακέλου

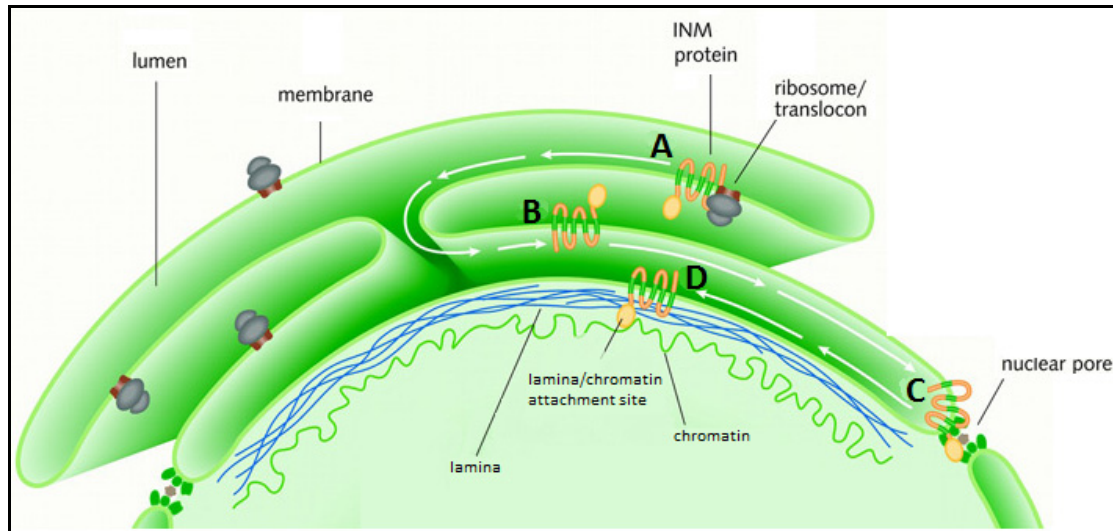
Μία από τις σημαντικότερες διαφορές μεταξύ ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών κυττάρων είναι η παρουσία του πυρήνα στα πρώτα. Ο πυρήνας είναι ένα σύνθετο οργανίδιο, στο οποίο εμπεριέχονται τα χρωμοσώματα και πραγματοποιούνται ζωτικής σημασίας διαδικασίες, όπως η αντιγραφή του DNA, η μεταγραφή και επεξεργασία του RNA και η συγκρότηση των ριβοσωμάτων. Οι λειτουργίες του πυρήνα εξαρτώνται άμεσα από τη δομική του οργάνωση και το σχηματισμό μιας μεμβρανικής δομής, του πυρηνικού φακέλου, ο οποίος διαχωρίζει τις κυτταρικές λειτουργίες που συντελούνται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα. Ο πυρηνικός φάκελος είναι μια λιπιδιακή διπλοστοιβάδα αποτελούμενη από δυο παράλληλες μεμβράνες, την εξωτερική πυρηνική μεμβράνη (ONM) η οποία είναι προέκταση του ενδοπλασματικού δικτύου και την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη (INM). Οι δυο μεμβράνες διαχωρίζονται από έναν αυλό (luminal space) και συμβάλλουν στις περιοχές όπου υπάρχουν τα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων (NPCs).

Ενώ η εξωτερική πυρηνική μεμβράνη είναι βιοχημικά και λειτουργικά όμοια με το ενδοπλασματικό δίκτυο και μπορεί να θεωρηθεί ως μια υποπεριοχή του, η εσωτερική πυρηνική μεμβράνη διαφοροποιείται σημαντικά και περιέχει συγκεκριμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες (εικόνα 1.1). Στην περιφέρεια της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης εντοπίζεται ένα δίκτυο ενδιάμεσων ινιδίων, η πυρηνική λάμινα. Η λάμινα παρέχει δομική υποστήριξη στον πυρήνα, διατηρώντας το σχήμα του και εξασφαλίζοντας το κατάλληλο περιβάλλον για τη διεκπεραίωση βασικών λειτουργιών (Foisner, 2003).

### 1.1.2 Η εσωτερική πυρηνική μεμβράνη

Η εσωτερική πυρηνική μεμβράνη αποτελεί αγκυροβόλιο ενός αριθμού μεμβρανικών πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται ο υποδοχέας της λαμίνης B (lamin B receptor, LBR), τα σχετιζόμενα με τη λάμινα πολυπεπίδια 1 και 2 (lamina associated polypeptides, LAP1, LAP2), η MAN1, η emerlin και η nurim. Οι περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες συνδέονται με τις λαμίνες και τη χρωματίνη (LBR, LAP1, LAP2, emerlin), συνεισφέροντας στην αρχιτεκτονική του πυρηνικού φακέλου. Οι πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης ανήκουν στην οικογένεια II των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Αποτελούνται από ένα αμινοτελικό τμήμα 200 περίπου αμινοξέων, ακολουθούμενο από

ποικίλο αριθμό διαμεμβρανικών ελίκων. Τα αμινοτελικά τμήματα των πρωτεϊνών προεκτείνονται προς το πυρηνόπλασμα και παρέχουν σημεία πρόσδεσης διαφόρων πυρηνικών μορίων (εικόνα 1.2).



**Εικόνα 1.1 Οργάνωση πυρηνικού φακέλου.** Στο σχήμα φαίνονται η εσωτερική και εξωτερική πυρηνική μεμβράνη, τα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων και ο αυλός του ενδοπλασματικού δικτύου. Οι πρωτεΐνες συνθέτονται στα ριβοσώματα του ενδοπλασματικού δικτύου (A), μετακινούνται κατά μήκος της εξωτερικής πυρηνικής μεμβράνης (B) και των συμπλεγμάτων των πυρηνικών πόρων (C) και αγκυροβολούνται στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη (D). Από Voelta et al, 2002.

Οι πρωτεΐνες LAP1 και LAP2 ανιχνεύτηκαν με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι ενός αδρού παρασκευάσματος πυρηνικών φακέλων και περιλαμβάνουν τρεις πρωτεΐνες παραπλήσιου μοριακού βάρους στα 75kDa (LAP1A), 68kDa (LAP1B) και 55kDa (LAP1C). Το γονίδιο της LAP1 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1p36 του ανθρώπου και οι τρεις LAP1 πρωτεΐνες προκύπτουν με εναλλακτικό μάτισμα του RNA. Κάθε ισομορφή LAP1 συνδέεται με τις λαμίνες με διαφορετική συγγένεια.

Το γονίδιο της LAP2 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12q22 του ανθρώπου και κωδικοποιεί διάφορες πρωτεΐνες. Αρχικά, αναγνωρίστηκαν τρεις LAP2 ισομορφές α, β και γ (επίσης γνωστές και ως θυμοποιητίνες). Οι LAP2β και LAP2γ εντοπίζονται αποκλειστικά στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη, ενώ η LAP2α δεν διαθέτει διαμεμβρανική περιοχή και εντοπίζεται στο πυρηνόπλασμα. Όλες οι ισομορφές LAP2 διαθέτουν ένα κοινό αμινοτελικό τμήμα 187 αμινοξέων, το οποίο συνδέεται πιθανώς με τη χρωματίνη. Η πιο καλά μελετημένη ισομορφή είναι η LAP2β, μια πρωτεΐνη 53kDa, η οποία αποτελείται από ένα αμινοτελικό τμήμα 409 αμινοξέων και μια μόνο διαμεμβρανική έλικα. Το αμινοτελικό τμήμα της

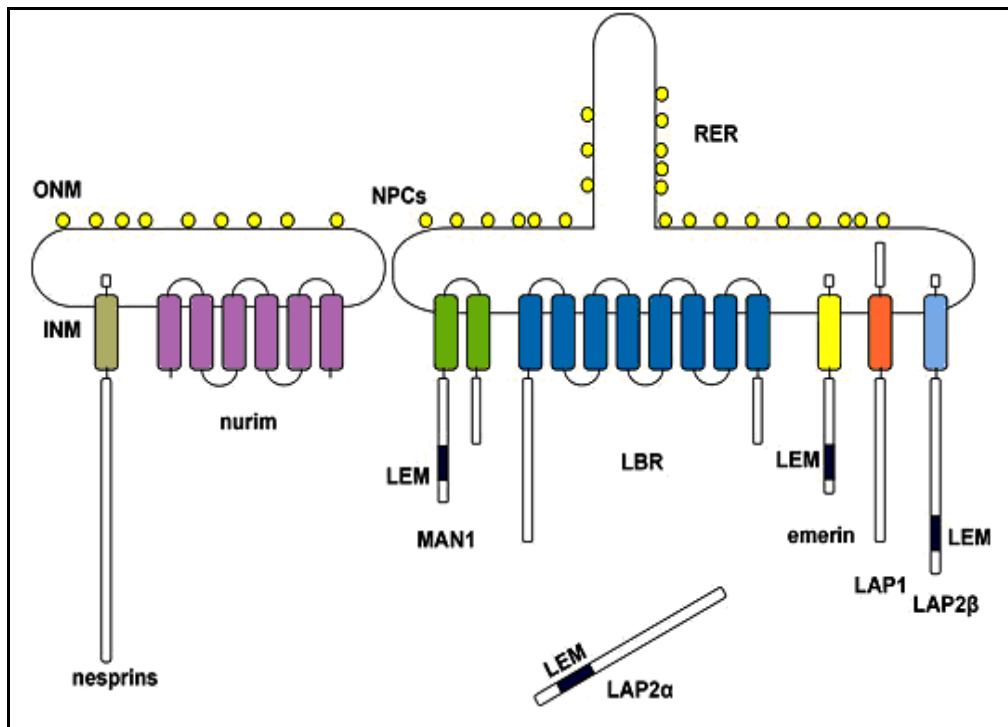
πρωτεΐνης συνδέεται με τις λαμίνες, τη χρωματίνη και την πρωτεΐνη BAF (barrier to autointegration factor).

Η πρωτεΐνη emerin ανακαλύφθηκε το 1994 μετά από κλωνοποίηση (positional cloning) ενός γονιδίου στο χρωμόσωμα Xq28 του ανθρώπου. Το γονίδιο αυτό είχε ενοχοποιηθεί για την μυϊκή δυστροφία Emery-Dreifuss. Η emerin περιέχει μια περιοχή 40 περίπου αμινοξέων στο αμινοτελικό της τμήμα, η οποία είναι ομόλογη με μια υποπεριοχή του αμινοτελικού τμήματος της LAP2β. Αλληλεπιδρά με τις λαμίνες ενώ συνδέεται και με συστατικά της χρωματίνης, πιθανώς όμως διαφορετικά από αυτά του LBR. Κύριες λειτουργίες της πρωτεΐνης είναι η αγκυροβόληση της πυρηνικής λάμινας στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη κατά την μεσόφαση και η «αντιστρεπτή αποικοδόμηση» του πυρηνικού φακέλου κατά την μίτωση.

Το 1999 ο Rolls και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν την πρωτεΐνη nurim μετά από έλεγχο μεγάλης κλίμακας που περιελάμβανε πρωτεΐνες συζευγμένες με την πρωτεΐνη GFP. Η nurim αποτελείται από 262 αμινοξέα και κύριο χαρακτηριστικό της είναι ότι δεν διαθέτει υδρόφιλη αμινοτελική περιοχή, αλλά μόνο 5 διαμεμβρανικές περιοχές.

Η πρωτεΐνη MAN1 ανακαλύφθηκε έπειτα από έλεγχο ασθενούς με νόσο του κολλαγόνου στον οποίο είχαν αναπτυχθεί αυτο-αντισώματα. Το αντίστοιχο γονίδιο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12q14 του ανθρώπου, ενώ η πρωτεΐνη αποτελείται από ένα αμινοτελικό τμήμα 470 αμινοξέων, ακολουθούμενο από δυο διαμεμβρανικές περιοχές και ένα καρβοξυτελικό τμήμα το οποίο προεκτείνεται προς το πυρηνόπλασμα. Η MAN1 διαθέτει μια ομόλογη περιοχή με τις πρωτεΐνες LAP2 και emerin, η οποία καλείται LEM. Η περιοχή αυτή περιέχει μια διατηρημένη αλληλουχία 40 αμινοξέων, βρίσκεται πλησίον ή εντός του αμινοτελικού τμήματος των πρωτεϊνών και αποτελείται από δυο έλικες οι οποίες διαχωρίζονται από μια στροφή. Οι LEM περιοχές εμπλέκονται στη σύνδεση των πρωτεϊνών με τον παράγοντα BAF και επομένως με τη χρωματίνη.

Τελευταίες μελέτες απαριθμούν περίπου 60 διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που εντοπίζονται αποκλειστικά και μόνο στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη (Schirmer et al, 2003). Μερικές από αυτές είναι: οι Unc-84 και LUMA με 3 ή 4 πιθανολογούμενες διαμεμβρανικές περιοχές, η πρωτεΐνη Ring Finger Binding Protein (RFBP), η οποία προσομοιάζει με τις φωσφολιπιδιακές αντλίες τύπου IV και μια νέα ομάδα τύπου II πρωτεϊνών που περιέχουν επαναλήψεις spectrin, οι Myne-1 και Nesprins (Foisner, 2003 και Holmer and H. J. Worman, 2001).



**Εικόνα 1.2** Σχηματική απεικόνιση των πρωτεϊνών της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης. INM: εσωτερική πυρηνική μεμβράνη, ONM: εξωτερική πυρηνική μεμβράνη, NPCs: σύμπλοκα πυρηνικών πόρων, RER: αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο. Τα παραλληλόγραμμα με τα διάφορα χρώματα αντιστοιχούν στις διαμεμβρανικές περιοχές των πρωτεϊνών της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης. Με τους μικρούς κίτρινους κύκλους αναπαριστώνται τα ριβοσώματα που είναι συνδεδεμένα με την εξωτερική πυρηνική μεμβράνη και το ενδοπλασματικό δίκτυο.

Πώς όμως αγκυροβολούν και παραμένουν οι πρωτεΐνες στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη; Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες συντίθεται στα ριβοσώματα του ενδοπλασματικού δικτύου και η τοπολογία τους καθορίζεται από σηματοδοτικές αλληλουχίες και αλληλουχίες παύσης της μεταφοράς (stop transfer sequences). Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες που παραμένουν στο ενδοπλασματικό δίκτυο ή στην εξωτερική πυρηνική μεμβράνη περιέχουν ειδικά σήματα στόχευσης και κατακράτησης, ενώ οι πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης κυκλοφορούν ελεύθερα στη μεμβράνη συνεχώς και καταλήγουν στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη αφού διέλθουν από τα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων. Οι διάμετροι αυτών των καναλιών είναι περίπου 10nm και επιτρέπουν τη διέλευση πρωτεϊνών με μοριακό βάρος της τάξης των 60kDa. Είναι αξιοσημείωτο ότι όλες οι πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης διαθέτουν τμήματα που προεξέχουν στο πυρηνόπλασμα με μοριακή μάζα μικρότερη των 60 kDa.

Διάφορες μελέτες των πρωτεϊνών της πυρηνικής μεμβράνης οδήγησαν στην υπόθεση ενός μοντέλου στόχευσης των πρωτεϊνών αυτών, γνωστού ως μοντέλο «διάχυσης-

κατακράτησης» (diffusion-retention model). Σύμφωνα με αυτό, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες, μετά τη σύνθεσή τους, κυκλοφορούν ελεύθερα στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και της εξωτερικής πυρηνικής μεμβράνης, μετακινούνται διαμέσω των πυρηνικών πόρων και φθάνουν στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη (εικόνα 1.1). Εκεί, η σύνδεσή τους με προσδέτες όπως οι λαμίνες ή η χρωματίνη, τις εμποδίζει να διαφύγουν (Holmer and H. J. Worman, 2001).

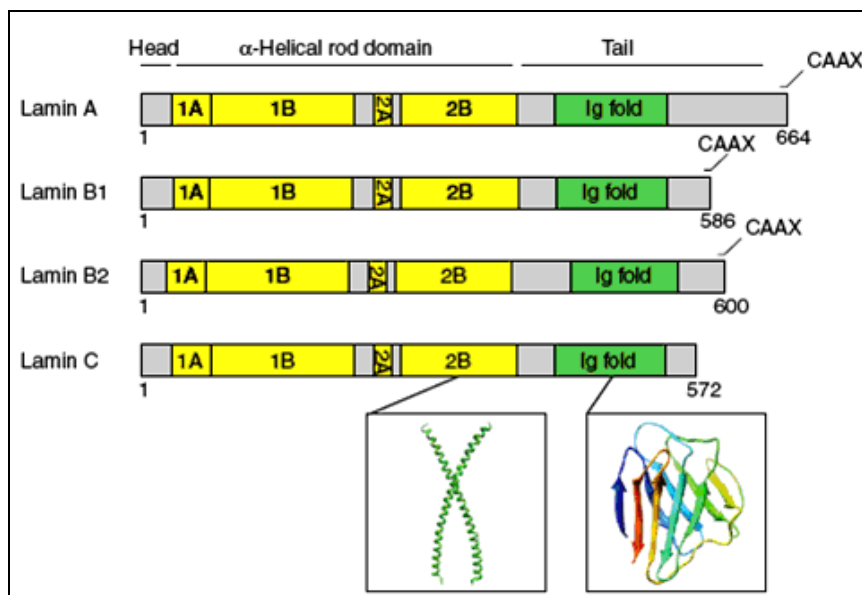
Κύρια λειτουργία των πρωτεϊνών της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης είναι η σύνδεση της πυρηνικής λάμινας και της ετεροχρωματίνης με την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη. Διαδραματίζουν όμως και σημαντικό ρόλο στη γενικότερη αρχιτεκτονική δομή και οργάνωση του πυρήνα, στην επανασυγκρότηση του πυρηνικού φακέλου κατά το τελευταίο στάδιο της μίτωσης, ενώ νεώτερες μελέτες τους αποδίδουν καθοριστικό ρόλο και στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Burke et al, 2002).

### 1.1.3 Η πυρηνική λάμινα

Ένα εκτεταμένο δίκτυο ινιδίων, η πυρηνική λάμινα, καλύπτει τη πυρηνοπλασματική περιφέρεια του πυρηνικού φακέλου και βρίσκεται σε στενή επαφή με την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη. Η πυρηνική λάμινα αποτελείται από τις λαμίνες, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν πρώτα βιοχημικά ως πρωτεΐνες 60 έως 80kDa και τελικά ταυτοποιήθηκαν ως πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων (Intermediate Filament proteins). Οι πυρηνικές λαμίνες ανήκουν στην οικογένεια V της υπερ-οικογένειας των ενδιάμεσων ινιδίων. Εκφράζονται μόνο στα μετάζωα και φαίνεται να περιορίζονται στο ζωικό βασίλειο καθώς δεν έχουν αναγνωριστεί ομόλογες πρωτεΐνες σε διάφορους κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως οι *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* και *Schizosaccharomyces pombe*.

Οι πυρηνικές λαμίνες ταξινομούνται σε δυο κατηγορίες, τις A και B, με βάση δομικά και βιοχημικά κριτήρια και το πρότυπο έκφρασής τους. Σε γενικές γραμμές, οι λαμίνες τύπου A ομοιάζουν με τις λαμίνες τύπου B στο αμινοτελικό και στο κεντρικό ραβδοειδές τμήμα τους (central rod domain), αλλά περιέχουν ένα εκτεταμένο καρβοξυτελικό τμήμα, το οποίο φιλοξενεί μια αλληλουχία 90 αμινοξέων (εικόνα 1.3). Οι λαμίνες τύπου B είναι παρούσες σχεδόν σε όλα τα είδη κυττάρων, ενώ οι λαμίνες τύπου A εκφράζονται βάσει καθορισμένων χωρο-χρονικών προτύπων κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης. Οι παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των δυο τύπων λαμινών φαίνεται ότι αντανακλούν και τις λειτουργικές διαφοροποιήσεις των πρωτεϊνών.

Από το εναλλακτικό μάτισμα του αντίστοιχου RNA προκύπτουν διάφορες ισομορφές λαμινών. Το γονιδίωμα των θηλαστικών περιέχει τρία γονίδια λαμινών (LMNA, LMNB1 και LMNB2), τα οποία συνολικά εκφράζουν επτά ισομορφές. Το γονίδιο LMNA μέσω εναλλακτικού ματίσματος παράγει τέσσερις ισομορφές: τις δυο κύριες λαμίνες A και C και τις δυο ισομορφές C2 και AΔ10. Οι λαμίνες A και C είναι όμοιες στα πρώτα 566 αμινοξέα ενώ από τη λαμίνη C απουσιάζουν 98 αμινοξέα από το καρβοξυτελικό τμήμα, τα οποία βρίσκονται στην προ-λαμίνη A και περιέχουν μια αλληλουχία έξι αμινοξέων (εικόνα 1.3). Επιπρόσθετα, από τη λαμίνη C απουσιάζει το μοτίβο CAAX, το οποίο τροποποιείται με φαρνεσυλίωση και υποβοηθά την αγκυροβόληση των λαμινών στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη. Στις λαμίνες τύπου B ανήκουν οι B1 και B2, οι οποίες κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια (LMNB1 και LMNB2) και η B3, η οποία προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου LMNB2.



**Εικόνα 1.3 Οι πυρηνικές λαμίνες και η δομή τους.** Τα μόρια των κύριων λαμινών στους ανθρώπους. Το κεντρικό ραβδοειδές τμήμα α-έλικας αποτελείται από τέσσερις υποπεριοχές (1A, 1B, 2A, 2B) (με κίτρινο χρώμα) οι οποίες διαχωρίζονται μέσω των συνδετικών τμημάτων L1, L12 και L2. Το καρβοξυτελικό τμήμα των μορίων περιέχει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού, μια περιοχή IgG (με πράσινο χρώμα) και το συντηρημένο μοτίβο CAAX το οποίο φαρνεσυλιώνεται. Στο κάτω μέρος της εικόνας και στα αντίστοιχα πλαίσια αναπαριστώνται οι δομές ενός τμήματος της υποπεριοχής 2B του κεντρικού ραβδοειδούς τμήματος της ανθρώπινης λαμίνης A (αριστερά) και της IgG περιοχής της ανθρώπινης λαμίνης A/C (δεξιά). Από Dechat et al, 2008.

Όπως όλες οι πρωτεΐνες των ενδιαμέσων ινιδίων έτσι και οι πυρηνικές λαμίνες αποτελούνται από τρία τμήματα, ένα κεντρικό με δευτεροταγή δομή α-έλικας (central rod

domain), το οποίο πλαισιώνεται από ένα αμινοτελικό τμήμα και ένα καρβοξυτελικό τμήμα. Η κεντρική ελικοειδής περιοχή καταλαμβάνει σχεδόν το μισό μήκος του μορίου (περίπου 350 αμινοξέα) και αποτελείται από τέσσερις  $\alpha$ -έλικες (1A, 1B, 2A και 2B), οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με μικρές μη ελικοειδείς αλληλουχίες (L1, L12 και L2). Το αμινοτελικό τμήμα των λαμινών ποικίλει σε μέγεθος ενώ το καρβοξυτελικό τμήμα τους περιέχει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS), μια περιοχή Ig και ένα μοτίβο CAAX (εικόνα 1.3).

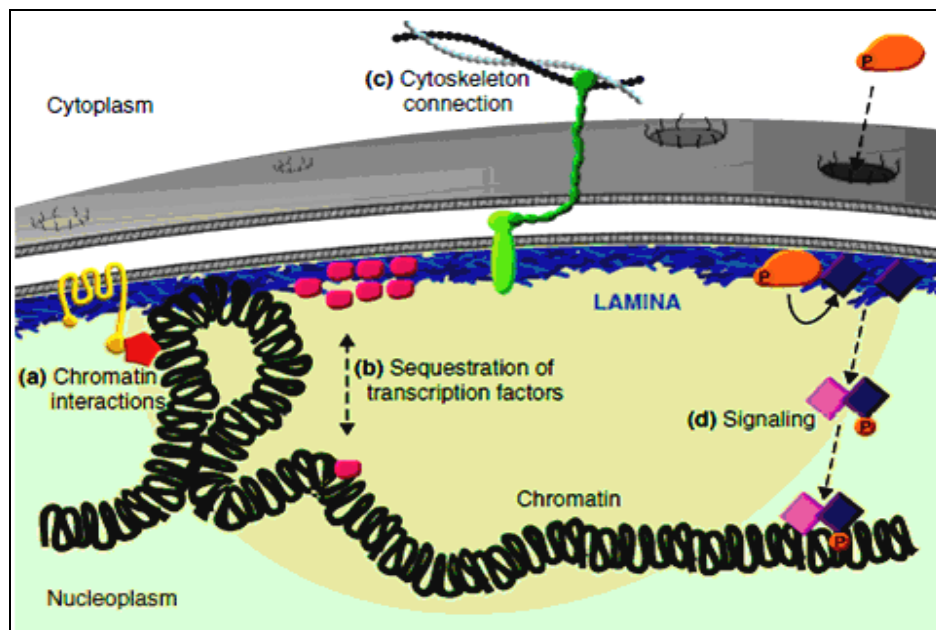
Οι λαμίνες τροποποιούνται μετα-μεταφραστικά με διάφορους τρόπους. Σχεδόν όλες περιέχουν το μοτίβο CAAX (κυστεΐνη, δύο αλειφατικά αμινοξέα, οποιοδήποτε αμινοξύ) στο καρβοξυτελικό τους άκρο, το οποίο αποτελεί θέση φαρνεσυλίωσης της πρωτεΐνης. Η φαρνεσυλίωση πραγματοποιείται σε τρία διαδοχικά στάδια και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

Πολλές διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες σχετίζονται με την πυρηνική λάμινα. Κύρια λειτουργία αυτών των ινιδίων είναι η παροχή δομικής στήριξης στον πυρήνα και ίσως η ρύθμιση της απόστασης μεταξύ των πυρηνικών πόρων. Οι λαμίνες παρέχουν μηχανική υποστήριξη στον πυρήνα, δρώντας ως ελαστικά-δομικά (tensegrity) στοιχεία τα οποία καθορίζουν την μορφολογία του πυρήνα και την αντοχή του στην παραμόρφωση. Η απουσία της λαμίνης A από τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα έχει προταθεί ως μια πιθανή εξήγηση για την πιο εύπλαστη και πλαστικά παραμορφώσιμη φύση του πυρήνα τους.

Οι λαμίνες μετέχουν ενεργά στην ανασυγκρότηση του πυρήνα μετά την κυτταρική διαίρεση. Στην μίτωση, όταν ο πυρηνικός φάκελος διασπάται και η πυρηνική λάμινα αποικοδομείται, οι λαμίνες τύπου A διαλυτοποιούνται και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, ενώ οι λαμίνες τύπου B παραμένουν συνδεδεμένες με μεμβρανικά τμήματα. Κατά την δημιουργία του υπό συγκρότηση πυρήνα γύρω από τα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα, οι λαμίνες τύπου A εισέρχονται στον πυρήνα μαζί με επιπλέον μόρια λαμίνης B.

Διάφορες μελέτες υποστηρίζουν συσχέτιση μεταξύ των λαμινών και των σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία είναι σημαντικά για την κυτταρική διαφοροποίηση και ομοίωση (εικόνα 1.4). Διαμέσου των αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες, οι λαμίνες

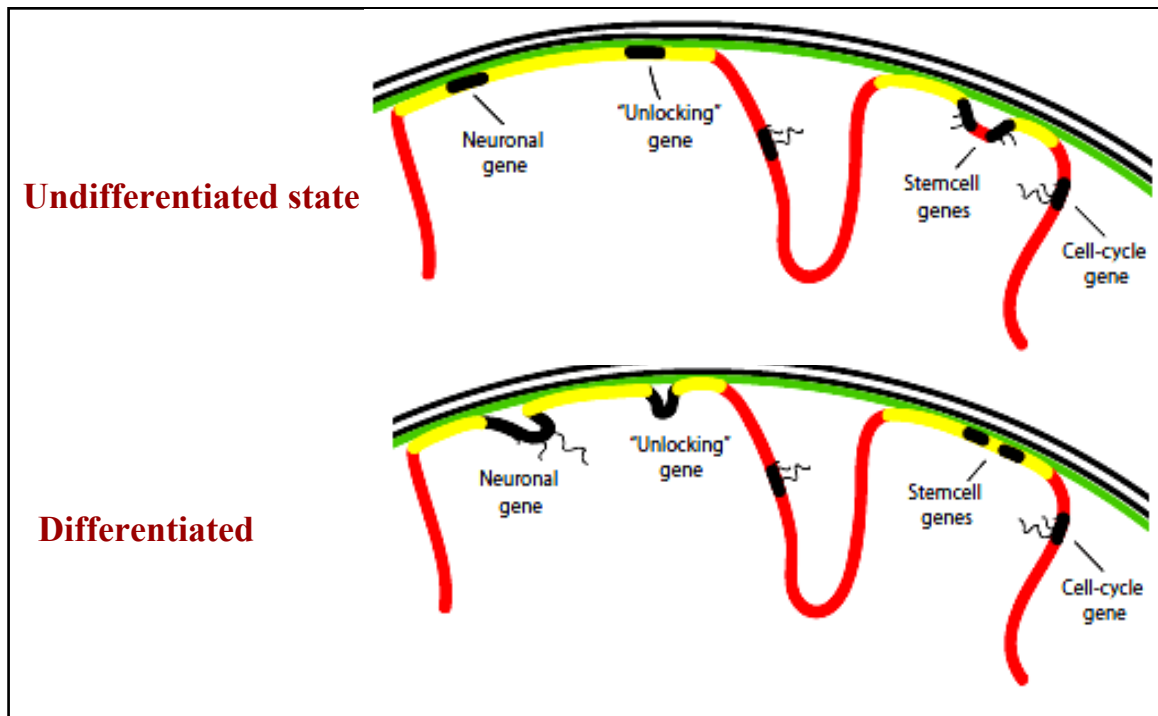
ρυθμίζουν την ενεργότητα και διαθεσιμότητα πολλών πρωτεϊνών στα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως των μονοπατιών Rb, Wnt, TGFβ και MAP.



**Εικόνα 1.4** Πιθανές λειτουργίες των λαμινών. (A) Οι πυρηνικές λαμίνες ρυθμίζουν την οργάνωση και τη δομή της χρωματίνης είτε άμεσα αλληλεπιδρώντας με αυτή είτε έμμεσα μέσω αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες-τροποποιητές. (B) Οι λαμίνες ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση διαμερισματοποιώντας διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες στην περιφέρεια του πυρήνα. (C) Μεσολαβούν στην δομική συνέκωση του πυρήνα με το κυτταρόπλασμα, διαμέσου του συμπλόκου LINC, το οποίο αποτελείται από τις λαμίνες, μια πρωτεΐνη της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης και μια πρωτεΐνη της εξωτερικής πυρηνικής μεμβράνης. (D) Το δίκτυο των λαμινών παρέχει ένα υπόβαθρο για την συγκέντρωση πρωτεϊνικών συμπλόκων τα οποία εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια. Από Worman, 2012.

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν τη συμμετοχή των λαμινών στη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας. Οι λαμίνες φαίνεται να είναι γενικοί ρυθμιστές της χρωματίνης. Μεταγραφικά ανενεργές περιοχές του γενώματος όπως τα κεντροσώματα, τα τελομερή και το ανενεργό X χρωμόσωμα, συνήθως εντοπίζονται κοντά στο δίκτυο της πυρηνικής λάμινας. Έχει δειχθεί ότι κατά την διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων προς πρόδρομα νευρωνικά κύτταρα, αυτές οι μεταγραφικά ανενεργές περιοχές που βρίσκονται πλησίον του πυρηνικού φακέλου, σταδιακά απομακρύνονται και τα αντίστοιχα γονίδια ενεργοποιούνται (εικόνα 1.5). Σε αντίθεση, μεταγραφικά ενεργά γονίδια, όπως αυτά των παραγόντων πολυδυναμίας των βλαστικών κυττάρων, πλησιάζουν στην πυρηνική λάμινα και αποσιωπώνται (Peric-Hupkes et al, 2010).





**Εικόνα 1.5 Μοντέλο των δυναμικών αλληλεπιδράσεων χρωματίνης – πυρηνικής λάμινας κατά την διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων.** Με πράσινο χρώμα αναπαριστάται η πυρηνική λάμινα, με κίτρινο οι ετεροχρωματινικές περιοχές, με κόκκινο η χρωματίνη σε ενεργή κατάσταση και με μαύρο τα γονίδια. Undifferentiated state: αδιαφοροποίητα βλαστικά κύτταρα, differentiated state: διαφοροποίηση των κυττάρων προς πρόδρομα νευρωνικά κύτταρα. Από Peric-Hupkes et al, 2010.

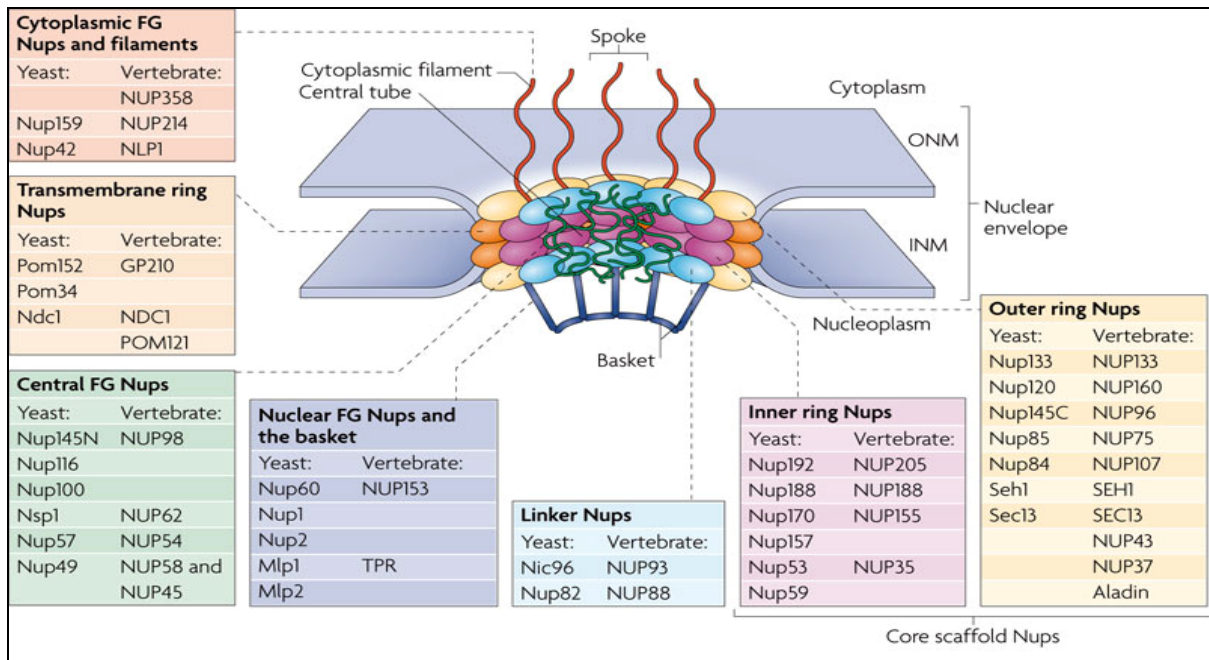
#### 1.1.4 Τα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων

Ο μοναδικός τρόπος ανταλλαγής μακρομορίων και μεταβολιτών μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος είναι η δίοδος των συμπλεγμάτων των πυρηνικών πόρων. Τα συμπλέγματα αυτά είναι πρωτεϊνικές κυλινδρικές δομές, που εγκαθίστανται σε σημεία σύντηξης της εξωτερικής και εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης και καταλαμβάνουν περίπου το 5-30% της επιφάνειας του πυρηνικού φακέλου. Σε ένα τυπικό ευκαρυωτικό κύτταρο HeLa υπάρχουν περίπου 2000-4000 πόροι (Suntharalingam et al, 2003). Μέσω των συμπλεγμάτων των πυρηνικών πόρων εισάγονται στον πυρήνα πυρηνικές πρωτεΐνες, ριβοσωμικές πρωτεΐνες και ώριμα μικρά πυρηνικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (snRNPs), ενώ εξάγονται στο κυτταρόπλασμα tRNAs, mRNAs και πρόδρομες μορφές των ριβοσωμάτων. Μικρά μόρια περίπου 20-40kDa διαχέονται ελεύθερα μέσα από τα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων, ενώ για τα μεγαλύτερα μόρια απαιτούνται μηχανισμοί ενεργού μεταφοράς (Bagley et al, 2000). Με βάση νεότερες μελέτες, φαίνεται ότι τα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων δεν αποτελούν μόνο πύλες μεταφοράς ουσιών αλλά διαδραματίζουν ρόλο και στη γενικότερη

δομή του πυρήνα, όπως στην οργάνωση της χρωματίνης. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι σε κύτταρα ζύμης η νουκλεοπορίνη Nup153 εμπλέκεται στη σύνδεση των τελομερών με τον πυρηνικό φάκελο (Galy et al, 2000).

Η δομή των πυρηνικών πόρων έχει μελετηθεί με διάφορες τεχνικές ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Οι μελέτες αυτές έχουν αποκαλύψει ότι η γενικότερη αρχιτεκτονική τους είναι εξελικτικά συντηρημένη από τους μύκητες μέχρι τον άνθρωπο. Συγκεκριμένα, οι πυρηνικοί πόροι εμφανίζουν χαρακτηριστική οκταεδρική συμμετρία και αποτελούνται από τρεις δακτυλίους: τον εσωτερικό, τον κυτταροπλασματικό και τον πυρηνοπλασματικό (εικόνα 1.6). Από τον κυτταροπλασματικό και πυρηνοπλασματικό δακτύλιο εκφύονται οκτώ ινίδια προς το κυτταρόπλασμα και το πυρηνόπλασμα αντίστοιχα. Επιπλέον, τα ινίδια του πυρηνοπλασματικού δακτυλίου ενώνονται με έναν τελικό δακτύλιο και σχηματίζουν ένα «καλάθι». Ανάμεσα στους παραπάνω δακτυλίους βρίσκεται ένας τρίτος δακτύλιος, ο οποίος αποτελείται από οκτώ ακτινωτά διατεταγμένους κυλίνδρους. Στο κέντρο των τριών δακτυλίων σχηματίζεται ο κεντρικός διάυλος μήκους περίπου 90nm και πλάτους 50nm ενώ ανάμεσα στους κυλίνδρους του κεντρικού δακτυλίου υπάρχουν περιφερικά κανάλια με μικρότερη διάμετρο (Stoffler et al, 2003).

Όσον αφορά τη δομή των συμπλεγμάτων των πυρηνικών πόρων, έχει βρεθεί ότι στα θηλαστικά αποτελούνται από 30 πρωτεΐνες, τις νουκλεοπορίνες, οι οποίες σχηματίζουν μεγαλομοριακά σύμπλοκα μοριακού μεγέθους περίπου 40MDa. Η κάθε νουκλεοπορίνη αντιπροσωπεύεται από τουλάχιστον οκτώ αντίγραφα ή από αριθμό πολλαπλάσιο του οκτώ, εξαιτίας της οκταεδρικής συμμετρίας των πυρηνικών πόρων (Cronshaw et al, 2002). Οι πυρηνικοί πόροι των θηλαστικών περιέχουν τρεις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (POM121, gp210 και ndc1) οι οποίες συνδέουν τους πυρηνικούς πόρους στην πυρηνική μεμβράνη. Οι υπόλοιπες νουκλεοπορίνες είναι διαλυτές και εντοπίζονται είτε στην κυτταροπλασματική πλευρά ή στην πυρηνοπλασματική, ενώ κάποιες απαντώνται και στις δύο πλευρές. Ένα μεγάλο ποσοστό των νουκλεοπορινών περιέχουν στο μόριό τους επαναλήψεις φαινυλαλανίνης-γλυκίνης (FG επαναλήψεις) οι οποίες πιστεύεται ότι επάγουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νουκλεοπορινών και των υποδοχέων-μεταφορέων (Fahrenkrog et al, 2004).



**Εικόνα 1.6 Σχηματική δομή του συμπλέγματος των πυρηνικών πόρων.** Τα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων αποτελούνται από δυο δακτυλίους, τον κυτταροπλασματικό και τον πυρηνόπλασματικό, από τους οποίους προβάλλουν οκτώ ινίδια στο κυτταρόπλασμα και το πυρηνόπλασμα αντίστοιχα. Τα ινίδια του πυρηνόπλασματος ενώνονται σε μια δομή που ονομάζεται «πυρηνικό καλάθι». Ανάμεσα στους παραπάνω δακτυλίους υπάρχει ο εσωτερικός δακτύλιος, στο κέντρο του οποίου σχηματίζεται ένας δίαυλος που φιλοξενεί τον μεταφορέα. Στην εικόνα αναφέρονται και οι νουκλεοπορίνες που συμμετέχουν στη συγκρότηση των συμπλεγμάτων των πυρηνικών πόρων τόσο στη ζύμη όσο και στα θηλαστικά. Από Strambio-De-Castillia et al, 2010.

### 1.1.5 Η οργάνωση της χρωματίνης

Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί διαθέτουν πολλούς μηχανισμούς συμπύκνωσης της χρωματίνης καθώς το ολικό μήκος του DNA είναι εκατοντάδες χιλιάδες φορές μεγαλύτερο από το μήκος του πυρήνα. Στα κύτταρα των ανθρώπων, για παράδειγμα, το DNA έχει μήκος περίπου δυο μέτρα και πρέπει να χωρέσει στον πυρήνα με διάμετρο λιγότερο από 10μm, να συμπυκνωθεί δηλαδή περισσότερο από 105 φορές (Horn and Peterson, 2002 και Razin et al, 2007).

Επομένως, η συμπύκνωση του DNA με τρόπο που να παραμένει λειτουργικό έχει μεγάλη σημασία για την αρχιτεκτονική του κυττάρου. Κατά την μεσόφαση, το γενετικό υλικό έχει τη μορφή ενός νουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου, της χρωματίνης, η οποία καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του πυρήνα. Περαιτέρω συμπύκνωση και αναδίπλωση της χρωματίνης κατά τη διάρκεια της μίτωσης δημιουργεί τα μεταφασικά χρωμοσώματα, των οποίων η μορφολογία και τα χαρακτηριστικά πρότυπα χρώσης έχουν προσδιοριστεί από

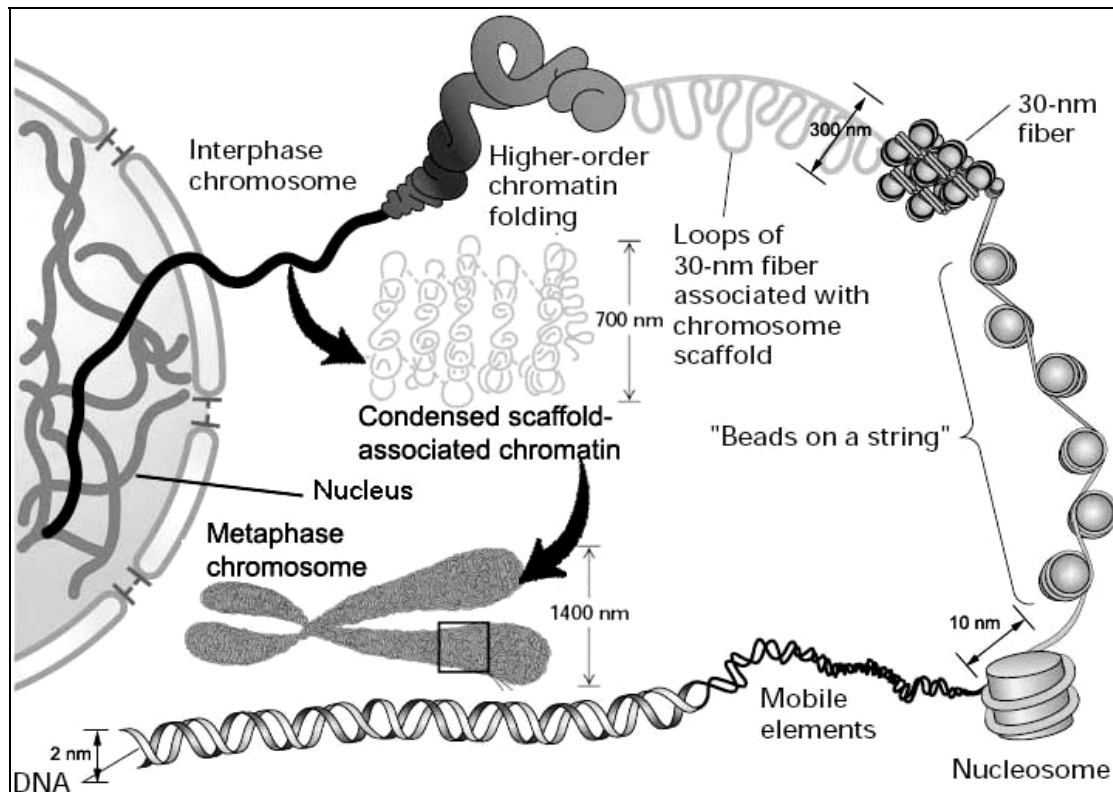
πολύ νωρίς (Lodish et al, 2003). Η συμπύκνωση του DNA πραγματοποιείται από πρωτεΐνες οι οποίες το περιστρέφουν και το αναδιπλώνουν σε όλο και μεγαλύτερο βαθμό οργάνωσης.

Η δομή της χρωματίνης είναι εντυπωσιακά όμοια στα κύτταρα όλων των ευκαρυωτών, περιλαμβανομένων των μυκήτων, των φυτών και των ζώων. Οι πρωτεΐνες που συνδέονται με το DNA είναι κυρίως οι ιστόνες, μια οικογένεια από μικρές βασικές πρωτεΐνες, που εκφράζονται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι ιστόνες υπάρχουν σε τόσο μεγάλες ποσότητες στο κύτταρο (περίπου 60 εκατομμύρια μόρια ανά κύτταρο) ώστε η ολική τους μάζα ισούται με αυτή του DNA στο σύμπλοκο της χρωματίνης. Οι ιστόνες είναι υπεύθυνες για το πρώτο και σπουδαιότερο στάδιο οργάνωσης της χρωματίνης, το σχηματισμό του νουκλεοσώματος.

Οι πέντε τύποι των ιστονικών πρωτεϊνών, οι H1, H2A, H2B, H3 και H4, είναι εμπλουτισμένοι σε θετικά φορτισμένα βασικά αμινοξέα, τα οποία αλληλεπιδρούν με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του DNA. Οι αμινοξικές αλληλουχίες των ιστονών του νουκλεοσωμικού πυρήνα (core histones) H2A, H2B, H3 και H4, οι οποίες σχηματίζουν το πυρήνα του νουκλεοσώματος, είναι αξιοσημείωτα όμοιες μεταξύ γενετικά απομακρυσμένων ειδών. Αντίθετα, η αμινοξική αλληλουχία της συνδετικής ιστόνης (linker histone) H1, η οποία ενώνεται με το συνδετικό DNA (το ελεύθερο DNA μεταξύ δυο νουκλεοσωμάτων) ποικίλει ανάμεσα στους οργανισμούς (Lodish et al, 2003).

Η εικόνα 1.7 αναπαριστά διαγραμματικά τους κυριότερους μηχανισμούς συμπύκνωσης του DNA για το σχηματισμό των χρωμοσωμάτων.

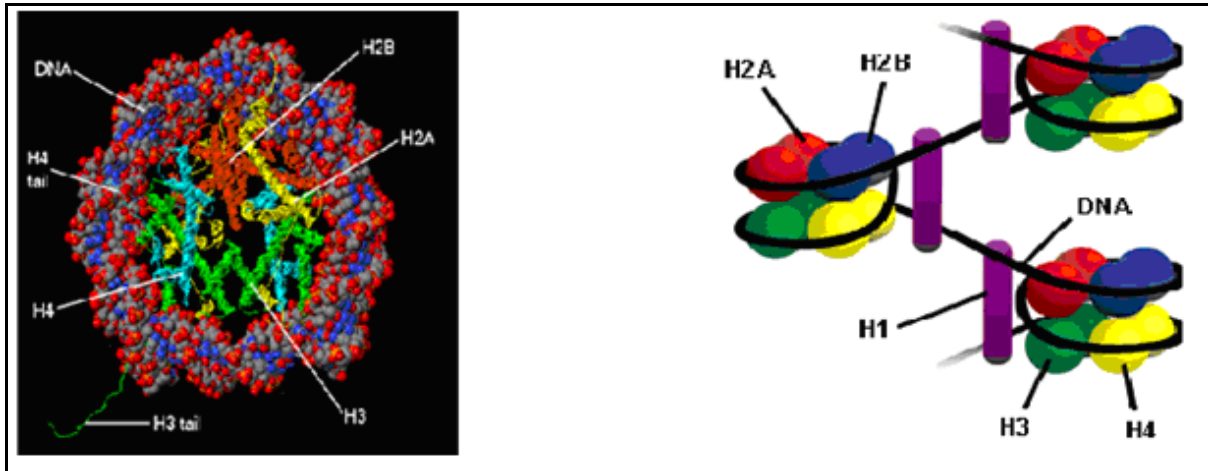
Τα νουκλεοσώματα έχουν διάμετρο περίπου 11nm και αποτελούνται από έναν πρωτεϊνικό πυρήνα και μια διπλή έλικα DNA, η οποία περιελίσσεται γύρω από τα σωματίδια για περίπου 1.65 στροφές και ισοδυναμεί με 146-147 ζεύγη νουκλεοτιδίων. Ο πυρήνας του νουκλεοσώματος αποτελείται από ένα οκταμερές ιστονών, H2A, H2B, H3 και H4 (εικόνα 1.8 και 1.9) (Horn and Peterson, 2002). Η δομή υψηλής ανάλυσης του πυρήνα του νουκλεοσώματος, αναλύθηκε το 1997 από τη Luger και αποκάλυψε ένα σύμπλοκο σε σχήμα δίσκου (disc-shaped histone core) με το DNA να περιστρέφεται αριστερόστροφα, γύρω από αυτό. Για το σχηματισμό του νουκλεοσώματος, συνδέονται αρχικά οι ιστόνες ώστε να σχηματίσουν τα διμερή H3-H4 και H2A-H2B και στη συνέχεια τα H3-H4 διμερή σχηματίζουν τετραμερή. Το (H3-H4)<sub>2</sub> τετραμερές συμπλοκοποιείται με δυο H2A-H2B διμερή και σχηματίζει τον πυρήνα γύρω από τον οποίο θα περιελιχθεί το DNA (εικόνα 1.8) (Razin et al, 2007).



**Εικόνα 1.7 Σύνοψη του μηχανισμού συμπύκνωσης της χρωματίνης.** Η διπλή έλικα του DNA συσπειρώνεται για να σχηματίσει το νουκλεόσωμα το οποίο συμπυκνώνεται περαιτέρω στη μορφή κομπολογιού. Σε ένα δεύτερο επίπεδο, η δομή συμπυκνώνεται για να σχηματίσει την ίνα των 30nm, η οποία αποτελεί τη βάση για το σχηματισμό της χρωματίνης. Από Lodish et al, 2003 και Horn and Peterson, 2002.

Η δομή του κομπολογιού αναπαριστά το πρώτο επίπεδο συμπύκνωσης του χρωμοσωμικού DNA. In vitro παρατηρήσεις με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξαν την ύπαρξη μιας δομής σε μορφή χάντρας σε νήμα (beads on a string). Το νήμα είναι το συνδετικό DNA και κάθε χάντρα είναι το νουκλεόσωμα. Ο μηχανισμός για το σχηματισμό της ίνας των 30nm δεν είναι πλήρως γνωστός. Το σωληνοειδές μοντέλο (solenoid model, Finch and Klug, 1976) προτείνει ότι τα νουκλεοσώματα οργανώνονται σε ακανόνιστες σπειροειδείς ή σωληνοειδείς δομές, με περίπου έξι νουκλεοσώματα ανά στροφή (Robinson et al, 2006 και Tremethick, 2007). Η συνδετική ιστόνη H1 πιθανώς συνδέεται με το DNA στο εσωτερικό του σωληνοειδούς, με ένα μόριο H1 ανά νουκλεόσωμα (εικόνα 1.9). Αυτό που ξέρουμε μέχρι στιγμής είναι ότι ο σφαιροειδής τομέας (globular domain) και το καρβοξυτελικό άκρο της ιστόνης H1 συνδέονται στην επιφάνεια του νουκλεοσώματος και είναι σε επαφή τόσο με DNA όσο και με άλλες πρωτεΐνες στα σημεία εισόδου και εξόδου του DNA (εικόνα 1.10A) (Hendzel et al, 2004 και Robinson et al, 2006). Αν και ο ακριβής μηχανισμός, η στοιχειομετρία και ο ρόλος της H1 στο σχηματισμό της ίνας των 30nm δεν

είναι πλήρως κατανοητός, φαίνεται ότι η H1 χρειάζεται για να σταθεροποιήσει μάλλον παρά για να σχηματίσει την ίνα (Robinson et al, 2006, Thomas, 1999, Bustin et al, 2005 και Woodcock et al, 2006).

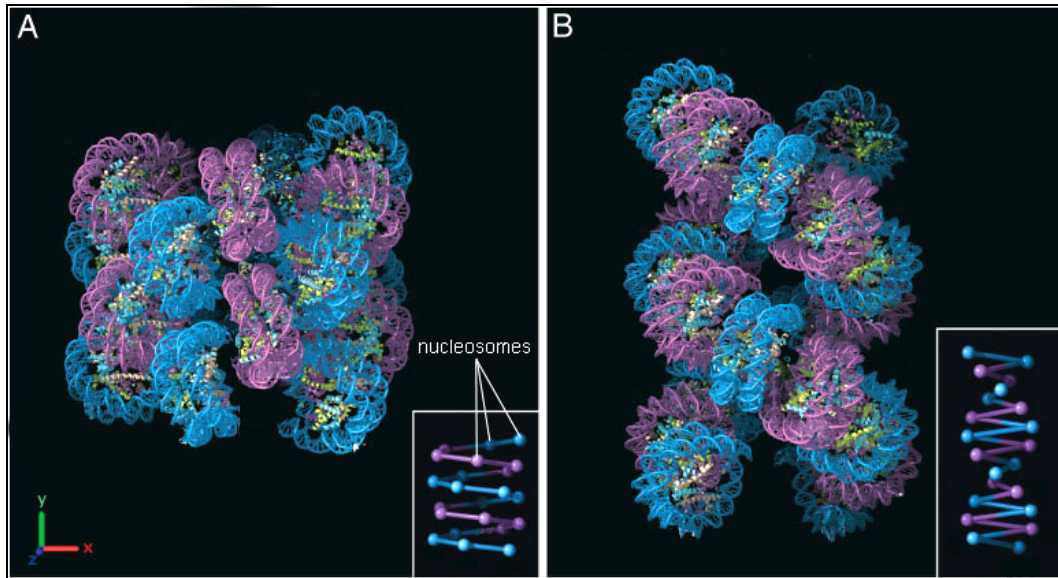


**Εικόνα 1.8** Τρισδιάστατη δομή του νουκλεοσώματος από ανάλυση κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ. Το δίκλωνο DNA περιελίσσεται γύρω από τις υπομονάδες των ιστονών (H2A, H2B, H3 και H4) παρέχοντας στο νουκλεόσωμα τη μορφή δίσκου. Από [www.jmol.org](http://www.jmol.org), 2007.

**Εικόνα 1.9** Το σωληνοειδές μοντέλο σχηματισμού των νουκλεοσωμάτων. Τα οκταμερή των ιστονών σχηματίζονται από δυο αντίγραφα κάθε ιστόνης H2A, H2B, H3 και H4, γύρω από τα οποία περιελίσσεται το DNA. Ένα μόριο ιστόνης H1 συνδέεται με το συνδετικό DNA σε κάθε άκρη του νουκλεοσώματος. Από Pennington, 2007.

Ένας δεύτερος μηχανισμός για το σχηματισμό της ίνας των 30nm φαίνεται να εμπλέκει τις ουρές των ιστονών, οι οποίες προεξέχουν από τα νουκλεοσώματα. Οι ουρές βοηθούν τα νουκλεοσώματα να συνδέονται μεταξύ τους και να σχηματίζουν μια αλυσίδα (string), η οποία με τη βοήθεια της ιστόνης H1 συμπυκνώνεται στην ίνα των 30nm (Robinson et al, 2006). Αυτό το μοντέλο ζικ-ζακ έλικας διπλής αρχής (zig zag two-start helix model, Woodcock et al, 1993) προτείνει ότι τα νουκλεοσώματα τοποθετούνται σε πιο «ακανόνιστη» διάταξη, ώστε να σχηματιστούν δυο σειρές νουκλεοσωμάτων με το συνδετικό DNA να διασταυρώνεται (criss-crosses) μεταξύ τους (εικόνα 1.10B).

Έλικες (loops) της χρωματινικής ίνας των 30nm, 50-200 kbp σε μήκος, προσφύονται σε μια εύπλαστη χρωμοσωμική μήτρα (flexible chromosome scaffold) και παράγουν μια ανώτερη δομή χαρακτηριστική των χρωμοσωμάτων κατά την μεσόφαση. Η αναδίπλωση της μήτρας έχει προταθεί ότι παράγει την δομή υψηλής συμπύκνωσης που χαρακτηρίζει τα μεταφασικά χρωμοσώματα (εικόνα 1.7) (Lodish et al, 2003 και Razin et al, 2007).



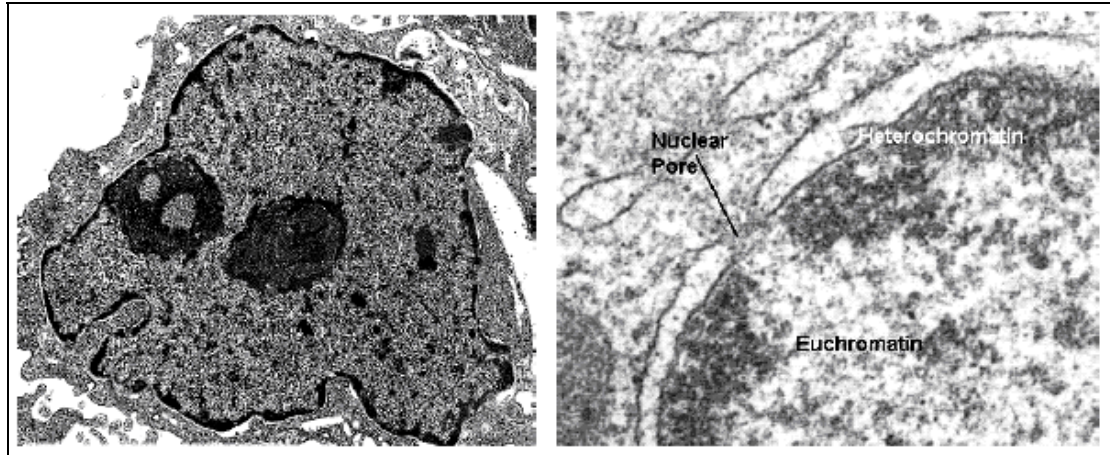
**Εικόνα 1.10** Δυο πιθανολογούμενα μοντέλα για το σχηματισμό της ίνας των 30nm. Τα εναλλασσόμενα ζεύγη των νουκλεοσωμάτων διακρίνονται με μπλε και μωβ. (Α) Το σωληνοειδές μοντέλο. Η συνδετική ιστόνη H1 είναι η κινητήριος δύναμη για το πακετάρισμα 22 νουκλεοσωμάτων στην δομή των 33nm. (Β) Το μοντέλο ζικ-ζακ έλικας διπλής αρχής. Οι ουρές των ιστονών μαζί με την συνδετική ιστόνη H1 πακετάρουν τα 22 νουκλεοσώματα σε μια δομή, η οποία έχει διάμετρο 28.4nm. Από Robinson et al, 2006.

Πειράματα *in vitro* έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση της H1 με τα νουκλεοσώματα σταθεροποιεί την συμπαγή δομή της χρωματίνης και αναστέλλει DNA-εξαρτώμενες διαδικασίες, όπως τη μεταγραφή και την αντιγραφή. Η ιστόνη H1 περιορίζει την κινητικότητα των νουκλεοσωμάτων, εμποδίζει την ελεύθερη πρόσβαση ρυθμιστικών παραγόντων στη χρωματίνη και παρεμποδίζει τη δράση των συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (Zlatanova et al, 2000 και Catez et al, 2006). Η μη φυσιολογική οργάνωση και λειτουργία των νουκλεοσωμάτων μπορεί να οδηγήσει σε μια πληθώρα δυσλειτουργιών (Hoch et al, 2007).

Μέσα στον πυρήνα υπάρχουν περιοχές στις οποίες τα επίπεδα συμπύκνωσης της χρωματίνης διαφέρουν. Οι περιοχές αυτές, ανάλογα με την ηλεκτροσκοιερότητά τους, διακρίνονται σε χρωματίνη υψηλής συμπύκνωσης ή ετεροχρωματίνη (heterochromatin) και χαλαρότερης μορφής χρωματίνη ή ευχρωματίνη (euchromatin) (εικόνα 1.11).

Η ευχρωματίνη καλύπτει τη μεγαλύτερη επιφάνεια εντός του πυρήνα. Η χαλαρότερη δομή της την κάνει ευκολότερα προσβάσιμη σε μεταγραφικούς παράγοντες και επομένως μεταγράφεται ενεργά. Αντίθετα, η ετεροχρωματίνη είναι λιγότερο προσβάσιμη και περιέχει μεγάλα τμήματα επαναλαμβανόμενου DNA (repetitive DNA) και πολύ λίγα εκφραζόμενα

γονίδια. Διακρίνεται σε περικεντρομεριδιακή ή ιδιοσυστατική (constitutive) και σε περιστασιακή (facultive). Η πρώτη παραμένει συμπυκνωμένη καθ' όλη τη διάρκεια ζωής ενός οργανισμού, ενώ η δεύτερη έχει πιο δυναμικό χαρακτήρα και μπορεί υπό διάφορες συνθήκες να «ευχρωματοποιείται».



**Εικόνα 1.11** Ηλεκτρονική μικρογραφία ευκαρυωτικού κυττάρου εμφανίζει την ετεροχρωματίνη (σκουρόχρωμες περιοχές) να βρίσκεται κυρίως γύρω από τους πυρηνίσκους και την περιφέρεια του πυρήνα (αριστερά). Δεξιά φαίνεται η κατανομή των δύο μορφών της χρωματίνης στην περιφέρεια του πυρήνα. Από Franke W, 1974.

#### 1.1.6 Η οργάνωση του πυρήνα στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα

Αν και τα κύτταρα περιέχουν το ίδιο γενετικό υλικό, η γονιδιακή έκφραση είναι αρκετά διαφορετική μεταξύ των κυτταρικών τύπων, υποδεικνύοντας την ύπαρξη ενός συστήματος συντονισμού και διατήρησης της έκφρασης διαφορετικών γονιδίων ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Οι παρατηρήσεις αυτές έχουν ιδιαίτερη σημασία στην περίπτωση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, όπου η αυτο-ανανέωση απαιτεί τη διαίρεση του γενώματος χωρίς απώλεια της πολυδυναμίας και η διαφοροποίηση των κυττάρων οδηγεί σε πολύπλοκες αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση οι οποίες επιτρέπουν τα κύτταρα να ακολουθήσουν συγκεκριμένες κυτταρικές κατευθύνσεις. Ο πυρηνικός φάκελος πιθανώς να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο σε αυτές τις διαδικασίες καθώς οργανώνει τα χρωμοσώματα και εμπεριέχει διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα με τη γονιδιακή έκφραση.

Μελέτες σε ανθρώπινα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα έδειξαν ότι τα χρωμοσώματα εντοπίζονται σε διακριτές χρωμοσωμικές περιοχές, όμοιες με αυτές των σωματικών κυττάρων. Για παράδειγμα, ο εντοπισμός των χρωμοσωμάτων 18 και 19 είναι αξιοσημείωτα



όμοιος μεταξύ των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων και των λεμφοβλαστοειδών κυττάρων, με το χρωμόσωμα 19 να βρίσκεται εσωτερικά στον πυρήνα σε σχέση με το χρωμόσωμα 18, υποδηλώνοντας τη διατήρηση της χρωμοσωμικής δομής ανεξαρτήτως κυτταρικού τύπου. Ιδιαίτερο ρόλο στην οργάνωση της χρωματινικής δομής στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα φαίνεται να έχει ο παράγοντας πολυδυναμίας Oct4, καθώς έλλειψη του παράγοντα προκαλεί αποδιοργάνωση της χρωματινικής δομής των κυττάρων (Morris et al, 2010).

Επιπλέον, τρισδιάστατη μορφολογική ανάλυση των X χρωμοσωμάτων σε θηλυκά εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα έδειξε ότι το «ενεργό» X χρωμόσωμα είναι πιο επιμήκες σε σύγκριση με το ανενεργό X, το οποίο είναι σφαιρικό. Μορφολογική ανάλυση του έβδομου χρωμοσώματος έδειξε ότι έχει παρόμοιο σχήμα και όγκο με το ενεργό X χρωμόσωμα, υποστηρίζοντας ότι τα «ενεργά» χρωμοσώματα εμφανίζουν πιο πεπλατισμένη, επιμήκης μορφολογία, η οποία επιτρέπει την ανάπτυξη περισσότερων σημείων επαφής με παράγοντες και ενισχύει την μεταγραφική δραστηριότητα (Rasmussen, 2003).

Το γονιδίωμα των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων είναι μεταγραφικά πιο ενεργό από αυτό των διαφοροποιημένων κυττάρων. Αυτή η μεταγραφική ενεργότητα ίσως είναι συνέπεια της πιο ευχρωματινικής δομής, καθώς η χρωματίνη είναι πιο προσβάσιμη σε μεταγραφικούς παράγοντες. Πράγματι, μελέτη των εκφραζόμενων γονιδίων έδειξε ότι η πλειοψηφία αυτών κωδικοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες και παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την δημιουργία πιο ευχρωματινικής δομής στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (Morris et al, 2010).

Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι για τη διατήρηση της πιο ευχρωματινικής δομής στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα κύριο ρόλο διαδραματίζει ο παράγοντας αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης Chd1. Έχει βρεθεί ότι βλαστικά κύτταρα ποντικού απουσία του παράγοντα εμφανίζουν ετεροχρωματίνη όμοια με αυτή διαφοροποιημένων κυττάρων και τα κύτταρα χάνουν την πολυδυναμία τους, υποδηλώνοντας τη σημασία του παράγοντα Chd1 στην εγκαθίδρυση της πολυδυναμίας των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (Morris et al, 2010).

Ακόμη, έχει προταθεί ότι ο πυρήνας των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων είναι λιγότερο δομημένος σε σχέση με τα διαφοροποιημένα κύτταρα. Είναι πιθανό τα απαραίτητα στοιχεία για το σχηματισμό διαφόρων δομών να υπάρχουν στα αδιαφοροποίητα κύτταρα, αλλά αυτά να είναι διάσπαρτα σε ένα σχετικά αποδιοργανωμένο περιβάλλον, το οποίο δομείται καθώς ξεκινά η διαδικασία της διαφοροποίησης (Li et al, 2012).

Κατά τη διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, διάφορα γονίδια αποσιωπώνται ή ενεργοποιούνται και αλλάζει η δομή της χρωματίνης, ανάλογα με την

κυτταρική κατεύθυνση. Το πιο μελετημένο σύστημα είναι αυτό της απενεργοποίησης του X χρωμοσώματος (XCI), όπου μια σειρά από καθορισμένα βήματα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης οδηγούν στην αποσιώπηση του ενός X χρωμοσώματος στα θηλυκά εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (Li et al, 2012).

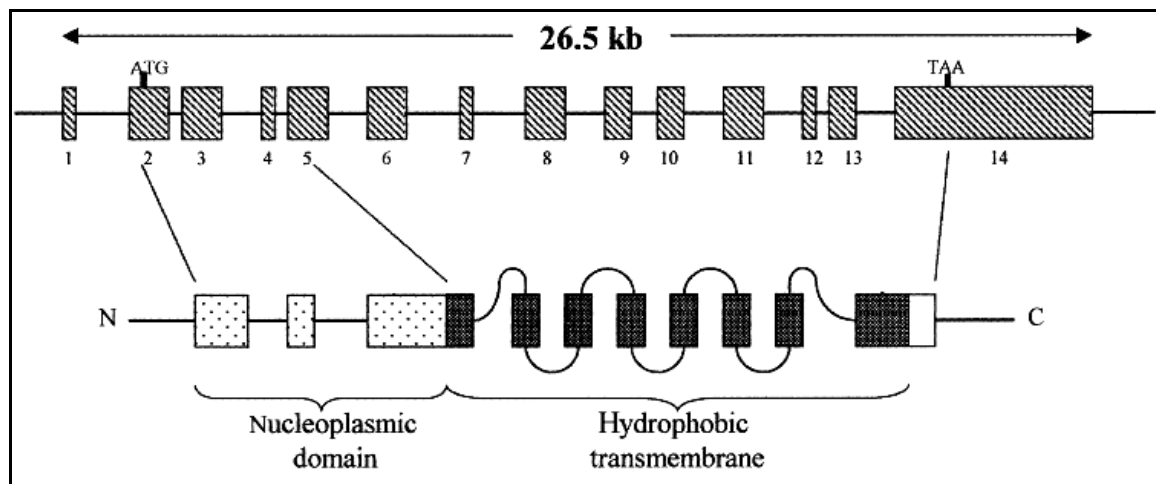
Επιπρόσθετα όλων αυτών, έχουν αναφερθεί και άλλες μεγαλύτερης εγκυρότητας χρωματινικές δομές στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Τα κεντρομερή σχηματίζουν συμπλέγματα τα οποία εντοπίζονται πιο κεντρικά στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα σε σχέση με τα διαφοροποιημένα κύτταρα, ενώ κατά τη διαφοροποίηση οι δομές αυτές μετατοπίζονται προς την περιφέρεια του πυρήνα. Σύγκριση των ετεροχρωματινικών περιοχών μεταξύ εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων και διαφοροποιημένων κυττάρων, έδειξε ότι η ετεροχρωματίνη υφίσταται σημαντικές χωροταξικές αλλαγές με την έναρξη της διαφοροποίησης. Στα βλαστικά κύτταρα, η ετεροχρωματίνη εμφανίζεται κυρίως σε διάχυτες δομές, ενώ στα κύτταρα προς διαφοροποίηση η ετεροχρωματίνη συμπυκνώνεται περαιτέρω και συγκεντρώνεται σε διακριτές περιοχές. Αυτή η συμπύκνωση της ετεροχρωματίνης συνοδεύεται και από διάφορες επιγενετικές τροποποιήσεις όπως τριμεθυλίωση της ένατης λυσίνης της ιστόνης H3 (H3K9me3), μείωση του ποσοστού ακετυλίωσης των ιστονών H3 και H4 και αύξηση της μεθυλίωσης του DNA (Morris et al, 2010).

Τέλος, ο πυρηνικός φάκελος των πολυδύναμων κυττάρων είναι αρκετά διαφορετικός από αυτόν των σωματικών κυττάρων. Από τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα απουσιάζουν οι λαμίνες A και C, αλλά όχι οι λαμίνες B1 και B2. Οι λαμίνες A/C εμφανίζονται νωρίς κατά την έναρξη της διαφοροποίησης, πριν από την μειορύθμιση του παράγοντα πολυδυναμίας Oct4, ενώ η σύνδεση της λαμίνης B με τη χρωματίνη φαίνεται να είναι πιο δυναμική στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Τα ιδιαίτερα αυτά πρότυπα έκφρασης των λαμινών φαίνεται να επηρεάζουν την μορφολογία του πυρήνα, με την απουσία της λαμίνης A να συνεισφέρει στην πλαστικότητα και την κινητική της χρωματίνης των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ενώ η έκφρασή της κατά τη διαφοροποίηση ίσως αποτελεί σημαντικό στοιχείο για τη διαδικασία ή/και τη διατήρηση της διαφοροποίησης. Λεπτομερής ανάλυση της δομής του πυρηνικού φακέλου έδειξε ότι ο αυλός μεταξύ των δυο πυρηνικών μεμβρανών είναι πιο ακανόνιστος και ευρύτερος στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα σε σχέση με τα διαφοροποιημένα κύτταρα (Morris et al, 2010). Τα στοιχεία αυτά υποδηλώνουν ότι ο πυρηνικός φάκελος συνεισφέρει στη διαμόρφωση του γενώματος των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, αν και οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί ελέγχου δεν έχουν διευκρινιστεί μέχρι σήμερα.

## 1.2 Ο υποδοχέας της λαμίνης Β (Lamin B Receptor)

### 1.2.1 Το γονίδιο του υποδοχέα της λαμίνης Β (LBR)

Το 1994 οι Ye και Worman κλωνοποίησαν το ανθρώπινο γονίδιο του LBR από μια cDNA βιβλιοθήκη HeLa κυττάρων. Η πρωτεΐνη αποτελείται από 615 αμινοξέα και παρουσιάζει 68% ομολογία με την αντίστοιχη πρωτεΐνη στα πτηνά. Την ίδια χρονιά αποδείχθηκε με πειράματα χαρτογράφησης με περιοριστικά ένζυμα (restriction mapping) ότι το ανθρώπινο γονίδιο αποτελείται περίπου από 35kb (Schuler et al, 1994). Το σήμα έναρξης της μεταγραφής απέχει περίπου 4kb από το σήμα έναρξης της μετάφρασης προς το 5' άκρο της αλυσίδας του DNA. Το γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1q42.1 και περιέχει 13 εξώνια. Τα πρώτα τέσσερα κωδικοποιούν την αμινοτελική περιοχή και τα υπόλοιπα την καρβοξυτελική. Μεταξύ των εξωνίων 4 και 5 υπάρχει ένα μεγάλο εσώνιο και είναι πολύ πιθανό το σημερινό γονίδιο του LBR να έχει προκύψει από ανασυνδυασμό δύο αρχέγονων γονιδίων, εκ των οποίων το ένα κωδικοποιεί μία «διαλυτή» πρωτεΐνη του πυρήνα και το άλλο ένα ένζυμο του ενδοπλασματικού δικτύου. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται ακόμη από την ομολογία που παρουσιάζει το υδρόφοβο καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης με τρεις πρωτεΐνες της ζύμης.



**Εικόνα 1.12** Δομική και λειτουργική οργάνωση του γονιδίου και της πρωτεΐνης LBR. Η δομή του ανθρώπινου γονιδίου LBR, όπου διαφαίνονται τα εξώνια που κωδικοποιούν για τα αντίστοιχα τμήματα της πρωτεΐνης. Από Best et al, 2003.

Στο ποντίκι το γονίδιο του LBR εμφανίζει συντενικότητα (synteny) με το αντίστοιχο ανθρώπινο και εντοπίζεται στην αντίστροφη αλυσίδα του χρωμοσώματος 1, στη θέση

181,815,316 - 181,842,401. Αποτελείται από 13 εξόνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 626 αμινοξέων.

### 1.2.2 Το σύμπλοκο του υποδοχέα LBR

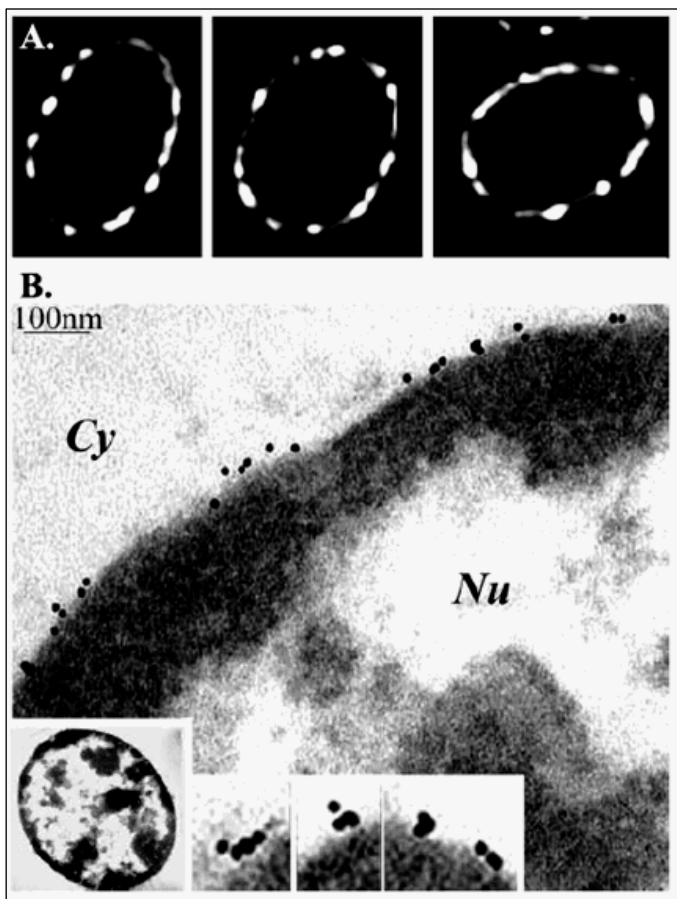
Ο υποδοχέας της λαμίνης Β (LBR) είναι μία πρωτεΐνη της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης, εξελικτικά συντηρημένη σε όλα τα μετόζωα. Αναγνωρίστηκε ως μία πρωτεΐνη που είχε την ικανότητα να συνδέεται στη λαμίνη Β. Η πρώτη σχετική με τον LBR εργασία δημοσιεύτηκε πριν από περίπου 20 χρόνια (Worman et al, 1988), όταν ερευνητές παρασκεύασαν πυρηνικούς φακέλους από ερυθροκύτταρα πτηνών, από τους οποίους με χρήση ουρίας απομακρύνθηκαν οι περιφερικά συνδεόμενες λαμίνες. Το παρασκεύασμα αποδείχτηκε ότι μπορεί να συνδεθεί με απομονωμένη λαμίνη Β, αλλά όχι με λαμίνη Α. Στη συνέχεια, αναγνωρίστηκε ο πρωτεϊνικός παράγοντας των πυρηνικών μεμβρανών ο οποίος ήταν υπεύθυνος για αυτή τη σύνδεση. Ο παράγοντας αρχικά ονομάστηκε p58 καθώς κατά την SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση μεταναστεύει στην περιοχή των 58 kDa. Όταν αργότερα προσδιορίστηκε η αμινοξική αλληλουχία του, αρχικά στα πτηνά (Worman et al, 1990) και αργότερα στον άνθρωπο (Ye and Worman, 1994), βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη αποτελείται από 637 και 615 αμινοξέα αντίστοιχα και το πραγματικό μοριακό του βάρος υπολογίστηκε στα 73kDa.

Όπως και άλλες πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης, ο LBR φαίνεται να αποτελεί τμήμα ενός μεγάλου πρωτεϊνικού συμπλόκου το οποίο περιέχει, εκτός του LBR, τις λαμίνες Α και Β, μία ειδική κινάση, μία άλλη διαμεμβρανική πρωτεΐνη (p18) και μία πρωτεΐνη (p34/p32) η οποία συνδέεται με τον παράγοντα ματίσματος 2 (splicing factor 2/SF2) (Simos and Georgatos, 1992).

Η πρωτεΐνη p18 αποτελεί ένα νέο μέλος των πρωτεϊνών του πυρηνικού φακέλου και εντοπίζεται τόσο στην εξωτερική, όσο και στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη. Η πρωτεΐνη ανιχνεύεται σχεδόν αποκλειστικά στους πυρήνες των ερυθροκυττάρων των πτηνών και έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά άμεσα με τον LBR και τη λαμίνη Β (Simos et al, 1996).

Η πρωτεΐνη p32 θεωρείται μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη η οποία εντοπίζεται σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα, όπως στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια, στον πυρήνα, στο ακροσωμικό κυστίδιο των σπερματιδίων, ενώ υπάρχουν αναφορές για ανίχνευσή της και στην επιφάνεια των κυττάρων (Soltys et al, 2000). Μετά από φθορισμομετρικό *in situ* υβριδισμό βρέθηκε ότι το ανθρώπινο γονίδιο της p32 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17q13.3 και κωδικοποιεί την πρόδρομη μορφή της (pre-p32) η οποία μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια.

Μετά από πρωτεόλυση των 73 αμινοξέων του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης παραλαμβάνεται η ώριμη μορφή της η οποία πιστεύεται ότι συμμετέχει στην αναπνευστική αλυσίδα (Guo et al, 1997 και Muta et al, 1997). Ο ρόλος της πρωτεΐνης p32 παραμένει αινιγματικός, όχι μόνο εξαιτίας της πολλαπλής εντόπισης της σε ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια χώρους, αλλά επειδή εμπλέκεται και σε ένα μεγάλο αριθμό αλληλεπιδράσεων με μια ποικιλία κυτταρικών, ιικών και βακτηριακών παραγόντων. Ειδικότερα, έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με τον παράγοντα μεταγραφής TFIIB (Yu et al, 1995), με τον παράγοντα ματίσματος του RNA SF2/ASF, παρεμποδίζοντας τη δέσμευση του RNA και κατά συνέπεια τη διαδικασία του ματίσματος (Petersen-Mahrt et al, 1999), καθώς και με την RS ακολουθία του LBR (Simos and Georgatos, 1994). Επιπλέον, αποτελεί υπόστρωμα για τις MAP κινάσες (Mitogen Activated Protein kinases) και φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης από αυτές οδηγεί σε αλλαγή της υποκυτταρικής κατανομής της και είσοδό της στον πυρήνα (Majumdar et al, 2002).



**Εικόνα 1.13 Οργάνωση του LBR σε πυρήνες ερυθροκυττάρων πτηνών.** Α. Οι διακριτές νησίδες (microdomains) του LBR όπως αποκαλύπτονται σε πυρήνες ερυθροκυττάρων πτηνών. Β. Τμήμα του πυρήνα μετά από ηλεκτρονική μικροσκοπία όπου διαφαίνονται με ακρίβεια οι διακριτές νησίδες της πρωτεΐνης. Τα ένθετα στο κάτω μέρος της εικόνας παρουσιάζουν ολόκληρο το πυρήνα (αριστερά) ή μια σειρά από νησίδες (δεξιά). Cy: κυτταρόπλασμα, Nu: πυρήνας. Από Makatsori et al, 2004.

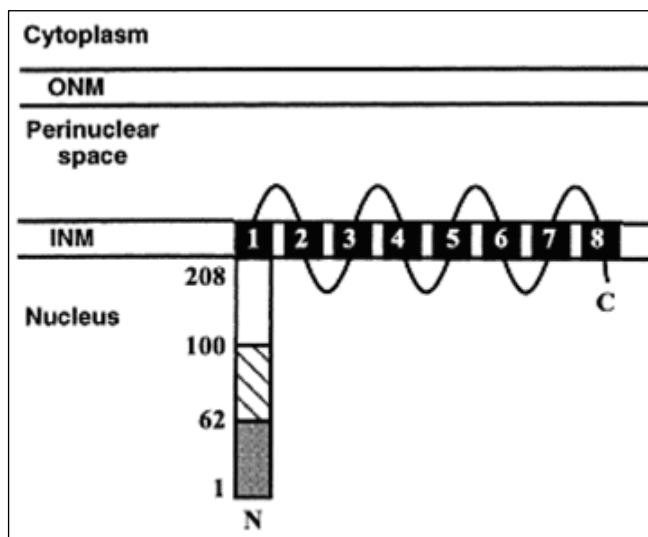
Η δραστικότητα κινάσης η οποία συν-ανοσοκατακρημνίζεται με τον LBR ανήκει σε μια νέα οικογένεια κινασών, τις SRPK κινάσες (Serine/Arginine Protein Kinases). Η φωσφορυλίωση του LBR πιστεύεται ότι ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις του με τις πρωτεΐνες

που συγκροτούν το σύμπλοκό του. Πράγματι, έχει βρεθεί ότι όταν ο LBR φωσφορυλιωθεί στην RS ακολουθία του, παρεμποδίζεται η δέσμευση της πρωτεΐνης p32 (Nikolakaki et al, 1996 και Mylonis et al, 2004). Οποιαδήποτε σερίνη των RS διπεπτιδίων του LBR μπορεί να αποτελέσει υπόστρωμα για την SRPK1, ενώ η ελάχιστη απαίτηση για να είναι δραστική η κινάση είναι η ύπαρξη τριών τουλάχιστον RS διπεπτιδίων (Paroutsoroulou et al, 1999). Αν και μέχρι σήμερα δεν έχει αποδειχθεί με σαφήνεια ότι η δραστικότητα κινάσης η οποία βρίσκεται δεσμευμένη με τον LBR αντιστοιχεί αποκλειστικά σε μέλος(η) των SRPKs, μια σειρά από ισχυρές ενδείξεις συνηγορούν ότι η SRPK1 είναι αυτή που φωσφορυλιώνει τον LBR (Takano et al, 2004).

Πρόσφατα, βιοχημικά και μορφολογικά πειραματικά δεδομένα απέδειξαν ότι ο LBR έχει την ιδιότητα να ολιγομερίζεται και να συσσωρεύεται σε διακριτές νησίδες (microdomains) στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη (εικόνα 1.13). Τα χαρακτηριστικά αυτά αναμένεται να παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στη δημιουργία του συμπλόκου, όσο και στην εν γένει λειτουργία της πρωτεΐνης (Makatsori et al, 2004).

### 1.2.3 Τοπολογία του LBR

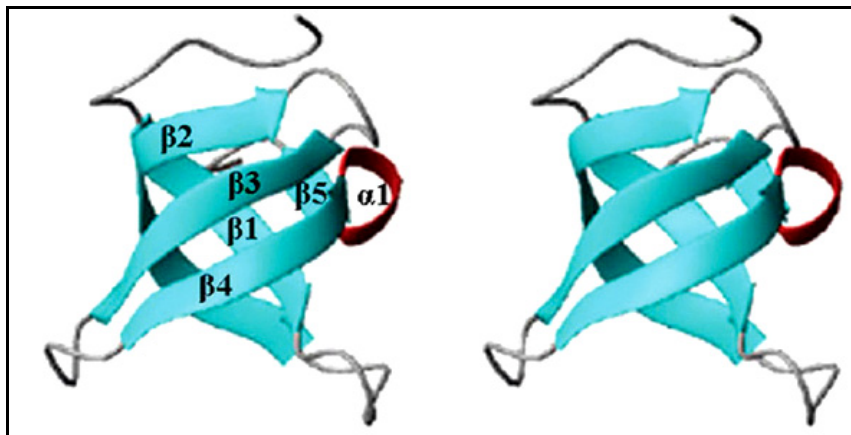
Ο LBR αποτελείται από μία αμινοτελική-υδρόφιλη περιοχή ακολουθούμενη από ένα υδρόφοβο διαμεμβρανικό τμήμα και από ένα πολύ μικρό καρβοξυτελικό άκρο (εικόνα 1.14).



**Εικόνα 1.14 Τοπολογικά χαρακτηριστικά του LBR.** Διακρίνονται οι υποπεριοχές του αμινοτελικού τμήματος της πρωτεΐνης [Tudor τομέας: αμινοξέα 1-62, ακολουθία διπεπτιδίων αργινίνης -σερίνης (RS): αμινοξέα 62-100, δεύτερη δομική περιοχή (second globular domain): αμινοξέα 100-208], τα οκτώ διαμεμβρανικά τμήματα και το καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης.

Το αμινοτελικό τμήμα του LBR έχει έκταση περίπου 210 αμινοξέων και περιέχει δύο υποπεριοχές οι οποίες παρουσιάζουν χαρακτηριστικά αυτόνομων δομικά οντοτήτων. Μεταξύ αυτών των περιοχών παρεμβάλλεται μία θετικά φορτισμένη περιοχή έκτασης 40 περίπου

αμινοξέων, κύριο χαρακτηριστικό της οποίας είναι η παρουσία συνεχόμενων διπεπτιδίων αργινίνης-σερίνης (RS repeats) (εικόνα 1.14). NMR ανάλυση του πρώτου από τα δύο αυτόνομα δομικά τμήματα του αμινοτελικού τμήματος του LBR (αμινοξέα 1 - 62) έδειξε ότι αυτό ανήκει στην οικογένεια των tudor μοτίβων (tudor domains). Αν και αρχικές έμμεσες παρατηρήσεις το θεωρούσαν υπεύθυνο για τη σύνδεση του LBR με τη λαμίνη B (Lin et al, 1996), πρόσφατα πειραματικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι το tudor μοτίβο δεν είναι επαρκές από μόνο του για την πρόσδεση της λαμίνης B in vitro και απαιτείται η γειτονική ακολουθία RS (Liokatis et al, 2012). Επιπλέον, ο tudor τομέας συνδέεται ισχυρά με τις ιστόνες H3, μέσω ηλεκτροστατικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, υποδηλώνοντας ότι η περιοχή αυτή μπορεί να χρησιμεύει ως μια βάση για την αλληλεπίδραση άλλων συστατικών με την πρωτεΐνη, όπως αυτές με την χρωματίνη.



**Εικόνα 1.15 Δομή του tudor τομέα του LBR.** Η τριτοταγής δομή του τομέα tudor όπως καθορίστηκε από πειράματα NMR. Με μπλε απεικονίζονται τα β-πτυχωτά φύλλα και με κόκκινο η  $3_{10}$ -έλικα που συνδέει τα β-πτυχωτά φύλλα β4 και β5. Από Liokatis et al, 2012.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περιοχή που περιέχει τα RS διπεπτίδια (αμινοξέα 62-100). Αναμένεται να έχει δομή τυχαίου σπειράματος (random coil), τουλάχιστον όταν δεν είναι δεσμευμένη με άλλα μόρια, λόγω του πολύ βασικού χαρακτήρα της (pI~10) και της αμινοξικής της σύστασης, καθώς είναι πλούσια σε θετικά φορτισμένα κατάλοιπα. Χαρακτηρίζεται κυρίως από την ικανότητά της να φωσφορυλιώνεται στα κατάλοιπα σερίνης, τόσο από μία ειδική για τον LBR (SRPK1) όσο και από μία μιτωτική cdc2 κινάση (Nikolakaki et al, 1996 και Takano et al, 2004). Τέλος, η ακολουθία RS αλληλεπιδρά τόσο με H3-H4 ολιγομερή όσο και με πλήρη νουκλεοσώματα (Liokatis et al, 2012).

Η δεύτερη δομική περιοχή (αμινοξέα 100-208) δεν παρουσιάζει ομοιότητα με καμιά γνωστή οικογένεια πρωτεϊνικών μοτίβων και παρά την ύπαρξη τμημάτων με υδρόφοβο

χαρακτήρα, φαίνεται να παρουσιάζει μεγάλη ευελιξία σύμφωνα με αλγόριθμους πρόβλεψης δευτεροταγούς δομής. Πειραματικά δεδομένα με χρήση της τεχνικής δυο-υβριδίων στο ζυμομύκητα (yeast two-hybrid assay) και δοκιμών συγκατακρήμνισης, εμπλέκουν την περιοχή αυτή στη σύνδεση του LBR με την ετεροχρωματινική πρωτεΐνη 1 (Heterochromatin protein 1, HP1) (Ye et al, 1997).

Το διαμεμβρανικό τμήμα του LBR έχει προβλεφθεί ότι περιέχει οκτώ τμήματα (Worman et al, 1990). Αυτό που του προσδίδει όμως ξεχωριστό ενδιαφέρον είναι η ομολογία του με αναγωγάσες των στερολών (στα σπονδυλωτά, στους μύκητες και στα φυτά) καθώς και η ικανότητά του να έχει αντίστοιχη ενζυμική δράση σε ζύμες (Silve et al, 1998). Ο LBR εμφανίζει 58% ομολογία με την πρωτεΐνη DHCR14 (TM7SF2), η οποία δρα ως αναγωγάση της στερόλης C14 και 37% ομολογία με την πρωτεΐνη DHCR7, η οποία έχει δράση αναγωγάσης της στερόλης C7. Φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι ο LBR είναι εξελικτικά πιο κοντά στην πρωτεΐνη DHCR14 (Ye Q et al, 1994 και Holmer L et al, 1998).

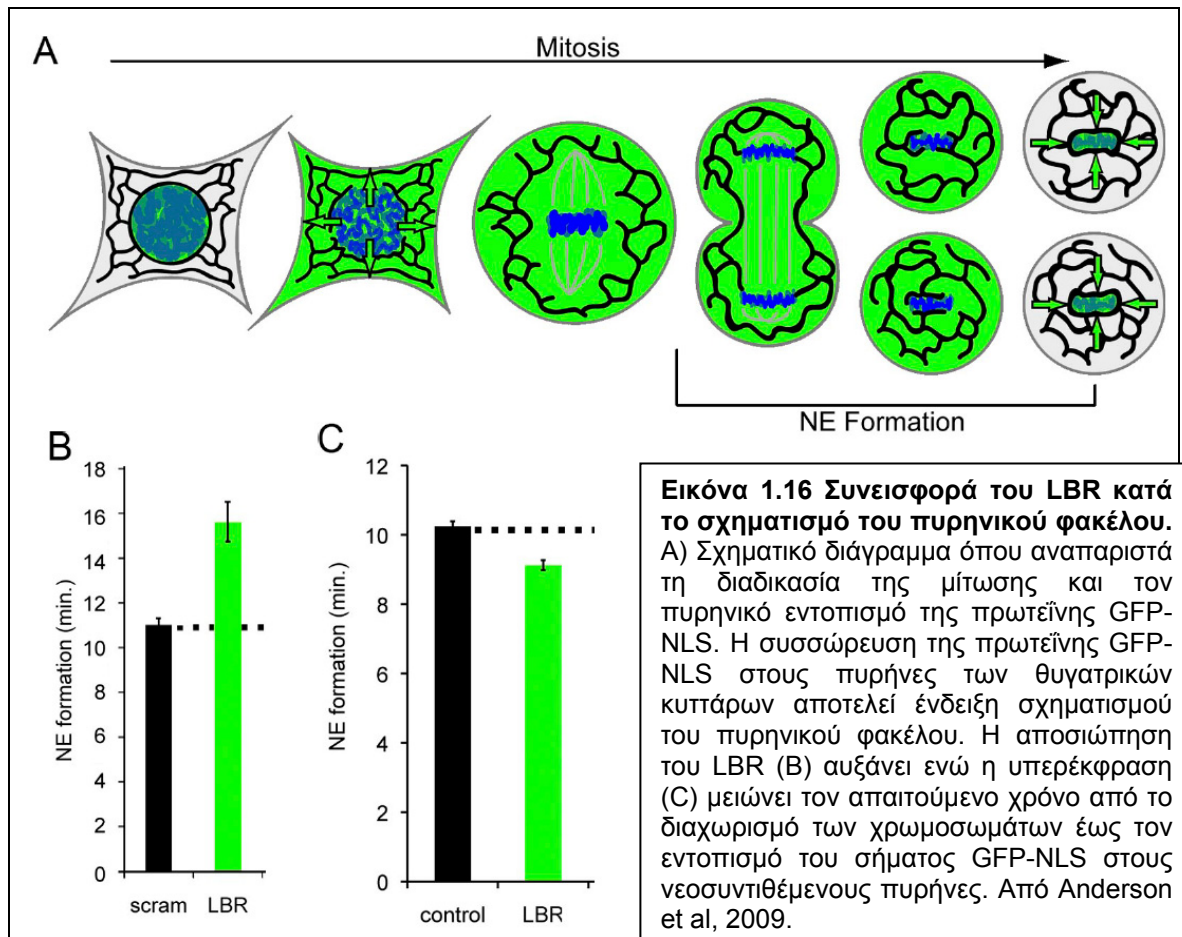
Τέλος, η πρωτεΐνη περιέχει ένα πολύ μικρό καρβοξυτελικό τμήμα (περίπου 30 αμινοξέα), το οποίο πιθανότητα βρίσκεται προς την πλευρά του πυρηνοπλάσματος, με άγνωστο μέχρι στιγμής ρόλο.

#### 1.2.4 Ο λειτουργικός ρόλος του LBR

Παρότι έχουν περάσει 20 χρόνια από την αναγνώρισή του, ο λειτουργικός ρόλος του LBR παραμένει αδιευκρίνιστος. Η ικανότητά του να συνδέεται με την πυρηνική λάμινα και τη χρωματίνη έχει δειχθεί επαρκώς, η φυσιολογική σημασία όμως και ο μηχανισμός αυτών των αλληλεπιδράσεων δεν είναι σαφής. Ο ρόλος της πρωτεΐνης στη δυναμική του πυρηνικού φακέλου διερευνήθηκε με υπερέκφραση του αμινοτελικού τμήματος του LBR συζευγμένου με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη EGFP και μελέτη του εντοπισμού και της κινητικότητάς του στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Ενώ στη μεσόφαση ο LBR βρίσκεται δεσμευμένος στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη συνδεδεμένος με χρωματινικές δομές, στα μιτωτικά κύτταρα αυτή η σύνδεση φαίνεται να χαλαρώνει και η πρωτεΐνη, μετά την αποσυναρμολόγηση του πυρηνικού φακέλου, διαχέεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Στο τέλος της μίτωσης, όταν ο πυρηνικός φάκελος επανασηματίζεται γύρω από τη χρωματίνη και την υπό συναρμολόγηση λάμινα, οι θέσεις πρόσδεσης με τη χρωματίνη αποκαλύπτονται και ο LBR δεσμεύεται και πάλι (Ellenberg et al, 1997). Πειράματα αποσιώπησης (si-RNA) έδειξαν ότι η έλλειψη της πρωτεΐνης οδηγεί σε σημαντική καθυστέρηση, αλλά όχι σε αναστολή, του σχηματισμού του πυρηνικού φακέλου στο τέλος της μίτωσης. Αντίθετα,

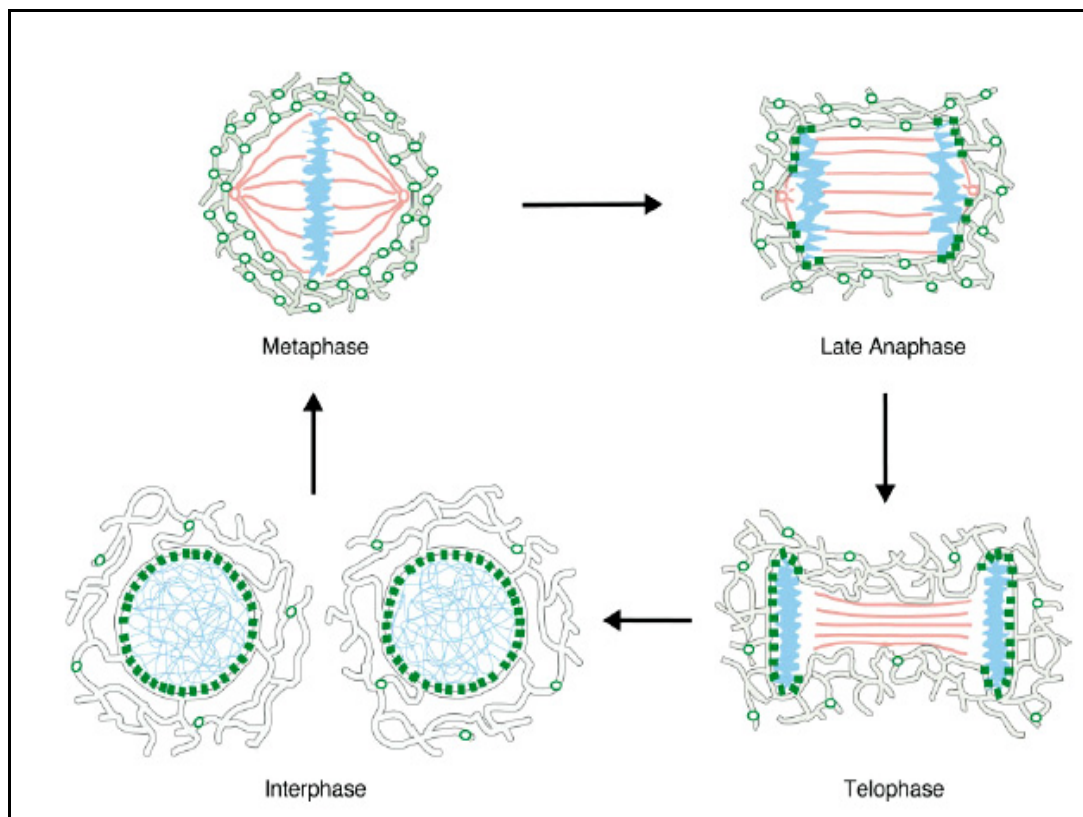


υπερέκφραση της πρωτεΐνης έχει ως αποτέλεσμα τον πιο γρήγορο σχηματισμό του πυρηνικού φακέλου, με μείωση της απόστασης διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων (εικόνα 1.16) (Anderson et al, 2009). Τέλος, έχει δειχθεί ότι η λαμίνη Β συνεντοπίζεται με τον LBR κατά τον κατακερματισμό του πυρηνικού φακέλου, υποδηλώνοντας ότι οι δυο πρωτεΐνες παραμένουν ως σύμπλοκο κατά τη διάρκεια της μίτωσης (Meier et al, 1994).



Η ιδιότητα του LBR να αναγνωρίζει και να συνδέεται με συγκεκριμένες χρωματινικές περιοχές, αλλά και να στρατολογεί παράγοντες ανασυγκρότησης των περιοχών αυτών, προσδίδει ένα ρυθμιστικό ρόλο του LBR τόσο στην αναδιοργάνωση της χρωματινής όσο και στη γονιδιακή έκφραση. Ένας τέτοιος ρόλος υποστηρίζεται από την αλληλεπίδρασή του με την πρωτεΐνη HP1, η οποία αποτελεί κύριο συστατικό μεταγραφικά ανενεργών χρωματινικών περιοχών. Οι δυο πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρούν άμεσα η μία με την άλλη, αλλά έμμεσα μέσω των τετραμερών H3-H4 (Polioudaki et al, 2001). Επίσης, έχει βρεθεί σύνδεση του LBR με την πρωτεΐνη MeCP2 τόσο in vivo όσο και in vitro. Η πρωτεΐνη αυτή εντοπίζεται στην ετεροχρωματίνη, αλληλεπιδρά με methyl-CpG δινοκλεοτίδια και λειτουργεί ως καταστολέας της μεταγραφής. Αυτό επιτυγχάνεται με την στρατολόγηση

συμπλόκων αποσιώπησης και αποακετυλασών των ιστονών, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της δομής της ετεροχρωματίνης (Guarda et al, 2009).



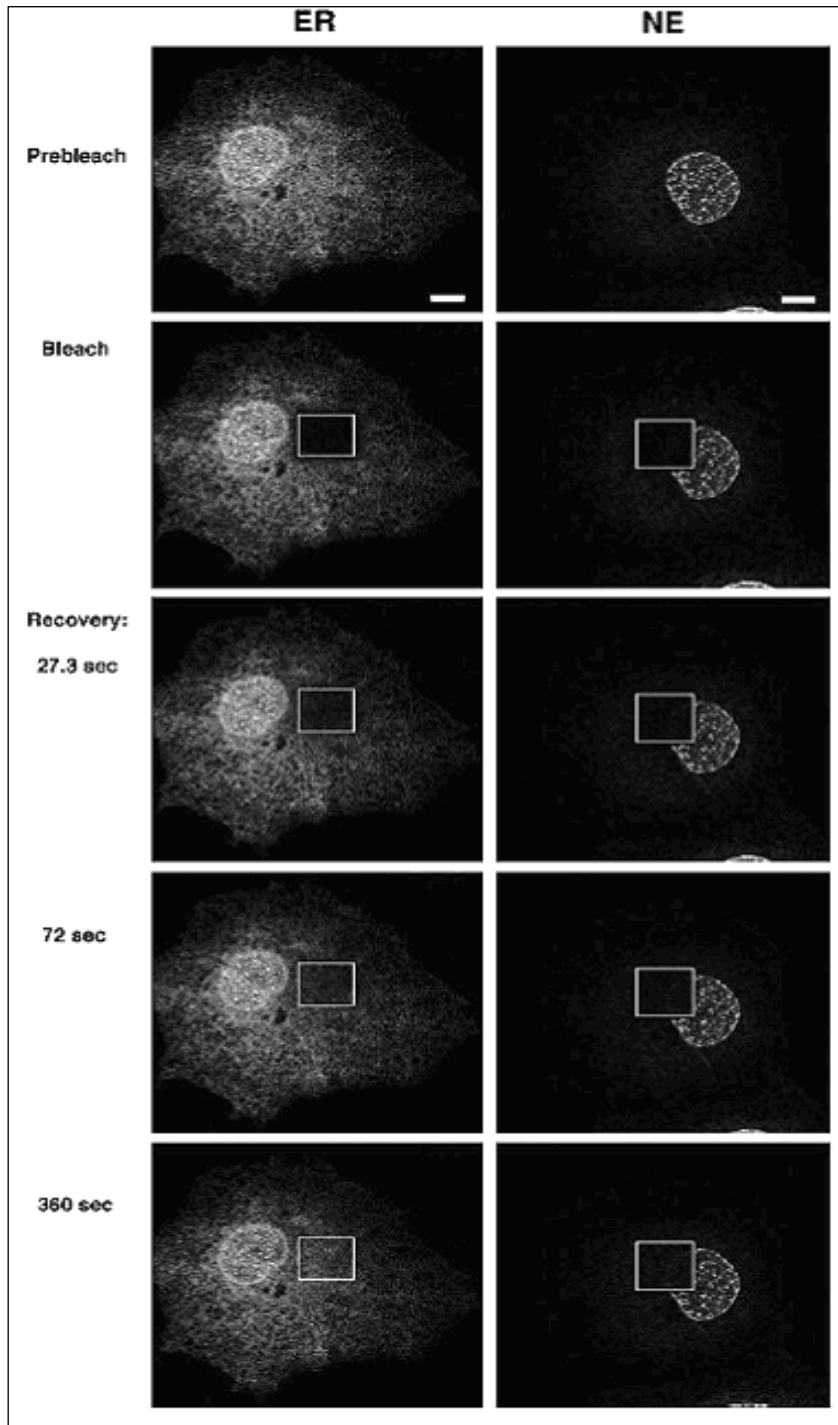
**Εικόνα 1.17** Πιθανός ρόλος του LBR κατά τον σχηματισμό του πυρηνικού φακέλου. Στη μεσόφαση (interphase) τα νεοσυντιθέμενα μόρια της πρωτεΐνης (πράσινο) μετακινούνται από το ενδοπλασματικό δίκτυο προς την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη όπου παραμένουν ενωμένα με την χρωματίνη (μπλε). Στην μετάφαση (metaphase) ο πυρηνικός φάκελος έχει κατακερματιστεί πλήρως και τα μόρια της πρωτεΐνης διαχέονται ελεύθερα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, το οποίο περιβάλλει την άτρακτο (κόκκινο) και τα χρωμοσώματα. Οι θέσεις πρόσδεσης του LBR επανεμφανίζονται στο τέλος της ανάφασης (late anaphase) και ολοκληρωτικά στην τελόφαση (telophase), παγιδεύοντας περισσότερα μόρια LBR. Τελικά, η χρωματίνη εσωκλείεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο εμπλουτισμένο σε LBR και σχηματίζεται ο πυρηνικός φάκελος. Από Ellenberg et al, 1997.

### 1.2.5 Δυναμική της πρωτεΐνης

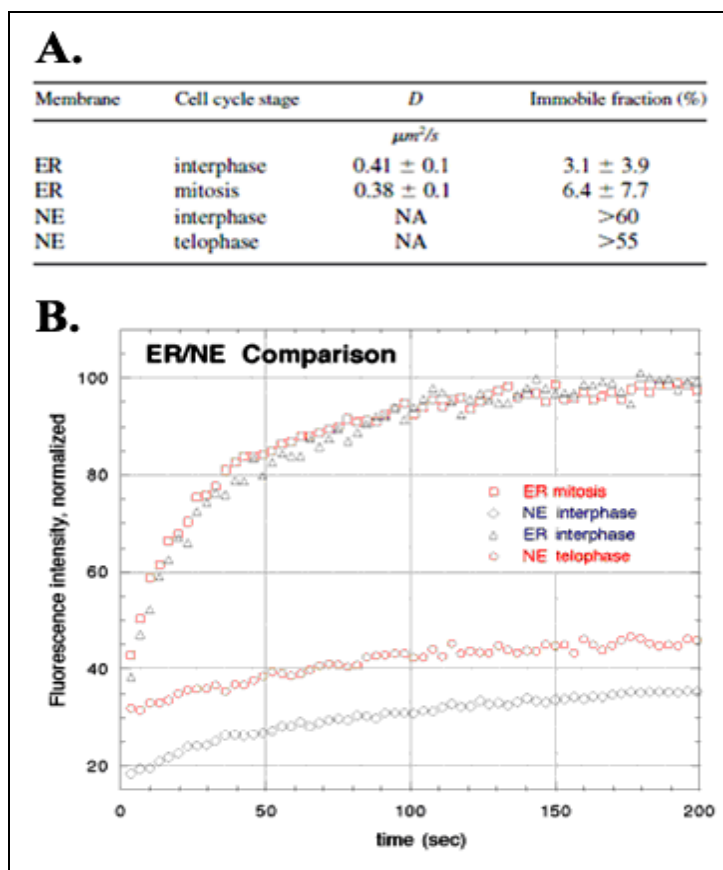
Μέχρι σήμερα οι πληροφορίες σχετικά με τη δυναμική του LBR είναι περιορισμένες και σχετικά αντιφατικές. Η πρώτη εργασία σχετικά με τη δυναμική της πρωτεΐνης δημοσιεύτηκε το 1997 (Ellenberg et al, 1997). Οι ερευνητές υπερέκφρασαν τα πρώτα 238 αμινοξέα της πρωτεΐνης (αντιστοιχούν στο αμινοτελικό τμήμα και το πρώτο διαμεμβρανικό τμήμα) συζευγμένα με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP, σε COS-7 κύτταρα. Παρόλη

την έλλειψη μεγάλου τμήματος της πρωτεΐνης (απουσιάζει το τμήμα από την δεύτερη διαμεμβρανική περιοχή μέχρι το καρβοξυτελικό τμήμα, μεγέθους 377 αμινοξέων), το μετάλλαγμα εντοπίστηκε στην πυρηνική μεμβράνη, δημιουργώντας την εντύπωση ότι αυτό διατηρεί όλες τις ιδιότητες του πλήρους μορίου. Χρησιμοποιώντας την μέθοδο ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτοσκίαση (FRAP), με σκίαση τμήματος του πυρηνικού φακέλου ή του ενδοπλασματικού δικτύου μήκους 4μm, προσδιορίστηκε το κινητικό κλάσμα (mobile fraction) και η σταθερά διάχυσης (diffusion constant, D) του μορίου. Η πρωτεΐνη εμφάνισε υψηλή δυναμική στο ενδοπλασματικό δίκτυο, με πλήρη ανάκτηση του φθορισμού στην περιοχή ενδιαφέροντος και σταθερά διάχυσης ίση με  $0.41 \pm 0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Αντίθετα, η πρωτεΐνη ήταν σημαντικά ακινητοποιημένη (immobilized) στον πυρηνικό φάκελο (εικόνα 1.18). Ωστόσο, όταν μελετήθηκε η δυναμική της πρωτεΐνης για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (20 λεπτά), παρατηρήθηκε ελάχιστη ανάκτηση του φθορισμού στην πυρηνική μεμβράνη, υποδηλώνοντας αργή ανταλλαγή μορίων μεταξύ του ενδοπλασματικού δικτύου και του πυρήνα. Φαίνεται λοιπόν ότι η πρωτεΐνη μετακινείται ελεύθερα από το ενδοπλασματικό δίκτυο στον πυρήνα και «παγιδεύεται» στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη, λόγω της ισχυρής σύνδεσής της με την ετεροχρωματίνη και τις λαμίνες.

Όταν μελετήθηκε η συμπεριφορά της πρωτεΐνης σε μιτωτικά κύτταρα, διαπιστώθηκε ότι αυτή παρουσίαζε πολύ όμοια δυναμική με αυτή των μεσοφασικών κυττάρων στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ ήταν ελάχιστα πιο δυναμική στον νεοσχηματιζόμενο πυρηνικό φάκελο των τελοφασικών κυττάρων (εικόνα 1.19). Η υψηλή δυναμική της πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο ώθησε τους ερευνητές να πραγματοποιήσουν πειράματα απώλειας φθορισμού (FLIP). Στα πειράματα αυτά φωτοσκιάστηκε τμήμα του ενδοπλασματικού δικτύου και καταγράφηκε η απώλεια φθορισμού από το υπόλοιπο δίκτυο, αλλά και τον πυρηνικό φάκελο. Ο φθορισμός του ενδοπλασματικού δικτύου μειώθηκε πιο γρήγορα σε σύγκριση με αυτόν του πυρηνικού φακέλου, υποδηλώνοντας ότι οι μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου είναι άμεσα συνδεδεμένες μεταξύ τους, ενώ η πρωτεΐνη παραμένει σταθερά προσδεσμένη στον πυρηνικό φάκελο.



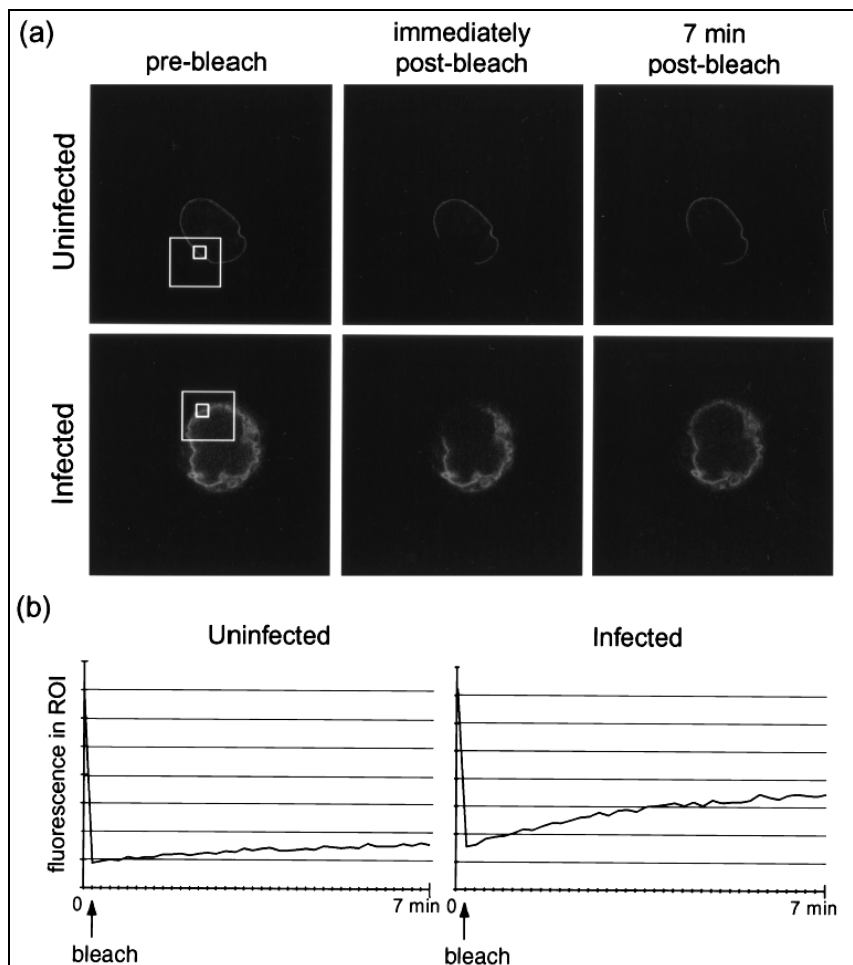
**Εικόνα 1.18** Πειράματα ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτοσκίαση (FRAP) του LBR-GFP σε μεσοφασικά κύτταρα COS-7. Αριστερά παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό πείραμα στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και δεξιά στον πυρηνικό φακέλο (NE). Ο φθορισμός ανακτάται πλήρως στην περίπτωση του ενδοπλασματικού δικτύου, όχι όμως και στην περίπτωση του πυρηνικού φακέλου. Από Ellenberg et al, 1997.



**Εικόνα 1.19** Πειράματα ανάκτησης φθορισμού (FRAP) του LBR σε μεσοφασικά και μιτωτικά κύτταρα. Α) Το μη-κινητικό κλάσμα (immobile fraction) και η σταθερά διάχυσης ( $D$ ) της πρωτεΐνης, όπως καταγράφηκαν σε επτά ανεξάρτητα πειράματα. NA: δεν προσδιορίστηκε τιμή καθώς το μη-κινητικό κλάσμα ήταν μεγαλύτερο του 55%. Β) Χαρακτηριστικές καμπύλες FRAP (ένταση φθορισμού συναρτήσει του χρόνου) της πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τον πυρηνικό φάκελο σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. (ER interphase: ενδοπλασματικό δίκτυο στη μεσόφαση, ER mitosis: ενδοπλασματικό δίκτυο στη μίτωση, NE interphase: πυρηνικός φάκελος στην μεσόφαση και NE telophase: πυρηνικός φάκελος στην τελόφαση). Από Ellenberg et al, 1997.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η δυναμική του LBR-GFP μετά από μόλυνση των COS κυττάρων με τον ερπητοϊό τύπου 1 (herpes simplex virus type 1, HSV-1) (Scott and O'Hare, 2001). Κύτταρα τα οποία υπερέκφραζαν μέρος της πρωτεΐνης (το αμινοτελικό τμήμα και την πρώτη διαμεμβρανική περιοχή), μολύνθηκαν με τον ιό και υπέστησαν φωτοσκίαση σε τμήμα του πυρηνικού φακέλου (εικόνα 1.20). Σε αντίθεση με τα κύτταρα ελέγχου, η ένταση φθορισμού στην πυρηνική μεμβράνη των HSV-1-μολυσμένων κυττάρων ανακτήθηκε σε σημαντικό βαθμό. Ο φθορισμός των κυττάρων που είχαν διαμολυνθεί με τον ιό για 8 ή 24 ώρες ανακτήθηκε σε ποσοστό 17% ή 22% αντίστοιχα, ενώ η αντίστοιχη τιμή για μη μολυσμένα κύτταρα ήταν 13%. Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι η πρωτεΐνη διαχέεται

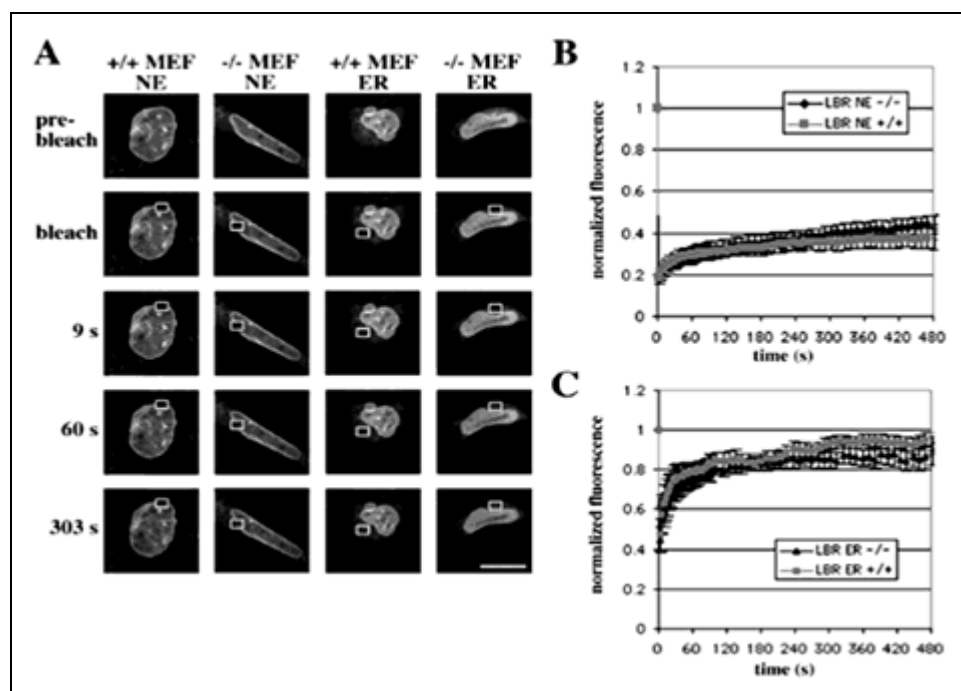
πιο γρήγορα στην πυρηνική μεμβράνη των μολυσμένων κυττάρων, πιθανώς λόγω ασθενέστερων αλληλεπιδράσεων LBR-χρωματίνης-λάμινας.



**Εικόνα 1.20** Πειράματα FRAP σε COS κύτταρα τα οποία εξέφραζαν την πρωτεΐνη LBR-GFP και μολύνθηκαν με τον ιό HSV-1. (a) Τμήμα του πυρηνικού φακέλου (μεγάλο τετράγωνο) φωτοσκοπίστηκε και καταγράφηκε η ανάκτηση του φθορισμού σε μικρότερο τμήμα του για 7 λεπτά (μικρό τετράγωνο). (b) Τυπικές καμπύλες ανάκτησης φθορισμού συναρτήσεως του χρόνου μετά από στατιστική ανάλυση 5 κυττάρων για κάθε περίπτωση. (uninfected: κύτταρα ελέγχου μη διαμολυσμένα και infected: κύτταρα μολυσμένα με τον ιό). Από Scott and O'Hare, 2001.

Για να προσδιοριστεί η συνεισφορά των λαμινών στη «συγκράτηση» του LBR (και άλλων πρωτεϊνών) στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη, μελετήθηκε η κινητική της πρωτεΐνης σε κύτταρα από τα οποία απουσίαζε η λαμίνη A (Ostlund et al, 2006). Ινοβλάστες ποντικών από τα οποία είχε εξαλειφθεί το γονίδιο της λαμίνης A (*Lmna*<sup>-/-</sup>) και υπερέκφραζαν τα πρώτα 238 αμινοξέα του LBR υπέστησαν φωτοσκίαση σε τμήμα του πυρηνικού φακέλου. Σε αντίθεση με άλλες πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης (emerin, MAN1), οι οποίες παρουσίασαν πιο γρήγορη κινητική στα *Lmna*<sup>-/-</sup> κύτταρα σε

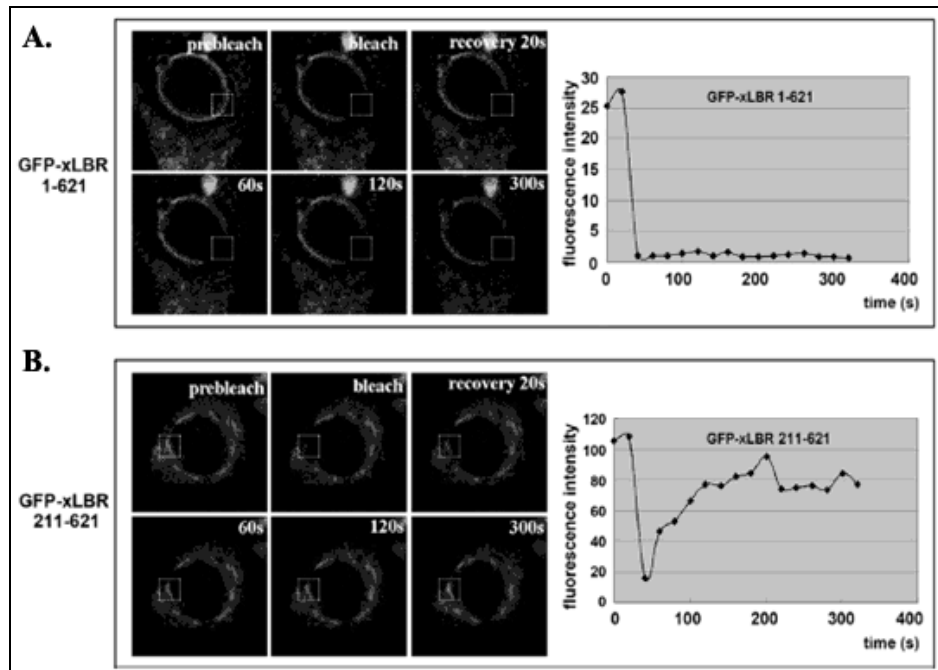
σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου, η δυναμική του LBR παρέμεινε αναλλοίωτη (εικόνα 1.21). Φαίνεται λοιπόν ότι ενώ οι πρωτεΐνες emerin και MAN1 συγκρατούνται στον πυρηνικό φάκελο μέσω αλληλεπιδράσεων με τη λαμίνη A, η δέσμευση του LBR εξαρτάται από άλλους παράγοντες. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με προηγούμενα βιοχημικά δεδομένα τα οποία παρουσιάζουν χαμηλή συγγένεια αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης με τη λαμίνη A και υποστηρίζουν ότι η πρωτεΐνη συγκρατείται στον πυρηνικό φάκελο λόγω αλληλεπιδράσεών της με παράγοντες όπως η λαμίνη B, οι πρωτεΐνες της ετεροχρωματίνης (HP1) και το DNA (Worman et al, 1988).



**Εικόνα 1.21** Η κινητική του LBR-GFP σε κύτταρα ελλειμματικά σε λαμίνη A (*Lmna*<sup>-/-</sup>). Η δυναμική της πρωτεΐνης τόσο στον πυρηνικό φάκελο (B) όσο και στο ενδοπλασματικό δίκτυο (C) είναι όμοια μεταξύ των κυττάρων MEF από *Lmna*<sup>-/-</sup> ή φυσιολογικά ποντίκια (+/+). Οι καμπύλες FRAP προέρχονται από 7 ανεξάρτητα πειράματα. Από Ostlund et al, 2006.

Οι περιοχές του LBR οι οποίες αλληλεπιδρούν με τη χρωματίνη ή τις λαμίνες εντοπίζονται όλες στο αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης, το οποίο προβάλλει προς το πυρηνόπλασμα. Για να διερευνηθεί αν οι ιδιότητες της πρωτεΐνης αλλοιώνονται απουσία αυτής της περιοχής, πραγματοποιήθηκαν πειράματα FRAP σε HeLa κύτταρα τα οποία υπερέκφραζαν το πλήρες μόριο LBR βατράχου (GFPxLBR1–621) ή το μετάλλαγμα από το οποίο απουσιάζει το αμινοτελικό τμήμα (GFP-xLBR211–621) (Lu et al, 2010). Η ανάκτηση του φθορισμού στα κύτταρα τα οποία υπερέκφραζαν το πλήρες μόριο ήταν ελάχιστη 300s μετά τη σκίαση του πυρηνικού φακέλου. Αντίθετα, η έλλειψη της αμινοτελικής περιοχής της

πρωτεΐνης (GFP-xLBR211–621) την κατέστησε πιο κινητική, υποδηλώνοντας ότι ο μεταλλαγμένος LBR μετακινείται ελεύθερα από το ενδοπλασματικό δίκτυο στον πυρηνικό φάκελο (και αντίστροφα), πιθανώς εξαιτίας έλλειψης των συνδέσεων της πρωτεΐνης με τη χρωματίνη ή τις λαμίνες (εικόνα 1.22).

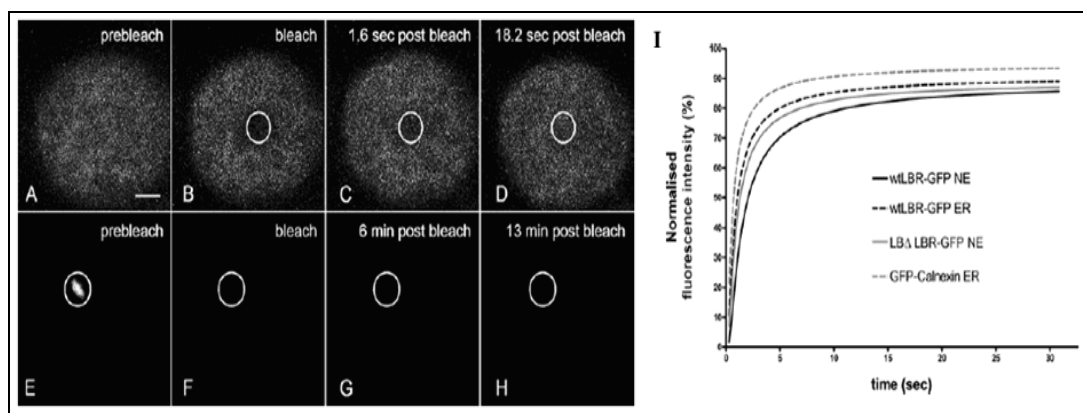


**Εικόνα 1.22 Δυναμική του μεταλλάγματος GFP-xLBR211–621 σε HeLa κύτταρα.** Τόσο η πλήρους μήκους πρωτεΐνη όσο και η μεταλλαγμένη μορφή της εντοπίζονται στον πυρηνικό φάκελο και προκαλούν το σχηματισμό περίσσειας μεμβρανών (membrane overproduction). A) Η κινητική του πλήρους μορίου GFP-xLBR1–621 και B) Η κινητική του μεταλλάγματος GFP-xLBR211–621. Από Lu et al, 2010.

Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και κατά τη μελέτη της δυναμικής της πρωτεΐνης στα φυτά (Graumann et al, 2007). Πιο συγκεκριμένα, τα πρώτα 238 αμινοξέα της ανθρώπινης πρωτεΐνης υπερεκφράστηκαν σε επιδερμικά κύτταρα φύλλων *N. Tabacum* (leaf lower-epidermal cells). Ακόμη, υπερεκφράστηκαν οι κατασκευές LBD-LBR–GFP και S80A-LBR–GFP, από τις οποίες απουσιάζει η πιθανή περιοχή σύνδεσης με τη λαμίνη B (αμινοξέα 1-60) ή το κατάλοιπο Ser80 της ακολουθίας RS έχει μεταλλαχθεί σε αλανίνη. Σε όλες τις περιπτώσεις, στα κύτταρα χορηγήθηκε latrunculin B για τον αποπολυμερισμό της ακτίνης του κυτταροσκελετού και τα κύτταρα υπέστησαν φωτοσκίαση σε κυκλική περιοχή διαμέτρου 1.53μm. Η δυναμική της πρωτεΐνης (μήκους 238 αμινοξέων) στον πυρηνικό φάκελο ήταν σημαντικά υψηλή, σε αντιδιαστολή με τα προηγούμενα αποτελέσματα σε κύτταρα θηλαστικών, με το φθορισμό να ανακτάται σε ποσοστό 87% και τη σταθερά διάχυσης να



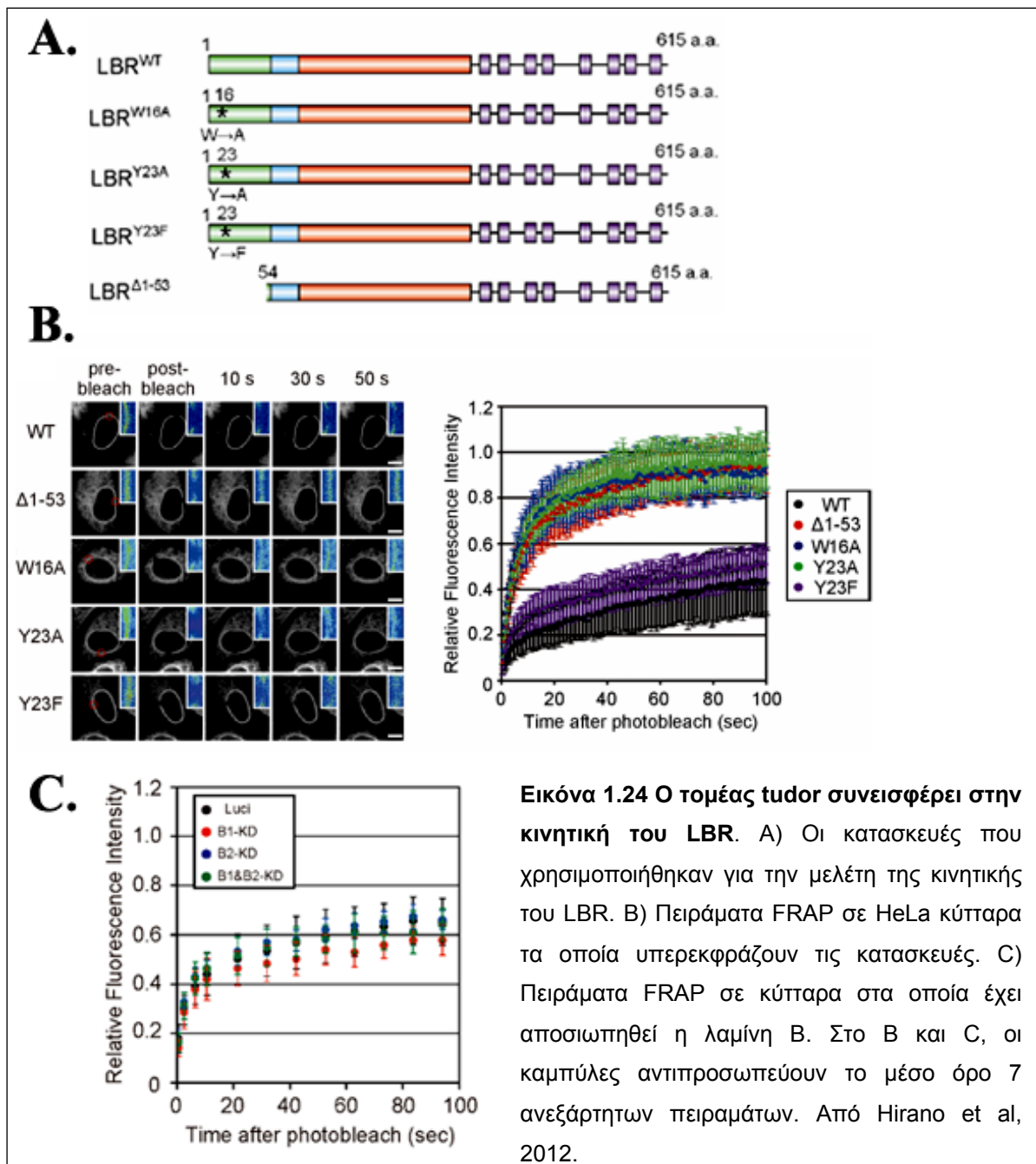
ανέρχεται σε  $0.08 \pm 0.04 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  (εικόνα 1.23). Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη LBD-LBR-GFP εντοπίστηκε, σε ορισμένα κύτταρα, εκτός του πυρηνικού φακέλου, τόσο στο ενδοπλασματικό δίκτυο όσο και σε συσσωματώματα και παρουσίασε ελαφρώς υψηλότερη δυναμική (κινητικό κλάσμα 88%). Ωστόσο, η μετάλλαξη του καταλοίπου σερίνης στην περιοχή RS είχε ως αποτέλεσμα τον εντοπισμό της πρωτεΐνης σε πυρηνικά έγκλειστα (nuclear inclusions), στα οποία η πρωτεΐνη παρέμεινε ακινητοποιημένη (κινητικό κλάσμα 3%). Φαίνεται λοιπόν ότι αν και τα φυτά δεν έχουν πρωτεΐνες ομόλογες των λαμινών, το δίκτυο των πρωτεϊνών που εντοπίζεται εσωτερικά του πυρηνικού φακέλου παρουσιάζει ανάλογες λειτουργίες με αυτές των λαμινών στα θηλαστικά.



**Εικόνα 1.23** Πειράματα ανάκτησης φθορισμού του LBR σε πυρήνες φυτικών κυττάρων. (A–D) Ανάκτηση του φθορισμού σε κύτταρα τα οποία υπερέκφραζουν την πρωτεΐνη wtLBR–GFP. (E–H) Δεν παρατηρήθηκε ανάκτηση του φθορισμού στην περίπτωση της πρωτεΐνης S80A–LBR–GFP εντός των πυρηνικών εγκλειστών. I) Καμπύλες FRAP. Κάθε καμπύλη αναπαριστά τον μέσο όρο 40 ανεξάρτητων πειραμάτων. Τα κινητικά κλάσματα των πρωτεϊνών είναι: wtLBR–GFP NE: 0.87, wtLBR–GFP ER: 0.89, LBD–LBR–GFP NE: 0.88 και GFP–calnexin ER: 0.94. Από Graumann et al, 2007.

Πρόσφατα, στα πλαίσια μιας εκτεταμένης μελέτης για τον ρόλο του tudor τομέα, δημοσιεύτηκαν τα πρώτα αποτελέσματα δυναμικής της πρωτεΐνης με υπερέκφραση του πλήρους μορίου σε HeLa κύτταρα (Liokatis et al, 2012 και Hirano et al, 2012). Τα κύτταρα τα οποία υπερέκφραζαν μεταλλαγμένες μορφές του tudor τομέα, σκιάστηκαν σε κυκλική περιοχή διαμέτρου  $2 \mu\text{m}$  και παρατηρήθηκε η ανάκτηση του φθορισμού (εικόνα 1.24). Η πλήρους μήκους πρωτεΐνη (LBRWT) παρουσίασε ελάχιστη ανάκτηση του φθορισμού στον πυρηνικό φάκελο (σταθερά διάχυσης  $0.030 \pm 0.002 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ ), ενώ στην περίπτωση έλλειψης του tudor τομέα (LBRΔ1-53) ή σημειακών μεταλλάξεων των αρωματικών καταλοίπων W16 και Y23 (LBRW16A και LBRY23A) η κινητική των πρωτεϊνών ήταν περίπου 7 φορές γρηγορότερη (σταθερές διάχυσης:  $0.230 \pm 0.007$ ,  $0.253 \pm 0.007$  και  $0.267 \pm 0.006 \mu\text{m}^2/\text{sec}$

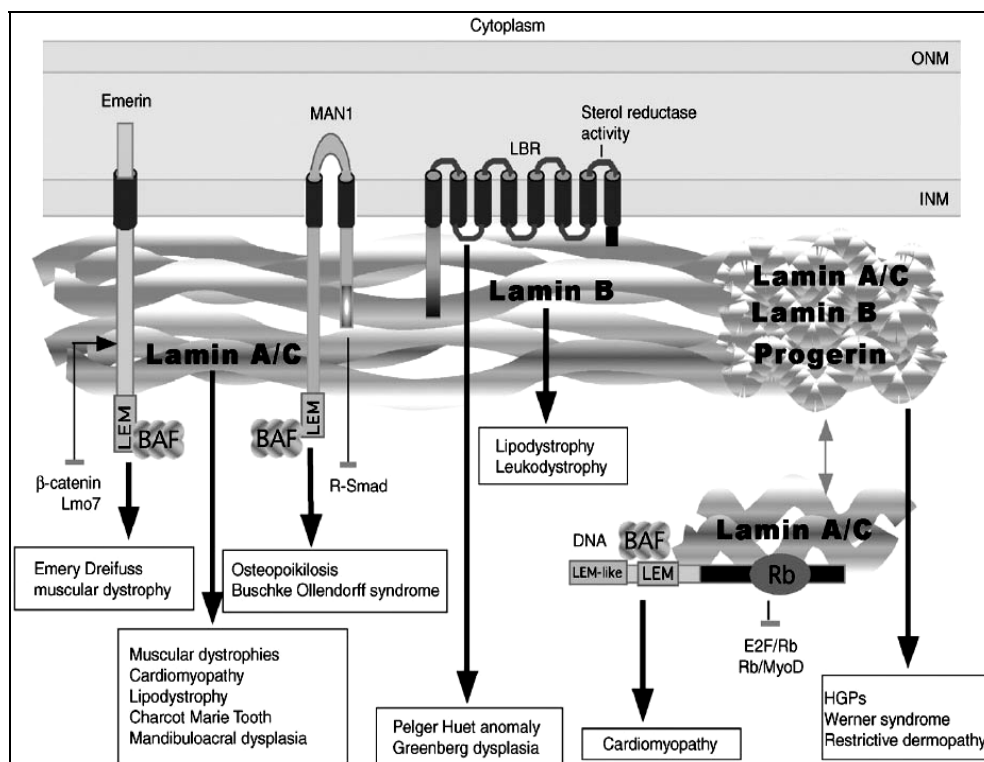
αντίστοιχα). Αντίθετα, σημειακή μετάλλαξη της τυροσίνης στη θέση 23 (LBR<sup>Y23F</sup>) μείωσε την κινητική της πρωτεΐνης στα επίπεδα του πλήρους μορίου (LBR<sup>WT</sup>). Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν τη σημασία του tudor τομέα στη συγκράτηση της πρωτεΐνης στον πυρηνικό φάκελο, πιθανόν μέσω των αλληλεπιδράσεών του με τη χρωματίνη και τη λαμίνη Β. Ωστόσο, όταν πραγματοποιήθηκαν πειράματα FRAP σε κύτταρα στα οποία είχαν αποσιωπηθεί οι λαμίνες Β1 και Β2 (siRNA knockdown), δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στη δυναμική των πρωτεϊνών, υποδηλώνοντας ότι η χαμηλή κινητική του LBR δεν οφείλεται στη σύνδεσή του με τις λαμίνες Β.



### 1.3 Ασθένειες που σχετίζονται με τον LBR

#### 1.3.1 Ασθένειες που σχετίζονται με τον πυρηνικό φάκελο (λαμινοπάθειες)

Πρόσφατα, μεγάλο ενδιαφέρον έχει δημιουργηθεί σε σχέση με τις πρωτεΐνες της πυρηνικής μεμβράνης λόγω της συσχέτισης μεταλλάξεων και κληρονομικών ασθενειών στον άνθρωπο. Αυτές οι νόσοι (λαμινοπάθειες) περιλαμβάνουν μέχρι στιγμής 17 σύνδρομα, μεταξύ των οποίων ποικίλοι τύποι καρδιομυοπάθειας, μυϊκής δυστροφίας, λιποδυστροφίας και προγηρίας.



Εικόνα 1.25 Πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου, πυρηνική λάμινα και ασθένειες. Από Vlcek et al, 2007.

Οι λαμινοπάθειες εκδηλώνονται κυρίως στους μεσεγχυματικούς ιστούς, όπως τους σκελετικούς μύες, την καρδιά, τον λιπώδη, τον συνδετικό και τον ερειστικό ιστό, και κατηγοριοποιούνται σε δυο κύριες ομάδες: στις ασθένειες που επηρεάζουν συγκεκριμένο ιστό με καθορισμένο τρόπο και στις ασθένειες που θίγουν πολλαπλούς ιστούς (συστηματικές νόσοι). Παρόλο που έχουν περιγραφεί περισσότεροι από 1000 νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί και περίπου 350 μεταλλάξεις που σχετίζονται με ασθένειες, δεν έχει βρεθεί μέχρι στιγμής καμιά άμεση συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου.

Κατά κύριο λόγο, οι λαμινοπάθειες οφείλονται σε μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν τις λαμίνες (εικόνα 1.26). Για παράδειγμα, μεταλλάξεις στο γονίδιο της λαμίνης τύπου A προκαλούν τις περισσότερες γνωστές ασθένειες, που θίγουν τους γραμμωτούς μύες, το λιπώδη ιστό, το περιφερικό νευρικό σύστημα ή πολλαπλά συστήματα που σχετίζονται με πρόωμη γήρανση και ανωμαλίες των οστών. Με την εξαίρεση της περιφερικής νευροπάθειας, η οποία σχετίζεται με το εξώδερμα, οι υπόλοιπες ασθένειες σχετίζονται με ιστούς του μεσεγχύματος. Οι μεταλλάξεις του LMNA γονιδίου είναι κατά κύριο λόγο σημειακές και οδηγούν σε αντικατάσταση αμινοξέων στα μόρια των λαμινών A και C. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί και μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν ανωμαλίες στο μάτισμα του RNA, μικρής έκτασης ελλείψεις στην αλληλουχία των μορίων ή σε πρόωμο τερματισμό της μετάφρασης.

Οι κυριότερες λαμινοπάθειες που σχετίζονται με μεταλλάξεις του γονιδίου της λαμίνης A είναι οι λιποδυστροφία τύπου 2, η προγηρία Hutchinson–Gilford και η ασθένεια Charcot–Marie–Tooth τύπου 2B1. Η οικογενής μερική λιποδυστροφία τύπου 2 (Familial partial lipodystrophy type 2 ή Dunnigan-type familial partial lipodystrophy) είναι μια αυτοσωμική επικρατής ασθένεια η οποία εμφανίζεται στην εφηβεία με απώλεια του υποδόριου λίπους από τα άκρα και συσσώρευση λίπους στο λαιμό και το πρόσωπο. Με τη πρόοδο της ασθένειας εμφανίζονται ανοχή στην ινσουλίνη, σακχαρώδης διαβήτης και υπερτριγλυκεριδιμία. Στην παιδική προγηρία Hutchinson–Gilford progeria (HGPS), τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται νωρίς μετά τη γέννηση και περιλαμβάνουν σκλήρυνση του δέρματος, κρανιοεγκεφαλικές ανωμαλίες (μικρό προσωπικό κρανίο και παραμορφώσιμη μύτη), άλλες ανωμαλίες στα οστά, αλωπεκία και μειωμένη ανάπτυξη. Συνήθως οι ασθενείς πεθαίνουν στη δεύτερη δεκαετία της ζωής τους, μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου ή εγκεφαλικό επεισόδιο. Οι περισσότερες περιπτώσεις οφείλονται σε αντικατάσταση μιας κυτοσίνης από θυμίνη στο νουκλεοτίδιο 1824 του εξωνίου 11 του LMNA γονιδίου.

Μια υπολειπόμενη μετάλλαξη στο LMNA γονίδιο έχει ανιχνευθεί σε παιδιά από την Αλγερία, όπου η αντικατάσταση της αργινίνης από κυστεΐνη στο κατάλοιπο 298 των λαμινών A και C, οδηγεί στην ασθένεια Charcot–Marie–Tooth τύπου 2B1. Η ασθένεια εμφανίζεται μεταξύ των ηλικιών 6 και 27 χρονών και τα συμπτώματα ποικίλουν από σοβαρά, με περιφερική εξασθένηση, αδυναμία των τεσσάρων άκρων και απώλεια αντανακλαστικών (συνήθως) των κάτω άκρων, μέχρι μια πιο ήπια λειτουργική αδυναμία.

<p><b>LMNA</b></p> <p><b>Affecting Striated Muscle</b></p> <p>Emery–Dreifuss muscular dystrophy (autosomal dominant and very infrequently recessive)</p> <p>Limb-girdle muscular dystrophy type 1B</p> <p>Congenital muscular dystrophy</p> <p>Heart–hand syndrome</p> <p>Dilated cardiomyopathy 1A</p> <p><b>Affecting Adipose Tissue</b></p> <p>Familial partial lipodystrophy type 2 (Dunningan-type familial partial lipodystrophy)</p> <p>Insulin resistance with a metabolic syndrome-like phenotype without apparent lipodystrophy</p> <p>Atypical lipodystrophic syndromes</p> <p>Mandibuloacral dysplasia with type A lipodystrophy</p> <p><b>Affecting Multiple Organs-Systems with Bone Involvement and Features of Premature Aging</b></p> <p>Hutchinson–Gilford progeria syndrome</p> <p>Atypical Werner syndrome</p> <p>Atypical progeria syndromes</p> <p>Mandibuloacral dysplasia with type A lipodystrophy</p> <p><b>Affecting Peripheral Nerve</b></p> <p>Charcot–Marie–Tooth disease type 2B1</p> <p><b>LMNB1</b></p> <p>Autosomal dominant adult-onset leukodystrophy</p> <p><b>LMNB2</b></p> <p>Acquired partial lipodystrophy</p>
---

**Εικόνα 1.26 Ασθένειες που προκαλούνται από μεταλλάξεις στα γονίδια των λαμινών.** Από Iván Méndez-López et al., 2012.

Σε αντίθεση με τις μεταλλάξεις του LMNA γονιδίου, οι οποίες προκαλούν διάφορες ασθένειες με ποικίλο φαινότυπο, μόνο μια ασθένεια έχει συσχετιστεί με το γονίδιο LMNB1 και μια με το γονίδιο LMNB2. Η αυτοσωμική επικρατής λευκοδυστροφία (adult-onset leukodystrophy) προκύπτει από διπλασιασμό του γονιδίου LMNB1. Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από συμμετρική από-μυελοποίηση (symmetrical demyelization) στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ο διπλασιασμός του LMNB1 γονιδίου προκαλεί υπερέκφραση της λαμίνης B1, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την πρόιμη περάτωση της διαφοροποίησης των ολιγοδενδροκυττάρων. Ετερόζυγες μεταλλάξεις ή σπάνιοι πολυμορφισμοί στο γονίδιο LMNB2 έχουν συσχετιστεί με την επίκτητη μερική λιποδυστροφία (partial lipodystrophy) ή το σύνδρομο Barraquer–Simons, μια ανωμαλία του λιπώδους ιστού η οποία συνήθως προκύπτει στη διαδρομή μιας αυτο-άνοσης νόσου, όπως η δερματομυοσίτιδα ή ο συστηματικός ερυθρηματώδης λύκος (Ya-Hui Chi et al., 2009 και Iván Méndez-López et al., 2012).

Ένας ολοένα μεγαλύτερος αριθμός ασθενειών σχετίζεται με μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης ή πρωτεΐνες που συνδέονται με αυτές (εικόνα 1.27). Μερικές από αυτές τις ασθένειες είναι όμοιες με αυτές που προκύπτουν από μεταλλάξεις του LMNA γονιδίου. Η πρώτη ασθένεια που συσχετίστηκε με πρωτεΐνη της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης ήταν η μυϊκή δυστροφία X-linked Emery–Dreifuss, η οποία παρουσιάζει πολύ όμοια συμπτώματα με την αυτοσωμική μυϊκή δυστροφία Emery–Dreifuss. Η μυϊκή δυστροφία X-linked Emery–Dreifuss προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο EDM, το οποίο κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη emerin. Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από πρόιμες συσπάσεις των αγκώνων, των αχίλλειων τενόντων και του αυχένα, δυσκαμψία της σπονδυλικής στήλης, προοδευτική μυϊκή αδυναμία και διατακτική μυοκαρδιοπάθεια. Ορισμένες περιπτώσεις μυϊκής δυστροφίας Emery–Dreifuss έχουν επίσης συσχετιστεί με μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες nesprin-1 και nesprin-2.

Μεταλλάξεις οι οποίες οδηγούν σε απώλεια της λειτουργικότητας (loss-of-function mutations) στο γονίδιο LEMD3, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη MAN1, προκαλούν διάφορες δυσπλασίες των οστών, όπως η οστεοποικίλωση, η μελορέοστωση και το σύνδρομο Buschke–Ollendorf (Iván Méndez-López et al., 2012).

Ασθένεια	Γονίδιο	Πρωτεΐνη	Κληρονομικότητα
Μυϊκή δυστροφία Emery-Dreifuss	EMD	Emerin	X
	SYNE1	Nesprin-1	AD
	SYNE2	Nesprin-2	AD
	TMEM43	LUMA	AD
	TMPO	LAP2a	AD
Οστεοποικίλωση	LEMD3	MAN1	AD
Σύνδρομο προγηρίας	BANF1	BAF	AR
Σκελετική δυσπλασία Greenberg	LBR	Lamin b receptor	AR
Ανωμαλία Pelger-Huet	LBR	Lamin b receptor	AD
Σύνδρομο Reynolds	LBR	Lamin b receptor	AR
Αυτοσωμική υπολειπόμενη αταξία της παρεγκεφαλίδας τύπου 8	SYNE1	Nesprin-1	AR
Αρθρογρύπωση	SYNE1	Nesprin-1	AR
Δυστονία <i>DYT1</i>	TOR1A	TorsinA	AD

**Εικόνα 1.27 Ασθένειες που προκύπτουν από μεταλλάξεις των πρωτεϊνών της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης ή από πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον πυρηνικό φάκελο. X-linked, AD: αυτοσωμική επικρατής AR: αυτοσωμική υπολειπόμενη. Από Iván Méndez-López et al, 2012.**

Στη βάση των φαινοτύπων των λαμινοπαθειών έχουν προταθεί δυο πιθανές εξηγήσεις για την μοριακή βάση αυτών των ασθενειών. Το πρώτο μοντέλο πιθανολογεί ότι οι ασθένειες

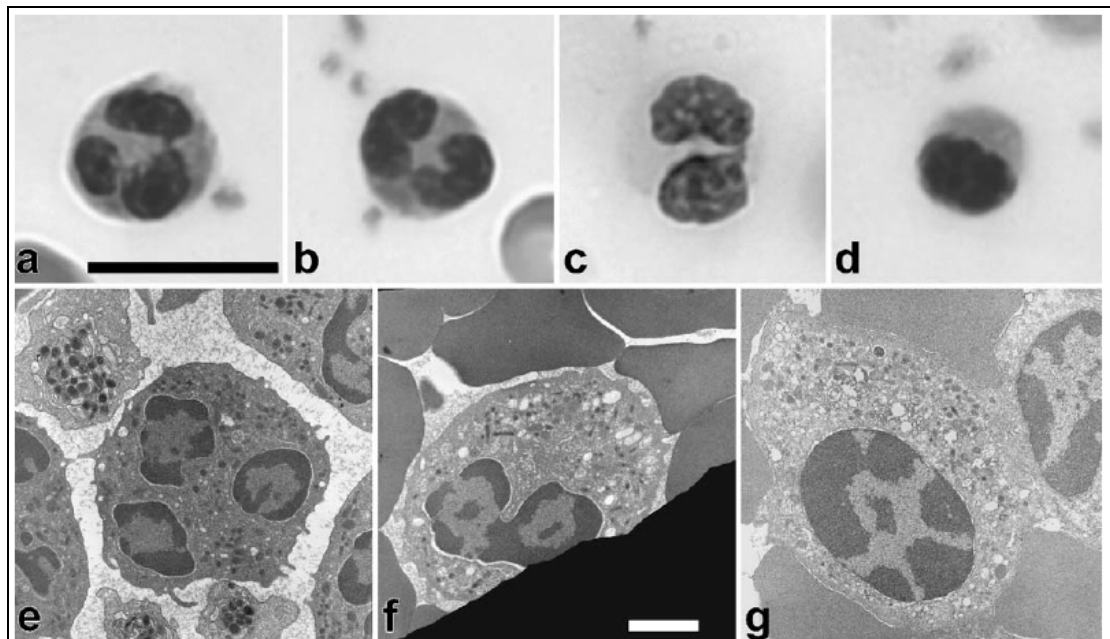
προκύπτουν από αλλοιώσεις στη δομή του πυρήνα, ενώ το δεύτερο προτείνει ότι η παθολογία τους οφείλεται σε ανωμαλίες της σηματοδότησης ή της γονιδιακής έκφρασης. Το ένα μοντέλο δεν αποκλείει το άλλο, καθώς αλλαγές σε μια από αυτές τις κυτταρικές διαδικασίες θα μπορούσαν να επηρεάσουν την άλλη. Έχουν αναφερθεί αλλαγές τόσο στη δομή του πυρήνα όσο και στη σηματοδότηση σε πολλά κυτταρικά συστήματα, τα οποία χρησιμοποιούνται ως μοντέλα μελέτης των λαμινοπαθειών (Gerace et al., 2012).

### 1.3.2 Η ανωμαλία Pelger – Huet (PHA)

Η ανωμαλία Pelger–Huët (PHA) χαρακτηρίζεται από απώλεια λόβωσης (hypossegmentation) και εκτεταμένη συμπύκνωση της χρωματίνης στους πυρήνες των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων. Χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά το 1928 από τον Karl Pelger, ο οποίος παρατήρησε αλλαγές στην μορφολογία των ουδετερόφιλων σε δυο ασθενείς με φυματίωση. Τέσσερα χρόνια αργότερα, ο Huët ανέφερε τα ίδια ευρήματα σε ένα παιδί που έπασχε από σοβαρή φυματίωση (Dusse et al, 2010). Η ανωμαλία κληρονομείται ως μια αυτοσωμική επικρατής ασθένεια και χαρακτηρίζεται από απώλεια λόβωσης του πυρήνα των κοκκιοκυττάρων (εμφάνιση ενός ή δύο λοβών) και συμπύκνωση της χρωματίνης στα λεμφοκύτταρα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα (εικόνα 1.28). Η ανωμαλία PHA είναι σχετικά συχνή, αλλά συχνά παραβλέπεται λόγω της έλλειψης συμπτωμάτων. Η συχνότητα εμφάνισής της είναι περίπου 0.01– 0.1% παγκοσμίως, ενώ σε μερικές περιοχές η συχνότητα αυξάνεται, όπως στο Västerbotten County της Σουδίας (0.6%) και στο Gelenau της Γερμανίας (1.01%) (Hoffmann et al, 2002).

Αν και η παθοφυσιολογία της ανωμαλίας PHA δεν είναι πλήρως γνωστή, θεωρείται ότι είναι μια καλοήθης ασθένεια, καθώς οι «ασθενείς» δεν παρουσιάζουν συμπτώματα που επιβαρύνουν τη ζωή τους. Τα κύτταρα των ασθενών με Pelger-Huët κυκλοφορούν φυσιολογικά στην κυκλοφορία του αίματος και παρά την παράξενη εμφάνισή τους είναι πλήρως λειτουργικά σε μεταβολικό επίπεδο και ανταποκρίνονται φυσιολογικά σε χημειοτακτικά ερεθίσματα. Στα ετερόζυγα άτομα περισσότερο από 55% των ουδετερόφιλων κυττάρων εμφανίζουν δίλοβους πυρήνες. Σε αντίθεση με τους ωοειδείς ή ακανόνιστους λοβούς των φυσιολογικών ουδετερόφιλων, οι λοβοί των PHA κυττάρων είναι συνήθως στρογγυλοί και συμμετρικοί. Αν και σχετικά σπάνια, έχει αναφερθεί ομοζυγωτία για την ανωμαλία. Τα ουδετερόφιλα αυτών των ασθενών περιέχουν ένα μόνο λοβό, στρογγυλό ή με λίγες εσοχές και συνιστούν περίπου το 96% του πληθυσμού τους (εικόνα 1.28) (Constantino,

2005). Επιπλέον, οι ομοζυγώτες εμφανίζουν ποικίλου βαθμού αναπτυξιακή καθυστέρηση, επιληψία και σκελετικές ανωμαλίες.

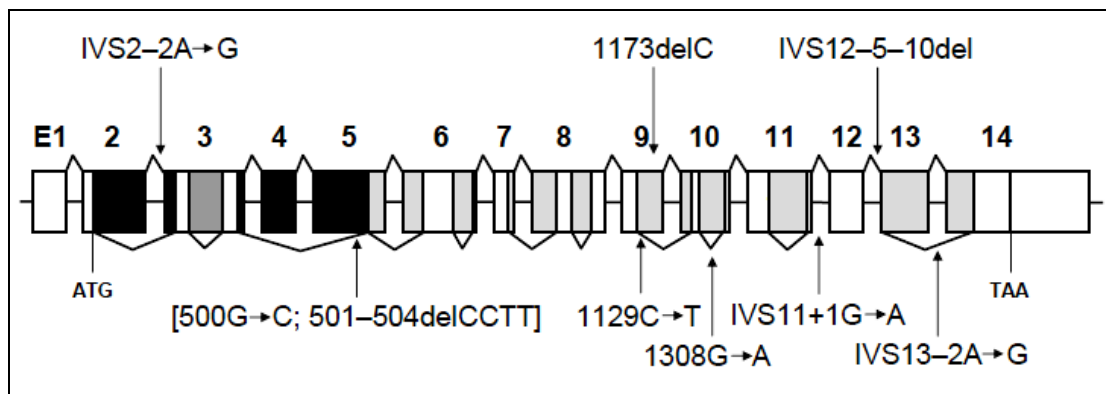


**Εικόνα 1.28** Μορφολογία των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων σε ασθενείς με Pelger – Huet ανωμαλία. a–d) Χρώσεις Wright–Giemsa ουδετερόφιλων κυττάρων στα οποία φαίνεται καθαρά η λόβωση των πυρήνων. a) φυσιολογικό ουδετερόφιλο με πολυλοβωτό πυρήνα, b και c) ουδετερόφιλα ετερόζυγου ασθενούς PHA με δίλωβο πυρήνα, d) κύτταρο ομόζυγο για PHA με απώλεια λόβωσης, e–g) Ηλεκτρονικές μικρογραφίες στις οποίες φαίνεται ο βαθμός συμπύκνωσης της χρωματίνης σε: e) φυσιολογικό ουδετερόφιλο, f) ετερόζυγο PHA ουδετερόφιλο και g) ομόζυγο PHA ουδετερόφιλο. Από Olinsa et al, 2008.

Ο ακριβής μηχανισμός που οδηγεί στην υπολόβωση (hyposegmentation) στα PHA ουδετερόφιλα παραμένει άγνωστος. Φαίνεται ότι αποτελεί μια γενετικώς ελεγχόμενη βλάβη, η οποία συσχετίζεται με αλλαγές στη σύνθεση των νουκλεοπρωτεϊνών και της χρωματίνης. Έλεγχος του πλήρους γενόματος (genome-wide scan) με χρήση μικροδορυφόρων (microsatellites) σε ασθενείς με ανωμαλία PHA, έδειξε ότι η ανωμαλία οφείλεται σε μεταλλάξεις στο χρωμόσωμα 1q41–43, όπου εντοπίζεται το γονίδιο του LBR. Έντεκα διαφορετικές μεταλλάξεις του γονιδίου έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα να προκαλούν την ανωμαλία (εικόνα 1.29). Πρόκειται για μεταλλάξεις σε θέσεις ματίσματος (splice site), πρόωρης λήξης της μετάφρασης (nonsense mutations) ή αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης (frameshift mutations), οι οποίες εντοπίζονται καθ' όλο το μήκος του γονιδίου και επηρεάζουν τόσο το αμινοτελικό όσο και το διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης (Best et al,



2003). Στις περισσότερες περιπτώσεις εμφανίζεται μια έλλειψη 6 βάσεων στο εσώνιο 12 (IVS12-5-10del), η οποία οδηγεί σε απώλεια του εξωνίου 13.

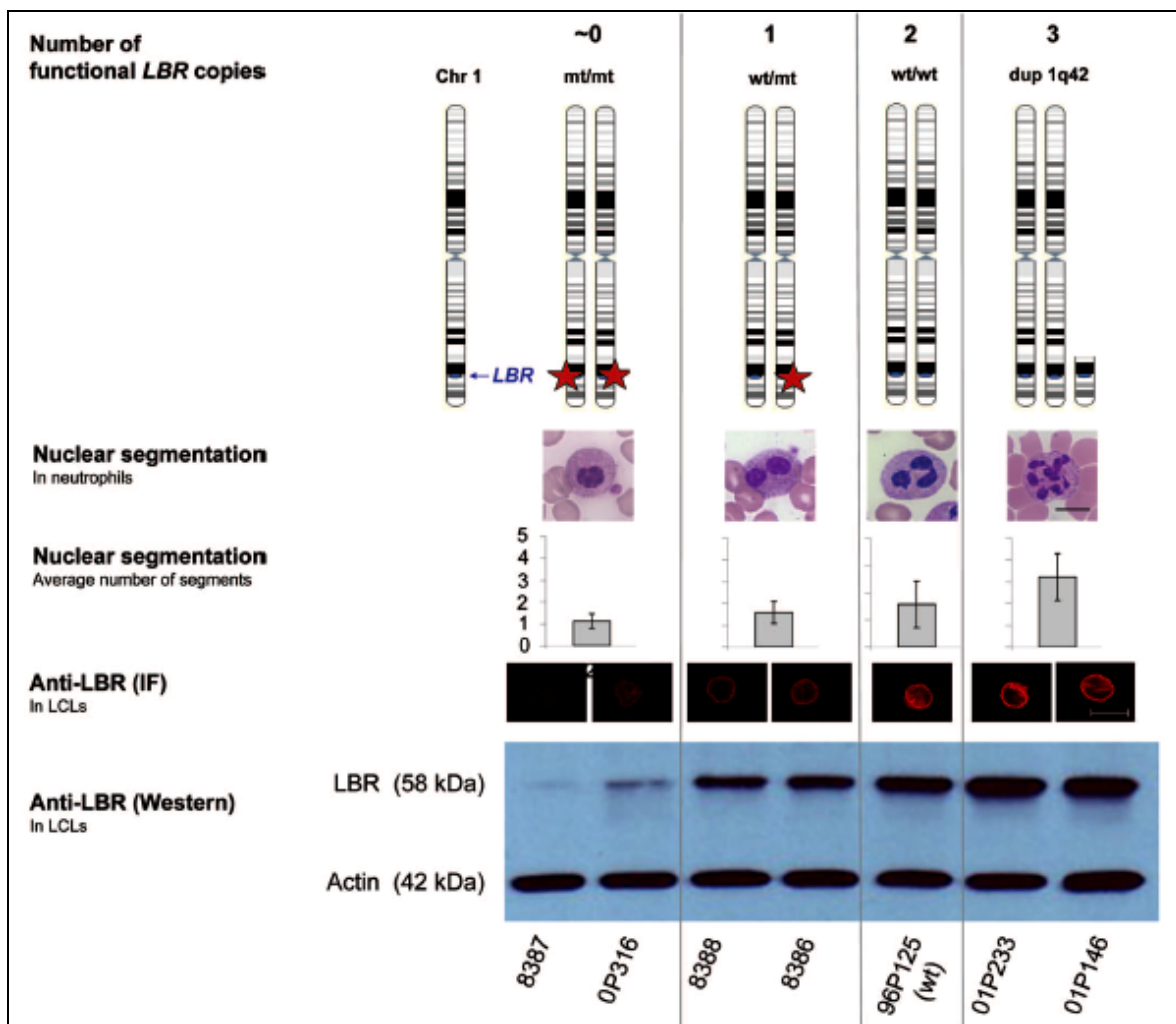


**Εικόνα 1.29** Δομή του γονιδίου LBR και συνήθεις μεταλλάξεις που οδηγούν στην ανωμαλία PHA. Η μετάλλαξη IVS2-2A→G οδηγεί σε απώλεια του εξωνίου 3, η IVS12-5-10del διαταράσσει το μάτισμα του εξωνίου 13 και οι μεταλλάξεις IVS11+1G→A και IVS13-2A→G οδηγούν σε απώλεια των εξωνίων 11 και 14 αντίστοιχα. Οι μεταλλάξεις 1308G→A, 1173delC, 1129C→T και [500G→C; 501-504delCCTT] οδηγούν σε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης στα κατάλοιπα Trp436, Leu393, Arg377 και Lys176 αντίστοιχα. Από Hoffmann et al, 2002.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ευρήματα που σχετίζονται με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης LBR στα κύτταρα ασθενών με PHA. Τα λεμφοβλαστοειδή κύτταρα των ασθενών εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης, με τους ετεροζυγώτες να έχουν τα μισά επίπεδα πρωτεΐνης σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα ενώ οι ομοζυγώτες να εκφράζουν ίχνη. Πειράματα ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι ο LBR εντοπίζεται κανονικά στον πυρηνικό φάκελο σε όλες τις περιπτώσεις (εικόνα 1.30) (Hoffmann et al, 2002).

Η παρουσία μειωμένου ποσού πρωτεΐνης στα κύτταρα των ετερόζυγων συνδέεται άμεσα με την εμφάνιση δίλοβων πυρήνων, ενώ τα ομόζυγα άτομα με ελάχιστη έκφραση της πρωτεΐνης εμφανίζουν πυρήνες με ένα μόνο λοβό. Φαίνεται λοιπόν ότι η έκφραση του LBR επηρεάζει το σχήμα και την κατανομή της χρωματίνης των ουδετερόφιλων κυττάρων με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Σε μια πιο εκτεταμένη μελέτη (Gravemann et al, 2010) οι ερευνητές συσχέτισαν άμεσα το βαθμό λόβωσης των ουδετερόφιλων κυττάρων με τον αριθμό των λειτουργικών αντιγράφων του γονιδίου LBR και τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης. Μελετώντας άτομα ομόζυγα για την PHA (0 λειτουργικά αντίγραφα του γονιδίου), ετερόζυγα (1 λειτουργικό αντίγραφο), φυσιολογικά (2 λειτουργικά αντίγραφα) και άτομα στα οποία είχε τριπλασιαστεί το γονίδιο (3 λειτουργικά αντίγραφα), απέδειξαν ότι ο

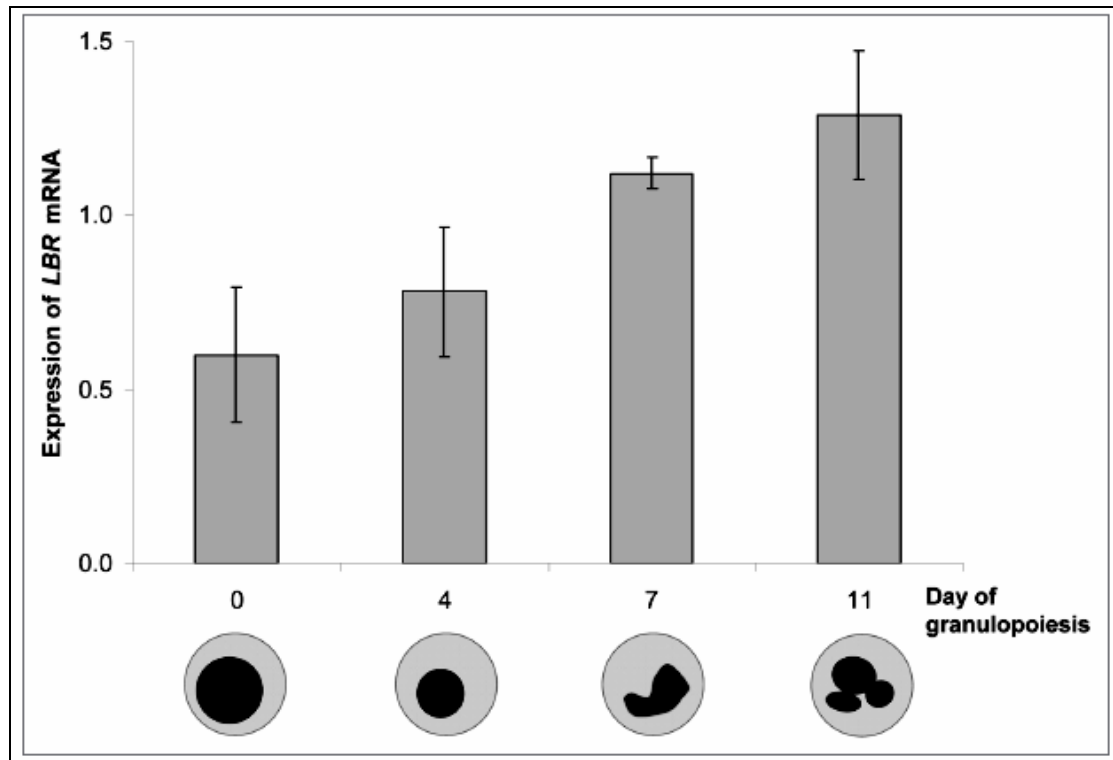
βαθμός λόβωσης του πυρήνα είναι ανάλογος του ποσού της πρωτεΐνης που παράγεται (εικόνα 1.30). Συνηγορητικά προς αυτή την κατεύθυνση, βρέθηκε ότι στον άνθρωπο η έκφραση του LBR αυξάνεται συνεχώς κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής κοκκιοποίησης/ διαφοροποίησης των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων, με τα πρόδρομα κύτταρα με ωσειδή πυρήνα να ωριμάζουν σε πολυλοβωτά ουδετερόφιλα μετά από 11 ημέρες (εικόνα 1.31).



**Εικόνα 1.30** Συσχέτιση λειτουργικών αντιγράφων του LBR γονιδίου, του ποσού της πρωτεΐνης και του βαθμού λόβωσης στον πυρήνα των ουδετερόφιλων κυττάρων. Ο αριθμός των λειτουργικών αντιγράφων του LBR γονιδίου σχετίζεται άμεσα με τον αριθμό των λοβών στα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και την έκφραση της πρωτεΐνης στα λεμφοβλαστοειδή κύτταρα. Από Gravemann et al, 2010.

Το πιο κατάλληλο μοντέλο μελέτης της διαφοροποίησης των ουδετερόφιλων είναι τα λευχαιμικά κύτταρα HL-60. Προσθήκη ρετινοϊκού οξέος (RA) σε αυτά επάγει το σχηματισμό λοβωτών πυρήνων, σε αναλογία με τη φυσιολογική κοκκιοποίηση (εικόνα 1.32). Κατά την διαδικασία αυτή, οι πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην

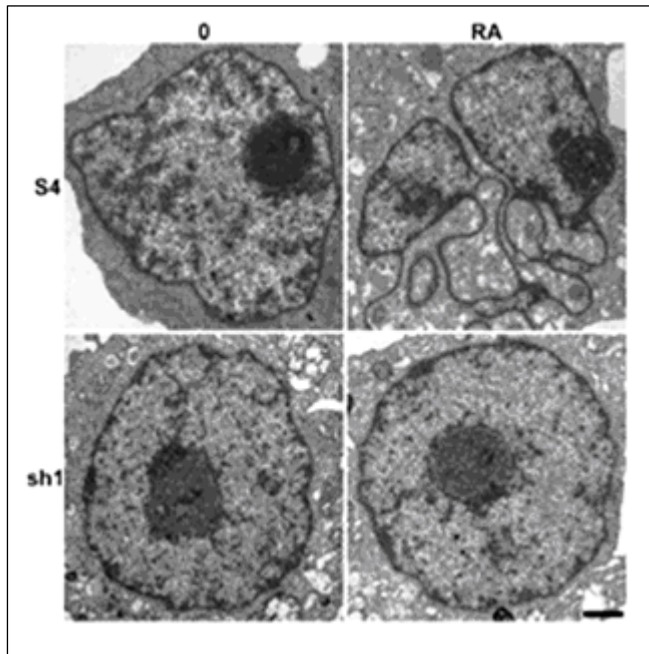
αλλαγή σχήματος του πυρήνα των κυττάρων. Έχει βρεθεί ότι οι λαμίνες A/C και B1 δεν εκφράζονται κατά την επαγόμενη διαφοροποίηση των κυττάρων ενώ τα επίπεδα έκφρασης του LBR αυξάνονται (Olins et al, 2004). Επιπρόσθετα, αποσιώπηση του γονιδίου του LBR στα φυσιολογικά κύτταρα (knockdown) και επαγωγή της διαφοροποίησης έχει ως αποτέλεσμα τα κύτταρα να παραμένουν αδιαφοροποίητα με ωοειδείς πυρήνες (εικόνα 1.32) και να καθυστερούν χρονικά κατά τον διπλασιασμό του DNA (Olins et al, 2010).



**Εικόνα 1.31** In vitro διαφοροποίηση των ουδετερόφιλων κυττάρων σχετίζεται με αυξανόμενα ποσά του LBR mRNA μετά από 0, 4, 7 ή 11 ημέρες. Από Gravemann et al, 2010.

Είναι σαφές λοιπόν ότι ο βαθμός λόβωσης των ουδετερόφιλων κυττάρων αποτελεί έναν ευαίσθητο δείκτη των μεταλλάξεων και του ποσού έκφρασης του LBR. Σε τι χρησιμεύει όμως η εμφάνιση λοβώσεων στους πυρήνες αυτών των κυττάρων; Μελέτες υποστηρίζουν ότι η λόβωση είναι σημαντική, έτσι ώστε τα ουδετερόφιλα να διαπερνούν τα ενδοθηλιακά τοιχώματα και να μεταναστεύουν μεταξύ των ιστών (Olinsa et al, 2008). Έχει προταθεί ότι η έλλειψη της λαμίνης B1 από τους πυρήνες των κυττάρων τα καθιστά πιο εύπλαστα/ευέλικτα, μειώνοντας την μηχανική αντίσταση και βοηθώντας τη μετακίνησή τους. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά ουδετερόφιλα, τα κύτταρα των ασθενών PHA φαίνεται να καθυστερούν να διαπεράσουν φίλτρα με πόρους μικρού μεγέθους (5μm). Ίσως η μειωμένη ικανότητα

μετανάστευσης αυτών των κυττάρων να οφείλεται εν μέρει στη μηχανική παρεμπόδιση των μεγάλων μη-λοβωτών πυρήνων, εξαιτίας της έλλειψης του LBR.



**Εικόνα 1.32 Αποσιώπηση του LBR εμποδίζει τη διαφοροποίηση των HL-60 κυττάρων.** Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας αδιαφοροποίητων (0) και επαγόμενων με ρετινοϊκό οξύ (RA) HL-60 κυττάρων. Κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων ελέγχου (S4) εμφανίζονται χαρακτηριστικές λοβώσεις στους πυρήνες, σε αντιδιαστολή με τα κύτταρα στα οποία έχει αποσιωπηθεί το γονίδιο του LBR (sh1). Από Olins et al, 2010.

### 1.3.3 Η επίκτητη ανωμαλία Pelger – Huet (acquired PHA, APHA)

Έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία επίκτητοι τύποι της ανωμαλίας Pelger-Huet (APHA ή pseudo PHA). Αυτές οι μορφές της ασθένειας κατηγοριοποιούνται ως αντιστρέψιμες ή μη και μπορούν να εμφανιστούν ως ετερόζυγες ή ομόζυγες καταστάσεις. Η επίκτητη ανωμαλία Pelger-Huet είναι κυρίως γνωστή ως μια εκδήλωση της μυελοδυσπλασίας, αλλά έχει αναφερθεί και σε άλλες αιματολογικές ασθένειες όπως τα σύνδρομα μυελο-υπερπλασίας, λεμφο-υπερπλασίας (myeloproliferative, lymphoproliferative syndromes) και η οξεία λευχαιμία. Αυτή η μορφή Pelger –Huet έχει εμφανιστεί επίσης σε διάφορες μολυσματικές ασθένειες, μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών ή μετά από λήψη συγκεκριμένης φαρμακευτικής αγωγής (εικόνα 1.33).

Το 2003 αναφέρθηκε η εύρεση μη φυσιολογικών ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων σε τρεις ασθενείς μετά από αγωγή με mycophenolate mofetil (MMF). Μάλιστα, η σοβαρότητα των συμπτωμάτων ήταν ανάλογη της δόσης MMF που χορηγήθηκε. Οι τρεις ασθενείς που μελετήθηκαν είχαν υποστεί μεταμόσχευση ήπατος, νεφρού ή παγκρέατος αντίστοιχα και όλοι υπέφεραν από οξεία απόρριψη του μοσχεύματος ένα μήνα μετά την εγχείριση. Τέσσερις, πέντε και οκτώ μήνες μετά, όλοι τους παρουσίασαν μια «στροφή προς τα αριστερά» στα επιχρίσματα του περιφερικού αίματος (Asmis et al., 2003).

Περιπτώσεις επίκτητης Pelger Huet ανωμαλίας	Αριθμός δημοσιεύσεων	
Σχετιζόμενες με νόσους	Τοξική στηθάγχη	1
	Ελονοσία	1
	Γρίπη	1
	Μονοπυρήνωση	1
	Μόλυνση <i>Micorplasma pneumoniae</i>	1
	Φυματίωση	1
	Αναπνευστική λοίμωξη	1
	AIDS	1
	Παρβοϊοί	1
	Ερυθματώδης λύκος	3
	Μυξοίδημα-Υποθυρεοειδισμός	1
	Ρευματοειδής αρθρίτιδα	1
	Νόσος Addison	1
	Σχετιζόμενες με χορήγηση φαρμάκων	CSF και IL-5
Ανοσοκατασταλτικά		6
Nomifensine		1
Ibuprofen		2
Sulfonamide		1
D-penicillamine		1

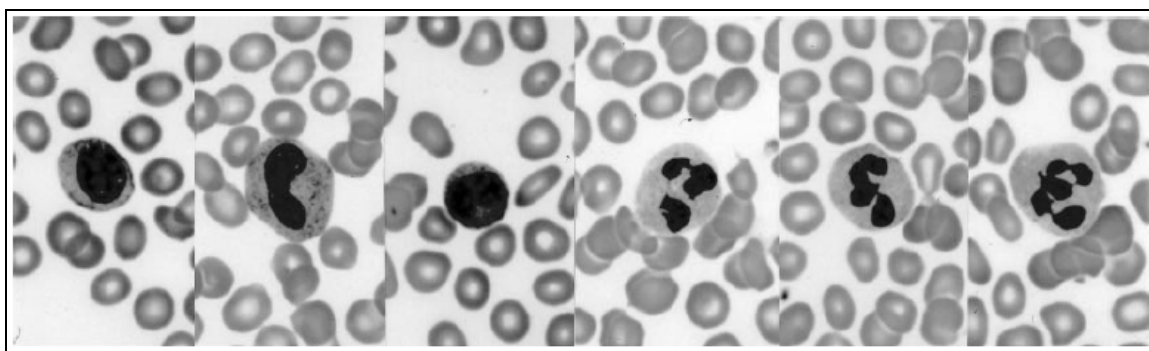
**Εικόνα 1.33 Περιπτώσεις επίκτητης Pelger – Huet ανωμαλίας που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία.** Από Dusse et al, 2010.

Είκοσι τρεις ασθενείς οι οποίοι έλαβαν paclitaxel ή docetaxel λόγω εμφάνισης καρκίνου του μαστού, του πνεύμονα ή των ωοθηκών, εμφάνισαν ΑΡΗΑ τρεις έως εννιά μέρες μετά την χορήγηση των φαρμάκων. Ωστόσο, η ΑΡΗΑ εξαφανίσθηκε 21 μέρες μετά την έναρξη της θεραπείας (Juneja et al., 1996).

Η μοναδική μελέτη η οποία συσχετίζει την εμφάνιση ΑΡΗΑ με αλλοιώσεις στο γονιδίωμα των ασθενών είναι αυτή των Sessarego και Ajmar. Η υπολόβωση των ουδετερόφιλων κυττάρων εκδηλώθηκε σε 11 από τους 83 ασθενείς με χρόνια μυελοειδή λευχαιμία κατά τη βλαστική φάση της νόσου. Χρωμοσωμικός έλεγχος κατά την περίοδο εμφάνισης της υπολόβωσης αποκάλυψε αλλοιώσεις στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17. Σε οκτώ περιπτώσεις εμφανίστηκε αντιστροφή της περιοχής [i(17q)], σε δυο περιπτώσεις μη ισοζυγισμένη μετάθεση (unbalanced translocation) και μία περίπτωση αφορούσε μονοσωμία. Όλες αυτές οι αναδιατάξεις είχαν ως κοινό σημείο την απώλεια του απώτερου άκρου του μικρού βραχίονα του χρωμοσώματος (Sessarego et al., 1987).

Η Dusse και οι συνεργάτες της, σε μια έρευνα μεγάλης κλίμακας εξέτασαν 170 ασθενείς που είχαν υποστεί μεταμόσχευση νεφρού και έλαβαν ανοσοκατασταλτικά φάρμακα (cyclosporine, azothioprine, mycophenolate mofetil, azothioprine και sirolimus). Διαπίστωσαν ότι εννέα από τους ασθενείς παρουσίασαν ΑΡΗΑ, ποσοστό εμφάνισης 5.3%. Ένα χρόνο αργότερα, επανεξέτασαν έξι από τους εννέα ασθενείς με ΑΡΗΑ και μόνο δυο από

αυτούς παρουσίασαν το χαρακτηριστικό φαινότυπο των ουδετερόφιλων κυττάρων της Pelger – Huet ανωμαλίας (Dusse et al., 2010).



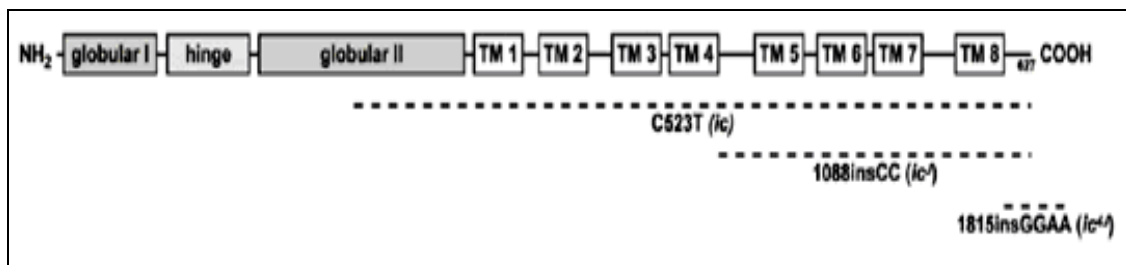
**Εικόνα 1.34** Επιχρίσματα αίματος από ασθενή όπου χορηγήθηκε MMF με τα ουδετερόφιλα να εμφανίζουν 0,1,2,3,4 ή 5 λοβώσεις (από αριστερά προς τα δεξιά). Οι πρώτες τρεις φωτογραφίες (από τα αριστερά) αντιπροσωπεύουν την περίοδο όπου χορηγήθηκε στον ασθενή MMF ενώ οι υπόλοιπες τρεις όταν ο ασθενής δεν λάμβανε πλέον την αγωγή. Από Asmis et al., 2003.

Σε μια προσπάθεια να εξηγηθεί η εμφάνιση της Pelger Huet ανωμαλίας σε αιματολογικές ασθένειες προτάθηκαν τρεις υποθέσεις. Η πρώτη σχετίζεται με ανωμαλίες στην αλληλουχία του LBR γονιδίου, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε χαμηλά επίπεδα της πρωτεΐνης. Η δεύτερη υπόθεση προτείνει ότι η pseudo PHA δεν είναι στην πραγματικότητα μια ανωμαλία της ωρίμανσης των ουδετερόφιλων, αλλά τα κύτταρα εμφανίζουν αυτό το φαινότυπο γιατί υφίστανται απόπτωση. Η τρίτη ερμηνεία συσχετίζει την εμφάνιση της επίκτητης PHA (σε ασθενείς με μυελοδυσπλασία) με την αυξημένη εμφάνιση ελλείψεων στο χρωμόσωμα 17. Παρόλα αυτά, παραμένει ακόμη άγνωστο γιατί κάποιοι – και όχι όλοι – από τους ασθενείς αναπτύσσουν επίκτητη Pelger Huet ανωμαλία. Το μοναδικό κοινό σημείο μεταξύ όλων των αναφορών σχετικά με την επίκτητη μορφή της ασθένειας είναι ότι όλοι οι ασθενείς είχαν απορρίψει μόσχευμα σε κάποιο στάδιο της ζωής τους (Dusse et al., 2010 και Asmis et al, 2003).

#### 1.3.4 Η ιχθύωση στα ποντίκια (ichthyosis)

Η ασθένεια της ιχθύωσης στα ποντίκια προσομοιάζει με αυτή της Pelger-Huet ανωμαλίας στον άνθρωπο. Τα ουδετερόφιλα κύτταρα των ποντικών παρουσιάζουν τις ίδιες αλλοιώσεις με αυτές της PHA. Επιπλέον, τα ομόζυγα ποντίκια αναπτύσσουν και άλλες ανωμαλίες, όπως απώλεια βάρους, αλωπεκία, συνδακτυλία και υδροκέφαλο. Περίπου τα

μισά από τα ομόζυγα ποντίκια πεθαίνουν στη μήτρα ή λίγο μετά τη γέννησή τους. Τρεις μεταλλάξεις στην περιοχή του γονιδίου του LBR μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση της ιχθύωσης: μια μετάλλαξη λήξης της μετάφρασης ( $ic$ ) και δύο μεταλλάξεις αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης ( $ic^J$ ,  $ic^{4J}$ ). Η  $ic^J$  μετάλλαξη εισάγει 2 επιπλέον αμινοξέα στη θέση 1088 (1088insCC), το οποίο θα είχε ως αποτέλεσμα την αλλαγή της αμινοξικής ακολουθίας μεταξύ των καταλοίπων 365–385 και τον πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης στη θέση 386, μεταξύ της τέταρτης και πέμπτης διαμεμβρανικής περιοχής (εικόνα 1.35).

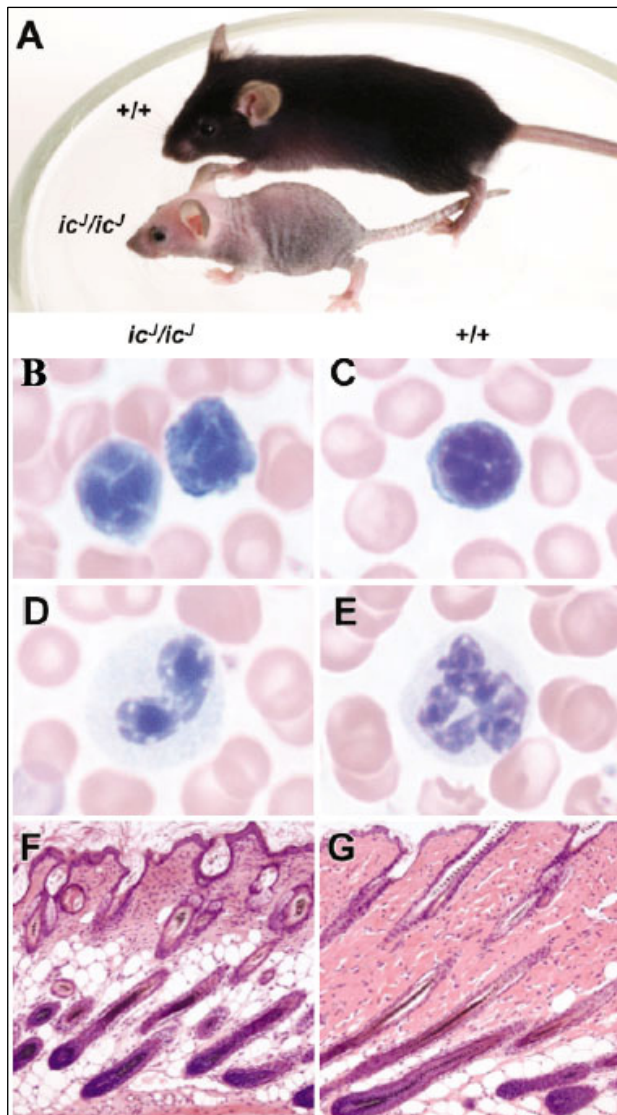


**Εικόνα 1.35 Μεταλλάξεις στο γονίδιο του LBR που οδηγούν στην ιχθύωση.** Οι διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν στο τμήμα της πρωτεΐνης το οποίο απουσιάζει λόγω των μεταλλάξεων C523T ( $ic$ ), 1088insCC ( $ic^J$ ) και 1815insGGAA ( $ic^{4J}$ ) αντίστοιχα. Από Shultz et al, 2003.

Τα λεμφοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα και τα ηωσινόφιλα, σε όλους τους ιστούς των ομόζυγων  $ic^J$  ποντικών, περιέχουν συσσωρεύσεις της χρωματίνης περιφερικά του πυρηνικού φακέλου. Παρόμοια μορφολογία στη χρωματίνη εμφανίζουν και άλλα είδη κυττάρων, όπως το εντερικό επιθήλιο και τα κύτταρα της παρεγκεφαλίδας. Τα ετερόζυγα ζώα αντίθετα, φέρουν έναν ελάχιστο αριθμό κυττάρων με αυτή την ανωμαλία. Επιπλέον, οι πυρήνες των ουδετερόφιλων κυττάρων των ομόζυγων ποντικών εμφανίζουν απώλεια λόβωσης (εικόνα 1.36). Πειράματα ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης κατά western έδειξαν απουσία ανιχνεύσιμης πρωτεΐνης στα ομόζυγα ζώα, κάτι που θα μπορούσε να εξηγηθεί είτε από πρόωρη αποικοδόμηση του RNA (nonsense-mediated RNA decay) ή της πρωτεΐνης, είτε από την αδυναμία μετάφρασης του μεταλλαγμένου RNA (Shultz et al, 2003). Προηγούμενες μελέτες (Makatsori et al, 2004) έδειξαν την ύπαρξη μεγάλων συσσωρεύσεων της πρωτεΐνης στον πυρηνικό φάκελο των ετερόζυγων ποντικών, τον έκτοπο εντοπισμό του LBR στις πλάκες συγκόλλησης (adhesion plaques) και ανωμαλίες στο σχήμα του πυρήνα.

Πρόσφατα, περιγράφηκε μια νέα μετάλλαξη στο γονίδιο του LBR (Lym3), η οποία έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση σταδιακής λεμφοπενίας (lymphopenia), ιδιαίτερα στα T λεμφοκύτταρα των ποντικών (Verhagen et al, 2012). Τα ομόζυγα Lym3 ποντίκια δεν εμφανίζουν κάποια χαρακτηριστικά όπως δερματικές ή σκελετικές ανωμαλίες, αναπτύσσουν

φυσιολογικό θύμο αδένα και μυελό των οστών, αλλά εμφανίζουν σημαντική μείωση των T και B κυττάρων στα δευτερεύοντα λεμφοειδή όργανα. Σε αναλογία με τα  $ic^J$  ποντίκια, εμφανίζεται μειωμένη λόβωση στους πυρήνες των ουδετερόφιλων κυττάρων. Η ασθένεια οφείλεται σε μια σημειακή μετάλλαξη (C/A) του εξωνίου 10, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος στη θέση 418 από αλανίνη.



**Εικόνα 1.36 Τα χαρακτηριστικά της ιχθύωσης στα ποντίκια.** Α) Φυσιολογικά και ομόζυγα  $ic^J$  ποντίκια ηλικίας πέντε εβδομάδων. Β-Ε) Επιχρίσματα αίματος με χρώση Wright-Giemsa. Β-С) Λεμφοκύτταρα από ομόζυγα ( $ic^J/ic^J$ ) και φυσιολογικά (+/+) ποντίκια. Φαίνονται οι συσσωρεύσεις της χρωματίνης. D- E) Ουδετερόφιλα από ομόζυγα και φυσιολογικά ποντίκια όπου φαίνεται η απώλεια λόβωσης του πυρήνα. F-G) Τομές δέρματος με χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης. Από Shultz et al, 2003.

Ο μηχανισμός εμφάνισης των συμπτωμάτων στα  $ic^J$  ουδετερόφιλα, λόγω έλλειψης του LBR, δεν είναι πλήρως κατανοητός. Είναι πιθανό να επηρεάζονται οι αλληλεπιδράσεις των λαμινών με τους υποδοχείς τους και να οδηγούν σε αυξημένη πυρηνική «ευθραυστότητα» (nuclear fragility), αλλαγές στη θέση του πυρήνα εντός του κυττάρου ή σε αλλαγές της δομής της χρωματίνης και της γονιδιακής έκφρασης. Για να διερευνηθεί αυτή η υπόθεση, κατασκευάστηκαν EML προγονικά κύτταρα (erythroid, myeloid and lymphoid



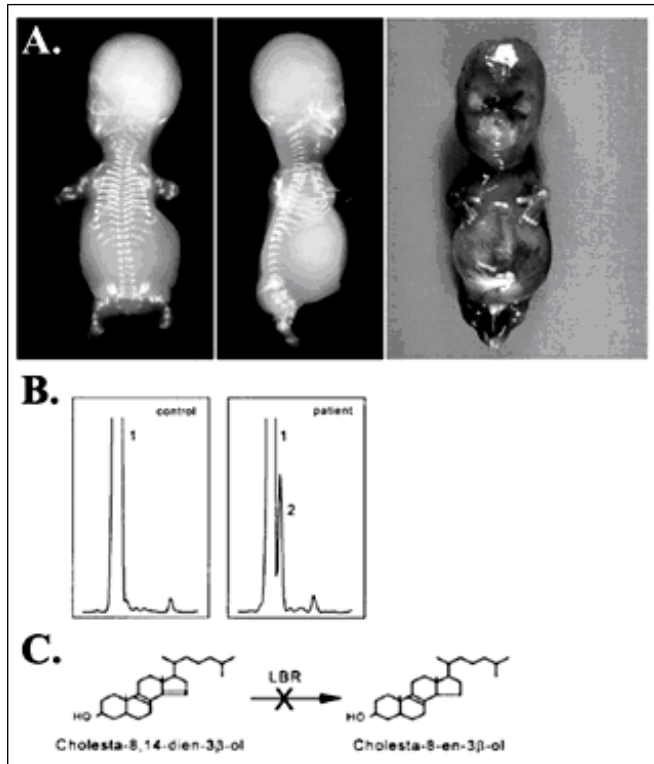
potential) από ομόζυγα  $ic^j$  ποντίκια, τα οποία διαφοροποιήθηκαν προς ώριμα ουδετερόφιλα (EPRO) και εξετάστηκαν ως προς την μορφολογία και λειτουργικότητά τους. Τα κύτταρα εμφάνισαν τα ίδια χαρακτηριστικά με αυτά του ζώου από το οποίο προήλθαν. Πειράματα χημειοταξίας αποκάλυψαν μειωμένη δυνατότητα μετανάστευσης μέσω μεμβρανών. Επιπλέον, τα κύτταρα εμφάνισαν ελαττωματική οξειδωτική αντίδραση (oxidative burst), πιθανώς λόγω απώλειας έκφρασης του  $gp91^{phox}$ , η οποία παρατηρείται στα EPRO κύτταρα. Αυτό το εύρημα συνδέει εμμέσως τον LBR με τον μεταγραφικό έλεγχο αυτής της οξειδάσης (Gaines et al, 2008). Έλεγχος της έκφρασης των πρωτεϊνών του πυρηνικού φακέλου στα EPRO κύτταρα έδειξε ότι εμφανίζουν τα ίδια χαρακτηριστικά με αυτά των ουδετερόφιλων του ζώου. Κατά την *in vitro* διαφοροποίηση των EPRO κυττάρων, η ποσότητα του LBR αυξάνεται στα φυσιολογικά και ετερόζυγα ποντίκια, αλλά όχι στα ομόζυγα. Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε αύξηση της λαμίνης A/C μόνο στα ετερόζυγα και ομόζυγα  $ic^j$  ποντίκια (Zwinger et al, 2008). Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν το ρόλο του LBR στην κυτταρο-αρχιτεκτονική των ουδετερόφιλων, στις λειτουργίες τους και στον έλεγχο της μεταγραφικής τους ρύθμισης.

### 1.3.5 Η δυσπλασία Greenberg (HEM ή Greenberg dysplasia)

Η Hydrops-ectopic calcification-“moth-eaten” (HEM) ή σκελετική δυσπλασία Greenberg αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 2003. Είναι μια σπάνια αυτοσωμική υπολειπόμενη ασθένεια και μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί μόνο εννέα περιπτώσεις παγκοσμίως. Η δυσπλασία Greenberg είναι θανατηφόρα και χαρακτηρίζεται από εμβρυϊκό ύδρωπα, βραχεία άκρα, ασβεστοποίηση των χόνδρων και των οστών και μερικές φορές από κατάγματα των επιμήκων οστών, πολυδακτυλία και προβληματική οστεοποίηση του κρανίου (εικόνα 1.37A). Αρχικά, βρέθηκε να προκαλείται από μια ομόλογη αντικατάσταση επτά νουκλεοτιδίων στο εξώνιο 13 του γονιδίου του LBR. Η αντικατάσταση αυτή (1599–1605 TCTTCTArCTAGAAG) εισάγει ένα κωδικόνιο λήξης το οποίο οδηγεί στην παραγωγή μιας κολοβωμένης πρωτεΐνης που εκτείνεται μέχρι την έβδομη διαμεμβρανική περιοχή (Waterham et al, 2003). Έκτοτε έχουν αναφερθεί και άλλες μεταλλάξεις του γονιδίου. Κοινό χαρακτηριστικό όλων αυτών είναι η τροποποίηση ή ο πρόωρος τερματισμός της πρωτεΐνης στο υδρόφοβο τμήμα της (Konstantinidou et al, 2008 και Clayton et al, 2010).

Σε ινοβλάστες δέρματος εμβρύου 18 εβδομάδων με δυσπλασία Greenberg ανιχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα ενός πρόδρομου μορίου του μονοπατιού σύνθεσης της χοληστερόλης (cholesta-8,14-dien-3-beta-ol), ενώ διαμόλυνση των ινοβλαστών με το cDNA

του πλήρους μορίου LBR, οδήγησε σε μείωση του πρόδρομου μορίου σχεδόν κατά 50% (εικόνα 1.37B). Το εύρημα αυτό υποδηλώνει έλλειψη του ενζύμου 3-beta-hydroxysterol delta(14)-reductase και αποδεικνύει ότι ο LBR έχει ενζυμική δράση. Αν και η μητέρα του εμβρύου ήταν υγιής, περίπου 60% των πολυμορφοπύρηνων κυττάρων της εμφάνιζαν υπολόβωση, όμοια με αυτή της PHA, υποδηλώνοντας ότι οι δύο ασθένειες πιθανώς να συνδέονται. Άρα, ενδέχεται η PHA να αποτελεί την ετερόζυγη (ελαφρά) μορφή της HEM.



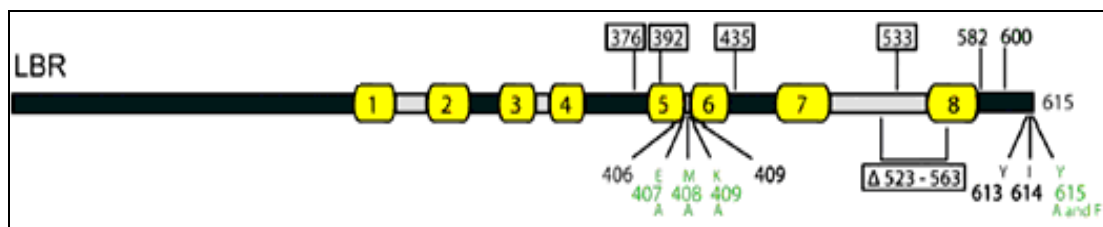
**Εικόνα 1.37 Η δυσπλασία Greenberg στον άνθρωπο.** A) Ακτινογραφία εμβρύου 15 εβδομάδων με HEM. B) Ανάλυση των στερολών στους ινοβλάστες δέρματος έδειξε αυξημένα επίπεδα του προδρόμου cholesta-8,14-dien-3b-ol (κορυφή 2) στο έμβρυο με HEM, ενώ μόνο χοληστερόλη (κορυφή 1) ανιχνεύθηκε στα φυσιολογικά έμβρυα. C) Η δράση αναγωγής του LBR (3b-hydroxysterol D14-reductase) καταλύει την αναγωγή του διπλού δεσμού μεταξύ των καταλοίπων άνθρακα C14-15 της πρόδρομης ουσίας cholesta-8,14-dien-3b-ol για την παραγωγή cholesta-8-en-3b-ol. Από Waterham et al, 2003.

Το γεγονός ότι η δυσπλασία HEM προκαλείται από την απώλεια της ενζυμικής δράσης του LBR οδήγησε τους ερευνητές να μελετήσουν σε μεγαλύτερη έκταση το ρόλο της πρωτεΐνης σε αυτόν το μηχανισμό. Έκφραση της ανθρώπινης πρωτεΐνης σε COS κύτταρα απέδειξε με άμεσο τρόπο ότι είναι ικανή να καταλύει την αναγωγή του διπλού δεσμού C14-15 του μορίου cholesta-8,14-dien-3b-ol (Bennati et al, 2006). Επιπρόσθετα, απουσία της αναγωγής ERG24 στη ζύμη, τα κύτταρα συσσωρεύουν την πρόδρομη μορφή ιγνοστερόλη (ignosterol). Μετασηματισμός αυτών των κυττάρων με τη φυσιολογική πρωτεΐνη αποκατέστησε το φυσιολογικό φαινότυπο των κυττάρων, ενώ ο μετασηματισμός τους με τις μεταλλαγμένες μορφές που απαντώνται στη δυσπλασία Greenberg οδήγησε στην αύξηση των επιπέδων της ιγνοστερόλης (Clayton et al, 2010).

Πώς όμως η απώλεια δράσης αναγωγάσης του LBR οδηγεί στην εμφάνιση της δυσπλασίας; Είναι πιθανό η συσσώρευση του μη φυσιολογικού μεταβολίτη cholesta-8,14-dien-3β-ol να έχει τοξικές επιδράσεις. Για παράδειγμα, η αλλαγή στην ποιότητα ή ποσότητα των ενδιάμεσων μεταβολιτών της χοληστερόλης ενδέχεται να επηρεάζει την φαρνεσυλίωση, τις στεροειδείς ορμόνες, τη βιταμίνη D, τη σηματοδότηση του μονοπατιού hedgehog ή να τροποποιεί άλλα πυρηνικά ή κυτταροπλασματικά στοιχεία. Ωστόσο, οι «τοξικές» επιδράσεις των μεταλλαγμένων μορφών του LBR φαίνεται να εκδηλώνονται μόνο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (Hermann et al, 2010) και να προϋποθέτουν ότι το αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης για πρόσδεση των λαμινών και της χρωματίνης στον πυρηνικό φάκελο υπάρχει και λειτουργεί κανονικά (Subramanian et al, 2012). Ίσως η αλλαγή της οργάνωσης του πυρήνα αποτελεί το υπόβαθρο για την εκδήλωση αυτών των φαινομένων.

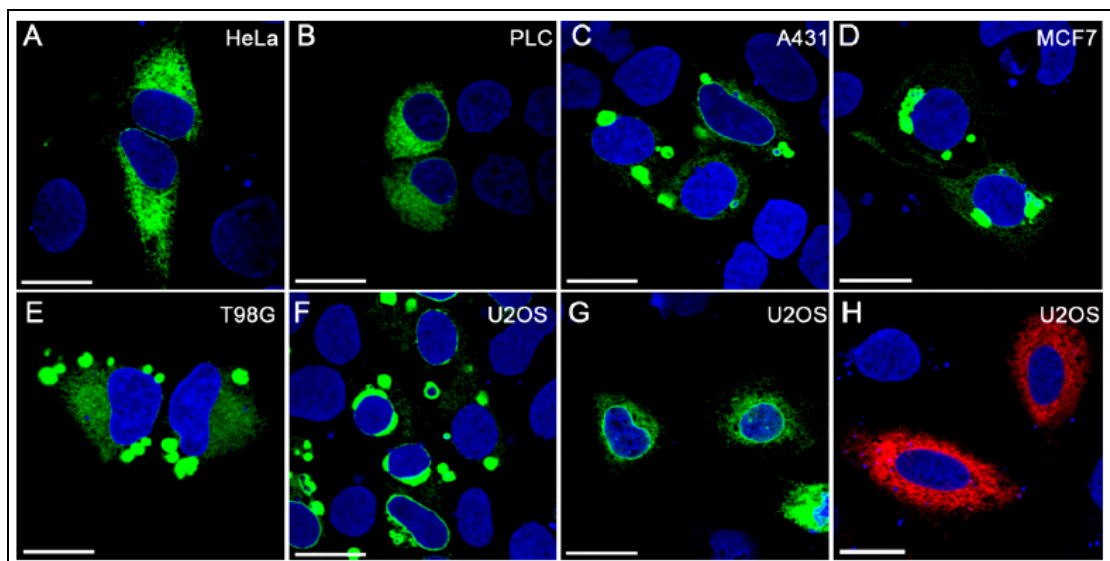
### 1.3.6 Ανωμαλίες κατά την έκφραση της πρωτεΐνης in vitro (η περίπτωση των U2OS κυττάρων)

Το 2010 μελετήθηκαν για πρώτη φορά μεταλλαγμένες μορφές του LBR οι οποίες εμφανίζονται σε σχετιζόμενες με την πρωτεΐνη ασθένειες (εικόνα 1.38). Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν έξι κυτταρικές σειρές προερχόμενες από ανθρώπινους ιστούς: δέρμα (A431), ωοθήκες (HeLa), μαστό (MCF7), ήπαρ (PLC), οστά (U2OS) και εγκέφαλο (T98G). Αρχικά μελετήθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης στους ιστούς και διαπιστώθηκε ότι τα υψηλότερα επίπεδα εμφανίζονταν στο ήπαρ, σε αντιδιαστολή με τα κύτταρα MCF7 τα οποία περιείχαν ελάχιστα ποσοστά. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η λαμίνη B1, τα επίπεδα έκφρασης της οποίας ήταν σταθερά.



**Εικόνα 1.38 Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης LBR και των καταλοίπων που μεταλλάσσονται σε σχετιζόμενες ασθένειες.** Οι αριθμοί με μαύρα γράμματα υποδηλώνουν το τελικό κατάλοιπο των καρβοξυτελικών μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης, ενώ οι αριθμοί στα κουτιά τα μεταλλαγμένα κατάλοιπα τα οποία αντιστοιχούν σε ασθένειες όπως η PHA και η δυσπλασία Greenberg. Οι αριθμοί με πράσινα γράμματα υποδηλώνουν μονές αντικαταστάσεις αμινοξέων στο πλήρες μόριο της πρωτεΐνης. Από Zwerger et al, 2010.

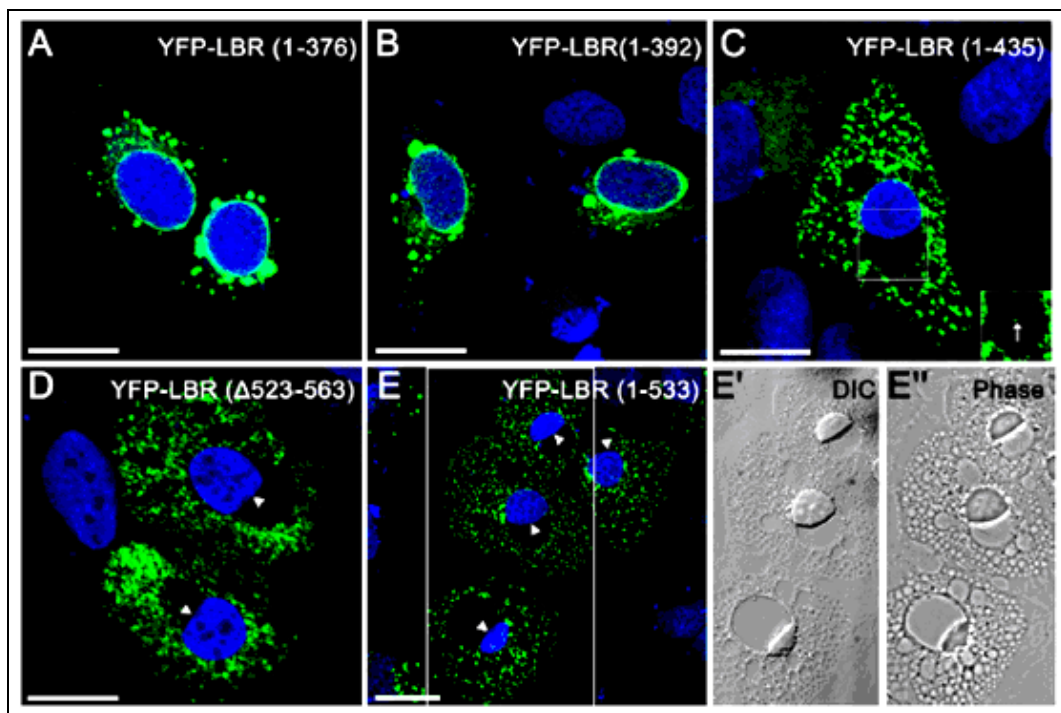
Μετά από διαμόλυνση HeLa και PLC κυττάρων, η υπερέκφραση αγρίου τύπου πρωτεΐνη συζευγμένη με την φθορίζουσα πρωτεΐνη YFP (YFP-LBRwt) εντοπίστηκε τόσο στον πυρηνικό φάκελο όσο και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Τα κύτταρα A431, MCF7, T98G και U2OS υπερέκφρασαν σε μεγάλο ποσοστό την πρωτεΐνη YFP-LBRwt, σχηματίζοντας μεγάλα συσσωματώματα στο κυτταρόπλασμα, τα οποία συχνά εφάπτονταν του πυρηνικού φακέλου. Οι ερευνητές θεωρώντας ότι οι αλλοιώσεις αυτές ήταν αποτέλεσμα της σύζευξης με την πρωτεΐνη YFP, κλωνοποίησαν τον LBR μαζί με την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry. Όπως ανέμεναν, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης mCherry-LBRwt στα U2OS κύτταρα δεν οδήγησε στον σχηματισμό συσσωματωμάτων (εικόνα 1.39).



**Εικόνα 1.39 Υπερέκφραση της αγρίου τύπου πρωτεΐνης YFP-LBRwt σε διάφορες κυτταρικές σειρές.** HeLa (A), PLC (B), A431 (C), MCF7 (D), T98G (E) και U2OS (F και G). Υπερέκφραση της κατασκευής mCherry-LBR σε U2OS (H). Μετά από μέτρια υπερέκφραση του YFP-LBRwt, η πρωτεΐνη εντοπίζεται στον πυρηνικό φάκελο και στο κυτταρόπλασμα (A, B και G). Μετά από υψηλή υπερέκφραση του YFP-LBRwt παρατηρείται σχηματισμός μεγάλων κυτταροπλασματικών συσσωματωμάτων (C, D, E και F). Από Zwirger et al, 2010.

Στη συνέχεια, οι ερευνητές μελέτησαν την έκφραση πέντε μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης [YFP-LBR (1-376), (1-392), (1-435), ( $\Delta$ 523-563) και (1-533)] και στις έξι κυτταρικές σειρές, με μεγαλύτερη έμφαση στην κυτταρική σειρά U2OS (εικόνα 1.40). Σε αυτά τα κύτταρα, τα μεταλλάγματα YFP-LBR (1-376) και YFP-LBR (1-392) εντοπίζονταν κατά κύριο λόγο στον πυρήνα, αλλά σχημάτιζαν και συσσωματώματα στο κυτταρόπλασμα στην ίδια έκταση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Αντίθετα, τα μεταλλάγματα YFP-LBR (1-435), YFP-LBR ( $\Delta$ 523-563) και YFP-LBR (1-533) συσσωρεύονταν κατά κύριο λόγο στο

κυτταρόπλασμα και ελάχιστο μόνο ποσοστό τους εντοπίζονταν στο πυρηνικό φάκελο. Ο όγκος του πυρήνα μειώθηκε σημαντικά σε σχέση με τα μη διαμολυσμένα κύτταρα και επιπλέον μεγάλες, ποικίλου μεγέθους δομές, όμοιες με κενοτόπια, σχηματίστηκαν σε διάφορα σημεία του πυρήνα. Αυτές οι δομές ονομάστηκαν κενοτόπια-σχετιζόμενα-με-τον-πυρήνα (nucleus-associated vacuoles, NAVs). Σε συμφωνία με το σχηματισμό των NAVs, ένας μεγαλύτερος αριθμός κενοτοπίων, μικρότερου όμως μεγέθους, εμφανίστηκε στο κυτταρόπλασμα, τα οποία ονομάστηκαν κυτταροπλασματικά κενοτόπια (cytoplasmic vacuoles, CVs). Αυτές οι δομές σχηματίστηκαν εκτός των U2OS κυττάρων και στα A431 και T98G κύτταρα. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε σχηματισμός NAVs και CVs και όταν τα μεταλλάγματα ήταν συζευγμένα με την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry.



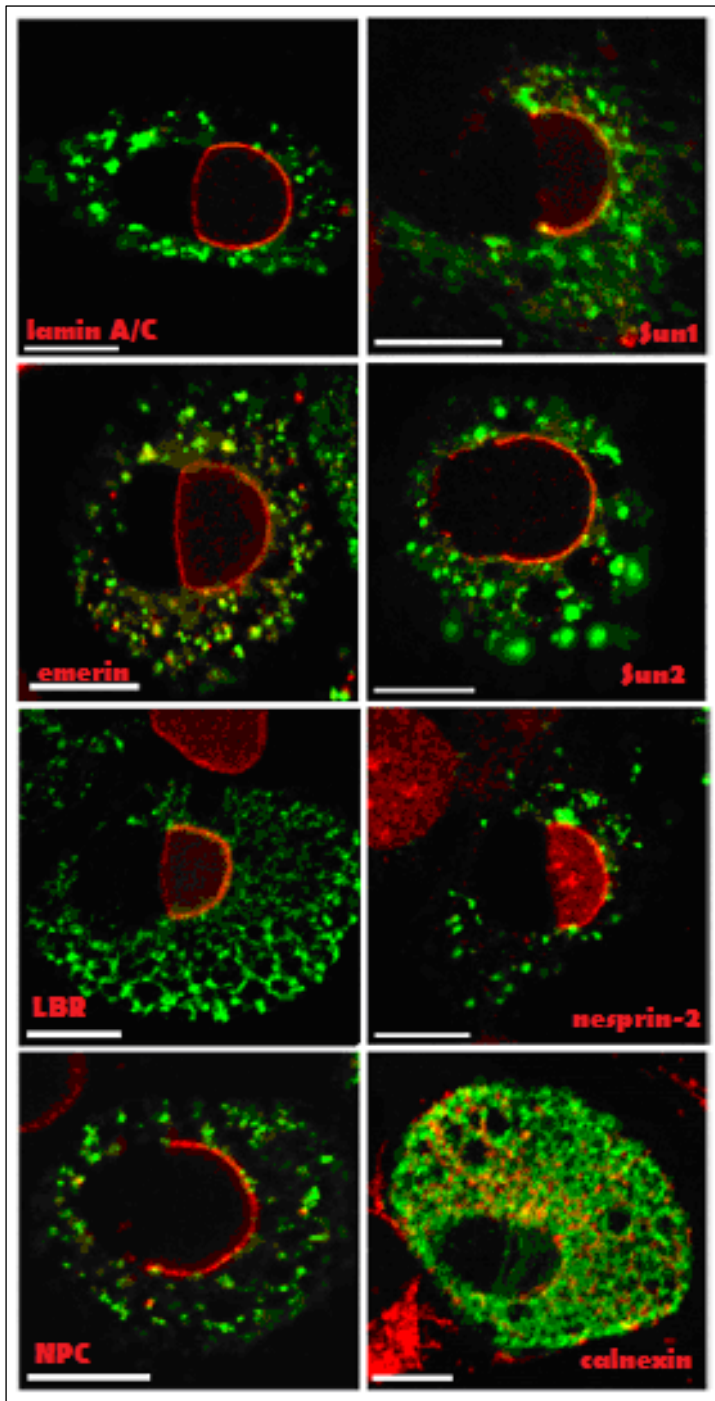
**Εικόνα 1.40 Διαμόλυνση πέντε μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης LBR σε U2OS κύτταρα.** (A και B) Τα μεταλλάγματα YFP-LBR (1-376) και YFP-LBR (1-392) εντοπίζονται στο πυρηνικό φάκελο αλλά σχηματίζουν και συσσωματώματα στο κυτταρόπλασμα. (C, D και E) Έκφραση των μεταλλαγμάτων YFP-LBR (1-435), (Δ523-563) και (1-533) οδηγεί στην συμπύκνωση του πυρήνα και τον σχηματισμό NAVs και CVs. Από Zwerger et al, 2010.

Για να διαπιστωθεί το ελάχιστο μήκος της πρωτεΐνης το οποίο ήταν ικανό να επάγει τη δημιουργία NAVs, οι ερευνητές κατασκεύασαν επιπλέον μεταλλάγματα με την πρωτεΐνη να διακόπτεται μεταξύ των αμινοξέων 392 και 435 και διαπίστωσαν ότι περικοπή της πρωτεΐνης στο κατάλοιπο 407 αλλοίωνε την μορφολογία του πυρήνα. Καθώς το μέταλλαγμα

YFP-LBR (1-533) αλλοίωσε τη δομή του πυρήνα (σε αντιδιαστολή με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη), οι ερευνητές θέλησαν να μελετήσουν το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης με μεγαλύτερη λεπτομέρεια (αμινοξέα 533 έως και 615). Για το σκοπό αυτό διαμόλυναν τα U2OS κύτταρα με τις κατασκευές YFP-LBR (1-582), YFP-LBR (1-600), YFP-LBR (1-613) και YFP-LBR (1-614) και διαπίστωσαν ότι και τα τέσσερα μεταλλάγματα ήταν ικανά να επάγουν τον σχηματισμό NAVs. Επομένως, τα αμινοξέα Y407 και Y615 είναι σημαντικά για τη διατήρηση της δομής του πυρήνα των U2OS κυττάρων.

Σε μια πιο λεπτομερή ανάλυση των σχηματιζόμενων NAVs, διαπιστώθηκε ότι οι δομές αυτές μεγάλωναν εκθετικά με την πάροδο του χρόνου, με παράλληλη μείωση του μεγέθους του πυρήνα. Τέσσερις περίπου ώρες μετά από τη διαμόλυνση των κυττάρων, ο πυρήνας και τα NAVs είχαν πολύ όμοιο μέγεθος. Τα NAVs φαίνεται να σχηματίζονται ως μια τοπική διάνοιξη του περιπυρηνικού χώρου (PNS), με την απομάκρυνση της εσωτερικής από την εξωτερική πυρηνική μεμβράνη. Μολονότι οι δομές αυτές σχηματίζονται, η πλειοψηφία των κυττάρων επιζεί, ενώ κύτταρα τα οποία εμφανίζουν σε μεγάλη έκταση αλλοίωση του πυρήνα τους πεθαίνουν 6 έως 30 ώρες μετά την εμφάνιση των πρώτων NAVs. Με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διαπιστώθηκε ότι 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων με το μετάλλαγμα YFP-LBR(1-533), μεγάλο ποσοστό της επιφάνειάς τους είχε καλυφθεί από NAVs και CVs. Ο πυρήνας των κυττάρων ήταν αρκετά συμπυκνωμένος και μικρότερος σε μέγεθος από τα NAVs. Η χρωματίνη ήταν υπερσυμπυκνωμένη και δεν ήταν δυνατός ο εντοπισμός πυρηνίσκων. Η απόσταση μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης στις περιοχές σχηματισμού των NAVs ήταν περίπου 10μm, σε αντιδιαστολή με τα μη διαμολυσμένα κύτταρα όπου η αντίστοιχη απόσταση ήταν 50nm.

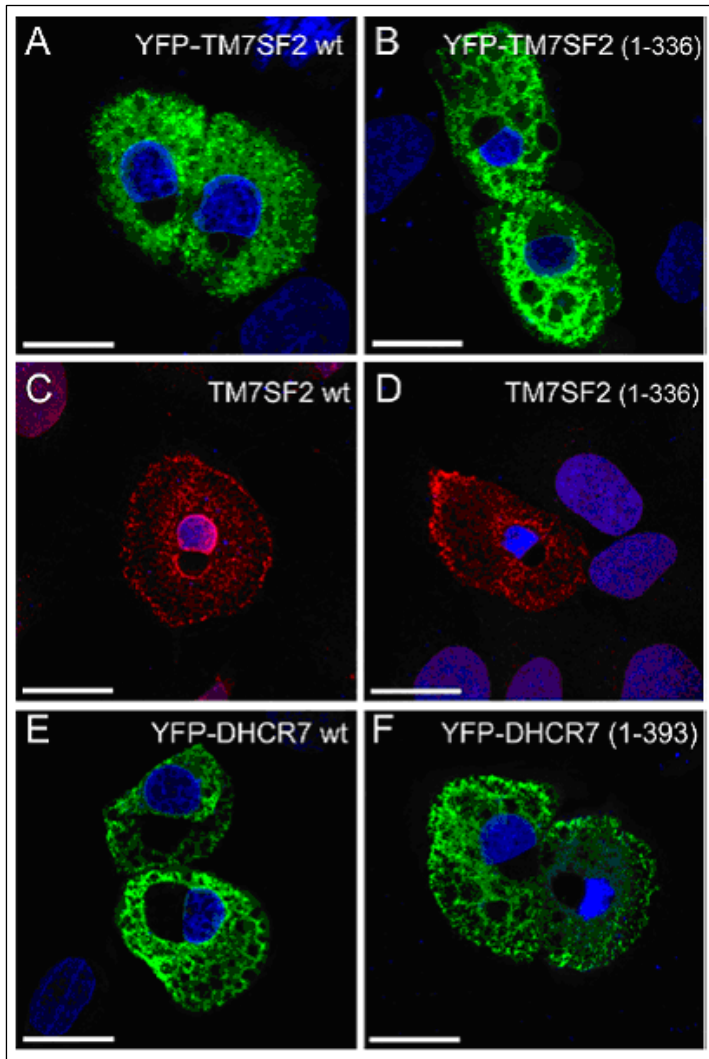
Ποια είναι όμως η μορφολογία της πυρηνικής μεμβράνης στα κύτταρα που εμφανίζουν αλλοιωμένο πυρήνα; Σε U2OS κύτταρα τα οποία υπερέκφραζαν το μετάλλαγμα YFP-LBR(1-533) πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού για πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου. Η έκφραση της ενδογενούς πρωτεΐνης LBR δεν επηρεάστηκε από την υπερέκφραση του μεταλλάγματος, ενώ οι λαμίνες A και C εντοπίστηκαν μόνο στην πυρηνική πλευρά των NAVs. Η πρωτεΐνη emerin ανιχνεύθηκε στον πυρηνικό φάκελο με ένα σημαντικό ποσοστό της να κατανέμεται και στο κυτταρόπλασμα υπό τη μορφή συσσωματωμάτων. Αντίθετα, τα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων απουσίαζαν από την περιοχή σχηματισμού των NAVs όπως και οι πρωτεΐνες Sun1 και Sun2. Τέλος, η πρωτεΐνη της εξωτερικής πυρηνικής μεμβράνης nesprin-2 giant, δεν εντοπίστηκε σε κανένα σημείο των σχηματιζόμενων NAVs, αλλά ήταν ανιχνεύσιμη στο υπόλοιπο τμήμα του πυρηνικού φακέλου (εικόνα 1.41).



Εικόνα 1.41 Κατανομή κύριων πρωτεϊνών της πυρηνικής μεμβράνης σε U2OS κύτταρα μετά από υπερέκφραση του μεταλλάγματος YFP-LBR(1-533). Σε όλες τις φωτογραφίες ο πυρήνας εντοπίζεται στη δεξιά πλευρά της εικόνας ενώ τα NAVs στα αριστερά. Από Zwerger et al, 2010.

Όπως έχει αναφερθεί ήδη, ο υποδοχέας LBR παρουσιάζει σημαντική ομολογία στην αλληλουχία του με άλλες δυο αναγωγάσες των στερολών, τις TM7SF2 και DHCR7. Οι ερευνητές αναρωτήθηκαν λοιπόν, αν η δράση της αναγωγάσης ήταν η γενεσιουργός αιτία για την εμφάνιση των κενотоπίων στον πυρήνα. Για το σκοπό αυτό, διαμόλυναν τα U2OS κύτταρα με τις αυτές τις πρωτεΐνες (σημασμένες με την φθορίζουσα πρωτεΐνη YFP). Η υπερέκφραση των πρωτεϊνών TM7SF2 και DHCR7 επήγαγε τον αποχωρισμό της εξωτερικής από την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη και το σχηματισμό NAVs (εικόνα 1.42). Σε μια

συμπληρωματική σειρά πειραμάτων συγκρίθηκαν τα επίπεδα στερολών σε φυσιολογικά και διαμολυσμένα κύτταρα με τις πρωτεΐνες YFP-LBRwt και YFP-LBR(1-533). Σε καμία από τις περιπτώσεις δεν ανιχνεύθηκαν πρόδρομες μορφές χοληστερόλης, υποδεικνύοντας ότι η υπερέκφραση του LBR δεν αλλάζει το μεταβολισμό των στερολών.



**Εικόνα 1.42 Υπερέκφραση των πρωτεϊνών TM7SF2 και DHCR7 σε U2OS κύτταρα.** (A, B, C και D) Τόσο η έκφραση της αγρίου τύπου όσο και του καρβοξυτελικού μεταλλάγματος της πρωτεΐνης TM7SF2 οδηγούν στη συμπύκνωση του πυρήνα και το σχηματισμό NAVs. (E και F) Οι κατασκευές YFP-DHCR7wt και YFP-DHCR7(1-393) επάγουν την εμφάνιση αλλοιώσεων στα κύτταρα. Από Zwerger et al, 2010.

Συνοψίζοντας, οι ερευνητές καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι οι μεταλλάξεις του LBR μπορούν να επηρεάσουν άμεσα την οργάνωση του πυρηνικού φακέλου και του ενδοπλασματικού δικτύου. Ωστόσο, η εμφάνιση αλλοιώσεων σε ορισμένες μόνο κυτταρικές σειρές, υποδηλώνει ότι τα μεταλλάγματα δεν είναι τοξικά από μόνα τους και ότι η δράση τους εξαρτάται από τις διακριτές/διαφορετικές ιδιότητες των κυττάρων. Το γεγονός ότι η υπερέκφραση των πρωτεϊνών TM7SF2 και DHCR7 οδηγεί στην εμφάνιση NAVs, υποδηλώνει ότι, υπό ορισμένες συνθήκες, ακόμη και πλήρως λειτουργικές πρωτεΐνες μπορούν να επηρεάσουν την μορφολογία του πυρήνα.



## 1.4 Σκοπός

Η παρούσα εργασία αφορά τις σχέσεις δομής-λειτουργίας και το φυσιολογικό ρόλο του υποδοχέα της λαμίνης Β (LBR) στην *in vitro* διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων. Ο LBR είναι μια εξαιρετικά συντηρημένη διαμεμβρανική πρωτεΐνη του πυρηνικού φακέλου, που περιλαμβάνει ένα υδρόφιλο αμινοτελικό τμήμα, οκτώ εν σειρά διαμεμβρανικές περιοχές (TM I-VIII) και ένα ουραίο καρβοξυτελικό τμήμα. Αφετηρία της μελέτης αποτέλεσε ένα βιβλιογραφικό παράδοξο: ενώ η αποκοπή των καρβοξυτελικών 2/3 (δηλαδή, όλου του τμήματος πέραν της TM I) δεν φαίνεται να επηρεάζει την κατανομή της πρωτεΐνης και τη δομή του κυττάρου σε δοκιμασίες πρόσκαιρης διαμόλυνσης σωματικών κυττάρων, μεταλλάξεις που συνεπάγονται απώλεια πολύ μικρότερου μέρους της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (TM V-VIII ή μόνο VIII) προκαλούν θανατηφόρες νόσους στο ποντίκι και τον άνθρωπο. Σκοπός του ερευνητικού μας προγράμματος ήταν:

- *Να καταγραφούν λεπτομερώς η κατανομή και η δυναμική του αγρίου τύπου LBR σε ζωντανά κύτταρα, εν σχέσει προς μεταλλαγμένες μορφές από τις οποίες έχουν αφαιρεθεί διάφορες περιοχές και δομικά μοτίβα.*
- *Να συγκριθούν οι ιδιότητες όλων των μορφών LBR σε επίπεδο κυτταρικού πληθυσμού (ensemble) και σε επίπεδο μονήρων κυττάρων (single-cell level).*
- *Να διαπιστωθεί εάν η υπερέκφραση αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένου LBR επηρεάζει βασικές λειτουργίες, όπως τη διατήρηση της πολυδυναμίας και την ικανότητα διαφοροποίησης των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ποντικού.*

Στις πειραματικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιήθηκαν για να ολοκληρωθεί η μελέτη περιλαμβάνονται η απεικόνιση ζωντανών κυττάρων σε πραγματικό χρόνο (live cell imaging), ο ποσοτικός έμμεσος ανοσοφθορισμός, η τεχνική ανάκτησης/απώλειας φθορισμού μετά από φωτοσκίαση (FRAP/FLIP), η εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης διαφόρων γονιδίων με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (qPCR), η *in vitro* διαφοροποίηση βλαστικών κυττάρων σε δύο και τρεις διαστάσεις και οι δοκιμασίες επιβίωσης.



## *Υλικά και μέθοδοι*



## 2.1 Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων

### 2.1.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Οι κυτταρικές σειρές HeLa, Hek293, MCF7, NIH3T3, CaCO<sub>2</sub>, C2C12, CHO, COS, BHK και U2OS αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας 37°C, και ατμόσφαιρας εμπλουτισμένης σε 5% CO<sub>2</sub>, ενώ οι καλλιέργειες κυττάρων MDCK αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας 37°C και ατμόσφαιρας εμπλουτισμένης σε 10% CO<sub>2</sub>. Το θρεπτικό μέσο το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών (εκτός των BHK) ήταν DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) εμπλουτισμένο με 2mM L-γλουταμίνη, 2mM πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και 10% FCS (Fetal Calf Serum), ενώ για τη καλλιέργεια των BHK κυττάρων το θρεπτικό υλικό DMEM ήταν εμπλουτισμένο με 2mM L-γλουταμίνη, 2mM πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, 5% FCS και 10% tryptose phosphate.

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

### 2.1.2 Διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων

Τα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν σε δυο διαστάσεις (2D) (δηλαδή σε τρυβλίο) με την αφαίρεση του LIF και της β-μερκαπτοαιθανόλης από το θρεπτικό μέσο. Μετά τη θρυψινοποίηση τους, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία με συγκέντρωση ~1000 κύτταρα/mm<sup>2</sup>. Το θρεπτικό μέσο ανανεώνεται καθημερινά καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (εννέα ημέρες).

Για τη διαφοροποίηση προς νευρωνικά κύτταρα ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο διαφοροποίησης σε τρεις διαστάσεις (3D) (κρεμάμενες σταγόνες) με χορήγηση ρετινοϊκού

οξέος. Πιο συγκεκριμένα, 500 μονήρη κύτταρα ανά 20μl θρεπτικού μέσου αφέθηκαν υπό μορφή «κρεμάμενων» σταγόνων (hanging drops) για διάστημα δυο ημερών ώστε να σχηματίσουν εμβρυοειδή σωματίδια (embryoid bodies, EBs). Τα σχηματιζόμενα σωματίδια μεταφέρθηκαν σε βακτηριολογικά τρυβλία και εκτέθηκαν σε 1μM RA για επιπλέον τέσσερις μέρες. Για την ανάπτυξη των σωματιδίων χρησιμοποιήθηκε GMEM θρεπτικό υλικό χωρίς την προσθήκη LIF το οποίο ανανεωνόταν κάθε δυο ημέρες.

Για τη διαφοροποίηση προς καρδιομυοκύτταρα, τα κύτταρα αφέθηκαν υπό μορφή «κρεμάμενων» σταγόνων όπως σημειώθηκε ανωτέρω. Στη συνέχεια, τα σχηματιζόμενα εμβρυοειδή σωματίδια μεταφέρθηκαν σε βακτηριολογικά τρυβλία για επτά επιπλέον μέρες. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για τη διαφοροποίηση ήταν IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) εμπλουτισμένο με 15% FBS, 2mM πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, 2 mM L-γλουταμίνη και  $1.5 \times 10^{-4}$  M α-μονοθειογλυκερόλη χωρίς την προσθήκη LIF. Το θρεπτικό μέσο ανανεωνόταν μετά την πέμπτη ημέρα ανά δυο ημέρες καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

### **2.1.3 Δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών βλαστικών κυττάρων**

Για τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα αντίστοιχα πλασμίδια και διαμοιράστηκαν σε τρυβλίο έξι φρεατίων. Για 12-15 μέρες χορηγήθηκε στα κύτταρα 1.5μg/ml πουρομυκίνης έως ότου να σχηματιστούν κλωνογενείς αποικίες ικανοποιητικού μεγέθους. Οι σχηματιζόμενες αποικίες συλλέχτηκαν και καθεμία μεταφέρθηκε σε φρεάτιο τρυβλίου 96 φρεατίων χωρίς την προσθήκη αντιβιοτικού. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού μέσου και προσθήκη αντιβιοτικού στο ήμισυ της τελικής συγκέντρωσης. Όταν τα κύτταρα αναπτυχθούν αρκετά, ώστε να καλύψουν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, μεταφέρονται διαδοχικά σε τρυβλίο 24 φρεατίων, 12 φρεατίων, 6 φρεατίων και τελικώς σε τρυβλίο 60mm. Οι κλώνοι ελέγχθησαν για τη παρουσία του αντίστοιχου πλασμιδίου είτε με παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο (έλεγχος φθορισμού των αποικιών), είτε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (με χρήση πριμοδοτικών αλληλουχιών οι οποίες καλύπτουν τόσο το ένθεμα όσο και τη φθορίζουσα πρωτεΐνη EGFP).

#### **2.1.4 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με ηλεκτροδιαπίδυση (Electroporation)**

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου ώστε να διαταραχθεί προσωρινά η φωσφολιπιδιακή διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα πολικά μόρια (όπως τα νουκλεϊκά οξέα) να εισέλθουν στο κύτταρο. Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ECM630 (BTX Inc.) και οι αντίστοιχες ειδικές κυψελίδες (cuvettes-BTX 640).  $1.2 \times 10^6$  κύτταρα και 10μg πλασμιδίου αραιώθηκαν σε τελικό όγκο 400μl DMEM και υπέστησαν ηλεκτροδιαπίδυση υπό των ακολούθων συνθηκών: 260V (ισχύς ρεύματος), 850μF (χωρητικότητα) και 725Ω (αντίσταση). Στην περίπτωση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων,  $5 \times 10^6$  κύτταρα αραιώθηκαν με 20μg πλασμιδίου σε τελικό όγκο 400μl GMEM και χρησιμοποιήθηκαν οι εξής παράμετροι: 200V, 950μF και 0Ω.

#### **2.1.5 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με πολυ-αιθυλενιμίνη**

Η πολυ-αιθυλενιμίνη (Poly-ethylenimine, PEI) είναι ένα συνθετικό, πολυμερές κατιόν με ιδιότητα να συμπυκνώνει το DNA σε θετικά φορτισμένα σωματίδια. Τα σωματίδια αυτά συνδέονται με ανιονικά κατάλοιπα της επιφάνειας του κυττάρου και εισέρχονται σε αυτό με ενδοκύτωση. Για τη διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών, τα κύτταρα διαχωρίστηκαν μια μέρα πριν ώστε η πυκνότητά τους να είναι περίπου 50% την ημέρα εφαρμογής του PEI. Την επόμενη μέρα 1.6μg πλασμιδίου αναμείχθηκαν με 0.72μl διαλύματος PEI συγκεντρώσεως 0.45% w/v, αφέθηκαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματιστούν τα συσσωματώματα και αναμείχθηκαν με τα κύτταρα για περίπου 4-5 ώρες.

### **2.2 Μέθοδοι γενετικής μηχανικής**

#### **2.2.1 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων επιδεκτικών στον μετασχηματισμό**

Τα βακτήρια ανασύρθηκαν από βακτηριακό μητρικό απόθεμα (στοκ) διαλύματος γλυκερόλης και επιστρώθηκαν σε τρυβλίο στερεού άγαρ. Ακολούθησε ολονύχτια επώαση σε θερμοκρασία 37°C. Κατόπιν, μία μονή αποικία επιλέχθηκε για εμβολισμό 3ml Luria Broth και αφέθηκε για ολονύχτια ανάπτυξη. Από την παραπάνω καλλιέργεια 2.5ml εμβολιάστηκαν σε 250ml LB και επώαστηκαν σε θερμοκρασία 37°C έως ότου η οπτική πυκνότητα, στα 600 nm, να προσεγγίσει τις 0.6 μονάδες. Στη συνέχεια, τα βακτήρια τοποθετήθηκαν στον πάγο

για 5 λεπτά και φυγοκεντρήθηκαν στα 4000g για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 30 ml παγωμένου διαλύματος TFB1(100mM RbCl, 50mM MnCl<sub>2</sub>, 30mM οξικό κάλιο, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 15% γλυκερόλη, pH5.8). Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 1.5 ώρα και φυγοκέντρωση στα 4000g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 4<sup>0</sup>C. Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 4 ml παγωμένου διαλύματος TFBII (10mM MOPS, 10mM RbCl, 75mM CaCl<sub>2</sub>, 15% γλυκερόλη, pH6.8). Τέλος, το αιώρημα διαμοιράστηκε σε αποστειρωμένα μικροσωληνάρια τα οποία ψύχθηκαν για 15 δευτερόλεπτα σε υγρό άζωτο και εν συνεχεία τα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -80<sup>0</sup>C.

### **2.2.2 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων**

Ο μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων έγινε σύμφωνα με την μέθοδο του Sambrook (Sambrook et al., 1989). Πιο συγκεκριμένα, 3ng πλασμιδιακού φορέα με το αντίστοιχο ένθεμα προστέθηκαν σε 100μl κυτταρικού αιωρήματος και ακολούθησε επώαση στον πάγο για 20 λεπτά και θερμικό σοκ στους 42°C για 1 λεπτό. Κατόπιν, έγινε προσθήκη 1ml LB και ανάπτυξη των βακτηρίων για 1 ώρα στους 37°C σε τροχιακό επωαστήρα. Η βακτηριακή καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στα 5000g και το βακτηριακό ίζημα αφού επαναδιαλύθηκε σε 200μl LB, επιστρώθηκε σε τρυβλία στερεού LB τα οποία περιείχαν αμπικιλίνη ή καναμυκίνη ανάλογα με το γονίδιο ανθεκτικότητας που φέρουν οι πλασμιδιακοί φορείς. Τέλος, τα τρυβλία επώαστηκαν ολονύχτια στους 37°C και μονές αποικίες επιλέχθηκαν για πιστοποίηση.

### **2.2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μικρής κλίμακας**

Μια μονή αποικία ανασύρθηκε από τρυβλίο στερεού άγαρ και αναπτύχθηκε σε 3ml LB με την προσθήκη του κατάλληλου αντιβιοτικού ανά περίπτωση, σε τροχιακό επωαστήρα (37°C, ολονύχτια ανάδευση). Σε φυγοκεντρικό σωληνάριο τοποθετήθηκαν 1.5ml της καλλιέργειας και φυγοκεντρήθηκαν στις 12000g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl διαλύματος PI (50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA, 100μg/ml RNase). Στο εναιώρημα προστέθηκαν 100μl διαλύματος PII (0.2N NaOH, 1% w/v SDS), 100μl διαλύματος PIII (3M CH<sub>3</sub>COONa pH 5.5) και το υλικό φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στα 13000g σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο φυγοκεντρικό σωληνάριο, όπου προστέθηκε 1ml διαλύματος 100% παγωμένης αιθανόλης και ακολούθησε



φυγοκέντρωση στα 13000g για 15 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1ml διαλύματος 70% παγωμένης αιθανόλης. Ακολούθησε φυγοκέντρωση όπως παραπάνω. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, το ίζημα αφέθηκε να ξηραθεί πλήρως σε θερμοκρασία δωματίου, επαναιωρήθηκε σε 30μl δις απεσταγμένου H<sub>2</sub>O και διατηρήθηκε στους -20°C.

#### **2.2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας**

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

#### **2.2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης**

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

#### **2.2.6 Απομόνωση θραυσμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης**

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

#### **2.2.7 Συρραφή τμημάτων DNA (Ligation)**

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

### 2.2.8 Απομόνωση ολικού RNA

Ολικό RNA από κύτταρα C127 απομονώθηκε με χρήση του πακέτου (kit) total RNA extraction της Nucleobond. Ακολούθησε σύνθεση του επιθυμητού cDNA και ενίσχυσή του με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) με τη μέθοδο των τυχαίων εξαμερών (random hexamers) και χρήση του πακέτου (kit) Superscript First strand synthesis της Invitrogen.

Οι συνθήκες της PCR αντίδρασης ήταν: 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 200mM dNTPs, 200pmol 5'πριμοδοτικό μόριο, 200pmol 3' πριμοδοτικό μόριο, 0.1U/μl Taq polymerase, εκμαγείο DNA (DNA template) 400-500ng.

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν υπό τις ακόλουθες συνθήκες: Μετουσίωση για 3 λεπτά στους 94°C ακολουθούμενη από 35 κύκλους με το εξής πρόγραμμα: μετουσίωση για 30 δευτερόλεπτα στους 94°C, αναδιάταξη για 2 λεπτά στους 51°C και επιμήκυνση για 2 λεπτά στους 72°C.

### 2.2.9 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Οι πλασμιακές κατασκευές, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αναφέρονται στον πίνακα I. Όλες εισήχθησαν στο φορέα pEGFP-N2, ενώ επιπρόσθετα οι κατασκευές FL, Icj και Gr εισήχθησαν στο φορέα pPyCAGIP για τη διαμόλυνση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων και η κατασκευή FL στο φορέα pEYFP-N2 για την πραγματοποίηση πειραμάτων υπερδιακριτικής μικροσκοπίας (STED).

Ακολουθήθηκε το παρακάτω πρόγραμμα κυκλοποίησης:

Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 5 λεπτά

Αποδιάταξη (denaturing) : 94°C για 45 δευτερόλεπτα

Υβριδισμός (annealing) : 61 °C ή 56 °C για 1 λεπτό

Σύνθεση (extension) : 72 °C για 3 λεπτά

Για 20 κύκλους και

Τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 8 λεπτά.

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

Πίνακας Ι

Κατασκευή	Ένθεμα	5' πριμοδοτική αλληλουχία	3' πριμοδοτική αλληλουχία
FL	Mouse LBR (αμινοξέα 1 – 626)	CCGGAAATTCATGCCAAGTAGGAAGTTTGTTGAG	CGCGGATCCCTCTGTAATGTAGGGGAATATGCGG
IcJ	Mouse LBR (αμινοξέα 1 – 362)	CCGGAAATTCATGCCAAGTAGGAAGTTTGTTGAG	CGCGGATCCCAAGGGGCTCGCAGAGAGCGCAA
Gr	Mouse LBR (αμινοξέα 1 – 544)	CCGGAAATTCATGCCAAGTAGGAAGTTTGTTGAG	CGCGGATCCCACTTTTCCCCGTGGAAGTATG
ΔTD	Mouse LBR (αμινοξέα 63 – 626)	CCGGAAATTCATGAGAAAAAGTGGCTCGATTCCAGC	CGCGGATCCCTCTGTAATGTAGGGGAATATGCGG
ΔCT	Mouse LBR (αμινοξέα 1 – 593)	CCGGAAATTCATGCCAAGTAGGAAGTTTGTTGAG	CGCGGATCCCATGGATAAGCAAGGCGGTGAA
TDRSGDTM1	Mouse LBR (αμινοξέα 1 – 260)	CCGGAAATTCATGCCAAGTAGGAAGTTTGTTGAG	CGCGGATCCCAAGCCGGCAGAGGTGGAG
TDRSGDTM4	Mouse LBR (αμινοξέα 1 – 219 / 335-361)	CCGGAAATTCATGCCAAGTAGGAAGTTTGTTGAG GAAGGACTTGGAGTACACTCACTTC	GAAGTGAGTGACTCCAAAGTCCCTTC CGCGGATCCCAAGGGGCTCGCAGAGAGCGCAA
TDRSTM1	Mouse LBR (αμινοξέα 1 – 106 / 219-260)	CCGGAAATTCATGCCAAGTAGGAAGTTTGTTGAG GCTTCCCATTTGGAGGAGTA	CTCCTCCAAAATGGGAAGCAG CGCGGATCCCAAGCCGGCAGAGGTGGAG
TDTM1	Mouse LBR (αμινοξέα 1 – 62 / 219-260)	CCGGAAATTCATGCCAAGTAGGAAGTTTGTTGAG AAGCAATTTGGAGGAGTACCTGGTG	CTCCTCCAAAATGCTTAAAGG CGCGGATCCCAAGCCGGCAGAGGTGGAG
TDRSGD	Mouse LBR (αμινοξέα 1 – 212)	CCGGAAATTCATGCCAAGTAGGAAGTTTGTTGAG	CGCGGATCCCAAGTGGTCACTTGAAAAGGTTCC
TDRS	Mouse LBR (αμινοξέα 1 – 106)	CCGGAAATTCATGCCAAGTAGGAAGTTTGTTGAG	CGCGGATCCCATGGGAAGCAGAGACGGGATC
RSGD	Mouse LBR (αμινοξέα 62 – 219)	CCGGAAATTCATGAGAAAAAGTGGCTCGATTCCAGC	CGCGGATTCCTCCCAAGTCCCTCTGTGGAGTGG
TD	Mouse LBR (αμινοξέα 1 – 62)	CCGGAAATTCATGCCAAGTAGGAAGTTTGTTGAG	CGCGGATCCCTTGCCTTAAAGGATTTTAAAGGCTT
RS	Mouse LBR (αμινοξέα 62 – 106)	CCGGAAATTCATGAGAAAAAGTGGCTCGATTCCAGC	CGCGGATCCCATGGGAAGCAGAGACGGGATC
GD	Mouse LBR (αμινοξέα 106 – 219)	CCGGAAATTCATGGAGGGTGACGTGAAGGAGAAGAAGG	CGCGGATTCCTCCCAAGTCCCTCTGTGGAGTGG
CT	Mouse LBR (αμινοξέα 594 – 626)	CCGGAAATTCATGCGAGAGGCCCGGGATGA	CGCGGATCCCTCTGTAATGTAGGGGAATATGCGG

## 2.2.10 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR)

Ολικό RNA από καλλιέργειες εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων απομονώθηκε και καθαρίστηκε με χρήση του πακέτου (kit) RNeasy protect της Qiagen. Οι αντιδράσεις ποσοτικοποίησης πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα Roche lightcycler 2.0 με χρήση του πακέτου (kit) Precision one-step qRT-PCR mastermix με SYBRgreen (PrimerDesign). Για την κανονικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το πακέτο (kit) geNorm reference kit (Primer Design) και επιλέχθηκαν τα γονίδια GAPDH και SDHA από μια λίστα γονιδίων. Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα qbasePLUS (Biogazelle). Οι αλληλουχίες των πριμοδοτικών μορίων οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον πίνακα II.

ΠΙΝΑΚΑΣ II		
Γονίδιο	5' πριμοδοτική αλληλουχία	3' πριμοδοτική αλληλουχία
LBR	AAGGAGATGAGGAGGGAAATTC	CGGCGTAGCGTTCTTCTC
Nanog	GCACTCAAGGACAGGTTTCAG	GCTTGCACTTCATCCTTTGGT
Oct4	AGCCCTCCCTACAGCAGAT	ATACTCTTCTCGTTGGGAATACTC
Klf4	CCCAACTACCCTCCTTTCCT	ACGACCTTCTTCCCCTCTTT

## 2.3 Μορφολογικές Μέθοδοι

### 2.3.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε επιστρωμένα κύτταρα

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός έγινε σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των Maison et al., (1993) και Meier and Georgatos, (1994). Πιο αναλυτικά, κύτταρα τα οποία αναπτύχθηκαν σε καλυπτρίδες μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 4% φορμαλδεΐδης αραιωμένη σε PBS για 10 λεπτά. Ακολούθησαν εκπλύσεις με PBS και το μέσο μονιμοποίησης εξουδετερώθηκε μετά από επώαση 5 λεπτών σε διάλυμα 5mM γλυκίνης διαλυτοποιημένης σε PBS. Τα δείγματα εκπλύθηκαν με PBS και επώαστηκαν για 15 λεπτά σε διάλυμα A (150mM NaCl, 20mM HEPES pH 7.4, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM EGTA, 0.2% Triton X-100, 0.5% FSG). Το πρωτεύον

αντίσωμα, αραιωμένο στην κατάλληλη συγκέντρωση, προστέθηκε στις καλυπτρίδες και ακολούθησε επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε θάλαμο υψηλής υγρασίας. Τα δείγματα εκπλύθηκαν με διάλυμα A, ακολούθησε επώαση με το δευτερεύον αντίσωμα και πλύσεις κατά τον ίδιο τρόπο. Στο πέρας της διαδικασίας έγινε μετα-μονιμοποίηση με διάλυμα 4% φορμαλδεΰδης σε PBS για 10 λεπτά και έκπλυση με PBS. Η χρώση του DNA έγινε με χρήση διαλύματος DAPI τελικής συγκέντρωσης 0.2mg/ml. Τέλος, οι καλυπτρίδες εκπλύθηκαν με PBS και αφού προστέθηκε Vectashield (διάλυμα μείωσης της απώλειας φθορισμού), επιστρώθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Τα δείγματα εξετάστηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica SP5 TCSII ή Zeiss LSM780. Τα αντισώματα και οι αντίστοιχες αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον πίνακα III.

<b>Πίνακας III</b>		
<b>Αντίσωμα</b>	<b>Αραίωση</b>	<b>Εταιρία</b>
<b>Nup</b>	1:500	Abcam
<b>BiP</b>	1:1000	Abcam
<b>Nanog</b>	1:250	Abcam
<b>Oct4</b>	1:250	Santa Cruz
<b>SMA</b>	1:2	Novocastra
<b>lamin-B</b>	1:1500	Παρασκευάστηκε από το εργαστήριο
<b>Troponin</b>	1:150	Developmental Studies Hybridoma Bank
<b>β3 tubulin</b>	1:5000	Covance

### 2.3.2 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε εμβρυοειδή σωματίδια

Τα εμβρυοειδή σωματίδια αναπτύχθηκαν σε καλυπτρίδες επιστρωμένες με ζελατίνη και μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 4% φορμαλδεΰδης αραιωμένης σε PBS για 1 ώρα. Ακολούθησαν εκπλύσεις με PBS και το μέσο μονιμοποίησης εξουδετερώθηκε μετά από επώαση 10 λεπτών σε διάλυμα 5mM γλυκίνης διαλυτοποιημένης σε PBS. Τα δείγματα εκπλύθηκαν με PBS και επώαστηκαν για 3 ώρες σε διάλυμα A (150mM NaCl, 20mM HEPES pH 7.4, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM EGTA, 0.2% Triton X-100, 0.5% FSG) και για 1 ώρα σε διάλυμα B (150mM NaCl, 20mM HEPES pH 7.4, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM EGTA, 0.5% Triton X-100, 0.5% FSG). Το πρωτεύον αντίσωμα (τροπονίνη ή β3 τουμπουλίνη), αραιωμένο στην κατάλληλη συγκέντρωση, προστέθηκε στις καλυπτρίδες και ακολούθησε ολονύκτια επώαση στους 4°C σε θάλαμο υψηλής υγρασίας. Τα δείγματα εκπλύθηκαν με διάλυμα A, εν

συνεχεία ακολούθησε επώαση με το δευτερεύον αντίσωμα και πλύσεις κατά τον ίδιο τρόπο. Στο πέρας της διαδικασίας έγινε μετα-μονιμοποίηση με διάλυμα 4% φορμαλδεΰδης σε PBS για 10 λεπτά και έκπλυση με PBS. Η χρώση του DNA έγινε με χρήση διαλύματος TOPRO-3 Iodide τελικής συγκέντρωσης 0.1μM. Τέλος, οι καλυπτρίδες εκπλύθηκαν με PBS και αφού προστέθηκε Vectashield επιστρώθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Τα δείγματα εξετάστηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica SP5 TCSII. Οι αραιώσεις των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον πίνακα III.

### **2.3.3 Ποσοτικοποίηση έντασης φθορισμού σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού**

Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού αναπτύχθηκαν σε καλυπτρίδες επιστρωμένες με ζελατίνη και υπέστησαν έμμεσο ανοσοφθορισμό με χρήση του Nanog αντισώματος. Τα δείγματα εξετάστηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο, λήφθηκαν διαδοχικές τομές και συνδυάστηκαν σε «προβολή μέσου όρου έντασης» (average projection). Η ένταση φθορισμού του αντισώματος για κάθε κύτταρο μετρήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Fiji (Johannes Schindelin et al). Σε διαδοχικά πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού από καλλιέργειες κυττάρων οι οποίες αναπτύχθηκαν ανεξάρτητα καταμετρήθηκαν συνολικά 1500 κύτταρα.

### **2.3.4 Μορφομετρικές μετρήσεις σε εμβρυοειδή σωματίδια**

Κατά τη δεύτερη ημέρα της διαφοροποίησης, «κρεμάμενες» σταγόνες ελέγχθηκαν για το σχηματισμό εμβρυοειδούς σωματιδίου. Οι σταγόνες εξετάστηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο Leica DMI6000B με χρήση 10x αντικειμενικού φακού και ο σχηματισμός ή μη εμβρυοειδούς σωματιδίου ελέγχθηκε για 100 σταγόνες σε 2 ανεξάρτητα πειράματα διαφοροποίησης.

Για τη μέτρηση της επιφάνειας (εμβαδού) των εμβρυοειδών σωματιδίων, τα σωματίδια εξετάστηκαν κατά την έκτη ημέρα της διαφοροποίησης σε οπτικό μικροσκόπιο Leica DMI6000B με χρήση 20x αντικειμενικού φακού. Η επιφάνεια των σωματιδίων μετρήθηκε για 150 εμβρυοειδή σωματίδια στο ισημερινό τους επίπεδο, με χρήση του προγράμματος Fiji.

### **2.3.5 Μέθοδοι ελέγχου κυτταρικής επιβίωσης**

Ο έλεγχος της κυτταρικής επιβίωσης πραγματοποιήθηκε με τη τεχνική του αποκλεισμού trypan blue (trypan blue exclusion). Η τεχνική στηρίζεται στο ότι τα ζωντανά κύτταρα επιλέγουν ποια στοιχεία διαπερνούν τη μεμβράνη τους, οπότε το trypan blue δεν απορροφάται από αυτά και αυτά δεν χρωματίζονται. Αντίθετα, η χρωστική διαπερνά τη μεμβράνη των νεκρών κυττάρων με αποτέλεσμα να χρωματίζονται μπλε. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, καλλιέργειες βλαστικών κυττάρων διαφοροποιήθηκαν σε δυο διαστάσεις για εννέα μέρες. Από την τέταρτη ημέρα και μετά, ίσος όγκος κυττάρων αναμείχθηκε με ίσο όγκο διαλύματος 0.4% trypan blue αραιωμένου σε PBS και επώαστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το εναιώρημα μεταφέρθηκε σε αιμοκυτταρόμετρο και ο αριθμός των χρωματισμένων (νεκρών) ή μη (ζωντανών) κυττάρων μετρήθηκε για τουλάχιστον  $1 \times 10^6$  κύτταρα.

### **2.3.6 Μελέτη του κυτταρικού κύκλου εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής (FACs assays)**

Αδιαφοροποίητα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ή στην έκτη ημέρα της διαφοροποίησης διαχωρίστηκαν σε μονήρη με διάλυμα τρυψίνης, φυγοκεντρήθηκαν στα 200g για 3 λεπτά και επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα PBS.  $1 \times 10^6$  κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με τετραπλάσιο όγκο διαλύματος 100% παγωμένης αιθανόλης και ακολούθησε χρώση του DNA με διάλυμα ιωδιούχου προπιδίου (propidium iodide, PI). Τα δείγματα αναλύθηκαν σε κυτταρομετρητή Facscalibur Flow Cytometer (BD Biosciences) και επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα CellQuest v.3.1.

### **2.3.7 Υπερδιακριτική μικροσκοπία (Stimulated emission depletion microscopy, STED)**

HeLa κύτταρα, τα οποία διαμολύνθηκαν με την κατασκευή FL-YFP, επιστρώθηκαν σε καλυπτρίδες συγκεκριμένου πάχους  $0.17 \pm 0.01$ mm (hecht-assistent) και αφέθηκαν να αναπτυχθούν για 24 ώρες. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 4% φορμαλδεΰδης για 10 λεπτά. Το μέσο μονιμοποίησης εξουδετερώθηκε μετά από επώαση 5 λεπτών με διάλυμα 5mM γλυκίνης και τα δείγματα επώαστηκαν για 15 λεπτά σε διάλυμα A (όπως και στο 2.3.1). Αφού προστέθηκε διάλυμα ProLong Gold (Invitrogen), τα δείγματα επιστρώθηκαν σε

αντικειμενοφόρους πλάκες και εξετάστηκαν με χρήση 100x αντικειμενικού φακού σε μικροσκόπιο Leica SP5II STED.

Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες συνθήκες: η σάρωση ήταν προς μια κατεύθυνση και είχε συχνότητα 400 Hz, η ανάλυση της εικόνας ήταν στα 512x512pixels, το διάφραγμα της δέσμης (pinhole) ορίστηκε στη 1 μονάδα Airy (AU) και η ισχύς της δέσμης laser (argon) στο 30% της μέγιστης ισχύος ενώ η ισχύς της δέσμης laser «κένωσης» 592nm στο 75% της μέγιστης ισχύος.

### **2.3.8 Μέθοδος ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτοσκίαση (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP)**

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

Για τις μεμβρανικές πρωτεΐνες στις HeLa κυτταρικές σειρές, η σάρωση του δείγματος ήταν προς μια κατεύθυνση και είχε συχνότητα σάρωσης 400 Hz, η ανάλυση της εικόνας στα 512x512pixels, το διάφραγμα της δέσμης (pinhole) ορίστηκε στις 3.99 μονάδες Airy (AU), η μεγέθυνση (zoom) κυμάνθηκε από 7 έως 10 και η ισχύς δέσμης του laser στο 10% της μέγιστης ισχύος σε όλη την διάρκεια του πειράματος, εκτός από την στιγμή της φωτοσκίασης που ήταν σε μέγιστη ισχύ (100%). Αφού επιλέχθηκε το κύτταρο προς ανάλυση, ορίστηκε η περιοχή ενδιαφέροντος (Region of Interest, ROI) όπου θα προκληθεί η φωτοσκίαση. Ως ROI χρησιμοποιήθηκαν: α) μια κυκλική περιοχή στο πυρηνικό φάκελο διαμέτρου 1.0, 1.25 ή 1.5μm, β) μια ζώνη του πυρηνικού φακέλου ύψους 3-5μm και μήκους 7μm, ή γ) μια κυκλική περιοχή του ενδοπλασματικού δικτύου διαμέτρου 3μm. Συνολικά ελήφθησαν 5 εικόνες πριν τη φωτοσκίαση για 32sec (pre-bleach images), ακολούθησε στιγμιαία φωτοσκίαση για 6.5sec και λήψη 16 εικόνων για 307sec (post-bleach images).

Για τις διαλυτές πρωτεΐνες των HeLa κυτταρικών σειρών η σάρωση του δείγματος ήταν προς τις δυο κατευθύνσεις και είχε συχνότητα 800Hz, η ανάλυση της εικόνας στα 128x128pixels, το διάφραγμα της δέσμης ορίστηκε στις 6.6 μονάδες Airy, η μεγέθυνση κυμάνθηκε από 10 έως 13 και η ισχύς ακτίνας δέσμης του laser στο 10% της μέγιστης ισχύος καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, εκτός από τη στιγμή της φωτοσκίασης που ήταν σε



μέγιστη ισχύ (100%). Ως ROI χρησιμοποιήθηκε μια κυκλική περιοχή (πυρηνοπλασματική ή κυτταροπλασματική) διαμέτρου 3.0 $\mu$ m. Συνολικά ελήφθησαν 20 εικόνες πριν τη φωτοσκίαση για 4sec, ακολούθησε στιγμιαία φωτοσκίαση για 0.36sec και λήψη 70 εικόνων για 12.6sec.

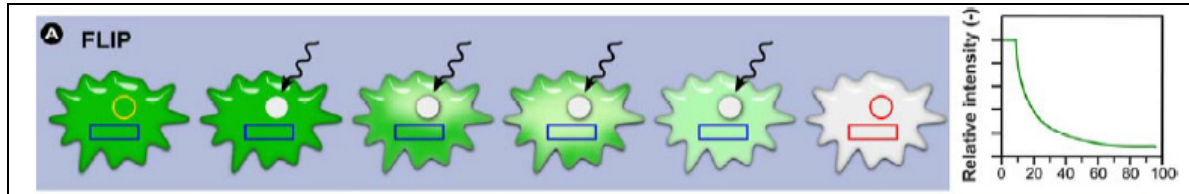
Για τις μεμβρανικές πρωτεΐνες στις καλλιέργειες των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, οι παράμετροι ήταν ίδιες με αυτές των μεμβρανικών πρωτεϊνών στα HeLa κύτταρα εκτός της δόσης του δείγματος η οποία ήταν προς τις δυο κατευθύνσεις και είχε συχνότητα 400Hz.

Κατόπιν ορίστηκαν ακόμη τρεις ROIs: μια ομοίου μεγέθους με τη περιοχή φωτοσκίασης που δεν υπέστη φωτοσκίαση, το σύνολο της περιοχής που κατανέμεται η πρωτεΐνη που αναλύεται (ο πυρηνικός φάκελος, το πυρηνόπλασμα και το κυτταρόπλασμα) καθώς και μια περιοχή κατά την οποία δεν εντοπίζεται η πρωτεΐνη που αναλύεται ώστε να καταγραφεί ο θόρυβος (background). Οι περιοχές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση των δεδομένων (data normalization).

### **2.3.9 Μέθοδος απώλειας φθορισμού μετά από φωτοσκίαση (Fluorescence Loss in Photobleaching, FLIP)**

Μία συμπληρωματική μέθοδος ως προς το FRAP αποτελεί η μέθοδος απώλειας φθορισμού μετά από φωτοσκίαση (Fluorescence Loss in Photobleaching, FLIP) η οποία χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί η σύνδεση μεταξύ διαφορετικών διαμερισμάτων/περιοχών του κυττάρου ή η κινητικότητα ενός μορίου εντός ενός διαμερίσματος. Η κύρια διαφορά του FLIP από το FRAP έγκειται στο γεγονός ότι πραγματοποιείται συνεχής φωτοσκίαση σε μια περιοχή του κυττάρου (ROI A) (Figure 2.1) και επομένως δεν συμβαίνει ανάκτηση του φθορισμού σε αυτήν την περιοχή, ενώ παράλληλα παρατηρούνται οι αλλαγές του φθορισμού σε μια γειτονική περιοχή ενδιαφέροντος (ROI B). Η απώλεια φθορισμού από την περιοχή ενδιαφέροντος B καθορίζει το κινητικό κλάσμα των μορίων της πρωτεΐνης, με μερική απώλεια φθορισμού από την περιοχή να υποδηλώνει ότι ένα ποσοστό των μορίων της πρωτεΐνης δεν κινείται στη περιοχή όπου υφίσταται συνεχόμενη φωτοσκίαση. Το γεγονός ότι κάποια μόρια δεν σκιάζονται υποδηλώνει ή ότι δεν υπάρχει σύνδεση μεταξύ των δυο περιοχών του κυττάρου ή ότι η πρωτεΐνη προς μελέτη δεν μετακινείται από τη μια περιοχή στην άλλη.

Τα πειράματα FLIP μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με τα πειράματα FRAP για να μελετηθούν φαινόμενα ενεργητικής ή παθητικής μεταφοράς. Στην πράξη, τα πειράματα FLIP χρησιμοποιούνται ως control των FRAP πειραμάτων.



Εικόνα 2.1 Πειραματική προσέγγιση των πειραμάτων FLIP

Για την πραγματοποίηση των FLIP πειραμάτων ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- α) ορίζεται η περιοχή ενδιαφέροντος A η οποία θα υποστεί συνεχόμενη φωτοσκίαση,
- β) λαμβάνονται εικόνες πριν την έναρξη του πειράματος για να καθοριστεί η ένταση φθορισμού πριν τη φωτοσκίαση,
- γ) πραγματοποιείται σύντομη συνεχής φωτοσκίαση με μέγιστη ισχύ ακτίνας του laser,
- δ) καταγράφεται η απώλεια φθορισμού από γειτονική περιοχή ενδιαφέροντος B κατά προτίμηση σε συνθήκες υψηλής ανάλυσης και τέλος,
- δ) υπολογίζονται οι αλλαγές του φθορισμού στη περιοχή ενδιαφέροντος B και ο χρόνος μείωσης του φθορισμού, ο οποίος αποτελεί μέτρο της ταχύτητας των μορίων.

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

Για την αγρίου τύπου πρωτεΐνη (FL) η σάρωση του δείγματος ήταν προς μια κατεύθυνση και είχε συχνότητα 400 Hz, η ανάλυση της εικόνας στα 512x512pixels, το διάφραγμα της δέσμης (pinhole) ορίστηκε στις 3.99 μονάδες Airy (AU), η μεγέθυνση κυμαινόταν από 4 έως 6 και η ισχύς δέσμης του laser στο 10% της μέγιστης ισχύος καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, εκτός από την στιγμή της φωτοσκίασης που ήταν σε μέγιστη ισχύ (100%). Μετά την επιλογή του κυττάρου προς ανάλυση, ορίστηκε ως περιοχή συνεχόμενης φωτοσκίασης μια ζώνη του πυρηνικού φακέλου ύψους 3-5μm και μήκους 7μm και ως περιοχές ενδιαφέροντος το υπόλοιπο τμήμα του πυρηνικού φακέλου και ένα τμήμα του κυτταροπλάσματος. Συνολικά ελήφθησαν 5 εικόνες πριν τη φωτοσκίαση για 32sec, ακολούθησε στιγμιαία φωτοσκίαση για 6.5sec και λήψη 16 εικόνων για 307sec. Το σχήμα επαναλήφθηκε έξι φορές.

Για το αμινοτελικό τμήμα του LBR (TDRSGD), η σάρωση του δείγματος ήταν προς τις δυο κατευθύνσεις και είχε συχνότητα 800Hz, η ανάλυση της εικόνας στα 256x256pixels, το διάφραγμα της δέσμης ορίστηκε στις 6.6 μονάδες Airy, η μεγέθυνση κυμαινόταν από 5 έως 7 και η ισχύς δέσμης του laser στο 10% της μέγιστης ισχύος σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, εκτός από τη στιγμή της φωτοσκίασης που ήταν σε μέγιστη ισχύ (100%). Ως περιοχή συνεχόμενης φωτοσκίασης χρησιμοποιήθηκε τετράγωνο κατάλληλου μεγέθους ώστε να καλύπτει το μισό πυρήνιο και ως περιοχές ενδιαφέροντος ορίστηκαν το υπόλοιπο τμήμα του πυρήνα και μια ανάλογη περιοχή του κυτταροπλάσματος. Ελήφθησαν 20 εικόνες πριν την φωτοσκίαση για 4sec, ακολούθησε στιγμιαία φωτοσκίαση για 0.36sec, λήψη 70 εικόνων για 12.6sec και το όλο σχήμα επαναλήφθηκε 10 φορές.

Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων ως προς την μη ηθελημένη φωτοσκίαση λόγω παρατήρησης (imaging photobleaching), μετρήθηκε η απώλεια φθορισμού από ομοίου μεγέθους περιοχές γειτονικών κυττάρων.



## *Αποτελέσματα*



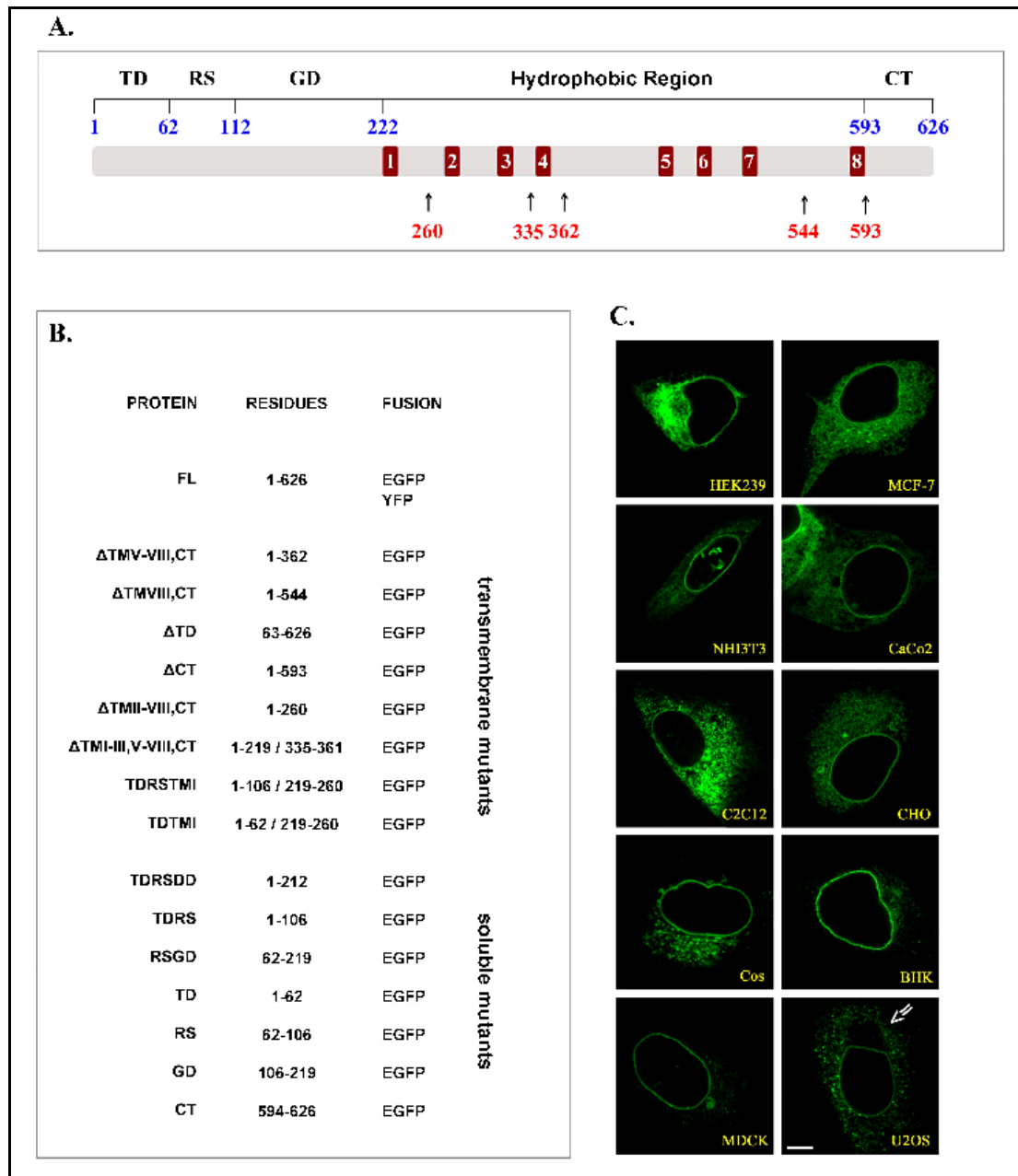
### 3.1 Μεταλλάγματα--κατασκευές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη

Προπαρασκευαστικά πειράματα σε HeLa κύτταρα έδειξαν ότι οι κατασκευές που έφεραν αμινοτελική σύζευξη της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης EGFP στην αγρίου τύπου πρωτεΐνη (EGFP-LBR) είχαν την τάση να σχηματίζουν κυτταροπλασματικά έγκλειστα, ειδικά σε κύτταρα με μεγάλη υπερέκφραση, όπως και σε προηγούμενες μελέτες (Ellenberg et al, 1997). Αντίθετα, όταν η πρωτεΐνη EGFP ήταν συζευγμένη στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (LBR-EGFP), τα διαμολυσμένα κύτταρα δεν εμφάνιζαν έκτοπες δομές και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν τέτοιες κατασκευές στη διαμόλυνση όλων των κυττάρων.

Για τους σκοπούς της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκαν 16 κατασκευές, περιλαμβανομένου του πλήρους μήκους LBR (FL) και μιας σειράς μεταλλαγμένων μορφών, από τις οποίες απουσίαζαν συγκεκριμένες περιοχές της πρωτεΐνης και απεικονίζονται στην εικόνα 3.1A,B. Ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει στις κατασκευές ΔTMV-VIII,CT και ΔTMVIII,CT οι οποίες προσομοιάζουν τις αμινοξικές αλληλουχίες των μεταλλαγμένων μορφών του LBR που απαντώνται στις ασθένειες ichthyosis και Greenberg dysplasia αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, η κατασκευή ΔTMII-VIII,CT αποτελεί το κύριο μετάλλαγμα που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως (αντί του πλήρους μορίου) για την ανάλυση της κινητικής της πρωτεΐνης σε προηγούμενες μελέτες.

### 3.2 Υπερέκφραση του αγρίου τύπου LBR σε κυτταρικές σειρές

Αρχικά, εξετάστηκε αν η υπερέκφραση της αγρίου τύπου πρωτεΐνης (FL) επέφερε αλλαγές στη δομή του πυρηνικού φακέλου. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση δέκα κυτταρικών σειρών με την κατασκευή FL. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης δεν επηρέασε την κυτταρική αρχιτεκτονική στην πληθώρα των κυτταρικών σειρών που ελέγχθησαν, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.1C. Ωστόσο, η υπερέκφραση του πλήρους μορίου FL στην κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος U2OS είχε ως αποτέλεσμα την αλλαγή της δομής του πυρηνικού φακέλου και πιο συγκεκριμένα την αποκόλληση της εσωτερικής από την εξωτερική πυρηνική μεμβράνη, σε ποσοστό 30% των διαμολυσμένων κυττάρων, σε συμφωνία με προηγούμενες παρατηρήσεις (Zwerger et al., 2010). Το γεγονός ότι η κυτταρική δομή αλλοιώθηκε σε μια μόνο κυτταρική σειρά και σε ένα σχετικά μικρό ποσοστό των διαμολυσμένων κυττάρων (30%), θεωρήθηκε ως ένα ειδο-εξαρτώμενο αποτέλεσμα (context-dependent effect) και δεν κρίθηκε αναγκαία η περαιτέρω διερεύνησή του.



**Εικόνα 3.1 Δομή και έκφραση του LBR σε κυτταρικές σειρές.** (A) Σχηματικό διάγραμμα της δομής της πρωτεΐνης. Με μπλε σημειώνονται τα τελικά κατάλοιπα των περιοχών της πρωτεΐνης και με κόκκινο τα τελικά αμινοξέα των κυριότερων μεταλλαγμάτων. (B) Κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη. Αναφέρονται η αμινοξική αλληλουχία και η σύζευξη με φθορίζουσες πρωτεΐνες. (C) Υπερέκφραση του FL-LBR σε κυτταρικές σειρές. Μόνο στην περίπτωση των κυτάρων U2OS παρατηρείται αποχωρισμός της εσωτερικής από την εξωτερική πυρηνική μεμβράνη.

### 3.3 Υπερέκφραση αγρίου τύπου LBR σε κύτταρα HeLa

Η μελέτη της κινητικής του LBR πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα HeLa, μετά από παροδική διαμόλυνσή τους με τις αντίστοιχες κατασκευές. Η επιλογή της συγκεκριμένης



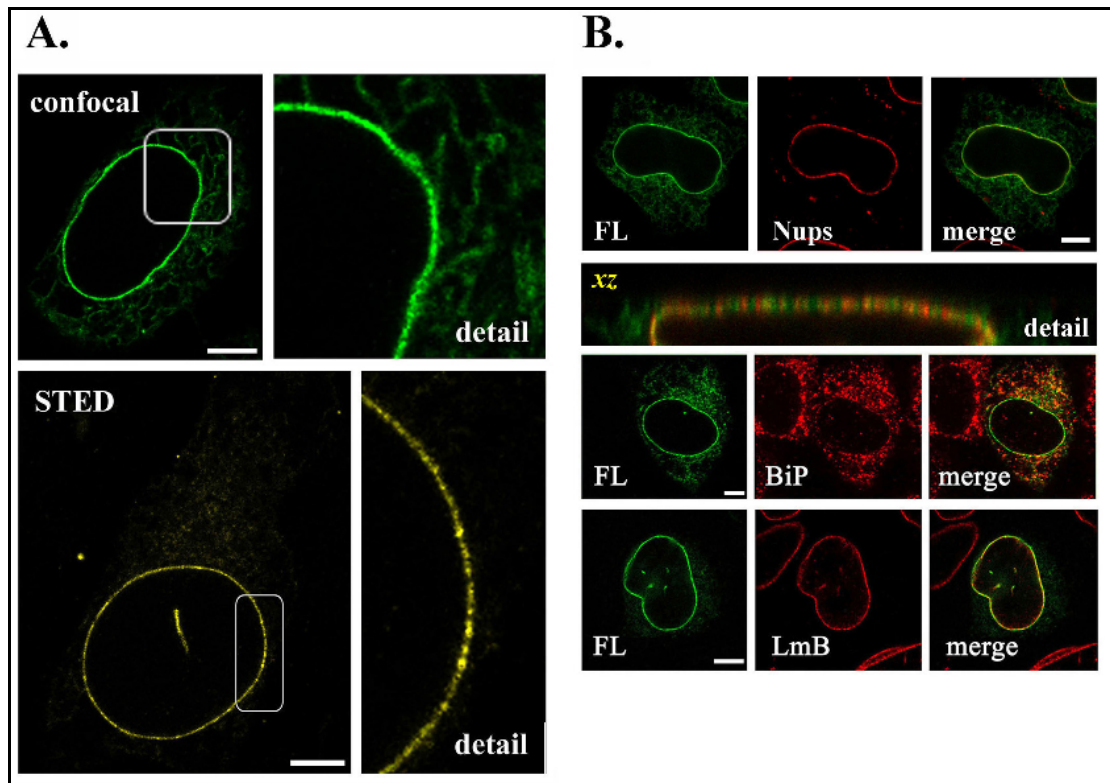
κυτταρικής σειράς έγινε γιατί τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης της ενδογενούς πρωτεΐνης σε σχέση με άλλες κυτταρικές σειρές (Zwinger et al., 2010) και επομένως παρέχουν λιγότερο «θόρυβο» για την μελέτη των ιδιοτήτων των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών.

Μετά από παροδική διαμόλυνση των κυττάρων, ο FL-LBR ανιχνεύθηκε τόσο στο ενδοπλασματικό δίκτυο όσο και στον πυρηνικό φάκελο (εικόνα 3.2A). Ωστόσο, βασιζόμενοι σε μετρήσεις έντασης φθορισμού ανά μονάδα επιφανείας, η πρωτεΐνη φάνηκε να είναι περίπου 3 φορές πιο συγκεντρωμένη στην περιφέρεια του πυρήνα, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη ειδικών αλληλεπιδράσεων.

Πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού των διαμολυσμένων κυττάρων έδειξαν ότι η κατανομή της πρωτεΐνης FL ήταν διακριτή από αυτή των πρωτεϊνών BiP (δείκτης του ενδοπλασματικού δικτύου) και Nup84/107 (δείκτης των πυρηνικών πόρων), αλλά πολύ παρόμοια με αυτή της λαμίνης B (εικόνα 3.2B). Επιπρόσθετα, κατά τον εντοπισμό της πρωτεΐνης στον πυρηνικό φάκελο ανιχνεύθηκαν διακριτές «νησίδες»-μικροπεριοχές (microdomains), όμοιες με τις δομές του ενδογενούς LBR. Με χρήση συνεστιακής και υπερδιακριτικής μικροσκοπίας βρέθηκε ότι οι «νησίδες» αυτές είχαν μέγεθος περίπου 0.56μm και περιείχαν το διπλάσιο ποσό πρωτεΐνης σε σχέση με γειτονικές περιοχές (εικόνα 3.2A).

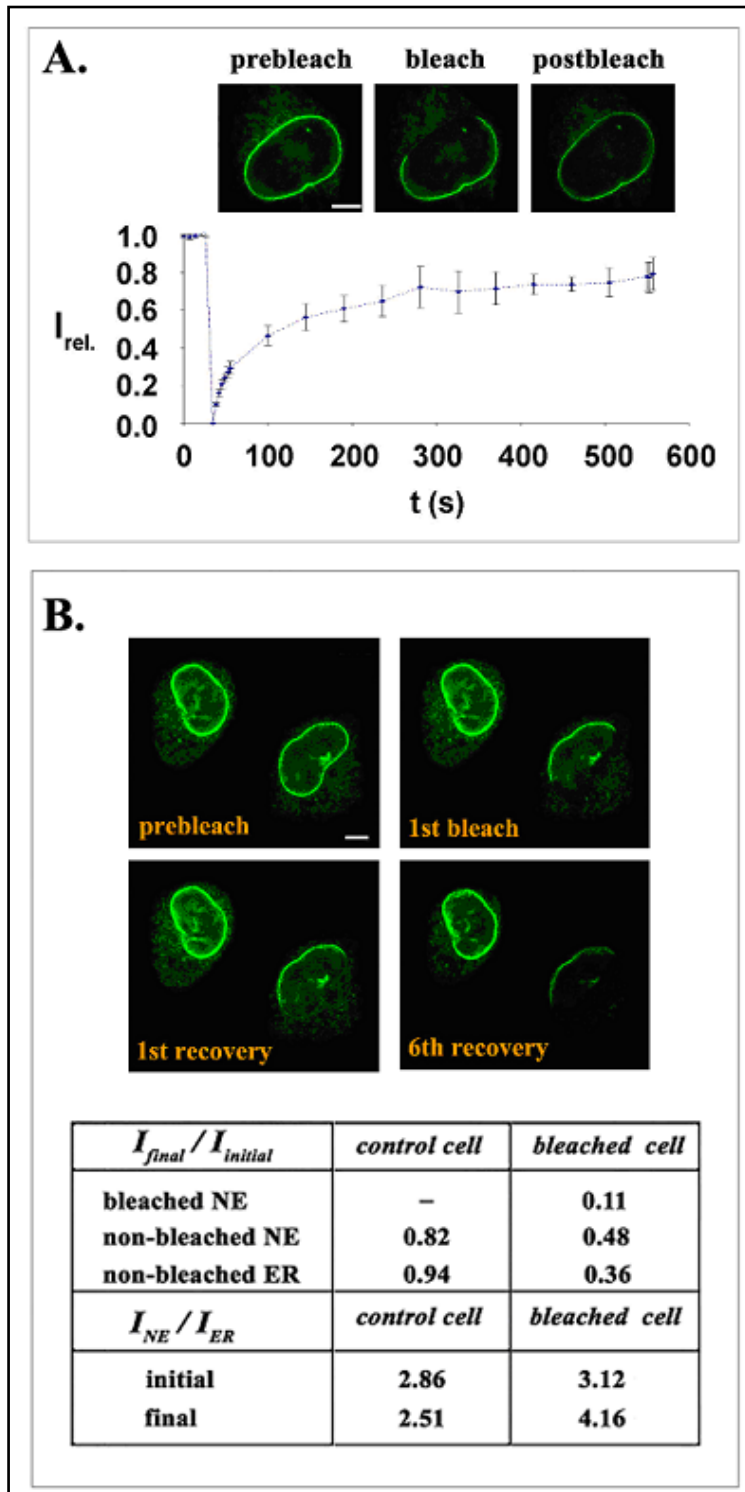
### **3.4 Δυναμική του αγρίου τύπου LBR όπως αποκαλύπτεται με πειράματα ανάκτησης φθορισμού**

Για την καλύτερη και ακριβέστερη μελέτη της κινητικής της πρωτεΐνης έπρεπε να καθοριστούν επακριβώς οι παράμετροι διεξαγωγής των FRAP πειραμάτων, όπως το χρονικό διάστημα ανάκτησης του φθορισμού μετά τη φωτοσκίαση. Για το σκοπό αυτό, HeLa κύτταρα διαμολύνθηκαν με την πρωτεΐνη FL, υπέστησαν φωτοσκίαση σε μέρος της πυρηνικής μεμβράνης και μελετήθηκε η ανάκτηση του φθορισμού στην περιοχή ενδιαφέροντος. Η ένταση φθορισμού της περιοχής ενδιαφέροντος/φωτοσκίασης έφθασε σε πλατό μετά από περίπου 250-300s και παρέμεινε σταθερή για περίπου 500s (εικόνα 3.3A). Επιπλέον, το κινητικό κλάσμα της πρωτεΐνης ήταν μικρότερο της μονάδας, υποδηλώνοντας ότι ένα σημαντικό ποσοστό της είναι ισχυρά συνδεδεμένο με το υποκείμενο δίκτυο της χρωματίνης και της πυρηνικής λάμινας. Συνεπώς, συμπεραίνουμε ότι το χρονικό διάστημα των 300s αποτελεί ένα ασφαλές όριο για τη μέτρηση της κινητικής του LBR.



**Εικόνα 3.2 Κατανομή της πρωτεΐνης FL-LBR στα HeLa κύτταρα.** (A) Η κατανομή της πρωτεΐνης FL-LBR μετά από παρατήρηση με συνεστιακή (confocal) ή υπερδιακριτική μικροσκοπία (STED). Οι εικόνες στα δεξιά αναπαριστούν τμήμα του πυρηνικού φακέλου σε μεγαλύτερη μεγέθυνση και υψηλότερη ανάλυση. (B) Έμμεσος ανοσοφθορισμός κυττάρων τα οποία υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη FL-LBR έναντι των πρωτεϊνών Nup84/107 (Nups), BiP και λαμίνης Β (LmB). Ο διαφορετικός εντοπισμός του LBR και των νουκλεοπορινών γίνεται πιο εμφανής στις τομές xz.

Για να διαπιστωθεί η πηγή προέλευσης των φθορισμογόνων μορίων που διαχέονται στην περιοχή ενδιαφέροντος πραγματοποιήθηκαν πειράματα FLIP. Τμήμα του πυρηνικού φακέλου υπέστη παρατεταμένη φωτοσκίαση για 27 λεπτά και ταυτόχρονα μετρήθηκε η ένταση φθορισμού στο υπόλοιπο τμήμα του πυρηνικού φακέλου και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η παροδική αύξηση φθορισμού στην περιοχή φωτοσκίασης συνοδεύτηκε από αντίστοιχη απώλεια φθορισμού στο υπόλοιπο τμήμα του πυρηνικού φακέλου και του ενδοπλασματικού δικτύου, υποδεικνύοντας τη δυναμική ανταλλαγή μη-συνδεδεμένων ή από-συνδεδεμένων μορίων της πρωτεΐνης διαμέσου του πυρηνικού φακέλου και του ενδοπλασματικού δικτύου (εικόνα 3.3B). Ωστόσο, η απώλεια φθορισμού από την πυρηνική μεμβράνη ήταν σημαντικά μικρότερη σε σύγκριση με αυτή του ενδοπλασματικού δικτύου, υποδηλώνοντας την πιο γρήγορη κινητική της πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Το τελευταίο επιβεβαιώθηκε και από τα πειράματα FRAP σε αυτή την περιοχή, όπως θα γίνει σαφές παρακάτω (εικόνα 3.10E).



**Εικόνα 3.3 Δυναμική της πρωτεΐνης FL-LBR σε HeLa κύτταρα.** (A) Τυπικό πείραμα ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτοσκίαση (FRAP). Η καμπύλη αναπαριστά το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. ( $I_{rel}$ ): ένταση φθορισμού μετά την κανονικοποίηση, ( $t$ ): χρόνος σε δευτερόλεπτα. (B) Τυπικό πείραμα απώλειας φθορισμού μετά από φωτοσκίαση (FLIP), με 6 διαδοχικές φωτοσκιάσεις-ανακτήσεις. Ο πίνακας δείχνει τη διαφορά φθορισμού ( $I_{final}/I_{initial}$ ) τόσο στον πυρηνικό φάκελο (NE) όσο και στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) στο κύτταρο το οποίο υπέστη φωτοσκίαση (bleached cell) και σε ένα γειτονικό κύτταρο ελέγχου (control cell).

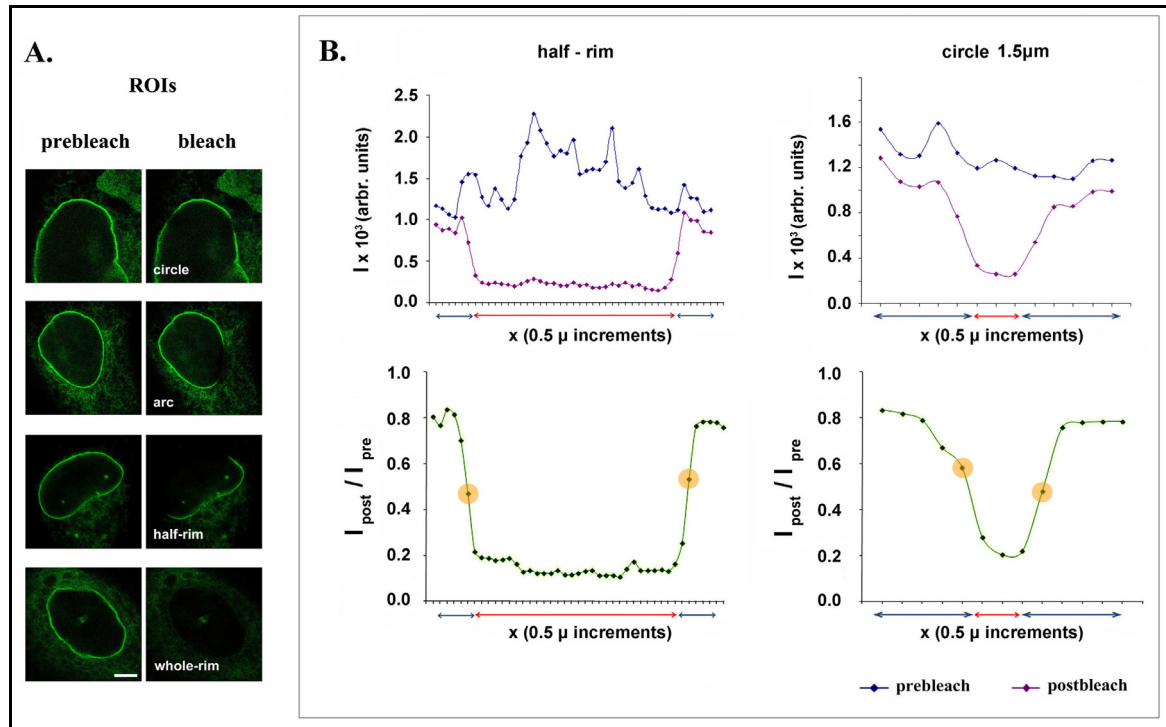
### 3.4.1 Προσδιορισμός της «πραγματικής» περιοχής ενδιαφέροντος φωτοσκίασης (Effective Region of Interest)

Για τη μελέτη της κινητικής της αγρίου τύπου πρωτεΐνης και πολύ περισσότερο για τη σύγκρισή της με εκείνες των μεταλλαγμένων μορφών, έπρεπε να διασφαλιστεί ότι τα

πειράματα FRAP έδιναν ασφαλή, επαναλήψιμα αποτελέσματα. Αυτό θεωρήθηκε αναγκαίο καθώς προηγούμενες μελέτες κινητικής έδωσαν διαφορετικά αποτελέσματα, ιδιαίτερα σε ότι αφορά το χρόνο ημι-ανάκτησης φθορισμού. Αν και τέτοιες διαφορές θα μπορούσαν να αποδοθούν σε μια ποικιλία παραγόντων - όπως η χρήση διαφορετικών κυτταρικών σειρών ή και τα ποικίλα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης - δύο σημαντικοί παράγοντες που οφείλουν να ληφθούν υπόψη είναι η ασυμμετρία του πυρηνικού φακέλου, με τις πολλαπλές ανόμοια χωροθετημένες διασυνδέσεις του με το ενδοπλασματικό δίκτυο και η ανομοιογενής κατανομή του LBR κατά μήκος του πυρηνικού φακέλου. Για να αντιμετωπισθούν τέτοια προβλήματα αναλύθηκε μεγάλος αριθμός κυττάρων και χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές γεωμετρίες σε ότι αφορά την περιοχή ενδιαφέροντος. Η λογική πίσω από αυτή την προσέγγιση ήταν ότι οι παράμετροι του πειράματος (όπως η αποικοδόμηση του φθορισμογόνου και οι πιθανές διαφορές των κυττάρων σε σχέση με τον κυτταρικό κύκλο) δεν θα επηρεάσουν σημαντικά την ανάκτηση του φθορισμού όταν η γεωμετρία της περιοχής φωτοσκίασης διαφέρει, διότι τυχαία και περιστασιακά γεγονότα θα συμβαίνουν με την ίδια συχνότητα ανεξαρτήτως συνθηκών. Αντίθετα, διαφορές στη σύσταση ή ασυμμετρίες στη δομή του πυρηνικού φακέλου θα ήταν δυνατό να επιφέρουν μεγαλύτερη διακύμανση στην κινητική της πρωτεΐνης, όταν η περιοχή ενδιαφέροντος καλύπτει ένα μικρό μόνο τμήμα του πυρηνικού φακέλου. Για τους πιο πάνω λόγους, στα πειράματα FRAP χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικές γεωμετρίες για την περιοχή ενδιαφέροντος: κύκλοι ποικίλης διαμέτρου (1.0, 1.25 και 1.5 $\mu\text{m}$ ) και καμπυλοειδείς περιοχές που καλύπτουν τμήμα, το μισό ή ολόκληρο τον πυρηνικό φάκελο (εικόνα 3.4A).

Στη συνέχεια καθορίστηκαν οι ελάχιστες διαστάσεις της περιοχής ενδιαφέροντος. Ανάλογα με τις πειραματικές παραμέτρους υπάρχει ένα συγκεκριμένο όριο στη διακριτική ικανότητα και επομένως στο ελάχιστο μέγεθος της περιοχής φωτοσκίασης. Για το σκοπό αυτό, μονιμοποιημένα κύτταρα HeLa που εξέφραζαν την πρωτεΐνη FL υπέστησαν φωτοσκίαση κατά μήκος της ημι-περιφέρειας του πυρηνικού φακέλου και μετρήθηκε η ένταση φθορισμού σε υποπεριοχές μήκους 0.5 $\mu\text{m}$  συν 3.0 $\mu\text{m}$  εκατέρωθεν. Αναπαριστώντας διαγραμματικά την ένταση φθορισμού συναρτήσει του μήκους (εικόνα 3.4B), διαπιστώνεται ότι ο φθορισμός της περιοχής ενδιαφέροντος είναι ομοιόμορφος, έχει μειωθεί σημαντικά αμέσως μετά τη φωτοσκίαση και παραμένει ομοιόμορφος. Ωστόσο, σε απόσταση 0.5 $\mu\text{m}$  εκατέρωθεν της περιοχής ενδιαφέροντος ο φθορισμός έχει μειωθεί σε μεγάλο ποσοστό σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα (κάτω από ιδανικές συνθήκες ο φθορισμός θα μειωνόταν μόνο στην περιοχή ενδιαφέροντος), γεγονός που υποδεικνύει ότι το πραγματικό μέγεθος της περιοχής φωτοσκίασης ισούται με το μέγεθος που ορίζουμε συν  $\sim 1.0\mu\text{m}$ . Ανάλογα

συμπεράσματα προέκυψαν και από τη χρήση (ως περιοχής ενδιαφέροντος) κύκλου διαμέτρου 1.5μm. Υπό αυτές τις συνθήκες, το ελάχιστο μέγεθος της περιοχής ενδιαφέροντος που μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ήταν ~1.0μm.

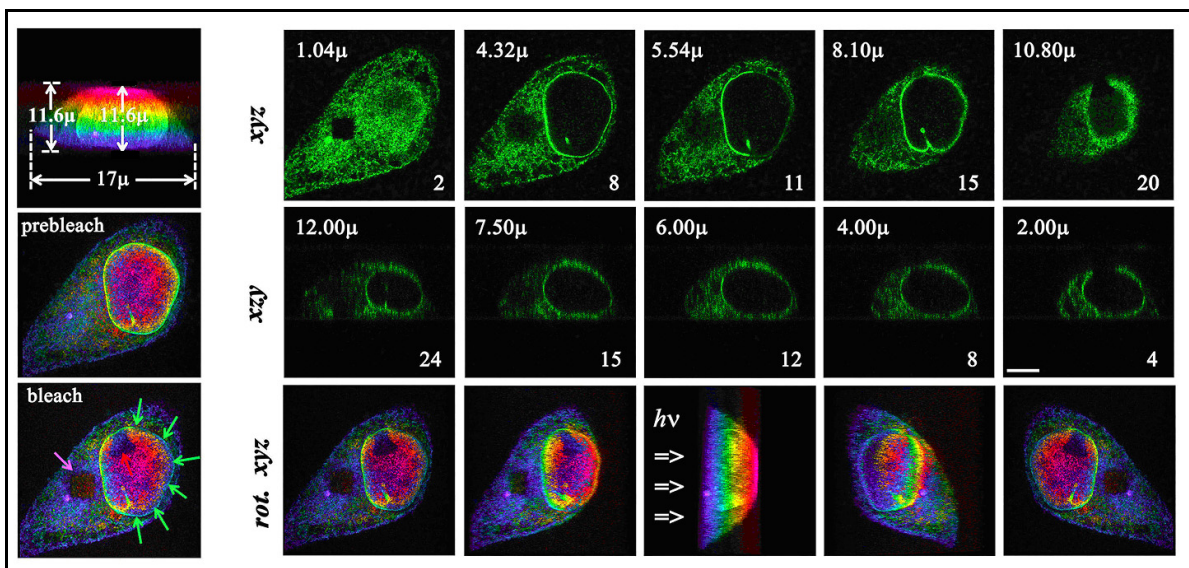


**Εικόνα 3.4 Καθορισμός της περιοχής ενδιαφέροντος (ROI).** (A) Στις εικόνες αναπαριστώνται οι έξι διαφορετικές περιοχές ενδιαφέροντος που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα FRAP. Circle: κυκλική περιοχή διαμέτρου 1.0, 1.25 ή 1.5μm, arc: τμήμα του πυρηνικού φακέλου ύψους 3-5μm και μήκους 7μm, half-rim: ~50% του πυρηνικού φακέλου, whole-rim: ~90% του πυρηνικού φακέλου. Οι εικόνες δείχνουν τμήμα του κυττάρου ή ολόκληρο το κύτταρο πριν τη φωτοσκίαση (prebleach) και αμέσως μετά τη σκίαση (bleach). (B) Καθορισμός του πραγματικού μεγέθους της περιοχής ενδιαφέροντος σε πειράματα FRAP μονιμοποιημένων κυττάρων με σκίαση κυκλικής περιοχής 1.5μm ή ~50% του πυρηνικού φακέλου. Τα διαγράμματα αναπαριστούν την ένταση φθορισμού ( $I$ ) κατά μήκος της περιοχής ενδιαφέροντος ( $x$ ) (κόκκινο βέλος) και εκατέρωθεν αυτής (μπλε βέλη), τόσο πριν (prebleach) όσο και μετά την φωτοσκίαση (postbleach). Μετά από την κανονικοποίηση της έντασης φθορισμού ( $I_{post}/I_{pre}$ ), διαπιστώνεται ότι ο φθορισμός της περιοχής ενδιαφέροντος έχει μειωθεί ομοιόμορφα, ενώ σε απόσταση 0.5μm εκατέρωθεν δεν παρατηρείται διαφορά (πορτοκαλί κύκλοι).

### 3.4.2 Γεωμετρία της περιοχής ενδιαφέροντος

Για να εκτιμηθεί το βάθος που πραγματοποιήθηκε φωτοσκίαση σε σχέση με το ολικό μέγεθος του κυττάρου πραγματοποιήθηκαν πειράματα FRAP σε μονιμοποιημένα κύτταρα. Κύτταρα διαμολυσμένα με την πρωτεΐνη FL υπέστησαν φωτοσκίαση σε τρεις περιοχές: στο

κατώτατο όριο του κυττάρου (περιοχή σχήματος τετραγώνου), στο ανώτερο επίπεδο (περιοχή σχήματος τριγώνου) και στον ισημερινό. Στη συνέχεια, τα κύτταρα παρατηρήθηκαν κατά μήκος του άξονα του z, ώστε να εκτιμηθεί το βάθος σκίασης εκατέρωθεν του ισημερινού επιπέδου. Όπως προκύπτει από τις διαδοχικές φωτογραφίες κατά μήκος των αξόνων xyz και xzy (εικόνα 3.5), πραγματοποιήθηκε μη επιθυμητή σκίαση για περίπου 1.4μm γύρω από το ισημερινό επίπεδο, ποσοστό σημαντικά μικρό σε σχέση με το ολικό πάχος του πυρήνα (περίπου 11μm).



**Εικόνα 3.5 Εκτίμηση του ποσοστού μη ηθελμμένης φωτοσκίασης.** Κύτταρα φωτοσκιάστηκαν σε ROIs σχήματος τετραγώνου (1.04μ) και τριγώνου (10.80μ) ως σημείων αναφοράς και στο ισημερινό επίπεδο στο ~50% του πυρηνικού φακέλου (5.54μ). Μετά από λήψη διαδοχικών εικόνων συνεστιακής μικροσκοπίας (confocal sections) στους άξονες xyz και xzy, εκτιμήθηκε το ποσοστό σκίασης του κυττάρου εκατέρωθεν του ισημερινού επιπέδου. Αυτό έγινε καλύτερα αντιληπτό μετά από προσομοίωση και μοντελοποίηση του κυττάρου (rot. xyz) με χρήση ειδικού προγράμματος συσχέτισης απόστασης-μήκους φάσματος.

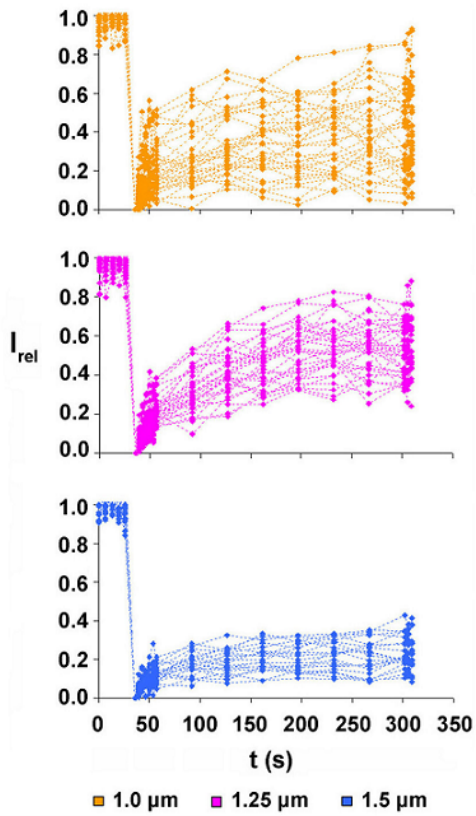
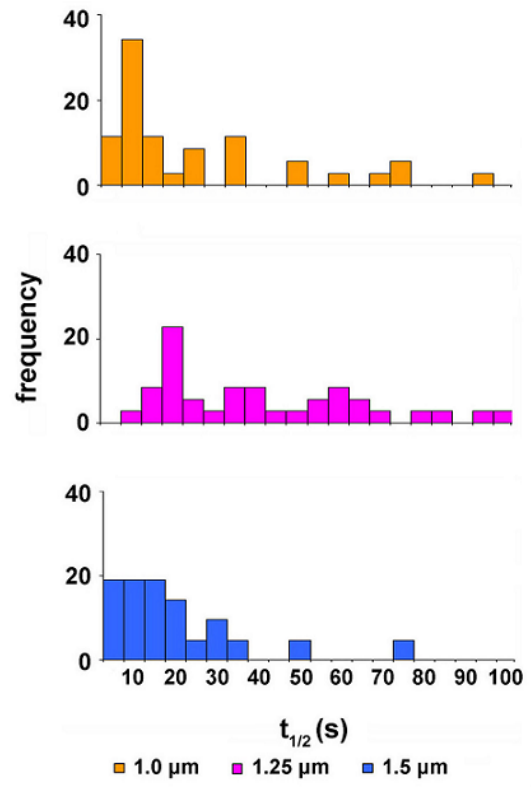
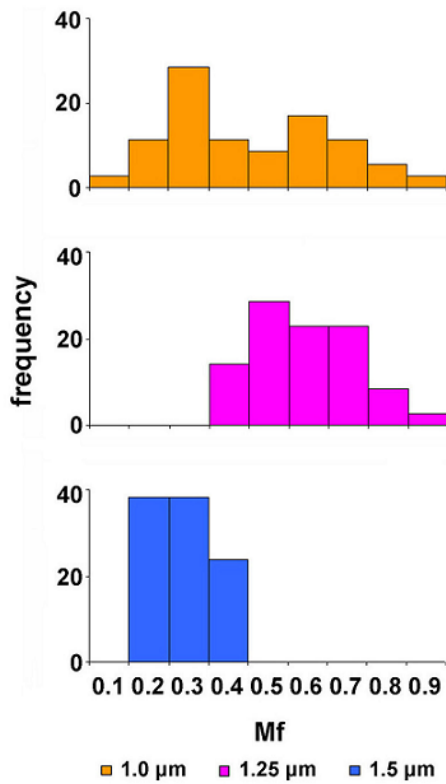
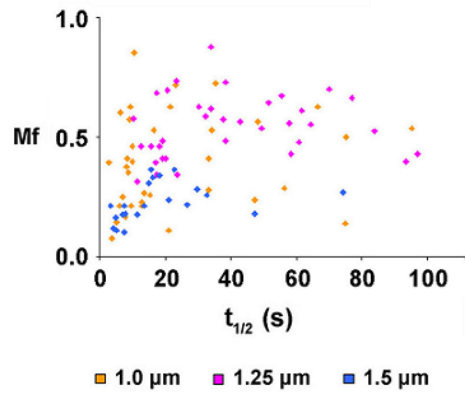
### 3.4.3 Πειράματα ανάκτησης φθορισμού με χρήση κυκλικών περιοχών ενδιαφέροντος

Αφού ολοκληρώθηκε η σειρά των πιλοτικών πειραμάτων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα FRAP σε κύτταρα που υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη FL. Σε αυτά τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κυκλικές ROIs διαμέτρου 1.0, 1.25 και 1.5μm. Όπως προκύπτει από τις καμπύλες ανάκτησης φθορισμού (εικόνα 3.6A), η έκταση και ο ρυθμός ανάκτησης φθορισμού παρουσίαζαν σημαντική διακύμανση, ενώ μειωνόταν αρκετά στην περίπτωση ROI διαμέτρου 1.5μm, με παράλληλη μείωση του κινητικού κλάσματος.

Περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι τα πειράματα FRAP με μικρού μεγέθους ROIs (1.0 $\mu$ m) έδιναν πάντα μια διφασική (bimodal) κατανομή του κινητικού κλάσματος, ενώ στην περίπτωση χρήσης ROIs διαμέτρου 1.25 $\mu$ m και 1.5 $\mu$ m οι αντίστοιχες κατανομές ήταν μονοκόρυφες (unimodal) (εικόνα 3.6B). Κάτι ανάλογο δεν παρατηρήθηκε ωστόσο στην περίπτωση των κατανομών των χρόνων ημι-ανάκτησης φθορισμών, οι οποίες μεταβάλλονταν ελάχιστα με την αλλαγή μεγέθους της περιοχής ενδιαφέροντος (εικόνα 3.6C).

Το γεγονός ότι ο ρυθμός ανάκτησης ( $t_{1/2}$ ) ποικίλει ανεξάρτητα του μεγέθους του ROI - και πολύ περισσότερο του κινητικού κλάσματος - μπορεί να γίνει εύκολα αντιληπτό από το διάγραμμα κινητικού κλάσματος συναρτήσεως του χρόνου ημι-ανάκτησης ( $Mf-t_{1/2}$ ) ( $r \ll 1$ ) (εικόνα 3.6D). Τα σημεία στο διάγραμμα είναι διασπαρμένα και όχι συγκεντρωμένα σε ομάδες, υποδηλώνοντας ότι η διακύμανση των δεδομένων δεν οφείλεται στην ετερογένεια του κυτταρικού πληθυσμού. Αν ίσχυε κάτι τέτοιο, κύτταρα στα οποία ο LBR ήταν πιο κινητικός θα έδιναν επαναλαμβανόμενα υψηλά κινητικά κλάσματα και ταυτόχρονα μικρούς χρόνους ημι-ανάκτησης, με αποτέλεσμα την ομαδοποίηση των σημείων στο διάγραμμα  $Mf-t_{1/2}$ . Αντίθετα, στο διάγραμμα παρατηρούμε σημεία (δείγματα) με παρόμοια κινητικά κλάσματα και διαφορετικούς χρόνους ημι-ανάκτησης ή και το αντίστροφο. Αυτό δηλώνει ότι ακόμη και περιοχές μικρής διαμέτρου (ROI=1.0 $\mu$ m) εσωκλείουν ετερογενή τμήματα του πυρηνικού φακέλου, τα οποία περιέχουν ακινητοποιημένα μόρια LBR, αλλά και μόρια τα οποία διαχέονται ελεύθερα.

**Εικόνα 3.6 Πειράματα FRAP με χρήση κυκλικών περιοχών ενδιαφέροντος (ROIs).** (A) Χαρακτηριστικές καμπύλες ανάκτησης φθορισμού μετά από σκίαση του πυρηνικού φακέλου σε κυκλική περιοχή διαμέτρου 1.0 $\mu$ m (n=35), 1.25 $\mu$ m (n=35) ή 1.5 $\mu$ m (n=22). (B) Η κατανομή συχνοτήτων του κινητικού κλάσματος (Mf). (C) Η αντίστοιχη κατανομή του χρόνου ημι-ανάκτησης  $t_{1/2}$ . (D) Διάγραμμα του κινητικού κλάσματος συναρτήσεως του χρόνου ημι-ανάκτησης. Σε όλες τις περιπτώσεις η ROI διαμέτρου 1.0 $\mu$ m απεικονίζεται με πορτοκαλί χρώμα, η ROI διαμέτρου 1.25 $\mu$ m με ροζ και η ROI διαμέτρου 1.5 $\mu$ m με μπλε (βλ. επόμενη σελίδα).

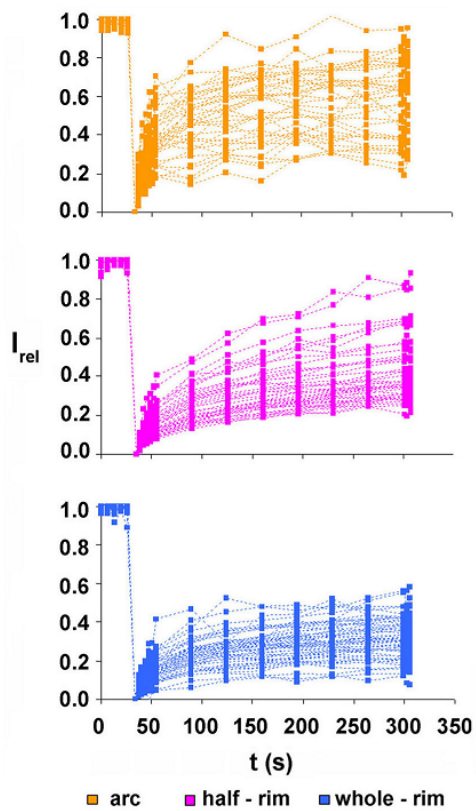
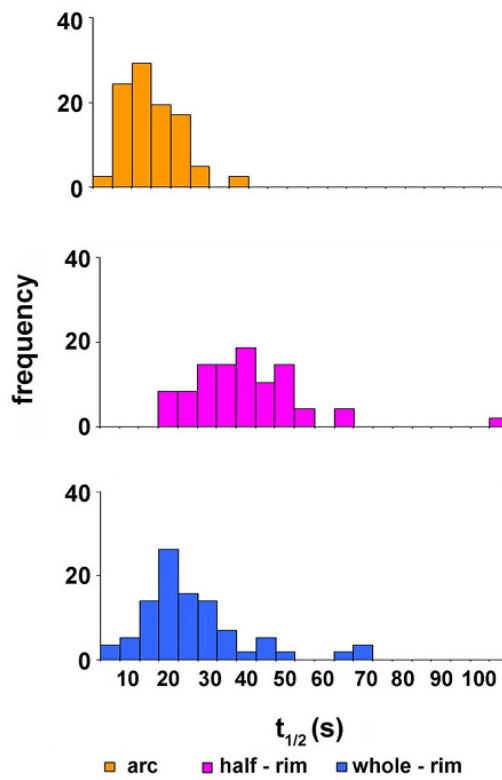
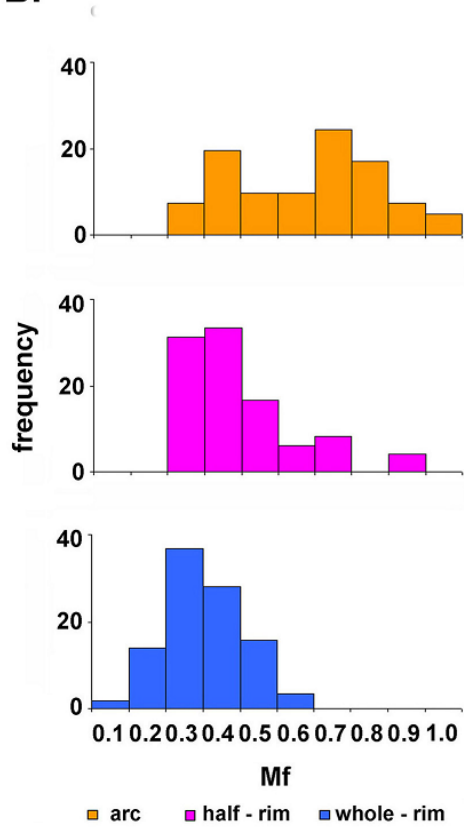
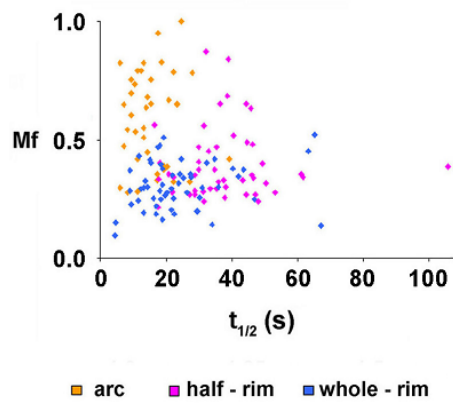
**A.****C.****B.****D.**



### 3.4.4 Πειράματα ανάκτησης φθορισμού με χρήση καμπυλόγραμμων περιοχών ενδιαφέροντος

Σε μια δεύτερη φάση πραγματοποιήθηκαν πειράματα FRAP σε κύτταρα που υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη FL με χρήση καμπυλόγραμμων ROIs που κάλυπταν ένα καμπυλόγραμμο τμήμα (τόξο) μήκους 10-90% της περιφέρειας του πυρήνα σε εγκάρσια τομή. Όμοια με πριν, παρατηρήθηκε μεγάλη διακύμανση τόσο στην έκταση όσο και στο ρυθμό ανάκτησης του φθορισμού (εικόνα 3.7A).

Όπως και στην περίπτωση των κυκλικών ROIs, η κατανομή του κινητικού κλάσματος όταν φωτοσκιάστηκε ένα καμπυλόγραμμο τμήμα του πυρηνικού φακέλου ήταν διασπαστική, ενώ με αύξηση του μεγέθους της ROI, η κατανομή γινόταν πιο «κωδωνοειδής» (Gauss) (εικόνα 3.7B). Αντίθετα, οι κατανομές του χρόνου ημι-ανάκτησης ήταν ανεξάρτητες του μεγέθους των ROIs (εικόνα 3.7C) και αρκετά διαφορετικές από τις αντίστοιχες κατανομές με χρήση κυκλικών ROIs. Από τη σύγκριση του κινητικού κλάσματος συναρτήσει του χρόνου ημι-ανάκτησης (εικόνα 3.7D) δεν διαπιστώθηκε άμεση συσχέτιση μεταξύ των δυο παραγόντων. Ωστόσο, συγκρίνοντας τις καμπύλες ανάκτησης φθορισμού με χρήση κυκλικής ROI διαμέτρου 1.5μm και καμπυλόγραμμου τμήματος μήκους 10% της περιφέρειας του πυρηνικού φακέλου (εικόνα 3.6A μπλε σημεία και εικόνα 3.7A πορτοκαλί σημεία), διαπιστώθηκε ότι η διακύμανση του κινητικού κλάσματος ήταν μεγαλύτερη στην τελευταία περίπτωση. Αυτό το αποτέλεσμα δε θα μπορούσε να εξηγηθεί μόνο από την ανομοιόμορφη κατανομή της πρωτεΐνης στον πυρηνικό φάκελο. Αν ίσχυε κάτι τέτοιο, η διακύμανση του κινητικού κλάσματος θα έπρεπε να ήταν μικρότερη στην περίπτωση σκίασης καμπυλόγραμμου τμήματος καθώς το ROI αυτό καλύπτει μεγαλύτερη επιφάνεια του πυρηνικού φακέλου. Επομένως, μέσω των πειραμάτων αυτών διαπιστώνεται η ύπαρξη μιας επιπλέον ασυμμετρίας, σε μεγαλύτερη κλίμακα, η οποία επηρεάζει το δείγμα με διαφορετικό τρόπο. Λαμβάνοντας υπόψη την αρχιτεκτονική του πυρηνικού φακέλου, οι καμπυλόγραμμες ROIs είναι πιθανό να αποτυπώνουν την ασυμμετρία μεταξύ της διεπιφάνειας του πυρηνικού φακέλου και του ενδοπλασματικού δικτύου.

**A.****C.****B.****D.**

**Εικόνα 3.7 Πειράματα FRAP με χρήση καμπυλόγραμμων ROIs.** (A) Χαρακτηριστικές καμπύλες ανάκτησης φθορισμού μετά από σκίαση καμπυλόγραμμων τμημάτων μήκους ~10% (n=41), ~50% (n=48) ή ~90% (n=57) της περιφέρειας του πυρήνα σε εγκάρσια τομή. (B) Η κατανομή συχνοτήτων του κινητικού κλάσματος (Mf). (C) Η αντίστοιχη κατανομή του χρόνου ημι-ανάκτησης  $t_{1/2}$ . (D) Διάγραμμα του κινητικού κλάσματος συναρτήσει του χρόνου ημι-ανάκτησης. Σε όλες τις περιπτώσεις το καμπυλόγραμμο τμήμα μήκους ~10% της περιφέρειας του πυρήνα σε εγκάρσια τομή (πάχος 1.7 $\mu$ m και μήκος 10 $\mu$ m) απεικονίζεται με πορτοκαλί χρώμα, το τμήμα μήκους ~50% με ροζ και το τμήμα μήκους ~90% με μπλε (βλ. προηγούμενη σελίδα).

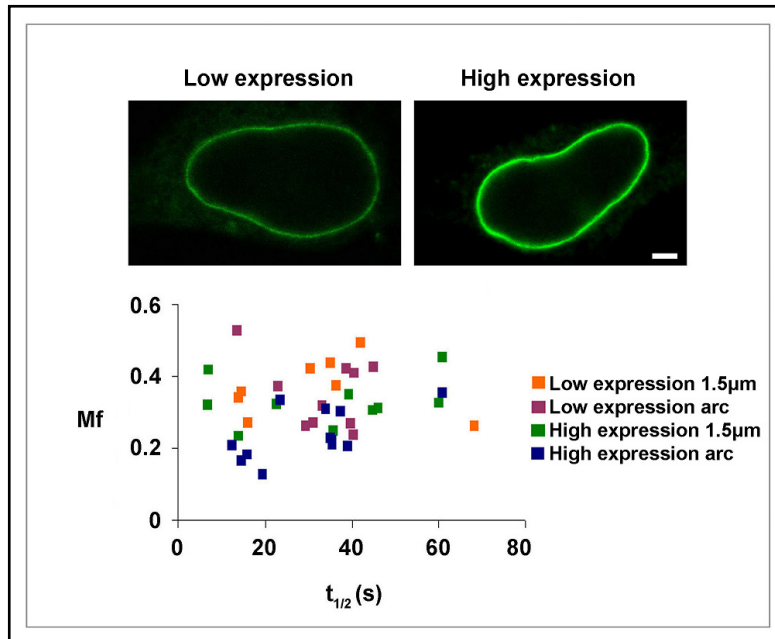
### 3.4.5 Συσχέτιση ποσοστού υπερέκφρασης της πρωτεΐνης και κινητικού κλάσματος

Θεωρώντας ότι κάθε κύτταρο περιέχει έναν προκαθορισμένο/συγκεκριμένο αριθμό περιοχών πρόσδεσης της πρωτεΐνης στον πυρηνικό φάκελο, μελετήθηκε αν το κινητικό κλάσμα επηρεάζονταν από τα επίπεδα έκφρασης της εξωγενούς πρωτεΐνης. Για το σκοπό αυτό, HeLa κύτταρα τα οποία υπερέκφραζαν την κατασκευή FL σε διαφορετικό βαθμό (διαφορά περίπου τρεις τάξεις μεγέθους μεταξύ χαμηλής και υψηλής έκφρασης) υπέστησαν φωτοσκίαση σε κυκλική περιοχή διαμέτρου 1.5 $\mu$ m ή σε καμπυλόγραμμο τμήμα του πυρηνικού φακέλου. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα της εικόνας 3.8, η κινητική του FL (Mf και  $t_{1/2}$ ) διέφερε από κύτταρο σε κύτταρο. Αυτή η διακύμανση ωστόσο, ήταν τελείως ανεξάρτητη του ποσοστού έκφρασης και δεν ακολουθούσε κάποιον κανόνα, υποδηλώνοντας ότι τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης δεν διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προαναφερθείσα διακύμανση της κινητικής της πρωτεΐνης.

### 3.4.6 Προσδιορισμός του κινητικού κλάσματος κατά μήκος της περιοχής φωτοσκίασης (bleach profile FRAP)

Μια πιθανή ερμηνεία των διακυμάνσεων που παρατηρήθηκαν στην κινητική του FL-LBR θα μπορούσε να είναι ότι η σκίαση της περιοχής ενδιαφέροντος δεν ήταν ομοιόμορφη κατά μήκος του άξονα των x, δίνοντας την «ψευδαίσθηση» ανομοιογενούς ανάκτησης του φθορισμού και κατ' επέκταση διακυμάνσεις στο κινητικό κλάσμα και το χρόνο ημι-ανάκτησης. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα FRAP όπου μετρήθηκε η ανάκτηση του φθορισμού κατά μήκος της περιοχής σκίασης (profile FRAP). HeLa κύτταρα τα οποία υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη FL φωτοσκιάστηκαν σε τμήμα του πυρηνικού φακέλου και μετρήθηκε η ανάκτηση του φθορισμού κατά μήκος της ROI ως συνάρτηση του χρόνου. Όπως φαίνεται από τα διαδοχικά στιγμιότυπα μετά την φωτοσκίαση (εικόνα 3.9A), η

ανάκτηση του φθορισμού κατά μήκος της περιοχής ενδιαφέροντος δεν ήταν ομοιόμορφη αλλά ούτε και σύγχρονη. Από το διάγραμμα έντασης φθορισμού συναρτήσεως της απόστασης επιβεβαιώθηκε ότι η αν και η φωτοσκίαση ήταν ομοιόμορφη σε ολόκληρη την περιοχή ενδιαφέροντος (χρόνος 35sec), ο φθορισμός ανακτήθηκε ανομοιόμορφα (χρόνος 308sec).



**Εικόνα 3.8** Η κινητική της πρωτεΐνης FL-LBR είναι ανεξάρτητη του βαθμού υπερέκφρασής της. Οι εικόνες απεικονίζουν χαρακτηριστικά παραδείγματα χαμηλής (low expression) ή υψηλής (high expression) έκφρασης της πρωτεΐνης. Διάγραμμα κινητικού κλάσματος συναρτήσεως του χρόνου ημι-ανάκτησης. Low expression 1.5µm: σκίαση κυτάρου με χαμηλή έκφραση του FL σε κυκλική περιοχή διαμέτρου 1.5µm, Low

expression arc: σκίαση κυτάρου με χαμηλή έκφραση του FL σε τμήμα του πυρηνικού φακέλου, High expression 1.5µm: σκίαση κυτάρου με υψηλή έκφραση του FL σε κυκλική περιοχή διαμέτρου 1.5µm, High expression arc: σκίαση κυτάρου με υψηλή έκφραση του FL σε τμήμα του πυρηνικού φακέλου (n=10).

Επιπρόσθετα, όταν μετρήθηκε ο ρυθμός ανάκτησης του φθορισμού (R) σε υποπεριοχές ίδιου μεγέθους (η ένταση φθορισμού σε κάθε χρονικό σημείο  $[I_x(t_i)]$  διακεντρική με την ένταση φθορισμού αμέσως μετά την σκίαση στην ίδια υποπεριοχή  $[I_x(t_0)]$ ) βρέθηκε ότι ο φθορισμός των μη σκιασμένων άκρων εκατέρωθεν της περιοχής ενδιαφέροντος μειωνόταν με τη πρόοδο του χρόνου  $[I_x(t_i)/I_x(t_0) < 1]$ , ενώ οι κεντρικές υποπεριοχές ανακτούσαν φθορισμό  $[I_x(t_i)/I_x(t_0) > 1]$ . Ωστόσο, ο ρυθμός ανάκτησης φθορισμού των κεντρικών υποπεριοχών δεν ήταν σταθερός και ποίκιλε κατά μήκος του άξονα των x, δημιουργώντας διακριτά «όρη και πεδιάδες» στο διάγραμμα του ρυθμού ανάκτησης (εικόνα 3.9A). Επιπλέον, ο φθορισμός των υποπεριοχών δεν αυξανόταν μονότονα αλλά εμφάνιζε και περιστασιακές μειώσεις. Στις περιπτώσεις αυτές, η μείωση στο ρυθμό ανάκτησης φθορισμού συνοδευόταν από παράλληλη αύξηση του φθορισμού σε γειτονικές υποπεριοχές,

υποδηλώνοντας ότι υποπεριοχές που είχαν προσωρινά συσσωρεύσει φθορίζοντα μόρια μπορούσαν να δράσουν ως «πηγές» για τις γειτονικές περιοχές.

### 3.4.7 Πειράματα ανάκτησης φθορισμού σε υποπεριοχές του πυρηνικού φακέλου

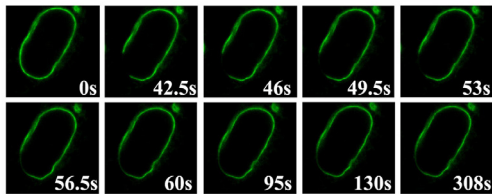
Για να διερευνηθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια κατά πόσο οι διακυμάνσεις της κινητικής οφείλονταν στην ετερογένεια του πληθυσμού (population heterogeneity) ή στην ασυμμετρία του πυρηνικού φακέλου, πραγματοποιήθηκαν πειράματα FRAP με ταυτόχρονη φωτοσκίαση περισσοτέρων του ενός (αλλά ομοίου μεγέθους) τμημάτων του πυρηνικού φακέλου. Για κάθε περιοχή ενδιαφέροντος εντός του ίδιου κυττάρου, υπολογίστηκε ο χρόνος ημι-ανάκτησης και από τις προκύπτουσες τιμές ο συντελεστής διακύμανσης του χρόνου ημι-ανάκτησης (coefficient of variation, CV). Όπως προκύπτει από την εικόνα 3.9B, ο συντελεστής διακύμανσης μεταξύ των περιοχών του ίδιου κυττάρου ήταν μερικές φορές πολύ μεγάλος ( $CV > 0.48$ ), προσεγγίζοντας το μέσο όρο/θόρυβο (average noise) του γενικού πληθυσμού των κυττάρων στην περίπτωση όπου φωτοσκιαζόταν μια ROI ανά κύτταρο (παράγραφος 3.4.4).

Σε μια δεύτερη σειρά πειραμάτων, πραγματοποιήθηκε σκίαση ενός μόνο τμήματος του πυρηνικού φακέλου και υπολογίστηκαν οι χρόνοι ημι-ανάκτησης σε τρεις ομοίου μεγέθους κυκλικές υποπεριοχές που κάλυπταν όλο το μήκος της ROI. Από τις προκύπτουσες τιμές (εικόνα 3.9C) προέκυψε ότι κάθε υποπεριοχή εμφάνιζε διαφορετική κινητική (διαφορετικές τιμές  $t_{1/2}$  μεταξύ των υποπεριοχών). Ωστόσο, ο συντελεστής διακύμανσης του χρόνου ημι-ανάκτησης μεταξύ διαφορετικών κυττάρων ήταν μικρότερος σε σύγκριση με αυτόν της προηγούμενης περίπτωσης (σκίαση τριών περιοχών στο ίδιο κύτταρο), υποδηλώνοντας ότι η ετερογένεια του πυρηνικού φακέλου (και του LBR) είναι λιγότερο εμφανής σε μικρή κλίμακα (short range).

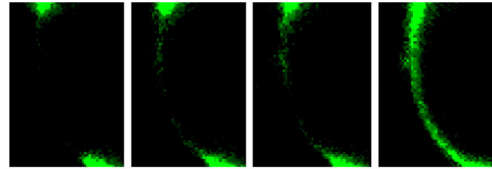
Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν ισχυρά την υπόθεση ότι οι παρατηρούμενες διακυμάνσεις της κινητικής δεν οφείλονται κατά κύριο λόγο στην ανομοιογένεια του κυτταρικού πληθυσμού (cell heterogeneity), αλλά περισσότερο στη δομική ασυμμετρία του πυρηνικού φακέλου.

A.

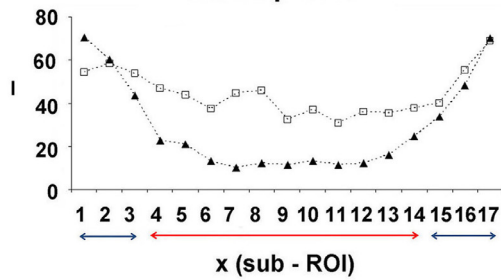
recovery series



detail

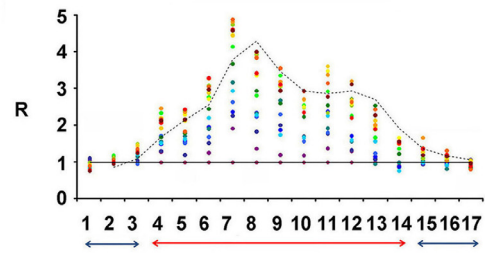


bleach profile

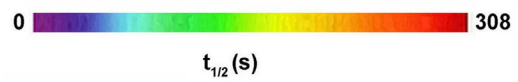


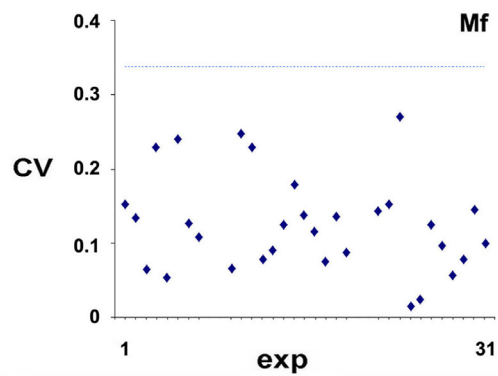
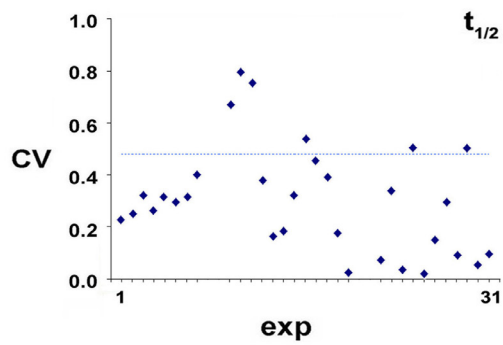
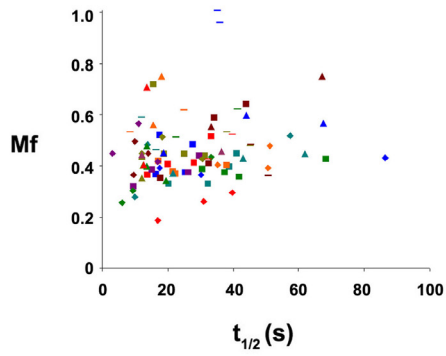
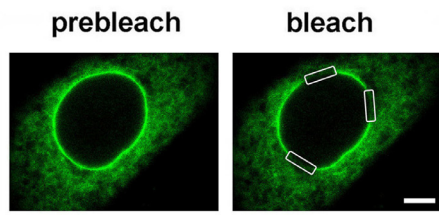
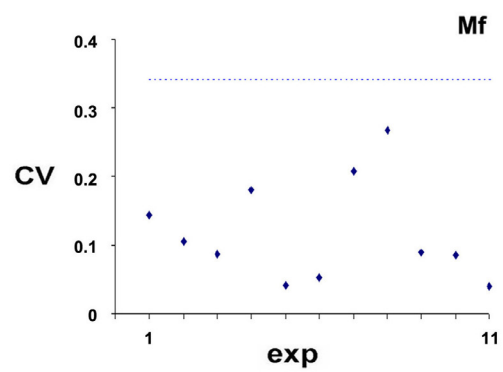
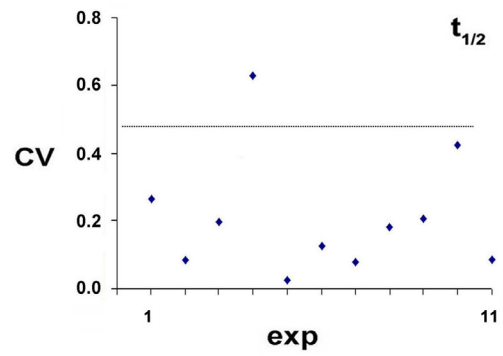
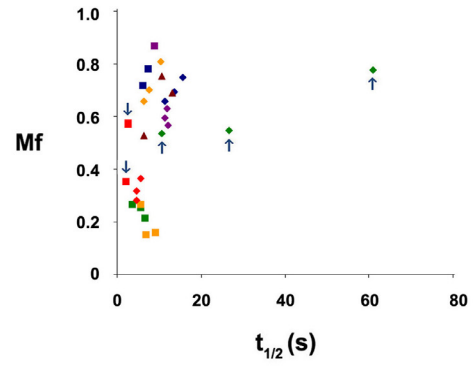
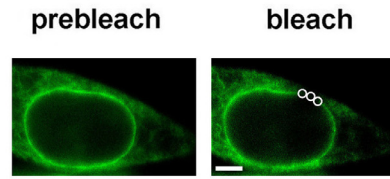
▲ 35 sec □ 308 sec

recovery profile



x (sub - ROI)



**B.****C.**

**Εικόνα 3.9 Χωρο-εξαρτώμενη διακύμανση της κινητικής του LBR.** (A). Πείραμα profile FRAP. Οι εικόνες παρουσιάζουν την ανάκτηση φθορισμού στην ίδια ROI (recovery series) και σε μεγαλύτερη μεγέθυνση σε τμήμα της περιοχής (detail). Στα διαγράμματα αναπαρίστανται η ένταση φθορισμού συναρτήσει της απόστασης (bleach profile) και ο ρυθμός ανάκτησης του φθορισμού (recovery profile) στην περιοχή ενδιαφέροντος και εκατέρωθεν αυτής (κόκκινα και μπλε βέλη αντίστοιχα). (I): ένταση φθορισμού, (x): μήκος της περιοχής, (R): ρυθμός ανάκτησης φθορισμού. Ο χρωματικός κώδικας υποδεικνύει το χρόνο από τη στιγμή σκίασης (35s) μέχρι το τέλος ανάκτησης του φθορισμού (308s). (B) Διακύμανση της κινητικής μεταξύ διαφορετικών περιοχών του πυρηνικού φακέλου. Οι εικόνες παρουσιάζουν ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα σκίασης κυττάρου σε τρεις ομοίου μεγέθους περιοχές του πυρηνικού φακέλου. Διαγράμματα  $Mf-t_{1/2}$  και συντελεστών διακύμανσης (CV) του κινητικού κλάσματος και του χρόνου ημι-ανάκτησης αντίστοιχα, μετά από σκίαση πολλαπλών περιοχών του πυρηνικού φακέλου (n=31). Ο «θόρυβος» που παρατηρείται στην περίπτωση σκίασης πολλαπλών περιοχών μερικές φορές είναι μεγαλύτερος από αυτόν που προκύπτει μετά από σκίαση μίας μόνο περιοχής ανά κύτταρο (διακεκομμένη γραμμή). (C) Διακύμανση της κινητικής εντός της περιοχής ενδιαφέροντος. Οι εικόνες παρουσιάζουν ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα σκίασης τμήματος του πυρηνικού φακέλου και καταγραφής της ανάκτησης φθορισμού σε υποπεριοχές αυτού. Διαγράμματα  $Mf-t_{1/2}$  και συντελεστών διακύμανσης του κινητικού κλάσματος και του χρόνου ημι-ανάκτησης αντίστοιχα, μετά από σκίαση τμήματος του πυρηνικού φακέλου και υπολογισμό των FRAP παραμέτρων για τρεις κυκλικές υποπεριοχές εντός του τμήματος (n=11). Στο διάγραμμα  $Mf-t_{1/2}$  τα βέλη σημειώνουν δυο χαρακτηριστικές περιπτώσεις κυττάρων με παραπλήσιο  $Mf$  και διαφορετικό χρόνο ημι-ανάκτησης (πράσινοι ρόμβοι) ή όμοιου  $t_{1/2}$  και διαφορετικού κινητικού κλάσματος (κόκκινα τετράγωνα) (βλ. προηγούμενη σελίδα).

### 3.5 Υπερέκφραση μεμβρανικών μεταλλαγμάτων σε HeLa κύτταρα και μελέτη της δυναμικής τους

Εφόσον, καθορίστηκε με ακρίβεια η κινητική της αγρίου τύπου πρωτεΐνης (FL) κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθούν οι κινητικές διαφόρων μεταλλαγμένων μορφών της, από τις οποίες απουσιάζουν ποικίλα μέρη του καρβοξυτελικού υδρόφοβου τμήματος του LBR (εικόνα 3.1B). Μεταξύ των μεταλλαγμάτων που εκφράστηκαν σε HeLa κύτταρα περιλαμβάνονταν η κατασκευή  $\Delta TMVIII,CT$  (από την οποία απουσιάζει η 8<sup>η</sup> διαμεμβρανική περιοχή και η καρβοξυτελική «ουρά» της πρωτεΐνης), η κατασκευή  $\Delta TMV-VIII,CT$  (έλλειψη των διαμεμβρανικών περιοχών 5-8 και της καρβοξυτελικής «ουράς») και η κατασκευή  $\Delta TMII-VIII,CT$  (η οποία αποτελείται από το αμινοτελικό τμήμα και την 1<sup>η</sup> διαμεμβρανική περιοχή της πρωτεΐνης). Οι δύο πρώτες κατασκευές αναλογούν σε μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης, οι οποίες απαντώνται στη δυσπλασία Greenberg και την ιχθύωση αντίστοιχα,

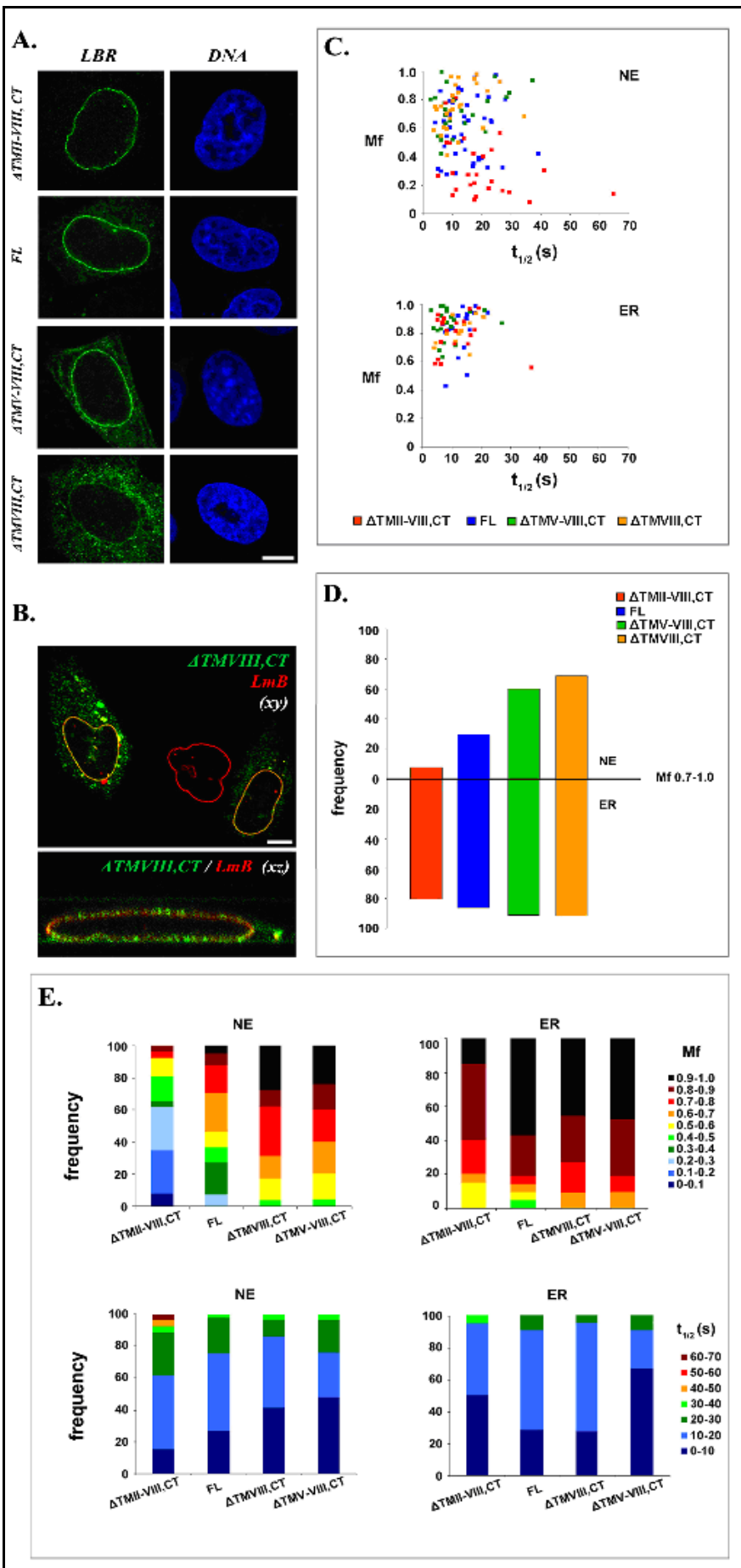


ενώ η κατασκευή ΔTMIII-VIII,CT αποτελεί το κυριότερο μετάλλαγμα που έχει χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενες μελέτες κινητικής της πρωτεΐνης.

### 3.5.1 Μελέτη της δυναμικής των ΔTMVIII,CT και ΔTMV-VIII,CT μεταλλαγμάτων

Μετά από έκφραση των πρωτεϊνών ΔTMVIII,CT και ΔTMV-VIII,CT σε HeLa κύτταρα, ο φθορισμός εντοπίστηκε στον πυρηνικό φάκελο, όμοια με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη FL (εικόνα 3.10A). Ωστόσο, η υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη ΔTMVIII,CT συσσωρευόταν στο ενδοπλασματικό δίκτυο σε μεγαλύτερο ποσοστό από την πρωτεΐνη FL, σχηματίζοντας έγκλειστα σε 20% περίπου των διαμολυσμένων κυττάρων (εικόνα 3.10B). Μερικές φορές στα συσσωματώματα αυτά εντοπιζόταν και η λαμίνη B, υποδηλώνοντας «παγίδευση» των πυρηνικών λαμινών λόγω της έκτοπης έκφρασης του LBR.

Πειράματα FRAP με σκίαση καμπυλόγραμμων τμημάτων του πυρηνικού φακέλου, σε HeLa κύτταρα, έδωσαν διακυμάνσεις στις κινητικές των δυο πρωτεϊνών (εικόνα 3.10C), σε πλήρη συμφωνία με την πρωτεΐνη FL. Ωστόσο, παρά τις διακυμάνσεις, διαπιστώθηκε ότι οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες ήταν πιο κινητικές από τον FL στο πυρηνικό φάκελο, ενώ η διαφορά αυτή μειωνόταν σημαντικά στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Αυτό έγινε καλύτερα αντιληπτό όταν υπολογίστηκαν οι σχετικές συχνότητες των κινητικών κλασμάτων κάθε πρωτεΐνης (frequency distributions): στον πυρηνικό φάκελο οι πιθανότητες ανίχνευσης κινητικών κλασμάτων μεγαλύτερων του 0.7 ( $Mf > 0.7$ ) για τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες ήταν διπλάσια σε σχέση με την πιθανότητα της πρωτεΐνης FL, ενώ στην περίπτωση του ενδοπλασματικού δικτύου οι αντίστοιχες διαφορές ήταν πολύ μικρότερες (εικόνα 3.10D και E).

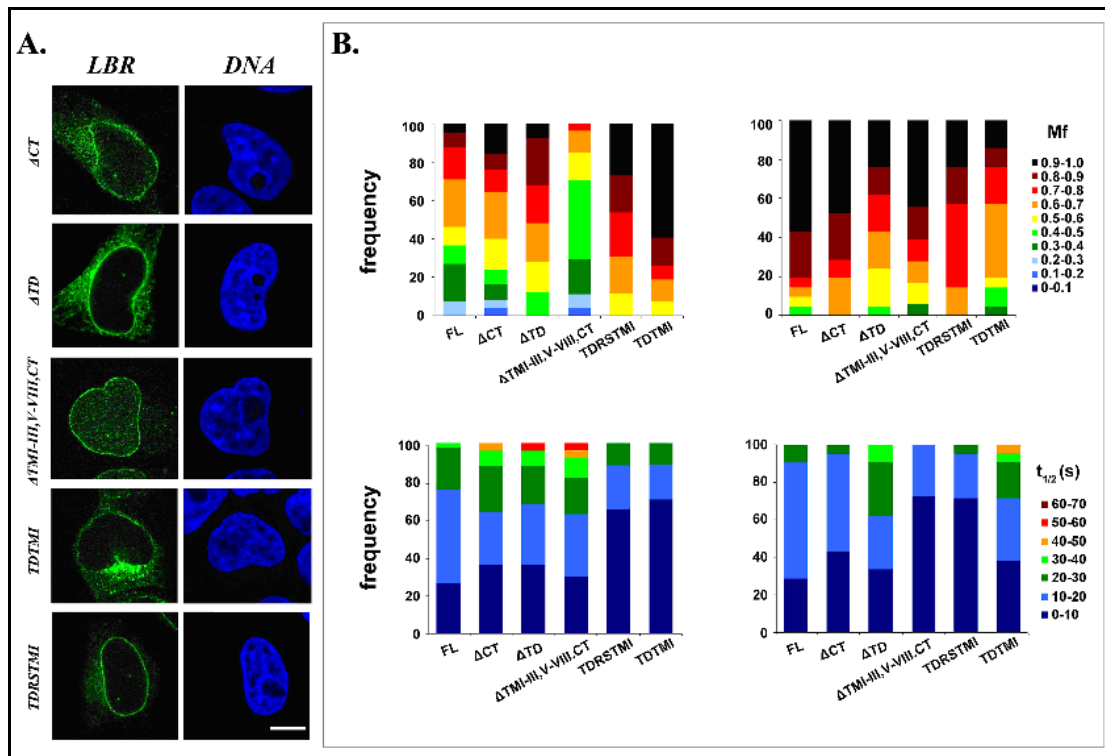


**Εικόνα 3.10 Εντοπισμός και δυναμική των μεμβρανικών πρωτεϊνών ΔTMII-VIII,CT, ΔTMV-VIII,CT και ΔTMVIII,CT στα HeLa κύτταρα.** (A) Οι πρωτεΐνες ΔTMII-VIII,CT, ΔTMV-VIII,CT και ΔTMVIII,CT κατανέμονται στον πυρηνικό φάκελο όπως η πρωτεΐνη FL-LBR. (B) Έμμεσος ανοσοφθορισμός κυττάρων που υπερεκφράζουν το μετάλλαγμα ΔTMVIII,CT με αντισώματα για τη λαμίνη Β (LmB). Σε μερικά κύτταρα, τα κυτταροπλασματικά έγκλειστα του LBR φαίνεται να περιέχουν λαμίνη Β. (C) Διαγράμματα κινητικού κλάσματος συναρτήσεως του χρόνου ημι-ανάκτησης ( $Mf-t_{1/2}$ ) μετά από σκίαση καμπυλόγραμμου τμήματος του πυρηνικού φακέλου (NE) ή κυκλικής περιοχής διαμέτρου 3μm του ενδοπλασματικού δικτύου (ER). (D) Διάγραμμα σχετικών συχνοτήτων κινητικού κλάσματος μεγαλύτερου του 0.7 ( $Mf$  0.7-1.0) για τις προαναφερθείσες πρωτεΐνες τόσο στον πυρηνικό φάκελο όσο και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. (E) Διαγράμματα σχετικών συχνοτήτων των κινητικών κλασμάτων και του χρόνου ημι-ανάκτησης των πρωτεϊνών, στον πυρηνικό φάκελο και το ενδοπλασματικό δίκτυο ( $n \geq 30$ ) (βλ. προηγούμενη σελίδα).

### 3.5.2 Μελέτη της δυναμικής άλλων μεμβρανικών μεταλλαγμάτων

Στη συνέχεια μελετήθηκαν οι κινητικές διαφορών μεμβρανικών μεταλλαγμάτων του LBR σε HeLa κύτταρα, με σκίαση καμπυλόγραμμων τμημάτων του πυρηνικού φακέλου. Στην περίπτωση του μεταλλάγματος-μοντέλου ΔTMII-VIII,CT, η κινητική του στον πυρηνικό φάκελο ήταν σημαντικά μικρότερη από αυτή του πλήρους μορίου, ενώ στο ενδοπλασματικό δίκτυο η διαφορά τους μειωνόταν αρκετά (εικόνα 3.10D και E). Για να διαπιστωθεί αν αυτό το αποτέλεσμα οφειλόταν σε μια ιδιαιτερότητα της πρώτης διαμεμβρανικής περιοχής κατασκευάστηκε το μετάλλαγμα ΔTMI-III,V-VIII,CT, το οποίο έχει την αμινοτελική «ουρά» της πρωτεΐνης συνδεδεμένη με την 4<sup>η</sup> διαμεμβρανική περιοχή (λείπουν οι διαμεμβρανικές περιοχές 1-3, 5-8 και το καρβοξυτελικό άκρο). Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.11, η «μέση» κινητική της πρωτεΐνης είναι πολύ όμοια με αυτή της ΔTMII-VIII,CT, τόσο στον πυρηνικό φάκελο όσο και στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

Στην περίπτωση που απουσίαζαν από την αμινοξική αλληλουχία η αμινοτελική περιοχή TD ή το καρβοξυτελικό άκρο CT, τα μεταλλάγματα (ΔTD και ΔCT αντίστοιχα) εντοπίζονταν στο πυρηνικό φάκελο, εμφάνιζαν ωστόσο διαφορετικές κινητικές, με την πρωτεΐνη ΔTD να είναι σχετικά πιο κινητική στον πυρηνικό φάκελο (εικόνα 3.11). Επίσης, ενώ η κατανομή του μεταλλάγματος TDRSTMI ήταν πολύ όμοια με αυτή του FL, τα περισσότερα από τα κύτταρα που εξέφραζαν το μετάλλαγμα TDTMI παρουσίαζαν διάφορες ανωμαλίες, όπως σχηματισμό εγκλείστων ή κενοτοπίων στο κυτταρόπλασμα. Όσον αφορά τις κινητικές των δυο πρωτεϊνών, αυτές ήταν πολύ όμοιες μεταξύ τους αλλά και παρόμοιες με αυτές των μεταλλαγμάτων ΔTMVIII,CT, ΔTMV-VIII,CT και ΔTD (εικόνα 3.11).



**Εικόνα 3.11** Εντοπισμός και δυναμική των μεμβρανικών πρωτεϊνών  $\Delta$ CT,  $\Delta$ TD,  $\Delta$ TMI-III,V-VIII,CT, TDTMI και TDRSTMI στα HeLa κύτταρα. (A) Όλες οι πρωτεΐνες κατανέμονται στον πυρηνικό φάκελο αλλά και στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπως ο FL-LBR. (B) Διαγράμματα σχετικής συχνότητας του κινητικού κλάσματος και του χρόνου ημι-ανάκτησης των πρωτεϊνών στον πυρηνικό φάκελο και το ενδοπλασματικό δίκτυο ( $n \geq 20$ ).

### 3.6 Υπερέκφραση «διαλυτών» μεταλλαγμάτων σε HeLa κύτταρα και μελέτη της δυναμικής τους

Σε μια επόμενη σειρά πειραμάτων, μελετήθηκε η κινητική διαφόρων «διαλυτών» μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης. Επτά μεταλλάγματα, τα οποία δεν περιείχαν καμία διαμεμβρανική περιοχή (εικόνα 3.1B), εκφράστηκαν σε HeLa κύτταρα και εξετάστηκαν οι κατανομές και οι δυναμικές τους. Όπως φαίνεται στις εικόνες 3.12A και 3.13A, καμία από τις πρωτεΐνες δεν εντοπίστηκε στον πυρηνικό φάκελο, υποδηλώνοντας τη σημασία των διαμεμβρανικών περιοχών στην αγκυροβόληση του LBR στην πυρηνική μεμβράνη. Επιπλέον, τα μεταλλάγματα που περιείχαν την επαναλαμβανόμενη αλληλουχία RS (RS, TDRSGD, TDRS και RSGD) εντοπίζονταν μόνο στο πυρηνόπλασμα, ενώ αυτά από τα οποία έλειπε η περιοχή RS (TD, GD, CT) εντοπίζονταν σε όλο το κύτταρο, όμοια με την κατανομή της πρωτεΐνης EGFP.

### 3.6.1 Μελέτη της δυναμικής της αμινοτελικής περιοχής της πρωτεΐνης (TDRSGD)

Το αμινοτελικό τμήμα του LBR (TDRSGD) προβάλλει προς το πυρηνόπλασμα και αποτελεί το κύριο λειτουργικό τμήμα της πρωτεΐνης. Βιοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι η περιοχή συνδέεται με τη χρωματίνη και τις λαμίνες (Makatsori et al., 2004) ενώ παράλληλα φέρει αλληλουχία NLS εισέρχεται στον πυρήνα και παραμένει εκεί μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Κύριος στόχος λοιπόν των επόμενων πειραμάτων ήταν να διευκρινιστεί ο βαθμός σύνδεσης της πρωτεΐνης αυτής και η δυναμική της.

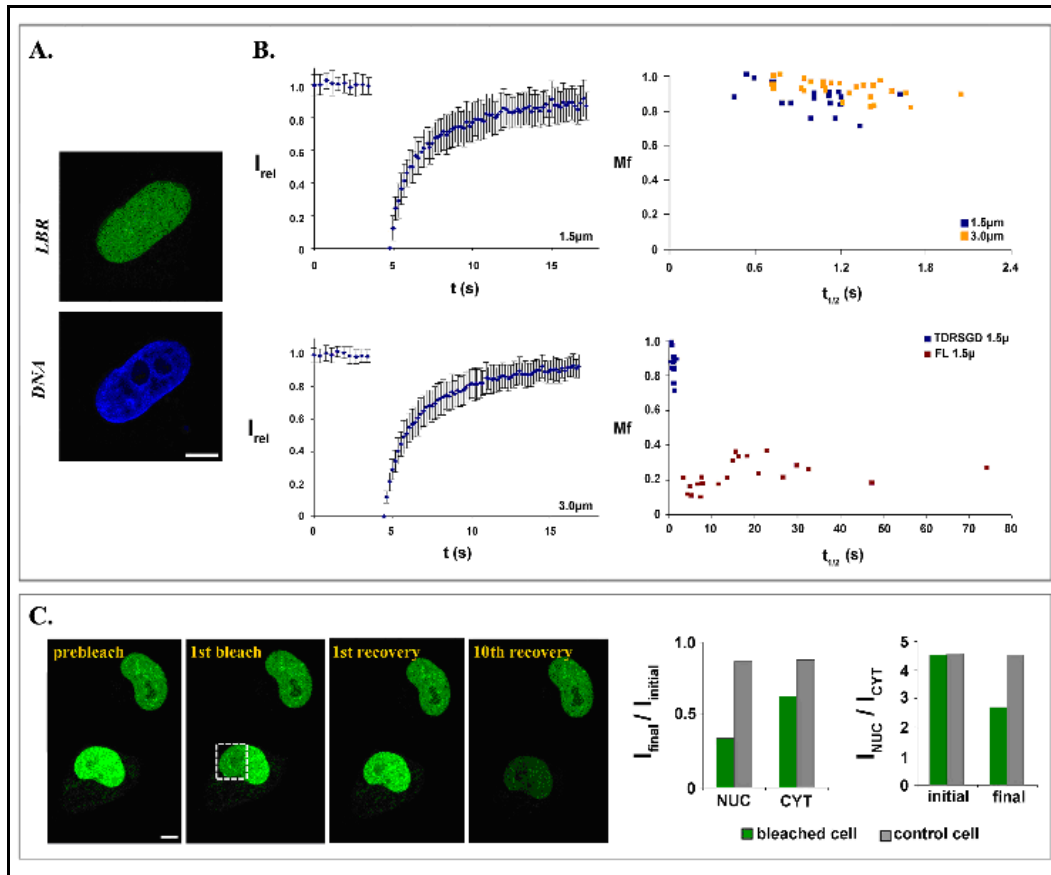
Για το σκοπό αυτό, HeLa κύτταρα τα οποία υπερέκφραζαν το μετάλλαγμα TDRSGD υπέστησαν φωτοσκίαση σε κυκλική ROI διαμέτρου 3.0 $\mu$ m εντός του πυρηνόπλασματος. Σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες που περιείχαν διαμεμβρανικά τμήματα, η δυναμική της πρωτεΐνης (τόσο το  $Mf$  όσο και το  $t_{1/2}$ ) παρουσίασε ελάχιστη διακύμανση (εικόνα 3.12B). Για να επιβεβαιωθεί ότι αυτό δεν ήταν αποτέλεσμα των διαφορετικών συνθηκών των FRAP πειραμάτων (σε σχέση με τις συνθήκες των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών), πραγματοποιήθηκαν πειράματα FRAP με χρήση κυκλικής ROI διαμέτρου 1.5 $\mu$ m και συνθηκών όμοιων με αυτών των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών (pinhole στα 4.0A). Όπως προκύπτει από το αντίστοιχο διάγραμμα, η κινητική της πρωτεΐνης ήταν ανεξάρτητη των συνθηκών πραγματοποίησης των πειραμάτων και παρέμεινε γρήγορη (τιμές  $t_{1/2}$  από 0.5sec έως 2.0sec).

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε πείραμα FLIP με παρατεταμένη φωτοσκίαση τμήματος του πυρηνόπλασματος για 8.47 λεπτά. Από την ανάλυση των δεδομένων (εικόνα 3.12C), προέκυψε ότι η ανταλλαγή μορίων μεταξύ των δυο περιοχών του πυρηνόπλασματος (σκιασμένη και μη) ήταν γρηγορότερη σε σχέση με το κυτταρόπλασμα, υποδηλώνοντας ότι η πρωτεΐνη καθυστερεί χρονικά διαπερνώντας τα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων.

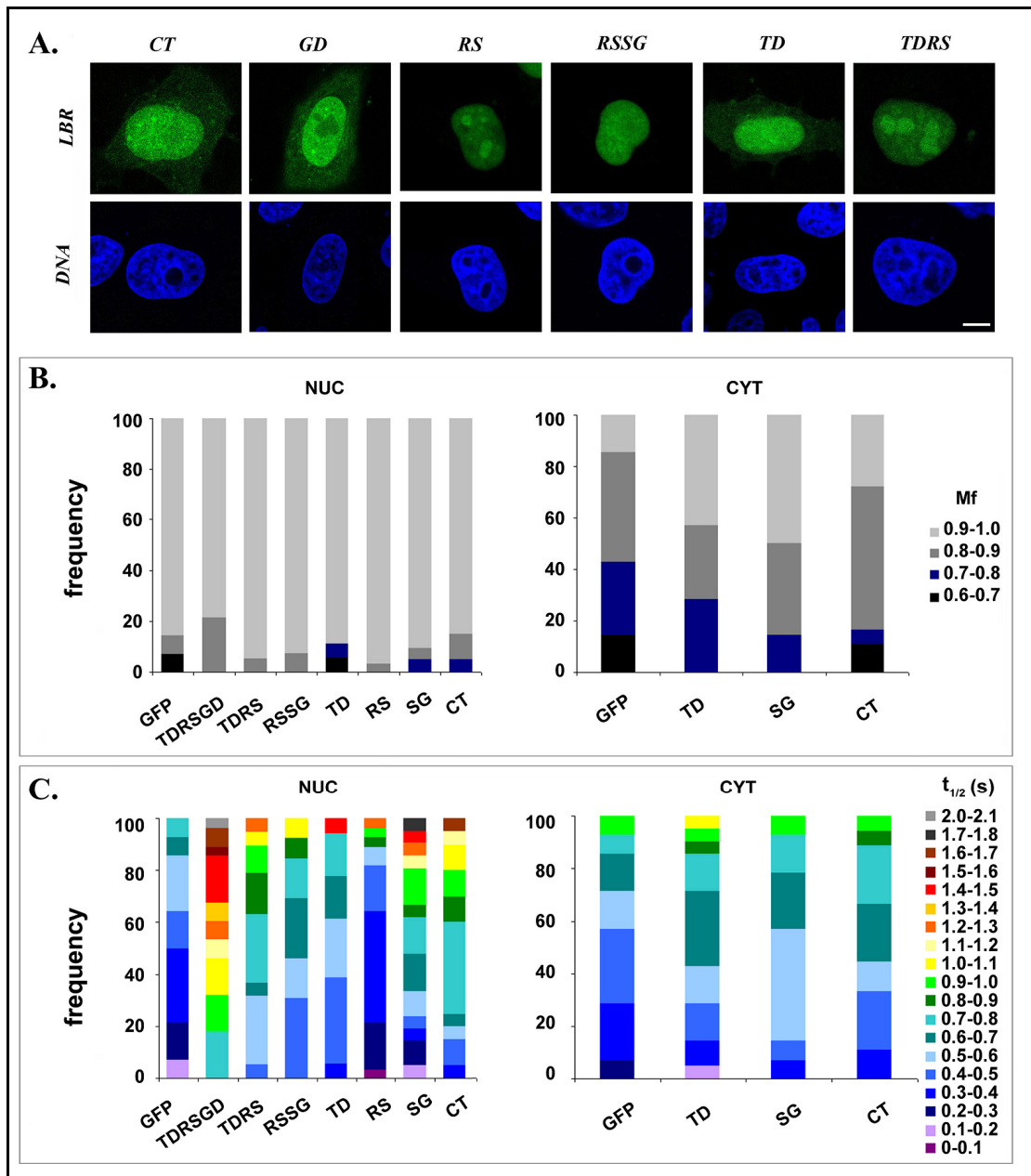
### 3.6.2 Μελέτη της δυναμικής άλλων διαλυτών μεταλλαγμάτων

Για τη μελέτη της κινητικής των διαλυτών μεταλλαγμάτων RS, TDRS, RSGD, TD, GD και CT, HeLa κύτταρα σκιάστηκαν σε κυκλική ROI διαμέτρου 3.0 $\mu$ m στο πυρηνόπλασμα ή στο κυτταρόπλασμα. Ο φθορισμός της ROI ανακτήθηκε σε μεγάλο ποσοστό ( $Mf > 0.7$ ) και, σε αντιδιαστολή με τα μεμβρανικά μεταλλάγματα, οι διακυμάνσεις των κινητικών κλασμάτων μεταξύ των δειγμάτων ήταν πολύ μικρές. Επιπρόσθετα, οι χρόνοι ημι-ανάκτησης κυμαίνονταν από 0.3s έως 1.8s, υποδηλώνοντας πολύ γρήγορη ανταλλαγή μορίων τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα (εικόνα 3.13B και C). Συγκρίνοντας

τις κινητικές των μεταλλαγμάτων, διαπιστώθηκε ότι αυτές ήταν παρόμοιες μεταξύ τους και όμοιες με την κινητική της EGFP πρωτεΐνης, υποδηλώνοντας απουσία ισχυρών συνδέσεων με το υποκείμενο δίκτυο της χρωματίνης ή των λαμινών.



**Εικόνα 3.12** Εντοπισμός και δυναμική της αμινοτελικής περιοχής της πρωτεΐνης LBR (TDRSGD). (A) Κατανομή της πρωτεΐνης TDRSGD μετά από υπερέκφραση σε HeLa κύτταρα. (B) Καμπύλες ανάκτησης φθορισμού της πρωτεΐνης TDRSGD μετά από σκίαση κυκλικής ROI διαμέτρου 1.5  $\mu\text{m}$  ή 3.0  $\mu\text{m}$  ( $n=30$ ). Σύγκριση της δυναμικής ( $Mf-t_{1/2}$ ) των πρωτεϊνών TDRSGD με χρήση ROI 1.5  $\mu\text{m}$ , TDRSGD με χρήση ROI 3.0  $\mu\text{m}$  και FL με χρήση ROI 1.5  $\mu\text{m}$ . Η διακύμανση των FRAP δεδομένων της πρωτεΐνης TDRSGD είναι πολύ μικρότερη σε σύγκριση με αυτή του FL. (C) Τυπικό πείραμα FLIP της πρωτεΐνης TDRSGD μετά από 10 διαδοχικούς κύκλους φωτοσκίασης-ανάκτησης. Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν τις αλλαγές στην ένταση φθορισμού ( $I_{final}/I_{initial}$ ) στο νουκλεόπλασμα (NUC) και στο κυτταρόπλασμα (CYT) τόσο του κυττάρου που υπέστη φωτοσκίαση (bleached cell) όσο και ενός γειτονικού κυττάρου ελέγχου (control cell).



**Εικόνα 3.13** Εντοπισμός και δυναμική των «διαλυτών» μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης LBR.

(A) Κατανομή των πρωτεϊνών CT, GD, RS, RSSG, TD και TDRS μετά από υπερέκφραση σε HeLa κύτταρα. (B) Διαγράμματα σχετικής συχνότητας του κινητικού κλάσματος των πρωτεϊνών στο πυρηνόπλασμα (NUC) και στο κυτταρόπλασμα (CYT). (C) Διαγράμματα σχετικής συχνότητας του χρόνου ημι-ανάκτησης των πρωτεϊνών στο πυρηνόπλασμα και στο κυτταρόπλασμα. Για την πραγματοποίηση των FRAP πειραμάτων, οι πρωτεΐνες υπέστησαν φωτοσκίαση σε κυκλική ROI διαμέτρου 3.0 $\mu$ m ( $n \geq 30$ ).

### **3.7 Δημιουργία και χαρακτηρισμός σταθερών κυτταρικών σειρών βλαστικών κυττάρων ποντικού οι οποίες υπερεκφράζουν τον LBR**

Για να μελετηθεί ο λειτουργικός ρόλος του LBR και των μεταλλάξεων που απαντώνται στις ασθένειες της ιχθύωσης (icj) και της δυσπλασίας Greenberg σε αναπτυξιακό πλαίσιο, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού (E14). Οι αμινοξικές αλληλουχίες των πρωτεϊνών FL, ΔTMV-VIII,CT και ΔTMVIII,CT υποκλωνοποιήθηκαν στον επισωματικό φορέα pPyCAGIP και χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση των E14 κυττάρων. Μετά από επιλογή των κυττάρων με πουρομυκίνη επιβίωσαν/παρήχθησαν είκοσι πέντε κυτταρικές σειρές που εξέφραζαν σταθερά τις τρεις πρωτεΐνες. Για την πραγματοποίηση των σχετικών πειραμάτων και με βάση τα ποσοστά υπερέκφρασης, επιλέχθηκαν τρεις κλώνοι από κάθε περίπτωση με την ονομασία F25, C28 και B12 (αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες FL, ΔTMV-VIII,CT και ΔTMVIII,CT αντίστοιχα), ενώ για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων ελέγχθηκαν και άλλοι τρεις κλώνοι. Όπως προέκυψε από πειράματα ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (εικόνα 3.14A), οι κλώνοι F25, C28 και B12 παρουσίαζαν 4 έως 8 φορές υψηλότερα επίπεδα LBR-mRNA, σε σύγκριση με τα E14 κύτταρα.

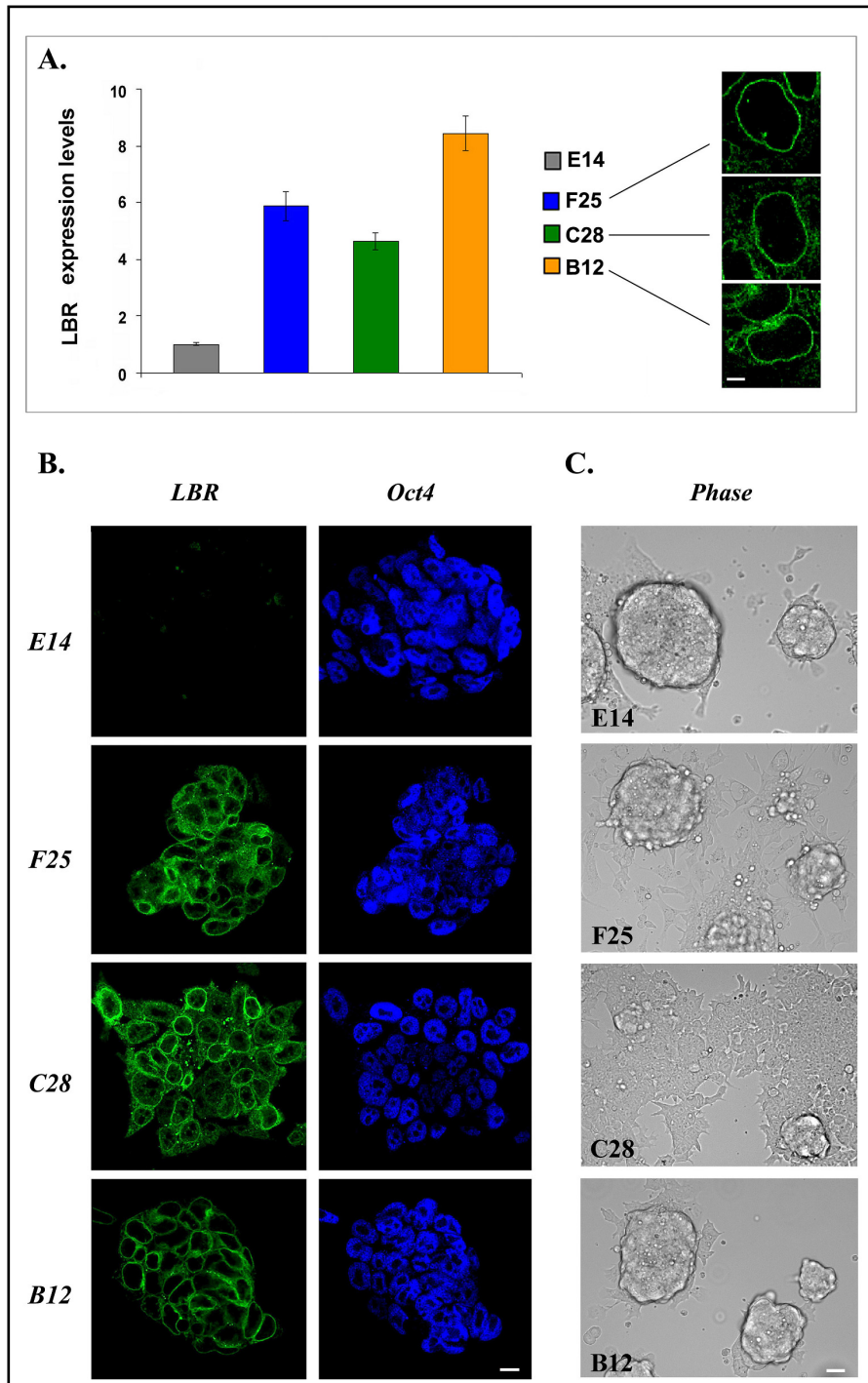
#### **3.7.1 Υπερέκφραση του LBR σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού και πολυδυναμία**

Στη συνέχεια, μελετήθηκε αν η υπερέκφραση της αγρίου τύπου πρωτεΐνης ή των μεταλλαγμένων μορφών αυτής επηρεάζει την πολυδυναμία των κυττάρων. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού έναντι του μεταγραφικού παράγοντα Oct4, μιας από τις σημαντικότερες πρωτεΐνες προσδιορισμού της βλαστικότητας των κυττάρων. Όπως παρατηρείται στην εικόνα 3.14B, οι αποικίες κυττάρων των κλώνων F25, C28 και B12 ήταν θετικές έναντι του παράγοντα Oct4 και σε παρόμοια επίπεδα με τα E14 κύτταρα.

Μια σημαντική διαφορά μεταξύ των κλώνων ήταν ότι κάποιοι δεν παρουσίαζαν την τυπική μορφολογία των βλαστικών κυττάρων. Αυτό ήταν ιδιαίτερα εμφανές στις αποικίες του κλώνου C28 που είχαν πολύ συχνά επίπεδη εμφάνιση, αλλά και στην περίπτωση του κλώνου F25, ο οποίος περιείχε μεγάλο αριθμό κυττάρων «ανάμεσα» στις αποικίες (εικόνα 3.14C).

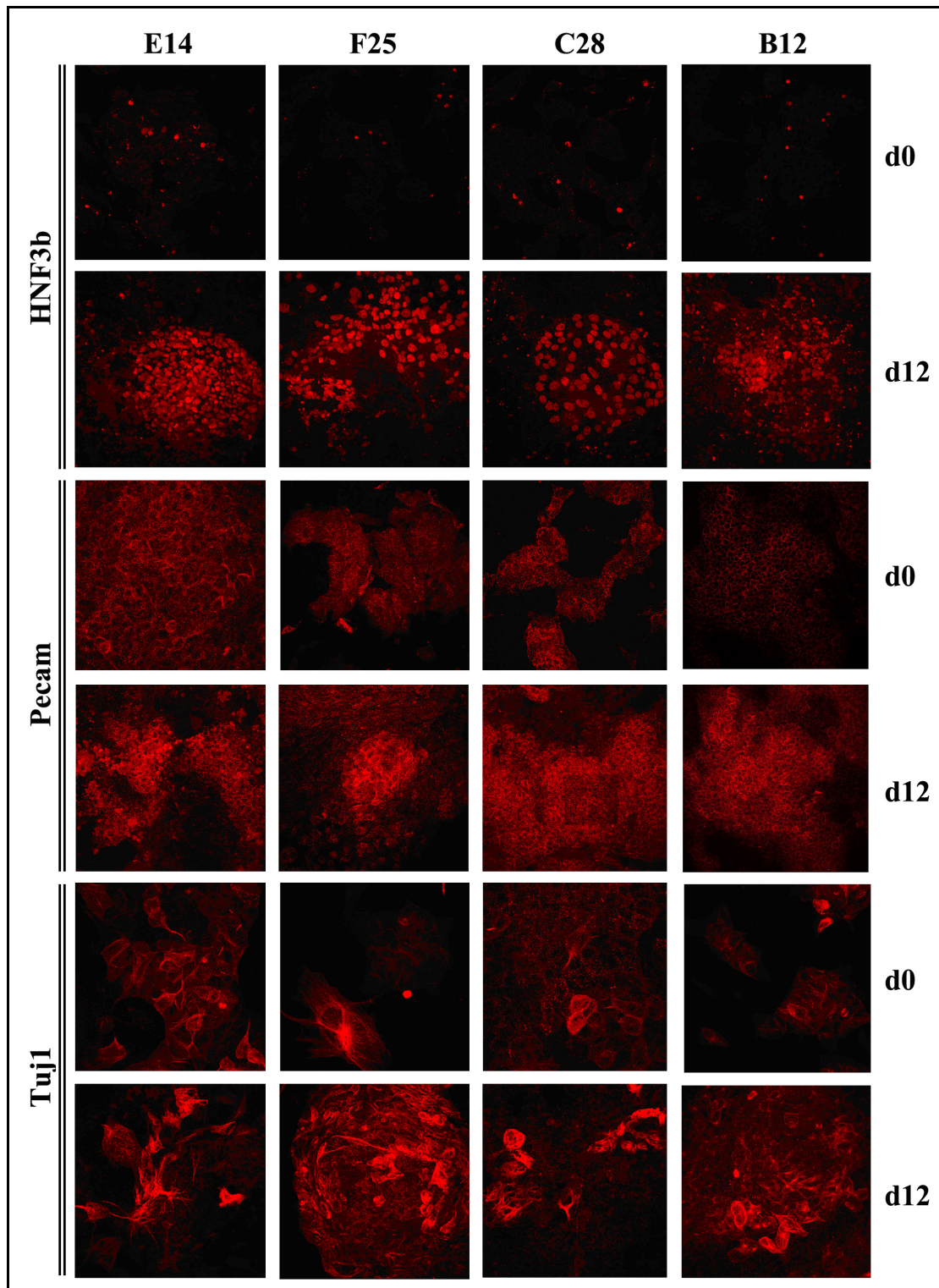


Για να προσδιοριστεί το αναπτυξιακό δυναμικό των κυττάρων, τα κύτταρα αφέθηκαν για διαφοροποίηση απουσία του παράγοντα LIF και μελετήθηκε η έκφραση ιστο-ειδικών δεικτών. Η εικόνα 3.15 παρουσιάζει αποτελέσματα μετά από ανοσοφθορισμό των κυττάρων έναντι δεικτών για τα τρία δέρματα (μεσόδερμα, εξώδερμα, ενδόδερμα), υποδηλώνοντας ότι και οι τρεις κλώνοι είναι ικανοί να διαφοροποιηθούν πλήρως.



**Εικόνα 3.14** Χαρακτηρισμός των σταθερών κυτταρικών σειρών βλαστικών κυττάρων οι οποίες υπερεκφράζουν LBR πρωτεΐνες. (A) Επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης LBR στους κλώνους E14, F25, C28 και B12 μετά από ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR). Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν πριμοδοτικές αλληλουχίες έναντι της αμινοτελικής περιοχής της πρωτεΐνης και τα γραφήματα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών πειραμάτων. (B) Έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης Oct4. (C) Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου μετά από καλλιέργεια των κλώνων παρουσία του παράγοντα LIF. Παρατηρείται η πιο επίπεδη

εμφάνιση του κλώνου C28 σε αντιδιαστολή με την χαρακτηριστική μορφολογία των αποικιών των βλαστικών κυττάρων E14.



**Εικόνα 3.15 Αναπτυξιακό δυναμικό των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων που υπερεκφράζουν LBR πρωτεΐνες.** Τα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν απουσία του παράγοντα LIF για δώδεκα ημέρες και πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός έναντι πρωτεϊνών κάθε δέρματος. Όλοι οι κλώνοι ήταν ικανοί να διαφοροποιηθούν. HNF3b: Hepatocyte nuclear factor 3b ή FOXA2, ενδοδερματικός δείκτης, Pecam: Platelet endothelial cell adhesion molecule, μεσοδερματικός δείκτης, Tuj1: Neuron-specific class III beta-tubulin, εξωδερματικός δείκτης.

### 3.7.2 Υπερέκφραση του LBR σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και κυτταρικός κύκλος

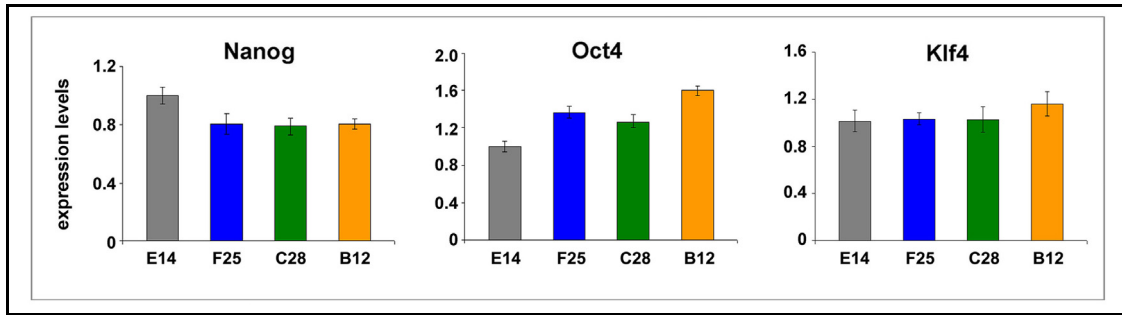
Για να επιβεβαιωθεί ότι η υπερέκφραση του LBR δεν επηρεάζει την πολυδυναμία των βλαστικών κυττάρων πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου στην αδιαφοροποίητη και διαφοροποιημένη κατάσταση αυτών (εικόνα 3.16). Παρουσία του παράγοντα LIF, όλοι οι κλώνοι είχαν κυτταρικό κύκλο ανάλογο των βλαστικών κυττάρων (E14), με χαρακτηριστικά μικρότερο ποσοστό κυττάρων στην G1 φάση και μεγαλύτερο στην S φάση. Επιπρόσθετα, διαφοροποίηση των κυττάρων σε δυο διαστάσεις (2D), επέφερε αλλαγή του κυτταρικού κύκλου, με σημαντική αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στην G1 φάση, υποδηλώνοντας ότι η διαδικασία της διαφοροποίησης προχωρούσε φυσιολογικά.

day 0				day 6			
% cells	F25	C28	B12	% cells	F25	C28	B12
<b>pre-G1</b>	<b>0.20</b>	<b>0.56</b>	<b>0.32</b>	<b>pre-G1</b>	<b>3.00</b>	<b>6.89</b>	<b>2.67</b>
<b>G1</b>	<b>30.37</b>	<b>26.37</b>	<b>25.51</b>	<b>G1</b>	<b>50.89</b>	<b>51.50</b>	<b>52.56</b>
<b>S</b>	<b>41.43</b>	<b>44.57</b>	<b>48.23</b>	<b>S</b>	<b>27.91</b>	<b>30.60</b>	<b>27.56</b>
<b>G2/M</b>	<b>28.97</b>	<b>29.66</b>	<b>27.54</b>	<b>G2/M</b>	<b>18.85</b>	<b>11.64</b>	<b>17.73</b>

**Εικόνα 3.16** Κυτταρικός κύκλος των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων τα οποία υπερεκφράζουν LBR πρωτεΐνες. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία του παράγοντα LIF (day0) ή απουσία του παράγοντα για έξι ημέρες (day6) και εν συνεχεία μετρήθηκε το ποσοστό των κυττάρων σε κάθε στάδιο του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής (FACS).

### 3.8 Η υπερέκφραση του LBR σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα επηρεάζει τις διακυμάνσεις και τα επίπεδα του Nanog

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση της πρωτεΐνης Nanog παρουσιάζει χαρακτηριστικές διακυμάνσεις στην αδιαφοροποίητη κατάσταση των βλαστικών κυττάρων (Kalmar et al., 2009). Κύριο ερώτημα λοιπόν ήταν αν η υπερέκφραση της αγρίου τύπου πρωτεΐνης ή των μεταλλαγμένων μορφών της επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης του Nanog. Ανάλυση των τριών κλώνων με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έδειξε μικρή (~20%) μείωση του Nanog-mRNA σε σχέση με τα βλαστικά κύτταρα E14, πράγμα το οποίο δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση άλλων μεταγραφικών παραγόντων (Oct4 και Klf4) (εικόνα 3.17).



**Εικόνα 3.17** Επίπεδα έκφρασης τριών παραγόντων πολυδυναμίας σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα τα οποία υπερεκφράζουν LBR πρωτεΐνες. Τα επίπεδα mRNA των παραγόντων πολυδυναμίας Nanog, Oct4 και Klf4 στα βλαστικά κύτταρα E14 και τους κλώνους F25, C28 και B12, μετά από ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR). Τα δεδομένα αναπαριστούν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

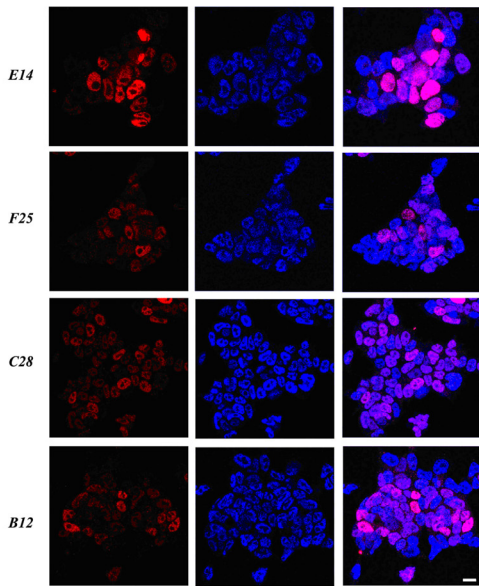
Είναι γνωστό ότι στην αδιαφοροποίητη κατάσταση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, τα επίπεδα έκφρασης των Oct4 και Nanog συσχετίζονται, το οποίο αναπαριστάται άμεσα από τον συντελεστή συσχέτισης Pearson ( $r$ ). Όσο πιο μεγάλη είναι η τιμή του  $r$ , τόσο πιο πολυδύναμα θεωρούνται τα κύτταρα (Munoz-Descalzo et al, 2012). Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού έναντι των πρωτεϊνών Nanog και Oct4, ποσοτικοποίηση της έντασης φθορισμού και στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων. Παρατηρώντας τις αποικίες διαπιστώθηκε ότι σε αντίθεση με τα κύτταρα E14, οι κλώνοι F25, C28 και B12 δεν περιείχαν κύτταρα που εκφράζουν υψηλά ή πολύ μικρά ποσοστά της πρωτεΐνης Nanog (εικόνα 3.18A). Υπολογίζοντας το συντελεστή συσχέτισης Pearson για κάθε κλώνο διαπιστώσαμε ότι οι συντελεστές συσχέτισης των κλώνων F25 και C28 ήταν σημαντικά χαμηλοί, ενώ αυτός του κλώνου B12 όμοιος με εκείνο των E14 κυττάρων (εικόνα 3.18B). Αν αναπαρασταθεί γραφικά ο λόγος Oct4:Nanog συναρτήσει των επιπέδων έκφρασης του Nanog, διαπιστώνεται ότι υπάρχουν περιορισμοί στη σχέση των δυο πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, υπάρχει ένα κατώτατο όριο στο λόγο Oct4:Nanog, το οποίο αντιπροσωπεύει τη βασική κατάσταση (ground state) των κυττάρων. Όταν ο λόγος Oct4:Nanog είναι πολύ κοντά σε αυτή την τιμή, τα κύτταρα εμφανίζουν μεγάλη διακύμανση των επιπέδων Nanog, ενώ όταν τα επίπεδα του Nanog είναι κάτω από ένα συγκεκριμένο όριο, τα κύτταρα εμφανίζουν ποικίλες τιμές λόγου Oct4:Nanog. Επομένως, σε μια καλλιέργεια εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων μπορούν να διακριθούν τρεις υποπληθυσμοί: α) κύτταρα με υψηλή συσχέτιση Oct4 προς Nanog, κοντά στη βασική κατάσταση τα οποία αντιστοιχούν στα πολυδύναμα κύτταρα, β) κύτταρα με χαμηλά επίπεδα έκφρασης Nanog και υψηλά επίπεδα Oct4, τα οποία αντιστοιχούν στα «κινητοποιημένα» βλαστικά κύτταρα (lineage-primed cells) και γ) κύτταρα με χαμηλά επίπεδα έκφρασης τόσο Nanog όσο και

Oct4, κάτω από τη βασική κατάσταση, τα οποία αντιστοιχούν στα κύτταρα προς διαφοροποίηση (εικόνα 3.18C). Εφαρμόζοντας τις παραπάνω συσχετίσεις στις αποικίες των κλώνων, διαπιστώνεται άμεσα η μείωση του ποσοστού των πολυδύναμων κυττάρων, με παράλληλη αύξηση του ποσοστού των «κινητοποιημένων» κυττάρων, μετά από υπερέκφραση των πρωτεϊνών LBR (εικόνα 3.18D). Η παρατήρηση ότι η υπερέκφραση του LBR διαταράσσει τα επίπεδα έκφρασης του Nanog επιβεβαιώνεται και από τη σύγκριση των κατανομών φθορισμού έναντι της πρωτεΐνης. Συγκρίνοντας τις αντίστοιχες κατανομές των E14 κυττάρων με αυτές των F25, C28 και B12, διαπιστώθηκε ότι οι αντίστοιχες κλίμακες ήταν αρκετά όμοιες μεταξύ των κλώνων, με αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που περιείχαν μικρά ή μέτρια ποσοστά της πρωτεΐνης, υποδηλώνοντας ότι η «φυσιολογική» διακύμανση του Nanog στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα αλλάζει με την υπερέκφραση του LBR (εικόνα 3.18E).

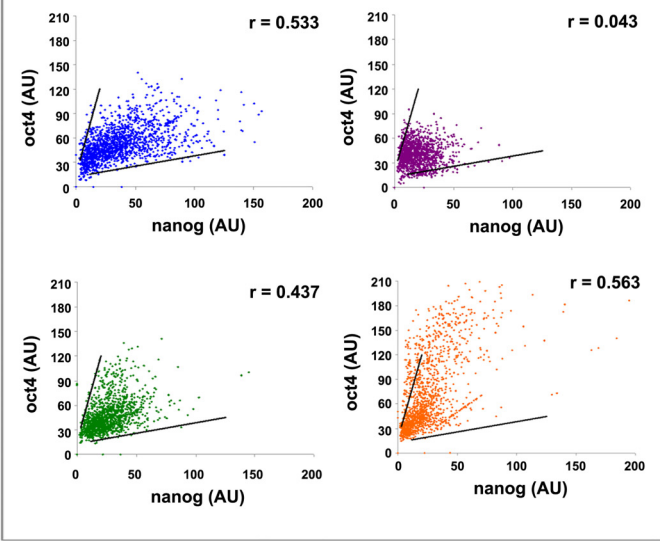
Παράλληλα έχει αναφερθεί ότι κατά τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων τα επίπεδα έκφρασης του Nanog μειώνονται σημαντικά με την πάροδο των ημερών. Για να διαπιστωθεί αν κάτι τέτοιο ισχύει και μετά από υπερέκφραση του LBR, τα κύτταρα αφέθηκαν για διαφοροποίηση απουσία του παράγοντα LIF για 48 έως 72 ώρες και εν συνεχεία ελέγχθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης (εικόνα 3.19A). Σε συμφωνία με τα προηγούμενα δεδομένα, ενώ τα βλαστικά κύτταρα (E14) εξέφραζαν την πρωτεΐνη (σε μικρά ποσοστά σε σύγκριση με την αδιαφοροποίητη κατάσταση), στους κλώνους F25, C28 και B12 η πρωτεΐνη δεν ήταν καν ανιχνεύσιμη, υποδεικνύοντας ότι η υπερέκφραση του LBR επιταχύνει την διαφοροποίηση των κυττάρων.

Τέλος, θέλοντας να επιβεβαιώσουμε άμεσα ότι η υπερέκφραση του LBR μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του Nanog, πραγματοποιήσαμε πειράματα παροδικής έκφρασης του αγρίου τύπου LBR σε βλαστικά κύτταρα. Κύτταρα E14 διαμολύνθηκαν με την πρωτεΐνη FL και μετά από 24h ή 48 ώρες, ελέγχθηκαν για την έκφραση της πρωτεΐνης Nanog. Όπως προκύπτει από την εικόνα 3.19B, στα κύτταρα που εξέφραζαν πολύ υψηλά ποσοστά FL δεν ανιχνεύτηκε καθόλου Nanog και σε μερικές περιπτώσεις ούτε Oct4. Σε συνδυασμό με τα πειράματα ελέγχου της μορφολογίας των κλώνων, τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν ότι η υπερέκφραση του LBR «μετατοπίζει» τα βλαστικά κύτταρα προς την κατεύθυνση των «κινητοποιημένων» βλαστικών κυττάρων (primed stem cells).

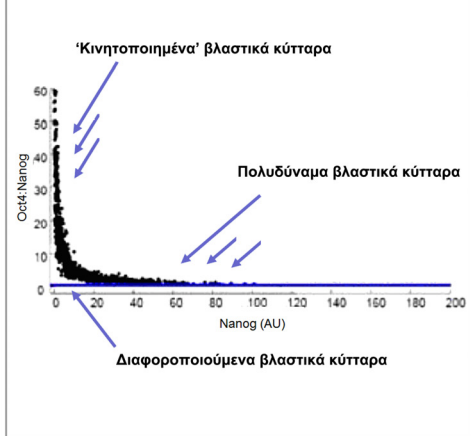
**A.** *Nanog* *Oct4* *merge & max. proj.*



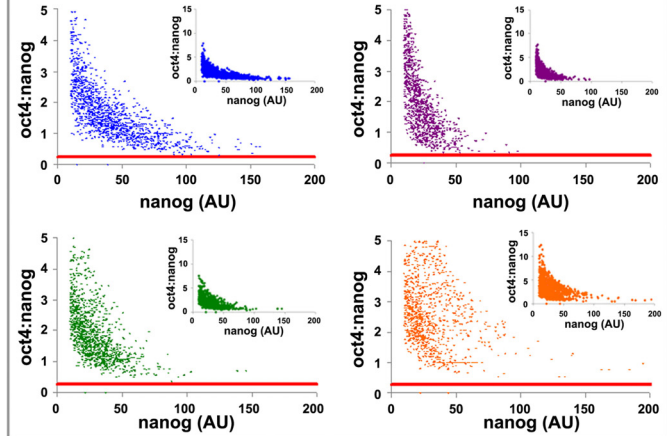
**B.**



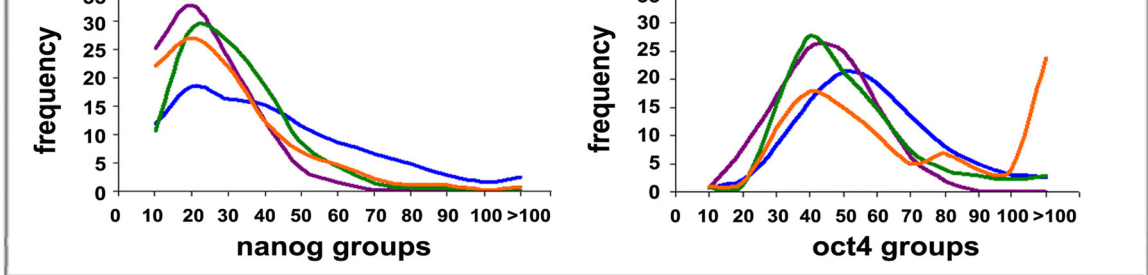
**C.**



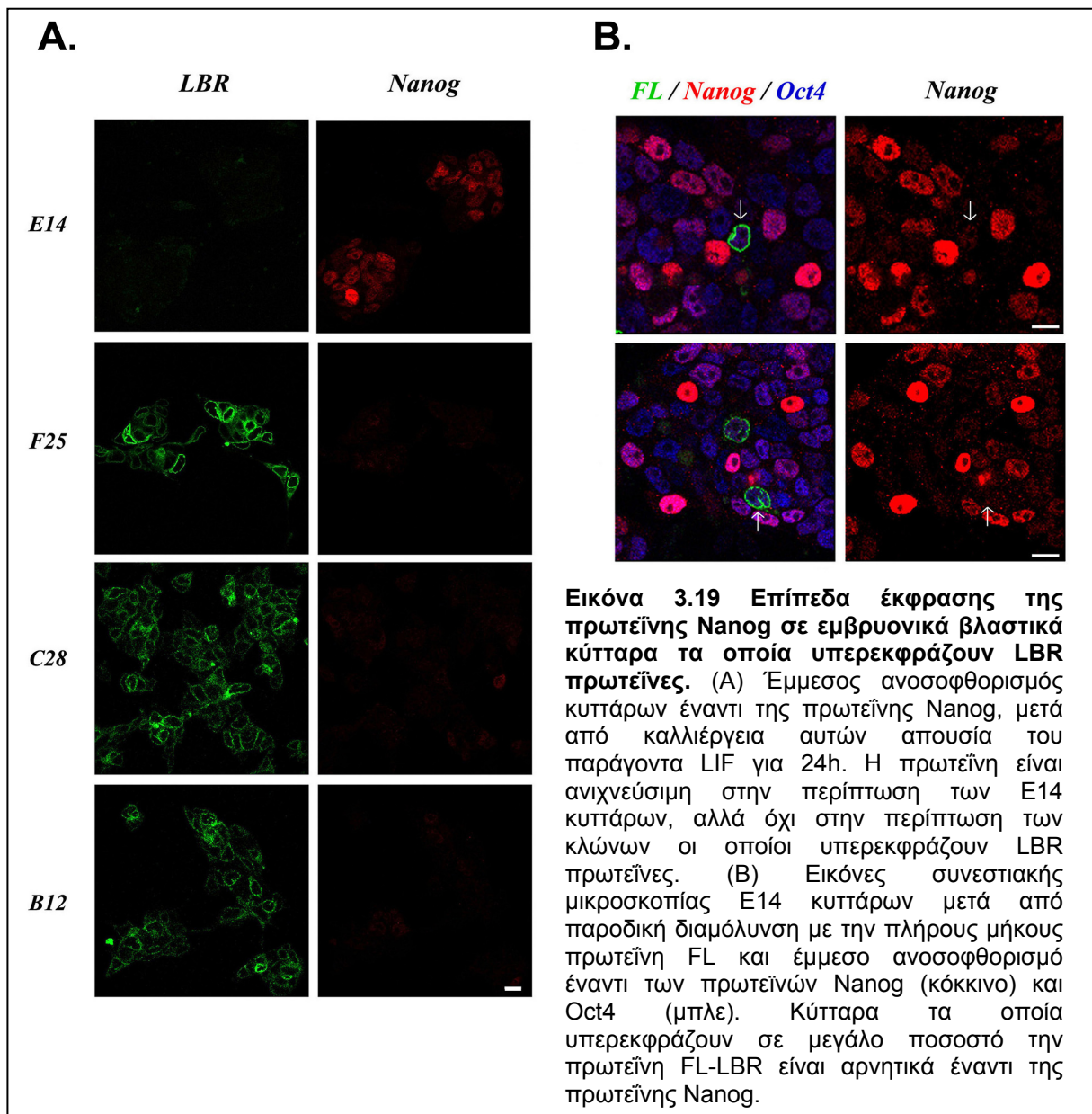
**D.**



**Ε.**



**Εικόνα 3.18** Επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης **Nanog** σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα τα οποία υπερεκφράζουν **LBR** πρωτεΐνες. (A) Έμμεσος ανοσοφθορισμός των κυττάρων έναντι των πρωτεϊνών **Nanog** (κόκκινο) και **Oct4** (μπλε). (B) Διαγράμματα συσχέτισης των πρωτεϊνών **Nanog** και **Oct4** και υπολογισμός του συντελεστή συσχέτισης **Pearson** για κάθε περίπτωση. (C) Σχηματικό διάγραμμα του λόγου **Oct4:Nanog** έναντι των επιπέδων **Nanog**, όπου διαχωρίζονται οι τρεις υποπληθυσμοί των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων. (D) Σχηματικό διάγραμμα του λόγου **Oct4:Nanog** έναντι των επιπέδων **Nanog** για τα κύτταρα που υπερεκφράζουν **LBR**. (E) Μετά από ανοσοφθορισμό των κλώνων έναντι των πρωτεϊνών **Nanog** και **Oct4** και ποσοτικοποίηση της έντασης φθορισμού σε κάθε κύτταρο, κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα διαγράμματα κατανομής των εντάσεων. Στα (B), (D) και (E) τα μπλε σημεία αντιστοιχούν στα κύτταρα **E14**, τα μωβ στον κλώνο **F25**, τα πράσινα στον κλώνο **C28** και τα πορτοκαλί στον κλώνο **B12**, ενώ σε όλες τις περιπτώσεις καταμετρήθηκαν συνολικά 1500 κύτταρα (βλ. προηγούμενη σελίδα).



### 3.9 Μελέτη της δυναμικής του LBR σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα

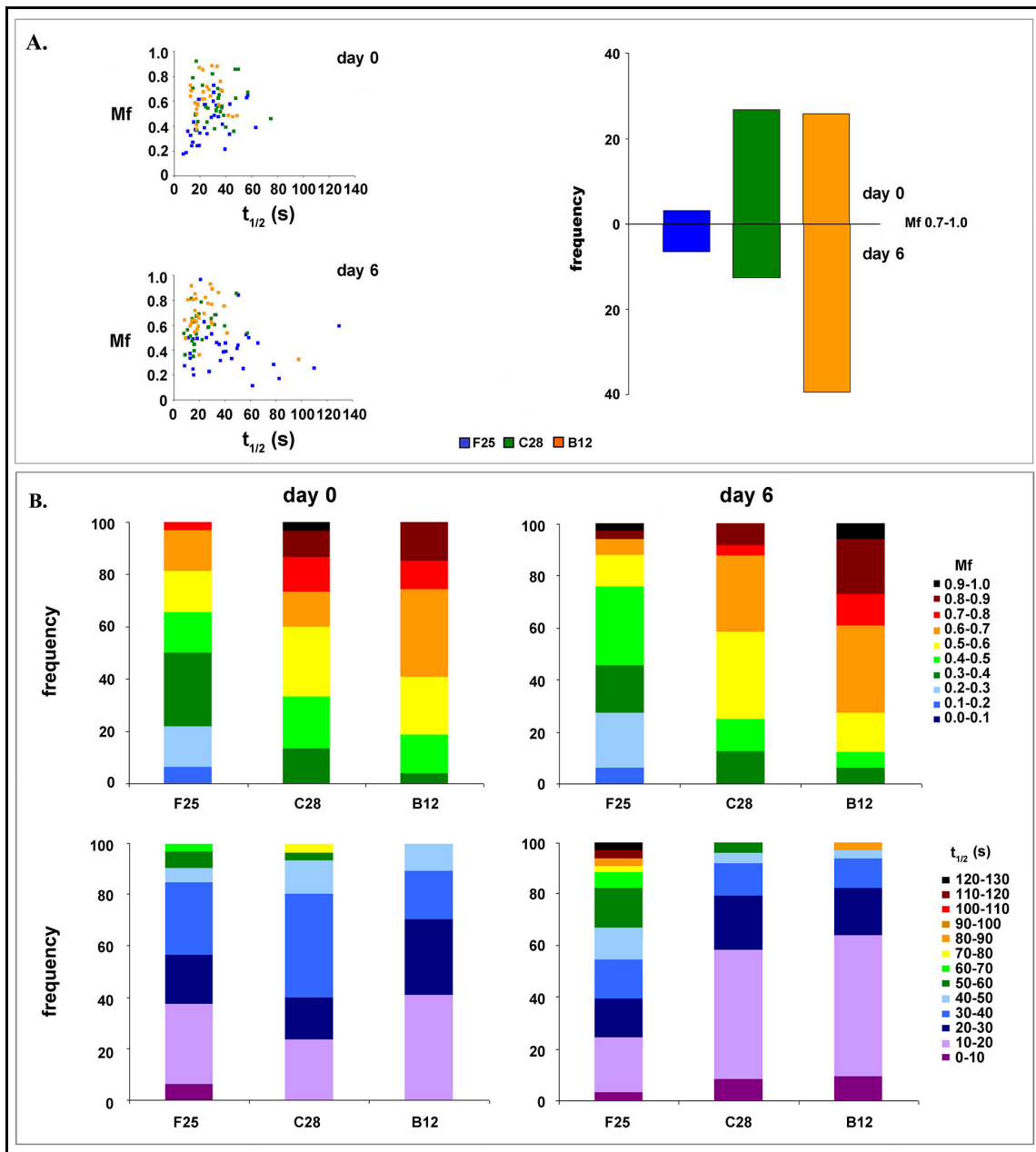
Στη συνέχεια, μελετήθηκε η δυναμική της αγρίου τύπου πρωτεΐνης (F25) και των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών (C28 και B12). Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα FRAP με χρήση ROIs που κάλυπταν ένα καμπυλόγραμμο τμήμα της περιφέρειας του πυρήνα σε εγκάρσια τομή, σε αδιαφοροποίητα κύτταρα (ημέρα 0) ή σε κύτταρα που αφέθηκαν για διαφοροποίηση απουσία του παράγοντα LIF για 5<sup>1/2</sup> ημέρες. Όπως προκύπτει από τα διαγράμματα  $Mf$  έναντι  $t_{1/2}$  (εικόνα 3.20A), στην αδιαφοροποίητη κατάσταση, η αγρίου τύπου πρωτεΐνη (F25) εμφάνιζε τα μικρότερα ποσοστά υψηλού κινητικού κλάσματος ( $Mf > 0.7$ ), ενώ οι δυναμικές των μεταλλαγμένων μορφών ήταν αρκετά όμοιες μεταξύ τους. Οι διαφορές στη δυναμική των πρωτεϊνών έγιναν εμφανείς κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Κάθε πρωτεΐνη εμφάνισε διαφορετικά ποσοστά κινητικού κλάσματος, με το πλήρες μόριο (F25) να είναι το λιγότερο κινητικό και τις δυναμικές των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών να διαφέρουν μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τα κύτταρα που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες αποκτούν σταδιακά διαφορετικές ιδιότητες με την έναρξη της διαφοροποίησης.

### 3.10 Υπερέκφραση του LBR σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και κυτταρική επιβίωση

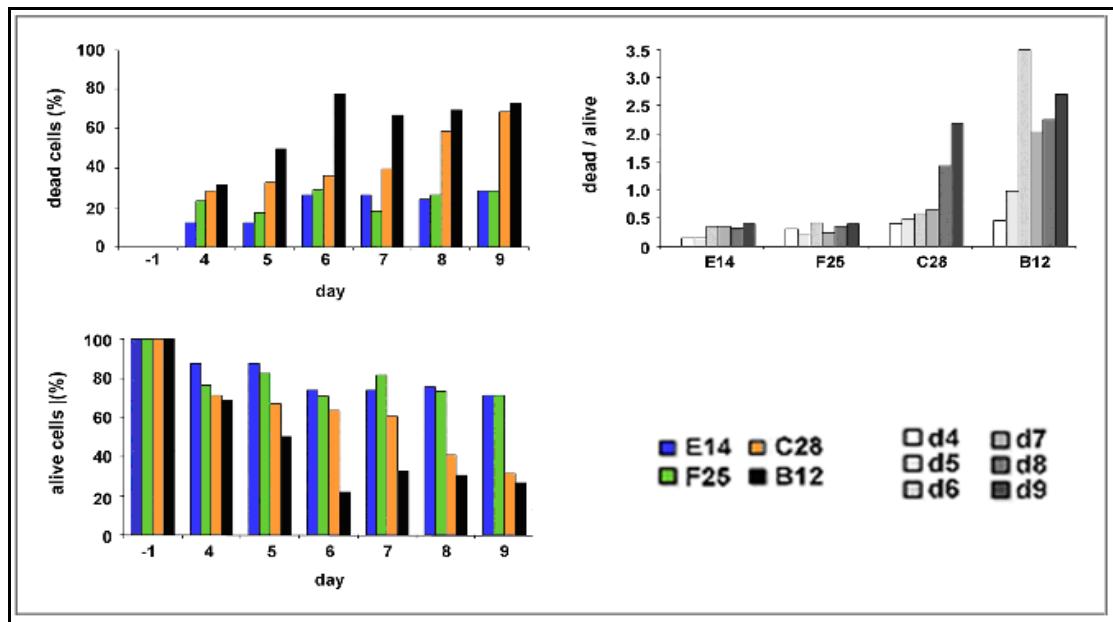
Από τα προηγούμενα δεδομένα διαπιστώθηκε ότι και μόνο η υπερέκφραση του πλήρους μορίου της πρωτεΐνης (F25) επιφέρει αλλαγές στο καθεστώς πολυδυναμίας των κυττάρων, οι οποίες γίνονται πιο εμφανείς στην περίπτωση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών με την έναρξη της διαφοροποίησης. Για να διερευνηθεί περαιτέρω αυτή η διαφορά μεταξύ των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαφοροποίησης των κυττάρων με χρήση πρωτοκόλλων διαφοροποίησης σε δυο (2D) ή τρεις διαστάσεις (3D).

Σε μια πρώτη σειρά πειραμάτων, τα κύτταρα αφέθηκαν για διαφοροποίηση απουσία του παράγοντα LIF για 9 ημέρες και μελετήθηκε η επιβίωση των κυττάρων ανά ημέρα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.21, με την πρόοδο της διαφοροποίησης, τα κύτταρα που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες (C28, B12) παρουσίαζαν αυξημένο ρυθμό θανάτου σε σχέση με τα βλαστικά κύτταρα E14 ή με αυτά που εκφράζουν το πλήρες μόριο (F25). Πιο συγκεκριμένα, 8-9 ημέρες από την έναρξη της διαφοροποίησης, το ποσοστό των νεκρών κυττάρων στον κλώνο C28 ήταν 60%, ενώ στον B12 πλησίαζε το 80%.





**Εικόνα 3.20 Δυναμική της πρωτεΐνης LBR στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα.** (A) Πειράματα FRAP στους κλώνους F25, C28 και B12, στην αδιαφοροποίητη κατάσταση (day 0) ή μετά από διαφοροποίηση των κυττάρων απουσία του παράγοντα LIF για έξι ημέρες (day 6). Διαγράμματα Mf- $t_{1/2}$  και σχετικής συχνότητας κινητικού κλάσματος μεγαλύτερου του 0.7 (Mf 0.7-1.0). (B) Διαγράμματα σχετικής συχνότητας του κινητικού κλάσματος και του χρόνου ημι-ανάκτησης των πρωτεϊνών. Τα πειράματα FRAP πραγματοποιήθηκαν μετά από σκίαση καμπυλόγραμμου τμήματος του πυρηνικού φακέλου ( $n \geq 30$ ).

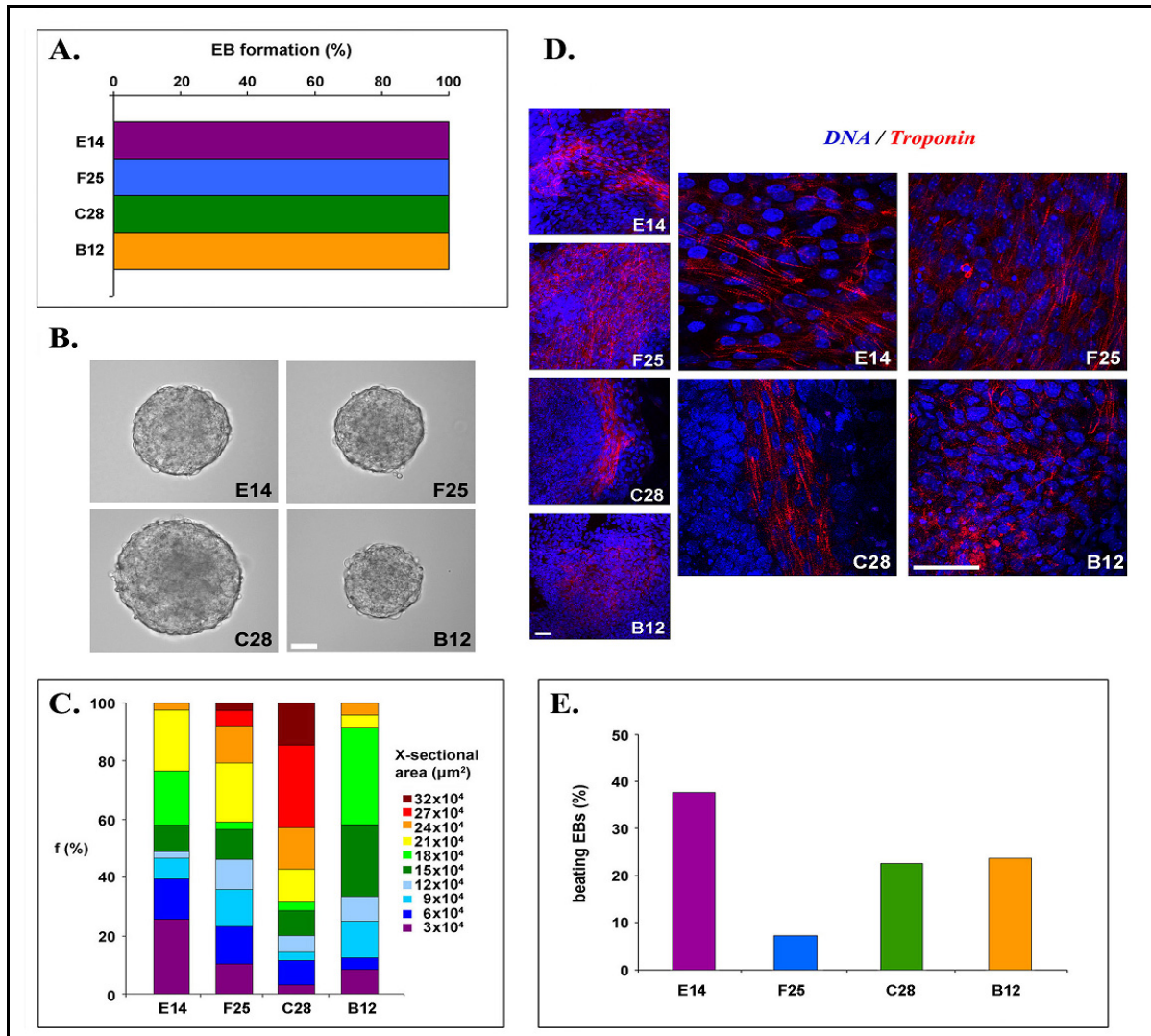


**Εικόνα 3.21 Έλεγχος της κυτταρικής επιβίωσης σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα τα οποία υπερεκφράζουν LBR πρωτεΐνες.** Τα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν απουσία του παράγοντα LIF για 9 ημέρες και ελέγχθηκε η επαγωγή του κυτταρικού θανάτου μέσω της τεχνικής αποκλεισμού trypan-blue. Στα διαγράμματα αποτυπώνονται το ποσοστό των νεκρών (dead cells) ή ζωντανών (alive cells) κυττάρων και η αναλογία νεκρών προς ζωντανών κυττάρων (dead/alive) ανά ημέρα διαφοροποίησης για κάθε κλώνο. Τα διαγράμματα αναπαριστούν το μέσο όρο 10 ανεξάρτητων πειραμάτων.

### 3.11 Διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων που εκφράζουν LBR προς καρδιομυοκύτταρα

Για να κατανοηθούν καλύτερα οι επιδράσεις των LBR μεταλλαγμάτων στη διάρκεια της διαφοροποίησης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα 3D διαφοροποίησης προς μεσόδερμα και συγκεκριμένα υπό συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη καρδιομυοκυττάρων. Το ποσοστό σχηματισμού των εμβρυοειδών σωματιδίων κατά τη δεύτερη ημέρα διαφοροποίησης ήταν ίδιο μεταξύ των κλώνων, ενώ παράλληλα δεν παρατηρήθηκε σημαντική μορφολογική διαφορά μεταξύ τους (εικόνα 3.22 A,B). Κατά την έκτη ημέρα διαφοροποίησης, η επιφάνεια των εμβρυοειδών σωματιδίων ήταν πολύ όμοια μεταξύ τους (εικόνα 3.22C), με ελάχιστα μεγαλύτερο μέγεθος εμβρυοειδών σωματιδίων του κλώνου C28, υποδηλώνοντας ότι η διαφοροποίηση μεταξύ των κυττάρων προχωρά με τον ίδιο ρυθμό. Μετά από ανοσοφθορισμό των εμβρυοειδών σωματιδίων έναντι της καρδιακής τροπονίνης στην ένατη ημέρα διαφοροποίησης (εικόνα 3.22D) διαπιστώθηκε ότι τα εμβρυοειδή σωματίδια όλων των κυτταρικών σειρών περιείχαν σημαντικά ποσοστά καρδιομυοκυττάρων. Ωστόσο, λειτουργικός χαρακτηρισμός αυτών των κυττάρων μέσω της δοκιμασίας αυτόματης

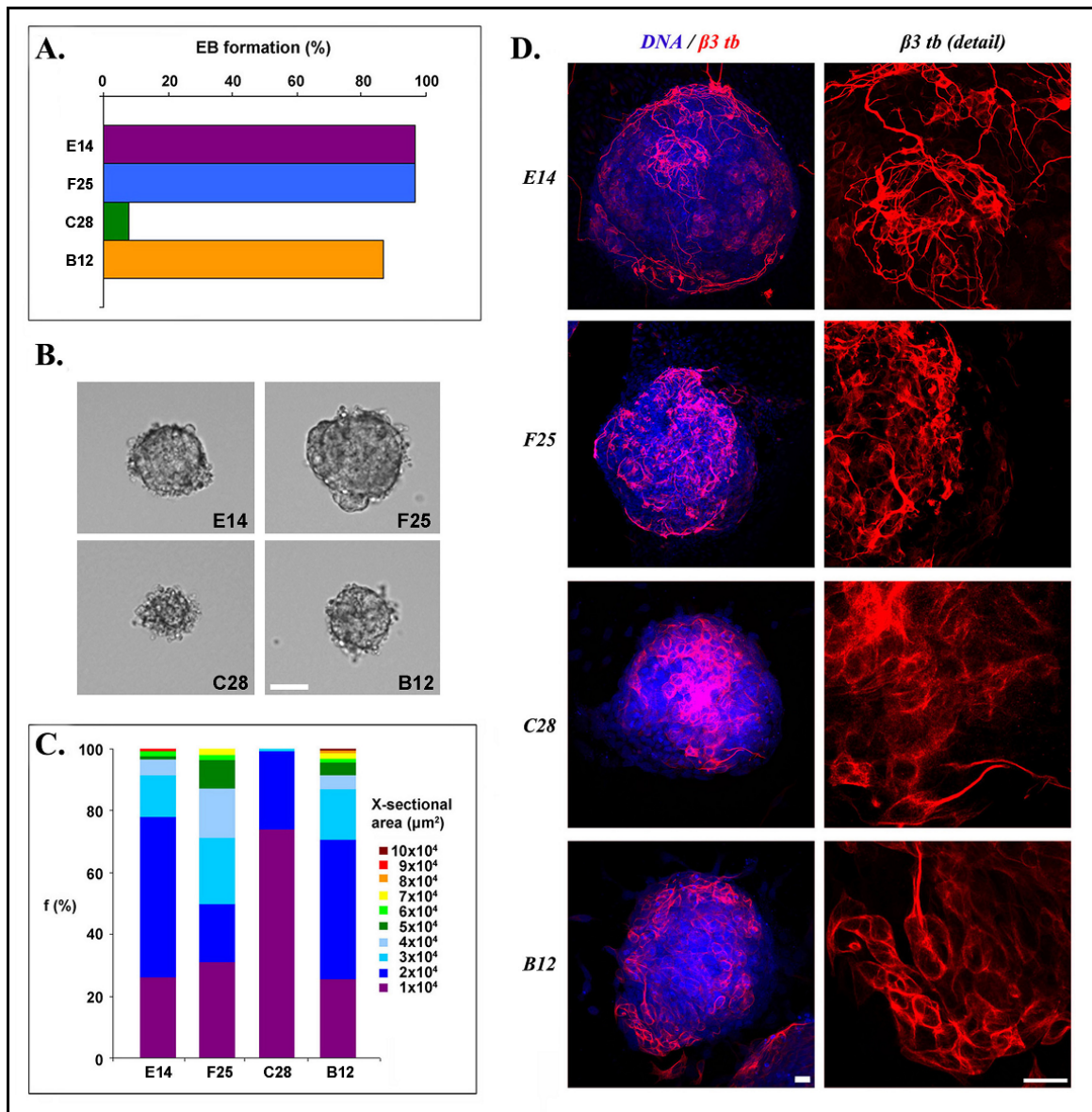
σύσπασης (spontaneous contracting/beating), έδειξε ότι τα ποσοστά των σωματιδίων που συσπώνται αυτόματα ήταν πολύ μικρότερα στους κλώνους C28 και B12 και ελάχιστα στον κλώνο F25 σε σύγκριση με τα E14 κύτταρα (εικόνα 3.22E).



**Εικόνα 3.22 Κατευθυνόμενη διαφοροποίηση βλαστικών κυττάρων τα οποία υπερεκφράζουν LBR πρωτεΐνες προς καρδιομυοκύτταρα.** (A) Ποσοστό σχηματισμού εμβρυοειδών σωματιδίων (EB formation) ανά κλώνο μετά από δυο ημέρες επαγόμενης διαφοροποίησης (n=200 EBs). (B) Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου εμβρυοειδών σωματιδίων μετά από δυο ημέρες επαγόμενης διαφοροποίησης. (C) Κατανομή της επιφάνειας των εμβρυοειδών σωματιδίων (X-sectional area) κατά την έκτη ημέρα επαγόμενης διαφοροποίησης (n=150 EBs). (D) Έμμεσος ανοσοφθορισμός εμβρυοειδών σωματιδίων έναντι της πρωτεΐνης καρδιακής τροπονίνης (troponin) κατά την ένατη ημέρα επαγόμενης διαφοροποίησης. Οι εικόνες στα δεξιά αναπαριστούν σε μεγαλύτερη μεγέθυνση τμήμα του εμβρυοειδούς σωματιδίου με το χαρακτηριστικό πρότυπο χρώσης της πρωτεΐνης. (E) Ποσοστό εμβρυοειδών σωματιδίων που συσπώνται αυτόματα (beating) κατά την ένατη ημέρα επαγόμενης διαφοροποίησης (n≥400 EBs).

### 3.12 Διαφοροποίηση εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων που εκφράζουν LBR προς νευρωνικά κύτταρα

Για να μελετηθεί το αναπτυξιακό δυναμικό των κλώνων υπό διαφορετικές συνθήκες διαφοροποίησης, τα κύτταρα αφέθηκαν για 3D διαφοροποίηση προς εξώδερμα και συγκεκριμένα υπό συνθήκες που ευνοούν τον εμπλουτισμό των εμβρυοειδών σωματιδίων σε νευρωνικά κύτταρα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.23A, το ποσοστό σχηματισμού εμβρυοειδών σωματιδίων κατά τη δεύτερη ημέρα διαφοροποίησης διέφερε σημαντικά μεταξύ των κλώνων. Τα κύτταρα που υπερέκφραζαν την αγρίου τύπου πρωτεΐνη (F25) σχημάτιζαν σωματίδια όπως και τα βλαστικά κύτταρα E14, ενώ το ποσοστό σχηματισμού του κλώνου B12 ήταν μικρότερο και μειωνόταν σημαντικά στην περίπτωση του κλώνου C28. Μορφολογικός έλεγχος των σωματιδίων την ίδια ημέρα (εικόνα 3.23B) έδειξε ότι τα σωματίδια των κλώνων F25 και B12 ήταν αρκετά όμοια με αυτά των E14 κυττάρων, ενώ τα σωματίδια του κλώνου C28 εμφάνιζαν ατυπίες, υποδηλώνοντας αδυναμία σχηματισμού φυσιολογικών εμβρυοειδών σωματιδίων μετά από υπερέκφραση του ΔTMV-VIII (icj) μεταλλάγματος. Οι διαφορές μεταξύ των σωματιδίων συνεχίζονταν και κατά την έκτη ημέρα διαφοροποίησης, με το μέγεθος των σωματιδίων να διαφέρει σημαντικά. Από την κατανομή μεγεθών διαπιστώθηκε ότι ο κλώνος C28 εμφάνιζε τα μικρότερα σωματίδια. Τα σωματίδια του F25 ήταν ενδιάμεσου μεγέθους, ενώ τα σωματίδια του B12 ήταν όμοια με αυτά των E14 κυττάρων (εικόνα 3.23C). Παρά τις όποιες διαφορές μεταξύ των κλώνων, τα εμβρυοειδή σωματίδια που κατάφεραν να επιβιώσουν μέχρι την έκτη ημέρα, περιείχαν φυσιολογικά/τυπικά νευρωνικά κύτταρα, όπως προέκυψε μετά από ανοσοφθορισμό των σωματιδίων έναντι της β3 τουμπουλίνης (εικόνα 3.23D).



**Εικόνα 3.23 Κατευθυνόμενη διαφοροποίηση βλαστικών κυττάρων τα οποία υπερεκφράζουν LBR πρωτεΐνες προς νευρωνικά κύτταρα.** (A) Ποσοστό σχηματισμού εμβρυοειδών σωματιδίων (EB formation) ανά κλώνο μετά από δυο ημέρες διαφοροποίησης (n=200 EBs). (B) Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου εμβρυοειδών σωματιδίων μετά από δυο ημέρες διαφοροποίησης. (C) Κατανομή της επιφάνειας των εμβρυοειδών σωματιδίων (X-sectional area) κατά την έκτη ημέρα διαφοροποίησης (n=150 EBs). (D) Έμμεσος ανοσοφθορισμός εμβρυοειδών σωματιδίων έναντι της πρωτεΐνης  $\beta 3$  τουμπουλίνης ( $\beta 3$  tubulin,  $\beta 3$  tb) κατά την έκτη ημέρα διαφοροποίησης. Οι εικόνες στα δεξιά αναπαριστούν σε μεγαλύτερη μεγέθυνση τμήμα του εμβρυοειδούς σωματιδίου με το χαρακτηριστικό πρότυπο χρώσης της πρωτεΐνης.



## *Συζήτηση*





#### 4.1 Η δυναμική της πρωτεΐνης LBR αντικατοπτρίζει την ασυμμετρία του πυρηνικού φακέλου

Η χρήση των τεχνικών καταγραφής των διακυμάνσεων του φθορισμού (FRAP, FLIP, FCS κα) έχει επιτρέψει την μελέτη των κυτταρικών φαινομένων σε πραγματικό χρόνο. Ωστόσο, σε πολλές από τις «F-τεχνικές» οι βιολογικές επιφάνειες, αν και στην πραγματικότητα ανισότροπες (anisotropic), με πολύπλοκη ασύμμετρη δομή, θεωρούνται απλά επίπεδες ή σφαιρικές επιφάνειες. Όμως η επίδραση της γεωμετρίας της επιφάνειας στην κινητική διαφόρων πρωτεϊνών δεν μπορεί να αγνοηθεί, καθώς η διάχυση μεμβρανικών πρωτεϊνών είναι αρκετά διαφορετική από αυτή των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών ή αυτών του αυλού, με διαφορά των χρόνων ημι-ανάκτησης να πλησιάζει ακόμη και τις τέσσερις τάξεις μεγέθους (Feder et al, 1996, Rayan et al., 2010, Sbalzarini et al. 2006). Ο πυρηνικός φάκελος είναι μια εξαιρετικά ασύμμετρη βιολογική διεπιφάνεια καθώς η καμπυλότητά του ποικίλει από περιοχή σε περιοχή. Ο αριθμός και η γεωμετρία των δεξαμενών του ενδοπλασματικού δικτύου που συνδέονται στην εξωτερική επιφάνεια του πυρηνικού φακέλου ποικίλει σημαντικά, επηρεάζοντας την εισροή μορίων από το ενδοπλασματικό δίκτυο προς την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη. Αν σε αυτά συνυπολογίσουμε το γεγονός ότι οι πυρηνικές μεμβράνες συνδέονται άμεσα με μακρομοριακές δομές οι οποίες κατανέμονται ανομοιογενώς, όπως το δίκτυο της πυρηνικής λάμινας και η ετεροχρωματίνη, ο βαθμός πολυπλοκότητας του συστήματος αυξάνεται ακραία. Με δεδομένη αυτήν την πολυπλοκότητα είναι ίσως παράδοξο ότι οι μέχρι τώρα μελέτες σχετικά με τη δυναμική των πρωτεϊνών της πυρηνικής μεμβράνης δεν ανίχνευσαν ποσοτικές διαφορές οφειλόμενες στις παραπάνω ασυμμετρίες.

Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω, για να μελετήσουμε συστηματικά τη δυναμική του LBR, ακολουθήσαμε δυο διαφορετικές προσεγγίσεις στηριζόμενοι στις τεχνικές FRAP και FLIP. Η επιλογή αυτών των τεχνικών δεν ήταν τυχαία. Καταρχήν, η τεχνική της ανάκτησης φθορισμού έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε όλες τις προηγούμενες μελέτες, επιτρέποντας την άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων μας με εκείνα άλλων. Επιπλέον, η τεχνική επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των δυναμικών παραμέτρων υπό συνθήκες υψηλής ανάλυσης, σημαντικό για την αξιοπιστία των δεδομένων. Τέλος, η τεχνική FRAP δεν είναι χρονοβόρα, επιτρέποντας την ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων, κάτι αναγκαίο στην περίπτωση όπου ελέγχονται διαφορετικοί κυτταρικοί πληθυσμοί.

Παρόλο τα πλεονεκτήματα, η τεχνική FRAP έχει και τους περιορισμούς της (Bates et al., 2006). Για να ελαχιστοποιήσουμε τυχόν σφάλματα, χρησιμοποιήσαμε μια ποικιλία ROIs

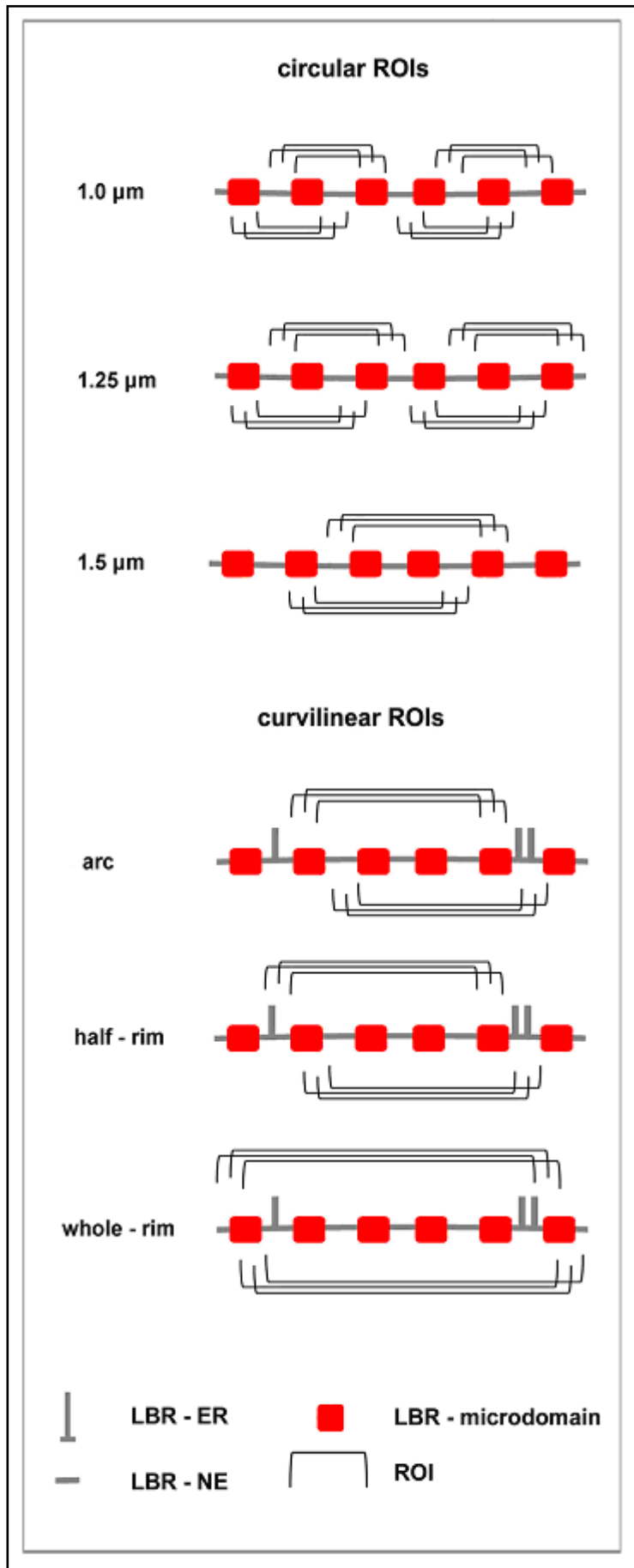
και καταβλήθηκε κάθε δυνατή προσπάθεια για την εξασφάλιση βέλτιστων συνθηκών πραγματοποίησης των πειραμάτων. Διερευνήσαμε επίσης και άλλες τεχνικές όπως αυτής της φασματοσκοπίας συσχέτισης φθορισμού (FCS). Ωστόσο, η απαίτηση για χαμηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης κατέστησαν τον προσδιορισμό της περιοχής ενδιαφέροντος δύσκολο λόγω λήψης εικόνων χαμηλής ανάλυσης και τη χρησιμοποίηση της τεχνικής ανέφικτη.

Με δεδομένα όλα τα ανωτέρω και αφού ελέγξαμε ένα σημαντικό μεγάλο αριθμό κυττάρων, διαπιστώσαμε ότι η δυναμική του πλήρους μήκους LBR παρουσιάζει σημαντική διακύμανση. Πιο συγκεκριμένα, το κινητικό κλάσμα της πρωτεΐνης ποίκιλε μέχρι και εννέα φορές, ενώ ο χρόνος ημι-ανάκτησης έως και σαράντα φορές. Αυτές οι διακυμάνσεις φαίνεται να εξαρτώνται από την περιοχή ή το τμήμα του πυρηνικού φακέλου που εξετάζεται κάθε φορά. Η διακύμανση της κινητικής υποδηλώνει ότι πέρα από την ασυμμετρία του πυρηνικού φακέλου, η πρωτεΐνη υπάρχει σε διαφορετικές καταστάσεις δέσμευσης (binding states), από πλήρως κινούμενα μόρια μέχρι ακινητοποιημένα σύμπλοκα. Ο προσδιορισμός των παραμέτρων της δυναμικής της πρωτεΐνης υπό τόσο περίπλοκες συνθήκες δεν θα ήταν ασφαλής, καθώς δεν γνωρίζουμε πολλά στοιχεία σχετικά με την κατάσταση του κάθε υποπληθυσμού της και, επομένως δεν μπορούν να εφαρμοστούν επακριβώς τα συνήθη μοντέλα διάχυσης. Για παράδειγμα, είναι γνωστό ότι ο LBR συνδέεται με ποικίλα υποστρώματα (Worman et al., 1988; Ye et al., 1996; Polioudaki et al., 2001; Clever et al., 2012), τροποποιείται μετα-μεταφραστικά (Nikolakaki et al., 1996) και ακολουθεί μια δαιδαλώδη διαδρομή από το ενδοπλασματικό δίκτυο μέχρι την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη διαπερνώντας τα σύμπλοκα των πυρηνικών πόρων (Lusk, Blobel and King, 2007). Η ελλιπής γνώση της φύσης αυτών των αλληλεπιδράσεων, καθιστούν την κανονικοποίηση των δεδομένων σε μοντέλα διάχυσης-πρόσδεσης μάλλον αναξιόπιστη.

Έχοντας τα ανωτέρω κατά νου, θεωρήσαμε ότι η εξαρτώμενη από την περιοχή ενδιαφέροντος διακύμανση της δυναμικής της πρωτεΐνης (ROI-dependent variation) οφείλεται σε μεγάλο ποσοστό στην ανομοιογενή κατανομή της κατά μήκος της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης. Το μοντέλο της εικόνας 4.1 εξηγεί διαγραμματικά το ρόλο των «νησίδων» του LBR στη διακύμανση του κινητικού κλάσματος. Είναι πιθανό ότι ROIs μικρού μεγέθους «περικλείουν» έναν τυχαίο αριθμό μορίων ακινητοποιημένης πρωτεΐνης, οδηγώντας σε μεγαλύτερη διακύμανση των FRAP παραμέτρων σε σχέση με ROIs μεγαλύτερου μεγέθους. Έτσι, αν θεωρήσουμε ότι υπάρχει ένας δεδομένος αριθμός ακινητοποιημένων μορίων σε μια περιοχή του πυρηνικού φακέλου, σκίασή της με ROIs μικρού μεγέθους θα ανιχνεύει διαφορετικό αριθμό ακινητοποιημένων μορίων κάθε φορά,

οδηγώντας σε μεγάλη διακύμανση των FRAP παραμέτρων. Αντίθετα, χρησιμοποιώντας ROIs μεγαλύτερης διαμέτρου, αυτά θα περικλείουν παρόμοιο αριθμό ακινητοποιημένων μορίων της πρωτεΐνης και επομένως θα εμφανίζουν πιο ομοιογενή FRAP δεδομένα. Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε ήδη, η διακύμανση μετά από σκίαση καμπυλόγραμμου τμήματος του πυρηνικού φακέλου ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με την αντίστοιχη με ROI διαμέτρου 1.5μm. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να εξηγηθεί όχι μόνο από την ανομοιογενή κατανομή των μικροπεριοχών της πρωτεΐνης αλλά και από τη χωροθέτηση των δεξαμενών του ενδοπλασματικού δικτύου. Είναι πιθανό οι καμπυλοειδείς ROIs να καλύπτουν τμήματα του πυρηνικού φακέλου στα οποία οι δεξαμενές του ενδοπλασματικού δικτύου είναι ανόμοια τοποθετημένες. Καθώς δεν έχει αναφερθεί καμία πρόσδεση της πρωτεΐνης σε αυτό το κυτταρικό διαμέρισμα, η πρωτεΐνη διαχέεται ελεύθερα και συνεπώς το ποσοστό των δεξαμενών του ενδοπλασματικού δικτύου θα συνεισφέρει σημαντικά στη δυναμική της πρωτεΐνης.

Το ότι η ασυμμετρία του πυρηνικού φακέλου επιφέρει διακύμανση στη δυναμική του LBR, διαπιστώνεται καλύτερα στην περίπτωση ταυτόχρονης φωτοσκίασης υποπεριοχών του ίδιου πυρήνα. Αν η επιφάνεια του πυρηνικού φακέλου ήταν ομοιογενής, οι παράμετροι  $M_f$  και  $t_{1/2}$  θα ήταν όμοιες μεταξύ των διαφορετικών ROIs του ίδιου πυρήνα. Ωστόσο, η ανίχνευση δεδομένων με όμοιο κινητικό κλάσμα και διαφορετικούς χρόνους ημι-ανάκτησης ή παραπλήσιου χρόνου ημι-ανάκτησης και διαφορετικών κινητικών κλασμάτων, υποδηλώνει τη διαφορετική σύσταση αυτών των περιοχών τόσο σε ακινητοποιημένες «νησίδες» της πρωτεΐνης όσο και σε δεξαμενές του ενδοπλασματικού δικτύου.



**Εικόνα 4.1** Εικόνα 4.1 Υποθετικό μοντέλο δυναμικής της πρωτεΐνης LBR. Οι «νησίδες» της πρωτεΐνης και οι δεξαμενές του ενδοπλασματικού δικτύου συνιστούν την κύρια πηγή μεταβολών της δυναμικής της πρωτεΐνης. Οι «νησίδες» συνεισφέρουν κατά μεγάλο ποσοστό στη διακύμανση των FRAP παραμέτρων όταν χρησιμοποιούνται κυκλικές ROIs, ενώ η διακύμανση των FRAP παραμέτρων στην περίπτωση χρήσης καμπυλόγραμμων ROIs οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ανομοιογενή διεπιφάνεια μεταξύ του ενδοπλασματικού δικτύου και του πυρηνικού φακέλου. Ανάλογα με το μέγεθος της ROI, ένας διαφορετικός αριθμός μικροπεριοχών ή/και δεξαμενών του ενδοπλασματικού δικτύου περιλαμβάνεται εντός αυτής, με αποτέλεσμα την λήψη διαφορετικών τιμών κινητικού κλάσματος και χρόνου ημι-ανάκτησης. Circular ROIs: κυκλικές περιοχές ενδιαφέροντος διαμέτρου 1.0, 1.25 και 1.5 $\mu\text{m}$ , curvilinear ROIs: περιοχές ενδιαφέροντος που καλύπτουν ένα καμπυλόγραμμο τμήμα μήκους ~10% (arc), ~50% (half-rim) ή ~90% (whole rim) της περιφέρειας του πυρήνα σε εγκάρσια τομή. LBR-ER: η πρωτεΐνη στο ενδοπλασματικό δίκτυο, LBR-NE: η πρωτεΐνη στον πυρηνικό φάκελο, LBR-microdomain: οι μικροπεριοχές της πρωτεΐνης.

## 4.2 Αποκοπή των διαμεμβρανικών τμημάτων του LBR αλλοιώνει τη δυναμική και τις λειτουργικές ιδιότητες της πρωτεΐνης

Αν και η μοντελοποίηση των αποτελεσμάτων μας θεωρήθηκε δύσκολη υπό αυτές τις συνθήκες, μερικές χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τη δυναμική της πρωτεΐνης μπορούν να εξαχθούν άμεσα από τα ποσοτικά δεδομένα. Για παράδειγμα, μελετώντας την κατανομή των σχετικών συχνοτήτων τόσο του κινητικού κλάσματος όσο και του χρόνου ημι-ανάκτησης σε ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων, μπορούμε να έχουμε πληροφορίες σχετικά με τις ιδιότητες του LBR στο κυτταρικό σύνολο (ensemble averaged properties) και να συγκρίνουμε διαφορετικές κυτταρικές σειρές ή να ελέγξουμε κατά πόσο μεταλλάξεις του μορίου επιδρούν στη δυναμική της πρωτεΐνης και κατ' επέκταση στις λειτουργικές της ιδιότητες.

Με βάση αυτό το σκεπτικό προχωρήσαμε στη σύγκριση της «σχετικής» δυναμικής διαφόρων καρβοξυτελικών μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης από τα οποία είχε αποκοπεί ποικίλος αριθμός διαμεμβρανικών τμημάτων. Το μετάλλαγμα ΔTMII-VIII,CT, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε προηγούμενες μελέτες αντί του πλήρους μορίου, εμφανίζει αξιοσημείωτα χαμηλή κινητική στον πυρηνικό φάκελο, σε αντίθεση με το ενδοπλασματικό δίκτυο όπου η κινητική του είναι όμοια με αυτή του πλήρους μήκους μορίου (FL-LBR). Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα μετά από αντικατάσταση της πρώτης από την τέταρτη διαμεμβρανική περιοχή (ΔTMI-III,V-VIII,CT), υποδηλώνοντας τη σημασία των διαμεμβρανικών περιοχών όχι μόνο στην αγκυροβόληση της πρωτεΐνης στον πυρηνικό φάκελο, αλλά και στις λειτουργικές της ιδιότητες.

Σε αντιδιαστολή, η αποκοπή της όγδοης ή των τεσσάρων τελευταίων διαμεμβρανικών περιοχών της πρωτεΐνης (ΔTMVIII,CT και ΔTMV-VIII,CT αντίστοιχα) κατέστησε τον LBR σημαντικά πιο δυναμικό στον πυρηνικό φάκελο και ελάχιστα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η συμπεριφορά αυτών των μεταλλαγμάτων, που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις που απαντώνται στις ασθένειες Greenberg και ιχθύωση, υποδηλώνει τη σημασία και πιθανόν την ύπαρξη (ενδομοριακών) αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαμεμβρανικών τμημάτων της πρωτεΐνης ή των βρόχων τα οποία τα διασυνδέουν (loop regions). Ανάλογες αλληλεπιδράσεις, οι οποίες προσφέρουν εξειδίκευση, αλλά και δομική σταθερότητα σε μεμβρανικές πρωτεΐνες, έχουν ταυτοποιηθεί σε υποδοχείς ή κανάλια ιόντων που εντοπίζονται στις κυτταρικές μεμβράνες. Σε αυτό το πλαίσιο, θα ήταν πιθανό η αποκοπή των διαμεμβρανικών τμημάτων να διαταράσσει όχι μόνο τη δράση αναγωγής της χοληστερόλης που εμφανίζει ο LBR, αλλά και άλλες άγνωστες μέχρι σήμερα αλληλεπιδράσεις του. Είναι προφανές λοιπόν, ότι εκτός του αμινοτελικού τμήματος της

πρωτεΐνης, του οποίου οι αλληλεπιδράσεις έχουν εν πολλοίς καταγραφεί, το καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης διαδραματίζει και αυτό σημαντικό ρόλο στις λειτουργικές της ιδιότητες.

### 4.3 Η συνεισφορά περιοχών του LBR στον εντοπισμό και τη δυναμική της πρωτεΐνης

Μελετώντας τον εντοπισμό και τη δυναμική των υπολοίπων μεταλλαγμάτων μπορούμε να εξαγάγουμε χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με τη συνεισφορά κάθε τμήματος της πρωτεΐνης στις ιδιότητες του μορίου. Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, η απαλοιφή του τομέα tudor (ΔΤD) κατέστησε την πρωτεΐνη πιο δυναμική στον πυρηνικό φάκελο, πιθανώς εξαιτίας της απώλειας αλληλεπιδράσεων με τη λαμίνη B ή την ιστόνη H3. Για τον καλύτερο προσδιορισμό του ρόλου του τομέα tudor, καταφύγαμε σε μια σειρά συμπληρωματικών πειραμάτων με μελέτη της κινητικής των μορίων που φέρουν τον τομέα ή και την ακολουθία RS μαζί με την πρώτη διαμεμβρανική περιοχή (TDTMI και TDRSTMI αντίστοιχα). Ενώ η κατανομή της πρωτεΐνης TDRSTMI ήταν όμοια με αυτή του FL, τα περισσότερα κύτταρα που εξέφραζαν την πρωτεΐνη TDTMI εμφάνιζαν ατυπίες (έγκλειστα) υποδηλώνοντας τη σημασία της ακολουθίας RS. Επιπλέον, οι δυο πρωτεΐνες είχαν παρόμοια κινητική στον πυρηνικό φάκελο, αλλά η πρωτεΐνη TDTMI παρουσίαζε σημαντική καθυστέρηση στο ενδοπλασματικό δίκτυο, τονίζοντας πιθανό ρόλο της ακολουθίας RS στη σωστή διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι οι ιδιότητες του LBR πιθανώς καθορίζονται από πολλαπλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της αμινοτελικής και της καρβοξυτελικής περιοχής του.

Η σημασία αυτών των αλληλεπιδράσεων έγινε πιο προφανής κατά την μελέτη των διαλυτών μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης. Ο εντοπισμός των διαλυτών μεταλλαγμάτων (από όλα απουσιάζουν τα διαμεμβρανικά τμήματα) στο πυρηνόπλασμα και το κυτταρόπλασμα υποδηλώνει τη σημασία των διαμεμβρανικών περιοχών στην αγκυροβόληση της πρωτεΐνης στον πυρηνικό φάκελο. Συνηγορητικά ως προς τα αποτελέσματα από τις πρωτεΐνες TDRSTMI και TDTMI, ο ρόλος της ακολουθίας RS στην αγκυροβόληση και παραμονή του LBR στον πυρήνα έγινε φανερός και στην περίπτωση των διαλυτών μεταλλαγμάτων. Τα μεταλλάγματα που περιείχαν την ακολουθία RS (TDRSGD, RS, TDRS και RSGD) εντοπίζονταν μόνο στο πυρηνόπλασμα, σε αντίθεση με τα μεταλλάγματα TD, GD και CT τα οποία κατανέμονταν σε όλο το κύτταρο.

Σύμφωνα με το μοντέλο «διάχυσης-κατακράτησης» (diffusion-retention model), οι πυρηνικές πρωτεΐνες διαχέονται ελεύθερα στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και

της εξωτερικής πυρηνικής μεμβράνης και μέσω των συμπλεγμάτων των πυρηνικών πόρων μετακινούνται στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη, όπου παραμένουν συνδεδεμένες με διάφορους προσδέτες όπως οι λαμίνες και η χρωματίνη (Holmer and H. J. Worman, 2001). Σε συμφωνία με το μοντέλο αυτό, τα πειράματα απώλειας φορισμού μετά από φωτοσκίαση (FLIP) της αμινοτελικής περιοχής της πρωτεΐνης (TDRSGD) επιβεβαίωσαν ότι η πρωτεΐνη καθυστερεί χρονικά διαπερνώντας τα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων.

Τέλος, από τη σύγκριση των FRAP παραμέτρων των διαλυτών μεταλλάξεων προέκυψε ότι τα μεταλλάγματα παρουσιάζουν παρόμοιες ιδιότητες, ως συνέπεια της απουσίας ισχυρών αλληλεπιδράσεων με το υποκείμενο δίκτυο της χρωματίνης και των λαμινών.

#### **4.4 Ο λειτουργικός ρόλος του LBR κατά τη διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων**

Ο ρόλος του LBR και άλλων μεμβρανικών πρωτεϊνών της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης κατά την ανασυγκρότηση του πυρήνα έχει δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες (Pyrgasopoulou et al, 1996; Collas et al, 1996; Anderson et al, 2009). Εκτός της λειτουργίας αυτής όμως, όλο και πιο συχνά υποστηρίζεται η σημασία του LBR κατά την ανάπτυξη και διαφοροποίηση. Μελέτες σε zebrafish έχουν δείξει ότι αποσιώπηση του LBR έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη θνησιμότητα των εμβρύων και την υποπλασία του κρανίου και της ουράς κατά το στάδιο της οργανογένεσης (Schild-Prüfert et al., 2006). Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι το ποσό έκφρασης του LBR διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων (Gravemann et al., 2010).

Μεταλλάξεις στο γονίδιο του LBR έχουν συσχετιστεί με σοβαρές ασθένειες στον άνθρωπο και τα ζώα, όπως η ανωμαλία Pelger-Huet, η ιχθύωση και η δυσπλασία Greenberg. Ωστόσο, δεν είναι πλήρως γνωστό αν η παθογένεση αυτών των ασθενειών σχετίζεται με αλλαγή της δομής του πυρηνικού φακέλου ή σε δευτερεύουσες επιδράσεις οι οποίες επηρεάζουν τη δράση αναγωγής της χοληστερόλης. Η μεγάλη ομολογία μεταξύ του LBR και του ενζύμου DHCR14, σε συνδυασμό με το ότι τα κύτταρα ιχθυωσικών ποντικών εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά πρόδρομων μεταβολιτών της χοληστερόλης (Subramanian et al., 2011) υπαινίσσονται ότι οι ασθένειες αυτές έχουν πράγματι σχέση με την ενζυμική δράση της πρωτεΐνης. Αντίθετα, πειράματα αποσιώπησης σε ποντίκια δείχνουν ότι τα DHCR14(-/-) ζώα είναι φυσιολογικά, ενώ τα DHCR14(-/-):LBR(-/+) ζώα εμφανίζουν ποικίλες ανωμαλίες, διαφορετικές από αυτές των ιχθυωσικών ποντικών, υποστηρίζοντας ότι

οι ασθένειες αυτές οφείλονται σε αλλαγές που αφορούν τη δομική ακεραιότητα του πυρηνικού φακέλου (Wassif et al., 2007). Φυσικά, η μια υπόθεση δεν αποκλείει την άλλη. Ενδέχεται, και οι δυο λειτουργίες του LBR (μεταβολική ρύθμιση και δομική λειτουργία) να είναι καθοριστικές για την εμφάνιση των σχετιζόμενων ασθενειών. Προς επιβεβαίωση αυτού, πρόσφατα ανιχνεύθηκε μια μετάλλαξη του LBR γονιδίου (Lym3) η οποία οδηγεί σε μείωση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης στα αιμοποιητικά κύτταρα και προκαλεί λεμφοπενία. Πειράματα μικροσυστοιχιών απέδειξαν ότι η έλλειψη φυσιολογικής ποσότητας της πρωτεΐνης δεν επηρεάζει άμεσα τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στα T-λευκοκύτταρα του μυελού των οστών, αλλά υπάρχει μια υπο-ομάδα γονιδίων, κοινή μεταξύ των T-λεμφοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων, η οποία υπερεκφράζεται στα μεταλλαγμένα κύτταρα (Verhagen et al., 2011).

Τα αποτελέσματά μας μετά από υπερέκφραση της πρωτεΐνης σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού συμφωνούν με αυτές τις παρατηρήσεις. Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του LBR μειώνουν ειδικά τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Nanog, τα οποία φυσιολογικά παρουσιάζουν διακυμάνσεις κατά την αδιαφοροποίητη κατάσταση των κυττάρων (Kalmar et al., 2009). Η μείωση των επιπέδων του Nanog, συμφωνεί απόλυτα με το γεγονός ότι το γονίδιο μετακινείται πλησίον του δικτύου των πυρηνικών λαμινών και υφίσταται αποσιώπηση κατά τη διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (Peric-Hupkes et al., 2010).

Ωστόσο, οι παρατηρούμενες αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του Nanog δεν φαίνεται να μεταβάλλουν την πολυδυναμία των κυττάρων, όπως υποδηλώνεται από την έκφραση άλλων παραγόντων πολυδυναμίας, τον κυτταρικό κύκλο και το αναπτυξιακό δυναμικό αυτών. Ο φυσιολογικός ρόλος του LBR διακρίνεται καλύτερα κατά τη διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, καθώς οδηγεί σε μείωση της ικανότητας σχηματισμού πλήρως λειτουργικών καρδιομυοκυττάρων. Αν οι υπερεκφρασμένες πρωτεΐνες είναι επιπρόσθετα και μεταλλαγμένες, τότε τα κύτταρα πεθαίνουν κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης και εμφανίζουν μη φυσιολογική διαφοροποίηση προς νευρωνικά κύτταρα. Συνηγορητικά, οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες εμφανίζουν πιο γρήγορη κινητική σε σύγκριση με τον αγρίου τύπου LBR.

Τα ανωτέρω στοιχεία υποδηλώνουν τη σημασία του LBR κατά τη διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, αλλά δεν διακρίνουν αν οι ιστο-ειδικές αποκλίσεις που παρατηρούνται κατά την *in vitro* διαφοροποίηση προκύπτουν λόγω της υπερέκφρασης ή της παρουσίας μεταλλάξεων στο μόριο της πρωτεΐνης. Για να διαχωρίσουμε τις δυο αυτές υποθέσεις, καταφύγαμε πρόσφατα στη χρήση επαναπρογραμματισμένων βλαστικών



κυττάρων (iPS cells) από ινοβλάστες ποντικών που φέρουν την αγρίου τύπου ή την icj μεταλλαγμένη μορφή. Προκαταρκτικά δεδομένα που προέρχονται από τη μελέτη αυτών των κυττάρων, φανερώνουν ότι ο μεταλλαγμένος icj-LBR εκφράζεται σε αυτά τα κύτταρα και εντοπίζεται στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη, όμοια με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Μελέτη της έκφρασης και του εύρους των διακυμάνσεων του παράγοντα Nanog επιβεβαιώνει τις παρατηρήσεις μας από τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, αν και οι παρατηρούμενες διαφορές είναι πιο ήπιες στην περίπτωση των επαναπρογραμματισμένων βλαστικών κυττάρων. Ωστόσο, για την καλύτερη κατανόηση του ρόλου των μεταλλάξεων του LBR στα επαναπρογραμματισμένα βλαστικά κύτταρα απαιτείται η ανάπτυξη πρωτοκόλλων στοχευμένης διαφοροποίησης αυτών.

Εν κατακλείδι, προτείνουμε ότι ο LBR ενδέχεται να επηρεάζει την έκφραση περιορισμένου αριθμού γονιδίων με διακριτό τρόπο. Έχει δειχθεί ότι τα γονίδια που γειτνιάζουν με τον πυρηνικό φάκελο, ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο, εναλλάσσονται συνεχώς (Peric-Hupkes et al., 2010) και επομένως ενδέχεται και τα γονίδια που αλληλεπιδρούν με τον LBR να διαφέρουν μεταξύ των διαφορετικών καταστάσεων του κυττάρου. Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί οι μεταλλάξεις του LBR επηρεάζουν τους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους με διαφορετικό τρόπο και προκαλούν μια πληθώρα κλινικών εκδηλώσεων.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### ***Κατευθυνόμενη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων: Ρόλος των επιγενετικών τροποποιήσεων και των αλληλεπιδράσεων χρωματίνης – πυρηνικού φακέλου.***

**Ιωάννης Γιαννιός**

Ο υποδοχέας της λαμίνης Β (LBR) είναι μια εξαιρετικά συντηρημένη διαμεμβρανική πρωτεΐνη του πυρηνικού φακέλου, που περιλαμβάνει ένα υδρόφιλο αμινοτελικό τμήμα, οκτώ εν σειρά διαμεμβρανικές περιοχές (TM I-VIII) και ένα ουραίο καρβοξυτελικό τμήμα. Η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με την περιφερική ετεροχρωματίνη, και το δίκτυο των πυρηνικών λαμινών, σχηματίζοντας διακριτές «νησίδες» στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη. Υπάρχουν ενδείξεις ότι ο LBR συμμετέχει στη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του πυρήνα, στη μεταγωγή σήματος, αλλά και στη μεταγραφική απενεργοποίηση μεγάλων γονδιακών συστοιχιών που είναι συνδεδεμένες με την πυρηνική περιφέρεια (LADs). Λόγω της εντυπωσιακής ομολογίας ανάμεσα στις διαμεμβρανικές περιοχές του LBR και τις αντίστοιχες περιοχές των ενζύμων DHCR14 και DHCR7, δύο αναγωγασών της στερόλης, εικάζεται επίσης ότι η πρωτεΐνη μπορεί να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη βιοσύνθεση της χοληστερόλης. Ποια από αυτές τις υποθέσεις και εικασίες είναι ορθή δεν είναι σαφές προς το παρόν. Παρόλα ταύτα, είναι μάλλον βέβαιο ότι ο LBR εμπλέκεται σε ζωτικής σημασίας λειτουργίες, διότι μεταλλάξεις σε διάφορα τμήματα του μορίου του προκαλούν μείζονες αναπτυξιακές βλάβες και θανατηφόρες νόσους στο ποντίκι και τον άνθρωπο.

Για να αποτυπωθούν οι σχέσεις δομής-λειτουργίας και να αποκαλυφθεί ο κύριος φυσιολογικός ρόλος του LBR, μελετήσαμε συστηματικά την κατανομή και τη δυναμική του αγρίου τύπου μορίου, εν σχέσει προς μεταλλαγμένες μορφές από τις οποίες έχουν αφαιρεθεί διάφορες περιοχές και δομικά μοτίβα. Σε αντιδιαστολή με προηγούμενες εργασίες, διαπιστώθηκε ότι η δυναμική τόσο της αγρίου τύπου πρωτεΐνης όσο και των μεταλλαγμένων μορφών παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις από τη μία περιοχή του πυρηνικού φακέλου στην άλλη. Οι διακυμάνσεις αυτές οφείλονται πρωτίστως στην ανομοιογενή κατανομή του LBR κατά μήκος της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης, αλλά και στην εμφανή ασυμμετρία της διεπιφάνειας πυρηνικού φακέλου-ενδοπλασματικού δικτύου. Παρά τη δυναμική αυτή «αβεβαιότητα», η σύγκριση των μέσων κινητικών παραμέτρων (ensemble average parameters) που προκύπτουν από την ανάλυση της δυναμικής του LBR σε επίπεδο

κυτταρικών πληθυσμών επιτρέπει την εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων σε ό,τι αφορά τις διαφορές αγρίου τύπου και μεταλλαγμένης πρωτεΐνης. Παραδείγματος χάρη, παράγωγα του LBR από τα οποία απουσιάζουν οι διαμεμβρανικές περιοχές V-VIII ή μόνο η VIII (όπως στη νόσο ιχθύωση και τη δυσπλασία του Greenberg) είναι κατά μέσο όρο πιο «κινητικά» στον πυρηνικό φάκελο από τον αγρίου τύπου LBR. Αντίθετα, μεταλλαγμένες μορφές από τις οποίες έχουν αφαιρεθεί οι διαμεμβρανικές περιοχές II-VIII, είναι λιγότερο κινητικές από την ακέραια πρωτεΐνη.

Για να διαπιστωθεί εάν ο αγρίου τύπου ή ο μεταλλαγμένος LBR επηρεάζουν βασικές λειτουργίες, όπως τη διατήρηση της πολυδυναμίας και την ικανότητα διαφοροποίησης, αναπτύξαμε σειρές εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ποντικού που εκφράζουν σταθερά τις αντίστοιχες πρωτεΐνες. Στο στάδιο των αδιαφοροποίητων κυττάρων, παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση της αγρίου τύπου πρωτεΐνης μειώνει ελαφρά την έκφραση, αλλά περιορίζει σημαντικά το δυναμικό εύρος των στοχαστικών διακυμάνσεων που υφίσταται ο μεταγραφικός παράγοντας Nanog. Κατ' αυτό τον τρόπο, σε επίπεδο πληθυσμού, μειώνεται αισθητά το ποσοστό των «αυθεντικά» πολυδύναμων (naïve) βλαστικών κυττάρων και αυξάνεται εκείνο των «κινητοποιημένων» (primed). Κάτι ανάλογο συμβαίνει, σε πολύ μικρότερο όμως βαθμό, μετά από υπερέκφραση των μεταλλαγμένων μορφών LBR.

Σειρές βλαστικών κυττάρων που εκφράζουν την αγρίου τύπου ή τις «υπερ-κινητικές» μορφές της πρωτεΐνης αδυνατούν να αναπτυχθούν φυσιολογικά και εμφανίζουν ιστο-ειδικές αποκλίσεις όταν επάγεται η στοχευμένη διαφοροποίησή τους προς καρδιο-μυοκύτταρα ή νευρωνικά κύτταρα. Εν τούτοις, ενώ οι σειρές που εκφράζουν αγρίου τύπου LBR επιβιώνουν για αρκετές ημέρες μετά την απόσυρση του παράγοντα επιβίωσης LIF από τα θρεπτικά μέσα, όλες οι σειρές που εκφράζουν τα κολοβωμένα μεταλλάγματα του υφίστανται μαζικό θάνατο. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, προκαταρκτικά δεδομένα που προέρχονται από τη μελέτη επαναπρογραμματισμένων ινοβλαστών προς βλαστικά κύτταρα (iPS cells) υποδηλώνουν ότι οι επιδράσεις της υπερέκφρασης του LBR και της αλλαγής στην αρχιτεκτονική του είναι διακριτά φαινόμενα.

## SUMMARY

### ***Directed differentiation of embryonic stem cells: Epigenetic factors and interactions between chromatin - nuclear envelope.***

**Ioannis Giannios**

Lamin B receptor (LBR) is a ubiquitous integral protein of the inner nuclear membrane, consisting of a N-terminal part facing the nucleoplasm, eight transmembrane domains and a small C-terminal tail. The protein interacts with chromatin, lamin B and HP1 and has the ability to form distinct microdomains in the inner nuclear membrane. Main functions of the protein are the preservation of chromatin structure and, perhaps, some role in cholesterol biosynthesis. Mutations of the LBR gene are responsible for major diseases in human and mice. In human embryos, truncation of the LBR protein beyond the seventh transmembrane domain results in Greenberg's dysplasia, while in mice truncation at the fourth transmembrane domain results in ichthyosis.

LBR has often been used as a marker of the inner nuclear membrane and as a reporter of nuclear envelope dynamics. However, what we currently know about the intracellular mobility of this protein is largely based on the properties of a "designer's mutant", which shows correct localization, but lacks the carboxy-terminal two-thirds of the molecule. Drawing a distinction from previous studies, we show here that the diffusional mobility of LBR exhibits a striking, region-specific variation, consistent with its non-uniform distribution along the inner nuclear membrane and the apparent asymmetry of the nuclear envelope-endoplasmic reticulum interface. Interestingly, removal of transmembrane domains II-VIII (as in the "designer's mutant") lowers significantly the ensemble averaged mobility of LBR at the nuclear envelope, but does not seem to affect LBR dynamics at the endoplasmic reticulum. On the other hand, deletion of transmembrane domains V-VIII or VIII (corresponding to icj and Greenberg mutants) renders the protein hyper-mobile.

Recent findings support that during the transition from the undifferentiated to the differentiated state of embryonic stem cells (ESCs), silenced loci attached to the nuclear periphery gradually detach and the corresponding genes are activated. Considering that LBR is directly implicated in the process of differentiation in at least one lineage (neutrophil leucocytes), our aim was to decipher in detail the functional role of the protein during ESCs differentiation. Our data suggest that over-expression of wild type or mutant LBR in

embryonic stem cells lowers significantly the dynamic range of Nanog fluctuations, but does not affect the non-differentiated state *per se*. However, this modest down-regulation of Nanog seems to alter the differentiation potential of the cells. Results from directed differentiation protocols show that cells over-expressing the hyper-mobile LBR mutants exhibit increased cell death and lineage-specific effects. Concluding, we suggest that LBR is important for orderly stem cell differentiation, but in a lineage-specific manner.

## *Παράρτημα*





## 6.1 Μέθοδος ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτοσκίαση (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP)

Η κινητική των μορίων μπορεί να μελετηθεί με έναν σχετικά περιορισμένο αριθμό τεχνικών όπως: ο εντοπισμός μονήρων σωματιδίων (Single Particle Tracking, SPT), η φασματοσκοπία συσχέτισης φθορισμού (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS), η ανάκτηση φθορισμού μετά από φωτοσκίαση (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP) ή νέες τεχνικές, όπως η φωτο-ενεργοποίηση (με χρήση της φωτο-ενεργοποιήσιμης, PA-GFP). Η τεχνική του εντοπισμού μονήρων σωματιδίων προσφέρει τις περισσότερες πληροφορίες και επιτυγχάνει την καλύτερη διακριτική ικανότητα, καθώς παρακολουθεί μικροσκοπικά στην πάροδο του χρόνου, τις πορείες μονήρων μορίων επιτρέποντας την ανίχνευση μεμονωμένων συμβάντων, όπως τις διακυμάνσεις της κινητικής λόγω χωρικών αιτιών (space depended mobility). Η χρήση της πρωτεΐνης GFP, σε αυτή την τεχνική, περιορίζεται εξαιτίας της χαμηλής φωτοσταθερότητας των σημασμένων πρωτεϊνών για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται ευρέως στη μελέτη μορίων εξωκυτταρικών μεμβρανών σημασμένων με οργανικές χρωστικές ή κβαντικά σφαιρίδια (Quantum dots). Επιπλέον, η τεχνική του εντοπισμού μονήρων σωματιδίων είναι χρονοβόρα καθώς απαιτεί τον εντοπισμό και την ανάλυση πολλαπλών μεμονωμένων πορειών. Σε αντίθεση με το SPT, οι τεχνικές των FCS και FRAP δίνουν μαζικές μετρήσεις της μέσης κινητικής των μορίων σε ένα καθορισμένο όγκο. Στην τεχνική της FCS καταγράφονται οι διακυμάνσεις του φθορισμού ως συνάρτηση του χρόνου, εξαιτίας των μορίων που διέρχονται από ένα συγκεκριμένο εστιακό όγκο. Από τις πειραματικές καμπύλες μπορούν να εξαχθούν τιμές όσον αφορά το συντελεστή διάχυσης (diffusion coefficient) ή τη συγκέντρωση των μορίων, ακόμη και για μόρια που διαχέονται γρήγορα. Κύριο μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι η χρήση ειδικού μικροσκοπίου και καλής τεχνογνωσίας για την εξαγωγή ασφαλών αποτελεσμάτων. Η αρχή της μεθόδου της FRAP στηρίζεται στη σκίαση του φθορισμού των μορίων σε μια συγκεκριμένη περιοχή του δείγματος. Η κινητική της πρωτεΐνης εκτιμάται από την ανάκτηση του φθορισμού στη περιοχή λόγω ανταλλαγής σκιασμένων και άθικτων μορίων.

Η τεχνική της FRAP χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στα μέσα του 1970 για τη μελέτη της διάχυσης βιομορίων σε ζωντανά κύτταρα (Edidin et al., 1976). Η ανάπτυξη των συνεστιακών μικροσκοπιών σε συνδυασμό με την κλωνοποίηση της πρωτεΐνης GFP (Prasher et al., 1992), την καθιέρωσαν ως την κυριότερη και πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την μέτρηση της κινητικής. Αν και είναι δύσκολο να περιγραφεί η πολυπλοκότητα των

αλληλεπιδράσεων με μία μόνο τεχνική, παρ' όλα αυτά μπορεί να μας βοηθήσει να κατανοήσουμε την κινητική των μορίων (molecular dynamics) και να υποστηρίξει πιθανολογούμενα βιολογικά μοντέλα.

Από τη μέτρηση της κινητικής μπορούν να εξαχθούν πληροφορίες για τις ακόλουθες ιδιότητες της πρωτεΐνης:

- α) το κινητικό κλάσμα των μορίων της πρωτεΐνης,
- β) το συντελεστή διάχυσης  $D$ ,
- γ) το χρόνο δέσμευσης της πρωτεΐνης σε μακρομοριακές δομές,
- δ) τον τρόπο μεταφοράς της πρωτεΐνης: τυχαία διάχυση, κατευθυνόμενη ροή ή πιο πολύπλοκα φαινόμενα και
- ε) τη συνοχή (continuity) των ενδοκυτταρικών οργανιδίων.

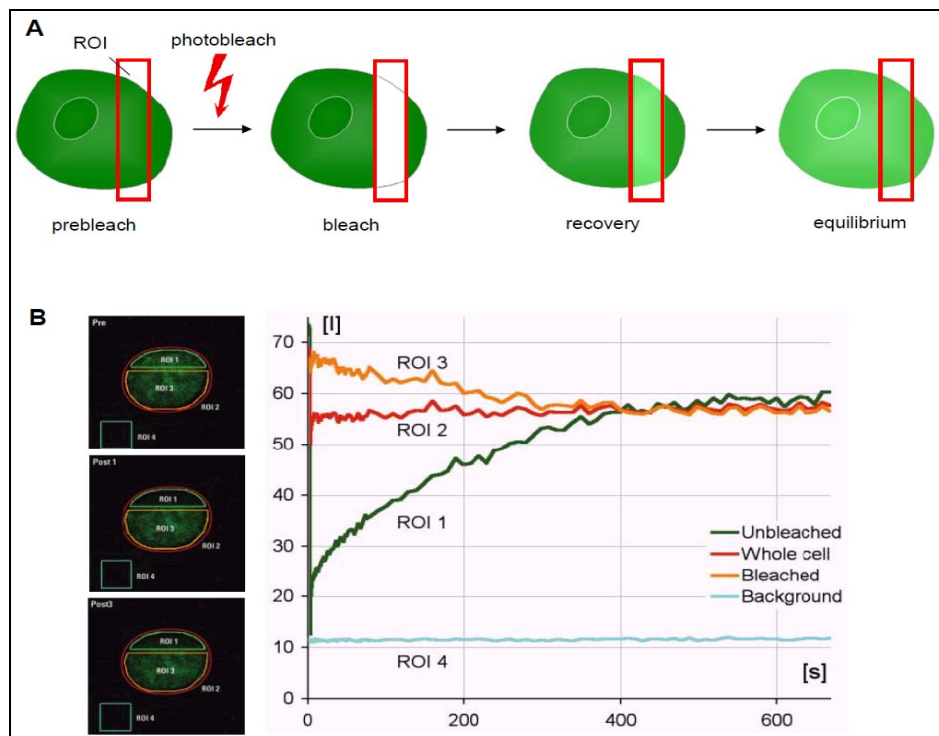
Η μεθοδολογία χωρίζεται σε τρία στάδια: τη συλλογή, την επεξεργασία (κανονικοποίηση) και την ανάλυση των δεδομένων.

### 6.1.1 Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων

Τα πειράματα FRAP πρέπει να πραγματοποιούνται με τέτοιες συνθήκες ώστε οι κυτταρικές διαδικασίες να μη διαταράσσονται και το πρότυπο κατανομής της πρωτεΐνης να μην αλλάζει. Ως επί το πλείστον, τα πειράματα FRAP πραγματοποιούνται σε συνεστιακά μικροσκόπια υψηλής ταχύτητας σάρωσης, τα οποία διαθέτουν φίλτρο AOTF (acousto-optical tunable filter), μέσω του οποίου μεταβάλλετε στιγμιαία η ισχύς της ακτινοβολίας laser από χαμηλή ένταση που απαιτείται για την απεικόνιση (4-8% της μέγιστης τιμής) σε υψηλή ένταση (100%) που απαιτείται για τη φωτοσκίαση. Στην περίπτωση των κυττάρων θηλαστικών χρησιμοποιούνται συνήθως ειδικοί θερμαινόμενοι κλίβανοι, όπου η θερμοκρασία παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Αρχικά επιλέγεται κατάλληλο κύτταρο όπου η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος είναι συζευγμένη με φθορίζουσα πρωτεΐνη και λαμβάνονται διαδοχικές εικόνες (pre-bleach images), όπου μετράται η αρχική μέση ένταση φθορισμού του δείγματος και ορίζεται η περιοχή ενδιαφέροντος (Region Of Interest, ROI) όπου θα προκληθεί φωτοσκίαση. Ακολουθεί στιγμιαία φωτοσκίαση, με χρήση 100% της έντασης του laser, και λήψη κατάλληλου αριθμού εικόνων (post-bleach images), όπου παρατηρείται ο ρυθμός ανάκτησης του φθορισμού στην περιοχή ενδιαφέροντος. Επιπρόσθετα της ανωτέρω περιοχής ορίζονται δυο ακόμη ROIs: το σύνολο της περιοχής στην οποία κατανέμεται η πρωτεΐνη που αναλύεται και μια περιοχή στην οποία δεν εντοπίζεται η πρωτεΐνη ώστε να καταγραφεί ο θόρυβος

(background) (εικόνα 6.1). Αυτές οι περιοχές χρησιμοποιούνται για την κανονικοποίηση των δεδομένων.



**Εικόνα 6.1 Η τεχνική FRAP.** Α. Η πρωτεΐνη προς μελέτη συζευγμένη με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP σκιαζεται στην περιοχή ενδιαφέροντος (ROI) με ακτίνα laser υψηλής έντασης. Το γεγονός αυτό καταστρέφει την φθορίζουσα ιδιότητα της GFP αλλά δεν επηρεάζει την πρωτεΐνη. Στη συνέχεια καταγράφεται ο φθορισμός διαφόρων περιοχών του κυττάρου (B), ανά τακτά χρονικά διαστήματα, και παρακολουθείται η ανάκτηση φθορισμού στη περιοχή ενδιαφέροντος εξαιτίας της διάχυσης μη σκιασμένων μορίων από τις γειτονικές περιοχές. Β. Από Karpel and Eils, 2004.

Η κανονικοποίηση των δεδομένων με χρήση των εντάσεων φθορισμού της περιοχής ενδιαφέροντος  $[I_t]$ , της συνολικής περιοχής κατανομής της πρωτεΐνης  $[T_t]$  και της περιοχής μη-εντόπισης της πρωτεΐνης  $[BG]$  γίνεται ως εξής:

α) Αφαιρείται ο θόρυβος (background subtraction) για κάθε χρονικό σημείο  $t$ ,

$$(I_t - BG) \text{ και } (T_t - BG)$$

β) Ορίζεται η ένταση φθορισμού που χάθηκε για κάθε χρονικό σημείο  $t$ ,

$$(T_{\text{prebleach}} - BG) / (T_t - BG)$$

γ) Διορθώνεται η ένταση φθορισμού που χάνεται, εξαιτίας της φωτοσκίασης από την ακτινοβολία χαμηλής έντασης που χρησιμοποιείται για την λήψη των εικόνων για κάθε χρονικό σημείο  $t$ ,

$$(I_t - BG)(T_{\text{prebleach}} - BG)/(T_t - BG)$$

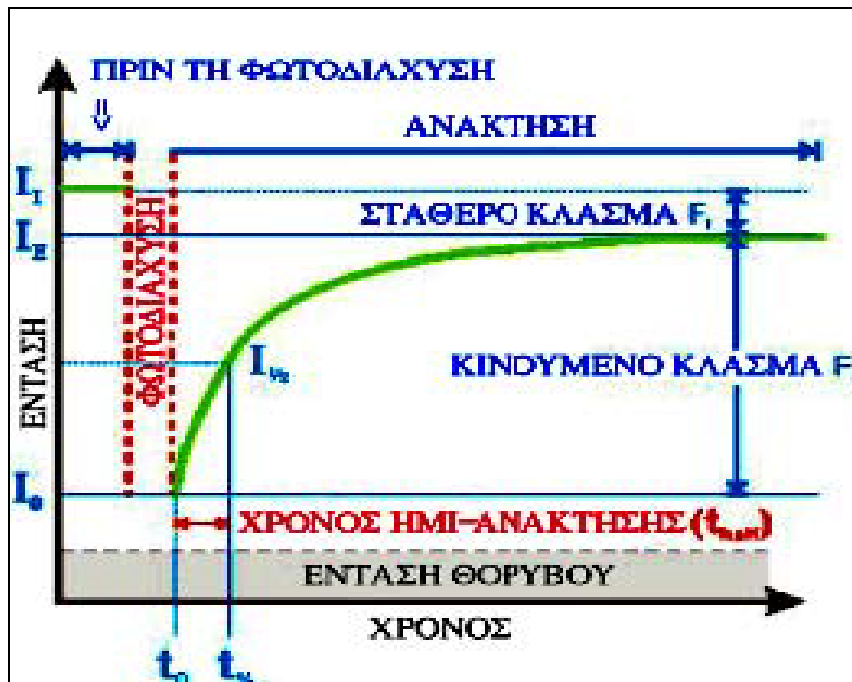
δ) Ορίζεται η σχετική ένταση φθορισμού στην περιοχή φωτοσκίασης για κάθε χρονικό σημείο  $t$ ,

$$(I_t - BG)(T_{\text{prebleach}} - BG) / (T_t - BG)(I_{\text{prebleach}} - BG)$$

Μετά την κανονικοποίηση προκύπτει γράφημα στο οποίο απεικονίζεται η ένταση φθορισμού στην περιοχή ενδιαφέροντος ως συνάρτηση του χρόνου (εικόνα 6.2). Από το γράφημα υπολογίζεται ο χρόνος ημι-ανάκτησης (recovery half-time,  $t_{1/2}$ ), δηλαδή ο χρόνος που απαιτείται ώστε ο φθορισμός στην περιοχή φωτοσκίασης να πάρει το μισό της μέγιστης τελικής τιμής. Όσο μικρότερη τιμή έχει η παράμετρος τόσο μεγαλύτερη είναι η κινητική του μορίου που αναλύεται. Ακόμη, συγκρίνεται η τελική τιμή του φθορισμού ( $I_E$ ) στην περιοχή φωτοσκίασης με την τιμή πριν την φωτοσκίαση ( $I_I$ ). Στην περίπτωση που  $I_I > I_E$ , προκύπτει το συμπέρασμα ότι μέρος του πληθυσμού των μορίων της πρωτεΐνης που αναλύεται ( $I_I - I_E$ ) είναι σταθερά συνδεδεμένο με κάποια σταθερή δομή (σταθερό κλάσμα, immobile fraction,  $F_I$ ) και το υπόλοιπο ( $I_E$ ) διαχέεται (κινούμενο, mobile fraction,  $F_m$ ), ενώ, όταν  $I_I = I_E$  το σύνολο του πληθυσμού των μορίων της πρωτεΐνης που αναλύετε διαχέεται ελεύθερα.

Οι περισσότερες μελέτες με χρήση της τεχνικής FRAP ερμηνεύουν τα αποτελέσματα αναλύοντας τις καμπύλες ανάκτησης και τον χρόνο ημι-ανάκτησης, είτε απλοποιώντας είτε αμελώντας τα φαινόμενα διάχυσης ή δέσμευσης που συμβαίνουν στο σύστημα. Ωστόσο, η εξαγωγή αποτελεσμάτων για το συντελεστή διάχυσης ή τα φαινόμενα δέσμευσης από τις καμπύλες ανάκτησης δεν είναι εφικτή, διότι το σχήμα της καμπύλης δεν αντικατοπτρίζει τις διαδικασίες που συμβαίνουν στο σύστημα (Sprague et al. 2006). Για παράδειγμα, η εξαγωγή τιμών για το χρόνο ημι-ανάκτησης έχει διαφορετικό νόημα αν η διαδικασία περιορίζεται από τη διάχυση ή τη δέσμευση (όπως θα αναφερθεί λεπτομερώς στη συνέχεια). Αν ο κύριος παράγοντας είναι η δέσμευση τότε η τιμή του  $t_{1/2}$  αντικατοπτρίζει άμεσα τη σταθερά αποδέσμωσης, ενώ στην περίπτωση της διάχυσης από την τιμή του  $t_{1/2}$  μπορεί να υπολογιστεί ο συντελεστής διάχυσης.

Ο συντελεστής διάχυσης (diffusion coefficient,  $D$ ) χαρακτηρίζει τη διάχυση ενός μορίου κάτω από συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες (π.χ. θερμοκρασίας ή ιξώδους). Τα περισσότερα από τα μοντέλα που χρησιμοποιούνται για να αναλύσουν τα πειράματα FRAP υπολογίζουν το συντελεστή διάχυσης σε συνάρτηση με το χρόνο  $\tau$  μέσω της εξίσωσης:  $D = w^2 / 4t_{1/2}$  όπου  $w$  είναι η ακτίνα της περιοχής σκίασης και  $t_{1/2}$  ο χρόνος ημι-ανάκτησης.



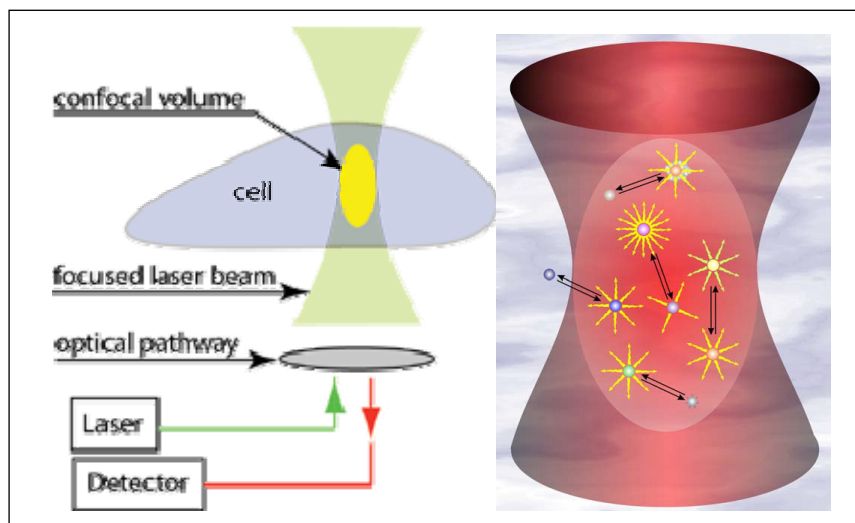
**Εικόνα 6.2** Εξιδανικευμένη καμπύλη ανάκτησης φθορισμού μετά την κανονικοποίηση των δεδομένων. Πριν το στάδιο της φωτοσκίασης, η ένταση φθορισμού  $I_i$  ισούται με 1 και πέφτει σε πολύ χαμηλά επίπεδα αμέσως μετά τη φωτοσκίαση στο σημείο  $t_0$ . Η ένταση του φθορισμού δεν γίνεται μηδέν καθώς η ανάκτηση μπορεί ήδη να πραγματοποιείται στο στάδιο της σκίασης λόγω της γρήγορης κίνησης των πρωτεϊνών και επιπλέον δεν καταστρέφεται όλος ο φθορισμός στη περιοχή ενδιαφέροντος. Η ανάκτηση συνεχίζεται μέχρι το σύστημα να φτάσει σε ισορροπία, όπου η ένταση του φθορισμού ( $I_e$ ) είναι μικρότερη της αρχικής τιμής ( $I_i$ ). Η διαφορά των εντάσεων φθορισμού αντικατοπτρίζει το σταθερό κλάσμα των μορίων της πρωτεΐνης ( $F_1$ ), ενώ η τελική ένταση φθορισμού το κινούμενο κλάσμα ( $F_m$ ).

### 6.1.2 Παράγοντες ελέγχου για τη διεξαγωγή FRAP πειραμάτων

Διάφοροι παράγοντες πρέπει να βελτιστοποιηθούν κατά τη διάρκεια ενός πειράματος FRAP για τη λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων:

- ο φωτισμός του δείγματος κατά τη διάρκεια λήψης εικόνων να είναι όσο το δυνατό χαμηλότερος ώστε να αποφευχθεί η φωτοσκίαση λόγω παρατήρησης του δείγματος.
- η διάρκεια της φωτοσκίασης να είναι όσο το δυνατό συντομότερη και να μην ξεπερνά το ένα δέκατο του χρόνου διάχυσης, καθώς διάχυση πραγματοποιείται ακόμη και κατά τη διάρκεια της φωτοσκίασης.
- ο ρυθμός λήψης εικόνων να είναι σχετικά γρήγορος, ώστε να ληφθεί ένας ικανοποιητικός αριθμός σημείων κατά την πρώτη φάση της ανάκτησης. Η ταχύτητα λήψης μπορεί να αυξηθεί αν φωτογραφηθεί ένα τμήμα αντί ολόκληρου του κυττάρου.

- η διάρκεια του πειράματος να είναι περίπου επτά με δέκα φορές πολλαπλάσια του χρόνου  $t_{1/2}$ .
- η ακτίνα του φωτός να είναι μεγάλη, ώστε η αναλογία σήματος προς θόρυβο να είναι ικανοποιητική αλλά ταυτόχρονα και μικρή, ως προς το μέγεθος του μελετημένου συστήματος, ώστε με αυτόν τον τρόπο να αποφευχθούν παρενέργειες στη κινητική (border effects on recovery). Για παράδειγμα, τα κυτταρικά τοιχώματα μπορούν να επηρεάσουν την κινητική λόγω διάθλασης.
- η επιλογή του αντικειμενικού φακού είναι σημαντική αναφορικά με τη γεωμετρία του όγκου που φωτοσκιάζεται και τη γεωμετρία του δείγματος. Γενικά όσο πιο λεπτή είναι η δομή που μελετάται τόσο πιο μεγάλο μπορεί να είναι το NA του αντικειμενικού φακού. Για δείγματα πάχους μεγαλύτερα από 10 $\mu\text{m}$  συνιστάται η χρήση αντικειμενικών φακών μικρής μεγέθυνσης / NA, γιατί ο όγκος φωτοσκίασης μπορεί να θεωρηθεί κυλινδρικός που διαπερνά το δείγμα σε όλο του το πάχος. Έτσι η διάχυση μπορεί να θεωρηθεί ότι γίνεται στις δυο διαστάσεις και αυτό απλοποιεί περαιτέρω την ανάλυση (εικόνα 6.3).



**Εικόνα 6.3 Ο όγκος της περιοχής ενδιαφέροντος.** Η επιλογή του κατάλληλου αντικειμενικού φακού επιτρέπει τη θεώρηση του όγκου που σκιάζεται ως κυλινδρικός, μικρός σε σχέση με όλη την επιφάνεια του κυττάρου, ο οποίος διαπερνά το κύτταρο σε όλο του το πάχος. Αυτό επιτρέπει την απλοποίηση ότι φαινόμενα που επιφέρουν αλλαγές στην ένταση φθορισμού να θεωρούνται ότι γίνονται σε δυο διαστάσεις.

Το κυριότερο στάδιο των πειραμάτων FRAP είναι η φωτοσκίαση της περιοχής ενδιαφέροντος με αποτελεσματικό και ακριβή τρόπο. Ο ακριβής μηχανισμός της φωτοσκίασης δεν είναι γνωστός, αλλά πιθανολογείται ότι σχετίζεται με την μετάβαση από την ενεργή μονή κατάσταση (excited singlet state) στην ενεργή τριπλή κατάσταση (excited

triplet state). Η ενεργή τριπλή κατάσταση έχει σχετικά μακρά διάρκεια ζωής και είναι χημικά πιο ενεργή.

Κάθε φθορισμογόνο μόριο έχει διαφορετικά χαρακτηριστικά αναφορικά με τη φωτοσκίαση. Στα πειράματα FRAP είναι σημαντικό να χρησιμοποιούνται μόρια τα οποία φωτοσκιάζονται ελάχιστα, κάτω από συνθήκες χαμηλού φωτός αλλά σκιάζονται γρήγορα και μη αντιστρεπτά, κάτω από δυνατή ένταση φωτός.

Για να ελαχιστοποιηθεί η φωτοσκίαση κατά τη διάρκεια λήψης εικόνων, πρέπει να ρυθμιστούν κατάλληλα οι κάτωθι παράμετροι:

- Μείωση των pixel ανάλυσης με μείωση της μεγέθυνσης ή μείωση του αριθμού των pixel (π.χ. χρήση pixels 128x128 αντί 512x512).
- Χρήση μεγαλύτερης ταχύτητας σάρωσης.
- Μείωση της ισχύος του laser.
- Χρήση φθορισμογόνων μορίων τα οποία είναι πιο ανθεκτικά στη φωτοσκίαση κάτω από συνθήκες χαμηλής έντασης laser.
- Αποφυγή χρήσης frame ή line average.
- Ρύθμιση του pinhole σε μεγάλη τιμή ώστε να λαμβάνονται πιο φωτεινά σήματα με χρήση μικρότερης έντασης laser.

Αντιθέτως παράμετροι που επηρεάζουν το στάδιο της φωτοσκίασης είναι:

- Ένταση του laser: περισσότερη ένταση laser έχει ως αποτέλεσμα πιο γρήγορη φωτοσκίαση, αλλά μπορεί να είναι επιβλαβής για τα κύτταρα.
- Μεγέθυνση: χρήση μεγάλης μεγέθυνσης αυξάνει την αποτελεσματική ακτινοβολία της περιοχής σάρωσης, με παράλληλη αύξηση της ταχύτητας φωτοσκίασης. Ωστόσο, αυξάνεται και ο χρόνος που απαιτείται για την επιστροφή στη κανονική μεγέθυνση λήψης εικόνων, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένες πληροφορίες για την ανάκτηση του φθορισμού.
- Ταχύτητα σάρωσης: όσο πιο μικρή είναι η ταχύτητα σάρωσης τόσο πιο πολύ ενέργεια ακτινοβολείται (radiated).

### 6.1.3 Ανάλυση FRAP δεδομένων

Τα δεδομένα από τα πειράματα FRAP είναι δυνατόν να αξιολογηθούν ποσοτικά απλά από το προκύπτον σχήμα της καμπύλης ανάκτησης φθορισμού, η οποία ανάλογα με την κινητική θα έχει και διαφορετική μορφή. Για να ληφθούν πιο αξιόπιστα ποσοτικά δεδομένα

από τα πειράματα, πρέπει να εφαρμοστεί μαθηματική μοντελοποίηση στις προκύπτουσες καμπύλες. Διάφορα μοντέλα έχουν προταθεί και αναλύονται λεπτομερώς στους Lele et al., 2004, Sprague et al., 2004, Sprague et al., 2006, Mazza et al., 2008. Για τα περισσότερα από τα μοντέλα έχουν ληφθεί υπόψη διάφορες υποθέσεις για την απλοποίηση του προβλήματος, όπως:

- τα μόρια κινούνται σε μια συγκεκριμένη περιοχή άπειρου ή μεγαλύτερου μεγέθους,
- ο ολικός αριθμός των μορίων δεν αλλάζει κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης του πειράματος,
- η φωτοσκίαση είναι πολύ σύντομη, ώστε η διάχυση που συμβαίνει εκείνη την περίοδο να θεωρείται αμελητέα και
- η φωτοσκίαση λόγω λήψης εικόνων είναι αμελητέα ή εισάγεται ως παράμετρος στο μοντέλο.

Τα μοντέλα αυτά κατηγοριοποιούνται σε αναλυτικά και αριθμητικά μοντέλα.

### 6.1.3.1 Αναλυτικά μοντέλα

Τα αναλυτικά μοντέλα στηρίζονται στη λύση (ή σε μια προσέγγιση) της εξίσωσης η οποία διέπει την εξέλιξη του μελετημένου φαινομένου (π.χ. εξίσωση διάχυσης). Παρέχουν μια έκφραση του φθορισμού εν συναρτήσει του χρόνου για την περίοδο μετά τη φωτοσκίαση, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα για τη μοντελοποίηση (fit) των πειραματικών δεδομένων. Αυτό αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα καθώς επιτρέπει την εκτίμηση των παραμέτρων του μοντέλου πιο άμεσα. Ο μόνος περιορισμός είναι ότι η εκτίμηση είναι έγκυρη μόνο κάτω από συγκεκριμένες υποθέσεις και χωροταξικούς περιορισμούς (π.χ. όγκος φωτοσκίασης και δείγμα) και δεν μπορεί να εφαρμοστεί εύκολα για διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. Επομένως, πρέπει να χρησιμοποιούνται πολύ προσεκτικά και η προκύπτουσα υπόθεση να ελέγχεται για την εγκυρότητά της. Τα αναλυτικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται κατηγοριοποιούνται ανάλογα με ποιά διαδικασία επηρεάζει περισσότερο την κινητική των μορίων (διάχυση ή πρόσδεση).

#### 6.1.3.1.1 Διάχυση

Όταν ο αριθμός των φθορισμογόνων μορίων του δείγματος είναι αρκετά μεγάλος ώστε να υποθέτεται ένα συνεχές μέσο, η συγκέντρωση των μορίων μπορεί να υπολογιστεί και η διάχυση λόγω Brownian κίνησης να περιγραφεί από μια διαφορική εξίσωση,



υπολογίζοντας το συντελεστή διάχυσης  $D$ . Υπάρχουν δυο βασικοί τρόποι για τη μοντελοποίηση της διάχυσης: χρησιμοποιώντας ένα στοχαστικό μοντέλο το οποίο περιγράφει τη κίνηση Brown ως τυχαία κίνηση των μορίων ή με χρήση του νόμου της διάχυσης που περιγράφηκε από τον Fick το 1855. Καθώς τα πειράματα FRAP αναπαριστούν τη διάχυση του πληθυσμού των μορίων και επομένως αντικατοπτρίζουν μια βαθμίδωση συγκέντρωσης, η προσέγγιση με χρήση του νόμου της διάχυσης είναι πιο κατάλληλη. Ο νόμος του Fick στην περίπτωση μελέτης της διάχυσης σε μία διάσταση εκφράζεται ως

$$\frac{\partial c(x, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}$$

όπου  $c$  η συγκέντρωση του μορίου και  $D$  ο συντελεστής διάχυσης. Η πρώτη χρήση του νόμου σε πειράματα FRAP προήλθε μετά από αναλυτική μοντελοποίηση από τον Axelrod et al. (1976), η οποία μετέπειτα χρησιμοποιήθηκε και τροποποιήθηκε ευρέως (Soumpasis 1983; Phair and Misteli 2000; Braeckmans et al. 2003). Στην περίπτωση όπου τα μόρια κινούνται μόνο με διάχυση, ο Axelrod πρότεινε τη χρήση της απλοποιημένης εξίσωσης  $D = 0.224w^2/t_{1/2}$ , όπου  $w$  η ακτίνα της περιοχής φωτοσκίασης και  $t_{1/2}$  ο χρόνος ημι-ανάκτησης. Ωστόσο, αυτή η εξίσωση προϋποθέτει κατανομή κατά Gauss της καμπύλης σκίασης και η διάχυση να συμβαίνει εγκάρσια σε 2 διαστάσεις (diffusion to occur only laterally, in 2D) (Klonis et al. 2002; Carrero et al. 2003). Μια διαφορετική προσέγγιση αποτελεί η σύγκριση του χρόνου ημι-ανάκτησης με αυτή που προκύπτει από in vitro πειράματα, αν είναι γνωστό το μέγεθος του μορίου (Seksek et al. 1997; Snapp et al. 2003).

#### 6.1.3.1.2 Διάχυση και πρόσδεση

Οι αλληλεπιδράσεις των μορίων, αν απλοποιηθούν, μπορούν να ληφθούν υπόψη στη μοντελοποίηση των πειραμάτων FRAP. Συνήθως, η απλοποίηση γίνεται αν θεωρήσουμε ένα μόριο που διαχέεται (F) ότι αλληλεπιδρά με ακινητοποιημένες θέσεις πρόσδεσης (S) και σχηματίζει το σύμπλοκο (C). Οπότε προκύπτει η αντίδραση  $F + S \rightleftharpoons C$ , με  $k_{on} [F][S] = k_{off} [C]$  κατά την ισορροπία του συστήματος.

Ο Sprague διατύπωσε ότι ανάλογα με τις τιμές  $k_{on}$  και  $k_{off}$ , μπορεί να υπάρξουν οι ακόλουθες περιπτώσεις κινητικής:

- **απλή διάχυση (free diffusion):** η πρόσδεση στις περιοχές σύνδεσης είναι αμελητέα εάν η τιμή  $k_{on}$  είναι πολύ μικρή και η αντίστοιχη  $k_{off}$  πολύ μεγάλη, οπότε η κινητική εξαρτάται μόνο από το φαινόμενο της διάχυσης και το μοντέλο του Soumpasis μπορεί να εφαρμοστεί.
- **εξαρτώμενη από τη πρόσδεση (reaction dependent ή diffusion-uncoupled mode):** η διάχυση δεν συνεισφέρει στην κινητική του μορίου, η οποία εξαρτάται μόνο από την ταχύτητα ανταλλαγής σκιασμένων/ φθοριζόντων μορίων στον προσδέτη. Πρέπει να τονιστεί ότι ο χρόνος ανάκτησης θα είναι ο ίδιος για διαφορετικού μεγέθους περιοχές σκίασης, γιατί μόνο η διάχυση και όχι η πρόσδεση, εξαρτάται από την επιφάνεια της περιοχής (ανάλογη του τετραγώνου της ακτίνας). Σε αυτή την περίπτωση μπορούν να χρησιμοποιηθούν μοντέλα εκθετικής συσχέτισης. Ωστόσο, αυτή η κατάσταση πιθανώς ισχύει σπάνια στα ζωντανά κύτταρα και φαίνεται ότι η διάχυση επιδρά πάντα στην κινητική των μορίων, ακόμη και στις περιπτώσεις χαμηλής κινητικής (εικόνα 6.4).
- **ενεργή διάχυση (Effective diffusion ή diffusion-coupled mode):** εφαρμόζεται στην περίπτωση όπου η ανταλλαγή μορίων στον προσδέτη είναι πιο γρήγορη σε σύγκριση με τη διάχυση και μπορεί να θεωρηθεί ότι βρίσκεται σε σταθερή κατάσταση. Επομένως, η κινητική του μορίου εξαρτάται από τη διάχυση των ελεύθερων μορίων. Στην περίπτωση αυτή υπάρχει σημαντική διαφορά στις τιμές ανάκτησης με την αλλαγή μεγέθους της περιοχής φωτοσκίασης. Τα μοντέλα διάχυσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν αλλά τότε η υπολογιζόμενη τιμή του συντελεστή διάχυσης θα είναι μικρότερη της θεωρητικής τιμής. Ο υπολογιζόμενος συντελεστής διάχυσης καλείται  $D_{eff}$  (effective diffusion coefficient), αναπαριστά το σύνολο των συντελεστών διάχυσης των ελεύθερων και δεσμευμένων μορίων και υπολογίζεται από την εξίσωση  $D_{eff} = D_{free} \times \text{Fraction}_{free}$  (Sprague et al. 2006) (Εικόνα 6.4).
- **πρόσδεση –διάχυση (Reaction-diffusion):** υπάρχουν περιπτώσεις όπου οι τιμές των  $k_{on}$  και  $k_{off}$  ποικίλουν και τα φαινόμενα διάχυσης και πρόσδεσης επιδρούν παρόμοια στο σύστημα, οπότε δεν μπορούν να εφαρμοστούν απλοποιήσεις. Σε αυτές τις περιπτώσεις χρησιμοποιούνται τα μοντέλα πρόσδεσης – διάχυσης.

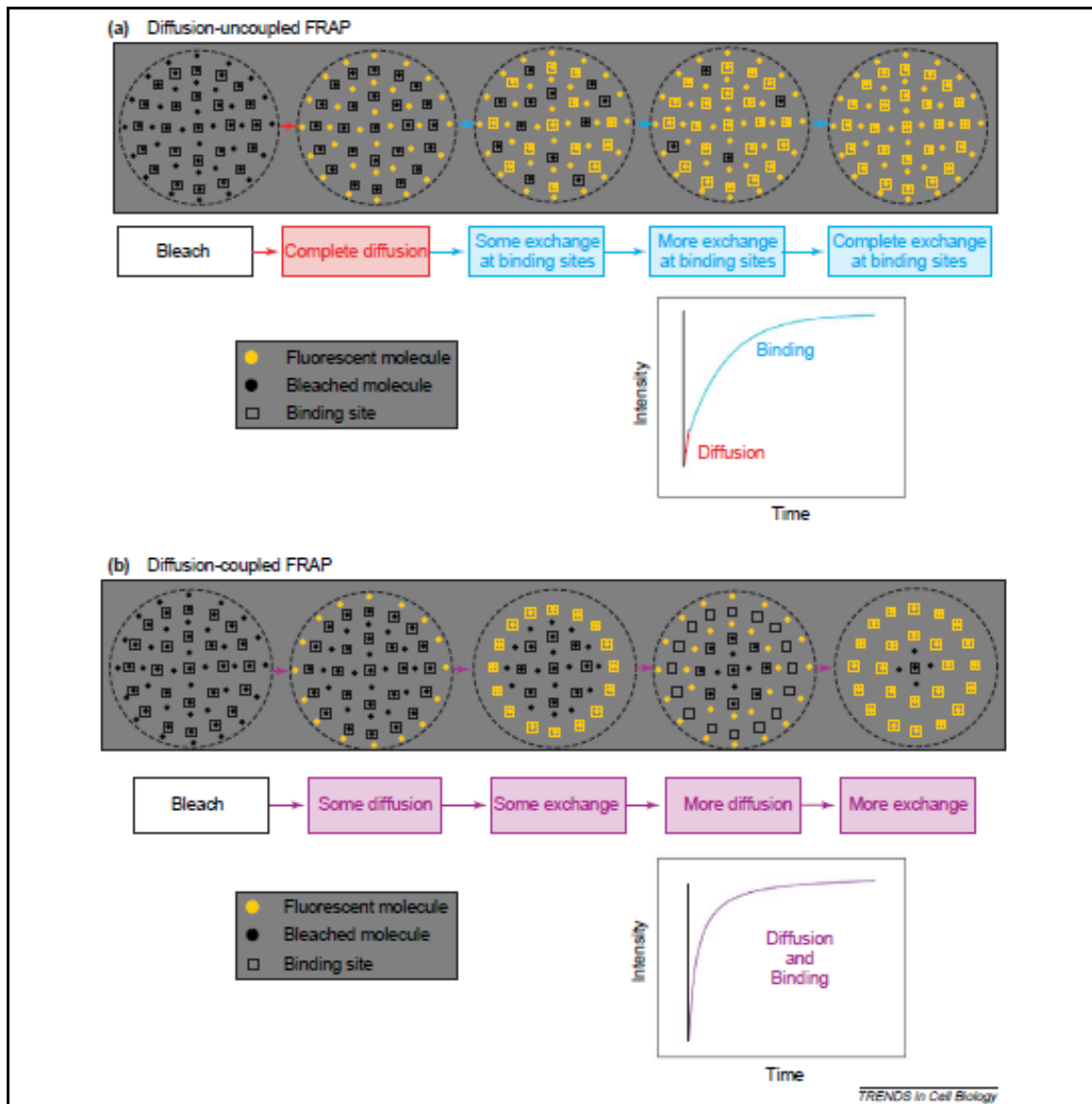
### 6.1.3.2 Αριθμητικά μοντέλα

Στην περίπτωση όπου δεν είναι εφικτή η αναλυτική μοντελοποίηση του συστήματος, προτείνεται η χρήση αριθμητικών μεθόδων. Αυτές δεν παρέχουν μια παράσταση (expression) που μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα στην κανονικοποίηση (fitting) των δεδομένων, αλλά μια υπολογιζόμενη καμπύλη, η οποία συγκρίνεται με την πειραματική. Χρησιμοποιώντας

αλγόριθμους βελτιστοποίησης, οι παράμετροι του μοντέλου εναλλάσσονται επανειλημμένα για να υπολογιστεί η αριθμητική λύση και να βρεθεί η κατάλληλη καμπύλη η οποία ανταποκρίνεται καλύτερα στα πειραματικά δεδομένα. Το κύριο πλεονέκτημα των αριθμητικών μοντέλων είναι ότι δεν απαιτούν προκαθορισμένες αρχικές συνθήκες. Σε αντίθεση με τις αναλυτικές μεθόδους, οι αρχικές συνθήκες μπορούν να μετρηθούν από τα πειραματικά δεδομένα αβίαστα και η εξέλιξη του φαινομένου να υπολογιστεί με ακρίβεια. Επιπλέον, πιο πολύπλοκες καταστάσεις όπως ανώμαλη γεωμετρία φωτοσκίασης, μπορούν να λυθούν.

### 6.1.3.3 Προσομοιώσεις FRAP

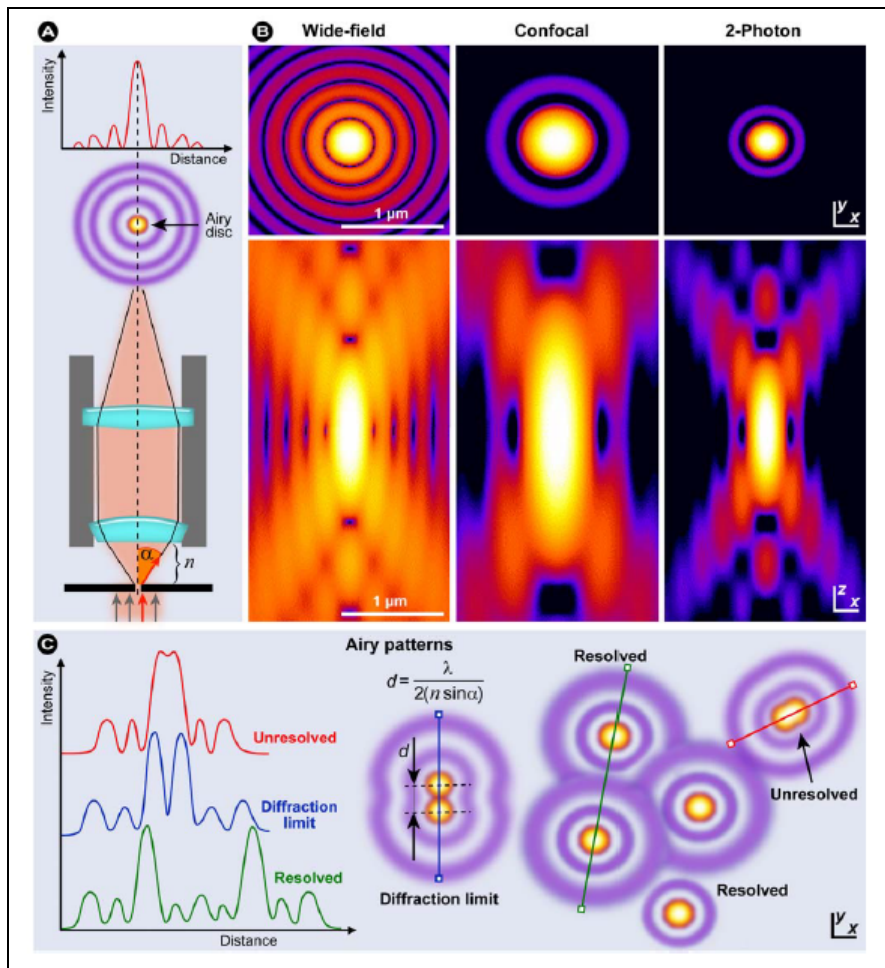
Σε πιο πολύπλοκες καταστάσεις, είναι πιθανό να μη δύναται η χρήση εξισώσεων που να περιγράφουν το βιολογικό δείγμα και να απαιτείται μια διαφορετική προσέγγιση, όπως η χρήση προσομοιώσεων. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη προσομοίωση είναι η Monte - Carlo η οποία στηρίζεται στην αρχή, ότι οι τροχιές μια πληθώρας μονήρων μορίων υπολογίζονται σύμφωνα με τους κανόνες οι οποίοι περιγράφουν την κινητική των σωματιδίων. Μπορούν να εφαρμοστούν σε αρκετά πολύπλοκα συστήματα όπως η ύπαρξη διαφόρων πληθυσμών του μορίου με διαφορετικές συγγένειες με τον προσδέτη, η διαμερισματοποίηση του δείγματος σε μεμβρανικές περιοχές και κυτταρόπλασμα κ.α.. Οι κυριότεροι περιορισμοί στη χρήση προσομοιώσεων είναι η απαίτηση πολλών υπολογισμών (high computational cost) και ότι οι προκύπτουσες καμπύλες ανάκτησης φθορισμού δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα για την κανονικοποίηση των δεδομένων. Το γεγονός αυτό συμβαίνει διότι τα δεδομένα της προσομοίωσης έχουν μεγάλο θόρυβο, λόγω της έμφυτης τυχαίας διαδικασίας με την οποία προκύπτουν.



**Εικόνα 6.4 Μοντέλα διάχυσης και πρόσδεσης.** (α) Εξαρτώμενη από τη πρόσδεση κινητική (Diffusion-uncoupled model). Μετά τη σκίαση, τα φθορίζοντα μόρια διαχέονται γρήγορα σε όλη την επιφάνεια της περιοχής και παραμένουν μόνο τα σκιασμένα μόρια που είναι συνδεδεμένα. Σταδιακά, τα σκιασμένα μόρια αποδεσμεύονται από τις θέσεις δέσμησης και εξέρχονται από την περιοχή ενδιαφέροντος, ενώ φθορίζοντα μόρια εισέρχονται στην περιοχή και ενώνονται με τις άδειες θέσεις δέσμησης. Η καμπύλη ανάκτησης αποτελείται από δυο διακριτά μέρη: το πρώτο μέρος το οποίο αντιπροσωπεύει το γρήγορο στάδιο της διάχυσης (κόκκινο) και ακολουθεί η αργή κινητική λόγω ανταλλαγής στις θέσεις πρόσδεσης (μπλε). (β) Ενεργή διάχυση (Diffusion-coupled model). Φθορίζοντα μόρια τα οποία εισέρχονται στη περιοχή ενδιαφέροντος προσδένονται γρήγορα με τις θέσεις δέσμησης που συναντούν. Η αποδέσμευση από αυτές τις θέσεις οδηγεί σε νέα διάχυση μορίων αλλά τα μόρια προσδένονται γρήγορα και πάλι. Με αυτό τον τρόπο τα μόρια εισέρχονται όλο και πιο εσωτερικά στην περιοχή ενδιαφέροντος. Η καμπύλη ανάκτησης δεν μπορεί να διακριθεί σε υποπεριοχές αλλά απεικονίζει τόσο τη διάχυση όσο και τη δέσμηση (κόκκινο + μπλε = μωβ) καθ' όλη τη διάρκεια της ανάκτησης. Από Sprague et al., 2005.

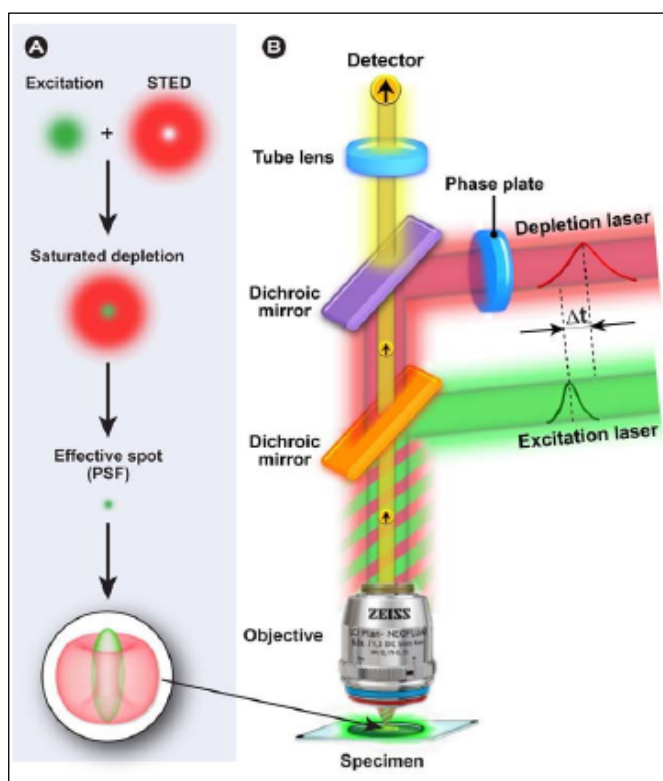
## 6.2 Υπερδιακριτική μικροσκοπία (Stimulated emission depletion microscopy, STED)

Τα συμβατικά μικροσκόπια χαρακτηρίζονται από περιορισμένη διακριτική ικανότητα/ανάλυση λόγω της περίθλασης του φωτός και του διαφράγματος το οποίο χρησιμοποιείται. Ο Ernst Abbe το 1873 περιέγραψε ότι η μικρότερη διακριτή απόσταση δυο σημείων σε ένα οπτικό μικροσκόπιο δεν μπορεί να είναι μικρότερη από το μισό του μήκους κύματος που χρησιμοποιείται ( $\lambda/2NA$ , όπου  $NA$  το αριθμητικό διάφραγμα). Ο περιορισμός του Abbe στην πράξη εμποδίζει την απεικόνιση κάτω από τα  $\approx 200\text{nm}$ . Επομένως, η διακριτική ικανότητα στο χώρο περιορίζεται εξαιτίας του διαθλαστικού δείκτη των μέσων από τα οποία περνά η ακτίνα φωτός και της κωνικής γωνίας του επικεντρωμένου φωτός (εικόνα 6.5) και μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά, αν χρησιμοποιηθούν μικρότερα μήκη κύματος. Ωστόσο, στα βιολογικά δείγματα η χρήση μικρότερων μηκών κύματος περιορίζεται καθώς μπορεί να επιφέρει καταστροφικά αποτελέσματα, όπως η δημιουργία ελευθέρων ριζών και η αυξημένη σκέδαση του φωτός. Για περισσότερο από έναν αιώνα ο περιορισμός του Abbe παρέμεινε ένα status quo, μέχρι που αναπτύχθηκε η τεχνολογία της φωτοφωταύγειας. Από τότε έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνολογίες υψηλής ανάλυσης (super resolution techniques) οι οποίες στηρίζονται σε διαφορετικές προσεγγίσεις. Κοινό σημείο όλων αυτών αποτελεί η υψηλή ανάλυση στο χώρο, σε σχέση με αυτή των συμβατικών μικροσκοπίων, η οποία στηρίζεται στη χρήση μη γραμμικών φαινομένων, εναλλασσομένων φθορισμογόνων (switchable fluorochromes) και ανίχνευσης φθορισμογόνων μορίων με μεγάλη ακρίβεια στο χώρο. Τέτοιες τεχνικές είναι: η εξαναγκασμένη εκπομπή λόγω αποδιέγερσης (stimulated emission depletion, STED), η σκίαση στη βασική κατάσταση (ground-state depletion, GSD), οι τεχνικές δομικού φθορισμού (structured illumination approaches, SIM), ο εντοπισμός λόγω φωτο-ενεργοποίησης (photo-activation localization microscopy, PALM), η μικροσκοπία στοχαστικής ανασύνθεσης (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM) κ.α.



**Εικόνα 6.5** (Α) Ο αντικειμενικός φακός και η πορεία του φωτός. Ένα σημείο στο εστιακό επίπεδο προβάλλεται ως φωτεινό κυκλικό σημείο (Airy disc) με ομόκεντρους κύκλους (Airy pattern) οι οποίοι συντελούν στο φαινόμενο της διάθλασης. (Β) Οι υπολογιζόμενες κατανομές εντάσεων στα επίπεδα  $x$ - $y$  (πάνω σειρά) και  $x$ - $z$  (κάτω σειρά) ενός σημείου όταν αυτό φωτογραφίζεται με διάφορες τεχνικές μικροσκοπίας. (Γ) Σχηματικό διάγραμμα του προτύπου διάθλασης (Airy pattern). Από Ishikawa-Ankerhold et al., 2012.

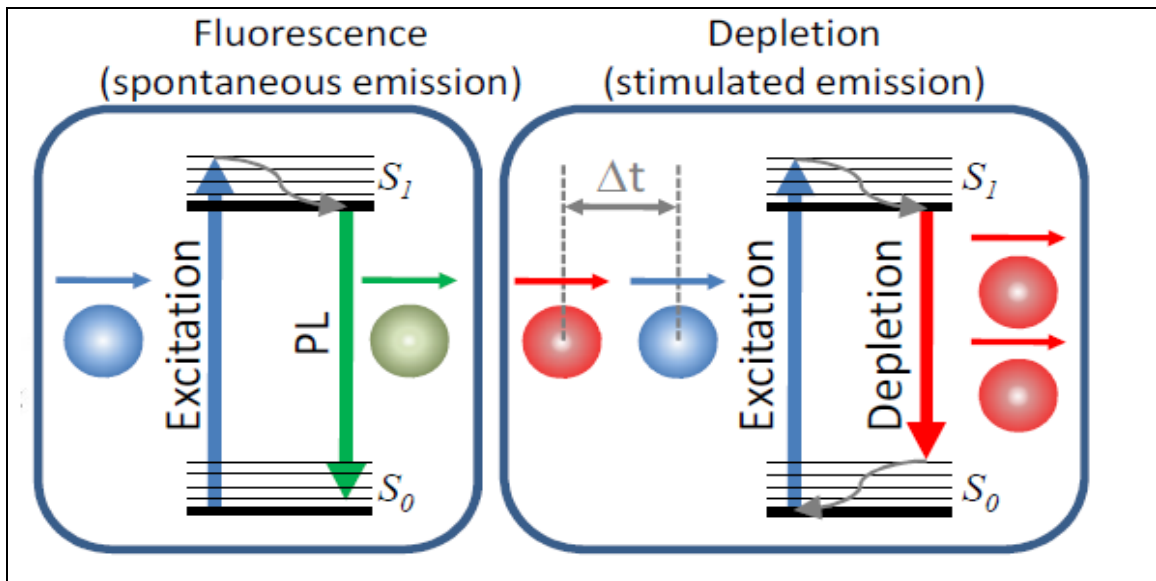
Η τεχνολογία της μικροσκοπίας εκπομπής μετά από εξαναγκασμένη αποδιέγερση (STED) αναπτύχθηκε το 1994. Στηρίζεται στη χρήση δυο επικαλυπτόμενων συγχρονισμένων ακτίνων laser, οι οποίες φτάνουν στο δείγμα διαδοχικά και από τις οποίες η πρώτη διεγείρει (excitation laser) και η δεύτερη αποδιεγείρει (ή μειώνει τη διέγερση) (depletion ή STED laser) (εικόνα 6.6). Στην περιοχή συνύπαρξης των δυο ακτίνων (περιφέρεια) πραγματοποιείται εξαναγκασμένη εκπομπή ενώ στην περιοχή εστίασης (κέντρο) όπου υπάρχει μόνο η ακτίνα διέγερσης παρατηρείται αυτόματη εκπομπή.



**Figure 6.6:** Η αρχή της μικροσκοπίας εξαναγκασμένης εκπομπής λόγω αποδιέγερσης (STED). (A) Η μικροσκοπία STED στηρίζεται στην μείωση της εστιακής δέσμης ενεργοποίησης (excitation focal spot) με αποδιέγερση των εξωτερικών μορίων τα οποία είναι σε διεγερμένη κατάσταση. Αυτό επιτυγχάνεται με χρήση εξαναγκασμένης εκπομπής ενός red shifted φωτός με χρονοκαθυστέρηση (B). Στην πραγματικότητα το PSF της ακτίνας διέγερσης συνδυάζεται με το PSF της ακτίνας μείωσης (STED laser) για να προκύψει το τελικό PSF το οποίο είναι μικρότερο του ορίου διάθλασης του φωτός. Από Ishikawa-Ankerhold et al., 2012.

### 6.2.1 Βασικές αρχές της μικροσκοπίας STED

Φθορισμός επιτυγχάνεται, όταν μια χρωστική διεγείρεται σε μια κατάσταση μεγαλύτερης ενέργειας και η αυθόρμητη χαλάρωση/ επιστροφή του ηλεκτρονίου στη βασική κατάσταση, δημιουργεί ένα νέο φωτόνιο το οποίο είναι χαρακτηριστικό για τα ενεργειακά επίπεδα της κάθε χρωστικής. Ωστόσο, αν το σύστημα βρίσκεται ακόμη στη διεγερμένη κατάσταση και διαταραχθεί από ένα δεύτερο laser, το ηλεκτρόνιο επιστρέφει στη βασική στοιβάδα χωρίς να παρατηρηθεί φθορισμός. Σε αυτή τη διαδικασία της εξαναγκασμένης εκπομπής το δεύτερο φωτόνιο αντιγράφει τον εαυτό του: η διαφορά ενέργειας μεταξύ της βασικής και διεγερμένης κατάστασης χρησιμοποιείται για να παραχθεί ένα φωτόνιο το οποίο είναι ακριβώς το ίδιο με το φωτόνιο μείωσης στο μήκος κύματος, τη πόλωση και τη κατεύθυνση διάδοσης (wavelength, polarization, direction of propagation). Ως αποτέλεσμα, η χρωστική επιστρέφει στη βασική κατάσταση χωρίς να έχει παραχθεί φθορισμός. Αυτή η τεχνική της εξαναγκασμένης εκπομπής είναι η βάση της μικροσκοπίας STED (εικόνα 6.7).



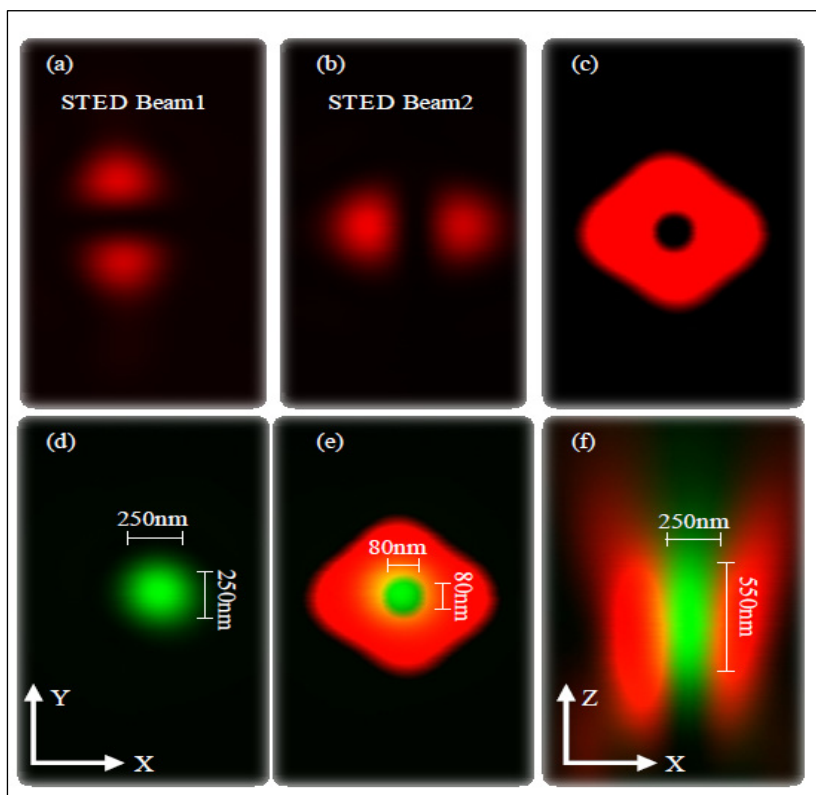
Εικόνα 6.7 Σύγκριση των ενεργειακών διαγραμμάτων μεταξύ της συνεστιακής και της μικροσκοπίας STED. Από Farahani et al., 2010.

Μια σημαντική παράμετρος στην εξαναγκασμένη εκπομπή είναι η χρονοκαθυστέρηση μεταξύ των laser διέγερσης και μείωσης. Η ακτίνα του STED laser πρέπει να φτάσει στο δείγμα τη στιγμή κατά την οποία το ηλεκτρόνιο είναι στη διεγερμένη κατάσταση. Επιπλέον, το εύρος του παλμού (pulse width) του laser μείωσης δεν μπορεί να είναι μεγαλύτερο από τη χρονική διάρκεια κατά την οποία η χρωστική είναι σε διεγερμένη κατάσταση και η ενέργεια (π.χ. μήκος κύματος) του φωτονίου μείωσης θα πρέπει να αντιστοιχεί στο εύρος μήκους κύματος εκπομπής της χρωστικής. Για αυτόν τον λόγο, το μήκος κύματος της STED ακτίνας επιλέγεται κατάλληλα για να αντιστοιχεί στο άκρο του φάσματος εκπομπής, χωρίς να αλληλεπικαλύπτει το φάσμα απορρόφησης και να αποφεύγεται η επαναπορρόφηση.

Η χρήση παλμικών laser στη μικροσκοπία STED είναι ευρέως αποδεκτή καθώς με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ο ακριβής έλεγχος των κύκλων διεγέρσεων και αποδιεγέρσεων και συνεπακόλουθα απαιτείται μικρή ισχύς του laser μείωσης. Ωστόσο, η χρήση laser συνεχόμενων μηκών κύματος έχει σημαντικά πλεονεκτήματα καθώς απλοποιεί την κατασκευή του μικροσκοπίου, αφαιρώντας τις μονάδες συγχρονισμού που απαιτούνται στα παλμικά συστήματα και μειώνει το κόστος κατασκευής. Τα κυριότερα μειονεκτήματα από τη χρήση των laser συνεχόμενων μηκών κύματος είναι η απαίτηση ισχύος laser τρεις φορές μεγαλύτερης από αυτή των παλμικών συστημάτων και η αυξημένη μη επιθυμητή φωτοσκίαση λόγω του συνεχούς φωτισμού των δειγμάτων. Παρόλο αυτά, η μικροσκοπία STED με συνεχόμενα μήκη κύματος έχει επιφέρει θετικά αποτελέσματα και έχει αναφερθεί μάλιστα διακριτική ανάλυση έως και 34nm με χρήση laser ισχύος 812mW.



Για να χρησιμοποιηθεί η τεχνική της μικροσκοπίας STED οι δυο αλληλεπικαλυπτόμενες ακτίνες διέγερσης και μείωσης πρέπει να εφαρμοστούν διαδοχικά στο δείγμα και επιπλέον το PSF της ακτίνας μείωσης πρέπει να είναι μηδέν στο κέντρο και μέγιστο στη περιφέρεια έτσι ώστε τα μόρια στην περιφέρεια να σκιάζονται. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί αν εφαρμοστεί μια μάσκα στη διαδρομή του laser μείωσης η οποία δημιουργεί ένα μοτίβο σχήματος ντόνατ. Η ποιότητα αυτού του μοτίβου είναι που καθορίζει και την απόλυτη ανάλυση. Στην πράξη υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι δημιουργίας αυτού του μοτίβου οι οποίες στηρίζονται σε διαφορετικές τεχνικές της μηχανικής αλλά όλες στηρίζονται στη χρήση μασκών ορατού (phase masks) (Εικόνα 6.8).



**Εικόνα 6.8 Σχηματισμός του μοτίβου ντόνατ στη μικροσκοπία STED.** Η εικόνα αναπαριστά το PSF των laser διέγερσης και μείωσης όπως προκύπτει μετά από παρατήρηση ενός σφαιριδίου χρυσού 80nm. Για τη δημιουργία της μάσκας ορατού χρησιμοποιήθηκαν πρίσματα τα οποία δημιουργούν το μοτίβο μετά από αλληλεπικάλυψη των δυο ακτίνων, οι οποίες είναι κάθετα τοποθετημένες η μια ως προς την άλλη. Το (a) αναπαριστά την ακτίνα μείωσης 1, το (b) την ακτίνα

μείωσης 2 και στο (c) είναι η αλληλοεπικάλυψη των 2 ακτινών, οπότε και σχηματίζεται το πλήρες μοτίβο ντόνατ (κόκκινο). Στο (d) φαίνεται το PSF της ακτίνας διέγερσης (πράσινο) ενώ στο (e) το σύνολο των ακτινών διέγερσης και αποδιέγερσης στο επίπεδο xy και στο (f) το σύνολο των ακτίνων στο xz επίπεδο. Όπως φαίνεται στο (f), δεν παρατηρείται αύξηση της ανάλυσης στο επίπεδο xz με χρήση της μικροσκοπίας STED. Από Farahani et al., 2010.

## 6.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη διακριτική ικανότητα της μικροσκοπίας STED

Η ανάλυση των κυτταρικών δομών στη κλίμακα των νανομέτρων απαιτεί αυστηρές συνθήκες αναφορικά με την παρασκευή των δειγμάτων σε σύγκριση με τη συνεστιακή

μικροσκοπία. Μη βέλτιστη παρασκευή του δείγματος θα αλλοιώσει την ποιότητα της εικόνας και την αναμενόμενη ανάλυση. Σημαντικοί παράγοντες από τους οποίους επηρεάζεται η ανάλυση είναι: η επιλογή του φθορισμογόνου, η χρώση των δειγμάτων και ο δείκτης διάθλασης.

### **6.2.2.1 Επιλογή του φθορισμογόνου**

Σε γενικό σύνολο, όλες οι φθορίζουσες χρωστικές και πρωτεΐνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μικροσκοπία STED. Ωστόσο, μερικές ιδιότητες όπως η αντοχή στη φωτοσκίαση (φωτοσταθερότητα) και η σπανιότητα των κατάλληλων συνδυασμών laser διέγερσης και μείωσης υποδηλώνει, ότι η πληθώρα των φθορισμογόνων δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί εύκολα στην υπερδιακριτική μικροσκοπία. Η εικόνα 6.9 αναφέρει τις κυριότερες χρωστικές οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί στη μικροσκοπία STED με τα αντίστοιχα μήκη κύματος διέγερσης και μείωσης.

### **6.2.2.2 Χρώση των δειγμάτων**

Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην εξασφάλιση της δομικής ακεραιότητας των δειγμάτων και παράλληλα στην καλύτερη προσβασιμότητα των αντισωμάτων. Βέλτιστα αποτελέσματα επιτυγχάνονται με φωτεινά δείγματα υψηλής αντίθεσης (υψηλή αναλογία σήματος προς θόρυβο). Ένας καλός κανόνας είναι, αν το σήμα είναι αχνό ή φωτοσκιάζεται εύκολα σε ένα συμβατικό συνεστιακό μικροσκόπιο, τότε δεν είναι κατάλληλο για μικροσκοπία STED.

Ένα σημαντικό κριτήριο αποτελεί το ίδιο το μέγεθος του αντισώματος και η πυκνότητα των μορίων αντίχενωσης. Η διαδικασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού (με πολλαπλά στάδια) θα ενισχύσει το σήμα αλλά ταυτόχρονα θα προσθέσει και μέγεθος στη δομή προς παρατήρηση. Αντίθετα, με τον άμεσο ανοσοφθορισμό επιτυγχάνεται το φθορισμογόνο να είναι αρκετά κοντά στη δομή αλλά με μικρότερη ένταση σήματος. Επιπλέον, η πυκνότητα των φθορισμογόνων θα πρέπει να είναι ικανή ώστε να τηρείται το κριτήριο του Nyquist (Nyquist sampling criterion), το οποίο ορίζει τον ελάχιστο απαιτούμενο αριθμό φθορισμογόνων μορίων που μπορούν να ανασυγκροτήσουν πιστά τη δομή προς παρατήρηση. Στην πράξη αυτό σημαίνει ότι η μέση απόσταση των μορίων θα πρέπει να είναι μικρότερη του μισού της επιθυμητής ανάλυσης και μικρότερα μεγέθη pixel (<30nm) πρέπει

να χρησιμοποιηθούν κατά τη λήψη εικόνων για να αποφευχθεί η υπο-δειγματοληψία (under-sampling).

<i>Dye Name</i>	<i>Manufacturer</i>	<i>Exc. <math>\lambda</math> (nm)</i>	<i>STED <math>\lambda</math> (nm)</i>
<i>Atto 425</i>	ATTO-TEC GmbH	440	532
<i>Atto 532</i>	ATTO-TEC GmbH	488	615
<i>DY-485XL</i>	Dyomics GmbH	488	647
<i>Alexa Fluor 488</i>	Invitrogen Corp.	488	592
<i>Chromeo 488</i>	Active Motif	488	602
<i>Oregon Green 488</i>	Invitrogen Corp.	488	592
<i>FITC</i>	Cappel Corp.	488	592
<i>DY-495</i>	Dyomics GmbH	488	592
<i>GFP</i>		488	575
<i>Citrine</i>		488	592
<i>YFP</i>		488	598
<i>Atto 565</i>	ATTO-TEC GmbH	532	640-660
<i>MR 121 SE</i>	Roche Diagnostics	532	793
<i>NK51</i>	ATTO-TEC GmbH	532	647
<i>RH 414</i>	Biotium Inc.	554	745
<i>Atto 590</i>	ATTO-TEC GmbH	570	690-710
<i>Alexa 594</i>	Invitrogen Corp.	570	690-710
<i>DyLight 594</i>	Thermo Scientific	570	690-710
<i>Atto 633</i>	ATTO-TEC GmbH	635	750
<i>Atto 647N</i>	ATTO-TEC GmbH	635	750
<i>Atto 655</i>	ATTO-TEC GmbH	635	780
<i>Malachite Green</i>		635	730-750
<i>E2-Crimson</i>		635	750

Εικόνα 6.9 Λίστα φθορισμογόνων μορίων που έχουν χρησιμοποιηθεί στη μικροσκοπία STED. Από Farahani et al., 2010.

### 6.2.2.3 Δείκτης διάθλασης (Refractive Index Matching)

Η μικροσκοπία STED επηρεάζεται σημαντικά ακόμη και από μικρές αλλαγές του δείκτη διαθλάσεως κατά μήκος της οπτικής διαδρομής, οι οποίες οδηγούν σε μείωση της ανάλυσης. Οι κυριότεροι παράγοντες από τους οποίους επηρεάζεται ο δείκτης διάθλασης είναι: το μέσο βύθισης, η καλυπτρίδα και το μέσο ενσωμάτωσης.

Η χρήση αντικειμενικών φακών υψηλού αριθμητικού ανοίγματος (1.4 NA) και μεγάλης μεγέθυνσης απαιτεί τη χρήση υγρού μέσου βύθισης μεταξύ του αντικειμενικού φακού και της αντικειμενοφόρου πλάκας. Συνιστάται η χρήση λαδιού βύθισης με δείκτη διάθλασης 1.518.

Η χρήση του 100x αντικειμενικού φακού περιορίζει τη χρήση καλυπτρίδων πάχους 170 $\mu$ m με δείκτη διάθλασης 1.52. Ωστόσο, οι καλυπτρίδες εμφανίζουν αποκλίσεις στο πάχος

έως και 12%, με αποτέλεσμα να μειώνεται σημαντικά η επιθυμητή ανάλυση. Γι' αυτό συνιστάται η χρήση καλυπτρίδων υψηλής ακρίβειας με μικρότερες διακυμάνσεις πάχους ( $170\mu\text{m} \pm 3\%$ ).

Ο δείκτης διάθλασης του μέσου ενσωμάτωσης οφείλει να είναι μεταξύ του δείκτη διάθλασης του μέσου βύθισης (1.518) και του δείκτη διάθλασης της καλυπτρίδας (1.52). Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα μέσα ενσωμάτωσης είναι το διάλυμα γλυκερόλης προς PBS σε αναλογία 90 προς 10, το Mowiol και το ProLongR Gold (με δείκτη διάθλασης 1.44). Για τη λήψη βέλτιστων εικόνων τα δείγματα πρέπει να έχουν πάχος μεταξύ 5 έως 10 $\mu\text{m}$ .

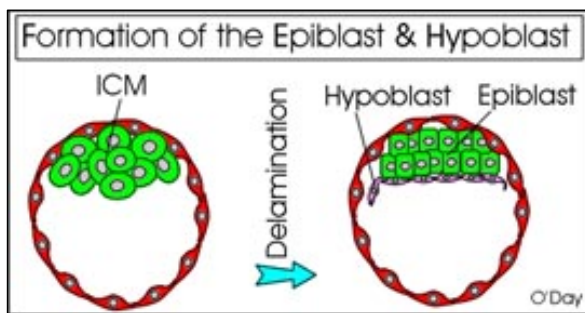
Τέλος, για τη λήψη εικόνων υψηλής ανάλυσης κρίνεται απαραίτητη η συχνή βαθμονόμηση του οργάνου. Ευρέως διαδεδομένα στη διαδικασία της βαθμονόμησης είναι η χρήση φθορίζουσών σφαιριδίων με μέγεθος μικρότερο της οπής (spot) του confocal ώστε να καθορίζεται η οπτική ανάλυση του μικροσκοπίου.

### **6.3 Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ES Cells)**

#### **6.3.1 Προέλευση και ιδιότητες των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων**

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης στο στάδιο της βλαστοκύστης. Μετά τη γονιμοποίηση, το γονιμοποιημένο ωάριο υφίσταται συνεχείς κυτταρικές διαιρέσεις και κυτταρικές μεταναστεύσεις, μια διαδικασία που ονομάζεται αυλάκωση. Κατά την αυλάκωση κάθε θυγατρικό κύτταρο κληρονομεί όλα τα χρωμοσώματα από το αρχικό κύτταρο και κατά αυτόν τον τρόπο κάθε θυγατρικό κύτταρο είναι πανομοιότυπο με το αρχικό. Οι διαιρέσεις αυτές ονομάζονται συμμετρικές. Τα θυγατρικά κύτταρα ονομάζονται βλαστομερή και προσκολλώνται μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα συσσωμάτωμα κυττάρων, το μορίδιο. Σε κάθε κυτταρική διαίρεση τα βλαστομερή μειώνονται σε μέγεθος αλλά είναι ικανά να δημιουργήσουν όλους τους διαφοροποιημένους κυτταρικούς τύπους γι' αυτό και χαρακτηρίζονται ως ολοδύναμα (totipotent). Τελικά, όταν ο αριθμός των βλαστομερών προσεγγίσει τα 32 κύτταρα ( $\approx 3,5$  μέρες μετά τη γονιμοποίηση στον ποντικό) δημιουργείται μια σφαιρική κοιλότητα που ονομάζεται βλαστοκύστη (Wild, Flemimg, 2001). Η βλαστοκύστη αποτελείται από δύο διαφορετικούς τύπους κυττάρων: ένα εξωτερικό πολωμένο επιθηλιακό μονόστοιβο, το τροφοεκτόδερμα (trophectoderm) και ένα εσωτερικό συσσωμάτωμα μη πολωμένων κυττάρων, τα οποία ονομάζονται κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας (Inner Cell

Mass, ICM). Τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας βρίσκονται στο εσωτερικό, προσκολλημένα μεταξύ τους και συνδέονται με τα κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος. Στη συνέχεια, τα κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος θα δώσουν τα γιγαντιαία τροφοβλαστικά κύτταρα του εξωπλακουντιακού κώνου, του εξωεμβρυϊκού εξωδέρματος και του πλακούντα. Τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας παίρνουν δύο διαφορετικές κατευθύνσεις και σχηματίζουν τα κύτταρα της επιβλάστης και τα κύτταρα της υποβλάστης τα οποία με τη σειρά τους διακλαδίζονται προς κύτταρα του πρώιμου και του σπλαχνικού ενδοδέρματος (Primitive Endoderm PE, Visceral Endoderm VE) (εικόνα 6.10). Τέλος, από τα κύτταρα της επιβλάστης θα προκύψουν όλοι οι ιστοί στα επόμενα στάδια της διαφοροποίησης ενώ τα κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος και του πρώιμου ενδοδέρματος θα δημιουργήσουν εξωεμβρυϊκούς ιστούς και συγκεκριμένα τον πλακούντα και τον λεκιθικό σάκο αντίστοιχα.



Εικόνα 6.10 Ο σχηματισμός της επιβλάστης και της υποβλάστης από τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας.

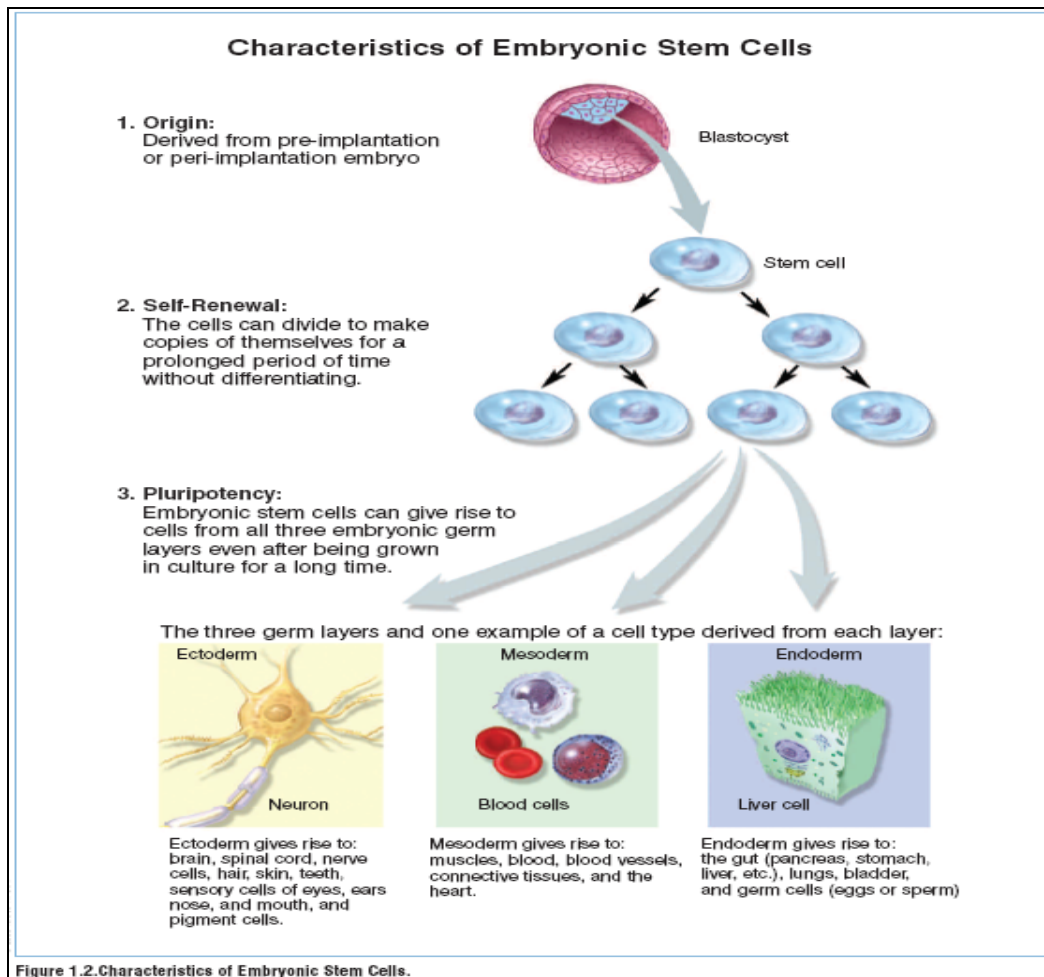
### 6.3.2 Χαρακτηριστικά των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων

Η απομόνωση βλαστικών κυτταρικών σειρών από την εσωτερική κυτταρική μάζα βλαστοκύστης του πρώιμου εμβρύου ποντικού επετεύχθη για πρώτη φορά το 1981. Αυτές οι πρώιμες κυτταρικές σειρές ονομάστηκαν εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ES). Οι δύο βασικές ιδιότητες των ES κυττάρων είναι η αυτο-ανανέωση και η πολυδυναμία (Εικόνα 6.11). Επίσης, εμφανίζουν την ικανότητα να αναπτύσσουν ισοδύναμους κλώνους, επιβεβαιώνοντας με αυτόν τον τρόπο ότι τα ES κύτταρα υπόκεινται σε συμμετρική αυτο-ανανέωση. Η ανάπτυξη τους μπορεί να συνεχίζεται απεριόριστα και να αναγεννούν πολύ γρήγορα μεγάλους πληθυσμούς από ανθεκτικές καθαρές αποικίες ES κυττάρων. Παρόλα ταύτα, τα ES κύτταρα δεν έχουν υποστεί αθανатоποίηση (immortalization) ή μετασχηματισμό (transformation) και δεν εμφανίζουν σημάδια γήρανσης σε αντίθεση με άλλες πρώιμες καλλιέργειες. Τα ES κύτταρα έχουν σταθερό διπλοειδικό καρυότυπο, απουσιάζει η απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος σε XX κυτταρικές σειρές και εμφανίζουν απουσία σημείου ελέγχου στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου.

Η πολυδυναμία των ES κυττάρων αποδείχθηκε από την ικανότητα τους να σχηματίζουν τερατοκαρκινώματα μετά από υποδόρια έγχυση τους σε ποντίκια *in vivo* και να διαφοροποιούνται προς κύτταρα όλων των ιστικών τύπων κάτω από ειδικές συνθήκες *in vitro*. Τα ES κύτταρα αναπτύσσονται σε συνθήκες καλλιέργειας και δίνουν σχετικά ομόλογους αδιαφοροποίητους πληθυσμούς, όπως διαπιστώνεται τόσο μορφολογικά όσο και από την έκφραση μιας σειράς μοριακών δεικτών. Μετά από έγχυση των ES κυττάρων σε φυσιολογική βλαστοκύστη ποντικού, τα κύτταρα μπορούν να συν-αποικήσουν με το αναπτυσσόμενο έμβryo σχηματίζοντας χίμαιρες.

### 6.3.3 Πολυδυναμία και αυτοανανέωση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων

Αρχικά, τα ES κύτταρα αναπτύσσονταν σε συν-καλλιέργειες με τροφικά κύτταρα (feeder cells) μιτωτικά ανενεργών ινοβλαστών παρουσία ορού βοός (FBS). Ωστόσο, παρατηρήθηκε, ότι τα ES κύτταρα είναι δυνατό να παραμένουν αδιαφοροποίητα απουσία των τροφικών κυττάρων, όταν προστίθεται στο θρεπτικό μέσο ο παράγοντας Leukemia Inhibitor Factor (LIF). Ο παράγοντας LIF είναι μια κυτοκίνη της οικογένειας IL-6 και δρα προσδεδεμένος στο ετεροδιμερές σύμπλεγμα υποδοχέα το οποίο συνίσταται από τον υποδοχέα LIF (LIFR) και την γλυκοπρωτεΐνη 130 (gp130). Αποτέλεσμα αυτής της σύνδεσης είναι η ενεργοποίηση του μονοπατιού Jak/Stat που είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της πολυδυναμίας *in vitro* (Smith 2001). Σε καλλιέργεια των κυττάρων απουσία ορού από το θρεπτικό μέσο, ο LIF είναι ανεπαρκής ώστε να εμποδίσει τη διαφοροποίησή τους. Για τη διατήρηση της αυτο-ανανέωσης των ES κυττάρων είναι απαραίτητος ο συνδυασμός του LIF με τον παράγοντα BMP4 ο οποίος είναι μέλος της οικογένειας των μορφογενετικών οστικών πρωτεϊνών (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs) (Ying et al., 2003). Η επίδραση των BMPs εμπλέκεται στην επαγωγή των πρωτεϊνών αναστολής της διαφοροποίησης (Id proteins), στην αναστολή του εξωκυτταρικού υποδοχέα κινάσης (ERK) και της p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). Για τη διατήρηση της αυτοανανέωσης των ES κυττάρων είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση του JAK-STAT σηματοδοτικού μονοπατιού. Απώλεια της STAT ενεργότητας σχετίζεται με απώλεια των ιδιοτήτων των ES κυττάρων. Καταλήγουμε λοιπόν, ότι η αυτοανανέωση των ES κυττάρων εξαρτάται από μια ισορροπία συγκρουόμενων ενδοκυτταρικών σημάτων.



**Εικόνα 6.11 Τα κύρια χαρακτηριστικά των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων είναι η αυτό-ανανέωση και η πολυδυναμία. Από Terese Winslow, 2006.**

Τα ES κύτταρα μπορούν να μετατραπούν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους με εξαίρεση το τροφοεκτόδερμα και τις εξωεμβρυικές ενδοδερμικές σειρές παρουσιάζοντας έτσι χαρακτηριστικά όμοια άλλα όχι ταυτόσημα με τα κύτταρα της ICM.

Μελέτες γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης προσδιόρισαν την ταυτότητα των ES κυττάρων. Ο παράγοντας Oct4 (γνωστός και ως Pou5f1) ο οποίος είναι δείκτης πολυδυναμίας των κυττάρων της εσωτερικής κυτταρικής μάζας του εμβρύου, εκφράζεται επίσης σε αδιαφοροποίητα ES κύτταρα ενώ η έκφραση του μειώνεται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης. Η έκφραση του διατηρείται σε ένα κρίσιμο σημείο για να παραμείνουν τα κύτταρα αδιαφοροποίητα. Ο τομέας POU του μεταγραφικού παράγοντα Oct4 παρατηρήθηκε ότι προσδένεται επιλεκτικά σε ενεργοποιημένα μοτίβα DNA σε εμβρυονικά καρκινικά κύτταρα. Πειράματα knockout του γονιδίου προτείνουν ότι ο Oct4 παίζει ένα καθοριστικό ρόλο στην εγκαθίδρυση της ιδιότητας της πολυδυναμίας των κυττάρων λόγω της απουσίας πολυδύναμων κυττάρων σε βλαστοκύστες Oct4<sup>-/-</sup> (Nichols et al., 1998). Επίσης, έχει

παρατηρηθεί ότι αναταραχή της έκφρασης του Oct4 πέρα από κάποια συγκεκριμένα όρια, μπορεί να επηρεάσει την επιλογή της τύχης του κυττάρου κατά τη διαφοροποίηση (Niwa et al., 2000). Τέλος, ο Oct4 φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση γονιδίων που εκφράζονται σε πολυδύναμες κυτταρικές σειρές όπως το Rex1 και το Fgf4.

Το περιορισμένο πρότυπο έκφρασης και η λειτουργική σημασία του Oct4, το ορίζουν ως ένα δυναμικό δείκτη της πολυδυναμίας των ES κυττάρων. Όμως, ο Oct4 από μόνος του είναι ανεπαρκής ώστε να διατηρήσει τα ES κύτταρα αδιαφοροποίητα. Άλλος ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο Nanog είναι απαραίτητος για τη διατήρηση των κυττάρων σε αδιαφοροποίητη κατάσταση. Η έκφραση του Nanog μειώνεται ταχύτατα όταν τα ES κύτταρα διαφοροποιούνται ενώ όταν η έκφραση του διατηρείται από έναν καταστατικό υποκινητή τα ES κύτταρα μπορούν να διατηρούνται αδιαφοροποίητα και να πολλαπλασιάζονται ακόμα και απουσία του LIF ή του BMP σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό. Άλλοι δείκτες οι οποίοι εκφράζονται ευρέως σε πολυδύναμους κυτταρικούς πληθυσμούς ποντικού *in vitro* και *in vivo* είναι το SSEA-1, η τελομεράση και η ενεργότητα του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση.

#### **6.3.4 In vitro διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων**

Η διαφοροποίηση των ES κυττάρων ποντικού μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες τεχνικές. Η απαλοιφή των αγωνιστών του gp130 από την καλλιέργεια των ES κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα τα κύτταρα να διαφοροποιούνται προς ετερογενείς κυτταρικούς πληθυσμούς (Smith 1991), οι οποίοι ωστόσο δεν έχουν χαρακτηριστεί εκτενώς. Επαγωγή της διαφοροποίησης των ES κυττάρων προς συγκεκριμένους ιστικούς τύπους μπορεί να επιτευχθεί με την προσθήκη παραγόντων και φαρμάκων, όπως το ρετινοϊκό οξύ (retinoic acid, RA), το διμέθυλ-σουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide) και αυξητικών παραγόντων.

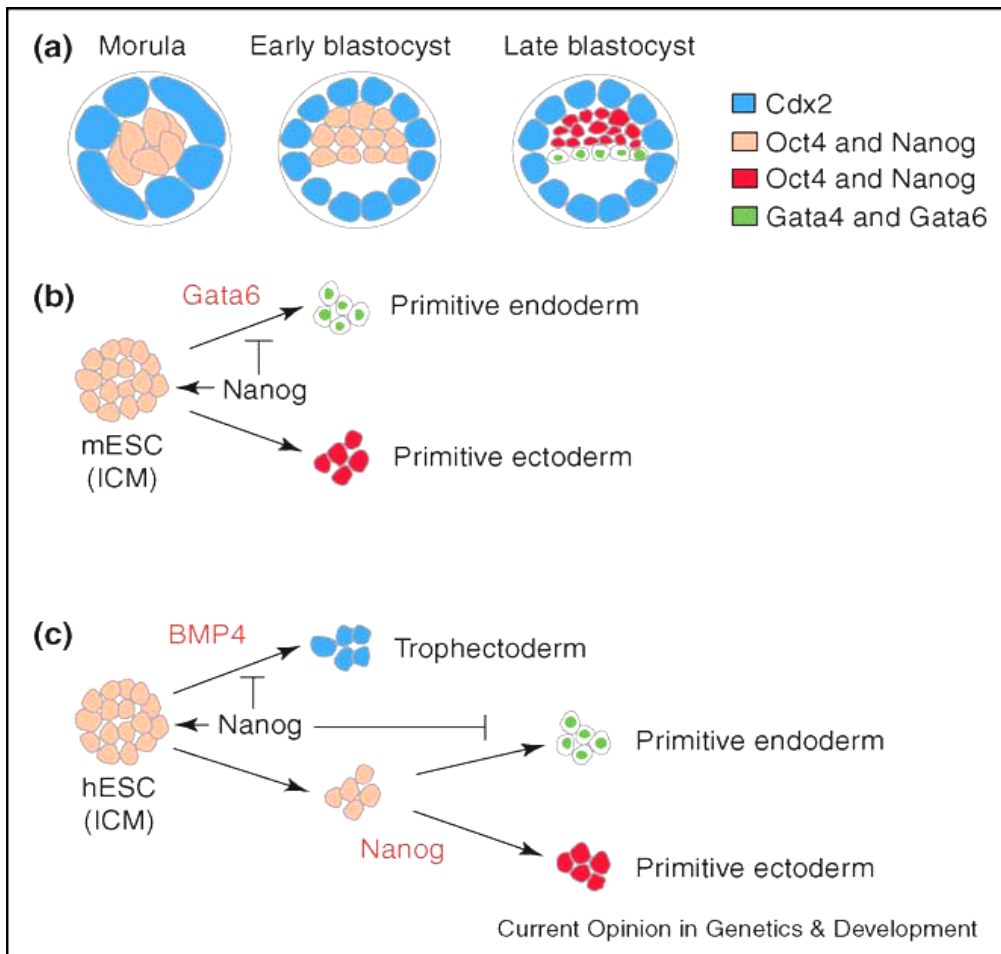
Η κυριότερη μέθοδος διαφοροποίησης των ES κυττάρων είναι η τρισδιάστατη καλλιέργεια τους και η δημιουργία εμβρυοειδών σωματιδίων (embryoid bodies, EBs). Τα εμβρυοειδή σωματίδια δημιουργούνται με την απομάκρυνση του LIF από την καλλιέργεια και την ανάπτυξη των ES κυττάρων σε ειδικά καλλιεργητικά τρυβλία. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ο σχηματισμός κυτταρικών συσσωματωμάτων σε μορφή εναιωρήματος, τα οποία διαφοροποιούνται σε αναλογία με το σχηματισμό του πρώιμου ενδοδέρματος από τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας τα οποία εκθέτονται από τη βλαστική κοιλότητα. Τα πολυδύναμα εσωτερικά κύτταρα των εμβρυοειδών σωματιδίων, αναλογικά με τα πολυδύναμα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας, διαφοροποιούνται σχηματίζοντας το πρώιμο εξώδερμα το οποίο θα δώσει τις τρεις γενετικές σειρές: ενδόδερμα, μεσόδερμα και



εξώδερμα. Η εξέλιξη της διαφοροποίησης των κυτταρικών σειρών στα εμβρυοειδή σωματίδια φαίνεται να ακολουθεί την διαδικασία της εμβρυογένεσης και συμπίπτει με την διαφοροποίηση των ES κυττάρων της εσωτερικής κυτταρικής μάζας, προτείνοντας έτσι, ότι τα ES κύτταρα μπορούν να αναγνωρίζουν και να απαντούν στα σήματα ρύθμισης της εμβρυϊκής ανάπτυξης.

Ωστόσο, η δημιουργία συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων είναι χαμηλή στα εμβρυοειδή σωματίδια περιορίζοντας έτσι την χρησιμότητα τους για το σχηματισμό συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών και τη χρήση τους στην έρευνα και την κυτταρική θεραπεία. Για τον λόγο αυτόν, χρησιμοποιούνται κατά την καλλιέργεια των EBs επαγωγί της διαφοροποίησης, θρεπτικά μέσα τα οποία συμπληρώνονται με αυξητικούς παράγοντες που συμμετέχουν σε μονοπάτια εμβρυϊκής διαφοροποίησης, όπως και επιλεκτικά θρεπτικά μέσα. Με τη χρήση των παραπάνω προσθέτων επιτυγχάνεται ο εμπλουτισμός ενός κυτταρικού πληθυσμού ή μιας κυτταρικής σειράς κατά τη διαφοροποίηση των ES κυττάρων.

Μία άλλη μέθοδος διαφοροποίησης των ES κυττάρων με σημαντικά πλεονεκτήματα είναι η διαφοροποίηση σε καλλιέργεια δύο διαστάσεων (2D culture). Έχουν αναφερθεί δυο εναλλακτικοί τρόποι δισδιάστατης διαφοροποίησης: α) τα ES κύτταρα καλλιεργούνται και διαφοροποιούνται σε άμεση επαφή με στρωματικά κύτταρα (όπως η κυτταρική σειρά OP9) (Nakano et al., 1994) και β) τα διαφοροποιημένα ES κύτταρα καλλιεργούνται σε μονοστιβάδα (monolayer) πάνω σε πρωτεΐνες εξωκυτταρικού υποστρώματος (όπως collagen IV, matrigel) (Nishikawa et al., 1998). Διαφοροποιώντας τα ES κύτταρα σε δυο διαστάσεις επιτυγχάνεται η παραγωγή μεγάλου αριθμού κυττάρων σε *in vitro* συνθήκες, αυξάνεται η προσβασιμότητα των αυξητικών παραγόντων οι οποίοι επάγουν την ιστικά κατευθυνόμενη διαφοροποίηση και χάνεται η δομική πολυπλοκότητα των τρισδιάστατων εμβρυοειδών σωματιδίων. Με αυτόν τον τρόπο, μειώνεται η δυναμική των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται καλύτερος έλεγχος των συνθηκών καλλιέργειας.



**Εικόνα 6.12 Η ανάπτυξη της βλαστοκύστης.** (a) Το μοτίβο έκφρασης διαφόρων παραγόντων κατά το σχηματισμό της βλαστοκύστης. (b) Το αναπτυξιακό δυναμικό των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων ποντικού *in vitro*. Η έκφραση του Nanog διατηρεί την αυτό-ανανέωση των κυττάρων και καταστέλλει τη δημιουργία πρωτογενούς ενδοδέρματος (primitive endoderm), ενώ εξαναγκασμένη έκφραση του Gata6 επάγει τη διαφοροποίηση προς πρωτογενές ενδόδερμα. (c) Το αναπτυξιακό δυναμικό των ανθρώπινων εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων *in vitro*. Επίδραση με BMP4 οδηγεί σε διαφοροποίηση των κυττάρων προς τροφοεκτόδερμα. Το Nanog διατηρεί την αυτοανανέωση των κυττάρων και καταστέλλει την δημιουργία του τροφοεκτοδέρματος και του πρωτογενούς ενδοδέρματος. Η υπερέκφραση του Nanog κατευθύνει τη διαφοροποίηση προς πρωτογενές εξώδερμα. Από Francesca M Spagnoli et al., 2006.

## *Βιβλιογραφία*



Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 2002

Anderson DJ, Vargas JD, Hsiao JP and Hetzer MW. Recruitment of functionally distinct membrane proteins to chromatin mediates nuclear envelope formation in vivo. *JCB*, 2009, 186, 2, 183-191

Asmis L., Hadaya K., Majno P., Toso Ch., Triponez F. and Starobinski M. Acquired and Reversible Pelger-Huet Anomaly of Polymorphonuclear Neutrophils in Three Transplant Patients Receiving Mycophenolate Mofetil Therapy. *American Journal of Hematology*, 2003, 73, 244–248

Bagley S., Goldberg M., Cronshaw J., Rutherford S. and Allen TD. The nuclear pore complex. *JCS*, 2000, 113, 3885-3886

Bates IR, Wiseman PW, Hanrahan JW. Investigating membrane protein dynamics in living cells. *Biochem Cell Biol*, 2006, 84, 6, 825-831

Bennati A, Castelli M, Fazia M, Beccari T, Caruso D, Servillo G and Roberti R. Sterol dependent regulation of human TM7SF2 gene expression: Role of the encoded 3 $\beta$ -hydroxysterol  $\Delta$ 14-reductase in human cholesterol biosynthesis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1761, 677–685

Best S, Salvati F, Kallo J, Garner C, Height S, Thein S and Rees D. Lamin B-receptor mutations in Pelger–Huet anomaly. *British Journal of Haematology*, 2003, 123, 542–544

Braeckmans K, Peeters L, Sanders NN, De Smedt SC and Demeester J. Three-dimensional fluorescence recovery after photobleaching with the confocal scanning laser microscope. *Biophys J.*, 2003, 85, 4, 2240-2252

Burke B. and Stewart C. Life at the edge: The nuclear envelope and human disease. *Nature*, 2002, 3, 575-585

Bustin M., Catez F. and Lim J. The Dynamics of Histone H1 Function in Chromatin. *Molecular Cell*, 2005, 17, 5, 617-620

Carrero G, McDonald D, Crawford E, de Vries G, Hendzel MJ. Using FRAP and mathematical modeling to determine the in vivo kinetics of nuclear proteins. *Methods*, 2003, 29, 1, 14-28

Catez F., Ueda T. and Bustin M. Determinants of histone H1 mobility and chromatin binding in living cells. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2006, 13, 4, 305-310

Clayton P, Fischer B, Mann A, Mansour S, Rossier E, Veen M, Lang Ch, Baasanjav S, Kieslich M, Brossuleit K, Gravemann S, Schnipper N, Karbasyan M, Demuth I, Zwerger M, Vaya A, Utermann G, Mundlos S, Stricker S, Sperling K and Hoffmann K. Mutations causing Greenberg dysplasia but not Pelger anomaly uncouple enzymatic from structural functions of a nuclear membrane protein. *Nucleus*, 2010, 1, 4, 354-366

Clever M, Funakoshi T, Mimura Y, Takagi M, Imamoto N. The nucleoporin ELYS/Mel28 regulates nuclear envelope subdomain formation in HeLa cells. *Nucleus*, 2012, 3, 2, 187-199

Collas P, Courvalin JC, Poccia D. Targeting of membranes to sea urchin sperm chromatin is mediated by a lamin B receptor-like integral membrane protein. *JCB*, 1996, 135, 1715-1725

Constantino B. Pelger-Huët Anomaly-Morphology, Mechanism and Significance in the Peripheral Blood Film, *MLT (CSMLS)*, 2005, 36, 2, 103-107

Cronshaw J., Krutchinsky A., Zhang W., Chait B. and Matunis M. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *JCB*, 2002, 158, 915-927

Dechat Th., Pflieger K., Sengupta K., Shimi K., Shumaker D., Solimando L. and Goldman R. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes and Development*, 2008, 22, 832–853

Dittmer T. and Misteli T. The lamin protein family. *Genome Biology*, 2011, 12, 222

Dusse L, Moreira A, Vieira L, Rios D, Silva R and Carvalho M. Acquired Pelger–Huët: What does it really mean? *Clinica Chimica Acta*, 2010, 411, 1587–1590

EAMNET, European Advanced Light Microscopy Network, (<http://www.embl.de/eamnet>)

Eddidin M, Zagyansky Y and Lardner TJ. Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells. *Science*, 1976, 191, 4226, 466-468

Ellenberg J, Siggia E, Moreira J, Smith C, Presley J, Worman H and Lippincott-Schwartz J. Nuclear Membrane Dynamics and Reassembly in Living Cells: Targeting of an Inner Nuclear Membrane Protein in Interphase and Mitosis. *JCB*, 1997, 138, 6, 1193–1206

Fahrenkrog B., Koser J. and Aebi U. The nuclear pore complex: a jack of all trades?, *Trends Biochem. Sci.*, 2004, 29, 175-182

Farahani J., Schibler M. and Bentolila M. Stimulated Emission Depletion (STED) Microscopy: from Theory to Practice. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, 2010, 1539-1547

Feder TJ, Brust-Mascher I, Slattery JP, Baird B, Webb WW. Constrained diffusion or immobile fraction on cell surfaces: a new interpretation. *Biophys J.*, 1996, 70, 6, 2767-2773

Finch T. and Klug A. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *PNAS*, 1976, 73, 6, 1897-1901

Foisner R. Cell Cycle Dynamics of the Nuclear Envelope. *The scientific world journal*, 2003, 3, 1–20

Gaines P, Tien C, Olins A, Olins D, Shultz L, Carney L and Berliner N. Mouse neutrophils lacking lamin B-receptor expression exhibit aberrant development and lack critical functional responses. *Exp Hem*, 2008, 36, 8, 965-976

Galy V., Olivo-Marin J., Scherthan H., Doye V., Rascalou N. and Nehrbass U. Nuclear pore complexes in the organization of silent telomeric chromatin. *Nature*, 2000, 403, 108-112

Gerace L. and Huber M. Nuclear lamina at the crossroads of the cytoplasm and nucleus. *JSB*, 2012, 177, 24–31

Graumann K, Irons S, Runions J and Evans D. Retention and mobility of the mammalian lamin B receptor in the plant nuclear envelope. *Biol. Cell*, 2007, 99, 553–556

Gravemann S, Schnipper N, Meyer H, Vaya A, Nowaczyk M, Rajab A, Hofmann W, Salewsky B, Tnnies H, Neitzel H, Stassen H, Sperling K and Hoffmann K. Dosage effect of zero to three functional LBR-genes in vivo and in vitro. *Nucleus*, 2010, 1, 2, 179-189

Guarda A, Bolognese F, Bonapace IM and Badaracco G. Interaction between the inner nuclear membrane lamin B receptor and the heterochromatic methyl binding protein, MeCP2. *Exp Cell Res*, 2009, 315, 11, 1895-1903

Guo N., Weremowicz S., Lynch N., Lim BL., Schwaeble W., Peerschke EI., Morton CC., Reid KB., Ghebrehiwet B. and Sastry KN. Assignment of C1QBP encoding the C1q globular domain binding protein (gC1q-R) to human chromosome 17 band p13.3 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1997, 77, 283-284

Hell S. and Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission. *Opt. Lett.*, 1994, 19, 11, 780-782

Henzel M., Lever A., Crawford E. and Thing H. The C-terminal Domain Is the Primary Determinant of Histone H1 Binding to Chromatin in Vivo. *JBC*, 2004, 279, 19, 20028–20034

Herrmann H and Zwerger M. The danger of “multi-tasking” LBR out of control. *Nucleus*, 2010, 1, 4, 319-324

Hirano Y, Hizume K, Kimura H, Takeyasu K, Haraguchi T and Hiraoka Y. Lamin B receptor recognizes specific modifications of histone H4 in heterochromatin formation. *JBC*, 2012, in press

Hoch Z., Stratton D. and Gloss L. Protein–Protein Förster Resonance Energy Transfer Analysis of Nucleosome Core Particles Containing H2A and H2A.Z. *JMB*, 2007, 371, 4, 971-988

Hoffmann K, Dreger Ch, Olins A, Olins D, Shultz L, Lucke B, Karl H, Kaps R, Müller D, Vayá A, Aznar J, Ware R, Cruz N, Lindner T, Herrmann H, Reis A and Sperling K. Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger–Huët anomaly). *NatGenet*, 2002, 31, 4, 410-414

Holmer L and Worman HJ. Inner nuclear membrane proteins: functions and targeting. *Cell Mol Life Sci.*, 2001, 58, 12-13, 1741-1747

Horn P. and Peterson C. Chromatin Higher Order Folding: Wrapping up Transcription. *Science*, 2002, 297, 5588, 1824-1827

Howard J. Worman H., Fong L., Muchir Ant. and Young St. Laminopathies and the long strange trip from basic cell biology to therapy. *J. Clin. Invest*, 2009, 119, 1825–1836

Ishikawa-Ankerhold H., Ankerhold R. and Drummen P. Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM.. *Molecules*, 2012, 17, 4, 4047-4132

Juneja S., Matthews J., Luzinat R., Fan Y., Michael M., Rischin D., Millward M. and Toner C. Association of acquired Pelger-Huet anomaly with taxoid therapy. *BJH*, 1996, 93, 139–141

Kalmar T, Lim C, Hayward P, Muñoz-Descalzo S, Nichols J, Garcia-Ojalvo J, Martinez Arias A. Regulated fluctuations in nanog expression mediate cell fate decisions in embryonic stem cells. *PLoS Biol*, 2009, 7, 7, 1-7

Kappel and Eils, Leica App. Letter 2004

Klar T., Engel E. and Hell S. Breaking Abbe's diffraction resolution limit in fluorescence microscopy with stimulated emission depletion beams of various shapes. *Phys. Rev.*, 2000, 64, 066611-066619

Klar T., Jakobs S., Dyba M., Egnér A. and Hell S. Fluorescence microscopy with diffraction resolution limit broken by stimulated emission. *PNAS USA*, 2000, 97, 15, 8206-8210

Klein C. and Waharte F. Analysis of Molecular Mobility by Fluorescence Recovery After Photobleaching in Living Cells. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, 2010, 772-783

Klonis N, Rug M, Harper I, Wickham M, Cowman A and Tilley L. Fluorescence photobleaching analysis for the study of cellular dynamics. *Eur Biophys J.*, 2002, 31, 1, 36-51

Konstantinidou An, Karadimas Ch, Waterham H, Superti-Furga A, Kaminopetros P, Grigoriadou M, Kokotas H, Agrogiannis G, Giannoulia-Karantana A, Patsouris E and Petersen M. Pathologic, radiographic and molecular findings in three fetuses diagnosed with HEM/Greenberg skeletal dysplasia. *Prenat Diagn*, 2008, 28, 309–312

Lele T, Oh P, Nickerson JA and Ingber DE. An improved mathematical approach for determination of molecular kinetics in living cells with FRAP. *Mech Chem Biosyst.*, 2004, 1, 3, 181-190

Li Mo, Liu G. and Belmonte J. Navigating the epigenetic landscape of pluripotent stem cells. *Nature Molecular Biology*, 2012, 13, 524-535

Lin F, Noyer CM, Ye Q, Courvalin JC and Worman HJ. Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis recognize a region within the nucleoplasmic domain of inner nuclear membrane protein LBR. *Hepatology*, 1996, 23, 1, 57-61

Liokatis S, Edlich C, Soupsana K, Giannios I, Panagiotidou P, Tripsianes K, Sattler M, Georgatos SD and Politou AS. Solution structure and molecular interactions of lamin B receptor Tudor domain. *JBC*, 2012, 6, 287, 2, 1032-1042

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser A., Krieger M., Scott P., Zipursky L. and Darnell J. *Molecular Cell Biology*. W.H. Freeman, 2003

Lu X, Shi Y, Lu Q, Ma Y, Luo J, Wang Q, Li J, Jiang Q and Zhang Ch. Requirement for Lamin B Receptor and Its Regulation by Importin  $\beta$  and Phosphorylation in Nuclear Envelope Assembly during Mitotic Exit. *JBC*, 2010, 285, 43, 33281–33293

Luger K., Maeder W., Richmond K., Sargent F. and Richmond J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution. *Nature*, 1997, 389, 6648, 251-260

Lusk CP, Blobel G, King MC. Highway to the inner nuclear membrane: rules for the road. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8, 5, 414-4120

Majumdar M., Meenakshi J., Goswami SK. and Datta K. Hyaluronan binding protein 1 (HABP1)/C1QBP/p32 is an endogenous substrate for MAP kinase and is translocated to the nucleus upon mitogenic stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, 8, 829-837

Makatsori D, Kourmouli N, Polioudaki H, Shultz LD, McLean K, Theodoropoulos PA, Singh PB, Georgatos SD. The inner nuclear membrane protein lamin B receptor forms distinct microdomains and links epigenetically marked chromatin to the nuclear envelope. *JBC*, 2004, 279, 24, 25567-25573

Mazza D, Braeckmans K, Cella F, Testa I, Vercauteren D, Demeester J, De Smedt SS and Diaspro A. A new FRAP/FRAPa method for three-dimensional diffusion measurements based on multiphoton excitation microscopy. *Biophys J*, 2008, 95, 7, 3457-3469

Meier J and Georgatos SD. Type B lamins remain associated with the integral nuclear envelope protein p58 during mitosis: implications for nuclear reassembly. *EMBO J.*, 1994, 13, 8, 1888-1898

Méndez-López I. and Worman H. Inner nuclear membrane proteins: impact on human disease., *Chromosoma*, 2012, 121, 153–167

Morris k, Chotalia M and Pombo Ana. Nuclear architecture in stem cells. *The Cell Biology of Stem Cells* by Eran Meshorer and Kathrin Plath, Landes Bioscience and Springer Science, 2010

Munoz-Descalzo S, Rue P, Ojalvo J and Arias AI. Correlations between the levels of oct4 and nanog as a signature for naïve pluripotency in mouse ES cells. *Stem Cells*, 2012, 30,12, 2683-2691

Muta T., Kang D., Kitajima S., Fujiwara T. and Hamasaki N. p32 protein, a splicing factor 2-associated protein, is localized in mitochondrial matrix and is functionally important in maintaining oxidative phosphorylation. *JBC*, 1997, 272, 24363-24370

Mylonis I., Drosou V., Brancorsini S., Nikolakaki E., Sassone-Corsi P. and Giannakouros T. Temporal association of protamine 1 with the inner nuclear membrane protein lamin B receptor during spermiogenesis. *JBC*, 2004, 19, 11626-11631

Nakano T., Kodama H. and Honjo T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science*, 1994, 265, 1098-1101

Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., Niwa H., Klewe-Nebenius D., Chambers I., Scholer H. and Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 1998, 95, 379-391

Nikolakaki E., Simos G., Georgatos SD. and Giannakouros T. Nuclear envelope associated kinase phosphorylates arginine-serine motifs and modulates interactions between the lamin B receptor and other nuclear proteins. *JBC*, 1996, 271, 8365-8372

Nishikawa S., Nishikawa S., Hirashima M., Matsuyoshi N. and Kodama H. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development*, 1998, 125, 1747-1757

Niwa H., Miyazaki J. and Smith A. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, 2000, 24, 372-376

Olins A and Olins D. Cytoskeletal influences on nuclear shape in granulocytic HL-60 cells. *BMC Cell Biology*, 2004, 5, 30

Olins A, Ernst A, Zwerger M, Herrmann H and Olins D. An in vitro model for Pelger-Huët anomaly Stable knockdown of lamin B receptor in HL-60 cells. *Nucleus*, 2010, 1, 6, 506-512

Olins A, Zwerger M, Herrmann H, Zentgraf H, Simond A, Monestiere M and Olins D. The human granulocyte nucleus: unusual nuclear envelope and heterochromatin composition. *EJCB*, 2008, 87, 5, 279–290

Östlund C, Sullivan T, Stewart C and Worman H. Dependence of diffusional mobility of integral inner nuclear membrane proteins on A-type lamins. *Biochemistry*, 2006, 45, 5, 1374–1382

Papoutsopoulos S., Nikolakaki E. and Giannakouros T. SRPK1 and LBR protein kinase show identical substrate specificities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, 255, 602–607

Pennington S. 11<sup>th</sup> Hour introduction to genetics. Book 5 from <http://www.blackwellpublishing.com/11thhour/book5/index.html>. Jul 2007

Peric-Hupkes D, Meuleman W, Pagie L, Bruggeman S, Solovei I, Brugman W, Graf S, Flicek P, Kerkhoven R, Lohuizen M, Reinders M, Wessels L and Steensel B. Molecular Maps of the Reorganization of Genome-Nuclear Lamina Interactions during Differentiation. *Molecular Cell*, 2010, 38, 603–613

Petersen-Mahrt S., Estmer C., Ohrmalm C., Matthews D., Russell W. and Akusjarvi G. The splicing factor-associated protein, p32, regulates RNA splicing by inhibiting ASF/SF2 RNA binding and phosphorylation. *EMBO J*, 1999, 15, 1014–1024

Phair RD and Misteli T. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*, 2000, 404, 6778, 604–609

Polioudaki H, Kourmouli N, Drosou V, Bakou A, Theodoropoulos PA, Singh PB, Giannakouros T and Georgatos SD. Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO Rep*, 2001, 2, 10, 920–925

Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG and Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 1992, 111, 2, 229–233

Pyrpasoulou A, Meier J, Maison C, Simos G, Georgatos SD. The lamin B receptor (LBR) provides essential chromatin docking sites at the nuclear envelope. *EMBO J.*, 1996, 16, 15, 24, 7108–7119

Rasmussen Th. Embryonic stem cell differentiation: A chromatin perspective. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2003

Razin V., Iarovaia V., Sjakste N., Sjakste T., Bagdoniene L., Rynditch V., Eivazova R., Lipinski M. and Vassetzky S. Chromatin Domains and Regulation of Transcription. *JMB*, 2007, 369, 3, 597–607

Robinson P., Fairall L., Huynh T. and Rhodes D. EM measurements define the dimensions of the 30-nm chromatin fiber: Evidence for a compact, interdigitated structure. *PNAS*, 2006, 103, 17, 6506–6511

Rolls MM, Stein PA, Taylor SS, Ha E, McKeon F, Rapoport TA. A visual screen of a GFP-fusion library identifies a new type of nuclear envelope membrane protein. *J Cell Biol*, 1999, 146, 1, 29–44

Ryan D, Roberti R and Gaines P. Lamin B receptor regulates the growth and maturation of myeloid progenitors via its sterol reductase domain: implications for cholesterol biosynthesis in regulating myelopoiesis. *J Immunol*, 2012, 188, 1, 85–102

Sbalzarini IF, Hayer A, Helenius A, Koumoutsakos P. Simulations of (an)isotropic diffusion on curved biological surfaces. *Biophys J.*, 2006, 90, 3, 878–885

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P and Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 2012, 9, 7, 676–682

Schirmer EC, Florens L, Guan T, Yates JR 3rd, Gerace L. Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics. *Science*, 2003, 301, 5638, 1380–1382

Schild-Prüfert K, Giegerich M, Schäfer M, Winkler C, Krohne G. Structural and functional characterization of the zebrafish lamin B receptor. *Eur J Cell Biol.*, 2006, 85, 8, 813–824

Schuler E, Lin F. and Worman H. Characterization of the human gene encoding LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *JCB*, 1994, 269, 31–37

Scott E and O'Hare P. Fate of the Inner Nuclear Membrane Protein Lamin B Receptor and Nuclear Lamins in Herpes Simplex Virus Type 1 Infection. *Journal of virology*, 2001, 8818–8830

Seksek O, Biwersi J and Verkman AS. Translational diffusion of macromolecule-sized solutes in cytoplasm and nucleus. *JCB*, 1997, 138, 1, 131–142

Sessarego M. and Ajmar Fr. Correlation between Acquired Pseudo-Pelger-Huet Anomaly and Involvement of Chromosome 17 in Chronic Myeloid Leukemia., *Cancer Genet Cytog*, 1987, 25, 265–270

Shultz L, Lyons B, Burzenski L, Gott B, Samuels R, Schweitzer P, Dreger C, Herrmann H, Kalscheuer V, Olins A, Olins D, Sperling K and Hoffmann K. Mutations at the mouse ichthyosis locus are within the lamin B receptor gene: a single gene model for human Pelger–Huet anomaly. *HMG*, 2003, 12, 1, 61–69

Silve S, Dupuy PH, Ferrara P and Loison G. Human lamin B receptor exhibits sterol C14-reductase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1392, 2–3, 233–244



Simos G, Maison C. and Georgatos SD. Characterization of p18, a component of the lamin B receptor complex and a new integral membrane protein of the avian nuclear envelope. *JBC*, 1996, 271, 12617-12625

Simos G. and Georgatos SD. The inner nuclear membrane protein p58 associates in vivo with a p58 kinase and the nuclear lamins. *EMBO J*, 1992, 11, 4027-4036

Simos G. and Georgatos SD. The lamin B receptor-associated protein p34 shares sequence homology and antigenic determinants with the splicing factor 2-associated protein p32. *FEBS Lett.*, 1994, 346, 225-228

Smith AG. Embryonic stem cells. In *Stern Cells*. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001, 205-230

Snapp EL, Altan N and Lippincott-Schwartz J. Measuring protein mobility by photobleaching GFP chimeras in living cells. *Curr Protoc Cell Biol.*, 2003, 21, 21.1

Soltys BJ., Kang D. and Gupta RS. Localization of p32 protein (gC1q-R) in mitochondria and at specific extramitochondrial locations in normal tissues. *Histochem. Cell Biol.*, 2000, 114, 245-255

Soumpasis DM. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys J.*, 1983, 41, 1, 95-97

Spagnoli F. and Hemmati-Brivanlou A. Guiding embryonic stem cells towards differentiation: lessons from molecular embryology. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2006, 16, 469-475

Sprague B. and McNally J. FRAP analysis of binding: proper and fitting. *TRENDS in Cell Biology*, 2005, 15, 2, 84-91

Sprague BL, Müller F, Pego RL, Bungay PM, Stavreva DA and McNally JG. Analysis of binding at a single spatially localized cluster of binding sites by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys J*, 2006, 91, 4, 1169-1191

Sprague BL, Pego RL, Stavreva DA and McNally JG. Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys J*, 2004, 86, 6, 3473-3495

Stem cell information: the National Institutes of Health resource for stem cell research, Terese Winslow, 2006

Stoffler D., Feja B., Fahrenkrog B., Walz J., Typke D. and Aebi U. Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture: implications for nucleocytoplasmic transport. *JMB*, 2003, 328, 1, 119-130

Subramanian G, Chaudhury P, Malu K, Fowler S, Manmode R, Gotur D, Zwerger M, Ryan D, Roberti R, Gaines P. Lamin B receptor regulates the growth and maturation of myeloid progenitors via its sterol reductase domain: implications for cholesterol biosynthesis in regulating myelopoiesis. *J Immunol.*, 2012, 188, 1, 85-102

Subramanian G, Chaudhury P, Malu K, Fowler S, Manmode R, Gotur D, Zwerger M, Suntharalingam M. and Wente S. Peering through the pore: Nuclear pore complex structure, assembly and function. *Dev. Cell*, 2003, 4, 775-789

Takano M., Koyama Y., Ito H., Hoshino S., Onogi H., Hagiwara M., Furukawa K. and Horigome T. Regulation of binding of lamin B receptor to chromatin by SR protein kinase and cdc2 kinase in *Xenopus* egg extracts. *JBC*, 2004, 26, 13265-13271

Thomas J. Histone H1: location and role. *Current Opinion in Cell Biology*, 1999, 11, 312-317

Tremethick D. Higher-Order Structures of Chromatin: The Elusive 30nm Fiber. *Cell*, 2007, 128, 4, 651-654

Verhagen A, de Graaf C, Baldwin T, Goradia A, Collinge J, Kile B, Metcalf D, Starr R and Hilton D. Reduced lymphocyte longevity and homeostatic proliferation in lamin B receptor-deficient mice results in profound and progressive lymphopenia. *Journal of Immunology*, 2012, 188, 1, 122-134

Vlcek S and Foisner R. Lamins and lamin-associated proteins in aging and disease. *Curr Opin Cell Biol.*, 2007, 19, 3, 298-304

Wassif CA, Brownson KE, Sterner AL, Forlino A, Zerfas PM, Wilson WK, Starost MF, Porter FD. HEM dysplasia and ichthyosis are likely laminopathies and not due to 3beta-hydroxysterol Delta14-reductase deficiency. *Hum Mol Genet.*, 2007, 16, 10, 1176-1187

Waterham H, Koster J, Mooyer P, Noort G, Kelley R, Wilcox W, Wanders R, Hennekam R and Oosterwijk J. Autosomal Recessive HEM/Greenberg Skeletal Dysplasia Is Caused by 3b-Hydroxysterol D14-Reductase Deficiency Due to Mutations in the Lamin B Receptor Gene. *Am J Hum Genet*, 2003, 72, 1013-1017

Woodcock L., Skoultchi A. and Fan Y. Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. *Chromosome Research*, 2006, 14, 17-25

Worman H. Nuclear lamins and laminopathies. *J Pathol*, 2012, 226, 316-325

Worman HJ, Evans CD and Blobel G. The lamin B receptor of the nuclear envelope inner membrane: a polytopic protein with eight potential transmembrane domains. *JCB*, 1990, 111, 4, 1535-1542

Worman HJ, Yuan J, Blobel G and Georgatos SD. A lamin B receptor in the nuclear envelope. *PNAS USA*, 1988, 85, 8531-8534

Ya-Hui Chi, Zi-Jie Chen and Kuan-Teh Jeang. The nuclear envelopathies and human diseases. *JBS*, 2009, 16, 96

Ye Q and Worman HJ. Primary structure analysis and lamin B and DNA binding of human LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *JBC*, 1994, 269, 15, 11306-11311

Ye Q and Worman HJ. Interaction between an integral protein of the nuclear envelope inner membrane and human chromodomain proteins homologous to *Drosophila* HP1. *J Biol Chem.*, 1996, 271, 25, 14653-14656

Ye Q, Callebaut I, Pezhman A, Courvalin JC and Worman HJ. Domain-specific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR. *JBC*, 1997, 272, 23, 14983-14989

Ying Q., Nichols J., Chambers I. and Smith A. BMP induction of *Id* proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 2003, 115, 281-292

Yu L., Loewenstein PM., Zhang Z. and Green M. In vitro interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Tat transactivator and the general transcription factor TFIIB with the cellular protein TAP. *J. Virol.*, 1995, 69, 3017-3023

Zlatanova J., Caiafa P. and Van Holde K. Linker histone binding and displacement: versatile mechanism for transcriptional regulation. *FASEB J*, 2000, 14, 12, 1697-1704

Zwenger M, Herrmann H, Gaines P, Olins A and Olins D. Granulocytic nuclear differentiation of lamin B receptor-deficient mouse EPRO cells. *Exp Hem*, 2008, 36, 8, 977-987

Zwenger M., Kolb Th., Richter K., Karakesisoglou I. and Herrmann H. Induction of a Massive Endoplasmic Reticulum and Perinuclear Space Expansion by Expression of Lamin B Receptor Mutants and the Related Sterol Reductases TM7SF2 and DHCR7. *Molecular Biology of the Cell*, 2010, 21, 354–368

