



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Επιγενετικοί δείκτες και ρυθμιστές σε
βλαστικά και διαφοροποιημένα κύτταρα
Ανάλυση μεταλλαγμένων στελεχών ποντικού που
φέρουν τη μετάλλαξη ic^1 στον LBR**

**ΣΟΥΨΑΝΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ-ΓΕΝΕΤΙΣΤΡΙΑ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010

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

Ημερομηνία αίτησης της κ. Σουψανά Αικατερίνης: 7-12-2004

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 551^α/29-3-2005

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Γεωργάτος Σπυρίδωνας, Καθηγητής Βιολογίας

Μέλη

Λαζαρίδης Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας

Κούκλης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 13-4-2005

«Επιγενετικοί δείκτες και ρυθμιστές σε βλαστικά και διαφοροποιημένα κύτταρα»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 666^α/22-9-2009

1. Γεωργάτος Σπυρίδωνας, Καθηγητής Βιολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Καναβάρος Παναγιώτης Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία-Εμβρυολογία Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Φώτσης Θεόδωρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Λαζαρίδης Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Παπαμαρκάκη Θωμαή Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Κούκλης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Πολίτου Αναστασία Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 2-12-2010

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Γουδέβενος Ιωάννης

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας

Η Γραμματέας της Σχολής

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ-ΖΩΗ



Στους γονείς μου,
που τόσα χρόνια πάλεψαν και παλεύουν για μένα

Περιεχόμενα

1.	Εισαγωγή	5
1.1	Μορφολογία, δομή και λειτουργία του κυτταρικού πυρήνα	7
1.2	Δομή και οργάνωση της χρωματίνης	8
1.2.1	Το νουκλεόσωμα	10
1.2.2	Ισομορφές ιστονών και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις	11
1.3	Δομή του πυρηνικού φακέλου	17
1.3.1	Πυρηνική λάμινα	18
1.3.2	Οι πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης	20
1.3.3	Ο υποδοχέας της λαμίνης Β (LBR)	21
1.3.3.1	Δομικά χαρακτηριστικά του LBR και ο λειτουργικός τους ρόλος	22
1.3.3.2	Η βιολογική σημασία του LBR	25
1.4	Ασθένειες και πυρηνικός φάκελος	30
1.4.1	LBR και ασθένειες	33
1.5	Σκοπός της διδακτορικής διατριβής	41
2.	Υλικά και Μέθοδοι	43
2.1	Πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη	45
2.2	Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη	45
2.3	Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων	46
2.3.1	Καλλιέργεια σπληνοκυττάρων	46
2.4	Παρασκευαστικές Μέθοδοι	46
2.4.1	Παραγωγή ανασυνδυασμένων χιμαιρικών πρωτεϊνών GST και καθαρισμός τους με τη χρήση χρωματογραφίας συγγενείας	46
2.4.2	Απομόνωση πυρήνων από ήπαρ ποντικού	47
2.4.3	Παραγωγή πυρηνικών φακέλων από πυρήνες ποντικού	48
2.4.4	Παρασκευή εκχυλισμάτων από πυρηνικούς φακέλους	48
2.4.5	Απομόνωση ολικών ιστονών από ποντίκια	49
2.5	Βιοχημικές Μέθοδοι	50
2.5.1	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών με χρήση πηκτής ακρυλαμιδίου	50
2.5.2	Χρώση πηκτών ακρυλαμιδίου	50
2.5.3	Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford	50

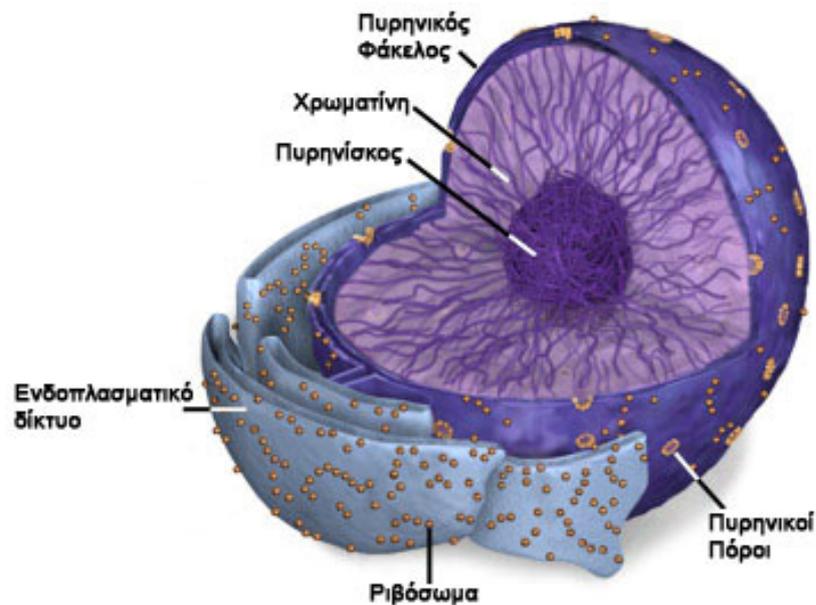
2.5.4	Δοκιμασίες συγκατακρήμνισης πρωτεϊνών με σφαιρίδια αγαρόζης-γλουταθειόνης (pull-down assays)	51
2.5.5	Ανοσοαποτύπωση κατά western	51
2.6	Μέθοδοι γενετικής μηχανικής	52
2.6.1	Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων επιδεκτικών στο μετασχηματισμό	52
2.6.2	Μετασχηματισμός βακτηριακών επιδεκτικών κυττάρων	53
2.6.3	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας	53
2.6.4	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας	54
2.6.5	Απομόνωση DNA από ουρά ποντικού	54
2.6.6	Γονότυπος ποντικών	55
2.6.7	Απομόνωση RNA από το λεπτό έντερο ποντικού	55
2.6.8	Ποσοτική PCR σε δείγματα από λεπτό έντερο ποντικού	56
2.6.9	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	57
2.6.10	Απομόνωση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης	57
2.6.11	Ανάλυση μικροσυστοιχιών DNA από ολικό RNA από το λεπτό έντερο ποντικού	57
2.7	Μορφολογικές Μέθοδοι	58
2.7.1	Έμμεσος ανοσοφθορισμός	58
2.7.2	Συνεστιακή μικροσκοπία	59
2.7.3	Παραγωγή τομών παραφίνης	59
2.7.4	Παραγωγή τομών κρυοστάτη	59
2.7.5	Χρώση τομών παραφίνης	60
2.7.6	Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε τομές κρυοστάτη	60
2.8	Φασματοσκοπία μάζας (MS)	61
3.	Αποτελέσματα	63
3.1	Ανάλυση ιστών και κυττάρων από ποντίκια με τη μετάλλαξη ic ^J	65
3.1.1	Χρώση τομών από το δέρμα	65
3.1.2	Χρώση τομών από το λεπτό έντερο	67
3.1.3	Χρώση τομών από το στόμαχο και το παχύ έντερο	72

3.1.4	Χρώση τομών από το ήπαρ	73
3.1.5	Χρώση τομών από το σπλήνα	77
3.1.6	Χρώση τομών από άλλους ιστούς	79
3.1.7	Μορφολογική και λειτουργική ανάλυση σπληνοκυττάρων	81
3.2	Βιοχημική ανάλυση των ποντικών με τη μετάλλαξη ic^J	86
3.2.1	Ανάλυση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των ιστονών με φασματοσκοπία μάζας (MS)	86
3.2.2	Εντοπισμός μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στην ιστόνη H3 με ανοσοαποτύπωση κατά Western	87
3.2.3	Δοκιμασία συγκατακρήμνισης από εκχύλισμα πυρηνικών φακέλων	87
3.3	Ανάλυση μέσω μικροσυστοιχιών DNA και ποσοτικής PCR (Real time PCR) στο λεπτό έντερο των Ic^J ποντικών	89
3.3.1	Ανάλυση μικροσυστοιχίες DNA	89
3.3.2	Ανάλυση γονιδίων-στόχων με ποσοτική PCR (Real-Time PCR)	97
4.	Συζήτηση	105
4.1	Ανοσοϊστοχημική μελέτη	107
4.2	Βιοχημική ανάλυση των ιστονών	109
4.3	Μελέτη της αλλαγής του προτύπου έκφρασης των γονιδίων του λεπτού εντέρου	110
4.3.1	Smad3, Banf1, πυρηνικός φάκελος και μεταγραφή γονιδίων	110
4.3.2	Λεπτό έντερο και διατροφή-Διαταραχή στη δημιουργία των χυλομικρών;	116
5.	Συμπεράσματα	121
5.1	Συμπεράσματα της μελέτης	123
6.	Περίληψεις	125
6.1	Περίληψη στα ελληνικά	127
6.2	Summary in English	129
7.	Βιβλιογραφία	131

Εισαγωγή

1.1 Μορφολογία, δομή και λειτουργία του κυτταρικού πυρήνα

Η βασική διαφορά ανάμεσα στους προκαρυωτικούς και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς αφορά την οργάνωση του γενετικού υλικού σε ένα διακριτό διαμέρισμα, που ονομάζεται πυρήνας. Τα δύο βασικά στοιχεία του πυρήνα είναι: η χρωματίνη και ο πυρηνικός φάκελος (Εικ.1).

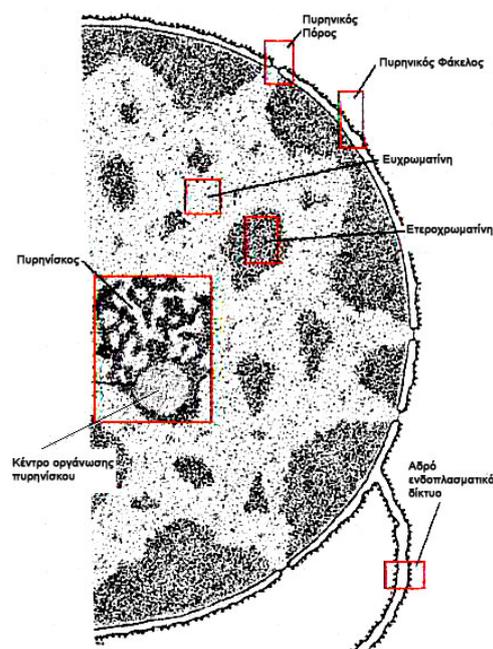


Εικόνα 1: Πυρήνας (τροποποίηση από micro.magnet.fsu.edu).

Χρωματίνη ονομάζεται το σύμπλοκο του DNA με τις πρωτεΐνες. Ο πυρηνικός φάκελος είναι μια διπλή μεμβράνη, η οποία διαχωρίζει το πυρηνόπλασμα από το κυτταρόπλασμα και λειτουργεί ως «φίλτρο» για την επιλογή στοιχείων που θα εισέλθουν και θα εξαχθούν από τον πυρήνα. Μερικές από τις λειτουργίες του πυρήνα είναι η προστασία και ο διαχωρισμός των γενετικών λειτουργιών από τις «βιοσυνθετικές», η αντιγραφή του γενετικού υλικού και η διακίνηση μεταγραφικών παραγόντων για την ενεργοποίηση ή την καταστολή γονιδίων. Ο κυτταρικός πυρήνας είναι από τα σημαντικότερα, αν όχι το σημαντικότερο, κυτταρικά οργάνια.

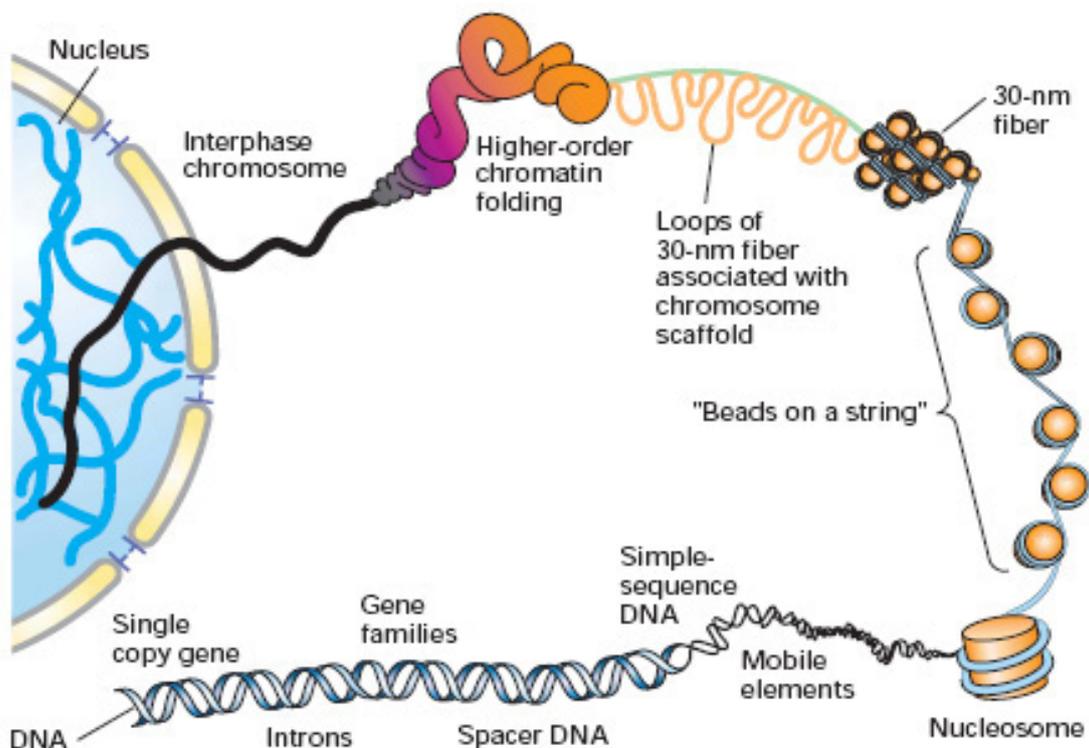
1.2 Δομή και οργάνωση της χρωματίνης

Η χρωματίνη, ανάλογα με το βαθμό συμπύκνωσής της, διαιρείται σε ευχρωματίνη και σε ετεροχρωματίνη (Chuang et al,2007). Μια σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο αυτές μορφές είναι η σειρά με την οποία αντιγράφονται στην S φάση, με την ευχρωματίνη να αντιγράφεται πρώτη (early S phase) και την ετεροχρωματίνη να έπεται (late S phase). Η ευχρωματίνη είναι μεταγραφικά ενεργή, λιγότερο συμπυκνωμένη και εμφανίζεται, στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ως μια ηλεκτροδιαυγής περιοχή, ενώ η ετεροχρωματίνη είναι μεταγραφικά ανενεργή, πολύ συμπυκνωμένη και εμφανίζεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ως ηλεκτροσκοιερή περιοχή (Εικ.2). Η ετεροχρωματίνη διαχωρίζεται περαιτέρω σε συστατική (constitutive) και σε περιστασιακή (facultative). Η συστατική ετεροχρωματίνη εντοπίζεται κυρίως γύρω από τα κεντρομερή, είναι αποσιωπημένη και παραμένει έτσι σε όλη τη διάρκεια της μεσόφασης, σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού. Η περιστασιακή ετεροχρωματίνη δεν είναι σταθερή ανάμεσα στους κυτταρικούς τύπους και μπορεί να επαναενεργοποιηθεί μεταγραφικά. Υπόκειται σε ιδιαίτερη ρύθμιση και συνήθως συνδέεται είτε με την διαδικασία της μορφογένεσης ή της διαφοροποίησης. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αποσιώπηση του χρωμοσώματος X στα θηλυκά άτομα.



Εικόνα 2: Μεσοφασικός πυρήνας όπως θα φαίνονταν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (τροποποίηση από IMB databank).

Το 1974, για πρώτη φορά προτάθηκε από τον Roger Kronenberg, ότι η χρωματίνη μοιάζει με «χάντρες κομπολογιού» (beads-on-a-string). Σε αυτή τη διάταξη, η αριστερόστροφη διπλή υπερέλικα του DNA των 2nm περιελίσσεται γύρω από ένα σύμπλοκο ιστονών, το νουκλεόσωμα. Το μήκος του DNA, που τυλίγεται γύρω του είναι περίπου στις 147 βάσεις, ενώ το μήκος του συνδετικού DNA, που παρεμβάλλεται ανάμεσα σε δύο νουκλεοσώματα, κυμαίνεται από 0 έως 210 νουκλεοτίδια. Αυτό υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει μια «κανονικότητα» στη δομή. Το ίδιο μήκος DNA μπορεί να «πακεταριστεί» με λιγότερα ή περισσότερα νουκλεοσώματα ανάλογα με τις απαιτήσεις της περιοχής. Σε κάθε περίπτωση όμως, το νουκλεόσωμα αποτελεί το πρώτο στάδιο συμπύκνωσης της χρωματίνης (ίνα 10nm, Εικ.3). Στη διαδικασία της συμπύκνωσης συμμετέχουν, πλην των νουκλεοσωματικών ιστονών, και άλλα στοιχεία. Η συνδετική ιστόνη H1 (H5 στα πτηνά), η οποία βρίσκεται στα σημεία εισόδου και εξόδου του DNA από το νουκλεόσωμα, σταθεροποιεί τη χρωματινική ίνα (Misteli et al, 2000).

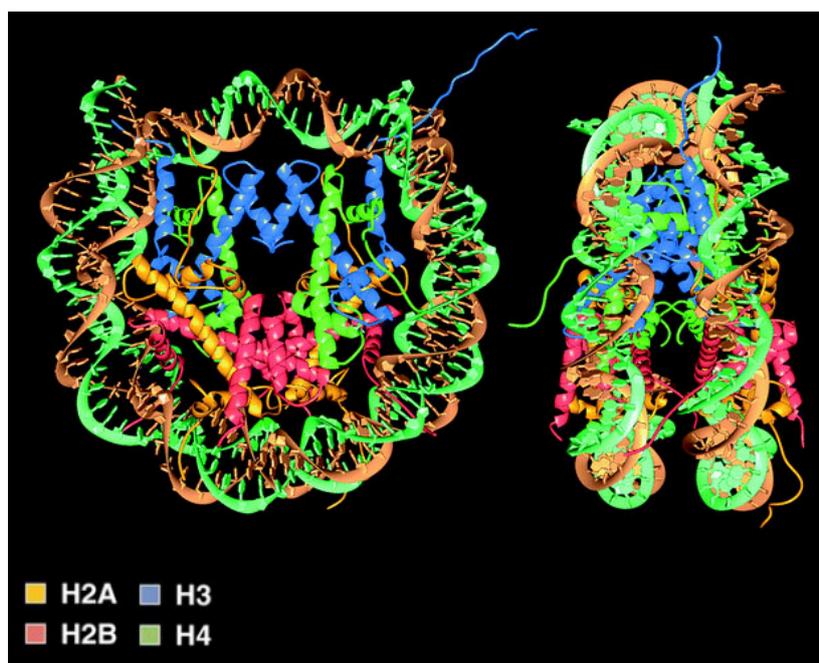


Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της συμπύκνωσης της χρωματίνης (Molecular Cell Biology, Darnell 5th edition).

Η ίνα των 10nm με τη σειρά της συσπειρώνεται περαιτέρω για να σχηματίσει την ίνα των 30nm, το πώς όμως γίνεται αυτό δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Στο επόμενο επίπεδο σχηματίζεται μια σειρά βρόχων (loops), οι οποίοι εκτίνονται προς τα έξω από έναν βασικό κεντρικό άξονα (χρωματινική ίνα) και τελικά, μετά σε ένα τελευταίο επίπεδο συμπύκνωσης, δημιουργείται το μιτωτικό χρωμόσωμα (Hansen, 2002, Woodcock et al, 2001).

1.2.1 Το νουκλεόσωμα

Τα νουκλεόσωμα αποτελούν το θεμέλιο λίθο της χρωματίνης. Η κρυσταλλογραφική δομή τους επιλύθηκε το 1984 από τον Timothy Richmond σε ανάλυση 7 Å (Richmond et al, 1984). Από τότε, έχουν δημοσιευθεί και άλλες δομές υψηλότερης ανάλυσης, που φτάνουν ως τα 1,9Å (Luger et al, 1997, White et al, 2001, Davey et al, 2002, Tsunaka et al, 2005). Το κάθε νουκλεόσωμα αποτελείται από ένα οκταμερές νουκλεοσωματικών ιστονών, πάνω στο οποίο περιτυλίγεται το DNA (Fletcher et al, 1996). Το οκταμερές των ιστονών συγκροτείται από τρία μέρη. Στο κέντρο εντοπίζεται ένα τετραμερές H3-H4 και στα άκρα, συμμετρικά ως προς τον άξονα συμμετρίας, υπάρχουν δύο διμερή ιστονών H2A-H2B (Εικ.4).



Εικόνα 4: Η κρυσταλλική δομή του νουκλεοσώματος σε ανάλυση 2,8 Å (Luger et al, 1997).

Οι τέσσερις νουκλεοσωματικές ιστόνες H3, H4, H2A, και H2B είναι πρωτεΐνες με μοριακή μάζα από 10 έως 22 kDa, θετικά φορτισμένες και ιδιαίτερα διατηρημένες στην εξέλιξη. Υπάρχει μια βασική δομή που απαντάται σε όλες τις ιστόνες και περιλαμβάνει τρία δομικά μοτίβα. Στο κέντρο του μορίου βρίσκονται τρεις α -έλικες, που αποτελούν το λεγόμενο “histone fold”. Οι εύκαμπτες «ουρές» στο αμινο- και καρβοξυ-τελικό άκρο υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Τέλος, οι ιστόνες διαθέτουν τμήματα που δεν περιέχονται στις α -έλικες και διαφέρουν σε κάθε ιστόνη, τα λεγόμενα “extra-fold structured elements”. Η H2A είναι η μόνη βασική ιστόνη που έχει μια ικανού μεγέθους καρβοξυτελική ουρά.

Κάθε ετεροδιμερές H3-H4 και H2A-H2B συνδέεται με το λεγόμενο «μοτίβο χειραψίας» (handshake motif). Το μοτίβο αυτό σχηματίζεται από τα κεντρικά τμήματα των ιστονών που έχουν στερεο-συμπληρωματικότητα (four helix bundle). Με τον ίδιο τρόπο, το διμερές H2A-H2B συνδέεται με το ήμισυ του τετραμερούς H3-H4. Η σταθερότητα του συμπλόκου καθορίζεται από την παρουσία DNA και από μια περιοχή της H2A, η οποία ονομάζεται περιοχή πρόσδεσης (docking domain). Η περιοχή πρόσδεσης της H2A αλληλεπιδρά με το άλλο μισό του τετραμερούς της H3-H4. Τέλος, τα δύο H2A-H2B διμερή αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω των L1 βρόχων της H2A (Akey et al, 2003, Hansen, 2002).

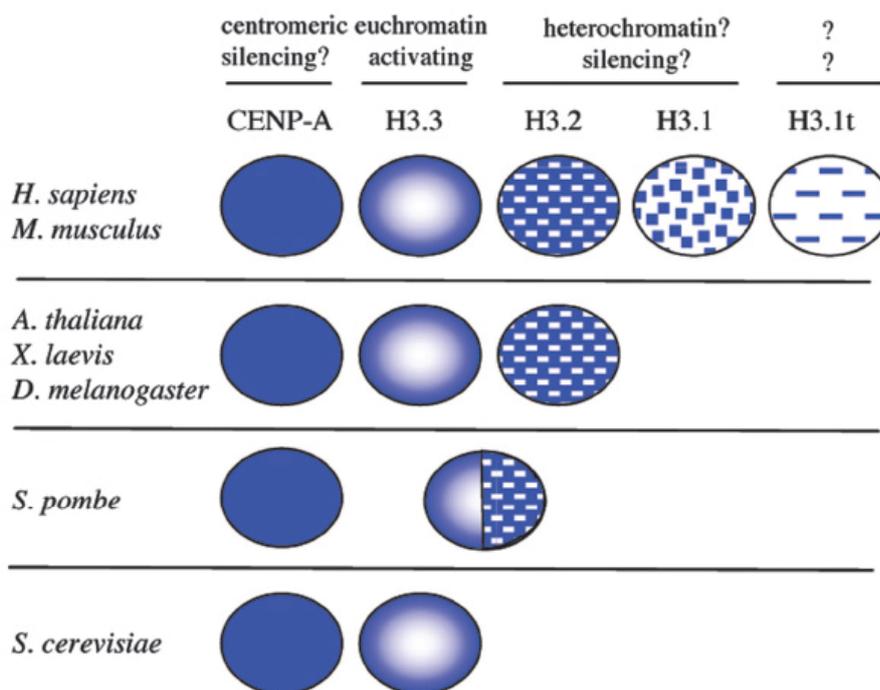
1.2.2 Ισομορφές ιστονών και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Το κύτταρο έχει αναπτύξει διάφορους τρόπους αναδιοργάνωσης της χρωματίνης, για να ελέγχει την προσβασιμότητα του DNA σε μια ποικιλία παραγόντων (π.χ. μεταγραφικοί παράγοντες, παράγοντες επιδιόρθωσης του DNA κ.α.). Δύο βασικοί μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτυγχάνεται αυτό είναι: α) η ανταλλαγή των κύριων μορφών ιστονών με άλλες ισομορφές (histone variants) και β) οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στις αμινοτελικές ουρές των ιστονών (histone post-translational modifications). Επίσης, αξίζει να αναφερθούν εδώ και τα ATP-εξαρτώμενα σύμπλοκα αναδιοργάνωσης της χρωματίνης (ATP-dependent chromatin remodeling complexes). Η δράση τους έχει ως αποτέλεσμα να επηρεάζεται η θέση και/ή η σταθερότητα των νουκλεοσωμάτων, πράγμα που οδηγεί σε μεγαλύτερη ή μικρότερη προσβασιμότητα των διαφόρων συμπλόκων στη χρωματίνη (Clapier et al, 2009).

Εκτός από την ιστόνη H4, όλες οι άλλες ιστόνες έχουν δύο ή περισσότερες ισομορφές (Pusarla et al, 2005). Τα γονίδια των ιστονών εκφράζονται κυρίως στην S

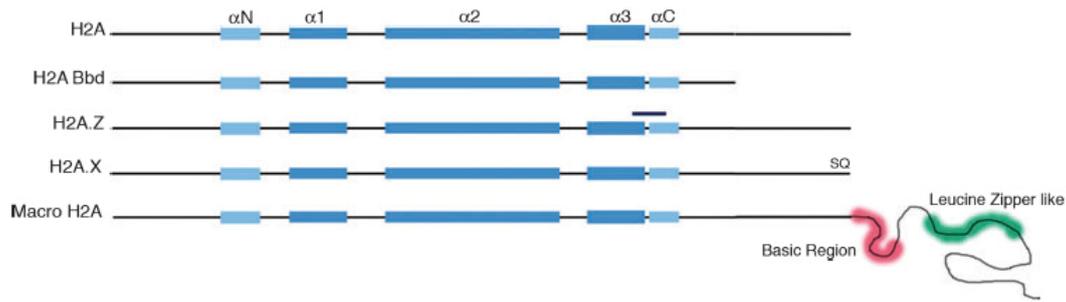
φάση και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες ενσωματώνονται άμεσα στο αντιγραφόμενο DNA. Έχει βρεθεί όμως και έκφραση εκτός S φάσης ή έκφραση που εξαρτάται από τον εκάστοτε ιστό.

Η H3 διαθέτει πέντε γνωστές ισομορφές: H3.1, H3.2, H3.3, CENP-A και H3.1t (Εικ.5) (Loyola et al, 2007, Hake et al, 2006a, Hake et al, 2006b). Από αυτές, η CENP-A είναι η ισομορφή με τις περισσότερες διαφορές στην αμινοξική της αλληλουχία σε σχέση με την κύρια μορφή H3.1 και τα νουκλεοσώματα που την περιέχουν εντοπίζονται αποκλειστικά στο κεντρομερίδιο. Οι ισομορφές H3.1 και H3.2 έχουν οριστεί ως εξαρτώμενες από την αντιγραφή (replication dependent), ενώ η H3.3 είναι ανεξάρτητη της αντιγραφής (replication independent) και έχει συσχετιστεί με μεταγραφικά ενεργές περιοχές. Τέλος, η ισομορφή H3.1t εντοπίζεται αποκλειστικά στους όρχεις.



Εικόνα 5: Ισομορφές της H3 σε διάφορους οργανισμούς (Hake et al, 2006b).

Η H2A έχει τέσσερις ισομορφές, τις H2A.X, H2A.Z, MacroH2A και H2A.Bbd και κάθε μία εμπλέκεται σε μια ιδιαίτερη λειτουργία (Εικ.6) (Ausió, 2006, Kamakaka et al, 2005, Redon et al, 2002).



Εικόνα 6: Ισομορφές της H2A (Pusarla et al, 2005). Τα μπλε σκούρα ορθογώνια αναπαριστούν τις 3 α-έλικες, που συμμετέχουν στο σχηματισμό του histone fold. Φαίνεται επίσης, το αρνητικά φορτισμένο τμήμα της H2A.Z, το SQ μοτίβο της H2A.X, η βασική περιοχή και το “leucine zipper” μοτίβο του καρβοξυτελικού τμήματος της MacroH2A.

Η H2A.X μοιάζει πολύ στην κύρια μορφή της H2A και έχει συνδεθεί άμεσα με την επιδιόρθωση του DNA, καθώς και με την αποσιώπηση του χρωμοσώματος Y στα θηλαστικά. Η H2A.Z είναι η καλύτερα χαρακτηρισμένη ισομορφή και η λειτουργία της εξαρτάται από τον εκάστοτε οργανισμό. Ενδεικτικά, μερικές από τις λειτουργίες που συμμετέχει είναι: δημιουργία και διατήρηση της περι-κεντρομεριδιακής και τελομεριδιακής ετεροχρωματίνης, ενεργοποίηση της μεταγραφής, αλλά και παρεμπόδιση της επέκτασης της ετεροχρωματίνης. Η MacroH2A έχει τις δικές της ισομορφές (MacroH2A1.1, MacroH2A1.2, και MacroH2A2). Πρόκειται για την μεγαλύτερη σε μέγεθος ισομορφή, έχει συσχετιστεί με την απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X και ειδικότερα με το ειδικό μεταγράφημα Xist(Xi). Επίσης, συμμετέχει στη σύνδεση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων στη χρωματίνη και στη λειτουργία του SWI/SNF. Η H2A.Bbd βρίσκεται σε όλα τα χρωμοσώματα εκτός από το απενεργοποιημένο X χρωμόσωμα. Τα οκταμερή των ιστονών που την περιέχουν, εμφανίζουν πιο χαλαρή διαμόρφωση, κάτι που μπορεί να υποδεικνύει έναν ακόμα μηχανισμό ρύθμισης της δομής της χρωματίνης.

Η H2B έχει μόνο δύο γνωστές ισομορφές, τις TH2B και H2BFWT και η λειτουργία τους αφορά τη σπερματογένεση (Quina et al, 2006).

Οι συνδετικές ιστόνες ή αλλιώς οι H1 τύπου ιστόνες είναι λειτουργικά ετερογενείς. Τόσο ο αριθμός των ισομορφών, όσο και ο βαθμός διαφοροποίησής τους είναι πολύ μεγαλύτερος από αυτόν των νουκλεοσωματικών ιστονών. Η ετερογένειά τους υφίσταται σε όλα τα είδη, πράγμα που υποδηλώνει ότι διαθέτουν μοναδικές λειτουργικές ιδιότητες.

Η H1 έχει εφτά σωματικές ισομορφές (H1.1-H1.5, H1⁰ και H1x) και τρεις που σχετίζονται επίσης με την σπερματογένεση (H1t, H1T2 και H1LS1) (Govin et al, 2004, Brown et al, 2001). Εκτός των ισομορφών H1.1-H1.5, όλες οι άλλες εκφράζονται ανεξάρτητα της αντιγραφής και εξαρτώνται από τη διαδικασία της ανάπτυξης. Οι ισομορφές H1.1-H1.5 κατανέμονται με μη τυχαίο τρόπο στο γονιδίωμα, παρουσιάζουν πολύ δυναμική αλληλεπίδραση με τη χρωματίνη και διαδραματίζουν βασικό ρόλο στον μεταβολισμό της (Εικ.7).

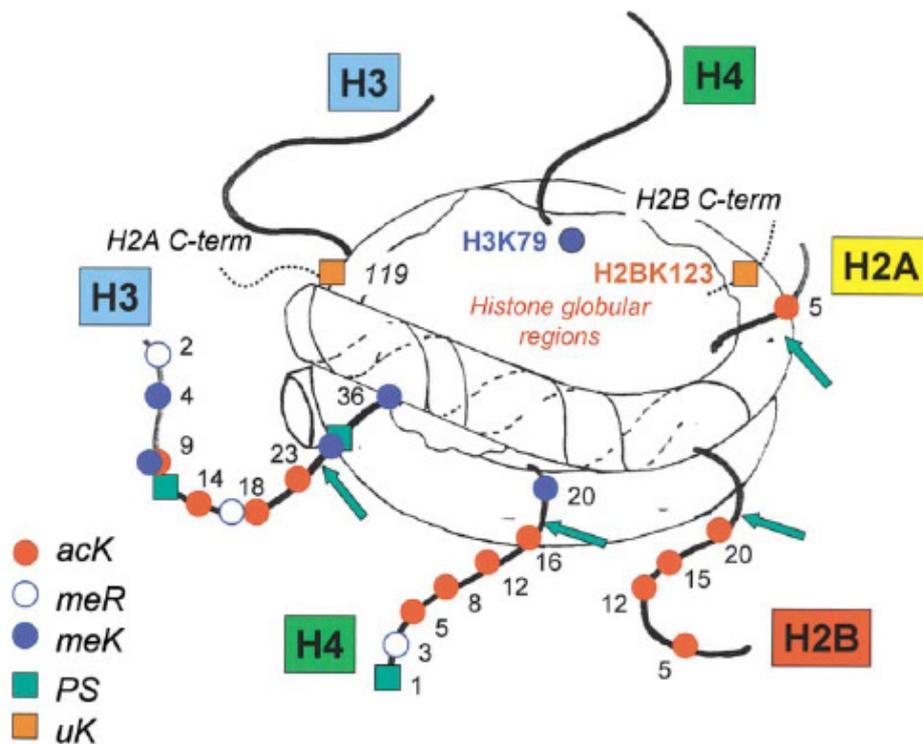
Variant	Organism	Essential for viability?	Proposed function
H1A	<i>Xenopus</i>	Not known	Specific gene repression during development
H1t	Mouse	No	Promotion of open chromatin structure; recombination during spermatogenesis
H1 ⁰	Mouse	No	Repression of gene expression; stabilization of chromatin structure during differentiation
H1c	Mouse	No	Activation of gene expression
H1 ^{S-2} , H1 ^{S-4}	Human	No	Activation of gene expression; selective depletion from active genes

Εικόνα 7: Μερικές από τις ισομορφές της H1 και οι λειτουργίες τους (Brown et al, 2001).

Τόσο οι βασικές ιστόνες όσο και οι ισομορφές τους, μπορούν να τροποποιηθούν σε διάφορες περιοχές του μορίου τους και με μια ποικιλία τρόπων (Turner, 2002, Jenuwein et al, 2001, Bhaumik et al, 2007, Villar-Garea et al, 2006, Kouzarides, 2007). Οι τροποποιήσεις αυτές περιλαμβάνουν:

1. ακετυλίωση λυσινών
2. μονο-, δι- και τρι- μεθυλίωση λυσινών
3. μονο- και δι- μεθυλίωση (συμμετρική και ασύμμετρη) αργινινών
4. φωσφορυλίωση σερινών και θρεονινών
5. ουβικοτινίλωση λυσινών
6. ADP μονο-/πολύ- ριβοσυλίωση (γλουταμικό οξύ)
7. σουμοϋλίωση λυσινών
8. μετατροπή αργινίνης σε κιτρουλλίνη

Ως τώρα, έχει καταγραφεί ένας πολύ μικρός αριθμός τροποποιήσεων in vivo και in vitro (Εικ.8). Ο πιθανός αριθμός τους όμως είναι αστρονομικός. Για παράδειγμα, στην ουρά της ιστόνης H3, μπορούν να υπάρξουν 256×10^6 συνδυασμοί τροποποιήσεων, αν κάποιος υπολογίσει όλες τις λυσίνες, αργινίνες, σερίνες και θρεονίνες.



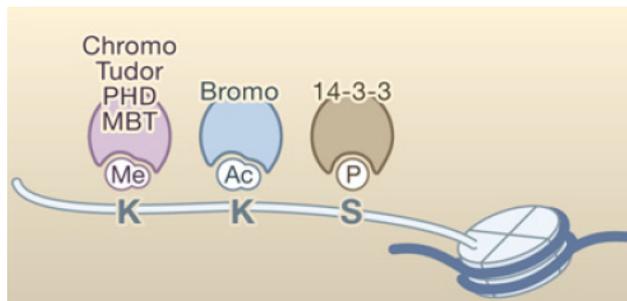
Εικόνα 8: Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στις βασικές ιστόνες (acK=ακετυλιωμένη λυσίνη, meR=μεθυλιωμένη αργινίνη, meK=μεθυλιωμένη λυσίνη, PS=φωσφορυλιωμένη σερίνη, uK=ουβικωτιλιωμένη λυσίνη. Τα πράσινα βέλη δείχνουν τα σημεία που κόβει το ένζυμο τρυψίνη για την παραγωγή πεπτιδίων προς ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας.) (Turner, 2002).

Έχει προταθεί ότι συγκεκριμένες τροποποιήσεις ή ένας συνδυασμός τους συνδέονται εκλεκτικά με μεταγραφικά ενεργές ή ανενεργές περιοχές. Η υπόθεση αυτή αποτελεί τη βάση του λεγόμενου «ιστονικού κώδικα» (histone code). Ως προς την ειδικότητα αυτού του κώδικα, μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι:

- η τριμεθυλιωμένη λυσίνη 9 και 27 στην ιστόνη H3, συσχετιζόμενες με την αποσιώπηση της χρωματίνης,

- η μεθυλίωση της λυσίνης 79 στην ιστόνη H3, συμβαίνει συνήθως σε ευχρωματινικές περιοχές,
- η ακετυλίωση της λυσίνης 16 στην ιστόνη H4, συσχετίζεται με τη μεταγραφή,
- η δι-, τρι- μεθυλίωση της λυσίνης 4 στην ιστόνη H3, απαντάται συνήθως σε ενεργές μεταγραφικά περιοχές,
- η φωσφορυλίωση της σερίνης 10 στην ιστόνη H3, που συμβαίνει κυρίως κατά τη διάρκεια της μίτωσης.

Εκτός των μεμονωμένων τροποποιήσεων, έχει επίσης διαπιστωθεί ύπαρξη συνδυασμών (binary switches), αλλά και συνύπαρξη «ενεργοποιητικών» και «απενεργοποιητικών» σημάτων ταυτόχρονα στην ίδια ουρά. Αυτό συμβαδίζει με την ιδέα της «πλαστικότητας», ιδίως κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης και ανάπτυξης, όπου συγκεκριμένα γονίδια πρέπει άμεσα να αρχίσουν να εκφράζονται ή να κατασταλούν. Το πώς θα λειτουργήσει μια τροποποίηση δεν εξαρτάται μόνο από το είδος της, αλλά και από την πρωτεΐνη που την αναγνωρίζει. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται «μόρια τελεστές» (effector molecules) και συνήθως λειτουργούν σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα που σχηματίζονται μέσω της σύνδεσης ειδικών μοτίβων (π.χ. bromo-, Tudor, PHD, MBT και chromo-) (Εικ.9).

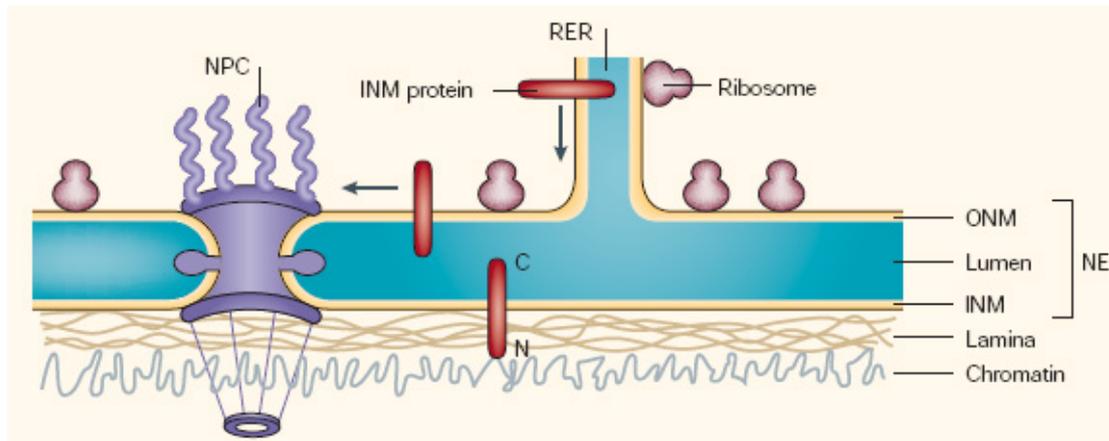


Εικόνα 9: Παράδειγμα μοτίβων που αναγνωρίζουν τροποποιημένα κατάλοιπα ιστονών (Kouzarides, 2007).

Το κύτταρο διαθέτει μια σειρά ενζύμων που καταλύουν την προσθήκη ή απομάκρυνση των παραπάνω τροποποιήσεων. Τα ένζυμα αυτά, στις περισσότερες περιπτώσεις, είναι ταυτόχρονα παρόντα στο κύτταρο. Αυτό δίνει μια ακόμη διάσταση της δυναμικής ισορροπίας που υπάρχει κάθε δεδομένη στιγμή. Τέλος, η παρουσία ή η απουσία μιας τροποποίησης μπορεί να επηρεάσει τις ενδο- και τις δια-νουκλεοσωματικές αλληλεπιδράσεις, αλλάζοντας το συνολικό φορτίο των νουκλεοσωμάτων (Reinke et al, 2003).

1.3 Δομή του πυρηνικού φακέλου

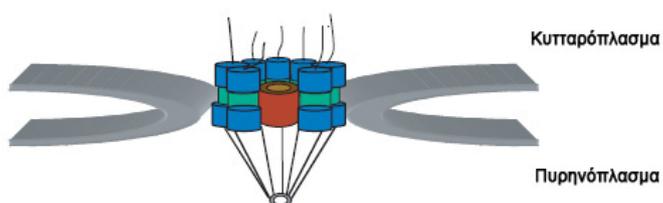
Ο πυρηνικός φάκελος αποτελείται από την εξωτερική και εσωτερική πυρηνική μεμβράνη, τα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων και τη μεμβράνη που τους περιβάλλει (Εικ.10) (Mataj, 2004).



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση του πυρηνικού φακέλου (NPC=πυρηνικός φάκελος, INM protein= πρωτεΐνη της έσω πυρηνικής μεμβράνης, RER=αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, Ribosome=ριβόσωμα, ONM=έξω πυρηνική μεμβράνη, Lumen=αυλός, INM=έσω πυρηνική μεμβράνη, NE=πυρηνικός φάκελος) (Mataj, 2004).

Η εξωτερική και η εσωτερική πυρηνική μεμβράνη έχουν την ίδια φωσφολιπιδική σύσταση, αλλά διαφέρουν ως προς την πρωτεϊνική τους σύσταση. Η εξωτερική πυρηνική μεμβράνη αποτελεί προέκταση του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου. Μέσω αυτής, πρωτεΐνες που πρόκειται να μεταφερθούν στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη διαχέονται, μέχρι να φτάσουν στον τελικό τους στόχο. Η εσωτερική πυρηνική μεμβράνη περιέχει μια σειρά πρωτεϊνών που δεν υπάρχουν σε άλλες μεμβράνες του κυττάρου. Μέσω αυτών, συνδέεται με την χρωματίνη και την πυρηνική λάμινα, που επενδύει εσωτερικά τον πυρήνα (Mataj, 2004, Georgatos, 2001, Gant et al, 1997). Τα συμπλέγματα των πυρηνικών πόρων είναι το σημείο που συντήκονται οι δύο μεμβράνες και ελέγχουν τη μεταφορά ουσιών και μακρομορίων από και προς τον πυρήνα. Αποτελούνται από ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, τις νουκλεοπορίνες, οι οποίες σχηματίζουν ένα δίαυλο που διαπερνά τον πυρηνικό φάκελο εγκάρσια και συνδέει το κυτταρόπλασμα με το πυρηνόπλασμα, χωρίς όμως

να επιτρέπει την ελεύθερη ανταλλαγή μακρομορίων. Σε κάθε πλευρά του διαύλου υπάρχει ένας δακτύλιος και ο όλος σχηματισμός παρομοιάζει ένα «καλάθι». Ο δακτύλιος που βρίσκεται στην πλευρά του πυρηνοπλάσματος φέρει ινίδια, τα οποία σχηματίζουν μια κωνοειδή προεκβολή, που καταλήγει σε ένα δεύτερο δακτύλιο (Εικ.11) (Lyman et al, 2001, Adam, 2001)



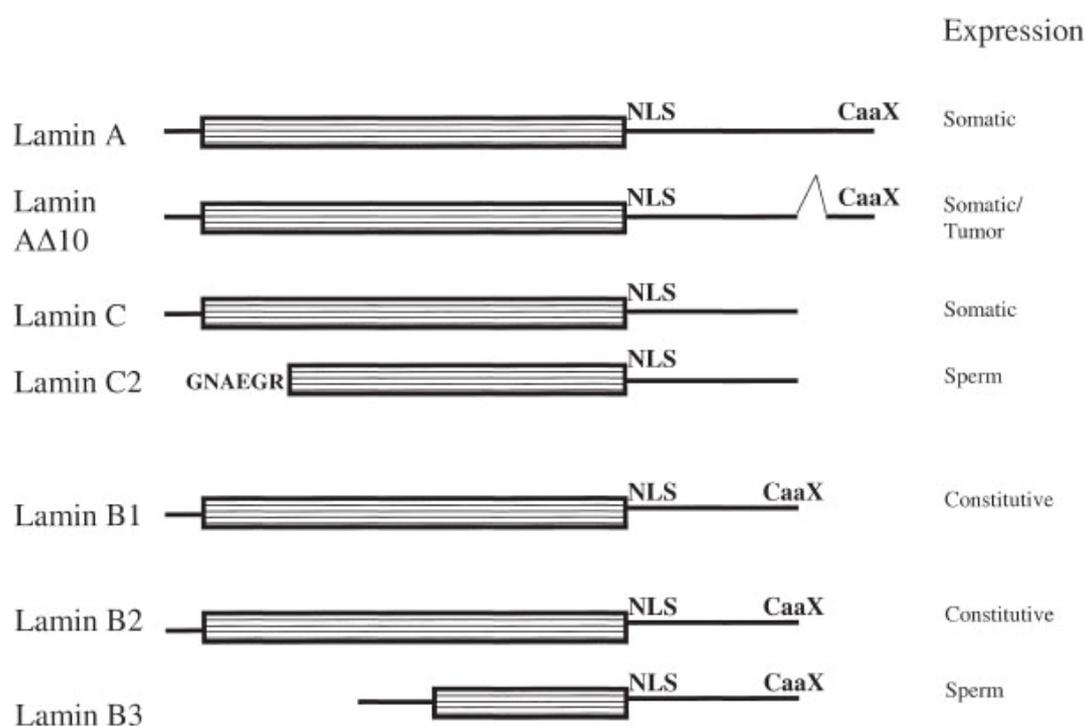
Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση του πυρηνικού πόρου. Με μπλε εμφανίζονται ο κυτταροπλασματικός και ο πυρηνικός δακτύλιος και με κόκκινο ο κεντρικός δακτύλιος (Adam, 2001)..

1.3.1 Πυρηνική λάμινα

Η πυρηνική λάμινα είναι ένα εκτεταμένο δίκτυο ινιδίων το οποίο εντοπίζεται στην περιφέρεια του κυτταρικού πυρήνα και βρίσκεται σε στενή επαφή με τον πυρηνικό φάκελο. Αποτελείται από τις λαμίνες, πρωτεΐνες που ανήκουν στην κατηγορία των ενδιάμεσων ινιδίων και κατηγοριοποιούνται με βάση τα δομικά και βιοχημικά τους χαρακτηριστικά σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις τύπου A και τύπου B (Fisher et al, 1986). Στα θηλαστικά έχουν αναγνωριστεί 7 διαφορετικές πρωτεΐνες έως τώρα. Στην κατηγορία τύπου A ανήκουν οι A, AΔ10, C και C2, οι οποίες προκύπτουν από διαφορετικό μάτισμα του ίδιου γονιδίου. Στις τύπου B ανήκουν οι B1, B2, οι οποίες κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια και η B3, που προέρχεται από διαφορετικό μάτισμα του γονιδίου της B2.

Δομικά όλες οι ισομορφές παρουσιάζουν κοινά βασικά χαρακτηριστικά. Αποτελούνται από ένα κεντρικό ραβδοειδές τμήμα (rod domain, περιοχή α-έλικας), το οποίο είναι υπεύθυνο για τον πολυμερισμό τους και είναι ιδιαίτερα συντηρημένο. Η περιοχή αυτή περιέχει τέσσερις α-έλικες, τις 1a, 1b, 2a και 2b, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με μη ελικοειδείς αλληλουχίες. Αμέσως μετά ακολουθεί ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS). Η κεντρική περιοχή περιβάλλεται από ένα N-τελικό και ένα C-τελικό τμήμα, τα οποία όμως εμφανίζουν ποικιλομορφία τόσο στο μέγεθος όσο και στην αλληλουχία. Στο καρβοξυτελικό τους άκρο οι λαμίνες φέρουν

επίσης ένα μοτίβο CAA_X (κυστεΐνη, δύο αλειφατικά αμινοξέα, οποιοδήποτε αμινοξύ), στο οποίο η κυστεΐνη φαρνεσυλιώνεται, τα τρία τελευταία αμινοξέα απομακρύνονται και η κυστεΐνη καρβοξυ-μεθυλιώνεται. Όταν η λαμίνη A εισέλθει στον πυρήνα, το μοτίβο CAA_X απομακρύνεται, ενώ απουσιάζει από τις C και C2, εξαιτίας του διαφορετικού ματίσματος του RNA (Εικ.12). Στις B τύπου λαμίνες όμως, το τροποποιημένο μοτίβο παραμένει (Moir et al, 2001, Stuurman et al, 1998).



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση των διαφόρων μορφών λαμίνων, που εντοπίζονται σε ιστούς των θηλαστικών και το πού εκφράζονται (Moir et al, 2001).

Οι δύο τύποι λαμινών παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες διαφορές μεταξύ τους. Οι τύπου A δεν εκφράζονται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, αλλά έχουν συνδεθεί εξελικτικά με τη διαδικασία της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης (Röber et al, 1989). Αντίθετα, οι τύπου B εκφράζονται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Η τοπολογία των δύο κατηγοριών λαμινών διαφέρει σημαντικά κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Οι τύπου A διαλυτοποιούνται πλήρως κατά τον κατακερματισμό του πυρηνικού φακέλου, ενώ οι τύπου B παραμένουν συνδεδεμένες με μεμβρανικά τμήματα (Burke and Gerace, 1986 and 1988, Yang et al, 1997, Moir et al, 2000).

Ο βασικός ρόλος τους αφορά την αρχιτεκτονική του πυρήνα. Συμμετέχουν στη ρύθμιση του σχήματός του, στον καθορισμό του μεγέθους του, καθώς και στη δομική του σταθερότητα (Hozák et al, 1995, Hutchison, 2002). Επίσης, προσφέρουν πληθώρα σημείων πρόσδεσης της χρωματίνης και των πρωτεϊνών του πυρηνικού φακέλου. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι απουσία του δικτύου των λαμινών δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί η αντιγραφή του DNA (Spann et al, 1997, Moir et al, 2000). Τέλος, φαίνεται ότι υπάρχει κάποια σχέση ανάμεσα στην αλλαγή της έκφρασης των λαμινών και στη μεταγραφή γονιδίων (Hutchison, 2002, Moir et al, 2001, Shimi et al, 2008).

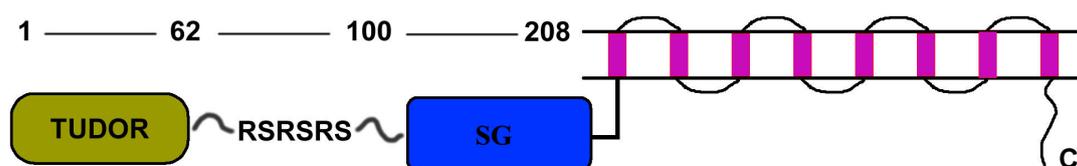
1.3.2 Οι πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης

Το πρώτο βασικό περιφερικό συστατικό της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης που ανακαλύφθηκε ήταν οι λαμίνες. Με την πάροδο του χρόνου, σε αυτό ήρθαν να προστεθούν μια σειρά διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, οι οποίες εμφανίζουν τόσο κοινά χαρακτηριστικά όσο και αρκετές διαφορές. Μερικές από τις βασικότερες είναι: ο υποδοχέας της λαμίνης Β (LBR), η emerlin, η MAN1, η nurim, η otefin, ο RFBP, η nesprin και τα συνδεδεμένα με την λάμινα πολυπεπτίδια 1 και 2 (LAP1,LAP2) (Εικ.13). Το πιο βασικό κοινό χαρακτηριστικό αυτών των πρωτεϊνών είναι η ικανότητά τους να συνδέονται είτε με τη χρωματίνη είτε με τη λάμινα είτε και με τις δύο δομές. Οι περισσότερες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης διαθέτουν αμινοτελικά τμήματα που προβάλλουν στο πυρηνόπλασμα, όπου και συνδέονται με κινάσες, οι οποίες ρυθμίζουν τη δράση τους. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι περισσότερες, αν όχι όλες αυτές οι πρωτεΐνες, απαντώνται σε μεγάλα σύμπλοκα, μέσω των οποίων συμμετέχουν άμεσα ή έμμεσα στην επαναδημιουργία του πυρηνικού φακέλου μετά την μίτωση (Foisner, 2001, Georgatos, 2001, Anderson et al, 2009).

νίνο κατά την μεσόφαση και ότι η φωσφορυλίωση αυτή μπορεί να επηρεάσει την σύνδεσή του στη λαμίνη Β (Appelbaum et al, 1990). Το 1992, σε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης, δείχθηκε ότι ο LBR συμμετέχει σε ένα μεγάλο πρωτεϊνικό σύμπλοκο, το οποίο εκτός του LBR περιέχει επίσης τις λαμίνες Α και Β, μια κινάση, τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη p18 και τον παράγοντα p34/p32 (Simos et al, 1992). Η κινάση του συμπλόκου αναγνωρίστηκε αργότερα να είναι η SRPK1, μια RS κινάση. Η p18 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, που εντοπίζεται εξίσου στην εξωτερική και στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη. Εμφανίζει ομοιότητες με τους περιφερικούς υποδοχείς των βενζοδιαζεπινών, συνδέεται ισχυρότερα με τον LBR παρά με την λαμίνη Β, ενώ δεν εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους (Simos et al, 1996). Το 1992 επίσης δείχθηκε ότι ο LBR μπορεί να φωσφορυλιωθεί στη μίτωση, σε κατάλοιπα θρεονίνης, από μια κινάση τύπου p34^{cdc2}, σε συνθήκες in vitro (Courvalin et al, 1992, Nikolakaki et al, 1996, Nikolakaki et al, 1997).

1.3.3.1 Δομικά χαρακτηριστικά του LBR και ο λειτουργικός τους ρόλος

Ο LBR αποτελείται από τρία μεγάλα διακριτά τμήματα, μια υδρόφιλη αμινοτελική περιοχή, ένα υδρόφοβο διαμεμβρανικό τομέα και μια μικρή καρβοξυτελική «ουρά» (Εικ.14).



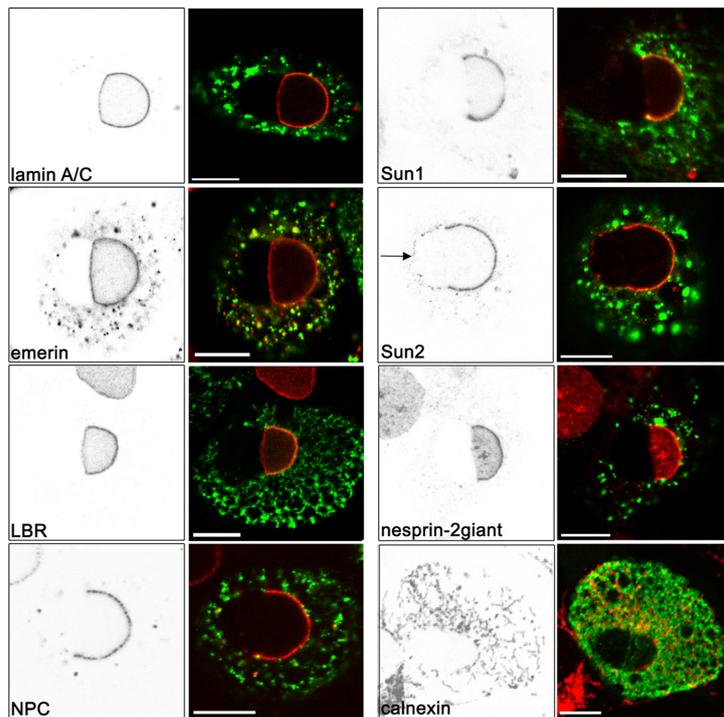
Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση του LBR.

Η αμινοτελική περιοχή έχει μήκος 208 αμινοξέα στον άνθρωπο και 219 αμινοξέα στο ποντίκι, είναι ιδιαίτερα φορτισμένη, προβάλλει στο πυρηνόπλασμα και λειτουργεί ως σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Soullam et al, 1993). Αποτελείται από δύο διακριτές υποπεριοχές, οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με ένα τμήμα 40 περίπου αμινοξέων. Η πρώτη δομικά διακριτή περιοχή του LBR (αμινοξέα 1-62) έχει δειχθεί ότι ανήκει στην οικογένεια των Tudor μοτίβων (Tudor domain) (Liokatis et al,

unpublished results). Ο βασικός του ρόλος δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί, αν και υπάρχουν έμμεσες ενδείξεις που του αποδίδουν ικανότητα σύνδεσης στη λαμίνη Β (Ye et al, 1994). Η δεύτερη δομικά διακριτή περιοχή (αμινοξέα 100-208, second globular domain) έως τώρα δεν έχει ταυτιστεί με κάποια γνωστή οικογένεια πρωτεϊνικών μοτίβων. Της έχει αποδοθεί όμως η ικανότητα σύνδεσης στην ετεροχρωματική πρωτεΐνη 1 (HP1) (Ye et al, 1997). Τα 40 περίπου αμινοξέα, που ενώνουν τις δύο παραπάνω περιοχές αποτελούνται από πολλά συνεχόμενα διπεπτίδια αργινίνης-σερίνης (RS motifs). Η περιοχή αυτή φαίνεται να μην έχει μια συγκεκριμένη δομή και είναι πιθανό να λαμβάνει μια τυχαία διαμόρφωση (random coil).

Τα διπεπτίδια RS αποτελούν το βασικό σημείο φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης. Δύο είναι οι βασικές κινάσες που ευθύνονται για αυτές τις φωσφορυλιώσεις, η SRPK1 (SR Protein Kinase I) και μια μιτωτική p34-cdc2 κινάση (Courvalin et al, 1992, Papoutsopoulou et al, 1999). Η πρώτη έχει βρεθεί ότι ελέγχει τη σύνδεση πρωτεϊνών στον LBR, ενώ η δεύτερη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σύνδεσή του με τη χρωματίνη. Ακόμα, η φωσφορυλίωση έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση του παράγοντα p32/p34 από το σύμπλοκο του LBR, ενώ δεν έχει καμία επίδραση στη σύνδεση με τη λαμίνη Β (Papoutsopoulou et al, 1999, Nikolakaki et al, 1996, Takano et al, 2002, Takano et al, 2004, Nikolakaki et al, 1997). Ο LBR φωσφορυλιώνεται όμως και από την πρωτεϊνική κινάση Α (Protein Kinase A), την κινάση καζεΐνης τύπου II και την calmodulin-dependent kinase II (Appelbaum et al, 1990, Simos et al, 1992, Kawahire et al, 1996, Kawahire et al, 1997). Στην RS περιοχή επίσης συνδέεται η importin β, κάτι που είναι απαραίτητο για τη στόχευση των μεμβρανικών κυστιδίων στη χρωματίνη, κατά το σχηματισμό του πυρηνικού φακέλου στο τέλος της μίτωσης. Η σύνδεση των δύο πρωτεϊνών εξαρτάται τόσο από την παρουσία της πρωτεΐνης Ran-GTP, όσο και από τη φωσφορυλίωση της S71 (xLBR) του LBR. Αρχικά, ο LBR φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 71 από τη μιτωτική κινάση p34-cdc2, κατά τη διάρκεια της μίτωσης, για να ενισχυθεί η σύνδεσή του με την importin β. Αφού συνδεθούν οι δύο πρωτεΐνες, τα NE κυστίδια οδηγούνται στην επιφάνεια της συμπυκνωμένης χρωματίνης, στο τέλος της μίτωσης. Εκεί, η importin β αλληλεπιδρά με την Ran-GTP και απελευθερώνει τον LBR. Η φωσφατάση PP1 αποφωσφορυλιώνει τον LBR, ώστε να μην ανασυνδεθεί με την importin β και αυτός με τη σειρά του συνδέεται με τη χρωματίνη προς το σχηματισμό του νέου πυρηνικού φακέλου (Ma et al, 2007, Lu et al, 2010).

Το υδρόφοβο διαμεμβρανικό τμήμα του LBR φαίνεται ότι περιλαμβάνει 8 διαμεμβρανικές περιοχές (Worman et al, 1990) και μοιάζει (ως προς την αμινοξική του αλληλουχία) με τις αναγωγάσες των στερολών. Αυτό όμως που κάνει την ομοιότητα αυτή ακόμη πιο ενδιαφέρουσα είναι η ικανότητά του να παρουσιάζει αντίστοιχη ενζυμική δράση (αναγωγή της στερόλης C14, sterol C14 reductase) στις ζύμες (Silve et al, 1998, Prakash et al, 1999). Στο γονίδιο του LBR στον άνθρωπο, ανάμεσα στα εξόνια που κωδικοποιούν το N-τελικό τμήμα της πρωτεΐνης και αυτά που κωδικοποιούν το C-τελικό, παρεμβάλλεται ένα μεγάλο ιντρόνιο. Αυτό πιθανώς υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη, όπως απαντάται σήμερα, προήλθε από τον ανασυνδυασμό δύο αρχέγονων γονιδίων. Τα γονίδια αυτά πιθανότατα κωδικοποιούσαν μια ιστονική πρωτεΐνη και ένα ένζυμο του ενδοπλασματικού δικτύου. Έχουν βρεθεί δύο πρωτεΐνες που έχουν ομολογία με τον LBR, η DHCR14 (TM7SF2) και η DHCR7. Η DHCR14 έχει 58% ομολογία με τον LBR και εμφανίζει δράση αναγωγάση της στερόλης C14. Η DHCR7 αντίστοιχα έχει 37% ομολογία και δράση αναγωγάση της στερόλης C7. Φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι ο LBR είναι πιο κοντά εξελικτικά με την DHCR14 (Ye et al, 1994, Schuler et al, 1994, Holmer et al, 1998). Μεταλλάξεις, που αφαιρούν μέρος του διαμεμβρανικού τμήματος του LBR, έχουν ως αποτέλεσμα, σε μερικές κυτταρικές σειρές (π.χ. U2OS, A431 αλλά όχι στα MCF7 ή PLC) τη συμπίεση της χρωματίνης και το σχηματισμό μεγάλων σχετιζόμενων με τον πυρήνα κενοτοπίων (NAVs). Τα κενοτόπια αυτά προέρχονται από την διόγκωση του περιπυρηνικού χώρου (perinuclear space) και το διαχωρισμό της εξωτερικής και εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης. Η εξωτερική πυρηνική μεμβράνη στα σημεία αυτά χάνει τους πυρηνικούς πόρους, ενώ χάνονται επίσης πρωτεΐνες του συμπλόκου που συνδέει το κυτταροσκελετό με τον σκελετό του πυρήνα (LINK-complex) (π.χ. Sun1, Sun2, Nesprin-2 Giant). Βασικά στοιχεία της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης παραμένουν ανέπαφα (Εικ.15). Με την πάροδο του χρόνου εμφανίζονται κενοτόπια και στο κυτταρόπλασμα, τα οποία οφείλονται σε διόγκωση του ενδοπλασματικού δικτύου. Παρόμοιο φαινότυπο εμφανίζουν τα κύτταρα όταν πραγματοποιηθεί υπερέκφραση, στη φυσιολογική τους μορφή, μιας από τις παραπάνω αναγωγάσες των στερολών. Ο φαινότυπος και στις δύο περιπτώσεις δεν οφείλεται στη συσσώρευση ενδιάμεσων προϊόντων του μονοπατιού της χοληστερόλης, αλλά ούτε προέρχεται από ER stress, αυτοφαγία ή απόπτωση (Zwerger et al, 2010).



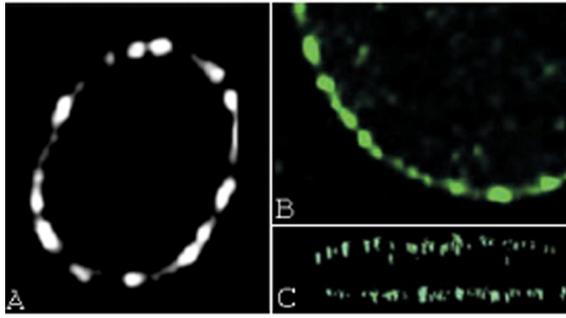
Εικόνα 15: Ανοσοφθορισμός διαφόρων πρωτεϊνών του πυρηνικού φακέλου και του LINK-complex (κόκκινο) σε U2OS κύτταρα, τα οποία εκφράζουν παροδικά μια μεταλλαγμένη μορφή του hLBR (YFP-hLBR 1-533) (Zwerger et al, 2010).

Σύμφωνα με πρόβλεψη της δομής του LBR, το μικρό καρβοξυτελικό του τμήμα προβάλλει στο πυρηνόπλασμα. Ο ρόλος του μέχρι στιγμής παραμένει άγνωστος.

1.3.3.2 Η βιολογική σημασία του LBR

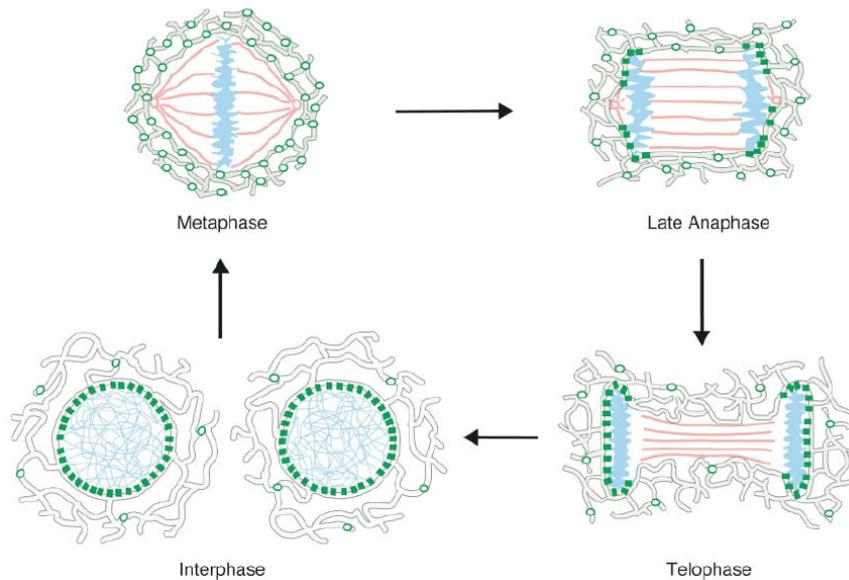
Δύο είναι οι πιο καλά μελετημένες αλληλεπιδράσεις του LBR: η σύνδεσή του με τη χρωματίνη και η σύνδεσή του με την πυρηνική λάμινα. Τόσο ο μηχανισμός όμως, όσο και η φυσιολογική σημασία των παραπάνω συνδέσεων, παραμένουν αδιευκρίνιστες. Το 1996, οι Pyrgasopoulou et al απέδειξαν ότι το κύριο σημείο σύνδεσης της χρωματίνης με τον πυρηνικό φάκελο είναι ο LBR και ότι η πρωτεΐνη αυτή έχει την ιδιότητα να αλληλεπιδρά τόσο με μεμονωμένα νουκλεοσώματα όσο και με πολυνουκλεοσώματα (Pyrgasopoulou et al, 1996).

Μορφολογικά και βιοχημικά πειράματα έδειξαν ότι ο LBR έχει την ιδιότητα να σχηματίζει ολιγομερή. Μέσο του ολιγομερισμού αυτού εντοπίζεται σε σαφώς διακριτές νησίδες (microdomains) στην έσω πυρηνική μεμβράνη. Εικάζεται ότι τα σύμπλοκα αυτά έχουν μεγάλη σημασία για την λειτουργία του, γιατί συμμετέχουν στη δημιουργία πλατφορμών αναδιοργάνωσης της χρωματίνης (Εικ.16) (Makatsori et al, 2004).



Εικόνα 16: A-B) Εντοπισμός του LBR σε ερυθροκύτταρα κοτόπουλου και ινοβλάστες ποντικού με τη χρήση αντισώματος, αντίστοιχα (τομή confocal xy). C) Τομή confocal xz από ινοβλάστες ποντικού. Φαίνονται χαρακτηριστικά οι νησίδες του LBR (Makatsori et al, 2004).

Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι ο LBR διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δυναμική του πυρηνικού φακέλου κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Ειδικότερα, πειράματα εντοπισμού και κινητικότητας, στα οποία εκφράστηκε το αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης σε σύντηξη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP), έδειξαν ότι ο LBR είναι σχεδόν τελείως ακινητοποιημένος στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη κατά τη μεσόφαση. Αντίθετα, στη προμετάφαση, όταν ο πυρηνικός φάκελος διασπάται, η πρωτεΐνη χάνει κάποιες από τις συνδέσεις της, εμφανίζει μεγαλύτερη κινητικότητα και διαχέεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Παραμένει εκεί έως το τέλος της μίτωσης (Εικ.17) (Ellenberg et al, 1997). Έχει δειχθεί επίσης, ότι η λαμίνη Β συνεντοπίζεται με τον LBR κατά τον κατακερματισμό του πυρηνικού φακέλου, κάτι που υποδεικνύει ότι παραμένουν ως σύμπλοκο κατά τη διάρκεια της μίτωσης (Meier et al, 1994). Ο LBR είναι υπεύθυνος για τη στόχευση των μεμβρανών στην επιφάνεια των χρωμοσωμάτων κατά τον επανασχηματισμό του πυρηνικού φακέλου και για την «αγκυροβόληση» της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης στην πυρηνική λάμινα (Pyrgasopoulou et al, 1996, Collas et al, 1996). Πειράματα si-RNA, έδειξαν ότι η έλλειψη του LBR έχει ως επακόλουθο τη σημαντική καθυστέρηση, αλλά όχι την αναστολή, του σχηματισμού του πυρηνικού φακέλου, στο τέλος της μίτωσης. Αντίθετα, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης οδηγεί σε ένα σαφώς πιο γρήγορο σχηματισμό, που έχει ως συνέπεια τη μείωση της απόστασης διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων. Η επιτάχυνση αυτή δεν έχει συνδεθεί έως τώρα με μιτωτικές ή άλλες ατυπίες (Anderson et al, 2009).

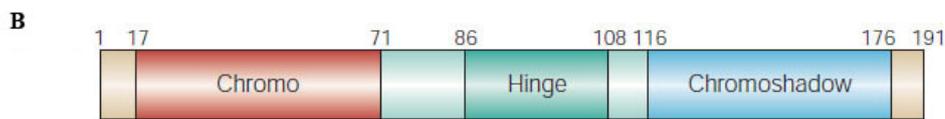


Εικόνα 17: Μοντέλο σχηματισμού του πυρηνικού φακέλου. Ελεύθερος νεοσυντιθέμενος LBR-πράσινοι κύκλοι, Δεσμευμένος LBR-πράσινα τετράγωνα, Χρωματίνη-μπλε , Μιτωτική άτρακτος-κόκκινο (Ellenberg et al, 1997).

Ένας σημαντικός πρωτεϊνικός παράγοντας που σχετίζεται με τον LBR είναι η ετεροχρωματική πρωτεΐνη 1 (HP1), ένα βασικό συστατικό των μεταγραφικά ανενεργών χρωματινικών περιοχών (James and Elgin, 1986, Ye et al, 1996). Πρόκειται για μια αρκετά συντηρημένη πρωτεΐνη που συναντάται σε όλους σχεδόν τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Στα θηλαστικά απαντώνται τρεις ισομορφές της HP1 (HP1 α , HP1 β , HP1 γ), οι οποίες κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Ο πρώτος ρόλος που αποδόθηκε σε αυτές τις πρωτεΐνες ήταν η συμμετοχή τους στο φαινόμενο επίδρασης θέσης (position-effect variegation -PEV). Η επίδραση θέσης συμβαίνει όταν ένα γονίδιο, το οποίο φυσιολογικά βρίσκεται σε μια ευχρωματινική περιοχή, μετατοπιστεί δίπλα ή μέσα σε μια ετεροχρωματινική περιοχή, με αποτέλεσμα να απενεργοποιηθεί. Οι HP1 πρωτεΐνες λειτουργούν ως καταστολείς του φαινομένου αυτού. Δομικά, οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούνται από τρεις υποπεριοχές (domains), τον χρωμοτομέα (CD) στο αμινοτελικό άκρο, τον σκιώδη χρωμοτομέα (CSD) στο καρβοξυτελικό άκρο και μια ευέλικτη περιοχή (hinge region) που συνδέει τους παραπάνω τομείς (Εικ.18) (Maison and Almouzni, 2004, Lomberk et al, 2006).

A

HP1 α	MGKTKRT-ADSSSSE	EEYVVEKVLDRRMVKGQVEYLLKWKGFSEEHNTWEPEKNLDC	59															
HP1 β	MGKKQNKKKVVEEVLEE	EEYVVEKVLDRRVVKGKVEYLLKWKGFSEEDNTWEPEENLDC	60															
HP1 γ	MGKKQNGK-SKKVEEAE	PEEFVVEKVLDRRVVNGKVEYFLKWKGFSDADNTWEPEENLDC	59															
	****	** ***** * ***** ***** ***** ****																
HP1 α	PELISEFMKKYK	KMKEGENNKPREKS	EGNKRKS-SFSNS-ADDIKSKKKRE	QSNDIAR	GF	117												
HP1 β	PDLIAEFLQSQK	TAHETDK-----	SEGGRKADSDSEDKGEESKPKKKKEES	-EKPRGF		113												
HP1 γ	PELIEDFLNSQK	AGKEKD-----	GTKRKSLSSES--	DDSKSKKRDA	-DKPRGF	107												
	* ** *	* *	* ** * *	* **	* **	***												
HP1 α	ERGLEPEKI	I	GATDSCGDL	MFLMKW	KD	TDEADL	VL	LAKEAN	VK	CPQ	I	VI	AFYEER	L	T	WH	AY	177
HP1 β	ARGLEPERI	I	GATDSSGEL	MFLMKW	KNS	DEADL	VP	AKEAN	VK	CPQ	V	VI	SFYEER	L	T	WH	SY	173
HP1 γ	ARGLDPERI	I	GATDSSGEL	MFLMKW	KDS	DEADL	VL	AKEAN	MK	CPQ	I	VI	AFYEER	L	T	WH	SC	167
	***	** *****	* *****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	** *****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
HP1 α	PEDAENKEKESAKS	191																
HP1 β	PSEDDDKKDDKN--	185																
HP1 γ	P-EDEAQ-----	173																
	*																	



Εικόνα 18: A) Αμινοξική αλληλουχία των HP1 πρωτεϊνών στο ποντίκι. Με αστερίσκο υποδεικνύονται τα συντηρημένα αμινοξέα. B) Πρωτοταγής δομή των HP1 πρωτεϊνών. Με κόκκινο είναι ο χρωμοτομέας (CD), με πράσινο η ευέλικτη συνδετική περιοχή (hinge region) και με μπλε ο σκιώδης χρωμοτομέας (CSD) (τροποποίηση από Maison and Almouzni, 2004).

Αρχικά, η περιοχή της HP1 που θεωρήθηκε ως υπεύθυνη για τη σύνδεση στον LBR, είναι ο σκιώδης χρωμοτομέας, ενώ του LBR, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η περιοχή second globular (Ye et al, 1997). Πιο πρόσφατα πειραματικά δεδομένα αποκάλυψαν ότι οι δύο αυτές πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρούν άμεσα η μία με την άλλη, αλλά έμμεσα μέσω των τετραμερών H3-H4 (Polioudaki et al, 2001). Σε κάθε περίπτωση όμως, η δημιουργία συμπλόκων με τέτοιου είδους πρωτεΐνες αποδίδει ένα δεύτερο εξίσου σημαντικό ρόλο στον LBR, αυτόν του ρυθμιστή.

Πρόσφατα εντοπίστηκε αλληλεπίδραση του LBR με την πρωτεΐνη MeCP2 τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro*. Δομικά η MeCP2 χαρακτηρίζεται μια υποπεριοχή που συνδέεται με μεθυλιωμένες κυτοσίνες (MBD) και μια υποπεριοχή αποσιώπησης της μεταγραφής (TRD) (Εικ.19). Εντοπίζεται στην ετεροχρωματίνη, αλληλεπιδρά με methyl-CpG δινουκλεοτίδια και λειτουργεί ως καταστολέας της μεταγραφής. Αυτό το επιτυγχάνει στρατολογώντας σύμπλοκα αποσιώπησης και αποακετυλάσες των ιστονών πάνω στο DNA, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση και την ενίσχυση της ετεροχρωματίνης. Επίσης, μεταλλάξεις στην αλληλουχία της προκαλούν το επικρατές φυλοσύνδετο σύνδρομο Rett.

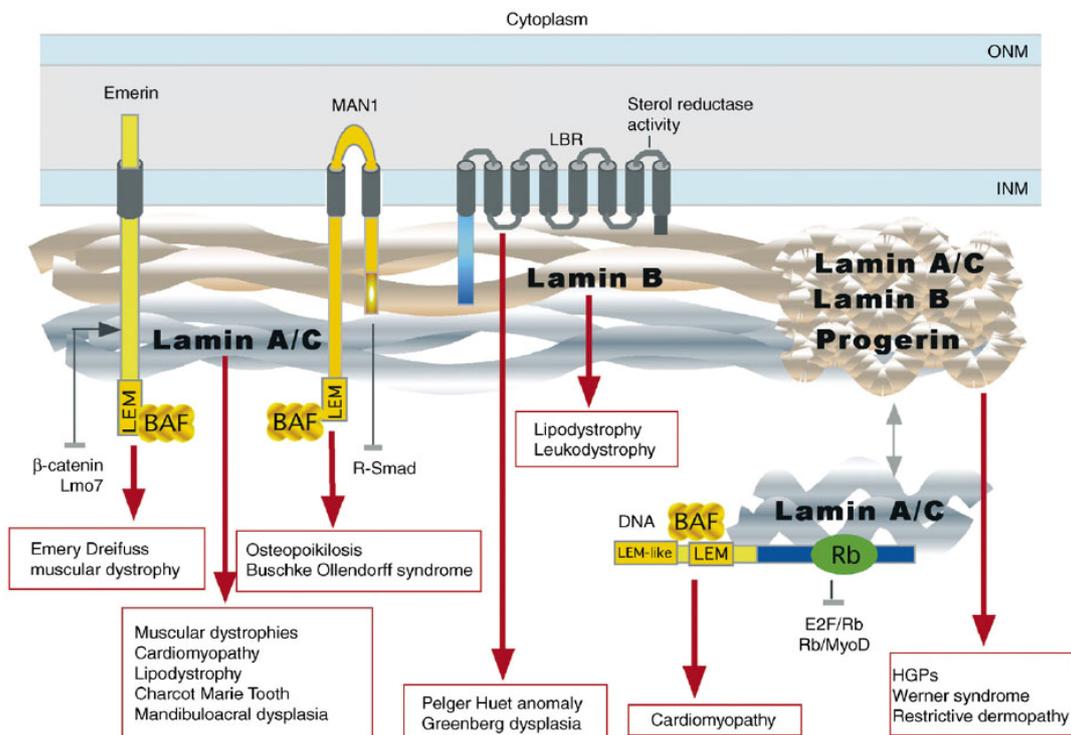


Εικόνα 19: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της MeCP2 (τροποποίηση από Tao et al, 2009).

Η περιοχή που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τον LBR είναι το συνδετικό τμήμα ανάμεσα στις υποπεριοχές MBD και TRD. Το σύμπλοκο LBR-MeCP2 πιθανώς να έχει ενεργό ρόλο στην τοποθέτηση του μεθυλιωμένου DNA στην περιφέρεια του πυρήνα και ταυτόχρονα να αποτελεί μέρος ενός δικτύου πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη σύνδεση της ετεροχρωματίνης στον πυρηνικό φάκελο, συμβάλλοντας έτσι στην αποσιώπηση γονιδίων (Guarda et al, 2009). Η υπόθεση αυτή εδραιώνεται περαιτέρω, από το γεγονός ότι εντοπίστηκε αλληλεπίδραση του LBR με το συνδετικό DNA των χρωμοσωμάτων. Μάλιστα, η σύνδεση αυτή ενισχύεται από την ύπαρξη δευτεροταγών δομών στο DNA (Duband-Goulet et al, 2000).

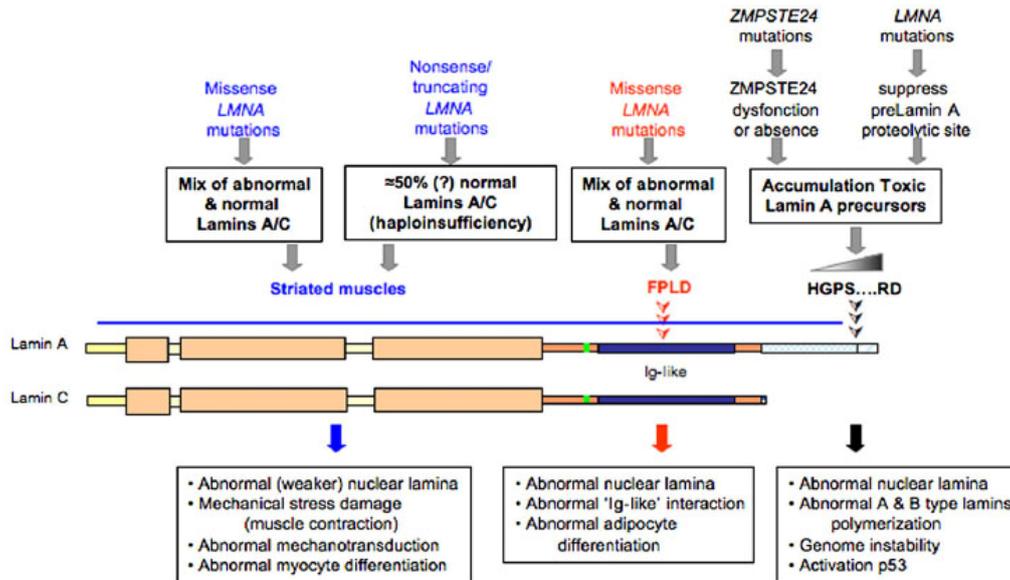
1.4 Ασθένειες και πυρηνικός φακέλος

Μια σειρά πειραματικών δεδομένων αποκάλυψαν ότι μεταλλάξεις σε πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου και της πυρηνικής λάμινας συσχετίζονται άμεσα με πολλές ασθένειες τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα. Οι ασθένειες αυτές περιλαμβάνουν μια ποικιλία συνδρόμων που αφορούν διαφορετικού τύπου ιστούς (Εικ.20).



Εικόνα 20: Πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου, πυρηνική λάμινα και ασθένειες (Vlcek et al, 2007).

Οι ασθένειες που σχετίζονται με τις λαμίνες ονομάστηκαν λαμινοπάθειες (laminopathies). Οι περισσότερες λαμινοπάθειες οφείλονται σε μεταλλάξεις του γονιδίου της λαμίνης A και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με τον ιστό ή/και το σύστημα που προσβάλουν περισσότερο. Υπάρχουν λοιπόν: α) ασθένειες των γραμμωτών μυών, β) λιποδυστροφίες, γ) περιφερικές νευροπάθειες και δ) διαταραχές με πρόωρη γήρανση (Εικ.21) (Worman and Bonne, 2007, Burke and Stewart, 2002, Hutchison et al, 2001, Worman and Courvalin, 2002).



Εικόνα 21: Πιθανοί μηχανισμοί παθογένειας που προκύπτουν από μετάλλαξη της λαμίνης A και του γονιδίου ZMPSTE24 (Worman and Bonne, 2007). Με μπλε απεικονίζονται οι ασθένειες των γραμμωτών μυών και με κόκκινο οι λιποδυστροφίες. Οι δύο αυτές κατηγορίες οφείλονται στη ταυτόχρονη παρουσία της φυσιολογικής και της μεταλλαγμένης λαμίνης A/C στο κύτταρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, στην περίπτωση των γραμμωτών μυών, η πυρηνική λάμινα να είναι αδύναμη, οι μύες να παρουσιάζουν βλάβες εξαιτίας του μηχανικού στρες και τα μυοκύτταρα να μη διαφοροποιούνται φυσιολογικά. Στις λιποδυστροφίες επίσης υπάρχει μη φυσιολογική λάμινα, ενώ παρουσιάζονται μη φυσιολογικές “Ig-like” αλληλεπιδράσεις και προβλήματα στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων. Με μαύρο απεικονίζονται οι διαταραχές πρόωρης γήρανσης, οι οποίες προκαλούνται από συσσώρευση πρόδρομων μορίων της λαμίνης A. Η συσσώρευση αυτή οδηγεί στο λάθος πολυμερισμό των λαμινών τύπου A και B, πράγμα που προκαλεί ανώμαλο σχηματισμό της πυρηνικής λάμινας, γενομική αστάθεια και ενεργοποίηση του p53. Οι ασθένειες αυτές προκαλούνται είτε από μεταλλάξεις στη λαμίνη A είτε από μεταλλάξεις του ενζύμου ZMPSTE24, το οποίο είναι υπεύθυνο για την ωρίμανση των μορίων της λαμίνης A.

Η πρώτη λαμινοπάθεια ανακαλύφθηκε το 1999 και ήταν η αυτοσωμική επικρατής μορφή της μυϊκής δυστροφίας Emery-Dreifuss (AD-EDMD) (Bonne et al, 1999). Η AD-EDMD χαρακτηρίζεται από συσπάσεις των αγκώνων, του αχίλλειου τένοντα και του λαιμού, ακαμψία της σπονδυλικής στήλης και σταδιακή αδυναμία των μυών με ταυτόχρονη απώλεια μυϊκής μάζας. Οι ασθενείς συνήθως πεθαίνουν από προβλήματα στην καρδιά, εξαιτίας ανωμαλιών στην αγωγιμότητα του ηλεκτρικού ερεθίσματος. Η αυτοσωμικά υπολειπόμενη μορφή της EDMD εμφανίζει τα ίδια κλινικά χαρακτηριστικά με την επικρατή μορφή. Στην ίδια κατηγορία ανήκουν επίσης η διατακτική καρδιομυοπάθεια 1A (dilated cardiomyopathy 1A) και limb girdle

muscular dystrophy 1B, οι οποίες κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο (Fatkin et al, 1999, Muchir et al, 2000). Παρουσιάζουν παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτά της AD-EDMD, με μόνη διαφορά ότι δεν έχουν συμπτώματα στους σκελετικούς μύες (Raffaele Di Barletta et al, 2000).

Στην κατηγορία των λαμινοπαθικών λιποδυστροφιών ανήκουν η οικογενής μερική λιποδυστροφία τύπου Dunnigan (familial partial lipodystrophy Dunnigan type, FPLD) και η Mandibuloacral (MAD) (Cao et al, 2000, Schmidt et al, 2000, Novelli et al, 2002). Η FPLD είναι αυτοσωμική επικρατής. Ο ασθενής εμφανίζει φυσιολογική κατανομή του λίπους στην παιδική ηλικία, αλλά κατά την είσοδό του στην εφηβεία ο υποδόριος λιπώδης ιστός εξαφανίζεται από τα άνω και κάτω άκρα και συσσωρεύεται στο πρόσωπο και τον αυχένα. Τα άτομα αυτά εμφανίζουν επίσης αντοχή στην ινσουλίνη και σακχαρώδη διαβήτη. Η MAD επιδεικνύει αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομικότητα και χαρακτηρίζεται από: καθυστερημένη ανάπτυξη μετά τη γέννα, ανωμαλίες του κρανίου και του προσώπου, σκελετικές ανωμαλίες, εμφάνιση στιγμάτων στο δέρμα, μερική λιποδυστροφία, αντοχή στην ινσουλίνη και σακχαρώδη διαβήτη. Έχει αναφερθεί ότι η MAD μπορεί να προκληθεί και από μετάλλαξη στο γονίδιο ZMPSTE24 (δευτερογενής λαμινοπάθεια). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την ενδοπρωτεάση FACE-1, η οποία είναι υπεύθυνη για την ωρίμανση των λαμινών τύπου A (Agarwal et al, 2003).

Στις περιφερικές νευροπάθειες ανήκει το σύνδρομο Charcot-Marie-Tooth τύπου 2B1 (CMT2B1) (De Sandre-Giovannoli et al, 2002). Η ασθένεια κληρονομείται ως αυτοσωμική υπολειπόμενη και χαρακτηρίζεται από απομυελινοποίηση των κινητικών νευρώνων.

Οι πιο σοβαρές ασθένειες, που οφείλονται σε μεταλλάξεις στη λαμίνη A, είναι αυτές της κατηγορίας της πρόωρης γήρανσης. Σε αυτή ανήκουν η Hutchinson Gilford progeria syndrome (HGPS), μερικές περιπτώσεις άτυπου συνδρόμου Werner και η περιοριστική δερματοπάθεια (Restrictive Dermopathy), όλες εκ των οποίων επιδεικνύουν αυτοσωμικό επικρατή τρόπο κληρονομικότητας (Eriksson et al, 2003, Navarro et al 2004, Chen et al, 2003). Η HGPS είναι πολύ σπάνια και επηρεάζει πολλά συστήματα με κύριο χαρακτηριστικό την πρόωρη γήρανση. Οι ασθενείς συνήθως πεθαίνουν πριν το εικοστό έτος της ηλικίας τους από καρδιακά προβλήματα. Το άτυπο σύνδρομο Werner συναντάται συνήθως μαζί με άλλα μακροσκοπικά κλινικά χαρακτηριστικά ασθενειών που οφείλονται σε μετάλλαξη στη λαμίνη A. Η περιοριστική δερματοπάθεια είναι ένα νεογνικό θανατηφόρο σύνδρομο, όπου το

νεογνό παρουσιάζει σοβαρή καθυστέρηση στην ενδομήτρια ανάπτυξη. Έχει αναφερθεί ότι η ασθένεια αυτή μπορεί να προκύψει και από μετάλλαξη στο γονίδιο ZMPSTE24 (δευτερογενής λαμινοπάθεια).

Έως σήμερα, δύο ασθένειες έχουν αποδοθεί στις λαμίνες τύπου B, η όψιμη λευκοδυστροφία (adult-onset leukodystrophy) και το σύνδρομο Barraquer-Simons. Η όψιμη λευκοδυστροφία οφείλεται σε διπλασιασμό του γονιδίου της λαμίνης B1 και κληρονομείται ως αυτοσωμική επικρατής (Padiath et al, 2006). Χαρακτηρίζεται από απομυελινοποίηση του κεντρικού νευρικού συστήματος και η κλινική της εικόνα μοιάζει πολύ με αυτή της σκλήρυνσης κατά πλάκας. Το σύνδρομο Barraquer-Simons οφείλεται σε τυχαίες μεταλλάξεις στο γονίδιο της B2 (Hegele et al, 2006). Ποντίκια ομόζυγα για την έλλειψη του γονιδίου της λαμίνης B1, πεθαίνουν στη γέννα από πολλαπλές ανωμαλίες στους πνεύμονες και στα οστά. Εμβρυονικοί ινοβλάστες από τα ζώα αυτά έχουν ανώμαλο πυρήνα, αλλά εμφανίζουν φυσιολογικές μηχανικές ιδιότητες (Vergnes et al, 2004, Lammerding et al, 2006).

Οι ασθένειες που οφείλονται σε πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου ονομάζονται «nuclear envelopathies» (Burke and Stewart, 2002, Nagano and Arahata, 2000). Στην κατηγορία αυτή, ανήκει η φυλοσύνδετη μυϊκή δυστροφία Emery-Dreifuss (X-linked), η οποία οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο της emerin (Bione et al, 1994, Manilal et al, 1996). Το γονίδιο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα X, με αποτέλεσμα την πλήρη έλλειψη της πρωτεΐνης στους άνδρες και την τυχαία έλλειψή της στις γυναίκες, εξαιτίας της αδρανοποίησης του X. Τα χαρακτηριστικά της ασθένειας είναι ίδια με αυτά της αυτοσωμικής μορφής, με κύρια διαφορά τον μεγαλύτερο αριθμό θανάτων λόγω καρδιακών προβλημάτων.

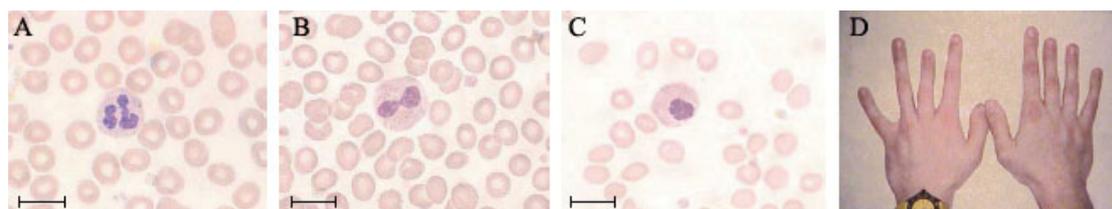
Τέλος, μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη MAN1 προκαλούν τρεις ασθένειες το σύνδρομο Buschke-Ollendorf, τη μελορεόστωση (melorheostosis) και την οστεοποικίλωση (Hellemans et al, 2004, Mumm et al, 2007). Όλες κληρονομούνται ως αυτοσωμικές υπολειπόμενες ασθένειες.

1.4.1 LBR και ασθένειες

Οι ασθένειες, που ως τώρα, έχουν βρεθεί να οφείλονται σε μετάλλαξη στο γονίδιο του LBR είναι η Pelger-Hüet (PHA) και η δυσπλασία Greenberg στον άνθρωπο και η ιχθύωση στα ποντίκια. Επίσης, έχουν εντοπιστεί αντισώματα για τον LBR σε

περιπτώσεις ασθενών που πάσχουν από αρχική χολική κίρρωση (Primary Biliary Cirrhosis PBC) και μεταλλάξεις σε ασθενείς με το σύνδρομο Reynolds.

Η PBA είναι μια αυτοσωμική επικρατής διαταραχή που χαρακτηρίζεται από μη φυσιολογικό σχήμα του πυρήνα και οργάνωση της χρωματίνης στα κοκκιοκύτταρα του αίματος (Εικ.22).



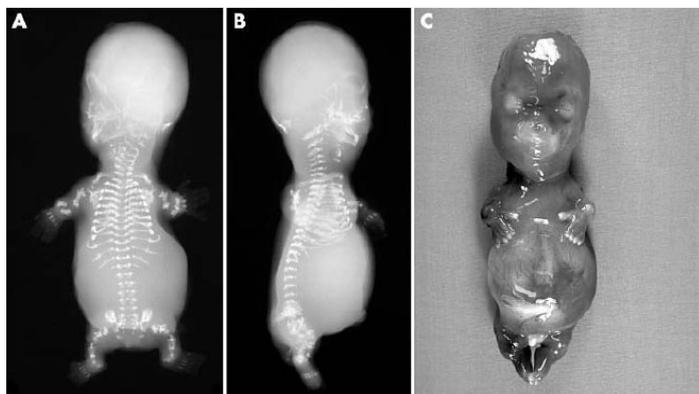
Εικόνα 22: A-C) Ουδετερόφιλο σε επίχρισμα αίματος από φυσιολογικό, ετερόζυγο και ομόζυγο άτομο αντίστοιχα. D) Χέρια ομόζυγου ατόμου. Είναι εμφανή τα μικρότερα δάχτυλα (Hoffmann et al, 2002).

Τα άτομα που πάσχουν εμφανίζουν μειωμένη λόβωση στους πυρήνες των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων, καθώς και μεγάλα συσσωματώματα χρωματίνης. Οι ομόζυγοι ασθενείς έχουν ουδετερόφιλα με σφαιρικό πυρήνα, σκελετικές ανωμαλίες, προβλήματα στην ανάπτυξη και εμφανίζουν επιληπτικές κρίσεις. Η συχνότητα εκδήλωσης της ασθένειας στον κόσμο είναι περίπου 0,01-0,1%. Σε μια περιοχή της βόρειας Σουηδίας όμως είναι 0,6%, ενώ στο χωριό Geleau της νοτιοανατολικής Γερμανίας φτάνει το 1,01%. Οι μεταλλάξεις του LBR που είναι υπεύθυνες για την PBA ποικίλουν.

Έχουν αναγνωρισθεί δύο μεταλλάξεις πρόωρης λήξης της μετάφρασης (nonsense mutations), δύο μεταλλάξεις αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης (frameshift mutations), καθώς και τέσσερις μεταλλάξεις σε θέσεις ματίσματος (splice sites) του RNA. Τα κύτταρα από ετερόζυγα άτομα έχουν μειωμένα επίπεδα του LBR, ενώ κύτταρα από ομόζυγα έχουν μόνο ίχνη του. Έχειδειχθεί ότι ο LBR μπορεί να δράσει ως αναγωγή της χοληστερόλης, οπότε αλλαγές στα επίπεδά του μπορούν πιθανώς να οδηγήσουν σε αναπτυξιακές ανωμαλίες. Κάτι παρόμοιο έχειδειχθεί για την αναγωγή της στερόλης DHCR7, η οποία είναι μεταλλαγμένη στο σύνδρομο Smith-Lemli-Opitz (Hoffmann et al, 2002, Best et al, 2003, Cunningham et al, 2009).

Η Hydrops-ectopic calcification-“moth-eaten” (HEM), ή αλλιώς σκελετική δυσπλασία Greenberg, είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη χονδροδυστροφία. Είναι

θανατηφόρα και χαρακτηρίζεται από εμβρυϊκό ύδρωπα, κοντά άκρα, ασβεστοποίηση των χόνδρων και των οστών και μερικές φορές από κατάγματα των επιμήκων οστών, πολυδακτυλία και κρανίο με προβληματική οστεοποίηση (Εικ.23).



Εικόνα 23: Έμβρυο 15 εβδομάδων με HEM. A) Οπίσθια ακτινογραφία, B) Πλευρική ακτινογραφία (Offiah et al, 2003).

Η μετάλλαξη του LBR, σε αυτή την περίπτωση, οδηγεί στη δημιουργία μιας κολοβωμένης πρωτεΐνης, η πολυπεπτιδική αλυσίδα της οποίας διακόπτεται ανάμεσα στην έβδομη και όγδοη διαμεμβρανική περιοχή. Σε ινοβλάστες δέρματος εμβρύου 18 εβδομάδων με HEM ανιχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα ενός πρόδρομου μορίου του μονοπατιού της χοληστερόλης (cholesta-8,14-dien-3-beta-ol). Το εύρημα αυτό ήταν συμβατό με την έλλειψη του ενζύμου 3-beta-hydroxysterol delta(14)-reductase. Διαμόλυνση των ινοβλαστών αυτών με το φυσιολογικό cDNA του LBR, οδήγησε στη μείωση του συσσωρευμένου πρόδρομου μορίου σχεδόν κατά 50%. Αυτό απέδειξε ότι πράγματι ο LBR κωδικοποιεί την προβληματική Δ^{14} -αναγωγή της στερόλης. Η μητέρα του εμβρύου ήταν υγιής, αλλά 60% περίπου των πολυμορφοπύρηνων της εμφάνιζαν υπολόβωση ίδια με αυτή της PHA. Αυτό, σε συνδυασμό με το ότι η PHA σε ομόζυγη μορφή προκαλεί μικρά άκρα και χονδροδυσπλασία στα κουνέλια και στις γάτες, δημιουργεί τη βάσιμη υποψία ότι οι δύο ασθένειες συνδέονται. Πιθανώς λοιπόν, η PHA να είναι η ετερόζυγη (ελαφρά) μορφή της HEM. Ελάχιστες ομόζυγες περιπτώσεις της PHA έχουν αναφερθεί και αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η ομόζυγη κατάσταση είναι σε μεγάλο ποσοστό θανατηφόρα (Offiah et al, 2003, Waterham et al, 2003, Oosterwijk et al, 2003).

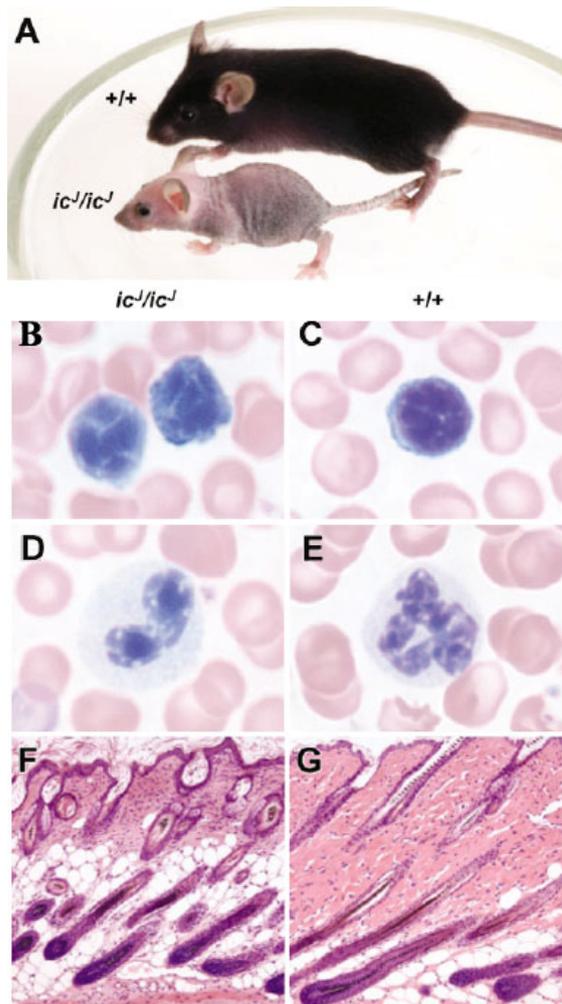
Η πρωτοπαθής χολική κίρρωση (PBC) είναι μία αυτοάνοση νόσος, η οποία χαρακτηρίζεται από την καταστροφή των χοληφόρων πόρων που βρίσκονται στο

ήπαρ. Η πιο συνηθισμένη πρωτεΐνη για την οποία εντοπίζονται αυτοαντισώματα είναι η γλυκοπρωτεΐνη των πυρηνικών πόρων gp210. Σε μερικές περιπτώσεις όμως, έχουν βρεθεί ασθενείς με αυτοαντισώματα για τον LBR. Τα αντισώματα και στις δύο περιπτώσεις είναι μοναδικά για την ασθένεια αυτή και δεν εντοπίζονται σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα ή ασθένειες του ήπατος (Courvalin et al, 1990, Lin et al, 1996).

Το 1970 το σύνδρομο Reynolds αναγνωρίστηκε ως συνδυασμός 2 ασθενειών, της PBC και του περιορισμένου σε έκταση δερματικού Σκληροδέρματος (limited systemic scleroderma ISSc). Ασθενείς με λαμινοπάθειες (π.χ. HGPS, restrictive dermopathy) εμφανίζουν κοινά κλινικά χαρακτηριστικά με το σύνδρομο αυτό. Μετά από ανάλυση γονιδίων που σχετίζονται με τις παραπάνω ασθένειες, βρέθηκε ασθενής στον οποίο για πρώτη φορά εντοπίστηκε ετερόζυγη μετάλλαξη μη συνώνυμου αμινοξέως στο γονίδιο του LBR. Η μετάλλαξη αυτή παρήγαγε μια πρωτεΐνη με προφανή τοξικά αποτελέσματα στους ινοβλάστες του ασθενούς (Gaudy-Marqueste, 2010).

Η ασθένεια της ιχθύωσης (ic) στα ποντίκια μοιάζει πάρα πολύ με την PHA στον άνθρωπο. Παρουσιάζει ακριβώς τα ίδια χαρακτηριστικά στα ουδετερόφιλα με αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω. Παράλληλα όμως, τα ζώα εμφανίζουν αλωπεκία, διαφόρων μορφών συνδακτυλίες και ήταν υδροκέφαλα. Ο γενετικός τόπος που θίγεται στην ιχθύωση εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 κοντά στο γονίδιο του LBR. Εκεί αναγνωρίστηκαν μια μετάλλαξη λήξης της μετάφρασης και δύο μεταλλάξεις αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης, που ονομάστηκαν ic, ic^J και ic^{4J}, αντίστοιχα. Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν στην παραγωγή κολοβών ή σοβαρά μεταλλαγμένων πρωτεϊνών.

Η μετάλλαξη ic^J αντιστοιχεί σε μια εισαγωγή δύο βάσεων CC στη θέση 1088, η οποία δημιουργεί μια αλλαγή στο πλαίσιο ανάγνωσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα αμινοξέα 365 έως 385 να αλλάζουν και να δημιουργείται ένα κωδικόνιο λήξης στη θέση 386. Μελέτες σε ζώα που έφεραν την μετάλλαξη αυτή αποκάλυψαν ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά. Ένας μεγάλος αριθμός ομόζυγων πεθαίνουν πριν τη γέννα. Το δέρμα όσων επιβιώνουν είναι πιο παχύ με σκληρά λέπια. Χρώση τομών παραφίνης με αιματοξυλίνη-ηωσίνη έδειξε επιδερμική υπερπλασία με ορθοκερατική υπερκεράτωση και διαστολή των θυλάκων της τρίχας. Τα λεμφοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα και τα ηωσινόφιλα, σε όλους τους ιστούς, περιείχαν συσσωρεύσεις της χρωματίνης δίπλα στον πυρηνικό φάκελο (Εικ.24).



Εικόνα 24: A) ic^J/ic^J wt/wt ποντίκια ηλικίας πέντε εβδομάδων. B-E) Επίχρισμα αίματος με χρώση Wright-Giemsa. B-C) Λεμφοκύτταρα από ic^J/ic^J και wt/wt ποντίκια. Φαίνονται οι συσσωρεύσεις της χρωματίνης. D-E) Ουδετερόφιλα από ic^J/ic^J και wt/wt ποντίκια. Ο πυρήνας των ομόζυγων έχει δύο λοβούς αντί να είναι πολυλοβοτός. F-G) Τομές από δέρμα με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (Shultz et al, 2003).

Παρόμοια μορφολογία στη χρωματίνη εμφάνιζαν και άλλα είδη κυττάρων, όπως το εντερικό επιθήλιο και κύτταρα της παρεγκεφαλίδας. Τα ετερόζυγα ζώα αντίθετα, έφεραν έναν ελάχιστο αριθμό κυττάρων με αυτή την ανωμαλία. Πειράματα ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης κατά western έδειξαν απουσία ανιχνεύσιμης πρωτεΐνης στα ομόζυγα ζώα, κάτι που θα μπορούσε να εξηγηθεί είτε από πρόωρη αποδόμηση του RNA ή της πρωτεΐνης είτε από την αδυναμία της μετάφρασης του μεταλλαγμένου RNA. Μια άλλη πιθανή εξήγηση είναι η πρωτεΐνη να είναι παρούσα αλλά οι αντιγονικοί επίτοποι που αναγνωρίζει το αντίσωμα να απουσιάζουν (Shultz et al, 2003). Οι Makatsori et al πραγματοποίησαν ανοσοφθορισμό με αντίσωμα για τον LBR σε ινοβλάστες από ετερόζυγα ζώα και έδειξαν ότι υπάρχουν μεγάλες συσσωρεύσεις της πρωτεΐνης στον πυρηνικό φάκελο. Στην ίδια μελέτη αναφέρθηκε επίσης έκτοπος εντοπισμός του LBR στις πλάκες συγκόλλησης (adhesion plaques) και ανωμαλίες στο σχήμα του πυρήνα (Makatsori et al, 2004).

Ο πολυλοβωτός πυρήνας πιστεύεται ότι προσφέρει αυξημένη ρευστότητα στα ουδετερόφιλα, η οποία χρησιμεύει στην απάντηση των κυττάρων στη χημειοταξία. Η απώλεια του σχήματος του πυρήνα λοιπόν, ίσως να επηρεάζει τόσο την κινητικότητα όσο και τη λειτουργία των κυττάρων. Οι Gaines et al θέλοντας να ελέγξουν αυτή την πιθανότητα κατασκεύασαν EML προγονικά κύτταρα (erythroid, myeloid and lymphoid potential) από ic^J/ic^J ποντίκια. Τα EML διαφοροποιήθηκαν προς ώριμα ουδετερόφιλα (EPRO), τα οποία εξετάστηκαν ως προς τη μορφολογία και τη λειτουργικότητά τους. Τα κύτταρα αυτά είχαν τα ίδια χαρακτηριστικά με αυτά του ζώου από το οποίο προήλθαν. Πειράματα χημειοταξίας αποκάλυψαν ελλιπή δυνατότητα μετανάστευσης μέσα από μεμβράνες με πόρους 3 μ m. Η φαγοκυττάρωση των κυττάρων ήταν φυσιολογική, ενώ είχαν ελαττωματική οξειδωτική αντίδραση (oxidative burst). Πιθανώς το πρόβλημα αυτό να οφείλεται εν μέρει στην απώλεια της έκφρασης του $gp91^{phox}$, που παρατηρείται στα EPRO, πράγμα που συνδέει εμμέσως τον LBR με το μεταγραφικό έλεγχο αυτής της οξειδάσης (Gaines et al, 2008). Ταυτόχρονα με τους Gaines et al, οι Zwerger et al πραγματοποίησαν πειράματα στα ίδια κύτταρα για να εξετάσουν αλλαγές στην έκφραση πρωτεϊνών του πυρηνικού φακέλου και στη δομή της ετεροχρωματίνης. Η μελέτη τους έδειξε ότι τα EPRO εμφάνιζαν τα ίδια χαρακτηριστικά με αυτά των ουδετερόφιλων του ζώου. Παρατήρησαν ότι, κατά την *in vitro* διαφοροποίηση των EPRO, η ποσότητα του LBR αυξανόταν τόσο στα wt/wt όσο και στα wt/-. Επιπροσθέτως, διαπιστώθηκε, επίσης κατά την *in vitro* διαφοροποίηση των EPRO, αύξηση της λαμίνης A/C στα wt/- και στα -/- σε σχέση με τα wt/wt (Zwerger et al, 2008). Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν το ρόλο του LBR στη μορφολογία των ουδετερόφιλων, στις λειτουργίες τους και στον έλεγχο της μεταγραφικής ρύθμισης ορισμένων γονιδίων τους.

Οι Cohen et al δημιούργησαν ένα γενετικά τροποποιημένο ποντίκι, στο οποίο εισήγαγαν ένα gene-trap με την β -γαλακτοσιδάση στο γονίδιο του LBR. Τα ζώα που παρήχθησαν διέθεταν, σε ομόζυγη μορφή, τα ίδια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με αυτά των ιχθυωσικών. Στατιστική ανάλυση έδειξε ότι περίπου το 54% των ομόζυγων ζώων πέθαινε πριν τη γέννα και μάλιστα πριν την εμφύτευση των εμβρύων. Το 50% αυτών που γεννήθηκαν πέθαιναν μέσα στις τρεις πρώτες μέρες, ενώ το 20% που έζησε έως την δέκατη με ενδέκατη εβδομάδα. Το υπόλοιπο 30% επιβίωσε περίπου τέσσερις εβδομάδες. Τα ομόζυγα ζώα δεν μπορούσαν να αναπαραχθούν και μετά από λεπτομερή εξέταση βρέθηκε ότι ήταν σεξουαλικά ανώριμα, με τα θηλυκά να εμφανίζουν υπερπλασία της μήτρας. Παρουσίαζαν επίσης σκολίωση της σπονδυλικής

στήλης, επτά αντί για έξη σπονδύλους ανάμεσα στο θώρακα και τη λεκάνη και οίδημα της κεφαλής. Τα δεδομένα αυτά, σε συνδυασμό με την έκφραση της πρωτεΐνης στα οστεογεννητικά κύτταρα, αποκαλύπτουν ένα νέο ρόλο στη σκελετική ανάπτυξη. Δοκιμασία TUNEL έδειξε αυξημένη απόπτωση στο κεντρικό νευρικό σύστημα των ομόζυγων, ενώ ήταν εμφανή τα σημάδια γλοίωσης στα αστροκύτταρα της περιφέρειας των πλευρικών κοιλιών του εγκεφάλου. Η λάμινα, σε ινοβλάστες από αυτά τα ποντίκια, είχε ρυτιδωμένη (wrinkled) εμφάνιση, σε σχέση με τα φυσιολογικά. Η HP1α σχημάτιζε λιγότερα και μεγαλύτερα συσσωματώματα (foci) και η συχνότητα εμφάνισης «μικρών πυρήνων» (micronuclei) ήταν μεγαλύτερη. Λειτουργική ανάλυση των ουδετερόφιλων δεν αποκάλυψε κάποια δυσλειτουργία στην αντιμετώπιση μολύνσεων. Τέλος, εξέτασαν αν ο μεταγραφικός παράγοντας C/EBPε συνδέεται με τον υποκινητή του LBR. Εντόπισαν τρεις πιθανές θέσεις πρόσδεσης και απέδειξαν ότι πράγματι ελέγχει μεταγραφικά το γονίδιο αυτό. Το εύρημα αυτό είναι συμβατό με τον σημαντικό ρόλο της πρωτεΐνης στα ουδετερόφιλα, μια και ο C/EBPε είναι απαραίτητος για τη διαφοροποίηση των κοκκιοκυττάρων (Cohen et al, 2008).

Οι Wassif et al έλεγξαν κατά πόσο η δυσπλασία HEM και η ιχθύωση οφείλονται είτε σε διαταραχή στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της χοληστερόλης είτε ανήκουν στην κατηγορία των λαμινοπαθειών. Συνέκριναν ομόζυγα ποντίκια ic^1 με ποντίκια που δεν εκφράζουν το γονίδιο για την Dhcr14 (TM7SF2), καθώς και με ποντίκια που συνδύαζαν τους δύο γονότυπους (LBR^{+/-}:Dhcr14^{-/-}). Τα τρία αυτά μεταλλαγμένα ποντίκια είχαν διαφορετικούς φαινότυπους. Ο φαινότυπος της ιχθύωσης δεν συμφωνεί με αυτόν του Dhcr14^{-/-}. Στα LBR^{-/-} ζώα βρέθηκε, στο σημείο αύξησης της κνήμης (tibial growth plate), σημαντική αποδιοργάνωση της υπερτροφικής ζώνης και ήπια της πολλαπλασιαστικής ζώνης. Επιπροσθέτως, το δοκιμάδες οστό ήταν ανώριμο και υπήρχε υπολειμματικός χόνδρος. Τα Dhcr14^{-/-} αντίστοιχα εμφάνιζαν μια μικρή μόνο αποδιοργάνωση της υπερτροφικής και πολλαπλασιαστικής ζώνης. Δεν βρήκαν ανωμαλίες στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της χοληστερόλης τόσο στο ήπαρ όσο και στο σπλήνα (Ούτε στο μοναδικό LBR^{-/-}:Dhcr14^{+/-} που εξέτασαν). Παρατήρησαν όμως ότι στο ήπαρ υπήρχε σημαντική αύξηση της αναγωγής Dhcr14 στα LBR^{-/-} ζώα και αντίστροφα. Πιθανώς λοιπόν, ένα και μόνο αντίγραφο από ένα από τα δύο γονίδια είναι αρκετό για τη σύνθεση της χοληστερόλης. Αυτό υποδεικνύει ότι υπάρχει συμπληρωματικότητα ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, μια ποικιλία ανωμαλιών στη βιοσύνθεση της χοληστερόλης εντοπίστηκε στο φλοιό του εγκεφάλου. Η ποικιλία αυτή όμως μπορεί να εξηγηθεί με πολλούς τρόπους.

Παρατηρήθηκαν μικρές παροδικές αυξήσεις των Δ^{14} -στερολών στα $LBR^{-/-}$ και στα $Dhcr14^{-/-}$ ζώα, ενώ στα $LBR^{+/-}; Dhcr14^{-/-}$ η αύξηση ήταν σημαντική. Όπως και στο ήπαρ, εντοπίστηκε και στον εγκέφαλο συμπληρωματικότητα ανάμεσα στα δύο γονίδια, αλλά σε πολύ μικρότερη έκταση. Επίσης, η έκφραση του LBR δεν εξαρτάται και δεν ελέγχεται από την ύπαρξη ή μη της χοληστερόλης, ενώ δεν είναι στόχος του $SREBP2$ (Wassif et al, 2007). Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι τα δύο γονίδια ελέγχονται εναλλακτικά από το κεντρικό νευρικό σύστημα και ότι είναι πιθανότερο οι δύο ασθένειες να ανήκουν στην κατηγορία των λαμινοπαθειών.

1.5 Σκοπός της διδακτορικής διατριβής

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη της χρωματίνης και του πυρηνικού φακέλου σε ποντίκια τα οποία φέρουν την μετάλλαξη ic^J του LBR, με την προοπτική να εξηγηθούν στο μοριακό επίπεδο οι αλλαγές που προκαλούν μερικά από τα βασικά χαρακτηριστικά του φαινοτύπου των ομόζυγων ζώων (δερματικές βλάβες, μικρό σωματικό βάρος κατά τη γέννηση, καχεξία και την αδυναμία ανάπτυξης). Για να επιτύχουμε αυτόν το στόχο αποφασίσαμε α) να εξετάσουμε μορφολογικά και με ανοσοϊστοχημική ανάλυση ιστούς και κύτταρα, β) να μελετήσουμε βιοχημικά πυρηνικές πρωτεΐνες με φασματοσκοπία μάζας και πειράματα συγκατακρήμνισης και γ) να πραγματοποιήσουμε ανάλυση του προτύπου έκφρασης γονιδίων του λεπτού εντέρου σε επίπεδο γονιδιώματος με μικροσυστοιχίες DNA.

Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

<u>Όνομα κατασκευής</u>	<u>Φορέας</u>	<u>Ένθεμα</u>
mHP1 α -GST	pGEX1	Mouse HP1 α (κατάλοιπα 1-191)
mHP1 β -GST	pGEX1	Mouse HP1 β (κατάλοιπα 1-185)
mHP1 γ -GST	pGEX1	Mouse HP1 γ (κατάλοιπα 1-183)
GST	pGAT2	GST
chNtLBR-GST	PGEX-2T	Chicken N-terminal LBR (κατάλοιπα 1-205)

2.2 Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

<u>Πρωτογενή Αντισώματα</u>	<u>Ξενιστής</u>	<u>Πολυκλωνικό/ Μονοκλωνικό</u>	<u>Εταιρία</u>
mLBR	Κουνέλι	Π	homemade
Lamin B	Κουνέλι	Π	homemade
Lamin A/C	Κουνέλι	Π	homemade
2meK4-H3	Κουνέλι	Π	Upstate
2meR2-H3	Κουνέλι	Π	Upstate
3meK9-H3	Κουνέλι	Π	Abcam
3m3K27-H3	Κουνέλι	Π	Upstate
Ki67	Κουνέλι	Π	Abcam
Troma I/K8	Αρουραίος	M	Hybridoma Bank
Troma III/K19	Αρουραίος	M	Hybridoma Bank

Τα δευτερεύοντα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ακόλουθα:

- goat a-rabbit IgG 568 με απορρόφηση (Abs) στα 578 nm και εκπομπή (Em) στα 603 nm από την Alexa Fluor, Molecular Probes (Eugene, OR).
- a-rabbit HRP

2.3 Μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων

2.3.1 Καλλιέργεια σπληνοκυττάρων

Καλλιέργειες σπληνοκυττάρων ποντικού αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας 37⁰C και ατμόσφαιρας εμπλουτισμένης σε 5% CO₂. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν RPMI 1650, που περιείχε 2mM L-γλουταμίνη, 2mM πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και 10% FCS (Fetal calf serum). Η ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων να μπουν στον κυτταρικό κύκλο έγινε με 5μg/ml PHA-L (phytohemagglutinin) για τρεις μέρες.

2.4 Παρασκευαστικές Μέθοδοι

2.4.1 Παραγωγή ανασυνδυασμένων χιμαιρικών πρωτεϊνών GST και καθαρισμός τους με τη χρήση χρωματογραφίας συγγενείας

Η παραγωγή και η απομόνωση χιμαιρικών πρωτεϊνών GST πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Smith and Johnson, 1988.

Καλλιέργεια βακτηρίων BL21(DE3), τα οποία περιέχουν το πλασμίδιο με την πρωτεΐνη προς έκφραση, αραιώθηκε σε O.D~0,1 και αφέθηκε να αναπτυχθεί έως ότου φτάσει στα 600nm την O.D~0,6 στους 37⁰C. Η επαγωγή της έκφρασης έγινε με την προσθήκη 0,2-0,5mM IPTG για 3 ώρες στους 37⁰C ή στους 26⁰C για την SRPK1-GST. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 5000rpm για 8 λεπτά στους 4⁰C, σε κεφαλή JA-14 (Beckman). Το βακτηριακό ίζημα πλύθηκε με διάλυμα 0,9% w/v NaCl και 1mM PMSF. Το αιώρημα φυγοκεντρήθηκε στα 5000rpm για 15 λεπτά στους 4⁰C, σε κεφαλή JA-20 (Beckman). Μετά από υπολογισμό του βάρους του ιζήματος, αυτό επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα λύσης (5ml/gr) χωρίς 1% Triton-X100 (Διάλυμα Λύσης: PBS, 10mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 1,2mM PMSF και 1% Triton-X100). Έγινε σύντομη έκθεση σε υπερήχους στους 0⁰C, σε ισχύ 40% της μέγιστης, 4-5 φορές επί 10 δευτερόλεπτα τη φορά. Προστέθηκε Triton-X100 σε τελική συγκέντρωση 1% και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 26000rpm για 45 λεπτά, στους 4⁰C, στην κεφαλή SW27 (Beckman). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και επώαστηκε με 0,5ml σφαιριδίων

γλουταθειόνης-αγαρόζης (Amersham), εξισορροπημένα με το διάλυμα λύσης, για 1 ώρα στους 4⁰C, υπό συνεχή ανάδευση. Το μείγμα τοποθετήθηκε σε στήλη χρωματογραφίας, πλύθηκε με 20 όγκους διαλύματος λύσης και 10 όγκους διαλύματος πλύσης (Διάλυμα Πλύσης: PBS, 1mM PMSF και 10mM β-μερκαπτοαιθανόλη). Η συνδεδεμένη πρωτεΐνη εκλούστηκε 5 φορές μετά από επώαση 4 λεπτών με 0,6ml διαλύματος έκλουσης (Διάλυμα Έκλουσης: 10mM ανηγμένης-reduced γλουταθειόνης και 50mM Tris-HCl pH 8). Το υλικό που συλλέχθηκε, υποβλήθηκε σε ολονύκτια διαπίδυση σε κατάλληλο διάλυμα, ανάλογα με την εκάστοτε διαδικασία, στους 4⁰C. Οι πρωτεΐνες φυλάχθηκαν στους -80⁰C μέχρι τη χρήση τους.

2.4.2 Απομόνωση πυρήνων από ήπαρ ποντικού

Η διαδικασία για την απομόνωση των πυρήνων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Blobel and Potter, 1966.

Οι ιστοί απομονώθηκαν από τα νεκρά ζώα και υπολογίστηκε το βάρος τους. Όλες οι διαδικασίες παρασκευής έγιναν στους 4⁰C, για να μειωθεί όσο το δυνατόν η πρωτεόλυση. Κοπήκαν σε πολύ μικρά κομμάτια με ένα ξυράφι (πάνω σε παγωμένη πλάκα γυαλιού) και τοποθετήθηκαν σε δοχείο, το οποίο είχε 2 φορές τον όγκο τους 0,25M διάλυμα Steak (0,25M Steak: 0,25M σακχαρόζη, 25mM KCl, 50mM Tris-HCl pH7,5, 5mM MgCl₂, 0,5mM DTT, 1mM PMSF και 2μg/ml αναστολείς των πρωτεασών). Το μείγμα ομογενοποιήθηκε με τη χρήση μηχανικής πίεσης 20 φορές και περάστηκε από 4 στρώματα βρασμένης γάζας για την απομάκρυνση κομματιών και μεμβρανών. Επαναλήφθηκε η ομογενοποίηση και το αιώρημα φυγοκεντρήθηκε στα 2500rpm για 10 λεπτά στους 4⁰C, σε κεφαλή JA-20 (Beckmann). Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρήθηκε με 2 όγκους 0,25M διαλύματος Steak. Ακολούθησε μηχανική ομογενοποίηση 10 φορές και το αιώρημα τοποθετήθηκε σε δοχείο, το οποίο περιείχε 2,3M διάλυμα Steak (2,3M Steak: 2,3M σακχαρόζη, 25mM KCl, 50mM Tris-HCl pH7,5, 5mM MgCl₂, 0,5mM DTT, 1mM PMSF και 2μg/ml αναστολείς των πρωτεασών). Ο όγκος του Steak διαλύματος πρέπει να είναι διπλάσιος του όγκου του αιωρήματος. Στη συνέχεια, το μείγμα αναδεύτηκε για 15 λεπτά στους 4⁰C και φυγοκεντρήθηκε στα 2500rpm για 1 ώρα και 20 λεπτά στους 4⁰C, σε κεφαλή SW-27 (Beckmann). Ο πάτος των σωληναρίων για την φυγοκέντρωση είχε επιστρωθεί με 5ml 2,3M διαλύματος Steak. Απομακρύνθηκε η πάνω στοιβάδα, το υπερκείμενο και το ίζημα των καθαρών πλέον

πυρήνων επαναιωρήθηκε σε 5ml 0,25M διαλύματος Steak. Φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στα 2500rpm στους 4°C, οι πυρήνες παγώθηκαν αμέσως σε υγρό N₂ και φυλάχθηκαν στους -80°C μέχρι τη χρήση τους.

2.4.3 Παραγωγή πυρηνικών φακέλων από πυρήνες ποντικού

Οι πυρήνες επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα A (Διάλυμα A: 20mM HEPES-KOH pH 7,4, 5mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 0,025% TritonX-100, 1mM DTT, 1mM PMSF, και 2μg/ml αναστολείς πρωτεασών) και τους προστέθηκαν 220units/ml MNase. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 15 λεπτά και η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη EDTA σε τελική συγκέντρωση 2mM. Έγινε φυγοκέντρηση στα 10000rpm για 15 λεπτά στους 4°C, σε κεφαλή JA-14 (Beckmann). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε στον πάγο, ενώ το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε παγωμένο διάλυμα 2mM EDTA pH 7,5 και επαναφυγοκεντρήθηκε, όπως παραπάνω. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε ξανά, αναμίχθηκε με το προηγούμενο και υπερφυγοκεντρήθηκε στα 50000rpm για 35 λεπτά στους 4°C, σε κεφαλή SW55Ti (Beckmann). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε για πειράματα συγκατακρήμνισης.

Οι πυρηνικοί φάκελοι, που προέκυψαν ως ίζημα μετά την πλύση με το διάλυμα 2mM EDTA pH 7,5, επαναδιαλύθηκαν σε παγωμένο ddH₂O και φυγοκεντρήθηκαν στα 10000rpm για 15 λεπτά στους 4°C, σε κεφαλή JA-14 (Beckmann). Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, οι πυρηνικοί φάκελοι ψύχθηκαν σε υγρό άζωτο και φυλάχθηκαν στους -80°C μέχρι τη χρήση τους.

2.4.4 Παρασκευή εκχυλισμάτων από πυρηνικούς φακέλους

Το ίζημα των πυρηνικών φακέλων επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα εκχύλισης (Διάλυμα εκχύλισης: 300mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7,4, 2mM MgCl₂, 0,1 mM EGTA, 250 mM σακχαρόζη, 0,1 mM DTT, 1 mM PMSF και 2μg/ml αναστολείς πρωτεασών). Ακολούθησε σύντομη έκθεση σε υπερήχους για την καλύτερη επαναδιάλυσή τους (15% της μέγιστης ισχύς για 15 δευτερόλεπτα) και έγινε υπερφυγοκέντρηση στα 50000rpm για 35 λεπτά στους 4°C, σε κεφαλή SW55Ti (Beckman). Όταν ήταν απαραίτητο επίσης προστέθηκε Triton-X100 σε τελική συγκέντρωση 1%, πριν την υπερφυγοκέντρηση. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε άμεσα.

2.4.5 Απομόνωση ολικών ιστονών από ποντίκια

Για την παραγωγή ιστονών, χρησιμοποιήθηκαν πυρήνες από ποντίκια, οι οποίοι παρασκευάστηκαν, όπως παραπάνω. Οι πυρήνες επαναδιαλύθηκαν σε 10 όγκους 0,2M θειικού οξέος και επώαστηκαν ολονύχτια στους 0°C. Το αιώρημα φυγοκεντρήθηκε στα 10000rpm για 45 λεπτά, στους 4°C, σε κεφαλή JA-20 (Beckmann). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και του προστέθηκε 1M Tris-HCl pH7,4 σε αναλογία 1:100. Ακολούθησε διαπίδυση σε 5lt ddH₂O για 5 ώρες στους 4°C και σε διάλυμα χρωματογραφίας για όλη την νύχτα, σε θερμοκρασία δωματίου (Διάλυμα χρωματογραφίας: 7M ουρία, 10mM οξικό νάτριο pH5,7, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF).

Παράλληλα με την παραπάνω διαδικασία, εξισορροπήθηκαν σφαιρίδια ρητίνης CM52 για την απομόνωση καθαρών ιστονών από το ομόζυγο δείγμα. Τα σφαιρίδια επαναιωρήθηκαν σε 100ml διαλύματος 1M οξικού νατρίου pH5,7 και αφέθηκαν να καθίσουν με τη δύναμη της βαρύτητας. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και επαναιωρήθηκαν πάλι σε 100ml διαλύματος 1M οξικού νατρίου pH5,7. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε δύο φορές με 100ml διαλύματος 20mM οξικού νατρίου pH5,7. Στο τέλος, τα σφαιρίδια επώαστηκαν ολονύχτια σε 100ml διαλύματος 7M ουρία, 10mM οξικού νατρίου pH5,7 και 1mM EDTA σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα σφαιρίδια επώαστηκαν με το υλικό από τη διαπίδυση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και τοποθετήθηκαν σε στήλη χρωματογραφίας. Έγινε πλύση με 50ml διαλύματος χρωματογραφίας. Ακολούθησε διαδοχική έκλουση με 25ml διαλύματος 100mM NaCl στο διάλυμα χρωματογραφίας, 25ml διαλύματος 250mM NaCl στο διάλυμα χρωματογραφίας και 25ml διαλύματος 600 mM NaCl στο διάλυμα χρωματογραφίας, λαμβάνοντας κλάσματα του 1,5 ml. Μετά το πέρας της έκλουσης, έγινε ανάλυση των κλασμάτων με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ολονύχτια διαπίδυση των ιστονών σε ddH₂O στους 4°C. Οι ιστόνες φυλάχθηκαν στους -80°C.

2.5 Βιοχημικές Μέθοδοι

2.5.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών με χρήση πηκτής ακρυλαμιδίου

Οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν με τη χρήση πηκτής πολυακρυλαμιδίου, υπό αναγωγικές συνθήκες, σύμφωνα με την μέθοδο του Laemmli, 1970. Στα δείγματα προς ανάλυση προστέθηκε, πριν τη χρήση τους, 4 φορές συγκεντρωμένο διάλυμα Laemmli (Tris-HCl (pH 7), 9,2% SDS, 40% γλυκερόλη, 0.2% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης και 100 mM DTT). Ακολούθησε η θέρμανσή τους στους 95⁰C για 5 λεπτά.

Στις πηκτές προστέθηκαν και δείκτες μοριακού βάρους (BIORAD), οι οποίοι είχαν τις ακόλουθες πρωτεΐνες:

- Φωσφορυλάση B (97,4 kDa)
- Αλβουμίνη ορρού βοός (66,2 kDa)
- Ωαλβουμίνη (45 kDa)
- Καρβονική Ανυδράση (31 kDa)
- Αναστολέας της τρυψίνης (21,5 kDa)
- Λυσοζύμη (14,4 kDa).

Οι πηκτές ακρυλαμιδίου, που χρησιμοποιήθηκαν, είχαν συγκέντρωση 12,5%, 13,5% και 15% και η ηλεκτροφόρηση έγινε σε διάλυμα που είχε 192 mM γλυκίνη, 25mM Tris base και 0,1% SDS για 3 ώρες στα 45mA και σε σταθερή μέγιστη τάση.

2.5.2 Χρώση πηκτών ακρυλαμιδίου

Αμέσως μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, έγινε χρώση των πηκτών σε διάλυμα 50% μεθανόλης, 12% οξικού οξέος και 0,1% w/v Coomassie Blue G250. Απομακρύνθηκε η περίσσεια χρωστικής και ακολούθησε επώαση σε διάλυμα 10-40% μεθανόλης, 10% οξικού οξέος έως ότου οι ζώνες των πρωτεϊνών γίνουν ορατές.

2.5.3 Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο από την εταιρία BIORAD.

Η μέθοδος στηρίζεται στο σχηματισμό ενός συμπλόκου, ανάμεσα στην πρωτεΐνη και στη χρωστική Coomassie Blue, το οποίο απορροφά φως. Η μέτρηση γίνεται στα 595nm, τόσο για την πρωτεΐνη προς διερεύνηση όσο και για την πρότυπη πρωτεΐνη BSA (Sigma), της οποίας η συγκέντρωση είναι γνωστή. Από την καμπύλη που προκύπτει, από τις διάφορες συγκεντρώσεις BSA που μετρούνται, εξάγεται το συμπέρασμα για την πρωτεΐνη που ενδιαφέρει. Η ευαισθησία της μεθόδου κυμαίνεται από 1-15mg ανά ml.

2.5.4 Δοκιμασίες συγκατακρήμνισης πρωτεϊνών με σφαιρίδια αγαρόζης-γλουταθειόνης (pull-down assays)

Αρχικά, τα σφαιρίδια αγαρόζης-γλουταθειόνης εξισορροπήθηκαν με 3 πλύσεις σε διάλυμα επώασης (Διάλυμα επώασης: 150mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7,4, 2mM MgCl₂, 0,1mM EGTA, 10% σακχαρόζη, 1% Triton X-100, 0,1mM DTT, 1mM PMSF) με ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις σε φυγόκεντρο Eppendorf για 20 δευτερόλεπτα. Οι ανασυνδυασμένες GST-πρωτεΐνες (μετά από διαπίδυση σε διάλυμα επώασης) φυγοκεντρήθηκαν για 30 λεπτά στα 13,000rpm στους 4⁰C, σε επιτραπέζια φυγόκεντρο Eppendorf για να απομακρυνθούν τυχόν συσσωματώματα. Στη συνέχεια, ~30μg πρωτεΐνης προστέθηκαν σε ~30μl καθαρού όγκου σφαιριδίων, παρουσία 1% FSG και ο τελικός όγκος του εναιωρήματος προσαρμόστηκε στα 200 μl με διάλυμα επώασης. Ακολούθησε επώαση 45 λεπτών, υπό συνεχή ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου, έτσι ώστε να συνδεθούν οι GST-πρωτεΐνες με τα σφαιρίδια. Τα σφαιρίδια με τις κινητοποιημένες πρωτεΐνες πλύθηκαν 3 φορές, όπως παραπάνω και μια ακόμα φορά με διάλυμα επώασης, στο οποίο είχε προσαρμοστεί η αλατότητά του, σε αυτή του δείγματος που θα επακολουθούσε (π.χ. 150mM, 300mM, 600mM). Το δείγμα και η GST-πρωτεΐνη επώαστηκαν μαζί για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, τα σφαιρίδια πλύθηκαν 5 φορές με το διάλυμα προσαρμοσμένης αλατότητας, μία φορά με το διάλυμα επώασης απουσία Triton X-100 και τους προστέθηκε laemmli, ώστε να είναι έτοιμα για ανάλυση.

2.5.5 Ανοσοαποτύπωση κατά western

Η ανοσοαποτύπωση κατά western έγινε σύμφωνα με τα καθιερωμένα πρωτόκολλα. Τα δείγματα αναλύθηκαν πρώτα με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

Ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτική πολυακρυλαμιδίου σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης (Protran, 0.45mm), υπό σταθερή τάση 35 V για 3 ώρες. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 192mM γλυκίνη, 25mM Tris-base, 0,1% SDS και 20% μεθανόλη. Η νιτροκυτταρίνη πλύθηκε 1 φορά για 15 λεπτά με το διάλυμα πλύσης (Διάλυμα πλύσης: 20mM Tris-HCl pH 7.4, 155mM NaCl και 0,1% Tween-20). Έγινε ολονύχτια επώαση της μεμβράνης, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου, με το διάλυμα πλύσης, στο οποίο είχε προστεθεί 1% ζελατίνης ψαριού (Fish Skin Gelatin, FSG) ή 5% w/v γάλα, για να δεσμευτούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης πρωτεϊνών. Την επόμενη μέρα, έγινε επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα, αραιωμένο στο διάλυμα πλύσης, παρουσία FSG για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, η νιτροκυτταρίνη πλύθηκε 4 φορές από 10 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση, σε διάλυμα πλύσης παρουσία FSG. Προστέθηκε το δευτερογενές αντισώματος, αραιωμένο στο διάλυμα πλύσης παρουσία FSG ή γάλακτος, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη πλύθηκε 3 φορές από 5 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση, σε διάλυμα πλύσης παρουσία FSG. Μετά, πλύθηκε 3 φορές από 5 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση, σε διάλυμα πλύσης. Τέλος, έγινε ανίχνευση των πρωτεϊνών με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, PIERCE), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.6 Μέθοδοι γενετικής μηχανικής

2.6.1 Παρασκευή βακτηριακών κυττάρων επιδεκτικών στο μετασηματισμό

Μια μικρή ποσότητα βακτηρίων ανασύρθηκε από στοκ γλυκερόλης και επιστρώθηκαν σε τρυβλίο στερεού Luria Broth (LB) άγαρ. Τα βακτήρια επώαστηκαν ολονύχτια στους 37⁰C και την επόμενη μέρα επιλέχθηκε μονή αποικία, η οποία εμβολιάστηκε σε 3ml LB. Η καλλιέργεια αφέθηκε να αναπτυχθεί ολονύχτια στους 37⁰C, υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, 2,5ml από την παραπάνω καλλιέργεια εμβολιάστηκε σε 250ml LB και επώαστηκε υπό ανάδευση στους 37⁰C ως ότου η οπτική της πυκνότητα, στα 600 nm, να φτάσει τις 0,4 μονάδες. Η φλάσκα με τα βακτήρια τοποθετήθηκε στον πάγο για 5 λεπτά και μετά φυγοκεντρήθηκε στα 3000rpm για 10 λεπτά στους 4⁰C, σε κεφαλή J-25 (Beckman). Το απομακρύνθηκε και

το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 40 ml παγωμένου διαλύματος TFI (Διάλυμα TFI: 10mM MES, 45mM MnCl₂-H₂O, 100mM RbCl και 10mM CaCl₂-H₂O, pH 5,8). Το βακτηριακό αιώρημα επώαστηκε στον πάγο για 5 λεπτά και φυγοκεντρήθηκε στα 3000rpm για 10 λεπτά στους 4⁰C, σε κεφαλή J-25 (Beckman). Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 3,5ml παγωμένου διαλύματος TFII (Διάλυμα TFII: 10mM Pipes, 50mM CaCl₂-H₂O, 10mM RbCl και 15% γλυκερόλη, pH 6,5), επώαστηκε στον πάγο για 15 λεπτά και μοιράστηκε σε παγωμένα μικροσωληνάρια. Τα επιδεκτικά πλέον βακτήρια πάγωσαν σε υγρό N₂ και φυλάχθηκαν στους -80⁰C έως την χρήση τους.

2.6.2 Μετασηματισμός βακτηριακών επιδεκτικών κυττάρων

Η παρασκευή βακτηριακών κυττάρων επιδεκτικών στον μετασηματισμό έγινε σύμφωνα με την μέθοδο του Sambrook, 1989. Το προϊόν αντίδρασης συγκόλλησης ή 3ng πλασμιδιακού φορέα προστέθηκε σε 100μl βακτηριακού αιωρήματος και επώαστηκε στον πάγο για 20 λεπτά. Μετά, ακολούθησε σύντομη επώαση στους 42⁰C για 1 λεπτό. Προστέθηκε 1ml Luria Broth (LB) χωρίς αντιβιοτικά και τα βακτήρια αφέθηκαν να ανακάμψουν στους 37⁰C, υπό ανάδευση, για 1 ώρα. Η βακτηριακή καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στις 5.000rpm για 5 λεπτά και το ίζημα, αφού επαναδιαλύθηκε σε 50 μl LB, επιστρώθηκε σε τρυβλίο στερεού LB, τα οποία περιείχαν το κατάλληλο αντιβιοτικό. Ακολούθησε ολονύχτια επώαση στους 37⁰C και επιλογή μονών αποικιών για πιστοποίηση της παρουσίας του πλασμιδίου.

2.6.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας

Μονή αποικία επιλέχθηκε από τρυβλίο στερεού άγαρ και αφέθηκε να αναπτυχθεί σε 3 ml LB με την προσθήκη του κατάλληλου αντιβιοτικού, σε τροχιακό επωαστήρα στους 37⁰C (ολονύχτια ανάδευση). 1,5ml καλλιέργειας τοποθετήθηκε σε φυγοκεντρικό σωληνάριο και φυγοκεντρήθηκε στις 12000rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100 μl διαλύματος P1 (Διάλυμα P1: 50mM Tris-HCl pH8, 10mM EDTA και 100μg/ml RNase απενεργοποιημένη στους 100⁰C για 10min). Έγινε προσθήκη 100 μl διαλύματος P2 και ήπια ανάδευση 4-6 φορές (Διάλυμα P2: 200mM NaOH και 1% SDS). Ακολούθησε προσθήκη 100 μl διαλύματος P3 και ήπια ανάδευση 4-6 φορές (Διάλυμα

P3: 2.5M CH₃COONa pH 5.5). Στη συνέχεια, έγινε φυγοκέντρηση στα 12000rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, συλλέχθηκε το υπερκείμενο και μεταφορά του σε νέο φυγοκεντρικό σωληνάριο. Προστέθηκε 1ml 100% παγωμένης αιθανόλης και το υλικό φυγοκεντρήθηκε στα 13000rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκε 1ml 70% παγωμένης αιθανόλης και το υλικό φυγοκεντρήθηκε ξανά στα 13000rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Το τελικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 20μl αποστειρωμένο ddH₂O και φυλάχθηκε στους -20⁰C.

2.6.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας

Πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε, σε μεγάλη κλίμακα, με τη βοήθεια πακέτων Nucleobond PC 100 (Macherey-nagel). Τα πακέτα χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με το εγχειρίδιο του κατασκευαστή.

2.6.5 Απομόνωση DNA από ουρά ποντικού

Περίπου 1cm από ουρά ποντικού τοποθετήθηκε σε 500μl διαλύματος πέψης και επώαστηκε ολονύχτια στους 55⁰C (Διάλυμα πέψης: 100mM Tris-HCl pH 8,5, 5mM EDTA, 0,2% (w/v) SDS, 200mM NaCl και 100ng/μl πρωτεΐνωση K). Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 13500rpm για 10 λεπτά, σε επιτραπέζια φυγόκεντρο erpendorf. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε, επώαστηκε με ίσο όγκο φαινόλης για 10 λεπτά, υπό ανάδευση και φυγοκεντρήθηκε όπως παραπάνω. Η φαινόλη απομακρύνθηκε και το DNA κατακρημνίστηκε με ίσο όγκο ισοπροπανόλης, ύστερα από 15 λεπτά φυγοκέντρηση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο erpendorf. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, το ίζημα του DNA ενυδατώθηκε με 1ml 70% αιθανόλης και φυγοκεντρήθηκε όπως παραπάνω. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα αφέθηκε να ξεραθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Το γενομικό DNA επαναιωρήθηκε σε 30μl αποστειρωμένο ddH₂O και φωτομετρήθηκε.

2.6.6 Γονότυπος ποντικών

Τα πριμοδοτικά ολιγονουκλεοτίδια (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό των φυσιολογικών, ετερόζυγων και ομόζυγων ζώων για το γονίδιο του LBR έχουν την εξής αλληλουχία (Shultz et al, 2003):

5' primer : 5'-GTACCTGTATCACTTCC-3'

3' primer : 5'-TGGCTGGCGACAGCTCCGCC -3'

και ενισχύουν ένα κομμάτι μήκους 121bp. Οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTPs, 0,4μM 5' primer, 0,4μM 3' primer, 0,1U/μl Taq polymerase, εκμαγείο DNA (DNA template) 400-500 ng.

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν κάτω από τις ακόλουθες συνθήκες:

Μετουσίωση για 2 λεπτά στους 94°C ακολουθούμενη από 40 κύκλους με το εξής πρόγραμμα:

Μετουσίωση για 30 δευτερόλεπτα στους 94°C

Αναδιάταξη για 30 δευτερόλεπτα στους 62°C

Επιμήκυνση για 30 δευτερόλεπτα στους 72°C

Μετά το πέρας των 40 κύκλων, ακολούθησε τελική επιμήκυνση για 2 λεπτά στους 72°C.

Το προϊόν της PCR αντίδρασης υποβλήθηκε σε ολονύχτια πέψη με το περιοριστικό ένζυμο BglII και αναλύθηκε σε 3% πηκτή αγαρόζης. Τα τμήματα DNA που προέκυψαν ήταν: 100bp που αντιστοιχεί στο φυσιολογικό γονίδιο του LBR, 121bp που αντιστοιχεί στο γονίδιο του LBR με την μετάλλαξη ic^j, 100bp-121bp που αντιστοιχεί σε ζώο που φέρει και τα δύο γονίδια.

2.6.7 Απομόνωση RNA από το λεπτό έντερο ποντικού

Αρχικά, το λεπτό έντερο απομονώθηκε από ζώα 3 ημερών και τοποθετήθηκε σε καθαρό αποστειρωμένο δοχείο με φορά από το στομάχι προς το παχύ. Αφού καθαρίστηκε από τους παρακείμενους ιστούς, αφαιρέθηκε 1cm από την αρχή του, ώστε να απομακρυνθεί ο δωδεκαδάκτυλος. Ακολούθησε η διαδικασία απομόνωσης του ολικού RNA, με τη βοήθεια του RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το RNA, που παράχθηκε, ελέγχθηκε για την ακεραιότητά του και ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση Agilent bioanalyzer 2100.

2.6.8 Ποσοτική PCR σε δείγματα από λεπτό έντερο ποντικού

Η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε, όπως παραπάνω. Η ποσοτική PCR (Real Time PCR) πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του SuperScript® III Platinum® Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR® Green και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα πριμοδοτικά ολιγονουκλεοτίδια (primers) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ακόλουθα:

- Για τον BAF1 το προϊόν ήταν μήκους 102bp και οι θερμοκρασίες αναδιάταξης 58⁰C και 60⁰C.
 - ✓ 5' primer : 5'-GGGCTTTGACAAGGCTTATG-3'
 - ✓ 3' primer : 5'-GCATTGGCACCACATGTATC-3'
- Για το SMAD3 το προϊόν ήταν μήκους 232bp και η θερμοκρασία αναδιάταξης 58⁰C.
 - ✓ 5' primer : 5'-GGGCCAACAAGTCAACAAGT-3'
 - ✓ 3' primer : 5'-CTGGCTGGCTAAGGAGTGAC-3'
- Για το FABP2 το προϊόν ήταν μήκους 213bp και η θερμοκρασία αναδιάταξης 58⁰C και 60⁰C.
 - ✓ 5' primer : 5'-TTGCTGTCCGAGAGGTTTCT-3'
 - ✓ 3' primer : 5'-GCTTTGACAAGGCTGGAGAC-3'
- Για την Vimentin το προϊόν ήταν μήκους 154bp και η θερμοκρασία αναδιάταξης 58⁰C.
 - ✓ 5' primer : 5'-CCAGAGACCCCAGCGCTCCT-3'
 - ✓ 3' primer : 5'-GCCGGAGCCACCGAACATCC-3'
- Για το Reg3b/Pap το προϊόν ήταν μήκους 141bp και η θερμοκρασία αναδιάταξης 58⁰C.
 - ✓ 5' primer : 5'-CTGCCTTAGACCGTGCTTTC-3'
 - ✓ 3' primer : 5'-AATTCGGGATGTTTGCTGTC-3'
- Για το Areg το προϊόν ήταν μήκους 178bp και η θερμοκρασία αναδιάταξης 58⁰C.
 - ✓ 5' primer : 5'-CATTATGCAGCTGCTTTGGA-3'
 - ✓ 3' primer : 5'-TTTCGCTTATGGTGGAAACC-3'

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν δύο φορές ανά πείραμα, ώστε να αποκλειστούν λάθη κατά το pipetting. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση paired t test (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>).

2.6.9 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη

Τα θραύσματα DNA αναλύθηκαν σε πηκτές αγαρόζης από 0,8 έως 3%, ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων προς ανάλυση. Η αγαρόζη διαλύθηκε με τη χρήση βρασμού σε διάλυμα 1xTAE και η ηλεκτροφόρηση έγινε επίσης σε 1xTAE σε τάση 5Volt/cm (50xTAE: 40mM Tris-acetate και 1mM EDTA pH 8). Στις πηκτές προστέθηκε ακόμα 0,5mg/ml βρωμιούχο αιθίδιο, έτσι ώστε τα τμήματα DNA να φαίνονται σε υπεριώδες φως.

2.6.10 Απομόνωση τμημάτων DNA από πηκτική αγαρόζη

Η απομόνωση των επιθυμητών τμημάτων DNA έγινε με τη χρήση του πακέτου της QIAGEN gel extraction kit και σύμφωνα με το εγχειρίδιο του κατασκευαστή.

2.6.11 Ανάλυση μικροσυστοιχιών DNA από ολικό RNA από το λεπτό έντερο ποντικού

Η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε, όπως παραπάνω. Ακολούθησε μετατροπή του RNA σε cDNA και παραγωγή σημασμένου RNA με τη βοήθεια του Amino Allyl MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit (Ambion). Η σήμανση έγινε με Cy3 Dye (WT) και Cy5 Dye (null). Χρησιμοποιήθηκαν Mouse OneArray™ Microarray Chips, τα οποία προετοιμάστηκαν κατάλληλα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολούθησε η διαδικασία του υβριδισμού σύμφωνα πάντα με τις οδηγίες του κατασκευαστή των μικροσυστοιχιών. Τα Chip αναλύθηκαν σε ScanArray™ Express (Perkin Elmer,® Inc.). Για την κανονικοποίηση (normalization) των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MIDAS (module lowess), ενώ για τη στατιστική ανάλυση το πρόγραμμα MEV ($p \leq 0,05$) (www.tm4.org).

2.7 Μορφολογικές Μέθοδοι

2.7.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός έγινε σύμφωνα με τα δημοσιευμένα πρωτόκολλα των Maison et al., 1993 και Meier and Georgatos, 1994.

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε καλυπτρίδες, αν μεγαλώνουν σε ταπήτιο, ή κωλύθηκαν σε αυτές, ύστερα από επεξεργασία αυτών με alcian blue. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν, είτε με επώαση σε 1-4% φορμαλδεΰδη αραιωμένη σε PBS για 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, είτε με επώαση σε 100% παγωμένη μεθανόλη για 1-10 λεπτά στους -20°C. Η μονιμοποίηση που επιλέχθηκε κάθε φορά εξαρτιόταν από το πρωτεύον αντίσωμα. Στην συνέχεια, τα κύτταρα πλύθηκαν 3 φορές με PBS και όταν το μέσο μονιμοποίησης ήταν η φορμαλδεΰδη, αυτή εξουδετερώθηκε με 10 λεπτά επώαση σε διάλυμα 5mM γλυκίνης, διαλυτοποιημένης σε PBS σε θερμοκρασία δωματίου (Η γλυκίνη απομακρύνθηκε με 1 πλύσιμο των κυττάρων με PBS). Ακολούθησε επώαση των κυττάρων σε διάλυμα Α για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (Διάλυμα Α: 150mM NaCl, 20mM HEPES pH 7,4, 2mM MgCl₂, 0,1mM EGTA, 0,2% Triton X-100 και 0,5% Fish Skin Gelatin). Το πρωτεύον αντίσωμα, αραιωμένο στην κατάλληλη συγκέντρωση σε διάλυμα Α, προστέθηκε στις καλυπτρίδες και έγινε επώαση για 1 ώρα σε θάλαμο υψηλής υγρασίας και θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα πλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα Α και επώαστηκαν με το δεύτερο αντίσωμα, όπως παραπάνω. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνθηκε με 3 πλύσεις με διάλυμα Α και 1 πλύση PBS. Ξαναέγινε μονιμοποίηση με 4% φορμαλδεΰδη αραιωμένη σε PBS για 10 λεπτά (post-fixation) σε θερμοκρασία δωματίου και η περίσσεια απομακρύνθηκε με 3 πλύσεις με PBS.

Η χρώση του DNA έγινε είτε με DAPI (4'-6-Diamidino-2-Phenylindole) συγκέντρωσης 10 µg/ml είτε με ιωδιούχο προπίδιο (propidium iodide-PI) συγκέντρωσης 5µg/ml για 4 ή 10 λεπτά αντίστοιχα. Όταν η επιλογή της χρώσης ήταν το PI, πραγματοποιήθηκε επίσης επώαση με 1mg/ml RNase, αραιωμένης σε PBS, για 30 λεπτά πριν την μετα-μονιμοποίηση των δειγμάτων.

Οι καλυπτρίδες πλύθηκαν 5 φορές με PBS και αφού στεγνώθηκαν, προστέθηκε Vectashield, για να αποτραπεί ο αποχρωματισμός κατά την παρατήρηση των

δειγμάτων στο μικροσκόπιο φθορισμού. Τέλος, τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες και στεγανοποιήθηκαν με βερνίκι.

Τα δείγματα εξετάστηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica SP1.

2.7.2 Συνεστιακή μικροσκοπία

Χρησιμοποιήθηκε το μικροσκόπιο TCS NT από την εταιρία Leica Optics, Germany. Η πηγή laser ήταν ακτίνα Ar/Kr (αργού/κρυπτού), η οποία επιτρέπει την λήψη οπτικών τομών πάχους της τάξης του δεκάτου των μικρομέτρων. Οι οπτικές τομές που λήφθηκαν ήταν πάχους 0,3-0,4μm.

2.7.3 Παραγωγή τομών παραφίνης

Διάφοροι ιστοί, αμέσως μόλις αφαιρέθηκαν από το ποντίκι, τοποθετήθηκαν για ολονύχτια επώαση σε φορμόλη. Ακολούθησε η τοποθέτηση των μονιμοποιημένων πλέον ιστών σε ιστοκινέτα, στην οποία θα γίνει η σταδιακή αφυδάτωσή τους, όπως φαίνεται παρακάτω:

- 1 δοχείο με 76% αιθανόλη
- 2 δοχεία με 80% αιθανόλη
- 2 δοχεία με 96% αιθανόλη
- 2 δοχεία με 100% αιθανόλη
- 2 δοχεία με ξυλόλη

Στη συνέχεια, έλαβε χώρα η διαδικασία του σκηνώματος, όπου κάθε ιστός περιβάλλεται από υγρή παραφίνη και σχηματίζει, όταν κρυώσει, κύβους (blocks). Από τους κύβους αυτούς, κόπηκαν, σε μικροτόμο, τομές στα 3-4μm, τοποθετήθηκαν σε πλακάκια super frost και φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, ως την χρήση τους.

2.7.4 Παραγωγή τομών κρυοστάτη

Διάφοροι ιστοί, αμέσως μόλις αφαιρέθηκαν από το ποντίκι, τοποθετήθηκαν σε O.C.T. και παγώθηκαν άμεσα. Ακολούθησε η κοπή των ιστών σε τομές, στα 3-4μm

και τοποθετήθηκαν σε πλακάκια super frost. Οι τομές, που παρήχθησαν κάθε φορά, χρησιμοποιήθηκαν άμεσα, ενώ το υπόλοιπο των ιστών φυλάχθηκε στους -80°C .

2.7.5 Χρώση τομών παραφίνης

Οι τομές προς χρώση επώαστηκαν ολονύχτια στους 60°C . Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε δοχείο που περιείχε προθερμασμένη ξυλόλη (στους 60°C) για 20 λεπτά στους 60°C . Ακολούθησαν πλύσεις του 1 λεπτού, υπό συνεχή ανάδευση, για την ενυδάτωση των τομών, σε διαλύματα που φαίνονται παρακάτω:

- Ξυλόλη
- 100% αιθανόλη
- 100% αιθανόλη
- 96% αιθανόλη
- 96% αιθανόλη
- ddH₂O

Η αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων έγινε με επώαση σε διάλυμα αποκάλυψης (DAKO), σε φούρνο μικροκυμάτων για 12 λεπτά στα 700W. Τα δείγματα επώαστηκαν με το πρωτογενές αντίσωμα και εντοπίστηκαν με τη χρήση του πακέτου UltraVision LP kit (Lab Vision), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο.

2.7.6 Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε τομές κρυοστάτη

Οι τομές αφέθηκαν να στεγνώσουν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μονιμοποιήθηκαν σε 100% μεθανόλη για 10 λεπτά στους -20°C . Στη συνέχεια, πλύθηκαν 3 φορές με PBS και επώαστηκαν για 30 λεπτά σε διάλυμα A σε θερμοκρασία δωματίου (Διάλυμα A: 150mM NaCl, 20mM HEPES pH 7,4, 2mM MgCl₂, 0,1mM EGTA, 0,2% Triton X-100 και 0,5% Fish Skin Gelatin). Από το σημείο αυτό, ακολουθήθηκαν τα βήματα του κλασσικού ανοσοφθορισμού.

2.8 Φασματοσκοπία μάζας (MS)

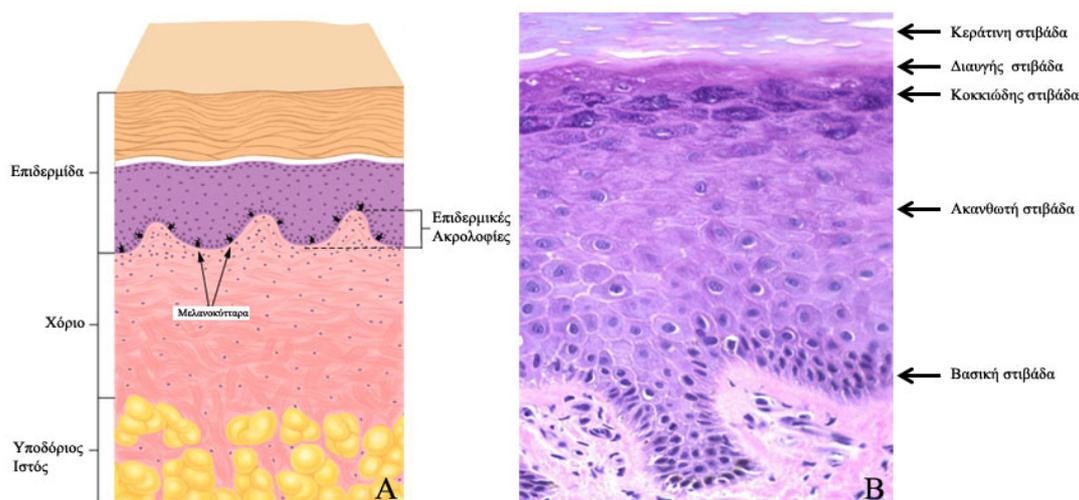
Η φασματοσκοπία μάζας MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of Flight) πραγματοποιήθηκε στο Functional Genomics Unit of Moredun Research Institute, Edinburgh, UK. Η πέψη των πρωτεϊνών προς εξέταση έγινε με μία πρωτεάση, η οποία κόβει μετά από κάθε αργινίνη.

Αποτελέσματα

3.1 Ανάλυση ιστών και κυττάρων από ποντίκια με τη μετάλλαξη ic^J

3.1.1 Χρώση τομών από το δέρμα

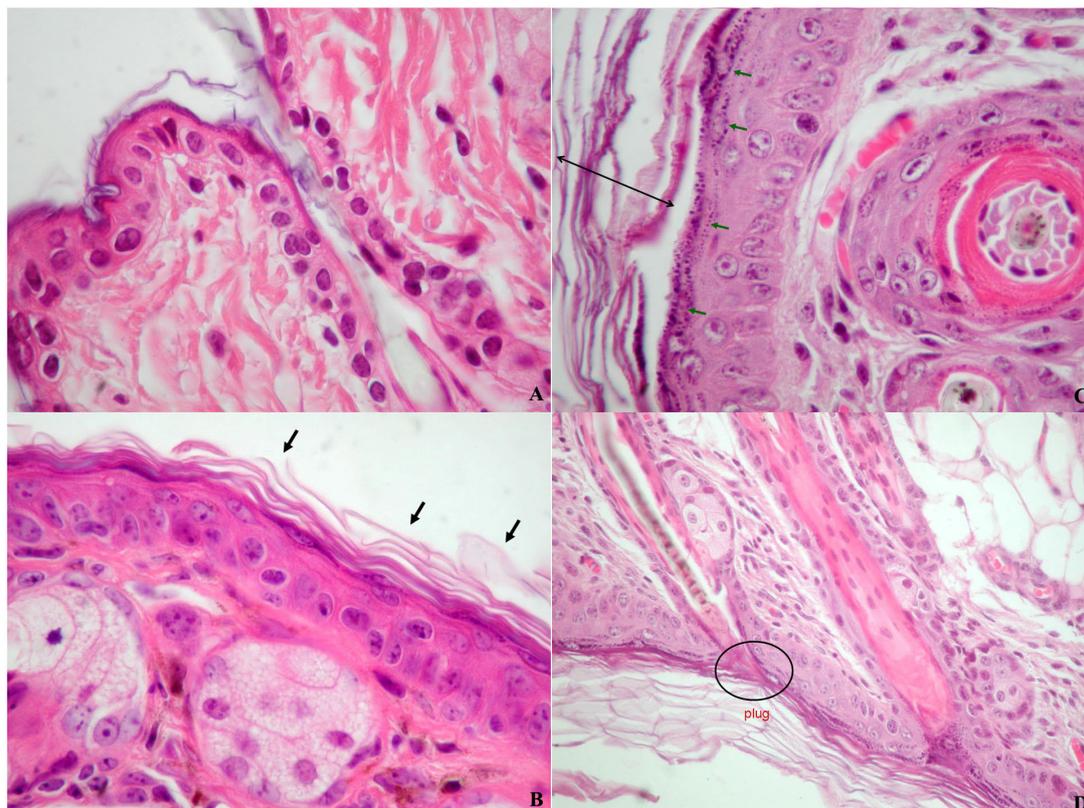
Το δέρμα αποτελείται από την επιδερμίδα και το χόριο. Η επιδερμίδα είναι ένας επιθηλιακός σχηματισμός εξωδερμικής προέλευσης. Αποτελείται από πέντε στιβάδες κυττάρων, τη βασική, την ακανθωτή, την κοκκιώδη, την διαυγή και την κερατίνη στιβάδα. Στο σημείο όπου η βασική στιβάδα συναντά το χόριο σχηματίζει τις επιδερμικές ακρολοφίες, στις οποίες εντοπίζονται και τα μελανοκύτταρα. Το χόριο είναι συνδετικός ιστός μεσοδερμικής προέλευσης και περιέχει πλήθος από αγγεία, νεύρα κ.α. (Εικ.25).



Εικόνα 25: A) Σχηματική αναπαράσταση των στιβάδων του δέρματος (τροποποίηση από www.uptodate.com) B) Οι στιβάδες της επιδερμίδας σε τομή παραφίνης με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (40x) (τροποποίηση από missinglink.ucsf.edu).

Για τη μορφολογική ανάλυση του δέρματος, έγινε αρχικά χρώση των τομών με αιματοξυλίνη-ηωσίνη. Οι τομές που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από φυσιολογικά, ετερόζυγα και ομόζυγα ζώα, για σύγκριση. Όπως φαίνεται στην Εικ.26, η δομή του δέρματος σε όλα τα δείγματα είναι η αναμενόμενη, με κάποιες όμως διαφοροποιήσεις. Το ετερόζυγο ζώο εμφανίζει μια ήπια υπερπλασία της επιδερμίδας και υπερπλασία της κερατίνης στιβάδας. Η επιδερμίδα του ομόζυγου έχει έντονη

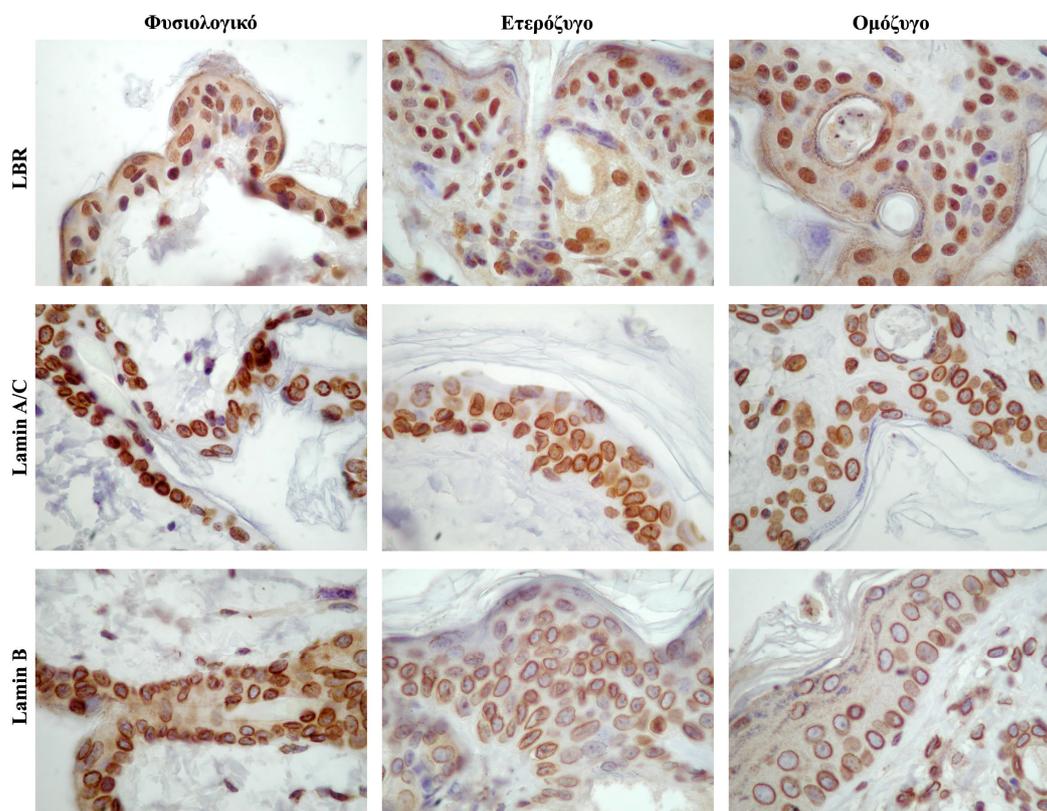
αύξηση κερατίνης και σημαντική υπερπλασία της κοκκιώδους στοιβάδας. Η περίσσεια κερατίνης δημιουργεί ένα είδος «πώματος» στους θύλακες των τριχών, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η έξοδος της τρίχας. Αυτό ίσως εξηγεί την αλωπεκία των ομόζυγων ζώων, καθώς και κάποιες εστίες δευτερογενούς φλεγμονής που εντοπίζονται στο δέρμα.



Εικόνα 26: Τομή δέρματος σε παραφίνη. Χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (100x). A) Φυσιολογικό, B) Ετερόζυγο, C) Ομόζυγο. Τα μαύρα βέλη δείχνουν την περίσσεια κερατίνης, ενώ τα πράσινα την κοκκιώδη στιβάδα. D) Τομή δέρματος από ομόζυγο ζώο, σε παραφίνη. Ο κύκλος δείχνει το πώμα κερατίνης. Χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (40x). Φαίνεται ο θύλακας της τρίχας και το πώμα από κερατίνη (plug).

Ακολούθησαν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε τομές παραφίνης με αντισώματα για τον LBR, τις λαμίνες A/C και τη λαμίνη B, όπως δείχνει η Εικ.27. Στα φυσιολογικά ζώα, οι πρωτεΐνες αυτές εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα της επιδερμίδας, πράγμα που συμβαίνει επίσης στο ετερόζυγο και στο ομόζυγο ζώο, χωρίς καμία διαφορά. Χρώση

τομών κρυοστάτη με το αντίσωμα για τις λαμίνες A/C επιβεβαίωσαν τα παραπάνω ευρήματα.

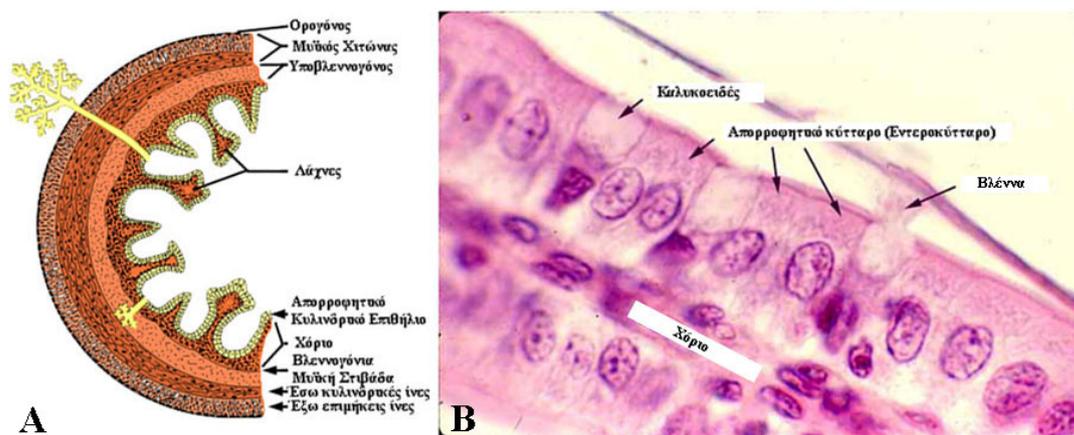


Εικόνα 27: Τομές από δέρμα σε παραφίνη και χρώση με αντισώματα για τον LBR, τις λαμίνες A/C και τη λαμίνη B (100x). Στην επιδερμίδα και των τριών ζώων η έκφραση είναι η ίδια.

3.1.2 Χρώση τομών από το λεπτό έντερο

Το λεπτό έντερο είναι το σημείο όπου γίνεται η απορρόφηση των τροφικών υλών και του νερού. Αποτελείται (από έξω προς τα μέσα) από τον ορογόνο υμένα, το μυϊκό χιτώνα, τον υποβλεννογόνο και τις λάχνες (Εικ.28). Ο μυϊκός χιτώνας απαρτίζεται από τις έξω επιμήκεις και τις έσω κυλινδρικές ίνες. Οι λάχνες αποτελούνται από το απορροφητικό κυλινδρικό επιθήλιο (εντεροκύτταρα) και το χόριο. Ανάμεσα στα εντεροκύτταρα υπάρχουν τα καλυκοειδή κύτταρα, που εκκρίνουν βλέννα και τα εντεροενδοκρινικά κύτταρα και τα κύτταρα Paneth. Το χόριο αποτελείται από συνδετικό ιστό πλούσιο σε αιμοφόρα αγγεία, λεμφοαγγεία, μυϊκά κύτταρα και νευρικές ίνες. Ο υποβλεννογόνος και το χόριο περιέχουν αθροίσματα λεμφοζιδίων (πλάκες

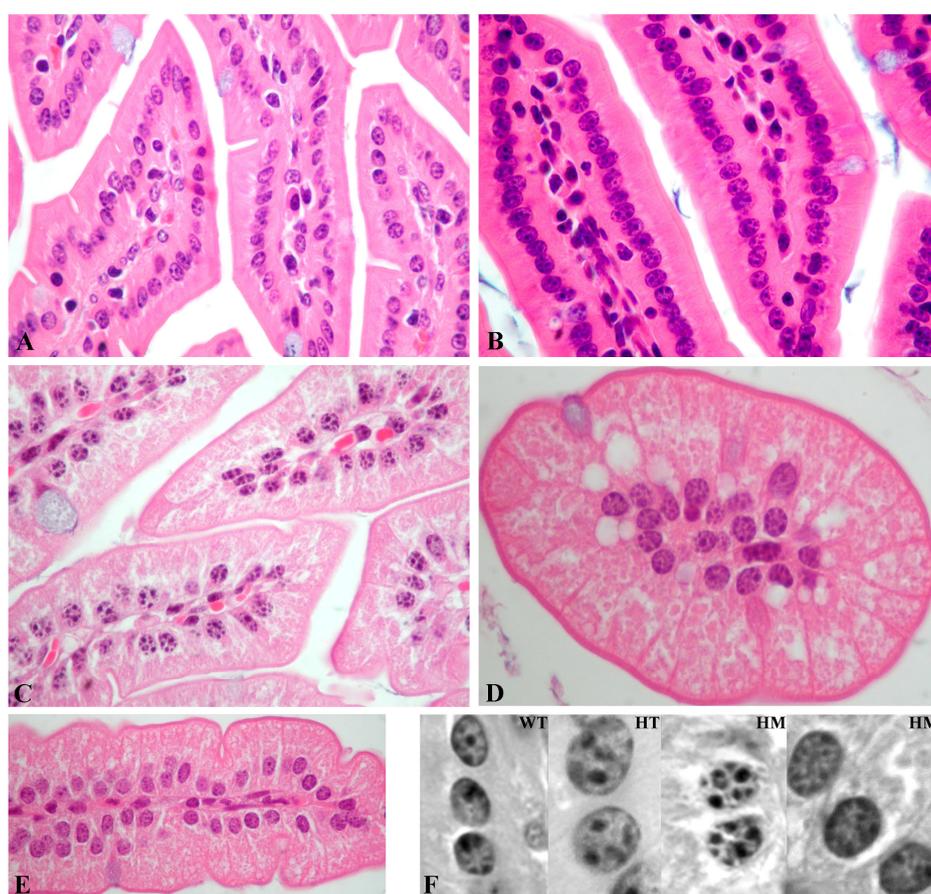
Peyer), τα οποία αποτελούν σημαντικό τμήμα του λεμφικού ιστού του εντέρου. Ανάμεσα στις λάχνες εντοπίζονται απλοί σωληνοειδείς αδένες (αδένες του Lieberkühn ή κρύπτες), οι οποίοι εκκρίνουν μια σειρά ενζύμων, όπως είναι οι εξωπεπτιδάσες και οι ενδοπεπτιδάσες. Στο σημείο αυτό, υπάρχουν επίσης τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα του εντέρου, τα οποία διαφοροποιούνται καθώς αφήνουν την κρύπτη και μεταναστεύουν κατά μήκος της λάχνης.



Εικόνα 28: Α) Σχηματική αναπαράσταση της δομής του λεπτού εντέρου (τροποποίηση από www.uoguelph.ca). Β) Τομή από λεπτό έντερο σε παραφίνη (τροποποίηση από www.siumed.edu). Χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (100x).

Φυσιολογικά, το λεπτό έντερο του ομόζυγου δεν διέφερε από το φυσιολογικό. Με την εξέταση του πρώτου ομόζυγου δείγματος, επιβεβαιώθηκε όμως η ύπαρξη συσσωματωμάτων χρωματίνης στους πυρήνες των εντεροκυττάρων. Περαιτέρω, όταν εξετάστηκαν δείγματα και από άλλα ομόζυγα ζώα, προέκυψε κάτι πολύ ενδιαφέρον. Οι ανωμαλίες του εντερικού επιθηλίου δεν εμφανίζονταν σε όλη την έκταση του εντέρου, αλλά είχαν «μωσαϊκό» χαρακτήρα. Ειδικότερα, στο ίδιο ομόζυγο ζώο κάποιες λάχνες είχαν τον χαρακτηριστικό φαινότυπο στη χρωματίνη, ενώ άλλες ήταν εντελώς φυσιολογικές. Ακόμα πιο εντυπωσιακό ήταν το γεγονός ότι κάθε λάχνη είχε είτε φυσιολογικό επιθήλιο είτε επιθήλιο με συσσωρεύσεις χρωματίνης δίπλα στον πυρηνικό φάκελο. Ποτέ δεν παρατηρήθηκε μίξη των δύο (Εικ.29). Ο μωσαϊκός αυτός φαινότυπος εκτεινόταν σε όλο το μήκος του λεπτού εντέρου, χωρίς να διακόπτεται. Η αλλοίωση της αρχιτεκτονικής των εντεροκυττάρων πιθανώς να εξηγεί τον καχεκτικό φαινότυπο των ζώων, επειδή, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το λεπτό

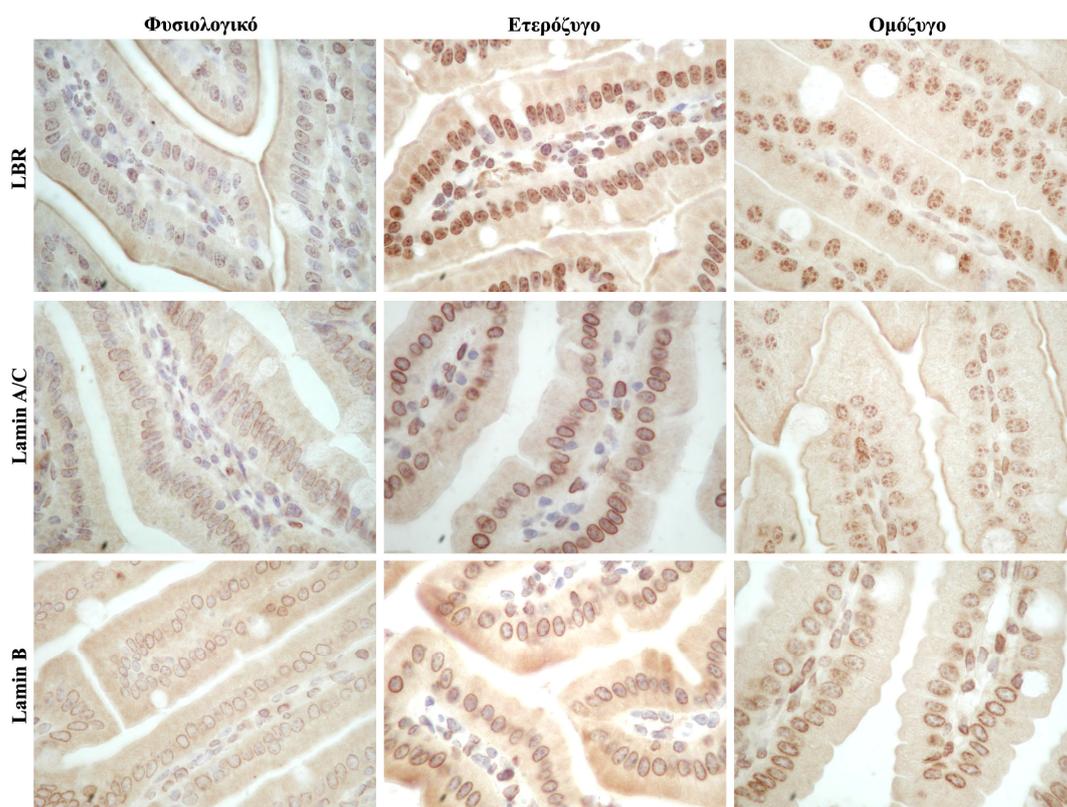
έντερο είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση θρεπτικών ουσιών. Η μη φυσιολογική κατανομή της χρωματίνης ίσως να επηρεάζει την πρωταρχική αυτή λειτουργία του εντέρου, με αποτέλεσμα τα ζώα να αδυνατούν να αναπτυχθούν (failure to thrive). Σε κάποια ζώα, η ελλιπής διείσδυση του φαινοτύπου αφήνει μέρος του εντερικού επιθηλίου ανέπαφο, πράγμα το οποίο μπορεί επίσης να εξηγήσει γιατί κάποια από τα ομόζυγα επιβιώνουν περισσότερα από άλλα. Τα καλυκοειδή και τα εντεροενδοκρινικά κύτταρα δεν εμφανίζουν συσσωρεύσεις χρωματίνης στον πυρηνικό φάκελο.



Εικόνα 29: A-E) Τομές παραφίνης από λεπτό έντερο. Χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (100x). A) Φυσιολογικό, B) Ετερόζυγο, C) Ομόζυγο με συσσωρεύσεις χρωματίνης σε όλες τις λάχνες (N.1) D) Ομόζυγο με συσσωρεύσεις χρωματίνης σε κάποιες λάχνες (N.2) E) Ομόζυγο χωρίς συσσωρεύσεις χρωματίνης (ίδια τομή με αυτή της D) (N.2).F) Μεγέθυνση από τις εικόνες A, B, C και E.

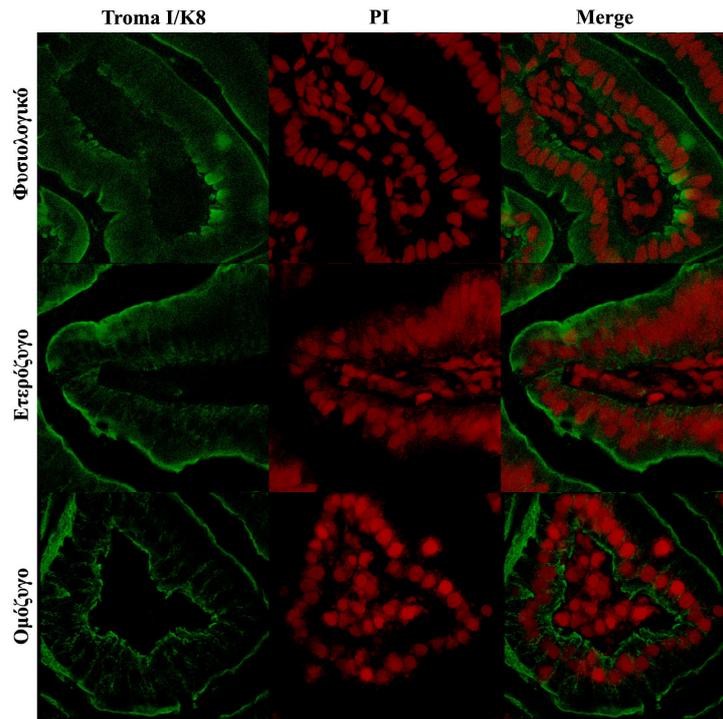
Ακολούθησαν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για τη διερεύνηση της έκφρασης και της τοπολογίας των πρωτεϊνών LBR, λαμίνες A/C και λαμίνη B (Εικ.30). Ο LBR δεν

εμφάνισε καμία διαφορά ως προς την έκφραση ή την τοπολογία και στα τρία δείγματα. Το ίδιο συνέβη και με τις άλλες δύο πρωτεΐνες. Στα ομόζυγα ο LBR φαίνεται ότι εντοπίζεται σε βαθιές εντομές και εγκολπώσεις του πυρήνα. Πάνω στα σημεία αυτά συσσωρεύονται επίσης οι λαμίνες A/C και B.

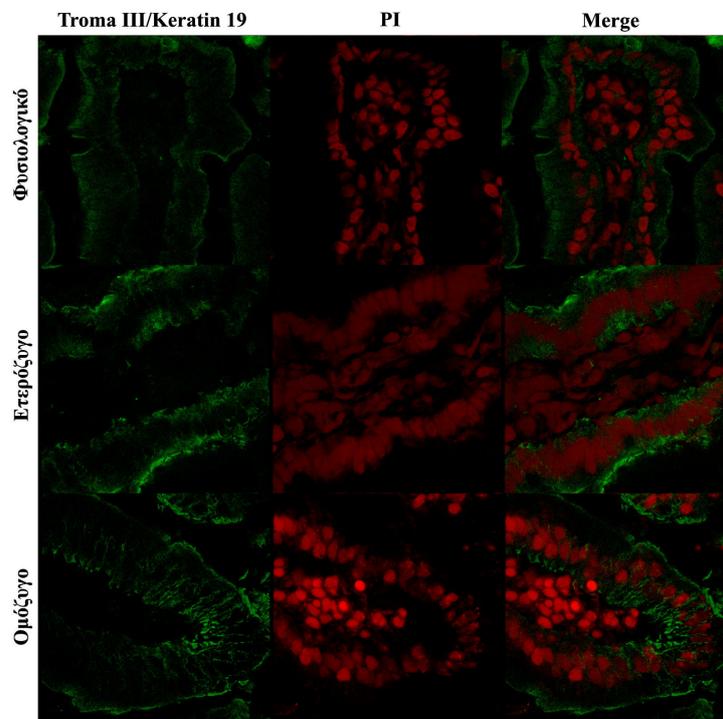


Εικόνα 30: Τομές παραφίνης από λεπτό έντερο και χρώση με αντισώματα για τον LBR, τις λαμίνες A/C και τη λαμίνη B (100x).

Το εντερικό επιθήλιο έχει σαφώς διαχωρισμένα όρια ανάμεσα στην κορυφαία και στη βασική επιφάνειά του. Για να διερευνηθεί κατά πόσο η ασυμμετρία αυτή διατηρείται στα μεταλλαγμένα ζώα, έγινε χρώση τομών κρυστάτη με αντισώματα για τις κερατίνες 8 και 19. Η κερατίνη 8 είναι η κύρια κερατίνη που εκφράζεται στο εντερικό επιθήλιο και εμφανίζει μεγαλύτερη εντόπιση στην κορυφαία επιφάνεια. Η έκφραση της κερατίνης 19 παρουσιάζει ποικιλομορφία και είναι χαμηλότερη αυτής της 8. Δε διαπιστώθηκε κάποια διαφορά ανάμεσα στα τρία δείγματα, όπως φαίνεται στις εικόνες 31 και 32.



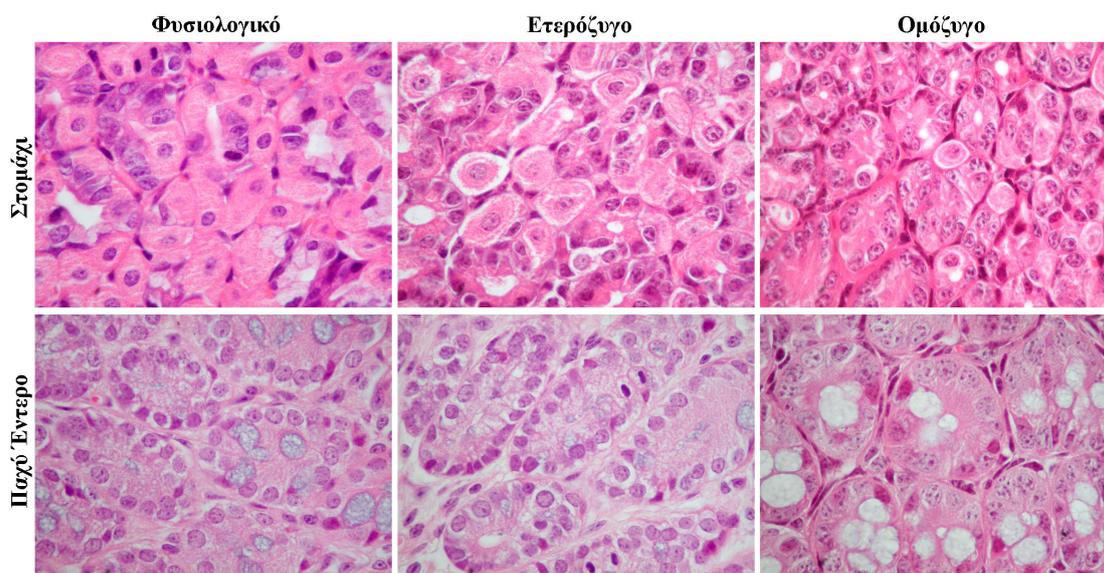
Εικόνα 31: Τομές λεπτού εντέρου σε κρουσάτη. Χρώση με αντίσωμα για την κερατίνη 8 (πράσινο) και με ιωδιούχο προπίδιο για το DNA (κόκκινο, PI) (100x). Στη τελευταία στήλη φαίνεται ο συνεντοπισμός των δύο (merge).



Εικόνα 32: Τομές λεπτού εντέρου σε κρουσάτη. Χρώση με αντίσωμα για την κερατίνη 19 (πράσινο) και με ιωδιούχο προπίδιο για το DNA (κόκκινο, PI) (100x). Στη τελευταία στήλη φαίνεται ο συνεντοπισμός των δύο (merge).

3.1.3 Χρώση τομών από το στόμαχο και το παχύ έντερο

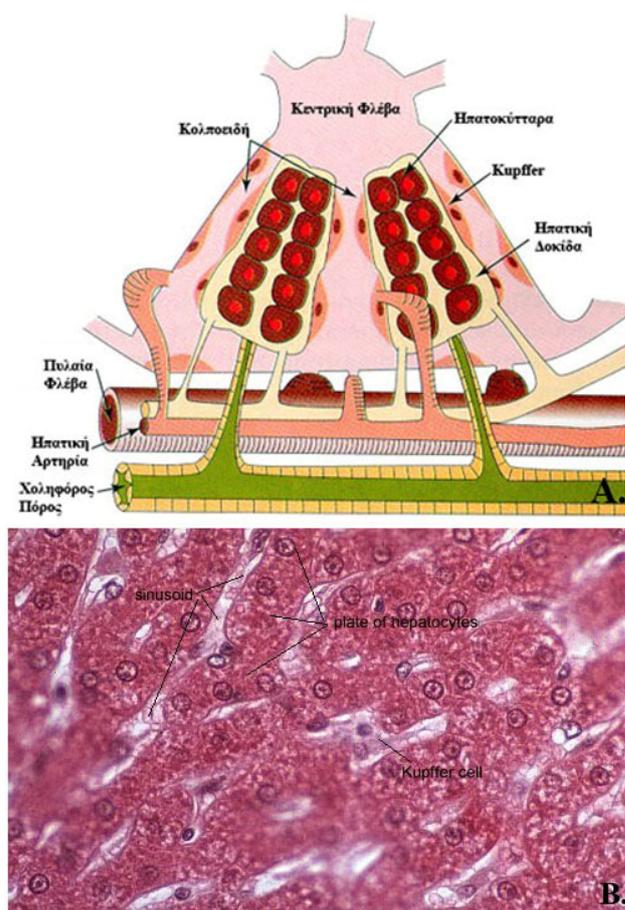
Ο γαστρικός βλεννογόνος του στομάχου αποτελείται από ένα επιφανειακό επιθήλιο, το οποίο περιέχει βλεννοπαραγωγικά και οξεοπαραγωγικά κύτταρα. Το παχύ έντερο έχει βλεννογόνο με πολύ μικρές λάχνες και διαθέτει αφθονία καλυκοειδών και απορροφητικών κυττάρων. Η κύρια λειτουργία των απορροφητικών κυττάρων είναι η απορρόφηση του νερού. Τα στοιχεία αυτά είναι παρόμοια με τις δομές του λεπτού εντέρου και για αυτό, στη συνέχεια, εξετάστηκε αν επηρεάζονται. Όπως φαίνεται στην Εικ.33, οι πυρήνες και στα δύο επιθήλια δεν εμφανίζουν κάποια ανωμαλία ή συσσώρευση της χρωματίνης στον πυρηνικό φάκελο. Επίσης ανοσοϊστοχημικές χρώσεις με αντισώματα για τον LBR, τις λαμίνες A/C και τη λαμίνη B δεν έδειξαν κάποια διαφορά. Οι δομικές αλλοιώσεις της χρωματίνης περιορίζονται λοιπόν μόνο στο λεπτό έντερο.



Εικόνα 33: Τομές παραφίνης από τον στόμαχο και παχύ έντερο. Χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (100x). Δεν υπάρχουν συσσωρεύσεις χρωματίνης στον πυρηνικό φάκελο ή άλλες ανωμαλίες στα ομόζυγα.

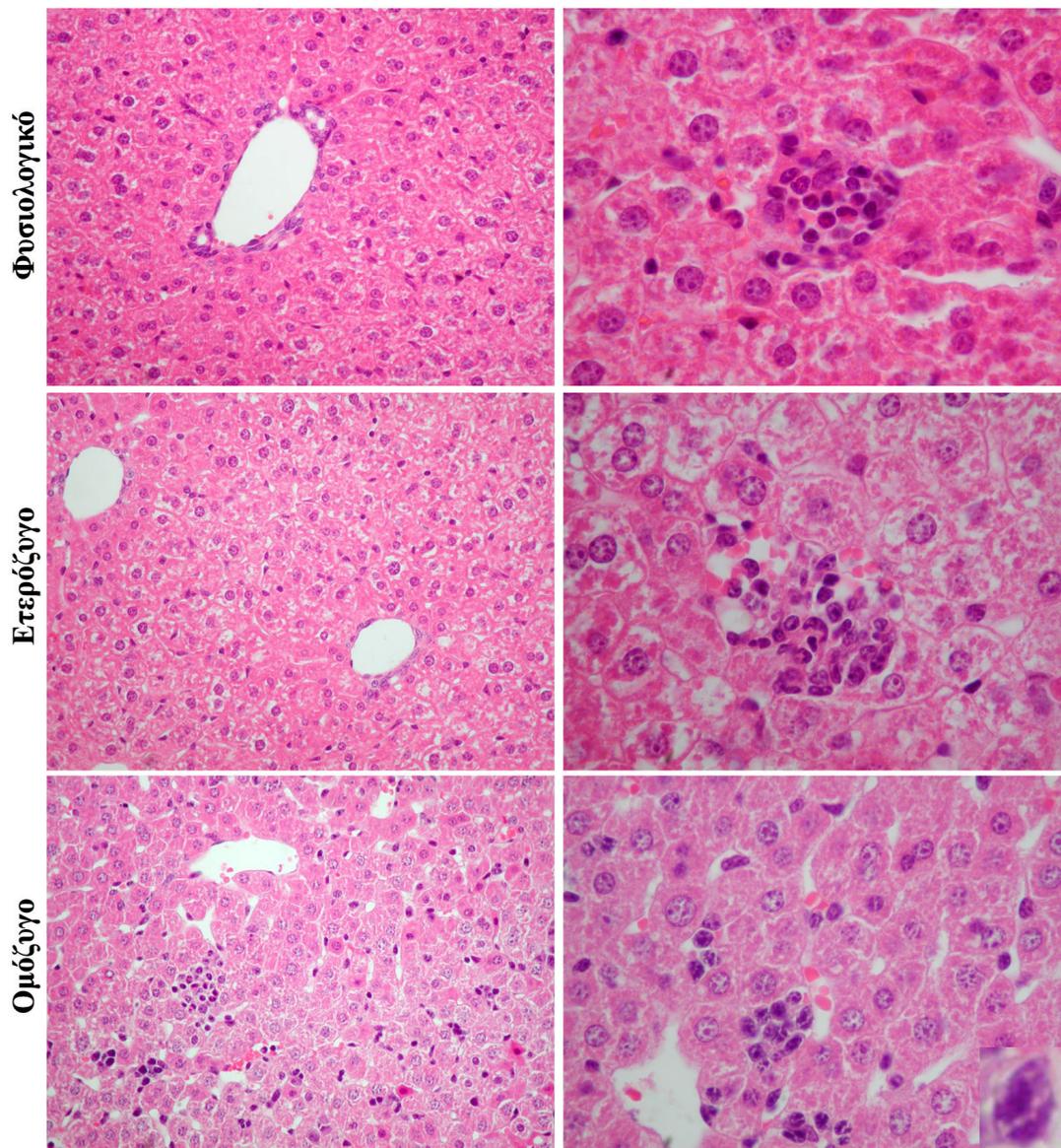
3.1.4 Χρώση τομών από το ήπαρ

Το βασικό δομικό στοιχείο του ήπατος είναι τα ηπατοκύτταρα, τα οποία διατάσσονται σε αναστομούμενες δοκίδες και σχηματίζουν τα ηπατικά λοβία. Μεταξύ των λοβίων αυτών, υπάρχουν οι χοληφόροι πόροι, τα λεμφοαγγεία και τα αιμοφόρα αγγεία. Επίσης, υπάρχουν συναθροίσεις λεμφοκυττάρων και μακροφάγα, τα οποία είναι γνωστά ως κύτταρα Kupffer (Εικ.34).



Εικόνα 34: A) Σχηματική αναπαράσταση της δομής του ήπατος (τροποποίηση από www.enjoylongerhealth.com), B) Τομή παραφίνης ήπατος με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (τροποποίηση από www.sacs.ucsf.edu).

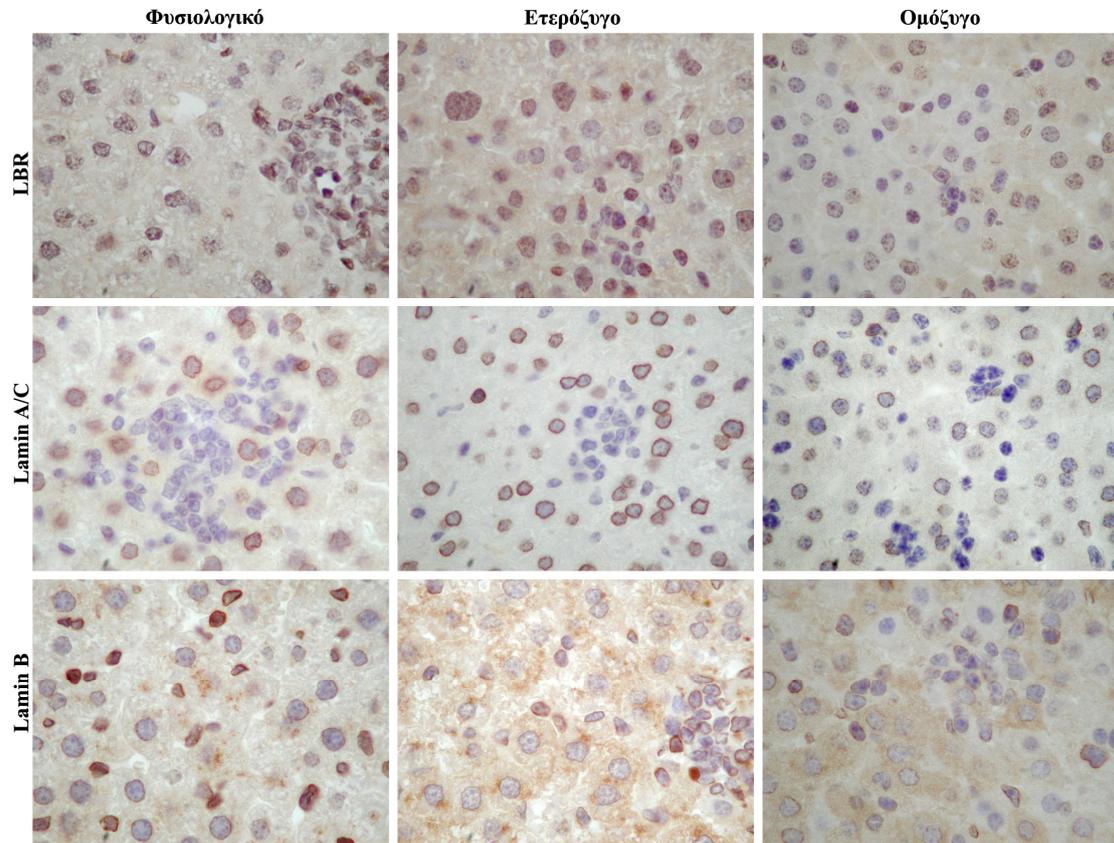
Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης από τομές παραφίνης δεν έδειξαν κάποια ανωμαλία ως προς τη δομή του ήπατος. Φαίνεται όμως ότι στα ομόζυγα ο αριθμός των λεμφοκυττάρων και των κυττάρων Kupffer είναι αυξημένος. Επίσης, στα λεμφοκύτταρα παρατηρούνται χαρακτηριστικά συσσωματώματα χρωματίνης (Εικ.35), όπως έχει ήδη αναφερθεί στη συναφή βιβλιογραφία (βλέπε «εισαγωγή»).



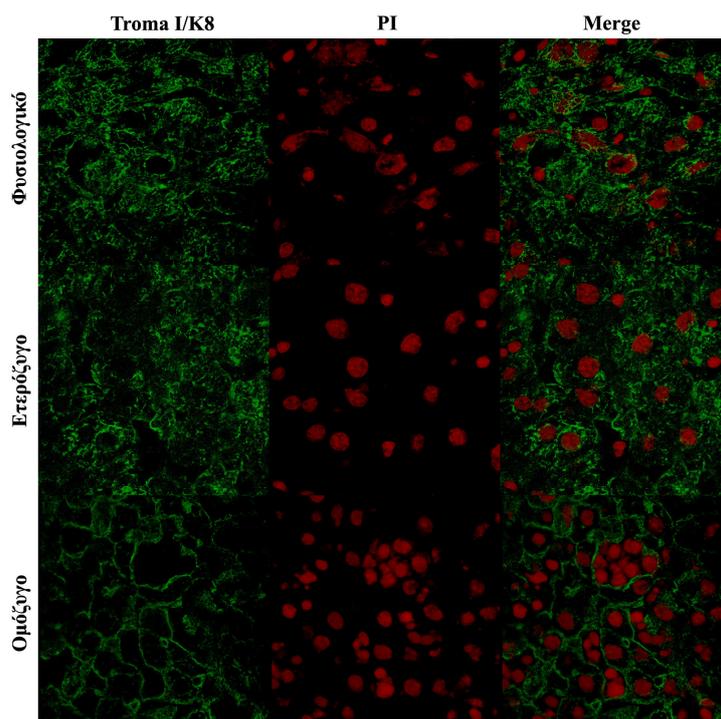
Εικόνα 35: Τομές ήπατος σε παραφίνη. Χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (40x-100x). Κάτω δεξιά είναι ένα λεμφοκύτταρο σε μεγέθυνση. Φαίνονται καθαρά δύο μεγάλες συσσωρεύσεις χρωματίνης.

Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις με αντισώματα για τον LBR, τις λαμίνες A/C και τη λαμίνη B έδειξαν ότι όλα τα κύτταρα του ήπατος εξέφραζαν τον LBR, τα ηπατοκύτταρα ήταν θετικά για τις λαμίνες A/C, ενώ τα λεμφοκύτταρα ήταν αρνητικά, όπως αναμενόταν. Όλα επίσης τα κύτταρα του ήπατος εξέφραζαν τη λαμίνη B (Εικ.36). Χρώση τομών κρουστάτη με τα αντισώματα για τις κερατίνες 8 και 19 έδειξαν ότι τα ηπατοκύτταρα ήταν θετικά για την κερατίνη 8, ενώ τα λεμφοκύτταρα ήταν αρνητικά (Εικ.37) και ότι όλα τα κύτταρα ήταν αρνητικά για την κερατίνη 19,

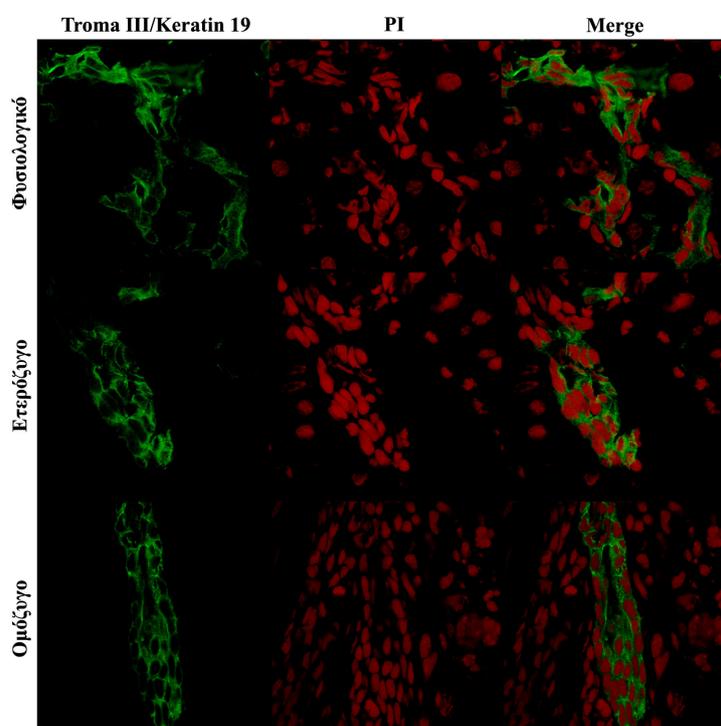
εκτός από τα κύτταρα των χοληφόρων πόρων (Εικ.38). Καμιά διαφορά δε διαπιστώθηκε ανάμεσα στα τρία είδη δειγμάτων.



Εικόνα 36: Τομές ήπατος σε παραφίνη και χρώση με αντισώματα για τον LBR, τις λαμίνες A/C και τη λαμίνη B (100x).



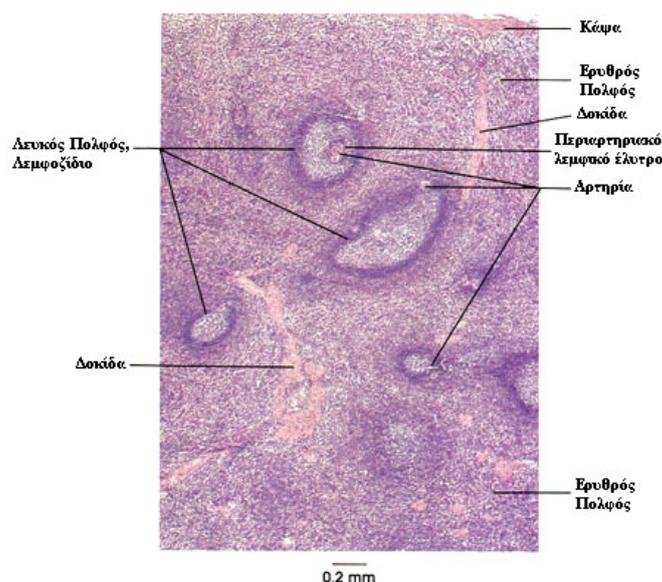
Εικόνα 37: Τομές ήπατος σε κρουστάτη. Χρώση με αντίσωμα για την κερατίνη 8 (πράσινο) και με ιωδιούχο προπίδιο για το DNA (κόκκινο, PI) (100x). Στη τελευταία στήλη φαίνεται ο συνεντοπισμός των δύο (merge).



Εικόνα 38: Τομές ήπατος σε κρουστάτη. Χρώση με αντίσωμα για την κερατίνη 19 (πράσινο) και με ιωδιούχο προπίδιο για το DNA (κόκκινο, PI) (100x). Στη τελευταία στήλη φαίνεται ο συνεντοπισμός των δύο (merge).

3.1.5 Χρώση τομών από το σπλήνα

Ο σπλήνας παράγει λεμφοκύτταρα και καταστρέφει ερυθροκύτταρα. Περιβάλλεται από μια κάψα συνδετικού ιστού, η οποία σχηματίζει δοκίδες στο εσωτερικό του οργάνου και το διαιρεί σε ατελή διαμερίσματα. Τα διαμερίσματα αυτά περιέχουν τον ερυθρό πολφό που περιβάλλει τον λευκό πολφό (Εικ.39).

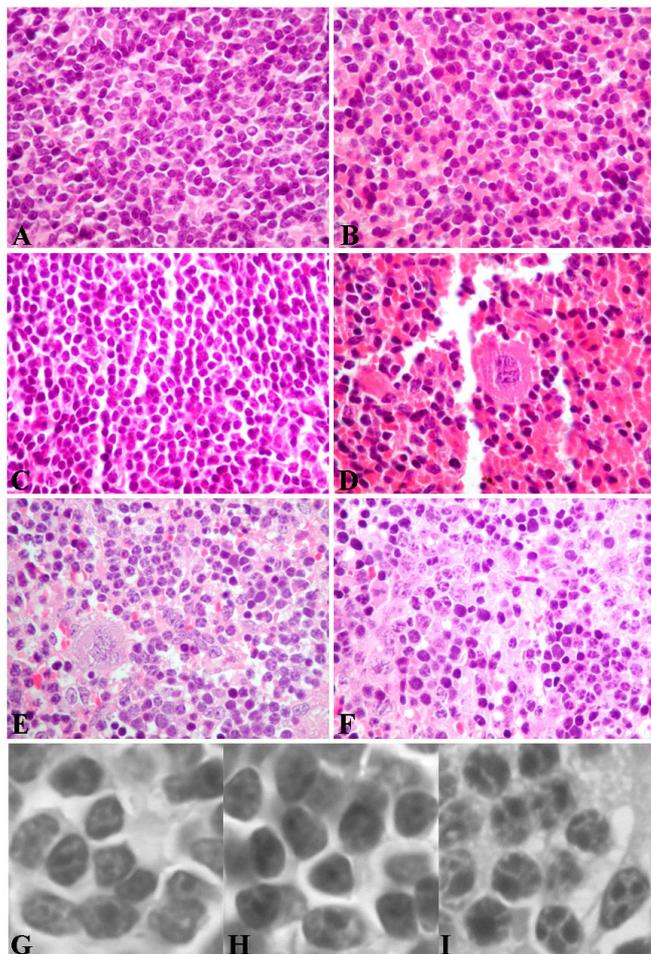


Εικόνα 39: Τομή του σπλήνα σε παραφίνη. Χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (35x) (τροποποίηση από www.anatomyatlases.org).

Ο λευκός πολφός αποτελείται από διάχυτο λεμφικό ιστό, που εντοπίζεται γύρω από αρτηρίες και λεμφοζίδια (βλαστικά κέντρα). Ο διάχυτος λεμφικός ιστός αποτελείται από T λεμφοκύτταρα, ενώ τα λεμφοζίδια περιέχουν κυρίως B λεμφοκύτταρα (ώριμα και ανώριμα). Στα όρια ανάμεσα στους δύο πολφούς υπάρχει μια μεθοριακή ζώνη, στην οποία εντοπίζονται ενεργά μακροφάγα και λίγα B λεμφοκύτταρα. Ο ερυθρός πολφός αποτελείται από τις σπληνικές χορδές και τα κολποειδή. Οι σπληνικές χορδές περιέχουν μακροφάγα, B και T λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα και πολλά κύτταρα του αίματος. Τα μακροφάγα είναι εκείνα που καταστρέφουν τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα.

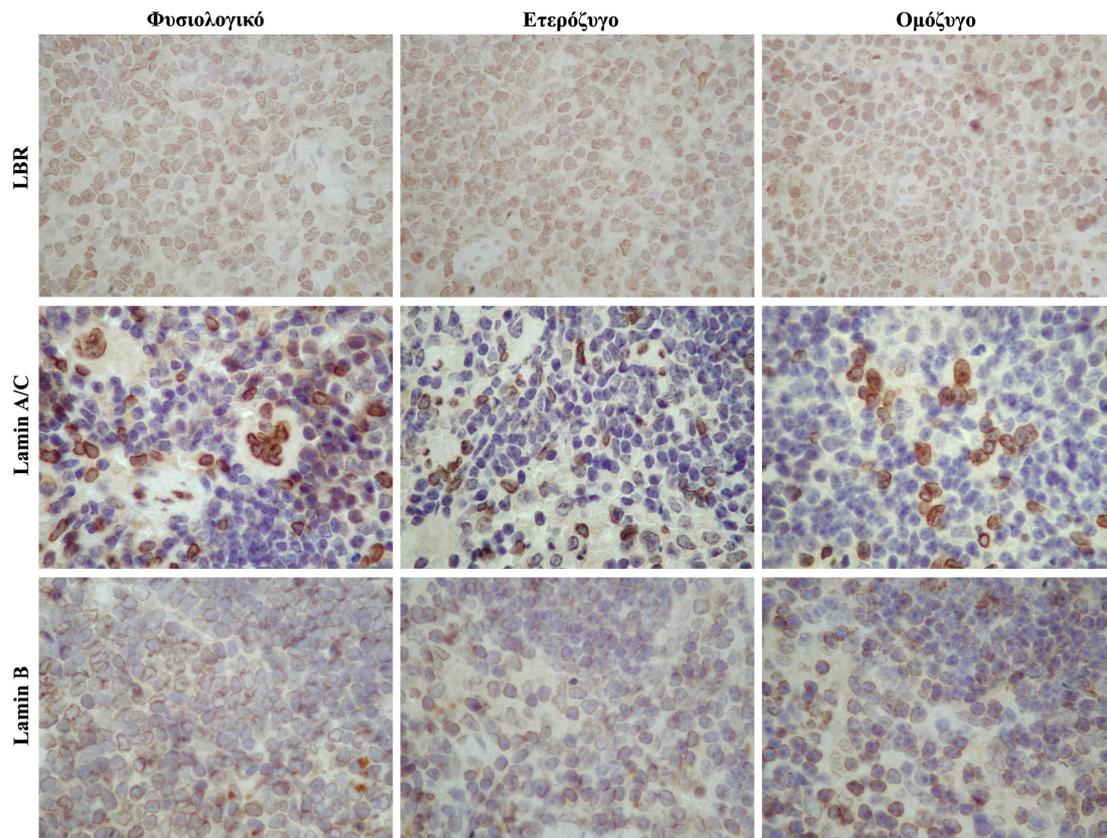
Χρώσεις αιματοξυλίνης-ηωσίνης συμφωνούν με τα ευρήματα των Shultz et al, όπως φαίνεται στην Εικ.40 και δείχνουν ότι όλα τα λεμφοκύτταρα φέρουν τα χαρακτηριστικά συσσωματώματα χρωματίνης (Shultz et al,2003). Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις με αντισώματα για τον LBR, τις λαμίνες A/C και τη λαμίνη B δεν

αποκάλυψαν κάποια διαφορά στην κατανομή αυτών των πρωτεϊνών (Εικ.41). Όλα τα κύτταρα ήταν θετικά για τον LBR και τη λαμίνη Β, ενώ για τις λαμίνες Α/С θετικά ήταν μόνο μερικά λεμφικά κύτταρα, τα μεγακαρυοκύτταρα και κύτταρα των αγγείων.



Εικόνα 40: Τομές παραφίνης από το σπλήνα. Χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (100x).

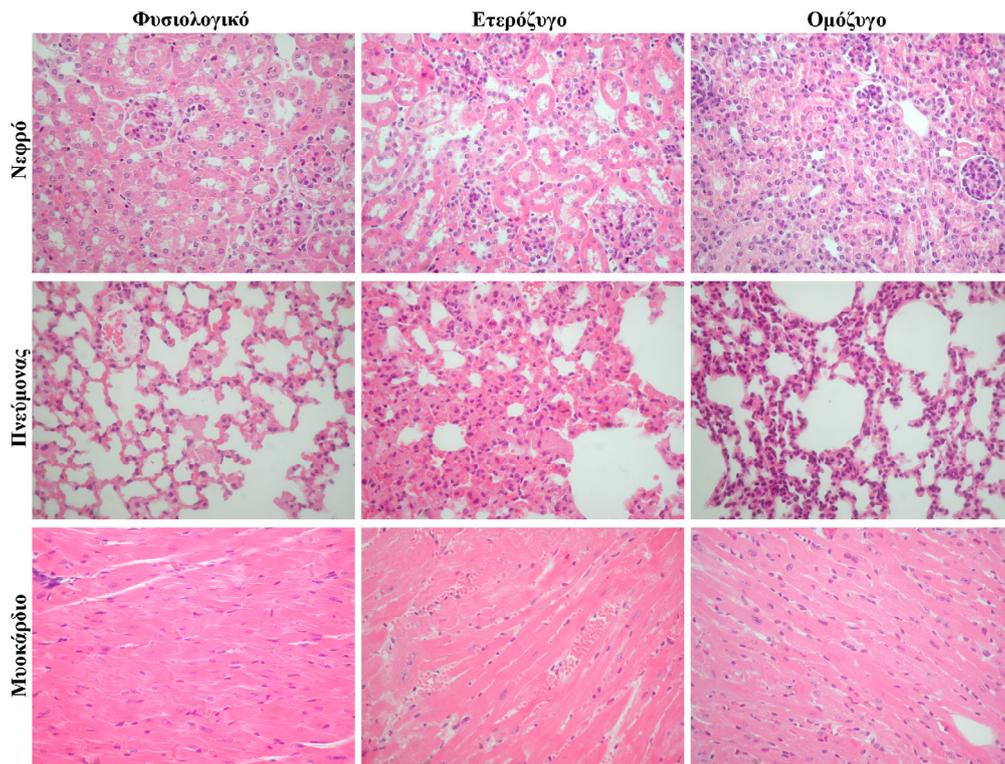
A) Φυσιολογικό-Λευκός Πολφός,
B) Φυσιολογικό-Ερυθρός Πολφός,
C) Ετερόζυγο-Λευκός Πολφός,
D) Ετερόζυγο-Ερυθρός Πολφός,
E) Ομόζυγο-Λευκός Πολφός,
F) Ομόζυγο-Ερυθρός Πολφός,
G-I) Λεμφοκύτταρα σε μεγέθυνση από φυσιολογικό, ετερόζυγο και ομόζυγο δείγμα, αντίστοιχα. Φαίνονται οι συσσωρεύσεις της χρωματίνης.



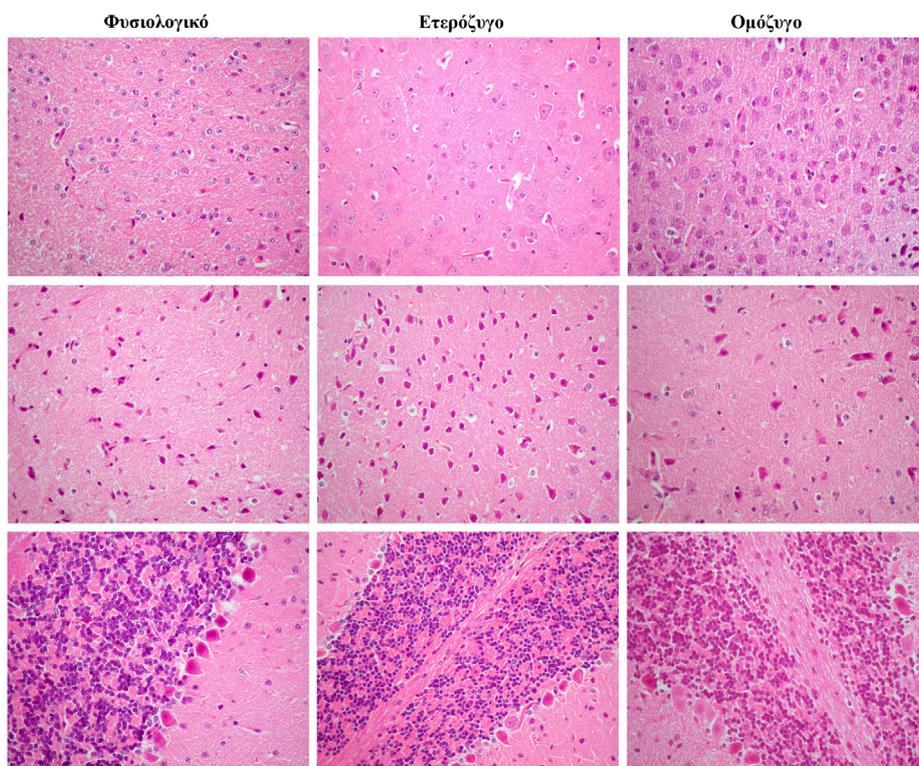
Εικόνα 41: Τομές παραφίνης από το σπλήνα και χρώση με αντισώματα για τον LBR, τις λαμίνες A/C και τη λαμίνη B (100x).

3.1.6 Χρώση τομών από άλλους ιστούς

Εκτός των παραπάνω ιστών, εξετάστηκαν ακόμα οι νεφροί, οι πνεύμονες, η καρδιά και ο εγκέφαλος φυσιολογικών, ετερόζυγων και ομόζυγων ζώων. Χρώσεις με αιματοξυλίνη-ηωσίνη δεν έδειξαν ουσιώδεις διαφορές ως προς την αρχιτεκτονική των ιστών ή ανωμαλίες στους πυρήνες των κυττάρων (Εικ.42). Επίσης, δεν διαπιστώθηκαν ατυπίες ή συσσωρεύσεις χρωματίνης στους πυρηνικούς φακέλους των κυττάρων της παρεγκεφαλίδας στα ομόζυγα δείγματα, πράγμα που διαφέρει με ό,τι έχει αναφερθεί από τους Shultz et al (Shultz et al,2003). Αυτή η διαφορά μπορεί να αποδοθεί στην ελλιπή διείσδυση του φαινοτύπου (Εικ.43). Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις με αντισώματα για τον LBR, τις λαμίνες A/C και τη λαμίνη B δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές στη τοπολογία ή την έκφραση των πρωτεϊνών στα τρία αυτά δείγματα.



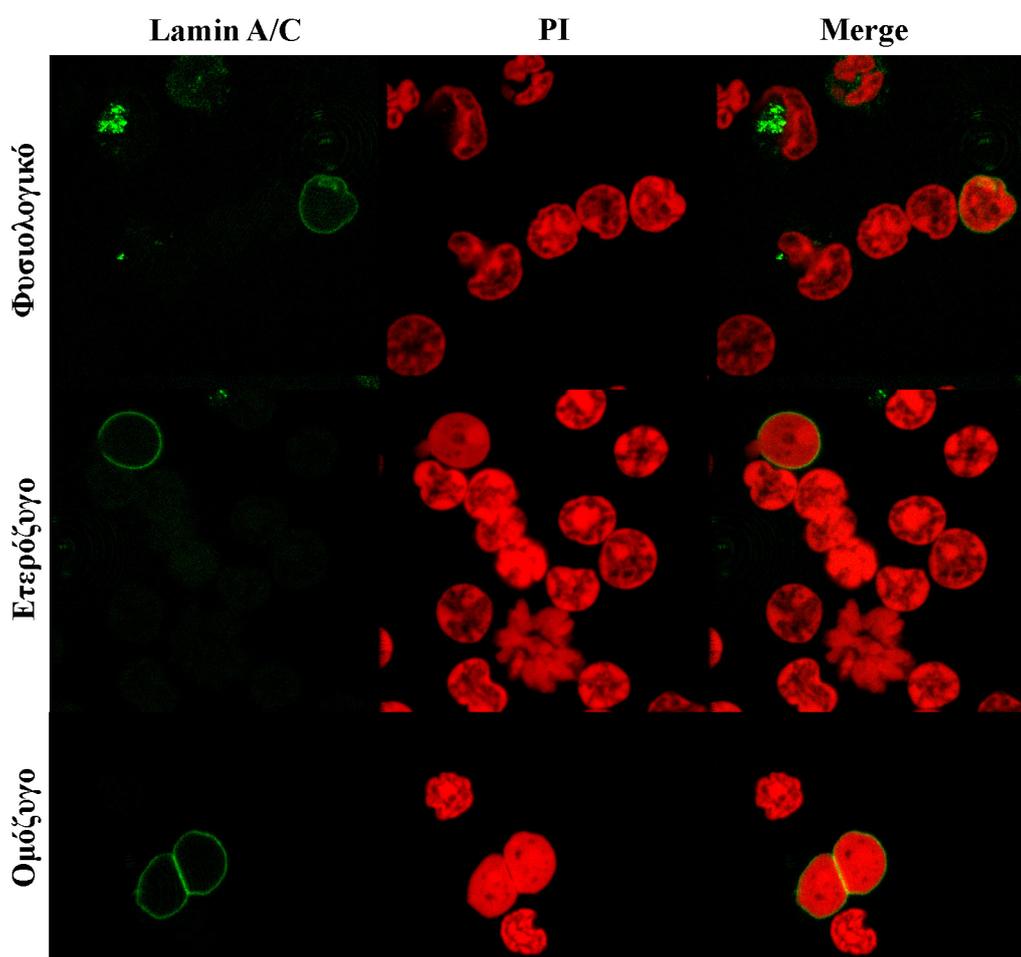
Εικόνα 42: Τομές παραφίνης από τους νεφρούς, τους πνεύμονες και το μυοκάρδιο. Χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (100x).



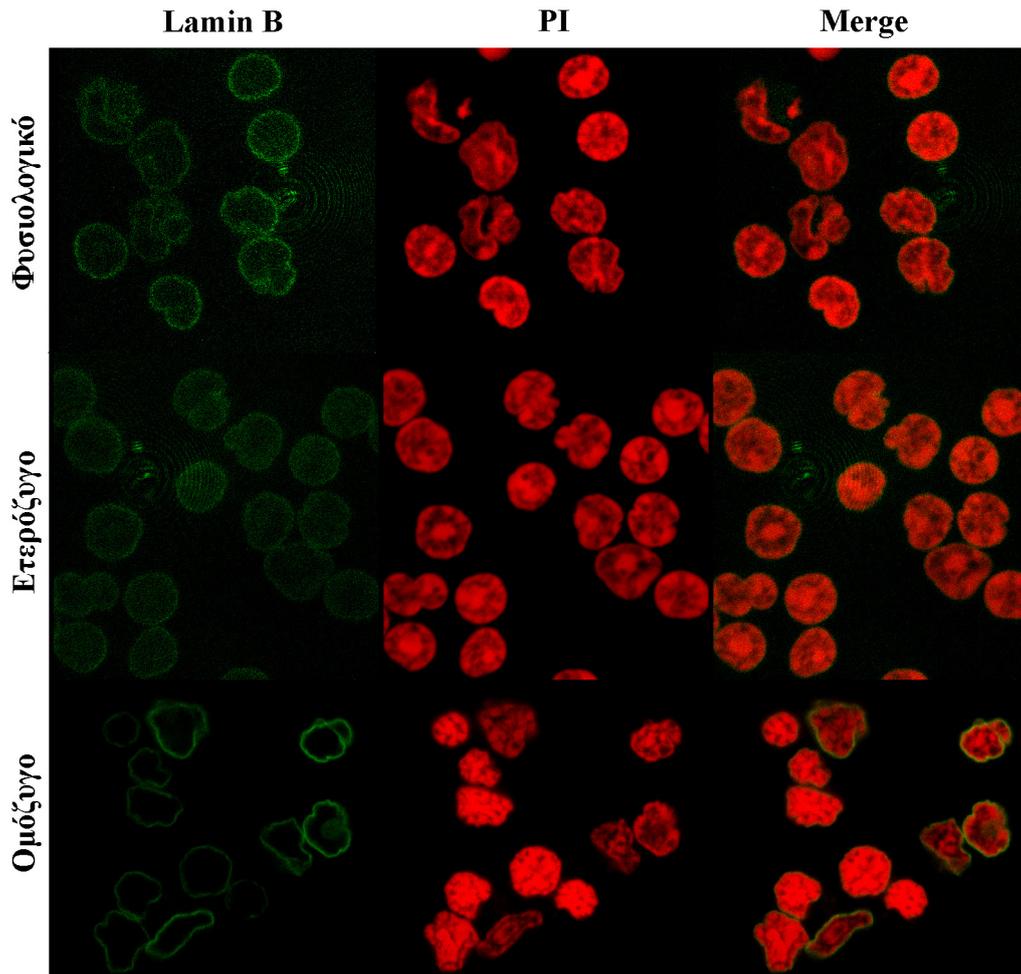
Εικόνα 43: Τομές παραφίνης από τον εγκεφαλικό φλοιό και την παρεγκεφαλίδα (τελευταία σειρά). Χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (100x).

3.1.7 Μορφολογική και λειτουργική ανάλυση σπληνοκυττάρων

Ο σπλήνας είναι ένας ιδιαίτερα κυτταροβριθής ιστός και περιβάλλεται από ενισχυμένη κάψα. Ανοίγοντας μια τομή στο όργανο και ασκώντας πίεση, επιτεύχθηκε η συλλογή των κυττάρων που περιέχει και έγινε ανοσοφθορισμός με αντισώματα για τις πρωτεΐνες λαμίνες A/C και λαμίνη Β (Εικ.44-45). Δεν εντοπίστηκαν ατυπίες στα ετερόζυγα ή στα ομόζυγα σπληνοκύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά.



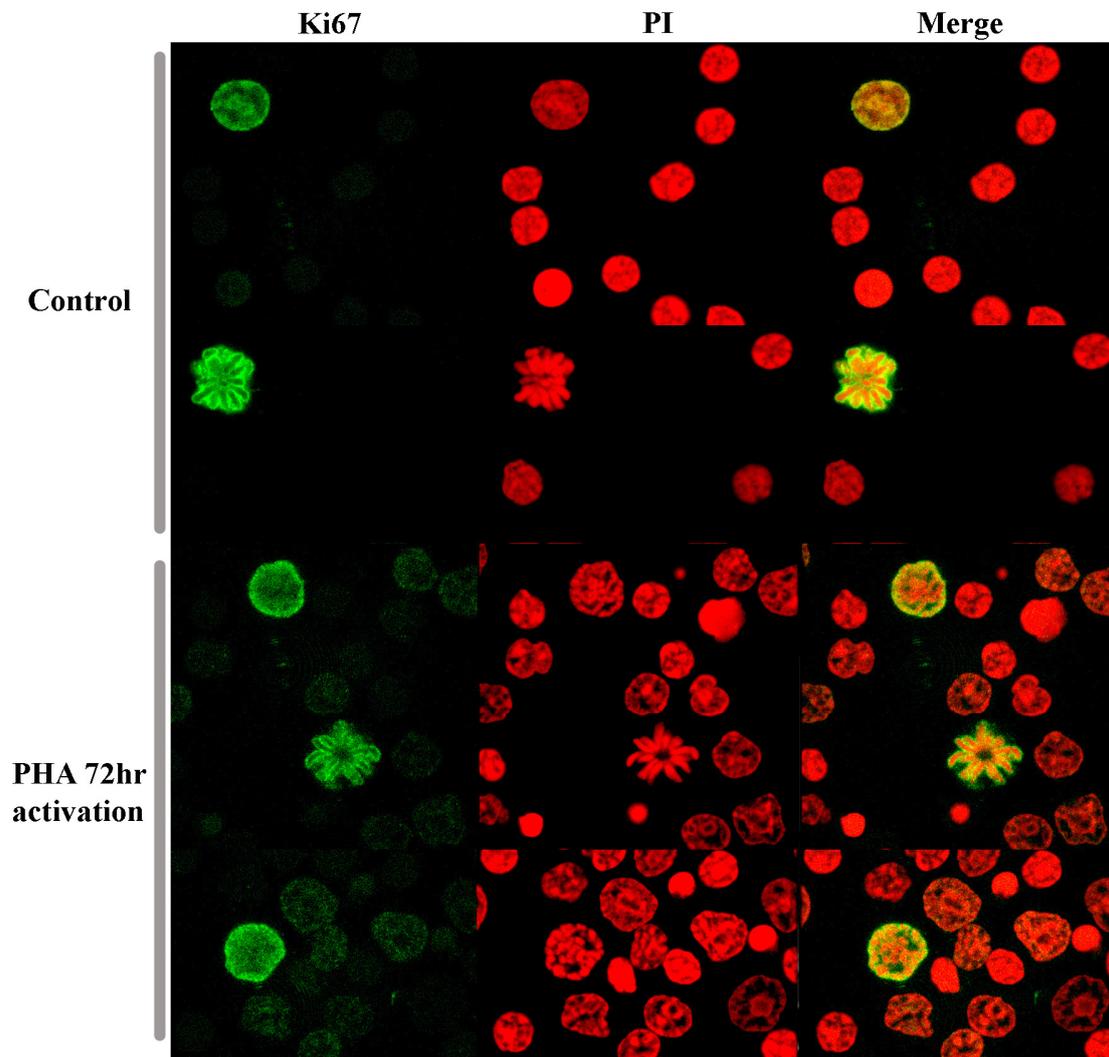
Εικόνα 44: Συνεστιακή μικροσκοπία σπληνοκυττάρων. Ανοσοφθορισμός με αντίσωμα για τις λαμίνες A/C (πράσινο) και με ιωδιούχο προπίδιο για το DNA (κόκκινο, PI) (100x). Στη τελευταία στήλη φαίνεται ο συνεντοπισμός των δύο (merge).



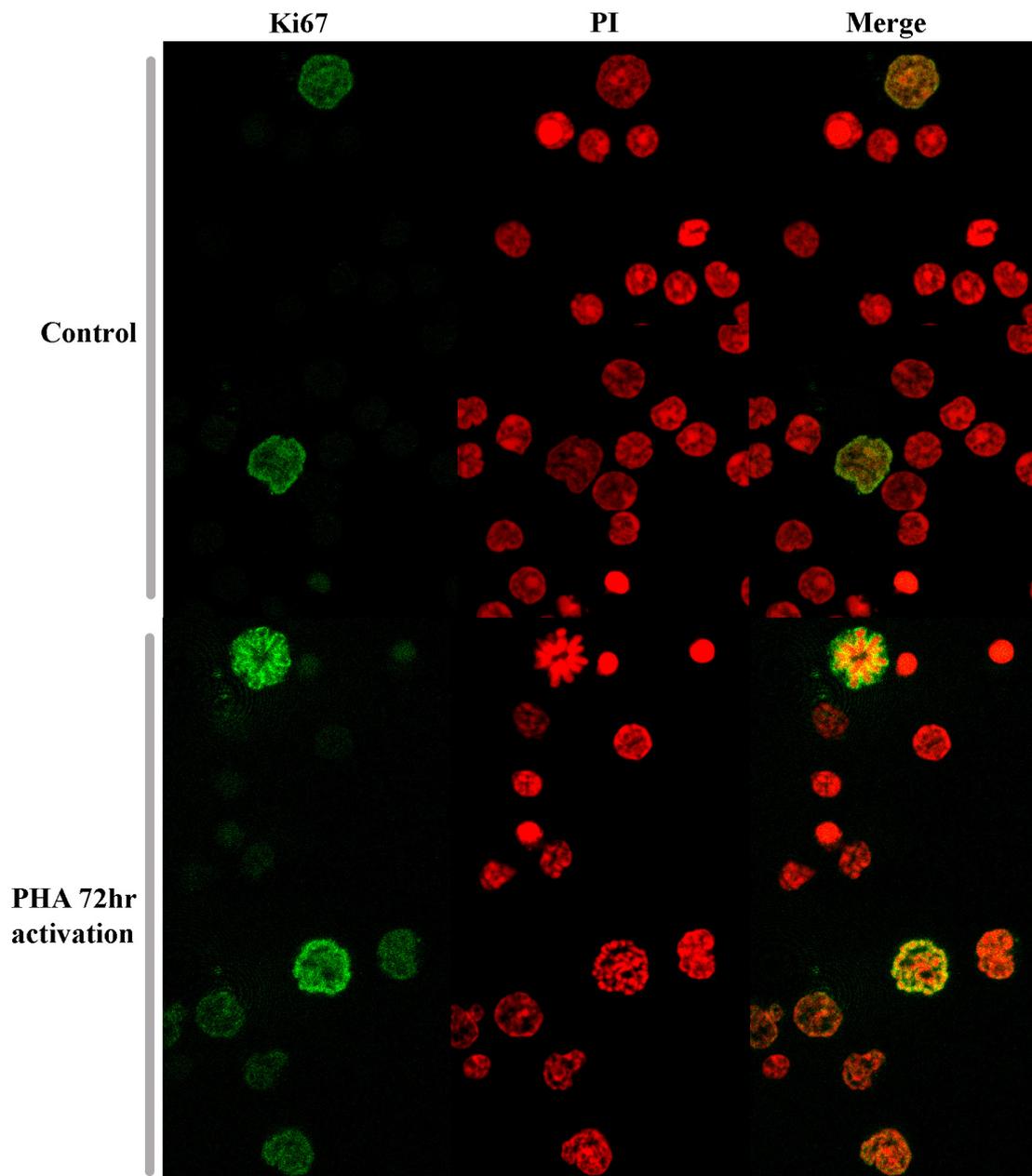
Εικόνα 45: Συνεστιακή μικροσκοπία σπληνοκυττάρων. Ανοσοφθορισμός με αντίσωμα για τις λαμίνες A/C (πράσινο) και με ιωδιούχο προπίδιο για το DNA (κόκκινο, PI) (100x). Στη τελευταία στήλη φαίνεται ο συνεντοπισμός των δύο (merge).

Το μεγαλύτερο ποσοστό των σπληνοκυττάρων αποτελείται από T και B λεμφοκύτταρα, τα οποία βρίσκονται σε ηρεμία (quiescence). Δεν βρίσκονται δηλαδή στον κυτταρικό κύκλο, αλλά στη G_0 , αναμένοντας το κατάλληλο ερέθισμα για να επανέλθουν και να αρχίσουν να διαιρούνται. Πιστεύοντας ότι στα κύτταρα των ομόζυγων ζώων η δυνατότητα αυτή ίσως να έχει επηρεαστεί, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των λεμφοκυττάρων παρουσία 5μg/ml PHA-L (phytohemagglutinin) στο θρεπτικό μέσο για τρεις μέρες. Η PHA-L είναι μια λεκτίνη, που προέρχεται από το φυτό *Phaseolus*. Η βασική της λειτουργία είναι να προκαλεί την επαναφορά των T-λεμφοκυττάρων στον κυτταρικό κύκλο. Μετά την επίδραση με PHA-L, πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός για το μιτωτικό δείκτη Ki67. Η πρωτεΐνη αυτή

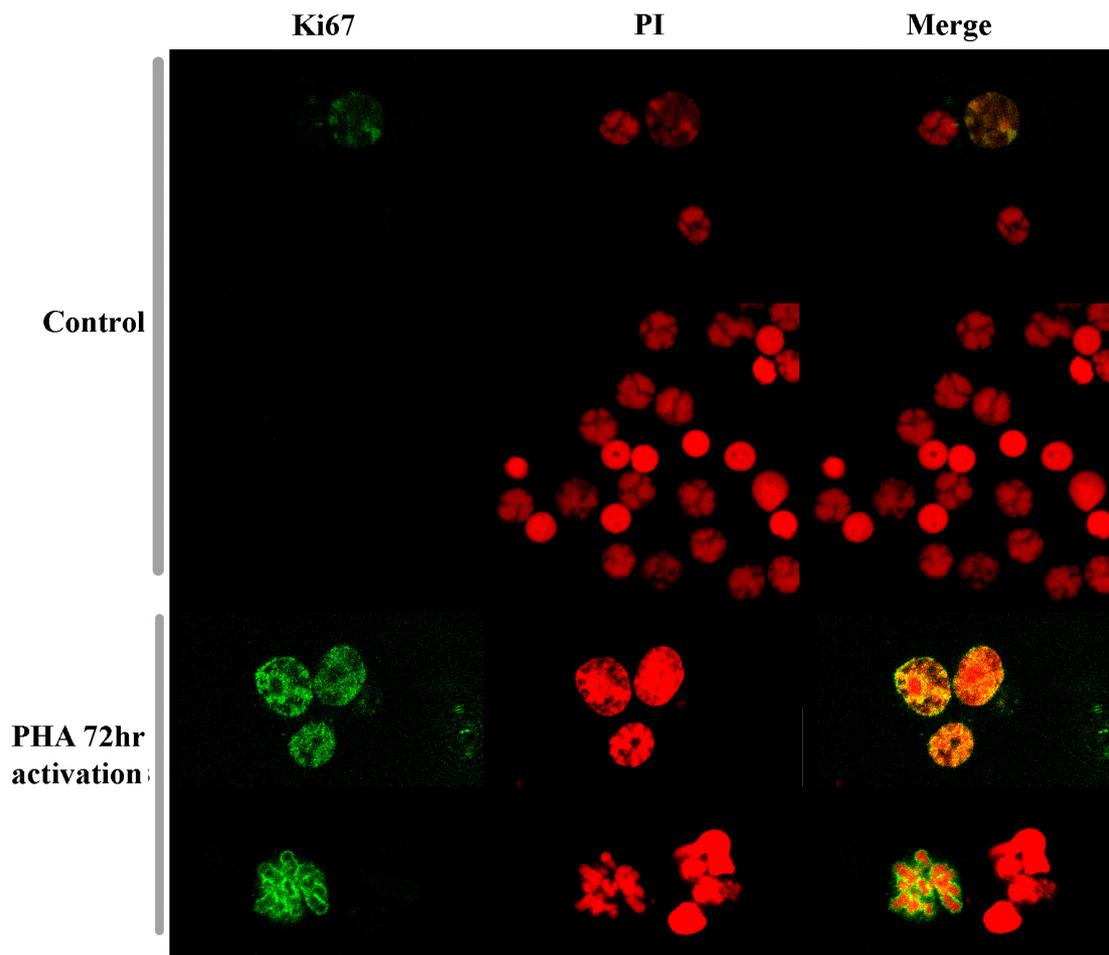
εκφράζεται μόνο σε κύτταρα που βρίσκονται στον κυτταρικό κύκλο και όχι σε αυτά που είναι στη G_0 . Κατά τη διάρκεια της μεσόφασης εντοπίζεται διάχυτη στον κυτταρικό πυρήνα, ενώ στη μίτωση μεταφέρεται στην επιφάνεια των χρωμοσωμάτων. Όπως δείχνουν οι Εικ.46-48, δεν υπάρχει κάποιο εμπόδιο στην είσοδο των σπληνοκυττάρων από ετερόζυγα ή ομόζυγα ζώα στον κυτταρικό κύκλο. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ικανότητά τους αυτή δεν έχει επηρεαστεί από τη μετάλλαξη του LBR.



Εικόνα 46: Συνεστιακή μικροσκοπία φυσιολογικών σπληνοκυττάρων. Ανοσοφθορισμός με αντίσωμα για την πρωτεΐνη Ki67 (πράσινο) και με ιωδιούχο προπύδιο για το DNA (κόκκινο, PI) (100x). Στη τελευταία στήλη φαίνεται ο συνεντοπισμός των δύο (merge). Τα κύτταρα ελέγχου ήταν στην καλλιέργεια για τρεις μέρες χωρίς προσθήκη PHA.



Εικόνα 47: Συνεστιακή μικροσκοπία ετερόζυγων σπληνοκυττάρων. Ανοσοφθορισμός με αντίσωμα για την πρωτεΐνη Ki67 (πράσινο) και με ιωδιούχο προπίδιο για το DNA (κόκκινο, PI) (100x). Στη τελευταία στήλη φαίνεται ο συνεντοπισμός των δύο (merge). Τα κύτταρα ελέγχου ήταν στην καλλιέργεια για τρεις μέρες χωρίς προσθήκη PHA.



Εικόνα 48: Συνεστιακή μικροσκοπία ομόζυγων σπληνοκυττάρων. Ανοσοφθορισμός με αντίσωμα για την πρωτεΐνη Ki67 (πράσινο) και με ιωδιούχο προπίδιο για το DNA (κόκκινο, PI) (100x). Στη τελευταία στήλη φαίνεται ο συνεντοπισμός των δύο (merge). Τα κύτταρα ελέγχου ήταν στην καλλιέργεια για τρεις μέρες χωρίς προσθήκη PHA.

3.2 Βιοχημική ανάλυση των ποντικών με τη μετάλλαξη ic^J

3.2.1 Ανάλυση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των ιστονών με φασματοσκοπία μάζας (MS)

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, ο LBR συνδέεται με τις ιστόνες. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό αυτών είναι η παρουσία πλήθους μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στις ουρές τους. Για να μελετηθεί κατά πόσο οι τροποποιήσεις αυτές επηρεάζονται, οι ιστόνες H3 και H2A υποβλήθηκαν σε ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας MALDI-TOF. Ολικές ιστόνες απομονώθηκαν από πυρήνες από το ήπαρ φυσιολογικών και ετερόζυγων ποντικών, με εκχύλιση θεικού οξέος. Επειδή τα ομόζυγα ζώα επιβιώνουν σπάνια, οι ιστόνες αυτού του δείγματος προήλθαν από ένα ολόκληρο ποντίκι. Αυτό επέβαλε τον περαιτέρω καθαρισμό τους με στήλη ιοντοανταλλαγής CM52. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και οι ζώνες που αντιστοιχούσαν στις παραπάνω ιστόνες στάλθηκαν για ανάλυση. Στον πίνακα 1 φαίνονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης.

Histone H3				Histone H2A				
Peptide	Modifications	WT	HT	Peptide	Modifications	WT	HT	HM
1-2	-	-	-	1-3	me+P	+	+	ND
3-8	none	ND	+	4-11	me+P	+	+	+
3-8	me	ND	+	12-17	none	+	ND	ND
3-8	me+P	+	ND	12-17	me+P	+	+	+
9-17	me+P	+	+	18-20	me+P	+	+	+
18-26	none	ND	+	21-29	none	+	ND	ND
18-26	me+P	+	+	21-29	me	+	ND	+
27-40	me+P	+	+	30-32	me+P	+	+	+
41-49	none	+	+	33-35	me+P	+	+	+
41-49	me+P	+	+	36-42	me+P	+	+	+
54-63	none	+	+	43-71	-	-	-	-
54-63	me+P	+	+	72-77	me+P	+	+	+
64-69	none	+	+	78-81	me+P	+	+	+
64-69	me+P	+	+	82-88	none	ND	+	+
73-83	none	+	+	82-88	me	ND	+	ND
73-83	me+P	+	+	89-99	none	ND	+	ND
117-128	none	+	+	89-99	me	ND	+	ND
117-128	me+P	+	+	100-129	-	-	-	-
129-135	me	+	+	H2A.z	-	+	+	+
H3.3	-	+	+	H2A.x	-	+	+	+

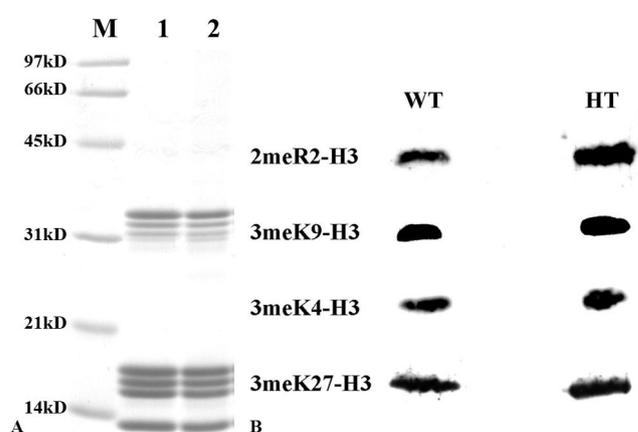
Πίνακας 1: Αποτελέσματα της ανάλυσης φασματοσκοπίας μάζας για τις ιστόνες H3 και H2A. (ND=δεν εντοπίστηκε, +=υπάρχει, -=δεν βρέθηκε το πεπτίδιο, none=καμία τροποποίηση, me=συνδυασμός μεθυλιώσεων, me+P=συνδυασμός μεθυλιώσεων και φωσφορυλιώσεων).

Η H3 από το ομόζυγο δείγμα δεν ήταν επαρκής για ανάλυση, τα άλλα δύο δείγματα όμως δε δείχνουν σημαντικές διαφορές. Ανιχνεύθηκε, και στα δύο δείγματα που

αναλύθηκαν, η ισομορφή της H3, H3.3. Στην H2A διαπιστώθηκαν ορισμένες διαφορές ανάμεσα στο φυσιολογικό και το ετερόζυγο. Το δείγμα από το ομόζυγο ζώο έδωσε κάποια περιορισμένα αποτελέσματα, αλλά πάλι το υλικό ήταν λίγο και η ανάλυση οριακή. Σε όλα τα δείγματα εντοπίστηκαν οι ισομορφές H2A.x και H2A.z.

3.2.2 Εντοπισμός μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στην ιστόνη H3 με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Μέρος των δειγμάτων H3 που στάλθηκαν για ανάλυση φασματοσκοπίας μάζας, αναλύθηκαν και με ανοσοαποτύπωση κατά Western, ώστε να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα και με έναν δεύτερο ανεξάρτητο τρόπο. Χρησιμοποιήθηκαν ολικές ιστόνες από το φυσιολογικό και το ετερόζυγο δείγμα, όχι όμως από το ομόζυγο, γιατί δεν υπήρξε αρκετό για αυτή τη δοκιμασία. Όπως φαίνεται στην Εικ.49, χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για τις τροποποιήσεις 2meR2, 2meK9, 2meK4 και 3meK27. Όλες εντοπίστηκαν και στα δύο δείγματα, γεγονός που επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας μάζας.

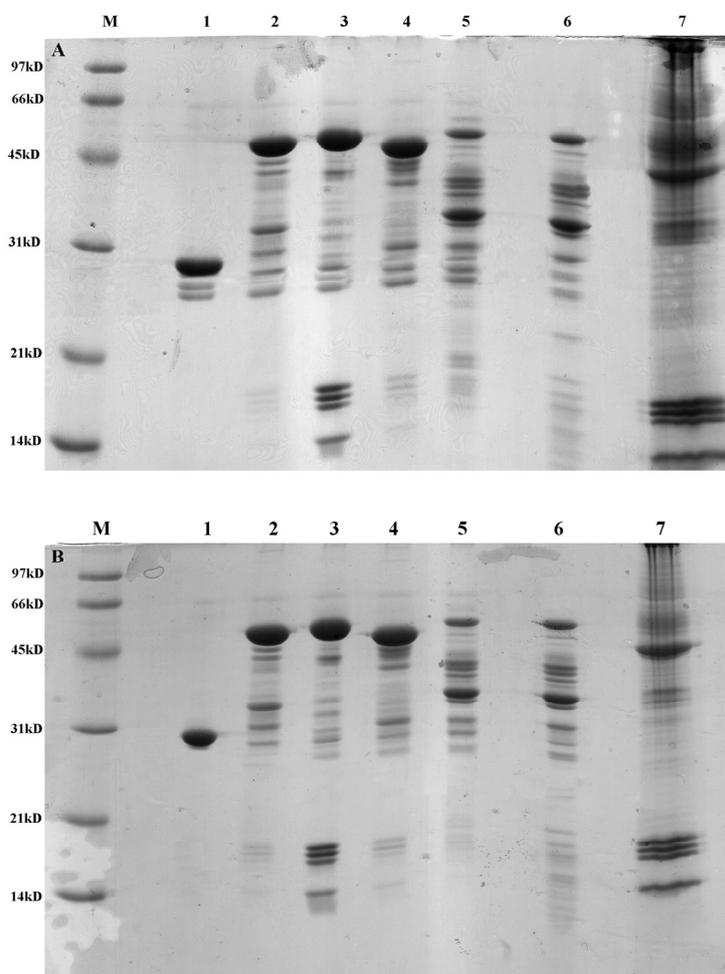


Εικόνα 49: A) SDS-PAGE ανάλυση των ολικών ιστονών, (M=μάρτυρες για τα μοριακά βάρη, 1= ετερόζυγο, 2=φυσιολογικό), B) ανάλυση κατά western με τα αντισώματα που φαίνονται στην εικόνα.

3.2.3 Δοκιμασία συγκατακρήμνισης από εκχύλισμα πυρηνικών φακέλων

Οι πυρηνικοί φάκελοι προέκυψαν μετά από πέψη πυρήνων ηπατοκυττάρων από φυσιολογικά και ετερόζυγα ζώα με MNase. Στη συνέχεια, οι φάκελοι εκχυλίστηκαν περαιτέρω και το διαλυτό υλικό αποτέλεσε την πηγή χρωματίνης για δοκιμασίες

συγκατακρήμιση (pull down). Σε αυτά τα πειράματα, ως «δόλωμα» χρησιμοποιήθηκαν οι τρεις ισομορφές της HP1 και το N-τελικό τμήμα του LBR σε σύντηξη με την GST. Όπως φαίνεται στην Εικ.50, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ανάμεσα στο υλικό που προέρχονταν από τα φυσιολογικά και τα ετερόζυγα ζώα. Επομένως, η αλληλεπίδραση των HP1 ισομορφών και του LBR με τις ιστόνες ποιοτικά είναι η ίδια. Εδώ, αξίζει να σημειωθεί ότι η HP1β φαίνεται να συνδέεται με εντυπωσιακά μεγαλύτερη συγγένεια στα νουκλεοσώματα σε σχέση με τις άλλες δύο ισομορφές. Το φαινόμενο αυτό δεν έχει παρατηρηθεί από άλλους.



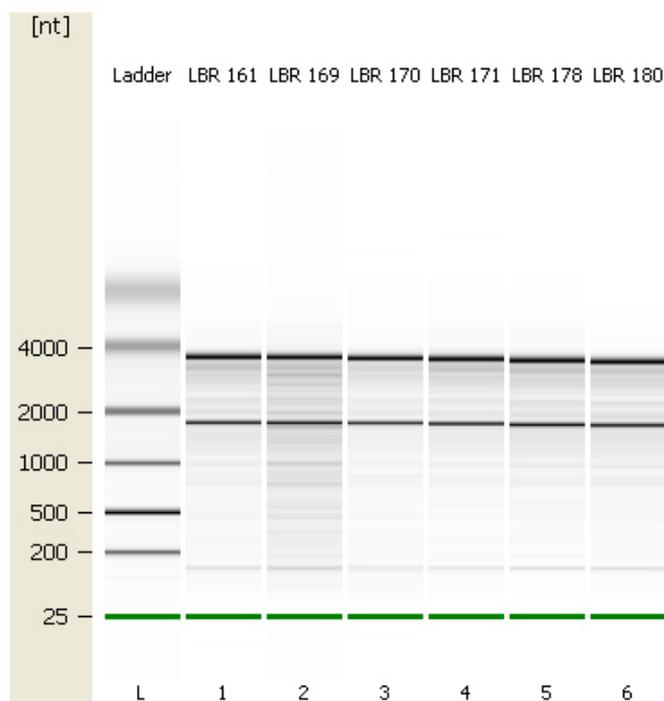
Εικόνα 50: Δοκιμασία συγκατακρήμισης ιστονών από εκχύλισμα πυρηνικών φακέλων με τις ισομορφές της πρωτεΐνης HP1 και το N-τελικό τμήμα του LBR σε σύντηξη με την GST, ανάλυση με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και χρώση με Coomassie Blue. Οι αντιδράσεις έγιναν παρουσία 300mM NaCl και 1% Triton-x100. A) φυσιολογικό, B) ετερόζυγο. (M=μάρτυρες για τα μοριακά βάρη, 1=δείγμα συγκατακρήμισης ελέγχου με την GST, 2=δείγμα συγκατακρήμισης με την HP1α-GST, 3=δείγμα συγκατακρήμισης με την HP1β-GST, 4=δείγμα συγκατακρήμισης με την HP1γ-GST, 5=δείγμα συγκατακρήμισης με τον LBR-GST, 6=LBR-GST, 7=εκχύλισμα πυρηνικών φακέλων).

3.3 Ανάλυση μέσω μικροσυστοιγιών DNA και ποσοτικής PCR (Real Time PCR) στο λεπτό έντερο των Ic^j ποντικών

3.3.1 Ανάλυση με μικροσυστοιχίες DNA

Η αυξημένη θνησιμότητα των ομόζυγων ζώων κατά την ενδομήτρια ζωή και η αδυναμία όσων επιζούν να αναπτυχθούν φυσιολογικά, συνδέει τον LBR με τη διαδικασία της ανάπτυξης. Επίσης, ο καχεκτικός φαινότυπος που παρουσιάζουν τα μεταλλαγμένα ζώα υποδεικνύει πιθανό πρόβλημα στην απορρόφηση τροφής. Αυτά τα δεδομένα, σε συνδυασμό με τα συσσωματώματα χρωματίνης που παρατηρήθηκαν στα εντεροκύτταρα, καθιστούν το λεπτό έντερο ιδανικό για ανάλυση με μικροσυστοιχίες. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε στη μονάδα μικροσυστοιγιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων με τη συνεργασία του Δρ.Κοτσικόρη και υπό την επίβλεψη της επίκουρης καθηγήτριας κ.Πολίτου.

Αρχικά, τμήμα λεπτού εντέρου απομονώθηκε από φυσιολογικά και ομόζυγα Ic^j ποντίκια και το δωδεκαδάκτυλο αφαιρέθηκε. Το ολικό RNA που απομονώθηκε, εξετάστηκε κατόπιν για να προσδιοριστεί η ποσότητα και η ποιότητά του (Εικ.51).



Εικόνα 51: Απεικόνιση του RNA που χρησιμοποιήθηκε για τις μικροσυστοιχίες και την ποσοτική PCR, όπως αυτά εμφανίζονται στον bioanalyzer. Οι τιμές RIN που δόθηκαν ήταν: 161=7,2, 169=7, 170=8, 171=7,5, 178=7,2, 180=7,2.

Για να γίνει δυνατή η ανάλυση με μικροσυστοιχίες, η ποιότητα του RNA πρέπει να είναι η καλύτερη δυνατή. Σύμφωνα με τον κατασκευαστή των μικροσυστοιχιών, η αποδεκτή τιμή RIN (RNA Integrity Number) από τον bioanalyzer πρέπει να είναι από 6,5 και πάνω. Έτσι, ανάλογα με τις τιμές του κάθε δείγματος, επιλέχθηκαν 3 δείγματα από κάθε κατηγορία προς ανάλυση. Ακολούθησε η παραγωγή cDNA, η μετατροπή του σε δίκλωνο RNA και η σήμανσή του με χρωστικές Cy3 και Cy5. Τα τελικά προϊόντα υβριδίστηκαν σε Mouse OneArray™ Microarray (Phalanx Biotech group) και αναλύθηκαν σε ScanArray™ Express (Perkin Elmer,® Inc.). Οι συγκεκριμένες μικροσυστοιχίες δημιουργήθηκαν με βάση το Mouse Exonic Evidence Based Oligonucleotide set (MEEBO) (ελάχιστη έκδοση) και το καθένα περιέχει 31,802 ολιγονουκλεοτίδια: 29,922 από αυτά αντιστοιχούν σε γονίδια του ποντικού, ενώ 1880 είναι πειραματικοί ανιχνευτές ελέγχου της ποιότητας του RNA και της διαδικασίας υβριδοποίησης. Το MEEBO αποτελείται από ανιχνευτές μήκους 70 νουκλεοτιδίων, οι οποίοι είχαν σχεδιαστεί ειδικά για μικροσυστοιχίες DNA από ομάδα ερευνητών του Πανεπιστημίου της Καλιφόρνια και του Stanford με επικεφαλή τον Dr. Ahs Alizadah.

Αναλύθηκαν οι ακόλουθοι συνδυασμοί δειγμάτων:

- 161 (wt/wt) vs 168 (Ic^j/ Ic^j)
- 169 (wt/wt) vs 180 (Ic^j/ Ic^j)
- 170 (wt/wt) vs 171 (Ic^j/ Ic^j) x 3 chips

Το ένα ζεύγος υβριδίστηκε 3 φορές, ώστε να επιβεβαιωθεί η ορθότητα της μεθόδου, όσο και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Στα δεδομένα που συλλέχθηκαν, ελέγχθηκαν πρώτα οι πειραματικοί ανιχνευτές ελέγχου. Αυτό έδειξε ότι σε όλες τις μικροσυστοιχίες ο υβριδισμός έγινε σωστά και οι διαφορές μεταξύ τους ήταν μέσα στα αποδεκτά όρια. Ακολούθησε η κανονικοποίηση των δειγμάτων, ώστε τα πιθανά γονίδια-στόχοι που θα παραληφθούν να μην οφείλονται σε διαφορές στην ένταση φθορισμού των χρωστικών ή στον αυτοφθορισμό. Τα γονίδια-στόχοι επιλέχθηκαν σύμφωνα με έναν βασικό κανόνα: πρέπει να εμφανίζουν διαφορές και στις τρεις ομάδες πειραμάτων. Επίσης, δόθηκε ιδιαίτερη σημασία σε αυτά που μπορούσαν άμεσα να συσχετιστούν με τη λειτουργία του λεπτού εντέρου. Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση σε όλα τα αποτελέσματα και ανιχνεύθηκαν 149 γονίδια ως στατιστικώς σημαντικά, δηλαδή ως γονίδια των οποίων η έκφραση ήταν σημαντικά αυξημένη ή μειωμένη σε σχέση με το φυσιολογικό μάρτυρα. Τα γονίδια αυτά

μπορούν να ομαδοποιηθούν στις ακόλουθες κατηγορίες, ανάλογα με τη λειτουργία τους:

- Μεταγραφικοί παράγοντες: 15 γονίδια
- Παράγοντες ανάπτυξης και κυτταρικός κύκλος: 8 γονίδια
- Λεπτό έντερο και διατροφή: 16 γονίδια
- Ιστόνες: 6 γονίδια
- Ριβόσωμα και μετάφραση: 25 γονίδια
- Κυστίδια μεταφοράς: 5 γονίδια
- Σχήμα, δομή και κίνηση του κυττάρου: 15 γονίδια
- Πρωτεόσωμα και απόπτωση: 7 γονίδια
- Μιτοχόνδριο: 14 γονίδια
- Ανοσοποιητικό σύστημα: 9 γονίδια
- Γονίδια που δεν εντάσσονται σε μια από τις παραπάνω κατηγορίες, αλλά με γνωστή δράση: 13 γονίδια
- Γονίδια άγνωστα ή με μη χαρακτηρισμένη δράση: 16 γονίδια

Στους πίνακες 2-13 που ακολουθούν, παρουσιάζονται αναλυτικά τα γονίδια κάθε ομάδας, σύμφωνα με την αλλαγή στο πρότυπο έκφρασής τους (από το μικρότερο στο μεγαλύτερο).

<u>NAME</u>	<u>MEEBO ID</u>	<u>Fold Change</u>	<u>P value</u>	<u>RT-PCR</u>	<u>FUNCTION</u>
Id3	mMC023409	1,67	0,02189876	-	Inhibit transcription
Id1	mMC014959	1,73	0,03433587	-	Cell growth, senescence, differentiation
Maca	mMC025709	1,87	0,0144326	-	Erythropoiesis, macrophage differentiation
Maf1	mMC020619	1,88	0,00547351	-	Represses pol III transcription
S100a1	mMC014901	1,91	0,02292202	-	Cell cycle progression and differentiation
Smad3	mMC010715	1,92	0,01229064	1,85	TGF-β and activin pathways
Prohibitin 2	mMC002254	1,94	0,010492	-	Transcriptional repression, represses the activity of estrogens, recruits HDAC1
Ybx1	mMR027090	1,95	0,04419029	-	Transcription factor
Creb3l3	mMC007401	1,98	0,02393651	-	Liver-specific transcription factor
Tifa	mMC018951	1,99	0,02413352	-	NF-kappa-B and AP-1 pathway
Klf5	mMR028863	2,01	0,03485297	-	Transcription factor
Btf3	mMC025014	2,08	0,04008249	-	Initiation of transcription
Gnb2	mMC019263	2,1	0,00281405	-	GTP binding protein, modulator/transducer in transmembrane signalling systems
Amnionless	mMC007552	2,21	0,00381509	-	Gastrulation, coreceptor of BMP
Neuritin 1	mMC001979	2,38	2,43E-04	-	Postmitotic-differentiating neurons of the developmental nervous system

Πίνακας 2: Μεταγραφικοί παράγοντες.

<u>NAME</u>	<u>MEEBO ID</u>	<u>Fold Change</u>	<u>P value</u>	<u>RT-PCR</u>	<u>FUNCTION</u>
Amphiregulin	mMC006792	0,39	0,04671589	0	Epidermal growth factor, mitogen
Pellino 2	mMC002540	1,87	0,00386394	-	Interacts with IRAK kinases and TRAF6
Anapc5	mMC019995	1,88	0,01569217	-	Anaphase-promoting complex
Centrin 3	mMC018546	1,93	0,00107936	-	Centrosome duplication and separation
Tetraspanin 15	mMC018996	2,07	0,01002177	-	regulation of cell development, activation, growth and motility
Banf1	mMC024120	2,16	0,02047576	1,9	Nuclear assembly, chromatin organization, gene expression, DNA repair
Granulin	mMC004917	2,49	0,01100315	-	Cell growth, development, wound healing
Cdk4	mMC015649	2,53	0,02604481	-	Control of the cell cycle

Πίνακας 3: Παράγοντες ανάπτυξης και κυτταρικός κύκλος.

<u>NAME</u>	<u>MEEBO ID</u>	<u>Fold Change</u>	<u>P value</u>	<u>RT-PCR</u>	<u>FUNCTION</u>
Wap	mMC013265	0,63	0,04784168	-	Major milk protein
Apoa4	mMR028912	0,64	0,02471776	-	Regulation of food intake
Csn1s2b	mMC008084	0,65	0,04539261	-	Milk protein
Carboxypeptidase E	mMC015127	1,87	0,01158058	-	Prohormone-processing exopeptidase
Mannosidase 2, alpha B1	mMR027510	1,88	0,00832529	-	Lysosomal hydrolase, catabolism of N-linked carbohydrates released during glycoprotein turnover
Slc17a5	mMC016963	1,88	0,01654467	-	Anion sugar transporter in lysosomes
Mucin 2	mMC017590	1,92	0,00879284	-	Muc2- protects the mucosa from infection and chemical damage
Transketolase	mMC019217	1,93	0,02410629	-	Connects the pentose phosphate pathway to glycolysis
Phosphoglycerate kinase 1	mMC023445	2,02	0,00321768	-	Glycolytic enzyme
Cathepsin Z	mMC003875	2,06	0,03067908	-	Lysosomal cysteine proteinase, protein recycling
Mfge8	mMC002993	2,07	0,02246046	-	Intestinal epithelial homeostasis and promotion of mucosal healing
Myosin VIIB	mMC007472	2,18	0,02969763	-	Actin-based motor molecules with ATPase activity, may be have a role in the apical membranes of transporting epithelia
Apob	mMC010539	2,61	0,03894685	-	Apolipoprotein of chylomicrons and low density lipoproteins
Spink4	mMC011978	2,85	0,01622947	-	Serine peptidase inhibitor
Cideb	mMC011287	3	0,01167793	-	Lipogenesis and fatty acid oxidation, Activates apoptosis
Glucose-6-phosphatase	mMC018099	3,23	0,04485118	-	Glucose homeostasis, gluconeogenesis and glycogenolysis

Πίνακας 4: Γονίδια που σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με το λεπτό έντερο και τη διατροφή.

<u>NAME</u>	<u>MEEBO ID</u>	<u>Fold Change</u>	<u>P value</u>	<u>RT-PCR</u>	<u>FUNCTION</u>
Hist1h2ak	mMC019924	1,94	0,00786196	-	H2A variant, nucleosome assembly
Hist1h2ao	mMR029755	1,94	0,02603306	-	H2A variant, nucleosome assembly
Hist1h2ad	mMC023048	1,97	0,02266956	-	H2A variant, nucleosome assembly
Hist2h3b	mMR029187	2,04	0,03725817	-	H3 variant, nucleosome assembly
Hist1h3h	mMC019528	2,27	0,02140623	-	H3 variant, nucleosome assembly
Hist1h1c	mMC010699	2,37	0,00275854	-	H1 variant, nucleosome assembly

Πίνακας 5: Γονίδια ιστονών.

<u>NAME</u>	<u>MEEBO ID</u>	<u>Fold Change</u>	<u>P value</u>	<u>RT-PCR</u>	<u>FUNCTION</u>
Eif2s3y	mMR027258	0,28	0,02938514	-	Initiation of translation
Eif3h	mMC020183	1,9	0,00544564	-	eIF-3 complex, initiation of translation
Rpl7a	mMC022677	1,91	0,00840405	-	Ribosomal protein
Dnajc2	mMR026805	1,93	0,04694727	-	Molecular chaperone for nascent polypeptide chains
Eif1b	mMC007531	1,93	0,00419314	-	Initiation of translation
Rpl21	mMC026111	1,96	0,00223692	-	Ribosomal protein
Nars	mMC008694	1,96	0,03257879	-	Charge tRNAs with aspartic acid
Eif4a3	mMC022795	1,98	0,0091517	-	ATP-dependent RNA helicase, mark the position of the exon-exon junction (by similarity)
Hsp90ab1	mMR028193	1,99	0,00662621	-	Molecular chaperone, folding of new proteins
Cct8	mMC011106	2	0,03161522	-	Molecular chaperone, folding of new proteins
Rpl10a	mMC021075	2	0,01840924	-	Ribosomal protein
Rpl36a	mMC019197	2	0,00245967	-	Ribosomal protein
Eif4g1	mMC016698	2	0,01452443	-	Protein complex EIF4F, recognition of the mRNA cap, ATP-dependent unwinding of 5'-terminal secondary structure, and recruitment of mRNA to the ribosome
Pcbp2	mMC024323	2,03	0,02357459	-	Poly(rC)-binding protein
Pabpc1	mMC020622	2,05	0,01110566	-	Poly(A) shortening and translation initiation
Rps16	mMC024605	2,09	0,00738037	-	Ribosomal protein
Rpl35	mMC020512	2,13	0,04192144	-	Ribosomal protein
Eef2	mMC019510	2,13	0,00730151	-	GTP-dependent translocation of the nascent protein chain from the A-site to the P-site of the ribosome
Sec61a1	mMC002055	2,17	0,00437751	-	Insertion of secretory and membrane polypeptides into the ER
Eef1g	mMC024230	2,2	0,0186494	-	Enzymatic delivery of aminoacyl tRNAs to the A-site of the ribosome
Rnase4	mMC022128	2,25	0,00127555	-	mRNA cleavage
Rpl7	mMC023558	2,29	0,00487111	-	Ribosomal protein
Rpl26	mMC020135	2,34	0,02543455	-	Ribosomal protein
Rpl32	mMC020534	2,38	0,02551998	-	Ribosomal protein
Fau	mMC024877	2,5	0,03373219	-	Ribosomal protein

Πίνακας 6: Ριβόσωμα και μετάφραση.

<u>NAME</u>	<u>MEEBO ID</u>	<u>Fold Change</u>	<u>P value</u>	<u>RT-PCR</u>	<u>FUNCTION</u>
Sec13	mMC006087	1,8	0,03755298	-	Vesicle biogenesis from endoplasmic reticulum during the transport of proteins, COPII coat
Sec31a	mMC004312	1,86	0,0569465	-	Vesicle biogenesis from endoplasmic reticulum during the transport of proteins, COPII coat
Atp6v1e1	mMR001536	1,99	0,0114988	-	Acidification of intracellular organelles, vacuolar
Vapa	mMC017223	2,11	0,01146284	-	Vesicle trafficking
Caveolin 1	mMC023773	2,14	0,02883801	-	Main component of the caveolae plasma membranes

Πίνακας 7: Γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες των κυστιδίων μεταφοράς.

<u>NAME</u>	<u>MEEBO ID</u>	<u>Fold Change</u>	<u>P value</u>	<u>RT-PCR</u>	<u>FUNCTION</u>
Claudin 3	mMC007576	1,88	0,01227277	-	Tight junction, cell-cell adhesion
Tubulin b6	mMC017434	1,91	0,01730658	-	Microtubules formation
Tgfb1	mMC013507	1,94	0,03710567	-	Cell adhesion, cell-collagen interactions
Pdlim3	mMC004603	1,95	0,00141746	-	Cytoskeletal assembly
Serpinh1	mMC021955	1,96	0,00785925	-	Chaperone in the biosynthetic pathway of collagen
Pdlim1	mMR029623	1,97	0,01388961	-	Cytoskeletal protein that binds other proteins to the cytoskeleton
Wdr1	mMC005175	2,05	0,02356104	-	Disassembly of actin filaments
Annexin A6	mMC007924	2,03	0,01518434	-	Regulation of muscle contraction and calcium ion transport
Collagen type 4a2	mMC008904	2,3	0,02459909	-	Collagen formation
Sparc	mMC010599	2,44	0,00769222	-	Cell shape, inhibits cell-cycle progression and influences the synthesis of extracellular matrix
Myosin 19	mMC013525	2,58	0,03765132	-	Regulation of both smooth muscle and nonmuscle cell contractile activity
Stathmin 1	mMC025918	2,66	0,01748854	-	Regulation of the microtubule filament system by destabilizing microtubules
Vimentin	mMC000916	2,77	0,00397512	2	Intermediate filament, maintains cell shape, integrity of the cytoplasm, and stabilizing cytoskeletal interactions
Myosin 1k	mMC012553	2,95	0,03045661	-	Phosphorylates myosin regulatory light chains to facilitate myosin interaction with actin filaments to produce contractile activity
Actin alpha 2	mMC021908	3,27	0,00172695	-	Cell motility, structure and integrity

Πίνακας 8: Γονίδια που επηρεάζουν το σχήμα, τη δομή και την κίνηση του κυττάρου.

<u>NAME</u>	<u>MEEBO ID</u>	<u>Fold Change</u>	<u>P value</u>	<u>RT-PCR</u>	<u>FUNCTION</u>
Dub1	mMR029624	0,6	0,00470818	-	Deubiquitinating enzyme 1
Psme1	mMR029451	1,95	0,0422086	-	Immunoproteasome assembly, efficient antigen processing
Bat3	mMC002509	1,99	0,00217487	-	Control of apoptosis
Psmb10	mMR026304	2,04	0,00917982	-	Member of proteasome
Psma2	mMC021170	2,11	0,00247314	-	Member of proteasome
Pdcd4	mMR030236	2,24	0,03312118	-	Apoptosis
Ifi30	mMC022339	2,84	0,01138509	-	Lysosomal thiol reductase that at low pH can reduce protein disulfide bonds, unfolding of proteins destined for lysosomal degradation

Πίνακας 9: Πρωτεόσωμα και απόπτωση.

<u>NAME</u>	<u>MEEBO ID</u>	<u>Fold Change</u>	<u>P value</u>	<u>RT-PCR</u>	<u>FUNCTION</u>
ATP synthase 6	mMR028728	0,54	0,03655182	-	ATP synthesis F0 complex
Iscu	mMC022796	1,87	0,03234782	-	Iron-sulfur cluster biosynthesis
NADH dehydrogenase a5	mMC019781	1,91	0,02142946	-	Transfers electrons from NADH to ubiquinone
Cps1	mMC020899	1,92	0,00693901	-	Removal of excess urea from cells
Got2	mMR031041	1,93	0,00754405	-	Role in amino acid metabolism and the urea and tricarboxylic acid cycles
Mtch1	mMC006304	1,95	0,00131932	-	Mitochondrial transporter
Cytochrome c-1	mMC020161	2,07	0,02436499	-	Mitochondrial respiratory chain
Monoamine oxidase B	mMC018106	2,11	0,0186374	-	Catalyzes the oxidative deamination of biogenic and xenobiotic amines, metabolism of neuroactive and vasoactive amines
Slc25a5	mMC024960	2,17	0,04705576	-	Catalyzes the exchange of ADP and ATP across the mitochondrial inner membrane
NADH dehydrogenase flavoprotein 1	mMC015211	2,24	0,00183666	-	Transfer of electrons from NADH to the respiratory chain
Cytochrome c oxidase 5a	mMC003771	2,31	0,02719889	-	Terminal oxidase in mitochondrial electron transport
NADH dehydrogenase Fe-S protein 2	mMC019049	2,59	0,02474451	-	Mitochondrial membrane respiratory chain NADH dehydrogenase
Slc25a3	mMC001804	2,61	0,03350552	-	Transport of phosphate groups from the cytosol to the mitochondrial matrix
ATP synthase 5b	mMC006983	3,36	0,03105689	-	ATP synthase F1 complex

Πίνακας 10: Γονίδια που τα προϊόντα τους εντοπίζονται στο μιτοχόνδριο.

<u>NAME</u>	<u>MEEBO ID</u>	<u>Fold Change</u>	<u>P value</u>	<u>RT-PCR</u>	<u>FUNCTION</u>
Lgals3bp	mMC013038	1,94	0,01019429	-	Immune response associated with natural killer and lymphokine-activated killer cell
Cbara1	mMC017249	1,96	0,00669736	-	Induces T helper 1-mediated autoreactivity
Mif	mMC021052	1,96	0,04444085	-	Cell-mediated immunity, immunoregulation, and inflammation
Ifitm3	mMC010751	2,31	0,00385627	-	Immune system, interferon
Dmbt1	mMC001577	2,39	0,02612517	-	Tumor suppressor gene, mucosal defense system, epithelial differentiation
Interleukin 18	mMC021817	2,5	0,04357496	-	Augments natural killer cell activity, stimulates interferon gamma production in T-helper type I cells
Defensin a4	mMC026119	2,78	0,00114771	-	Host defense, corticostatic activity and inhibits corticotropin stimulated corticosterone production
Reg3g	mMC003835	3,75	0,04366194	-	Stress protein involved in the control of bacterial proliferation, antimicrobial peptide produced by paneth cells
Reg3b, Pap	mMC012894	4,9	0,03410391	13,36	α -cells of Langerhans islets, regenerating pangreatic islets, pancreatic inflammation, stress protein involved in the control of bacterial proliferation, antimicrobial peptide produced by paneth cells, activate Jak kinase

Πίνακας 11: Ανοσοποιητικό σύστημα.

<u>NAME</u>	<u>MEEBO ID</u>	<u>Fold Change</u>	<u>P value</u>	<u>RT-PCR</u>	<u>FUNCTION</u>
Prdx6	mMR030113	0,44	0,0197462	-	Redox regulation, regulation of phospholipid turnover
Urod	mMC008652	1,91	0,00751094	-	Fifth enzyme of the heme biosynthetic pathway
Cd82	mMC023499	1,93	5,27E-04	-	Metastasis suppressor, MHC class II complex
Rpn2	mMC017256	1,97	0,00655173	-	Links high mannose oligosaccharides to asparagine residues
Calml4	mMC013786	1,97	0,0379722	-	Calcium ion binding
Ace	mMC008704	1,97	0,02064678	-	Converts angiotensin I to angiotensin II, degrades bradykinin
Cytochrome b5	mMC000964	1,99	0,00122025	-	Electron carrier for membrane bound oxygenases, sterol and lipid biosynthesis pathway (ER)
Papss1	mMC010635	2,12	0,00458821	-	Sulfate donor cosubstrate for all sulfotransferase (SULT) enzymes
Gstp1	mMR026924	2,14	0,04138393	-	Conjugation of reduced glutathione
Hint1	mMC015783	2,18	0,01751246	-	Hydrolyzes adenosine 5'-monophosphoramidate substrates
Gstp1	mMC025098	2,33	0,01212049	-	Conjugation of reduced glutathione
H2-Q6	mMC020333	2,63	0,02974306	-	Antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I.
Abp1	mMC017902	2,69	0,01741643	-	Deaminates putrescine and histamine

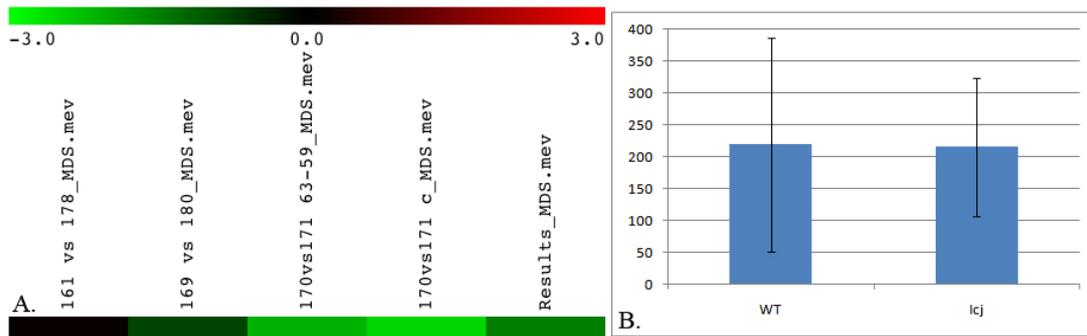
Πίνακας 12: Γονίδια που δεν εντάσσονται σε μια από τις παραπάνω κατηγορίες, αλλά με γνωστή δράση.

<u>NAME</u>	<u>MEEBO ID</u>	<u>Fold Change</u>	<u>P value</u>	<u>RT-PCR</u>	<u>FUNCTION</u>
NA	mMC004135	0,58	0,01949307	-	RIKEN cDNA
N6amt1	mMC011920	1,9	0,0110176	-	Putative protein methyltransferase
NA	mMC025408	1,95	0,01819831	-	RIKEN cDNA
Tmem205	mMC023440	1,96	0,03964073	-	Membrane protein
Maged2	mMC008777	1,98	0,00280922	-	Possible p53-dissociator
Tmem147	mMC002067	2	0,0066171	-	Transmembrane protein, Nicalin-NOMO protein complex
Fam132a	mMC007411	2	0,02327547	-	Unknown
Pttg1ip	mMC008056	2,02	0,04559585	-	May facilitate nuclear translocation of PTTG1
AU019823	mMC019743	2,03	0,02944716	-	Unknown
NA	mMR030111	2,08	0,03870633	-	Unknown
U2af114	mMC021191	2,09	0,00235834	-	RNA splicing and mRNA processing
Slc35b1	mMC003303	2,12	0,01244844	-	Probable sugar transporter
NA	mMR030063	2,14	0,03304383	-	Unknown
Yipf1	mMC007195	2,21	0,0181244	-	Unknown
Amdhd2	mMC010884	2,44	0,02778039	-	Carbohydrate metabolic process.
NA	mMR029930	2,58	0,01272874	-	Unknown

Πίνακας 13: Γονίδια άγνωστα ή με μη χαρακτηρισμένη δράση.

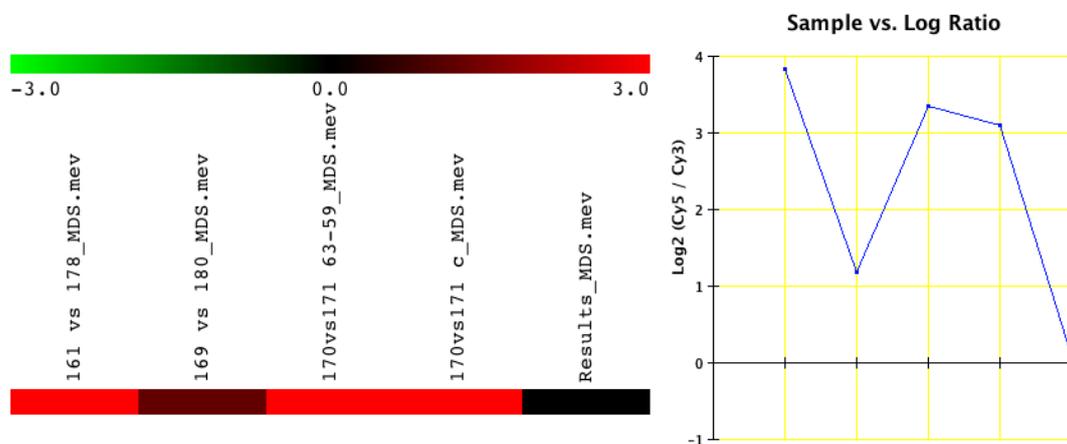
3.3.2 Ανάλυση γονιδίων-στόχων με ποσοτική PCR (Real-Time PCR)

Ο πρώτος και κύριος τρόπος επιβεβαίωσης της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων μιας μικροσυστοιχίας DNA είναι η ποσοτική PCR. Έτσι, το ίδιο RNA που χρησιμοποιήθηκε στις μικροσυστοιχίες, χρησιμοποιήθηκε και σε αντιδράσεις ποσοτικής PCR για επιλεγμένα γονίδια. Αρχικά, δοκιμάστηκαν τα Eif2s3y και Reg3b, ως τα γονίδια που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη μείωση (0,28) και τη μεγαλύτερη αύξηση (4,9) στη μεταγραφή τους, αντίστοιχα. Τα δεδομένα που αφορούσαν το γονίδιο Eif2s3y δυστυχώς δεν επιβεβαιώθηκαν και για αυτό στη συνέχεια δοκιμάστηκε το αμέσως επόμενο, που ήταν το Areg (0,39). Στην περίπτωση αυτή, η ποσοτική PCR επιβεβαίωσε την αλλαγή στο πρότυπο έκφρασης, αλλά όπως φαίνεται στην εικόνα 52, αυτή δεν ήταν η αναμενόμενη. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι πολλές φορές η μείωση της μεταγραφής ενός γονιδίου που εντοπίζεται στις μικροσυστοιχίες δεν επιβεβαιώνεται πάντα, όταν το αντίστοιχο γονίδιο υποβληθεί σε ποσοτική PCR. Στην περίπτωση αυτή, συνήθως θεωρούνται ως σωστά τα αποτελέσματα της ποσοτικής PCR.

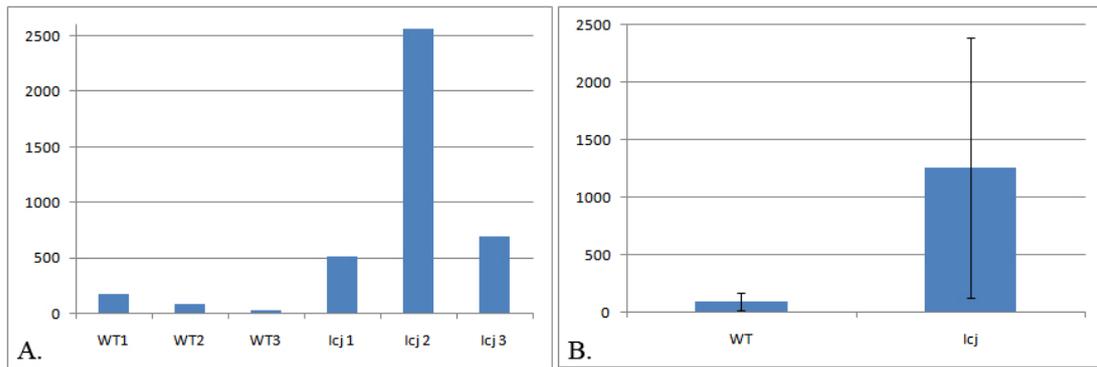


Εικόνα 52: Α) Αποτελέσματα μικροσυστοιχιών ανά πείραμα για το γονίδιο *Areg* (0,39 fold decrease, $p=0,047$). Με κόκκινο αντιπροσωπεύεται η αύξηση της έκφρασης και με πράσινο η μείωση. Β) Αποτελέσματα ποσοτικής PCR για το γονίδιο *Areg* ($p=0.9740$). Απεικονίζεται ο μέσος όρος από όλα τα δείγματα. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα φυσιολογικά και στα ομόζυγα ζώα.

Η αλλαγή στο πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *Reg3b/Pap*, επιβεβαιώθηκε, όπως φαίνεται στις εικόνες 53-54.

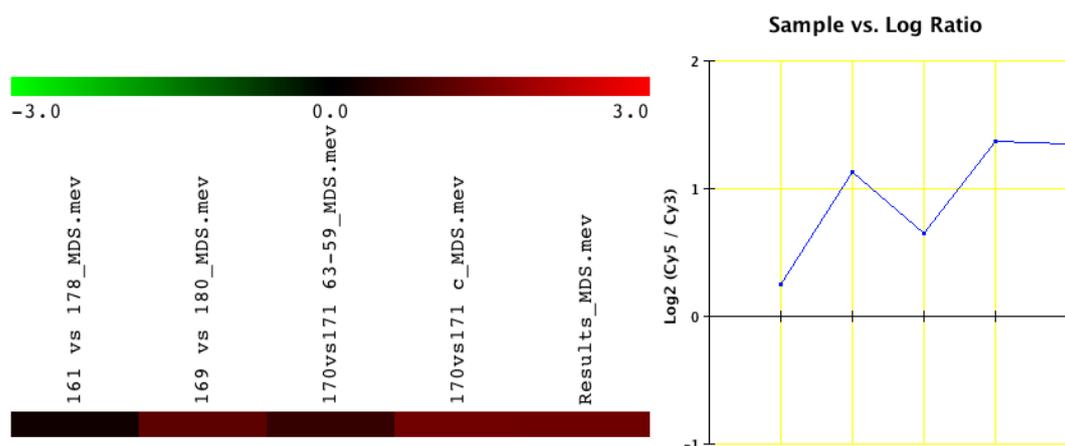


Εικόνα 53: Αποτελέσματα μικροσυστοιχιών ανά πείραμα για το γονίδιο *Reg3b/Pap* (4,9 fold increase, $p=0,034$). Με κόκκινο αντιπροσωπεύεται η αύξηση της έκφρασης και με πράσινο η μείωση.

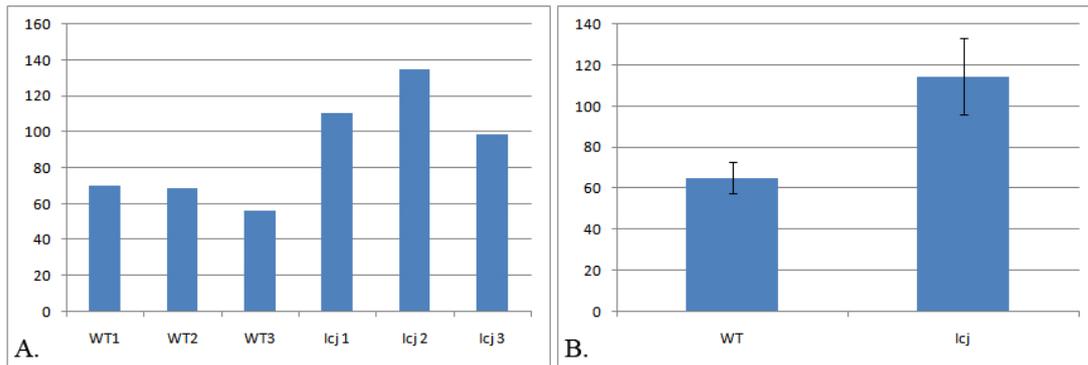


Εικόνα 54: Α) Ποσοτική PCR για το γονίδιο Reg3b/Pap. Υπάρχει μεγάλη διαφορά ανάμεσα στα ομόζυγα ζώα. Φαίνεται καθαρά όμως η αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου. Β) Απεικόνιση του μέσου όρου των αποτελεσμάτων της ποσοτικής PCR (13,39 fold increase, $p=0,1495$). Απαιτούνται πολλά περισσότερα δείγματα, ώστε να μειωθεί το εύρος λάθους.

Ακολούθησε ανάλυση των γονιδίων Smad3, Banf1, Vimentin (Vim) και I-FABP2. Τα γονίδια αυτά επιλέχθηκαν είτε γιατί έχουν άμεση ή έμμεση σχέση με τον LBR και τον πυρηνικό φάκελο, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (βλέπε συζήτηση), είτε γιατί μπορούν να συσχετιστούν με το φαινότυπο του ομόζυγου ζώου στο λεπτό έντερο. Το Smad3, στην ανάλυση μικροσυστοιχιών, εμφανίστηκε να αυξάνεται περίπου 1,9 φορές σε σχέση με το μάρτυρα. Η ποσοτική PCR επιβεβαίωσε το αποτέλεσμα αυτό (Εικ.55-56).

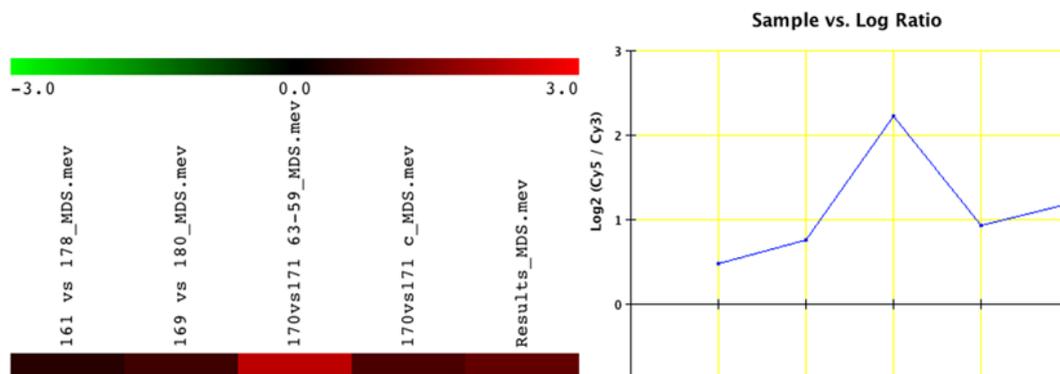


Εικόνα 55: Αποτελέσματα μικροσυστοιχιών ανά πείραμα για το γονίδιο Smad3 (1,92 fold increase, $p=0,012$). Με κόκκινο αντιπροσωπεύεται η αύξηση της έκφρασης και με πράσινο η μείωση.

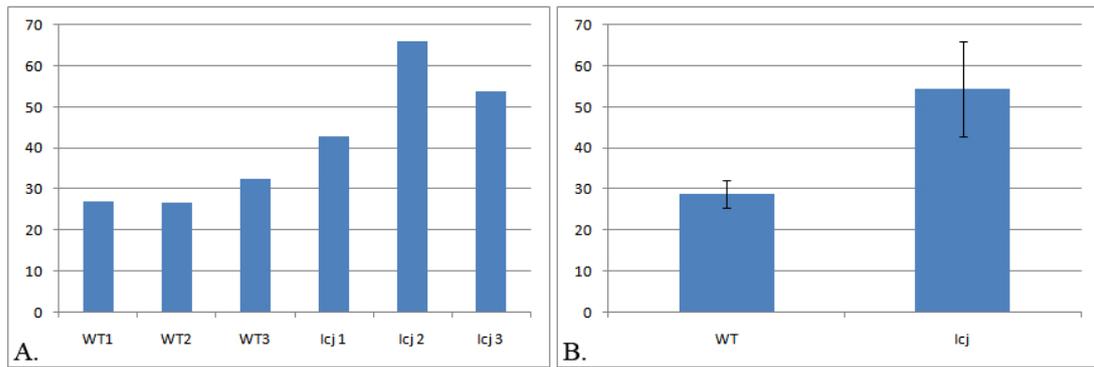


Εικόνα 56: Α) Ποσοτική PCR για το γονίδιο Smad3. Β) Απεικόνιση του μέσου όρου των αποτελεσμάτων της ποσοτικής PCR (1,76 fold increase, $p=0,0130$).

Η αλλαγή στο πρότυπο έκφρασης του Baf1 ή αλλιώς Baf1 παρουσιάστηκε, στην ανάλυση μικροσυστοιχιών, ως αύξηση περίπου 2,1 φορές. Αυτό επίσης επιβεβαιώθηκε με ποσοτική PCR, η οποία αποκάλυψε μια διαφορά της τάξεως του 1,9 (Εικ.57-58).

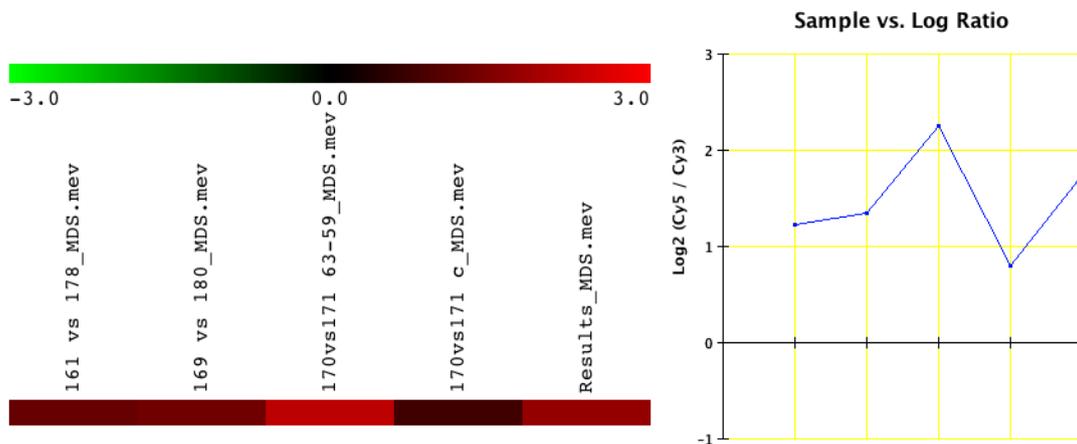


Εικόνα 57: Αποτελέσματα μικροσυστοιχιών ανά πείραμα για το γονίδιο Baf1 (2,16 fold increase, $p=0,02$). Με κόκκινο αντιπροσωπεύεται η αύξηση της έκφρασης και με πράσινο η μείωση.

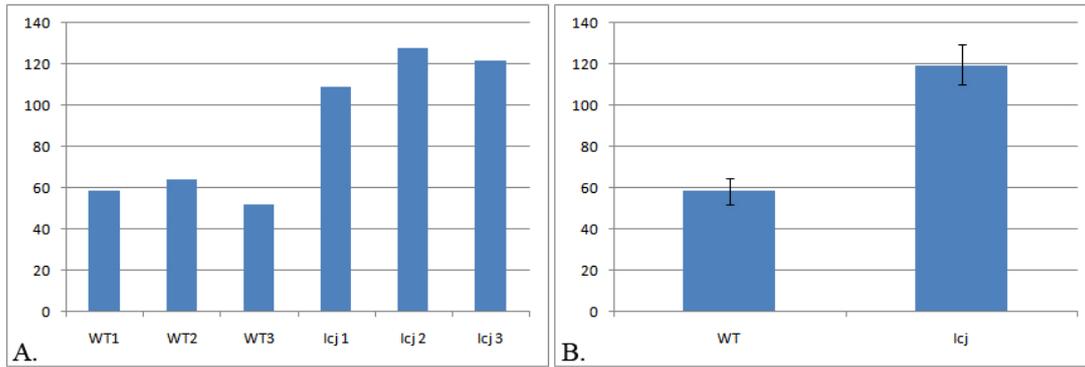


Εικόνα 58: A) Ποσοτική PCR για το γονίδιο Baf1. B) Απεικόνιση του μέσου όρου των αποτελεσμάτων της ποσοτικής PCR (1,88 fold increase, $p=0,0211$).

Το γονίδιο Vimentin, που εμφανίστηκε να εκφράζεται 2,8 φορές παραπάνω στο ic^J ποντίκι (Εικ.59), επιβεβαιώθηκε με ποσοτική PCR, η οποία έδειξε μια αύξηση περίπου 2 φορές, όπως φαίνεται στην εικόνα 60.

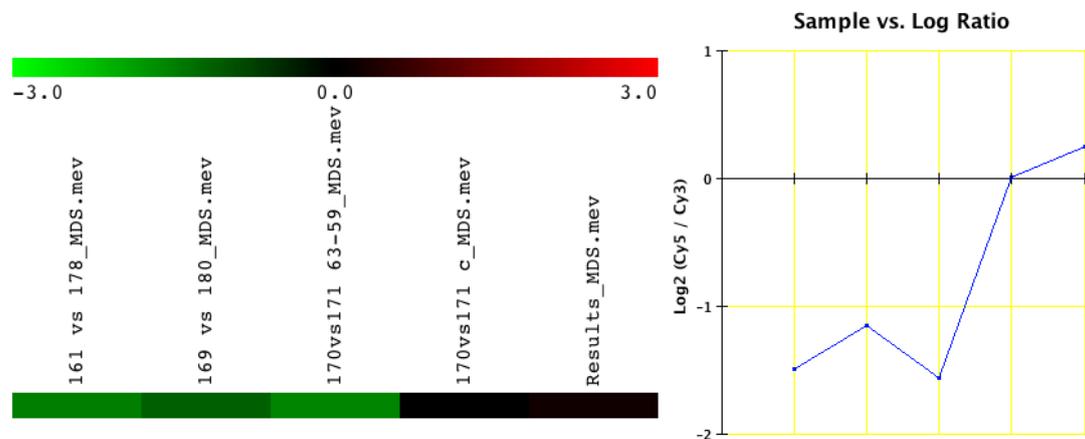


Εικόνα 59: Αποτελέσματα μικροσυστοιχιών ανά πείραμα για το γονίδιο Vimentin (2,77 fold increase, $p=0,004$). Με κόκκινο αντιπροσωπείται η αύξηση της έκφρασης και με πράσινο η μείωση.

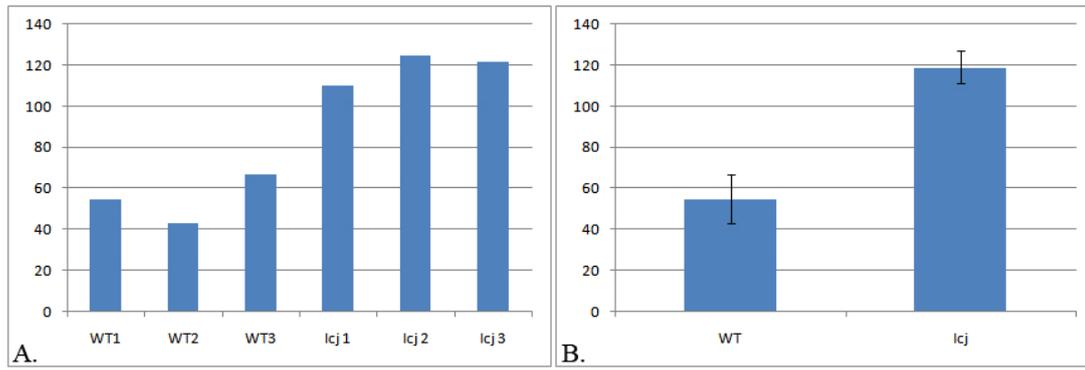


Εικόνα 60: A) Ποσοτική PCR για το γονίδιο Vim. B) Απεικόνιση του μέσου όρου των αποτελεσμάτων της ποσοτικής PCR (2,05 fold increase, $p=0,0008$).

Το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου I-FABP2 έδειξε μία σημαντική μείωση σε 3 πειράματα ανάλυσης μικροσυστοιχιών (0,38), όπως φαίνεται στην εικόνα 61. Στα άλλα δύο δεν έδωσε κάποιο αποτέλεσμα και για το λόγω αυτό δεν υπάρχει στους παραπάνω πίνακες. Στην ποσοτική PCR αντίθετα παρουσίασε αύξηση 2,16 φορές. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν στατιστικώς σημαντικά ($p=0,0015$) (Εικ.62).



Εικόνα 61: Αποτελέσματα μικροσυστοιχιών ανά πείραμα για το γονίδιο I-FABP2 (0,38 fold decrease, $p=0,008$). Με κόκκινο αντιπροσωπεύεται η αύξηση της έκφρασης και με πράσινο η μείωση.



Εικόνα 62: Α) Ποσοτική PCR για το γονίδιο I-FABP2. Β) Απεικόνιση του μέσου όρου των αποτελεσμάτων της ποσοτικής PCR (2,16 fold increase, $p=0,0015$).

Συζήτηση

4.1 Ανοσοϊστοχημική μελέτη

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η ιχθύωση (ic^J) στα ποντίκια οφείλεται στην εισαγωγή δύο βάσεων CC στη θέση 1088 στο γονίδιο του LBR. Αυτό προκαλεί αλλαγή στα αμινοξέα 365 έως 385, ενώ στη θέση 386 εμφανίζεται ένα κωδικόνιο λήξης. Ο φαινότυπος των ομόζυγων ζώων χαρακτηρίζεται από: α) αυξημένη θνησιμότητα πριν τη γέννηση, β) καχεξία, γ) αλωπεκία, δέρμα με σκληρά λέπια, διαστολή των θυλάκων της τρίχας και επιδερμική υπερπλασία με ορθοκερατική υπερκεράτωση, δ) συσσωματώματα χρωματίνης στον πυρηνικό φάκελο των λευκοκυττάρων και των εντεροκυττάρων. Έως σήμερα, έχει πραγματοποιηθεί μια σειρά μελετών πάνω σε αυτά τα ζώα και στις μεταλλάξεις του LBR, όμως καμία από αυτές δεν μπόρεσε να εξηγήσει επαρκώς την παθογένεση της ασθένειας.

Ως αρχική προσέγγιση, αποφασίστηκε να γίνει μια εκτενής ανοσοϊστοχημική μελέτη σε τομές παραφίνης και κρυοστάτη χρησιμοποιώντας φυσιολογικά και μεταλλαγμένα στελέχη ποντικών. Για προφανείς λόγους, ο πρώτος ιστός που εξετάστηκε ήταν το δέρμα. Οι χρώσεις αιματοξυλίνης-ηωσίνης έδειξαν ότι ο σχηματισμός της τρίχας είναι φυσιολογικός. Επίσης, χρώσεις με αντισώματα τόσο για τον LBR, όσο και για τις λαμίνες A/C και τη λαμίνη B δεν αποκάλυψαν διαφορές. Παρατηρήθηκε όμως, ότι η υπερπαραγωγή κερατίνης δημιουργεί ένα είδος «πώματος» στην είσοδο των θυλάκων των τριχών, με αποτέλεσμα να εμποδίζει την έξοδο και πιθανώς τη φυσιολογική αύξηση της τρίχας. Αυτό υποστηρίζεται περαιτέρω από τα στοιχεία δευτερεύουσας φλεγμονής, τα οποία εντοπίζονται κοντά στα τριχοθυλάκια.

Ο επόμενος ιστός που μελετήθηκε ήταν ο σπλήνας, το όργανο με τη μεγαλύτερη συσσώρευση λεμφοκυττάρων. Από άποψη αρχιτεκτονικής του ιστού, δεν εντοπίστηκε κάτι αξιοσημείωτο. Οι χρώσεις αιματοξυλίνης-ηωσίνης επιβεβαίωσαν την αρχική δημοσίευση των Shultz et al, για την παρουσία συσσωματωμάτων χρωματίνης στον πυρηνικό φάκελο τόσο των λεμφοκυττάρων, όσο και των λευκοκυττάρων που εντοπίζονται εκεί. Χρώσεις με αντισώματα για τον LBR, τις λαμίνες A/C και τη λαμίνη B παρουσίασαν την αναμενόμενη κατανομή.

Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά των ομόζυγων ζώων, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι η καχεξία. Η κατάσταση αυτή προέρχεται συνήθως από αδυναμία απορρόφησης της τροφής ή από αυξημένο βασικό μεταβολισμό. Για το λόγο αυτό,

εξετάστηκαν ορισμένα βασικά όργανα του πεπτικού συστήματος (στόμαχος, λεπτό και παχύ έντερο, το ήπαρ) και οι νεφροί. Χρώσεις αιματοξυλίνης-ηωσίνης στο στόμαχο, το παχύ έντερο, το ήπαρ και τους νεφρούς δεν έδειξαν ανωμαλίες στη δομή των ιστών, αλλά στο λεπτό έντερο τα πράγματα ήταν διαφορετικά. Ενώ η αρχιτεκτονική του ιστού ήταν απόλυτα φυσιολογική, παρατηρήθηκαν συσσωματώματα χρωματίνης στους πυρήνες των εντεροκυττάρων. Ο φαινότυπος αυτός δεν είχε την ίδια διείσδυση σε όλα τα ομόζυγα ζώα και εκτεινόταν σε όλο το μήκος του λεπτού εντέρου, ανεξάρτητα από την περιοχή. Υπήρξαν περιπτώσεις όπου το ίδιο ζώο είχε κάποιες λάχνες με ανώμαλο επιθήλιο και κάποιες με φυσιολογικό. Σε άλλες πάλι, όλο το εντερικό επιθήλιο παρουσίαζε χαρακτηριστικά συσσωματώματα στον πυρήνα. Κάθε λάχνη όμως εμφάνιζε επιλεκτικά είτε τον ένα είτε τον άλλο φαινότυπο. Δεν παρατηρήθηκε μίξη των δύο, όπως και δεν υπήρξαν ομόζυγα ζώα με απόλυτα φυσιολογικό εντερικό επιθήλιο. Τα επιθήλια του στομάχου και του παχέος εντέρου μοιάζουν αρκετά με το επιθήλιο του λεπτού εντέρου, όμως αυτά, όπως δείχθηκε, δεν παρουσίαζαν κάποια ανωμαλία. Η ιδιαιτερότητα του μωσαϊκού αυτού φαινοτύπου ίσως να οφείλεται σε ανωμαλίες στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα που εντοπίζονται στις κρύπτες. Τα κύτταρα αυτά είναι εκείνα που διαφοροποιούνται μεταναστεύοντας κατά μήκος των λαχνών και παράγουν τα εντεροκύτταρα. Περαιτέρω μελέτη των παραπάνω ιστών με αντισώματα για τον LBR, τις λαμίνες A/C και τη λαμίνη B δεν έδειξαν κάποια διαφορά. Τομές κρουστάτη του λεπτού εντέρου και του ήπατος μελετήθηκαν επίσης με αντισώματα για τη βασική κερατίνη 8 των εντεροκυττάρων και των ηπατοκυττάρων και την κερατίνη 19. Δεν παρατηρήθηκαν όμως διαφορές ως προς την έκφραση και την κατανομή των πρωτεϊνών αυτών.

Οι πνεύμονες, η καρδιά και ο εγκέφαλος ήταν οι τελευταίοι ιστοί που μελετήθηκαν. Οι χρώσεις με αιματοξυλίνη-ηωσίνη δεν έδειξαν ατυπίες ως προς τη δομή των οργάνων ή των κυττάρων που περιέχουν. Η απουσία συσσωρεύσεων χρωματίνης στα κύτταρα του εγκεφάλου αποδόθηκε στην ελλιπή διείσδυση του φαινοτύπου. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις με αντισώματα για τον LBR, τις λαμίνες A/C και τη λαμίνη B δεν έδειξαν διαφορές.

Αυτό το πρώτο μέρος της μελέτης αποκάλυψε ένα πολύ ενδιαφέρον φαινόμενο στο λεπτό έντερο των ομόζυγων ζώων που αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω. Ο μωσαϊκός φαινότυπος, δηλαδή η παρουσία συσσωματωμάτων χρωματίνης, πιθανώς αλλάζει τον βαθμό συμπύκνωσης της χρωματίνης και κατ'επέκταση την προσβασιμότητα αυτής σε μεταγραφικούς παράγοντες. Έτσι, προφανώς μεταβάλλεται

η γονιδιακή έκφραση. Η μεταβολή αυτή έχει ως αποτέλεσμα μια σειρά άλλων αλλαγών στον «ενζυματικό εξοπλισμό» και όχι μόνο των εντεροκυττάρων. Η μεταβολή στη γονιδιακή έκφραση ίσως να εξηγήσει την καχεξία και τελικά τον θάνατο όσων ζώων γεννιούνται, πιθανώς από έλλειψη απορρόφησης θρεπτικών υλών.

4.2 Βιοχημική ανάλυση

Οι ιστόνες είναι οι βασικές πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά ο LBR (βλέπε Εισαγωγή). Πρόκειται για τα δομικά στοιχεία του νουκλεοσώματος. Οι πρωτεΐνες αυτές φέρουν μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις στις «ουρές» τους, οι οποίες ρυθμίζουν θετικά ή αρνητικά τη γονιδιακή έκφραση. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της H3 και της H2A με φασματοσκοπία μάζας MALDI-TOF από απομονωμένες ολικές ιστόνες. Με τον τρόπο αυτό ελέγχθηκε τόσο η παρουσία των διαφόρων ισομορφών των πρωτεϊνών αυτών, όσο και η ύπαρξη κλασσικών μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης δεν έδειξαν ουσιαστικές διαφορές, γεγονός που επιβεβαιώθηκε με ανάλυση κατά western.

Οι ιστόνες συνδέονται όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία και με άλλες πρωτεΐνες εκτός του LBR. Για να ελεγχθεί λοιπόν η ικανότητά τους αυτή, πραγματοποιήθηκαν πειράματα συγκατακρήμνισης από εκχύλισμα πυρηνικών φακέλων που συλλέχθηκαν από φυσιολογικά και ετερόζυγα ζώα. Οι πρωτεΐνες που επιλέχθηκαν ως «δόλωμα» ήταν οι τρεις ισομορφές της HP1 και ο LBR. Παρόλα αυτά από τα αποτελέσματα δεν προέκυψαν ποιοτικές διαφορές στη σύνδεση των ιστονών με καμία από τις τέσσερις πρωτεΐνες ανάμεσα στα δύο δείγματα.

4.3 Μελέτη της αλλαγής του προτύπου έκφρασης των γονιδίων του λεπτού εντέρου

Έως τώρα, οι κλασσικές μέθοδοι δεν αποκάλυψαν κάτι σημαντικό, εκτός από το λεπτομερέστερο χαρακτηρισμό του φαινοτύπου στους πυρήνες των εντεροκυττάρων. Οι χρώσεις με αντισώματα για τις βασικές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρά ο LBR δεν υπέδειξαν κάποια ανωμαλία, ενώ η μορφολογική εικόνα των διαφόρων ιστών ήταν απόλυτα φυσιολογική. Έτσι, το επόμενο βήμα στην ανάλυση των ομόζυγων ζώων και στην προσπάθεια αιτιολόγησης του φαινοτύπου τους ήταν η μελέτη των επιπέδων μεταγραφής των γονιδίων του λεπτού εντέρου. Το όργανο αυτό επιλέχθηκε για δύο βασικούς λόγους. Ο πρώτος ήταν η παρουσία συσσωρεύσεων χρωματίνης στους πυρήνες του απορροφητικού επιθηλίου με τη μορφή του μωσαϊκού. Ο δεύτερος ήταν το γεγονός ότι το λεπτό έντερο είναι το σημείο του οργανισμού, όπου απορροφώνται οι τροφές. Η καχεξία των μεταλλαγμένων ζώων υποδηλώνει δυσλειτουργία στον τομέα αυτό, με τρεις πιθανές εκδοχές ή το συνδυασμό τους: α) ανορεξία, β) αδυναμία απορρόφησης θρεπτικών συστατικών και γ) υπερμεταβολικό σύνδρομο.

Η ανάλυση του ολικού RNA των κυττάρων του λεπτού εντέρου με μικροσυστοιχίες DNA και επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με ποσοτική PCR, αποκάλυψε μια σειρά γονιδίων-στόχων. Τα γονίδια αυτά, όπως αναφέρθηκε στα αποτελέσματα, κατατάχθηκαν σε κατηγορίες ανάλογα με δύο κριτήρια: α) τη λειτουργία που διαδραματίζουν στο κύτταρο και β) με το αν σχετίζονται ή όχι με την καχεξία.

4.3.1 Smad3, Banf1, πυρηνικός φάκελος και μεταγραφή γονιδίων

Το γονίδιο Smad3, το οποίο βρέθηκε να έχει διπλάσια ποσότητα mRNA στα ic^J ποντίκια, είναι μια ρυθμιστική Smad και ανήκει στην υπεροικογένεια του TGF- β . Δομικά, αποτελείται από μια N-τελική περιοχή MH1 (terminal Mad homology 1) και μια C-τελική περιοχή MH2 (Mad homology 2). Οι περιοχές αυτές συνδέονται μεταξύ τους μέσω μιας σειράς αμινοξέων που είναι πλούσια σε προλίνες. Η περιοχή MH1 είναι υπεύθυνη για την εισαγωγή της πρωτεΐνης στον πυρήνα και την σύνδεσή της με το DNA, ενώ η περιοχή MH2 ρυθμίζει τον ολιγομερισμό της Smad3, τη σύνδεσή της με τους υποδοχείς τύπου I και την αλληλεπίδρασή της με κυτταροπλασματικές

πρωτεΐνες. Η συνδετική περιοχή είναι υπεύθυνη για την ουβικουτινίωση της πρωτεΐνης (Εικ.63).



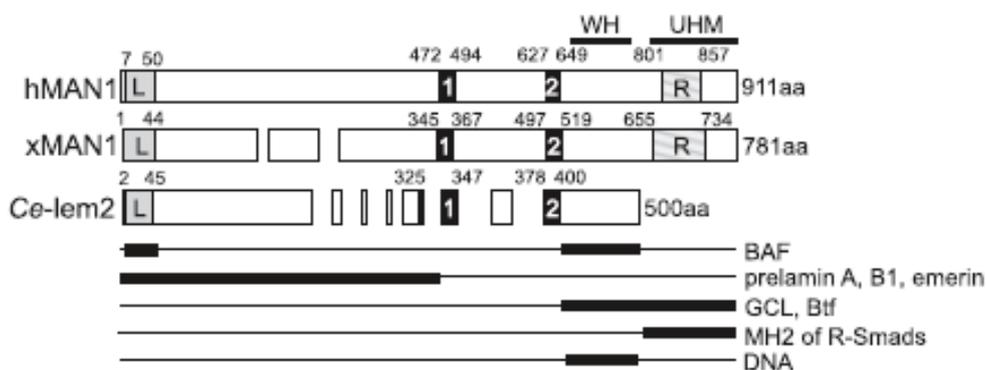
Εικόνα 63: Διάγραμμα της δομής του μεταγραφικού παράγοντα Smad3.

Διαφορετικοί μεταγραφικοί παράγοντες συνδέονται και στους δύο τομείς της Smad3, ενώ σε μερικές περιπτώσεις απαιτείται η παρουσία της συνδετικής περιοχής. Η βασική λειτουργία της Smad3 είναι η μεταγωγή ειδικών σημάτων για την ενεργοποίηση ή καταστολή γονιδίων, ως απόκριση στη σύνδεση προσδέτη στους υποδοχείς επιφανείας του κυττάρου, TGF- β και activins. Οι πρωτεΐνες αυτές συνδέονται σε υποδοχείς τύπου II (κινάσες σερίνης/θρεονίνης) και επάγουν των ετεροδιμερισμό τους με τους υποδοχείς τύπου I. Σε αυτούς συνδέεται η Smad3 και φωσφορυλιώνεται για να ενεργοποιηθεί. Η ενεργοποιημένη πλέον Smad3 αλληλεπιδρά με τη Smad4 και μεταφέρεται στον πυρήνα (Massagué, 1998, Schmierer et al, 2007). Μετά την εισαγωγή του στον πυρήνα, το σύμπλοκο Smad3/Smad4 είναι ικανό να συνδεθεί σε περιοχές του DNA που περιέχουν το στοιχείο SBE (Smad-binding element) ή είναι GC-rich. Η σύνδεση αυτή, από μόνη της, δεν είναι αρκετά σταθερή και για το λόγο αυτό απαιτείται αλληλεπίδραση με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Έχει βρεθεί ότι δύο βασικές οικογένειες τέτοιων παραγόντων είναι οι p300 και P/CAF (p300-and CBP-associating factor). Στην περίπτωση απενεργοποίησης γονιδίων, η Smad3 συνδέεται και με αποακετυλάσες των ιστονών (Hu et al, 1998, Itoh et al, 2000, Moustakas et al, 2001, Roberts et al, 2003, Ten Dijke et al, 2004, Brown et al, 2007).

Η Smad4 για να μεταφερθεί στον πυρήνα πρέπει πάντα να είναι συνδεδεμένη με μία άλλη Smad. Αντίθετα, η Smad3 μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα ανεξάρτητα από την Smad4. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο διαφορετικούς τρόπους. Ο πρώτος περιλαμβάνει απευθείας αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες των πυρηνικών πόρων (NUP214 και NUP153), ενώ ο δεύτερος προϋποθέτει σύνδεση με την importin β 1. Για να επιτευχθεί η αλληλεπίδραση Smad3/ importin β 1 πρέπει πρώτα η Smad3 να φωσφορυλιωθεί. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια αλλαγή στην τεταρτοταγή

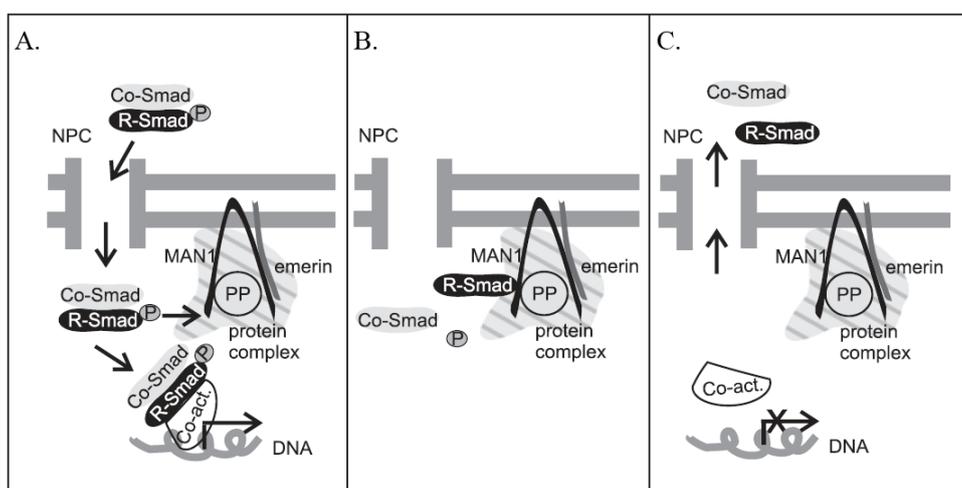
διαμόρφωση της πρωτεΐνης, η οποία αποκαλύπτει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού. Η importin β1 το αναγνωρίζει, συνδέεται με τη Smad3 και τη μεταφέρει στον πυρήνα. Εκεί, το σύμπλοκο διασπάται με τη βοήθεια της Ran-GTP (Xiao et al, 2000, Kurisaki et al, 2001, Xu et al, 2003, Chen et al, 2005).

Σύμφωνα με την μέχρι τώρα βιβλιογραφία, φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων, άμεσα ή έμμεσα, μέσω συμπλόκων με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες. Πρόσφατα, βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη της έσω πυρηνικής μεμβράνης MAN1 αλληλεπιδρά με διάφορες ρυθμιστικές Smads κα μία από αυτές είναι η Smad3 (Osada et al, 2003, Pan et al, 2004, Lin et al, 2005, Ishimura et al, 2006, Bengtsson, 2007, Cohen et al, 2007). Η MAN1 ανήκει στην οικογένεια των LEM-domain πρωτεϊνών. Δομικά, αποτελείται από μία νουκλεοπλασματική N-τελική περιοχή, δύο διαμεμβρανικές περιοχές και μια επίσης νουκλεοπλασματική C-τελική περιοχή. Η N-τελική περιοχή περιλαμβάνει ένα τομέα LEM και ένα μοτίβο έλικας-στροφής-έλικας. Στην περιοχή αυτή συνδέονται ο παράγοντας Baf, η προ-λαμίνη A, η λαμίνη B1 και η emerin. Η C-τελική περιοχή είναι υπεύθυνη για την σύνδεση στο DNA και για την αλληλεπίδραση με τους μεταγραφικούς παράγοντες GCL Btf. Επίσης, εδώ εντοπίζεται και ένα μοτίβο RR, με το οποίο η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με το τμήμα MH2 της Smad3 (Εικ.64).



Εικόνα 64: Χάρτης σύνδεσης διαφόρων στοιχείων στη MAN1. Απεικονίζεται η MAN1 στον άνθρωπο, στο *Xenopus laevis* και στον *Caenorhabditis elegans*. Τα κενά αντιπροσωπεύουν διαφορές πάνω από 10 αμινοξέα στην αλληλουχία των πρωτεϊνών. Οι αριθμοί επάνω από κάθε πρωτεΐνη είναι το πρώτο και το τελευταίο αμινοξύ κάθε λειτουργικής περιοχής (L-LEM domain, WH- winged helix domain, UHM-U2AF homology motif, R-RRmotif). Οι αριθμοί 1 και 2 αντιπροσωπεύουν τις δύο διαμεμβρανικές περιοχές. Με μαύρες γραμμές εμφανίζονται οι περιοχές που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με την κάθε πρωτεΐνη (Bengtsson, 2007).

Έχει δειχθεί ότι η MAN1 μπορεί να διασυνδέει τη Smad3 και το DNA μέσω δύο διαφορετικών θέσεων, διαμεσολαβώντας τόσο στην ενεργοποίηση, όσο και στην καταστολή γονιδίων-στόχων του TGF- β μονοπατιού (Caruto et al, 2006). Υπάρχουν δύο τρόποι για να συμβεί ένα από τα παραπάνω: α) η MAN1 να «βοηθάει» στην αποφωσφορυλίωση της Smad3, β) να διασπά με κάποιο μηχανισμό το σύμπλοκο Smad3/ Smad4. Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι πράγματι η Smad3, όταν είναι συνδεδεμένη με την MAN1, δεν είναι ταυτόχρονα σε σύμπλοκο με την Smad4. Επίσης, η αύξηση των επιπέδων της MAN1 έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της Smad3. Ακόμα, η υπερέκφραση της MAN1 οδηγεί σε αναστολή της συγκέντρωσης της Smad3 στον πυρήνα, γεγονός που καταδεικνύει μειωμένη σύνδεσή της σε πυρηνικά στοιχεία και επαναμεταφορά της στο κυτταρόπλασμα. Η ελεύθερη Smad3 αποφωσφορυλιώνεται γρήγορα όταν είναι σε μορφή μονομερούς και εξάγεται από τον πυρήνα. Πιθανώς και σε αυτό το σημείο η MAN1 να διαδραματίζει κάποιο ρόλο, αλληλεπιδρώντας με φωσφατάσες. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η MAN1 μπορεί να λειτουργεί ως «μοριακό φίλτρο» στον πυρηνικό φάκελο (Εικ.65).



Εικόνα 65: Προτεινόμενο μοντέλο ρύθμισης του TGF- β μονοπατιού από την MAN1 (Bengtsson, 2007). A) Οι ρυθμιστικές Smads (R-smad) εισέρχονται στον πυρήνα ως σύμπλοκα με τη Smad4 (Co-smad). Η MAN1 βρίσκεται ως σύμπλοκο με την emerlin, με άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες και ίσως με μια πιθανή φωσφατάση (PP). Συνδέεται, μέσω του μοτίβου RR, στην MH2 περιοχή της R-smad. B) Η σύνδεση της MAN1 με την R-smad διασπά το σύμπλοκο R-smad/Co-smad. Προωθεί την αποφωσφορυλίωση της R-smad. C) Έξοδος της R-smad από τον πυρήνα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη λιγότερων Smad ενεργών συμπλόκων, ικανών να ενεργοποιήσουν ή να καταστείλουν γονίδια (NPC-πυρηνικοί πόροι).

Ο Baf (Barrier-to-autointegration factor) είναι μία από τις βασικές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τη MAN1. Πρωτοανακαλύφθηκε από την ικανότητά του να εμποδίζει την αυτο-εισαγωγή του γενετικού υλικού του ιού MoMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) στο DNA. Είναι μια μικρή πρωτεΐνη που σχηματίζει διμερή. Τα επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου του Baf βρέθηκαν να είναι αυξημένα, περίπου δύο φορές στα ic^j ποντίκια. Η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με dsDNA, πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου, χρωματίνη, ιστόνες και διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες. Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στο πυρηνόπλασμα, με μεγάλη συγκέντρωση στον πυρηνικό φάκελο, εκτός από την S φάση όπου είναι η πρωτεΐνη είναι απόλυτα πυρηνική. Τα δύο αυτά κλάσματα, δεν ανανεώνουν το ένα το άλλο, κάτι που δείχνει αυστηρή ρύθμιση στον εντοπισμό της. Οι εικαζόμενες λειτουργίες του Baf είναι ο έλεγχος της μόλυνσης από ρετροϊούς, η δημιουργία του πυρήνα στο τέλος της μίτωσης, η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, διάφορες αναπτυξιακές διαδικασίες και η έκφραση γονιδίων. Κατά τη διάρκεια της μίτωσης, ο παράγοντας αυτός φωσφορυλιώνεται από τη VKR (vaccinia-related kinase), απελευθερώνεται από την emerlin και το DNA και διαχέεται στο κυτταρόπλασμα (Nichols et al, 2006). Στην ανάφαση, ένα κλάσμα του Baf συνδέεται με την LAP2α στα τελομερή, όπου και σταθεροποιείται από τον ομο-ολιγομερισμό της (Dechat et al, 2004). Επίσης, προκαλεί τη συγκέντρωση και άλλων LEM-domain πρωτεϊνών, όπως η emerlin και η LAP2β, στην επιφάνεια των χρωμοσωμάτων. Κατά τη δημιουργία του νέου πυρήνα, τα σύμπλοκα αυτά διαχέονται στην επιφάνεια των χρωμοσωμάτων. Ο Baf ελέγχει την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης, μέσω της ιδιότητάς του να συνδέεται με dsDNA. Υπάρχουν δύο εκδοχές για το πώς ο Baf υπεισέρχεται στις αναπτυξιακές διαδικασίες και στον μεταγραφικό έλεγχο γονιδίων. Ο πρώτος μηχανισμός περιλαμβάνει το σχηματισμό της ετεροχρωματίνης. Η δημιουργία συμπυκνωμένης χρωματίνης ελέγχεται από σύμπλοκα αναδιοργάνωσης και από επιγενετικούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν τροποποιήσεις στις ουρές των ιστονών. Ο Baf συμμετέχει στη δημιουργία της ετεροχρωματίνης πιθανώς αλληλεπιδρώντας με το DNA, με την ουρά της H3 και τις συνδετικές ιστόνες, όπως η H1.1 (Montes de Oca et al, 2005). Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει την άμεση ή έμμεση λειτουργία του Baf ως μεταγραφικού παράγοντα. Αυτό ενισχύεται από την ικανότητά του να αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα Ctx (retinal cone-rod homeobox factor). Παρόλο που ακόμα ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι γνωστός, πιστεύεται ότι βασίζεται στην ικανότητα της πρωτεΐνης να «γεφυρώνει» τμήματα DNA και να προκαλεί

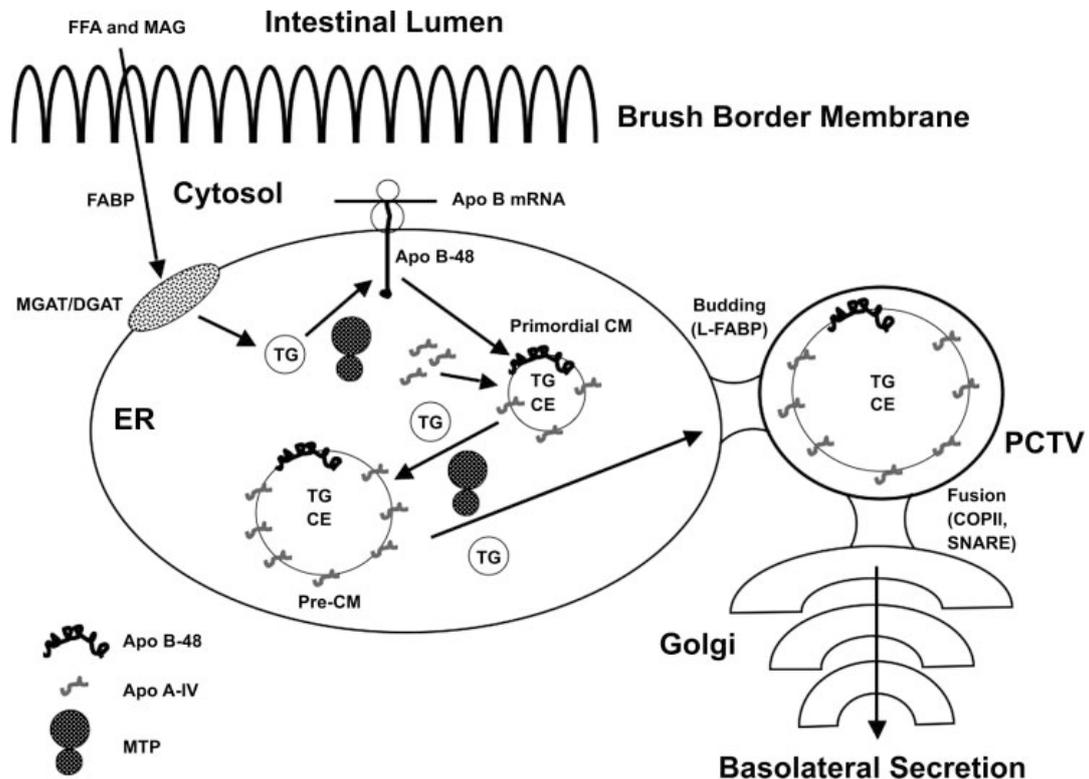
συμπύκνωση. Η λειτουργική μορφή του Baf είναι ένα ομοδιμερές, το οποίο αλληλεπιδρά με το φωσφο-σκελετό του dsDNA στη μικρή αύλακα, ανεξαρτήτως αλληλουχίας. Το μοντέλο αυτό απαιτεί την άμεση ή έμμεση αλληλεπίδραση του Baf με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, ώστε να εξασφαλιστεί η ειδικότητα της διαδικασίας. Η MAN1 και γενικότερα οι πρωτεΐνες που φέρουν το LEM-domain είναι πιθανώς οι μεσολαβητές σε αυτή τη διαδικασία. Για παράδειγμα, η MAN1 συνδέεται με τις ρυθμιστικές Smads, η LAP2α με τη pRB (the retinoblastoma protein) η LAP2β με τον μεταγραφικό παράγοντα GCL (germ cell-less), η otefin με την Smad4 και η emerlin με την β-catenin. Έχει προταθεί ότι η αλληλεπίδραση των LEM πρωτεϊνών με τους μεταγραφικούς παράγοντες τους «διαμερισματοποιεί» στον πυρηνικό φάκελο αναστέλλοντας έτσι τη δράση τους. Η παρουσία του Baf στον πυρηνικό φάκελο βοηθάει στην καταστολή γονιδίων μέσω τις ιδιότητάς του να συνδέει DNA δημιουργώντας δομές υψηλής συμπύκνωσης. Επίσης, μπορεί να συναγωνίζεται τους μεταγραφικούς παράγοντες για τη σύνδεση στις LEM πρωτεΐνες. Κάτι τέτοιο φαίνεται να συμβαίνει στην περίπτωση της emerlin, όπου η πρωτεΐνη ανταγωνίζεται τον μεταγραφικό παράγοντα GCL για τη σύνδεση στο DNA. Πιθανώς αυτό δεν ισχύει για την MAN1. Υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι ο Baf αλληλεπιδρά με τους μεταγραφικούς παράγοντες p15/SUB1/PC4, NonO, Requiem και LEDGF. Πειραματικά δεδομένα έδειξαν αλληλεπίδραση του Baf με την πρωτεΐνη PARP1. Η PARP1 προκαλεί συμπύκνωση της χρωματίνης και καταστολή της μεταγραφής. Συμμετέχει όμως και στην ενεργοποίηση της μεταγραφής, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA και αλληλεπιδρά με την λαμίνη A. Έχει βρεθεί ότι ο Baf συνδέεται με την RecQ, μια ελικάση του DNA, η οποία επίσης αλληλεπιδρά με την PARP1 και με τις πρωτεΐνες DDB2 και CUL4 του συμπλόκου CUL4-DDB-ROC1, το οποίο στρατολογείται στα σημεία επιδιόρθωσης του DNA. Μία άλλη πρωτεΐνη που συνδέεται με τον Baf είναι η μοριακή συνοδός της ιστόνης H3, RBBP4. Η RBBP4, ως συστατικό του συμπλόκου CAF-1, σχετίζεται έμμεσα με το PCNA, μια άλλη πρωτεΐνη που συνδέεται με την λαμίνη A. Βασική της λειτουργία είναι η εναπόθεση των ισομορφών της H3 στα νουκλεοσώματα κατά τη διάρκεια του διπλασιασμού του DNA, αλλά και ανεξάρτητα από αυτόν. Πιθανώς, ο Baf σταθεροποιεί τα χρωματινικά σύμπλοκα, που περιέχουν την RBBP4 και το PCNA, συνδέοντάς τα με την λαμίνη A (Zheng et al, 2000, Haraguchi et al, 2001, Wang et al, 2002, Segura-Totten et al, 2002, Bradley et al, 2005, Mansharamani et al, 2005,

Bengtsson et al, 2004, Bengtsson et al, 2006, Margalit et al, 2007, Jiang et al, 2008, Montes de Oca et al, 2009).

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω δεδομένα, οι πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου εμπλέκονται σε διάφορες διαδικασίες, μία από τις οποίες είναι και ο μεταγραφικός έλεγχος. Πιθανώς, ένα μεγάλο μέρος των μεταγραφικών συμπλόκων και παραγόντων να αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες αυτές, ώστε να ενισχυθεί ή να κατασταλεί η δράση τους. Οι λαμινοπάθειες και άλλες ασθένειες, που έχουν συσχετιστεί με τις πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου, εμφανίζουν μεγάλη ιστο-ειδικότητα. Στην περίπτωση των ομόζυγων *ic¹* ποντικών βρέθηκε ότι πολλοί παράγοντες μεταβάλλουν την έκφρασή τους, αλλά μόνο η Smad3 και ο Baf έχουν άμεσα συσχετιστεί με την πυρηνική μεμβράνη. Ίσως λοιπόν ο LBR να συνδέεται και αυτός άμεσα ή έμμεσα με μεταγραφικούς παράγοντες. Περαιτέρω πειράματα πιθανώς να αποκαλύψουν πως αυτοί συνδέονται άμεσα με το φαινότυπο του ζώου.

4.3.2 Λεπτό έντερο και διατροφή-Διαταραχή στη δημιουργία των χυλομικρών;

Από τα 149 γονίδια-στόχους που χαρακτηρίστηκαν ως στατιστικά σημαντικά μέσω ανάλυσης με μικροσυτοιχίες, 16 σχετίζονται άμεσα με το λεπτό έντερο και τη διατροφή. Αρκετά από αυτά συμμετέχουν στη διακίνηση και στη δημιουργία των χυλομικρών. Τα χυλομικρά είναι μεγάλα σωματίδια λιποπρωτεϊνών και αποτελούνται από τριακυλογλυκερόλες, εστέρες χοληστερόλης, φωσφολιπίδια, χοληστερόλη και πρωτεΐνες. Η λειτουργία τους είναι να μεταφέρουν τα λιπίδια των τροφών και τη χοληστερόλη από το έντερο σε άλλα μέρη του σώματος. Αρχικά, δημιουργούνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), όπου η ApoB συνδέεται με λιπίδια, με τη βοήθεια της πρωτεΐνης MTP (αναπτυσσόμενα χυλομικρά). Στα αναπτυσσόμενα χυλομικρά προστίθεται η πρωτεΐνη ApoA4, η οποία επιτρέπει την περαιτέρω προσθήκη λιπιδίων. Στη συνέχεια, τα αναπτυσσόμενα χυλομικρά εξέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο σε ειδικά οχήματα και μεταφέρονται στο *cis*-Golgi. Εκεί υποβάλλονται σε μια τελική επεξεργασία και μεταφέρονται στην κυκλοφορία μέσω έκκρισης από την πλευρική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης (Εικ.66) (McCormick et al, 1996, Wang, 2003, Siddiqi et al, 2003, Black, 2007).



Εικόνα 66: Η δημιουργία και η διακίνηση των χυλομικρών (CM). Ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) και μονο-ακυλ-γλυκερίδια (MAG) εισέρχονται στα εντεροκύτταρα με διάχυση ή με τη βοήθεια άλλων πρωτεϊνών-μεταφορέων. Στη συνέχεια, μεταφέρονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) με τη βοήθεια πρωτεϊνών σύνδεσης λιπαρών οξέων (FABPs). Εκεί, μετατρέπονται σε τριακυλογλυκερόλες (Triacylglycerol-TG) με τη χρήση των ενζύμων MGAT (acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferase) και DGAT (acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase). Η νέο-συντιθέμενη ApoB εισέρχεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τροποποιείται με την προσθήκη τριακυλογλυκερολών από το ένζυμο MTP (microsomal triglyceride transferase). Η τροποποιημένη ApoB μαζί με φωσφολιπίδια και ελεύθερη χοληστερόλη δημιουργεί τα αρχέγονα χυλομικρά (Primordial CM). Στο εσωτερικό των δομών αυτών το ένζυμο MTP προσθέτει περαιτέρω τριακυλογλυκερόλες και εστέρες χοληστερόλης (CE). Επίσης, στην επιφάνεια των αρχέγονων χυλομικρών προστίθεται η πρωτεΐνη ApoA-IV, η οποία επιτρέπει τη δημιουργία μεγαλύτερων σε μέγεθος δομών. Αυτό το επιτυγχάνει σταθεροποιώντας την επιφάνεια των δομών ή/και αναγκάζοντας τα αρχέγονα χυλομικρά να παραμείνουν στο ενδοπλασματικό δίκτυο για περαιτέρω προσθήκη λιπιδίων. Οι δομές που προκύπτουν ονομάζεται πλέον Pre-CM. Τα Pre-CM μεταφέρονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύμπλεγμα Golgi σε ειδικά οχήματα μεταφοράς που ονομάζονται PCTV (pre-CM transport vesicle). Τα PCTV εκβλαστάνουν από το ενδοπλασματικό δίκτυο με τη βοήθεια της πρωτεΐνης L-FABP και συνδέονται στο Golgi μέσω των πρωτεϊνών COPII και SNARE. Μετά την τελική επεξεργασία στο Golgi, τα ώριμα χυλομικρά εκκρίνονται μέσω της βασικής μεμβράνης (Black, 2007).

Από την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε βρέθηκε ότι ορισμένα γονίδια που συμμετέχουν στη δημιουργία των χυλομικρών αλλάζουν το πρότυπο έκφρασης στα *ic^j* ζώα. Το γονίδιο Apo4 (Apolipoprotein A-IV) εμφάνισε μειωμένη μεταγραφή στα ομόζυγα ζώα. Η Apo4 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία παράγεται στο λεπτό έντερο και το ήπαρ. Η βασική της λειτουργία είναι να ρυθμίζει την πρόσληψη τροφής. Ειδικότερα, μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στον υποθάλαμο όπου επιδρά αρνητικά μειώνοντας το αίσθημα της πείνας. Η έκφρασή της καθορίζεται από την ενεργή απορρόφηση λιπιδίων και εξαρτάται από τη δημιουργία των χυλομικρών (chylomicrons). Όσα περισσότερα χυλομικρά δημιουργούνται στα εντεροκύτταρα τόσο αυξάνονται τα επίπεδά της. Επίσης, η έκφραση του πεπτιδίου PYY προάγει την παραγωγή της Apo4. Η Apo4 ενσωματώνεται στα αναπτυσσόμενα χυλομικρά κατά τα πρώτα στάδια της βιογένεσής τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο και αλληλεπιδρά με τις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL) και σε λιγότερο βαθμό με τις λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL). Η έλλειψη τροφής έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της στον υποθάλαμο (Stan et al, 2003, Tso et al, 2001, Tso et al, 2004, Tso and Liu, 2004). Knockout ποντίκια για την Apo4, έχουν χαμηλή HDL, αλλά εμφανίζουν φυσιολογική απορρόφηση λιπιδίων, φυσιολογική ανάπτυξη και συμπεριφορά στη διατροφή τους (Weinstock et al, 1997). Στην ίδια κατηγορία των απολιποπρωτεϊνών ανήκει και η πρωτεΐνη Apob (Apolipoprotein B), της οποίας το γονίδιο βρέθηκε να έχει αυξημένη μεταγραφή. Εμφανίζεται σε δύο ισομορφές την ApoB-100 και την ApoB-48. Η πρώτη εκφράζεται κυρίως στο έντερο του εμβρύου και στο ήπαρ. Η δεύτερη συντίθεται κυρίως στο έντερο μετά τη γέννηση. Σε αντίθεση με την Apo4, η ApoB δεν ρυθμίζει τη διατροφή, αλλά παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των χυλομικρών. Η απορρύθμιση της μεταγραφής των πρωτεϊνών Apo4 και ApoB πιθανώς να δημιουργεί προβλήματα στη δημιουργία των χυλομικρών. Τέλος, το τρίτο γονίδιο που συνδέεται με τα χυλομικρά είναι το γονίδιο Fabp2, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη I-FABP2 (intestinal-fatty acid binding protein). Το γονίδιο αυτό, σε τρία πειράματα βρέθηκε να έχει πολύ μειωμένη μεταγραφή, ενώ η ποσοτική PCR έδειξε σημαντική αύξηση. Η I-FABP2 αποτελεί περίπου το 3% των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών των εντεροκυττάρων και η κατανομή της στο λεπτό έντερο αυξάνεται από τις κρύπτες προς τις λάχνες. Επίσης, στα εντεροκύτταρα εντοπίζεται και η L-FABP (liver-fatty acid binding protein), η οποία είναι ομόλογη της I-FABP. Η πρωτεΐνη αυτή είναι απαραίτητη για την ελευθέρωση των PCTV από το ενδοπλασματικό δίκτυο (Εικ.65). Η εκβλάστηση δεν

γίνεται παρουσία της I-FABP. Εξαιτίας της κατανομής τους, στις πρωτεΐνες αυτές έχουν αποδοθεί διάφορες λειτουργίες, όπως α) πρόσληψη των λιπαρών οξέων από τα εντεροκύτταρα και η απόδοσή τους στα μεταβολικά μονοπάτια, β) προστασία των κυτταρικών μεμβρανών από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και τα acyl-CoA παράγωγα, γ) διατήρηση μια άμεσα προσβάσιμης ενδοκυτταρικής συσσώρευσης λιπαρών οξέων για γρήγορο μεταβολισμό. Παρόλα αυτά, η απώλεια της I-FABP2 δεν έχει δραματικά αποτελέσματα στην απορρόφηση των λιπαρών οξέων. Υπό συγκεκριμένες συνθήκες όμως (πχ. ηλικία, διατροφή), η έλλειψή της μπορεί να προκαλέσει παχυσαρκία, συγκέντρωση τριγλυκεριδίων στο ήπαρ, ανοχή στην ινσουλίνη (insulin resistance) και υπερτριγλυκεριδαιμία (Green et al, 1992, Glatz et al, 1996, Vassileva et al, 2000, Tso et al, 2004, Agellon et al, 2007, Cianflone et al, 2008, Montoudis et al, 2008, Levy et al, 2009).

Τέλος, ένα ακόμα γονίδιο, το οποίο συνδέεται έμμεσα με τη δημιουργία των χυλομικρών και εμφανίζει μεταβολή στην έκφρασή του στα ομόζυγα ζώα είναι το γονίδιο Cideb. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί τον παράγοντα cell death-inducing DNA fragmentation, alpha subunit-like effector B. Εκφράζεται στο ήπαρ, στα νεφρά, στο λεπτό έντερο και τον στόμαχο. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των μιτοχονδρίων (απόπτωση), στη λιπόλυση, στην οξειδωση των λιπαρών οξέων, στο σχηματισμό σταγονιδίων λίπους και στην αποθήκευση λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα και στα λιποκύτταρα. Συνδέεται επίσης με την πρωτεΐνη ApoB κατά το σχηματισμό των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας, αλλά η ρύθμιση της έκφρασης των δύο πρωτεϊνών δεν συνδέεται άμεσα. Ακόμα, υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι ο Cideb σχετίζεται με τον έλεγχο της ομοιοστασίας της σύνθεσης της χοληστερόλης στο ήπαρ. Ποντίκια, στα οποία απουσιάζει η πρωτεΐνη αυτή, εμφανίζουν αυξημένη πρόσληψη τροφής, μειωμένα επίπεδα λίπους και τριγλυκεριδίων στο αίμα, αυξημένη οξειδωση των λιπαρών οξέων, είναι ευαίσθητα στην ινσουλίνη, δαπανούν μεγάλα ποσά ενέργειας και είναι αδύνατα (Chen et al, 2000, Li et al, 2007, Wu et al, 2008, Ye et al, 2009, Gong et al, 2009, Li et al, 2010). Η αυξημένη μεταγραφή του γονιδίου ίσως προκαλείται από τις αυξημένες ανάγκες του οργανισμού σε ενέργεια. Επίσης, πιθανώς να επηρεάζεται το μονοπάτι σύνθεσης των λιπιδίων.

Τα παραπάνω δεδομένα «ανοίγουν» πολλές κατευθύνσεις προς μελέτη. Σύμφωνα με τα στοιχεία αυτά, είναι σχεδόν αδύνατο να προσδιοριστεί ένας μόνο λόγος για το φαινότυπο της καχεξίας στα ομόζυγα ποντίκια. Εξετάζοντας όμως το σύνολο των γονιδίων που εμφανίζουν αλλαγές στο πρότυπο έκφρασής τους φαίνεται ότι το μικρό

σωματικό βάρος και η αδυναμία ανάπτυξης οφείλονται σε ένα συνδυασμό παραγόντων. Πιθανώς και οι τρεις αιτιολογίες (αδυναμία πρόσληψης θρεπτικών υλών, διαταραχή του συστήματος ελέγχου της πρόσληψης τροφής και υπερμεταβολικό σύνδρομο) να είναι σωστές, ίσως όμως η κάθε μία να έχει διαφορετικό βαθμό βαρύτητας.

Συμπεράσματα

5.1 Συμπεράσματα της μελέτης

- Χρώσεις με αιματοξυλίνη-ηωσίνη στο δέρμα έδειξαν ότι η αλωπεκία των ισθίων ζώων οφείλεται στην υπερπλασία της κεράτινης στοιβάδας της επιδερμίδας. Η υπερβολική αύξηση αυτής της στοιβάδας δημιουργεί ένα είδος πώματος που σφραγίζει τους θύλακες των τριχών, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η έξοδος της τρίχας.
- Οι χρώσεις με αιματοξυλίνη-ηωσίνη στο λεπτό έντερο αποκάλυψαν ένα είδος μωσαϊκού φαινοτύπου στους πυρήνες των εντεροκυττάρων. Ο φαινότυπος αυτός χαρακτηρίζεται από την παρουσία συσσωματωμάτων χρωματίνης στον πυρηνικό φάκελο. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται είτε σε ολόκληρο το εντερικό επιθήλιο είτε σε μέρος του.
- Οι χρώσεις με αιματοξυλίνη-ηωσίνη στο στομάχι και το παχύ έντερο έδειξαν απόλυτα φυσιολογικό φαινότυπο, παρά το γεγονός ότι το επιθήλιό τους μοιάζει αρκετά με αυτό του λεπτού εντέρου.
- Οι χρώσεις με αιματοξυλίνη-ηωσίνη στο ήπαρ, στο σπλήνα, στους νεφρούς, στην καρδιά, στον εγκέφαλο και στους πνεύμονες δεν έδειξαν διαφορές.
- Χρώσεις τόσο σε τομές παραφίνης, όσο και σε τομές κρυστάτη με διάφορα αντισώματα δεν έδειξαν αξιόλογες διαφορές ανάμεσα στα φυσιολογικά, στα ετερόζυγα και στα ομόζυγα ζώα.
- Η λαμίνες A/C και B εμφάνισαν φυσιολογική κατανομή στα ετερόζυγα και ομόζυγα σπληνοκύτταρα που απομονώθηκαν και εξετάστηκαν με ανοσοφθορισμό.
- Τα T-λεμφοκύτταρα των ετερόζυγων και ομόζυγων ποντικών ανταποκρίθηκαν στην επίδραση με PHA-L και επανήλθαν στον κυτταρικό κύκλο.
- Η ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας δεν αποκάλυψε διαφορές στις τροποποιήσεις των ιστονών H3 και H2A των φυσιολογικών, ετερόζυγων και ομόζυγων ζώων.
- Τα νουκλεοσώματα που παρήχθησαν από φυσιολογικά και ετερόζυγα ζώα παρουσίασαν την ίδια συγγένεια για τις ισομορφές της πρωτεΐνης HP1 και τον LBR.
- Η ανάλυση με μικροσυτοιχίες DNA αποκάλυψε 149 γονίδια, τα οποία μετέβαλαν το πρότυπο έκφρασής τους στα μεταταγμένα ζώα. Κάποια από τα

γονίδια αυτά επιβεβαιώθηκαν με ποσοτική PCR. Τα δεδομένα αυτά «δείχνουν» ότι ο LBR ίσως ελέγχει άμεσα ή έμμεσα τη μεταγραφική κατάσταση γονιδίων. Χρειάζονται όμως περαιτέρω πειράματα για να επιβεβαιωθεί ή να απορριφθεί αυτή η υπόθεση.

Περίληψεις

6.1 Περίληψη στα Ελληνικά

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εστιάζεται στη μελέτη ποντικών οι οποίοι φέρουν, σε ετερόζυγη ή ομόζυγη μορφή, μία μετάλλαξη στον υποδοχέα της λαμίνης Β (LBR). Οι πειραματικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιήθηκαν κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες: α) μορφολογική ανάλυση διαφόρων ιστών και κυττάρων, β) βιοχημική ανάλυση πυρηνικών πρωτεϊνών και γ) ανάλυση του προτύπου έκφρασης σε επίπεδο γονιδιώματος.

Αρχικά, μελετήθηκαν οι ακόλουθοι ιστοί σε τομές παραφίνης: δέρμα, σπλήνας, λεπτό έντερο, παχύ έντερο, στόμαχος, ήπαρ, νεφροί, εγκέφαλος, καρδιά και πνεύμονες. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε τομές παραφίνης, κρυο-τομές, ή επιχρίσματα (απομονωμένα σπληνοκύτταρα) χρησιμοποιώντας αντισώματα που αναγνωρίζουν τις πυρηνικές λαμίνες, τον LBR, ή τις κερατίνες 8 και 19. Τέλος, μελετήθηκε η ικανότητα των T-λεμφοκυττάρων να μεταβαίνουν από τη φάση ηρεμίας (G_0) σε φάση κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μετά από ειδική επαγωγή με PHA.

Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η αρχιτεκτονική των περισσότερων ιστών και η κατανομή των πρωτεϊνών που εξετάστηκαν δεν έχουν επηρεαστεί από τη μετάλλαξη στον LBR. Παρόλα ταύτα, από τη μορφολογική μελέτη προέκυψαν ενδείξεις ότι η αλωπεκία που παρατηρείται στα ομόζυγα ζώα οφείλεται σε εκλεκτική υπερπλασία της κερατίνης στοιβάδας της επιδερμίδας, ενώ η καχεξία που τελικά οδηγεί στον θάνατο μπορεί να συσχετίζεται με βλάβες του εντερικού επιθηλίου. Αυτή η υπόθεση βασίζεται στο γεγονός ότι το επιθήλιο του λεπτού εντέρου στα ομόζυγα ποντίκια χαρακτηρίζεται από την παρουσία συσσωματωμάτων χρωματίνης στον πυρηνικό φάκελο που εμφανίζουν έναν ενδιαφέροντα «μωσαϊκό» φαινότυπο.

Η μορφολογική ανάλυση που πραγματοποιήσαμε συμπληρώθηκε με βιοχημική ανάλυση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στις ιστόνες H3 και H2A με φασματοσκοπίας μάζας. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα συγκατακρήμνισης χρωματίνης χρησιμοποιώντας ως «δόλωμα» τις τρεις ισομορφές της ετεροχρωματινικής πρωτεΐνης HP1 και τον LBR. Τα παραπάνω πειράματα δεν αποκάλυψαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα αγρίου τύπου και τα μεταλλαγμένα ζώα.

Τα παραπάνω δεδομένα, σε συνδυασμό με τον καχεκτικό φαινότυπο των ομόζυγων ζώων, έκαναν απαραίτητη τη χρήση της τεχνολογίας μικροσυστοιχιών DNA, ώστε να εξεταστεί η αλλαγή στο πρότυπο έκφρασης των γονιδίων που εκφράζονται στο λεπτό έντερο. Η ανάλυση αυτού του τύπου αποκάλυψε 149 γονιδια-στόχους των οποίων η μεταγραφική δράση είναι σημαντικά διαφορετική στα ομόζυγα ζώα. Πολλά από αυτά τα γονίδια αντιστοιχούν σε μεταγραφικούς παράγοντες, ενώ άλλα σχετίζονται (άμεσα ή έμμεσα) με την πρόσληψη και απορρόφηση θρεπτικών υλών. Τα γονίδια Smad3 και Banf1 παρουσίασαν αύξηση των επιπέδων του RNA τους και αυτό επιβεβαιώθηκε με τη χρήση ποσοτικής PCR. Με τον ίδιο τρόπο μελετήθηκαν τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων Areg, Reg3b/Pap, Vimentin και I-FABP2.

Από τη μελέτη μας συμπεραίνεται ότι ο LBR διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταγραφικό έλεγχο συγκεκριμένων γονιδίων, άποψη που συμφωνεί με αποτελέσματα που έχουν δημοσιευθεί στην πρόσφατη βιβλιογραφία.

6.2 Summary in English

This work focuses on the study of mice carrying a heterozygous and homozygous mutation in the lamin B receptor (LBR). The experimental approaches used can be divided into three categories: a) morphological analysis of different tissues and cells, b) biochemical analysis of nuclear proteins and c) analysis of the transcriptional activity in genomic-wide level.

Initially, the following tissues were studied in paraffin sections: skin, spleen, small intestine, large intestine, stomach, liver, kidney, brain, heart and lungs. At the same time, immunohistochemical stains were performed in paraffin sections, cryosections or smears (isolated splenocytes), using antibodies against the nuclear lamins, LBR or keratins 8 and 19. Finally, the ability of T-lymphocytes to transit from the quiescent state (G_0) to proliferative state, after induction with PHA, was examined.

These experiments showed that the architecture of most tissues and the distribution of the proteins studied were not affected by mutations in LBR. Nevertheless, from the morphological study it would appear that alopecia, which is observed in homozygous animals, is due to the selective epidermal hyperplasia of the stratum corneum, whereas cachexia, which eventually leads to death, can be correlated to intestinal epithelium lesions. This idea is based on the fact that the epithelium of the small intestine in homozygous animals is characterized by the presence of chromatin clumps in the nuclear envelope that produce an interesting “mosaic” phenotype.

The morphological analysis which we performed was complemented by biochemical analysis of the post-translational modifications in histones H3 and H2A with mass spectrometry. Pull down experiments were also performed by using the three heterochromatin protein 1 (HP1) isoforms and LBR as “baits”. The above experiments did not reveal any significant differences between the wild type and the mutant animals.

The above data, in combination with the cachectic phenotype of the homozygous animals, made necessary the use of DNA microarray technology, so that the change in transcriptional activity of the genes which are expressed in the small intestine can be examined. This kind of analysis revealed 149 target-genes, whose transcriptional activity is notably different in homozygous animals. Many of these genes correspond

to transcription factors, while other relate (directly or indirectly) to the intake and ingestion of nutrients. Smad3 and Banf1 genes presented an increase of their RNA levels and this was confirmed by the use of Real-Time PCR. The same was performed for the Areg, Reg3b/Pap, Vimentin and I-FABP2 genes.

From our study it can be concluded that LBR plays an important role in the transcriptional control of specific genes, a view that is in good agreement with recent results that have been approved in the recent literature.

Βιβλιογραφία

- Adam S.A., (2001) "*The nuclear pore complex.*" *Genome Biol.* 2(9).
- Agarwal A.K., Fryns J.P., Auchus R.J., Garg A., (2003) "*Zinc metalloproteinase, ZMPSTE24, is mutated in mandibuloacral dysplasia.*" *Hum Mol Genet.* 12(16):1995-2001.
- Agellon L.B., Drozdowski L., Li L., Iordache C., Luong L., Clandinin M.T., Uwiera R.R., Toth M.J., Thomson A.B., (2007) "*Loss of intestinal fatty acid binding protein increases the susceptibility of male mice to high fat diet-induced fatty liver.*" *Biochim Biophys Acta.* 1771(10):1283-8.
- Akey C.W., Luger K., (2003) "*Histone chaperones and nucleosome assembly.*" *Curr Opin Struct Biol.* 13(1):6-14.
- Anderson D.J., Vargas J.D., Hsiao J.P., Hetzer M.W., (2009) "*Recruitment of functionally distinct membrane proteins to chromatin mediates nuclear envelope formation in vivo.*" *J Cell Biol.* 186(2):183-91.
- Appelbaum J., Blobel G., Georgatos S.D., (1990) "*In vivo phosphorylation of the lamin B receptor. Binding of lamin B to its nuclear membrane receptor is affected by phosphorylation.*" *J Biol Chem.* 265(8):4181-4.
- Ausió J., (2006) "*Histone variants-the structure behind the function.*" *Brief Funct Genomic Proteomic.* 5(3):228-43.
- Bengtsson L., (2007) "*What MAN1 does to the Smads. TGFbeta/BMP signaling and the nuclear envelope.*" *FEBS J.* 274(6):1374-82.
- Bengtsson L., Wilson K.L., (2004) "*Multiple and surprising new functions for emerin, a nuclear membrane protein.*" *Curr Opin Cell Biol.* 16(1):73-9.
- Bengtsson L., Wilson K.L., (2006) "*Barrier-to-autointegration factor phosphorylation on Ser-4 regulates emerin binding to lamin A in vitro and emerin localization in vivo.*" *Mol Biol Cell.* 17(3):1154-63.
- Best S., Salvati F., Kallo J., Garner C., Height S., Thein S.L., Rees D.C., (2003) "*Lamin B-receptor mutations in Pelger-Huët anomaly.*" *Br J Haematol.* 123(3):542-4.
- Bhaumik S.R., Smith E., Shilatifard A., (2007) "*Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis.*" *Nat Struct Mol Biol.* 14(11):1008-16.
- Bione S., Maestrini E., Rivella S., Mancini M., Regis S., Romeo G., Toniolo D., (1994) "*Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy.*" *Nat Genet.* 8(4):323-7.

- Black D.D., (2007) “*Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. I. Development of intestinal lipid absorption: cellular events in chylomicron assembly and secretion.*” *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 293(3):G519-24.
- Blobel G., Potter V.R., (1966) “*Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield.*” *Science* 154(757):1662-5.
- Bonne G., Di Barletta M.R., Varnous S., Bécane H.M., Hammouda E.H., Merlini L., Muntoni F., Greenberg C.R., Gary F., Urtizbera J.A., Duboc D., Fardeau M., Toniolo D., Schwartz K., (1999) “*Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy.*” *Nat Genet.* 21(3):285-8.
- Bradley C.M., Ronning D.R., Ghirlando R., Craigie R., Dyda F., (2005) “*Structural basis for DNA bridging by barrier-to-autointegration factor.*” *Nat Struct Mol Biol.* 12(10):935-6.
- Brown D.T., (2001) “*Histone variants: are they functionally heterogeneous?*” *Genome Biol.* 2(7).
- Brown K.A., Pietenpol J.A., Moses H.L., (2007) “*A tale of two proteins: differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF-beta signaling.*” *J Cell Biochem.* 101(1):9-33.
- Burke B., Gerace L., (1986) “*A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis.*” *Cell* 44(4):639-52.
- Burke B., Stewart C.L., (2002) “*Life at the edge: the nuclear envelope and human disease.*” *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(8):575-85.
- Cao H., Hegele R.A., (2000) “*Nuclear lamin A/C R482Q mutation in canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy.*” *Hum Mol Genet.* 9(1):109-12.
- Caputo S., Couprie J., Duband-Goulet I., Kondé E., Lin F., Braud S., Gondry M., Gilquin B., Worman H.J., Zinn-Justin S., (2006) “*The carboxyl-terminal nucleoplasmic region of MAN1 exhibits a DNA binding winged helix domain.*” *J Biol Chem.* 281(26):18208-15.
- Chen H.B., Rud J.G., Lin K., Xu L., (2005) “*Nuclear targeting of transforming growth factor-beta-activated Smad complexes.*” *J Biol Chem.* 280(22):21329-36.
- Chen L., Lee L., Kudlow B.A., Dos Santos H.G., Sletvold O., Shafeghati Y., Botha E.G., Garg A., Hanson N.B., Martin G.M., Mian I.S., Kennedy B.K., Oshima J., (2003) “*LMNA mutations in atypical Werner's syndrome.*” *Lancet.* 362(9382):440-5.

- Chen Z., Guo K., Toh S.Y., Zhou Z., Li P., (2000) "Mitochondria localization and dimerization are required for CIDE-B to induce apoptosis." *J Biol Chem.* 275(30):22619-22.
- Chuang C.H., Belmont A.S., (2007). "Moving chromatin within the interphase nucleus-controlled transitions?" *Semin Cell Dev Biol.* 18(5):698-706.
- Cianflone K., Paglialunga S., Roy C., (2008) "Intestinally derived lipids: metabolic regulation and consequences--an overview." *Atheroscler Suppl* 9(2):63-8.
- Clapier C.R., Cairns B.R., (2009) "The biology of chromatin remodeling complexes." *Annu Rev Biochem.* 78:273-304.
- Cohen T.V., Klarmann K.D., Sakchaistri K., Cooper J.P., Kuhns D., Anver M., Johnson P.F., Williams S.C., Keller J.R., Stewart C.L., (2008) "The lamin B receptor under transcriptional control of C/EBPepsilon is required for morphological but not functional maturation of neutrophils." *Hum Mol Genet.* 17(19):2921-33.
- Cohen T.V., Kosti O., Stewart C.L., (2007) "The nuclear envelope protein MAN1 regulates TGFbeta signaling and vasculogenesis in the embryonic yolk sac." *Development* 134(7):1385-95.
- Collas P., Courvalin J.C., Poccia D., (1996) "Targeting of membranes to sea urchin sperm chromatin is mediated by a lamin B receptor-like integral membrane protein." *J Cell Biol.* 135(6 Pt 2):1715-25.
- Courvalin J.C., Lassoued K., Worman H.J., Blobel G., (1990) "Identification and characterization of autoantibodies against the nuclear envelope lamin B receptor from patients with primary biliary cirrhosis." *J Exp Med.* 172(3):961-7.
- Courvalin J.C., Segil N., Blobel G., Worman H.J., (1992) "The lamin B receptor of the inner nuclear membrane undergoes mitosis-specific phosphorylation and is a substrate for p34cdc2-type protein kinase." *J Biol Chem.* 267(27):19035-8.
- Cunningham J.M., Patnaik M.M., Hammerschmidt D.E., Vercellotti G.M., (2009) "Historical perspective and clinical implications of the Pelger-Huet cell." *Am J Hematol.* 84(2):116-9.
- Davey C.A., Sargent D.F., Luger K., Maeder A.W., Richmond T.J., (2002). "Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1,9 Å resolution." *J Mol Biol.* 319(5):1097-113.
- Dechat T., Gajewski A., Korbei B., Gerlich D., Daigle N., Haraguchi T., Furukawa K., Ellenberg J., Foisner R., (2004) "LAP2alpha and BAF transiently localize to

telomeres and specific regions on chromatin during nuclear assembly." J Cell Sci. 117(Pt 25):6117-28.

De Sandre-Giovannoli A., Chaouch M., Kozlov S., Vallat J.M., Tazir M., Kassouri N., Szepietowski P., Hammadouche T., Vandenberghe A., Stewart C.L., Grid D., Lévy N., (2002) "*Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse.*" Am J Hum Genet. 70(3):726-36.

Duband-Goulet I., Courvalin J.C., (2000) "*Inner nuclear membrane protein LBR preferentially interacts with DNA secondary structures and nucleosomal linker.*" Biochemistry 39(21):6483-8.

James T.C., Elgin S.C., (1986) "*Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in Drosophila melanogaster and its gene.*" Mol Cell Biol. 6(11):3862-72.

Ellenberg J., Siggia E.D., Moreira J.E., Smith C.L., Presley J.F., Worman H.J., Lippincott-Schwartz J., (1997) "*Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis.*" J Cell Biol. 138(6):1193-206.

Eriksson M., Brown W.T., Gordon L.B., Glynn M.W., Singer J., Scott L., Erdos M.R., Robbins C.M., Moses T.Y., Berglund P., Dutra A., Pak E., Durkin S., Csoka A.B., Boehnke M., Glover T.W., Collins F.S., (2003) "*Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome.*" Nature 423(6937):293-8.

Fatkin D., MacRae C., Sasaki T., Wolff M.R., Porcu M., Frenneaux M., Atherton J., Vidaillet H.J. Jr., Spudich S., De Girolami U., Seidman J.G., Seidman C., Muntoni F., Muehle G., Johnson W., McDonough B., (1999) "*Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease.*" N Engl J Med. 341(23):1715-24.

Fisher D.Z., Chaudhary N., Blobel G., (1986) "*cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins.*" Proc Natl Acad Sci U S A. 83(17):6450-4.

Fletcher T.M., Hansen J.C., (1996). "*The nucleosomal array: structure/ function relationships.*" Crit Rev Eukaryot Gene Expr 6(2-3):149-88.

Foisner R, (2001) "*Inner nuclear membrane proteins and the nuclear lamina.*" J Cell Sci. 114(Pt 21):3791-2.

- Gaines P., Tien C.W., Olins A.L., Olins D.E., Shultz L.D., Carney L., Berliner N., (2008) "*Mouse neutrophils lacking lamin B-receptor expression exhibit aberrant development and lack critical functional responses.*" *Exp Hematol.* 36(8):965-76.
- Gant T.M., Wilson K.L., (1997) "*Nuclear assembly.*" *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:669-95.
- Gaudy-Marqueste C., Roll P, Esteves-Vieira V., Weiller P.J., Grob J.J., Cau P., Lévy N., De Sandre-Giovannoli A., (2010) "*LBR mutation and nuclear envelope defects in a patient affected with Reynolds syndrome.*" *J Med Genet.* 47(6):361-70.
- Gerace L., Burke B., (1988) "*Functional organization of the nuclear envelope.*" *Annu Rev Cell Biol.* 4:335-74.
- Georgatos S.D., (2001) "*The inner nuclear membrane: simple or very complex?*" *EMBO J.* 20(12):2989-94.
- Georgatos S.D, Blobel G., (1987) "*Lamin B constitutes an intermediate filament attachment site at the nuclear envelope.* *J Cell Biol.*" 105(1):117-25.
- Georgatos S.D., Maroulakou I., Blobel G., (1989) "*Lamin A, lamin B, and lamin B receptor analogues in yeast.*" *J Cell Biol.* 108(6):2069-82.
- Glatz J.F., van der Vusse G.J., (1996) "*Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance.*" *Prog Lipid Res.* 35(3):243-82.
- Gong J., Sun Z., Li P., (2009) "*CIDE proteins and metabolic disorders.*" *Curr Opin Lipidol.* 20(2):121-6.
- Govin J., Caron C., Lestrat C., Rousseaux S., Khochbin S., (2004) "*The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis.*" *Eur J Biochem.* 271(17):3459-69.
- Green R.P., Cohn S.M., Sacchettini J.C., Jackson K.E., Gordon J.I., (1992) "*The mouse intestinal fatty acid binding protein gene: nucleotide sequence, pattern of developmental and regional expression, and proposed structure of its protein product.*" *DNA Cell Biol.* 11(1):31-41.
- Guarda A., Bolognese F., Bonapace I.M., Badaracco G., (2009) "*Interaction between the inner nuclear membrane lamin B receptor and the heterochromatic methyl binding protein, MeCP2.*" *Exp Cell Res.* 315(11):1895-903.
- Hake S.B., Allis C.D., (2006a) "*Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the "H3 barcode hypothesis".*" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(17):6428-35.

Hake S.B., Garcia B.A., Duncan E.M., Kauer M., Dellaire G., Shabanowitz J., Bazett-Jones D.P., Allis C.D., Hunt D.F., (2006b) "*Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants.*" J Biol Chem. 281(1):559-68.

Hansen J.C., (2002) "*Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions.*" Annu Rev Biophys Biomol Struct.31:361-92.

Haraguchi T., Koujin T., Segura-Totten M., Lee K.K., Matsuoka Y., Yoneda Y., Wilson K.L., Hiraoka Y., (2001) "*BAF is required for emerin assembly into the reforming nuclear envelope.*" J Cell Sci. 114(Pt 24):4575-85.

Hegele R.A., Cao H., Liu D.M., Costain G.A., Charlton-Menys V., Rodger N.W., Durrington P.N., (2006) "*Sequencing of the reannotated LMNB2 gene reveals novel mutations in patients with acquired partial lipodystrophy.*" Am J Hum Genet. 79(2):383-9.

Hellemans J., Preobrazhenska O., Willaert A., Debeer P., Verdonk P.C., Costa T., Janssens K., Menten B., Van Roy N., Vermeulen S.J., Savarirayan R., Van Hul W., Vanhoenacker F., Huylebroeck D., De Paepe A., Naeyaert J.M., Vandesompele J., Speleman F., Verschueren K., Coucke P.J., Mortier G.R., (2004) "*Loss-of-function mutations in LEMD3 result in osteopoikilosis, Buschke-Ollendorff syndrome and melorheostosis.*" Nat Genet. 36(11):1213-8.

Hu P.P., Datto M.B., Wang X.F., (1998) "*Molecular mechanisms of transforming growth factor-beta signaling.*" Endocr Rev. 19(3):349-63.

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

Holmer L., Pezhman A., Worman H.J., (1998) "*The human lamin B receptor/sterol reductase multigene family.*" Genomics 54(3):469-76.

Hozák P., Sasseville A.M., Raymond Y., Cook P.R., (1995) "*Lamin proteins form an internal nucleoskeleton as well as a peripheral lamina in human cells.*" J Cell Sci. 108 (Pt2):635-44.

Hutchison C.J., (2002) "*Lamins: building blocks or regulators of gene expression?*" Nat Rev Mol Cell Biol. 3(11):848-58.

Hutchison C.J., Alvarez-Reyes M., Vaughan O.A., (2001) “*Lamins in disease: why do ubiquitously expressed nuclear envelope proteins give rise to tissue-specific disease phenotypes?*” J Cell Sci. 114(Pt1):9-19.

Ishimura A., Ng J.K., Taira M., Young S.G., Osada S., (2006) “*Man1, an inner nuclear membrane protein, regulates vascular remodeling by modulating transforming growth factor beta signaling.*” Development. 133(19):3919-28.

Itoh S., Itoh F., Goumans M.J., Ten Dijke P., (2000) “*Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins.*” Eur J Biochem. 267(24):6954-67.

Jenuwein T., Allis C.D., (2001) “*Translating the histone code.*” Science. 293(5532):1074-80.

Jiang X., Xia L., Chen D., Yang Y., Huang H., Yang L., Zhao Q., Shen L., Wang J., Chen D., (2008) “*Otefin, a nuclear membrane protein, determines the fate of germline stem cells in Drosophila via interaction with Smad complexes.*” Dev Cell. 14(4):494-506.

Kamakaka R.T., Biggins S., (2005) “*Histone variants: deviants?*” Genes Dev. 19(3):295-310.

Kawahire S., Tachibana T., Umemoto M., Yoneda Y., Imai N., Saito M., Ichimura T., Omata S., Horigome T., (1996) “*Subcellular distribution and phosphorylation of the nuclear localization signal binding protein, NBP60.*” Exp Cell Res. 222(2):385-94.

Kawahire S., Takeuchi M., Gohshi T., Sasagawa S., Shimada M., Takahashi M., Abe T.K., Ueda T., Kuwano R., Hikawa A., Ichimura T., Omata S., Horigome T., (1997) “*cDNA cloning of nuclear localization signal binding protein NBP60, a rat homologue of lamin B receptor, and identification of binding sites of human lamin B receptor for nuclear localization signals and chromatin.*” J Biochem. 121(5):881-9.

Kouzarides T., (2007) “*Chromatin modifications and their function.*” Cell. 128(4):693-705.

Kurisaki A., Kose S., Yoneda Y., Heldin C.H., Moustakas A., (2001) “*Transforming growth factor-beta induces nuclear import of Smad3 in an importin-beta1 and Ran-dependent manner.*” Mol Biol Cell. 12(4):1079-91.

Lammerding J., Fong L.G., Ji J.Y., Reue K., Stewart C.L., Young S.G., Lee R.T., (2006) “*Lamins A and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics.*” J Biol Chem. 281(35):25768-80.

- Levy E., Ménard D., Delvin E., Montoudis A., Beaulieu J.F., Mailhot G., Dubé N., Sinnett D., Seidman E., Bendayan M., (2009) “*Localization, function and regulation of the two intestinal fatty acid-binding protein types.*” *Histochem Cell Biol.* 132(3):351-67.
- Li J.Z., Lei Y., Wang Y., Zhang Y., Ye J., Xia X., Pan X., Li P., (2010) “*Control of cholesterol biosynthesis, uptake and storage in hepatocytes by Cideb.*” *Biochim Biophys Acta* 1801(5):577-86.
- Li J.Z., Ye J., Xue B., Qi J., Zhang J., Zhou Z., Li Q., Wen Z., Li P., (2007) “*Cideb regulates diet-induced obesity, liver steatosis, and insulin sensitivity by controlling lipogenesis and fatty acid oxidation.*” *Diabetes.* 56(10):2523-32.
- Lin F., Morrison J.M., Wu W., Worman H.J., (2005) “*MAN1, an integral protein of the inner nuclear membrane, binds Smad2 and Smad3 and antagonizes transforming growth factor-beta signaling.*” *Hum Mol Genet.* 14(3):437-45.
- Lin F., Noyer C.M., Ye Q., Courvalin J.C., Worman H.J., (1996) “*Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis recognize a region within the nucleoplasmic domain of inner nuclear membrane protein LBR.*” *Hepatology* 23(1):57-61.
- Lomberk G., Wallrath L., Urrutia R., (2006) “*The Heterochromatin Protein 1 family.*” *Genome Biol.* 7(7):228.
- Loyola A., Almouzni G., (2007) “*Marking histone H3 variants: how, when and why?*” *Trends Biochem Sci.* 32(9):425-33.
- Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J., (1997). “*Crystal structure of the nucleosome core particle at 2,8 Å resolution.*” *Nature* 389(6648):251-60.
- Lu X., Shi Y., Lu Q., Ma Y., Luo J., Wang Q., Ji J., Jiang Q., Zhang C., (2010) “*Requirement for lamin B receptor and its regulation by importin {beta} and phosphorylation in nuclear envelope assembly during mitotic exit.*” *J Biol Chem.* [Epub ahead of print]
- Lyman S.K., Gerace L., (2001) “*Nuclear pore complexes: dynamics in unexpected places.*” *J Cell Biol.* 154(1):17-20.
- Maison C., Almouzni G., (2004) “*HPI and the dynamics of heterochromatin maintenance.*” *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(4):296-304.
- Makatsori D., Kourmouli N., Polioudaki H., Shultz L.D., McLean K., Theodoropoulos P.A., Singh P.B., Georgatos S.D., (2004) “*The inner nuclear*

membrane protein lamin B receptor forms distinct microdomains and links epigenetically marked chromatin to the nuclear envelope." J Biol Chem. 279(24):25567-73.

Manilal S., Nguyen T.M., Sewry C.A., Morris G.E., (1996) "*The Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein, emerin, is a nuclear membrane protein.*" Hum Mol Genet. 5(6):801-8.

Mansharamani M., Wilson K.L., (2005) "*Direct binding of nuclear membrane protein MAN1 to emerin in vitro and two modes of binding to barrier-to-autointegration factor.*" J Biol Chem. 280(14):13863-70.

Margalit A., Brachner A., Gotzmann J., Foisner R., Gruenbaum Y., (2007) "*Barrier-to-autointegration factor--a BAFfling little protein.*" Trends Cell Biol. 17(4):202-8.

Massagué J., (1998) "*TGF-beta signal transduction.*" Annu Rev Biochem. 67:753-91.

Mattaj I.W., (2004) "*Sorting out the nuclear envelope from the endoplasmic reticulum.*" Nat Rev Mol Cell Biol. 5(1):65-9.

Ma Y., Cai S., Lv Q., Jiang Q., Zhang Q., Sodmergen, Zhai Z., Zhang C., (2007) "*Lamin B receptor plays a role in stimulating nuclear envelope production and targeting membrane vesicles to chromatin during nuclear envelope assembly through direct interaction with importin beta.*" J Cell Sci 120(Pt 3):520-30.

McCormick S.P., Ng J.K., Véniant M., Borén J., Pierotti V., Flynn L.M., Grass D.S., Connolly A., Young S.G., (1996) "*Transgenic mice that overexpress mouse apolipoprotein B. Evidence that the DNA sequences controlling intestinal expression of the apolipoprotein B gene are distant from the structural gene.*" J Biol Chem. 271(20):11963-70.

Meier J., Georgatos S.D., (1994) "*Type B lamins remain associated with the integral nuclear envelope protein p58 during mitosis: implications for nuclear reassembly.*" EMBO J. 13(8):1888-98.

Misteli T., Gunjan A., Hock R., Bustin M., Brown D.T., (2000) "*Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells.*" Nature 408(6814):877-81.

Moir R.D., Spann T.P., (2001) "*The structure and function of nuclear lamins: implications for disease.*" Cell Mol Life Sci. 58(12-13):1748-57.

Moir R.D., Spann T.P., Herrmann H., Goldman R.D., (2000) "*Disruption of nuclear lamin organization blocks the elongation phase of DNA replication.*" J Cell Biol. 149(6):1179-92.

- Moir R.D., Yoon M., Khuon S., Goldman R.D., (2000) “*Nuclear lamins A and B1: different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells.*” *J Cell Biol.* 151(6):1155-68.
- Montes de Oca R., Lee K.K., Wilson K.L., (2005) “*Binding of barrier to autointegration factor (BAF) to histone H3 and selected linker histones including H1.1.*” *J Biol Chem.* 280(51):42252-62.
- Montes de Oca R., Shoemaker C.J., Gucek M., Cole R.N., Wilson K.L., (2009) “*Barrier-to-autointegration factor proteome reveals chromatin-regulatory partners.*” *PLoS One* 4(9):e7050.
- Montoudis A., Seidman E., Boudreau F., Beaulieu J.F., Menard D., Elchebly M., Mailhot G., Sane A.T., Lambert M., Delvin E., Levy E., (2008) “*Intestinal fatty acid binding protein regulates mitochondrion beta-oxidation and cholesterol uptake.*” *J Lipid Res.* 49(5):961-72.
- Morin P., Sagné C., Gasnier B., (2004) “*Functional characterization of wild-type and mutant human sialin.*” *EMBO J.* 23(23):4560-70.
- Moustakas A., Souchelnytskyi S., Heldin C.H., (2001) “*Smad regulation in TGF-beta signal transduction.*” *J Cell Sci.* 114(Pt 24):4359-69.
- Muchir A., Bonne G., van der Kooi A.J., van Meegen M., Baas F., Bolhuis P.A., de Visser M., Schwartz K., (2000) “*Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B).*” *Hum Mol Genet.* 9(9):1453-9.
- Nagano A., Arahata K., (2000) “*Nuclear envelope proteins and associated diseases.*” *Curr Opin Neurol.* 13(5):533-9.
- Mumm S., Wenkert D., Zhang X., McAlister W.H., Mier R.J., Whyte M.P., (2007) “*Deactivating germline mutations in LEMD3 cause osteopoikilosis and Buschke-Ollendorff syndrome, but not sporadic melorheostosis.*” *J Bone Miner Res.* 22(2):243-50.
- Navarro C.L., De Sandre-Giovannoli A., Bernard R., Boccaccio I., Boyer A., Geneviève D., Hadj-Rabia S., Gaudy-Marqueste C., Smitt H.S., Vabres P., Faivre L., Verloes A., Van Essen T., Flori E., Hennekam R., Beemer F.A., Laurent N., Le Merrer M., Cau P., Lévy N., (2004) “*Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) defects cause nuclear disorganization and identify restrictive dermopathy as a lethal neonatal laminopathy.*” *Hum Mol Genet.* 13(20):2493-503.

- Nichols R.J., Wiebe M.S., Traktman P., (2006) “*The vaccinia-related kinases phosphorylate the N' terminus of BAF, regulating its interaction with DNA and its retention in the nucleus.*” *Mol Biol Cell.* 17(5):2451-64.
- Nikolakaki E., Meier J., Simos G., Georgatos S.D., Giannakouros T., (1997) “*Mitotic phosphorylation of the lamin B receptor by a serine/arginine kinase and p34(cdc2).*” *J Biol Chem.* 272(10):6208-13.
- Nikolakaki E., Simos G., Georgatos S.D., Giannakouros T., (1996) “*A nuclear envelope-associated kinase phosphorylates arginine-serine motifs and modulates interactions between the lamin B receptor and other nuclear proteins.*” *J Biol Chem.* 271(14):8365-72.
- Novelli G., Muchir A., Sangiuolo F., Helbling-Leclerc A., D'Apice M.R., Massart C., Capon F., Sbraccia P., Federici M., Lauro R., Tudisco C., Pallotta R., Scarano G., Dallapiccola B., Merlini L., Bonne G., (2002) “*Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C.*” *Am J Hum Genet.* 71(2):426-31.
- Offiah A.C., Mansour S., Jeffrey I., Nash R., Whittock N., Pyper R., Bewley S., Clayton P.T., Hall C.M., (2003) “*Greenberg dysplasia (HEM) and lethal X linked dominant Conradi-Hünermann chondrodysplasia punctata (CDPX2): presentation of two cases with overlapping phenotype.*” *J Med Genet.* 40(12):e129.
- Oosterwijk J.C., Mansour S., van Noort G., Waterham H.R., Hall C.M., Hennekam R.C., (2003) “*Congenital abnormalities reported in Pelger-Huët homozygosity as compared to Greenberg/HEM dysplasia: highly variable expression of allelic phenotypes.*” *J Med Genet.* 40(12):937-41.
- Osada S., Ohmori S.Y., Taira M., (2003) “*XMAN1, an inner nuclear membrane protein, antagonizes BMP signaling by interacting with Smad1 in Xenopus embryos.*” *Development.* 130(9):1783-94.
- Padiath Q.S., Saigoh K., Schiffmann R., Asahara H., Yamada T., Koeppen A., Hogan K., Ptáček L.J., Fu Y.H., (2006) “*Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy.*” *Nat Genet.* 38(10):1114-23.
- Pan D., Estévez-Salmerón L.D., Stroschein S.L., Zhu X., He J., Zhou S., Luo K., (2005) “*The integral inner nuclear membrane protein MAN1 physically interacts with the R-Smad proteins to repress signaling by the transforming growth factor- β superfamily of cytokines.*” *J Biol Chem.* 280(16):15992-6001

- Papoutsopoulou S., Nikolakaki E., Giannakouros T., (1999) “*SRPK1 and LBR protein kinases show identical substrate specificities.*” *Biochem Biophys Res Commun.* 255(3):602-7.
- Polioudaki H., Kourmouli N., Drosou V., Bakou A., Theodoropoulos P.A., Singh P.B., Giannakouros T., Georgatos S.D., (2001) “*Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1.*” *EMBO Rep.* 2(10):920-5.
- Prakash A., Sengupta S., Aparna K., Kasbekar D.P., (1999) “*The erg-3 (sterol delta14,15-reductase) gene of Neurospora crassa: generation of null mutants by repeat-induced point mutation and complementation by proteins chimeric for human lamin B receptor sequences.*” *Microbiology* 145(Pt 6):1443-51.
- Pusarla R.H., Bhargava P., (2005) “*Histones in functional diversification. Core histone variants.*” *FEBS J.* 272(20):5149-68.
- Pyrpasopoulou A., Meier J., Maison C., Simos G., Georgatos S.D., (1996) “*The lamin B receptor (LBR) provides essential chromatin docking sites at the nuclear envelope.*” *EMBO J.* 15(24):7108-19.
- Quina A.S., Buschbeck M., Di Croce L., (2006) “*Chromatin structure and epigenetics.*” *Biochem Pharmacol.* 72(11):1563-9.
- Raffaele Di Barletta M., Ricci E., Galluzzi G., Tonali P., Mora M., Morandi L., Romorini A., Voit T., Orstavik K.H., Merlini L., Trevisan C., Biancalana V., Housmanowa-Petrusewicz I., Bione S., Ricotti R., Schwartz K., Bonne G., Toniolo D., (2000) “*Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy.*” *Am J Hum Genet.* 66(4):1407-12.
- Redon C., Pilch D., Rogakou E., Sedelnikova O., Newrock K., Bonner W., (2002) “*Histone H2A variants H2AX and H2AZ.*” *Curr Opin Genet Dev.* 12(2):162-9.
- Reinke H., Hörz W., (2003) “*Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter.*” *Mol Cell.* 11(6):1599-607.
- Richmond T.J., Finch J.T., Rushton B., Rhodes D., Klug A., (1984). “*Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution*” *Nature* 311(5986):532-7.
- Röber R.A., Weber K., Osborn M., (1989) “*Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study.*” *Development.* 105(2):365-78.

Roberts AB, Russo A, Felici A, Flanders KC. (2003) "*Smad3: a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF-beta.*" *Ann N Y Acad Sci.* 995:1-10.

Schmierer B., Hill C.S., (2007) "*TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility.*" *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(12):970-82.

Schuler E., Lin F., Worman H.J., (1994) "*Characterization of the human gene encoding LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane.*" *J. Biol. Chem.* 269(15):11312-7.

Segura-Totten M., Kowalski A.K., Craigie R., Wilson K.L., (2002) "*Barrier-to-autointegration factor: major roles in chromatin decondensation and nuclear assembly.*" *J Cell Biol.* 158(3):475-85.

Segura-Totten M., Wilson K.L., (2004) "*BAF: roles in chromatin, nuclear structure and retrovirus integration.*" *Trends Cell Biol.* 14(5):261-6.

Shackleton S., Lloyd D.J., Jackson S.N., Evans R., Niermeijer M.F., Singh B.M., Schmidt H., Brabant G., Kumar S., Durrington P.N., Gregory S., O'Rahilly S., Trembath R.C., (2000) "*LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy.*" *Nat Genet.* 24(2):153-6.

Shimi T., Pflieger K., Kojima S., Pack C.G., Solovei I., Goldman A.E., Adam S.A., Shumaker D.K., Kinjo M., Cremer T., Goldman R.D., (2008) "*The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription.*" *Genes Dev.* 22(24):3409-21.

Shultz L.D., Lyons B.L., Burzenski L.M., Gott B., Samuels R., Schweitzer P.A., Dreger C., Herrmann H., Kalscheuer V., Olins A.L., Olins D.E., Sperling K., Hoffmann K., (2003) "*Mutations at the mouse ichthyosis locus are within the lamin B receptor gene: a single gene model for human Pelger-Huët anomaly.*" *Hum Mol Genet.* 12(1):61-9.

Siddiqi S.A., Gorelick F.S., Mahan J.T., Mansbach CM 2nd., (2003) "*COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle.*" *J Cell Sci.* 116(Pt 2):415-27.

Silve S., Dupuy P.H., Ferrara P., Loison G., (1998) "*Human lamin B receptor exhibits sterol C14-reductase activity in Saccharomyces cerevisiae.*" *Biochim. Biophys. Acta.* 1392(2-3):233-44.

Simos G., Georgatos S.D., (1992) "*The inner nuclear membrane protein p58 associates in vivo with a p58 kinase and the nuclear lamins.*" *EMBO J.* 11(11):4027-36.

- Simos G., Maison C., Georgatos S.D., (1996) "*Characterization of p18, a component of the lamin B receptor complex and a new integral membrane protein of the avian erythrocyte nuclear envelope.*" J Biol Chem. 271(21):12617-25.
- Smith D.B., Johnson K.S., (1988) "*Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase.*" Gene 67(1):31-40.
- Soullam B., Worman H.J., (1993) "*The amino-terminal domain of the lamin B receptor is a nuclear envelope targeting signal.*" J. Cell Biol. 120(5):1093-100.
- Spann T.P., Moir R.D., Goldman A.E., Stick R., Goldman R.D., (1997) "*Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis.*" J Cell Biol. 136(6):1201-12.
- Stan S., Delvin E., Lambert M., Seidman E., Levy E., (2003) "*Apo A-IV: an update on regulation and physiologic functions.*" Biochim Biophys Acta. 1631(2):177-87.
- Stuurman N., Heins S., Aebi U., (1998) "*Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions.*" J Struct Biol. 122(1-2):42-66.
- Takano M., Koyama Y., Ito H., Hoshino S., Onogi H., Hagiwara M., Furukawa K., Horigome T., (2004) "*Regulation of binding of lamin B receptor to chromatin by SR protein kinase and cdc2 kinase in Xenopus egg extracts.*" J Biol Chem. 279(13):13265-71.
- Takano M., Takeuchi M., Ito H., Furukawa K., Sugimoto K., Omata S., Horigome T., (2002) "*The binding of lamin B receptor to chromatin is regulated by phosphorylation in the RS region.*" Eur J Biochem. 269(3):943-53.
- Tao J., Hu K., Chang Q., Wu H., Sherman N.E., Martinowich K., Klose R.J., Schanen C., Jaenisch R., Wang W., Sun Y.E., (2009) "*Phosphorylation of MeCP2 at Serine 80 regulates its chromatin association and neurological function.*" Proc Natl Acad Sci U S A. 106(12):4882-7.
- Ten Dijke P., Hill C.S., (2004) "*New insights into TGF-beta-Smad signalling.*" Trends Biochem Sci. 29(5):265-73.
- Tso P., Liu M., (2004) "*Apolipoprotein A-IV, food intake, and obesity.*" Physiol Behav 83(4):631-43.
- Tso P., Liu M., Kalogeris T.J., Thomson A.B., (2001) "*The role of apolipoprotein A-IV in the regulation of food intake.*" Annu Rev Nutr 21:231-54.
- Tso P., Nauli A., Lo C.M., (2004) "*Enterocyte fatty acid uptake and intestinal fatty acid-binding protein.*" Biochem Soc Trans. 32(Pt 1):75-8.

- Tso P., Sun W., Liu M., (2004) "*Gastrointestinal satiety signals IV. Apolipoprotein A-IV.*" Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 286(6):G885-90.
- Tsunaka Y., Kajimura N., Tate S., Morikawa K., (2005). "*Alteration of the nucleosomal DNA path in the crystal structure of a human nucleosome core particle.*" Nucleic Acids Res. 33(10):3424-34.
- Turner B.M., (2002) "*Cellular memory and the histone code.*" Cell. 111(3):285-91.
- Yang L., Guan T., Gerace L., (1997) "*Integral membrane proteins of the nuclear envelope are dispersed throughout the endoplasmic reticulum during mitosis.*" J Cell Biol. 137(6):1199-210.
- Vassileva G., Huwyler L., Poirier K., Agellon L.B., Toth M.J., (2000) "*The intestinal fatty acid binding protein is not essential for dietary fat absorption in mice.*" FASEB J. 14(13):2040-6.
- Vergnes L., Péterfy M., Bergo M.O., Young S.G., Reue K., (2004) "*Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity.*" Proc Natl Acad Sci U S A. 101(28):10428-33.
- Villar-Garea A., Imhof A., (2006) "*The analysis of histone modifications.*" Biochim Biophys Acta. 1764(12):1932-9.
- Vlcek S., Foisner R., (2007) "*Lamins and lamin-associated proteins in aging and disease.*" Curr Opin Cell Biol. 19(3):298-304.
- Wang A.B., Liu D.P., Liang C.C., (2003) "*Regulation of human apolipoprotein B gene expression at multiple levels.*" Exp Cell Res 290(1):1-12.
- Wang X., Xu S., Rivolta C., Li L.Y., Peng G.H., Swain P.K., Sung C.H., Swaroop A., Berson E.L., Dryja T.P., Chen S., (2002) "*Barrier to autointegration factor interacts with the cone-rod homeobox and represses its transactivation function.*" J Biol Chem. 277(45):43288-300.
- Wassif C.A., Brownson K.E., Sterner A.L., Forlino A., Zerfas P.M., Wilson W.K., Starost M.F., Porter F.D., (2007) "*HEM dysplasia and ichthyosis are likely laminopathies and not due to 3beta-hydroxysterol Delta14-reductase deficiency.*" Hum Mol Genet. 16(10):1176-87.
- Waterham H.R., Koster J., Mooyer P., Noort Gv G., Kelley R.I., Wilcox W.R., Wanders R.J., Hennekam R.C., Oosterwijk J.C., (2003) "*Autosomal recessive HEM/Greenberg skeletal dysplasia is caused by 3 beta-hydroxysterol delta 14-reductase deficiency due to mutations in the lamin B receptor gene.*" Am J Hum Genet. 72(4):1013-7.

- Weinstock P.H., Bisgaier C.L., Hayek T., Aalto-Setälä K., Sehayek E., Wu L., Sheffele P., Merkel M., Essenburg A.D., Breslow J.L., (1997) "*Decreased HDL cholesterol levels but normal lipid absorption, growth, and feeding behavior in apolipoprotein A-IV knockout mice.*" *J Lipid Res.* 38(9):1782-94.
- White C.L., Suto R.K., Luger K., (2001). "*Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions.*" *EMBO J.* 20(18):5207-18.
- Woodcock C.L., Dimitrov S., (2001) "*Higher-order structure of chromatin and chromosomes.*" *Curr Opin Genet Dev.* 11(2):130-5.
- Worman H.J., Bonne G., (2007) "*'Laminopathies': a wide spectrum of human diseases.*" *Exp Cell Res.* 313(10):2121-33.
- Worman H.J., Courvalin J.C., (2002) "*The nuclear lamina and inherited disease.*" *Trends Cell Biol.* 12(12):591-8.
- Worman H.J., Evans C.D., Blobel G., (1990) "*The lamin B receptor of the nuclear envelope inner membrane: a polytopic protein with eight potential transmembrane domains.*" *J Cell Biol.* 111(4):1535-42.
- Worman H.J., Yuan J., Blobel G., Georgatos S.D., (1988) "*A lamin B receptor in the nuclear envelope.*" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(22):8531-4.
- Woodcock C.L., Dimitrov S., (2001) "*Higher-order structure of chromatin and chromosomes.*" *Curr Opin Genet Dev.* 11(2):130-5.
- Wu C., Zhang Y., Sun Z., Li P., (2008) "*Molecular evolution of Cide family proteins: novel domain formation in early vertebrates and the subsequent divergence.*" *BMC Evol Biol.* 8:159.
- Xiao Z., Liu X., Lodish H.F., (2000) "*Importin beta mediates nuclear translocation of Smad 3.*" *J Biol Chem.* 275(31):23425-8.
- Xu L., Alarcón C., Cöl S., Massagué J., (2003) "*Distinct domain utilization by Smad3 and Smad4 for nucleoporin interaction and nuclear import.*" *J Biol Chem.* 278(43):42569-77.
- Ye J., Li J.Z., Liu Y., Li X., Yang T., Ma X., Li Q., Yao Z., Li P., (2009) "*Cideb, an ER- and lipid droplet-associated protein, mediates VLDL lipidation and maturation by interacting with apolipoprotein B.*" *Cell Metab.* 9(2):177-90.
- Ye Q., Callebaut I., Pezhman A., Courvalin J.C., Worman H.J., (1997) "*Domain-specific interactions of human HPI-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR.*" *J Biol. Chem.* 272(23):14983-9.

- Ye Q., Worman H.J., (1994) "*Primary structure analysis and lamin B and DNA binding of human LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane.*" J Biol Chem. 269(15):11306-11.
- Ye Q., Worman H.J., (1996) "*Interaction between an integral protein of the nuclear envelope inner membrane and human chromodomain proteins homologous to Drosophila HP1.*" J Biol Chem. 271(25):14653-6.
- Zheng R., Ghirlando R., Lee M.S., Mizuuchi K., Krause M., Craigie R., (2000) "*Barrier-to-autointegration factor (BAF) bridges DNA in a discrete, higher-order nucleoprotein complex.*" Proc Natl Acad Sci U S A. 97(16):8997-9002.
- Zingone A., Hiraiwa H., Pan C.J., Lin B., Chen H., Ward J.M., Chou J.Y., (2000) "*Correction of glycogen storage disease type 1a in a mouse model by gene therapy.*" J Biol Chem. 275(2):828-32.
- Zwerger M., Herrmann H., Gaines P., Olins A.L., Olins D.E., (2008) "*Granulocytic nuclear differentiation of lamin B receptor-deficient mouse EPRO cells.*" Exp Hematol. 36(8):977-87.
- Zwerger M., Kolb T., Richter K., Karakesisoglou I., Herrmann H., (2010) "*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.*" Mol Biol Cell. 21(2):354-68.