

STRESZCZENIE

Jądro komórkowe odpowiada za wiele podstawowych funkcji komórki. Kształt i rozmiar jądra komórkowego wpływają m.in. na proliferację komórek (Versaavel i wsp. 2012) ekspresję genów (Jain i wsp. 2013) i syntezę białek (Thomas i wsp. 2002). W procesie starzenia, a także w stanach chorobowych np. w nowotworach, kształt i rozmiar jądra ulega zmianom (Zink i wsp. 2004). Najczęściej spotykanym kształtem jądra jest kształt owalny lub okrągły. Istnieją jednak pewne typy komórek, u których nietypowy kształt jądra jest zjawiskiem prawidłowym np. w neutrofilach (Rowat i wsp. 2013).

Niektóre komórki systemu krwiotwórczego charakteryzuje nietypowy kształt jądra komórkowego – co dotyczy bazofilów, eozynofilów, neutrofilów i makrofagów (Yang i wsp. 2013). Nietypowy kształt jądra komórkowego w neutrofilach jest potrzebny do prawidłowego ich funkcjonowania, jądro podzielone na fragmenty zwane segmentami jest niezbędne do przemieszczania się (Hoffmann i wsp. 2002). Odmienny kształt jądra występuje również w komórkach wielu typów nowotworów. Poszczególne typy nowotworów powiązane są z charakterystycznymi zmianami w strukturze wewnątrzjądrowej, co jest wykorzystywane w diagnostyce (Zink i wsp. 2004). Wykazano, że odmienny kształt jądra komórki nowotworowej umożliwia przemieszczanie się, doprowadzając do przerzutów (Dahl i wsp. 2008, Bell i Lammerding 2016).

Jądro otoczone jest otoczką jądrową, która zbudowana jest z wewnętrznej i zewnętrznej błony jądrowej. Zawiera dużą liczbę różnych białek, które odgrywają rolę w organizacji przestrzennej chromatyny i regulacji genów. Pod wewnętrzną błoną jądrową znajduje się blaszka jądrowa zbudowana z lamin i filamentów pośrednich, które zapewniają mechaniczne wsparcie, a także miejsce, w którym znajdują się kompleksy porów jądrowych (Hetzer 2010). Wiadomo na przykład, że deformacja kształtu jądra w komórkach nowotworowych (Zink i wsp. 2004) i innych komórkach (Lammerding i wsp. 2005) jest powiązana z mutacjami genów lamin.

Proces różnicowania obejmuje zmiany nie tylko w fenotypie komórki, ekspresji genów i reorganizacji struktury wewnątrzjądrowej, ale także elastyczności i kształtu jądra komórkowego (Pejrowski i wsp. 2007). Różnicowanie się komórek występuje na przykład w hipokampalnej neurogenezie dorosłych, w ramach której wyróżniono pięć fenotypów komórek o różnej morfologii. Ponieważ kształt jądra komórkowego zależy również od morfologii komórek (Chen i

wsp. 2015), neurogeneza dorosłych stanowi odpowiedni model umożliwiający ocenę zmienności kształtu jądra komórkowego.

W procesie neurogenezy hipokampalnej, który ma miejsce u dorosłych ssaków, stwierdzono występowanie neuralnych komórek macierzystych (NSC), z których powstają nowe neurony ziarniste. Hipokampalna neurogeneza dorosłych jest procesem wieloetapowym, w ramach którego wyróżniono cztery subpopulacje komórek linii neurogennej: NSC (typ 1), neuralne komórki progenitorowe (typ 2a, 2b i typ 3) i neurony ziarniste (typ 4). Ponadto komórki typu 1 można podzielić na dwie subpopulacje, różniące się na podstawie stanu aktywności (aktywne i wyciszone NSC, czyli NSCaNSC i NSCqNSC) oraz na podstawie morfologii komórki (typ α i typ β). Neuralne komórki progenitorowe migrując z warstwy podziarnistej do warstwy ziarnistej zakrętu zębatego hipokampa, przechodzą różnicowanie, co zapewnia regenerację tkanki oraz prawdopodobnie wspomaga procesy plastyczności (Kempermann i wsp. 2015).

Nietypowy kształt jądra NSC został opisany w kilku pracach. Pokazano charakterystyczne elementy chromatyny w jądrach komórek typu B (ang. envelope limited chromatin sheets, ELCS) warstwy podkomorowej komory bocznej, również w NSC rozwoju embrionalnego człowieka. Wykazano, że występowanie ELCS w komórkach typu B jest powiązane ze stanem ich wyciszenia. Występowanie ww. charakterystycznych elementów chromatyny opisano także w komórkach typu 1 zakrętu zębatego, jednakże są to obserwacje dotyczące jedynie trzech komórek (Cebrian-Silla i wsp. 2017). Jak dotąd nie opisano szczegółowo nietypowego kształtu jąder NSC w zakręcie zębatym, nie jest znana funkcja ich odmiennego kształtu.

Zbadano kształt jąder w poszczególnych typach komórek neurogenezy hipokampalnej dorosłych. Wykorzystano transgeniczną linię myszy z genem GFP pod promotorem nestyny, a poszczególne typy komórek wyznakowano metodą immunohistochemiczną oraz klasyfikowano na podstawie cech morfologicznych: typ 1 (nestyna-GFP+, długa wypustka neuralna), typ 2a (nestyna-GFP+/DCX-, brak wypustki neuralnej), typ 2b (nestyna-GFP+/DCX+), typ 3 (nestyna-GFP-/DCX+), typ 4 (NeuN+), aNSC (GFAP+), komórka przejściowa I (GFAP+/nestyna-GFP+), komórka przejściowa II (nestyna-GFP+), qNSC (nestyna-GFP+/Ki67+). Metodą mikroskopii konfokalnej zostały zebrane zdjęcia całego jądra komórkowego, zaś metodą mikroskopii elektronowej zbadano ultrastrukturę jądra komórki nestyna+ i przeprowadzono rekonstrukcję w programie Imaris.

Przy użyciu programu VisNow obliczono parametry określające kształt jąder komórek każdego typu. Jądra komórek typu 1 wykazały najmniejszą kulistość i objętość, w porównaniu z pozostałymi typami komórek. Znamienne różnice występowały również porównując średnią wartość kulistości i objętości pomiędzy typem 2a a pozostałymi typami komórek. Cechą odróżniającą NSC od NeuPC jest wysokość jądra, której pomiar jest istotnie większy niż w jądrach NeuPC. Największą wysokość jądra miały komórki typu 4, które również cechują się największą objętością, powierzchnią oraz kulistością. Odróżniającą cechą komórek typu 2a jest spłaszczony kształt jądra, przypominający kształtem erytrocyt. Omówione charakterystyczne cechy kształtu zostały również potwierdzone poprzez zastosowanie automatycznego klasyfikatora typu komórki, opracowanego na podstawie istniejącego programu ITK-SNAP. Przeprowadzona analiza umożliwiła osiągnięcie prawdopodobieństwa przyporządkowania jądra na podstawie cech kształtu do typu komórki na poziomie 46%, co jest dobrym wynikiem biorąc pod uwagę to, że program uczył się jedynie na zbiorze 150 jąder. Wpuklenia NE stwierdzono w komórkach NSC i NeuPC na obrazie z mikroskopu elektronowego, a rekonstrukcja trójwymiarowa jądra pozwoliła zobrazować przestrzenne ułożenie wpuklenia. Ta analiza również potwierdziła występowanie nieregularnego kształtu jądra w NSC/NeuPC. Analiza jąder komórek w różnym stanie aktywności pokazała, że komórki te nie różnią się pod względem cech kształtu. Stwierdzono natomiast różnice w przestrzennej organizacji chromatyny. W komórkach aktywnych chromatyna jest mniej równomiernie rozłożona w przestrzeni – prawdopodobnie wynika to z większej ilości skupisk heterochromatyny. Jądra komórek typu α i typu β wykazują bardzo podobne cechy kształtu, nie pokazano istotnych różnic dotyczących badanych zmiennych.

Uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań nad czynnikami wpływającymi na proces neurogenezy, które są zależne od kształtu jądra lub wpływają na kształt jądra, takimi jak budowa NE, przestrzenna organizacja chromatyny czy też mechanizmy epigenetyczne. Opracowana metoda umożliwiła kompleksową trójwymiarową analizę kształtu jąder komórkowych. Jak dotąd nie opisano odmiennego kształtu jąder komórek linii neurogennej w literaturze, istnieją jedynie wzmianki o nieregularnym kształcie komórek typu 2 (Kempermann i wsp. 2004), a także wykazano obecność ELCS w trzech komórkach NSC neurogenezy hipokampalnej (Cebrian-Silla i wsp. 2017). Ponadto opracowaną metodę można zastosować do analizy kształtu innych komórek eukariotycznych, co może stanowić cenne narzędzie

diagnostyczne w chorobach nowotworowych lub innych, które są powiązane ze zmianą kształtu jądra.