

mgr inż. Aneta Grymanowska

**Ocena zmienności kształtu jądra neuralnych komórek macierzystych
neurogenezy hipokampalnej dorosłych**

**Assesment of nuclear-shape alterations in neural stem cells of adult
hippocampal neurogenesis**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. Robert Filipkowski

Promotor pomocniczy: dr Adriana Magalska



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa 2023

Podziękowania

Szczególne podziękowania należą się osobom, które włożyły ogromny wkład we współpracę nad tym projektem. Należy wymienić dr. Jakuba Zielińskiego, dr. Krzysztofa Nowińskiego, mgr. Bartosza Boruckiego oraz pozostałe osoby z Interdyscyplinarnego Centrum Matematycznego Uniwersytetu Warszawskiego, które opracowały wersję programu do analizy kształtu badanych jąder komórkowych oraz uczestniczyli w statystycznej analizie danych.

Ponadto, wymienić należy pracowników Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego – dr. Piotra Majkę i mgr Sylwię Bednarek, którzy pracowali nad wykorzystaniem algorytmu uczącego do programowego opisanie kształtu jąder.

Ogromne podziękowania kieruję również w stronę mojego promotora, dr. hab. Roberta K. Filipkowskiego za nieustające zaangażowanie oraz wsparcie, mojej promotor pomocniczej, dr Adriany Magalskiej – za pomoc w opanowaniu technik immunocytochemicznych i mikroskopowych, a także dr. Krzysztofa H. Olszyńskiego, za opracowanie wybranych rycin.

Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej rozprawie były finansowane z grantu Narodowego Centrum Nauki HARMONIA nr 2014/14/M/NZ4/00561.

Część doświadczeń była przeprowadzona we współpracy z:

- Środowiskowym Laboratorium Laserowych Technik Mikroskopowych IMDiK im. M. Mossakowskiego PAN;
- Pracownią Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej IBD im. M. Nenckiego PAN;
- Pracownią Neuroinformatyki IBD im. M. Nenckiego PAN;
- Interdyscyplinarnym Centrum Matematycznego Programowania i Modelowania Uniwersytetu Warszawskiego.

Spis treści

1. WSTĘP	7
1.1. Budowa i funkcje jądra komórkowego.....	7
1.2. Czynniki, które wpływają na kształt jądra.....	10
1.2.1. Laminy	10
1.2.2. Jądrowe kompleksy porowe.....	11
1.2.3. Białka z domenami KASH i SUN	12
1.2.4. Chromosomy i organizacja przestrzenna chromatyny	14
1.2.5. Siateczka śródplazmatyczna (ER).....	16
1.2.6. Metabolizm lipidowy	17
1.2.7. Neutrofile jako przykład odmiennego kształtu jądra w stanie fizjologicznym	18
1.2.8. Nowotwory jako przykład odmiennego kształtu jądra w stanie chorobowym	20
1.2.9. Plemnik jako przykład migrującej komórki o odmiennym kształcie jądra.....	21
1.3. Hipokampalna neurogeneza dorosłych.....	22
1.3.1. Aktywne i spoczynkowe NSC.....	24
1.3.2. Dwa odrębne typy morfologiczne NSC.....	26
2. CELE PRACY	29
3. MATERIAŁY I METODY	30
3.1. Myszy	30
3.2. Uzyskanie skrawków histologicznych	30
3.2.1. Do mikroskopu konfokalnego.....	30
3.2.2. Do mikroskopu elektronowego	30
3.3. Immunohistochemia	31
3.3.1. Immunofluorescencja.....	31
3.3.2. Immunogold pre-embedment.....	31
3.4. Mikroskop konfokalny	32
3.5. Segmentacja w programie VisNow	32
3.6. Parametry wykorzystane do analizy kształtu jądra.....	33
3.7. Segmentacja w programie ITK-SNAP	35
3.8. Analiza statystyczna; dostępność danych.....	35
3.9. Układ doświadczeń.....	36
4. WYNIKI	38
4.1. Porównanie budowy jąder pięciu typów komórek neurogenezy hipokampalnej	38
4.2. Porównanie budowy jąder komórek neurogenezy hipokampalnej po odrzuceniu wartości odstających	40

4.3.	Porównanie budowy jąder NSC o różnej aktywności i morfologii	48
4.4.	Splaszczanie badanych jąder	53
4.5.	Czynniki różnicowe kształtu	54
4.6.	Automatyczny klasyfikator typu komórki	57
4.7.	Ultrastruktura jądra NSC	59
4.8.	Weryfikacja programu VisNow w modelu nowotworowym	60
5.	DYSKUSJA	63
5.1.	Podsumowanie i wstępne porównanie uzyskanych wyników z wiedzą literaturową.....	63
5.2.	Typ 1 jako „wyjątkowo odróżniający się”; komórki typu 2b vs 3	64
5.3.	Neurony / typ 4 – najbardziej kuliste, z odmienną organizacją chromatyny.....	65
5.4.	Brak różnic pomiędzy komórkami α i β	66
5.5.	Niewiele różnic pomiędzy komórkami typu 1 o różnej aktywności	66
5.6.	Pytanie o funkcję/funkcje nietypowego kształtu jąder komórkowych	67
5.7.	Zastosowana metoda	68
5.8.	Znaczenie wyników i dalsze kierunki badań.....	70
5.9.	Podsumowanie.....	72
1.	PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI.....	73
2.	STRESZCZENIE	74
3.	ABSTRACT.....	77
4.	INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....	80
5.	BIBLIOGRAFIA	81
6.	Lista publikacji autorki rozprawy	96

Wykaz skrótów

aNSC – aktywne neuralne komórki macierzyste (ang. active neural stem cells)

BAF – białka BAF (ang. barrier-to-autointegration factor)

DG – zakręt zębaty (ang. dentate gyrus)

EGFR – receptor czynnika wzrostu (ang. epidermal growth factor receptor)

ELCS – mostki chromatynowe (ang. envelope-limited chromatin sheets)

ER – siateczka śródplazmatyczna (ang. endoplasmic reticulum)

GFP – białko zielonej fluorescencji (ang. green fluorescent protein)

H₂O₂ – nadtlenek wodoru

HGPS – zespół Hutchinsona-Gilforda (ang. Hutchinson-Gilford progeria syndrome)

HP1 – białko wiążące heterochromatynę 1 (ang. heterochromatin protein 1)

INM – wewnętrzna błona jądrowa (ang. inner nuclear membrane)

LAD – domeny związane z laminą (ang. lamin associated domains)

LINC – kompleks białkowy LINC (ang. linker of nucleoskeleton and cytoskeleton)

NDS – surowica ośła (ang. normal donkey serum)

NE – otoczka jądrowa (ang. nuclear envelope)

NET – międzybłonowe białka NE (ang. nuclear envelope transmembrane proteins)

NeuPC – neuralne komórki progenitorowe (ang. neural progenitor cells)

NSC – neuralne komórki macierzyste (ang. neural stem cells)

Nup153 – białko kompleksu poru jądrowego 153 (ang. nuclear pore complex 153)

Nup170 – białko kompleksu poru jądrowego 170 (ang. nucleoporin 170)

Nup188 – białko kompleksu poru jądrowego 188 (ang. nucleoporin 188)

ONM – zewnętrzna błona jądrowa (ang. outer nuclear membrane)

PARP1 – polimeraza poli-ADP rybozy (ang. poly-ADP ribose polymerase)

PB – bufor fosforanowy (ang. phosphate buffer)

PBS – buforowana fosforanem sól fizjologiczna (ang. phosphate buffered saline)

PFA – paraformaldehyd

Pom152 – białko pory błonowej 152 (ang. pore membrane protein 152)

PP2A – fosfataza białkowa 2A (protein phosphatase 2A)

qNSC – wyciszone neuralne komórki macierzyste (ang. quiescent neural stem cells)

SGZ – warstwa podziarnista (ang. subgranular zone)

TAD – domeny powiązane topologicznie (ang. topologically associated domains)

1. WSTĘP

Jądro komórkowe jest wysoce dynamiczną i złożoną strukturą w komórkach eukariotycznych, które odpowiada za wiele kluczowych procesów takich jak np. proliferacja czy synteza białek; u źródła tych procesów leży regulacja ekspresji genów (Versaevel, Grevesse i Gabriele 2012, Jain i wsp. 2013, Thomas i wsp. 2002). Coraz więcej obserwacji wskazuje na to, że sam kształt jądra istotnie wpływa na prawidłowe funkcjonowanie komórek (Westerman i wsp. 1999, Umehara i wsp. 2010). Zmianom kształtu jądra towarzyszą na przykład jakościowe zmiany w przestrzennej organizacji chromatyny, które z kolei prowadzą do zmian w ekspresji genów (Gisselsson i wsp. 2001, Towbin i wsp. 2012, Deolal i Mishra 2021).

W prawidłowo funkcjonujących komórkach najczęściej obserwuje się jądro o owalnym kształcie, jednakże niektóre wyspecjalizowane typy komórek mogą wykazywać nietypowy kształt jądra, który wpływa na ich prawidłowe funkcjonowanie (Hoffman i wsp. 2007). Z kolei zmiany w morfologii jądra występują w stanach chorobowych, np. w laminopatiach i chorobach nowotworowych (Baylin i Jones 2016, Zink i wsp. 2004).

Nietypowy kształt jądra i wysoce skondensowana chromatyna zostały także opisane w neuronalnych komórkach macierzystych (ang. neural stem cells, NSC) neurogenezy hipokampalnej dorosłych (ang. adult neurogenesis) (Kempermann i wsp. 2004). Z tych komórek powstają dojrzałe neurony, które są w pełni funkcjonalne i włączane w istniejące sieci neuronalne (Kempermann 2002). Kształt jądra komórkowego NSC i nowo powstałych neuronów może być jednym z kluczowych elementów mających wpływ na regulację neurogenezy. Jak dotąd nie opisano w sposób systematyczny odmiennej morfologii jądra tych komórek, dlatego też przedmiotem niniejszej pracy jest jej dokładne zbadanie i opisanie.

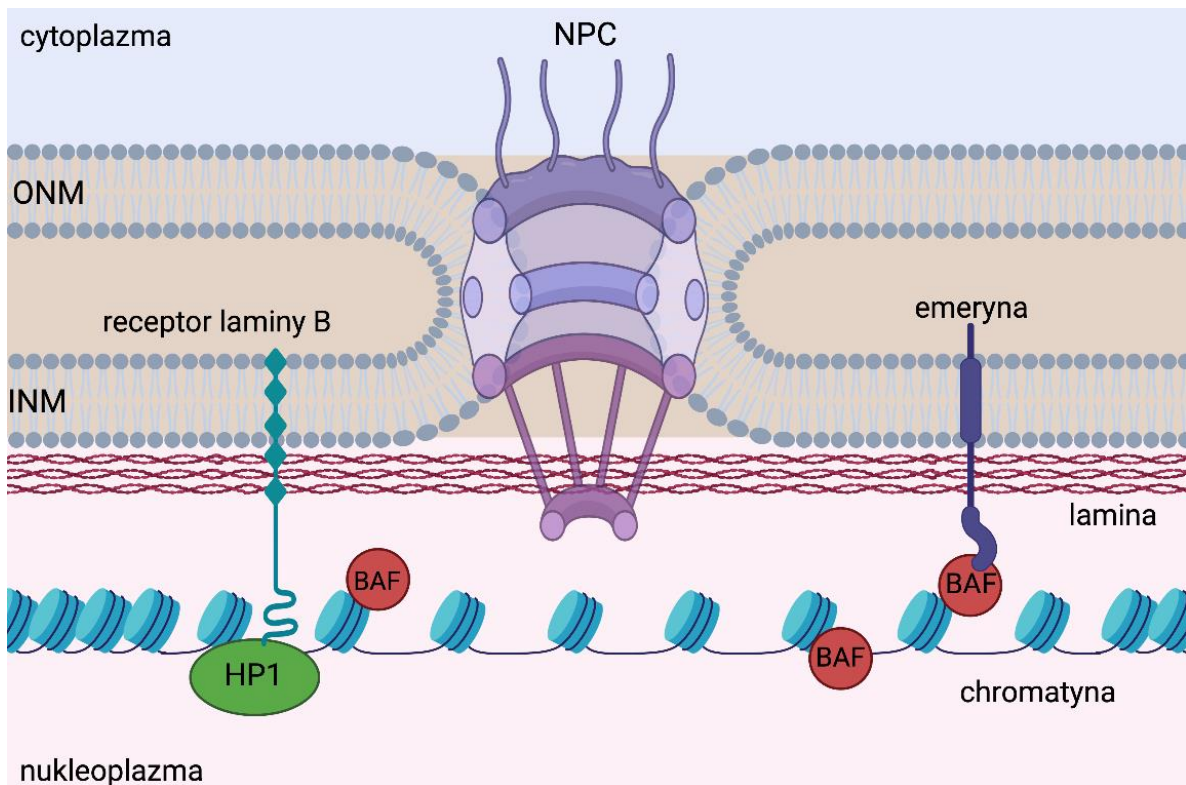
W dalszej części wstępu zostaną opisane i omówione czynniki, które wpływają na morfologię jądra komórkowego, a także potencjalne funkcje odmiennego kształtu jądra – na wybranych przykładach. Zostanie przedstawiona także aktualna wiedza na temat odmiennej morfologii jąder NSC zakrętu zębatego hipokampa, a także jej przypuszczalne biologiczne znaczenie w przebiegu procesu neurogenezy.

1.1. Budowa i funkcje jądra komórkowego

Cechą charakterystyczną komórki eukariotycznej jest obecność jądra, w którym znajdują się chromosomy oddzielone od cytoplazmy błoną jądrową (Pederson 2011). Błona jądrowa (ang. nuclear envelope, NE) składa się z dwóch podwójnych warstw lipidowych –

wewnętrznej i zewnętrznej (Wilson i Berk 2010). U podstawy wewnętrznej błony jądrowej (ang. inner nuclear membrane, INM) leży blaszka jądrowa, która zbudowana jest z sieci włókien lamin i innych powiązanych białek (Wilson i Berk 2010). Wewnętrzna i zewnętrzna błona jądrowa (ang. outer nuclear membrane, ONM) są połączone ze sobą kompleksami białek tworzącymi pory jądrowe, które zbudowane są z wielu kopii około 30 jądrowych białek porowych, tworząc strukturę o masie około 60 MDa. Pory jądrowe rozmieszczone są na całej przestrzeni NE i umożliwiają transport cząsteczek między cytoplazmą a jądrem (Hetzer i wsp. 2005, Wente i Rout 2010). Liczba porów jądrowych w otoczce jądrowej jest zależna od organizmu, aktywności metabolicznej i typu komórki, liczba ta waha się między ok. 100 u drożdży a ok. 2000 u ludzi (Maul i Deaven 1977, Maeshima i wsp. 2011).

Pomimo tego, że ONM i INM tworzą jedną strukturę połączoną porami jądrowymi, różnią się one składem białkowym (Schirmer i Foisner 2007). ONM jest połączona z siateczką śródplazmatyczną (ang. endoplasmic reticulum, ER), na powierzchni, której znajdują się rybosomy. W skład ONM wchodzi wiele białek, które znajdują się również w ER (Hetzer i wsp. 2005, English i wsp. 2009). Z kolei w INM znajdują się białka, które oddziałują z blaszką jądrową, białkami wchodzącymi w interakcję z chromatyną, takimi jak białka BAF (ang. barrier-to-autointegration factor), HP1 (ang. heterochromatin protein 1) i histony (Ryc. 1) (Zuleger i wsp. 2011). Białka BAF wiążą się bezpośrednio z podwójną nicią DNA umożliwiając bezpośredni kontakt dwóch odległych fragmentów DNA z aktywatorami transkrypcji i białkami INM. Co ciekawe, odległość między INM i ONM jest stała, prawdopodobnie ze względu na obecność kompleksów białkowych LINC (ang. linker of nucleoskeleton and cytoskeleton, Ryc. 3), które łączą obie błony.



Ryc. 1. Porowy kompleks jądrowy (ang. NPC, nuclear pore complex) oraz białka międzybłonowe znajdujące się w wewnętrznej błonie jądrowej (ang. INM, inner nuclear membrane). Białka INM wchodzą w interakcję z blaszką jądrową i białkami wiążącymi się z chromatyną takimi jak BAF (ang. barrier-to-autointegration factor), HP1 (ang. heterochromatin protein 1) i histonami.

Blaszka jądrowa odpowiada za utrzymanie sztywności jądra, reagując na siły mechaniczne, których oddziaływanie na jądro powoduje zmiany w jego sztywności (Lee i wsp. 2007, Dahl i wsp. 2008, Aoki i wsp. 2011). Ponadto, interakcje między blaszką jądrową a chromatyną odgrywają rolę w organizacji genomu, na przykład ułatwiając rozmieszczenie chromosomów w określonych terytoriach w jądrze, czy też kontrolując proces różnicowania się komórek, w tym komórek neurogenezy (Toda i wsp. 2017). We wszystkich organizmach interakcje białek wewnętrznej błony jądrowej z chromatyną odgrywają rolę w regulacji ekspresji genów. Zatem błona jądrowa to znacznie więcej niż tylko bariera dyfuzyjna między jądrem a cytoplazmą, odgrywa rolę w regulacji transkrypcji, ekspresji genów, a także bierze udział w reakcji na stres mechaniczny.

1.2. Czynniki, które wpływają na kształt jądra

1.2.1. Lamininy

Lamininy są głównym składnikiem blaszki jądrowej, są obecne u wszystkich zwierząt, nie występują w roślinach i eukariontach jednokomórkowych (Ditter i wsp. 2011, Simon i Wilson 2011). Istnieją dwa głównie rodzaje lamin jądrowych: typ A i typ B. U ssaków lamininy typu A są kodowane przez gen *LMNA*, a lamininy typu B są kodowane przez geny *LMNB1* i *LMNB2*. Geny lamin mają wiele wariantów składania prekursorowego mRNA (np. lamina C jest wariantem składania prekursorowego mRNA genu *LMNA*). U większości bezkręgowców występuje tylko jedna izoforma lamininy, podobna do lamininy B występującej u ssaków. Ekspresja genu lamininy jest zależna od rozwoju: geny lamininy B ulegają ekspresji w czasie rozwoju, podczas gdy geny lamininy A ulegają ekspresji w komórkach zróżnicowanych (Dechat i wsp. 2008).

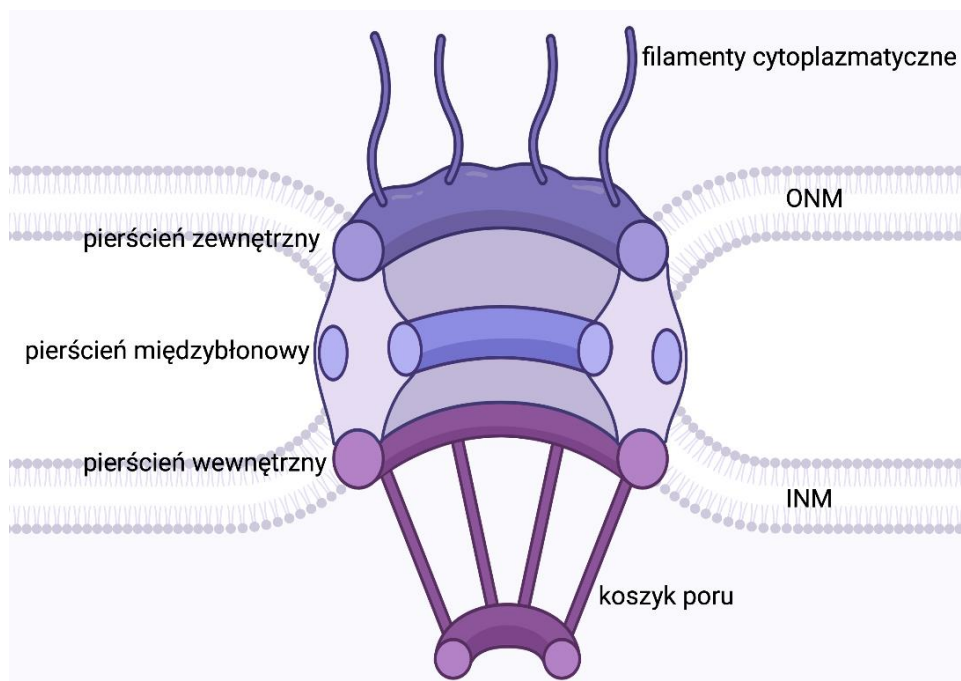
Niektóre mutacje w genach kodujących lamininy, w enzymach przekształcających lamininy lub w białkach związanych z laminami odpowiadają za choroby z grupy laminopatii (Capell i Collins 2006). Choroby te mogą wpływać na mięśnie szkieletowe, mięśnie sercowe, tkankę tłuszczową i kości. Jedną z najbardziej charakterystycznych zmian komórkowych obserwowanych w laminopatiach jest nietypowa morfologia jądra spowodowana mutacją w genie *LMNA*, co podkreśla znaczenie blaszki jądrowej w utrzymaniu prawidłowego kształtu jądra komórkowego. Mutacja tego typu występuje w zespole Hutchinsona-Gilforda (ang. Hutchinson-Gilford progeria syndrome, HGPS) – tak zwanym syndromie przedwczesnego starzenia się. Konsekwencją pojawienia się tej mutacji są zaburzenia stabilności struktury jądra i ekspresji genów (Vidak i Foisner 2016). Komórki pacjentów z HGPS wykazują zniekształcone jądra, w których charakterystyczne są wpuklenia NE, a także pęcherzyki jądrowe, czyli wystające fragmenty NE, mające kształt pęcherzy (Worman 2012). Warto podkreślić, że prawidłowo starzejące się komórki wykazują podobny fenotyp (Scaffidi i Misteli 2006; Pathak i wsp. 2021).

1.2.2. Jądrowe kompleksy porowe

Architektura wewnątrzjądrowa jest także regulowana przez aktywność jądrowych kompleksów porowych (Ryc. 2) (ang. nuclear pore complex, NPC), które odgrywają znaczącą rolę w regulacji transkrypcji (Casolari i wsp. 2004, Capelson i wsp. 2010, Peric-Hupkes i wsp. 2010). W badaniu nad żabą *Xenopus* wykazano, że zmniejszenie zawartości białek Nup188 (ang. nucleoporin 188), które współtworzą NPC, doprowadziło do zwiększonego tempa transportu białek z cytoplazmy do INM, a następnie do zwiększenia rozmiaru jądra (Theerthagiri i wsp. 2010). Warty uwagi jest fakt, że zmniejszenie zawartości Nup188 wpłynęło jedynie na tempo transportu białek a nie na rozmiar transportowanych białek, który jest ograniczony do 40 kDa (Ohba i wsp. 2004), a także zachowana została zasada nieprzepuszczania białek ONM, czy też ER (Theerthagiri i wsp. 2010). Zatem Nup188 oraz inne białka NPC mogą kontrolować przepływ białek z cytoplazmy do INM, uczestnicząc w utrzymaniu prawidłowego rozmiaru i kształtu jądra.

Wyeliminowanie Nup170 w szczepie drożdży pozbawionym transbłonowego białka Pom152 (ang. pore membrane proteins) prowadzi do deformacji jądra (Aitchison i wsp. 1995). Jednym z potencjalnych mechanizmów, który wpływa na kształt jądra na skutek zmian w białkowym składzie porów jądrowych może być oddziaływanie między białkami NE a wnętrzem jądra. Jeżeli zmienione pory jądrowe zaburzają łączenie NE z białkami strukturalnymi jądra komórkowego, NE może być bardziej podatna na siły ciągnące oddziałujące na jądro komórkowe poprzez cytoszkielet, np. podczas migracji (Witkin i wsp. 2010). Zmiany w składzie białkowym porów jądrowych, które licznie występują w otoczce jądrowej, mogą prowadzić do niekontrolowanego rozrostu NE i zmiany kształtu jądra.

Wykazano, że w neuronalnych komórkach progenitorowych (ang. neural progenitor cells, NeuPC) interakcje Nup153 z czynnikiem transkrypcyjnym Sox2 wpływają na architekturę wewnątrzjądrową. Interakcja Nup153 i Sox2 reguluje proces różnicowania się NeuPC, utrzymując stałą pulę niezróżnicowanych komórek. Stwierdzono także występowanie korelacji pomiędzy liczbą interakcji Nup153 z promotorami genów lub miejscami transkrypcji a, odpowiednio, zwiększoną lub zmniejszoną ekspresją genów, natomiast hamowanie ekspresji Nup153 zmienia genomową lokalizację Sox2 i indukuje różnicowanie (Toda i wsp. 2017).



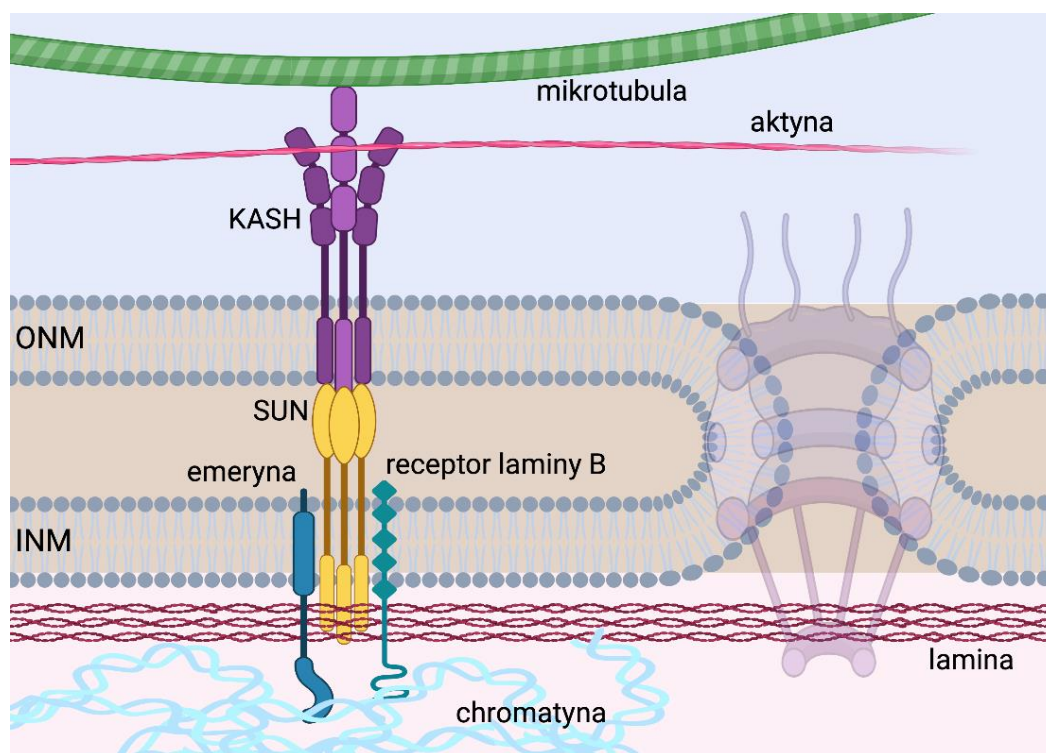
Ryc. 2. Budowa jądrowego kompleksu porowego (ang. NPC, nuclear pore complex). NPC składa się z trzech pierścieni oraz koszyka poru. Pierścień zewnętrzny i wewnętrzny umiejscowione są odpowiednio w zewnętrznej (ang. outer nuclear membranę, ONM) i wewnętrznej błonie jądrowej (ang. inner nuclear membranę, INM).

1.2.3. Białka z domenami KASH i SUN

Zarówno u niższych, jak i wyższych organizmów eukariotycznych NE zawiera białka z domenami KASH i SUN, które fizycznie łączą cytoszkielet z blaszką jądrową (u wyższych eukariontów) lub chromatyną (u drożdży). Białka z domeną KASH (Klarsicht-Anc1-syne 1 homolog) są zakotwiczone w ONM, podczas gdy białka z domeną SUN (Sad1/UNC-84) znajdują się w INM (Ryc. 3) (Fridkin i wsp. 2009, Jahed i wsp. 2018, Razafsky i Hodzic 2009). Końce C białek z domenami KASH i SUN oddziałują ze sobą w przestrzeni międzybłonowej NE, tworząc mostki błonowe zwane LINC (Crisp i wsp. 2006). N-koniec białka z domeną SUN znajduje się w nukleoplazmie i oddziałuje z chromatyną u drożdży, a u wyższych eukariontów – z białkami INM np. emeryną, receptorem laminy B a także z białkami nukleoszkieletu np. laminą A (Chang i wsp. 2015). Cytoplazmatyczna część białek z domeną KASH wchodzi w interakcje z różnymi elementami cytoszkieletu – w tym włóknami aktynowymi i mikrotubulami; pokazano też, że powiązana z mikrotubulami aktomiozyna wpływa na kształt jądra (Geng i wsp. 2023). Kompleks LINC odgrywa kluczową rolę w przestrzennej organizacji jądra, przemieszczaniu się chromosomów i w regulowaniu wpływu sił mechanicznych

oddziałujących na jądro. Oddziaływania sił mechanicznych wpływają zarówno na integralność NE, jak i na kształt jądra.

Wiele innych obserwacji wskazuje na istotną rolę białek kompleksu LINC w utrzymaniu prawidłowego kształtu jądra komórkowego. W liniach komórkowych HeLa wyciszenie ekspresji genów kodujących białka z domenami SUN1 i SUN2, zwiększa przestrzeń między INM i ONM (Crisp i wsp. 2006). Wykazano, że obniżenie zawartości określonej izoformy nespryny (białka z domeną KASH) prowadzi do szeregu zmian kształtu jądra, od niewielkiego wybrzuszenia NE do powstania poważnie zniekształconych ogromnych jąder (Luke i wsp. 2008). Podobnie u śluzowca *Dictyostelium discoideum* mutacja w genie białka Sun-1, w wyniku której nie powstaje domena wiążąca chromatynę, prowadzi do poważnych deformacji jądra (Xiong i wsp. 2008). Ponadto w neutrofilach, u których jądro jest wielopłatowe, wykazano brak występowania lub niższe stężenie niektórych białek kompleksu LINC w porównaniu do makrofagów, których jądra wykazują owalny kształt (Olins i Olins 2009). Sugeruje to, że poziom ekspresji genów białek tworzących kompleks LINC może być regulowany w celu kontrolowania kształtu i architektury jądra. Zatem kompleks LINC wraz z innymi białkami odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu prawidłowego kształtu jądra.



Ryc. 3. Kompleks LINC składa się z białka z domeną KASH, ulokowanego w zewnętrznej błonie jądrowej (ONM) i białka z domeną SUN, zakotwiczonego w wewnętrznej błonie jądrowej (INM). Pod powierzchnią błon jądrowych znajduje się blaszka jądrowa, której głównym składnikiem są laminy. Białka SUN wchodzi w interakcje z białkami INM, natomiast białka KASH wiążą się z elementami cytoszkieletu, np. aktyną, mikrotubulami.

1.2.4. Chromosomy i organizacja przestrzenna chromatyny

Biorąc pod uwagę związek między NE, blaszką jądrową i chromatyną, można przypuszczać, że zmiany kształtu jądra mogą wpływać na ekspresję genów i naprawę DNA, przyczyniając się w ten sposób do przyspieszenia starzenia się, do wywołania procesu chorobowego czy też wystąpienia prawidłowego procesu fizjologicznego. Wykorzystując metodę do badania organizacji przestrzennej chromatyny, przy minimalnym zakłóceniu jej trójwymiarowej struktury Bolzer i wsp. (2005) wykazali, że w jądrach ludzkich fibroblastów w spoczynku i w trakcie podziału występuje określone rozmieszczenie prometafazowych chromosomów i terytoriów chromosomowych. W tych komórkach, które mają płaskie elipsoidalne jądra, chromosomy były ułożone według wielkości, przy czym mniejsze chromosomy prawdopodobnie znajdowały się bliżej środka jądra, a większe chromosomy częściej znajdowały się w obwodowej części jądra. W przeciwieństwie do rozmieszczenia chromosomów w limfocytach i innych typach komórek ludzkich, które mają jądra kuliste i w których rozmieszczenie chromosomów nie jest związane z wielkością, ale z gęstością występowania genów. Chromosomy z wysoką gęstością występowania genów znajdują się zwykle bliżej środka jądra, podczas gdy chromosomy z niską gęstością występowania genów zlokalizowane są w części obwodowej jądra (Boyle i wsp. 2001). Te obserwacje nasuwają pytanie, czy kształt jądra decyduje o rozmieszczeniu terytoriów chromosomowych, czy też jest odwrotnie.

Domeny powiązane topologicznie (ang. topologically associated domains, TAD) w genomach zwierząt stanowią regiony chromosomalne, które zwykle znajdują się blisko siebie. W obrębie jednego TAD występują interakcje i pętle chromatyny między regionami regulacyjnymi, takimi jak wzmacniacze transkrypcji, promotory i izolatory, które regulują ekspresję genów. Sąsiadujące ze sobą TAD są izolowane od siebie, w tym m.in. przez białko izolujące CTCF (ang. CCCTC-binding factor) i retrotranspozony (Maul i Deaven 1977, Alber i wsp. 2007, Dixon i wsp. 2012). Znaczenie CTCF w organizacji chromosomów wykazano poprzez zmiany orientacji lub pozycji miejsc wiązania CTCF, które prowadzą do skrócenia pętli chromatyny i modyfikacji architektury przestrzennej chromosomów (Guo i wsp. 2015, Lupianez i wsp. 2015). Podczas gdy niektóre aspekty organizacji TAD są takie same dla wielu różnych typów komórek (Dixon i wsp. 2012), zmiany interakcji TAD zachodzą na skutek różnicowania i w odpowiedzi na zmiany środowiska zewnętrznego (Bell i Felsenfeld 2000, Robinson 2006, Splinter i wsp. 2006, Dixon i wsp. 2012, Waszak i wsp. 2015). Wpływ rozmiaru i kształtu jądra na organizację TAD jeszcze nie został zbadany.

Domeny związane z laminą (ang. lamina-associated domains, LAD) to transkrypcyjnie represyjne domeny chromatyny zlokalizowane w NE. LAD są na ogół wzbogacone w represyjne modyfikacje histonów (Towbin i wsp. 2012), a umiejscowienie aktywnych genów przy blaszce jądrowej może powodować ich wyciszenie. Dla przykładu w ludzkich embrionalnych komórkach macierzystych i ciałkach zarodkowych aktywne geny cyklu okołodobowego są wyciszane po przeniesieniu do LAD przez polimerazę poli-ADP rybozy PARP1 (ang. poly ADP ribose polymerase) i CTCF (Zhao i wsp. 2015). Lamininy regulują organizację przestrzenną chromatyny poprzez interakcje z poszczególnymi domenami LAD. Dla przykładu u muszki *Drosophila* lamininy typu B wchodzi w interakcję z białkiem Wash (ang. washout), należącym do rodziny białek WAS (ang. Wiskott-Aldrich syndrome), aby zachować prawidłową organizację LAD i chromosomów (Verboon i wsp. 2015). Wyeliminowanie lamininy B w mysich embrionalnych komórkach macierzystych zmniejszyło liczbę interakcji między poszczególnymi regionami chromatyny, które tworzyły LAD w mysich embrionalnych komórkach macierzystych z prawidłową zawartością lamininy B, a blaszką jądrową (Zheng i wsp. 2015). Wiadomo, że lamininy i inne białka znajdujące się w blaszce jądrowej wpływają na rozmiar i kształt jądra, można spekulować zatem, że wpływają także na organizację LAD.

Chromatyna może występować w postaci euchromatyny lub heterochromatyny, przy czym ta ostatnia często znajduje się na obrzeżach jądra. Zmiany w ilości heterochromatyny i euchromatyny są również powszechnie spotykane w nowotworach i innych chorobach (Morgan i Shilatifard 2015). Modyfikacje histonów, które znacznie zwiększają poziom euchromatyny powodują osłabienie sztywności jądra, jego nieprawidłową morfologię i pęknięcia (Stephens i wsp. 2018). Dla przykładu nadekspresja genu białka jądrowego HMGN5 (ang. high mobility group N5) powoduje zmniejszenie zagęszczenia chromatyny, stabilności i sztywności jądra, a w konsekwencji prowadzi do jego pęcznienia (Furusawa i wsp. 2015). Utrzymanie prawidłowego kształtu obserwowano po zwiększeniu zawartości heterochromatyny zarówno w przypadku zaburzeń związanych z modyfikacją histonów, ale również zaburzeń związanych z laminami, w tym w komórkach z nadmierną acetylacją histonów, zmniejszoną zawartością lamininy B1 lub nadekspresją progeryn, a także w komórkach pacjentów z HGPS (Stephens i wsp. 2018, Stephens i wsp. 2019). Ostatnio pokazano także rolę aktomiozyny w regulacji kształtu jądra komórkowego (Geng i wsp. 2023).

1.2.5. Siateczka śródplazmatyczna (ER)

Otoczka jądrowa jest integralną częścią ER. Nie można wykluczyć zatem, że utrzymanie prawidłowego kształtu i rozmiaru jądra zależy także od przebiegu formowania się jądra i ER po podziale komórkowym, gdy dochodzi do powstania błon ER w postaci kanalików, blaszek i cystern. Przepuszczalnie, w trakcie ponownego formowania NE, komórki mogą kontrolować ilość podwójnej błony lipidowej przeznaczonej do odbudowy NE, co jest ściśle powiązane z regulacją ilości podwójnej błony lipidowej do odbudowy ER. Badania na *C. elegans* wskazują, że retikulony, białka znajdujące się w ER, odgrywają ważną rolę przy rozpadzie NE przed podziałem komórkowym (Audhya i wsp. 2007). Pozbawienie *C. elegans* genów *YOPI/RET1* zablokowało uwalnianie białek INM podczas mitozy i zapobiegło rozpadowi NE, wskazując na istotną rolę ER w formowaniu jądra. Postawiono hipotezę, że przyczyną tego blokowania jest zmieniona morfologia ER (Audhya i wsp. 2007). Podobne zjawisko opisano w zarodkach *C. elegans*, gdzie zmiany w morfologii ER, wywołane przez zakłócenie syntezy lipidów, zbiegły się również z zakłóceniem rozpadu NE i powstaniem zdeformowanych jąder w kolejnym cyklu komórkowym (Golden i wsp. 2009). Ta zależność między rozpadem NE a morfologią ER pokazuje, że rozdzielenie białek i podwójnej błony lipidowej pomiędzy poszczególne domeny ER odgrywa ważną rolę fizjologiczną, a dynamika NE zależy od struktury siateczki.

Po podziale komórkowym dochodzi do rozdzielenia lipidów i białek między NE a ER. Rozdział ten może odbywać się na podstawie powinowactwa białek ER do białek cytoszkieletu, a białek NE – do białek jądrowych. Dla przykładu pory jądrowe odgrywają ważną rolę w kontrolowaniu ruchu białek między INM a ONM (Ohba i wsp. 2004). Białka INM są syntetyzowane w obwodowej części ER i dyfundują do ONM zanim zostaną przetransportowane za pośrednictwem porów jądrowych do INM (Mattaj 2004). Wykazano, że podczas mitozy obwodowa część ER występuje prawie całkowicie w postaci kanalików (Puhka i wsp. 2007), a także że kanaliki są potrzebne do ponownego powstania NE (Anderson i Hetzer 2007, Anderson i Hetzer 2008). W kolejnych badaniach stwierdzono natomiast, że podczas mitozy w komórkach ssaków ER prawie w całości składa się z płaskiej błony i że jądro powstaje ponownie z tych blaszek błonowych (Lu i wsp. 2009, Lu i wsp. 2011). Należy podkreślić, że ER pozostaje jedną ciągłą strukturą przez cały cykl komórkowy. Bez względu na to, czy ER ma postać blaszek błonowych czy kanalików podczas mitozy, jasne jest, że dynamiczne zmiany, które zachodzą w ER podczas cyklu mogą oddziaływać na NE. W ludzkich liniach komórkowych mutacja w genie receptora laminy B i ekspresja zmienionego białka, które jest

białkiem INM, prowadzi do powiększenia światła ER oraz przestrzeni pomiędzy INM a ONM (Zwenger, Kolb i wsp. 2010).

1.2.6. Metabolizm lipidowy

Fosfolipidy są jednym z głównych składników NE, zatem przypuszczalnie synteza lipidów odgrywa rolę w utrzymaniu kształtu i rozmiaru jądra (Antonin i Siniosoglou 2022). Udowodniono rolę syntezy lipidów w utrzymaniu prawidłowego rozmiaru i kształtu jądra w wielu badaniach na drożdżach ze zmienionym metabolizmem lipidów, w tym mutantów *spo7Δ*, *nem1Δ* oraz *pah1Δ* (Siniosoglou i wsp. 1998). Białka *S. cerevisiae* Spo7 i Nem1 tworzą związany z ER kompleks fosfatazy, który aktywuje białko Pah1 poprzez defosforylację (Santos-Rosa i wsp. 2005). Pah1 jest kluczowym regulatorem metabolizmu lipidów; przekształca kwas fosfatydowy w diacyloglicerol (Orso i wsp. 2009) i reguluje ekspresję genów biosyntezy lipidów (Santos-Rosa i wsp. 2005, O'Hara i wsp. 2006). Usunięcie *SPO7*, *NEM1* lub *PAH1* w *S. cerevisiae* powoduje rozbudowanie ER i utworzenie zdeformowanego jądra (Siniosoglou i wsp. 1998, Santos-Rosa i wsp. 2005, Campbell i wsp. 2006). Jądra *S. cerevisiae* są zazwyczaj okrągłe, a jąderko tworzy strukturę przypominającą kształtem czapeczkę i umiejscowione jest w bliskiej odległości do NE. W komórkach *spo7Δ*, *nem1Δ* i *pah1Δ* otoczka jądrowa rozciąga się w miejscu jąderka tworząc „smugę”, natomiast fragment NE otaczający chromatynę zachowuje swój okrągły kształt (Campbell i wsp. 2006). Istnieje kilka możliwych wyjaśnień, dlaczego rozciągnięcie NE dotyczy tylko fragmentu znajdującego się w okolicy jąderka. Otoczka jądrowa przylegająca do jąderka może być miejscem, w którym lipidy są przyłączane lub jest to najbardziej elastyczny fragment NE, który może gromadzić dodatkowy materiał błonowy. Rozciąganie NE tylko w okolicy jąderka wskazuje na możliwość występowania różnych domen lipidowych w otoczce jądrowej, które mają różne właściwości fizyczne, co może wpływać na plastyczność błony. Domeny te można wyszczególnić na podstawie interakcji między otoczką jądrową a leżącą u podstaw NE chromatyną.

Proces przyłączania się lipidów do NE jest jeszcze mało poznany. Pozostaje pytanie o to, czy lipidy mogą swobodnie przepływać między ER a otoczką jądrową. Jeżeli transfer lipidowy przebiega swobodnie, może dochodzić do rozrostu NE i jednocześnie do rozrostu błony ER. Występuje kilka mutantów, u których pokazano jednoczesny rozrost błony ER i NE. Na przykład w drożdżach wyeliminowanie genów *SEC31*, *SEC53*, *SARI* białek szlaku wczesnego wydzielania białka (ang. early protein secretion pathways) prowadzi do rozrostu błony ER i jednocześnie NE (Siniosoglou i wsp. 1998, Matynia i wsp. 2002, Santos-Rosa i

wsp. 2005, Campbell i wsp. 2006). U *C. elegans* dezaktywacja szlaku, który jest kontrolowany homologiem Pah1, znanym jako lipina, prowadzi do rozrostu błony ER, przy czym zaburzony jest proces rozkładu NE i ponownej jej rekonstrukcji, co z kolei wpływa na kształt jądra (Golden i wsp. 2009).

Na kształt jądra wpływają także białka NE, które mogą odgrywać rolę w homeostazie lipidów. Przykładem tak funkcjonującego białka jest Mps3 z domeną SUN, które oprócz tego, że znajduje się w INM, jest zlokalizowane również na wrzecionie podziałowym (Jaspersen i wsp. 2006). Nadekspresja dominującego allelu *MPS3* prowadzi do nadmiernego rozrostu NE i nieprawidłowej morfologii jądra, z kilkoma ułożonymi warstwami błony jądrowej (Friederichs i wsp. 2011). Morfologia ER tych mutantów nie ulega zmianie. Ten defekt można wyeliminować poprzez usunięcie genów *FAA3* lub *DEPI*, które biorą udział w metabolizmie lipidów, lub przez dodanie substancji chemicznych, które wpływają na właściwości błony, takich jak alkohol benzyłowy i kwas oleinowy. Mechanizm wpływu Mps3 na homeostazę lipidów nie jest znany, ale jasne jest, że białka wewnętrznej błony jądrowej i metabolizm lipidów mogą mieć znaczący wpływ na kształt jądra.

1.2.7. Neutrofile jako przykład odmiennego kształtu jądra w stanie fizjologicznym

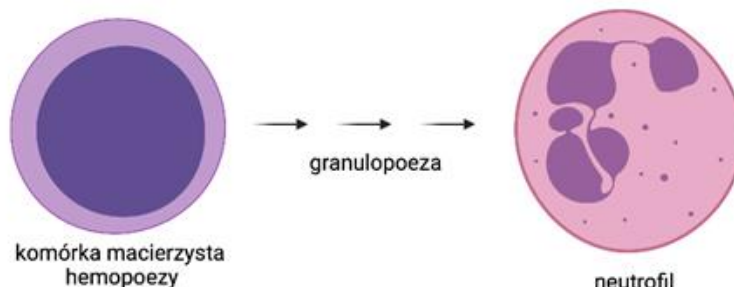
Jednymi z najlepiej poznanych typów komórek z odmiennym kształtem jądra są neutrofile. Neutrofile są komórkami układu odpornościowego, które migrują do ognisk infekcji. Ich cechą charakterystyczną jest posegmentowane jądro, zwykle składające się z dwóch do pięciu płatów, oddzielonych cienkimi włóknami nukleoplazmy, w których znajduje się niewielka ilość chromatyny (Hoffmann i wsp. 2007). Płatowa struktura jądra powstaje w procesie różnicowania; okrągłe jądro u prekursorów mielocytów stopniowo zwiększa liczbę płatów (Ryc. 4). Analiza przestrzenna chromatyny wykazała, że większość chromosomów jest losowo rozmieszczana w płatach neutrofile, ale ich ułożenie może ulec zmianie po aktywacji komórki przez bakterie (Yerle-Bouissou i wsp. 2009). W obrębie każdego płatu organizacja chromatyny jest ustalona zgodnie z układem opartym na gęstości genów, w którym chromatyna uboga w geny znajduje się w obwodowej części jądra, a chromatyna o dużej gęstości występowania genów znajduje się bliżej jego środka (Boyle i wsp. 2001, Hubner i wsp. 2015).

Uważa się, że posegmentowane jądro umożliwia neutrofilom przechodzenie przez małe szczeliny w śródbłonku i przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Hoffmann i wsp. 2007). W przypadku anomalii Pelger-Hueta, która wywołana jest mutacją w genie receptora laminy B, granulocyty obojętne nie są w stanie uformować prawidłowo wielopłatowego jądra, a

także występują u nich zaburzenia migracji (Hoffmann i wsp. 2002). Płatowanie (lobulacja) jądra jest zależne nie tylko od receptora laminy B, ale wiąże się także ze zmniejszeniem ilości niektórych białek blaszki jądrowej i zależy od obecności mikrotubul (Olins i wsp. 2008). Neutrofile mają także większą różnorodność długości linkera DNA między nukleosomami niż limfocyty T, co wskazuje na zwiększoną elastyczność chromatyny (Valouev i wsp. 2011). Jednakże, okazało się, że posegmentowane jądro nie jest absolutnie konieczne do migracji, chociaż zdecydowanie może ją wspomagać (Voisin i wsp. 2009).

Granulocyty mają mniejszą ilość lamin w porównaniu do makrofagów i monocytów – głównie zmniejszona jest zawartość laminy A i C, zaś większa jest zawartość laminy B (Hoffmann i wsp. 2007). Stosunek zawartości laminy A do laminy B wpływa na elastyczność jądra (Shin i wsp. 2013). Zaburzenia lamin związane z normalnym starzeniem się wpływają na kształt jądra wszystkich granulocytów, w wyniku zmian w sztywności i strukturze blaszki jądrowej (Scaffidi i wsp. 2005, Chan i wsp. 2010). Te związane z wiekiem defekty w strukturze blaszki jądrowej są również widoczne w laminopatiach, takich jak HGPS (Worman 2005).

W niektórych stanach chorobowych można zauważyć hipersegmentację neutrofilii, czyli powstawanie sześciu lub więcej płatów jądrowych. Wykazano np. że jest ona związana z niedokrwistością megaloblastyczną wynikającą z niedoboru witaminy B12 i kwasu foliowego oraz niedokrwistością spowodowaną niedoborem żelaza (Westerman i wsp. 1999). Jest ona również związana z zespołem Bouchera-Neuhäusera – defektem metabolicznym lipidów (Umehara i wsp. 2010). U szczurów niedobór witaminy A powoduje hiposegmentację związaną z koniecznością obecności retinoidów w różnicowaniu promielocytów do dojrzałych neutrofilii (Twining i wsp. 1996). Zatem występuje wiele ścieżek, które kontrolują powstanie płatowej morfologii jądra neutrofilii.



Ryc. 4. Jądro komórki macierzystej hemopoety ma kształt owalny. W procesie różnicowania jądro neutrofilii zwiększa liczbę płatów (Biorender).

1.2.8. Nowotwory jako przykład odmiennego kształtu jądra w stanie chorobowym

Nieprawidłowy kształt jądra jest cechą charakterystyczną komórek nowotworowych, jedną z cech diagnostycznych nowotworów jest pleomorfia, czyli zwiększona różnorodność kształtów i rozmiarów jąder. Pleomorfia nasila się w miarę rozwoju nowotworu (True i Jordan 2008, Zink i wsp. 2004). Związek między mutacjami występującymi w komórkach nowotworowych a morfologią jądra jest mało poznany. Pojawia się więc pytanie, czy zmiany w kształcie jądra przyczyniają się do powstawania mutacji DNA tych komórek, czy są jedynie jej konsekwencją.

Potwierdzono występowanie zależności między nieprawidłowym kształtem jądra a niestabilnością chromosomów (Gisselsson i wsp. 2001). Niestabilne chromosomy zwykle prowadzą do powstawania pęcherzyków jądrowych. Na przykład genomowe badanie RNAi w ludzkich komórkach zidentyfikowało wiele genów, których wyciszenie prowadzi do odkształcenia jądra (Neumann i wsp. 2010). Geny te były również potrzebne do prawidłowej segregacji chromosomów, co wskazuje na występowanie związku między organizacją przestrzenną chromosomów a kształtem jądra. Można spekulować, że zmiany kształtu jądra spowodowane nieprawidłową segregacją chromosomów mogą z kolei prowadzić do zmian w ekspresji genów, wpływając na prawidłowe funkcjonowanie komórek, potencjalnie przyczyniając się do powstawania mutacji w ich DNA.

Niedawno pokazano, że poddawanie komórek osteosarkomy działaniu nadtlenu wodoru (H_2O_2) indukuje zależne od stężenia zmiany kształtu jądra, które ustępują pod wpływem działania przeciwutleniacza N-acetylo-L-cysteiny lub nadekspresji katalazy. Okazało się również, że bardziej podatne na działanie nadtlenu wodoru (H_2O_2) są komórki mitotyczne, co sugeruje, że H_2O_2 wpływa głównie na procesy rozkładu i ponownego składania NE w trakcie podziału komórkowego. Zbadano wpływ H_2O_2 na aktywność fosfatazy białkowej 2A (ang. protein phosphatase 2A, PP2A), która bierze udział w ponownym składaniu NE podczas mitozy, i wykazano, że H_2O_2 zmniejsza aktywność PP2A. Ponadto wykazano, że nadekspresja PP2A częściowo niweluje efekt wywołany działaniem H_2O_2 . W tym samym badaniu wykazano również, że H_2O_2 powoduje nieprawidłową lokalizację białek BAF, które są substratem PP2A w czasie telofazy. Ten efekt jest związany ze zmianą lokalizacji lamin A/C, a nadekspresja PP2A zapobiegła tym zmianom (Ahn i wsp. 2019).

Zmiany w morfologii jąder komórek nowotworowych powiązane są ze zmianami w stężeniu białek NE, np. lamin A i C (Bell i Lammerding 2016). Dla komórek migrujących te zmiany mogą przyczyniać się do większej elastyczności NE i ułatwić przemieszczanie się

komórek w obrębie przestrzeni międzykomórkowej. Należy również zwrócić uwagę na to, że zmiany w składzie NE mogą wpływać także na szlaki sygnałowe i prowadzić do zmian w transkrypcji w komórkach nowotworowych.

Kolejną cechą morfologiczną odróżniającą komórki nowotworowe od zdrowych jest odmienna organizacja chromatyny, w związku z czym podejmowane są próby kliniczne opracowania terapii opartych na modyfikacjach epigenetycznych. Chaetocyna jest obiecującym kandydatem jako środek terapeutyczny do leczenia nowotworów (Lai i wsp. 2015). Jest inhibitorem metylotransferazy histonowej (pośredniczącej w trimetylacji lizyny 9 histonu H3, markera konstytutywnej heterochromatyny). Poddawanie fibroblastów działaniu chaetocyny powoduje reorganizację ich chromatyny (Illner i wsp. 2010) i pojawienie się terytoriów chromosomowych o dużej gęstości genów w obwodowej części jądra komórkowego.

Poszczególne nowotwory mają swoje własne cechy wyróżniające – na przykład rak cewki moczowej można odróżnić od zdrowej tkanki za pomocą szczególnie dużych jąder (Poropatich i wsp. 2016). Możliwość dokładnej oceny tych cech stanowiłaby cenne narzędzie do diagnozy onkologicznej. Cechy morfologiczne jąder, takie jak ich symetria i rozmiar, mogą też odzwierciedlać stopień działania chemioterapii (Diamond 1982, Ogura i wsp. 2016). Dlatego szczególnie ważne jest rozwijanie narzędzi przeznaczonych do diagnozy nowotworów, które umożliwiają rozróżnienie stadiów zaawansowania choroby i również takich, które na podstawie oceny zmienności kształtu jądra będą mogły ocenić efekt terapeutyczny.

1.2.9. Plemnik jako przykład migrującej komórki o odmiennym kształcie jądra.

Migracja komórek może wpływać na zmianę kształtu jądra. Jednym z przykładów komórki o odmiennym kształcie jądra, która migruje, jest plemnik. Istnieją znaczące różnice w morfologii jądra komórkowego, a także w budowie komórki między męskimi i żeńskimi gametami. Podczas gdy komórka jajowa jest najczęściej duża, nieruchliwa i ma kuliste jądro, plemniki są małe, wysoce ruchliwe i przybierają różne kształty (Zuccotti i wsp. 2005). W jądrach plemników występuje m.in. większe zagęszczenie chromatyny, co także można stwierdzić w jądrach NSC i NeuPC. Przyczyny dodatkowego zagęszczenia chromatyny w plemnikach są dyskusyjne. Prawdopodobnie umożliwia ono pływanie, ale może również chronić DNA przed uszkodzeniem i zapewnić dodatkowy poziom regulacji epigenetycznej genomowi ojcowskiemu (Rathke i wsp. 2014). Gdy jądro się kurczy, rozwijający się plemnik pozbywa się również większości cytoplazmy. W konsekwencji większość główki jest wypełniona jądrem plemnika, a kształt jądra często ściśle odpowiada kształtowi główki

plemnika. Wiele wskazuje na to, że jądro jest aktywnym uczestnikiem spermatogenezy decydującym o ostatecznym kształcie plemnika. Jądro kondensuje i przyjmuje kształt zanim plemnik porzuci zbędną cytoplazmę, a następnie błona zaciska się wokół jądra dostosowując się do kształtu jądra (Verhoeven 1999).

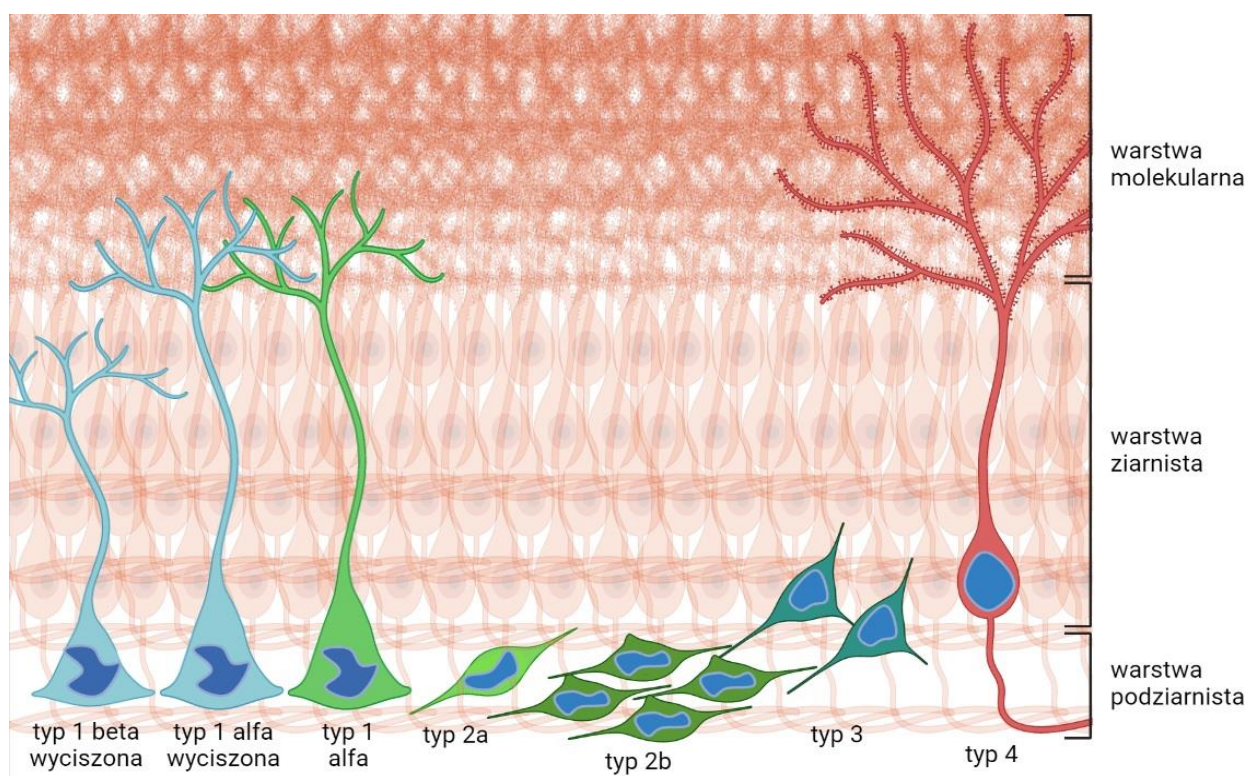
1.3. Hipokampalna neurogeneza dorosłych

Hipokamp jest strukturą w mózgu, która odpowiada za procesy poznawcze, takie jak pamięć i uczenie się (Squire 1992), niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania u ludzi. Odkrycie neurogenezy hipokampalnej dorosłych pociągnęło za sobą pojawienie się pytań dotyczących funkcji nowo powstałych neuronów u dorosłych osobników. Przypuszczalnie neurony te przyczyniają się do wzrostu plastyczności mózgu i regeneracji tkanki nerwowej (Liu i wsp. 2013). Funkcja nowych neuronów jak dotąd nie została jednak wyjaśniona, pojawia się bowiem wiele sprzeczności w badaniach nad ich rolą w pamięci i uczeniu się. W wielu pracach pokazano ich kluczowe znaczenie (Jessberger i wsp. 2009, Zhang i wsp. 2008, Imayoshi i wsp. 2008), aczkolwiek inni badacze wykazali, że myszy i szczury pozbawione neurogenezy potrafią poprawnie wykonywać szereg testów kognitywnych (Jaholkowski i wsp. 2009, Urbach i wsp. 2013, Jessberger i wsp. 2009). Obecnie przyjmuje się, że nowo powstałe neurony mają istotne znaczenie w rozdzielaniu wzorców (ang. pattern separation), czyli zdolności do rozróżniania podobnych miejsc, zdarzeń i doświadczeń (Danielson i wsp. 2016, Tronel i wsp. 2012, Nakashiba i wsp. 2012). Wykazano, także że istnieje związek pomiędzy obniżeniem procesu neurogenezy hipokampalnej u dorosłych a występowaniem chorób mózgu związanych z wiekiem, jak również zaburzeń nastroju (Small i wsp. 2011, Miller i Hen 2015).

W neurogenzie hipokampalnej dorosłych powstają głównie komórki ziarniste zakrętu zębatego (ang. dentate gyrus, DG) formacji hipokampa (Kempermann i wsp. 2015). Komórki te są podstawowymi pobudliwymi komórkami nerwowymi DG. Otrzymują sygnał z kory śródwęchowej i przekazują go do regionu CA3 hipokampa, odpowiadając za pobudzenie komórek piramidowych. Aktywność neuronów ziarnistych jest modulowana przez dużą liczbę interneuronów znajdujących się w DG hipokampa i we wnęce (*hilus*) (Kempermann i wsp. 2015). Komórki prekursorowe, które współtworzą niszę neurogenną, znajdują się w wąskim paśmie tkanki między warstwą ziarnistą komórek a wnęką zwaną warstwą podziarnistą (SGZ, ang. subgranular zone) (Imayoshi i wsp. 2009).

Hipokampalna neurogeneza dorosłych jest procesem wieloetapowym, w ramach którego wyróżniono cztery subpopulacje komórek linii neurogennej: NSC (typ 1), neuralne

komórki progenitorowe (typ 2a i typ 2b), neuroblasty (typ 3) i neurony ziarniste (typ 4) (Ryc. 5, Kempermann 2004). NSC wyróżniają się szczególną morfologią komórkową, mają wypustkę, która przebiega przez całą warstwę ziarnistą i sięga do warstwy molekularnej, gdzie rozgałęzia się (Huttmann i wsp. 2003, Kriegstein i Alvarez-Buylla 2009, Beckervordersandforth i wsp. 2014). Większość komórek typu 1 pozostaje w stanie spoczynku, czyli w stanie odwracalnego zatrzymania cyklu komórkowego (Urban i wsp. 2019). Po aktywacji NSC, w wyniku podziału asymetrycznego powstaje komórka typu 2. W kolejnych etapach różnicowania, w wyniku wielokrotnych podziałów komórkowych, powstaje populacja komórek progenitorowych, w ramach której możemy wyodrębnić komórki typu 2a, typu 2b i typu 3. Następnie komórki typu 3 różnicują do neuronów ziarnistych, w ramach tego etapu możemy rozróżnić wczesne postmitotyczne dojrzewanie i późne postmitotyczne dojrzewanie (Kempermann i wsp. 2004).



Ryc. 5. Dojrzewanie komórek nerwowych w procesie neurogenezy. Komórki typu 1 są neuralnymi komórkami macierzystymi, w ramach, których wyróżnia się podtypy na podstawie cech morfologii komórki – komórki α i β , w ramach których komórki α występują w stanie wyciszonym i aktywnym, β zaś w stanie wyciszonym. W wyniku asymetrycznego podziału komórkowego powstają komórki typu 2 – wyróżnia się typ 2a i typ 2b. Komórki typu 3 są neuronalnymi komórkami progenitorowymi w dalszej fazie różnicowania, które mają zdolność do samopowielania. Na ostatnim etapie neurogenezy w wyniku różnicowania komórek typu 3 powstaje niedojrzały a następnie dojrzały neuron ziarnisty, inaczej zwany komórką typu 4.

Coraz więcej badań pokazuje, że proces neurogenezy jest procesem bardzo dynamicznym i nie da się rozdzielić poszczególnych etapów sztywną linią. Co więcej, wiele badań wskazuje na to, że w obrębie populacji NSC występuje różnorodność na poziomie molekularnym i morfologicznym (Joly i Tropepe 2018). Pomimo tych rozbieżności, aby lepiej rozumieć proces neurogenezy hipokampalnej, potrzebna jest spójna klasyfikacja poszczególnych stadiów procesu i rozróżnienie poszczególnych typów komórek, dlatego kolejne etapy tej pracy będą opierały się na opisanej wyżej klasyfikacji.

1.3.1. Aktywne i spoczynkowe NSC

Powstawanie nowych neuronów w procesie neurogenezy hipokampalnej jest regulowane przez różnorodne czynniki fizjologiczne na wielu jej etapach. Jednym z kluczowych etapów jest zmiana stanu spoczynku i ponowne uruchomienie cyklu komórkowego NSC. Wykazano, że w ramach populacji komórek NSC można wyróżnić dwa podtypy, które różnią się pod względem właściwości molekularnych (Codega i wsp. 2014, Llorens-Bobadilla, i wsp. 2015). Aktywne NSC (ang. active neural stem cells, aNSC) wykazują ekspresję GFAP, CD133, receptora czynnika wzrostu (EGFR) i nestyny, podczas gdy NSC w stanie spoczynku (ang. quiescent neural stem cells, qNSC) wykazują ekspresję GFAP, CD133, ale już nie EGFR i nestyny. Co więcej, qNSC nie wykazują ekspresji markerów proliferacji takich jak Ki67 (Doetsch i wsp. 1999, Codega i wsp. 2014).

Większość NSC występuje w stanie spoczynkowym; qNSC wykazują niski metabolizm i wysoką wrażliwość na sygnały środowiska zewnętrznego, i mogą być aktywowane przez różnorodne bodźce fizjologiczne (Urban i wsp. 2019). Równowaga między wyciszeniem NSC a ich aktywacją wpływa nie tylko na tempo neurogenezy, ale także na długoterminowe utrzymanie puli komórek macierzystych i potencjału neurogenego starzejącego się mózgu. Zachowanie NSC w stanie spoczynku jest także związane z regulacją ekspresji genów, o czym świadczą występujące w tych komórkach regiony heterochromatyny, które odpowiadają wyciszonym genom (Capelson i wsp. 2010). Wykazano także, że interakcje Nup153 z Sox2 odpowiadają za regulację procesu różnicowania i wpływają na utrzymanie puli niezróżnicowanych neuronalnych komórek progenitorowych (Toda i wsp. 2017).

W rozwoju embrionalnym i wczesnopoporodowym myszy, w DG dzielące się progenitory wytwarzają neurony ziarniste, które stają się qNSC pod koniec pierwszego tygodnia postnatalnego. W drugim tygodniu postnatalnym qNSC nabierają typowych cech morfologicznych i tworzą rozpoznawalną niszę neurogeną w SGZ (Berg i wsp. 2019). W

początkowych badaniach zidentyfikowano wszystkie NSC jako spoczynkowe komórki progenitorowe, są one zazwyczaj identyfikowane poprzez brak markerów proliferacji (Codega i wsp. 2014). Większość NSC u myszy nie uruchamia cyklu komórkowego (Doetsch i wsp. 1999), a niewielka ich część wykazuje aktywność, na co wskazuje stwierdzenie obecności markerów cyklu komórkowego takich jak Ki67 lub MCM2, a także bromodeoksyurydyny lub etynylodeoksyurydyny po ich podaniu (Codega i wsp. 2014, Urban i wsp. 2016).

Większość tkanek u dorosłych osobników zawiera komórki macierzyste, które dzielą się, aby wygenerować zróżnicowane komórki w celu naprawy tkanek a także samoodnowy – tj. generowania nowych komórek macierzystych, które następnie przechodzą w stan spoczynku, w celu utrzymania populacji komórek macierzystych przez dłuższy okres. Pomimo tego, że w stanie spoczynku komórki wykazują niską aktywność metaboliczną, w tym niski poziom RNA i syntezy białek, stan spoczynku jest aktywnym procesem obejmującym wiele ścieżek molekularnych, których uruchamianie ma na celu zatrzymanie komórki przed wejściem na ścieżkę różnicowania się. Ten stan zapobiega starzeniu się oraz umożliwia zatrzymanie cyklu komórkowego (Cheung i Rando 2013).

Stan spoczynku NSC jest definiowany jako odwracalne zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G₀, a także w G₂ (Otsuki i Brand 2018). Brak proliferacji jest również cechą charakterystyczną komórek trwale zróżnicowanych i starzejących się, ale qNSC mogą ponownie wejść w cykl komórkowy w warunkach fizjologicznych. Stan spoczynku jest uważany za ważny dla długo żyjących komórek dzielących się, ponieważ chroni je przed utratą ich potencjału proliferacyjnego i pozwala uniknąć akumulacji uszkodzeń DNA, białek i mitochondriów, które mogą prowadzić do rozwoju nowotworów złośliwych lub starzenia się (Cheung i Rando 2013).

Jednokomórkowa analiza transkryptomu komórek izolowanych z niszy neurogennej mózgu dojrzałej myszy daje nowe spojrzenie na rozumienie stanu spoczynku związane ze zmianami w ekspresji genów i fizjologii komórki, które zachodzą, gdy NSC stają się aktywne (Llorens-Bobadilla, i wsp. 2015, Artegiani i wsp. 2017, Basak i wsp. 2018). Taka analiza pokazuje, że występuje różnorodność molekularna w obrębie populacji qNSC. Różnorodność ta jest przypisana komórkom występującym w różnych stadiach spoczynku, co tworzy pewnego rodzaju kontinuum pomiędzy przejściem od stanu spoczynku do stanu aktywności.

Charakterystyczna dla stanu spoczynku NSC jest wysoka aktywność szlaków sygnałowych niszy neurogennej oraz niski poziom transkrypcji i translacji białek w NSC. Aktywacja NSC obejmuje aktywację genów zaangażowanych w biogenezę rybosomów,

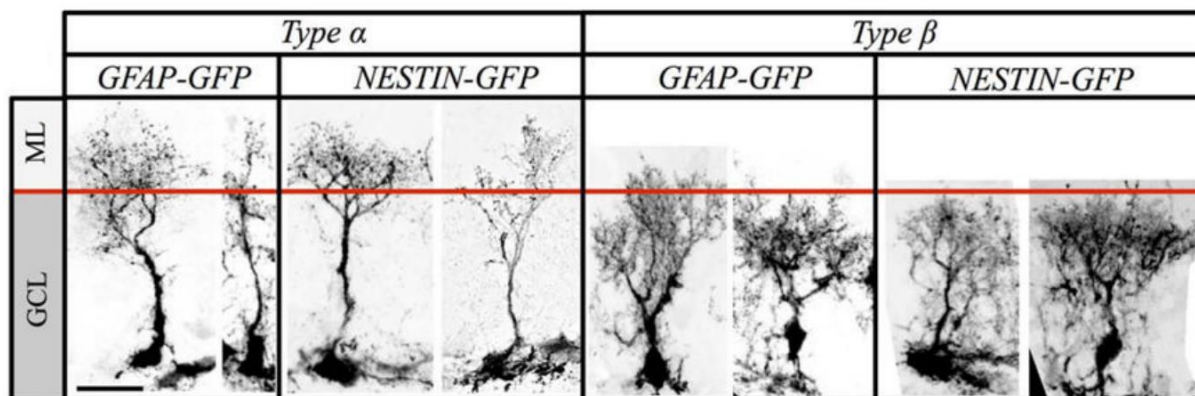
następnie syntezę RNA i ekspresję genów cyklu komórkowego, a także stopniowe wstrzymywanie aktywności zewnętrznych szlaków sygnałowych (Llorens-Bobadilla, i wsp. 2015, Dulken i wsp. 2017, Basak i wsp. 2018). Zewnętrzne szlaki sygnałowe regulują stan spoczynku oraz aktywności NSC poprzez modyfikację ekspresji genów, czynników transkrypcyjnych i innych aktywnych cząsteczek w tych komórkach. Organizacja przestrzenna chromatyny i białek NE, które biorą udział w ekspresji genów, transkrypcji i translacji w procesie aktywacji NSC, prawdopodobnie przyczynia się do prawidłowego utrzymania kształtu jądra tych komórek. Ponadto różnorodność molekularna w obrębie populacji NSC oraz kontinuum dynamiczne pomiędzy zmianą ze stanu spoczynku do stanu aktywacji NSC, może mieć swoje odzwierciedlenie w odmiennym kształcie jądra.

Wcześniejsze badania wykazały, że mysie i ludzkie NSC płodu w warstwie przykomorowej komory bocznej, drugiej strefy neurogennej mózgu, mają nieregularne jądra, które wykazują nietypowe wpuklenia NE (Guerrero-Cazares i wsp. 2011, Capilla-Gonzalez i wsp. 2014b). Zbadano ultrastrukturę i trójwymiarową organizację tych wpukleń i wykazano, że odpowiadają one strukturom zwanym mostkami chromatynowymi (ang. envelope-limited chromatin sheets, ELCS) (Cebrian-Silla i wsp. 2017). Te struktury zostały pierwotnie opisane w neutrofilach (Davies i Small 1968). ELCS są związane z białkami NE: laminą B, receptorem laminy B i Lap2 (Ghadially 1997, Olins i wsp. 1998, Olins i Olins 2009). Warto podkreślić, że ELCS opisano tylko w niektórych limfocytach i niektórych komórkach nowotworowych, w tym komórkach rdzeniaka pnia mózgu (Tani i wsp. 1971). Wykazano także, że obecność ELCS jest związana ze stanem spoczynku w NCS (Cebrian-Silla i wsp. 2017). Do tej pory jednak nie zbadano szczegółowo morfologii jader NSC neurogenezy. Biorąc pod uwagę rolę, jaką odgrywa kształt jądra w prawidłowym funkcjonowaniu komórek, odmienna morfologia jądra NSC może okazać się znacząca dla prawidłowego przebiegu procesu neurogenezy.

1.3.2. Dwa odrębne typy morfologiczne NSC

NSC znajdujące się w SGZ cechują się charakterystyczną morfologią komórki, podobną do komórki glejowej. W tych komórkach występuje długa wypustka, która przechodzi przez całą warstwę ziarnistą i na jej zakończeniu rozgałęzia się w warstwie molekularnej DG (Huttmann i wsp. 2003, Kriegstein i Alvarez-Buylla 2009, Beckervordersandforth i wsp. 2014). NSC w SGZ mogą również posiadać krótsze wypustki, które rozciągają się horyzontalnie (Steiner i wsp. 2006, Suh i wsp. 2007). Zakłada się, że regulacja proliferacji NSC odbywa się w odpowiedzi na bodźce odbierane z niszy neurogennej poprzez wypustkę neuralną, inaczej

określaną jako „drzewko” (ang. dendritic arbor, Gebara i wsp. 2016). Zidentyfikowano dwa odrębne typy morfologiczne NSC w DG hipokampa – typ α i typ β – które można odróżnić na podstawie dwóch prostych cech, długości wypustki i stopnia złożoności rozgałęzienia „drzewka” (Gebara i wsp. 2016).



Ryc. 6. Obrazy konfokalne komórek α i komórek β przedstawiające parametry morfologiczne (Gebara i wsp. 2016).

Typ α stanowi ok. 70% wszystkich NSC i cechuje się długą wypustką i wąskim rozgałęzieniem „drzewka”, która sięga do warstwy molekularnej DG. Z kolei komórki β cechują się krótką wypustką, a jej zakończenie jest bardziej rozbudowane i mieści się głównie w obrębie warstwy ziarnistej. Analiza ekspresji markerów wykazała, że zarówno w komórkach typu α , jak i β występują markery NSC takie jak GFAP i Sox2. Jednakże, pozostałe markery NSC takie jak Sox1, prominina i nestyna ulegały ekspresji tylko w niewielkiej frakcji komórek typu β (Gebara i wsp. 2016). Komórki typu α wykazują wszystkie cechy NSC, natomiast komórki β wykazują mniej jednoznaczne cechy. Morfologia i ekspresja markerów molekularnych sugerują, że komórki te stanowią stadium pośrednie między qNSC a astrocytami, ze względu na obecność markerów dojrzałych astrocytów – S100 β i GLT1, które zwykle nie występują w NSC (Gebara i wsp. 2016). Alternatywnie, komórki typu β mogą reprezentować przejściową morfologię komórek typu α , które ulegają przemianie do astrocytów. Istnieje pogląd, że przemiana ta ma miejsce w czasie starzenia się (Bonaguidi i wsp. 2011, Encinas i wsp. 2011) lub w hiperaktywacji wywołanej padaczką (Sierra i wsp. 2015).

Zależność między morfologią a funkcją NSC sugeruje, że wypustki NSC odgrywają potencjalną rolę w regulacji ich aktywności. Wykazano, że oba typy komórek (α i β) są połączone bezpośrednio z kilkoma typami komórek niszy neurogennej, w tym m.in. z

komórkami mikrogleju, astrocytami i naczyniami krwionośnymi. Wiadomo, że bezpośrednie przekazywanie sygnałów przez te komórki do NSC odgrywa kluczową rolę w regulacji proliferacji (Palmer i wsp. 2000, Sierra i wsp. 2010, Ashton i wsp. 2012). Połączenie z mikroglejem wydaje się być bardziej istotne dla komórek typu β , ze względu na zwiększoną liczbę powiązań z mikroglejem, w porównaniu z komórkami typu α . Obecność mikrogleju w DG wiąże się ze stanem zapalnym, który może redukować proces neurogenezy poprzez wytwarzanie cytokin (Monje i wsp. 2003).

Odmienna morfologia jądra NSC w hipokampalnej neurogenezie dorosłych jak dotąd nie została przebadana. W kilku pracach pokazano występowanie nietypowych jąder z nieregularnym ułożeniem NE w komórkach B (które są odpowiednikiem komórek typu 1 w warstwie przykomorowej komory bocznej, drugiej strefie neurogennej mózgu ssaków) w rozwoju płodowym człowieka i myszy (Capilla-Gonzalez i wsp. 2014a, Doetsch i wsp. 1999, Morshead i wsp. 1994, Pastrana i wsp. 2009). Przypuszcza się, że nietypowa morfologia jądra może być powiązana z pluripotencjalnością komórek macierzystych (Gorkin i wsp. 2014, Eckersley-Maslin i wsp. 2013). W jednej z prac potwierdzono obecność występowania wpukleń NE w komórkach B warstwy przykomorowej komory bocznej (Cebrian-Silla i wsp. 2017), które odpowiadają charakterystycznym elementom NE (ELCS) opisanym jak dotąd w neutrofilach i komórkach nowotworowych, których jedną z cech charakterystycznych jest nietypowa morfologia jądra (Tani i wsp. 1971). W wymienionej powyżej pracy pokazano występowanie ELCS także w jądrach trzech przebadanych komórek typu 1 DG hipokampa. Jak dotąd niewiele wiadomo na temat odmiennej morfologii jądra NSC neurogenezy hipokampalnej, która może mieć istotne znaczenie w prawidłowym przebiegu procesu neurogenezy, w związku z tym konieczne są dalsze badania nad morfologią jąder tych komórek.

2. CELE PRACY

1. Opracowanie metody służącej do oceny kształtu jąder komórkowych przy zastosowaniu obrazowania w mikroskopie konfokalnym.
2. Kompleksowe opisanie i scharakteryzowanie cech kształtu jąder komórek neurogenezy hipokampalnej w komórkach rozróżnianych ze względu na etap różnicowania, stan aktywności, a także różnice w morfologii komórki.
3. Weryfikacja zastosowanej metody do oceny kształtu jąder komórek w modelu nowotworowym.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Myszy

Linia myszy transgeniczných z wprowadzonym genem białka zielonej fluorescencji (GFP, ang. green fluorescent protein) pod promotorem nestyny (myszy nestyna-GFP oryginalnie pochodzą z laboratorium Masahito Yamaguchi z Uniwersytetu Osakijskiego, Yamaguchi i wsp. 2000) sprowadzona została z Instytutu Maxa Plancka w Dreźnie. W chwili rozpoczęcia doświadczenia myszy były w wieku 7-8 tygodni; karmione paszą standardową *ad libitum* ze stałym dostępem do wody. Dołożono wszelkich starań, aby zminimalizować cierpienie zwierząt i ich liczbę wykorzystaną w doświadczeniach.

3.2. Uzyskanie skrawków histologicznych

Preparaty zawierające ludzkie *medulloblastoma* (rdzeniaka zarodkowego) i *pilocytic astrocytoma* (gwiaździak włosowatokomórkowy) wraz z kontrolnymi preparatami mózgdzku otrzymano od prof. Ewy Matyi, kierownika Zakładu Neuropatologii Doświadczałnej i Klinicznej IMDiK PAN.

3.2.1. Do mikroskopu konfokalnego

Myszy nestyna-GFP zostały poddane perfuzji, dosercowo podano 20 ml buforowanej fosforanem soli fizjologicznej o stężeniu 0,1 M (PBS) a następnie 25 ml roztworu paraformaldehydu o stężeniu 4% (PFA), po uprzednio podanej narkozie (morbital, 100 ml/kg, 0,1 ml na mysz, dootrzewnowo). Mózgi utrwalono przez noc w temperaturze 4°C, w PFA, a następnie poddano krioprotekcji w roztworze sacharozy (30%) przez trzy dni w temperaturze 4°C. Mózgi zamrożono poprzez zanurzenie w heptanie (Sigma-Aldrich) o temperaturze -80°C na suchym lodzie i pocięto na skrawki (40 μm) na kriostacie (Leica CM 1950) (-20°C). Skrawki przechowywano w roztworze krioprotekcyjnym (roztwór glikolu etylenu i gliceryny w PBS), w temperaturze -20°C.

3.2.2. Do mikroskopu elektronowego

Myszy nestyna-GFP zostały poddane perfuzji, dosercowo podano 20 ml PBS i 25 ml PFA o stężeniu 2% z glutaraldehydem (0,5%; Sigma-Aldrich) w roztworze buforu fosforanowego o stężeniu wyjściowym 0,1 M, po uprzednio podanej narkozie (morbital, 100 ml/kg, 0,1 ml na mysz, dootrzewnowo). Mózgi utrwalono przez noc w temperaturze 4°C, w PFA z

glutaraldehydem. Następnie mózgi pokrojono na skrawki (50 μm) na wibratomie i przechowywano w buforze fosforanowym (Campbell i wsp. 2006) w temperaturze 4°C.

3.3. Immunohistochemia

3.3.1. Immunofluorescencja

Skrawki przepłukano w PBS i inkubowano przez 1,5 h w roztworze do blokowania, składającym się z surowicy ośle (5%, ang. normal donkey serum, NDS) i Tritonu-X100 (0,1%) rozpuszczonych w PBS. Pierwszorzędowe i drugorzędowe przeciwciała rozcieńczono w NDS o stężeniu 5% w PBS. Skrawki inkubowano z pierwszorzędowymi przeciwciałami przez 24 h w temperaturze 4°C na wytrząsarce, płukano w roztworze PBS z Tritonem-X100 (0,1%, PBS-Triton X-100), następnie inkubowano z drugorzędowymi przeciwciałami przez 1,5 h w temperaturze pokojowej. Do wybarwienia DNA zastosowano inkubację w barwniku fluorescencyjnym Hoechst rozcieńczonym (1:5000) w PBS-Triton X-100 przez 10 min, a następnie trzykrotnie płukano w PBS. Pierwszorzędowe przeciwciała zastosowano w stężeniach: α -GFP (koza, 1:400, Novus Biologicals), α -NeuN (kura, 1:400, Merck Milipore), α -DCX (królik, 1:200, Abcam), α -GFAP (mysz, 1:400, Synaptic Systems), α -Ki-67 (szczur, 1:400, Thermofisher Scientific). W przypadku przeciwciał drugorzędowych zastosowano: ośle przeciwkozie Alexa Fluor 488 (1:250, Jackson ImmunoResearch), ośle przeciwnożowce Alexa Fluor 549 (1:250, Jackson ImmunoResearch), ośle przeciwnożowce Alexa Fluor 647 (1:250, Jackson ImmunoResearch), ośle przeciwszczurze 549 (1:250, Jackson ImmunoResearch), ośle przeciwmysie 647 (1:250, Jackson ImmunoResearch).

3.3.2. Immunogold pre-embedment

Skrawki mózgu przepłukano PB. Następnie inkubowano w roztworze blokującym przez 2 h (5%, NDS). Przepłukano roztworem surowicy ośle z Tritonem-X100 (0,1%) w celu permabilizacji (delikatnego dziurawienia błon). Przeciwciała zostały rozcieńczone w roztworze blokującym. Skrawki inkubowano z pierwszorzędowym przeciwciałem α -GFP (koza 1:500) przez 24 h w temperaturze 4°C na wytrząsarce. Następnie przepłukano roztworem PB i inkubowano z drugorzędowym przeciwciałem połączonym ze złotem ośle przeciwkozie nanogold (1:250) przez 2 h w temperaturze pokojowej na wytrząsarce. Zastosowano wzmocnienie sygnału złotem inkubując skrawki w roztworze GoldEnhancer (Nanoprobes) przez 2 min.

3.4. Mikroskop konfokalny

Obrazowanie wykonano przy użyciu fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 780 i obiektywu 63x z immersją olejową (obiektyw apochromatyczny 63x/1.6 Oil). W trakcie wykonywania zdjęć preparaty wzbudzano laserem o długości fali 408 nm, 488 nm, 560 nm i 630 nm. Kolejne płaszczyzny konfokalne (wzdłuż osi z) zbierano w odstępach 0,21 μm , przy rozdzielczości obrazu 1024x1024 ze skalą szarości 16-bit i powiększeniu cyfrowym obrazu, co pozwoliło na uzyskanie wielkości piksela równej 0,07 x 0,07 μm . Obrazowano całe jądra losowo wybranych poszczególnych typów komórek uzyskując obrazy w formie plików z-stack o wielkości voksela 78 x 78 x 210 nm, odpowiednio w osiach x, y i z. Obraz ustawiano tak, by warstwa podziarnista położona była równoległe do podstawy pola widzenia oraz poniżej warstwy ziarnistej w celu zachowania takiego samego układu przestrzennego jąder na każdym obrazie. Każdy obraz cechuje się identycznymi ustawieniami, dzięki czemu zachowane są stałe warunki przy segmentacji jąder, a wartości uzyskanych parametrów kształtu dla zbadanych jąder można ze sobą porównywać.


3.5. Segmentacja w programie VisNow

Wykorzystano program VisNow, który zmodyfikowano na potrzeby przeprowadzenia prezentowanych analiz, dzięki współpracy z Interdyscyplinarnym Centrum Matematycznego Programowania i Modelowania Uniwersytetu Warszawskiego. Segmentację przeprowadzono ręcznie oraz bez znajomości typu komórki, zaznaczając całą powierzchnię jądra na każdej płaszczyźnie w osi z. Po dokonaniu segmentacji program obliczył następujące parametry (Tab. 1): objętość, powierzchnię, kulistość, średnią odległość od środka masy obiektu do jego powierzchni, wysokość, momenty centralne, wektory własne i współczynniki różnic kształtu. Tą metodą dokonano analizy czterech grup komórek: pięciu typów komórek neurogenezy, komórek typu 1 neurogenezy aktywnych i wyciszonych, komórek typu 1 neurogenezy odróżnianych ze względu na typ morfologiczny – komórki alfa i komórki beta oraz wybranych komórek nowotworowych. Jądra komórek neurogenezy do analizy wybierano na podstawie obecności markerów specyficznych dla danego typu komórki, w przypadku, gdy na jednym obrazie było więcej komórek danego typu niż jedna, za każdym razem były wybierane te, które znajdowały się bliżej środka obrazu. Jądra komórek nowotworowych wybierano do analizy ze środka warstwy komórkowej, po jednym jądrze ze zdjęcia.

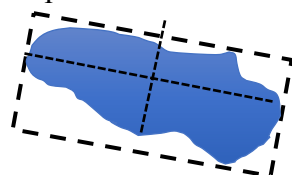
3.6. Parametry wykorzystane do analizy kształtu jądra

Zmierzono 30 różnych zmiennych / cech opisujących kształt jądra (Tab. 1) oraz dwa rodzaje współczynników różnicujących kształt, zastosowanie których umożliwiło uzyskanie 25 (współczynnik „DECIBEL”) i 17 (współczynnik „SQRT”) różnych wartości. Mierzone parametry przedstawiają się w następujący sposób:

Tab. 1. Parametry mierzone w programie VisNow opisujące cechy kształtu badanego obiektu trójwymiarowego, j.u., jednostki umowne.

Cecha (nazwa)	Jedn.	Opis
Volume	μm^3	Objętość jądra obliczona z liniowej interpolacji obrazu na siatkę o voxelach sześciennych; interpolacja liniowa, gęstość (w) pomiędzy w_0 a w_1 dla poszczególnych voxelów liczona jest zgodnie z wzorem: $w = hw_1 + (1-h)w_0$, gdzie h jest odległością pomiędzy w_0 a w_1 .
STAT_sum	j.u.	Sumaryczna zawartość DNA obliczona na podstawie jasności poszczególnych voxelów; przy założeniu liniowej proporcjonalności jasności obrazu i zawartości znacznika w voxelu; sumaryczna ilość znacznika jądrowego w obiekcie.
STAT_avg	j.u.	Średnia gęstość DNA ; średnia intensywność znacznika jądrowego obliczona ze średniej jasności voxelów
STAT_stdev	j.u.	Odchylenie standardowe gęstości DNA ; zmienność (nierównomierność) rozkładu DNA w obiekcie
STAT_min	j.u.	Pomiar intensywności znacznika jądrowego – minimum
STAT_q1	j.u.	Pomiar intensywności znacznika jądrowego – 1. kwartyl
STAT_med	j.u.	Pomiar intensywności znacznika jądrowego – mediana (2 kwartyl)
STAT_q3	j.u.	Pomiar intensywności znacznika jądrowego – 3. kwartyl
STAT_max	j.u.	Pomiar intensywności znacznika jądrowego – maksimum
C3D_bound_cube_width	μm	Szerokość prostopadłościanu, w które wpisane jest jądro (zmierzona po osiach xyz) („obiektywna” góra/dół) 

C3D_bound_cube_height	μm	Wysokość prostopadłościanu, w które wpisane jest jądro (xyz)
C3D_bound_cube_depth	μm	Głębokość prostopadłościanu, w które wpisane jest jądro (xyz)
C3D_surf_size	μm^3	Powierzchnia jądra. Wyrażona w μm^3 , gdyż jest to objętość warstwy powierzchniowej o grubości 1 woksela – liczba wokseli powierzchniowych x objętość woksela.
C3D_mean_dist2surf	μm	Promień średni ; średnia odległość od środka masy jądra do jego powierzchni
C3D_median_dist2surf	μm	Mediana odległości od środka jądra do jego powierzchni
C3D_SD_dist2surf	μm	Odchylenie standardowe odległości od środka jądra do jego powierzchni. Ta wartość odzwierciedla gładkość i stopień pofałdowania.
eigenvalue_0		Osie główne ; posortowane po wartości bezwzględnej wartości własnej macierzy kowariancji jądra (binarnego). Rozumiane jako rozciągłość jądra w 3 kierunkach głównych. Uporządkowane od największej do najmniejszej. Wzajemna relacja tych 3 wartości ocenia, czy jądro jest zbliżone do kuli, czy bardziej podłużne, czy też płaskie.
eigenvalue_1		
eigenvalue_2		
200, 020, 002		Momenty centralne II rzędu (całki liczone względem środka masy; pokazują w którą stronę rozkład jest bardziej przechylony)
z-balance		Stosunek masy góra-dół ; stosunek masy jądra w górnej jego połowie do masy jądra w dolnej jego połowie w kierunku osi z
r = XX		Współczynniki różnicowe kształtu jądra na poszczególnych poziomach szczegółów



3.7. Segmentacja w programie ITK-SNAP

Opracowany został dodatkowy moduł w programie ITK-SNAP służący do automatycznej segmentacji i klasyfikacji typów komórek, przy współpracy z Instytutem Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego. Wykorzystano U-Net (Ronneberger i wsp. 2015) oparty na Deep Convolutional Neural Network (DCNN), zmodyfikowany w celu dostosowania do wielokanałowych obrazów 3D. Cztery kanały odpowiadają czterem zastosowanym rodzajom barwienia: nestyna, NeuN, Hoechst i DCX. Komórki mają przypisane prawdopodobieństwa przynależności do każdego z 5 możliwych typów. Ten program uczył się za pomocą sztucznej inteligencji rozpoznawania typu komórki po kształcie jądra. Pula komórek, której się uczył należała do grupy 5 typów komórek neurogenezy.

3.8. Analiza statystyczna; dostępność danych

Przed zastosowaniem jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) zbadano normalność rozkładu za pomocą testu Shapiro-Wilka oraz sprawdzono, czy wariancje są równe – za pomocą testów Levene'a i Browna-Forsythe'a dla wszystkich zmierzonych zmiennych. Ponieważ nie wszystkie zestawy danych spełniały warunek normalności rozkładu i równości wariancji, dokonano logarytmicznej transformacji danych metodą Box-Cox. W przypadku wystąpienia efektu głównego, zastosowano analizę post-hoc typu Duncan. W sytuacjach, gdy po tych działaniach nadal nie otrzymano uzyskano normalności rozkładu i równości wariancji, zastosowano test Kruskalla-Wallisa dla wielu grup niezależnych, a dla dwóch grup niezależnych – test U Manna Whitneya. W przypadku uzyskania wyniku znamiennego statystycznie za pomocą testu Kruskalla-Wallisa zastosowano porównania testem Dunna (Dunn 1964, Dinno 2015) wraz z procedurą Benjaminiego-Hochberga (1995).

W celu znalezienia jąder, których kluczowe zmienne (objętość i sumaryczna ilość DNA tzn. STAT_sum) odstawały od pozostałych, analizowano grupę zmiennych opisujących ich kształt. Zmienne poddawano przekształceniu za pomocą PCA (ang. principal component analysis). Z dwóch głównych czynników – PCA1 (objętość) i PCA2 (ilość DNA), utworzono macierz kowariancji. Przy założeniu, że dane złożone ze zmiennych PCA1 i PCA2 powinny tworzyć dwuwymiarowy rozkład normalny, odrzucano jądra, dla których wartość prawdopodobieństwa wylosowania z rozkładu normalnego zadanego powyższą macierzą kowariancji była mniejsza niż założony próg.

Pokazano uzyskane istotne różnice na poziomie $p < 0,05$. Wyniki przedstawiono jako średnie + błąd standardowy średniej (SEM). Wszystkie zebrane dane są dostępne jako:

DOI: 10.17632/xcvph2sryg.1.

3.9. Układ doświadczeń

1) Doświadczenie I

Ocena zmienności kształtu jądra w zależności od stadium dojrzałości komórek w procesie neurogenezy. Przeanalizowano trzydzieści komórek z każdego z 5 typów, które pochodziły z 15 osobników ($N_{\text{osobniki}} = 15$, $n_{\text{jądra}} = 150$).

2) Doświadczenie II

Ocena zmienności kształtu jądra w zależności od stanu aktywacji komórki. Przeanalizowano 24 komórki z każdego z 4 stanów aktywacji, które pochodziły z 11 osobników ($N_{\text{osobniki}} = 11$, $n_{\text{jądra}} = 96$).

3) Doświadczenie III

Ocena zmienności kształtu jądra w zależności od cech morfologicznych komórki. Przeanalizowano 22 komórki z dwóch typów morfologicznych, które pochodziły z 11 osobników ($N_{\text{osobniki}} = 11$, $n_{\text{jądra}} = 44$).

4) Doświadczenie IV

Zastosowanie automatycznej metody analizy parametrów kształtu z możliwością wyróżnienia typów komórek do oceny zmienności kształtu jądra w zależności od stadium dojrzałości ($N_{\text{osobniki}} = 15$, $n_{\text{jądra}} = 150$).

5) Doświadczenie V

Zbadanie ultrastruktury jądra komórki nestyna-GFP+ metodą mikroskopii elektronowej wraz z trójwymiarową rekonstrukcją jądra.

Tab. 2. Zestawienie markerów (przeciwciał pierwszorzędowych) i cech morfologicznych wykorzystanych do określenia typu komórki w opisanych doświadczeniach I, II, III i IV.

Typ komórki	Przeciwciała pierwszorzędowe	Badane cechy morfologiczne
Doświadczenie I		
typ 1	nestyna-GFP	wypustka neuralna
typ 2a	nestyna-GFP	brak wypustki neuralnej
typ 2b	nestyna-GFP i DCX	brak wypustki neuralnej
typ 3	DCX	brak wypustki neuralnej
typ 4	NeuN	brak wypustki neuralnej
Doświadczenie II		
wyciszona	GFAP	wypustka neuralna
stan przejściowy I	GFAP i nestyna-GFP	wypustka neuralna
stan przejściowy II	nestyna-GFP	wypustka neuralna
aktywna	nestyna-GFP i Ki-67	wypustka neuralna
Doświadczenie III		
alfa	nestyna-GFP	wypustka neuralna sięgająca do warstwy molekularnej zakrętu zębatego
beta	nestyna-GFP	wypustka neuralna niewykraczająca poza warstwę ziarnistą zakrętu zębatego

4. WYNIKI

Zbadano szereg wielkości fizycznych opisujących kształt jąder komórkowych (zebrane w Tab. 1) pięciu typów komórek neurogenezy hipokampalnej, czterech etapów aktywacji komórek typu 1 oraz dwóch wariantów morfologicznych typu 1; na końcu wykorzystując opracowaną metodę wykonano badanie kształtu jąder komórek nowotworowych. Wyodrębniono pięć typów komórek na podstawie opisanych w literaturze markerów; typ 1 (nestyna-GFP+, obecność wypustki), typ 2a (nestyna-GFP+), typ 2b (nestyna-GFP+/DCX+), typ 3 (DCX+), typ 4 (NeuN). Komórki typu 1 należą do subpopulacji NSC, w ramach której możemy wyodrębnić komórki na podstawie stanu aktywności, wyróżniamy komórki aktywne oraz wyciszone, a także komórki w stanie przejściowym pomiędzy aktywacją a wyciszeniem. W niniejszej pracy zostały wyodrębnione dwa stany przejściowe, które były rozpoznawane na podstawie obecności markerów; dla pierwszego etapu przejściowego – GFAP i nestyna-GFP, dla drugiego etapu przejściowego – nestyna oraz stan aktywacji – z markerem Ki67. NSC można rozróżnić również na podstawie cech morfologicznych. Wyróżnia się typ α , który charakteryzuje się długą wypustką zakończoną rozgałęzieniem, określanym mianem „drzewka”, sięgającym aż do warstwy molekularnej DG oraz typ β , który ma znacznie krótszą i bardziej rozgałęzioną wypustkę, która sięga nie dalej niż poza warstwę ziarnistą DG. Poniżej podsumowano wybrane wyniki przeprowadzonych pomiarów.

4.1. Porównanie budowy jąder pięciu typów komórek neurogenezy hipokampalnej

Wybrane wyniki ww. badania opisujące właściwości pięciu typów komórek neurogenezy hipokampalnej dorosłych myszy pokazano na Ryc. 7. Porównano objętość wokseli leżących na granicy jąder – uzyskane wielkości nie są rzeczywistą wartością **powierzchni** jąder, ale umożliwiają porównanie względnej wielkości powierzchni pomiędzy komórkami poszczególnych typów. Największą względną wartość powierzchni jądrowej miały komórki typu 4 – neurony (Ryc. 7A). U komórek tych stwierdzono także występowanie największej **objętości**. Drugie pod względem objętości były komórki typu 3 (Ryc.7B), Na podstawie ww. dwóch parametrów obliczono **kulistość** jąder – jako stosunek objętości jądra do jego powierzchni. Najbardziej kuliste okazały się jądra komórek typu 4, a w dalszej kolejności – jądra komórek typu 3, 2b, 2a, zaś jądra komórek typu 1 miały najniższą wartość kulistości (Ryc. 7C).

Kolejną zmienną zbadaną w celu określenia wielkości i sferyczności jądra był **promień średni** – średnia odległość od środka masy obiektu do jego powierzchni – mierzona wraz z **odchyleniem standardowym**. W przypadku kuli odchylenie standardowe średniej odległości od środka masy jest równe 0. Im wartość odchylenia standardowego jest wyższa, tym większe różnice występują pomiędzy odległościami od środka masy obiektu do jego powierzchni. Okazało się, że największa wartość odległości od środka masy jądra do jego powierzchni występuje w neuronach (Ryc. 7D), co potwierdza obserwację o największej objętości ich jąder (Ryc. 7B). Jednocześnie jądra komórek typu 1 i 2a miały najwyższe wartości odchylenia standardowego mierzonej odległości (omawiane różnice nie były jednak znamienne statystycznie; nie pokazano), co potwierdza występowanie nieregularnego kształtu jądra w tych komórkach.

Kolejną cechą różnicującą komórki pomiędzy typami okazała się być średnia wartość sygnału jądrowego barwnika fluorescencyjnego. Ten pomiar pozwala ocenić wewnętrzną strukturę jądra, jego wynik można interpretować jako oddający **gęstość DNA** (powstaje na podstawie rozkładu i intensywności barwienia DNA). Gęstość DNA uzyskała najwyższe wartości w jądrach komórek typu 1, 2a i 2b, najmniejsza zaś była w jądrach komórek typu 4 (Ryc. 7E). Co ważne, pomiar odchylenia standardowego średniego sygnału jądrowego (**odchylenie standardowe gęstości DNA**) nie wykazał istotnych różnic, co wskazuje na to, że DNA jest rozłożone w jądrach komórek każdego typu w podobnie równomierny sposób (Ryc. 7F).

Zmierzono także bardziej szczegółowe wymiary jąder: **szerokość, wysokość i głębokość**; podstawowe 3 **momenty centralne** i **osie główne**. Szerokość, wysokość i głębokość jąder stanowią odpowiednie wymiary prostopadłościanu (z zachowaniem osi „góra”-”dół”), w którą wpisane jest badane jądro. Jądra komórek typu 2a okazały się szersze od jąder komórek typu 3. Okazało się, że jądra komórek typu 1 i 3 są niższe do jąder komórek typu 4, natomiast znacząco niższe (spłaszczone) jądra występują w komórkach typu 2a (Ryc. 7H), co potwierdzają także obrazy z mikroskopu konfokalnego (Ryc. 9D). Z kolei istotne różnice w głębokości wykazały komórki typu 1 i typu 2a w porównaniu do komórek typu 4, które mają najmniejszą wartość głębokości, jednakże obserwowane różnice były niewielkie (Ryc. 7I).

Aby ocenić, w jaki sposób rozkłada się masa jądra w przestrzeni względem osi xyz, obliczono **momenty centralne** zwykle w kierunkach głównych (całki liczone względem środka masy). Okazało się na przykład, że jądra komórek typu 2a mają najbardziej rozłożoną masę wzdłuż osi x i y (Ryc. 7J i 7L), co może oznaczać, że jądra tych komórek są płaskie i podłużne

względem warstwy ziarnistej DG. Wzdłuż osi z najbardziej równomiernie rozłożoną masę mają jądra komórek typu 4. Wyniki te potwierdzają również obrazy mikroskopowe, na których jądro komórki typu 2a ma masę rozłożoną wzdłuż osi x i y. Jądro komórki typu 4 zachowuje podobną masę wraz z postępem osi z (Ryc. 10).

Obliczono także 3 główne wymiary badanych jąder, tzn. osie główne (in. wektory własne; ang. eigenvalues), które pozwalają wpisać obiekt w najbardziej zbliżony do niego prostopadłościan położony dowolnie w przestrzeni. Wzajemna relacja tych trzech wartości oddaje to, czy badany obiekt jest zbliżony do kuli, bardziej podłużny (przypomina kształtem cygaro), czy też płaski (placek). Wyniki przedstawiono na Ryc. 7M-O.

4.2. Porównanie budowy jąder komórek neurogenezy hipokampalnej po odrzuceniu wartości odstających

Ponieważ zauważono, że w przypadku wielu jąder mamy do czynienia z wynikami odstającymi od wartości średnich dla poszczególnych grup, co dotyczyło np. objętości i sumarycznej zawartości DNA, przeprowadzono analizę wyników bez wartości odstających. Liczby n dla poszczególnych grup podano w opisie Ryc. 7 i 8, a także Ryc. 11 i 12.

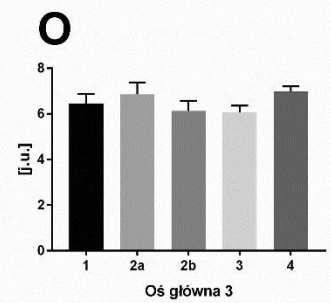
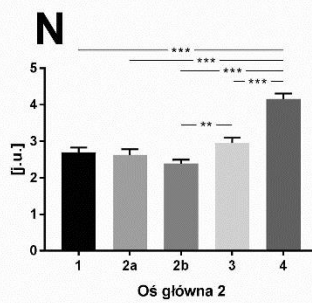
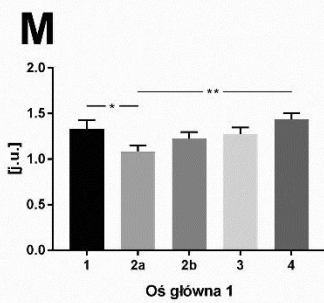
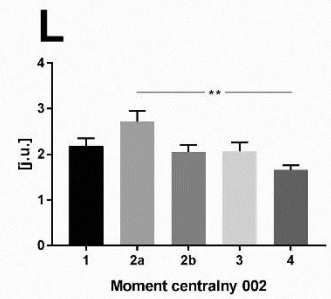
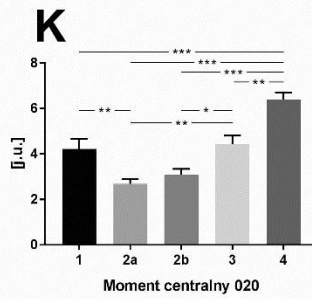
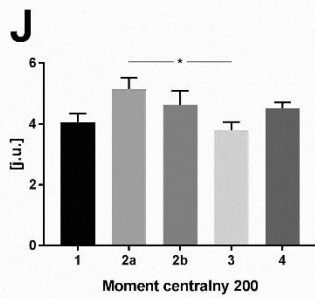
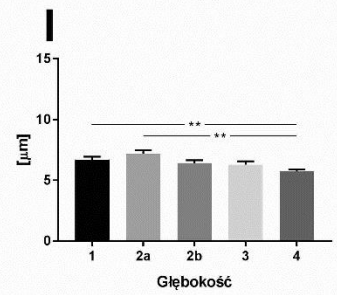
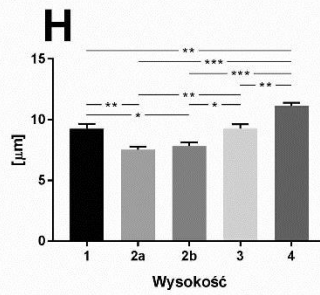
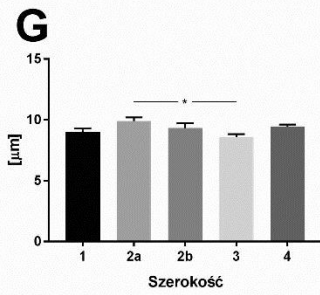
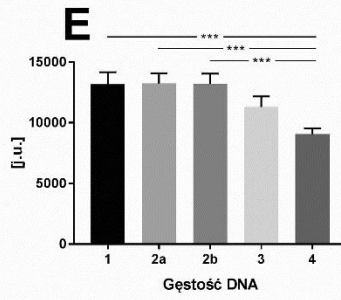
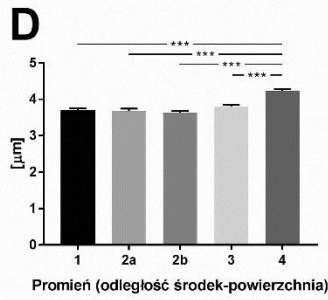
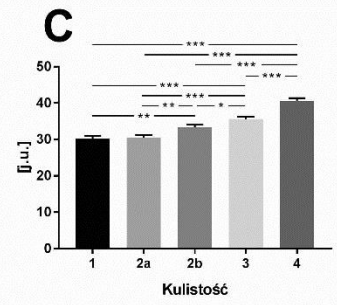
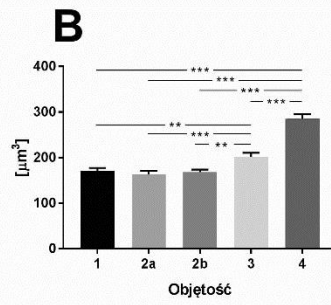
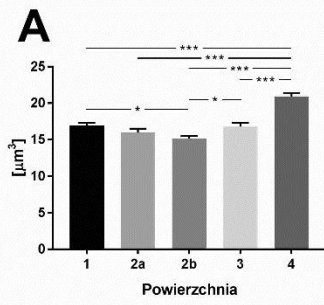
W przypadku analizy pięciu typów komórek neurogenezy dorosłych eliminacja wartości odstających nie spowodowała utraty znamienności najważniejszych i najsilniejszych różnic dotyczących porównywanych zmiennych, a nawet wiele różnic uzyskało silniejszą znamienność lub pojawiły się dodatkowe różnice pomiędzy grupami – co dotyczy np. powierzchni, objętości, kulistości, promienia, gęstości DNA, momentu centralnego 200 i osi głównej 1. Jednakże niektóre różnice obserwowane dla wszystkich jąder nie pojawiły się po analizie danych pozbawionych wartości odstających – co najbardziej widać w przypadku głębokości (Ryc. 8I) i momentu centralnego 002 (Ryc. 8L).

Ryc. 7. Porównanie budowy jąder komórek typu 1-4 (tzn. 1, 2a, 2b, 3, 4 – neurony, n = 30) neurogenezy hipokampalnej na podstawie wybranych zmiennych (por. Tab. 1), tzn. powierzchni (**A**), objętości (**B**), kulistości (**C**), promienia średniego (**D**), gęstości DNA (**E**), odchylenia standardowego gęstości DNA (**F**), szerokości (**G**), wysokości (**H**), głębokości (**I**), momentu centralnego 200 (**J**), momentu centralnego 020 (**K**), momentu centralnego 002 (**L**), osi głównej 1. (**M**), osi głównej 2. (**N**) oraz osi głównej 3. (**O**).

W przypadku części ww. wielkości możliwa była do przeprowadzenia analiza parametryczna, a obserwowane różnice pomiędzy grupami (Duncan) poparte zostały stwierdzeniem występowania efektu głównego grupy po jednoczynnikowej analizie wariancji (ANOVA) w przypadku: powierzchni (**A**), $F(4, 145) = 21,31$, $p < 0,0001$; objętości (**B**), $F(4, 145) = 34,04$, $p < 0,0001$; kulistości (**C**), $F(4, 145) = 34,22$, $p < 0,0001$; promienia średniego (**D**), $F(4, 145) = 19,48$, $p < 0,0001$; gęstości DNA (**E**), $F(4, 145) = 5,33$, $p = 0,0005$; osi głównej 1. (**M**), $F(4, 145) = 3,15$, $p = 0,0162$ oraz osi głównej 2. (**N**), $F(4, 145) = 23,26$, $p < 0,0001$.

Z kolei w przypadku innych parametrów posłużono się analizą nieparametryczną, a obserwowane różnice pomiędzy grupami (Dunn z procedurą Benjaminiego-Hochberga) zostały oparte na wyniku testu Kruskala-Wallis – w przypadku: szerokości (**G**), $p = 0,0250$; wysokości (**H**), $p < 0,0001$; głębokości (**I**), $p = 0,0025$; momentu centralnego 200 (**J**), $p = 0,0201$; momentu centralnego 020 (**K**), $p < 0,0001$; jak również momentu centralnego 002 (**L**), $p = 0,0058$.

Różnice pomiędzy grupami (Duncan, Dunn) znamienne statystycznie: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

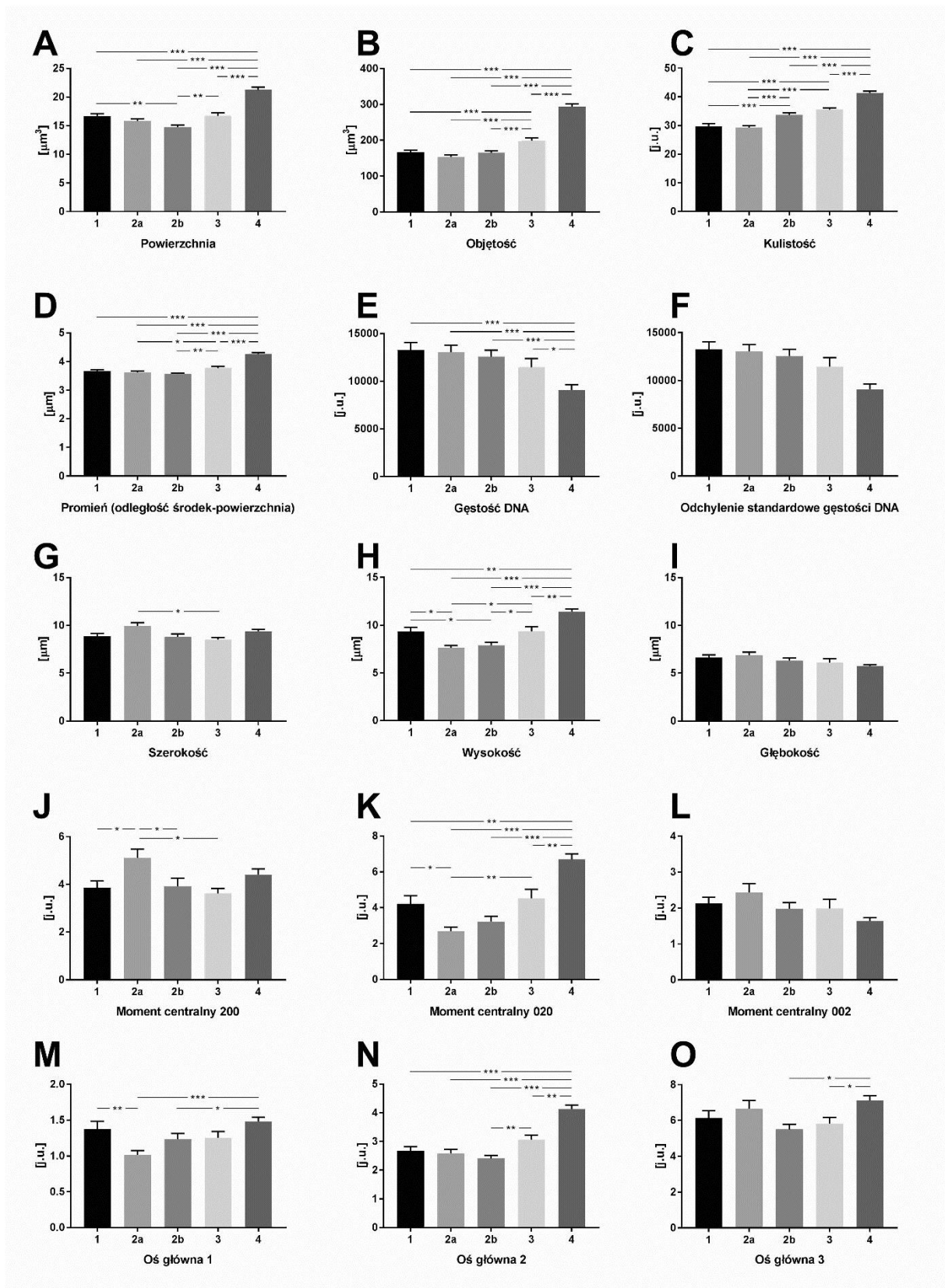


Ryc. 8. Porównanie budowy jąder komórek typu 1-4 (tzn. 1, 2a, 2b, 3, 4 – neurony) neurogenyzy hipokampalnej na podstawie wybranych zmiennych po odrzuceniu wartości odstających (por. Tab. 1). Porównano zmienne: powierzchnię (**A**), objętość (**B**), kulistość (**C**), promień średni (**D**), gęstość DNA (**E**), odchylenie standardowe gęstości DNA (**F**), szerokość (**G**), wysokość (**H**), głębokość (**I**), moment centralny 200 (**J**), moment centralny 020 (**K**), moment centralny 002 (**L**), oś główną 1. (**M**), oś główną 2. (**N**) oraz oś główną 3. (**O**).

W przypadku części ww. wielkości możliwa była do przeprowadzenia analiza parametryczna, a obserwowane różnice pomiędzy grupami (Duncan) poparte zostały stwierdzeniem występowania efektu głównego grupy po jednoczynnikowej analizie wariancji (ANOVA) w przypadku: powierzchni (**A**), $F(4, 99) = 33,76$, $p < 0,0001$; objętości (**B**), $F(4, 99) = 65,75$, $p < 0,0001$; kulistości (**C**), $F(4, 99) = 49,82$, $p < 0,0001$; promienia średniego (**D**), $F(4, 99) = 41,24$, $p < 0,0001$; gęstości DNA (**E**), $F(4, 99) = 6,00$, $p = 0,0002$.

Z kolei w przypadku innych parametrów posłużono się analizą nieparametryczną, a obserwowane różnice pomiędzy grupami (Dunn z procedurą Benjaminiego-Hochberga) zostały oparte na wyniku testu Kruskala-Wallisa – w przypadku: szerokości (**G**), $p = 0,0210$; wysokości (**H**), $p < 0,0001$; momentu centralnego 200 (**J**), $p = 0,0142$; momentu centralnego 020 (**K**), $p < 0,0001$; osi głównej 1. (**M**), $p = 0,0006$; osi głównej 2. (**N**), $p < 0,0001$ oraz osi głównej 3. (**O**), $p = 0,0100$.

Liczba zbadanych jąder: typ 1, $n = 22$; typ 2a, $n = 20$; typ 2b, $n = 24$; typ 3, $n = 18$; typ 4, $n = 20$. Różnice pomiędzy grupami (Duncan, Dunn) znamienne statystycznie: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.



Ryc. 9. Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego ilustrujące niektóre opisane różnice pomiędzy budową jąder komórek typu 1-4 (tzn. 1, 2a, 2b, 3, 4) neurogenezy hipokampalnej.

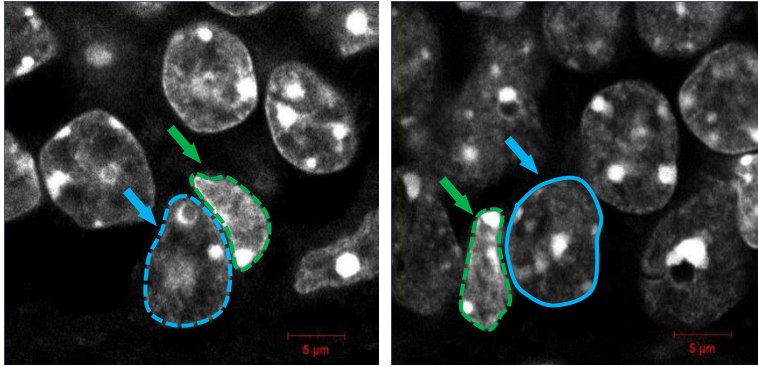
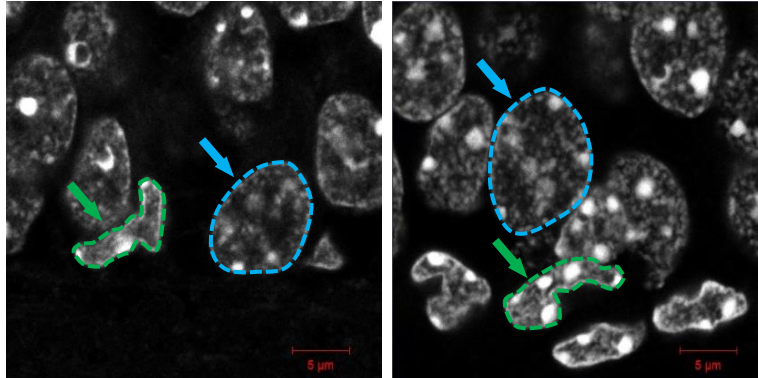
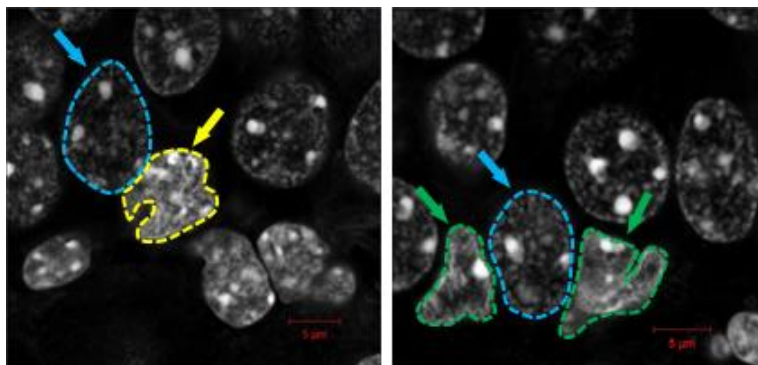
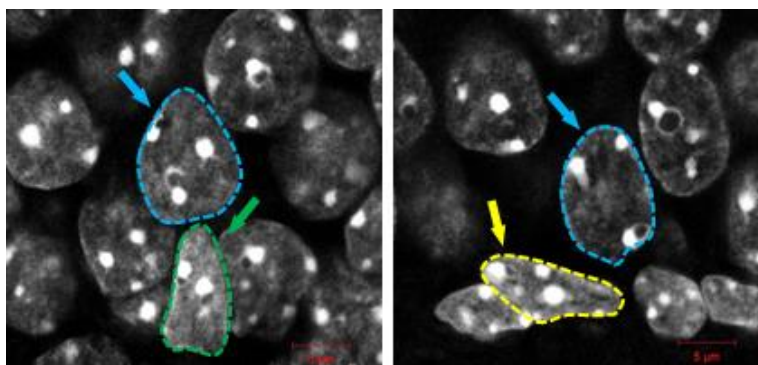
A. Objętość; jądra komórek typu 1 (zielone strzałki) i komórek typu 4 (niebieskie strzałki). Jądra komórek typu 1 są mniejsze w porównaniu do jąder komórek typu 4.

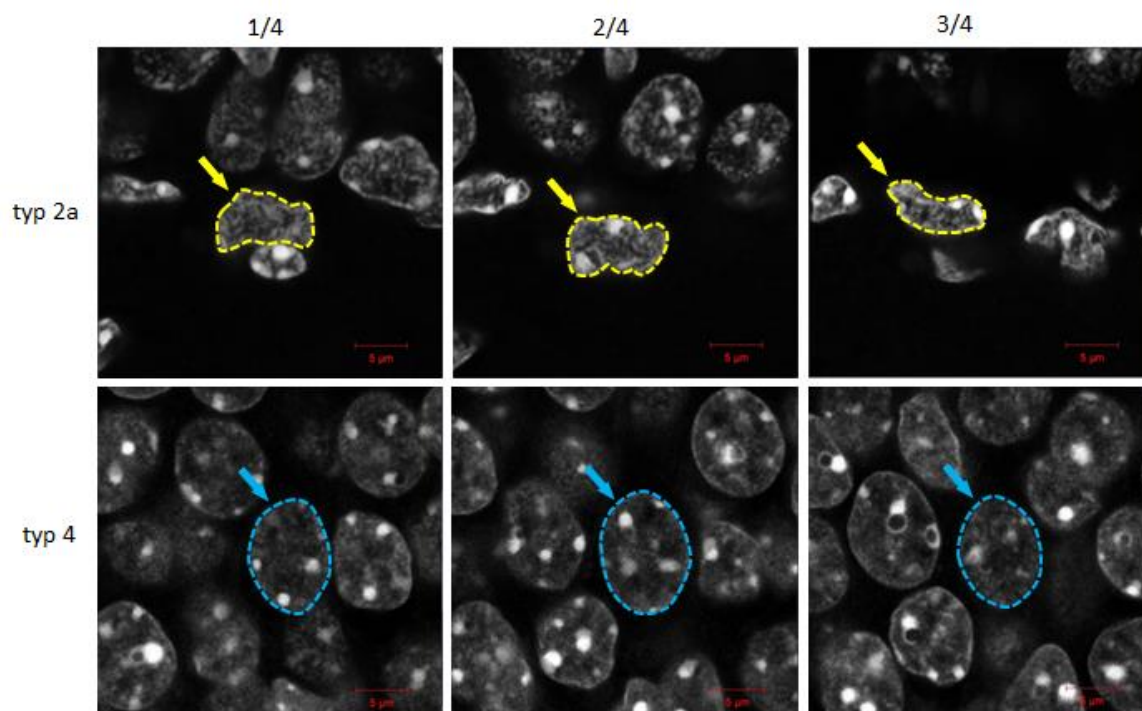
B. Kulistość; jądra komórek typu 1 (zielone strzałki) i komórek typu 4 (niebieskie strzałki). Jądra komórek typu 1 są bardziej okrągłe (kuliste).

C. Gęstość DNA; jądra komórek typu 1 (zielone strzałki), typu 2a (żółta strzałka) i komórek typu 4 (niebieskie strzałki). Widoczna gęstość DNA (siła sygnału) jąder komórek typu 4 jest mniejsza niż w jądrach komórek typu 1 i 2a.

D. Wysokość; jądro komórki typu 1 (zielona strzałka), typu 2a (żółta strzałka) i komórek typu 4 (niebieskie strzałki). Wysokość (wymiar pionowy obiektu) jest najmniejsza w przypadku komórki typu 2a.

Kalibracja – 5 μm .

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



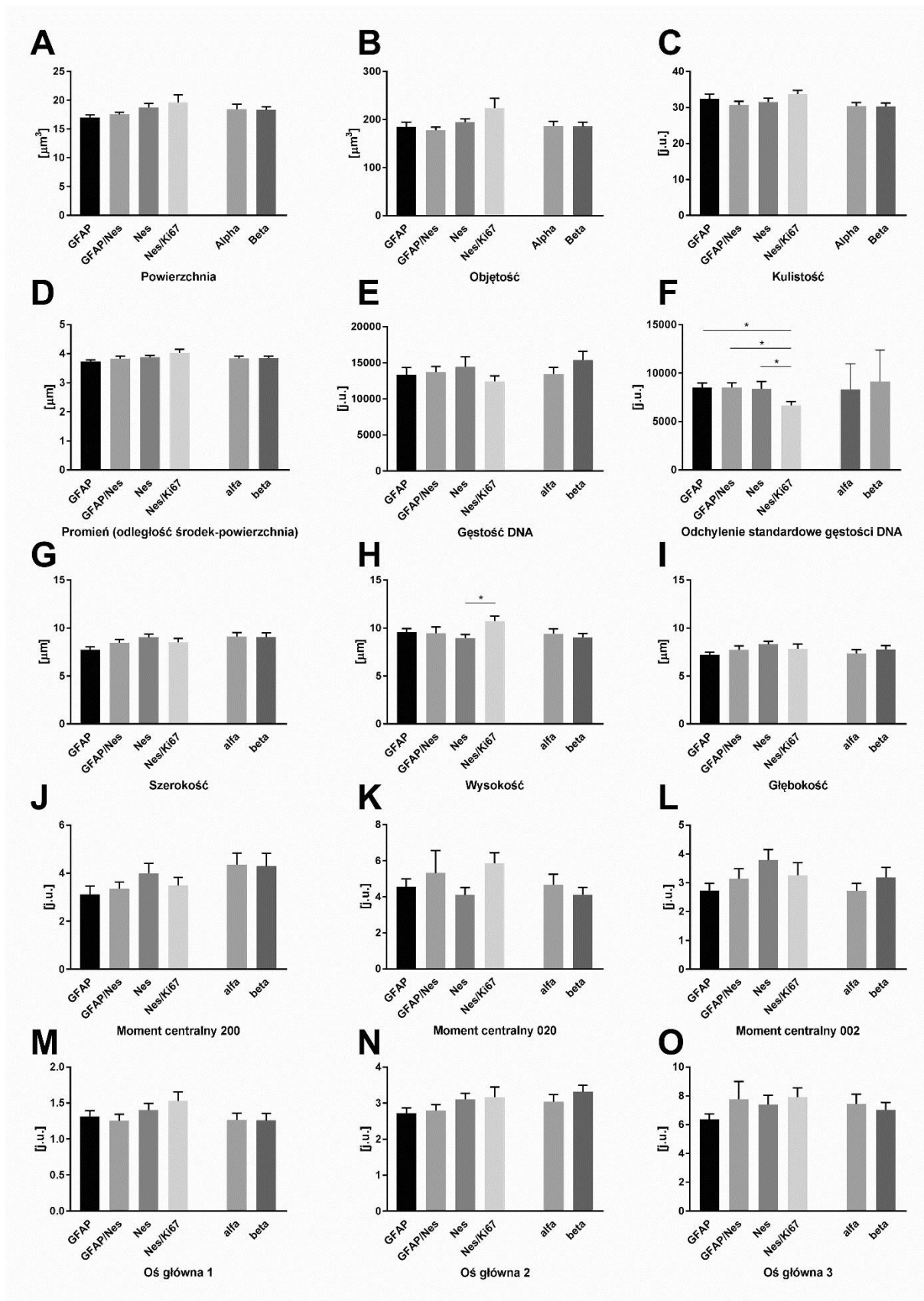
Ryc. 10. Jądro komórki typu 2a (strzałki żółte) oraz komórka typu 4 (niebieskie strzałki) w trzech płaszczyznach, środkowej oraz środkowymi pomiędzy środkiem a początkiem/końcem osi z (przód, środek, tył); kalibracja – 5 µm.

4.3. Porównanie budowy jąder NSC o różnej aktywności i morfologii

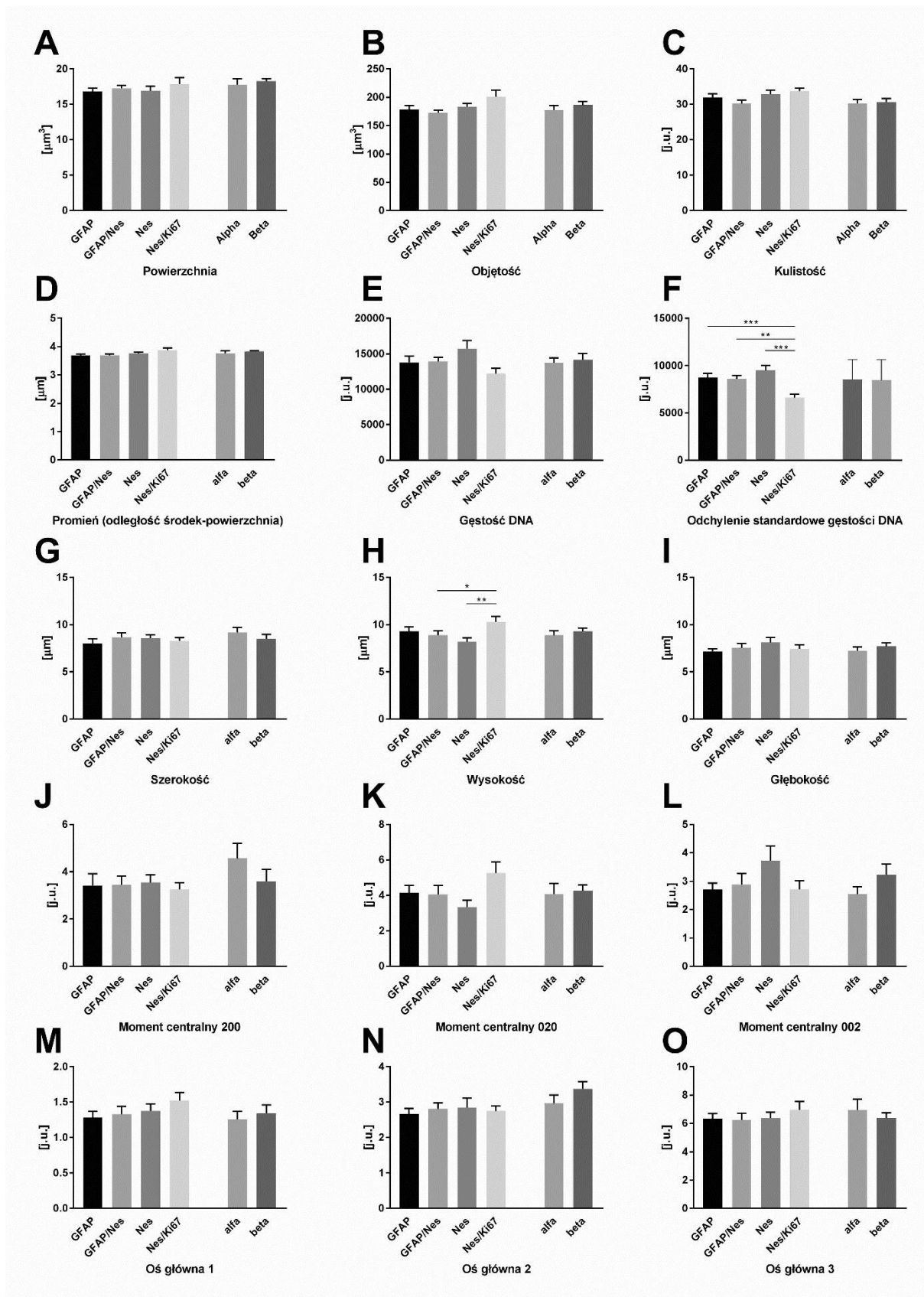
Analogiczne badanie przeprowadzono po zebraniu materiału mikroskopowego NSC (tzn. jedynie typu 1): wyciszonych (GFAP+), na pierwszym (GFAP+/nestyna-GFP+) i drugim (nestyna-GFP+) etapie przejściowym oraz aktywnych (nestyna-GFP+/Ki67+). W tym zestawieniu uwzględniono także dwa warianty morfologiczne – α i β . Wybrane wyniki myszy pokazano na Ryc. 11 i 12.

Stwierdzone różnice pomiędzy zmiennymi wystąpiły jedynie w przypadku odchylenia standardowego gęstości DNA (Ryc. 11F) i wysokości (Ryc. 11H), jednakże różnice te okazały się bardziej znamienne po usunięciu danych odstających (Ryc. 12F i 12H). Komórki Ki/67+ okazały się wyższe niż komórki GFAP/Nes+ i Nes+, jak również miały mniejsze odchylenie standardowe gęstości DNA niż komórki GFAP+, GFAP/Nes+ i Nes+.

Ryc. 11. Porównanie budowy jądra komórkowego czterech różnych grup neuralnych komórek macierzystych (NSC, typ 1) o różnej aktywności (obecność markerów: GFAP, GFAP i nestyny, nestyny oraz nestyny wraz z Ki67, n = 24) oraz dwóch wariantów anatomicznych NSC, tzn. komórek alfa vs beta (n = 22) na podstawie wybranych zmiennych (por. Tab. 1), tzn. powierzchni (**A**), objętości (**B**), kulistości (**C**), promienia średniego (**D**), gęstości DNA (**E**), odchylenia standardowego gęstości DNA (**F**), szerokości (**G**), wysokości (**H**), głębokości (**I**), momentu centralnego 200 (**J**), momentu centralnego 020 (**K**), momentu centralnego 002 (**L**), osi głównej 1. (**M**), osi głównej 2. (**N**) oraz osi głównej 3. (**O**). W oparciu o wyniki analizy nieparametrycznej stwierdzono różnice pomiędzy grupami NSC o różnej aktywności (Dunn z procedurą Benjaminiego-Hochberga; *, $p < 0,05$), które zostały oparte na wyniku testu Kruskala-Wallisa – w przypadku: odchylenia standardowego gęstości DNA (**F**), $p = 0,0162$ i wysokości (**H**), $p = 0,0411$. Nie stwierdzono żadnych różnic pomiędzy komórkami alfa i beta.

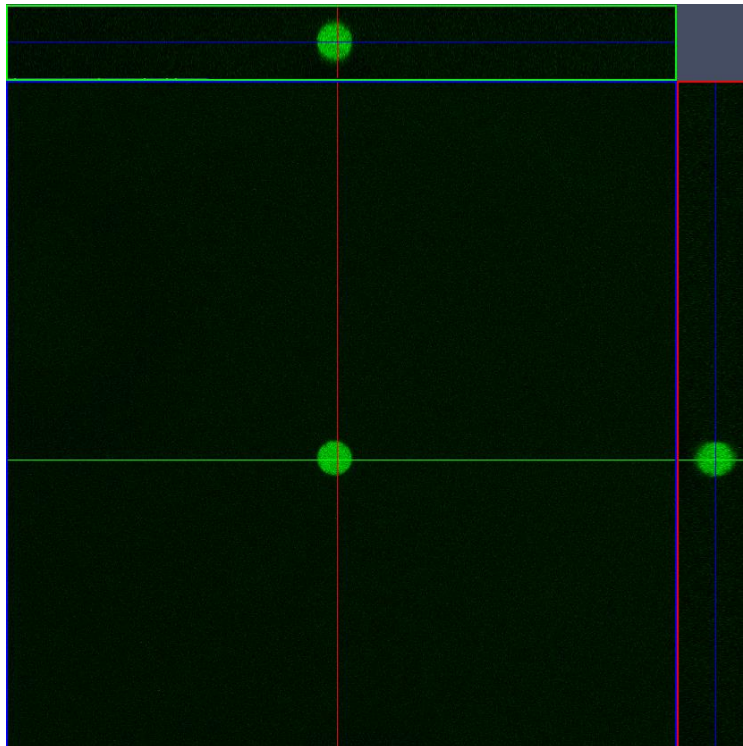


Ryc. 12. Porównanie budowy jądra czterech różnych grup neuralnych komórek macierzystych (NSC, typ 1) o różnej aktywności (obecność markerów: GFAP, GFAP i nestyny, nestyny oraz nestyny wraz z Ki67) oraz dwóch wariantów anatomicznych NSC, tzn. komórek alfa vs beta po odrzuceniu wartości odstających na podstawie wybranych zmiennych (por. Tab. 1), tzn. powierzchni (**A**), objętości (**B**), kulistości (**C**), promienia średniego (**D**), gęstości DNA (**E**), odchylenia standardowego gęstości DNA (**F**), szerokości (**G**), wysokości (**H**), głębokości (**I**), momentu centralnego 200 (**J**), momentu centralnego 020 (**K**), momentu centralnego 002 (**L**), osi głównej 1. (**M**), osi głównej 2. (**N**) oraz osi głównej 3. (**O**). W przypadku części ww. wielkości możliwa była do przeprowadzenia analiza parametryczna, a obserwowane różnice pomiędzy grupami NSC o różnej aktywności (Duncan) poparte zostały stwierdzeniem występowania efektu głównego grupy po jednoczynnikowej analizie wariancji (ANOVA) w przypadku: odchylenia standardowego gęstości DNA (**F**) $F(3, 56) = 8,13$, $p = 0,0001$ i wysokości (**H**) $F(3, 56) = 3,06$, $p = 0,0355$. Nie stwierdzono żadnych różnic pomiędzy komórkami alfa i beta. Liczba zbadanych jąder: GFAP +, $n = 16$; GFAP/nestyna+, $n = 17$, nestyna+, $n = 12$; nestyna/Ki67+; typ1 alfa, $n = 16$; typ1 beta, $n = 15$. Różnice pomiędzy grupami (Duncan) znamienne statystycznie: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

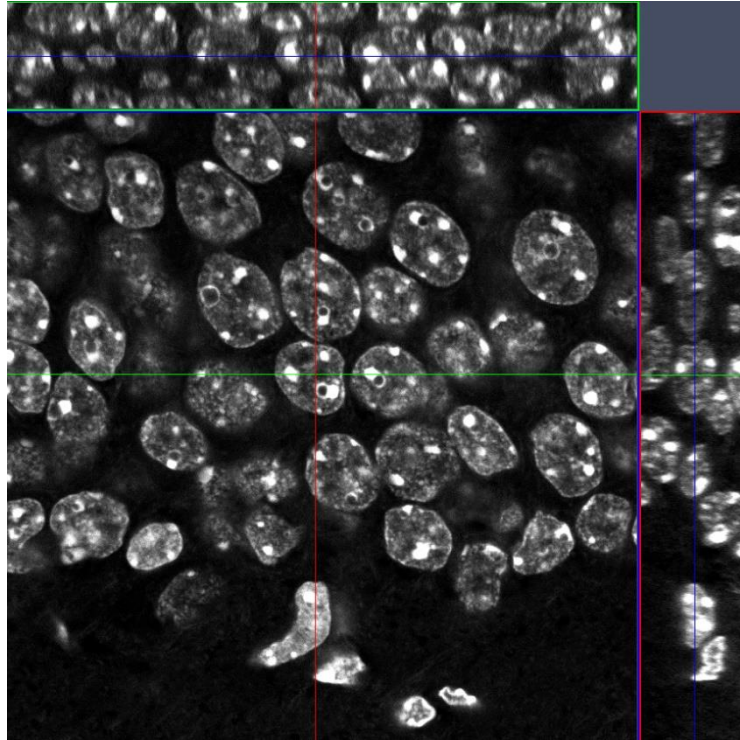


4.4. Spłaszczenie badanych jąder

Uzyskane analizy pokazały, że wszystkie jądra komórkowe, niezależnie od typu, mają zawsze ten sam wymiar znacznie mniejszy – jest to wymiar w osi z (głębokość), podczas gdy szerokość i głębokość badanych jąder komórkowych powinny być takie same (por. Ryc. 7G vs. 7I). Oznacza to, że badane komórki zostały spłaszczone. Aby potwierdzić, czy rzeczywiście tak jest, wykonano zdjęcia kontrolne przy użyciu kulek o znanych wymiarach ($4\ \mu\text{m}$) wykorzystywanych do kalibrowania mikroskopu. Na zdjęciach z mikroskopu konfokalnego, kulki mają taki sam wymiar w każdej osi (Ryc. 13). Zatem oznacza to, że analizowane komórki zostały w rzeczywistości spłaszczone. Prawdopodobnie może to być spowodowane naciskiem szkiełka nakrywkowego. Aby potwierdzić tę hipotezę część skrawków zostało pociętych strzałkowo i przygotowanych według opisanych metod. Na uzyskanym zdjęciu skrawków strzałkowych, stwierdzono również spłaszczenie komórek w osi z (Ryc. 14).



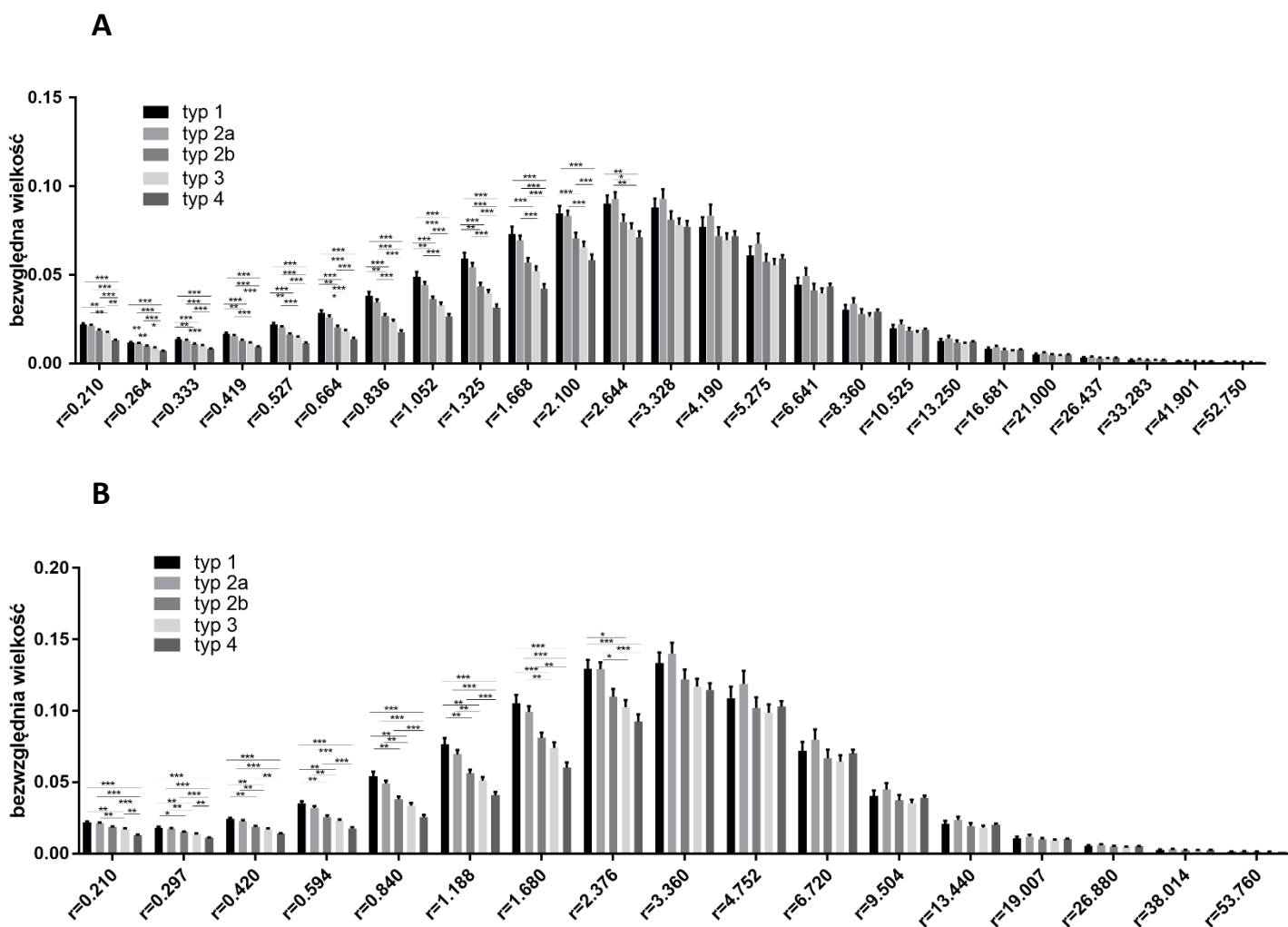
Ryc. 13. Widok ortho obrazu konfokalnego w programie ZEN 2.3 SP1. Na obrazie znajduje się nanokulka o wymiarach $4\ \mu\text{m}$.



Ryc. 14. Widok ortho obrazu konfokalnego w programie ZEN 2.3 SP1. Na obrazie widać jądra komórek w zakręcie zębatym hipokampa myszy nestyna-GFP, których skrawki pokrojono strzałkowo.

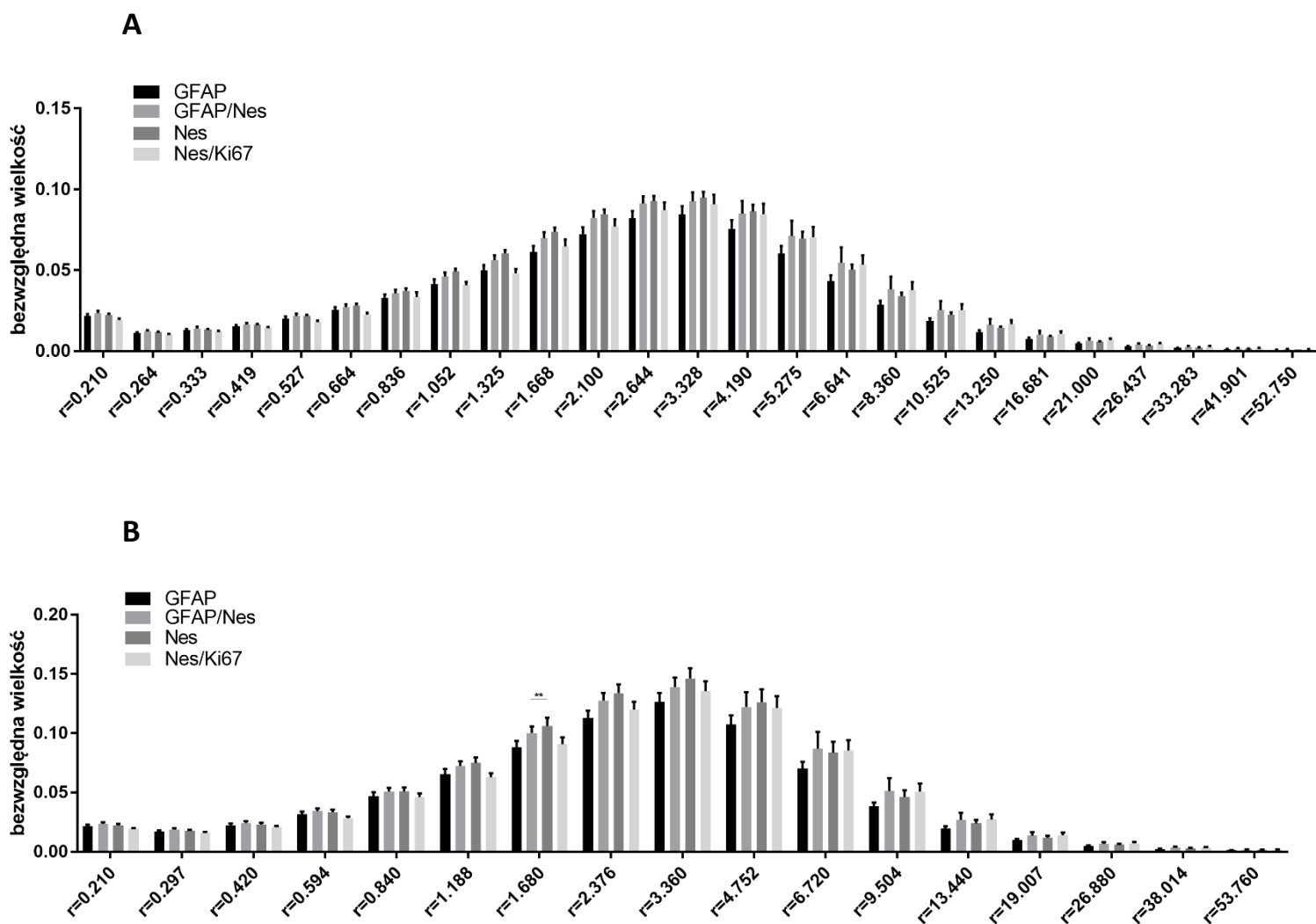
4.5. Czynniki różnicowe kształtu

Zastosowano również algorytm matematyczny – wieloskalowy deskryptor kształtu w postaci ciągu objętości – umożliwiający obliczenie różnic mnogościowych pomiędzy kolejnymi konturami rozmycia kształtu badanych obiektów, które powstały na podstawie kolejnych wartości (średnicy, $\text{średnicy}/\sqrt{2}$, $\text{średnicy}/2$, itd.), dzięki zastosowaniu rozmycia gaussowskiego. Ta analiza pozwala zobrazować złożoność jądra pod względem występowania chropowatości, wpukleń lub odstających struktur tzw. szczegółów odróżniających, których objętość jest obliczana jako wielkość względna (Ryc. 15, oś pionowa). Zastosowano dwa sposoby różnicowania kształtu, z wykorzystaniem różnych współczynników różnicowania. Jądra komórek typu 1 i typu 2a na każdym etapie oceny kształtu wykazują największą złożoność swojej budowy w porównaniu z pozostałymi typami komórek (Ryc. 15).



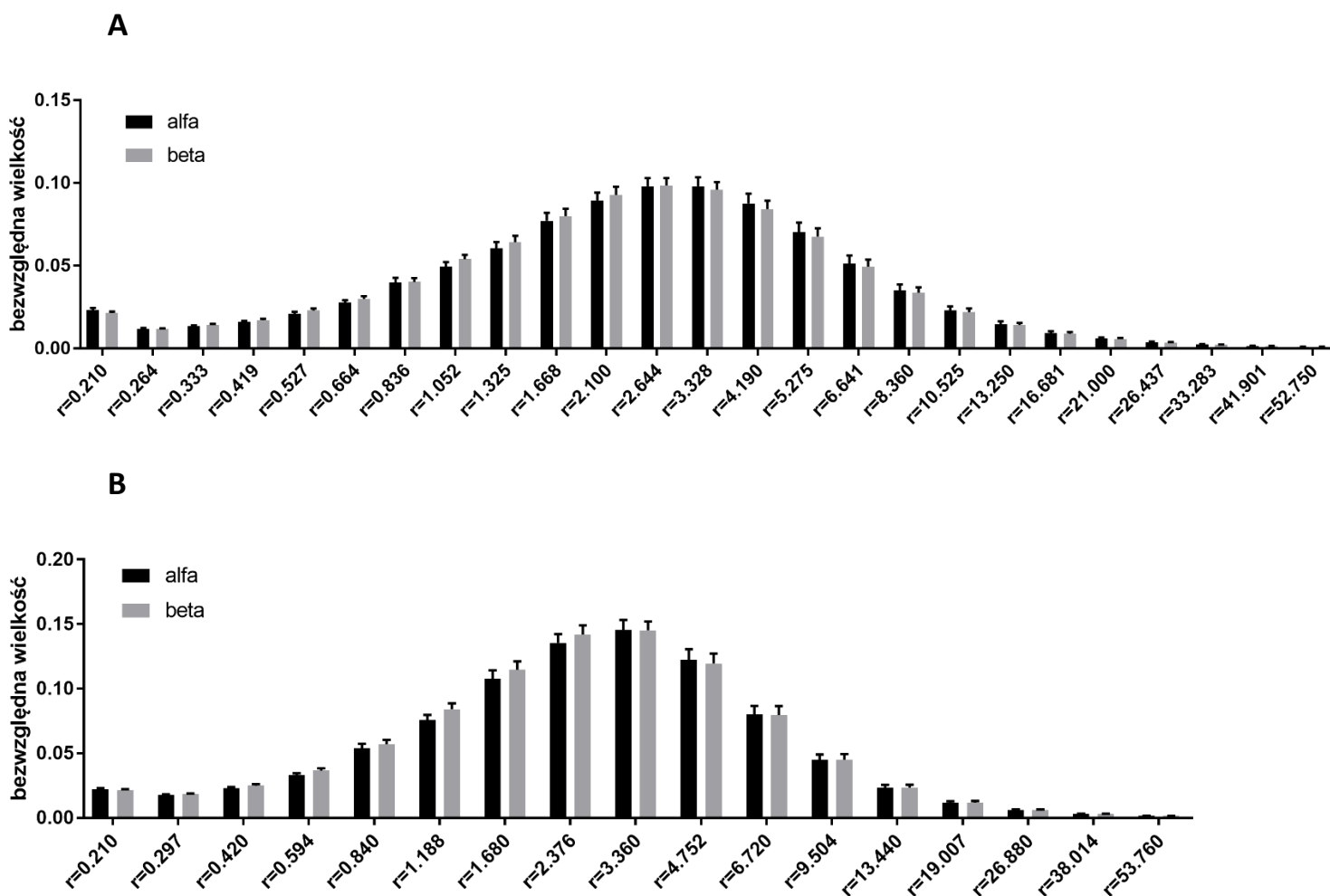
Ryc. 15. Czynniki różnicowe kształtu jąder komórek każdego typu linii neurogennej DG, (A) policzone według współczynnika „DECIBEL”, (B) policzone według współczynnika „SQRT”.

Przeanalizowane zostały jądra komórek aktywnych i wyciszonych. Porównując jądra czterech podtypów NSC nie wykazano znaczących różnic kształtu (Ryc. 16).



Ryc. 16. Czynniki różnicowe kształtu jąder komórek wyciszonych i aktywnych, (A) policzone według współczynnika „DECIBEL”, (B) policzone według współczynnika „SQRT”.

Analiza współczynników różnicy kształtu jąder komórek α i β wykazała, że komórki te również nie różnią się pod względem cech charakterystycznych kształtu (Ryc. 17).



Ryc. 17. Czynniki różnicowe kształtu jąder komórek alfa i beta, (A) policzone według wzoru „DECIBEL”, (B) policzone według wzoru „SQRT”.

4.6. Automatyczny klasyfikator typu komórki

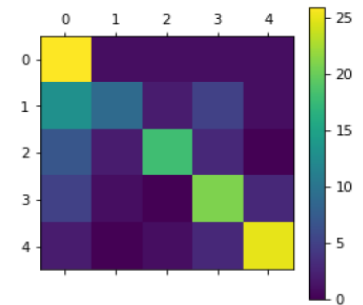
Wykorzystano istniejący program ITK-SNAP służący do segmentacji jąder komórkowych i innych struktur biologicznych. Program uczył się za pomocą sztucznej inteligencji rozpoznawania typu komórki po różnych cechach opisujących kształt jądra takich jak: objętość, wydłużenie, spłaszczenie, średnica elipsoidy, obwód i promień kuli, w którą wpisane jest jądro, obwód właściwy, oś główna, średnica Fereta, momenty bezwładności, kulistość. Pula komórek, na podstawie której program się uczył, należała do grupy 5 typów komórek neurogenety.

Zastosowano losowe drzewko decyzyjne jako środek do klasyfikacji jąder. Najwyższa dokładność jaką uzyskano dla pojedynczego drzewa decyzyjnego wynosiła 67% dla głębokości 10 (Ryc. 18A). Przy kolejnej próbie zastosowano 10 estymatorów przy

głębokości 10 i uzyskano dokładność na poziomie 97% (Ryc. 18B). Jednakże, po podzieleniu zbioru danych na grupy uczące i testowe (7:3) osiągnięto dokładność 46%, co jest wynikiem lepszym niż wynik losowy, ale nie zapewnia ostatecznego i wiarygodnego przewidywania typu komórki (Ryc. 18C).

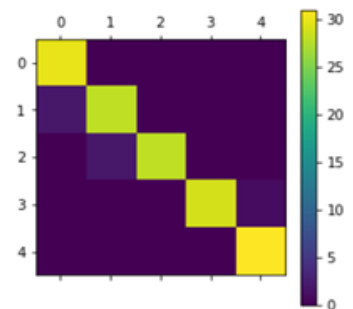
A

	Typ 1	Typ 2a	Typ 2b	Typ 3	Typ 4
Typ 1	[26	1	1	1	1]
Typ 2a	[13	9	2	5	1]
Typ 2b	[7	2	18	3	0]
Typ 3	[5	1	0	21	3]
Typ 4	[2	0	1	3	25]



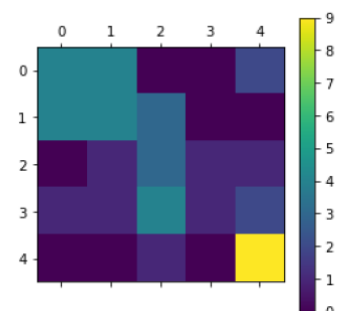
B

	Typ 1	Typ 2a	Typ 2b	Typ 3	Typ 4
Typ 1	[30	0	0	0	0]
Typ 2a	[2	28	0	0	0]
Typ 2b	[0	2	28	0	0]
Typ 3	[0	0	0	30	0]
Typ 4	[0	0	0	0	31]



C

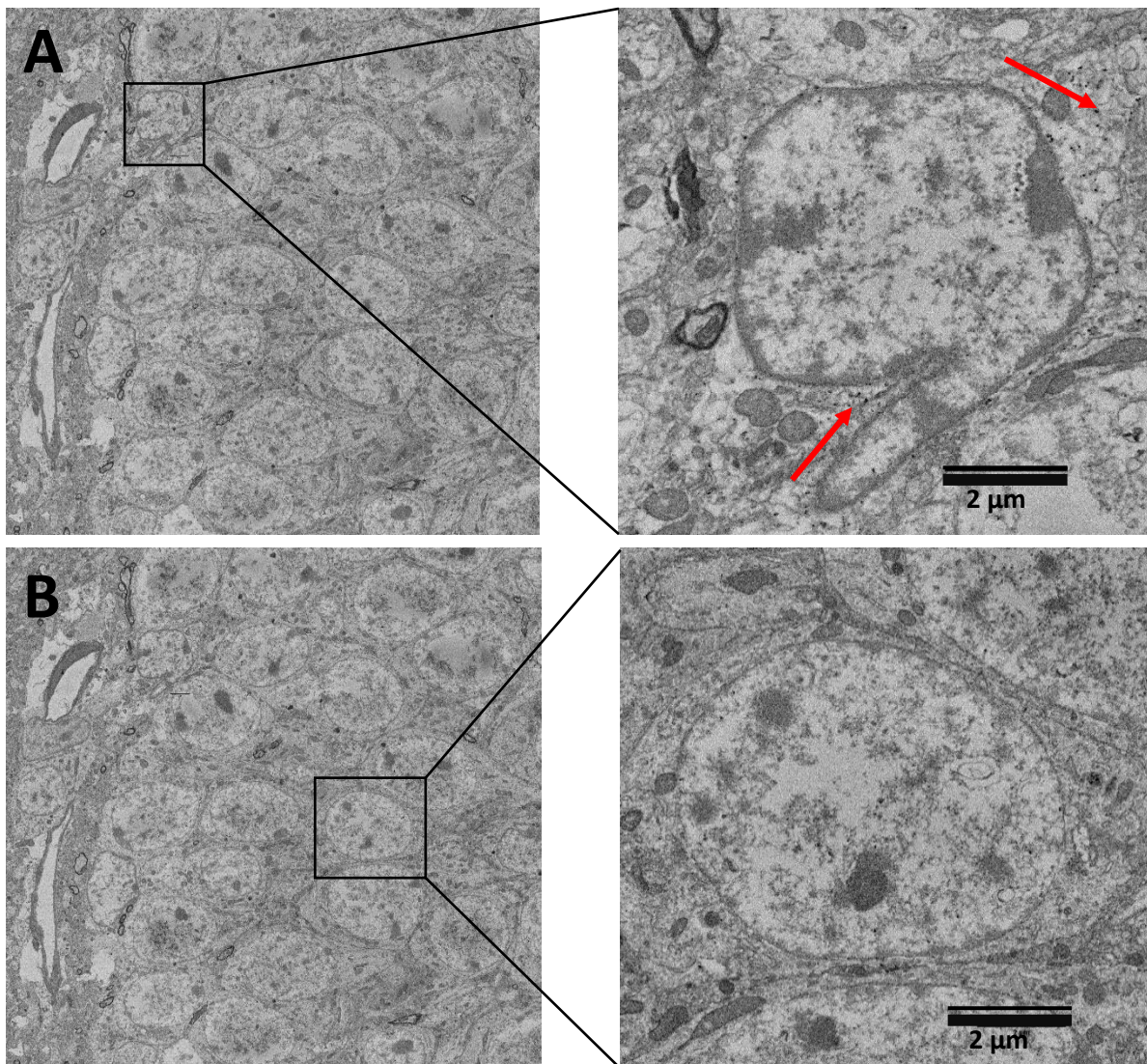
	Typ 1	Typ 2a	Typ 2b	Typ 3	Typ 4
Typ 1	[4	4	0	0	2]
Typ 2a	[4	4	3	0	0]
Typ 2b	[0	1	3	1	1]
Typ 3	[1	1	4	1	2]
Typ 4	[0	0	1	0	9]



Ryc. 18. Macierze losowej pomyłki dla automatycznego klasyfikatora: dla pojedynczego drzewka decyzyjnego (A), z 10 estymatorami (B), uczona na 70% danych i przetestowana na 30% (C) (przygotowane przez zespół dr. P. Majki, IBD im. M. Nenckiego PAN).

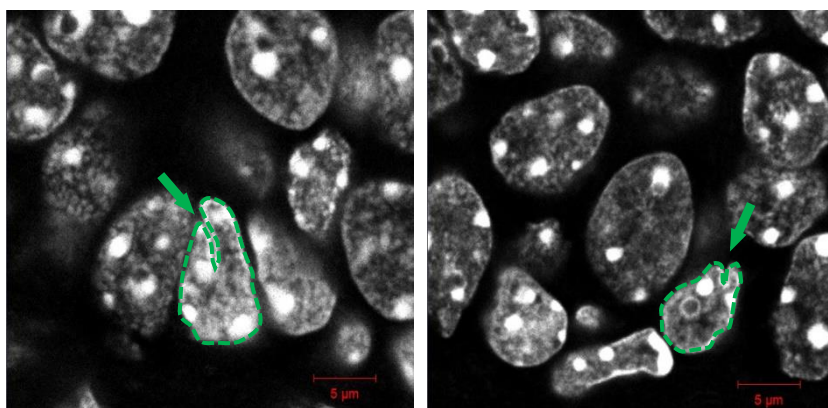
4.7. Ultrastruktura jądra NSC

Wykonano trójwymiarową rekonstrukcję jądra komórki nestyna-GFP. Komórki zostały wyznakowane przeciwciałem koloidowanym ze złotem. Na obrazie z mikroskopu elektronowego widać czarne kropki świadczące o obecności przeciwciała w komórce (Ryc. 19A, czerwone strzałki). Komórki nestyna+ z pofałdowaniami jądra i jego znacznie mniejszą objętością należą prawd. do typu 1, typu 2a lub typu 2b. Zbadano cytoplazmę pozostałych komórek tego samego fragmentu tkanki i nie potwierdzono obecności czarnych kropek, świadczących o pozytywnym sygnale nestyna-GFP (Ryc. 19B).



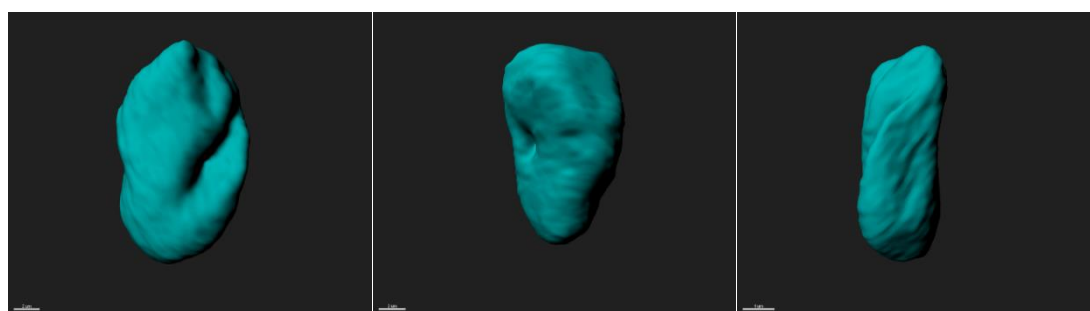
Ryc. 19. Jądra komórki w zakręcie zębatym hipokampa; **A**, nestyna-GFP+ (czarne kropki oznaczone czerwonymi strzałkami); **B**, nie stwierdzono czarnych kropek w cytoplazmie.

Na wybranym przekroju jądra widać wpuklenie NE (Ryc. 19A). Podobne wpuklenia stwierdzono również na obrazach konfokalnych w komórkach typu 1. (Ryc. 20)



Ryc. 20. Jądra komórek typu 1 z widocznymi wpukleniami NE (zaznaczone zieloną strzałką).

Wykonano trójwymiarową rekonstrukcję jądra komórki na podstawie obrazów z mikroskopu elektronowego za pomocą programu Imaris, przedstawiono trzy następujące po sobie perspektywy jądra będącego w obrocie (Ryc. 21).



Ryc. 21. Jądro komórki nestyna-GFP+ po segmentacji w programie Imaris; kalibracja – 1 μm .

Można zauważyć, że jądro tej komórki ma jeden wymiar najmniejszy, co może potwierdzać wcześniejszą obserwację o spłaszczeniu jąder. Wpuklenie otoczki jądrowej, które zostało pokazane na obrazie konfokalnym jest widoczne w postaci wpuklenia NE przebiegającej przez połowę długości jądra. Nie stwierdzono innych charakterystycznych elementów kształtu.

4.8. Weryfikacja programu VisNow w modelu nowotworowym

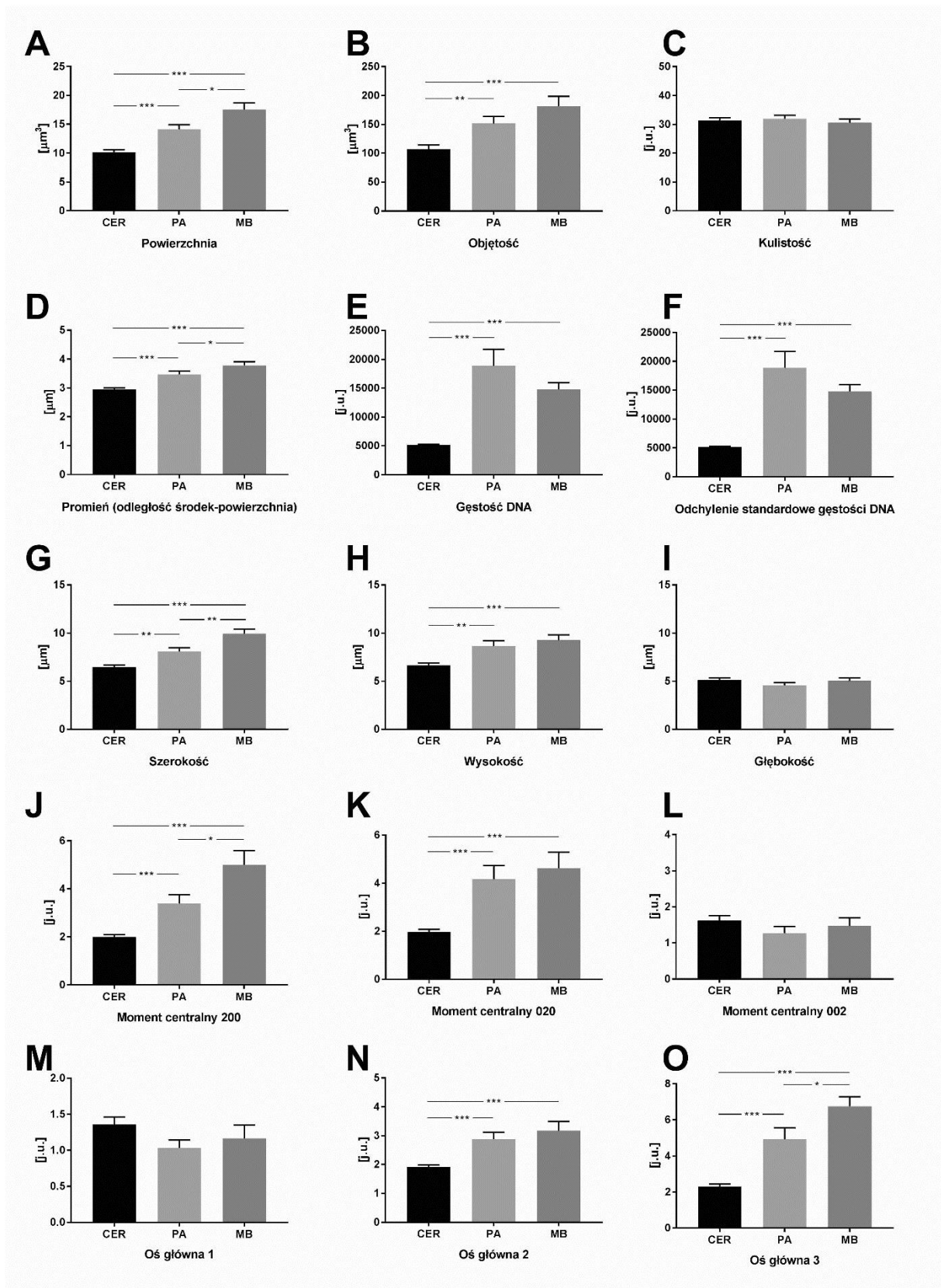
Wykonano badanie kształtu jąder komórek nowotworowych. Do analizy wybrano dwa różne typy nowotworów (pilocytic astrocytoma i medulloblastoma) pobrane od człowieka oraz tkankę osoby zdrowej (fragment mózdzku) jako grupę kontrolną. Doświadczenie to służyło przede wszystkim weryfikacji możliwości zastosowania opracowanej metody badania kształtu jąder w innych modelach badawczych. Do analizy wybrano kilka podstawowych zmiennych opisujących kształt jądra komórkowego. Wyniki przedstawiono na Ryc. 22.

Ryc. 22. Porównanie budowy jąder komórek mózdzku (ang. cerebellum, **CER**) i wybranych komórek nowotworowych mózdzku (pilocytic astrocytoma, **PA** i medulloblastoma, **MB**) na podstawie analizy wybranych zmiennych (por. Tab. 1), tzn. powierzchni (**A**), objętości (**B**), kulistości (**C**), promienia średniego (**D**), gęstości DNA (**E**), odchylenia standardowego gęstości DNA (**F**), szerokości (**G**), wysokości (**H**), głębokości (**I**), momentu centralnego 200 (**J**), momentu centralnego 020 (**K**), momentu centralnego 002 (**L**), osi głównej 1. (**M**), osi głównej 2. (**N**) oraz osi głównej 3. (**O**).

W przypadku większości ww. zmiennych możliwe okazało się przeprowadzenie analiza parametryczna, a obserwowane różnice pomiędzy grupami (Duncan) poparte zostały stwierdzeniem występowania efektu głównego grupy w jednoczynnikowej analizie wariancji (ANOVA), w przypadku: powierzchni (**A**), $F(2, 27) = 27,97$, $p < 0,0001$; objętości (**B**), $F(2, 27) = 12,15$, $p = 0,0002$; promienia średniego (**D**), $F(2, 27) = 18,79$, $p < 0,0001$; szerokości (**G**), $F(2, 27) = 22,12$, $p < 0,0001$; wysokości (**H**), $F(2, 27) = 8,28$, $p = 0,0016$; momentu centralnego 200 (**J**), $F(2, 27) = 22,44$, $p < 0,0001$; momentu centralnego 020 (**K**), $F(2, 27) = 19,39$, $p < 0,0001$; osi głównej 2. (**M**), $F(2, 27) = 12,94$, $p = 0,0001$ oraz osi głównej 3. (**N**), $F(2, 27) = 43,28$, $p < 0,0001$.

Z kolei w przypadku dwóch zmiennych posłużono się analizą nieparametryczną, a obserwowane różnice pomiędzy grupami (Dunn z procedurą Benjaminiego-Hochberga) zostały oparte na wyniku testu Kruskala-Wallisa, tzn. w przypadku: gęstości DNA (**E**), $p = 0,0001$ i odchylenia standardowego gęstości DNA (**F**), $p = 0,0001$.

Różnice pomiędzy grupami (Duncan, Dunn) znamienne statystycznie: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.



5. DYSKUSJA

5.1. Podsumowanie i wstępne porównanie uzyskanych wyników z wiedzą literaturową

W niniejszej pracy zbadano kształt jąder poszczególnych typów komórek neurogenezy hipokampalnej w DG oraz wybranych podtypów NSC wyróżnianych pod względem stanu aktywności i morfologii wykorzystując program komputerowy do pomiaru szeregu zmiennych kształtu. W tabeli poniżej przedstawiono najbardziej charakterystyczne elementy kształtu poszczególnych typów zbadanych komórek.

Tab. 3. Podsumowanie obserwowanych różnic w kształcie jąder komórkowych poszczególnych typów komórek neurogenezy hipokampalnej wraz z odniesieniami literaturowymi.

typ komórki	wynik, obserwowane cechy jąder	odniesienia literaturowe
typ 1	złożoność kształtu (pokazana m.in. dzięki czynnikom różnicowym kształtu), mała objętość i kulistość, kształt wydłużony, pionowy.	obecność ELCS w trzech komórkach, Cerbian-Silla i wsp. 2017, brak informacji o objętości jądra, kulistości itd.
typ 2a	złożoność kształtu pokazana m.in. dzięki czynnikom różnicowym kształtu, mała objętość i kulistość; płaskie (najmniejsza wysokość) i szerokie (wysoka wartość głębokości), wysoka wartość gęstości DNA	Kempermann i wsp. 2004 - „chromatyna w jądrze wydaje się bardziej skondensowana”, płaski kształt może wynikać z podziału asymetrycznego (Tsunekawa i wsp. 2012, Tsunekawa i Osumi 2012).
typ 2b	mała objętość i kulistość; niewielkie różnice w porównaniu do komórek typu 2a	brak danych w literaturze
typ 3	objętość większa niż u 2a; kulistość większa niż w komórkach typu 1 i 2a	brak danych w literaturze
typ 4	największa powierzchnia, objętość, promień średni i kulistość; najmniejsza gęstość DNA i złożoność kształtu, kształt „owalny”	brak danych w literaturze
Typ 1, alfa i beta	komórki alfa i typ beta – brak różnic pod względem badanych cech kształtu jądra	brak danych w literaturze na temat różnic w kształcie jądra, jest praca na temat kształtu komórek alfa i beta (Gebara i wsp. 2016).
typ 1 GFAP+	najmniejsza szerokość	brak danych w literaturze
typ 1 Nes/Ki67 +	większą wysokość niż u typu 1 Nes i najmniejsza gęstość DNA	brak danych w literaturze

Największe różnice pomiędzy badanymi cechami kształtu stwierdzono w obrębie grupy pięciu typów komórek odpowiadających etapom różnicowania w neurogenezie w DG hipokampa. Jak dotąd nie opisano w sposób systematyczny i ilościowy odmiennego kształtu jąder pięciu typów komórek neurogenezy hipokampalnej, uwzględniając także wybrane cechy charakterystyczne komórek typu 1 takich jak stan aktywności/wyciszenia i różnice w

morfologii komórek – komórki typu α i komórki typu β . Zatem uzyskana analiza może stanowić cenną bazę danych do badań nad czynnikami, które wpływają na morfologię jądra i roli jaką odgrywa w procesie neurogenezy. Biorąc pod uwagę fakt, że kształt NE ma wpływ na regulację ekspresji genów, morfologia jądra NSC i ich progenitorów może mieć ogromne znaczenie w stanach chorobowych, które mogą być powiązane z procesem neurogenezy takich jak choroby neurodegeneracyjne czy depresja.

W wielu pracach pokazywano jednak jądra ww. komórek na zdjęciach z mikroskopu konfokalnego i elektronowego, na których widoczne są charakterystyczne cechy kształtu wymienione w Tab. 1. Na przykład w publikacji Bedrosian i wsp. (2021) widoczny jest nieregularny, niekulisty kształt jąder komórek typu 1, 2a i 2b. Z kolei w pracy Encinasa i Enikolopova (2008) można zauważyć komórkę typu 1 i 2a – jądro komórki typu 1 ma wyraźnie wydłużony, „pionowy” kształt, a jądro komórki typu 2a ma kształt spłaszczony. Zespół prof. Kempermana (2004) wspomina o bardziej skondensowanej chromatynie w komórkach typu 2a w porównaniu do pozostałych typów komórek neurogenezy hipokampalnej w DG. Ponadto Cebrian-Silla i wsp. (2017) pokazuje nieregularny kształt jądra komórek typu 1 i występowanie struktur ELCS. Poniżej w sposób bardziej szczegółowy omówiono niektóre z uzyskanych wyników.

5.2. Typ 1 jako „wyjątkowo odróżniający się”; komórki typu 2b vs 3

Jądra komórek typu 1 cechują się złożonością kształtu, małą objętością i kulistością oraz mają kształt wydłużony pionowo. W niniejszej pracy nieregularność kształtu oraz pojawiające się charakterystyczne elementy kształtu zostały potwierdzone pomiarem czynników różnicowych kształtu. W pracach kilku autorów, na zdjęciach mikroskopowych można zauważyć nieregularny, niekulisty kształt jąder komórek typu 1, natomiast autorzy o tym nie wspominają. Jądra tych komórek mają też wyraźnie skondensowaną chromatynę oraz mniejszą objętość w porównaniu do neuronów ziarnistych (Bedrosian i wsp. 2021, Encinas i Enikolopov 2008). W jednej z prac opisano występowanie charakterystycznych elementów chromatyny – ELCS – w komórkach typu 1 za pomocą obrazowania w mikroskopie elektronowym, w strefie przykomorowej komory bocznej, a także na trzech przykładach komórek typu 1 w DG (Cebrian-Silla i wsp. 2017). W niniejszej pracy wyniki z mikroskopu elektronowego nie potwierdziły występowania ELCS w jądrach komórek NSC/NeuPC – prawdopodobnie ze względu na zbyt małą liczbę zbadanych preparatów. Natomiast widoczne były wpuklenia NE charakterystyczne dla jąder NeuPC, a zwłaszcza NSC. Jednakże nie można jednoznacznie stwierdzić, czy dana komórka jest komórką typu 1, typu 2a, czy 2b, np. na uzyskanym obrazie

(Ryc. 19A) nie jest widoczna wypustka charakterystyczna dla komórek typu 1, co nie wyklucza tego, że była ona w tej komórce obecna.

Co ciekawe, jądra komórek typu 1 okazały się „wyższe” od komórek typu 2a, które w sposób bezpośredni są komórkami potomnymi komórek typu 1. Morfologia jądra bardzo często jest powiązana z morfologią samej komórki, jeśli komórka jest wydłużona, jądro komórkowe także, co może tłumaczyć obecność wydłużonego („pionowego”) jądra komórek typu 1 (Weiss i Garber 1952, Khatau i wsp. 2009). Komórki typu 2a wyróżniają się z kolei tym, że ich wymiar szerokości jest największy a wymiar wysokości – najmniejszy. Różnice te są prawdopodobnie konsekwencją niesymetrycznego podziału jądra NSC (komórki typu 1). Pokazano, że funkcją tego podziału jest utrzymanie potencjału proliferacyjnego NSC/NeuPC poprzez niesymetryczne przekazanie białka cykliny D2 komórkom potomnym. Komórka-córka, której zostaje przekazana cyklina D2 utrzymuje zdolność do samo-odnawiania, podczas gdy druga komórka wchodzi na szlak różnicowania (Tsunekawa i wsp. 2014).

Nieregularny kształt jąder NSC/NeuPC może być powiązany ze zmniejszeniem się objętości jądra komórkowego. Wykazano bowiem, że w hodowli komórkowej mysich embrionalnych fibroblastów, po uwolnieniu komórek od podłoża płytki hodowlanej, jądro komórkowe zmniejszyło swoją objętość o 50%, co było skorelowane ze zmniejszeniem objętości komórki również o 50%. Zmianie w objętości jądra towarzyszyło pofałdowanie NE i przybranie nieregularnego kształtu (Kim i wsp. 2016). Na obrazach z mikroskopu konfokalnego NSC niniejszej pracy widoczne są wpuklenia NE, a kształt jądra jest pofałdowany.

Nie stwierdzono różnic w zmiennych określających kształt jądra pomiędzy komórkami typu 2b i 3. Należy jednakże zwrócić uwagę na to, że podział komórek na poszczególne typy jest umowny, dlatego że proces neurogenezy jest dynamiczny i ciągły (Kempermann i wsp. 2004), zatem ustalenie granicy pomiędzy zakończeniem ekspresji a pojawieniem się kolejnego markera jest niejednoznaczne. Brak różnic pomiędzy komórkami typu 2b a 3 pod względem kształtu jądra, może wskazywać na to, że komórki te są do siebie na tyle podobne, że w zasadzie tworzą jedną acz heterogenną i zróżnicowaną grupę komórek.

5.3. Neurony / typ 4 – najbardziej kuliste, z odmienną organizacją chromatyny

Neurony ziarniste, których jądra cechują się największą kulistością w porównaniu do pozostałych typów komórek, mają przy tym najmniejszą gęstość DNA, co może być rezultatem tego, że DNA zajmuje większą przestrzeń jądrową – w porównaniu do jąder o mniejszej objętości w przypadku komórek typu 1, 2a, 2b i 3. Obserwacja ta sugeruje, że chromatyna w NSC i NeuPC jest inaczej przestrzennie zorganizowana, co może przekładać się na

funkcjonowanie komórki. Wiadomo, że występują różnice w ekspresji genów pomiędzy NSC/NeuPC a neuronami (Toda i wsp. 2017, Urban i wsp. 2019). W trakcie różnicowania neuronalnego dochodzi do generalnych zmian w ekspresji genów, czemu towarzyszy reorganizacja trójwymiarowej struktury chromatyny i struktury jądra komórkowego (np. Solovei i wsp. 2013).

5.4. Brak różnic pomiędzy komórkami α i β

Stwierdzono także brak różnic pod względem badanych cech kształtu jąder pomiędzy komórkami typu 1 α i typu 1 β . Są to komórki typu 1 rozróżniane ze względu na cechy morfologii komórkowej, jednakże, jak pokazują uzyskane wyniki, obserwowane różnice w budowie zewnętrznej komórek nie są powiązane z występowaniem różnic w kształcie ich jąder. Różnice w morfologii tych komórek dotyczą głównie długości i rozgałęzienia charakterystycznej dla tych komórek wypustki (komórki β mają wypustkę niewystającą poza warstwę ziarnistą, komórki α – wystającą), natomiast perykarion tych komórek jest do siebie zbliżony pod względem morfologii (Gebara i wsp., 2016).

Również pod względem badanej w niniejszej pracy gęstości jądrowego DNA, odzwierciedlającej przestrzenną organizację chromatyny, komórki α i β nie wykazały istotnych różnic. Jest to ciekawe, ponieważ komórki te nie tylko wykazują różnice pod względem morfologii komórki, ale również wykazano, że różnią się aktywnością – komórki β pozostają nieaktywne w przeciwieństwie do komórek α (Gebara i wsp. 2016). Różnice występują także na poziomie markerów, w komórkach typu α potwierdzono występowanie markerów komórek macierzystych np. Sox2, Sox1, Nestyna, GFAP i Prominina1, w komórkach β oprócz tych obserwowano także markery astrocytarne, np. GCL, S100 β i GLT1 (Gebara i wsp. 2016). W niniejszej pracy nie zweryfikowano obecności tych markerów, komórki były odróżniane na podstawie obserwacji morfologii komórek na obrazach konfokalnych.

5.5. Niewiele różnic pomiędzy komórkami typu 1 o różnej aktywności

W obrębie grupy komórek typu 1 rozróżnianych pod względem stanu aktywności stwierdzono niewielkie różnice pod względem badanych cech kształtu. Zwraca jednak uwagę wynik dotyczący odchylenia standardowego wartości sygnału jądrowego. Wynik ten odzwierciedla różnice w natężeniu sygnału jądrowego w obrębie grupy, czyli pojawiające się obszary skondensowanej chromatyny i obszary, w których chromatyna nie występuje lub jest mniej skondensowana. Najbardziej równomiernie rozłożony sygnał jądrowy pokazany został w komórkach aktywnych (nestyna-GFP+/Ki-67+), zaś w komórkach wyciszonych (GFAP+) i na

I etapie przejściowym (GFAP+/nestyna-GFP+) sygnał jest mniej równomiernie rozłożony, wskazując tym samym na występowanie skupisk heterochromatyny w komórkach wyciszonych i na I etapie przejściowym. Ta obserwacja znajduje swoje potwierdzenie we wcześniejszych badaniach, w których wykazano, że utrzymanie stanu wyciszenia komórki jest powiązane z regulacją na poziomie ekspresji genów, którą odzwierciedlają pojawiające się w jądrze komórkowym regiony heterochromatyny odpowiadające wyciszonym genom (Capelson i Corces 2004, Capelson i wsp. 2010)

Analiza ekspresji genów oraz sekwencjonowanie RNA na poziomie pojedynczej komórki (ang. single-cell RNA sequencing) wykazała wiele różnic na poziomie transkryptomu pomiędzy NSC wyciszonymi i aktywnymi. Transkryptom aktywnych NSC jest wzbogacony w geny odpowiadające transkrypcji, translacji i naprawie DNA, podczas gdy wyciszone NSC są wzbogacone w transkrypty odpowiadające za przekazywanie sygnałów komórkowych we wnętrzu komórki oraz odbieranie i odpowiadanie na sygnały z macierzy komórkowej a także adhezję komórek (Basak i wsp. 2018, Codega i wsp. 2014, Dulken i wsp. 2017, Martynoga i wsp. 2013). Należy także zwrócić uwagę na komórkę aktywną (nestyna-GFP+/Ki-67+), której jądro miało największą wysokość (Ryc. 11H i 12H), co może odzwierciedlać przygotowanie komórki do mającego nastąpić podziału niesymetrycznego i powstania komórki typu 2a.

5.6. Pytanie o funkcję/funkcje nietypowego kształtu jąder komórkowych

Nadal pozostaje jednak pytanie o funkcje odmiennego kształtu jądra NSC i NeuPC. Jedną z przypuszczalnych odpowiedzi w przypadku jąder NeuPC może być umożliwienie im migracji. Wykazano, że NeuPC migrują w warstwie ziarnistej DG (Sun i wsp. 2015, Bonaguidi i wsp. 2011). Migracja komórek może wpływać na zmianę kształtu jądra. Jednym z przykładów komórki o odmiennym kształcie jądra, która migruje, jest plemnik, którego cechy kształtu jądra i związane z nim funkcje zostały szczegółowo opisane we wstępie. Rolę kształtu jądra w migracji komórek pokazano także u roślin (Goto i wsp. 2021). Kolejnym dobrze zbadanym przykładem migrującej komórki o odmiennym kształcie jądra jest neutrofil (Hoffmann i wsp. 2007). Warto podkreślić, że charakterystyczną strukturę chromatyny ELCS w jądrach neutrofilii i komórek nowotworowych (czyli komórek migrujących), opisano również w jądrach komórek typu 1 neurogenezy hipokampalnej (Cebrian-Silla i wsp. 2017, Hoffmann i wsp. 2007). Komórki typu 1 nie migrują w przeciwieństwie do NeuPC, aczkolwiek zarówno w przypadku NSC, neutrofilii i niektórych migrujących komórek nowotworowych, ulegają one siłom nacisku w ciasnych przestrzeniach tkankowych, podobnie jak w przypadku komórek typu 1 (komórki

B) w SVZ, u których potwierdzono występowanie ELCS, a ich obecność powiązano dodatkowo ze stanem wyciszenia

Jądra komórek migrujących w ciasnej przestrzeni tkankowej, a taką jest także warstwa ziarnista DG, ulegają deformacjom kształtu (Denais i wsp. 2016, McGregor i wsp. 2016). Deformacja kształtu jądra jest bardzo ważna w tym przypadku, ponieważ zakres deformacji jądra wpływa na ograniczenie migracji komórek w macierzy zewnątrzkomórkowej (Petrie i wsp. 2014). Środowisko DG jest bardzo gęsto „upakowane”, a zatem przypuszczalnie komórki, które znajdują się w tej przestrzeni poddawane są oddziaływaniu sił nacisku, zwłaszcza podczas migracji. Deformacje kształtu jądra komórek, które migrują mogą prowadzić do zmian w przestrzennej organizacji chromatyny, a w konsekwencji do zmian w ekspresji genów (Gupta i wsp. 2012, Thomas i wsp. 2002, Vergani i wsp. 2004). Jednakże nie jest do końca jasne, czy zmiany w ekspresji genów przyczyniają się do deformacji kształtu jądra komórek, czy też inne czynniki jak np. siły mechaniczne wpływają na zmianę kształtu i tym samym przyczyniają się do zmian w ekspresji genów. Odmienny kształt jądra NSC/NeuPC może być powiązany ze specyficznym ułożeniem białek NE względem chromatyny lub czynników transkrypcyjnych. Jak już wspomniano, wykazano bowiem, że oddziaływanie nukleoporyny Nup153 z Sox2 w NeuPC jest konieczne do kontrolowania prawidłowego przebiegu różnicowania do neuronów (Toda i wsp. 2017).

5.7. Zastosowana metoda

Wyniki uzyskane dzięki zastosowanej metodzie pozwalają na dokładną charakterystykę jąder komórek neurogenezy hipokampalnej pod względem kształtu. Większość opisów kształtów jąder i ich klasyfikacji, które można odnaleźć w literaturze (np. Cebrian-Silla i wsp. 2017, Tsunekawa i wsp. 2014, Toda i wsp. 2017) została przygotowana na podstawie dwuwymiarowego obrazowania i analizy, podczas gdy jądra komórkowe są strukturami, a zatem przy badaniu morfologii jądra na podstawie jednej wybranej płaszczyzny traci się informację na temat morfologii całego jądra komórkowego. Zastosowana metoda pozwoliła odkryć ważną obserwację. Okazało się, że wszystkie jądra w badanych komórkach w jednym z badanych wymiarów są spłaszczone. Pojawia się pytanie, jaki wpływ ma spłaszczenie mechaniczne na tkankę, a w niej badane struktury, zwłaszcza w odniesieniu do badanego kształtu jąder. Prawdopodobnie komórki ulegają spłaszczeniu podczas przygotowania preparatu do obrazowania pod mikroskopem, w momencie, gdy na szkiełko podstawowe nakładane jest szkiełko nakrywkowe, powodując nacisk. Jest to na pewno temat wart uwagi, nie tylko w przypadku badania jąder, ale jakichkolwiek innych struktur znajdujących się w

przestrzeni tkankowej. Pozostaje również pytanie, jak zachowują się jądra na preparatach z hodowli tkankowych, czy tam również dochodzi do podobnego zjawiska spłaszczenia.

Niewątpliwie elementem opracowanej metody, który warto dopracować, jest sposób obrysowywania jąder, który w niniejszym projekcie był wykonywany ręcznie. Nie podjęto na razie prac w celu wprowadzenia automatycznego obrysowywania jąder w programie VisNow. Natomiast w niniejszej pracy podjęto próbę opracowania algorytmu uczenia się w programie ITK-SNAP, który również jest wykorzystywany do oceny kształtu badanych struktur biologicznych. Celem było umożliwienie automatycznego obrysowania całej przestrzeni jądra na obrazie z mikroskopu oraz identyfikację typu komórki na podstawie cech kształtu. Jednakże wynik automatycznego klasyfikowania typów komórek w programie ITK-SNAP pokazuje że, prawdopodobieństwo właściwego przyporządkowania typu komórki na podstawie cech kształtu wyniósł jedynie 46%. Należy jednak zwrócić uwagę na to, że w przypadku automatycznej klasyfikacji – program ITK-SNAP obliczał i wykorzystywał inne cechy kształtu niż program VisNow. Pozostaje zatem pytanie, czy wykorzystując inne parametry kształtu obliczane w programie VisNow możliwe będzie uzyskanie lepszego wyniku prawdopodobieństwa przyporządkowania jądra do danego typu komórki na podstawie zbadanych cech kształtu. Ponadto program ITK-SNAP uczył się na zbiorze 150 jąder, zatem warto przeprowadzić automatyczną klasyfikację na większym zbiorze danych, aby zweryfikować uzyskany wynik.

Należy zaznaczyć również, że badane cechy kształtu jądra, w programie VisNow, przedstawiają pomiar wartości voxeli obrazu oparty na wybranych algorytmach matematycznych. Co oznacza, że opisane cechy kształtu nie są pomiarem rzeczywistym. Dla przykładu, pole powierzchni jąder to jest suma voxeli określająca badane jądro, wyrażana w postaci objętości. Ponadto, niektóre z parametrów jak np. badane osie główne, wysokość, szerokość oraz głębokość pozwalają ocenić subtelne różnice kształtu, jak to czy jądro jest wydłużone lub spłaszczone. Natomiast nie umożliwia wykrycia charakterystycznych cech takich jak np. wpuklenia, które są widoczne na mikroskopie elektronowym. Parametrem, który najlepiej pozwala ocenić złożoność kształtu jąder jest wieloskalowy deskryptor kształtu. Natomiast wynik uzyskany przy zastosowaniu tego parametru pokazuje nam profil zmian, np. większe zmiany pomiędzy poszczególnymi rozmyciami gaussowskimi w komórkach typu 1 są większe niż w neuronach ziarnistych, aczkolwiek nadal nie posiadamy informacji o występujących wpukleniach lub wypukleniach otoczki jądrowej. W zastosowanej metodzie

brakuje sposobu na to, żeby ocenić występowanie takich właściwości kształtu, a także żeby być w stanie określić ich rozmiar.

Warto podkreślić, że opracowana metoda jest uniwersalna, a jej potencjał można zastosować do oceny cech kształtu jąder wielu innych komórek eukariotycznych, jak wykazano w tej pracy na przykładzie komórek nowotworowych. Dzięki opracowaniu metody oceny zmienności kształtu jąder, możliwe będzie rozróżnienie poszczególnych typów komórek na podstawie charakterystycznych cech kształtu w wielu procesach biologicznych, w ramach których występuje zmienność kształtu jądra, np. w procesie leukopoezy, lub też w stanach patologicznych, np. w dystrofii mięśniowej i w chorobach nowotworowych, w tym ostatnim przypadku może stanowić bardzo cenne narzędzie diagnostyczne i prognostyczne.

5.8. Znaczenie wyników i dalsze kierunki badań

Odmienne kształt i rozmiar jądra związane są ze starzeniem i niektórymi stanami chorobowymi, takimi jak nowotwory (Capell i Collins 2006, Pathak i wsp. 2021, Webster i wsp. 2010, Zink i wsp. 2004). W przypadku nowotworów obserwuje się m.in. płaty, wgłębienia i fałdy NE, a także znacznie powiększoną objętość jąder komórkowych (Chow i wsp. 2012). Pomimo ogromnego postępu w badaniach nad nowotworami na przestrzeni lat, nadal stosuje się tradycyjną metodę diagnostyczną polegającą na ocenie histopatologicznej próbki pobranej od pacjenta, a nieprawidłowy kształt jąder jest jednym z kluczowych kryteriów diagnostycznych. Program VisNow może zostać wykorzystany w diagnostyce nowotworów. Przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy, wstępne i bardzo nieprecyzyjne badanie dwóch rodzajów komórek nowotworowych pokazało, że proponowana metodyka pozwala na pokazanie różnic pomiędzy preparatem kontrolnym a nowotworowym, jak również umożliwia wskazanie różnic pomiędzy budową jąder różnych nowotworów (Ryc. 22).

Ponadto na podstawie wiedzy, którą posiadamy na temat czynników, które wpływają na kształt jądra i na temat jego biologicznego znaczenia, kryterium stwierdzające występowanie odmiennej morfologii jądra może być niewystarczające. Wiele wskazuje na znaczącą rolę NE oraz białek NE, które mogą wpływać na zmiany kształtu jądra i są powiązane z chorobami nowotworowymi (Chow i wsp. 2012). Dzisiaj istnieje bowiem wiele typów nowotworów, w których wykazano występowanie różnych zmian w NE, o różnych genetycznych podłożach i ich klinicznych cechach (rokowanie, przerzuty, sposób rozprzestrzeniania się, wrażliwość na stosowane terapie) (Fischer 2014). Historycznie nowotworom nadano nazwy odnoszące się do tkanek, z których powstały – klasyfikacja histogenetyczna. Jakkolwiek ta klasyfikacja

powoduje wykorzystanie ograniczonej liczby cech biologicznych określających dany typ nowotworu, dzisiaj wiemy, że w obrębie jednego typu nowotworu obserwuje się ogromną różnorodność, m.in. np. pod względem oceny nieprawidłowości występujących w otoczce jądrowej (Chow i wsp. 2012). Zatem konieczne wydaje się uwzględnienie morfologii całego jądra w kryterium diagnostycznym, co może zostać zbadane stosując program VisNow.

Pomimo dużego diagnostycznego i prognostycznego znaczenia nieprawidłowości w kształcie jądra (Giardina i wsp. 1996, Haroske i wsp. 1996), dokładny mechanizm stojący za deformacją jądra w komórkach nowotworowych nie jest nadal dobrze poznany, a także nie jest zbadane to, czy deformacje kształtu jądra wpływają na proces nowotworzenia czy odwrotnie. Zatem opracowana w niniejszej pracy metoda łącząca obrazowanie tkanek za pomocą mikroskopu konfokalnego i analizy kształtu jądra może być wykorzystana w badaniach, których celem jest dokładne poznanie mechanizmów stojących za deformacją jądra komórek nowotworowych.

Wiadomo także, że modyfikacje histonów przyczyniają się do zmian w trójwymiarowej organizacji chromatyny. Dla przykładu – nadekspresja genu białka HMG5 powoduje zmniejszenie zagęszczenia chromatyny, stabilności i sztywności jądra, a w konsekwencji prowadzi do jego pęcznienia (Furusawa i wsp. 2015). Nadekspresja HMG5 u myszy transgenicznym prowadzi do wad serca i przedwczesnej śmierci, co wskazuje na fizjologiczne znaczenie mechanizmu decydującego o kształcie jądra opartego na zmianach w chromatynie. Zmiany w ilości skondensowanej heterochromatyny i mniej skondensowanej euchromatyny są również powszechnie spotykane w nowotworach i innych chorobach (Morgan i Shilatifard 2015). Modyfikacje histonów, które znacznie zwiększają poziom euchromatyny powodują osłabienie sztywności, nieprawidłową morfologię i pęknięcia NE (Stephens i wsp. 2018). Natomiast zwiększenie ilości heterochromatyny może przywrócić prawidłowy kształt i sztywność NE. Utrzymanie prawidłowego kształtu jądra pokazano poprzez zwiększenie się zawartości heterochromatyny – zarówno w przypadku zmian związanych z modyfikacją histonów, ale także zmian związanych z laminami (Stephens i wsp. 2018, Stephens i wsp. 2019). Zatem modyfikacje histonów poprzez różne mechanizmy epigenetyczne mogą być czynnikami, które zarówno zaburzają prawidłowy kształt jądra, jak i go przywracają. Jest to wskazaniem do dalszych badań nad mechanizmami epigenetycznymi i trójwymiarową strukturą chromatyny w komórkach neurogenezy hipokampalnej, czego jak dotąd nie zbadano. Nie jest również znana rola lamin i innych białek NE w utrzymaniu prawidłowego kształtu jądra w komórkach neurogenezy hipokampalnej,

Badanie nietypowego kształtu jąder i nietypowych elementów kształtu jąder komórkowych jest dziedziną nową i niewiele jest metod i strategii metodycznych stosowanych do oceny ilościowej opartej na materiale mikroskopowym (Janssen i wsp. 2022). Niniejsza praca stanowi propozycję takiej strategii.

5.9. Podsumowanie

Uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań w wielu różnych obszarach jak np. neurogeneza i powiązane z nią choroby neurologiczne, jak i choroby nowotworowe – np. badanie mechanizmów odmiennej morfologii jąder komórek nowotworowych, opracowanie nowych metod diagnostycznych. Ponadto ta praca stanowi pierwszy i jedyny jak dotąd, zbiór informacji na temat cech kształtu jąder komórek w neurogenzie hipokampalnej i rzuca światło na kolejny aspekt tego procesu, jakim jest morfologia jądra, a także pozostawia pytanie, jaką rolę pełni odmienny kształt jądra neuralnych komórek macierzystych i progenitorowych w DG. Praca stanowi także propozycję metodycznej ścieżki postępowania w ocenie morfologii jąder komórkowych: zebrania materiału, odtworzenia struktury przestrzennej, analizy i automatycznej klasyfikacji/identyfikacji badanych komórek.

1. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

1. Komórki neurogenezy hipokampalnej różnią się poszczególnymi cechami kształtu jądra. Na podstawie tych różnic można przyporządkować jądro do danego typu komórki z prawdopodobieństwem na poziomie 46%.
2. Stwierdzono i udokumentowano występowanie wpukleń NE w komórkach NSC na obrazach konfokalnych oraz w komórce progenitorowej na obrazie z mikroskopu elektronowego.
3. Komórki w różnych stanach aktywności nie różnią się pod względem cech kształtu jądra, natomiast różnią się pod względem rozmieszczenia gęstości chromatyny w przestrzeni jądrowej. Komórki aktywne, mają najmniej równomiernie rozłożoną gęstość chromatyny, co może świadczyć o tym, że chromatyna w jądrach tych komórek występuje w formie skupisk skondensowanej chromatyny.
4. Komórki odróżniane ze względu na różnice w morfologii komórki są do siebie bardzo podobne pod względem badanych cech kształtu jądra. Różnice w morfologii komórki nie mają swojego odzwierciedlenia w różnicach morfologii jądra.

2. STRESZCZENIE

Jądro komórkowe odpowiada za wiele podstawowych funkcji komórki. Kształt i rozmiar jądra komórkowego wpływają m.in. na proliferację komórek (Versaevel 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). Odmienne 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.

3. ABSTRACT

The nucleus is responsible for many basic cellular functions. Nuclear shape is known to have a significant influence on cell proliferation (Versaevel et al. 2012), gene expression (Jain et al. 2013), and protein synthesis (Thomas et al. 2002). The nucleus typically has either an oval or round shape. The size and shape of the nucleus is altered in normal physiological aging and pathological situations like in cancer cells (Zink et al. 2004). Irregular nuclear shape can be observed also in healthy cells, for example in neutrophils (Rowat et al. 2013).

Some cells of the blood system exhibit an unusual nuclear shape. Apart from granulocytes (basophils, eosinophils and neutrophils), they also include macrophages (Yang i wsp. 2013). The atypical shape of the nucleus is necessary for their proper functioning. In neutrophils, the multi-lobed nucleus is used for migration into the infectious sites (Hoffmann et al. 2002). An altered nuclear shape also occurs in many types of cancer. Particular types of cancer are associated with characteristic changes in the nuclear architecture, which is a key diagnostic feature (Zink et al. 2004). According to one hypothesis, the altered nuclear shape in cancer cells enables it to migrate, leading to metastasis (Dahl et al. 2008, Bell i Lammerding 2016).

The nucleus is enclosed by the nuclear envelope, which is a highly regulated membrane barrier composed of inner and outer nuclear membrane. It contains of a large number of different proteins that have been implicated in chromatin organization and gene regulation. Under the inner nuclear membrane lies a meshwork of nuclear lamina proteins composed of intermediate filament lamins that provide mechanical support and anchor the nuclear pore complexes (Hetzer 2010). It is known for example, that abnormally shaped nucleus is associated with alterations in lamina proteins in cancer cells (Zink et al. 2004) and in mutated cells (Lammerding i wsp. 2005).

The process of differentiation includes changes not only in the phenotype, gene expression and reorganization of the intranuclear structure, but also in the flexibility and shape of the nucleus (Pajerowski et al. 2007). Cell differentiation occurs for example, in adult hippocampal neurogenesis, where five phenotypes of cells with different nuclear morphology are distinguished. Since the shape of the nucleus also depends on the cell morphology (Chen et al. 2015), adult neurogenesis is a suitable model to assess the variability in nuclear shape.

In the process of adult hippocampal neurogenesis in mammals, neural stem cells (NSC), which give rise to new granule neurons, are born. Adult hippocampal neurogenesis is a multistage process in which subpopulations of neurogenic lineage cells have been distinguished: NSC (type 1), neural progenitor cells (type 2a, 2b and type 3), and granular neurons (type 4). In addition, type 1 cells can be divided into two subpopulations, differing in their activity status (active and quiescent NSC, i.e. NSCaNSC and NSCqNSC), and cell morphology (type α and type β). Neural progenitor cells, migrating from the subgranular layer to the dentate gyrus (DG) of the hippocampus, undergo differentiation, which ensures tissue regeneration and possibly supports plasticity (Kempermann et al. 2015).

The unusual shape of the NSC nucleus was shown in several publications. Characteristic chromatin elements, i.e. envelope limited chromatin sheets, ELCS, were demonstrated in type-B-cell nuclei of the subventricular layer of the lateral ventricle, as well as in NSC during human embryonic development. It was shown that the presence of ELCS in type B cells is associated with their quiescent state. The occurrence of ELCS was described in type 1 cells of the dentate gyrus, however, these were observations concerning only three cells (Cebrian-Silla et al. 2017). So far, the atypical shape of the NSC nuclei in the dentate gyrus was described in detail, and the function of their different shape is unknown.

The shape of the nucleus in every cell type of adult hippocampal neurogenesis was examined. A transgenic mouse with the GFP gene under nestin promotor was used, and particular cell types were labelled using immunohistochemistry and classified according to morphological features: type 1 (nestin-GFP+, neural process), type 2a (nestin-GFP+, no neural process), type 2b (GFP+/DCX+), type 3 (DCX+), type 4 (NeuN+), aNSC (GFAP+), cell in I transition state (GFAP+/nestyna-GFP+), cell in II transition state (nestyna-GFP+), qNSC (nestyna-GFP+/Ki67+). Images of the entire cell nucleus were collected by confocal microscopy, and electron microscopy was used to examine the ultrastructure of the nestin-GFP+ cell nucleus and reconstructed in the Imaris program.

Using modified VisNow software, shape parameters were measured in every cell type. Analyzing the parameters, the nuclei of type 1 cells showed the lowest roundness and volume compared to other cell types. Significant differences were also shown when comparing the mean value of roundness and volume between type 2a and other types of cells. The feature that distinguished NSC from NeuPC is the height of the nucleus, which is significantly higher than the height of NeuPC. Type 4 cells have shown to have the highest nucleus, the biggest volume,

surface area and also sphericity. The distinguishing feature of type 2a cells is the flattened shape of the nucleus, resembling an erythrocyte. The described characteristic features of the shape were also confirmed using an automated cell type classifier, developed on the basis of ITK-SNAP software. Performed analysis allowed to achieve accuracy of 46%, which is a good result considering that the program was learning only on a set of 150 nuclei. The nuclear envelope invaginations were observed in the image from an electron microscope, and the three-dimensional reconstruction of the nucleus allowed to visualize the spatial arrangement of this feature. This analysis also confirmed the presence of an irregular nuclear shape in NSC/NeuPC. Nuclear shape analysis of cells in different states of activity showed that these cells do not differ in terms of nuclear shape features. Only differences in spatial organization of chromatin were observed. In active cells, chromatin is less evenly distributed in space, probably due to the presence of heterochromatin clusters. The nuclei of type α and type β cells show very similar features, no significant differences were observed in the measured shape parameters.

Obtained results provide a structural framework for elucidating molecular mechanisms that govern the altered shape and can be used for further research on the factors determining neurogenesis, which depend on the shape of the nucleus, such as the composition of nuclear lamina, chromatin organization or epigenetic mechanisms. The developed method allowed to perform a detailed three-dimensional analysis of the nuclear shape. Until now the altered nuclear shape of NSC has not been described, it has been observed in progenitor cells (type-2 cells) of adult hippocampal neurogenesis (Kempermann et al. 2004), and the presence of ELCS in three NSC has been demonstrated (Cebrian-Silla et al. 2017). Furthermore, the developed method can be used to analyze the nuclear shape of other eukaryotic cells, which can be a valuable diagnostic tool in cancer or other diseases related to nuclear shape changes.

4. INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1. Opisanie ilościowe odmiennego kształtu jądra w neuralnych i progenitorowych komórkach macierzystych neurogenezy hipokampalnej.
2. Przedstawienie bazy danych/wyników dotyczących morfologii jąder komórek neurogenezy hipokampalnej, które mogą być wykorzystane do badań nad funkcją kształtu jąder tych komórek w stanie fizjologicznym, a także w stanach chorobowych lub w starzeniu się.
3. Opracowanie metody analizy kształtu jąder, która stanowi cenne narzędzie diagnostyczne, prognostyczne i badawcze, np.:
 - zastosowanie w diagnostyce i rokowaniu nowotworów,
 - zastosowanie do celów badawczych w badaniu związku zmian kształtu jądra ze zmianami chorobowymi w dystrofii mięśniowej i chorobach neurodegeneracyjnych.
4. Zastosowanie mikroskopii konfokalnej zamiast mikroskopii elektronowej do rekonstrukcji kształtu jąder – jako alternatywa do badania ultrastruktury jąder komórkowych, która daje możliwość przebadania większej liczby komórek, a także zastosowania wielokrotnego znakowania immunohistochemicznego na jednym preparacie.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Ahn, J.H., M.G. Cho, S. Sohn, J.H. Lee (2019). „Inhibition of PP2A activity by H₂O₂ during mitosis disrupts nuclear envelope reassembly and alters nuclear shape.” *Exp Mol Med* **51**(6): 1-18.
2. Aitchison, J.D., G. Blobel, M.P. Rout (1995). „Nup120p: a yeast nucleoporin required for NPC distribution and mRNA transport.” *J Cell Biol* **131**(6 Pt 2): 1659-1675.
3. Alber, F., S. Dokudovskaya, L.M. Veenhoff, W. Zhang, J. Kipper, D. Devos, A. Suprpto, O. Karni-Schmidt, R. Williams, B.T. Chait, A. Sali, M.P. Rout (2007). „The molecular architecture of the nuclear pore complex.” *Nature* **450**(7170): 695-701.
4. Anderson, D.J., M.W. Hetzer (2007). „Nuclear envelope formation by chromatin-mediated reorganization of the endoplasmic reticulum.” *Nat Cell Biol* **9**(10): 1160-1166.
5. Anderson, D.J., M.W. Hetzer (2008). „Reshaping of the endoplasmic reticulum limits the rate for nuclear envelope formation.” *J Cell Biol* **182**(5): 911-924.
6. Antonin, W., S. Siniossoglou (2022). „Nuclear Shape-Shifters: Lipid and Protein Dynamics at the Nuclear Envelope.” *Cells* **11**: 4120.
7. Aoki, K., H. Hayashi, K. Furuya, M. Sato, T. Takagi, M. Osumi, A. Kimura, H. Niki (2011). „Breakage of the nuclear envelope by an extending mitotic nucleus occurs during anaphase in *Schizosaccharomyces japonicus*.” *Genes Cells* **16**(9): 911-926.
8. Artegiani, B., A. Lyubimova, M. Muraro, J.H. van Es, A. van Oudenaarden, H. Clevers (2017). „A Single-Cell RNA Sequencing Study Reveals Cellular and Molecular Dynamics of the Hippocampal Neurogenic Niche.” *Cell Rep* **21**(11): 3271-3284.
9. Ashton, R.S., A. Conway, C. Pangarkar, J. Bergen, K. I. Lim, P. Shah, M. Bissell, D. V. Schaffer (2012). „Astrocytes regulate adult hippocampal neurogenesis through ephrin-B signaling.” *Nat Neurosci* **15**(10): 1399-1406.
10. Audhya, A., A. Desai, K. Oegema (2007). „A role for Rab5 in structuring the endoplasmic reticulum.” *J Cell Biol* **178**(1): 43-56.
11. Basak, O., T.G. Krieger, M.J. Muraro, K. Wiebrands, D.E. Stange, J. Frias-Aldeguer, N.C. Rivron, M. van de Wetering, J.H. van Es, A. van Oudenaarden, B.D. Simons, H. Clevers (2018). „Troy+ brain stem cells cycle through quiescence and regulate their number by sensing niche occupancy.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**(4): E610-E619.
12. Baylin, S.B., P.A. Jones (2016) “Epigenetic Determinants of Cancer.” *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**(9): a019505.
13. Beckervordersandforth, R., A. Deshpande, I. Schaffner, H.B. Huttner, A. Lepier, D.C. Lie, M. Gotz (2014). „In vivo targeting of adult neural stem cells in the dentate gyrus by a split-cre approach.” *Stem Cell Reports* **2**(2): 153-162.

14. Bedrosian, T.A., J. Houtman, J.S. Eguiguren, S. Ghassemzadeh, N. Rund, N.M. Novaresi, L. Hu, S.L. Parylak, A.M. Denli, L. Randolph-Moore, T. Namba, F.H. Gage, T. Toda (2021). „Lamin B1 decline underlies age-related loss of adult hippocampal neurogenesis.” EMBO J **40**(3): e105819.
15. Bell, A.C., G. Felsenfeld (2000). „Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene.” Nature **405**(6785): 482-485.
16. Bell, E.S., J. Lammerding (2016). „Causes and consequences of nuclear envelope alterations in tumour progression.” Eur J Cell Biol **95**(11): 449-464.
17. Benjamini, Y., Y. Hochberg (1995). „Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple hypothesis testing.” J R Stat Soc B **57**:289-300.
18. Berg, D.A., Y. Su, D. Jimenez-Cyrus, A. Patel, N. Huang, D. Morizet, S. Lee, R. Shah, F.R. Ringeling, R. Jain, J.A. Epstein, Q.F. Wu, S. Canzar, G.L. Ming, H. Song, A.M. Bond (2019). „A Common Embryonic Origin of Stem Cells Drives Developmental and Adult Neurogenesis.” Cell **177**(3): 654-668 e615.
19. Bolzer, A., G. Kreth, I. Solovei, D. Koehler, K. Saracoglu, C. Fauth, S. Muller, R. Eils, C. Cremer, M.R. Speicher, T. Cremer (2005). „Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes.” PLoS Biol **3**(5): e157.
20. Bonaguidi, M.A., M.A. Wheeler, J.S. Shapiro, R.P. Stadel, G.J. Sun, G.L. Ming, H. Song (2011). „In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics.” Cell **145**(7): 1142-1155.
21. Boyle, S., S. Gilchrist, J.M. Bridger, N.L. Mahy, J.A. Ellis, W.A. Bickmore (2001). „The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells.” Hum Mol Genet **10**(3): 211-219.
22. Campbell, J.L., A. Lorenz, K.L. Witkin, T. Hays, J. Loidl, O. Cohen-Fix (2006). „Yeast nuclear envelope subdomains with distinct abilities to resist membrane expansion.” Mol Biol Cell **17**(4): 1768-1778.
23. Capell, B.C., F.S. Collins (2006). „Human laminopathies: nuclei gone genetically awry.” Nat Rev Genet **7**(12): 940-952.
24. Capelson, M., V.G. Corces (2004). „Boundary elements and nuclear organization.” Biol Cell **96**(8): 617-629.
25. Capelson, M., Y. Liang, R. Schulte, W. Mair, U. Wagner, M.W. Hetzer (2010). „Chromatin-bound nuclear pore components regulate gene expression in higher eukaryotes.” Cell **140**(3): 372-383.
26. Capilla-Gonzalez, V., A. Cebrian-Silla, H. Guerrero-Cazares, J.M. Garcia-Verdugo, A. Quinones-Hinojosa (2014a). „Age-related changes in astrocytic and ependymal cells of the subventricular zone.” Glia **62**(5): 790-803.

27. Capilla-Gonzalez, V., H. Guerrero-Cazares, J.M. Bonsu, O. Gonzalez-Perez, P. Achanta, J. Wong, J.M. Garcia-Verdugo, A. Quinones-Hinojosa (2014b). „The subventricular zone is able to respond to a demyelinating lesion after localized radiation.” *Stem Cells* **32**(1): 59-69.
28. Casolari, J.M., C.R. Brown, S. Komili, J. West, H. Hieronymus, P.A. Silver (2004). „Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization.” *Cell* **117**(4): 427-439.
29. Cebrian-Silla, A., C. Alfaro-Cervello, V. Herranz-Perez, N. Kaneko, D.H. Park, K. Sawamoto, A. Alvarez-Buylla, D.A. Lim, J.M. Garcia-Verdugo (2017). „Unique Organization of the Nuclear Envelope in the Post-natal Quiescent Neural Stem Cells.” *Stem Cell Reports* **9**(1): 203-216.
30. Chan, Y.K., M.H. Tsai, D.C. Huang, Z.H. Zheng, K. D. Hung (2010). „Leukocyte nucleus segmentation and nucleus lobe counting.” *BMC Bioinformatics* **11**: 558.
31. Chang, W., H.J. Worman, G.G. Gundersen (2015). „Accessorizing and anchoring the LINC complex for multifunctionality.” *J Cell Biol* **208**(1): 11-22.
32. Chen, B., C. Co, C.C. Ho (2015). „Cell shape dependent regulation of nuclear morphology.” *Biomaterials* **67**: 129-136.
33. Cheung, T.H., T.A. Rando (2013). „Molecular regulation of stem cell quiescence.” *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(6): 329-340.
34. Chow, K.H., R.E. Factor, K.S. Ullman (2012). „The nuclear envelope environment and its cancer connections.” *Nat Rev Cancer* **12**(3): 196-209.
35. Codega, P., V. Silva-Vargas, A. Paul, A.R. Maldonado-Soto, A.M. Deleo, E. Pastrana, F. Doetsch (2014). „Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche.” *Neuron* **82**(3): 545-559.
36. Crisp, M., Q. Liu, K. Roux, J.B. Rattner, C. Shanahan, B. Burke, P.D. Stahl, D. Hodzic (2006). „Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex.” *J Cell Biol* **172**(1): 41-53.
37. Dahl, K.N., A.J. Ribeiro, J. Lammerding (2008). „Nuclear shape, mechanics, and mechanotransduction.” *Circ Res* **102**(11): 1307-1318.
38. Danielson, N.B., P. Kaifosh, J.D. Zaremba, M. Lovett-Barron, J. Tsai, C.A. Denny, E.M. Balough, A.R. Goldberg, L.J. Drew, R. Hen, A. Losonczy, M.A. Kheirbek (2016). „Distinct Contribution of Adult-Born Hippocampal Granule Cells to Context Encoding.” *Neuron* **90**(1): 101-112.
39. Davies, H.G., J.V. Small (1968). „Structural units in chromatin and their orientation on membranes.” *Nature* **217**(5134): 1122-1125.
40. Dechat, T., K. Pflieger, K. Sengupta, T. Shimi, D.K. Shumaker, L. Solimando, R.D. Goldman (2008). „Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin.” *Genes Dev* **22**(7): 832-853.

41. Denais, C.M., R.M. Gilbert, P. Isermann, A.L. McGregor, M. te Lindert, B. Weigelin, P.M. Davidson, P. Friedl, K. Wolf, J. Lammerding (2016). „Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration.” Science **352**(6283):353-358.
42. Diamond, A.J. (1982). „Beyond technology. Or computers are not enough.” Canadian Library Journal **39**(4): 206-6209.
43. Dinno, A. (2015). „Nonparametric pairwise multiple comparisons in independent groups using Dunn’s test.” The Stata Journal **15**(1): 292-300.
44. Ditter, M., H. Stork, B. Schuster, F. Fujara (2011). „Combining one-dimensional stray-field micro-imaging with mechanical field-cycling NMR: a new spectrometer design.” J Magn Reson **209**(1): 47-52.
45. Dixon, J.R., S. Selvaraj, F. Yue, A. Kim, Y. Li, Y. Shen, M. Hu, J.S. Liu, B. Ren (2012). „Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions.” Nature **485**(7398): 376-380.
46. Deolal, P., K. Mishra (2021). „Regulation of diverse nuclear shapes: pathways working independently, together.” Communicative Integrative Biol **14**(1): 158-175.
47. Doetsch, F., I. Caille, D.A. Lim, J.M. Garcia-Verdugo, A. Alvarez-Buylla (1999). „Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain.” Cell **97**(6): 703-716.
48. Doetsch, F., J.M. Garcia-Verdugo, A. Alvarez-Buylla (1999). „Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain.” Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11619-11624.
49. Dulken, B.W., D.S. Leeman, S.C. Boutet, K. Hebestreit, A. Brunet (2017). „Single-cell transcriptomic analysis defines heterogeneity and transcriptional dynamics in the adult neural stem cell lineage.” Cell Rep **18**(3): 777-790.
50. Dunn, O.J. (1964). „Multiple comparisons using rank sums.” Technometrics, **6**:241-252.
51. Eckersley-Maslin, M.A., J.H. Bergmann, Z. Lazar, D.L. Spector (2013). „Lamin A/C is Expressed in Pluripotent Mouse Embryonic Stem Cells.” Nucleus **4**(1):53-60.
52. Encinas, J.M., G. Enikolopov (2008). „Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain.” Methods Cell Biol **85**: 243-272.
53. Encinas, J.M., T.V. Michurina, N. Peunova, J.H. Park, J. Tordo, D.A. Peterson, G. Fishell, A. Koulakov, G. Enikolopov (2011). „Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus.” Cell Stem Cell **8**(5): 566-579.
54. English, A.R., N. Zurek, G.K. Voeltz (2009). „Peripheral ER structure and function.” Curr Opin Cell Biol **21**(4): 596-602.
55. Fischer, A.H. (2014). „The diagnostic pathology of the nuclear envelope in human cancers.” Adv Exp Med Biol **773**: 49-75.
56. Fridkin, A., A. Penkner, V. Jantsch, Y. Gruenbaum (2009). „SUN-domain and KASH-domain proteins during development, meiosis and disease.” Cell Mol Life Sci **66**(9): 1518-1533.

57. Friederichs, J.M., S. Ghosh, C.J. Smoyer, S. McCroskey, B.D. Miller, K.J. Weaver, K.M. Delventhal, J. Unruh, B.D. Slaughter, S.L. Jaspersen (2011). „The SUN protein Mps3 is required for spindle pole body insertion into the nuclear membrane and nuclear envelope homeostasis.” PLoS Genet **7**(11): e1002365.
58. Furusawa, T., M. Rochman, L. Taher, E.K. Dimitriadis, K. Nagashima, S. Anderson, M. Bustin (2015). „Chromatin decompaction by the nucleosomal binding protein HMG5 impairs nuclear sturdiness.” Nat Commun **6**: 6138.
59. Gebara, E., M.A. Bonaguidi, R. Beckervordersandforth, S. Sultan, F. Udry, P.J. Gijs, D.C. Lie, G.L. Ming, H. Song, N. Toni (2016). „Heterogeneity of Radial Glia-Like Cells in the Adult Hippocampus.” Stem Cells **34**(4): 997-1010.
60. Geng J., Z. Kang, Q. Sun, M. Zhang, P. Wang, Y. Li, J. Li, B. Su, Q. Wei (2023). „Microtubule assists actomyosin to regulate cell nuclear mechanics and chromatin accessibility”. Research **6**: 0054.
61. Ghadially, F.N. (1997). „Case for the panel. Mitochondrial inclusions in prostate adenocarcinoma.” Ultrastruct Pathol **21**(5): 475-477.
62. Giardina, C., G. Renzulli, G. Serio, D.M. Caniglia, T. Lettini, C. Ferri, G. D'Eredita, R. Ricco, V.P. Delfino (1996). „Nuclear morphometry in node-negative breast carcinoma.” Anal Quant Cytol Histol **18**(5): 374-382.
63. Gisselsson, D., J. Bjork, M. Hoglund, F. Mertens, P. Dal Cin, M. Akerman, N. Mandahl (2001). „Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability.” Am J Pathol **158**(1): 199-206.
64. Golden, A., J. Liu, O. Cohen-Fix (2009). „Inactivation of the C. elegans lipin homolog leads to ER disorganization and to defects in the breakdown and reassembly of the nuclear envelope.” J Cell Sci **122**(Pt 12): 1970-1978.
65. Gorkin, D.U., D. Leung, B. Ren (2014). „The 3D genome in transcriptional regulation and pluripotency.” Cell Stem Cell **14**(6): 762-775.
66. Goto, C., I. Hara-Nishimura, K. Tamura (2021). „Regulation and Physiological Significance of the Nuclear Shape in Plants.” Front Plant Sci **12**:673905.
67. Guerrero-Cazares, H., O. Gonzalez-Perez, M. Soriano-Navarro, G. Zamora-Berridi, J.M. Garcia-Verdugo, A. Quinones-Hinojosa (2011). „Cytoarchitecture of the lateral ganglionic eminence and rostral extension of the lateral ventricle in the human fetal brain.” J Comp Neurol **519**(6): 1165-1180.
68. Guo, Y., Q. Xu, D. Canzio, J. Shou, J. Li, D.U. Gorkin, I. Jung, H. Wu, Y. Zhai, Y. Tang, Y. Lu, Y. Wu, Z. Jia, W. Li, M.Q. Zhang, B. Ren, A.R. Krainer, T. Maniatis, Q. Wu (2015). „CRISPR Inversion of CTCF Sites Alters Genome Topology and Enhancer/Promoter Function.” Cell **162**(4): 900-910.

69. Gupta, S., N. Marcel, A. Sarin, G.V. Shivashankar (2012). „Role of actin dependent nuclear deformation in regulating early gene expression.” PLoS One **7**(12): e53031.
70. Haroske, G., V. Dimmer, K. Friedrich, W. Meyer, B. Thieme, F. Theissig, K.D. Kunze (1996). „Nuclear image analysis of immunohistochemically stained cells in breast carcinomas.” Histochem Cell Biol **105**(6): 479-485.
71. Hetzer, M.W. (2010). „The nuclear envelope.” Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(3): a000539.
72. Hetzer, M.W., T.C. Walther, I.W. Mattaj (2005). „Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery.” Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 347-380.
73. Hoffmann, K., C.K. Dreger, A.L. Olins, D.E. Olins, L.D. Shultz, B. Lucke, H. Karl, R. Kaps, D. Muller, A. Vaya, J. Aznar, R.E. Ware, N. Sotelo Cruz, T.H. Lindner, H. Herrmann, A. Reis, K. Sperling (2002). „Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huet anomaly).” Nat Genet **31**(4): 410-414.
74. Hoffmann, K., K. Sperling, A.L. Olins, D. E. Olins (2007). „The granulocyte nucleus and lamin B receptor: avoiding the ovoid.” Chromosoma **116**(3): 227-235.
75. Hubner, B., M. Lomiento, F. Mammoli, D. Illner, Y. Markaki, S. Ferrari, M. Cremer, T. Cremer (2015). „Remodeling of nuclear landscapes during human myelopoietic cell differentiation maintains co-aligned active and inactive nuclear compartments.” Epigenetics Chromatin **8**: 47.
76. Huttmann, K., M. Sadgrove, A. Wallraff, S. Hinterkeuser, F. Kirchhoff, C. Steinhauser, W.P. Gray (2003). „Seizures preferentially stimulate proliferation of radial glia-like astrocytes in the adult dentate gyrus: functional and immunocytochemical analysis.” Eur J Neurosci **18**(10): 2769-2778.
77. Illner, D., R. Zinner, V. Handtke, J. Rouquette, H. Strickfaden, C. Lanctot, M. Conrad, A. Seiler, A. Imhof, T. Cremer, M. Cremer (2010). „Remodeling of nuclear architecture by the thiodioxopiperazine metabolite chaetocin.” Exp Cell Res **316**(10): 1662-1680.
78. Imayoshi, I., M. Sakamoto, T. Ohtsuka, K. Takao, T. Miyakawa, M. Yamaguchi, K. Mori, T. Ikeda, S. Itohara, R. Kageyama (2008). „Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain.” Nat Neurosci **11**(10):1153-1161.
79. Imayoshi, I., M. Sakamoto, T. Ohtsuka, R. Kageyama (2009). „Continuous neurogenesis in the adult brain.” Dev Growth Differ **51**(3): 379-386.
80. Jahed, Z., U.T. Vu, D. Fadavi, H. Ke, A. Rathish, S.C.J. Kim, W. Feng, M.R.K. Mofrad (2018). „A molecular model for LINC complex regulation: activation of SUN2 for KASH binding.” Mol Biol Cell **29**(16): 2012-2023.
81. Jaholkowski, P., A. Kiryk, P. Jedynek, N.M. Ben Abdallah, E. Knapska, A. Kowalczyk, A. Piechal, K. Blecharz-Klin, I. Figiel, V. Lioudyno, E. Widy-Tyszkiewicz, G.M. Wilczynski, H.P. Lipp, L. Kaczmarek, R.K. Filipkowski (2009). „New hippocampal neurons are not obligatory for memory formation; cyclin D2 knockout mice with no adult brain neurogenesis show learning.” Learn Mem **16**(7): 439-451.

82. Jain, N., K.V. Iyer, A. Kumar, G.V. Shivashankar (2013). „Cell geometric constraints induce modular gene-expression patterns via redistribution of HDAC3 regulated by actomyosin contractility.” Proc Natl Acad Sci U S A **110**(28): 11349-11354.
83. Janssen, A.F.J., S.Y. Breusegem, D. Larrieu (2022). „Current methods and pipelines for image-based quantitation of nuclear shape and nuclear envelope abnormalities.” Cells **11**: 347.
84. Jaspersen, S.L., A.E. Martin, G. Glazko, T.H. Giddings, Jr., G. Morgan, A. Mushegian, M. Winey (2006). „The Sad1-UNC-84 homology domain in Mps3 interacts with Mps2 to connect the spindle pole body with the nuclear envelope.” J Cell Biol **174**(5): 665-675.
85. Jessberger, S., R.E. Clark, N.J. Broadbent, G.D. Clemenson, Jr., A. Consiglio, D.C. Lie, L.R. Squire, F.H. Gage (2009). „Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats.” Learn Mem **16**(2): 147-154.
86. Joly, J.S., V. Tropepe (2018). „Neural stem cell heterogeneity.” Prog Neurobiol **170**: 1.
87. Kempermann, G. (2022). „What is hippocampal neurogenesis good for?” Front Neurosci **16**: 852680.
88. Kempermann, G., S. Jessberger, B. Steiner, G. Kronenberg (2004). „Milestones of neuronal development in the adult hippocampus.” Trends Neurosci **27**(8): 447-452.
89. Kempermann, G., H. Song, F.H. Gage (2015). „Neurogenesis in the Adult Hippocampus.” Cold Spring Harb Perspect Biol **7**(9): a018812.
90. Khatau, S.B., C.M. Hale, P.J. Stewart-Hutchinson, M.S. Patel, C.L. Stewart, P.C. Searson, D. Hodzic, D. Wirtz (2009). „A perinuclear actin cap regulates nuclear shape.” Proc Natl Acad Sci U S A **106**(45): 19017-19022.
91. Kim, D.H., B. Li, F. Si, J.M. Phillip, D. Wirtz, S.X. Sun (2016). „Volume regulation and shape bifurcation in the cell nucleus.” J Cell Sci **129**(2): 457.
92. Kriegstein, A., A. Alvarez-Buylla (2009). „The glial nature of embryonic and adult neural stem cells.” Annu Rev Neurosci **32**: 149-184.
93. Lai, Y.S., J.Y. Chen, H.J. Tsai, T.Y. Chen, W. C. Hung (2015). „The SUV39H1 inhibitor chaetocin induces differentiation and shows synergistic cytotoxicity with other epigenetic drugs in acute myeloid leukemia cells.” Blood Cancer J **5**: e313.
94. Lammerding, J., J. Hsiao, P.C. Schulze, S. Kozlov, C.L. Stewart, R.T. Lee (2005). „Abnormal nuclear shape and impaired mechanotransduction in emerin-deficient cells.” J Cell Biol **170**(5): 781-791.
95. Lee, J.S., C.M. Hale, P. Panorchan, S.B. Khatau, J.P. George, Y. Tseng, C.L. Stewart, D. Hodzic, D. Wirtz (2007). „Nuclear lamin A/C deficiency induces defects in cell mechanics, polarization, and migration.” Biophys J **93**(7): 2542-2552.
96. Liu, P., Z. Huang, N. Gu (2013). „Exposure to silver nanoparticles does not affect cognitive outcome or hippocampal neurogenesis in adult mice.” Ecotoxicol Environ Saf **87**: 124-130.

97. Llorens-Bobadilla, E., S. Zhao, A. Baser, G. Saiz-Castro, K. Zwadlo, A. Martin-Villalba (2015). „Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury.” Cell Stem Cell **17**(3): 329-340.
98. Lu, L., M.S. Ladinsky, T. Kirchhausen (2009). „Cisternal organization of the endoplasmic reticulum during mitosis.” Mol Biol Cell **20**(15): 3471-3480.
99. Lu, L., M.S. Ladinsky, T. Kirchhausen (2011). „Formation of the postmitotic nuclear envelope from extended ER cisternae precedes nuclear pore assembly.” J Cell Biol **194**(3): 425-440.
100. Luke, Y., H. Zaim, I. Karakesiosoglou, V.M. Jaeger, L. Sellin, W. Lu, M. Schneider, S. Neumann, A. Beijer, M. Munck, V.C. Padmakumar, J. Gloy, G. Walz, A.A. Noegel (2008). „Nesprin-2 Giant (NUANCE) maintains nuclear envelope architecture and composition in skin.” J Cell Sci **121**(11): 1887-1898.
101. Lupianez, D.G., K. Kraft, V. Heinrich, P. Krawitz, F. Brancati, E. Klopocki, D. Horn, H. Kayserili, J.M. Opitz, R. Laxova, F. Santos-Simarro, B. Gilbert-Dussardier, L. Wittler, M. Borschiwer, S.A. Haas, M. Osterwalder, M. Franke, B. Timmermann, J. Hecht, M. Spielmann, A. Visel, S. Mundlos (2015). „Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions.” Cell **161**(5): 1012-1025.
102. Maeshima, K., H. Iino, S. Hihara, N. Imamoto (2011). „Nuclear size, nuclear pore number and cell cycle.” Nucleus **2**(2): 113-118.
103. Martynoga B., J.L. Mateo, B. Zhou, J. Andersen, A. Achimastou, N. Urbán, D. van den Berg, D. Georgopoulou, S. Hadjur, J. Wittbrodt, L. Ettwiller, M. Piper, R.M. Gronostajski, F. Guillemot (2013). „Epigenomic enhancer annotation reveals a key role for NFIX in neural stem cell quiescence.” Genes Dev **27**(16):1769-1786.
104. Mattaj, I.W. (2004). „Sorting out the nuclear envelope from the endoplasmic reticulum.” Nat Rev Mol Cell Biol **5**(1): 65-69.
105. Matynia, A., S.S. Salus, S. Sazer (2002). „Three proteins required for early steps in the protein secretory pathway also affect nuclear envelope structure and cell cycle progression in fission yeast.” J Cell Sci **115**(Pt 2): 421-431.
106. Maul, G.G., L. Deaven (1977). „Quantitative determination of nuclear pore complexes in cycling cells with differing DNA content.” J Cell Biol **73**(3): 748-760.
107. McGregor, A.L., C.R. Hsia, J. Lammerding (2016). „Squish and squeeze-the nucleus as a physical barrier during migration in confined environments.” Curr Opin Cell Biol **40**:32-40.
108. Miller, B.R., R. Hen (2015). „The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety.” Curr Opin Neurobiol **30**: 51-58.
109. Monje, M.L., H. Toda, T.D. Palmer (2003). „Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis.” Science **302**(5651): 1760-1765.

110. Morgan, M.A., A. Shilatifard (2015). „Chromatin signatures of cancer.” *Genes Dev* **29**(3): 238-249.
111. Morshead, C.M., B.A. Reynolds, C.G. Craig, M.W. McBurney, W.A. Staines, D. Morassutti, S. Weiss, D. van der Kooy (1994). „Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells.”, *Neuron* **13**(5):1071-1082.
112. Nakashiba, T., J.D. Cushman, K.A. Pelkey, S. Renaudineau, D.L. Buhl, T.J. McHugh, V. Rodriguez Barrera, R. Chittajallu, K.S. Iwamoto, C.J. McBain, M.S. Fanselow, S. Tonegawa (2012). „Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion.”, *Cell* **149**(1):188-201.
113. Neumann, B., T. Walter, J.K. Heriche, J. Bulkescher, H. Erfle, C. Conrad, P. Rogers, I. Poser, M. Held, U. Liebel, C. Cetin, F. Sieckmann, G. Pau, R. Kabbe, A. Wunsche, V. Satagopam, M.H. Schmitz, C. Chapuis, D.W. Gerlich, R. Schneider, R. Eils, W. Huber, J.M. Peters, A.A. Hyman, R. Durbin, R. Pepperkok, J. Ellenberg (2010). „Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes.” *Nature* **464**(7289): 721-727.
114. O'Hara, L., G.S. Han, S. Peak-Chew, N. Grimsey, G.M. Carman, S. Siniosoglou (2006). „Control of phospholipid synthesis by phosphorylation of the yeast lipin Pah1p/Smp2p Mg²⁺-dependent phosphatidate phosphatase.” *J Biol Chem* **281**(45): 34537-34548.
115. Ogura, M., Y. Yamamoto, H. Miyashita, H. Kumamoto, M. Fukumoto (2016). „Quantitative analysis of nuclear shape in oral squamous cell carcinoma is useful for predicting the chemotherapeutic response.” *Med Mol Morphol* **49**(2): 76-82.
116. Ohba, T., E.C. Schirmer, T. Nishimoto, L. Gerace (2004). „Energy- and temperature-dependent transport of integral proteins to the inner nuclear membrane via the nuclear pore.” *J Cell Biol* **167**(6): 1051-1062.
117. Olins, A.L., B. Buendia, H. Herrmann, P. Lichter, D.E. Olins (1998). „Retinoic acid induction of nuclear envelope-limited chromatin sheets in HL-60.” *Exp Cell Res* **245**(1): 91-104.
118. Olins, A.L., M. Zwerger, H. Herrmann, H. Zentgraf, A.J. Simon, M. Monestier, D.E. Olins (2008). „The human granulocyte nucleus: Unusual nuclear envelope and heterochromatin composition.” *Eur J Cell Biol* **87**(5): 279-290.
119. Olins, D.E., A.L. Olins (2009). „Nuclear envelope-limited chromatin sheets (ELCS) and heterochromatin higher order structure.” *Chromosoma* **118**(5): 537-548.
120. Orso, G., D. Pendin, S. Liu, J. Tassetto, T.J. Moss, J.E. Faust, M. Micaroni, A. Egorova, A. Martinuzzi, J.A. McNew, A. Daga (2009). „Homotypic fusion of ER membranes requires the dynamin-like GTPase atlastin.” *Nature* **460**(7258): 978-983.
121. Otsuki, L., A.H. Brand (2018). „Cell cycle heterogeneity directs the timing of neural stem cell activation from quiescence.” *Science* **360**(6384): 99-102.

122. Pajerowski, J.D., K.N. Dahl, F.L. Zhong, P.J. Sammak, D.E. Discher (2007). „Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation.” Proc Natl Acad Sci U S A **104**(40): 15619-15624.
123. Palmer, T.D., A.R. Willhoite, F.H. Gage (2000). „Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis.” J Comp Neurol **425**(4): 479-494.
124. Pastrana, E., L.C. Cheng, F. Doetsch (2009). „Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny.” Proc Natl Acad Sci U S A **106**(15):6387-6392.
125. Pathak, R.U., M. Soujanya, R.K. Mishra (2021). „Deterioration of nuclear morphology and architecture: a hallmark of senescence and aging.” Ageing Res Rev **67**:101264.
126. Pederson, T. (2011). „The nucleus introduced.” Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(5).
127. Peric-Hupkes, D., W. Meuleman, L. Pagie, S.W. Bruggeman, I. Solovei, W. Brugman, S. Graf, P. Flicek, R.M. Kerkhoven, M. van Lohuizen, M. Reinders, L. Wessels, B. van Steensel (2010). „Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation.” Mol Cell **38**(4): 603-613.
128. Petrie, R.J., H. Koo, K.M. Yamada (2014). „Generation of compartmentalized pressure by a nuclear piston governs cell motility in a 3D matrix.” Science **345**(6200):1062-1065.
129. Poropatich, K., J.C. Yang, R. Goyal, V. Parini, X.J. Yang (2016). „Nuclear size measurement for distinguishing urothelial carcinomas from reactive urothelium on tissue sections.” Diagn Pathol **11**(1): 57.
130. Puhka, M., H. Vihinen, M. Joensuu, E. Jokitalo (2007). „Endoplasmic reticulum remains continuous and undergoes sheet-to-tubule transformation during cell division in mammalian cells.” J Cell Biol **179**(5): 895-909.
131. Rathke, C., W.M. Baarends, S. Awe, R. Renkawitz-Pohl (2014). „Chromatin dynamics during spermiogenesis.” Biochim Biophys Acta **1839**(3): 155-168.
132. Razafsky, D., D. Hodzic (2009). „Bringing KASH under the SUN: the many faces of nucleocytoskeletal connections.” J Cell Biol **186**(4): 461-472.
133. Ronneberger, O., P. Fischer, T. Brox (2015). „U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation.” Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015 Conference Paper:234-241.
134. Robinson, R. (2006). „Polyglutamine leads to altered chromatin architecture and neurodegeneration.” PLoS Biol **4**(3): e70.
135. Rowat, A.C., D.E. Jaalouk, M. Zwerger, W.L. Ung, I.A. Eydelnant, D.E. Olins, A.L. Olins, H. Herrmann, D.A. Weitz, J. Lammerding (2013). „Nuclear envelope composition determines the ability of neutrophil-type cells to passage through micron-scale constrictions.” J Biol Chem **288**(12): 8610-8618.

136. Santos-Rosa, H., J. Leung, N. Grimsey, S. Peak-Chew, S. Siniossoglou (2005). „The yeast lipin Smp2 couples phospholipid biosynthesis to nuclear membrane growth.” *EMBO J* **24**(11): 1931-1941.
137. Scaffidi, P., L. Gordon, T. Misteli (2005). „The cell nucleus and aging: tantalizing clues and hopeful promises.” *PLoS Biol* **3**(11): e395.
138. Scaffidi, P., T. Misteli (2006). „Lamin A-dependent nuclear defects in human aging.” *Science* **312**(5776): 1059-1063.
139. Schirmer, E.C., R. Foisner (2007). „Proteins that associate with lamins: many faces, many functions.” *Exp Cell Res* **313**(10): 2167-2179.
140. Shin, J.W., K.R. Spinler, J. Swift, J.A. Chasis, N. Mohandas, D.E. Discher (2013). „Lamins regulate cell trafficking and lineage maturation of adult human hematopoietic cells.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(47): 18892-18897.
141. Sierra, A., J.M. Encinas, J.J. Deudero, J.H. Chancey, G. Enikolopov, L.S. Overstreet-Wadiche, S.E. Tsirka, M. Maletic-Savatic (2010). „Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis.” *Cell Stem Cell* **7**(4): 483-495.
142. Sierra, A., S. Martin-Suarez, R. Valcarcel-Martin, J. Pascual-Brazo, S.A. Aelvoet, O. Abiega, J.J. Deudero, A.L. Brewster, I. Bernales, A.E. Anderson, V. Baekelandt, M. Maletic-Savatic, J.M. Encinas (2015). „Neuronal hyperactivity accelerates depletion of neural stem cells and impairs hippocampal neurogenesis.” *Cell Stem Cell* **16**(5): 488-503.
143. Simon, D.N., K.L. Wilson (2011). „The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic 'network of networks'.” *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(11): 695-708.
144. Siniossoglou, S., H. Santos-Rosa, J. Rappsilber, M. Mann, E. Hurt (1998). „A novel complex of membrane proteins required for formation of a spherical nucleus.” *EMBO J* **17**(22): 6449-6464.
145. Small, S.A., S.A. Schobel, R.B. Buxton, M.P. Witter, C.A. Barnes (2011). „A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease.” *Nat Rev Neurosci* **12**(10): 585-601.
146. Solovei, I., A.S. Wang, K. Thanisch, C.S. Schmidt, S. Krebs, M. Zwerger, T.V. Cohen, D. Devys, R. Foisner, L. Peichl, H. Herrmann, H. Blum, D. Engelkamp, C.L. Stewart, H. Leonhardt, B. Joffe (2013). „LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation.” *Cell* **152**(3): 584-598.
147. Splinter, E., H. Heath, J. Kooren, R.J. Palstra, P. Klous, F. Grosveld, N. Galjart, W. de Laat (2006). „CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the beta-globin locus.” *Genes Dev* **20**(17): 2349-2354.
148. Squire, L.R. (1992). „Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans.” *Psychol Rev* **99**(2): 195-231.

149. Steiner, B., F. Klempin, L. Wang, M. Kott, H. Kettenmann, G. Kempermann (2006). „Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis.” *Glia* **54**(8): 805-814.
150. Stephens, A.D., E.J. Banigan, J.F. Marko (2019). „Chromatin's physical properties shape the nucleus and its functions.” *Curr Opin Cell Biol* **58**: 76-84.
151. Stephens, A.D., P.Z. Liu, E.J. Banigan, L.M. Almassalha, V. Backman, S.A. Adam, R.D. Goldman, J.F. Marko (2018). „Chromatin histone modifications and rigidity affect nuclear morphology independent of lamins.” *Mol Biol Cell* **29**(2): 220-233.
152. Suh, H., A. Consiglio, J. Ray, T. Sawai, K.A. D'Amour, F.H. Gage (2007). „In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus.” *Cell Stem Cell* **1**(5): 515-528.
153. Sun, G.J., Y. Zhou, R.P. Stadel, J. Moss, J.H. Yong, S. Ito, N.K. Kawasaki, A.T. Phan, J.H. Oh, N. Modak, R.R. Reed, N. Toni, H. Song, G.L. Ming (2015). „Tangential migration of neuronal precursors of glutamatergic neurons in the adult mammalian brain.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(30): 9484-9489.
154. Tani, E., J. Takeuchi, Y. Ishijima, N. Higashi, E. Fujihara, T. Ametani, K. Ando (1971). „Elongated nuclear sheet and intranuclear myelin figure of human medulloblastoma.” *Cancer Res* **31**(12): 2120-2129.
155. Theerthagiri, G., N. Eisenhardt, H. Schwarz, W. Antonin (2010). „The nucleoporin Nup188 controls passage of membrane proteins across the nuclear pore complex.” *J Cell Biol* **189**(7): 1129-1142.
156. Thomas, C.H., J.H. Collier, C.S. Sfeir, K.E. Healy (2002). „Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(4): 1972-1977.
157. Toda, T., J.Y. Hsu, S.B. Linker, L. Hu, S.T. Schafer, J. Mertens, F.V. Jacinto, M.W. Hetzer, F.H. Gage (2017). „Nup153 Interacts with Sox2 to Enable Bimodal Gene Regulation and Maintenance of Neural Progenitor Cells.” *Cell Stem Cell* **21**(5): 618-634 e617.
158. Towbin, B.D., C. Gonzalez-Aguilera, R. Sack, D. Gaidatzis, V. Kalck, P. Meister, P. Askjaer, S.M. Gasser (2012). „Step-wise methylation of histone H3K9 positions heterochromatin at the nuclear periphery.” *Cell* **150**(5): 934-947.
159. Tronel, S., L. Belnoue, N. Grosjean, J.M. Revest, P.V. Piazza, M. Koehl, D.N. Abrous (2012). „Adult-born neurons are necessary for extended contextual discrimination.” *Hippocampus* **22**(2):292-298.
160. True, L.D., C.D. Jordan (2008). „The cancer nuclear microenvironment: interface between light microscopic cytology and molecular phenotype.” *J Cell Biochem* **104**(6): 1994-2003.

161. Tsunekawa, Y., J.M. Britto, M. Takahashi, F. Polleux, S.S. Tan, N. Osumi (2012). „Cyclin D2 in the basal process of neural progenitors is linked to non-equivalent cell fates.” EMBO J **31**(8):1879-1892.
162. Tsunekawa, Y., T. Kikkawa, N. Osumi (2014). „Asymmetric inheritance of Cyclin D2 maintains proliferative neural stem/progenitor cells: a critical event in brain development and evolution.” Dev Growth Differ **56**(5): 349-357.
163. Tsunekawa, T., N. Osumi (2012). „How to keep proliferative neural stem/progenitor cells: a critical role of asymmetric inheritance of cyclin D2.” Cell Cycle **11**(19):3550-3554.
164. Twining, S.S., D.P. Schulte, P.M. Wilson, B.L. Fish, J.E. Moulder (1996). „Retinol is sequestered in the bone marrow of vitamin A-deficient rats.” J Nutr **126**(6): 1618-1626.
165. Umehara, T., H. Yaguchi, M. Suzuki, E. Isozaki, S. Mochio (2010). „Are hypersegmented neutrophils a characteristic of Boucher-Neuhauser syndrome?” J Neurol Sci **295**(1-2): 128-130.
166. Urbach, A., I. Robakiewicz, E. Baum, L. Kaczmarek, O.W. Witte, R.K. Filipkowski (2013). „Cyclin D2 knockout mice with depleted adult neurogenesis learn Barnes maze task.” Behav Neurosci **127**(1):1-8.
167. Urban, N., I.M. Blomfield, F. Guillemot (2019). „Quiescence of Adult Mammalian Neural Stem Cells: A Highly Regulated Rest.” Neuron **104**(5): 834-848.
168. Urban, N., D.L. van den Berg, A. Forget, J. Andersen, J.A. Demmers, C. Hunt, O. Ayrault, F. Guillemot (2016). „Return to quiescence of mouse neural stem cells by degradation of a proactivation protein.” Science **353**(6296): 292-295.
169. Valouev, A., S.M. Johnson, S.D. Boyd, C.L. Smith, A.Z. Fire, A. Sidow (2011). „Determinants of nucleosome organization in primary human cells.” Nature **474**(7352): 516-520.
170. Verboon, J.M., H. Rincon-Arano, T.R. Werwie, J.J. Delrow, D. Scalzo, V. Nandakumar, M. Groudine, S.M. Parkhurst (2015). „Wash interacts with lamin and affects global nuclear organization.” Curr Biol **25**(6): 804-810.
171. Vergani, L., M. Grattarola, C. Nicolini (2004). „Modifications of chromatin structure and gene expression following induced alterations of cellular shape.” Int J Biochem Cell Biol **36**(8): 1447-1461.
172. Verhoeven, G. (1999). „Spermatogenesis and spermatogenic control: a state of the art.” Verh K Acad Geneeskd Belg **61**(3): 417-432.
173. Versaevel, M., T. Grevesse, S. Gabriele (2012). „Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells.” Nat Commun **3**: 671.
174. Vidak, S., R. Foisner (2016). „Molecular insights into the premature aging disease progeria.” Histochem Cell Biol **145**(4): 401-417.

175. Voisin, M.B., A. Woodfin, S. Nourshargh (2009). „Monocytes and neutrophils exhibit both distinct and common mechanisms in penetrating the vascular basement membrane in vivo.” Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(8): 1193-1199.
176. Waszak, S.M., O. Delaneau, A.R. Gschwind, H. Kilpinen, S.K. Raghav, R.M. Witwicki, A. Orioli, M. Wiederkehr, N.I. Panousis, A. Yurovsky, L. Romano-Palumbo, A. Planchon, D. Bielser, I. Padioleau, G. Udin, S. Thurnheer, D. Hacker, N. Hernandez, A. Reymond, B. Deplancke, E.T. Dermitzakis (2015). „Population Variation and Genetic Control of Modular Chromatin Architecture in Humans.” Cell **162**(5): 1039-1050.
177. Webster, M.T., J.M. McCaffery, O. Cohen-Fix (2010). „Vesicle trafficking maintains nuclear shape in *Saccharomyces cerevisiae* during membrane proliferation.” J Cell Biol **191**(6): 1079-1088.
178. Weiss, P., B. Garber (1952). „Shape and Movement of Mesenchyme Cells as Functions of the Physical Structure of the Medium: Contributions to a Quantitative Morphology.” Proc Natl Acad Sci U S A **38**(3): 264-280.
179. Wenthe, S.R., M.P. Rout (2010). „The nuclear pore complex and nuclear transport.” Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(10): a000562.
180. Westerman, D.A., D. Evans, J. Metz (1999). „Neutrophil hypersegmentation in iron deficiency anaemia: a case-control study.” Br J Haematol **107**(3): 512-515.
181. Wilson, K.L., J.M. Berk (2010). „The nuclear envelope at a glance.” J Cell Sci **123**(Pt 12): 1973-1978.
182. Witkin, K.L., J.M. Friederichs, O. Cohen-Fix, S.L. Jaspersen (2010). „Changes in the nuclear envelope environment affect spindle pole body duplication in *Saccharomyces cerevisiae*.” Genetics **186**(3): 867-883.
183. Worman, H.J. (2005). „Components of the nuclear envelope and their role in human disease.” Novartis Found Symp **264**: 35-42; discussion 42-50, 227-230.
184. Worman, H.J. (2012). „Nuclear lamins and laminopathies.” J Pathol **226**(2): 316-325.
185. Xiong, H., F. Rivero, U. Euteneuer, S. Mondal, S. Mana-Capelli, D. Larochele, A. Vogel, B. Gassen, A.A. Noegel (2008). „Dictyostelium Sun-1 connects the centrosome to chromatin and ensures genome stability.” Traffic **9**(5): 708-724.
186. Yamaguchi, M., H. Saito, M. Suzuki, K. Mori (2000). „Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice.” Neuroreport **11**(9):1991-1996.
187. Yang, M., G. Busche, A. Ganser, Z. Li (2013). „Morphology and quantitative composition of hematopoietic cells in murine bone marrow and spleen of healthy subjects.” Ann Hematol **92**(5): 587-594.
188. Yerle-Bouissou, M., F. Mompert, E. Iannuccelli, D. Robelin, A. Jauneau, Y. Lahbib-Mansais, C. Delcros, I.P. Oswald, J. Gellin (2009). „Nuclear architecture of resting and LPS-stimulated porcine neutrophils by 3D FISH.” Chromosome Res **17**(7): 847-862.

189. Zhang, C.L., Y. Zou, W. He, F.H. Gage, R.M. Evans (2008) „A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour.” *Nature* 451(7181):1004-1007.
190. Zhao, H., E.G. Sifakis, N. Sumida, L. Millan-Arino, B.A. Scholz, J.P. Svensson, X. Chen, A.L. Ronnegren, C.D. Mallet de Lima, F.S. Varnoosfaderani, C. Shi, O. Loseva, S. Yammine, M. Israelsson, L.S. Rathje, B. Nemeti, E. Fredlund, T. Helleday, M.P. Imreh, A. Gondor (2015). „PARP1- and CTCF-Mediated Interactions between Active and Repressed Chromatin at the Lamina Promote Oscillating Transcription.” *Mol Cell* 59(6): 984-997.
191. Zheng, X., Y. Kim, Y. Zheng (2015). „Identification of lamin B-regulated chromatin regions based on chromatin landscapes.” *Mol Biol Cell* 26(14): 2685-2697.
192. Zink, D., A.H. Fischer, J.A. Nickerson (2004). „Nuclear structure in cancer cells.” *Nat Rev Cancer* 4(9): 677-687.
193. Zuccotti, M., S. Garagna, V. Merico, M. Monti, C. Alberto Redi (2005). „Chromatin organisation and nuclear architecture in growing mouse oocytes.” *Mol Cell Endocrinol* 234(1-2): 11-17.
194. Zuleger, N., M.I. Robson, E.C. Schirmer (2011). „The nuclear envelope as a chromatin organizer.” *Nucleus* 2(5): 339-349.
195. Zwerger, M., T. Kolb, K. Richter, I. Karakesisoglou, H. Herrmann (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): 354-368.

6. Lista publikacji autorki rozprawy

1. Olszyński K.H., Polowy R., Wardak A.D., Łaska I.A., **Grymanowska A.W.**, Puławski W., Gawryś O., Koliński M., Filipkowski R.K. Rats emit aversive 44-kHz ultrasonic vocalizations during prolonged Pavlovian fear conditioning. **eLife**, Reviewed Preprint; <https://doi.org/10.7554/eLife.88810.1>, 2023.
2. Olszyński K.H., Polowy R., Wardak A.D., **Grymanowska A.W.**, Zieliński J., Filipkowski R.K. Spontaneously hypertensive rats manifest deficits in emotional response to 22-kHz and 50-kHz ultrasonic playback. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, 120:110615, 2023.
3. Olszyński K.H., Polowy R., Wardak A.D., **Grymanowska A.W.**, Filipkowski R.K. Increased Vocalization of Rats in Response to Ultrasonic Playback as a Sign of Hypervigilance Following Fear Conditioning. **Brain Sci.**, 11:970, 2021.
4. Milewski K., Hilgier W., Fręsko I., Polowy R., Podsiadłowska A., Zołocińska E., **Grymanowska A.W.**, Filipkowski R.K., Albrecht J., Zielińska M. Carnosine reduces oxidative stress and reverses attenuation of righting and postural reflexes in rats with thioacetamide-induced liver failure. **Neurochem Res.**, 41:376-84, 2016.

Praca przeglądowa zawierająca fragmenty niniejszej rozprawy:

5. **Grymanowska A.W.**, Filipkowski R.K. Kształt jądra w komórkach organizmów eukariotycznych i jego potencjalne znaczenie biologiczne / Nuclear shape in eukaryotic cells and its potential biological significance. **Post. Biol. Kom.** 48:41-58, 2021.