

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**“ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ-ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ”**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**“Ανάλυση μικροσυστοιχιών και χρήση της ποσοτικής Real-time PCR με σκοπό:**

**A. Τη μελέτη του προτύπου έκφρασης του γονιδίου Gtl2 στο νωτιαίο μυελό των  
μυών**

**B. Τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων στους TAG-1<sup>-/-</sup> μύες”.**

**ΖΟΥΠΗ ΛΗΔΑ**

**Υπεύθυνη καθηγήτρια: Καραγωγέως Δόμνα**

**Επιβλέπων Καθηγητής: Καλαντίδης Κρίτων**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ**

**ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2007**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

**Η** παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Νευροεπιστημών της κας Καραγωγέως Δόμνας. Αρχικά θα ήθελα να την ευχαριστήσω θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσε, να πραγματοποιήσω τη μεταπτυχιακή μου διατριβή στο εργαστήριο της, για την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη της, όλο αυτό το διάστημα. Καλή επιτυχία στο Λονδίνο!

Εν' συνεχεία θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κο Καλαντίδη για τις συμβουλές και τις γνώσεις που μοιράστηκε μαζί μου γύρω από την γονιδιακή αποσιώπηση, καθώς και για το ότι δέχτηκε να διορθώσει και να βαθμολογήσει τη διατριβή αυτή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Κώστα το Θεοδωράκη, την κολώνα του εργαστηρίου (!), για τις συμβουλές, τις συζητήσεις, τις γνώσεις του γύρω από ποικίλα θέματα(!!) αλλά και για το ευχάριστο κλίμα που δημιουργεί στο εργαστήριο (ακόμα και όταν είναι αγχωμένος). Καλή συνέχεια να έχουμε!

Για τη συνεργασία μας σ' αυτό το project θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Βιδάκη Μαρίνα, στην οποία χρωστάω τις περισσότερες γνώσεις μου γύρω από τις διάφορες εργαστηριακές τεχνικές. Την ευχαριστώ για τις χρήσιμες συμβουλές της, για την ευχάριστη παρέα, την υπομονή που έδειξε καθώς και για το εκκολαπτόμενο αυγό που μου χάρισε πρόσφατα : ) .

Για τη Μαρία τη Σαββάκη δεν αρκεί ένα απλό ευχαριστώ, μιας και η γνωριμία μας ξεκίνησε στη διάρκεια των προπτυχιακών μας σπουδών στη Λάρισα. Πέρα από την ευχάριστη συνεργασία, την εκπαίδευσή μου στα Western blot και τη Real time PCR, μας συνδέει και μια καλή φιλία ετών! Ακόμα δεν έχεις έρθει για καφέ σπίτι μου!

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Μαρκέλλα για τη βοήθειά της, τις συμβουλές όποτε τις χρειάζομαι καθώς και για τα εμπνευσμένα σαρδάμ της, τις κουραστικές και δύσκολες μέρες!

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τα άτομα που πέρασαν από αυτό το εργαστήριο και που είμαι ιδιαίτερα χαρούμενη για τη γνωριμία μου μαζί τους: τον Αλέξανδρο (ευχαριστώ για την εκμάθηση ενός αριθμού τεχνικών και για το γραφείο), την Ελένη (τη δασκάλα της in situ), τη Λιάνα (για την υπέροχη παρέα και για τις μουσικές επιλογές), την Αγγελική (ακόμα θυμάμαι το περίεργο φυτό), το Μεθόδιο (για τις ατέλειωτες στιγμές γέλιου), τη Δήμητρα και τη Γεωργία (για την ευχάριστη παρέα).

Ευχαριστώ πολύ τα παιδιά από τα διπλανά εργαστήρια: την Κάλλια (καλή τύχη στο EMBL), το Νικόλα, το Γιάννη, το Μιχάλη, την Τόνια, τη Χαρά και την Έλενα για τις όμορφες στιγμές στα διαλείμματα.

Τελειώνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου στην Κρήτη: Πέτρο, Βάσσια, Ναταλία, Μαριάννα, Νίκο, Κατερίνα, Άρη, Ντίνο που ομορφαίνουν τη διαμονή μου στο Ηράκλειο, αλλά και ένα ευχαριστώ για τους φίλους μου που είναι μακριά.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ θα ήθελα να το δώσω στην οικογένειά μου και κυρίως στη μητέρα μου για την αγάπη και την υποστήριξή όλα αυτά τα χρόνια.

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	5
ABSTRACT .....	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	28
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	48
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	54

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 70 γονίδια τα οποία υφίστανται γονιδιακή αποτύπωση. Αρκετά από αυτά εμπλέκονται στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και συνεπώς στην συμπεριφορά. Βασική προϋπόθεση για την κατανόηση του ρόλου τους, είναι να μελετήσουμε πρωτίστως το πρότυπο έκφρασής τους στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Microarray αναλύσεις αποκάλυψαν ότι το γονίδιο *Gtl2*, το οποίο δρα ως non-coding RNA και εκφράζεται από το μητρικό χρωμόσωμα, εμφανίζει διαφορετική έκφραση στον κοιλιακό και ραχιαίο τελεγκέφαλο. Επιπρόσθετα, σειρά πειραμάτων υβριδοποιήσεων *in situ* σε τομές εγκεφάλου αποκάλυψαν ένα αρκετά ενδιαφέρον πρότυπο έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου. Για να αποκτήσουμε μια ολοκληρωμένη εικόνα του προτύπου έκφρασης αυτού στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στο πρώτο τμήμα αυτής της εργασίας, εφαρμόζεται μια σειρά νέων υβριδοποιήσεων *in situ* στο νωτιαίο μυελό μυών ηλικίας από E11.5 ως P7. Αρκετά έντονη έκφραση παρατηρείται στη φαιά ουσία και στα γάγγλια των ραχιαίων ριζών σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια.

Η TAG-1 είναι ένα νευρωνικό μόριο κυτταρικής συνάφειας της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών, η οποία εκφράζεται σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα των τρωκτικών. Οι γνωστοί φυσιολογικοί ρόλοι της συγκεκριμένης πρωτεΐνης αφορούν τη διαμεσολάβηση της κυτταρικής συνάφειας, την αύξηση των νευραξόνων, την καθοδήγηση των νευρικών κυττάρων κατά τη μετανάστευσή τους καθώς και την συμμετοχή της στην οργάνωση των εμμύελων ινών. Ο μηχανισμός με τον οποίο δρα, καθώς και το πλήθος των μορίων με τα οποία αλληλεπιδρά, δεν έχουν αποσαφηνιστεί. Στο δεύτερο τμήμα με το συνδυασμό της microarray ανάλυσης, αλλά και μέσω της ποσοτικής Real time PCR, προσπαθούμε να ανακαλύψουμε νέα μόρια τα οποία αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη, καθώς και πιθανά σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία αυτή εμπλέκεται.

## ABSTRACT

Until recently, approximately 70 genetically imprinted genes have been identified, many of which are thought to play a role in neurodevelopment and behavior. In order to elucidate the role of specific genes in these processes, the observation of their expression pattern in the central nervous system is required. Preliminary data from a microarray study have revealed the differential expression of Gtl2, a maternally expressed non-coding RNA, between the ventral and the dorsal telencephalon of the mouse. Moreover, a series of in situ hybridizations in coronal brain sections from mice indicated a very interesting expression pattern in different parts of the brain. In order to obtain an overall image of the Gtl2 expression pattern we performed in situ hybridization in transverse sections of mouse spinal cord at different developmental stages (E11.5 to P7). Strong expression was observed in the cell bodies of the gray matter and in the dorsal root ganglia.

TAG-1 is a neural specific cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, with a strong expression in different parts of the central and peripheral nervous system in rodents. This protein is thought to be implicated in fasciculation, neurite outgrowth, axonal migration and myelination events. The mechanisms through which it acts and the overall number of molecules which are able to interact with TAG-1, are still to be elucidated. In this study, through the use of microarray analysis and of quantitative Real time PCR, we aim to reveal new interacting molecules and possible downstream signaling events in which our protein is implicated.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### **A.1. Ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος**

Στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης των θηλαστικών, το τέλος της γαστριδιοποίησης σηματοδοτεί την οργανογένεση, η οποία ξεκινά με τη νευριδιοποίηση. Ως νευριδιοποίηση ορίζεται η μετατροπή της επίπεδης στιβάδας του εξωδέρματος σε ένα κενό κυλινδρικό σωλήνα. Στο στάδιο αυτό αρχίζει ο σχηματισμός του νευρικού συστήματος (Gilbert, 1994).

Αρχική ένδειξη της νευριδιοποίησης αποτελεί η πλάτυνση του ραχιαίου εξωδέρματος το οποίο σχηματίζει τη νευρική πλάκα. Τα άκρα της νευρικής πλάκας ανυψώνονται και σχηματίζουν νευρικές πτυχές, οι οποίες περιβάλλουν πλευρικά μια βάθυνση γνωστή ως νευρική αύλακα. Η τελευταία εκτείνεται κατά μήκος της ραχιαίας πλευράς του εμβρύου. Ακολουθεί η σύγκλιση των νευρικών πτυχών και η σύντηξή τους προς τη δημιουργία του λεγόμενου νευρικού σωλήνα, που αποτελεί την αρχική υποτυπώδη μορφή του κεντρικού νευρικού συστήματος (Gilbert, 1994).

Η διαφοροποίηση του νευρικού σωλήνα συντελείται ταυτόχρονα σε ανατομικό, ιστολογικό και κυτταρικό επίπεδο. Στο ανατομικό επίπεδο, ο νευρικός σωλήνας παρουσιάζει διογκώσεις και περισφίξεις οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού. Στο ιστολογικό επίπεδο, οι κυτταρικοί πληθυσμοί ανακατατάσσονται και δημιουργούν τα διάφορα τμήματα του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού. Τέλος, στο κυτταρικό επίπεδο, τα νευρο-επιθηλιακά κύτταρα διαφοροποιούνται στους διάφορους τύπους νευρώνων και κυττάρων της γλοίας (Gilbert, 1994).

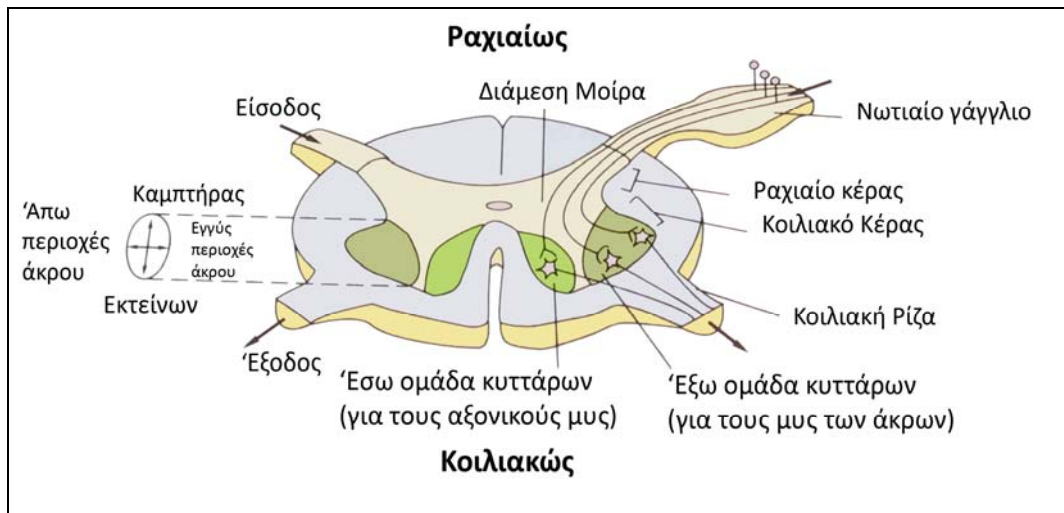
### **A.2. Ο νωτιαίος μυελός των θηλαστικών**

Το κεντρικό νευρικό σύστημα του ενήλικου μπορεί να διαιρεθεί σε επτά ανατομικές περιοχές, καθεμία από τις οποίες αναπτύσσεται από μια ιδιαίτερη περιοχή του νευρικού σωλήνα. Οι επτά κύριες περιοχές είναι: 1) ο νωτιαίος μυελός, (2) ο

προμήκης μυελός, (3) η γέφυρα, (4) η παρεγκεφαλίδα, (5) ο μέσος εγκέφαλος, (6) ο διάμεσος εγκέφαλος και (7) τα εγκεφαλικά ημισφαίρια.

Ο νωτιαίος μυελός είναι το πιο ουραίο μέρος του κεντρικού νευρικού συστήματος. Απαντάται μέσα στον οστέινο σωλήνα που σχηματίζεται στη σπονδυλική στήλη. Εκτείνεται από τη βάση του κρανίου μέχρι τον πρώτο οσφυϊκό σπόνδυλο και, επομένως, δε διατρέχει όλο το μήκος της σπονδυλικής στήλης. Δέχεται αισθητικές πληροφορίες από το δέρμα, τις αρθρώσεις και τους μυς του κορμού και των άκρων και περιέχει τους κινητικούς νευρώνες που ελέγχουν τις εκούσιες και τις αντανακλαστικές κινήσεις. Δέχεται επίσης, αισθητικές πληροφορίες από τα εσωτερικά όργανα και έχει ομάδες νευρώνων που ελέγχουν πολλές σπλαχνικές λειτουργίες (Kandel, Schwartz, Jessel, 1995).

Ο νωτιαίος μυελός έχει τύπο σαφώς διαμερισμένης κατασκευής, πράγμα που γίνεται εμφανές από την ύπαρξη των ζευγών νωτιαίων νεύρων. Τα νωτιαία νεύρα είναι περιφερικά νεύρα που σχηματίζονται με τη σύγκλιση των ραχιαίων και των κοιλιακών ριζών. Οι ραχιαίες ρίζες μεταφέρουν στο νωτιαίο μυελό αισθητικές πληροφορίες από τους μυς, το δέρμα και τα σπλάχνα. Οι κοιλιακές ρίζες περιέχουν κινητικούς νευράξονες που νευρώνουν μυς, καθώς και νευράξονες του συμπαθητικού και του παρασυμπαθητικού συστήματος. Στο εσωτερικό του νωτιαίου μυελού, τόσο οι ομάδες των αισθητικών κυττάρων που δέχονται πληροφορίες από την περιφέρεια όσο και οι ομάδες των κινητικών κυττάρων που ελέγχουν συγκεκριμένες ομάδες μυϊκών ινών συγκεντρώνονται σε χωριστές περιοχές που δεν αναμιγνύονται τυχαία. Εκτός από κυτταρικές ομάδες, ο νωτιαίος μυελός περιέχει ανιούσες ίνες, δια μέσου των οποίων φθάνουν στον εγκέφαλο οι αισθητικές πληροφορίες και κατιούσες ίνες, οι οποίες μεταφέρουν κινητικές εντολές από τον εγκέφαλο στους κινητικούς νευρώνες (Kandel, Schwartz, Jessel, 1995; Vander, Sherman, Luciano, 2000).



**Εικόνα 1.** Σχηματική αναπαράσταση εγκάρσιας τομής του νωτιαίου μυελού των θηλαστικών. Διακρίνεται η φαιά και η λευκή ουσία. Οι κινητικοί νευρώνες του νωτιαίου μυελού ταξινομούνται λειτουργικώς σε έσω και έξω ομάδα. Η έσω ομάδα περιέχει κινητικούς νευρώνες που νευρώνουν τους αξονικούς μυς του τραχήλου και της ράχης. Στην έσω ομάδα, οι εσωτερικοί κινητικοί νευρώνες νευρώνουν άπω μυς. Οι κοιλιακοί κινητικοί νευρώνες νευρώνουν εκτείνοντες και οι ραχιαίοι καμπτήρες μυς (Kandel, Schwartz, Jessel, 1995)

Εγκάρσια τομή στο νωτιαίο μυελό, αποκαλύπτει μια κεντρική μοίρα φαιάς ουσίας, σε σχήμα πεταλούδας, η οποία αποτελείται κυρίως από τα κυτταρικά σώματα των νευρώνων, και μια περιφερειακή μοίρα λευκής ουσίας, αποτελούμενη από εμμέλους νευράξονες. Τα κυτταρικά σώματα των κινητικών νευρώνων βρίσκονται στο κοιλιακό τμήμα της φαιάς ουσίας, στα κοιλιακά κέρατα. Οι κινητικοί νευρώνες οι οποίοι νευρώνουν συγκεκριμένους μυς, αθροίζονται στους κινητικούς πυρήνες (δεξαμενές κινητικών νευρώνων), οι οποίοι διατάσσονται σε επιμήκεις στήλες, εκτεινόμενες σε ένα έως τέσσερα νευροτόμια. Η τοπογραφική οργάνωση των διάφορων κινητικών πυρήνων ακολουθεί δυο σημαντικούς ανατομικούς και λειτουργικούς κανόνες: τον κανόνα εγγύς-άπω και τον κανόνα καμπτήρας-εκτείνων. Εικόνα 1.

Σύμφωνα με τον κανόνα εγγύς-άπω, οι κινητικοί νευρώνες που νευρώνουν τους εγγύτερους μυς (αξονικούς) βρίσκονται τελείως προς τα έσω, ενώ εκείνοι που νευρώνουν απώτερους μυς βρίσκονται προσδευτικώς περισσότερο προς τα έξω. Σύμφωνα με τον κανόνα καμπτήρα-εκτείνων, οι κινητικοί νευρώνες που νευρώνουν εκτείνοντες μυς βρίσκονται κοιλιακώς σε σχέση με εκείνους που νευρώνουν καμπτήρες μυς (Kandel, Schwartz, Jessel, 1995).



Οι ανατομικές αυτές σχέσεις αντιστοιχούν σε μια σημαντική λειτουργική διάκριση: οι αξονικοί μύες (της στάσης του σώματος) και οι εγγύς μύες (ιδίως οι εκτείνοντες των κάτω άκρων) χρησιμοποιούνται κατ' εξοχήν για τη διατήρηση της ισορροπίας και της στάσης του σώματος. Αντιθέτως, οι άπω μύες (ιδίως των άνω άκρων) χρησιμοποιούνται για τις δραστηριότητες λεπτών χειρισμών. Οι έσω και έξω κινητικοί νευρώνες ελέγχονται από διαφορετικούς πληθυσμούς διάμεσων νευρώνων και από διαφορετικές κατιούσες οδούς.

### **A.3. Το φαινόμενο της γονιδιακής αποτύπωσης στα θηλαστικά (genetic imprinting).**

Ένα χαρακτηριστικό φαινόμενο που παρατηρείται στα θηλαστικά είναι αυτό της γονιδιακής αποτύπωσης (genetic imprinting). Το φαινόμενο αυτό αναφέρεται στη διαφορετική έκφραση των αλληλομόρφων ενός γονιδίου ανάλογα με το αν η προέλευσή τους είναι μητρική ή πατρική. Σε κάθε περίπτωση, το ένα αλληλόμορφο εκφράζεται ενώ το άλλο υφίσταται σίγηση. Για κάθε αποτυπωμένο γονίδιο η μητρική ή πατρική έκφραση είναι καθορισμένη και συντηρημένη μέσα και μεταξύ των ειδών (Yenitodiyenco et al., 2004). Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 70 αποτυπωμένα γονίδια, με ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό αυτών να εκφράζεται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (Davies et al., 2005; Edwards and Ferguson-Smith, 2007). Τα αποτυπωμένα γονίδια φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την ανάπτυξη του οργανισμού (Reik and Walter, 2002), ενώ όλο και περισσότερο αυξάνονται οι πιθανότητες συμμετοχής τους κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης του νευρικού και της συμπεριφοράς του οργανισμού (Davies et al., 2005).

Αν και έχει παρατηρηθεί ένας μικρός αριθμός αυτόνομων γονιδίων που υφίστανται αποτύπωση (π.χ. *Nap115*, *Nnat*, *Inpp5f\_v2*), το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών οργανώνεται σε ομάδες γονιδίων οι οποίες καταλαμβάνουν μεγάλες χρωμοσωμικές περιοχές στο γένωμα (Edwards and Ferguson-Smith, 2007). Αυτές οι ομάδες περιέχουν έναν αριθμό γονιδίων, ικανών να παράγουν κάποιο πρωτεϊνικό προϊόν και τουλάχιστον ένα γονίδιο από το οποίο απουσιάζει αυτή η ικανότητα. Τέτοιο είδους γονίδια μπορούν να παράγουν μετάγραφα RNA τα

οποία όμως δεν είναι σε θέση να παράγουν περαιτέρω πρωτεΐνες (non-coding RNAs). Έχει προταθεί ότι η παρουσία κάποιων non-coding RNAs σε μια ομάδα εξυπηρετεί την καταστολή της μεταγραφής των γειτονικών σε αυτά γονιδίων, *in cis* (Da Rocha et al., 2007).

Η οργάνωση των αποτυπωμένων γονιδίων σε ομάδες προσφέρει τη δυνατότητα ρύθμισής τους από κοινά στοιχεία αν και οι μηχανισμοί αυτής δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Με τα μέχρι στιγμής υπάρχοντα στοιχεία γνωρίζουμε ότι κάθε γονιδιακή ομάδα ελέγχεται κυρίως από ένα *cis-acting* στοιχείο το οποίο αποκαλείται περιοχή ρύθμισης της αποτύπωσης (Imprinting Control Region-ICR), αλλά και από επιπρόσθετα στοιχεία που συμμετέχουν ρυθμίζοντας τη λειτουργία της ICR (Edwards and Ferguson-Smith, 2007).

Ο μηχανισμός της αποτύπωσης όλων των γονιδίων μιας ομάδας περιλαμβάνει το φαινόμενο της διαφορετική μεθυλίωση της ICR κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης, η οποία είναι συνήθως συνδεδεμένη με τη μεταγραφική καταστολή (Edwards and Ferguson-Smith, 2007). Οι γονιδιακές ομάδες υποδιαιρούνται σε: ομάδες στις οποίες η ICR υφίσταται μεθυλίωση κατά την διαδικασία της ωογένεσης στο μητρικό χρωμόσωμα, και σε ομάδες στις οποίες η μεθυλίωση λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης κατά την πατρική κληρονομικότητα. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκει και το υπό εξέταση γονίδιο, *Gtl2*.

#### **A.4. Το γονίδιο *Gtl2* (Gene trap locus 2).**

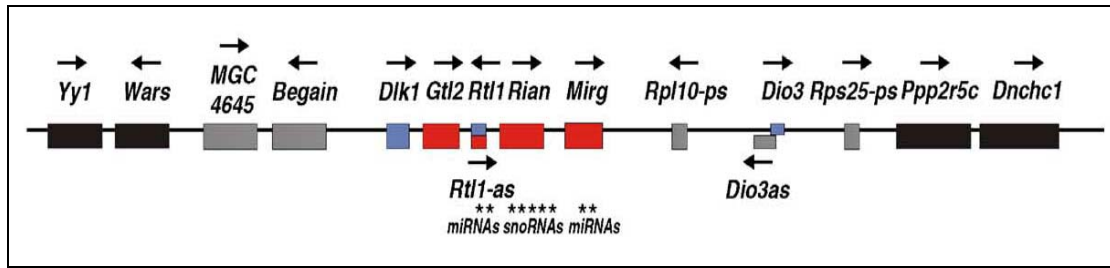
Ο γονιδιακός τόπος *Gtl2/Meg3* (Maternally Expressed Gene 3 στον άνθρωπο), ανακαλύφθηκε κατά τη διάρκεια μιας προσπάθειας παγίδευσης γονιδίων (gene trap screen) με χωροχρονικά καθορισμένο πρότυπο έκφρασης κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του ποντικού (Schuster-Gossler et al., 1994). Η παγίδευση επιτεύχθηκε με την ένθεση *LacZ* στο γονιδιακό τόπο του *Gtl2* και η έκφρασή του εντοπίστηκε στο μεσόδερμα, στους σωμίτες, στους μυοβλάστες, στους

σκελετικούς μυς και σε διάφορες περιοχές του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος και ιδιαίτερα στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο (Schuster-Gossler et al., 1994; McLaughlin et al., 2005, Da Rocha et al., 2007).

Ενδιαφέρον προκάλεσε το γεγονός ότι η μεταφορά του διαγονιδίου που δημιουργήθηκε μέσω της γαμετικής κυτταρικής σειράς και μάλιστα κατά την πατρική κληρονόμηση, είχε ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της εμβρυϊκής και μετ-εμβρυϊκής ανάπτυξης. Αντίθετα, κατά τη μητρική κληρονόμηση του διαγονιδίου ο παραπάνω φαινότυπος εμφανίζονταν σημαντικά μειωμένος (Schuster-Gossler et al., 1994). Οι μελέτες που ακολούθησαν αποκάλυψαν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με το συγκεκριμένο γονίδιο.

Το *Gtl2* γονίδιο έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 12 του ποντικού και στο χρωμόσωμα 14q στον άνθρωπο, σε μια περιοχή στην οποία εδράζουν γονίδια σημαντικά για τη σωστή ανάπτυξη του οργανισμού, όπως αποδείχτηκε από φαινοτυπικές μελέτες τόσο σε τρωκτικά, όσο και σε ασθενείς με μονογονεϊκή δυσωμία (Georgiades et al., 2000; Tevendale et al., 2006; Kagami et al., 2005, Kotzot, 2004). Η περιοχή του χρωμοσώματος στην οποία βρίσκεται το *Gtl2* έχει μέγεθος 1Mb, ενώ η ομάδα των αποτυπωμένων γονιδίων στην οποία συμμετέχει απαρτίζεται από:

- τρία γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες (protein-coding genes) και τα οποία εκφράζονται από το πατρικά κληρονομούμενο χρωμόσωμα (*Dlk1/Pref1*, *Rtl1*, *Dio3*) και
- έναν αριθμό μεγάλων και μικρών non-coding RNAs τα οποία εκφράζονται από μητρικά κληρονομούμενο χρωμόσωμα και περιλαμβάνουν το *Gtl2*, C/D small nucleolar RNAs/*Rian* και έναν αριθμό *microRNAs* τα οποία είτε βρίσκονται απομονωμένα είτε ομαδοποιούνται στα *anti-Rtl1* και *Mirg* (Tierling et al., 2005; da Rocha et al., 2007; Schmidt et al., 2000; Seitz et al., 2004; Takada et al., 2000) Εικόνα 2.



**Εικόνα 2.** Σχηματική αναπαράσταση του συνόλου των γονιδίων στο χρωμόσωμα 12 του ποντικού, που υφίστανται γονιδιακή αποτύπωση. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια που εκφράζονται από το μητρικό χρωμόσωμα, με γαλάζιο τα γονίδια που εκφράζονται από το πατρικό χρωμόσωμα, με μαύρο τα γονίδια τα οποία παρουσιάζουν αμοιβαία έκφραση και με γκρι γονίδια των οποίων η προέλευση της έκφρασης δεν έχει διευκρινιστεί. Οι αστερίσκοι αντιπροσωπεύουν την τοποθεσία των μικρών RNAs, ενώ ο μεταγραφικός προσανατολισμός απεικονίζεται με βέλη (Tierling et al., 2005).

Τα γονίδια *Dlk1* (Delta like homolog 1) και *Gtl2* βρίσκονται στην εγγύτερη περιοχή της ομάδας. Το γονίδιο *Dlk1* κωδικοποιεί για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία ανήκει στην *Notch/Delta/Serrate* οικογένεια σηματοδοτικών μορίων και η οποία παίζει ρόλο στη διαφοροποίηση ορισμένων ιστών. Επιπρόσθετα, φαίνεται να είναι μια επίσης υποψήφια πρωτεΐνη που ευθύνεται για τις μυϊκές και σκελετικές ανωμαλίες των οργανισμών με μονογονεϊκή δυσωμία (Georgiades et al., 2001; Moon et al., 2002; Tevendale et al., 2006).

Το *Gtl2* γονίδιο, δρα ως non-coding RNA το οποίο αν και κωδικοποιεί πολλά, μικρού μήκους, μόρια RNA μέσω εναλλακτικού ματίσματος, κανένα από αυτά δε διαθέτει συντηρημένο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame) (Schuster-Gossler et al., 1998). Μια θεωρία υποστηρίζει ότι το συγκεκριμένο non-coding RNA αποτελεί τμήμα ενός μεγαλύτερου μεταγράφου το οποίο καλύπτει και άλλες περιοχές της γενετικά αποτυπωμένης ομάδας (Lin et al., 2003; Tierling et al., 2006). Παρόλα αυτά η λειτουργική σημασία του *Gtl2* στη διαδικασία της γονιδιακής αποτύπωσης και στην εμβρυϊκή ανάπτυξη ενός οργανισμού παραμένει ακόμα άγνωστη.

### **B.1. Μόρια κυτταρικής συνάφειας της υπερ-οικογένειας των ανοσοσφαιρινών (IgSF CAMs).**

Η κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση, η διακυτταρική επικοινωνία και η ανοσολογική απόκριση, αποτελούν βασικές λειτουργικές διαδικασίες των κυττάρων στις οποίες συμμετέχουν τα μόρια κυτταρικής συνάφειας (Cell Adhesion Molecules, CAMs). Πρόκειται κυρίως για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες κατατάσσονται σε διαφορετικές οικογένειες: τις καντερίνες (cadherins), τις ιντεγκρίνες (integrins), τις σελεκτίνες (selectins) και την υπερ-οικογένεια των ανοσοσφαιρινών (immunoglobulin superfamily, IgSF) (Hynes et al., 2000). Ένας επιπρόσθετος διαχωρισμός τους βασίζεται στην εξάρτηση ή μη των πρωτεϊνών αυτών από τα ιόντα ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ ). Οι καντερίνες, ιντεγκρίνες και σελεκτίνες αποτελούν τις λεγόμενες ασβεστιο-εξαρτώμενες πρωτεΐνες, ενώ τα μέλη της υπερ-οικογένειας των ανοσοσφαιρινών δεν εξαρτώνται από τα ιόντα του ασβεστίου.

Η υπερ-οικογένεια των ανοσοσφαιρινών χαρακτηρίζεται από διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούνται, αρχικά, από ένα εξωκυττάριο τμήμα το οποίο περιέχει επαναλήψεις περιοχών που ομοιάζουν με ανοσοσφαιρινικές (Ig-like domains), συνδεδεμένων μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Ακολουθεί μια διαμεμβρανική περιοχή και ένα κυτταροπλασματικό τμήμα το οποίο αλληλεπιδρά με τον κυτταροσκελετό. Στη συγκεκριμένη υπερ-οικογένεια ανήκει η οικογένεια των μορίων κυτταρικής συνάφειας του νευρικού συστήματος (Neural CAMs ή NCAMs), που θα απασχολήσουν ένα τμήμα της παρούσας εργασίας. Τα μόρια αυτά είναι απαραίτητα για τη σωστή ανάπτυξη του νευρικού συστήματος αλλά και για την περεταίρω λειτουργικότητα αυτού στον ενήλιο οργανισμό. Ευθύνονται για την διαμεσολάβηση της κυτταρικής συνάφειας, την αύξηση και ανάπτυξη των νευριτών αλλά και για την μετανάστευση των νευρικών κυττάρων (Walsh and Doherty, 1997).

Οι πρωτεΐνες αυτές χαρακτηρίζονται σαφώς, από την παρουσία τμημάτων που ομοιάζουν με τις περιοχές των ανοσοσφαιρινών (Ig-like) και είναι συνήθως ομόλογες με την σταθερή τους περιοχή, C2 (Williams and Barclay, 1988). Ορισμένα μέλη αυτής της οικογένειας περιέχουν επίσης ένα ή περισσότερα τμήματα που ομοιάζουν με τις φιβρονεκτίνες (Fibronectin-like domains ή FN-like

domains) τύπου III περιοχές στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Αυτή η κατηγορία πρωτεϊνών διαιρείται περαιτέρω σε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και σε πρωτεΐνες που είναι προσδεμένες στην κυτταρική μεμβράνη μέσω ενός τμήματος γλυκοσυλοφωσφατιδυλοινοσιτόλης (GPI-anchor). Στην τελευταία ομάδα ανήκει η πρωτεΐνη TAG-1 (Karagogeos, 2003).

Οι βασικότερες υποοικογένειες της οικογένειας των IgSF NCAMs είναι αυτές των L1 και NCAM. Οι πρωτεΐνες της L1 υποοικογένειας παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση των νευραξόνων, στη μετανάστευση, επιβίωση και αναγέννηση των νευρικών κυττάρων, καθώς και στην πλαστικότητα των συνάψεων. Οι λειτουργίες των πρωτεϊνών αυτών, όπως και ορισμένοι μηχανισμοί δράσης τους έχουν μελετηθεί εκτενώς. Οι πρωτεΐνες της NCAM υποοικογένειας, από τη μεριά τους, παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση των νευρικών κυττάρων και στη συναπτική πλαστικότητα, καθώς και στον προσανατολισμό των αξόνων. Τόσο η πρωτεΐνη L1 όσο και η πρωτεΐνη NCAM, έχουν συνδεθεί με ένα σημαντικό αριθμό εγκεφαλικών διαταραχών όπως η σχιζοφρένεια και η νόσος του Alzheimer (Maness and Schachner, 2007).

Η πρωτεΐνη TAG-1 ανήκει στην υποοικογένεια των IgSF NCAMs, F3/ contactin, η οποία απαριθμεί έξι μέλη: την πρωτεΐνη F3/contactin, τις πρωτεΐνες BIG-1 και BIG-2, τις πρωτεΐνες NB2 και NB3 και φυσικά την πρωτεΐνη TAG-1. Οι πρωτεΐνες αυτές χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη 6 Ig-like και 4 FNIII-like τύπου III περιοχών, ενώ είναι προσδεμένες στην κυτταρική μεμβράνη μέσω ενός τμήματος γλυκοσυλοφωσφατιδυλοινοσιτόλης (GPI-anchor). Η πρωτεΐνη αυτή θα αποτελέσει αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας και επομένως αναλύεται με περισσότερη λεπτομέρεια παρακάτω.

## **B.2. Δομή της πρωτεΐνης TAG-1 (Transient Axonal Glycoprotein 1)**

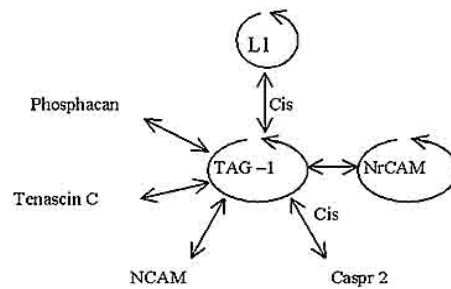
Η πρωτεΐνη TAG-1 είναι μια καλά συντηρημένη γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 135 kDa. Παρουσιάζει 50% ομολογία με την F3/contactin, λιγότερη ομολογία (20-30%) με τις L1 και NCAM, ενώ με όλες εμφανίζει κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Όπως προαναφέρθηκε, αποτελείται από έξι ανοσοσφαιρινικές τύπου C2

υποπεριοχές στο αμιντελικό της άκρο και από τέσσερις φιλμπρονεκτινικές τύπου III επαναλήψεις στο καρβοξυτελικό της άκρο. Συνδέεται με τη μεμβράνη μέσω GPI προσδέματος, ενώ συγχρόνως έχει εντοπιστεί και σε διαλυτή μορφή (Karagogeos et al., 1991). Εικόνα 3.



**Εικόνα.3.** Σχηματική αναπαράσταση της δομής της TAG-1 πρωτεΐνης. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι Ig-like περιοχές και με γαλάζιο οι FNIII-like περιοχές (© 2000 Cell).

Η TAG-1 ανιχνεύτηκε αρχικά στον επίμου και στο μυ, ενώ αργότερα βρέθηκε η ομόλογη πρωτεΐνη στην όρνιθα (axonin-1), στον άνθρωπο (TAX-1) και στο zebrafish (Tsiotra et al., 1996; Warren et al., 1999). Συμμετέχει σε ένα εκτενές δίκτυο αλληλεπιδράσεων το οποίο απεικονίζεται στην εικόνα 4, και των οποίων η φυσιολογική σημασία δεν έχει διευκρινιστεί. Παρουσιάζει την ικανότητα ομοφιλικών αλλά και ετεροφιλικών αλληλεπιδράσεων με μόρια της ίδιας ή μη οικογένειας. Πιο συγκεκριμένα, πειράματα συνεντοπισμού και *in vitro* μελέτες σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μεμβρανών του εγκεφάλου έδειξαν ότι η TAG-1 αλληλεπιδρά με την L1/NgCAM (Kunz et al., 1991), την NrCAM (Sutter et al., 1995, Buchstaller et al., 1996), την NCAM, τις πρωτεογυκάνες Neurocan, Phosphacan, RPTPζ/β και την πρωτεΐνη του εξωκυτάριου χώρου tenascin-C (Milev et al., 1996). Τέλος, πρόσφατα, πειραματικές μελέτες από το εργαστήριό μας, έδειξαν την ικανότητα αλληλεπίδρασης της TAG-1 με ένα μέλος της υπεροικογένειας των neurexins, την Caspr2, καθώς και με τους διαύλους καλίου στις εμμύελες ίνες του περιφερικού νευρικού συστήματος (Traka et al., 2002; Tzimourakas et al., 2007).



**Εικόνα 4.** Σχηματική αναπαράσταση του συνόλου των αλληλεπιδράσεων της TAG-1 πρωτεΐνης (Karagogeos, 2003).

### **Β.3. Έκφραση της TAG-1 πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης.**

Στα πρώιμα εμβρυϊκά στάδια, πειράματα *in situ* υβριδοποίησης έδειξαν ότι η TAG-1 εκφράζεται από συγκεκριμένους υποπληθυσμούς νευρώνων σε εγκέφαλο και νωτιαίο μυελό, όπως και στους νευρώνες των γαγγλίων ραχιαίων ριζών (Dorsal root ganglia-DRG).

Πιο συγκεκριμένα, στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο, εμφανίζεται παροδικά σε υποπληθυσμούς νευρώνων του πρόσθιου εγκεφάλου και του στελέχους. Επιπρόσθετα, εκφράζεται σε κρνιακά νεύρα, στις φλοιο-θαλαμικές προβολές καθώς και σε μακριές δεσμίδες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Επίσης, εκφράζεται στο μεσολόβιο, στον πρόσθιο σύνδεσμο, στο σύνδεσμο του ιππόκαμπου και στον αναπτυσσόμενο οσφρητικό λοβό (Wolfer et al., 1997; Bailly et al., 1996). Στο νωτιαίο μυελό, η TAG-1 εκφράζεται παροδικά στους κινητικούς νευρώνες, όπως και στους συνδεσμικούς νευρώνες (commissural neurons) που αποτελούν αισθητικούς νευρώνες δεύτερης τάξης. Οι τελευταίοι, εντοπίζονται στη ραχιαίο-πλευρική περιοχή της σπονδυλικής στήλης, ενώ η ελκτική δύναμη της νετρίνης-1 προκαλεί την έκταση των αξόνων τους προς το εδαφιαίο πέταλο.

Η έκφρασή της ανιχνεύεται επίσης, στα σώματα των νευρώνων που θα σχηματίσουν τους προ-παρεγκεφαλιδικούς πυρήνες, καθώς και στους μεταμιτωτικούς, προ-μεταναστευτικούς νευρώνες της έσω κοκκώδους στιβάδας στην παρεγκεφαλίδα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η TAG-1 φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στη μετανάστευση και επιβίωση ενός αριθμού των προπαρεγκεφαλιδικών πυρήνων, μιας και πειράματα σε μύες που έχουν χάσει την ικανότητα έκφρασης



λειτουργικής TAG-1 πρωτεΐνης, παρατηρήθηκε μειωμένος αριθμός των προ-παρεγκεφαλικών πυρήνων LRN (lateral reticular nuclei) και ECN (external cuneate nuclei) που σχηματίζονται μετά τη μετανάστευσή τους (Kyriakopoulou et al., 2002; Denaxa et al., 2005). Τέλος, η TAG-1 συμμετέχει στη μετανάστευση των GABAεργικών νευρώνων του εμβρυικού φλοιού (Denaxa et al., 2001).

Νωρίς κατά την ανάπτυξη, αλλά και στον ενήλικο οργανισμό η πρωτεΐνη TAG-1 εκφράζεται από τα ολιγοδενδροκύτταρα του Κεντρικού νευρικού συστήματος, τα κύτταρα Schwann του περιφερικού νευρικού συστήματος καθώς και από τις αντίστοιχες εμμύελες ίνες. Στις εμμύελες ίνες, πειράματα ανοσοιστοχημείας έδειξαν ότι η TAG-1 εντοπίζεται στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές (Traka et al., 2002). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η TAG-1, αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Caspr2 αλλά και με τους διαύλους καλίου, ενώ φαίνεται να είναι υπεύθυνη για τη συσσώρευση και επομένως για τη σωστή κατανομή των πρωτεϊνών αυτών στην εγγύς των παρακομβικών περιοχή (Traka et al., 2002; Tzimourakas et al., 2007). Η απώλεια της TAG-1 από τη συγκεκριμένη περιοχή αν και δε φαίνεται να επηρεάζει την ικανότητα μετάδοσης του σήματος από τους άξονες, παρόλα αυτά μειώνει το μήκος των μεσοκομβικών τμημάτων, επηρεάζει σοβαρά την κατανομή της Caspr2 και των διαύλων καλίου, ενώ οι TAG-1<sup>-/-</sup> μύες φαίνεται να εμφανίζουν χαρακτηριστικά ελαττωματικής κινητικής ικανότητας (Traka et al., 2003; Tzimourakas et al., 2007; Karagogeos and Kyriakopoulou, unpublished data).

Στον ενήλικο οργανισμό, η έκφραση της TAG-1 εντοπίζεται επίσης στην κοκκώδη στοιβάδα της παρεγκεφαλίδας, στο οσφρητικό σύστημα, σε πυρήνες του θαλάμου, στα CA1 και CA3 πυραμιδικά κύτταρα του ιππόκαμπου, στον υποθάλαμο, στο ραχιαίο κέρασ και στη λευκή ουσία του νωτιαίου μυελού (Yoshihara et al., 1995; Wolfer et al., 1997; Denaxa et al., 2003).

## ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα εργασία χωρίζεται σε δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος, βασικός στόχος είναι ο καθορισμός του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *Gtl2* στο νωτιαίο μυελό των μυών, σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. *Microarray* αναλύσεις αποκάλυψαν ότι το γονίδιο αυτό εμφανίζει διαφορετικά επίπεδα έκφρασης ανάμεσα σε πρόσθιο και οπίσθιο τελεγκέφαλο, σε ραχιαία και κοιλιακή περιοχή. Αρχικά μελετήθηκε το πρότυπο έκφρασής του με μια σειρά υβριδοποιήσεων *in situ* και στη συγκεκριμένη εργασία, ακολουθεί μια αντίστοιχη σειρά πειραμάτων στο νωτιαίο μυελό, ώστε να αποκτήσουμε μια ολοκληρωμένη εικόνα του προτύπου έκφρασης του στο κεντρικό νευρικό σύστημα των τρωκτικών. Εκτός από την τεχνική της υβριδοποίησης *in situ*, εφαρμόζεται και ιστολογική χρώση, σε εγκάρσιες τομές νωτιαίου μυελού.

Επιπρόσθετα, έγινε μια προσπάθεια μελέτης εγκεφάλου μυών τα οποία έχουν μεταλλαχθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να μην πραγματοποιείται η σωστή γονιδιακή αποτύπωση του γονιδίου *Gtl2* με αποτέλεσμα την υπερ-έκφρασή του από πατρικό, αυτή τη φορά, χρωμόσωμα. Σε αυτή την περίπτωση, ελέγχθηκε το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου στον εγκέφαλο των μυών, καθώς και η ύπαρξη ή μη διαφοροποίησης των στοιβάδων του φλοιού, μέσω της υβριδοποίησης *in situ* με RNA ανιχνευτές για τα mRNAs των *Gtl2*, *ER81* και *RORB*.

Στο δεύτερο μέρος, θα μας απασχολήσει η εύρεση των μορίων, των οποίων τα επίπεδα έκφρασης επηρεάζονται κατά την απουσία της πρωτεΐνης TAG-1, στον εγκεφαλικό φλοιό και τον προμήκη μυελό των μυών. Η TAG-1 είναι ένα νευρωνικό μόριο κυτταρικής συνάφειας της υπερ-οικογένειας των ανοσοσφαιρινών το οποίο εκφράζεται σε διάφορες δομές του κεντρικού και περιφερικού συστήματος των θηλαστικών. Η πρωτεΐνη TAG-1 εμπλέκεται και σε έναν αριθμό διεργασιών όπως η διαμεσολάβηση της κυτταρικής συνάφειας των νευρικών κυττάρων, η αύξηση του μήκους των νευριτών, η καθοδήγηση των αξόνων και η μυελίνωση. Παρόλα αυτά, ο μηχανισμός με τον οποίο δρα, όπως και το πλήθος των μορίων με τα οποία αλληλεπιδρά σε κάθε περίπτωση δεν έχουν διευκρινιστεί. Για ο σκοπό αυτό, παρουσιάζεται μια σειρά πειραματικών προσεγγίσεων προς απάντηση των

παραπάνω ερωτημάτων και άρα την σταδιακή αποκάλυψη του φυσιολογικού και λειτουργικού ρόλου της TAG-1 στο νευρικό σύστημα των θηλαστικών. Οι πειραματικές τεχνικές που εφαρμόζονται σε αυτή την περίπτωση, είναι η ποσοτική Real time PCR και η microarray ανάλυση.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### **1. Πειραματόζωα**

Για την μελέτη του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *Gtl2* στο νωτιαίο μυελό, χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικοί μύες των στελεχών CBAx5716. Η ημέρα της σύλληψης θεωρείται εμβρυϊκή μέρα 0.5 (E 0.5). Τα αναπτυξιακά στάδια τα οποία επιλέχθηκαν ήταν: E11.5, E13.5, E14.5, E16.5, E18.5 και P7. Τα έγκυα ζώα θανατώθηκαν με μεγάλες δόσεις αιθέρα ή χλωροφορμίου, είτε με αποσύνδεση της σπονδυλικής τους στήλης (cervical dislocation). Τα έμβρυα συλλέχθηκαν σε φωσφορικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline: 400mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.5M NaCl). Για τη μελέτη των μεταλλαγμένων μυών, εστάλησαν εγκέφαλοι μυών ηλικίας P0 από την κα Schmidt Jennifer (Department of biological Sciences, University of Illinois at Chicago). Οι συγκεκριμένοι μύες προέκυψαν από τη διασταύρωση Cast/Ei και C57BL/6 στελεχών. Ο τρόπος με τον οποίο έγινε η μετάλλαξη τους αναφέρεται με λεπτομέρεια στο άρθρο των Carr et al., 2007.

Για τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων σε μύες ελλειπτικούς για την πρωτεΐνη TAG-1, χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικοί μύες των στελεχών CBAx57B1/10 και μύες που φέρουν το ελλειπτικό γονίδιο για την TAG-1 πρωτεΐνη (TAG-1 K.O. ή TAG-1  $^{-/-}$ ). Οι TAG-1  $^{-/-}$  μύες χορηγήθηκαν από τον Dr. Kazutada Watanabe (Dept. Of Molecular Medical Science, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Japan). Τα έγκυα ζώα τα οποία έφεραν έμβρυα αναπτυξιακού σταδίου E14.5 θυσιάστηκαν με τους τρόπους που περιγράφονται παραπάνω, ενώ τα έμβρυα συλλέχθηκαν σε PBS/DEPC  $\text{H}_2\text{O}$  διάλυμα.

### **2. Προετοιμασία ιστών για τομές κρυοτόμου**

Οι ιστοί των εμβρυϊκών και μετεμβρυϊκών σταδίων μονιμοποιούνται σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεΰδης (4% PFA), για 14-16 ώρες. Στη συνέχεια, η κρυοπροστασία των ιστών επιτυγχάνεται με την επώασή τους σε διάλυμα 30% σουκρόζης σε PBS, για επιπλέον 14-16 ώρες. Ακλουθεί η έγκλισή τους σε διάλυμα 15% σουκρόζης /

7.5% ζελατίνης σε PBS. Οι ιστοί κόβονται σε κρουτόμο, σε διαδοχικές τομές πάχους 16μm, κάθετες στον πρόσθιο-οπίσθιο άξονα και συλλέγονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες.

### 3. *In situ* υβριδοποίηση

#### 3.1 Παρασκευή ανιχνευτή RNA με αντίδραση μεταγραφής *in vitro*

Για τη δημιουργία RNA ανιχνευτών χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια που εμπεριέχουν cDNA για τα Gtl2, RORB και ER81 γονίδια.

**Πίνακας 1.** Πλασμίδια και ένζυμα για τη δημιουργία RNA ανιχνευτών

Μόριο	Πλασμιδιακός φορέας	Μη νοηματικό RNA (antisense)	
		Ένζυμο	Πολυμεράση
<b>Gtl2</b>	pEX10x <sup>+</sup>	XbaI	SP6
<b>ER81</b>	pBL	SpeI	T7
<b>RORB</b>	pBL	XhoI	T3

Για τη σήμανση των ανιχνευτών πραγματοποιήθηκε *in vitro* μεταγραφή χρησιμοποιώντας το Riboprobe Gemini System II Buffers kit (Promega), T7 πολυμεράση (Roche) και UTP σημασμένο με διοξυγενίνη (Dioxigenin-11-UTP, Roche).

Η διαδικασία της *in vitro* μεταγραφής ακολουθεί την εξής διαδικασία:

Σε σωληνάκια errendorf 1.5 ml αναμιγνύονται με τη σειρά που αναφέρονται τα παρακάτω υλικά:

- H<sub>2</sub>O χωρίς νουκλεάσες 7μl
- 5X ρυθμιστικό διάλυμα μεταγραφής 5μl
- 0.1M DTT 2μl
- 10mM rGTP 1μl
- 10mM rCTP 1μl
- 10mM rATP 1μl
- 10mM rUTP 0.65μl

- 10mM 11-DIG-UTP 0.35μl
- Καταστολέας RNAσών 1μl (40 units)
- RNA πολυμεράση 1μl (20 units)
- 1μg/μl γραμμοποιημένο πλασμιδιακό DNA 1μl

Το μείγμα επωάζεται για 3 ώρες στους 37°C. Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 2μl (10u/μl) RNAση χωρίς DNAση I (Roche) και την επώαση του μίγματος στους 37°C για 15 λεπτά.

Η κατακρήμνιση του RNA γίνεται με την προσθήκη 100μl TE (10mM Tris pH 8.0, 0.1mM EDTA pH 8.0), 10μl 4M LiCl και 300μl 100% EtOH στους -20°C για 30 λεπτά. Ακολουθεί η φυγοκέντρηση του διαλύματος, η πλύση του ιζήματος με 70% EtOH και η επαναδιαλυτοποίησή του σε TE, σε τελική συγκέντρωση 0.1 μg/μl.

### **3.2 *In situ* υβριδοποίηση σε τομές κρυοτόμου**

Αρχικά οι τομές αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Στη συνέχεια ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- Προσθήκη 4% PFA σε PBS για 10 λεπτά
- Πλύση με PBS για 10 λεπτά (x3)
- Ακετυλίωση για 10 λεπτά, σε RT, που πραγματοποιείται με το διάλυμα: 4ml τριαιθανολαμίνη 7.5M, 0.525 ml HCl 37% και 0.75ml οξικός ανυδρίτης σε 295ml H<sub>2</sub>O
- Πλύση με PBS για 10 λεπτά (x3)
- Επώαση των τομών για 6 ώρες σε RT με διάλυμα προ-υβριδοποίησης, το οποίο περιέχει: 50% φορμαμίδιο, 5x SSC, 5x Denharts, 250mg/ml yeast RNA, 500mg/ml herring sperm DNA
- Προσθήκη στις τομές διαλύματος υβριδοποίησης και επώαση στους 72°C για 14-16 ώρες. Το διάλυμα υβριδοποίησης δημιουργείται με την προσθήκη 400ng/ml σημασμένου με διοξυγενίνη RNA ανιχνευτή (DIG-RNA probe)
- Οι τομές εμβαπτίζονται σε διάλυμα 5x SSC, 72°C, για 5 λεπτά
- Μεταφορά των τομών σε διάλυμα 0.2x SSC, 72°C, για 1 ώρα

- Πλύση με διάλυμα 0.2 x SSC για 5 λεπτά
- Πλύση με διάλυμα B1 (0,1M Tris pH 7.5, 0.15M NaCl), για 5 λεπτά (x2)
- Επώαση με διάλυμα B1 με 10% FBS (Fetal Bovine Serum, GIBCO), για 1 ώρα, σε RT
- Προσθήκη πρωτογενούς αντισώματος για τη διοξυγενίνη, συνδεδεμένο με αλκαλική φωσφατάση (anti-DIG-AP, Fab fragments, Roche), αραιωμένο 1/5000 σε διάλυμα B1 με 1% FBS, για 14-16 ώρες στους 4°C
- Πλύση με διάλυμα B1 για 5 λεπτά (x3)
- Πλύση με διάλυμα B2 (0.1M Tris pH 9.5, 1M NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>) για 10 λεπτά (x3)
- Επώαση με διάλυμα: 75mg/ml NBT (Nitroblue tetrazolium chloride, Roche), και 50mg/ml BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine salt, Roche) σε διάλυμα B2. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε σκοτάδι έως ότου δώσει ικανοποιητική χρώση
- Σταμάτημα της αντίδρασης μέσω πολλαπλών πλύσεων με PBS
- Προσθήκη διαλύματος ζελατίνης/γλυκερόλης και παρατήρηση.

#### 4. Ιστολογική χρώση με cresyl violet

Οι τομές κρουτόμου εμβαπτίζονται διαδοχικά στα ακόλουθα διαλύματα:

- Απιονισμένο H<sub>2</sub>O για 5 λεπτά
- 1% cresyl violet (SIGMA) για 10 λεπτά
- Απιονισμένο H<sub>2</sub>O για 1 λεπτό
- 50% αιθανόλη και 50% οξικό οξύ, στιγμιαία
- 80% αιθανόλη για 5 λεπτά
- 90% αιθανόλη για 5 λεπτά
- 100% αιθανόλη για 5 λεπτά (x2)
- Ξυλένιο για 5 λεπτά
- Entellan και παρατήρηση.

## 5. Απομόνωση ολικού RNA από ιστούς TAG-1 wt και Κ.Ο. μυών για τη διεξαγωγή microarray ανάλυσης.

Για την μελέτη της γονιδιακής έκφρασης μέσω της microarray ανάλυσης απομονώθηκε συνολικό RNA από εγκεφαλικά στελέχη και φλοιούς E14.5 φυσιολογικών και TAG-1 <sup>-/-</sup> μυών. Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκε το RNeasy® Midi kit (50) όπως και το QIAshredder™ (50) της QIAGEN, για την απομόνωση του RNA. Συνολικά εστάλησαν από 3 βιολογικές ρέπλικες με: RNA TAG-1 wt φλοιού, RNA TAG-1 wt προμήκους μυελού, RNA TAG-1 Κ.Ο. φλοιού και RNA TAG-1 Κ.Ο. προμήκους μυελού. Το σύνολο των δειγμάτων στάλθηκαν στην εταιρία Orzyon Genomics SA (Barcelona/Spain), όπου και πραγματοποιήθηκαν οι υβριδισμοί, εις διπλούν. Πιο συγκεκριμένα, τα TAG-1 wt δείγματα σημάνθηκαν με πράσινο χρώμα (Cy3) ενώ τα αντίστοιχα TAG-1 Κ.Ο. δείγματα με κόκκινο χρώμα (Cy5). Τα δείγματα έφεραν την κωδικοποίηση του παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 2.**

Κωδικός δείγματος	Περιγραφή δείγματος
1-A1-Me-Wt Cy3	A1 προμήκης μυελός E14,5 TAG-1 +/+
2-A1-C-Wt Cy3	A1 φλοιός E14,5 TAG-1 +/+
3-A2-Me-KO Cy5	A2 προμήκης μυελός E14,5 TAG-1 -/-
4-A2-C-KO Cy5	A2 φλοιός E14,5 TAG-1 -/-
5-B1-Me-Wt Cy3	B1 προμήκης μυελός E14,5 TAG-1 +/+
6-B1-C-Wt Cy3	B1 φλοιός E14,5 TAG-1 +/+
7-B2-Me-KO Cy5	B2 προμήκης μυελός E14,5 TAG-1 -/-
8-B2-C-KO Cy5	B2 φλοιός E14,5 TAG-1 -/-
9-C1-Me-Wt Cy3	C1 προμήκης μυελός E14,5 TAG-1 +/+
10-C1-C-Wt Cy3	C1 φλοιός E14,5 TAG-1 +/+
11-C2-Me-KO Cy5	C2 προμήκης μυελός E14,5 TAG-1 -/-
12-C2-C-KO Cy5	C2 φλοιός E14,5 TAG-1 -/-

Τα δείγματα υβριδοποιήθηκαν ως εξής: Τα δείγματα των τριών ομάδων που προήλθαν από το φλοιό TAG-1 wt μυών υβριδοποιήθηκαν με τα αντίστοιχα δείγματα της ίδιας ομάδας, των TAG-1 Κ.Ο. μυών. Η ίδια διαδικασία



ακολουθήθηκε και για τα δείγματα του προμήκους μυελού. Μετά το πέρας των υβριδισμών, μετρήθηκε η ένταση του κάθε spot, ενώ η ανάλυση και η διεξαγωγή των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται γραφικά με τη μορφή MA γραφημάτων (Dutoit et al., 2002, βλέπε αποτελέσματα).

## 6. Real time PCR των ενδιαφερόμενων γονιδίων.

Οι αντιδράσεις της Real time PCR πραγματοποιήθηκαν σε μηχανήματα Mx3000P™ της STRATAGENE, στο εργαστήριο ιολογίας της ιατρικής σχολής του πανεπιστημίου Κρήτης. Σε κάθε αντίδραση μετρείται η εκπομπή του φθορισμού της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green, η οποία προσδένεται σε δίκλωνο DNA και με την οποία σημαίνονται τα δείγματά μας. Για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία συγκεντρώθηκαν TAG-1 wt και K.O. έμβρυα E14.5, από τα οποία απομονώθηκε ο φλοιός και ο προμήκης μυελός, καθώς και φλοιός από P8 μυ, ο οποίος θα χρησιμοποιηθεί για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης. Ακολούθησε η απομόνωση του συνολικού RNA των ιστών με τη βοήθεια των RNeasy® Midi kit (50) και QIAshredder™ (50) της QIAGEN. Μετά τη λήψη του συνολικού RNA τα δείγματα φωτομετρούνται και υπολογίζεται η καθαρότητά τους σύμφωνα με το λόγο:  $A_{260}/A_{280}$ . Ακολούθησε η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής των RNAs σύμφωνα με την εξής διαδικασία: Μεταφορά του μίγματος το οποίο περιλαμβάνει 1μgr RNA, 1μl Random Hexamers και DEPC-H<sub>2</sub>O, για 5 λεπτά στους 70°C και κατόπιν στον πάγο. Ακολουθεί προσθήκη των: 5x Buffer M-MLV, dNTPs 10mM, RTM-MLV (Promega) και η μεταφορά του μίγματος συνολικού όγκου 20μl, στους 37°C για 1 ώρα. Τα δείγματα φυλάσσονται στους -80°C.

Για τη διεξαγωγή των Real time PCR αντιδράσεων σχεδιάστηκαν τα παρακάτω ζεύγη primers:

**Πίνακας 3.**

Όνομα Γονιδίου	Forward Primer	Reverse Primer
<b>L1</b>	GGGTGGCAAATACCAGTG	GGGCCTTCTCTTCATTGCA
<b>NCAM</b>	GGTCCGAGATGGTCAGTTG	GGGGTCACCTCCAGATAGC
<b>Nlgn2</b>	TTTGCCGCCCTGGACACA	AAGAGGAGGGGCAGGTTG

<b>Plekhj1</b>	GCCAAGAGCAGTGTCAAG	GGTCCTTGCCAGTCATCTT
<b>Cdc42</b>	CGCCTCGATTAACAACGTAT	GCGTCCACCCACCTTCAT
<b>GAPDH</b>	ATTGTCAGCAATGCATCCTG	ATGGACTGTGGTCATGAGCC

Για το εκάστοτε ζεύγος primers, δημιουργήθηκε μία αραιώση των 2μΜ. Έπειτα, τα ζεύγη υποβλήθηκαν σε μια σειρά αντιδράσεων Real time PCR χρησιμοποιώντας ως template cDNA φλοιού εγκεφάλου μύος, ηλικίας P8, με σκοπό την εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας, υποστρώματος και το σχεδιασμό της εκάστοτε πρότυπης καμπύλης. Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκαν 50ng, 10ng, 2ng και 0,4ng cDNA. Σε κάθε tube προστέθηκαν 10μl iTaq™ SYBR Green Supermix with ROX (BIO-RAD), 2μl Forward Primer, 2μl Reverse Primer, DEPC-H<sub>2</sub>O για τελικό όγκο αντίδρασης 20μl.

Οι τελικές συνθήκες των PCR αντιδράσεων είναι ίδιες και για τα 6 γονίδια ενώ η ποσότητα cDNA που προστίθεται σε κάθε δείγμα είναι τα 30ng:

**Πίνακας 4.**

<u><b>Βήμα</b></u>	<u><b>Θερμοκρασία</b></u>	<u><b>Χρόνος</b></u>
1	95°C	10'
2	95°C	15"
3 (αναδιάταξη των primers) Πρώτη μέτρηση του σήματος φθορισμού	56°C	1'
4	72°C	30''
Επανάληψη 40 φορές των βημάτων 2, 3 και 4		
5	95°C	30''
6 Δεύτερη μέτρηση του σήματος φθορισμού	55°C	30''
7	95°C	30''

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### **A. Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου Gtl2 στο νωτιαίο μυελό των μυών κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, αλλά και μετά τη γέννηση.**

Όπως προαναφέρθηκε και στην εισαγωγή, το Gtl2, δρα ως non-coding RNA και εκφράζεται στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα των θηλαστικών. Επιπρόσθετα, *microarray* αναλύσεις έδειξαν ότι το εν' λόγω γονίδιο, παρουσιάζει διαφορετικό πρότυπο έκφρασης στον κοιλιακό και ραχιαίο τελεγκέφαλο. Για να μπορέσει να διαλευκανθεί ο φυσιολογικός και λειτουργικός ρόλος του συγκεκριμένου γονιδίου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του κεντρικού νευρικού συστήματος, επιλέξαμε ως πρώτη προσέγγιση να μελετήσουμε το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου σε εγκέφαλο και νωτιαίο μυελό. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήσαμε πειράματα υβριδοποίησης *in situ* χρησιμοποιώντας έναν RNA ανιχνευτή, ο οποίος σχεδιάστηκε για να στοχεύει ειδικά το mRNA του Gtl2 γονιδίου.

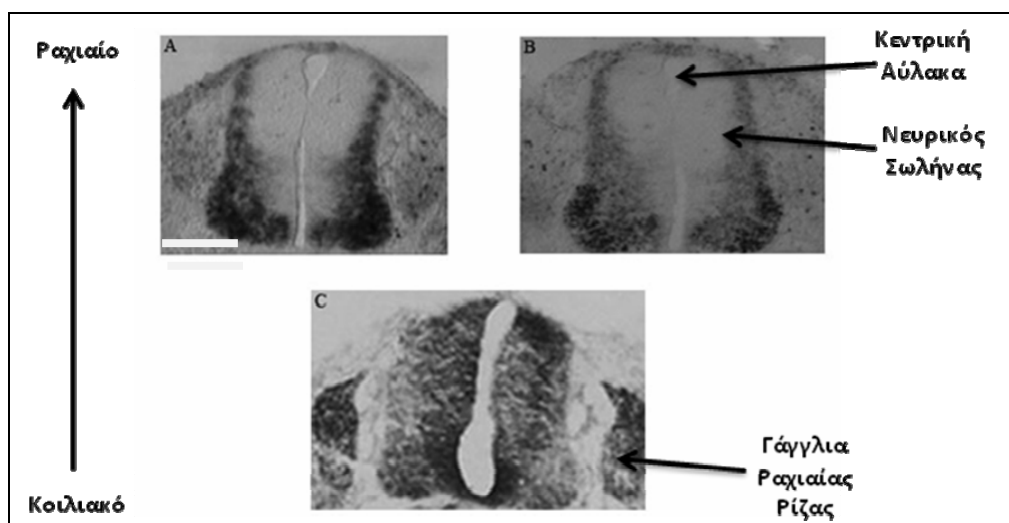
Μια σειρά υβριδισμών που ακολούθησαν σε τομές εγκεφάλου σε διάφορα στάδια ανάπτυξης, επιβεβαίωσαν τη χωρο-χρονική καθορισμένη έκφραση του γονιδίου στον τελεγκέφαλο, καθώς και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου, όπως ο θάλαμος, ο υποθάλαμος και ο ιππόκαμπος (McLaughlin et al., 2005). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων η έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου, γινόταν πιο ευρεία όσο αναπτύσσονταν η περιοχή (McLaughlin et al., 2005). Μιας και το πρότυπο έκφρασης του Gtl2 στον εγκέφαλο προκάλεσε αρκετό ενδιαφέρον, συνεχίσαμε με μία σειρά νέων υβριδισμών *in situ*, με σκοπό να μελετήσουμε αυτή τη φορά το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου στο νωτιαίο μυελό, σε αντίστοιχα αναπτυξιακά στάδια. Έτσι, θα μπορούμε να έχουμε μια καθολική εικόνα του προτύπου έκφρασης του Gtl2 στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

Για την συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν εγκάρσιες κρουτομές νωτιαίου μυελού εμβρύων ηλικίας E11.5, E13.5, E14.5, E16.5, E18.5, καθώς και εμβρύων ηλικίας 7 ημερών μετά τη γέννηση (P7). Ταυτόχρονα,

πραγματοποιήθηκε και εμβάπτιση των κρουτομών σε χρώση Cresyl Violet, η οποία χρωματίζει τα κυτταρικά σώματα, με αποτέλεσμα να αποκτάται μια μορφολογική εικόνα των τομών.

### A.1. Εμβρυϊκή ημέρα 11.5

Κατά την εμβρυϊκή ημέρα 11.5, όπου ο νωτιαίος μυελός βρίσκεται σε ένα στάδιο έντονης διαφοροποίησης, το mRNA του *Gtl2* εντοπίζεται κατά μήκος του ραχιαιο-κοιλιακού άξονα, περιμετρικά του νευρικού σωλήνα. Ιδιαίτερα έντονη είναι η έκφρασή του στο κοιλιακό τμήμα του νευρικού σωλήνα (basal plate), μια περιοχή από την οποία θα προκύψουν τα ραχιαία κέρατα του νωτιαίου μυελού (Kaufman, 1992). Ελάχιστη είναι η έκφραση στα γάγγλια των ραχιαίων ριζών (Dorsal Root Ganglia) αριστερά και δεξιά αυτού. Στο συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο ο νωτιαίος μυελός είναι μια μορφολογικά στενή δομή πλευρικά σε σχέση με το μέγεθός του κατά το ραχιαιο-κοιλιακό άξονα. Όσο αναπτύσσεται όμως το έμβρυο, η κατάσταση αλλάζει με την πλευρική επέκταση της δομής, όπως θα δούμε και παρακάτω. Εικόνα 1.



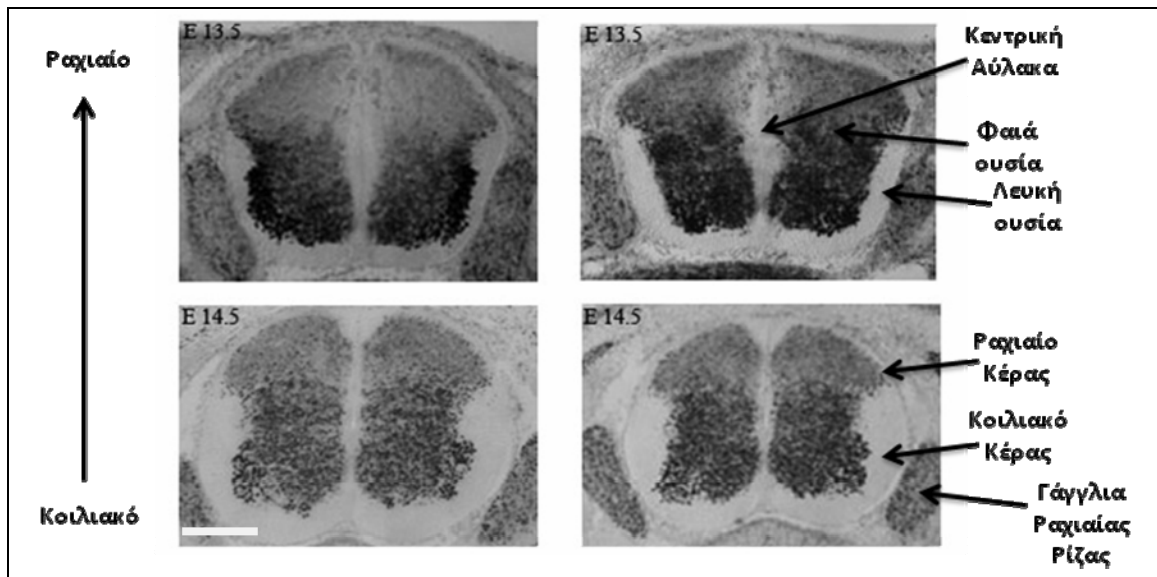
**Εικόνα 1:** Εγκάρσιες τομές νωτιαίου μυελού εμβρύων ηλικίας E11.5. **(A,B)** *In situ* υβριδοποίηση όπου απεικονίζεται έκφραση του γονιδίου *Gtl2* σε δύο διαφορετικά επίπεδα του θωρακικού

τμήματος του νωπιαίου μυελού. Η εικόνα B βρίσκεται σε πιο ουραίο επίπεδο από την εικόνα A. **(C)** Ιστολογική χρώση με Cresyl Violet εγκάρσιας τομής θωρακικού τμήματος του νωπιαίου μυελού, η οποία αντιστοιχεί στο επίπεδο της εικόνας A (Scale bar: 0.641mm/cm).

## **A.2. Εμβρυϊκές ημέρες 13.5 και 14.5**

Κατά τη διάρκεια των εμβρυϊκών ημερών 13.5-14 ο νωπιαίος μυελός δεν έχει πλήρως διαφοροποιηθεί, γεγονός το οποίο γίνεται αντιληπτό από το σχήμα και το μέγεθος της κεντρικής αύλακας (central canal), καθώς και από το συνολικό σχήμα των ραχιαίων και κοιλιακών κεράτων της φαιάς ουσίας. Η κεντρική αύλακα έχει σχήμα διαμαντιού και εκτείνεται στο ραχιαίο τμήμα του μυελού. Αυτού του είδους η μορφολογία αποτελεί ένα ενδιάμεσο στάδιο της τελικής, η οποία επέρχεται κατά τις εμβρυϊκές μέρες 16.5-17.5. Όπως αναφέρθηκε, τα ραχιαία και κοιλιακά κέρατα της φαιάς ουσίας έχουν σχηματιστεί και περιβάλλονται από ένα στρώμα λευκής ουσίας. Καθώς η εξέλιξη του νωπιαίου μυελού προχωράει (E14.5 και έπειτα), τα ραχιαία κέρατα επεκτείνονται περισσότερο προς την περιφέρεια του μυελού, σε σχέση με τα κοιλιακά. Επιπρόσθετα, το ποσοστό της λευκής ουσίας μεταβάλλεται ιδιαίτερα στο κοιλιακό τμήμα του μυελού, καθώς και πλευρικά (Kaufman, 1992).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το πρότυπο έκφρασης του υπό εξέταση γονιδίου, στα συγκεκριμένα στάδια. Τα επίπεδα mRNA που ανιχνεύονται στη συγκεκριμένη περίπτωση, είναι εμφανώς αυξημένα και εντοπίζονται στην περιοχή της φαιάς ουσίας και των γαγγλίων των ραχιαίων ριζών. Μετάγραφα του γονιδίου απουσιάζουν παντελώς από την περιοχή της λευκής ουσίας. Και σε αυτή την περίπτωση υπάρχει διαφορά στην ένταση του σήματος που λαμβάνουμε, ανάμεσα στο ραχιαίο και το κοιλιακό τμήμα του νωπιαίου μυελού. Εικόνα 2.



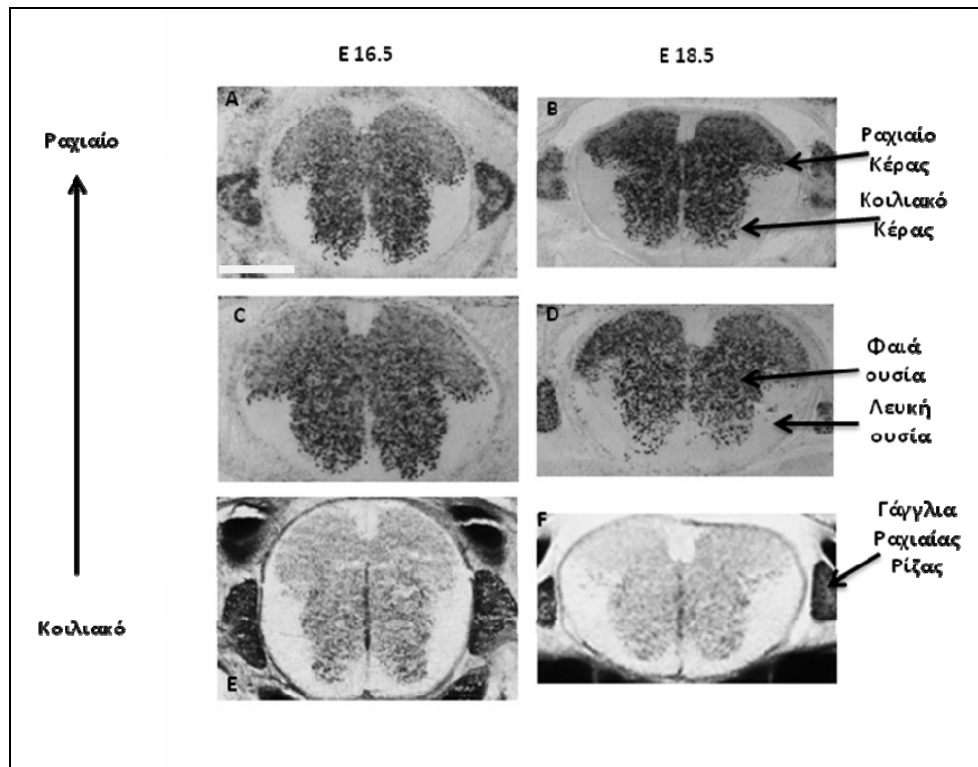
**Εικόνα 2:** *In situ* υβριδοποίηση εγκάρσιων τομών νωτιαίου μυελού σε έμβρυα ηλικίας E13.5 και E14.5. Οι τομές που απεικονίζονται σε αυτή την περίπτωση αντιπροσωπεύουν διαφορετικά επίπεδα του θωρακικού τμήματος του νωτιαίου μυελού, όπως και στην εικόνα 1. Ιδιαίτερα έντονη είναι η έκφραση του γονιδίου *Gtl2* στην φαιά ουσία και στα γάγγλια των ραχιαίων ριζών (Scale bar: 0.641mm/cm).

### A.3. Εμβρυϊκές ημέρες 16.5 και 18.5

Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ημέρας 16.5, ο νωτιαίος μυελός αρχίζει να παίρνει και την τελική του διαμόρφωση. Όπως προαναφέρθηκε, τα ραχιαία και κοιλιακά κέρατα αναπτύσσονται και αναδιατάσσονται μορφολογικά, ενώ η κεντρική αύλακα σχεδόν απουσιάζει. Τα επίπεδα έκφρασης του *Gtl2* διατηρούνται σε αρκετά υψηλά επίπεδα στο νωτιαίο μυελό, φαινόμενο το οποίο παρατηρείται και στον εγκέφαλο, όπου εμφανίζεται και η πρόδρομη μορφή του ιππόκαμπου. Η ένταση του σήματος παραμένει ισχυρή στη φαιά ουσία, όπου εντοπίζονται κυρίως τα κυτταρικά σώματα των νευρώνων, ενώ και εδώ απουσιάζει από τη λευκή ουσία, η οποία εμπεριέχει τους άξονες αυτών. Επιπρόσθετα, τα κυτταρικά σώματα που εντοπίζονται στα γάγγλια των νωτιαίων ριζών, συνεχίζουν να εκφράζουν το γονίδιο το ίδιο ισχυρά, όπως και στις εμβρυϊκές μέρες 13.5 και 14.5. Παρόμοια με τα προηγούμενα αναπτυξιακά στάδια, η διαφορά συνεχίζει να υφίσταται στα επίπεδα έκφρασης ανάμεσα στο ραχιαίο και το κοιλιακό τμήμα του νωτιαίου μυελού.

Το πρότυπο έκφρασης του *Gtl2* και κατά την εμβρυϊκή ημέρα 18.5 αν και ομοιάζει με εκείνο των προηγούμενων εμβρυϊκών ημερών, διαφέρει στο ότι η διαφορετική

έκφραση μεταξύ του ραχιαίου και κοιλιακού τμήματος του νωτιαίου μυελού δεν είναι πλέον ιδιαίτερα εμφανής, όπως στα προηγούμενα στάδια. Εικόνα 3.



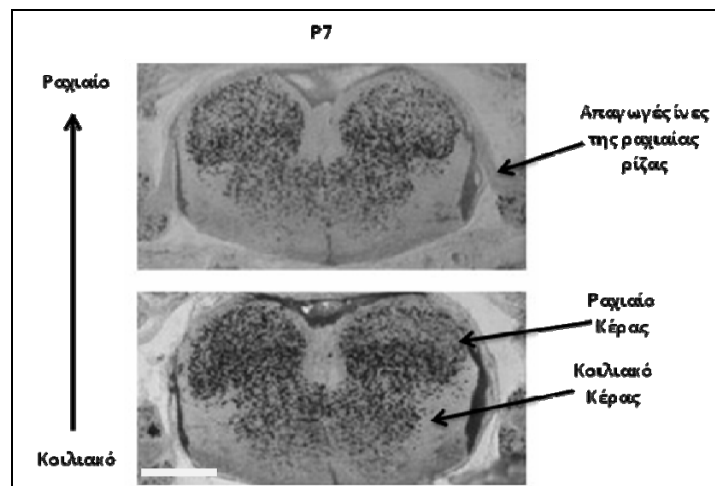
**Εικόνα 3:** Εγκάρσιες τομές νωτιαίου μυελού εμβρύων ηλικίας E16.5 και E18.5 (A,C) *In situ* υβριδοποίηση όπου απεικονίζεται έκφραση του γονιδίου Gtl2 σε δύο διαφορετικά επίπεδα του θωρακικού τμήματος του νωτιαίου μυελού σε E16.5 έμβρυα. 5 (B,D) *In situ* υβριδοποίηση όπου απεικονίζεται έκφραση του γονιδίου Gtl2 σε δύο διαφορετικά επίπεδα του θωρακικού τμήματος του νωτιαίου μυελού σε E18.5 έμβρυα. (F) Ιστολογική χρώση με Cresyl Violet εγκάρσιας τομής θωρακικού τμήματος του νωτιαίου μυελού, (E) E16.5 εμβρύου και (F) E18.5 εμβρύου (Scale bar: 0.641mm/cm).

#### A.4. Μύες 7 ημερών μετά τη γέννηση (P7)

Εκτός από τα διάφορα εμβρυϊκά στάδια ανάπτυξης, εξετάσαμε το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου και σε νωτιαίο μυελό μωών, 7 ημερών μετά τη γέννηση (P7). Σε αυτό το στάδιο, ο νωτιαίος μυελός είναι διαφοροποιημένος, ενώ η μορφολογία του έχει μετατραπεί. Σε αυτή την περίπτωση η ποσοστιαία αναλογία μεταξύ της λευκής και της φαιάς ουσίας αυξάνεται κατά τη μετακίνησή μας από τα ραχιαία προς το κοιλιακό τμήμα της εγκάρσιας τομής. Σε αυτό το στάδιο τα κέρατα της φαιάς ουσίας είναι συνδεδεμένα με τις απαγωγές και προσαγωγές ίνες του συμπαθητικού συστήματος. Σε επίπεδο μορφολογίας κυττάρων, τα κοιλιακά κέρατα περιέχουν μεγάλο αριθμό, μεγάλου μεγέθους κυττάρων, τα οποία αποτελούν τα κυτταρικά σώματα των κινητικών νευρώνων που είναι

υπεύθυνοι για τη νεύρωση των μυών. Αντίθετα, στα ραχιαία κέρατα της φαιάς ουσίας τείνουν να είναι αρκετά μικρότερα και με μικρό κυτταροπλασματικό όγκο (Kaufman, 1992).

Η έκφραση του γονιδίου *Gtl2*, εκτείνεται και πάλι στα κύτταρα της επιφάνειας της φαιάς ουσίας, όπως και στα κυτταρικά σώματα που εδράζουν στα γάγγλια των ραχιαίων ριζών. Η ένταση του σήματος που λαμβάνεται στην προκειμένη περίπτωση, κατά την ανίχνευση του mRNA είναι ικανοποιητική, αν και σαφώς μειωμένη από εκείνη των εμβρυϊκών ημερών. Η διαφορετικής έντασης έκφραση μεταξύ του ραχιαίου και του κοιλιακού τμήματος είναι πλέον λιγότερο εμφανής, όπως και στην περίπτωση E18.5 εμβρύων. Εικόνα 4.



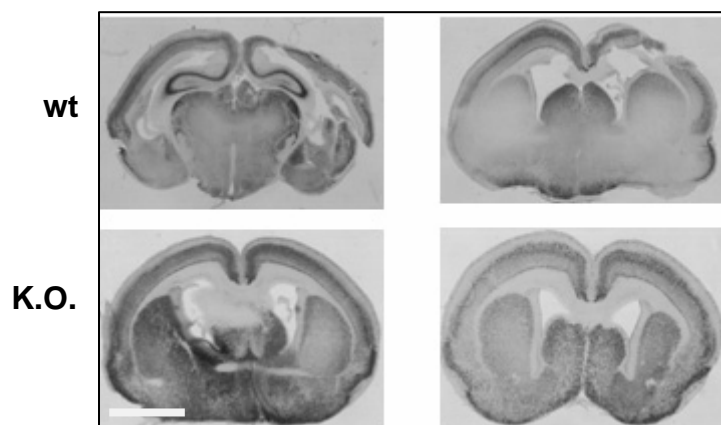
**Εικόνα 4:** *In situ* υβριδοποίηση εγκάρσιων τομών νωτιαίου μυελού σε μύες ηλικίας P7. Οι τομές που απεικονίζονται σε αυτή την περίπτωση αντιπροσωπεύουν διαφορετικά επίπεδα του θωρακικού τμήματος του νωτιαίου μυελού. Διαφαίνεται το εύρος της έκφρασης του γονιδίου *Gtl2* στην φαιά ουσία και στα γάγγλια των ραχιαίων ριζών (Scale bar: 0.641 mm/cm).



#### **A.5. Μελέτη του προτύπου έκφρασης του γονιδίου Gtl2 σε εγκεφάλους όπου το γονίδιο έχει μεταλλαχθεί.**

Σε αυτό το τμήμα της εργασίας, έγινε μια προσπάθεια μελέτης των επιπτώσεων που μπορεί να προκαλέσει η αλλοίωση της αρχιτεκτονικής του γονιδίου Gtl2 στο σχηματισμό και την ανάπτυξη του εγκεφαλικού φλοιού. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκαν τομές εγκεφάλου μυών στα οποία μέρος του υποκινητή του γονιδίου έχει απομακρυνθεί και στη θέση του έχει προστεθεί neo κασέτα. Αυτή η μετατροπή είχε σαν αποτέλεσμα τη μη ορθή γονιδιακή αποτύπωση του Gtl2 και την ταυτόχρονη υπερ-έκφρασή του από το πατρικό χρωμόσωμα (Carr et al., 2007). Οι μύες που μας χορηγήθηκαν εμφάνιζαν πατρική κληρονομία του διαγονιδίου.

Δυστυχώς μια σειρά προβλημάτων που προέκυψαν δεν κατέστησαν δυνατή τη διεξαγωγή συγκρίσιμων αποτελεσμάτων και άρα των επιθυμητών συμπερασμάτων. Οι περισσότεροι από τους ιστούς που παραλάβαμε ήταν κατεστραμμένοι σε αρκετά σημεία. Επίσης η ποιότητά τους ήταν τέτοια ώστε η απόκτηση συνεχών και καλής ποιότητας τομών κρυοτόμου ήταν αρκετά δύσκολη. Τέλος και ενώ ο αρχικός μας στόχος ήταν η μορφολογική παρατήρηση των δειγμάτων με την υποβολή των τομών σε διάλυμα χρώσης Cresyl Violet, κάτι τέτοιο κατέστη αδύνατο μιας και οι ιστοί ήταν ιδιαίτερα ευαίσθητοι σε αυτού του είδους την επεξεργασία. Χαρακτηριστικά, κατά τη μεταφορά τους στο διάλυμα, μεγάλα τμήματα των τομών ή ακόμα και ολόκληρες τομές αποκολληθήκαν και καταστραφήκαν. Αν και μερικές υβριδοποιήσεις *in situ* έγιναν (εικόνα 5) σε καμία περίπτωση δεν καταφέραμε να αποκτήσουμε συγκρίσιμα αποτελέσματα.



**Εικόνα 5:** *In situ* υβριδοποίηση εγκάρσιων τομών φλοιού σε μύες ηλικίας P7. Οι τομές που απεικονίζονται σε αυτή την περίπτωση αντιπροσωπεύουν διαφορετικά επίπεδα του φλοιού Gtl2 wt και μεταλλαγμένων μυών. (Scale bar: 2mm/cm).

Όπως παρατηρούμε και από την εικόνα, η έκφραση του Gtl2 είναι εμφανής τόσο στους wt όσο και στους K.O. μύες. Η έκφραση του γονιδίου είναι σαφώς εντονότερη στους εγκεφάλους των K.O. μυών αν και από την παρατήρηση της εικόνας μόνο, το συγκεκριμένο συμπέρασμα δεν θεωρείται αξιόπιστο μιας και τα επίπεδα των τομών είναι διαφορετικά. Η έκφραση του γονιδίου είναι έντονη και εντοπίζεται στις στιβάδες του φλοιού, στον ιππόκαμπο, στο θάλαμο, την αμυγδαλή και στην προ-οπτική περιοχή. Οι περιοχές του εγκεφάλου στις οποίες ανιχνεύεται το mRNA του γονιδίου είναι όμοιες με εκείνες που περιγραφικά κατά την ανάλυση του προτύπου έκφρασης στο φλοιό φυσιολογικών μυών από το εργαστήριό μας (McLaughlin et al., 2005).

Στη συνέχεια ακολούθησε μια σειρά υβριδισμών *in situ* με μάρτυρες χαρακτηριστικούς των στοιβάδων του φλοιού, όπως ο RORB και ο ER81. Σε αυτή την περίπτωση δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά στην έκφραση και τον εντοπισμό των συγκεκριμένων μορίων (data not shown). Παρόλα αυτά η παραπάνω παρατήρηση γίνεται με κάθε επιφύλαξη μιας και σε αυτή την περίπτωση δεν αποκτήθηκαν συγκρίσιμες εικόνες και για το συγκεκριμένο λόγο δεν παρατίθενται στην παρούσα εργασία.

## **B. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης πέντε γονιδίων στο φλοιό και τον προμήκη μυελό σε TAG-1 wt και K.O. μύες.**

Στο δεύτερο αυτό τμήμα των αποτελεσμάτων γίνεται μια προσπάθεια εύρεσης και μελέτης μορίων, των οποίων τα επίπεδα έκφρασης επηρεάζονται κατά την απουσία της πρωτεΐνης TAG-1, στον εγκεφαλικό φλοιό και τον προμήκη μυελό των μυών. Η TAG-1 είναι ένα νευρωνικό μόριο κυτταρικής συνάφειας της υπερ-οικογένειας των ανοσοσφαιρινών το οποίο εκφράζεται στο οσφρητικό σύστημα, το νεοφλοιό, την αναπτυσσόμενη παρεγκεφαλίδα, τον ιππόκαμπο, το νωτιαίο μυελό και στις εμμύελες ίνες του περιφερικού και του κεντρικού νευρικού συστήματος. Πέρα από την ευρεία έκφρασή της στο νευρικό σύστημα των θηλαστικών, εμπλέκεται και σε έναν αριθμό διεργασιών όπως η διαμεσολάβηση της κυτταρικής συνάφειας των νευρικών κυττάρων, η αύξηση του μήκους των νευριτών, η καθοδήγηση των αξόνων και η μυελίνωση. Παρόλα αυτά, ο μηχανισμός με τον οποίο δρα, όπως και το πλήθος των μορίων με τα οποία αλληλεπιδρά σε κάθε περίπτωση δεν έχουν διευκρινιστεί. Για ο σκοπό αυτό, παρουσιάζεται μια σειρά πειραματικών προσεγγίσεων προς απάντηση των παραπάνω ερωτημάτων και άρα την σταδιακή αποκάλυψη του φυσιολογικού και λειτουργικού ρόλου της TAG-1 στο νευρικό σύστημα των θηλαστικών.

### **B.1. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων L1 και NCAM σε φλοιό και προμήκη μυελό TAG-1 wt και K.O. μυών, με την εφαρμογή της ποσοτικής Real time PCR.**

Η τεχνική της Real time PCR μας επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του cDNA του γονιδίου στόχου (και επομένως του mRNA που μεταγράφεται από το γονίδιο αυτό) σε δείγμα άγνωστης συγκέντρωσης σε σχέση με ένα ενδογενές σύστημα αναφοράς, που συνήθως είναι ένα γνωστό γονίδιο η έκφραση του οποίου ελάχιστα μεταβάλλεται. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το γονίδιο που επιλέχθηκε ήταν αυτό της GAPDH (γονίδιο που κωδικοποιεί για το μεταβολικό ένζυμο αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης).

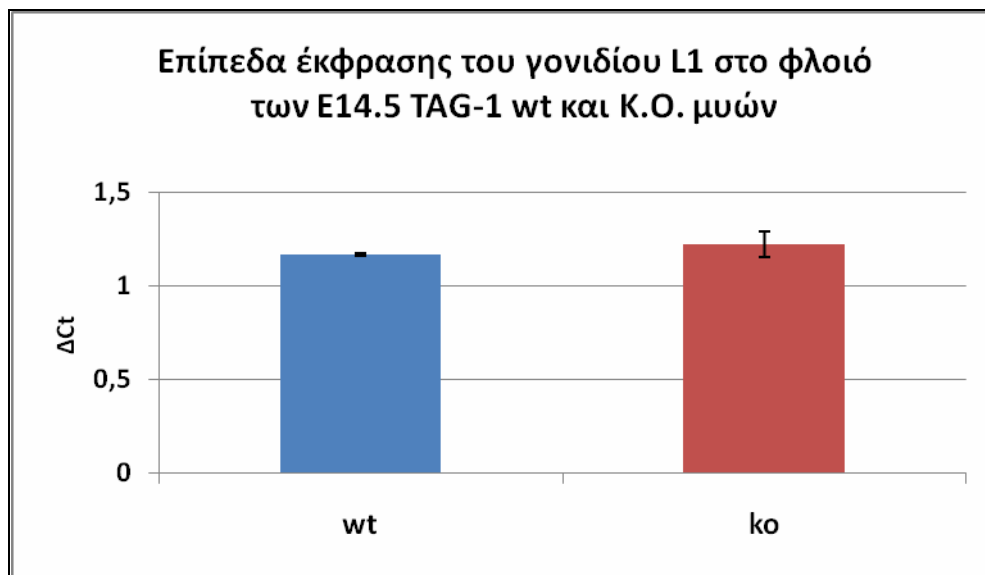
Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, οι πρωτεΐνες L1 και NCAM αποτελούν μέλη δύο βασικών υποοικογενειών των IgSF NCAMs. Επίσης, οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με την TAG-1 (βλέπε Εισαγωγή). Αρχικά λοιπόν εξετάστηκε εάν τα επίπεδα έκφρασης των συγκεκριμένων πρωτεϊνών επηρεάζονται στο επίπεδο της μεταγραφής, στα TAG-1 K.O. ζώα. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκαν δύο περιοχές του εγκεφάλου, ο φλοιός και ο προμήκης μυελός, από μύες ηλικίας E14.5. Το συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο είναι αρκετά κρίσιμο για την ανάπτυξη του εγκεφάλου, μιας τότε ξεκινά η μετανάστευση των νευρώνων προς τις διάφορες περιοχές του φλοιού.

Από τα συγκεκριμένα είδη ιστών απομονώθηκε το συνολικό τους RNA και χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω για τη δημιουργία του αντίστοιχου κάθε φορά cDNA. Ακολούθησε ο σχεδιασμός των primers, ειδικών για τις κωδικές περιοχές, των γονιδίων L1 και NCAM. Στη συνέχεια, το εκάστοτε ζεύγος primers υποβλήθηκε σε μια σειρά αντιδράσεων Real time PCR χρησιμοποιώντας ως template cDNA φλοιού εγκεφάλου ηλικίας P8, με σκοπό την εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας και συγκέντρωσης υποστρώματος για τη διεξαγωγή των αντιδράσεων και την απόκτηση αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

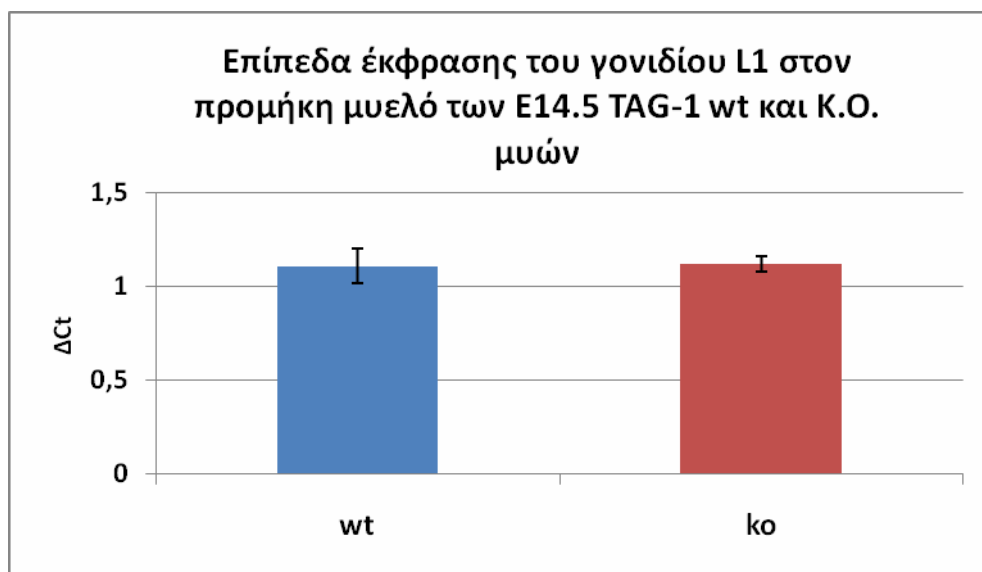
Και στις δύο περιπτώσεις, η βέλτιστη θερμοκρασία αναδιάταξης των primers ήταν οι 56°C ενώ η ποσότητα του template που προστέθηκε ήταν τα 30ng. Σε κάθε

αντίδραση, το κάθε δείγμα εξεταζόταν 2 φορές (duplicates), ενώ οι αντιδράσεις επαναλήφθηκαν 3 φορές για το κάθε γονίδιο.

Τα τελικά αποτελέσματα των Real time PCR για τα γονίδια L1 και NCAM συνοψίζονται στα παρακάτω διαγράμματα.

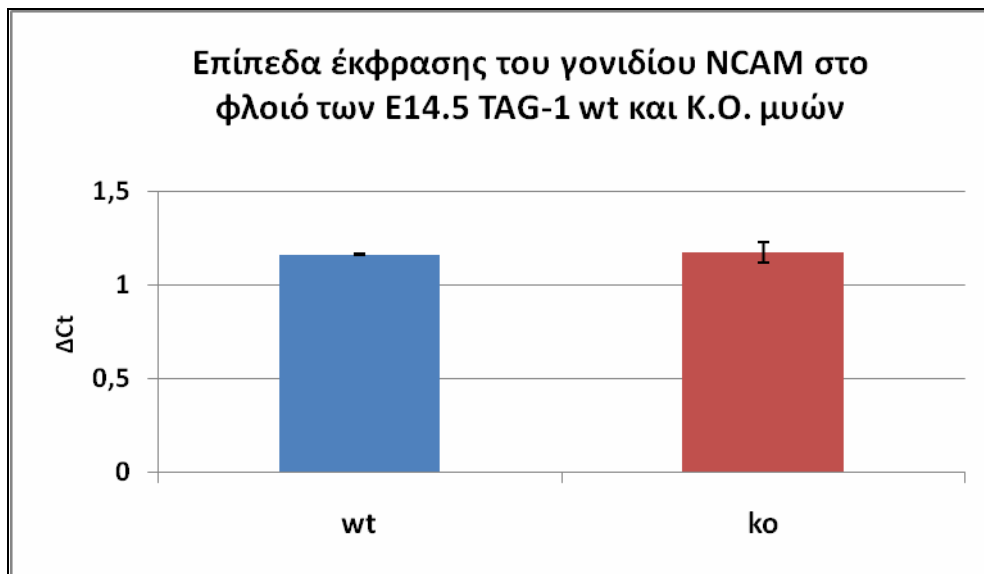


**Γράφημα 1.:** Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου L1 στο φλοιό του εγκεφάλου των TAG-1 wt και K.O. μυών. Για το συγκεκριμένο γράφημα συνδυάστηκαν τα αποτελέσματα τριών επαναλήψεων πανομοιότυπων αντιδράσεων. Το τυπικό σφάλμα αντιστοιχεί στην τυπική απόκλιση μεταξύ των αποτελεσμάτων των 3 επαναλήψεων.

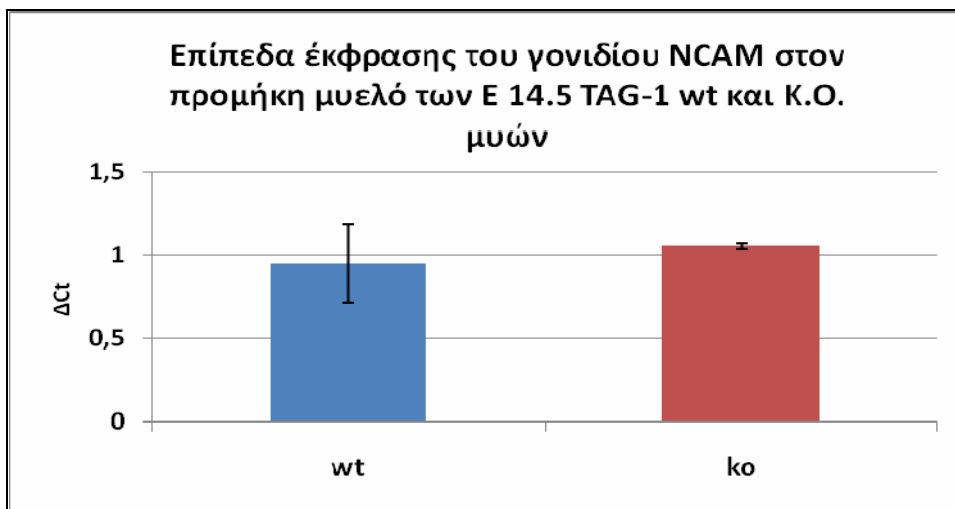


**Γράφημα 2.:** Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου L1 στον προμήκη μυελό του εγκεφάλου των TAG-1 wt και K.O. μυών. Για το συγκεκριμένο γράφημα συνδυάστηκαν τα αποτελέσματα τριών επαναλήψεων πανομοιότυπων αντιδράσεων. Το τυπικό σφάλμα αντιστοιχεί στην τυπική απόκλιση μεταξύ των αποτελεσμάτων των 3 επαναλήψεων.

Όπως φαίνεται και από τα γραφήματα 1 και 2, τόσο στο φλοιό όσο και στον προμήκη μυελό των TAG-1 K.O. μυών, δε σημειώνεται κάποια μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της L1. Παρόμοια δεδομένα λήφθηκαν και για το γονίδιο της NCAM στο φλοιό και τον προμήκη μυελό, όπως φαίνεται και από τα γραφήματα 3 και 4 που ακολουθούν.



**Γράφημα 3.:** Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου NCAM στο φλοιό του εγκεφάλου των TAG-1 wt και K.O. μυών. Για το συγκεκριμένο γράφημα συνδυάστηκαν τα αποτελέσματα τριών επαναλήψεων πανομοιότυπων αντιδράσεων. Το τυπικό σφάλμα αντιστοιχεί στην τυπική απόκλιση μεταξύ των αποτελεσμάτων των 3 επαναλήψεων.



**Γράφημα 4.:** Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου NCAM στον προμήκη μυελό του εγκεφάλου των TAG-1 wt και K.O. μυών. Για το συγκεκριμένο γράφημα συνδυάστηκαν τα αποτελέσματα τριών επαναλήψεων πανομοιότυπων αντιδράσεων. Το τυπικό σφάλμα αντιστοιχεί στην τυπική απόκλιση μεταξύ των αποτελεσμάτων των 3 επαναλήψεων.

## **B.2. Microarray ανάλυση των επιπέδων έκφρασης γονιδίων στο φλοιό και τον προμήκη μυελό σε TAG-1 wt και K.O. μύες.**

Η ανάπτυξη των DNA microarrays άνοιξε το δρόμο για την ταυτόχρονη μελέτη της έκφρασης πολλών χιλιάδων γονιδίων. Η ανάπτυξη της μεθοδολογίας αυτών έγινε δυνατή εκτός των άλλων και από τις σημαντικές προόδους στην αλληλούχηση του γενετικού υλικού πολλών οργανισμών.

Σε μία τυπική εφαρμογή ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης ενός βιολογικού συστήματος, ακινητοποιούνται σε σταθερό υπόστρωμα χιλιάδες διαφορετικοί ιχνηθέτες, καθένας από τους οποίους χρησιμοποιείται για την ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου με το οποίο εμφανίζει συμπληρωματικότητα. Οι ιχνηθέτες εναποτίθενται (ή συντίθενται) με τη χρήση ρομποτικών συστημάτων, με συγκεκριμένη διάταξη σε κατάλληλα κατεργασμένες επιφάνειες αντικειμενοφόρων πλακών ή σε μεμβράνες υβριδισμού.

Μετά την ακινητοποίηση των ιχνηθετών κάθε microarray υβριδίζεται με το μείγμα των σημασμένων νουκλεϊνικών οξέων και αναλύεται το σήμα διαδοχικά σε κάθε ένα από τα επιμέρους στοιχεία της συστοιχίας με αυτόματα συστήματα ανάλυσης. Τα σημασμένα μόρια, σε αντίθεση με τους υβριδισμούς κατά Southern ή Northern, δεν αντιστοιχούν σε ένα στόχο, αλλά επειδή αποτελούν το σημασμένο μίγμα που προκύπτει από το συνολικό mRNA που εκφράζει το βιολογικό σύστημα στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες, θα αναγνωρίσουν χιλιάδες διαφορετικούς στόχους. Επειδή κάθε επιμέρους στοιχείο της μικροσυστοιχίας αντιστοιχεί σε ένα γονίδιο, θα υβριστεί με το σημασμένο μόριο που δημιουργήθηκε με μήτρα το mRNA που μεταγράφεται από το συγκεκριμένο γονίδιο. Η ένταση του σήματος σε κάθε στοιχείο είναι ανάλογη των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου.

Η τεχνολογία αυτή επιτρέπει την ταυτόχρονη μελέτη της έκφρασης χιλιάδων γονιδίων σε συγκεκριμένες πειραματικές επεμβάσεις και την αναγνώριση συγκεκριμένων μεταβολικών μονοπατιών.

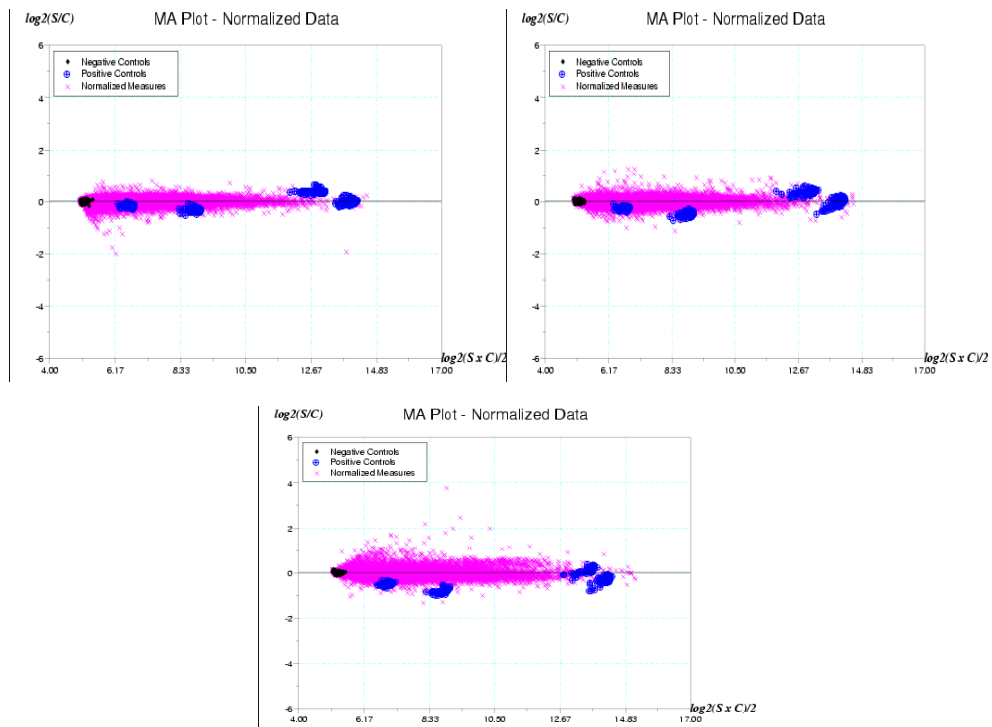
Στην προσπάθειά μας να εντοπίσουμε το σύνολο των γονιδίων των οποίων η έκφραση επηρεάζεται από την απουσία της TAG-1, αποφασίσαμε να συγκεντρώσουμε βιολογικά δείγματα φλοιού και προμήκους μυελού από TAG-1 wt και K.O. ζώα, ηλικίας E14.5, με σκοπό να σταλούν για microarray ανάλυση. Τρεις βιολογικές ρεπλικές από κάθε είδος ιστού συγκεντρώθηκαν και το RNA αυτών απομονώθηκε. Το σύνολο των δειγμάτων στάλθηκε στην Oryzon Genomics SA (Barcelona/Spain). Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα γραφήματα που προέκυψαν μετά από την αυτοματοποιημένη μέτρηση της έντασης των spots και την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Σε κάθε γράφημα το κάθε σημείο (ροζ ή μπλε) αντιστοιχεί σε έναν probe των microarrays. Οι τιμές της μεταβλητής M (κάθετος άξονας), αντιστοιχούν στο λογάριθμο του λόγου της διαφορετικής έκφρασης (log-differential expression). Οι τιμές της μεταβλητής A (οριζόντιος άξονας) αντιστοιχούν στη λογαριθμική ένταση του κάθε spot. Οι μεταβλητές M και A υπολογίζονται από την ένταση του πράσινου και κόκκινου χρώματος των spots.

$$M = \log_2 (\text{Κόκκινο} / \text{Πράσινο})$$

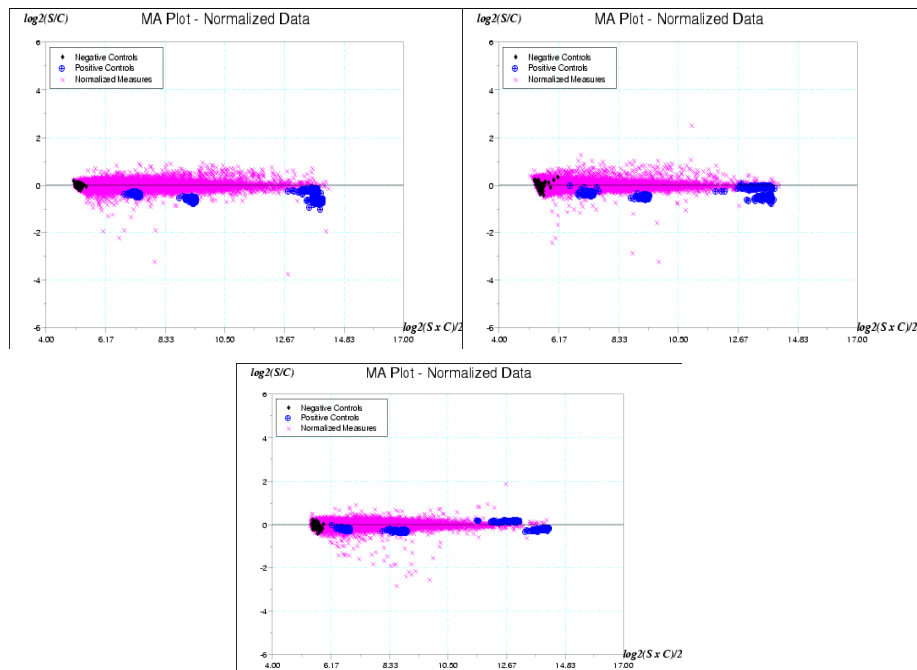
$$A = \log_2 (\sqrt{\text{κόκκινο} + \text{πράσινο}})$$

Σε κάθε γράφημα, οι θετικές τιμές απεικονίζουν γονίδια τα οποία υπερεκφράζονται, ενώ οι αρνητικές τιμές σε γονίδια των οποίων η έκφραση είναι μειωμένη. Τα σημεία τα οποία εντοπίζονται πιο δεξιά στον οριζόντιο άξονα παρουσιάζουν μεγαλύτερο ποσοστό έκφρασης από εκείνα που βρίσκονται πιο αριστερά.





**Εικόνα 6.:** Σύνολο γραφημάτων που προκύπτουν από τις τιμές των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που προέκυψαν από τους υβριδισμούς των δειγμάτων προμήκους μυελού TAG-1 wt και Κ.Ο. μυών. Από αριστερά προς τα δεξιά παρουσιάζονται τα γραφήματα της Α και Β ομάδας, ενώ το κάτω γράφημα αντιπροσωπεύει την ομάδα C. Με ροζ χρώμα απεικονίζονται οι τιμές των γονιδίων που έδωσαν θετικό ή αρνητικό σήμα, ενώ με μπλε και μαύρο χρώμα απεικονίζονται τα θετικά και αρνητικά control.



**Εικόνα 7.:** Σύνολο γραφημάτων που προκύπτουν από τις τιμές των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που προέκυψαν από τους υβριδισμούς των δειγμάτων φλοιού TAG-1 wt και Κ.Ο. μυών. Από αριστερά προς τα δεξιά παρουσιάζονται τα γραφήματα της Α και Β ομάδας, ενώ το κάτω γράφημα αντιπροσωπεύει την ομάδα C. Με ροζ χρώμα απεικονίζονται οι τιμές των γονιδίων που έδωσαν θετικό ή αρνητικό σήμα, ενώ με μπλε και μαύρο χρώμα απεικονίζονται τα θετικά και αρνητικά control.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων με το σύνολο των γονιδίων παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 1.** Συνολικός αριθμός up- και down-regulated γονιδίων σε φλοιό και προμήκη μυελό των TAG-1 Κ.Ο. μυών σε σχέση με των TAG-1 wt.

Είδος ιστού	Αριθμός up-regulated γονιδίων/ εύρος τιμών	Αριθμός down-regulated γονιδίων/εύρος τιμών
Φλοιός	133(+2.33 ως +1.22)	274 (-2.89 ως -1.20)
Προμήκης μυελός	67 (+2.29 ως +1.21)	230 (-2.39 ως -1.21)

Σύμφωνα με τα δεδομένα της συγκεκριμένης εταιρίας, οι τιμές των ποσοστών μεταβολής των επιπέδων έκφρασης (folds) υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας λογαριθμική κλίμακα και σύμφωνα με τον τύπο:

$$FC = \text{Ratio} = \text{Sample Expression} / \text{Control expression} (\text{ratio} > 1)$$

$$FC = -1 / \text{Ratio} = \text{Control Expression} / \text{Sample expression} (\text{ratio} < 1)$$

Επομένως μια τιμή όπως, π.χ. +1.50, αντιστοιχεί σε αύξηση των επιπέδων έκφρασης κατά 50%.

Στα αποτελέσματα της microarray ανάλυσης δεν εμφανίζονται καθόλου γονίδια τα οποία είναι γνωστό πως οι πρωτεΐνες που παράγουν αλληλεπιδρούν με την TAG-1, όπως η L1 και NCAM που εξετάστηκαν παραπάνω. Από την πληθώρα των γονιδίων επιλέξαμε ένα μικρό αριθμό αυτών προς επιβεβαίωση μέσω της Real time PCR. Πίνακας 2.

**Πίνακας 2.** Στοιχεία των γονιδίων που επιλέχθηκαν για επιβεβαίωση της microarray ανάλυσης, με Real time PCR

Όνομα γονιδίου	Προμήκης Μυελός		Φλοιός	
	Up-regulation	Down-regulation	Up-regulation	Down-regulation
<b>PlekhJ1 (pleckstrin homology domain containing, family J member 1)</b>	-	-	-	<b>-1.96</b>
<b>Cdc42 (Cell division cycle 42)</b>	-	<b>-1.46</b>	-	<b>-1.23</b>

<b>Nln2 (Neuroigin 2)</b>	<b>+1.37</b>	-	-	-
---------------------------	--------------	---	---	---

Η επιλογή αυτών των γονιδίων έγινε ως εξής: το γονίδιο *Plekhj1* επιλέχθηκε με βάση το υψηλό ποσοστό μείωσης των επιπέδων έκφρασης (96%) στο φλοιό των TAG-1 K.O. μυών σε σχέση με εκείνο των wt. Τα επόμενα γονίδια, αν και εμφανίζουν χαμηλότερα fold αλλοίωσης των επιπέδων έκφρασής τους επιλέχθηκαν με βάση την βιολογική τους σημασία, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (βλέπε Συζήτηση).

### **B.1. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *Plekhj1*, *Nlgn2* και *Cdc42* σε φλοιό και προμήκη μυελό TAG-1 wt και K.O. μυών, με την εφαρμογή της ποσοτικής Real time PCR.**

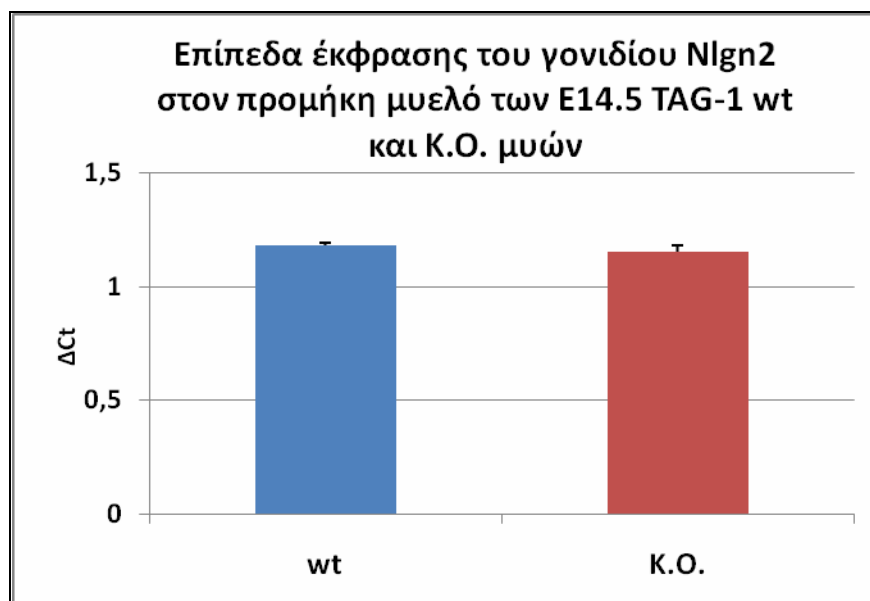
Η microarray ανάλυση στηρίζεται σε υβριδισμούς που γίνονται σε μικροκλίμακα και αφορούν χιλιάδες επιμέρους στόχους, γι' αυτό τα αποτελέσματα είναι ευαίσθητα σε μια σειρά εξωτερικών και εσωτερικών παραμέτρων. Διακυμάνσεις στο βιολογικό υλικό ή στην ποιότητα του RNA αλλά και η διαδικασία ανάλυσης των αποτελεσμάτων αποτελούν ένα μέρος μόνο των παραμέτρων που εισάγουν σφάλμα στα πειραματικά αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών.

Για την αποφυγή ψευδών αποτελεσμάτων στο πεδίο των μικροσυστοιχιών, έχει υιοθετηθεί η διεξαγωγή επιβεβαιωτικών πειραμάτων, για τον έλεγχο της αξιοπιστίας των αρχικών δεδομένων. Για το σκοπό αυτό επιλέγονται τεχνικές όπως η τεχνική της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time quantitative PCR). Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου που την καθιστούν την πλέον κατάλληλη για την επιβεβαίωση πειραμάτων υβριδισμού είναι η υψηλή ειδικότητα και η δυνατότητα ποσοτικής ανίχνευσης μορίων ελάχιστης συγκέντρωσης μέσα σε ένα μίγμα.

Και σε αυτή την περίπτωση, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με εκείνη που εφαρμόστηκε για τα γονίδια *L1* και *NCAM*. Θυμίζοντας, αρχικά απομονώθηκε ο φλοιός και ο προμήκης μυελός E14.5 TAG-1 wt και K.O. μυών. Από τα συγκεκριμένα είδη ιστών απομονώθηκε το συνολικό τους RNA και χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω για τη δημιουργία του αντίστοιχου κάθε φορά

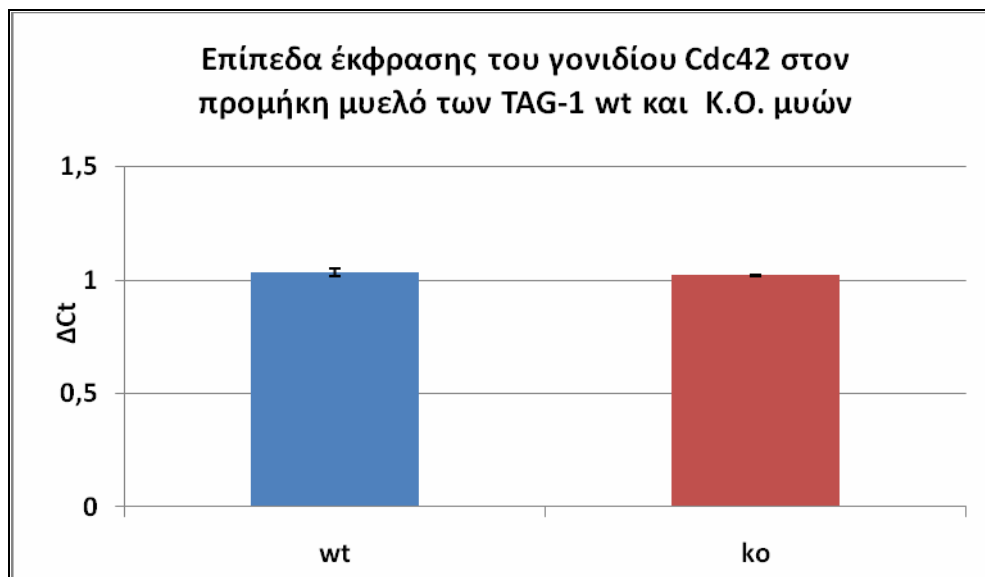
cDNA. Ακολούθησε ο σχεδιασμός των primers, ειδικών για τις κωδικές περιοχές των γονιδίων. Στη συνέχεια, το εκάστοτε ζεύγος primers υποβλήθηκε σε μια σειρά αντιδράσεων Real time PCR χρησιμοποιώντας ως template cDNA φλοιού εγκεφάλου ηλικίας P8, με σκοπό την εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας και συγκέντρωσης υποστρώματος για τη διεξαγωγή των αντιδράσεων και την απόκτηση αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Το γονίδιο της GAPDH χρησιμοποιήθηκε και εδώ ως το ενδογενές γονίδιο αναφοράς.

Σε όλες τις περιπτώσεις, η βέλτιστη θερμοκρασία αναδιάταξης των primers ήταν επίσης οι 56°C ενώ η ποσότητα του template που προστέθηκε ήταν τα 30ng. Σε κάθε αντίδραση, το κάθε δείγμα εξεταζόταν 2 φορές (duplicates), ενώ οι αντιδράσεις επαναλήφθηκαν 3 φορές για το κάθε γονίδιο. Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων αποδίδονται με την κάτωθι σειρά γραφημάτων.

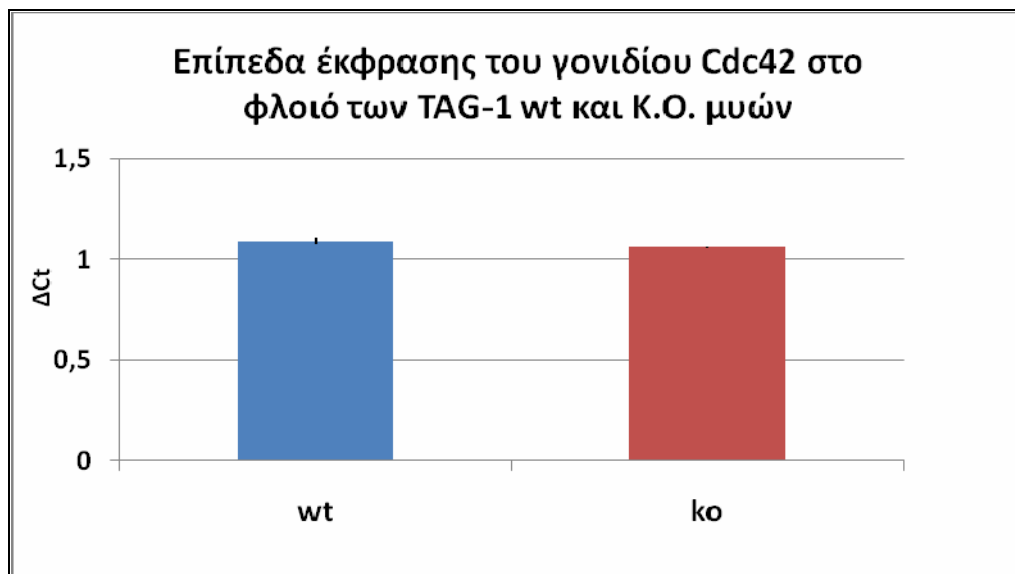


**Γράφημα 5.:** Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου Nlgn2 στον προμήκη μυελό του εγκεφάλου των TAG-1 wt και K.O. μυών. Για το συγκεκριμένο γράφημα συνδυάστηκαν τα αποτελέσματα τριών επαναλήψεων πανομοιότυπων αντιδράσεων. Το τυπικό σφάλμα αντιστοιχεί στην τυπική απόκλιση μεταξύ των αποτελεσμάτων των 3 επαναλήψεων.

Αντίθετα με τα αποτελέσματα των microarrays, τα αποτελέσματα της Real-time PCR δεν επιβεβαιώνουν την κατά 37% αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου Nlgn2 στον προμήκη μυελό των TAG-1 K.O. μυών σε σχέση με τους wt μύες. Όπως φαίνεται και από το γράφημα, οι τυπικές αποκλίσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων κάθε αντίδρασης είναι ιδιαίτερα μικρές.



**Γράφημα 6.:** Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου Cdc42 στον προμήκη μυελό του εγκεφάλου των TAG-1 wt και Κ.Ο. μυών. Για το συγκεκριμένο γράφημα συνδυάστηκαν τα αποτελέσματα τριών επαναλήψεων πανομοιότυπων αντιδράσεων. Το τυπικό σφάλμα αντιστοιχεί στην τυπική απόκλιση μεταξύ των αποτελεσμάτων των 3 επαναλήψεων.

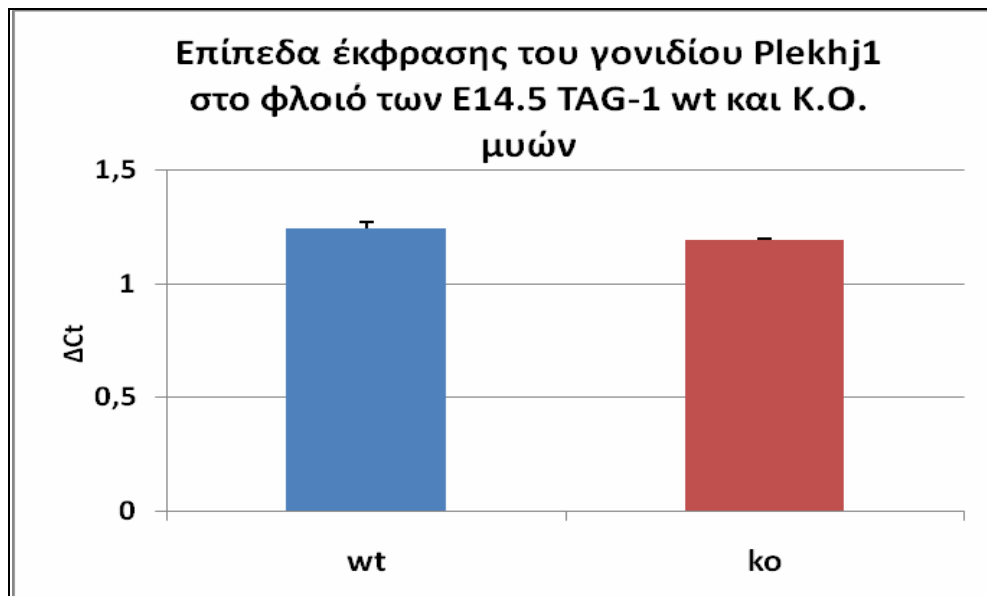


**Γράφημα 7.:** Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου Cdc42 στο φλοιό του εγκεφάλου των TAG-1 wt και Κ.Ο. μυών. Για το συγκεκριμένο γράφημα συνδυάστηκαν τα αποτελέσματα τριών επαναλήψεων πανομοιότυπων αντιδράσεων. Το τυπικό σφάλμα αντιστοιχεί στην τυπική απόκλιση μεταξύ των αποτελεσμάτων των 3 επαναλήψεων.

Δυστυχώς, και σ' αυτή την περίπτωση αντίθετα με τα αποτελέσματα της microarray ανάλυσης που έδειξαν 46% μείωση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου Cdc42 στον προμήκη μυελό των TAG-1 Κ.Ο. ζώων, όπως και 23% μείωση στο φλοιό αυτών, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την Real time

PCR δεν επιβεβαιώνουν τα παραπάνω. Επίσης, και εδώ, οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων ανά αντίδραση είναι ελάχιστες.

Το γονίδιο της *Plekhj1*, σύμφωνα με τα δεδομένα της microarray ανάλυσης, αναμένεται να εμφανίσει 96% μείωση των επιπέδων έκφρασής του στο φλοιό των TAG-1 Κ.Ο. μυών σε σχέση με τα wt. Και στην προκειμένη περίπτωση τα αποτελέσματα της Real time PCR αντικρούουν αυτά των microarrays, όπως φαίνεται και στο γράφημα 8, όπου σε καμία περίπτωση δεν παρατηρείται τέτοιου μεγέθους μείωση.



**Γράφημα 8.:** Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Plekhj1* στο φλοιό του εγκεφάλου των TAG-1 wt και Κ.Ο. μυών. Για το συγκεκριμένο γράφημα συνδυάστηκαν τα αποτελέσματα τριών επαναλήψεων πανομοιότυπων αντιδράσεων. Το τυπικό σφάλμα αντιστοιχεί στην τυπική απόκλιση μεταξύ των αποτελεσμάτων των 3 επαναλήψεων.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### A. Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου Gtl2

Ο γονιδιακός τόπος Gtl2 (Gene trap locus 2) ανακαλύφθηκε κατά την προσπάθεια παγίδευσης γονιδίων με χωρο-χρονικά καθορισμένο πρότυπο έκφρασης κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη των τρωκτικών (Schuster-Gossler et al., 1994). Η έκφρασή του παρατηρήθηκε στους σωματίτες, στους μυοβλάστες, στους σκελετικούς μυς και σε διάφορες περιοχές του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος και ιδιαίτερα στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο (Schuster-Gossler et al., 1994; McLaughlin et al., 2005; Da Rocha et al., 2007). Το συγκεκριμένο γονίδιο χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 12 των μυών, ενώ ομόλογό του έχει βρεθεί και στον άνθρωπο και φέρει το όνομα Meg3 (Maternally expressed gene 3). Δρα ως non-coding RNA μιας και δεν είναι ικανό να παράγει κάποιο πρωτεϊνικό προϊόν, ενώ παράλληλα κωδικοποιεί για πολλαπλά, μικρού μήκους RNA μόρια, μέσω εναλλακτικού ματίσματος, τα οποία όμως δεν παρουσιάζουν κάποιο συντηρημένο πλαίσιο ανάγνωσης (Schuster-Gossler et al., 1998).

Αποτελεί ένα από τα γονίδια που υφίστανται γονιδιακή αποτύπωση. Τα αποτυπωμένα γονίδια φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την ανάπτυξη του οργανισμού (Reik and Walter, 2002), ενώ όλο και περισσότερο αυξάνονται οι πιθανότητες συμμετοχής τους στη διαδικασία της ανάπτυξης του νευρικού και της συμπεριφοράς του οργανισμού (Davies et al., 2005). Η χρωμοσωμική περιοχή στην οποία χαρτογραφείται φαίνεται να έχει συνδεθεί με την ασθένεια της μονογονεϊκής δυσωμίας στον άνθρωπο, ενώ στα τρωκτικά, η μεταφορά του μεταλλαγμένου γονιδίου από τον πατέρα, προκάλεσε προβλήματα στην ανάπτυξη των οργανισμών (Schuster-Gossler et al., 1994).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου στο νωτιαίο μυελό των μυών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκάλεσε το αποτέλεσμα microarray ανάλυσης σύμφωνα με την οποία το συγκεκριμένο γονίδιο παρουσίαζε διαφορές στο πρότυπο έκφρασης μεταξύ πρόσθιου και οπίσθιου τελεγκέφαλου και μάλιστα μεταξύ ραχιαίου και κοιλιακού τμήματος. Αρχικά,

εφαρμόσθηκε μια σειρά πειραμάτων που καθόρισαν το πρότυπο έκφρασης του Gtl2 σε τομές πρόσθιου εγκεφάλου σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια (McLaughlin et al., 2005). Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι το εν' λόγω γονίδιο παρουσιάζει έντονη έκφραση στον κοιλιακό τελεγκέφαλο, στο διεγκέφαλο, στο νεοφλοιό και στον ιππόκαμπο, από την εμβρυϊκή ημέρα 12.5.

Στην παρούσα εργασία, έγινε μια σειρά πειραμάτων υβριδοποίησης *in situ* καθώς και ιστολογική χρώση σε εγκάρσιες τομές νωτιαίου μυελού σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Έντονη έκφραση παρατηρήθηκε από την εμβρυϊκή μέρα 11.5 στην περιφέρεια του νευρικού σωλήνα και με ιδιαίτερα έντονη έκφραση στο κοιλιακό τμήμα αυτού. Χαρακτηριστική ήταν και η αρκετά χαμηλή έκφραση στα γάγγλια ραχιαίων ριζών.

Από την εμβρυϊκή ημέρα 13.5 έως την 16.5, όπου ο νωτιαίος μυελός αρχίζει και αποκτά την τελική του διαμόρφωση το πρότυπο έκφρασης του Gtl2 είναι παρόμοιο. Εκφράζεται μόνο στην περιοχή της φαιάς ουσίας όπου εντοπίζονται τα κυτταρικά σώματα των νευρώνων, ενώ απουσιάζει πλήρως από την περιοχή της λευκής ουσίας. Επιπρόσθετα, ιδιαίτερα έντονη είναι η έκφρασή του και στα γάγγλια ραχιαίων ριζών. Περισσότερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε όλα αυτά τα αναπτυξιακά στάδια έντονη είναι η διαφορά μεταξύ του ραχιαίου και του κοιλιακού τμήματος του νωτιαίου μυελού, με εντονότερη την έκφραση στο κοιλιακό τμήμα της φαιάς ουσίας.

Κατά την εμβρυϊκή ημέρα 18.5 και στο μετ-εμβρυϊκό στάδιο P7, δεν υπάρχουν πλέον ενδείξεις έντονης διαφοροποίησης του νωτιαίου μυελού. Κατά την εμβρυϊκή ημέρα 18.5 η έκφραση του Gtl2 παραμένει έντονη στη φαιά ουσία και στα γάγγλια των ραχιαίων ριζών, αλλά αυτή τη φορά η διαφορά της έκφρασης μεταξύ ραχιαίου και κοιλιακού τμήματος είναι λιγότερο εμφανής σε σχέση με τα προηγούμενα αναπτυξιακά στάδια. Κατά την έβδομη ημέρα μετά τη γέννηση, η έκφραση του Gtl2 φαίνεται ασθενέστερη. Παρόλα αυτά συνεχίζει να εντοπίζεται στις ίδιες περιοχές, με τη διαφορά της έκφρασης ανάμεσα σε ραχιαίο και κοιλιακό τμήμα να είναι επίσης λιγότερο εμφανής.



Παρατηρώντας τις εικόνες των *in situ* υβριδοποιήσεων, σε συνδυασμό με εκείνες της μορφολογικής χρώσης, όπου υπάρχουν, μπορούμε να διακρίνουμε ότι τα κύτταρα που εκφράζουν *Gtl2* ακολουθούν την ανάπτυξη και την οργάνωση της φαιάς ουσίας. Από τα πρώιμα στάδια όπου τα ραχιαία και κοιλιακά κέρατα αρχίζουν να σχηματίζονται, μέχρι την τελική διαμόρφωσή τους, παρατηρούμε ότι τα κύτταρα αυτά συνεχίζουν να εκφράζουν το γονίδιο, αρκετά έντονα.

Με την ολοκλήρωση των παραπάνω πειραμάτων έχουμε στη διάθεσή μας το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *Gtl2* σε ολόκληρο το κεντρικό νευρικό σύστημα. Παρόλα αυτά δεν γνωρίζουμε τον τρόπο δράσης του συγκεκριμένου γονιδίου, αλλά ούτε και τον ρόλο που παίζει στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Κρίνεται λοιπόν αναγκαία η περαιτέρω μελέτη του συγκεκριμένου non-coding RNA για να εξακριβωθεί αρχικά το είδος των κυτταρικών πληθυσμών που το εκφράζουν σε εγκέφαλο και νωτιαίο μυελό, για να διαλευκανθεί η σημασία αυτού στην ανάπτυξη των δομών αυτών, αλλά και σε διεργασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός σε σύγκριση με μόρια μάρτυρες.

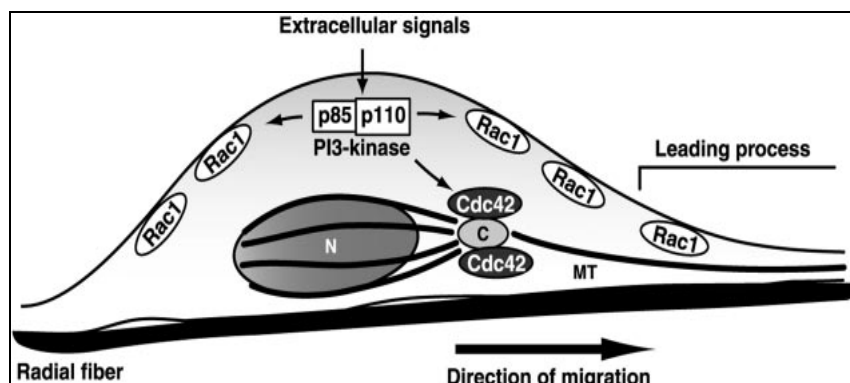
### **B. Μελέτη των επιπέδων έκφρασης 5 γονιδίων σε φλοιό και προμήκη μυελό σε TAG-1 wt και K.O. μύες. Σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ microarray ανάλυσης και Real time PCR.**

Η πρωτεΐνη TAG-1 είναι ένα νευρωνικό μόριο κυτταρικής συνάφειας της υπερ-οικογένειας των ανοσοσφαιρινών. Ανήκει στην οικογένεια F3/contactin, όπου το πιο μελετημένο μέλος αυτής είναι η F3 πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη TAG-1 εκφράζεται στο οσφρητικό σύστημα, στο νεοφλοιό, στην αναπτυσσόμενη παρεγκεφαλίδα, στον ιππόκαμπο, στο νωτιαίο μυελό και στις εμμύελες ίνες του περιφερικού και του κεντρικού νευρικού συστήματος (Denaxa et al. 2001; Traka et al., 2002; Wolfer et al., 1997; Yoshihara et al., 1995). Πέρα από την ευρεία έκφρασή της στο νευρικό σύστημα των θηλαστικών, εμπλέκεται και σε έναν αριθμό διεργασιών όπως η διαμεσολάβηση της κυτταρικής συνάφειας των νευρικών κυττάρων, η αύξηση του μήκους των νευριτών, η καθοδήγηση των αξόνων και η μυελίνωση. Παρόλα αυτά, ο μηχανισμός με τον οποίο δρα, όπως και το πλήθος των μορίων με τα οποία αλληλεπιδρά σε κάθε περίπτωση δεν έχουν διευκρινιστεί.

Οι πρωτεΐνες της L1 υποοικογένειας παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση των νευραξόνων, στη μετανάστευση, επιβίωση και αναγέννηση των νευρικών κυττάρων, καθώς και στην πλαστικότητα των συνάψεων. Οι λειτουργίες των πρωτεϊνών αυτών, όπως και ορισμένοι μηχανισμοί δράσης τους έχουν μελετηθεί εκτενώς. Οι πρωτεΐνες της NCAM υποοικογένειας, από τη μεριά τους, παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση των νευρικών κυττάρων, στη συναπτική πλαστικότητα, καθώς και στον προσανατολισμό των αξόνων.

Η πρωτεΐνη Neuroligin 2 την οποία και εξετάσαμε σ' αυτή την εργασία, είναι μία πρωτεΐνη η οποία εντοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια, με έντονη την παρουσία της στις νευρωνικές συνάψεις, όπου εντοπίζονται και πρωτεΐνες της οικογένειας των *neurexins*. Τα μόρια των δυο αυτών οικογενειών φαίνεται να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους στην περιοχή της σύναψης και μαζί να ρυθμίζουν την πλαστικότητα αυτής (Kurschner et al., 1998).

Το σηματοδοτικό μονοπάτι της Cdc42 πρωτεΐνης, έχει δείχθει ότι συνδέεται με εκείνο της P13-κινάσης και ότι επηρεάζει την ακτινωτή μετανάστευση (*radial migration*) των νευρώνων προς σχηματισμό των έξι στοιβάδων του εγκεφαλικού φλοιού (Konno et al., 2004). Η οικογένεια των ιντεγκρινών θεωρείται υποψήφιο μόριο το οποίο δρα *up-stream* των παραπάνω μονοπατιών. Εικόνα 1.



**Εικόνα 1.:** Προτεινόμενο μοντέλο δράσης των σηματοδοτικών μονοπατιών P13 κινάσης, Rac και Cdc42 που εμπλέκονται στη μετανάστευση των διανευρώνων του φλοιού (Konno et al., 2004)

Σε μια προσπάθεια αποκάλυψης των γονιδίων των οποίων τα επίπεδα έκφρασης, σε μεταγραφικό επίπεδο, μεταβάλλονται στους TAG-1 Κ.Ο. οργανισμούς διεξαγάγαμε αρχικά σειρά αντιδράσεων Real time PCR μελετώντας τα επίπεδα των γονιδίων L1 και NCAM. Ένας επιπλέον στόχος μας ήταν να εντοπίσουμε κάποιο ή κάποια μόρια τα οποία “αναλαμβάνουν” να εκτελέσουν τον ίδιο ρόλο με αυτόν της TAG-1, όταν εκείνη δεν δύναται να μεταγραφεί.

Για τα πειράματά μας επιλέξαμε να μελετήσουμε τον εγκεφαλικό φλοιό και τον προμήκη μυελό των οργανισμών. Το αναπτυξιακό στάδιο που επιλέξαμε είναι εκείνο της εμβρυικής ημέρας 14.5, στάδιο κατά το οποίο λαμβάνει χώρα η μετανάστευση των νευρώνων προς το σχηματισμό των στοιβάδων του φλοιού. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων L1 και NCAM τόσο στο φλοιό όσο και στον προμήκη μυελό, μεταξύ των TAG-1 wt και Κ.Ο. μυών. Αν και πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την TAG-1, καμία από αυτές δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την απουσία αυτής στα TAG-1 Κ.Ο. ζώα.

Στη συνέχεια, έγινε μια δεύτερη προσπάθεια, μέσω της microarray ανάλυσης, για την απάντηση των παραπάνω ερωτημάτων. Σε αυτή την περίπτωση αναμενόταν ο εντοπισμός μορίων που συμμετέχουν σε κάποιο συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι, πιθανώς downstream της TAG-1, και τα επίπεδα των οποίων θα εμφανίζονταν αλλοιωμένα απουσία της TAG-1. Επιλέγοντας τα ίδια είδη ιστών και το ίδιο αναπτυξιακό στάδιο, δείγματα αυτών εστάλησαν προς τη διεξαγωγή των υβριδισμών. Τα αποτελέσματα της microarray ανάλυσης επέφεραν ένα μεγάλο αριθμό up-regulated και down-regulated γονιδίων σε φλοιό και προμήκη μυελό. Στα δεδομένα αυτής της ανάλυσης δεν περιλαμβάνονταν τα γονίδια της L1 και NCAM, γεγονός που κατά κάποιο τρόπο επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα και της Real time PCR.

Σύμφωνα με την εταιρία που διεξήγαγε την ανάλυση, τα ποσοστά μείωσης ή αύξησης των επιπέδων έκφρασης των αναφερόμενων γονιδίων έχουν εύρος από 20% περίπου ενώ κάποια ξεπερνούν και το 100%. Για να εξετάσουμε το αληθές των δεδομένων, επιλέξαμε ενδεικτικά, τρία γονίδια: αυτό της Nlgn2, της

Cdc42, η επιλογή των οποίων έγινε με βάση τα στοιχεία που είχαμε από τη βιβλιογραφία, καθώς και το γονίδιο της Plekhj1, για την οποία αν και δεν υπάρχουν ακόμα στοιχεία για το ρόλο της, η επιλογή έγινε με βάση την κατά 96% μείωση των επιπέδων έκφρασή της στο φλοιό των Κ.Ο. μυών.

Οι αντιδράσεις της Real time PCR που διεξήχθησαν στη συνέχεια, επαναλήφθηκαν 3 φορές ενώ το εκάστοτε δείγμα σε κάθε αντίδραση, εμφανιζόταν 2 φορές για την όσο το δυνατό μείωση των σφαλμάτων κατά το χειρισμό. Οι πρότυπες καμπύλες των αντιδράσεων είχαν κλίση  $>0,99$  και η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε χρησιμοποιώντας τα επίπεδα έκφρασης του housekeeping γονιδίου GAPDH. Οι αντιδράσεις περιλάμβαναν την μέτρηση της απορρόφησης της φθορίζουσας ουσίας SYBR Green, ενώ οι συνθήκες αυτών παρουσιάζονται στο τμήμα Υλικά και Μέθοδοι.

Δυστυχώς, αντίθετα από τα αποτελέσματα της microarray ανάλυσης, για κανένα από τα 3 γονίδια δεν επιβεβαιώθηκε η αναμενόμενη μεταβολή των επιπέδων έκφρασης. Αν και γενικά, τα δεδομένα των microarray αναλύσεων εμφανίζουν αρκετά ψευδώς θετικά δεδομένα, τουλάχιστον η μεγάλης απόκλισης μετατροπές θα αναμενόταν να επιφέρουν παρόμοιο αποτέλεσμα και κατά τη μελέτη τους μέσω της ποσοτικής Real time PCR. Αυτό που προέχει είναι η διεξοδική ανάλυση των γονιδίων που αποκάλυψε η microarray ανάλυση, η επιλογή νέων γονιδίων προς επιβεβαίωση είτε μέσω της Real time PCR, αλλά ακόμα και με τη χρήση του κλασικής αποτύπωσης κατά Northern. Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων και των τριών τεχνικών, θα αποδώσει περισσότερο έγκυρα αποτελέσματα, για το εκάστοτε υπό εξέταση γονίδιο. Με αυτό τον τρόπο, θα είναι δυνατή και η περαιτέρω μελέτη των μελλοντικών γονιδίων που θα προκύψουν, με απώτερο σκοπό την αποκάλυψη του μηχανισμού δράσης και την κατανόηση της φυσιολογικής σημασίας της TAG-1 πρωτεΐνης στο νευρικό σύστημα των θηλαστικών.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bailly Y., Kyriakopoulou K., Dehaye-Bouchaud N., Mariani J., Karagogeos D. 1996. Cerebellar granule cell differentiation in the mutant and X-irradiated rodents revealed by the neural cell adhesion molecule TAG-1. *J. Comp. Neurol.* 369:150-161.
- Carr MS., Yevtodiyenko A., Schmidt CL., Schmidt JV. 2007. Allele-specific histone modifications regulate expression of the Dlk1-Gtl2 imprinted domain. *Genome* 89:280-90.
- Buchstaller A., Kunz S., Berger P., Kunz B., Ziegler U., Rader C., Sonderegger P. 1996. Cell adhesion molecules NgCAM and axonin-1 form heterodimers in the neuronal membrane and cooperate in neurite outgrowth promotion. *J Cell Biol.* 135(6 Pt1): 1593-1607.
- Davies W., Isles AR., Wilkinson LS. 2005. Imprinted gene expression in the brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29:421-30.
- Da Rocha ST., Tevendale M., Knowles E., Takada S., Watkins M., Ferguson-Smith AC. 2007. Restricted co-expression of Dlk1 and the reciprocally imprinted non-coding RNA, Gtl2: Implications for cis-acting control. *Genomes & Developmental Control* 306:810-23.
- Denaxa M., Pavlou O., Tsiotra P., Papadopoulos GC., *et al.* 2003. The upstream regulatory region of the gene for the human homologue of the adhesion molecule TAG-1 contains elements driving neural specific expression in vivo. *Mol. Brain Res.* 118: 91-101.
- Denaxa M., Kyriakopoulou K., Theodorakis K., Trichas G., Vidaki M., Takeda Y., Watanabe K., Karagogeos D. 2005. The adhesion molecule TAG-1 is required for proper migration of the superficial migratory stream in the medulla, but not of cortical interneurons. *Dev. Biol.* 288(1): 87-99.
- Denaxa M., Chan CH, Schachner M., Parnavelas JG., Karagogeos D. 2001. The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development* 128:4635-44.

- Dudoit S., Yang YH., Callow M., Speed T. 2000. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. Technical report #578.
- Edwards CA., Ferguson-Smith AC. 2007. Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19(3): 281-9. Review.
- Georgiades P., Watkins M., Surani MA, Ferguson-Smith AC. 2000. Parental origin-specific developmental defects in mice with uniparental disomy for chromosome 12. *Development* 127(21): 4719-28.
- Georgiades P., Watkins M., Burton GJ., Ferguson-Smith AC. 2001. Roles for genomic imprinting and the zygotic genome in placental development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 10; 98(8): 4522-27.
- Gilbert SF. 1994. *Developmental Biology.* (Sinauer Associate Inc. Massachusetts).
- Hynes RO., Zhao Q. 2000. The evolution of cell adhesion. *J. Cell Biol.* 150(2): F89-96.
- Kagami M., Nishimura G., Okuyama T., Hayashidani M., Takenchi T., Tanaka S., Ishiro F., Kuosawa K., Ogata T. 2005. Segmental and full parental disomy 14 dissection of the phenotype with respect to rare autosomal recessively inherited traits, trisomy mosaicism and genomic imprinting. *Ann. Genet.* 47(3): 251-260.
- Kandel E., Schwartz JH., Jessel TM. 1995. *Essentials of neural science and behavior.*
- Karagogeos D., Morton SB., Casano F., Dodd J., Jessel TM. 1991. Developmental expression of the axonal glycoprotein TAG-1. Differential regulation by central and peripheral neurons in vitro. *Development* 112:51-67.
- Karagogeos D. 2003. Neural GPI-anchored cell adhesion molecules. *Frontiers in Bioscience.* 8: s1304-s1320.
- Kaufman MH. 1992. *The Atlas of Mouse Development.* Academic Press.
- Konno D., Yoshimura S., Hori K., Maruoka H., Sobue K. 2005. Involvement of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Rac1 and Cdc42 Pathways in Radial Migration of Cortical Neurons *J. Biol. Chem.* 280(6): 5582-88.

- Kunz S., Siring M., Buchstaller A., Berger P., Lanz A., Pader C., Vogt L., Kunz B., Sonderegger P. 1998. Neurite fasciculation mediated by complexes of axonin 1 and Ng cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* 143(): 1673-90.
- Kurschner C., Mermelstein PG., Holden WT., Surmeier J. 1998. CIPP, a Novel Multivalent PDZ Domain Protein, Selectively Interacts with Kir4.0 Family Members, NMDA Receptor Subunits, Neurexins, and Neuroligins. *Mol. Cell. Neurosci.* 11:161-72
- Kyriakopoulou K., Diego I., Wassef M., Karagogeos D. 2002. A combination of chain and neurophilic migration involving the adhesion molecule TAG-1 in the caudal medulla. *Development* 129:287-296.
- Lin SP., Youngson N., Takada S., Seitz H., Reik W., Paulsen M., Cavaille J, Feguson-Smith AC. 2003. Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and the paternal chromosomes at the *Dlk1-Gtl2* imprinted cluster on mouse chromosome 12. *Nature* 35:97-102.
- Maness PF., Schachner M. 2007. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci.* 10(1): 19-26.
- Milev P., Maurel P., Haring M., Margolis RK., Margolis RU. 1996. Tag1/axonin1 is a high affinity ligand of neurocan, phosphacan/protein tyrosine phosphatases  $\zeta/\beta$  and NCAM. *The J. Biol. Chem.* 271(26): 15716- 23.
- McLaughlin D., Vidaki M., Renieri E., Karagogeos D. 2005. Expression pattern of the maternally imprinted gene *Gtl2* in the forebrain during embryonic development and adulthood. *Gene Expression Patterns* 6(4): 394-9.
- Moon YS., Smas CM., Villena JA., Kim KH., Yun EJ., Sui HS. 2002. Mice lacking paternally expressed *Pref1/Dlk1* display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol. Cell Biol.* 22(15): 5585-92.
- Reik W, Walter J. 2001. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat.Rev. Genet.* 2(1): 21-32. Review
- Schuster-Gossler K., Zachgo J., Soininen R., Schoor M., Korn R., Gossler A. 1994. Gene trap integrations in genes active in mouse embryonic stem cells

efficiently detect developmentally regulated gene expression. *Transgene* 1:281-91.

- Schuster-Gossler K., Billinski P., Sado T., Ferguson-Smith, Gossler A. 1998. *Gtl2LacZ*, an insertional mutation on mouse chromosome 12 with parental origin-dependent phenotype. *Mamm. Genome* 7(1): 20-49.
- Schmidt JV., Matteson PG., Jones BK., Guan XJ., Tilghman SM. 2000. The *Dlk1* and *Gtl2* genes are linked and reciprocally imprinted. *Genes Dev.* 14(16): 1997-2002.
- Seitz H., Royo H., Bortolin ML., Lin SP, Ferguson-Smith AC., Cavaille J. 2004. A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse *Dlk1-Gtl2* domain. *Genome Research* 14:1741-48.
- Suter DM., Pollerberg GE., Buchstaller A., Giger RJ., Dreyer WJ., Sonderegger, P. 1995. Binding between the neural cell adhesion molecules axonin-1 and Nr-CAM/Bravo is involved in neuron-glia interaction. *J Cell Biol.* 131(4): 1067-1081.
- Takada S., Tevedale M., Baker J., Georgiades P., Campbell E., Freeman T., Johnson MH., Paulsen M., Ferguson-Smith AC. 2000. *Delta-like* and *Gtl2* are reciprocally expressed, differentially methylated linked imprinted genes on mouse chromosome 12. *Current Biology* 10:1135–138.
- Tevendale M., Watkins M, Rasberry C., Cattanach B., Ferguson-Smith AC. 2006. Analysis of mouse conceptuses with uniparental duplication/deficiency for distal chromosome 12: Comparison with chromosome 12 uniparental disomy and implication for genomic imprinting. *Cytogenet. Genome Res.* 113(1-4): 215-22.
- Tierling S., Dalbert S., Schoppenhorst S., Tsai CE., Oligier S., Ferguson-Smith AC., Paulsen M., Walter J. 2005. High-resolution map and imprinting analysis of the *Gtl2-Dnchc1* domain on mouse chromosome 12. *Genomics* 87(2): 225-235.
- Traka M., Goutebroze L., Denisenko N., Bessa M., Nifli A., Havaki S., Iwakura Y., Fukamauchi F., Watanabe K., Soliven B., Girault JA., Karagogeos D. (2003). Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of



juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *The Journal of Cell Biology* 162: 1161-1172.

- Tsiotra PC., Theodorakis K., Papamatheakis J., Karagogeos D. 1996. The fibronectin domains of the neural adhesion molecule TAX-1 are necessary and sufficient for homophilic binding. *J Biol Chem.* 271(46): 29216-29222.
- Tzimourakas A., Giasemi S., Mouratidou M., Karagogeos D. 2007. Structure-function analysis of protein complexes involved in the molecular architecture of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *Biotechnology Journal* 1:1-7.
- Vaunder, Sherman, Luciano. 2000. *Human Physiology: the mechanisms of body function*, 8<sup>th</sup> edition.
- Walsh FS., Doherty P. 1996. Cell adhesion molecules and neuronal regeneration. *Curr.Opin. Cell Biol.* 8:707-713.
- Williams AF., Baeclay AN. 1988. The immunoglobulin superfamily domains for cell surface recognition. *Annu Rev. Immunol.* 6:381-405.
- Wolfer DP., Giger RJ., Stagliar M., Sonderegger P., Lipp HP. 1997. Expression of the axon growth – related neural adhesion molecule TAG1/axonin1 in the adult mouse brain. *Anat Embryol.* 197:177-85.
- Yevtodiyenco A., Steshina E., Farnier SC., Levorse JM., Schmidt JV. 2004. A 178-kb BAC transgene imprints the mouse Gtl2 gene and localizes tissue specific regulatory elements. *Genomics* 84:277-87.
- Yoshihara Y, Kawasaki M, Tamada A, Nagata S, Kagamiyama H, Mori K. 1995. Overlapping and differential expression of BIG-2, BIG-1, TAG-1 and F3: four members of an axon associated cell adhesion molecule subgroup of the immunoglobulin superfamily. *Journal of Neurobiology*, 28: 51-69.