

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΤΗΣ 5΄ΜΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΜΕΝΗΣ
ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ TAX-1 ΓΟΝΙΔΙΟΥ
ΚΑΘΟΔΗΓΟΥΝ ΕΙΔΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΤΟ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΟ ΚΕΝΤΡΙΚΟ
ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ**

ΔΕΝΑΞΑ ΜΥΡΤΩ

**Υπεύθυνη Καθηγήτρια: Καραγωγέως Δόμνα
Υπεύθυνος Καθηγητής: Παπαματθαϊάκης Ιωσήφ**

**Ηράκλειο Κρήτης
Σεπτέμβριος 1999**

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 1998-1999 στο εργαστήριο της επικ.καθ. Δόμνας Καραγωγέως, στην Ιατρική Σχολή.

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθ. Ιωσήφ Παπαματθαϊάκη για την διόρθωση αυτής της εργασίας και ακολούθως, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ:

Στην Δόμνα, η οποία αν και ...Βέγγος, ήταν πάντα στο πλευρό μου, με συμβούλευε και με καθοδηγούσε τόσο στα άμεσα όσο και στα μακροπρόθεσμα σχέδιά μου, πράγμα που μάλλον της άρεσε, εφόσον δεν έχει πρόβλημα να με ανεχτεί άλλα τρία χρόνια στο εργαστήριό της. -τους άλλους τους ρώτησες;

Στην Ράνια, που όχι μόνο με καθοδήγησε στα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο, αλλά ήταν και είναι στο πλευρό μου κάθε στιγμή. Ράνια, είναι μεγάλη μου χαρά να μοιράζομαι τον πάγκο με μία Βαζέλα!!!!!!

Στην Catherine (το γράφω στα γαλλικά, γιατί με τόσα ταξίδια στο Παρίσι έχει ξεχάσει πώς την φωνάζουν στα ελληνικά), για τις πολύτιμες συμβουλές της, και κυρίως για την διδαχή της λειτουργίας τουscanner που τόσο καλά γνωρίζει να το χειρίζεται!

Στην Μαρία, ή σωστότερα στον τυφώνα Mary ο οποίος αυτό τον καιρό πλήττει την Βορ.Καρολίνα. Η βοήθειά της ήταν πολύτιμη, αλλά δε θέλω να γράψω περισσότερα πράγματα για να μην κατηγορηθώ ότι υπερβάλω εξαιτίας της συγγένειας που πρόσφατα αποκτήσαμε.

Στην Δέσποινα, η οποία ευτυχώς ήταν αυτή που ανέλαβε τον Nicolas, ώστε να επιστρέψει σώος στο Παρίσι!

Τέλος, στον Κώστα, του οποίου η παρουσία είναι καταλυτική (βοηθάει σ' αυτό το ότι είναι χημικός) για την ομαλή λειτουργία του εργαστηρίου μας και την ανώμαλη ψυχική μας υγεία! Και επειδή είναι δύσκολη η ζωή ενός άντρα σε ένα εργαστήριο που υπάρχουν μόνο γυναίκες (ευτυχώς αυτό θα αλλάξει στο άμεσο μέλλον) θέλω μόνο να του πω:

Κώστα, αφού θε να 'σαι μόνος σου με πέντε κοπελούδες,
που δεν ακούνε κρητικά, μητ' έχουνε πλεξούδες,
για να 'ναι η ζήση σου καλή και να μη γίνεις άφρων,
μάθε να τραγουδάς U2, να 'σαι για μας ο άρχων.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κατερίνα Λιαπάκη και τον κο Κωστή Κουρουνιώτη για την άριστη συνεργασία μας, και την Φαίδρα για την πολύτιμη βοήθειά της στην προετοιμασία των φωτογραφιών.

Τέλος (οριστικό αυτή τη φορά), οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου: τον Παντελή, την Ειρήνη, την Φοίβη, την Εύη και τους υπόλοιπους Πατρινούς, που με την παρουσία τους ομορφαίνουν τη ζωή μου, και μου δίνουν κουράγιο να συνεχίσω.

Από τις ευχαριστίες εσκεμένα λείπει ο Μπάμπης ύστερα από τις απόπειρες εκφοβισμού μέχρι θανάτου που διενέργησε εναντίον μου και ενώ ήμουν αφοσιωμένη στην συγγραφή της παρούσας εργασίας. Προς μεγάλη δυστυχία όλων σας απέτυχαν!!!!

ABSTRACT

UPSTREAM REGULATORY SEQUENCES OF THE HUMAN TAX-1 GENE DRIVE SPECIFIC EXPRESSION TO THE DEVELOPING MOUSE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

The glycoprotein TAG-1 (named TAX-1 in the human) is a cell adhesion molecule (CAM) belonging to the Ig/FNIII family. TAG-1 is expressed at the earliest stages of axon outgrowth in vivo and has been shown to promote adhesion and neurite outgrowth in vitro via homophilic and heterophilic mechanisms respectively. In the developing human as well as in mouse, TAX-1/TAG-1 expression can be used as a good indicator of axonogenesis. In vivo studies have implicated the molecule in the guidance of commissural axons to the floor plate in embryonic spinal cord. TAG-1 has also been implicated in the differentiation of granule cell precursors in the postnatal cerebellum. In addition, TAG-1 is expressed in many different neuronal populations in the central nervous system (CNS) during development and postnatal growth. As an initial step to understand the molecular mechanisms that underlie this complex pattern of expression, we have begun the functional dissection of regulatory sequences of the TAX-1 gene using transgenic mouse analysis. We isolated genomic fragments of the TAX-1 locus and used them to drive the expression of the reporter gene *LacZ* in transgenic mice. A total of seven independent lines have been obtained with a construct containing 4 Kb of TAX-1 upstream sequence. Preliminary results show that the construct is able to partially recapitulate the endogenous pattern of TAG-1 expression in the developing CNS. In particular, expression is detected as early as embryonic day 11 and persists through adulthood. It is detected in the cerebellar primordium, hippocampus and several nuclei in the embryonic and postnatal mouse CNS.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.Ανάπτυξη και Κυτταρική Συνάφεια	
2.Ανάπτυξη του ΝΣ, Καθοδήγηση νευραξόνων και Μόρια Κυτταρικής Συνάφειας.	
3.Οικογένειες Μορίων Κυτταρικής Συνάφειας.	
3.1.Η οικογένεια των Κετχερινών.	
3.2.Η οικογένεια των Ιντεγκρινών.	
3.3.Η υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών.	
4.Το μόριο κυτταρικής συνάφειας TAG-1 και οι ομόλογές του πρωτεΐνες axonin και TAX-1.	2
5.Γονιδιακή Ρύθμιση των μορίων κυτταρικής συνάφειας.	5
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	7
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	8
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	7
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	1
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	9

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ανάπτυξη και Κυτταρική Συνάφεια.

Η κοινωνική συμπεριφορά που χαρακτηρίζει τα κύτταρα φαίνεται να είναι το ζωτικό χαρακτηριστικό στην ανάπτυξη του εμβρύου. Τα κύτταρα φαίνεται να έχουν ιδιότητες που καθορίζουν τη σταθερότητα ή μη των σχέσεών τους με τα γειτονικά τους κύτταρα. Το σώμα δεν είναι απλά μία συλλογή κυτταρικών τύπων που είναι τυχαία καταναμημένα. Η ανάπτυξη του εμβρύου περιλαμβάνει όχι μόνο τη διαφοροποίηση των κυττάρων αλλά και τη μορφογένεση που επιτελείται με την ομαδοποίηση κυττάρων σε ιστούς και ιστών σε όργανα (Gilbert, 1994).

Ανάμεσα στις πρωταρχικές μορφογενετικές διαδικασίες της ανάπτυξης όπως η κατεύθυνση και ο αριθμός των κυτταρικών διαιρέσεων, η κυτταρική διαφοροποίηση, η κυτταρική αύξηση και ο κυτταρικός θάνατος, σημαντικό ρόλο κατέχει η κυτταρική συνάφεια. Ο μηχανισμός της κυτταρικής συνάφειας είναι ουσιαστικός για την αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφορετικών τύπων κυττάρων και συνεπώς συντελεί στη διαδικασία της οργανογένεσης και στην καθιέρωση της τελικής μορφολογίας του οργανισμού.

Πρωτεύοντα ρόλο για την ύπαρξη κυτταρικής συνάφειας παίζουν τα μόρια κυτταρικής συνάφειας ή CAMs (Cell Adhesion Molecules) τα οποία εντοπίζονται τόσο στην επιφάνεια των κυττάρων όσο και στον εξωκυττάριο χώρο. Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με τη δομή και τη λειτουργία τους σε τέσσερις μεγάλες οικογένειες (Hynes and Lander, 1992): **1)** στις κατχερίνες (cadherins) (Takeichi, 1988), **2)** στα μόρια που ανήκουν στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών (Immunoglobulin superfamily) (Williams and Barclay, 1988; Jessell, 1988), **3)** στις σελεκτίνες (Bevilacqua et al., 1991), και **4)** στις ιντεγκρίνες (Hynes, 1987). Εκτός των σελεκτινών, που εκφράζονται κυρίως σε κύτταρα του αίματος και του ενδοθηλίου, οι υπόλοιπες οικογένειες μορίων κυτταρικής συνάφειας παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και θα εξεταστούν διεξοδικότερα στις επόμενες ενότητες.

2. Ανάπτυξη του Νευρικού Συστήματος, Καθοδήγηση Νευραξόνων και Μόρια Κυτταρικής Συνάφειας.

Τόσο η μορφολογία όσο και η πληθώρα των διαφορετικών και πολύπλοκων λειτουργιών του ώριμου νευρικού συστήματος εξαρτώνται από τη δημιουργία συγκεκριμένων ενδοσυνδέσεων μεταξύ των χιλιάδων τύπων νευρικών κυττάρων καθώς και με κύτταρα-στόχους μη νευρικής προέλευσης (Jessell and Schacher, 1991). Η καθιέρωση των αλληλεπιδράσεων αυτών πραγματοποιείται νωρίς κατά την ανάπτυξη του εμβρύου μέσω μιας διαδοχικής πορείας η οποία μπορεί να θεωρηθεί πως πραγματοποιείται σε έξι βασικά στάδια:

1. Κατά το τέλος της γαστριδίωσης, ένας ομοιόμορφος πληθυσμός προγόνων νευρικών κυττάρων επάγεται από το αδιαφοροποίητο εξώδερμα μέσω μιας διαδικασίας αλληλεπίδρασης του προνωτοχορδικού μεσοδέρματος με το υπερκείμενο εξώδερμα, η οποία καλείται νευρική επαγωγή . Ειδικά όσον αφορά στα σπονδυλωτά, η νευρική επαγωγή έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό της νευρικής πλάκας, γεγονός που αποτελεί την απαρχή της νευριδίωσης. Κατά τη νευριδίωση, τα άκρα της νευρικής πλάκας ανασηκώνονται και συγκλίνουν σταδιακά, έως ότου να συνενωθούν και να σχηματίσουν το νευρικό σωλήνα που τελικά θα διαφοροποιηθεί στον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό. Παράλληλα, πάνω ακριβώς από τον νευρικό σωλήνα σχηματίζεται η νευρική κρηπίδα από την οποία θα προέλθουν οι νευρώνες του περιφερικού νευρικού συστήματος.

2. Ο ομοιόμορφος πληθυσμός κυττάρων εξωδερμικής προέλευσης που επάγεται κατά τη νευριδίωση, αρχίζει να διαφοροποιείται σε ποικίλες κατηγορίες κυττάρων. Τα κύτταρα του νευρικού σωλήνα δίνουν αποκλειστικά γλοία κύτταρα και ανώριμους νευρώνες, οι πληθυσμοί των οποίων ενυπάρχουν στις κοιλιακές περιοχές (ventricular zones) των σχηματιζόμενων νευρικών δομών του ΚΝΣ από πολύ νωρίς κατά την ανάπτυξη . Αντίθετα, από την νευρική κρηπίδα, εκτός των γλοίων και νευρικών κυττάρων του περιφερικού συστήματος, θα προέλθουν και μη νευρικά κύτταρα όπως τα μελανοκύτταρα του δέρματος και τα κύτταρα του χόνδρου των οστών .

3. Οι ανώριμοι νευρώνες, εφόσον κατά κανόνα ολοκληρώσουν την τελευταία μιτωτική τους διαίρεση, μεταναστεύουν από τις βλαστικές περιοχές στην

τελική τους θέση. Κατά τη μετανάστευσή τους τα νευρικά κύτταρα πρέπει να διανύσουν μικρές (ΚΝΣ) ή μεγάλες αποστάσεις (ΠΝΣ) από την περιοχή γένεσής τους ακολουθώντας συγκεκριμένα μονοπάτια και καθοδηγητικά σήματα του περιβάλλοντος (π.χ. κύτταρα νευρικής κρηπίδας) ή ήδη υπάρχουσες νευρικές ίνες, με τις οποίες αλληλεπιδρούν ειδικά (π.χ. μετανάστευση νευρώνων πάνω σε ακτινωτά τοποθετημένες γλοίες ίνες κατά την ανάπτυξη του φλοιού) .

4. Οι νευρώνες διαφοροποιούνται με την επαγωγή νευραξόνων, οι οποίοι κατευθύνονται προς τα κύτταρα στόχους τους. Η επιμήκυνση των νευραξόνων, οι οποίοι μπορεί να επεκτείνονται για αρκετά μέτρα, πραγματοποιείται προς συγκεκριμένη κατεύθυνση, υπεύθυνος για την εύρεση της οποίας είναι ο αυξητικός κώνος . Ο κώνος ανάπτυξης φαίνεται να αναγνωρίζει ειδικά καθοδηγητικά σήματα του περιβάλλοντος, τα οποία ενεργοποιούν σε αυτόν δευτερεύοντα διαβιβαστικά μονοπάτια, που, μέσω τροποποίησης της δομής ή της λειτουργίας πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού, του αλλάζουν την κινητικότητά του (Jessell, 1991). Σε πολλές περιπτώσεις παρατηρείται ομαδοποίηση των νευραξόνων, φαινόμενο το οποίο καλείται δεσμίδωση, και συλλογική μετανάστευσή τους πάνω σε προϋπάρχουσες νευρικές ίνες.

5. Δημιουργούνται επιλεκτικά συνάψεις μεταξύ νευρώνων και των κυττάρων στόχων αυτών, οι οποίοι μπορεί να είναι κύτταρα νευρικής ή μη νευρικής προέλευσης. Και στην περίπτωση αυτή σήματα του μικροπεριβάλλοντος που ενεργοποιούν δευτερεύοντα διαβιβαστικά μονοπάτια και επάγουν την έκφραση ειδικών γονιδίων ή τροποποιούν τη δράση πρωτεϊνών τόσο στον προσυναπτικό νευρώνα όσο και στο μετασυναπτικό κύτταρο, είναι υπεύθυνα για την εγκαθίδρυση της σύναψης.

6. Πολλές από τις συνάψεις αυτές πρόκειται στη συνέχεια να αναδιοργανωθούν ή να τροποποιηθούν. Οι προαναφερόμενες λειτουργίες θα συνεχίζουν να χαρακτηρίζουν το νευρικό σύστημα και μετά την “ωρίμανσή” του, εφόσον η πλαστικότητα είναι μία από τις βασικές ιδιότητές του.

Σε όλα τα προαναφερόμενα στάδια ανάπτυξης του νευρικού συστήματος η κυτταρική συνάφεια αποτελεί μηχανισμό ουσιαστικής σημασίας. Αναλυτικότερα:

Όσον αφορά στα πρωταρχικά μορφογενετικά γεγονότα ανάπτυξης του νευρικού ιστού, σημαντικό ρόλο φαίνεται να έχουν οι κατχερίνες (Takeichi, 1988). Για παράδειγμα, το μόριο της N-cadherin εκφράζεται για πρώτη φορά κατά το στάδιο της

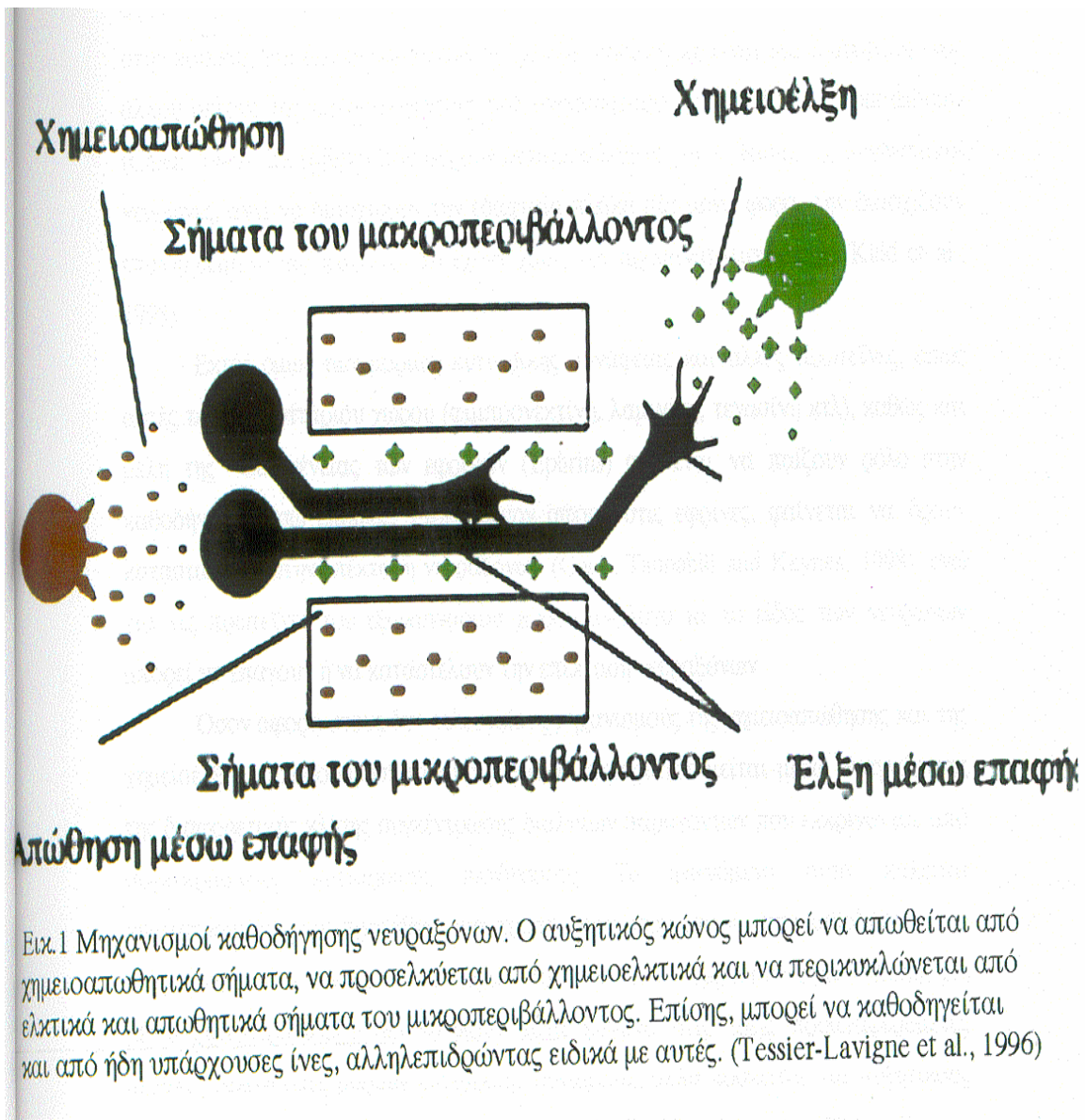
γαστριδίωσης στην περιοχή του εξωδέρματος, από το οποίο θα προέλθει η νευρική πλάκα και τελικά ο νευρικός σωλήνας. Έκτοπη έκφραση της N-cadherin σε έμβρυα *Xenopus* έδειξε πως το μόριο αυτό ενέχεται στη διαδικασία αποχωρισμού του νευρικού σωλήνα από το εξώδερμα.

Την ίδια πρώιμη αναπτυξιακή περίοδο, για την επαγωγή της μετανάστευσης των κυττάρων της νευρικής κρηπίδας είναι απαραίτητη η παρουσία μορίων της οικογένειας των ιντεργκρινών και συγκεκριμένα της φιμπρονεκτίνης και της λαμνίνης. Οι πρωτεΐνες αυτές βρίσκονται στον εξωκυττάριο χώρο και ενέσεις αντισωμάτων έναντι αυτών έδειξαν πως παρεμποδίζουν τη μετανάστευση των κυττάρων της νευρικής κρηπίδας του κρανιακού τμήματος. Επίσης, αμέσως πριν αρχίσουν να μεταναστεύουν, τα κοκκιώδη κύτταρα της παρεγκεφαλίδας εκφράζουν το μόριο L1/ Ng-CAM που ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Ένέσεις με αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης αυτής καταστέλλουν τη μετανάστευση των κοκκιωδών κυττάρων (Linner et al., 1983).

Πιο πολύπλοκη και πιο συλλογική φαίνεται να είναι η δράση των μορίων κυτταρικής συνάφειας κατά την καθοδήγηση των νευραξόνων. Οι αυξητικοί κώνοι μέσω των οποίων καθοδηγούνται οι νευράξονες φαίνεται να κατευθύνονται με τουλάχιστον τέσσερις διαφορετικούς μηχανισμούς: 1) έλξη μέσω επαφής (contact attraction), 2) απώθηση μέσω επαφής (contact repulsion), 3) χημιοέλξη (chemoattraction) και 4) χημιοαπώθηση (chemorepulsion) (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996) (εικ.1).

Η συμμετοχή των μορίων κυτταρικής συνάφειας είναι ιδιαίτερα σημαντική για την καθοδήγηση νευραξόνων με απώθηση ή έλξη μέσω επαφής. Μηχανισμοί τροποποίησης της συγγένειας των μορίων κυτταρικής συνάφειας για κάποιο μόριο-συνδέτη ή παροδικής έκφρασης τους με ειδικό χωροχρονικό πρότυπο φαίνεται να συμβάλουν ουσιαστικά στο συγκεκριμένο είδος καθοδήγησης (Dodd and Jessell, 1988).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πορεία των νευραξόνων των συνδεσμικών νευρώνων (commissural axons) στο νευροεπιθήλιο του νωτιαίου μυελού. Οι άξονες αυτοί, που αρχικά βρίσκονται στο ραχιαίο τμήμα του νωτιαίου μυελού, προεκτείνονται προς την κοιλιακή μεσαία γραμμή, που ονομάζεται εδαφιαία πλάκα (floor plate), τη διασχίζουν και στη συνέχεια, στρεφόμενοι, κατευθύνονται προς το εμπρόσθιο τμήμα του νωτιαίου μυελού. Οι άξονες αυτοί, κατά την επέκτασή τους στο



νευροεπιθήλιο, πριν διασχίσουν την εδαφιαία πλάκα, εκφράζουν την πρωτεΐνη TAG-1 και δεν έχουν δεσμιδωθεί. Εφόσον όμως διασχίσουν την εδαφιαία πλάκα, η έκφραση της TAG-1 ελαττώνεται ακαριαία, ανιχνεύεται η έκφραση μιας άλλης πρωτεΐνης της ίδιας οικογένειας, της L1, ενώ οι άξονες αρχίζουν να δεσμιδώνονται (Stoeckli and Landmesser, 1998). Παράλληλα, στην καθοδήγηση των συνδεσμικών νευρώνων, ουσιαστική είναι και η συμβολή ενός άλλου μέλους της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών, του Robo (Roundabout) (Chien, 1998). Σε έμβρυα που φέρουν μεταλλάξεις για το Robo, οι συνδεσμικοί νευρώνες, αντί να διασχίσουν την εδαφιαία πλάκα μία μόνο φορά, την διασχίζουν επανηλλειμένα και φαίνεται να έχουν χάσει τον προσανατολισμό τους (Kidd et al., 1998).

Εκτός όμως των μορίων κυτταρικής συνάφειας και άλλες πρωτεΐνες, όπως αυτές του εξωκυττάριου χώρου (φιμπρονεκτίνη, λαμινίνη, τενασίνη κτλ), καθώς και μέλη της οικογένειας των εφρινών (Ephrins) φαίνεται να παίζουν ρόλο στην καθοδήγηση μέσω επαφής. Ειδικά όσον αφορά στις εφρίνες, φαίνεται να δρουν κατασταλτικά στην επέκταση νευραξόνων (Cook, Tannahill and Keynes, 1998), ενώ για τις πρωτεΐνες του εξωκυττάριου χώρου ανάλογα με το είδος των νευρώνων μπορεί να επάγουν ή να καταστέλουν την επέκταση νευραξόνων

Όσον αφορά στους δύο τελευταίους μηχανισμούς της χημειοαπόθησης και της χημειοέλξης, η καθοδήγηση των νευραξόνων πραγματοποιείται μέσω αναγνώρισης της διαφορετικής κλίσης συγκέντρωσης διαλυτών παραγόντων που εκκρίνονται από συγκεκριμένους κυτταρικούς πληθυσμούς. Το φαινόμενο αυτό καλείται χημειοτροπισμός και προτάθηκε για πρώτη φορά όσον αφορά στην καθοδήγηση των νευραξόνων από τον Ramón y Cajal. Τα μόρια που συμβάλουν στην καθοδήγηση μέσω χημειοτροπισμού δεν ανήκουν κατά κανόνα στις τρεις προαναφερόμενες μεγάλες οικογένειες μορίων κυτταρικής συνάφειας, αλλά πρόκειται για αυξητικούς παράγοντες όπως ο NGF (nerve growth factor) (Dodd and Jessell, 1988), μέλη της οικογένειας των νετρινών (netrins) και οι υποδοχείς τους (DCC, UNC-40, UNC-5) καθώς και μέλη της οικογένειας των σεμαφορινών (semaphorins/collapsins) και οι υποδοχείς τους (neuropilins) (Cook, Tannahill and Keynes, 1998). Συγκεκριμένα, οι νετρίνες δρουν χημειοελκτικά κατά την καθοδήγηση νευραξόνων που διασχίζουν τη μεσσηία γραμμή

(midline) τόσο του νωτιαίου μυελού όσο και του εγκεφάλου. Ποντίκια τα οποία δεν εκφράζουν netrin-1 παρουσιάζουν ανωμαλίες στην προβολή των συνδεσμικών νευρώνων (commissural neurons) του νωτιαίου, καθώς και επιπλέον βλάβες στο μεσολόβιο (*corpus callosum*) και στους πρόσθιους και ιπποκαμπικούς συνδεσμικούς νευρώνες. Αντίθετα, οι σεμαφορίνες δρουν κυρίως χημειοαπωθητικά. Για παράδειγμα, τόσο αισθητικοί όσο και συμπαθητικοί νευρώνες που καλλιεργούνται σε πήκτωμα κολλαγόνου μεγαλώνουν μακριά από COS κύτταρα που εκφράζουν Sema III.

Τέλος, όσον αφορά στη δημιουργία συνάψεων, σημαντικό ρόλο φαίνεται να έχουν οι κατχερίνες (Shapiro and Colman, 1999). Οι διακυτταρικές συνδέσεις που δημιουργούνται με τη μεσολάβηση κατχερινών, παρουσιάζουν την ίδια παράλληλη μεμβρανική τοποθέτηση όπως και οι συνάψεις του ΚΝΣ, ενώ και στις δύο περιπτώσεις παρατηρείται η ίδια ομαδοποίηση κατχερινών στις περιοχές της κυτταρικής επιφάνειας των κυττάρων που αλληλεπιδρούν.

3. Οικογένειες Μορίων Κυτταρικής Συνάφειας.

Όπως έχουμε ήδη προαναφέρει τα μόρια κυτταρικής συνάφειας τα οποία εμπλέκονται στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις μεγάλες οικογένειες:

3.1. Η οικογένεια των Κατχερινών.

Οι κατχερίνες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες συγκολλούν κύτταρα δημιουργώντας ομοφιλικές συνδέσεις μεταξύ τους. Για τη δομική διαμόρφωσή τους καθώς και το λειτουργικό τους ρόλο είναι απαραίτητη η παρουσία ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}), απουσία των οποίων παρατηρείται ραγδαία αποικοδόμηση και πρωτεολυτική προσβολή του μορίου.

Μέχρι σήμερα είναι γνωστά περίπου δώδεκα μόρια κατχερινών. Εκφράζονται σε όλα σχεδόν τα κύτταρα, κυρίως στα σημεία κυτταρικής επαφής όπου βρίσκονται οι προσκολλητικές συνδέσεις του κυττάρου. Κύτταρα τα οποία εκφράζουν

διαφορετικούς τύπους κατχερινών διαχωρίζονται μεταξύ τους και σχηματίζουν ξεχωριστά συσσωματώματα (Nose et al., 1988; Takeichi et al., 1988).

Η δομή του μορίου των κατχερινών φαίνεται στην εικόνα 2. Η εξωκυτταρική περιοχή του μορίου υποδιαιρείται σε πέντε ομόλογες περιοχές 113 αμινοξικών καταλοίπων (EC1-EC5) στις οποίες εντοπίζεται η ιδιότητα κυτταρικής συνάφειας καθώς και οι θέσεις πρόσδεσης του ασβεστίου. Συγκεκριμένα, η περιοχή EC1 περιέχει το τριπεπτίδιο HAV που είναι το σημείο αναγνώρισης και σύναψης ομοφιλικών δεσμών κατά τη συγκόλληση των κυττάρων. Το σημείο αυτό είναι συντηρημένο σε όλες τις κύριες κατχερίνες και μεταλλάξεις σε αυτό αναστέλλουν τη συγκόλληση μεταξύ των κυττάρων (Nose et al., 1990). Επίσης, τα αμινοξέα που περιβάλλουν το τριπεπτίδιο HAV είναι σημαντικά για την εξειδίκευση της συγκόλλησης.

Στην κυτταροπλασματική περιοχή πολλών κατχερινών και συγκεκριμένα στα 70 αμινοξικά κατάλοιπα του καρβοξυτελικού άκρου προσδέεται μία ομάδα κυτταροπλασματικών πεπτιδίων που ονομάζονται κατενίνες (α,β,γ). Οι κατενίνες συνδέουν ένα μόριο κατχερίνης με μικρονημάτια ακτίνης του κυτταροσκελετού.

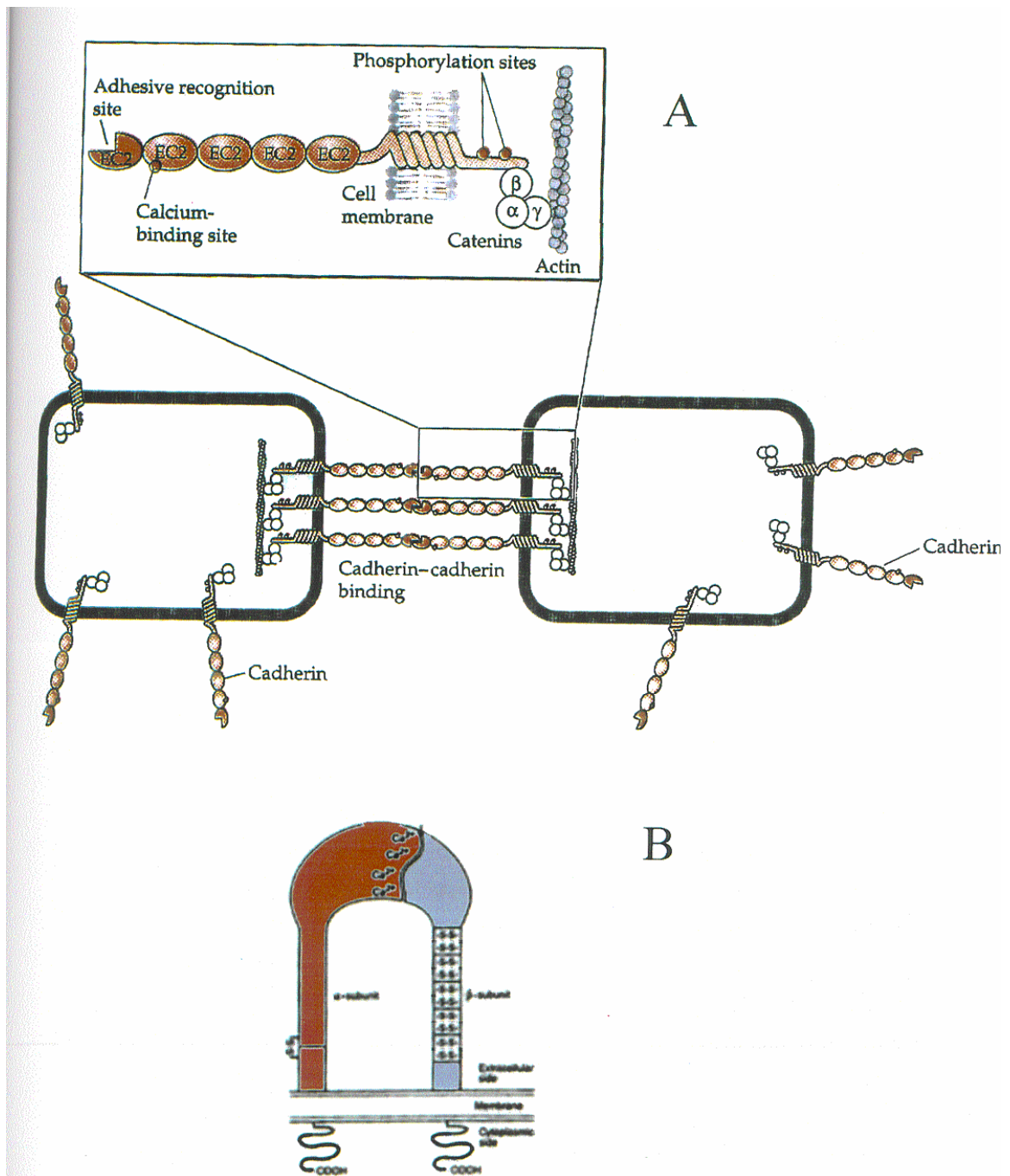
Στην οικογένεια των κατχερινών ανήκουν πρωτεΐνες όπως οι:

- E-cadherin, η οποία ανιχνεύεται σε όλα τα κύτταρα του πρώιμου εμβρύου πριν αυτά αρχίσουν να μεταναστεύουν ενώ αργότερα περιορίζεται στον επιθηλιακό ιστό εμβρύων και ενηλίκων.

- P-cadherin, η οποία ανιχνεύεται στα κύτταρα της τροφοβλάστης στο έμβρυο των θηλαστικών και αργότερα στον πλακούντα.

- N-cadherin, η οποία όπως έχουμε ήδη αναφέρει εκφράζεται στο εξώδερμα από το οποίο θα προέλθει η νευρική πλάκα καθώς και στα κύτταρα της νευρικής κρηπίδας εφόσον αυτά φτάσουν στον κατάλληλο προορισμό τους.

- Οι γλυκοπρωτεΐνες desmogleins και desmocollins που παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό στενών συνδέσμων και δεσμοσωματίων.



Εικ.2 Α. Απεικόνιση της δομής ενός αντιπροσωπευτικού μορίου κατχερίνης και του τρόπου με τον οποίο δύο μόρια κατχερίνης αλληλεπιδρούν ομοφιλικά.

Β. Η δομή ενός αντιπροσωπευτικού μορίου ιντεγκρίνης. (Gilbert, 1994).

3.2. Η οικογένεια των Ιντεγκρινών.

Η δεύτερη μεγάλη οικογένεια μορίων κυτταρικής συνάφειας είναι οι ιντεγκρίνες . Οι πρωτεΐνες αυτές μεσολαβούν κυρίως στην προσκόλληση μεταξύ κυττάρων και εξωκυττάριας ύλης, συντελώντας στην μεταβίβαση πληροφοριών από το μικροπεριβάλλον μέσα στο κύτταρο και το αντίστροφο (Hynes, 1987). Ωστόσο, κάποιες ιντεγκρίνες όπως εκείνες που εκφράζονται στα λεμφοκύτταρα και στα λευκοκύτταρα, μεσολαβούν και σε ετεροφιλικές διακυτταρικές συνδέσεις, αλληλεπιδρώντας με μέλη της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών.

Σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες των άλλων οικογενειών που έχουν μία και μόνο υπομονάδα, οι ιντεγκρίνες είναι αβ ετεροδιμερή, δηλαδή αποτελούνται από μία α και μία β αλυσίδα. Έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον 14 α αλυσίδες και 8 β αλυσίδες, πολλές από τις οποίες αποτελούν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος, που συνδιάζονται σε 19 διαφορετικά μόρια ιντεγκρινών. Αν και θεωρητικά κάθε α αλυσίδα μπορεί να συνδέεται με διαφορετική β αλυσίδα, έχει βρεθεί ότι οι περισσότερες α υπομονάδες συνδέονται με την ίδια β υπομονάδα, σχηματίζοντας υποδοχείς με διαφορετική εξειδίκευση (Hynes, 1992). Έναν επιπλέον μηχανισμό εξειδίκευσης και πολυπλοκότητας των ιντεγκρινών αποτελούν και οι ποικίλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που έχουν περιγραφεί (Hynes, 1992).

Η εικόνα 2 δείχνει τη δομή μίας τυπικής ιντεγκρίνης. Στον εξωκυττάριο χώρο, το αμινοτελικό άκρο της α υπομονάδας χαρακτηρίζεται από πολλαπλές ενεργές περιοχές όπου προσδένονται δισθενή κατιόντα (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ανάλογα με την ιντεγκρίνη), τα οποία θεωρούνται σημαντικά για την λειτουργικότητα της ιντεγκρίνης. Αντίστοιχα, στη β αλυσίδα το αμινοτελικό άκρο χαρακτηρίζεται από 56 κυστεΐνες, οι οποίες είναι αυστηρά συντηρητικές μεταξύ όλων των β αλυσίδων και αποτελούν πιθανά σημεία σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών που παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της δομής της ιντεγκρίνης. Συνεργαζόμενες και οι δύο αλυσίδες σχηματίζουν στον εξωκυττάριο χώρο μία σφαιρική δομή με την οποία οι ιντεγκρίνες φαίνεται να αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες-συνδέτες τους. Συγκεκριμένα φαίνεται να αναγνωρίζουν το τριπεπτίδιο RGD (Αργινίνη-Λυσίνη-Ασπαραγίνη) αν και άλλα πρωτεϊνικά μοτίβα (πχ.

EILDV για το μόριο της $\alpha 4\beta 1$ ιντεγκρίνης) έχουν αναγνωρισθεί ως θέσεις πρόσδεσης των ιντεγκρινών σε διάφορες πρωτεΐνες (Diamind and Springer, 1994). Το καρβοξυτελικό άκρο της α υπομονάδας που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα περιέχει μία πολύ συντηρητική αλληλουχία με την οποία το μόριο αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη calreticulin. Αντίστοιχα, το καρβοξυτελικό άκρο της β υπομονάδας αλληλεπιδρά με την ακτίνη του κυτταροσκελετού μέσω της ταλίνης, βικουλίνης και α -ακτινίνης. Επίσης, το κυτταροπλασματικό άκρο της $\beta 1$ ιντεγκρίνης βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης fak (focal adhesion kinase. Με τον τρόπο αυτό φαίνεται οι ιντεγκρίνες να μεταβιβάζουν πληροφορίες από το μικροπεριβάλλον στο εσωτερικό του κυττάρου. Πράγματι, μετά την πρόσδεση των ιντεγκρινών με τον συνδέτη τους, έχει παρατηρηθεί αύξηση του ενδοκυττάρου pH, φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση πρωτεϊνικών κινασών, αλλαγή του μεταβολισμού και της γονιδιακής έκφρασης.

Η ίδια ιντεγκρίνη είναι δυνατόν να αγνωρίζει διαφορετικές γλυκοπρωτεΐνες της εξωκυττάριας ύλης. Για παράδειγμα, η $\alpha 3\beta 1$ ιντεγκρίνη μεσολαβεί στην προσκόλληση κυττάρων στη λαμινίνη, στη φιβρονεκτίνη, στην εντακτίνη και στο κολλαγόνο IV. Μερικές ωστόσο ιντεγκρίνες είναι μοναδικές για κάθε γλυκοπρωτεΐνη, όπως η $\alpha 6\beta 1$ για την λαμινίνη.

Είναι επίσης γνωστό, ότι η εξειδίκευση μερικών ιντεγκρινών για ένα συγκεκριμένο μόριο αναγνώρισης εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο που τα εκφράζει. Έτσι, η $\alpha 2\beta 1$ ιντεγκρίνη της μεμβράνης των αιμοπεταλίων είναι υποδοχέας του κολλαγόνου ενώ στα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι υποδοχέας της λαμινίνης και του κολλαγόνου.

Τέλος το ίδιο μόριο ιντεγκρίνης αναγνωρίζει πολλαπλές αλληλουχίες πάνω στο ίδιο μόριο συνδέτη της. Για παράδειγμα, η $\alpha 1\beta 1$ ιντεγκρίνη αναγνωρίζει τουλάχιστον δύο διαφορετικά μοτίβα στο μόριο της λαμινίνης.

3.3 Η υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών.

Τα μέλη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών εξαιτίας της δομικής ποικιλομορφίας τους εμπλέκονται σε μία πληθώρα γεγονότων που σχετίζονται με τη νευροϊστογένεση. Για παράδειγμα, συμβάλουν στην ακτινωτή (radial) και οριζόντια

(tangential) μετανάστευση προγενήτορων νευρικών κυττάρων, στη δεσμίδωση των νευριτών, στην επαγωγή και επέκταση νευραξόνων καθώς και στην παρεμπόδιση της αύξησης των νευριτών (Brümmendorf and Rathjen, 1996).

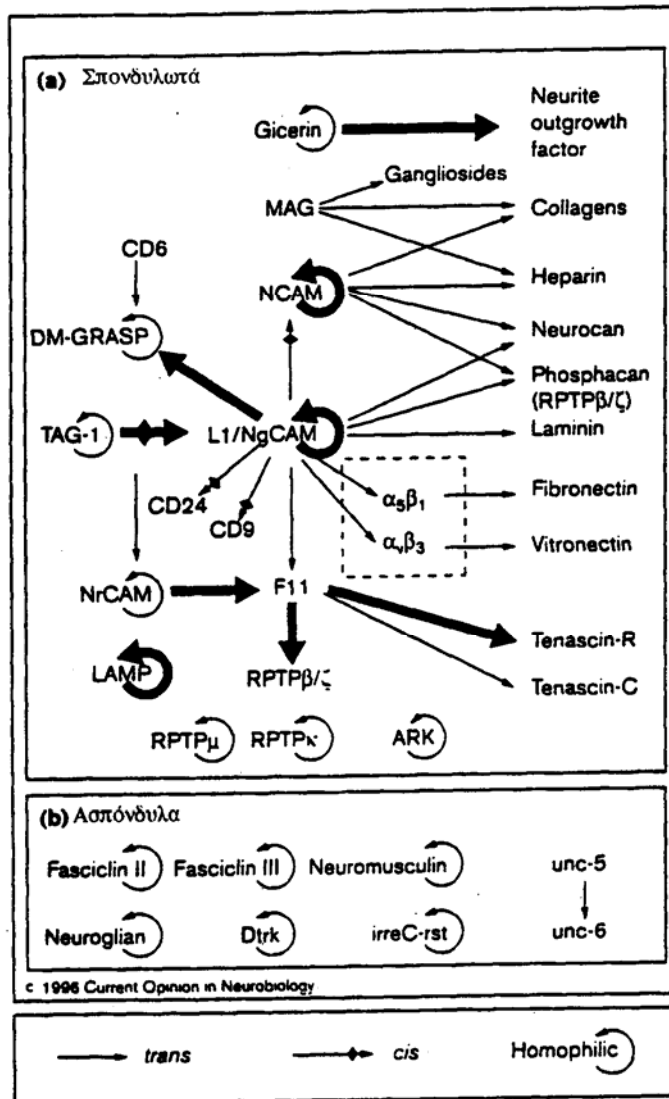
Οι πρωτεΐνες της υπεροικογένειας αυτής χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη επαναλαμβανόμενων περιοχών με ομοιότητα στις ανοσοσφαιρίνες (Ig-like domains), και σε πολλές περιπτώσεις και από άλλες περιοχές κοντά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη που είναι γνωστές ως τύπου III φιμπρονεκτικές επαναλήψεις (FNIII-like domains). Επίσης, πολλές από τις πρωτεΐνες διαθέτουν και κυτταροπλασματικό τμήμα ενώ άλλες προσδένονται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης μέσω ενός γλυκοσυλφωσφατίδιλο δεσμού (GPI anchor). Η δομική αυτή πολυπλοκότητα που χαρακτηρίζει τα μέλη της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών τους προσδίδει τη δυνατότητα σύναψης ποικίλων trans και cis ομοφιλικών ή ετεροφιλικών αλληλεπιδράσεων (εικ. 3). Για την επιτέλεση των αλληλεπιδράσεων φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντικά και τα δύο μοτίβα των πρωτεϊνών, με τις ανοσφαιρικές περιοχές να συμμετέχουν στην δημιουργία κυρίως ετεροφιλικών αλληλεπιδράσεων ενώ με τις φιμπρονεκτικές σε ομοφιλικές.

Σύμφωνα με τη συνολική οργάνωση των ενεργών περιοχών των μορίων τους (domains) και την πρωτοταγή τους δομή, τα μέλη της υπεροικογένειας των ανοσφαιρινών είναι δυνατόν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις μεγάλες ομάδες (Brümmendorf and Rathjen, 1993) (εικ. 4):

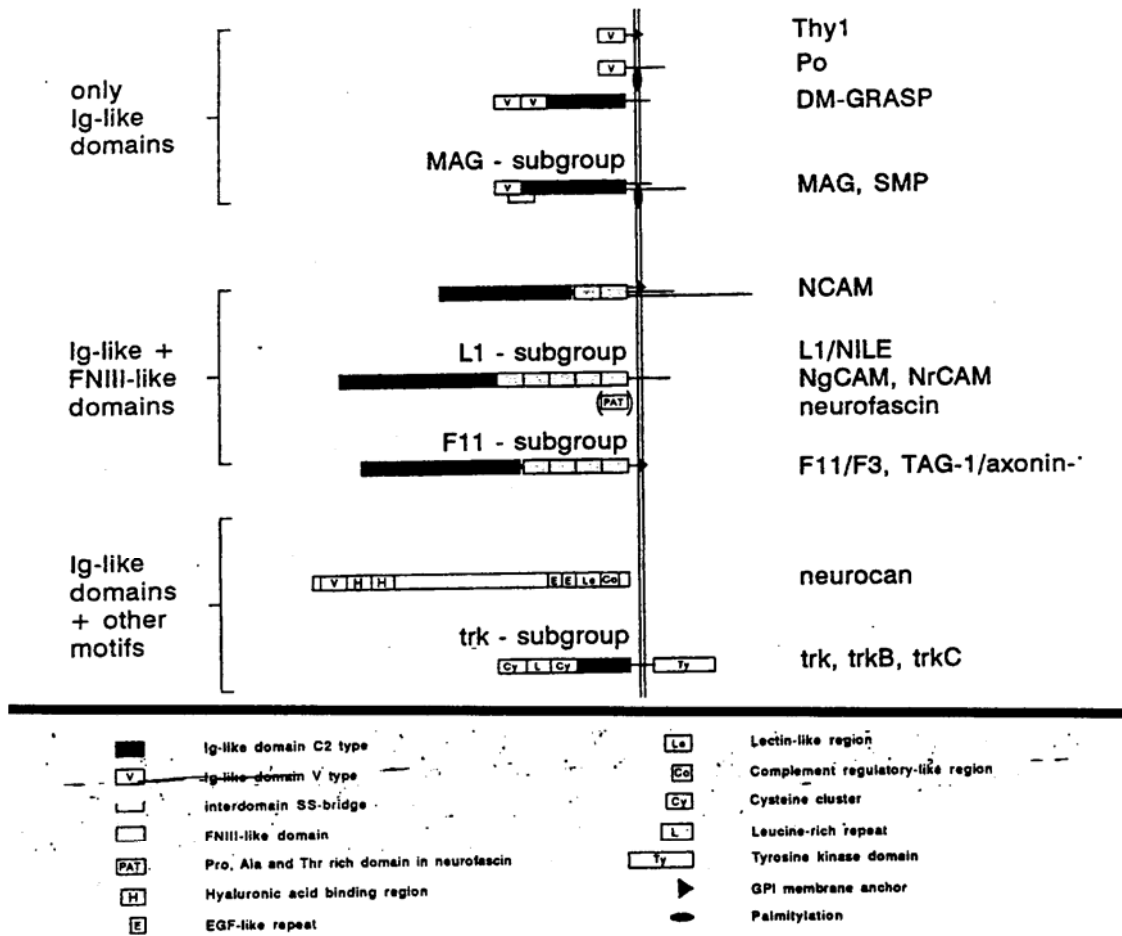
α) Σε πρωτεΐνες οι οποίες δομούνται μόνο από περιοχές με ομοιότητα στις ανοσοσφαιρίνες. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μυελινοποίηση νευρώνων όπως η MAG (Myelin Associated Glycoprotein), η Po και η SMP (Schwann Myelin Protein) (Dulac et al., 1992), καθώς και οι πρωτεΐνες BEN (Pourquie et al., 1990) και gicerin (Taira et al., 1994) που έχουν ιδιότητες επαγωγής νευραξόνων όταν βρίσκονται σε υπόστρωμα.

β) Σε πρωτεΐνες οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία περιοχών με ομοιότητα στις ανοσοσφαιρίνες σε συνδιασμό με τύπου III φιμπρονεκτικές περιοχές. Η κατηγορία αυτή μπορεί να υποδιαιρεθεί περαιτέρω σε δύο υποομάδες:

I. Στην υποομάδα των πρωτεϊνών που έχουν ιδιότητες παρόμοιες με την L1 πρωτεΐνη. Πρόκειται για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες το εξωκυτταρικό τμήμα των



Εικ.3 Αλληλεπιδράσεις μορίων της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών με διάφορα μόρια κυτταρικής συνάφειας που έχουν πιστοποιηθεί μέχρι σήμερα. Τα βέλη στο κάτω μέρος υποδηλώνουν το είδος αλληλεπίδρασης.



Εικ.4 Ομαδοποίηση των πρωτεϊνών της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών βάση των δομικών χαρακτηριστικών τους. Γλυκοπρωτεΐνες των οποίων η πρωτοταγής δομή είναι γνωστή και εντοπίζονται κυρίως στο νευρικό σύστημα κατηγοροποιούνται ανάλογα με τη συνολική οργάνωση των λειτουργικών περιοχών τους και την αμινοξική τους αλληλουχία.

οποίων χαρακτηρίζεται από την παρουσία έξι περιοχών με ομοιότητα στις ανοσοσφαιρίνες και πέντε τύπου III φιμπρονεκτικών περιοχών. Οι εξωκυττάριας περιοχές δεν είναι συντηρητικές στα διάφορα μέλη. Αντίθετα, το κυτταροπλασματικό τμήμα των 110 αμινοξικών καταλοίπων είναι ιδιαίτερα συντηρητικό, γεγονός που υποδηλώνει τη σημασία του σχετικά με τη λειτουργία των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα ,εντοπίζονται δύο περιοχές με υψηλό βαθμό συντηρητικότητας. Η πρώτη βρίσκεται κοντά και μερικώς στο εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ η δεύτερη πρόκειται για ένα μοτίβο δώδεκα αμινοξικών καταλοίπων (QFNEDGSFIGQY) που τοποθετούνται κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών. Η κυτταροπλασματική περιοχή των μορίων της L1 υποομάδας είναι δυνατόν να αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού όπως σπεκτρίνη (spectrin), ακτίνη (actin) και neurofascin. Επίσης πολλές από τις πρωτεΐνες με ομοιότητες προς την L1 διαθέτουν ισομορφές που προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα. Στην ομάδα των πρωτεϊνών που μοιάζουν με την L1 ανήκουν οι: NgCAM (neuron-glia cell adhesion molecule), NrCAM (NgCAM-related cell adhesion molecule), neurofascin και neuroglian (Burgoon et al., 1991; Rathjen et al., 1991).

II. Στην υποομάδα των πρωτεϊνών που έχουν ομοιότητες με την F11 πρωτεΐνη. Τα μέλη της υποομάδας αυτής είναι γλυκοπρωτεΐνες που χαρακτηρίζονται από την παρουσία έξι περιοχών με ομοιότητα στις ανοσοσφαιρίνες και τέσσερις τύπου III φιμπρονεκτικές περιοχές, που συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη μέσω ενός γλυκοσυλφωσφατίδιο δεσμού (GPI anchor). Οι πρωτεΐνες της κατηγορίας αυτής συναντώνται τόσο σε διαλυτή μορφή όσο και προσδεμένες στην κυτταρική επιφάνεια αν και ανάλογα με την πρωτεΐνη η μία από τις δύο μορφές φαίνεται να επικρατεί. Η βιολογική σημασία της ύπαρξης του GPI-δεσμού δεν είναι γνωστή. Πιθανόν η διακοπή των προσδέσεων του αυξητικού κώνου με κόψιμο του GPI-δεσμού να είναι ωφέλιμη κατά την επέκταση των νευραξόνων (Ferguson and Williams, 1988; Low, 1989). Η πλειοψηφία των πρωτεϊνών της F11 υποομάδας εντοπίζονται σε περιορισμένα τμήματα της επιφάνειας του νευράξονα προσδίδοντας κάποια μορφή πολικότητας στους νευρώνες που τα εκφράζουν. Ένα άλλο χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών αυτών αποτελεί το πεπτιδικό τμήμα που μεσολαβεί μεταξύ των Ig και FNIII σχετιζόμενων περιοχών, το

οποίο είναι πλούσιο σε γλυκίνη και προλίνη (Gennarini et al., 1989; Furley et al., 1990; Zuelling et al., 1992). Η περιοχή αυτή ίσως να χρησιμεύει σαν άρθρωση επιτρέποντας στις πρωτεΐνες να προσαρμόζονται σε διαφορετικές διαμεμβρανικές αποστάσεις κατά την αλληλεπίδρασή τους με υποδοχείς των γειτονικών νευραξόνων. Ενδείξεις για την στήριξη της υπόθεσης αυτής προέρχονται από μελέτη της πυκνότητας του μορίου της NCAM κατά την επέκταση των νευραξόνων του αμφιβληστροειδούς. Τέλος για όλες τις πρωτεΐνες της F11-υποομάδας έχουν εντοπιστεί διαφορετικά μετάγραφα για τα οποία δεν υπάρξουν ενδείξεις ότι προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα οπότε είναι μάλλον προϊόντα που προκύπτουν από διαφορετικές θέσεις πολυαδενυλίωσης. Μέλη της κατηγορίας αυτής είναι οι πρωτεΐνες: F11 και οι ομόλογές της F3 και contactin, η TAG-1 και οι ομόλογές της axonin και TAX-1, οι BIG-1 και BIG-2 (Brümmendorf et al., 1989; Furley et al., 1990).

Η πρωτεΐνη NCAM (Edelman, 1984) ανήκει στην ίδια υποοικογένεια αλλά λόγω της πληθώρας των διαφορετικών ισομορφών της δεν τοποθετείται σε καμία από τις προαναφερόμενες δύο υποομάδες.

γ) Σε πρωτεΐνες οι οποίες χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη περιοχών με ομοιότητα στις ανοσοσφαιρίνες σε συνδιασμό ποικίλα μοτίβα διαφορετικά του τύπου III φμπρονεκτικού μοτίβου. Η κατηγορία αυτή είναι τόσο δομικά όσο και λειτουργικά πολύ ετερογενής και μόνο οι υποδοχείς trk (tyrosin kinase receptors) μπορούν να αποτελούν μία ξεχωριστή υποομάδα (Chao, 1992). Το ενδοκυτταρικό καρβοξυτελικό άκρο των υποδοχέων αυτών έχει ενεργότητα κινάσης και έχει αποδειχθεί να ενεργοποιεί τα μονοπάτια των src, ras και MAP κινασών, με τελικό αποτέλεσμα την αλλαγή στην γονιδιακή έκφραση στο πυρήνα των νευρώνων.

4. Το μόριο κυτταρικής συνάφειας TAG-1 και οι ομόλογες του πρωτεΐνες axonin και TAX-1.

Η πρωτεΐνη TAG-1 (Transient Axonal surface Glycoprotein), όπως έχουμε ήδη προαναφέρει είναι μέλος της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών και συγκεκριμένα της F3 υποομάδας. Πρόκειται για μία γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 135 Kd, η έκφραση της οποίας για πρώτη φορά ανιχνεύθηκε σε υποπληθυσμούς

νευρικών κυττάρων του νωτιαίου μυελού και συγκεκριμένα κατά την διαφοροποίηση και αρχική επέκταση των νευραξόνων των κινητικών και συνδεσμικών νευρώνων, καθώς και στα γάγγλια της ραχιαίας ρίζας (DRG) του ΠΝΣ. (Dodd et al., 1988). Περαιτέρω μελέτες έδειξαν μία παροδική έκφραση της πρωτεΐνης κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης συγκεκριμένων υποπληθυσμών νευρώνων του ΚΝΣ και ΠΝΣ, τόσο σε περιοχές όπου σχηματίζονται αξονικά μονοπάτια (axon tracts) όσο και σε μεταναστευτικά ρεύματα μετα-μιτωτικών νευρώνων (migratory streams) (Yamamoto et al, 1986; Wolfer et al, 1994).

Στην εικόνα 5 φαίνεται αναλυτικά το χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης της TAG-1 στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα. Η έκφραση της TAG-1 εντοπίζεται στα περισσότερα αναπτυσσόμενα αξονικά μονοπάτια όπως: σε όλα σχεδόν τα κρανιακά νεύρα, στις ραχιαίες (DRG) και κοιλιακές ρίζες (VRG) του νωτιαίου μυελού, στις κοιλιακοσυνδεσμικές και ραχιαίες δέσμες του νωτιαίου μυελού, στο κοιλιακό οσφρητικό μονοπάτι (*lateral olfactory tract*), στην ηνιομεσοσκελιαία δεσμίδα (*fasciculus retroflexus*), στην ψαλίδα (*fornix*), στους πρόσθιους και οπίσθιους συνδέσμους, στο μεσολόβιο (*corpus callosum*) και στον ιππόκαμπο. Επίσης, έκφραση TAG-1 ανιχνεύεται σε περιοχές όπου πραγματοποιείται μετανάστευση κυττάρων όπως στην ενδιάμεση ζώνη του νεοφλοιού (*intermediate zone of neocortex*) και της νωτιαίας χορδής, καθώς και στην παρεγκεφαλίδα, στα κυτταρικά σώματα των κοκκωδών κυττάρων του εσωτερικού τμήματος της εξωτερικής κοκκώδους στοιβάδας κατά την μετακίνησή τους προς την εσωτερική κοκκώδη στοιβάδα. Σε κάθε περίπτωση είναι φανερό πως η έναρξη και η διάρκεια της έκφρασης της TAG-1 πρωτεΐνης διαφέρει ανάλογα με το αναπτυξιακό σχέδιο στους διάφορους πληθυσμούς νευρώνων.

Η έκφραση της TAG-1 πρωτεΐνης έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζεται διαφορετικά στους κεντρικούς και περιφερικούς νευρώνες (Karagogeos et al., 1991). Ενώ η έκφρασή είναι εφήμερη στους νευρώνες του νωτιαίου μυελού και δεν ξαναεκφράζεται σε καλλιέργειες ώριμων νευρώνων *in vitro*, ώριμοι περιφερειακοί νευρώνες (DRG) όταν καλλιεργηθούν *in vitro* ξαναεκφράζουν TAG-1 (Karagogeos et al., 1991). Η απώλεια ανίχνευσης της πρωτεΐνης αν και αυτή συνεχίζει να εκφράζεται στον εγκέφαλο ενήλικα ποντικού (Dodd et al., 1988; Wolfer et al. 1998) πιθανότατα να οφείλεται σε ενδογενείς παράγοντες των νευρώνων όσον αφορά στο ΚΝΣ και λιγότερο

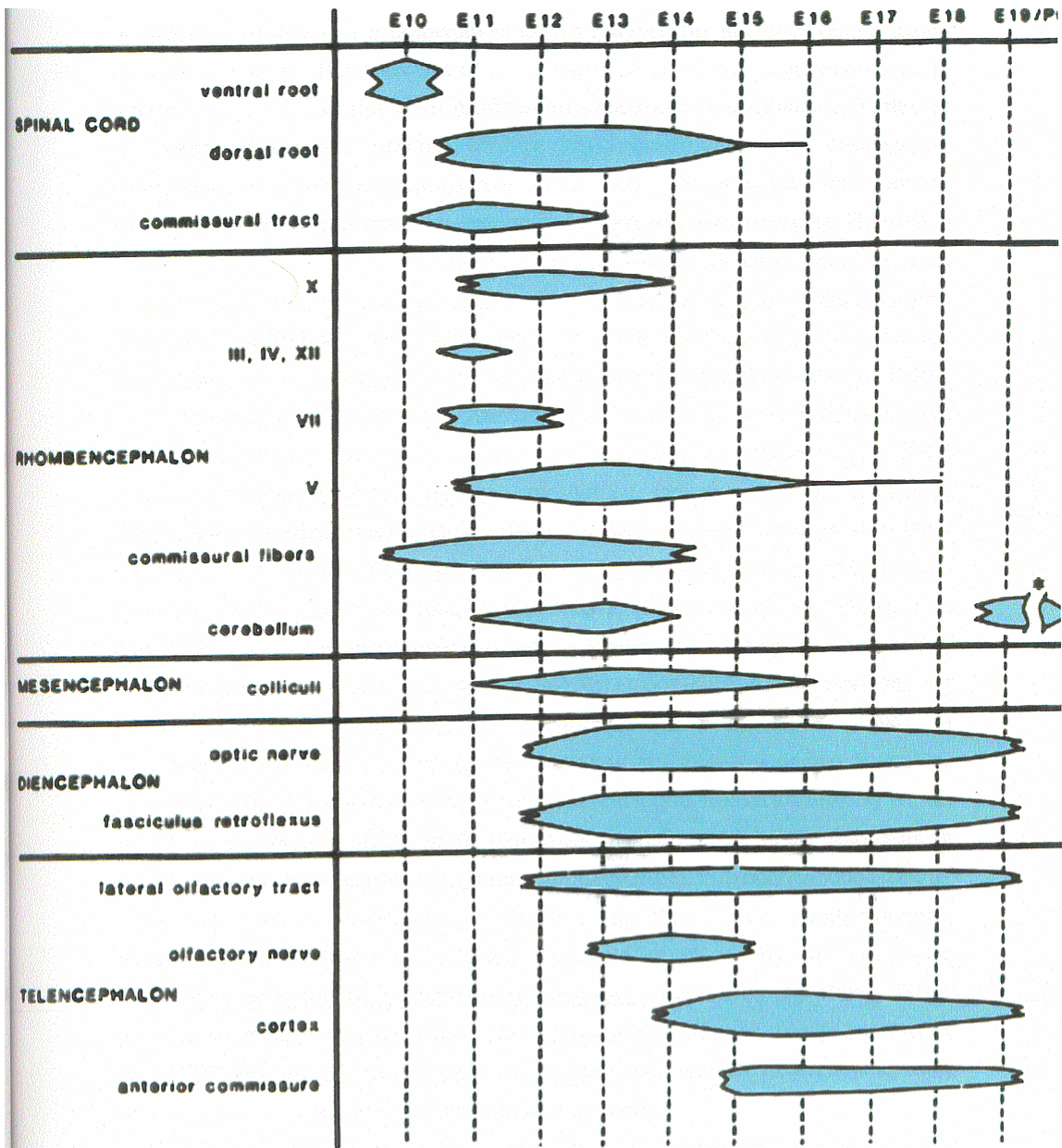


Fig.5 Λιγαροαμιατική απεικόνιση του χωροχρονικού προτύπου έκφρασης της TAG-1 με βάση τα δεδομένα που προκύπτουν ύστερα από ανοσοιστοχημεία έναντι της TAG-1, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα 4D7. (Yamamoto et al., 1986).

σε στοιχεία του περιβάλλοντος (Dodd et al., 1988; Furley et al., 1990; Karagogeos et al., 1991).

Η πρωτεΐνη TAG-1 ανιχνεύεται σε δύο μορφές: δεσμευμένη στην κυτταρική επιφάνεια μέσω GPI δεσμού αλλά και εκκρινόμενη (Furley et al., 1990; Karagogeos et al., 1991). Η έκφραση της επιφανειακής μορφής φαίνεται να ρυθμίζεται αυστηρά σε εμβρυικά στάδια ενώ η εκκρινόμενη μορφή ανιχνεύεται και στο ενήλικο άτομο (Karagogeos et al., 1991). Αν και οι δύο μορφές φαίνεται να προέρχονται από το ίδιο μετάγραφο και να μην είναι αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος (Furley et al., 1990), βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι προέρχονται από διαφορετικά ενδοκυτταρικά μονοπάτια (Karagogeos et al., 1991). Η βιολογική σημασία της ύπαρξης του GPI-δεσμού δεν είναι γνωστή, όπως έχει ήδη προαναφερθεί. Πιθανόν η διακοπή των προσδέσεων του αυξητικού κώνου με κόψιμο του GPI-δεσμού να είναι ωφέλιμη κατά την επέκταση των νευραξόνων στα διάφορα κυτταρικά περιβάλλοντα (Ferguson and Williams, 1988; Low, 1989). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται μετά τον χαρακτηρισμό φωσφολιπασών στον εγκέφαλο των θηλαστικών (Hoener et al., 1990).

Πειράματα όπου όταν ανασυνδιασμένη ή αγρίου τύπου TAG-1 πρωτεΐνη χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα αυξάνει την επέκταση νευραξόνων από DRG νευρώνες, πιστοποίησαν την ιδιότητα της TAG-1 για επαγωγή της επέκτασης νευραξόνων *in vitro* (Furley et al., 1990). Για την επέκταση νευριτών από DRG νευρώνες σε υπόστρωμα TAG-1 αποδείχτηκε ακολούθως πως δεν είναι απαραίτητη η παρουσία της μεμβρανικής μορφής της TAG-1 (Fesenfeld et al., 1994), ενώ παρεμποδίζεται με την παρουσία αντισωμάτων έναντι της L1 και της β1 υπομονάδας των ιντεγκρινών, πιστοποιώντας έτσι την ύπαρξη ετεροφιλικής αλληλεπίδρασης της TAG-1 με τις προαναφερόμενες δύο πρωτεΐνες (Fesenfeld et al., 1994). Η αλληλεπίδραση της TAG-1 με την L1 πραγματοποιείται όταν και οι δύο πρωτεΐνες βρίσκονται στην κυτταρική επιφάνεια του ίδιου κυττάρου, πρόκειται δηλαδή για *cis* μορφή αλληλεπίδρασης (Rader et al., 1996; Dhar Malhotra et al., 1998). Ακόμη με τη δημιουργία συσσωματωμάτων ύστερα από διαμολύνσεις S2 κυττάρων Δροσόφιλας με cDNA της TAG-1, αποδείχτηκε η ιδιότητα της TAG-1 για αλληλεπιδράσεις ομοφιλικού τύπου (Rader et al., 1993; Fesenfeld et al., 1994) για τις οποίες μεσολαβούν οι τύπου III φμπρονεκτικές περιοχές (Tsiotra et al., 1996). Τέλος, φαίνεται να υπάρχει κάποιου είδους λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ

της TAG-1 και της F3 όσον αφορά την επέκταση και τη δεσμίδωση νευραξόνων των κοκκωδών κυττάρων της παρεγκεφαλίδας (Buttiglione et al., 1998).

Έχουν βρεθεί δύο ομόλογες ως προς την TAG-1 πρωτεΐνες: η axonin-1 στην όρνιθα (Zuelling et al., 1992) και η TAX-1 στον άνθρωπο (Tsiotra et al., 1993).

Η axonin-1 παρουσιάζει 75% ομοιότητα με την TAG-1 όσον αφορά στην αμινοξική τους αλληλουχία, και είναι και αυτή προσδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη μέσω ενός GPI δεσμού (Zuelling et al., 1992). Ωστόσο, διαφέρει από την TAG-1 στο ότι το μόριο της δε χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη της Arg-Gly-Asp αλληλουχίας, η οποία όπως έχει προαναφερθεί μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση μεταξύ της φιμπρονεκτίνης και των ιντεγκρινών. Η axonin συμμετέχει σε μία πληθώρα αλληλεπιδράσεων με διάφορα μόρια κυτταρικής συνάφειας. Συγκεκριμένα έχει αποδειχτεί να δημιουργεί ομοφιλικούς δεσμούς (Rader et al., 1993) και να συμμετέχει σε ετεροφιλικές αλληλεπιδράσεις trans μορφής με τις πρωτεΐνες Nr-CAM (Suter et al., 1995), neurocan, phosphacan και N-CAM (Milev et al., 1996) και cis μορφής με την Ng-CAM πρωτεΐνη (Buchstaller et al., 1996).

Η TAX-1 πρωτεΐνη παρουσιάζει 91% ομοιότητα με την TAG-1 όσον αφορά στην αμινοξική τους αλληλουχία (Tsiotra et al., 1993). Η δομή του μορίου της χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη όλων των λειτουργικών περιοχών και μοτίβων που υπάρχουν στην TAG-1. Επίσης, πειράματα με Schneider κυττάρικες σειρές που εκφράζουν σταθερά ολόκληρη την TAX-1 πρωτεΐνη ή μόνο τις ανοσοσφαιρικές ή φιμπρονεκτικές περιοχές, απέδειξαν πως για την δημιουργία αλληλεπιδράσεων ομοφιλικού τύπου μεσολαβούν οι τύπου III φιμπρονεκτικές περιοχές (Tsiotra et al., 1996).

5. Γονιδιακή Ρύθμιση των μορίων κυτταρικής συνάφειας.

Τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του νευρικού συστήματος αποτελούν ένα ιδανικό σύστημα για την μελέτη της γονιδιακής ρύθμισης της ανάπτυξης. Αυτό οφείλεται στο ότι τα μόρια κυτταρικής συνάφειας που μεσολαβούν στις διαδικασίες των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων οι οποίες είναι καθοριστικές για τη μορφογένεση, αποτελούν γονιδιακά προϊόντα που ρυθμίζονται άμεσα από σημαντικά όσον αφορά στην ανάπτυξη γονίδια .

Ιδιαίτερα οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών, εξαιτίας της περιορισμένης έκφρασής τους χρονικά και τοπικά, έχουν γίνει τελευταία αντικείμενο μελέτης της γονιδιακής ρύθμισής τους. Σε πολλές από τις πρωτεΐνες αυτές (N-CAM, Ng-CAM, axonin, L1, F3) έχει γίνει ανάλυση του υποκινητή τους και έχουν βρεθεί cis αλληλουχίες στις οποίες δεσμεύονται in vitro πρωτεΐνες που ανήκουν σε διάφορες οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων που προσδένονται στο DNA, όπως μέλη των Hox, Pax, POU, bHLH και NFκB οικογενειών (Edelman and Jones, 1998). Πειράματα με διαγονιδιακά ποντίκια που έφεραν κατασκευές του υποκινητή της Ng-CAM ή της L1 συνδεδεμένες στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με το lacZ γονίδιο αναφοράς, πιστοποίησαν τη σημασία των παραγόντων αυτών, εφόσον μεταλλάξεις των θέσεων πρόσδεσης Hox ή Pax πρωτεϊνών είχαν ως αποτέλεσμα την αδυναμία αναπαράστασης του ενδογενούς προτύπου έκφρασης των Ng-CAM και L1 πρωτεϊνών στο νωτιαίο μυελό από τα διαγονίδια.

Επίσης μελέτες για την πιστοποίηση παραγόντων που περιορίζουν την έκφραση των προαναφερόμενων μορίων κυτταρικής συνάφειας στο νευρικό σύστημα, έδειξαν πως αλληλουχίες οι οποίες εντοπίζονται στο πρώτο ή δεύτερο εξόνιο των γονιδίων των Ng-CAM και L1 αντίστοιχα, και οι οποίες στη συνέχεια ονομάστηκαν NRSEs (Neural Restrictive Silencer Elements), καταστέλουν την έκφραση των εν λόγω πρωτεϊνών σε μη νευρικά κύτταρα in vitro. Η σημασία των αλληλουχιών αυτών πιστοποιήθηκε και in vivo με τη δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών τα οποία έφεραν κατασκευές του L1 γονιδίου χωρίς τις NRSEs αλληλουχίες συνδεδεμένες στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με το lacZ γονίδιο αναφοράς, στα οποία παρατηρήθηκε εκτεταμένη έκτοπη έκφραση της L1 σε μη νευρικό ιστό (Edelman and Jones, 1998).

Με βάση τα προαναφερόμενα γίνεται φανερό πως το περιορισμένο και αυστηρά χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης των γονιδίων κυτταρικής συνάφειας οφείλεται σε ένα συνδιασμό παραγόντων οι οποίοι περιληπτικά σκιαγραφούνται στην εικόνα 6 (Edelman and Jones, 1998).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το αυστηρά εξειδικευμένο χωροχρονικό πρότυπο που χαρακτηρίζει την πλειοψηφία των μελών της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος διαφόρων οργανισμών, τα κάνει ιδιαίτερα ελκυστικά όσον αφορά στη μελέτη της γονιδιακής ρύθμισής τους. Το ενδιαφέρον αυξάνεται ακόμα περισσότερο από τη στιγμή που οι πρωτεΐνες αυτές ελέγχουν άμεσα τη μοφογένεση του νευρικού συστήματος δίνοντας έτσι σημαντικές πληροφορίες για την γονιδιακή ρύθμιση της ίδιας της ανάπτυξης του νευρικού ιστού. Οι προαναφερόμενες διαπιστώσεις καθώς και το ότι είχαμε στη διάθεσή μας ένα καλά χαρακτηρισμένο τμήμα του υποκινητή της TAX-1 (εικ7) (Tsiotra et al., 1993), που είναι το ανθρώπινο ομόλογο της TAG-1, μας παρακίνησαν να μελετήσουμε *in vivo* το κατά πόσο *cis* ρυθμιστικές αλληλουχίες που ενυπάρχουν στη 5' μη μεταγραφόμενη περιοχή του γονιδίου της TAX-1 επαρκούν για την αναπαράσταση του ενδογενούς προτύπου. Για να απαντήσουμε στο ερώτημα αυτό, εισάγαμε στο γένωμα ποντικών το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης της E.coli υπό τον έλεγχο ενός τμήματος 4Kb του υποκινητή της TAX-1. Από την προαναφερόμενη πειραματική διαδικασία προέκυψαν επτά ανεξάρτητες διαγονιδιακές σειρές που έφεραν στο γονιδίωμά τους το TAX-1/ LacZ διαγονίδιο και οι οποίες ονομάστηκαν PromI-PromVII.

1372 **SCIP** **AP-2** **E-box**
 1272 **GRE(r)**
 1172 **MyoD**
 1072 **b** **bicoid**
 -972 **hep70** **ExamHl**
 -872 **GRE(r)** **NF-1/JunB** **E-box**
 -772 **SCIP**
 -672 **SCIP**
 -572 **Ets-1(r)** **NF-1κB** **C Ncol**
 -472 **Sp1**
 -372 **Sp1** **SCIP**
 -272 **Sp1** **Aval** **zeste**
 -172 **AP-2**
 -72 **AP-2**
 29 **Aval**
 129 **Aval**

Εικ. 7 Η νοκ-αυτοκλιδική αλληλουχία τμήματος του υποκινητή του TAX-1 γονιδίου. Υπογραμμισμένα φαίνονται τα συντηρημένα μοτίβα DNA μεταγραφικών παραγόντων. Οι χρωματισμένοι κύκλοι δείχνουν τις αλληλουχίες που παρκατηρήθηκαν και σε άλλα νευρικά γονίδια. Με τόνια αναφέρονται οι θέσεις έναρξης της μεταγραφής και το ανοικτό βέλος δείχνει την αγωγή της cDNA αλληλουχίας. Με μικρά γράμματα αναφέρεται η αλληλουχία του πρώτου ιντρωνίου. (Αδατοροική διαγραφή Παύτσας Π.)

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Αντιδραστήρια και υλικά.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη προήλθαν από τις ακόλουθες εταιρίες: AMERSHAM, BDH, CHANCE-PROPPER LTD, MERCK, O.KINDLER GmbH & Co, PROMEGA, SIGMA CHEMICALS, SUPERIOR.

Τα ένζυμα περιορισμού προήλθαν από τις εταιρίες: NEW ENGLAND BIOLABS, CLONTECH.

Το kit της in vitro μεταγραφής αγοράστηκε από την εταιρία: PROMEGA.

Οι νάυλον μεμβράνες υβριδοποίησης προήλθαν από την εταιρία, SCHELEICHER & SCHUEL και τα film αυτοραδιογραφίας από την KODAK.

2. Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών.

Η παραγωγή των διαγονιδιακών ποντικών έγινε στο εκτροφείο ζώων του Ι.Μ.Β.Β. από τον κο Κ. Κουρουνιώτη. Η διαγονιδιακή μονάδα που χρησιμοποιήθηκε (εικ1 στα αποτελέσματα) περιείχε 4Kb από την αλληλουχία του υποκινητή του ανθρώπινου μορίου TAX-1 (Tsiotra et al., 1993), συνδεδεμένα στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με το Lac-Z γονίδιο. Στο 3' άκρο, το διαγονίδιο περιείχε το εσόνιο και το σήμα πολυαδενυλίωσης του ποντικίσου γονιδίου της πρωταμίνης (mP1 gene). Η διαγονιδιακή κατασκευή έγινε από τον κο Κ. Θεοδωράκη, ενώ το μεγαλύτερο τμήμα της ανάλυσης των γενωμικών DNA των διαγονιδιακών ζώων έγινε από την κα Κ. Λιαπάκη.

3. Απομόνωση γενωμικού DNA

- 1) Μεταφορά των ουρών που έχουν αφαιρεθεί από τα προς μελέτη ζώα στο κατάλληλο διάλυμα όπου θα πραγματοποιηθεί η αντίδραση της πρωτεΐνάσης K, και του οποίου η σύσταση είναι η ακόλουθη: 100μM NaCl, 10mM Tris HCl pH:8.0, 25mM EDTA pH:8.0, 0.5% SDS.
- 2) Προσθήκη πρωτεΐνάσης K (10μg/ μl) και επώαση στους 55°C O/N.

- 3) Προσθήκη RNase (10μg/ml) και επώαση στους 37°C για δέκα λεπτά.
- 4) Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος φαινόλης-χλωροφορμίου. Ανακίνηση για 15 λεπτά.
- 5) Φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στα 13.500 rpm.
- 6) Αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος φαινόλης-χλωροφορμίου. Ανακίνηση για 15 λεπτά.
- 7) Φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στα 13.500 rpm.
- 8) Αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιου. Ανακίνηση για 15 λεπτά.
- 9) Φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στα 13.500 rpm.
- 10) Μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό eppendorf tube και κατακρύμνιση του DNA με ίσο όγκο ίσο προπανόλης. Το DNA εξαιτίας της μεγάλης συγκέντρωσης του απομακρύνεται με πιπέτα pasteur η οποία στη συνέχεια εμβαπτίζεται σε 70% αιθανόλη. Ακολουθεί στέγνωμα του DNA σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθως εμβάπτιση της πιπέτας σε nanopure H₂O, O/N στους 4°C για να επαναδιαλυθεί το DNA πλήρως.
- 11) Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA.

4. Ανιχνευτές για την ανάλυση των διαγονιδιακών ποντικών.

Για την ανάλυση των διαγονιδιακών ποντικών ως ανιχνευτές χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες: α) του Lac-Z γονιδίου β) τμήματος του υποκινητή του ανθρώπινου TAX-1. (εικ.1 στα αποτελέσματα).

5. Πέψη μορίων DNA με ένζυμα περιορισμού

Όλες οι πέψεις με ένζυμα περιορισμού έγιναν με βάση τις οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρίας και τα πρωτόκολλα που περιγράφονται από τους Sambrook et al., 1989.

6. Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτωμα αгарόζης.

Πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ηλεκτροέκλωσης σε μεμβράνες διαπίδωσης, ενώ ο καθαρισμός του DNA έγινε με φαινόλη-χλωροφόρμιο και η κατακρύμνιση με αιθανόλη και οξικό νάτριο.

7. Ραδιοσήμανση μορίων DNA.

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος σήμανσης τμημάτων DNA με τη βοήθεια τυχαίων εκκινητών (random priming labelling). Η μέθοδος αυτή δίνει ραδιοσημασμένα τμήματα DNA υψηλής ειδικής ενεργότητας ($1 \times 10^9 \text{cpm}/\mu\text{gr}$). Η αρχή της μεθόδου είναι η ακόλουθη: Γραμμικά δίκλινα τμήματα DNA αποδιατάσσονται παροδικά. Στη συνέχεια μία σειρά από εξαμερείς εκκινητές αφήνονται να αναδιαταχθούν με τυχαία τμήματα του αποδιαταγμένου DNA, παρουσία της πολυμεριστικής ιδιότητας του ενζυμικού κλάσματος της Klenow, και των $\alpha[32\text{P}]\text{-dATP}$ και $\alpha[32\text{P}]\text{-dUTP}$.

8. Dot Blot

Πρόκειται για μία πολύ απλή τεχνική μεταφοράς πυκνού, μη υδρολυμένου DNA σε νάυλον μεμβράνη, στην οποία ακολούθως μπορεί να εφαρμοστεί υβριδοποίηση με τον κατάλληλο ανιχνευτή και να καθοριστούν τα θετικά ως προς αυτόν, δείγματα DNA. Η όλη ανάλυση έχει ως εξής:

- 1) Διάλυση 5 μg DNA σε 120 μl H₂O.
- 2) Προσθήκη 20 μl NaOH 4N, και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 3) Προσθήκη 200 μl NH₄COOH 2M και άμεση τοποθέτηση των δειγμάτων σε πάγο.
- 4) Διαβροχή της μεμβράνης με διάλυμα NH₄COOH 1M και τοποθέτησή της στη κατάλληλη θέση της συσκευής(κάτω από τα πηγαδάκια).
- 5) Άνοιγμα του κενού αέρος και πλύσιμο των πηγαδιών όπου θα φορτώσουμε τα δείγματά μας, με το ίδιο διάλυμα.
- 6) Φόρτωμα των δειγμάτων μας.

7) Αναμονή μέχρι να απορροφηθούν πλήρως, και ακολούθως απομάκρυνση της μεμβράνης από τη συσκευή και τοποθέτησή της για 2 ώρες στους 80°C.

9. Ανάλυση κατά Southern

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην μεταφορά του υδρολυμένου με περιοριστικά ένζυμα DNA από πήκτωμα αгарόζης σε νάυλον μεμβράνη τοποθετημένη στην επιφάνεια του πηκτώματος. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται από τον Southern.

10. Υβριδοποίηση νουκλεϊκών οξέων.

Οι υβριδοποιήσεις των μεμβρανών έγιναν σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Denhardt.

Το διάλυμα υβριδοποίησης που χρησιμοποιήθηκε είναι το ακόλουθο:

6x SSC

5x Denhardt

0.5% SDS

100μg/ml αποδιαταγμένο DNA από σπέρμα σολωμού

Οι υβριδοποιήσεις έγιναν κατά κανόνα στους 65°C.

Όσον αφορά στις εκπλύσεις για την μή ειδική πρόσδεση, έγιναν με τα ακόλουθα διαλύματα:

2x SSC, 0.1% SDS

1x SSC, 0.1% SDS

0.1x SSC, 0.1% SDS.

Όλες οι εκπλύσεις έγιναν στην θερμοκρασία υβριδοποίησης.

11. Φασματοφωτομετρική ανάλυση με ONPG.

Πρόκειται για μία εύκολη και γρήγορη μέθοδο για τον προσδιορισμό ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης, η οποία βασίζεται στην ιδιότητα του ο-νιτροφαινολ-β-

D-γαλακτοζίτη (ONPG) να δίνει γαλακτόζη και χρωμοφόρο ο-νιτροφαινόλη, παρουσία β-γαλακτοσιδάσης. Η ο-νιτροφαινόλη είναι δυνατόν να ανιχνευθεί χρησιμοποιώντας φασματοφωτομετρία και συγκεκριμένα μετρώντας απορρόφηση στα 420nm. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για ποσοτικό προσδιορισμό της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης. Αναλυτικά η όλη πειραματική πορεία έχει ως εξής:

- 1) Απομόνωση των ακόλουθων ιστών: εγκέφαλος, παρεγκεφαλίδα, οσφρητικοί βολβοί, οφθαλμοί, νεφρά, συκώτι, καρδιά, πνεύμονες, σπλήνα, έντερο.
- 2) Γρήγορο ξέπλυμα σε PB στους 4°C.
- 3) Μεταφορά και ομογενοποίηση των ιστών σε διάλυμα PM-2: 23mM NaH₂PO₄, 77mM Na₂HPO₄, 0.1mM MnCl₂, 2mM MgSO₄, 40mM β-mercaptoethanol, 0,1% Triton 100, pH 7.3.
- 4) Φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
- 5) Μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρά Eppendorf tubes.
- 6) Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης των δειγμάτων με τη μέθοδο Bradford, χρησιμοποιώντας kit της BioRad.
- 7) Διαλύουμε 100μg πρωτεΐνης από κάθε δείγμα σε 800μl διαλύματος PM-2 και προσθέτουμε 200μl ONPG (4mg/ml). Επώαση στους 37°C, O/N.
- 8) Τερματισμός της αντίδρασης με 500μl Na₂CO₃.
- 9) Φωτομέτρηση στα 420nm.

12. Lac-Z assay

12.1. Lac-Z assay σε postnatal και ενήλικα ποντίκια

- 1) Απομόνωση των εγκεφάλων και τμήματος της νωτιαίας χορδής.
- 2) Μεταφορά των ιστών σε μονιμοποιητικό διάλυμα 2% παραφορμαλδεύδης, 0.2% γλουταραλδεύδης σε 1xPB, για 45 λεπτά στους 4°C
- 3) Τρία τουλάχιστον πλυσίματα των ιστών σε 1xPB για περίπου μισή ώρα το καθένα.
- 4) Έγκλιση των ιστών σε διάλυμα αλβουμίνης-ζελατίνης.
- 5) Τομές σε vibroslicer πάχους 100 μm.

- 6) Μεταφορά των τομών σε διάλυμα για Lac-Z χρώση. Το διάλυμα χρώσης αποτελείται από τα ακόλουθα συστατικά:
- X-Gal ή Bluo-Gal 20mg/ml
 - 1% NP-40
 - 1% Deoxycholate
 - 1M MgCl₂
 - 100x Ferrocyanide
 - 100x Ferricyanide
 - 1x PB
- 7) Επώαση O/N σε θερμοκρασία δωματίου σε συνθήκες σκότους.
- 8) Πλυσίματα με 1xPB.
- 9) Μονιμοποίηση των τομών σε διάλυμα 2% παραφορμαλδεΰδης, 0.2% γλουταραλδεΰδης σε 1xPB, O/N στους 4°C.
- 10) Μεταφορά των τομών σε διάλυμα 50% γλυκερόλης σε 1xPB, O/N στους 4°C.
- 11) Μεταφορά των τομών σε διάλυμα 80% γλυκερόλης σε 1xPB, για δύο ώρες στους 4°C.
- 12) Mounting των τομών με διάλυμα ζελατίνης-γλυκερόλης.

12.2 Lac-Z assay σε έμβρυα ποντικών

Σε έμβρυα ηλικίας E11 και E12 η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε τομές κρουτόμου για ολόκληρο το έμβρυο, ενώ στις υπόλοιπες ηλικίες πραγματοποιήθηκε απομόνωση του εγκεφάλου και τμήματος της νωτιαίας χορδής των εμβρύων και στη συνέχεια ακολούθησαν τομές σε κρουτόμο. Η όλη πειραματική πορεία ήταν κοινή σε όλα τα άλλα σημεία και περιγράφεται ακολούθως:

- 1) Μεταφορά των ιστών ή των εμβρύων σε μονιμοποιητικό διάλυμα 2% παραφορμαλδεΰδης, 0.2% γλουταραλδεΰδης σε 1xPB, για 30 λεπτά και στους 4°C
- 2) Τρία τουλάχιστον πλυσίματα των ιστών με 1xPB για περίπου μισή ώρα το καθένα.
- 3) Μεταφορά των εμβρύων ή των ιστών σε διάλυμα 30% σουκρόζης σε 1xPB, O/N.
- 4) Έγκλιση των εμβρύων ή των ιστών σε μίγμα 7.5% ζελατίνης, 15% σουκρόζης σε 1xPB.

- 5) Παγώμα των εμβρύων ή των ιστών σε μεθυλ-βουτάνιο, στους -55°C .
- 6) Τομές των εμβρύων ή των ιστών σε κρυτόμο, στους -20°C . Το πάχος των τομών που πραγματοποιήθηκαν ήταν 25 μm .
- 7) Μεταφορά των τομών σε Super Frost/Plus αντικειμενοφόρους.
- 8) Σχηματισμός του περιγράμματος της αντικειμενοφόρου με DACO pen.
- 9) Χρώση των τομών με τοποθέτηση 500 μl από το αντιδραστήριο χρώσης που περιγράψαμε παραπάνω.
- 10) Σταδιακή αφυδάτωση των τομών με διαδοχικά πλυσίματα σε: 70%, 80%, 95%, 100% αιθανόλη και ακολούθως 3 φορές με 100% τολουόλιο.
- 11) Mounting των τομών με Entellan.

13. In situ υβριδοποίηση

13.1. Πλασμίδιο για in situ.

Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του ανιχνευτή όσον αφορά στα in situ πειράματα φαίνεται στην εικ.1 των αποτελεσμάτων. (Κατασκευάστηκε από τον κ. Κ. Θεοδωράκη).

13.2. Παρασκευή του γραμμικού DNA προτύπου.

- 1) Υδρόλυση με το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού στην 5' περιοχή της κωδικοποιούσας αλληλουχίας του γονιδίου που θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για την in vitro μεταγραφή.
- 2) Προσθήκη 50 $\mu\text{g/ml}$ πρωτεΐνης K για 30 λεπτά στους 37°C .
- 3) Εκχυλίσεις με φαινόλη-χλωροφόρμιο
- 4) Επαναδιάλυση σε TE
- 5) Τρέχουμε μικρή ποσότητα σε πήκτωμα αγαρόζης για έλεγχο-ποσοτικοποίηση.

13.3. Παρασκευή του ανιχνευτή (probe).

- 1) Προσθήκη των ακόλουθων αντιδραστηρίων σε σιλικοναρισμένα Eppendorf tubes:
 - Nuclease free water 7μl
 - 5x transcription buffer 4μl
 - 0.1M DTT 2μl
 - 10mM rGTP 1μl
 - 10mM rCTP 1μl
 - 10mM rATP 1μl
 - 10mM rUTP 0.65μl
 - 10mM 11-DIGrUTP 0.35μl
 - RNAsin 1μl
 - RNA polymerase 1μl
 - 1μg/ml linear DNA template 1°C.
- 2) Επώαση για τουλάχιστον δύο ώρες στους 37°C.
- 3) Προσθήκη 2μl DNase απαλαγμένης από RNase και επώαση για 15 λεπτά στους 37°C.
- 4) Κατακρήμιση με: 90μl EDTA, 12μl LiCl 4M, 360μl EtOH 100%, στους -20°C για τουλάχιστον 30 λεπτά.
- 5) Φυγοκέντρηση για 10-15 λεπτά στα 12K rpm.
- 6) Πλύσιμο με 70% EtOH.
- 7) Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 12K rpm.
- 8) Στέγνωμα σε θερμοκρασία δωματίου.
- 9) Επαναδιάλυση σε 100 μl.
- 10) Τρέχουμε μικρή ποσότητα σε πήκτωμα αγαρόζης για έλεγχο και ποσοτικοποίηση.

13.4 In situ υβριδοποίηση για τομές κρυοτόμου.

1. Μονιμοποίηση των εμβρύων σε 4% παραφορμαλδεύδη, O/N.
2. Πλύσιμο των εμβρύων σε 1xPBS.
3. Μεταφορά των εμβρύων σε 30% σουκρόζη, O/N.
4. Έγκλιση των εμβρύων σε μίγμα 7.5% ζελατίνη, 15% σουκρόζη.

5. Παγώμα των εμβρύων σε μεθυλ-βουτάνιο, στους -55°C .
6. Τομές των εμβρύων σε κρυτόμο, στους -20°C . Το πάχος των τομών που πραγματοποιήθηκαν ήταν 10 μm .
7. Μεταφορά των τομών σε Super Frost/Plus αντικειμενοφόρους.
8. Στέγνωμα των τομών για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στο στάδιο αυτό οι τομές είναι δυνατόν να φυλαχθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -20°C ή -80°C .
9. Σχεδιασμός του περιγράμματος της αντικειμενοφόρου με DACO-pen.
10. Μονιμοποίηση των τομών σε 4% παραφορμαλδεύδη, σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Πλυσίματα των τομών σε 1xPBS.
12. Ακετυλίωση των τομών σε διάλυμα ακετυλίωσης [295 ml H_2O , 4 ml τριαιθανολαμίνη, 0.525 ml HCl (37%) και 0.75 ml οξικού ανυδρίτη]. Η ακετυλίωση πραγματοποιείται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Μεταφορά των τομών σε διάλυμα 1% Triton σε 1xPBS για 30 λεπτά.
14. Πλυσίματα των τομών σε 1xPBS.
15. Προϋβριδοποίηση των τομών: Προσθήκη 300 λ από το διάλυμα υβριδοποίησης [50% φορμαμίδιο, 5xSSC, 5xDenharts, 250mg/ml yeast RNA, 500mg/ml herring sperm DNA] σε κάθε αντικειμενοφόρο. Η προυβριδοποίηση διαρκεί τουλάχιστον 6 ώρες και γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου.
16. Υβριδοποίηση των τομών: Προσθήκη διαλύματος υβριδοποίησης [διάλυμα προϋβριδοποίησης το οποίο περιέχει 200-400 ng/ml από τον ανιχνευτή (DIG-RNA probe)]. Η υβριδοποίηση πραγματοποιείται στους 72°C , O/N.
17. Μεταφορά των τομών σε 0.2xSSC, στους 72°C και για 1 ώρα.
18. Πλύσιμο των τομών σε διάλυμα B1 [0.1M Tris pH7.5, 0.15 M NaCl] για 5 λεπτά.
19. Προσθήκη 300 ml διαλύματος blocking [B1 + 10% Foetal Calf Serum] πάνω σε κάθε αντικειμενοφόρο και επώαση για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
20. Χρώση με anti-DIG-AP αντίσωμα διαλυμένο 1/5000 σε διάλυμα B2 [B1 + 1% Foetal Calf Serum]. Επώαση O/N στους 4°C .
21. Τρία πλυσίματα με διάλυμα B1, 5 λεπτά το καθένα.
22. Τρία πλυσίματα με διάλυμα B3 [0.1M Tris pH9.5, 0.1M NaCl, 50mM MgCl_2], 10 λεπτά το καθένα.

23. Προσθήκη 300 ml από το διάλυμα B4 [75mg/ml NBT, 50mg/ml BCIP σε διάλυμα B3] πάνω σε κάθε αντικειμενοφόρο. Η αντίδραση πραγματοποιείται στο σκοτάδι και διαρκεί μέχρι να μας δώσει ικανοποιητική χρώση.
24. Πλύσιμο των τομών με TE.
25. Στέγνωμα των τομών σε θερμοκρασία δωματίου.
26. Σταδιακή αφυδάτωση των τομών με διαδοχικά πλυσίματα σε: 70%, 80%, 95%, 100% αιθανόλη και ακολούθως 3 φορές με 100% τολουόλιο.
27. Mounting των τομών με Entellan.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

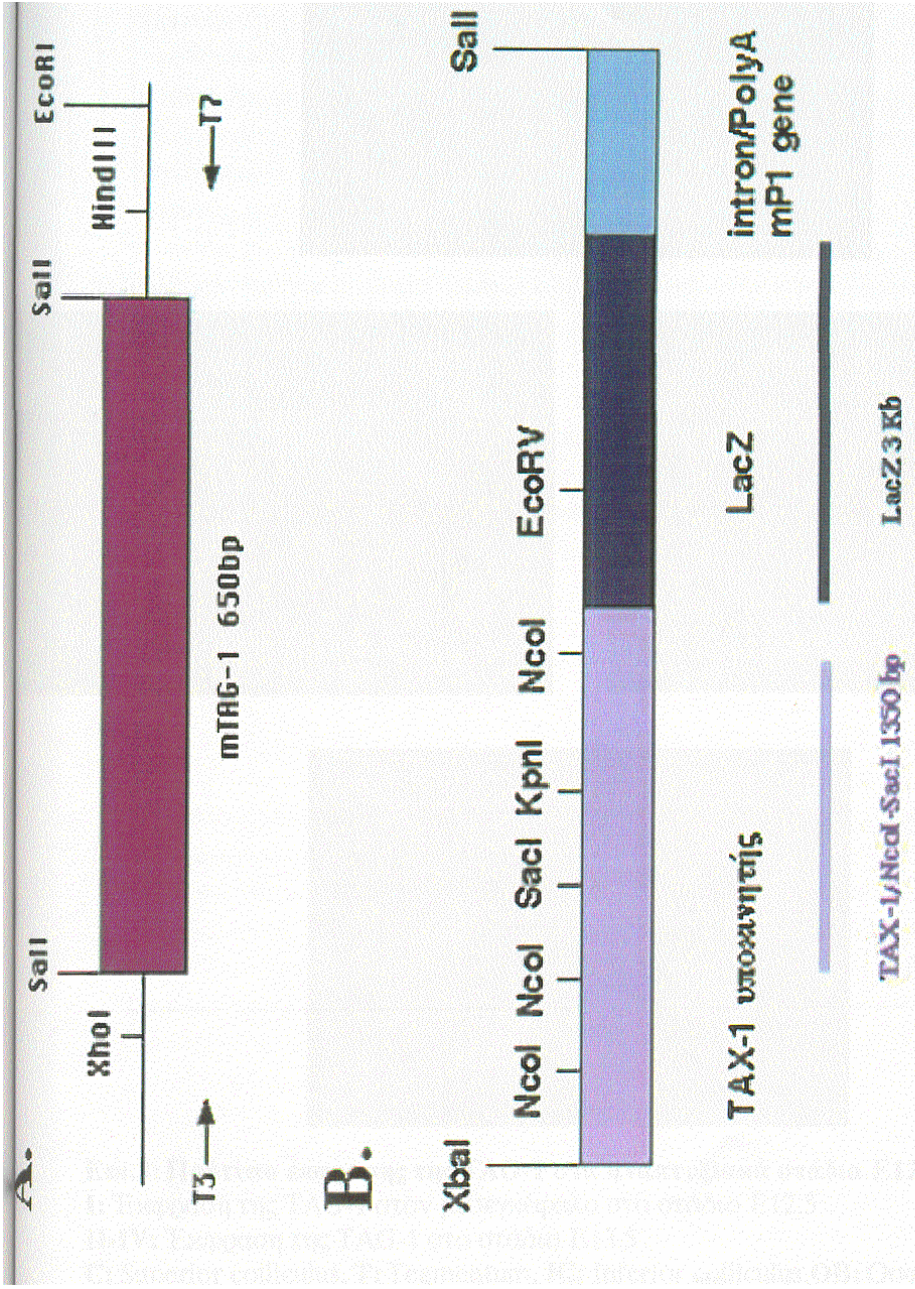
1. Πρότυπο έκφρασης της TAG-1 κατά την εμβρυϊκή και μετεμβρυϊκή ανάπτυξη καθώς και στο ενήλικο ποντίκι.

Για την μελέτη του προτύπου έκφρασης της TAG-1 στον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό του ποντικού χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της *in situ* υβριδοποίησης. Ως ανιχνευτής για τον προσδιορισμό της έκφρασης της TAG-1 χρησιμοποιήθηκε τμήμα του ενδογενούς γονιδίου *mtag-1* (σχήμα 1.Α.). Πρόκειται για ένα SalI-SalI τμήμα 650 bp το οποίο κλωνοποιήθηκε σε pBluescript KS. Το πλασμίδιο γραμμοποιήθηκε με HindIII και το cRNA παράχθηκε με T3 πολυμεράση.

1.1. Πρότυπο έκφρασης της TAG-1 κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του ποντικού.

Η μελέτη του προτύπου έκφρασης της ενδογενούς TAG-1 πραγματοποιήθηκε στα στάδια ανάπτυξης μεταξύ των εμβρυϊκών ημερών 12.5 και 17.5 (E12.5-E17.5), στον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό εμβρύων ποντικού. Για την μελέτη κάθε αναπτυξιακού σταδίου αναλύθηκαν τουλάχιστον δύο έμβρυα. Την εν λόγω αναπτυξιακή περίοδο συμβαίνουν δραματικές μορφογενετικές αλλαγές στο έμβρυο του ποντικού, και αναπτύσσονται όλες σχεδόν οι δομές του ΚΝΣ με κύρια εξαίρεση την παρεγκεφαλίδα που χαρακτηρίζεται από μετεμβρυϊκή ανάπτυξη. Αναλυτικά ανιχνεύσαμε έκφραση του ενδογενούς *tag-1* μεταγράφου στις ακόλουθες δομές του νευρικού συστήματος:

1) Εμβρυϊκή ημέρα ανάπτυξης 12.5 (E12.5): Στο στάδιο αυτό αρχίζουν να διακρίνονται σε μεγαλύτερο βαθμό οι διάφορες δομές του εγκεφάλου, ενώ παρατηρείται ιδιαίτερη αύξηση και διαφοροποίηση των θαλαμικών και υποθαλαμικών περιοχών, καθώς και του ραβδωτού σώματος (*corpus striatum*). Έκφραση της TAG-1 παρατηρείται σε πολλές από τις διαφοροποιούμενες περιοχές. Χαμηλό σήμα εντοπίζεται στην ενδιάμεση ζώνη (*intermediate zone*) του θαλαμικού νευροεπιθηλίου, καθώς και στην κοιλιακή υποθαλαμική περιοχή. Επίσης αρκετά έντονη έκφραση ανιχνεύεται στον μεσεγκέφαλο, στην ενδιάμεση ζώνη της καλύπτρας (*tegmentum*) και στην περιοχή που θα διαφοροποιηθεί στο τετράδυμο πέταλο (*pretectum mesencephali*) (εικ.2.1). Όσον αφορά στον νωτιαίο μυελό, σήμα



Εικ. 1: Α. Η κατασκευή για την *in vitro* μεταγραφή του φήματος της TAG-1 του ποντικού (mTAG-1) πραγματοποιήθηκε για την παρασκευή του ανιχνευτή της mTAG-1 *in situ* πειράματα.

Β. Η κατασκευή του TAX-1/LacZ διανομδίου και οι ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν για τη ανάλυση των διαγονιδιακών ποντικώ ν.



Εικ.2: Πρότυπο έκφρασης της TAG-1 στα αναπτυξιακά στάδια E12.5 και E13.5

I: Έκφραση της TAG-1 στον μεσεγκέφαλο στο στάδιο E12.5

II-IV: Έκφραση της TAG-1 στο στάδιο E13.5

C: Superior colliculus, **T:** Tegmentum, **IC:** Inferior colliculus, **OB:** Οσφρητικός βολβός,

C: Φλοιός, **I:** Μοριώδης στοιβάδα του φλοιού, **IZ:** Ενδιάμεση ζώνη του φλοιού,

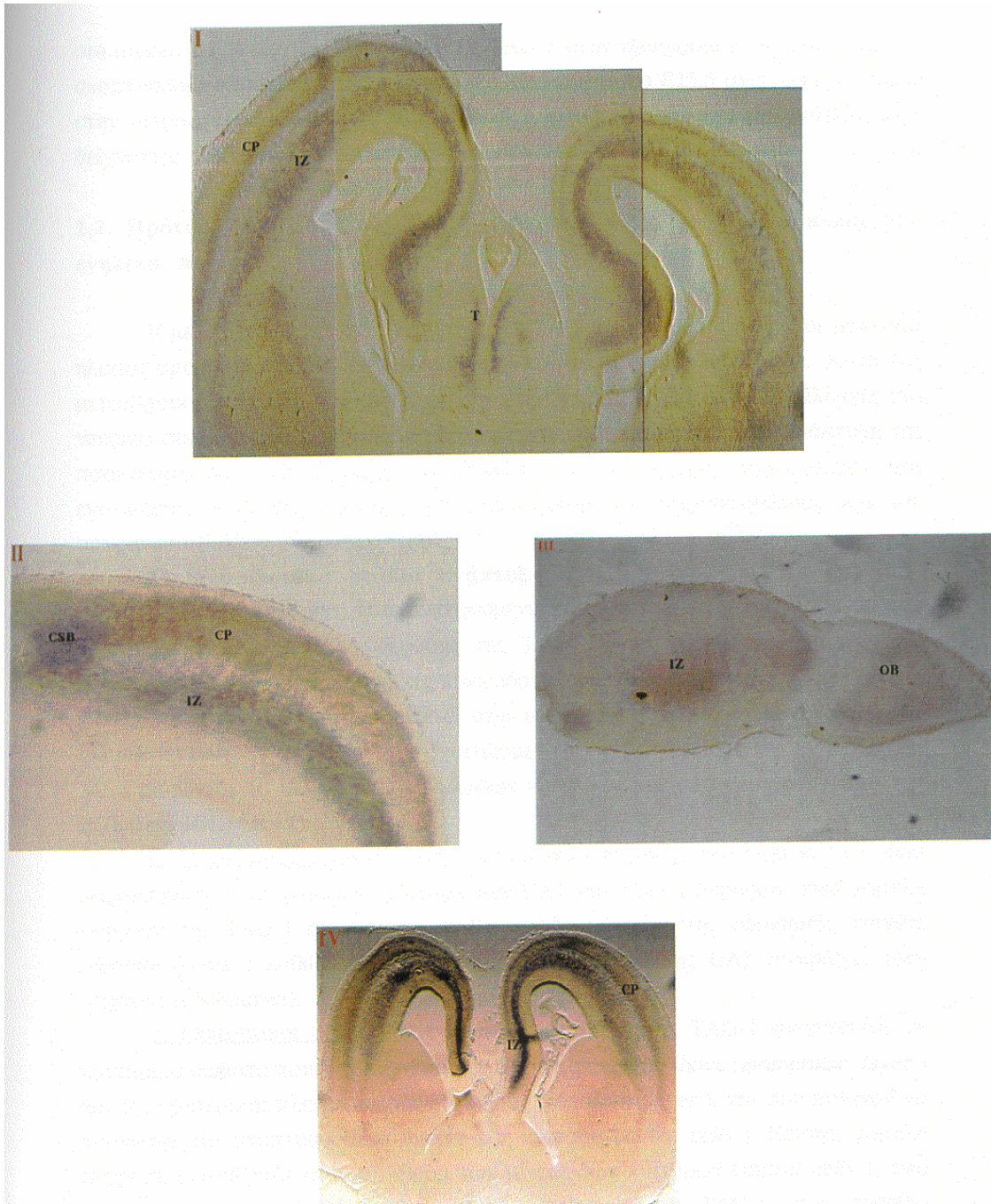
T: Θάλαμος, **AT:** Πρόσθιος Θάλαμος, **DRG:** Γάγγλια ραχιαίας ρίζας

εντοπίζεται μόνο στα γάγγλια του ραχιαίας ρίζας (DRG), όπως άλλωστε ήταν αναμενόμενο από ανάλογες μελέτες (Furley et al., 1990).

2) Εμβρυϊκή ημέρα ανάπτυξης 13.5 (E13.5): Στο στάδιο αυτό παρατηρείται ραγδαία διαφοροποίηση των βασικότερων δομών του προσθγκεφάλου, ενώ αρχίζει η διαφοροποίηση του εγκεφαλικού φλοιού (*cerebral cortex*). Έκφραση της TAG-1 ανιχνεύεται για πρώτη φορά στο οσφρητικό επιθήλιο (εικ.2.II) και στον αναπτυσσόμενο φλοιό, κυρίως στην κοιλιακή περιοχή αυτού. Συγκεκριμένα, όσον αφορά στον φλοιό, παρατηρούνται ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα έκφρασης στην ενδιάμεση ζώνη του φλοιού ενώ πολύ χαμηλότερα στη μοριώδη στοιβάδα (εικ.2.III). Σήμα συνεχίζουμε να εντοπίζουμε στην ενδιάμεση ζώνη του θαλάμου και τον κοιλιακό υποθάλαμο, καθώς επίσης και στον πρόσθιο θάλαμο (*anterior thalamus*) (εικ.2.III), ενώ στον μεσεγκέφαλο ανιχνεύεται έκφραση στα άνω (*superior*) και κάτω διδύμια (*inferior colliculus*) (εικ.2.IV). Στον νωτιαίο μυελό συνεχίζει να υπάρχει έκφραση του tag-1 στα γάγγλια της ραχιαίας ρίζας.

3)_Εμβρυϊκή μέρα 14.5 (E14.5): Στο στάδιο αυτό δε παρατηρούνται μεγάλες διαφορές όσον αφορά στις δομές στις οποίες ανιχνεύεται έκφραση της TAG-1 σε σχέση με το E13.5 στάδιο ανάπτυξης. Ωστόσο, σημαντικές διαφοροποιήσεις συμβαίνουν στον φλοιό, όπου εκτός του πολύ έντονου σήματος στην ιδιαίτερα αναπτυγμένη ενδιάμεση ζώνη, έκφραση εντοπίζεται και στο *cortical plate* (εικ.3.I-3.II). Επίσης λόγω της περαιτέρω ωρίμανσης των μεσαίων περιοχών του φλοιού έκφραση ανιχνεύεται και στον αναπτυσσόμενο ιππόκαμπο στην ενδιάμεση και πάλι ζώνη. Τέλος δεν εντοπίζουμε καθόλου σήμα στον νωτιαίο μυελό.

4) Στάδια ανάπτυξης από E15.5 έως E17.5: Στις ηλικίες αυτές το πρότυπο έκφρασης της TAG-1 περιορίζεται σταδιακά σε πολύ μεγάλο βαθμό αν και ανιχνεύεται έκφραση σε νέες δομές όπως για παράδειγμα στην παρεγκεφαλίδα, που μόλις αρχίζει να διαφοροποιείται. Αναλυτικά, όσον αφορά στον φλοιό, το πρότυπο έκφρασης της TAG-1 συνεχίζει να ακολουθεί την κοιλιακομεσαία πορεία ωρίμανσης του φλοιού, με αποτέλεσμα ενώ στις βασοκοιλιακές περιοχές του φλοιού να μην ανιχνεύεται έκφραση σε καμία στοιβάδα, να είναι ιδιαίτερα έντονη στην ενδιάμεση ζώνη και στο *cortical plate*, στο ραχιομεσαίο τμήμα του φλοιού (εικ.3.IV). Τελικά και στις περιοχές αυτές η έκφραση της TAG-1 θα εκλείψει μετά την γέννηση, και θα εντοπίζεται πλέον μόνο στον ιππόκαμπο. Στον διεγκέφαλο, στο στάδιο E15.5 εντοπίζεται έκφραση μόνο στον επιθάλαμο και σε περιορισμένους πυρήνες του υποθαλάμου, η οποία σταδιακά χάνεται ώστε τελικά στο στάδιο E17.5 να μην ανιχνεύεται έκφραση στον διεγκέφαλο. Στον μεσεγκέφαλο συνεχίζει να εκφράζεται TAG-1 στα άνω και κάτω διδύμια μέχρι το στάδιο E17.5 όπου και εκλείπει. Τέλος,



Εικ.3: Πρότυπο έκφρασης της TAG-1 στα αναπτυξιακά στάδια E14.5 και E15.5.

I-III: Έκφραση της TAG-1 στο στάδιο E14.5.

IV: Έκφραση της TAG-1 στο στάδιο E15.5.

OB: Όσφρητικός βολβός, **IZ:** Ενδιάμεση ζώνη του φλοιού, **CP:** Cortical plate, **T:** Θάλαμος, **CSB:** Corticostriatal boundary.

στο στάδιο E17.5 αρχίζει η έκφραση της TAG-1 στην εξωτερική βλαστική ζώνη της αναπτυσσόμενης παρεγκεφαλίδας, ενώ ήδη από το στάδιο E15.5 ανιχνεύεται TAG-1 στην μιτροειδή στοιβάδα και τον πρόσθιο πυρήνα των οσφρητικών βολβών (δεν δείχνονται δεδομένα).

1.2. Πρότυπο έκφρασης της TAG-1 κατά την μετεμβρυϊκή ηλικία και στο ενήλικο ποντίκι.

Η μέλετη του προτύπου έκφρασης της TAG-1 πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια ηλικίας από P0 (postnatal day 0) έως P17, καθώς και σε ενήλικα ποντίκια. Κατά την μετεμβρυϊκή ανάπτυξη δεν παρατηρούνται δραματικές μορφογενετικές αλλαγές στο νευρικό σύστημα του ποντικού, με εξαίρεση την διαφοροποίηση και ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας. Η έκφραση της TAG-1 είναι ιδιαίτερα περιορισμένη και εντοπίζεται μόνο στις περιοχές του ιπποκάμπου, της παρεγκεφαλίδας και του οσφρητικού βολβού. Αναλυτικότερα:

1) Μετεμβρυϊκά στάδια ανάπτυξης P0-P17:

α) Παρεγκεφαλίδα: Η αναπτυσσόμενη παρεγκεφαλίδα χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα έκφρασης της TAG-1 στην προμεταναστευτική ζώνη (*preimigratory zone*) της εξωτερικής κοκκώδους στοιβάδας (*external granular layer - EGL*). Ασθενέστερο σήμα εντοπίζεται στην εσωτερική κοκκώδη στοιβάδα (*internal granule layer-IGL*), ενώ στην νεοσχηματιζόμενη μοριώδη στοιβάδα (*molecular layer-ML*) βράφονται τα σώματα των κοκκωδών κυττάρων που μεταναστεύουν από την EGL στην IGL (εικ.4.I).

β) Ιπποκάμπος: Στην περιοχή του αμμωνίου κέρατος, ιδιαίτερα έντονο σήμα παρουσίασαν τα πυραμιδικά κύτταρα των CA1 και CA3 στοιβάδων, ενώ χαμηλή έκφραση της TAG-1 ανιχνεύεται στα κοκκώδη κύτταρα της οδοντωτής ταινίας (*dentate gyrus*) καθώς και στα πυραμιδικά κύτταρα της CA2 στοιβάδας (δεν δείχνονται δεδομένα).

γ) Οσφρητικοί βολβοί: Η εντονότερη έκφραση της TAG-1 ανιχνεύεται σε κυτταρικά σώματα που εντοπίζονται μεταξύ της σπειραμοειδούς (*glomerular layer*) και της εξωτερικής πλεγματοειδούς στοιβάδας (*plexiform layer*), και που πιθανόν να πρόκειται για αναπτυσσόμενα θυσσανώδη κύτταρα (*tufted cells*). Επίσης, χαμηλή έκφραση εντοπίζεται στην στοιβάδα των μιτροειδών κυττάρων (*mitral cells*), ενώ χαρακτηριστικά υψηλά είναι τα επίπεδα έκφρασης της TAG-1 στον πρόσθιο οσφρητικό πυρήνα (*anterior olfactory nucleus*) σε σχέση με τον οπίσθιο (*posterior olfactory nucleus*) όπου το σήμα είναι πιο ασθενές (δεν δείχνονται δεδομένα).

2) **Ενήλικο ποντίκι:** Η έκφραση της TAG-1 στο ενήλικο ποντίκι δε παρουσιάζει σημαντικές διαφορές σε σχέση με το πρότυπο έκφρασης στα προαναφερόμενα μεταμβρυϊκά στάδια. Στην παρεγκεφαλίδα η έκφραση ελλατώνεται σημαντικά στην εξωτερική κοκκώδη στοιβάδα ενώ είναι ιδιαίτερα έντονη στην εσωτερική κοκκώδη στοιβάδα (εικ 14). Όσον αφορά στον ιππόκαμπο και τους οσφρητικούς βολβούς, εξακολουθεί να υπάρχει έκφραση στις ίδιες περιοχές αλλά σαφέστερα σε πολύ χαμηλότερο επίπεδο.

Τα αποτελέσματά μας όσον αφορά στην έκφραση της TAG-1 στα μετεμβρυϊκά στάδια ανάπτυξης και στο ενήλικο ποντίκι βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Wolfer et al., 1998).

Το αυστηρά περιορισμένο χωροχρονικά πρότυπο έκφρασης του TAG-1 γονιδίου κατά την ανάπτυξη του ποντικού παρουσιάζεται στα ακόλουθα σχεδιαγράμματα:

Τελεγκέφαλος

	E12.5	E13.5	E14.5	E15.5	E17.5	P0	P6	Adult
Οσφρ.Βολβός								
Θυσσανώδη κυτ.	□	□	□	□	□	■	■	▨
Μιτροειδή κυτ.	□	□	□	▣	▣	▨	▨	▣
Προσθ. πυρήνας	□	□	□	▣	▨	■	■	▨
Οπίσθ. πυρήνας	□	□	□	□	▨	▨	▨	▣
Φλοιός								
Μοριώδη στοιβ.	□	▣	□	□	□	□	□	□
Cortical plate	□	□	▣	▨	■	▣	□	□
Ενδιάμεση στοιβ.	□	▣	■	■	■	▣	□	□
Ιππόκαμπος								
CA1	□	□	□	□	□	■	■	▨
CA2	□	□	□	□	□	▣	▣	□
CA3	□	□	□	□	□	■	■	▨
Οδοντωτή ταινία	□	□	□	□	□	▣	▣	□

Διεγκέφαλος

	E12.5	E13.5	E14.5	E15.5	E17.5	P0	P6	Adult
Θάλαμος	▨	■	■	▨	□	□	□	□
Υποθάλαμος	▩	▩	▩	□	□	□	□	□
Επιθάλαμος	□	□	□	▨	□	□	□	□

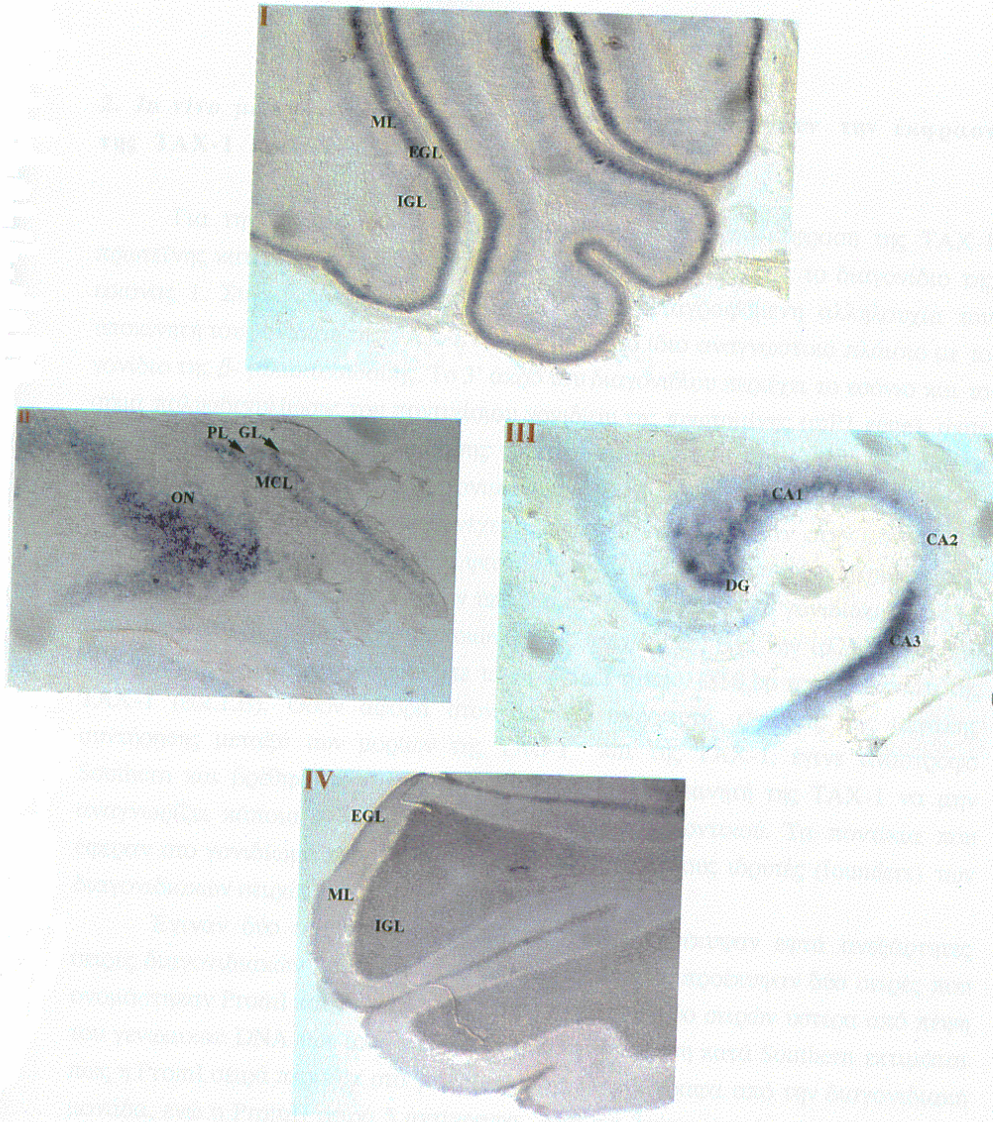
Μεσεγκέφαλος

	E12.5	E13.5	E14.5	E15.5	E17.5	P0	P6	Adult
Ανω διδύμα	□	■	■	▨	▩	□	□	□
Κάτω διδύμα	□	■	■	▨	▩	□	□	□
Καλύπτρα	■	▨	□	□	□	□	□	□

Μετεγκέφαλος

	E12.5	E13.5	E14.5	E15.5	E17.5	P0	P6	Adult
Παρεγκεφαλίδα								
EGL	□	□	□	□	▩	■	■	▩
ML	□	□	□	□	□	▩	▩	□
IGL	□	□	□	□	□	▩	▨	■

□ : καθόλου έκφραση ▩ : ελάχιστη έκφραση ▨ : μικρή έκφραση ■ : μεγάλη έκφραση



Εικ.4: Πρότυπο έκφρασης της TAG-1 κατά την μετεμβρυική ανάπτυξη και στο ενήλικο ποντίκι

I: Έκφραση της TAG-1 στην παρεγκεφαλίδα κατά την ηλικία P0

II-IV: Έκφραση της TAG-1 στο ενήλικο ποντίκι

II: Οσφρητικός βολβός **III:** Ιππόκαμπος **IV:** Παρεγκεφαλίδα

EGL: Εξωτερική κοκκώδης στοιβάδα, **ML:** Μοριώδης στοιβάδα,

IGL: Εσωτερική κοκκώδης στοιβάδα, **DG:** Προιονωτή ταινία,

ON: Πυρήνας οσφρητικού βολβού, **ML:** Στοιβάδα μιτροειδών κυττάρων,

PL: Πλεγματοειδής στοιβάδα, **GL:** Σπειραμοειδής στοιβάδα

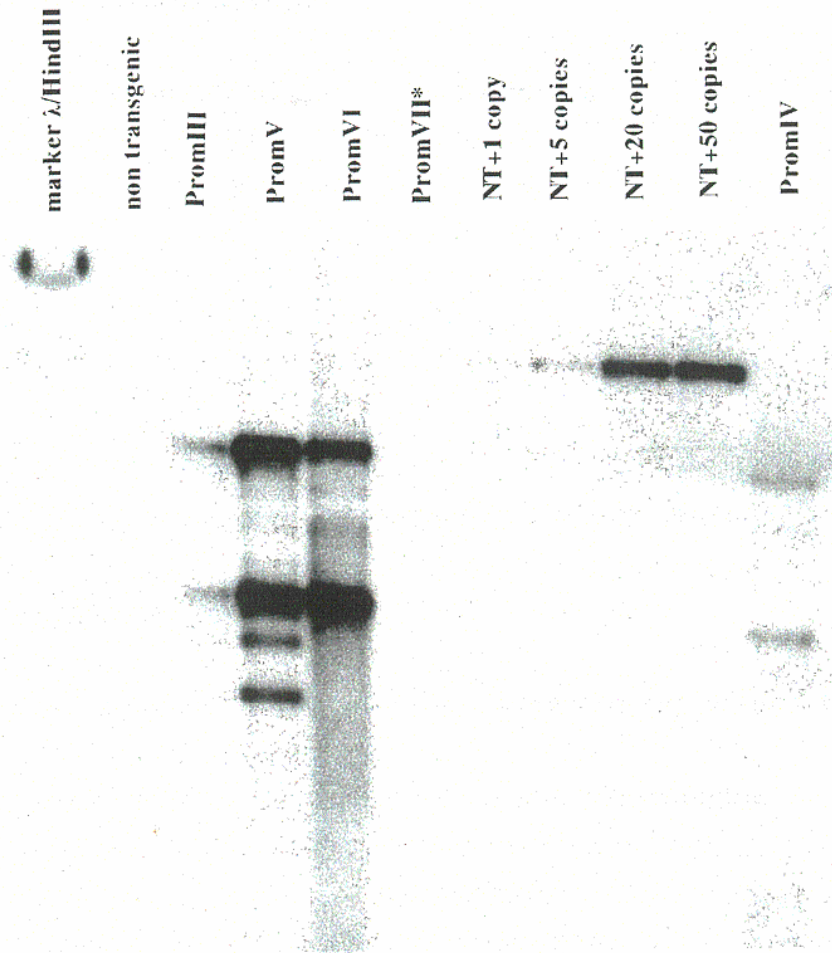
CA1,CA2,CA3 στοιβάδες ιπποκάμπου

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

2. *In vivo* μελέτη στοιχείων του υποκινητή που ελέγχουν την έκφραση της TAX-1 πρωτεΐνης.

Για την *in vivo* μελέτη στοιχείων που ελέγχουν την έκφραση της TAX-1 πρωτεΐνης κατασκευάστηκαν διαγονιδιακά ποντίκια που έφεραν το διαγονίδιο της εικόνας 1. Συγκεκριμένα 4 Kb από την 5' μη μεταγραφόμενη αλληλουχία του υποκινητή του γονιδίου της TAX-1 συνδέθηκαν στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης. Το 3' άκρο του διαγονιδίου περιέχει το εσόνιο και το σήμα πολυαδενυλίωσης του ποντικίσσιου γονιδίου της πρωταμίνης (mP1 gene), ώστε το μετάγραφο της β-γαλακτοσιδάσης να είναι σταθερό. Το διαγονίδιο ενέθηκε σε έναν από τους δύο προπυρήνες γονιμοποιημένων ωαρίων ποντικού, πριν από το στάδιο σύντηξής τους, ενώ στη συνέχεια τα ωάρια εμφυτεύθηκαν στην μήτρα μιας ποντικίνας που ήταν σε κατάσταση ψευδοκύησης. Τα ποντίκια που γεννήθηκαν από την κύηση αυτή ελέγχθηκαν για την ύπαρξη του διαγονιδίου στο γονιδίωμά τους με ανάλυση κατά Southern, χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτές, είτε την αλληλουχία του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης, είτε το NcoI-SacI τμήμα 1350 bp του υποκινητή της TAX-1 (εικ.1.B). Όσον αφορά στον δεύτερο ανιχνευτή, εξαιτίας της μεγάλης συντήρησης μεταξύ των μορίων της TAG-1 και της TAX-1, έγινε ανάστροφο Southern και βρέθηκε το συγκεκριμένο τμήμα του υποκινητή της TAX-1 να μην αναγνωρίζει κάποια αλληλουχία στο γονιδίωμα του ποντικού. Τα ποντίκια που έφεραν στο γονιδίωμα τους το διαγονίδιο αποτέλεσαν τους ιδρυτές (founders) των διαγονιδιακών σειρών.

Έγιναν δύο σειρές ενέσεων από τις οποίες προέκυψαν επτά ανεξάρτητες σειρές διαγονιδιακών ποντικών. Από τις πρώτες ενέσεις προέκυψαν δύο σειρές που ονομάστηκαν PromI και PromII. Από το πρότυπο των δύο σειρών ύστερα από πέψη του γενωμικού DNA των founders με EcoRV και ανάλυση κατά Southern εκτιμάται πως η PromI σειρά περιέχει στο γονιδίωμά της 10 αντίγραφα από την διαγονιδιακή μονάδα, ενώ η PromII σειρά 5 αντίγραφα. Από τις δεύτερες ενέσεις προέκυψαν οι σειρές PromIII έως PromVII. Το πρότυπο των σειρών αυτών ύστερα από ανάλυση κατά Southern φαίνεται στο σχήμα 1. Όσον αφορά στον αριθμό των αντιγράφων της διαγονιδιακής μονάδας που περιέχουν, αυτός εκτιμάται σε 7 για την PromIII, 5 για την PromIV, ~100 για την PromV, ~ 100 για την PromVI ενώ για την PromVII δεν έχει γίνει ανάλυση (πίνακας 1).



Σχήμα 1: Ανάλυση των ιδρυτών (founders) των διαγονιδιακών σειρών PromIII-PromVII* κατά Southern, ύστερα από υδρόλυση του γενομικού DNA με το ένζυμο EcoRV

NT: non-transgenic: μη διαγονιδιακό ζώο

NT+1-50 copies: γενομικό DNA από μη διαγονιδιακό ζώο με ένα ή μεγαλύτερο αριθμό αντιγράφων του ενθέματος (insert).

PromVII*: Στο συγκεκριμένο Southern δεν ανιχνεύθηκε σήμα για την PromVII σειρά, η οποία είναι υπό εξέταση.

Τέλος, όσον αφορά την λειτουργικότητα του υποκινητή, έγινε για κάθε σειρά μελέτη του προτύπου έκφρασης της β-γαλακτοσιδάσης με την εφαρμογή ιστοχημείας, χρησιμοποιώντας X-Gal ή Bluo-Gal ως υποστρώματα του ενζύμου. Αναλύθηκαν όλα τα στάδια της εμβρυϊκής (E11.5-E17.5) και μετεβρυϊκής ανάπτυξης του ποντικού (P0-P16), καθώς και ενήλικα ποντίκια.

Σειρά	Copy number	Έκφραση
PromI	10	-
PromII	5	+
PromIII	7	-
PromIV	5	+
PromV	~100	+
PromVI	~100	+
PromVII	?	?

Πίνακας 1. Ο αριθμός αντιγράφων του διαγονιδίου σε κάθε σειρά και ποιές σειρές το εκφράζουν.

? : Δεν έχει γίνει ανάλυση.

2.1. Μελέτη του προτύπου έκφρασης της διαγονιδιακής σειράς PromI.

Η μελέτη του προτύπου έκφρασης της PromI διαγονιδιακής σειράς έγινε αρχικά σε ετερόζυγα, όσον αφορά στο διαγονίδιο ποντίκια, στα οποία δεν ανιχνεύθηκε έκφραση β-γαλακτοσιδάσης σε κανένα αναπτυξιακό στάδιο, εμβρυϊκά ή μετεμβρυϊκά. Προσπάθειες για την παραγωγή ομόζυγων ποντικών έδωσαν μόνο θηλυκά ομόζυγα ποντίκια, στα οποία εντοπίστηκε έκφραση μόνο στο χοριοειδές πλέγμα, κατά την P6 ηλικία. Μελέτες για έκτοπη έκφραση του διαγονιδίου σε ιστούς μη νευρικής προέλευσης δεν πραγματοποιήθηκαν. Δεν έγινε περαιτέρω ανάλυση.

2.2. Μελέτη του προτύπου έκφρασης της διαγονιδιακής σειράς PromII.

Η PromII διαγονιδιακή σειρά όπως προαναφέρθηκε φέρει στο γονιδιώμα της το διαγονίδιο σε πέντε αντίγραφα. Ωστόσο, αν και ο αριθμός των αντιγράφων είναι μικρότερος από αυτόν της PromI, η σειρά παρουσιάζει υψηλά επίπεδα έκφρασης β-γαλακτοσιδάσης σε διάφορες δομές του νευρικού συστήματος, τόσο εμβρυϊκά όσο και μετεμβρυϊκά. Η έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης περιορίζεται μόνο στον νευρικό ιστό,

όπως αποδείχτηκε με την εφαρμογή της ONPG μεθόδου για μία σειρά πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από διάφορους ιστούς, σε αντιπροσωπευτικά αναπτυξιακά στάδια και στο ενήλικο ποντίκι (πίνακας 2).

Η μελέτη του προτύπου έκφρασης του διαγονιδίου πραγματοποιήθηκε σε ομόζυγα ποντίκια ξεκινώντας από την εμβρυϊκή ημέρα ανάπτυξης 11.5 (E11.5) σε όλα τα μετέπειτα αναπτυξιακά στάδια και στο ενήλικο ποντίκι. Για την μελέτη κάθε ηλικίας θυσιάστηκαν τουλάχιστον 2 ζώα.

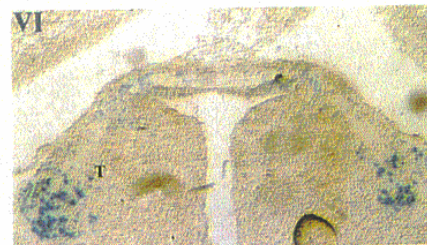
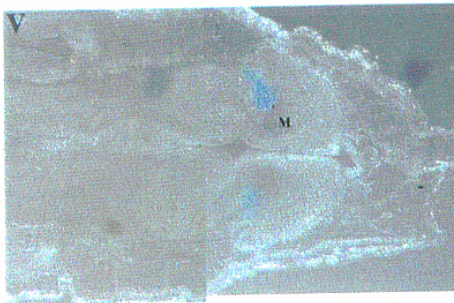
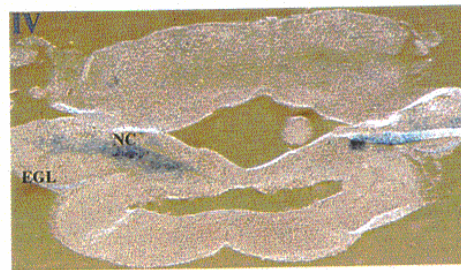
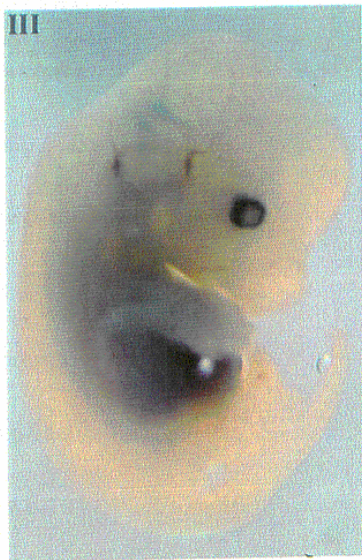
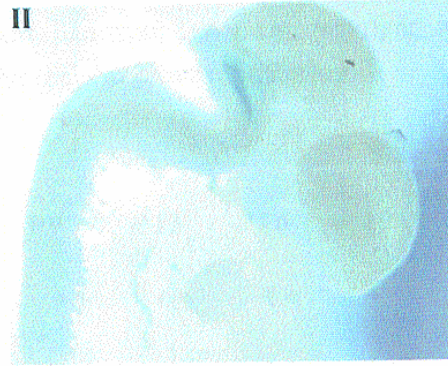
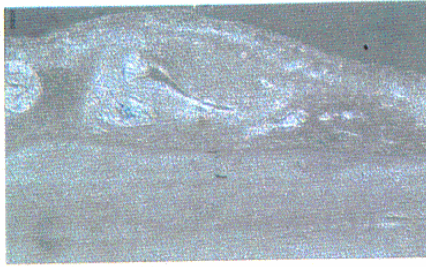
Το πρότυπο έκφρασης του διαγονιδίου στην PromII σειρά παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον εφόσον φαίνεται να ακολουθεί μερικώς το πρότυπο έκφρασης της ενδογενούς TAG-1, όσον αφορά τους κυτταρικούς πληθυσμούς στους οποίους ανιχνεύεται σήμα, δεν χαρακτηρίζεται όμως από την ίδια χρονική εξέλιξη. Οι διαφορές μεταξύ των προτύπων έκφρασης της ενδογενούς TAG-1 και του διαγονιδίου, καθώς και οι πιθανοί λόγοι για την ύπαρξη αυτών θα μελετηθούν στο τμήμα της συζήτησης. Στη συνέχεια θα περιγράψουμε αναλυτικά το πρότυπο έκφρασης του διαγονιδίου στην PromII σειρά.

2.2.1. Πρότυπο έκφρασης του διαγονιδίου στην PromII σειρά κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη.

1) Εμβρυϊκή ημέρα ανάπτυξης 12.5 (E12.5): Το πρότυπο έκφρασης του διαγονιδίου στο στάδιο αυτό είναι περιορισμένο σε λίγες περιοχές του ΚΝΣ. Σήμα ανιχνεύεται σε πυρήνες του προμήκη μυελού (*medulla*) και στο αιθουσαιοκοχλικό γάγγλιο (*vestibulocochlear gagglion complex*) (εικ.5.I-II).

2) Εμβρυϊκή μέρα ανάπτυξης 13.5 (E13.5): Στο στάδιο αυτό συνεχίζει να υπάρχει έκφραση του διαγονιδίου στις προαναφερόμενες δομές καθώς επίσης και σε πυρήνες του μεσεγκεφάλου (εικ.5.IV). Αξίζει να σημειωθεί πως σε χρώση που έγινε σε τομές του κωτιαίου μυελού εμβρύου της εν λόγω ηλικίας, ανιχνεύεται σήμα σε κύτταρα που κατανέμονται κατά μήκος του ραχιαιοκοιλιακού άξονα του ΝΜ, ενώ δεν έχουμε καθόλου χρώση στα γάγγλια της ραχιαίας ρίζας.

3) Εμβρυϊκή μέρα ανάπτυξης 14.5 (E14.5): Καθώς στο στάδιο αυτό αναπτύσσονται πολλές δομές του ΚΝΣ παρατηρείται και αύξηση των περιοχών που εμφανίζουν X-gal χρώση. Συγκεκριμένα, έκφραση του διαγονιδίου ανιχνεύεται σε πυρήνες του ενδιάμεσου θαλάμου (*intermediate thalamus*) και υποθαλάμου (*intermediate hypothalamus*), σε πυρήνες του μεσεγκεφάλου κυρίως στην ενδιάμεση ζώνη της καλύπτρας (*tegmentum*), στο πρόσθιο τμήμα της γέφυρα (*anterior pons*),



Εικ.5: Πρότυπο έκφρασης του TAX-1/LacZ διαγονιδίου κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη.

I: Τομή εμβρύου ηλικίας E12.5. Ανιχνεύεται έκφραση στο σύμπλεγμα του αιθουσαιοκοχλικού γαγγλίου.

II-III: LacZ χρώση σε ολόκληρο έμβryo ηλικίας E12.5, και σε εγκέφαλο εμβρύου της ίδιας ηλικίας.

IV: Έκφραση του διαγονιδίου σε πυρήνες του μεσεγκεφάλου (M) σε έμβryo ηλικίας E13.5.

V-VI: Τομές εγκεφάλου εμβρύων ηλικίας E15.5 στις οποίες ανιχνεύεται LacZ σήμα σε πυρήνες του θαλάμου (T) και στην παρεγκεφαλίδα στον φλοιό (EGL) και στους πυρήνες (NC).

4) Εμβρυϊκά στάδια ανάπτυξης από E15.5-E17.5: Στα τελευταία αυτά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης συνεχίζει να υπάρχει έκφραση του διαγονιδίου σε όλες τις δομές του ΚΝΣ που περιγράψαμε στο στάδιο E14.5 και μάλιστα σε υψηλότερο βαθμό (εικ.5V-VI). Η μη ελάττωση της έκφρασης του διαγονιδίου στο τέλος της εμβρυϊκής ανάπτυξης και η πλήρης έλλειψη έκφρασής του στον αναπτυσσόμενο φλοιό, αποτελούν τις δύο βασικότερες διαφορές του TAX-1/LacZ διαγονιδίου σε σχέση με το πρότυπο έκφρασης της ενδογενούς TAG-1, την εν λόγω αναπτυξιακή περίοδο.

2.2.2. Πρότυπο έκφρασης του διαγονιδίου στην P_{rom}II σειρά κατά την μετεμβρυϊκή ανάπτυξη και στο ενήλικο ποντίκι.

Το πρότυπο έκφρασης του TAX-1/LacZ διαγονιδίου μελετήθηκε στα μετεμβρυϊκά στάδια ανάπτυξης από P0 έως P17 (εικ.6), καθώς και σε ενήλικα ποντίκια ηλικίας δύο-τριών μηνών (εικ.7). Κατά την ανάλυση διαπιστώσαμε να υπάρχει το ίδιο πρότυπο έκφρασης του διαγονιδίου σε όλα τα προαναφερόμενα στάδια, με μικρές ίσως διακυμάνσεις όσον αφορά στην ένταση του σήματος οι οποίες όμως δεν αντιπροσωπεύουν διαφοροποιήσεις που οφείλονται στο στάδιο ανάπτυξης. Γίνεται λοιπόν φανερό, πως και κατά την μετεμβρυϊκή ανάπτυξη η έκφραση του διαγονιδίου δε χαρακτηρίζεται από ένα αυστηρά καθορισμένο χρονικό πρότυπο.

Συγκεκριμένα, έκφραση του διαγονιδίου ανιχνεύεται στις ακόλουθες δομές:

α) Τελεγκέφαλος: Έκφραση του διαγονιδίου εντοπίζεται στον πρόσθιο και σε μικρότερο βαθμό στον οπίσθιο πυρήνα του οσφρητικού βολβού, στον εγκεφαλικό φλοιό στις στοιβάδες II/ III και VI, στον ιππόκαμπο στις στοιβάδες CA1, CA2 σε χαμηλότερη έκφραση στην CA3 καθώς και στο υπόθεμα (*subiculum*), στο αμυγδαλοειδές σώμα (*amygdala*) και στην ωχρή σφαίρα (*globus pallidus*).

β) Διευκέφαλος: Ανιχνεύεται έκφραση του TAX-1/LacZ διαγονιδίου σε πολλούς πυρήνες του θαλάμου και του υποθαλάμου.

γ) Μεσεγκέφαλος: Εντοπίζεται χρώση στα άνω και κάτω διδύμια.

δ) Παιοεγκεφαλίδα: Το διαγονίδιο εκφράζεται τόσο στην εξωτερική και εσωτερική κοκκώδη στοιβάδα, όσο και στην στοιβάδα των Purkinje κυττάρων.

ε) Μετεγκέφαλος: Σε διάφορους πυρήνες της γέφυρας και του προμήκη.

Συνοπτικά το χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης του TAX-1/LacZ διαγονιδίου παρουσιάζεται στο ακόλουθο σχεδιάγραμμα.

4) Εμβρυϊκά στάδια ανάπτυξης από E15.5-E17.5: Στα τελευταία αυτά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης συνεχίζει να υπάρχει έκφραση του διαγονιδίου σε όλες τις δομές του ΚΝΣ που περιγράψαμε στο στάδιο E14.5 και μάλιστα σε υψηλότερο βαθμό (εικ.5V-VI). Η μη ελάττωση της έκφρασης του διαγονιδίου στο τέλος της εμβρυϊκής ανάπτυξης και η πλήρης έλλειψη έκφρασής του στον αναπτυσσόμενο φλοιό, αποτελούν τις δύο βασικότερες διαφορές του TAX-1/LacZ διαγονιδίου σε σχέση με το πρότυπο έκφρασης της ενδογενούς TAG-1, την εν λόγω αναπτυξιακή περίοδο.

2.2.2. Πρότυπο έκφρασης του διαγονιδίου στην PromII σειρά κατά την μετεμβρυϊκή ανάπτυξη και στο ενήλικο ποντίκι.

Το πρότυπο έκφρασης του TAX-1/LacZ διαγονιδίου μελετήθηκε στα μετεμβρυϊκά στάδια ανάπτυξης από P0 έως P17 (εικ.6), καθώς και σε ενήλικα ποντίκια ηλικίας δύο-τριών μηνών (εικ.7). Κατά την ανάλυση διαπιστώσαμε να υπάρχει το ίδιο πρότυπο έκφρασης του διαγονιδίου σε όλα τα προαναφερόμενα στάδια, με μικρές ίσως διακυμάνσεις όσον αφορά στην ένταση του σήματος οι οποίες όμως δεν αντιπροσωπεύουν διαφοροποιήσεις που οφείλονται στο στάδιο ανάπτυξης. Γίνεται λοιπόν φανερό, πως και κατά την μετεμβρυϊκή ανάπτυξη η έκφραση του διαγονιδίου δε χαρακτηρίζεται από ένα αυστηρά καθορισμένο χρονικό πρότυπο.

Συγκεκριμένα, έκφραση του διαγονιδίου ανιχνεύεται στις ακόλουθες δομές:

α) Τελεγκέφαλος: Έκφραση του διαγονιδίου εντοπίζεται στον πρόσθιο και σε μικρότερο βαθμό στον οπίσθιο πυρήνα του οσφρητικού βολβού, στον εγκεφαλικό φλοιό στις στοιβάδες II/ III και VI, στον ιππόκαμπο στις στοιβάδες CA1, CA2 σε χαμηλότερη έκφραση στην CA3 καθώς και στο υπόθεμα (*subiculum*), στο αμυγδαλοειδές σώμα (*amygdala*) και στην ωχρή σφαίρα (*globus pallidus*).

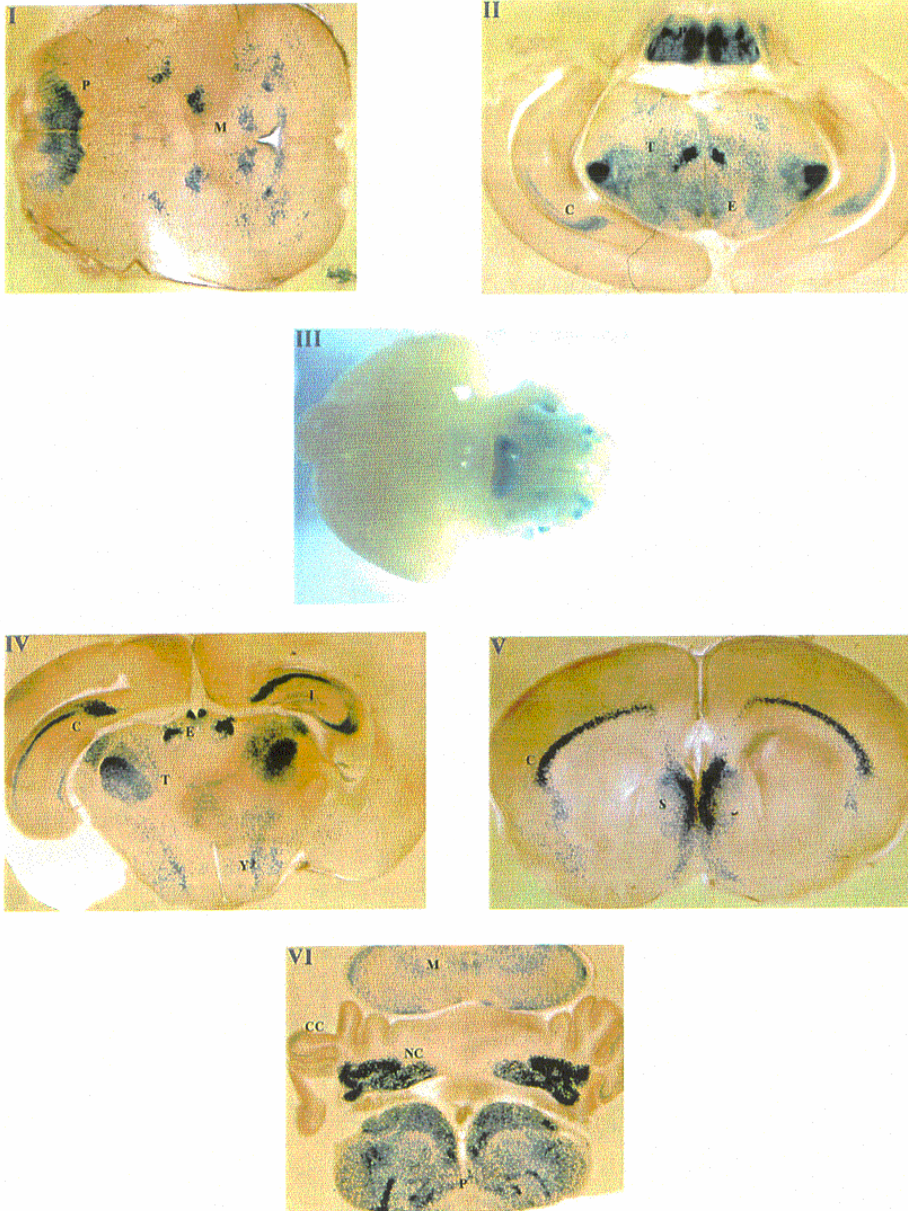
β) Διευκέφαλος: Ανιχνεύεται έκφραση του TAX-1/LacZ διαγονιδίου σε πολλούς πυρήνες του θαλάμου και του υποθαλάμου.

γ) Μεσεγκέφαλος: Εντοπίζεται χρώση στα άνω και κάτω διδύμια.

δ) Παιοεγκεφαλίδα: Το διαγονίδιο εκφράζεται τόσο στην εξωτερική και εσωτερική κοκκώδη στοιβάδα, όσο και στην στοιβάδα των Purkinje κυττάρων.

ε) Μετεγκέφαλος: Σε διάφορους πυρήνες της γέφυρας και του προμήκη.

Συνοπτικά το χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης του TAX-1/LacZ διαγονιδίου παρουσιάζεται στο ακόλουθο σχεδιάγραμμα.



Εικ.6: Πρότυπο έκφρασης του TAX-1/LacZ κατά την μετεμβρυϊκή ανάπτυξη.

I-II: LacZ χρώση στον μεσεγκέφαλο (M) και την γέφυρα (P) ποντικού ηλικίας P2.

II, IV: Έκφραση του διαγονιδίου σε πυρήνες του Θαλάμου (T), στον φλοιό (C), τον ιππόκαμπο (I), τον υποθάλαμο (Y) και τον επιθάλαμο (E) σε ποντίκι ηλικίας P4

V, VI: Τομές εγκεφάλου ποντικού ηλικίας P7 στις οποίες ανιχνεύεται έκφραση του TAX-1/LacZ διαγονιδίου στον φλοιό, στο septum (S), στον μεσεγκέφαλο (M), σε πυρήνες (NC) και στον φλοιό (CC) της παρεγκεφαλίδας.

Τελεγκέφαλος

	E12.5	E13.5	E14.5	E15.5- 17.5	P0-P17	Adult
Οσφρ.Βολβοί						
Πρόσθιος πυρήνας	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Οπίσθιος πυρήνας	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Φλοιός						
στοιβάδα II/ III	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
στοιβάδα VI	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Ιππόκαμπος						
CA1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
CA2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
CA3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
υπόθεμα	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Αμυγδαλή	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Ωχρή σφαίρα	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Διεγκέφαλος

	E12.5	E13.5	E14.5	E15.5- 17.5	P0-P17	Adult
Θάλαμος	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Υποθάλαμος	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

: καθόλου έκφραση
 : ελάχιστη έκφραση
 : μικρή έκφραση
 : μεγάλη έκφραση

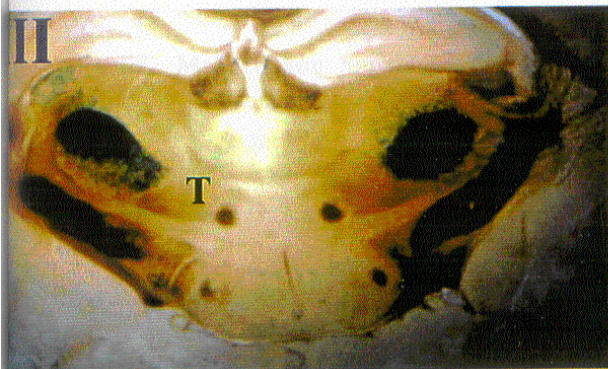
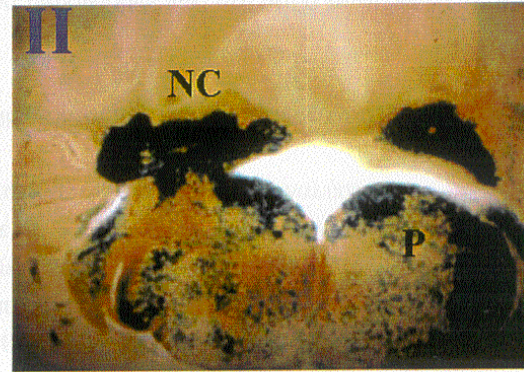
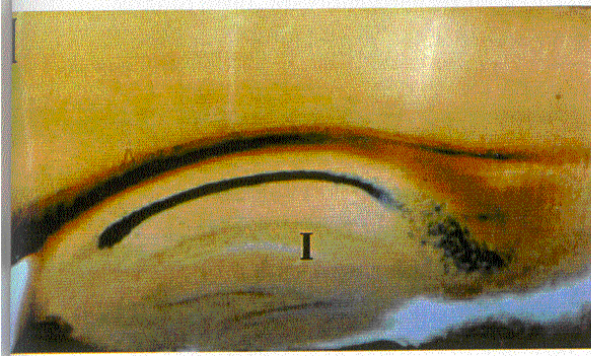
Μεσεγκέφαλος

	E12.5	E13.5	E14.5	E15.5- 17.5	P0-P17	Adult
Άνω διδύμα	□	▨	■	■	■	■
Κάτω διδύμα	□	▨	■	■	■	■
Καλύπτρα	□	▨	■	■	■	■

Μετεγκέφαλος

	E12.5	E13.5	E14.5	E15.5- 17.5	P0-P17	Adult
Παρεγκεφαλίδα						
EGL	□	□	▨	▨	■	■
Purkinje layer	□	□	□	□	■	■
IGL	□	□	□	□	■	■
Γέφυρα	▩	▩	▨	■	■	■
Προμήκης	▩	▨	▨	■	■	■

□ : καθόλου έκφραση ▩ : ελάχιστη έκφραση ▨ : μικρή έκφραση ■ : μεγάλη έκφραση



Εικ.7: Πρότυπο έκφρασης του διαγονιδίου στο ενήλικο ποντίκι.

I: Έκφραση στον ιπλόκαμπο (I).

II: Έκφραση σε πυρήνες της παρεγκεφαλίδας (NC), και στην γέφυρα (P).

III: Έκφραση του διαγονιδίου σε πυρήνες του θαλάμου (T).

IV: LacZ χρώση στον νωτιαίο μυελό (SC).

2.3. Μελέτη του προτύπου έκφρασης της διαγονιδιακής σειράς PromIII.

Ο ιδρυτής της σειράς PromIII δεν μπόρεσε να διασταυρωθεί και να δώσει απογόνους. Επίσης, εφαρμόζοντας LacZ χρώση σε τομές εγκεφάλου δεν ανιχνεύσαμε κάποιο σήμα. Με επιφύλαξη θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε πως στη σειρά αυτή θα είχαμε πολύ χαμηλή ή και καθόλου έκφραση.

2.4. Μελέτη του προτύπου έκφρασης της διαγονιδιακής σειράς PromIV.

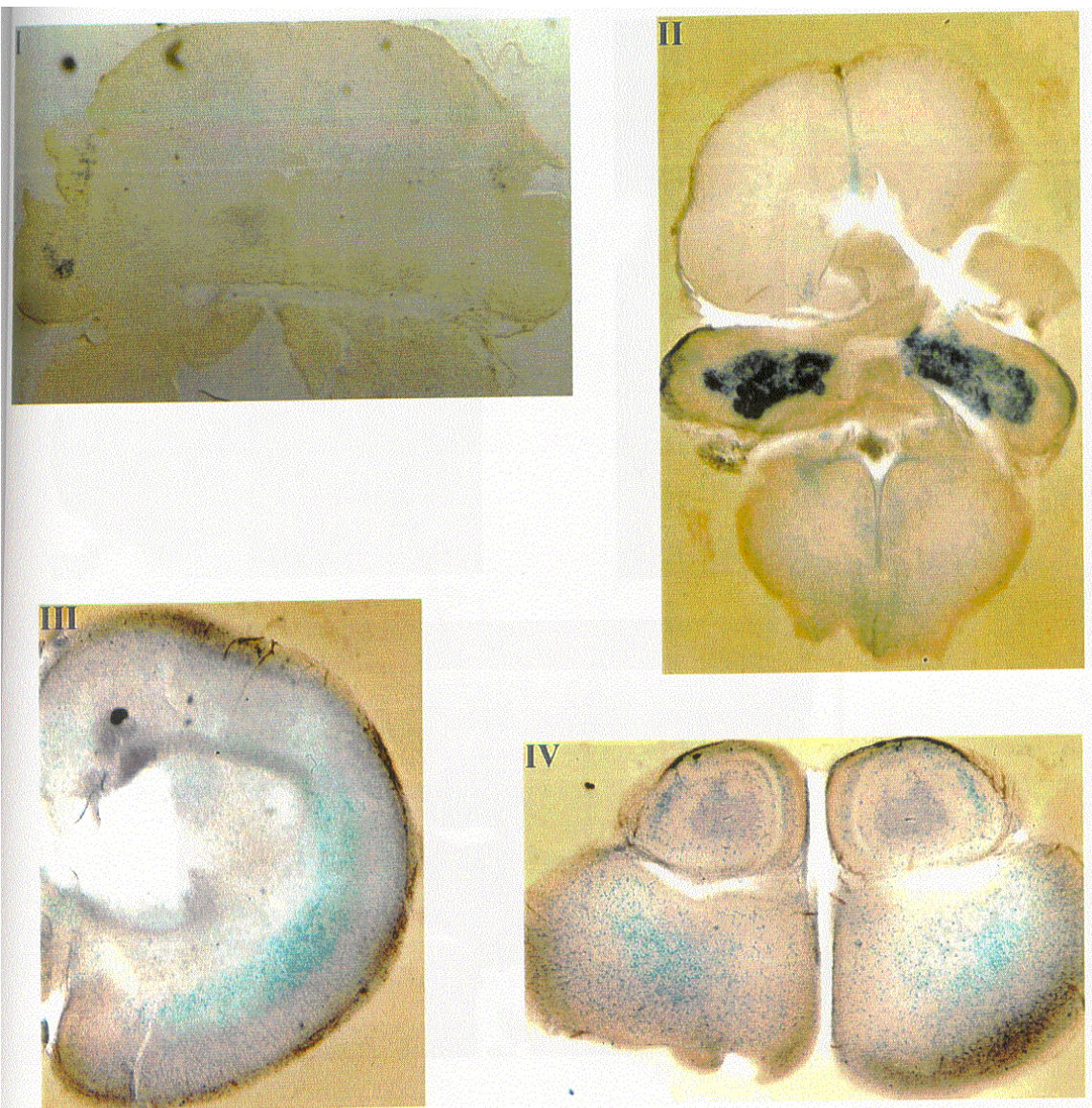
Η PromVI σειρά δεν έχει ακόμα ομοζυγωθεί. Ωστόσο πρώιμες αναλύσεις σε έμβρυα ηλικίας E14.5 και E17.5, καθώς και σε ποντίκια ηλικίας P4 έδειξαν αρκετά υψηλά επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου, κυρίως σε πυρήνες του μεσεγκεφάλου και στην παρεγκεφαλίδα, στον φλοιό και και τους πυρήνες (εικ.8). Το πρότυπο έκφρασης του TAX-1/LacZ στη σειρά αυτή φαίνεται να θυμίζει σε μεγάλο βαθμό το πρότυπο έκφρασης της PromII σειράς. Λεπτομερής ανάλυση της σειράς έτσι ώστε να προκύψουν ασφαλή συμπεράσματα θα πραγματοποιηθεί σε ομόζυγα PromIV ποντίκια.

2.5. Μελέτη του προτύπου έκφρασης της διαγονιδιακής σειράς PromV.

Ο ιδρυτής της PromV σειράς δεν μπόρεσε να διασταυρωθεί και να δώσει απογόνους. Ωστόσο, εφαρμόζοντας LacZ χρώση σε τομές του εγκεφάλου του ανιχνεύσαμε πολύ μεγάλη έκφραση του διαγονιδίου σε δομές ανάλογες με αυτές στις οποίες εντοπίζεται έκφραση του TAX-1/LacZ στην PromII σειρά. Με επιφύλαξη θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε πως η PromV σειρά θα είχε το ίδιο πρότυπο έκφρασης με την PromII σειρά.

2.6. Μελέτη του προτύπου έκφρασης της διαγονιδιακής σειράς PromVI.

Η PromVI σειρά δεν έχει ομοζυγωθεί. Ωστόσο ανάλυση ετερόζυγων εμβryών ηλικίας E17.5 καθώς και νεογέννητων ποντικίων έδειξε υψηλή έκφραση του διαγονιδίου σε διάφορες δομές του ΚΝΣ. Συγκεκριμένα όσον αφορά στα E17.5 έμβρυα, παρατηρείται έκφραση σε πυρήνες του μεσεγκεφάλου και στην παρεγκεφαλίδα. Στα νεογέννητα ποντίκια ανιχνεύεται σαφέστατα, έκφραση του διαγονιδίου σε πολύ περισσότερες δομές. Έτσι εκτός από τις προαναφερόμενες περιοχές στις οποίες συνεχίζουμε να εντοπίζουμε LacZ χρώση, έκφραση ανιχνεύεται



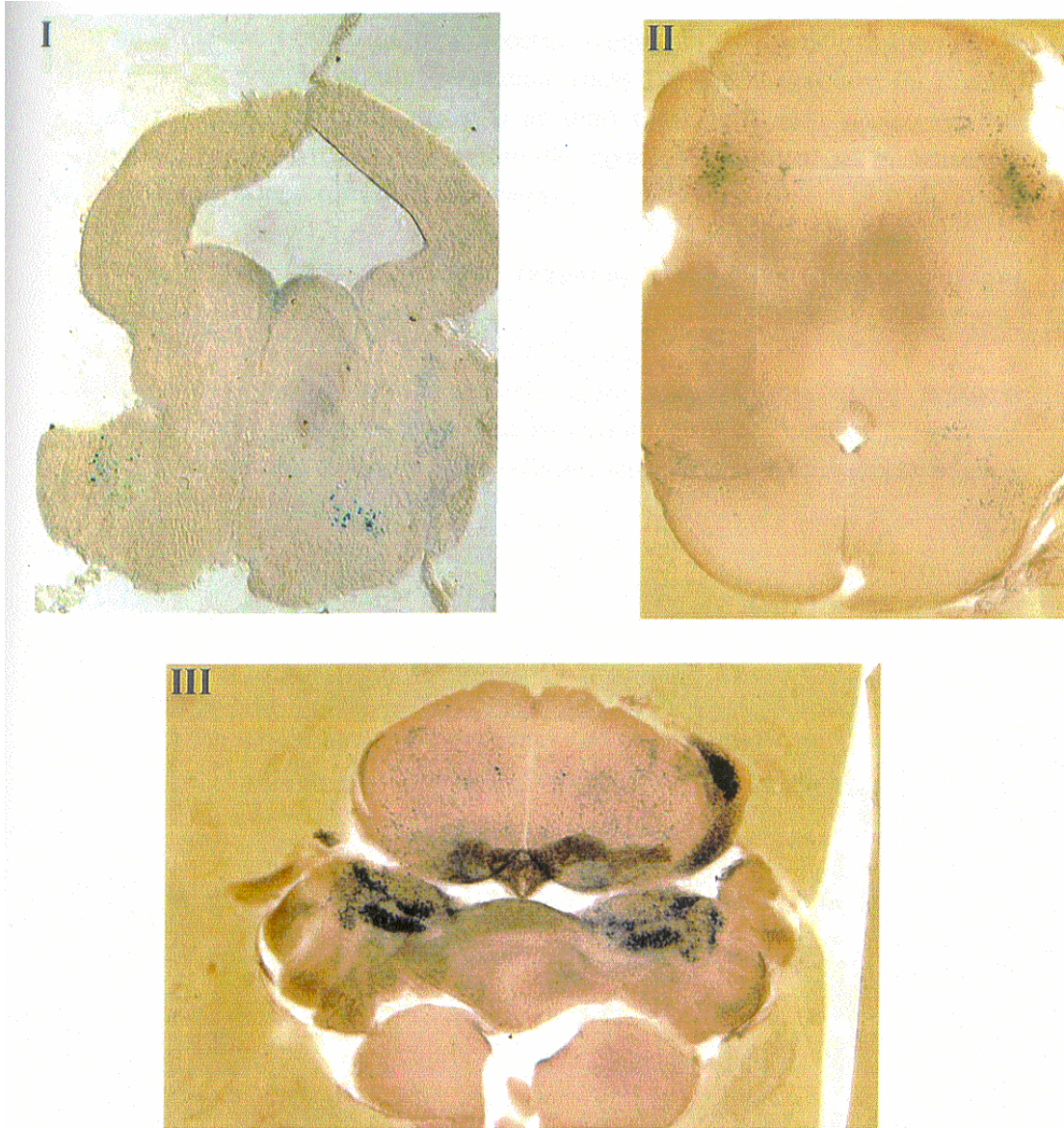
Εικ.8: Πότυπο έκφρασης του διαγονιδίου στην PromVI σειρά.

Εικ.8: Πρότυπο έκφρασης του διαγονιδίου στην PromVI σειρά.

I: LacZ χρώση σε πηλύνες και στον φλοιό της παρεγκεφαλίδας εμβρύου ηλικίας E17.5.

II: Έκφραση του διαγονιδίου στην παρεγκεφαλίδα νεογέννητου ποντικού (P0).

III-IV: LacZ χρώση στον φλοιό (III) και τον πρόσθιο οσφρητικό πυρήνα, σε νεογέννητο ποντίκι (IV).



Εικ.9: Πρότυπο έκφρασης του διαγονιδίου στην PromIV σειρά.

I: LacZ χρώση σε πυρήνες της γέφυρας σε έμβryo ηλικίας E14.5.

II: Έκφραση του διαγονιδίου σε πυρήνες της παρεγκεφαλίδας σε έμβryo ηλικίας E17.5.

III: Τομή εγκεφάλου ποντικού ηλικίας P4 στην οποία ανιχνεύεται έκφραση του διαγονιδίου στην παρεγκεφαλίδα και σε πυρήνες του μεσεγκεφάλου.

στον φλοιό του εγκεφάλου, στον πρόσθιο πυρήνα του οσφρητικού βολβού και σε πυρήνες του θαλάμου και του υποθαλάμου (εικ.9). Το πρότυπο έκφρασης της PromVI σειράς φαίνεται να είναι παρόμοιο με αυτό της PromII τόσο χωρικά όσο και χρονικά, ασφαλέστερα συμπεράσματα θα προκύψουν ωστόσο με τη λεπτομερή ανάλυση της σειράς, όταν αυτή ομοζυγωθεί.

2.7. Μελέτη του προτύπου έκφρασης της διαγονιδιακής σειράς PromVII.

Μέχρι σήμερα έχουμε αναλύσει μόνο κάποιους εγκεφάλους ενήλικων ποντικών στους οποίους δε μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε έκφραση του διαγονιδίου. Ετερόζυγα ποντίκια διαφόρων εμβρυϊκών και μετεμβρυϊκών αναπτυξιακών σταδίων βρίσκονται υπό ανάλυση.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Το ενδογενές πρότυπο έκφρασης της TAG-1 κατά την ανάπτυξη του ποντικού.

Η παρακολούθηση του χωροχρονικού προτύπου έκφρασης μορίων κατά την ανάπτυξη μας παρέχει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την ρύθμιση, τις αλληλεπιδράσεις και εν γένει το ρόλο των πρωτεϊνών αυτών *in vivo*. Η TAG-1 πρωτεΐνη ανήκει στα μόρια αυτά που χαρακτηρίζονται από ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον πρότυπο έκφρασης στο νευρικό σύστημα, όπως έχει διεξοδικά αναλυθεί σε πρωτεϊνικό επίπεδο (Yamamoto et al., 1986; Wolfer et al., 1994), τόσο κατά την εμβρυϊκή ηλικία όσο και σε μετεμβρυϊκά στάδια ανάπτυξης και στο ενήλικο ποντίκι. Ως απόρροια των προαναφερόμενων μελετών προκύπτει η πιθανή εμπλοκή της TAG-1 σε μία πληθώρα αναπτυξιακών διαδικασιών, όπως στην μετανάστευση κυττάρων, στην επέκταση και καθοδήγηση νευραξόνων καθώς και στη διατήρηση της πλαστικότητας του ώριμου εγκέφαλου.

Μέχρι σήμερα, παρόλη τη λεπτομερή ανάλυση της έκφρασης της TAG-1 με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους, δεν υπάρχει μεγάλος αριθμός αναφορών που να εξετάζουν την έκφραση του mRNA της TAG-1. Οι σχετικές μάλιστα μελέτες περιορίζονται κυρίως στην ανίχνευση μεταγραφικής δραστηριότητας για την TAG-1 σε όψιμα μετεμβρυϊκά στάδια ανάπτυξης και σε ενήλικα ποντίκια (Wolfer et al, 1998) ενώ δεν εξετάζεται καθόλου η παρουσία TAG-1 mRNA σε εμβρυϊκά και πρώιμα μετεμβρυϊκά αναπτυξιακά στάδια, όταν επιτελείται η μορφογένεση του νευρικού συστήματος. Το ενδιαφέρον μας λοιπόν εστιάστηκε στη μελέτη της έκφρασης του mRNA της TAG-1 καθόλη την ανάπτυξη του ποντικού, όχι μόνο διότι κάτι τέτοιο ήταν απαραίτητο για να γίνει δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την έκφραση του TAX-1/ LacZ διαγονιδίου, αλλά και επειδή η γνώση των νευρωνικών πληθυσμών στα κυτταρικά σώματα των οποίων ανιχνεύεται με *in situ* έκφραση TAG-1, μας δίνει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη γονιδιακή ρύθμιση της πρωτεΐνης και τους μηχανισμούς δράσης της κατά την ανάπτυξη.

Έκφραση της ενδογενούς TAG-1 σε επίπεδο μεταγράφου (mRNA) ανιχνεύθηκε σε πολλούς κυτταρικούς πληθυσμούς κυρίως κατά την εμβρυϊκή ηλικία. Οι πληθυσμοί αυτοί εντοπίζονται κυρίως σε περιοχές (θάλαμος, φλοιός κτλ), οι οποίες τη συγκεκριμένη περίοδο υπόκεινται σε δραματικές αναπτυξιακές αλλαγές που σχετίζονται με την διαφοροποίηση και επέκταση νευραξόνων ή τη μετανάστευση ανώριμων νευρώνων. Η ανίχνευση σήματος με την εφαρμογή της *in situ*

μεθοδολογίας στα συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια ήταν σε πλήρη συμφωνία με το πρότυπο έκφρασης της TAG-1 σε επίπεδο πρωτεΐνης, με την έννοια ότι εντοπιζόταν στις ίδιες βασικές δομές του ΚΝΣ και ξεκινούσε κατά το ίδιο αναπτυξιακό στάδιο. Φυσικά η έκφραση του mRNA της TAG-1 στις δομές αυτές περιοριζόταν στα κυτταρικά σώματα των νευρώνων σε αντίθεση με την πρωτεΐνη η οποία εκφραζόταν και στην κυτταρική μεμβράνη των επεκτεινόμενων νευραξόνων κατείχε ένα πολύ πιο διευρυμένο πρότυπο έκφρασης.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον κατά τα εμβρυϊκά στάδια ανάπτυξης του ποντικού μας προκάλεσε το πρότυπο έκφρασης του TAG-1 mRNA στον αναπτυσσόμενο εγκεφαλικό φλοιό. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει στα αποτελέσματα, έκφραση ανιχνεύθηκε αρχικά στο εσωτερικό τμήμα της ενδιάμεσης ζώνης (IZ) και σε χαμηλότερο ποσοστό στην εξωτερική στοιβάδα I, ενώ στη συνέχεια χάθηκε από την στοιβάδα I και άρχισε να εντοπίζεται στο cortical plate και την IZ, ακολουθώντας μία κοιλιακομεσαία πορεία, μέχρι που στο στάδιο P0 περιορίστηκε στις δομές του ιπποκάμπου. Γνωρίζοντας πως η οριζόντια μετανάστευση κυττάρων (tangential migration) από περιοχές εκτός του φλοιού, η οποία φαίνεται να συμβάλει σε πολύ μεγάλο βαθμό στην δημιουργία των φλοιικών στοιβάδων χαρακτηρίζεται από το ίδιο χωροχρονικό πρότυπο, δημιουργούνται βάσιμα ερωτήματα για το αν η TAG-1 εμπλέκεται σε αυτή. Είναι πιθανόν κυτταρικοί πληθυσμοί οι οποίοι εντοπίζονται στις προαναφερόμενες στοιβάδες του φλοιού και εκφράζουν TAG-1, να δημιουργούν με την επέκταση νευραξόνων τους το χαρακτηριστικό δίκτυο ιών που διακρίνεται στον φλοιό ύστερα από την εφαρμογή ανοσοιστοχημείας για την TAG-1, με τις οποίες τα κύτταρα να αλληλεπιδρούν ειδικά μέσω ομοφιλικών ή ετεροφιλικών δεσμών και να μεταναστεύουν κατά τον οριζόντιο άξονα του φλοιού. Πειράματα in vitro καλλιιεργειών τομών εγκεφάλου στις οποίες θα ενεθούν αντισώματα έναντι της TAG-1 ή TAG-1 διαλυτής μορφής στο όριο μεταξύ του κοιλιακού φλοιού και του ραβδωτού σχηματισμού (corticostriatal boundary) θα διαλευκάνουν τη σημασία της TAG-1 στην οριζόντια μετανάστευση κυττάρων. Στα ίδια πλαίσια, χρήσιμες πληροφορίες θα προκύψουν και από καλλιέργειες της περιοχής του Gargilionic Eminence, από όπου προέρχεται ο μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων που μεταναστεύουν οριζόντια σε υπόστρωμα κυττάρων που εκφράζουν στην επιφάνειά τους TAG-1, καθώς και από τη μελέτη του προτύπου έκφρασης της TAG-1 και της μετανάστευσης σε ποντίκια που φέρουν μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη διαμόρφωση του φλοιού (small-eye, reeler).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί όμως και η ανίχνευση έκφρασης mRNA TAG-1 στον εγκέφαλο του ενήλικου ποντικού. Η συνέχιση της μεταγραφής της TAG-1 στον

ιππόκαμπο, την παρεγκεφαλίδα και τους οσφρητικούς βολβούς του ώριμου εγκεφάλου αποδίδει στην TAG-1 έναν πιθανό ρόλο σε μηχανισμούς διατήρησης της πλαστικότητας των εν λόγω δομών. Είναι γνωστό μάλιστα πως η πλαστικότητα αυτή που χαρακτηρίζει τον ώριμο εγκέφαλο δεν επιτυγχάνεται μόνο μέσω νευροδιαβιβαστικών ουσιών αλλά και από αλληλεπιδράσεις συνάφειας μέσω επιφανειακών υποδοχέων. Συγκεκριμένα, στον ιππόκαμπο, ο οποίος χαρακτηρίζεται από το δυναμικό μακρούς διαρκείας (long terminal potentiation-LTP) που ουσιαστικά πρόκειται για φαινόμενο παρατεταμένης αύξησης της συναπτικής δραστηριότητας και σχετίζεται με τους μηχανισμούς της μάθησης και της μνήμης, έχει αποδειχτεί από προηγούμενες μελέτες η εμπλοκή των μορίων L1 και NCAM στην διατήρηση του LTP (Lüthi et al., 1994). Ανάλογα πειράματα απενεργοποίησης της TAG-1 με αντισώματα ή με αντιπληροφοριακά ολιγονουκλεοτίδια θα μας έδιναν πληροφορίες σχετικά με το ρόλο της TAG-1 στην διατήρηση της πλαστικότητας του ιπποκάμπου.

Τέλος, το εξειδικευμένο χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης της TAG-1 δημιουργεί βασικά ερωτήματα σχετικά με τους παράγοντες που ελέγχουν τη γονιδιακή ρύθμισή του. Ο χαρακτηρισμός του υποκινητή της TAG-1 αποτελεί το πρώτο βήμα για τη μελέτη της γονιδιακής ρύθμισης του μορίου, έτσι ώστε να ακολουθήσουν στη συνέχεια πειράματα πιστοποίησης μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι συμβάλλουν στον καθορισμό του συγκεκριμένου χωροχρονικού προτύπου έκφρασης της TAG-1. Επίσης, κάποιες ενδείξεις για την εύρεση τέτοιων παραγόντων μπορούν να προκύψουν και από την σύγκριση του προτύπου έκφρασης των παραγόντων αυτών στο ΚΝΣ (αν κάτι τέτοιο είναι εφικτό) σε σχέση με αυτό της TAG-1.

2. Μελέτη του προτύπου έκφρασης του TAX-1/ LacZ διαγονιδίου κατά την ανάπτυξη του ποντικού. Σύγκριση με το ενδογενές πρότυπο της TAG-1.

Το αυστηρά εξειδικευμένο χωροχρονικό πρότυπο που χαρακτηρίζει την πλειοψηφία των μελών της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος διαφόρων οργανισμών, τα κάνει ιδιαίτερα ελκυστικά όσον αφορά στη μελέτη της γονιδιακής ρύθμισής τους. Το ενδιαφέρον αυξάνεται ακόμα περισσότερο από τη στιγμή που οι πρωτεΐνες αυτές ελέγχουν άμεσα τη μοφογένεση του νευρικού συστήματος δίνοντας έτσι σημαντικές πληροφορίες για την γονιδιακή ρύθμιση της ίδιας της ανάπτυξης του νευρικού ιστού (Edelman and Jones, 1998).

Θέλοντας να μελετήσουμε *in vivo* το κατά πόσο *cis* ρυθμιστικές αλληλουχίες που ενυπάρχουν στη 5' μη μεταγραφόμενη περιοχή του γονιδίου της TAX-1, που είναι το ανθρώπινο ομόλογο της TAG-1, επαρκούν για την αναπαράσταση του ενδογενούς προτύπου, εισάγαμε στο γένωμα ποντικών το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης της E.coli υπό τον έλεγχο ενός τμήματος 4Kb του υποκινητή της TAX-1. Η επιλογή του β-gal ως γονίδιο αναφοράς για την διαγονιδιακή κατασκευή, βασίστηκε στα επιτυχή αποτελέσματα που έχουν δώσει ανάλογες μελέτες, καθώς και στην ευκολία και την πιστότητα της ιστοχημικής χρώσης με X-gal ως μεθόδου ανίχνευσης της έκφρασης του διαγονιδίου.

Από την προαναφερόμενη πειραματική διαδικασία προέκυψαν επτά ανεξάρτητες διαγονιδιακές σειρές που έφεραν στο γονιδίωμά τους το TAX-1/ LacZ διαγονίδιο και οι οποίες ονομάστηκαν PromI-PromVII. Από τις διαγονιδιακές σειρές τουλάχιστον σε μία, την PromI, δεν ανιχνεύσαμε έκφραση του διαγονιδίου σε κανένα αναπτυξιακό στάδιο, ενώ πιθανόν να μην εκφράζει και ο PromIII ιδρυτής. Η αδυναμία έκφρασης του διαγονιδίου στις σειρές αυτές δεν οφείλεται στον μικρό αριθμό αντιγράφων του TAX-1/ LacZ διαγονιδίου που είχε εισαχθεί στο γένωμά τους, εφόσον και οι δύο φέρουν περισσότερα αντίγραφα σε σχέση με την PromII σειρά, στην οποία ανιχνεύονται υψηλά επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου. Η διαπίστωση αυτή μας οδηγεί στην υπόθεση πως στις PromI και PromIII σειρές η ένθεση των αντιγράφων έχει γίνει σε χρωμοσωμική περιοχή μη ευνοϊκή για την έκφρασή τους πχ. συστατική ετεροχρωματίνη, καθώς και στο ότι από το συγκεκριμένο τμήμα του υποκινητή της TAX-1, που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του διαγονιδίου, πιθανόν να λείπουν LCRs (Locus Control Elements) αλληλουχίες. Οι LCRs πρόκειται για *cis* ρυθμιστικές αλληλουχίες οι οποίες συντελούν στην

εγκαθίδρυση ενεργών μεταγραφικών μονάδων σε όλα τα κύτταρα που έχουν την ίδια καταγωγή ανεξάρτητα από το χρωμοσωμικό περιβάλλον του γονιδίου (Kioussis and Festenstein, 1997). Στην πιθανή έλλειψη LCRs ίσως να οφείλονται και οι διαφορές που παρατηρούνται όσον αφορά στην έκφραση του διαγονιδίου μεταξύ ατόμων της ίδιας σειράς. Συγκεκριμένα, κατά την ανάλυση των ομόζυγων διαγονιδιακών ποντικών της PromII σειράς, παρατηρήσαμε διαφορές στην ένταση του σήματος τομών εγκεφάλου διαφορετικών ποντικών που είχαν όμως προέλθει από την ίδια γέννα και είχαν την ίδια ηλικία όταν αναλύθηκαν. Η διαφορά αυτή δεν οφειλόταν στο μικρότερο βαθμό χρώσης των κυττάρων μιας συγκεκριμένης περιοχής στον εγκέφαλο του ενός ποντικού σε σχέση με τον άλλο, αλλά στην αύξηση του αριθμού των κυττάρων της ίδιας δομής που εξέφραζαν το διαγονίδιο. Οι παρατηρήσεις αυτές θα μπορούσαν να εξηγηθούν ως φαινόμενο PEV (Position Effect Variegation) και αυτή η στοχαστική αποσιώπηση της έκφρασης του διαγονιδίου στα κύτταρα μιας συγκεκριμένης δομής που πιθανόν να έχουν και την ίδια καταγωγή να οφείλεται στην έλλειψη των LCRs (Kioussis and Festenstein, 1997; Martin et al., 1997; Graubert et al., 1998). Βέβαια υπάρχουν και άλλες πιθανές εξηγήσεις για τις διαφορές που εντοπίστηκαν στην έκφραση του διαγονιδίου σε ποντίκια της ίδιας σειράς, όπως για παράδειγμα η ποικιλιότητα που χαρακτηρίζει την έκφραση του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης όταν αυτή χρησιμοποιείται ως γονίδιο μάρτυρας σε μια διαγονιδιακή κατασκευή (MacGregor et al., 1991). Σε κάθε περίπτωση πάντως θα ήταν ενδιαφέρον να γίνουν πειράματα *in situ* υβριδοποίησης στα χρωμοσώματα του γενώματος κάθε διαγονιακής σειράς και να προσδιοριστεί αν σε κάποιες από αυτές (π.χ. PromI) το διαγονίδιο έχει ενθεθεί σε ετεροχρωματινική περιοχή.

Στις υπόλοιπες σειρές (εκτός της PromVII, η οποία δεν αναλυθεί) ανιχνεύουμε έκφραση του διαγονιδίου και μάλιστα το πρότυπο έκφρασής τους φαίνεται να είναι το ίδιο με αυτό της PromII τόσο χωρικά όσο και χρονικά. Ωστόσο, χρειάζεται να γίνει λεπτομερής ανάλυση σε όλες τις διαγονιδιακές σειρές εκτός της PromII, στην οποία έχει ολοκληρωθεί, για να προκύψουν τέτοια συμπεράσματα με βεβαιότητα και να γίνουν συγκρίσεις σχετικά με το επίπεδο έκφρασης της κάθε σειράς και του αριθμού αντιγράφων που έχει ενθεθεί στο γονιδιώμα τους. Οι πρώιμες πάντως ενδείξεις του όμοιου προτύπου έκφρασης των εν λόγω διαγονιδιακών σειρών, μας προδιαθέτει αισιόδοξα στο να υποθέσουμε πως το συγκεκριμένο χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης ελέγχεται από το τμήμα του υποκινητή της TAX-1 που φέρει το διαγονίδιο μας και όχι από άλλες *cis* ρυθμιστικές αλληλουχίες που πιθανόν να βρίσκονται κοντά στη θέση ένθεσης του TAX-1/ LacZ διαγονιδίου. Ωστόσο, όλες οι σειρές εκτός της PromII

βρίσκονται υπό μελέτη, και συνεπώς δε μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για το αν η έκφραση της κάθε σειράς εξαρτάται από τον αριθμό αντιγράφων του διαγονιδίου που περιέχει, γεγονός που θα ενίσχυε την υπόθεσή μας έλεγχο της έκφρασης του διαγονιδίου από αλληλουχίες που ενυπάρχουν στο τμήμα του υποκινητή του γονιδίου της TAX-1 που χρησιμοποιήσαμε.

Συγκρίνοντας το πρότυπο έκφρασης της PromII διαγονιδιακής σειράς σε σχέση με το ενδογενές πρότυπο της TAG-1, παρατηρούμε αρκετές διαφορές τόσο χωρικά όσο και χρονικά, οι οποίες συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

	E12.5-E17.5		P0-P17		Ενήλικο	
	Ενδογ.	Διαγ.	Ενδογ.	Διαγ.	Ενδογ.	Διαγ.
Πρόσθ.οσφρ.πυρ.	+	-	+	+	+	+
Οπίσθ.οσφρ.πυρ.	+/-	-	+/-	-	+/-	-
Ιππόκαμπος						
CA1	-	-	+	+	+	+
CA2	-	-	-	+	-	+
CA3	-	-	+	+	+	+
dentate gyrus	-	-	+/-	-	+/-	-
Φλοιός						
Στοιβάδα I	+/-	-	-	-	-	-
Στοιβάδα II/ III	+	-	-	+	-	+
Στοιβάδα IV	-	-	-	-	-	-
Στοιβάδα V	+	-	-	+	-	-
Στοιβάδα VI	+	-	-	+	-	+
Θάλαμος	+	+	-	+	-	+
Υποθάλαμος	+	+	-	+	-	+
Μεσεγκέφαλος						
Άνω Διδύμα	+	+	-	+	-	+
Κάτω Διδύμα	+	+	-	+	-	+
Παρεγκεφαλίδα						
Κοκκώδης στοιβάδα	-	+	+	+	+	+
Στοιβάδα Purkinje	-	-	-	+	-	+
Πυρήνες	+/-	+	+	+	+	+
Γέφυρα	+	+	+	+	+	+
Προμήκης	+	+	+	+	+	+
Νωτιαίος Μυελός	+	+	-	+	-	+

Οι διαφορές αυτές μπορούν να εστιαστούν σε τρία βασικά σημεία:

1) Στην έλλειψη αποσιώπησης της έκφρασης του διαγονιδίου κατά τα μετεμβρυϊκά στάδια ανάπτυξης και στο ενήλικο ποντίκι. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη από την αλληλουχία του τμήματος του TAX-1 υποκινητή του διαγονιδίου, *cis* ρυθμιστικών στοιχείων που υπάρχουν στον υποκινητή του ενδογενούς TAG-1 γονιδίου και με τα οποία αλληλεπιδρούν καταστολείς (repressors) καθόλη τη μετεμβρυϊκή ζωή του ποντικού, οι οποίοι αποσιωπούν την έκφραση του TAG-1.

2) Σε φαινόμενα έκτοπης έκφρασης του διαγονιδίου. Η έκτοπη έκφραση δεν παρατηρείται σε κύτταρα μη νευρικού ιστού αλλά σε “λάθος” νευρώνες, όπως για παράδειγμα στην CA2 στοιβάδα του ιπποκάμπου και στη στοιβάδα των Purkinje κυττάρων της παρεγκεφαλίδας. Η έκτοπη έκφραση είναι πιθανόν να οφείλεται στην έλλειψη *cis* ρυθμιστικών αλληλουχιών ανάλογων με τα NRSEs στοιχεία, που θα περιορίζουν την έκφραση της πρωτεΐνης σε συγκεκριμένο πληθυσμό νευρικών κυττάρων. Βέβαια μέχρι σήμερα, οι NRSEs αλληλουχίες που έχουν βρεθεί σε διάφορα μόρια της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών έχουν συσχετιστεί με φαινόμενα εκτοπικής έκφρασης μόνο σε μη νευρικό ιστό, κάτι που δε συμβαίνει στην περίπτωση μας. Αυτό όμως δεν αποκλείει τη συμμετοχή τους σε συνδυασμό με τα LCRs και ίσως και άλλων *cis* ρυθμιστικών αλληλουχιών στην εκλέπτυνση του προτύπου έκφρασης τέτοιων πρωτεϊνών.

3) Στην ετεροχρονισμένη έκφραση του διαγονιδίου όσον αφορά στις στοιβάδες του φλοιού. Το διαγονίδιο δεν εκφράζεται κατά τα εμβρυϊκά στάδια ανάπτυξης, όπου είναι και η περίοδος ανάπτυξης του φλοιού, αλλά μετεμβρυϊκά και στο ενήλικο ποντίκι, όταν σταματάει η μεταγραφή της ενδογενούς πρωτεΐνης. Πιθανόν, η έλλειψη αφενός *cis* ρυθμιστικών στοιχείων στον υποκινητή του διαγονιδίου μας και αφετέρου ο διαφορετικός συνδυασμός μεταγραφικών παραγόντων που είναι απαραίτητος για τη “σωστή” ρύθμιση της μεταγραφής του ενδογενούς γονιδίου στις διάφορες δομές και στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, να εξηγούν το φαινόμενο αυτό.

Σε κάθε περίπτωση δεν πρέπει επίσης να ξεχνάμε την πιθανή ύπαρξη διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων που να συμβάλλουν ουσιαστικά στη ρύθμιση του προτύπου έκφρασης της TAX-1 και οι οποίοι να μην υπάρχουν στο πυρηνικό περιβάλλον των νευρικών κυττάρων του ποντικού. Είναι επίσης πιθανόν το πρότυπο έκφρασης της TAX-1 να διαφέρει όντως σε κάποιο ποσοστό από αυτό της TAG-1.

Με βάση τις προαναφερόμενες παρατηρήσεις είναι φανερό πως πρέπει να γίνει λεπτομερέστερη ανάλυση του υποκινητή της TAX-1 για να βγούν βάσιμα συμπεράσματα όσον αφορά στην γονιδιακή ρύθμιση της έκφρασης της πρωτεΐνης. Στα πλαίσια αυτά, είναι απαραίτητη η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός μεγαλύτερου τμήματος του υποκινητή και μάλιστα και των δύο πρώτων εξωνίων του γονιδίου εφόσον σε άλλες πρωτεΐνες της ίδιας οικογένειας εντοπίζονται εκεί σημαντικές ρυθμιστικές αλληλουχίες (Edelman and Jones, 1998). Επίσης, ελλειπτικές κατασκευές για την ευρύτερη περιοχή του υποκινητή και άλλες που θα φέρουν σημειακές μεταλλάξεις σε αλληλουχίες πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, και θα μελετηθούν όσον αφορά στο πρότυπο έκφρασης που εμφανίζουν διαγονιδικά ποντίκια, θα οδηγήσουν στην εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το ποιοί μεταγραφικοί παράγοντες και ρυθμιστικές αλληλουχίες ελέγχουν γενετικά το πρότυπο έκφρασης της TAX-1. Αν τελικά πιστοποιηθεί η δράση κάποιου μεταγραφικού παράγοντα για τον οποίο υπάρχουν ή είναι δυνατή η κατασκευή knock-out ποντικών, η μελέτη του προτύπου έκφρασης του TAX-1/ LacZ σε ποντίκια που θα προκύψουν από τη διασταύρωση των knock-out και των Prom διαγονιδιακών ποντικών θα δώσει σημαντικές πληροφορίες.