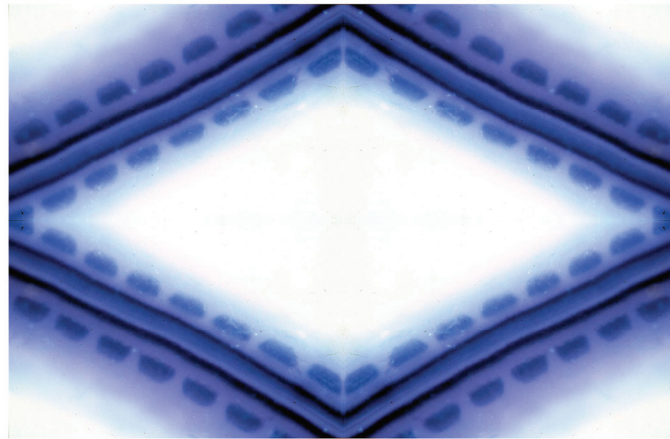


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
&
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ -
ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανίχνευση, κλωνοποίηση, μελέτη του προτύπου
έκφρασης και λειτουργικός ρόλος του γονιδίου
chick Nsc1



Κώστας Θεοδωράκης

ΙΟΥΛΙΟΣ 2007

Στο Νικόλα

Στη Στέλλα

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Η αλήθεια είναι πως το 1997, αποτολμώντας να ξεκινήσω «Μεταπτυχιακές Σπουδές», δεν μπορούσα να προβλέψω τη χρονική τους διάρκεια αλλά ούτε και πόσες φορές θα αναρωτιόμουν στη συνέχεια αν έκανα καλά που πήρα αυτή την απόφαση. Ήμουν όμως σίγουρος ότι το τέλος θα ήταν ένας επίλογος περίσκεψης, ικανοποίησης και ανακούφισης, που συνήθως ονομάζεται «Ευχαριστίες» του Διδακτορικού. Ο επίλογος αυτός μου δίνει την ευκαιρία, όχι μόνο να ευχαριστήσω δασκάλους, φίλους και συνοδοιπόρους, αλλά και να αναπολήσω στιγμές, συναισθήματα και σκέψεις. Έζησα και μοιράστηκα εμπειρίες βιωματικές, μοναδικές και ανεκτίμητες. Χωρίς αυτές η αξία της Διατριβής μου θα ήταν για μένα πραγματικά ασήμαντη.

Το πρώτο ΜΕΓΑΛΟ ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ το οφείλω στην κ. Καραγωγέως Δόμνα, επιστημονική υπεύθυνη αυτής της διατριβής. Σίγουρα χωρίς τη δική της παρότρυνση, στήριξη και επιστημονική καθοδήγηση δε θα είχα φτάσει ως εδώ. Οι άοκνες, και πολλές φορές με αυταπάρνηση, προσπάθειές της για την εξασφάλιση των πολυπόθητων αλλά δυσεύρετων Grants μου έδωσαν τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω τα πειράματα και τα ταξίδια που απαιτούνταν για την ολοκλήρωση αυτής της δουλειάς.

Ευχαριστώ τα μέλη της Τριμελούς μου Επιτροπής κ.κ. Δελιδάκη Χρήστο και Καρδάση Δημήτρη, διότι όλα αυτά τα χρόνια έδειξαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη δουλειά μου και ήταν πάντα πρόθυμοι να αφιερώσουν όσο χρόνο χρειαζόμουν για να συζητήσουμε τα προβλήματα που παρουσιάζονταν.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της Επταμελούς Επιτροπής Αξιολόγησης της Δ.Δ. μου :

Τις κ.κ. Στυλιανοπούλου Φωτεινή και Θεμού Κική, που πέρα από τις εύστοχες παρατηρήσεις τους, η παρουσία τους λειτούργησε αγχολυτικά κατά την ψυχοφθόρα διαδικασία «υποστήριξης» της Διατριβής μου.

Τον κ. Σαββάκη Μπάμπη, ο οποίος συνέβαλε καθοριστικά στην απόφασή μου για να αρχίσω τις Μεταπτυχιακές μου Σπουδές.

Τον κ. Πλαϊτάκη Ανδρέα, τον «Κλινικό» της Επταμελούς μου, του οποίου το ενδιαφέρον και οι παρατηρήσεις για τη δουλειά μου με εξέπληξαν ευχάριστα.

Ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να κάνω στο IMBB, διότι μέσα από τη δουλειά μου, δημιουργήθηκαν οι πρώτες απορίες και το ενδιαφέρον μου για τη Μοριακή Βιολογία. Ευχαριστώ τον κ. Παπαματθαϊάκη Σήφη και την ομάδα του και ιδιαίτερα τη Γιούλα

Τσιότρα και τον Άκη Μιχαηλίδη που μου έμαθαν τα πρώτα μου γράμματα στη Μοριακή Βιολογία. Ευχαριστώ επίσης την ομάδα του Stockroom (Σταύρο, Μανόλη, Νεκταρία, Μαρία), τις Κυρίες της κουζίνας (Κατερίνα, Στέλλα, Κ^α Μαρία, Μαρίνα, Σοφία), το Computer Team (Δημήτρη, Γιάννη) και την ομάδα του Ζωοκομείου (Κώστα, Ελένη, Νίκη, Χαρά, Στέλλα).

Από τα κοντινά εργαστήρια της Ιατρικής, θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Το Γιώργο Μαυροθαλασσίτη, για τις πολλές επιστημονικές απορίες που μου έλυνε, αλλά και για τη βοήθειά του σε θέματα ηλεκτρολογικού, μηχανολογικού και γενικότερα τεχνικού ενδιαφέροντος. Το Σαράντη και το Μιχάλη, που φεύγοντας θα αφήσουν δυσαναπλήρωτο κενό για τη πτέρυγά 2Γ.

Τον Τάκη Θεοδωρόπουλο για τη φιλική, ανεπιτήδευτη και πάντα πηγαία συμπεριφορά του. Την Τώνια και τη Χαρά, για τα διαλείμματα φιλοξενίας που μου παρέχουν, όταν θέλω να ξεφύγω για λίγο από το εργαστήριο μας.

Το Σπύρο Γεωργάτο, ο οποίος ήταν και το τρίτο άτομο που με ενθάρρυνε καθοριστικά για την έναρξη της Δ.Δ. μου.

Τη Νίκη, τη Σοφία, τον Κώστα, τη Ζέτα, το Νίκο, το Γιώργο, το Θάνο και το Γιάννη από το Εργαστήριο του κ. Σαββάκη για τις πολλές ευχάριστες στιγμές που έχουμε μοιραστεί όλα αυτά τα χρόνια.

Το Θεοδωρή Κωστέα, τη Βέτα Παπακώστα και τη Λίνα Βαρδούλη για την πάντα φιλική και άψογη συνεργασία μας.

Φτάνοντας στο εργαστήριό μας, και κατά χρονολογική σειρά γνωριμίας, έχω να πω:

Για τη Δόμνα: μετά από δεκαέξι και πλέον χρόνια συνεργασίας, χρειάζομαι ιδιαίτερη προσπάθεια για να θυμηθώ κάποιες κακές στιγμές μας. Οι κύριες διαφωνίες μας αφορούσαν θέματα πολιτικοκοινωνικά (είναι ο Μλάντιτς και ο Κάραζιτς πατριώτες ή δολοφόνοι ? πρέπει να στηρίζουμε την απεργία των δασκάλων, παρά το ότι δεν έχουμε που να αφήσουμε τα παιδιά μας ?), Κρητολογικά (αξίζει να ζεις αν δεν είσαι Κρητικός ή δε σκέφτεσαι σαν Κρητικός ?) και φιλοσοφικά (ποιος τελικά κυβερνά τον κόσμο, ο Μπιλ, η Χίλαρυ ή η Μόνικα ?). Πέρα από τις ελάχιστες διαφωνίες μας η συνεργασία μας υπήρξε πραγματικά άψογη. Τόσο άψογη που πολλές φορές αναρωτήθηκα αν αυτό οφείλεται στο ότι και οι δυο είμαστε πολύ βολικοί άνθρωποι ή στο ότι και οι δυο έχουμε τις ίδιες παραξενιές. Τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου ίσως ξέρουν την απάντηση....

Θα πρέπει επίσης να αναφέρω την ανεπιφύλακτη κατανόηση, στήριξη και συνδρομή της σε ιδιαίτερα δύσκολες επαγγελματικές και προσωπικές μου στιγμές.

Η Κατερίνα Κυριακοπούλου, άξια και δυσεύρετη συνεργάτιδα, χαμογελαστή και πάντα πρόθυμη να βοηθήσει με δίδαξε τις πρώτες ιστολογικές και εμβρυολογικές τεχνικές. Μαζί καταγράφαμε τις φάσεις της σελήνης προκειμένου να προβλέψουμε το φύλο των εμβρύων...Και σχεδόν πάντα είχαμε επιτυχία !!

Η Μαρία Τράκα εύστροφη και πείσμων ως μισή Καλαματιανή, συμπλήρωσε την αρχική μας ομάδα και κάθε συζήτηση μαζί της είχε ξεχωριστό ενδιαφέρον και ζωντάνια, αφού σχεδόν πάντα καταλήγαμε να διαφωνούμε.

Η Μυρτώ Δεναζά ήρθε λίγο αργότερα να προσθέσει μια νότα γλυκύτητας και χάρης στο εργαστήριό μας. Παρά το ότι ήταν επιμελέστατη και πολύ εργατική (βλ. φύτρουλας) μου ήταν πάντα ευχάριστη και πολύ προσφιλής η παρέα της.

Η Μαρίνα Βιδάκη προσεγγίζοντας την ώριμη νεότητά της, αναδεικνύεται σε άξιο τέκνο και μαθήτριά της Μυρτούς. Εργατική και γλυκύτατη, αποπνέει συνήθως μια ηρεμία, που ελάχιστες φορές καταλήγει σε καταιγίδα. Όμως ακόμα και τότε, μετά την μπόρα ξανασκάει ο ήλιος και το χαμόγελο της. Κι οι πεταλούδες ξαναπετούν.

Με την Κατίδου Μαρκέλλα καθόμαστε πλάτη με πλάτη. Παρόλα αυτά προτάξαμε ηρωικά τα στήθη μας στον αγώνα για τη σωτηρία του NSCL1. Της οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για τη βοήθεια της και τα μοναδικά ergo bars που μου έκανε.

Τον Αλέξανδρο Τζημουράκα, πραγματικά τον θαυμάζω και τον ζηλεύω μερικές φορές. Ήρεμος, πράος, καλοσυνάτος και υπομονετικός ακόμα κι όταν του έκανα παρατηρήσεις. Αλέξανδρε φεύγεις όμως, και δε βλέπω άλλο άνδρα να 'ρχεται στο lab...

Ευχαριστώ ακόμα τη Maugra Strigini, για τις πάντα εύστοχες και χρήσιμες υποδείξεις της, τη Dr. Marion Wassef και το Δρ. Αντώνη Γαβαλά για τη φιλοξενία και εκπαίδευση στα εργαστήριά τους, καθώς και όσους συνεργάστηκα ή (εκ)παίδευσα όλα αυτά τα χρόνια: Μαρία Σαββάκη, Σέβη Γιασεμή, Κάσση Ψηφογιώργου, Λήδα Ζούπη, Νικιάνα Σμιγδαλά, Γιώργο Τριχά, Καλλιόπη Γκούσκου, Μαρία Καλατζάκη, Έλενα Βοργιά, Μαρία Αμπράζη, Δέσποινα Σταματάκη, Μπάμπη Ράλλη, Σπύρο Ποντικάκη, David McLaughlin, Μαρία-Χριστίνα Καστρινάκη, Μαριρένα Γρηγορίου, Βίκυ Σοφianoπούλου, Μαρία Μπέσσα, Νίκο Κούρτη, Κώστα Χατζηδημητράκη, Ελένη Ρενιέρη, Πόπη Αλμπαντάκη, Λιάνα Γκούβη, Γιώργο Κούκο, Κατερίνα Δουλγεράκη, Γεωργία Τσικαλά, Αγγελική Δαράκη, Μαρία Βλαβάκη, Δήμητρα Κοτζαμάνη, Μεθόδιο Ξημεράκη και Δήμητρα Τερζή.

Ευχαριστώ τους γονείς μου Νίκο και Ευαγγελία, και τα αδέρφια μου Κατερίνα, Μανόλη και Άννα και το μικρό Νίκο για την αγάπη τους και τη συνεχή στήριξη και συμπαράσταση που μου παρείχαν.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στα παιδιά μου Νικόλα και Στέλλα για τις ώρες που έκλεψα από αυτά για να ασχοληθώ με τη διατριβή μου.

Η γυναίκα μου Βάσω, αν και ποτέ δεν κατανόησε ή συμμερίστηκε την επιθυμία μου για την πραγματοποίηση αυτής της Διατριβής, με βοήθησε με τον δικό της τρόπο ώστε να επιταχύνω και να ενδυναμώσω τις προσπάθειές μου για την ολοκλήρωσή της.

Ευχαριστώ και τους φίλους μου Στέλιο, Ευγενία, Αντώνη, Δημήτρη και Βαγγέλη για την κατανόηση, τη συμπαράσταση, τις παρέες και τις μακρές συζητήσεις που κάναμε όλο αυτό το διάστημα.

Θα κλείσω αυτό τον επίλογο με την ερώτηση του Νικόλα, που με προβληματίσε και θα με απασχολήσει στο μέλλον:

- «...μπαμπά, κι όταν το τελειώσεις το Διδακτορικό, τι θα το κάνεις ?»
- ...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
SUMMARY	2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1. Μεταγραφική ρύθμιση	4
1.2. Κατηγορίες μεταγραφικών παραγόντων	5
1.3. Ο ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος των σπονδυλωτών	7
1.4. Οι πρωτεΐνες του τύπου έλικα-θηλειά-έλικα ως ρυθμιστές της μεταγραφής στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς	11
1.5. Τα γονίδια bHLH στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος των σπονδυλωτών	17
1.6. <i>Nsc1</i> και <i>Nsc2</i>	21
1.7. Έκφραση του γονιδίου <i>Nsc1</i>	28
1.8. Αλληλεπίδραση του NSCL1 με άλλες bHLH πρωτεΐνες	29
1.9. Φαινότυπος <i>Nsc1</i> ^{-/-} και <i>Nsc2</i> ^{-/-} ποντικών	31
1.10. Πειράματα εκτοπικής έκφρασης και υπερέκφρασης του γονιδίου <i>cNsc1</i> ..	31
1.11. Σκοπός και στόχοι	32
2. ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1. Προέλευση αντιδραστηρίων και υλικών	35
2.2. Πειραματόζωα	35
2.3. Βακτηριακά στελέχη, ιικοί και πλασμιδιακοί φορείς	36
2.4 Μοριακές μέθοδοι	37
2.5. Μέθοδος ανοσοαποτύπωσης	48
2.6. In Situ Υβριδοποίηση	51
2.7. Κυτταρικές σειρές	56
2.8. Μικροχειρουργικές επεμβάσεις στον οπίσθιο εγκέφαλο σε έμβρυα όρνιθας μέσα στο αυγό (in ovo)	61
2.9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	
2.9.1. Ρετροϊικοί φορείς ικανοί για διπλασιασμό προερχόμενοι από τον RSV ..	64
2.9.2. Δομές του αναπτυσσόμενου νευρικού συστήματος εμβρύου όρνιθας	66

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Ανιχνευση και κλωνοποίηση του γονιδίου <i>cNsc11</i> της όρνιθας	68
3.2. Κλωνοποίηση του <i>cNsc11</i> σε πλασμιαδικούς φορείς έκφρασης	77
3.3. Δημιουργία σημασμένων antisense RNA ανιχνευτών για την ανίχνευση του προτύπου έκφρασης του γονιδίου <i>cNsc11</i> στο αναπτυσσόμενο έμβρυο όρνιθας ..	79
3.4. Πρότυπο έκφρασης του <i>cNsc11</i> στην όρνιθα	81
3.4.1. Γενικά	
3.4.2. Έκφραση του chick <i>Nsc11</i> στο νευρικό σωλήνα	
3.4.3. Έκφραση του chick <i>Nsc11</i> και mouse <i>Nsc11</i> στον εγκέφαλο (ιππόκαμπος, υποθάλαμος, φλοιός εγκεφαλικών ημισφαιρίων)	
3.4.4. Έκφραση του chick <i>Nsc11</i> στην παρεγκεφαλίδα	
3.4.5. Έκφραση του chick <i>Nsc11</i> στον οπίσθιο εγκέφαλο	
3.5. Έκφραση του <i>mNsc11</i> και σύγκρισή του με την έκφραση του <i>Tag1</i> στον οπίσθιο εγκέφαλο	93
3.6. Λειτουργικός ρόλος του <i>Nsc11</i>	95
3.6.1. Διερεύνηση της σχέσης του <i>mNsc11</i> με τα γονίδια <i>Hoxb1</i> , <i>Hoxb2</i> , <i>Plzf</i> , <i>Engrailed-1</i> , <i>Pax6</i> και <i>Tag1</i>	
3.6.2. Έκφραση του <i>mNsc11</i> στον οπίσθιο εγκέφαλο σε ποντικούς με απώλεια δράσης του γονιδίου <i>Hoxb1</i>	
3.6.3. Πρότυπο έκφρασης των <i>Hoxb1</i> , <i>Hoxb2</i> , <i>Plzf</i> και <i>Engrailed-1</i> σε φυσιολογικούς και ποντικούς με απενεργοποιημένο το γονίδιο <i>Nsc11</i> (<i>Nsc11</i> ^{-/-})	
3.6.4. Έκφραση του <i>cNsc11</i> στα όρια των ρομβομερών που δημιουργούνται μετά από αφαίρεση δυο γειτονικών ρομβομερών	
3.6.5. Πειράματα υπερέκφρασης – έκτοπης έκφρασης του chick <i>Nsc11</i> με τη χρήση του ρετροϊικού φορέα έκφρασης RCAS(BP)- <i>cNsc11</i>	
3.7. Μελέτη του μεταγραφικού ρόλου του γονιδίου <i>Nsc11</i>	103
3.7.1. Με τη χρήση του συστήματος GAL4-UAS του σακχαρομύκητα	
3.7.2. Με τη χρήση πλασμιδίου αναφοράς που περιέχει E-boxes ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης	

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Γενικά	115
4.2. Κλωνοποίηση του γονιδίου <i>cNsc11</i> της όρνιθας	118
4.3. Η έκφραση του <i>cNsc11</i> εντοπίζεται σε μεταμιτωτικούς νευρώνες του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, που βρίσκονται στη φάση διαφοροποίησής τους	119
4.4. Η έκφραση του <i>Nsc11</i> , στην παρεγκεφαλίδα της όρνιθας και του ποντικού, εντοπίζεται σε μιτωτικούς και προμεταναστευτικούς νευρώνες της εξωτερικής κοκκώδους στοιβάδας (EGL)	123
4.5. Η απώλεια δράσης του γονιδίου <i>Nsc11</i> προκαλεί επιβράδυνση της διαφοροποίησης στον οπίσθιο εγκέφαλο, ενώ η έκφρασή του στους προσωποκινητικούς νευρώνες ελέγχεται από το γονίδιο <i>Hoxb1</i>	125
4.6. Το γονίδιο chick <i>Nsc11</i> εκφράζεται στα όρια των ρομβομερών, καθώς και σε νεοδημιουργούμενα όρια, μετά από μικροχειρουργική επέμβαση	128
4.7. Μη φυσιολογική έκφραση του chick <i>Nsc11</i> με τη χρήση του ρετροϊκού φορέα έκφρασης RCAS(BP)- <i>cNsc11</i> οδηγεί σε ανώμαλη ανάπτυξη του ματιού και του εγκεφάλου	131
4.8. Ο μεταγραφικός παράγοντας <i>cNSCL1</i> , ως ομοδιμερές, επιφέρει καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης	133
4.9. Η πολύ βασική περιοχή β' του <i>mNSCL1</i> ευθύνεται για την ενεργοποιητική ικανότητα του ετεροδιμερούς ME1a/ <i>mNSCL1</i>	135
4.10. Συνοψίζοντας	137
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	139

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας bHLH κατέχουν κεντρικό ρόλο στις διαδικασίες του κυτταρικού καθορισμού και διαφοροποίησης. Οι bHLH πρωτεΐνες έχουν κατηγοριοποιηθεί σε επτά τάξεις. Η πρώτη τάξη περιλαμβάνει πρωτεΐνες που εκφράζονται σε πολλούς ιστούς και σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή, όπως οι ME1a, E2 και daughterless. Η δεύτερη τάξη περιλαμβάνει μόρια που έχουν ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης όπως οι Mash1, Math1, NeuroD και NSCL1, και σχηματίζουν επί το πλείστον, ετεροδιμερή με μόρια της πρώτης τάξης.

Κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας έγινε δυνατή η απομόνωση του γονιδίου *cNsc1* της όρνιθας. Η πρωτεΐνη chick NSCL1, μεγέθους 130 αμινοξέων, παρουσιάζει πολύ υψηλό βαθμό συντήρησης με τις ομόλογες πρωτεΐνες NSCL1 του ανθρώπου και του ποντικού, οι οποίες αποτελούνται από 133 αμινοξέα. Στην περιοχή bHLH διαφέρουν μόνο κατά ένα αμινοξύ, έχοντας ποσοστό ομολογίας 98%.

Κατά την εξέταση του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *cNsc1* διαπιστώσαμε ότι η έκφρασή του περιορίζεται αποκλειστικά σε νευρικές δομές τόσο του ΚΝΣ όσο και του ΠΝΣ, όπως συμβαίνει με τα ομόλογα γονίδια του ανθρώπου και του ποντικού. Συγκεκριμένα, παρατηρήσαμε έκφρασή του σχεδόν σε όλες τις νευρικές δομές, όπως: το νευρικό σωλήνα, τα κρανιακά και τα αισθητικά γάγγλια, τον ιππόκαμπο, το διεγκέφαλο, το νωτιαίο μυελό, τον οπίσθιο εγκέφαλο και την παρεγκεφαλίδα. Με πειράματα *in situ* υβριδοποίησης παρατηρήσαμε ότι η έκφραση του *cNsc1* εντοπίζεται σε μεταμιτωτικούς νευρώνες του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, που βρίσκονται στη φάση διαφοροποίησής τους, ενώ στην παρεγκεφαλίδα εντοπίζεται σε μιτωτικούς νευροβλάστες και μεταμιτωτικούς προμεταναστευτικούς νευρώνες της εξωτερικής κοκκώδους στοιβάδας.

Σε στελέχη μυών με απώλεια δράσης του γονιδίου *Hoxb1* διαπιστώσαμε ότι παύει η έκφρασή του *mNsc1* στους προσωποκινητικούς νευρώνες, ενώ χρησιμοποιώντας μύες με απώλεια δράσης του γονιδίου *mNsc1* διαπιστώσαμε υστέρηση στη φυσιολογική εξέλιξη της έκφρασης των γονιδίων *Hoxb1*, *Hoxb2*, *Plzf* και *Engrailed-1* στον οπίσθιο εγκέφαλο, η οποία είναι πολύ πιθανόν να οφείλεται σε επιβράδυνση της διαδικασίας διαφοροποίησης των περιοχών αυτών του οπίσθιου εγκεφάλου.

Η μελέτη μας αποκάλυψε νέες περιοχές έκφρασης του *Nsc1*. Διαπιστώσαμε ότι εκφράζεται στα ρομβομερή και στα όρια των ρομβομερών, καθώς και σε όρια τα οποία δημιουργούνται μετά από μικροχειρουργική επέμβαση η οποία επιφέρει γειτνίαση ενός περιττού και ενός άρτιου ρομβομερούς, ενώ δεν εκφράζεται στις περιπτώσεις γειτνίασης ρομβομερών με την ίδια αρτιότητα, οπότε δε δημιουργείται νέο όριο.

Προκαλέσαμε υπερέκφραση και έκτοπη έκφραση του chick *Nsc1* με τη χρήση του ρετροϊκού φορέα έκφρασης RCAS(BP)-cNSCL1, και παρατηρήσαμε ότι προκαλείται σμίκρυνση του ματιού και ανώμαλη ανάπτυξη του εγκεφάλου.

Μελετήσαμε τη μεταγραφική ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα NSCL1 και βρήκαμε ότι ομοδιμερισμός του cNSCL1 που είναι σε σύντηξη με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του γονιδίου *GAL4*, επιφέρει καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου της λουσιφεράσης σε ένα πλασμιδίο αναφοράς. Απεναντίας, ετεροδιμερή του mNSCL1 με το ME1a προκαλούν ισχυρή μεταγραφική ενεργοποίηση προσδεδεμένα σε E-boxes, τα οποία βρίσκονται ανοδικά του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης. Η

ενεργοποιητική ικανότητα του mNSCL1 πρέπει να εντοπίζεται σε μια πολύ βασική περιοχή (β'), η οποία βρίσκεται ανοδικά της bHLH περιοχής.

SUMMARY

Transcription factors of the bHLH family play a major role in cellular determination and differentiation. bHLH proteins have been classified in seven categories. Class I HLH proteins like ME1a, E2 and daughterless, are expressed in many tissues and are capable of forming either homo- or heterodimers. Class II HLH proteins, which include members such as Mash1, Math1, NeuroD and NSCL1, show a tissue-restricted expression pattern. With few exceptions, they cannot form homodimers and preferentially heterodimerize with the class I proteins.

In the present study, the chick *Nsc11* gene has been isolated with the aim of performing functional experiments *in ovo*. Chick NSCL1 consists of 130 aminoacids and shows a significant conservation with the human and mouse homologs, which consist of 133 aminoacids. They differ just in one aminoacid in the bHLH region, reaching 98% homology.

Our experiments showed that *cNsc11* is strictly expressed in neurons of the CNS and the PNS, like mouse and human homologs. Particularly, we observed that the *Nsc11* is expressed in almost all the tissues of the nervous system such as the neural tube, the cranial and sensory ganglia, the hippocampus, the spinal cord, the diencephalon, the hindbrain and the cerebellum. *In situ* hybridization experiments showed that *cNsc11* is only expressed in differentiating postmitotic neurons of the brain and the neural tube, while it is expressed in the cerebellum, in mitotic neuroblasts and postmitotic premigratory neurons of the external granule layer (EGL).

In *Hoxb1*^{-/-} mice we observed that *Nsc11* expression is ceased in facial branchiomotor neurons (fbm). In *Nsc11*^{-/-} mice a delay on the expression pattern is observed for *Hoxb1*, *Hoxb2*, *Plzf* and *Engrailed-1* in the hindbrain, possibly due to a slowing down of differentiation of this region.

Our results reveal novel sites of *Nsc11* expression in mouse and chick. *Nsc11* is expressed in rhombomeres, rhombomere boundaries and regenerated boundaries that are formed when an even numbered rhombomere is grafted next to an odd numbered rhombomere. Grafting an even (odd) numbered rhombomere next to another even (odd) numbered rhombomere, results in a single enlarged rhombomere that lacks the interrhombomeric boundary, and no *Nsc11* expression is detected.

In ovo injection and electroporation of the replication competent retrovirus RCAS(BP)-cNSCL1, and subsequent *cNsc11* misexpression, results in abnormal brain development and small eye production.

We furthermore studied the transcriptional activity of NSCL1 as a homodimer or as a heterodimeric complex with ME1a protein. We found out that homodimers of cNSCL1 fused to GAL4-DBD resulted in a strong reporter gene repression. On the contrary, heterodimers of mNSCL1 with ME1a bind to specific E-boxes and behave as transcriptional activators in reporter gene assays. The transcriptional capacity of NSCL1 should be localized in a basic region (b') upstream of the bHLH domain.

1.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Μεταγραφική ρύθμιση

Οι φαινοτυπικές διαφορές, που κάνουν διακριτά τα διάφορα είδη κυττάρων σε ένα πολυκύτταρο οργανισμό, οφείλονται, ως επί το πλείστον, στην διαφορετική έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν διάφορες πρωτεΐνες. Η διαδικασία ελέγχου και ρύθμισης της μεταγραφής γονιδίων από την RNA πολυμεράση II κατέχει κομβικό σημείο στη διαδικασία παραγωγής των συγκεκριμένων πρωτεϊνών που θα προσδώσουν στο κάθε κύτταρο τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του. Η ρύθμιση της έκφρασης ενός γονιδίου μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους και σε όλα τα στάδια που μεσολαβούν από την "ενεργοποίηση" της περιοχής της χρωματίνης, όπου βρίσκεται το συγκεκριμένο γονίδιο, μέχρι την παραγωγή της λειτουργικής πρωτεΐνης.

Ένας πολύ συνηθισμένος, και αρκετά καλά μελετημένος, τρόπος είναι η πρόσδεση πρωτεϊνών (μεταγραφικών παραγόντων) στην περιοχή του υποκινητή ενός γονιδίου ή γενικότερα στην ευρύτερή του περιοχή κατά τέτοιο τρόπο που να επηρεάζει θετικά ή αρνητικά τη μεταγραφή του εν λόγω γονιδίου. Οι μεταγραφικοί παράγοντες αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA στις οποίες και προσδέονται με αποτέλεσμα να αλληλεπιδρούν είτε με υπομονάδες της βασικής μεταγραφικής μηχανής είτε με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (Mitchell and Tjian, 1989)

Η μεταγραφή μπορεί να διακριθεί σε δύο μέρη: τη βασική μεταγραφή και τη ρυθμιστική μεταγραφή. Η βασική μεταγραφή για όλες τις τάξεις των γονιδίων κατευθύνεται από την RNA πολυμεράση καθώς και από μία ομόλογη ομάδα γενικών μεταγραφικών παραγόντων (general transcription factors, GTFs), ανεξάρτητα από τα γονίδια που μεταγράφονται.

Όσον αφορά στη ρυθμιστική μεταγραφή, κάθε γονίδιο περιέχει μία ομάδα cis στοιχείων, τα οποία επιτρέπουν την αύξηση (ο ενισχυτής ή enhancer) ή τη μείωση (ο silencer ή dehcancer) της γονιδιακής έκφρασης. Αυτά τα στοιχεία μπορούν να βρίσκονται οπουδήποτε σε ένα γονίδιο και η διάταξη τους είναι χαρακτηριστική για κάθε γονίδιο. Ο ενισχυτής επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου κατά έναν τρόπο ανεξάρτητο της κατεύθυνσης, της θέσης και του προσανατολισμού και αποτελεί στόχο ρυθμιστικών μεταγραφικών παραγόντων υπεύθυνων για την κυτταροειδική γονιδιακή έκφραση. Επιπλέον, είναι σημαντικός στην επαγόμενη γονιδιακή έκφραση.

Ένας ενισχυτής επιλέγει ένα συγκεκριμένο παράγοντα από ένα πλήθος συγγενών παραγόντων (Tamura et al, 1996).

Οι μεταγραφικοί ρυθμιστικοί παράγοντες ανήκουν στις πρωτεΐνες που προσδένονται στο DNA και γι' αυτό το λόγο έχουν περιοχές πρόσδεσης στο DNA. Πολλοί από τους παράγοντες περιέχουν επίσης μία περιοχή σύνδεσης σε πρωτεΐνη και προσδένονται στο DNA σαν διμερή. Γενικά, αυτοί οι παράγοντες έχουν μια μεταγραφική ρυθμιστική περιοχή που μπορεί να συνδέεται άμεσα ή έμμεσα στους βασικούς παράγοντες της μεταγραφής. Επιπλέον, μερικοί ρυθμιστικοί παράγοντες των οποίων οι λειτουργίες τροποποιούνται από μέταλλα ή συστατικά χαμηλού μοριακού βάρους περιέχουν περιοχές που συνδέονται σε προσδέτες (ligands).

1.2. Κατηγορίες μεταγραφικών παραγόντων

Οι πολυάριθμοι ρυθμιστικοί μεταγραφικοί παράγοντες που έχουν απομονωθεί έως τώρα ταξινομούνται σε αρκετές κατηγορίες, οι κυριότερες από τις οποίες είναι:

α) Οι υποδοχείς στεροειδών (steroid receptors) κατατάσσονται σε μια ομάδα βάσει μιας λειτουργικής σχέσης: κάθε υποδοχέας ενεργοποιείται με την πρόσδεση ενός συγκεκριμένου στεροειδούς. Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid receptor) είναι αυτός που έχει αναλυθεί περισσότερο από όλους. Οι υποδοχείς των στεροειδών, καθώς και άλλοι υποδοχείς, όπως ο υποδοχέας της θυρεοειδούς ορμόνης (thyroid hormone receptor) ή ο υποδοχέας του ρετινοϊκού οξέος (retinoic acid receptor), είναι μέλη μιας μεγάλης οικογένειας προσδετοεξαρτώμενων ενεργοποιητών που έχουν τον ίδιο γενικό τρόπο λειτουργίας: ο ενεργοποιητής είναι ανενεργός εωσότου να δεσμεύσει ένα μικρομοριακό, ειδικό προσδέτη.

β) Οι πρωτεΐνες με δάκτυλο ψευδαργύρου (zinc finger) περιέχουν βρόγχους ~23 αμινοξέων με μια θέση συναρμογής ψευδαργύρου, η οποία σχηματίζεται από αμινοξέα κυστεΐνης και ιστιδίνης. Το μοτίβο αυτό αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στον παράγοντα TF_{III}A, που είναι απαραίτητος για τη μεταγραφή των γονιδίων 5S του ριβοσωμικού RNA από την RNA πολυμεράση III. Από τότε έχει εντοπιστεί σε πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες. Μια διαφορετική παραλλαγή του μοτίβου αυτού έχει βρεθεί στους υποδοχείς των στεροειδών.

γ) Οι πρωτεΐνες της μορφής έλικα-στροφή-έλικα (HTH, Helix-Turn-Helix). Το μοτίβο αυτό αναγνωρίστηκε αρχικά στους φάγους. Η μια α-έλικα εφαρμόζει μέσα στη μεγάλη αύλακα του DNA, ενώ η άλλη προσανατολίζεται υπό γωνία εγκάρσια

προς το DNA. Μια συγγενική μορφή του μοτίβου αυτού είναι η homeodomain (ομοιοτική περιοχή ή ομοιοεπικράτεια), που αρχικά είχε χαρακτηριστεί σε διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες κωδικοποιούνται από γονίδια που ρυθμίζουν την ανάπτυξη της *Drosophila*. Εντοπίζεται επίσης και σε μεταγραφικούς παράγοντες θηλαστικών.

δ) Οι πρωτεΐνες με μορφή αμφιπαθούς έλικας-θηλειάς-έλικας (HLH, Helix-Loop-Helix). Το μοτίβο αυτό βρέθηκε σε πρωτεΐνες των ευκαρυωτών, πολλές από τις οποίες ρυθμίζουν την ανάπτυξη. Κάθε αμφιπαθής έλικα παρουσιάζει μια πλευρά με υδρόφοβα κατάλοιπα και μια πλευρά με φορτισμένα κατάλοιπα. Το μήκος του συνδετικού βρόγχου (θηλειάς) είναι 12-18 αμινοξέα. Το μοτίβο αυτό επιτρέπει το διμερισμό των πρωτεϊνών, ενώ μια βασική περιοχή της πρωτεΐνης, που βρίσκεται δίπλα του, έρχεται σε επαφή με το DNA.

ε) Οι πρωτεΐνες με "φερμουάρ" λευκίνης (leucine zipper), περιλαμβάνουν μια αλληλουχία αμινοξέων στην οποία σε κάθε έβδομη θέση, βρίσκεται ένα κατάλοιπο λευκίνης. Το φερμουάρ λευκίνης μιας πρωτεΐνης αλληλεπιδρά με το φερμουάρ λευκίνης μιας άλλης πρωτεΐνης σχηματίζοντας ένα διμερές. Δίπλα στο φερμουάρ λευκίνης μπορεί να υπάρχει μια αλληλουχία θετικά φορτισμένων καταλοίπων που ενέχονται στην πρόσδεση στο DNA.

στ) Οι πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν ένα ή περισσότερα HMG boxes (High Mobility Group) προσδέονται ως μονομερή σε περιοχές του DNA που είναι πλούσιες σε Αδενίνη και Θυμίνη. Το μοτίβο HMG αποτελείται από τρεις α -έλικες, ενώ η κύρια αλληλεπίδραση με το DNA υφίσταται στη μικρή αύλακα του DNA, επιφέροντας ένα εντυπωσιακό λύγισμα στην έλικα του DNA. Τα HMG-boxes αποτελούνται από 80 περίπου αμινοξέα, όμως η ομοιότητα μεταξύ διαφορετικών HMG-boxes προσεγγίζει μόλις το 25%. Πρωτεΐνες που περιέχουν ένα HMG-box προσδέονται στο DNA αναγνωρίζοντας συγκεκριμένες αλληλουχίες του, ενώ πρωτεΐνες που περιέχουν πολλά HMG-boxes προσδέονται στο DNA χωρίς να παρουσιάζουν ιδιαίτερη ειδικότητα πρόσδεσης σε συγκεκριμένες αλληλουχίες.

Εκτός από τους μεταγραφικούς παράγοντες που συνδέονται στο DNA, υπάρχει και μία άλλη κατηγορία μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι δεν συνδέονται στο DNA, αλλά εμπλέκονται άμεσα στη μεταγραφική ρύθμιση. Αυτοί οι παράγοντες, που ονομάζονται ενδιάμεσες ενώσεις (mediators), μπορούν να συνδεθούν στους βασικούς παράγοντες της μεταγραφής και στους μεταγραφικούς ρυθμιστικούς παράγοντες και να τους ενώσουν (Tamura et al, 1996). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι LIM-πρωτεΐνες:

Οι LIM-πρωτεΐνες πήραν το όνομά τους από τα αρχικά των πρωτεϊνών Lin1, Isl-1 και Mec-3 περιλαμβάνουν ένα συντηρημένο μοτίβο, πλούσιο σε κυστεΐνη και ιστιδίνη, που αποτελείται από ομοιοτικές περιοχές σε σύντηξη με ένα δάκτυλο ψευδαργύρου (zinc finger). Το μοτίβο αυτό δεν προσδένεται στο DNA αλλά επιτρέπει τη δημιουργία πολλαπλών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων και έχει βρεθεί τόσο σε πυρηνικές όσο και σε κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Κάποιες πυρηνικές LIM-πρωτεΐνες αποτελούνται πρωτίστως από δυο LIM-περιοχές και ονομάστηκαν γι' αυτό LMO-πρωτεΐνες (LIM only proteins)

Πέραν των παραπάνω ρυθμιστικών μορίων, η μεταγραφή ενός γονιδίου ρυθμίζεται από επιπρόσθετα μόρια που σαν στόχο έχουν να διαμορφώσουν τη δομή της οργανωμένης, σε νουκλεοσώματα, ευχρωματίνης ώστε αυτή να γίνει προσβάσιμη στην RNA-πολυμεράση και τους μεταγραφικούς παράγοντες. Αυτά τα μόρια ανήκουν σε δύο κατηγορίες: στα ATP-εξαρτώμενα σύμπλοκα, όπως η SWI/SNF οικογένεια, και στα σύμπλοκα τροποποίησης των ιστονών, όπως οι ακετυλ-μεταφοράσες ιστονών (HATs, με αρκετά γνωστό το HAT σύμπλοκο SAGA) (Peterson and Cote, 2006).

Αποτέλεσμα της συνεργατικής δράσης μεταξύ των τροποποιητικών συμπλόκων και της μεταγραφικής μηχανής είναι η αυστηρά ρυθμιζόμενη μεταγραφή των γονιδίων τοπικά και χρονικά κατά την ανάπτυξη των οργανισμών

1.3. Ο ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος των σπονδυλωτών

Ο εγκέφαλος είναι το όργανο στο οποίο εκφράζεται, σε σύγκριση με όλα τα άλλα όργανα ενός ανθρώπου, το μεγαλύτερο τμήμα των γενετικών πληροφοριών που είναι κωδικοποιημένες στο DNA. Πιστεύεται ότι εκφράζονται 10 ως 20 φορές περισσότερες πρωτεΐνες από ό,τι στο νεφρό ή στο ήπαρ. Η ποικιλία αυτή οφείλεται εν μέρει στο μεγαλύτερο αριθμό και στην ποικιλομορφία των κυτταρικών τύπων του εγκεφάλου. Πολλοί όμως πιστεύουν, επίσης, ότι καθένα από τα 100 δισεκατομμύρια νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου εκφράζει μεγαλύτερη ποσότητα γενετικών πληροφοριών από ένα ηπατικό ή νεφρικό κύτταρο.

Η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος των σπονδυλωτών αποτελεί ένα ενδιαφέρον πρόβλημα για τους αναπτυξιακούς βιολόγους εξαιτίας του μεγάλου αριθμού των μορφολογικά ξεχωριστών τάξεων νευρώνων με τα πολύπλοκα πρότυπα οργάνωσης και σύνδεσης. Το νευρικό σύστημα των σπονδυλωτών περιέχει τεράστιο

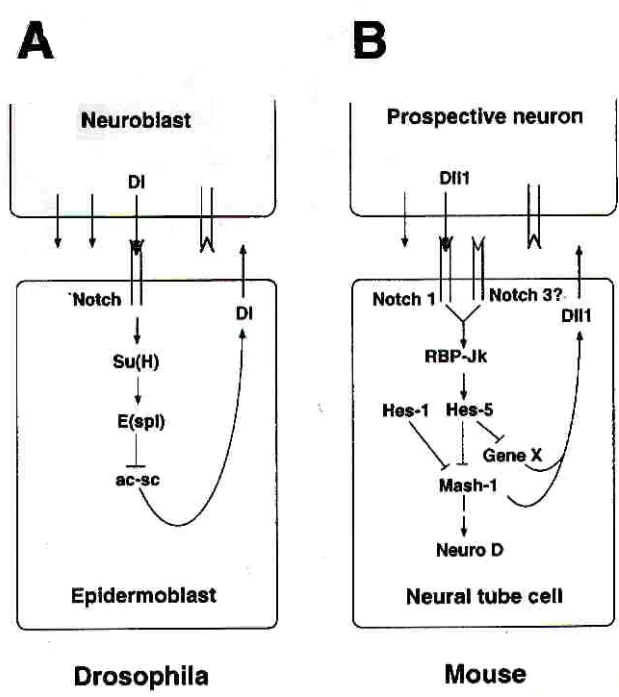
αριθμό διαφορετικών νευρώνων που εκτελούν καθορισμένες λειτουργίες και αλληλοσυνδέονται με τρόπους ιδιαίτερα ακριβείς και στερεότυπους, δημιουργώντας τις συνάψεις που απαιτούνται για την άρτια λειτουργία του. Τα θεμέλια αυτής της ποικιλίας και εξειδίκευσης ορίζονται νωρίς κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος κατά τον προσθιοπίσθιο και ραχιαίο-κοιλιακό άξονα του νευρικού σωλήνα (Lumsden and Krumlauf, 1996; Tanabe and Jessell, 1997). Η πρόιμη νευρογένεση και νευρωνική διαφοροποίηση είναι αποτέλεσμα αλυσιδωτής δράσης πολλών πρωτεϊνικών συμπλόκων, μεταξύ των οποίων εξέχουσα θέση καταλαμβάνουν πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες με εξειδικευμένη και περιορισμένη έκφραση όπως η οικογένεια των Pax, των Hox και των bHLH πρωτεϊνών (Ericson et al, 1997; Osumi et al., 1997; Takahashi and Osumi, 2002; Davenne et al, 1999; Jungbluth et al, 1999; Studer et al, 1996). Τα κύτταρα του νευρικού συστήματος επιλέγουν την μοίρα τους ως απάντηση σε εξωκυττάρια σήματα που ενεργοποιούν ομάδες μεταγραφικών παραγόντων κατά τρόπο ειδικό για την περιοχή και το κύτταρο, προικίζοντας με αυτόν τον τρόπο κάθε τύπο νευρώνα με μοναδικά χαρακτηριστικά. Έχει αναγνωριστεί ο ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων στη δημιουργία των πρόδρομων νευρικών κυττάρων, στον εντοπισμό των διαφόρων τμημάτων του νευρικού συστήματος και στην επακόλουθη διαφοροποίηση των συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων εντός των περιοχών στις οποίες βρίσκονται (Bang and Goulding, 1996).

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα δημιουργούνται σε συγκεκριμένα σημεία και στη συνέχεια μεταναστεύουν διανύοντας πολλές φορές μεγάλες αποστάσεις, ώσπου να φτάσουν στις τελικές τους θέσεις. Εκεί συνεχίζουν τη διαφοροποίησή τους, εκτείνουν νευράξονες και δημιουργούν τις απαραίτητες συνάψεις με άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς, ώστε να δημιουργηθεί σωστά και με ακρίβεια το εκτενές δίκτυο του νευρικού συστήματος.

Η προοδευτική απόκτηση των χαρακτηριστικών οργάνωσης του ενήλικου νευρικού συστήματος είναι το αποτέλεσμα συνδυασμένης δράσης αντίρροπων αναπτυξιακών γεγονότων, τα οποία χαρακτηρίζονται αντιδιασταλτικά προοδευτικά (progressive) και υπόστροφα ή παλίνδρομα (regressive). Τα πρώτα έχουν αθροιστικό χαρακτήρα και καθορίζονται από γενετικούς κυρίως παράγοντες. Σ' αυτά περιλαμβάνονται ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των κυττάρων, η ανάπτυξη των επιμέρους φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των κυττάρων, καθώς και ο σχηματισμός νευρωνικών συνδέσεων. Αντίθετα, τα υπόστροφα γεγονότα προκαλούν

απώλεια ενός μέρους των αποκτηθέντων χαρακτηριστικών του νευρικού συστήματος, οδηγώντας σε επιλεκτική μείωση του αριθμού των νευρικών κυττάρων, εξάλειψη νευραξονικών ή δενδριτικών τμημάτων και περιορισμό των αρχικών δυνατοτήτων των κυττάρων. Η εκλεκτικότητα των υπόστροφων γεγονότων καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από επιγενετικούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων κυρίαρχο ρόλο παίζουν ο ανταγωνισμός των νευρωνικών στοιχείων για εξασφάλιση κυτταρικών στόχων και τροφικών παραγόντων, καθώς και το είδος και η ποσότητα πληροφοριών που προσφέρονται σε συγκεκριμένες κυτταρικές ομάδες (Cowan et al, 1984).

Μετά την ανακάλυψη από τους Spemann και Mangold το 1924 ότι ο οργανωτής, που βρίσκεται στο ραχιαίο χείλος του βλαστοπόρου των αμφιβίων, είναι ικανός να επάγει τη δημιουργία ενός έκτοπου εμβρυϊκού άξονα μετά από μεταμόσχευση του σε κοιλιακό εξώδερμα, δομές με παρόμοιες ιδιότητες έχουν περιγραφεί στα πουλιά (Hensen's node), στα ποντίκια (node) και στα ψάρια (embryonic shield). Ο οργανωτής ξεκινάει την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, παρέχοντας σήματα τα οποία επάγουν και σχεδιάζουν το νευρικό ιστό. Επιπλέον, παράγωγα του μεσοδέρματος του οργανωτή παράγουν σήματα που συνεισφέρουν στο σχεδιασμό του ραχιαίου/κοιλιακού άξονα του νευρικού σωλήνα. Πλήθος μεταγραφικών



Εικόνα 1: Το συντηρημένο μονοπάτι μεταγωγής σήματος που ξεκινάει από τον υποδοχέα Notch.

παραγόντων που έχουν αναγνωριστεί στα σπονδυλωτά εκφράζονται ειδικά στον οργανωτή. Αυτοί περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες με ομοιοτικές περιοχές (homeodomain) not και goosecoid, τις winged-helix πρωτεΐνες HNF-3β, pntallavis/XFH-1 και axial καθώς και την LIM-τύπου πρωτεΐνη με ομοιοτική περιοχή Lim-1 (Bang and Goulding, 1996). Οι πρωτεΐνες με ομοιοτικές περιοχές ανήκουν στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων που έχουν τη μορφή έλικας-

στροφής-έλικας. Η ομοιοτική περιοχή αποτελείται από τρεις α-έλικες. Οι έλικες 2 και 3 ενώνονται με στροφή και είναι αυτές που παρουσιάζουν ομολογία με τη δομή έλικα-στροφή-έλικα.

Η νευρική επαγωγή είναι η διαδικασία με την οποία το εξώδερμα μετατρέπεται σε νευρικό ιστό μέσω της αλληλεπίδρασης του με το μεσόδερμα του οργανωτή. Μία από τις βασικές αποκρίσεις στη νευρική επαγωγή είναι η επιλογή της νευρικής μοίρας του κυττάρου έναντι της επιδερμικής του μοίρας. Η αλληλεπίδραση με άμεση επαφή μεταξύ των κυττάρων είναι απαραίτητη για το σωστό διαχωρισμό αυτών των δύο κυτταρικών σειρών. Έτσι ένα μελλοντικό νευρικό κύτταρο εμποδίζει τα γειτονικά του κύτταρα από το να γίνουν και αυτά νευρώνες, ένας μηχανισμός που ονομάζεται πλευρική αναστολή (lateral inhibition). Αυτός ο μηχανισμός ρυθμίζει ακόμα τον αριθμό των κυττάρων που θα γίνουν νευρώνες όπως επίσης και τη διάταξη τους στο χώρο. Τα προϊόντα των λεγόμενων νευρογόνων γονιδίων συμμετέχουν σ' αυτή τη διαδικασία επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων. Τα γονίδια *Delta (Dl)*, *Notch (N)*, *Suppressor of Hairless (Su(H))* και το *Enhancer of split (E(spl))* σύμπλοκο, ανήκουν στην ομάδα των νευρογόνων γονιδίων της *Drosophila*. Όλα τα αρμόδια κύτταρα εκφράζουν τα *Notch*, *Su(H)*, *E(spl)*, *achaete-scute (ac-sc)* και *Delta*. Για τη μεταγωγή του σήματος από τον Notch στον πυρήνα πιστεύεται ότι η σύνδεση του προσδέτη επάγει την πρωτεολυτική διάσπαση του Notch και τη μετατόπιση ενός τμήματος του στον πυρήνα, όπου συνδέεται και ενεργοποιεί τον Su(H). Στην συνέχεια ενεργοποιούνται τα γονίδια του συμπλόκου *E(spl)* από τον *Su(H)*, τα οποία απενεργοποιούν τα γονίδια *ac-sc* που ανήκουν στην τάξη των προνευρωνικών γονιδίων, γεγονός που οδηγεί στην δημιουργία επιδερμοβλάστη. Έχει βρεθεί πως αυτό το μονοπάτι μεταγωγής σήματος που ξεκινάει από τον Notch έχει διατηρηθεί στα θηλαστικά ενώ σε αυτό συμμετέχουν ομόλογες πρωτεΐνες αυτών της *Drosophila* όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1** (De la Pompa et al, 1997).

Ο εντοπισμός των επιμέρους τμημάτων του νευρικού συστήματος είναι ένα σημαντικό πρώιμο βήμα στον καθορισμό της κυτταρικής τους μοίρας. Τα κύτταρα του νευρικού συστήματος καθορίζονται σταδιακά, αρχικά με το να αποκτούν συγκεκριμένη τοπική ταυτότητα και στη συνέχεια με το να ενεργοποιούν διαφορετικά ρυθμιστικά γονίδια ειδικά για τον κάθε κυτταρικό τύπο εντός αυτών των περιοχών. Αλλαγές στη γονιδιακή μεταγραφή παρέχουν ένα μέσο, ώστε να μπορέσουν τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα να ενεργοποιήσουν την κατάλληλη ομάδα γονιδίων αποκωδικοποιώντας με αυτόν τον τρόπο την τοπική πληροφορία που δέχτηκαν. Η

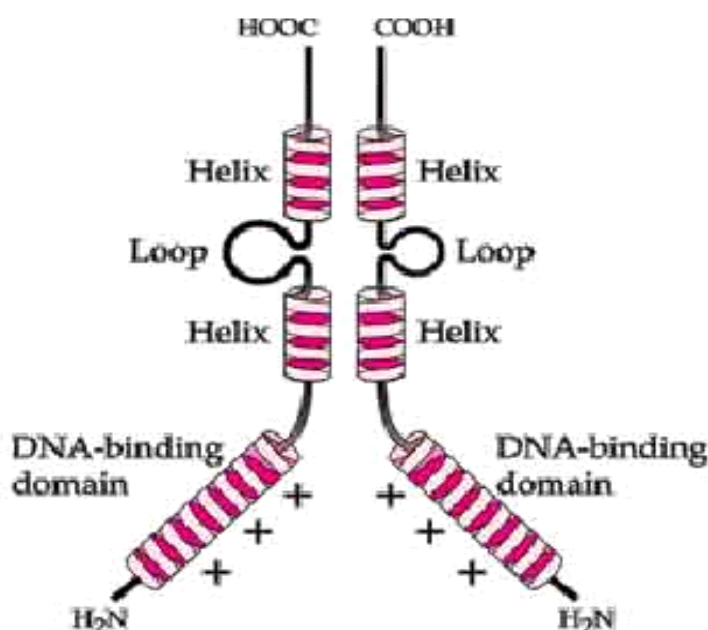
έναρξη του σχεδιασμού του νευρικού συστήματος σημειώνεται με τη διαίρεση του νευρικού σωλήνα σε πρόσθιο εγκέφαλο, μεσεγκέφαλο, οπίσθιο εγκέφαλο και νωτιαίο μυελό κατά μήκος του προσθιοπίσθιου άξονα και την παραπέρα διαίρεση αυτών των περιοχών σε ραχιαίες και κοιλιακές περιοχές (Bang and Goulding, 1996).

Τέλος, μελέτες στην *Drosophila* και στον *C. elegans* παρέχουν πληροφορίες ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να δράσουν σαν "διακόπτες ελέγχου" όσον αφορά στην εξειδίκευση των νευρικών κυτταρικών τύπων. Η απώλεια της λειτουργίας ή η έκτοπη έκφραση ενός μεταγραφικού παράγοντα μπορεί να είναι επαρκής για να τροποποιήσει τη μορφολογία του νευρικού κυττάρου, τον φαινότυπο του νευροδιαβιβαστή, τη σύναψη και το πρότυπο προβολής του νευρώνα. Για παράδειγμα τα γονίδια του *C. elegans* που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες με ομοιοτικές περιοχές *unc-4* και *unc-30* δρουν έτσι ώστε να ρυθμίζουν τη σύναψη και την έκφραση του νευροδιαβιβαστή αντίστοιχα. Το *unc-4* γονίδιο είναι απαραίτητο σε μία υποομάδα κινητικών νευρώνων για να εξασφαλίσει ότι ο κατάλληλος διάμεσος νευρώνας εγκαθιστά τη συναπτική επαφή. Από την άλλη, το *unc-30* γονίδιο είναι απαραίτητο για την έκφραση του τελικού φαινότυπου των GABAεργικών κινητικών νευρώνων και μπορεί να επάγει την έκφραση του νευροδιαβιβαστή GABA όταν εκφράζεται έκτοπα σε αισθητικούς νευρώνες (Bang and Goulding, 1996).

1.4. Οι πρωτεΐνες του τύπου έλικα-θηλειά-έλικα ως ρυθμιστές της μεταγραφής στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς

Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωρισθεί 240 πρωτεΐνες του τύπου έλικας-θηλειας-έλικας (helix-loop-helix, HLH) σε οργανισμούς τόσο διαφορετικούς όπως ο *Sacharomyces cerevisiae* και ο άνθρωπος. Η βασική δομή αυτών των πρωτεϊνών φαίνεται στην Εικόνα 2. Στο σακχαρομύκητα οι πρωτεΐνες HLH ρυθμίζουν την πρόσληψη του φωσφορικού, τη βιοσύνθεση της μεθειονίνης και τη σύνθεση των φωσφολιπιδίων (Hoshizaki et al, 1990). Στα θηλαστικά εμπλέκονται σε αναπτυξιακά γεγονότα όπως η νευρογένεση, η μυογένεση, η αιματοποίηση και η ανάπτυξη του παγκρέατος (Massari and Murre, 2000) αλλά και σε πολλές άλλες κυτταρικές λειτουργίες όπως η κυτταρική αύξηση και απόπτωση. Ελέγχουν επίσης την ανάπτυξη αλλά και τη λειτουργία ζωτικών οργάνων όπως είναι το πάγκρεας, η καρδιά, τα αγγεία κ.α. (Naya et al, 1997; Firulli et al, 1998).

Οι bHLH πρωτεΐνες προσδένονται μέσω της βασικής τους περιοχής σε μια ειδική αλληλουχία DNA, γνωστή ως **E-box** – CANNTG – (Lee, 1997; Ephrussi et al, 1985). Τέτοια E-box cis-στοιχεία έχουν βρεθεί σε υποκινητές και ενισχυτές που σχετίζονται με την ειδική έκφραση γονιδίων στους μύες, στα νεύρα, στο πάγκρεας,



Εικόνα 2: Η βασική δομή των bHLH πρωτεϊνών αποτελείται από ένα μοτίβο αμφιπαθούς α-έλικας, θηλειάς, αμφιπαθούς α-έλικας που συνοδεύεται από μία περιοχή πρόσδεσης στο DNA πλούσια σε βασικά αμινοξέα. Το μοτίβο έλικας – θηλειάς – έλικας χρησιμεύει ως περιοχή διμερισμού όπου βασικό ρόλο έχει η δομή της αμφιπαθούς α-έλικας με τις υδρόφοβες-υδρόφιλες ιδιότητες της. Παράλληλα όμως συνεισφέρει και

στην πρόσδεση στο DNA, αφού αμινοξέα από τη θηλειά και την έλικα 2 έρχονται σε επαφή με το DNA.

στη βαριά και στις ελαφριές αλυσίδες κ, λ των αντισωμάτων και αλλού (Massari and Murre, 2000; Ledent and Vervoort, 2001).

Οι περιοχές E-box είναι στοιχεία που μεσολαβούν στην ειδική για τον κάθε κυτταρικό τύπο γονιδιακή μεταγραφή. Το μοτίβο αμφιπαθούς α-έλικας – θηλειάς – αμφιπαθούς α-έλικας φαίνεται να δρα σαν περιοχή διμερισμού μέσω των συντηρημένων υδρόφοβων αμινοξέων στις έλικες (Lipkowitz et al, 1992). Σχηματίζονται 4 παράλληλες α-έλικες που επιτρέπουν στη βασική περιοχή να προσδεθεί σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA στους υποκινητές των γονιδίων στόχων. Η βασική περιοχή εντοπίζεται, στα περισσότερα μέλη της HLH οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων, ανοδικά, ακριβώς δίπλα στην HLH περιοχή, περιέχει θετικά φορτισμένα αμινοξέα και καθορίζει την εξειδίκευση της σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα στο DNA (Begley et al, 1992; Murdoch et al, 1999). Εκτός από τη βασική περιοχή, κατάλοιπα αμινοξέων στη θηλειά και στην έλικα 2 επίσης συνδέονται με το DNA. Οι HLH περιοχές κρατούνται στενά συνδεδεμένες με

δεσμούς van der Waals μεταξύ συντηρημένων υδρόφοβων αμινοξέων. Κάθε μονομερές αλληλεπιδρά είτε με την CAN είτε με την NTG περιοχή του E-box. Ένα γλουταμινικό οξύ που είναι παρόν στη βασική περιοχή κάθε υπομονάδας έρχεται σε επαφή με τις βάσεις C, A του E-box. Μία γειτονική αργινίνη σταθεροποιεί τη θέση του γλουταμινικού με άμεση αλληλεπίδραση με τα νουκλεοτίδια C, A καθώς και με τη φωσφοδιεστερική ραχοκοκαλιά. Τα αμινοξέα glu και arg είναι συντηρημένα στις περισσότερες bHLH πρωτεΐνες (basic HLH πρωτεΐνες, HLH πρωτεΐνες που περιέχουν τη βασική περιοχή), κάτι που είναι σύμφωνο με ένα ρόλο στην ειδική σύνδεση στο DNA (Massari and Murre, 2000).

Πρόσφατα προτάθηκε μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα άποψη, σύμφωνα με την οποία η δομή των πολύπλοκων δικτύων που οι πρωτεΐνες bHLH σχηματίζουν μέσω των πολλαπλών, πειραματικά εμπεριστατωμένων, αλληλεπιδράσεών τους, απεικονίζει ότι βασικοί παράγοντες στη συγκρότησή τους είναι φαινόμενα διπλασιασμού ενός γονιδίου (single gene duplication events), καθώς και φαινόμενα ανασυγκρότησης λειτουργικών τμημάτων (domain rearrangement events), τουλάχιστον πριν το κομβικό σημείο εξελικτικής διαφοροποίησης (divergence) μεταξύ των αρθροπόδων και χορδοτών (Amoutzias et al, 2004). Ο μεγάλος αριθμός των bHLH πρωτεϊνών επιβάλλει την κατηγοριοποίησή τους. Οι ακόλουθες κατηγορίες έχουν καθοριστεί με βάση το πρότυπο έκφρασής τους, την κατανομή τους στους ιστούς, την ικανότητα διμερισμού τους, τη λειτουργία τους και την ικανότητα πρόσδεσης τους σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA (Fisher and Caudy, 1998; Massari and Murre, 2000; Ledent and Vervoort, 2001) (**Εικόνα 4**):

Στην **τάξη I** ανήκουν οι E-πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν τις E12, E47, ME1 (ή HEB ή REB ή HTF4), E2-2 και Daughterless. Οι πρωτεΐνες αυτής της τάξης εκφράζονται σε πολλούς ιστούς και σχηματίζουν όμο- και έτερο-διμερή και η εξειδίκευσή τους περιορίζεται στο E-box. Οι E-πρωτεΐνες αποτελούν ενεργοποιητές της μεταγραφής.

Η **τάξη II** περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες MyoD, Myogenin, Atonal, NeuroD/Beta2, το achaete-scute σύμπλοκο κ.α. Οι πρωτεΐνες αυτής της τάξης χαρακτηρίζονται από έναν ιστοειδικό τύπο έκφρασης και με λίγες εξαιρέσεις σχηματίζουν ετεροδιμερή με E-πρωτεΐνες.

Η **τάξη III** περιλαμβάνει τους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας Myc, τον TFE3, τον SREBP-1 και τον σχετιζόμενο με τη μικροφθalmία μεταγραφικό παράγοντα, Mi. Οι μεταγραφικοί παράγοντες αυτής της τάξης περιέχουν ένα φερμουάρ λευκίνης δίπλα στο HLH μοτίβο (Henthorn et al, 1990).

Οι πρωτεΐνες των τάξεων II και III, με εξαίρεση τις πρωτεΐνες Tal1, ABF1 και Mist1 της τάξης II που αναστέλλουν τη μεταγραφή γονιδίων (Park and Sun, 1998; Massari et al, 1998; Lemercier et al, 1998; Massari and Murre, 2000), είναι γενικά ενεργοποιητές της μεταγραφής.

Η **τάξη IV** περιλαμβάνει τους μεταγραφικούς παράγοντες Mad, Max, Mxi1 οι οποίοι διμερίζονται με τις πρωτεΐνες της οικογένειας myc ή μεταξύ τους (Blackwood and Eisenman, 1991). Όταν οι πρωτεΐνες Mad και Mxi1 ετεροδιμερίζονται με την πρωτεΐνη Max και συνδέονται σε E-box στοιχεία αναστέλλουν τη μεταγραφή.

Η **τάξη V** αποτελείται από τους μεταγραφικούς παράγοντες Id και emc, από τους οποίους λείπει η βασική περιοχή και εξαιτίας αυτού είναι αρνητικοί ρυθμιστές των HLH πρωτεϊνών των τάξεων I και II. Οι πρωτεΐνες της τάξης V συνδέονται με τους HLH ενεργοποιητές και αναστέλλουν παθητικά τη μεταγραφή αφού το ετεροδιμερές δεν μπορεί να συνδεθεί στο DNA (Benezra, 1990).

Οι πρωτεΐνες HLH της **τάξης VI** είναι αναστολείς της μεταγραφής και έχουν προλίνη στη βασική τους περιοχή. Η τάξη αυτή περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες της Drosophila Hairy, Enhancer of split και την οικογένεια HES των ομόλογων γονιδίων στα θηλαστικά (Sasai et al, 1992).

Τέλος, οι HLH πρωτεΐνες της **τάξης VII** ξεχωρίζουν από την παρουσία της bHLH-PAS περιοχής (Crews, 1998) και περιλαμβάνει τον υποδοχέα των αρωματικών υδρογονανθράκων (Aromatic Hydrocarbon Receptor, AHR), τον παράγοντα 1a που επάγει την υποξία και τις πρωτεΐνες της Drosophila Single minded και Period (Massari and Murre, 2000).

Ένας διαφορετικός τρόπος κατηγοριοποίησης των HLH πρωτεϊνών ανάλογα με την ειδικότητα της πρόσδεσής τους, τις κατατάσσει στις παρακάτω ομάδες (Atchley and Fitch, 1997; Dang et al, 1992; Swanson et al, 1995) :

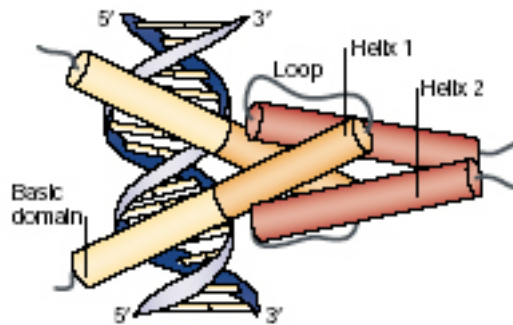
Ομάδα A, η οποία αποτελείται από τις κατηγορίες I και II. Οι πρωτεΐνες της ομάδας αυτής προσδέονται σε θέσεις E του τύπου CAGNTG. Οι θέσεις αυτές ονομάζονται E θέσεις τάξης A.

Ομάδα B, η οποία αποτελείται από τις πρωτεΐνες των κατηγοριών III, IV και VI. Η κατηγορία αυτή των πρωτεϊνών προσδέονται σε E αλληλουχίες τύπου CACGTG και CATGTG. Οι αλληλουχίες αυτές ονομάζονται E θέσεις τάξης B. Επιπρόσθετα, οι πρωτεΐνες της κατηγορίας VI προσδέονται σε θέσεις τύπου CACGCG και CACGAG, οι οποίες ονομάζονται E θέσεις τάξης C και N αντίστοιχα (Oellers et al,

1994; Ohsako et al 1994; Tietze et al, 1992; Van Doren et al, 1994; Jennings et al, 1999).

Ομάδα Γ η οποία αποτελείται από τις πρωτεΐνες της κατηγορίας VII, που προσδένονται στις αλληλουχίες ACGTG ή GCGTG.

Ομάδα Δ που αποτελείται από τις πρωτεΐνες της κατηγορίας V, οι οποίες όπως προαναφέραμε δεν έχουν την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA.



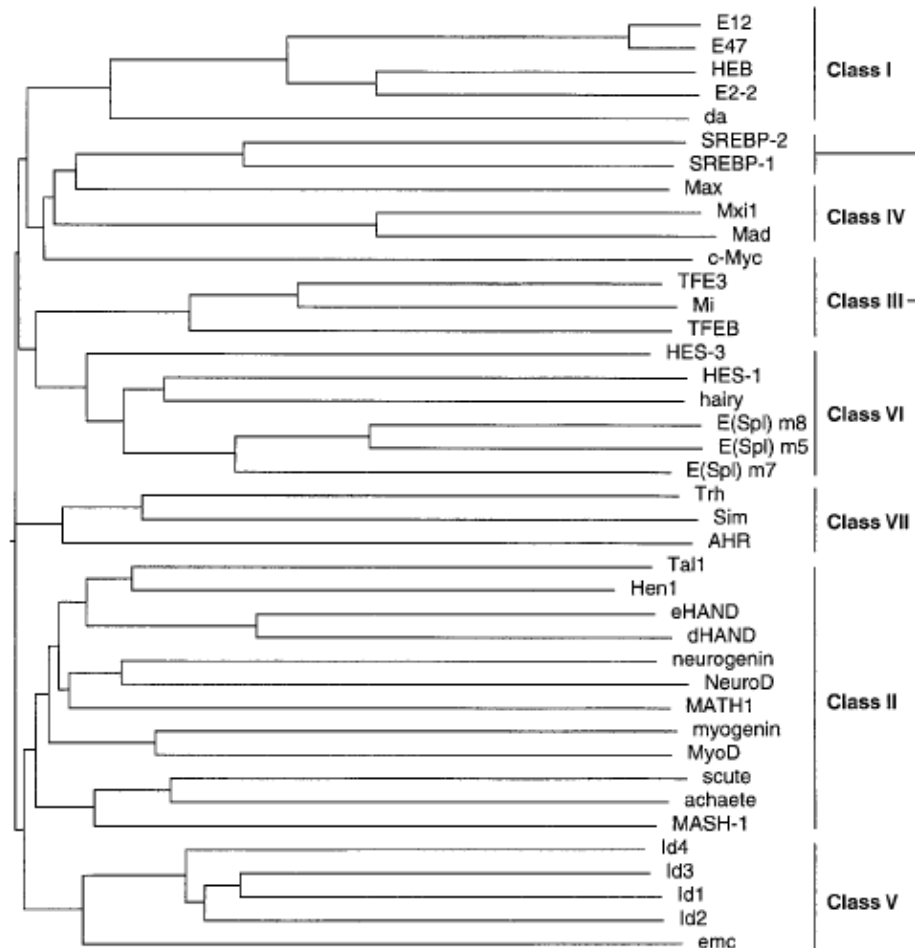
Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της δομής ενός διμερούς bHLH περιοχών προσδεμένο στο DNA. Η βασική περιοχή (basic domain) προσαρμόζεται στη μεγάλη αύλακα του DNA και πολλά αμινοξέα έρχονται σε άμεση επαφή με την αλληλουχία. Οι δύο α-έλικες από κάθε μονομερές συμπλέκονται για να σχηματίσουν ένα κόμβο από τέσσερις έλικες (από Bertrand et al, 2002).

Ένας άλλος διαχωρισμός που αναφέρεται κυρίως στις πρωτεΐνες της τάξης II και αφορά τη λειτουργία τους, είναι σε παράγοντες καθορισμού (determination factors) και παράγοντες διαφοροποίησης (differentiation factors), (Lee, 1997). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν πρωτεΐνες που εκφράζονται στις βλαστικές ζώνες όπως οι MASH-1, MATH-1, MATH-4A και Ngns. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκει η NeuroD η οποία εκφράζεται σε πολλές περιοχές του αναπτυσσόμενου νευρικού συστήματος αλλά και στο ενήλικο. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν ακόμη τα neuroD2, MATH-2, NSCL1 και NSCL2.

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα οι HLH πρωτεΐνες ρυθμίζουν σημαντικά αναπτυξιακά γεγονότα στους πολυκύτταρους οργανισμούς όπως είναι ο καθορισμός του φύλου στη *Drosophila*, η μυογένεση, η ανάπτυξη της καρδιάς και του παγκρέατος, η νευρογένεση και τέλος η αιματοποίηση. Όσον αφορά στη μυογένεση οι ρυθμιστικοί παράγοντές της (myogenic regulatory factors, MRF) είναι bHLH

πρωτεΐνες. Οι MRFs μετατρέπουν τα κύτταρα του μεσοδέρματος σε αρχέγονα μυϊκά κύτταρα (μυοβλάστες) και εκφράζονται μόνο σε σκελετικούς μύες.

Στη συνέχεια θα αναφερθούμε λεπτομερέστερα στην ρύθμιση της νευρογένεσης στα σπονδυλωτά από τους HLH μεταγραφικούς παράγοντες (Massari and Murre, 2000).



Εικόνα 4: Πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών και κατηγοριοποίηση μερικών από τους πιο αντιπροσωπευτικούς HLH μεταγραφικούς παράγοντες των θηλαστικών και της Δροσόφιλας. Το δένδρόγραμμα έχει δημιουργηθεί με τη χρήση του αλγόριθμου Clustal W (από Massari and Murre, 2000).

1.5. Τα γονίδια bHLH στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος των σπονδυλωτών

Κατά τη διάρκεια της νευριδιοποίησης, οι νευρικές αύλακες ανεβαίνουν από τη ραχιαία πλευρά του εμβρύου, πλησιάζουν μεταξύ τους στο μέσο και αρχίζουν να ενώνονται σχηματίζοντας με αυτόν τον τρόπο το νευρικό σωλήνα. Ο νευρικός σωλήνας αρχικά αποτελείται από μία μονή στοιβάδα νευρικών αρχέγονων κυττάρων, τα οποία στη συνέχεια θα δώσουν γένεση στους νευρώνες και στα κύτταρα γλοίας. Αυτές οι διαδικασίες στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος στα θηλαστικά φαίνονται να ελέγχονται θετικά ή αρνητικά από πολλαπλούς bHLH μεταγραφικούς παράγοντες, κατ' αντιστοιχία με τη *Drosophila* (Εικόνα 1). Στην *Drosophila*, γονίδια bHLH όπως τα *achaete*, *scute*, *atonal* και *daughterless (da)* καθορίζουν τη νευρική μοίρα στο εξώδερμα σαν προνευρικά γονίδια, ενώ γονίδια bHLH όπως τα *hairy* και *Enhancer of split (E(spl))* ρυθμίζουν αρνητικά τη νευρογένεση. Ανωμαλία οποιουδήποτε από αυτά τα γονίδια έχει ως αποτέλεσμα υπερπλασία ή υποπλασία του νευρικού συστήματος.

Βάσιμες προσδοκίες για τον πιθανό ρόλο των bHLH γονιδίων στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος των σπονδυλωτών δημιουργήθηκαν, όταν σε πειράματα που έγιναν στη Δροσόφιλα, βρέθηκε ότι μεταλλάξεις στα γονίδια *AS-C* οδηγούν στην απώλεια νευρώνων. Τα "προνευρικά" αυτά γονίδια είναι απαραίτητα για το νευρικό καθορισμό, δηλαδή τη δημιουργία μη προκαθορισμένου εκτοδέρματος, ικανού να δώσει νευρικά κύτταρα (Campuzano et al, 1992; Lee, 1997).

Τα πρώτα σχετικά αποτελέσματα, για τα σπονδυλωτά, προήλθαν από πειράματα στον *Xenopus*, καθώς σ' αυτόν τον οργανισμό τα πρώτα στάδια της νευρικής επαγωγής είναι πειραματικώς προσιτά και αξιολογήσιμα. Στον *Xenopus* βρέθηκαν δύο αντίστοιχα *AC-S* γονίδια, τα: *Xash1* και *Xash3*. Έκτοπη έκφραση της *Xash3* σε έμβρυα *Xenopus* προκαλεί δραματική επέκταση της νευρικής πλάκας (Ferreiro et al, 1994; Turner and Weintraub, 1994). Έκτοπη έκφραση ενός άλλου bHLH γονιδίου σε έμβρυα *Xenopus*, του *XNeuroD*, προκαλεί πρόιμη και έκτοπη νευρογένεση (Lee et al, 1995; McCormick et al, 1996; Ma et al, 1996). Ο φαινότυπος είναι διαφορετικός απ' αυτόν της έκτοπης έκφρασης του *Xash3* καθώς δεν παρατηρείται επέκταση της νευρικής πλάκας. Τα ομόλογα γονίδια των *AC-S* στα θηλαστικά είναι τα *Mash-1* και *Mash-2*. Η έκφραση του *Mash-1* εντοπίζεται στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ και ΠΝΣ. Καταστροφή του γονιδίου *Mash-1* έδειξε ότι είναι

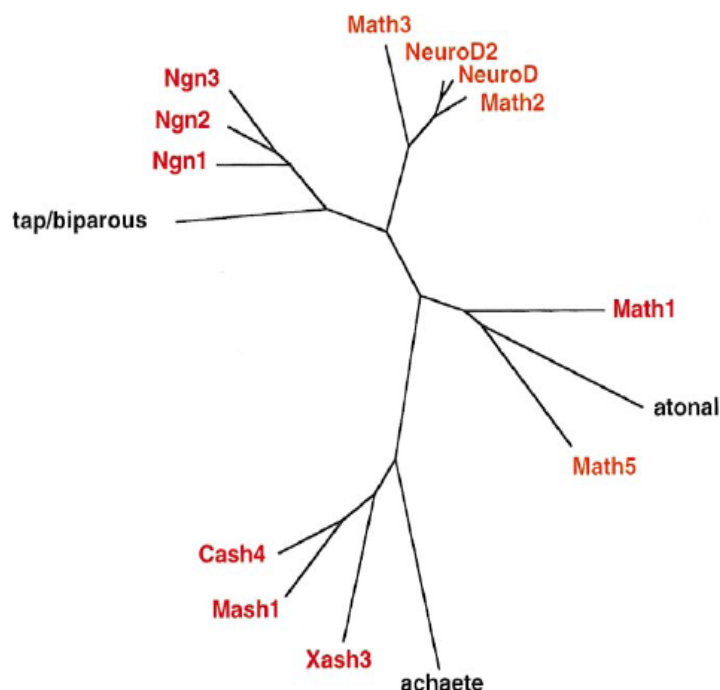
απαραίτητο για τη σωστή ανάπτυξη, τόσο του αυτόνομου νευρικού συστήματος, όσο και των σφρηκτικών νευρώνων (Hirsch et al, 1998).

Στα θηλαστικά, ομόλογα των bHLH γονιδίων της *Drosophila* έχουν χαρακτηριστεί σαν ρυθμιστές της νευρικής ανάπτυξης. Ο μεταγραφικός παράγοντας Mash1, ένα ομόλογο των *achaete* και *scute*, σχηματίζει ετεροδιμερές σύμπλοκο με τον μεταγραφικό παράγοντα E2A, ένα ομόλογο της πρωτεΐνης Da και ρυθμίζει θετικά τη νευρική διαφοροποίηση. Αντίθετα, οι μεταγραφικοί παράγοντες Hes1 και Hes5, ομόλογα των μεταγραφικών παραγόντων *Hairy* και *E(spl)*, ανταγωνίζονται τις δραστηριότητες των θετικών bHLH παραγόντων (Mash1, *Math1* και E2A) και ρυθμίζουν αρνητικά τη νευρική διαφοροποίηση (Guillemot, 1999). Η ισορροπία μεταξύ αυτών των θετικών και αρνητικών bHLH παραγόντων είναι σημαντική για τη μορφογένεση του νευρικού συστήματος αφού, απουσία του Hes1, η νευρική διαφοροποίηση επιταχύνεται κάτι που έχει ως αποτέλεσμα σοβαρές ανωμαλίες του νευρικού συστήματος όπως είναι η έλλειψη εγκεφάλου και ανωμαλίες των ματιών (Kageyama et al, 1997).

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1**, τα μόρια που ρυθμίζουν την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος έχουν συντηρηθεί αρκετά, δομικά και λειτουργικά, ανάμεσα στη *Drosophila* και στα θηλαστικά. Όπως στη *Drosophila*, έτσι και στα θηλαστικά το μονοπάτι μεταγωγής σήματος $\text{Notch} \rightarrow \text{RBP-J} \rightarrow \text{Hes1} \dashv \text{Mash1}$ πιθανότατα διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Όμως, υπάρχουν και κάποιες διαφορές ανάμεσα στα δύο είδη όπως το γεγονός ότι στη *Drosophila*, η πρωτεΐνη *achaete* δρα στη διαδικασία επιλογής μεταξύ της νευρικής και της επιδερμικής μοίρας του κυττάρου και οι πρωτεΐνες *hairy* και *E(spl)* εμπλέκονται στην ίδια διαδικασία ανταγωνιστικά. Αντίθετα, τα ομόλογα τους στα θηλαστικά δεν εμπλέκονται στην επιλογή μεταξύ της νευρικής και επιδερμικής μοίρας του κυττάρου αλλά ρυθμίζουν τη διαδικασία διαφοροποίησης των ήδη καθορισμένων κυτταρικών σειρών (Kageyama et al, 1997).

Ένας μεγάλος αριθμός μεταγραφικών παραγόντων εκφράζονται διαδοχικά και παροδικά στα αρχέγονα νευρικά κύτταρα καθώς προχωράει η νευρογένεση. Πρωτεΐνες της bHLH τάξης κατέχουν έναν κεντρικό ρόλο στον καθορισμό των κυτταρικών σειρών των νευρικών κυττάρων στο Κ.Ν.Σ και στο Π.Ν.Σ και στην απόκτηση των παν-νευρικών χαρακτηριστικών από τους διαφοροποιούμενους νευρώνες. Πολλά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά ρυθμίζονται από πρωτεΐνες με ομοιοτικές περιοχές, αλλά οι bHLH πρωτεΐνες εμπλέκονται επίσης στον καθορισμό

συγκεκριμένων χαρακτηριστικών του φαινοτύπου των νευρώνων, όπως είναι για παράδειγμα ο νευροδιαβιβαστής που θα εκφράζουν. Τα παν-νευρικά χαρακτηριστικά προέρχονται από την ενεργοποίηση των παν-νευρικών γονιδίων, τα οποία εκφράζονται σε όλα τα αρχέγονα νευρικά κύτταρα και θεωρείται ότι ρυθμίζουν γενικά τη διαδικασία της νευρικής διαφοροποίησης ενώ αντίθετα τα γονίδια επιλογής τύπου νευρικού κυττάρου εκφράζονται από διακριτές υποομάδες αρχέγονων νευρικών κυττάρων και εμπλέκονται στον καθορισμό της νευρικής τους ταυτότητας. Μερικά γονίδια, όπως τα *Mash1*, *Math1* και τα γονίδια της οικογένειας *Neurogenin* (*Ngn*) εκφράζονται σε διαιρούμενα κύτταρα κάτι που προτείνει ότι εμπλέκονται στον καθορισμό των πληθυσμών των αρχέγονων νευρικών κυττάρων, ενώ άλλα, όπως τα *NeuroD* και τα σχετικά με αυτό γονίδια εκφράζονται κυρίως σε μεταμιτωτικά αρχέγονα κύτταρα ή σε διαφοροποιημένους νευρώνες, κάτι που προτείνει γι' αυτά ένα ρόλο στη διαφοροποίηση των αρχέγονων νευρικών κυττάρων ή στη διατήρηση της διαφοροποιημένης κατάστασης. Τα γονίδια της οικογένειας *Ngn* ενεργοποιούν ένα πρόγραμμα διαφοροποίησης το οποίο περιλαμβάνει την επακόλουθη έκφραση των bHLH γονιδίων *NeuroD*, *Math3*, *Nscl1* και *Nscl2* σε πολύ διαφορετικές μεταξύ τους περιοχές του νευρικού συστήματος όπως είναι τα κρανιακά αισθητικά γάγγλια, ο νωτιαίος μυελός, ο αμφιβληστροειδής χιτώνας και ο εγκεφαλικός φλοιός, ενώ η έκφραση των σχετικών με το *NeuroD* γονιδίων, *Math2* και *NeuroD2* είναι κατά ένα μεγάλο βαθμό περιορισμένη στους ώριμους νευρώνες του Κ.Ν.Σ, ιδιαίτερα στον εγκεφαλικό φλοιό (Guillemot, 1999).



Εικόνα 5: Ακτινωτό φυλογενετικό δένδρο των νευρικών bHLH γονιδίων των σπονδυλωτών και των αντίστοιχων της Δροσόφιλας. Δώδεκα bHLH γονίδια αντίστοιχα των προνευρικών γονιδίων της Δροσόφιλας εκφράζονται στο νευρικό σύστημα των σπονδυλωτών (στην εικόνα παρουσιάζονται μόνο τα ορθόλογα του ποντικού, με εξαίρεση τα *Xash3* και *Cash4*). Αυτά τα γονίδια απαρτίζουν τέσσερις υποοικογένειες με πολύ παρόμοιες bHLH περιοχές. Η μία απ' αυτές περιλαμβάνει τα ορθόλογα των *ac-sc* γονιδίων: *ash1* (εκφράζεται σε όλα τα σπονδυλωτά που έχουν μελετηθεί), *Xash3* (έχει βρεθεί μόνο στον *Xenopus*), *Cash4* (έχει βρεθεί μόνο στην όρνιθα). Η δεύτερη υποοικογένεια περιλαμβάνει τα ορθόλογα του *atonal*: *ath1* και *ath5*. Η τρίτη υποοικογένεια περιλαμβάνει τα γονίδια *Neurogenins*, τα οποία είναι πιο στενά σχετιζόμενα με τα πρόσφατα χαρακτηρισμένα γονίδια *tap/biparous* της Δροσόφιλας, από ότι τα *achaete-scute* και *atonal*. Η τέταρτη υποοικογένεια περιλαμβάνει τα *NeuroD* και άλλα συγγενικά γονίδια, τα οποία δεν έχουν ορθόλογα στη Δροσόφιλα, αλλά είναι ασθενώς σχετιζόμενα με το *atonal*. Τα νευρικά bHLH γονίδια *Nsc11* και *Nsc12* δε σχετίζονται με προνευρικά γονίδια αλλά με το γονίδιο *SCL* το οποίο εκφράζεται σε πρόδρομα κύτταρα του αιμοποιητικού. Τα ονόματα των γονιδίων της Δροσόφιλας είναι γραμμένα με μαύρο χρώμα, τα γονίδια των σπονδυλωτών που εκφράζονται κατεξοχήν σε διαιρούμενα πρόδρομα νευρικά κύτταρα (γονίδια καθορισμού) είναι κόκκινα, ενώ αυτά που εκφράζονται σε μεταμιτωτικούς νευρώνες (γονίδια διαφοροποίησης) είναι σε πορτοκαλί (από Guillemot, 1999).

Μια έρευνα έδειξε ότι η παροδική έκφραση των bHLH πρωτεϊνών του νευρικού συστήματος, *NeuroD2*, *NeuroD*, *Mash1*, *ngn1-3*, *Math1-3* και *NSCL1* είναι επαρκής για να ξεκινήσει ένα σταθερό πρόγραμμα νευρικής διαφοροποίησης σε πολυδύναμα P19 κύτταρα εμβρυϊκού καρκινώματος ποντικού (Farah et al, 2000). Αυτό το

πρόγραμμα περιλαμβάνει αλλαγές στη μορφολογία, επέκταση δενδριτών, έκφραση πρωτεϊνών ειδικών για τα νευρικά κύτταρα, παύση του κυτταρικού κύκλου και την ικανότητα για μεταγωγή ηλεκτρικού σήματος. Η παύση του κυτταρικού κύκλου ανιχνεύθηκε με την αυξημένη έκφραση του αναστολέα της κινάσης που εξαρτάται από την κυκλίνη, p27^{kip1} όταν πραγματοποιήθηκαν πειράματα συνδιαμόλυνσης των P19 κυττάρων με ένα πλασμίδιο έκφρασης της bHLH πρωτεΐνης και με ένα πλασμίδιο έκφρασης της πρωτεΐνης E12, που αποτελεί την πρωτεΐνη με την οποία διμερίζονται οι παραπάνω νευρογενείς bHLH πρωτεΐνες. Έτσι οι bHLH πρωτεΐνες του νευρικού συστήματος μπορούν να λειτουργούν σαν βασικοί ρυθμιστές της νευρογένεσης στα θηλαστικά, από την άποψη ότι είναι ικανές να επάγουν ένα πρόγραμμα νευρικής διαφοροποίησης σε μη νευρικά κύτταρα. Οι μόνες άλλες γνωστές πρωτεΐνες που έχουν αυτή την ικανότητα σε κυτταρική καλλιέργεια είναι η οικογένεια MyoD των bHLH πρωτεϊνών, οι πρωτεΐνες της οποίας μπορούν να κατευθύνουν τη μυογένεση (Farah et al., 2000). Σε in vitro πειράματα για διερεύνηση της μυικής διαφοροποίησης βρέθηκε ότι ένας μόνο μεταγραφικός παράγοντας, ο MyoD, ήταν αρκετός για να μετατρέψει μία κυτταρική σειρά ινοβλαστών από έμβρυο ποντικού σε μυοβλάστες. Η έκφραση του MyoD έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας σειράς μυο-ειδικών γονιδίων και η επακόλουθη έκφρασή τους έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή των επιμολυσμένων κυττάρων μέσω σύντηξης σε λειτουργικούς μυοσωληνίσκους (Murre et al, 1989).

1.6. *Nsc11* και *Nsc12*

Τα γονίδια *Nsc11* και *Nsc12* (ονομάζονται επίσης και *Hen1* και *Hen2* ή *Nhlh1* και *Nhlh2*) κωδικοποιούν μια διακριτή υποομάδα των bHLH πρωτεϊνών. Το γονίδιο *Nsc11* (Neurological Stem Cell Leukemia gene) αναγνωρίστηκε βάσει της υβριδοποίησης του με ένα ήδη γνωστό ανθρώπινο αιμοποιητικό γονίδιο της οικογένειας HLH, το *SCL* (Stem Cell Leukemia gene), από το οποίο πήρε και το όνομα του. Οι παράγοντες *SCL* (ή όπως αλλιώς ονομάζεται *Tal-1* ή *Hen-1*) και *LYL1* εμπλέκονται σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες που εντοπίζονται σε ασθενείς με οξεία λεμφογενή λευχαιμία από T-κύτταρα (Brown et al, 1992). Ο NSCL1 ανήκει στην τάξη II των HLH μεταγραφικών παραγόντων και έχει βρεθεί ότι λειτουργεί σαν ενεργοποιητής της μεταγραφής όταν ετεροδιμερίζεται με την πρωτεΐνη ME1a της οικογένειας των E-πρωτεϊνών (Uittenbogaard et al, 1999).

Το ανθρώπινο *Nsc11* γονίδιο εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 1, στο τμήμα 1q22, ενώ το ομόλογο του *Nsc11* στον ποντικό χαρτογραφείται σε μία περιοχή του γενώματος του ποντικού που είναι συνταινική με τα ανθρώπινα χρωμοσωμικά τμήματα 1q12-23 (Brown et al, 1992). Στην περιοχή αυτή εντοπίζεται και η “looptail” μετάλλαξη (*Lp*), η οποία επιφέρει σε ομόζυγα *Lp/Lp* έμβρυα ποντικών αδυναμία κλεισίματος του νευρικού σωλήνα, στην περιοχή του αυχένα/οπίσθιου εγκεφάλου (Copp et al, 1994; Mullick et al, 1995; Stanier et al, 1995). Εξαιτίας αυτού, θεωρήθηκε αρχικά πιθανό το γονίδιο *Nsc11* να εμπλέκεται σ’ αυτή τη μετάλλαξη και τον επακόλουθο φαινότυπο. Μεταγενέστερες, όμως, έρευνες έδειξαν ότι κάτι τέτοιο δεν είναι πολύ πιθανό, καθώς και η έκφραση του *Nsc11* και η ανάλυση του γενωμικού τύπου του, σε *Lp/Lp* ομόζυγα έμβρυα ποντικών ήταν φυσιολογική (Murdoch et al, 1999). Το γονίδιο *Nsc12* εντοπίστηκε στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 1, στο τμήμα 1p11-1p12 καθώς και στο χρωμόσωμα 3 του ποντικού (Lipkowitz et al, 1992). Η κωδικοποιούσα περιοχή του *Nsc11* αποτελείται από 399 bp στον ποντικό και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 133 αμινοξέων με M.B. 14.8 kDa, ενώ η πρωτεΐνη NSCL2 αποτελείται από 135 αμινοξέα με M.B. 15 kDa

Παρότι η πρωτεΐνη NSCL1 έχει προβλεπόμενο M.B 14.8 kDa, η ηλεκτροφορητική της κινητικότητα σε gel SDS-πολυακρυλαμίδης παρουσιάζει σημαντική υστέρηση. Η κινητικότητά της αντιστοιχεί σε πρωτεΐνη με M.B περίπου 20 kDa. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην τριτοταγή διαμόρφωσή της ή/και σε εκτεταμένη φωσφορυλίωση της. Όσον αφορά τη φωσφορυλίωσή της αυτή έχει διαπιστωθεί ότι υφίσταται, και μάλιστα μόνο σε κατάλοιπα σερίνης (Brown and Baer, 1994).

Η NSCL1 πρωτεΐνη περιέχει το τυπικό HLH μοτίβο καθώς και μία βασική περιοχή ανοδικά. Η βασική περιοχή του NSCL1 εκτείνεται 25 αμινοξέα ανοδικά της HLH περιοχής και περιλαμβάνει 6 συνεχόμενα κατάλοιπα αργινίνης. Η παρουσία αυτής της βασικής περιοχής προτείνει το NSCL1 σαν θετικό ρυθμιστή της HLH τάξης (Begley et al, 1992). Στη βασική περιοχή του NSCL1 υπάρχει ένα συντηρημένο υδρόφοβο κατάλοιπο βαλίνης, στο 3’ άκρο της “βασικής περιοχής 2” BR2 (Εικόνα 6) το οποίο είναι υπεύθυνο για την επιλεκτικότητα πρόσδεσης του NSCL1 στο E-box μοτίβο “CAGCTG”. Την ίδια επιλεκτικότητα πρόσδεσης στο E-box μοτίβο “CAGCTG” παρουσιάζουν και οι bHLH μεταγραφικοί παράγοντες E12, E47, MyoD, AP4 και Tal1 οι οποίοι στην αντίστοιχη θέση έχουν ένα κατάλοιπο γλουταμίνης ή ένα αλειφατικό κατάλοιπο βαλίνης, λευκίνης ή μεθειονίνης. Αντίθετα

bHLH μεταγραφικοί παράγοντες που έχουν συντηρημένο, στην αντίστοιχη θέση, ένα κατάλοιπο αργινίνης (c-Myc, USF, CBF1, MAX, TFE3, PHO4) προσδένονται επιλεκτικά στο E-box μοτίβο “CACGTG” (Dang, 1992).

Τα ανθρώπινα γονίδια των *Nsc11* και *Nsc12* κωδικοποιούν πρωτεΐνες που αποτελούνται από 133 και 135 αμινοξέα αντίστοιχα και περιέχουν μακριές 5'-αμετάφραστες περιοχές σε σύγκριση με τα περισσότερα γονίδια. Οι μακριές 5'-αμετάφραστες περιοχές είναι συχνές σε γονίδια αυξητικών παραγόντων, σε πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες και σε πρωτεΐνες θερμικού shock. Οι 3'-αμετάφραστες περιοχές των δύο γονιδίων είναι σχετικά πλούσιες σε A+T και η αλληλουχία ATTTA βρίσκεται περίπου 10-12 φορές σε αυτή την περιοχή. Αυτό το μοτίβο βρίσκεται συχνά σε 3'-αμετάφραστες περιοχές κυτοκινών και μεταγραφικών παραγόντων και θεωρείται ότι αποσταθεροποιεί το κυτταροπλασματικό mRNA. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των γονιδίων *Nsc11* και *Nsc12* είναι υψηλά συντηρημένες μεταξύ των ανθρώπινων και των ποντικών ομόλογων (κωδικοποιούν πρωτεΐνες με αντίστοιχο αριθμό αμινοξέων), αλλά και μεταξύ τους, όπως φαίνεται στον πίνακα 1 (Lipkowitz et al, 1992).

Το ομόλογο γονίδιο των *Nsc11* και *Nsc12* στη δροσόφιλα ονομάστηκε *DroNHLH* και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 162 αμινοξέων. Το γονίδιο *DroNHLH* παρουσιάζει ελαφρώς μεγαλύτερη ομοιότητα με το γονίδιο *Nsc11*, αν και το ποσοστό ομολογίας της bHLH περιοχής του, τόσο με το NSCL1 όσο και με το NSCL2, φτάνει στο ποσοστό 87%. Η έκφραση του *DroNHLH* ξεκινά κατά το εμβρυικό στάδιο 12, όταν οι νευροβλάστες έχουν ήδη διαμορφωθεί. Η έκφρασή του παρατηρείται μόνο σε ώριμους διαφοροποιημένους νευρώνες (Varterasian, 1993).

Στον *Xenopus* το ομόλογο γονίδιο *XHEN1* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 128 αμινοξέων. Το ποσοστό ομολογίας της XHEN1 είναι 75% με την πρωτεΐνη NSCL1 και 65% με την πρωτεΐνη NSCL2. Στην περιοχή bHLH το ποσοστό ομολογίας των πρωτεϊνών XHEN1 και NSCL1 είναι 99%, διαφέρουν δηλαδή μόνο σε ένα αμινοξύ (Bao et al, 2000). Υπερέκφραση, μάλιστα, του XHEN1 σε έμβρυα από *Xenopus* οδηγεί σε επαγωγή νευρογένεσης και πρόωμης νευρικής διαφοροποίησης.

BASIC REGIONS BINDING SITE

	BR1	BR2	
Class A	Nsc11	AK YR TAHATR	ERIR V
	E12	KE RR VANNAR	ERLR V
	E47	RE RR MANNAR	ERVR V
	MyoD	AD RR KAATMR	ERRR L
	AP4	RI RR EIANSN	ERRR M
	Ta11	VV RR IFTNSR	ERWR Q
			CAG CTG
Class B	C-Myc	NV KR RTHNVL	ERQR R
	USF	EK RR AQHNEV	ERRR R
	CBF1	KQ RK DSHKEV	ERRR R
	Max	AD KR AHHNAL	ERRR R
	TFE3	RQ KK DNHNLI	ERRR R
	PHO4	DD KR ESHKHA	EQAR R
			CAC GTG

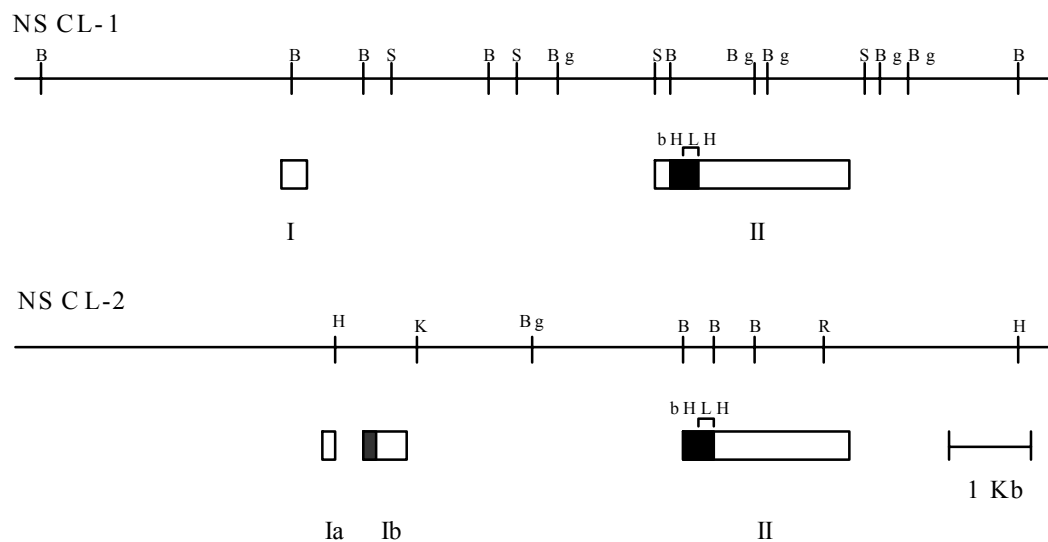
Εικόνα 6: Στην εικόνα αυτή φαίνονται οι βασικές περιοχές BR1 και BR2 (με έντονη γραφή) καθώς και το πρώτο αμινοξύ αμέσως μετά την BR2 περιοχή (με κόκκινο), το οποίο ευθύνεται για την επιλεκτικότητα πρόσδεσης των bHLH μεταγραφικών παραγόντων μεταξύ των “CAGCTG” και “CACGTG” E-boxes (Dang et al, 1992).

	Human Nsc12	Mouse Nsc11	Mouse Nsc12	SCL	LYL
Human Nsc11	89%,75%	89%		63%	63%
	54%	73%			
Human Nsc12			92%	63%	63%
			80%		

Πίνακας 1. Ποσοστά νουκλεοτιδικής ομολογίας μεταξύ των γονιδίων *Nsc1* καθώς και μεταξύ των *Nsc1* γονιδίων του ανθρώπου και των αιματοποιητικών γονιδίων *SCL* και *LYL* (Lipkowitz et al, 1992). Οι έντονοι χαρακτήρες αντιστοιχούν σε ποσοστά ομολογίας κωδικών περιοχών, οι απλοί χαρακτήρες σε ποσοστά ομολογίας σε όλο το μήκος του cDNA και οι πλάγιοι χαρακτήρες σε ποσοστά ομολογίας bHLH περιοχών.

Το ανθρώπινο γονίδιο *Nsc11* περιέχει 2 εξόνια ενώ το *Nsc12* περιέχει 3 εξόνια ενώ όλη η μεταφραζόμενη περιοχή και στα δύο μόρια εντοπίζεται στο εξόνιο II

(Murdoch et al, 1999). Παρά τη νουκλεοτιδική τους ομολογία οι πρωτεΐνες NSCL1 και NSCL2 παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές οι οποίες προφανώς ευθύνονται για τη διαφορετική λειτουργία τους. Η πιο σημαντική διαφορά τους έγκειται στην Ν-τελική περιοχή τους, όπου στην NSCL1 βρίσκεται μια περιοχή πλούσια σε προλίνες, ενώ στην NSCL2 βρίσκεται μια περιοχή πλούσια σε όξινα αμινοξέα. Αυτές οι αλληλουχίες είναι πιθανές περιοχές μεταγραφικής ενεργοποίησης (Lipkowitz et al, 1992).



Εικόνα 7: Περιοριστικοί χάρτες και γενωμική οργάνωση των ανθρώπινων γονιδίων *Nsc11* και *Nsc12*. Τα εξώνια (κουτάκια) φαίνονται κάτω από τους περιοριστικούς χάρτες. Οι κωδικές περιοχές είναι χρωματισμένες μαύρες και οι bHLH περιοχές είναι σημειωμένες πάνω από αυτές. Η επικρατούσα μορφή του *Nsc12* ματίζει το εξώνιο Ia στο εξώνιο Ib. Η γραμμοσκιασμένη επιφάνεια στο 5' άκρο του εξωνίου Ib στο *Nsc12* παριστά πιθανό εναλλακτικό μετάγραφο. Τα αρχικά των θέσεων περιοριστικών ενζύμων αντιστοιχούν στα παρακάτω ένζυμα: B, BamHI; Bg, Bgl II; R, EcoRI; H, Hind III; K, KpnI; S, SstI.

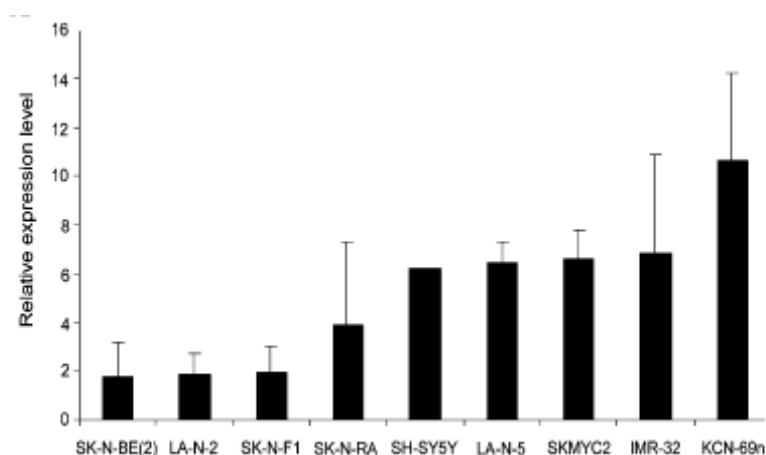
Η έκφραση των ανθρώπινων γονιδίων *Nsc11* και *Nsc12* εξετάστηκε σε πλήθος κυτταρικών σειρών με ανάλυση κατά Northern και τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στον παρακάτω **πίνακα 2** (Lipkowitz et al, 1992) :

Κυτταρική σειρά	Έκφραση <i>Nsc11</i>	Έκφραση <i>Nsc12</i>
Neuroblastoma		
SMS-KAN	+	+
SK-N-LO	+	+
SK-N-AS	+	-
LA-N-1(5)	+	-
SK-N-BE(2)	?	-
SMS-KCNR	-	+
LA-N-1	-	-
SK-N-DZ	-	-
SK-N-SH	-	-
SK-N-SH (5YSY)	-	-
SK-N-SH (SHEP)	-	-
IMR 32	-	-
NCI-H1101	-	-
GI/CAN	-	-
PNET		
TC32	+	-
SK-N-DW	+	-
SK-N-F1	+	-
CHP-100	-	-
SK-PN-L1	-	-
Small cell lung cancer		
NCI-H69	+	?
NCI-H146	+	?
NCI-H1417	+	-
NCI-H82	-	-
NCI-H209	-	-
NCI-H187	-	-
NCI-H592	-	-
NCI-H1092	-	Δεν ελέγχθηκε
Carcinoid		
NCI-H727	?	-
NCI-H720	-	-

Κυτταρική σειρά	Έκφραση <i>Nsc11</i>	Έκφραση <i>Nsc12</i>
Non-small cell lung cancer		
NCI-H23	-	-
NCI-H125	-	-
NCI-H226	-	-
NCI-H460	-	-
NCI-H520	-	-
NCI-H661	-	-
NCI-H810	-	-
NCI-H1299	-	-
NCI-H1373	-	-
NCI-H1581	-	-

Πίνακας 2: Έκφραση των ανθρώπινων γονιδίων *Nsc11* και *Nsc12* σε κυτταρικές σειρές διαφορετικής προέλευσης. Η ανάλυση κατά Northern έγινε με τη χρήση δέκα μικρογραμμάρων ολικού RNA

Μεταγενέστερα (Manetopoulos et al, 2003) η έκφραση του *Nsc11* διερευνήθηκε σε εννέα αδιαφοροποίητες κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος με τη χρήση RT-PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης μετά από αντίστροφη μεταγραφή) η οποία διαθέτει πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης από ότι η ανάλυση κατά Northern. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων φαίνονται συνοπτικά στην **εικόνα 8**.



Εικόνα 8: Έκφραση του (ανθρώπινου) *Nsc11* γονιδίου σε εννέα αδιαφοροποίητες κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος. Για κάθε κυτταρική σειρά απομονώθηκαν δυο μικρογραμμάρια ολικό RNA, όπου πραγματοποιήθηκε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής για την παραγωγή του cDNA και στη συνέχεια PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών (RT-PCR).

1.7. Έκφραση του γονιδίου *NscII*

Το γονίδιο *NscII* εκφράζεται μόνο σε κύτταρα του νευρικού συστήματος. Ειδικότερα σε έμβρυα ποντικού 8.75 - 13.5 ημέρες μετά τη σύλληψη τους εκφράζεται στην υποεπενδυματική στοιβάδα του νευροεπιθηλίου σε ολόκληρο το Κ.Ν.Σ, ενώ στο Π.Ν.Σ εκφράζεται στα γάγγλια ραχιαίων ριζών (DRG, dorsal root ganglia), στο αισθητικό ρινικό επιθήλιο, στο γάγγλιο του τριδύμου και σε άλλα κρανιακά γάγγλια με μέγιστα επίπεδα έκφρασης στις 10.5-12 ημέρες (Begley et al, 1992). Η ανάπτυξη του Κ.Ν.Σ λαμβάνει χώρα μέσω κυτταρικού πολλαπλασιασμού στην επενδυματική στοιβάδα που ακολουθείται από μετανάστευση σε πιο εξωτερικά στρώματα. Αυτή η μετανάστευση συνοδεύεται από κυτταρική διαφοροποίηση (Begley et al, 1992). 9.5 ημέρες μετά τη σύλληψη, η έκφραση του *NscII* είναι έντονη στην υποεπενδυματική στοιβάδα του αναπτυσσόμενου Κ.Ν.Σ, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, όπου βρίσκεται ένας υποπληθυσμός μεταμιτωτικών νευρικών κυττάρων που πρόκειται να μεταναστεύσουν και να διαφοροποιηθούν. Αυτό το πρότυπο έκφρασης του *NscII* προτείνει ένα ρόλο του στη ρύθμιση της εξόδου των κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο ή της έναρξης της διαφοροποίησης από τη στιγμή που τα κύτταρα γίνουν μεταμιτωτικά (Murdoch et al, 1999).

Παράλληλα με τη δική μας εργασία, πραγματοποιήθηκαν και έρευνες από άλλες ερευνητικές ομάδες, οι οποίες ασχολήθηκαν με την έκφραση του *NscII* σε συγκεκριμένες δομές, όπως στην παρεγκεφαλίδα, στον αμφιβληστροειδή χιτώνα, στα κρανιακά και στα αισθητικά γάγγλια (Uittenbogaard et al, 1999; Kruger and Braun, 2002).

Σε όλα τα πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί η έκφραση του *NscII* δεν παρουσιάζει κάποια κυτταρική εξειδίκευση (cell type specific expression), για νευρικά κύτταρα ή κύτταρα της γλοίας. Μονάχα κατά την ανάπτυξη του αμφιβληστροειδούς χιτώνα στο μάτι της όρνιθας έχει παρατηρηθεί κυτταρική εξειδίκευση στην έκφρασή του. Συγκεκριμένα έντονη έκφραση του *cNscII* παρατηρείται αρχικά κατά την εμβρυική ημέρα E7 σε διαφοροποιούμενα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, η οποία κατά τις επόμενες εμβρυικές ημέρες φθίνει. Αντιθέτως η έκφραση του *cNscII* στα γλοιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς αρχίζει κατά την εμβρυική ημέρα E15, διατηρείται έντονη τις επόμενες ημέρες, και συνεχίζει να υφίσταται τουλάχιστον για τις πρώτες τριάντα ημέρες μετά την εκκόλαψη (Li et al, 1999).

1.8. Αλληλεπίδραση του NSCL1 με άλλες bHLH πρωτεΐνες

Όντας μέλος της τάξης II της οικογένειας των bHLH μεταγραφικών παραγόντων, ο NSCL1 δρα σχηματίζοντας ετεροδιμερή κυρίως με τις E-πρωτεΐνες. Λόγω της επικαλυπτόμενης έκφρασης της πρωτεΐνης ME1a και του NSCL1 στην αναπτυσσόμενη παρεγκεφαλίδα (Neuman et al, 1993), εξετάστηκε το ενδεχόμενο λειτουργικής αλληλεπίδρασής τους (Uittenbogaard et al, 1999). Βρέθηκε ότι όταν ο NSCL1 ετεροδιμερίζεται με τον ME1a δρα ως θετικός ενεργοποιητής. Αυτό το ετεροδιμερές βρέθηκε να προσδένεται με μεγάλη συγγένεια στο ολιγομερές 5'-AGCTGGCAGCAGCTGGCAGCA-3' (μE2) (Uittenbogaard et al, 1999). Η μεγάλη συγγένεια πρόσδεσης του ετεροδιμερούς NSCL1/ME1a στο ολιγομερές αυτό που περιέχει το E-box "CAGCTG" οφείλεται στην πολύ ειδική αναγνώριση του ολιγονουκλεοτιδίου "CAG" από το NSCL1 καθώς και του ολιγονουκλεοτιδίου "CTG" από το ME1a (Chiaramello et al, 1995).

Σε αντίθεση με τα περισσότερα μέλη της τάξης II της οικογένειας των bHLH μεταγραφικών παραγόντων, η πρωτεΐνη NSCL1 σχηματίζει και ομοδιμερή τα οποία αναγνωρίζουν και προσδένονται επιλεκτικά στο E-box της αλληλουχίας GGGNCGCAGCTGCGNCCC. Επίσης η πρωτεΐνη NSCL1 σχηματίζει ετεροδιμερή με την E-πρωτεΐνη E12, τα οποία αναγνωρίζουν την αλληλουχία TCGAAGGACG CAGCTGATCCCC (Brown and Baer, 1994). Όμως παρά τη δυνατότητα σχηματισμού ομοδιμερών NSCL1/NSCL1 και ετεροδιμερών NSCL1/E12, τα οποία προσδένονται σε συγκεκριμένα E-boxes, σε πειράματα ενεργοποίησης με πλασμίδια αναφοράς δεν καταγράφηκε η ικανότητα ενεργοποίησης των πλασμιδίων αναφοράς από τα διμερή αυτά. Αυτό θα μπορούσε να σημαίνει είτε την απουσία ενεργοποιητικής δράσης, είτε την ανάγκη συνεργασίας με άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες προκειμένου να επιτευχθεί μεταγραφική ενεργοποίηση.

Πράγματι, παράλληλη έκφραση των XHEN1 και της "LIM-only" πρωτεΐνης XLMO-3 σε κύτταρα θηλαστικών οδήγησε σε μεταγραφική ενεργοποίηση ενός πλασμιδίου αναφοράς το οποίο περιείχε τέσσερα E-boxes. Επίσης πειράματα συνδιαμόλυνσης των XHEN1 και XLMO-3 στον *Xenopus* οδήγησαν στην έκφραση ενδογενούς X-NGNR-1 (*Xenopus Neurogenin-1*), XNeuroD, N-CAM και N-tubulin (Bao et al, 2000).

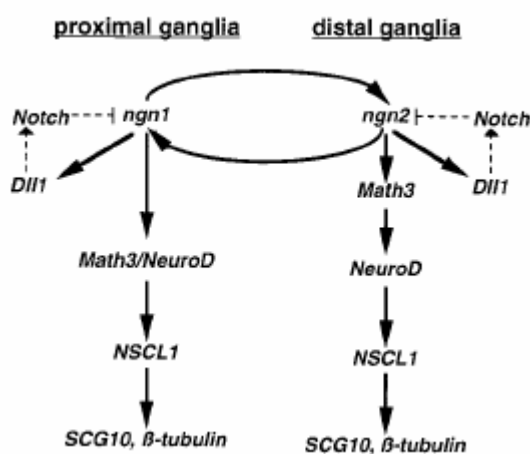
Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης NSCL1 στην κυτταρική σειρά HiB5 (αθανатоποιημένα πρώιμα πολυδύναμα κύτταρα ιπποκάμπου) οδηγεί στην ανάπτυξη

πολύ μακρών νευριτών, η οποία μπορεί να παρεμποδιστεί από την “LIM-only” πρωτεΐνη LMO-4 (Manetopoulos et al, 2003).

Η πρωτεΐνη NSCL1 ενισχύει *in vitro* τη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου Id2 και επιπροσθέτως η έκφρασή του προλαμβάνει τη μείωση της έκφρασης του Id2 σε κυτταρικές σειρές F9 τερατοκαρκινώματος, μετά από επαγωγή της διαφοροποίησης (Neuman et al, 1995).

Επιπλέον, ο NSCL1 αλληλεπιδρά τόσο με άλλες E πρωτεΐνες όπως η E47 όσο και με «LIM-only» πρωτεΐνες, όπως η LMO-1, LMO-2 και LMO-3 , LMO-4 (Bao et al, 2000). Μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων ο NSCL1 εμπλέκεται σε μονοπάτια για τη θετική ρύθμιση της έκφρασης νέυρο-ειδικών bHLH πρωτεϊνών που επάγουν τα όψιμα στάδια διαφοροποίησης (Bao et al, 2000).

Η έκφραση του Nscl1 στα εγγύς και άπω αισθητικά κρανιακά γάγγλια είναι ιδιαίτερη έντονη και με μεγάλη διάρκεια κατά τη φάση της εμβρυικής ανάπτυξης, και ελέγχεται από το σηματοδοτικό μονοπάτι του Notch (**Εικόνα 9**), (Fode et al, 1998; Ma et al, 1998).



Εικόνα 9: Σύνοψη των ρυθμιστικών αλληλεπιδράσεων στα εγγύς και άπω αισθητικά κρανιακά γάγγλια, όπως έχει καταγραφεί μετά από ανάλυση *ngn* μεταλλαγμένων ποντικών. Η πρωτεΐνη *ngn1* είναι απαραίτητη στα πρόδρομα κύτταρα των εγγύς αισθητικών κρανιακών γαγγλίων, ενώ η *ngn2* στα πρόδρομα κύτταρα των άπω αισθητικών κρανιακών γαγγλίων.

1.9. Φαινότυπος *Nsc11*^{-/-} και *Nsc12*^{-/-} ποντικών

Πειράματα επαγωγής ομόζυγων *Nsc11* μεταλλαγών σε ποντίκια δεν είχαν κάποιο διακριτό φαινότυπο σε σχέση με τα αγρίου τύπου και τα ετερόζυγα. Συγκεκριμένα, τα νευρικά κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού, των κρανιακών γαγγλίων και της παρεγκεφαλίδας, όπου και παρατηρείται εντονότερη η έκφραση του *Nsc11*, αναπτύχθηκαν χωρίς καμία προφανή μορφολογική ανωμαλία. Τόσο το πρόγραμμα διαφοροποίησης τους, όσο και η μεταναστευτική τους πορεία δεν παρουσίασαν κάποια μεταβολή. Αντίθετα, τα *Nsc12*^{-/-} ποντίκια ήταν στείρα και είχαν τάσεις παχυσαρκίας.

Τα διπλά μεταλλαγμένα ποντίκια για τα *Nsc11* και *Nsc12* δεν παρουσιάζουν κάποια μορφολογική, κινητική ή αναπτυξιακή ανωμαλία σε σύγκριση με τα *Nsc11*^{-/-} ποντίκια. Επομένως, είναι πιθανό η διάσωση του φαινοτύπου σε *Nsc11*^{-/-} (και *Nsc11*^{-/-} x *Nsc12*^{-/-}) ποντίκια να οφείλεται στη δράση άλλων bHLH πρωτεϊνών, εκτός του *Nsc12*, κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης (Kruger and Braun, 2002). Όμως τα *Nsc11*^{-/-} x *Nsc12*^{-/-} ποντίκια πεθαίνουν όλα μέσα στις πρώτες ημέρες μετά τη γέννησή τους, γεγονός το οποίο μας ωθεί στην υπόθεση ότι μετά τη γέννηση, για κάποιο άγνωστο λόγο, η έκφραση του ενός τουλάχιστον από τα *Nsc11* και *Nsc12* είναι απαραίτητη για την επιβίωση.

Συστηματική παρακολούθηση όμως των *Nsc11*^{-/-} ποντικών για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο του ενός έτους οδήγησε στο συμπέρασμα, ότι τα *Nsc11*^{-/-} ζώα παρουσιάζουν πολύ υψηλά ποσοστά θνησιμότητας σε σχέση με τα φυσιολογικά. Συγκεκριμένα ενώ οι φυσιολογικοί ποντικοί παρουσιάζουν μηδενική θνησιμότητα ένα χρόνο μετά τη γέννησή τους, οι *Nsc11*^{-/-} ποντικοί παρουσιάζουν θνησιμότητα 25%, ενώ οι *Nsc11*^{-/-} x *Nsc12*^{+/-} ποντικοί παρουσιάζουν θνησιμότητα 45%. Επιπρόσθετα όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι *Nsc11*^{-/-} x *Nsc12*^{-/-} ποντικοί πεθαίνουν μέσα στις πρώτες μέρες μετά τη γέννησή τους από καρδιοαναπνευστική ανεπάρκεια (Cogliati et al, 2002).

1.10. Πειράματα εκτοπικής έκφρασης και υπερέκφρασης του γονιδίου *cNsc11*

Πειράματα εκτοπικής έκφρασης του ομόλογου γονιδίου *cNsc11* στην όρνιθα με χρήση ρετροϊκού συστήματος είχαν ως τελικό αποτέλεσμα το θάνατο των εμβρύων μεταξύ E9 και E13, ενώ κανένα δεν κατάφερε να επιβιώσει για περισσότερο

από 13 εμβρυϊκές μέρες (Li et al 1999; Yan and Wang, 2001). Πριν το στάδιο αυτό, τα έμβρυα παρουσιάζουν σημαντική καταστολή στην ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας και μεγέθυνση της οπτικής καλύπτρας (tectum). Παρά τη μεγέθυνση του tectum δεν παρατηρούνται αλλαγές στη μορφολογία του. Παρατηρείται αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων στο στάδιο E9, ωστόσο αυτή μάλλον είναι δευτερογενής συνέπεια του αυξημένου ελεύθερου χώρου και της μειωμένης πίεσης.

Υπερέκφραση του *cNsc11* στην εξωτερική κοκκώδη στιβάδα της παρεγκεφαλίδας έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Li et al, 1999). Επίσης, υπερέκφραση του *cNsc11* έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μικρών οφθαλμών στην όρνιθα, μειωμένο πολλαπλασιασμό κυττάρων και μαζικό κυτταρικό θάνατο στον αμφιβληστροειδή στο εμβρυϊκό στάδιο E8 (Li et al, 1999).

Σε πειράματα εκτεταμένης έκτοπης έκφρασης του *cNsc11* παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του γονιδίου BMP4 (ομόλογο στα σπονδυλωτά του decapentaplegic -dpp- της Δροσόφιλας), και παράλληλα καταγράφηκαν σοβαρές μυοσκελετικές ανωμαλίες και παρεμπόδιση στην ανάπτυξη-δημιουργία του χόνδρου (Yan and Wang, 2001).

Τα παραπάνω αποτελέσματα δε φαίνεται να προκύπτουν από γενικότερη αλλαγή της ισορροπίας έκφρασης των bHLH πρωτεϊνών εφόσον αντίστοιχα πειράματα με το *cNsc12* δεν έχουν ανάλογους δραματικούς φαινοτύπους.

1.11. Σκοπός και στόχοι

Ο γενικότερος σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου, της σημασίας της έκφρασης και των αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες του μεταγραφικού παράγοντα NSCL1.

Για την επίτευξη αυτού του σκοπού οι κύριοι στόχοι που τέθηκαν κατά την έναρξη ή και κατά την πορεία αυτής της μελέτης ήταν επιγραμματικά οι εξής:

- 1) Η ανίχνευση και κλωνοποίηση του γονιδίου *Nsc11* της όρνιθας (chick *Nsc11* ή *cNsc11*). Η επιλογή της όρνιθας ως πειραματόζωου (παράλληλα και συμπληρωματικά με τη χρήση του ποντικού), μας προσφέρει το πλεονέκτημα της πραγματοποίησης πειραμάτων σε έμβρυα μέσα στο αυγό (in ovo), όπου οι εμβρυολογικοί χειρισμοί είναι πολύ πιο εύκολοι σε σχέση με αντίστοιχα πειράματα στον ποντικό.

- 2) Η μελέτη του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *Nsc11*, τόσο στην όρνιθα όσο και στον ποντικό, σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια, η σύγκριση των προτύπων αυτών και η διερεύνηση του βαθμού συντήρησής τους, μεταξύ των δυο αυτών οργανισμών.
- 3) Η συσχέτιση του προτύπου έκφρασης του *Nsc11* σε διάφορες δομές του ΚΝΣ και ΠΝΣ με το πρότυπο έκφρασης του μορίου συνάφειας TAG1, προκειμένου να έχουμε μια πρώτη ένδειξη για την πιθανότητα ρύθμισης της έκφρασης του *Tag1* από το *Nsc11*.
- 4) Η καταγραφή του προτύπου έκφρασης των γονιδίων *Hoxb1*, *Hoxb2*, *Plzf*, *Engrailed-1*, *Tag1* και *Pax-6* στον οπίσθιο εγκέφαλο σε φυσιολογικούς και *Nsc11*^{-/-} ποντικούς, και παράλληλα η σύγκριση του προτύπου έκφρασης του *Nsc11* ανάμεσα σε φυσιολογικούς και *Hoxb1*^{-/-} ποντικούς στον οπίσθιο εγκέφαλο.
- 5) Η μελέτη των πιθανών επιπτώσεων (αναπτυξιακών, μορφολογικών, ανατομικών, επιβίωσης) που θα έχει ως συνέπεια, η μη φυσιολογική έκφραση του *cNsc11* (υπερέκφραση ή/και έκτοπη έκφραση).
- 6) Η μελέτη της μεταγραφικής ενεργότητας του NSCL1 ως ομοδιμερούς και ως ετεροδιμερούς με το μεταγραφικό παράγοντα ME1a και η διερεύνηση του φυσιολογικού μεταγραφικού ρόλου της πολύ βασικής περιοχής b', που βρίσκεται ανοδικά της bHLH περιοχής.

2.

ΥΛΙΚΑ

ΚΑΙ

ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Προέλευση αντιδραστηρίων και υλικών

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη προήλθαν από τις ακόλουθες εταιρείες: Aldrich, Boehringer Mannheim, Biorad, Gibco-BRL, Merck, Pharmacia, Promega, Roche, Sigma, Stratagene, και United States Biochemicals corp.

Τα περιοριστικά και τροποποιητικά ένζυμα προήλθαν από τις εταιρείες : Promega, Gibco-BRL, Minotech, Finnzymes, New England Biolabs, Pharmacia, Roche και Stratagene.

Τα θρεπτικά υλικά καλλιέργειας βακτηριακών στελεχών αγοράστηκαν από τις εταιρείες Difco και Merck ενώ τα θρεπτικά και υλικά καλλιέργειας ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών από τις εταιρείες Gibco-BRL, Sigma, Nalgene, Nunc και Biochrom.

Τα ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια α [³²P]-dATP, α [³²P]-dCTP, α [³⁵S]-dATP προήλθαν από την εταιρεία Amersham – Pharmacia.

Οι νάυλον μεμβράνες υβριδοποίησης αγοράστηκαν από τις εταιρείες Schleicher & Schuel και BDH, οι μεμβράνες διαπίδυσης από τη Medicell και τα φύλλα αυτοραδιογραφίας από την Kodak και Fuji.

2.2. Πειραματόζωα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν:

- 1) Φυσιολογικοί ποντικοί των στελεχών CBAx C57B1/10.
- 2) Ποντικοί που εμφανίζουν απώλεια δράσης του γονιδίου *Nsc11*, οι οποίοι μας χορηγήθηκαν από το Dr. Marcus Kruger.
- 3) Ποντικοί (έμβρυα) που εμφανίζουν απώλεια δράσης του γονιδίου *Hoxb1*, οι οποίοι μας χορηγήθηκαν από το Δρ. Αντώνη Γαβαλά.

Η ημέρα της σύλληψης θεωρήθηκε η εμβρυϊκή ημέρα 0.5 (E0.5). Τα έγκυα ζώα θυσιάστηκαν με μεγάλη δόση αιθέρα ή χλωροφορμίου και τα έμβρυα συλλέχθηκαν σε φωσφορικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline: 400mM Na₂HPO₄, 50mM NaH₂PO₄, 1,5M NaCl). Στη συνέχεια, ακολούθησε μονιμοποίηση του ιστού.

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν γονιμοποιημένα αυγά όρνιθας (*Gallus gallus domesticus*) τα οποία επώαστηκαν οριζόντια στους 38 °C σε υψηλή υγρασία και η ηλικία των εμβρύων προσδιορίστηκε σύμφωνα με τον πίνακα αναπτυξιακών σταδίων των

Hamburger και Hamilton, (1951). Για τα πειράματα υπερέκφρασης και έκτοπης έκφρασης του γονιδίου *cNsc11* με τη χρήση του ρετροϊκού φορέα RCASBP(A) χρησιμοποιήθηκαν γονιμοποιημένα white Leghorn αυγά, τα οποία είχαν ελεγχθεί ώστε να μην περιέχουν ενδογενείς ρετροϊούς για την αποφυγή ομόλογου ανασυνδυασμού με το ρετροϊό που χρησιμοποιούμε.

2.3. Βακτηριακά στελέχη, ιικοί και πλασμιδιακοί φορείς

Χρησιμοποιήθηκε μια cDNA βιβλιοθήκη εμβρύου όρνιθας 5 ημερών της εταιρείας STRATAGENE με φορέα τον Uni-ZAP XR. Ως θέσεις κλωνοποίησης των ενθεμάτων είχαν χρησιμοποιηθεί οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων XhoI και EcoRI.

Για την εξαγωγή του pBluescript SK(+/-) από τον Uni-ZAP XR χρησιμοποιήθηκε ο βοηθητικός φάγος ExAssist με τη μέθοδο In Vivo Excision όπως αυτή περιγράφεται από τη STRATAGENE.

Για τη δημιουργία ανασυνδυασμένων κατασκευών χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pBluescript SK(+/-) της STRATAGENE, ο οποίος αναπτύχθηκε σε βακτηριακά στελέχη E.coli : DH5a , XL-1-blue MRF' και SOLR.

Οι γονότυποι και οι σχετικές αναφορές αυτών των στελεχών ευρίσκονται στους Sambrook et al, και στη STRATAGENE.

Για την υπερέκφραση του γονιδίου *cNsc11* χρησιμοποιήθηκε ο ρετροϊκός πλασμιδιακός φορέας RCAS(BP)/A στον οποίο κλωνοποιήθηκε το γονίδιο *cNsc11*, αφού πρώτα κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο δέκτη Slax12. Στην ομάδα αυτών των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν και τα πλασμίδια RCASBP(A)/AP , που εκφράζει αλκαλική φωσφατάση και RCASBP(A)/GFP που εκφράζει την πρωτεΐνη GFP, ως αρνητικά πειράματα ελέγχου.

Για την κατασκευή των χιμαιρικών πλασμιδιακών κατασκευών του *cNsc11* με την GAL4-DBD-(1-147), χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pBxGI (προσφορά από το Δρ. Χ. Δελιδάκη), ενώ ως πλασμίδια αναφοράς (λουσιφεράσης) και κανονικοποίησης τιμών χρησιμοποιήθηκαν τα UAS-tk-Luc και CMV-LacZ (από Δρ. Χ. Δελιδάκη), pG5B-Luc, pCMV-βgal (από Δρ. Δ. Καρδάση) , RSV-LacZ (από Δρ. Γ. Μαυροθαλασσίτη). Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο GAL4-Smad3 (143-248) (από Δρ. Δ. Καρδάση).

Για τη δημιουργία πλασμιδίου αναφοράς που περιέχει E-boxes ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο “AdML in pGL3-basic “ το οποίο περιέχει το minimal promoter του αδενοϊού (από Δρ. Δ. Καρδάση).

Οι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης για τα γονίδια ME1a (ME1a in pCMV-Sport 6) και *mNscII* (*mNscII* in pCMV-Sport 6.1) αγοράστηκαν από την εταιρεία RZPD.

Για τη δημιουργία της ελλειπτικής πλασμιδιακής κατασκευής του *mNscII* χωρίς τη b' περιοχή (*mNscIIΔ* in pcDNA3) χρησιμοποιήθηκαν οι φορείς pGEM T-easy και pcDNA3

2.4 Μοριακές μέθοδοι

2.4.1 Βακτηριακές καλλιέργειες

Για την καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών E.coli (DH5a, DH₁₀B, XL-1blue MRF' και SOLR) χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά υλικά LB (Luria-Bertani) και 2XYT σε υγρή και στερεά μορφή και σε σύσταση όπως περιγράφεται από τη STRATAGENE. Ανάλογα με τον πλασμιδιακό φορέα που χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό των βακτηρίων, έγινε και η προσθήκη των απαιτούμενων αντιβιοτικών, αμικιλίνη 100μg/ml ή/και τετρακυκλίνη 10μg/ml.

2.4.2 Μετασχηματισμός (transformation) βακτηριακών κυττάρων με τη χρήση χημικών ουσιών.

Ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων έγινε με τη μέθοδο LB-PEG. Η μέθοδος αυτή δίνει συχνότητα μετασχηματισμού κυττάρων μεγαλύτερη από 1×10^7 και περιλαμβάνει σε συντομία τα παρακάτω στάδια:

1. Μεταφέρουμε μια βακτηριακή αποικία E.coli από ένα φρέσκο 2XYT-άγαρ τρυβλίο σε υγρή καλλιέργεια μικρού όγκου (2-3 ml) και επωάζουμε 14-16 ώρες στους 37 °C.
2. Εμβολιάζουμε 250ml 2XYT με 2.5 ml από την παραπάνω καλλιέργεια και επωάζουμε, ώσπου η οπτική πυκνότητα των κυττάρων στα 600nm να φτάνει έως 0.7.
3. Τοποθετούμε στον πάγο για 10 λεπτά.
4. Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα στους 4 °C, στις 5000 rpm για 15 λεπτά και επαναδιαλύουμε σε 2.5 ml κρύο 2XYT.

5. Προσθέτουμε 12.5 ml διάλυμα LB-PEG (36%v/v γλυκερόλη, 12%w/v PEG 8000, 12mM MgSO₄ σε LB θρεπτικό) και αναδεύουμε καλά, αλλά όχι απότομα. (Όσα από τα κύτταρα δεν χρησιμοποιηθούν αμέσως μπορούν να μοιραστούν σε μικρές ποσότητες και να διατηρηθούν στους -80 °C).
6. Αναμιγνύουμε 100 μl βακτήρια με 1 μl DNA (περίπου 50ng) και αφήνουμε στον πάγο για 15 λεπτά.
7. Μεταφέρουμε τα βακτήρια στους 42 °C για 1 λεπτό και μετά ξανά στον πάγο για 5 λεπτά.
8. Προσθέτουμε 900 μl 2XYT και επωάζουμε στους 37 °C για 1 ώρα αναδεύοντας.
9. Απλώνουμε τα βακτήρια σε τρυβλία επιστρωμένα με 2XYT + αντιβιοτικό και επωάζουμε στους 37 °C για 15 περίπου ώρες.

2.4.3. Δημιουργία και μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με την εφαρμογή ηλεκτροσόκ (electrocompetent)

Καλλιέργεια 3ml εμβολιάζεται με αποικία κυττάρων E.coli στελέχους DH₁₀B και αφήνεται να αναπτυχθεί για ~16h στους 37 °C σε θρεπτικό μέσο LB (για 1lt, 5gr yeast extract, 10gr bactotryptone, 10gr NaCl, ρύθμιση του pH στο 7.0).

Την επόμενη ημέρα εμβολιάζονται 200ml θρεπτικού LB* (για 1lt: 5gr yeast extract, 10gr bactotryptone, 2gr NaCl, ρύθμιση του pH στο 7.0) με 2ml καλλιέργειας DH₁₀B κυττάρων και επωάζονται στους 37 °C εφόσον η οπτική πυκνότητα των κυττάρων να είναι 0,6. Ακολουθεί:

- Επώαση των κυττάρων στον πάγο για 15 min
- Φυγοκέντρηση στις 4000 rpm στους 4 °C για 15min
- Επαναδιάλυση πελέτας σε ίσο όγκο κρύο nanopure νερό
- Φυγοκέντρηση στις 4000 rpm στους 4 °C για 15min
- Επαναδιάλυση πελέτας σε 1/2 όγκο κρύο nanopure νερό
- Φυγοκέντρηση στις 4000rpm στους 4 °C για 15min
- Επαναδιάλυση πελέτας σε 1/4 όγκου κρύο nanopure νερό
- Φυγοκέντρηση στις 4000 rpm στους 4 °C για 15min
- Επαναδιάλυση πελέτας σε 1/10 όγκο κρύο nanopure νερό
- Φυγοκέντρηση στις 3500 rpm στους 4 °C για 15min
- Επαναδιάλυση σε ~1ml κρύο 10% v/v διάλυμα γλυκερόλης

- Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται αμέσως ή φυλάσσονται σε aliquots των 80μl στους -80 °C.
- Όλες οι παραπάνω διαδικασίες γίνονται, όσο το δυνατό, στον πάγο χρησιμοποιώντας πάντα κρύες πιπέττες, falcons, tips. Για το μετασχηματισμό των κυττάρων, προστίθενται 1-2μl της αντίδρασης ligation στα κύτταρα τα οποία στη συνέχεια τοποθετούνται σε ειδική κρύα κυψελίδα για να γίνει το electroporation (2000 V για 5msec).

Στα κύτταρα προστίθενται ~800μl θρεπτικό μέσο 2XYT και αφήνονται να επωαστούν για 1h στους 37 °C. Τα κύτταρα στη συνέχεια απλώνονται σε τρυβλίο με θρεπτικό LB ή 2XYT που φέρει το κατάλληλο αντιβιοτικό.

2.4.4 Απομόνωση πλασμιδιακών νουκλεϊκών οξέων

I. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα

Για την παρασκευή σε μικρή κλίμακα (mini prep) υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αλκαλικής λύσης (alkaline lysis). Η μέθοδος αυτή αποδίδει υψηλής καθαρότητας και σχετικά μεγάλες ποσότητες πλασμιδιακού DNA (10-15 μg) κατάλληλου για ανάλυση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Η διαδικασία περιγράφεται από τους Sambrook et al, 1989.

II. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αλκαλικής λύσης σε συνδυασμό με διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις διαβάθμισης χλωριούχου καισίου (CsCl gradient), παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (Sambrook et al, 1989). Το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε είναι το εξής:

1. Κατακρημνίζουμε τα βακτηριακά κύτταρα από μία ολονύκτια καλλιέργεια των 400 ml με φυγοκέντρηση στους 4 °C, στις 4000 rpm για 15 min σε έναν Sorvall GS3 ρότορα (ή ισοδύναμό του) και απομακρύνουμε όλο το υπερκείμενο υγρό.
2. Επαναδιαλύουμε τη βακτηριακή πελλέτα σε 10 ml διαλύματος #1 (GTE).
3. Προσθέτουμε 1 ml διαλύματος λυσοζύμης συγκέντρωσης 10 mg/ml σε 10 mM Tris·Cl [pH 8.0].
4. Προσθέτουμε 20 ml φρέσκου διαλύματος #2 και ανακατεύουμε καλά. Φυλάσσουμε το δοχείο φυγοκέντρωσης σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 min.

5. Προσθέτουμε 15 ml κρύου διαλύματος #3. Κλείνουμε το δοχείο φυγοκέντρησης και ανακινούμε καλά, αλλά όχι έντονα. Τοποθετούμε το δοχείο φυγοκέντρησης στον πάγο για 10 min. Το άσπρο ίζημα που δημιουργείται αποτελείται από χρωμοσωμικό DNA, υψηλού M.B RNA καθώς και σύμπλοκα καλίου/SDS/πρωτεΐνης/ μεμβράνες.
6. Φυγοκεντρούμε στους 4 °C, στις 4000 rpm για 15 min σε έναν Sorvall GS3 ρότορα (χωρίς την εφαρμογή φρένου). Δημιουργείται συμπαγές άσπρο ίζημα που περιέχει τα υπολείμματα των βακτηρίων.
7. Μεταφέρουμε την υπερκείμενη υγρή φάση σε δοχείο φυγοκέντρησης των 250 ml με ένα χωνί που περιέχει υαλοβάμβακα φιλτράροντας το παράλληλα. Προσθέτουμε 60% του όγκου ισοπροπανόλη, ανακινούμε καλά και αφήνουμε το μπουκάλι σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.
8. Φυγοκεντρούμε στις 5000 rpm για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να κατακρημνιστεί το πλασμιδιακό DNA. Ξεπλένουμε με μερικά ml 70% αιθανόλης και αφήνουμε το DNA να στεγνώσει.
9. Επαναδιαλύουμε το κατακρημνισμένο DNA σε 3 ml αποστειρωμένο H₂O και προχωρούμε στον καθαρισμό ο οποίος αποτελείται από τα παρακάτω βήματα:
 - a. Υπολογίζουμε με ακρίβεια τον όγκο του διαλύματος του DNA και τα μεταφέρουμε σε νέο πλαστικό σωληνάριο.
 - b. Για κάθε ml διαλύματος προσθέτουμε 1.1 gr στερεού CsCl και ανακατεύουμε καλά ώσπου να διαλυθεί το CsCl.
 - c. Προσθέτουμε 60-100 μl EtBr (συγκέντρωσης 10mg/ml σε H₂O).
 - d. Μεταφέρουμε το διάλυμα ανακατεύοντας σε ειδικά σωληνάρια υπερφυγοκέντρησης (quick seal centrifuge tubes) και συμπληρώνουμε προσεκτικά με διάλυμα CsCl περιεκτικότητας 1 gr/ml H₂O.
 - e. Κλείνουμε το σωληνάριο και τοποθετούμε ισοζυγισμένα τα δείγματα στην υπερφυγόκεντρο στις 55000 rpm μέχρι την επόμενη ημέρα.
 - f. Την επόμενη ημέρα έχουν δημιουργηθεί δύο ζώνες DNA στο κέντρο περίπου του σωληναρίου υπερφυγοκέντρησης. Η κάτω ζώνη περιέχει το πλασμιδιακό DNA που μας ενδιαφέρει. Η πάνω ζώνη, αν υπάρχει, είναι λεπτή και αποτελείται από γραμμικό DNA καθώς και από κομμένο κυκλικό πλασμιδιακό DNA (nicked DNA). Παίρνουμε το πλασμιδιακό DNA προσεκτικά με μία σύριγγα και το μεταφέρουμε σε ένα καθαρό πλαστικό σωληνάριο. Κάνουμε διαδοχικές εκχυλίσεις με κορεσμένο διάλυμα CsCl/ισοπροπανόλης/ H₂O ώσπου να μη διακρίνεται διαφορά στο χρώμα ανάμεσα στις δύο φάσεις. Η διαφορά χρώματος δείχνει την παρουσία EtBr.

- g. Μεταφέρουμε, μετρώντας τον όγκο, το διάλυμα του DNA σε γυάλινο σωληνάριο COREX και προσθέτουμε δύο όγκους H₂O. Έπειτα προσθέτουμε διπλάσιο από το συνολικό όγκο, αιθανόλη 100%.
- h. Φυγοκεντρούμε στις 12000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου (18 °C) για να κατακρημνιστεί το DNA, το μεταφέρουμε σε σωληνάριο eppendorf και το διαλύουμε σε 500-1000 μl απιονισμένο, αποστειρωμένο νερό.
- i. Τέλος, μετράμε την απορρόφηση του δείγματος μας στα 260 nm και 280 nm για να βρούμε τη συγκέντρωση του και να επιβεβαιώσουμε την καθαρότητα του.

2.4.5 Απομόνωση DNA βακτηριοφάγων

I. Απομόνωση DNA βακτηριοφάγων σε μικρή κλίμακα από στερεή καλλιέργεια.

Ακολουθήθηκε η μέθοδος της απομόνωσης μετά από ανάπτυξη των βακτηριοφάγων σε χλόη βακτηρίων έως την πλήρη λύση τους (plate lysate). Η μέθοδος περιγράφεται διεξοδικά στους Sambrook et al, 1989, και χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων. Η απόδοση είναι 15-40μg DNA, ποσότητα που επαρκεί για προκαταρκτική ανάλυση.

II. Απομόνωση DNA βακτηριοφάγων σε μεγάλη κλίμακα

Χρησιμοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες των κυττάρων-ξενιστών και για τον καθαρισμό των βακτηριοφάγων ακολουθήθηκε η μέθοδος της υπερφυγοκέντρωσης σε διαβάθμιση χλωριούχου καισίου (CsCl gradient) όπως περιγράφεται στους Sambrook et al, 1989.

2.4.6. Απομόνωση γενωμικού DNA από ιστούς

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από ιστούς (έμβρυα όρνιθας και ποντικού και ουρές ποντικού) ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

1. Κατάλληλη ποσότητα ιστού ομογενοποιείται σε 400μl tail digestion buffer.

Tail digestion buffer :

- 100 mM NaCl
- 10 mM Tris HCl, pH:8.0
- 25 mM EDTA, pH: 8.0
- 0.5% SDS

2. Αφήνουμε για 30 min στους 37 °C.

3. Προσθέτουμε 15 μl πρωτεΐνάση K (10 μg/μl) και αφήνουμε στους 55 °C για μερικές ώρες ή O/N.
4. Προσθέτουμε RNAse (10 μg/μl) και αφήνουμε στους 37 °C για 10 λεπτά.
5. Προσθέτουμε 400μl PhOH και ανακινούμε ήπια για 10 λεπτά.
6. Προσθέτουμε 300 μl χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (49:1), και ανακινούμε ήπια ξανά για 10 λεπτά.
7. Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 12000 rpm, και απομακρύνουμε την κάτω φάση.
8. Κάνουμε ξανά εκχύλιση με 300 μl χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (49:1), και ανακινούμε ήπια για 10 λεπτά.
8. Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στις 12000 rpm, και απομονώνουμε την πάνω (υδατική) φάση.
9. Προσθέτουμε 200 μl οξικό αμμώνιο 10 M και 800 μl EtOH.
10. Ανακινούμε και φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 12000 rpm.
11. Ξεπλένουμε το ίζημα του γενωμικού DNA με 70% EtOH και επαναδιαλύουμε σε 100 μl T.E.

2.4.7. Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Η απομόνωση του DNA έγινε με τη μέθοδο της ηλεκτροέκλυσης σε μεμβράνες διαπίδυσης και ο καθαρισμός με κολώνα Sephadex G50, φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη και άλας οξικού νατρίου.

Μετά την ηλεκτροφόρηση του DNA σε παρασκευαστικό gel αγαρόζης 0,8% - 1% απομονώνεται η επιθυμητή ζώνη και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (TAE). Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση και στη συνέχεια αλλαγή της πολικότητας του ηλεκτρικού πεδίου για 30 sec ώστε να απομακρυνθεί από τη μεμβράνη το DNA που πιθανόν έχει κολλήσει.

Το υγρό μεταφέρεται από τη μεμβράνη και υπόκειται σε εκχυλίσεις με 2-βουτανόλη ώστε να μειωθεί ο όγκος του διαλύματος του DNA.

Για τον καθαρισμό του DNA δημιουργείται στήλη από Sephadex G50 σε σύριγγα του 1ml. Το διάλυμα περνά από τη στήλη με φυγοκέντρηση στις 2500rpm για 5min. Ακολουθεί προσθήκη ίσου όγκου μίγματος φαινόλης-χλωροφόρμιου, ανάδευση και φυγοκέντρηση για 5min στις 13000rpm. Στο υπερκείμενο προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου και μετά από ανάδευση και φυγοκέντρηση το νέο υπερκείμενο κατακρημνίζεται προσθέτοντας 1/10 του όγκου οξικό νάτριο 3M, pH 5.2 και διπλάσιο

όγκο 100% αιθανόλης. Ακολουθεί ψύξη για 10min στους -20 °C και φυγοκέντρωση για 15min στις 13000 rpm στους 4 °C. Το κατακρημνισμένο DNA αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλύεται στον επιθυμητό όγκο νερού.

2.4.8. Απομόνωση ολικού RNA από ιστούς (έμβρυα όρνιθας και ποντικού)

Χρησιμοποιήθηκαν πάντα φρέσκα και αποστειρωμένα διαλύματα, με ιδιαίτερη προσοχή σε όλους τους χειρισμούς.

Συνοπτικά η διαδικασία που ακολουθείται είναι :

1. Πλένουμε τον ιστό, τον ζυγίζουμε και τον αποθηκεύουμε στους -80 °C.
2. Προσθέτουμε buffer H (τα 200 μg ιστού επαναδιαλύονται σε 800 μl buffer H) και τον ομογενοποιούμε. Αφήνουμε O/N στους 4 °C.
3. Φυγοκεντρούμε 10,000 rpm για 30'.
4. Ξεπλένουμε δύο φορές το ίζημα με ίσο όγκο περίπου buffer W και ενδιάμεσως φυγοκεντρούμε, όπως και προηγουμένως.
5. Αφήνουμε το ίζημα του RNA να επαναδιαλύεται σε buffer S, σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 ώρες, υπό ανακίνηση.
6. Φυγοκεντρούμε 10,000 rpm για 30'.
7. Καθαρίζουμε το υπερκείμενο με όξινη φαινόλη: 2x όξινη φαινόλη: χλωροφόρμιο και 1x χλωροφόρμιο.
8. Κατακρημνίζουμε το RNA με 2V αιθανόλη και 3M οξικό νάτριο pH 5.3.
9. Τρέχουμε λίγο σε ένα gel αγαρόζης και ελέγχουμε την ποιότητά του.

<u>Buffer H</u>	10 ml:
3M LiCl	3 ml από 10M LiCl
6M Urea	3.6 gr Urea
0.1% SDS	50 μl από 20% SDS
10mM NaOAc pH 5.2	33 μl από 3M NaOAc
200 μg/ml Heparin (προαιρετικά)	

<u>Buffer W</u>	15 ml:
4M LiCl	6 ml από 10M LiCl
8 M Urea	7.2 gr Urea

<u>Buffer S</u>	10 ml:
1% SDS	500 μ l από 20% SDS
50mM NaOAc pH 5.2	167 μ l από 3M NaOAc

2.4.9. Απομόνωση poly(A⁺) RNA

Oligo-dT κολώνα

1. Εάν είναι σε υδατικό διάλυμα (και όχι υπό τη μορφή ξηρής σκόνης), την καθαρίζουμε αρχικά, με πολλούς όγκους 0.1N NaOH.
2. Ξεπλένουμε με nanopure H₂O.
3. Ξεπλένουμε με loading buffer, μέχρις ότου το pH της να γίνει <8.0.

2.4.10. Επιλογή των poly(A⁺) RNAs

1. Κατακρημνίζουμε το RNA (περίπου 500 μ g) με 2V αιθανόλη και 3M οξικό νάτριο pH 5.3.
2. Επαναδιαλύουμε σε 100-200 μ l nanopure H₂O και αφήνουμε 10' στους 70 °C για αποδιάταξη.
3. Προθέτουμε ίσο όγκο 2x loading buffer.
4. Φορτώνουμε στην κολώνα και μαζεύουμε τα κλάσματα (flow-through). Φορτώνουμε και ίσο όγκο με τον όγκο του δείγματος, 1x loading buffer και συγκεντρώνουμε όλο το παραπάνω flow-through.
5. Το ζεσταίνουμε ξανά για 5' στους 70 °C.
6. Φορτώνουμε πάλι στην κολώνα και μαζεύουμε τα κλάσματα (flow-through).
7. Ξεπλένουμε την κολώνα με 6-8 ml loading buffer (μαζεύουμε κλάσματα του 1 ml).
9. Εκλούουμε με ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (elution buffer) και μαζεύουμε 5-6 κλάσματα των 500 μ l.
10. Προσθέτουμε σε όλα τα κλάσματα (flow-through, wash και elution) αλάτι και αιθανόλη και αφήνουμε O/N στους -80 °C.
11. Φυγοκεντρούμε στις 10,000 rpm, 30'.
12. Επαναδιαλύουμε τα κλάσματα σε 20 μ l nanopure H₂O και ελέγχουμε σε gel αγαρόζης 2-5 μ l από το καθένα.

<u>Loading buffer</u>	250 ml:
10mM Tris-Cl pH 7.5	1.25 ml από 1M Tris-Cl
0.5 M NaCl	25 ml από 5M NaCl
1mM EDTA	500 μ l από 0.5M EDTA
0.1% SDS	1.2 ml από 20% SDS

<u>Elution buffer</u>	<u>100 ml:</u>
10mM Tris-Cl pH 7.5	1 ml από 1M
1mM EDTA	200 μ l από 0.5M
0.05% SDS	250 μ l από 20%

2.4.11. Δημιουργία cDNA με αντίστροφη μεταγραφή πολυ(A)⁺ RNA

Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Sambrook et al, 1989.

2.4.12. Πέψη μορίων DNA με ένζυμα περιορισμού

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από τις εταιρείες Promega, Minotech και New England Biolabs και οι πέψεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρείας και με βάση τα πρωτόκολλα που περιγράφονται από τους Sambrook et al, 1989.

2.4.13. Υβριδοποίηση (Annealing) ολιγονουκλεοτιδίων

Ισομοριακή ποσότητα των δυο συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων με τελική συγκέντρωση 20ng/ μ l, 10x T4 DNA Ligase buffer (Promega) και νερό σε τελικό όγκο 50 μ l, τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 95 °C και αφήθηκε να κρυώσει σταδιακά. Με αυτό τον τρόπο τα δυο ολιγονουκλεοτίδια ενώνονται λόγω συμπληρωματικότητας.

2.4.15. Ραδιοσήμανση μορίων DNA

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Σήμανσης τμημάτων DNA με την βοήθεια τυχαίων εκκινητών (random priming labelling): Η μέθοδος αυτή δίνει ραδιοσημασμένα τμήματα DNA υψηλής ειδικής ενεργότητας (1x10⁹ cpm/ μ gr). Η αρχή της μεθόδου είναι η εξής: γραμμικά δίκλινα τμήματα DNA αποδιατάσσονται παροδικά με βράσιμο στους 100 °C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια μία σειρά από

εξαμερείς εκκινητές αφήνονται να αναδιαταχθούν με τυχαία τμήματα του αποδιαταγμένου DNA, παρουσία της πολυμεριστικής ιδιότητας του ενζυμικού κλάσματος Klenow, των dATP, dCTP, dGTP, dTTP και των α[³²P]-dATP και α[³²P]-dCTP ραδιενεργών νουκλεοτιδίων με αποτέλεσμα τη δημιουργία ραδιοσημασμένων γραμμικών τμημάτων DNA διαφόρου μήκους. Χρησιμοποιήθηκε σε υβριδοποιήσεις για αναλύσεις γενωμικού DNA κατά Southern και στην επιλογή κλώνων από την cDNA βιβλιοθήκη. Η τεχνική αναπτύχθηκε από τους Feinberg and Vogelstein (1983), και το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται από τους Sambrook et al, 1989.

2.4.16. Μέθοδοι υποκλωνοποίησης μορίων DNA

I. Τροποποίηση των άκρων τμημάτων DNA:

Δημιουργία τυφλών άκρων (blunt ends). Χρησιμοποιήθηκε το ενζυμικό κλάσμα Klenow της DNA πολυμεράσης, το οποίο έχει την ιδιότητα είτε να προσθέτει νουκλεοτίδια σε 3' υπολειπόμενα άκρα χάρη στην πολυμεριστική του ιδιότητα 5' → 3', είτε να υδρολύει 3' προεξέχοντα άκρα χάρη στην εξωνουκλεοτιδική του δράση 3' → 5', (Sambrook et al, 1989).

II. Σύνδεσεις μορίων DNA (ligation). Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω μέθοδοι ανάλογα με το είδος των άκρων (προεξέχοντα ή τυφλά) και το είδος των μορίων που επρόκειτο να συνδεθούν :

α) Επανασύνδεση πλασμιδίου με συμβατά άκρα (sticky ends). Η συγκέντρωση του DNA δεν ξεπερνούσε τα 30-50μg/ml, ενώ η ποσότητα της T4 DNA λιγάσης (Promega) ήταν 1u Weiss για κάθε αντίδραση, σε συνθήκες 4 °C και χρόνο επώασης 14-16 ώρες.

β) Επανασύνδεση πλασμιδίου με τυφλά άκρα (blunt ends). Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ανάλογο με την προηγούμενη ποσό DNA, ενώ η ποσότητα της λιγάσης αυξήθηκε σε 2 Weiss units για κάθε αντίδραση, και οι συνθήκες ήταν επώαση για 12-16 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (20 °C).

γ) Δημιουργία ανασυνδυσμένων πλασμιδίων με συμβατά άκρα. Σε αυτές τις περιπτώσεις η αναλογία μορίων φορέα (vector) : αναλογία μορίων ενθέματος (insert) ήταν από 1:1 έως 1:5. Η συνολική ποσότητα του DNA δεν ξεπερνούσε τα 150-200 ng και η συγκέντρωση της λιγάσης 1u Weiss για κάθε αντίδραση.

δ) Δημιουργία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με τυφλά άκρα. Σε αυτές τις περιπτώσεις η αναλογία μορίων φορέα : αναλογία μορίων ενθέματος ήταν από 1:3 έως 1: 8, ενώ το ποσό της λιγάσης αυξανόταν 2 έως 3 φορές.

ε) Δημιουργία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με κατευθυνόμενη κλωνοποίηση ενθέματος. Η μοριακή αναλογία τροποποιείται σε 1:1 και η ποσότητα της λιγάσης όπως στη περίπτωση (γ).

2.4.17. Προσδιορισμός της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μορίων DNA (DNA sequencing analysis)

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του τερματισμού της επιμήκυνσης της ραδιοσημασμένης αλυσίδας του DNA σε διάφορα μήκη, με την ενσωμάτωση τριφωσφορικών δι-δεοξυνουκλεοτιδίων (dideoxy nucleotide chain termination method) των Sanger et al, 1977. Η σήμανση των μορίων έγινε με α[³⁵S]-dATP και χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Sequenase (USB) που είναι τροποποιημένη T7 DNA πολυμεράση σύμφωνα με τις οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρείας (USB: Sequenase TM kit, Version 2.0). Όλες οι αντιδράσεις αναλύθηκαν σε 5-6% αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης.

2.4.18. Μεταφορά κατά Southern γενωμικού ή κλωνοποιημένου DNA (Southern analysis)

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην μεταφορά του υδρολυμένου με περιοριστικά ένζυμα DNA από πήκτωμα αγαρόζης σε νάυλον μεμβράνη τοποθετημένη στην επιφάνεια του πηκτώματος. Η ανάλυση αυτή έγινε όπως περιγράφεται από τους Sambrook et al, 1989.

2.4.19. Υβριδοποίηση νουκλεϊκών οξέων (hybridization)

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

Συνοπτικά στη μέθοδο Denhardt χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα υβριδοποίησης το ακόλουθο:

6x SSC

5x Denhardt

0.5% SDS

100 µg/ ml αποδιαταγμένο DNA από σπέρμα σολωμού
Διαλύματα έκπλυσης της μη-ειδικής πρόσδεσης στην μεμβράνη:

2x SSC, 0.1% SDS

1x SSC, 0.1% SDS

0.1x SSC, 0.1% SDS

Όλες οι εκπλύσεις γίνονται στην θερμοκρασία υβριδοποίησης.

2.4.20. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Η μέθοδος αυτή δίνει τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού τμημάτων DNA in vitro μέσω διαδοχικών βημάτων επώασης σε διάφορες θερμοκρασίες με τη χρήση του θερμοανθεκτικού ενζύμου της Taq DNA πολυμεράσης. Οι συνθήκες για τις PCR αντιδράσεις εξαρτώνται από το αναμενόμενο προϊόν και τους εκκινητές που χρησιμοποιούμε και σχεδιάζονται πάντα σύμφωνα με τις οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρείας της Taq DNA πολυμεράσης.

2.5. Μέθοδος ανοσοαποτύπωσης (Western blot analysis)

2.5.1. Προετοιμασία δειγμάτων από τα κύτταρα

1. Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από την κυτταρική καλλιέργεια.
2. Ξέπλυμα των κυττάρων με 1xPBS δύο φορές.
3. Προσθέτουμε το διάλυμα λύσης των κυττάρων 1xRLB (150 -300 µl/ πηγαδάκι σε 6-well plate) στα πηγαδάκια και τα μεταφέρουμε στους -80 °C για 10 min και έπειτα στους 37 °C για 2 min για να βοηθήσουμε τα κύτταρα να σπάσουν.
4. Στη συνέχεια ξεπλένουμε πολύ καλά τον πυθμένα όπου βρίσκονται προσκολλημένα τα κύτταρα με το διάλυμα RLB, που ήδη υπάρχει μέσα, ώσπου η επιφάνεια του πυθμένα να γίνει λεία.
5. Μεταφορά των κυττάρων σε eppendorf 1,5 ml.
6. Φυγοκέντρωση στις 13000 rpm, στους 4 °C για 30 min.
7. Μεταφορά υπερκείμενου (lysate) σε ένα καθαρό eppendorf.
8. Προσθήκη ίσου όγκου 2X sample loading buffer και 100 mM DTT σε 10 µl του δείγματος.
9. Βράσιμο δειγμάτων για 5min.
10. Μεταφορά στον πάγο μέχρι να ξεκινήσουμε το φόρτωμα του gel.

2.5.2. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων (running)

1. Προετοιμασία των gel πολυακρυλαμίδης και τοποθετησή τους στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (Biorad).
2. Προσθήκη 1L από το 1X running buffer (γεμίζουμε όλο τον ενδιάμεσο των gel χώρο και τον μισό από τον χώρο που βρίσκεται γύρω από τα gel).
3. Φορτώνουμε τα δείγματα στα πηγάδια (wells).
4. Ρυθμίζουμε την συσκευή ηλεκτροφόρησης στα 80V για όσο χρόνο τα δείγματα βρίσκονται στο stacking gel (πηκτή επιστοιβάσης) για περίπου 30min και στην συνέχεια την ρυθμίζουμε στα 100V μέχρι να φύγει η χρωστική από το gel (σχεδόν 2 hours). Αν θέλουμε να τρέξουμε το gel O/N ρυθμίζουμε την συσκευή στα 30V.

2.5.3. Μεταφορά των πρωτεϊνών από το gel σε νάυλον μεμβράνη (transfer)

1. Φτιάχνουμε 1X transfer buffer, περίπου μια ώρα πριν τη χρήση, και το τοποθετούμε στους 4 °C.
2. Κόβουμε στις διαστάσεις του gel 1 κομμάτι νάυλον μεμβράνης και 6 κομμάτια χαρτί whattman.
3. Αδειάζουμε το running buffer από την συσκευή και απομακρύνουμε το gel.
4. Κόβουμε το τμήμα που αντιστοιχεί στο stacking gel και κρατάμε το τμήμα που αντιστοιχεί στο separating gel (πηκτή διαχωρισμού).
5. Εμποτίζουμε σε 1X transfer buffer τα χαρτιά whattman, τη νάυλον μεμβράνη καθώς και τα ειδικά σφουγγαράκια
6. Τοποθετούμε πρώτα το σφουγγάρι (στη μαύρη πλευρά της θήκης του sandwich), ενώ ακολουθούν με τη σειρά 3 whattman χαρτιά, το gel, η μεμβράνη, 3 χαρτιά wattman , και το σφουγγαράκι δημιουργώντας έτσι ένα sandwich
7. Χρησιμοποιούμε μια γυάλινη πιπέτα pasteur για να απομακρύνουμε τον αέρα που έχει εγκλωβιστεί
8. Κλείνουμε το sandwich και το τοποθετούμε στην συσκευή, έχοντας τη μαύρη πλευρά της θήκης του sandwich στη μαύρη πλευρά της συσκευής
9. Γεμίζουμε τη συσκευή με κρύο transfer buffer και τοποθετούμε πάγο γύρω από αυτή.
10. Ρυθμίζουμε τη συσκευή της ηλεκτροφόρησης στα 310 mA για 1 hr ώστε να μεταφερθούν οι πρωτεΐνες από το gel στη μεμβράνη ή αν θέλουμε να κάνουμε την ηλεκτροφόρηση O/N την ρυθμίζουμε στα 30V. Η ηλεκτροφόρηση O/N γίνεται στους 4 °C.

2.5.4. Ανοσοαποτύπωση (Immunoblotting)

1. Απομακρύνουμε τη μεμβράνη από το sandwich και την επωάζουμε σε PBSMT (5% γάλα σε 0,1% PBST) για 1hr με ανακίνηση.

500 ml 0,1% PBST (φυλάσσεται στους 4 °C): 500ml 1xPBS και 500μl Tween 100%

2. Βάζουμε το πρώτο αντίσωμα, διαλυμένο σε PBSMT (PBST με 5% γάλα) στην μεμβράνη και την αφήνουμε O/N στους 4 °C. Εναλλακτικά την αφήνουμε για 2hr σε θερμοκρασία δωματίου (RT).

3. Απομακρύνουμε το αντίσωμα, το οποίο μπορούμε να φυλάξουμε στους -20 °C και να το ξαναχρησιμοποιήσουμε για 2-3 φορές.

4. Πλύσιμο 3x με 1% PBS-T για 15min.

5. Προετοιμάζουμε το δεύτερο αντίσωμα (συνδεδεμένο με υπεροξειδάση) στην κατάλληλη συγκέντρωση, πάλι σε PBSMT, το οποίο και επωάζουμε για 1hr υπό ανακίνηση.

6. Ξεπλένουμε με PBST για 3x15min.

7. Στεγνώνουμε την μεμβράνη ακουμπώντας την σε ένα κομμάτι χαρτί wattman.

8. Τοποθετούμε πάνω στην μεμβράνη υπόστρωμα της υπεροξειδάσης για την αντίδραση χημειοφωταύγειας (ECL της εταιρείας Chemicon) για 1', στεγνώνουμε τη μεμβράνη ξανά και στη συνέχεια εκθέτουμε την μεμβράνη σε φωτογραφικό φιλμ και εμφανίζουμε.

10x RUNNING-TRANSFER BUFFER (1 Lt) :

900 ml 10x Tris-Glycine

100 ml SDS 10%

(για το 1x TRANSFER BUFFER χρησιμοποιούμε 100ml 10x RUNNING-TRANSFER BUFFER, 20% μεθανόλη και νερό μέχρι το 1lt).

10x Tris-Glycine (1 Lt, pH 8.3): 30.2 gr Tris-base, 188 gr glycine

2x Sample Buffer:

100mM Tris-Cl pH 6.8

4% SDS

0.2% bromophenol blue

20% glycerol

Πηκτή πολυακρυλαμιδίου 7.5% :

α) Πηκτή διαχωρισμού (separating gel)

2.5 ml dH₂O

1.25 ml 30% acrylamide

1.25 separating gel buffer (1.5 M Tris-Cl pH 8.8 + 0.4% SDS)

50 μl 10% APS

2.5 μl TEMED

β) Πηκτή επιστοίβασης (stacking gel)

1.8 ml dH₂O

450 μl 30% acrylamide

750 μl stacking gel buffer (1 M Tris-Cl pH 6.8 + 0.4% SDS)

30 μl 10% APS

3 μl TEMED

2.6. In Situ Υβριδοποίηση

Η τεχνική της *in situ* υβριδοποίησης χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων *cNsc11*, *mNsc11*, *Tag1*, *Hoxb1* σε επίπεδο mRNA, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο την αποτύπωση και παρατήρηση του προτύπου έκφρασής τους. Εφαρμόσθηκε σε ολόκληρα έμβρυα (whole mount) όρνιθας και ποντικού, σε εγκάρσιες και διαμήκεις τομές εμβρύων όρνιθας και ποντικού καθώς και σε ποντικούς ολίγων ημερών μετά τη γέννησή τους. Ο τρόπος παρασκευής του ανιχνευτή καθώς και οι λεπτομέρειες στον τρόπο εφαρμογής της τεχνικής παρουσιάζονται αναλυτικά στο σχετικό εγχειρίδιο της Boehringer Mannheim (Non radioactive In situ Hybridization Application manual, second edition).

2.6.1. Παρασκευή του γραμμικού DNA προτύπου

Υδρολύουμε για 3-4 ώρες με κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο στην 5' περιοχή της κωδικοποιού αλληλουχίας του γονιδίου ή μέρους του γονιδίου που θα χρησιμοποιηθεί σαν μήτρα για την *in vitro* μεταγραφή. Αυτό θα έχει σαν αποτέλεσμα η DNA κατευθυνόμενη RNA πολυμεράση να συνθέσει μόρια συμπληρωματικά των μεταγράφων του γονιδίου.

Κατόπιν προσθέτουμε 50 µg/ml πρωτεΐνάσης K για 30 λεπτά στους 37 °C.
Κάνουμε εκχυλίσεις με φαινόλη/χλωροφόρμιο και καταβύθιση με NaAcet-EtOH.
Ποσοτικοποίηση με τρέξιμο μικρής ποσότητας σε πήκτωμα αγαρόζης.

2.6.2. Παρασκευή του ανιχνευτή (probe) με "εκτός οργανισμού μεταγραφή" (In vitro transcription)

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι πρόσφατα παρασκευασμένα και απαλλαγμένα από ριβονουκλεάσες (RNases)

1) Σε eppendorf tubes (1.5 ml) τα οποία έχουν επικαλυφθεί με σιλικόνη προσθέτουμε με την ακόλουθη σειρά:

nuclease free H ₂ O	7µl
5x transcription buffer	4 µl
0.1 M DTT	2µl
10 mM rGTP	1µl
10 mM rCTP	1µl
10 mM rATP	1µl
10 mM rUTP	0.65µl
10 mM 11-DIGrUTP	0.35µl
RNAasin	1µl
RNA polymerase	1µl
1 µg/µl linear template DNA	1µl

2) Επώαση για τουλάχιστον 2 ώρες στους 37 °C

3) Τρέχουμε ποσότητα 1 µl σε πήκτωμα αγαρόζης για έλεγχο/ποσοτικοποίηση του (επιθυμητή DNA/RNA αναλογία: 1/10).

4) Προσθέτουμε 2 µl DNAse απαλλαγμένης από RNAse (15 λεπτά, 37 °C).

5) Τρέχουμε 1 µl σε πήκτωμα αγαρόζης για να ελέγξουμε ότι δεν υπάρχει DNA.

6) Προσθέτουμε :

90 µl EDTA
12µl LiCl 4 M
360 µl EtOH

τοποθετούμε για τουλάχιστον 30 λεπτά στους -20 °C.

7) Φυγοκεντρούμε στις 12000 rpm, 15 λεπτά στους 4 °C.

8) Πλύσιμο με 70% αιθανόλη.

9) Φυγοκεντρούμε στις 12000 rpm, 5 λεπτά στους 4 °C.

10) Στεγνώνουμε και επαναδιαλύουμε το RNA σε 100 μl T.E.

Διατηρούμε το RNA στους -20 °C ή -80 °C μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

2.6.3. Διαδικασία *in situ* υβριδοποίησης σε τομές κρυοτόμου

Η μέθοδος της *in situ* υβριδοποίησης εφαρμόζεται σε τομές κρυοτόμου ως εξής:

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές φυλάσσονται στους -20 °C μέχρι τη χρήση τους. Εφόσον είναι να χρησιμοποιηθούν τις ξεπαγώνουμε και τις αφήνουμε να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 20-30 λεπτά. Στη συνέχεια οι τομές μονιμοποιούνται σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεΰδης σε PBS, για 10 λεπτά. Ακολούθως, οι τομές πλένονται με PBS (3x5 λεπτά), επωάζονται με διάλυμα ακετυλίωσης: 4 ml τριαιθανολαμίνη, 0.525 ml HCl (37%) και 0.75 ml οξικός ανυδρίτης σε 295 ml H₂O, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί εμφάπτισή τους σε διάλυμα PBT για 30 λεπτά και μετά από τρία δεκάλεπτα πλυσίματα με PBS, επώαση των τομών για 6 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου, με το διάλυμα προϋβριδοποίησης, το οποίο περιέχει: 50% φορμαμίδιο, 5xSSC, 5xDenharts, 250mg/ml yeast RNA, 500mg/ml herring sperm DNA. Ακολούθως, προσθέτουμε το διάλυμα υβριδοποίησης, που είναι διάλυμα προϋβριδοποίησης το οποίο περιέχει 200-400 ng/ml από τον σημασμένο με διγοξυγενίνη ανιχνευτή (DIG-RNA probe). Η υβριδοποίηση γίνεται στους 72 °C, για 14 με 16 ώρες. Αξίζει να σημειωθεί, πως για να αποφευχθεί η εξάτμιση του διαλύματος υβριδοποίησης, οι τομές πρέπει να καλύπτονται με μεμβράνη parafilm.

Την επόμενη ημέρα, οι τομές εμφαπτίζονται σε διάλυμα 5xSSC για 5 λεπτά, στους 72 °C, οπότε και απομακρύνονται οι μεμβράνες parafilm, και στην συνέχεια, μεταφέρονται σε διάλυμα 0.2xSSC, στους 72 °C και για 1 ώρα. Μετά από δύο πεντάλεπτα πλυσίματα με διάλυμα που περιέχει 0.1M Tris pH7.5, 0.15 M NaCl (διάλυμα B1), ακολουθεί επώαση των τομών για δύο ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου, με διάλυμα 10% FCS σε B1, για να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης του αντισώματος. Στην συνέχεια, οι τομές επωάζονται με πρωτογενές αντίσωμα έναντι της διγοξυγενίνης το οποίο είναι συνδεδεμένο με αλκαλική φωσφατάση (anti-DIG-AP, Fab fragments, Roche), αραιωμένο 1/5000 σε διάλυμα 1%FCS, για 14 με 16 ώρες στους 4 °C.

Την επόμενη ημέρα, οι τομές πλένονται με διάλυμα B1 (3x5 λεπτά), και στη συνέχεια, με διάλυμα το οποίο περιέχει: 0.1M Tris pH 9.5, 0.1M NaCl, 50mM MgCl₂ (διάλυμα B2) (3x10 λεπτά), έτσι ώστε να εξισορροπηθεί το pH των τομών. Ακολουθεί επώαση με το χρωμογόνο διάλυμα: 75mg/ml NBT (Nitroblue tetrazolium chloride, Roche) και 50mg/ml BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine salt, Roche) σε διάλυμα B2. Η αντίδραση πραγματοποιείται στο σκοτάδι, μέχρι να μας δώσει ικανοποιητική χρώση.

Τέλος, οι τομές πλένονται με διάλυμα PBT πολλές φορές, και ακολουθεί σταδιακή αφυδάτωση, με διαδοχικές εμβαπτίσεις σε: 70%, 80%, 95%, 100% αιθανόλη, και ακολούθως 3 φορές σε 100% ξυλόλη. Εφόσον, οι τομές καλυφθούν με Entellan και τοποθετηθούν καλυπτρίδες, είναι έτοιμες για παρατήρηση.

2.6.4. Διαδικασία *in situ* υβριδοποίησης σε τομές μικροτόμου δόνησης ή σε ολόκληρα ιστοτεμάχια και έμβρυα

I. Μονιμοποίηση ιστού

Ο ιστός μονιμοποιείται σε 4% PFA και διατηρείται στους 4 °C (2-3 μήνες)

Για περαιτέρω φύλαξη αφυδατώνεται ως εξής:

2x5 λεπτά σε PBT (PBT: PBS +0,1% Tween-20)

5 λεπτά 25% Μεθανόλη/75% PBT (2 φορές κατά προτίμηση)

5 λεπτά 50% Μεθανόλη/50% PBT (2 φορές κατά προτίμηση)

5 λεπτά 75% Μεθανόλη/25% PBT (2 φορές κατά προτίμηση)

5 λεπτά σε Μεθανόλη (3-4 φορές)

φύλαξη στους -20 °C για αρκετούς μήνες.

II. Προετοιμασία ιστού για *in situ* υβριδοποίηση

1) Για να επαναχρησιμοποιηθεί ο ιστός ακολουθείται ενυδάτωση κατά την αντίστροφη πορεία, ως εξής:

5 λεπτά 75% Μεθανόλη/25% PBT (2 φορές κατά προτίμηση)

5 λεπτά 50% Μεθανόλη/50% PBT (2 φορές κατά προτίμηση)

5 λεπτά 25% Μεθανόλη/75% PBT (2 φορές κατά προτίμηση)

5 λεπτά σε PBT (3-4 φορές)

2) Προσθέτουμε H₂O₂ 2% για μία ώρα.

3) Ξεπλένουμε με PBT, 3x5 λεπτά.

4) Προσθήκη πρωτεΐνάσης K (5 µg/ml) για 10 λεπτά. Η πρωτεΐνάση διασπά τις πρωτεΐνες που περιβάλλουν τα νουκλεϊκά οξέα ώστε να διευκολυνθεί η πρόσβαση του ανιχνευτή στα νουκλεϊκά οξέα-στόχο.

5) Σταματάμε την αντίδραση προσθέτοντας γλυκίνη 5 mg/ml.

6) Ξεπλένουμε με PBT 3-4 φορές

7) Μετα-μονιμοποίηση σε 0,2% γλουταραλδεϋδη / 4% PFA για 20 λεπτά.

III. Προϋβριδοποίηση

Ξεπλένουμε με PBT 2x5 λεπτά.

Προσθέτουμε στο κάθε δείγμα ανάλογο όγκο διαλύματος υβριδοποίησης.

Προϋβριδοποιούμε στους 70 °C για μία ώρα τουλάχιστον.

Η σύσταση του διαλύματος προϋβριδοποίησης-υβριδοποίησης είναι:

Formamide	50%
SSC	5X
Yeast RNA	50 µg/ml
SDS	1%
Heparin	50 µg/ml

IV. Υβριδοποίηση

Προσθέτουμε περίπου 1µg/ml από τον ανιχνευτή και επωάζουμε O/N στους 70 °C.

V. Πλυσίματα μετά την υβριδοποίηση - επώαση με αντίσωμα

Ξέπλυμα 2x30 λεπτά στους 70 °C με "διάλυμα I" (50% φορμαμίδιο, 5xSSC, 1%SDS).

Ξέπλυμα 10 λεπτά στους 70 °C με "διάλυμα I"/"διάλυμα II" (0.5 M NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% Tween 20).

Ξέπλυμα 3x5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με "διάλυμα II".

Προσθέτουμε 2x30 λεπτά RNase A 100µg/ml διαλύματος II στους 37 °C.

Ξέπλυμα με "διάλυμα II" , 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Ξέπλυμα με "διάλυμα III" (50% φορμαμίδιο, 2xSSC), 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Ξέπλυμα με "διάλυμα III" 2x30 λεπτά στους 65 °C.

Ξέπλυμα με TBST (για 50 ml: 8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 25ml Tris-HCl 1M pH7.5, 1ml Tween-20) για 3x5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Προσθέτουμε 10% FCS (ή NGS) σε 1X TBST και αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 90 λεπτά.

Επώαση με αντίσωμα αντι-διγοξυγενίνης (1/2000) αραιωμένο σε TBST-1% FCS, για 12-16 ώρες στους 4 °C.

VI. Πλύσιματα μετά το αντίσωμα και ιστοχημεία

Ξεπλένουμε με TBST αρχικά 3x5 λεπτά και στη συνέχεια 5x40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Πλύσιμο 3x10 λεπτά με NTMT (100mM NaCl, 100mM Tris-HCl pH 9.5, 50mM MgCl₂, 0.1% Tween-20) σε θερμοκρασία δωματίου.

Η δράση της αλκαλικής φωσφατάσης ανιχνεύεται χρωματομετρικά με τις ουσίες NBT και BCIP:

Σε 10ml NTMT προσθέτουμε 45 μl NBT (stock 75mg/ml) και 35 μl BCIP (stock 50mg/ml) και χρησιμοποιούμε για το κάθε δείγμα αρκετή ποσότητα ώστε να σκεπάζεται επαρκώς.

Αφήνουμε για δύο ώρες τουλάχιστον έως O/N περιμένοντας την ανάπτυξη του χρώματος.

Διατηρούμε σε σκοτάδι ανακινώντας τα πρώτα 20 λεπτά και προαιρετικά μπορούμε να τοποθετήσουμε στους 37 °C όπου γίνεται γρηγορότερα η ανάπτυξη χρώματος.

Όταν το χρώμα αναπτυχθεί στην επιθυμητή έκταση, ξεπλένουμε 3x5 λεπτά με PBT, στη συνέχεια 2x10 λεπτά με PBT και αφήνουμε O/N στους 4 °C.

Κατόπιν βάζουμε σε 50% γλυκερόλη σε PBS για 3 ώρες περίπου και μετά σε 80% γλυκερόλη σε PBS διατηρώντας στους 4 °C για όσο θέλουμε.

2.7. Κυτταρικές σειρές

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HEPG2, SHSY και HEK293 (human embryonic kidney). Για την καλλιέργειά τους χρησιμοποιείται θρεπτικό μέσο DMEM (Sigma) με προσθήκη 10% FCS, πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και γλουταμινικό (Gibco-BRL ή Sigma). Η επώαση των κυττάρων γίνεται στους 37 °C σε ατμόσφαιρα με 5% CO₂.

2.7.1. Παροδική διαμόλυνση (transfection) ευκαρυωτικών κυττάρων

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την εισαγωγή πλασμιδιακών κατασκευών DNA σε καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών. Εμείς χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της

κατακρήμνισης συμπλόκων DNA με φωσφορικό ασβέστιο. Οι καλλιέργειες των κυττάρων έγιναν σε έναν κλίβανο όπου οι συνθήκες είναι 37 °C/5% CO₂. Η πρόσληψη του DNA από κύτταρα σε καλλιέργεια ενισχύεται σημαντικά όταν το DNA παρουσιάζεται συμπλοκοποιημένο με φωσφορικό ασβέστιο. Το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε είναι το εξής:

I. Προετοιμασία ευκαρυωτικών κυττάρων για παροδική διαμόλυνση (transfection)

1. Περίπου 24 ώρες πριν το transfection αφαιρούμε όλο το θρεπτικό μέσο (DMEM) από την καλλιέργεια των κυττάρων που βρίσκονται προσκολλημένα στον πυθμένα της φιάλης.
2. Προσθέτουμε τρυψίνη που βοηθάει τα κύτταρα να ξεκολλήσουν από τα τοιχώματα της φιάλης αλλά και μεταξύ τους, καθώς τα συσσωματώματα των κυττάρων παρεμποδίζουν το transfection και τοποθετούμε τη φιάλη στους 37 °C/5% CO₂ για 5-10 min.
3. Στη συνέχεια προσθέτουμε θρεπτικό υλικό (DMEM) στη φιάλη μέχρι να καλυφθεί η επιφάνεια της και ανακατεύουμε ώσπου να ξεκολλήσουν τα κύτταρα και να διαλυθούν τα συσσωματώματα.
4. Μετράμε τα κύτταρα με τη βοήθεια του κυτταρομετρητή και βρίσκουμε το πλήθος των κυττάρων/ml καλλιέργειας.
5. Σε πιάτα 6 θέσεων (6-well plates), ακτίνας 1.75 cm, βάζουμε 5·10⁵ κύτταρα/well καθώς και περίπου 2 ml θρεπτικό/ well. Η αναλογία των κυττάρων/well διαφέρει ανάλογα με το εμβαδόν της επιφάνειας του well. Στη συνέχεια τοποθετούμε τα κύτταρα στους 37 °C/5% CO₂ μέχρι την επομένη που θα γίνει το transfection.

II. Transfection

6. Ετοιμάζουμε τα δείγματα του DNA που περιέχουν το πλασμίδιο της λουσιφεράσης, το πλασμίδιο της β-γαλακτοσιδάσης καθώς και το πλασμίδιο που περιέχει ολόκληρο ή τμήμα του προς μελέτη γονιδίου. Για τα 6-well plates η συνολική ποσότητα του DNA στο κάθε δείγμα ήταν 6 μg (συμπληρώνουμε με το πλασμίδιο pBluescript KS).
7. Στο σωληνάριο erppendorf που περιέχει το δείγμα του DNA προσθέτουμε 15.5 μl CaCl₂ 2M και συμπληρώνουμε ως τα 125 μl με αποστειρωμένο H₂O (οι τιμές αυτές είναι ειδικές για τα 6-well plates).

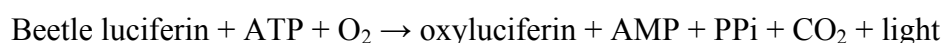
8. Ρίχνουμε το περιεχόμενο του προηγούμενου σωληναρίου eppendorf σταγόνα-σταγόνα σε νέο σωληνάριο eppendorf που περιέχει 125 μl 2xHBS και το αφήνουμε για 15-20 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματιστεί το ίζημα..
9. Ανακατεύουμε ελαφρά με την πιπέττα και προσθέτουμε το μίγμα στάγδην στο πηγαδάκι με τα κύτταρα .
10. Τοποθετούμε και πάλι τα 6-well plates στους 37 °C/5% CO₂ έως την επόμενη ημέρα.
11. Την επόμενη ημέρα ξεπλένουμε τα κύτταρα 2 φορές με θρεπτικό (DMEM, χωρίς πρόσθετα). Αφού τα ξεπλύνουμε προσθέτουμε θρεπτικό υλικό (DMEM με πρόσθετα) και τα τοποθετούμε στους 37 °C/5% CO₂ έως την επόμενη ημέρα οπότε θα συλλέξουμε τα κύτταρα και θα κάνουμε τις μετρήσεις μας.

2.7.2. Η τεχνική της λουσιφεράσης

Η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας χρησιμοποιείται ευρέως σαν γονίδιο αναφοράς για τους παρακάτω λόγους:

1. Η πρωτεΐνη δεν απαιτεί μετα-μεταφραστική τροποποίηση και η δραστηριότητα της πρωτεΐνης είναι διαθέσιμη κατά τη μετάφραση.
2. Πρόκειται για πολύ ευαίσθητη τεχνική με μεγάλη απόδοση φωτός.
3. Πρόκειται τέλος για μια γρήγορη τεχνική.

Η αντίδραση που καταλύεται από τη λουσιφεράση της πυγολαμπίδας είναι η εξής:



Στην τεχνική της λουσιφεράσης από την Promega το φως διατηρείται για περίπου 1 min από τη στιγμή που θα συνδυαστούν το ένζυμο με το υπόστρωμα. Για μετασχηματισμένα κύτταρα είναι απαραίτητο ένα ρυθμιστικό διάλυμα που προκαλεί τη λύση των κυττάρων για την προετοιμασία του δείγματος πριν τον υπολογισμό της λουσιφεράσης. Εμείς χρησιμοποιήσαμε το διάλυμα RLB (Reporter Lysis Buffer), το οποίο είναι ήπιο και αποτελεσματικό για προσκολλημένα κύτταρα θηλαστικών όπως τα δικά μας. Το γονίδιο της λουσιφεράσης βρίσκεται κλωνοποιημένο στον πλασμιαδικό φορέα pGL3-basic της εταιρείας Promega. Ο φορέας αυτός δεν περιέχει ευκαρυωτικό υποκινητή ούτε και ενισχυτές. Εμείς χρησιμοποιούμε αυτόν τον φορέα στον οποίο όμως έχει κλωνοποιηθεί μια περιοχή GAL4 UAS. Ο ανασυνδυασμένος

φορέας ονομάζεται πλέον pG5B-luc. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pUAS-tk-Luc ως φορέας του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης, το οποίο περιέχει εκτός από την περιοχή GAL4 UAS και τμήματα της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου της κινάσης της θυμιδίνης (tk, thymidine kinase). Το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε είναι το ακόλουθο:

1. Απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό από τα πηγαδάκια όπου έχουν αναπτυχθεί τα κύτταρα.
2. Ξεπλένουμε τα κύτταρα με 1xPBS (Phosphate Buffered Saline).
3. Προσθέτουμε το διάλυμα 1xRLB (150 μl/ πηγαδάκι σε 6-well plate) στα πηγαδάκια και τα μεταφέρουμε στους -80 °C για 10 min και έπειτα στους 37 °C για 2 min για να βοηθήσουμε τα κύτταρα να σπάσουν.
4. Στη συνέχεια ξεπλένουμε πολύ καλά τον πυθμένα όπου βρίσκονται προσκολλημένα τα κύτταρα με το διάλυμα RLB που ήδη υπάρχει μέσα, ώσπου η επιφάνεια του πυθμένα να γίνει λεία.
5. Μεταφέρουμε τα λυμμένα κύτταρα σε σωληνάρια τύπου eppendorf, τα ανακατεύουμε πολύ καλά και τα διατηρούμε στον πάγο.
6. Φυγοκεντρούμε στις 11000 rpm για 2 min στους 4 °C.
7. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο υγρό σε νέα σωληνάρια eppendorf και τα φυλάσσουμε στον πάγο ώσπου να ξεκινήσουμε τη μέτρηση.
8. Προσθέτουμε 25 μl (μπορεί να διαφέρει) από το υπόστρωμα της τεχνικής της λουσιφεράσης (πρέπει να βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση αλλά φυλάσσεται στους -80 °C) σε 5 μl (ή και περισσότερα) από το δείγμα μας (cell extract). Αμέσως ανακινούμε, μετράμε την εκπομπή φωτονίων σε φωτόμετρο και καταγράφουμε τα αποτελέσματα.

2.7.3. Η τεχνική της β-γαλακτοσιδάσης

Το γονίδιο LacZ από την E.coli, το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση, βρίσκεται ανάμεσα στα πιο βασικά γονίδια αναφοράς. Η β-γαλακτοσιδάση καταλύει την υδρόλυση ποικίλων β-γαλακτοζιτών. Χρησιμοποιήσαμε δυο πλασμίδια έκφρασης της β-γαλακτοσιδάσης, το pCMV-LacZ και το RSV-LacZ. Ανοδικά του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης υπάρχει ο αντίστοιχος υποκινητής που εξασφαλίζει ότι το γονίδιο θα εκφραστεί αν φυσικά εισέλθει στα κύτταρα των θηλαστικών. Η β-γαλακτοσιδάση χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση των

αποτελεσμάτων από την τεχνική της λουσιφεράσης αφού υποδεικνύει τον αριθμό των κυττάρων που μετασηματίστηκαν. Υποθέτουμε πως σε ότι ποσοστό κυττάρων εκφράζεται η β-γαλακτοσιδάση στο ίδιο ποσοστό κυττάρων έχει εισέλθει και το πλασμίδιο που περιέχει τη λουσιφεράση καθώς και τα υπόλοιπα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι:

- -Sodium Phosphate Buffer (Na₂HPO₄), 0.1 M, pH= 7.3 (προσαρμόζεται με 0.1 M NaH₂PO₄)
- 100x Salt buffer:

3M KCl	333 μl
1M MgCl ₂	100 μl
β-mercaptoethanol	352 μl
H ₂ O	215 μl
ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	1000μl
- -Na₂CO₃ 1M
- -OPNG_8mg/ml σε διάλυμα 0.1 M Na₂HPO₄

Για την αντίδραση, προστίθενται διαδοχικά σε σωληνάριο eppendorf:

- 0.1 M Na₂HPO₄ 456μl
- OPNG 132μl
- 100x Salt buffer 6μl
- εκχύλισμα κυττάρων 6μl
- ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ 600μl

Τα δείγματα επωάζονται (σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 37 °C) μέχρι να αποκτήσουν κιτρινωπή απόχρωση. Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 200μl 1M Na₂CO₃ τηρώντας τη σειρά των δειγμάτων με την οποία ξεκίνησε η αντίδραση. Στη συνέχεια μετράται η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων στα 410nm. Οι τιμές για να είναι αξιόπιστες πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ 0,1-1.

Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα των τιμών της τεχνικής της β-γαλακτοσιδάσης είναι απαραίτητα για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την τεχνική της λουσιφεράσης. Ουσιαστικά με τη β-γαλακτοσιδάση μπορούμε να μετρήσουμε το

ποσοστό των επιτυχώς διαμολυσμένων κυττάρων και να αποκλείσουμε από τις τελικές τιμές τον παράγοντα της επιτυχίας της διαμόλυνσης που είναι διαφορετικός σε κάθε δείγμα.

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Από όλα τα δείγματα τα οποία έχουν διαμολυνθεί με το ίδιο πλασμίδιο που κωδικοποιεί το γονίδιο της λουσιφεράσης σε ένα πείραμα, επιλέγουμε αυτό με τη μεγαλύτερη τιμή οπτικής πυκνότητας για τη β-γαλακτοσιδάση.
- Η τιμή αυτή διαιρείται στη συνέχεια με τις τιμές οπτικής πυκνότητας των υπόλοιπων δειγμάτων. Έτσι προκύπτει για κάθε δείγμα ένας παράγοντας μεγαλύτερος του 1, εκτός από αυτό με τη μεγαλύτερη τιμή που είναι ίσο με 1.
- Η τιμή κάθε δείγματος από την τεχνική της λουσιφεράσης πολλαπλασιάζεται με τον αντίστοιχο παράγοντα που προέκυψε από τη β-γαλακτοσιδάση και έτσι δημιουργείται η κανονικοποιημένη τιμή.
- Επειδή σε κάθε πείραμα κάθε δείγμα πραγματοποιείται εις διπλούν, η τελική τιμή προκύπτει από το μέσο όρο αυτών.
- Σύμφωνα με τις τελικές τιμές δημιουργείται η γραφική παράσταση.

2.8. Μικροχειρουργικές επεμβάσεις στον οπίσθιο εγκέφαλο σε έμβρυα όρνιθας μέσα στο αυγό (in ovo)

Όλες οι επεμβάσεις έγιναν σε έμβρυα όρνιθας σταδίων HH10 – HH13 (~E2) τα οποία είχαν επωαστεί σε οριζόντια θέση προσέχοντας κατά τη μετακίνηση και τον χειρισμό τους να μην περιστραφούν. Πριν την επέμβαση καθαρίζουμε την επάνω επιφάνεια του αυγού (επιφάνεια εργασίας) με οινόπνευμα και αφαιρούμε με μια σύριγγα 2-4 ml αλβουμίνη. Στη συνέχεια ανοίγουμε με ένα ψαλίδι ένα «παράθυρο» στο αυγό διαμέτρου περίπου 1.5-2 εκατοστών. Με ένα τριχοειδές ή σύριγγα ινσουλίνης εισάγουμε μαύρη μελάνη (Pelican no.16, αραιωμένο 1:1 με PBS-Pen-Strep) μεταξύ βλαστοδέρματος και λεκίθου για να είναι ορατές όλες οι εμβρυικές δομές και ιστοί. Αφήνουμε 2-3 σταγόνες PBS-Pen-Strep πάνω στο σημείο που βρίσκεται το έμβρυο. Για την επέμβαση χρησιμοποιούμε μικρονυστέρια από βολφράμιο ακονισμένα με ηλεκτρόλυση σε διάλυμα 0.5 M KOH ή λειαινώντας τα με τριβή πάνω σε ειδικό υλικό λείανσης (Oregon stone). Αρχικά απομακρύνεται η βιτελλινική μεμβράνη και στη συνέχεια με πολύ λεπτούς χειρισμούς απομακρύνονται ένα ή δύο ρομβομερή από το αριστερό τμήμα του οπίσθιου εγκεφάλου του εμβρύου. Κατόπιν κλείνουμε το

«παράθυρο» του αυγού με ειδική κολλητική ταινία και συνεχίζουμε την επώαση για μία μέρα περίπου ακόμα.

2.8.1. Υπερέκφραση και έκτοπη έκφραση του γονιδίου *cNscII* με τη χρήση του πλασμιδίου RCAS(BP)-*cNscII* και την εφαρμογή τετραγωνικών ηλεκτρικών παλμών (in ovo electroporation)

Τα πλασμίδια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για αυτά τα πειράματα (RCAS(BP)-*cNscII* και RCAS(BP)-GFP) είχαν απομονωθεί από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας και στη συνέχεια τα DNAs καθαρίστηκαν με υπερφυγοκέντριση σε διαβάθμιση CsCl. Με αυτή την τεχνική καθαρισμού παίρνουμε αρίστης ποιότητας DNA. Η συγκέντρωση του RCAS(BP)-*cNscII* ήταν 1μg/μl ενώ του RCAS(BP)-GFP 300ng/μl. Για την διάλυση των DNAs χρησιμοποιήσαμε διάλυμα 1xPBS στο οποίο προσθέτουμε και κάποια χρωστική ουσία (Fast Green 0.2%) προκειμένου να είναι πιο ευδιάκριτη η μικροένεση του DNA στο νευρικό σωλήνα. Η προσθήκη του RCAS(BP)-GFP γίνεται ώστε να είναι δυνατή η διαπίστωση του βαθμού επιτυχίας της όλης διαδικασίας με την παρατήρηση των εμβρύων σε ένα μικροσκόπιο φθορισμού λίγες ώρες αργότερα. Συνήθως μετά από 14-18 ώρες είχαμε έντονο φθορισμό στα έμβρυα και κατά συνέπεια μπορούσαμε να συμπεράνουμε σε ποιες ακριβώς περιοχές είχε επιτευχθεί η υπερέκφραση ή έκτοπη έκφραση του *cNscII*. Οι μικροπιπέττες που χρησιμοποιήσαμε για τις ενέσεις ήταν γυάλινοι τριχοειδείς σωλήνες εξωτερικής διαμέτρου 1mm και εσωτερικής 0.78mm, ενώ ο όγκος του διαλύματος DNA κυμαινόταν από 0.2-1μl ανά μικροένεση. Οι γυάλινοι τριχοειδείς σωλήνες προκειμένου να αποκτήσουν την επιθυμητή διάμετρο (η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογη της ταχύτητας εκροής του διαλύματος DNA) ζεσταίνονταν και υποβάλλονταν σε εφελκυσμό με τη χρήση ειδικού εφελκυστή (moving-coil microelectrode puller, GC100T-10).

Για την παραγωγή των τετραγωνικών ηλεκτρικών παλμών χρησιμοποιήσαμε το τροφοδοτικό Electroporator T820 της εταιρείας BTX. Τα ηλεκτρόδια είχαν διάμετρο 1 mm, ενώ το μήκος του οριζόντιου τμήματος (όπου δημιουργείται το ηλεκτρικό πεδίο) ήταν περίπου 5 mm, όση ήταν περίπου και η απόσταση των ηλεκτροδίων μεταξύ τους.

Για την διεξαγωγή αυτών των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν white Leghorn αυγά, τα οποία είχαν ελεγχθεί ώστε να μην περιέχουν ενδογενείς ρετροϊούς. Τα έμβρυα τα οποία υποβλήθηκαν σε *in ovo* electroporation ήταν σταδίων HH7 έως και HH13.

Το ποσοστό θνησιμότητας ήταν μεγαλύτερο στα έμβρυα μικρότερων σταδίων (HH7, HH8), λόγω μικρότερης ανθεκτικότητας στο ηλεκτρικό πεδίο καθώς και στα πιο μεγάλα (HH12, HH13) στα οποία υπήρχε εμφανής καρδιακή λειτουργία. Το καταλληλότερο στάδιο για την έγχυση του DNA στο νευρικό σωλήνα είναι το στάδιο HH10 (στάδιο 10 σωματιών) κατά το οποίο η νευρική αύλακα έχει κλείσει δημιουργώντας ένα κλειστό σύστημα σαν αυλό (lumen) στο οποίο είναι εύκολο να ενεθεί το DNA. Η διαδικασία προετοιμασίας που ακολουθείται είναι όμοια με αυτήν της προηγούμενης παραγράφου (καθάρισμα με οινόπνευμα, απομάκρυνση αλβουμίνης, άνοιγμα «παραθύρου», προσθήκη μελάνης και PBS-Pen-Strep). Στη συνέχεια απομακρύνεται η βιτελλινική μεμβράνη και γίνεται η μικροένεση του DNA. Προκειμένου να ελέγχουμε τον όγκο του διαλύματος του DNA που κάνουμε ένεση κάθε φορά, συνδέουμε τον τριχοειδή σωλήνα με τη βοήθεια ενός λάστιχου με αυτόματα ρυθμιζόμενη διάταξη που ελέγχει τη ροή του DNA.

Μετά τη μικροένεση του DNA τοποθετούμε τα δυο ηλεκτρόδια αριστερά και δεξιά του εμβρύου, στο ύψος που έγινε η ένεση του DNA προσέχοντας να μην έρθουν σε επαφή με το έμβρυο και εφαρμόζουμε το ηλεκτρικό πεδίο.

Συνήθως εφαρμόζαμε 4-5 ηλεκτρικούς παλμούς 25 V, διάρκειας 50 msec ο καθένας. Εάν αυξήσουμε την απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων τότε πρέπει να εφαρμόσουμε μεγαλύτερη τάση προκειμένου να έχουμε παρόμοιο ποσοστό επιτυχίας.

Μετά την εφαρμογή των ηλεκτρικών παλμών κλείνουμε το «παραθύρο» του αυγού με ειδική κολλητική ταινία και συνεχίζουμε την επώαση. Την επόμενη ημέρα ελέγχουμε σε ένα μικροσκόπιο φθορισμού ποια έμβρυα ενέθηκαν επιτυχώς, παρατηρώντας την έκφραση (φθορισμό) της GFP πρωτεΐνης. Τα έμβρυα τα οποία δεν παρουσιάζουν φθορισμό απομακρύνονται, όπως κι αυτά που έχουν πεθάνει. Τα έμβρυα τα οποία συλλέξαμε και μελετήσαμε είχαν επωασθεί για 1-4 ημέρες επιπλέον μετά την μικροένεση του RCAS(BP)-*cNscII*. Εξαιτίας του αρνητικού φορτίου του DNA, κατά την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου, το DNA κινείται προς την κατεύθυνση του θετικά φορτισμένου ηλεκτροδίου (άνοδος) με αποτέλεσμα να εισέλθει και κατ' επέκταση να εκφραστεί μόνο στα κύτταρα του μισού νευρικού σωλήνα, αφήνοντας τον υπόλοιπο μισό νευρικό σωλήνα ανέπαφο. Μ' αυτό τον τρόπο έχουμε τη δυνατότητα να παρατηρήσουμε άμεσα τις διαφορές ανάμεσα στα δυο αυτά τμήματα.

2.9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

2.9.1. Ρετροϊικοί φορείς Ικανοί για διπλασιασμό προερχόμενοι από τον RSV

Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι βασισμένοι σε RSV ρετροϊικοί φορείς, είναι αυτοί της σειράς RCAS(A). Ο RCAS(A) (**R**eplication **C**ompetent **A**LSV LTR with **S**plice acceptor and subgroup **A** env gene) περιέχει ένα ρεπλικόνιο από E.coli, ενωμένο με ένα στέλεχος RSV (Schmidt-Ruppin-A στέλεχος). Το γονίδιο v-src έχει απομακρυνθεί και έχει αντικατασταθεί με μια περιοχή πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης που περιέχει μια μοναδική Cla I περιοριστική θέση. Αυτή η Cla I περιοριστική θέση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κλωνοποίηση ξένων cDNA αλληλουχιών. Μια αλληλουχία θέσης δέκτη ματίσματος, τοποθετημένη αμέσως ανοδικά (5') της θέσης Cla I, καθιστά βέβαιη τη δημιουργία υπογενωμικού mRNA που θα αντιστοιχεί στο κλωνοποιημένο cDNA. Σε μια δεύτερη γενιά φορέων, το γονίδιο pol αντικαταστάθηκε από το pol γονίδιο του στελέχους Bryan του RSV, οδηγώντας στη σειρά φορέων RCAS(BP). Αυτοί αντιγράφονται πολύ πιο αποτελεσματικά από τους RCAS φορείς (Hughes and Kosik, 1984)

Ο Hughes και οι συνεργάτες του σχεδίασαν ένα πλασμίδιο δέκτη (Slax12, Slax13) που περιέχει πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης (polylinker) , οι οποίες περικλείονται ανάμεσα σε δύο Cla I περιοριστικές θέσεις (Hughes et al, 1987). Η cDNA αλληλουχία που μας ενδιαφέρει, κλωνοποιείται στο πλασμίδιο δεκτη, εξάγεται από αυτό μέσω πέψης με Cla I και εισάγεται στην Cla I θέση του RCAS(BP) φορέα. Οι RCAS και RCAS(BP) φορείς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μη-ελεγχόμενη υψηλών επιπέδων έκφραση των κλωνοποιημένων αλληλουχιών.

Σε RCAS(BP) φορείς μπορούν να κλωνοποιηθούν αλληλουχίες DNA μέχρι 2.4 Kb.

Μεγαλύτερα τμήματα έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του ιικού γενώματος ώστε να εμποδίζεται το πακετάρισμα σε ικά σώματα (Bell and Brickell, 1997).

Φαίνεται ότι μερικοί ιστοί ή όργανα είναι πιο δεκτικοί σε ιική μόλυνση, αλλά συστηματική μελέτη δεν έχει αναφερθεί. Επίσης φαίνεται να υπάρχει ποικιλία στην αποτελεσματικότητα με την οποία ιοί από διαφορετική ομάδα μολύνουν ιστούς. Για παράδειγμα ιοί της ομάδας B είναι πιο αποτελεσματικοί στο να μολύνουν κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος σε έμβρυα όρνιθας μικρότερα του σταδίου 12 (Hamburger and Hamilton, 1951), σε σύγκριση με ιούς από τις ομάδες A και E.

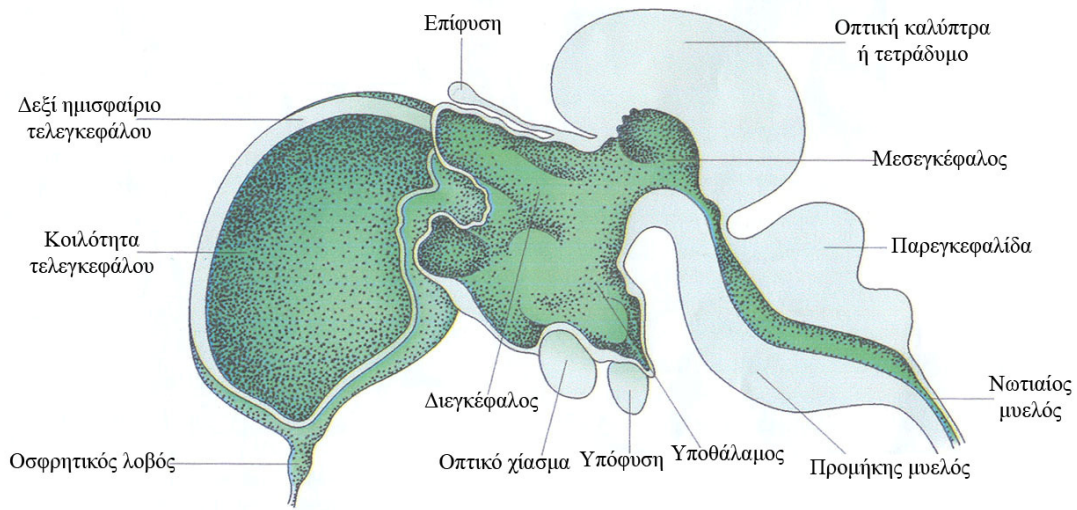
Η μόλυνση ενός ιστού χρησιμοποιώντας ρετροϊικούς φορείς γίνεται με τρεις τρόπους:

1. Με ένεση ικών σωματίων (που φέρουν το γονίδιο που μας ενδιαφέρει) στο σημείο του ιστού που θέλουμε να μολυνθεί.
2. Με τοποθέτηση κυτταρικών συσσωματωμάτων στην περιοχή που θέλουμε να μολυνθεί.
3. Με ένεση της ρετροϊκής κατασκευής, και κατόπιν εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού στην περιοχή (electroporation).

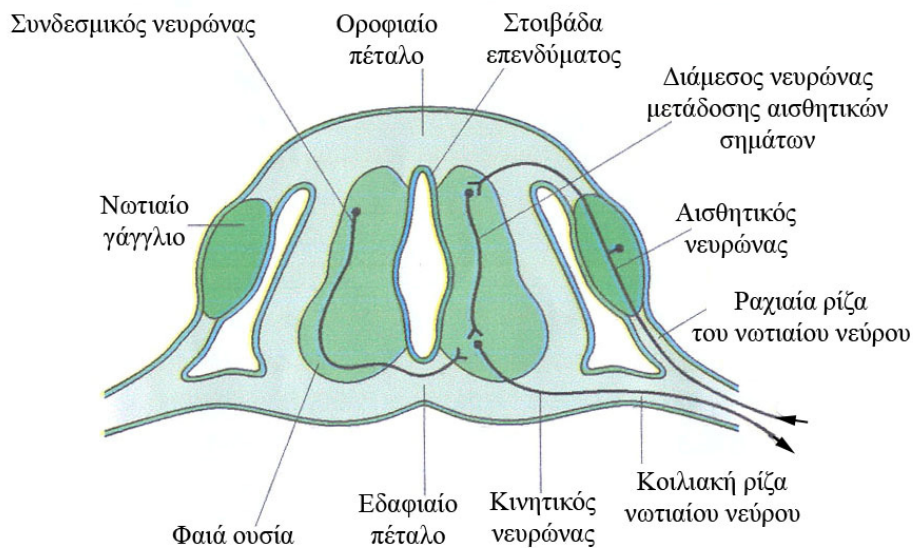
Ο πρώτος και ο τρίτος τρόπος ενδείκνυνται στις περιπτώσεις όπου έχουμε κοιλότητες κατάλληλες για να γίνει η ένεση, όπως είναι ο νευρικός σωλήνας και οι κοιλίες του εγκεφάλου. Ο δεύτερος τρόπος ενδείκνυται στην περίπτωση συμπαγούς ιστού, όπου τα κύτταρα είναι πολύ πυκνά. Έτσι αυτό που γίνεται, είναι η μεταφορά μέρους της μολυσμένης με ρετροϊούς καλλιέργειας από βακτηριακό τρυβλίο Petri, όπου τα κύτταρα λόγω έλλειψης υποστρώματος στο πιάτο συγκολλώνται μεταξύ τους και συγκροτούν συσσωματώματα. Τα συσσωματώματα αυτά χρησιμοποιούνται ως μοσχεύματα και εισάγονται στο έμβρυο *in ovo*.

Παράλληλα με τη διαμόλυνση για έκφραση του γονιδίου που μας ενδιαφέρει, γίνεται πάντα σε άλλα έμβρυα αντίστοιχων σταδίων διαμόλυνση με τη ρετροϊκή κατασκευή RCASBP(A)/AP που εκφράζει αλκαλική φωσφατάση. Αυτά τα διαμολυσμένα ζώα που προκύπτουν υπόκεινται στις ίδιες αναλύσεις με αυτά στα οποία έχουμε υπερεκφράσει το υπο μελέτη γονίδιο και χρησιμεύουν ως control. Αν σε αυτά τα έμβρυα παρατηρείται αλλαγή του προτύπου έκφρασης του ενδογενούς υπό μελέτη γονιδίου ή άλλων γονιδίων, τότε σημαίνει ότι η διαδικασία διαμόλυνσης επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων και όχι η δράση της ανασυνδυασμένης πλασμιδιακής κατασκευής που περιέχει το γονίδιο που μας ενδιαφέρει.

2.9.2. Δομές του αναπτυσσόμενου νευρικού συστήματος εμβρύου όρνιθας



Εικόνα 10: Η δομή του εγκεφάλου εμβρύου όρνιθας 8 ημερών. Στο διάμεσο και στον οπίσθιο εγκέφαλο η τομή έχει γίνει στη μέση γραμμή, ενώ ο δεξιός τελεγκέφαλος και η παρεγκεφαλίδα παρουσιάζονται σε παραοβελιαία τομή.



Εικόνα 11: Οι κύριες δομές του αναπτυσσόμενου νωτιαίου μυελού

3.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Ανίχνευση και κλωνοποίηση του γονιδίου *cNsc11* της όρνιθας

Για την απομόνωση του γονιδίου *cNsc11* της όρνιθας χρησιμοποιήθηκε μία cDNA βιβλιοθήκη εμβρύου όρνιθας ηλικίας πέντε ημερών κλωνοποιημένη στο φάγο Uni-ZAP XR. Σαρώθηκαν συνολικά 10^6 βακτηριοφάγοι και χρησιμοποιήθηκε τμήμα περίπου 1800 νουκλεοτιδίων από το cDNA του ποντικού το οποίο ήταν στη διάθεσή μας ως ραδιενεργός ανιχνευτής των θετικών κλώνων. Το τμήμα αυτό περιλάμβανε όλη την κωδική περιοχή, την 5'-μη μεταφραζόμενη περιοχή και τμήμα της 3'-μη μεταφραζόμενης περιοχής. Από το κάθε τρυβλίο όπου απλώθηκαν περίπου 160.000 φάγοι ελέγχθηκαν διπλά φίλτρα, ώστε τα αναμενόμενα σήματα να έχουν μεγαλύτερη αξιοπιστία. Οι υβριδοποιήσεις έγιναν σε θερμοκρασία 55 °C, ενώ το πλύσιμο των ραδιενεργών φίλτρων έγινε σε ήπιες συνθήκες μειώνοντας διαδοχικά την συγκέντρωση του άλατος μέχρι 1x SSC. Δυστυχώς από αυτή την προσπάθεια δεν έγινε δυνατή η επαλήθευση θετικών κλώνων με τις διαδικασίες εμπλουτισμού πιθανών θετικών κλώνων που ακολούθησαν.

Για επιβεβαίωση του αρνητικού μας αποτελέσματος επαναλήφθηκε εκ νέου η διαδικασία του απλώματος 10^6 βακτηριοφάγων από την ίδια βιβλιοθήκη. Το αποτέλεσμα ήταν και πάλι αρνητικό, αποκλείοντας έτσι, την πιθανότητα τεχνικού λάθους.

Στην συνέχεια σχεδιάσαμε εκκινητές (primers) για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) βασιζόμενοι στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των γονιδίων *Nsc11* του ανθρώπου και του ποντικού, οι οποίες μας ήταν γνωστές. Συνολικά σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν, με όλους τους δυνατούς συνδυασμούς, 12 εκκινητές (**Πίνακας 3**) ειδικοί για την κωδική περιοχή του γονιδίου. Βασική ιδέα για τον σχεδιασμό τους ήταν η πιθανότητα να έχει συντηρηθεί σε μεγάλο βαθμό η πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης μεταξύ του ανθρώπου, του ποντικού και της όρνιθας. Ως μήτρα (template) για το PCR χρησιμοποιήθηκε DNA από την cDNA φαγική βιβλιοθήκη εμβρύου όρνιθας ηλικίας πέντε ημερών της εταιρείας Stratagene (#937405). Επίσης, ως μήτρα, χρησιμοποιήθηκε cDNA το οποίο κατασκευάσαμε από έμβρυα όρνιθας τεσσάρων και πέντε ημερών. Επιπρόσθετα, δε, καθώς όλη η κωδική περιοχή του γονιδίου *Nsc11*, τόσο στον άνθρωπο όσο και στον ποντικό περιέχεται σε ένα εξόνιο, αξιολογώντας την πιθανότητα το ίδιο να συμβαίνει και στην όρνιθα, χρησιμοποιήσαμε και γενωμικό DNA όρνιθας ως μήτρα σε μεγάλο αριθμό αντιδράσεων. Παρά τον εξαιρετικά μεγάλο αριθμό αντιδράσεων PCR που έγιναν και

τη χρήση διαφόρων συνθηκών θερμοκρασίας, συγκεντρώσεων αλάτων, χρόνων κ.λ.π. δεν υπήρξε θετικό αποτέλεσμα. Αιτία γι' αυτό, απ' ό,τι διαπιστώθηκε αργότερα, ήταν ο σχετικά μικρός βαθμός συντήρησης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στο 5' άκρο της κωδικής περιοχής του γονιδίου *Nsc11*, με αποτέλεσμα οι εκκινητές που είχαμε σχεδιάσει για την περιοχή αυτή, και που χρησιμοποιούνταν σε κάθε αντίδραση PCR να μην μπορούν να προσδεθούν ικανοποιητικά στο DNA μήτρα.

Για να αυξήσουμε την πιθανότητα ενός θετικού αποτελέσματος αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε έναν εκκινητή ειδικό για την περιοχή bHLH του γονιδίου *Nsc11*, παρ' όλο που μ' αυτόν τον τρόπο αυξανόταν η πιθανότητα για μη ειδική πρόσδεση σε άλλα bHLH γονίδια. Ο εκκινητής αυτός ήταν ο "bNSCL" (Πίνακας 3 και Εικόνα 12).

Έτσι αρχικά απομονώθηκε με PCR και κλωνοποιήθηκε το τμήμα της bHLH περιοχής που αντιστοιχεί στους εκκινητές bNSCL και 3' NSCL και στη συνέχεια έγινε sequencing. Από την ομολογία που παρουσίαζε αυτό το τμήμα σε σχέση με το γονίδιο *Nsc11* του ανθρώπου και του ποντικού συμπεράναμε, ότι μάλλον έχουμε εντοπίσει το ομόλογο *cNsc11* της όρνιθας. Επειδή το μέγεθός του ήταν μικρό (189 νουκλεοτίδια) σχεδιάστηκε ένας νέος εκκινητής από την γνωστή πλέον αλληλουχία αυτού του προϊόντος. Ο εκκινητής αυτός (cbasF) χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις PCR μαζί με τον εκκινητή T3 ο οποίος είναι ειδικός για πρόσδεση στους βραχίονες του Uni-ZAP XR βακτηριοφάγου. Ως μήτρα για το PCR χρησιμοποιήθηκε DNA από την προαναφερόμενη cDNA φαγική βιβλιοθήκη εμβρύου όρνιθας ηλικίας πέντε ημερών.

Με αυτόν τον τρόπο έγινε δυνατή η απομόνωση ενός τμήματος περίπου 300 νουκλεοτιδίων, το οποίο στην συνέχεια κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα T-GEM Easy vector της εταιρείας Promega. Έγινε στην συνέχεια προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής του αλληλουχίας, από όπου διαπιστώθηκε ότι είχε μήκος 270 νουκλεοτιδίων και ποσοστό ομολογίας 92.8% με το γονίδιο *Nsc11* του ανθρώπου στην κωδική περιοχή και 72.3% σε όλο το μήκος ενώ με το γονίδιο *Nsc11* του ποντικού τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 91% και 71%. Από τα 270 νουκλεοτίδια τα 165 ανήκαν στην κωδική περιοχή, ενώ τα 105 στην 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή.

Στην **Εικόνα 12** παρατίθεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία της κωδικής περιοχής του γονιδίου *cNsc11* της όρνιθας και με πλάγια γραφή, φαίνονται οι εκκινητές που είχαν σχεδιαστεί λαμβάνοντας υπόψη τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου *Nsc11* στον άνθρωπο και στον ποντικό. Οι εκκινητές είναι στοιχισμένοι

ακριβώς πάνω (μπλε, αυτοί που έχουν κατεύθυνση 5' προς 3' σε σχέση με το γονίδιο *Nsc11*) ή κάτω (πράσινοι, αυτοί που έχουν την αντίθετη κατεύθυνση) από την αντίστοιχη περιοχή του cDNA. Οι εκκινητές bNSCL και 3' NSCL με τους οποίους πήραμε το πρώτο ειδικό προϊόν της PCR είναι με κόκκινο.

<i>N18 F</i>	<i>5' T NAAYWSNGAY ACNATGG 3'</i>
<i>N20 F</i>	<i>5' ATGATGYT NAAYWSNGAY AC 3'</i>
<i>NBP 2F</i>	<i>5' AY ACNATGGARY TNGAYTNCC 3'</i>
<i>NBP 1F</i>	<i>5' ATGATGYT NAAYWSNGAY ACNATG 3'</i>
<i>F'NSCL</i>	<i>5' ACCATGGAGC TGGACCTGCN 3'</i>
<i>5'NSCL</i>	<i>5' ATGATGCT CAACTCCGAT ACCATGG 3'</i>
<i>bNSCL</i>	<i>5' G CCACGGCCAA GTACCGCACN 3'</i>
<i>cbasF</i>	<i>5' GCCCACGCCA CGAGGGAACG CATCC 3'</i>
<i>NBP 3R</i>	<i>5' CDATYTTNS WNARYTTYTT RTC 3'</i>
<i>3' NSCL</i>	<i>5' TCAGACGT CCAGCACATG GTTCAG 3'</i>
<i>R' NSCL</i>	<i>5' GTAG GAGATATAGC AGATGN 3'</i>
<i>NBP 4R</i>	<i>5' CRTG RTTNARRTAN SWDATRTARC 3'</i>

Πίνακας 3 : Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR αντιδράσεις. Οι μπλε εκκινητές είναι αυτοί που έχουν κατεύθυνση 5' προς 3' (σε σχέση με το γονίδιο *cNsc11*), ενώ πράσινοι αυτοί που έχουν την αντίθετη κατεύθυνση. Οι εκκινητές bNSCL και 3' NSCL με τους οποίους πήραμε το πρώτο ειδικό προϊόν της PCR είναι με κόκκινο.

5' T NAAYWSNGAY ACNATGG 3' (N18 F)
 5' ATGATGYT NAAYWSNGAY AC 3' (N20 F)
 5' AY ACNATGGARY TNGAYYTNC 3' (NBP 2F)
 5' ATGATGYT NAAYWSNGAY ACNATG 3' (NBP 1F)
 5' ACCATGGAGC TGGACCTGCN 3' (F'NSCL)
 5' ATGATGCT CAACTCCGAT ACCATGG 3' (5'NSCL)
 CCACCAATGCT CAACTCGGAG CAGACAGAGC TCGACCTCCC GCCCGGGCAC
 TCCGAGCCCG AATCCGTCTT CAGCGACTGC GGCCGCGTGG GCGGCGCGGA
 GGAGTCCGGC GTCGCTTTGT GCCCTCAGCC CCGCGGGGCC GAGCAGGCAG
 AGGCGGTGAA GAAGGACCTG CAGCACCTGA GCCGGGAGGA GCGGCGGCGG
 5' G CCACGGCCAA GTACCGCACN 3' (bNSCL)
 (cbasF) 5' GCCCACGCCA CGAGGGAACG
 CGGCGGCGAG CCACGGCCAA GTACCGCACA GCCCACGCCA CGAGGGAACG
 CATCC
 CATCCGCGTG GAAGCCTTCA ACATGGCCTT CGCCGAGCTG CGCAAGCTGC
 TGCCCACGCT GCCGCCCGAC AAGAAGCTCT CCAAGATTGA GATCCTTCGC
 3' CTR TTYTTYRANW SNTTYTADC 5' (NBP 3R)
 CTGGCTATCT GCTACATCTC CTACCTGAAC CACGTGCTGG ATGTCTGAGC
 (3' NSCL) 3' GACTTG GTACACGACC TGCAGACT 5'
 3' NGTAGA CGATATAGAG GATG 5' (R' NSCL)
 3' CRATRTADWS NATRRANTTR GTRC 5' (NBP 4R)

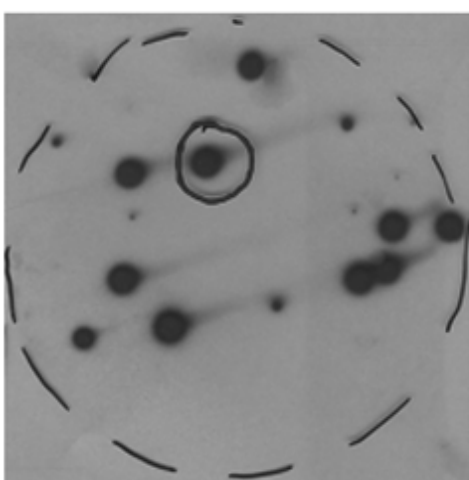
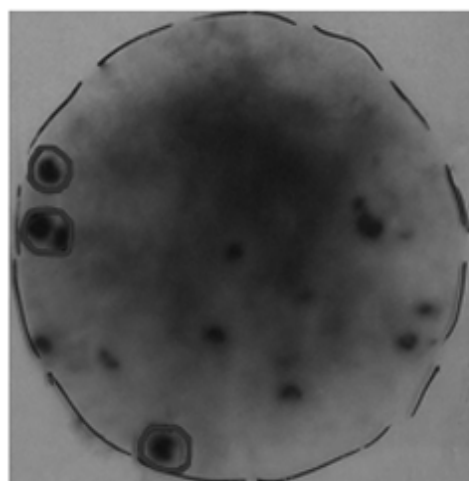
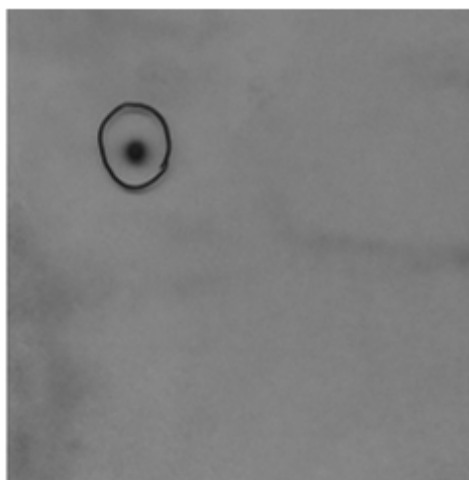
Εικόνα 12: Στοίχιση των εκκινήτων σε σχέση με την κωδική περιοχή του γονιδίου. Οι εκκινήτες είναι στοιχισμένοι ακριβώς πάνω (μπλε, αυτοί που έχουν κατεύθυνση 5' προς 3' σε σχέση με το γονίδιο *cNscII*) ή κάτω (πράσινοι, αυτοί που έχουν την αντίθετη κατεύθυνση) από την αντίστοιχη περιοχή του cDNA. Οι εκκινήτες bNSCL και 3' NSCL με τους οποίους πήραμε το πρώτο ειδικό προϊόν της PCR είναι με κόκκινο.

Στη συνέχεια έγινε ραδιενεργή σήμανση του κλωνοποιημένου τμήματος των 270 νουκλεοτιδίων του *cNscII* και προχωρήσαμε σε εκ νέου σάρωση της προαναφερθείσας cDNA βιβλιοθήκης. Σαρώθηκαν, ξανά, συνολικά 10^6 φάγοι σε έξι τρυβλία. Από το κάθε τρυβλίο όπου υπήρχαν περίπου 160.000 φάγοι ελέγχθηκαν πάλι διπλά φίλτρα. Οι υβριδοποιήσεις έγιναν σε θερμοκρασία 58 °C, ενώ το πλύσιμο των ραδιενεργών φίλτρων έγινε σε σχετικά αυστηρές συνθήκες μειώνοντας διαδοχικά την συγκέντρωση του άλατος μέχρι 0,5x SSC. Οι θετικοί κλώνοι που απομονώθηκαν, οκτώ στο σύνολο, μεταφέρθηκαν σε τρυβλία μικρότερων διαστάσεων και χωριστά ο κάθε ένας. Με τέτοιες διαδοχικές διαδικασίες εμπλουτισμού των θετικών κλώνων, καταλήξαμε στην ταυτοποίηση και απομόνωση πλακών με μοναδικούς φάγους. Από τους οκτώ αρχικά πιθανούς φάγους καταλήξαμε σε δύο, τους #1 και #5 (**Εικόνα 13**), καθώς τα σήματα που αντιστοιχούσαν στους υπόλοιπους φάγους δεν επαληθεύτηκαν κατά τις διαδοχικές διαδικασίες εμπλουτισμού.

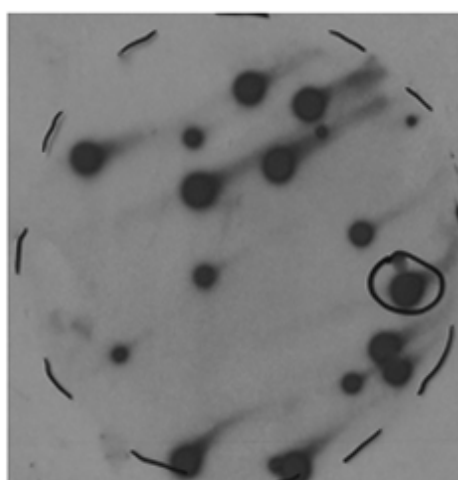
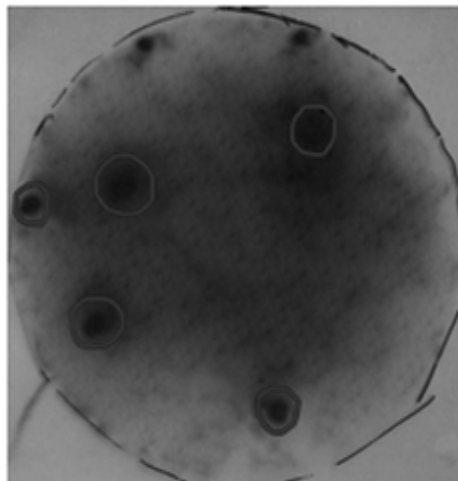
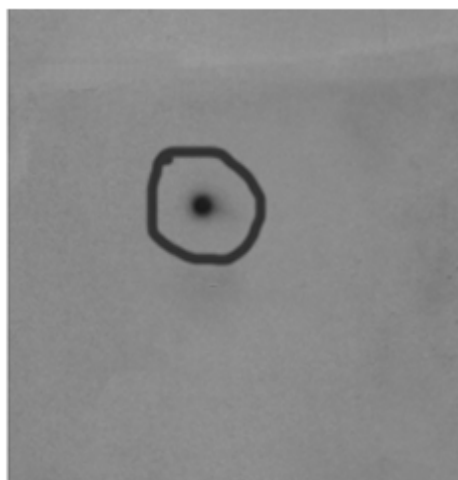
Για την κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς, των εμπιεχομένων στους φάγους τμημάτων cDNA χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της *in vivo excision* (εξαγωγής). Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας Stratagene, όπως αυτή περιγράφεται αναλυτικά στο εγχειρίδιο της Uni-ZAP XR Library (#937405) την οποία χρησιμοποιήσαμε. Αποτέλεσμα αυτής της τεχνικής ήταν η κλωνοποίηση των αντίστοιχων εμπιεχομένων cDNAs στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript SK(+/-). Οι πλασμιδιακές κατασκευές που προέκυψαν χαρακτηρίστηκαν με τους αριθμούς #246 (περιέχει το cDNA του φάγου #1) και #247 (περιέχει το cDNA του φάγου #5).

Έγιναν αλεπάλληλες πέψεις, με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων, και διαπιστώθηκε ότι το cDNA που προερχόταν από το φάγο #1 είχε μέγεθος περίπου 2500 νουκλεοτίδια, ενώ αυτό του φάγου #5 περίπου 1700. Με τις πρώτες αυτές πέψεις διαπιστώθηκε ότι κάποια μικρά τμήματα DNA που προέκυπταν με τη χρήση μερικών περιοριστικών ενζύμων, π.χ. Bam HI, φαίνονταν όμοια, αφήνοντας ανοιχτό το ενδεχόμενο τα δύο cDNAs να έχουν κάποιες περιοχές με μεγάλη ή απόλυτη ομολογία.

Φάγος #1



Φάγος #5



Εικόνα 13: Διαδοχικά στάδια εμπλουτισμού των αρχικών πιθανών κλώνων, μέχρι το στάδιο επίτευξης “διακριτής πλάκας βακτηριοφάγου” (single bacteriophage plaque). Στην εικόνα αυτή παρουσιάζονται οι #1 και #5 βακτηριοφάγοι, οι μόνοι από τους αρχικούς που επιβεβαιώθηκε ότι περιείχαν θετικούς κλώνους.

Ακολούθησε προσδιορισμός της πρωτοταγούς δομής του DNA των δύο ενθέματων που κλωνοποιήθηκαν στον pBluescript SK(+/-), με τη μέθοδο ενσωμάτωσης τριφωσφορικών δι-δεοξυνουκλεοτιδίων (dideoxy nucleotide chain termination method, Sanger et al., 1977).

Για την αποτελεσματικότερη διεξαγωγή του sequencing δημιουργήθηκαν ελλειπτικές κατασκευές (deletion constructs) με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων και την αποκοπή τμημάτων από το 5' άκρο τους και επανασύνδεσή τους στην συνέχεια (religation). Εκτός από τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το sequencing και ήταν ειδικοί για πρόσδεση στους πολυσυνδέτες του pBluescript SK(+/-), χρησιμοποιήθηκαν και εκκινητές οι οποίοι σχεδιάστηκαν καθώς προχωρούσε η ανάγνωση της αλληλουχίας.

Στις επόμενες σελίδες παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των cDNAs που περιέχονται στα πλασμίδια #246 (από το φάγο #1) και #247 (από το φάγο #5) καθώς και οι συγκρίσεις των πρωτεϊνών, με υπογραμμισμένη την περιοχή bHLH, και των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών της κωδικής περιοχής του γονιδίου chick *NscII* και των αντίστοιχων γονιδίων στον άνθρωπο και στον ποντικό. Η σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των δυο cDNAs μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι αυτά πρέπει να προκύπτουν ως προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος αφού η κωδική τους περιοχή είναι πανομοιότυπη, όμως οι 5' και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές τους παρουσιάζουν αρκετές διαφορές.

Νουκλεοτιδική αλληλουχία του ενθέματος του φάγου #1

```

1   CCTGCATGGT CCTTGAGCTC CTGCCCTATT CGTGGCATGC TCGGGCCCCA
51  AGGATCCCCG GGCTCATCCC ACCGAGCAGG TCGCCAACTT TCTGCCTCCT
101 CCATGGACGG ATGAGCAAGC AGTTCCCGGA TTA CTTTGGG CTTCAGGAAG
151 AGGAAAGCTG GAGCCTGGGA ATGGTCGTCA ACTCAGGGTT TATTGCCGTC
201 GCCCCTCCAG CAAGAAAAAG GGAAGCACTC TGAAGTCGTG CAGAGACGCC
251 GTGTGATGAG GAGGAGGAGG AGAGCCAGTG GGGCAGTGCT GTGAGCAAGA
301 GGCCCTGTCC CAGTGGATTC GCTTCGCCTC ACTCCACCCC CAGCCCAGCA
351 TCTGTCCATC TGTCCATCCA TCCATCCGTC CATCCATCCG CACCCACCAT
401 GCTCAACTCG GAGCAGACAG AGCTCGACCT CCCGCCCGCG CACTCCGAGC
451 CCGAATCCGT CTTCAGCGAC TGC GGCCGCG TGGGCGGCGG GGAGGAGTCC
501 GGCGTCGCTT TGTGCCCTCA GCCCCGCGGG GCCGAGCAGG CAGAGGCGGT

```

551 **GAAGAAGGAC CTGCAGCACC TGAGCCGGGA GGAGCGGCGG CGGCGGCGGC**
601 **GAACCACGGC CAAGTACCGC ACAGCCCACG CCACGAGGGA ACGCATCCGC**
651 **GTGGAAGCCT TCAACATGGC CTTGCGCGAG CTGCGCAAGC TGCTGCCAC**
701 **GCTGCCGCC GACAAGAAGC TCTCCAAGAT TGAGATCCTT CGCCTGGCTA**
751 **TCTGCTACAT CTCCTACCTG AACCACGTGC TGGATGTCTG AGCCGCCAG**
801 CCTGTGTCTG TTTGTCTGTC CGTCCACCCG TCCGTCACCA ACCCAACCAA
851 CTTGCTGGGC TGAGGGTTTG AGTATGTCTG GTCCAGATGC GACCCAACAA
901 TGCTGCACCT GTATCTGTCT GACTGCTTGG ATGGACTGAA TCCCATCTGC
951 CTGCTCTGCC TCTATCCATA AACTGCATCT CCCACCACC AAGCCCACAT
1001 CCATCTGTCT GTCCGTGCTG CCTGAGCCAG GCGGGCTGTT CAGCCCATCA
1051 GATGTCTGTC TGTCTGCTG GACCTGCTGC CTGAAGCCCG TCTGTTCCCA
1101 ACGTCTGTCT GTCCTTCTGC TGCATGTCCC GCTGATAGTG CCAATGGGAT
1151 CCTGAGCCCA CATCTGTCCA TCTGTCCCA CAGCCACGAC CTGGTCCACC
1201 TTCACCCATG TCACCTCTTT TCTACAAGCC ACAGACTGTG CCCATGAGGC
1251 ACCAAGCAGC CCACAGTCCC ATCCATCTGC CCCTCCAGCC ACAGGGCACC
1301 GCCTGGGGAC CACCCACCT TCCCAGCGCT CTCCCCTGTG CACAGAGAAG
1351 CCTCTCCAGC TCCATCCTGG TGTGGCACAG AGTACTCAGC ATGCTGCAGA
1401 CGTAGGGCAG GATCCGGCCA CACTACACCA TGGACAGCTG CATGGTGCCC
1451 AAGGCCATAC TGACCTATGC CTGGCTGGAG CTGCTGTCAC CTGGGGCCTG
1501 GCTGAGCCCC TTCACTGCAC ACCCACCTCC CCAATGCATC CCACTCTGGG
1551 AGCACCTCAT CCCAGAGCTG TGCATCCCA CCTGCACTAC CCTCAGCTCT
1601 GAGCAGAGTG AGCGTGGAAC CCCTAGCCCT TTACACGCCC TCTTCGCATC
1651 AATATCCCTG ACAGCCCCAG AGCAATCTTC ATACCCCACC TCTTCCTCTG
1701 TCTCCCCTGT TACTTTCTAA GAGTTAATTT TGCCTGGCG GTGGCAGGAG
1751 CACGAGCAGA GCTCCATGGG GACCGGGACA GAGCAGAAAG TGCTGCTGT
1801 GCCCAAAGGC AGTGTGCTGC TCACTGCAGG GTGGAATATG GCCCAACTCC
1851 ATCCCCGTCC TGGCACTGCC CACAGCTCCA GACCCCATCT CCCTGCATCC
1901 CCAGAGCAGC CCACATCCCA TGGGACGTGC TCGGGGATGT GGCATCCCA
1951 AGGGACACGG ACAGAGCAGG GCAGCCCACC CGTCCCCTCC ACTCAGCCCA
2001 CGGCCCTGCG CCACGAGGAT ATTTATTTGA ATTAATTTTA TTGATAAATG
2051 TTATTATTTA TTTGCTGTGT TGTGCACTTT TCGGAAAAGA AACCTAGGAA
2101 GCAAACAACA AACAGAAACA ACCACGGTGG AAAGCAGCCC AACCCACCCC
2151 TGTGTGCCCC AGCTTGCATT TCGTCTTGGC TGTTCCGACT GTGTGAGGAT
2201 TTATTATTTA TGAGTTCACG AGGAAGTCGG GGAGGGGAA ATGAATTAAA
2251 CTGCCAGCAA AAGAGATCTT GAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
2301 AAAAAAAAAA AAAAAA

Νουκλεοτιδική αλληλουχία του ενθέματος του φάγου #5

1 CTGCATGGTC CTTGAGCTCC TGCCCTATTC GTGGCATGCT CGGGCCCCAA
 51 GGATCCCGGG GCTCATCCCA CCGAGCAGGT CGCCAAC TTT CTGCCTCCTC
 101 CATGGACGGA TGAGCAAGCA GTTCCCGGAT TACTTTGGGC TTCAGGAAGA
 151 GGAAAGCTGG AGCCTGGGAA TGGTCGTCAA CTCAGGGCTC GGCTCTGACA
 201 CCTGACAGCC CCTGACCCGG TTCAGCTGCA CGGGAGCTGC CGATGTTTTGT
 251 GTTTTTGTG TATTTTTATG CATCCTGCCC TTCTATCAGT TTATTGCCGT
 301 CGCCCTTCAG CAAGAAAAAG GGAAGCACTC TGAAGTCGTG CAGAGACGCC
 351 GTGTGATGAG GAGGAGGAGG AGGAGAGCCA GTBGGGCAGT GCTGTGAGCA
 401 AGAGTGCCTG TCCCAGTTGG ATTCGCTTCG CCTCACTCCA CCCCAGCCC
 451 AGCATCTGTT CCATCTGTTC CATCCATCCA TCCGTTCAT CCATCCGCAC
 501 CCACC**ATGCT CAACTCGGAG CAGACAGAGC TCGACCTCCC GCCCGGGCAC**
 551 **TCCGAGCCCG AATCCGTCTT CAGCGACTGC GGCCGCGTGG GCGGCGCGGA**
 601 **GGAGTCCGGC GTCGCTTTGT GCCCTCAGCC CCGCGGGGCC GAGCAGGCAG**
 651 **AGGCGGTGAA GAAGGACCTG CAGCACCTGA GCCGGGAGGA GCGGCGGCGG**
 701 **CGGCGGCGAG CCACGGCCAA GTACCGCACA GCCACGCCA CGAGGGAACG**
 751 **CATCCGCGTG GAAGCCTTCA ACATGGCCTT CGCCGAGCTG CGCAAGCTGC**
 801 **TGCCACGCT GCCGCCGAC AAGAAGCTCT CCAAGATTGA GATCCTTCGC**
 851 **CTGGCTATCT GCTACATCTC CTACCTGAAC CACGTGCTGG ATGTCTGAGC**
 901 CGCCCAGCCT GTGTCTGTTT GTCTGTCCGT CCACCCGTCC GTCACCAACC
 951 CAACCAACTT GCTGGGCTGA GGGTTTGAGT ATGTCTGGTC CAGATGCGAC
 1001 CCAACAATGC TGCACCTGTA TCTGTCTGAC TGCTTGATG GACTGAATCC
 1051 CATCTGCCTG CTCTGCCTCT ATCCATAAAC TGCATCTCCC CACCACCAAG
 1101 CCCACATCCA TCTGTCTGTC CGTGTCTGCCT GAGCCAGGCG GGCTGTTTCTG
 1151 CCCATCAGAT GTCTGTCTGT CCTGCTGGAC CTGCTGCCTG AAGCCCGTCT
 1201 GTTCCCAACG TCTGTCTGTC CTTCTGCTGC ATGTCCCGCT GATAGTGCCA
 1251 ATGGGATCCT GAGCCACAT CTGTCCATCT GTCCCCACAG CCACGACCTG
 1301 GTCCACCTTC ACCCATGTCA CCTCTTTTTT CCAAGCCACA GACTGTGCC
 1351 ATGAGGCAAA AAAGCCCAA GTCCCATCCA TCTGCCCCCC CAGCCAAAGG
 1401 GCACCCCTG GGGACCACC CACCTTCCA GCCCCCCC CTGTGCAAAA
 1451 AAAAACCCTT CCAGCCCCAC CCTGTTTTGG CACAAAGTAC CCAACATTCT
 1501 TCAACCGTAG GGCAGGATCC GGCCACACTA CACCATGGAC AGCTGCAGGG
 1551 TGCCCAAGGC CATACTGACC TATGCCTGGC TGGAGCTGCT GTCACCTGGG
 1601 GCCTGGCTGA GCCCCTTAC TGCACACCGT CACCCCCC AATAAACGTT
 1651 GTTGAGCAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
 1701 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

```

1
Human MMLNSDTMEL DLPPTHSETE SGFSDCGGGA GPDGAGPGGP GGGQARGPEP
Mouse MMLNSDTMEL DLPPTHSETE SGFSDCGGGP GPDGAGSGDP GVVQVRSSEL
Chick .MLNSEQTEL DLPPAHSEPE SVFSDCGRVG GAEESGVA.. LCPQPRGAEQ

51 basic Helix1 100
Human GEPGRKDLQH LSREERRRRR RATAKYRTAH ATRERIRVEA FNLAFAELRK
Mouse GESGRKDLQH LSREERRRRR RATAKYRTAH ATRERIRVEA FNLAFAELRK
Chick AEA VKKDLQH LSREERRRRR RATAKYRTAH ATRERIRVEA FNMAFAELRK

101 Loop Helix2 133
Human LLPTLPPDKK LSKIEILRLA ICYISYLNHV LDV
Mouse LLPTLPPDKK LSKIEILRLA ICYISYLNHV LDV
Chick LLPTLPPDKK LSKIEILRLA ICYISYLNHV LDV

```

Εικόνα 14: Σύγκριση μεταξύ των πρωτεϊνών NSCL1 του ανθρώπου, του ποντικού και της όρνιθας. Οι πρωτεΐνες NSCL1 του ανθρώπου και του ποντικού αποτελούνται από 133 αμινοξέα, ενώ της όρνιθας από 130. Στην περιοχή bHLH διαφέρουν μόνο κατά ένα αμινοξύ, έχοντας ποσοστό ομολογίας 98%.

	Human NSCL1	Mouse NSCL1
Chick NSCL1	84.5	83.2
Chick NSCL1 bHLH	98	98

Πίνακας 4: Ποσοστά ομολογίας των πρωτεϊνών NSCL1 της όρνιθας σε σχέση με την αντίστοιχη πρωτεΐνη του ανθρώπου και του ποντικού.

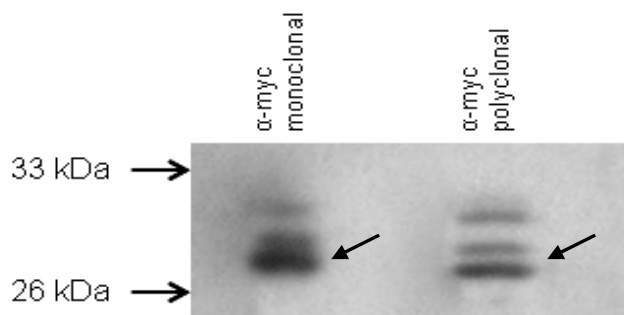
3.2. Κλωνοποίηση του *cNsc11* σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης

Προκειμένου να εκφράσουμε και να απομονώσουμε την πρωτεΐνη cNSCL1 σε βακτηριακά κύτταρα, κλωνοποιήσαμε την κωδική περιοχή του γονιδίου *cNsc11* στον πλασμιδιακό βακτηριακό φορέα έκφρασης pRSET A, και δημιουργήσαμε την

πλασμιδιακή κατασκευή cNsc11 - pRSET A. Στη συνέχεια έγινε μετασηματισμός (Transformation) στο στέλεχος E. coli BL21 (DE3) pLysS με το πλασμίδιο cNsc11-pRSET A, εμβολιασμός καλλιέργειών μεγάλης κλίμακας και επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης μας με τη χρήση ισοπρόπυλο-β-D-θειογαλακτοσιδίου (IPTG). Δυστυχώς όσες προσπάθειες κι αν έγιναν απέτυχαν. Μετά από αλλεπάλληλες προσπάθειες και τροποποιήσεις προτεινομένων πρωτοκόλλων καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη μας είναι ιδιαίτερος τοξική για τα βακτήρια E. coli BL21 (DE3) pLysS.

Την ίδια τύχη είχε και η μετέπειτα προσπάθεια κλωνοποίησης του *cNsc11* στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T-1, από όπου θα παίρναμε την πρωτεΐνη μας σε χιμαιρική μορφή με την πρωτεΐνη GST.

Μετά την αποτυχία της κλωνοποίησης σε βακτηριακούς φορείς έκφρασης αποφασίσαμε να γίνει προσπάθεια κλωνοποίησης στον ευκαρυωτικό φορέα έκφρασης pcDNA3, στον οποίο επιπρόσθετα είχαν κλωνοποιηθεί τρία αντίγραφα της πρωτεΐνης – επιτόπου myc (3cmyc-pcDNA3, προσφορά του Δρ. Α. Μουστάκα). Με αυτό τον τρόπο θα ήταν δυνατή η ανίχνευση της χιμαιρικής πρωτεΐνης 3cmyc - cNSCL1, που θα παραγόταν, με τη χρήση ειδικού anti-myc αντισώματος, που ήταν στη διάθεσή μας. Πράγματι το πλασμίδιο 3cmyc-cNsc11-pcDNA3 κατασκευάστηκε με σχετική ευκολία, χρησιμοποιήθηκε για διαμόλυνση κυττάρων HEK 293T και απομονώθηκαν τα κυτταρικά εκχυλίσματα, στα οποία έγινε ανάλυση κατά Western με τη χρήση μονοκλωνικού και πολυκλωνικού αντισώματος α-myc (Εικόνα 15). Όπως φαίνεται και στην εικόνα 15, η κινητικότητα της χιμαιρικής πρωτεΐνης 3cmyc - cNSCL1 δεν αντιστοιχεί απόλυτα στο προβλεπόμενο Μοριακό Βάρος, το οποίο υπολογίζεται περίπου σε 20 kDa. Υστέρηση στην κινητικότητα παρατηρείται και στην πρωτεΐνη mNSCL1 του ποντικού, η οποία αποδίδεται τόσο στη στερεοδιάταξή της, όσο και στη φωσφορυλίωση της σε κατάλοιπα σερίνης (Brown and Baer, 1994).

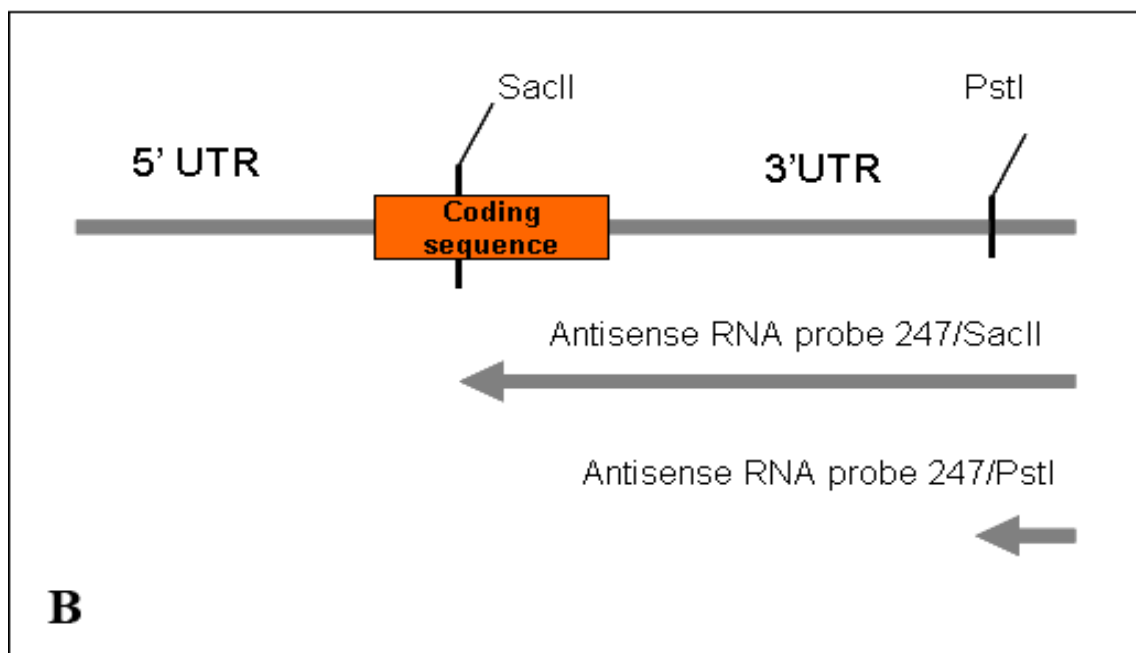
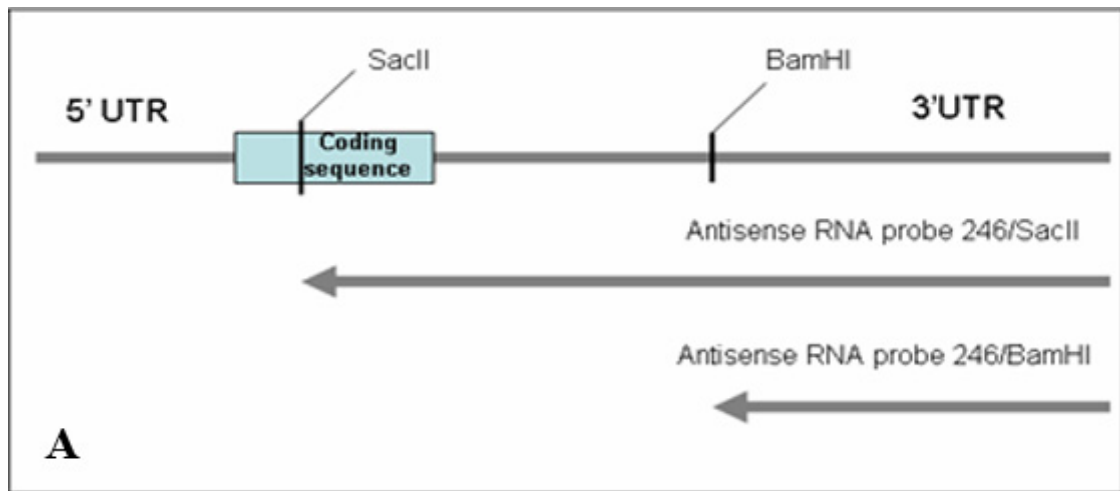


Εικόνα 15: Ανάλυση κατά Western σε κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα HEK 293T, τα οποία έχουν διαμολυνθεί με το πλασμίδιο 3cmyc-cNsc11-pcDNA3. Ως πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε, τόσο μονοκλωνικό, όσο και πολυκλωνικό αντίσωμα α-myc, το οποίο αναγνωρίζει την πρωτεΐνη – επίτοπο myc, η οποία εκφραζόταν σε σύντηξη με την πρωτεΐνη chick NSCL1.

3.3. Δημιουργία σημασμένων antisense RNA ανιχνευτών για την ανίχνευση του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *cNsc11* στο αναπτυσσόμενο έμβρυο όρνιθας

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της *in situ* υβριδοποίησης (HIS) κατασκευάστηκαν αρχικά, και χρησιμοποιήθηκαν διερευνητικά, τέσσερις ανιχνευτές από antisense mRNA. Αυτοί ήταν οι 246/BamHI, 246/SacII, 247/PstI και 247/SacII, οι οποίοι διακρίνονται στην εικόνα 16. Ύστερα από τα πρώτα πειράματα που έγιναν με αυτούς αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε για την συνέχιση των πειραμάτων μόνο τον ανιχνευτή 246/SacII. Ο antisense mRNA ανιχνευτής 246/SacII που χρησιμοποιήθηκε προέρχεται από τμήμα cDNA μεγέθους περίπου 1800 νουκλεοτιδίων, όπου περιέχεται όλη η 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή και σχεδόν όλη η κωδικοποιός περιοχή του γονιδίου, όπως φαίνεται και στην εικόνα 16. Η επιλογή του συγκεκριμένου ανιχνευτή έγινε διότι παρατηρήσαμε ότι δίδει έντονη ειδική χρώση πολύ γρηγορότερα σε σχέση με τους άλλους τρεις, παρόλο που τελικά το πρότυπο έκφρασης είναι τελείως όμοιο.

Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας (negative control) ανιχνευτής από νοηματικό (sense) mRNA, κατασκευασμένος παράλληλα και με τις ίδιες συνθήκες, όπως και οι antisense RNA ανιχνευτές. Σε καμία περίπτωση δε διαπιστώσαμε την ύπαρξη μη αναμενόμενου σήματος.



Εικόνα 16: Απεικόνιση των antisense RNA ανιχνευτών που σχεδιάστηκαν για τα πειράματα της *in situ* υβριδοποίησης. **A:** Οι ανιχνευτές 246/BamHI και 246/SacII, προήλθαν από το cDNA του κλώνου #246, **B:** οι ανιχνευτές 247/PstI και 247/SacII προέκυψαν από το cDNA του κλώνου #247. Μετά τα πρώτα διερευνητικά πειράματα, ο ανιχνευτής 246/SacII ήταν αυτός που χρησιμοποιήθηκε κατά κύριο λόγο.

Η έκφραση του *cNscII* παρατηρήθηκε αποκλειστικά σε συγκεκριμένες δομές του νευρικού συστήματος και ειδικότερα στα κρανιακά γάγγλια, στα αισθητικά γάγγλια, στο νευροεπιθήλιο της παρεγκεφαλίδας, στο διεγκέφαλο, στον οπίσθιο εγκέφαλο, στο

ραχιαίο και νωτιαίο τμήμα του νευρικού σωλήνα, στα ρομβομερή καθώς και στα όρια των ρομβομερών.

Παράλληλα με τον ανιχνευτή 246/Sac II έγιναν και πειράματα για την ανίχνευση της έκφρασης της *axonin*, στα ίδια ή σε ίδιου αναπτυξιακού σταδίου έμβρυα, για συγκριτικούς λόγους. Όπως έχουμε προαναφέρει η *axonin* εκφράζεται μόνο σε μεταμιτωτικούς νευρώνες, όπως τα νωτιαία αισθητικά γάγγλια, η παρεγκεφαλίδα και η γέφυρα. Όπως παρατηρήσαμε υπάρχει ένα παρόμοιο πρότυπο έκφρασης σε αρκετές δομές του νευρικού συστήματος (παρεγκεφαλίδα, νωτιαίος μυελός, οπίσθιος εγκέφαλος κ.α.), όμως υπάρχουν και αξιοσημείωτες διαφορές. Η έκφραση του *cNscII* στα όρια των ρομβομερών δεν είχε μέχρι τώρα αναφερθεί στον άνθρωπο και τον ποντικό όπου έχουν γίνει αντίστοιχα πειράματα και χρειάζεται παραπέρα διερεύνηση καθώς έχουν βρεθεί ελάχιστοι μεταγραφικοί παράγοντες που εκφράζονται στις περιοχές αυτές.

3.4. Πρότυπο έκφρασης του *cNscII* στην όρνιθα

3.4.1. Γενικά

Από τις μέχρι τώρα εργασίες που αναφέρονταν στο γονίδιο *NscII* στον άνθρωπο και στον ποντικό είχαμε κάποιες κατ' αρχήν πληροφορίες σχετικά με το πρότυπο έκφρασής του και πιθανές ενδείξεις για τον φυσιολογικό του ρόλο (Lipkowitz et al, 1992; Gobel et al, 1992). Από τα αποτελέσματα της δικής μας εργασίας συμπεραίνουμε ότι όντως υπάρχει μία πολύ εξειδικευμένη έκφραση στο νευρικό σύστημα σε πρώιμα στάδια ανάπτυξης η οποία αρχίζει να φαίνεται περί τη δεύτερη εμβρυική ημέρα (στάδιο HH 10+) στο ραχιαίο τμήμα του νευρικού σωλήνα και στη συνέχεια εντείνεται και επεκτείνεται και σε άλλες δομές, όπως: κρνιακά γάγγλια, αισθητικά γάγγλια, ιππόκαμπο, υποθάλαμο, οπίσθιο εγκέφαλο, ρομβομερή και όρια ρομβομερών, διεγκέφαλο, νωτιαίο μυελό, και παρεγκεφαλίδα. Συγκριτικά με το πρότυπο έκφρασης του chick *NscII* και του μορίου συνάφειας *axonin* παρατηρούμε αξιοσημείωτες ομοιότητες αλλά και εμφανείς διαφορές σε πολλές δομές, όπως στην παρεγκεφαλίδα, νωτιαίο μυελό και οπίσθιο εγκέφαλο. Οι διαφορές που μπορούμε να διαπιστώσουμε αφορούν υποομάδες κυτταρικών τύπων των παραπάνω νευρικών δομών που σαφέστατα κάνουν διακριτά τα δύο πρότυπα έκφρασης ελαχιστοποιώντας την πιθανότητα η έκφραση της *axonin* να εξαρτάται άμεσα από την έκφραση του

cNscII. Η έκφραση του *cNscII* στα ρομβομερή και στα όρια των ρομβομερών ενδεικνύει τον πιθανό του ρόλο στον καθορισμό της ταυτότητας των ρομβομερών και του οπίσθιου εγκεφάλου, τα οποία με τη σειρά τους έχουν σχέση με την οργάνωση, τόσο των επιμέρους κινητικών πυρήνων του εγκεφαλικού στελέχους κατά τμήματα, όσο και μη νευρικών ιστών στην περιφέρεια του σώματος

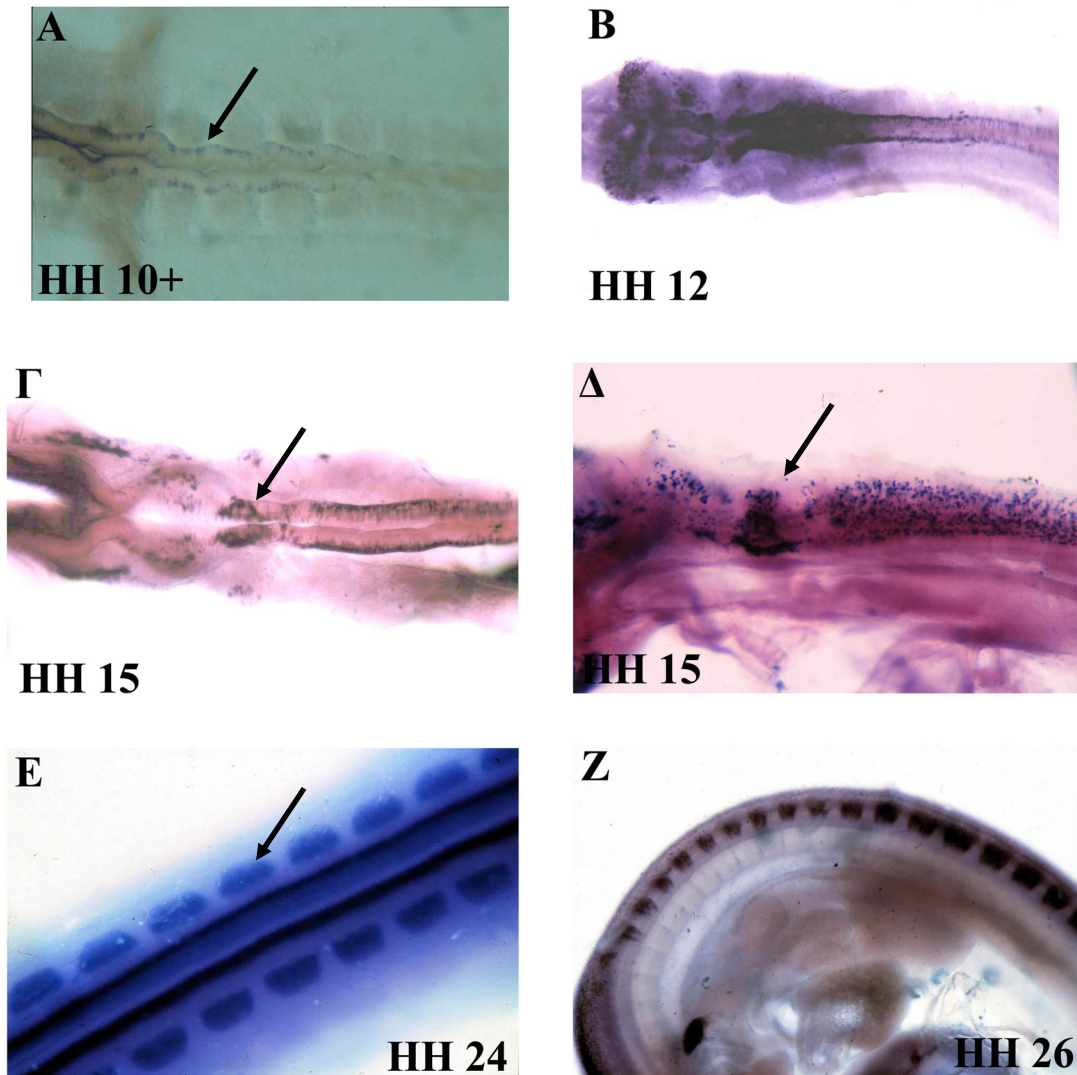
3.4.2. Έκφραση του chick *NscII* στο νευρικό σωλήνα

Προκειμένου να διαπιστώσουμε τη χρονική περίοδο κατά την οποία αρχίζει η έκφραση του *cNscII* προχωρήσαμε σε πειράματα *in situ* υβριδοποίησης σε ολόκληρα έμβρυα όρνιθας (whole mount hybridization) και στη συνέχεια σε τομές μικροτόμου δόνησης και κρυοτόμου.

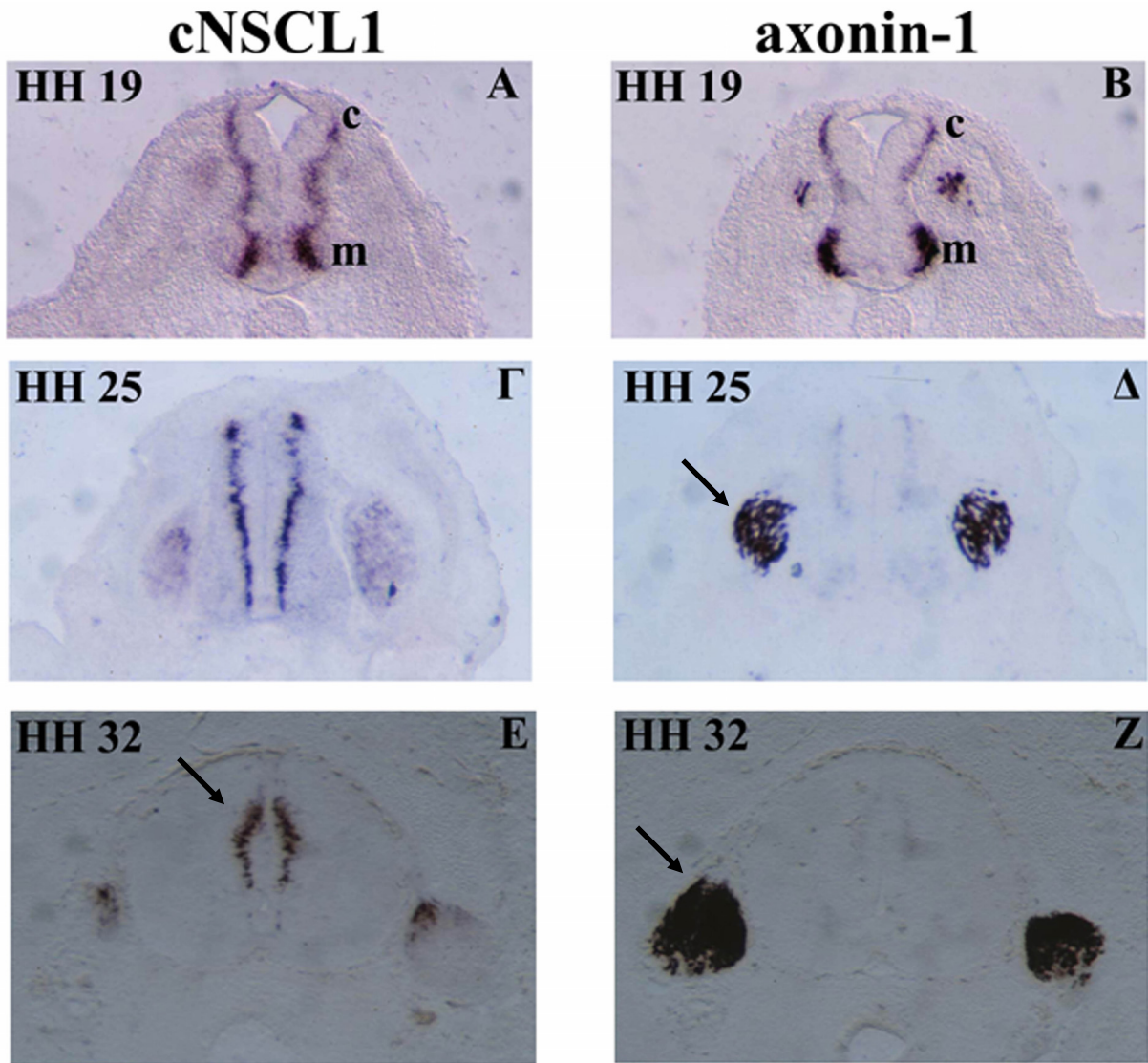
Για τα whole mount πειράματα χρησιμοποιήσαμε έμβρυα τα οποία κάλυπταν τα αναπτυξιακά στάδια HH 8 έως και HH 26. Με τα πειράματα αυτά διαπιστώσαμε ότι η έναρξη της έκφρασης του *cNscII* συμπίπτει με το αναπτυξιακό στάδιο HH 10+ και εντοπίζεται σε κύτταρα που βρίσκονται στο πλάγιο ραχιαίο τμήμα του νευρικού σωλήνα (Εικόνα 17, Α). Προχωρώντας σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια η έκφραση επεκτείνεται και προχωράει με προσθιοπίσθια κατεύθυνση, όπως και η ωρίμανση του νευρικού σωλήνα. Κατά το στάδιο HH 24 έχει επεκταθεί σε όλο το μήκος του νευρικού σωλήνα, όπως και στα αισθητικά γάγγλια (DRGs – Dorsal Root Gagglia ή αισθητικά γάγγλια ραχιαίων ριζών), ενώ μετά από αυτό το στάδιο αρχίζει να φθίνει.

Με την ολοκλήρωση των πρώτων whole mount πειραμάτων, προχωρήσαμε σε πειράματα *in situ* υβριδοποίησης σε τομές μικροτόμου δόνησης και κρυοτόμου, προκειμένου να έχουμε λεπτομερέστερη εικόνα του προτύπου έκφρασης του *cNscII*. Παράλληλα με τα πειράματα *in situ* υβριδοποίησης για το γονίδιο *cNscII* πραγματοποιήσαμε αντίστοιχα πειράματα για το γονίδιο *axonin-1*. Σκοπός μας ήταν να έχουμε μια πρώτη εικόνα για την πιθανότητα συνεντοπισμού της έκφρασης των δυο αυτών γονιδίων και κατ' επέκταση μια πρώτη ένδειξη για πιθανή σχέση τους. Πράγματι, από τα πρώτα αποτελέσματα διαπιστώσαμε ότι τόσο το *cNscII* όσο και η *axonin-1* εκφράζονται σε συνδεδεσικούς και κινητικούς νευρώνες του νευρικού σωλήνα, όμως δεν υπάρχει αλληλεπικάλυψη του προτύπου έκφρασης τους. Από το πρότυπο έκφρασής τους προκύπτει ότι εκφράζονται σε διαφορετικές υποομάδες κινητικών και συνδεδεσικών νευρώνων (Εικόνα 18). Από τα πειράματα αυτά φάνηκε, επίσης, ότι παρόλο που και τα δυο αυτά γονίδια εκφράζονται στα αισθητικά γάγγλια

των ραχιαίων ριζών (DRGs), η έκφρασή τους δε συμπίπτει χρονικά. Επίσης πρέπει να αναφέρουμε ότι η έκφραση του *cNsc11* στο νωτιαίο μυελό, σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια που μελετήσαμε, περιορίζεται σε υποομάδες πρόδρομων μεταμιτωτικών συνδεσμικών ή κινητικών νευρώνων (Εικόνα 18, Α,Γ,Ε)



Εικόνα 17: Η έναρξη της έκφρασης του chick *Nsc11* παρατηρείται στο νευρικό σωλήνα κατά το εμβρυϊκό στάδιο HH 10+ (Α), δίδοντας στικτή χρώση σε μεμονωμένα κύτταρα ή ομάδες κυττάρων που εντοπίζονται μόνο στο πλάγιο ραχιαίο τμήμα του νευρικού σωλήνα, ενώ στο στάδιο HH 12 η έκφρασή του έχει πλέον επεκταθεί στο μεγαλύτερο τμήμα του νευρικού σωλήνα. Στο στάδιο HH 15 (Γ: ραχιαία όψη, Δ: πλάγια όψη), φαίνεται η πολύ έντονη έκφρασή του στο r4 (τέταρτο ρομβομερές). Στα στάδια HH 24 (Ε) και HH 26 (Ζ) η έκφρασή του έχει επεκταθεί σε όλο το μήκος του νευρικού σωλήνα και στα νωτιαία αισθητικά γάγγλια (Ε, βέλος).



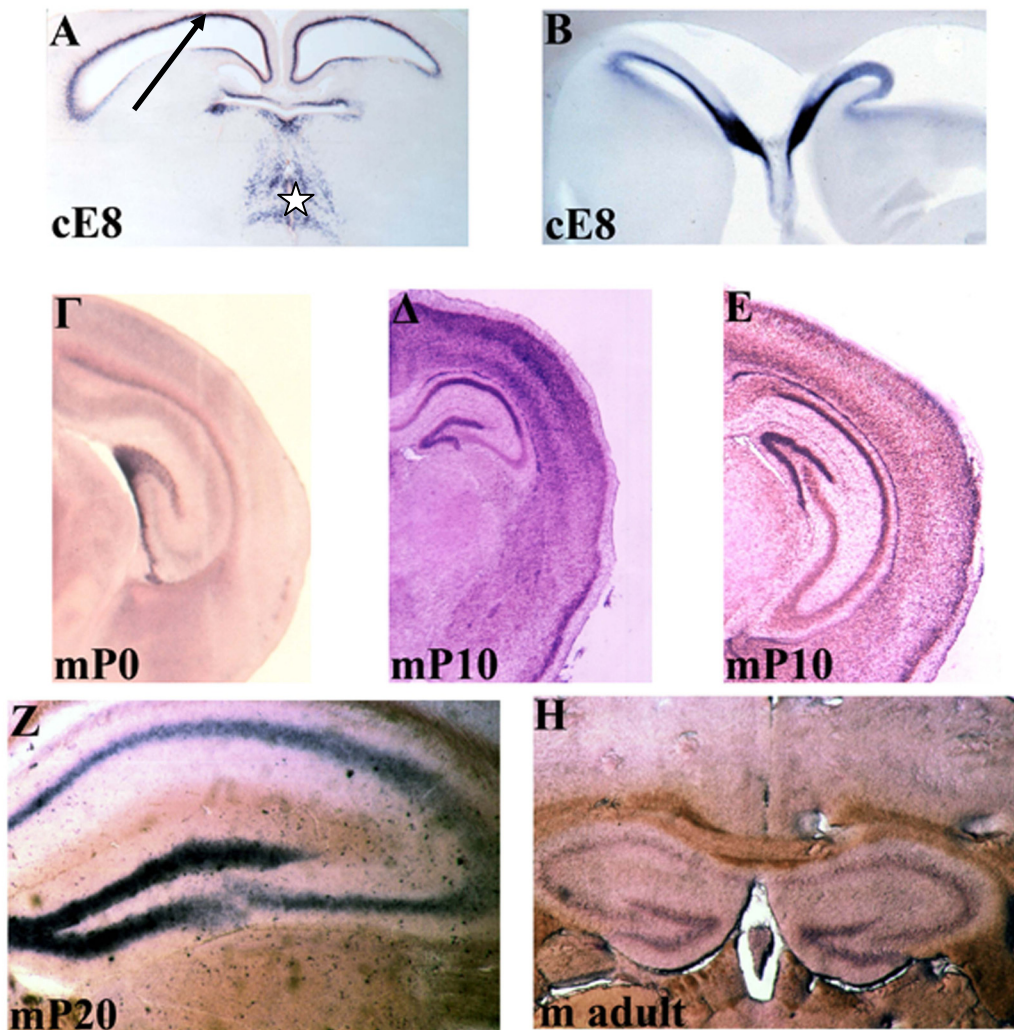
Εικόνα 18 : Έκφραση του *cNsccl* σε σύγκριση με την έκφραση της *axonin-1* στον αναπτυσσόμενο νωτιαίο μυελό κατά τα εμβρυϊκά στάδια HH 19, HH 25 και HH 32. Όλες οι φωτογραφίες απεικονίζουν εγκάρσιες τομές, οι οποίες έχουν υβριδοποιηθεί με antisense RNA ανιχνευτή για το *cNsccl* (A,Γ,E) και για την *axonin-1* (B,Δ,Z). Στο στάδιο HH 19 παρατηρούμε εκτενή έκφραση του *cNsccl* (A) και της *axonin-1* (B) σε προγονικούς συνδεσμικούς (c) και κινητικούς νευρώνες (m). Η έκφραση όμως της *axonin-1* εντοπίζεται σε διαφορετικούς υποπληθυσμούς κυττάρων που κατέχουν πιο πλάγια θέση Στο στάδιο HH 25 η έκφραση του *cNsccl* εντοπίζεται σε μεταμιτωτικούς νευρώνες στην υποεπενδυματική στοιβάδα (subventricular). Σ' αυτό το στάδιο η έκφραση της *axonin-1* είναι πολύ ασθενής στο νωτιαίο μυελό, ενώ υπάρχει πολύ έντονη έκφραση στα αισθητικά γάγγλια (Δ, βέλος). Στο στάδιο HH 32 η έκφραση του *cNsccl* περιορίζεται σε ένα υποπληθυσμό της βλαστικής στοιβάδας στο ραχιαίο τμήμα του νωτιαίου μυελού (E, βέλος), ενώ στο ίδιο στάδιο η έκφραση της *axonin-1* έχει γίνει πολύ πιο ισχυρή στα αισθητικά γάγγλια (Z, βέλος).

3.4.3. Έκφραση του chick *Nsc11* και mouse *Nsc11* στον εγκέφαλο (ιππόκαμπος, υποθάλαμος, φλοιός εγκεφαλικών ημισφαιρίων)

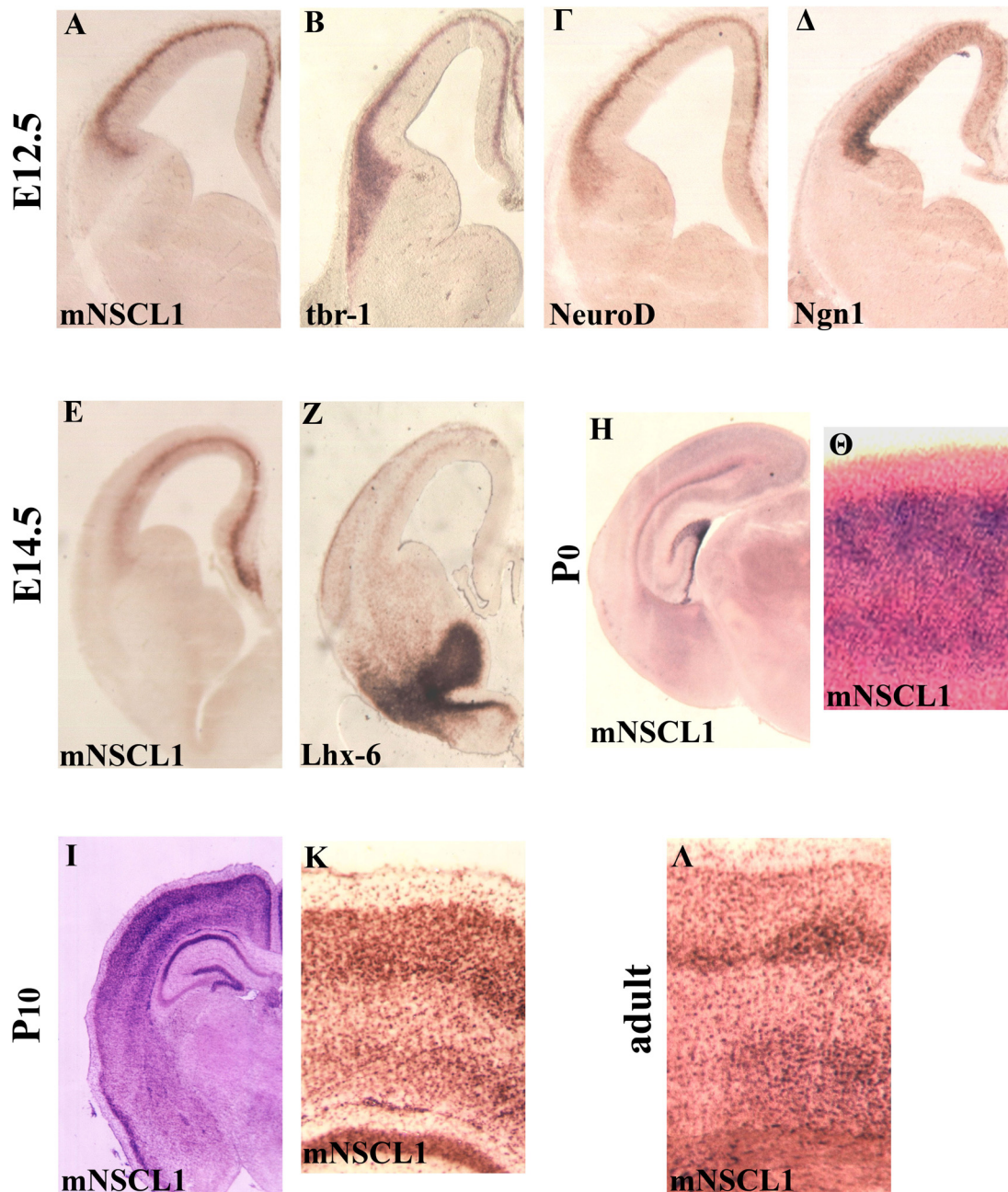
Για να διαπιστώσουμε την έκφραση του chick *Nsc11* σε συγκεκριμένες δομές του εγκεφάλου προχωρήσαμε σε πειράματα in situ υβριδοποίησης σε εγκάρσιες τομές μικροτόμου δόνησης από εγκεφάλους εμβρύων όρνιθας που κάλυπταν τα εμβρυικά αναπτυξιακά στάδια HH8 (τέσσερα ζεύγη σωματιών) έως HH36 (δέκατη εμβρυική ημέρα). Τα ισχυρότερα επίπεδα έκφρασης τα παρατηρήσαμε κατά την όγδοη εμβρυϊκή ημέρα (Εικόνα 19). Συγκεκριμένα κατά την E8 το *cNsc11* είδαμε να εκφράζεται στην υποβλαστική στοιβάδα της οπτικής καλύπτρας, στον υποθάλαμο και στο μέσο και κοιλιακό ιππόκαμπο.

Προκειμένου να διερευνήσουμε το βαθμό συντήρησης στο πρότυπο έκφρασης του *Nsc11* μεταξύ διαφορετικών οργανισμών, προχωρήσαμε σε πειράματα in situ υβριδοποίησης σε εγκάρσιες τομές κρυστόμου από εγκεφάλους εμβρύων ποντικών, αλλά και πρώιμων μεταγεννητικών σταδίων καθώς και ενήλικων ζώων. Η χρήση του ποντικού ως πειραματόζωου, που χρησιμοποιείται παράλληλα και συμπληρωματικά με την όρνιθα, παρέχει το πλεονέκτημα ότι υπάρχει πολύ περισσότερη γνώση σχετικά με την ανάπτυξη, την ανατομία, την ιστολογία και τη χρήση γνωστών γονιδίων – δεικτών που εκφράζονται σε συγκεκριμένες περιοχές – ομάδες κυττάρων. Όπως προέκυψε μετά από σύγκριση της έκφρασης του *mNsc11* με αυτή του *tbr-1* και του *neuroD*, που εκφράζονται σε ανώριμους μεταμιτωτικούς πυραμιδικούς νευρώνες της προφλοιϊκής πλάκας (Bulfone et al, 1995; Henver et al, 2006) και του *Ngn1* που εκφράζεται στην κοιλιακή (μιτωτική) ζώνη (Lee, 1997; Guillemot, 1999) (Εικόνα 20) φαίνεται ότι το mRNA του *mNsc11* εμφανίζεται έντονα κατά το εμβρυϊκό στάδιο E12.5 στην προφλοιϊκή πλάκα (PPL, Plexiform Primordium Layer ή preplate zone). Λίγο αργότερα, στην ηλικία E14.5 το *mNsc11* εμφανίζεται στην υποκοιλιακή (subventricular) ζώνη, περιοχή έκφρασης του γονιδίου *Lhx-6* το οποίο εκφράζεται από τους ενδονευρώνες του φλοιού από την αρχή της διαφοροποίησής τους, κατά την οριζόντια μετανάστευσή τους, αλλά και μετεμβρυϊκά (Lavdas et al, 1999), (Εικόνα 20).

Η έκφραση του *mNsc11* συνεχίζεται και σε μετέπειτα αναπτυξιακά στάδια καθώς και στον ενήλικα ποντικό. Στο στάδιο P0 εμφανίζεται στον αναπτυσσόμενο ιππόκαμπο και σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα στο φλοιό, στις στοιβάδες 2-5 (Εικόνα 20). Παρόμοιο πρότυπο έκφρασης αλλά με πιο έντονη και ευρύτερη χρώση στο φλοιό παρουσιάζεται στο στάδιο P10 αλλά και στον ενήλικα ποντικό.



Εικόνα 19: Έκφραση του *cNsc11* και *mNsc11* στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο. Πειράματα *in situ* υβριδοποίησης σε εγκάρσιες τομές κρουτόμου εμβρύων όρνιθας E8 (A,B), νεογέννητων ποντικών P0 (Γ), P10 (Δ - πρόσθια τομή, Ε - οπίσθια τομή), P20 (Ζ) και ενήλικου (Η). Κατά την εμβρυική ημέρα E8 το *cNsc11* εκφράζεται στην υποβλαστική στοιβάδα της οπτικής καλύπτρας (A, βέλος), στον υποθάλαμο (A, αστερίσκος) και στον μέσο και κοιλιακό ιππόκαμπο (B). Η έκφραση του *mNsc11* ακολουθεί ένα πολύ δυναμικό πρότυπο στον ιππόκαμπο ξεκινώντας από την ημέρα γέννησης (Γ), και συνεχίζοντας σε όλα τα μεταγεννητικά στάδια P10, P20 (Δ,Ε,Ζ) μέχρι και το ενήλικο ζώο (Η).

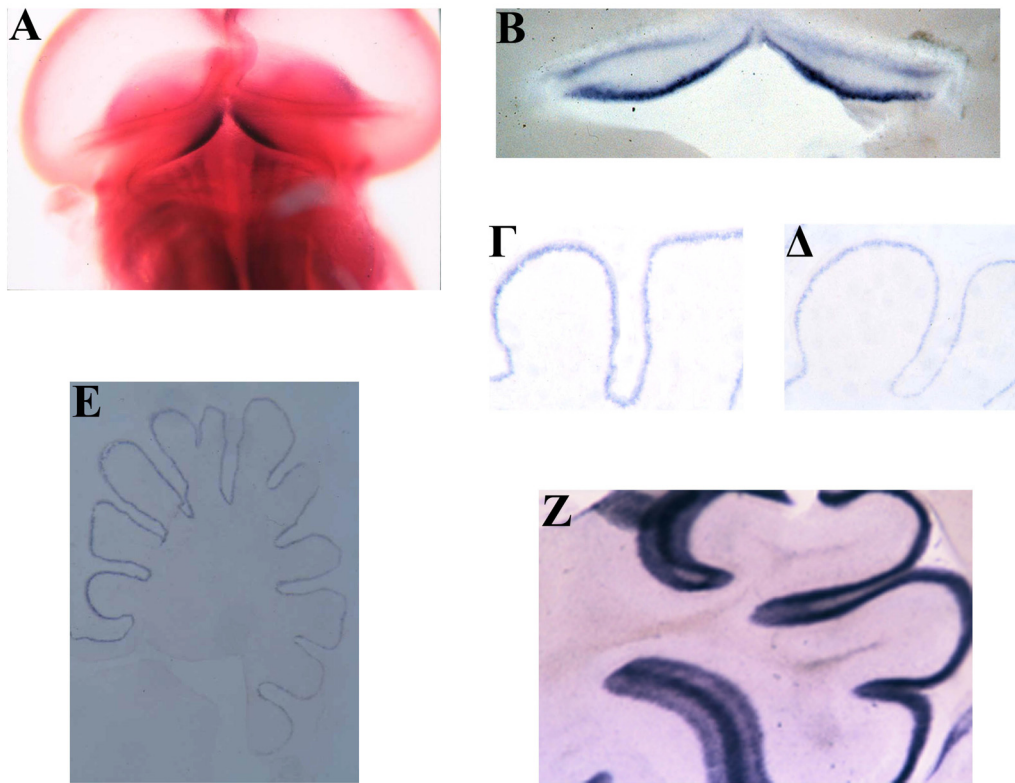


Εικόνα 20: Έκφραση του *mNscL1* στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Πειράματα *in situ* υβριδοποίησης σε εγκάρσιες τομές κρουτόμου εγκεφάλων ποντικών εμβρυϊκής ηλικίας E12.5 και E14.5, P0, P10 και ενήλικου. Το *mNscL1* εκφράζεται στο φλοιό, στην προφλοιϊκή πλάκα στο εμβρυϊκό στάδιο E12.5 (A) όπως προκύπτει από σύγκριση με την έκφραση των μορίων *tbr-1*(B), *neuroD* (Γ) και *Ngn1* (Δ). Στο στάδιο E14.5 εκφράζεται στην υποκοιλιακή (subventricular) ζώνη (E) όπου εκφράζεται και το *Lhx-6* (Z). Στο στάδιο P₀ εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στο φλοιό, στις στοιβάδες 2-5 (H, Θ). Η έκφραση του *mNscL1* στο φλοιό αυξάνεται ξανά στη μεταγεννητική περίοδο, όπως φαίνεται και στις εικόνες I, K και Λ.

3.4.4. Έκφραση του chick *NscII* στην παρεγκεφαλίδα

Την έκφραση του *cNscII* στην παρεγκεφαλίδα τη διαπιστώσαμε καταρχήν σε whole mount πειράματα in situ υβριδοποίησης, που πραγματοποιήσαμε σε έμβρυα όρνιθας διαφόρων ηλικιών. Μετά τη διαπίστωση αυτή, προχωρήσαμε σε πειράματα in situ υβριδοποίησης σε τομές μικροτόμου δόνησης και κρουτόμου, τόσο για τη διαπίστωση της έκφρασης του *cNscII*, όσο και της *axonin-1*. Παράλληλα πραγματοποιήσαμε πειράματα για την ανίχνευση του προτύπου έκφρασης του mouse *NscII* στην παρεγκεφαλίδα σε μεταγεννητικά στάδια, καθώς η ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας στον ποντικό αρχίζει κατά τα όψιμα εμβρυϊκά στάδια, συνεχίζεται και ολοκληρώνεται κατά τη μεταγεννητική περίοδο.

Έκφραση του *cNscII* εμφανίζεται κατά την πέμπτη εμβρυϊκή μέρα (E5) στην πρόδρομη μορφή της παρεγκεφαλίδας (προπαρεγκεφαλιδικό επιθήλιο), και συγκεκριμένα στο ρομβικό χείλος της παρεγκεφαλίδας, αλλά όχι στο πιο οπίσθιο μυελεγκεφαλικό ρομβικό χείλος (Εικόνα 21, A), όπως και κατά την ημέρα E8 (Εικόνα 21, B). Η έκφραση του *cNscII* στη νεοδημιουργούμενη παρεγκεφαλίδα κατά την εμβρυϊκή ημέρα E14 περιορίζεται στην εξωτερική κοκκώδη στοιβάδα (EGL, external granule layer), και προσομοιάζει πολύ με την έκφραση της *axonin-1* κατά την ίδια χρονική περίοδο (Εικόνα 21, Γ,Δ,Ε) (Dodd et al, 1988; Furley et al, 1990). Στην ίδια περιοχή (EGL) παρατηρούμε και την έκφραση του *mNscII* στη μεταγεννητική ημέρα P9 (Εικόνα 21, Z), η οποία αντιστοιχεί περίπου στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο ωρίμανσης με την παρεγκεφαλίδα της όρνιθας κατά την εμβρυϊκή ημέρα E14.

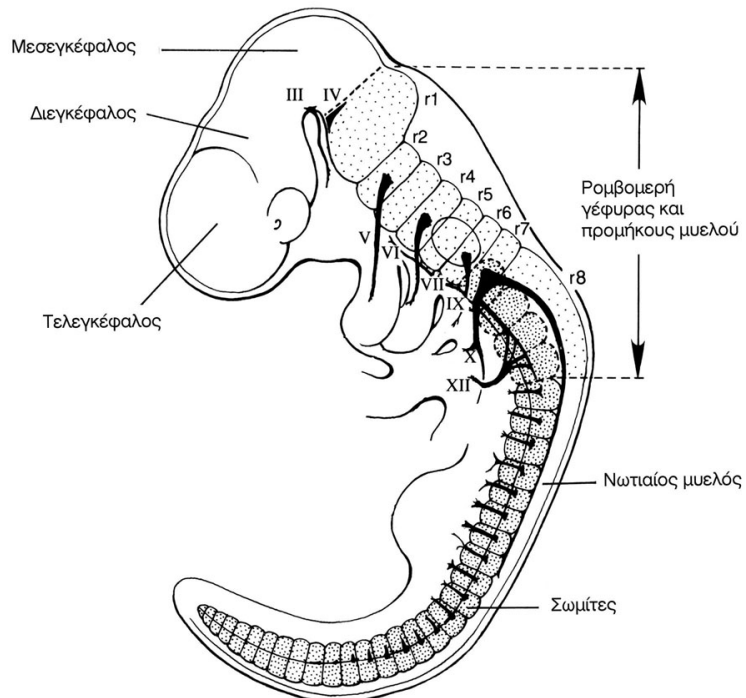


Εικόνα 21: Έκφραση του *cNsc11*, *mNsc11* και *axonin-1* στην παρεγκεφαλίδα. (A,B): Ραχιαία όψη από πειράματα whole mount in situ υβριδοποίησης σε έμβρυα όρνιθας σταδίου E5 (A) και E8 (B). Η έκφραση του *cNsc11* εντοπίζεται στο ρομβικό χείλος της πρόδρομης παρεγκεφαλίδας, ενώ εκλείπει από το πιο οπίσθιο μυελεγκεφαλικό ρομβικό χείλος. (Γ, Δ, E): Η έκφραση του *cNsc11* κατά την εμβρυϊκή ημέρα E14 (Γ, E) σε τομές κρουτόμου (Γ) και μικροτόμου δόνησης (E) περιορίζεται στην εξωτερική κοκκώδη στοιβάδα (EGL), και προσομοιάζει πολύ με το πρότυπο έκφρασης της *axonin-1* (Δ). (Z): Η έκφραση του mouse *Nsc11* σε τομή μικροτόμου δόνησης κατά τη μεταγεννητική ημέρα P9 στην εξωτερική κοκκώδη στοιβάδα (EGL) δίνει το ίδιο πρότυπο όπως το *cNsc11* στο αντίστοιχο αναπτυξιακό στάδιο ωρίμανσης της παρεγκεφαλίδας.

3.4.5. Έκφραση του chick *Nsc11* στον οπίσθιο εγκέφαλο

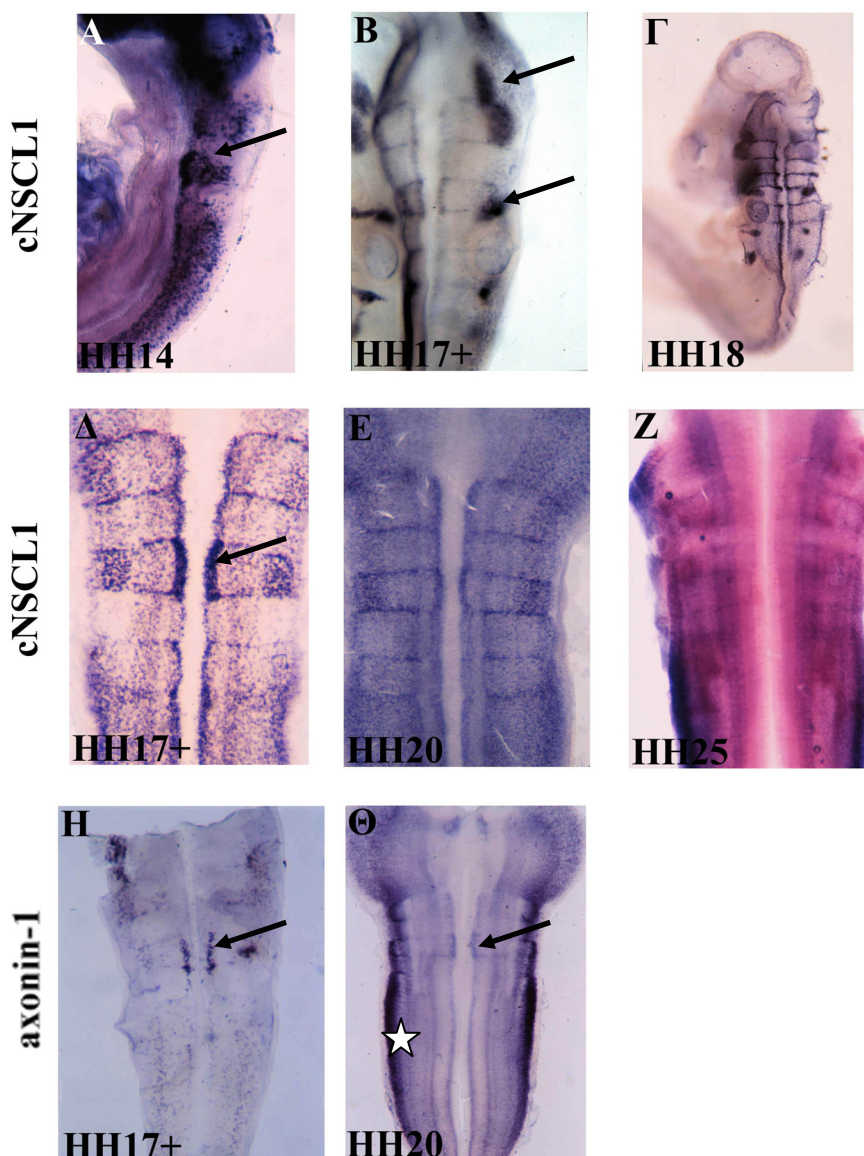
Μια από τις πιο ενδιαφέρουσες περιοχές που ανιχνεύσαμε την έκφραση του *cNsc11* είναι ο οπίσθιος εγκέφαλος (hindbrain) ή ρομβοειδής εγκέφαλος και πιο συγκεκριμένα τα ρομβομερή και τα όρια των ρομβομερών, καθώς δεν υπήρχε καμία αναφορά για την έκφρασή του σ' αυτή την περιοχή και με δεδομένο ότι πολύ λίγοι μεταγραφικοί παράγοντες έχουν ανιχνευθεί να εκφράζονται στα όρια των ρομβομερών όπως ο Pax-6 (Heyman et al, 1995) και η πρωτεΐνη με δάκτυλο ψευδαργύρου Plzf (Cook et al, 1995).

Ο ρομβοειδής εγκέφαλος είναι η περιοχή του αναπτυσσόμενου νευρικού συστήματος που περιβάλλει την 4η κοιλία. Νωρίς κατά την ανάπτυξη, στην περιοχή του ρομβοεγκεφάλου παρατηρείται διαμερισματοποίηση (segmentation) του νευροεπιθηλίου και δημιουργούνται τα λεγόμενα ρομβομερή (Εικόνα 22). Τα ρομβομερή (1 έως 8) είναι παροδικές δομές, που παρουσιάζουν συνδυαστική έκφραση Hox γονιδίων και άλλων μεταγραφικών παραγόντων, που ευθύνονται για τον καθορισμό κυτταρικής μοίρας (Lumsden and Krumlauf, 1996). Επιπλέον, τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα που ανήκουν σε καθένα από τα ρομβομερή εμφανίζουν συγκεκριμένες ιδιότητες και δίνουν καθορισμένους κυτταρικούς πληθυσμούς (Kandel et al, 1991). Η δομή του ρομβοειδούς εγκεφάλου χωρίζεται εμβρυολογικά στο μυελεγκέφαλο και στο μετεγκέφαλο. Ο μυελεγκέφαλος ωριμάζοντας δίνει τον προμήκη μυελό, ενώ από την ραχιαία περιοχή του μετεγκεφάλου δημιουργείται η παρεγκεφαλίδα και από την κοιλιακή η γέφυρα (Patten and Carlson, 1974; Altman and Bayer, 1987).



Εικόνα 22: Σχηματική απεικόνιση εμβρύου όρνιθας, όπου διακρίνονται τα διάφορα τμήματα του αναπτυσσόμενου νευρικού συστήματος.

Τα πειράματα που πραγματοποιήσαμε κάλυψαν όλα τα αναπτυξιακά στάδια του εμβρύου όρνιθας, κατά τα οποία παρατηρείται έκφραση του *cNsc11* στον οπίσθιο εγκέφαλο (HH12 έως HH25). Κατά το στάδιο HH14 (Εικόνα 23, A) παρατηρούμε ισχυρή έκφραση του *cNsc11* στο ρομβομερές 4 (r4) , ενώ ασθενέστερη έκφρασή του παρατηρούμε στο r2 και στα r6, r7 και r8. Στα επόμενα στάδια η έκφρασή του εντοπίζεται κατεξοχήν στα όρια των ρομβομερών (Εικόνα 23, B, Γ, Δ, E), στα κρνιακά γάγγλια (Εικόνα 23, B) και σε δυο επιμήκεις κοιλιακές ζώνες εκατέρωθεν και παράλληλα με το εδαφιαίο πέταλο. Η έκφραση του *cNsc11* στο r4 παραμένει ισχυρότερη σε σχέση με την έκφρασή του στα άλλα ρομβομερή, και σε αντίθεση με τα r3 και r5 όπου είναι ανύπαρκτη και ειδικά στο κοιλιακό τμήμα του r4 (Εικόνα 23, Δ), περιοχή όπου εντοπίζονται πρόδρομα κύτταρα των προσωποκινητικών νευρώνων (facial branchiomotor neurons, fbm) πριν μεταναστεύσουν (Lumsden and Keynes, 1989; Varela-Echavarría et al, 1996; Jacob and Guthrie, 2000; Studer, 2001). Η έκφραση του *cNsc11* στο όρια των ρομβομερών αρχίζει να φθίνει μετά το στάδιο HH20 και διακρίνεται με δυσκολία στο στάδιο HH25 (Εικόνα 23, Z), το οποίο αντιστοιχεί και με το τέλος της μορφολογικής υπόστασης των ρομβομερών. Για συγκριτικούς λόγους πραγματοποιήσαμε και πειράματα *in situ* υβριδοποίησης για το γονίδιο *axonin-1*, σε έμβρυα όρνιθας αντίστοιχων σταδίων. Τα πιο ενδιαφέροντα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 23, H-Θ, όπου παρατηρούμε την έκφραση του *axonin-1* στο κοιλιακό τμήμα του r4 κατά το στάδιο HH17+ (H), η οποία μειώνεται μέχρι το στάδιο HH20, στο οποίο όμως διακρίνουμε και την έκφρασή του στα όρια r3/r4 και r4/r5 (Θ). Στο στάδιο HH20 διακρίνουμε και την πολύ έντονη έκφραση του *axonin-1* κατά μήκος δυο ζωνών στο πιο πλάγιο τμήμα του οπίσθιου εγκεφάλου.

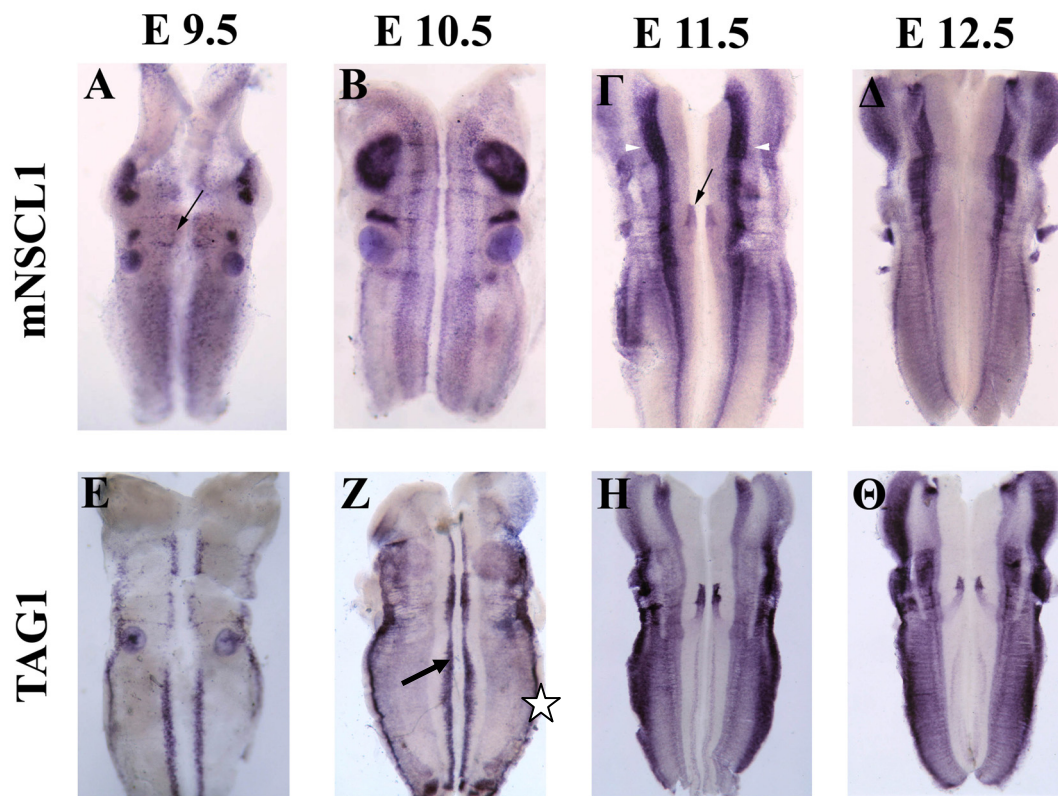


Εικόνα 23: Έκφραση του *cNsc1* και της *axonin-1* στον οπίσθιο εγκέφαλο. (A, B, Γ) Πειράματα whole mount in situ υβριδοποίησης σε έμβρυα όρνιθας σταδίου HH14 (A), HH17+ (B) και HH18 (Γ). Η έκφραση του *cNsc1* στο στάδιο HH14 είναι εντοπισμένη στο ρομβομερές 4 (A, βέλος) και λιγότερο στα r2, r6, r7 και r8. Κατά τα στάδια HH17+ και HH18 η έκφραση του *cNsc1* είναι ιδιαίτερα έντονη στα όρια των ρομβομερών (Γ) και στα κρανιακά γάγγλια (B, βέλη). Η έκφραση του *cNsc1* στα όρια των ρομβομερών και σε δυο επιμήκεις κοιλιακές ζώνες εκατέρωθεν και παράλληλα με το εδαφιαίο πέταλο (basal plate), προεξεχόντως του r4 (Δ, βέλος) και στη συνέχεια του r2, διακρίνεται εύκολα σε φωτογραφίες επιπεδοποιημένων (flat mount) εμβρύων όρνιθας σταδίων HH17+ (Δ) και HH20 (E), ενώ κατά το στάδιο HH25 (Z) η έκφραση του *cNsc1* ίσα που διακρίνεται στα όρια των ρομβομερών. Η έκφραση της *axonin-1* κατά το στάδιο HH17+ εντοπίζεται στο κοιλιακό τμήμα του r4 (H, βέλος), ενώ κατά το στάδιο HH20 παρατηρείται στα όρια r3/r4 και r4/r5 και με μεγαλύτερη πάλι ένταση στο κοιλιακό τμήμα του r4 (Θ, βέλος) και κατά μήκος δυο ζωνών στο πιο πλάγιο τμήμα του οπίσθιου εγκεφάλου (Θ, αστερίσκος).

3.5. Έκφραση του *mNsc11* και σύγκρισή του με την έκφραση του *Tag1* στον οπίσθιο εγκέφαλο του ποντικού

Θέλοντας να διερευνήσουμε το βαθμό συντήρησης του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *Nsc11* μεταξύ της όρνιθας και του ποντικού, προχωρήσαμε σε πειράματα whole mount in situ υβριδοποίησης σε έμβρυα ποντικού σταδίων E9.5, E10.5, E11.5 και E12.5. Αντίστοιχα πειράματα κάναμε και για το γονίδιο *Tag1* (ομόλογο του *axonin-1* στον ποντικό) (Dodd et al, 1988; Furley et al, 1990). Διαπιστώσαμε ότι η έκφραση του *mNsc11* αρχίζει (για την περιοχή του οπίσθιου εγκεφάλου) κατά την εμβρυϊκή ημέρα E9.5 (Εικόνα 24, Α) από το r4 και τα κρανιακά γάγγλια, ενώ κατά την E10.5 (Εικόνα 24, Β) έχει την πιο μεγάλη έκφραση στα κρανιακά γάγγλια και σε όλα τα όρια των ρομβομερών (εκτός του r7/r8). Κατά την E11.5 (Εικόνα 24, Γ) η έκφραση του *mNsc11* εντοπίζεται κατεξοχήν σε μεταναστεύοντες πρόδρομους προσωποκινητικούς νευρώνες και σε δύο επιμήκεις περιοχές στο μέσο του ραχαιοκοιλιακού άξονα. Η έκφραση στους πρόδρομους προσωποκινητικούς νευρώνες εξαφανίζεται κατά την E12.5 (Εικόνα 24, Δ), ενώ η έκφραση στις δύο επιμήκεις περιοχές παραμένει.

Η έκφραση του *mTag1* κατά την ημέρα E9.5 εντοπίζεται στο κοιλιακό τμήμα του r2, r4 και πιο οπίσθια του r6 (Εικόνα 24, Ε). Κατά την ημέρα E10.5 η έκφραση του *mTag1* έχει επεκταθεί σε δυο επιμήκεις κοιλιακές ζώνες εκατέρωθεν του εδαφιαίου πετάλου, καθώς και σε δυο ζώνες στο πιο πλάγιο (και άρα ραχιαίο) τμήμα του οπίσθιου εγκεφάλου. Κατά την ημέρα E11.5 και E12.5 (Εικόνα 24, Η-Θ), η έκφραση του *mTag1* περιορίζεται στο κοιλιακό τμήμα των r4, r5 και r6, όπου όπως είπαμε λαμβάνει χώρα η μετανάστευση των προσωποκινητικών νευρώνων.



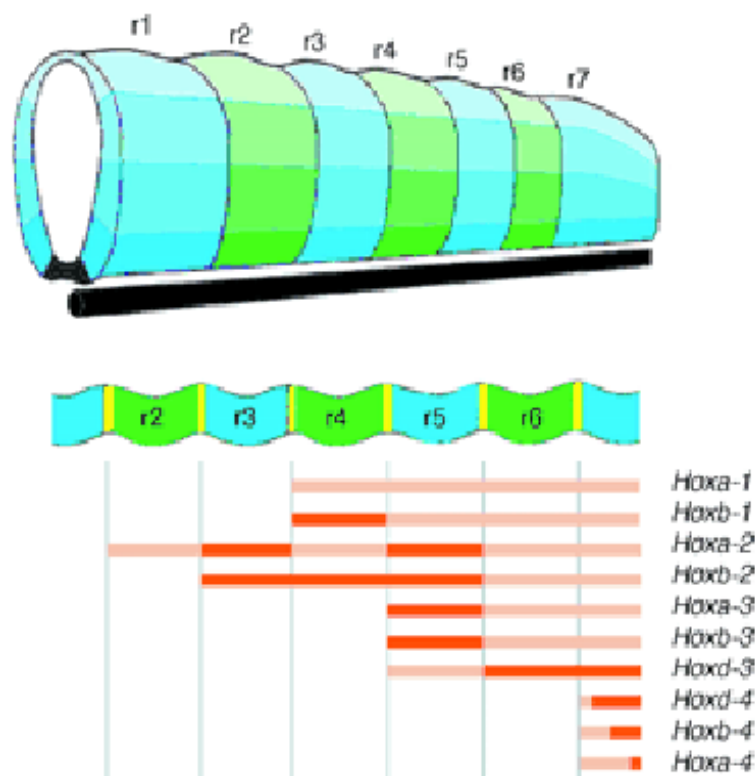
Εικόνα 24: Σύγκριση του προτύπου έκφρασης μεταξύ mouse *Nsc11* και mouse *Tag1*. Η έκφραση του *mNsc11* αρχίζει να διακρίνεται κατά την εμβρυϊκή ημέρα E9.5 στο r4, στο εδαφιαίο πέταλο και στα όρια r3/r4 και r4/r5 (A, βέλος) και τα κρανιακά γάγγλια, ενώ κατά την E10.5 (B) έχει πολύ έντονη έκφραση στα κρανιακά γάγγλια και σε όλα τα όρια των ρομβομερών (εκτός του r7/r8). Κατά την E11.5 (Γ) η έκφραση του *mNsc11* εντοπίζεται κατεξοχήν σε μεταναστεύοντες πρόδρομους προσωποκινητικούς νευρώνες (Γ, βέλος) και σε δύο παράλληλες επιμήκειες περιοχές στο μέσο του ραχιαιοκοιλιακού άξονα (Γ, ανάμεσα στους λευκούς δείκτες). Η έκφραση στους πρόδρομους προσωποκινητικούς νευρώνες δεν είναι πλέον ορατή κατά την E12.5 (Δ), ενώ η έκφραση στις δύο επιμήκειες περιοχές παραμένει.

Η έκφραση του *mTag1* κατά την ημέρα E9.5 εντοπίζεται στο κοιλιακό τμήμα των r2, r4 και πιο οπίσθια του r6 (E). Κατά την ημέρα E10.5 η έκφραση του *mTag1* έχει επεκταθεί σε δυο επιμήκειες κοιλιακές ζώνες εκατέρωθεν του εδαφιαίου πετάλου (Z, βέλος), καθώς και σε δυο ζώνες στο πιο πλάγιο τμήμα του οπίσθιου εγκεφάλου (Z, αστερίσκος), εκατέρωθεν πάλι του εδαφιαίου πετάλου. Κατά την ημέρα E11.5 και E12.5 (H-Θ), η έκφραση του *mTag1* περιορίζεται στο κοιλιακό τμήμα μεταξύ των r4 και r6, όπου λαμβάνει χώρα η μετανάστευση των προσωποκινητικών νευρώνων.

3.6. Λειτουργικός ρόλος του *Nsc1*

3.6.1. Διερεύνηση της σχέσης του *mNsc1* με τα γονίδια *Hoxb1*, *Hoxb2*, *Plzf*, *Engrailed-1*, *Pax6* και *Tag1*

Τα γονίδια *Hox* έχουν βρεθεί σε κάθε κατηγορία ζώων (μαλάκια, έντομα, σκώληκες, υδροειδή, σπονδυλωτά) έως και τον άνθρωπο, και θεωρούνται ότι σε όλες αυτές τις κατηγορίες εμπλέκονται με παρόμοια λειτουργία στη διαμόρφωση του κύριου σωματικού άξονα (καφαλο-ουραιού) και στον καθορισμό των διαφορών ανάμεσα στα κύτταρα κατά μήκος του άξονα αυτού. Οι πιο σημαντικές και ταυτόχρονα μελετημένες περιοχές έκφρασης τους είναι ο οπίσθιος εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός (McGinnis and Krumlauf, 1992; Krumlauf, 1994; Keynes and Krumlauf, 1994; Lumsden and Krumlauf, 1996; Hirth et al, 1998; Pearson et al, 2005).



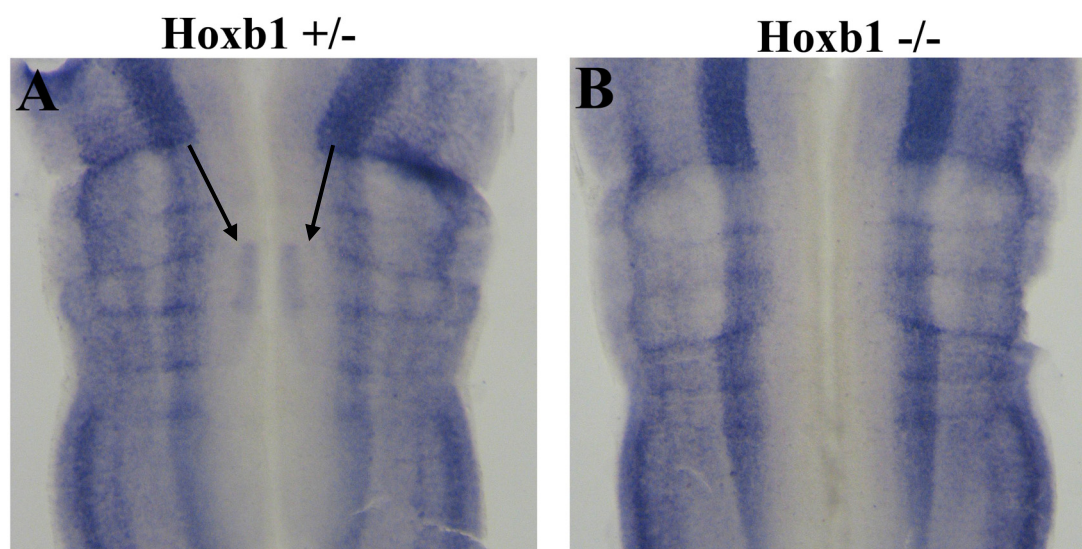
Εικόνα 25: Σχηματική παράσταση του προτύπου έκφρασης των πιο σημαντικών *Hox* γονιδίων στα ρομβομερή. Παρατηρούμε ισχυρή έκφραση του *Hoxb1* στο r4 και του *Hoxb2* στα r3, r4 και r5.

Με αφορμή την πολύ ειδική έκφραση του *Nsc1* στον οπίσθιο εγκέφαλο, στα ρομβομερή και στα όρια των ρομβομερών, αποφασίσαμε να εξετάσουμε την πιθανή σχέση του με τα γονίδια *Hoxb1*, *Hoxb2*, αλλά και τα *Plzf*, *Engrailed-1* (*En-1*), *Pax6*

και *Tag1*, τα οποία επίσης εκφράζονται στον οπίσθιο εγκέφαλο (Wurst et al, 1994; Cook et al, 1995; Goddard et al, 1996; Studer et al, 1996; Gavalas et al, 1998; Studer et al, 1998; Gaufo et al, 2000; Gavalas et al, 2003).

3.6.2. Έκφραση του *mNsc11* στον οπίσθιο εγκέφαλο σε ποντικούς με απώλεια δράσης του γονιδίου *Hoxb1*

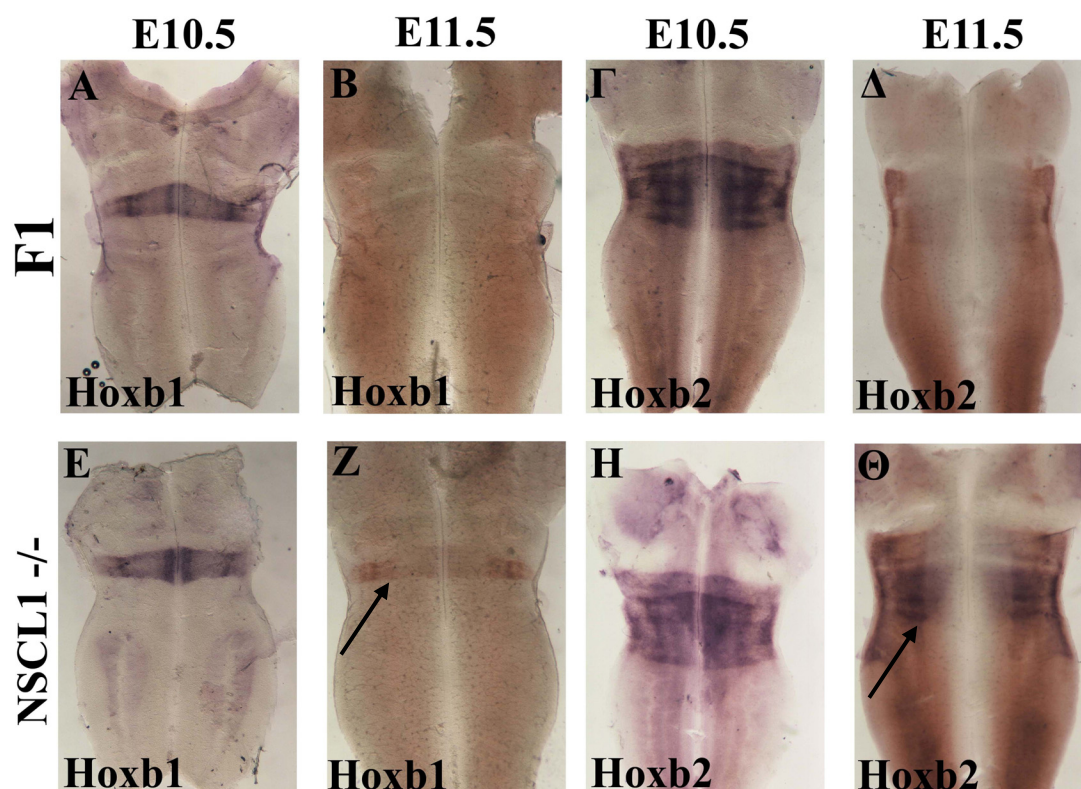
Καταρχήν εξετάσαμε την έκφραση του *mNsc11* σε έμβρυα ποντικών με απώλεια δράσης του *Hoxb1* γονιδίου (*Hoxb1*^{-/-}, προσφορά του Δρ. Α. Γαβαλά). Είναι γνωστό ότι το *Hoxb1* συμμετέχει στον καθορισμό της νευρωνικής μοίρας του τέταρτου ρομβομερούς (r4) που καθορίζει τη δημιουργία του προσωπικού κινητικού πυρήνα (Gavalas et al, 1998; Studer et al, 1998). Απαλοιφή του *Hoxb1* οδηγεί σε ανώμαλη ανάπτυξη του πυρήνα αυτού (Gavalas et al, 2003, Gaufo et al, 2000; Goddard et al, 1996; Studer et al, 1996). Δεδομένου του ότι το *Nsc11* εκφράζεται στο r4, θέλαμε να ελέγξουμε εάν βρίσκεται στο γονιδιακό μονοπάτι που ελέγχει το *Hoxb1*. Σε πειράματα whole mount in situ υβριδοποίησης που πραγματοποιήσαμε σε *Hoxb1*^{-/-} έμβρυα ποντικών E10.5 και E11.5 διαπιστώσαμε ότι παύει η έκφραση του *mNsc11* στους προσωπικινητικούς νευρώνες (fbm) που παρατηρούμε σε φυσιολογικούς και σε *Hoxb1*^{+/-} ποντικούς (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: Whole mount in situ υβριδοποίηση σε έμβρυα ποντικών E10.5, *Hoxb1*^{+/-} (A) και *Hoxb1*^{-/-} (B), με antisense *mNsc11* ανιχνευτή. Παρατηρούμε ότι η έκφραση του *mNsc11* στους προσωπικινητικούς νευρώνες στο κοιλιακό τμήμα του ρομβομερούς 4 στον *Hoxb1*^{-/-} ποντικό (B) δεν υπάρχει, σε αντίθεση με τον *Hoxb1*^{+/-} ποντικό, όπου παρατηρούμε το αναμενόμενο πρότυπο έκφρασης (A, βέλη).

3.6.3. Πρότυπο έκφρασης των *Hoxb1*, *Hoxb2*, *Plzf* και *Engrailed-1* σε φυσιολογικούς και ποντικούς με απενεργοποιημένο το γονίδιο *Nsc11* (*Nsc11*^{-/-})

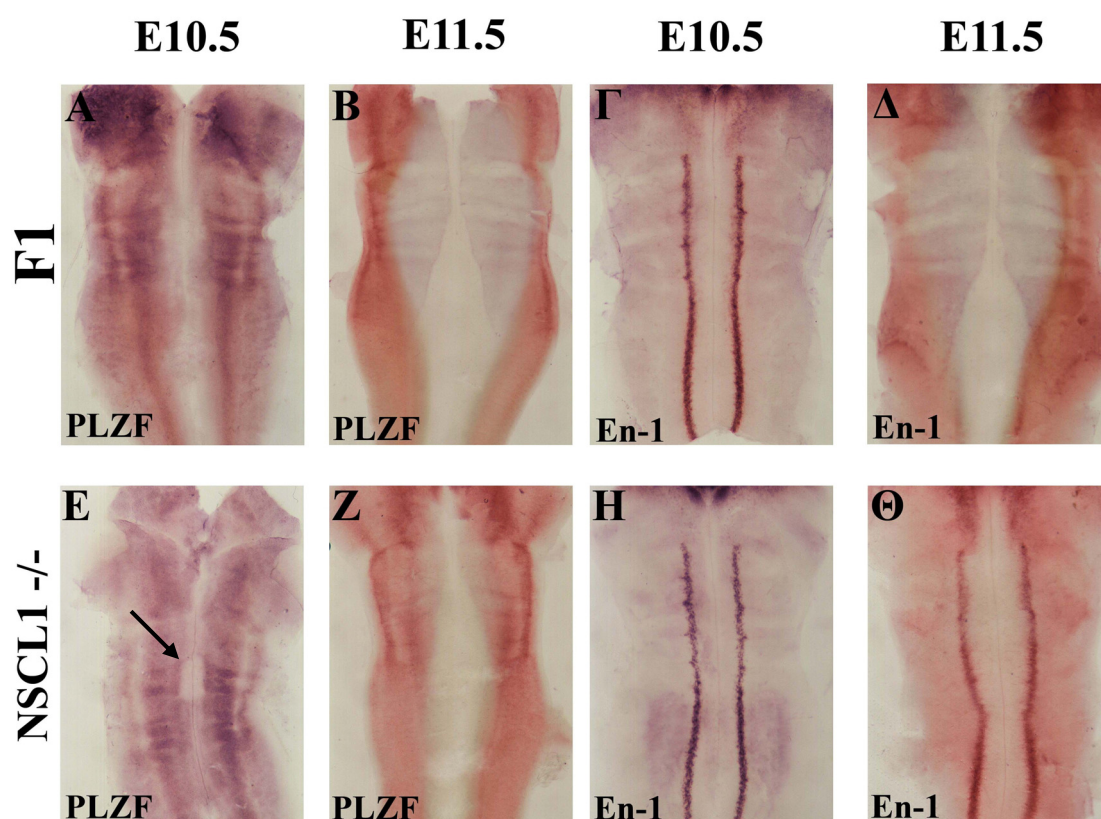
Προκειμένου να διερευνήσουμε τον πιθανό ρόλο του *Nsc11* στην έκφραση των γονιδίων *Hoxb1*, *Hoxb2*, *Plzf* και *Engrailed-1* στον οπίσθιο εγκέφαλο προχωρήσαμε σε πειράματα whole mount in situ υβριδοποίησης σε έμβρυα φυσιολογικών και *Nsc11*^{-/-} (προσφορά του Dr. Kruger M.) ποντικών εμβρυϊκής ηλικίας E10.5 και E11.5, με antisense RNA ανιχνευτές για τα γονίδια αυτά (Εικόνα 27 & 28). Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων μας έδειξαν ότι το πρότυπο έκφρασης τόσο για το *Hoxb1* όσο και για το *Hoxb2*, δεν παρουσιάζει κάποια εμφανή διαφορά κατά την εμβρυϊκή ημέρα E10.5 μεταξύ των φυσιολογικών (F1) και των *Nsc11*^{-/-} ποντικών. Κατά την εμβρυϊκή ημέρα όμως E11.5 και για τα δυο αυτά γονίδια παρατηρούμε ότι η έκφρασή τους διατηρείται σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στους *Nsc11*^{-/-} ποντικούς σε σχέση με τους φυσιολογικούς.



Εικόνα 27: Whole mount in situ υβριδοποίηση για τα *Hoxb1* και *Hoxb2* γονίδια. Κατά την ημέρα E10.5 τα επίπεδα έκφρασης του *Hoxb1* (A,E) και *Hoxb2* (Γ,Η) δεν παρουσιάζουν κάποια αξιόλογη διαφορά μεταξύ των φυσιολογικών και *Nsc11*^{-/-} ποντικών. Αντιθέτως κατά την E11.5 τα επίπεδα έκφρασης για το *Hoxb1*(Z, βέλος) και *Hoxb2* (Θ, βέλος) στους *Nsc11*^{-/-} ποντικούς διατηρούνται σε πολύ υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με αυτά των φυσιολογικών ποντικών (B,Δ).

Όσον αφορά την έκφραση του *Plzf* παρατηρούμε ότι κατά την εμβρυική ημέρα E10.5 στους *Nsc11^{-/-}* ποντικούς έχει προκληθεί πολύ ειδική και πλήρης απώλεια της έκφρασής του, στην περιοχή των προσωποκινητικών νευρώνων, κάτι το οποίο δεν συμβαίνει στους φυσιολογικούς ποντικούς. Επίσης κατά την E11.5 η έκφραση του *Plzf* στους *Nsc11^{-/-}* ποντικούς διατηρείται σε πολύ υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα φυσιολογικά ζώα, στα οποία η έκφραση του *Plzf* έχει περιοριστεί στα πιο πλάγια τμήματα του οπίσθιου εγκεφάλου. Ανάλογη αύξηση της έκφρασης παρατηρούμε και για το γονίδιο *En-1* κατά την E11.5, οπότε τα επίπεδα έκφρασης του στους *Nsc11^{-/-}* ποντικούς διατηρούνται σε πολύ υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με αυτά των φυσιολογικών ποντικών, σε δυο γραμμές παράλληλες με τη μέση γραμμή του εδαφιαίου πετάλου.

Απεναντίας δεν παρατηρήσαμε καμιά διαφορά στο πρότυπο έκφρασης του *Tag1* και του *Pax6*, μεταξύ των φυσιολογικών και των *Nsc11^{-/-}* ποντικών.



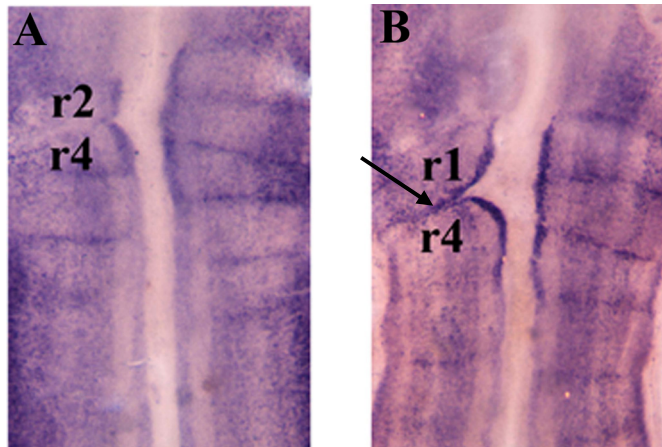
Εικόνα 28: Whole mount in situ υβριδοποίηση για τα γονίδια *Plzf* και *En-1*. Παρατηρούμε ότι κατά την ημέρα E10.5 τα επίπεδα έκφρασης του *Plzf* στους φυσιολογικούς (A) και *Nsc11^{-/-}* ποντικούς (E) δεν παρουσιάζουν κάποια εμφανή διαφορά, εκτός από την περιοχή των προσωποκινητικών νευρώνων όπου παρατηρούμε ότι στους *Nsc11^{-/-}* ποντικούς η έκφραση του *Plzf* έχει εξαφανισθεί

τελείως (E, βέλος). Αλλαγή στο πρότυπο έκφρασης του *Plzf* παρατηρούμε και κατά την ημέρα E11.5, όπου είναι σαφής η μεγαλύτερου βαθμού μείωση της έκφρασης του *Plzf* στους F1 ποντικούς (B) σε σχέση με τους *NscII*^{-/-}. Για το γονίδιο *En-1* δεν υπάρχει διαφορά στο πρότυπο έκφρασης κατά την E10.5 (Γ,Η) μεταξύ των φυσιολογικών και *NscII*^{-/-} ποντικών. Αντιθέτως κατά την E11.5 τα επίπεδα έκφρασης για το *En-1* στους *NscII*^{-/-} ποντικούς (Θ) διατηρούνται σε πολύ υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με αυτά των φυσιολογικών ποντικών (Δ), σε δυο γραμμές παράλληλες με τη μέση γραμμή του εδαφιαίου πετάλου.

3.6.4. Έκφραση του *cNscII* στα όρια των ρομβομερών που δημιουργούνται μετά από αφαίρεση δυο γειτονικών ρομβομερών

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των ρομβομερών είναι η «ομαδοποίησή» τους σε άρτια και περιττά ρομβομερή με πολλά κοινά χαρακτηριστικά, π.χ. διαφοροποιημένοι νευρώνες παρουσιάζονται πρώτα στα ρομβομερή 4, 2 και 6, ενώ στα περιττά ρομβομερή αρκετά αργότερα (Lumsden et al, 1989). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα όρια των ρομβομερών δεν επιτρέπουν τη μετακίνηση και μίξη κυττάρων από γειτονικά ρομβομερή, ενώ αν αφαιρέσουμε κάποιο(α) ρομβομερές(ή), τότε τα ρομβομερή που θα βρεθούν σε γειτονικές θέσεις «μετατρέπονται» σε ένα ενιαίο μεγάλο ρομβομερές, αν και τα δυο είναι άρτια ή περιττά, ενώ αν το ένα είναι άρτιο και το άλλο περιττό τότε δημιουργείται ένα νέο όριο μεταξύ τους (Fraser et al, 1990; Guthrie and Lumsden, 1991; Guthrie et al, 1991).

Προκειμένου να διερευνήσουμε την έκφραση και τον πιθανό ρόλο του *NscII* στις περιπτώσεις αυτές, κατά τις οποίες σχηματίζεται, μετά από μικροχειρουργική επέμβαση, ένα νέο όριο (μετά τη γειτνίαση ενός περιττού με ένα άρτιο ρομβομερές) ή ένα ενιαίο μεγάλο ρομβομερές (μετά τη «συνένωση» δυο άρτιων ή περιττών ρομβομερών), προχωρήσαμε σε πειράματα whole mount in situ υβριδοποίησης σε έμβρυα όρνιθας στα οποία είχαμε αφαιρέσει ένα ή δυο ρομβομερή. Τα αποτελέσματά μας, σε σύνολο έντεκα μικροχειρουργικών επεμβάσεων έδειξαν ότι το *cNscII* εκφράζεται στο νέο όριο το οποίο δημιουργείται μετά τη γειτνίαση ενός περιττού και ενός άρτιου ρομβομερούς, τα οποία φυσιολογικά δε γειτνιάζουν, ενώ δεν εκφράζεται κατά μήκος της ένωσης δυο ρομβομερών με την ίδια αρτιότητα (Εικόνα 29).



Εικόνα 29: Whole mount in situ υβριδοποίηση με antisense RNA ανιχνευτή για το γονίδιο *cNsc11* σε έμβρυο όρνιθας στο οποίο έχει γίνει αφαίρεση του r3 (A), και σε έμβρυο στο οποίο έχουν αφαιρεθεί τα r2 και r3 (B). Στο B διακρίνεται καθαρά η έκφραση του *cNsc11* στο όριο των r1/r4 (βέλος), κάτι το οποίο δεν παρατηρείται στο A στο όριο των r2/r4

3.6.5. Πειράματα υπερέκφρασης – έκτοπης έκφρασης του chick *Nsc11* με τη χρήση του ρετροϊκού φορέα έκφρασης RCAS(BP)-*cNsc11*

Η κωδική περιοχή του γονιδίου *cNsc11* ως προϊόν PCR κλωνοποιήθηκε κατ' αρχήν στο πλασμίδιο δέκτη Slax13/NcoIxBmaI που περιέχει πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης (polylinker), οι οποίες περικλείονται ανάμεσα σε δύο Cla I περιοριστικές θέσεις (Hughes et al, 1987).

Στη συνέχεια έγινε εξαγωγή του από αυτό μέσω πέψης με Cla I και κλωνοποιήθηκε στην Cla I θέση του RCAS(BP) φορέα, δίνοντας μας έτσι το πλασμίδιο-ρετροϊκό φορέα έκφρασης RCAS(BP)-*cNsc11*.

Ως αρνητικοί μάρτυρες στα πειράματα που ακολούθησαν χρησιμοποιήθηκαν έμβρυα στα οποία έγινε έγχυση (injection) και ηλεκτρομετασχηματισμός (electroporation) με το ρετροϊκό φορέα (RCAS(BP) ή το ρετροϊκό φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης GFP [RCAS(BP)/GFP]. Στα πειράματα αυτά ουδέποτε παρατηρήσαμε αναπτυξιακές ανωμαλίες στα έμβρυα που χρησιμοποιήσαμε.

Για τα πειράματά μας έγινε έγχυση με μικροπιπέττα των προαναφερομένων πλασμιδίων σε διάφορες περιοχές του νευρικού σωλήνα εμβρύων όρνιθας ηλικίας 1-2,5 ημερών και στη συνέχεια με ηλεκτρικούς παλμούς (electroporation) έγινε δυνατή η είσοδος των πλασμιδίων στα κύτταρα μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.

Η τεχνική αυτή (injection-electroporation) δίνει τη δυνατότητα να επιμολύνονται με το πλασμιδιακό DNA μόνο τα κύτταρα που βρίσκονται προς τη μία ή την άλλη

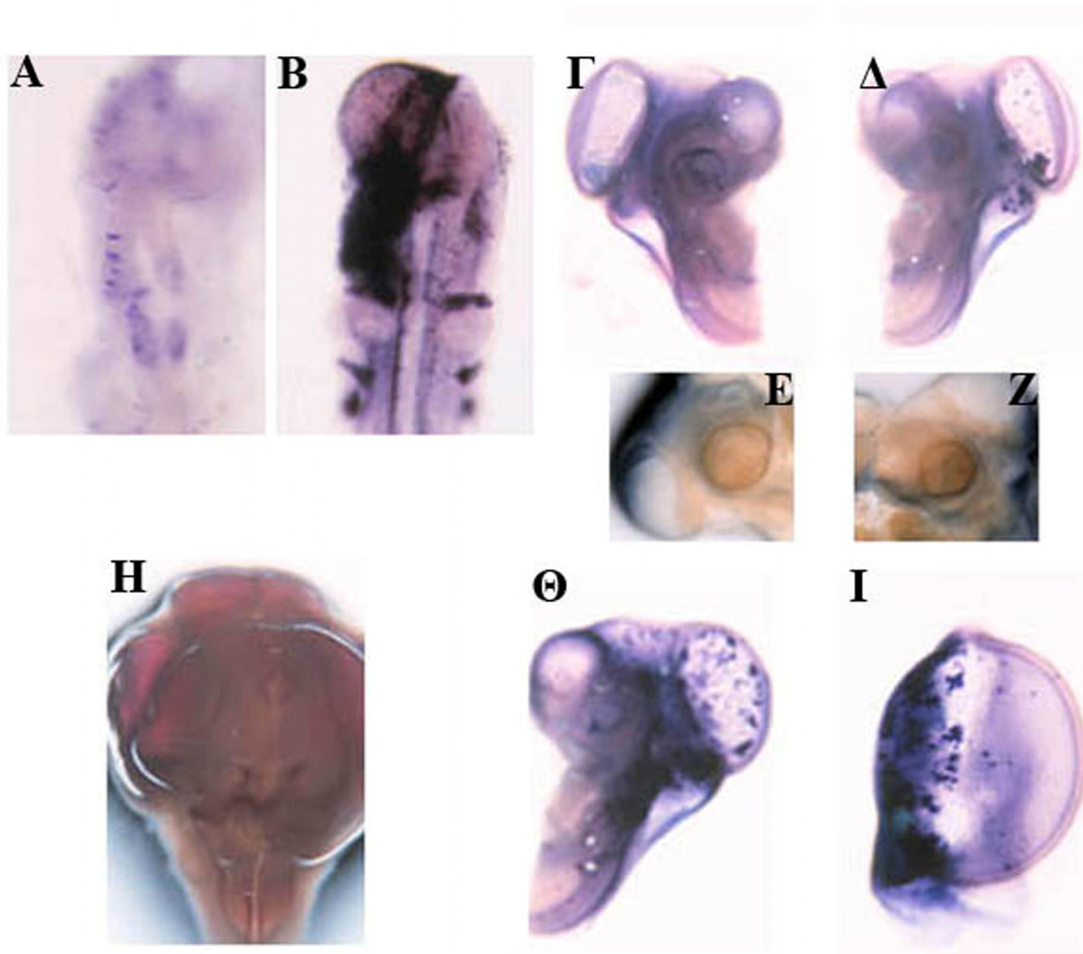
πλευρά του νευρικού σωλήνα, ενώ η άλλη να μένει ανεπηρέαστη και να χρησιμεύει ως αρνητικό συγκριτικό στοιχείο (αρνητικό control). Στα πειράματα που εμείς πραγματοποιήσαμε το ηλεκτρικό πεδίο είχε τέτοια φορά ώστε η επιμόλυνση να συμβαίνει στο αριστερό τμήμα.

Η συλλογή και η εξέταση των (επιβιωσάντων) εμβρύων μετά από 1-4 ημέρες έδειξαν πολύ μεγάλη συχνότητα (μακροσκοπικών) αναπτυξιακών ανωμαλιών σε περιοχές κυρίως του πρόσθιου και μέσου εγκεφάλου, των ματιών και των άκρων.

Στον **πίνακα 5** καταγράφονται συνοπτικά τα μακροσκοπικά ευρήματα που παρατηρήσαμε σε σαράντα οκτώ έμβρυα, από ένα σύνολο περίπου εκατόν σαράντα, στα οποία πραγματοποιήσαμε τα πειράματα υπερέκφρασης του *cNsc11*, ενώ στην **Εικόνα 30** απεικονίζονται κάποια έμβρυα με τις πιο χαρακτηριστικές αλλαγές.

στάδιο injection/ electroporation	ημέρα παρατήρησης	Παρατηρήσεις
<HH 8	+2d	αριστερή-δεξιά ασυμμετρία μέσου εγκεφάλου
<HH 8	+4d	μικρότερο αριστερό μάτι
HH 8-9	+3d	μικρότερο αριστερό μάτι, ασύμμ. μέσος εγκέφαλος
HH 10	+3d	σμίκρυνση του αριστ. τμήματος της οπτικής καλύπτρας
HH 10	+3d	μικρότερο αριστερό μάτι & (αριστ) τελεγκέφαλος
HH 10-11	+3d	μικρότερο αριστερό μάτι
HH 11-12	+1d	αριστερή-δεξιά ασυμμετρία μέσου εγκεφάλου
HH 11-12	+3d	μικρότερο αριστερό μάτι & τελεγκέφαλος-διεγκέφαλος
HH 13-14	+3d	μικρότερο αριστερό μάτι & οπτική καλύπτρα
HH 13-14	+4d	ανώμαλη ανάπτυξη αρ. άνω άκρου και οπτ. καλύπτρας
HH 13-14	+4d	ανώμαλη ανάπτυξη τελεγκεφάλου

Πίνακας 5: Συνοπτική καταγραφή των μακροσκοπικών ευρημάτων σε έμβρυα όρνιθας, στα οποία έχει γίνει υπερέκφραση του γονιδίου *cNsc11*. Η κατηγοριοποίηση έχει γίνει λαμβάνοντας υπόψη το στάδιο στο οποίο έγινε το injection/electroporation και η ημέρα συλλογής-παρατήρησης των εμβρύων.



Εικόνα 30: Α: Μια ημέρα μετά το injection/electroporation η υπερέκφραση του *cNscII* είναι διακριτή, ενώ δυο ημέρες μετά (Β) είναι ιδιαίτερα εκτεταμένη. Γ,Δ,Ε,Ζ: Έχει γίνει injection/electroporation σε δυο έμβρυα στην περιοχή του αριστερού ματιού. Το δεξί μάτι (Γ,Ε) των δυο εμβρύων έχει το φυσιολογικό μέγεθος, σε αντίθεση με το αριστερό τους μάτι (Δ,Ζ) που έχει αρκετά μικρότερο μέγεθος. Η: Τέσσερις ημέρες μετά το injection/electroporation η ασυμμετρία μεταξύ αριστερού-δεξιού ημισφαιρίου της οπτικής καλύπτρας είναι δραματική. Σε άλλο έμβryo (Θ, πλάγια αριστερή όψη) η υπερέκφραση του *cNscII* στο αριστερό ημισφαίριο προκάλεσε τρεις ημέρες μετά το injection/electroporation τον ίδιο φαινότυπο, όπως φαίνεται καθαρά και σε ραχιαία όψη (Ι) της οπτικής καλύπτρας που έχει αποκοπεί από το υπόλοιπο έμβryo.

3.7. Μελέτη του μεταγραφικού ρόλου του γονιδίου *NscII*

3.7.1. Με τη χρήση του συστήματος GAL4-UAS του σακχαρομύκητα

Στο σύστημα αυτό, χρησιμοποιείται πλασμίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης που φέρει ανοδικά του *luc* γονιδίου, την αλληλουχία πρόσδεσης UAS (upstream activating Sequence), του μεταγραφικού ενεργοποιητή GAL4 των γονιδίων *GAL* του σακχαρομύκητα. Θεωρητικά, αν ένα μόριο έχει ενεργοποιητική δράση και είναι σε σύντηξη με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του GAL4 (GAL4 DNA binding domain ή GAL4 DBD), θα πρέπει να προκαλέσει ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου της λουσιφεράσης.

Για τη δημιουργία ανασυνδυασμένων κατασκευών χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pBxGI, ο οποίος αναπτύχθηκε σε βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli* (*E.coli*) DH₁₀B. Ο πλασμιδιακός φορέας pBxGI περιέχει τον υποκινητή SV40 (ώστε να εκφράζεται στα κύτταρα των θηλαστικών) και εκφράζει τα πρώτα 147 αμινοξέα του γονιδίου *GAL4*. Στα 147 αυτά αμινοξέα περιλαμβάνεται η περιοχή που προσδένεται στην αλληλουχία UAS (αμινοξέα 1-65), η περιοχή διμερισμού (αμινοξέα 65-94) η οποία το μετατρέπει σε ένα ισχυρώς προσδεδεμένο διμερές και μία πολύ ασθενής ενεργοποιητική περιοχή (αμινοξέα 90-147). Δεν περιλαμβάνονται οι κατεξοχήν ενεργοποιητικές περιοχές του γονιδίου *GAL4* (αμινοξέα 148-196 και 768-881). Οι ανασυνδυασμένες πλασμιδιακές κατασκευές που φτιάξαμε στον φορέα pBxGI εκφράζουν χμιαϊκές πρωτεΐνες που αποτελούνται από την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA Binding Domain, DBD) της πρωτεΐνης GAL4 της ζύμης (αμινοξέα 1-147) καθώς και από το προϊόν του τμήματος του γονιδίου του *cNscII* που εισαγάγαμε. Αυτή η χμιαϊκή πρωτεΐνη όταν εκφραστεί προσδένεται ως διμερές στην περιοχή GAL4 UAS (Upstream Activating Sequence) που βρίσκεται ανοδικά του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης. Η περιοχή GAL4 UAS δεν υπάρχει φυσιολογικά στο γονιδίωμα των θηλαστικών (West et al, 1984; Ma and Ptashne, 1987; Lin et al, 1988; Giniger and Ptashne, 1988; Lamphier and Ptashne, 1992; Marmorstein et al, 1992).

Η κωδική περιοχή του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα *cNSCL1* δίνεται παρακάτω:

ATGCT CAACTCGGAG CAGACAGAGC TCGACCTCCC GCCCGGGCAC
 TCCGAGCCCG AATCCGTCTT CAGCGACTGC GGCCGCGTGG GCGGCGCGGA
 GGAGTCCGGC GTCGCTTTGT GCCCTCAGCC CCGCGGGGCC GAGCAGGCAG
 AGGCGGTGAA GAAGGACCTG CAGCACCTGA GCCGGGAGGA GCGGCGGCCG
 CGGCGGCGAG CCACGGCCAA GTACCGCACACA GCCCACGCCA CGAGGGAACG
 CATCCGCGTG GAAGCCTTCA ACATGGCCTT CGCCGAGCTG CGCAAGCTGC
 TGCCACGCT GCCGCCGAC AAGAAGCTCT CCAAGATTGA GATCCTTCGC
 CTGGCTATCT GCTACATCTC CTACCTGAAC CACGTGCTGG ATGTC**TGA**

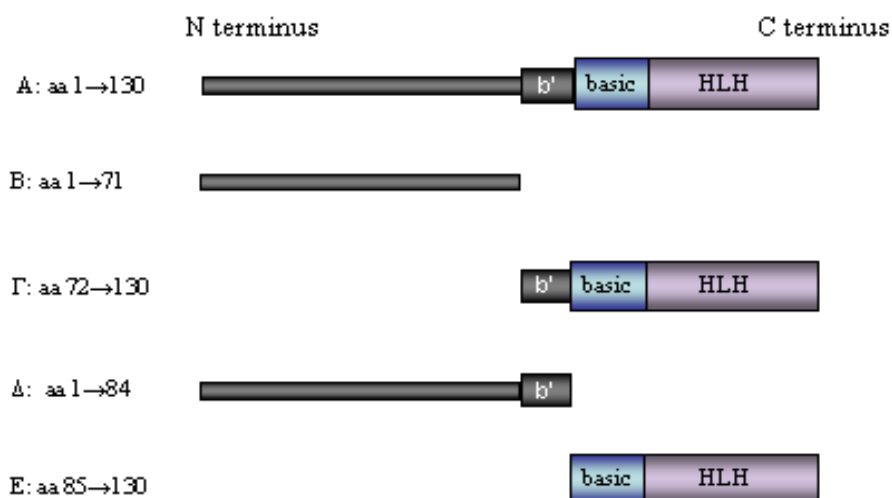
Σχεδιάστηκαν οι εκκινητές που φαίνονται στον **Πίνακα 6** οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις PCR, όπου ως μήτρα DNA είχαμε την παραπάνω κωδική περιοχή του γονιδίου *cNscII*. Το αποτέλεσμα ήταν να δημιουργηθούν τέσσερις ελλειπτικές μορφές (B,Γ,Δ,Ε) του γονιδίου *cNscII*, καθώς και ολόκληρο (Α) το *cNscII*, όπως φαίνονται στην **Εικόνα 31**. Σε όλα αυτά τα PCR προϊόντα έχουν προστεθεί στα άκρα θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων EcoRI και BamHI, ώστε κατά την κλωνοποίησή τους στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pBxGI/ EcoRI x BamHI να εισάγονται οι ελλείψεις ή ολόκληρο το γονίδιο *cNscII* με το ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης (in frame) σε σχέση με το GAL4 DBD(1-147), που είναι ήδη κλωνοποιημένο.

#1	CCG <u>GAATTC</u> ATGCTCAACTCGGAGCAGAC
#2	CGC <u>GGATCCC</u> AGGTGCTGCAGGTCCTTC
#3	CCG <u>GAATTC</u> GACCTGCAGCACCTGAGCC
#4	CGC <u>GGATTC</u> GGCCGTGGTTCGCCGCCGC
#5	CCG <u>GAATTC</u> CGGCGGGCGAACCACGGCCAAG
#6	CGC <u>GGATCCTC</u> CAGACATCCAGCACGTGGTT

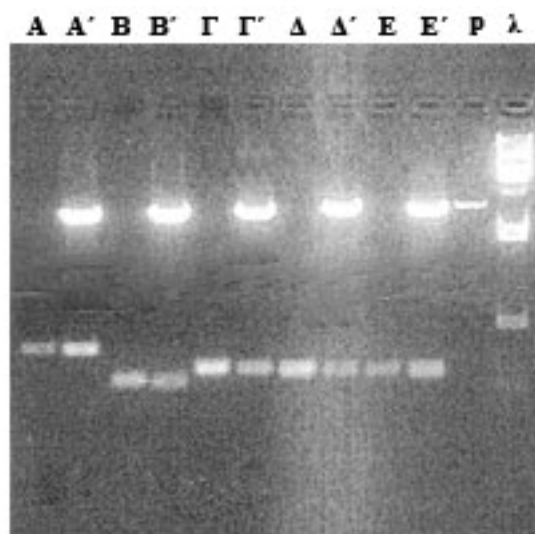
Πίνακας 6: Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR αντιδράσεις. Οι υπογραμμισμένες και με έντονους χαρακτήρες αλληλουχίες απεικονίζουν τις θέσεις αναγνώρισης από τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και EcoRI (GGATCC: θέση αναγνώρισης για το ένζυμο BamHI, GAATTC: θέση αναγνώρισης για το ένζυμο EcoRI).

Στη συνέχεια έγινε πέψη των PCR προϊόντων με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και EcoRI και κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pBxG1/ EcoRI x BamHI.

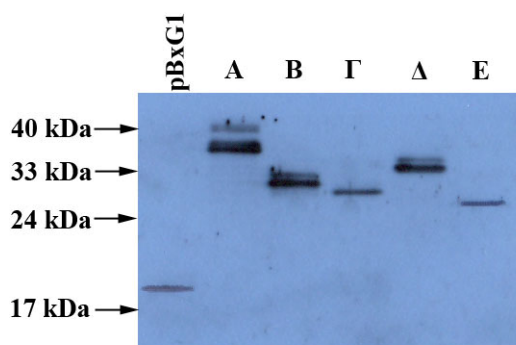
Οι πέντε αυτές πλασμιδιακές κατασκευές δόθηκαν για αλληλούχιση, επιβεβαιώθηκε ότι ήταν σωστές, έγινε διαμόλυνση κάθε πλασμιδιακής κατασκευής χωριστά και του φορέα κλωνοποίησης pBxG1 σε κυτταρικές σειρές HEPG2 (Hepatic) και HEK 293T (Human Embryonic Kidney), από όπου και συλλεχθηκαν τα κυτταρικά εκχυλίσματα (cell lysates) και έγινε ανάλυση κατά Western (**Εικόνα 33**) με τη χρήση αντισώματος ειδικού για την αναγνώριση της περιοχής πρόσδεσης στο DNA (DBD) της πρωτεΐνης GAL4, η οποία περιέχεται στο φορέα κλωνοποίησης pBxG1 και σε όλες τις πλασμιδιακές κατασκευές A, B, Γ, Δ, E.



Εικόνα 31: Ελλειπτικές κατασκευές της κωδικής περιοχής του *cNsc11* γονιδίου (Ονομάζονται A-E). Η b' περιοχή είναι μία περιοχή η οποία είναι πλούσια σε κατάλοιπα αργινίνης και έχει χαρακτηριστεί ως περιοχή πλούσια σε βασικά αμινοξέα.



Εικόνα 32: Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 1%. Τα προϊόντα A-E που προέκυψαν από την PCR αντίδραση καθώς και τα προϊόντα A'-E' που προέκυψαν έπειτα από πέψη των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και BamHI. Από την πέψη των πλασμιδιακών κατασκευών προκύπτουν τα προϊόντα A-E και ο πλασμιδιακός φορέας pBxGI. p=pBxGI πλασμιδιακός φορέας, λ=DNA ladder λ/HindIII

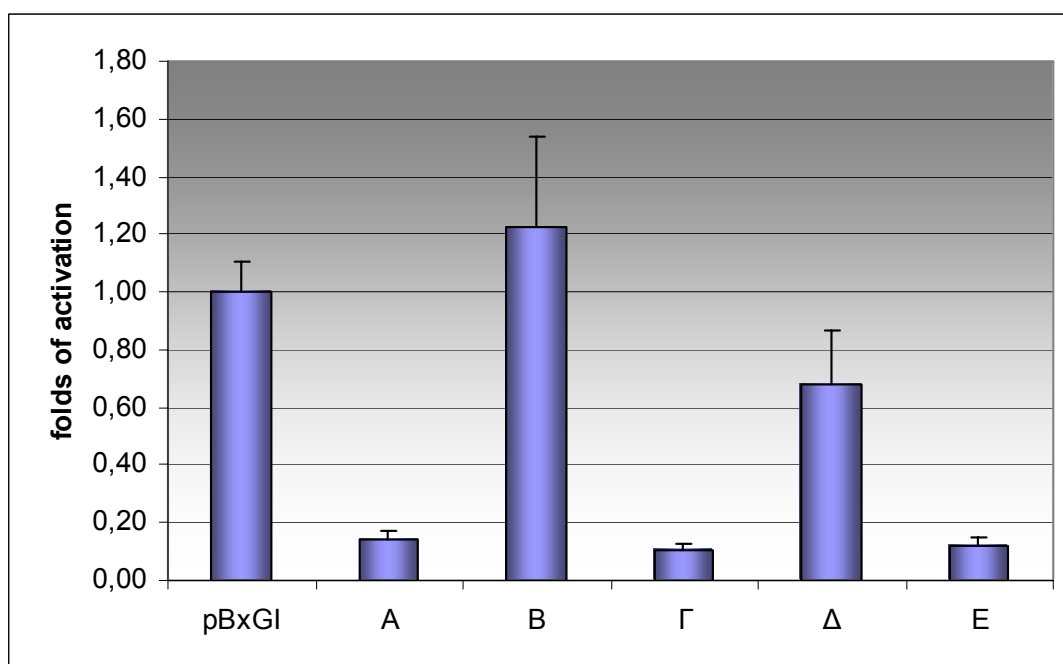


Εικόνα 33: Ανάλυση κατά Western κυτταρικών εκχυλισμάτων από κύτταρα HEK 293T, μετά από διαμόλυνση με τα πλασμίδια pBxGI, A, B, Γ, Δ και E. Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την αναγνώριση της περιοχής DBD της πρωτεΐνης GAL4.

Ακολούθως για τη μελέτη της μεταγραφικής ενεργότητας των πλασμιδίων αυτών πραγματοποιήθηκαν πειράματα συνδιαμόλυνσης των κυτταρικών σειρών HEPG2 και HEK 293T με τα εξής πλασμίδια: το πλασμίδιο που περιέχει το γονίδιο αναφοράς της β-γαλακτοσιδάσης (για κανονικοποίηση των τιμών της λουσιφεράσης),

το πλασμίδιο που περιέχει το γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης καθώς και το πλασμίδιο που περιέχει ολόκληρο το γονίδιο *cNsc11* ή την ελλειπτική κατασκευή του γονιδίου του *cNsc11* που μελετάμε κάθε φορά (**Πίνακας 7**).

Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων αποδίδονται συνοπτικά (ως Μ.Ο.) στο παρακάτω διάγραμμα (**Εικόνα 34**):



Εικόνα 34: Συγκριτικές τιμές μεταγραφικής ενεργοποίησης του πλασμιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης pG5B-luc, εκφρασμένες σε “folds of activation” – «φορές ενεργοποίησης», για τις ελλειπτικές κατασκευές B, Γ, Δ, E, ολόκληρο το γονίδιο *cNsc11* (A) και τον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης pBxG1.

α/α	pBxG1	A	B	Γ	Δ	E	pG5B-luc	pCMV-lacZ	pBlsc
1	1 μg						1 μg	1 μg	3 μg
2		1 μg					1 μg	1 μg	3 μg
3			1 μg				1 μg	1 μg	3 μg
4				1 μg			1 μg	1 μg	3 μg
5					1 μg		1 μg	1 μg	3 μg
6						1 μg	1 μg	1 μg	3 μg

Πίνακας 7: Στον πίνακα αυτό αναγράφονται οι ποσότητες του κάθε πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα των διαμολύνσεων σε κύτταρα HEPG2 (~500.000 κύτταρα/well of 6-well plate) και HEK 293T (~250.000 κύτταρα/well of 6-well plate).

Η υβριδοποιημένη αυτή αλληλουχία κλωνοποιήθηκε στον pGL3-basic πλασιδιακό φορέα, στον οποίο είχε προηγουμένως εντεθεί η ελάχιστη περιοχή από τον υποκινητή του αδενοϊού AdML (minimal promoter of Adenovirus major late gene) το οποίο φέρει TATA box (προσφορά του Δρ. Δ. Καρδάση). Για την κλωνοποίηση της αλληλουχίας που φέρει τα δυο E-boxes στον φορέα pGL3-basic-AdML έγινε πρώτα πέψη του φορέα με τα περιοριστικά ένζυμα *Nhe I* και *Xho I*, ώστε να προκύπτουν προεξέχοντα άκρα συμβατά με τα άκρα της αλληλουχίας που φέρει τα δυο E-boxes. Η κλωνοποίηση της αλληλουχίας αυτής έγινε ανοδικά του AdML minimal promoter. Στη συνέχεια, στελέχη DH5α του βακτηρίου *E.coli* χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία του μετασχηματισμού. Με την παραπάνω διαδικασία ολοκληρώθηκε η κατασκευή του πλασμιδίου αναφοράς (Reporter) “**2 E-boxes-AdML-pGL3-basic**” το οποίο περιέχει δυο ειδικές θέσεις πρόσδεσης για το ετεροδιμερές mNSCL1/ME1a του οποίου τη μεταγραφική ικανότητα θέλουμε να μελετήσουμε.

II) Δημιουργία ελλειπτικής κατασκευής του γονιδίου *mNscII* με απαλοιφή της b' περιοχής του γονιδίου

Προκειμένου να κατασκευαστεί η συγκεκριμένη ελλειπτική κατασκευή του γονιδίου *mNscII*, έγινε σχεδίαση εκκινητών ειδικών για το αμινοτελικό και για το καρβοξυτελικό άκρο (Εικόνα 35). Με χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης έγινε παραγωγή και απομόνωση της N-τελικής και C-τελικής περιοχής χωρίς να περιλαμβάνεται η b' περιοχή. Για την N-τελική περιοχή κατασκευάστηκε ένας εκκινητής που φέρει περιοριστική θέση για την *EcoRI* (ο πρόσθιος εκκινητής-forward), ενώ ο αντίστροφος εκκινητής (reverse) σχεδιάστηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να φέρει *NotI* περιοριστική θέση. Όσο για την C-τελική περιοχή, ο πρόσθιος εκκινητής φέρει περιοριστική θέση για το ένζυμο *NotI*, ενώ ο αντίστροφος φέρει περιοριστική θέση αναγνώρισης για το ένζυμο *SmaI*. Ο εκκινητής-reverse για την N-τελική περιοχή όπως και ο εκκινητής-forward για την C-τελική περιοχή φέρουν την ίδια αλληλουχία αναγνώρισης από το περιοριστικό ένζυμο *NotI* προκειμένου να καταστεί δυνατή η δημιουργία συνεκτικών συμπληρωματικών άκρων

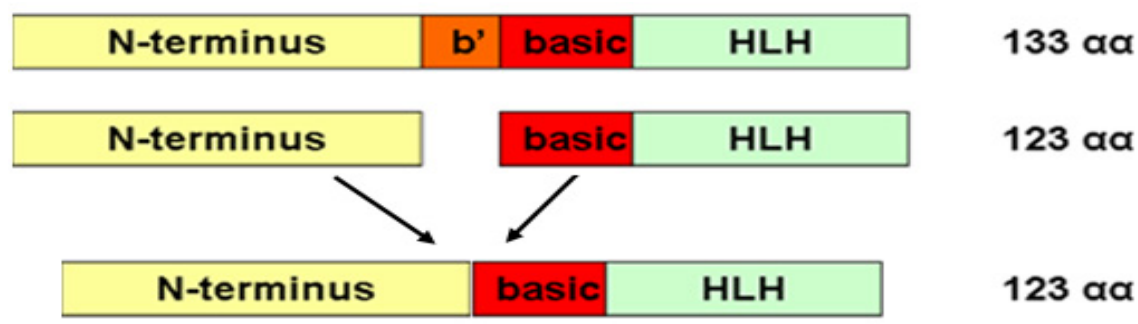
Εκκινητές για την N-τελική περιοχή	
Πρόσθιος (forward) εκκινητής: <div style="text-align: center;"> EcqRI { Met 5' ccg gaa ttc [atg] atg ctc aac tcc gat ac 3' </div>	Αντίστροφος (reverse) εκκινητής: <div style="text-align: center;"> NotI { 5'cgg gcg gcc gcc aag tgc tgc agg tct tt 3' </div>
Εκκινητές για την C-τελική περιοχή	
Πρόσθιος (forward) εκκινητής: <div style="text-align: center;"> NotI { 5'cgg gcg gcc gcg aag tac cgc acg gca cac 3' </div>	Αντίστροφος (reverse) εκκινητής: <div style="text-align: center;"> Stop SmaI codon { 5' tcc ccc ggg [ca]gac gtc cag cac atg 3' </div>

Εικόνα 35: Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την N-τελική περιοχή και για τη C-τελική περιοχή του γονιδίου mouse *Nsc11*.

Η N-τελική και η C-τελική περιοχή παρήχθησαν μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε μεγάλη κλίμακα. Στη συνέχεια κάθε προϊόν χωριστά κλωνοποιήθηκε στο φορέα pGEM T-easy. Ο φορέας pGEM T-easy φέρει άκρα στα οποία προεξέχει μια βάση θυμίνης (στο 3' άκρο κάθε αλυσίδας του DNA) έτσι ώστε τα προϊόντα από αντιδράσεις PCR που φέρουν άκρα με 3-προεξέχουσα αδείνη να είναι συμπληρωματικά και να κλωνοποιούνται ευκολότερα.

Ακολούθως, η N-τελική περιοχή απομονώθηκε από τον pGEM T-easy φορέα μέσω παρασκευαστικής πέψης με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI και κλωνοποιήθηκε στον pcDNA3 φορέα, στην αντίστοιχη θέση, δίνοντας μας έτσι την πλασιδιακή κατασκευή “N-terminus in pcDNA3”. Με όμοια λογική απομονώθηκε και η C-τελική περιοχή από τον pGEM T-easy φορέα χρησιμοποιώντας το περιοριστικό ένζυμο NotI. Παράλληλα έγινε πέψη του “N-terminus in pcDNA3” με NotI και ακολούθησε κλωνοποίηση της C-τελικής περιοχής (που είχε Not I άκρα).

Έτσι επιτεύχθηκε η κατασκευή ενός ελλειπτικού μορίου mNSCL1, στο οποίο έχουν απαλειφθεί δώδεκα αμινοξέα (Ser-Arg-Glu-Glu-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Ala-Thr) της πολύ βασικής περιοχής b' του γονιδίου *mNsc11* (**Εικόνα 36**). Εξαιτίας της αναγκαστικής ένθεσης της περιοριστικής θέσης NotI, στη θέση αυτών των δώδεκα αμινοξέων έχουν προστεθεί δυο κατάλοιπα Αλανίνης.



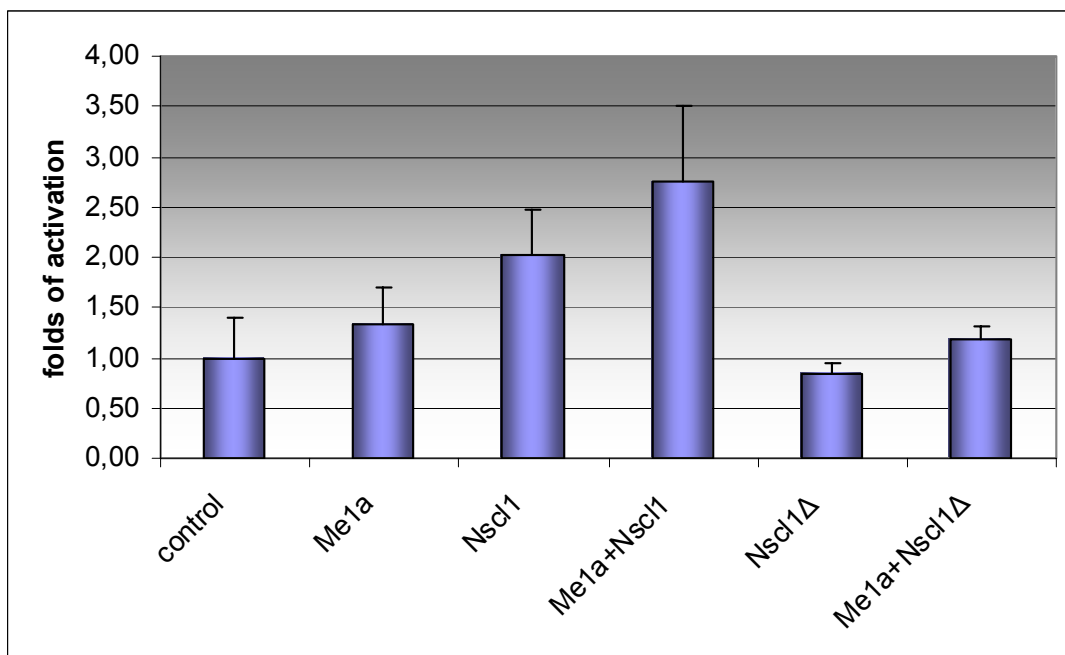
Εικόνα 36: Σχηματική παράσταση του φυσιολογικού *mNsc11* γονιδίου (133 αα) και του ελλειπτικού *mNsc11Δ* (123 αα).

III) Πειράματα συνδιαμόλυνσης

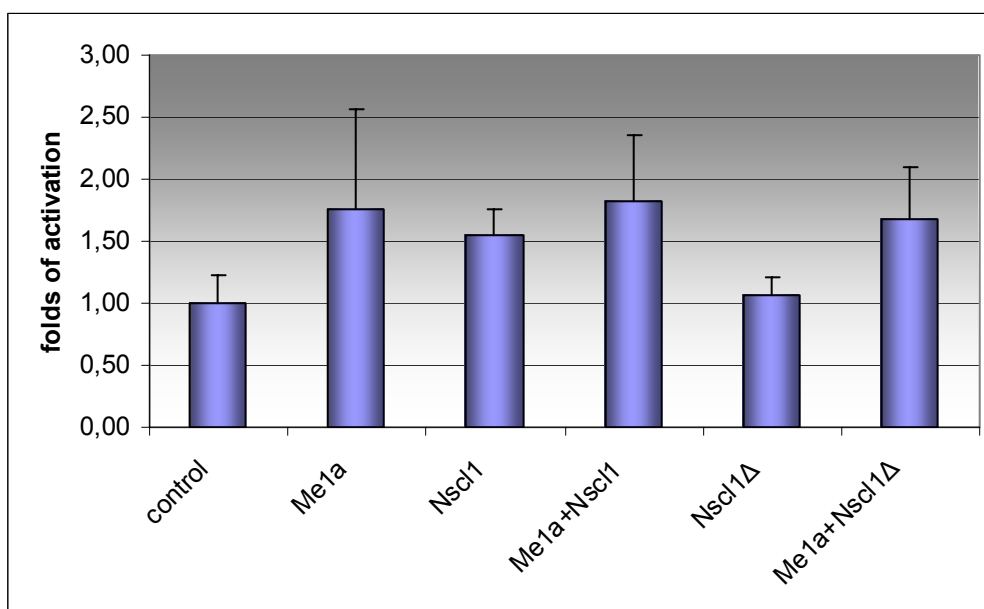
Για τη μελέτη της μεταγραφικής ενεργότητας των πλασμιδίων αυτών πραγματοποιήθηκαν πειράματα συνδιαμόλυνσης των κυτταρικών σειρών HEPG2 και SHSY-5Y με τα εξής πλασμίδια: **i)** το πλασμίδιο αναφοράς (Reporter) “2 E-boxes-AdML-pGL3-basic” **ii)** CMV-lacZ: φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης υπό τον υποκινητή CMV που εκφράζεται σε ευκαρυωτικά κύτταρα, για κανονικοποίηση των τιμών της λουσιφεράσης **iii)** ME1a in pCMV-Sport **6 iv)** *mNsc11* in pCMV-Sport 6.1 **v)** *mNsc11Δ*: φέρει την ελλειπτική κατασκευή του *mNsc11* γονιδίου, που σχεδιάστηκε στην παρούσα εργασία και **vi)** pBluescript φορέας ο οποίος προστίθεται στα δείγματα προκειμένου να υπάρχει ίση ποσότητα DNA μεταξύ των δειγμάτων που θα εισαχθούν στα κύτταρα. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν από το κάθε πλασμίδιο αναγράφονται στον Πίνακα 8. Τα πειράματα αυτά έγιναν σε κύτταρα HEPG2 και SHSY-5Y, και τα αποτελέσματα υπό μορφή ραβδογράμματος φαίνονται στην Εικόνα 37 (HEPG2) και στην Εικόνα 38 (SHSY-5Y)

α/α	Reporter	Me1a	mNsc11	mNsc11Δ	b-gal	pBlsc
1	1μg	-	-	-	1μg	4μg
2		1μg	-	-		3μg
3		-	1μg	-		3μg
4		1μg	1μg	-		2μg
5		-	-	1μg		3μg
6		1μg	-	1μg		2μg

Πίνακας 8: Ποσότητες του κάθε πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα συνδιαμόλυνσης των κυτταρικών σειρών HEPG2 και SHSY-5Y.



Εικόνα 37: Συγκριτικές τιμές μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου της λουσιφεράσης από τα γονίδια *ME1a*, *Nsc11*, *Nsc11Δ*, *ME1a/Nsc11* και *ME1a/Nsc11Δ* σε κύτταρα HEPG2, εκφρασμένες σε “folds of activation” – «φορές ενεργοποίησης». Οι τιμές αυτές έχουν προκύψει ως Μ.Ο. τριών διπλών πειραμάτων, όπου χρησιμοποιήθηκαν ~500.000 κύτταρα/well.

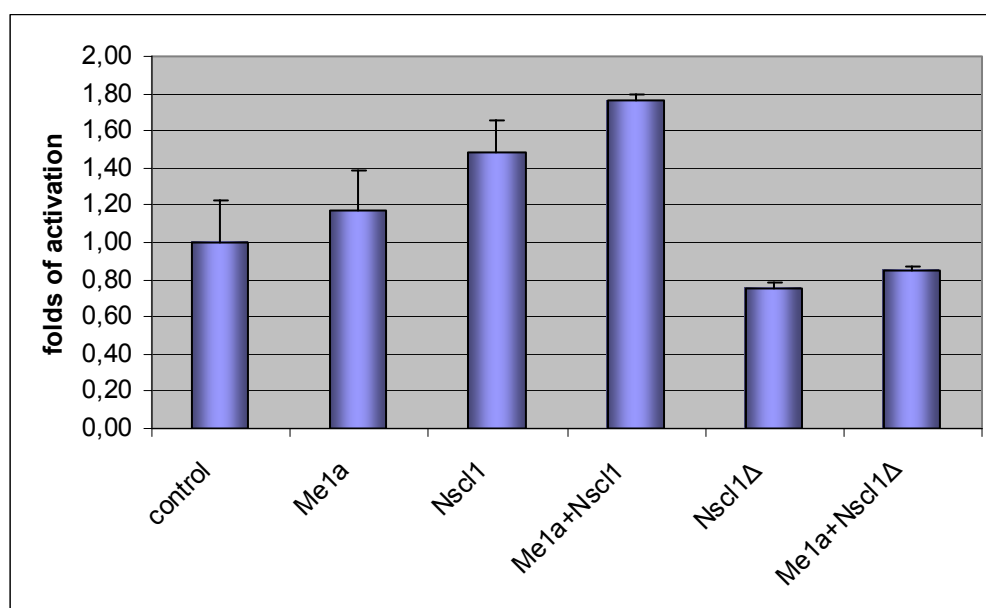


Εικόνα 38: Συγκριτικές τιμές μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου της λουσιφεράσης από τα γονίδια *ME1a*, *Nsc11*, *Nsc11Δ*, *ME1a/Nsc11* και *ME1a/Nsc11Δ* σε κύτταρα SHSY-5Y, εκφρασμένες σε “folds of activation” – «φορές ενεργοποίησης». Οι τιμές αυτές έχουν προκύψει ως Μ.Ο. τριών διπλών πειραμάτων, όπου χρησιμοποιήθηκαν ~250.000 κύτταρα/well.

Στη συνέχεια τα πειράματα συνδιαμολύνσεων συνεχίστηκαν τόσο σε κύτταρα HEPG2 όσο και σε SHSY-5Y, χρησιμοποιώντας όμως τώρα περίσσεια από τα πλασμίδια mNsc11 και mNsc11Δ. Οι ακριβείς ποσότητες αυτών φαίνονται στον Πίνακα 9, και τα αποτελέσματα των πειραμάτων (για τα SHSY-5Y κύτταρα) στην Εικόνα 39.

α/α	Reporter	Me1a	mNsc11	mNsc11Δ	b-gal	pBlsc
1	1μg	-	-	-	1μg	5μg
2		1μg	-	-		4μg
3		-	4μg	-		1μg
4		1μg	4μg	-		-
5		-	-	4μg		1μg
6		1μg	-	4μg		-

Πίνακας 9: Ποσότητες του κάθε πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα συνδιαμολύνσης των κυτταρικών σειρών HEPG2 και SHSY-5Y, έχοντας σε περίσσεια τα πλασμίδια mNsc11 και mNsc11Δ.



Εικόνα 39: Συγκριτικές τιμές μεταγραφικής ενεργοποίησης (εκφρασμένες σε “folds of activation” – «φορές ενεργοποίησης») του γονιδίου της λουσιφεράσης από τα γονίδια *ME1a*, *Nsc11*, *Nsc11Δ*, *ME1a/Nsc11* και *ME1a/Nsc11Δ* σε κύτταρα SHSY-5Y έχοντας σε περίσσεια τα πλασμίδια mNsc11 και mNsc11Δ. Οι τιμές αυτές έχουν προκύψει ως Μ.Ο. τριών διπλών πειραμάτων, όπου χρησιμοποιήθηκαν ~250.000 κύτταρα/well.

4.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Γενικά

Η οικογένεια των HLH μεταγραφικών παραγόντων κατέχει κομβικό ρόλο κατά τη διάρκεια του “καθορισμού” και της διαφοροποίησης των κυττάρων ενός οργανισμού. Η διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν διάφορες αναπτυξιακές διαδικασίες έδειξε ότι οι HLH πρωτεΐνες σχετίζονται με μια πληθώρα αναπτυξιακών γεγονότων από το σακχαρομόκητα μέχρι τον άνθρωπο. Οι HLH μεταγραφικοί παράγοντες παρεμβαίνουν δυναμικά, σε όλες σχεδόν τις αναπτυξιακές διαδικασίες, ρυθμίζοντας τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων, μέσω της πρόσδεσής τους σε συντηρημένες αλληλουχίες, τα E-boxes. Οι αλληλουχίες αυτές εντοπίστηκαν για πρώτη φορά σε cis-ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου IgH της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης - πέντε στο σύνολο - (Staudt and Lenardo, 1991; Nelsen and Sen, 1992) και στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν άλλες τρεις στην περιοχή του ενισχυτή της ελαφριάς - κ - αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών.

Πολύ μεγάλος αριθμός ερευνητικών εργασιών, που έχει γίνει, έχει καταδείξει τον σημαντικό ρόλο των HLH μεταγραφικών παραγόντων σε όλες σχεδόν τις κατηγορίες οργανισμών :

Στο σακχαρομόκητα bHLH μεταγραφικοί παράγοντες ελέγχουν ζωτικές μεταβολικές διαδικασίες όπως η βιοσύνθεση των φωσφολιπιδίων και της μεθειονίνης (Berben et al, 1990; Hoshizaki et al, 1990; Cai and Davis, 1990).

Στο νηματώδη σκόληκα έχουν βρεθεί 24 HLH πρωτεΐνες, κάποιες από τις οποίες είναι απαραίτητες για τη λειτουργία περιφερειακών αισθητηρίων οργάνων απαραίτητων για την αναπαραγωγή καθώς και τη σωστή ανάπτυξη του νευρικού συστήματος (Zhao and Emmons, 1995; Wrischnik and Kenyon, 1997; Ruvkun and Hobert, 1998).

Στη δροσόφιλα HLH γονίδια, όπως το *daughterless (da)* και το *scute (sc)* ή *sisterless-b (sis-b)* εμπλέκονται στη διαδικασία καθορισμού του φύλου (Cronmiller and Cline, 1987; Parkhurst and Meneely, 1994), ενώ και η νευρογένεση προαπαιτεί τη συνδυαστική δράση πολλών γονιδίων της HLH οικογένειας, όπως το *achaete-scute complex (AS-C)*, το *Extramacrochaetae (Emc)*, το *Enhancer of split [E(spl)]* κ.α. (Jan and Jan, 1993; Campos-Ortega, 1993; Jarman et al, 1993).

Όσον αφορά τα θηλαστικά έχουν βρεθεί δεκάδες HLH μεταγραφικοί παράγοντες που ενέχονται στις διαδικασίες ανάπτυξης των περισσότερων σωματικών οργάνων και

συστημάτων, και έλλειψη των οποίων ή μη φυσιολογική λειτουργία τους επιφέρει το θάνατο ή σοβαρές δυσλειτουργίες.

Κατά τη μυογένεση οι bHLH μεταγραφικοί παράγοντες MyoD, MRF-4, Myf-5 και myogenin ρυθμίζουν τη δημιουργία και τη διαφοροποίηση των μυικών κυττάρων των σκελετικών μυών από το πρώιμο εμβρυικό μεσόδερμα. Οι τέσσερις αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα και αλληλεπικάλυψη στη λειτουργία τους. Ποντικοί, όμως, οι οποίοι παρουσιάζουν έλλειψη της λειτουργίας των *MyoD* και *Myf-5* πεθαίνουν κατά τη γέννηση και παρουσιάζουν έλλειψη σκελετικών μυών (Braun et al, 1992; Olson, 1990; Rudnicki et al, 1992; Rudnicki et al, 1993; Weintraub et al, 1991).

Κατά τη μορφογένεση της καρδιάς οι bHLH μεταγραφικοί παράγοντες dHAND και eHAND διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο, αφού η έλλειψή τους προκαλεί σοβαρές βλάβες στο σχηματισμό της καρδιάς με επακόλουθη συνέπεια το θάνατο κατά την εμβρυική ηλικία (Srivastana et al, 1995; Srivastana et al, 1997; Riley et al, 1998; Firulli et al, 1998).

Σημαντικός αριθμός bHLH μεταγραφικών παραγόντων εκφράζεται στο πάγκρεας, του οποίου η φυσιολογική λειτουργία και ρόλος έχει άμεση σχέση με τα επίπεδα παραγωγής ινσουλίνης. Σε ποντικούς με έλλειψη λειτουργίας του *BETA2/NeuroD* γονιδίου παρατηρείται τετραπλάσια συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ζώα, γεγονός το οποίο οδηγεί στο θάνατο αυτών, λίγες μέρες μετά τη γέννησή τους. Η μειωμένη παραγωγή ινσουλίνης οφείλεται σε δραματική μείωση του αριθμού των β-παγκρεατικών κυττάρων που παράγουν ινσουλίνη (German et al, 1991; Naya et al., 1997; Nelson et al, 1990; Shieh et al, 1991).

bHLH μεταγραφικοί παράγοντες συμμετέχουν και στη διαδικασία καθορισμού και διαφοροποίησης όλων των κυτταρικών τύπων του αιμοποιητικού συστήματος. Έλλειψη της λειτουργίας του bHLH μεταγραφικού παράγοντα SCL/Tal1 οδηγεί σε πλήρη αδυναμία παραγωγής αίματος και πρώιμο εμβρυικό θάνατο, ενώ η φυσιολογική του λειτουργία είναι απαραίτητη για την παραγωγή B και T λεμφοκυττάρων (Shivdasani et al, 1995; Porcher et al, 1996).

Σημαντικός, όμως, είναι ο ρόλος των bHLH μεταγραφικών παραγόντων και κατά τη νευρογένεση των θηλαστικών. HLH μεταγραφικοί παράγοντες είναι απαραίτητοι για την επιλογή της νευρικής μοίρας από πρόδρομα κύτταρα του εξωδέρματος, του ελέγχου του πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και της τελικής διαφοροποίησης τους. Έλλειψη της λειτουργίας του γονιδίου *Mash1*, έχει σοβαρή επίπτωση στη

διαφοροποίηση νευρώνων του αυτόνομου νευρικού, του οσφρητικού και του αμφιβληστροειδούς. Στο αυτόνομο νευρικό σύστημα τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ώριμους νευρώνες, απουσία του *Mash1*, ενώ τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα του οσφρητικού επιθηλίου πεθαίνουν. Στον αμφιβληστροειδή απουσία του *Mash1*, μειώνεται ο αριθμός των δίπολων (bipolar) νευρώνων, ενώ αυξάνεται ο αριθμός των Muller γλοιακών κυττάρων (Cau et al, 1997; Guillemot et al, 1993; Sommer et al, 1995; Blaugrund et al, 1996; Tomita et al, 1996). Επίσης έλλειψη της λειτουργίας του γονιδίου *Hes1* οδηγεί σε αδυναμία σύντηξης (κλεισίματος) του πρόσθιου τμήματος του νευρικού σωλήνα, ανεγκεφαλία και ανώμαλη ανάπτυξη των ματιών (Ishibashi et al, 1995; Tomita et al, 1996).

Στον άνθρωπο έχειδειχθεί ότι το bHLH γονίδιο *Mnt* είναι ένα από τα 20 μη λειτουργικά γονίδια του συνδρόμου Miller-Dieker (MDS), κατά το οποίο οι ασθενείς παρουσιάζουν «αγυρία», δηλαδή πλήρη έλλειψη του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων και σοβαρή κρανιοπροσωπική δυσμορφία (Dobyns et al, 1983; Dobyns et al, 1991; Kazuhito et al, 2004).

Όσον αφορά το bHLH γονίδιο *Nsc11*, έχει βρεθεί ότι οι *Nsc11*^{-/-} ποντικοί παρουσιάζουν πολύ υψηλά ποσοστά θνησιμότητας σε σχέση με τα φυσιολογικά ζώα. Συγκεκριμένα ενώ οι φυσιολογικοί ποντικοί παρουσιάζουν μηδενική θνησιμότητα ένα χρόνο μετά τη γέννησή τους, οι *Nsc11*^{-/-} ποντικοί παρουσιάζουν θνησιμότητα 25%, ενώ οι *Nsc11*^{-/-} x *Nsc12*^{+/-} ποντικοί παρουσιάζουν θνησιμότητα 45%. Επιπρόσθετα όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι *Nsc11*^{-/-} x *Nsc12*^{-/-} ποντικοί πεθαίνουν μέσα στις πρώτες μέρες μετά τη γέννησή τους από καρδιοαναπνευστική ανεπάρκεια (Cogliati et al, 2002). Η πιο πιθανή εξήγηση, για αυτά τα πολύ μεγάλα ποσοστά πρόωρης θνησιμότητας, είναι ότι η έλλειψη του *Nsc11* γονιδίου επηρεάζει τον πυρήνα του πνευμονογαστρικού νεύρου (vagal nerve), και κατ' επέκταση τον τόνο του παρασυμπαθητικού συστήματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της λειτουργίας των τασεοϋποδοχέων και της δυνατότητας της καρδιάς να λειτουργεί σε ένα μεγάλο εύρος συχνοτήτων. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η καρδιακή αρρυθμία και ο θάνατος, λόγω κακής νεύρωσης της καρδιάς, παρότι δεν παρουσιάζει δομική ανωμαλία.

4.2. Κλωνοποίηση του γονιδίου *cNscII* της όρνιθας

Στην παρούσα εργασία επιτεύχθηκε, καταρχήν, η κλωνοποίηση του γονιδίου *cNscII* της όρνιθας με τη χρήση DNA εκκινητών οι οποίοι σχεδιάστηκαν λαμβάνοντας υπόψη την ήδη γνωστή αλληλουχία των ομόλογων γονιδίων του ποντικού και του ανθρώπου. Οι δυο διαφορετικοί κλώνοι που ταυτοποιήσαμε, μήκους 1719 και 2316 νουκλεοτιδίων, κωδικοποιούν την πρωτεΐνη cNSCL1 μεγέθους 130 αμινοξέων, και προβλεπόμενου M.B. 14.3 kDa. Η περιοχή bHLH, η οποία ευθύνεται για την πρόσδεση στο DNA και το σχηματισμό διμερών, διαφέρει μόνο κατά ένα αμινοξύ (σε σύνολο πενήντα τεσσάρων) σε σχέση με την αντίστοιχη περιοχή στον ποντικό και στον άνθρωπο, κάνοντας φανερό τον πολύ μεγάλο βαθμό συντήρησης μεταξύ αυτών των οργανισμών. Η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου (5-UTR) έχει σχετικά μεγάλο μέγεθος, σε σύγκριση με τα πιο πολλά γονίδια, κοινό χαρακτηριστικό μεταγραφικών παραγόντων, αυξητικών παραγόντων και πρωτεϊνών θερμικού σοκ (heat shock proteins) (Kozak, 1987).

Όσον αφορά την αμινοξική αλληλουχία του γονιδίου *NscII* (και στους τρεις αυτούς οργανισμούς), εντύπωση προκαλεί η ύπαρξη μιας πολύ βασικής περιοχής (την οποία ονομάσαμε b') ανοδικά της bHLH περιοχής και της οποίας τον πιθανό μεταγραφικό ρόλο θελήσαμε να μελετήσουμε εκτενέστερα. Αξιοσημείωτο είναι ότι υπάρχουν επτά κατάλοιπα αργινίνης - τα έξι συνεχόμενα - σε σύνολο εννέα αμινοξέων. Όπως γνωρίζουμε, ορισμένες από τις αλληλεπιδράσεις των αμινοξέων με τις νουκλεοτιδικές βάσεις φαίνεται να ευνοούνται έναντι άλλων, κατά την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με το DNA. Συγκεκριμένα, μελέτες έχουν δείξει ότι η αλληλεπίδραση καταλοίπων αργινίνης με τη βάση γουανίνη αποτελεί μια από τις πιο συχνά εμφανιζόμενες αλληλεπιδράσεις (33%) (Luscombe et al, 2001). Αυτή η επιλεκτικότητα, στη δημιουργία αλληλεπιδράσεων μεταξύ αμινοξέων και βάσεων, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα είτε τη σταθεροποίηση των συμπλόκων μεταξύ DNA και πρωτεϊνών είτε να συμβάλλει στην εξειδίκευση της πρόσδεσης των πρωτεϊνών σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA.

Επομένως, η περιοχή b'-πλούσια σε αργινίνες- μπορεί να συμβάλλει στην σταθεροποίηση της πρόσδεσης του NSCL1 στο DNA κατά τέτοιο τρόπο ώστε η στερεοδιάταξη την οποία λαμβάνει τελικά η πρωτεΐνη να επιδρά θετικά ή αρνητικά στο μεταγραφικό της ρόλο. Σαν αποτέλεσμα, αφαίρεση της b' περιοχής μπορεί να

ενισχύει τη θετική ή αρνητική ενεργοποίηση της μεταγραφής που προκαλείται από τον NSCL1.

Επιπρόσθετα, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι πρωτεΐνες που προορίζονται να δράσουν στον πυρήνα φέρουν μια ειδική αλληλουχία σήματος - εντοπισμού (NLS – Nuclear Localization Signal) με θετικά φορτισμένα αμινοξέα, η παρουσία της πολύ θετικά φορτισμένης b' περιοχής, ενδέχεται να ευθύνεται για συγκεκριμένο εντοπισμό του NSCL1. Ενδιαφέρον θα ήταν να ελεγχθεί ο κυτταρικός εντοπισμός της ελλειπτικής πρωτεΐνης NSCL1Δ σε σχέση με τον κυτταρικό εντοπισμό της NSCL1. Είναι πολύ πιθανό να φανεί ότι ο πυρηνικός εντοπισμός της NSCL1Δ είναι μικρότερος του αντίστοιχου της NSCL1, γεγονός το οποίο θα αποτελούσε και άλλη μια πιθανή ερμηνεία της μειωμένης ικανότητας της NSCL1Δ να προκαλέσει μεταγραφική ενεργοποίηση.

4.3. Η έκφραση του *cNsc11* εντοπίζεται σε μεταμιτωτικούς νευρώνες του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, που βρίσκονται στη φάση διαφοροποίησής τους

Για να διαπιστώσουμε την έκφραση του *cNsc11* πραγματοποιήσαμε, καταρχήν, πειράματα whole mount in situ υβριδοποίησης σε έμβρυα όρνιθας που κάλυπταν τα εμβρυικά αναπτυξιακά στάδια HH8 (τέσσερα ζεύγη σωματιών) έως HH36 (δέκατη εμβρυική ημέρα). Έτσι μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε την εκτεταμένη έκφραση του *cNsc11* σε κύτταρα του Κ.Ν.Σ. και του Π.Ν.Σ. Στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο η έκφρασή του εντοπίζεται σε όλες τις κύριες δομές: τελεγκέφαλο, διεγκέφαλο, μεσεγκέφαλο και μυελεγκέφαλο. Η έκφραση σ' αυτές τις περιοχές ξεκινά κατά την εμβρυική ημέρα E5 και αυξάνεται έως και την E8, ενώ από την E9 μειώνεται και κατά την E15 δεν είναι πλέον ανιχνεύσιμη, εκτός από την περιοχή της αναπτυσσόμενης παρεγκεφαλίδας. Στη συνέχεια, με πειράματα in situ υβριδοποίησης σε τομές μικροτόμου δόνησης και κρουτόμου, διαπιστώσαμε ότι η έκφραση του *cNsc11* σε όλες αυτές τις δομές εντοπίζεται σε κύτταρα έξω από την βλαστική ζώνη, στην υποκοιλιακή ζώνη του νευροεπιθηλίου. Στην περιοχή αυτή εντοπίζονται πρόιμοι μεταμιτωτικοί νευρώνες, που βρίσκονται στα πρώτα στάδια της διαφοροποίησής τους. Η διαπίστωση αυτή έρχεται να συμφωνήσει και με πειράματα ανοσοϊστοχημείας μετά από ενσωμάτωση βρωμο-δεοξυ-ουριδίνης (BrdU incorporation) σε μιτωτικά κύτταρα αυτών των περιοχών, των οποίων το πρότυπο δεν

επικαλύπτεται με το πρότυπο των κυττάρων που εκφράζουν το *cNscII* (Li et al, 1999).

Αξιοπρόσεκτο ωστόσο είναι το γεγονός ότι η έκφραση του *NscII* εντοπίζεται σε περιοχές του εγκεφάλου που ακόμα και στο ενήλικο άτομο εμφανίζουν κάποια δυναμικότητα. Συγκεκριμένα, έκφραση υπάρχει στην περιοχή του ιππόκαμπου, μια περιοχή γνωστή για την παρουσία μιτωτικών κυττάρων και τη δυνατότητα δημιουργίας και διαφοροποίησης νευρώνων στο ενήλικο άτομο. Έκφραση του *NscII* εντοπίζεται και στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, μια περιοχή για την οποία συνεχώς προστίθενται νέα δεδομένα για την ύπαρξη ενός δεύτερου κύματος μιτωτικής διαίρεσης στην υποκοιλιακή ζώνη. Για να διαπιστώσουμε την έκφραση του chick *NscII* στον εγκέφαλο προχωρήσαμε σε πειράματα in situ υβριδοποίησης σε εγκάρσιες τομές μικροτόμου δόνησης από εγκεφάλους εμβρύων όρνιθας διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων. Τα ισχυρότερα επίπεδα έκφρασης τα παρατηρήσαμε κατά την όγδοη εμβρυϊκή ημέρα. Συγκεκριμένα κατά την E8 το *cNscII* είδαμε να εκφράζεται στην υποκοιλιακή ζώνη της οπτικής καλύπτρας, στον υποθάλαμο και στο μέσο και κοιλιακό ιππόκαμπο.

Παράλληλα με τα πειράματα στην όρνιθα, έγιναν και αντίστοιχα πειράματα στον ποντικό καλύπτοντας όλες τις ηλικίες από τα εμβρυικά στάδια μέχρι και το ενήλικο ζώο. Τα πρότυπα έκφρασης που διαπιστώσαμε μεταξύ αυτών των δυο οργανισμών ήταν πολύ παρόμοια.

Έτσι για την όρνιθα κατά την εμβρυϊκή ημέρα E8 το *cNscII* εκφράζεται στην υποκοιλιακή ζώνη (SVZ, subventricular zone) της οπτικής καλύπτρας, όπως αντίστοιχα εκφράζεται και στον ποντικό το *mNscII* κατά την εμβρυϊκή ημέρα E14.5, ενώ δυο μέρες νωρίτερα εκφράζεται στον ποντικό στην προφλοιϊκή πλάκα (PPL, Plexiform Primordium Layer). Όπως αναφέραμε και πρωτότερα τόσο η SVZ όσο και η PPL θεωρούνταν ότι απαρτίζονταν αποκλειστικά από μεταμιτωτικά κύτταρα, όμως πλέον οι ενδείξεις για μιτωτική δραστηριότητα στην SVZ (ειδικά στα πρωτεύοντα και στα ενήλικα) συνεχώς αυξάνονται. Στα μεταγενετικά στάδια καθώς και στον ενήλικο ποντικό η έκφραση του *mNscII* εντοπίζεται στις στοιβάδες II, III και VI της φλοιϊκής πλάκας.

Όσον αφορά την έκφραση του *NscII* στην περιοχή του ιππόκαμπου παρατηρήσαμε το πιο υψηλό επίπεδο έκφρασης στην όρνιθα κατά την εμβρυϊκή ημέρα E8 και στη συνέχεια αρχίζει να φθίνει χωρίς να έχουμε όμως δεδομένα για τη μεταγενετική και ενήλικη περίοδο. Στον ποντικό δε διαπιστώσαμε έκφραση του

mNsc11 κατά την εμβρυική περίοδο, αλλά η έναρξη της έκφρασης του *mNsc11* εντοπίζεται περί την ημέρα της γέννησης και συνεχίζεται καθ' όλη την επόμενη περίοδο μέχρι και την ενηλικίωση. Τόσο στην όρνιθα όσο και στον ποντικό η εντονότερη έκφραση εντοπίζεται στην περιοχή της οδοντωτής έλικας (Dentate Gyrus) και στις περιοχές CA1, CA2 και CA3 όπου εντοπίζονται πλήθος πυραμιδικών νευρώνων. Η περιοχή της οδοντωτής έλικας είναι μια από τις δυο περιοχές, μαζί με τους οσφρητικούς νευρώνες, όπου προστίθενται νέοι νευρώνες καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής των θηλαστικών. Αναφορικά με το πρότυπο σχηματισμού της περιοχής της οδοντωτής έλικας αρχικά καταλαμβάνεται από Cajal-Retzius κύτταρα και ακτινωτή γλοία, στοιχεία που προωθούν τη μορφογένεσή της (Rickmann et al, 1987). Σε αντίθεση όμως με άλλες περιοχές του φλοιού, υπάρχουν κάποιοι μιτωτικοί πρόδρομοι κυτταρικοί πληθυσμοί που διατηρούν την ικανότητα να δημιουργούν νευρώνες. Μεταγεννητικά, τα πρόδρομα αυτά κύτταρα σχηματίζουν την υποκοκκιώδη ζώνη (subgranular zone - SGZ) (Altman and Bayer, 1990). Στην SGZ ζώνη υπάρχει μια συνεχής ανανέωση των πρόδρομων κοκκιωδών κυττάρων καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής. Επιπλέον, παράλληλα με τον σχηματισμό της SGZ, ξεκινάει μια σύνθετη μεταναστευτική πορεία προκειμένου να σχηματιστούν οι CA1, CA2 και CA3 περιοχές όπου εντοπίζονται οι πυραμιδικοί νευρώνες.

Κατά τα εμβρυϊκά και μεταγεννητικά στάδια έχουν εντοπιστεί πλήθος HLH μεταγραφικών παραγόντων που φαίνεται να συμμετέχουν ρυθμιστικά στη μορφογένεση και το σχηματισμό του ιππόκαμπου. Εστιάζοντας στις πρώτες δυο μεταγεννητικές εβδομάδες στον επίμυ, ο *Mash1* μεταγραφικός παράγοντας εκφράζεται από την πλειοψηφία των πρόδρομων κυττάρων που βρίσκονται στην SGZ. Χαρακτηριστικό είναι ότι στο ενήλικο άτομο η έκφραση του *Mash1* εντοπίζεται αποκλειστικά στην SGZ ζώνη και καθόλου στην κοκκιώδη στοιβάδα καθώς και ότι τα κύτταρα που εκφράζουν *Mash1* διατηρούν το μιτωτικό τους χαρακτήρα. Αντίστοιχες μελέτες έδειξαν ότι τα κύτταρα που βγαίνουν από τη μίτωση και μεταναστεύουν προς την εσωτερική πλευρά της κοκκιώδους στοιβάδας, εκφράζουν έντονα τον HLH μεταγραφικό παράγοντα *NeuroD*. Ο *NeuroD* εκφράζεται από το σύνολο των κοκκιωδών κυττάρων, ακόμα και κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους, αλλά με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης να έχουν τα πρώιμα κοκκιώδη κύτταρα εκείνα δηλαδή της εσωτερικής πλευράς. Στο ενήλικο διατηρείται η έκφραση του *NeuroD* αν και υπάρχει σχετική μείωση της έκφρασης στην εσωτερική πλευρά της κοκκιώδους στοιβάδας (Pleasure et al, 2000). Από τα στοιχεία που προκύπτουν

φαίνεται ότι ο NSCL1 ακολουθεί σε μεγάλο βαθμό το ίδιο πρότυπο με αυτό του HLH παράγοντα *NeuroD*. Αναφορικά με την περιοχή της οδοντωτής έλικας και οι δυο παράγοντες εκφράζονται έντονα στην SGZ, αλλά και στην κοκκιώδη στοιβάδα. Ενδεχομένως θα μπορούσε να ειπωθεί ότι το *Nsc11* εκφράζεται εντονότερα στην SGZ όπως και το *NeuroD* (Pleasure et al, 2000). Με δεδομένο ότι το γονίδιο *NeuroD* και το *Nsc11* παρουσιάζουν λειτουργική αλληλεπικάλυψη κατά την ανάπτυξη άλλων συστημάτων, όπως το λιθοειδές και το αιθουσαιοακουστικό γάγγλιο (Kruger et al, 2006) είναι πιθανό να έχουν παρόμοιο ρόλο και στη διαδικασία δημιουργίας, διαφοροποίησης ή μετανάστευσης των διαφόρων κυτταρικών πληθυσμών του ιππόκαμπου.

Εδώ θα πρέπει να αναφέρουμε και ότι η υπερέκφραση του *Nsc11* στην αθανατοποιημένη κυτταρική σειρά HiB5 από πρόδρομα πολυδύναμα κύτταρα ιπποκάμπου οδηγεί σε σημαντική αύξηση της επέκτασης νευριτών, ενδεικνύοντας έτσι ότι αυτά αποκτούν ένα πιο ώριμο νευρικό φαινότυπο (Manetopoulos et al, 2003). Η επαγωγή όμως της επέκτασης νευριτών σ' αυτή την ιπποκαμπική κυτταρική σειρά, εκμηδενίζεται απόλυτα, εάν γίνει συνδιαμόλυνση με την LIM-only πρωτεΐνη LMO4, πιθανότατα μέσω πρόσδεσής της πάνω στην πρωτεΐνη NSCL1.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συσχέτιση του λειτουργικού ρόλου του ιπποκάμπου σε σχέση με τα επίπεδα και το πρότυπο έκφρασης του *Nsc11*. Γνωρίζουμε ότι ο ιππόκαμπος μετέχει σε όψεις της αποθήκευσης της μνήμης και στην αντιμετώπιση στρεσογόνων καταστάσεων. Ειδικά η περιοχή CA3 ενέχεται στον έλεγχο της ροής των πληροφοριών μέσα στον ιππόκαμπο και εμφανίζει τη μεγαλύτερη πλαστικότητα (έκφραση γονιδίων, δημιουργία συναπτικών θέσεων κ.α.) σε στρεσογόνες καταστάσεις. Νεογεννηθέντες ποντικοί δεν αποκρίνονται σε καταστάσεις στρες, ενώ αρχίζουν να αποκρίνονται μετά τη δεύτερη βδομάδα της ζωής τους. Από τα αποτελέσματά μας παρατηρούμε ότι ενώ το γονίδιο *Nsc11* εκφράζεται έντονα σε διάφορες περιοχές του ιπποκάμπου του ποντικού (οδοντωτή έλικα, CA1, CA2) κατά την ημέρα της γέννησης, εκλείπει τελείως η έκφρασή του από την περιοχή CA3. Η έκφρασή του στην CA3 αρχίζει μετά τη δεύτερη βδομάδα της ζωής του, η οποία συμπίπτει με την έναρξη της απόκρισης του ποντικού σε καταστάσεις στρες και συνεχίζεται σε όλη την υπόλοιπη διάρκεια της ζωής του. Γι' αυτό το λόγο θεωρούμε ότι θα είναι πολύ χρήσιμη η διενέργεια πειραμάτων μελέτης της συμπεριφοράς φυσιολογικών και NSCL1^{-/-} ποντικών υπό συνθήκες στρες και κανονικές συνθήκες.

Όσον αφορά την έναρξη της έκφρασης του *cNscII* στο νευρικό σωλήνα, αυτή ανιχνεύεται κατά το αναπτυξιακό στάδιο HH 10+ και επεκτείνεται με προσθιοπίσθια κατεύθυνση σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια. Κατά το στάδιο HH 24 έχει επεκταθεί σε όλο το μήκος του νωτιαίου μυελού, όπως και στα αισθητικά γάγγλια και μετά από αυτό το στάδιο αρχίζει να φθίνει, πάλι με προσθιοπίσθια κατεύθυνση, ενώ η έκφραση του *cNscII* αρχίζει να εξαφανίζεται πρώτα από το ραχιαίο τμήμα και στη συνέχεια από το κοιλιακό, αναφορικά με το ραχαιοκοιλιακό άξονα. Η προσθιοπίσθια και ταυτόχρονα ραχαιοκοιλιακή εξέλιξη αυτού του φαινομένου, ταυτίζεται με την ωρίμανση του νωτιαίου μυελού, κατά τον προσθιοπίσθιο και ραχαιοκοιλιακό άξονα.

Με πειράματα *in situ* υβριδοποίησης, σε εγκάρσιες τομές μικροτόμου δόνησης και κρυστού, διαπιστώσαμε ότι το *cNscII* εκφράζεται σε υποομάδες συνδεσμικών και κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού. Συγκρίνοντας το πρότυπο έκφρασης του *cNscII* με το πρότυπο έκφρασης του *axonin-1* και του γονιδίου *Islet-1* (Ericson et al, 1992), τα οποία εκφράζονται σε μεταμιτωτικούς νευρώνες, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το *cNscII* εκφράζεται σε πρώιμους μεταναστεύοντες κινητικούς νευρώνες, που απομακρύνονται από τη βλαστική ζώνη, αμέσως μετά την τελευταία μίτωσή τους.

Τα συμπεράσματα αυτών των πειραμάτων συμφωνούν με αντίστοιχα πειράματα σε έμβρυα ποντικών. Το γονίδιο *mNscII* στον ποντικό δεν εκφράζεται κατά την εμβρυική ημέρα E8.5, όταν το νευροεπιθήλιο απαρτίζεται, κυρίως, από μιτωτικούς νευροβλάστες, αλλά η έναρξη της έκφρασής του συμπίπτει με την εμβρυική ημέρα E9.5 και την έναρξη της διαφοροποίησης των πρώτων μεταμιτωτικών νευρώνων (Murdoch et al, 1999). Σε συμφωνία με τα παραπάνω έρχεται και η παρατήρηση ότι σε ποντικούς με απώλεια δράσης του γονιδίου *Hes1* (*Hes1^{-/-}*), στους οποίους εμφανίζεται πρόωρη διαφοροποίηση, το γονίδιο *mNscII* εκφράζεται πρόωρα (Ishibashi et al, 1995).

4.4. Η έκφραση του *NscII*, στην παρεγκεφαλίδα της όρνιθας και του ποντικού, εντοπίζεται σε μιτωτικούς και προμεταναστευτικούς νευρώνες της εξωτερικής κοκκώδους στοιβάδας (EGL)

Η παρεγκεφαλίδα αποτελεί ένα από τα επτά κύρια μέρη του εγκεφάλου και παρουσιάζει την ιδιαιτερότητα ότι προέρχεται από δυο πληθυσμούς βλαστικών κυττάρων διαφορετικής προέλευσης, του μεσεγκεφάλου και του μετεγκεφάλου

(Hallonet et al 1990; Fujita et al, 1966). Ο ένας πληθυσμός κυττάρων προέρχεται από το νευροεπιθήλιο, και είναι αυτός που δίνει τους “εν τω βάθει” πυρήνες της παρεγκεφαλίδας και τους νευρώνες Purkinje. Αργότερα, κατά την ανάπτυξη, ένας μικρός αριθμός κυττάρων μεταναστεύει από την κοιλιακή βλαστική ζώνη του μετεγκεφάλου, προς το ραχιαίο τμήμα του μετεγκεφάλου, σχηματίζοντας το ρομβικό χείλος, από τα κύτταρα του οποίου θα προέλθουν τα κύτταρα της εξωτερικής κοκκώδους στοιβάδας (EGL) της παρεγκεφαλίδας (Hallonet et al, 1990).

Η έκφραση του *mNsc11* ανιχνεύεται στο προπαρεγκεφαλιδικό επιθήλιο κατά την εμβρυική ημέρα E10.5, ενώ κατά την E14 η έκφρασή του εντοπίζεται στη βλαστική στοιβάδα του επιθηλίου της παρεγκεφαλίδας. Κατά τα όψιμα εμβρυικά στάδια η έκφραση του *mNsc11* ανιχνεύεται σε μεταναστεύοντα πρόδρομα κύτταρα της εξωτερικής κοκκώδους στοιβάδας.

Για την ανίχνευση του προτύπου έκφρασης του chick *Nsc11* στην παρεγκεφαλίδα πραγματοποιήσαμε πειράματα whole mount in situ υβριδοποίησης σε έμβρυα όρνιθας, που κάλυπταν τα αναπτυξιακά στάδια από την E2 έως και την E9, και στη συνέχεια προχωρήσαμε σε πειράματα in situ υβριδοποίησης σε τομές μικροτόμου δόνησης και κρυστούμου καλύπτοντας τα υπόλοιπα εμβρυικά αναπτυξιακά στάδια. Κατά την εμβρυική ημέρα E5 η έκφραση του *cNsc11* πρωτοεμφανίζεται στο προπαρεγκεφαλιδικό επιθήλιο, και η έκφρασή του είναι συνεχής κατά τις επόμενες εμβρυικές ημέρες μέχρι την εκκόλαψη (E19). Το μέγιστο επίπεδο της έκφρασής του, ανιχνεύεται κατά τις εμβρυικές ημέρες E14-E15, χρονικό διάστημα που συμπίπτει με την πιο δυναμική νευρογένεση αυτής της περιοχής, ενώ στη συνέχεια φθίνει. Η έκφραση του chick *Nsc11*, όπως και του mouse *Nsc11*, εντοπίζεται τόσο στη βλαστική (μιτωτική) έξω εξωτερική κοκκώδη στοιβάδα (outer EGL), όσο και στην προμεταναστευτική (μεταμιτωτική) έσω εξωτερική κοκκώδη στοιβάδα (inner EGL), στην οποία οι ανώριμοι μεταμιτωτικοί νευροβλάστες υπόκεινται τα πρώτα στάδια διαφοροποίησής τους, πριν μεταναστεύσουν στην εσωτερική κοκκώδη στοιβάδα (Internal Granule Layer-IGL).

Στον ποντικό, ασθενής έκφραση του mouse *Nsc11* ανιχνεύεται παροδικά και στη νεοδημιουργούμενη εσωτερική κοκκώδη στοιβάδα (IGL), στην οποία μόλις έχουν μεταναστεύσει κύτταρα από την προμεταναστευτική έσω EGL (Duncan et al, 1997; Uittenbogaard et al, 1999). Η έκφραση όμως του *mNsc11* δε συνεχίζεται στον ενήλικα ποντικό, ενδεικνύοντας και σε συμφωνία με όλα τα παραπάνω, το ρόλο του *Nsc11* στις διαδικασίες πολλαπλασιασμού, μετανάστευσης και διαφοροποίησης των

κοκκωδών κυττάρων της παρεγκεφαλίδας, αλλά όχι στη διατήρηση της διαφοροποιημένης τους κατάστασης.

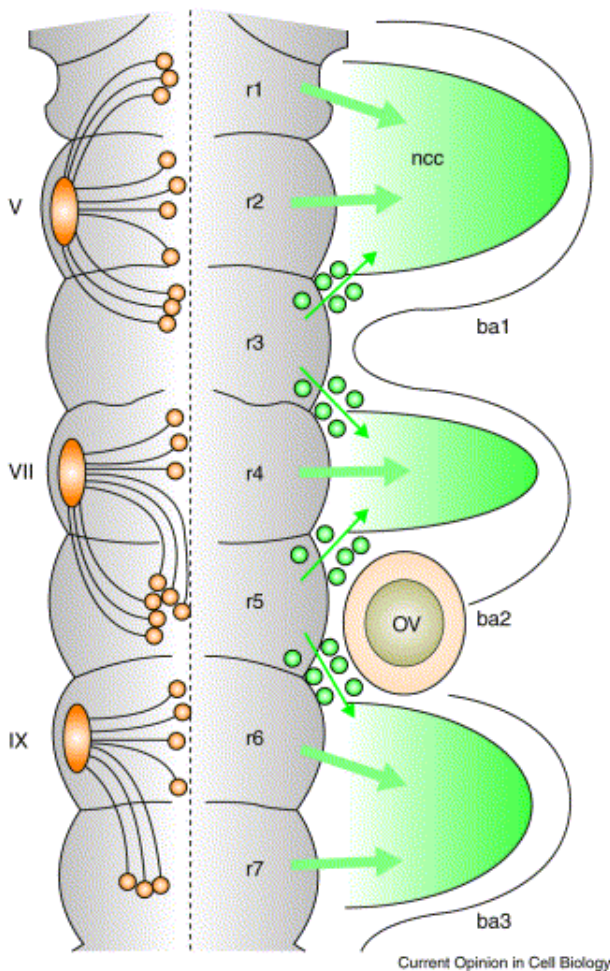
4.5. Η απώλεια δράσης του γονιδίου *Nsc11* προκαλεί επιβράδυνση της διαφοροποίησης στον οπίσθιο εγκέφαλο, ενώ η έκφρασή του στους προσωποκινητικούς νευρώνες ελέγχεται από το γονίδιο *Hoxb1*

Στα πρώτα στάδια σχηματισμού του εγκεφάλου, και συγκεκριμένα κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των εγκεφαλικών κυστιδίων, ο μελλοντικός εγκέφαλος εμφανίζει διαδοχικές ελαφρές διογκώσεις, που ονομάζονται νευρομέρη. Η διαμερισματοποίηση αυτή (μεταμεριδίωση) είναι ιδιαίτερα εμφανής στον οπίσθιο εγκέφαλο (ή ρομβοεγκέφαλος ή ρομβοειδής εγκέφαλος), όπου τα νευρομέρη ονομάζονται ειδικότερα ρομβομερή. Τα ρομβομερή στην όρνιθα εμφανίζονται, διαδοχικά, μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων HH9 έως HH12 (λίγο πριν τη δεύτερη εμβρυική ημέρα) και είναι διακριτά μέχρι το στάδιο HH24+, περί την τέταρτη εμβρυική ημέρα (Vaage, 1969). Ο οπίσθιος εγκέφαλος χωρίζεται σε 8 ρομβομερή, από τα οποία το καθένα εκφράζει κάποιο συγκεκριμένο και πολύ ειδικό συνδυασμό γονιδίων, που του προσδίδει ορισμένα χαρακτηριστικά, που είναι μοναδικά για το κάθε ρομβομερές. Κεντρικό ρόλο στον καθορισμό της νευρωνικής μοίρας κάθε ρομβομερούς κατέχουν τα γονίδια *Hox*, πολλών από τα οποία το πρόσθιο όριο έκφρασης συμπίπτει με τα όρια που σχηματίζονται μεταξύ των ρομβομερών (Hunt et al, 1991; Noden, 1992). Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των ρομβομερών είναι η κατηγοριοποίησή τους σε άρτια και περιττά, με αρκετά κοινά χαρακτηριστικά ανά κατηγορία. Διαφοροποιημένοι νευρώνες δημιουργούνται πρώτα στα άρτια ρομβομερή r4, r2 και r6, ενώ στα περιττά εμφανίζονται αργότερα. Παράλληλα, ενώ μέσα στο κάθε ρομβομερές επιτρέπεται η μετακίνηση και η αλλαγή θέσης μεταξύ των κυττάρων, αυτό δεν μπορεί να γίνει μεταξύ κυτταρικών σωμάτων γειτονικών ρομβομερών από τη στιγμή που θα δημιουργηθούν τα όρια μεταξύ αυτών (Fraser et al, 1990). Η γενεαλογία των κυττάρων των κρανιακών νεύρων, όπως και των βραγχιακών τόξων (branchial arches) συνδέεται αυστηρά με την ύπαρξη των ρομβομερών. Έτσι το τρίδυμο νεύρο (V, trigeminal), απαρτίζεται από νευράξονες κυτταρικών σωμάτων που βρίσκονται στα r2, r1 και r3, αλλά η έξοδος όλων αυτών από τον οπίσθιο εγκέφαλο, προκειμένου να νευρώσουν τους περιφερικούς τους στόχους, βρίσκεται στο r2. Ομοίως το προσωπικό νεύρο (VII, facial), που αποτελείται από άξονες

νευρώνων του r4 και r5, έχει την έξοδό του στο r4 και το γλωσσοφαρυγγικό (IX, glossopharyngeal), που συλλέγει άξονες, που προέρχονται από νευρώνες του r6 και r7, έχει έξοδο από το r6 (**Εικόνα 40**). Παρόμοια, αυστηρά καθορισμένα, μεταναστευτικά μονοπάτια ακολουθούν και τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας κατευθυνόμενα προς τα βραγχιακά τόξα (Trainor and Krumlauf, 2001).

Με τα πειράματά μας διαπιστώσαμε ότι το πρότυπο έκφρασης του chick *Nsc11* στον οπίσθιο εγκέφαλο, χρονικά και τοπολογικά, προσομοιάζει με την πορεία διαφοροποίησης των νευρώνων αυτής της περιοχής. Συγκεκριμένα παρατηρήσαμε ότι εκφράζεται πρώτα στο r4 μετά στο r2 και στη συνέχεια στα r6, r7 και r8. Η έκφρασή του, δε, στα r5, r3 και r1, εκτός από τη χρονική υστέρηση, παρουσιάζεται και ασθενέστερη. Ιδιαίτερα έντονο πρότυπο έκφρασης παρουσιάζει το *cNsc11* στο r4 και συγκεκριμένα στην περιοχή του βασικού πετάλου, όπου γεννιούνται οι προσωποκινητικοί νευρώνες (fbm, facial branchiomotor neurons). Οι νευρώνες αυτοί εκτείνουν τους άξονές τους, ραχιαία προς το σημείο εξόδου του προσωπικού νεύρου, ενώ λίγο αργότερα μεταναστεύουν πλαγιοπίσθια, μέχρι να καταλάβουν την τελική τους θέση, σχηματίζοντας τον προσωποκινητικό πυρήνα. Είναι γνωστό ότι το *Hox b1* συμμετέχει στον καθορισμό της νευρωνικής μοίρας του τέταρτου ρομβομερούς που καθορίζει τη δημιουργία του προσωπικού κινητικού πυρήνα (Gavalas et al, 1998; Studer et al, 1998).

Απαλοιφή του *Hox b1* οδηγεί σε ανώμαλη ανάπτυξη του πυρήνα αυτού (Gavalas et al, 2003, Gaufo et al, 2000; Goddard et al, 1996; Studer et al, 1996). Δεδομένου του ότι το *Nsc11* εκφράζεται στο r4 και στους μεταναστεύοντες προσωποκινητικούς νευρώνες θελήσαμε να ελέγξουμε εάν βρίσκεται στο γονιδιακό μονοπάτι που ελέγχει το *Hox b1*. Για το λόγο αυτό σε ποντικούς με απώλεια δράσης του *Hox b1* (*Hox b1*^{-/-}, προσφορά του Δρ. Γαβαλα Α.) μελετήσαμε το πρότυπο έκφρασης του *mNsc11* με υβριδοποίηση in situ. Πραγματικά διαπιστώσαμε ότι η έκφραση του *mNsc11*, δεν υφίσταται κατά την εμβρυική ημέρα E10.5, στους προσωποκινητικούς νευρώνες στους *Hox b1*^{-/-} ποντικούς (σε αντίθεση με τους *Hox b1*^{+/-}), οδηγώντας μας στο συμπέρασμα ότι η έκφρασή του *mNsc11* στους συγκεκριμένους νευρώνες βρίσκεται υπό τον άμεσο ή έμμεσο έλεγχο του *Hox b1*.



Εικόνα 40: Τμηματική οργάνωση του οπίσθιου εγκεφάλου, των κινητικών νευρώνων και μετανάστευση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας. Τα σπλαγχοπροσωποκινητικά νεύρα (V, VII, IX) συλλέγουν άξονες από κυτταρικά σώματα (μικρές πορτοκαλί σφαίρες) που βρίσκονται σε διάφορα ρομβομερή, αλλά η έξοδος όλων από τον οπίσθιο εγκέφαλο βρίσκεται μόνο σε άρτια ρομβομερή. Τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας (ncc, neural crest cells) τα οποία μεταναστεύουν προς τα βραγχιακά τόξα (ba, branchial arches) προέρχονται κατεξοχήν από τα r1, r2, r4, r6 και r7 (πράσινα έντονα βέλη), ενώ από τα ρομβομερή r3 και r5, μεταναστεύει πολύ μικρότερος αριθμός κυττάρων προς τα βραγχιακά τόξα. OV: ωτικό κυστίδιο, V: τρίδυμο κινητικό νεύρο, VII: προσωποκινητικό νεύρο, IX: γλωσσοφαρυγγικό κινητικό νεύρο

Στη συνέχεια, θέλοντας να διερευνήσουμε τον πιθανό γενικότερο ρόλο του *Nsc11* στην ανάπτυξη του οπίσθιου εγκεφάλου χρησιμοποιήσαμε ποντικούς με απώλεια δράσης του *Nsc11* (*Nsc11*^{-/-}, προσφορά του Δρ. Kruger M). Στους ποντικούς αυτούς, και παράλληλα σε φυσιολογικούς ποντικούς, πραγματοποιήσαμε πειράματα whole mount in situ υβριδοποίησης για τις εμβρυικές ηλικίες E10.5 και E11.5, για τα γονίδια *Hoxb1*, *Hoxb2*, *Plzf*, *Tag1*, *Pax6* και *Engrailed-1*, που αποτελούν δείκτες με γνωστό πρότυπο έκφρασης για τον οπίσθιο εγκέφαλο. Διαπιστώσαμε ότι κατά την εμβρυική ημέρα E11.5 το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *Hoxb1*, *Hoxb2*, *Plzf*, και *Engrailed-1*, παρουσιάζει εμφανή διαφορά συγκριτικά με το πρότυπο έκφρασης στα φυσιολογικά ζώα. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα έκφρασης αυτών των γονιδίων διατηρούνται σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα από ότι στα φυσιολογικά ζώα, όπου η έκφρασή τους έχει μειωθεί πολύ περισσότερο και σε σχέση με την εμβρυική ημέρα E10.5. Για τα γονίδια *Tag1* και *Pax6* δε διαπιστώσαμε κάποια μεταβολή. Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι η απώλεια δράσης του γονιδίου *Nsc11*,

προκαλεί υστέρηση στη φυσιολογική εξέλιξη της έκφρασης των γονιδίων αυτών (*Hoxb1*, *Hoxb2*, *Plzf*, και *Engrailed-1*), η οποία πιθανόν να οφείλεται είτε σε καθυστέρηση της έναρξης είτε σε επιβράδυνση της διαδικασίας διαφοροποίησης των περιοχών αυτών του οπίσθιου εγκεφάλου. Επειδή όμως το πρότυπο έκφρασης αυτών των γονιδίων κατά την εμβρυική ημέρα E10.5 δεν παρουσιάζει κάποια διαφορά, είναι πολύ πιο πιθανή η δεύτερη εκδοχή.

Προκειμένου να ενδυναμώσουμε το συμπέρασμά μας, ότι η έκφρασή του *mNscII* στους προσωποκινητικούς νευρώνες βρίσκεται υπό τον άμεσο ή έμμεσο έλεγχο του *Hox b1* και παράλληλα θέλοντας να διερευνήσουμε περισσότερο τον πιθανό έλεγχο του *NscII* από το *Hox b1* θεωρούμε απαραίτητη την πραγματοποίηση πειραμάτων υπερέκφρασης του γονιδίου *Hox b1*. Υποθέτουμε ότι εφόσον η έκφραση του *NscII* (τουλάχιστον στους προσωποκινητικούς νευρώνες) βρίσκεται υπό τον άμεσο ή έμμεσο έλεγχο του *Hox b1*, η υπερέκφραση του *Hox b1* θα οδηγήσει και σε αύξηση της έκφρασης του *NscII*.

Η υπόθεσή μας ότι η απώλεια δράσης του γονιδίου *NscII*, είναι πιθανό να προκαλεί καθυστέρηση της έναρξης της διαφοροποίησης είτε επιβράδυνση της διαδικασίας διαφοροποίησης των περιοχών αυτών του οπίσθιου εγκεφάλου, χρειάζεται παραπέρα πειραματική διερεύνηση. Πειράματα ανοσοϊστοχημείας μετά από ενσωμάτωση βρωμο-δεοξυ-ουριδίνης, σε φυσιολογικούς και *NscII*^{-/-} ποντικούς θα μας δείξουν εάν υπάρχει κάποια διαφορά στον αριθμό των μιτωτικών κυττάρων σε αντίστοιχες ηλικίες. Επιπρόσθετες πληροφορίες μπορούμε να έχουμε με τη χρήση γνωστών γονιδίων - δεικτών της νευρικής διαφοροποίησης και ωρίμανσης.

4.6. Το γονίδιο chick *NscII* εκφράζεται στα όρια των ρομβομερών, καθώς και σε νεοδημιουργούμενα όρια, μετά από μικροχειρουργική επέμβαση

Τα όρια των ρομβομερών χαρακτηρίζονται από ένα σύνολο ιδιοτήτων και μορφολογικών χαρακτηριστικών που τους προσδίδουν μία ιδιαίτερη ταυτότητα, ενώ ο φυσιολογικός τους ρόλος δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί πλήρως. Στην όρνιθα δημιουργείται πρώτα το όριο r5/r6, κατά το στάδιο HH9-, αμέσως μετά το r3/r4 (HH9), στη συνέχεια τα r2/r3 και r4/r5 (HH10) και ακολουθούν τελευταία τα r1/r2, r6/r7 και r7/r8 κατά το στάδιο HH12 (Guthrie, 1996). Στον οπίσθιο εγκέφαλο η νευρογένεση, και η επακόλουθη διαφοροποίηση, παρατηρείται πρώτα στο κέντρο των

ρομβομερών, στη συνέχεια επεκτείνεται στις υπόλοιπες περιοχές του ρομβομερούς για να καταλήξει στα όρια (Hanneman et al, 1988; Trevarrow et al, 1990). Η δημιουργία των ορίων επάγεται από παράγοντες γειτονικών ρομβομερών, που έχουν ως συνέπεια τη δημιουργία κυττάρων που εκφράζουν συγκεκριμένα μόρια και θα αποτελέσουν τα “δομικά στοιχεία” του ορίου. Την πλειονότητα των κυττάρων αυτών αποτελούν εξειδικευμένα νευροεπιθηλιακά ή ακτινωτά νευρογλοιακά κύτταρα (Radial glial cells), τα οποία είναι γνωστό ότι χρησιμεύουν ως υπόστρωμα για την ακτινωτή μετανάστευση νευρικών κυττάρων (Kandel et al, 1991; Baek et al, 2006). Τα όρια των ρομβομερών είναι περιοχές με μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και χαμηλή κυτταρική πυκνότητα, με την πλειονότητα των κυτταρικών σωμάτων να προβάλλουν προς την κοιλιακή επιφάνεια αφήνοντας κενούς πολλούς χώρους στην πιο οροφιαία περιοχή η οποία μπορεί να πληρωθεί με εξωκυττάρια συστατικά. Ο εξωκυττάριος αυτός κενός χώρος αυξάνει περίπου κατά τρεις φορές μεταξύ των σταδίων HH10 και HH18 (Heyman et al, 1993). Κάτω από τις πτυχές των ορίων των ρομβομερών υπάρχουν οπές ή κοιλότητες οι οποίες γεμίζουν με νευράξονες, καθώς προχωρά η νευρογένεση. Στα όρια των ρομβομερών συναντώνται η γλυκοπρωτεΐνη του εξωκυττάριου υλικού Laminin, ενώ η μορφή της N-CAM που συναντάται σε ενήλικες παρουσιάζει μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με την εμβρυική η οποία εμφανίζει και ασθενέστερες συναπτικές ιδιότητες σε σχέση με την N-CAM των ενηλίκων (Lumsden and Keynes, 1989). Στα όρια των ρομβομερών επίσης συναντάμε ακτίνη (Guthrie et al, 1991) καθώς και υψηλή συγκέντρωση λεκτίνης (Layer and Alber, 1990). Όπως προαναφέραμε, κυτταρικά σώματα από διπλανά ρομβομερή δεν έχουν τη δυνατότητα να διασχίσουν τα όρια, από τη στιγμή που αυτά θα δημιουργηθούν και μετέπειτα, εκτός από ελάχιστες εξαιρέσεις (Guthrie et al, 1993; Birgbauer and Fraser, 1994; Fraser et al, 1990; Cooke et al, 2001; Mellitzer et al, 1999). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τον ιδιαίτερα αυξημένο αριθμό γλυκοπρωτεϊνών με άμεση συμμετοχή σε συναπτικά φαινόμενα καθιστά τα μόρια, που εκφράζονται στις περιοχές αυτές και ιδιαίτερα τους μεταγραφικούς παράγοντες, υποψήφια για συμμετοχή σε διαδικασίες επέκτασης ή/και καθοδήγησης νευραξόνων.

Μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι έχουν βρεθεί ότι εκφράζονται στα όρια των ρομβομερών είναι οι *Fgf-3* (Mahmood et al, 1995), ο zinc-finger *Plzf* (Cook et al., 1995) και ο *Pax-6* (Heyman et al, 1995). Πρόσφατα διαπιστώθηκε και η επίμονη έκφραση του bHLH μεταγραφικού καταστολέα *Hes1* στα όρια των ρομβομερών, η

οποία, πιθανότατα, συνδέεται άμεσα με την παρεμπόδιση της νευρογένεσης και τον μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Baek et al, 2006).

Με την παρούσα εργασία διαπιστώσαμε ότι το γονίδιο chick *Nsc11*, και το ομόλογο του στον ποντικό, τα οποία εκφράζονται αρχικά στα ρομβομερή, σε μετέπειτα αναπτυξιακά στάδια περιορίζονται στα όρια των ρομβομερών, μέχρι το τέλος της μορφολογικής τους υπόστασης. Η ακολουθία αυτή της έκφρασης του *Nsc11* συμπορεύεται με τη νευρογένεση και διαφοροποίηση, την οποία παρατηρούμε στα ρομβομερή αρχικά, ενώ στη συνέχεια φθίνει στα ρομβομερή και εμφανίζεται στα όρια των ρομβομερών. Η έκφραση του *Nsc11* είναι διακριτή σε όλα τα όρια των ρομβομερών, τόσο στην όρνιθα όσο και στον ποντικό. Παράλληλα με την έκφραση του *Nsc11*, διαπιστώσαμε την έκφραση των *axonin-1* και *Tag1* στα όρια r3/r4 και r4/r5, στην όρνιθα και στον ποντικό αντίστοιχα, τα οποία περικλείουν το r4. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς γνωρίζουμε ότι το γονίδιο *Tag1* εκφράζεται από τους μεταναστεύοντες προσωποκινητικούς νευρώνες που γεννιούνται στο r4 (Garel et al, 2000; δικά μας αποτελέσματα).

Το μόριο συνάφειας *Tag1* είναι μια πρωτεΐνη που ανήκει στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών και εμφανίζει παροδική έκφραση σε πληθυσμούς μεταμιτωτικών νευρώνων (Dodd et al, 1988; Furley et al, 1990; Karagogeos et al, 1991). Από παλαιότερες έρευνες ήταν γνωστό ότι εμπλέκεται στη διαδικασία επέκτασης νευραξόνων καθώς και στην συνάφεια των κυττάρων μεταξύ τους (Furley et al, 1990). Επιπρόσθετα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος είναι γνωστό ότι το γονίδιο *Tag1* εκφράζεται παροδικά, από κυτταρικούς πληθυσμούς που βρίσκονται στη διαδικασία της μετανάστευσης (Dodd et al, 1988; Wolfer et al, 1994). Έως σήμερα, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη *Tag1* εμπλέκεται σε διαδικασίες επέκτασης και καθοδήγησης νευραξόνων αλλά και μεταναστευόντων νευρώνων συνήθως αλληλεπιδρώντας με άλλα μόρια συνάφειας (Furley et al, 1990; Felsenfeld et al, 1994; Lustig et al, 1999; Stoeckli and Landmesser, 1995; Denaxa et al, 2001).

Ένα κεντρικό θέμα σε σχέση με τη δημιουργία και το λειτουργικό ρόλο των ρομβομερών και των ορίων τους, αποτέλεσε το ερώτημα εάν τα ρομβομερή δημιουργούνται ως φυσικό επακόλουθο των ορίων που παρεμβάλλονται στον οπίσθιο εγκέφαλο ή αν τα ρομβομερή επάγουν τη δημιουργία των ορίων μεταξύ τους. Η κρατούσα άποψη αυτή τη στιγμή είναι η δεύτερη, η οποία υποστηρίζεται από

διάφορα πειραματικά αποτελέσματα: α) Σε περιπτώσεις που έχουμε απώλεια της μορφολογικής υπόστασης των ορίων, όπως στην περίπτωση επίδρασης με ρετινοϊκό οξύ (Nittenberg et al, 1997), δεν παρατηρείται καμιά μεταβολή στην προσθιοπίσθια κατανομή των διαφόρων κυτταρικών ομάδων, ούτε και παρατηρείται κάποια μίξη κυττάρων μεταξύ περιοχών που αντιστοιχούν σε πρώην διαφορετικά ρομβομερή β) Μετά τη δημιουργία των ορίων, εάν μεταφέρουμε με μικροχειρουργική επέμβαση δυο ρομβομερή σε διπλανές θέσεις τότε αυτά, εάν είναι διαφορετικής αρτιότητας, θα ξαναεπάγουν τη δημιουργία ενός νέου ορίου μεταξύ τους, ενώ εάν έχουν την ίδια αρτιότητα, θα «ενοποιηθούν» σε ένα ενιαίο μεγάλο ρομβομερές (Guthrie and Lumsden, 1991).

Προκειμένου να διερευνήσουμε την έκφραση και τον πιθανό ρόλο του *Nsc11* στην περίπτωση αυτή κατά την οποία σχηματίζεται, μετά από μικροχειρουργική επέμβαση, ένα νέο όριο (μετά τη γειτνίαση ενός περιττού με ένα άρτιο ρομβομερές) ή ένα ενιαίο μεγάλο ρομβομερές (μετά τη «συνένωση» δυο άρτιων ή περιττών ρομβομερών), προχωρήσαμε σε πειράματα whole mount in situ υβριδοποίησης σε έμβρυα όρνιθας σταδίων HH8+ έως HH12 στα οποία είχαμε αφαιρέσει ένα ή δυο ρομβομερή και στη συνέχεια τα αφήσαμε να επωαστούν, για μια ημέρα ακόμα. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι το *cNsc11* εκφράζεται στο νέο όριο το οποίο δημιουργείται μετά την προκαλούμενη γειτνίαση ενός περιττού και ενός άρτιου ρομβομερούς, ενώ δεν εκφράζεται στις περιπτώσεις γειτνίασης ρομβομερών με την ίδια αρτιότητα.

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η έκφραση του *cNsc11* αποτελεί ένα από τα επαγόμενα επακόλουθα γεγονότα της συνάντησης κυτταρικών πληθυσμών με διαφορετικά χαρακτηριστικά από γειτονικά ρομβομερή και που έχουν ως τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ορίου μεταξύ τους.

4.7. Μη φυσιολογική έκφραση του chick *Nsc11* με τη χρήση του ρετροϊκού φορέα έκφρασης RCAS(BP)-*cNsc11* οδηγεί σε ανώμαλη ανάπτυξη του ματιού και του εγκεφάλου

Προκειμένου να διερευνήσουμε τα αποτελέσματα της μη φυσιολογικής έκφρασης (έκτοπης ή υπερέκφρασης) του chick *Nsc11* κατασκευάστηκε ο ρετροϊκός φορέας έκφρασης RCAS(BP)-*cNsc11* τον οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε για έγχυση (injection) με μικροπιπέττα σε διάφορες περιοχές του νευρικού σωλήνα, εμβρύων όρνιθας ηλικίας 1,5 - 2,5 ημερών, ενώ ακολούθως με ηλεκτρικούς παλμούς

(electroporation) έγινε δυνατή η είσοδος του στα κύτταρα μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.

Όπως έχουμε προαναφέρει με την τεχνική αυτή (injection-electroporation) μας παρέχεται η δυνατότητα να επιμολώνονται με το πλασμιδιακό DNA μόνο τα κύτταρα που βρίσκονται προς τη μία ή την άλλη πλευρά του νευρικού σωλήνα, ενώ η άλλη να μένει ανεπηρέαστη και να χρησιμεύει ως αρνητικό συγκριτικό στοιχείο (αρνητικό control).

Η συλλογή και η εξέταση των εμβρύων μετά από 1-4 ημέρες έδειξαν πολύ μεγάλη συχνότητα (μακροσκοπικών) αναπτυξιακών ανωμαλιών σε περιοχές κυρίως των ματιών, του πρόσθιου και μέσου εγκεφάλου, του προπαρεγκεφαλιδικού επιθηλίου και των άκρων.

Το γονίδιο chick *Nsc11* εκφράζεται στον αμφιβληστροειδή σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του κατά την εμβρυική ηλικία (από E6 έως και E18). Μάλιστα παρουσιάζει κυτταροειδικότητα στην έκφρασή του καθώς εκφράζεται πρώτα σε διαφοροποιούμενα γαγγλιακά κύτταρα, ενώ αργότερα (περί την E15) εκφράζεται σε γλοιακά κύτταρα που εντοπίζονται στο κέντρο της έσω μοριακής στοιβάδας (INL, Inner Nuclear Layer). Η έκφραση, μάλιστα, στα γλοιακά κύτταρα συνεχίζεται για τουλάχιστο τριάντα ημέρες μετά την εκκόλαψη (Li et al, 1999,b). Σε όλα τα έμβρυα που συλλέξαμε και υπήρχε υπερέκφραση του *cNsc11* στην περιοχή του ματιού, διαπιστώσαμε ότι αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μικρότερου ματιού. Αιτία γι' αυτό είναι, πιθανότατα, ο αυξημένος κυτταρικός θάνατος που προκαλείται, εξαιτίας της υπερέκφρασης του chick *Nsc11*, τόσο στα γαγγλιακά όσο και στα γλοιακά κύτταρα. Επιπρόσθετοι λόγοι θα μπορούσαν να είναι η πρόωρη έξοδος των νευροβλαστών του αμφιβληστροειδούς από τον κυτταρικό κύκλο και η πιθανή παρεμπόδιση των γλοιακών κυττάρων να εισέλθουν ξανά στον κυτταρικό κύκλο μετά από κάποιου είδους διέγερση, κάτι το οποίο δεν είναι ασυνήθιστο για γλοιακά κύτταρα, σε αντίθεση με τους νευρώνες (Willbold and Layer, 1998).

Από τα πειράματά μας, επίσης, διαπιστώσαμε ότι η υπερέκφραση του chick *Nsc11* στον εγκέφαλο προκάλεσε σοβαρές αναπτυξιακές ανωμαλίες, με αποτέλεσμα να υπάρχει εμφανής μακροσκοπική διαφορά μεταξύ του αριστερού και του δεξιού τμήματος (που δεν υπερεκφράζει το *cNsc11*) του εγκεφάλου. Σε όλες τις περιπτώσεις εμείς παρατηρήσαμε σμίκρυνση των περιοχών αυτών, και συγκεκριμένα στον

πρόσθιο εγκέφαλο, στην οπτική καλύπτρα και στο προπαρεγκεφαλιδικό επιθήλιο. Η σπουδαιότητα αυτών των παρατηρουμένων μεταβολών ενισχύεται από το γεγονός ότι αντίστοιχα πειράματα, για δυο άλλα bHLH γονίδια, το *cNsc13* και το *neurogenin2* δεν επέφεραν καμιά ορατή μορφολογική αλλαγή (Li et al, 1999). Αυτό μας ωθεί στο συμπέρασμα ότι τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης του chick *Nsc11* δεν οφείλονται απλά στην τυχαία “διατάραξη” της πολύ λεπτής ισορροπίας που υφίσταται μεταξύ των HLH γονιδίων, αλλά σε κάποιο πολύ ειδικό ρόλο του chick *Nsc11* για την ανάπτυξη του εγκεφάλου.

Σε λίγες περιπτώσεις όπου η έκφραση του chick *Nsc11* επεκτάθηκε σε περιοχές, όπου δεν εκφράζεται φυσιολογικά, όπως τα άνω άκρα, παρατηρήσαμε ανώμαλη ανάπτυξή τους. Αυτό πιθανόν να οφείλεται σε μείωση της έκφρασης του μορφογενετικού παράγοντα των οστών BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4), η οποία έχει καταγραφεί σε αντίστοιχα πειράματα (Yan and Wang, 2001). Αξίζει και εδώ να αναφερθεί ότι έκτοπη έκφραση στα άκρα του πολύ συγγενικού γονιδίου chick *Nsc12* δεν επιφέρει αντίστοιχα αναπτυξιακά προβλήματα ή εμβρυικό θάνατο. Αντιθέτως όλα τα έμβρυα στα οποία γίνεται έκτοπη έκφραση ή υπερέκφραση του chick *Nsc11* πεθαίνουν το πολύ τη δέκατη τρίτη εμβρυική ημέρα.

4.8. Ο μεταγραφικός παράγοντας cNSCL1, ως ομοδιμερές, επιφέρει καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης

Η πρωτεΐνη NSCL1, όπως και όλες οι bHLH πρωτεΐνες της τάξης II σχηματίζει ετεροδιμερή με τις E- πρωτεΐνες E12, E47 και ME1a. Παράλληλα όμως, έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει και ομοδιμερή τα οποία προσδένονται σε ένα σχεδόν απόλυτα παλίνδρομο E-box : GGGNCGCAGCTGCGNCCC (Brown and Baer, 1994). Αυτή την ικανότητα σχηματισμού ομοδιμερών από bHLH πρωτεΐνες της τάξης II έχει δείχτει ότι την έχουν και οι πρωτεΐνες Mist1 και ABF-1 (Lemercier et al, 1998; Massari et al, 1998), οι οποίες έχει δείχθει ότι εμφανίζουν δράση μεταγραφικών καταστολέων. Κατασταλτική μεταγραφική δράση εμφανίζει και η τάξης II πρωτεΐνη Tal1, η οποία όμως δε φέρεται να έχει την ικανότητα σχηματισμού ομοδιμερών (Park and Sun, 1998).

Προκειμένου να μελετήσουμε τη μεταγραφική ενεργότητα του *cNSCL1*, ως ομοδιμερές, δημιουργήσαμε μια πλασμιδιακή κατασκευή του *cNsc11*, όπου είναι σε σύντηξη με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του γονιδίου *GAL4* (*GAL4 DBD*) και τέσσερις ελλειπτικές πλασμιδιακές κατασκευές του *cNsc11*, πάλι σε σύντηξη με την *GAL4 DBD*. Αυτές οι χμαιρικές πρωτεΐνες εκφράστηκαν σε ευκαρυωτικά κύτταρα οπότε και προσδέθηκαν ως ομοδιμερή στην περιοχή *GAL4 UAS* (*Upstream Activating Sequence*) ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης σε ένα πλασμίδιο αναφοράς, δίνοντας μας τα αντίστοιχα επίπεδα ενεργοποίησης ή καταστολής της μεταγραφής που επιφέρουν.

Από τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων φαίνεται πως τα ομοδιμερή των πλασμιδιακών κατασκευών Α, Γ και Ε παρουσιάζουν πολύ ισχυρή κατασταλτική δράση. Κοινό χαρακτηριστικό των πλασμιδιακών κατασκευών Α, Γ και Ε είναι ότι περιέχουν την περιοχή *bHLH* του *cNSCL1*. Συγκεκριμένα η μείωση της μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης σε σχέση με το βασικό επίπεδο ενεργοποίησης που προκαλείται από το φορέα κλωνοποίησης *pBxG1* είναι της τάξης του 85% και για τις τρεις πλασμιδιακές κατασκευές Α, Γ και Ε. Η πλασμιδιακή κατασκευή Β, η οποία περιέχει την Ν-τελική περιοχή χωρίς την πολύ βασική της υποπεριοχή *b'* επιφέρει μικρή αύξηση της ενεργοποίησης σε ποσοστό 35%. Η πλασμιδιακή κατασκευή Δ, η οποία φέρει ολόκληρη την Ν-τελική περιοχή (όπως η Β) και την πολύ βασική υποπεριοχή *b'*, προκαλεί μείωση της ενεργοποίησης σε ποσοστό 20%. Συγκρίνοντας αυτά τα αποτελέσματα μεταξύ τους και συσχετίζοντας τα με τις αντίστοιχες περιοχές της πρωτεΐνης *cNSCL1* που έχουν απαλειφθεί στις ελλειπτικές κατασκευές, μπορούμε να εξάγουμε τα παρακάτω συμπεράσματα :

Ο μεταγραφικός παράγοντας *cNSCL1*, στο συγκεκριμένο σύστημα που τον μελετήσαμε, παρουσιάζει ισχυρή κατασταλτική δράση ως ομοδιμερές. Το Ν-τελικό του τμήμα (κατασκευή Β) παρουσιάζει κάποια ασθενή ενεργοποιητική ικανότητα, η οποία όμως εκμηδενίζεται και μετατρέπεται σε ασθενή κατασταλτική δράση με την παρουσία της πολύ βασικής υποπεριοχής *b'*. Η ισχυρή κατασταλτική ικανότητα του *cNSCL1*, ως ομοδιμερές, πρέπει να εντοπίζεται στην περιοχή *bHLH*, καθώς οποιαδήποτε από τις πλασμιδιακές κατασκευές (Α, Γ, Ε) την περιέχει, παρουσιάζει σχεδόν απολύτως τα ίδια επίπεδα κατασταλτικής ικανότητας. Θα πρέπει επίσης να λάβουμε υπόψη ότι οι πλασμιδιακές κατασκευές Α, Γ και Ε περιλαμβάνουν δυο περιοχές διμερισμού. Η πρώτη, προς το αμινοτελικό άκρο, αποτελεί την περιοχή

διμερισμού (αμινοξέα 65-94) του γονιδίου *GAL4* και η δεύτερη, στο καρβοξυτελικό άκρο, αποτελεί την HLH περιοχή διμερισμού της πρωτεΐνης NSCL1. Οπότε είναι πολύ πιθανό η ύπαρξη δυο περιοχών διμερισμού (στην αρχή και στο τέλος της χμιαϊκής πρωτεΐνης) να επιφέρει πλήρη αδυναμία μεταγραφικής ενεργοποίησης, η οποία μπορεί να οφείλεται είτε στην αδυναμία πρόσδεσης στο DNA είτε στη δημιουργία ανενεργού διμερούς. Στο γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται και η μείωση της ενεργοποιητικής ικανότητας σε σχέση με τον πλασμιδιακό φορέα pBxG1, ο οποίος περιέχει μια πολύ ασθενή ενεργοποιητική περιοχή (αμινοξέα 90-147) της πρωτεΐνης GAL4.

4.9. Η πολύ βασική περιοχή β' του mNSCL1 ευθύνεται για την ενεργοποιητική ικανότητα του ετεροδιμερούς ME1a/mNSCL1

Η E-πρωτεΐνη E47 σχηματίζει ομοδιμερή τα οποία εμφανίζουν σημαντική ενεργοποιητική ικανότητα. Όταν όμως συνεκφράσουμε μαζί με την E47 και το mNSCL1, παρατηρούμε μείωση της ενεργοποιητικής ικανότητας της E47, η οποία μάλιστα αυξάνεται όσο αυξάνεται η περίσσεια του mNSCL1 (Manetopoulos et al, 2003). Μια άλλη E-πρωτεΐνη η ME1a, σχηματίζει επίσης ομοδιμερή τα οποία εμφανίζουν ενεργοποιητική ικανότητα, προσδεδεμένα σε δυο E-boxes τα οποία βρίσκονται ανοδικά ενός γονιδίου αναφοράς (Uittenbogaard et al, 1999).

Παλαιότερες μελέτες είχαν δείξει ότι το γονίδιο ME1a εμφανίζει επικαλυπτόμενη έκφραση με το *mNsc11* στην αναπτυσσόμενη παρεγκεφαλίδα (Neuman et al, 1993). Αυτό στάθηκε αφορμή να διερευνηθεί η πιθανότητα να υπάρχει λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ τους, οπότε και διαπιστώθηκε ότι όταν ο ME1a ετεροδιμερίζεται με τον NSCL1 έχουμε αύξηση της ενεργοποίησης, σε σχέση με το ομοδιμερές ME1a/ME1a. Το ετεροδιμερές NSCL1/ME1a προσδένεται, μέσω της βασικής περιοχής της κάθε πρωτεΐνης, με μεγάλη συγγένεια στο ολιγομερές μΕ2: 5'-AGCTGGCAGCAGCTGGCAGCA-3' (Uittenbogaard et al, 1999). Σύμφωνα με την ίδια αναφορά το ετεροδιμερές ME1a/NSCL1 προκαλεί ενεργοποίηση της μεταγραφής, η οποία ενισχύεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του NSCL1.

Ένας από τους στόχους της δικής μας εργασίας ήταν και η διερεύνηση της συμβολής της πολύ βασικής b' περιοχής του γονιδίου *Nsc11* στο ρόλο του ως μεταγραφικού παράγοντα. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκε η ελλειπτική κατασκευή mNsc11Δ του γονιδίου *mNsc11*, από την οποία έχει αφαιρεθεί η b' περιοχή. Παράλληλα

κατασκευάσαμε πλασμίδιο αναφοράς που περιέχει δυο E-boxes ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης :

5' CTAGCTGGCAGCAGCTGGCAGCAAGCTGGCAGCAGCTGGCAGCAC 3'

Οι συνδιαμολύνσεις που κάναμε σε ευκαρυωτικά κύτταρα με τους συνδυασμούς των πλασμιδιακών κατασκευών : ME1a μόνο του, mNsc11 μόνο του, ME1a/mNsc11, mNsc11Δ μόνο του και ME1a/mNsc11Δ μας οδηγούν στα παρακάτω συμπεράσματα : Το ομοδιμερές ME1a/ME1a παρουσιάζει χαμηλή ενεργοποιητική ικανότητα τόσο στην ηπατική κυτταρική σειρά HEPG2 όσο και στην κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος SHSY-5Y.

Το ομοδιμερές mNSCL1/mNSCL1 παρουσιάζει επίσης ενεργοποιητική ικανότητα, και μάλιστα υψηλότερη από αυτήν του ME1a/ME1a ομοδιμερούς. Επιπρόσθετα ο ετεροδιμερισμός του ME1a με το mNSCL1 προκαλεί παραπέρα αύξηση της ενεργοποιητικής τους ικανότητας.

Για την ενεργοποιητική ικανότητα του mNSCL1, ευθύνεται σε πολύ μεγάλο βαθμό η πολύ βασική περιοχή b', αφού η απαλοιφή της οδήγησε σε απώλεια της ενεργοποιητικής τους ικανότητας τόσο τα ομοδιμερή mNSCL1Δ/mNSCL1Δ, όσο και τα ετεροδιμερή mNSCL1Δ/ ME1a.

Η σχετικά μικρή μείωση της ενεργοποιητικής ικανότητας του mNSCL1 που παρατηρούμε στα κύτταρα SHSY-5Y, με την απαλοιφή της b' περιοχής είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στο ενδογενώς παραγόμενο mNSCL1, καθώς όταν αυξήσουμε την ποσότητα του mNsc11Δ πλασμιδίου με το οποίο διαμολύνουμε τα κύτταρα SHSY-5Y, το αποτέλεσμα είναι ανάλογο με το αποτέλεσμα που παίρνουμε από τα αντίστοιχα πειράματα στα ηπατικά κύτταρα HEPG2, τα οποία δεν εκφράζουν ενδογενές *mNsc11*.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις μας σε σχέση με τη συμβολή της πολύ βασικής περιοχής b' στην ενεργοποιητική ικανότητα του mNSCL1 θα μπορούσαν ίσως να εξηγηθούν λαμβάνοντας υπόψη κάποια δεδομένα, όσον αφορά την αλληλεπίδραση των καταλοίπων αργινίνης (στα οποία είναι πολύ πλούσια η b' περιοχή) με τις νουκλεοτιδικές βάσεις.

Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι ορισμένες από τις αλληλεπιδράσεις των αμινοξέων με τις νουκλεοτιδικές βάσεις φαίνεται να ευνοούνται και να έχουν καθοριστικότερο ρόλο έναντι άλλων, κατά την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με το DNA. Παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει ότι η αλληλεπίδραση καταλοίπων αργινίνης με τη βάση γουανίνη αποτελεί μια από τις πιο συχνά εμφανιζόμενες αλληλεπιδράσεις

(33%) (Luscombe et al, 2001). Αυτή η ειδικότητα στη δημιουργία αλληλεπιδράσεων μεταξύ αμινοξέων και βάσεων μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα είτε τη σταθεροποίηση των συμπλόκων μεταξύ DNA και πρωτεϊνών ή να συμβάλλει στην εξειδίκευση της πρόσδεσης των πρωτεϊνών σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA.

Επομένως, η περιοχή b' - πλούσια σε αργινίνες - μπορεί να συμβάλλει στην σταθεροποίηση της πρόσδεσης του NSCL1 στο DNA κατά τέτοιο τρόπο ώστε η στερεοδιάταξη την οποία λαμβάνει τελικά η πρωτεΐνη να ενισχύει τη μεταγραφική της ικανότητα, με αποτέλεσμα η αφαίρεση της να μειώνει σημαντικά την ενεργοποίηση της μεταγραφής που προκαλείται από τον NSCL1.

Επιπρόσθετα λαμβάνοντας υπόψη, ότι οι πρωτεΐνες που προορίζονται να δράσουν στον πυρήνα, όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες, φέρουν μια ειδική αλληλουχία σήματος (NLS) με θετικά φορτισμένα αμινοξέα, η παρουσία της b' περιοχής ενδέχεται να ευθύνεται, σε μεγάλο βαθμό, για τον πυρηνικό εντοπισμό του NSCL1. Οπότε, η έλλειψη της b' περιοχής οδηγεί σε μείωση της μεταγραφής εξαιτίας της συγκράτησης της πρωτεΐνης NSCL1 εκτός του πυρήνα.

Ακόμα όμως κι αν το ετεροδιμερές mNSCL1Δ/ ME1a εισέρχεται στον πυρήνα, λόγω της ύπαρξης του NLS της πρωτεΐνης ME1a, το σύμπλοκο που δημιουργείται δεν έχει ενεργοποιητική ικανότητα. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε αδυναμία πρόσδεσης στο DNA (αφού η b' περιοχή είναι πολύ πιθανό να συνεισφέρει σημαντικά στην πρόσδεση στο DNA) είτε σε αδυναμία αλληλεπίδρασης με άλλα μόρια (συν)ενεργοποιητές.

4.10. Συνοψίζοντας.....

Τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα της παρούσας μελέτης θα μπορούσαν να συνοψιστούν ως εξής:

Η πρωτεΐνη chick NSCL1 μεγέθους 130 αμινοξέων παρουσιάζει πολύ υψηλό βαθμό συντήρησης με τις ομόλογες πρωτεΐνες NSCL1 του ανθρώπου και του ποντικού, οι οποίες αποτελούνται από 133 αμινοξέα. Στην περιοχή bHLH διαφέρουν μόνο κατά ένα αμινοξύ, έχοντας ποσοστό ομολογίας 98%.

Η έκφραση του *cNsc11* εντοπίζεται σε μεταμιτωτικούς νευρώνες του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, που βρίσκονται στη φάση διαφοροποίησής τους, ενώ στην παρεγκεφαλίδα εντοπίζεται σε μιτωτικούς και προμεταναστευτικούς νευρώνες της εξωτερικής κοκκώδους στοιβάδας.

Η απώλεια δράσης του γονιδίου *mNsc11* προκαλεί υστέρηση στη φυσιολογική εξέλιξη της έκφρασης των γονιδίων *Hoxb1*, *Hoxb2*, *Plzf*, και *Engrailed-1* στον οπίσθιο εγκέφαλο, η οποία είναι πολύ πιθανόν να οφείλεται σε επιβράδυνση της διαδικασίας διαφοροποίησης των περιοχών αυτών του οπίσθιου εγκεφάλου, ενώ η έκφρασή του *mNsc1* στους προσωποκινητικούς νευρώνες ελέγχεται από το γονίδιο *Hoxb1*.

Το γονίδιο *Nsc11* εκφράζεται στα όρια των ρομβομερών, καθώς και σε νεοδημιουργούμενα όρια τα οποία δημιουργούνται μετά την προκαλούμενη γειτνίαση ενός περιττού και ενός άρτιου ρομβομερούς, ενώ δεν εκφράζεται στις περιπτώσεις γειτνίασης ρομβομερών με την ίδια αρτιότητα, μετά από μικροχειρουργική επέμβαση. Μη φυσιολογική έκφραση του chick *Nsc11* με τη χρήση του ρετροϊκού φορέα έκφρασης RCAS(BP)-cNsc11 οδηγεί σε ανώμαλη ανάπτυξη του ματιού και του εγκεφάλου.

Ομοδιμερισμός του μεταγραφικού παράγοντα cNSCL1 που είναι σε σύντηξη με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του γονιδίου *GAL4*, επιφέρει καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου της λουσιφεράσης σε ένα πλασμίδιο αναφοράς.

Τα ετεροδιμερή του ME1a με το mNSCL1 προκαλούν ισχυρή μεταγραφική ενεργοποίηση προσδεδεμένα σε E-boxes, τα οποία βρίσκονται ανοδικά του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Altman J and Bayer S. Development of the precerebellar nuclei in the rat: I. The precerebellar neuroepithelium of the rhombencephalon. *J.Comp. Neurol.*, 1987, 257: 477-489.
2. Altman J and Bayer SA. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the prenatal and postnatal periods. *J. Comp Neurol.*, 1990, 301 : 365-381.
3. Amoutzias GD, Robertson DL, Oliver SG and Bornberg-Bauer E. Convergent evolution of gene networks by single gene duplications in higher eukaryotes. *Embo Reports*, 2004, 5: 1-6.
4. Atchley WR and Fitch WM. A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *PNAS*, 1997 May 13;94(10):5172-6.
5. Baek JH, Hatakeyama J, Sakamoto S, Ohtsuka T and Kageyama R. Persistent and high levels of Hes1 expression regulate boundary formation in the developing central nervous system. *Development*, 2006 Jul;133(13):2467-76.
6. Bang AG and Goulding MD. Regulation of vertebrate neural cell fate by transcription factors. *Current Opinion in Neurobiology*, 1996, 6:25-32.
7. Bao J, Talmage DA., Role LW and Gautier J. Regulation of neurogenesis by interactions between HEN1 and neuronal LMO proteins. *Development*, 2000, 127: 425-435.
8. Begley CG, Lipkowitz S, Gobel V, Mahon K, Bertness V, Green AR, Gouch NM and Kirsch IR. Molecular characterization of NSCL, a gene encoding a helix-loop-helix protein expressed in the developing nervous system. *PNAS*, 1992; 89: 38-42.
9. Bell EJ and Brickell PM. Replication-competent retroviral vectors for expressing genes in avian cells in vitro and in vivo. *Mol Biotechnol.*, 1997 Jun;7(3):289-98. Review.
10. Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL and Weintraub H. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell*, 1990 Apr 6;61(1):49-59.
11. Berben G, Legrain M, Gilliquet V and Hilger F. The yeast regulatory gene PHO4 encodes a helix-loop-helix motif. *Yeast*, 1990 Sep-Oct;6(5):451-4.
12. Bertrand N, Castro DS and Guillemot F. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci.*, 2002, 3: 517-530.
13. Birgbauer E and Fraser SE. Violation of cell lineage restriction compartments in the chick hindbrain. *Development*, 1994 Jun;120(6):1347-56.
14. Blackwood EM and Eisenman RN. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science*, 1991, 251: 1211-1217.
15. Blaugrund E, Pham TD, Tennyson VM, Lo L, Sommer L, Anderson DJ and Gershon MD. Distinct subpopulations of enteric neuronal progenitors defined by time of development, sympathoadrenal lineage markers and Mash-1-dependence. *Development*, 1996 Jan;122(1):309-20.
16. Braun T, Rudnicki MA, Arnold HH and Jaenisch R. Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell*, 1992 Oct 30;71(3):369-82.
17. Brown L and Baer R. HEN1 encodes a 20-kilodalton phosphoprotein that binds an extended E-box motif as a homodimer. *Mol Cell Biol.*, 1994, Feb;14(2):1245-55.

18. Brown L, Espinosa III R, Le Beau MM and Siciliano MJ. HEN1 and HEN2: A subgroup of basic helix-loop-helix genes that are coexpressed in a human neuroblastoma. *PNAS*, 1992, 89:8492-8496.
19. Cai M and Davis RW. Yeast centromere binding protein CBF1, of the helix-loop-helix protein family, is required for chromosome stability and methionine prototrophy. *Cell*, 1990 May 4;61(3):437-46.
20. Campos-Ortega JA. Mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J Neurobiol.*, 1993 Oct;24(10):1305-27. Review.
21. Campuzano S and Modolell J. Patterning of the *Drosophila* nervous system: the achaete-scute gene complex. *Trends Genet.*, 1992 Jun;8(6):202-8. Review.
22. Cau E, Gradwohl G, Fode C and Guillemot F. Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Development*, 1997 Apr;124(8):1611-21.
23. Chiaramello A, Soosaar A, Neuman T and Zuber MX. Differential expression and distinct DNA-binding specificity of ME1a and ME2 suggest a unique role during differentiation and neuronal plasticity. *Brain Res Mol Brain Res.*, 1995, Mar;29(1):107-18.
24. Cogliati T, Good DJ, Haigney M, Delgado-Romero P, Eckhaus MA, Koch WJ and Kirsch IR. Predisposition to Arrhythmia and Autonomic Dysfunction in *Nhlh1*-Deficient Mice. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, 22(14):4977-4983.
25. Cook M, Gould A, Brand N, Davies J, Strutt P, Shakhovich R, Licht J, Waxman S, Chen Z, Gluecksohn-Waelsch S, Krumlauf R and Zelent A. Expression of the zinc-finger gene PLZF at rhombomere boundaries in the vertebrate hindbrain. *PNAS*, 1995 Mar 14;92(6):2249-53.
26. Cooke J, Moens C, Roth L, Durbin L, Shiomi K, Brennan C, Kimmel C, Wilson S and Holder N. Eph signalling functions downstream of *Val* to regulate cell sorting and boundary formation in the caudal hindbrain. *Development*, 2001, 128, pp. 571–580.
27. Copp AJ, Checiu I and Henson JN. Developmental basis of severe neural tube defects in the loop-tail (*Lp*) mutant mouse: use of microsatellite DNA markers to identify embryonic genotype. *Dev Biol.*, 1994 Sep;165(1):20-9.
28. Cowan WM, Fawcett JW, O'Leary DDM and Stanfield BB. Regressive events in neurogenesis. *Science*, 1984 Sep 21;225(4668):1258-65.
29. Crews ST. Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes and Development*, 1998, 12:607-620, Review.
30. Cronmiller C and Cline TW. The *Drosophila* sex determination gene *daughterless* has different functions in the germ line versus the soma. *Cell*, 1987 Feb 13;48(3):479-87.
31. Dang CV, Dolde C, Gillison ML and Kato GJ. Discrimination between related DNA sites by a single amino acid residue of Myc-related basic-helix-loop-helix proteins. *PNAS*, 1992, Jan 15;89(2):599-602.
32. Davenne M, Maconochie MK, Neun R, Pattyn A, Chambon P, Krumlauf R and Rijli FM. *Hoxa2* and *Hoxb2* control dorsoventral patterns of neuronal development in the rostral hindbrain. *Neuron*, 1999, Apr;22(4):677-91.
33. De la Pompa JL, Wakeham A, Correia KM, Samper E, Brown S, Aguilera RJ, Nakano T, Honjo T, Mak TW, Rossant J and Conlon RA. Conservation of the Notch signaling pathway in mammalian neurogenesis. *Development*, 1997, 124:1139-1148.
34. Denaxa M, Chan CH, Schachner M, Parnavelas JG and Karagogeos D. The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development*, 2001 Nov;128(22):4635-44.

35. Dobyns WB, Curry CJ, Hoyme HE, Turlington L and Ledbetter DH. Clinical and molecular diagnosis of Miller-Dieker syndrome. *Am J Hum Genet.*, 1991 Mar; 48(3):584-94.
36. Dobyns WB, Stratton RF, Parke JT, Greenberg F, Nussbaum RL and Ledbetter DH. Miller-Dieker syndrome: lissencephaly and monosomy 17p. *J Pediatr.*, 1983 Apr; 102(4):552-8.
37. Dodd J, Morton SB, Karagogeos D, Yamamoto M and Jessell TM. Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons. *Neuron*, 1988 Apr;1(2):105-16..
38. Dunkan MK, Bordas L, Diccico-Bloom E and Chada KK. Expression of the Helix-Loop-Helix Genes Id-1 and NSCL-1 During Cerebellar Development. *Developmental Dynamics*, 1997, 208:107-114.
39. Ephrussi A, Church GM, Tonegawa S, and Gilbert W. B-lineage specific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors in vivo. *Science*, 1985, 227:134-140.
40. Ericson J, Briscoe J, Rashbass P, van Heyningen V and Jessell TM. Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 1997;62:451-66. Review
41. Ericson J, Thor S, Edlund T, Jessell TM and Yamada T. Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science*, 1992 Jun 12;256(5063):1555-60.
42. Farah MH, Olson JM, Susic HB, Hume RI, Tapscott SJ and Turner DL. Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development*, 2000, 127:693-702.
43. Feinberg AP and Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.*, 1983, Jul 1;132(1):6-13.
44. Felsenfeld DP, Hynes MA, Skoler KM, Furley AJ and Jessell TM. TAG-1 can mediate homophilic binding, but neurite outgrowth on TAG-1 requires an L1-like molecule and beta 1 integrins. *Neuron*, 1994 Mar;12(3):675-90.
45. Ferreira B, Kintner C, Zimmerman K, Anderson D and Harris WA. XASH genes promote neurogenesis in *Xenopus* embryos. *Development*, 1994;120:3649-3655.
46. Firulli AB, McFadden DG, Lin Q, Srivastava D and Olson EN. Heart and extra-embryonic mesodermal defects in mouse embryos lacking the bHLH transcription factor *Hand1*. *Nat Genet.*, 1998 Mar;18(3):266-70.
47. Fisher A and Caudy M. The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions. *BioEssays*, 1998, 20: 298-306.
48. Fode C, Gradwohl G, Morin X, Dierich A, LeMeur M, Goriadis C and Guillemot F. The bHLH protein *NEUROGENIN 2* is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons. *Neuron*, 1998 Mar;20(3):483-94.
49. Fraser S, Keynes R and Lumsden A. Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions. *Nature*, 1990 March 29;344:431-5.
50. Fujita S, Shimada M and Nakamura T. H3-thymidine autoradiographic studies on the cell proliferation and differentiation in the external and the internal granular layers of the mouse cerebellum. *J Comp Neurol.*, 1966 Oct;128(2):191-208.
51. Furley AJ, Morton SB, Manalo D, Karagogeos D, Dodd J and Jessell TM. The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity. *Cell*, 1990, Apr 6;61(1):157-70.

52. Garel S, Garcia-Dominguez M and Charnay P. Control of the migratory pathway of facial branciomotor neurons. *Development*, 2000, 127: 5297-5307.
53. Gaufo GO, Flodby P and Capecchi MR. Hoxb1 controls effectors of sonic hedgehog and Mash1 signaling pathways. *Development*, 2000 Dec;127(24):5343-54.
54. Gavalas A, Ruhrberg C, Livet J, Henderson CE and Krumlauf R. Neuronal defects in the hindbrain of Hoxa1, Hoxb1 and Hoxb2 mutants reflect regulatory interactions among these Hox genes. *Development*, 2003, 130(23):5663-79.
55. Gavalas A, Studer M, Lumsden A, Rijli FM, Krumlauf R and Chambon P. Hoxa1 and Hoxb1 synergize in patterning the hindbrain, cranial nerves and second pharyngeal arch. *Development*, 1998, 125(6):1123-36.
56. German MS, Blonar MA, Nelson C, Moss LG and Rutter WJ. Two related helix-loop-helix proteins participate in separate cell-specific complexes that bind the insulin enhancer. *Mol Endocrinol.*, 1991 Feb;5(2):292-9.
57. Gilbert SF. *Developmental Biology*, 2003, 391-421.
58. Giniger E and Ptashne M. *PNAS*, 1988 January; 85(2): 382–386. Cooperative DNA binding of the yeast transcriptional activator GAL4.
59. Goddard JM, Rossel M, Manley NR and Capecchi MR. Mice with targeted disruption of Hoxb-1 fail to form the motor nucleus of the VIIth nerve. *Development*, 1996 Oct;122(10):3217-28.
60. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC and Gelbart WM. *An introduction in genetic analysis*, 2003, 350-354.
61. Guillemot F. Review, Vertebrate bHLH genes and the determination of neuronal fates. *Experimental Cell Research*, 1999, 253:357-364.
62. Guillemot F, Lo LC, Johnson JE, Auerbach A, Anderson DJ and Joyner AL. Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell*, 1993 Nov 5;75(3):463-76.
63. Guthrie S, Butcher M and Lumsden A. Patterns of cell division and interkinetic nuclear migration in the chick embryo hindbrain. *J Neurobiol.*, 1991 Oct;22(7):742-54.
64. Guthrie S, Prince V and Lumsden A. Selective dispersal of avian rhombomere cells in orthotopic and heterotopic grafts. *Development*, 1993 Jun;118(2):527-38.
65. Guthrie S and Lumsden A. Formation and regeneration of rhombomere boundaries in the developing chick hindbrain. *Development*, 1991, 112:221-229.
66. Haire MF and Chiaravello A. Transient expression of the basic helix-loop-helix protein NSCL-2 in the mouse cerebellum during postnatal development. *Molecular Brain Research*, 1996, 36:174-178
67. Hallonet ME, Teillet MA and Le Douarin NM. A new approach to the development of the cerebellum provided by the quail-chick marker system. *Development*, 1990 Jan;108(1):19-31.
68. Hamburger V and Hamilton HL. A series of normal stages in the development of chick embryo. *J. Morphol.*, 1951, 88, 49-92.
69. Hanneman E, Trevarrow B, Metcalfe WK, Kimmel CB and Westerfield M. Segmental pattern of development of the hindbrain and spinal cord of the zebrafish embryo. *Development*, 1988 103, pp. 49–58.
70. Henthorn P, Kiledjian M, and Kadesch T. Two distinct transcription factors that bind the immunoglobulin enhancer μ E5/ κ E2 motif. *Science*, 1990, 247: 467-470.
71. Heyman I, Faissner A and Lumsden A. Cell and matrix specialisations of rhombomere boundaries. *Dev Dyn.*, 1995 Nov;204(3):301-15

72. Heyman I, Kent A and Lumsden A. Cellular morphology and extracellular space at rhombomere boundaries in the chick embryo hindbrain. *Dev Dyn.*, 1993 Dec; 198(4):241-53.
73. Hirsch MR, Tiveron MC, Guillemot F, Brunet JF and Goridis C. Control of noradrenergic differentiation and Phox2a expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system. *Development*, 1998, Feb;125(4):599-608.
74. Hirth F, Hartmann B and Reichert H. Homeotic gene action in embryonic brain development of *Drosophila*. *Development*, 1998 May;125(9):1579-89.
75. Hoshizaki DK, Hill JE and Henry SA. The *Saccharomyces cerevisiae* INO4 gene encodes a small, highly basic protein required for derepression of phospholipid biosynthetic enzymes. *J Biol Chem.*, 1990 Mar 15;265(8):4736-45.
76. Hughes S and Kosik E. Mutagenesis of the region between env and src of the SR-A strain of Rous sarcoma virus for the purpose of constructing helper-independent vectors. *Virology*, 1984, Jul 15;136(1):89-99.
77. Hughes SH, Greenhouse JJ, Petropoulos CJ and Suttrave P. Adaptor plasmids simplify the insertion of foreign DNA into helper-independent retroviral vectors. *J Virol.*, 1987, Oct;61(10):3004-12.
78. Hunt P, Whiting J, Muchamore I, Marshall H and Krumlauf R. Homeobox genes and models for patterning the hindbrain and branchial arches. *Dev Suppl.*, 1991;1:187-96.
79. Ishibashi M, Ang SL, Shiota K, Nakanishi S, Kageyama R and Guillemot F. Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev.*, 1995 Dec 15;9(24):3136-48.
80. Jacob J and Guthrie S. Facial visceral motor neurons display specific rhombomere origin and axon pathfinding behavior in the chick. *J Neurosci.*, 2000 Oct 15; 20(20):7664-71.
81. Jan YN and Jan LY. HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis. *Cell*, 1993 Dec 3;75(5):827-30. Review.
82. Jarman AP, Grau Y, Jan LY and Jan YN. atonal is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Cell*, 1993 Jul 2;73(7):1307-21.
83. Jennings BH, Tyler DM and Bray SJ. Target specificities of *Drosophila* enhancer of split basic helix-loop-helix proteins. *Mol. Cell. Biol.*, 1999, 19, 4600-4610.
84. Jungbluth S, Bell E and Lumsden A. Specification of distinct motor neuron identities by the singular activities of individual Hox genes. *Development*, 1999 Jun; 126(12):2751-8.
85. Kandel ER, Schwartz JH and Jessell T. Principles of neural science. Elsevier, New York, 1991.
86. Karagogeos D, Morton SB, Casano F, Dodd J and Jessell TM. Developmental expression of the axonal glycoprotein TAG-1: differential regulation by central and peripheral neurons in vitro. *Development*, 1991 May;112(1):51-67.
87. Keynes R and Krumlauf R. Hox genes and regionalization of the nervous system. *Annu Rev Neurosci.*, 1994;17:109-32.
88. Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.*, 1987 Oct 26;15(20):8125-48. Review.
89. Kruger M and Braun T. The neuronal basic helix-loop-helix transcription factor NSCL-1 is dispensable for normal neuronal development. *Mol Cell Biol.*, 2002, Feb;22(3):792-800.

90. Kruger M, Schmid T, Kruger S, Bober E and Braun T. Functional redundancy of NSCL-1 and NeuroD during development of the petrosal and vestibulocochlear ganglia. *Eur J Neurosci.*, 2006 Sep;24(6):1581-90.
91. Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell*, 1994 Jul 29;78(2):191-201. Review.
92. Lamphier MS and Ptashne M. Multiple mechanisms mediate glucose repression of the yeast GAL1 gene. *PNAS*, 1992 July 1; 89(13): 5922–5926.
93. Lavdas AA, Grigoriou M, Pachnis V and Parnavelas JG. The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J. Neuroscience*, 1999, 19:7881–7888.
94. Layer PG and Alber R. Patterning of chick brain vesicles as revealed by peanut agglutinin and cholinesterases. *Development*, 1990 Jul;109(3):613-24.
95. Ledent V and Vervoort M. The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome Res.*, 2001, 11, 754-770.
96. Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N and Weintraub H. Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science*, 1995 May 12;268(5212):836-44.
97. Lee JE. Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Current Opinion in Neurobiology*, 1997; 7:13-20. Review.
98. Leland Hartwell, Leroy Hood, Michael L. Goldberg, Ann E. Reynolds, Lee M. Silver and Ruth C. Veres. From Genes to genomes. *Genetics*, 2004, 581-592.
99. Lemercier C, To RQ, Carrasco RA and Konieczny SF. The basic helix-loop-helix transcription factor Mist1 functions as a transcriptional repressor of myoD. *EMBO J.*, 1998 Mar 2;17(5):1412-22.
100. Lewin Benjamin. *Genes VIII*, 2004, 632-652
101. Li C-M, Yan R-T and Wang S-Z. Misexpression of a bHLH gene, cNSCL1, results in abnormal brain development. *Developmental Dynamics*, 1999 215:238-247.
102. Li C-M, Yan R-T and Wang S-Z. Misexpression of cNSCL1 Disrupts Retinal Development. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 1999 14:17-27.
103. Lin YS, Carey MF, Ptashne M and Green MR. GAL4 derivatives function alone and synergistically with mammalian activators in vitro. *Cell*, 1988 Aug 26;54(5):659-64.
104. Lipkowitz S, Gobel V, Varterasian ML, Nakahara K, Tchorz K and Kirsch IR. A comparative structural characterization of the human NSCL-1 and NSCL-2 genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992;267:21065-21071.
105. Lumsden A and Keynes R. Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature*, 1989 Feb 2;337(6206):424-8.
106. Lumsden A and Krumlauf R. Patterning the vertebrate neuraxis. *Science*, 1996 Nov 15;274(5290):1109-15. Review.
107. Luscombe NM, Laskowski RA and Thornton JM. Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acids Res.*, 2001 Jul 1;29(13):2860-74.
108. Lustig M, Sakurai T and Grumet M. Nr-CAM promotes neurite outgrowth from peripheral ganglia by a mechanism involving axonin-1 as a neuronal receptor. *Dev Biol.*, 1999 May 15;209(2):340-51.
109. Ma J and Ptashne M. The carboxy-terminal 30 amino acids of GAL4 recognized by GAL80. *Cell*, 1987 Jul 3;50(1):137-42.
110. Ma Q, Chen Z, del Barco Barrantes I, de la Pompa JL and Anderson DJ. neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron*, 1998 Mar;20(3):469-82.

111. Ma Q, Kintner C and Anderson DJ. Neurogenin: a vertebrate neuronal determination gene, acts upstream of NeuroD in a cascade. *Cell*, 1996; 87:43-52.
112. Mahmood R, Kiefer P, Guthrie S, Dickson C and Mason I. Multiple roles for FGF-3 during cranial neural development in the chicken. *Development*, 1995 May; 121(5): 1399-410.
113. Manetopoulos C, Hansson A, Karlsson J, Jonsson JI and Axelson H. The LIM-only protein LMO4 modulates the transcriptional activity of HEN1. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2003 Aug 8;307(4):891-9.
114. Marmorstein R, Carey M, Ptashne M and Harrison SC. DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. *Nature*, 1992 Apr 2;356(6368):408-14.
115. Massari ME and Murre C. Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eukaryotic Organisms. *Molecular And Cellular Biology*, 2000, 20(2):429-440.
116. Massari ME, Rivera RR, Voland JR, Quong MW, Breit TM, van Dongen JJ, de Smit O and Murre C. Characterization of ABF-1, a novel basic helix-loop-helix transcription factor expressed in activated B lymphocytes. *Mol Cell Biol.*, 1998 Jun;18(6):3130-9.
117. McCormick MB, Tamimi RM, Snider L, Asakura A, Bergstrom D and Tapscott SJ. NeuroD2 and NeuroD3: distinct expression patterns and transcriptional activation potentials within the NeuroD gene family. *Molecular Cell Biology*, 1996; 16: 5792-5800.
118. McGinnis W and Krumlauf R Homeobox genes and axial patterning., 1992 Jan 24;68(2):283-302.
119. Mellitzer G, Xu Q and Wilkinson DG. Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature*, 1999 400, pp. 77–81.
120. Miller AD. Retroviral vectors. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1992;158:1-24. Review.
121. Mitchell PJ and Tjian R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*, 1989 Jul 28;245(4916): 371-8. Review.
122. Mullick A, Groulx N, Trasler D and Gros P. Nhlh1, a basic helix-loop-helix transcription factor, is very tightly linked to the mouse looptail (Lp) mutation. *Mamm Genome*, 1995 Oct;6(10):700-4.
123. Murdoch JN, Eddleston J, Leblond-Bourget N, Stanier P and Copp AJ. Sequence and expression analysis of Nhlh1: A basic helix-loop-helix gene implicated in neurogenesis. *Developmental Genetics*, 1999, 24:165-177.
124. Murre C, Bain G, van Dijk MA, Engel I, Furnari BA, Massari ME, Matthews JR, Quong MW, Rivera RR and Stuver MH. Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1994 Jun 21;1218(2):129-35. Review.
125. Murre C, McCaw PS and Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell*, 1989 Mar 10;56(5):777-83.
126. Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD and Lassar AB. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, 1989 Aug 11;58(3):537-44.
127. Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB and Tsai MJ. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev.*, 1997 Sep 15;11(18):2323-34.
128. Nelsen B and Sen R. Regulation of immunoglobulin gene transcription. *Int Rev Cytol.*, 1992;133:121-49. Review.

129. Nelson C, Shen LP, Meister A, Fodor E and Rutter WJ. Pan: a transcriptional regulator that binds chymotrypsin, insulin, and AP-4 enhancer motifs. *Genes Dev.*, 1990 Jun;4(6):1035-43.
130. Neuman K, Nornes HO and Neuman T. Helix-Loop-Helix transcription factors regulate Id2 gene promoter activity. *FEBS Letters*, 1995, 374:279-283.
131. Neuman T, Keen A, Knapik E, Shain D, Ross M, Nornes HO and Zuber MX. ME1 and GE1: basic helix-loop-helix transcription factors expressed at high levels in the developing nervous system and in morphogenetically active regions. *Eur J Neurosci.*, 1993 Apr 1;5(4):311-8.
132. Nittenberg R, Patel K, Joshi Y, Krumlauf R, Wilkinson DG, Brickell PM, Tickle C and Clarke JD. Cell movements, neuronal organisation and gene expression in hindbrains lacking morphological boundaries. *Development*, 1997 Jun;124(12):2297-306.
133. Noden DM. Vertebrate craniofacial development: novel approaches and new dilemmas. *Curr Opin Genet Dev.*, 1992 Aug;2(4):576-81. Review
134. Oellers N, Dehio M and Knust E. bHLH proteins encoded by the Enhancer of split complex of *Drosophila* negatively interfere with transcriptional activation mediated by proneural genes. *Mol. Gen. Genet.*, 1994, 244, 465-473.
135. Ohsako S, Hyer J, Panganiban G, Oliver I and Caudy M. Hairy function as a DNA binding helix-loop-helix repressor of *Drosophila* sensory organ formation. *Genes and Development*, 1994, 8, 2743-2755.
136. Olson EN. MyoD family: a paradigm for development? *Genes Dev.*, 1990 Sep;4(9):1454-61. Review.
137. Osumi N, Hirota A, Ohuchi H, Nakafuku M, Iimura T, Kuratani S, Fujiwara M, Noji S and Eto K. Pax-6 is involved in the specification of hindbrain motor neuron subtype. *Development*, 1997 Aug;124(15):2961-72.
138. Park ST and Sun XH. The Tall oncoprotein inhibits E47-mediated transcription. Mechanism of inhibition. *J Biol Chem.*, 1998 Mar 20;273(12):7030-7.
139. Parkhurst SM and Meneely PM. Sex determination and dosage compensation: lessons from flies and worms. *Science*, 1994 May 13;264(5161):924-32. Review.
140. Patten BM and Carlson BM. *Foundations of embryology*, 1974. New York: McGraw-Hill: Third edition
141. Pearson JC, Lemons D and McGinnis W. Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat Rev Genet.* 2005 Dec;6(12):893-904. Review.
142. Peterson CL and Cote J. Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes & Development*, 2006, 18: 602-616
143. Pleasure SJ, Collins AE and Lowenstein DH. Unique expression patterns of cell fate molecules delineate sequential stages of dentate gyrus development. *J. Neuroscience*, 2000 20 : 6095-6105.
144. Porcher C, Swat W, Rockwell K, Fujiwara Y, Alt FW and Orkin SH. The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell*, 1996 Jul 12;86(1):47-57.
145. Rickmann M, Amaral DG and Cowan WM. Organization of radial glial cells during the development of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol.*, 1987 Oct 22;264(4):449-79.
146. Riley P, Anson-Cartwright L and Cross JC. The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis. *Nat Genet.*, 1998 Mar;18(3):271-5.
147. Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from tumor cells. *J. Exp. Med.*, 1911, 13, 397-411.

148. Rudnicki MA, Braun T, Hinuma S and Jaenisch R. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell*, 1992 Oct 30;71(3):383-90.
149. Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH and Jaenisch R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell*, 1993 Dec 31;75(7):1351-9.
150. Ruvkun G and Hobert O. The taxonomy of developmental control in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 1998 Dec 11;282(5396):2033-41. Review.
151. Ryoichiro Kageyama, Makoto Ishibashi, Koichi Takebayashi and Koichi Tomita. bHLH Transcription Factors and Mammalian Neuronal Differentiation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1997, 29(12):1389-1399.
152. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 edn., CSHLP, NY. 1989.
153. Sasai Y, Kageyama R, Tagawa Y, Shigemoto R and Nakanishi S. Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genes and Development*, 1992, 6: 2620-2634.
154. Shieh SY and Tsai MJ. Cell-specific and ubiquitous factors are responsible for the enhancer activity of the rat insulin II gene. *J Biol Chem.*, 1991 Sep 5;266(25):16708-14.
155. Shivdasani RA, Mayer EL and Orkin SH. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature*, 1995 Feb 2;373(6513):432-4.
156. Sommer L, Shah N, Rao M and Anderson DJ. The cellular function of MASH1 in autonomic neurogenesis. *Neuron*, 1995 Dec;15(6):1245-58.
157. Srivastava D, Cserjesi P and Olson EN. A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. *Science*, 1995 Dec 22;270(5244):1995-9.
158. Srivastava D, Thomas T, Lin Q, Kirby ML, Brown D and Olson EN. Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nat Genet.*, 1997 Jun;16(2):154-60.
159. Stanier P, Henson JN, Eddleston J, Moore GE and Copp AJ. Genetic basis of neural tube defects: the mouse gene loop-tail maps to a region of chromosome 1 syntenic with human 1q21-q23. *Genomics*, 1995 Apr 10;26(3):473-8.
160. Staudt LM and Lenardo MJ. Immunoglobulin gene transcription. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:373-98. Review.
161. Stoeckli ET and Landmesser LT. Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play different roles in the in vivo guidance of chick commissural neurons. *Neuron*, 1995 Jun;14(6):1165-79.
162. Studer M, Gavalas A, Marshall H, Ariza-McNaughton L, Rijli FM, Chambon P and Krumlauf R. Genetic interactions between Hoxa1 and Hoxb1 reveal new roles in regulation of early hindbrain patterning. *Development*, 1998 125(6):1025-36.
163. Studer M, Lumsden A, Ariza-McNaughton L, Bradley A and Krumlauf R. Altered segmental identity and abnormal migration of motor neurons in mice lacking Hoxb-1. *Nature*, 1996 Dec 19-26;384(6610):630-4.
164. Studer M, Lumsden A, Ariza-McNaughton L, Bradley A and Krumlauf R. Altered segmental identity and abnormal migration of motor neurons in mice lacking Hoxb-1. *Nature*, 1996 Dec 19-26;384(6610):630-4.
165. Studer M. Initiation of facial motoneuron migration is dependent on rhombomeres 5 and 6. *Development*, 2001 Oct;128(19):3707-16.
166. Swanson HI, Chan WK and Bradfield CA. DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J Biol Chem.*, 1995, Nov 3;270(44): 26292-302.

167. Tamura TA, Konishi Y, Makino Y and Mikoshiba K. Mechanisms of transcriptional regulation and neural gene expression. *Neurochem. Int.*, 1996, 29(6):573-581.
168. Takahashi M and Osumi N. Pax6 regulates specification of ventral neurone subtypes in the hindbrain by establishing progenitor domains. *Development*, 2002, Mar;129(6):1327-38.
169. Tanabe Y and Jessell TM. Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science*. 1996 Nov 15;274(5290):1115-23. Review. Erratum in: *Science*, 1997 Apr 4;276(5309):21.
170. Tietze K, Oellers N and Knust E. Enhancer of split^D, a dominant mutation of *Drosophila*, and its use in the study of functional domains of a helix-loop-helix protein. *PNAS*, 1992, 89, 6152-6156.
171. Tomita K, Ishibashi M, Nakahara K, Ang SL, Nakanishi S, Guillemot F and Kageyama R. Mammalian hairy and Enhancer of split homolog 1 regulates differentiation of retinal neurons and is essential for eye morphogenesis. *Neuron*, 1996 Apr;16(4):723-34.
172. Tomita K, Nakanishi S, Guillemot F and Kageyama R. Mash1 promotes neuronal differentiation in the retina. *Genes Cells*, 1996 Aug;1(8):765-74.
173. Toyo-oka K, Hirotsune S, Gambello MJ, Zhou ZQ, Olson L, Rosenfeld MG, Eisenman R, Hurlin P and Wynshaw-Boris A. Loss of the Max-interacting protein Mnt in mice results in decreased viability, defective embryonic growth and craniofacial defects: relevance to Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet.*, 2004 May 15;13(10):1057-67.
174. Trainor PA and Krumlauf R. Hox genes, neural crest cells and branchial arch patterning. *Curr Opin Cell Biol.*, 2001 Dec;13(6):698-705. Review
175. Trevarrow B, Marks DL and Kimmel CB. Organization of hindbrain segments in the zebrafish embryo. *Neuron*, 1990 4, pp. 669-679
176. Turner DL and Weintraub H. Expression of achaete-scute homolog 3 in *Xenopus* embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev.*, 1994 Jun 15;8(12):1434-47.
177. Uittenbogaard M, Peavy DR and Chiamello A. Expression of the bHLH gene NSCL1 suggests a role in regulating cerebellar granule cell growth and differentiation. *Journal of neuroscience research*, 1999, 57:770-781.
178. Vaage S. The segmentation of the primitive neural tube in chick embryos (*Gallus domesticus*). A morphological, histochemical and autoradiographical investigation. *Ergeb Anat Entwicklungsgesch.*, 1969;41(3):3-87.
179. Van Doren M, Bailey AM, Esnayra J, Ede K and Posakony JW. Negative regulation of proneural gene activity: Hairy is a direct transcriptional repressor of achaete. *Genes Development*, 1994, 8, 2729-2742.
180. Varela-Echavarria A, Pfaff SL and Guthrie S. Differential expression of LIM homeobox genes among motor neuron subpopulations in the developing chick brain stem. *Mol Cell Neurosci.*, 1996;8(4):242-57
181. Varterasian M, Lipkowitz S, Karsch-Mizrachi I, Paterson B and Kirsch I. Two new *Drosophila* genes related to human hematopoietic and neurogenic transcription factors. *Cell Growth Differ.*, 1993 Nov;4(11):885-9.
182. Weintraub H, Dwarki VJ, Verma I, Davis R, Hollenberg S, Snider L, Lassar A and Tapscott SJ. Muscle-specific transcriptional activation by MyoD. *Genes Dev.*, 1991 Aug;5(8):1377-86.
183. West RW, Yocum JR and Ptashne M. *Saccharomyces cerevisiae* GAL1-GAL10 divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UASG. *Mol Cell Biol.*, 1984 November; 4(11): 2467-2478.

184. Willbold E and Layer PG. Muller glia cells and their possible roles during retina differentiation in vivo and in vitro. *Histol Histopathol.*, 1998 Apr;13(2):531-52. Review.
185. Wolfer DP, Henehan-Beatty A, Stoeckli ET, Sonderegger P and Lipp HP. Distribution of TAG-1/axonin-1 in fibre tracts and migratory streams of the developing mouse nervous system. *J Comp Neurol.*, 1994 Jul 1;345(1):1-32.
186. Wrischnik LA and Kenyon CJ. The role of lin-22, a hairy/enhancer of split homolog, in patterning the peripheral nervous system of *C. elegans*. *Development*, 1997 Aug;124(15):2875-88.
187. Wurst W, Auerbach AB, Joyner AL. Multiple developmental defects in Engrailed-1 mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development*, 1994 Jul;120(7):2065-75.
188. Yan R-T and Wang S-Z. Embryonic Abnormalities from Misexpression of cNSCL1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 287:949-955
189. Zhao C and Emmons SW. A transcription factor controlling development of peripheral sense organs in *C. elegans*. *Nature*, 1995 Jan 5;373(6509):74-8.

Novel sites of expression of the bHLH gene *NSCLI* in the developing nervous system

Kostas Theodorakis^{a,b}, Katerina Kyriakopoulou^a, Marion Wassef^c, Domna Karagozeos^{a,b,*}

^aUniversity of Crete Medical School, Heraklion, Crete, Greece

^bInstitute of Molecular Biology and Biotechnology, Heraklion 71110, Crete, Greece

^cCNRS UMR 8542, Regionalisation Nerveuse, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm 75230 Paris Cedex 5, France

Received 28 June 2002; received in revised form 12 August 2002; accepted 13 August 2002

Abstract

We report on novel sites of expression of the bHLH transcription factor *NSCLI* in the developing forebrain, hindbrain and spinal cord in chick and mouse. In the hindbrain in particular, *NSCLI* is the first bHLH transcription factor detected so far in rhombomere boundaries and its expression is coincident with boundary formation and maintenance. Novel sites of expression of this gene include the hippocampus, septum, tectum and hypothalamic nuclei. *NSCLI* is thus expressed in various neuronal populations that are either not actively proliferating or postmitotic. © 2003 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: bHLH; Transcription factors; Chick/avian; Rhombomere boundaries; Cranial ganglia; Spinal cord; Dorsal root ganglia; *NSCLI*; *TAG-1/axonin-1*

1. Results and discussion

1.1. Expression pattern of avian and mouse *NSCLI* in rhombomere boundaries

We have isolated *cNSCLI*, the avian homologue of mouse and human *NSCLI* (neurologic stem cell leukemia, Begley et al., 1992; Li et al., 1999a). *NSCLI* is expressed in various neuronal populations (Begley et al., 1992; Lipkowitz et al., 1992; Li et al., 1999a). Some details of the expression pattern of chick *NSCLI* in the central nervous system (CNS) have been described (Li et al., 1999a,b; Uittenbogaard et al., 1999) with particular attention to the retina and cerebellum. We have noticed novel sites of expression of the gene that have not been described previously, in the developing brain. In the hindbrain, a strong *NSCLI* signal is detected in rhombomere boundaries in both chick and mouse (Fig. 1, B1, B2, C, D, H). In addition, a stronger *NSCLI* signal is observed in r4, corresponding to facial branchiomotor (fbm) neurons (Fig. 1, B1, G) (Lumsden and Keynes, 1989; Varela-Echevarria et al., 1996). *NSCLI* signal is detected in stages HH15–HH20 (Fig. 1A–D) and is evident through HH24 (not shown), when rhombomere boundaries are not morphologically evident any more. *NSCLI* is one of the few transcription

factors associated with rhombomere boundaries, together with the zinc-finger protein PLZF (Cook et al., 1995) and Pax-6 (Heyman et al., 1995). These structures consist of specialized cells that form at the boundaries of rhombomeres and help in maintaining their segregation (Lumsden and Keynes, 1989; Fraser et al., 1990; Guthrie et al., 1991a; Guthrie and Lumsden, 1991b; Nittenberg et al., 1997; Lumsden, 1999). They are characterized by large intercellular spaces, early differentiation of radial glia, and precocious development of an axon between rich marginal zone. It will be of interest to further investigate the particular role of *NSCLI* in this region. The hindbrain expression of *NSCLI* described above for the chick is also conserved in the mouse embryo (Fig. 1G–J). In both chick and mouse tissues, the adhesion molecule *TAG-1(rodent)/axonin-1(chick)* is used as a marker of the basal plate (Fig. 1E, F, K–M), fbm (Fig. 1E, F, K–M) and the lateral part of the neural tube (Fig. 1F, K–N).

1.2. Expression of *NSCLI* in other CNS structures

NSCLI is detected in the cerebellar rhombic lip (Fig. 2A, B) but not in the posterior myelencephalic rhombic lip and in postmitotic granule cells (Fig. 2C) (Li et al., 1999a; Uittenbogaard et al., 1999). The expression of *NSCLI* is similar to the described pattern of *TAG-1/axonin-1* in postmitotic granule cells (Fig. 2D) (Yamamoto et al., 1986; Furley et al., 1990). We also noticed other sites of expres-

* Corresponding author. Tel.: +30-81-039-4542; fax: +30-81-039-4530.
E-mail address: karagoze@imbb.forth.gr (D. Karagozeos).

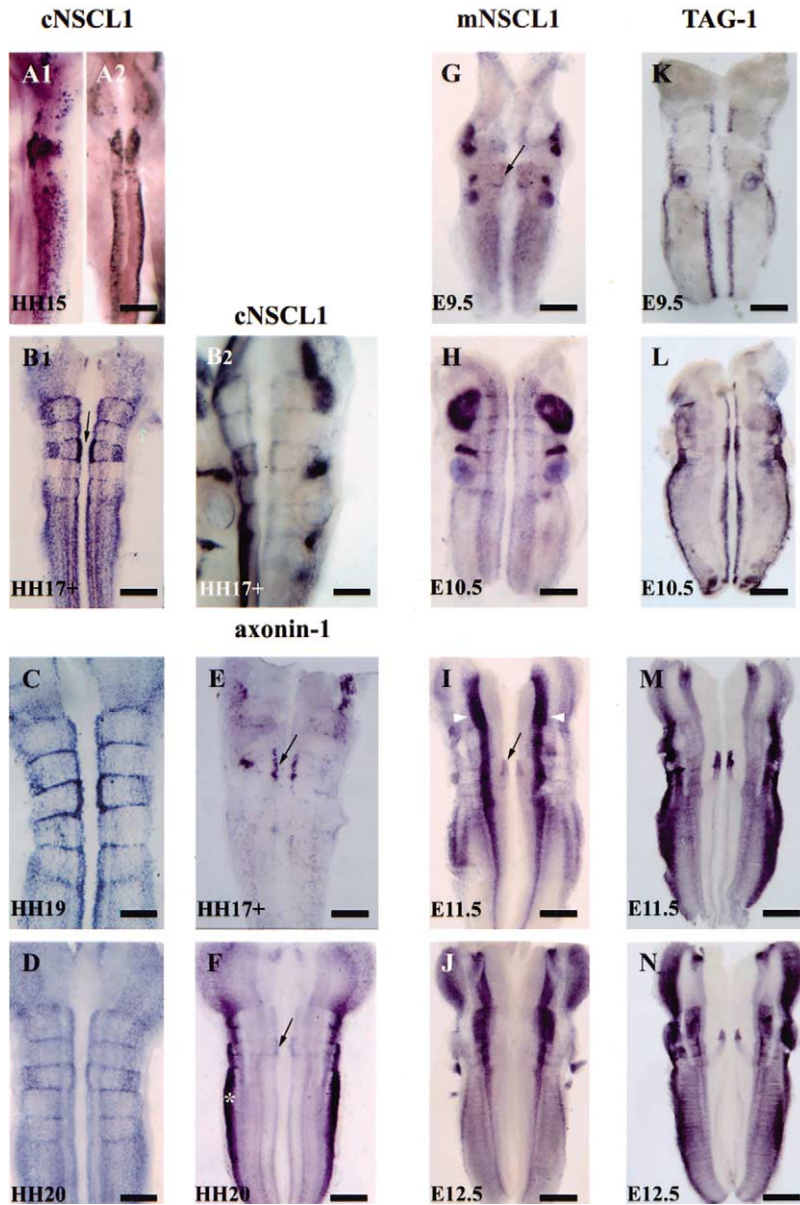


Fig. 1. Chick and mouse *NSCL1* expression pattern in the developing hindbrain in comparison to *TAG-1/axonin-1*. The developmental stages are indicated in each panel. Whole mount in situ hybridization with *cNSCL1* (A–D), *axonin-1* (E–F), *mNSCL1* (G–J), *TAG-1* (K–N) antisense probes. In stage HH15 (A1 – lateral view, A2 – dorsal view), punctate signal is detected in the lateral part of the neural tube. A strong *cNSCL1* signal is detected in rhombomere 4 (r4) while there is no remarkable signal in r3 and r5. In B1, *cNSCL1* transcripts are present in rhombomere boundaries as well as in the basal plate, and are particularly intense in r4 (arrow). In B2, a strong *cNSCL1* signal can be observed in the cranial ganglia (whole mount chick embryo HH17+). In C, the expression in the rhombomere boundaries and basal plate is the highest and appears more uniform in all rhombomeres. The stronger signal in r4 is maintained. In D, the expression in the boundaries is reduced and in the basal plate has almost disappeared. This pattern of *cNSCL1* expression is compared to *axonin-1*, expressed at the basal plate of r4 in stage HH17+ (arrow in E) and HH20 (arrow in F). In F, a strong signal is detected in the lateral part of the neural tube (rhombic lip, asterisk) while low level staining is observed at r3/r4 and r4/r5 boundaries and is barely visible at the r2/r3 boundary. In comparison to the chick, mouse *NSCL1* at E9.5 (G) is detected in cranial ganglia and at r4 (arrow). At E10.5 (H), mouse *NSCL1* is expressed in cranial ganglia and all rhombomere boundaries except the r7/r8, albeit, less intensely than in chick. At E11.5, the signal is mainly detected in migrating fbm neurons located in r4 (arrow in I) and in two longitudinal streams at the middle of the dorsoventral axis (between arrowheads). Faint signal is observed in some rhombomere boundaries. In E12.5 (J), the signal in fbm neurons and boundaries is eliminated. In comparison, *TAG-1* is expressed in the basal plate of r2 and r4 and posteriorly to r6 in E9.5. In E10.5 (L), *TAG-1* is expressed in the basal plate all along the AP axis, as well as in the lateral part of the neural tube. In E11.5 (M), the signal in the basal plate is restricted in r4 to r6 where the migration of fbm neurons is taking place. In E12.5 (N), the *TAG-1* signal in fbm neurons persists contrary to the *NSCL1* signal at the equivalent stage (J). Scale bars in A: 200 μm ; in B1,C,D: 300 μm ; in E: 170 μm , in F,G: 450 μm , in H,I,L: 600 μm , in B2,J,M,N: 770 μm , in K: 370 μm .

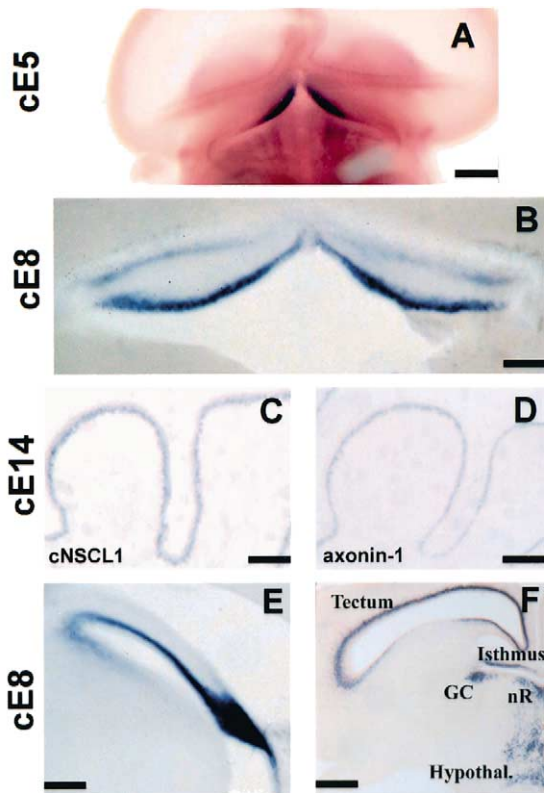


Fig. 2. Expression pattern of *cNSCL1* and *axonin-1* in the developing brain. (A) Whole-mount in situ hybridization for *cNSCL1* in E5 embryo brain, dorsal side up. *cNSCL1* is expressed in the cerebellar primordia. (B) Transverse vibratome section of E8 chick embryo showing in situ hybridization signal for *cNSCL1* in the developing cerebellum. (C,D) In situ hybridization for the detection of *cNSCL1* (C) and *axonin-1* (D) on sagittal cryostat sections of E14 chick embryo. *cNSCL1* and *axonin-1* are both expressed by the postmitotic granule cells of the external granule layer. (E,F) In situ hybridization for *cNSCL1* on coronal vibratome sections of E8 chick embryo brain. (E) *cNSCL1* is expressed in the medial and ventral hippocampus and septum. (F) Signal is also detected in the tectum, the isthmus region, the central gray (GC, griseum centrale), the raphe nuclei (nR) and the hypothalamus. Scale bars in A, E: 300 μ m; in B,D: 240 μ m; in C: 160 μ m, in F: 360 μ m.

sion of *NSCL1* such as the hippocampus and septum (Fig. 2E) as well as the tectum and hypothalamic nuclei (Fig. 2F).

1.3. Expression of avian and murine *NSCL1* in the developing spinal cord and dorsal root ganglia and comparison with *TAG-1/axonin-1*

In order to determine the expression of *NSCL1* in the spinal cord and dorsal root ganglia, we have compared it with that of *TAG-1/axonin-1*, a well studied marker for this structure (Dodd et al., 1988; Ruegg et al., 1989). The spatial and temporal pattern of expression of *NSCL1* (Fig. 3A, D, G) shows limited similarities with that of *TAG-1/axonin-1* (Fig. 3B, E, H). Namely, while *NSCL1* and *TAG-1/axonin-1* are expressed in commissural neurons at HH19 (Fig. 3A, B), *NSCL1* is still detected in postmitotic neurons later (Fig. 3D,

G) but *TAG-1/axonin-1* is not detected in a likewise manner (Fig. 3E, H). Another difference includes the stronger *TAG-1/axonin-1* signal in the dorsal root ganglia (Fig. 3D, E, G, H).

2. Experimental procedures

2.1. Cloning of avian *NSCL1*

A 271 bp fragment was first isolated by polymerase chain reaction (PCR) using DNA from a Uni-ZAP cDNA library from 5-day chick embryos (Stratagene #937405) and primers: 5'-GCCACGCCACGAGGGGAACGCATCC-3' and 5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'. This fragment, corresponding to 165 bp of the bHLH region and 106 bp of the 3'UTR, was used to screen the above cDNA library. Three clones were obtained covering the entire coding region of chick *NSCL1* gene (Accession number AF393850).

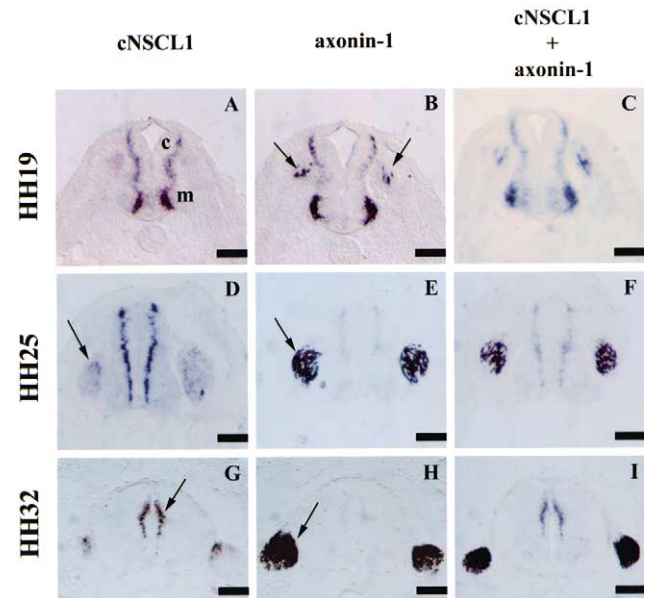


Fig. 3. Expression pattern of *cNSCL1* in comparison to *axonin-1* in the developing spinal cord at HH 19, HH 25 and HH32. All panels show transverse cryostat sections hybridized with *cNSCL1* (A,D,G), *axonin-1* (B,E,H) and both *cNSCL1* and *axonin-1* (C,F,I). At stage HH19 (A), the expression of *cNSCL1* is widespread at the neural tube in commissural (c) and motor neuron progenitors (m). In comparison, *axonin-1* is expressed by a different, more laterally localized population of motor neurons at stages HH19 (B), commissural neurons and dorsal root ganglia (arrows in B). The gap in the double in situ image (C) observed in the ventral spinal cord indicates that there is no overlap in the *NSCL1* and *axonin-1*-positive motor neuron populations. The *cNSCL1* signal is observed in postmitotic neurons in the subventricular zone at stage HH25 and low level staining is observed in the dorsal root ganglia (arrow in D). At this stage, *axonin-1* expression is very faint in the spinal cord (E), contrary to its very strong expression in the dorsal root ganglia (arrow in E). At stage HH32 (G), *cNSCL1* expression is restricted in a subpopulation at the ventricular zone of the dorsal spinal cord (arrow in G). *Axonin-1* expression is much more intense in the dorsal root ganglia at this stage (arrow in H). Scale bars in A: 170 μ m; in B,C: 160 μ m; D,E,F: 240 μ m, in G,H: 300 μ m, in I: 360 μ m.

2.2. Eggs and embryos

Fertilized eggs were incubated in a humidified atmosphere at 38°C. The embryos were staged according to Hamburger and Hamilton (1951). CBAx57Bl/10 mice were used and the day of vaginal plug detection was considered as embryonic day 0.5 (E0.5).

2.3. In situ hybridization

Full length chick *NSCL1* cDNA clones were obtained in pBluescript SK(+/-) by in vivo excision and recircularization (Stratagene, in vivo excision protocol). A 1790 bp fragment, obtained by digestion with SacII, was used as a probe for in situ hybridization using T7 RNA polymerase (Scharen-Wiemers and Gefrin-Moser, 1993). To test the specificity of the probe, we also used a fragment encompassing most of the 3' UTR (without any coding sequence) for in situ hybridization experiments, giving identical results. No staining was obtained with sense probes.

Acknowledgements

We are grateful to Drs C. Begley and P. Sonderegger for providing reagents and to Drs S. Martinez and A. Stamatakis for help with chick embryo anatomy and Drs A. Gavalas and A. Pierani for comments on the manuscript. We thank L. Vardouli for help with library screening and C. Rallis for help with in situ hybridization. This work has been supported by intramural grants from the University of Crete and the IMBB-FORTH as well as the Greek–French collaborative programme PLATON 2001 to D.K. and M.W.

References

- Begley, C.G., Lipkowitz, S., Gobel, V., Mahon, K., Bertness, V., Green, A.R., Gouch, N.M., Kirsch, I.R., 1992. Molecular characterization of NSCL, a gene encoding a helix–loop–helix protein expressed in the developing nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 38–42.
- Cook, M., Gould, A., Brand, N., Davies, J., Strutt, P., Shakhovich, R., Licht, J., Waxman, S., Chen, Z., Gluecksohn-Waelsch, S., Krumlauf, R., Zelent, A., 1995. Expression of the zinc-finger gene PLZF at rhombomere boundaries in the vertebrate hindbrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2249–2253.
- Dodd, J., Morton, B., Karagozeos, D., Yamamoto, M., Jessell, T., 1988. Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons. *Neuron* 1, 105–116.
- Fraser, S., Keynes, R., Lumsden, A., 1990. Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions. *Nature* 344, 431–435.
- Furley, A.J., Morton, S.B., Manalo, D., Karagozeos, D., Dodd, J., Jessell, T.M., 1990. The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity. *Cell* 61, 157–170.
- Guthrie, S., Butcher, M., Lumsden, A., 1991a. Patterns of cell division and interkinetic nuclear migration in the chick embryo hindbrain. *J. Neurobiol.* 22, 742–754.
- Guthrie, S., Lumsden, A., 1991b. Formation and regeneration of rhombomere boundaries in the developing chick hindbrain. *Development* 112, 221–229.
- Hamburger, V., Hamilton, H.L., 1951. A series of normal stages in the development of chick embryo. *J. Morphol.* 88, 49–92.
- Heyman, I., Faissner, A., Lumsden, A., 1995. Cell and matrix specialisations of rhombomere boundaries. *Dev. Dyn.* 204, 301–315.
- Li, C.-M., Yan, R.-T., Wang, S.-Z., 1999a. Misexpression of a bHLH Gene, cNSCL1, results in abnormal brain development. *Dev. Dyn.* 215, 238–247.
- Li, C.-M., Yan, R.-T., Wang, S.-Z., 1999b. Misexpression of cNSCL1 disrupts retinal development. *Mol. Cell. Neurosci.* 14, 17–27.
- Lipkowitz, S., Gobel, V., Varterasian, M.L., Nakahara, K., Tchorz, K., Kirsch, I.R., 1992. A comparative structural characterization of the human NSCL-1 and NSCL-2 genes. *J. Biol. Chem.* 267, 21065–21071.
- Lumsden, A., Keynes, R., 1989. Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* 337, 424–428.
- Lumsden, A., 1999. Closing in on rhombomere boundaries. *Nat. Cell Biol.* 1, E83–E85.
- Nittenberg, R., Patel, K., Joshi, Y., Krumlauf, R., Wilkinson, G.D., Brickell, M.P., Tickle, C., Clarke, D.W.J., 1997. Cell movements, neuronal organisation and gene expression in hindbrains lacking morphological boundaries. *Development* 124, 2297–2306.
- Ruegg, M.A., Stoeckli, E.T., Lanz, R.B., Streit, P., Sonderegger, P., 1989. A homologue of the axonally secreted protein axonin-1 is an integral membrane protein of nerve fiber tracts involved in neurite fasciculation. *J. Cell. Biol.* 109, 2363–2378.
- Scharen-Wiemers, N., Gefrin-Moser, A., 1993. A single protocol to detect transcripts of various types and expression levels in neural tissue and cultured cells: in situ hybridization using digoxigenin-labelled cRNA probes. *Histochemistry* 100, 431–440.
- Uittenbogaard, M., Peavy, D., Chiamello, A., 1999. Expression of the bHLH gene NSCL-1 suggests a role in regulating cerebellar granule cell growth and differentiation. *J. Neurosci. Res.* 57, 770–781.
- Varela-Echevarria, A., Pfaff, S.L., Guthrie, S., 1996. Differential expression of LIM homeobox genes among motor neuron subpopulations in the developing chick brain stem. *Mol. Cell. Neurosci.* 8, 242–257.
- Yamamoto, M., Boyer, A.M., Crandall, J.E., Edwards, M., Tanaka, H., 1986. Distribution of stage-specific neurite-associated proteins in the developing murine nervous system recognized by a monoclonal antibody. *J. Neurosci.* 6, 3576–3594.