

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**« ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ-ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ »**

**« ΠΡΟΤΥΠΟ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ Gd2 ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ**  
**ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ ΣΕ ΕΜΒΡΥΪΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ**  
**ΣΤΟ ΕΝΗΛΙΚΟ ΑΤΟΜΟ »**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΒΙΔΑΚΗ ΜΑΡΙΝΑ**

**Υπεύθυνη καθηγήτρια: Καραγωγέως Δ.**  
**Επιβλέπων καθηγητής: Χαλεπάκης Γ.**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ**  
**ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2005**

**Στη μητέρα μου...**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η συγκεκριμένη διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Νευροεπιστημών της κας Δ. Καραγωγέως. Ολοκληρώνοντας, θα ήθελα να την ευχαριστήσω ιδιαίτερα για τη στήριξη και την καθοδήγησή της, καθώς και για την εμπιστοσύνη της, όλο αυτό το χρονικό διάστημα της συνεργασίας μας. Ελπίζω να συνεχίσουμε έτσι!

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κο Γ. Χαλεπάκη, ο οποίος δέχτηκε να διορθώσει και να βαθμολογήσει τη διατριβή αυτή.

Πριν από οποιοδήποτε άλλο μέλος του εργαστηρίου, θέλω να ευχαριστήσω τη Μυρτώ και την Κατερίνα, οι οποίες έχουν πια φύγει, αλλά υπήρξαν «δασκάλες» μου στην πρώτη μου επαφή με το εργαστήριο και τους οφείλω πολλά για την υπομονή τους και για όσα μου έμαθαν. Μου έχουν λείψει πολύ...

Ένα πολύ πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Κώστα, τη Μαρκέλλα, το Γιώργο (G) και τον Αλέξανδρο, για το όμορφο κλίμα που δημιουργούν στο εργαστήριο. Μας εύχομαι καλή συνέχεια και στον G, εύχομαι καλή τύχη στην Οξφόρδη.

Για τη συνεργασία μας στο συγκεκριμένο project, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον David McLaughlin, ενώ ευχαριστώ και όλα τα άτομα που πέρασαν αυτό το διάστημα από το εργαστήριο: το Νίκο, τη Σέβη, την Ελένη, τις Μαρίες, την Έλενα, αλλά και τα άτομα από τα γειτονικά εργαστήρια: το Γιωργάκη, το Μιχάλη, τη Χαρά, την Τόνια. Ήταν πολύ ευχάριστη η παρουσία τους στο χώρο και η συναναστροφή μαζί τους και ελπίζω να συνεχίσουμε σε αντίστοιχες συνθήκες!

Θα ήθελα ακόμα, να ευχαριστήσω ξεχωριστά τους φίλους μου Άντα, Μαρία, Αντώνη, Ανδρέα, Μπάμπη και Χάρη, που είναι εδώ και γεμίζουν τον εξω-εργαστηριακό χρόνο μου (ατελείωτες ώρες μπουρλώτ και φιλοσοφικών συζητήσεων!!!), ενώ ευχαριστώ και όσους φίλους μου είναι μακριά, για την αγάπη τους.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ ανήκει στους γονείς μου, που πάντα είναι δίπλα μου και στηρίζουν τις επιλογές μου και στη μικρή μου Κατερίνα.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1. Ανάπτυξη του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων.....	6
2. Γονιδιακή αποτύπωση κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος.....	8
3. Το γονίδιο Gtl2.....	10
Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας.....	11
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	12
1. Πειραματόζωα.....	12
2. Προετοιμασία ιστών για τομές κρουστούμου.....	12
3. <i>In situ</i> υβριδοποίηση.....	12
3.1 Παρασκευή ανιχνευτή RNA με αντίδραση μεταγραφής <i>in vitro</i> .....	12
3.2 Υβριδοποίηση <i>in situ</i> σε τομές κρουστούμου.....	14
3.3 Whole mount <i>in situ</i> υβριδοποίηση.....	15
4. Ανοσοϊστοχημεία.....	16
5. Ιστολογική χρώση με cresyl violet.....	17
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	18
1. Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου Gtl2 στον πρόσθιο εγκέφαλο, κατά την ανάπτυξη και στο ενήλικο άτομο.....	18
2. Η έκφραση του Gtl2 κατά την ανάπτυξη του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων.....	21
3. Σύγκριση της έκφρασης του γονιδίου Gtl2 με το πρότυπο έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Lhx6 και του ενζύμου GAD67.....	24
4. Έκφραση του γονιδίου Gtl2 στον ιπόκαμπο, κατά την ανάπτυξη του πρόσθιου εγκεφάλου.....	25
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	27
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	31

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πρόσφατες μελέτες, έχουν αποκαλύψει ένα μεγάλο αριθμό γενετικά αποτυπωμένων γονιδίων (genetically imprinted), πολλά από τα οποία θεωρείται ότι εμπλέκονται στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και συνεπώς στη συμπεριφορά. Βασική προϋπόθεση για την κατανόηση του ρόλου τέτοιων γονιδίων, είναι η διερεύνηση του προτύπου έκφρασής τους. Microarray αναλύσεις έδειξαν ότι το γονίδιο *Gtl2*, το οποίο παρουσιάζει μητρική αποτύπωση (maternally imprinted) εμφανίζει διαφορετική έκφραση στον κοιλιακό και ραχιαίο τελεγκέφαλο σε αναπτυξιακά στάδια κρίσιμα για την γέννηση και μετανάστευση των νευρωνικών πληθυσμών του φλοιού του εγκεφάλου. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές όπως η υβριδοποίηση *in situ* και η ανοσοϊστοχημεία, προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου στο κεντρικό νευρικό σύστημα του ποντικού, από την εμβρυϊκή ημέρα 10,5, μέχρι τα ενήλικα στάδια. Έντονη έκφραση του *Gtl2* παρατηρείται στο διεγκέφαλο, στην κοιλιακή περιοχή του τελεγκεφάλου, στις μεταμιτωτικές στιβάδες του νεοφλοιού και στην στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων του ιπποκάμπου.

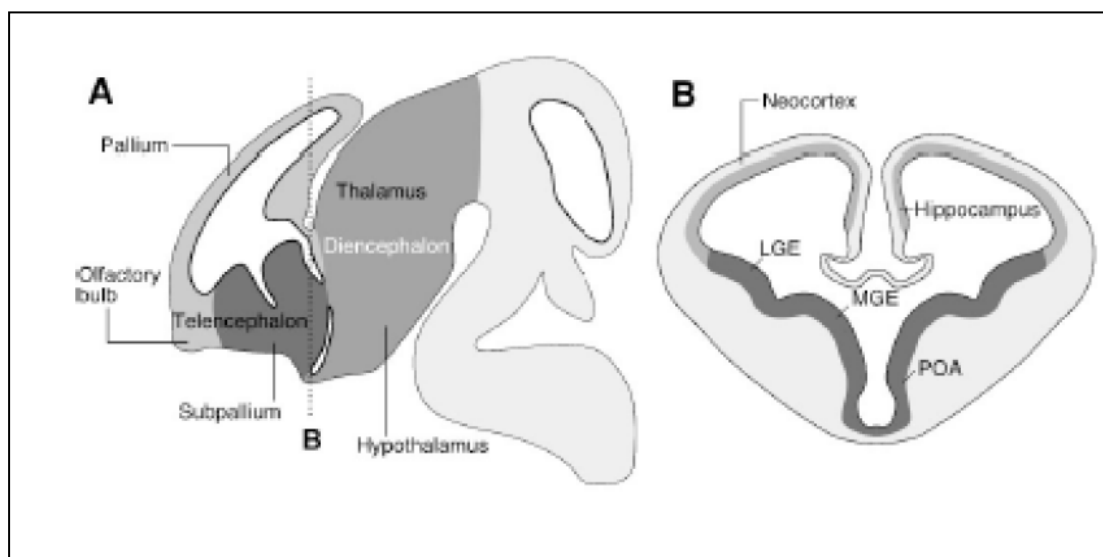
### **Abstract**

Recent work has uncovered a large number of imprinted genes, many of which are thought to play a role in neurodevelopment and behavior. In order to begin to understand the role of specific genes in these processes, their expression patterns will be the key to their functional elucidation. In this study we used *in situ* hybridization to study the developmental expression of *Gtl2* in the mouse central nervous system (CNS) from E10.5 to adulthood, since preliminary data from a microarray study indicated differential expression between the ventral and dorsal telencephalon of the mouse at a critical time point in the generation and migration of cortical neuronal populations. Strong expression was observed in the diencephalon, ventral telencephalon, post mitotic cell layers of the neocortex and pyramidal cell layer of the hippocampus.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. Ανάπτυξη του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων

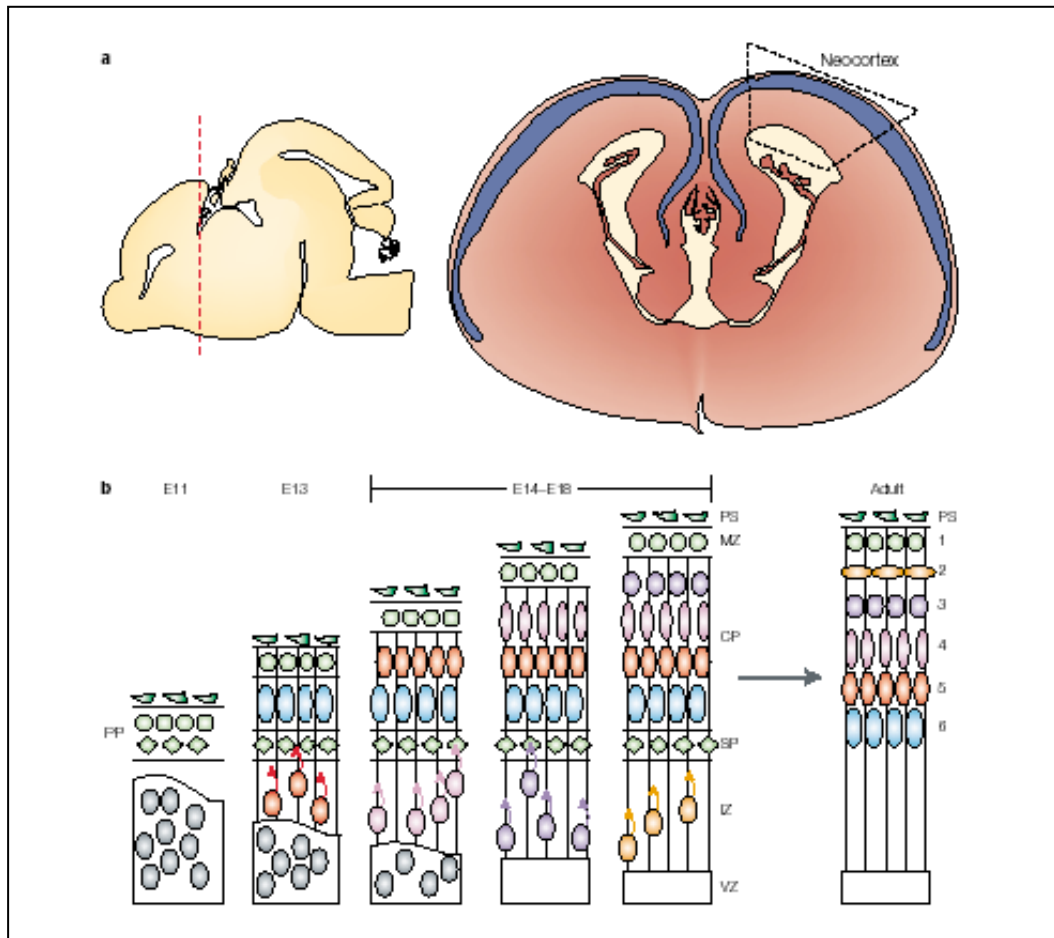
Στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του νευρικού συστήματος των θηλαστικών ο νευρικός σωλήνας είναι μια ευθεία δομή χωρίς κανένα ιδιαίτερο μορφολογικό χαρακτηριστικό. Σταδιακά κατά την ανάπτυξη διαφοροποιείται και σχηματίζονται τρεις πρώιμες κοιλίες: ο πρόσθιος εγκέφαλος (forebrain), ο μεσεγκέφαλος (midbrain) και ο οπίσθιος ή ρομβοειδής εγκέφαλος (hindbrain). Ο πρόσθιος εγκέφαλος στη συνέχεια υποδιαιρείται στον τελεγκεφαλο (telencephalon) και τον διεγκέφαλο (diencephalon), ενώ μια περίσφυξη του τελεγκεφάλου θα οδηγήσει στον σχηματισμό δύο πλευρικών κοιλιών, των μελλοντικών εγκεφαλικών ημισφαιρίων (Gilbert, 1994; Wolpert, 2002) (Εικ. 1A). Αργότερα κατά την ανάπτυξη (εμβρυϊκή ημέρα E10.5), δημιουργούνται στο βασικό τελεγκεφαλο η πλευρική και μεσαία πρόδρομη δομή των μελλοντικών βασικών γαγγλίων (lateral ganglionic eminence, LGE και medial genlionic eminence, MGE αντίστοιχα) (DeCarlos et al., 1996) (Εικ. 1B). Παράλληλα με το βασικό, διαφοροποιείται και ο ραχιαίος τελεγκεφαλος, σε δύο δομές από τις οποίες μελλοντικά θα προκύψουν ο ιππόκαμπος και ο νεοφλοιός (Εικ. 1B).



**Εικόνα 1.** Η ανατομία του αναπτυσσόμενου πρόσθιου εγκεφάλου στο ποντίκι

A) Σχηματική απεικόνιση μιας επιμήρους τομής εγκεφάλου, ηλικίας E12.5, στην οποία φαίνονται οι επιμέρους δομές του πρόσθιου εγκεφάλου, ο διεγκέφαλος

(diencephalon) και ο τελεγκέφαλος (telencephalon). Pallium: φλοιός, Olfactory bulb: οσφρητικός βολβός, Subpallium: βασικός τελεγκέφαλος, Thalamus: θάλαμος Hypothalamus: υποθάλαμος. **B)** Σχηματική απεικόνιση μιας οβελιαίας τομής τελεγκεφάλου ηλικίας E12.5, όπου φαίνονται η πλευρική (LGE) και μεσαία (MGE) πρόδρομη δομή των βασικών γαγγλίων και η πρόσθια προ-οπτική δομή (POA, anterior preoptic area). (Marin & Rubenstein, 2003).



## **Εικόνα 2. Η δημιουργία των στιβάδων του νεοφλοιού**

**a)** Η θέση του νεοφλοιού στο ΚΝΣ και σε απεικόνιση οβελιαίας τομής εγκεφάλου ηλικίας E16.5, στο επίπεδο της κόκκινης γραμμής. **b)** Η δημιουργία των στιβάδων κατά την ανάπτυξη και η οργάνωσή τους στο ενήλικο άτομο. E11: Η προφλοιϊκή πλάκα (PP) δημιουργείται από τους πρώτους νευρώνες που μεταναστεύουν από την κοιλιακή ζώνη (VZ) προς την εξωτερική επιφάνεια του εγκεφάλου (PS). E13: Νέοι νευρώνες μεταναστεύουν διασχίζοντας την ενδιάμεση ζώνη (IZ) και χωρίζουν την προφλοιϊκή πλάκα στην επιχείλια ζώνη (MZ), την υποφλοιϊκή πλάκα (SP) και

ανάμεσά τους τη φλοιϊκή πλάκλα (CP). E14-18: Νευρώνες μεταναστεύουν συνεχώς και οι νεώτεροι ηλικιακά καταλαμβάνουν τις ανώτερες στιβάδες. Ενηλικίωση: Ο νεοφλοιός αποτελείται από 6 στιβάδες. Η υποφλοιϊκή ζώνη έχει αποικοδομηθεί, ενώ η κοιλιακή και η ενδιάμεση ζώνη παραμένουν (τροποποιημένο από Gupta et al., 2002).

Ο νεοφλοιός είναι η πιο πρόσφατη εξελικτικά περιοχή του τελεγκεφάλου και αποτελεί την έδρα όλων των ανώτερων λειτουργιών του εγκεφάλου. Για τα ιδιαίτερα λειτουργικά χαρακτηριστικά που αποδίδονται στο νεοφλοιό, υπεύθυνη είναι εν μέρει η πολυπλοκότητα της δομής του. Όπως είναι γνωστό, ο νεοφλοιός είναι δομημένος σε στιβάδες, κάθε μία από τις οποίες περιέχει νευρικά κύτταρα διαφορετικά ως προς τη μορφή και τη λειτουργία τους. Τα κύτταρα αυτά, κατηγοριοποιούνται στους εξής βασικούς πληθυσμούς (Marin & Rubenstein, 2001):

1. Ο πρώτος πληθυσμός αποτελείται από κύτταρα που γεννιούνται στην κοιλιακή περιοχή του ραχιαίου τελεγκεφάλου, μεταναστεύουν ακτινωτά προς την τελική τους θέση στο φλοιό και θα αποτελέσουν τους μελλοντικούς πυραμιδικούς νευρώνες, με κύριο νευροδιαβιβαστή τη γλουταμίνη.
2. Ο δεύτερος πληθυσμός αποτελείται από κύτταρα που γεννιούνται στην κοιλιακή περιοχή του βασικού τελεγκεφάλου και μεταναστεύουν οριζόντια προς το ραχιαίο τελεγκέφαλο, όπου θα διαφοροποιηθούν σε μη-πυραμιδικούς ενδονευρώνες, με κύριο νευροδιαβιβαστή το γ-αμινο βουτυρικό οξύ (GABA).

## **2. Γονιδιακή αποτύπωση κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος**

Ένας αρκετά μεγάλος αριθμός γονιδίων στο ποντίκι υφίστανται γενετική αποτύπωση (genetic imprinting), διεργασία κατά την οποία μόνο ένα από τα δύο αλληλόμορφα ενός γονιδίου εκφράζεται, ενώ το άλλο υφίσταται σίγηση. Το αλληλόμορφο αυτό μπορεί να προέρχεται είτε από τον πατέρα, είτε από τη μητέρα. Ωστόσο για κάθε αποτυπωμένο γονίδιο η πατρική ή η μητρική έκφραση είναι καθορισμένη και συντηρημένη μέσα και μεταξύ των ειδών (Yevtodiyenco et al., 2004). Τα γονίδια που υφίστανται γενετική αποτύπωση, είναι συνήθως ομαδοποιημένα σε μεγάλες χρωμοσωμικές περιοχές μέσα στο γένωμα, γεγονός που υποδηλώνει τη ρύθμισή τους από κοινά στοιχεία, παρ' όλο που ο μηχανισμός αυτός δεν είναι απόλυτα κατανοητός (Yevtodiyenco et al., 2004).



Μία από τις πιθανές λειτουργίες της γενετικής αποτύπωσης, είναι η ρύθμιση γονιδίων σύμφωνα με καθορισμένο ιστο-ειδικό και χρονικό πρότυπο (Croteau et al., 2002). Για το λόγο αυτό πολλά αποτυπωμένα γονίδια φαίνεται ότι έχουν σημαντικό ρόλο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη διαφόρων συστημάτων, μεταξύ αυτών και του νευρικού (Davies et al., 2005). Συγκεκριμένα, μεγάλο ποσοστό των αποτυπωμένων γονιδίων που έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα, εμφανίζουν έκφραση στο κεντρικό νευρικό σύστημα και ιδιαίτερα στον εγκέφαλο (Davies et al., 2005). Τα γονίδια αυτά δεν παρουσιάζουν κάποιο κοινό χαρακτηριστικό ως προς τη λειτουργία τους, καθώς κωδικοποιούν ποικίλα μετάγραφα, από πρωτεΐνες, μέχρι μικρά μόρια RNA (πίνακας 1) (Davies et al., 2005).

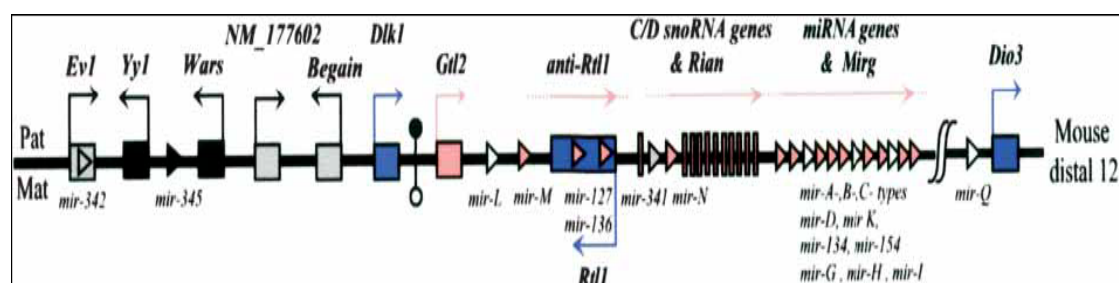
Neurally expressed imprinted genes underpin a variety of cellular functions		
Physiological function	Examples	Expressed allele
Intracellular signalling	<i>Gnas(xl)</i>	Paternal
	<i>RasGrf1</i>	Paternal
RNA processing	<i>Snrpn</i>	Paternal
Genome modification	<i>Nap115</i>	Paternal
Membrane-associated receptor/trans- porter/structural protein	<i>Dlk1</i>	Paternal
	<i>Sgce</i>	Paternal
	<i>5-Htr2a</i>	Maternal
Non-coding RNA (regulatory?)	<i>H19</i>	Maternal
	<i>Peg13</i>	Paternal
	<i>snoRNAs</i>	Paternal
	<i>microRNAs</i>	Maternal
Protein trafficking/processing	<i>Copg2</i>	Maternal
	<i>Ube3a</i>	Maternal
	<i>Usp29</i>	Paternal
Transcription factor/zinc-finger protein	<i>Mash2</i>	Maternal
	<i>Mkm3/</i>	Paternal
	<i>Zfp127</i>	
	<i>Peg3</i>	Paternal
Growth/cell cycle	<i>Cdkn1c</i>	Maternal
	<i>Necdin</i>	Paternal
	<i>Zac1</i>	Paternal

**Πίνακας 1. Αποτυπωμένα γονίδια που εκφράζονται στο νευρικό σύστημα**

Τα συγκεκριμένα γονίδια κωδικοποιούν προϊόντα που ποικίλουν: από πρωτεΐνες μέχρι μικρά RNAs (Davies et al., 2005).

### 3. Το γονίδιο Gtl2

Ο γονιδιακός τόπος Gtl2 (gene trap locus 2), ανακαλύφθηκε σε μια προσπάθεια παγίδευσης γονιδίων (gene trap screen) με χωροχρονικά καθορισμένο πρότυπο έκφρασης κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του ποντικού (Schuster-Gossler et al., 1994). Όπως είναι γνωστό, οι φορείς παγίδευσης γονιδίων είναι σχεδιασμένοι ώστε να εντοπίζουν ενδογενή έκφραση γονιδίων, μέσω σύντηξης ενδογενών εξονίων με γονίδια αναφοράς (Skarnes, 1990, 1993). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η παγίδευση πραγματοποιήθηκε με ένθεση LacZ στο γονιδιακό τόπο του Gtl2 και παρατηρήθηκε έκφραση στο μεσόδερμα (paraxial mesoderm), στους σωμίτες, σε μυοβλάστες, στους σκελετικούς μύες και σε τμήματα του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) (Schuster-Gossler et al., 1994). Η μεταφορά του διαγονιδίου στους απογόνους μέσω της γαμετικής κυτταρικής σειράς, έχει ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της εμβρυϊκής και μετ-εμβρυϊκής ανάπτυξης (Schuster-Gossler et al., 1996). Ο φαινότυπος αυτός ωστόσο, ακολουθεί συγκεκριμένο πρότυπο κληρονομικότητας: ετερόζυγα ποντίκια που έχουν κληρονομήσει τη μεταλλαγή από τον πατέρα, εμφανίζουν σε μεγάλο ποσοστό νανισμό, ενώ ο αντίστοιχος φαινότυπος μειώνεται σε ποσοστά, όταν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο έχει κληρονομηθεί από τη μητέρα. Το Gtl2 γονίδιο, έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 12 του ποντικού (Schuster-Gossler et al., 1996) (Εικ. 2), το οποίο σε περίπτωση μονογονεϊκής δισωμίας (uniparental disomy), έχει βρεθεί ότι προκαλεί εμβρυϊκή θνησιμότητα (Cattanach & Rasberry, 1994). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει, ότι η συγκεκριμένη περιοχή περιλαμβάνει γονίδια γενετικά αποτυπωμένα και ότι το Gtl2 ενδεχομένως ανήκει σε αυτά (Schuster-Gossler et al., 1996).



**Εικόνα 3.** Σχηματική απεικόνιση της ακραίας περιοχής του χρωμοσώματος 12, στην οποία παρατηρείται γενετική αποτύπωση στο ποντίκι. Με τα τετράγωνα, απεικονίζονται το Gtl2 και γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, ενώ με τις κάθετες

γραμμές και τα τρίγωνα, εμφανίζονται τα snoRNA και τα miRNA γονίδια αντίστοιχα. Τα γονίδια που εκφράζονται από το μητρικό αλληλόμορφο και αυτά που εκφράζονται από το πατρικό, έχουν αντίστοιχα χρώμα ροζ και μπλε (Seitz et al., 2004).

Γνωστό και ως Meg3 (maternally expressed gene 3), το Gtl2 κωδικοποιεί πολλά μόρια RNA μικρού μήκους, μέσω εναλλακτικού ματίσματος, τα οποία εντοπίζονται στον πυρήνα σε πολλούς κυτταρικούς πληθυσμούς και σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Μάλιστα, το cDNA των μορίων αυτών περιλαμβάνει πολλά ανοιχτά πλαίσια διαβάσματος και πιθανότατα δεν κωδικοποιεί κάποιο πρωτεϊνικό προϊόν. Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα, ότι το Gtl2 ενδέχεται να δρα ως microRNA (Schuster-Gossler et al., 1998).

### **Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας**

Βασικός στόχος της συγκεκριμένης εργασίας, ήταν ο καθορισμός του προτύπου έκφρασης του γονιδίου Gtl2 στο κεντρικό νευρικό σύστημα και συγκεκριμένα στον πρόσθιο εγκέφαλο. Microarray αναλύσεις αποκάλυψαν ότι το συγκεκριμένο γονίδιο παρουσιάζει διαφορετικό πρότυπο έκφρασης στον πρόσθιο σε σχέση με τον οπίσθιο τελεγκέφαλο, τόσο στη ραχιαία όσο και στην κοιλιακή περιοχή. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το Gtl2 ενδέχεται να έχει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη του πρόσθιου εγκεφάλου και στον καθορισμό των δομών του. Επομένως, η μελέτη του προτύπου έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου, αποτελεί μια πρώτη προσέγγιση για την κατανόηση της λειτουργίας και της σημασίας του στην στιβαδοποίηση του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, ή σε άλλες αναπτυξιακές διεργασίες στον τελεγκέφαλο. Χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές της υβριδοποίησης *in situ* και της ανοσοϊστοχημείας, καθώς επίσης και ιστολογικές χρώσεις.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. Πειραματόζωα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικοί μύες των στελεχών CBAxC57B16 και OF1 (Iffa Credo, Lyon, France). Η ημέρα της σύλληψης θεωρείται 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5M NaCl). Χρησιμοποιήθηκαν ζώα αναπτυξιακών σταδίων E12,5, 12,5, 14,5, 16,5, P0, P7 και ενήλικα.

### 2. Προετοιμασία ιστών για τομές κρουτόμου

Εγκέφαλοι εμβρυϊκών και μετεμβρυϊκών σταδίων αλλά και από ενήλικα άτομα, μονιμοποιούνται σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδης, 14-16 ώρες. Ιδιαίτερα στα ενήλικα άτομα, εφαρμόζεται ενδοκαρδιακή έγχυση παραφορμαλδεΐδης 4% (perfusion) έπειτα από ολική νάρκωση με 2,5% Avertin (22μl/g ζώου) και κατόπιν απομόνωση του εγκεφάλου. Στη συνέχεια, οι ιστοί επώάζονται σε διάλυμα 30% σουκρόζης σε PBS για κρυοπροστασία, 14-16 ώρες και ακολουθεί έγκλιση τους σε διάλυμα 15% σουκρόζης / 7.5% ζελατίνης σε PBS. Οι ιστοί κόβονται σε κρουτόμο, σε διαδοχικές τομές, κάθετες στον προσθιοπίσθιο άξονα (coronal), πάχους 14 μm και συλλέγονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες.

### 3. *In situ* υβριδοποίηση

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

Για τη δημιουργία ανιχνευτών χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια που εμπεριέχουν cDNA για τα γονίδια:

- Gt12

- GAD67

- Lhx6

**Πίνακας 1.** Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή ανιχνευτών

Μόριο	Πλασμιδιακός φορέας	Μη νοηματικό RNA(antisense)		Νοηματικό RNA (sense)	
		Ένζυμο	Πολυμεράση	Ένζυμο	Πολυμεράση
<b>Gtl2</b>	pEXlox+	XbaI	SP6	ApaI	T7
<b>GAD67</b>	pBSII (KS)	SalI	T7	NotI	T3
<b>Lhx6</b>	pBL	NotI	T3	XhoI	T7

Για τη σήμανση των ανιχνευτών έγινε *in vitro* μεταγραφή χρησιμοποιώντας το Riboprobe Gemmini System II Buffers kit (Promega), T3 και T7 RNA πολυμεράσες (Roche) και UTP σημασμένο με διοξυγενίνη (Digoxigenin-11-UTP, Roche).

Η διαδικασία της *in vitro* μεταγραφής έγινε ως εξής:

1. Σε σωληνάκια erpendorf αναμίχθηκαν τα ακόλουθα υλικά με τη σειρά που αναφέρονται και επώαστηκαν για 3 ώρες στους 37°C:

- H<sub>2</sub>O χωρίς νουκλεάσες 7μl
- 5x ρυθμιστικό διάλυμα μεταγραφής 4μl
- 0.1 M DTT 2μl
- 10mM rGTP 1μl
- 10mM rCTP 1μl
- 10mM rATP 1μl
- 10 mM rUTP 0.65μl
- 10mM 11-DIG-UTP (ή 12-Fluo-UTP) 0.35μl
- Καταστολέας RNAσών 1μl (40 units)
- RNA πολυμεράση 1μl (20 units)
- 1μg/μl γραμμοποιημένο πλασμιδιακό DNA 1μl

2. Σταματάμε την αντίδραση προσθέτοντας 2μl (10u/μl units) RNAση χωρίς DNAσηI (Roche) και επωάζοντας για 15 λεπτά στους 37°C

3. Γίνεται κατακρίμνηση του RNA προσθέτοντας 100μl TE (10mM Tris pH8., 0,1mM EDTA pH8.0), 10μl 4M LiCl και 300μl 100% EtOH στους -20°C για 30 λεπτά

4. Φυγοκεντρούμε, ξεπλένουμε το ίζημα (pellet) με 70% EtOH και επαναδιαλύουμε σε TE σε τελική συγκέντρωση 0.1μg/μl

### 3.2 Υβριδοποίηση *in situ* σε τομές κρυστόμου

Οι τομές αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Στη συνέχεια:

- 4%PFA in PBS, 10 λεπτά
- Πλύση με PBS, 5 λεπτά, x3
- Ακετυλίωση, 10 λεπτά, RT, με το ακόλουθο διάλυμα: 4ml τριαιθανολαμίνη, 0,525 ml HCl 37% και 0,75ml οξικός ανυδρίτης σε 295 ml H<sub>2</sub>O
- Πλύση με PBT, 30 λεπτά
- Πλύση με PBS, 10 λεπτά, x3
- Επάωση 6 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου, με διάλυμα προϋβριδοποίησης, το οποίο περιέχει: 50% φορμαμίδιο, 5x SSC, 5x Denharts, 250mg/ml yeast RNA & 500mg/ml herring sperm DNA
- Προσθήκη διαλύματος υβριδοποίησης [διάλυμα προϋβριδοποίησης, που περιέχει 400ng/ml σημασμένου με διγοξυγενίνη ανιχνευτή (DIG-RNA probe)]
- Επάωση στους 72°C για 14-16 ώρες
- Οι τομές εμβαπτίζονται σε διάλυμα 5x SSC για 5 λεπτά, στους 72°C
- Μεταφορά των τομών σε διάλυμα 0,2x SSC, στους 72°C, 1 ώρα
- Πλύση με διάλυμα B1 (0,1M Tris pH 7,5, 0,15M NaCl), 5 λεπτά, x2
- Επάωση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα, με διάλυμα 10% FCS σε B1
- Πρωτογενές αντίσωμα για τη διγοξυγενίνη, συνδεδεμένο με αλακαλική φωσφατάση (anti-DIG-AP, Fab fragments, Roche), αραιωμένο 1/5000 σε 1% FCS, για 14-16 ώρες στους 4°C
- Πλύσεις με διάλυμα B1, 5 λεπτά, x3
- Πλύσεις με διάλυμα B2 (0,1M Tris pH 9,5, ),1M NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>)
- Επάωση με διάλυμα: 75mg/ml NBT (Nitroblue tetrazolium chloride, Roche) και 50mg/ml BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate,4-toluidine salt, Roche), σε διάλυμα B2. Η αντίδραση πραγματοποιείται στο σκοτάδι έως ότου δώσει ικανοποιητική χρώση
- Πολλαπλές πλύσεις με PBT

- Αφυδάτωση των τομών με διαδοχικές εμβαπτίσεις σε 70%, 80%, 90%, 100% αιθανόλη και 3 εμβαπτίσεις σε 100% ξυλόλη
- Entellan (MERCK) και παρατήρηση

### 3.3 Whole mount *in situ* υβριδοποίηση

Τα στάδια που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

- Πλύση με 4% PFA σε θερμοκρασία δωματίου
- Πλύσεις με PBT (PBS, 0,1% Tween-20), 5 λεπτά, x2
- Σταδιακή αφυδάτωση με 25%MeOH-75%PBT, 50%MeOH-50%PBT, 75%MeOH-25%PBT, 100%MeOH (x2), 5 λεπτά σε κάθε πέρασμα
- Σταδιακή ενυδάτωση με 75%MeOH-25%PBT, 50%MeOH-50%PBT & 25%MeOH-75%PBT, 5 λεπτά σε κάθε πέρασμα
- Πλύσεις με PBT, 5 λεπτά, x3
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2%, 1 ώρα με ανάδευση
- Πλύσεις με PBT, 5 λεπτά, x3
- Πρωτεΐνάση K, 5μg/ml, 10 λεπτά
- Πλύσεις με PBT, 5 λεπτά, x2
- Επάωση με 0,2% γλουταραλδεϋδη, 4% PFA σε PBT, 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Πλύσεις με PBT, 5 λεπτά, x2
- Προϋβριδοποίηση, 1 ώρα στους 70°C με το ακόλουθο διάλυμα: 50% φορμαμίδιο, 5x SSC, 50μg/ml yeast RNA, 1% SDS, 50μg/ml ηπαρίνη, σε αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O
- Προσθήκη διαλύματος υβριδοποίησης [διάλυμα προϋβριδοποίησης, που περιέχει 20ng/ml σημασμένου με διγοξυγενίνη ανιχνευτή (DIG-RNA probe)]
- Διάλυμα I (50% φορμαμίδιο, 5x SSC, 1% SDS), 30 λεπτά, στους 70°C, x2
- Διάλυμα I : Διάλυμα II (0,5M NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1% Tween-20), 1:1, 10 λεπτά, στους 70°C
- Διάλυμα II, 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, x3
- RNase A 100μg/ml σε διάλυμα II, 30 λεπτά στους 37°C, x2
- Διάλυμα II, 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Διάλυμα III (50% φορμαμίδιο, 2x SSC), 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

- Διάλυμα III, 30 λεπτά στους 65°C, x2
- Πλύση με διάλυμα TBST (για 50ml 20x: 8g NaCl, 0,2g KCl, 25ml Tris-HCl 1M pH 7,5, 1ml Tween-20) και levamisole (50mg σε 100ml TBST)
- 10% NGS (Normal Goat Serum) σε TBST-levamisole, 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Πρωτογενές αντίσωμα για τη διγοξυγενίνη, συνδεδεμένο με αλακαλική φωσφατάση (anti-DIG-AP, Fab fragments, Roche), αραιωμένο 1/2000 σε 1% NGS-TBST-levamisole, για 14-16 ώρες στους 4°C
- TBST-levamisole, 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, x3
- Πλύσεις με TBST-levamisole, 40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, x5
- NTMT-levamisole (100mM NaCl, 100mM Tris-HCl pH 9,5, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Tween-20, 2mM levamisole)
- Επώαση με διάλυμα: 75mg/ml NBT (Nitroblue tetrazolium chloride, Roche) και 50mg/ml BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate,4-toluidine salt, Roche), σε διάλυμα NTMT. Η αντίδραση πραγματοποιείται στο σκοτάδι έως ότου δώσει ικανοποιητική χρώση
- Πλύσεις με PBT, 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, x5
- Πλύση με PBT 14-16 ώρες στους 4°C
- Παρατήρηση

#### 4. Ανοσοϊστοχημεία

Η ανοσοϊστοχημεία πραγματοποιήθηκε σε τομές κρυοτόμου ως εξής:

Οι τομές πλύθηκαν με PBS και καλύφθηκαν οι μη ειδικές θέσεις δέσμησης του αντισώματος επωάζοντας 1 ώρα με διάλυμα PBS, 1%BSA, 0.1%Triton-X-100 ή PBS, 1%FCS, 0.1%TritonX-100. Ακολούθως, επώαθησαν με διάλυμα του πρωτοταγούς αντισώματος (monoclonal anti-mouse NeuN, Chemicon) 1:1000 σε PBS, 0.1%BSA, 0.1%TritonX-100 ή PBS, 0.1%FCS, 0.1%TritonX-100, στους 4°C για 14-16 ώρες. Μετά από 3-4 πλυσίματα με PBT (PBS,0.1%TritonX-100) επώαθησαν με το διάλυμα του δευτεροταγούς αντισώματος (anti-mouse IgG-biotinylated, Boehringer Mannheim Biochemicals) 1:250 σε PBS, 0.1%BSA, 0.1%TritonX-100 ή PBS, 0.1%FCS, 0.1%TritonX-100, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί επώαση με διάλυμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης συνδεδεμένη με βιοτίνη (Vectastain elite ABC kit, Vector Laboratories) και στη συνέχεια χρωματική



αντίδραση με DAB (3,3'-Diaminobenzidine) και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (FAST™ DAB tablet set, Sigma).

### **5. Ιστολογική χρώση με cresyl violet**

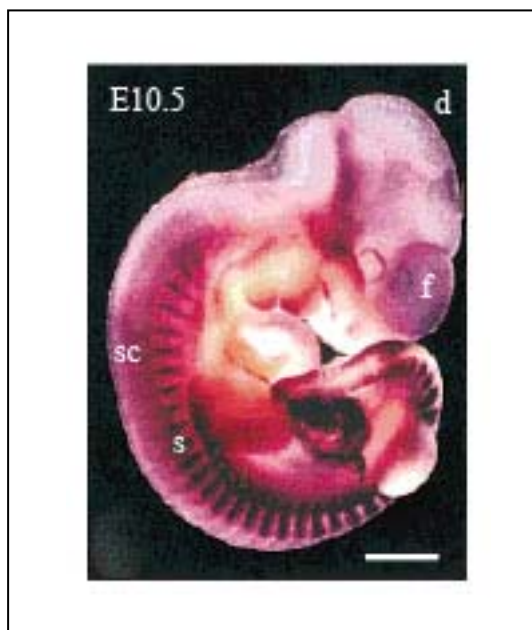
Τομές κρυστόμου εμβαπτίζονται στα ακόλουθα διαλύματα:

- απιονισμένο H<sub>2</sub>O, 5 min
- 1% cresyl violet (SIGMA), 10 min
- απιονισμένο H<sub>2</sub>O, 1 min
- 50% αιθανόλη και 50% οξικό οξύ, στιγμιαία
- 80% αιθανόλη, 5 min
- 90% αιθανόλη, 5 min
- 100% αιθανόλη, 5 min, x2
- ξυλόλη, 5 min, x3
- Entellan και παρατήρηση.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1. Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *Gtl2* στον πρόσθιο εγκέφαλο, κατά την ανάπτυξη και στο ενήλικο άτομο.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το γονίδιο *Gtl2* ανακαλύφθηκε με την τεχνική της παγίδευσης γονιδίων και έκφρασή του παρατηρήθηκε μεταξύ άλλων και στο αναπτυσσόμενο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ωστόσο δεν έχει μελετηθεί το ακριβές πρότυπο έκφρασής του στον εγκέφαλο, ενώ *microarray* αναλύσεις έδειξαν ότι παρουσιάζει διαφορετικό πρότυπο έκφρασης στον κοιλιακό και ραχιαίο τελεγκέφαλο. Προκειμένου να μελετηθεί το πρότυπο έκφρασής του, ως πρώτη προσέγγιση για την κατανόηση της λειτουργίας του στο ΚΝΣ, πραγματοποιήθηκαν υβριδοποιήσεις *in situ* με RNA ανιχνευτή για το *Gtl2* mRNA, τόσο σε ολόκληρα έμβρυα, όσο και σε τομές εγκεφάλου, σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν ολόκληρα έμβρυα ηλικίας E10.5, όπου φαίνεται το γενικό πρότυπο έκφρασης του γονιδίου (Εικ. 1). Παρατηρείται έντονο σήμα στους σωμαίτες, αλλά και σε τμήματα του ΚΝΣ, όπως ο νωτιαίος μυελός, ο διεγκέφαλος και ο πρόσθιος εγκέφαλος (εγκεφαλικά ημισφαίρια).



#### Εικόνα 1.

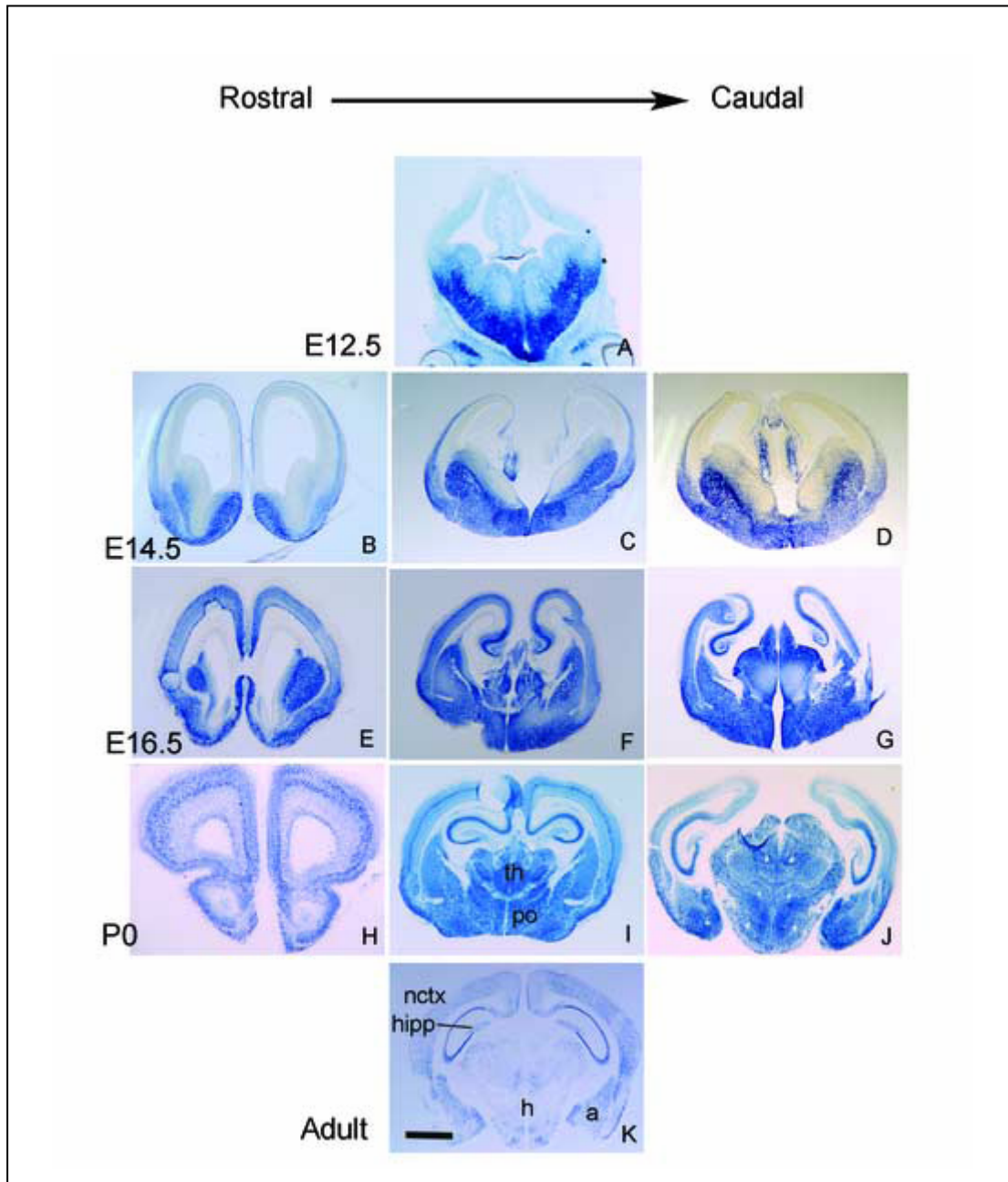
#### **Έκφραση του *Gtl2* σε έμβρυο ποντικού ηλικίας E10.5**

Whole mount *in situ* υβριδοποίηση με RNA ανιχνευτή για το *Gtl2* mRNA. Παρατηρείται έντονη έκφραση στον πρόσθιο εγκέφαλο (forebrain, f), στο διεγκέφαλο (diencephalon, d), στο νωτιαίο μυελό (spinal cord, sc) και στους σωμαίτες (somites, s).

Scale bar: 900μm

Επιπλέον ανάλυση πραγματοποιήθηκε, με την εφαρμογή υβριδοποίησης *in situ* σε εγκάρσιες τομές τελεγκεφάλου, έτσι ώστε να καθοριστεί λεπτομερώς το πρότυπο

έκφρασης του γονιδίου στη συγκεκριμένη δομή του ΚΝΣ. Χρησιμοποιήθηκαν κρυτομές από εγκεφάλους εμβρύων ηλικίας E12.5, E14.5 και E16.5, στάδια στα οποία αναπτύσσεται ο φλοιός και κρυτομές από εγκεφάλους P0 (ημέρα της γέννησης) και ενήλικων ζώων. Συγκεκριμένα, σε εγκάρσιες τομές ηλικίας E12.5, παρατηρείται έντονη έκφραση στη βάση του πρόσθιου εγκεφάλου, ενώ δεν υπάρχει σήμα στην περιοχή του νεοφλοιού (Εικ. 2Α). Σε εγκεφάλους ηλικίας E14.5, το mRNA του Gtl2, εντοπίζεται κατά μήκος του προσθιο-οπίσθιου άξονα, να εκτείνεται από την κοιλιακή προς τη μέση και ραχιαία περιοχή του τελεγκεφάλου (Εικ. 2Β, C, D). Αυτό το πρότυπο έκφρασης παρατηρείται και σε εγκεφάλους ηλικίας E16.5, όπου έντονη έκφραση παρατηρείται επιπλέον στο θάλαμο, στον υποθάλαμο και στον ιππόκαμπο, δομές που αναπτύσσονται ταχύτατα στο συγκεκριμένο εμβρυϊκό στάδιο (Εικ. 2Ε, F, G). Οι δομές αυτές εμφανίζουν έκφραση του Gtl2 και κατά την ημέρα της γέννησης P0 (Εικ. 2Η, I, J), αλλά και στο ενήλικο άτομο, παρ' όλο που στην τελευταία περίπτωση, δεν είναι τόσο έντονη, με εξαίρεση την περιοχή του ιπποκάμπου (Εικ. 2Κ).



**Εικόνα 2.** Έκφραση του Gtl2 στον αναπτυσσόμενο και ενήλικο εγκέφαλο

*In situ* υβριδοποίηση σε κάθετες τομές του πρόσθιου εγκεφάλου όπου φαίνεται η έκφραση του γονιδίου Gtl2 κατά τα εμβρυϊκά στάδια E12.5 (A), E14.5 (B-D), E16.5 (E-G), την ημέρα της γέννησης P0 (H-J) και στο ενήλικο άτομο (K). Στα αναπτυξιακά στάδια E14.5, E16.5 και P0 παρουσιάζεται συγκριτικά το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου στον προσθιοπίσθιο άξονα. Το mRNA του Gtl2 εντοπίζεται από την εμβρυϊκή ημέρα E12.5 μέχρι την ενηλικίωση σε συγκεκριμένα τμήματα στο νεοφλοιό (neocortex, nctx), στον ιππόκαμπο (hippocampus, hipp), στο θάλαμο

(thalamus, th), στα αμύγδαλα (amygdala, a) και στην προ-οπτική περιοχή (preoptic area, po). Scale bar: 300μm

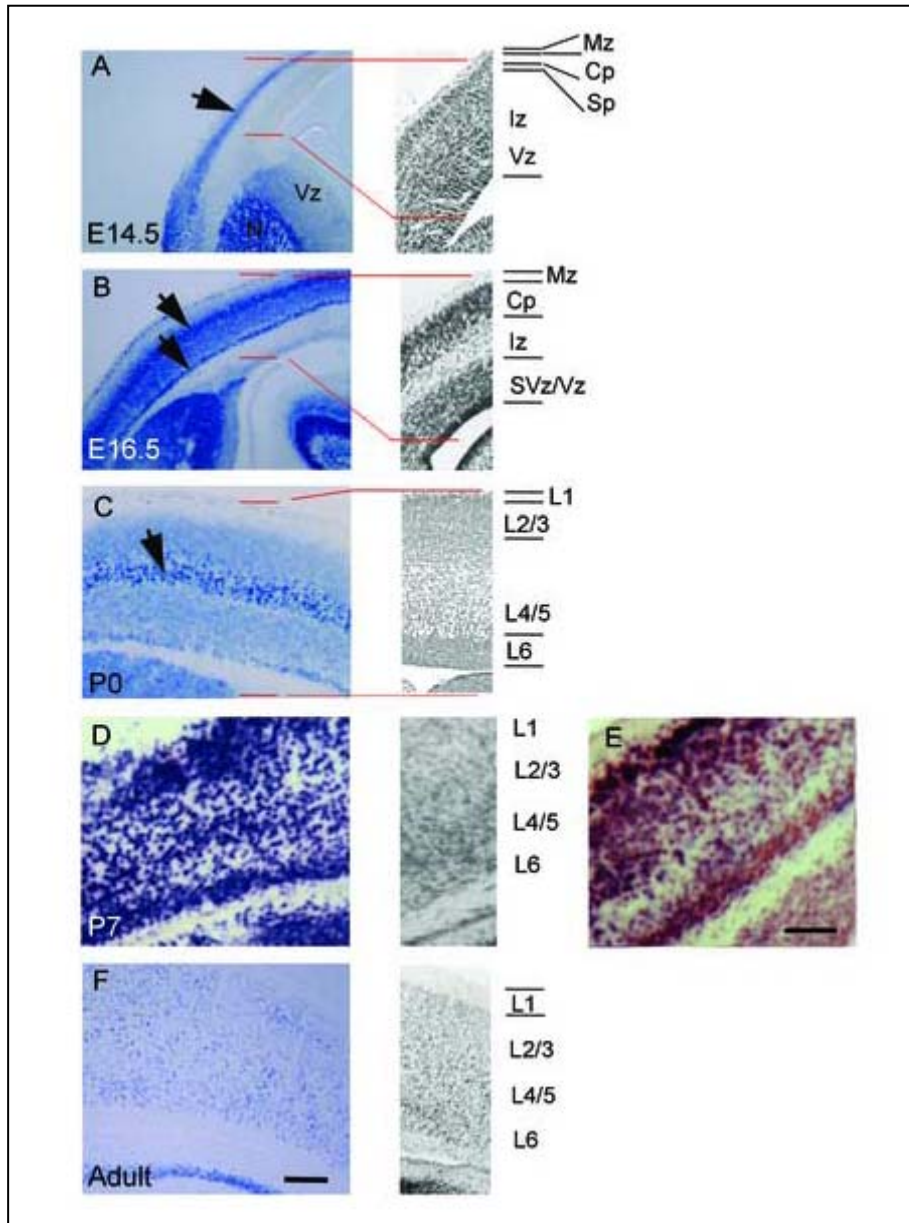
## **2. Η έκφραση του Gtl2, κατά την ανάπτυξη του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων.**

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω δεδομένα, η έκφραση του γονιδίου Gtl2 στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων κατά την ανάπτυξη, ακολουθεί ένα συγκεκριμένο χωροχρονικό πρότυπο. Προκειμένου αυτό να μελετηθεί λεπτομερώς, χρησιμοποιήθηκαν εγκάρσιες τομές κρυστόμου, αναπτυξιακών σταδίων E14.5, E16.5, P0, P7 (7<sup>η</sup> ημέρα μετά τη γέννηση) και από ενήλικα ζώα. Οι συγκεκριμένες ηλικίες επιλέχθηκαν, διότι περιλαμβάνουν τα χρονικά πλαίσια στα οποία ξεκινάει (E14.5) και ολοκληρώνεται (σε μετα-γεννητικά στάδια), η ανάπτυξη του φλοιού. Στις τομές κάθε ηλικίας εφαρμόστηκε υβριδοποίηση *in situ*, όπου φαίνεται η κατανομή του mRNA του Gtl2 στο φλοιό (Εικ. 3A, B, C, D, F). Επιπλέον πραγματοποιήθηκε χρώση αντίστοιχων τομών με τη χρωστική cresyl violet, η οποία βάφει τα κυτταρικά σώματα και επιτρέπει την παρατήρηση της μορφολογίας του ιστού (3A, B, C, D, F). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η χρώση με cresyl violet αποκαλύπτει τη μορφολογία των στιβάδων του αναπτυσσόμενου φλοιού και βοηθάει στον καθορισμό των στιβάδων έκφρασης του Gtl2.

Όπως προκύπτει, το mRNA του γονιδίου εντοπίζεται περιορισμένο στη φλοιϊκή πλάκα νωρίς κατά την ανάπτυξη (E14.5, Εικ. 3A), ενώ σε μετέπειτα στάδια εκφράζεται σε μεγαλύτερο εύρος και εκτείνεται προς την ενδιάμεση ζώνη του φλοιού (E16.5, Εικ. 3B). Την ημέρα της γέννησης P0, παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα έκφρασης του Gtl2 σε ολόκληρο σχεδόν το φλοιό, με εξαίρεση μια στιβάδα κυττάρων με έντονη έκφραση, η οποία εντοπίζεται μεταξύ των στιβάδων 4/5 (Εικ. 3C). Αργότερα, την 7<sup>η</sup> ημέρα μετά τη γέννηση, το mRNA του γονιδίου δίνει έντονο σήμα σε ολόκληρο το φλοιό (Εικ. 3D), ενώ ομοιόμορφη κατανομή στις στιβάδες παρουσιάζεται και στο ενήλικο άτομο (Εικ. 3F).

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν το Gtl2 σε όλα τα παραπάνω πειράματα εκφράζεται από νευρώνες του φλοιού και όχι από μη νευρωνικούς κυτταρικούς πληθυσμούς (π.χ. γλοιακά κύτταρα), πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία ενάντια στην πρωτεΐνη NeuN, σε τομές στις οποίες είχε προηγουμένως εφαρμοστεί

υβριδοποίηση *in situ* για το Gtl2 mRNA. Η NeuN εντοπίζεται στους πυρήνες των νευρικών κυττάρων και αποτελεί παν-νευρωνικό μάρτυρα. Όπως είναι φανερό, υπάρχει συν-εντοπισμός των δύο σημάτων (Εικ. 3E).



**Εικόνα 3.** Έκφραση του Gtl2 στον αναπτυσσόμενο νεοφλοιό

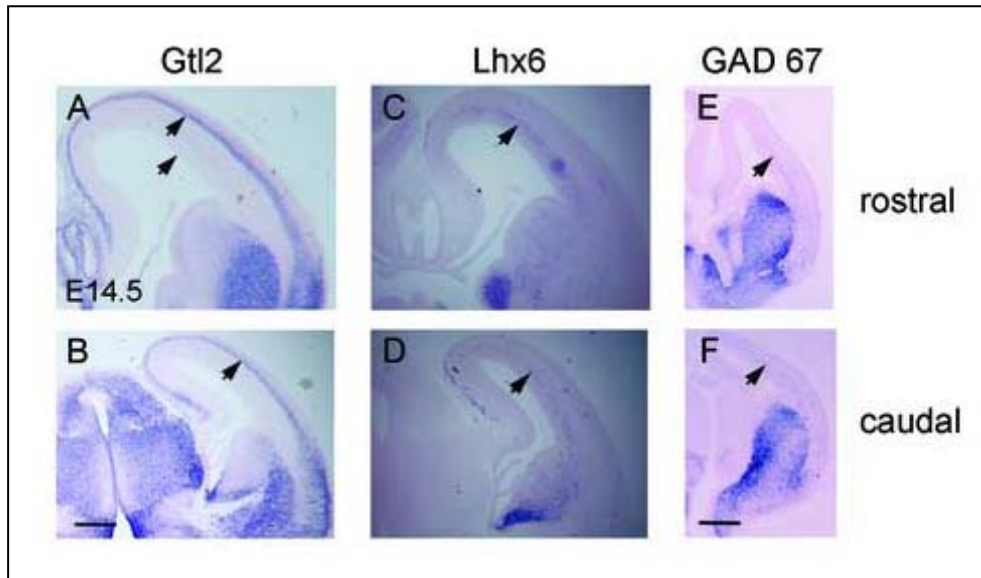
*In situ* υβριδοποίηση σε κάθετες τομές του πρόσθιου εγκεφάλου, όπου φαίνεται έκφραση του γονιδίου Gtl2 στις μετα-μιτωτικές στιβάδες του νεοφλοιού, στα αναπτυξιακά στάδια E14.5 (A), E16.5 (B), P0 (C), P7 (D) και στο ενήλικο (F).

Τομές ίδιου επιπέδου, όπου έχει πραγματοποιηθεί ιστολογική χρώση με cresyl violet, παρατίθενται δίπλα σε κάθε ηλικία, προκειμένου να είναι εμφανείς οι στιβάδες του

φλοιού. Οι κόκκινες γραμμές υποδεικνύουν τις περιοχές με αντιστοιχία μεταξύ των φωτογραφιών. (A) Η έκφραση του Gtl2 κατά την εμβρυϊκή ημέρα E14.5 εντοπίζεται στη φλοιϊκή πλάκα (cortical plate, Cp, βέλος). (B) Η περιοχή έκφρασης του γονιδίου, εμφανίζεται πιο διευρυμένη προς την ενδιάμεση ζώνη (intermediae zone, Iz) κατά την ημέρα E16.5. (C) Κατά την ημέρα της γέννησης P0, η έκφραση του Gtl2 εντοπίζεται σε ολόκληρο το φλοιό εκτός από την εξωτερική ζώνη (outer marginal zone, Mz), ενώ πολύ έντονη έκφραση παρατηρείται σε μια στιβάδα κυττάρων εντός των στιβάδων 4/5 (βέλος). Ομοιόμορφη έκφραση σε όλες τις στιβάδες του φλοιού (2-6) παρατηρείται κατά την ημέρα P7 (D) μετά τη γέννηση και στο ενήλικο άτομο (F). (E) Ανοσοϊστοχημεία όπου φαίνεται η έκφραση της πρωτεΐνης NeuN, η οποία συμπίπτει με αυτή του Gtl2. Mz, Marginal zone, Cp, cortical plate, Iz, intermediate zone, Svz/Vz, subventricular and ventricular zone, L1-6, cortical layers 1 to 6 respectively. Scale bar: 100μm. Scale bar (D,E): 640μm

### **3. Σύγκριση της έκφρασης του γονιδίου Gtl2 με το πρότυπο έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Lhx6 και του ενζύμου GAD67.**

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, το mRNA του Gtl2, εντοπίζεται σε πληθυσμούς νευρικών κυττάρων. Προκειμένου να διαπιστωθεί η φύση των συγκεκριμένων νευρώνων, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της έκφρασης του Gtl2 με την έκφραση των γονιδίων Lhx6 και GAD67. Το Lhx6 είναι μεταγραφικός παράγοντας, που εκφράζεται στους μεταναστευτικούς ενδονευρώνες του φλοιού κατά την ανάπτυξη (Lavdas et al., 1999), ενώ το ένζυμο GAD67 είναι απαραίτητο για την παραγωγή του γ-αμινο-βουτυρικού οξέος (GABA) στους ενδονευρώνες. Τα συγκεκριμένα δύο μόρια θεωρούνται μάρτυρες των ενδονευρωνικών πληθυσμών του φλοιού και γι' αυτόν ακριβώς το λόγο επιλέχθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα. Πραγματοποιήθηκε υβριδοποίηση *in situ* σε τομές κρυστόμου σε πρόσθιο και οπίσθιο επίπεδο, κατά το αναπτυξιακό στάδιο E14.5, όπου η μετανάστευση των ενδονευρώνων προς το φλοιό, είναι σε εξέλιξη. Το Gtl2 εκφράζεται και στο πρόσθιο και στο οπίσθιο τμήμα του φλοιού, αλλά περιορίζεται στη φλοιϊκή πλάκα (Εικ. 4A, B), σε αντίθεση με τα Lhx6 και GAD67, τα οποία εντοπίζονται στην υπο-κοιλιακή και ενδιάμεση ζώνη (Εικ. 4C-F) του φλοιού.



**Εικόνα 4.** Σύγκριση της έκφρασης του **Gtl2**, του **Lhx6** και του **GAD67**, στον πρόσθιο και οπίσθιο εγκέφαλο, κατά την εμβρυϊκή ημέρα **E14.5**

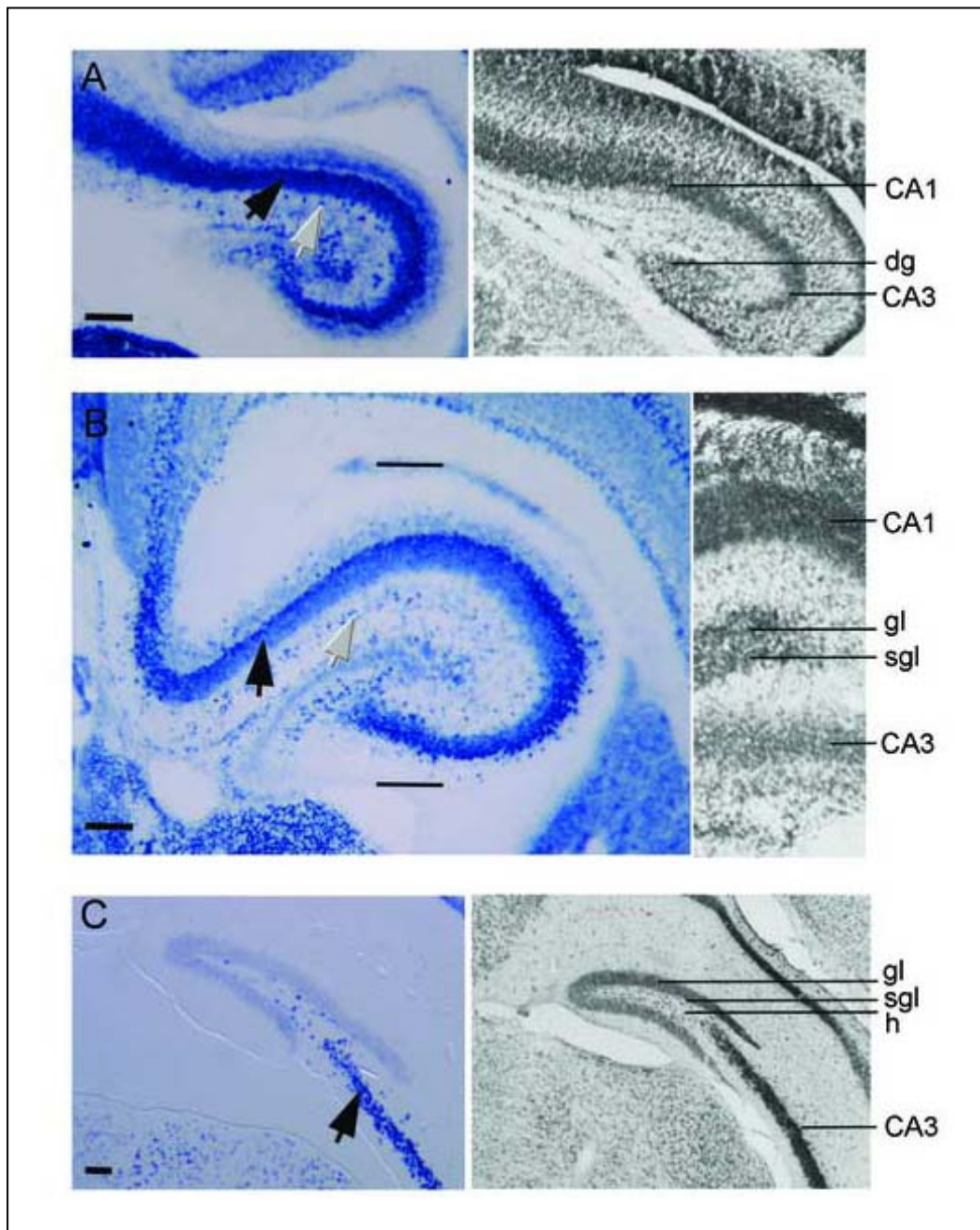
Η έκφραση του **Gtl2** παρατηρείται σε πρόσθιο (A,C,E) και οπίσθιο (B,D,F) επίπεδο στον πρόσθιο εγκέφαλο, και εντοπίζεται τόσο στην κοιλιακή, όσο και στη ραχιαία περιοχή (μάυρα βέλη). Φαίνεται ότι η έκφραση περιορίζεται στη φλοιϊκή πλάκα. Η έκφραση των **Lhx6** και **GAD67**, εμφανίζει παρόμοιο πρότυπο ως προς τον κοιλιακό και ραχιαίο άξονα, αλλά εντοπίζεται πλησιέστερα στη υπο-κοιλιακή (subventricular) και ενδιάμεση (intermediate) ζώνη του φλοιού σε σχέση με το **Gtl2**. Scale bar, 800μm.

#### **4. Έκφραση του γονιδίου **Gtl2** στον ιππόκαμπο, κατά την ανάπτυξη του πρόσθιου εγκεφάλου.**

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το πρότυπο έκφρασης του **Gtl2** στον αναπτυσσόμενο ιππόκαμπο, όπου παρατηρείται έντονη έκφραση σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια που έχουν μελετηθεί. Συγκεκριμένα, ιδιαίτερα έντονη έκφραση παρατηρείται στο εμβρυϊκό στάδιο **E16.5**, όπου εντοπίζεται στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων αλλά και σε μεμονωμένα κύτταρα κοντά σε αυτή, ενώ ασθενέστερη έκφραση εμφανίζεται και στην περιοχή του dentate gyrus (Εικ. 5A). Ανάλογο πρότυπο έκφρασης παρατηρείται τόσο κατά την ημέρα της γέννησης **P0**



(Εικ. 5B), όσο και στο ενήλικο άτομο, όπου το Gtl2 έχει πάψει να εκφράζεται από μεμονωμένα κύτταρα και περιορίζεται στην πυραμιδική στιβάδα (Εικ. 5C).



**Εικόνα 5.** Έκφραση του γονιδίου Gtl2 στον ιππόκαμπο, κατά την ανάπτυξη.

(A-C) Εγκάρσιες τομές στο επίπεδο του ιπποκάμπου, κατά τα αναπτυξιακά στάδια E16.5 (A), P0 (B) και στο ενήλικο άτομο (C), όπου παρατηρείται έντονη έκφραση του Gtl2 στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων (μαύρα βέλη) και λιγότερο έντονη έκφραση στην περιοχή του dentate gyrus. Παρατίθενται αντίστοιχες τομές με χρώση

cresyl violet, όπου φαίνεται η πυκνότητα των κυττάρων και η μορφολογία του ιστού. Οι μπάρες στη φωτογραφία B, υποδεικνύουν την περιοχή που φαίνεται στην αντίστοιχη χρώση cresyl violet. Στα αναπτυξιακά στάδια E16.5 και P0, φαίνονται πολλά μεμονωμένα κύτταρα κοντά στην πυραμδική στιβάδα, τα οποία εκφράζουν Gtl2 (λευκά βέλη). dg, dentate gyrus. gl, granular layer (κοκκώδης στιβάδα). sgl, sub granular layer (υπο-κοκκώδης στιβάδα). CA1, CA3, pyramidal cell layers (στιβάδες πυραμδικών νευρώνων). H, hylus. Scale bar: 50 μm

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο γονιδιακός τόπος Gtl2 (gene trap locus 2), ανακαλύφθηκε σε μια προσπάθεια παγίδευσης γονιδίων (gene trap screen) με χωροχρονικά καθορισμένο πρότυπο έκφρασης κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του ποντικού (Schuster-Gossler et al., 1994). Συγκεκριμένα, έκφραση του Gtl2 έχει αναφερθεί στο λεκιθική σάκο, στο μεσόδερμα και στα αναπτυσσόμενα εκκριτικά όργανα, καθώς επίσης και στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Schuster-Gossler et al., 1998). Ποντίκια μεταλλαγμένα για το συγκεκριμένο γονίδιο, εμφανίζουν καθυστέρηση στην ανάπτυξή τους όταν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο έχει κληρονομηθεί από τον πατέρα (Schuster-Gossler et al., 1996).

Γνωστό και ως Meg3 (maternally expressed gene 3), το Gtl2 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12, μια από τις τουλάχιστον 10 περιοχές του γονιδιώματος του ποντικού που υφίστανται γενετική αποτύπωση (Peters & Beechey, 2004). Το συγκεκριμένο φαινόμενο συνίσταται στην έκφραση ορισμένων γονιδίων από το αλληλόμορφο ενός μόνο από τους δύο γονείς (Reik & Walter, 2001). Πολλά γενετικά αποτυπωμένα γονίδια εκφράζονται στον εγκέφαλο (Davies et al., 2005). Θεωρείται ότι έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη (Reik & Walter, 2001), ενώ ολόένα και περισσότερα στοιχεία οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα αποτυπωμένα γονίδια έχουν σημαντικό ρόλο κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και στη συμπεριφορά (Davies et al., 2005). Ορισμένα γενετικά αποτυπωμένα γονίδια θεωρείται ότι δρουν ως microRNAs, εμποδίζοντας τη μετάφραση ή καταστρέφοντας τα μετάγραφα-στόχους τους μέσω του RNAi μηχανισμού (Seitz et al., 2003; 2004). Το Gtl2 κωδικοποιεί πολλά μόρια RNA μικρού μήκους, μέσω εναλλακτικού ματίσματος, τα οποία εντοπίζονται στον πυρήνα σε πολλούς κυτταρικούς πληθυσμούς και σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Μάλιστα, το cDNA των μορίων αυτών περιλαμβάνει πολλά ανοιχτά πλαίσια διαβάσματος και πιθανότατα δεν κωδικοποιεί κάποιο πρωτεϊνικό προϊόν. Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα, ότι το Gtl2 ενδέχεται να δρα ως microRNA (Schuster-Gossler et al., 1998)

Βασικός στόχος της συγκεκριμένης εργασίας, είναι η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου Gtl2 στον αναπτυσσόμενο πρόσθιο εγκέφαλο, καθώς από microarray αναλύσεις προέκυψε ότι αυτό εμφανίζει διαφορετική έκφραση στην κοιλιακή και ραχιαία περιοχή της συγκεκριμένης δομής. Ο καθορισμός του προτύπου εμφάνισης του Gtl2 mRNA στον πρόσθιο εγκέφαλο και συγκεκριμένα στο φλοιό, θα βοηθήσει στην κατανόηση της λειτουργίας του συγκεκριμένου γονιδίου και της σημασίας του

για τις αναπτυξιακές διεργασίες του φλοιού, όπως κυτταρικός πολλαπλασιασμός, μετανάστευση, κτλ.

Για το σκοπό αυτό, κατασκευάστηκαν ανιχνευτές για το mRNA του Gtl2 και εφαρμόστηκε υβριδοποίηση *in situ*, τόσο σε ολόκληρα έμβρυα, όσο και σε κρυστομές από εγκεφάλους διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων. Όπως προκύπτει, η έκφραση του γονιδίου ξεκινάει κατά την εμβρυϊκή ημέρα E9.5 και συνεχίζεται μέχρι την ενηλικίωση ακολουθώντας ένα καθορισμένο χωρο-χρονικό πρότυπο. Συγκεκριμένα, κατά την εμβρυϊκή ημέρα E12.5, παρατηρείται έντονη έκφραση στη βάση του πρόσθιου εγκεφάλου, σε αρκετή απόσταση από τις κοιλιακές ζώνες όπου γεννιούνται και παραμένουν οι νευρώνες του φλοιού, έως ότου ξεκινήσουν να μεταναστεύουν προς το φλοιό. Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει ότι τα κύτταρα που εκφράζουν το Gtl2 είναι πιθανό να είναι μετα-μιτωτικοί νευρώνες, οι οποίοι δεν έχουν ξεκινήσει τη μετανάστευσή τους. Θα πρέπει να επισημανθεί, ότι δεν ενδέχεται τα συγκεκριμένα κύτταρα να είναι γλοιακά, καθώς αυτά γεννιούνται σε μετέπειτα αναπτυξιακά στάδια (Bayer & Altman, 1990; Qian et al., 2000). Αργότερα, κατά την εμβρυϊκή ημέρα E14.5, η έκφραση του Gtl2 έχει επεκταθεί προς τον μέσο και ραχιαίο τελεγκέφαλο, σε ολόκληρο τον πρόσθιο-οπίσθιο άξονα. Αντίστοιχο πρότυπο παρατηρείται και σε εγκεφάλους ηλικίας E16.5, στους οποίους υπάρχει επιπλέον έκφραση στο θάλαμο, τον υποθάλαμο και τον υπόκαμπο, δομές που αναπτύσσονται στο συγκεκριμένο στάδιο. Κατά την ημέρα της γέννησης P0 οι δομές αυτές εξακολουθούν να εκφράζουν Gtl2, ενώ στο ενήλικο άτομο η έκφραση εμφανίζεται ασθενέστερη και πιο περιορισμένη. Το γεγονός αυτό ενδέχεται να οφείλεται στον περιορισμό του κυτταρικού πληθυσμού που εκφράζει Gtl2 στον ώριμο εγκέφαλο, σε σχέση με τον αναπτυσσόμενο. Εξαίρεση αποτελεί η δομή του υπόκαμπου, όπου έντονη έκφραση παρατηρείται σε όλα τα στάδια ανάπτυξης.

Στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, το πρότυπο εμφάνισης του Gtl2 mRNA παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Εκφράζεται στην περιοχή της φλοιϊκής πλάκας και η έκφραση γίνεται ευρύτερη, όσο αυξάνεται σε μέγεθος η συγκεκριμένη περιοχή κατά την ανάπτυξη. Όπως προκύπτει από το συν-εντοπισμό του Gtl2 mRNA με την πρωτεΐνη NeuN, η οποία αποτελεί μάρτυρα όλων των νευρικών κυττάρων, τα κύτταρα που εκφράζουν Gtl2 στο φλοιό είναι νευρικά κύτταρα. Ενδέχεται να γεννιούνται και να πολλαπλασιάζονται στο φλοιό, χωρίς να μεταναστεύουν από άλλη περιοχή του πρόσθιου εγκεφάλου. Αυτή η πιθανότητα είναι συμβατή με την αύξηση της έκφρασης του Gtl2, όσο αυξάνεται σε μέγεθος η φλοιϊκή πλάκα κατά την

ανάπτυξη. Οι νευρώνες αυτοί σε μετα-μιτωτικά στάδια αρχίζουν να εκφράσουν Gtl2, κατά τη μετακίνησή τους από την κοιλιακή, ή υπο-κοιλιακή περιοχή του νεοφλοιού προς την τελική τους θέση στη φλοιϊκή πλάκα. Αυτό το ενδεχόμενο θα αποτελούσε επίσης επεξήγηση για τις διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των στιβάδων του φλοιού ως προς την έκφραση του Gtl2 στα αναπτυξιακά στάδια E16.5 και P0. Οι διαφορά στα επίπεδα έκφρασης στις στιβάδες θα μπορούσε να οφείλεται στην ηλικιακή διαφορά των νευρώνων κάθε στιβάδας (τα κύτταρα που γεννιούνται πρώτα καταλαμβάνουν τις βαθύτερες στιβάδες, ενώ τα νεότερα κύτταρα βρίσκονται σε ανώτερες και πιο επιφανειακές στιβάδες του φλοιού).

Ένα άλλο εναλλακτικό ενδεχόμενο για την προέλευση των κυττάρων που εκφράζουν Gtl2 στο φλοιό, είναι το ότι τα κύτταρα αυτά γεννιούνται στην περιοχή των κοιλιακών ζωνών του πρόσθιου εγκεφάλου και συγκεκριμένα στην μεσαία και πλευρική πρόδρομη δομή των βασικών γαγγλίων (medial ganglionic eminence, MGE και lateral ganglionic eminence, LGE αντίστοιχα), ως ενδονευρώνες του φλοιού. Ωστόσο, μάλλον η συγκεκριμένη υπόθεση δεν ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα, καθώς στις περιοχές των MGE και LGE δεν παρατηρείται έκφραση του γονιδίου κατά τις εμβρυϊκές ημέρες E12.5 και E14.5 που γεννιούνται οι ενδονευρώνες. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από τη σύγκριση της έκφρασης των Lhx6 και GAD67 γονιδίων, τα οποία αποτελούν μάρτυρες των GABAεργικών ενδονευρώνων του φλοιού, με το πρότυπο έκφρασης του Gtl2. Το τελευταίο, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, εντοπίζεται στη φλοιϊκή πλάκα σε όλες σχεδόν τις κυτταρικές στιβάδες και η έκφρασή του αυξάνεται αναλογικά, όσο επεκτείνεται η συγκεκριμένη περιοχή κατά την ανάπτυξη του φλοιού. Αντίθετα, τα Lhx6 και GAD67 που εκφράζονται από τους GABAεργικούς ενδονευρώνες, εντοπίζονται σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια (E13.5-E14.5) στα MGE και LGE, όπου γεννιούνται τα κύτταρα και στη συνέχεια η έκφρασή τους επεκτείνεται κατά μήκος του μεταναστευτικού μονοπατιού των ενδονευρώνων προς το φλοιό.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η έκφραση του Gtl2 στον ιππόκαμπο. Εμφανίζεται ιδιαίτερα έντονη και σαφώς καθορισμένη χωρικά, από την αρχή της ανάπτυξης της συγκεκριμένης δομής. Το γονίδιο εκφράζεται κυρίως στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων, αλλά και σε παρακείμενους κυτταρικούς υποπληθυσμούς. Αρχικά, στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του ιππόκαμπου (E16.5 και P0), το Gtl2 mRNA εμφανίζει ευρεία έκφραση, η οποία σταδιακά περιορίζεται μέχρι την ενηλικίωση. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην αυξανόμενη κυτταρική οργάνωση που λαμβάνει

χώρα μέχρι να προκύψει η ώριμη δομή. Τα κύτταρα δηλαδή είναι πιο διάσπαρτα στην αρχή και με την πάροδο του χρόνου οργανώνονται, προκειμένου να δώσουν τις στιβάδες του ώριμου ιππόκαμπου στον εγκέφαλο του ενήλικου ατόμου.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα εργασία αναλύθηκε λεπτομερώς το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου Gtl2 στον πρόσθιο εγκέφαλο, από τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, μέχρι την ενηλικίωση. Έντονη έκφραση παρατηρείται στον κοιλιακό τελεγκέφαλο, στο διεγκέφαλο, στο νεοφλοιό και στον ιππόκαμπο, από την εμβρυϊκή ημέρα E12.5 μέχρι το ενήλικο. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τον πιθανό ρόλο του Gtl2 στην ανάπτυξη του πρόσθιου εγκεφάλου και στη διαφοροποίηση των δομών του. Ιδιαίτερα στο νεοφλοιό αποδείχτηκε ότι το συγκεκριμένο γονίδιο δεν εκφράζεται από τους ενδονευρώνες του φλοιού. Ωστόσο το αυστηρά καθορισμένο πρότυπο έκφρασης του γονιδίου τόσο στις στιβάδες του φλοιού, όσο και στον ιππόκαμπο, υποδηλώνει τη ρύθμισή του κατά την ανάπτυξη και υπογραμμίζει τη λειτουργία του σε συγκεκριμένους υποπληθυσμούς κυττάρων των δομών αυτών. Για το λόγο αυτό, περαιτέρω μελέτες του συγκεκριμένου γονιδίου κρίνονται απαραίτητες, προκειμένου να εντοπιστούν γονίδια-στόχοι (εφ' όσον διαπιστωθεί ότι πράγματι δρα ως microRNA) και να γίνει κατανοητή η λειτουργία του και η σημασία του στην ανάπτυξη των δομών του εγκεφάλου και σε διεργασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση.

\*

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bayer, S.A. and Altman, J. 1990. Neocortical Development, Second Edition (New York: Raven Press).
- Cattanach BM., Rasberry C. 1994. Enhanced specific-locus mutation response of 101/H male mice to single, acute X-irradiation. *Mutat. Res.* 311(1): 77-84.
- Davies W., Isles AR., Wilkinson LS. 2005. Imprinted gene expression in the brain. *Neurosci Biobehav Rev.* 29(3): 421-30.
- DeCarlos JA., Lopez-Mascaraque L., Valverde F. 1996. Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J. Neurosci.* 16: 6146-156.
- Denaxa M., Chan CH., Schachner M., Parnavelas JG., Karagogeos D. 2001. The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development.* 128(22): 4635-44.
- Flames N, Marin O. 2005. Developmental mechanisms underlying the generation of cortical interneuron diversity. *Neuron.* 46(3): 377-81.
- Gilbert SF. 1994. *Developmental Biology.* (Sinauer Associate Inc. Massachusetts).
- Grigoriou, M., Tucker, A.S., Sharpe, P.T. and Pachnis, V. 1998. Expression and regulation of Lhx6 and Lhx7, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development. *Development.* 125(11): 2063-74.
- Gupta A., Tsai LH., Wynshaw-Boris A. 2002. Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat. Rev. Genet.* 3: 342-55.
- Lavdas AA., Grigoriou M., Pachnis V., Parnavelas JG., Lavdas AA. 1999. The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci.* 19(18): 7881-8.
- Marin O., Rubenstein JL. 2001. A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nature Rev. Neurosci.* 2: 780-90.
- Marin O., Rubenstein JL. 2003. Cell migration in the forebrain. *Annu. Rev. Neurosci.* 26: 441-83.

- Peters J, Beechey C. 2004. Identification and characterisation of imprinted genes in the mouse. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2(4): 320-33.
- Qian, X., Shen, Q., Goderie, S.K., He, W., Capela, A., Davis, A.A., Temple, S. 2000. Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28: 69-80.
- Reik W, Walter J. 2001. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet*. 2(1): 21-32. Review.
- Schuster-Gossler K., Zachgo J., Soininen R., Schoor M., Korn R. and Gossler A. 1994. Gene trap integrations in genes active in mouse embryonic stem cells efficiently detect developmentally regulated gene expression. *Transgene*, 1: 281-291
- Schuster-Gossler K., Simon-Chazottes D., Guenet JL., Zachgo J., Gossler A. 1996. Gtl2lacZ, an insertional mutation on mouse chromosome 12 with parental origin-dependent phenotype. *Mamm Genome*. 7(1): 20-4.9
- Schuster-Gossler K., Bilinski P., Sado T., Ferguson-Smith A., Gossler A. 1998. The mouse Gtl2 gene is differentially expressed during embryonic development encodes multiple alternatively spliced transcripts, and may act as an RNA. *Dev Dyn*. 212(2): 214-28.
- Seitz H., Youngson N., Lin SP., Dalbert S., Paulsen M., Bachellerie JP., Ferguson-Smith AC., Cavaille J. 2003. Imprinted microRNA genes transcribed antisense to a reciprocally imprinted retrotransposon-like gene. *Nat Genet*. 34(3): 261-2.
- Seitz H., Royo H., Lin SP., Youngson N., Ferguson-Smith AC., Cavaille J. 2004. Imprinted small RNA genes. *Biol Chem*. 385(10): 905-11. Review.
- Seitz H., Royo H., Bortolin ML., Lin SP., Ferguson-Smith A., Cavaille J. 2004. A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse Dlk1-Gtl2 domain. *Genome Res*. 14: 1741-48.
- Wolper L. 2002. Principles of development. Oxford Univ. Press
- Yevtdiyenco A., Steshina E., Farner SC., Levorse JM., Schmidt JV. 2004. A 178-kb BAC transgene imprints the mouse Gtl2 gene and localizes tissue-specific regulatory elements. *Genomics* 84: 277-87.



**Publications:**

McLaughlin D., Vidaki M., Renieri E., Karagogeos D. Expression pattern of the maternally imprinted gene Gtl2 in the forebrain during embryonic development and adulthood. *Mech Dev.* In press.