

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

«Νευροεπιστημών»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ

ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

«ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΦΛΕΜΙΝΓΚ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Δημιουργία ενός αλληλίου Sox2-EGFP που εκφράζεται σε κύτταρα ακτινωτής γλοίας στον φλοιό του εμβρυικού εγκεφάλου του ποντικού»

Σαριδάκη Μαρία – Ιωάννα

Ιούλιος 2009

Υπεύθυνη ερευνήτρια Γ΄: Ευμορφία Ρεμπούτσικα, PhD

Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»

Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής

Εργαστήριο Βιολογίας Βλαστικών Κυττάρων

Τριμελής επιτροπή: Δρ. Ε. Ρεμπούτσικα

Καθ. Χ. Δελιδάκης

Καθ. Γ. Αμοιρίδης

Στον παππού μου...

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω καταρχάς την κα Ε. Ρεμπούτσικα για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπαιδευτώ στο εργαστήριο της. Τους γονείς μου και την αδερφή μου, που με στηρίζανε σε όλα τα επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου και που χωρίς αυτούς δεν θα είχα τη δυνατότητα να εκπληρώσω το στόχο μου.

Ευχαριστώ όλους τους ερευνητές του κέντρου για την καθοδήγηση και τα παραδείγματα που μου έθεσαν.

Ευχαριστώ την Άννα, που με βοήθησε τόσο μέσα στο χώρο του εργαστηρίου, όσο και έξω από αυτό, καθώς και όλα τα παιδιά που κάνανε τη διαμονή μου τόσο πιο ευχάριστη.

Ξεχωριστή θέση στις ευχαριστίες δεν θα μπορούσε να μην έχει ο παππούς μου που πάντα πίστευε στις δυνάμεις μου και ποτέ δεν αμφέβαλλε, όσο δύσκολες και αν ήταν οι καταστάσεις.

Περιεχόμενα

1.1. Abstract.....	4
1.2. Περίληψη.....	5
2. Εισαγωγή	
2.1. Βλαστικά κύτταρα στο νευρικό σύστημα.....	6
2.2. Κύτταρα ακτινωτής γλοίας στον ποντικό.....	8
2.3. Sox2: ένα γονίδιο βλαστικών κυττάρων.....	12
2.4 Το Sox2 ως μάρτυρας για τα κύτταρα ακτινωτής γλοίας.....	13
2.5. Το Sox2 ως εσωτερικός ρυθμιστής της ταυτότητας των νευρικών βλαστικών κυττάρων.....	15
2.6. Σκοπός της εργασίας.....	17
3. Αποτελέσματα – Συζήτηση	
3.1. Τεχνολογία Γενομικής Μηχανικής.....	18
3.2. Μέθοδος COIN (Conditional by Inversion).....	19
3.3. Flp/FRT σύστημα.....	24
3.4. Δημιουργία ενός επαγόμενου Sox2 ^{COIN} αλληλομόρφου.....	26
3.5. Δημιουργία Sox2 ^{COIN/COIN} ποντικών.....	28
3.6. Δημιουργία Sox2 ^{INV/+} αλληλομόρφου (Sox2 ^{eGFP/+}).....	30
3.6.1. Χωρο-ειδικός ανασυνδυασμός του DNA.....	32
3.6.2. hGFAP-Cre	35
3.7. Δημιουργία Sox2 ^{INV/INV} αλληλομόρφου (Sox2 ^{eGFP/eGFP}).....	36
4. Επίλογος.....	39
5. Υλικά και μέθοδοι.....	40

1.1 Abstract

Sox2 is an HMG-box containing transcription factor required for pluripotency of embryonic stem cells and formation of the epiblast. During early development, Sox2 is expressed in the morula, inner cell mass of the blastocyst and later on in the sensory placodes, foregut and the nervous system. Sox2 null embryos die at implantation stage hampering the analysis of Sox2 function during development. We have demonstrated that Sox2 is important for the maintenance of cortical radial glia identity *ex vivo*. Here, we describe a novel Sox2 Conditional by Inversion (COIN) allele in radial glial cells *in vivo*.

1.2 Περίληψη

Το Sox2 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που περιέχει την περιοχή HMG-box, ο οποίος είναι απαραίτητος για τον πλειοδυναμισμό των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων και για τη δημιουργία του επιβλάστη. Κατά την πρόιμη ανάπτυξη, το γονίδιο του Sox2 εκφράζεται στο μορίδιο, στην εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης και αργότερα εκφράζεται στις αισθητικές πλάκες, στο αρχέντερο και στο νευρικό σύστημα. Τα έμβρυα στα οποία έχει απαλειφεί το γονίδιο Sox2 πεθαίνουν στο στάδιο της εμφύτευσης, εμποδίζοντας έτσι την ανάλυση της λειτουργίας του Sox2 κατά την ανάπτυξη. Έχουμε δείξει ότι το Sox2 είναι σημαντικό για τη διατήρηση της ταυτότητας των φλοιικών κυττάρων ακτινωτής γλοίας *ex vivo*. Σε αυτήν την εργασία, περιγράφουμε ένα νέο επαγόμενο Conditional by Inversion (COIN) αλλήλιο του Sox2 σε κύτταρα ακτινωτής γλοίας *in vivo*.

2. Εισαγωγή

2.1 Βλαστικά κύτταρα στο νευρικό σύστημα

Στην εποχή του ανθρώπινου γονιδιώματος κανένα άλλο ερευνητικό πεδίο δεν έχει συζητηθεί δημόσια περισσότερο από την *Βιολογία Βλαστικών Κυττάρων*. Δύο ανακαλύψεις ήταν κρίσιμες σε αυτό το πεδίο: η κλωνοποίηση ζώων και η παραγωγή ανθρώπινων εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (hESC, human embryonic stem cells). Πολλά είναι γνωστά για τη διαφοροποίηση συγκεκριμένων τάξεων βλαστικών κυττάρων, όμως ο τρόπος με τον οποίον ταυτοποιούνται είναι ακόμα ασύλληπτος.

Βλαστικά κύτταρα έχουν ταυτοποιηθεί σε αρκετούς σωματικούς ιστούς, συμπεριλαμβάνοντας το νευρικό σύστημα, τον μυελό των οστών, την επιδερμίδα, τον σκελετικό μυ και το σπύκι και πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της ομοιόστασης σε κάθε έναν από τους ιστούς στους ενήλικους οργανισμούς.

Νευρικά βλαστικά κύτταρα. Κατά την εμβρυογένεση, η εσωτερική κυτταρική μάζα (ICM, inner cell mass) της βλαστοκύστης αποτελείται από μία ομάδα βλαστικών κυττάρων που συνεισφέρουν σε όλους τους ιστούς του εμβρύου. Με μερική διαφοροποίηση αυτών των βλαστικών κυττάρων παράγεται το εξώδερμα, που με τη σειρά του παράγει το νευρο-εξώδερμα και την επιδερμίδα. Το νευρο-εξώδερμα είναι ο αρχέγονος ιστός του νευρικού συστήματος που περιέχει μια πιο εξειδικευμένη ομάδα βλαστικών κυττάρων, τα **νευρικά βλαστικά κύτταρα** (NBK, neural stem cells). Τα NSC είναι πρόδρομα κύτταρα που αυτο-ανανεώνονται και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε νευρώνες, γλοία και ολιγοδενδροκύτταρα. Τα NBK δεν εντοπίζονται μόνο στο έμβρυο, αλλά και στον ενήλικο οργανισμό και αποτελούν μια μεγάλη ελπίδα για τη θεραπεία μεγάλου εύρους κλινικών καταστάσεων στις οποίες εμπλέκεται η απώλεια νευρώνων. Μπορούν επίσης να παρέχουν χρήσιμα ερευνητικά εργαλεία για τη γενική μοριακή και κυτταρική νευροεπιστήμη όσο και για τη νευροφαρμακολογία. Αυτό είναι ένα κρίσιμο ερευνητικό πεδίο στο σταυροδρόμι της βασικής βιολογίας, της βιοϊατρικής και της βιοπληροφορικής με τεράστιο αντίκτυπο στη δημόσια συνειδητοποίηση και στην αντίληψη της μοντέρνας επιστήμης και του αντίκτυπου της στην καθημερινότητα.

Παρόλο το τεράστιο ενδιαφέρον και τις υποσχέσεις που έχουν παράγει οι έρευνες στα νευρικά βλαστικά κύτταρα, πολλές πλευρές της βιολογίας τους παραμένουν άγνωστες. Θα είναι κρίσιμο να επιλυθούν μερικά σημαντικά ζητήματα πριν να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν για κλινικές υπηρεσίες. Ακόμα, η ανάπτυξη πηγών μεγάλης κλίμακας νευρικών βλαστικών κυττάρων θα είναι κρίσιμο και για τη βασική έρευνα και για νέες προσεγγίσεις προς την κατανόηση και τη θεραπεία νευρολογικών ανωμαλιών. Μελέτες που στοχεύουν στην κατανόηση του ρόλου των νευρικών βλαστικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη και στον ενήλικο οργανισμό έχουν οδηγήσει στην άποψη ότι τα βλαστικά κύτταρα είναι χρονικά και χωρικά περιορισμένα και ότι δεν είναι όλα τα βλαστικά κύτταρα ισοδύναμα. Παρόλ' αυτά δεν είναι ξεκάθαρος ο τρόπος με τον οποίον δημιουργούνται. Η έλλειψη ειδικών μαρτύρων για τα νευρικά βλαστικά κύτταρα δημιουργεί μια δυσκολία στην απάντηση των ερωτήσεων που αφορούν στη συχνότητα και στον εντοπισμό τους. Ακόμα, οι μηχανισμοί που ευθύνονται για την ικανότητα αυτο-ανανέωσης και τα ερεθίσματα που επάγουν τη διαφοροποίησή τους ακολουθώντας συγκεκριμένα μονοπάτια δεν είναι καλά καθορισμένα. Η μελέτη των νευρικών βλαστικών κυττάρων σε διαφορετικά πλαίσια και με διαφορετικές προσεγγίσεις, σε συνδυασμό με την εφαρμογή της συγκριτικής γενωμικής θα πρέπει να οδηγήσουν στην ταυτοποίηση των ρυθμιστικών μονάδων που υπόκεινται στη βιολογία των νευρικών βλαστικών κυττάρων.

2.2. Κύτταρα ακτινωτής γλοίας στον ποντικό

Τα κύτταρα ακτινωτής γλοίας είναι ένας ευρέως διαδεδομένος μη-νευρωνικός τύπος κυττάρων του αναπτυσσόμενου κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) όλων των σπονδυλωτών που έχουν αναλυθεί μέχρι στιγμής. Η πρώτη λειτουργία τους που ταυτοποιήθηκε κατά τις αρχικές φάσεις της ιστογένεσης του εγκεφάλου είναι η υποστήριξη των νευρώνων που μεταναστεύουν ακτινωτά. Πρόσφατα, έχουν προσελκύσει περαιτέρω ενδιαφέρον λόγω του κεντρικού τους ρόλου σε ποικιλία αναπτυξιακών διεργασιών, καθώς και του ρόλου που έχουν ως πρόδρομα νευρικά κύτταρα. Πρόκειται περί καλά χαρακτηρισμένων κυττάρων λόγω της χαρακτηριστικής ακτινωτής μορφολογίας τους και των γλοιακών τους ιδιοτήτων. Τα σώματα των κυττάρων ακτινωτής γλοίας βρίσκονται στην μεσοκοιλιακή ζώνη (ventricular zone, VZ) και στο νωτιαίο μυελό, ενώ μακριές ακτινωτές απολήξεις εκτείνονται από το σώμα μέχρι τη βασική μεμβράνη (basal membrane) στην pial επιφάνεια.

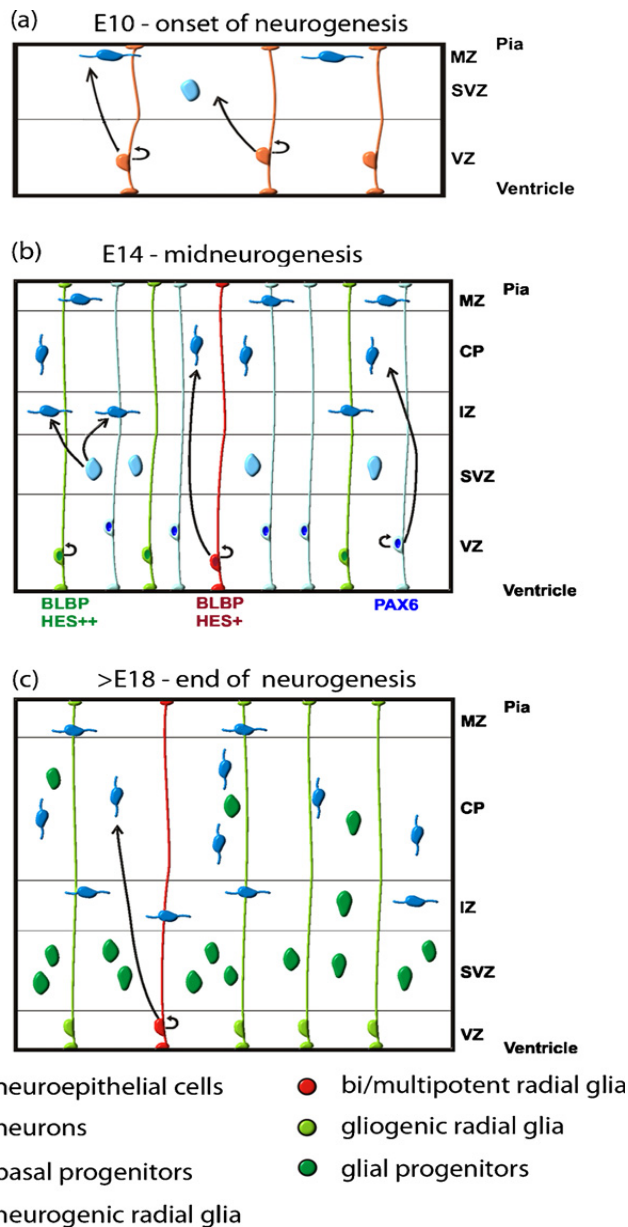
Υποκατηγορίες πρόδρομων κυττάρων είναι παρόντες στον εγκεφαλικό φλοιό των εμβρύων των θηλαστικών καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης. Νωρίς στην νευρογένεση, περίπου στην E10 του ποντικού, οι πρόγονοι της VZ είναι νευροεπιθηλιακά κύτταρα με χαρακτηριστικά επιθηλίου και ακτινωτές αποφυάδες που επαφύονται στην pia και την κοιλία. Έχουν την ικανότητα της αυτο-ανανέωσης, κατά την οποία δίδουν γένεση σε δύο νευροεπιθηλιακά κύτταρα, και έχουν την επιλογή της ασύμμετρης διαίρεσης, παράγοντας έναν νευρώνα και ένα νευροεπιθηλιακό κύτταρο ή ένα βασικό πρόδρομο κύτταρο και ένα νευροεπιθηλιακό κύτταρο.

Κατά τη διάρκεια της νευρογένεσης, περίπου στην E14 στον εγκεφαλικό φλοιό, οι κυτταρικοί πρόγονοι στην VZ είναι κύτταρα ακτινωτής γλοίας προερχόμενα από τα νωρίτερα νευροεπιθηλιακά κύτταρα. Σε αυτό το στάδιο μπορούν να ταυτοποιηθούν διάφορες υποκατηγορίες κυττάρων ακτινωτής γλοίας με βάση τα μοριακά, κυτταρικά και γενεαλογικά χαρακτηριστικά τους. Η παρουσία του BLBP και τα υψηλά ποσοστά έκφρασης του Hes χαρακτηρίζουν κύτταρα ακτινωτής γλοίας που παράγουν άλλα κύτταρα ακτινωτής γλοίας με συμμετρική διαίρεση. Άλλα κύτταρα ακτινωτής γλοίας παράγουν νευρώνες, εκφράζουν Pax6 και διαρούνται με

ασύμμετρο τρόπο, ανανεώνοντας τον εαυτό τους και παράγοντας έναν μετα-μιτωτικό νευρώνα. Αυτά τα κύτταρα ακτινωτής γλοίας, στο τέλος της νευρογένεσης, θα διαιρεθούν συμμετρικά παράγοντας δύο μετα-μιτωτικούς νευρώνες. Είναι λοιπόν περιορισμένα στη γένεση νευρώνων και οι απόγονοί τους αποτελούνται αποκλειστικά από νευρώνες τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Άλλη μια υποκατηγορία είναι παρούσα, θετική στην έκφραση BLBP, αλλά με χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης Hes. Μπορεί να είναι δι-δύναμα πρόδρομα κύτταρα που παράγουν νευρώνες και κύτταρα γλοίας.

Αργά στην νευρογένεση, στην E18, μόνο δύο υποκατηγορίες κυττάρων ακτινωτής γλοίας έχουν παραμείνει. Αυτά που διαιρούνται συμμετρικά και παράγουν κύτταρα ακτινωτής γλοίας που θα μετατραπούν σε πρόδρομα αστροκύτταρα και ένα μικρό ποσοστό δι-/ πολυ- δύναμων κυττάρων ακτινωτής γλοίας, τα οποία προηγουμένως παρήγαγαν νευρώνες και τώρα παράγουν πρόδρομα γλοιακά κύτταρα.

Τα κύτταρα ακτινωτής γλοίας που βρίσκονται στον νωτιαίο και τον κοιλιακό τελεγκέφαλο έχουν χαρακτηριστικά που τα ξεχωρίζουν μεταξύ τους κατά τη διάρκεια της νευρογένεσης (E10 – E17). Τα κύτταρα ακτινωτής γλοίας που βρίσκονται κοιλιακά στον τελεγκέφαλο εκφράζουν Gsh2, δίδουν κυρίως γένεση σε γλοιακά κύτταρα και έχουν την ικανότητα της αυτο-ανανέωσης, δίδοντας έτσι γένεση σε άλλα δύο κύτταρα ακτινωτής γλοίας. Δι/ πολύ- δύναμα κύτταρα ακτινωτής γλοίας είναι παρόντα στο κοιλιακό τμήμα του τελεγκεφάλου. Τα βασικά πρόδρομα κύτταρα αποτελούν την πλειοψηφία των πρόδρομων κυττάρων στο LGE και στο MGE, δίνοντας γένεση στην πλειοψηφία των νευρώνων. Στο νωτιαίο τμήμα του τελεγκεφάλου εντοπίζονται αρκετοί πληθυσμοί κυττάρων ακτινωτής γλοίας, που ορίζονται ως *νευρογενή* κύτταρα ακτινωτής γλοίας εκφράζοντας Pax6 και παράγοντας αποκλειστικά νευρώνες, *γλοιογενή* κύτταρα ακτινωτής γλοίας τα οποία αυτό-ανανεώνονται και παράγουν άλλα κύτταρα ακτινωτής γλοίας καθώς και *διδύναμα* κύτταρα ακτινωτής γλοίας που παράγουν τόσο νευρώνες, όσο και γλοιοκύτταρα. Τα βασικά πρόδρομα κύτταρα αποτελούν μειοψηφία στον νωτιαίο τελεγκέφαλο.

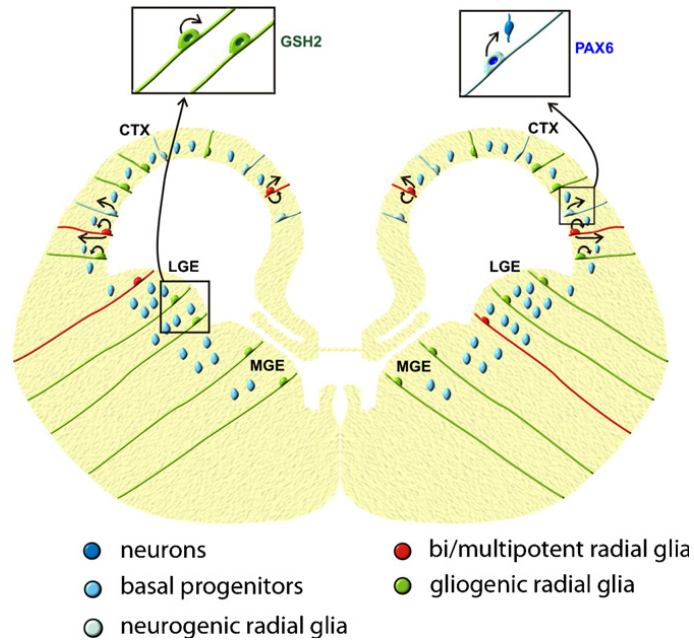


Εικόνα 1. Κύτταρα ακτινωτής γλοίας κατά τη νευρογένεση

(α) την ημέρα E10, οι πρόγονοι της VZ δίδουν γένεση σε δύο νευροεπιθηλιακά κύτταρα, και έχουν την επιλογή της ασύμμετρης διαίρεσης, παράγοντας έναν νευρώνα και ένα νευροεπιθηλιακό κύτταρο ή ένα βασικό πρόδρομο κύτταρο και ένα νευροεπιθηλιακό κύτταρο

(β) την ημέρα E14, τα κύτταρα ακτινωτής γλοίας που δίνουν γένεση σε άλλα κύτταρα ακτινωτής γλοίας χαρακτηρίζονται από την παρουσία του BLBP και τα υψηλά επίπεδα έκφρασης Hes. Κύτταρα ακτινωτής γλοίας που εκφράζουν Pax6 διαιρούνται με ασύμμετρο τρόπο ανανεώνοντας τον εαυτό τους και παράγοντας έναν νευρώνα. Η τρίτη κατηγορία κυττάρων ακτινωτής γλοίας εκφράζει BLBP και χαμηλότερα επίπεδα Hes και θεωρούνται δι-δύναμα κύτταρα που δίνουν γένεση σε νευρώνες και άλλα κύτταρα ακτινωτής γλοίας

(γ) την ημέρα E18, έχουν μείνει δύο υποκατηγορίες, η μία διαιρείται συμμετρικά και παράγει κύτταρα ακτινωτής γλοίας που θα δώσουν γένεση σε πρόδρομα αστροκύτταρα, η άλλη υποκατηγορία πριν παρήγαγε νευρώνες, αλλά τώρα παράγει πρόδρομα γλοιακά κύτταρα.



Εικόνα 2. Κύτταρα ακτινωτής γλοίας στον τελεγκέφαλο.

Τα κύτταρα ακτινωτής γλοίας που βρίσκονται κοιλιακά στον τελεγκέφαλο, διαφέρουν από αυτά που βρίσκονται νωτιαία. Τα κοιλιακά κύτταρα εκφράζουν Gsh2, δίδουν γένεση κυρίως σε γλοιακά κύτταρα και έχουν την ικανότητα της αυτό-ανανέωσης.

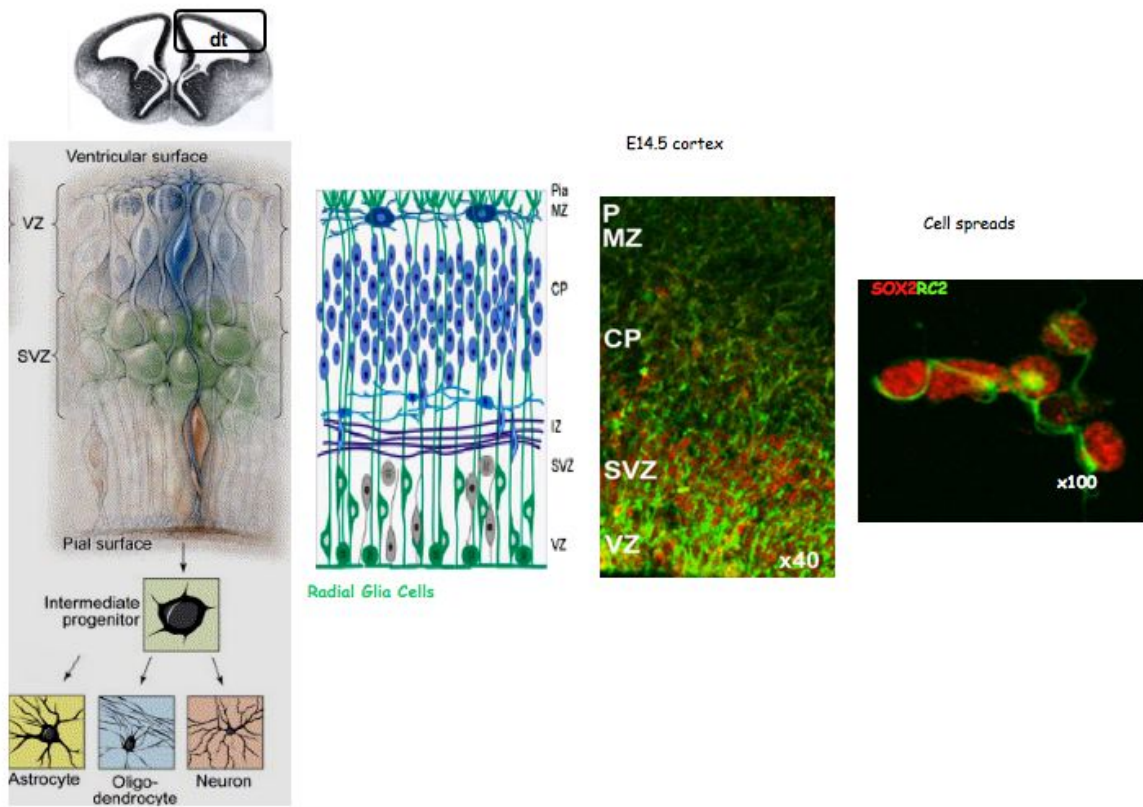
Στο νωτιαίο τμήμα εντοπίζονται νευρογενείς πληθυσμοί κυττάρων ακτινωτής γλοίας, που εκφράζουν Pax6 και παράγουν νευρώνες, γλιογενή κύτταρα που αυτό-ανανεώνονται και δι-δύναμα κύτταρα ακτινωτής γλοίας που παράγουν τόσο νευρώνες όσο και γλοιακά κύτταρα

2.3 Sox2: ένα γονίδιο βλαστικών κυττάρων.

Γονίδια που εμπλέκονται στον καθορισμό και τη διατήρηση της κατάστασης των βλαστικών κυττάρων θα έπρεπε: (α) να επιτρέπουν ή να ενθαρρύνουν την αυτό-ανανέωση, (β) να απονέμουν πλαστικότητα έτσι ώστε οι απόγονοι των βλαστικών κυττάρων να μπορούν να υιοθετούν διαφορετικές μοίρες, και (γ) να επιτρέπουν στο κύτταρο να απαντά σε σήματα που επάγουν αυτό-ανανέωση ή διαφοροποίηση. Ένα τέτοιο γονίδιο μπορεί να είναι και το Sox2, ένα μέλος της οικογένειας γονιδίων Sox (SRY-related HMG box) που κωδικοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες και περιέχει μία Ομάδα Υψηλής Κινητικότητας (HMG High Mobility Group) που δεσμεύεται στο DNA. Το Sox2 κατατάσσεται στην υπο-οικογένεια SOXB1 μαζί με το Sox1 και το Sox3. Το Sox2 είναι το πρώτο από τα τρία γονίδια που εκφράζεται, μεταγραφόμενο στα πρώτα στάδια της βλαστοκύστης στην εσωτερική κυτταρική μάζα (ICM). Μετά την εμφύτευση, το Sox2 εκφράζεται σε όλο τον επιβλάστη, αλλά καθώς συνεχίζει η γαστριδίωση, περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό στο εμπρόσθιο νευροεξώδερμα. Στο ΚΝΣ η έκφρασή του συσχετίζεται περισσότερο με την μη δεσμευμένη διαίρεση των βλαστικών και πρόδρομων κυττάρων, όχι μόνο στο έμβρυο αλλά και στον ενήλικο οργανισμό. Η έκφραση του Sox2 στις πλειοδύναμες κυτταρικές σειρές στο πρόωρο έμβρυο του ποντικού και η συνεχιζόμενη έκφρασή του στο νευροεπιθήλιο και κοιλιακό στρώμα του αναπτυσσόμενου ΚΝΣ υποδηλώνουν ότι το Sox2 θα μπορούσε να είναι σημαντικό στη διατήρηση ή συντήρηση του αναπτυξιακού δυναμικού. Το Sox2 χαρακτηρίζει την πλειοδύναμη καταγωγή στο πρώιμο έμβρυο του ποντικού, έτσι ώστε να εκφράζεται τόσο στην εσωτερική κυτταρική μάζα, στον επιβλάστη και στα γεννητικά κύτταρα όσο και στα πολυδύναμα κύτταρα του εξωεμβρικού εξωδέρματος. Και στις δύο γενεαλογίες η μείωση της έκφρασης συσχετίζεται με τη δέσμευση προς τη διαφοροποίηση, έτσι ώστε να μην είναι παρόν σε κυτταρικούς τύπους με περιορισμένο αναπτυξιακό δυναμικό. Ακόμα, η έκφραση του Sox2 συνδέεται με την αδέσμευτη διαίρεση των βλαστικών και πρόδρομων κυττάρων του αναπτυσσόμενου και του ενήλικου κεντρικού νευρικού συστήματος. Όντως, ομοιογενείς πληθυσμοί νευροεπιθηλιακών κυττάρων από ES κύτταρα που διαφοροποιούνται *in vitro* ή από εμβρυικό εγκέφαλο μπορούν να απομονωθούν χρησιμοποιώντας την επιλογή για το Sox2 σεσημασμένο αλληλίο. Αυτά τα κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιαστούν ως βλαστικά/ πρόδρομα κύτταρα ή να τους επιτραπεί η διαφοροποίηση κάτω από ποικίλες συνθήκες *in vitro* ή *in vivo*.

2.4 Το Sox2 ως μάρτυρας για τα κύτταρα ακτινωτής γλοίας.

Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, η εσωτερική κυτταρική μάζα (ICM) της βλαστοκύστης αντιπροσωπεύει μια ομάδα βλαστικών κυττάρων που συνεισφέρουν σε όλους τους ιστούς μέσα στο έμβρυο. Μερική διαφοροποίηση αυτών των βλαστικών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του εξωδέρματος το οποίο με τη σειρά του παράγει το νευροεξώδερμα και την επιδερμίδα. Το νευροεξώδερμα είναι ο προγονικός ιστός του νευρικού συστήματος που περιέχει μια πιο ειδικευμένη ομάδα βλαστικών κυττάρων, τα *Νευρικά Βαστικά Κύτταρα (Neural Stem Cells, NSC)*. Τα NSC είναι πρόγονοι που αυτο – ανανεώνονται οι οποίοι διαφοροποιούνται σε νευρώνες, γλοία και ολιγοδενδροκύτταρα. Λίγα είναι γνωστά μέχρι τώρα για του μεταγραφικούς παράγοντες που διατηρούν την NSC κατάσταση στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Παρόλ' αυτά μέλη της υποοικογένειας SOXB1 των HMG box παραγόντων έχουν εμπλακεί στην ανάπτυξη του ΚΝΣ και έχουν χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρες για την απομόνωση νευρικών βλαστικών κυττάρων. Για να διαλευκανθεί ο ρόλος του Sox2, παράχθηκε μία μετάλλαξη απώλειας της λειτουργίας σε ES κύτταρα αντικαθιστώντας το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του Sox2 με βgeo χρησιμοποιώντας ομόλογο ανασυνδυασμό. Ανάλυση των ομόζυγων για τη μετάλλαξη του Sox2 εμβρύων έδειξε ότι το SOX2 είναι σημαντικό για τη δημιουργία του επιβλάστη και του εξωεμβρυϊκού εξωδέρματος στο ποντίκι. Τα ομόζυγα για τη μετάλλαξη έμβρυα πεθαίνουν σύντομα μετά την εμφύτευση αποκαλύπτοντας μια ανάγκη για το Sox2 στις πολυδύναμες γενεαλογίες του πρώιμου εμβρύου. Ακόμα, το Sox2 απαιτείται για την επιβίωση των ES κυττάρων. Στα ετερόζυγα Sox2^{βgeo/+} έμβρυα, τα οποία φαίνονται να είναι φυσιολογικά, η έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης ανακεφαλαιώνει το ενδογενές προφίλ έκφρασης του Sox2 στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ακόμα, η αντίσταση στη νεομυκίνη επιτρέπει την απομόνωση κυττάρων που εκφράζουν Sox2^{βgeo/+} στην παρουσία του G418. Όντως, εμείς και άλλοι έχουμε χρησιμοποιήσει επιτυχώς αυτήν την τεχνική επιλογής για να απομονώσουμε ομοιογενείς πληθυσμούς πρόδρομων νευρικών κυττάρων με Sox2 από εμβρυικά βλαστικά κύτταρα που διαφοροποιούνται ή όχι από εγκέφαλο εμβρύου. Αυτά τα πειράματα υποδηλώνουν ότι το SOX2 είναι ένας έξοχος μάρτυρας για να μελετηθούν οι ιδιότητες των εμβρυονικών και ενήλικων νευρικών βλαστικών κυττάρων.

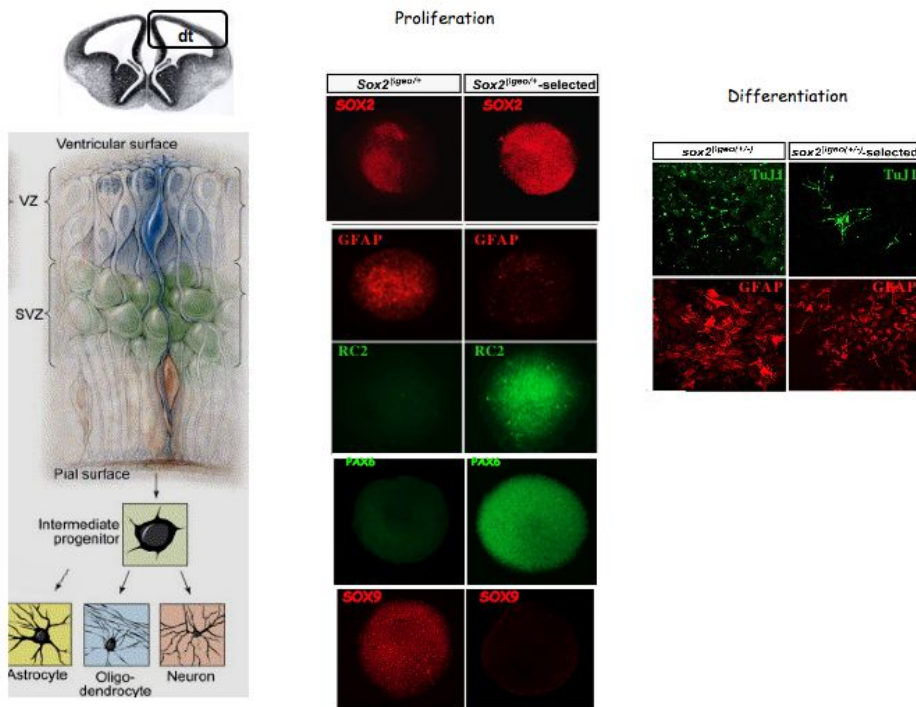
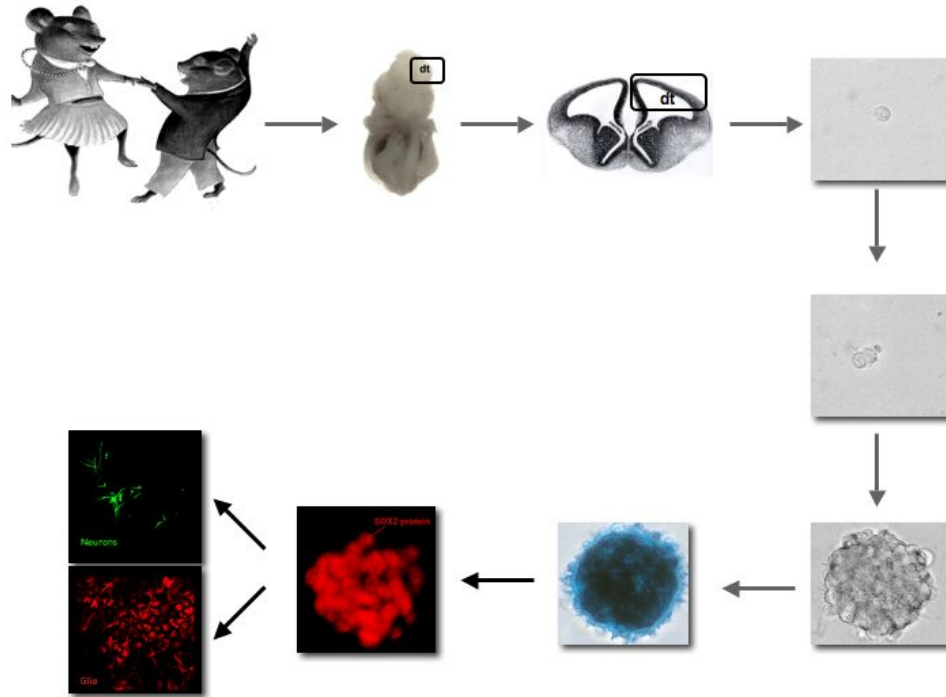


Εικόνα 3. Τα σώματα των κυττάρων ακτινωτής γλοίας βρίσκονται στην κοιλιακή ζώνη (ventricular zone, VZ), ενώ μακριές ακτινωτές απολήξεις εκτείνονται από το σώμα μέχρι τη βασική μεμβράνη (basal membrane) στην pial επιφάνεια. Δίνουν γένεση σε ενδιάμεσα πρόδρομα κύτταρα τα οποία αργότερα παράγουν όλους τους κυτταρικούς τύπους του νευρικού συστήματος.

2.5. Το Sox2 ως εσωτερικός ρυθμιστής της ταυτότητας των νευρικών βλαστικών κυττάρων.

Στο εργαστήριό μας έχουμε χρησιμοποιήσει το Sox2 ως μέσο για να μελετήσουμε τις ιδιότητες των νευρικών βλαστικών κυττάρων και τις όψεις του μοριακού και κυτταρικού ελέγχου της διαφοροποίησής τους. Έχουν παράγει νευρόσφαιρες από τον εγκεφαλικό φλοιό εμβρύων Sox2^{βgeo/+} ηλικίας E14.5 και βρήκαν ότι τα νευρικά βλαστικά κύτταρα που αυτο-ανανεώνονται περιορίζονται στο μέρος στο οποίο εκφράζεται το Sox2 κάτω από φυσιολογικές συνθήκες οι νευρόσφαιρες περιέχουν ποικιλία πιο διαφοροποιημένων κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβάνοντας πρόδρομα κύτταρα της νευρικής πλάκας, γεγονός το οποίο μπορεί να αποκαλυφθεί μετά από εμφύτευση στον οπίσθιο εγκέφαλο εμβρύων ποντικού ηλικίας 8.5 dpc. Τα Sox2 επιλεγμένα κύτταρα όμως από τον φλοιό διατηρούν τον χαρακτήρα και τις ιδιότητες των ακτινωτών γλοιοκυττάρων και σε καλλιέργεια. Η έκφραση του Sox2 είναι απαραίτητη για τη συμμετρική διαίρεση των κυττάρων ακτινωτής γλοίας *ex vivo*.

Παρόλ' αυτά αν οι νευρόσφαιρες διατηρηθούν κάτω από συνθήκες επιλογής, τέτοιες ώστε όλα τα κύτταρα να εκφράζουν Sox2 και οποιαδήποτε θέση που παρέχεται από τα διαφοροποιημένα κύτταρα να απομακρύνεται, τα βλαστικά κύτταρα υιοθετούν έναν χαρακτήρα ακτινωτής γλοίας με πιο περιορισμένη μοίρα *in vitro* και μετά την εμφύτευση. Τα δεδομένα μας υποδηλώνουν ότι τα βλαστικά κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος ακολουθούν ένα εσωτερικό πρόγραμμα, όπου το Sox2 είναι ένας κοινός παράγοντας, αλλά που μπορεί να τροποποιηθεί με εξωτερικά σήματα που προέρχονται από τους διαφοροποιημένους κυτταρικούς προγόνους.



Εικόνα 4. Το Sox2 διατηρεί την ταυτότητα των νευρικών βλαστικών κυττάρων σαν RC2- θετικά, Pax6- θετικά κύτταρα ακτινωτής γλοίας σε καλλιέργειες νευροσφαιρών ex vivo.

2.6. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του ρόλου του Sox2 στα κύτταρα ακτινωτής γλοίας με τη δημιουργία ενός επαγόμενου, στοχευμένου αλληλίου Sox2-eGFP στον φλοιό του εγκεφάλου εμβρύων επίμυος.

3. Αποτελέσματα - Συζήτηση

3.1 Τεχνολογία Γενωμικής Μηχανικής.

Η τεχνολογία Velocigene, που αναπτύχθηκε από τη Regeneron Pharmaceuticals Inc., είναι μια high – throughput για τη μηχανική στοχευμένων μεταλλάξεων στο γένωμα του ποντικού. Η βασική στρατηγική και μέθοδος, όπως και αρκετά παραδείγματα, έχουν δημοσιευτεί σε υψηλού κύρους περιοδικά. Κατά την περίοδο της δημοσίευσης που περιέγραφε το Velocigene, είχαν δημιουργηθεί 200 knock-out σειρές και από τότε άλλες 500 περίπου έχουν προστεθεί και είναι σε διάφορα στάδια ανάπτυξης. Επιπρόσθετα στην παραγωγή κανονικών knock-out αλληλίων, η τεχνολογία Velocigene έχει χρησιμοποιηθεί για να δημιουργηθούν διαγονιδιακά (transgenics), ανταλλαγές αλληλουχιών ποντικού με ανθρώπινες της τάξης των Mbp (π.χ. στην «ανθρωποποίηση» του Ig τύπου) και εξαρτώμενα (conditional) αλληλία. Ακόμα, έχει το εκτεταμένο τεχνολογικό portfolio στην ανάπτυξη ιδιόκτητων σειρών ES κυττάρων που προέρχονται από διαφορετικά γένη ποντικών, οι οποίες σειρές έχει δειχθεί ότι μπορούν να στοχευθούν και να υφίστανται germ line transmission σε υψηλό ρυθμό και τελικά να αναπτυχθεί μια μέθοδος για τη δημιουργία όλων των ποντικών που προέρχονται από ES κύτταρα, μειώνοντας έτσι τον χρόνο που απαιτείται για να δημιουργηθούν πειραματικοί λόχοι ποντικών. Μαζί με την εφεύρεση και τον σχεδιασμό νέων κασετών τροποποίησης για να υποστηρίξουμε όλες αυτές τις στρατηγικές, έχουμε δημιουργήσει ένα state of the art τεχνολογικό portfolio για το σχεδιασμό μεταλλάξεων στο γένωμα των θηλαστικών. Η δουλειά μας έχει γίνει αποδεκτή και αναγνωρισμένη σε συμπόσια και σε συνέδρια σε διεθνές επίπεδο και έχει οδηγήσει τόσο σε εμπορικές όσο και σε ακαδημαϊκές συνεργασίες, όπως το πρόσφατα βραβευμένο Gates Foundation grant που παρέλαβε το Πανεπιστήμιο του Yale (“A Mouse Model to Evaluate Live-Attenuated Vaccine Candidates”. Lead Investigator: Richard A. Flavell, Yale University and Howard Hughes Medical Institute, U.S.) που σε συνεργασία με τη Regeneron Pharmaceuticals θα αξιοποιήσει την τεχνολογία Velocigene προς την κατεύθυνση της δημιουργίας ποντικών με ανθρωποποιημένα συστατικά του ανοσολογικού συστήματος.

3.2. Μέθοδος COIN (*Conditional by Inversion*).

Η ιστοειδική απαλοιφή γονιδίων ή τα ελεγχόμενα διαγονιδιακά αλλήλια τροποποιούνται όταν τα αντίστοιχα μη-ρυθμιζόμενα προϊόντα ή τα μη-ρυθμιζόμενα διαγονιδιακά αλλήλια παρουσιάζουν αναπτυξιακούς ή πολύπλοκους φαινότυπους, οι οποίοι διακινδυνεύουν τον πειραματισμό στον ενήλικο οργανισμό με ιστοειδικό τρόπο. Παρόλο που υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για την τροποποίηση ελεγχόμενων αλληλίων στο γονιδίωμα του επίμυος, αυτή που χρησιμοποιείται ευρέως χρησιμοποιεί το σύστημα Cre/ lox. Στην περίπτωση των αλληλίων για ιστοειδική απαλοιφή, τμήμα ή και ολόκληρο το γονίδιο – στόχος έχει εκατέρωθεν θέσεις loxP σε σύνθεση άμεσης επανάληψης. Με έκθεση στην ρεκομπινάση Cre, η αλληλουχία ανάμεσα στις θέσεις loxP απαλείφεται, δημιουργώντας ένα ελλειμματικό αλλήλιο. Αφού η έκφραση της ρεκομπινάσης Cre μπορεί να ελεγχθεί τόσο χρονικά όσο και χωρικά, ένα μόνο ελεγχόμενο αλλήλιο μπορεί να αναλυθεί με μεγάλη ειδικότητα σε πολλούς διαφορετικούς ιστούς και μάλιστα με χρονικό έλεγχο, αναπαράγοντας μέχρι την κατάλληλη «Cre deleter» σειρά. Η διαθεσιμότητα μεγάλου φάσματος τέτοιων σειρών, στις οποίες παρατηρείται απαλοιφή μέσω της Cre, που έχουν χαρακτηριστεί σχετικά καλά, καθιστά αυτού του τύπου τη στρατηγική ιδιαίτερα πολύπλευρη και εν μέρει συμβάλλει στη διαδεδομένη χρήση του. Η ελεγχόμενη διαγένεση που μεσολαβείται από την Cre/ lox βασίζεται στην παρουσία μιας «floxed STOP κασέτας» τοποθετημένης ανάμεσα στον υποκινητή και το γονίδιο του ενδιαφέροντός μας (διαγονίδιο). Πριν την απαλοιφή της floxed STOP κασέτας το διαγονίδιο δεν μεταγράφεται. Με έναν παρόμοιο τρόπο με αυτόν που περιγράφηκε για τα floxed ελεγχόμενα ελλειμματικά διαγονίδια, η floxed STOP κασέτα μπορεί να αφαιρεθεί με αναπαραγωγή με τη Cre deleter σειρά. Σε αυτό το σύστημα, η χωρο-χρονική ειδικότητα μπορεί να επιτευχθεί με πολλούς τρόπους.

Παρόλο που η τεχνολογία για την τροποποίηση των floxed ελεγχόμενων αλληλίων είναι καλά καθιερωμένη, υπάρχουν ακόμα αρκετά μειονεκτήματα σχεδιασμού

(α) Η επιλογή της τοποθέτησης των lox θέσεων μέσα στο γονίδιο – στόχο. Αυτή η διαδικασία μπορεί να κρύβει δυσκολίες και εξαρτάται από τη δομή του γονιδίου – στόχου.

(β) Επιπρόσθετα, παρόλο που η ακριβής τοποθέτηση των lox θέσεων μέσα σε μια άλλη αλληλουχία έχει διευκολυνθεί πάρα πολύ με την τεχνική του ομόλογου βακτηριακού ανασυνδυασμού (bacterial homologous recombination, BHR), η ανάγκη της τοποθέτησης των δύο lox θέσεων σε απομακρυσμένες περιοχές, ώστε να βρίσκονται εκατέρωθεν του γονιδίου που πρέπει να απαλειφεί, καθιστά απαραίτητη την διεξαγωγή δύο BHR συμβάντων.

(γ) Η απόσταση μεταξύ των lox θέσεων. Έχει αναφερθεί ότι όσο μεγαλύτερη είναι η απόσταση, τόσο μικρότερη είναι η συχνότητα του ανασυνδυασμού.

(δ) Η απουσία ενός γονιδίου μάρτυρα για εύκολη απεικόνιση της απαλοιφής του γονιδίου και σήμανση των κυττάρων στα οποία η απαλοιφή της floxed κασέτας έχει λάβει χώρα.

(ε) Η απώλεια της lox θέσης μακριά από την κασέτα επιλογής φαρμάκου κατά τη στόχευση, λόγω ανασυνδυασμού με ομόλογες αλληλουχίες μέσα στην floxed περιοχή. Αυτό είναι ένα πολύ συχνό πρόβλημα, αλλά δεν αναφέρεται στη βιβλιογραφία. Ακόμα, όσο μεγαλύτερη είναι η περιοχή που πρέπει να γίνει floxed, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα να προκύψει αυτό το πρόβλημα.

Για να διατηρηθούν τα πλεονεκτήματα του Cre/ lox συστήματος στην τροποποίηση των ελεγχόμενων αλληλίων και ταυτόχρονα να λυθούν τα παραπάνω προβλήματα, εκμεταλλευτήκαμε την πολύπλευρη φύση που προσδίδει η τεχνολογία BHR και Velocigene και σχεδιάσαμε μια καινούρια μέθοδο για την τροποποίηση των ελεγχόμενων αλληλίων που ορίζονται ως COIN (Conditional Inversion). Η COIN μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα ενός στοιχείου 'λήξης της μεταγραφής' που αποτελείται από μία 3' περιοχή ματίσματος και μια αλληλουχία πολυαδενυλίωσης. Αυτές οι δύο αλληλουχίες δρουν μαζί για να λήξουν τη μεταγραφή και ως αποτέλεσμα να καταργήσουν την ενσωμάτωση της αλληλουχίας παρακάτω από τη θέση ένθεσης του στοιχείου.

Έτσι, όταν αυτό το SA-polyA στοιχείο εντεθεί σε μια μεταγραφική μονάδα, θα εμποδίσει τη μεταγραφή της γονιδιακής αλληλουχίας που βρίσκεται παρακάτω από τη θέση ένθεσης και ως αποτέλεσμα θα δημιουργηθεί ένα ελλειμματικό υβριδικό μήνυμα που αποτελείται από την τροποποιημένη προς τα άνω αλληλουχία του γονιδίου ματισμένη μέσα στο εντεθειμένο στοιχείο. Η χρησιμότητα αυτής της προσέγγισης μπορεί να ενισχυθεί με το να συμπεριλάβουμε μια αλληλουχία μάρτυρα,

όπως αυτήν που κωδικοποιεί τη β-γαλακτοσιδάση (συχνά αναφερόμενη και ως LacZ) ή οποιαδήποτε κατάλληλη φθορίζουσα πρωτεΐνη όπως η ευρέως χρησιμοποιούμενη eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein). Ενσωματώνοντας έναν μάρτυρα μεταξύ της 3' θέσης ματίσματος και της αλληλουχίας του σήματος πολυαδενυλίωσης, γονίδια που τροποποιούνται με αυτό το στοιχείο (SA-marker-polyA) σημαίνονται και οι περιοχές έκφρασης απεικονίζονται με ευκολία. Αφού η αλληλουχία του μάρτυρα ενσωματώθηκε σε ένα υπαρκτό, αλλά διερρηγμένο τώρα πια ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), η αλληλουχία του μάρτυρα είναι σχεδιασμένη με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να είναι στο ίδιο πλαίσιο με το προς τα άνω τμήμα του διερρηγμένου ORF. Μεγάλο μέρος του συστήματος είναι πολύ παρόμοιο με την παγίδευση γονιδίων και βασίζεται στις ίδιες αρχές όπως και η παγίδευση γονιδίων, εν τούτοις με μερικές σημαντικές διαφορές που σημειώνονται παρακάτω.

Αφού το στοιχείο **SA-marker-polyA** θα δράσει σαν στοιχείο διακοπής της μεταγραφής μόνο όταν τοποθετηθεί στη sense αλυσίδα του γονιδίου στόχου, είναι λογικό ότι (α) θα ήταν αβλαβές – δηλαδή, δεν θα τροποποιούσε την έκφραση του γονιδίου στόχου – αν τοποθετείτο στην antisense αλυσίδα (υποθέτοντας ότι κανένα ρυθμιστικό στοιχείο δεν υπέστη διάσπαση στο τελικό τροποποιημένο αλλήλιο) και (β) η ικανότητα να δημιουργεί ένα ελλειμματικό αλλήλιο θα μπορούσε να αποκατασταθεί με αναστροφή του στοιχείου στην sense αλυσίδα.

Τέτοια λειτουργική conditionality μεταδόθηκε με την εκατέρωθεν του **SA-marker-polyA** στοιχείου τοποθέτηση των μεταλλαγμένων lox θέσεων lox71 και lox66, σε μία διαμόρφωση ανεστραμμένης εικόνας, για να δημιουργηθεί ένα αναστρέψιμο στοιχείο **[lox66]_SA-marker-polyA_lox71**, αναφερόμενο στο εξής ως COIN στοιχείο – τα άγκιστρα ([...]) δηλώνουν ότι η lox66 θέση είναι σε αντίστροφο συμπληρωματικό προσανατολισμό σε σύγκριση με τη lox71 θέση. Αφού η [lox66] και η lox71 βρίσκονται σε ανεστραμμένο προσανατολισμό μεταξύ τους, η έκθεση στην ρεκομπινάση Cre, η [lox66] θέση ανασυνδυάζεται με τη lox71 θέση έχοντας ως αποτέλεσμα την αναστροφή της ενδιάμεσης αλληλουχίας. Ακόμα, ο ανασυνδυασμός που διαμεσολαβείται από την Cre μεταξύ των [lox66] και lox71 θέσεων καταλήγει σε μια διπλά μεταλλαγμένη lox66/71 θέση και μία [loxP] θέση. Η πρώτη είναι πολύ φτωχό υπόστρωμα για την Cre και παρόλο που η πιθανότητα για περαιτέρω ανασυνδυασμό μεταξύ της lox66/71 και της [loxP] δεν έχει απαλειφτεί τελείως, δεν

έχει παρατηρηθεί ακόμα και σε επίμνες στους οποίους η Cre εκφράζεται παντού καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του ποντικίου.

Ακόμα, για να δημιουργηθεί μια κασέτα τροποποίησης που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την εισαγωγή του COIN στοιχείου σε οποιοδήποτε γονίδιο, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που αποτελούνται από μόνο ένα εξόνιο, όπως στην περίπτωση του Sox2, το COIN στοιχείο τοποθετήθηκε μέσα σε ένα ιντρόνιο. Με αυτόν τον τρόπο το COIN στοιχείο θα μπορούσε να εισαχθεί είτε σε εξόνια είτε σε ιντρόνια, ανάλογα με την ειδική εφαρμογή σχεδιασμού και τις υπάρχουσες επιλογές. Στο τέλος, σχεδιάστηκε μέσα στο ιντρόνιο του COIN μια κασέτα επιλογής αντιβιοτικού/ φαρμάκου διπλού σκοπού, εκατέρωθεν της οποίας υπάρχουν FRT (FRTed), παρέχοντας έτσι μια κασέτα τροποποίησης γενικής χρήσης που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στον σχεδιασμό φορέων παγίδευσης.

Η μέθοδος COIN έχει χρησιμοποιηθεί για να δημιουργήσει ελεγχόμενα αλλήλια για περισσότερα από 15 γονίδια. Από αυτά 2 έχουν μελετηθεί λεπτομερώς, το ROSA26 και το hprt. Έχουμε δείξει ότι:

1. Πριν την αναστροφή του COIN στοιχείου, το COIN αλλήλιο είναι φαινοτυπικά αγρίου τύπου. Στην περίπτωση των ROSA26 COINs, το προφίλ έκφρασης και τα επίπεδα έκφρασης του ROSA26 τόπου παραμένουν, ενώ στην περίπτωση του hprt, τα ES κύτταρα είναι φαινοτυπικά αγρίου τύπου, αφού πεθαίνουν με την παρουσία της 6-θειογοθανίνης (6-TG).
2. Μετά την αναστροφή του COIN στοιχείου, το ανεστραμμένο COIN αλλήλιο είναι φαινοτυπικά ελλειμματικό. Στην περίπτωση του ROSA26, η έκφραση του ενός γονιδίου μάρτυρα (dsRED2) αντικαθίσταται πλήρως από την έκφραση ενός άλλου, του eGFP. Στην περίπτωση του hprt, τα ES κύτταρα που φέρουν το ανεστραμμένο αλλήλιο είναι φαινοτυπικά hprt-null αφού επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται ακόμα και παρουσία 6-TG.
3. Στον hprt γενετικό τόπο, προσεκτική παρατήρηση των επιπέδων του hprt μηνύματος αποκάλυψε ότι η παρουσία της κασέτας επιλογής αντιβιοτικού (στο COIN αλλήλιο, πριν την αναστροφή) έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων του μηνύματος. Παρόλ' αυτά, τα επίπεδα αποκαθίστανται σε αυτά

του αγρίου τύπου μετά την αφαίρεση της FRTed κασέτας επιλογής φαρμάκου με τη βοήθεια της ρεκομπινάσης FRT.

4. Στον *hprt* γενετικό τόπο, μετά την αναστροφή κανένα *hprt* μήνυμα δεν μπορεί να ανιχνευθεί τόσο από ανάλυση Northern όσο και από ποσοτική PCR (qPCR). Ακόμα, πριν την αναστροφή δεν μπορούσε να ανιχνευθεί έκφραση της eGFP, ενώ μετά την αναστροφή το *hprt* μήνυμα αντικαθίσταται από αυτό της eGFP. Και στα δύο μηνύματα, το τμήμα του μηνύματος που βρίσκεται προς τα άνω του COIN στοιχείου ενσωματώνεται όπως αναμένεται.

Έτσι, πληρώντας όλα τα κριτήρια (φαινοτυπικά, επίπεδα μηνύματος και προφίλ έκφρασης) τα COIN αλληλία έχουν βρεθεί να είναι πραγματικά ελεγχόμενα αλληλία πριν την αναστροφή του COIN στοιχείου και να συμπεριφέρονται ως ελλειμματικά αλληλία μετά την αναστροφή.

Ακόμα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα COIN αλληλία διαφέρουν από την τεχνολογία παγίδευσης γονιδίων (συμπεριλαμβανομένων των 'εξαρτημένων' παγίδων γονιδίων) σε πολλά σημαντικά σημεία:

- Τα COIN αλληλία είναι στοχευμένα αλληλία, σχεδιασμένα σκόπιμα να δημιουργούν ένα πραγματικό ελλειμματικό αλληλίο μετά την αναστροφή της COIN κασέτας.
- Τα COIN αλληλία δεν είναι υπομορφικά, ενώ πολλές παγίδες γονιδίων είναι.
- Δημιουργούνται μέσω της στόχευσης, οπότε δεν είναι υπόλογα στους περιορισμούς της τεχνολογίας της παγίδευσης γονιδίων – λαμβάνουμε ως αρχή ότι οποιοδήποτε γονίδιο μπορεί να τροποποιηθεί άσχετα από τη μεταγραφική του δραστηριότητα ή τη θέση του στο γονιδίωμα.
- Επειδή είναι αγρίου τύπου πριν την αναστροφή, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να δημιουργήσουν εξαρτημένα αλληλία ακόμα και σε γονίδια που έχουν την τάση να παράγουν φαινοτύπους απλο-ανεπάρκειας στα ES κύτταρα.

Έτσι, φαίνεται ότι τα COINs παρέχουν όντως μια βελτιωμένη μέθοδο για τη δημιουργία εξαρτημένων αλληλίων.

3.3. *Flp/ FRT* σύστημα

Άλλο ένα μέλος της οικογένειας των ιντεγκρασών, η Flp, χρησιμοποιείται για την ιστοειδική ή κυτταροειδική έκφραση διαφόρων διαγονιδίων. Η Flp ρεκομπινάση αναγνωρίζει και κόβει στις λεγόμενες περιοχές FRT (34 bp) με αποτέλεσμα να μπορεί να γίνει ανασυνδυασμός του DNA εκατέρωθεν του οποίου βρίσκονται οι FRT θέσεις. Η αγρίου τύπου Flp έχει περιορισμένη ενζυμική δραστικότητα στους 37°C, με αποτέλεσμα τον μη ανασυνδυασμό ή τον μωσαϊκό ανασυνδυασμό στα ποντίκια, γεγονός που οδήγησε στη δημιουργία του θερμοευαίσθητου ομολόγου F_{lpe}.

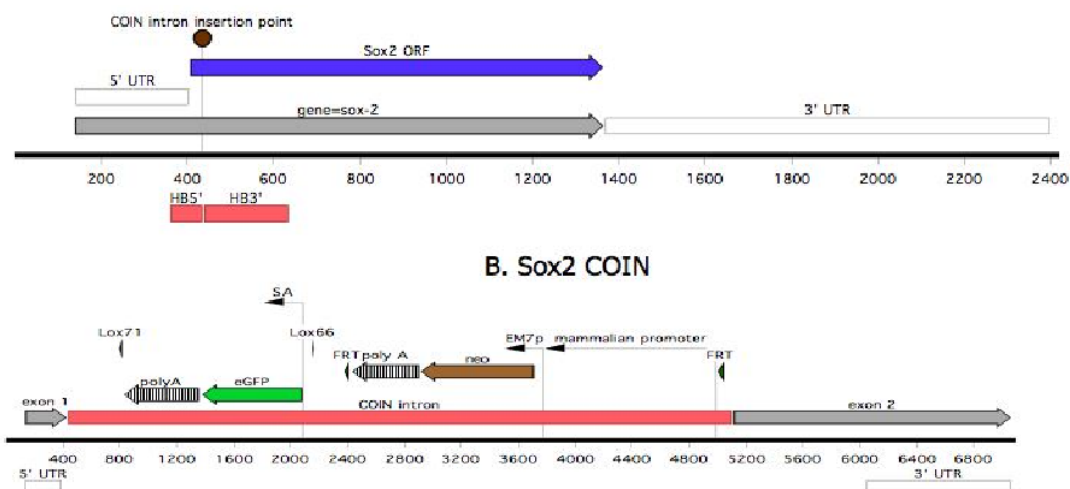
Αν και το συγκεκριμένο σύστημα δεν χρησιμοποιείται τόσο ευρέως όσο το Cre, ωστόσο αποτελεί γενετικό εργαλείο, κυρίως σε μελέτες ιστοειδικής απενεργοποίησης διαγονιδίων. Αξίζει να αναφέρουμε ότι έχει δημιουργηθεί και σειρά ποντικών που εκφράζει το ανασυνδυαστικό ένζυμο Flp κάτω από τον υποκινητή Rosa26.

Πολλά από τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω για το Cre/LoxP σύστημα, ισχύουν και για το παρόν σύστημα. Με την βοήθεια του Flp ανασυνδυαστικού ενζύμου επιτυγχάνουμε ειδική στον τόπο και στον χρόνο έκφραση των διαγονιδίων που μας ενδιαφέρουν δεδομένου ότι εκφράζουμε την ρεκομπινάση μας κάτω από έναν χρονο-ειδικό υποκινητή όπως εκείνος της Hsp. Το συγκεκριμένο σύστημα έχει χρησιμοποιηθεί για την επαγόμενη έκφραση κυτταροτοξικών πρωτεϊνών, όπως και για ιστο-ειδική απενεργοποίηση γονιδίων και μελέτες κυτταρικής γενεαλογίας την διάρκεια της εμβρυογένεσης και στον ενήλικο οργανισμό. Τέλος, καθώς η αποτελεσματικότητα ανασυνδυασμού του συγκεκριμένου συστήματος είναι <100%, συνήθως επιτυγχάνεται μωσαϊκή έκφραση του διαγονιδίου από ζώο σε ζώο. Επομένως, το σύστημα αυτό είναι πολύ χρήσιμο για την χαρτογράφηση μωσαϊκισμών. Συνολικά, τα δύο παραπάνω συστήματα χρησιμοποιούνται επί το πλείστον για ιστο-ειδική αποσιώπηση διαγονιδίων και κυτταροειδικές μελέτες κατά την διάρκεια της ανάπτυξης αλλά και στην ενήλικο ζωή.

Αρχικά, το συγκεκριμένο σύστημα είναι λιγότερο αποτελεσματικό σε σχέση με το Cre/loxP. Επίσης, τα αποτελέσματα του ανασυνδυασμού από το συγκεκριμένο σύστημα είναι μη αναστρέψιμα, όπως αναφέραμε παραπάνω και για το Cre/LoxP. Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις μη ειδικής έκφρασης της επαγόμενης πρωτεΐνης με το συγκεκριμένο σύστημα. και έχουν αναφερθεί κάποιες χρωμοσωμικές διαταραχές, λόγω υψηλής δραστηριότητας του ενζύμου. Η αποτελεσματικότητα του συστήματος εξαρτάται από την επιλογή ενός ισχυρού υποκινητή/ενισχυτή, για παράδειγμα του CMV, κάτι το οποίο βέβαια δρα περιοριστικά στην δυνατότητά μας να έχουμε ιστοειδική έκφραση του διαγονιδίου που μας ενδιαφέρει. Τέλος, έχει παρατηρηθεί τελευταία η δραστηριότητα του ανασυνδυαστικού ενζύμου να εξαρτάται από την περιοχή που εντοπίζεται το διαγονίδιο. Και σε αυτή την περίπτωση έχουμε το πρόβλημα της ανάγκης ύπαρξης δυο διαφορετικών διαγονιδιακών σειρών του οργανισμού που μελετούμε για την ορθή λειτουργία του συστήματος.

3.4. Δημιουργία ενός επαγόμενου Sox2^{COIN} αλληλομόρφου

Η πλασμιδιακή κατασκευή του Sox2^{COIN} παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, γιατί το γονίδιο Sox2 αποτελείται από μόνο ένα εξόνιο και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να δημιουργηθεί ένα τεχνητό ιντρόνιο, το οποίο περιλαμβάνει την κασέτα του COIN. Έτσι τελικά, δημιουργήσαμε το COIN αλληλίο του Sox2 ανακατασκευάζοντας το Sox2 ως ένα γονίδιο που αποτελείται από δύο εξόνια. Η κασέτα περιλαμβάνει την κασέτα επιλογής αντιβιοτικού νεομυκίνης ανάμεσα σε δύο FRT περιοχές και την κασέτα eGFP ανάμεσα σε δύο LoxP περιοχές. Η κασέτα αυτή τοποθετήθηκε μέσα στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του Sox2 ανάμεσα σε μία τεχνητή θέση δότη και δέκτη ματίσματος, ώστε μετά το μάτισμα η πρωτεΐνη Sox2 να εκφράζεται κανονικά. Τα Sox2^{COIN} ES κύτταρα επιλέχθηκαν με τη μέθοδο Velocigene, που αναπτύχθηκε στη Regeneron Pharmaceuticals, έτσι ώστε να αποτελούνται από ένα μοναδικό στοχευμένο αλληλίο.

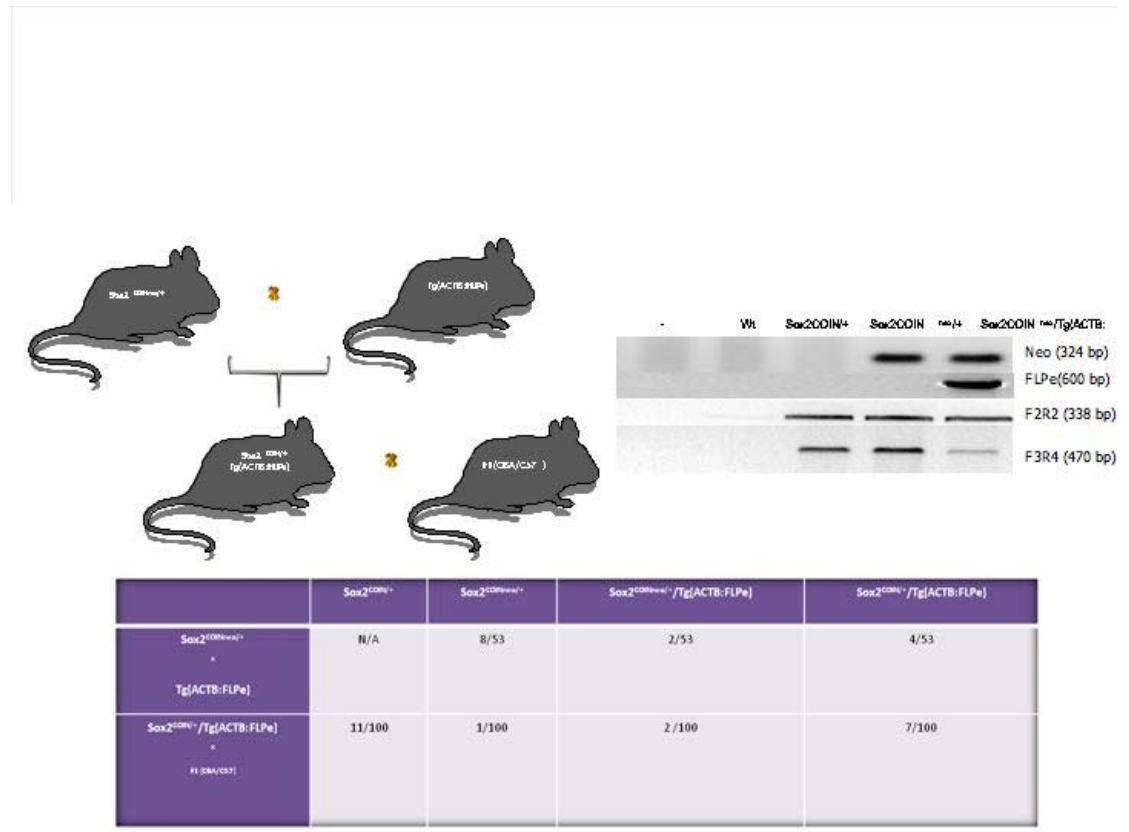


Εικόνα 5. Γραφική αναπαράσταση του γονιδίου Sox2 πριν και μετά την ένθεση της κασέτας COIN.

(Α) Γραφική αναπαράσταση του γονιδίου Sox2, αποτελείται από ένα μοναδικό εξόνιο και απεικονίζονται το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, οι αμετάφραστες περιοχές καθώς και το σημείο ένθεσης της κασέτας COIN.

(Β) Γραφική αναπαράσταση της κασέτας COIN μετά την ένθεση. Απεικονίζονται τα δύο πλέον τεχνητά εξόνια, οι περιοχές loxP που θα αναγνωριστούν από την ρεκομπινάση Cre, οι περιοχές FRT εκατέρωθεν της κασέτας της αντίστασης στη νεομυκίνη, που θα αναγνωριστούν από τη ρεκομπινάση Flp, το γονίδιο-μάρτυρας eGFP και το σήμα πολυαδενυλίωσης για λήξη της μεταγραφής.

Τα ετεροζυγωτά ποντίκια χρησιμοποιήθηκαν για διασταυρώσεις με διαγονιδιακά Tg(ACTB-Flp) ποντίκια για την απαλοιφή της κασέτας του neo. Οι απόγονοι εκφράζουν σε όλα τα κύτταρά τους τη φλιπάση, ένζυμο ανασυνδυασμού που αναγνωρίζει και ανασυνδυάζει τις περιοχές FLP, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα την αφαίρεση του neo. Προβλήματα αναπαραγωγής για την απομάκρυνση της φλιπάσης, που είναι συνηθισμένα σε αυτό το στάδιο, ξεπεράστηκαν μετά από πέντε περίπου σειρές διασταυρώσεων.

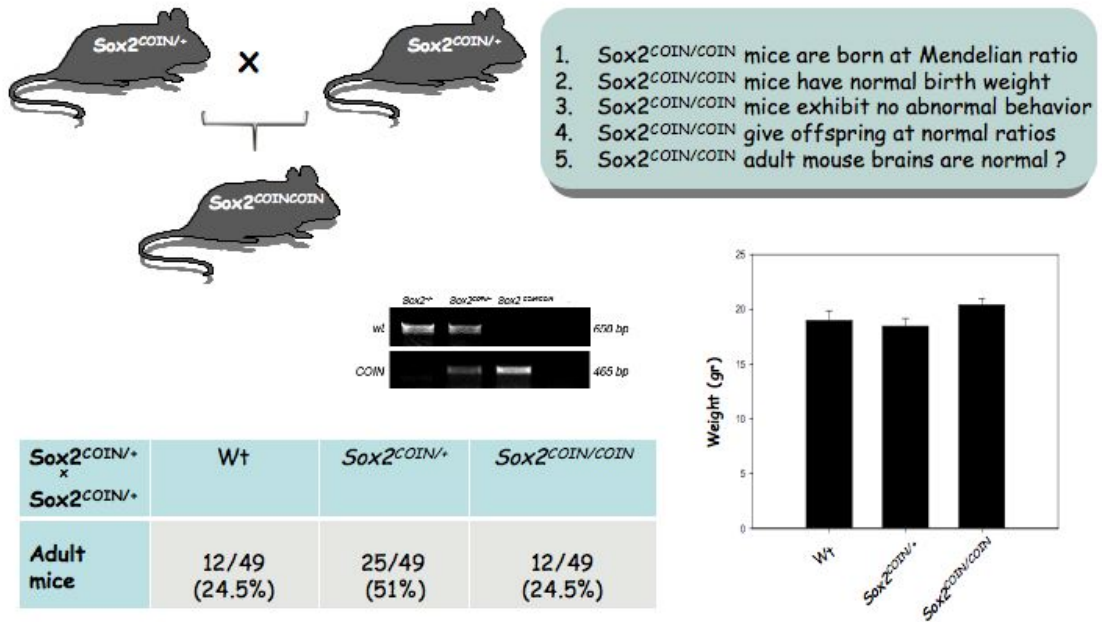


Εικόνα 6. Αφαίρεση της κασέτας neo με διασταύρωση ποντικών Sox2^{neo/+} με ποντίκια που φέρουν τη ρεκομπινάση Flp.

3.5. Δημιουργία Sox2^{COIN/COIN} ποντικών

Πολύ σημαντικό βήμα επίσης για την μελέτη της ιστοειδικής μετάλλαξης του Sox2 είναι η δυνατότητα της δημιουργίας Sox2^{COIN/COIN} ποντικών που μπορούν να διασταυρωθούν με Sox2^{eGFP/+} : Tg (tissue-specific CRE). Με διασταυρώσεις μεταξύ ποντικών Sox2^{COIN/+} γεννιούνται ποντίκια Sox2^{COIN/COIN}, τα οποία γεννιούνται με μεντελική αναλογία και είναι απολύτως φυσιολογικά, γεγονός που μας δίνει ένα εξαιρετικό πλεονέκτημα.

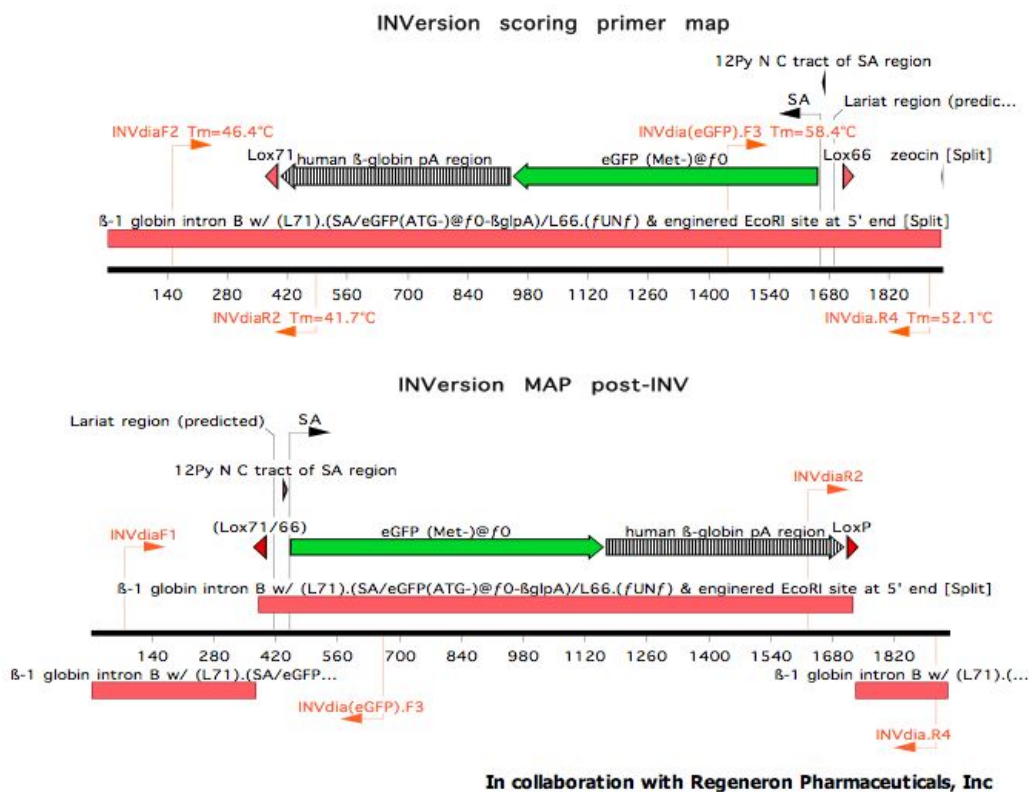
Για να μπορέσουμε να ξεχωρίσουμε τα ετεροζυγωτά ως προς το COIN ποντίκια από τα ομοζυγωτά, σχεδιάσαμε τρεις καινούριους primers, ο ένας εκ των οποίων αναγνωρίζει την αρχή του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου Sox2 (Sox2401F), ο δεύτερος αναγνωρίζει περιοχή μέσα στην COIN κασέτα (R2*R) και ο τρίτος αναγνωρίζει περιοχή του γονιδίου Sox2 που έπεται της κασέτας (Sox21050R). Χρησιμοποιώντας τους primers αυτούς ανά ζεύγη, μπορούμε να ξεχωρίσουμε τα Sox2^{COIN/+} ποντίκια από τα Sox2^{COIN/COIN} και φυσικά από τα αγρίου τύπου ποντίκια. Το ζεύγος Sox2401F, Sox21050R παράγει φράγμα που αντιστοιχεί στο αγρίου τύπου αλληλίο του γονιδίου Sox2, ενώ το ζεύγος Sox2401F, R2*R παράγει φράγμα που αντιστοιχεί στην κασέτα του COIN. Ως αποτέλεσμα, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της PCR, DNA από ποντίκια αγρίου τύπου θα παράγει φράγμα μόνο με το πρώτο ζεύγος primers, από ετεροζυγωτά ποντίκια θα παραχθούν φράγματα και με τα δύο ζεύγη primers, ενώ από ποντίκια ομοζυγωτά θα παραχθεί φράγμα μόνο με το δεύτερο ζεύγος.



Εικόνα 7. Τα ομοζυγωτά $Sox2^{COIN/COIN}$ ποντίκια φαίνονται φυσιολογικά.

3.6. Δημιουργία Sox2^{INV/+} αλληλομόρφου (Sox2^{eGFP/+})

Μετά από αυτό ξεκινήσαμε την παραγωγή του αλληλίου Sox2^{INV/+} δηλαδή σε ανεστραμμένη (inverted) μορφή, που θα εκφράζει την eGFP κάτω από τον έλεγχο των ρυθμιστικών περιοχών του γονιδίου Sox2. Αυτό το επιτύχαμε με διασταυρώσεις ποντικών Sox2^{COIN/COIN} με ποντίκια που εκφράζουν το ανασυνδυαστικό ένζυμο Cre υπό τον έλεγχο γονιδίων που εκφράζονται χωροχρονικά στις περιοχές του εμβρύου και ενηλίκου ποντικού που μας ενδιαφέρει να απαλείψουμε την λειτουργία του γονιδίου Sox2.



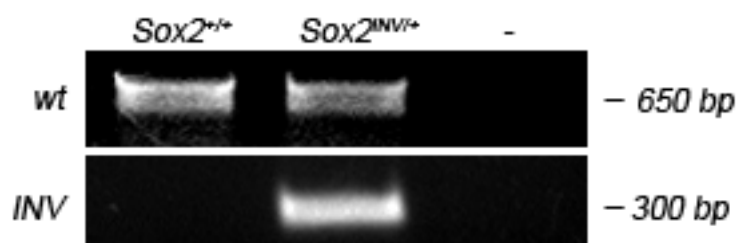
Εικόνα 8. Γραφική αναπαράσταση της κασέτας COIN πριν και μετά την αναστροφή.

(A) η κασέτα COIN πριν την αναστροφή από την ρεκομπινάση Cre. Απεικονίζεται το γονίδιο-μάρτυρας eGFP, το σήμα πολυαδενυλίωσης καθώς και η κατεύθυνση της μεταγραφής του γονιδίου, κατά την οποία δεν μεταγράφεται το γονίδιο-μάρτυρας.

(B) Η κασέτα COIN μετά την αναστροφή από την ρεκομπινάση Cre. Το γονίδιο της eGFP πλέον εκφράζεται και το σήμα της πολυαδενυλίωσης έχει ως αποτέλεσμα τη λήξη της μεταγραφής πρώιμα, πριν τη μεταγραφή του γονιδίου του Sox2.

Με διασταυρώσεις μεταξύ ποντικών $Sox2^{COIN/+}$ και διαγονιδιακών ποντικών που εκφράζουν το ανασυνδυαστικό ένζυμο Cre κάτω από τον έλεγχο του γονιδίου hGFAP, πετυχαίνουμε αναστροφή της κασέτας COIN, την έκφραση της πρωτεΐνης eGFP και τη μείωση της έκφρασης του Sox2 στα κύτταρα ακτινωτής γλοίας. Τα ποντίκια $Sox2^{INV/+}$ γεννιούνται κανονικά σύμφωνα με τη μενδελιανή αναλογία, δεν έχει παρατηρηθεί θνησιμότητα, ούτε κάποιος εμφανής φαινότυπος που να αφορά στη μορφολογία ή τη συμπεριφορά τους.

Για την επιβεβαίωση του γονοτύπου των εκάστοτε ποντικών, χρησιμοποιούμε τη μέθοδο της PCR με primers ειδικούς για τις περιοχές που θέλουμε να ταυτοποιήσουμε. Για να ξεχωρίσουμε τα ποντίκια που φέρουν την ανεστραμμένη μορφή της κασέτας COIN από ποντίκια με τους λοιπούς γονοτύπους, σχεδιάσαμε ένα ζεύγος primers το οποίο αναγνωρίζει περιοχή του γονιδίου της eGFP, παράγοντας έτσι φράγμα που αντιστοιχεί στην ανεστραμμένη μορφή της κασέτας COIN. Επειδή η αναστροφή της κασέτας COIN είναι ιστο-ειδική, η επιβεβαίωση της αναστροφής επιτυγχάνεται με απομόνωση DNA από τον ιστό στον οποίο έχει γίνει αναστροφή της κασέτας COIN. Οι υπόλοιποι ιστοί του εν λόγω ποντικού παρουσιάζουν τη μη-ανεστραμμένη μορφή της κασέτας.

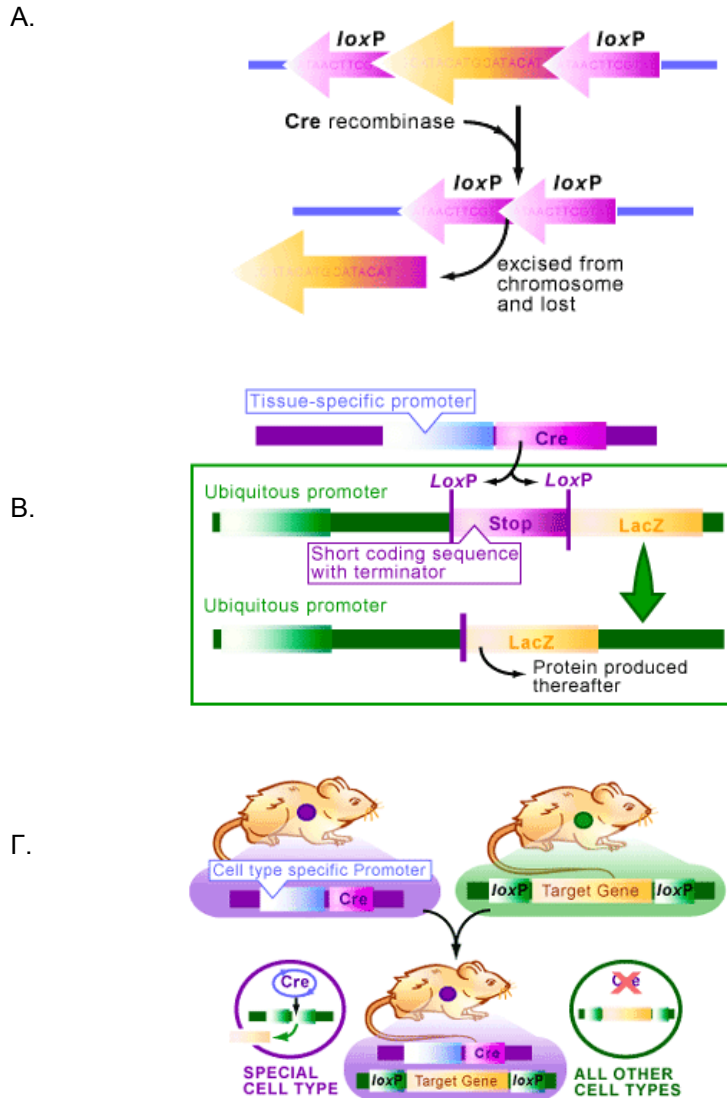


Εικόνα 9. Γονοτύπηση $Sox2^{+/+}$, $Sox2^{INV/+}$ και $Sox2^{INV/INV}$ ποντικών.

3.6.1. Χωρο-ειδικός ανασυνδυασμός του DNA

Το σύστημα Cre/ LoxP βασίζει τη λειτουργία του στη μοριακή δράση του ενζύμου Cre του βακτηριοφάγου P1. Το ένζυμο αυτό έχει την ικανότητα να αφαιρεί από το γονιδίωμα οποιαδήποτε τμήματα περιέχονται μεταξύ δύο ειδικών παλίνδρομων αλληλουχιών τις οποίες αναγνωρίζει και ονομάζονται σημεία loxP. Κάθε loxP αποτελείται από δύο παλίνδρομες αλληλουχίες 13 bp που διαχωρίζονται από μια αλληλουχία 8 bp.

Η εφαρμογή του συστήματος αυτού στην επιλεκτική γονιδιακή τροποποίηση στο ποντίκι προαπαιτεί τη δημιουργία δύο σειρών ποντικών: μιας σειράς η οποία φέρει δύο loxP σε προκαθορισμένες θέσεις ενός γονιδίου, και μιας δεύτερης, η οποία εκφράζει την Cre σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους ή αναπτυξιακά στάδια. Μετά τη διασταύρωση των δύο αυτών ποντικών, το τροποποιημένο τμήμα DNA που φέρει εκατέρωθεν του τις loxP θέσεις, περιορίζεται στους κυτταρικούς τύπους ή αναπτυξιακά στάδια σύμφωνα με την ειδικότητα της έκφρασης της Cre.



Εικόνα 10. Αρχές λειτουργίας Cre/loxP συστήματος για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης.

A. Τρόπος δράσης του Cre ανασυνδυαστικού ενζύμου

B. Ρύθμιση της πρωτεϊνικής έκφρασης με το Cre/loxP σύστημα. Σε ιστούς ή κύτταρα που εκφράζεται το Cre ανασυνδυαστικό ένζυμο, το stop κωδικόνιο απομακρύνεται επιτρέποντας την έκφραση του CDNA που μας ενδιαφέρει, στην συγκεκριμένη περίπτωση του LacZ.

Γ. Διαγονιδιακά ποντίκια με το σύστημα Cre/loxP. Ποντίκια που εκφράζουν το Cre ανασυνδυαστικό ένζυμο διασταυρώνονται με ποντίκια που φέρουν το γονίδιο στόχο να περικλυεται από δυο LoxP περιοχές. Τα διπλά διαγονιδιακά ποντίκια εφ' όσον το Cre εκφράζεται ιστοειδικά δεν θα εκφράζουν το γονίδιο στόχο.

Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα του συγκεκριμένου συστήματος είναι ότι χρησιμοποιείται με αποτελεσματικότητα για την έκφραση κυτταροτοξικών και κυρίαρχων αρνητικών πρωτεϊνών. Είναι λειτουργικό σχεδόν σε όλους του τύπους κυττάρων, ακόμη και στα νευρικά κύτταρα. Οι Malatesta et al. κατάφεραν να σημάνουν νευρικά κύτταρα στον εγκέφαλο και να τα διαφοροποιήσουν χωρίς να υπάρχει οποιαδήποτε επίδραση στα γειτονικά γλοιοκύτταρα. Επίσης, ο ανασυνδυασμός με βάση το Cre/ loxP σύστημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να αναπαραστήσει συγκεκριμένες χρωμοσωμικές αλλαγές μεγάλων τμημάτων DNA και συνεπώς να εγκαθιδρύσει 'χρωμοσωμικά' μοντέλα ασθενειών, όπως το σύνδρομο Down ή η διαταραχή Charcot-Marie-tooth I. Κατασκευάζοντας ποντίκια με συγκεκριμένες περιοχές απλοειδίας από ανασυνδυασμό με το Cre ανασυνδυαστικό ένζυμο, μπορούμε να τα χρησιμοποιήσουμε για γενετικά screening. Επιπλέον, το συγκεκριμένο σύστημα έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμο για τη στόχευση μεγάλων γονιδίων όπως η APP (amyloid precursor protein) που καλύπτουν πάνω από 200 kb.

Η αποδοτικότητα του ανασυνδυασμού που επάγεται από την Cre σπάνια φτάνει το 100%, εξαιτίας της μωσαϊκής έκφρασης της Cre από τα διαγονιδιακά ποντίκια. Συνεπώς, είναι δύσκολο με το συγκεκριμένο σύστημα να μελετηθούν πρωτεΐνες των οποίων η μοριακή δράση στο κύτταρο εξαρτάται από την αλληλεπίδρασή του με γειτονικά κύτταρα. Βέβαια, συγχρόνως αυτό το μειονέκτημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πλεονέκτημα για τη μελέτη ασθενειών που προχωράνε αργά και σταδιακά, καθώς δεν καταφέρνουμε να έχουμε να έχουμε καθολική απενεργοποίηση του γονιδίου και μπορούμε να μελετήσουμε τα αποτελέσματα της ελλιπούς έκφρασης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε βάθος χρόνου. Ένα από τα πιο βασικά μειονεκτήματα του συγκεκριμένου συστήματος είναι και ότι η δράση του δεν μπορεί να αναστραφεί, σε αντίθεση με τα συστήματα που βασίζονται στη μεταγραφική ρύθμιση από κάποιον επαγωγέα. Επιπλέον, επειδή η αλλαγή στο γονιδίωμα είναι παρούσα από την αρχή της εμβρυικής ανάπτυξης, τα μεταλλαγμένα ποντίκια παρουσιάζουν σημαντικά αναπτυξιακά προβλήματα ή ακόμη και εμβρυική θνησιμότητα. Αυτό έχει ως συνέπεια να μην μπορεί να γίνει περαιτέρω ανάλυση των συγκεκριμένων γονιδίων στον ενήλικο οργανισμό. Παράλληλα, έχουν παρατηρηθεί συμβάντα μη ειδικής ενεργοποίησης των γονιδίων που μας ενδιαφέρουν, κυρίως λόγω τυχαίου ανασυνδυασμού. Ένα ακόμη μειονέκτημα είναι ότι το ρυθμιστικό κύκλωμα

και το επαγόμενο γονίδιο περιέχονται σε δύο διαφορετικά και για το λόγο αυτό χρειαζόμαστε και δύο διαφορετικά διαγονιδιακά ποντίκια με διασταύρωση των οποίων προκύπτει το τελικό ποντίκι που μας δίνει την επαγόμενη πρωτεΐνη. Συνεπώς, η παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης είναι περισσότερο χρονοβόρα σε σχέση με άλλα συστήματα που φέρουν τόσο τα ρυθμιστικά στοιχεία όσο και την επαγόμενη πρωτεΐνη σε ένα μόνο διαγονίδιο.

3.6.2. *hGFAP-Cre*

Για την χωρο-ειδική αναστροφή της κασέτας COIN σε κύτταρα ακτινωτής γλοίας χρησιμοποιήσαμε στις διασταυρώσεις διαγονιδιακά ποντίκια *hGFAP-Cre*. Σε αυτά τα ποντίκια η έκφραση του Cre ρεκομπινάσης ξεκινά την εμβρυική ημέρα E13.5 σε κύτταρα ακτινωτής γλοίας στις νωτιαίες και διάμεσες περιοχές του τελεγκεφάλου, ενώ μέχρι τη στιγμή της γέννησης η έκφραση γίνεται σχεδόν ενιαία σε όλο το κεντρικό νευρικό σύστημα, σε όλους δηλαδή τους κυτταρικούς τύπους που προέρχονται από τα κύτταρα ακτινωτής γλοίας. Στους ενήλικους οργανισμούς η έκφραση της *hGFAP-Cre* παρατηρείται κυρίως σε αστροκύτταρα του εγκεφάλου, αλλά και σε στιβάδες που εντοπίζονται κυρίως νευρώνες, όπως τα κοκκιώδη κύτταρα της παρεγκεφαλίδας, ο οσφρητικός λοβός και τα πυραμιδικά κύτταρα του υποκάμπου. Ακόμα, η φαιά ουσία του εγκεφαλικού φλοιού παρουσιάζει εμφανή έκφραση της Cre, όπως και σχεδόν όλα τα NeuN-θετικά κύτταρα στον εγκεφαλικό φλοιό. Έχει παρατηρηθεί επίσης, έκφραση σε μειονότητες κυτταρικών τύπων εκτός του εγκεφάλου, κυρίως στο συκώτι. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρείται έκφραση στα αμύελα κύτταρα Schwann του περιφερειακού νευρικού συστήματος, παρόλο που αυτά τα κύτταρα εκφράζουν GFAP.

3.7. Δημιουργία $Sox2^{INV/INV}$ αλληλομόρφου ($Sox2^{eGFP/eGFP}$)

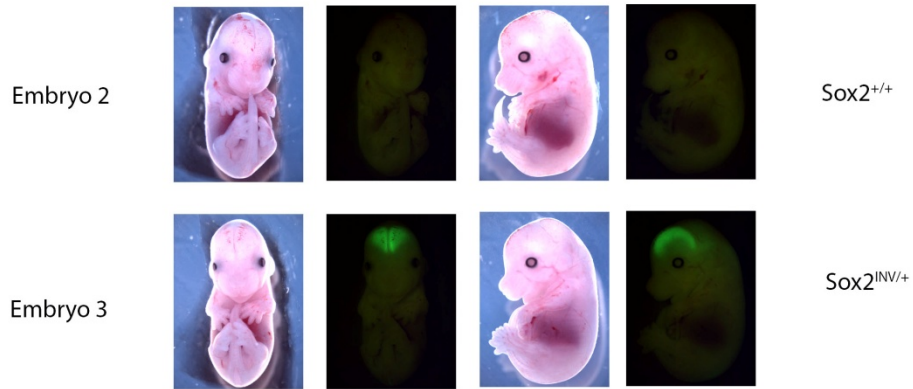
Το επόμενο βήμα ήταν η παραγωγή ποντικών με πλήρη απαλοιφή του γονιδίου $Sox2$ στα κύτταρα ακτινωτής γλοίας. Για αυτόν το σκοπό, αρχικά διασταυρώσαμε ποντίκια $Sox2^{COIN/COIN}$ με ποντίκια $Sox2^{INV/+};hGFAP-Cre$ και αναλύσαμε έμβρυα σε ηλικία E14.5, κατά την οποία έχει ήδη ξεκινήσει η έκφραση του ανασυνδυαστικού ενζύμου Cre. Μέχρι στιγμής έχουμε αναλύσει 18 έμβρυα που προέρχονται από τη συγκεκριμένη διασταύρωση, από τα οποία 6 παρουσιάζουν έκφραση της πρωτεΐνης eGFP στον εγκεφαλικό φλοιό και στην σπονδυλική στήλη.

Τα εν λόγω έμβρυα αφαιρέθηκαν από τη μήτρα την εμβρυική ημέρα E14.5 και φωτογραφήθηκαν με τη βοήθεια στερεοσκοπίου σε φωτεινό πεδίο και κάτω από φθορισμό. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε ο εγκεφαλικός φλοιός, από τον οποίο απομονώσαμε DNA, RNA και πυρηνικές πρωτεΐνες για ανάλυση των εμβρύων με τις μεθόδους της PCR, RT-PCR και Western Blot. Επίσης από τα έμβρυα αφαιρέθηκε τμήμα του συκωτιού ως ιστός ελέγχου για όλες τις προαναφερθείσες διαδικασίες. Με τη μέθοδο της PCR ταυτοποιήσαμε τον γονότυπο του κάθε εμβρύου και με τις μεθόδους της RT-PCR και του Western Blot θα εξακριβώσουμε τις επιπτώσεις της αναστροφής της κασέτας όσον αφορά στη μεταγραφή και μετάφραση του γονιδίου $Sox2$, αντίστοιχα. Αν και ο αριθμός των εμβρύων είναι μικρός, περίπου 25% των εμβρύων που δημιουργούνται από τη διασταύρωση $Sox2^{COIN/COIN}$ με $Sox2^{INV/+};hGFAP-Cre$ είναι $Sox2^{INV/INV}$. Τα επίπεδα έκφρασης του $Sox2$ στα εν λόγω έμβρυα κυμαίνεται από 23% -40%. Αναμένεται να υπολογιστεί το ποσοστό έκφρασης της πρωτεΐνης $Sox2$ με τη μέθοδο Western Blot, καθώς και ο αριθμός των κυττάρων που εκφράζουν $Sox2$ με ανοσοϊστοχημεία σε τομές του φλοιού του εγκεφάλου των εμβρύων. Αναμένουμε να παρουσιαστεί μείωση και των επιπέδων μετάφρασης του εν λόγω γονιδίου στον εγκεφαλικό φλοιό των εμβρύων που παρουσιάζουν αναστροφή της κασέτας (θετικά για eGFP).

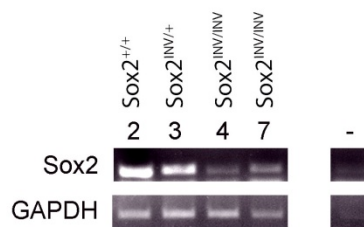
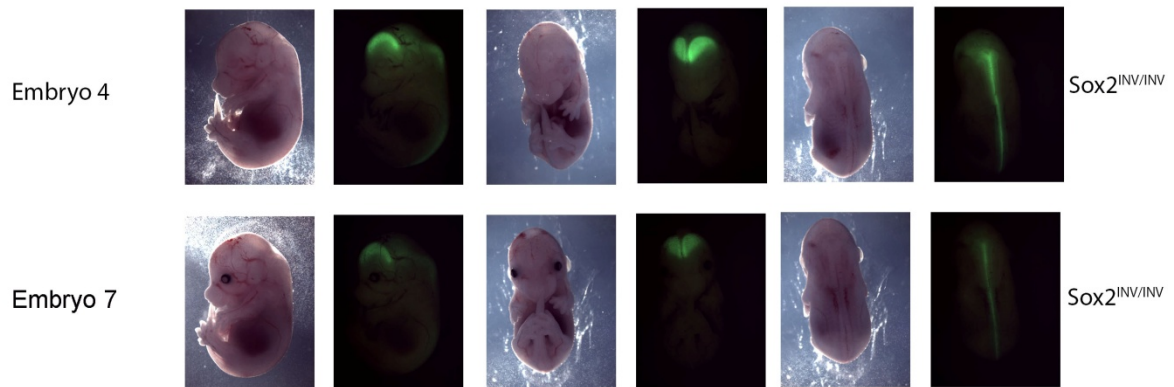
Για τον ίδιο σκοπό, τη δημιουργία εμβρύων με απαλοιφή του γονιδίου $Sox2$ στα κύτταρα ακτινωτής γλοίας, ακολουθήσαμε και έναν εναλλακτικό, πιο άμεσο τρόπο, διασταυρώνοντας $Sox2^{INV/+}; hGFAP-Cre$ ποντίκια μεταξύ τους. Δυστυχώς μέχρι στιγμής δεν έχουμε καταφέρει να δημιουργήσουμε ποντίκια $Sox2^{INV/+}$ που να μη φέρουν την $hGFAP-Cre$. Η συγκεκριμένη διασταύρωση έχει πραγματοποιηθεί

μόνο μία φορά και είναι ακόμα πολύ νωρίς για να βγάλουμε συμπεράσματα. Από τα 9 έμβρυα που ήταν παρόντα, τα τρία παρουσίασαν έκφραση της πρωτεΐνης eGFP, ενώ η αναμενόμενη αναλογία είναι 75%. Τα έμβρυα φωτογραφήθηκαν με τη βοήθεια στερεοσκοπίου σε φωτεινό πεδίο και κάτω από φθορισμό, στη συνέχεια αφαιρέθηκε τμήμα του εγκεφαλικού φλοιού για απομόνωση DNA, RNA και πρωτεϊνών για περαιτέρω ανάλυση. Επίσης, αφαιρέθηκε τμήμα της ουράς ως ιστός ελέγχου. Μέχρι στιγμής δεν έχουμε ταυτοποιήσει Sox2^{INV/INV} έμβρυα από αυτή τη διασταύρωση.

Sox2^{INV/+} : hGFAP-Cre x Sox2^{INV/+} :hGFAP-Cre



Sox2^{COIN/COIN} x Sox2^{INV/+} : hGFAP-Cre



Εικόνα 11. Εικόνες φωτεινού πεδίου και φθορισμού αντιπροσωπευτικών γονοτύπων. Με RT-PCR εμφανίζεται η μείωση των επιπέδων μεταγραφής του γονιδίου Sox2

4. Επίλογος

Τα μέχρι στιγμής αποτελέσματά μας δείχνουν πως το COIN είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για τη μελέτη της δράσης του Sox2 στον εγκέφαλο. Αναμένεται η περαιτέρω ανάλυση των εμβρύων Sox2^{INV/+} και Sox2^{INV/INV} με ανοσοϊστοχημείες και Western Blot για την πλήρη κατανόηση του ρόλου του Sox2 σε κύτταρα ακτινωτής γλοίας στον εγκέφαλο και αργότερα στη σπονδυλική στήλη.

5. Υλικά και μέθοδοι

Απομόνωση DNA από ιστό ουράς ή αυτιού ποντικού: Τα δείγματα τοποθετούνται σε 0.5 ml Lysis Buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.5, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl) με 10 µl Proteinase K και επωάζονται για 12 ώρες στους 55° C. Προστίθεται ίσος όγκος (0,5 ml) διαλύματος φαινόλης: χλωροφορμίου: ισοαμυλικής αιθανόλης (αναλογία 25: 24: 1 αντίστοιχα), τα δείγματα αναδεύονται και φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά, στις 14.000 rpm στους 25° C. Το υπερκείμενο τοποθετείται σε νέο, αποστειρωμένο σωληνάκι erpendorff 1.5 ml, ακολουθεί άλλη μία επεξεργασία με το διάλυμα φαινόλης: χλωροφορμίου: ισοαμυλικής αλκοόλης και μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο (400 µl) τοποθετείται ξανά σε νέο, αποστειρωμένο σωληνάκι. Στα δείγματα προστίθενται 2.5 όγκοι καθαρής αιθανόλης (1 ml) και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 15 λεπτά, στις 14.000 rpm, στους 4° C. Το υπερκείμενο αφαιρείται, προστίθεται 70% καθαρή αιθανόλη, ακολουθεί φυγοκέντρωση για 5 λεπτά, στις 14.000 rpm, στους 4° C. Το υπερκείμενο αφαιρείται, τα δείγματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στεγνώσουν και η πελέτα επαναδιαλύεται σε διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0).

Αντίδραση PCR για έλεγχο γονιδίων: για κάθε αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιούνται 250 ng DNA, primer forward, primer reverse, dNTPs 5 mM, 10x BSA

Αλληλουχίες primers που χρησιμοποιήθηκαν:

- Cre frw: 5' ATTACCGGTCGATGCAACGAGT 3'
Cre rvs: 5' CAGGTATCTCTGACCAGGTCA 3'

Πρόγραμμα PCR: 1^{ος} κύκλος : 94° C για 2 λεπτά

2^{ος} κύκλος (6 επαναλήψεις) : 92° C για 1 λεπτό

57° C για 1 λεπτό

74° C για 1 λεπτό

3^{ος} κύκλος (26 επαναλήψεις) : 92° C για 30 δευτερόλεπτα

55° C για 30 δευτερόλεπτα

74° C για 40 δευτερόλεπτα

4^{ος} κύκλος :

74° C για 10 λεπτά

- Sox2401F: 5' GCGCGCATGTATAACATGATGGAGACGGA 3'
Sox21050R: 5' TAGGTCTGCGAGCTGGTCATGGAGTTGTA 3'
R2*R: 5' TTCCTCCTCTCCTGACTACTCCCAGTCATA 3'
Πρόγραμμα PCR: 1^{ος} κύκλος : 94° C για 2 λεπτά
2^{ος} κύκλος (6 επαναλήψεις) : 92° C για 2 λεπτά
57° C για 2 λεπτά
74° C για 2 λεπτά
3^{ος} κύκλος (26 επαναλήψεις) : 92° C για 1 λεπτό
55° C για 1 λεπτό
74° C για 1,5 λεπτά
4^{ος} κύκλος : 74° C για 10 λεπτά
- F1: 5' GTTTTTCAGGGTGTGTTTGTAG 3'
F3: 5' CTGAAGCACTGCACGCCGTAG 3'
R2: 5' CCTTACATGTTTTACTAG 3'
R4: 5' CTCAGAGTATTTTATCCTCATCTC 3'
Πρόγραμμα PCR: 1^{ος} κύκλος : 94° C για 5 λεπτά
2^{ος} κύκλος (30 επαναλήψεις) : 92° C για 1 λεπτό
50° C για 1 λεπτό
74° C για 1 λεπτό
3^{ος} κύκλος : 74° C για 10 λεπτά

Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA σε πήκτωμα

αγαρόζης: Τα γραμμικά μόρια DNA μεταναστεύουν σε πήκτωμα αγαρόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου και με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους τους. Η πυκνότητα του πηκτώματος καθώς και η εφαρμοζόμενη τάση πεδίου καθορίζονται από τα μεγέθη των μορίων που θα διαχωριστούν. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1X TAE (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA pH 8.0).

Απομόνωση RNA και πυρήνων απο ιστό ποντικού:

Αρχικά, ο κατά προτίμηση ιστός ξεπλένεται καλά με κρύο PBS. Στη συνέχεια προστίθενται 500 µl Buffer N το οποίο περιέχει 30 µl 10% NP-40 (0.6%). Ακολουθεί απαλή ανάδευση, μέχρι το μίγμα να είναι ομοιογενές, και επωάζεται στον πάγο για 5 λεπτά. Με φυγοκέντρηση στις 3.000 rpm για 5 λεπτά στους 4° C, κατακρημνίζονται οι πυρήνες, ενώ το υπερκείμενο

περιέχει το RNA, το οποίο μεταφέρεται σε καθαρό erpendorf 2 ml. Οι πυρήνες επαναδιαλύονται σε 1 ml Buffer N, φυγοκεντρώνται ξανά για 5 λεπτά, στις 3.000 rpm, στους 4° C, το υπερκείμενο αφαιρείται και το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται δύο φορές, προσέχοντας να μην παραμείνουν για πολλή ώρα στον πάγο. Μετά την τρίτη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο αφαιρείται και οι πυρήνες επαναδιαλύονται σε 500 µl Buffer N και παρατηρούνται κάτω από το μικροσκόπιο για να επιβεβαιωθεί η κατάστασή τους. Ακολουθεί ποσοτικοποίηση του DNA: σε 5-10 µl του διαλύματος των πυρήνων, προστίθεται 1 ml 2 M NaCl και αναδεύεται καλά. Μετράται η απορρόφηση των δειγμάτων στα 260 nm/ 280 nm/ 230 nm χρησιμοποιώντας το διάλυμα 2 M NaCl ως κενό.

Απομόνωση RNA: στο υπερκείμενο που αφαιρέθηκε στην πρώτη φυγοκέντρωση, προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης, αναδεύεται καλά και φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm, για 10 λεπτά στους 4° C. Το υπερκείμενο τοποθετείται σε νέο erpendorf και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Στα δείγματα προστίθενται 50 µl 3 M NaOAc pH 5.2, 1 µl γλυκογόνο (20 µg/µl), 1.2 ml παγωμένη καθαρή αιθανόλη και επωάζονται στους -80° C για 12 ώρες. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm, για 20 λεπτά στους 4° C, το υπερκείμενο αφαιρείται και η πελέτα ξεπλένεται με 85% αιθανόλη σε DEPC H₂O. Η πελέτα στεγνώνει σε speed vac για λίγο και επαναδιαλύεται σε DEPC-ddH₂O.

Buffer N:

15mM Tris-HCl buffer, pH 7.5

60 mM KCl

15 mM NaCl

5 mM MgCl₂

1 mM CaCl₂

1 mM dithiothreitol (DTT)

10 mM glycerophosphate

250 mM sucrose

Protein Inhibitor Cocktail

Επεξεργασία δειγμάτων RNA με DNase: τα δείγματα RNA τοποθετούνται σε αποστειρωμένα σωληνάκια erendorff, μαζί με 5 µl 10x DNase buffer που παρέχεται με το ένζυμο, 3 µl DNase και DEPC-H₂O τόσο, ώστε ο συνολικός όγκος της

αντίδρασης να είναι 50 μ l. Οι αντιδράσεις επωάζονται στους 37° C για μία ώρα. Στη συνέχεια, προστίθενται 50 μ l DEPC-H₂O και ακολουθεί επεξεργασία με διάλυμα φαινόλης: χλωροφορμίου: ισοαμλικής αλκοόλης, όπως περιγράφηκε άνωθεν.

Σύνθεση cDNA από ολικό RNA: Τα δείγματα RNA (1 μ g) επωάζονται με 1 μ l oligodT primer (500 ng/ μ l) στους 65° C για 5 λεπτά. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στον πάγο για 2-3 λεπτά. Κατόπιν, φτιάχνεται το μίγμα σύνθεσης του cDNA, το οποίο περιέχει: 2.5 mM dNTPs mix (10x), 100 mM DTT (10x), 10x BSA, 5x Διάλυμα (250 mM Tris-HCl (pH 8.3 στους 25° C), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT). Προστίθεται διπλά απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 20 μ l ανά δείγμα. Το μίγμα επωάζεται για ένα λεπτό στους 37° C, στη συνέχεια προστίθενται 2 μ l RTase σε κάθε αντίδραση και ακολουθεί επώαση για μία ώρα στους 37° C. Η τελική συγκέντρωση του δείγματος είναι 50 ng/ μ l.

Αντίδραση RT-PCR για την έκφραση γονδίων: Για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης χρησιμοποιούμε 40ng cDNA, 50 μ M primer forward και 50 μ M primer reverse, dNTPs (10mM) 100X, BSA (10X), PCR Buffer Quiagen (500 mM KCl , 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 15mM MgCl₂), 1.25u Taq Quiagen (5u/ μ l), και διπλά απιονισμένο νερό μέχρι του όγκου των 20 μ l.

6. Βιβλιογραφία

1. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Dev*. 2003. 17: 126-140.
2. Ellis P, Fagan BM, Magness ST, Hutton S, Taranova O, Hayashi S, McMahon A, Rao M, Pevny L. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev Neurosci*. 2004. 26:148-165.
3. Ekonomou A, Kazanis I, Malas S, Wood H, Alifragis P, Denaxa M, Karagogeos D, Constanti A, Lovell-Badge R, Episkopou V. Neuronal migration and ventral subtype identity in the telencephalon depend on SOX1. *PLoS Biol*. 2005. 3(6): e186.
4. Ferri AL, Cavallaro M, Braida D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A, Ottolenghi S, Pandolfi PP, Sala M, DeBiasi S, Nicolis SK. Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development*. 2004. 131(15):3805-19.
5. Gnjatic S, Wheeler C, Ebner M, Ritter E, Murray A, Altorki NK, Ferrara CA, Hepburne-Scott H, Joyce S, Koopman J, McAndrew MB, Workman N, Ritter G, Fallon R, Old LJ. Seromic analysis of antibody responses in non-small cell lung cancer patients and healthy donors using conformational protein arrays. *J Immunol Methods*. 2009. 28;341(1-2):50-8.
6. Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H. Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet*. 2000. 16(4):182-7.
7. Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schoeller, H., and Smith, A. Formation of pluripotent stem cells

- in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct-4. *Cell*. 1998. 95: 379–391.
8. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*. 2000. 24(4):372-6.
 9. Pevny LH, Lovell-Badge R. Sox genes find their feet. *Curr Opin Genet Dev*. 1997. 7(3):338-44.
 10. Wood HB, Episkopou V. Comparative expression of the mouse Sox1, Sox2 and Sox3 genes from pre-gastrulation to early somite stages. *Mech Dev*. 1999. 86(1-2):197-201.
 11. Zappone MV, Galli R, Catena R, Meani N, De Biasi S, Mattei E, Tiveron C, Vescovi AL, Lovell-Badge R, Ottolenghi S, Nicolis SK. Sox2 regulatory sequences direct expression of a (beta)-geo transgene to telencephalic neural stem cells and precursors of the mouse embryo, revealing regionalization of gene expression in CNS stem cells. *Development*. 2000. 127(11):2367-82.
 12. Cavallaro M, Mariani J, Lancini C, Latorre E, Caccia R, Gullo F, Valotta M, DeBiasi S, Spinardi L, Ronchi A, Wanke E, Brunelli S, Favaro R, Ottolenghi S, Nicolis SK. Impaired generation of mature neurons by neural stem cells from hypomorphic Sox2 mutants. *Development*. 2008. 135(3):541-57.
 13. Donner AL, Episkopou V, Maas RL. Sox2 and Pou2f1 interact to control lens and olfactory placode development. *Dev Biol*. 2007. 303(2):784-99.
 14. Etchevers HC, Amiel J, Lyonnet S. Molecular bases of human neurocristopathies. *Adv Exp Med Biol*. 2006;589:213-34.
 15. Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*. 2003. 39(5):749-65.

16. Hayashi S, Tenzen T, McMahon AP. Maternal inheritance of Cre activity in a Sox2Cre deleter strain. *Genesis*. 2003. 37(2):51-3.
17. Okubo T, Pevny LH, Hogan BL. Sox2 is required for development of taste bud sensory cells. *Genes Dev*. 2006. 1;20(19):2654-9.
18. Que J, Luo X, Schwartz RJ, Hogan BL. Multiple roles for Sox2 in the developing and adult mouse trachea. *Development*. 2009. 136(11):1899-907.
19. Taranova OV, Magness ST, Fagan BM, Wu Y, Surzenko N, Hutton SR, Pevny LH. SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes Dev*. 2006. 1;20(9):1187-202.
20. Zhuo L., Theis M, Alvarez-Maya I., Brenner M., Willecke K., Messing A. hGFAP-Cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function *in vivo*. *Genesis*, 2001, 31:85-94