

Ariel, ένα long non coding RNA με πιθανό ρυθμιστικό ρόλο στη νευρογένεση

Διπλωματική εργασία
Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα: Μοριακή Ιατρική –
Νευροβιολογία Τμήμα Ιατρικής,
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Αντωνίου Δάφνη



Αθήνα, 2012

Τομέας Ιστολογίας, Κέντρο Βασικής Έρευνας Ι
Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών, Ακαδημία Αθηνών-ΙΙΒΕΑΑ
Δρ Πολίτης Παναγιώτης

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Ιατρικής

Διατμηματικό Μεταπτυχιακό πρόγραμμα

Μοριακή Ιατρική

Διπλωματική Εργασία

ΑΝΤΩΝΙΟΥ ΔΑΦΝΗ

Τίτλος

**Ariel, ένα long non coding RNA με πιθανό ρυθμιστικό
ρόλο στη νευρογένεση**

Τριμελής Επιτροπή :

Δρ. Σπύρος Ευθυμίου, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Δρ. Αριστείδης Χαρώνης, Ερευνητής Β', Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Δρ. Παναγιώτης Πολίτης, Ερευνητής Δ', Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του διατμηματικού μεταπτυχιακού **Μοριακή Ιατρική**, στο **Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών**, στο **Κέντρο Βασικής Έρευνας**, στο εργαστήριο **Ιστολογίας** υπό την επίβλεψη του υπευθύνου **Δρ. Πολίτη Παναγιώτη, Ερευνητής Δ'**.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	5
1.Εισαγωγή.....	6
1.1 Νευρικός ιστός.....	6
1.2 Νευρικά βλαστικά κύτταρα: δημιουργία, διαφοροποίηση και αναγέννηση.....	8
1.3 Ο homeobox μεταγραφικός παράγοντας Prox1 (prospero related homeobox 1) και ο αναπτυξιακός του ρόλος.....	10
1.4 Ο homeobox μεταγραφικός παράγοντας Prox1 και το νευρικό σύστημα.....	12
1.5 LONG NON CODING RNAs (lncRNAs).....	14
1.5.1 lncRNAs: μία νέα κατηγορία RNA μορίων με λειτουργικό ρόλο.....	14
1.5.2 Long non coding RNAs και επιγενετική ρύθμιση.....	18
1.5.3 Μερικά από τα γνωστά lncRNAs.....	20
1.5.4 lncRNAs στο νευρικό σύστημα, σε νευρολογικές ασθένειες και τον καρκίνο...22	
1.5.5 ARIEL, ένα άγνωστο έως τώρα lncRNA στο νευρικό σύστημα - ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	25
2.Υλικά και μέθοδοι.....	27
2.1 Καλλιέργεια νευρικών βλαστικών κυττάρων (νευρόσφαιρες)	27
2.2 Απομόνωση ολικού RNA και σύνθεση cDNA.....	28
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription PCR/RT-PCR) και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR).....	29
2.4 Ανοσοφθορισμός σε πρωτογενή NBK εμβρύου ποντικού.....	31
2.5 Κατασκευή-κλωνοποίηση πλασμιδιακών φορέων.....	32
2.6 Διαμόλυνση (CaCl ₂ transfection) κυτταρικής σειράς Neuro2A.....	33
2.7 Μέθοδος λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης.....	34

2.8 Μελέτες υπερέκφρασης του Ariel σε NBK εμβρύου ποντικού.....	35
2.9 Western Blot μέθοδος.....	37
3.Αποτελέσματα.....	38
3.1 Πρότυπο έκφρασης του Ariel στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα του ποντικού..	39
3.2 Υπερέκφραση του Ariel και μελέτη φαινοτύπου σε νευρικά βλαστικά κύτταρα.....	43
3.2.1 Επιβεβαίωση της υπερέκφρασης του Ariel μέσω αδενοϊκού φορέα σε N2A κύτταρα και σε NBK.....	43
3.2.2 In vitro μελέτες υπερέκφρασης (gain of function) του Ariel σε πρωτογενή NBK.....	44
3.2.2.1 Μελέτες υπερέκφρασης στην αστρογλιογένεση.....	45
3.2.2.2 Μελέτες υπερέκφρασης στη νευρογένεση.....	46
3.2.2.3 Μελέτη υπερέκφρασης σε σχέση με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε πρωτογενή νευρικά βλαστικά κύτταρα.....	47
3.4 Πιθανή επίδραση του Ariel στο γονίδιο Prox1.....	47
3.4.1 Μελέτη της πιθανής επίδρασης του Ariel στην πρωτεΐνη του Prox1.....	48
3.4.2 Μελέτη της πιθανής επίδρασης του Ariel στο mRNA του Prox1.....	49
4.Συζήτηση-Μελλοντικοί στόχοι	53
4.1 Συζήτηση.....	53
4.2 Μελλοντικοί στόχοι.....	56

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Την τελευταία δεκαετία έχουν προκύψει πολλά πειραματικά δεδομένα, που δείχνουν ότι περιοχές του DNA που δεν μεταφράζονται συμμετέχουν ενεργά στη ρύθμιση πολλών και ποικίλων κυτταρικών διαδικασιών. Η αναλυτική μελέτη του μεταγραφώματος (transcriptome) αποκάλυψε πληθώρα περιοχών που μεταγράφονται αλλά δε σχετίζονται με τη δημιουργία πρωτεϊνών. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν και τα long non coding RNAs τα οποία είναι μεταγραφόμενα RNA μόρια, μεγέθους μεγαλύτερου από 200 νουκλεοτίδια. Οι λειτουργίες των lncRNAs έχουν μεγάλο εύρος. Η έκφραση των lncRNAs μπορεί να επηρεάζει την έκφραση των γειτονικών τους γονιδίων. Με βάση τις γνωστές πληροφορίες για το *Prox1* και τη σημαντικότητά του στην νευρωνική διαφοροποίηση θέλαμε να ερευνήσουμε εάν το γονίδιο του *Prox1* σχετίζεται με κάποιο lncRNA. Από λεπτομερή ανάλυση της βιβλιογραφίας διαπιστώσαμε την ύπαρξη αναφορών για την παρουσία ενός lncRNA σε στενή γειτνίαση με το γονίδιο του *Prox1*. Η βιοπληροφορική ανάλυση των δημοσιευμένων μεταγράφων έδειξε ότι αυτό το υποθετικό lncRNA, το οποίο ονομάστηκε από την ομάδα μας Ariel, εκφράζεται αντι-παράλληλα με το *Prox1*, έχοντας συμπληρωματική αλληλουχία 134 βάσεων στο 5' UTR (5' αμετάφραστη περιοχή). Στόχος της εργασίας μας ήταν η μελέτη του συγκεκριμένου lncRNA καθώς και η πιθανή συσχέτιση του με το *Prox1*. Αρχικά δείξαμε ότι το Ariel εκφράζεται έντονα στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα του ποντικού, και συγκεκριμένα διαπιστώσαμε ότι εκφράζεται στα εμβρυϊκά στάδια που συμπίπτουν με την έναρξη της αστρογλιογένεσης. Επιπλέον, δείχνει υψηλά επίπεδα έκφρασης και στα νευρικά βλαστικά κύτταρα (NBK) που διαφοροποιούνται προς αστροκύτταρα. Αυτά τα δεδομένα προτείνουν ότι το Ariel ίσως να εμπλέκεται στους μοριακούς μηχανισμούς καθορισμού της ταυτότητας των NBK κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Για να ελέγξουμε αυτή την υπόθεση πραγματοποιήσαμε πειράματα υπερέκφρασης του Ariel σε NBK, τα οποία απομονώνουμε από το εμβρυϊκό κεντρικό νευρικό σύστημα του ποντικού και καλλιεργούμε in vitro. Έτσι δείξαμε ότι το Ariel είναι ικανό να επάγει την αστρογλιογένεση και να καταστέλλει τη νευρογένεση. Επίσης δείξαμε ότι είναι ικανό να καταστέλλει την έκφραση του *Prox1* τόσο στο επίπεδο της πρωτεΐνης όσο και του mRNA. Γνωρίζοντας ότι το *Prox1* δρα στα NBK με τον αντίθετο τρόπο, δηλαδή καταστέλλει την αστρογλιογένεση και επάγει την νευρογένεση, προτείνουμε ότι το Ariel μέσω της ικανότητάς του να μειώνει την έκφραση *Prox1* στο μεταγραφικό επίπεδο, ίσως να ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των NBK κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο νευρικός ιστός

Το νευρικό σύστημα αποτελείται από το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) που περιλαμβάνει τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό και από το περιφερικό σύστημα που περιλαμβάνει τα νεύρα που εκτείνονται από τον εγκέφαλο ή το νωτιαίο μυελό προς τους μύες, τους αδένες και τα αισθητήρια όργανα.

Η βασική λειτουργική ομάδα του νευρικού συστήματος είναι το νευρικό κύτταρο ή νευρώνας. Τα νευρικά κύτταρα λειτουργούν με τη γένεση ηλεκτρικών σημάτων που ταξιδεύουν από το ένα μέρος στο άλλο του ίδιου κυττάρου με την απελευθέρωση χημικών μηνυμάτων γνωστών ως νευροδιαβιβαστές, προκειμένου να επικοινωνήσουν. Οι νευρώνες παρουσιάζονται με ποικιλία μεγεθών και μορφών ωστόσο οι περισσότεροι από αυτούς αποτελούνται από τέσσερα μέρη: 1)το κυτταρικό σώμα 2)τους δενδρίτες 3)έναν άξονα και 4)τις αξονικές απολήξεις ή αλλιώς τα επανομαζόμενα αξονικά τερματικά ή τελικά κομβία (Γελαδάς, Ν. Τσακόπουλος 2000). Από το κυτταρικό σώμα εκτείνονται ένας ή περισσότεροι δενδρίτες οι οποίοι λαμβάνουν τις ηλεκτρικές ώσεις από υποδοχείς ή άλλα νευρικά κύτταρα, ενώ ο άξονας (νευρική ακτίνα) ο οποίος μπορεί να καλύπτεται από στρώματα μυελίνης που χωρίζονται μεταξύ τους από τους κόμβους Ranvier μεταφέρει τις ώσεις από το σώμα προς τα άλλα νευρικά κύτταρα ή όργανα. Η σύνδεση μεταξύ των δύο νευρώνων όπου ο ένας τροποποιεί τη δραστηριότητα του άλλου ονομάζεται σύναψη.

Οι νευρώνες ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες: α) τους προσαγωγούς νευρώνες που μεταφέρουν την πληροφορία στο ΚΝΣ β) τους απαγωγούς νευρώνες που μεταφέρουν την πληροφορία έξω από το ΚΝΣ προς τα εκτελεστικά όργανα γ) τους διάμεσους νευρώνες που βρίσκονται εξ ολοκλήρου μέσα στο ΚΝΣ και σχηματίζουν κυκλώματα με άλλους νευρώνες ή συνδέουν προσαγωγούς νευρώνες. Η πληροφορία διαβιβάζεται μέσω των συνάψεων μέσω των νευροδιαβιβαστών, οι οποίοι απελευθερώνονται από τον προσυναπτικό νευρώνα και προσδένονται σε υποδοχείς που βρίσκονται στο μετασυναπτικό νευρώνα.

Ένας άλλος βασικός τύπος κυττάρων του νευρικού ιστού είναι τα νευρογλοιακά κύτταρα (ή νευρογλοία). Τα νευρογλοιακά κύτταρα υποστηρίζουν φυσιολογικά και μεταβολικά τους νευρώνες. Ένας τύπος γλοίας είναι τα ολιγοδενδροκύτταρα που

σχηματίζουν τη μυελίνη γύρω από τους άξονες στο ΚΝΣ. Ένας δεύτερος τύπος νευρογλοιακών κυττάρων είναι τα αστροκύτταρα που συντελούν σημαντικά στην ομοιοστάση της συγκέντρωσης του K^+ και του γλουταμικού οξέος στον εξωκυττάριο χώρο του ΚΝΣ. Ακόμη, τα αστροκύτταρα υποστηρίζουν μεταβολικά τους νευρώνες ενώ κατά την εμβρυική ανάπτυξη καθοδηγούν τους νευρώνες κατά τη μετανάστευσή τους και διεγείρουν την αύξηση των νευρώνων με την έκκριση αυξητικών παραγόντων. Ένας τρίτος τύπος γλοίας, η μικρογλοία, (ή μικρογλοιακά κύτταρα) είναι υπεύθυνη για λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος στο ΚΝΣ. Τέλος τα κύτταρα Schwann που αποτελούν τα νευρογλοιακά κύτταρα του περιφερικού νευρικού συστήματος, παράγουν στρώμα μυελίνης που καλύπτει τις περιφερικές νευρικές ίνες, χρησιμεύουν ως οδηγοί για τους αναπτυσσόμενους νευρώνες και διαθέτουν και ανοσολογικές λειτουργίες.

Το νευρικό σύστημα προέρχεται από την εξωδερμική βλαστική στοιβάδα. Στο πρώιμο έμβρυο (19η εμβρυική μέρα στον άνθρωπο και 7^η μέρα στο ποντίκι) το νευρικό σύστημα αρχίζει να δημιουργείται από την επαγωγική δράση μίας μεσοδερμικής δομής, της νωτοχορδής, επί ορισμένων εξωδερμικών κυττάρων που βρίσκονται στη ραχιαία πλευρά του εμβρύου (Larsen 1996, Gilbert 1997). Τα κύτταρα αυτά επιμηκύνονται και οι μελλοντικές νευρικές περιοχές ανασηκώνονται πάνω από το περιβάλλον εξώδερμα και με αυτό τον τρόπο σχηματίζουν τη νευρική πλάκα (neural plate). Σε αυτή τη χρονική φάση αρχίζει η μορφογένεση του νευρικού συστήματος με τη μετατροπή της νευρικής πλάκας σε νευρικό σωλήνα (4^η εμβρυϊκή μέρα στον άνθρωπο). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται νευριδίωση και διακρίνεται σε πρωτογενή και δευτερογενή (Larsen 1996). Κατά την πρωτογενή νευριδίωση, η νευρική πλάκα αίρεται σε σχηματισμό νευρικών πτυχών (Gilbert 1997). Τα έξω χείλη των νευρικών πτυχών συναντώνται στη μέση γραμμή και συνενώνονται, ενώ ταυτόχρονα αποχωρίζονται από το επιφανειακό εξώδερμα. Ακολούθως, τα αποσπώμενα χείλη του επιφανειακού εξωδέρματος συνενώνονται και περιβάλλουν πλήρως το νευρικό σωλήνα. Ο νευρικός σωλήνας σε πρώτη φάση είναι ανοιχτός και επικοινωνεί με την αμνιακή κοιλότητα διαμέσου δύο μεγάλων στομιών, του πρόσθιου και το οπίσθιου νευροπόρου. Κατά την ανάπτυξη παρατηρείται πρώτα η σύγκλιση του πρόσθιου νευροπόρου (24^η εμβρυϊκή μέρα στον άνθρωπο). Το κεφαλικό άκρο του νευρικού σωλήνα διευρύνεται και σχηματίζει τα τρία πρωτογενή εγκεφαλικά κυστίδια: το πρόσθιο (forebrain), το μέσο (midbrain) και το οπίσθιο (hindbrain) τα οποία αργότερα θα δώσουν γένεση στις δομές του ώριμου εγκεφάλου: από το πρόσθιο εγκεφαλικό κυστίδιο προκύπτουν οι οσφρητικοί λοβοί, ο ιππόκαμπος, ο νεοφλοιός, τα βασικά γάγγλια, ο θάλαμος, ο υποθάλαμος κλπ. Από το μέσο εγκεφαλικό κυστίδιο

προκύπτει ο μέσος εγκέφαλος. Τέλος το οπίσθιο εγκεφαλικό κυστίδιο δίνει γένεση στην περεγκεφαλίδα, η οποία είναι μια περιοχή του εγκεφάλου που παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της κίνησης, στη γέφυρα και στον προμήκη μυελό (Larsen 1996, Gilbert 1997, Παπαδόπουλος 1999).

Μετά τη σύγκλιση του πρόσθιου πόρου πραγματοποιείται η σύγκλιση του οπίσθιου νευροπόρου μέσω της δευτερογενούς νευριδίωσης (26^η μέρα στον άνθρωπο) (Gilbert 1997). Κατά το στάδιο αυτό, μία κεντρική μάζα πολυδύναμων κυττάρων στο ουραίο τμήμα του νευρικού σωλήνα (ουραία εξοχή) σχηματίζει έναν αρχικώς συμπαγή νευρικό μυελό. Στη συνέχεια, κατά μήκος του νευρικού μυελού σχηματίζεται αυλός που τελικά ενώνεται με τον νευρικό πόρο. Από τον νευρικό μυελό προκύπτει τελικά ο ώριμος νωτιαίος μυελός (Larsen 1996). Ο νωτιαίος μυελός διαιρείται σε δύο περιοχές : τη φαιά και τη λευκή ουσία που περιβάλλει τη φαιά και περιέχει εμμύελους άξονες διάμεσων νευρώνων που οργανώνονται σε ανιούσες και κατιούσες οδούς. Οι άξονες των προσαγωγών και απαγωγών ινών σχηματίζουν τα νωτιαία νεύρα.

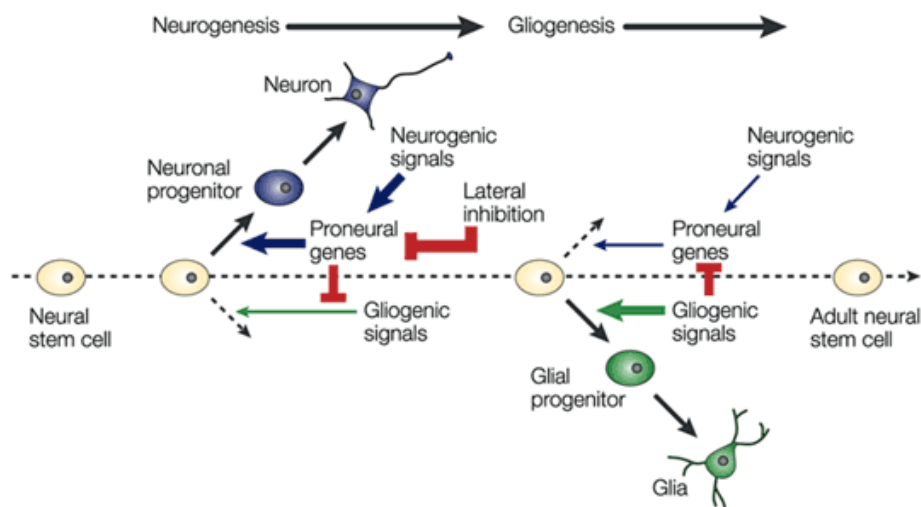
Όλα τα παραπάνω στάδια μορφογένεσης του νευρικού συστήματος, δημιουργίας της κατάλληλης κύτταρο-αρχιτεκτονικής δομής των περιοχών του ώριμου νευρικού συστήματος που εξασφαλίζουν τη σωστή αυτή δομή και την άριστη λειτουργία του ώριμου νευρικού συστήματος, είναι αποτέλεσμα τεσσάρων βασικών διεργασιών. Αυτές είναι: 1) η διαίρεση των κυττάρων 2) η διαφοροποίησή τους στους διάφορους τύπους νευρικών κυττάρων 3) η μετανάστευσή τους στις θέσεις δράσης τους για τη δημιουργία νευρωνικών κυκλωμάτων και δ) ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος που σκοπό έχει τη μείωση σε επιθυμητά επίπεδα του αριθμού των νευρικών κυττάρων που υπερπαραγονται κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης (Παπαδόπουλος, 1999).

1.2 Νευρικά βλαστικά κύτταρα: δημιουργία, διαφοροποίηση και αναγέννηση

Το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) των σπονδυλωτών αναπτύσσεται από ένα μικρό αριθμό νευροβλαστικών κυττάρων (NBK) (Neural Stem Cells-NSCs). Τα NBK είναι κύτταρα που αρχικά πολλαπλασιάζονται έντονα και στη συνέχεια διαφοροποιούνται σταδιακά στους διάφορους κυτταρικούς τύπους, δίνοντας πρώτα τα διαφορετικά είδη νευρώνων και αργότερα

ολιγοδενδροκύτταρα και αστροκύτταρα (Politis et al.,2008). Για να επιτευχθεί αυτή η σταδιακή διαδικασία διαφοροποίησης, τα NBK του νευρικού σωλήνα δέχονται πολύ νωρίς κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη την επίδραση πολλών εξωκυττάρων σημάτων από ουσίες οι οποίες καλούνται μορφογόνα (morphogens). Με τη σειρά τους, τα μορφογόνα ενεργοποιούν την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων με τρόπο χωροχρονικό και κυτταρο-ειδικό (Jessel 2000, Shirasaki et Pfaff, 2002). Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες καθορίζουν την ταυτότητα και την οργάνωση των NBK και ενεργούν στο σχηματισμό του αρχιτεκτονικού σχεδίου του νευρικού σωλήνα (Jessel TM,2000).

Σε αντίθεση με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα, τα οποία μπορούν να πολλαπλασιάζονται εκτενώς σε μια αδιαφοροποίητη κατάσταση και μπορούν να αποτελέσουν μια απεριόριστη πηγή πολλών κυτταρικών τύπων, τα NBK που προέρχονται από τον εμβρυϊκό ή τον ενήλικο εγκέφαλο είναι πολυδύναμα προγονικά κύτταρα τα οποία μπορούν να διαφοροποιούνται σε συγκεκριμένα είδη κυττάρων (McKay et al., 1997, Gage 2000, Anderson, 2001).



Nature Reviews | Neuroscience

Εικόνα 1.1: Η πορεία της νευρογένεσης και μορφογένεση του νευρικού συστήματος (Guillemot et al,2002)

Αφού ολοκληρωθεί η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος μετά τη γέννηση η κυτταρική διαίρεση είναι σημαντικά επιβραδυνμένη για το σχηματισμό νέων νευρώνων (Γελαδάς Ν., Τσακόπουλος, 2000). Ωστόσο, παρόλο που ο εγκέφαλος θεωρείται ένα όργανο τρωτό σε τραυματισμούς και ασθένειες λόγω της μειωμένης ικανότητάς του για αναγέννηση, τα

τελευταία χρόνια μετά από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν κυρίως σε ποντίκια , αρουραίους αλλά και σε ανθρώπους, διαπιστώθηκε ότι υπάρχει μιτωτική δραστηριότητα και νευρογένεση σε συγκεκριμένες περιοχές του ενήλικου εγκεφάλου. Συγκεκριμένα, τα νευρικά κύτταρα των ενηλίκων βρίσκονται στην α)υποκοιλιακή ζώνη (subventricular zone SVZ), ανάμεσα στο πλευρικό τοίχωμα της πλάγιας κοιλίας, στην υποκοκκιώδη ζώνη (subgranular zone) β) στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου, στην υπομεσολάβια ζώνη (subcallosal zone) γ) μεταξύ του ιπποκάμπου και μεσολάβιου σωματίου και τέλος δ) στην παρεγκεφαλίδα στο όριο μεταξύ του εσωτερικού κοκκιώδους στρώματος και της λευκής ουσίας. Αυτά τα NBK δρουν μόνο στις συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου, γεγονός όμως που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον ως μηχανισμός νευρωνικής επιδιόρθωσης εάν αυτά τα κύτταρα μπορούσαν να επιστρατευθούν έτσι ώστε να δημιουργήσουν νέους λειτουργικούς νευρώνες σε περιπτώσεις βλαβών του νευρικού συστήματος. Εξαιτίας του περιορισμένου δυναμικού τους σε σύγκριση με τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα, τα νευρικά βλαστοκύτταρα δεν δίνουν γένεση σε καρκινώματα. Για αυτούς τους λόγους τα τελευταία χρόνια το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει εστιάσει στη διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών και των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των NBK έτσι ώστε στο μέλλον να είναι εφικτή η χρήση τους σε θεραπευτικές προσεγγίσεις νευρικών παθήσεων (Golden et Cerko,1996, Doe, 2008).

1.3 Ο homeobox μεταγραφικός παράγοντας Prox1 (prospero related homeobox 1) και ο αναπτυξιακός του ρόλος

Το γονίδιο του homeobox μεταγραφικού παράγοντα *Prox1* κλωνοποιήθηκε αρχικά στο ποντίκι από ομολογία με το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα Prospero στη *Drosophila melanogaster*. Το γονίδιο του *Prox1* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 737 αμινοξέων με μοριακό βάρος στα 84 kDa (Hong et al,2003), και αποτελείται από δυο κύριες περιοχές, μία περιοχή που είναι ίδια με της πρωτεΐνης Prospero, και μία περιοχή homeodomain (Lavado et al.,2007). Ομόλογες πρωτεΐνες του *Prox1* έχουν ταυτοποιηθεί και σε άλλα σπονδυλωτά, όπως Xenopus, Zebrafish, κοτόπουλο και άνθρωπο (Tomarev et al,1996, Glasgow et Tomarev, 1998, Ny et al, 2005). Στα σπονδυλωτά, το γονίδιο *Prox1* εκφράζεται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης στον αμφιβληστροειδή, στο φακό των ματιών, στο κοχλία του αυτιού, στο νωτιαίο μυελό, στον εγκέφαλο, στου σκελετικούς μυς, στην καρδιά, στο ήπαρ, στο

πάγκρεας και στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του λεμφικού συστήματος (Oliver et al,1993, Tomarev et al, 1998, Wigle and Oliver, 1999, Burke and Oliver,2002, Wigle et al, 2002, Wang et al, 2005, Bermingham-McDonogh et al.,2006). Στα ποντίκια, μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με λειτουργική απενεργοποίηση του Prox1 έχουν δείξει ότι η δράση του συγκεκριμένου γονιδίου είναι απαραίτητη για το σχηματισμό διαφόρων οργάνων και κυτταρικών τύπων όπως των φακών του ματιού, του αμφιβληστροειδή, του ήπατος, του παγκρέατος, της καρδιάς και των ενδοθηλιακών κυττάρων του λεμφικού συστήματος (Wigle et al. 1999, Sosa-Pineda et al. 2000, Hon et al. 2002, Dyer et al. 2003, Harvey et al.2005, Wang et al. 2005, Risebro et al. 2009). Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι ο Prox1 είναι ένας βασικός ρυθμιστής της οργανογένεσης.

Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εμβρυϊκού ήπατος στο ποντίκι, πολυδύναμοι ηπατοβλάστες πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε ηπατοκύτταρα και χολαγγειοκύτταρα. Στη διάρκεια της συγκεκριμένης διαδικασίας ο μεταγραφικός παράγοντας Prox1, εντοπίζεται την ένατη μέρα της εμβρυϊκής ανάπτυξης στο αρχέγονο ηπατικό ιστό και στο ραχιαίο παγκρεατικό εκβλάστημα. Μελέτες σε ποντίκια όπου έχει απαλειφθεί το Prox1 έδειξαν ότι οδηγεί στο σχηματισμό μικρότερου ήπατος (Kamiya et al. 2008). Παρόμοιο αποτέλεσμα παρουσιάζεται και στην ανάπτυξη του παγκρέατος (Wang et al. 2005). Ένας ακόμη ρόλος του Prox1 είναι αυτός που διαδραματίζει στην ανάπτυξη του λεμφικού συστήματος. Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης ο παράγοντας Prox1 είναι βασικός ρυθμιστής της μετανάστευσης και της διαφοροποίησης των λεμφικών ενδοθηλιακών κυττάρων (Wigle et Oliver 2009, Wigle et al.2002). Καταστολή του σε ποντίκια έδειξε αποτυχία σχηματισμού του λεμφικού συστήματος (Hong et al. 2002, Petrova et al. 2002). Επιπλέον ο Prox1 έχει θεμελιώδη δράση κατά τη διάρκεια της καρδιακής μορφογένεσης (Risbero et al. 2009). Ο Prox1 εκφράζεται στην αναπτυσσόμενη καρδιά και έμβρυα ποντικών που φέρουν μη λειτουργικό Prox1 πεθαίνουν γύρω στη 14^η μέρα της εμβρυϊκής ανάπτυξης (Oliver et al 1993, Tomarev et al. 1996).

1.4 Ο homeobox μεταγραφικός παράγοντας Prox1 και το νευρικό σύστημα

Όπως φαίνεται από τις προαναφερόμενες πειραματικές διαδικασίες και αποτελέσματα, ο Prox1 είναι βασικός ρυθμιστής της κυτταρικής διαφοροποίησης και οργανογένεσης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και σχετίζεται τόσο με τη φυσιολογία όσο και με την παθογένεια ορισμένων οργάνων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση μεγαλύτερος βάρος θα δοθεί στη συμμετοχή του Prox1 στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος.

Όπως έχει προαναφερθεί πιο πάνω ο Prox1 αποτελεί το ομόλογο μόριο του homeobox μεταγραφικού παράγοντα Prospero της *Drosophila melanogaster*, ο οποίος απομονώθηκε κατά τη διάρκεια μελετών των ρυθμιστικών μηχανισμών της νευρωνικής διαφοροποίησης στο ΚΝΣ της *Drosophila melanogaster* (Hong et al, 2003) (Griffiths et al. 2004; Li et Vaessin, 2000; Choksi et al., 2004). Κατά τη διάρκεια της νευρογένεσης στη *Drosophila*, τα νευρικά βλαστικά κύτταρα διαιρούνται ασύμμετρα για να δημιουργήσουν δύο θυγατρικά κύτταρα με διακριτό πολλαπλασιαστικό δυναμικό και ξεχωριστή μοίρα. Το ένα από τα δύο κύτταρα παραμένει νευροβλαστικό ενώ το άλλο ένα μητρικό γάγγλιο (Doe 1992, Doe et al. 1991). Στη συνέχεια, το νέο νευροβλαστικό κύτταρο επαναλαμβάνει αυτές τις ασύμμετρες διαιρέσεις, ενώ το μητρικό γάγγλιο διαιρείται σε δύο θυγατρικά κύτταρα τα οποία διαδοχικά χάνουν το πολλαπλασιαστικό τους δυναμικό και διαφοροποιούνται για να γίνουν νευρώνες και γλοιοκύτταρα (Jan et Jan, 1998). Μελέτες έχουν δείξει ότι ο μεταγραφικός παράγοντας Prospero είναι καθοριστής της κυτταρικής σειράς κατά τη διάρκεια των ασύμμετρων διαιρέσεων των νευροβλαστών (Doe et al. 1991, Vaessin et al. 1991) και απαραίτητος για τη διατήρηση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού των γλοιοκυττάρων (Griffiths and Hidalgo, 2004). Τέλος, ο Prospero είναι απαραίτητος στη διάρκεια της ανάπτυξης του ματιού της μύγας, για το διαχωρισμό της κυτταρικής μοίρας μεταξύ φωτο-υποδοχέων του χρώματος (Cook T., 2003).

Στα σπονδυλωτά ο Prox1 έχει βρεθεί ότι εκφράζεται στο μάτι, στον εγκέφαλο και στο νωτιαίο μυελό εμβρύων κοτόπουλου και ποντικού (Torri et al, 1999). Ακόμα, οι Lavado and Oliver, 2007 διερεύνησαν περαιτέρω την έκφραση του Prox1 στα ποντίκια και διαπίστωσαν ότι κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη εκφράζεται στην υποκοιλιακή ζώνη ή στις περιοχές του εγκεφάλου που διαφοροποιούνται νωρίς. Στο ίδιο στάδιο παρατηρείται η έκφραση του mRNA αλλά όχι της πρωτεΐνης σε διάφορες περιοχές του υποθαλάμου και προθαλάμου

(Lavado et al, 2007). Άλλες μελέτες έχουν ταυτοποιήσει την έκφρασή του στα ώριμα κοκκιοκύτταρα της οδοντωτής έλικας τόσο στον αναπτυσσόμενο όσο και στον ενήλικο εγκέφαλο (Bick-Sander et al, 2006, Navarro-Quiroga et al, 2006). Σε παλαιότερες μελέτες έχει αναφερθεί ότι κατά την πρόωμη νευρογένεση το Prox1 εκφράζεται μαζί με την πρωτεΐνη Mash1 (Torri et al, 1999).

Επίσης, μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει ότι ο Prox1 είναι απαραίτητος κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του αμφιβληστροειδή (Dyer et al, 2003). Συγκεκριμένα, τα πρόδρομα κύτταρα της ανάπτυξης του αμφιβληστροειδή ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό τους κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, έτσι ώστε να δημιουργηθεί ο σωστός αριθμός κάθε κυτταρικού τύπου την κατάλληλη στιγμή. Σε αυτή την περίπτωση το Prox1 ρυθμίζει την έξοδο των κυττάρων αυτών από τον κυτταρικό κύκλο. Κύτταρα που δεν έχουν Prox1 έχουν λιγότερες πιθανότητες να σταματήσουν τη διαίρεση ενώ η έκτοπη έκφραση του Prox1 αναγκάζει τα πρόδρομα κύτταρα να βγουν από τον κυτταρικό κύκλο (Dyer et al, 2003).

Τέλος, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι στον αναπτυσσόμενο νωτιαίο μυελό κοτόπουλου και ποντικού ο Prox1 εκφράζεται παροδικά σε ένα υποσύνολο πρόδρομων διάμεσων νευρώνων ενώ εξαιρείται ειδικά στους κινητικούς νευρώνες (Mishra et al, 2008; Kaltezioti et al, 2010). Χρησιμοποιώντας μελέτες gain of function και loss of function για το Prox1 σε έμβρυα κοτόπουλου, διαπιστώθηκε ότι ο Prox1 είναι ικανός να οδηγήσει τα νευροβλαστικά κύτταρα εκτός κυτταρικού κύκλου και να επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης β-III tubulin η οποία βρίσκεται στους μεταμιτωτικούς νευρώνες ; Kaltezioti et al, 2010). Επιπλέον, εφαρμόζοντας RNAi τεχνικές για το Prox1 παρατηρήθηκε ότι η φυσιολογική λειτουργία του είναι απαραίτητη για τη διεξαγωγή του προγράμματος της νευρωνικής διαφοροποίησης, σε συνεργασία με τους νευρογονικούς παράγοντες Mash1, Νευρογενίνης 2 (Ngn2) αλλά και πέρας (downstream) αυτών (Mishra et al, 2008; Kaltezioti et al, 2010). Αυτά τα αποτελέσματα, καταδεικνύουν ένα σημαντικό και ειδικό ρόλο του Prox1 για τους διάμεσους νευρώνες του νωτιαίου μυελού, στον έλεγχο των βημάτων που απαιτούνται για την έξοδο των νευροβλαστικών κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο και τη διαφοροποίησή τους. Επιπλέον, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Mishra et al. 2008, Kaltezioti et al. 2010) ο Prox1 αποτελεί υπονήφιο μεταγραφικό παράγοντα για τη ρύθμιση του Notch1 γονιδίου. Το Notch 1 σηματοδοτικό μονοπάτι έχει αποδειχθεί ότι έχει θεμελιώδη ρόλο στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Ωστόσο, ενώ έχουν γίνει διεξοδικές μελέτες όσον αφορά τη δράση του και τη σύνδεσή του με την παθογένεια, η ρύθμιση του συγκεκριμένου μονοπατιού στο επίπεδο της μεταγραφής έχει ελάχιστα μελετηθεί. Επομένως, ο Prox1 αποδεικνύεται ως ένας βασικός

ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου και της διαφοροποίησης των νευροβλαστικών κυττάρων με μεγάλο εύρος λειτουργιών προς μελέτη.

1.5 LONG NON CODING RNAs (lncRNAs)

1.5.1 *lncRNAs: ΜΙΑ ΝΕΑ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ RNA ΜΟΡΙΩΝ ΜΕ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟ ΡΟΛΟ*

Μέχρι πρόσφατα, η γονιδιακή ρύθμιση είχε ως βάση τη σχέση πρωτεΐνης- γονιδίου μέσω του κεντρικού δόγματος της βιολογίας, δηλαδή ότι το DNA μεταγράφεται σε mRNA το οποίο στη συνέχεια κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη. Παρόλα αυτά, τη τελευταία δεκαετία έχουν προκύψει στοιχεία, που δηλώνουν ότι οι ρύθμιση των βιολογικών διαδικασιών που καθορίζουν και την πολυπλοκότητα του οργανισμού, βασίζεται κυρίως στις περιοχές του DNA που δεν μεταφράζονται (Mattick,2004). Συγκεκριμένα, το ποσοστό του γονιδιώματος που κωδικοποιεί για πρωτεΐνες ανέρχεται στο 1,5% περίπου, ενώ πολλές μη κωδικές περιοχές μεταγράφονται σε μη κωδικά RNA (non coding RNAs). Μετά από πρόσφατες μελέτες, αποδείχθηκε πως τα non coding RNAs (ncRNAs) συμμετέχουν με πολύ ενεργό ρόλο στη ρύθμιση πολλών βιολογικών διαδικασιών όπως η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση και ο μεταβολισμός (Mercer et al.2009, Ponting et al. 2009, Wilusz et al. 2009). Η αναλυτική μελέτη του μεταγραφώματος (transcriptome) αποκάλυψε δεκάδες χιλιάδες περιοχές που μεταγράφονται αλλά δε σχετίζονται με τη δημιουργία πρωτεϊνών.

Σε αντίθεση με τα small non coding RNAs, όπως τα siRNAs, miRNAs, piRNAs, υπάρχουν στην παραπάνω ομάδα ncRNA και τα long non coding RNAs τα οποία είναι σε μικρό βαθμό συντηρημένα εξελικτικά, και έχει βρεθεί ότι ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση με ποικίλους τρόπους (Chang et al.,2011). Τα long non coding RNAs (lncRNAs) είναι μεταγραφόμενα RNA μόρια, μεγέθους μεγαλύτερου από 200 νουκλεοτίδια. Τα lncRNAs πρωτοανακαλύφθηκαν έπειτα από υψηλής ανάλυσης sequencing cDNA βιβλιοθήκης σε ποντίκι (Okazaki et al., 2002). Περαιτέρω έρευνα για αυτά, αποκάλυψε ότι ξεπερνούν κατά πολύ σε αριθμό τα mRNA μόρια τα οποία κωδικοποιούν για πρωτεΐνες (Carninci et al., 2005).

Επιπλέον μελέτες για τα lncRNAs δείχνουν πως συμμετέχουν σε πολλές σημαντικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένου της μεταγραφής, της ωρίμανσης, της μετάφρασης, της

κατανομής των παραγόντων στον πυρήνα των κυττάρων, της γονιδιακής αποτύπωσης (genetic imprinting), της αναδιοργάνωσης του γονιδιώματος καθώς και της τροποποίησης της χρωματίνης (Jin-Tao Guo et al., 2011). Μεγάλος αριθμός lncRNAs έχει συσχετιστεί με ασθένειες στον άνθρωπο όπως ο καρκίνος, η νόσος Alzheimer's καθώς και καρδιαγγειακές παθήσεις. Για τους παραπάνω λόγους, η μελέτη αυτών και η καλύτερη κατανόηση της λειτουργικής τους σημασίας μπορεί να οδηγήσει στην κατανόηση των κυτταρικών μηχανισμών καθώς και στα αίτια διαφόρων ασθενειών.

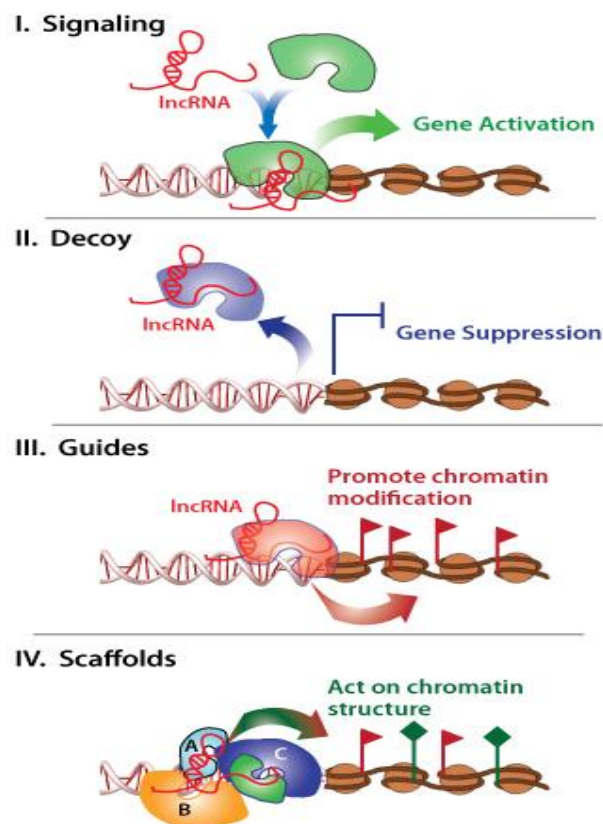
Οι λειτουργίες των lncRNAs έχουν μεγάλο εύρος, και για το λόγο αυτό θα μπορούσαν να ομαδοποιηθούν σε τέσσερις βασικές κατηγορίες με κριτήριο τη δράση τους στο κύτταρο. Η πρώτη κατηγορία είναι να ομαδοποιηθούν ως κυτταρικά σήματα. Πιο συγκεκριμένα, η πλειονότητα των lncRNAs μεταγράφεται από την πολυμεράση II όπως αποδεικνύεται από την πρόσδεση της πολυμεράσης σε αυτά, τα 5' caps, τις τροποποιήσεις των ιστονών που σχετίζονται με την επιμήκυνση από την πολυμεράση II, και την πολυαδενυλίωση (Guttman et al., 2009). Αυτά τα μόρια παρουσιάζουν κυτταροειδικότητα, και εκφράζονται με διαφορετικά ερεθίσματα, γεγονός που δηλώνει ότι η έκφρασή τους υπόκειται κάτω από συγκεκριμένο μεταγραφικό έλεγχο. Εξαιτίας του μεταγραφικού τους ελέγχου σε συγκεκριμένους χρόνους και κάτω από συγκεκριμένα αναπτυξιακά σήματα, μπορούν να θεωρηθούν ως ρυθμιστές της έκφρασης άλλων γονιδίων (βλ. εικόνα 1.2-I). Τα lncRNAs αυτής της κατηγορίας, έχει βρεθεί πως συμμετέχουν στη ρύθμιση της εκκίνησης, επιμήκυνσης ή τερματισμού της μεταγραφής. Χάρη σε αυτή την ικανότητά τους, θα μπορούσαν να θεωρηθούν βιολογικοί δείκτες συγκεκριμένων λειτουργιών του κυττάρου (Jin-Tao Guo et al., 2011).

Η δεύτερη ομαδοποίηση που μπορεί να γίνει είναι για τα lncRNAs τα οποία προσδένονται σε άλλα μόρια και δεν επιτρέπουν την πρόσδεση αυτών στους ενισχυτές ή τους υποκινητές του γονιδιώματος. Τα lncRNAs αυτής της κατηγορίας χαρακτηρίζονται ως «δολώματα» (decoys) τα οποία προσελκύουν και προσδένονται σε πρωτεϊνικά μόρια εμποδίζοντάς τα έτσι να επάγουν την μεταγραφή του γονιδίου-στόχου. Τα RNAs αυτά, λειτουργούν ως καταστολείς πολλών ρυθμιστικών παραγόντων, είτε αυτοί είναι μεταγραφικοί παράγοντες, είτε τροποποιητές χρωματίνης, είτε άλλα παρόμοιας λειτουργικής σημασίας μόρια (Jin-Tao Guo et al., 2011) (βλ. εικόνα 1.2-II). Κατά συνέπεια, ο κύριός τους ρόλος είναι η παρεμπόδιση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου.

Η τρίτη κατηγορία lncRNAs αναφέρεται στους «καθοδηγητές» (guides). Πρόκειται για lncRNAs τα οποία προσδένονται σε πρωτεΐνες και σχηματίζουν σύμπλοκο (RNA-

πρωτεΐνη) το οποίο δρα σε συγκεκριμένο στόχο. Με τον τρόπο αυτό καθοδηγούν και διευκολύνουν την πρόσδεση κάποιου παράγοντα στο DNA. Όπως είναι αναμενόμενο λόγω της λειτουργίας τους, τα lncRNAs αυτά μπορούν να δράουν είτε cis δηλαδή σε κοντινά γονίδια από την περιοχή που εκφράζονται τα ίδια, είτε trans δηλαδή σε μακρινής απόστασης γονίδια. Αυτή η ομάδα RNAs, μπορεί να προσελκύει σύμπλοκα πρωτεϊνών όπως τα TrxG (Trithorax Group) ή το polycomb PcG, καθώς και μεταγραφικούς παράγοντες. Επιπλέον η ικανότητά τους να δράουν και σε απομακρυσμένα γονίδια (trans) τα καθιστά πιθανά και για χρωματινικές τροποποιήσεις. Η δράση αυτής της ομάδας, φαίνεται να έχει αντίθετα αποτελέσματα σε σχέση με την προηγούμενη κατηγορία όσον αφορά την επαγωγή της μεταγραφής κάποιου γονιδίου-στόχου (βλ. εικόνα 1.2-III).

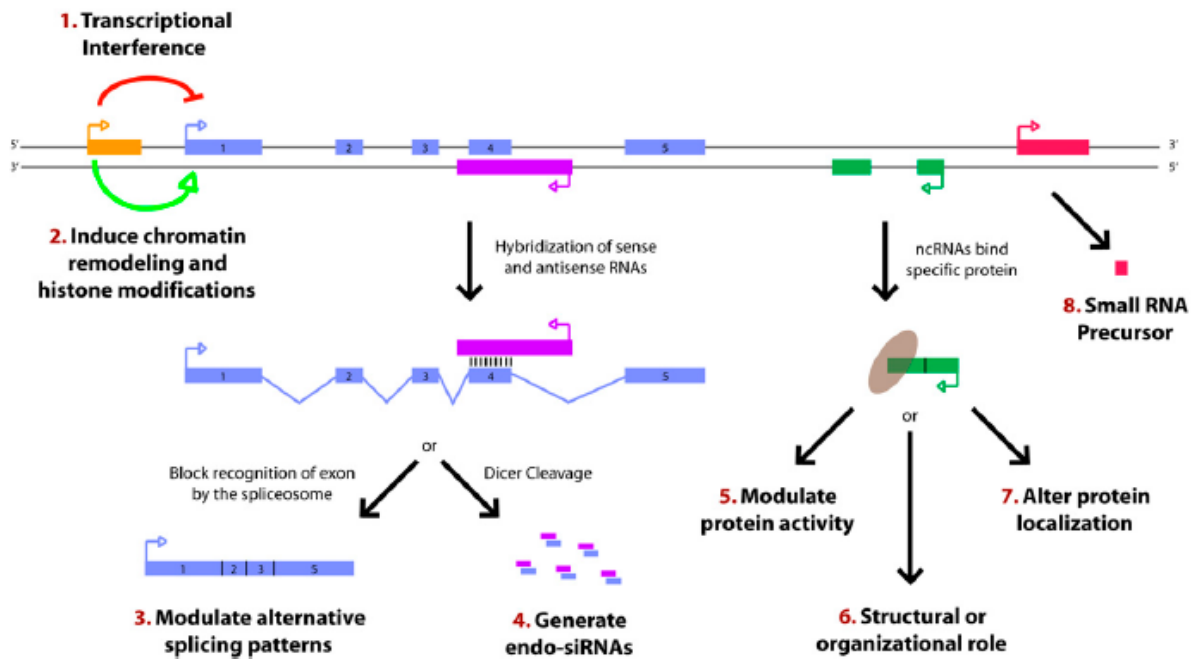
Τέλος, στην τελευταία κατηγορία ανήκουν τα lncRNAs τα οποία έχουν την ικανότητα να προσδένονται στο DNA και να προσελκύουν διαφορετικά πρωτεϊνικά μόρια σχηματίζοντας έτσι ετερογενή πρωτεϊνικά σύμπλοκα τα οποία δράουν στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου. Κατά συνέπεια, λειτουργούν σαν υπόστρωμα το οποίο φέρνει σε επαφή διαφορετικά μόρια πάνω στη γονιδιωματική αλυσίδα (βλ. εικόνα 1.2-IV).



Εικόνα 1.2: Κατηγοριοποίηση λειτουργικών lncRNAs

Παρουσιάζονται σχηματικά οι κατηγορίες των lncRNAs. Στο (I) φαίνεται η λειτουργία τους ως σηματοδότες επαγωγής της μεταγραφής. Αντίθετα, στο (II) απεικονίζεται η παρεμπόδιση της μεταγραφής καθώς αγκιστρώνεται το RNA και εμποδίζει τους διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες να προσδεθούν, στο (III) τα lncRNAs δρουν ως καθοδηγητές με την πρόσδεση μορίων που επηρεάζουν τη δομή της χρωματίνης και τέλος στο (IV) η λειτουργία αυτών ως υποστρώματα για την πρόσδεση διαφορετικών πρωτεϊνικών μορίων πάνω στο DNA.

Πιο συγκεκριμένα, ο μοριακός μηχανισμός μέσω του οποίου μπορεί να δρουν τα lncRNAs ποικίλει ανάλογα με την κατηγορία τους (βλ. παρακάτω εικόνα 1.3). Η έκφραση των lncRNAs μπορεί να επηρεάζει την έκφραση των γειτονικών τους γονιδίων, είτε μέσω επαγωγής είτε μέσω καταστολής τους (Katayama et al. 2005). Για παράδειγμα, η μεταγραφή ενός ncRNA στην περιοχή ενός υποκινητή μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση απευθείας με τον μεταγραφικό παράγοντα που προσδένεται για να επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου-στόχου και να συμμετέχει έτσι στην αποσιώπηση του γονιδίου αυτού. Έχει βρεθεί και το αντίθετο παράδειγμα, όπου η έκφραση του lncRNA σε μια τέτοια περιοχή μπορεί να εμποδίζει την αποσιώπηση του γονιδίου-στόχου με παράλληλη πρόσδεση του RNA σε Polycomb πρωτεϊνικό σύμπλοκο (D. L. Spector et al. 2011). Άλλος τρόπος δράσης τους είναι η υβριδοποίησή τους με συμπληρωματικά mRNAs και να προωθούν έτσι είτε την διαφορετική ωρίμανση είτε την αποικοδόμησή τους. Επιπλέον, όπως προαναφέρθηκε, μπορεί τα lncRNAs να προσδένονται σε πρωτεΐνες και το σύμπλοκο που δημιουργείται να έχει είτε ρυθμιστικό ρόλο, είτε οργανωτικό ή δομικό ρόλο (σε επίπεδα αλλαγής της δομής της πρωτεΐνης), είτε κατασταλτικό ρόλο για τη δράση αυτής της πρωτεΐνης. Τέλος, έχουν βρεθεί πολλά small noncoding RNAs (εκτός των γνωστών microRNAs, piRNAs κλπ) τα οποία φαίνεται να προέρχονται από long RNA μετάγραφα καθώς διαθέτουν το δείκτη αλληλουχίας που εντοπίζεται στο 5' άκρο των long RNA μεταγράφων (D. L. Spector et al. 2011). Τα lncRNAs έχει βρεθεί πως κατέχουν πολύ σημαντικό ρόλο και σε επιγενετικούς μηχανισμούς ελέγχου και ρύθμισης έκφρασης άλλων γονιδίων (βλ. παρακάτω πιο αναλυτικά).



Εικόνα 1.3: Μοριακοί μηχανισμοί δράσης των long noncoding RNAs

Στη σχηματική απεικόνιση, φαίνονται οι πιθανές δράσεις των lncRNAs όπου στο (1-2) φαίνεται η έκφρασή τους και επαγωγή ή καταστολή γειτονικού γονιδιακού τόπου, στο (3) φαίνεται η υβριδοποίησή τους με τα συμπληρωματικά mRNAs, στο (5-6-7) η πιθανή τους δράση κατά το σχηματισμό συμπλόκου με πρωτεΐνες, ενώ στο (8) ο σχηματισμός small RNAs από την μεταγραφή τους.

1.5.2 Long non coding RNAs και επιγενετική ρύθμιση

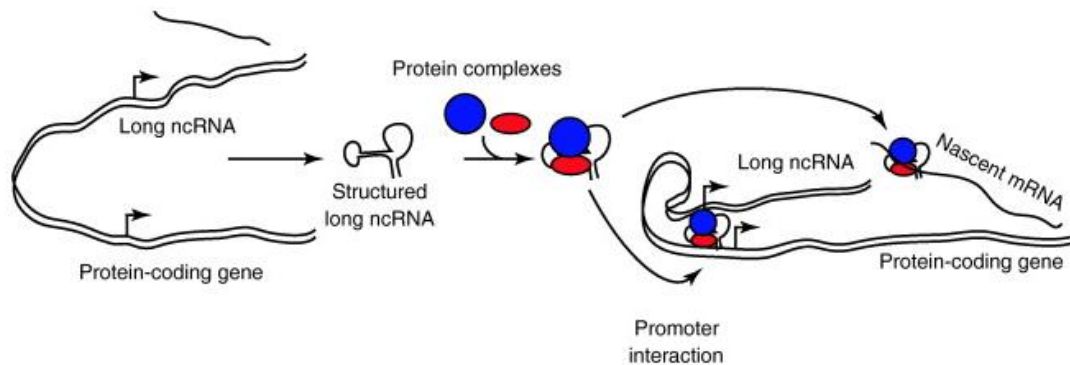
Τελευταία, έρευνες αποδεικνύουν όλο και πιο έντονα πως το μέχρι τώρα γνωστό “junk” DNA αποκτά λειτουργική σημασία, καθώς μεγάλο ποσοστό από αυτό φαίνεται να είναι ενεργό μεταγραφικά. Επίσης, το 40-50% των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες εκφράζει και ένα αντιπαράλληλο τμήμα RNA το οποίο δεν μεταφράζεται και ανήκει στην κατηγορία “long antisense non coding” RNAs. Πρόσφατες παρατηρήσεις καταγράφουν πως αυτά τα μόρια θα μπορούσαν να κατέχουν ρυθμιστικό ρόλο ρυθμίζοντας την γονιδιακή έκφραση μέσω επιγενετικών μηχανισμών (Morris K. V. 2009). Τα long non coding RNAs φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική πολυπλοκότητα, με διαφορετική σημασία αναλόγως τον οργανισμό. Στον άνθρωπο τα lncRNAs φαίνεται να δρουν ως μέρος του

ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης μέσω επιστράτευσης επιγενετικών συμπλόκων σε συγκεκριμένους γονιδιακούς τόπους. Το τελευταίο διάστημα αποκτούν όλο και περισσότερη σημασία επιστημονικά, και ένας πιθανός λόγος για αυτό είναι η εναλλαγή της δευτεροταγούς δομής τους η οποία μπορεί να υπόκειται σε πολλές αλλαγές και έτσι κάθε φορά να επιδρά σε διαφορετικούς στόχους (Morris K. V. 2009).

Πιο συγκεκριμένα, τα long non coding RNAs έχουν συσχετιστεί και με την επαγωγή αλλά και με την καταστολή της μεταγραφής, μέσω διαφορετικών μονοπατιών. Είναι γνωστό ότι οι Polycomb (PcG) πρωτεΐνες δρουν κατασταλτικά για τη μεταγραφή, ενώ η ομάδα των Trithorax (TrxG) πρωτεϊνών την επάγουν. Πρόκειται για σημαντικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες οι οποίες επιδρούν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης στη γονιδιακή έκφραση επηρεάζοντας τη δομή της χρωματίνης (Morris et al.2010). Ένα πιθανό μοντέλο που έχει προταθεί για την επιστράτευση αυτών των πρωτεϊνικών συμπλόκων και τελικά τη γονιδιακή ρύθμιση, είναι μέσω μορίων RNA-RNA (Hekimoglu et Ringrose 2009). Σύμφωνα με αυτό, ένα ελεύθερο RNA μετάγραφο, συνδέεται με το σύμπλοκο PcG ή TrxG και έπειτα αλληλεπιδρά με ένα ελεύθερο συμπληρωματικό RNA μόριο το οποίο μεταγράφεται αντιπαράλληλα από το πρώτο με αποτέλεσμα την επιστράτευση αυτών των συμπλόκων σε συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο και τελικά την επαγωγή ή καταστολή της μεταγραφής. Ένα τέτοιο παράδειγμα lncRNAs είναι το HOTAIR το οποίο εντοπίζεται να μεταγράφεται στο HOXC γονιδιακό τόπο, και επιδρά αρνητικά στη μεταγραφή του HOXD γονιδιακού τόπου μέσω επιστράτευσης του PRC2 Polycomb πρωτεϊνικού συμπλόκου (Morris et al.2010). Άλλο παράδειγμα είναι το Xist ncRNA, το οποίο σχετίζεται με την επιστράτευση συμπλόκων αναδιοργάνωσης της χρωματίνης και τελικά αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης (βλ πιο αναλυτικά παρακάτω).

Αντίθετα με τα παραπάνω, έχουν βρεθεί και περιπτώσεις όπου η παρουσία lncRNAs μπορεί να συσχετίζεται με την επαγωγή της μεταγραφής και επομένως της έκφρασης γειτονικού γονιδίου. Συγκεκριμένα, σε πολλές μελέτες έχει βρεθεί αλληλεπίδραση πολλών non coding RNAs με ενισχυτές ενεργών μεταγραφικά γονιδίων γεγονός που ενισχύει την άποψη για θετική ρύθμιση της μεταγραφής γειτονικών γονιδίων από lncRNAs. Πρόσφατη μελέτη που έγινε με σκοπό τον καθορισμό των lncRNAs στο ανθρώπινο γονιδίωμα, έδειξε ότι η αποσιώπηση πολλών εξ αυτών είχε ως συνέπεια την μείωση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων (Orom UA et al., 2011). Ένα παράδειγμα είναι ένα lncRNA γειτονικά του γονιδίου Snail homolog 1 το οποίο είναι απαραίτητο για την έκφραση του δεύτερου. Η αποσιώπηση των lncRNAs έδειξε να επηρεάζει και τη ρύθμιση γονιδίων σε διαφορετικά χρωμοσώματα, γεγονός που υποδηλώνει την πιθανή δράση τους και σε trans επίπεδο (Orom UA et al. 2011).

Επιπλέον, έχει βρεθεί ένα lncRNA που ονομάζεται Jrx, ανοδικά (upstream) του lncRNA Xist, το οποίο φαίνεται να ρυθμίζει θετικά την έκφραση του δεύτερου, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα ncRNAs αυτά μπορεί να ρυθμίζουν την έκφραση RNA μορίων και όχι μόνο τη ρύθμιση γονιδίων που εκφράζουν πρωτεΐνες (Tia D. et al., 2010).



Εικόνα 1.4: Πιθανή λειτουργία των lncRNAs όσον αφορά στην επαγωγή της μεταγραφής γειτονικών ή μη γονιδίων (Orom UA et al., 2011).

Όπως απεικονίζεται, ένα lncRNA μπορεί να εκφράζεται από κάποιο μακρινό ανεξάρτητο υποκινητή, και σε αρκετές περιπτώσεις να υπόκειται σε πολυαδενυλίωση ή ωρίμανση. Μετά το σχηματισμό της δευτεροταγούς δομής του αλληλεπιδρά με πρωτεϊνικά σύμπλοκα είτε επαγωγής είτε καταστολής της έκφρασης. Το σύμπλοκο πρωτεϊνών –RNA στη συνέχεια στοχεύει στον υποκινητή του γονιδίου-στόχου επιδρώντας έτσι στην έκφρασή του. Επίσης, το σύμπλοκο αυτό μπορεί να επιδρά στο mRNA του γονιδίου ρυθμίζοντας την έκφρασή του σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο.

1.5.3 Μερικά από τα γνωστά lncRNAs

- **Xist και Tsix ncRNAs**

Στα θηλαστικά, τα θηλυκά άτομα διαθέτουν το διπλάσιο αριθμό γονιδίων λόγω των δύο X χρωμοσωμάτων από ότι τα αρσενικά, και για αυτό το λόγο έχουν αναπτύξει έναν μηχανισμό αποσιώπησης ενός εκ των δύο X χρωμοσωμάτων ώστε να υπάρχει ισορροπία των γονιδιακών προϊόντων (Lyon, 1961). Η περιοχή του X χρωμοσώματος που σχετίζεται με την απενεργοποίηση αυτή ονομάζεται Xic (X chromosome inactivation center). Από την περιοχή αυτή έχει βρεθεί να μεταγράφεται ένα γονίδιο που ονομάστηκε Xist το οποίο δεν κωδικοποιεί για πρωτεΐνη και φαίνεται να διαθέτει καθοριστικό ρόλο στην απενεργοποίηση του ενός X

χρωμοσώματος. Το Xist επιδρά σχεδόν σε όλες τις περιοχές του απενεργοποιημένου χρωμοσώματος πιθανώς μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων (Sado et al., 2005). Ένα γονίδιο με το όνομα Tsix έχει εντοπιστεί να εκφράζεται αντιπαράλληλα με το Xist και να μην κωδικοποιεί για πρωτεΐνη αλλά το προϊόν του να είναι ένα lncRNA. Μελέτες έδειξαν ότι η καταστολή του Tsix έχει ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση του Xist γονιδίου. Από αυτό προκύπτει και ένας νέος τρόπος δράσης των lncRNAs που σχετίζεται με την κατασταλτική ρύθμιση ενός άλλου ncRNA (Sado et al., 2005).

- **Nkx2.2AS antisense RNA**

Το *Nkx2.2* κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη που αποτελεί γνωστό μεταγραφικό παράγοντα με βασικό ρόλο καθοδήγησης των νευρικών βλαστικών κυττάρων σε ολιγοδενδροκύτταρα (Guillemot F., 2007). Το *Nkx2.2AS* αποτελεί ένα μη κωδικό RNA το οποίο βρέθηκε να μεταγράφεται αντιπαράλληλα του *Nkx2.2* γονιδίου και αποτελεί παράδειγμα της κατηγορίας των ncRNA τα οποία ρυθμίζουν γειτονικό γονίδιο επάγοντας την έκφρασή του. Φάνηκε ότι η υπερέκφρασή του επάγει την διαφοροποίηση σε ολιγοδενδροκύτταρα, καθώς επίσης και ότι η περιοχή που αλληλεπικαλύπτεται με το γονίδιο *Nkx2.2* είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση του ncRNA.

- **lncRNAs σε μηχανισμούς κυτταρικού κύκλου και DNA damage response**

Επίσης, ένα ncRNA έχει βρεθεί στον υποκινητή του γονιδίου της κυκλίνης D1 (CCND1) του οποίου η έκφραση επάγεται με ιονίζουσα ακτινοβολία και φαίνεται να καταστέλλει την έκφραση της CCND1 μέσω επιστράτευσης του TLS το οποίο εμποδίζει τις ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών. Ένα άλλο παράδειγμα είναι το lncRNA ANRIL το οποίο μεταγράφεται αντιπαράλληλα και επικαλύπτει μέρος του γονιδίου *p15*. Η δράση του ANRIL έχει συσχετιστεί με καταστολή του p15 είτε με άμεση αλληλεπίδραση είτε και έμμεσα μέσω τροποποίησης της χρωματίνης σε ετεροχρωματίνη. Επίσης, στο γονιδιακό τόπο του γονιδίου *CDKN1A* βρέθηκε ένα αντιπαράλληλο lncRNA, το οποίο ονομάστηκε PANDA και το οποίο επάγεται κατά τη βλάβη του DNA. Βρέθηκε επίσης ότι η επαγωγή του εξαρτάται από το p53 και η δράση του σχετίζεται με την καταστολή της έκφρασης αποπτωτικών γονιδίων μέσω επιστράτευσης του μεταγραφικού παράγοντα NF-YA (Hung T. et al., 2011).

- **lncRNA MALAT1, ένα ncRNA στη συναπτογένεση**

Το MALAT1 πρόκειται για ένα lncRNA το οποίο έχει βρεθεί να εκφράζεται σε πολλούς ιστούς με υψηλά επίπεδα έκφρασης σε νευρώνες. Εντοπίζεται σε υψηλά επίπεδα στους

πυρήνες όταν είναι ενεργή η μεταγραφή από την RNA πολυμεράση II. Εκτός αυτού, έχει βρεθεί να σχετίζεται με πολλά γονίδια που ρυθμίζουν ή σταθεροποιούν την συναπτογένεση (Bernard D. et al., 2010)

- **HOTAIR lncRNA**

Το HOTAIR αποτελεί ένα lncRNA το οποίο έχει εντοπιστεί να περιλαμβάνεται στο γονιδιακό τόπο του HOXC και αφού μεταγραφεί, στοχεύει στο σύμπλοκο πρωτεϊνών Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2). Το αποτέλεσμα αυτής της επιστράτευσης είναι η καταστολή της έκφρασης του HOXD γονιδιακού τόπου, το οποίο σχετίζεται με τα αναπτυξιακά πρότυπα. Το HOTAIR αποτελεί ένα από τα πρώτα παραδείγματα lncRNAs το οποίο βρέθηκε να έχει trans δράση. Επιπλέον το συγκεκριμένο έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται περίπου στο ¼ των ανθρώπινων καρκίνων του μαστού στρατολογώντας το PRC2 σε δεκάδες περιοχές του γονιδιώματος και προκαλώντας χρωματινικές τροποποιήσεις (Hung T. et Chang HY, 2010).

1.5.4 lncRNAs στο νευρικό σύστημα, σε νευρολογικές ασθένειες και τον καρκίνο

Τα long noncoding RNAs έχουν βρεθεί να εκφράζονται είτε ιστοειδικά, είτε σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια, είτε και σε συγκεκριμένες ασθένειες, γεγονός που τα καθιστά πιθανά σημαντικά μόρια θεραπευτικών στόχων.

- **ΚΑΡΚΙΝΟΣ**

Συγκεκριμένα, όσον αφορά στον καρκίνο, έχουν βρεθεί lncRNAs τα οποία έχουν δράση αντικαρκινική, καθώς και lncRNAs των οποίων η έκφραση επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και συνεπώς τη δημιουργία καρκινικών όγκων. Πιο αναλυτικά, στον καρκίνο του προστάτη έχουν βρεθεί 121 lncRNAs τα οποία έχουν διαφοροποιημένη έκφραση στα καρκινικά κύτταρα, ένα τέτοιο παράδειγμα lncRNA είναι το PCAT-1 το οποίο λειτουργεί σαν μεταγραφικός παράγοντας που καταστέλλει πολλά γονίδια και πιθανώς να συμβάλλει στην εξέλιξη του προστάτη (Prensner JR et al., 2011). Σε άλλη έρευνα εντοπίστηκαν 216 lncRNAs να προέρχονται από περιοχές υποκινητών γονιδίων κυτταρικού κύκλου. Αυτά τα RNAs εμφανίζουν περιοδική έκφραση σε σχέση με τον κυτταρικό κύκλο και διαφοροποιημένη έκφραση σε ανθρώπινους καρκίνους. Η έκφρασή τους φάνηκε να

ρυθμίζεται από συγκεκριμένα ογκογόνα ερεθίσματα, ή κατά τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων ή έπειτα από βλάβες του DNA (Hung T. et al., 2011). Επιπλέον, βρέθηκε ότι το lncRNA ANRIL είναι ικανό να καταστέλλει τη λειτουργία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Αυτό βρέθηκε να αλληλεπιδρά με το SUZ12, μία υπομονάδα του PRC2 (βλ. παραπάνω) και να καταστέλλει έτσι το p15 γονίδιο, γνωστό ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο (Kotake Y. et al., 2011). Εκτός της ογκογόνου δράσης έχουν εντοπιστεί και lncRNAs με ογκοκατασταλτική δράση όπως το GAS5 του οποίου η έκφραση μειώνεται ραγδαία σε κύτταρα από λευχαιμία και στην NHI3T3 καρκινική σειρά, ή το link-p21 RNA το οποίο στρατολογεί το hnRNP-K μεταγραφικό καταστολέα και τελικά οδηγεί σε απόπτωση και γονιδιακή αποσιώπηση (Gutschner et al. 2012).

- **ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ**

Όσον αφορά στο νευρικό σύστημα, έχει βρεθεί ότι η πλειοψηφία των lncRNAs που έχουν εντοπιστεί έως τώρα, εκφράζεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα με πολλά από αυτά να είναι συντηρημένα εξελικτικά. Περισσότερα από 200 lncRNAs από αυτά, βρέθηκαν να εκφράζονται στο αναπτυσσόμενο και ενήλικα εγκέφαλο ποντικού, τα οποία προέρχονται από γονιδιακούς τόπους κοντά σε γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που είναι σημαντικοί μεταγραφικοί παράγοντες με ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος (Qureshi IA et al., 2010). Από μία άλλη μελέτη (Mercer et al., 2010) βρέθηκε πως 169 lncRNAs ακολουθούν διαφορετική έκφραση κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων σε GABAεργικά κύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα, ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα, και μυελινοποιημένα κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, το Nkx2.2AS (βλ. παραπάνω) έχει βρεθεί ότι επάγει τη διαφοροποίηση προς ολιγοδενδροκύτταρα μέσω επαγωγικής ρύθμισης του *Nkx2.2* γονιδίου (Tochitani S, Hayashizaki Y 2008). Ένα άλλο lncRNA το *Evf1* (Embryonic Ventral Forebrain-1) εκφράζεται στο γονιδιακό τόπο του *Dlx6* το οποίο αποτελεί σημαντικό μεταγραφικό παράγοντα για την νευρογένεση στο πρόσθιο εγκέφαλο (Wang Y. et al., 2010). Τέλος, ένα άλλο παράδειγμα lncRNA που συμμετέχει στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος είναι το *Sox2OT* (*Sox2 Overlapping Transcript*) το οποίο μεταγράφεται από το γονιδιακό τόπο του *Sox2* γονιδίου που είναι ουσιαστικός μεταγραφικός παράγοντας απαραίτητος για τη διατήρηση της πολυδυναμικότητας των εμβρυϊκών και ενήλικων νευρικών βλαστικών κυττάρων. Το *Sox2OT* εκφράζεται σταθερά στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικού, ενώ έχει συγκεκριμένο μοτίβο έκφρασης στον ενήλικο εγκέφαλο και

δυναμική ρύθμιση κατά την ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος του ποντικού (Amaral PP et al., 2009).

- **ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ**

Πολλά lncRNAs έχουν εντοπιστεί να συμμετέχουν έμμεσα ή άμεσα σε πολλές νευρο-αναπτυξιακές, -εκφυλιστικές, -ανοσολογικές, -ογκολογικές, καθώς και ψυχιατρικές διαταραχές (Qureshi IA et al., 2010).

Συγκεκριμένα, για τις νευρο-αναπτυξιακές διαταραχές, έχουν βρεθεί να εμπλέκονται σχετικά με τη γονιδιακή αποτύπωση (genomic imprinting) σε σύνδρομα όπως το Prader-Willi και το Angelman (AS) (Koerner et al., 2009). Ενώ ο ρόλος τους ακόμα δεν είναι καλά μελετημένος σε σχέση με τα σύνδρομα αυτά, μπορεί να συμμετέχουν είτε έμμεσα προκαλώντας επιγενετικές τροποποιήσεις, είτε άμεσα ρυθμίζοντας την έκφραση σημαντικών γονιδίων. Επιπλέον, lncRNAs μπορεί να επιδρούν και στο fragile X σύνδρομο καθώς και στο fragile X tremor και ataxia που προκαλούνται από μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την FMR1 πρωτεΐνη. Το FMR4 είναι ένα lncRNA το οποίο μοιράζεται τον ίδιο υποκινητή με το παραπάνω γονίδιο και εκφράζεται αντιπαράλληλα (Khalil et al., 2008) και υπόκειται και αυτό σε αποσιώπηση όπως και το *fmr1* στους παραπάνω ασθενείς. Επιπρόσθετα, lncRNAs μπορεί να συμμετέχουν και σε περιστατικά εγκεφαλικών δυσμορφιών. Παραπάνω αναφέρθηκε η σχέση του *Sox2* γονιδίου με το Sox2OT lncRNA. Το πρώτο έχει συσχετιστεί με σύνδρομα όπως η μικροφθαλμία ή υποπλασία του οπτικού νεύρου, και έτσι συσχετίζεται έμμεσα με τις δυσμορφίες αυτές και το lncRNA το οποίο ρυθμίζει την Sox2 πρωτεΐνη (Amaral PP et al., 2009). Τέλος, πιθανώς lncRNAs να συσχετίζονται και με το σύνδρομο Down. Το NRON είναι ένα lncRNA το οποίο ρυθμίζει τη μετακίνηση του μεταγραφικού παράγοντα NFAT από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Σε πειραματικά μοντέλα έχει βρεθεί πως η μειωμένη λειτουργία της NFAT πρωτεΐνης οδηγεί σε συμπτώματα κοινά με αυτά του συνδρόμου Down (Arron et al., 2006).

Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες απασχολούν μεγάλο μέρος της επιστημονικής κοινότητας λόγω του μεγάλου ποσοστού ασθενών παγκοσμίως. Ακόμα και σε αυτό το εύρος ασθενειών, έχει εντοπιστεί ένας σημαντικός αριθμός lncRNAs. Αρχικά, για τη νόσο Alzheimer's είναι γνωστό ότι το ένζυμο BACE1 είναι αυτό που διασπά την APP πρωτεΐνη σε αμυλοειδικά β πεπτίδια, τα οποία στη συνέχεια σχηματίζουν τις αμυλοειδικές πλάκες στον εγκέφαλο των ασθενών με AD. Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν την έκφραση και λειτουργία

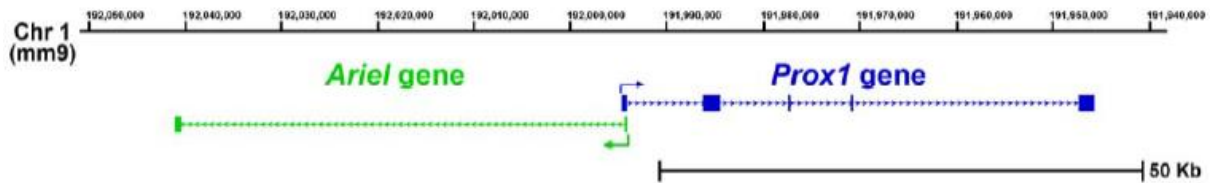
αυτού του ενζύμου δεν είναι ακόμα ξεκάθαροι, αλλά περιλαμβάνουν ένα lncRNA συντηρημένο μετάγραφο και εκφραζόμενο αντιπαράλληλα, το BACE1-AS που συσχετίζεται με την έκφραση του BACE1 (Faghihi MA et al.,2008). Επίσης, ένα άλλο lncRNA που συσχετίζεται με AD είναι το BC200 το οποίο παρουσιάζει διαφορετικά επίπεδα έκφρασης σε ασθενείς και φυσιολογικά άτομα. Αυξημένα επίπεδα αυτού βρέθηκαν σε περιοχές του εγκεφάλου που επηρεάζονται σε μεγαλύτερο βαθμό από τη νόσο όπως ο ιππόκαμπος ή η περιοχή Brodmann (Mus et al., 2007). Επιπλέον, ένα lncRNA μπορεί να εμπλέκεται και στην αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (amyotrophic lateral sclerosis, ALS). Μεταλλαγές στο FUS/TLS γονίδιο προκαλούν συμπτώματα ALS όπου η πρωτεΐνη του παραπάνω γονιδίου δρα σαν RNA binding πρωτεΐνη, η οποία όμως στρατολογείται από ένα lncRNA το οποίο μεταγράφεται από το γονιδιακό τόπο της κυκλίνης D1 και καταστέλλει την έκφρασή της (Wang et al.,2008). Τέλος, lncRNAs έχουν βρεθεί και στη νόσο του Huntington's (Benn et al.,2008) καθώς και στη σκλήρυνση κατά πλάκας (Abarategui and Krangel,2007) ενώ άλλα lncRNAs σχετίζονται και με τη σχιζοφρένεια, τη διπολική διαταραχή, την κατάθλιψη και άλλες ψυχιατρικές ασθένειες (Qureshi IA et al., 2010).

Με βάση τα παραπάνω, γίνεται κατανοητό για ποιο λόγο η ερευνητική κοινότητα δίνει όλο και μεγαλύτερη βαρύτητα στα μόρια που ονομάζονται lncRNAs καθώς έχουν πάψει πλέον να θεωρούνται απλώς ως γονιδιακός «θόρυβος». Διαπιστώνεται ότι εμπλέκονται σε πολύ σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες καθώς και ότι συμμετέχουν στην εξέλιξη πολλών ασθενειών.

1.5.5 ARIEL, ένα άγνωστο έως τώρα lncRNA στο νευρικό σύστημα - ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Με βάση τις γνωστές πληροφορίες για το *Prox1* και τη σημαντικότητά του στην νευρωνική διαφοροποίηση θέλαμε να ερευνήσουμε εάν το γονίδιο του *Prox1* σχετίζεται με κάποιο lncRNA. Από λεπτομερή ανάλυση της βιβλιογραφίας και κυρίως από πρόσφατες δημοσιεύσεις μαζικής ανάλυσης του μεταγραφώματος (genome-wide transcriptome analyses) ανθρώπινων και ποντικίστιων κυττάρων (Clark MB et al., 2012; Mercer et al. 2008; Mercer et al. 2010; Mattick et al.,2008; Guttman et al.,2011), διαπιστώσαμε την ύπαρξη αναφορών για την παρουσία ενός lncRNA σε στενή γειτνίαση με το γονίδιο του *Prox1*. Η βιοπληροφορική ανάλυση των δημοσιευμένων μεταγράφων έδειξε ότι αυτό το υποθετικό lncRNA (αρχικά

ονομάστηκε AK142161) εκφράζεται αντι-παράλληλα με το *Prox1*, έχοντας κοινή αλληλουχία 134 βάσεων στο 5' UTR (5' αμετάφραστη περιοχή).



Εικόνα 1.5: γονιδιακός τύπος του **prox1- Ariel** στο χρωμόσωμα 1 του ποντικού. Σχηματική απεικόνιση της βιοπληροφορικής ανάλυσης της γονιδιωματικής περιοχής των γονιδίων *Ariel-Prox1* στο χρωμόσωμα 1 όπου παρατηρείται να εκφράζεται προς τη μία κατεύθυνση το *Prox1* (μπλε χρώμα), ενώ προς την αντίθετη να εκφράζεται το *Ariel* (πράσινο χρώμα) έχοντας μία κοινή αλληλουχία στην 5' περιοχή και των δύο, πιθανή περιοχή αλληλεπίδρασής τους.

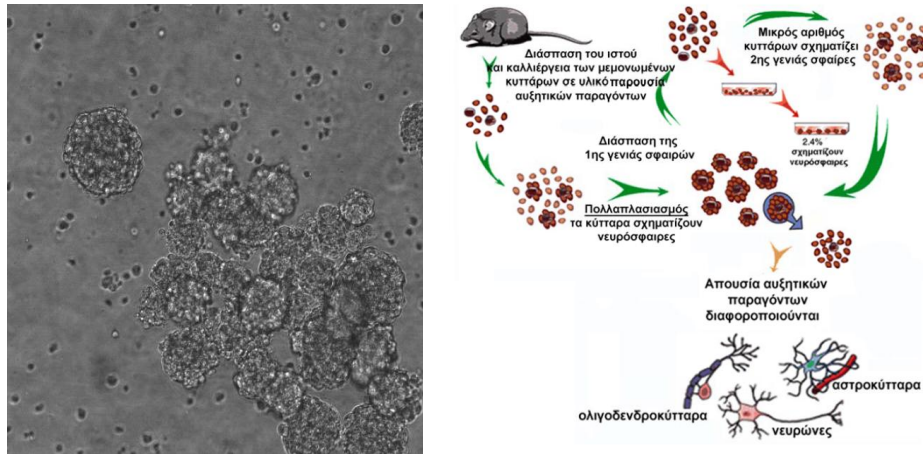
Βασιζόμενοι στη συσχέτιση του με το *Prox1* (*Prospero*: ο βασικός χαρακτήρας από το θεατρικό έργο «*Η Τρικομία*» του Σαίξπηρ) μετονομάσαμε αυτό το lncRNA σε «*Ariel*» (ένας ακόμη χαρακτήρας από το ίδιο θεατρικό έργο). Στόχος αυτής της εργασίας, είναι η μελέτη του συγκεκριμένου lncRNA στο νευρικό σύστημα του ποντικού. Έπειτα, γνωρίζοντας τη μεγάλη σημασία του *Prox1* στην νευρογένεση σκοπεύουμε να μελετήσουμε και την πιθανή τους αλληλεπίδραση .

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Καλλιέργεια νευρικών βλαστικών κυττάρων (νευρόσφαιρες)

Οι θηλυκές μητέρες-ποντίκια στελέχους Wistar γεννήθηκαν και ανατράφηκαν στο ΠΒΕΑΑ, υπό σταθερές συνθήκες διαβίωσης: η θερμοκρασία περιβάλλοντος διατηρούνταν συνεχώς στους 23-25°C, ενώ εξασφαλιζόνταν σταθεροί κύκλοι φωτισμού 12 ωρών (8:00-20:00 σε φως και 20:00-8:00 σε σκοτάδι). Έπιναν νερό βρύσης και έτρωγαν τροφή σε κύβους κατά βούληση. Στις μελέτες μας αναισθητοποιήθηκαν με αιθέρα και ως πειραματόζωα χρησιμοποιήθηκαν έμβρυα ποντικού.

Στην καλλιέργεια, ένα μονό νευρικό βλαστικό κύτταρο μπορεί να διαιρεθεί και να φτιάξει περισσότερα κύτταρα τα οποία όλα μαζί σχηματίζουν μια στρογγυλή, κοίλη δομή, γνωστή ως «νευρόσφαιρα». Οι νευρόσφαιρες (νευροσφαιρίδια) συνεχίζουν να μεγαλώνουν στην καλλιέργεια, και όταν μεγαλώσουν αρκετά, διαχωρίζονται σε μονά κύτταρα. Τα NBK προέρχονταν από τον τελεγκέφαλο ή από τον νωτιαίο μυελό εμβρύου ποντικού ηλικίας E14.5 και διατηρούνταν σαν καλλιέργειες νευρόσφαιρων σε ένα θρεπτικό μέσο χωρίς ορό [μείγμα 1:1 DMEM και F-12 με πενικιλίνη (100 units/ml, Invitrogen) και στρεπτομυκίνη (100 mg/ml, Invitrogen)], που περιείχε το συμπλήρωμα B-27 [B-27 supplement (1 ml/50 ml θρεπτικού μέσου, Invitrogen)], ινσουλίνη (20 mg/ml; Sigma), τον ανασυνδυασμένο ανθρώπινο βασικό αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών (bFGF 20 ng/ml; R&D Systems) και τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF 20 ng/ml; R&D Systems). Ύστερα από 5 έως 7 μέρες στην καλλιέργεια, οι επιπλεύουσες νευρόσφαιρες διαχωρίζονταν μεταξύ τους με θρυψινοποίηση και τα μονήρη κύτταρα αφήνονταν έως ότου να ξανασχηματίσουν σφαίρες τουλάχιστον τρεις φορές πριν την περαιτέρω χρησιμοποίησή τους. Οι μελέτες πολλαπλασιασμού των NBK πραγματοποιούνταν μετά από διάσπαση σε μονήρη κύτταρα, επίστρωση αυτών των κυττάρων σε καλυπτρίδες (coverslips) επικαλυμμένες με poly-L-lysine (πυκνότητα κυττάρων 6×10^4) σε πιάτα καλλιέργειας των 24 θέσεων (24-well plates), και περαιτέρω καλλιέργεια για δύο μέρες παρουσία EGF/bFGF. Για τη διαφοροποίηση των NBK, οι διαχωρισμένες νευρόσφαιρες τοποθετούνταν σε καλυπτρίδες επικαλυμμένες με poly-L-lysine (πυκνότητα κυττάρων 7×10^4) και διατηρούνταν σε καλλιέργεια για δύο ή τρεις μέρες απουσία αυξητικών παραγόντων. Από το σύστημα αυτό μετά από τρεις ημέρες διαφοροποίησης προέκυπταν 10% νευρώνες, 1-5% ολιγοδενδροκύτταρα, 60% αστροκύτταρα, ενώ το υπόλοιπο 25% των κυττάρων παρέμεναν πολυδύναμα NBK.



Εικόνα 2.1: Απεικόνιση νευρικών βλαστικών κυττάρων στη μορφή των νευρόσφαιρων καθώς και τρόπος απομόνωσης από έμβρυα ποντικού 14 ημερών (E14)

2.2 Απομόνωση ολικού RNA και σύνθεση cDNA

Για τη μελέτη της έκφρασης του μηνύματος RNA συγκεκριμένων γονιδίων σε εμβρυϊκό ιστό ποντικού και στα NBK ήταν απαραίτητη η απομόνωση του RNA και η σύνθεση του αντίστοιχου cDNA. Τα έμβρυα συλλέχθηκαν και ξεπλύθηκαν με PBS, ενώ τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε φλάσκες καλλιέργειας των 25 cm² (10⁶ κύτταρα ανά φλάσκα) και επώαστηκαν στις συνθήκες ανάπτυξής τους overnight. Στη συνέχεια, τα κύτταρα, μεταφέρθηκαν σε 15 ml falcons και φυγοκεντρήθηκαν στις 830 στροφές για 7 λεπτά. Ακολούθησε η απομόνωση ολικού RNA από το κυτταρικό ίζημα ή/και από τον εμβρυϊκό ιστό με τη βοήθεια του RNeasy Mini kit από την Qiagen (χρήση γουδιού σε συνδυασμό με υγρό άζωτο). Η τελική έκλυση του RNA πραγματοποιήθηκε σε 50μl RNase-free H₂O παρεχόμενο από το kit μετά από φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 1 λεπτό.

Μετά το τέλος της διαδικασίας απομόνωσης, 5 μl από κάθε δείγμα ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αгарόζης 1% [5x TBE (54 g Tris, 27.5 g Boric acid, 20 ml 0.5M EDTA pH 8.0, dH₂O μέχρι το 1lt), 6x DNA loading buffer (0.25% bromophenol blue, 40% (w/v) sucrose σε dH₂O)] για να επιβεβαιωθεί η παρουσία αέριου RNA. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του RNA με φωτομέτρηση στα 260 nm και ακολουθήθηκε κατεργασία των δειγμάτων με το ένζυμο RQ1 DNaseI (Promega) για την αποικοδόμηση υπολειμάτων DNA. Σε κάθε αντίδραση προστέθηκαν 10 μg δείγματος RNA, 10 μl DNaseI, 10x διάλυμα αντίδρασης και dH₂O μέχρι τελικό όγκο 40 μl και η κάθε αντίδραση επώαστηκε στους 37°C για 60 λεπτά. Ακολούθησε η προσθήκη 2 μl DNase Stop Solution για τον

τερματισμό της αντίδρασης και επώαση στους 65°C για 10 λεπτά για την απενεργοποίηση του ενζύμου.

Μετά την κατεργασία με τη DNase μετρήθηκε η συγκέντρωση του δείγματος RNA στα 260 nm και πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του cDNA με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής, με τη χρήση του ενζύμου ImPromII reverse transcriptase system από την Promega. Σε κάθε αντίδραση προστέθηκε αρχικά 1.1 µg RNA, 1 µl μείγματος τυχαίων εκκινητών (random primers) και dH₂O μέχρι τελικό όγκο 12µl, και μετά από επώαση 5 λεπτών στους 70°C για την αποδιάταξη του RNA η αντίδραση μεταφέρθηκε στον πάγο. Ακολούθησε προσθήκη 4 µl 5x διαλύματος αντίδρασης, 1 µl 10mM dNTPs, 2 µl MgCl₂ και επώαση 2 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, σε κάθε αντίδραση προστέθηκε 1 µl ενζύμου ImPromII και πραγματοποιήθηκε επώαση σε αυξανόμενες θερμοκρασίες: σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, στους 42°C για 60 λεπτά (σύνθεση cDNA) και στους 70°C για 15 λεπτά (απενεργοποίηση ενζύμου). Στη συνέχεια, το cDNA φυλάχθηκε στους -80°C.

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription PCR/RT-PCR) και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR)

Η απλή RT-PCR όσο και η real-time PCR πραγματοποιήθηκαν για το γονίδιο του *prox1*, *Ariel* και *Gapdh*. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές (primers) οι οποίοι σχεδιάστηκαν σύμφωνα με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του *Ariel*, καθώς και ήδη σχεδιασμένοι από την ερευνητική μας ομάδα εκκινητές για το *prox1* και *gapdh* (πίνακας 1).

ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ
5-RI-AK14-For	gagaGAATTC gactctctctctttctctctctctttctttc
3-RI-AK14-Rev	gagaGCGCCGC gggcggaagaaaactgtttattaataattc
5-RI-AK14-For2	gagaGAATTC acatacctctctctgcttgaggaccagctc
AK14-Ex1-2-For	cacgcggtgatgtcttactg
AK14-Ex1-2-Rev	aagacacagggcgggtgagc
AK14-Exon2-For	aatgcttctctcgcaccaat
AK14-Exon2-Rev	ctacggtaaacagccactca

Πίνακας 1: οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το γονίδιο Ariel.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την RT-PCR ήταν το εξής: το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Phusion DNA Polymerase (1μl – 2U/μl) (Finenzymes, Phusion, Finland) με 10μl 5X Phusion HF buffer (1x), 2μl 10mM dNTPs (400μM), 0.8μM τελική συγκέντρωση κάθε εκκινητή και 2μl cDNA ως υπόστρωμα σε τελικό όγκο 50μl. Οι συνθήκες ήταν οι εξής:

- Αποδιάταξη του ολικού δείγματος DNA στους 95 °C για 2min
 - Αποδιάταξη του DNA στους 95 °C για 45sec
 - Επαναδιάταξη των εκκινητών στους 57 °C για 45sec
 - Πολυμερισμός στους 72 °C για 2min
 - Τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10min
- } 39 κύκλοι

Τα προϊόντα αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και ταυτοποιήθηκαν με τον marker GeneRuller™ 1Kb DNA ladder (μέγεθος μορίων κλίμακας: 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 8, 10 kb - Fermentas, USA) .

Η αντίδραση της real-time PCR πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του SYBR GreenER kit της Invitrogen. Σε κάθε αντίδραση προστέθηκε 1.5 μl cDNA, 200 nM από τον ειδικό 5'- και 3'-εκκινητή, 10 μl από το SYBR Green supermix (περιέχει την πολυμεράση, το διάλυμα αντίδρασης και τα dNTPs) και dH₂O μέχρι τελικό όγκο 20 μl. Η αντίδραση έλαβε χώρα στο ειδικό μηχάνημα Chromo4 instrument της BIORAD στις εξής συνθήκες:

- Ενεργοποίηση της πολυμεράσης στους 50 °C για 2min
 - Αποδιάταξη του ολικού δείγματος DNA στους 95 °C για 2min
 - Αποδιάταξη του DNA στους 95 °C για 20''sec
 - Επαναδιάταξη των εκκινητών και πολυμερισμός στους 60 °C για 1min
 - Melting curve analysis από 60 °C έως 95 °C κάθε μισό βαθμό
- } 40 κύκλοι

Την αντίδραση συνόδευσε ανάλυση καμπύλης αποδιάταξης του προϊόντος (melting curve analysis) από τους 55°C στους 99°C με λήψη μετρήσεων κάθε 0.5°C. Η ανάλυση αυτή διαβεβαίωσε την παρουσία ενός μόνο προϊόντος στην αντίδραση.

2.4 Ανοσοφθορισμός σε πρωτογενή NBK εμβρύου ποντικού

Η τεχνική του ανοσοφθορισμού εφαρμόστηκε σε νευρικά βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από το ΚΝΣ (τελεγκέφαλο ή νωτιαίο μυελό) εμβρύου ποντικού με σκοπό τη μελέτη του φαινοτύπου κατά την υπερέκφραση του *Ariel*.

Ύστερα από 5 έως 7 μέρες στην καλλιέργεια, οι επιπλεύουσες νευρόσφαιρες διαχωρίστηκαν μεταξύ τους με θρυψινοποίηση και αφέθηκαν έως ότου να ξανασχηματιστούν σφαίρες. Τα πειράματα ανοσοφθορισμού για τον πολλαπλασιασμό των NBK πραγματοποιήθηκαν μετά από διάσπαση σε μονήρη κύτταρα, επίστρωση αυτών των κυττάρων σε καλυπτρίδες επικαλυμμένες με poly-L-lysine (πυκνότητα κυττάρων 6×10^4) σε πιάτα καλλιέργειας των 24 θέσεων (24-well plates), επώαση στους 37°C σε συνθήκες $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ για δύο ώρες, και περαιτέρω καλλιέργεια για δύο μέρες (48 ώρες) παρουσία EGF/bFGF. Στα πειράματα ανοσοφθορισμού για τη διαφοροποίηση των NBK, οι διαχωρισμένες νευρόσφαιρες τοποθετήθηκαν σε καλυπτρίδες επικαλυμμένες με poly-L-lysine (πυκνότητα κυττάρων 7×10^4), επώαστηκαν στους 37°C για δύο ώρες σε συνθήκες $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$, και διατηρήθηκαν σε καλλιέργεια για τρεις μέρες (72 ώρες) απουσία αυξητικών παραγόντων. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού: τα coverslips μεταφέρθηκαν με τη βοήθεια λαβίδας σε τρυβλίο Petri πάνω σε parafilm, ξεπλύθηκαν με 1x PBS, τοποθετήθηκαν για 20min σε 4% PFA για να μονιμοποιηθούν τα κύτταρα, ξεπλύθηκαν ξανά τρεις φορές με 1x PBS, τοποθετήθηκαν στο blocking buffer (5% ορός, 0,1% Triton X-100, 1x PBS) για 1 ώρα, στη συνέχεια επώαστηκαν overnight στους 4°C , παρουσία ειδικών πρωτογενών αντισωμάτων τα οποία είναι αραιωμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα (1% ορός, 0,1% Triton X-100, 1x PBS), πλύθηκαν με 1x PBS επί τρεις φορές, τοποθετήθηκαν στο ίδιο διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος για 1.30 ώρα στο σκοτάδι, επώαστηκαν για 10min με DAPI, πλύθηκαν με επί τρεις φορές 1x PBS, μία φορά με H_2O και τέλος μονιμοποιήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα χρησιμοποιώντας DAKO ή Mowiol, με την επιφάνεια των κυττάρων να εφάπτεται στην πλάκα. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν με μικροσκόπιο φθορισμού ή με συν-εστιακό μικροσκόπιο με εστίαση x20 και x40 φορές. Τα πρωτογενή και τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν γενικά στα πειράματα ανοσοφθορισμού φαίνονται στους παρακάτω πίνακες:

Πρωτογενές αντίσωμα	Δευτερογενές αντίσωμα
rabbit anti-Prox1, πολυκλωνικό (ReliaTech), 1/150 αραιώση	donkey anti-rabbit συζευγμένο με AlexaFluor 488 (Molecular Probes), 1/ 300 αραιώση
rat anti-BrdU, μονοκλωνικό (Biocompare),	donkey anti-mouse συζευγμένο με

1/50 αραιώση	AlexaFluor 488 (Molecular Probes), 1/ 300 αραιώση
mouse anti-Nestin, μονοκλωνικό (Chemicon), 1/100 αραιώση	donkey anti-rabbit συζευγμένο με AlexaFluor 568 (Molecular Probes), 1/ 300 αραιώση
mouse anti-βIII tubulin (Tuj-1), μονοκλωνικό (Covance, USA), 1/500 αραιώση	donkey anti-mouse συζευγμένο με AlexaFluor 568 (Molecular Probes), 1/ 300 αραιώση
mouse anti-GFAP, μονοκλωνικό (Sigma), 1/800 αραιώση	

Πίνακας 2: πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν

2.5 Κατασκευή-κλωνοποίηση πλασμιδιακών φορέων

Για τη δημιουργία των constructs που φέρουν το Ariel καθώς και το τμήμα της 5' αμετάφραστης περιοχής του *proxl*, χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα οι πλασμιδιακοί φορείς pENTR-D-TOPO και pGL3 promoter vector (5010kb). Επίσης, το Ariel κλωνοποιήθηκε και στο πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1.

Για την κατασκευή του φορέα pENTR με το ένθεμα Ariel, χρειάστηκε να υποβληθούν και τα δύο σε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *SacII* στις ίδιες συνθήκες. Έπειτα ακολούθησε η αντίδραση της λιγάσης (Roche, Germany), συνολικού όγκου 10μl μεταξύ των ενθεμάτων και του φορέα. Τα δείγματα αρχικά τοποθετήθηκαν στους 45°C για 5 min, στη συνέχεια εισήχθη σε αυτά το ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης, το ένζυμο και έπειτα τοποθετήθηκαν στους 4°C επί δεκαεξαώρου. Στη συνέχεια τα προϊόντα της αντίδρασης λιγάσης χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων *E.coli* του στελέχους JM109. Κατά το μετασχηματισμό τα προϊόντα της αντίδρασης λιγάσης τοποθετούνται μαζί με τα κύτταρα και αφήνονται στον πάγο για 30min για να αυξηθεί η συγκέντρωση του DNA περιμετρικά του κυττάρου. Έπειτα τα δείγματα υφίστανται heat-shock στους 42°C για 2min, έτσι ώστε το επιθυμητό DNA να διαπεράσει την ημιπερατή μεμβράνη των βακτηριακών κυττάρων ώστε να επέλθει ο μετασχηματισμός. Μετά το heat-shock προστίθεται στα κύτταρα 1ml υγρό θρεπτικό υλικό **Luria-Bertani** (LB, Sigma Missouri, USA) και τοποθετούνται για 1,5 ώρα στους 37°C επί συνεχή κίνηση, ώστε τα βακτηριακά κύτταρα να ανακάμψουν από τις ακραίες συνθήκες και να μπορέσουν να πολλαπλασιαστούν. Ύστερα φυγοκεντρείται το κυτταρικό διάλυμα για 1min στις 13000 rpm έτσι ώστε να κατακρημνιστούν τα κύτταρα. Τέλος επαναδιαλύεται το ίζημα σε 100μl υγρό LB και επιστρώνονται σε τριβλία petri με στερεό θρεπτικό υλικό LB (Fluka Biochemica, Switzerland) και κάποιο αντιβιοτικό επιλογής για να είναι εφικτή η επιλογή των κλώνων που φέρουν το επιθυμητό construct. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το αντιβιοτικό ήταν

καναμυκίνη (Sigma, USA) επειδή ο φορέας φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη. Τα τριβλία αφήνονται επί δεκαεξάωρου στους 37°C. Μετά τον μετασχηματισμό επιλέγονται οι αποικίες που αναπτύχθηκαν παρουσία του αντιβιοτικού και καλλιεργούνται σε υγρό LB και καναμυκίνη σε τελικό όγκο 3ml η κάθε μία επί δεκαεξάωρου στους 37°C επί συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια γίνεται εκχύλιση από κάθε βακτηριακή καλλιέργεια των construct με το Qiaprep miniprep kit (Qiagen).

Οι κλώνοι με το σωστό αποτέλεσμα πέψης επανακαλλιεργούνται σε υγρό LB και αμπικιλίνη σε τελικό όγκο 100ml στους 37°C επί συνεχή ανάδευση. Έπειτα γίνεται εκχύλιση των επιθυμητών construct από κάθε βακτηριακή καλλιέργεια με το Qiagen plasmid midi kit (Qiagen) και στέλνονται για αλληλούχιση (Biogenomica).

Για την κατασκευή του κλώνου pGL3 με το ένθεμα της 5'αμετάφραστης περιοχής του prox1 ακολούθησε η ίδια διαδικασία, με τη διαφορά ότι τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα NcoI και HindIII, καθώς και ότι το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αμπικιλίνη. Όμοια για το φορέα pcDNA3.1, χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα XhoI και NotI, με γονίδιο ανθεκτικότητας την αμπικιλίνη.

2.6 Διαμόλυνση (CaCl₂ transfection) κυτταρικής σειράς Neuro2A

Η κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος ποντικού Neuro 2A (N2A - νευρικά κύτταρα από νευροβλάστωμα εγκεφάλου ποντικού – μορφολογία αμοιβαδοειδών βλαστικών κυττάρων, προσκόλληση στο υπόστρωμα) καλλιεργήθηκε για δύο μέρες στους 37°C παρουσία θρεπτικού υλικού το οποίο περιείχε 88% DMEM (3,7g/l NaHCO₃, 1g/l D-glucose, w/o L-Glutamine, low endotoxin, biochrome AG), 10% FBS (biochrome AG), 1% pen/strep (Gibco) και 1% L-Glutamin (Gibco). Το θρεπτικό υλικό αλλάχθηκε στην καλλιέργεια και προστέθηκε νέο, σε τέτοια ποσότητα που να αποτελούσε τα 2/3 του συνολικού τελικού όγκου του μείγματος. Για τη διαδικασία της διαμόλυνσης ακολούθησαν τα εξής βήματα: α) το θρεπτικό υλικό των κυττάρων αντικαταστάθηκε με φρέσκο υλικό 2 ώρες πριν τη διαμόλυνση β) για κάθε well, το προς διαμόλυνση πλασμιδιακό DNA, το οποίο απομονώθηκε σε μεγάλη κλίμακα (Plasmid Midi kit-QIAGEN) ύστερα από μετασχηματισμό (transformation) χημικά δεκτικών κυττάρων *E.coli* (στελέχη JM109 και stable2), αναμείχτηκε με 14 μl διαλύματος 2M CaCl₂ και dH₂O μέχρι τελικό όγκο 111 μl γ) το μείγμα του DNA προστέθηκε σταγόνα-σταγόνα σε 111 μl διαλύματος 2x HBS pH 7.1 [50mM HEPES pH 7.1 (Sigma), 280mM NaCl (Carlo Erba), 1.5mM Na₂HPO₄ (Riedel-de Haen)] και επώαστηκε 40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου δ) ακολούθως, το μείγμα διαμόλυνσης προστέθηκε σταδιακά σε ολόκληρη την

επιφάνεια κάθε well και τα κύτταρα επώαστηκαν overnight στις συνθήκες ανάπτυξής τους, ώστε να προσλάβουν το διαμολυσμένο DNA ε) την επόμενη ημέρα, το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με φρέσκο υλικό λόγω της τοξικότητας του HBS, και τα κύτταρα επώαστηκαν για ακόμα 24 ώρες πριν υποβληθούν στη δοκιμασία του ανοσοφθορισμού (βλ. 3.6.) για τον έλεγχο ορθότητας του πλασμιδιακού DNA.

2.7 Μέθοδος λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης

Για τη μέθοδο της λουσιφεράσης τα κύτταρα N2A καλλιεργούνται σε 12άρια-well πιάτα, σε τελικό όγκο καλλιέργειας και θρεπτικού 1ml στο καθένα πιάτο. Αφού πραγματοποιηθεί η διαμόλυνση των κυττάρων όπως αναφέρθηκε πιο πάνω μετά από δύο μέρες πραγματοποιείται η διαδικασία της μεθόδου της λουσιφεράσης. Αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από τις κυτταρικές καλλιέργειες N2A και ξεπλένονται με 1x PBS δύο φορές και στη συνέχεια προστίθεται 80μl 1x Report Lysis Buffer (RLB) (promega) και τα κύτταρα συλλέγονται με scraper και τοποθετούνται σε erpendorfs. Στη συνέχεια πραγματοποιείται γρήγορη ανάδευση των κυττάρων (vortex) για 5sec και παραμονή τους σε θερμοκρασία δωματίου για 7min. Η τελευταία διαδικασία επαναλαμβάνεται για ακόμα δύο φορές. Έπεται φυγοκέντριση για 10min στις 13000rpm στους 4°C, συλλογή του υπερκείμενου και μεταφορά σε νέο erpendorf. Έπειτα πραγματοποιείται η μέθοδος της λουσιφεράσης όπου χρησιμοποιούνται από κάθε δείγμα 20μl κυτταρικού εκχυλίσματος και 100μl διάλυμα υποστρώματος λουσιφεράσης. Το διάλυμα υποστρώματος λουσιφεράσης έχει προετοιμαστεί νωρίτερα και αποτελείται από 20mM Tris PH8 (Carlo Erba), 2,67mM MgSO₄, 0,1mM EDTA, 33,3mM DTT (Biochemica), 270μM Co enzyme-A (sigma), 470μM Luciferine (promega), 530μM ATP (sigma), dH₂O. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης μετριέται στο λουσιφερόμετρο σε μονάδες RLU. Ύστερα από τη μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης πραγματοποιείται η διαδικασία μέτρησης έκφρασης της β-γαλακτοσιδάσης όπου με αυτό τον τρόπο πιστοποιείται η επιτυχία της διαμόλυνσης. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης για κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται 3μl 100x διάλυμα Mg, 201μl 0.1 sodium phosphate (pH 7,5), 30μl κυτταρικού εκχυλίσματος και 66μl 1x ONPG που είναι και το υπόστρωμα της β-γαλακτοσιδάσης. Δημιουργείται πάντα και ένα δείγμα ελέγχου το οποίο περιέχει όλα τα διαλύματα της αντίδρασης εκτός από το κυτταρικό εκχύλισμα. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στους 37°C μέχρι να αρχίσουν να παίρνουν κίτρινο χρώμα. Μόλις τα δείγματα αρχίζουν να παίρνουν κίτρινο χρώμα τερματίζεται η αντίδραση με την προσθήκη 500μl 1M Na₂CO₃. Τέλος μετριέται η απορρόφηση για κάθε δείγμα στα 420nm στο

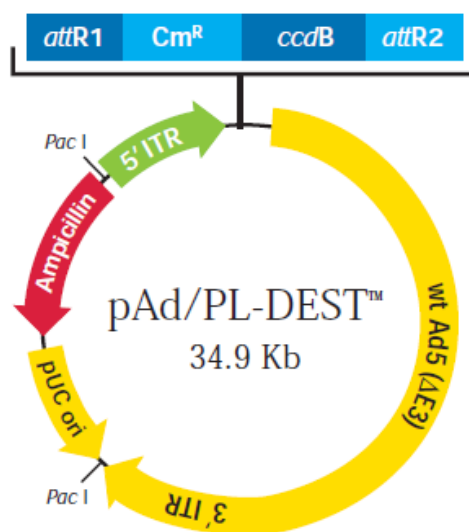
φωτόμετρο. Η μέτρηση αρχικά ρυθμίζεται βάση της μηδενικής τιμής του δείγματος ελέγχου. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας της λουσιφεράσης προκύπτει από το λόγο των μονάδων της ενεργότητας της λουσιφεράσης (RLU) προς την απορρόφηση των ίδιων δειγμάτων για την β-gal.

2.8 Μελέτες υπερέκφρασης του Ariel σε NBK εμβρύου ποντικού

Για τις μελέτες υπερέκφρασης του Ariel στα NBK χρειάστηκε να κατασκευαστεί αδενοϊός που θα το εκφράζει. Χρησιμοποιήθηκε το ViraPower™ Adenoviral Expression System εγχειρίδιο της Invitrogen .

Αρχικά, παρέχεται ο πλασμιδιακός φορέας pAd/PL-DEST ο οποίος περιλαμβάνει τα εξής στοιχεία στην αλληλουχία του:

- Τις αλληλουχίες ανθρώπινου αδενοϊού τύπου 5 που κωδικοποιούν για γονίδια και στοιχεία απαραίτητα για το σωστό «πακετάρισμα» και παραγωγή του αδενοϊού (Left and Right ITRs, encapsidation signal sequence, late genes) (Hitt et al.,1999;Russell,2000).
- Δύο περιοχές ανασυνδυασμού attR1 και attR2 για ανασυνδυασμό κατά την κλωνοποίηση του DNA που έχει τοποθετηθεί από τον κλώνο εισόδου “entry clone”
- Γονίδιο ανθεκτικότητας στη χλωραμφαινικόλη και στην αμπικιλίνη
- pUC για υψηλά επίπεδα αντιγραφής και διατήρησης στο πλασμίδιο από το E. Coli.



Εικόνα 2.2: Σχηματική απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδιακού φορέα που χρησιμοποιείται ως φορέας έκφρασης (destination vector).

Τα βήματα που ακολουθούνται έχουν για αρχή την κλωνοποίηση του γονιδίου-στόχου στον κλώνο εισόδου. Έπειτα, με αντίδραση LR ανασυνδυασμού μεταξύ του κλώνου εισόδου και του κλώνου έκφρασης κατασκευάζεται ο κλώνος προορισμού που πλέον περιλαμβάνει το γονίδιο-στόχο. Στη συνέχεια, ο κλώνος αυτός υπόκειται σε πέψη με το ένζυμο PacI με στόχο να σχηματίσει μονόκλωνη αλυσίδα με άκρα τα ITRs. Τέλος, με αυτό διαμολύνεται η κυτταρική σειρά HEK293A για να παραχθεί το πρώτο αδενοϊκό stock. Η κυτταρική αυτή σειρά εκφράζει σταθερά τις E1 πρωτεΐνες (E1α και E1β) που απαιτούνται για την παραγωγή του αδενοϊού από τα κύτταρα.

Συγκεκριμένα, για την κατασκευή του κλώνου εισόδου: χρησιμοποιούμε τον entry clone (50-150 ng/reaction) (στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι ο φορέας που περιλαμβάνει ήδη το Arie1), μαζί με τον destination vector (300ng/reaction) σε διάλυμα TE pH 8.0 ώστε ο συνολικός όγκος να φτάσει τα 8 μl. Έπειτα προσθέτουμε 2μl LR clonase II ένζυμο, με καλή ανάδευση. Η αντίδραση επωάζεται για 1 ώρα στους 25°C. έπειτα προστίθεται 1μl πρωτεϊνάσης K και επωάζεται για 10' στους 37°C. Έπειτα ακολουθεί η διαδικασία μετασχηματισμού σε βακτήρια (competent cells, JM109). Οι σωστές αποικίες θα είναι αυτές που έχουν ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη και όχι σε χλωραμφαινικόλη καθώς έχει αφαιρεθεί από το destination vector, αφού αντικαταστάθηκε από το γονίδιο-στόχο. Επομένως, επιλέγονται έπειτα από καλλιέργεια στα δυο αντιβιοτικά όσες είναι θετικές και ακολουθεί απομόνωση με mini και midi prep όπως έχει προαναφερθεί.

Έπειτα, ακολουθεί πέψη με το ένζυμο PacI του φορέα που πλέον έχει το επιθυμητό ένθεμα. Για επιβεβαίωση της πέψης, ελέγχουμε μικρή ποσότητα με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε 1% gel αгарόζης. Στη συνέχεια, διαμολύνονται με τη μέθοδο CaCl₂ (βλ. παραπάνω) τα κύτταρα HEK293A με το παραπάνω γραμμικό φορέα με στόχο την παρασκευή αδενοϊού που περιέχει και το Arie1. Το ένθεμα αυτό περιλαμβάνει και την αλληλουχία του γονιδίου GFP, επομένως τα θετικά κύτταρα (που θα έχουν διαμολυνθεί) θα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο φθορισμού με πράσινο χρώμα. Έπειτα από ένα χρονικό διάστημα περίπου 10 ημερών τα κύτταρα διαρρηγνύονται και στο υπερκείμενο έχει παραχθεί ο επιθυμητός αδενοϊός.

Στη συνέχεια, μαζεύουμε το υπερκείμενο και το επωάζουμε για 30' στους -80°C και έπειτα στους 37°C για 15'. Τα βήματα αυτά επαναλαμβάνονται για 3 φορές. Στο τέλος, διαμολύνονται νέα HEK293A με αυτό το υπερκείμενο, όπου ακολουθεί πάλι η ίδια διαδικασία έως να περισυλλεχθεί το νέο υπερκείμενο. Αυτό πλέον μπορεί να φυλαχθεί στους -80°C ή να χρησιμοποιηθεί για επιμόλυνση επιθυμητών κυτταροκαλλιεργειών που θέλουμε να

υπερεκφράζουν το Ariel (εν προκειμένω τα NBK).

Σε όλη την παραπάνω διαδικασία, απαιτούνται μέτρα σύμφωνα με το Biosafety Level 2 καθώς υπάρχει ο κίνδυνος διαμόλυνσης ανθρώπινων κυττάρων.

2.8 Western Blot μέθοδος

Κατά το western blot πραγματοποιείται SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση (10%) ακρυλαμίδιο, 0,33M Tris pH8,8 ,0,1M SDS, 0,1 ammonium persulfate, TEMED) 20μl δείγματος για 1 ώρα στα 130V. Στη συνέχεια γίνεται μεταφορά των αποτυπομάτων του πηκτώματος σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Amersham) για 1 ώρα στα 350mA. Ο marker που χρησιμοποιείται είναι ο protein marker της Sigma .Έπειτα, πραγματοποιείται blocking για 1 ώρα με τοποθέτηση της μεμβράνης σε blocking buffer υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια, τοποθετείται το πρωτογενές αντίσωμα για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση παρουσία διαλύματος (1% γάλα σκόνη regilait σε 1xTBS-T.). Το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν rabbit- a- -prox1 1:200 αραίωση. Ακολουθεί πλύση της μεμβράνης με 1x TBS-T για 5min επί τρεις φορές και τοποθέτηση δευτερογενούς αντισώματος για 1 ώρα. Το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν a-rabbit με αραίωση 1:5000. Ακολουθεί πλύση της μεμβράνης με 1x TBS-T για 5min επί τρεις φορές και ανίχνευση του δευτερογενούς αντισώματος χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ECL (Perkim Elmer) για 1min και έκθεση της μεμβράνης σε φωτογραφικό film.

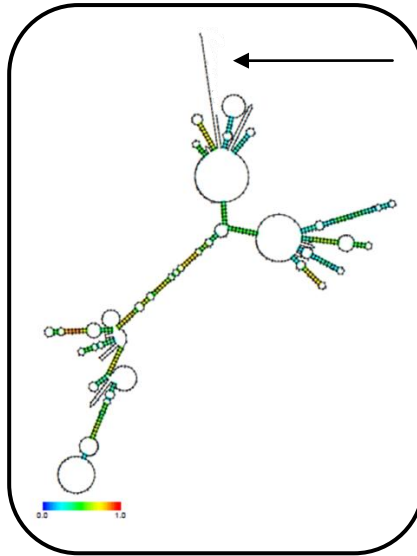
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατά την ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος, ο καθορισμός της ταυτότητας των διαφορετικών κυτταρικών τύπων βασίζεται στα ρυθμιστικά δίκτυα γονιδιακής έκφρασης. Έτσι, διάφοροι ρυθμιστικοί παράγοντες συνεργούν ώστε να διαφοροποιείται το κύτταρο σε συγκεκριμένο τύπο, καταστέλλοντας τα υπόλοιπα μονοπάτια που θα οδηγούσαν σε διαφορετική μοίρα. Μελετώντας το πολύπλοκο αυτό δίκτυο, η ερευνητική μας ομάδα πρόσφατα ανακάλυψε τον ρόλο του *Prox1* στη ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ πολλαπλασιασμού και πολυδυναμικότητας των NBK κατά την ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος και κατά την εξέλιξη του καρκίνου (Kaltezioti 2010; Elkouris 2011; Foskolu 2012). Στη συνέχεια, θελήσαμε να μελετήσουμε το *Ariel*, που με βάση τη γενετική του θέση (βλ. «εισαγωγή, στόχος εργασίας») πιθανώς να συσχετίζεται με το *Prox1*. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται η ακριβής αλληλουχία του *Ariel*.

```
gactctctctct ctttctctctct ctcttttcttt tcaactctctctc tctctctctccc  
cctctctcttcttctcttgcgg gcagagaaga aaccacacgcgc cgcacgcgcggt  
gatgtcttac tgggtgataattggcccaggg gtcggttatga acatacctctt  
ctctgcttga ggaccagctc agcccctcatgtccccgaaa tgctttgcaa  
agacaccgct caccgccttg tgtcttcttt tgagctctggagcactgttg  
attgatcatc cgtgtaagcc aatcctatac aagtccacc tgtttaacca  
ggtcaaacgc aatgccttc cgtgttctgt cagaagagtgc catgtgcccgc  
gaggggtgaggatcaatgctt ctctcgcacc aattaagacc actcttttgac  
tgctcacagc aatgttccccgaacagtgga tttggaggag gggttctgct  
tttctcagac cgtgagagggc atggatcacagcatctgtag ctgagtggcg  
tgttaccgta ggaagagaga agcctctctt gatacttatgtgtagcttta  
gctgtagatct gtcgcgtag tctcaccagc caaactgatc  
tcctcacatacagcatctct gctcccacgc gtgaggagca gcgagggcagg  
aagagctgcc taggcttgctgtggcacgccc tccctgggtg ctctatctta  
ccttggtgca gccgtgctat agatgaccctcctatgtct aagcagtggt  
gaaaatattg ttttagttca atatatagcc atctctaacgaaatctgtgc  
tgtttttagca gaattattaa taaacagttt tctttccgcc c
```

Πίνακας 3.1: αλληλουχία του *Ariel*, μεγέθους 832 bp

Ακολούθησε, με τη χρήση συγκεκριμένων υπολογιστικών προγραμμάτων, η κατασκευή της πιθανούς δευτεροταγούς δομής του *Ariel*. Παρατηρείται τμήμα της αλληλουχίας η οποία είναι κοινή με το *Prox1*, να είναι μονόκλωνη αλυσίδα, γεγονός που την καθιστά πιθανή περιοχή πρόσδεσης (βέλος, εικόνα 3.2)



Εικόνα 3.2 : Δευτεροταγής δομή του long non coding RNA, Ariel. Στην παραπάνω αναπαράσταση της πιθανής δευτεροταγούς δομής του RNA φαίνεται με χρωματική απεικόνιση η ισχύς των δεσμών στις δίκλωνες αλυσίδες. Με το βέλος απεικονίζεται το τμήμα που αποτελεί μονόκλωνη αλυσίδα, το οποίο είναι και το 5' τμήμα κοινής αλληλουχίας με το *Prox1* (το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε : <http://www.genebee.msu.su/cgi-bin/nph-rna2.pl>).

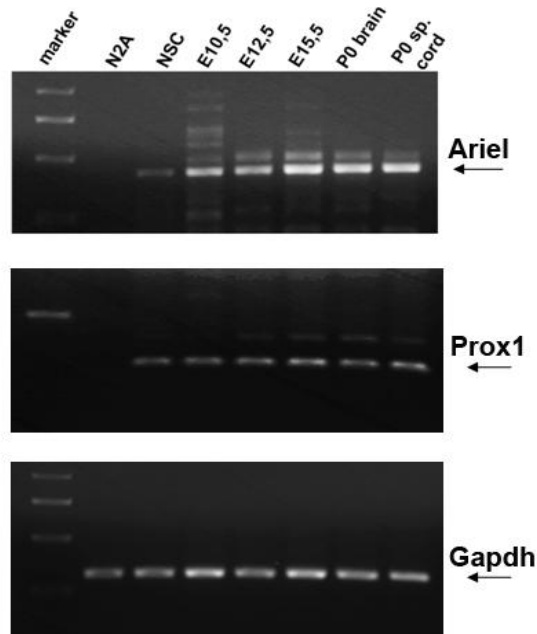
Λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις παρατηρήσεις στη συνέχεια θέλαμε να μελετήσουμε την έκφραση αυτού του lncRNA στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του νευρικού συστήματος, καθώς και τη λειτουργική συσχέτιση με την έκφραση του γονιδίου *Prox1*.

3.1 Πρότυπο έκφρασης του Ariel στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα του ποντικού

Αρχικά θέλαμε να μελετήσουμε την έκφραση του *Ariel* στο νευρικό σύστημα, και πιο συγκεκριμένα αν εκφράζεται ή όχι στα διαφορετικά εμβρυϊκά αναπτυξιακά στάδια, σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, καθώς και αν εντοπίζεται σε πρωτογενή νευρικά βλαστικά κύτταρα (NBK).

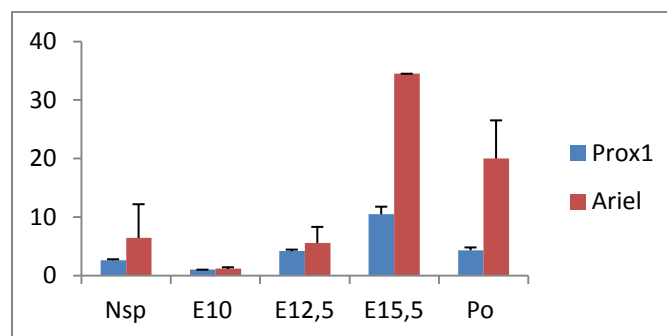
Αρχικά, έγινε απομόνωση πρωτογενών βλαστικών κυττάρων από νωτιαίο μυελό εμβρύου ποντικού 14^{ov} ημερών (E14). Επίσης, απομονώσαμε ιστό από διαδοχικές αναπτυξιακές ηλικίες ποντικού 10 ημερών (E10,5), 12 ημερών (E12,5) και 15 ημερών (E15,5) αντιστοίχως, καθώς και σε νεογέννητα ποντίκια (P0). Ακολούθησε απομόνωση του mRNA και παράχθηκε cDNA με RT πολυμεράση (reverse transcriptase). Στη συνέχεια, με τους κατάλληλους εκκινητές εφαρμόστηκε PCR ανάλυση (βλ. «υλικά και μέθοδοι»). Η ίδια

πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε και σε σταθερή κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος ποντικού (N2A). Συγκριτικά, για κάθε δείγμα, εφαρμόστηκε PCR για το γονίδιο *Prox1* καθώς και για το *Gapdh* ως house keeping gene. Όλα τα αποτελέσματα ταυτοποιήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης (Εικόνα 3.3)



Εικόνα 3.3: Το *Ariel* εκφράζεται στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια εμβρύου ποντικού. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της PCR, το *Ariel* εκφράζεται σε μικρό βαθμό στα νευρικά βλαστικά κύτταρα, ενώ αυξημένα επίπεδα έκφρασης παρουσιάζονται στα τελευταία αναπτυξιακά στάδια κατά την εμβρυογένεση του ποντικού. Επίσης, δεν εκφράζεται καθόλου στα κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού. Στα ίδια δείγματα παρατηρείται και η έκφραση των *Prox1* και *Gapdh* χωρίς σημαντικές μεταβολές.

Στη συνέχεια, έγιναν πειράματα και με PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR) για να διαπιστωθεί η σχέση έκφρασης αυτών των γονιδίων.

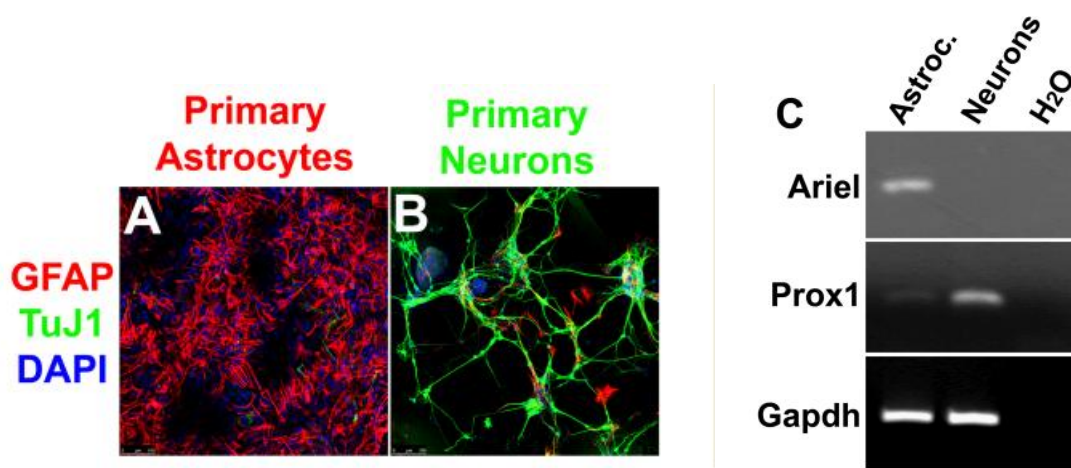


Εικόνα 3.4: Σύγκριση της έκφρασης των γονιδίων *Prox1* και *Ariel* κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος (Κ.Ν.Σ.). Στο ραβδόγραμμα φαίνονται τα

αποτελέσματα της Real-time PCR για δείγματα Κ.Ν.Σ. από διαφορετικές ηλικίες εμβρύων ποντικού καθώς και NBK. Παρουσιάζεται η σχετική έκφραση για τα δύο γονίδια *Prox1*, *Ariel* ενώ γονίδιο αναφοράς ήταν το *Gapdh*. Το *Prox1* έχει αυξημένη έκφραση από την 12^η ημέρα ανάπτυξης του εμβρύου ποντικού, καθώς κυρίως τότε ξεκινά η νευρογένεση. Παράλληλα, στην 15^η μέρα εμφανίζεται έντονη αύξηση και των επιπέδων του *Ariel*, γεγονός που συμπίπτει με την αστρογλιογένεση (Yuasa S., 2001; Rowitch DH, 2004).

Από το παραπάνω πείραμα συμπεραίνεται ότι το συγκεκριμένο long non coding RNA ακολουθεί ένα πρότυπο έκφρασης που φαίνεται να συμπίπτει με την αστρογλιογένεση στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

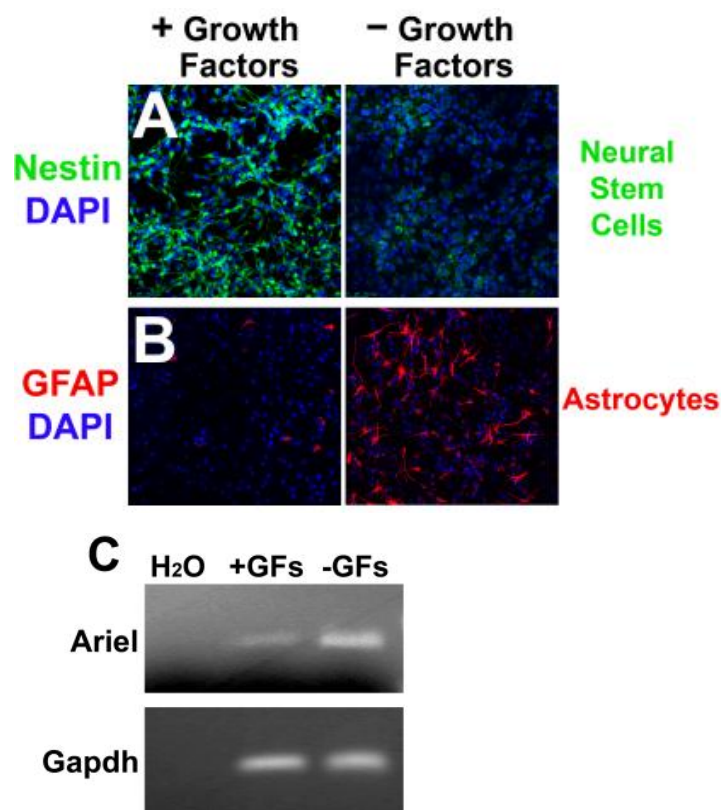
Ακολούθησε μελέτη για τα ενδογενή επίπεδα έκφρασης του RNA του *Ariel*, σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους του νευρικού συστήματος. Έτσι, έγινε απομόνωση εγκεφάλων από Ρο νεογνήνα ποντίκια με στόχο την καλλιέργεια πρώιμων αστροκυττάρων, καθώς επίσης και από E16 έμβρυα ποντικού με σκοπό την καλλιέργεια πρώιμων νευρώνων. Μετά από απομόνωση RNA και χρήση των κατάλληλων εκκινήτων για το *Ariel*, έγινε PCR και στους δύο τύπους κυττάρων. Για να ελέγξουμε την καθαρότητα αυτών των καλλιιεργειών, έγιναν και πειράματα ανοσοφθορισμού σε αυτού του τύπου τα κύτταρα χρησιμοποιώντας κατάλληλους δείκτες (markers) για επιβεβαίωση των κυτταρικών τύπων (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5: Το *Ariel* φαίνεται να εκφράζεται έντονα στα αστροκύτταρα και όχι στους νευρώνες. Σε πρωτογενείς καλλιέργειες αστροκυττάρων παρατηρούμε αυξημένα επίπεδα του *Ariel* σε σχέση με το *Prox1* (A και C), ενώ το αντίθετο φαίνεται να ισχύει για τους νευρώνες (B και C). Στα πειράματα ανοσοφθορισμού χρησιμοποιούνται συγκεκριμένοι δείκτες για αστροκύτταρα (GFAP) (βλ.Α), για νευρώνες (TuJ1) (βλ.Β) και για τους πυρήνες (DAPI).

Επιβεβαιώνεται από τα παραπάνω ότι υπάρχει συσχέτιση του *Ariel* με τα αστροκύτταρα, γεγονός που συμπίπτει με τη μέχρι τώρα υπόθεση. Σημαντικό επίσης συμπέρασμα είναι ότι δεν εκφράζεται στους νευρώνες, επομένως δε σχετίζεται με μηχανισμούς νευρογένεσης.

Επιπλέον, έγιναν παρόμοιες μελέτες σε νευρικά βλαστικά κύτταρα (NBK) τα οποία καλλιεργήθηκαν παρουσία και απουσία αυξητικών παραγόντων. Στην πρώτη περίπτωση έχουν τη δυνατότητα αυτό-ανανέωσης και πολλαπλασιασμού (εικόνα 3.6A), ενώ στη δεύτερη διαφοροποιούνται κυρίως σε αστροκύτταρα (εικόνα 3.6.B).



Εικόνα 3.6 : Το *Ariel* εκφράζεται πιο έντονα στα NBK που επάγονται να διαφοροποιηθούν (απουσία αυξητικών παραγόντων). Μετά από RT-PCR ανάλυση για να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης του *Ariel* σε NBK βρέθηκε αυξημένο σε συνθήκες που ευνοείται η αστρογλιογένεση (-GFs) (C). Από τα πειράματα ανοσοφθορισμού (A και B) φαίνεται ότι τα κύτταρα που καλλιεργούνται απουσία αυξητικών παραγόντων περιλαμβάνουν πολύ περισσότερα πρώιμα αστροκύτταρα (με κόκκινο χρώμα) και πολύ λιγότερα NBK (πράσινο χρώμα). Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν νεστίνη για ένδειξη νευρικών βλαστοκυττάρων (βλ.A), και GFAP για ένδειξη της διαφοροποίησης σε αστροκύτταρα (βλ.B).

Με το πείραμα αυτό ενισχύεται η μέχρι τώρα υπόθεση ότι στην πρώιμη διαφοροποίηση των κυττάρων προς γλοία του κεντρικού νευρικού συστήματος, εμφανίζεται ταυτόχρονα και

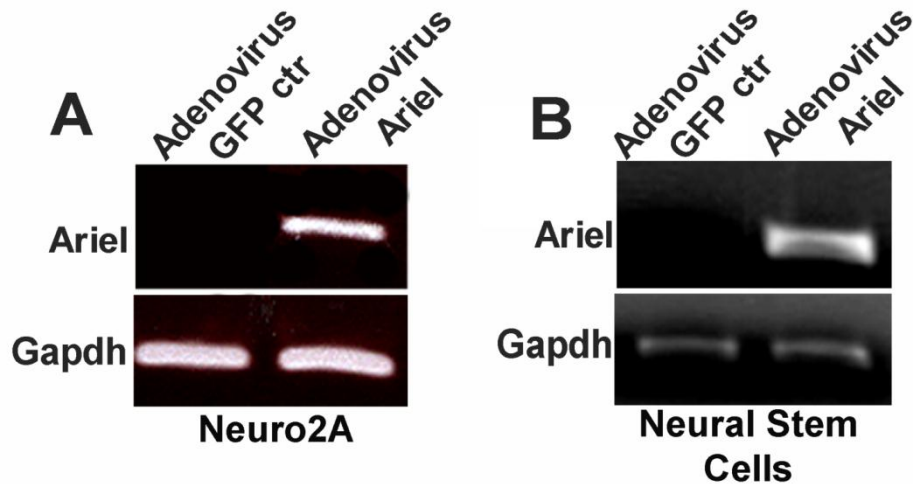
αυξημένη έκφραση του *Ariel*. Αντίθετη εικόνα έχει το *Prox1*, το οποίο όπως έχει προαναφερθεί απαιτείται για τη διαφοροποίηση σε νευρώνες. Αυτό ενισχύει την άποψη ότι το *Ariel* πιθανώς να έχει καθοριστικό ρόλο στο σχηματισμό των αστροκυττάρων, και παράλληλα να ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του *Prox1*.

3.2 Υπερέκφραση του *Ariel* και μελέτη φαινοτύπου σε νευρικά βλαστικά κύτταρα

Για να μελετήσουμε την επίδραση του *Ariel* στη διαφοροποίηση των NBK πραγματοποιήσαμε μελέτες υπερέκφρασης σε αυτά τα κύτταρα. Για αυτό το σκοπό, αρχικά κατασκευάσαμε έναν αδενοϊό ικανό να υπερεκφράζει ταυτόχρονα το *Ariel* και το γονίδιο αναφοράς GFP σε NBK (βλ. «μέθοδοι και υλικά, κατασκευή αδενοϊού»). Στόχος αυτού ήταν να διαθέτουμε αδενοϊό ο οποίος να υπερεκφράζει το επιθυμητό γονίδιο (*Ariel*), με επιπλέον έκφραση του GFP γονιδίου, ώστε να μπορούμε να εντοπίζουμε τα κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με αυτόν. Επιπλέον κατασκευάστηκε ένας ιός που περιλαμβάνει μόνο την αλληλουχία του GFP γονιδίου, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στα πειράματά μας ως ο ιός-μάρτυρας.

*3.2.1 Επιβεβαίωση της υπερέκφρασης του *Ariel* μέσω αδενοϊκού φορέα σε N2A κύτταρα και σε NBK*

Μετά την κατασκευή του αδενοϊού (με GFP, και με GFP-*Ariel*) έγινε επιμόλυνση σε καλλιέργειες N2A. Απομονώθηκε στη συνέχεια το RNA και με τη μέθοδο της RT-PCR ανάλυσης ελέγχθηκε η υπερέκφραση του *Ariel*. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα NBK (Εικόνα 3.7).



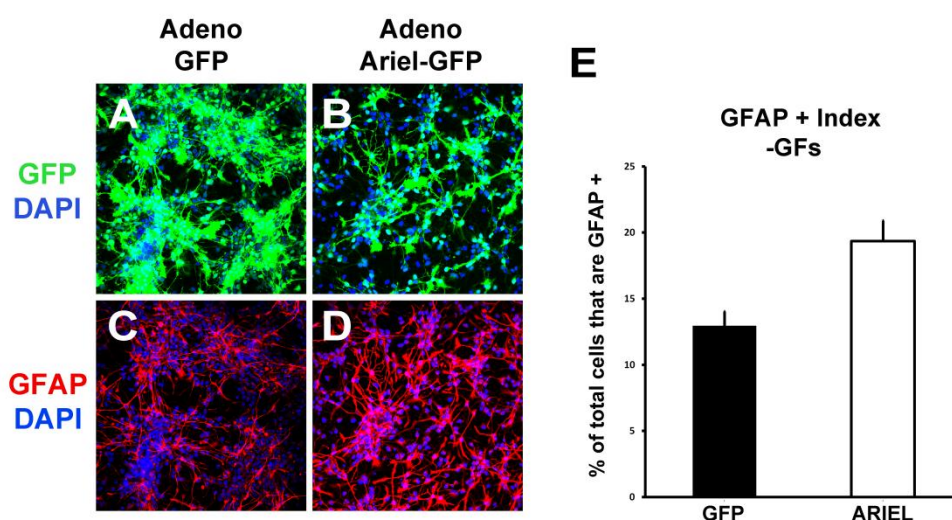
Εικόνα 3.7: Το *Ariel* υπερεκφράζεται από τον αδενοϊκό φορέα έπειτα από επιμόλυνση σε **N2A και NBK**. Αρχικά έγινε επιμόλυνση του ιού σε κύτταρα N2A και μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *Ariel* και *Gapdh* (βλ. A). Παρατηρείται η διαφορά της έκφρασης του *Ariel* στα κύτταρα που το υπερεκφράζουν σε σχέση με αυτά που εκφράζουν μόνο το GFP. Παρατηρείται η ίδια διαφορά στην υπερέκφραση του *Ariel* και στα NBK, γεγονός που επιβεβαιώνει τη σωστή κατασκευή του αδενοϊού (βλ. B).

3.2.2 *In vitro* μελέτες υπερέκφρασης (gain of function) του *Ariel* σε πρωτογενή NBK

Ακολούθησε επιμόλυνση καλλιέργειας NBK με ιό που εκφράζει μόνο το GFP γονίδιο, καθώς και με ιό που υπερεκφράζει μαζί και το *Ariel*. Σκοπός αυτού του τύπου πειραμάτων ήταν να μελετηθεί αν επηρεάζεται η πορεία διαφοροποίησης των NBK έπειτα από υπερέκφραση του *Ariel*. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι δείκτες, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο που θέλαμε να μελετήσουμε. Πιο συγκεκριμένα, για να μελετηθεί η επίδραση του *Ariel* στον αριθμό των αστροκυττάρων χρησιμοποιήθηκε ο GFAP μάρτυρας, στον αριθμό των νευρώνων χρησιμοποιήθηκε ο TuJ1 μάρτυρας (βIII-τουμπουλίνη), ενώ για τον αριθμό των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ενσωμάτωσης-BrdU (το οποίο ενσωματώνεται στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα και αποτελεί δείκτη εισόδου των κυττάρων στην S φάση).

3.2.2.1 Μελέτες υπερέκφρασης στην αστρογλιογένεση

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση του *Ariel* στην αστρογλιογένεση με επιμόλυνση NBK με τον αδενοϊό.

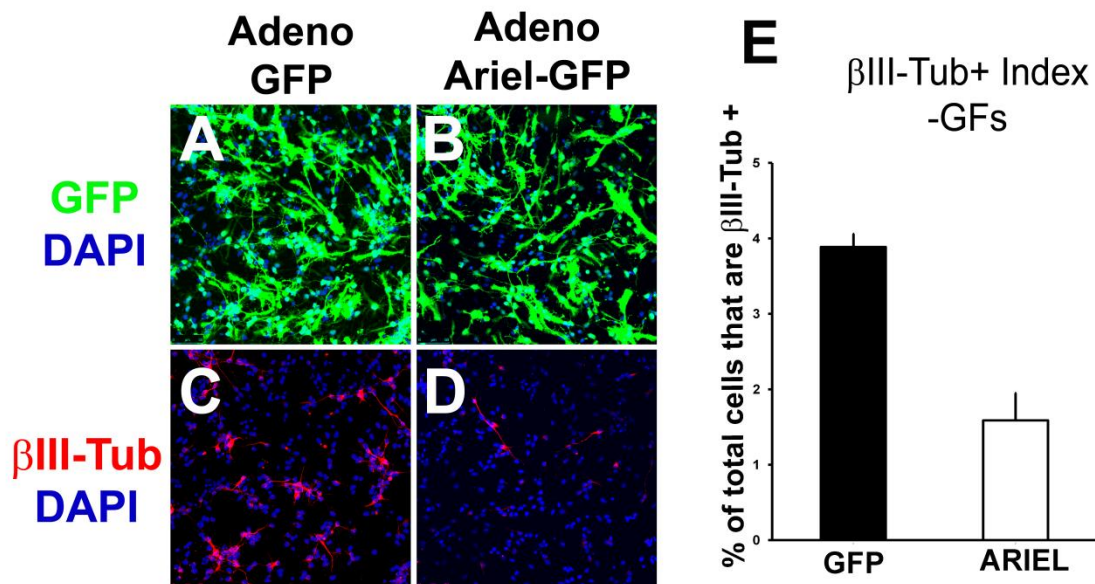


Εικόνα 3.8: Η εξαναγκασμένη έκφραση του *Ariel* επάγει την αστρογλιογένεση. Στα (A) και (C) εμφανίζονται έπειτα από ανοσοφθορισμό, τα NBK που έχουν επιμολυνθεί με αδενοϊό που εκφράζει το GFP. Οι δείκτες GFAP και DAPI απεικονίζουν τα αστροκύτταρα και τους πυρήνες των ζωντανών κυττάρων αντίστοιχα. Στο (B) και (D) παρουσιάζονται τα κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με τον ιό που υπερέκφράζει το *Ariel* μαζί με το GFP. Στη δεύτερη περίπτωση παρατηρείται μερική αύξηση 33,1% (1,4 fold) του αριθμού των αστροκυττάρων σε σχέση με τα πρώτα. Στο (E) παρουσιάζεται η ποσοτικοποίηση αυτών των αποτελεσμάτων.

Συμπεραίνεται από το πείραμα αυτό ότι το *Ariel* επηρεάζει θετικά τη διαφοροποίηση προς αστροκύτταρα, επομένως επιδρά υπέρ της αστρογλιογένεσης. Συνεπώς συμπεραίνουμε ότι το *Ariel* δρα αντίθετα από το *Prox1*, το οποίο κατά την έκφρασή του επάγει τη νευρογένεση.

3.2.2.2 Μελέτες υπερέκφρασης στη νευρογένεση

Το ίδιο πείραμα ακολουθήθηκε για τη μελέτη της διαφοροποίησης των NBK σε νευρώνες. Χρησιμοποιήθηκε ο TuJ1 σαν δείκτης για νευρώνες και DAPI για τους πυρήνες των ζωντανών κυττάρων. Οι μετρήσεις έγιναν από το μικροσκόπιο φθορισμού.

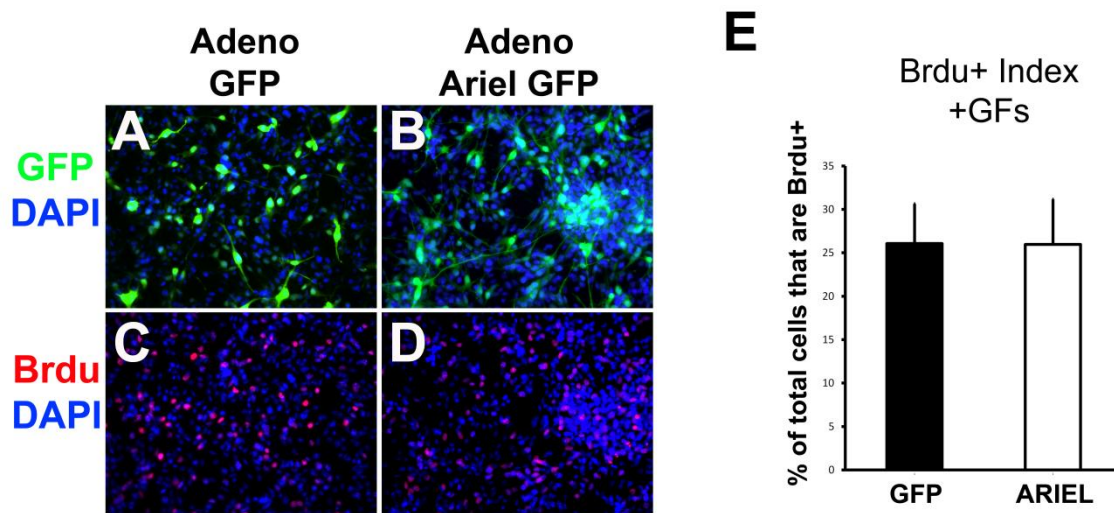


Εικόνα 3.9: Η εξαναγκασμένη έκφραση του *Ariel* μειώνει τον αριθμό των νευρώνων που θα σχηματιστούν. Στα (A) και (C) εμφανίζονται έπειτα από ανοσοφθορισμό, τα NBK που έχουν επιμολυνθεί με αδενοϊό που εκφράζει το GFP. Στο (B) και (D) παρουσιάζονται τα κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με τον ιό που υπερεκφράζει το *Ariel* μαζί με το GFP. Στο (E) απεικονίζεται η ποσοτικοποίηση αυτών των αποτελεσμάτων

Σύμφωνα με τις μετρήσεις, παρατηρείται σημαντική μείωση (59,13%) στον αριθμό των κυττάρων που διαφοροποιούνται προς νευρώνες όταν σε αυτά υπερεκφράζεται το *Ariel*. Ο φαινότυπος αυτός υποδηλώνει πως το *Ariel* επιδρά αρνητικά στο σχηματισμό νευρώνων, γεγονός που είναι σε συμφωνία με τη θετική επίδραση του *Ariel* στο σχηματισμό αστροκυττάρων.

3.2.2.3 Μελέτη υπερέκφρασης σε σχέση με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε πρωτογενή νευρικά βλαστικά κύτταρα

Μία επιπλέον μελέτη έγινε σε NBK παρουσία αυξητικών παραγόντων με σκοπό τη μελέτη πιθανής επίδρασης του *Ariel* στο πολλαπλασιαστικό δυναμικό αυτών.



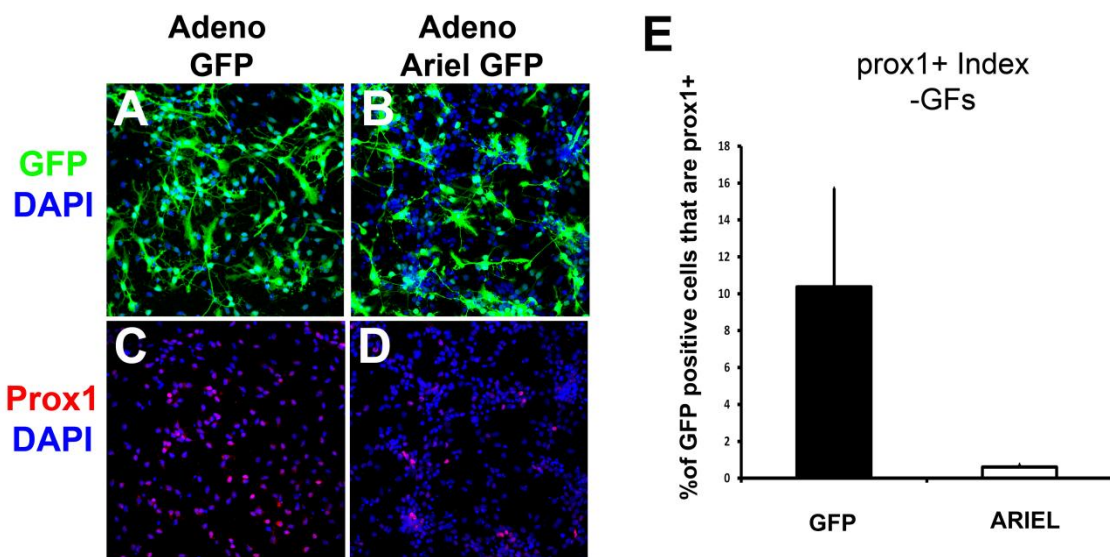
Εικόνα 3.10: Το *Ariel* δεν επιδρά στο πολλαπλασιαστικό δυναμικό των NBK. Παρουσιάζονται τα NBK έπειτα από επιμόλυνση με αδενοϊό παρουσία αυξητικών παραγόντων, όπου με κόκκινο χρώμα εμφανίζεται το BrdU στα κύτταρα που βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού (C), (D). Με βάση τα αποτελέσματα (E) προκύπτει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα κύτταρα που εκφράζουν μόνο το GFP και στα κύτταρα που εκφράζουν το GFP-Ariel. Επομένως, το *Ariel* δεν έχει κάποια σημαντική επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

3.4 Πιθανή επίδραση του *Ariel* στο γονίδιο *Prox1*

Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα, θελήσαμε να μελετήσουμε περαιτέρω αν το *Ariel* ρυθμίζει την έκφραση του *Prox1*, και ποιος είναι ο σχετικός μηχανισμός αλληλεπίδρασης των δύο αυτών γονιδίων, ώστε να κατανοήσουμε τον μηχανισμό μέσω του οποίου το *Ariel* οδηγεί τα NBK προς αστρογλιογένεση.

3.4.1 Μελέτη της πιθανής επίδρασης του *Ariel* στην πρωτεΐνη του *Prox1*

Αρχικά δοκιμάσαμε εάν το *Ariel* είναι ικανό να επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης του *Prox1*. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοφθορισμού για τη μελέτη του αριθμού των κυττάρων που εκφράζουν το *Prox1* μετά από την υπερέκφραση του *Ariel*. Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ειδικό για το *Prox1* και παρατηρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασής του σε NBK (Εικόνα 3.11).

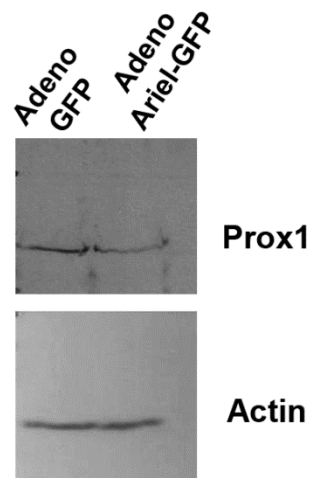


Εικόνα 3.11: Η εξαναγκασμένη έκφραση του *Ariel* μειώνει σημαντικά τα επίπεδα της **Prox1** πρωτεΐνης. Παρατηρείται η διαφορά των κυττάρων επιμολυσμένων με ιό που εκφράζει μόνο το GFP (βλ. A, C) και με ιό που υπερεκφράζει και το *Ariel* (βλ. B, D), έπειτα από επιμόλυνση NBK απουσία αυξητικών παραγόντων. Με κόκκινο χρώμα φαίνεται το ειδικό αντίσωμα για το *Prox1*. Σύμφωνα με τις μετρήσεις (βλ. E), παρατηρείται πολύ μεγάλη μείωση στον αριθμό κυττάρων θετικών για το *Prox1* (94% μείωση).

Από το πείραμα αυτό προκύπτει το συμπέρασμα ότι η υπερέκφραση του *Ariel* έχει σε μεγάλο βαθμό αρνητική επίδραση στα επίπεδα έκφρασης του *Prox1*, γεγονός που επιβεβαιώνει την μέχρι τώρα υπόθεση αρνητικής αλληλεπίδρασης των δύο αυτών γονιδίων με στόχο τη διαφοροποίηση προς νευρώνες ή αστροκύτταρα αντίστοιχα.

Για την επιπλέον μελέτη της επίδρασης στην πρωτεΐνη *Prox1* ακολούθησαν παρόμοια πειράματα με Western Blot ανάλυση σε NBK. Σε αυτά τα δείγματα μελετήθηκε η πρωτεΐνη

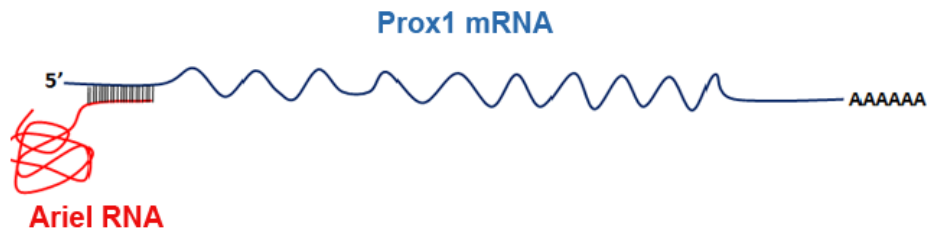
Prox1, καθώς και η ακτίνη σαν μάρτυρας σύμφωνα με το οποίο γίνεται η συγκριτική ποσοτικοποίηση.



Εικόνα 3.12: Η εξαναγκασμένη έκφραση του *Ariel* μειώνει τα επίπεδα της **Prox1** πρωτεΐνης. Σύμφωνα με τα παραπάνω, συμπεραίνεται πως σε NBK στα οποία το *Ariel*, η πρωτεΐνη Prox1 μειώνεται. Αυτό παρατηρείται παρουσία αλλά και απουσία αυξητικών παραγόντων με πιο έντονα αποτελέσματα στη δεύτερη περίπτωση. Σημειώνεται λοιπόν πως το *Ariel* επιδρά αρνητικά στα επίπεδα της πρωτεΐνης Prox1. Επόμενο ερώτημα που τέθηκε ήταν αν αυτό το lncRNA επιδρά άμεσα στην πρωτεΐνη ή στην έκφραση του *Prox1* mRNA.

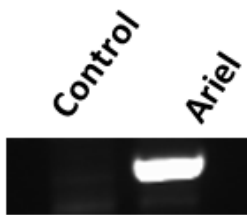
3.4.2 Μελέτη της πιθανής επίδρασης του *Ariel* στο mRNA του *Prox1*

Κρίνοντας από τα παραπάνω, θελήσαμε να μελετήσουμε αν υπάρχει κάποια επίδραση του lncRNA στην πορεία του mRNA του *Prox1* προς μετάφραση στο ριβόσωμα. Η πρώτη σκέψη ήταν μία πιθανή αλληλεπίδραση στην 5' περιοχή του mRNA του *Prox1* καθώς εκεί γνωρίζουμε ότι υπάρχει περιοχή συμπληρωματικής αλληλουχίας με το *Ariel*. Επομένως πιθανή πρόσδεση του *Ariel* εκεί μπορεί να σημαίνει και παρεμπόδιση της μετάφρασης του *Prox1* (Εικόνα 3.12).

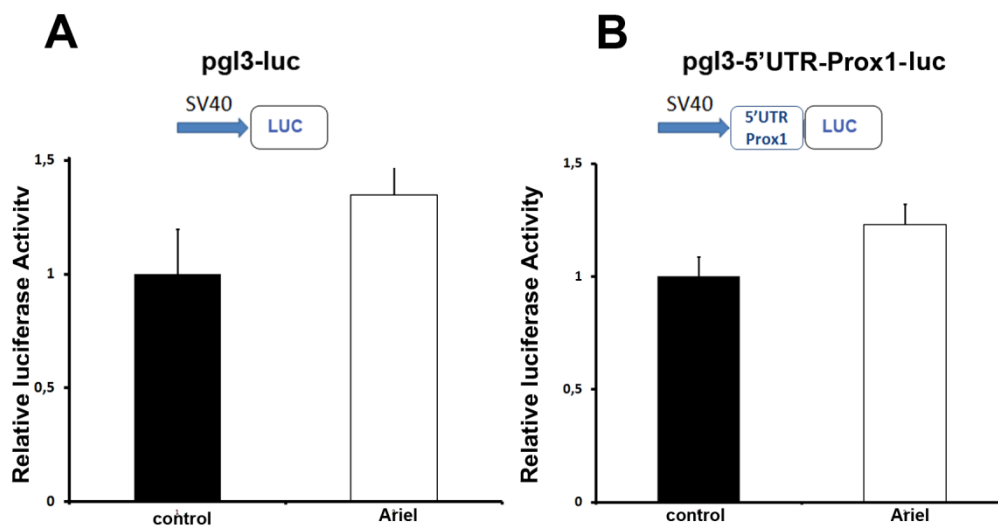


Εικόνα 3.13: Απεικόνιση πιθανής πρόσδεσης του *Ariel* στην 5' αμετάφραστη περιοχή του *Prox1* στην κοινή αλληλουχία των δύο αυτών μορίων

Για το σκοπό αυτό, κλωνοποιήθηκε το *Ariel* στο pcDNA3.1 πλασμίδιο (εικόνα 3.14) με σκοπό την διαμόλυνση σε κύτταρα νευροβλαστώματος N2A. Ταυτόχρονα κατασκευάσαμε ένα πλασμίδιο αναφοράς, όπου η 5' αμετάφραστη περιοχή του mRNA του *Prox1* (εικόνα 3.15-B) κλωνοποιήθηκε ανοδικά (upstream) του γονιδίου της λουσιφεράσης (pgl3-5'UTR-*Prox1*-luc). Αν η υπόθεση μας για την πιθανή δράση του *Ariel* στη μετάφραση είναι σωστή, περιμένουμε να παρεμποδίσει την μετάφραση και του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης.



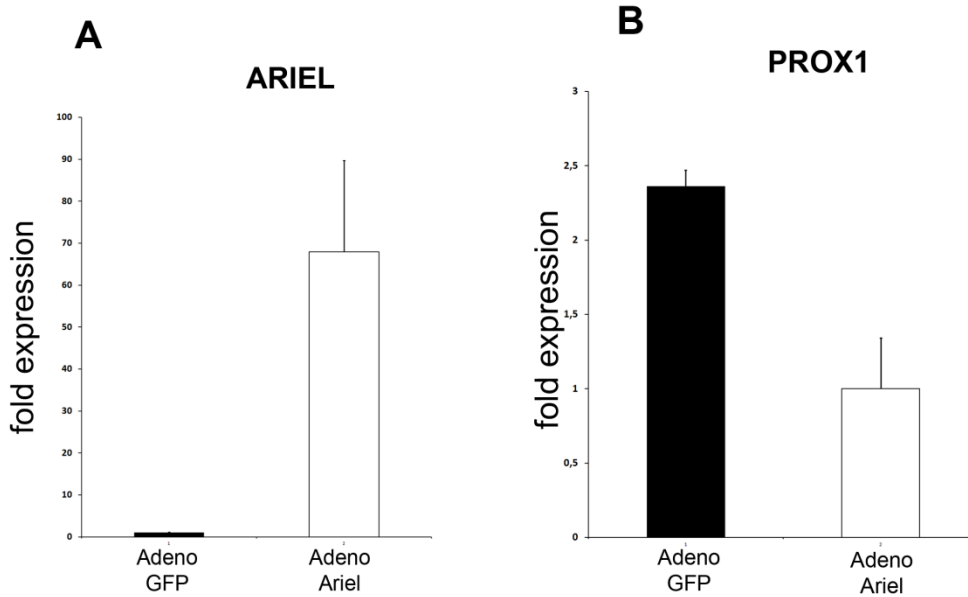
Εικόνα 3.14: Υπερέκφραση του *Ariel*, μετά από κλωνοποίηση στο φορέα pcDNA3.1.



Εικόνα 3.15: Το lncRNA *Ariel* δε φαίνεται να επιδρά άμεσα στην 5' UTR περιοχή του mRNA του *Prox1*. Στο (A) παρατηρείται η διαφορά της ενεργότητας της λουσιφεράσης σε N2A κύτταρα στο δείγμα-μάρτυρα (control) σε σχέση με το δείγμα που έχει γίνει υπερέκφραση του *Ariel*. Σε αυτή την περίπτωση έχει χρησιμοποιηθεί φορέας μόνο με το γονίδιο της λουσιφεράσης. Στο (B) πραγματοποιήθηκε το ίδιο πείραμα παρουσία του pgl3-5'UTR-Prox1-luc.

Συμπεραίνεται από τις παραπάνω μετρήσεις ότι η διαφορά που προκύπτει μετά την ταυτόχρονη διαμόλυνση της 5' περιοχής του *Prox1* με το *Ariel*, σε σχέση με τη διαμόλυνση χωρίς την υπερέκφραση του *Ariel*, δεν είναι στατιστικά σημαντική. Επομένως δεν συμπεραίνεται πιθανή ρύθμιση του *Prox1* από το *Ariel* στο επίπεδο της μετάφρασης.

Σύμφωνα και με τη βιβλιογραφία (Tia D. et al., 2010; Orom UA et al., 2011; Morris et al.2010) είναι γνωστό ότι πολύ μεγάλο ποσοστό από τα lncRNA δρουν σε επίπεδο μεταγραφής. Επομένως ο επόμενός μας στόχος ήταν να μελετήσουμε την επίδραση της υπερέκφρασης του *Ariel* στο επίπεδο της μεταγραφής του *Prox1*. Για το σκοπό αυτό έγιναν πειράματα υπερέκφρασης σε νευρικά βλαστικά κύτταρα απουσία αυξητικών παραγόντων και μελετήθηκαν με real-time RT-PCR ανάλυση τα επίπεδα έκφρασης του *Prox1*.



Εικόνα 3.16: Η εξαναγκασμένη έκφραση του *Ariel* μειώνει σημαντικά τα επίπεδα του **Prox1 mRNA** στα NBK. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από real-time PCR ανάλυση όπου στο (A) παρατηρείται η κατά πολύ αυξημένη έκφραση του *Ariel* στα κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με αδενοϊό *Ariel* σε σχέση με αυτά που έχουν επιμολυνθεί με τον ιό μάρτυρα. Στο (B) παρατηρείται η μείωση των επιπέδων έκφρασης του *Prox1* στην περίπτωση υπερέκφρασης του *Ariel*, σε σχέση με τα επιμολυσμένα με τον ιό μάρτυρα κύτταρα.

Συμπεραίνεται πως στα δείγματα με υπερέκφραση του *Ariel*, ενώ τα κύτταρα έχουν την τάση να διαφοροποιηθούν οπότε και θα περιμέναμε αυξημένο το *Prox1*, παρατηρείται μείωσή του. Επομένως επιβεβαιώνεται η υπόθεση ότι τα δύο αυτά γονίδια αλληλεπιδρούν σε επίπεδο RNA, μέσω κάποιου μηχανισμού όπου το *Ariel* ελέγχει αρνητικά την έκφραση του mRNA του *Prox1*.

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

4.1 Συζήτηση

Μέχρι πρότινος, τα RNA μόρια είχαν ενδιάμεσο ρόλο μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων σε πρωτεΐνες. Το τελευταίο διάστημα έχει βρεθεί μία καινούργια σχετικά κατηγορία ρυθμιστικών μορίων RNA, τα οποία ονομάζονται long non coding RNAs και φαίνεται να αποκτούν όλο και περισσότερη σημαντικότητα στη ρύθμιση της έκφρασης πολλών μεταγραφικών παραγόντων (Guttman M., Rinn JL.,2012). Η παρούσα εργασία περιγράφει το long non coding RNA *Ariel* (ή αλλιώς AK142161), και το πιθανό ρόλο του στη ρύθμιση της νευρογένεσης κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Το γονίδιο *Prox1* αποτελεί έναν σημαντικό homeobox μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος συμβάλλει κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη στη διαφοροποίηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων σε νευρώνες. Η μελέτη του *Prox1* από την ερευνητική μας ομάδα, οδήγησε στον εντοπισμό του *Ariel*, το οποίο βρέθηκε στον ίδιο γονιδιακό τόπο και συγκεκριμένα στην περιοχή του χρωμοσώματος 1 του ποντικού. Το *Ariel* βρέθηκε να μεταγράφεται αντιπαράλληλα με το *Prox1* και να περιλαμβάνει μία συμπληρωματική αλληλουχία στην 5' αμετάφραστη περιοχή του. Γνωρίζοντας από την βιβλιογραφία ότι έχουν βρεθεί αρκετά long non coding RNAs τα οποία επάγουν την νευρωνική διαφοροποίηση (Stanton LW et al., 2011) θελήσαμε να μελετήσουμε τον πιθανό ρόλο του *Ariel* στην έκφραση του *Prox1*. Αρχικά μάλιστα υποθέσαμε, ότι η συμπληρωματική τους αλληλουχία πιθανώς να αποτελεί μία περιοχή αλληλεπίδρασης αυτών των δύο. Υπολογιστικά δεδομένα προτείνουν ότι το τμήμα από το RNA *Ariel* που είναι συμπληρωματικό του *Prox1* ίσως να σχηματίζει μονόκλωνη αλυσίδα κατά τη δευτεροταγή του δομή, γεγονός που το καθιστά πιθανό τμήμα αλληλεπίδρασης με το *Prox1*. Επιπλέον, η παρούσα εργασία καταδεικνύει πως υπάρχει συσχέτιση μεταξύ αυτών των δύο γονιδίων. Ο ρυθμιστικός ρόλος του *Ariel* στη διαφοροποίηση των NBK κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, ίσως να γίνεται μέσω της καταστολής της έκφρασης του *Prox1*.

Αρχικά, δείξαμε πως το *Ariel* εκφράζεται στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα του ποντικού, και μάλιστα με αυξητική τάση ως την 15^η εμβρυϊκή μέρα, ακολουθώντας παρόμοια πρότυπα με αυτά του σχηματισμού των πρώιμων αστροκυττάρων (Yuasa S., 2001, Rowitch

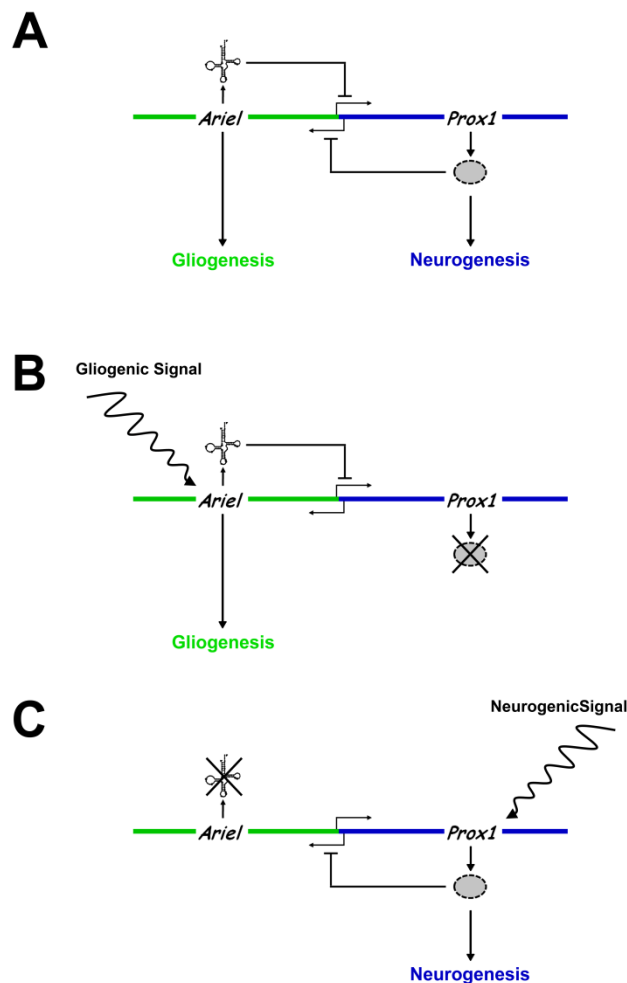
DH., 2004). Η παρατήρηση αυτή μας οδήγησε στο ερώτημα εάν το *Ariel* εμπλέκεται στις διαδικασίες διαφοροποίησης των NBK σε αστροκύτταρα. Για το σκοπό αυτό μελετήσαμε την έκφρασή του σε καλλιέργειες πρώιμων αστροκυττάρων αλλά και νευρώνων. Το συμπέρασμα που προέκυψε ήταν ότι το *Ariel* εκφράζεται σε πολύ υψηλότερα επίπεδα στην πρώτη κατηγορία κυττάρων, ενώ δεν εκφράζεται καθόλου σε πρώιμους νευρώνες. Τα ακριβώς αντίθετα επίπεδα έκφρασης παρουσιάζει το *Prox1*, το οποίο είναι γνωστό ότι απαιτείται για τη νευρογένεση (Jessberger et al, 2011; Kaltezioti et al.,2010;Mishra et al.,2008; Lavado et al.,2007). Στη συνέχεια, μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης του *Ariel* σε καλλιέργεια NBK παρουσία και απουσία αυξητικών παραγόντων. Αυτό μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η έκφραση του *Ariel* επάγεται κατά τη διαφοροποίηση των NBK σε αστροκύτταρα.

Για να μελετήσουμε περαιτέρω τα παραπάνω ερωτήματα, θελήσαμε να υπερεκφράσουμε το *Ariel* σε NBK, με τη χρήση αδενοϊού, ώστε να παρατηρήσουμε τις επιπτώσεις του. Έπειτα από επιμόλυνση NBK με τον ιό, αρχικά παρατηρήσαμε ότι επάγεται η αστρογλοιογένεση. Όταν το πείραμα επαναλήφθηκε με σκοπό τη μέτρηση των νευρώνων που σχηματίζονται, παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός αυτών ήταν αισθητά μειωμένος. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στον πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων. Επομένως, μπορέσαμε να επιβεβαιώσουμε πως το *Ariel* επάγει την αστρογλοιογένεση με ταυτόχρονη καταστολή της νευρογένεσης. Δεδομένου ότι το *Prox1* επιδρά στα NBK με τον αντίθετο τρόπο, δηλαδή επάγει την νευρογένεση και καταστέλλει την αστρογλοιογένεση υποθέσαμε ότι το *Ariel* ίσως να επιδρά στα NBK μέσω της ρύθμισης του *Prox1*.

Σε συμφωνία με τα παραπάνω, μετά από υπερέκφραση του *Ariel* παρατηρήσαμε σημαντική μείωση στα επίπεδα έκφρασης του *Prox1* σε επίπεδο πρωτεΐνης. Η παρατήρηση αυτή ταυτοποιήθηκε με πειράματα ανοσοφθορισμού, αλλά και με Western blot. Για να μελετήσουμε αυτή τη δράση ελέγξαμε πιθανή πρόσδεση του *Ariel* στην 5' αμετάφραστη περιοχή του *Prox1* χωρίς όμως να παρατηρήσουμε σημαντική αλληλεπίδρασή τους. Έτσι, ακολούθησαν πειράματα με real-time RT-PCR όπου διαπιστώσαμε μεγάλη μείωση των επιπέδων του *Prox1* mRNA όταν υπερεκφράσαμε το *Ariel*. Καταλήξαμε στο συμπέρασμα πως το *Ariel* δεν ελέγχει τη μετάφραση του *Prox1* στο ριβόσωμα, αλλά ότι το ρυθμίζει σε μεταγραφικό επίπεδο.

Συμπερασματικά, τα μέχρι τώρα αποτελέσματά μας προτείνουν ότι το *Ariel* μέσω της ικανότητάς του να ρυθμίζει το *Prox1* στο μεταγραφικό επίπεδο, επηρεάζει τη διαφοροποίηση των NBK κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος.

Τα τελευταία βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι τα long non coding RNAs κατέχουν ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση σημαντικών για τη διαφοροποίηση και ανάπτυξη γονιδίων. Ο έλεγχος από το *Ariel* ενός τέτοιου μεταγραφικού παράγοντα, ίσως να αποτελεί ένα ακόμη μηχανισμό ρύθμισης lncRNA όπου αυτή τη φορά θα οδηγεί στη διαφοροποίηση προς αστροκύτταρα. Ο μηχανισμός που προτείνουμε και καθίσταται προς μελέτη περιγράφει μια δυναμική ισορροπία της έκφρασης του *Ariel* με το *Prox1*, όπου στην περίπτωση που υπερισχύει το πρώτο, το κύτταρο αποκτά χαρακτήρα γλοίας, ενώ στην περίπτωση του δεύτερου, το κύτταρο οδηγείται σε πρόιμο νευρώνα (βλ. εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1: Πιθανό ρυθμιστικό μοντέλο κυτταρικής διαφοροποίησης. Στο (A) παρατηρείται η δυναμική ισορροπία μεταξύ των δύο γονιδίων. Στην περίπτωση που υπάρχει σήμα για γλοιογένεση (B) επάγεται η έκφραση του *Ariel* το οποίο ενεργοποιεί το μηχανισμό για γλοιογένεση, ενώ παράλληλα καταστέλλει την έκφραση του *Prox1*. Αντίθετα στην περίπτωση που το κύτταρο δεχθεί σήμα για νευρογένεση (C) επάγεται η έκφραση του *Prox1*, το οποίο με τη σειρά του οδηγεί σε πρόιμο νευρώνα ενώ ταυτόχρονα καταστέλλει το *Ariel*.

4.2 Μελλοντικοί στόχοι

Αρχικά, μελλοντικός μας στόχος είναι να μελετήσουμε τις επιπτώσεις που μπορεί να έχει η αποσιώπηση του *Ariel* κατά την διαφοροποίηση των NBK. Αυτό θα επιτευχθεί με τη χρήση shRNA για το *Ariel*, όπου θα γίνει στοχευμένη καταστολή της έκφρασης του γονιδίου. Σύμφωνα με το μηχανιστικό μας μοντέλο θα περιμέναμε να δούμε καταστολή της αστρογλιογένεσης. Παράλληλα, θα μελετήσουμε τις επιπτώσεις που θα έχει η ταυτόχρονη υπερέκφραση του *Ariel* με παράλληλη αποσιώπηση του *Prox1* σε NBK που διαφοροποιούνται. Στόχος μας θα είναι να συμπεράνουμε αν η ικανότητα του *Ariel* να καταστέλλει το *Prox1* μπορεί να εξηγήσει τη δράση του στη διαφοροποίηση των NBK. Επόμενός μας στόχος είναι να μελετήσουμε τον ακριβή μοριακό μηχανισμό κατασταλτικής δράσης του *Ariel* πάνω στο *Prox1*, συγκεκριμένα, να μελετηθεί αν αυτό γίνεται μέσω σταθεροποίησης του mRNA ή μέσω μεταγραφικής ρύθμισης. Με πειράματα FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) θα μπορέσουμε να διαπιστώσουμε πού εντοπίζεται το *Ariel*, στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου, ή και στα δύο, και έπειτα κατά πόσο αυτό συνεντοπίζεται με το mRNA του *Prox1*. Τέλος, μελλοντικό πείραμα θα είναι η ένεση αδενοϊών που φέρουν το *Ariel* σε πειραματικά μοντέλα (ποντίκι) ώστε να παρατηρηθεί in vivo η δράση του κατά την ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Οι πειραματικοί μας σχεδιασμοί θα έχουν ως αποτέλεσμα σε μεγάλο βαθμό την κατανόηση της λειτουργίας αυτού του καινούργιου long non coding RNA. Αυτό θα μπορούσε στη συνέχεια να αποτελέσει στόχο έρευνας για τη θεραπεία τραυμάτων του κεντρικού νευρικού συστήματος όπου τα αστροκύτταρα έχουν αναπόσπαστο ρόλο, καθώς επίσης και σε ασθένειες που σχετίζονται με απώλεια γλοίας και επομένως δυσλειτουργία των νευρώνων.

Βιβλιογραφία

- Abarrategui I, Krangel MS. Noncoding transcription controls downstream promoters to regulate T-cell receptor alpha recombination. *EMBO J*. 2007 Oct 17;26(20):4380-90. Epub 2007 Sep 20.
- Amaral, PP., et al., Complex architecture and regulated expression of the Sox2ot locus during vertebrate development. *RNA*. 2009 Nov;15(11):2013-27. Epub 2009 Sep 18
- Anderson D.J., Stem cells and pattern formation in the nervous system: the possible versus the actual. 2001. *Neuron*. 30(1), 19-35.
- Arron, JR., et al., NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature*. 2006 Jun 1;441(7093):595-600. Epub 2006 Mar 22
- Benn CL, Huntingtin modulates transcription, occupies gene promoters in vivo, and binds directly to DNA in a polyglutamine-dependent manner. *J Neurosci*. 2008 Oct 15;28(42):10720-33
- Bermingham-McDonogh O, Oesterle EC, Stone JS, Hume CR, Huynh HM, Hayashi T. Expression of Prox1 during mouse cochlear development. *J Comp Neurol* 2006;496:172–186.
- Bick-Sander A, Steiner B, Wolf SA, Babu H, Kempermann G.. Running in pregnancy transiently increases postnatal hippocampal neurogenesis in the offspring. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:3852–3857.
- Burke Z, Oliver G. Prox1 is an early specific marker for the developing liver and pancreas in the mammalian foregut endoderm. *Mech Dev* 2002;118:147-155.
- Choksi SP, et al., Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in *Drosophila* neural stem cells. *Dev Cell*. 2006 Dec;11(6):775-89.
- Clark MB, et al., Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability. *Genome Res*. 2012 May;22(5):885-98. Epub 2012 Mar 9
- Γελαδάς Ν., Τσακόπουλος Μ. Φυσιολογία του ανθρώπου-Μηχανισμοί της Λειτουργίας του Οργανισμού. τόμος Ι, 8^η έκδοση, Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, σελ.236-243, 283-307.
- Doe C.Q. (2008) Neural stem cells: balancing self-renewal with differentiation. 2008. *Development*. 135 (9), 1575-87.
- Doe CQ. Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Development* 1992;116:855–863
- Doe CQ, Chu-LaGriff Q, Wright DM, Scott MP. The prospero gene specifies cell fates in the *Drosophila* central nervous system. *Cell* 1991;65:451–464.

- Faghihi, MA., Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat Med.* 2008 Jul;14(7):723-30. Epub 2008 Jun 29
- Foskolou IP, Stellas D, Rozani I, Lavigne MD, Politis PK. Prox1 suppresses the proliferation of neuroblastoma cells via a dual action in p27-Kip1 and Cdc25A. *Oncogene*2012 Apr 16. doi: 10.1038/onc.2012.129.
- Gage F.H.Mammalian neural stem cells. 2000. *Science.* 287(5457),1433-8
- Gilbert F.S. *Developmental Biology* 5th Edition,Sunderlands Massachusetts, Sinauer Associates Inc. (p242-275).
- Glasgow E, Tomarev SI. Restricted expression of the homeobox gene prox 1 in developing zebrafish. *Mech Dev* 1998;76:175–178
- Golden J.A. and Cepko C.L. Clones in the chick diencephalon contain multiple cell type and siblings are widely dispersed.1996. *Development.*122(1),65-78
- Griffiths R, Hidalgo A. Prospero maintains the mitotic potential of glial precursors enabling them to respond to neurons. *EMBO J.* 2004;23:2440–2450
- Gutschner, T. and S. Diederichs, The Hallmarks of Cancer: A long non-coding RNA point of view. *RNA Biol*, 2012. 9(6).
- Guttman, M., et al., Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*, 2009. 458(7235): p. 223-7.
- Guttman, M. and J.L. Rinn, Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature*, 2012. 482(7385): p. 339-46.
- Hekimoglu, B. and L. Ringrose, Non-coding RNAs in polycomb/trithorax regulation. *RNA Biol*, 2009. 6(2): p. 129-37.
- Hong YK., Detmar M.. Prox1, master regulator of the lymphatic vasculature phenotype. *Cell Tissue Res.* 2003;314, 85-92
- Hong YK, Harvey N, Noh YH, Schacht V, Hirakawa S, Detmar M, Oliver G. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn.* 2002;225:351–357.
- Hung, T. and H.Y. Chang, Long noncoding RNA in genome regulation: prospects and mechanisms. *RNA Biol*, 2010. 7(5): p. 582-5.
- Hung, T., et al., Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nat Genet*, 2011. 43(7): p. 621-9.
- Jan YN, Jan LY. Asymmetric cell division. *Nature* 1998;392:775–778
- Jessell T.M. Neuronal specification in the spinal cord:inductive signals and transcriptional codes. *Nat. Rev Genet.*2009,1,20-29

- Kaltezioti V., Kouroupi G, Oikonomaki M, Mantouvalou, E, Rohrer H, Charonis A, Matsas R and Politis Prox1 regulates the Notch1-Mediated Inhibition of Neurogenesis. Plos Biol 2010. 8(12), e1000565
- Kamiya A, Kakinuma S, Onodera M, Miyajima A, Nakauchi H. Prospero-Related Homeobox 1 and Liver Receptor Homolog 1 Coordinately Regulate Long-Term Proliferation of Murine Fetal Hepatoblasts. Hepatology 2008;48:252-264
- Karalay, O., et al., Prospero-related homeobox 1 gene (Prox1) is regulated by canonical Wnt signaling and has a stage-specific role in adult hippocampal neurogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(14): p. 5807-12.
- Katayama, S., et al., Antisense transcription in the mammalian transcriptome. Science, 2005. 309(5740): p. 1564-6.
- Khalil, A.M., et al., A novel RNA transcript with antiapoptotic function is silenced in fragile X syndrome. PLoS One, 2008. 3(1): p. e1486.
- Koerner, M.V., et al., The function of non-coding RNAs in genomic imprinting. Development, 2009. 136(11): p. 1771-83.
- Kotake, Y., et al., Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. Oncogene, 2011. 30(16): p. 1956-62.
- Larsen J.W. Εμβρυολογία του ανθρώπου, Αθήνα, Επιστημονικές Εκδόσεις "Γρ. Παρισιάνου" ;996
- Lathia J.D. et al., Notch:from neural development to neurological disorders. 2008. J. Neurochem. 107 (6), 1471-81.Review
- Lavado A, Oliver G. Prox1 expression patterns in the developing and adult murine brain. Develop.Dynamics, 2007;236: 518-524
- Li, L. and H. Vaessin, Pan-neural Prospero terminates cell proliferation during Drosophila neurogenesis. Genes Dev, 2000. 14(2): p. 147-51.
- Louvi A.and Artavanis-Tsakonas S.Notch Signaling in vertebrate neural development.2006. Nat Rev Neurosci.7,93-102.
- Malecova, B. and K.V. Morris, Transcriptional gene silencing through epigenetic changes mediated by non-coding RNAs. Curr Opin Mol Ther, 2010. 12(2): p. 214-22
- McKay R. Stem cells int the central nervous system.1997. Science 276(5309),66-71
- Mishra K, Gui H, Matise M P. Prox1 Regulates A Transitory State For Interneuron Neurogenesis in the Spinal Cord. Develop. Dynam. 2008;237:393–402
- Mercer, T.R., et al., Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(2): p. 716-21.
- Mercer, T.R., et al., Long noncoding RNAs in neuronal-glial fate specification and oligodendrocyte lineage maturation. BMC Neurosci, 2010. 11: p. 14.

- Morris, K.V., Long antisense non-coding RNAs function to direct epigenetic complexes that regulate transcription in human cells. *Epigenetics*, 2009. 4(5): p. 296-301.
- Mus, E., P.R. Hof, and H. Tiedge, Dendritic BC200 RNA in aging and in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(25): p. 10679-84.
- Navarro-Quiroga I, Hernandez-Valdes M, Lin SL, Naegele JR. Postnatal cellular contributions of the hippocampus subventricular zone to the dentate gyrus, corpus callosum, fimbria, and cerebral cortex. *J Comp Neurol* 2006;497:833–845
- Ng, S.Y., R. Johnson, and L.W. Stanton, Human long non-coding RNAs promote pluripotency and neuronal differentiation by association with chromatin modifiers and transcription factors. *EMBO J*, 2011. 31(3): p. 522-33.
- Ny A, Koch M, Schneider M, Neven E, Tong RT, Maity S, Fischer C, Plaisance S, Lambrechts D, Heligon C, Terclavers S, Ciesiolka M, Kalin R, Man WY, Senn I, Wyns S, Lupu F, Brandli A, Vleminckx K, Collen D, Dewerchin M, Conway EM, Moons L, Jain RK, Carmeliet P. A genetic *Xenopus laevis* tadpole model to study lymphangiogenesis. *Nat Med*. 2005;11:998–1004.
- Orom, U.A. and R. Shiekhattar, Noncoding RNAs and enhancers: complications of a long-distance relationship. *Trends Genet*, 2011. 27(10): p. 433-9.
- Petrova, TV, Makinen T, Makela TP, Saarela J, Virtanen I, Ferrell, RE, Finegold DN, Kerjaschki D, Yla-Herttua S, Alitalo K. Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *EMBO J*. 2002;21:4593–4599.
- Prensner, J.R., et al., Transcriptome sequencing across a prostate cancer cohort identifies PCAT-1, an unannotated lincRNA implicated in disease progression. *Nat Biotechnol*, 2011. 29(8): p. 742-9.
- Politis P.K. et al., BM88/Cend1 is involved in histone deacetylase inhibition-mediated growth arrest and differentiation of neuroblastoma cells. *FEBS letters* 2008.582, 741-748
- Politis P.K. et al, Coordination of cell cycle exit and differentiation of neuronal progenitors. *Cell cycle* 2008,7,691-697.
- Qureshi, I.A., J.S. Mattick, and M.F. Mehler, Long non-coding RNAs in nervous system function and disease. *Brain Res*, 2010. 1338: p. 20-35.
- Risebro CA, Searles RG, Melville AA, Ehler E, Jina N, Shah S, Pallas J, Hubank M, Dillard M, Harvey NL, Schwartz RJ, Chien KR, Oliver G, Riley PR. Prox1 maintains muscle structure and growth in the developing heart. *Development*. 2009;136(3):495-505
- Rowitch, D.H., Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nat Rev Neurosci*, 2004. 5(5): p. 409-19.
- Sado, T., Y. Hoki, and H. Sasaki, Tsix silences Xist through modification of chromatin structure. *Dev Cell*, 2005. 9(1): p. 159-65.
- Shirasaki R. et Pfaff S.L. Transcriptional codes and the control of neuronal identity. 2002. *Annu Rev Neurosci*. 25,251-281.

- Tian, D., S. Sun, and J.T. Lee, The long noncoding RNA, Jpx, is a molecular switch for X chromosome inactivation. *Cell*, 2010. 143(3): p. 390-403.
- Tochitani, S. and Y. Hayashizaki, Nkx2.2 antisense RNA overexpression enhanced oligodendrocytic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 372(4): p. 691-6.
- Tomarev SI, Sundin O, Banerjee-Basu S, Duncan MK, Yang JM, Piatigorsky J. Chicken homeobox gene Prox 1 related to *Drosophila* prospero is expressed in the developing lens and retina. *Dev Dyn* 1996;206:354–367.
- Torii M, Matsuzaki F, Osumi N, Kaibuchi K, Nakamura S, Casarosa S, Guillemot F, Nakafuku M. Transcription factors Mash-1 and Prox-1 delineate early steps in differentiation of neural stem cells in the developing central nervous system. *Development* 1999;126:443–456
- Vaessin H, Grell E, Wolff E, Bier E, Jan LY, Jan YN. Prospero is expressed in neuronal precursors and encodes a nuclear protein that is involved in the control of axonal outgrowth in *Drosophila*. *Cell* 1991;67:941–953
- Wang J, Kilic G, Aydin M, Burke Z, Oliver G, Sosa-Pineda B. Prox1 activity controls pancreas morphogenesis and participates in the production of “secondary transition” pancreatic endocrine cells. *Dev Biol*. 2005;286:182–194.
- Wang, K.C. and H.Y. Chang, Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell*, 2011. 43(6): p. 904-14.
- Wang, Y., et al., Dlx5 and Dlx6 regulate the development of parvalbumin-expressing cortical interneurons. *J Neurosci*, 2010. 30(15): p. 5334-45.
- Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, Gunn MD, Jackson DG, Oliver G. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J* 2002;21:1505–1513.
- Wigle JT, Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 1999;98:769-778.
- Wilusz, J.E., H. Sunwoo, and D.L. Spector, Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev*, 2009. 23(13): p. 1494-504.
- Yan, B., Z.H. Wang, and J.T. Guo, The research strategies for probing the function of long noncoding RNAs. *Genomics*, 2012. 99(2): p. 76-80.
- Yuasa, S., Development of astrocytes in the mouse embryonic cerebrum tracked by tenascin-C gene expression. *Arch Histol Cytol*, 2001. 64(1): p. 119-26.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω

πολύ θερμά τον Ερευνητή Δ' του εργαστηρίου Ιστολογίας του ΠΒΕΑΑ Παναγιώτη Πολίτη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το αντικείμενο του ενδιαφέροντός μου, για την καθοδήγηση, τη συμπαράσταση αλλά και την υπομονή του όλο αυτό το διάστημα εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Ακόμη, ευχαριστώ θερμά τον Ερευνητή Β' του εργαστηρίου Ιστολογίας του ΠΒΕΑΑ Αριστείδη Χαρόνη για τις συμβουλές του και την στήριξή του. Επίσης ευχαριστώ τον καθηγητή Σπύρο Ευθυμιόπουλο που δέχτηκε να αποτελεί επιβλέπων καθηγητής της παρούσας εργασίας και να συνεργαστεί μαζί μου. Ακόμη ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα Θανάση Στεργιόπουλο για την πολύτιμη βοήθεια και συμπαράσταση που μου έδειξε κατά τη συνεργασία μας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Τομέα, Βαλέρια Καλτεζιώτη, Ζοζεφίνα Φοσκώλου, Πελαγία Κουκουράκη, Μαρία Πάσχου, Πέννυ Φούκα, Νίκη Πράκουρα, Καραγιάννη Φανή για τη βοήθειά τους.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου και τους στενούς μου φίλους που με στήριζαν όποτε το είχα ανάγκη.