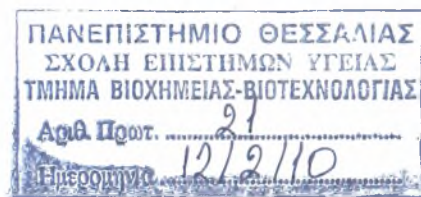


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

« ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ -
ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ
ΔΕΙΚΤΕΣ »



Πασχάλης Θεοτόκης

ΧΩΡΟΧΡΟΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ mRNA
ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ
ΝΕΥΡΑΞΟΝΙΚΗΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗΣ
ΝΟΓΟ-Α, ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ
ΜΟΝΤΕΛΟ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ
ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ

ΘΕΣ/ΝΙΚΗ 2010



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 8120/1
Ημερ. Εισ.: 06-05-2010
Δωρεά: _____
Ταξιδετικός Κωδικός: Δ
573.853 6
ΘΕΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087076

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**« ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-
ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ
ΔΕΙΚΤΕΣ »**

Πασχάλης Θεοτόκης

ΧΩΡΟΧΡΟΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ mRNA
ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ
ΝΕΥΡΑΞΟΝΙΚΗΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗΣ
NOGO-A, ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ
ΜΟΝΤΕΛΟ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ
ΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ

ΘΕΣ/ΝΙΚΗ 2010

Χωροχρονική μελέτη προτύπου έκφρασης mRNA του αναστολέα νευραξονικής αναγέννησης Nogo-A, σε πειραματικό μοντέλο πολλαπλής σκλήρυνσης.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο
Πειραματικής Νευρολογίας & Νευροανοσολογίας της Β' Νευρολογικής
Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου
Θεσσαλονίκης κατά το έτος 2009, υπό την επίβλεψη και
καθοδήγηση του Επίκουρου Καθηγητή Νικολάου Γρηγοριάδη

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή αποτελείται από τους :

Νικόλαο Γρηγοριάδη, Επίκουρο Καθηγητή Νευρολογίας,
Ιατρική Σχολή Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Δημήτριο Κουρέα, Καθηγητή Φυσιολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας.

Νικόλαο Μπαλατσό, Λέκτορα Βιοχημείας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας.

ΣΤΟΝ ΠΑΤΕΡΑ ΜΟΥ, ΠΟΥ ΑΝ ΚΑΙ ΕΦΥΓΕ ΠΡΟΣΦΑΤΩΣ ΑΠΟ
ΤΗ ΖΩΗ, ΜΟΥ ΕΔΕΙΞΕ ΤΟ ΔΡΟΜΟ ΤΗΣ ΖΩΗΣ

ΣΤΗΝ ΜΗΤΕΡΑ ΜΟΥ ΠΟΥ ΣΥΝΕΧΙΖΕΙ ΝΑ ΜΟΥ ΔΕΙΧΝΕΙ ΠΩΣ
ΔΙΑΒΑΙΝΟΥΝ ΤΟ ΔΡΟΜΟ ΑΥΤΟ

ΘΕΡΜΕΣ ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ ΠΡΟΣ:

- ❖ Τα μέλη της τριμελούς εισηγητικής επιτροπής
- ❖ Τον Πρόεδρο και το Διοικητικό Συμβούλιο του Ιδρύματος Μποδοσάκη για την υποτροφία που μου χορηγήθηκε για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας
- ❖ Τον Διευθυντή της Β' Νευρολογικής κλινικής του Α.Π.Θ Καθηγητή Νικόλαο Τάσκο για την εμπιστοσύνη και συμπαράσταση του, ηθική και επιστημονική
- ❖ Τον Καθηγητή Θεόδωρο Σκλαβιάδη, εργαστήριο Φαρμακολογίας του Φαρμακευτικού τμήματος του Α.Π.Θ για την φιλοξενία στο εργαστήριο του για τη διαδικασία κλωνοποίησης του γονιδίου Nogo-A
- ❖ Όλα τα μέλη του εργαστηρίου Πειραματικής Νευρολογίας και Νευροανοσολογίας της Β' Νευρολογικής κλινικής του Α.Π.Θ και ιδιαιτέρως: τον ιατρό Αθανάσιο Λουρμπόπουλο για την οργάνωση του πειραματικού μέρους και την ανεκτίμητη βοήθεια κατά την διάρκεια των θυσιών των πειραματοζώων, την βιολόγο Ρόζα Λαγουδάκη για την οργάνωση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων της real-time PCR, την ιατρό Έλενα Πολυζωΐδου καθώς επίσης και την διδάκτορα Ευγενία Σάλτα που βοήθησε στην κλωνοποίηση του γονιδίου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ / ABSTRACT	7
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
2.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	9
2.1.1 Ο νευρώνας	9
2.1.2 Η γλοία	10
2.1.2.1 Τα αστροκύτταρα	10
2.1.2.2 Τα ολιγοδενδροκύτταρα και τα κύτταρα Schwann.....	11
2.1.2.3 Άλλα κύτταρα	12
2.2 ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΝΣ.....	12
2.2.1 Απομυελινωτικές νόσοι του ΚΝΣ: Πολλαπλή Σκλήρυνση	12
2.2.1.1 Η φλεγμονή στην ΠΣ.....	13
2.2.1.2 Η γλοιακή ουλή	14
2.2.1.3 Η αξονική κάκωση στην ΠΣ.....	14
2.2.2 Το πειραματικό μοντέλο της ΠΣ: ΠΑΕ	14
2.2.2.1 Επαγωγή της νόσου: Ενεργητική και Παθητική ΠΑΕ.....	15
2.2.2.2 Οξεία και χρόνια ΠΑΕ	16
2.2.2.3 Κλινικά χαρακτηριστικά της ΠΑΕ.....	16
2.3 ΝΕΥΡΟΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	18
2.3.1 Αποκατάσταση του ΠΝΣ.....	18
2.3.2 Αποκατάσταση του ΚΝΣ	19
2.3.3 Ανασταλτικοί παράγοντες αποκατάστασης του ΚΝΣ	19
2.3.3.1 Πρωτεογλυκάνες CSPGs και KSPGs	19
2.3.3.2 Πρωτεΐνες μυελίνης: MAG και OMgp	20
2.3.3.3 Άλλοι ανασταλτικοί παράγοντες	20
2.4 Ο ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ ΑΞΟΝΙΚΗΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗΣ NOGO-A.....	20
2.4.1 Δομή του γονιδίου Nogo.....	21
2.4.2 Ισομορφές του Nogo και τα πρότυπα έκφρασης τους	21
2.4.2.1 Nogo-A.....	22
2.4.2.2 Nogo-B και -C.....	22
2.4.3 Υποδοχέας του Nogo και μοριακός μηχανισμός αναστολής.....	23
2.4.4 Nogo-A και Πολλαπλή Σκλήρυνση / ΠΑΕ	24
2.5 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	26

3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	28
3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ	28
3.1.1 Επισκόπηση πειραματικού πρωτοκόλλου και χωρισμός ομάδων ..	28
3.1.2 Επαγωγή χρόνιας ΠΑΕ	28
3.1.3 Κλινική εξέταση πειραματοζώων	29
3.1.4 Θυσίες πειραματοζώων	31
3.1.5 Τομές ιστών	32
3.2 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ: IN SITU ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ.....	33
3.2.1 ISH με μη ραδιενεργό RNA ανιχνευτή: επισκόπηση τεχνικής	33
3.2.2 Κλωνοποίηση του Nogo-A ειδικού τμήματος.....	35
3.2.3 In vitro μεταγραφή και σήμανση ανιχνευτή.....	44
3.2.4 Πρωτόκολλο ISH.....	45
3.3 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ: REAL-TIME PCR	47
3.3.1 Real-time PCR με SYBR Green: επισκόπηση τεχνικής.....	47
3.3.2 Παραγωγή RNA χρησιμοποιώντας TRIzol.....	48
3.3.3 Παραγωγή cDNA από ολικό RNA.....	48
3.3.4 Η αντίδραση rt-PCR	49
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	51
4.1 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ISH.....	51
4.1.1 Έκφραση του Nogo-A mRNA στον τελεγκέφαλο.....	54
4.1.2 Έκφραση του Nogo-A mRNA στον διεγκέφαλο	55
4.1.3 Έκφραση του Nogo-A mRNA στον μεσεγκέφαλο	57
4.1.4 Έκφραση του Nogo-A mRNA στον ρομβοεγκέφαλο.....	57
4.1.5 Έκφραση του Nogo-A mRNA στην παρεγκεφαλίδα.....	59
4.1.6 Έκφραση του Nogo-A mRNA στο νωτιαίο μυελό.....	59
4.2 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ REAL-TIME PCR	60
4.2.1 Αποτελέσματα εγκεφάλου	60
4.2.2 Αποτελέσματα νωτιαίου μυελού	61
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	63
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	68

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο Nogo-A, ένας αναστολέας της νευρικής ανάπτυξης, έχει βρεθεί να παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της νευραξονικής αναγέννησης μετά από τραυματισμό. Τα πρότυπα έκφρασης του mRNA του έχουν μελετηθεί στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) τόσο φυσιολογικών όσο και μετά από τραυματισμό εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού, ενήλικων επίμυων. Το mRNA του Nogo-A βρέθηκε να εκφράζεται άφθονο στους περισσότερους εγκεφαλικούς πυρήνες νευρώνων των φυσιολογικών ζώων συμπεριλαμβανομένου νευρώνων του ιππόκαμπου, πυρήνων της ηνίας, απιοειδή φλοιού, ερυθρού πυρήνα, κοινού κινητικού και γεφυρικού τριδυμικού πυρήνα. Δεδομένου του γεγονότος ότι κανένα παρόμοιο πρότυπο δεν έχει διερευνηθεί έως τώρα σε απομυελινωτικές νόσους, μελετήσαμε μια ομάδα ενήλικων C57BL/6 μυών ανά χρονικά διαστήματα σε μια MOG-επαγόμενη πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ), ένα μοντέλο πολλαπλής σκλήρυνσης, καθώς επίσης και μια ομάδα φυσιολογικών πειραματοζώων (παίνε ζώα). Ο *in situ* υβριδισμός (ISH) πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον εντοπισμό των σημείων έκφρασης του Nogo-A mRNA σε τομές εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού πάχους 26μm, χρησιμοποιώντας RNA ανιχνευτές που σημάνθηκαν με διγοξυγενίνη. Η *real-time* PCR χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την ποσοτικοποίηση της έκφρασης μεταξύ όλων των ομάδων των ζώων ενώ τα δεδομένα κανονικοποιήθηκαν και εξετάστηκαν για την παρουσία στατιστικά σημαντικών διαφορών. Η ιστοχημική ανάλυση με ISH αποκάλυψε ένα πρότυπο έκφρασης παρόμοιο με αυτό που έχει παρατηρηθεί σε ενήλικες επίμυες και η *real-time* PCR έδειξε μια χρονο-ανεξάρτητη μεταβολή των mRNA επιπέδων για τα εγκεφαλικά εικυλίσματα ενώ μια προοδευτική αύξηση των μεταγράφων με κορύφωση στην οξεία φάση ακολουθούμενη από πτώση στη χρόνια, για τα δείγματα νωτιαίου μυελού. Βάση όλων των παραπάνω, είναι εμφανές ότι αυτές οι αλλαγές σχετίζονται με τις φλεγμονώδεις διεργασίες που συμβαίνουν στο ΚΝΣ τις συγκεκριμένες χρονικές περιόδους τονίζοντας έτσι την σχέση του μορίου με την ανοσοδιαμεσολαβούμενη απομυελίνωση.

1. ABSTRACT

Nogo-A, a neurite outgrowth inhibitor, has been found to play a significant role in controlling axonal regrowth after injury. The mRNA expression patterns of Nogo-A have been studied in the adult rat central nervous system (CNS) both in naive animals and in animal models, such as traumatic brain and spinal cord injury. Nogo-A mRNA was abundantly expressed in most brain nuclei of naive animals, including neurons of the hippocampus, habenular nuclei, piriform cortex, red nucleus, oculomotor nucleus and pontine trigeminal nucleus. Given that no similar pattern expression has ever been investigated in demyelinating diseases, we performed MOG-induced experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in adult C57BL/6 mice, an animal model of multiple sclerosis (MS). Both EAE and MS are considered T-cell mediated autoimmune disorders. We studied the NOGO-A mRNA expression at various time points following the induction of the disease. Naive (non - EAE) animals were used as controls. In situ Hybridization (ISH) was performed in order to detect and localize the specific Nogo-A mRNA's in 26 μ m brain and spinal cord sections using digoxigenin-labelled riboprobes. Real-time PCR was used in order to quantify the expression among all groups of animals and data were normalized and analysed for statistical significance. Histochemical analysis with ISH revealed an mRNA expression pattern similar to that previously reported in naive adult rats and real-time PCR exhibited a time-independent change in mRNA levels in brain homogenates while a time-progressive up-regulation of the transcripts culminating in acute phase of the disease followed by a mere fall in chronic, were observed in spinal cord. Evidently, these changes were related to the inflammatory reaction within CNS at the correspondent time - point. Current results indicate that the expression of NOGO-A mRNA and the concomitant axonal regeneration is dependent on the kinetics of the underlying immune - mediated demyelination.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

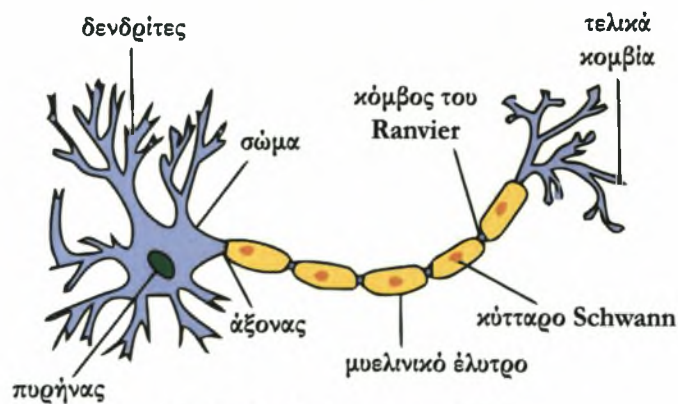
Το νευρικό σύστημα είναι ένα δίκτυο εξειδικευμένων κυττάρων που ονομάζονται νευρώνες τα οποία συντονίζουν τις αντιδράσεις ενός ζώου και στέλνουν μηνύματα από και προς περιοχών του σώματος του. Ο αριθμός των νευρικών κυττάρων είναι τεράστιος και είναι αδύνατο να μετρηθεί, ωστόσο παλαιοί ανατόμοι είχαν υπολογίσει ότι στον ανθρώπινο εγκέφαλο υπάρχουν δύο τρισεκατομμύρια νευρώνες. Οι νευρώνες στέλνουν μηνύματα είτε ως ηλεκτροχημικά κύματα τα οποία ταξιδεύουν κατά μήκος λεπτών ινών που ονομάζονται άξονες, είτε ως χημικά μόρια, τους νευροδιαβιβαστές, που απελευθερώνονται σε άλλα κύτταρα. Εκτός των νευρώνων, το νευρικό σύστημα περιλαμβάνει μια άλλη ειδική ομάδα μη νευρωνικών κυττάρων, την γλοία, η οποία παρέχει δομική και μεταβολική στήριξη στους νευρώνες.

2.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Στα περισσότερα ζώα το νευρικό σύστημα χωρίζεται σε δύο κύριες κατηγορίες: το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και το περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ). Το ΚΝΣ αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του νευρικού συστήματος και συμπεριλαμβάνει τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό. Το ΠΝΣ είναι μια συλλογική κατηγοριοποίηση όλων εκείνων των κυτταρικών δομών, κυρίως των νευραξόνων (ή απλά νύρων) καθώς επίσης και νευρικών συναθροίσεων που ονομάζονται γάγγλια, που δεν εμπίπτουν εξ ορισμού στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Δύο είναι οι διακριτές ομάδες κυττάρων του νευρικού συστήματος: Οι νευρώνες και η γλοία.

2.1.1 Ο νευρώνας

Ο νευρώνας αποτελείται από 3 κύρια τμήματα: το κυτταρικό σώμα, τον νευράξονα και τους δενδρίτες (Σχήμα 1). Ο νευράξονας ή νευρική ίνα, αποτελεί μια προέκταση του κυτταρικού σώματος. Το αρχικό τμήμα του νευράξονα ονομάζεται εκφυτικός κώνος και είναι αυτό που τον συνδέει με το κυτταρικό σώμα. Τόσο στο τελικό τμήμα του άξονα όσο και εγκάρσια κατά μήκος του εμφανίζονται διακλαδώσεις οι οποίες καταλήγουν σε απολήξεις, υπεύθυνες για την μεταβίβαση των χημικών σημάτων.



Σχήμα 1. Δομή νευρώνα του ΠΝΣ.

Οι νευράξονες ποικίλουν σε μήκος από 1mm έως και 1 μέτρο όπως για παράδειγμα, αυτοί που ξεκινούν από τον νωτιαίο μυελό και καταλήγουν στα άκρα του ζώου. Ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό του νευράξονα είναι η έλλειψη ριβοσωμάτων και έτσι όλες οι πρωτεΐνες προέρχονται από το σώμα του νευρώνα, μια δομή που έχει διάμετρο 20μm και περιέχει όλα τα υποκυτταρικά οργανίδια (πυρήνα, ενδοπλασματικό δίκτυο, σύστημα Golgi). Οι άξονες των νευρώνων καλύπτονται από έλυτρο μυελίνης, το οποίο σχηματίζεται από κύτταρα γλοίας που περιελίσσονται γύρω από τον άξονα.

2.1.2 Η γλοία

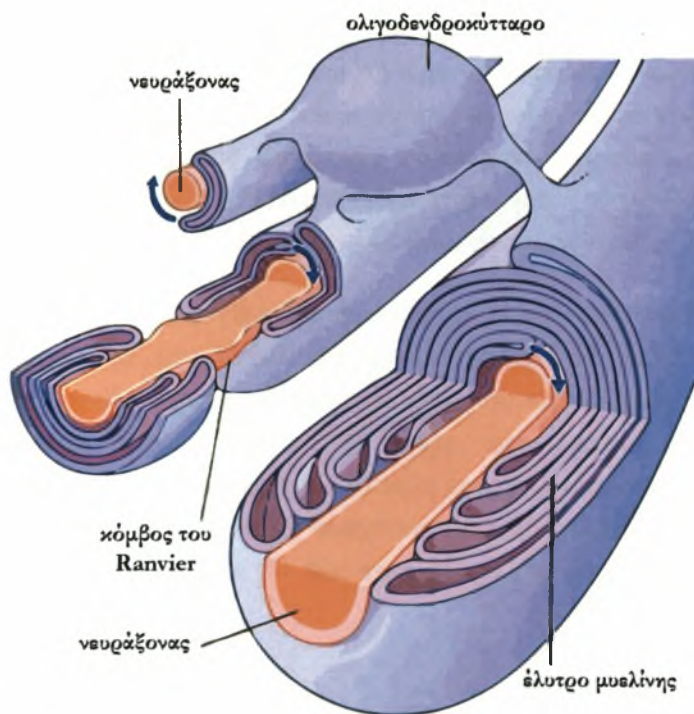
Τα γλοιακά κύτταρα ή γλοία (ελλ. glue =κόλλα) είναι μη νευρωνικά κύτταρα τα οποία παρέχουν την απαραίτητη θρεπτική υποστήριξη στους νευρώνες, διατηρούν την ομοιόσταση, κάποια από αυτά σχηματίζουν την μυελίνη ενώ κάποια άλλα παίρνουν ενεργό μέρος στη σηματοδότηση. Ανακαλύφθηκε το 1856 από τον παθολόγο Rudolf Virchow στην προσπάθεια του να ανεύρει τον συνδετικό ιστό του εγκεφάλου. Στον ανθρώπινο εγκέφαλο υπολογίζεται πως ο αριθμός των γλοιακών κυττάρων ξεπερνά αυτόν των νευρώνων κατά 10 φορές. Τα κύτταρα της γλοίας διατηρούν την ικανότητα πολλαπλασιασμού κατά την ενηλικίωση, μια ιδιότητα που όπως είναι γνωστό λείπει από τους περισσότερους νευρώνες. Δύο είναι οι κύριοι τύποι γλοίας: η μικρογλοία και η μακρογλοία. Η μικρογλοία είναι εξειδικευμένα μακροφάγα με ικανότητα φαγοκύτωσης τα οποία προστατεύουν τους νευρώνες. Αποτελούν περίπου το 15% των κυττάρων του ΚΝΣ και έχουν υψηλούς ρυθμούς κινητικότητας και διαίρεσης όταν δημιουργηθεί κάποια βλάβη στον εγκέφαλο. Όλα τα υπόλοιπα κύτταρα της γλοίας ανήκουν στην μακρογλοία και είναι τα εξής :

2.1.2.1 Τα αστροκύτταρα

Τα αστροκύτταρα (ή κοινώς αστρογλοία) έλαβαν την ονομασία τους από την χαρακτηριστική αστεροειδής μορφή τους και είναι ο πιο άφθονος πληθυσμός κυττάρων της γλοίας του ΚΝΣ. Ρυθμίζουν το εξωτερικό χημικό περιβάλλον των νευρώνων με το να αφαιρούν την περίσσεια ιόντων, κυρίως καλίου, και με τις πολυάριθμες προεκβολές τους συνδέουν τους νευρώνες στην αιματική παροχή του εγκεφάλου συμβάλλοντας έτσι στην θρεπτική υποστήριξη τους. Πρόσφατα δεδομένα αποκαλύπτουν ότι τα αστροκύτταρα μπορούν να διεγερθούν όπως οι νευρώνες μέσω διαβιβαστών και κυμάτων ασβεστίου.¹ Η ιστοχημική ανίχνευση τους είναι εύκολη λόγω της έκφρασης της όξινης πρωτεΐνης των ινιδίων (glial fibrillary acidic protein ή GFAP).

2.1.2.2 Τα ολιγοδενδροκύτταρα & τα κύτταρα Schwann: η δημιουργία της μυελίνης

Αυτά τα κύτταρα της γλοίας παρέχουν τις μεμβράνες οι οποίες περιβάλλουν τους νευράξονες, δηλαδή τη μυελίνη (Σχήμα 2). Το έλυτρο της μυελίνης περιοδικά διακόπτεται δημιουργώντας τους κόμβους του Ranvier. Το μυελώδες έλυτρο εκτός από μονωτική προστασία που προσδίδει στον νευράξονα, χρησιμεύει για την μετάδοση και την επιτάχυνση της νευρικής ώσης κατά μήκος του. Για παράδειγμα ένας εμμύελος άξονας μεταφέρει ώσεις από 5 έως και 30 μέτρα το δευτερόλεπτο σε αντίθεση με έναν αμμύελο που μεταφέρει 0,5 με 2 μέτρα το δευτερόλεπτο. Τα ολιγοδενδροκύτταρα και τα κύτταρα Schwann διαφέρουν τόσο στην τοποθεσία τους, όσο και σε ορισμένα άλλα χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα, τα ολιγοδενδροκύτταρα βρίσκονται μόνο στο ΚΝΣ, ενώ τα κύτταρα Schwann βρίσκονται μόνο στο ΠΝΣ. Μια άλλη διαφορά είναι ότι ένα ολιγοδενδροκύτταρο συμμετέχει στο σχηματισμό της μυελίνης αρκετών νευραξόνων, ενώ κάθε κύτταρο Schwann περιβάλλει μόνο ένα συγκεκριμένο νευράξονα. Οι εμμύελοι άξονες έχουν χαρακτηριστικό άσπρο χρώμα λόγω της παρουσίας της μυελίνης και αναφέρονται ως λευκή ουσία σε αντίθεση με την φαιά που χαρακτηρίζει τα σώματα των νευρώνων. Η μυελίνη αποτελείται από 80% λιπίδια και 20% πρωτεΐνη. Κάποιες από τις πρωτεΐνες που την απαρτίζουν είναι η βασική πρωτεΐνη της μυελίνης (MBP), η πρωτεολιπιδική πρωτεΐνη της μυελίνης (PLP) που αποτελεί σχεδόν το 50% της ολικής πρωτεΐνης της μυελίνης και η γλυκοπρωτεΐνη της μυελίνης των ολιγοδενδροκυττάρων (MOG) που αποτελεί μόλις το 0,05% της ολικής, τρεις πρωτεΐνες οι οποίες έχουν αποδειχθεί εγκεφαλιτιδογόνες (προκαλούν δηλαδή εγκεφαλίτιδες).



Σχήμα 2. Τυπικό ολιγοδενδροκύτταρο και ο σχηματισμός της μυελίνης στο ΚΝΣ.

2.1.2.3 Άλλα κύτταρα

Εκτός από τα αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδροκύτταρα, στο ΚΝΣ υπάρχουν τα επενδυματικά κύτταρα αλλά και η ακτινωτή γλοία. Τα επενδυματικά κύτταρα καλύπτουν εσωτερικά τους χώρους μέσα στους οποίους κυκλοφορεί το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF) ενώ η ακτινωτή γλοία παρέχει ένα είδος σκαλωσιάς πάνω στο οποίο μεταναστεύουν οι νευρώνες κατά την ανάπτυξη τους.

2.2 ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΝΣ

Όπως προαναφέρθηκε, μια από τις κύριες λειτουργίες της μυελίνης είναι η μόνωση του νευράξονα. Αν για κάποιο λόγο ελαττωθεί ή παραληφθεί αυτή η προστασία που παρέχει το έλυτρο της μυελίνης, τότε ο νευράξονας εκτίθεται σε εξωγενείς παράγοντες με απρόβλεπτες επιπτώσεις στην λειτουργία του νευρώνα, έως και καταστροφή του. Όταν πρωτεΐνες της μυελίνης αναγνωριστούν από το ανοσοποιητικό σύστημα ως εαυτό αντιγόνα τότε μιλάμε για μια αυτοάνοση ασθένεια με επικρατή φαινότυπο την φλεγμονή και απομυελίνωση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πολλαπλή σκλήρυνση ή κοινώς, σκλήρυνση κατά πλάκας.

2.2.1 Απομυελινωτικές νόσοι του ΚΝΣ: Πολλαπλή σκλήρυνση

Η πολλαπλή σκλήρυνση (ΠΣ) ορίζεται ως μια χρόνια φλεγμονώδης απομυελινωτική νόσος του ΚΝΣ και θεωρείται η πιο συχνή αιτία μη τραυματικής νευρολογικής βλάβης.² Προσβάλλει περίπου 2.5 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως, κυρίως ενήλικες ηλικίας 20 έως 40 ετών, ενώ εμφανίζεται συχνότερα στις γυναίκες από ότι στους άνδρες σε αναλογία 2:1. Πρόκειται για μια επίκτητη, αυτοάνοση νόσο, πολυπαραγοντικής και άγνωστης έως και σήμερα αιτιολογίας. Στην παθογένεια της εμπλέκονται τόσο η κυτταρική όσο και η χυμική ανοσία, ενώ απαραίτητη κρίνεται και η παρουσία ενός εξωγενούς παράγοντα, πιθανώς ενός βραδείας δράσης ιού, ο οποίος προκαλεί σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα μια παθολογική ανοσολογική αντίδραση που κατευθύνεται ενάντια των πρωτεϊνών της μυελίνης.³

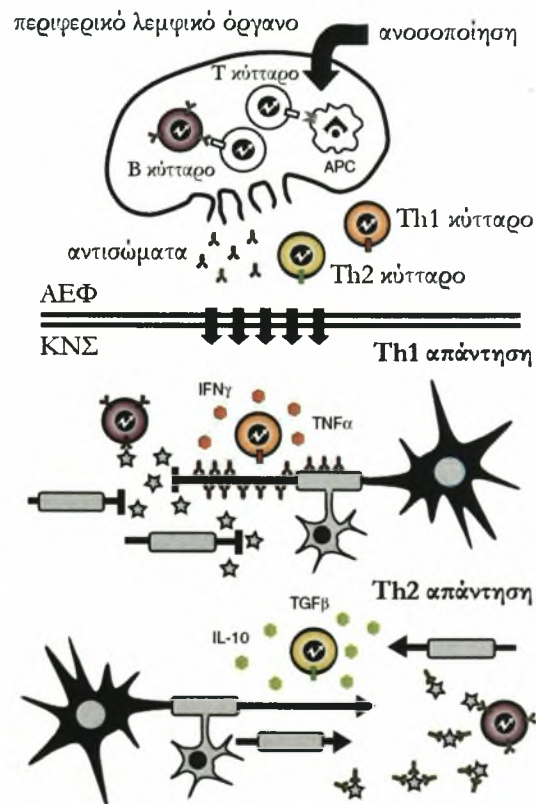
Παρόλο που η νόσος έχει συνήθως χαρακτηριστική πορεία με εξάρσεις και υφέσεις, εν τούτοις παρουσιάζει μεγάλη κλινική ανομοιογένεια.⁴ Η μεγάλη ποικιλία της κλινικής εικόνας οφείλεται στις διάχυτες βλάβες που εμφανίζονται στο ΚΝΣ, οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στα οπτικά νεύρα, στο νωτιαίο μυελό και στην περικοιλιακή λευκή ουσία. Το πώς προκαλείται η έναρξη, οι αλλαγές που συμβαίνουν κατά την διάρκεια του χρόνου, η συσχέτιση μεταξύ συμπτωμάτων και άλλων ευρημάτων της νόσου καθώς και το πώς αυτή επηρεάζεται από την θεραπεία είναι στο σύνολο τους σχεδόν άγνωστα.

Νευροπαθολογία της ΠΣ

Η πρωτοπαθής απομυελίνωση και η παρουσία πολυεστιακών απομυελινωτικών πλακών (εξ ου και η ονομασία) αποτελούν το βασικότερο παθολογοανατομικό εύρημα στην ΠΣ.⁵ Οι πρώτες περιγραφές από τους Carswell και Cruveilhier που χρονολογούνται πριν από περίπου 160 χρόνια, ακολούθηθηκαν από την λεπτομερή κλινική και παθολογική συσχέτιση μελετών του Charcot, ο οποίος περιέγραψε τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά της ΠΣ: α) την εστιακή απομυελίνωση σχετιζόμενη με την φλεγμονή, β) την δημιουργία γλοιακής ουλής η οποία είναι η συνάθροιση γλοιακών κυττάρων στον τόπο της απομυελίνωσης, και γ) τη διαφορετικού βαθμού καταστροφή των νευραξόνων.

2.2.1.1 α) Η φλεγμονή στην ΠΣ

Ανοσοκυτταροχημικές μελέτες τομών ιστού του ΚΝΣ από ασθενείς με ΠΣ έχουν δείξει ότι οι περιαγγειακές αθροίσεις φλεγμονωδών κυττάρων και η παρεγχυματική διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων αποτελείται κυρίως από T-λεμφοκύτταρα και μακροφάγα καθώς και μερικά B-λεμφοκύτταρα.⁶ Οι ενεργοποιημένοι υπότυποι των T-λεμφοκυττάρων που αναγνωρίζονται είναι τα Th1 και Th2 βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα. Τα Th1 λεμφοκύτταρα γενικά παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως η IL-2, η IFN- γ και ο TNF- α ,^{7,8} ενώ τα Th2 εκκρίνουν αντι-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως η IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 και IL-13 (Σχήμα 3). Επιπλέον μελέτες με MRI στα αρχικά στάδια της ΠΣ υποδεικνύουν ότι πριν τη δημιουργία των περισσότερων βλαβών προηγείται η διένεξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (ΑΕΦ) με αποτέλεσμα την διήθηση των λεμφοκυττάρων.⁹



Σχήμα 3. Ανοσιακές απαντήσεις στη ΠΣ. Μια Th1 απάντηση επιφέρει καταστρεπτικά αποτελέσματα στην ακεραιότητα της μυελίνης των αξόνων ενώ αντιθέτως μια Th2 απάντηση έχει ευεργετικά αποτελέσματα (Τροποπ. από Fontoura et al. 2006).

2.2.1.2 β) Η γλοιακή ουλή

Η γλοιακή ουλή είναι μια ενεργή κυτταρική διεργασία που εμφανίζεται μετά από τραυματισμό του ΚΝΣ. Ο κύριος κυτταρικός πληθυσμός της γλοιακής ουλής είναι αντιδρώντα αστροκύτταρα, γι αυτό πολλές φορές αναφέρεται και ως αστροκυτταρική ουλή.¹⁰ Μετά την ενεργοποίησή τους από επαγωγείς της γλοιακής ουλής όπως οι TGFβ-1, TGFβ-2, IL-1 και IFN-γ, τα αστροκύτταρα υπόκεινται σε μορφολογικές αλλαγές και μέσω της αύξησης της κυτταροπλασματικής GFAP, ενισχύεται ο κυτταροσκελετός, τα κύτταρα αναπτύσσουν ψευδοπόδια και οδηγούνται στο σημείο της απομυελίνωσης, συμπληρώνοντας το κυτταρικό έλλειμμα της περιοχής. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται αστρογλοίωση.

Παρόλη την ευεργετική δράση που ασκεί η αστρογλοίωση στο σημείο της φλεγμονής ελέγχοντας και καταστέλλοντας την περαιτέρω φυσική καταστροφή του νευράξονα, εμφανίζει και μειονεκτήματα. Το κυριότερο από αυτά είναι η παρεμπόδιση της νευροαναγέννησης μέσω ανασταλτικών μορίων που εμφανίζονται στο σημείο, εμποδίζοντας την πλήρη και λειτουργική ανάρρωση των απομυελινωμένων νευρώνων του ΚΝΣ. Σε μια γλοιακή ουλή, εκτός των αστροκυττάρων αξιολογούμενη είναι και η παρουσία μικρογλοίας, η οποία ασκεί τις φαγοκυτταρικές της ιδιότητες.

2.2.1.3 γ) Η αξονική κάκωση στην ΠΣ

Η πυκνότητα των νευραξόνων ελαττώνεται στις περισσότερες απομυελινωτικές πλάκες της ΠΣ. Μια οξεία αξονική βλάβη μπορεί να συμβεί κατά την διάρκεια ενεργούς απομυελίνωσης ή μπορεί να είναι ήδη εμφανής στα αρχικά στάδια της πορείας της νόσου.^{11,12} Οι Kornek et al. ανέφεραν υψηλό ποσοστό οξείας αξονικής κάκωσης κατά τη διάρκεια ενεργούς απομυελίνωσης αλλά και ένα μικρότερο σε ανενεργές απομυελινωτικές πλάκες, εύρημα που παρέχει ποσοτική απόδειξη ύπαρξης μιας βραδέως προκαλούμενης χρόνιας αξονικής καταστροφής η οποία συμβάλλει τελικώς στην κλινική επιδείνωση της νόσου.¹³ Ο μηχανισμός της αξονικής κάκωσης ωστόσο, παραμένει άγνωστος.

2.2.2 Το πειραματικό μοντέλο της ΠΣ: Πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα

Το 1933 ο Rivers και οι συνάδελφοι του Sprunt και Berry, ανέφεραν ότι μετά από επαναλαμβανόμενους ενδομυϊκούς εμβολιασμούς με εκχυλίσματα εγκεφάλου σε οκτώ πιθήκους, δύο ανέπτυξαν αταξία και μυϊκή αδυναμία και βρέθηκαν να παρουσιάζουν περιαγγειακές φλεγμονώδεις και απομυελινωτικές βλάβες στο ΚΝΣ. Με την προσθήκη πλήρους εκχυλίσματος του Freund (CFA) (μυκοβακτηρίδια σε μεταλλικό έλαιο) σε γαλάκτωμα νευρικού ιστού, προκλήθηκε οξεία διάσπαρτη εγκεφαλομυελίτιδα σε αρκετά και διαφορετικά είδη ζώων με πολύ ελαττωμένο

λανθάνοντα χρόνο μετά από μονήρη εμβολιασμό ή μόνο λίγους εμβολιασμούς ομόλογου ιστού ΚΝΣ.^{14,15} Αυτές ήταν η πρώτες επίσημες περιγραφές πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (ΠΑΕ), το καλύτερο έως σήμερα, διαθέσιμο ζωικό μοντέλο των φλεγμονωδών απομυελινωτικών νόσων του ανθρώπινου ΚΝΣ.

Η ΠΑΕ έχει δύο κύριους κλινικούς τύπους που ποικίλουν στην κλινική πορεία και στην νευροπαθολογία (οξεία και χρόνια ΠΑΕ). Η οξεία ΠΑΕ είναι μονοφασική νόσος που προσομοιάζει την οξεία διάσπαρτη εγκεφαλομυελίτιδα στον άνθρωπο. Η χρόνια ΠΑΕ εκδηλώνεται είτε με μία χρόνια προϊούσα/σταθερή πορεία είτε ως υποτροπιάζουσα νόσος με εξάρσεις και υφέσεις και προσομοιάζει με την ανθρώπινη νόσο της ΠΣ. Τα πρωτόκολλα επαγωγής της νόσου διαφέρουν κυρίως στο αντιγόνο που χρησιμοποιείται (MOG ή πεπτιδιά της, MBP ή πεπτιδιά της, PLP ή ομογενοποίημα ιστού από το ΚΝΣ), στον χρησιμοποιούμενο φορέα του αντιγόνου ή περιέκτη του (adjuvant), στις ποσότητες των αντιγόνο-περιέκτη που χρησιμοποιούνται, στο χρονοδιάγραμμα εμβολιασμού και στην περιοχή ενοφθαλμισμού (πέλμα ή βάση ουράς). Υπάρχουν δύο τύποι επαγωγής της ΠΑΕ στα ζώα: η ενεργητική ΠΑΕ και παθητική ή εκ μεταφοράς.

2.2.2.1 Επαγωγή της νόσου: Ενεργητική και Παθητική ΠΑΕ

Στο μοντέλο της ενεργητικής ΠΑΕ, ο μυς με ΠΑΕ παράγει ενεργά τα δικά του, ειδικά για τη μυελινική πρωτεΐνη, T-λεμφοκύτταρα. Μια μονήρης ομάδα ζώων ανοσοποιείται με μυελινική πρωτεΐνη γαλακτωματοποιημένη με CFA. Η τοξίνη pertussis ενίεται στη μία ή δύο μέρες που ακολουθούν. Η τοξίνη του pertussis θεωρείται ότι αυξάνει τη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Μέσα σε 2-3 εβδομάδες αυτοί οι μύες εκδηλώνουν κλινικά σημεία ΠΑΕ. Η ενεργός μέθοδος έτσι συνδυάζει την επαγωγική φάση και τη φάση αποτελέσματος, με τις δυο φάσεις να λαμβάνουν χώρα στο ίδιο ζώο.¹⁶

Η παθητική ΠΑΕ προκαλείται με τη χορήγηση ενεργοποιημένων έναντι της μυελίνης T-λεμφοκυττάρων σε φυσιολογικά πειραματόζωα. Αυτά τα T-λεμφοκύτταρα παρήχθησαν από εμβολιασμό μίας ξεχωριστής ομάδας ζώων με μια πρωτεΐνη μυελίνης, γαλακτωματοποιημένης σε πλήρες συμπλήρωμα Freund's (CFA): αυτή η πρώτη ομάδα ανοσοποιημένων μυών θυσιάζονται και κυτταρικά εναιωρήματα που περιέχουν T-λεμφοκύτταρα ειδικά στην πρωτεΐνη της μυελίνης φτιάχνονται από διυλισμένους λεμφαδένες. Μετά από *in vitro* διέγερση με μυελινική πρωτεΐνη, αυτά τα T-λεμφοκύτταρα μεταφέρονται σε μια δεύτερη ομάδα πειραματόζωων, τα οποία ακολούθως αναπτύσσουν ΠΑΕ. Με τη μέθοδο είναι διακριτές η φάση ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων έναντι της μυελίνης του ΚΝΣ και η επαγωγική φάση της απομυελίνωσης.¹⁶

2.2.2.2 Οξεία και χρόνια ΠΑΕ

Η πρόκληση ΠΑΕ είτε με ενεργητική είτε παθητική ανοσοποίηση, οδηγεί σε οξεία ΠΑΕ, μια μονοφασική νόσο που συνήθως ακολουθείται από αυτόματη ανάρρωση (ίαση). Η νόσος εκδηλώνεται στην περίπτωση της ενεργητικής ΠΑΕ εντός 10 ημερών από την ημέρα του πρώτου ενοφθαλμισμού του αντιγόνου (λανθάνουσα περίοδος) ή, στην περίπτωση της παθητικής ΠΑΕ, εκδηλώνεται γρηγορότερα και συνήθως εντός 5 περίπου ημερών από την ημέρα χορήγησης των T-λεμφοκυττάρων. Ακολουθεί μία γρήγορη επιδείνωση με κορύφωση αυτής και ακόλουθη ύφεσή της, η οποία συνολικά διαρκεί περίπου 7-10 μέρες και στη συνέχεια τα πειραματόζωα συνήθως αναρρώνουν πλήρως.¹⁷

Η χρόνια ΠΑΕ, και ιδιαιτέρως η υποτροπιάζουσα μορφή της, χαρακτηρίζεται συνήθως από επαναλαμβανόμενες κλινικές προσβολές, που ορίζονται ως υποτροπές, ακολουθούμενες από περιόδους μερικής ή πλήρους κλινικής αποκατάστασης που ορίζονται ως υφέσεις. Επίσης η νόσος μπορεί να λάβει τη μορφή μίας χρόνιας προϊούσας κλινικής πορείας, χωρίς εξάρσεις και υφέσεις, στην οποία τα πειραματόζωα έχουν σχετικά σταθερή κλινική εικόνα. Στον μύ C57bl/6 η χρόνια ΠΑΕ μπορεί να προκληθεί με δύο ενέσεις MOG σε γαλάκτωμα CFA σε μεσοδιάστημα μίας εβδομάδας. Το μοντέλο της MOG-επαγόμενης ΠΑΕ (παρουσία του πεπτιδίου 35-55 της MOG το οποίο έχει αποδεχθεί να επιφέρει την υψηλότερη εγκεφαλιτιδογονικότητα) αποτελεί βασικό μοντέλο χρόνιας ΠΑΕ στους μύες.^{18,19}

2.2.2.3 Κλινικά χαρακτηριστικά της ΠΑΕ

Μετά από μία λανθάνοντα περίοδο που ακολουθεί την ενεργή ή παθητική ανοσοποίηση, τα πειραματόζωα χάνουν βάρος και εμφανίζουν νευρολογικά σημεία. Η απώλεια του βάρους συμβαίνει χαρακτηριστικά 1-2 ημέρες προ της εμφάνισης των πρώτων κλινικών σημείων της νόσου και αποτελεί ασφαλή ένδειξη επικείμενης έναρξης της ΠΑΕ. Η μέγιστη κλινική εικόνα αναπτύσσεται 3-4 ημέρες μετά την έναρξη της νόσου και ανάλογα με το μοντέλο μπορεί να ακολουθηθεί είτε από πλήρη ύφεση και ίαση των πειραματοζώων -οπότε προκύπτει η οξεία ΠΑΕ- είτε από μερική ύφεση και νέα έξαρση ή από σταθερή κλινική πορεία -οπότε προκύπτει η χρόνια ΠΑΕ.²⁰

Στην οξεία ΠΑΕ τα ζώα είτε πεθαίνουν είτε αναρρώνουν και δεν έχουν άλλες προσβολές. Στη χρόνια υποτροπιάζουσα ΠΑΕ τα ζώα τυπικά αναρρώνουν από την πρώτη προσβολή και έχουν ακόλουθες υποτροπές, οι οποίες χωρίζονται από περιόδους με μερική ή πλήρη κλινική ανάρρωση· όμως, μέσα στην ομάδα των ζώων που αναπτύσσουν χρόνια υποτροπιάζουσα ΠΑΕ, μερικά από τα ενοφθαλμισθέντα ζώα μπορεί να εκδηλώσουν ένα χρόνιο σταθερό ή χρόνιο προοδευτικό νευρολογικό έλλειμμα που συνεχίζει από την πρώτη προσβολή ή από επαναλαμβανόμενες

προσβολές.²¹ Η κλινική εικόνα σε όλα τα μοντέλα τρωκτικών (μύες και επίμυες) εκτιμάται και ποσοτικοποιείται με βάση μία κλίμακα βαθμολόγησης από το «0» έως το «5» ή «6» της κινητικότητας του πειραματοζώου. Το «0» αντιστοιχεί σε φυσιολογικό πειραματοζώο και το μέγιστο «5» ή «6» σε θάνατο του πειραματοζώου από την νόσο.^{17,20,22}

2.3 ΝΕΥΡΟΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Η νευροαναγέννηση αναφέρεται στην ανάπτυξη και επιδιόρθωση των νευρικών ιστών, κυττάρων ή κυτταρικών προϊόντων. Τέτοιοι μηχανισμοί συμπεριλαμβάνουν την επαναμυελίνωση, τη δημιουργία νέων νευρώνων, γλοίας, αξόνων ή μυελίνης. Η εμφάνιση επαναμυελίνωσης του ΝΣ είναι ένα αδιαμφισβήτητο γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται μέσω ενός πλήθους μελετών.^{23,24,25} Αυτές οι μελέτες υποδηλώνουν μια συνεχή δυναμική συσχέτιση μεταξύ παθογόνων και επανορθωτικών παραγόντων στην εξελισσόμενη βλάβη της ΠΑΕ. Το εύρος της επαναμυελίνωσης φαίνεται να εξαρτάται από την διαθεσιμότητα των ολιγοδενδροκυττάρων ή των προδρόμων μορφών τους στις βλάβες.

Η νευροαναγέννηση διαφέρει μεταξύ του ΠΝΣ και του ΚΝΣ τόσο σε λειτουργικά χαρακτηριστικά και μηχανισμούς, όσο σε έκταση και ταχύτητα. Όταν ένας άξονας τραυματίζεται, το τελικό του άκρο (άπω) υπόκειται σε βαλλεριανή εκφύλιση (προοδευτική αποικοδόμηση από το σημείο τραυματισμού ως το ύψος των νευρικών απολήξεων) χάνοντας έτσι μαζί και το μυελώδες έλυτρο. Στη συνέχεια το νευρικό κύτταρο έχει δύο επιλογές: να ενεργοποιήσει το μονοπάτι της απόπτωσης δηλαδή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου ή να προσπαθήσει να επιδιορθώσει τη βλάβη. Η επιδιόρθωση, όπως θα δούμε και παρακάτω, δεν είναι πάντοτε εφικτή.

2.3.1 Αποκατάσταση του ΠΝΣ

Επιδιόρθωση στο ΠΝΣ παρατηρείται σε μεγάλο ποσοστό.²⁶ Αξονικές προεκβολές αρχίζουν να εκφύονται από το εγγύ νευραξονικό τμήμα (αυτό που συνδέεται με το σώμα του νευρώνα) προς το εναπομένον, αλλά μερικώς εκφυλισμένο, άπω τμήμα. Η ανάπτυξη των νευρικών προεκβολών ρυθμίζεται από χημειοτακτικούς παράγοντες που εκκρίνονται από τα κύτταρα Schwann. Τραυματισμός του ΠΝΣ επάγει την άμεση μετανάστευση φαγοκυττάρων, κυττάρων Schwann και μακροφάγων στο σημείο της κάκωσης με σκοπό την απομάκρυνση των νεκρών κυτταρικών υπολειμμάτων. Μετά από μια νευρική κάκωση, το εγγύ τμήμα αναπτύσσει οίδημα και υπόκειται σε μια ισχνή παροδική ανάνδρωση εκφύλιση αλλά με την απομάκρυνση των νεκρών κυτταρικών υπολειμμάτων, η αύξηση προεκβολών και η ανάπτυξη εκφυτικών κώνων είναι γεγονός.

Ο εγγύς νευράξονας είναι ικανός να αναδομηθεί, αν και εφόσον το κυτταρικό σώμα παραμείνει ανέπαφο και δεύτερον, έχει διασφαλίσει μόνιμη επαφή με κύτταρα Schwann του “καναλιού”, της πρωτοταγούς δηλαδή δομής μιας ομάδας νευραξόνων που ονομάζεται ενδονεύριο. Ποσοστά υψηλής αναδόμησης παρατηρούνται στον άνθρωπο τα οποία φτάνουν για μικρούς νευρώνες τα 2mm/μέρα και για

μεγαλύτερους τα 5mm/μέρα.²⁷ Το άπω τμήμα παρόλα αυτά, υφίσταται βαλλεριανή εκφύλιση εντός μερικών ωρών από τον τραυματισμό· ο άξονας και η μυελίνη αποικοδομούνται, αλλά το ενδονεύριο παραμένει. Σε μετέπειτα στάδια της αποκατάστασης, κύτταρα Schwann καθοδηγούν και επαναφέρουν τη σωστή στερεοταξία των νευρών, εκκρίνοντας νευροτροφικούς παράγοντες.

2.3.2 Αποκατάσταση του ΚΝΣ

Αντιθέτως με το ΠΝΣ, ένας τραυματισμός στο ΚΝΣ είναι μη αναστρέψιμος, και δεν ακολουθείται από εκτεταμένη νευροαναγέννηση. Ο περιορισμός αυτός οφείλεται στην ανασταλτική επίδραση της γλοίας και του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος. Το εχθρικό αυτό και απαγορευτικό αναπτυξιακό περιβάλλον δημιουργείται εν μέρει από την μετανάστευση αναστολέων που σχετίζονται με την μυελίνη, αστροκυττάρων, ολιγοδενδροκυττάρων και προδρόμων τους, καθώς και μικρογλοίας. Η καθυστερημένη αποικοδόμηση του άπω νευραξονικού τμήματος σε σχέση με αυτή του ΠΝΣ, συνεισφέρει επίσης προς αυτή την κατεύθυνση και αυτό γιατί τα εκφυλισμένα υπολείμματα αξόνων και μυελίνης δεν απομακρύνονται ικανοποιητικά, επιβαρύνοντας το σημείο και ουσιαστικά το έργο της αποκατάστασης. Όλοι αυτοί οι παράγοντες προάγουν τον σχηματισμό της γλοιακής ουλής, παρουσία της οποίας δεν είναι εφικτή η αποκατάσταση των νευρών. Αξίζει να σημειωθεί πως έχει επιτευχθεί νευροαναγέννηση του ΚΝΣ κάτω από τις κατάλληλες και ευνοϊκές για τα κύτταρα συνθήκες,²⁷ οπότε τελικά το πρόβλημα έγκειται της υπέρβασης ή εξάλειψης αυτών των ανασταλτικών παραγόντων.

2.3.3 Ανασταλτικοί παράγοντες της αξονικής αποκατάστασης του ΚΝΣ

Η αναστολή της αναγέννησης των νευρώνων είναι το αποτέλεσμα συσσώρευσης αντιδρώντων αστροκυττάρων, της δημιουργίας γλοιακής ουλής στον τόπο του τραυματισμού και της αυξημένης έκφρασης μορίων που συμβάλλουν στην διακοπή της νευρικής ανάπτυξης και επέκτασης.²⁸ Ανάμεσα σε αυτά, συγκαταλέγονται μόρια που έχουν τόσο αστροκυτταρική όσο ολιγοδενδριτική ή υπολειμματική μυελινική προέλευση: οι πρωτεογλυκάνες θειικής χονδροϊτίνης και κερατάνης, η πρωτεΐνη Nogo, η γλυκοπρωτεΐνη σχετιζόμενη με μυελίνη (MAG), η γλυκοπρωτεΐνη ολιγοδενδροκυττάρων-μυελίνης (OMgp), μόρια εφρίνης B3 και σεμαφορίνης 4D καθώς και ο άγνωστος έως και σήμερα NI-35.

2.3.3.1 Πρωτεογλυκάνες θειικής χονδροϊτίνης και κερατάνης

Οι πρωτεογλυκάνες θειικής χονδροϊτίνης (CSPGs) είναι μόρια τα οποία υπερεκφράζονται σε αντιδρώντα αστροκύτταρα και πρόδρομα ολιγοδενδροκύτταρα (OPCs) κατόπιν διεγέρσεως σχηματισμού της γλοιακής ουλής. Χαρακτηριστικό παράδειγμα CSPG αποτελεί ο NG2 ο οποίος βρίσκεται στην μεμβράνη των

παραπάνω κυττάρων ασκώντας αρνητική επίδραση στη νευρική αναγέννηση.²⁷ Η εμφάνιση του ξεκινά μέσα σε 48 ώρες από τον τραυματισμό ενώ υψηλότερα επίπεδα του παράγοντα αυτού παρατηρούνται έως και την δέκατη ημέρα. Οι πρωτεογλυκάνες θειικής κερατάνης (KSPGs) είναι μόρια με παρόμοια δράση και τα οποία υπερεικφράζονται σε αντιδρώντα αστροκύτταρα.

2.3.3.2 Ανασταλτικές πρωτεΐνες μυελίνης: MAG και OMgp

Ανάμεσα στα μόρια με ολιγοδενδριτική ή υπολειμματική μυελινική προέλευση κυριότεροι εκπρόσωποι είναι η πρωτεΐνη Nogo, η γλυκοπρωτεΐνη σχετιζόμενη με μυελίνη (MAG)²⁹ και η γλυκοπρωτεΐνη ολιγοδενδροκυττάρων-μυελίνης (OMgp)³⁰. Η πρωτεΐνη Nogo, για την οποία ακολουθεί εκτενής αναφορά, είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη σε αντίθεση με την MAG η οποία πέρα από τη μεμβρανική φύση, μπορεί να ασκήσει την δράση της και μέσω της διαλυτής dMAG³¹ ενώ η OMgp είναι αγκιστρωμένη στην μεμβράνη μέσω του γλυκολιπιδίου της φωσφατιδυλοϊνσιτόλης (ΦΙ). Διαφορές άλλες προκύπτουν βάσει της δομής των γονιδίων τους· η ανθρώπινη OMgp ευρίσκεται στο 17q11.2 και αποτελείται από 2 εξόνια δίνοντας μια πρωτεΐνη 120kDa, ενώ η MAG βρίσκεται στο 19q13.1, αποτελείται από 12 εξόνια και κωδικοποιεί 2 ισομορφές: την 67kDa S-MAG και την 72kDa L-MAG. Η κυριότερη διαφορά όμως είναι σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες Nogo και OMgp, η MAG δεν εκφράζεται σε νευρικά κύτταρα, αλλά περιορίζεται στη γλοία του ΚΝΣ.³² Παρόλα αυτά και οι τρεις πρωτεΐνες δρουν μέσω του ίδιου κοινού υποδοχέα, NgR.³³

2.3.3.3 Άλλοι ανασταλτικοί παράγοντες

Η εφρίνη B3 και σεμαφορίνη 4D έχουν αναγνωριστεί και αυτά ως δύο ανασταλτικά μόρια που εμποδίζουν την διαδικασία της επαναμυελίνωσης μέσω των υποδοχέων EphA4 και PlexinB1 αντίστοιχα.²⁶

2.4 Ο ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ ΝΕΥΡΑΞΟΝΙΚΗΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗΣ NOGO-A

Όλο το ενδιαφέρον γύρω από αυτό το μόριο ξεκίνησε πριν ακριβώς από μια δεκαετία οπού τρεις ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες, οι Chen και συν³⁴, Grandpre και συν³⁵ καθώς και Prinjha και συν³⁶, δημοσίευσαν συγχρόνως τα αποτελέσματα τους μέσα από τα οποία ανεδείκνυαν την πρωτεΐνη Nogo, ως έναν από τους κυριότερους αναστολείς της νευραξονικής αναγέννησης. Το εργαλείο που είχαν στα χέρια τους ήταν ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, το IN-1, το οποίο είχε αναπτύξει προηγουμένως ο Schwab και η ερευνητική του ομάδα, το οποίο αναγνώριζε και εξουδετέρωνε την ανασταλτική δράση του παράγοντα (τότε υπό το όνομα NI-250 λόγω μοριακής μάζας που ήταν ίση με 250.000) σε καλλιέργεια κυττάρων.³⁷ Από τότε έως σήμερα,

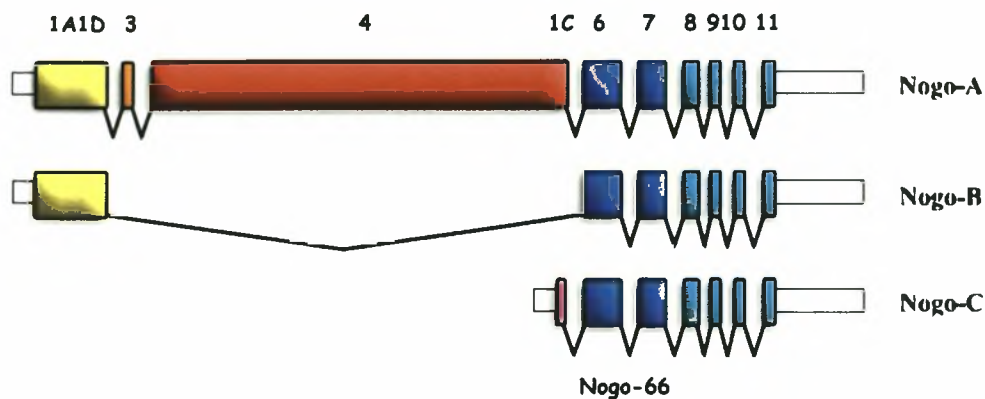
ένα πλήθος ερευνητικών εργασιών έχει συγκεντρωθεί, ένας αριθμός ο οποίος τείνει να αυξάνεται διαλευκαίνοντας το μυστήριο το οποίο κρύβεται πίσω από αυτό το μόριο και τις πλειοτροπικές του δράσεις.

2.4.1 Δομή του γονιδίου Nogo

Το ανθρώπινο γονίδιο του Nogo (RTN4) έχει χαρτογραφηθεί στο γενετικό τόπο 2p14-13. Αποτελείται από 14 εξόνια σε αντίθεση με του μυ που χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 11 και έχει 11 εξόνια.³⁸ Αποτελεί το τέταρτο μέλος της οικογένειας των ρετικουλονίων, μιας οικογένειας πρωτεϊνών που πήρε το όνομα της από τον υποκυτταρικό εντοπισμό της στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ). Τα ρετικουλονία είναι πρωτεΐνες 200-1200 αμινοξέων με μια κοινή καρβοξυτελική περιοχή (περιοχή ομολογίας ρετικουλονίων ή RHD) που αποτελείται από 2 υδροφοβικά τμήματα και μια εσωτερική αλληλουχία 66 αμινοξέων. Συγκεκριμένα για το RTN4, η κοινή καρβοξυτελική περιοχή κωδικοποιείται από τα εξόνια 6-11, ενώ η εσωτερική αλληλουχία των 66 αμινοξέων, γνωστή και ως Nogo-66, κωδικοποιείται από τα συντηρημένα εξόνια 6 και 7.³³ Η καρβοξυτελική περιοχή περιέχει επίσης ένα σήμα συγκράτησης στο ΕΔ (-KRKAE) προσδίδοντας έτσι τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό του μορίου. Παρόλα αυτά για να επιτελέσει τον ρόλο του, ένας ικανοποιητικός αριθμός μεταφέρεται και συντήγεται με την μεμβράνη με δύο συγκεκριμένες διαμορφώσεις όπως αναλύεται παρακάτω.

2.4.2 Οι τρεις κύριες ισομορφές του Nogo και τα πρότυπα έκφρασης τους

Από τις 7 διαφορετικές πρωτεΐνες που μπορούν να προκύψουν από εναλλακτικό μάτισμα του RTN4, μόνο 3, οι Nogo-A, -B και -C, θεωρούνται κύριες ισομορφές οι οποίες εκφράζονται στο ενήλικο ΚΝΣ μύων (Σχήμα 4). Τα δευτερεύοντα μετάγραφα, κανένα από τα οποία δεν αναφέρεται ως Nogo, αν και έχουν σωστά διευθετημένα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs), ωστόσο δεν έχουν αναδείξει πειραματικά δεδομένα έκφρασης τους.³³ Για παράδειγμα, τα RTN4-D, -E, -Aa, -Ab, -F και -G, θεωρούνται ως δευτερεύοντα μετάγραφα τα οποία είναι ορχεο-ειδικά (Rtn-I).^{38,39} Οι ανθρώπινες Nogo-A, -B και -C πρωτεΐνες έχουν 1192 αμινοξέα (αα), 373αα και 199αα σε μήκος, ενώ όταν ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα SDS-PAGE δίνουν ζώνες των 205kDa, 52kDa και 25kDa αντίστοιχα.⁴⁰ Ανάλυση στυπώματος Northern με κοινό ανιχνευτή (pan-Nogo) για την περιοχή Nogo-66, αποκαλύπτει τα 3 κύρια mRNA μετάγραφα μήκους 4,6kb, 2,6kb και 1,6kb αντίστοιχα.



Σχήμα 4. Οι τρεις κύριες ισομορφές του γονιδίου *nrg4* (Nogo) στο μυ (*mus musculus*).

2.4.2.1 Nogo-A

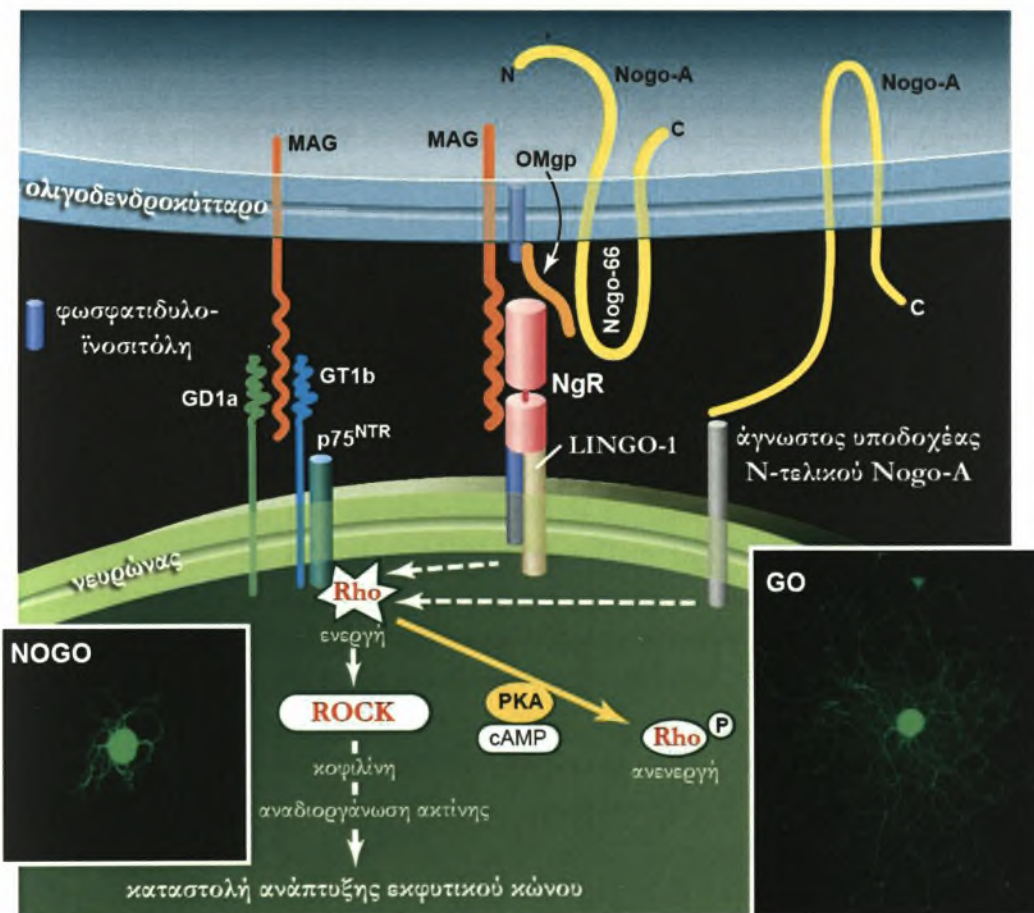
Το 4,6kb Nogo-A μετάγραφο εντοπίζεται κυρίως σε εμβρυϊκό και ενήλιο ΚΝΣ με παράλληλη αλλά σαφώς χαμηλότερη έκφραση στους ιστούς της καρδιάς και των όρχεων.⁴⁰ Πιστεύεται ότι το πρωτεϊνικό προϊόν του Nogo-A αντιστοιχεί στο NI-250, το οποίο αναγνωρίζεται από το μονοκλωνικό αντίσωμα IN-1, λόγω της σύμπτωσης των προβλεπόμενων μοριακών βαρών. Οι Josephson και συν⁴¹ δημοσίευσαν την πρώτη πλήρη μελέτη έκφρασης του Nogo-A με *in situ* υβριδισμό σε ιστούς επίμου και ανθρώπου, αποκαλύπτοντας την έκφραση σε ολιγοδενδροκύτταρα και κάποια συγκεκριμένα είδη νευρώνων αλλά την απουσία από GFAP θετικά αστροκύτταρα ή κύτταρα Schwann του ΠΝΣ. Πολύ σύντομα ακολούθησαν και άλλες μελέτες έκφρασης σε mRNA⁴² και πρωτεϊνικό επίπεδο^{33,40,43,44} οι οποίες επιβεβαιώνουν τα παραπάνω δεδομένα παρουσιάζοντας, παράλληλα, αντίστοιχα πρωτεϊνικά πρότυπα.

2.4.2.2 Nogo-B και -C

Αντίθετα με το Nogo-A, τα Nogo-B και -C εναλλακτικά μετάγραφα δεν περιορίζονται τόσο στο ΚΝΣ. Η πρωτεΐνη του Nogo-B (55 kDa) εκφράζεται στον εγκέφαλο και νωτιαίο μυελό όσο και στους όρχεις, καρδιά, πνεύμονες, συκώτι, σπλήνα και νεφρούς.⁴⁰ Η ίδια πρωτεΐνη πιθανολογείται επίσης να αποτελεί τον αχαρακτήριστο ανασταλτικό παράγοντα NI-35, μια υπόθεση που συνάγεται από τα προβλεπόμενα μοριακά βάρη των 2 πρωτεϊνών.⁴⁵ Μεγάλο ενδιαφέρον συγκεντρώνεται και για την Nogo-C πρωτεΐνη που εκφράζεται δραματικά στον σκελετικό μυ ενώ ένα 40% της έκφρασης αυτής εμφανίζεται στον εγκέφαλο και ένα 5% σε νωτιαίο μυελό και καρδιά.⁴⁰ Η παρουσία τόσο του Nogo-A αλλά και Nogo-B και -C εκτός του νευρικού ιστού, ίσως υποδηλώνουν δευτερεύοντες ρόλους του μορίου Nogo, πέρα της νευραξονικής αναστολής.⁴⁶

2.4.3 Υποδοχέας του Nogo-A και μοριακός μηχανισμός αναστολής

Η ανασταλτική δράση των Nogo πρωτεϊνών επιτελείται μέσω του υποδοχέα Nogo (NgR) ή Nogo-66, γιατί το τμήμα της πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα είναι η εσωτερική αλληλουχία των 66 αμινοξέων. Το ανθρώπινο NgR γονίδιο (R1N4R) αποτελείται από 2 εξόνια που εκτίνονται ~27kb στη χρωμοσωμική θέση 22q11. Ταυτοποιήθηκε το 2001 και η δομή του υποδοχέα έγινε γνωστή το 2003.^{47,48,49} Είναι αγκιστρωμένος στην μεμβράνη μέσω γλυκολιπιδίου της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, εκφράζεται στο ΚΝΣ αλλά σε αρκετά χαμηλότερα επίπεδα από τον προσδέτη του διαμεσολαβώντα την μεταβίβαση σήματος μέσω ενεργοποίησης της RhoA GTPάσης (Σχήμα 5).^{47,50,51}



Σχήμα 5. Μοριακός μηχανισμός καταστολής της νευραξονικής αναγέννησης. Μόρια δρουν σε διάφορους υποδοχείς και συστατικά τους όπως ο NgR, LINGO-1, p75 (ή TROY) καθώς και άλλους άγνωστους μέχρι στιγμής υποδοχείς όπως αυτός που ενεργοποιείται από το αμινοτελικό άκρο του Nogo-A ή των υποδοχέων των πρωτεογλυκάνων θετικής χονδροϊτίνης (CSPGs), με προσδέτες οι οποίοι υπερεκφράζονται σε αντιδρώντα αστροκύτταρα (δεν αναπαρίστανται). Σε όλες τις περιπτώσεις η μεταγωγή σήματος γίνεται μέσω του Rho μονοπατιού (Τροποπ. από Woolf και Bloechlinger 2002).

Το σύμπλοκο του Nogo-66 υποδοχέα αποτελείται από 3 πρωτεΐνες: την NgR, η οποία αλληλεπιδρά άμεσα με το Nogo-66 τμήμα, τον p75^{NTR} συνυποδοχέα ο οποίος πιθανόν αποτελεί το μεταγωγικό μέρος του υποδοχέα^{52,53} και την διαμεμβρανική εγκεφαλοειδική LLR πρωτεΐνη LINGO-1.⁵⁴ Οι δύο άλλες από τις κύριες ανασταλτικές πρωτεΐνες, MAG και OMgp, αλληλεπιδρούν επίσης με το σύμπλοκο NgR/p75^{NTR} ^{29,30,55} αναδεικνύοντας έτσι τη συμβολή αυτού του μορίου στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος προς την καταστολή ανάπτυξης εκφυτικών κώνων, το πρώτο δηλαδή βήμα της νευραξονικής αναγέννησης. Η μεταγωγή σήματος πραγματοποιείται μέσω του Rho μονοπατιού· η RhoA GTPάση αφού ενεργοποιηθεί από τον υποδοχέα NgR, ενεργοποιεί την ROCK (Rho-A κινάση) η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί την LIM κινάση η οποία θα ενεργοποιήσει την κοφιλίνη, ένα μόριο που επάγει την αναδιοργάνωση της ακτίνης του κυτταροσκελετού με τελικό αποτέλεσμα την καταστολή ανάπτυξης εκφυτικών κώνων.²⁶ Συμπληρωματικά, ενδιαφέρον αποτελεί η ύπαρξη ενός άλλου άγνωστου έως σήμερα διαμεμβρανικού υποδοχέα, ο οποίος έμμεσα συνδέεται με το παραπάνω μονοπάτι και ο οποίος έχει βρεθεί να ενεργοποιείται από το αμινοτελικό άκρο του Nogo-A, όταν αυτό βρεθεί με διαφορετική διαμόρφωση στη μεμβράνη.⁵⁶

2.4.4 Nogo-A και Πολλαπλή Σκλήρυνση / ΠΑΕ

Αν και αρκετές μελέτες έχουν συνδέσει τον αναστολέα Nogo-A και διάφορα νευρολογικά μοντέλα όπως της τραυματικής εγκεφαλικής κάκωσης (TBI) και αντίστοιχης κάκωσης του νωτιαίου μυελού (SCI), λίγες έως ελάχιστες έχουν κάνει σύνδεση με την ΠΣ και την ΠΑΕ.⁵⁷ Μια αύξηση της έκφρασης του Nogo από ολιγοδενδροκύτταρα εντοπίστηκε σε χρόνια ενεργές απομυελινωτικές πλάκες ΠΣ, όπου το μόριο αυτό υποθετικά αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του NgR εκφρασμένο σε αντιδρώντα αστροκύτταρα και μικρογλοία.⁵⁸ Όσον αφορά την ΠΑΕ, δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες^{59,60} το 2004, πραγματοποίησαν επαγωγή ΠΑΕ σε knockout (k.o) μύες της φυλής C57BL/6 για το γονίδιο Nogo A/B, και δημοσίευσαν παρόμοια αποτελέσματα αναφέροντας ότι η έλλειψη του Nogo, επέφερε κλινική βελτίωση στα k.o πειραματόζωα σε σχέση με τους μάρτυρες. Ωστόσο, μεταγενέστερα ανοσοϊστοχημικά δεδομένα ανέφεραν ότι το πρότυπο έκφρασης της Nogo-A πρωτεΐνης ολιγοδενδροκυττάρων δεν αλλάζει μεταξύ ανοσοποιημένων ΠΑΕ ζώων σε σχέση με φυσιολογικούς υγιείς μύες, ενώ μια μικρή αύξηση παρατηρήθηκε στον νωτιαίο μυελό των ανοσοποιημένων πιθανόν ως αντίδραση στις φλεγμονώδεις και αξονοκαταστροφικές διεργασίες της ΠΑΕ.⁶¹ Παρόλα αυτά, τόσο τα πειράματα των Karnezis και συν⁵⁹ που χρησιμοποίησαν το μη εγκεφαλιτιδογόνο πεπτιδίο Nogo623-640 το οποίο επέφερε ανοσιακή απόκριση ενάντιας στο Nogo-A σε μια MOG-επαγόμενη ΠΑΕ, όσο και των Fontoura και

συν⁶⁰ με ένα παρόμοιο αλλά σχετικά εγκεφαλιτιδογόνο τμήμα του Nogo-66, αναδεικνύουν ανοσοτροποποιητικά φαινόμενα στα οποία οφείλεται η προαναφερθείσα κλινική βελτίωση, προάγοντας το Nogo-A ως ρυθμιστή απομυελινωτικών παθήσεων.

2.5 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Έως προσφάτως, η ΠΣ θεωρούνταν ως μια κυρίαρχη απομυελινωτική διαταραχή του ΚΝΣ και αρκετή προσπάθεια επικεντρώθηκε στην έρευνα της συσχέτισης μεταξύ της εξέλιξης των βλαβών και της κλινικής πορείας σε ότι αφορά την μυελινική καταστροφή και επιδιόρθωση. Πρόσφατα δεδομένα που αφορούν τον ρόλο της αξονικής κάκωσης στην παθογένεια της ΠΣ υποδεικνύουν μια έντονη συσχέτιση μεταξύ του εύρους της αξονικής καταστροφής του νωτιαίου μυελού, της παράλυσης και της απώλειας μετακίνησης.⁶² Στην ΠΑΕ, το πειραματικό μοντέλο της ΠΣ, έχει αναφερθεί ότι η αξονική καταστροφή είναι εμφανής από τα αρχικά ακόμη στάδια της ασθένειας και αυξάνει με την σοβαρότητα της κλινικής εξέλιξης της νόσου.⁶³ Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι η αξονική κάκωση είναι ένα σημαντικό παθολογικό εύρημα και παράγοντας της μόνιμης ανικανότητας στην ΠΣ.⁶² Σε αντίθεση με το ΠΝΣ, η αναγέννηση, ανάπτυξη και δομική ελαστικότητα των νευραξόνων είναι περιορισμένες στο ενήλικο ΚΝΣ ύστερα από προσβολή.⁶⁴ Στις περισσότερες των περιπτώσεων, αυτός ο περιορισμός προέρχεται από την συνάθροιση ανασταλτικών μορίων μυελινικής και αστροκυτταρικής προέλευσης στο σημείο της βλάβης, παρά από την έλλειψη ευεργετικών αυξητικών παραγόντων αποκατάστασης.⁶⁴ Από την ταυτοποίηση του ως ένας από τους κύριους αναστολείς της νευρικής ανάπτυξης,^{34,35,36} ο Nogo-A έχει αποσπάσει την προσοχή αρκετών ερευνητικών ομάδων ανά τον κόσμο, συγκεντρώνοντας το ερευνητικό ενδιαφέρον γύρω από τα πρότυπα έκφρασης του στο ΚΝΣ, τόσο σε επίπεδο mRNA^{41,42} όσο και πρωτεΐνης^{43,44} σε μοντέλα νευρολογικών παθήσεων.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάλυση του πρότυπου έκφρασης του mRNA του Nogo-A σε πειραματικό μοντέλο της ΠΣ, την ΠΑΕ. Η ανάλυση του προτύπου έγινε σε πρώτη φάση ποιοτικά, δηλαδή σε τοπολογικό (χωρικό) επίπεδο με αναγνώριση των νευρωνικών δομών που το εκφράζουν και δεύτερον ποσοτικά, με μέτρηση των επιπέδων του στο ΚΝΣ. Ένας συνδυασμός τεχνικών χρησιμοποιήθηκε προς επίτευξη του παραπάνω στόχου: ο *in situ* υβριδισμός με RNA ανιχνευτή εφαρμόστηκε για την ποιοτική ανίχνευση του μορίου σε τομές εγκεφάλων και νωτιαίου μυελού ενήλικων μύων C57BL/6 ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με Real-time PCR σε ομογενοποίημα των αντίστοιχων ιστών. Τρεις ήταν οι χρονικές στιγμές που μελετήθηκαν κατά την εξέλιξη της νόσου: την 10^η μέρα από την επαγωγή της ΠΑΕ που ορίζει την έναρξη της, στην οξεία φάση και την χρόνια φάση. Χρησιμοποιήθηκε αντίστοιχη ομάδα μαρτύρων στους οποίους δεν πραγματοποιήθηκε επαγωγή της ΠΑΕ (naïve ζώα). Τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του παράγοντα έχουν μελετηθεί εκτενώς σε μύες^{43,65}, επίμυες⁴⁰ αλλά και στον άνθρωπο^{41,58,66} και συγκρίσεις έγιναν ανάμεσα σε απομυελινωτικά ή τραυματικά μοντέλα και υγιείς μάρτυρες. Ανοσοθεραπείες έχουν επίσης προταθεί σε αυτά τα

μοντέλα, οι οποίες προάγουν εμφανή και ικανοποιητική κλινική βελτίωση.^{59,60} Αντιθέτως, αντικρουόμενα αποτελέσματα έχουν δημοσιευτεί τα οποία αφορούν τα αντίστοιχα mRNA επίπεδα σε μοντέλα όπως αυτό της τραυματικής κάκωσης του νωτιαίου μυελού^{40,41,43,44} και μια αποσαφήνιση κρίνεται απαραίτητη προς αυτή την κατεύθυνση. Έως και σήμερα, καμία δημοσιευμένη έρευνα δεν υπάρχει για τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του Nogo-A στην ΠΑΕ.

3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Ένα σύνολο 44 θηλέων C57BL/6 μυών, ηλικίας 6-8 εβδομάδων και βάρους 18-20gr χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Τα ενήλικα πειραματόζωα ελήφθησαν από το Ινστιτούτο Παστέρ και η διαβίωση τους έως και το πέρας των πειραμάτων έγινε σε ειδική αίθουσα με προδιαγραφές υψηλής ασφάλειας (animal care house, P3) του εργαστηρίου Πειραματικής Νευρολογίας και Νευροανοσολογίας της Β' Νευρολογικής Κλινικής του Α.Π.Θ. Ο χώρος αυτός επιτρέπει τον έλεγχο των συνθηκών φωτισμού (12ωρη εναλλαγή), θερμοκρασίας, πίεσης, εξαερισμού (μέσω φίλτρων (hepa) και είναι ελεύθερος παθογόνων. Οι μύες χωρίστηκαν σε 4 ομάδες των έντεκα, κάθε μία σε ξεχωριστό κλουβί και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό.

3.1.1 Επισκόπηση πειραματικού πρωτοκόλλου και χωρισμός ομάδων

Το πείραμα ξεκίνησε με την επαγωγή χρόνιας πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας σε 33 ενήλικες μύες C57BL/6 και ολοκληρώθηκε με τις θυσίες των πειραματοζώων σε τρεις χρονικές περιόδους: την 10^η μέρα από την επαγωγή, στην οξεία φάση και την χρόνια φάση. Χρησιμοποιήθηκε αντίστοιχη ομάδα 11 μαρτύρων στους οποίους δεν πραγματοποιήθηκε επαγωγή της ΠΑΕ (naïve ζώα). Τρία πειραματόζωα ζώα από κάθε ομάδα οδηγήθηκαν για ιστοχημική χρώση *in situ* υβριδισμού με RNA ανιχνευτή ενώ τέσσερα για ανάλυση με *real-time* PCR. Οι ιστοί που μελετήθηκαν με τις παραπάνω 2 μεθόδους ήταν εγκέφαλος και νωτιαίος μυελός (ΚΝΣ). Ο χωρισμός των ομάδων των ζώων που πήραν μέρος συνοψίζεται στον Πίνακα 1 ενώ η διαδικασία σχηματικά στο Σχήμα 6:

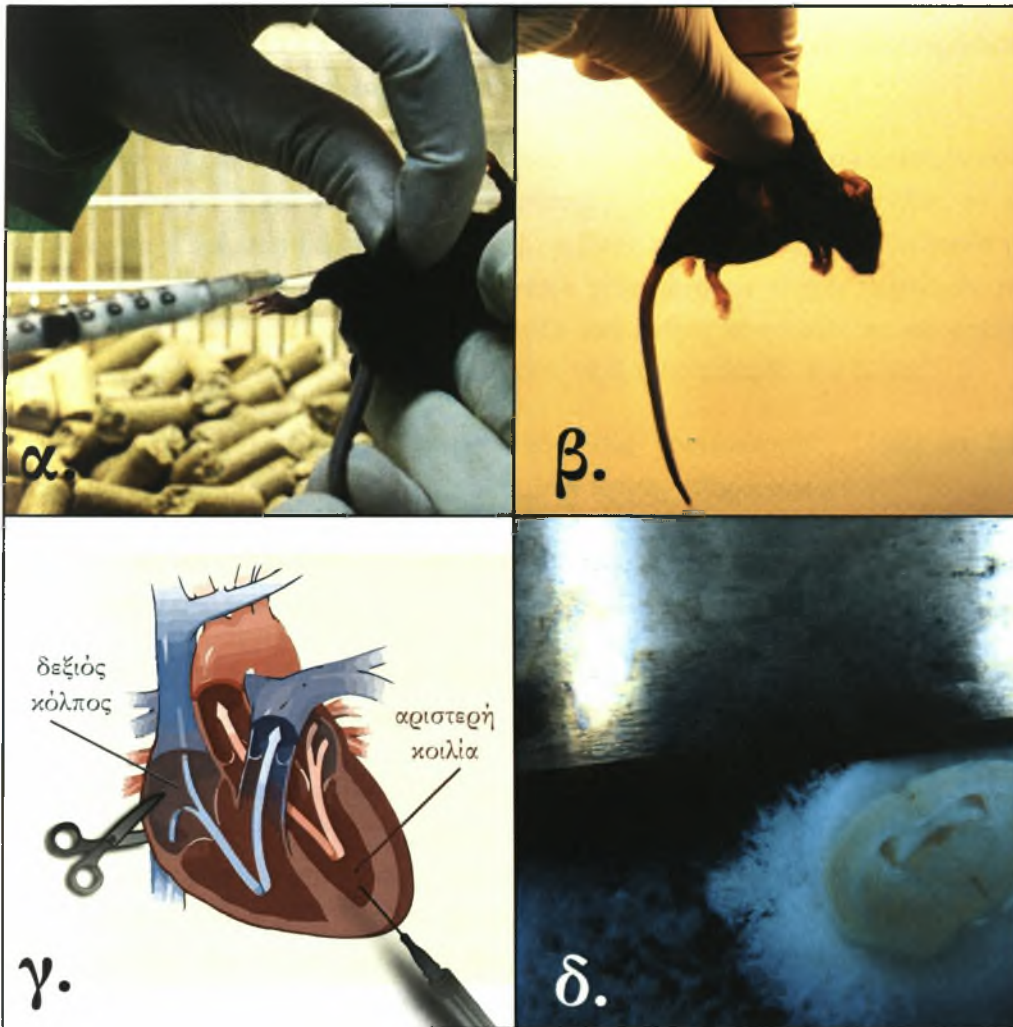
Πίνακας 1. Ομάδες πειραματοζώων και τεχνικές που ακολουθήθηκαν.

τεχνική	αριθμός ζώων			
	naïve ζώα	10 ^η ημέρα	οξεία φάση	χρόνια φάση
ISH	3	3	3	3
real-time PCR	4	4	4	4

3.1.2 Επαγωγή χρόνιας ΠΑΕ

Η επαγωγή της χρόνιας ΠΑΕ επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας το γραμμικό πεπτιδίο της μυελινικής πρωτεΐνης MOG 35-55. Την ημέρα επαγωγής της νόσου (ημέρα 0), έγινε υποδόρια έγχυση 0,15mg γραμμικής MOG στη βάση της ουράς κάθε πειραματοζώου. Η MOG ήταν διαλυμένη σε 100μL ατελούς Freund's συμπληρώματος (IFA) στο οποίο είχε προστεθεί μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης

H37Ra (4mg/ανά mL IFA) και 100μL PBS (αλατούχου δ/ματος φωσφορικών). Την ίδια μέρα χορηγήθηκαν επίσης 400ng/ζώο της τοξίνης Pertussis διαλυμένης σε 500μL PBS ενδοπεριτοναϊκά. Την 2^η ημέρα από την επαγωγή, χορηγήθηκε ενισχυτικά η μισή ποσότητα της τοξίνης Pertussis της αρχικής δόσης, δηλαδή 200ng/ζώο διαλυμένης σε 500μL PBS, ενδοπεριτοναϊκά. Την 7^η ημέρα από την επαγωγή, έγινε επαναληπτική χορήγηση της αρχικής δόσης γραμμικής MOG ενισχυτικά, στη βάση της ουράς των πειραματοζώων.



Σχήμα 6. Σχηματική αναπαράσταση πειραματικού πρωτοκόλλου. α. επαγωγή της ΠΛΑΕ, β. κλινική εξέταση των πειραματοζώων, γ. θυσία πειραματοζώων με διακαρδιακή διήθηση, δ. τομή ιστών σε ψυχρόμενη μικροτόμο.

3.1.3 Κλινική εξέταση των πειραματοζώων

Η κλινική εξέταση έγινε σε καθημερινή βάση χρησιμοποιώντας την παρακάτω κλίμακα κλινικής εξέτασης (Σχήμα 7):

0: Κανένα κλινικό σημείο. Η ουρά ανέρχεται κάθετα ως προς τον οριζόντιο άξονα του ζώου και παραμένει σε αυτή τη θέση ύστερα από άσκηση πίεσης στον αυχένα.

0,5: Η γενική κλινική εικόνα είναι καλή. Η θέση της ουράς ποικίλει, από την κάθετη ως προς την οριζόντια θέση σε σχέση με τον επιμήκη (οριζόντιο) άξονα του πειραματοζώου και το ακραίο της τμήμα παρουσιάζει μια ελαφριά παράλυση. Υπάρχει εμφανής αδυναμία να την διατηρήσει στην κατακόρυφη θέση για αρκετή ώρα ύστερα από άσκηση πίεσης στον αυχένα.

1: Κατά τη συγκράτηση του ζώο από τη ράχη η ουρά βρίσκεται στο οριζόντιο επίπεδο μετά από άσκηση πίεσης στον αυχένα.

1,5: Χαρακτηρίζονται όλα τα περιστατικά που δεν μπορούν να βαθμολογηθούν ούτε ξεκάθαρα 1 ούτε όμως και 2. Στην περίπτωση αυτή η ουρά εμφανίζει: α) το περιφερικό της τμήμα χαλαρή παράλυση, β) η βάση της ουράς σχηματίζει γωνία με τον οριζόντιο άξονα του ζώου προς τα κάτω, γ) δεν έχουμε πλήρη παράλυση της ουράς από την βάση της και δ) αυτή εμφανίζει ένα βαθμό κινητικότητας και μπορεί να ανυψώνεται για λίγο ποτέ όμως πάνω από το οριζόντιο επίπεδο του ζώου.

2: Παράλυση της ουράς και έλλειψη παντελούς κινητικότητας. Όταν το ζώο ανατρέπεται, παρατηρείται ταχεία επάνοδος στα τέσσερα άκρα του.

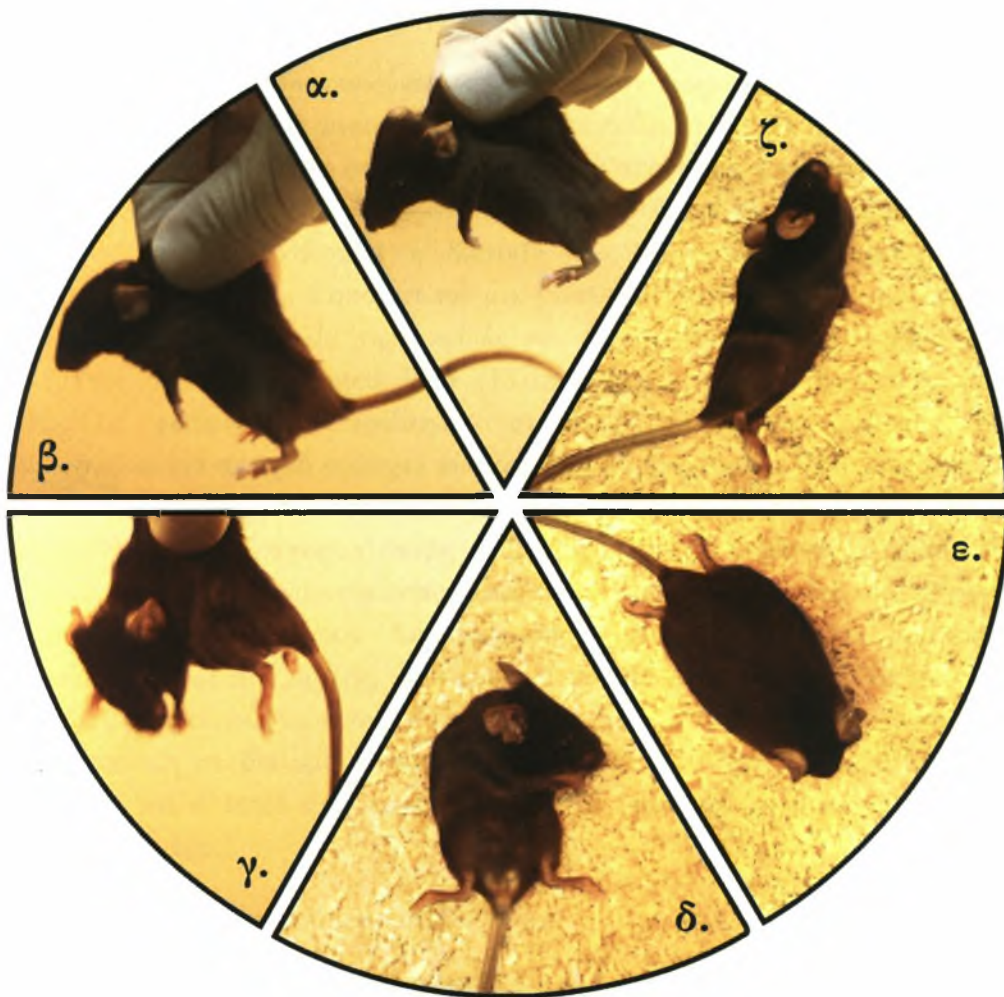
2,5: Το 2 και επιπλέον όταν το ζώο ανατρέπεται, παρατηρείται βραδεία επάνοδος στα τέσσερα άκρα του.

3: Το 2 και παντελής αδυναμία του πειραματοζώου να επανέλθει στα τέσσερα άκρα, όταν αυτό τοποθετείται στη ράχη.

3,5: Τα οπίσθια άκρα εμφανίζουν μετρίου βαθμού πάρεση. Μπορεί να είναι αμφοτερόπλευρη ή να αφορά ένα από τα οπίσθια στο οποίο καθίσταται περισσότερο εμφανής. Τα αντανakλαστικά θέσης των οπίσθιων άκρων απουσιάζουν αλλά μπορούν να προσφέρουν ώθηση στο ζώο και να παρέχουν λειτουργική κίνηση. Πιο εμπειρικά το ζώο πατάει στα πόδια του αλλά δεν μπορούν να στηρίξουν ικανοποιητικά το βάρος του ζώου και κατά την κίνηση περπατούν με τα οπίσθια άκρα σε απαγωγή.

4: το ζώο κινείται κατά κύριο λόγο με τα πρόσθια άκρα, σέρνοντας τα δύο οπίσθια, είναι όμως δυνατό να δούμε μικρές αμυδρές κινήσεις των άκρων αυτών που δεν είναι συνεχείς αλλά διαλείπουσες και δεν συμβάλλουν σε ομοιόμορφη κίνηση του ζώου.

4,5: Τα δύο οπίσθια άκρα χάνουν παντελώς την κινητικότητα τους και επιπλέον εμφανίζεται έντονη μυϊκή ατροφία στα άκρα αυτά και στους οπίσθιους μύες της ράχης με παράλληλη απώλεια βάρους. Δεν παρατηρείται ακόμη παράλυση των πρόσθιων άκρων.



Σχήμα 7. Κλίμακα κλινικής εξέτασης πειραματοζώων στο μοντέλο της ΠΑΕ. α. κλινικό σκορ 0, β. κλινικό σκορ 1, γ. κλινικό σκορ 2, δ. κλινικό σκορ 3, ε. κλινικό σκορ 4, ζ. κλινικό σκορ 5.

5: Το 4,5 και παράλυση ενός ή και των δύο πρόσθιων άκρων. Το πειραματοζώο εμφανίζει αδυναμία μετακίνησης από την θέση του ενώ σπάνια επανέρχεται στη φυσιολογική κλινική του κατάσταση.

6: Θάνατος του πειραματοζώου.

3.1.4 Θυσίες πειραματοζώων

Η μέθοδος της θυσίας πειραματοζώων επιλέγεται ανάλογα με το είδος τις μελέτης. Η διακαρδιακή διήθηση και μονιμοποίηση με παραφορμαλδεΰδη είναι η προτιμώμενη μέθοδος για τομές παγωμένου μικροτόμου ή κρυοστάτη, ενώ η άμεση θυσία και ταχεία ψύξη των ιστών είναι η ακολουθούμενη μέθοδος για μελέτη με real-time PCR.

3.1.4.1 Θυσία με διακαρδιακή διήθηση

Τα ζώα αρχικά αναισθητοποιούνται σε περιβάλλον κορεσμένο με αιθέρα και η εκτίμηση της αναισθησίας γίνεται με έλεγχο αντανακλαστικού της κινητικότητας των δακτύλων των πρόσθιων και οπίσθιων άκρων μετά από πίεση τους. Στη συνέχεια το πειραματόζωο τοποθετείται και ακινητοποιείται σε ύπτια θέση πάνω σε τεμάχιο συμπαγούς φελλού. Ακολουθεί η διάνοιξη του θωρακικού τοιχώματος και η αποκάλυψη της καρδιάς. Τοποθετείται μια βελόνα η οποία συνδέεται με σύστημα ορών στην αριστερή κοιλία της καρδιάς και το ζώο διηθείται με περίπου 5mL διαλύματος 1x DEPC-treated PBS (137mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM NaH₂PO₄) εκτέμνοντας παράλληλα τον δεξιό κόλπο της καρδιάς. Έτσι δημιουργείται ένα ανοιχτό σύστημα κυκλοφορίας με διερχόμενο PBS. Στη συνέχεια διακόπτεται η παροχή του και αντικαθίσταται με διερχόμενο διάλυμα 4% DEPC-treated PFA (4% Παραφορμαλδεΐδη σε 1x PBS). Το ζώο διηθείται με 50mL PFA και αφού διαπεράσει μονιμοποιώντας όλους τους ιστούς του σώματος του, εξέρχεται του ανοιχτού δεξιού κόλπου. Απομακρύνεται η βελόνα, αφαιρείται προσεκτικά εγκέφαλος και νωτιαίος μυελός, μεταφέρονται σε διάλυμα 4% DEPC-treated PFA και επωάζονται ολονύχτια στους 4°C. Την επομένη, το διάλυμα αντικαθίσταται με 30% συγκρότηση σε διάλυμα φωσφορικών 0.5x PB (2x: 20mM Na₂HPO₄, 4mM NaH₂PO₄) και οι ιστοί είναι έτοιμοι να κοπούν όταν επέλθει η καταβύθιση τους (συνήθως 2-3 μέρες).

3.1.4.2 Θυσία ζώων για real-time PCR

Όσα από τα πειραματόζωα προορίστηκαν για real-time PCR, αποκλείστηκαν από τη διακαρδιακή διήθηση με παραφορμαλδεΐδη και αφού αναισθητοποιήθηκαν με αιθέρα, θυσιάστηκαν άμεσα, οι ιστοί αφαιρέθηκαν από τα σώματα των ζώων, υπέστησαν ταχεία ψύξη σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80°C έως την χρήση τους.

3.1.5 Τομές ιστών

Οι μονιμοποιημένοι ιστοί των εγκεφάλων και νωτιαίου μυελού τεμαχίστηκαν σε ψυχόμενη μικροτόμο (freezing microtome) και συλλέχθηκαν τομές πάχους 26μm. Οι τομές αυτές συντηρούνται παροδικά σε διάλυμα 0.5x PB (free floating) έως την τοποθέτησή τους σε αντικειμενοφόρες πλάκες Superfrost Plus® (Menzel). Οι πλάκες αποθηκεύονται για σύντομο χρονικό διάστημα στους -20°C, ενώ για μακροχρόνια χρήση στους -80°C.

3.2 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ: IN SITU ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ

Ο *in situ* υβριδισμός (ISH) εκμεταλλεύεται την ιδιότητα που έχουν δύο συμπληρωματικά μονόκλινα νουκλεϊνικής φύσεως μόρια να υβριδίζονται κάτω από κατάλληλες συνθήκες. Ο υβριδισμός συμβαίνει μεταξύ συμπληρωματικών βάσεων των νουκλεϊνικών οξέων (DNA ή RNA), ενώ η όλη τεχνική εφαρμόζεται σε τομές και παρασκευάσματα ιστών (*in situ*) και εντοπίζει τέτοιου είδους υβριδικά μόρια. Αρχικά όταν εισήχθη σαν τεχνική το 1969, ⁶⁷ έβρισκε εφαρμογή στην ανίχνευση DNA στόχων. Μια γνωστή παραλλαγή της έγκειται στον εντοπισμό γονιδιακών τόπων στα χρωμοσώματα του πυρήνα, με μέσο ανίχνευσης το φθορισμό (FISH).⁶⁸ Παράλληλα επεκτάθηκε σε κυτταροπλασματικό RNA και στην ανίχνευση αλληλουχιών RNA ιών.⁶⁹ Από τότε, ο *in situ* υβριδισμός έχει υποστεί αρκετές βελτιώσεις ως τεχνική και βρίσκει πλέον ευρεία εφαρμογή σε πολλούς τομείς όπως αυτός της νευροβιολογίας, όπου η ανίχνευση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων αποτελεί το κλειδί της κατανόησης πολύπλοκων νευρικών διεργασιών.

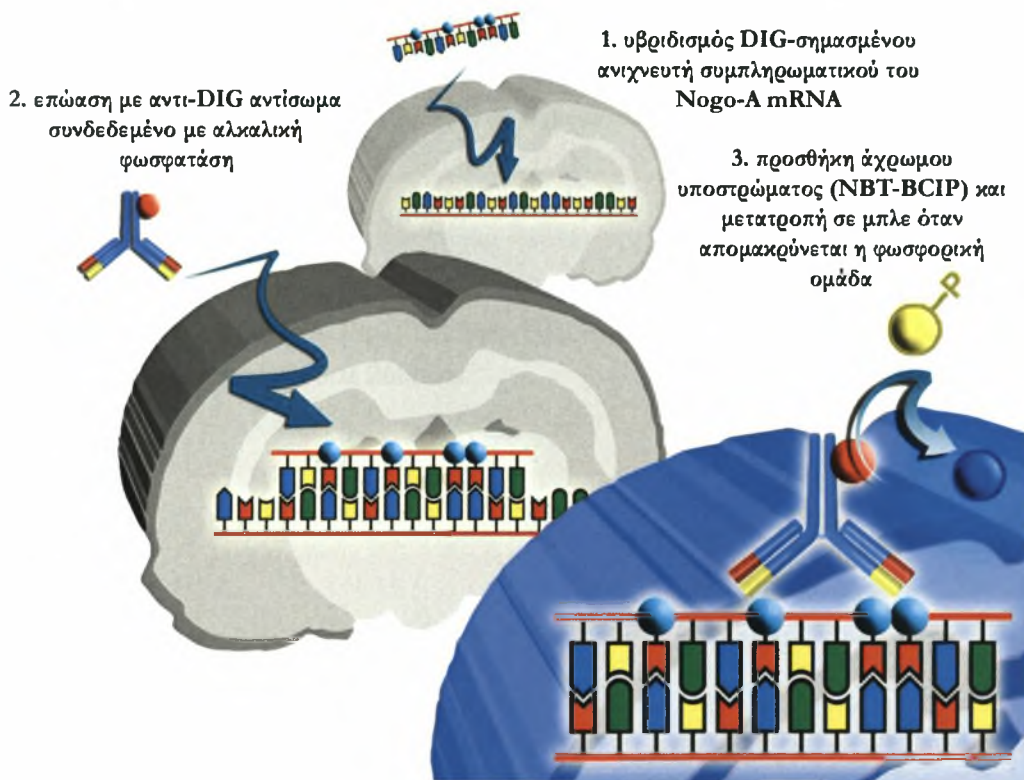
Τέσσερα είναι τα βασικά είδη των ανιχνευτών που έχουν χρησιμοποιηθεί έως σήμερα στον *in situ* υβριδισμό: δίκλινο DNA (dsDNA), μονόκλινο DNA (ssDNA), RNA και συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια. Καθένα από αυτά βρίσκει διαφορετική εφαρμογή ανάλογα με την προς ανάλυση μελέτη και έχει πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα.⁷⁰ Η σήμανση και ο εντοπισμός τους μπορεί να γίνει με χρήση ραδιενεργών ισοτόπων όπως ο ³²P και το ³⁵S, τα οποία αυξάνουν την ευαισθησία και επιτρέπουν μια ποσοτική μέτρηση του ληφθέντος σήματος. Παρόλα αυτά, οι ραδιοσημασμένοι ανιχνευτές απαιτούν μεγαλύτερους χρόνους έκθεσης (7-10 ημέρες), παρέχουν μικρότερη χρονική διάρκεια παραμονής του σήματος (1-6 εβδομάδες) και αναπαράγουν τόσο προβλήματα ασφάλειας όσο και απόρριψης ραδιενεργού υλικού.^{71,72} Γι αυτό τον λόγο έχουν αναπτυχθεί μη ραδιενεργοί μέθοδοι σήμανσης που εκμεταλλεύονται την ενσωμάτωση απτενίων, δηλαδή μικρών μορίων συνδεδεμένων στον ανιχνευτή και τα οποία στη συνέχεια αναγνωρίζονται από IgG αντισώματα, συμβάλλοντας έτσι σε μια σημαντική ενίσχυση σήματος.⁷³

3.2.1 *In situ* υβριδισμός με μη ραδιενεργό RNA ανιχνευτή: επισκόπηση τεχνικής

Από τον πρώτο ISH με RNA ανιχνευτή που πραγματοποίησε ο Cox και συν ⁷⁴ το 1984, έως και σήμερα, οι RNA ανιχνευτές (ριβοανιχνευτές) που σημαίνονται με απτένια είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές καθώς συνδυάζουν υψηλή ευαισθησία και ανάλυση, την ικανότητα εντοπισμού και οπτικοποίησης μεταγράφων ανά κύτταρο ιστού ή ολόκληρου εμβρύου καθώς και τον συνδυασμένο εντοπισμό δευτέρου RNA ή πρωτεΐνης.⁷⁵ Ακολουθούμενος των πλύσεων και της υβριδοποίησης, ο εντοπισμός του ριβοανιχνευτή στον ιστό πραγματοποιείται μέσω αντισώματος που

αναγνωρίζει το απτενικό μόριο και είναι παράλληλα είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο. Το ένζυμο καταλύει μια αντίδραση μετατροπής ενός χρωμογόνου υποστρώματος επιτρέποντας έτσι τον έμμεσο εντοπισμό του μορίου στόχου, δηλαδή του mRNA στη συγκεκριμένη περιοχή του ιστού.

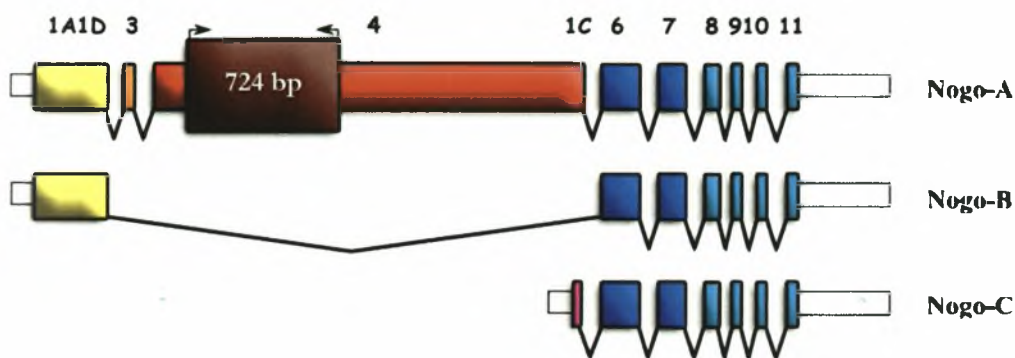
Ένας αριθμός απτενικών μορίων όπως διγοξιγενίνης (DIG), φλουορεσκεΐνης, δινιτροφαινόλης (DNP) καθώς και αντισωμάτων συνδεδεμένων με ένζυμα όπως αλκαλικής φωσφατάσης (AP) και horse radish υπεροξειδάσης (HRP), είναι διαθέσιμος εμπορικά. Από όλα τα είδη ριβοανιχνευτών, ευρύτερη πρακτική εφαρμογή βρίσκουν πλέον οι DIG-σημασμένοι ριβοανιχνευτές οι οποίοι αναγνωρίζονται από anti-DIG αντισώματα συνδεδεμένα με αλκαλική φωσφατάση καταλύοντας την χρωμογόνο αντίδραση του NBT (4-nitro blue tetrazolium chloride) με το BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) (Σχήμα 8). Τέτοιου είδους ριβοανιχνευτές χρησιμοποιήθηκαν και στη παρούσα μελέτη. Η σύνθεσή τους ακολούθησε έναν αριθμό βημάτων από την κλωνοποίηση του κατάλληλου τμήματος σε πλασμιδιακό φορέα που φέρει εκατέρωθεν των θέσεων κλωνοποίησης αλληλουχίες πρόσδεσης RNA πολυμεράσης, έως την ολοκλήρωσή τους με την γραμμοποίηση της πλασμιδιακής κατασκευής και την *in vitro* μεταγραφή με παράλληλη σήμανση.



Σχήμα 8. Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής του *in situ* υβριδισμού με DIG-σημασμένο ριβοανιχνευτή.

3.2.2 Κλωνοποίηση του Nogo-A ειδικού τμήματος

Για την ιστολογική ανίχνευση του mRNA του Nogo-A επιλέχθηκε τμήμα του γονιδίου Rtn4 (*mus musculus*) το οποίο να είναι ειδικό μόνο για το Nogo-A μετάγραφο (1^η ισομορφή) και όχι για τα Nogo-B και -C. Έτσι ενισχύθηκε με αντίδραση PCR ένα τμήμα 724bp του 4^{ου} εξονίου του Rtn4, ενός γιγαντιαίου εξονίου μήκους 2.36kb (Σχήμα 9). Αν και το υπόστρωμα της PCR ήταν γενωμικό DNA και όχι κάποιο cDNA το οποίο να συνδύαζε περισσότερα του ενός εξόνια, ο σχεδιασμός του ανιχνευτή τηρούσε τα συνήθη χαρακτηριστικά: το μέγεθος του τμήματος είναι μεταξύ 300 και 1000bp, εύρος που αφενός επιτρέπει αποτελεσματική υβριδοποίηση και αφετέρου ικανοποιητική πρόσβαση στο στόχο mRNA.



Σχήμα 9. Nogo-A ειδικό τμήμα του 4^{ου} εξονίου, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση του ριβοανιχνευτή στον *in situ* υβριδισμό.

3.2.2.1 Απομόνωση DNA

Μικρό κομμάτι ουράς ενήλικα μυ επώαστηκε με 100μL 50mM NaOH στους 95°C για 30 λεπτά. Προστίθενται 30μL 1M Tris-HCL pH 7.6 με παράλληλη ανάδευση και το διάλυμα φωτομετράται στα 260nm.

3.2.2.2 Αντίδραση PCR

Το Nogo-A ειδικό τμήμα μήκους 724bp (Σχήμα 9) ενισχύθηκε με τους εξής primers: FW 5'- CTGGTCAAGAGGATTTCCTCA - 3' και RV 5' - CAGGTGATGTACGCTCTGGA - 3'. Για μια αντίδραση PCR των 50μL χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

✓ DNA (περίπου 300ng)	2 μL
✓ 0,5 pmol από τον κάθε primer	2,5μL (stock 10 pmol)
✓ 200 nmol dNTP's	0,4μL (stock 25 mmol)
✓ 1x Promega PCR Buffer (με 1,5 mmol MgCl ₂)	5 μL (stock 10x)
✓ Ταq πολυμεράση	1,5μL
✓ dd-H ₂ O έως τα 50μL	+ 36,1μL
	<hr/>
	50 μL

Οι συνθήκες ενίσχυσης για την PCR στον θερμικό κυκλοποιητή ήταν:

Αρχική αποδιάταξη	95 °C για 5 min	
Αποδιάταξη	95 °C για 30 sec	} 30x
Υβριδοποίηση εκκινητών	58 °C για 30 sec	
Επέκταση	72 °C για 2 min	
Αποδιάταξη	95 °C για 30 sec	} 5x
Υβριδοποίηση εκκινητών	56,7 °C για 30 sec	
Επέκταση	72 °C για 2 min	
Τελικό βήμα επέκτασης	72 °C για 10 min	
Αποθήκευση	4 °C ∞	

Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα 1% αγαρόζης με 6μL EtBr (stock 10mg/mL). Το διάλυμα της συσκευής της ηλεκτροφόρησης ήταν TBE 1x. Το loading buffer που αναμίχθηκαν τα προϊόντα πριν ηλεκτροφορηθούν ήταν 6x και περιείχε 40% (w/v) σουκρόζη σε dH₂O & 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης. Οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης ήταν 100V για ~30min.

3.2.2.3 Εξαγωγή DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Η αντίδραση της PCR επαναλήφθηκε και τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε 1.2 % low melting αγαρόζη με σκοπό την επακόλουθη αποκοπή και απομόνωση των ζωνών από το πήκτωμα. Η εξαγωγή του DNA έγινε με το kit NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel) ακολουθώντας το πειραματικό πρωτόκολλο. Το τμήμα του πηκτώματος με την επιθυμητή ζώνη αφαιρέθηκε προσεκτικά με νυστέρι και ζυγίστηκε. Κατόπιν διαλυτοποιήθηκε με κατάλληλο διάλυμα όγκου ανάλογο προς το βάρος της αγαρόζης. Η κατακράτηση του DNA έγινε σε ειδικές στήλες και ύστερα από διαδοχικές εκπλύσεις και φυγοκεντρήσεις συλλέχτηκε σε κατάλληλο όγκου νερού ελεύθερου DNAσών. Στη συνέχεια, 5 μ L της παραπάνω αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα 1% αγαρόζης και φωτομετρήθηκαν με σκοπό την ποσοτικοποίηση του ανακτημένου DNA.

3.2.2.4 Αντίδραση σύνδεσης

Η κλωνοποίηση του τμήματος πραγματοποιήθηκε με kit κλωνοποίησης (Qiagen). Αρχικά, 1 μ L της αντίδρασης εξαγωγής DNA αραιώθηκε 1:10 δίνοντας τελική συγκέντρωση 75ng/ μ L μια ποσότητα ικανή να εισαχθεί σε πλασμιδιακό φορέα pDrive. Για μια αντίδραση σύνδεσης των 10 μ L χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

✓ PCR προϊόν	1 μ L
✓ pDrive Cloning Vector (50ng/ μ L)	1 μ L
✓ Ligation Master Mix 2x	5 μ L
✓ dd-H ₂ O έως τα 10 μ L	+ 3 μ L
	<hr/>
	10 μ L

Πραγματοποιήθηκε επώαση των δειγμάτων για 2 ώρες στους 4°C. Ακολούθως, 5 μ L κάθε αντίδρασης αποθηκεύτηκαν στους -20°C ενώ τα υπόλοιπα 5 μ L χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση μετασχηματισμού.

3.2.2.5 Αντίδραση μετασχηματισμού και στερεές καλλιέργειες

Για το μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων, 5 μ L της αντίδρασης σύνδεσης μεταφέρθηκαν σε TOP10 δεικτικά κύτταρα E.Coli αφού είχαν προηγουμένως αποψυχθεί αργά σε πάγο (5-10min). Αφέθηκαν στον πάγο για 30 λεπτά και στη συνέχεια υπέστησαν heat-shock στους 42°C για 2 λεπτά. Επιστρέφονται στον πάγο και αφήνονται για περίπου 2 λεπτά. Αφού προστεθεί 1mL 2xYT μέσου, επωάζονται στους 37°C για 45 λεπτά. Φυγοκεντρώνονται για 1 λεπτό σε 14.000rpm και

απορρίπτεται το υπερκείμενο. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 200μL 2xYT μέσου. Τέλος, τα κύτταρα επιστρώνονται σε τριβλίο που περιέχει 25mL άγαρ/2xYT μέσου, 50 μM IPTG, 0,1 μg/mL αμπικιλίνης και 80 μg/mL X-Gal. Τα τριβλία γυρίζονται ανάποδα και αφήνονται για ολονύκτια επώαση (~20h) στους 37°C. Την επόμενη μέρα ελέγχθηκαν για την ύπαρξη λευκών και μπλε αποικιών.

3.2.2.6 Υγρές καλλιέργειες

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχής εισαγωγή του ενθέματος Nogo-A στα λευκά κύτταρα και όχι η παρουσία κάποιου ψευδούς θετικού αποτελέσματος, επαναλήφθηκε αντίδραση PCR απευθείας στις αποικίες αυτές. Όσες από αυτές έδωσαν θετικό αποτέλεσμα ύπαρξης ενθέματος, προχώρησαν στην ανάπτυξη σε υγρές καλλιέργειες. Έτσι, η κάθε λευκή αποικία που επιλέχθηκε, ενοφθαλμίστηκε σε 12μL ddH₂O από τα οποία 5μL χρησιμοποιήθηκαν για την επαναληπτική PCR ενώ τα υπόλοιπα 7μL φυλάχθηκαν για τις υγρές καλλιέργειες. Κάθε υγρή καλλιέργεια περιείχε εκτός των 7μL των κυττάρων, 5mL 2xYT μέσου παρουσία αντιβιοτικών (0,1 μg/mL αμπικιλίνης και 0,05 μg/mL καναμικίνης). Οι καλλιέργειες επώαστηκαν ολονύκτια σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C με έντονη ανάδευση.

3.2.2.7 Πλασμιδιακή απομόνωση (minipreps)

Από τα 5 mL κάθε υγρής καλλιέργειας, 4 mL χρησιμοποιήθηκαν για πλασμιδιακή απομόνωση, ενώ 850 μL συλλέχθηκαν και αποθηκεύτηκαν με 150μL γλυκερόλης (15% stock γλυκερόλης) στους -80°C. Η πλασμιδιακή απομόνωση του DNA έγινε με το NucleoSpin® Plasmid Miniprep Kit (Macherey-Nagel) ακολουθώντας το πειραματικό πρωτόκολλο. Τα βακτηριακά κύτταρα συλλέχθηκαν και λύθηκαν με κατάλληλα διαλύματα. Ακολούθως τα πλασμίδια συγκεντρώθηκαν στο υπερκείμενο και προσδέθηκαν αφού μεταφέρθηκαν πρώτα σε ειδικές στήλες που παρείχε το kit. Τέλος, 50μL ανακτήθηκαν ύστερα από διαδοχικές εκπλύσεις και φυγοκεντρώσεις σε νερό ελεύθερου DNAsών. Για το κάθε δείγμα ξεχωριστά, 1 μL της παραπάνω αντίδρασης αραιώθηκε με 999μL ddH₂O και φωτομετρήθηκε με σκοπό την ποσοτικοποίηση του ανακτημένου πλασμιδιακού DNA.

3.2.2.8 Περιορισμός πλασμιδίων

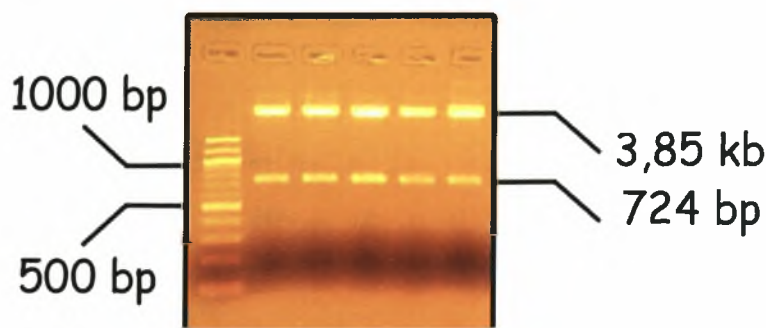
Ένα δεύτερο στάδιο επαλήθευσης της εισαγωγής του ορθού ενθέματος είναι ο περιορισμός των πλασμιδίων σε ακραίες θέσεις του πολυσυνδέτη και η παρατήρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης ύστερα από ηλεκτροφόρηση. Ο πολυσυνδέτης του πλασμιδιακού φορέα που χρησιμοποιήθηκε (pDrive) διαθέτει 2 θέσεις κοπής για το EcoRI οπότε εμφανίζει το πλασμίδιο (3,85kb) και μια ζώνη του Nogo-A ενθέματος στα 724bp (Σχήμα 10). Διαθέτει επίσης 1 θέση κοπής για το XhoI οπότε

εμφανίζει το πλασμίδιο μαζί με το ένθεμα σε ευθύγραμμη μορφή (linearized) γύρω στα 4,55kb. Παράλληλα, τα ίδια δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν αλλά χωρίς να υποστούν πέψη από κάποιο ένζυμο (αρνητικός μάρτυρας). Η αντίδραση περιορισμού πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 2 ώρες και για μια αντίδραση των 20μL χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια του Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Αντιδράσεις περιορισμού των πλασμιδίων.

Αντίδραση πέψης για E.CoRI		Αντίδραση πέψης για XhoI		Χωρίς ένζυμο	
E.CoRI	0,5μL	XhoI	0,5μL	-	-
E.CoRI buffer	2μL	NEB buffer 2	2μL	NEB buffer 2	2μL
ddH₂O	15,5μL	BSA 10x	2μL	BSA 10x	2μL
Πλασμιδιακό DNA	2μL	ddH₂O	13,5μL	ddH₂O	14μL
		Πλασμιδιακό DNA	2μL	Πλασμιδιακό DNA	2μL
Συνολικός όγκος	20μL		20μL		20μL

Ακολουθήθηκε η απενεργοποίηση του ενζύμου στους 67°C για 20min και τέλος η ηλεκτροφόρηση όλης της αντίδρασης του κάθε δείγματος (20μL) με 4μL loading buffer σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.



Σχήμα 10. Ηλεκτροφόρηση αντίδρασης πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης 1% όπου εμφανίζεται το ένθεμα του *Nogo-A* τμήματος (724bp) και ο πλασμιδιακός φορέας *pDrive* (3,85kb).

3.2.2.9 Αλληλούχιση κλώνων

Τον περιορισμό ακολουθεί η ταυτοποίηση του προσανατολισμού ένθεσης του τμήματος σε καθένα από τους κλώνους που παρήχθησαν και βάση αυτού θα γίνει η σύνθεση των ανιχνευτών εκμεταλλευόμενοι τις αλληλουχίες πρόσδεσης RNA πολυμεράσης που υπάρχουν εκατέρωθεν των θέσεων κλωνοποίησης. Έτσι, ένας αριθμός δειγμάτων στέλνονται προς αλληλούχιση χρησιμοποιώντας 10μL ανά δείγμα από τα αντίστοιχα προϊόντα των minipreps. Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν στην αλληλούχιση ήταν οι universal primers M13 F & R.

3.2.2.10 Στερεή επανακαλλιέργεια κυττάρων 15% stock γλυκερόλης

Αφού αναγνωρίστηκαν ποιοι βακτηριακοί κλώνοι βολεύουν για τη σύνθεση των ανιχνευτών, ένας μικρός αριθμός κυττάρων των αντίστοιχων αρχικών καλλιέργειών που φυλάχτηκαν στους -80°C , επανασυστάθηκε αρχικά σε στερεό μέσο και στη συνέχεια σε υγρό. Όπως και στην προηγούμενες στερεές καλλιέργειες, το μέσο αποτελούταν από άγαρ και 2xYT παρουσία ποσότητας αντιβιοτικών (100μg/mL αμπικιλίνης και 50μg/mL καναμικίνης ανά τριβλίο). Τα κύτταρα ενοφθαλμίζονται στο μέσο χωρίς να έχει αποψυχθεί ο κύριος όγκος τους και στη συνέχεια επιστέφονται αμέσως στη βαθειά κατάψυξη. Επιάζονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να απορροφηθούν από το μέσο, τα τριβλία γυρίζονται ανάποδα και αφήνονται για ολονύκτια επώαση (16h) στους 37°C . Την επόμενη μέρα ελέγχθηκαν για την ανάπτυξη αποικιών.

3.2.2.11 Υγρή επανακαλλιέργεια

Μια οκτάωρη επώαση αρχικής υγρής καλλιέργειας (starter culture) που περιείχε 5mL 2xYT μέσου μαζί με αντίστοιχη ποσότητα αντιβιοτικών και μιας ακεραιάς ενοφθαλμισμένης αποικίας, προηγήθηκε των κυρίων υγρών ολονύκτιων καλλιέργειών. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C με έντονη ανάδευση και μετά από 8 ώρες που αναπτύχθηκε ικανοποιητική θολότητα, μεταφέρθηκαν 150μL σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη που περιείχε 150mL 2xYT μέσου με αντίστοιχες ποσότητες αντιβιοτικών. Η επώαση πραγματοποιήθηκε ολονύκτια σε κλίβανο στις ίδιες συνθήκες.

3.2.2.12 Μέγιστη ανάκτηση πλασμιδιακού DNA (maxipreps)

Για τις ανάγκες του πρωτοκόλλου, κρίνεται αναγκαία η περίσσεια υποστρώματος DNA (20μg) κατά την προετοιμασία του δείγματος για την σύνθεση των ριβοανιχνευτών. Έτσι, η πλασμιδιακή απομόνωση και ανάκτηση του DNA έγινε με το GenElute™ High Performance Plasmid Maxiprep Kit (Sigma) ακολουθώντας το πειραματικό πρωτόκολλο. Όλος ο όγκος κάθε υγρής καλλιέργειας (150mL) φυγοκεντρήθηκε στα 5000g για 10 λεπτά, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα βακτηριακά κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε κατάλληλο όγκο διαλύματος. Στη συνέχεια λύθηκαν με κατάλληλα διαλύματα ενώ το πλασμιδιακό DNA φιλτραρίστηκε, και αφού μεταφέρθηκε πρώτα σε ειδικές στήλες που παρείχε το kit και φυγοκεντρήθηκε στα 3000g για 2 λεπτά, προσδέθηκε σε αυτές. Η έκλουση του από τις στήλες πραγματοποιήθηκε με 2,5mL νερού ελεύθερου DNAσών ενώ ακολούθησε συγκέντρωση του 1,5mL σε τελικό όγκο 50μL.

Η κατακρήμνιση γίνεται παρουσία 0,1 όγκων 3M Sodium Acetate pH 5.2 και 0,7 όγκων ισοπροπανόλης. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 14.000rpm στους 4°C για

30 λεπτά, το υπερεικείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξεπλένεται με 1,5mL 70% αιθανόλης. Ακολουθεί μια επαναληπτική φυγοκέντρωση για 10 λεπτά, το υπερεικείμενο απορρίπτεται ξανά ενώ το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου έως την πλήρη εξάτμιση της αλκοόλης. Τέλος, το ίζημα ανασυστάθηκε σε 50μL νερού ελεύθερου DNAσών, και το κάθε δείγμα φωτομετρήθηκε με σκοπό την ποσοτικοποίηση του ανακτημένου πλασμιδιακού DNA.

3.2.2.13 Προετοιμασία για μεταγραφή: γραμμοποίηση της κατασκευής με περιορισμό

Βάση της ταυτοποίησης του προσανατολισμού των ενθεμάτων με αλληλούχιση, επιλέχθηκαν τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα και οι RNA πολυμεράσες που θα συνθέσουν *in vitro* RNA μόρια συμπληρωματικά (αντι-νοηματικά) και μη (νοηματικά) ως προς το αντίστοιχο τμήμα του Nogo-A. Όταν το ένθεμα ενσωματώνεται αντίθετα της οριζουσας φοράς (+/-) στον φορέα pDrive, τότε χρησιμοποιείται το περιοριστικό ένζυμο XhoI που κόβει 1 φορά καθοδικά του ενθέματος (ενώ καμμία φορά μέσα σε αυτό) και η T7 RNA πολυμεράση της οποίας η αλληλουχία πρόσδεσης εντοπίζεται ανοδικά του ενθέματος. Η T7 RNA πολυμεράση μεταγράφει της οριζουσας κατεύθυνσης, δημιουργώντας έτσι ένα τμήμα λίγο μεγαλύτερο του μήκους του Nogo-A που αρχικά σχεδιάστηκε (826bp), το οποίο αποτελεί τον αντι-νοηματικό (anti-sense) ανιχνευτή. Για τη σύνθεση του νοηματικού (sense) ανιχνευτή, ακολουθείται η αντίστροφη διαδικασία, δίνοντας ένα μόριο μήκους 809bp.

Όταν το ένθεμα ενσωματώνεται με την οριζουσα φορά (+/+) στον φορέα pDrive, τότε ο αντίστοιχος αντι-νοηματικός ανιχνευτής δημιουργείται μεταγραφόμενος προς την αντίθετη κατεύθυνση, χρησιμοποιώντας το περιοριστικό ένζυμο BamHI που κόβει 1 φορά ανοδικά του ενθέματος (ενώ καμμία φορά μέσα σε αυτό) και την SP6 RNA πολυμεράση της οποίας η αλληλουχία πρόσδεσης εντοπίζεται καθοδικά του ενθέματος. Για τη σύνθεση του νοηματικού ανιχνευτή, ακολουθείται ανάλογη διαδικασία με πριν. Στον Πίνακα 3 αναγράφονται τα αντιδραστήρια ανά αντίδραση περιορισμού για τις 2 περιπτώσεις ένθεσης που προέκυψαν (+/- και +/+), τόσο για την σύνθεση αντι-νοηματικού ανιχνευτή όσο και για την σύνθεση νοηματικού. Η επιθυμητή συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA υποστρώματος σε μια αντίδραση περιορισμού 100μL είναι 20μg (δηλαδή 0,2μg/μL), τα οποία περιορίζονται από 20-40 units ενζύμου. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 2 ώρες.

Πίνακας 3. Αντιδράσεις περιορισμού με σκοπό την γραμμοποίηση της πλασμιδιακής κατασκευής.

+/-				+/+			
<i>anti-sense</i>		<i>sense</i>		<i>anti-sense</i>		<i>sense</i>	
<i>XhoI</i>	5μL	<i>BamHI</i>	5μL	<i>BamHI</i>	5μL	<i>XhoI</i>	5μL
10xNEB buffer 4	10μL	10xNEB buffer 3	10μL	10xNEB buffer 3	10μL	10xNEB buffer 4	10μL
BSA 100x	1μL	BSA 100x	1μL	BSA 100x	1μL	BSA 100x	1μL
ddH ₂ O	έως 100μL	ddH ₂ O	έως 100μL	ddH ₂ O	έως 100μL	ddH ₂ O	έως 100μL
Plasmid DNA	20μg	Plasmid DNA	20μg	Plasmid DNA	20μg	Plasmid DNA	20μg
Συνολικός όγκος	100μL		100μL		100μL		100μL

Μια σειρά βημάτων ακολούθησαν την αντίδραση περιορισμού με σκοπό την απομάκρυνση όλων των πρωτεϊνών· στο μίγμα της αντίδρασης προστέθηκαν 5μL 10% SDS και 5μL πρωτεϊνάσης K (17mg/ml stock) με σκοπό την απενεργοποίηση των περιοριστικών ενζύμων. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 15 λεπτά και στη συνέχεια το γραμμοποιημένο DNA εκχυλίζεται με φαινόλη/χλωροφόρμιο. Προστίθενται 55μL φαινόλης και 55μL χλωροφορμίου/ισοαμυλίου (24:1), δηλαδή μιας αναλογίας 25:24:1, αναδεύονται καλά και φυγοκεντρώνονται στις 14000rpm για 5 λεπτά. Η διαυγής υδατική φάση (πάνω) μεταφέρεται σε καινούργιο eppendorf και η διαδικασία επαναλαμβάνεται.

Η κατακρήμνιση του DNA πραγματοποιήθηκε παρουσία 230μL 100% παγωμένης αιθανόλης και 11μL 3M NaAcetate pH 5.2. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 14000rpm για 15 λεπτά στους 4°C και άμεση αφαίρεση του υπερκείμενου. Μετά από ανασύσταση του ιζήματος σε 200μL 70% αιθανόλης ακολουθεί επαναληπτική φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, το υπερκείμενο απορρίπτεται ενώ το ιζήμα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Το ιζήμα ανασυστάθηκε σε 20μL H₂O ελεύθερου RNασών (DEPC-treated) και η ποσότητα του DNA προσδιορίστηκε με χρήση φασματοφωτομέτρου ενώ ο ποιοτικός έλεγχος του γραμμοποιημένου προϊόντος έγινε με ηλεκτροφόρηση 2 μL σε πήκτωμα 1% αγαρόζης.

3.2.3 In vitro μεταγραφή και σήμανση του ριβοανιχνευτή

Η μεταγραφή και DIG-σήμανση των ριβοανιχνευτών πραγματοποιήθηκε με το DIG RNA Labeling Kit SP6/T7 (Roche) ακολουθώντας το πειραματικό πρωτόκολλο. Για μια αντίδραση μεταγραφής όγκου 20μL, απαιτείται 1μg DNA υποστρώματος ενώ αναλόγως με τον προσανατολισμό του ενθέματος, χρησιμοποιούνται 40units από την κατάλληλη πολυμεράση (SP6 ή T7) ώστε να παραχθεί ο αντι-νοηματικός και νοηματικός ανιχνευτής. Το νουκλεοτιδικό μίγμα (NTP's labeling mix) αποτελείται από 10mM ATP, 10mM CTP, 10mM GTP, 6.5mM μη σημασμένου UTP αλλά και 3.5mM σημασμένου DIG-11-UTP pH 7,5. Στο μίγμα προστέθηκαν και 20units αναστολέα RNασών. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 2 ώρες ενώ οι ποσότητες των αντιδραστηρίων αναγράφονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση των ριβοανιχνευτών.

+/-				+ / +			
<i>anti-sense</i>		<i>sense</i>		<i>anti-sense</i>		<i>sense</i>	
T7		SP6		SP6		T7	
RNA pol	2μL	RNA pol	2μL	RNA pol	2μL	RNA pol	2μL
10x		10x		10x		10x	
Transc. buffer	2μL	Transc. buffer	2μL	Transc. buffer	2μL	Transc. buffer	2μL
10x		10x		10x		10x	
NTP's labeling mix	2μL	NTP's labeling mix	2μL	NTP's labeling mix	2μL	NTP's labeling mix	2μL
RNase Inhibitor	1μL	RNase Inhibitor	1μL	RNase Inhibitor	1μL	RNase Inhibitor	1μL
DEPC-H₂O	έως 20μL	DEPC-H₂O	έως 20μL	DEPC-H₂O	έως 20μL	DEPC-H₂O	έως 20μL
template DNA	1μg	template DNA	1μg	template DNA	1μg	template DNA	1μg
Συνολικός όγκος	20μL		20μL		20μL		20μL

Την αντίδραση ακολούθησε η προσθήκη και επώαση 20units (2μL) DNάσης I στους 37°C για 15 λεπτά ώστε να καταστραφεί το DNA υπόστρωμα. Η κατακρήμνιση του RNA πραγματοποιήθηκε με 10 μL 4M LiCl, 300μL 100% παγωμένης αιθανόλης και 100μL H₂O ελεύθερου RNασών. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 14000rpm για 15 λεπτά στους 4°C και άμεση αφαίρεση του υπερκείμενου. Μετά από ανασύσταση του ιζήματος σε 200μL 70% αιθανόλης ακολουθεί επαναληπτική φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, το υπερκείμενο απορρίπτεται ενώ το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε

θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 100μL H₂O ελεύθερου RNασών (DEPC-treated) και αποθηκεύεται στους -20°C. Η ποσότητα του σηματοδοτημένου RNA προσδιορίστηκε με χρήση φασματοφωτομέτρου.

3.2.4 Πειραματικό πρωτόκολλο in situ υβριδισμού σε τομές ψυχόμενης μικροτόμου

Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται στον in situ υβριδισμό προετοιμάζονται με H₂O ελεύθερο RNασών (DEPC-treated). Όλες οι πλύσεις και οι επωάσεις πραγματοποιούνται σε slide mailers 5 θέσεων ενώ ανακινούνται διαρκώς σε rocker και θερμοκρασία δωματίου, εκτός των επωάσεων που πραγματοποιούνται σε υδατόλουτρο.

3.2.4.1 Προετοιμασία ιστού και υβριδοποίηση με ριβοανιχνευτή (1^η μέρα)

1. Οι τομές μεταφέρονται από τους -20°C σε θερμοκρασία δωματίου όπου και αφήνονται να στεγνώσουν για 2-3 ώρες
2. Ξεπλένονται σε 4% PFA (4% Παραφορμαλδεΰδη σε 0,01M PBS) για 15 λεπτά
3. Ξεπλένονται σε 1xPBS (137mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM NaH₂PO₄) 3 φορές από 5 λεπτά η κάθε πλύση
4. Επωάζονται με Detergent solution (1% IGEPAL CA-630, 1% SDS, 0.5% Deoxycholate, 50 mM Tris-HCL pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0 και 150 mM NaCl), 2 φορές από 30 λεπτά η κάθε πλύση
5. Ξεπλένονται σε 1xPBS για 10 λεπτά
6. Επωάζονται με πρωτεΐνάση K (1μg/mL) στο ρυθμιστικό της διάλυμα (100 mM Tris-HCL pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0) για 30 λεπτά στους 37°C
7. Ξεπλένονται σε 4% PFA για 15 λεπτά
8. Ξεπλένονται σε 1xPBS, 3 φορές από 5 λεπτά η κάθε πλύση
9. Οι τομές μεταφέρονται σε mailer που περιέχει το διάλυμα προ-υβριδοποίησης (50% φορμαμίδιο, 5x SSC, 1% SDS, 500 μg/mL yeast tRNA, 200 μg/mL ακετυλιωμένη BSA και 50 μg/mL ηπαρίνης) και επωάζονται για 2 ώρες στους 70°C
10. Οι τομές μεταφέρονται σε mailer που περιέχει το διάλυμα υβριδοποίησης (0,3μg ανιχνευτή ανά mL Pre-hyb solution) και επωάζονται ολονύχτια στους 70°C

3.2.4.2 Επώαση με anti-DIG αντίσωμα και προσθήκη υποστρώματος NBT/BCIP (2^η μέρα)

1. Οι τομές μεταφέρονται σε mailer που περιέχει προθερμασμένο Solution X (50% Φορμαμίδιο, 2x SSC, 1% SDS) και ξεπλένονται 3 φορές από 45 λεπτά η κάθε πλύση, στους 70°C. Με αυτό το βήμα απομακρύνονται όσοι ριβοανιχνευτές δεν έχουν υβριδιστεί στις τομές.
2. Στη συνέχεια, ξεπλένονται σε 1x TBST (10x: 250mM Tris-HCL pH 7.5, 1,36M NaCL, 26,8mM KCL, 10% Tween-20) 3 φορές από 15 λεπτά η κάθε πλύση
3. Επώάζονται σε παρεμποδιστικό διάλυμα (10% Lamb Serum σε TBST) για 1 ώρα
4. Επώάζονται με anti-DIG αντίσωμα συνδεδεμένο με αλκαλική φωσφατάση (Roche) (1:5000 σε 1% Lamb Serum σε TBST) για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή ολονύκτια στους 4°C
5. Ξεπλένονται σε 1x TBST 3 φορές από 15 λεπτά η κάθε πλύση
6. Ξεπλένονται σε φρέσκο διάλυμα NTMT (100mM Tris-HCL pH 9.5, 100mM NaCL, 50mM MgCL₂, 1% Tween-20) για 10 λεπτά
7. Τέλος, οι τομές επώάζονται σε διάλυμα ανάπτυξης χρώματος που περιέχει 52μL NBT με 52μL BCIP σε 15mL φρέσκου NTMT. Η επώαση πραγματοποιείται ολονύκτια σε σκοτεινό μέρος γιατί είναι μια φωτοευαίσθητη αντίδραση ενώ παρακολουθείται καθημερινά ελέγχοντας την ένταση του σήματος.

3.2.4.3 Ανάπτυξη χρώματος και τερματισμός αντίδρασης (ημέρες 3^η - 5^η)

1. Το διάλυμα ανάπτυξης χρώματος (NBT/BCIP σε NTMT) θα πρέπει να ανανεώνεται ανά 16 με 20 ώρες, όταν παίρνει μοβ αποχρώσεις. Εμφανή σημάδια χρώσης αρχίζουν να εμφανίζονται συνήθως εντός 48 ωρών.
2. Όταν η ένταση του χρώματος κριθεί ικανοποιητική, γίνεται ζέπλυμα των τομών σε διάλυμα τερματισμού (10mM Tris-HCL pH 7.5, 10mM EDTA pH 8.0)
3. Οι τομές επώάζονται ολονύκτια σε 1x TBST με σκοπό την απομάκρυνση τυχόν background
4. Τέλος, στα πλακάκια τοποθετούνται καλυπτρίδες, στις οποίες έχει προστεθεί μικρή ποσότητα Aquamount, και μετά από ολονύκτια επώαση σε απαγωγό εστία, στεγανοποιούνται και παρατηρούνται στο μικροσκόπιο. Η παρατήρηση των τομών έγινε με σύστημα οπτικής μικροσκοπίας (Zeiss) και η ποσοτικοποίηση των ευρημάτων αξιολογήθηκε με το ψηφιακό σύστημα φωτογράφησης Nikon Digital Sight DS.

3.3 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ mRNA ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ: REAL-TIME PCR

Η ποσοτική ή πραγματικού χρόνου PCR (qPCR, real-time PCR) αποτελεί μια παραλλαγή της αρχικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που εισήχθηκε από τον Kary Mullis το 1983, με κύρια διαφορά που έγκειται στον προσδιορισμό των προϊόντων της PCR ανά πάσα στιγμή κατά την γραμμική φάση της αντίδρασης, πριν αυτή φτάσει σε πλατό. Τα προϊόντα που προσδιορίζονται με αυτή την τεχνική μπορεί να προέρχονται είτε από γενωμικό DNA είτε από κάποιο cDNA προερχόμενο από το αντίστοιχο mRNA μέσω αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR), παρέχοντας έτσι την δυνατότητα μέτρησης της δυναμικής έκφρασης ενός γονιδίου.

Από το 1999 που άρχισε να εφαρμόζεται ευρέως⁷⁶ έως και σήμερα, η μέθοδος έχει υποστεί βελτιώσεις παρόλα αυτά η αρχή της παραμένει η ίδια: η μέτρηση του φθορισμού από φθορίζοντα μόρια ύστερα από διέγερση με υπεριώδη ακτινοβολία. Τα μόρια αυτά ενσωματώνονται α) σε άκρες ανιχνευτών DNA αλληλουχιών εκλύοντας ακτινοβολία όταν αυτές υδρολυθούν (TaqMan, LightCycler) β) αλληλουχιών δομής φουρκέτας που φθορίζουν μόνο όταν υβριδιστούν με τον DNA στόχο (LUX, Molecular Beacons) και γ) παρεμβαλλόμενων χρωστικών δίκλωνου DNA (SYBR Green). Όλες οι παραλλαγές επιτρέπουν πολλαπλή ενίσχυση και αναγνώριση περισσότερων του ενός γονιδιακών τόπων (multiplexing) εκτός των παρεμβαλλόμενων χρωστικών οι οποίες ενσωματώνονται τυχαία σε δίκλωνο DNA. Επίσης για τον ίδιο λόγο, επειδή δηλαδή δεν πραγματοποιείται αλληλουχιο-ειδικός εντοπισμός όπως στις 2 πρώτες παραλλαγές, είναι αναγκαία η ανάλυση του σημείου τήξεως των προϊόντων (Melting Curve Analysis) για τον αποκλεισμό ψευδώς θετικών σημάτων (πχ διμερών εκκινήτων ή προσμίξεις γενωμικού όταν η απομόνωση γίνεται με TRIzol). Παρόλα αυτά η real-time PCR με χρήση SYBR Green αποτελεί την προτιμητέα παραλλαγή γιατί είναι μια φτηνή και γενική σε εφαρμογή μέθοδος σε σύγκριση με τις υπόλοιπες.

3.3.1 Real-time PCR με SYBR Green: επισκόπηση τεχνικής

Η SYBR Green I είναι μια κυανιούχος χρωστική η οποία όταν βρεθεί σε σύμπλοκο με δίκλωνο DNA, απορροφά μπλε ακτινοβολία ($\lambda_{\max}=488\text{nm}$) και εκπέμπει πράσινη ($\lambda_{\max}=522\text{nm}$). Στη γραμμική φάση της PCR όπου αναμένεται αύξηση δίκλωνων μορίων DNA κατά τους κύκλους υβριδοποίησης και επέκτασης, η πρόσδεση της SYBR Green επιτρέπει την οπτικοποίηση αυτής της αύξησης με μέτρηση του εκπεμπόμενου σήματος (Σχήμα). Στη συνέχεια η ποιότητα των προϊόντων ελέγχεται με ανάλυση MCA του σημείου τήξεως τους, δηλαδή της πτώσης του σήματος φθορισμού σε μια σταδιακή αύξηση 0,5 βαθμών °C από τους 72°C στους 95°C. Η παρουσία μίας καμπύλης σε γράφημα -dφθορισμού/dχρόνου πιστοποιεί την ύπαρξη

ειδικού προϊόντος ενώ η παρουσία περισσότερων της μίας καμπύλης την ύπαρξη δευτερογενών μη ειδικών. Η πιστοποίηση αυτή γίνεται και με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης όπου ελέγχεται η παρουσία μίας ή περισσότερων ζωνών. Παράλληλα με τα δείγματα στόχου (target gene), ενισχύεται και ένα ενδογενές housekeeping γονίδιο αναφοράς όπως αυτό της β-ακτίνης (control gene) και πραγματοποιείται μια σχετική ποσοτικοποίηση βάση της $2^{-\Delta\Delta CT}$ μεθόδου⁷⁷, όπου CT είναι το κατώφλι περάσματος (crossing threshold) της εκθετικής φάσης. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η κανονικοποίηση του δείγματος εξαλείφοντας διακυμάνσεις και παρεκκλίσεις μεταξύ βιολογικών και τεχνικών διαφορών που παρεμβαίνουν στην ανάλυση των δεδομένων.

3.3.2 Παραγωγή RNA χρησιμοποιώντας TRIzol

Η απομόνωση και παραγωγή του RNA έγινε με τη χρήση του ακόλουθου πρωτόκολλου: Ομογενοποιήθηκαν 50-100mg ιστού (εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού) σε 1ml TRIzol® (Gibco) χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη σύριγγα. Το ομογενοποίημα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Προστέθηκαν 200μL χλωροφόρμιου (CHCl₃) σε κάθε σωληνάριο, αναδεύτηκαν και το περιεχόμενο του σωληναρίου επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στα 12.000g στους 4°C. Κατόπιν, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε ένα καινούργιο σωληνάριο προστέθηκαν 500μL ισοπροπανόλης και το δείγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 12.000g για 15 λεπτά στους 4°C και άμεση αφαίρεση του υπερκείμενου. Μετά από ανασύσταση του ιζήματος σε 1ml 70% αιθανόλης, ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στους 4°C, το υπερκείμενο απορρίπτεται ενώ το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα ανασυστάθηκε σε 60μL H₂O ελεύθερου RNασών (DEPC-treated) και το RNA φωτομετρήθηκε με σκοπό τον υπολογισμό της ποσότητας που θα χρειαστεί για κάθε δείγμα στην αντίδραση σύνθεσης cDNA.

3.3.3 Παραγωγή cDNA από ολικό RNA χρησιμοποιώντας αντίστροφη μεταγραφάση

Η παραγωγή cDNA από ολικό RNA μέσω της μεθόδου RT-PCR σε αυτό το πείραμα επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας το iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) ακολουθώντας το πειραματικό πρωτόκολλο. Για μια αντίδραση σύνθεσης των 20μL χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

✓ 5x iScript Reaction Mix	4μL
✓ iScript αντίστροφη μεταγραφάση	1μL
✓ H ₂ O ελεύθερο νουκλεασών	5μL
✓ RNA υπόστρωμα (1μg RNA)	+ 10μL
	<hr/>
	20μL

Πραγματοποιήθηκε επώαση των δειγμάτων για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ακολούθησαν 30 λεπτά στους 42°C και τέλος 5 λεπτά στους 85°C για την απενεργοποίηση του ενζύμου. Ακολούθως, τα προϊόντα της κάθε αντίδρασης αποθηκεύτηκαν στους 4°C έως την αντίδραση της PCR.

3.3.4 Η αντίδραση real-time PCR

Για την ποσοτική ανίχνευση του mRNA του Nogo-A επιλέχθηκε όπως και στον *in situ* υβριδισμό, να ενισχυθεί τμήμα του γονιδίου Rtn4 (*Mus musculus*) το οποίο να είναι ειδικό μόνο για το Nogo-A μετάγραφο (1^η ισομορφή) και όχι για τα Nogo-B και -C. Η ενισχυόμενη νουκλεοτιδική αλληλουχία ενέπιπτε εντός των 724bp του 4^{ου} εξονίου του Rtn4 που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των ριβοανιχνευτών του ISH. Έτσι, τμήμα μήκους 203bp και με primers τους: FW 5'- AGAGTC ACCTGCGACCCTTA - 3' και RV 5' - TAGCTCTAGCAGCCAGCACA - 3', επιλέχθηκε για να μετρήσει τα επίπεδα έκφρασης του Nogo A mRNA με real-time PCR. Το κάθε δείγμα ενισχύθηκε εις διπλούν ενώ ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη πάλι εις διπλούν. Η real-time PCR πραγματοποιήθηκε με το SYBR® FAST qPCR Kit (Kapa) ενώ για μια αντίδραση των 20μL χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

✓ cDNA (<20ng)	1μL
✓ 200 nM FW primer	0,4μL (από 10 μM stock)
✓ 200 nM RV primer	0,4μL (από 10 μM stock)
✓ SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X)	10μL
✓ H ₂ O ελεύθερο νουκλεασών μέχρι τα 20μL	+ 8,2μL
	<hr/>
	20μL

Η αντίδραση real-time PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή iCycler iQ™ (Bio-Rad) και οι συνθήκες ενίσχυσης ήταν:

Αρχική αποδιάταξη	95 °C για 12 min	
Αποδιάταξη	94 °C για 30 sec	} 40x
Υβριδοποίηση εκκινητών	60 °C για 30 sec	
Επέκταση	72 °C για 20 sec	
Τελικό βήμα επέκτασης	72 °C για 5 min	
<u>MCA ανάλυση</u>		} ↑ κατά 0,5 °C / ανά κύκλο
Αποδιάταξη μορίων	55 °C για 20 sec	
Αποδιάταξη μορίων	72 °C για 20 sec	
Τελικό βήμα αποδιάταξης	72 °C για 3 min	
Αποθήκευση	4 °C ∞	

Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα 1,5% αγαρόζης όπου ελέγχθηκε η παρουσία ή απουσία μη ειδικών προϊόντων (βάση αριθμού των ζωνών).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ IN SITU ΥΒΡΙΔΙΣΜΟ

Το mRNA του Nogo-A εκφράζεται στο ΚΝΣ τόσο μαρτύρων όσο και αρρώστων μυών. Ο χωρικός εντοπισμός των νευρωνικών δομών που εκφράζεται το mRNA έγινε με χρήση στερεοταξικών συντεταγμένων άτλαντα εγκεφάλου μν C57BL/6.⁷⁸ Τα θετικά κύτταρα χωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες (πολύ ισχυρό, ισχυρό/μέτριο και αδύναμο), βάση οπτικής σύγκρισης (ημιποσοτικά) της έκτασης συγκέντρωσης της μπλε χρωστικής. Τόσο η τοπολογία όσο και η σχετική πυκνότητα των in situ σημάτων συνοψίζεται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Νευρωνική έκφραση του Nogo-A mRNA στο ΚΝΣ του μν C57BL/6.

Δομές	
Ι. Τελεγκέφαλος	
<i>Οσφρητικός βολβός</i>	
Σπειροειδής στοιβάδα	ΔΕ
Μιτροειδής στοιβάδα	
Κοκκιώδης στοιβάδα	
Εγκεφαλικός φλοιός	++
Απισειδής φλοιός (Pir)	+++
<i>Ιπποκάμπειος σχηματισμός</i>	
Αμμώνιο κέρας (CA1-3)	+++
Οδοντωτή έλικα (DG)	-/+
<i>Διάφραγμα</i>	
Tenia Tecta (TT)	ΔΕ
Έσω διαφραγματικός πυρήνας (MS)	+
Έξω διαφραγματικός πυρήνας (LS)	+
Διαγώνια ταινία (του Broca)	ΔΕ
Ραχιαίος ενδοαπισειδής πυρήνας (DEn)	++
Προτείχισμα (CI)	++
Αμυγδαλή	+
Πυρήνας του τελικού πετάλου του ραβδωτού (BSTc)	-/+
<i>Ωχρά σφαίρα (GP)</i>	
Εξωτερική μοίρα (GPe)	-/+
Εσωτερική μοίρα (GPI)	
Κερκοφόρος πυρήνας/κέλυφος (striatum)	-/+
Επικλινής πυρήνας (NAcc)	
<i>Προοπτικοί πυρήνες</i>	
MCPO	+++
MnPO	++
MPOM	++
MPA	+

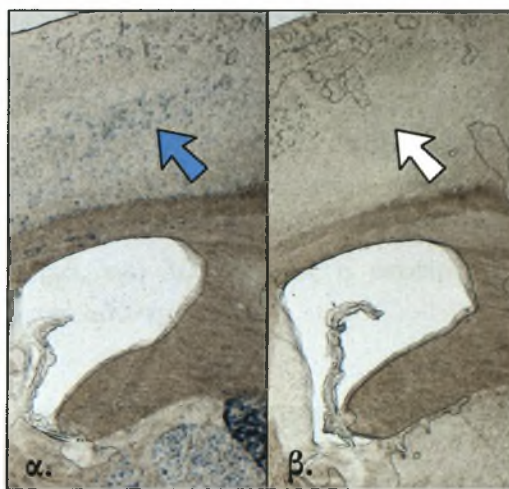
II. Διεγκεφάλος	
<i>Θάλαμος</i>	
Δικτυωτός πυρήνας (Rt)	++
Προσθιοραχιαίος πυρήνας (AD)	+++
Παραδεσμικός πυρήνας (PF)	ΔΕ
Έσω πυρήνας (CM)	++
Παραταινωτός (PT)	++
Πρόσθιος παρακοιλιακός (PVA)	+++
Πρόσθιος-έσω (AM)	++
Συνδετικός (Re)	++
Άλλοι πυρήνες	+
<i>Πυρήνες ηγίας (Habennilar)</i>	
Έσω πυρήνας (MHb)	+++
Έξω πυρήνας	-/+
<i>Υποθάλαμος</i>	
Μαστίο (Φυματομαστικός πυρήνας)	ΔΕ
Υπεροπτικός πυρήνας (SO)	+++
<i>Παρακοιλιακοί πυρήνες (Pa)</i>	
PaLM	+++
PaMM	+++
PaPo	++
Πρόσθια υποθαλάμια περιοχή (AHP)	++
Έσω κοιλιακός πυρήνας (VMH)	++
Άλλοι υποθαλαμικοί πυρήνες	-/+
Υποθαλάμιος πυρήνας (STh)	+
Αβέβαιη Ζώνη (Zona incerta)	-/+
III. Μεσεγκεφάλος	
<i>Πυρήνες γονατώδους σώματος</i>	
Ραχιαίος (MGD)	+
Κοιλιακός (MGV)	
Κοιλιακό καλυπτρικό δεμάτιο (VTA)	++
<i>Μέλαινα ουσία (SN)</i>	
Συμπαγής μοίρα (SNc)	+
Δικτυωτή μοίρα (SNr)	-/+
Ερυθρός πυρήνας	+++
Πυρήνας του Darkschewitsch (Dk)	++
Πυρήνας του κοινού κινητικού "III" (πυρήνας Edinger-Westphal)	+++
Μεσοσκελιαίος πυρήνας (Interpeduncular nu)	+
Κεντρική φαϊή ουσία (PAG)	+
IV. Γέφυρα & Προμήκης μυελός	
<i>Πυρήνες της ραφής</i>	
Ραχιαίος (DR)	+++
Έσω (MnR)	
Μέγας (magnus)	ΔΕ
Αφανής (obscures)	
Γεφυρικοί πυρήνες	+++
Παραδιδυμικός πυρήνας (PBG)	+++
Κοιλιακός πυρήνας έξω λημνίσκου (VLL)	+

Τροχλιακός πυρήνας "IV"	++
Τριδυμικός πυρήνας "V"	
Μεσεγκεφαλικός	+++
Κινητικός	++
Γεφυρικός	++
Νωτιαία δεσμίδα (Sp5)	+
Προτετραδυμική περιοχή	-/+
Άνω διδυμία (Οπτικό σύστημα)	+
Κάτω διδυμία (Ακουστικό σύστημα)	+
Κοιλιακοί πυρήνες	
Ραχιαίος (DC)	++
Κοιλιακός (VCP)	
Αιθουσαίοι πυρήνες	
Άνω (SuVe)	+++
Έσω (MVe)	
Υπομέλας τόπος (LC)	++
Δικτυωτοί πυρήνες	
Δικτυωτός πυρήνας της καλύπτρας	++
Έξω δικτυωτός πυρήνας	
Ραχιαίος καλυπτρικός πυρήνας (DTg)	+
Προσωπικός πυρήνας "VII"	++
Έξω σφηνοειδής πυρήνας (ECu)	++
Μικτός πυρήνας (Amb)	++
Ραχιαίος κινητικός πυρήνας του πνευμονογαστρικού "X"	++
Υπογλώσσιος πυρήνας "XII"	++
Πυρήνας μονήρους δεσμίδας (Sol)	+
Δέρας κάτω ελαίας (IO)	+
Ισχνός πυρήνας (Gr)	ΔΕ
V. Παρεγκεφαλίδα	
Παρεγκεφαλιδικός φλοιός	
Κύτταρα Purkinje	++
Κοκκιώδης στοιβάδα	+
Μοριώδης στοιβάδα	-
Βαθιοί παρεγκεφαλιδικοί πυρήνες	++
VI. Νωτιαίος μυελός	
Φαία ουσία	
Ραχιαίο κέρασ	-/+
Κοιλιακό κέρασ (κινητικοί νευρώνες)	++
Λευκή ουσία (ολιγοδενδροκύτταρα)	-/+
Γάγγλια ραχιαίας ρίζας (DRG)	ΔΕ

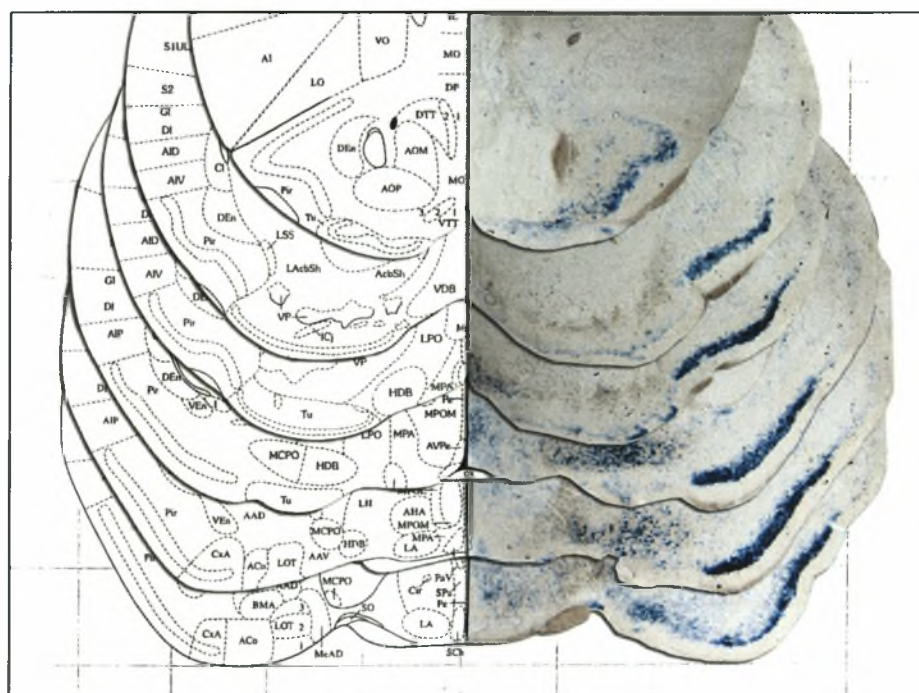
Σημείωση. -, μη ανιχνεύσιμο; +, αδύναμο; ++, μέτριο/δυνατό; +++, πολύ δυνατό; ΔΕ, δεν εξετάστηκε; " ", υποδηλώνουν τα κраниακά νεύρα.

4.1.1 Έκφραση του Nogo-A mRNA στον τελεγκέφαλο (εγκεφαλικά ημισφαίρια)

Ο εγκεφαλικός φλοιός παρουσίασε ένα μέτριο/δυνατό αλλά διάχυτο σήμα του mRNA, το οποίο εντοπίστηκε κυρίως σε μεγάλους πυραμιδικούς νευρώνες αλλά και σε μικρότερα κύτταρα, με μια τάση συγκέντρωσης του σήματος στην πέμπτη (V) στοιβάδα (Σχήμα 11). Σε πυραμιδικούς νευρώνες επίσης του Αμμώνιου κέρατος του ιπποκάμπεου σχηματισμού και συγκεκριμένα περισσότερο της CA3 και λιγότερο των CA1/CA2 περιοχών, εντοπίστηκε ισχυρότατη έκφραση του Nogo-A mRNA ενώ ισχνό σήμα έδωσε η οδοντωτή έλικα (DG). Διάσπαρτο σήμα έδωσαν γλοιακικής φύσεως κύτταρά, πιθανόν ολιγοδενδροκύτταρα, του μεσολοβίου (cc). Ισχυρότατη έκφραση του Nogo-A mRNA εντοπίζεται επίσης στον απιοειδή φλοιό (Pir) που συνοδεύεται από ένα δυνατό σήμα του προοπτικού πυρήνα MCPO (Σχήμα 12). Τέλος, αν και δεν εξετάστηκε η περιοχή των οσφρητικών βολβών, έχει αναφερθεί υψηλότατη έκφραση του Nogo-A mRNA στα κύτταρα της μιτροειδούς και κοκκιώδους στοιβάδας⁴².



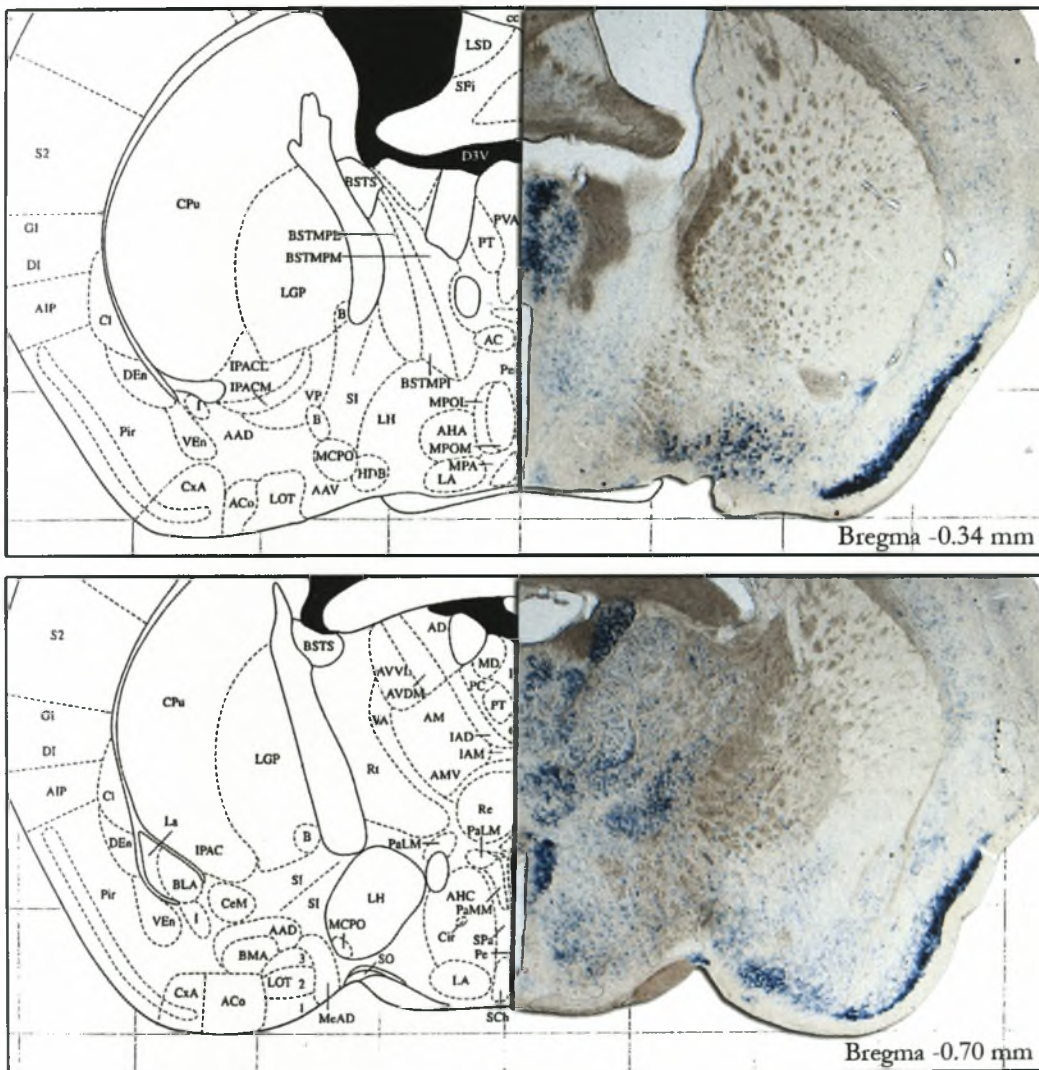
Σχήμα 11. Nogo-A mRNA στον φλοιό.
a. anti-sense β. sense ανιχνευτής



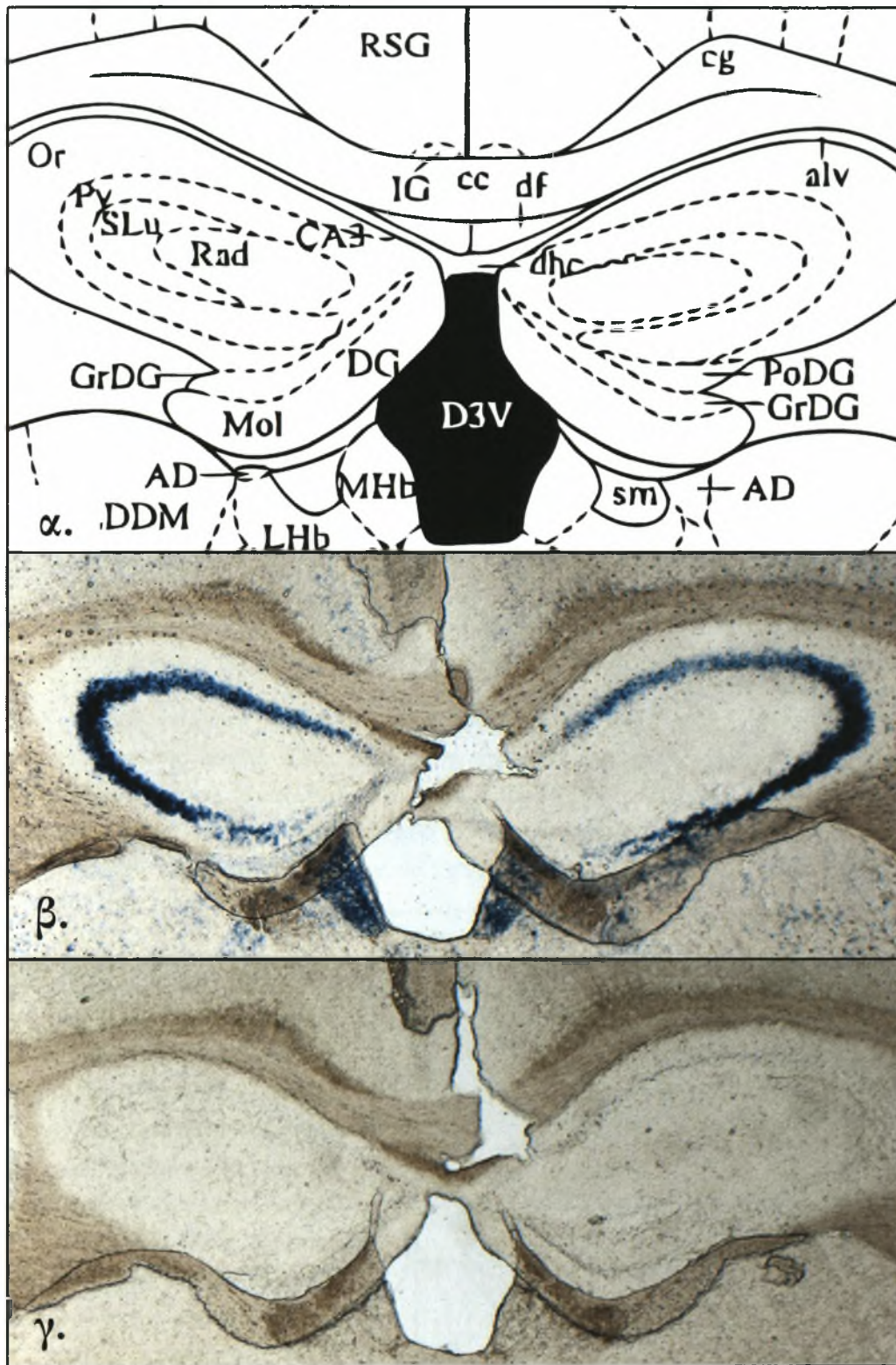
Σχήμα 12. Έκφραση του Nogo-A mRNA στον απιοειδή φλοιό.

4.1.2 Έκφραση του Nogo-A mRNA στον διεγκέφαλο

Σχεδόν όλοι οι θαλαμικοί πυρήνες εκφράζουν έντονα το Nogo-A mRNA με αρκετά εντονότερο σήμα από τον πρόσθιο παρακλιμακίο (PVA) και πρόσθιο ραχιαίο (AD) (Σχήμα 13). Εντονότατο και χαρακτηριστικό της δομής σήμα δίνει ο έσω πυρήνας της ηνίας (MHb) (Σχήμα 14). Από τους πυρήνες του υποθαλάμου, ισχυρή έκφραση του Nogo-A mRNA εντοπίστηκε στον υπεροπτικό (SO) και σε κάποιους από τους παρακλιμακίους πυρήνες (PaLM και PaMM). Οι υπόλοιποι πυρήνες του υποθαλάμου χαρακτηρίζονται από μέτριας εντάσεως σήμα, ενώ λοιποί όπως ο υποθαλάμιος πυρήνας (STh) και της αβέβαιης ζώνης (ZI) από αδύναμο.



Σχήμα 13. Έκφραση του Nogo-A mRNA σε θαλαμικούς και υποθαλαμικούς πυρήνες.



Σχήμα 14. Έκφραση του Nogo-A mRNA στον ιπλόκαμπο (CA3) και τον έσω πυρήνα της ηνίας (MHb).
 α. στερεοταξιζικές συντεταγμένες β. anti-sense, γ. sense ανιχνευτής

4.1.3 Έκφραση του Nogo-A mRNA στον μεσεγκέφαλο

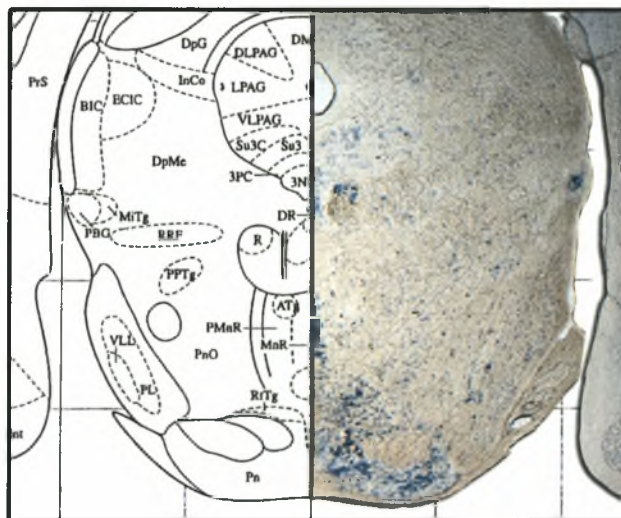
Στον μεσεγκέφαλο το mRNA του Nogo-A φαίνεται να εκφράζεται πολύ έντονα στον πυρήνα του κοινού κινητικού ή κρανιακού νεύρου III (πυρήνας Edinger-Westphal) και στον ερυθρό πυρήνα (R) ενώ σχετική ένταση διαφαίνεται στον πυρήνα του Darkschewitsch (Dk), στο κοιλιακό καλυπτρικό δεμάτιο (VTA) και στην περιοχή του γονατώδους σώματος (MGD, MGv) (Σχήμα 15).



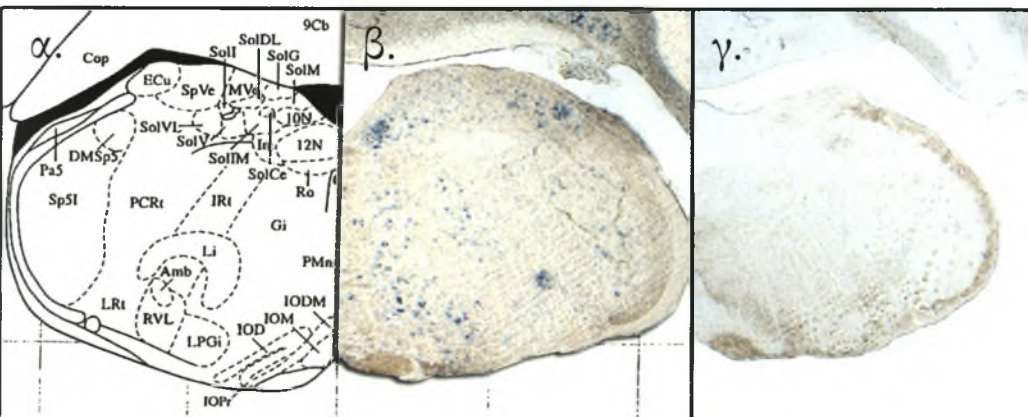
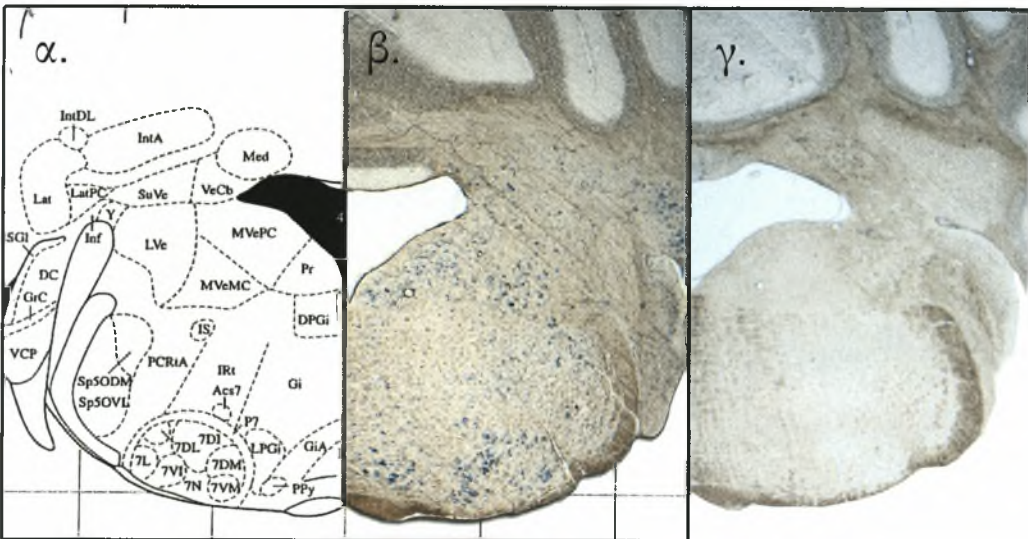
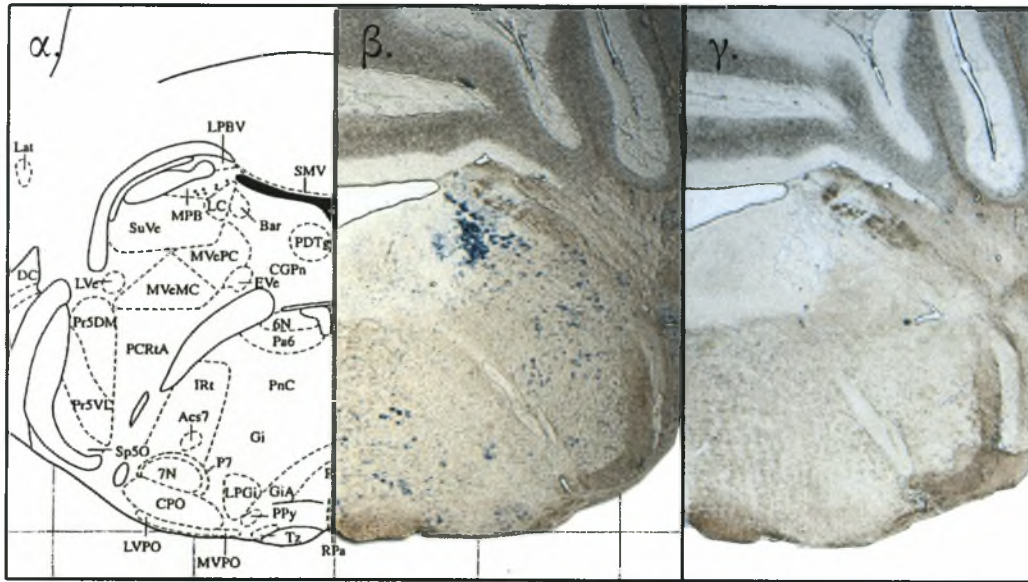
Σχήμα 15. Έκφραση του Nogo-A mRNA στον μεσεγκέφαλο.

4.1.4 Έκφραση του Nogo-A mRNA στον ρομβοεγκέφαλο (γέφυρα και προμήκης)

Πολύ ισχυρή έκφραση του Nogo-A mRNA παρατηρήθηκε σε γεφυρικούς πυρήνες και πυρήνες της ραφής (DR, MnR), σε πυρήνες του κοινού κινητικού (3N και υπεροπτικούς), στον παραδιδυμικό πυρήνα (PBG) (Σχήμα 16), καθώς επίσης και σε μεσεγκεφαλικούς πυρήνες του τριδύμου κρανιακού νεύρου V (δεν παρουσιάζονται). Πολύ ισχυρή έκφραση συνεχίστηκε να εμφανίζεται σε αιθουσαίους πυρήνες (SuVe, MVe), ενώ σχετικά ισχυρή εντοπίστηκε στον υπομέλανα τόπο (LC), σε και κοχλιακούς πυρήνες (DC, VCP), αλλά και σε κινητικούς πυρήνες όπως του προσωπικού κρανιακού νεύρου VII, τον ραχιαίο κινητικό πνευμονογαστρικού (X) και του υπογλώσσιου κρανιακού νεύρου XII. Σχετικά δυνατό σήμα παρατηρήθηκε επίσης στον έξω σφηνοειδή πυρήνα, σε δικτυωτούς πυρήνες, ενώ αδύναμη έκφραση εμφάνισαν οι υπόλοιποι πυρήνες (Σχήμα 17).



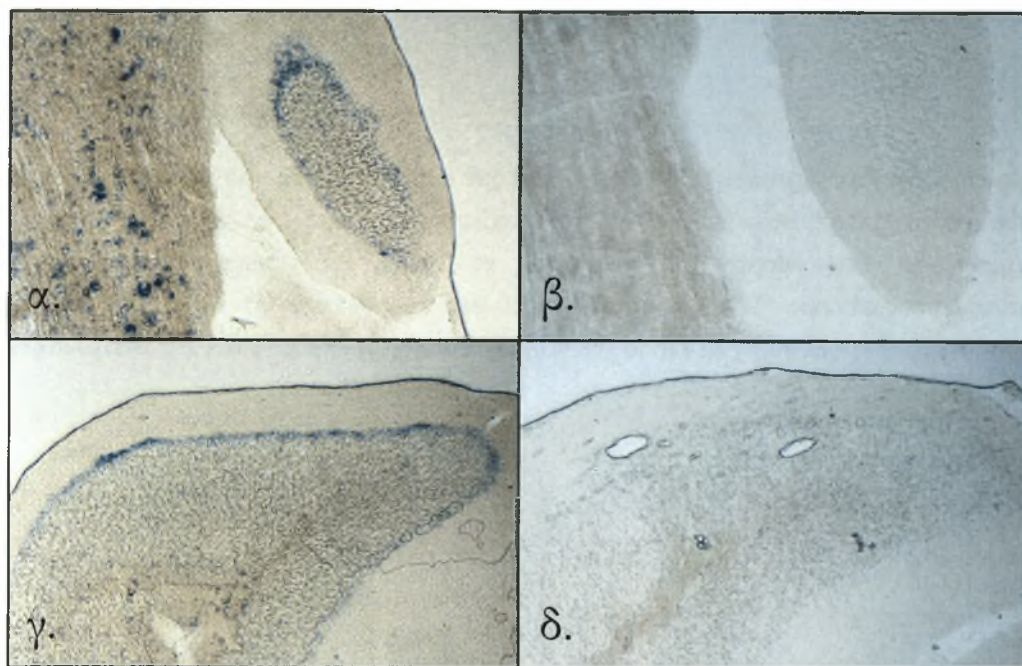
Σχήμα 16. Έκφραση του Nogo-A mRNA σε γεφυρικούς πυρήνες και πυρήνες της ραφής.



Σχήμα 17. Εκφραση του Nogo-A mRNA στον προμήκη μυελό. α. στερεοταξικές συντεταγμένες β. anti-sense, γ. sense ανιχνευτής

4.1.5 Έκφραση του Nogo-A mRNA στην παρεγκεφαλίδα

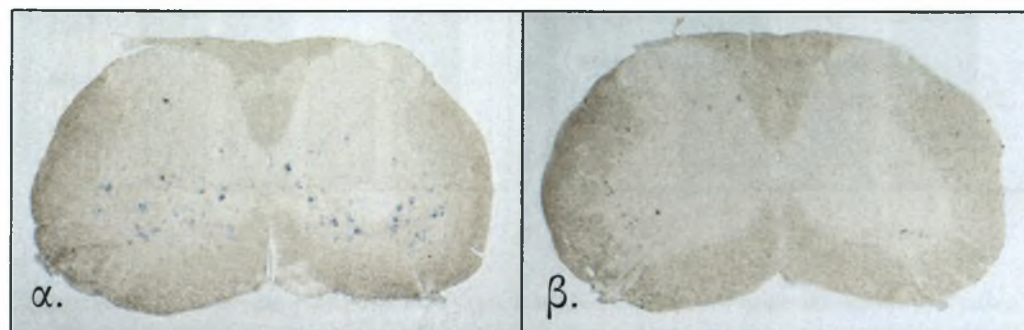
Ισχυρή έκφραση του Nogo-A mRNA εμφάνισαν τα κύτταρα Purkinje της παρεγκεφαλίδας, ελαφρότερη η κοκκιώδης στοιβάδα ενώ έκφραση δεν εντοπίστηκε στη μοριώδη στοιβάδα (Σχήμα 18). Έντονο σήμα έδωσαν πυρήνες που βρίσκονται βαθιά στην παρεγκεφαλίδα ενώ παντελή απουσία του Nogo-A mRNA παρατηρήθηκε από την υπόλοιπη δομή της παρεγκεφαλίδας.



Σχήμα 18. Έκφραση του Nogo-A mRNA στα κύτταρα Purkinje της παρεγκεφαλίδας α. και γ. anti-sense, β. και δ. sense ανιχνευτής

4.1.6 Έκφραση του Nogo-A mRNA στον νωτιαίο μυελό

Τέλος, στο νωτιαίο μυελό έκφραση του Nogo-A mRNA φάνηκε να υπάρχει αποκλειστικά στο πρόσθιο κέρασ της φαιάς ουσίας, στο ύψος της αυχενικής μοίρας και συγκεκριμένα σε α-κινητικούς νευρώνες (Σχήμα 19).



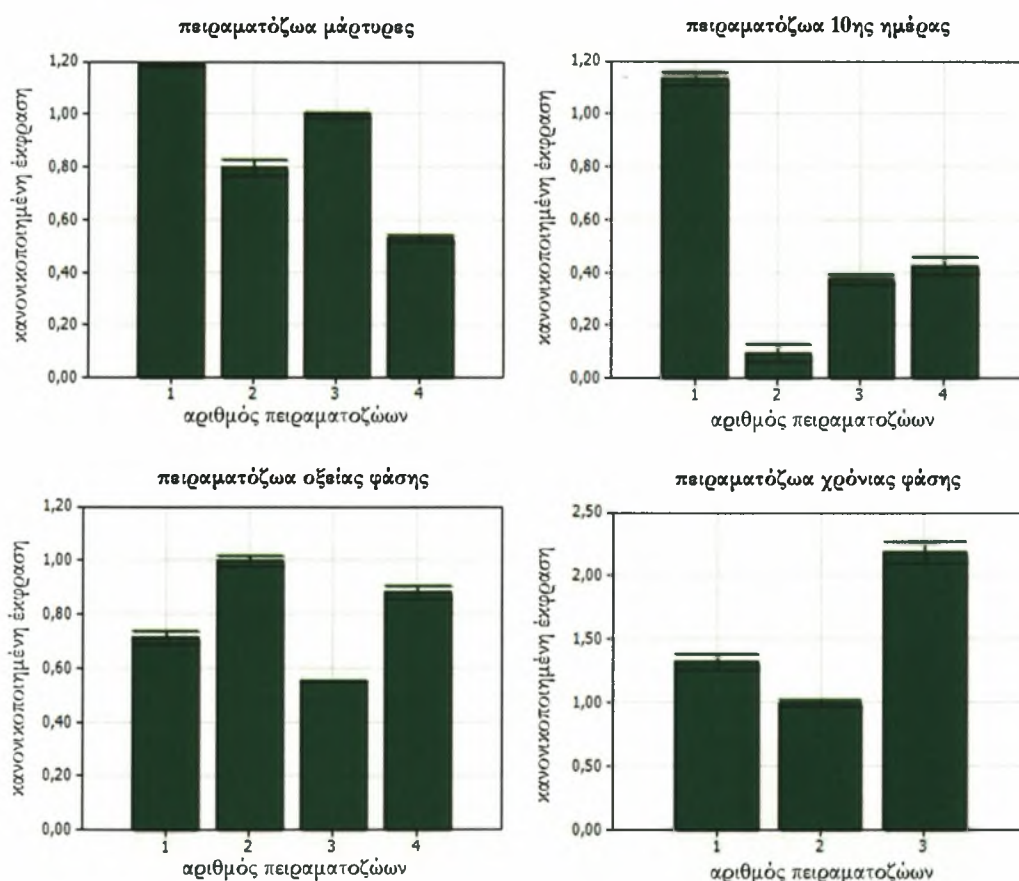
Σχήμα 19. Έκφραση του Nogo-A mRNA στο νωτιαίο μυελό. α. anti-sense, β. sense ανιχνευτής

4.2 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ REAL-TIME PCR

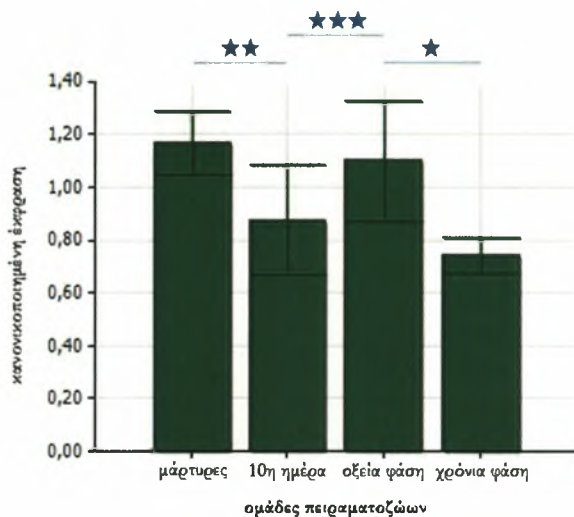
Τα αποτελέσματα της real-time PCR αναλύθηκαν με την μέθοδο REST[®] 79 και η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα GraphPad Prism 5. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με την στατιστική μέθοδο Kruskal-Wallis για να ελεγχθεί η στατιστική σημαντικότητα μεταξύ όλων των ομάδων της μελέτης. Αιολούθησε Post-hoc ανάλυση χρησιμοποιώντας το Dunn's test για να συγκριθούν οι ομάδες ανά δύο, βαθμολογώντας με * την διαφορά ως στατιστικά σημαντική, ** ως μέτρια σημαντική και με *** ως πολύ σημαντική.

4.2.1 Αποτελέσματα εγκεφάλου

Η MCA ανάλυση που ακολουθήθηκε της real-time PCR, ήταν αρνητική στην ύπαρξη παραπροϊόντων ή γενωμικών προσμίξεων στα δείγματα που προέρχονταν από ομογενοποιημένα εγκεφάλου. Έτσι, τα δεδομένα εισήχθησαν στο πρόγραμμα GraphPad Prism 5, αναλύθηκαν με την μέθοδο REST[®] και παρουσιάζονται μεμονωμένα για κάθε ομάδα (Σχήμα 20) αλλά και ολικά (Σχήμα 21).



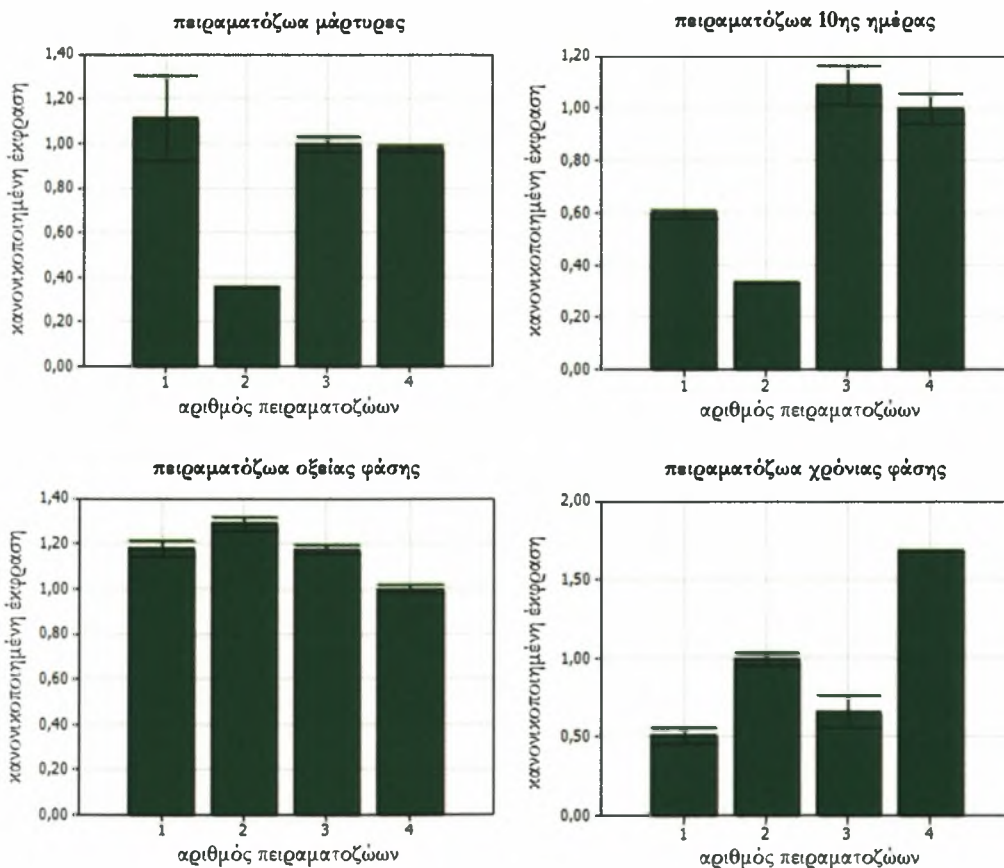
Σχήμα 20. Κανονικοποιημένη έκφραση του *Nogo-A* mRNA σε δείγματα ομογενοποιημένου εγκεφάλου σε κάθε μια από τις τέσσερις ομάδες πειραματοζώων που χρησιμοποιήθηκαν.



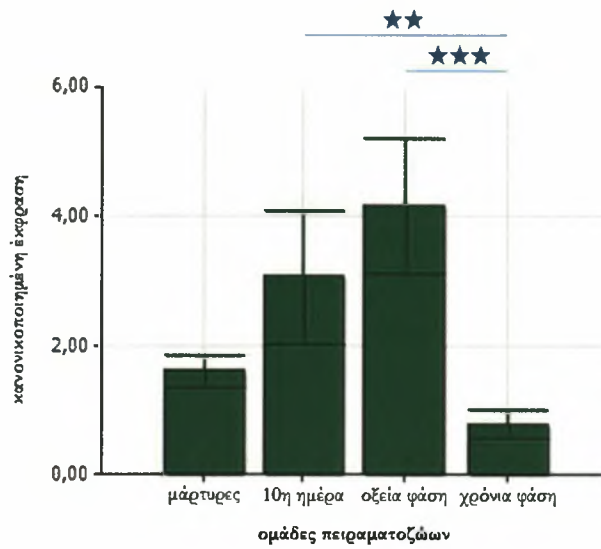
Σχήμα 21. Κανονικοποιημένη έκφραση του Nogo-A mRNA σε δείγματα ομογενοποιημένου εγκεφάλου μεταξύ και των τεσσάρων ομάδων πειραματοζώων. Μεγάλη στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ των δειγμάτων της 10^{ης} ημέρας και της οξείας φάσης, μετρίου βαθμού μεταξύ των μαρτύρων και της 10^{ης} ημέρας ενώ μικρή στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ της οξείας και χρόνιας φάσης.

4.2.2 Αποτελέσματα νωτιαίου μυελού

Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε για τα δείγματα προερχόμενα από ομογενοποίηση νωτιαίου μυελού και τα δεδομένα παρουσιάζονται μεμονωμένα για κάθε ομάδα (Σχήμα 22) αλλά και ολικά (Σχήμα 23).



Σχήμα 22. Κανονικοποιημένη έκφραση του Nogo-A mRNA σε δείγματα ομογενοποιημένου νωτιαίου μυελού σε κάθε μια από τις τέσσερις ομάδες πειραματοζώων που χρησιμοποιήθηκαν.



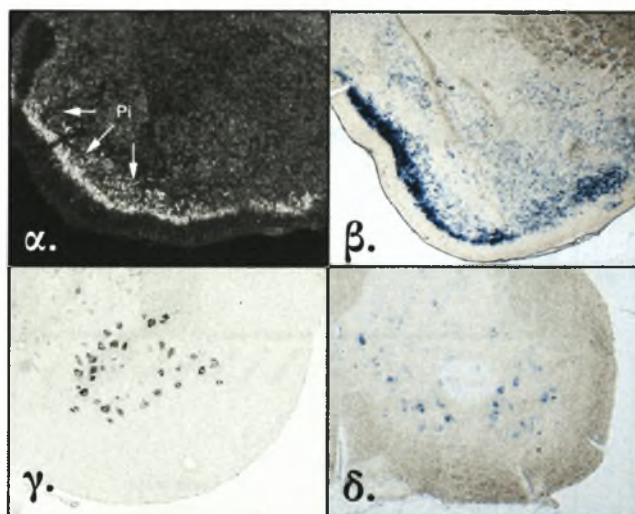
Σχήμα 23. Κανονικοποιημένη έκφραση του *Nogo-A mRNA* σε δείγματα ομογενοποιημένου νωτιαίου μυελού μεταξύ και των τεσσάρων ομάδων πειραματοζώων. Μεγάλη στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ των δειγμάτων της οξείας και της χρόνιας φάσης ενώ μετρίου βαθμού διαφορά μεταξύ της 10^{ης} ημέρας και της χρόνιας φάσης.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο αναστολέας της νευραξονικής αναγέννησης Nogo-A, αποτελεί έναν από τους κύριους ρυθμιστικούς παράγοντες ολιγοδενδριτικής προέλευσης, στους οποίους οφείλεται μερικώς η αδυναμία του ΚΝΣ να επανέλθει ύστερα από κάποιο τραυματισμό ή κάκωση.^{80,81} Ο ανασταλτικός του ρόλος έχει επαληθευτεί τόσο από *in vitro* πειράματα σε κυτταροκαλλιέργειες όσο και *in vivo* σε πειραματόζωα όπως μύες και επίμυες.⁴⁴ Πειράματα όμως έχουν γίνει και σε ανθρώπινο ιστό προερχόμενο τόσο από έμβρυα⁶⁶ όσο και από αυτοψία ενηλίκων προσβεβλημένων από ΠΣ⁵⁸. Τα ζωικά μοντέλα που έχουν χρησιμοποιηθεί για να μελετηθεί ο παράγοντας Nogo-A αφορούν κλινικά επαγόμενους τραυματισμούς του νευρικού συστήματος όπως η ρίψη βάρους σε συγκεκριμένο ύψος της σπονδυλικής στήλης (WDI),⁴¹ αποκοπής του ισχυακού ή οπτικού νεύρου⁴⁴ και έκθεση σε νευροτοξικούς παράγοντες όπως το καϊνικό οξύ⁴¹. Παρόλα αυτά ελάχιστα μοντέλα έχουν χρησιμοποιηθεί για την μελέτη του Nogo-A που εμπλέκουν απομυελίνωση και ακολουθούμενη αξονική καταστροφή, επαγόμενη από το ανοσιακό σύστημα όπως η ΠΣ και το πειραματικό της μοντέλο, την ΠΑΕ.⁵⁹

Τα επίπεδα τα οποία έχει μελετηθεί εκτενώς η επίδραση του Nogo-A είναι κυρίως το γονιδιακό και το πρωτεϊνικό. Σε γονιδιακό επίπεδο έχει δειχθεί ότι μεταλλαγμένα knock-out (k.o) ζώα για τις διάφορες ισομορφές του Nogo σε μοντέλα κάκωσης του μυελού των οστών (SCI), έχουν αυξημένη ικανότητα αναγέννησης αξόνων^{81,82} η οποία διαφέρει μεταξύ των φυλών τους⁸³, αν και έχει ειπωθεί ότι από μόνο της η απαλοιφή του γονιδίου Nogo δεν είναι αρκετή για την παραγωγή τέτοιου φαινοτύπου⁸⁴. Σε επίπεδο πρωτεΐνης, αντίστοιχες μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση anti- Nogo-A αντισωμάτων συνεισφέρει θετικά προς την εξυγίανση της κλινικής εικόνας των πειραματοζώων που έχουν υποστεί τόσο SCI⁸⁵, όσο και ΠΑΕ^{59,60}. Προς αυτή την κατεύθυνση έχει βοηθήσει η μελέτη και ταυτοποίηση των προτύπων έκφρασης του Nogo-A. Η έκφραση της πρωτεΐνης Nogo-A έχει μελετηθεί πλήρως σε άνθρωπο, μυ και επίμυ, ενώ όσον αφορά τα ζώα, η έκφραση μελετήθηκε τόσο σε φυσιολογικά (naïve) όσο και μετά από πρόκληση κάποιου τραυματισμού ή νόσου. Έχει δειχθεί ότι συνεντοπίζεται επί το πλείστον σε υψηλό βαθμό με το αντίστοιχο mRNA του, ωστόσο υπάρχουν και εμφανείς διαφορές μεταξύ των δύο προτύπων⁴⁴. Παρόλα αυτά, τα δεδομένα που έχουν συγκεντρωθεί για τα πρότυπα έκφρασης mRNA αφορούν κυρίως τραυματικά μοντέλα κακώσεων σε επίμυες.

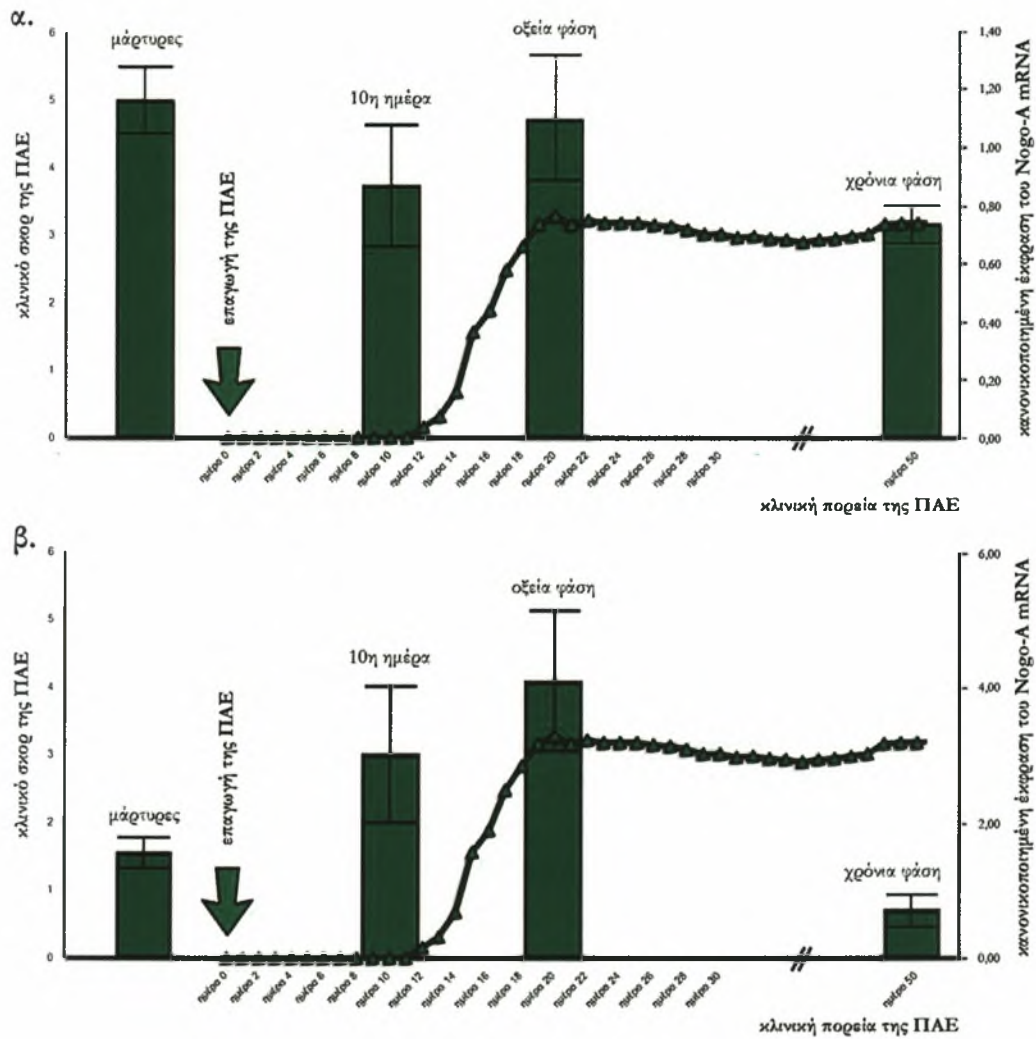
Δεδομένου της ελαττωμένης χρήσης απομυελινωτικών μοντέλων στην μελέτη δράσης του Nogo-A σε συνδυασμό με το βιβλιογραφικό κενό που αφορά το πρότυπο έκφρασης του mRNA σε μυ, διενεργήθηκε η παρούσα μελέτη η οποία αφορά τον χωρο-χρονικό εντοπισμό του Nogo-A στην πορεία εξέλιξης της ΠΑΕ. Αρχικά, πραγματοποιήσαμε ποιοτική ανίχνευση του μορίου με *in situ* υβριδισμό για να εντοπίσουμε τις περιοχές έκφρασης στον ιστό. Πολύ ισχυρό σήμα εντοπίστηκε στον απιοειδή φλοιό (Pir), τις CA1-3 περιοχές του ιππόκαμπου, τον έσω πυρήνα της ηνίας (MHb), ερυθρό (nr) και κοινό κινητικό (III) πυρήνα καθώς επίσης και στον υπομέλανα τόπο (LC) του προμήκη μυελού. Στην παρεγκεφαλίδα ισχυρό σήμα έδωσαν τα κύτταρα purkinje ενώ ενδιαφέρον αποτελεί το θετικό σήμα ορισμένων κυττάρων του μεσολοβίου (cc), πολύ πιθανόν ολιγοδενδροκυττάρων, εντοπίζοντας έτσι δομές γλοιακής φύσεως. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν και επαληθεύτηκαν σε ποσοστό που αγγίζει το 90%, με πρότυπα έκφρασης του ίδιου μορίου σε φυσιολογικούς επίμυες άλλων μελετών (Σχήμα 24).



Σχήμα 24. Πρότυπα έκφρασης του Nogo-A mRNA της παρούσας μελέτης (β, δ) σε σχέση με παλαιότερες. α. στον απιοειδή φλοιό εγκεφάλου από Josephson et al. 2001, γ. σε κινητικούς νευρώνες του ωτιαίου μυελού από Hunt et al. 2003

Ακολούθως, θέλοντας να ερμηνεύσουμε τα θετικά αυτά σήματα και την σημασία τους σε σχέση με την νόσο, επιλέξαμε ένα ζώο από τις τρεις χαρακτηριστικές μέρες τις ΠΑΕ· την 10^η ημέρα από την επαγωγή που χαρακτηρίζει την έναρξη της νόσου, την ημέρα που το ζώο κρατάει τον μέγιστο, σταθερό και αμετάβλητο για 3-4 μέρες βαθμό (γύρω στην 22^η ημέρα) χαρακτηρίζοντας έτσι την οξεία φάση και τέλος ένα πειραματόζωο μετά από 50 μέρες όπου και έχει εισέλθει της χρόνιας φάσης της νόσου. Τα τρία αυτά πειραματόζωα συγκρίθηκαν με ένα τέταρτο το οποίο δεν υποβλήθηκε τις νόσου, χαρακτηρίζοντας το ως μάρτυρα (naïve). Η ιστοχημική μελέτη δεν έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των ζώων και του μάρτυρα, με χαμηλά θετικά σήματα χρώσης ανά ζώο στις ίδιες περιοχές, εκτός από μια εμφανή εικόνα έντονης χρώσης του πειραματοζώου της 10^{ης} ημέρας. Παρομοίως, ο ποσοτικός έλεγχος των μεταγράφων mRNA Nogo-A, ο οποίος πραγματοποιήθηκε

με real-time PCR σε 4 ζώα των επιλεγμένων ημερών, για τον εγκέφαλο αποκάλυψε μια χαρακτηριστική αυξομείωση μεταξύ των ημερών, μεταξύ των οποίων κάποιες από αυτές στατιστικά σημαντικών, αλλά χωρίς κάποια δραματική αλλαγή που να υποδηλώνει άμεση γονιδιακή ρύθμιση (Σχήμα 25 α). Μόνο τα αποτελέσματα του νωτιαίου μυελού στα αντίστοιχα ζώα φάνηκε να ακολουθούν μια συγκεκριμένη κινητική η οποία έδινε αύξηση της έκφρασης έως και την οξεία φάση με μια ακολουθούμενη πτώση στη χρόνια (Σχήμα 25 β).



Σχήμα 25. Κανονικοποιημένη έκφραση του Nogo-A mRNA εγκέφαλου (α) και νωτιαίου μυελού (β) σε συνάρτηση με την κλινική πορεία των πειραματοζώων της ΠΑΕ αλλά και μαρτύρων. Με μπάρες απεικονίζεται η έκφραση του mRNA και με συνεχόμενη γραμμή η κλινική πορεία.

Για τον εγκέφαλο έχει δείχθει ότι τα επίπεδα mRNA μυελινικών πρωτεϊνών αντιδρούν με μεγάλη ευαισθησία σε αυτοάνοσες απομυελινώσεις σε σχέση με τις

αντίστοιχες πρωτεΐνες τους⁶¹, όπως έχει συχνά παρατηρηθεί και σε πρώιμα στάδια απομυελίνωσης επαγόμενη από κουπριζόνη⁸⁶. Έχει επίσης αναφερθεί ότι μέχρι και την 42^η ημέρα MOG-επαγόμενης ΠΑΕ, δεν υπάρχει κάποια σημαντική χρονικά βασισμένη διαφορά στην επανέκφραση τέτοιων μυελινικών γονιδίων κατά τη διάρκεια επαναμυελίνωσης.^{61,86,87} Έτσι, η παρατηρούμενη αυξομείωση της έκφρασης, πιθανόν δεν αντικατοπτρίζει μια ουσιαστική βιολογική διεργασία με απώτερο σκοπό κάποιου είδους αναστολή, αλλά απλώς μια γενικευμένη κατάσταση γονιδιακής απορύθμισης παρουσία ανοσοδιαμεσολαβούμενης απομυελίνωσης. Αναφορικά με το νωτιαίο μυελό, δημοσιευμένες έρευνες που αφορούν στην έκφραση του Nogo-A μετά από τραυματισμό του νωτιαίου μυελού σε επίμυες, παρουσιάζουν αντιφατικά ιστολογικά αποτελέσματα: άλλοτε ότι εμφανίζεται αύξηση των mRNA γύρω από το σημείο τραυματισμού και άλλες ότι δεν παρατηρείται καμία αύξηση, ενώ στις περισσότερες των περιπτώσεων δεν μπορούν να εξηγηθούν τα αντιφατικά αποτελέσματα.^{40,41,43,44} Εμείς παρατηρήσαμε μια σταδιακή αύξηση της έκφρασης έως και την οξεία φάση, μια κατάσταση δηλαδή προετοιμασίας και κινητοποίησης του ΚΝΣ λόγω της ενεργούς απομυελινωτικής διεργασίας και μιας επακόλουθης πτώσης της κατά την χρόνια φάση. Τα ευρήματα αυτά εναρμονίζονται με την επαρκώς κατοχυρωμένη διαπίστωση ότι το συγκεκριμένο μοντέλο της ΠΑΕ επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό το νωτιαίο μυελό σε σχέση με τον εγκέφαλο. Επίσης, η κλινική κλίμακα αξιολόγησης που χρησιμοποιείται για το μοντέλο της ΠΑΕ, ανταποκρίνεται στην υποκείμενη παθολογία του νωτιαίου μυελού και όχι του εγκεφάλου.

Στη βάση αυτών των δεδομένων, τα ευρήματα από την κινητική της έκφρασης του Nogo-A mRNA στο νωτιαίο μυελό είναι ενδεικτικά της δυνατότητας αξονικής αναγέννησης σε καίριες χρονικές στιγμές κατά την εξέλιξη της απομυελίνωσης. Πιο συγκεκριμένα, κατά την ενεργοποίηση του ανοσιακού συστήματος στην περιφέρεια (10^η ημέρα) και πριν εισέλθουν λεμφοκύτταρα στον νωτιαίο μυελό, ήδη σηματοδοτείται η υπερέκφραση του Nogo-A mRNA που ενδεχομένως να σημαίνει και την επερχόμενη αναστολή της αναγέννησης των νευραξόνων οι οποίοι θα υποστούν εκφύλιση εξαιτίας της επερχόμενης φλεγμονώδους αντίδρασης εντός του νωτιαίου μυελού. Η έκφραση του Nogo-A mRNA εξακολουθεί να αυξάνει σημαντικά έως και την οξεία φάση της ΠΑΕ, όπου ο νωτιαίος μυελός έχει διηθηθεί από λεμφοκύτταρα. Είναι ακριβώς η φάση που αρχίζει η ανοσοδιαμεσολαβούμενη απομυελίνωση και αξονική εκφύλιση και φαίνεται ότι κατά τη φάση αυτήν δε λαμβάνει χώρα καμία αναγεννητική δράση για τους άξονες. Κατά τη χρόνια φάση της νόσου, η έκφραση του Nogo-A mRNA υποχωρεί δραματικά σε επίπεδα που παρατηρούνται και στα φυσιολογικά πειραματόζωα, γεγονός που συνδέεται απόλυτα με την απουσία φλεγμονωδών κυττάρων κατά τη χρονική αυτή στιγμή. Συνεπώς η οποιαδήποτε αναγεννητική ικανότητα για τους νευράξονες είναι εφικτή εφόσον αυτοί δεν έχουν υποστεί πλήρη εκφύλιση κατά τη χρονική περίοδο που προηγήθηκε.

Συμπερασματικά, αν και ο Nogo-A ξεκίνησε ως ένας από τους κύριους ανασταλτικούς παράγοντες της γλοιακής ουλής, ο οποίος έχει χαρακτηριστεί ως δείκτης (marker) ολιγοδενδροκυττάρων⁶¹, στην πορεία αποδείχθηκε ισχυρό ορόσημο εντοπισμού και των περισσότερων νευρώνων. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν αυτό το γεγονός μιας και ένδειξη ισχυρότερης χρώσης εμφανίστηκε σε κεντρικούς πυρήνες κρανιακών νεύρων καθώς επίσης και σε νευρώνες με υψηλή αναγεννησιακή ικανότητα, όπως κινητικοί νευρώνες, δικτυωτοί θαλαμικοί πυρήνες, καθώς επίσης και βαθιοί παρεγκεφαλιδικοί πυρήνες.⁴² Σε αυτούς τους συγκεκριμένους πυρήνες, έχει αναφερθεί έλλειψη του υποδοχέα Nogo, NgR, ένα πολύ σημαντικό εύρημα που εξηγεί ικανοποιητικά την υψηλή αναγεννησιακή ικανότητα των νευρώνων αυτών.⁴² Μια ταυτοποίηση του υποδοχέα NgR κρίνεται απαραίτητη στη παρούσα μελέτη της ΠΑΕ, γιατί αυτό ίσως αποτελέσει και τον συνδετικό κρίκο μεταξύ της δράσης του μορίου και του κλινικού φαινοτύπου της νόσου. Πρόσφατα δεδομένα επιβεβαιώνουν την ύπαρξη του υποδοχέα ακόμη και σε λεμφοκύτταρα, δίνοντας μια νέα διάσταση στην παθογένεια της ΠΑΕ.⁸⁸ Υπό το φως τέτοιων ευρημάτων και θεωρώντας την ΠΣ ως νόσο δύο φάσεων, μιας αρχικά φλεγμονώδους και στη συνέχεια νευροεκφυλιστικής, ο Nogo-A θα μπορούσε να θεωρηθεί στόχος θεραπευτικής προσέγγισης τόσο της πρώτης όσο και της δεύτερης φάσης.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Newman EA. New roles for astrocytes: Regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* 2003; 26(10):536-42
2. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2002; 359(9313):1221-1231
3. Lassmann H, Raine CS, Antel J, Prineas JW. Immunopathology of multiple sclerosis: report on an international meeting held at the Institute of Neurology of the University of Vienna. *J Neuroimmunol* 1998; 86(2):213-217
4. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauser B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000; 47(6):707-717
5. Charcot JM. Histologie de la sclerose en plaques. *Gaz Hopital* 1868; 41:554-566
6. Bauer J, Rauschka H, Lassmann H. Inflammation in the nervous system: the human perspective. *Glia* 2001; 36(2):235-43
7. Canella B, Raine CS. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 1995; 37:424-435
8. Navikas V, Link H. Cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 1996; 45:322-333
9. Filippi M, Youstry T, Campi A, et al. Comparison of triple dose versus standard dose gadolinium-DTPA for detection of MRI enhancing lesions in multiple sclerosis. *Neurology* 1996; 46:379-384
10. Stichel CC, Muller HW. The CNS lesion scar: new vistas on an old regeneration barrier. *Cell Tissue Research* 1998
11. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri M, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 1997; 120:393-399
12. Gentleman SM, Nash MJ, Sweeting CJ, et al. Beta-amyloid precursor protein (beta APP) as a marker for axonal injury after head injury. *Neurosci Lett* 1993; 160:139-144
13. Kornek B, Storch M, Weissert R et al. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am J Pathol* 2000; 157:267-276
14. Kabat EA, Wolf A, Bezer AE. The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. *J Exp Med.* 1947; 85(1):117-130
15. Waksman BH. Allergic encephalomyelitis in rats and rabbits pretreated with nervous tissue. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1959; 18(3):397-417
16. Voskuhl, R. R. Palaszynski, K. Sex hormones and experimental autoimmune encephalomyelitis: Implications for multiple sclerosis. *The Neuroscientist* 2001; 7(3): 258-270

17. Gijbels K, Engelborghs S, De Deyn PP. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: an animal model for multiple sclerosis. *Neurosci Res Com*, 2000; 26(3):193-206
18. Rich C, Link JM, Zamora A, Jacobsen H, Meza-Romero R, Offner H, Jones R, Burrows GG, Fugger L, Vandenbark AA. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-35-55 peptide induces severe chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in HLA-DR2-transgenic mice. *Eur J Immunol* 2004; 34(5):1251-61
19. Eugster HP, Frei K, Bachmann R, Bluethmann H, Lassmann H, Fontana A. Severity of symptoms and demyelination in MOG-induced EAE depends on TNFR1. *Eur J Immunol* 1999; 29(2):626-32
20. Encinas JA, Weiner HL, Kuchroo VK. Inheritance of susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 1996; 45(6):655-69
21. Pender MP, Stanley GP, Yoong G, Nguyen KB. The neuropathology of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis induced in the Lewis rat by inoculation with whole spinal cord and treatment with cyclosporine A. *Acta Neuropathol.* 1990; 80(2):172-83
22. Zhang G-X, Yu S, Gran B, Li J, Calida D, Ventura E, Chen X, Rostami A. T cell and antibody responses in remitting-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in (C57bl/6xSJL) F1 mice. *J Neuroimmunol* 2004; 148:1-10
23. Bruck W, Kuhlmann T, Stadelmann C. Remyelination in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2003; 206:181-185
24. Murray PD, McGavern DB, Sathornsumetee S, Rodriguez M. Spontaneous remyelination following extensive demyelination is associated with improved neurological function in a viral model of multiple sclerosis. *Brain* 2001; 124:1403-1416
25. Ruffini F, Kennedy TE, Antel JP. Inflammation and remyelination in the central nervous system: a tale of two systems. *Am J Pathol* 2004; 164(5):1519-22
26. Yiu G, Zhigang H. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7:617-627
27. Recknor, J.B. and S.K. Mallapragada, Nerve Regeneration: Tissue Engineering Strategies, in *The Biomedical Engineering Handbook: Tissue Engineering and Artificial Organs*, J.D. Bronzino, Editor. 2006, Taylor & Francis: New York
28. Zhang HQ, Uchimura K, Kadomatsu K. Brain keratan sulfate and glial scar formation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; 1086: 81-90
29. Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, Sivasankaran R, Wang K, Nikulina E, Kimura N, Cai H, Deng K, Gao Y, He Z, Filbin M. Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron.* 2002; 35(2):283-90
30. Wang KC, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Guo Y, Neve RL, He Z. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 2002; 417(6892):941-4

31. Tang S, Qiu J, Nikulina E, Filbin MT. Soluble myelin-associated glycoprotein released from damaged white matter inhibits axonal regeneration. *Mol Cell Neurosci* 2001; 18(3):259-69
32. Martini R. Myelin-associated glycoprotein is not detectable in perikaryal myelin of spiral ganglion neurons of adult mice. *Glia* 1994; 10(4):311-4
33. Hunt D, Coffin RS, Anderson PN. The Nogo receptor, its ligands and axonal regeneration in the spinal cord; a review. *J Neurocytol.* 2002; 31(2):93-120
34. Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 2000; 403(6768):434-9
35. GrandPré T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 2000; 403(6768):439-44
36. Prinjha R, Moore SE, Vinson M, Blake S, Morrow R, Christie G, Michalovich D, Simmons DL, Walsh FS. Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature* 2000; 403(6768):383-4
37. Caroni P. & Schwab ME. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1988; 1:85-96
38. Oertle T, Huber C, van der Putten H, Schwab ME. Genomic structure and functional characterisation of the promoters of human and mouse nogo/rtn4. *J Mol Biol* 2003; 325(2):299-323
39. Zhou ZM, Sha JH, Li JM, Lin M, Zhu H, Zhou YD, Wang LR, Zhu H, Wang YQ, Zhou KY. Expression of a novel reticulon-like gene in human testis. *Reproduction.* 2002; 123(2):227-34
40. Huber AB, Weinmann O, Brösamle C, Oertle T, Schwab ME. Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *J Neurosci* 2002; 22(9):3553-67
41. Josephson A, Widenfalk J, Widmer HW, Olson L, Spenger C. NOGO mRNA expression in adult and fetal human and rat nervous tissue and in weight drop injury. *Exp Neurol* 2001; 169(2):319-28
42. Hasegawa T, Ohno K, Sano M, Omura T, Omura K, Nagano A, Sato K. The differential expression patterns of messenger RNAs encoding Nogo-A and Nogo-receptor in the rat central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 2005; 133(1):119-30
43. Wang X, Chun SJ, Treloar H, Vartanian T, Greer CA, Strittmatter SM. Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact. *J Neurosci* 2002; 22(13):5505-15
44. Hunt D, Coffin RS, Prinjha RK, Campbell G, Anderson PN. Nogo-A expression in the intact and injured nervous system. *Mol Cell Neurosci* 2003; 24(4):1083-102
45. Ng CE, Tang BL. Nogos and the Nogo-66 receptor: factors inhibiting CNS neuron regeneration. *J Neurosci Res* 2002; 67(5):559-65

46. Bullard TA, Protack TL, Aguilar F, Bagwe S, Massey HT, Blaxall BC. Identification of Nogo as a novel indicator of heart failure. *Physiol Genomics* 2008; 32(2):182-9
47. Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 2001; 409(18):341-6
48. He XL, Bazan JF, McDermott G, Park JB, Wang K, Tessier-Lavigne M, et al. Structure of the Nogo receptor ectodomain: a recognition module implicated in myelin inhibition. *Neuron* 2003; 38:177-85
49. Barton WA, Liu BP, Tzvetkova D, Jeffrey PD, Fournier AE, Sah D, et al. Structure and axon outgrowth inhibitor binding of the Nogo-66 receptor and related proteins. *EMBO J* 2003; 22:3291-302
50. Sandvig A, Berry M, Barrett LB, Butt A, Logan A. Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signalling, and correlation with axon regeneration. *Glia* 2004; 46:225-51
51. Niederost B, Oertle T, Fritsche J, McKinney RA, Bandtlow CE. Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *J Neurosci* 2002; 22:10368-76
52. Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, Segal R, He Z. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 2002; 420(6911):74-8
53. Wong ST, Henley JR, Kanning KC, Huang KH, Bothwell M, Poo MM. A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci* 2002; 5(12):1302-8
54. Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, et al. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci* 2004; 7(3):221-8
55. Liu BP, Fournier A, GrandPre T, Strittmatter SM. Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science* 2002; 297:1190-3
56. Woolf CJ, Bloechlinger S. It takes more than two to Nogo. *Science* 2002; 297(5584):1132-4
57. Fontoura P, Steinman L. Nogo in multiple sclerosis: growing roles of a growth inhibitor. *J Neurol Sci* 2006; 245(1-2):201-10
58. Satoh J, Onoue H, Arima K, Yamamura T. Nogo-A and nogo receptor expression in demyelinating lesions of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005; 64(2):129-38
59. Karnezis T, Mandemakers W, McQualter JL, Zheng B, Ho PP, Jordan KA, Murray BM, Barres B, Tessier-Lavigne M, Bernard CC. The neurite outgrowth inhibitor Nogo A is involved in autoimmune-mediated demyelination. *Nat Neurosci* 2004; 7(7):736-44
60. Fontoura P, Ho PP, DeVoss J, Zheng B, Lee BJ, Kidd BA, Garren H, Sobel RA, Robinson WH, Tessier-Lavigne M, Steinman L. Immunity to the extracellular domain of Nogo-A modulates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2004; 173(11):6981-92

61. Kuhlmann T, Remington L, Maruschak B, Owens T, Brück W. Nogo-A is a reliable oligodendroglial marker in adult human and mouse CNS and in demyelinated lesions. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007; 66(3):238-46
62. Trapp BD, Ransohoff R, Rudick R. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr Opin Neurol* 1999; 12(3):295-302
63. Onuki M, Ayers MM, Bernard CC, Orian JM. Axonal degeneration is an early pathological feature in autoimmune-mediated demyelination in mice. *Microsc Res Tech* 2001; 52(6):731-9
64. Schwab ME, Caroni P. Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J Neurosci* 1988; 8(7):2381-93
65. Liu H, Ng CE, Tang BL. Nogo-A expression in mouse central nervous system neurons. *Neurosci Lett* 2002; 328(3):257-60
66. Al Halabiah H, Delezoide AL, Cardona A, Moalic JM, Simonneau M. Expression pattern of NOGO and NgR genes during human development. *Gene Expr Patterns* 2005; 5(4):561-8
67. Gall JG, Pardue ML: Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969; 63:378-383
68. Pardue ML, Dawid IB. Chromosomal locations of two DNA segments that flank ribosomal insertion-like sequences in *Drosophila*: flanking sequences are mobile elements. *Chromosoma* 1981; 83(1):29-43
69. Haase AT, Ventura P, Gibbs CJ Jr, Tourtellotte WW. Measles virus nucleotide sequences: detection by hybridization in situ. *Science* 1981; 212(4495):672-5
70. Feldman, RS, Meyer, JS, Quenzer, LF. Principles of Neuropsychopharmacology. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc 1997 Pages 31-35.
71. Lewis ME, Robbins E, Grega D, Baldino F. Nonradioactive detection of vasopressin and somatostatin mRNA with digoxigenin-labeled oligonucleotide probes. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 579:246-53
72. Klimpfinger M, Zisser G, Ruhri C, Pütz B, Steindorfer P, Höfler H. Expression of c-myc and c-fos mRNA in colorectal carcinoma in man. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1990; 59(3):165-71
73. Panoskaltis-Mortari A, Bucy RP: In situ hybridization with digoxigenin-labeled RNA probes. Facts and artifacts. *Biotechniques* 1995; 18:300-307
74. Cox KH, DeLeon DV, Angerer LM, Angerer RC. Detection of mrnas in sea urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probes. *Dev Biol*. 1984; 101(2):485-502
75. Lopez-Sanchez C, Garcia-Martinez V, Lawson A, Chapman SC, Schoenwolf GC. Rapid triple-labeling method combining in situ hybridization and double immunocytochemistry. *Dev Dyn* 2004; 230(2):309-15
76. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques* 1999; 26:112-115

77. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001; 25:402-408
78. Paxinos G, Franklin KB. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Compact Second Ed. 2004 Elsevier Science (USA)
79. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(9):e36
80. Niederöst B, Oertle T, Fritsche J, McKinney RA, Bandtlow CE. Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *J Neurosci* 2002; 22(23):10368-76
81. Kim JE, Li S, GrandPré T, Qiu D, Strittmatter SM. Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B. *Neuron* 2003; 38(2):187-99
82. Simonen M, Pedersen V, Weinmann O, Schnell L, Buss A, Ledermann B, Christ F, Sansig G, van der Putten H, Schwab ME. Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury. *Neuron* 2003; 38(2):201-11
83. Dimou L, Schnell L, Montani L, Duncan C, Simonen M, Schneider R, Liebscher T, Gullo M, Schwab ME. Nogo-A-deficient mice reveal strain-dependent differences in axonal regeneration. *J Neurosci* 2006; 26(21):5591-603
84. Zheng B, Ho C, Li S, Keirstead H, Steward O, Tessier-Lavigne M. Lack of enhanced spinal regeneration in Nogo-deficient mice. *Neuron* 2003; 38(2):213-4
85. Merkler D, Metz GA, Raineteau O, Dietz V, Schwab ME, Fouad K. Locomotor recovery in spinal cord-injured rats treated with an antibody neutralizing the myelin-associated neurite growth inhibitor Nogo-A. *J Neurosci* 2001; 21(10):3665-73
86. Morell P, Barrett CV, Mason JL, Toews AD, Hostettler JD, Knapp GW, Matsushima GK. Gene expression in brain during cuprizone-induced demyelination and remyelination. *Mol Cell Neurosci* 1998; 12(4-5):220-7
87. Jurevics H, Largent C, Hostettler J, Sammond DW, Matsushima GK, Kleindienst A, Toews AD, Morell P. Alterations in metabolism and gene expression in brain regions during cuprizone-induced demyelination and remyelination. *J Neurochem* 2002; 82(1):126-36
88. Pool M, Niino M, Rambaldi I, Robson K, Bar-Or A, Fournier AE. Myelin regulates immune cell adhesion and motility. *Exp Neurol* 2009; 217(2):371-7