



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ Β ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ  
ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΩΝ (EDNRB) ΣΕ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΑ  
ΕΜΒΡΥΑ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

ΝΙΚΗ ΑΡΓΥΡΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2005



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ Β ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ  
ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΩΝ (ΕΔΝΡΒ) ΣΕ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΑ  
ΕΜΒΡΥΑ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

ΝΙΚΗ ΑΡΓΥΡΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2005



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

Αριθ. Εισ.: 4356/1

Ημερ. Εισ.: 07-03-2005

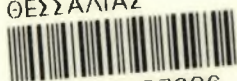
Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2005

ΑΡΓ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087986

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε  
στο Εργαστήριο Μοριακής Νευροβιολογίας  
του National Institute for Medical Research, στο Λονδίνο  
υπό την επίβλεψη του Dr. Vassilis Pachnis.

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή αποτελείται από τους:

Βασίλης Πάχνης, Επικεφαλής του τομέα Μοριακής Νευροβιολογίας (Head of division), National Institute for Medical Research

Αιμιλία Ζίφα, Λέκτορας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Κων/νος Μαθιόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>5</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΕΣ .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΩΝ .....</b>	<b>10</b>
1.2.1 EDNRB ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ.....	11
<b>1.3 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΩΝ .....</b>	<b>12</b>
<b>1.4 ΡΟΛΟΣ ET-3/EDNRB ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ .....</b>	<b>13</b>
1.4.1 ΚΥΤΤΑΡΑ ΝΕΥΡΙΚΗΣ ΑΚΡΟΛΟΦΙΑΣ .....	13
1.4.2 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ-3 ΚΑΙ ΤΟΥ EDNRB ΣΤΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ .....	15
<b>1.5 EDNRB ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.....</b>	<b>16</b>
1.5.1 ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ .....	16
1.5.2 ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ EDNRB ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ .....	19
<b>1.6 EDNRB ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΛΑΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .....</b>	<b>21</b>
1.6.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΛΑΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	21
1.6.2 ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ EDNRB ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΛΑΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	22
<b>1.7 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....</b>	<b>23</b>
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ .....</b>	<b>26</b>
<b>2.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>27</b>
2.2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΑΠΟ ΙΣΤΟΥΣ .....	27
2.2.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ .....	28
<b>2.3 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>31</b>
2.3.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ .....	31
2.3.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΧΡΩΣΗΣ ΜΕ Χ-GAL .....	31
2.3.3 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΜΒΡΥΩΝ ΓΙΑ ΤΟΜΕΣ ΣΕ ΚΡΥΟΤΟΜΟ .....	31
2.3.4 ΤΟΜΕΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ EDNRB.....	32
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ ΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΙΩΝ.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2 ΧΡΩΣΗ ΜΕ Χ-GAL ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ.....</b>	<b>36</b>
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>47</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>51</b>

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο υποδοχέας B των ενδοθηλινών (EDNRB) είναι ένας υποδοχέας επτά διαμεμβρανικών περιοχών που συνδέεται με G-πρωτεΐνες και παρουσιάζει την ίδια συγγένεια και για τα τρία μόρια προσδετών του (ET-1, ET-2, ET-3). Οι ενδοθηλίνες είναι πεπτίδια 21 αμινοξέων, με ποικίλες δράσεις στη φυσιολογία των λείων μυών. Πρόσφατες γενετικές μελέτες αποκάλυψαν τη λειτουργία αυτού του συστήματος στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας. Πιο συγκεκριμένα, η δέσμευση της ET-3 στον EDNRB διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη δύο κυρίως κυτταρικών τύπων που προέρχονται από τα αρχέγονα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας: των κυττάρων του εντερικού νευρικού συστήματος και των μελανοκυττάρων. Για παράδειγμα, αρνητικές μεταλλάξεις στα γονίδια *Et-3* (*ls*) και *Ednrb* (*s'*) στα ποντίκια προκαλούν έλλειψη νευρικών εντερικών γαγγλίων στο κόλον και έλλειψη χρωστικής στο μεγαλύτερο μέρος του δέρματος. Η ιατρική σημασία αυτού του φαινότυπου τονίζεται από το γεγονός ότι παρόμοια προβλήματα συναντώνται σε μια σχετικά συχνή εκ γενετής ασθένεια (1: 5000), που ονομάζεται ασθένεια του Hirschsprung και χαρακτηρίζεται από απώλεια εντερικών νευρώνων στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της έκφρασης του EDNRB υποδοχέα σε έμβρυα ποντικού ηλικίας E10.5-E13.5 ημερών. Τα αναπτυξιακά αυτά στάδια αντιστοιχούν στις ηλικίες όπου, σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, πραγματοποιείται η μετανάστευση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας προς τον εντερικό σωλήνα και την επιδερμίδα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια, στα οποία εισήχθη το LacZ γονίδιο αναφοράς (μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού) στο γενετικό τόπο του *Ednrb*. Στη συνέχεια, με χρήση ιστοχημικών τεχνικών προσδιορίστηκαν οι κυτταρικοί τύποι που εκφράζουν τον υποδοχέα EDNRB στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Παρατηρήθηκε έντονη έκφραση του υποδοχέα EDNRB από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας που μεταναστεύουν προς τον εντερικό σωλήνα και την επιδερμίδα, σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν. Ωστόσο, μια πιο λεπτομερής μελέτη της έκφρασης του *Ednrb* γονιδίου στο έμβρυο ποντικού θα παρέχει χρήσιμες πληροφορίες και θα βοηθήσει στην κατανόηση της λειτουργίας του EDNRB/ET-3 μονοπατιού στη γενικότερη αναπτυξιακή πορεία του οργανισμού.



## **ABSTRACT**

Endothelin receptor B (EDNRB) is a seven transmembrane G protein-coupled receptor for the 21 amino acid peptide endothelin-3 (ET-3). Endothelin signaling has a wide range of effects on the physiology of smooth muscle but recent genetic studies have revealed a function of this signaling pathway in the development of several neural crest derivatives, like enteric neurons and melanocytes. For example, null mutations in *Ednrb* and *Et-3*, result in defects in the formation of the enteric nervous system and in coat color spotting. The medical significance of this phenotype is highlighted by the fact that similar defects are encountered in a rather common congenital disorder (1: 5000), called Hirschsprung's disease, which is characterized by absence of enteric neurons from the distal part of the gut.

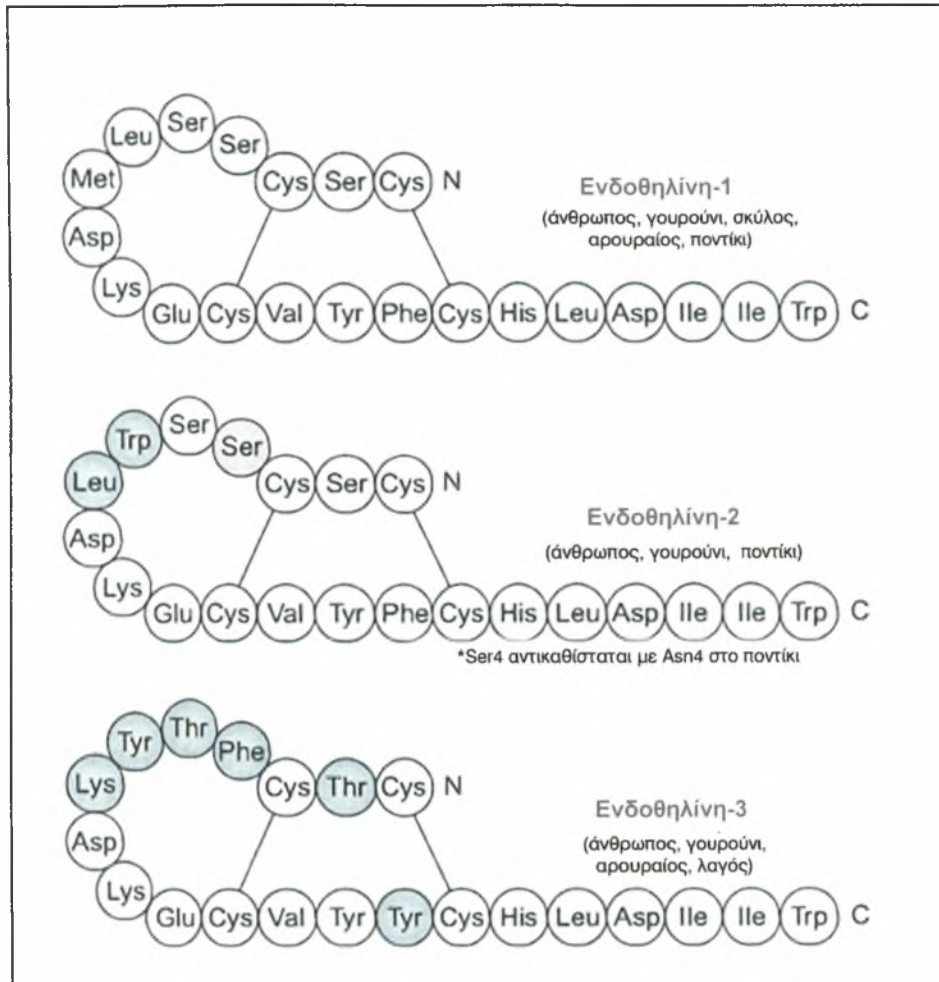
In the present work, we examined the expression pattern of the EDNRB receptor throughout the mouse embryo at various stages of development (E10.5-E13.5). For this purpose, we used a reporter mouse strain in which *Ednrb* locus has been targeted by homologous recombination and expresses the bacterial LacZ gene under the control of *Ednrb* promoter. Thus, by using  $\beta$ -galactosidase histochemistry, it can be identified which cell types express EDNRB receptor. We observed intense EDNRB expression by neural crest cells that migrate to the intestinal tube and the epidermis, in all the developmental stages that were studied. A detailed description of the pattern of distribution of EDNRB in the mouse embryo will provide valuable information for the potential sites of activity of ET-3 and will reveal the cellular types, which are controlled by this signaling molecule, and the role of this signaling system to the developmental pattern.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΕΣ

Το 1985, ο Hickey και οι συνεργάτες του, δημοσίευσαν μια αναφορά όπου περιέγραφαν έναν αγγειοσυσταλτικό παράγοντα, προερχόμενο από ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων (endothelium derived contractile factor). Τρία χρόνια αργότερα, η ουσία αυτή απομονώθηκε από καλλιέργεια ενδοθηλιακών αρτηριακών κυττάρων χοίρου, καθαρίστηκε και ονομάστηκε ενδοθηλίνη-1 (Yanagisawa *et al*, 1988). Η ανακάλυψη της ενδοθηλίνης κέντρισε το παγκόσμιο ενδιαφέρον λόγω της ισχυρής και παρατεταμένης αγγειοσυσταλτικής της δράσης. Πρόκειται για ένα πεπτιδίο που αποτελείται από 21 αμινοξέα, με δυο δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των καταλοίπων 1 με 15 και 3 με 11 (Εικόνα 1). Η μελέτη της αλληλουχίας του cDNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αυτή, αποκάλυψε ότι η ενδοθηλίνη παράγεται από ένα αρχικό πρόδρομο μόριο 203 αμινοξέων, την προπροενδοθηλίνη, από το αμινοτελικό άκρο της οποίας απομακρύνονται 164 αμινοξέα με τη δράση μιας ειδικής ενδοπεπτιδάσης, καταλήγοντας στην επονομαζόμενη μεγάλη-ενδοθηλίνη (39 αμινοξέα). Κατόπιν, η μεγάλη-ενδοθηλίνη, που αποτελεί ένα βιολογικώς ανενεργό ενδιάμεσο, μετατρέπεται στην ενεργή ενδοθηλίνη με τη δράση του μετατρεπτικού ενζύμου της ενδοθηλίνης, ECE (Endothelin Converting Enzyme) (Shimada *et al*, 1994). Στον άνθρωπο, το γονίδιο που κωδικοποιεί το πεπτιδίο της προπροενδοθηλίνης (212 αμινοξέα), εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6 και αποτελείται από 5 εξόνια και 4 ιντρόνια (Bloch *et al*, 1989, Inoue *et al*, 1989).

Το 1989, ένα χρόνο μετά την ανακάλυψη της ενδοθηλίνης-1, η ανάλυση του υπεύθυνου γονιδίου σε συνδυασμό με γενωμικές αναλύσεις αποκάλυψε την ύπαρξη ακόμη δύο γονιδίων που παρήγαγαν πεπτιδία με παρόμοια αμινοξική ακολουθία. Για το λόγο αυτό, οι τρεις πλέον ενδογενείς ισομορφές του μορίου χαρακτηρίστηκαν ως ενδοθηλίνη-1, ενδοθηλίνη-2 και ενδοθηλίνη-3 (ET-1, ET-2, ET-3) (Inoue *et al*, 1989) (Εικόνα 1). Καθένα από τα τρία αυτά πεπτιδία αποτελείται από 21 κατάλοιπα αμινοξέων και εκφράζεται σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων και ιστών.



**Εικόνα 1:** Δομή των τριών ισομορφών των ενδοθηλινών. Με γαλάζιο χρώμα υποδεικνύονται τα κατάλοιπα που διαφοροποιούνται από εκείνα της ενδοθηλίνης-1 (Masaki, 2004)

## 1.2 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΩΝ

Η δράση των ενδοθηλινών μεσολαβείται από μεμβρανικούς υποδοχείς επτά διαμεμβρανικών α-ελίκων που συνδέονται με τριμερείς G-πρωτεΐνες (GPCR, G-protein coupled receptors). Περί τα 1990, χαρακτηρίστηκαν και κλωνοποιήθηκαν δύο ειδών υποδοχείς, ο υποδοχέας A της ενδοθηλίνης (EDNRA Endothelin Receptor A) και ο υποδοχέας B της ενδοθηλίνης (EDNRB Endothelin Receptor B) (Arai et al, 1990, Sakurai et al, 1990). Και οι δυο υποδοχείς βρίσκονται σε πληθώρα ιστών, κυττάρων και οργάνων (καρδιά, νεφροί, πνεύμονες, επινεφρίδια, κεντρικό νευρικό) αλλά παρουσιάζουν

διαφορετικά επίπεδα έκφρασης, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη ενός πολυλειτουργικού συστήματος ενδοθηλινών. Ο EDNRA υποδοχέας προσδένει με μεγαλύτερη συγγένεια τις ET-1 και ET-2 σε σχέση με την ET-3 ( $ET-1 \geq ET-2 \gg ET-3$ ) και συναντάται συνήθως στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα, ενώ ο EDNRB υποδοχέας προσδένει και τις τρεις ισομορφές με σχεδόν την ίδια υψηλή συγγένεια. Συνεπώς, η ET-3 είναι ένας εκλεκτικός αγωνιστής του EDNRB υποδοχέα.

Το ενδιαφέρον για τους υποδοχείς των ενδοθηλινών, λόγω της εμπλοκής τους σε καρδιαγγειακές ασθένειες, οδήγησε στην φαρμακολογική τους μελέτη, η οποία αποκάλυψε, με τη χρήση συνθετικών ανταγωνιστών, την ύπαρξη υποτύπων του EDNRA υποδοχέα (EDNRA1, EDNRA2). Ένας τρίτος τύπος υποδοχέα ενδοθηλινών ανακαλύφθηκε σε ωοκύτταρα *Xenopus*, που προσδένει με μεγάλη συγγένεια την ET-3 σε σχέση με τις δυο άλλες ενδοθηλίνες, και ονομάστηκε υποδοχέας ενδοθηλίνης C (EDNRC) (Karne *et al*, 1993).

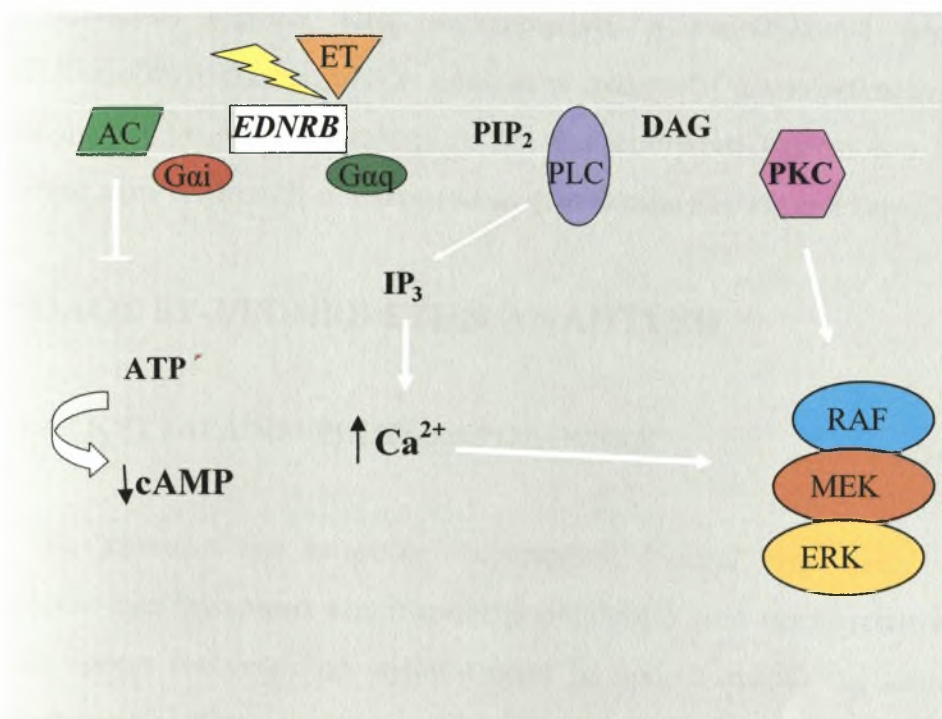
### 1.2.1 EDNRB ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ

Όπως προαναφέρθηκε, ο υποδοχέας B των ενδοθηλινών, συνδέεται με ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες και παρουσιάζει την ίδια συγγένεια για τους τρεις διαφορετικούς τύπους προσδετών του (ET-1, ET-2, ET-3) (Εικόνα 2). Ο EDNRB υποδοχέας ενεργοποιεί διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια, ανάλογα με την υποοικογένεια G-πρωτεΐνης με την οποία συνδέεται. Έτσι, μέσω της  $G_{\alpha i}$  αναστέλλει τη δράση της αδενυλοκυκλάσης, μειώνοντας τα επίπεδα του cAMP και μέσω της  $G_{\alpha q}$  πρωτεΐνης ενεργοποιεί τη μεμβρανική φωσφολιπάση Cβ (PLCβ). Η PLCβ, εν



**Εικόνα 2:** Πρόβλεψη δομής του EDNRB (GPCR) υποδοχέα με χρήση του προγράμματος Rasmol.

συνεχία, διασπά την φωσφατιδυλ-διφωσφορική ινοσιτόλη (PIP<sub>2</sub>) σε διακυλογλυκερόλη (DAG) και τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP<sub>3</sub>). Η τελευταία προκαλεί αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca<sup>2+</sup>, το οποίο ακολούθως προκαλεί μετακίνηση της πρωτεϊνικής κινάσης C στη μεμβράνη (που ενεργοποιείται από τη DAG) και ενεργοποίηση του MAPK/ERK μονοπατιού (*Sasaki et al, 1998, Cramer et al, 2001, Heuckeroth, 2003*) (Εικόνα 3). Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός, μέσω του οποίου δρα αυτό το μονοπάτι, δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί.



**Εικόνα 3:** Διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τις ενδοθηλίνες μετά τη σύνδεσή τους στον υποδοχέα EDNRB.

### 1.3 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΩΝ

Οι ενδοθηλίνες και οι υποδοχείς τους έγιναν αρχικώς γνωστοί λόγω της ανάμειξής τους στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης. Μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα EDNRB προκαλούν συστολή στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων του αίματος, ενώ μέσω του EDNRB προκαλούν διαστολή στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Οι ενδοθηλίνες, όμως, εμπλέκονται και σε

πληθώρα άλλων φυσιολογικών και κυτταρικών αποκρίσεων, όπως πολλαπλασιασμός και υπερτροφία των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων και των καρδιακών μυοκυττάρων, βρογχοσυστολή, αναστολή της απελευθέρωσης ρενίνης, επαγωγή της έκκρισης αλδοστερόνης από τα κύτταρα του φλοιού των επινεφριδίων, ρύθμιση της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών και πολλαπλασιασμό των αστροκυττάρων (Για Review βλ Davenport 2002, Goraca 2002, Masaki 2004). Βρέθηκε επίσης ότι οι ενδοθηλίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας (neural crest cells) στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Πιο συγκεκριμένα, η ενδοθηλίνη-1 μέσω του EDNRA υποδοχέα διαδραματίζει ρόλο στην ανάπτυξη των κεφαλικών κυρίως κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας και η ενδοθηλίνη-3 μέσω του EDNRB υποδοχέα στην ανάπτυξη των σωματικών (Για Review βλ Pla and Larue, 2003).

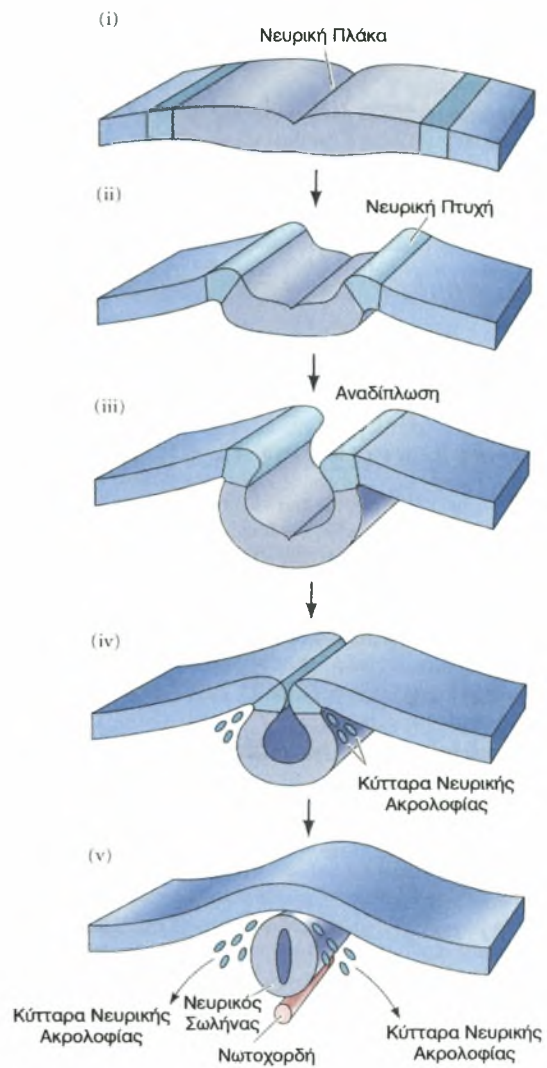
## **1.4 ΡΟΛΟΣ ET-3/EDNRB ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ**

### **1.4.1 ΚΥΤΤΑΡΑ ΝΕΥΡΙΚΗΣ ΑΚΡΟΛΟΦΙΑΣ**

Τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας (neural crest cells, NCCs) αποτελούν ένα ξεχωριστό και παροδικό πληθυσμό που προέρχεται από το ραχιαίο τμήμα του νευρικού σωλήνα κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης στα θηλαστικά. Έχουν την ικανότητα να μεταναστεύουν κατά μήκος προκαθορισμένων μονοπατιών σε μεγάλη απόσταση από τη θέση σχηματισμού τους και να δώσουν γένεση σε μια πολύ μεγάλη ποικιλία κυτταρικών τύπων. Από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας θα προκύψουν νευρώνες και κύτταρα γλοίας του συμπαθητικού και παρασυμπαθητικού νευρικού συστήματος, μελανοκύτταρα (χρωστικά κύτταρα), κύτταρα του μυελού του αδένα των επινεφριδίων και κύτταρα του σκελετικού και συνδετικού ιστού. Τα NC κύτταρα παράγονται κατά τη νευριδιοποίηση στο ύψος των νευρικών πτυχών που σχηματίζονται κατά την ανύψωση των

άκρων της νευρικής πλάκας, όταν αυτή σχηματίσει το νευρικό σωλήνα (Εικόνα 4) (Bronner-Fraser, 1993).

Τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας μπορούν να ταξινομηθούν σύμφωνα με τη θέση τους κατά μήκος του πρόσθιου-οπίσθιου άξονα και σύμφωνα με τα κύτταρα στα οποία θα δώσουν γένεση. Έτσι, κύτταρα που παράγονται στο πρόσθιο τμήμα του νευρικού σωλήνα του εμβρύου, πάνω από τους σωμίτες, και μετακινούνται προς το κranίο, λέγονται κεφαλικά ή κρανιακά κύτταρα (cephalic or cranial neural crest cells). Τα κύτταρα αυτά θα δώσουν γένεση σε μεσεγχευματικά κύτταρα και κύτταρα του συνδετικού και μυϊκού ιστού του προσώπου. Τα υπόλοιπα, που προέρχονται από τις οπίσθιες περιοχές, αποτελούν τα σωματικά NCCs (somitic). Τα τελευταία απαρτίζονται από τα κύτταρα της περιοχής του αυχένα (vagal, σωμίτες 1-7), τα κύτταρα της περιοχής του στελέχους (truncal, σωμίτες 8-27) και αυτά της περιοχής του ιερού (sacral, οπίσθια του σωμίτη 28). Τα αυχενικά και τα ιερά NCCs θα δώσουν παρασυμπαθητικά εντερικά γάγγλια και τα στελεχιαία NCCs θα δώσουν ανάλογα με το μεταναστευτικό μονοπάτι που θα ακολουθήσουν: συμπαθητικά γάγγλια, γάγγλια των οπίσθιων ή αισθητικών ριζών (dorsal root ganglia), κύτταρα του μυελού του αδένου των επινεφριδίων (ακολουθώντας το ραχιαίο-κοιλιακό μονοπάτι) και χρωστικά κύτταρα του δέρματος-



**Εικόνα 4:** Δημιουργία κυττάρων νευρικής ακρολοφίας (Gilbert, *Developmental Biology*, 7<sup>th</sup> edition)



μελανοκύτταρα (ακολουθώντας το ραχιαίο-πλευρικό μονοπάτι) (*Pla and Larue 2003*).

Μελέτες στα ποντίκια έδειξαν ότι ο EDNRB και η ET-3 είναι απαραίτητα στοιχεία για την ολοκληρωμένη ανάπτυξη δυο τύπων κυττάρων που προέρχονται από τα NCCs (neural crest - derivatives): των μελανοκυττάρων και των νευρικών κυττάρων που δημιουργούν το εντερικό νευρικό σύστημα (*Hosoda et al., 1994, Baynash et al., 1994, Puffenberg et al., 1994*).

#### **1.4.2 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ-3 ΚΑΙ ΤΟΥ EDNRB ΣΤΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ**

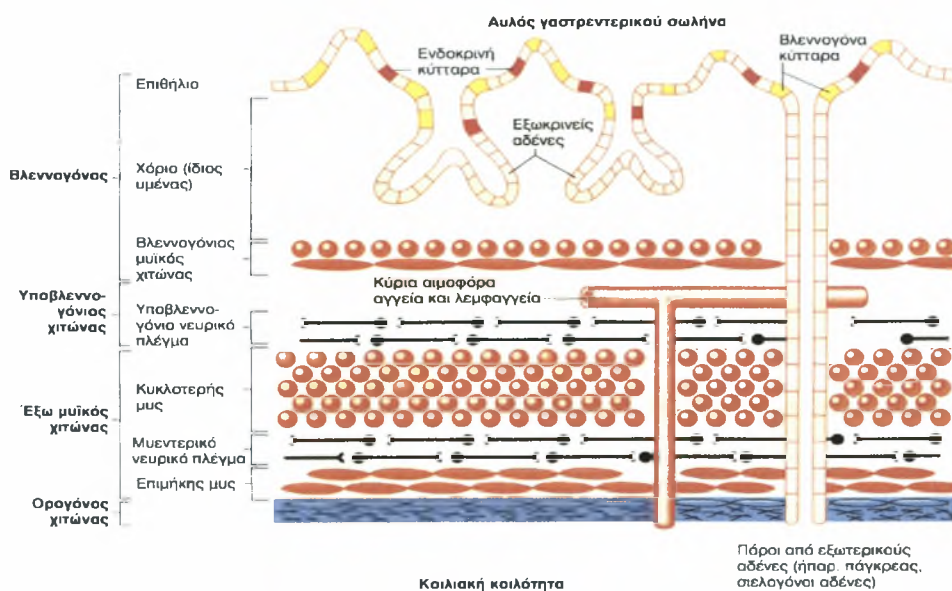
Μεταλλαγμένα αλληλόμορφα σε τρεις ξεχωριστούς γενετικούς τόπους, *piebald lethal (s<sup>l</sup>)*, *lethal spotted (ls)* και *Dominant megacolon (Dom)* στα ποντίκια προκαλούν έλλειψη νευρικών εντερικών γαγγλίων στο κόλον (colon aganglionosis) και έλλειψη χρωστικής στο μεγαλύτερο μέρος του δέρματος (coat color spotting).

Οι *ls* και *s<sup>l</sup>* μεταλλάξεις είναι αυθόρμητες και χαρτογραφούνται σε διαφορετικούς τόπους του γενώματος του ποντικού. Πρόσφατα, δείχθηκε ότι οι μεταλλάξεις αυτές είναι μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τον β υποδοχέα των ενδοθηλινών (EDNRB, *piebald lethal (s<sup>l</sup>)*) και τον προσδέτη του ενδοθηλίνης-3 (ET-3, *lethal spotted (ls)*) (*Hosoda et al., 1994, Baynash et al., 1994, Puffenberg et al., 1994*). Το *ls* αλληλόμορφο παρουσιάζει μια σημειακή μετάλλαξη που αποτρέπει τη μετατροπή της προ-προ-ενδοθηλίνης στην ενεργή της μορφή ET-3 και η μετάλλαξη στον *s<sup>l</sup>* τόπο αντιστοιχεί σε αφαίρεση του Ednrb γονιδίου. Πρόκειται για αυτοσωμικά υπολειπόμενα αλληλόμορφα που δεν παρουσιάζουν αναγνωρίσιμο φαινότυπο σε ετεροζυγωτία, ενώ οι ομοζυγώτες και των δυο τύπων παρουσιάζουν απώλεια γαγγλίων στο ακραίο τμήμα του παχέος εντέρου και απώλεια μελανοκυττάρων σε πολλές περιοχές του δέρματος.

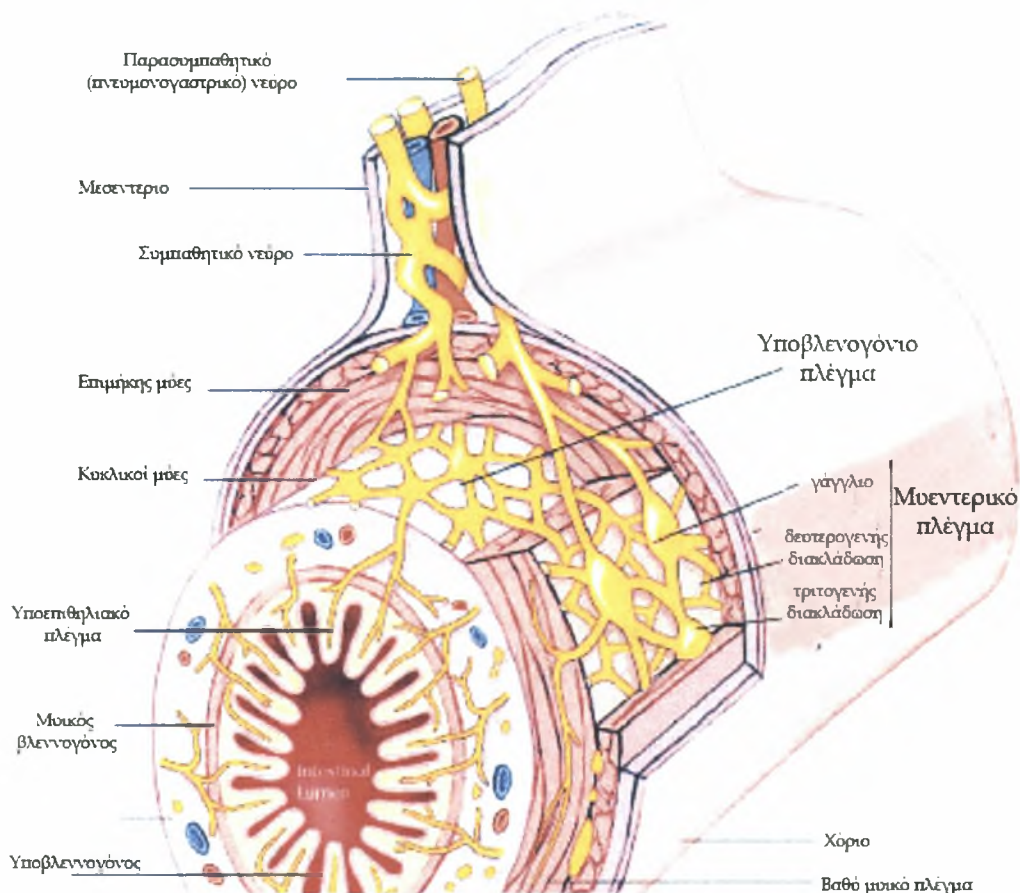
## 1.5 EDNRB ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

### 1.5.1 ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το εντερικό νευρικό σύστημα (ΕΝΣ), τμήμα του αυτόνομου νευρικού συστήματος, είναι ένα πολύπλοκο δίκτυο νευρικών και γλοιακών κυττάρων μέσα στο γαστρεντερικό τοίχωμα, υπό τη μορφή δύο πλεγμάτων, του μυεντερικού και του υποβλεννογόνιου. Τα πλέγματα αυτά λειτουργούν αντανακλαστικά και ελέγχουν την περισταση του εντερικού τοιχώματος (μυεντερικό), ρυθμίζοντας τη συσταλτικότητα των εσωτερικών λείων μυών και τη δραστηριότητα των εκκριτικών αδένων του γαστρεντερικού συστήματος (υποβλεννογόνο) (Gershon, 1994) (Εικόνα 5 και 6). Το εντερικό νευρικό σύστημα απαρτίζεται από τουλάχιστον 14 διαφορετικούς τύπους εντερικών νευρώνων, που έχουν τη δυνατότητα να παράγουν κάθε είδους νευροδιαβιβαστή που συναντάται στον εγκέφαλο. Οι νευρώνες του ΕΝΣ δεν περιβάλλονται από το στρώμα μυελίνης που δημιουργούν τα κύτταρα Schwann αλλά από εντερική γλοία. Όλοι οι εντερικοί νευρώνες και η γλοία είναι παράγωγα των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας (neural crest cells, NC).



**Εικόνα 5:** Δομή του γαστρεντερικού τοιχώματος σε επιμήκη διατομή. Το μυεντερικό πλέγμα εντοπίζεται μεταξύ των κυκλοτερών και επιμηκών μυών, ενώ το υποβλεννογόνιο νευρικό πλέγμα μεταξύ των κυκλοτερών μυών και του βλεννογόνιου μυϊκού χιτώνα (*Vander, Τσακόπουλος, Γελαδάς, Φυσιολογία του Ανθρώπου, Εκδόσεις Παοχαλίδης, 8η έκδοση*).

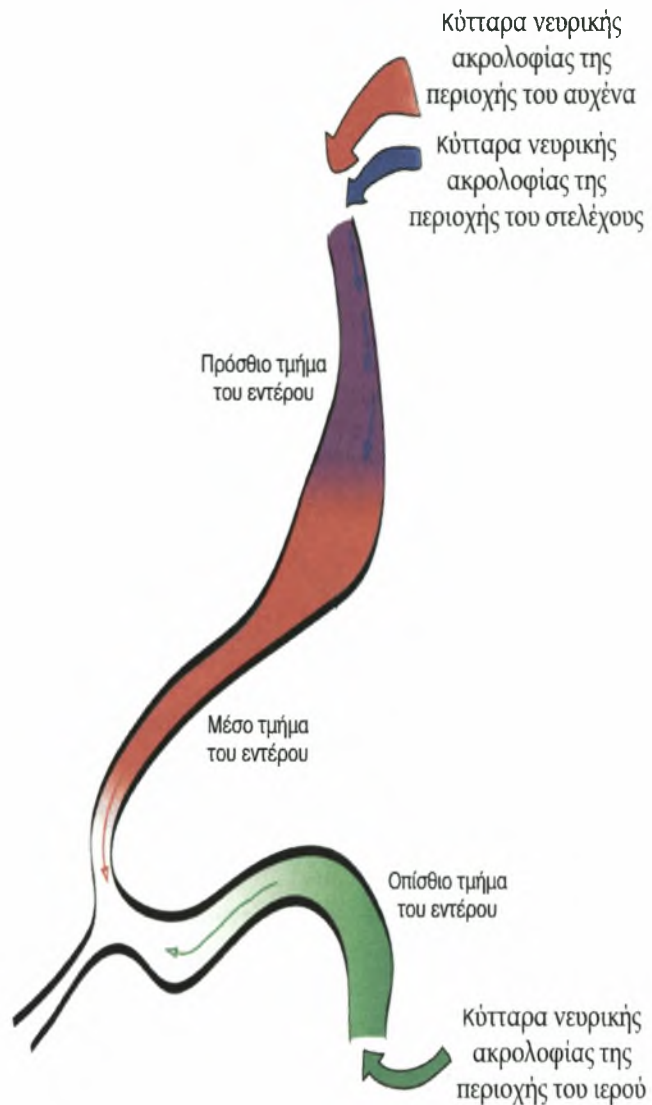


**Εικόνα 6:** Δομή του εντερικού τοιχώματος σε εγκάρσια διατομή. Διακρίνεται το εντερικό νευρικό σύστημα που αποτελείται από δύο νευρικά πλέγματα, το μυεντερικό και το υποβλεννογόνιο. Το μυεντερικό πλέγμα είναι υπεύθυνο για τη σύσπαση των λείων μυών του γαστρεντερικού τοιχώματος και το υποβλεννογόνιο για τη δραστηριότητα των εκκριντικών αδένων του γαστρεντερικού συστήματος (*Gershon, 1981*).

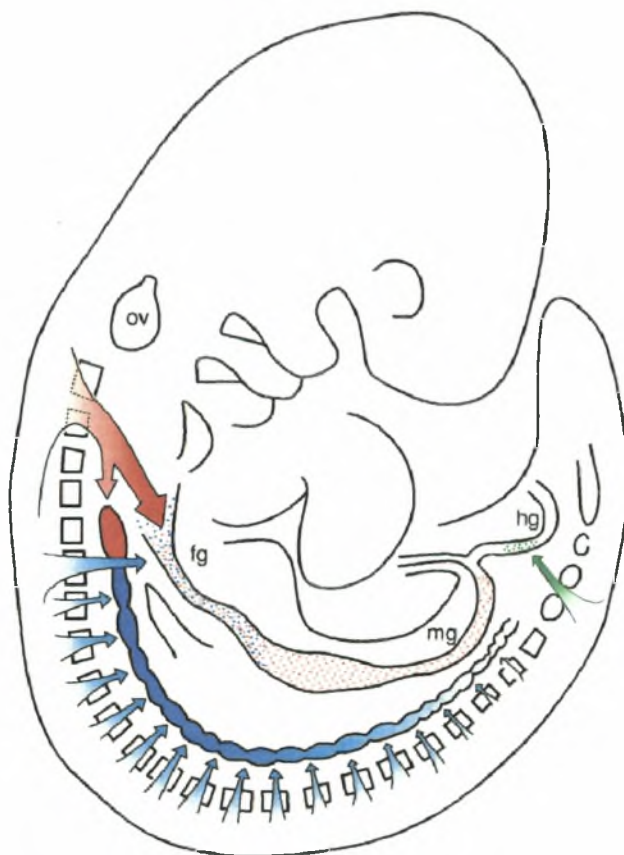
Το εντερικό νευρικό σύστημα των θηλαστικών προκύπτει από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας που προέρχονται από δύο κυρίως περιοχές του νευρικού σωλήνα, την αυχενική περιοχή (*vagal region*), που αντιστοιχεί στους σωματίτες 1 έως 7 και την περιοχή του ιερού (*sacral region*) που εκτείνεται οπίσθια του σωματίτη 28 (*Burns and Le Douarin, 1998, Le Douarin and Teillet,*

1973). Τα NC κύτταρα της περιοχής του αυχένα αποικίζουν ολόκληρο τον εντερικό σωλήνα του εμβρύου, με μια πρόσθια προς οπίσθια (rostral to caudal) κατεύθυνση, ενώ τα NC κύτταρα που προέρχονται από την ιερή περιοχή αποικίζουν το τμήμα του εντερικού σωλήνα, κάτω από τη θέση του ομφάλιου λώρου, μεταναστεύοντας με μια οπίσθια προς πρόσθια (caudal to rostral) κατεύθυνση. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας της ιερής περιοχής δεν εισέρχονται στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου (hindgut), προτού αυτό να έχει ήδη αποικηθεί από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας της αυχενικής περιοχής (Burns and Le Douarin, 1998, Kapur, 2000). Επιπλέον, μια ακόμη ομάδα NC κυττάρων της άνω στελεχιαίας περιοχής που αντιστοιχούν

στους σωμίτες 6 με 7, μεταναστεύουν προς το έντερο λίγο μετά την εμφάνιση των NC αυχενικών κυττάρων και φαίνεται να περιορίζονται κυρίως στο τμήμα του πρόσθιου εντερικού σωλήνα (οισοφάγος και στομάχι) (Durbec et al., 1996) (Εικόνα 7 και 8).



**Εικόνα 7:** Σχηματική αναπαράσταση της αποίκησης, στο σχηματιζόμενο εντερικό σύστημα, από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας. Τα κύτταρα της περιοχής του αυχένα (κόκκινο) μεταναστεύουν κοιλιακά για να αποικίσουν όλο το έντερο. Τα κύτταρα της περιοχής του στελέχους (μπλε) αποικίζουν το πρόσθιο έντερο και αυτά της περιοχής του ιερού (πράσινο) το οπίσθιο έντερο (Gariépy, 2001).



**Εικόνα 8:** Σχηματική αναπαράσταση της συνεισφοράς των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας της αυχενικής περιοχής (κόκκινο), της στελεχιαίας (μπλε) και της ιερής (πράσινο) στο σχηματισμό του εντερικού νευρικού συστήματος. hg: hindgut, οπίσθιο έντερο. mg: midgut, ενδιάμεσο έντερο. fg: foregut, πρόσθιο έντερο (Durbec et al, 1996).

### 1.5.2 ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ EDNRB ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Στα σπονδυλωτά, το γονίδιο για τον Β-υποδοχέα των ενδοθηλινών εκφράζεται αρχικά στο ραχιαίο τμήμα του νευρικού σωλήνα, στην περιοχή δηλαδή όπου παράγονται τα πολυδύναμα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας (NCCs), προτού αυτά ξεκινήσουν τη μετανάστευσή τους. *In vitro* πειράματα σε καλλιέργειες NC κυττάρων (στα πτηνά) έδειξαν ότι η προσθήκη ET-3 σε αυτό το στάδιο ανάπτυξης, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας, καθώς αυτά αποχωρίζονται από το νευρικό σωλήνα. Αν αναλογιστεί κανείς ότι τα κύτταρα της νευρικής

ακρολοφίας που θα δώσουν γένεση στο εντερικό νευρικό σύστημα και αυτά που θα διαφοροποιηθούν σε μελανοκύτταρα, πρέπει να μεταναστεύσουν σε μεγάλες αποστάσεις, η πολλαπλασιαστική δράση της ET-3 στα κύτταρα αυτά είναι πολύ σημαντική (*Nataf et al., 1996*).

Η δράση της ET-3 στα NC κύτταρα και στα κύτταρα που θα προέλθουν από αυτά, εξαρτάται από το στάδιο διαφοροποίησης αυτών των κυττάρων (*Taraviras and Pachnis, 1999*). Έτσι, η ενδοθηλίνη-3 έχει διαφορετική δράση στα αρχικά πολυδύναμα κύτταρα, όπου προκαλεί τον πολλαπλασιασμό τους, από ότι στα εντερικά NCCs, απομονωμένα από το έντερο εμβρύων σπονδυλωτών. Εντερικά NC κύτταρα ονομάζονται τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας μόλις εισέλθουν στο μεσέγχυμα του πρόσθιου εντέρου (foregut) κατά την εμβρυονική ημέρα E9-9.5, που μεταναστεύουν με μια πρόσθια προς οπίσθια κατεύθυνση για να αποικίσουν όλο το έντερο. Την E10.5 ημέρα έχουν φτάσει στο μέσο έντερο και έχουν αποικίσει ολόκληρο το λεπτό έντερο μέχρι το τυφλό την E11.5. Η αποίκηση του οπίσθιου εντέρου ολοκληρώνεται την E13.5-14.5 (*Durbec et al, 1996, Young et al, 1998, Natarajan et al, 2002*). Στην περίπτωση των εντερικών NCCs, η ενεργοποίηση του EDNRB φαίνεται να αναστέλλει τη διαφοροποίηση των εντερικών NC κυττάρων σε νευρώνες, διατηρώντας έτσι τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας σε ένα αδιαφοροποίητο στάδιο (*Wu et al, 1999*).

Επιπρόσθετα, η ET-3, πέρα από τη δράση της στα αρχικά πολυδύναμα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας και στα εντερικά NC κύτταρα (ENCCs), επηρεάζει και την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων του εντέρου (non crest cells), στα οποία επίσης εκφράζεται ο υποδοχέας EDNRB. Σε αντίθεση με την αναστολή της διαφοροποίησης των εντερικών NC κυττάρων, η ET-3 επάγει τη διαφοροποίηση των λείων μυών και ακολούθως αναστέλλει την έκκριση της λαμινίνης-1 από τα κύτταρα αυτά (*Wu et al, 1999*). Η δράση αυτή είναι επίσης πολύ σημαντική, καθώς η λαμινίνη-1, μέσω της αλληλεπίδρασης της α1 υπομονάδας της με έναν υποδοχέα, που εκφράζεται από κύτταρα προερχόμενα από τα NCCs, επάγει την ανάπτυξη των εντερικών νευρώνων (*Chalazonitis et al, 1997*).

Οι παρατηρήσεις αυτές, σχετικά με τα αποτελέσματα της δράσης της ET-3 στην ανάπτυξη των εντερικών νευρώνων και των λείων μυών, οδήγησαν στην υπόθεση ότι η ενδοθηλίνη-3 ρυθμίζει τη σωστή ανάπτυξη του εντερικού νευρικού συστήματος. Όταν υπάρχει έλλειψη ET-3-EDNRB, οι συνθήκες ευνοούν τη νευρική διαφοροποίηση, καθώς ένας αναστολέας λείπει (ET-3 ή EDNRB) και αντί αυτού ένας παράγοντας που επάγει τη διαφοροποίηση (λαμινίνη-1) είναι παρών. Το γεγονός ότι το τελευταίο τμήμα του εντέρου που πρέπει να αποικηθεί από τα εντερικά NCCs είναι το τελικό κόλον, κάνει σαφές ότι θα πρέπει να αποφευχθεί η διαφοροποίηση των NC κυττάρων σε νευρώνες, προτού τα πρώτα αποικίσουν όλο το έντερο. Κι αυτό γιατί ενώ τα NCCs έχουν τη δυνατότητα να μεταναστεύουν και να πολλαπλασιάζονται, οι τελικώς διαφοροποιούμενοι νευρώνες αδυνατούν. Έτσι, προτάθηκε, ότι ο *in vivo* ρόλος του ET-3/EDNRB συστήματος είναι να διατηρεί έναν επαρκή πληθυσμό διαιρούμενων εντερικών NC κυττάρων, ικανών να αποικίσουν όλο τον εντερικό σωλήνα, εμποδίζοντας την πρόωμη διαφοροποίησή τους σε νευρώνες. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της ET-3 (εκφράζεται από τα μεσεγχυματικά κύτταρα) εντοπίζονται στην περιοχή του τυφλού, λίγο πριν το κόλον.

Συμπερασματικά, η ενδοθηλίνη-3 αναστέλλει τη διαφοροποίηση των εντερικών NC κυττάρων με δύο τρόπους:

I. Έναν άμεσο, λόγω της δράσης της ET-3 στα μεταναστευτικά NC κύτταρα και

II. Έναν έμμεσο, λόγω της δράσης της ET-3 στα κύτταρα των λείων μυών και της συσχετιζόμενης μείωσης της λαμινίνης-1 (η λαμινίνη-1 επάγει τη διαφοροποίηση).

## **1.6 EDNRB ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΛΑΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ**

### **1.6.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΛΑΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας που δεν ακολουθούν το ραχιαιο-κοιλιακό μονοπάτι πολλαπλασιάζονται στην περιοχή MSA (migration staging area) για μερικές ώρες και εν συνεχεία ακολουθούν το ραχιαιο-πλευρικό μονοπάτι. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα των μελανοβλαστών (προγεννήτορες των μελανοκυττάρων) προκύπτουν από το ραχιαίο τμήμα του νευρικού σωλήνα κατά την εμβρυονική μέρα E9-9.5 και συγκεντρώνονται για 24 ώρες πλευρικά του νευρικού σωλήνα στην περιοχή MSA. Την E10-10.5, οι μελανοβλάστες αρχίζουν και μεταναστεύουν ραχαιοπλευρικά κατά μήκος του πρόσθιου οπίσθιου άξονα και την E11 ο μεγαλύτερος αριθμός αυτών των κυττάρων εντοπίζεται στην περιοχή του κεφαλιού και στην περιοχή του ιερού. Μετά τη μετανάστευσή τους, οι μελανοβλάστες εισβάλλουν στην επιδερμίδα μεταξύ των ημερών E12.5 και E13.5 όπου και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται εκτενώς. Τα κύτταρα αυτά θα ολοκληρώσουν τη διαφοροποίησή τους σε μελανοκύτταρα (χρωστικά κύτταρα του δέρματος) λίγο μετά τη γέννηση (*Shin et al, 1999*).

#### **1.6.2 ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ EDNRB ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΛΑΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Τόσο η ενδοθηλίνη-3 όσο και ο υποδοχέας της EDNRB είναι απαραίτητα μόρια για την ομαλή ανάπτυξη των μελανοκυττάρων προερχόμενων από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν *in vitro*, με καλλιέργειες πολυδύναμων NC κυττάρων ποντικών και πτηνών, έδειξαν ότι η ET-3 ευνοεί την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό αυτών, αυξάνοντας έτσι τον πληθυσμό τους (*Lahav et al., 1996, Reid et al., 1996*). Επίσης, όταν η συγκέντρωση της ET-3 μειώνεται (όπως στα *ls* ποντίκια) ή όταν δεν υπάρχει σωστή απόκριση στην ET-3 λόγω προβλήματος στον υποδοχέα (όπως στα *s<sup>l</sup>* ποντίκια), ο πληθυσμός των μελανοβλαστών μειώνεται σημαντικά με αποτέλεσμα να αποτυγχάνει η αποίκιση συγκεκριμένων περιοχών του δέρματος (δημιουργώντας έτσι το white spotted coat color).



Έρευνες στα ποντίκια, αποκάλυψαν ότι υπάρχει μια κρίσιμη περίοδος κατά την οποία είναι απαραίτητο το σηματοδοτικό μονοπάτι του EDNRB, που ξεκινάει την εμβρυονική ημέρα E10.5 και καταλήγει την E12.5. Η περίοδος αυτή αντιστοιχεί στη μετανάστευση των μελανοβλαστών στο ραχιαίο-πλευρικό μονοπάτι, πριν την είσοδό τους στην επιδερμίδα (*Shin et al., 1999*). Αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι *in vivo* η ενδοθηλίνη-3 είναι σημαντική για να αυξήσει τον αρχικό πληθυσμό των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας και να διασφαλίσει έναν αριθμό μελανοβλαστών ικανό να αποικίσει όλο το δέρμα.

Πειράματα στα πτηνά, έδειξαν ότι ο υποδοχέας EDNRB, που εκφράζεται ουσιαστικά από όλα τα προ-μεταναστευτικά και τα αρχικά μεταναστευτικά NCCs, 'απενεργοποιείται' από τα κύτταρα που ακολουθούν το πλευρικό μονοπάτι κάτω από το εξώδερμα και τα οποία ξεκινούν να εκφράζουν τον EDNRB2 τύπο (*Lecoin et al, 1998*). Φαίνεται επομένως ότι, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του δέρματος στα πτηνά, η ενδοθηλίνη-3 που συντίθεται από τα μεσεγχυματικά κύτταρα της επιδερμίδας, προκαλεί μέσω της ενεργοποίησης του EDNRB2, την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των μελανοβλαστών και τελικώς των μελανοκυττάρων. Στα ποντίκια, ωστόσο, που δεν έχει αναφερθεί ποτέ έκφραση του EDNRB2 γονιδίου, τα μεταναστευτικά κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας που είτε ακολουθούν το ραχιαίο-πλευρικό είτε το κοιλιακό μονοπάτι εκφράζουν τον υποδοχέα EDNRB.

Συμπερασματικά, δεδομένου ότι *in vivo* η ET-3 παράγεται από το εξώδερμα συνεπάγεται πως: α) η δέσμευση της ET-3 στον υποδοχέα EDNRB των μελανοβλαστών είναι υπεύθυνη για τον αρχικό πολλαπλασιασμό των πολυδύναμων NCCs και β) η έκθεση στην ενδοθηλίνη-3 καταλήγει σε δέσμευση αυτών των πολυδύναμων κυττάρων να διαφοροποιηθούν σε χρωστικά κύτταρα του δέρματος μέσω της έκφρασης του EDNRB2 στα πτηνά και του EDNRB στα θηλαστικά (*Pla and Larue. 2003*).

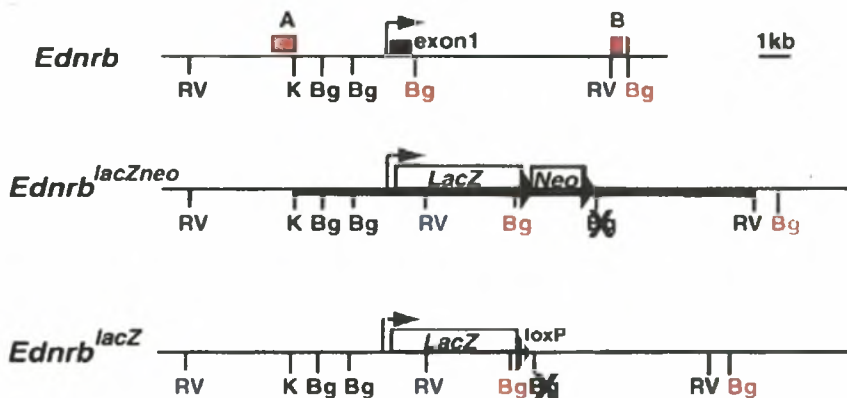
## 1.7 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της έκφρασης του EDNRB υποδοχέα σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια εμβρύων ποντικού. Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη πραγματοποιείται σε έμβρυα ηλικίας E10.5-E13.5 ημερών. Τα αναπτυξιακά αυτά στάδια αντιστοιχούν στις ηλικίες, που σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, πραγματοποιείται η μετανάστευση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας προς τον εντερικό σωλήνα και την επιδερμίδα. Η ιστολογική εντόπιση του προϊόντος του γονιδίου γίνεται με χρήση ετερόζυγων *EdnrblacZ +/-* ποντικών, στα οποία η εμφάνιση μπλε χρώματος σε διάφορα σημεία, λόγω της αντίδρασης του X-gal με τη β-γαλακτοσιδάση, υποδεικνυε την έκφραση του EDNRB.

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια στελέχους C57BL/6J, που εμφανίζουν μερική απώλεια δράσης του γονιδίου EDNRB. Τα πειραματόζωα αυτά κατασκευάστηκαν στο εργαστήριο του Dr. Shin στο τμήμα κυτταρικής και αναπτυξιακής βιολογίας του Fox Chase Center, στη Φιλαδέλφεια. Στα συγκεκριμένα ζώα εισήχθη το LacZ γονίδιο με ομόλογο ανασυνδυασμό. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε ένα πλασμίδιο που έφερε την 5' αμετάφραστη περιοχή του EDNRB γονιδίου αλλά όχι και την τριπλέτα έναρξης της μετάφρασης και το γονίδιο LacZ. Με τον ομόλογο ανασυνδυασμό το τμήμα που περιλαμβάνει τα γενετικά αυτά στοιχεία εισάγεται στο γενετικό τόπο του EDNRB γονιδίου αντικαθιστώντας την περιοχή του εξονίου 1 και 250 bp από το ιντρόνιο 1 (Lee et al, 2003) (Εικόνα 9).



**Εικόνα 9:** Στόχευση του γονιδίου EDNRB. Απαλοιφή τμήματος του γονιδίου με ομόλογο ανασυνδυασμό με το γονίδιο LacZ και άλλα γενετικά στοιχεία βοηθητικά για τον ομόλογο ανασυνδυασμό και την επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων (Lee et al, 2003).

Έτσι αφαιρείται η περιοχή του γονιδίου που κωδικοποιεί την εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα καθώς και τις δύο πρώτες διαμεμβρανικές περιοχές του (αμινοξέα 1-161). Το πλασμίδιο στόχευσης (targeting construct) περιέχει ακόμα το γονίδιο αντίστασης στη νεομυκίνη P<sub>gk</sub>-neo (ανάμεσα σε δυο αλληλουχίες loxP) για την επιλογή των κυττάρων στα οποία έγινε ο ανασυνδυασμός καθώς και, όπως προαναφέρθηκε, το

γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (LacZ) ως γονίδιο μάρτυρα των κυττάρων που εκφράζουν το EdnrB, και χρησιμοποιήθηκε για επιμόλυνση βλαστικών κυττάρων 14.1 ημερών (ES cells E14.1). Η κασέτα του γονιδίου επιλογής neo αφαιρέθηκε από τα EdnrB<sup>lacZneo</sup>/ + ποντίκια μέσω διασταύρωσης με EIIa-Cre ποντίκια, προς παραγωγή των EdnrB<sup>lacZ</sup> ζώων. Η διασταύρωση των ετερόζυγων ζώων που περιείχαν το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β-γαλακτοσιδάση (αρσενικά), πραγματοποιήθηκε με ζώα αγρίου τύπου (θυληκά). Έγκυα ζώα που κυοφορούσαν έμβρυα ηλικίας από 10.5 έως 13.5 θυσιάζονταν για τη συλλογή των εμβρύων των αντίστοιχων ηλικιών και την περαιτέρω χρήση τους στην πειραματική διαδικασία. Στα έμβρυα που συλλέγονταν για την κάθε ηλικία υπήρχε αριθμητική αναλογία ετερόζυγων και αγρίου τύπου. Τα μεν πρώτα χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της έκφρασης του EDNRB και τα δε δεύτερα για μάρτυρες.

Ο προσδιορισμός του γονότυπου των ζώων (wild-type ή EdnrB<sup>lacZ</sup>+/-) που χρησιμοποιήθηκαν στις διασταυρώσεις έγινε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και για τον υπολογισμό της ηλικίας των εμβρύων, η ημέρα της σύλληψης θεωρήθηκε ως εμβρυονική ημέρα E 0.5.

## 2.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΑΠΟ ΙΣΤΟΥΣ

Για την απομόνωση γενωμικού υλικού από ιστούς (ουρές ποντικών) ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Οι ιστοί επώαστηκαν για 14-16 ώρες στους 55°C με 500 μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K (0,4mg/ml πρωτεΐνάση K, 50mM Tris pH8, 100mM EDTA pH8, 100mM NaCl, 1%SDS). Στη συνέχεια τα νουκλεϊκά οξέα απομονώθηκαν με τη μέθοδο εκχύλισης με φαινόλη και χλωροφόρμιο (ανάμιξη του διαλύματος μετά την πέψη με 250μl φαινόλη και 250μl χλωροφόρμιο, φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000rpm σε θερμοκρασία δωματίου και απομόνωση της υδατικής φάσης) και κατακρημνίστηκαν με προσθήκη ίσου όγκου (500μl) ισοπροπανόλης και

φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πλύσιμο του ιζήματος με 70% αιθανόλη (EtOH), τα νουκλεϊκά οξέα επαναδιαλύθηκαν σε επιθυμητό όγκο (100μl) αποστειρωμένου H<sub>2</sub>O.

## 2.2.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του γονοτύπου των EdnrB<sup>lacZ</sup> και αγρίου τύπου ποντικών. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο του Dr Shin στη Φιλαδέλφεια και τα αντιδραστήρια ήταν από την εταιρεία Invitrogen. Η κάθε μία από τις αντιδράσεις είχε τελικό όγκο 50μl και περιείχε 2μl DNA (~50ng/μl, απομονωμένο από ουρά ποντικού), 5μl ρυθμιστικού διαλύματος ειδικού για την πολυμεράση Taq, 2,5μl MgCl<sub>2</sub> (50mM), 1μl dNTPs (10mM), 1μl από κάθε εκκινητή (100pmol/μl) και 2U πολυμεράσης Taq. Η αντίδραση επώαστηκε στη συνέχεια σε ειδικό θερμικό κυκλοποιητή.

Για την ενίσχυση τμήματος του εξονίου 1 του γονιδίου EDNRB χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές:

EDNRB 5': 5' CCAGACTGAAAACAGCAGAGCGGC 3'

EDNRB 2: 5' GGTCTCCCAGAGCCAGACTGGCGATC 3'

Οι εκκινητές αυτοί δεσμεύονται στο εσωτερικό του εξονίου 1 και αναμένεται να ενισχύσουν ένα τμήμα περί τις 496bp, σύμφωνα με την αλληλουχία που παραθέτεται ακολούθως.

```
GGGAGACTGAATGCAGACCAGCGGGTGGCGTGCGCCAAAGTTCCCCTGGCGCGCAAACCTTAA
CTTACTGTAAAGGCGCGGGTAGAGGCAACCGGGCTAGTGTGTTTTTCAGAGGCTTGGCTGGGGTAG
CTGACTTAAGTGTCTCTTCACTCCCAGTTGGTCT<Primer_sense>CCAGACTGAAAACAGCA
GAGCGGC</Primer_sense>TACCAGACTCTCACAGGAGCAAGCTGTAACATGCAATCGCCCGCAAG
CCGGTGCAGACGCGCCTTGGTGGCGTGCTGCTGGCCTGTGGCTTCTTGGGGGTATGGGGAGAG
AAAAGAGGATTCCACCTGCCCAAGCCACGCTGTCACTTCTCGGGACTAAAGAGGTAATGACGCC
ACCCACTAAGACCTCCTGGACCAGAGGTTCCAACCTCCAGTCTGATGCGTTCCTCCGCACCTGCGG
AGGTGACCAAAGGAGGGAGGGGGGCTGGAGTCCCGCCAAGATCCTTCCCTCCTCCGTGCCAACG
AAATATTGAGATCAGCAAGACTTTTAAATACATCAACACGATTGTGTCGTGCCTCGTGTTCGTGCTA
GGCATCATCGGGAACCTCCACGCTGCTAAGAATCATCTACAAGAACAAGTGCATGCGCAATGGTCCC
```

AATATCTT<Primer\_antisense>GATCGCCAGTCTGGCTCTGGGAGACC</Primer\_antisense>TACTGC  
ACATCATCATAGACATACCCATTAACACCTACAAGTTGCTCGCAGAGGACTGGCCATTTGGAGCTG  
AGATGTGTAAGCTGGTGCCCTTCATACAGAAGGCTTCTGTGGGAATCACAGTGCTGAGTCTTTGTG  
CTCTAAGTATTGACAGATATCGAGCTGTTGCTTCTTGGAGTCGAATTAAGGAATTGGGGTTCCAAA  
ATGGACAGCAGTAGAAAATTGTTTTAATTTGGGTGGTCTCTGTGGTCTGGCTGTCCCCGAAGCCAT  
AGGTTTTGATATGATTACGTCCGACTACAAAGGAAAGCCCCTAAGGGTCTGCATGCTTAATCCCTTT  
CAGAAAACAGCCTTCATGCAGTTTTACAAGACAGCCAAAGATTGGTGGCTGTTTCAGTTTCTACTTCT  
GCTTGCCGCTAGCCATCACTGCAGTCTTTTATACCCTGATGACCTGCGAAATGCTCAGGAAGAAGA  
GCGGTATGCAGATTGCTTTGAATGATCACTTAAAGCAGAGACGAGAAGTGGCCAAGACAGTCTTCT  
GCCTGGTCCCTCGTGTGTTGCTCTGTGGCTTCCCCTTCACCTCAGCCGGATCCTGAAGCTCACCC  
TGTATGACCAGAGCAATCCACACAGGTGTGAGCTTCTGAGCTTTTTGTTGGTTTTGGACTACATTGG  
TATCAACATGGCTTCTTTGAACTCCTGCATCAATCCAATCGCTCTGTATTTGGTGAGCAAAAAGATTC  
AAAACTGCTTTAAGTCATGTTTGTGCTGCTGGTGCCAAACGTTTGAGGAAAAGCAGTCCTTGGAG  
GAGAAGCAGTCCCTGCCTGAAGTTCAAAGCCAACGATCACGGATATGACAACCTCCGGTCCAGCAAT  
AAATACAGCTCGTCTTGAAGGCAAGAACTCGCCGAATCTCACTGTCCTCATTGTGGACAGATAC  
CATTAAAACAAAATGAAACCGTTGCCAAATCAAATGGAAAAAACCATGCTAGCAGAAAAGGTGTGC  
GCGCGTGTGAGAGGGATTATTTTAACTGTTCTGACGCTCAACACCCGGATATATTCACGGGCTGTT  
TACAACCTAAGAAAGCTGTGGGAAGGAATGAAGCCCTCCTCCGTGGGGAAGCACTTAGATTCTTAG  
TCAGCACTTCAGCAGAGCTCTTAAAAGCCCCTAGTGC GTTCACATGCCACTTACGTTTAAAAAACG  
AGA ACTTCACTGAAGTTCTGTT CAGGAGTTTATTATCCAGTCCATGAATCTGGATTCAAGAAAGCA  
TGACATTGCAAAAACAATTCTTAAAACGAAGTTTCAATTGCTTAATTTGAAACTTAAAAAAAAAAAACT  
AATAAATTTTTATGCATACTATCATACCCACTAATCTGATTGTA ACTATATGCAAAAAGAAAAGGCAAT  
ATGGTTGGTAAACTTTTTTGGTCAATTACCAACATTGAAATGATCAGAATTCGGGGGAAGAAAAGACA  
GCCTGCGAATGCCACAGAGAAAACATGGGAAAGCGTGAGCTGCTATGCCTGAGACTTCTGAAATTC  
CCTCACACATACTCTGCAGAAAGACACAAAACAGAACACTACCTATGATTTCTTAAAGTTCTTTCAA  
ATATCCTTTCATGATTGAAGTTTAAATTCCATGTGTTCAACTTCATCATCTGTAAATACTTAGCTATTA  
GCTATAAGCACTACACGTAGAGGACTTAACAAAGGGCAGGTCCCAGCGTTTCGTAGCTTTCTGACAA  
AGAGATGCCAGTAACCCGTTATAGACAGAATGTGAATTGCCCGGTGCAGTGTCCACATGGCAAA  
GAAGCAGGGAGCATCCTTTCAGCCATGCTGTAGAGAAAATGGTCCACAGCACAATATGATAGCGAA  
AATACCGTGGTTAACGCCATAGAAAATAGTCACTGTAACCAGCTCTCTCGGAGGCATACTACCAA  
CTTTTTATGTTATTCTGAAAATAGCCAATAGAAAGGCGTTCTGGACATGGTGCTTTTTCTAAAACGT  
AGAAGCCAAACTGCTTCGGGGTCTGCAAGATCCTCCTTTGCGCATTCTGTCTAGGTTTTTTTTT  
TTTTTTTTTAATCTCCTTCCACGACGTGCCTTAGGTTCACTCCGGATGAGCGGTGTGTGAAAGAATG  
CCCAAGAGAAAACCTGAAGAGAGAGGAAATGAGGTGGGGCCAGAGGAAGCCCGTGGGGAAATATT  
CCCATTCTTAGCCCTGTGTTTCGCTCACTGCCACGTCATGTCCGGTGTGAAAGTCTGGTTCGGCTCC  
AGCAAAAACAAAGCGCAGCGTCTCAGCGTGA CTGCGGAACAAACCAAGCCCCGAGAGCTTTAACCT  
TGTCTTAAAATATAACAGATTTTCTTCTTCTTTTTCTTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTC  
TTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTTTTCATAACCCAGGCCACATGTTGAAAATGAGCTTAAACA  
ATGCAGTTTTCTACCAAAATCATTGTGACAATAAATAAACCCAAACGGGACAATGAGGTAAAAAAC  
CAAGAACAATACTGAATCCACGTGACACATGACTCTCTT TAGGAGTCAACCCACAGTTCTTGTGTGTA  
CAGATTGCTTTTTAATCATAAAGGACGCCCCAGATCTTCAATTTTAAAGTTAGTTATTGGCTCCCCAGT  
AGTTTCACAGCGTGGATATATTTTAAATTTTACTAAGTTT TAGATTGGTTTTATTGTTGTGTTCTAAA  
TTCTTAAAGTCTAACATCTTTGTTTAAACCCAGATGTTCCCTCCCTCTTCATGGGCAATAATCGTCCTG  
CCAAATTATGAAATGGCATAAGAATACTATTACATAATATATACAATAAAACTATATTAAGTGGCTTT  
TTTATTA AAAATTTTAGCACACAGACCAAGGGTGATAAGAAAAAAAACATGATTCCCTTGCATAATTA

AAACCAAGATAAGAGAAGGTACCATCTAATTTAAAGCATATTTTCTAACATTTAAGTAGCCTAATATA  
GCAATGCATAAAAAATAGTGTTAAACAAGGATGTTAGAGGTCAAACGATTTGTAAGTGACTTCAGCCTA  
TTTTCTCCCAAATPATTACTGCTATTTTTGGTCTGTGTTCAAACATTTTCAGTATTGATAATGTGCAA  
CAGCCAAAGGAACACTGTTTTTCATCCAAATGCGGGTGTGTTGTACCTAACATGCACTTGTAATAAAG  
CCGTGTAAAATAACTGTGTTTTGTTTTGCTCTGGTCACCTAAAGTGCGAGCTTGTGTGCTTGCTAAC  
TTCTTGTTGAGTAAGCAAAACCAATAAACGTTCAAATGGTT

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις παρακάτω συνθήκες:

95°C για 4min

94°C για 30 sec

57°C για 45 sec

72°C για 60 sec

} x 35 κύκλους

72°C για 10min

Το προϊόν της συγκεκριμένης αντίδρασης πολυμεράσης έχει μέγεθος 496 bp και αντιστοιχεί σε τμήμα του εξονίου 1 του γονιδίου.

Τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν τέλος σε πήκτωμα 1,2% αгарόζης, 0,1μg/ml βρωμιούχου αιθιδίου σε 1xTAE (4,84γρ. Tris, 0,34γρ. CH<sub>3</sub>COONa, 0,1862γρ. Na<sub>2</sub>EDTA, 1,125ml CH<sub>3</sub>COOH σε τελικό όγκο 1 λίτρου) και τα μεγέθη των τμημάτων του DNA εκτιμήθηκαν με χρήση DNA ladder.

Μια δεύτερη αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου LacZ με χρήση των εκκινητών:

LacZ IF: 5' CCGACGGCACGCTGATTGA 3'

LacZ IR: 5' GCTCCGCCGCTTCATACTG 3'

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε υπό τις εξής συνθήκες :

95°C για 4min

94°C για 1min

62°C για 1min

72°C για 1min

} x 30 κύκλους

72°C για 10min

Το προϊόν αυτής της αντίδρασης αναμένεται περί τα 519 bp.



## 2.3 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.3.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ

Τα έγκυα ζώα θυσιάστηκαν με αυξανόμενη δόση CO<sub>2</sub>, και τα έμβρυα (ηλικίας E 10.5 έως E 13.5) συλλέχθηκαν σε κρύο ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline: 400mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5mM NaCl). Στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν (fixation) σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης/γλουταραλδεΐδης (1% παραφορμαλδεΐδη, 0,2% γλουταραλδεΐδη, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM EGTA και 0,02% NP-40 σε PBS) για 10-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

### 2.3.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΧΡΩΣΗΣ ΜΕ X-GAL

Τη μονιμοποίηση με το διάλυμα παραφορμαλδεΐδης/γλουταραλδεΐδης που περιγράφηκε, ακολούθησε ξέπλυμα με διάλυμα 0,02% NP-40 σε PBS για 5 λεπτά (x3) σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αντίδραση χρώσης με το υπόστρωμα X-gal σε τελική συγκέντρωση 1mg/ml μέσα σε διάλυμα αποτελούμενο από 5mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>·3H<sub>2</sub>O, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Na deoxycholate και 0,02% NP-40 σε PBS. Η αντίδραση αυτή έλαβε χώρα σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου εμφανιστεί το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Την αντίδραση χρώσης ακολούθησε ξέπλυμα (x3) με PBS και μονιμοποίηση με διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδης σε PBS (post-fixation) για λίγες ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

### 2.3.3 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΜΒΡΥΩΝ ΓΙΑ ΤΟΜΕΣ ΣΕ ΚΡΥΟΤΟΜΟ

Τα Ednr<sup>B<sup>lacZ</sup></sup> (βαμμένα) έμβρυα και τα αγρίου τύπου έμβρυα (control) εξισορροπήθηκαν σε διάλυμα 30% σουκρόζης σε PBS, σε θερμοκρασία 4°C. Την επόμενη ημέρα μεταφέρθηκαν για 20-30 λεπτά στους 37°C και εμβαπτίστηκαν σε ημίρρευστο διάλυμα 7,5% ζελατίνης/15% σουκρόζης/PBS

(0,1M), σε τρυβλίο όπου και αφέθηκαν έως ότου το ημίρρευστο διάλυμα ζελατίνης που περιέκλειε τα έμβρυα να γίνει συμπαγές (gel). Εν συνεχεία, το gel που περιείχε το κάθε έμβρυο κοβόταν σε σχήμα κύβου. Στα σχηματιζόμενα blocks τοποθετήθηκε OCT (Optimum Cutting Temperature) και ακολούθησε κατάψυξη σε ισοπεντάνιο ψυχόμενο στους  $-55^{\circ}\text{C}$  με ξηρό πάγο και αποθήκευση αυτών στους  $-80^{\circ}\text{C}$  έως ότου κοπούν σε ψυχόμενο κρυτόμο στους  $-25^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.3.4 ΤΟΜΕΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ EDNRB**

Οι εγκάρσιες τομές πάχους 14 $\mu\text{m}$  συλλέχθηκαν σε σιλικονιοποιημένες αντικειμενοφόρους πλάκες όπου και μονιμοποιήθηκαν με χρήση μονιμοποιητικού μέσου (mounting medium glycergel) και καλύπτρας. Η παρατήρηση των αποτελεσμάτων έγινε σε οπτικό μικροσκόπιο τύπου Leica με τη βοήθεια ειδικού άτλαντα (The Atlas of Mouse Development, Kaufman 1992). Τέλος, οι φωτογραφίες ελήφθησαν μέσω υπολογιστή συνδεδεμένου με ειδική κάμερα με χρήση του Openlab προγράμματος.

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

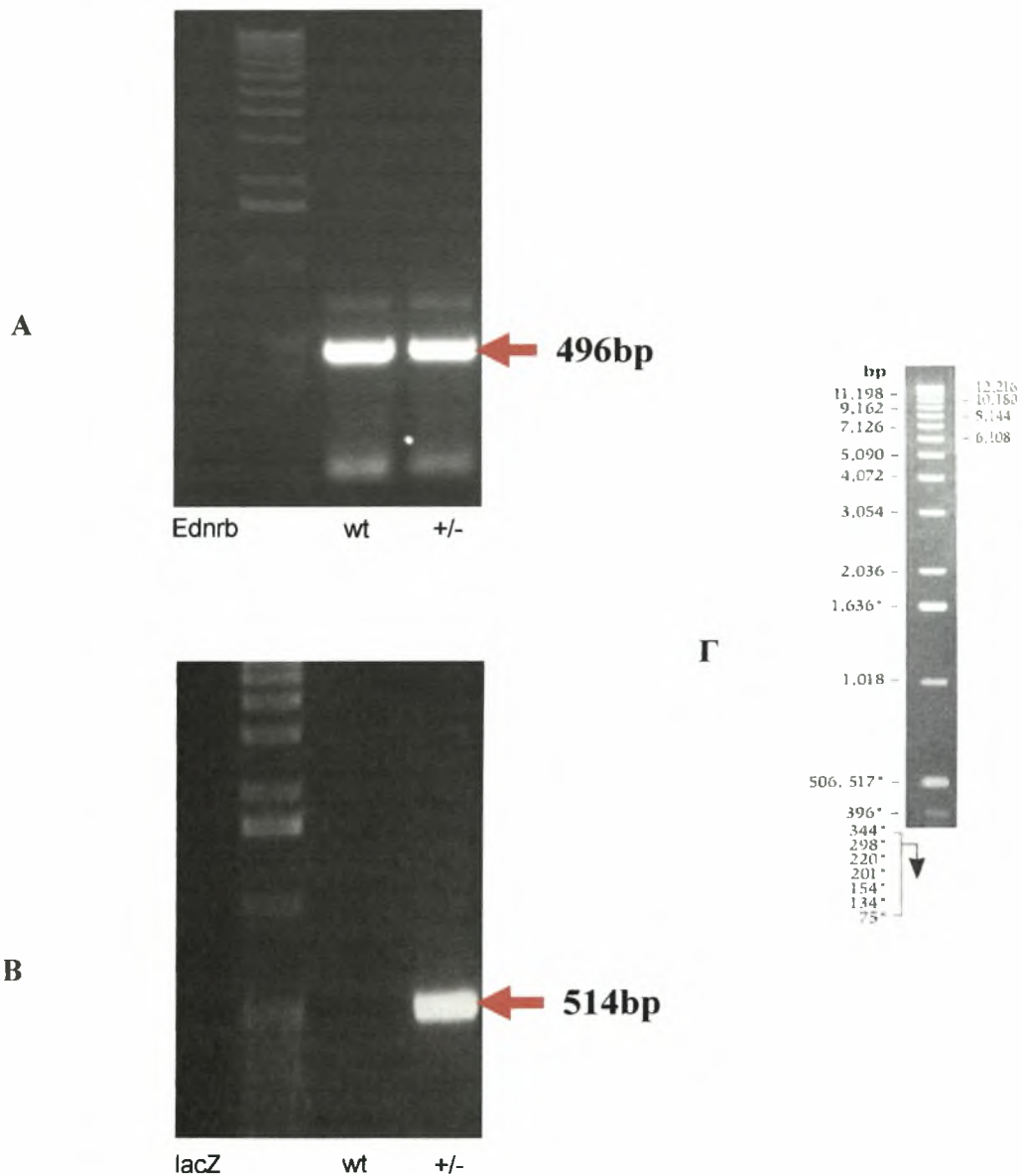
### 3.1 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ ΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΙΩΝ.

Η μελέτη της έκφρασης του EDNRB σε επίπεδο ιστών προϋποθέτει την εισαγωγή ενός γονιδίου μάρτυρα ώστε να είναι εφικτός ο εντοπισμός του προϊόντος του υποδοχέα. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε ο ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ του LacZ και του εξονίου 1 του γονιδίου EDNRB σε ένα από τα δύο αλληλόμορφα του συγκεκριμένου γονιδιακού τόπου. Ετερόζυγα ποντίκια EdnrBlacZ+/- διασταυρώθηκαν με ποντίκια άγριου τύπου EdnrBlacZ-/- και από κάθε θηλυκό που εγκυμονούσε λαμβάνονταν τα έμβρυα σε διάφορα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε όλες της περιπτώσεις το 50% των εμβρύων ήταν ομόζυγα άγριου τύπου ενώ το υπόλοιπο 50% ήταν ετερόζυγα.

Για την εξακρίβωση του γονότυπου των ποντικών πραγματοποιούνται δύο παράλληλες αντιδράσεις PCR με εκκινητές για την ενίσχυση του εξονίου 1 του EDNRB και τμήματος του LacZ. Τα προϊόντα των αντιδράσεων ηλεκτροφορούνται και με συγκριτική παρατήρηση εκτιμάται αν το ποντίκι είναι ετερόζυγο ή ομόζυγο. Η ενίσχυση του τμήματος του εξονίου 1 του EDNRB παίζει και το ρόλο του θετικού μάρτυρα καθώς η ενίσχυση του τμήματος αυτού είναι αναμενόμενη σε όλες τις περιπτώσεις και μπορεί να θεωρηθεί ότι το θετικό αποτέλεσμα υποδεικνύει την άνευ προβλημάτων τέλεση της PCR αντίδρασης. Το προϊόν της ενίσχυσης του εξονίου 1 του EDNRB είναι ένα τμήμα DNA περί τις 496bp (Εικόνα 10). Αν στη στήλη που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο ποντίκι εμφανίζονται οι ζώνες από την ενίσχυση και των δύο τμημάτων DNA τότε αυτό είναι EdnrBlacZ+/- τύπου, ενώ αντίθετα αν λείπει η ζώνη που αντιστοιχεί στο τμήμα του LacZ τότε το ποντίκι είναι αγρίου τύπου (Εικόνα 11).



**Εικόνα 10:** Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση τμήματος του εξονίου 1 του EDNRB δεσμεύονται σε περιοχές του εξονίου που απέχουν 496bp μεταξύ τους, μέγεθος που αντιστοιχεί και στο αναμενόμενο αποτέλεσμα.



**Εικόνα 11:** **A.** Τα προϊόντα της ενίσχυσης του τμήματος του εξονίου 1 του EDNRB με χρήση γενωμικού DNA από ομόζυγο (πρώτη στήλη) και ετερόζυγο (δεύτερη στήλη) ποντίκι. **B.** Τα προϊόντα της ενίσχυσης του τμήματος του LacZ με χρήση γενωμικού DNA από ομόζυγο (πρώτη στήλη) και ετερόζυγο (δεύτερη στήλη) ποντίκι. Ο προσδιορισμός της ετεροζυγωτίας ή της ομοζυγωτίας του εκάστοτε ποντικού προκύπτει από τη συγκριτική παρατήρηση της παρουσίας και των δύο προϊόντων. **Γ.** Ο DNA ladder που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των μεγεθών των ενισχυμένων τμημάτων DNA.

### 3.2 ΧΡΩΣΗ ΜΕ X-gal ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Μετά την επαλήθευση της ύπαρξης ετεροζυγών, τα ποντίκια στο σύνολο τους χρησιμοποιούνται για τη συνέχιση των πειραμάτων (διασταυρώσεις και λήψη εμβρύων). Αρχικά, πραγματοποιούνται πλύσεις των εμβρύων (χρήση PBS) με σκοπό την απομάκρυνση εξωγενών ιστών που δεν αφαιρέθηκαν πλήρως κατά τη λήψη των εμβρύων, λόγω δυσκολίας εφαρμογής της τεχνικής. Ακολουθείται ειδική μεταχείριση για τη σταθεροποίηση των ιστών τους, ώστε να μην είναι επιρρεπείς σε αλλοιώσεις. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται η γλουταραλδεΐδη και η παραφορμαλδεΐδη, ως συστατικά του μονιμοποιητικού διαλύματος, εκ των οποίων το πρώτο συστατικό παρουσιάζει ταχύτερη δράση. Η είσοδος των ουσιών αυτών στα κύτταρα των ιστών πραγματοποιείται με τη βοήθεια του απορρυπαντικού NP-40, που κάνει τα κύτταρα διαπερατά αλλοιώνοντας τις πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης. Το EGTA χρησιμοποιείται στο μονιμοποιητικό διάλυμα καθώς προστατεύει τους ιστούς από λάθος χρώση (ελαχιστοποιεί το background) και το χλωριούχο μαγνήσιο ενισχύει τη δράση του ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης.

Μετά τη μεταχείριση των εμβρύων με τα προαναφερθέντα διαλύματα ακολουθεί χρώση τους με ειδικό διάλυμα (staining solution) στο οποίο προστίθεται το ανάλογο της λακτόζης, X-gal. Η ουσία αυτή καταβολίζεται από τη β-γαλακτοσιδάση στους ιστούς που εκφράζουν το συγκεκριμένο ένζυμο και μέσω μιας οξειδωτικής αντίδρασης που πραγματοποιείται

παρουσία ιόντων σιδήρου, προκύπτει μια μπλε ουσία ως παραπροϊόν (5-bromo-4-chloro-indigo) χρωματίζοντας τμηματικά το έμβρυο ανάλογα με την έκφραση του LacZ και κατ' επέκταση του EDNRB. Τα ιόντα σιδήρου παρέχονται από τα συστατικά του διαλύματος χρώσης. Η παρατήρηση, λοιπόν, ουσιαστικά του γονιδίου μάρτυρα υποδεικνύει την ιστοεξειδικευμένη έκφραση του υπό μελέτη υποδοχέα. Μετά το στάδιο της χρώσης ακολουθεί και πάλι πλύση των εμβρύων για την πλήρη απομάκρυνση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν και σταθεροποίησή τους σε ειδικό μίγμα ώστε να είναι εφικτή η τμηματοποίησή τους και η παρατήρηση των επί μέρους ιστών.

Σε κάθε περίπτωση τα έμβρυα των διαφορετικών ηλικιακών καταστάσεων δέχονται την ίδια μεταχείριση, όπως επίσης και τα έμβρυα διαφορετικού γονότυπου (ομόζυγα, ετερόζυγα ως προς το EDNRB). Στα αγρίου τύπου ποντίκια δεν παρατηρείται ο μπλε χρωματισμός σε αντίθεση με τα ετερόζυγα, γεγονός αναμενόμενο λόγω της έλλειψης του γονιδίου LacZ. Οπότε, η χρώση λειτουργεί και ως ένα δεύτερο σημείο ελέγχου, μετά την αντίδραση PCR, όσον αφορά το γονότυπο των ποντικών. Συγκρίνοντας τα διάφορα αναπτυξιακά στάδια εκτιμάται η ανά ηλικία έκφραση του EDNRB, ως προς το επίπεδο και την τοπολογία της (Εικόνες 12,13,14,15). Σύμφωνα με την απεικόνιση της έκφρασης του EDNRB στις διάφορες ηλικιακές καταστάσεις μπορεί να εκτιμηθεί η διαφοροποίηση της έκφρασης του υποδοχέα στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια σε επίπεδο ιστών.

## E 10.5 EMBRYA



**Εικόνα 12:** Έμβρυα ηλικίας E 10.5. Στην αριστερή στήλη παρουσιάζονται έμβρυα ετερόζυγα ενώ στη δεξιά στήλη αγρίου τύπου, μετά τη χρώση. Το σκίτσο αντιστοιχεί σε έμβρυο ποντικού E 10.5 σύμφωνα με τον άτλαντα. Στην πρώτη φωτογραφία απεικονίζεται το δεξί προφίλ των εμβρύων και ακολουθούν η ραχιαία όψη και το αριστερό προφίλ.

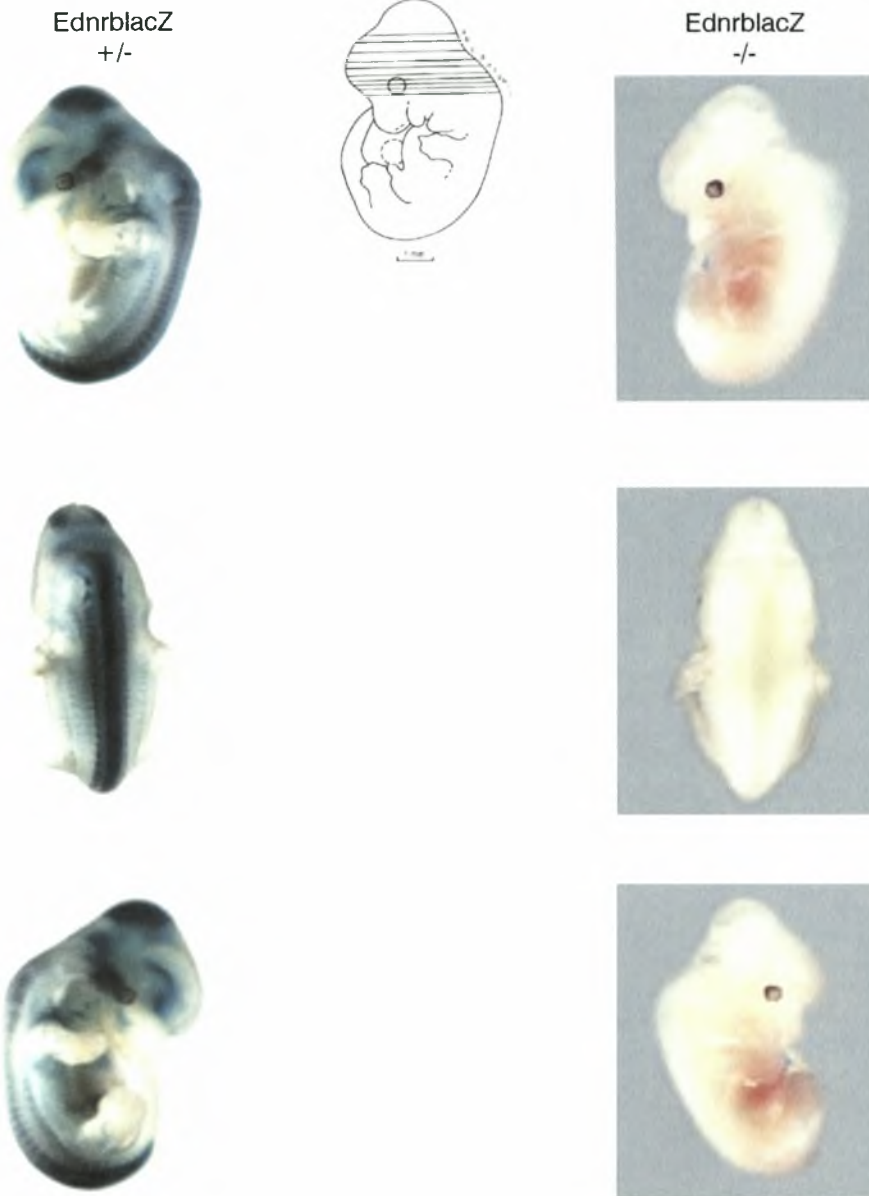


## E 11.5 EMBRYA



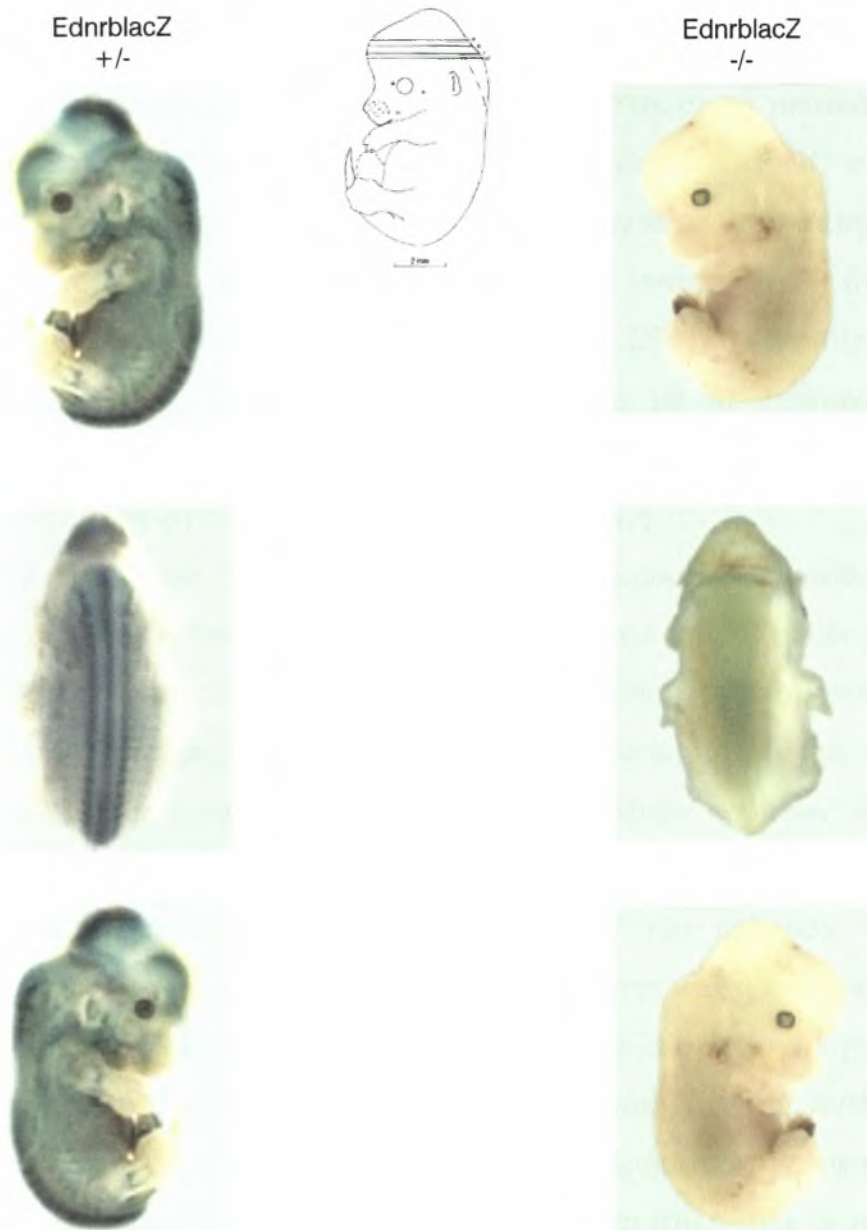
**Εικόνα 13:** Έμβρυα ηλικίας E 11.5. Στην αριστερή στήλη παρουσιάζονται έμβρυα ετερόζυγα ενώ στη δεξιά στήλη αγρίου τύπου, μετά τη χρώση. Το σκίτσο αντιστοιχεί σε έμβρυο ποντικού E 11.5 σύμφωνα με τον άτλαντα. Στην πρώτη φωτογραφία απεικονίζεται το δεξί προφίλ των εμβρύων και ακολουθούν η ραχιαία όψη και το αριστερό προφίλ.

## E 12.5 EMBRYA



**Εικόνα 14:** Έμβρυα ηλικίας E 12.5. Στην αριστερή στήλη παρουσιάζονται έμβρυα ετερόζυγα ενώ στη δεξιά στήλη αγριου τύπου, μετά τη χρώση. Το σκίτσο αντιστοιχεί σε έμβρυο ποντικού E 12.5 σύμφωνα με τον άτλαντα. Στην πρώτη φωτογραφία απεικονίζεται το δεξι προφίλ των εμβρύων και ακολουθούν η ραχιαία όψη και το αριστερό προφίλ.

## E 13.5 EMBRYA



**Εικόνα 15:** Έμβρυα ηλικίας E 13.5. Στην αριστερή στήλη παρουσιάζονται έμβρυα ετερόζυγα ενώ στη δεξιά στήλη αγρίου τύπου, μετά τη χρώση. Το σκίτσο αντιστοιχεί σε έμβρυο ποντικού E 13.5 σύμφωνα με τον άτλαντα. Στην πρώτη φωτογραφία απεικονίζεται το δεξί προφίλ των εμβρύων και ακολουθούν η ραχιαία όψη και το αριστερό προφίλ.

Παρατηρείται ότι σε όλα τα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης υπάρχει έντονη χρώση κατά μήκος του πρόσθιου-οπίσθιου άξονα, γύρω από το νευρικό σωλήνα και σταδιακή μετατόπιση αυτής ραχιαίο-κοιλιακά. Καθώς τα κύτταρα που εκφράζουν τον EDNRB υποδοχέα είναι εκείνα της νευρικής ακρολοφίας (NC) ο εντοπισμός της χρώσης συμπίπτει με τη μετανάστευσή τους προς τα σημεία της τελικής τους διαφοροποίησης. Τα NC κύτταρα μεταναστεύουν προς το έντερο και το δέρμα δίνοντας το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα στις περιοχές αυτές με την πάροδο των αναπτυξιακών σταδίων. Επίσης, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η έκφραση του EDNRB εντοπίζεται και στον εγκέφαλο. Η εντόπιση αυτή είναι σύμφωνη με τα βιβλιογραφικά δεδομένα βάσει των οποίων ο υποδοχέας εκφράζεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα στην περιοχή του εγκεφάλου (*Tsaur et al, 1997*).

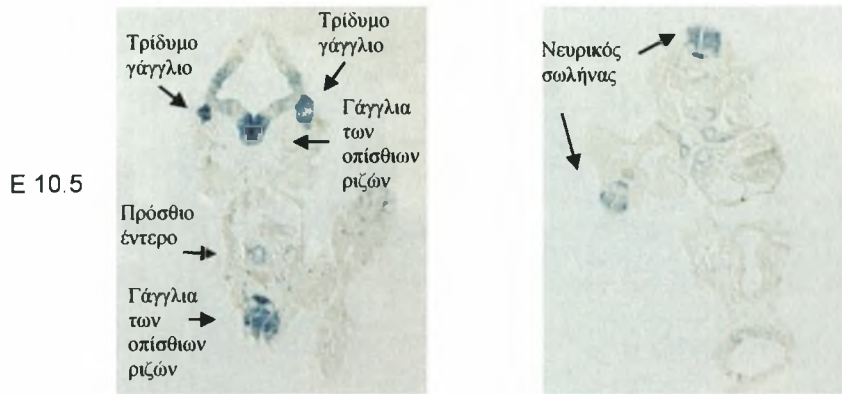
Ωστόσο η χρώση σε επίπεδο εμβρύου δεν μπορεί να υποδείξει με ακρίβεια τους ιστούς στους οποίους εκφράζεται ο υπό μελέτη υποδοχέας. Η γενική εικόνα που προκύπτει βοηθάει σε μια εκτίμηση της παρουσίας του υποδοχέα αλλά δεν επαρκεί για τον ιστολογικό εντοπισμό του. Για το λόγο αυτό πραγματοποιούνται τομές των σταθεροποιημένων εμβρύων ώστε να προκύψει μια πιο λεπτομερής απεικόνιση της γονιδιακής έκφρασης του EDNRB (Εικόνες 16,17,18,19). Η τμηματοποίηση του εμβρύου τελείται σύμφωνα με τον άτλαντα βάσει του οποίου εκτιμάται και η παρουσία των διαφόρων ιστών ανά τομή. Πολύ σημαντικό ρόλο παίζει η επιλογή της γωνίας τμηματοποίησης των εμβρύων ώστε οι τομές να αντιστοιχούν στις αντίστοιχες του άτλαντα και να μη γίνονται λανθασμένες εκτιμήσεις όσον αφορά την ιστολογική εντόπιση του υποδοχέα. Στην μελέτη αυτή επιλέχτηκε οι τομές να γίνουν εγκάρσια, αλλά σε μερικές περιπτώσεις η επιλογή της γωνίας δεν ήταν επιτυχής. Σύμφωνα με τις τομές επιβεβαιώνεται η εντόπιση του υποδοχέα στις υποψήφιας από τη βιβλιογραφία περιοχές.

Πιο συγκεκριμένα παρατηρείται έκφραση του υποδοχέα EDNRB, από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας του ραχιαίου τμήματος του νευρικού σωλήνα σε όλες τις ηλικίες. Κάποια από αυτά τα κύτταρα θα δώσουν γένεση στα εντερικά γάγγλια και κάποια θα διαφοροποιηθούν σε μελανοκύτταρα.

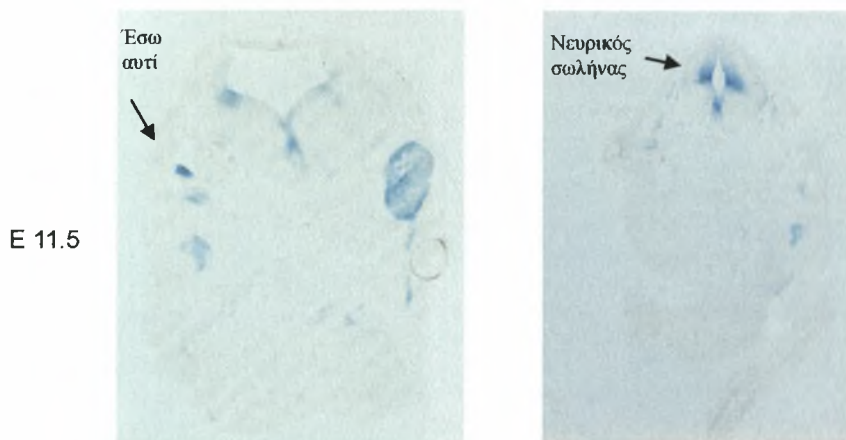
Έκφραση του EDNRB στο έντερο και στα μελανοκύτταρα σημειώνεται επίσης σε όλες τις ηλικίες (Εικόνα 16,18,19).

Ειδικότερα στα διάφορα ηλικιακά στάδια παρουσιάζεται διαφορετική εντόπιση του EDNRB διότι τα κύτταρα που εκφράζουν το συγκεκριμένο υποδοχέα έχουν ένα συγκεκριμένο προφίλ μετανάστευσης ανά αναπτυξιακό στάδιο. Έτσι σε έμβρυα ηλικίας E10.5 ημερών παρατηρείται έντονη έκφραση του γονιδίου στα τριδύμα γάγγλια και στα γάγγλια των οπίσθιων ριζών καθώς και στο πρόσθιο έντερο. Σε έμβρυα ηλικίας E11.5 ημερών η έκφραση του EDNRB είναι έντονη στα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας γύρω από το νευρικό σωλήνα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στη συγκεκριμένη ηλικία εντοπίζεται έκφραση και στο έσω αυτί. Στην ηλικία των E12.5 ημερών η έκφραση του γονιδίου εντοπίζεται στα γάγγλια των οπίσθιων ριζών, στα επενδυτικά κύτταρα του νευρικού σωλήνα, τα μελανοκύτταρα του δέρματος και στο έντερο. Έκφραση σημειώνεται και σε συμπαθητικά νεύρα. Τέλος, σύμφωνα με τις τομές εμβρύων ηλικίας E13.5 ημερών υπάρχει έντονη έκφραση του γονιδίου στα γάγγλια των οπίσθιων ριζών, στα επενδυτικά κύτταρα του νευρικού σωλήνα, στο στομάχι και στο έντερο. Έκφραση σημειώνεται και σε συμπαθητικά νεύρα.

ΕΓΚΑΡΣΙΕΣ ΤΟΜΕΣ  
EdnrblacZ +/-

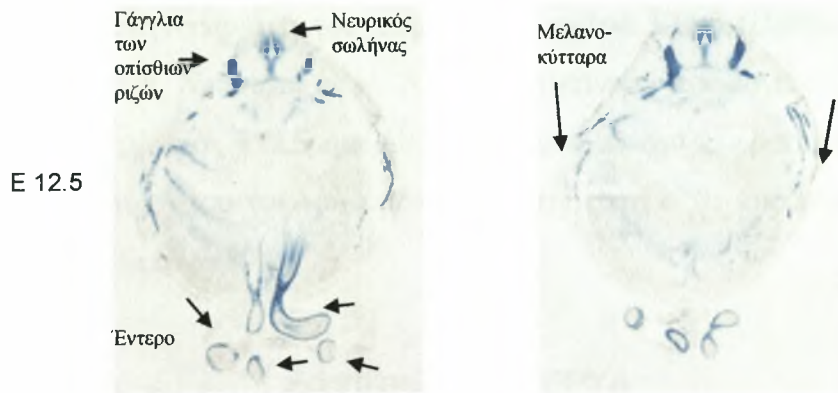


**Εικόνα 16:** Τομές εμβρύων ηλικίας E10.5 ημερών. Παρατηρείται έντονη έκφραση του γονιδίου στα τριδύμα γάγγλια και στα γάγγλια των οπίσθιων ριζών καθώς και στο πρόσθιο έντερο.

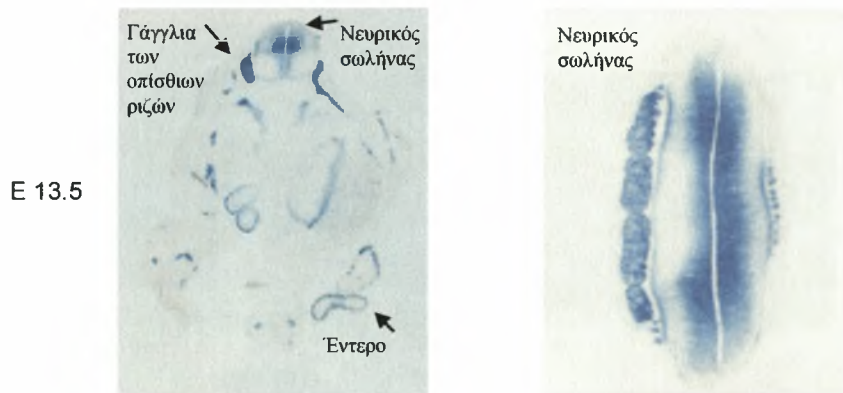


**Εικόνα 17:** Τομές εμβρύων ηλικίας E11.5 ημερών. Παρατηρείται έντονη έκφραση του γονιδίου στα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας γύρω από το νευρικό σωλήνα(δεξιά). Αξιοσημείωτη είναι η έκφραση στο έσω αυτί (αριστερά).

## ΕΓΚΑΡΣΙΕΣ ΤΟΜΕΣ EdnrblacZ +/-



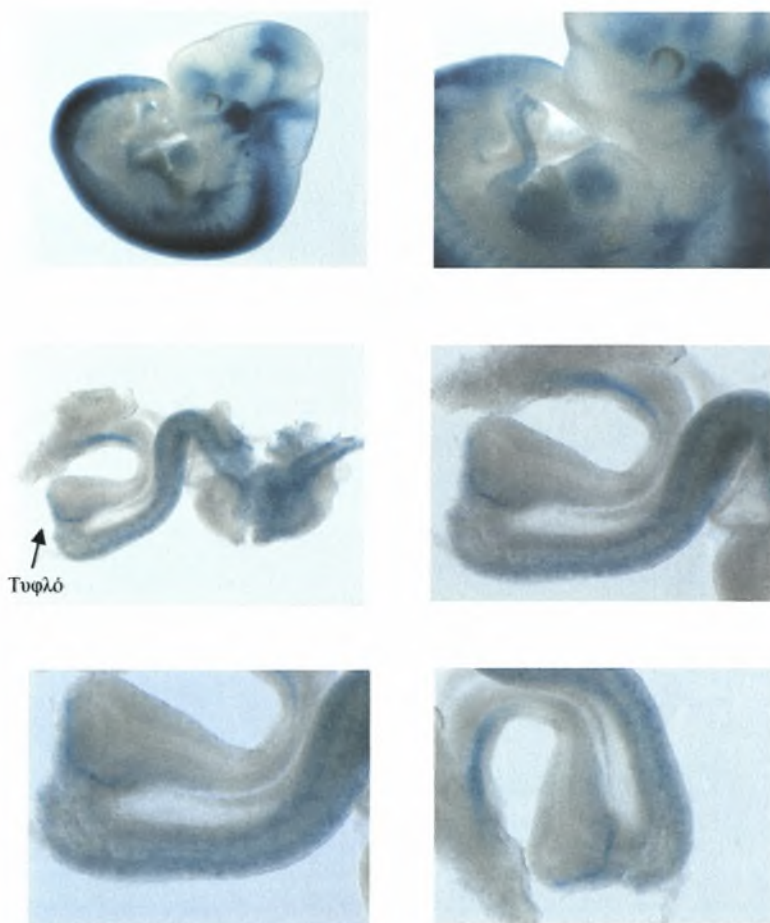
**Εικόνα 18 :** Τομές εμβρύων ηλικίας E12.5 ημερών. Παρατηρείται έντονη έκφραση του γονιδίου στα γάγγλια των οπίσθιων ριζών, στα επενδυτικά κύτταρα του νευρικού σωλήνα, τα μελανοκύτταρα του δέρματος και στο έντερο. Έκφραση σημειώνεται και σε συμπαθητικά νεύρα.



**Εικόνα 19 :** Τομές εμβρύων ηλικίας E13.5 ημερών. Παρατηρείται έντονη έκφραση του γονιδίου στα γάγγλια των οπίσθιων ριζών, στα επενδυτικά κύτταρα του νευρικού σωλήνα, στο στομάχι και στο έντερο. Έκφραση σημειώνεται και σε συμπαθητικά νεύρα (αριστερά). Δεξιά φαίνεται η έκφραση από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας στο ραχιαίο τμήμα του νευρικού σωλήνα.

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας που μεταναστεύουν ραχιαιοκοιλιακά για να αποικίσουν τον εντερικό σωλήνα εισβάλλουν στο πρόσθιο έντερο την ηλικιακή ημέρα E9.5 και εντοπίζονται στην περιοχή του τυφλού την ημέρα E11.5 (Durbec *et al*, 1996, Young *et al*, 1998, Natarajan *et al*, 2002). Απεικόνιση απομονωμένου εντέρου από ποντίκια ηλικίας E11.5 ημερών επιβεβαιώνει την έκφραση του EDNRB μέχρι την περιοχή του τυφλού καθώς παρατηρείται ο χαρακτηριστικός μπλε χρωματισμός (Εικόνα 20).

EdnrblacZ +/- EMBΡΥΑ  
E11.5  
ΕΝΤΕΡΟ



**Εικόνα 20:** Απομονωμένο έντερο από έμβρυο ποντικού ηλικίας E11.5 ημερών. Παρατηρείται η μετανάστευση των εντερικών NC έως την περιοχή του τυφλού και η έκφραση του EDNRB από τα κύτταρα αυτά.



# ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της έκφρασης του EDNRB υποδοχέα σε έμβρυα ηλικίας E10.5-E13.5 ημερών. Τα αναπτυξιακά αυτά στάδια αντιστοιχούν στις ηλικίες, που σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, πραγματοποιείται η μετανάστευση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας προς τον εντερικό σωλήνα και την επιδερμίδα. Η ιστολογική εντόπιση του προϊόντος του γονιδίου έγινε με χρήση ετερόζυγων EdnrblacZ +/- ποντικών, στα οποία η εμφάνιση μπλε χρώματος σε διάφορα σημεία, λόγω της αντίδρασης του X-gal με τη β-γαλακτοσιδάση, υποδεικνυε την έκφραση του EDNRB.

Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις στα έμβρυα των ποντικών η έκφραση του υποδοχέα εντοπίζεται κατά μήκος του πρόσθιου-οπίσθιου άξονα, γύρω από το νευρικό σωλήνα, σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν. Με την πάροδο των σταδίων η έκφραση φαίνεται να εξαπλώνεται ραχιαίο-κοιλιακά στα έμβρυα αυτά. Καθότι τα κύτταρα που εκφράζουν τον EDNRB υποδοχέα είναι εκείνα της νευρικής ακρολοφίας, ο εντοπισμός της χρώσης συμπίπτει με τη μετανάστευσή τους προς τα σημεία της τελικής τους διαφοροποίησης. Έκφραση του υποδοχέα εντοπίζεται επίσης στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα. Ειδικότερα, σύμφωνα με τις τομές των εμβρύων, παρατηρείται έκφραση του EDNRB στα τρίδυμα γάγγλια και στα γάγγλια των οπίσθιων ριζών (dorsal root ganglia), αντίστοιχα (Εικόνα 16,18,19). Όπως οι εντερικοί νευρώνες και τα μελανοκύτταρα του δέρματος, έτσι και τα κύτταρα στα γάγγλια των οπίσθιων ριζών και στα τρίδυμα γάγγλια, προέρχονται από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας. Χαρακτηριστική και πιο αντιπροσωπευτική είναι η εικόνα 18, όπου φαίνεται η έκφραση του EDNRB στο έντερο, στα μελανοκύτταρα του δέρματος και στα γάγγλια των οπίσθιων ριζών. Συμπερασματικά, λοιπόν, ο υποδοχέας EDNRB εκφράζεται έντονα από τα μεταναστευτικά κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας, τα οποία θα δώσουν γένεση σε ποικιλία κυτταρικών τύπων, ανάλογα με το μεταναστευτικό μονοπάτι που θα ακολουθήσουν (εντερικά γάγγλια, μελανοκύτταρα, κύτταρα του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος). Επιπλέον, σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, τα κύτταρα

της νευρικής ακρολοφίας που ακολουθούν το ραχιαιοκοιλιακό μονοπάτι για να αποικίσουν τον εντερικό σωλήνα, εντοπίζονται στην περιοχή του τυφλού την εμβρυονική ημέρα E11.5 (*Natarajan et al., 2002*). Η απεικόνιση απομονωμένου εντέρου από έμβρυα ηλικίας E11.5 ημερών και η έκφραση του EDNRB σε αυτό είναι σύμφωνα με τα παραπάνω (Εικόνα 20).

Στα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμπεριλαμβάνονται οι τομές που είναι οι πιο αντιπροσωπευτικές. Ωστόσο παρουσιάζονται και τομές που ελήφθησαν υπό λανθασμένη γωνία και εξαιτίας του γεγονότος αυτού σε κάποιες περιπτώσεις είναι αδύνατος ο προσδιορισμός του ιστού όπου εκφράζεται ο υποδοχέας. Θα πρέπει να αναφερθεί επίσης ότι λόγω προβλημάτων με τον κρουστάτη υπάρχει πληθώρα κατεστραμμένων καθώς και ακατάλληλων προς παρατήρηση τομών. Εφόσον, όμως, η διαδικασία που περιγράφηκε στα «υλικά και μέθοδοι» είναι επαναλήψιμη, υπάρχει δυνατότητα τα αποτελέσματα αυτά να ανακτηθούν.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο β-υποδοχέας της ενδοθηλίνης-3 εκφράζεται στο έσω αυτί σύμφωνα με παρατήρηση στην τομή εμβρύου ηλικίας E11.5 ημερών. Το φαινόμενο αυτό σχετίζεται άμεσα με την ασθένεια Waardenburg syndrome Type IV ή, όπως αλλιώς ονομάζεται, Hirschsprung's disease type II (*McCallion et al., 2001*). Η ασθένεια αυτή περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1888 από τον Harald Hirschsprung, χωρίς όμως να είναι γνωστή η παθοφυσιολογία της, και εμφανίζεται με συχνότητα 1 στις 5000 γεννήσεις. Το 80% των περιπτώσεων είναι σποραδικές, χωρίς εμφανή αιτιολογία, και το υπόλοιπο 20% κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα (*Martucciello et al., 2000*). Τα τελευταία χρόνια, μεταλλάξεις του β υποδοχέα των ενδοθηλινών και της ενδοθηλίνης-3 έχουν ανιχνευτεί σε ασθενείς με έλλειψη νευρικών γαγγλίων στον εντερικό σωλήνα (intestinal aganglionosis). Στους ασθενείς αυτούς έχουν επίσης παρατηρηθεί και προβλήματα στην αίσθηση της ακοής (*Steel et al., 1999*). Η επικρατέστερη άποψη σχετικά με την αιτιολογία της ασθένειας υποστηρίζει ότι οφείλεται σε πρόωμη διαφοροποίηση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας σε νευρώνες καθώς αυτά αποικίζουν το έντερο (*Martucciello et al., 2000*). Έτσι, ανάλογα με

το σημείο στο οποίο σταματά η μετανάστευση των NC κυττάρων και επάγεται η διαφοροποίησή τους σε νευρώνες, προκύπτει ένα τμήμα του εντερικού σωλήνα που δεν αποικίζεται και επομένως παρουσιάζει έλλειψη εντερικών γαγγλίων.

Ωστόσο, μεταλλάξεις του EDNRB είναι υπεύθυνες για μόλις το 5% των περιπτώσεων. Ένα μεγάλο ποσοστό της ασθένειας (50%) οφείλεται σε μεταλλάξεις του c-ret γονιδίου. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για έναν υποδοχέα κινάσης τυροσίνης (RET) που εκφράζεται από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας. Υπάρχουν τέσσερις διαφορετικοί προσδέτες του (GDNF: glial-derived neurotrophic factor, NRTN: neurturin, ARTN: artemin, PSPN: persephin) και η δέσμευσή τους προϋποθέτει την έκφραση δευτέρων υποδοχέων (coreceptors) (GFRa1, GFRa2, GFRa3, GFRa4) (Για *Review* Βλπ *Heuckeroth, 2003*). Επιπλέον, μεταλλάξεις στο Sox-10 (μεταγραφικός παράγοντας sry-related) γονίδιο, έχουν δείχθει να διαδραματίζουν ρόλο στην ασθένεια. Συνολικά, έχουν ανιχνευτεί μέχρι σήμερα 6 διαφορετικά γονίδια που εμπλέκονται στην ασθένεια (*Ret, Gdnf, Ednrb, Et-3, Ece-1, Sox-10*) με ποικίλους τρόπους (*Martucciello et al., 2000*). Το γεγονός ότι τα διαφορετικά αυτά σηματοδοτικά μονοπάτια αλληλεπιδρούν, κάνει το σύστημα δύσκολο ως προς τη μελέτη του. Έτσι, για την πλήρη κατανόηση της λειτουργίας και ανάπτυξης του εντερικού νευρικού συστήματος, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν συνδυαστικές μελέτες σε διαγονιδιακά και σε knockout ζώα. Τα προβλήματα που θα παρουσιάζονται σε αυτά τα ζώα θα πρέπει εν συνεχεία να συσχετιστούν με λεπτομερείς παθολογικές και ιστολογικές μελέτες των ασθενών με τελικό σκοπό την ευκολότερη διάγνωση και αντιμετώπιση του προβλήματος.

# **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Arai H., Hori S., Aramori I., Ohkubo H., and Nakanishi S. (1990) Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature (Lond)* 348:730-732.

Baynash AG., Hosoda K., Giaid A., Richardson JA., Emoto N., Hammer RE. and Yanagisawa M. (1994) Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 79: 1277-1285.

Bloch KD., Friedrich SP., Lee ME., Eddy RL., Shows TB., Quertermous T. (1989) Structural organization and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin. *J Biol Chem* 18: 10851-10857.

Bronner-Frasser M. (1993) Neural crest cell migration in the developing embryo. *Trends In Cell Biology* 3: 392-397.

Burns AJ., and Le Douarin NM. (1998) The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Development* 125: 4335-4347.

Chalazonitis A., Tennyson VM., Kibbey MC., Rothman TP. and Gershon MD. (1997) The  $\alpha$ -1 subunit of laminin-1 promotes the development of neurons by interacting with LBP110 expressed by neural crest-derived cells immunoselected from the fetal mouse gut. *J Neurobiol* 33: 118-138.

Crammer H., Schmenger H., Heinrich K. , Horstmeyer A., Boning H., Breit A, Piiper A., Lundstorm K., Esterl W., Schroeder C. (2001) Coupling of endothelin receptors to the ERK/MAP kinase pathway. Roles of palmitoylation and  $G_{\alpha_q}$ . *Eur J Biochem* 268: 5449-5459.

Daveport AP. (2002) International union of pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 54: 219-226.

Durbec PL., Larsson-Blomberg LB., Schuchardt A., Costantini F., Pachnis V. (1996) Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts. *Development* 122: 349-358.

Gariépy CH. (2001) Intestinal motility disorders and development of the enteric nervous system. *Pediatric Research* 49: 605-613.

Gershon MD., Erde SM. (1981) The nervous system of the gut. *Gastroenterology* 80: 1571

Gershon MD., Kirchggesner AL., Wade PR. (1994) Functional anatomy of the enteric nervous system. *Physiol gastroint tract* 1: 381-422.

Goraca A. (2002) New views on the role of endothelin. *Endocrine Regulations* 36: 161-167

Heuckeroth R. (2003) Finding your way to the end: A tale of GDNF and Endothelin-3. *Neuron* 40: 871-879

Hosoda K., Hammer RE., Richardson JA., Baynash AG., Cheung JC., Giaid A. and Yanagisawa M. (1994) Targeted and natural (piebaldlethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 79: 1267-1276.

Inoue A., Yanagisawa M., Kimura S., Kasuya Y., Miyauchi T., Goto K. and Masaki T. (1989) The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2863-2867.

Inoue A., Yanagisawa M., Takuwa Y., Mitsui Y., Kobayashi M., Masaki T. (1989) The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem* 25: 14954-14959.

Karne S., Jayawickreme CK., Lerner MR. (1993) Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* 268: 19126-19133.

Kapur R.P. (2000) Colonization of the murine hindgut by sacral crest-derived neural precursors: experimental support for an evolutionarily conserved model. *Dev Biol* 227 : 146-155.

Lahav R., Ziller C., Dupin E., Le Douarin NM. (1996) Endothelin 3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3892-3897.

Lecoin L., Sakurai T., Ngo MT., Abe Y., Yanagisawa M. and Le Douarin NM. (1998). Cloning and characterization of a novel endothelin receptor subtype in the avian class. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3024-3029.

Lee HO., Levorse JM. and Shin MK. (2003) The endothelin receptor- B is required for the migration of neural crest-derived melanocyte and enteric neuron precursors. *Dev Biol* 259: 162-175.

Le Douarin NM., Teillet MA. (1973) The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol* 30: 31-48.

Masaki T. (2004) Historical review: Endothelin. *Trends in Pharmacological Sciences* 25: 219-224.

Martucciello G., Ceccherini I., Lerone M., Jasonni V. (2000) Pathogenesis of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 35: 1017-1025.

McCallion AS., Chakravati A. (2001) EDNRB/ET-3 and Hirschsprung's disease type II. *Pigment cell Res* 14: 161-169.



Nataf V., Lecoin L., Eichmann A. and Le Douarin NM. (1996) Endothelin-B receptor is expressed by neural crest cells in the avian embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9645-9650.

Natarajan D., Marcos-Gutierrez C., Pachnis V. and De Graaff E. (2002) Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. *Development* 129: 5151-5160.

Pla P. and Larue L. (2003) Involvement of endothelin receptors in normal and pathological development of neural crest cells. *Int J Dev Biol* 47: 315-325.

Puffenberger EG., Hosoda K., Washington SS., Nakao K., deWit D., Yanagisawa M., and Chakravart A. (1994) A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell* 79: 1257-1266.

Reid K., Turnley AM., Maxwell GD., Kurihara Y., Kurihara H., Bartlett PF., Muphy M. (1996) Multiple roles of endothelin in melanocyte development: regulation of progenitor number and stimulation of differentiation. *Development* 122: 3911-3919.

Sakurai T., Yanagisawa M., Takuwa Y., Miyazaki H., Kimura S., Goto K. and Masaki T. (1990) Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature (Lond)* 348: 732-735.

Sasaki Y., Hori S., Oda K., Okada T. and Takimoto M. (1998) Both ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors are involved in mitogen-activated protein kinase activation and DNA synthesis of astrocytes: study using ET<sub>B</sub> receptor deficient rats. *Eur J Neur* 10: 2984-2993.

Shimada K., Takahashi N., Tanzawa K. (1994) Cloning and functional expression of endothelin converting enzyme from rat endothelial cells. *J Biol Chem* 269: 18275-18278.

Shin MK., Levorse JM., Ingram RS. and Tilghman SM. (1999) The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development. *Nature* 402: 496-501.

Steel KP., Bussoli TJ. (1999) Deafness genes. Expression of surprise. *TIG* 15: 207-211.

Taraviras S., Pachnis V. (1999) Development of the mammalian enteric nervous system. *Curr Opin Genet Dev* 9: 321-327.

Tsaur ML., Wan Y., Lai F., Cheng HF. (1997) Expression of B-type endothelin receptor gene during neuronal development. *FEBS Letters* 417: 208-212

Vander MA., Sherman, Luciano, Τσακόπουλος, Γελαδάς. (2001) Φυσιολογία του ανθρώπου. Έκδοση 8<sup>η</sup>. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης

Wu JJ., Chen JX., Rothman TP. and Gershon MD. (1999) Inhibition of in vitro enteric neuronal development by endothelin-3: mediation by endothelin B receptors. *Development* 126: 1161-1173.

Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tombe Y., Kobayashi M. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415.

Young HM., Hearn CJ., Ciampoly D., Southwell BR., Brunet J., Newgreen DF. (1998) A single rostrocaudal colonization of the rodent intestine by enteric neuron precursors is revealed by the expression of *phox2b*, *ret*, *p75* and by explants grown under the kidney capsule or in organ culture. *Dev Biol* 202: 67-84.