



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

Διδρυματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
Μοριακή-Κυτταρική Βιολογία και Βιοτεχνολογία

**Πειραματικό πρότυπο *Fmr1* KO - Μελέτη έκφρασης
νευροβιολογικών δεικτών που σχετίζονται με την πλαστικότητα σε
εγκεφαλικές περιοχές που υποστηρίζουν γνωστικές λειτουργίες**

Διατριβή Μεταπτυχιακής Ειδίκευσης

Γεράσιμος Νάκας
Βιολόγος

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Κατερίνα Αντωνίου

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2022

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Φαρμακολογίας κυρίας Κατερίνας Αντωνίου, κατά το χρονικό διάστημα 2021 - 2022. Ολοκληρώνοντας την θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίηση της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Ευστάθιο Φριλίγγο, Καθηγητή Βιολογικής Χημείας και διευθυντή του Δ.Π.Μ.Σ. «Μοριακή-Κυτταρική Βιολογία και Βιοτεχνολογία» καθώς και την επιτροπή επιλογής, που ενέκριναν την ένταξή μου στο συγκεκριμένο πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών κατά το ακαδημαϊκός έτος 2020 - 2021.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Κατερίνα Αντωνίου, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψή της, έχοντας μια άριστη συνεργασία με συνεχή επικοινωνία, υποστήριξη, καθοδήγηση και έμπρακτο ενδιαφέρον για την πορεία της εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας κυρία Αναστασία Πολίτου, την Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας κυρία Θωμαΐς Παπαμαρκάκη, τον Καθηγητή Βιολογικής Χημείας κύριο Ευστάθιο Φριλίγγο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας κύριο Γεώργιο Λεονταρίτη που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην πενταμελή εξεταστική επιτροπή.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω και στα μέλη του εργαστηρίου, στους υποψήφιους διδάκτορες Όλγα Τσαρνά, Χάρη Μπρακατσέλο και Γιώργο Ντούλα καθώς και τον συνεργάτη Μιχάλη Ασπρογέρακα, για την έμπρακτη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές τους, τις γνώσεις και δεξιότητες που μου μετέδωσαν, την υποστήριξη, την αρμονική συνεργασία και το φιλικό κλίμα που επικρατούσε όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους φίλους και την οικογένειά μου που με υποστήριξαν και ήταν δίπλα μου κάθε φορά που τους χρειάστηκα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το σύνδρομο του εύθραυστου X (Fragile X Syndrome, FXS) είναι η κυρίαρχη μονογονιδιακή αιτία αυτισμού και νοητικής υστέρησης που προκαλείται από την έλλειψη της πρωτεΐνης FMRP. Η απουσία της κατά την ανάπτυξη και η αλληλεπίδρασή της με τη γλουταματεργική νευροδιαβίβαση φαίνεται να οδηγούν σε γνωστικά ελλείματα και απορρύθμιση της συναπτικής πλαστικότητας. Αν και το μοντέλο του *Fmr1* KO επίμου παρέχει πρόσθετη μεταφραστική εγκυρότητα σε σχέση με αυτό του *Fmr1* KO μυ, οι μελέτες στις οποίες έχει αξιοποιηθεί είναι περιορισμένες. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε καταγραφή του κινητικού και γνωστικού προφίλ ενηλίκων *Fmr1* KO και αγρίου τύπου (WT) επιμύων μέσω συγκεκριμένων συμπεριφορικών δοκιμασιών. Επιπλέον, αξιολογήθηκαν τόσο η πρωτεϊνική έκφραση υπομονάδων των γλουταματεργικών AMPA/NMDA υποδοχέων και του μονοπατιού BDNF/TrkB μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, όσο και τα επίπεδα του γλουταμικού μέσω HPLC-ED σε εγκεφαλικές περιοχές που σχετίζονται με τις γνωστικές λειτουργίες και τη νευροπλαστικότητα.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ένα προφίλ υπερκινητικότητας για τους *Fmr1* KO επίμους και έλλειμα ως προς το πρότυπο έκφρασης μη συνειρμικής, χωρικής και αναγνωριστικής μνήμης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης υπομονάδων των NMDAR και AMPAR στον προμετωπιαίο φλοιό, ενώ μείωση στον ιππόκαμπο των *Fmr1* KO. Γονοτυπικές διαφορές με ιστο-ειδικό πρόσρημο προέκυψαν και για τα πρωτεϊνικά επίπεδα του νευροτροφικού παράγοντα BDNF. Τα νευροχημικά ευρήματα ανέδειξαν μείωση των επιπέδων του γλουταμικού με αυξημένο ρυθμό ανακύκλυσής του στον προμετωπιαίο φλοιό, ενώ τα επίπεδα γλουταμικού ήταν αυξημένα στον ιππόκαμπο των KO συγκριτικά με τους WT επίμους. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν συμπεριφορικές μεταβολές και απορρύθμιση ως προς τη γλουταματεργική διαβίβαση και διαδικασίες συναπτικής πλαστικότητας.

ABSTRACT

Fragile X Syndrome (FXS) is the most common single gene cause of autism and intellectual disabilities, caused by the lack of the FMRP protein. This deficiency during brain development and its interaction with glutamatergic neurotransmission appear to lead to cognitive deficits and dysregulation of synaptic plasticity. Although the *Fmr1* KO rat model provides higher translational validity in relation to *Fmr1* KO mice, its use in experimental studies is limited due to its infancy status. In the present study, the motor activity and cognitive profile of *Fmr1* KO and wild type (WT) rats were assessed. Moreover, both protein expression of AMPA/NMDA glutamate receptor subunits and the BDNF/TrkB pathway were evaluated using Western immunoblotting, and finally glutamate tissue levels were estimated by HPLC-ED, in brain regions associated with cognitive function and neuroplasticity.

The results of the present study showed hyper locomotor activity in *Fmr1* KO rats and deficits in non-associative, spatial and recognition memory. In addition, there was an increase in the protein expression levels of NMDAR and AMPAR subunits in the prefrontal cortex, while a decrease was observed in the hippocampus of *Fmr1* KO. Genotypic and tissue-specific differences were also observed with respect to the protein levels of the neurotrophic factor BDNF. Neurochemical results showed a decrease in glutamate levels with an increased recycling rate in the prefrontal cortex, while glutamate levels were elevated in the hippocampus of the KO compared to WT rats. Our results indicate behavioral changes and dysregulation of glutamate transmission and synaptic plasticity processes in *Fmr1* KO rat model as compared to WT counterparts.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
CA	<i>Cornu ammonis</i>
d.hipp	dorsal hippocampus
EAATs	Excitatory Amino Acid Transporters
FMR1	Fragile X Mental Retardation type 1
FMRP	Fragile X Mental Retardation Protein
FX-hESC	Fragile X - human Embryonic Stem Cells
FXPOI	Fragile X - Associated Primary Ovarian Insufficiency
FXR1P	Fragile X related protein 1
FXR2P	Fragile X related protein 2
FXS	Fragile X Syndrome
FXTAS	Fragile X - Associated Tremor/Ataxia Syndrome, FXTAS
hiPSCs	human - induced Pluripotent Stem Cells
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KO	Knock Out
LTD	Long-term Depression
LTP	Long-term Potentiation
NES	Nuclear Export Signal
NLS	Nuclear Localization Signal
PFC	Prefrontal Cortex
STP	Short-term plasticity
v.hipp	ventral hippocampus
vGluTs	vesicular Glutamate Transporters
WT	Wild Type

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iv
ABSTRACT.....	v
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	vi
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Σύνδρομο Εύθραυστου Χ.....	2
1.1.1 Εισαγωγικά στοιχεία.....	2
1.1.2 Επιπολασμός και Φαινοτυπικά Χαρακτηριστικά.....	2
1.1.3 Γονίδιο FMR1.....	4
1.1.4 Πρωτεΐνη FMRP.....	6
1.3.6 Μοντέλα μελέτης FXS.....	9
1.2 Γνωστικές λειτουργίες και συναπτική πλαστικότητα.....	10
1.2.1 Εγκεφαλικές περιοχές και γνωστικές λειτουργίες.....	10
1.2.2 Συναπτική πλαστικότητα.....	14
1.2.3 Σηματοδότηση BDNF.....	16
1.3 Γλουταματεργικό σύστημα.....	18
1.3.1 Γλουταμικό.....	18
1.3.2 Υποδοχείς γλουταμικού.....	21
1.4 Νευροβιολογικοί μηχανισμοί FXS.....	27
1.5 Σκοπός.....	32
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	33
2.1 Πειραματόζωα.....	34
2.2 Συμπεριφορικές δοκιμασίες.....	35
2.2.1 Δοκιμασία Ανοικτού Πεδίου (Open Field Test, OFT).....	35
2.2.2 Δοκιμασία Αναγνώρισης Θέσης Αντικειμένου (Object Location Task, OLT) ...	36
2.2.3 Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου (Object Recognition Task, ORT)38	
2.3 Θυσία πειραματοζώων και απομόνωση εγκεφαλικών περιοχών.....	39
2.4 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blotting).....	40
2.4.1 Ομογενοποίηση Ιστών (Ολικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών).....	40
2.4.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ολικών πρωτεϊνών.....	41
2.4.3 Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση.....	43
2.4.4 Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS PAGE).....	44

2.4.5 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών (Transfer) και χρώση της μεμβράνης (Ponceau)	45
2.4.6 Ανοσοαποτύπωση	46
2.4.7 Οπτικοποίηση μπαντών και ποσοτικοποίηση	48
2.5 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	49
2.5.1 Οργανολογία Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης	50
2.5.2 Σχεδιασμός πειραματικής διαδικασίας.....	54
2.6 Στατιστική Ανάλυση.....	59
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	61
3.1 Συμπεριφορικές Δοκιμασίες	62
3.1.1. Δοκιμασία Ανοικτού Πεδίου (Open Field Test)	62
3.1.2 Δοκιμασία Αναγνώρισης Θέσης Αντικειμένου (OLT)	63
3.1.3 Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου (ORT).....	63
3.2 Western Blotting.....	63
3.2.1 Υποδοχείς NMDA	63
3.2.2 Υποδοχείς AMPA.....	66
3.2.3 BDNF – TrkB.....	68
3.3 Νευροχημική Ανάλυση	70
3.3.1 Προμετωπιαίος Φλοιός	70
3.3.2 Ραχιαίος ιππόκαμπος	71
3.3.3 Κοιλιακός ιππόκαμπος	72
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	73
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	83
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	89

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σύνδρομο Εύθραυστου Χ

1.1.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Το σύνδρομο του εύθραυστου Χ (Fragile X Syndrome, FXS) είναι η πιο κοινή αιτία κληρονομούμενης νοητικής υστέρησης καθώς αντιστοιχεί στο 1-2% όλων των περιπτώσεων, ενώ επίσης αποτελεί και την κυρίαρχη μονογονιδιακή αιτία αυτισμού. Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1943 από τους James Purdon Martin και Julia Bell ως ένα οικογενές σύνδρομο νοητικής υστέρησης που επηρέαζε κυρίως τους άντρες οι οποίοι μάλιστα εμφάνιζαν δυσμορφικά χαρακτηριστικά και μακροορχιδισμό (Martin and Bell, 1943). Το 1969 ο Herbert Lubs συσχέτισε το σύνδρομο αυτό με έναν κυτταρογενετικό δείκτη και συγκεκριμένα με την ύπαρξη ευθραυστότητας στο άκρο του μακριού βραχίονα του χρωμοσώματος Χ, δίνοντας έτσι την ονομασία σύνδρομο εύθραυστου Χ (Lubs, 1969). Το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για το σύνδρομο αναγνωρίστηκε το 1991 από τρεις ομάδες που εργάστηκαν ανεξάρτητα δίνοντας του την ονομασία *FMR1* (Fragile X Mental Retardation type 1). Ειδικότερα, αναφέρθηκε για πρώτη φορά η παρουσία μιας «δυναμικής μετάλλαξης» στο γονίδιο αυτό, δηλαδή μια επέκταση της τριπλέτας των βάσεων CGG η οποία αυξάνει μεταξύ των γενεών (Oberlé *et al.*, 1991; Verkerk *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1991). Έκτοτε, έχουν διεξαχθεί διάφορες μελέτες για να περιγραφεί ο κλινικός φαινότυπος των ατόμων, ενώ μέχρι και σήμερα συνεχίζονται μελέτες προκειμένου να αποσαφηνιστούν οι υποκείμενοι μοριακοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί ώστε να αναπτυχθούν κατάλληλες θεραπευτικές προσεγγίσεις (Mila *et al.*, 2018).

1.1.2 Επιπολασμός και Φαινοτυπικά Χαρακτηριστικά

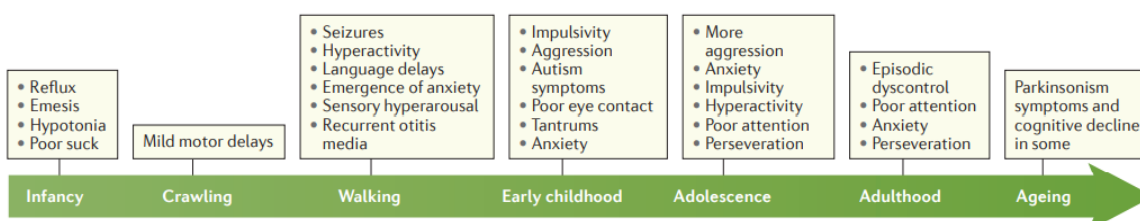
Η συχνότητα εμφάνισης του FXS στον πληθυσμό αντιστοιχεί σε 1 ανά 5.000 για τα αρσενικά άτομα, ενώ στα θηλυκά 1 ανά 4.000-8.000, κάτι που υποδηλώνει μεγαλύτερη διακύμανση στα θηλυκά άτομα λόγω της τυχαίας απενεργοποίησης του χρωμοσώματος Χ. Τα φυσικά χαρακτηριστικά του FXS περιλαμβάνουν μακρύ πρόσωπο με προεξέχοντα αυτιά, υπερεκτατές αρθρώσεις δακτύλων, πλατυποδία, και μακροορχιδισμός που αναπτύσσεται κατά την εφηβεία (Heulens *et al.*, 2013; Kidd *et al.*, 2014). Σημειώνεται βέβαια ότι, οι τροποποιήσεις στα φυσικά

χαρακτηριστικά δεν είναι εμφανείς σε όλους τους ασθενείς, ιδίως στην περίπτωση των θηλυκών ατόμων που εμφανίζουν πιο ήπια συμπτωματολογία (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Φυσικά χαρακτηριστικά του FXS. Α) Απεικονίζονται 3 αδέρφια με FXS τα οποία παρουσιάζουν φαινοτυπικές τροποποιήσεις όπως προεξέχοντα αυτιά καθώς επίσης και στερεοτυπικές κινήσεις. Β) Η μητέρα με την κόρη της η οποία έχει FXS χωρίς ωστόσο να εμφανίζει κάποιο φαινοτυπική αλλοίωση (Hagerman et al., 2017).

Όσον αφορά τα κλινικά χαρακτηριστικά, αυτά παρουσιάζουν μια βαθμιαία εμφάνιση και εξέλιξη με το πέρασμα της ηλικίας (Εικόνα 2). Από την βρεφική ηλικία παρατηρούνται συμπτώματα όπως υποτονία και εμετός, ενώ μετέπειτα αρχίζουν να εμφανίζονται συχνά κινητικές δυσκολίες και προβλήματα στην όραση. Κατά την παιδική ηλικία εκτός από υπερκινητικότητα, τα παιδιά μπορεί να εμφανίσουν επιληπτικές κρίσεις και διαταραχές που εμπίπτουν στο φάσμα του αυτισμού (Berry-Kravis et al., 2010; Hogan et al., 2017). Ένα εύρος της αρχικής συμπτωματολογίας όπως η αγχώδης διαταραχή διατηρείται μέχρι και την ενήλικη ζωή, ενώ κατά τη γήρανση είναι πιθανό να εμφανιστούν ακόμη και κλινικά χαρακτηριστικά παρκινσονικού συνδρόμου (Hagerman et al., 2017).

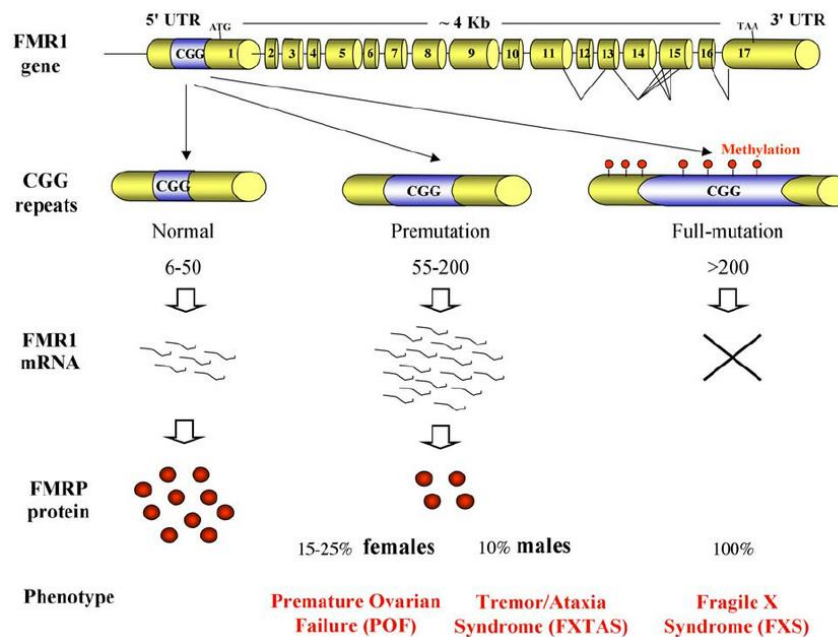


Εικόνα 2. Κλινικά χαρακτηριστικά FXS. Αναγράφονται βασικά συμπτώματα που εμφανίζουν τα άτομα με το πέρασμα της ηλικίας (Hagerman et al., 2017).

1.1.3 Γονίδιο FMR1

Το γονίδιο *FMR1* εδράζεται στο χρωμόσωμα X (Xq27.3), έχει μέγεθος περίπου 40 kilobases (kb), περιλαμβάνει 17 εξώνια και κωδικοποιεί ένα μόριο mRNA της τάξης των 3.9 kb, αν και μπορεί να υποστεί εναλλακτικό μάτισμα. Αποτελεί ένα καλά συντηρημένο γονίδιο μεταξύ των ειδών, καθώς εντοπίζεται από την *Drosophila melanogaster* μέχρι τον *Homo sapiens* σε υψηλή ομολογία. Στην αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου (5'-UTR) είναι χαρακτηριστική η επανάληψη της τρινουκλεοτιδικής αλληλουχίας CGG (CpG island) η οποία φυσιολογικά κυμαίνεται από 6-50 επαναλήψεις περίπου, χωρίς να είναι μεθυλιωμένη και δρα ως υποκινητής (Ashley *et al.*, 1993; Eichler *et al.*, 1993). Υπάρχουν όμως περιπτώσεις όπου τα αλληλόμορφα μπορούν να περιέχουν αριθμό επαναλήψεων πέρα από το φυσιολογικό εύρος (**Εικόνα 3**). Πιο συγκεκριμένα, όταν οι επαναλήψεις είναι μεταξύ 45-60 (γκρι ζώνη), τα αλληλόμορφα αναφέρονται ως ενδιάμεσα και είναι σχετικά σταθερά, ενώ μπορούν να μεταβιβάζονται στις επόμενες γενεές με ένα ενδεχόμενο να μετατραπούν σε αλληλόμορφα σταδίου προ-μετάλλαξης. Στο στάδιο αυτό, αν και οι επαναλήψεις CGG κυμαίνονται από 55 έως 200, το γονίδιο παραμένει μεταγραφικά ενεργό χωρίς να έχει υποστεί μεθυλίωση η περιοχή CpG. Ωστόσο, παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα σύνθεσης της FMRP παρά τα πολύ αυξημένα επίπεδα του mRNA. Οι φορείς τέτοιων αλληλομόρφων αφενός έχουν σοβαρό ενδεχόμενο να αναπτύξουν κάποια διαταραχή όπως η πρωτοπαθής ωοθηκική ανεπάρκεια που σχετίζεται με το εύθραυστο X (Fragile X - Associated Primary Ovarian Insufficiency, FXPOI) (Allingham-Hawkins *et al.*, 1999) ή το σύνδρομο τρόμου - αταξίας που σχετίζεται με το εύθραυστο X (Fragile X - Associated Tremor/Ataxia Syndrome, FXTAS) (Hagerman *et al.*, 2001). Αφετέρου, δεδομένου ότι στο στάδιο αυτό οι επαναλήψεις τείνουν να αυξάνονται σε αριθμό σε κάθε κυτταρική διαίρεση, είναι πιθανό να επηρεαστούν οι απόγονοι αυτών των ατόμων. Στην περίπτωση που οι επαναλήψεις ξεπεράσουν τις 200 τότε τα αλληλόμορφα είναι στο στάδιο της πλήρους μετάλλαξης. Ειδικότερα, η περιοχή CpG είναι μεθυλιωμένη προκαλώντας έτσι μεταγραφική αποσιώπηση του γονιδίου με αποτέλεσμα να μην παράγεται καθόλου η πρωτεΐνη FMRP και να εκδηλώνεται το σύνδρομο FXS (Zalfa1 and Bagni 2004).

Η επίδραση που έχει στον φαινότυπο η παρουσία αλληλομόρφων με πλήρη μετάλλαξη διαφοροποιείται μεταξύ των δύο φύλων. Συγκεκριμένα, οι άνδρες που είναι φορείς της πλήρους μεταλλαγής εκδηλώνουν πάντα το σύνδρομο FXS, ενώ μόνο το 30-50% των γυναικών θα επηρεαστεί από την παρουσία αυτών των αλληλομόρφων. Αυτό οφείλεται στον μωσαϊκισμό που προκύπτει από την τυχαία απενεργοποίηση του ενός από τα δύο χρωμοσώματα X στα θηλυκά άτομα. Επίσης, διαφορές στον τύπο και την βαρύτητα των συμπτωμάτων που εκδηλώνουν οι ασθενείς οφείλονται συχνά στον μωσαϊκισμό όσον αφορά το βαθμό μεθυλίωσης στην περιοχή CpG. Όταν η μεθυλίωση δεν είναι πλήρης και επιτρέπεται σε ένα βαθμό η έκφραση της FMRP, τα άτομα χαρακτηρίζονται από πιο ήπια συμπτωματολογία (Mila *et al.* 2018).



Εικόνα 3. Το γονίδιο *FMR1*. Φυσιολογικά στην περιοχή 5'-UTR υπάρχουν έως 50 επαναλήψεις της αλληλουχίας CGG και το τμήμα αυτό δρα ως υποκινητής. Στο στάδιο προ-μετάλλαξης τα αντίγραφα της αλληλουχίας κυμαίνονται από 55-200 και παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα mRNA αλλά μειωμένα επίπεδα της πρωτεΐνης FMRP. Αν τα αντίγραφα ξεπεράσουν σε αριθμό τα 200 τότε ο υποκινητής υφίσταται μεθυλίωση με αποτέλεσμα την πλήρη αποσιώπηση του γονιδίου χωρίς να παράγεται πρωτεΐνη. Σημειώνεται ότι αν και το σύνδρομο FXS εκδηλώνεται με την πλήρη μετάλλαξη του γονιδίου, οι φορείς των αλληλομόρφων προ-μετάλλαξης μπορεί να αναπτύξουν άλλες διαταραχές (Zalfa1 and Baghi, 2004).

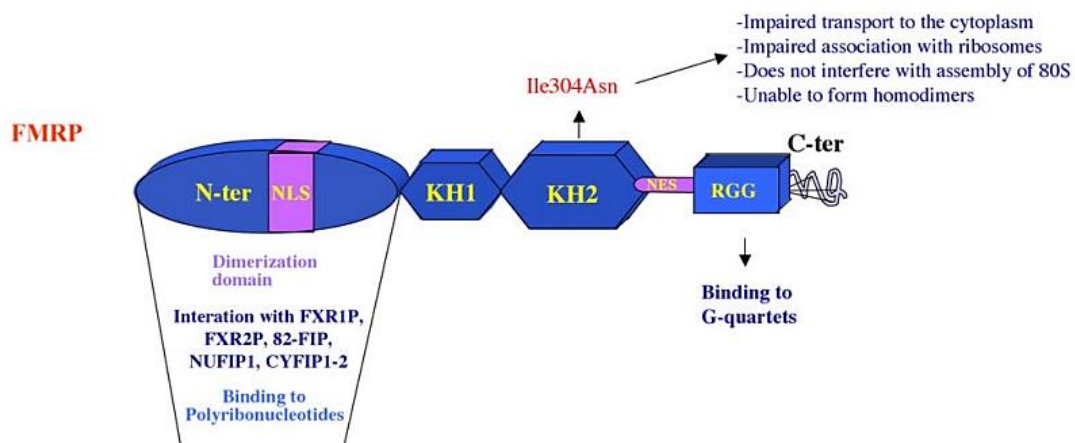
Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει η επέκταση της αλληλουχίας CGG δεν είναι γνωστός αν και έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα. Η επικρατέστερη άποψη αφορά τροποποιήσεις στις θέσεις έναρξης της αντιγραφής με ταυτόχρονη

στασιμότητα και διολίσθηση της DNA πολυμεράσης στις CGG επαναλήψεις με αποτέλεσμα να προκαλείται επέκταση και αστάθεια. Ο βασικός λόγος που εμποδίζει να αποσαφηνιστεί ο υποκείμενος μηχανισμός είναι ότι η αστάθεια των επαναλήψεων και κατ' επέκταση η αποσιώπηση του γονιδίου συμβαίνουν κατά την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη. Επομένως, για την μελέτη χρειάζονται ανθρώπινα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (Gerhardt *et al.*, 2014). Αξίζει να σημειωθεί ότι, παρόλο που το 98% των περιπτώσεων με FXS αφορά την επέκταση της τρινουκλεοτιδικής αλληλουχίας, το 1-2% αφορά την ύπαρξη σημειακών μεταλλάξεων ή ελλειμάτων που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας του γονιδίου *FMR1*. Για αυτό προτείνεται σε ασθενείς που έχουν έναν κλινικό φαινότυπο αντίστοιχο με αυτό για το σύνδρομο FXS αλλά δεν είναι φορείς της πλήρους μετάλλαξης των επαναλήψεων, να ελέγχονται για πιθανές σημειακές μεταλλάξεις (Hirst *et al.*, 1995; Myrick *et al.*, 2014).

1.1.4 Πρωτεΐνη FMRP

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το γονίδιο *FMR1* ονομάζεται FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) και ανήκει σε μια μικρή οικογένεια πρωτεϊνών που περιλαμβάνει και τις σχετιζόμενες με το σύνδρομο X πρωτεΐνες FXR1P και FXR2P με τις οποίες έχει 60% ταυτότητα στην αμινοξική αλληλουχία. Η FXR1P σχετίζεται με την ανάπτυξη των σκελετικών και καρδιακών μυϊκών ινών, ενώ η FXR2P αν και έχει παρόμοιο ρόλο με την FMRP, δεν μπορεί να αντισταθμίσει πλήρως την απώλεια της όταν χρειάζεται (Chen and Joseph, 2015). Ειδικότερα, η FMRP είναι μια κυτταροπλασματική κατά βάση πρωτεΐνη που δεσμεύει μόρια RNA εκλεκτικά, ρυθμίζοντας έτσι τη μετάφραση των μορίων στόχων της. Εκφράζεται από την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη αλλά και μεταγεννητικά, με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης να εντοπίζονται στον εγκέφαλο και τα γεννητικά όργανα. Έχει πολύ σημαντικό ρόλο στην ομαλή ανάπτυξη των δενδριτών και την συναπτική πλαστικότητα, καθώς αλληλεπιδρά με πολυριβοσώματα προσκολλημένα στο ενδοπλασματικό δίκτυο αλλά και ελεύθερα ριβοσώματα στη βάση των δενδριτών και των ακάνθων ρυθμίζοντας έτσι τοπικά την πρωτεϊνοσύνθεση (Mila *et al.* 2018)

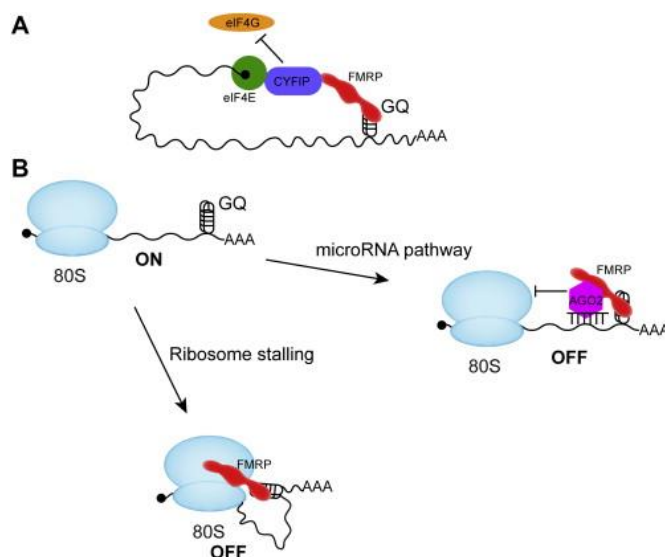
Το γονίδιο *FMR1* λόγω εναλλακτικού ματίσματος κωδικοποιεί συνολικά 11 γνωστές ισομορφές της FMRP στον άνθρωπο, που φέρουν μια υψηλά συντηρημένη αλληλουχία 400 περίπου καταλοίπων στο αμινοτελικό άκρο και μεταβλητές αλληλουχίες στο καρβοξυτελικό άκρο αναφορικά με τη συγγένεια δέσμευσης mRNA. Ειδικότερα, για τη δέσμευση μορίων RNA η FMRP περιλαμβάνει δύο περιοχές ομολογίας ριβονουκλεοπρωτεΐνης K (τομείς KH) και ένα σύμπλεγμα περιοχών πλούσιων σε αργινίνη και γλυκίνη (πλαίσιο RGG) (Εικόνα 4) (Zhang *et al.*, 2019). Είναι αξιοσημείωτο ότι μεταλλάξεις σε αυτές τις περιοχές έχουν ανιχνευθεί σε άτομα με FXS στα οποία ο αριθμός των CGG επαναλήψεων κυμαίνεται σε φυσιολογικά επίπεδα. Χαρακτηριστικά, η παρανοηματική μετάλλαξη Ile304Asn στον τομέα KH2 μειώνει τη σταθερότητα και τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης (De Bouille *et al.*, 1993; Valverde *et al.*, 2008). Επίσης, δραστικότητα πρόσδεσης RNA έχει βρεθεί και στο αμινοτελικό άκρο, ενώ αν και η FMRP είναι κατά βάση μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη φέρει μια αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS) και μία εξόδου από τον πυρήνα (Nuclear Export Signal, NES). Έτσι, μπορεί να μεταβαίνει μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος ρυθμίζοντας πιθανόν τη μεταφορά των μορίων mRNA (Zalfa and Bagni, 2004; Chen and Joseph, 2015).



Εικόνα 4. Δομικές και λειτουργικές επικράτειες της FMRP. Περιλαμβάνει τις περιοχές KH1, KH2 και RGG για δέσμευση μορίων RNA, ενώ υπάρχουν και αλληλουχίες εισόδου και εξόδου από τον πυρήνα. Επίσης, μέσω αλληλουχιών στο αμινοτελικό άκρο, μεσολαβείται διμερισμός, αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες ή δέσμευση σε πολυριβωσώματα (Zalfa and Bagni, 2004).

Η FMRP έχει κυρίως ανασταλτικό ρόλο όσον αφορά την πρωτεϊνοσύνθεση, με τη δράση της να εστιάζεται στην παρεμπόδιση είτε της έναρξης της μετάφρασης των μορίων mRNA είτε του σταδίου της επιμήκυνσης όπως προκύπτει από μελέτες

(**Εικόνα 5**) (Plante *et al.*, 2006; Napoli *et al.*, 2008; Edbauer *et al.*, 2010; Darnell *et al.*, 2011). Στην πρώτη περίπτωση, σύμφωνα με το προτεινόμενο μοντέλο, η FMRP αφού δεσμεύσει εκλεκτικά το μόριο mRNA στρατολογεί τον κυτταροπλασματικό παράγοντα CYFIP ο οποίος δεσμεύει τον παράγοντα eIF4E. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να εμποδίζεται η αλληλεπίδραση μεταξύ eIF4E και eIF4G και συνεπώς να μην σχηματίζεται το εναρκτήριο μεταφραστικό σύμπλοκο στην περιοχή της καλύπτρας στο 5' άκρο. Εναλλακτικά, αναφορικά με το στάδιο της επιμήκυνσης έχει δειχθεί ότι η FMRP αφενός μπορεί να στρατολογεί παράγοντες όπως οι Argonaute 2 και Dicer που συμμετέχουν στο microRNA μονοπάτι, που αποτελεί μετα-μεταγραφικό μηχανισμό ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης μέσω αναστολής της μετάφρασης ή αποικοδόμησης του mRNA. Αφετέρου, μπορεί να προσδένεται απευθείας στο ριβόσωμα εμποδίζοντας την πρόσδεση σε αυτό των μορίων tRNA και των παραγόντων επιμήκυνσης (Chen and Joseph, 2015). Η δράση της πάντως είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς φαίνεται να ρυθμίζει τη μετάφραση του 4-6% των μορίων mRNA στον εγκέφαλο, ενώ μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως μεθυλίωση της αργινίνης στην επικράτεια RGG ή φωσφορυλίωση σε συντηρημένα κατάλοιπα σερίνης επηρεάζουν σε υψηλό βαθμό τη δραστηριότητά της (Zhang *et al.*, 2019).



Εικόνα 5. Προτεινόμενα μοντέλα δράσης της FMRP για την αναστολή της μετάφρασης. Α) Η FMRP στρατολογεί τον παράγοντα CYFIP με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η αλληλεπίδραση μεταξύ eIF4E και eIF4G και να μην σχηματίζεται το εναρκτήριο μεταφραστικό σύμπλοκο. Β) Το στάδιο της επιμήκυνσης αναστέλλεται καθώς η FMRP προσελκύει παράγοντες που συμμετέχουν στο microRNA σύστημα αποσώπησης ή καθώς δεσμεύεται απευθείας στο ριβόσωμα και εμποδίζει την πρόσδεση των παραγόντων επιμήκυνσης (Chen and Joseph.,2015).

1.3.6 Μοντέλα μελέτης FXS

In vitro

Ο μοριακός και κυτταρικός φαινότυπος ανθρώπινης εμβρυϊκής σειράς βλαστοκυττάρων που φέρει την πλήρη μετάλλαξη για το *FMR1* (Fragile X - human Embryonic Stem Cells, FX-hESC) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 2007 (Eiges *et al.*, 2007). Μετέπειτα, με τη δημιουργία των πρώτων ανθρώπινων επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (human - induced Pluripotent Stem Cells, hiPSCs) μέσω επαναπρογραμματισμού, η αξιοποίηση των βλαστοκυττάρων για την μοντελοποίηση ασθενειών αναπτύχθηκε γρήγορα και στη συνέχεια εφαρμόστηκε στην έρευνα του FXS (Urbach *et al.*, 2010; Sheridan *et al.*, 2011). Ουσιαστικά, τα ανθρώπινα πολυδύναμα κύτταρα προσφέρουν ένα μέσο για την επιβεβαίωση όσων λαμβάνονται σε ζωικά μοντέλα και συγχρόνως αποκαλύπτουν νέες συνιστώσες για την παθοφυσιολογία του FXS που μπορεί να υπάρχουν μόνο στα ανθρώπινα κύτταρα. Δεδομένου ότι, τα κύτταρα που αναπτύσσονται *in vitro* δεν έχουν την πολυπλοκότητα και την επικοινωνία μεταξύ των διαφορετικών συστημάτων ενός οργανισμού, εξελίξεις όπως η δημιουργία οργανοειδών, ενός συνδυασμού δηλαδή διαφόρων κυτταρικών τύπων που θα προσομοιάζει τον ανθρώπινο εγκέφαλο, θεωρείται ότι αποτελεί έναν από τους μελλοντικούς στόχους της προκλινικής έρευνας του FXS (Telias, 2019).

In vivo

Τα ζωικά μοντέλα του FXS περιλαμβάνουν *Fmr1* knockout (KO) οργανισμούς όπως η «φρουτόμυγα» (*Drosophila*), το ψάρι ζέβρα (*Zebrafish*), ο μύς και ο αρουραίος ή επίμυς, με αυτό του μύς να είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο τόσο για βασική έρευνα όσο και για τις ακόλουθες προκλινικές δοκιμασίες (Wong *et al.*, 2020). Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκε για πρώτη φορά το 1994 και έκτοτε ανακαλύφθηκαν πληθώρα δεδομένων για τις μοριακές και κυτταρικές λειτουργίες της FMRP (The Dutch-Belgian Fragile X Consortium, 1994). Βέβαια, στην περίπτωση των *Fmr1* KO οργανισμών, η FMRP δεν εκφράζεται σε κανένα κύτταρο και ολόκληρη η ανάπτυξη του οργανισμού πραγματοποιείται απουσία της. Απεναντίας, στον άνθρωπο κατά τους πρώτους μήνες της εμβρυϊκής ανάπτυξης η επέκταση της CGG περιοχής προκαλεί ακανόνιστο πρότυπο έκφρασης της FMRP και μόνο σε

μεταγενέστερα στάδια αφού πραγματοποιηθεί υπερμεθυλίωση αυτής της περιοχής σταματά πλήρως η έκφραση της (Telias, 2019). Ωστόσο, παρόλο που δημιουργήθηκαν μετέπειτα μοντέλα μυών με επέκταση αυτών των CGG επαναλήψεων, το KO μοντέλο παραμένει το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο καθώς εμφανίζει πολλά από τα χαρακτηριστικά του συνδρόμου στον άνθρωπο (Hagerman *et al.*, 2017). Αν και οι *Fmr1* KO μυς είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι στη μελέτη του FXS, το μοντέλο του *Fmr1* KO επίμου θεωρείται ότι παρέχει πρόσθετη εγκυρότητα καθώς οι επίμυες διαθέτουν πιο σύνθετες γνωστικές ικανότητες σε σύγκριση με τους μυς (Ellenbroek and Youn, 2016). Οι προκλινικές μελέτες που αφορούν στο FXS και έχουν διεξαχθεί τα τελευταία 20 χρόνια, εστιάζουν κυρίως στο ρόλο της γλουταματεργικής και GABA-εργικής νευροδιαβίβασης στο νευροβιολογικό υπόβαθρο του FXS σε συνδυασμό με στοχεύσεις σε μεταβολές αναφορικά με δείκτες πλαστικότητας καθώς και νευρογένεσης (Bear *et al.*, 2004; Dölen and Bear, 2008; Braat and Kooy, 2015; Van der Aa and Kooy, 2020).

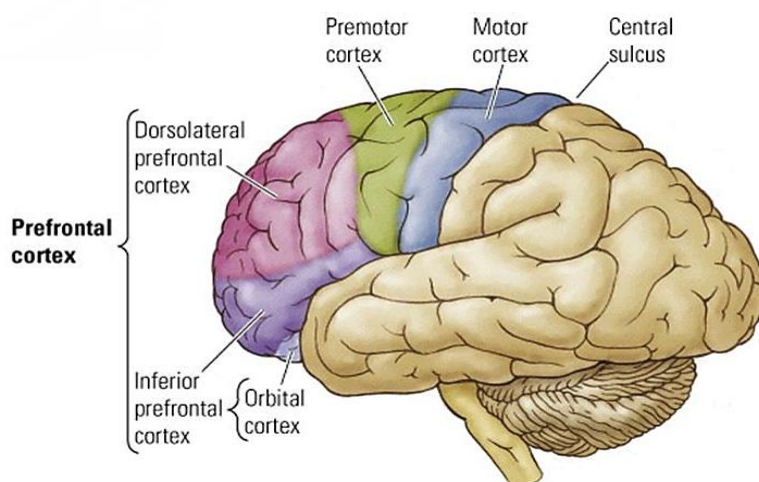
1.2 Γνωστικές λειτουργίες και συναπτική πλαστικότητα

1.2.1 Εγκεφαλικές περιοχές και γνωστικές λειτουργίες

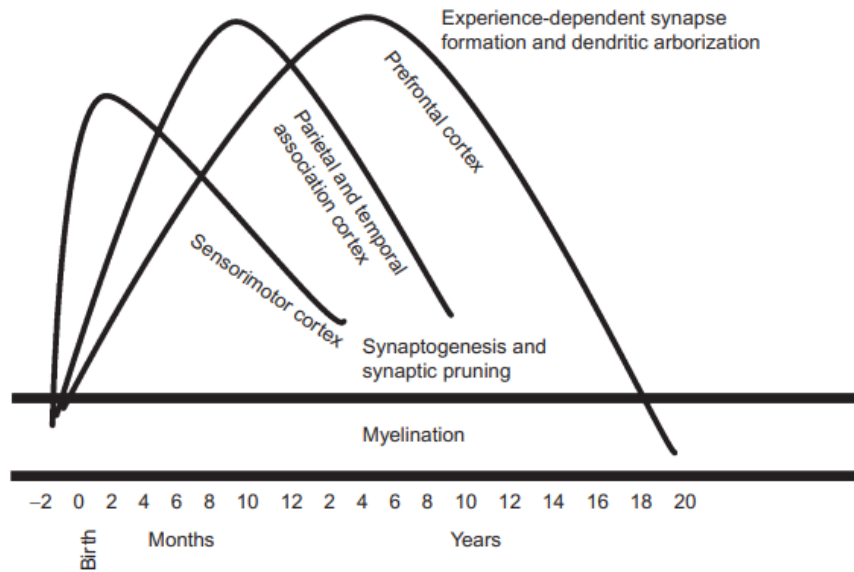
Προμετωπιαίος Φλοιός

Ο προμετωπιαίος φλοιός (Prefrontal Cortex, PFC) περιλαμβάνει ένα μεγάλο μέρος του μετωπιαίου φλοιού, ακριβώς μπροστά από τον πρωτογενή κινητικό και τον προκινητικό φλοιό (**Εικόνα 6**). Είναι χαρακτηριστικό ότι παρουσιάζει συνδεσιμότητα με σχεδόν όλα τα αισθητήρια νεοφλοιώδη και κινητικά συστήματα καθώς και με υποφλοιώδεις δομές όπως τα βασικά γάγγλια και ο ιππόκαμπος. Όσον αφορά τις λειτουργίες που επιτελεί, εμπλέκεται σε ανώτερες γνωστικές διεργασίες που ομαδοποιούνται υπό τον όρο «εκτελεστικές λειτουργίες» καθώς και με την επεξεργασία της γλώσσας, των συναισθημάτων και την κοινωνικότητα. Ειδικότερα, οι εκτελεστικές λειτουργίες περιλαμβάνουν την οργάνωση των εισροών από διάφορες αισθητηριακές οδούς, τη διατήρηση της προσοχής, τη διαχείριση πληροφοριών στη μνήμη εργασίας και τον συντονισμό των στοχευόμενων συμπεριφορών (Miller, 2000; Teffer and Semendeferi, 2012).

Ο PFC είναι μια από τις τελευταίες περιοχές του εγκεφάλου που ωριμάζει, όπως προκύπτει με βάση τους περισσότερους δείκτες ανάπτυξης και μάλιστα οι νευρώνες σε περιοχές που αναπτύσσονται αργότερα κατά τη διάρκεια της ζωής έχουν πιο πολύπλοκες δενδριτικές διακλαδώσεις από εκείνους που ωριμάζουν νωρίτερα, όπως ο πρωτογενής σωματοαισθητικός και ο πρωτογενής κινητικός φλοιός (**Εικόνα 7**) (Teffer and Semendeferi, 2012). Η ανάπτυξη του PFC χαρακτηρίζεται από αύξηση στην πρώιμη παιδική ηλικία, μείωση στην εφηβεία και στη συνέχεια ελαφρά αύξηση και σταθεροποίηση στην ενήλικη ζωή. Αυτό το μοτίβο πιστεύεται ότι συνδέεται με την ωρίμανση των κυκλωμάτων του φλοιού που αποτελούν τη βάση των λειτουργιών που σχετίζονται με τη γλώσσα, τη λήψη αποφάσεων, τον έλεγχο της προσοχής και τη μνήμη εργασίας (Caviness *et al.*, 1996; Giedd *et al.*, 1996; Casey *et al.*, 2005).



Εικόνα 6. Προμετωπιαίος φλοιός. Ανατομικά βρίσκεται μπροστά από τον κινητικό και προκινητικό φλοιό, ενώ παρουσιάζονται και περιοχές στις οποίες υποδιαιρείται.

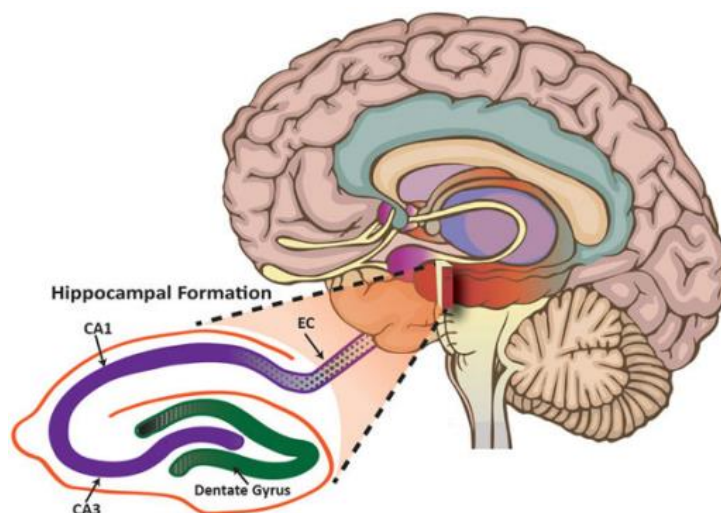


Εικόνα 7. Χρονική πορεία ωρίμανσης PFC. Απεικόνιση της χρονικής πορείας ανάπτυξης του φλοιού εστιάζοντας στον προμετωπιαίο, τον αισθητικοκινητικό και στον βρεγματικό-κροταφικό φλοιό. Τροποποίηση από Thompson και Nelson, 2001.

Ιππόκαμπος

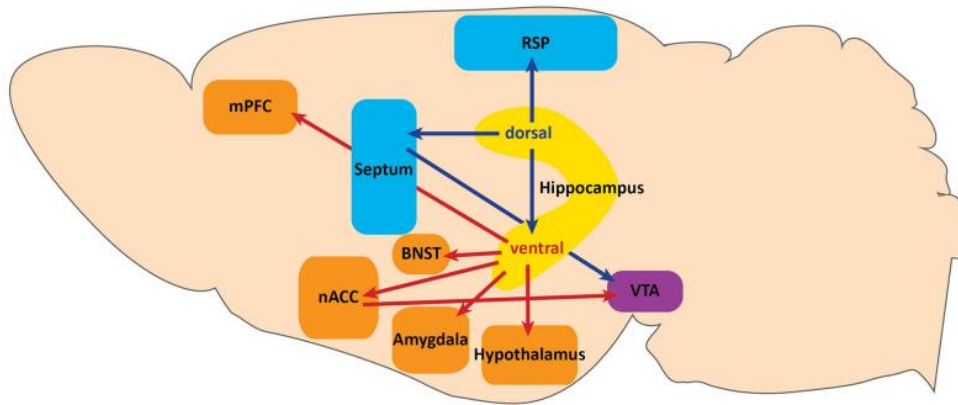
Ο ιπποκάμπειος σχηματισμός είναι μια υποφλοιώδης δομή σε σχήμα C στην άκρη του κροταφικού λοβού. Ο ιππόκαμπος ή αλλιώς «κέρας του Άμμωνος» (*Cornu ammonis*) αποτελεί ουσιαστικά μία από τις περιοχές του ιπποκάμπειου σχηματισμού, ενώ οι υπόλοιπες συμπληρώνονται από την οδοντωτή έλικα (*Dentate gyrus*), το υπόθεμα (*subiculum*) και τον ενδορρινικό φλοιό (Entorhinal cortex) (**Εικόνα 8**). Από τις κύριες λειτουργίες που επιτελεί είναι η μάθηση και η μνήμη ενώ μεταξύ άλλων εμπλέκεται στον χωρικό προσανατολισμό, τη συναισθηματική συμπεριφορά ως μέρος του μεταιχμιακού συστήματος¹ καθώς και στη ρύθμιση λειτουργιών του υποθαλάμου. Στον ιππόκαμπο ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά η ύπαρξη συναπτικής πλαστικότητας που περιγράφηκε με τον όρο μακροπρόθεσμη ενδυνάμωση (Long-term potentiation, LTP), ενώ είναι αξιοσημείωτο ότι στην υποκοκκιδώδη σιβάδα της οδοντωτής έλικας η νευρογένεση συνεχίζεται και κατά την ενήλικη ζωή (Anand and Dhikav, 2012; Schultz and Engelhardt, 2014).

¹ Το μεταιχμιακό σύστημα (limbic system) αναφέρεται σε ένα σύνολο δομών που βρίσκονται μεταξύ του φλοιού και του υποθαλάμου και σχετίζεται με το έλεγχο των συναισθημάτων, της συμπεριφοράς των κινήτρων, ενώ έχει σημαντικό ρόλο στη μνήμη και τη μάθηση.



Εικόνα 8. Ιπποκάμπειος σχηματισμός. Διακρίνεται ο ιππόκαμπος (*Cornu ammonis*, CA), η οδοντωτή έλικα (*Dentate gyrus*) και ο ενδορρινικός φλοιός (*Entorhinal cortex*, EC) (Vineyard et al., 2012).

Το γεγονός ότι ο ιππόκαμπος εμπλέκεται στη μνήμη και μάθηση αλλά παράλληλα και στον συναισθηματικό έλεγχο, οδήγησε σε λεπτομερή έλεγχο των νευρικών κυκλωμάτων που διέπουν τέτοιες φαινομενικά ανόμοιες διαδικασίες. Οι μελέτες έδειξαν ότι η έξοδος του ιπποκάμπου διαφέρει κατά μήκος του ραχιαίου-κοιλιακού άξονα, υποδεικνύοντας ότι ανάλογα με την περιοχή εξόδου, μπορεί να στρατολογηθούν διαφορετικές δομές (**Εικόνα 9**) (Tannenholz et al., 2014). Πιο συγκεκριμένα, οι προβολές από τον ραχιαίο ιππόκαμπο (dorsal hippocampus, d.hipp) σχετίζονται κυρίως με γνωστικές διαδικασίες εξαρτώμενες από το υφιστάμενο πλαίσιο. Χαρακτηριστικά, μέσω προβολών του στον πρόσθιο φλοιό του προσαγωγίου έχει δειχθεί ότι μπορεί να επηρεάζει άμεσα διεργασίες χωρικής μνήμης (Cenquizca and Swanson, 2007; Luo et al., 2011). Απεναντίας, οι προβολές από τον κοιλιακό ιππόκαμπο (ventral hippocampus, v.hipp) σχετίζονται κυρίως με την συναισθηματική έκφραση και την συμπεριφορά κινήτρων. Τέτοιες προβολές περιλαμβάνουν τον έσω προμετωπιαίο φλοιό (medial Prefrontal Cortex, mPFC), τον υποθάλαμο, την αμυγδαλή, το διάμεσο πυρήνα της τελικής ταινίας (Bed Nucleus of the Stria Terminalis, BNST) και την κοιλιακή καλυπτρική περιοχή (Ventral Tegmental Area VTA) μέσω του επικλινούς πυρήνα (Nucleus Accumbens, nACC) (Canteras and Swanson, 1992; Cullinan et al., 1993; McDonald, 1998; Cenquizca and Swanson, 2007; Cezario et al., 2008; Adhikari et al., 2010; Valenti et al., 2011).



Εικόνα 9. Προβολές κατά μήκος του ραχιαίου-κοιλιακού άξονα του ιπποκάμπου. Ο ραχιαίος ιππόκαμπος προβάλλει στην οπισθοσπληνική περιοχή (RSP) του πρόσθιου φλοιού του προσαγωγίου και στην κοιλιακή καλυπτική περιοχή (VTA) μέσω του διαφράγματος. Αυτές οι προβολές συμβάλλουν στις εξαρτώμενες από το πλαίσιο γνωστικές διαδικασίες. Οι προβολές από τον κοιλιακό ιππόκαμπο περιλαμβάνουν: τον έσω προμετωπιαίο φλοιό (mPFC), τον υποθάλαμο, την αμυγδαλή, το διάμεσο πυρήνα της τελικής ταινίας (BNST) και την VTA μέσω του επικλινούς πυρήνα (nACC). Οι κοιλιακές προβολές του ιπποκάμπου λειτουργούν για τη ρύθμιση της έκφρασης φόβου και του άγχους (Tannenholtz et al., 2014).

1.2.2 Συναπτική πλαστικότητα

Ο όρος πλαστικότητα αναφέρεται στην ικανότητα ενός μεμονωμένου οργανισμού ή κυττάρου να προσαρμόζει τον φαινότυπό του ως απόκριση στις περιβαλλοντικές τροποποιήσεις. Η πλαστικότητα είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό των συνάψεων του νευρικού συστήματος (Chistiakova et al., 2014). Η νευροπλαστικότητα, αλλιώς γνωστή ως πλαστικότητα του εγκεφάλου ή νευρική πλαστικότητα, είναι η ικανότητα των νευρικών συνάψεων και των οδών του εγκεφάλου να τροποποιούνται από αλλαγές στις σκέψεις και τα συναισθήματα, καθώς και από περιβαλλοντικά, συμπεριφορικά και νευρικά ερεθίσματα (Huttenlocher, 2009). Αυτές οι επαναλαμβανόμενες τροποποιήσεις συμβαίνουν καθώς ο εγκέφαλος “μαθαίνει” και διατηρεί νέα δεδομένα κατά την ανάπτυξή του, με τις περιττές νευρικές συνδέσεις να υφίστανται υποστροφή και ταυτόχρονα να ενισχύονται λειτουργικά οι απαραίτητες συνάψεις. Η συναπτική πλαστικότητα έχει μελετηθεί κατά κύριο λόγο για τις γλουταματεργικές συνάψεις εστιάζοντας κυρίως στον ιππόκαμπο, τον φλοιό και την παρεγκεφαλίδα (Kourosch-Arami et al. 2021).

Με βάση τη χρονική διάρκεια διατήρησης των αλλαγών, η συναπτική πλαστικότητα διακρίνεται σε βραχυπρόθεσμη ή μακροπρόθεσμη. Πιο συγκεκριμένα, η βραχυπρόθεσμη πλαστικότητα (Short-term plasticity, STP) έχει

διάρκεια από μερικά χιλιοστά του δευτερολέπτου έως αρκετά λεπτά και δεν απαιτεί τη μεταγραφή γονιδίων για τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών. Αυτή η φάση θεωρείται ότι μεσολαβείται κυρίως από σύντομες εκρήξεις δραστηριότητας που προκαλούν παροδική συσσώρευση του ασβεστίου στα άκρα των προσυναπτικών νευρώνων. Τα αυξημένα επίπεδα ασβεστίου προκαλούν αλλαγές στην πιθανότητα απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών τροποποιώντας άμεσα τις βιοχημικές διεργασίες που αποτελούν τη βάση της εξωκυττάρωσης των συναπτικών κυστιδίων, ενώ συγχρόνως, φωσφορυλιώσεις πρωτεϊνών μπορούν να επηρεάσουν και την ενσωμάτωση νέων υποδοχέων στις μετασυναπτικές θέσεις (Zucker and Regehr, 2002). Αυτές οι αλλαγές θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο σε βραχυπρόθεσμες προσαρμογές σε αισθητηριακές εισροές, παροδικές αλλαγές στις καταστάσεις συμπεριφοράς και βραχείας διάρκειας μορφών μνήμης (Citri and Malenka, 2008).

Όσον αφορά την μακροπρόθεσμη συναπτική πλαστικότητα, περιλαμβάνει αλλαγές που διαρκούν από ώρες μέχρι και μέρες, ενώ απαιτείται η σύνθεση νέων πρωτεϊνών για τη διατήρησή τους. Ειδικότερα, η μακροπρόθεσμη πλαστικότητα διακρίνεται σε μακροπρόθεσμη ενδυνάμωση (LTP) και μακροπρόθεσμη εξασθένηση (Long-term depression, LTD). Πειραματικά είχε βρεθεί ότι η σύντομη, υψηλής συχνότητας ενεργοποίηση γλουταματεργικών οδών του υπόκαμπου θα μπορούσε να προκαλέσει αύξηση της συναπτικής αποτελεσματικότητας. Αυτό το φαινόμενο που ονομάστηκε LTP, θεωρείται ότι αποτελεί τη βάση ορισμένων μορφών μνήμης (Nicoll *et al.*, 1988). Στο βασικό μοντέλο επαγωγής LTP, είναι καθοριστικός ο ρόλος των υποδοχέων του γλουταμικού AMPA και NMDA, καθώς απαιτείται η ταυτόχρονη παρουσία γλουταμικού αλλά και η επίτευξη ενός κατωφλίου μετασυναπτικής εκπόλωσης ώστε να επιτραπεί η είσοδος Ca^{2+} . Η εισροή Ca^{2+} ενεργοποιεί κινάσες και φωσφατάσες οι οποίες δρουν σε μια ποικιλία υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων διαύλων ιόντων, κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών αλλά και μεταγραφικών παραγόντων (Lisman, 2003). Σημαντικό ρόλο στην επαγωγή του LTP και γενικότερα στην εδραίωση της μνήμης και μάθησης έχουν νευροτροφικοί παράγοντες όπως ο BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) (Patterson *et al.*, 1992; Mattson, 2008). Απεναντίας, η διέγερση χαμηλής συχνότητας έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί LTD στον υπόκαμπο (Yang *et al.*, 1994). Αρκετοί παράγοντες έχουν

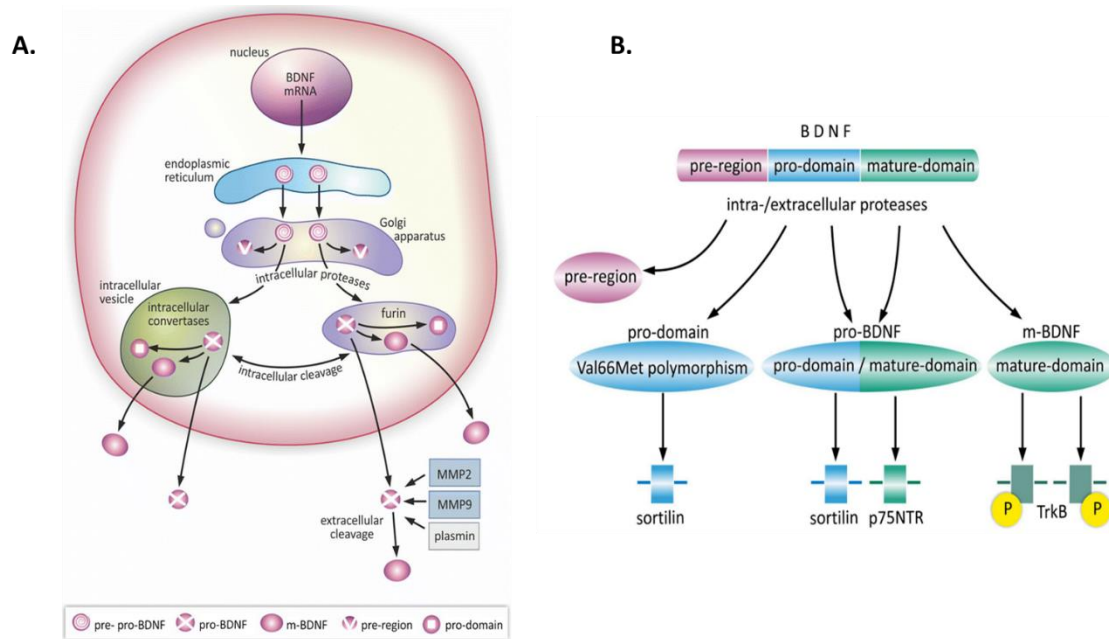
αναφερθεί ότι συμβάλλουν στην επαγωγή LTD όπως η υπερπόλωση μετασυναπτικών θέσεων, η ενεργοποίηση των υποδοχέων NMDA και των μη NMDA, η ενεργοποίηση των μεταβοτροπικών υποδοχέων γλουταμικού και η μέτρια μετασυναπτική εισροή Ca^{2+} . Σε κάθε περίπτωση, οι αλλαγές που προκαλούνται λόγω συναπτικής πλαστικότητας δεν είναι μόνιμες και υπάρχουν ρυθμιστικοί μηχανισμοί για να κρατούν σε ισορροπία την εναλλαγή μεταξύ LTP και LTD (Akhondzadeh, 1999).

1.2.3 Σηματοδότηση BDNF

Ο εγκεφαλικός νευροτροφικός παράγοντας, BDNF, είναι μία από τις πιο ευρέως διαδεδομένες και εκτενώς μελετημένες νευροτροφίνες στον εγκέφαλο των θηλαστικών. Ο BDNF είναι μέλος της οικογένειας των νευροτροφινών η οποία περιλαμβάνει επίσης τον νευρικό αυξητικό παράγοντα (Nerve Growth Factor, NGF), τη νευροτροφίνη 3 (Neurotrophin-3, NT3) και τη νευροτροφίνη 4 (Neurotrophin-4, NT4). Ανάμεσα στις σημαντικές λειτουργίες του περιλαμβάνονται ο έλεγχος της νευρωνικής και νευρογλοιακής ανάπτυξης, η συναπτογένεση, η νευροπροστασία και η ρύθμιση τόσο βραχυπρόθεσμων όσο και μακροπρόθεσμων συναπτικών αλληλεπιδράσεων, οι οποίες είναι κρίσιμες για τη μάθηση και τη μνήμη (Kowianski *et al.*, 2018).

Η μεταγραφή του BDNF εξαρτάται από τη νευρωνική δραστηριότητα και ρυθμίζεται από την εκπόλωση της μεμβράνης. Συγκεκριμένα, αύξηση στη συγκέντρωση ενδοκυττάριου Ca^{2+} μέσω ενεργοποίησης υποδοχέων γλουταμικού τύπου NMDA ή τασεολεγχόμενων διαύλων ασβεστίου τύπου L (L-VGCC) μετά από ένα εκπολωτικό ερέθισμα ξεκινά τη μεταγραφή του γονιδίου BDNF (Tao *et al.*, 1998). Ο εντοπισμός του BDNF είναι ως επί το πλείστον σωματοδενδριτικός εντός κυστιδίων πυκνού πυρήνα (59%), ενώ μόνο το 29% στοχεύει στους δενδρίτες. Η μετάφραση του μορίου mRNA του BDNF παράγει τον πρόδρομο προ-BDNF στο ενδοπλασματικό δίκτυο (**Εικόνα 10 A**). Έπειτα, μετατοπίζεται στη συσκευή Golgi, όπου η προ-αλληλουχία σήματος αποκόπτεται για να σχηματιστεί η προ-BDNF μορφή (30 kDa). Αυτή ακολούθως υποβάλλεται σε περαιτέρω επεξεργασία είτε ενδοκυτταρικά είτε εξωκυτταρικά, όπου η προ-περιοχή αποκόπτεται πρωτεολυτικά

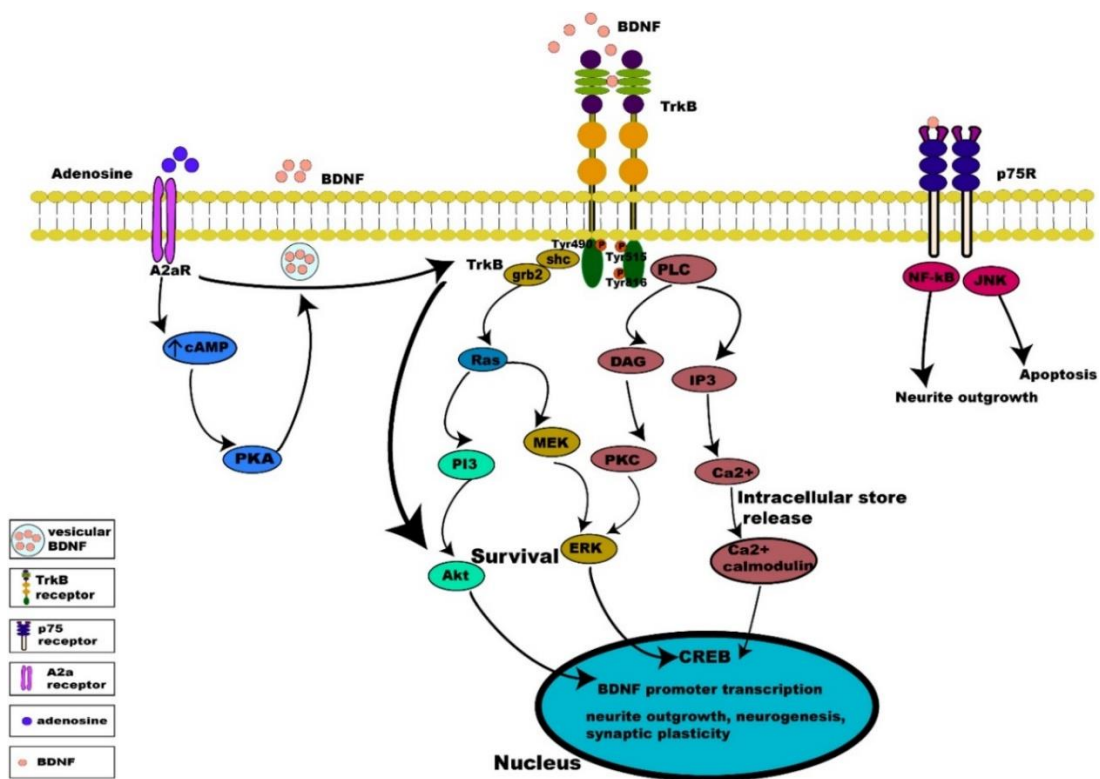
και προκύπτει ο ώριμος BDNF. Το τελικό μοριακό βάρος του BDNF είναι 14 kDa και αποτελείται από 119 αμινοξέα. Συνολικά, η σύνθεση, η επεξεργασία και η έκκριση του BDNF οδηγεί σε τρεις λειτουργικά ενεργές πρωτεΐνες: την προ-περιοχή του BDNF, τον προ-BDNF και τον ώριμο BDNF οι οποίοι αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς τους για να ασκήσουν τις λειτουργίες τους (**Εικόνα 10 B**) (Pradhan *et al.*, 2019).



Εικόνα 10. Α) Σύνθεση και ωρίμανση του BDNF. Η προ-προ μορφή του BDNF μεταφέρεται στο σύμπλεγμα Golgi για να παραχθεί ο προ-BDNF. Ακολουθώντας, είτε ενδοκυτταρικά μέσω της δράσης πρωτεασών όπως οι κονβερτάσες είτε εξωκυτταρικά μέσω μεταλλοπρωτεασών, αποκόπτεται η προ-περιοχή και παράγεται η ώριμη μορφή του BDNF. (B) Αλληλεπίδραση ισομορφών BDNF με τους αντίστοιχους υποδοχείς (Kowianski *et al.*, 2018).

Ο BDNF συνδέεται με υψηλή συγγένεια με τον υποδοχέα TrkB της οικογένειας των κινάσων τυροσίνης (tyrosine protein kinase receptors, Trk) και με χαμηλότερη συγγένεια με τον υποδοχέα p75. Οι υποδοχείς TrkB και p75 έχουν σωματοδενδρική κατανομή όπου ο TrkB εντοπίζεται στις προ- και μετασυναπτικές μεμβράνες αλλά και ενδοκυτταρικά. Βέβαια, η πρόσδεση του BDNF στον υποδοχέα p75 μεσολαβεί αντίθετες ενέργειες σε σχέση με την πρόσδεση του στον TrkB. Χαρακτηριστικά, η σηματοδότηση BDNF/TrkB ενισχύει τη νευρωνική διεγερσιμότητα και τη συναπτική ισχύ, ενώ η σύνδεση BDNF/p75 δρα μειώνοντας τη διεγερσιμότητα και τη συναπτική ισχύ (Bramham and Messaoudi, 2005). Όσον αφορά τον TrkB, αποτελείται από τρεις περιοχές: μια εξωκυτταρική περιοχή για τον

προσδέτη, μια διαμεμβρανική και μια ενδοκυτταρική περιοχή με ενεργότητα τυροσινικής κινάσης. Παρουσία του BDNF προκαλείται διμερισμός και αυτοφωσφορυλίωση του TrkB σε κατάλοιπα τυροσίνης (Tejeda and Diaz-Guerra, 2017). Είναι αξιοσημείωτο ότι ανάλογα με το ποια κατάλοιπα τυροσίνης φωσφορυλιώνονται, ενεργοποιούνται και οι αντίστοιχες οδοί σηματοδότησης (Εικόνα 11). Συγκεκριμένα, φωσφορυλίωση στα κατάλοιπα Tyr490 και Tyr515 οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK/ERK, η φωσφορυλίωση της Tyr515 ενεργοποιεί επίσης το μονοπάτι σηματοδότησης της PI3K, ενώ αυτή στην Tyr816 ενεργοποιεί τη σηματοδότηση της PLCγ (Pradhan *et al.*, 2019).



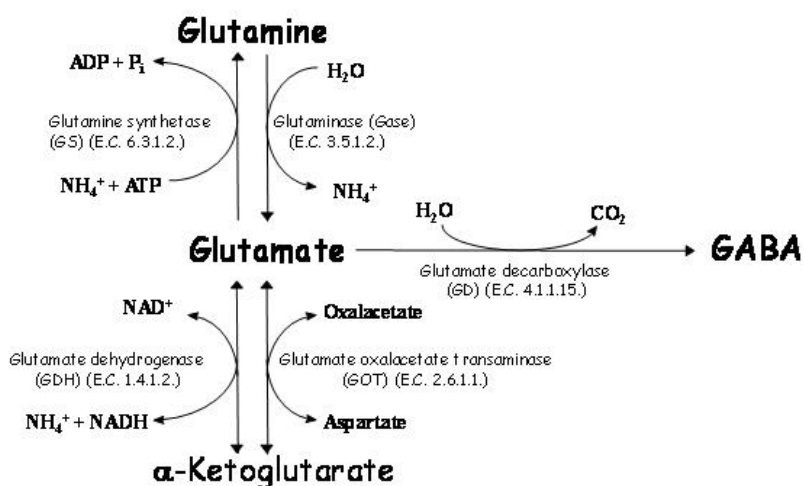
Εικόνα 11. Ενδοκυτταρικοί οδοί σηματοδότησης του BDNF. Η ενεργοποίηση BDNF-TrkB εκκινεί κυρίως μονοπάτια σηματοδότησης MAPK, PI3K και PLC γ, ενώ η pro-BDNF/p75 εκκινεί τη σηματοδότηση JNK. Επίσης, η νευρωνική δραστηριότητα προάγει την απελευθέρωση της αδενοσίνης που συνδέεται με τους A2aRs για να ενεργοποιήσει την αδενυλική κυκλάση και την PKA (Pradhan *et al.*, 2019).

1.3 Γλουταματεργικό σύστημα

1.3.1 Γλουταμικό

Το L-γλουταμικό οξύ ανήκει στα μη απαραίτητα αμινοξέα, καθώς μπορεί να συντεθεί *de novo*, ενώ υπάρχει σε πολλά τρόφιμα είτε σε ελεύθερη μορφή είτε σε

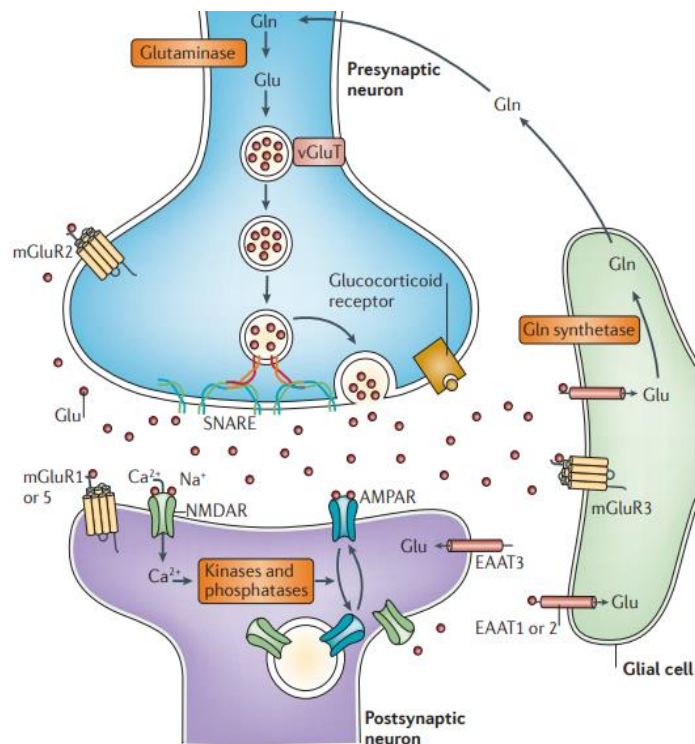
πεπτίδια και πρωτεΐνες. Μπορεί να συντεθεί με δύο διαφορετικούς τρόπους. Πρώτον, από α-κετογλουταρικό, είτε μέσω της γλουταμικής αφυδρογονάσης είτε από μια ποικιλία αμινοτρανσφερασών (**Εικόνα 12**). Δεύτερον, μπορεί να συντεθεί από άλλα αμινοξέα που ανήκουν στην «οικογένεια γλουταμικού» όπως γλουταμίνη, αργινίνη, προλίνη και ιστιδίνη. Αξίζει να σημειωθεί ότι, το γλουταμικό είναι ο μεταβολικός πρόδρομος, μέσω της γλουταμινικής αποκαρβοξυλάσης, για το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) το οποίο είναι ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) (Brosnan and Brosnan, 2013). Όσον αφορά το ρόλο του, το γλουταμικό είναι ο κύριος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής στο ΚΝΣ των σπονδυλωτών. Έχει δειχθεί ότι οι συγκεντρώσεις του στον ανθρώπινο εγκέφαλο μπορεί να κυμαίνονται από περίπου 1 μM στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό έως 100 mM στα εκκριτικά κυστίδια (Nedergaard *et al.* 2002). Γενικά, η γλουταματεργική διαβίβαση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των νευρώνων, τη μετανάστευση και την επιβίωση στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο, ενώ έχει κρίσιμο ρόλο στην συναπτική πλαστικότητα και σε λειτουργίες όπως η μνήμη και η μάθηση (McDonald and Johnston, 1990; Yano *et al.*, 1998; Gécz, 2010)



Εικόνα 12. Μεταβολισμός γλουταμικού στον εγκέφαλο. Ο μεταβολισμός του γλουταμικού σχετίζεται με το σχηματισμό γλουταμίνης ή α -κετογλουταρικού ή GABA (Centelles, 2016).

Η απελευθέρωση γλουταμικού η οποία αποτελεί τη βάση της διεγερτικής νευροδιαβίβασης στον εγκέφαλο, είναι μια αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία (**Εικόνα 13**). Στις γλουταματεργικές συνάψεις, τα προσυναπτικά άκρα συνδέονται συνήθως με εξειδικευμένες μετασυναπτικές δομές (δενδριτικές άκανθες), σε

αντίθεση με τις συνάψεις στις οποίες απελευθερώνονται μονοαμινοεργικοί νευροδιαβιβαστές (ντοπαμίνη, νοραδρεναλίνη, αδρεναλίνη, σεροτονίνη και ισταμίνη). Ειδικότερα, στο προσυναπτικό τμήμα αφού συντεθεί το γλουταμικό, πακετάρεται σε κυστίδια μέσω των κυστιδιακών μεταφορέων του γλουταμικού (vesicular Glutamate Transporters, vGluTs) (Poroli *et al.*, 2011). Για την αλληλεπίδραση και τη σύντηξη των κυστιδίων με την προσυναπτική μεμβράνη, ώστε να διαχυθεί το γλουταμικό στη συναπτική σχισμή, έχει σημαντικό ρόλο το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα SNARE. Το σύμπλεγμα SNARE σχηματίζεται από την αλληλεπίδραση δύο πρωτεϊνών συναπτικής μεμβράνης (συνταξίνη 1 ή συνταξίνη 2 και SNAP25) και μίας κυστιδιακής πρωτεΐνης (συναπτομπρεβίνη 1 ή συναπτομπρεβίνη 2) (Rizo and Rosenmund, 2008; Südhof and Rothman, 2009). Κατόπιν κατάλληλου ερεθίσματος που θα προκαλέσει την εκπόλωση του προσυναπτικού τερματικού και είσοδο Ca^{2+} , το γλουταμικό απελευθερώνεται στη συναπτική σχισμή και δεσμεύεται στους υποδοχείς που βρίσκονται στη μετασυναπτική μεμβράνη. Κατά τη δέσμευση, οι υποδοχείς ξεκινούν διάφορες αποκρίσεις όπως εκπόλωση της μεμβράνης, ενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης, ρύθμισης της τοπικής πρωτεϊνικής σύνθεσης και της γονιδιακής έκφρασης. Μάλιστα, ο αριθμός και η σταθερότητα αυτών των υποδοχέων στη μεμβράνη είναι ένας σημαντικός παράγοντας της συναπτικής αποτελεσματικότητας (Poroli *et al.*, 2011). Έπειτα, το γλουταμικό απομακρύνεται από τον εξωκυτταρικό χώρο με τους μεταφορείς διεγερτικών αμινοξέων υψηλής συγγένειας (Excitatory Amino Acid Transporters EAATs), οι οποίοι βρίσκονται σε γειτονικά νευρογλοιακά κύτταρα (EAAT1 και EAAT2) και, σε κάποιο βαθμό, σε νευρώνες (EAAT3 και EAAT4) (O'Shea, 2002). Στα νευρογλοιακά κύτταρα, το γλουταμικό μετατρέπεται σε γλουταμίνη από τη συνθετάση της γλουταμίνης και στη συνέχεια, η γλουταμίνη απελευθερώνεται μέσω των μεταφορέων τύπου N. Τελικά, προσλαμβάνεται μέσω των μεταφορέων τύπου A συζευγμένων με Na^+ από τον γλουταματεργικό νευρώνα, όπου η γλουταμίνη υδρολύεται σε γλουταμικό (Erecińska and Silver, 1990).

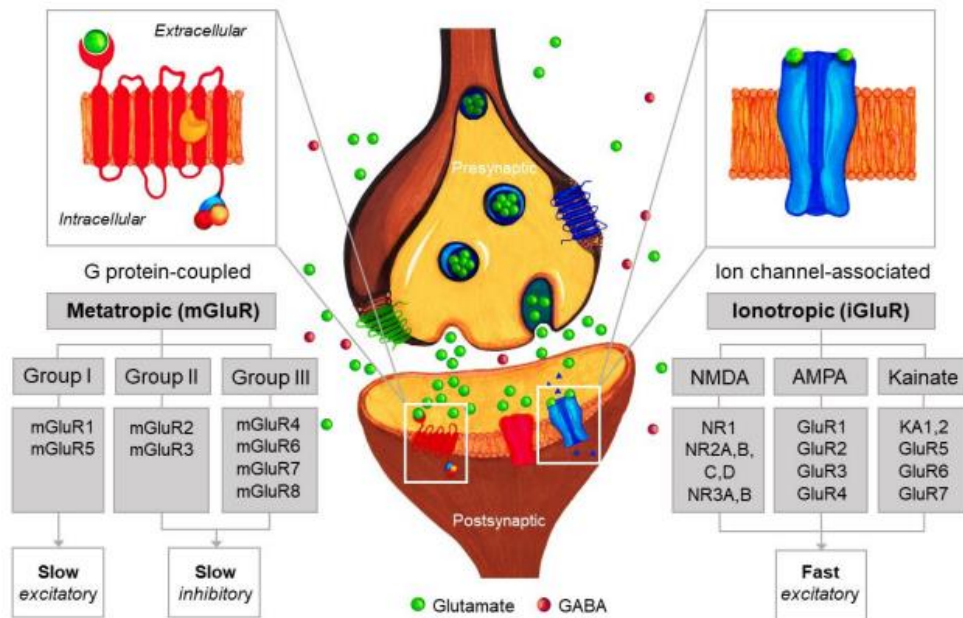


Εικόνα 13. Κύκλος γλουταμικού-γλουταμίνης. Το γλουταμικό συσκευάζεται σε κυστίδια με κυστιδιακούς μεταφορείς γλουταμικού (vGluTs). Οι πρωτεΐνες του συμπλέγματος SNARE μεσολαβούν στην αλληλεπίδραση και τη σύντηξη κυστιδίων με την προσυναπτική μεμβράνη. Μετά την απελευθέρωση στον εξωκυτταρικό χώρο, το γλουταμικό δεσμεύεται στους υποδοχείς του που βρίσκονται στη μεταυναπτική μεμβράνη. Το γλουταμικό απομακρύνεται από τη σύναψη μέσω μεταφορέων διεγερτικών αμινοξέων (EAATs) σε γειτονικά νευρογλοιακά κύτταρα και σε μικρότερο βαθμό σε νευρώνες. Στα νευρογλοιακά κύτταρα, το γλουταμικό μετατρέπεται σε γλουταμίνη από τη συνθετάση της γλουταμίνης και μεταφέρεται πίσω στον γλουταματεργικό νευρώνα, όπου υδρολύεται σε γλουταμικό (Poroli et al., 2011).

1.3.2 Υποδοχείς γλουταμικού

Οι υποδοχείς του γλουταμικού χωρίζονται σε δύο κύριες ομάδες τους ιονοτροπικούς και τους μεταβοτροπικούς ανάλογα με τον μηχανισμό που ακολουθεί την ενεργοποίησή τους (**Εικόνα 14**). Οι ιονοτροπικοί είναι υποδοχείς που συνδέονται με χημειο-ελεγχόμενους διαύλους ιόντων και περιλαμβάνουν τρεις οικογένειες υποδοχέων: N-μεθυλο-D-ασπαραγινικού οξέος (NMDA), α-αμινο,3-υδροξυ,5-μεθυλ,4-ισοξαζολοπροπιονικού οξέος (AMPA) και του καϊνικού οξέος. Αυτοί οι υποδοχείς μεσολαβούν τις άμεσες εκπολωτικές αποκρίσεις στις περισσότερες διεγερτικές συνάψεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα των θηλαστικών και μάλιστα ο υποδοχέας NMDA έχει σημαντικό ρόλο στη συναπτική πλαστικότητα. Αντιθέτως, οι μεταβοτροπικοί υποδοχείς είναι συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες και επηρεάζουν έμμεσα την διαπερατότητα των διαύλων μέσω δεύτερων

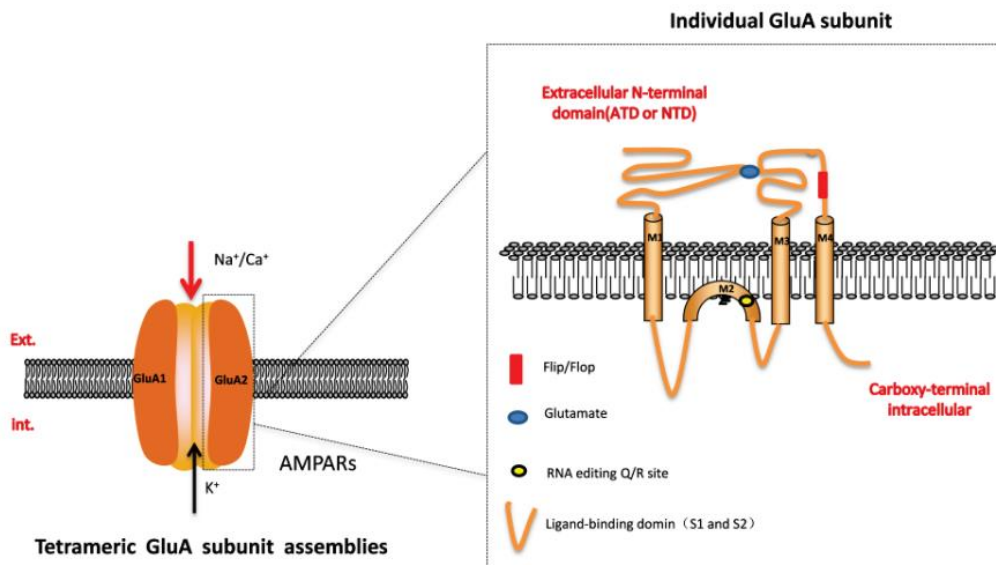
αγγελιοφόρων. Με βάση το μηχανισμό της μεταγωγής, χωρίζονται σε τρεις ομάδες (Group I-III) και η μετάδοση των πληροφοριών φαίνεται να είναι πιο αργή σε σχέση με τους ιονοτροπικούς (Scheefhals and MacGillavry, 2018).



Εικόνα 14. Τύποι υποδοχών γλουταμικού. *GluR*: υποδοχέας γλουταμικού; *NR*: υπότυπος υποδοχέα NMDA. *KA*: υπότυπος υποδοχέα καϊνικού.

AMPA Υποδοχείς (AMPA)

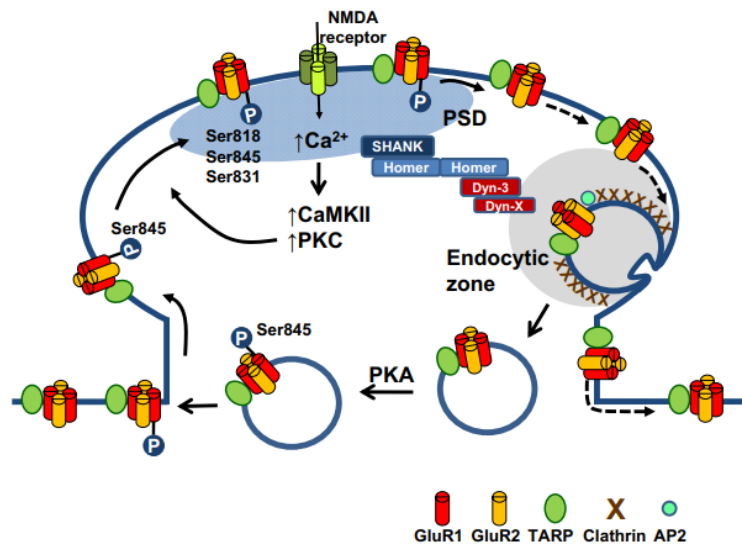
Οι υποδοχείς AMPA είναι ομο- ή ετερο-τετραμερή συγκροτήματα των υπομονάδων GluR_1 - GluR_4 και μεσολαβούν την γρήγορη διεγερτική νευροδιαβίβαση στον εγκέφαλο (**Εικόνα 15**). Κάθε υπομονάδα περιλαμβάνει μια θέση πρόσδεσης για το γλουταμικό, συνίσταται από περίπου 900 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 105 kDa, ενώ οι υπομονάδες μοιράζονται 68-74% ταυτότητα όσον αφορά την αλληλουχία αμινοξέων. Οι υπομονάδες GluR_1 - GluR_4 συνδυάζονται σε τετραμερή σε διαφορετική στοιχειομετρία η οποία ποικίλλει ανάλογα την εγκεφαλική περιοχή, και καθορίζει τη λειτουργία του διαύλου (Santos *et al.*, 2009). Χαρακτηριστικά, στις ώριμες διεγερτικές συνάψεις του ιππόκαμπου, οι AMPARs αποτελούνται κυρίως από $\text{GluR}_1/\text{GluR}_2$ και, σε ορισμένες περιπτώσεις, από υπομονάδες $\text{GluR}_3/\text{GluR}_2$. Είναι αξιοσημείωτο ότι οι υποδοχείς που περιέχουν την υπομονάδα GluR_2 παρουσιάζουν χαμηλή αγωγιμότητα και διαπερατότητα Ca^{2+} , ενώ ευνοούν την διαπερατότητα του Na^+ (Derkach *et al.*, 2007).



Εικόνα 15. Υποδοχέας AMPA. Οι υποδοχείς AMPA (AMPARs) είναι ετερομερή συγκροτήματα τεσσάρων υπομονάδες GluR1- GluR4. Ο διαφορετικός συνδυασμός των υπομονάδων επηρεάζει χαρακτηριστικά της λειτουργίας του υποδοχέα όπως την αγωγιμότητα και την διαπερατότητα σε ιόντα (Cheng et al., 2017).

Οι υποδοχείς AMPA συντίθενται στο σώμα και μεταφέρονται στην επιφάνεια του κυττάρου μέσω της εκκριτικής οδού και της αξιοποίησης των πρωτεϊνών μεταφοράς του κυτταροσκελετού. Ο εντοπισμός των AMPARs στις συνάψεις ρυθμίζεται μέσω δύο μηχανισμών. Πρώτον, μέσω εξωκυττάρωσης, ενδοκυττάρωσης και ανακύκλωσης κατά την εκκριτική οδό και δεύτερον, μέσω διάχυσης στη μεμβράνη από εξωσυναπτικές θέσεις προς τις συναπτικές. Ένας σημαντικός ρόλος για τη διακίνηση των AMPARs και την επιφανειακή διάχυση σχετίζεται με την μνήμη και μάθηση και κατ'επέκταση τη συναπτική πλαστικότητα (Niciu et al., 2012). Όσον αφορά τη λειτουργικότητα των AMPARs, οι φωσφορυλιώσεις συνιστούν τον βασικότερο παράγοντα ρύθμισης (Εικόνα 16). Πιο συγκεκριμένα, η υπομονάδα GluR₁ έχει περιγραφεί ότι φωσφορυλιώνεται σε τρία κατάλοιπα σερίνης που βρίσκονται στο ενδοκυτταρικό καρβοξυτελικό άκρο: στη σερίνη 831 (Ser831) τόσο από την κινάση πρωτεΐνης C (PKC) όσο και από την CaMKII, στη σερίνη 845 (Ser845) μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) και της εξαρτώμενης από cGMP πρωτεΐνης κινάσης II (cGKII) καθώς και στη σερίνη 818 (Ser818) από την PKC. Η φωσφορυλίωση των ανωτέρω καταλοίπων ενισχύει τη λειτουργία των υποδοχέων και συμβάλλει στην ενσωμάτωσή τους στη συναπτική μεμβράνη κατά το LTP. Αντιθέτως, φωσφορυλιώσεις που έχουν βρεθεί στην

υπομονάδα GluR₂ στα κατάλοιπα Ser880 και Tyr876 σχετίζονται με εσωτερίκευση των υποδοχέων και επαγωγή LTD (Santos *et al.*, 2009).

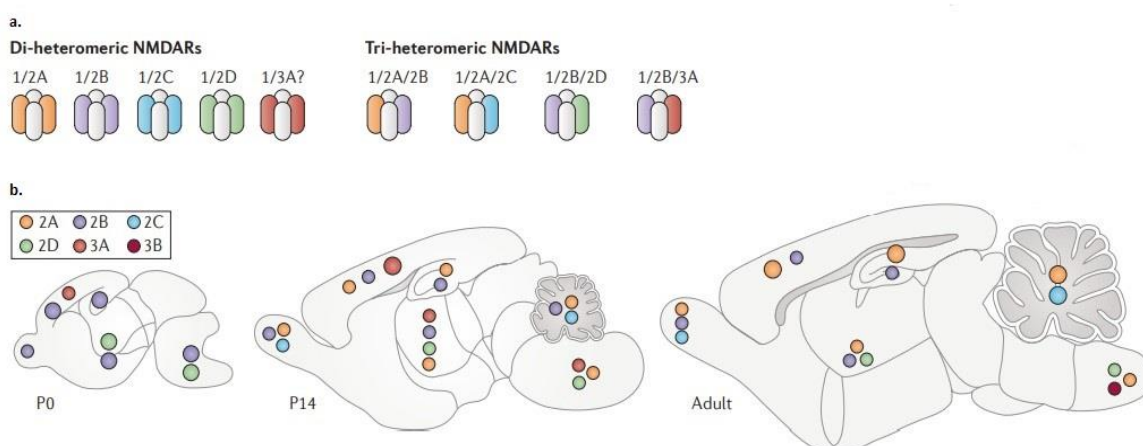


Εικόνα 16. Ρύθμιση της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας των υποδοχέων AMPA που περιέχουν GluR1. Οι AMPARs που υπάρχουν στην PSD έχουν περιορισμένη κινητικότητα, σε αντίθεση με τους μη συναπτικούς υποδοχείς που διαχέονται στη μεμβράνη. Οι υποδοχείς που εσωτερικεύονται μπορούν στη συνέχεια να ανακυκλωθούν. Φωσφορυλιώσεις σε κατάλοιπα του GluR1 ενισχύουν την εσωμάτωση των υποδοχέων στη μεμβράνη (Santos *et al.*, 2009).

NMDA Υποδοχείς (NMDARs)

Οι υποδοχείς NMDA είναι ετεροτετραμερή σύμπλοκα με τις υπομονάδες τους να ομαδοποιούνται σε τρεις υποοικογένειες σύμφωνα με την ομολογία της αλληλουχίας τους: υπομονάδα GluN1, τέσσερις διακριτές υπομονάδες GluN2 (GluN2A, GluN2B, GluN2C και GluN2D) και ένα ζεύγος υπομονάδων GluN3 (GluN3A και GluN3B). Ο συνολικός αριθμός αμινοξέων ανά υπομονάδα κυμαίνεται από 900 έως πάνω από 1.480, ενώ η διαφορά στο μέγεθος της υπομονάδας οφείλεται κυρίως στις διαφορές στο μήκος της ενδοκυτταρικής καρβοξυλικής-τερματικής περιοχής (CTD). Η περιοχή αυτή εμπλέκεται στη διακίνηση υποδοχέων και συνδέει τους υποδοχείς με τους καταρράκτες των σημάτων (Niciu *et al.*, 2012). Η σύνθεση των NMDAR συνίσταται με δύο υπομονάδες GluN1 οι οποίες συνδυάζονται με άλλες δύο GluN2 ή με μία μίξη υπομονάδων GluN2 και GluN3 (**Εικόνα 17 A**). Ειδικότερα, η έκφραση της GluN1 παρατηρείται σε όλο τον εγκέφαλο και είναι κρίσιμη για την φυσιολογική νευροανάπτυξη. Στον εμβρυϊκό εγκέφαλο, εκφράζονται μόνο οι υπομονάδες GluN2B και GluN2D, ενώ η έκφραση της GluN2A ξεκινά λίγο μετά τη γέννηση και αυξάνεται μέχρι να εκφράζεται σταθερά σχεδόν σε

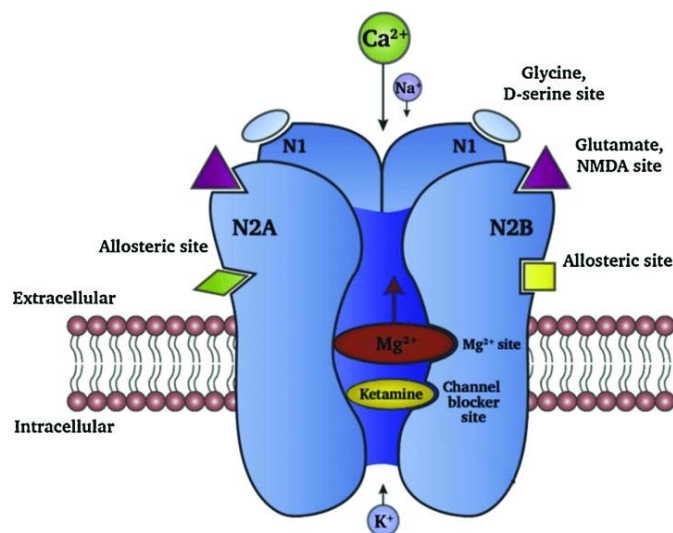
κάθε περιοχή του ΚΝΣ στον ενήλικα (**Εικόνα 17 Β**). Ταυτόχρονα με αυτή την προοδευτική αύξηση της έκφρασης της GluN2A, η έκφραση της GluN2D μειώνεται σημαντικά και περιορίζεται κυρίως στον διεγκέφαλο και τον μεσεγκέφαλο, ενώ η έκφραση της GluN2B διατηρείται σε υψηλά επίπεδα στον πρόσθιο εγκέφαλο. Οι υπομονάδες GluN3A και GluN3B εμφανίζουν επίσης διαφορετικά οντογενετικά προφίλ. Η GluN3A αυξάνεται σημαντικά στην πρώιμη μεταγεννητική ζωή και στη συνέχεια μειώνεται προοδευτικά. Αντίθετα, η έκφραση της GluN3B αυξάνεται αργά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και στον ενήλικα εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στους κινητικούς νευρώνες και στους νευρώνες του στελέχους (Paoletti, *et al.*, 2013). Γενικά, οι υπομονάδες GluN2A και το GluN2B είναι οι κυρίαρχες και έχουν κεντρικούς ρόλους στη συναπτική λειτουργία και πλαστικότητα. Χαρακτηριστικά, όταν στη σύναψη η αναλογία GluN2A/GluN2B είναι χαμηλή μετά από συναπτική διέγερση, είναι πιο πιθανό να εμφανιστεί το LTP παρά LTD. Αντίθετα, όταν η αναλογία GluN2A/GluN2B είναι υψηλή, ευνοείται η επαγωγή LTD (Xu *et al.*, 2008).



Εικόνα 17. Σύθεση υπομονάδων και πρότυπο έκφρασης υποδοχέων NMDA. a) Συνδυασμοί υπομονάδων για τους υποδοχείς NMDA που θεωρείται ότι υπάρχουν στο ΚΝΣ. b) Το αναπτυξιακό προφίλ της έκφρασης των υπομονάδων GluN στον εγκέφαλο μύς κατά την ημέρα γέννησης (P0), 2 εβδομάδες μετά τη γέννηση (P14) και στο στάδιο του ενήλικα (Paoletti, *et al.*, 2013).

Οι NMDAR παρουσιάζουν ιδιότητες που τους διακρίνουν από άλλους τύπους ιονοτροπικών υποδοχέων που ενεργοποιούνται παρουσία προσδέτη. Έχουν εντοπιστεί τουλάχιστον έξι θέσεις πρόσδεσης που ρυθμίζουν την πιθανότητα ανοίγματος του διαύλου ιόντων (**Εικόνα 18**). Για την ενεργοποίησή των υποδοχέων υπάρχουν θέσεις για δύο υποχρεωτικούς προσδέτες (γλουταμικό και γλυκίνη ή D-σερίνη), ωστόσο, ο διάυλος ιόντων υπόκειται σε ένα μπλοκ Mg^{2+} εξαρτώμενο από

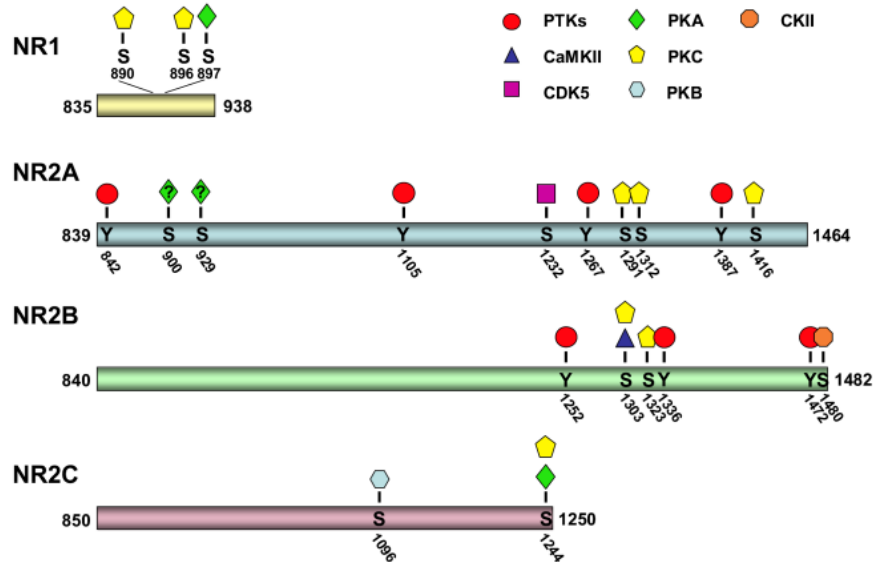
την τάση. Επομένως, για την ενεργοποίησή τους η παρουσία προσδετών πρέπει να συμπίπτει με ταυτόχρονη εκπόλωση της μεμβράνης σε τέτοιο δυναμικό ώστε να απομακρυνθεί το Mg^{2+} από τον πόρο του διαύλου και να επιτραπεί η διόδος των ιόντων. Οι NMDAR είναι εξαιρετικά διαπερατοί από Ca^{2+} και εμφανίζουν αργή κινητική λόγω της αργής αποδέσμευσης του γλουταμικού (Kokane *et al.*, 2020).



Εικόνα 18. Τυπική δομή NMDAR. Ο υποδοχέας έχει ρυθμιστικές θέσεις πρόσδεσης που επηρεάζουν τη λειτουργία και την ενεργοποίησή του (Kokane *et al.*, 2020).

Η καρβοξυτελική περιοχή των υπομονάδων GluN έχει σημαντικό ρόλο για την διακίνηση και τον εντοπισμό των υποδοχέων. Ουσιαστικά, ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις των υποδοχέων με μια ποικιλία πρωτεϊνών κυττοσολίου και μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων υπαγορεύεται η ακριβής ενδοκυτταρική διακίνηση και εντοπισμός των υποδοχέων NMDA. Μάλιστα, οι διαφορετικές υπομονάδες μπορούν να συζεύξουν τους υποδοχείς με διακριτά σύμπλοκα ενδοκυτταρικής σηματοδότησης (Sanz-Clemente *et al.*, 2013). Επίσης, τα C-άκρα των υπομονάδων είναι υποστρώματα για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης ή τυροσίνης η οποία είναι ένας βασικός μηχανισμός που ρυθμίζει τη λειτουργία και τον εντοπισμό των υποδοχέων στις συνάψεις (**Εικόνα 19**). Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση της GluN2B στο S1480 από την CKII διαταράσσει την αλληλεπίδραση μεταξύ των επιφανειακών υποδοχέων NMDA και της οικογένειας πρωτεϊνών PSD-95, προκαλώντας εσωτερίκευση των υποδοχέων. Ωστόσο, η φωσφορυλίωση του GluN2B στο Y1472 από την κινάση Fyn

διαταράσσει την αλληλεπίδραση μεταξύ των υποδοχέων NMDA και του ενδοκυτταρικού συμπλέγματος AP2-κλαθρίνης, οδηγώντας σε σταθεροποίηση του υποδοχέα στην κυτταρική επιφάνεια (Chen and Roche, 2007; Vieira *et al.*, 2020).



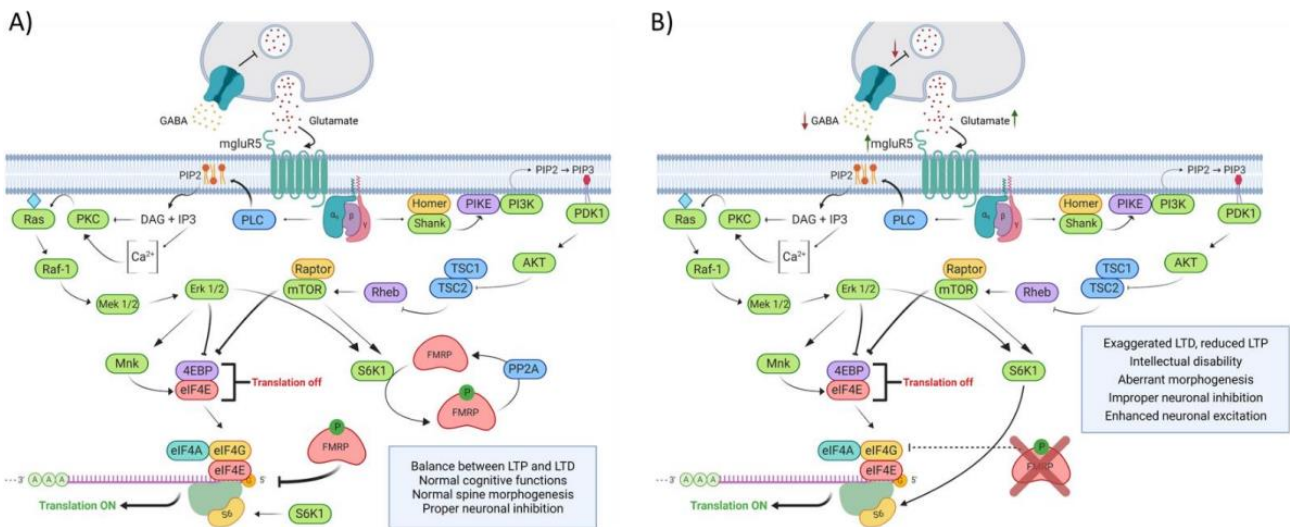
Εικόνα 19. Θέσεις φωσφορυλίωσης στις κυτταρικές ουρές των υπομονάδων του υποδοχέα NMDA. Κάθε ουρά φωσφορυλιώνεται σε κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης και/ή τυροσίνης από μια ποικιλία κινασών. Η NR2A φωσφορυλιώνεται ειδικά από την CDK5, η NR2B ειδικά από την CKII και η NR2C ειδικά από την PKB (Chen and Roche, 2007).

1.4 Νευροβιολογικοί μηχανισμοί FXS

Οι προκλινικές μελέτες εστιάζουν κυρίως στο ρόλο που έχει η διεγερτική γλουταματεργική διαβίβαση, ειδικότερα αυτή που μεσολαβείται μέσω των μεταβοτροπικών υποδοχέων τύπου I του γλουταμικού (mGluR1, mGluR5) καθώς και η ανασταλτική διαβίβαση του GABA, αναφορικά με τους υποκείμενους μοριακούς μηχανισμούς του FXS (Bear *et al.*, 2004).

Φυσιολογικά, σε μια γλουταματεργική σύναψη, η απελευθέρωση γλουταμικού από το προσυναπτικό τερματικό και η ενεργοποίηση των mGluR5 μετασυναπτικά έχει ως αποτέλεσμα την πυροδότηση καθοδικά σηματοδοτικών μονοπατιών όπως το Ras/Raf/Mek/Erk και το PI3K/AKT/mTOR με αποτέλεσμα την έκφραση πρωτεϊνών που προωθούν το LTD. Ωστόσο, διατηρείται ισορροπία μεταξύ LTP και LTD καθώς η ενεργοποίηση προσυναπτικών υποδοχέων GABA μειώνει την απελευθέρωση του γλουταμικού ενώ, παράλληλα, η FMRP μετασυναπτικά δρα ως

αρνητικός ρυθμιστής της μετάφρασης πρωτεϊνών που ευνοούν την επαγωγή LTD (Bear *et al.*, 2004; Dionne and Corbin, 2021) (**Εικόνα 20**). Στην περίπτωση όμως του FXS με την απουσία της FMRP, η συναπτική πλαστικότητα φαίνεται να διαταράσσεται και να σχετίζεται με μια κατάσταση υπερδιεγερσιμότητας του φλοιού όπως έχει βρεθεί τόσο σε ασθενείς όσο και σε μοντέλα *Fmr1* KO μυών (Contractor *et al.*, 2015; Gibson *et al.*, 2008; Morin-Parent *et al.*, 2019). Μελέτες έχουν δείξει αυξημένη σηματοδότηση μέσω mGluR τύπου I στον υπόκαμπο *Fmr1* KO μυών, που είχε ως αποτέλεσμα την ανισορροπία μεταξύ LTD και LTP (Huber *et al.*, 2002; Bear *et al.*, 2004; Dölen and Bear, 2008). Συγκεκριμένα, η υπερενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT/mTOR έχει βρεθεί τόσο στον φλοιό και τον υπόκαμπο *Fmr1* KO μυών (Hou *et al.*, 2006; Price *et al.*, 2007; Weng *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2010) όσο και σε μεταθανάτιες αναλύσεις εγκεφάλων από ασθενείς με FXS (Hoeffler *et al.*, 2012; Wang, *et al.*, 2012).

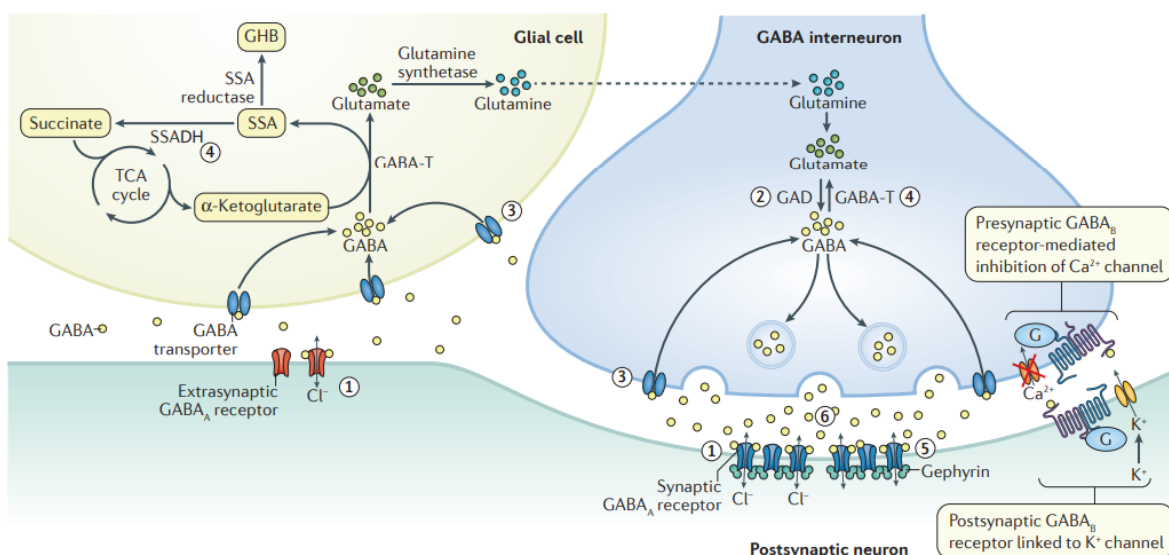


Εικόνα 20. Σχηματικό μοντέλο νευροβιολογίας του FXS. A) Απελευθέρωση γλουταμικού και ενεργοποίηση των mGluR5 οδηγεί στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών για την έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με το LTD. Ρυθμιστικός έλεγχος για την ισορροπία μεταξύ LTP και LTD ασκείται τόσο μέσω προσυναπτικής αναστολής λόγω των υποδοχέων του GABA όσο και μετασυναπτικά μέσω της FMRP που ελέγχει τη μετάφραση πρωτεϊνών. B) Στην περίπτωση του FXS, χάνεται ο ρυθμιστικός έλεγχος μέσω της FMRP και παράλληλα μειώνεται η προσυναπτική ρύθμιση με αποτέλεσμα ενισχυμένη γλουταματεργική σηματοδότηση μέσω mGluR5 και διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ LTP και LTD (Dionne & Corbin, 2021).

Παράλληλα, διαταραχές στη GABAεργική σηματοδότηση φαίνεται να έχουν κρίσιμο ρόλο στην παθοφυσιολογία του FXS (**Εικόνα 21**). Μελέτες αναφέρουν αρκετές τροποποιήσεις στη σηματοδότηση του GABA στον εγκέφαλο *Fmr1* KO μυών, συμπεριλαμβανομένης μιας μείωσης στην έκφραση των υπομονάδων των υποδοχέων του GABA, GABA_A και GABA_B (Braat and Kooy, 2015; Contractor *et al.*, 2015). Ειδικότερα, έχουν βρεθεί μειωμένα επίπεδα μορίων mRNA των υπομονάδων του GABA_A στον φλοιό, τον υπόκαμπο και την παρεγκεφαλίδα *Fmr1* KO μυών, κάτι που υποδηλώνει ότι αυτά τα μόρια mRNA είναι στόχοι της FMRP (D'Hulst *et al.*, 2009; Curia *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2011). Επίσης, σχετικά με τα επίπεδα GABA, έχει βρεθεί μείωση της διαθεσιμότητας του GABA στη συναπτική σχισμή στην περιοχή της αμυγδαλής *Fmr1* KO μυός (Olmos-Serrano, 2010), ενώ σε άλλη μελέτη με αντίστοιχο ζωικό μοντέλο ήταν μειωμένα τα ενδοκυτταρικά επίπεδα GABA στην περιοχή της παρεγκεφαλίδας (Davidovic *et al.*, 2011). Επιπλέον, έχει βρεθεί μείωση στην έκφραση ενζύμων που σχετίζονται με την σύνθεση, τον καταβολισμό και την επαναπρόσληψη του GABA στον φλοιό, την αμυδαλή και την παρεγκεφαλίδα *Fmr1* KO μυών (D'Hulst *et al.*, 2009; Olmos-Serrano *et al.*, 2010). Έτσι, συνδυαστικά με τις τροποποιήσεις στη γλουταματεργική διαβίβαση, προκαλείται μια ανισορροπία μεταξύ διεγερτικής και ανασταλτικής νευροδιαβίβασης που θεωρείται ότι είναι η βάση για τα γνωστικά και συμπεριφορικά χαρακτηριστικά που παρατηρούνται στο FXS (Hagerman *et al.*, 2017).

Σημαντική επίδραση έχει και η σηματοδότηση νευροτροφικών παραγόντων και κυρίως του BDNF, δεδομένου του ρόλου του στη ρύθμιση της συναπτικής πλαστικότητας, ενώ διαταραχές στη σηματοδότησή του έχουν συσχετιστεί με τον αυτισμό (Teliás, 2019 b). Ειδικότερα, σε *in vitro* καλλιέργειες νευρώνων του υποκάμπου μυός, βρέθηκε ότι η επώαση των κυττάρων με BDNF μείωσε τα επίπεδα του *Fmr1* mRNA, κάτι που δεν συνέβη με τη χρήση άλλων νευροτροφικών όπως η NT3. Αυτό υποδηλώνει μια ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ του BDNF και της μεταγραφής του *Fmr1* (Castren *et al.*, 2002). Σε *in vivo* μελέτη *Fmr1* KO μυ, βρέθηκαν αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα του BDNF στον υπόκαμπο και μειωμένα στον φλοιό, γεγονός που υποδηλώνει μια ιστο-ειδική μεταβολή ως προς την έκφραση του BDNF (Louhivuori *et al.*, 2011). Επίσης, μελέτες αναφέρουν

απορρύθμιση της σηματοδότησης BDNF/TrkB στο μοντέλο του Fmr1 KO μυός και, μάλιστα, αυτό οδηγεί σε αλλοιωμένη ανάπτυξη του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένης της υπερβολικής διακλάδωσης των δενδριτών, της αυξημένης ακανθογένεσης και της μειωμένης συναπτικής πλαστικότητας (Louhivuori *et al.*, 2011; Kim and Cho, 2014). Όπως προτείνεται από τους Kim και Cho (2014), η αυξημένη δενδριτική διακλάδωση και η ακανθογένεση στο FXS αναπτύσσονται πιθανώς ως δευτερεύουσες αντισταθμιστικές αποκρίσεις στη μειωμένη μετασυναπτική δραστηριότητα κατά το LTD που σχετίζεται με την υπέρμετρη ενεργοποίηση των mGluR τύπου I. Ουσιαστικά, όταν οι μετασυναπτικές και νευροφυσιολογικές δραστηριότητες μειώνονται στο FXS, οι δενδρίτες ενδέχεται να αυξάνουν την ευαισθησία τους ως προς τον BDNF και κατ'έπекταση να αλλάζει ο βαθμός της διακλάδωσής τους (Kim and Cho, 2014).



Εικόνα 21. Διαταραχές στη σηματοδότηση του GABA κατά το FXS. Απουσία της FMRP μειώνεται η έκφραση υπομονάδων που συγκροτούν τους υποδοχείς GABA_A και GABA_B του GABA (1). Επίσης, μειώνεται η έκφραση ενζύμων για την σύνθεση του GABA (2), μεταφορέων του GABA (3), ενζύμων για τον καταβολισμό (4) καθώς και μορίων που συμμετέχουν στην ομαδοποίηση των υποδοχέων (5). Παράλληλα, μείωση παρατηρείται και στα επίπεδα του ελεύθερου GABA (6) (Hagerman *et al.*, 2017).

Από τις παραπάνω μελέτες συνολικά, γίνεται κατανοητό ότι το μοντέλο του Fmr1 KO μυός έχει εκτενώς χρησιμοποιηθεί στην προκλινική έρευνα του FXS, αν και οι επίμυες θεωρείται ότι προσφέρουν πρόσθετη εγκυρότητα. Πειραματικά έχει δειχθεί ότι ο ρυθμός νευρογένεσης στον ενήλικο ιππόκαμπο είναι πολύ μεγαλύτερος στους επίμυες από ότι στους μυς και μάλιστα τα νέα αυτά κύτταρα

είχαν δέκα φορές περισσότερες πιθανότητες να ενεργοποιηθούν κατά τη διάρκεια της μάθησης. Αυτό υποδηλώνει σημαντικές διαφορές στη νευρωνική πλαστικότητα μεταξύ επιμύων και μυών η οποία δεν περιορίζεται μόνο στον ιππόκαμπο αλλά επεκτείνεται και στις φλοιώδεις περιοχές (Snyder *et al.*, 2009; Ellenbroek and Youn, 2016). Ωστόσο, μέχρι σήμερα οι μελέτες στις οποίες έχει χρησιμοποιηθεί το μοντέλο του *Fmr1* KO επίμου είναι περιορισμένες, δεδομένου ότι η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων επίμυων ξεκίνησε μόλις το 2010. Όσον αφορά τα διάφορα στελέχη επιμύων, υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι οι επίμυες Long Evans μπορεί να είναι πιο κατάλληλοι για δοκιμασίες που ελέγχουν την κινητική δραστηριότητα (Wawryko *et al.*, 2004), ενώ χρειάζονται λιγότερο χρόνο για εκπαίδευση στις λειτουργικές δοκιμασίες. Το γεγονός τους καθιστά ιδανικό μοντέλο για χρήση σε συμπεριφορικές/νευροβιολογικές πειραματικές διαδικασίες που διεξάγονται στο πλαίσιο μεταφραστικών μελετών του FXS και αφορούν στον έλεγχο διαταραχών των γνωστικών λειτουργιών (Turner and Burne, 2014).

1.5 Σκοπός

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο *Fmr1* KO επίμυς, ως μοντέλο μελέτης του FXS. Οι στόχοι της μελέτης αφορούσαν αρχικά στην καταγραφή συμπεριφορικών παραμέτρων μεταξύ των οποίων η καταγραφή της κινητικής δραστηριότητας και ο έλεγχος γνωστικών λειτουργιών. Ακολούθησε και μελέτη της λειτουργίας του γλουταματεργικού συστήματος τόσο μέσω αξιολόγησης της πρωτεϊνικής έκφρασης υπομονάδων των υποδοχέων AMPA και NMDA, όσο και με την μέτρηση των επιπέδων του γλουταμικού σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές που σχετίζονται με την οργάνωση γνωστικών λειτουργιών και διαδικασιών νευροπλαστικότητας. Στη συγκεκριμένη μελέτη επιχειρήθηκε μια αποτύπωση του προφίλ νευροπλαστικότητας του συγκεκριμένου μοντέλου σε συσχέτιση με το προφίλ συγκεκριμένων εκφάνσεων των γνωστικών λειτουργιών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματόζωα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο *Fmr1* KO επίμυς του στελέχους Long Evans (LE) *Fmr1*^{em2M^{cwi}}. Το στέλεχος αυτό δημιουργήθηκε από το Simons Foundation Autism Research Initiative (SFARI) σε συνεργασία με το MCW Gene Editing Rat Resource Center. Η μεταλλαγή που έχει υποστεί το γονίδιο *Fmr1* είναι η εισαγωγή 2 ζευγών βάσεων (Base pairs -Bp) στο εξώνιο 8, μέσω τεχνολογίας CRISPR/Cas9.

Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν ενήλικες, περίπου 3 μηνών, αρσενικοί επίμυες αγρίου τύπου (Wild Type, WT) και *Fmr1* Knock Out (KO) οι προέκυψαν από διασταυρώσεις που έγιναν μεταξύ ετρερόζυγων θηλυκών επιμύων ως προς την μετάλλαξη (X^+X^+) και KO αρσενικών (X^-Y) (**Εικόνα 22**). Τα πειραματόζωα αναπαράχθηκαν και διατηρήθηκαν στο εκτροφείο πειραματοζώων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Έπειτα από τον απογαλακτισμό τους, την 21^η ημέρα μετά την γέννηση, τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς κλωβούς διαστάσεων 42.5 x 26.6 x 15.5 cm, ανά δύο ή τρεις, με ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή, σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας 21°C ±2°C και υγρασίας και με νυχθημερήσιο 12 ωρών (έναρξη της φωτεινής περιόδου στις 07.00 π.μ.). Όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα που αφορούσαν τον χειρισμό των ζώων πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις ευρωπαϊκές οδηγίες για τη φροντίδα και τη χρήση των πειραματόζωων (EEC Council 86/609; 27/01/1992, European Communities Council Directive 86/609/EEC) και οι πειραματικές διαδικασίες σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν η ταλαιπωρία και ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων πειραματοζώων βάσει των κατευθυντηρίων γραμμών της FELASA (Guillen, 2012).



Εικόνα 22. Σχηματική απεικόνιση διασταυρώσεων επιμύων. Ετερόζυγα θηλυκά ως προς την μετάλλαξη για το *Fmr1* διασταυρώθηκαν με αρσενικά *Fmr1 KO*.

2.2 Συμπεριφορικές δοκιμασίες

Η έναρξη των συμπεριφορικών πειραμάτων έγινε όταν οι επίμυες ήταν σε ηλικία 3 μηνών περίπου, αφού προηγήθηκε καθημερινή εξοικείωση με τον πειραματιστή για μια εβδομάδα. Επίσης, όλα τα πειραματόζωα εξοικειώνονταν στο δωμάτιο πειραματισμού για 40 λεπτά τουλάχιστον πριν τη διενέργεια του εκάστοτε πειράματος. Όλες οι δοκιμασίες ήταν «τυφλές» ως προς τον γονότυπο των επιμύων και διεξήχθησαν κατά την φωτεινή περίοδο του ημερήσιου κύκλου και τερματίστηκαν τουλάχιστον 3 ώρες πριν την έναρξη της σκοτεινής περιόδου. Σκοπός των συμπεριφορικών πειραμάτων ήταν να αξιολογηθεί η κινητική δραστηριότητα καθώς και η χωρική και η αναγνωριστική μνήμη των *Fmr1 KO* αρσενικών επιμύων συγκριτικά με τα WT.

2.2.1 Δοκιμασία Ανοικτού Πεδίου (Open Field Test, OFT)

Η αξιολόγηση της κινητικότητας ενός ζώου, τόσο σε έναν ανεξερεύνητο, όσο και σε έναν οικείο χώρο, μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για την κινητική του λειτουργία, για εκφάνσεις της γνωστικής του λειτουργίας και για την κατάσταση της «εσωτερικής διεγερσιμότητας» (Emotionality) (Polissidis *et al.*, 2014). Κατά τη δοκιμασία του Ανοικτού Πεδίου ο επίμυς τοποθετείται σε έναν κλωβό κινητικότητας και το πειραματόζωο εξοικειώνεται με το νέο περιβάλλον παρουσιάζοντας με την πάροδο του χρόνου μειωμένη δραστηριότητα, ενώ στην αρχή έχει εκτενώς εξερευνήσει το κλωβό παρουσιάζοντας αυξημένη δραστηριότητα. Η καταγραφή της κινητικότητας των επιμύων πραγματοποιήθηκε

σε κλωβούς καταγραφής κινητικότητας με φωτοκύτταρα (ENV515, Activity Monitor, version 5, Med Associates). Η πειραματική συσκευή ανοικτού πεδίου αποτελείται από έναν διαφανή κλωβό διαστάσεων 40 x 40 x 40 cm, ανοικτό στο επάνω μέρος και με μια ηλεκτρική μονάδα καταγραφής (**Εικόνα 23**). Οι επιφάνειες του κλωβού είναι εξοπλισμένες με οριζόντιες και κάθετες σειρές ανιχνευτών με αποτέλεσμα η κίνηση του πειραματοζώου να προκαλεί διακοπές στις δεσμίδες φωτός, οι οποίες καταγράφονται αυτόματα στο σύστημα.



Εικόνα 23. Διάταξη συσκευής ανοικτού πεδίου.

Πριν την εισαγωγή κάθε επίμου, το δάπεδο καθαρίζεται επιμελώς με νερό και διάλυμα αιθανόλης 70%, για την απάλειψη των οσμών από προηγούμενα πειραματόζωα. Στη συνέχεια, τοποθετούνται στον κλωβό, όπου καταγράφεται η κινητικότητά τους για μια ώρα. Συγκεκριμένα, γίνεται η αυτόματη καταγραφή μιας σειράς κινητικών παραμέτρων, όπως της οριζόντιας κινητικότητας - εκφρασμένη ως διανυθείσα απόσταση και ως συχνότητα οριζόντιας κινητικότητας (ambulatory distance και ambulatory counts, αντίστοιχα) - και της κάθετης κινητικότητας - εκφρασμένη ως συχνότητα κάθετης κινητικότητας (vertical counts).

Σημειώνεται ότι στην παρούσα μελέτη έγινε διάκριση του χρόνου καταγραφής, με το πρώτο μισάωρο περίπου να αντιστοιχεί στην αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα (spontaneous motor activity) που εκδηλώνει το πειραματόζωο καθώς εκτίθεται σε ένα νέο περιβάλλον, ενώ το επόμενο διάστημα στην κινητικότητα που εμφανίζει το πειραματόζωο αφού πλέον έχει εξοικειωθεί με το περιβάλλον (habituated motor activity).

2.2.2 Δοκιμασία Αναγνώρισης Θέσης Αντικειμένου (Object Location Task, OLT)

Για την αξιολόγηση της αναγνωριστικής βραχυπρόθεσμης χωρικής μνήμης των πειραματόζωων πραγματοποιήθηκε η Δοκιμασία Αναγνώρισης Θέσης Αντικειμένου, η οποία αποτελεί παραλλαγή της μεθόδου που πρώτοι περιέγραψαν οι Ennaceur και Delacour το 1988. Πρόκειται για ένα παράδειγμα που δε στηρίζεται

στην ανταμοιβή, αλλά στην αυθόρμητη εξερευνητική ικανότητα των τρωκτικών (Ennaceur and Delacour, 1988). Το πειραματικό πρωτόκολλο περιλαμβάνει 3 φάσεις (Pitsikas *et al.*, 2008, 2014; Galanopoulos *et al.*, 2014) και πραγματοποιείται σε έναν αδιαφανή ανοιχτό λευκό ξύλινο κλωβό διαστάσεων 50 x 50 x 50 cm (**Εικόνα 24**).

Η συγκεκριμένη πειραματική συμπεριφορική δοκιμασία περιλαμβάνει 3 φάσεις. Η πρώτη φάση είναι αυτή της εξοικείωσης, κατά την οποία οι επίμυες τοποθετούνται ατομικά στον πειραματικό κλωβό ώστε να τον εξερευνήσουν για 3 λεπτά και στη συνέχεια επιστρέφουν στους κλωβούς διαβίωσής τους. Η συγκεκριμένη διαδικασία εξοικείωσης επαναλαμβάνεται μετά από μία ώρα, καθώς και την επόμενη ημέρα. Την τρίτη ημέρα ακολουθούν οι δύο επόμενες φάσεις της δοκιμασίας. Κατά την πρώτη φάση (**T₁**), τοποθετούνται στη μία πλευρά του κλωβού δύο πανομοιότυπα αντικείμενα (πλαστικά, μεταλλικά ή γυάλινα κυλινδρικού σχήματος και τυχαία κατανεμημένα στα πειραματόζωα), σε απόσταση περίπου 10 cm από το τοίχωμα. Στη συνέχεια, κάθε επίμυς αφήνεται στο κέντρο του πειραματικού κλωβού ώστε να εξερευνήσει τα δύο αντικείμενα για 5 λεπτά και ακολούθως επιστρέφει στον κλωβό διαβίωσης. Ο χρόνος εξερεύνησης στο κάθε αντικείμενο από το πειραματόζωο καταγράφεται από τον ερευνητή με τη χρήση συγκεκριμένου ηλεκτρονικού προγράμματος. Ως χρόνος εξερεύνησης ενός αντικείμενου ορίζεται η χρονική διάρκεια κατά την οποία το τρωκτικό ακουμπάει το αντικείμενο ή η μύτη του απέχει λιγότερο από 2 cm από αυτό και με κατεύθυνση προς αυτό, ενώ αν κάθετα στάσιμο δε θεωρείται ότι εκδηλώνει εξερευνητική συμπεριφορά. Μετά από μία ώρα αρχίζει η τελευταία φάση (**T₂**) όπου οι επίμυες επανατοποθετούνται για 3 λεπτά στο κέντρο του κλωβού με διαφορετική όμως πειραματική διάταξη. Συγκεκριμένα, το ένα από τα δύο πανομοιότυπα αντικείμενα παραμένει στην ίδια θέση με αυτήν της προηγούμενης φάσης, η οποία είναι ήδη γνωστή για τους επίμυες, και χαρακτηρίζεται ως οικεία (Familiar, F), ενώ το άλλο αντικείμενο τοποθετείται σε διαφορετική θέση, διαγώνια ως προς την αρχική, η οποία χαρακτηρίζεται ως νέα (Novel, N). Ο χρόνος παραμονής στο κάθε αντικείμενο της φάσης T₂ καταγράφεται. Σημειώνεται ότι, για την αποφυγή προτίμησης των επιμύων στη θέση ή το υλικό κάποιου αντικείμενου χρησιμοποιείται εναλλάξ διαφορετικό ζεύγος αντικειμένων και γίνεται τοποθέτησή τους σε διαφορετικό

σημείο του κλωβού (δεξιά - αριστερά στις γωνίες). Επίσης, γίνεται καλός καθαρισμός τόσο των αντικειμένων όσο και του δαπέδου του κλωβού με διάλυμα 70% αιθανόλης, πριν την εισαγωγή του κάθε πειραματόζωου στον πειραματικό χώρο για την απάλειψη πιθανών οσμών.



Εικόνα 24. Σχηματική απεικόνιση των φάσεων και της διάταξης των αντικειμένων για τη δοκιμασία αναγνώρισης θέσης αντικειμένου (OLT).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται με τη χρήση ενός Δείκτη Ικανότητας Διάκρισης (Discrimination Index) $DI=(N-F)/(N+F)$, χαρακτηριστικού για το κάθε πειραματόζωο, που ορίζεται ως το πηλίκο της διαφοράς του χρόνου εξερεύνησης του αντικειμένου στην καινούργια θέση μείον τον χρόνο εξερεύνησης του αντικειμένου στην οικεία θέση προς το άθροισμα των δύο αυτών χρόνων, δηλαδή προς τον συνολικό χρόνο εξερεύνησης των δύο αντικειμένων (Cavoy and Delacour, 1993). Αυξημένος χρόνος για το αντικείμενο στη νέα θέση και συνεπώς μεγαλύτερος δείκτης διάκρισης, υποδηλώνει την ύπαρξη μνήμης σχετικά με τη θέση του μη μετατοπισμένου αντικειμένου.

2.2.3 Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου (Object Recognition Task, ORT)

Το μοντέλο αυτό βασίζεται στο πρωτόκολλο που αρχικά περιγράφηκε από τους Ennaceur και Delacour (1998) με ελάχιστες τροποποιήσεις το οποίο έκτοτε έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως ένα μοντέλο αξιολόγησης της αναγνωριστικής (μη-χωρικής) μνήμης μέσω της αυθόρμητης εξερευνητικής δραστηριότητας. Το πειραματικό πρωτόκολλο είναι παρόμοιο με αυτό που ακολουθείται στο OLT (Δοκιμασία Αναγνώρισης Θέσης) και διαφοροποιείται μόνο κατά την τρίτη φάση της δοκιμασίας. Πιο συγκεκριμένα, κατά την φάση T₁ τοποθετούνται στον πειραματικό κλωβό δύο πανομοιότυπα αντικείμενα και αφήνεται ο επίμυς να τα εξερευνήσει για 5 λεπτά. Ο χρόνος που περνά το πειραματόζωο σε κάθε αντικείμενο καταγράφεται από τον ερευνητή. Μετά από μία ώρα ξεκινάει η T₂ φάση, διάρκειας 3 λεπτών, όπου κάθε επίμυς επανατοποθετείται στο κέντρο του κλωβού και αφήνεται να

εξερευνήσει τα αντικείμενα που έχουν τοποθετηθεί στις ίδιες θέσεις με την προηγούμενη φάση αλλά δεν είναι πανομοιότυπα. Συγκεκριμένα, ένα από τα 2 οικεία αντικείμενα παραμένει στη θέση του (F), ενώ ένα νέο αντικείμενο (N) τοποθετείται στην άλλη θέση (**Εικόνα 25**).



Εικόνα 25. Σχηματική απεικόνιση των φάσεων και της διάταξης των αντικειμένων για τη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου (ORT).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται με τη χρήση ενός Δείκτη Ικανότητας Διάκρισης (Discrimination Index) $DI=(N-F)/(N+F)$, χαρακτηριστικού για το κάθε πειραματόζωο, που ορίζεται ως το πηλίκο της διαφοράς του χρόνου εξερεύνησης του νέου αντικειμένου μείον τον χρόνο εξερεύνησης του οικείου αντικειμένου προς το άθροισμα των δύο αυτών χρόνων, δηλαδή προς τον συνολικό χρόνο εξερεύνησης των δύο αντικειμένων. Αυξημένος χρόνος εξερεύνησης για το νέο αντικείμενο και συνεπώς μεγαλύτερος δείκτης διάκρισης, υποδηλώνει την ύπαρξη αναγνωριστικής μνήμης σχετικά με το οικείο αντικείμενο.

2.3 Θυσία πειραματόζωων και απομόνωση εγκεφαλικών περιοχών

Τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν με αποκεφαλισμό, με τη βοήθεια λαϊμητόμου, αφού πρώτα είχαν αναισθητοποιηθεί με ισοφλουράνιο και είχε διαπιστωθεί η απουσία αντανακλαστικού σε μηχανικό ερέθισμα. Οι εγκεφαλοι απομακρύνθηκαν ταχύτατα και μεταφέρθηκαν σε πάγο προκειμένου να απομονωθούν οι περιοχές ενδιαφέροντος μέσω ψυχόμενης μικροτόμου. Οι εγκεφαλικές δομές (PFC, d.hipp), v.hipp) προς ανάλυση επιλέχθηκαν βάσει του ρόλου τους στις ανώτερες γνωστικές λειτουργίες. Ακολούθως, εναποτέθηκαν σε προζυγισμένα και προσημειωμένα με τον αριθμό του πειραματόζωου σωληνάκια erpendorf που ήταν εμβαπτισμένα σε πάγο. Ακολούθησε ζύγιση των erpendorf και καταγραφή, ώστε αφαιρώντας την τιμή του προζυγισμένου σωληναρίου να υπολογιστεί το καθαρό βάρος του εγκεφαλικού ιστού.

2.4 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blotting)

Η ανοσοαποτύπωση ή αλλιώς Western blotting είναι μια ημιποσοτική μέθοδος ανίχνευσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών ενός μίγματος, που συνδυάζει την υψηλή αναλυτική ικανότητα της ηλεκτροφόρησης, την ειδικότητα των αντισωμάτων και την ευαισθησία των ενζυμικών μεθόδων. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση του μοριακού βάρους μιας πρωτεΐνης ενδιαφέροντος καθώς και για την σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεϊνικής έκφρασης (Mahmood and Yang, 2012). Στην παρούσα μελέτη, η τεχνική αυτή αξιοποιήθηκε αρχικά, για την γονοτύπηση των επιμύων (WT ή KO) ώστε να προσδιοριστεί αν εκφράζεται η πρωτεΐνη FMRP, με βάση κάποιο πρωτεϊνικό εκχύλισμα από τους ιστούς που απομονώθηκαν. Επίσης, ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης υπομονάδων των υποδοχέων AMPA (GluR1, GluR2), NMDA (GluN1, GluN2A, GluN2B) καθώς και τα επίπεδα έκφρασης του νευροτροφικού παράγοντα BDNF και του υποδοχέα του TrkB σε ολικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών από τις περιοχές PFC, d.hipp και v.hipp. Επίσης, υπολογίστηκε και ο λόγος GluN2A/GluN2B, όπως προτείνεται από τη βιβλιογραφία για την προσέγγιση της μελέτης των υπομονάδων του NMDA (Yashiro & Philpot, 2008).

2.4.1 Ομογενοποίηση Ιστών (Ολικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών)

Τα δείγματα (ιστοί) που συλλέχθηκαν ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση του συστήματος υπερήχων (Virsonic,). Συγχρόνως, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα λύσης RIPA (**Πίνακας 1**) το οποίο εμπλουτίστηκε με αναστολείς φωσφατασών και πρωτεασών (RIPA⁺) (**Πίνακας 2**). Συγκεκριμένα, προστέθηκαν 200μL RIPA⁺ σε κάθε δείγμα και εφαρμόστηκαν 2x15 sec στους υπερήχους (Amplitude:80), με ενδιάμεσο διάλειμμα 10 sec, ενώ σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας τα δείγματα κρατήθηκαν στον πάγο. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν υπό ανάδευση στους 4°C για 1 ώρα και έπειτα, φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (Eppendorf® 5415C) στις 14000 στροφές (rpm) σε θερμοκρασία των 4°C. Τα ληφθέντα υπερκείμενα μεταφέρθηκαν σε νέα σωληνάρια eppendorf και αποθηκεύτηκαν στους - 80 °C, έως ότου έγινε η ανάλυσή τους με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Πίνακας 1. Τα συστατικά και οι ποσότητες τους για την παρασκευή του διαλύματος λύσης RIPA. Σημειώνεται ότι ο τελικός όγκος (50mL) συμπληρώνεται με ddH₂O.

<i>Compound</i>	<i>Stock concentration</i>	<i>Concentration RIPA</i>	<i>V_{tot} for 50mL RIPA</i>
<i>Tris-HCl pH=7,5</i>	1 M	50 mM	2,5 mL
<i>NaCl</i>	5 M	150 mM	1,5 mL
<i>EDTA (pH=8)</i>	0,5 M	2 mM	200 μL
<i>SDS</i>	10 %	0.1 %	500 μL
<i>NaDOC</i>	10 %	1 %	5 mL
<i>Triton</i>	10 %	1 %	5 mL
<i>Glycerol</i>	100 %	10 %	5 mL

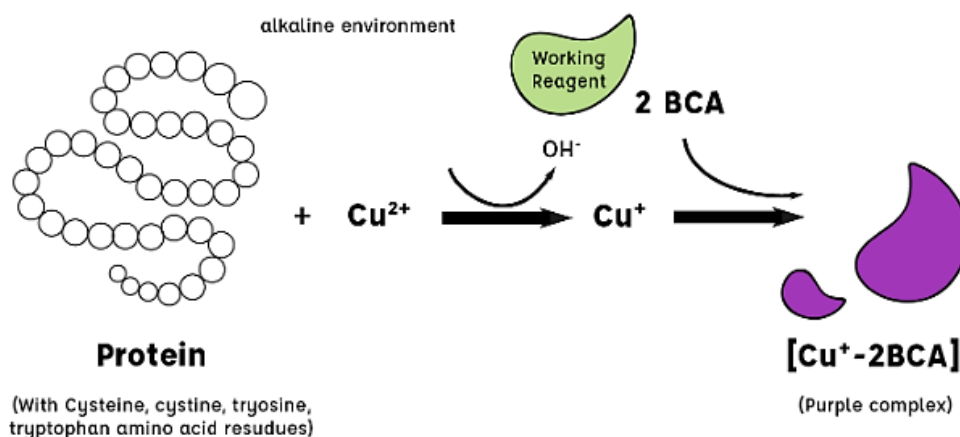
Πίνακας 2. Τα συστατικά και οι ποσότητες τους για την παρασκευή του διαλύματος λύσης RIPA⁺. Σημειώνεται ότι ο τελικός όγκος (50mL) συμπληρώνεται με διάλυμα RIPA. NaF: Αναστολέας φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης, NaVO₃: Αναστολέας τυροσινικής φωσφατάσης, PMSF: Αναστολέας πρωτεασών σερίνης, BGP: αναστολέας φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης, Na₃MoO₄: Σταθεροποιεί τους υποδοχείς και λειτουργεί ως αναστολέας φωσφατασών.

<i>Compound</i>	<i>Stock concentration</i>	<i>Concentration RIPA⁺</i>	<i>V_{tot} for 2,5 mL RIPA⁺</i>
<i>NaVO₃</i>	0,2 M	2 mM	25 μL
<i>Na₃MoO₄</i>	0,1 M	2 mM	50 μL
<i>BGP</i>	0,5 M	5 mM	10 μL
<i>NaF</i>	0,5 M	5 mM	10 μL
<i>PMSF</i>	0,1 M	1 mM	5 μL
<i>Protease inhibitors</i>	-	-	5 μL

2.4.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ολικών πρωτεϊνών

Η μέτρηση της ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των ομογενοποιημένων δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βιοχημική μέθοδο BCA (Bicinchoninic Acid) χρησιμοποιώντας το πακέτο BCA Protein Assay (Pierce™ BCA Protein Assay Kit), με τη χρήση φασματοφωτόμετρου NanoDrop (NanoDrop 2000 Thermo Scientific, USA). Η μέθοδος συνδυάζει την αναγωγή του Cu²⁺ σε Cu¹⁺ από πρωτεΐνη σε ένα αλκαλικό μέσο, με την εξαιρετικά ευαίσθητη και εκλεκτική χρωματομετρική ανίχνευση του κατιόντος χαλκού (Cu¹⁺) από το δικινχονικό οξύ (BCA) (Εικόνα 26). Το πρώτο βήμα

είναι η χηλοποίηση του χαλκού με την πρωτεΐνη σε αλκαλικό περιβάλλον για να σχηματιστεί ένα ανοιχτό μπλε σύμπλοκο (αντίδραση διουρίας). Στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης, το ανηγμένο κατιόν του χαλκού που σχηματίστηκε στο πρώτο βήμα αντιδρά με δύο μόρια BCA και παράγεται ένα προϊόν με έντονο πορφυρό χρώμα. Το σύμπλοκο BCA/χαλκού είναι υδατοδιαλυτό και εμφανίζει ισχυρή απορρόφηση στα 562 nm. Το χρώμα που δημιουργείται στη μέθοδο BCA οφείλεται στην μακρομοριακή δομή της πρωτεΐνης, στον αριθμό των πεπτιδικών δεσμών και στην παρουσία τεσσάρων αμινοξέων (κυστεΐνη, κυστίνη, τρυπτοφάνη και τυροσίνη) (Smith *et al.*, 1985). Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης προσδιορίζεται με βάση μια κοινή γνώστη πρωτεΐνη όπως είναι η αλβουμίνη βοός (BSA). Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν διαλύματα stock 1mL με συγκεντρώσεις 125μg/mL, 250μg/mL, 500μg/mL, 750μg/mL, 1mg/mL, 1.5mg/mL και 2mg/mL BSA σε ddH₂O. Για κάθε 5μL των παραπάνω διαλυμάτων προστέθηκαν 100μL από το διάλυμα εργασίας (Reagent A και Reagent B με το δεύτερο να αποτελεί το 1/50 του τελικού όγκου) και ακολούθησε ανάδευση και επώαση των δειγμάτων για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο (37°C). Η απορρόφηση των διαλυμάτων μετρήθηκε στα 562 nm και κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα υπό εξέταση δείγματα, αφού πρώτα αραιώθηκαν με ddH₂O σε αναλογία 1:5. Μετά την μέτρηση της απορρόφησης τους υπολογίστηκε η συγκέντρωση πρωτεϊνών τους σε mg/mL, με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης αναφοράς.



Εικόνα 26. Βασική αντίδραση στη μέθοδο BCA για την παραγωγή έγχρωμου προϊόντος.

2.4.3 Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Η προετοιμασία των δειγμάτων γίνεται έτσι ώστε όλα τα δείγματα να περιέχουν την ίδια ποσότητα πρωτεΐνης πριν ηλεκτροφορηθούν. Τα δείγματα αραιώνονται με ρυθμιστικό διάλυμα ισοφόρτωσης πρωτεϊνών (Laemmli loading Buffer, LB) (**Πίνακας 3**). Το ρυθμιστικό διάλυμα Laemmli δημιουργεί εξαιρετικές συνθήκες για τον ποιοτικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθός τους καθώς περιέχει γλυκερόλη, Tris HCl, SDS, μπλε της βρωμοφαινόλης και β-μερκαπτοαιθανόλη. Πιο συγκεκριμένα, το SDS ως γνωστό απορρυπαντικό μετουσιώνει τις πρωτεΐνες διασπώντας τους μη ομοιοπολικούς δεσμούς και αποσταθεροποιώντας έτσι τη δομή τους. Επίσης, προσθέτει αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες προκαλώντας απώθηση μεταξύ των αμινοξέων, το οποίο οδηγεί σε αναδίπλωση της πρωτεΐνης και τάση προς τη γραμμικοποίηση της. Η β-μερκαπτοαιθανόλη χρησιμοποιείται για τη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών που δημιουργούνται μεταξύ των αμινοξέων. Το Tris σταθεροποιεί το πρωτεϊνικό εκχύλισμα, αναστέλλει τις ενζυμικές αντιδράσεις και εμποδίζει τις πρωτεάσες των κυττάρων να επηρεάσουν τις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος. Για τη διασφάλιση ότι τα δείγματα θα παραμείνουν εντός του πηγαδιού της πηκτής ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται γλυκερόλη υψηλής πυκνότητας. Όσον αφορά στο μπλε της βρωμοφαινόλης, αποτελεί ένδειξη για το μέτωπο της ηλεκτροφόρησης καθώς οι πρωτεΐνες διασχίζουν την πηκτή. Στα δείγματα μετά την ομογενοποίηση προστέθηκε κατάλληλος όγκος LB 6x, ώστε στον τελικό τους όγκο να περιέχουν LB σε συγκέντρωση 1x. Η διαδικασία της αραιώσης πραγματοποιείται σε απαγωγό και με τα δείγματα σε πάγο. Ακολούθησε επιπλέον αραιώση των δειγμάτων με την προσθήκη LB 1x σε όγκους που υπολογίζονται ξεχωριστά για το κάθε δείγμα ανάλογα με την ποσότητα πρωτεΐνης που περιέχει. Μετά την αραιώση πραγματοποιήθηκε περαιτέρω αποδιάταξη των πρωτεϊνών μέσω θέρμανσης στους 95°C για 5 λεπτά μέσω της συσκευής Heatblock (Stuart block heater SBH130DC, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK). Έπειτα, τα δείγματα αναδεύτηκαν μέσω vortex και έγινε spin down.

Πίνακας 3. Συστατικά και οι ποσότητες τους για την παρασκευή διαλύματος Laemli 6X. Σημειώνεται ότι η β-μερκαπτοαιθανόλη προστίθεται στο τέλος.

Laemmli loading Buffer	
<i>SPS 10%</i>	1,8 g
<i>Tris-HCl pH=6.8</i>	7,5 mL
<i>Bromophenol blue</i>	6 mg
<i>Glycerol</i>	9,6 mL
<i>ddH₂O</i>	1,1 mL

2.4.4 Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου είναι μια αναλυτική μέθοδος, η οποία επιτρέπει το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Πραγματοποιείται σε αποδιατακτικές συνθήκες με τη βοήθεια του αποδιατακτικού παράγοντα SDS, ο οποίος, όπως ήδη αναφέρθηκε, καταργεί τις ενδομοριακές δυνάμεις μεταξύ των πρωτεϊνών και τους προσδίδει αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο. Η δέσμευση του SDS γίνεται με λόγο 1 μόριο SDS ανά 2 αμινοξέα, με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να έχουν όμοιες αναλογίες φορτίου/μεγέθους και συνεπώς η μετακίνησή τους στην πηκτή υπό την εφαρμογή τάσης να είναι ανάλογη του μοριακού τους μεγέθους. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται ο διαχωρισμός τους με βάση το μοριακό βάρος και όχι το ηλεκτρικό τους φορτίο. Οι πρωτεΐνες μετακινούνται προς το θετικό πόλο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το μέγεθός τους.

Το σύστημα ηλεκτροφόρησης είναι δύο φάσεων, που σημαίνει πως υπάρχουν 2 ειδών πηκτές για την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) και η πηκτή διαχωρισμού (separating gel) (**Πίνακας 4**). Η πηκτή (γέλη) επιστοίβαξης είναι χαμηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο και σκοπός της είναι να διασφαλίσει ότι όλες οι πρωτεΐνες θα εισέλθουν ταυτόχρονα στην πηκτή διαχωρισμού, η οποία είναι υψηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο. Μάλιστα, η ακριβής περιεκτικότητα της πηκτής διαχωρισμού διαφέρει ανάλογα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος καθώς το μέγεθος των πόρων καθορίζεται από την συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου. Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πηκτές διαχωρισμού 10-12%, ενώ η πηκτή επιστοίβαξης είναι

πάντοτε 5%. Η πηκτή διαχωρισμού παρασκευάζεται πρώτη και όταν πήξει παρασκευάζεται η πηκτή επιστοίβαξης στην οποία τοποθετούνται κατάλληλα «χτενάκια» για να δημιουργηθούν οι θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης (Biorad, Mini-PROTEAN[®] 3 Cell) πληρώνεται με την ανάλογη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών, Running Buffer 1x αραιωμένο κατάλληλα από το αντίστοιχο 5x (**Πίνακας 5**). Παράλληλα με τα δείγματα φορτώνεται και πρωτεϊνικός δείκτης με γνωστό μοριακό βάρος (marker), ενώ το τροφοδοτικό ρυθμίζεται στα 110-120 Volt. Η ηλεκτροφόρηση ξεκινά στα 120 Volt για 20 λεπτά περίπου μέχρι να διαχωριστούν ελαφρώς οι πρωτεΐνες του μάρτυρα και τα πρωτεϊνικά δείγματα να διαπεράσουν το πήκτωμα επιστοίβαξης, ενώ στη συνέχεια γίνεται στα 150 Volt μέχρι το μέτωπο της ηλεκτροφόρησης να διατρέξει όλο το μήκος του πηκτώματος διαχωρισμού.

Πίνακας 4. Συστατικά και ποσότητες για τις πηκτές επιστοίβαξης και διαχωρισμού. Σημειώνεται ότι οι ποσότητες αντιστοιχούν σε 2 πηκτές ανά κατηγορία. Επίσης, τα αντιδραστήρια APS and TEMED είναι υπεύθυνα για την κατάλυση του πολυμερισμού της πηκτής για αυτό προστίθενται τελευταία.

Διάλυμα	Separating gel 10%	Separating gel 12%	Stacking gel 5%
<i>ddH₂O</i>	5,9 mL	4,9 mL	3,4 mL
<i>30% Acrylamide mix</i>	5,0 mL	6,0 mL	830 μL
<i>Tris 1,5M, pH=8,8 (sep.)</i>	3,8 mL	3,8 mL	1,0 M, pH=6,6 630 μL
<i>SDS 10%</i>	150 μL	150 μL	50 μL
<i>APS 10%</i>	150 μL	150 μL	50 μL
<i>TEMED</i>	6 μL	6 μL	5 μL

Πίνακας 5. Συστατικά και ποσότητες για το Running Buffer (5x) σε όγκο ddH₂O ίσο με 1,2L.

Running Buffer (5x)	
Tris-base	15 g
Glycine	72 g
SDS	5 g

2.4.5 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών (Transfer) και χρώση της μεμβράνης (Ponceau)

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Υγρής Μεταφοράς (Wet Transfer), κατά την οποία οι πρωτεΐνες του πηκτώματος μεταφέρθηκαν ηλεκτροφορητικά πάνω σε

μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Protran, pore size 0.45μm). Συγκεκριμένα, μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου απομακρύνεται από τη συσκευή της ηλεκτροφόρησης και τις γυάλινες πλάκες. Το πήκτωμα επιστοίβασης αφαιρείται με τη βοήθεια των spacers και το πήκτωμα διαχωρισμού τοποθετείται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (**Πίνακας 6**), για να απομακρυνθούν τα ρυθμιστικά άλατα της ηλεκτροφόρησης και τα απορρυπαντικά. Ταυτόχρονα με το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς διαβρέχονται και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, τα διηθητικά χαρτιά, καθώς και τα ειδικά σφουγγαράκια της συσκευής. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και τα χαρτιά κόβονται στο μέγεθος του πηκτώματος. Αφού διαποτίζονται πλήρως με το διάλυμα μεταφοράς, τοποθετούνται προσεκτικά στην ειδική συσκευή (Criterion™ Blotter) ώστε να σχηματιστεί το «sandwich» της ηλεκτρομεταφοράς ως εξής: σφουγγαράκι - 2 χαρτάκια - πήκτωμα διαχωρισμού – μεμβράνη - 2 χαρτάκια - σφουγγαράκι. Πριν τη μετακίνηση του «sandwich» ηλεκτρομεταφοράς στην ειδική κασέτα υφίσταται rolling έτσι ώστε να αποκλειστούν τυχόν φυσαλίδες αέρα που έχουν παγιδευτεί στο εσωτερικό του. Γίνεται πλήρωση της συσκευής με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς, τοποθετείται παγοκύστης και το τροφοδοτικό ρυθμίζεται στα 400 mA, με τη διαδικασία της μεταφοράς να διαρκεί περίπου μία ώρα. Μετά το πέρας της μεταφοράς, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης διαβρέχθηκε με ddH₂O και ακολούθησε η χρώση της με κατάλληλη χρωστική (Ponceau Rouge, (Sigma-Aldrich P7170), ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Ακολούθησε πλύση των μεμβρανών με ddH₂O, ώστε να απομακρυνθεί η χρώση.

Πίνακας 6. Συστατικά και ποσότητες για το Transfer Buffer (1x) με τελικό όγκο 1L ο οποίος συμπληρώνεται με ddH₂O.

Transfer Buffer (1x)	
<i>Glycine</i>	14.4 g
<i>Tris</i>	3.03 g
<i>MetOH</i>	200 mL

2.4.6 Ανοσοαποτύπωση

Οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης του αντισώματος στη μεμβράνη πρέπει να καλυφθούν για να επιτευχθεί ειδική δέσμευση του αντισώματος στην πρωτεΐνη

στόχο. Για αυτό το λόγο, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα αποκλεισμού, δηλαδή με διάλυμα 5% γάλακτος (0,5g σκόνη άπαχου γάλακτος σε 10mL ρυθμιστικού διαλύματος TBST) υπό ανακίνηση. Για την παρασκευή TBST αρχικά αραιώνεται κατάλληλα το διάλυμα TBS 10x (**Πίνακας 7**) και στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 1 mL διαλύματος Tween20 ανά 1000 mL TBS 1x. Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης 3 φορές με περίσσεια διαλύματος TBST, για 5 λεπτά και έπειτα η ολονύκτια (overnight) επώασή της με το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο αραιώνεται κατάλληλα με το ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού BSA ή το διάλυμα γάλακτος. Στη συνέχεια γίνεται έκπλυση της μεμβράνης 3 φορές για 5 λεπτά με TBST και επωάζεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το δευτερογενές αντίσωμα το οποίο αραιώνεται σε διάλυμα 5% γάλακτος. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο horseradish peroxidase (HRP) και αναγνωρίζει ανοσοσφαιρίνες του ζώου από το οποίο έχει παραχθεί το πρωτογενές αντίσωμα. Τέλος γίνονται 5 πλύσεις των 5 λεπτών με TBST. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη με τις αντίστοιχες αραιώσεις τους αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 8**).

Πίνακας 7. Συστατικά και ποσότητες για την παρασκευή διαλύματος TBS 10x. Σημειώνεται ότι μετά την ρύθμιση του pH=7,4 συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι το 1L με ddH₂O.

TBS 10x (pH=7,4)	
Tris	60,6 g
NaCl	88 g
ddH ₂ O	800 mL

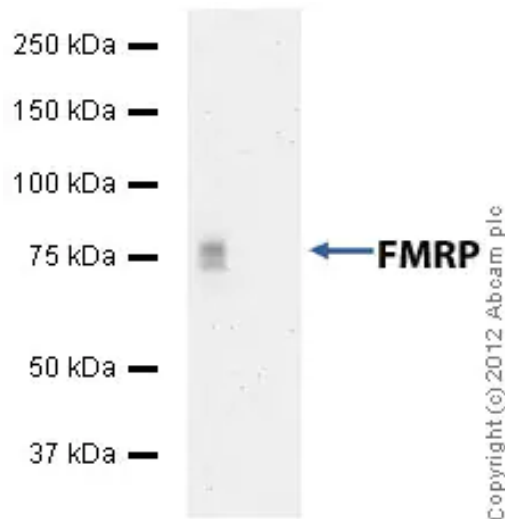
Πίνακας 8. Αναγράφονται τα χαρακτηριστικά των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

Name	Code	Molecular Weight (KDa)	Dilution for 1st Antibody	Organism	Dilution for 2nd Antibody
<i>α-tubulin</i>	T61995A	50	1:10000	Mouse	1:5000
<i>FMRP</i>	ab17722 Abcam	71	1:2000	Rabbit	1:4000
<i>GluN1</i>	D6SB7	120	1:1000	Rabbit	1:4000
<i>GluN2A</i>	4205S C.S	180	1:1000	Rabbit	1:4000
<i>GluN2B</i>	D8E10 C.S	180	1:1000	Rabbit	1:4000
<i>BDNF</i>	ab108319 Abcam	14 (Mature BDNF)	1:1000	Rabbit	1:4000
<i>TrkB</i>	80E3 C.S	90-140	1:1000	Rabbit	1:4000
<i>GluR1</i>	D4N9V C.S	100	1:4000	Rabbit	1:4000
<i>GluR2</i>	E1L8U C.S	100	1:4000	Rabbit	1:4000

2.4.7 Οπτικοποίηση μπαντών και ποσοτικοποίηση

Καθώς το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο με HRP, η ανίχνευση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με το σύστημα ECL (Enhanced ChemiLuminescence) (Biorad, Clarity™ Western ECL Blotting Substrates) που βασίζεται στη χημειοφωταύγεια. Οι μεμβράνες επωάζονται για 5 λεπτά στο σύστημα λουμινόλης - ενισχυτή ως εξής: αναμιγνύονται 2,5mL από το κάθε συστατικό (λουμινόλη και ενισχυτής, reagents A και B) ακριβώς πριν την εφαρμογή. Η αντίδραση της λουμινόλης με το συνδεδεμένο με υπεροξειδάση (HRP) αντίσωμα οδηγεί στην οξείδωσή της. Στη συνέχεια, η λουμινόλη επανέρχεται στη βασική της κατάσταση με εκπομπή φωτονίου και παράγει έτσι φωτεινό σήμα, το οποίο αποτυπώνεται σε κατάλληλο σύστημα απεικόνισης. Η εμφάνιση πραγματοποιείται με τη χρήση κάμερας που συνδέεται με το Chemidoc XRS software (Biorad) και το λογισμικό Quantity One. Η οπτική πυκνότητα κάθε ζώνης πρωτεΐνης μετρήθηκε με ημιποσοτικό τρόπο με χρήση κατάλληλου λογισμικού (ImageJ for Windows). Συγκεκριμένα, ορίστηκε ένα ορθογώνιο πλαίσιο σταθερού εμβαδού που περιέκλειε την κάθε ζώνη των πρωτεϊνών και μετρήθηκε η ένταση του σήματος (optical density, O.D.) στο εσωτερικό του. Για την κανονικοποίηση των δειγμάτων και για να αποδοθεί η ακριβής οπτική απορρόφησή τους, η οπτική πυκνότητα κάθε ζώνης διαιρέθηκε με την οπτική πυκνότητα της ζώνης της α -τουμπουλίνης από το ίδιο δείγμα.

Σημειώνεται ότι, στην περίπτωση της FMRP δεν έγινε κάποια ποσοτικοποίηση, απλώς ελέγχθηκε αν υπάρχει ή όχι η αντίστοιχη μπάντα στη μεμβράνη (**Εικόνα 27**) προκειμένου να προσδιοριστεί ο γονότυπος των επιμύων (WT ή KO).



Εικόνα 27. Τυπική εικόνα μετά από western blotting για την ανίχνευση της FMRP.

2.5 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) είναι μια εξελιγμένη μορφή της κλασσικής υγρής χρωματογραφίας και ορίζεται ως εκείνη η τεχνική ανάλυσης κατά την οποία ένα μείγμα ενώσεων διαχωρίζεται περνώντας μέσα από ένα πορώδες υλικό, την στατική φάση. Για να μπορέσει να περάσει το μείγμα μέσα από τη στατική φάση είναι απαραίτητη η χρήση ενός διαλύματος (κινητή φάση) το οποίο θα παρασύρει το μείγμα διαμέσου αυτής. Η διαβίβαση της κινητής φάσης μέσα από τη στατική επιτυγχάνεται με τη βοήθεια της βαρύτητας (υγρή χρωματογραφία) ή με την χρήση αντλιών χαμηλής πίεσης. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με βάση την ικανότητα που έχει κάθε ένωση του μείγματος να παραμένει τόσο στην στατική όσο και στην κινητή φάση. Οι ενώσεις που έχουν χημικά περισσότερο συγγένεια με την στατική φάση όταν περνούν διαμέσου αυτής, έχουν την τάση να προσδένονται σε αυτή πιο εύκολα με αποτέλεσμα να παραμένουν μεγαλύτερο χρόνο εντός της στήλης (Durai *et al.*, 2020).

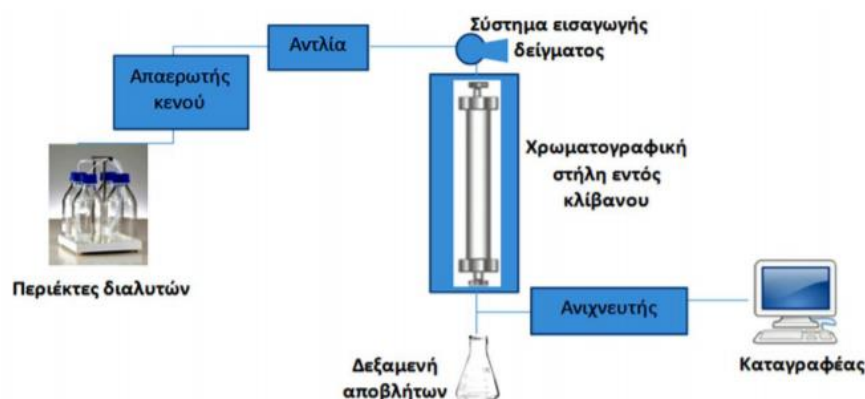
Η HPLC είναι μία από τις πιο διαδεδομένες αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού. Η ευαισθησία της, η εύκολη προσαρμογή της σε ακριβείς ποσοτικούς και ποιοτικούς προσδιορισμούς, η καταλληλότητά της για τον διαχωρισμό ποικίλων ενώσεων και ειδικότερα μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων ουσιών, είναι μόνο μερικοί από τους λόγους για τους οποίους αυτή η τεχνική είναι τόσο διαδεδομένη.

Η HPLC βρίσκει εφαρμογή στην ανάλυση πολλών τύπων ενώσεων όπως είναι τα αμινοξέα, οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα, οι υδατάνθρακες, τα φαρμακευτικά σκευάσματα και διάφορες ανόργανες ουσίες (Swadesh, 2000).

Σκοπός της αξιοποίησης της HPLC στην παρούσα μελέτη ήταν να προσδιοριστούν τα ιστικά επίπεδα του γλουταμικού (Glutamate, Glu), του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) αλλά και της γλουταμίνης (Glutamine, GLN) στις περιοχές PFC, d.hipp και v.hipp των επιμύων, ώστε να αξιολογηθούν τυχόν αλλαγές στη λειτουργία του γλουταματεργικού συστήματος.

2.5.1 Οργανολογία Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης

Η βασική διάταξη του συστήματος της HPLC (**Εικόνες 28, 29**) αποτελείται από το σύστημα άντλησης της κινητής φάσης, τον απαερωτή κενού, το σύστημα έγχυσης του δείγματος, τη χρωματογραφική στήλη εντός κλίβανου, τον ανιχνευτή και το πρόγραμμα καταγραφής (Karkalousos P, 2015).



Εικόνα 28. Η βασική διάταξη ενός συστήματος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC). (Karkalousos P, 2015).



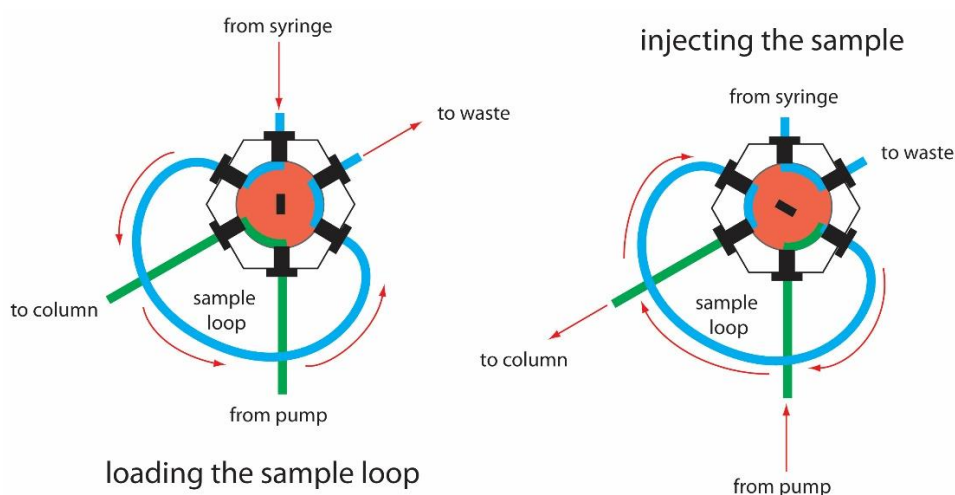
Εικόνα 29. Απεικόνιση του συστήματος της HPLC που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Σύστημα αποθήκευσης και άντλησης κινητής φάσης

Ο διαλύτης, πριν την αποθήκευσή του στο δοχείο, πρέπει να απαερώνεται και να φιλτράρεται έτσι ώστε να απομακρυνθούν ο αέρας και τυχαίες προσθήκες όπως σκόνη. Τόσο ο αέρας όσο και η σκόνη προκαλούν ποικίλα προβλήματα στην λειτουργία της HPLC. Τέτοια προβλήματα μπορεί να είναι αστάθεια της γραμμής βάσης (baseline), αδυναμία επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων ή εμφάνιση άγνωστων κορυφών δηλαδή χρωματογραφικές κορυφές που οφείλουν την ύπαρξή τους σε ενώσεις οι οποίες κανονικά δεν θα έπρεπε να υπάρχουν στο μείγμα που αναλύεται, γνωστές επίσης και ως «ghost peaks». Τα φίλτρα αυτά μπορεί να είναι τόσο εξωτερικά (διαφορετική συσκευή) όσο και να αποτελούν κομμάτι της HPLC. Στην παρούσα μελέτη, η συσκευή της HPLC διέθετε ενσωματωμένο απαερωτή, ενώ το φιλτράρισμα της κινητής φάσης έγινε σε ξεχωριστή συσκευή με διήθηση υπό κενό μέσω εξειδικευμένων μεμβρανικών φίλτρων Millipore μεγέθους πόρων 0,45μm. Επίσης, η αντλία του συστήματος HPLC που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ήταν η αντλία δύο πιστονιών YL9112 Plus Isocratic Pump (YOUNG in Chromass) και ο ρόλος της είναι στην παροχή συνεχούς άντλησης και προώθησης της κινητής φάσης διαμέσου του συστήματος υπό ρυθμιζόμενη υψηλή πίεση και ροή. Η ροή της κινητής φάσης μέσα από το σύστημα της HPLC ρυθμίστηκε ισοκρατικά στα 0,9 mL/min.

Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος εισαγωγής δείγματος στην HPLC βασίζεται σε βρόχους δειγμάτων (**Εικόνα 30**). Ο σκοπός είναι να γίνει έγχυση του δείγματος στην υψηλής πίεσης κινητή φάση χωρίς να προκληθεί διακοπή στη ροή. Ο όγκος του βρόχου (loop) ρυθμίστηκε στα 20 μL και παράλληλα από την γραμμή εντολών επιλέχθηκε κάθε ένεση να γίνεται υπό μορφή full loop, το οποίο σημαίνει ότι ο δειγματολήπτης για κάθε ένεση θα χρειαζόταν $20 \times 3 = 60 \mu\text{L}$. Η επιπλέον ποσότητα των 40 μL χρησιμοποιείται για την έκπλυση του loop, ενώ τα τελευταία εναπομείναντα 20 μL είναι αυτά που αναλύονται, αποτελούν δηλαδή την ποσότητα που θα εισαχθεί εντός του χρωματογράφου ο οποίος ήταν συνδεδεμένος με σύστημα αυτόματης έγχυσης Autosampler (HT4000 Series from HTA s.l.r). Τα συστήματα αυτά είναι ικανά να εισάγουν μέσω ρομποτικής βαλβίδας δείγματα από φιαλίδια που βρίσκονται αποθηκευμένα σε χώρους με ελεγχόμενη θερμοκρασία.



Εικόνα 30. Εικόνα τυπικού βρόχου εισαγωγής δείγματος. Η συσκευή αλλάζοντας την διαμόρφωσή της μπορεί να εισάγει το δείγμα εντός του κλειστού κυκλώματος της κινητής φάσης. Στην πρώτη περίπτωση η συσκευή βρίσκεται στην κατάσταση φόρτωσης, κατά την οποία το δείγμα τοποθετείται εντός του χώρου αποθήκευσής του πριν την εισαγωγή στη στήλη (loop), χωρίς να έρχεται σε επαφή με την κινητή φάση. Στην δεύτερη περίπτωση με την αλλαγή της διάταξης, η διαδρομή που ακολουθεί η κινητή φάση αλλάζει έτσι ώστε να περνάει εντός του βρόχου παρασέρνοντας έτσι το δείγμα (Skoog et al., 2020).

Χρωματογραφική στήλη

Οι στήλες χρωματογραφίας είναι το σημαντικότερο κομμάτι ενός μηχανήματος HPLC. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία αντιστροφής φάσης (reversed-phase chromatography) όπου η στατική φάση είναι

μη πολική, συχνά ένας υδρογονάνθρακας, και η κινητή φάση είναι σχετικά πολικός διαλύτης όπως ύδωρ, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο ή κάποιο μείγμα τέτοιου τύπου ενώσεων. Κατά την έκλουση, το πολικότερο συστατικό εμφανίζεται πρώτο αφού κατακρατείται λιγότερο από την μη πολική στατική φάση. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Hypersil™ ODS C₁₈ (Columns from Thermo Scientific™), το πληρωτικό υλικό της οποίας αποτελείται από μακριές αλυσίδες υδρογονανθράκων (C₁₈), διαστάσεων 250mm μήκους * 4,6 mm εσωτερικής διαμέτρου και διάμετρο σωματιδίων 5μm. Σημειώνεται ότι θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση διαλυμάτων με τιμές pH μεγαλύτερες από περίπου 7,5 και μικρότερες από 2,5 λόγω υδρόλυσης ή καταστροφής του υλικού πλήρωσης της στήλης. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός της πίεσης εντός της στήλης που όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ελέγχεται με τη βοήθεια της αντλίας, εξίσου σημαντική για να γίνει σωστά η ανάλυση είναι και η θερμοκρασία. Γι' αυτό το λόγο, η στήλη βρίσκεται σε θερμοστατούμενο κλίβανο, ενώ τόσο η στήλη όσο και η κινητή φάση πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου, καθώς διαφορετική θερμοκρασία μπορεί να αλλάξει τα αποτελέσματα της ανάλυσης και συνεπώς να μην υπάρχει επαναληψιμότητα και γραμμικότητα (Karkalousos P, 2015).

Ανιχνευτής

Ο ανιχνευτής στην HPLC είναι ένα από τα πιο κρίσιμα στοιχεία του συστήματος, γιατί καθιστά ορατό το διαχωρισμό που επιτυγχάνεται μέσω της στήλης. Οι ανιχνευτές στην HPLC είναι συχνά παραδοσιακά αναλυτικά όργανα προσαρμοσμένα σε κυψελίδες ροής για να μετρούν χαμηλές συγκεντρώσεις αναλυτών. (Skoog *et al.*, 2020). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ηλεκτροχημικός ανιχνευτής DECADE Elite - Antec Scientific, κυψελίδα SenCell™ με γέφυρα άλατος (Ag/AgCl) βασιζόμενος στην αμπερομετρία. Οι ανιχνευτές αυτού του τύπου παρουσιάζουν πλεονεκτήματα, όπως υψηλή ευαισθησία, απλότητα και ευρεία χρήση, ενώ η λειτουργία τους βασίζεται στην οξείδωση ή αναγωγή δραστικών ομάδων των ουσιών στο δείγμα προς ανάλυση με αποτέλεσμα αυτές να ανιχνεύονται. Σημειώνεται ότι, τα αμινοξέα που εξετάστηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη (Glu, GABA, GLN) καθίστανται ανιχνεύσιμα μετά από κατάλληλη αντίδραση παραγωγοποίησης. Το δυναμικό του ηλεκτροχημικού ανιχνευτή ρυθμίστηκε στα

800 Volt και το εύρος (range) στα 50 nA. Όσο πιο χαμηλά ρυθμίζεται η τιμή του range, τόσο πιο ευαίσθητο γίνεται το ηλεκτρόδιο να αντιδρά και να παράγει ηλεκτρικό ρεύμα, με αποτέλεσμα ο ανιχνευτής να έχει τη δυνατότητα να καταγράψει και τις πιο μικρές κορυφές.

Πρόγραμμα καταγραφής

Το σύστημα της HPLC ήταν συνδεδεμένο με υπολογιστή που είχε πρόγραμμα ανάλυσης (Clarity™) μέσω των οποίου γινόταν η συλλογή, αποθήκευση και επεξεργασία των σημάτων των ανιχνευτών. Μάλιστα, μέσω του προγράμματος έγινε σύνδεση των τμημάτων της HPLC ώστε συνολικά να λειτουργεί κατά αυτοματοποιημένο τρόπο.

2.5.2 Σχεδιασμός πειραματικής διαδικασίας

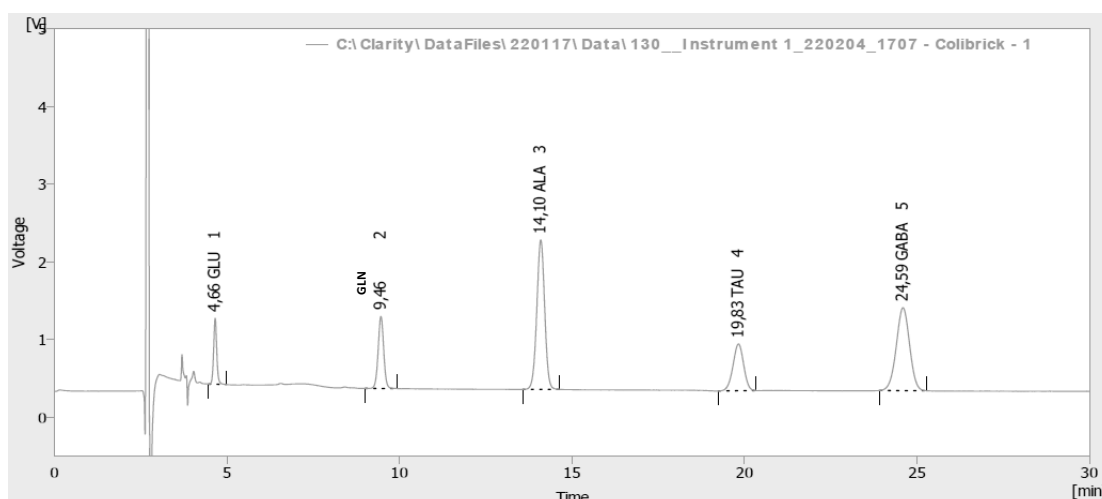
Παρασκευή διαλυμάτων

Κινητή φάση

Για την παρασκευή 500mL ρυθμιστικού διαλύματος κινητής φάσης ζυγίζονται 4,4g $C_6H_8O_7 \cdot 1H_2O$ (Citric acid monohydrate), 10,3g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (Sodium dihydrogen phosphate dihydrate) και 190mg $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$. Ακολουθεί ανάδευση σε 400mL ddH₂O, ρύθμιση pH=5,26 με χρήση διαλύματος HCl 4N και συμπληρώνεται ο υπόλοιπος όγκος μέχρι τα 500mL με ddH₂O. Έπειτα, γίνεται προσθήκη ακετονιτρίλιου (ACN 70%) ώστε η τελική συγκέντρωση του στην κινητή φάση να είναι 5%. Αφού διηθηθεί υπό κενό η κινητή φάση τοποθετείται στο δοχείο αποθήκευσης της HPLC.

Η χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος έχει την ικανότητα να διατηρήσει σταθερό το pH του και κατά συνέπεια το baseline, μετά την εισαγωγή του δείγματος. Η τιμή του pH είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς μπορεί να καθορίσει την συνολική πολικότητα των ενώσεων, ενώ αλλαγή της πολικότητας όχι μόνο αλλάζει τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες αλλά επηρεάζει και τον τρόπο πρόσδεσής και συνεπώς και τον τρόπο αλληλεπίδρασής τους με τη στατική φάση της στήλης. Σαν αποτέλεσμα αλλάζει ο χρόνος κατακράτησης της κάθε ένωσης εντός της στήλης το οποίο με την σειρά του επηρεάζει τον χρόνο που χρειάζεται η ένωση για να φτάσει

στον ανιχνευτή. Με την τιμή του pH που επιλέχθηκε στην παρούσα εργασία τα αμινοξέα δεν είχαν μεταξύ τους τον ίδιο χρόνο έκλουσης και επομένως οι χρωματογραφικές κορυφές τους δεν αλληλοεπικαλύπτονταν (**Εικόνα 31**). Όσον αφορά τη χρήση του EDTA, λόγω της φύσης των αμινομάδων και των καρβοξυλομάδων που υπάρχουν στο μόριο του μπορεί και δρα σαν χηλικός υποκαταστάτης, σχηματίζοντας χηλικά σύμπλοκα με ελεύθερα κατιόντα μετάλλων που υπάρχουν εντός της στήλης και να τα αδρανοποιεί. Τα ιόντα αυτά υπό κανονικές συνθήκες μπορούν και οξινίζουν ελαφρώς την στήλη, διαταράσσοντας ελαφρώς την συνοχή του pH εντός της, κάτι που με την σειρά του δυσχεραίνει τον χρωματογραφικό διαχωρισμό. Επίσης, μπορούν και σχηματίζουν ασθενείς δεσμούς με οργανικές ενώσεις, δηλαδή δημιουργούν σύμπλοκα με αυτές, το οποίο οδηγεί στην περαιτέρω κατακράτηση των ουσιών αυτών εντός της στήλης.



Εικόνα 31. Χαρακτηριστική εικόνα χρωματογραφήματος όπως προκύπτει από την ανίχνευση των αμινοξέων *Glu*, *GLN*, *Ala*, *Tau* και *GABA* .

Διάλυμα υπερχλωρικού οξέος (HClO_4) 0,2 N

Για την παρασκευή 500mL διαλύματος HClO_4 ζυγίζονται 750mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (Sodium Metabisulfate), 250mg EDTA και ακολουθεί ανάδευση με 400mL ddH_2O . Στη συνέχεια προστίθενται 8.6mL HClO_4 (70%), συνεχίζεται η ανάδευση και τελικώς ογκομετρείται για να συμπληρωθεί ο όγκος μέχρι τα 500mL. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε δοχείο στους 4°C προστατευμένο από έκθεση στο φως.

Διαλύματα παρακαταθήκης αμινοξέων (stock solutions)

Για την παρασκευή των διαλυμάτων παρακαταθήκης των διαφορετικών αμινοξέων (Glu, Ala, Tau, GLN, GABA), ζυγίζονται ξεχωριστά 2mg των πρότυπων ουσιών. Μετά την ζύγισή τους, μεταφέρονται σε falcon όπου διαλύονται μέσω vortex με 10mL διαλύματος HClO_4 0,2N. Με τον τρόπο αυτό, προκύπτουν διαλύματα παρακαταθήκης διαφορετικών αμινοξέων συγκέντρωσης 0,2mg/mL. Έπειτα, κάθε πρότυπο διάλυμα χωρίζεται σε κλάσματα που διατηρούνται στους -80°C .

Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων εργασίας (standard solution)

Η παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων εργασίας γινόταν καθημερινά πριν τον έλεγχο των αγνώστων δειγμάτων, με σκοπό τον καθορισμό της καμπύλης γραμμικότητας της εκάστοτε ημέρας. Συγκεκριμένα συλλέγονται 100μL από το κάθε διάλυμα παρακαταθήκης (Glu, Ala, Tau, GLN, GABA), τα οποία και τοποθετούνται σε erpendorf, με τελικό όγκο $5 \cdot 100\mu\text{L} = 500\mu\text{L}$. Έπειτα στα ήδη υπάρχοντα 500μL γίνεται προσθήκη 500μL διαλύματος HClO_4 0,2 N με αποτέλεσμα ο νέος όγκος του διαλύματος να διαμορφωθεί στο 1 mL. Το συγκεκριμένο διάλυμα ορίζεται αυθαίρετα ως Διάλυμα No 1 και αποτελεί το εναρκτήριο διάλυμα με βάση το οποίο παρασκευάζονται περαιτέρω αραιωμένα διαλύματα. Πιο συγκεκριμένα, από το Διάλυμα No 1 κατασκευάστηκε το Διάλυμα No 2 με τον εξής τρόπο. Από το διάλυμα No 1 λαμβάνονται 500 μL τα οποία και μεταφέρονται σε erpendorf. Έπειτα γίνεται προσθήκη άλλων 500μL καθαρού διαλύματος HClO_4 0,2 N σε αυτά με τον τελικό όγκο να διαμορφώνεται εκ νέου στο 1mL. Το καινούριο διάλυμα No 2 περιέχει τα ίδια ακριβώς αμινοξέα με το διάλυμα No 1 στις ίδιες ακριβώς συνθήκες μόνο που συγκέντρωσή τους θα είναι το $\frac{1}{2}$ σε σχέση με το No 1. Αντιστοίχως, παρασκευάζεται το διάλυμα No 3 από το No 2, στο οποίο οι συγκεντρώσεις των αμινοξέων θα είναι στο $\frac{1}{4}$ του No 1. Ανάμεσα στις διάφορες αραιώσεις πραγματοποιείται ανάδευση του νεοσχηματισμένου διαλύματος με vortex.

Διάλυμα Borax 0.1M

Για την παρασκευή 50mL διαλύματος Borax 0,1 M ζυγίζονται 1,9g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (sodium tetraborate decahydrate) και ακολούθως γίνεται ανάδευση με 40mL ddH₂O υπό ήπια θέρμανση στον μαγνητικό αναδευτήρα. Έπειτα προστίθενται 20mg EDTA και αφήνεται έως ότου διαλυθεί, ρυθμίζεται το pH=10,4 με χρήση διαλύματος NaOH 4M και τελικώς συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 50mL με ddH₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε falcon τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα θειώδους Νατρίου (Na_2SO_3)

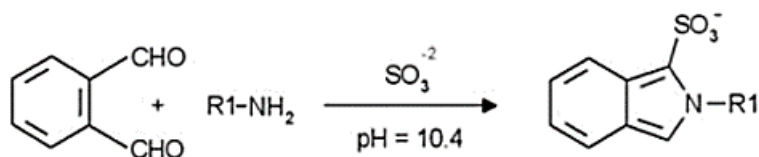
Για την παρασκευή διαλύματος 10mL θειώδους Νατρίου (Na_2SO_3) ζυγίζονται 0,04 g Na_2SO_3 και ακολουθεί ανάδευση 10mL ddH₂O μέχρι να διαλυθεί πλήρως η σκόνη. Έπειτα συλλέγεται σε falcon και φυλάσσεται στους 4°C.

Διάλυμα όρθο-φθαλαλδεΐδης (OPA)

Για την παρασκευή διαλύματος OPA, ζυγίζονται 20mg OPA και ακολουθεί ανάδευση σε 5,5mL διαλύματος Borax 0,1 M. Η ανάδευση γίνεται απουσία φωτός καθώς το OPA είναι φωτοευαίσθητο. Αφού διαλυθεί, προστίθενται 30μL διαλύματος Na_2SO_3 και συνεχίζεται η ανάδευση. Το διάλυμα συλλέγεται σε falcon τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο και φυλάσσεται στους 4°C. Συνίσταται να χρησιμοποιηθεί την επόμενη μέρα από την παρασκευή του.

Η όρθο-φθαλαλδεΐδη είναι μια ένωση η οποία έχει την ικανότητα να αντιδρά με αμινομάδες και έτσι να τις καθιστά ηλεκτροενεργές. Με αυτόν τον τρόπο ενώσεις όπως είναι τα αμινοξέα Glu και GABA, τα οποία υπό κανονικές συνθήκες δεν θα μπορούσαν να ανιχνευτούν από το ηλεκτρόδιο, γίνονται ανιχνεύσιμα. Συγκεκριμένα, για να μπορέσει να γίνει η αντίδραση της παραγωγοποίησης (**Εικόνα 32**) είναι απαραίτητη η ύπαρξη μιας αμινομάδας (αμινοξυ), το αντιδραστήριο OPA καθώς επίσης και η ύπαρξη μιας πηγής θείου. Επίσης, πρέπει οι συνθήκες που επικρατούν στο διάλυμα να είναι αρκετά βασικές, αλλιώς η αντίδραση δεν μπορεί να ολοκληρωθεί, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει ανίχνευση των ενώσεων από τον ηλεκτροχημικό. Στην παρούσα εργασία, για την αντίδραση αναμείχθηκαν λίγο πριν την ανάλυση 90μL διαλύματος OPA με 10μL

του εκάστοτε δείγματος, σε γυάλινο φιαλίδιο το οποίο τοποθετήθηκε σε ψυχόμενο Autosampler.



Εικόνα 32. Αντίδραση όρθο-φθαλαλδεΐδης με αμινοξύ υπό την παρουσία πηγής θείου σε βασικές συνθήκες.

Ομογενοποίηση ιστών και προετοιμασία δειγμάτων

Η ομογενοποίηση των εγκεφαλικών ιστών (PFC, d.hipp, v.hipp) πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια συσκευής υπερήχων (Virasonic – UP 100H Ultraschallprozessor, dr. Hielscher GmbH). Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 250μL διαλύματος HClO₄ 0,2N και τοποθετήθηκαν για 2x20 sec στους υπερήχους, με ενδιάμεσο διάλειμμα 10 s για να μην καταστραφεί το δείγμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλη τη διαδικασία της ομογενοποίησης, τα erpendorf πρέπει να παραμένουν σε πάγο, καθώς μπορεί να αναπτύξουν υψηλή θερμοκρασία λόγω των υπερήχων. Στη συνέχεια, τα ομογενοποιημένα, φυγοκεντρήθηκαν σε φυγόκεντρο Erpendorf® (5415C), στις 14000 στροφές/λεπτό (r.p.m.) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία των 4°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, διαχωρίστηκαν και απομονώθηκαν με προσοχή τα υπερκείμενα διαλύματα από τα αντίστοιχα ιζήματα, τοποθετήθηκαν σε νέα Erpendorf (3 κλάσματα ανά δείγμα) και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι τη στιγμή της ανάλυσής τους. Σημειώνεται ότι, πριν την ανάλυσή τους, για κάθε δείγμα έγινε μια αραιώση 1:5, δηλαδή 5μL δείγματος προστέθηκαν σε 20μL ddH₂O και από αυτό το διάλυμα χρησιμοποιήθηκαν τα 10μL για την αντίδραση με το OPA.

Καμπύλη βαθμονόμησης

Η HPLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για τον ποιοτικό προσδιορισμό μιας ένωσης όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό της. Για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί ο ποιοτικός προσδιορισμός είναι απαραίτητη η εφαρμογή μιας κατάλληλης μεθόδου μέσω της οποίας η ένωση θα μπορέσει να ανιχνευτεί. Από την άλλη πλευρά, όσον αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό της ένωσης, δεν αρκεί μόνο η σωστή μέθοδος αλλά επίσης η υπό εξέταση ένωση θα πρέπει να βρίσκεται εντός

συγκεκριμένου εύρους συγκέντρωσης. Πιο συγκεκριμένα, θα πρέπει σε αυτό το εύρος η σχέση μεταξύ της έντασης του σήματος, που ανιχνεύεται από το ηλεκτρόδιο, να είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των αμινοξέων των πρότυπων διαλυμάτων (standards solutions). Διαφορετικά αν η συγκέντρωση της υπό ανίχνευση ουσίας είναι πολύ μεγάλη, η ένταση του σήματος που θα καταγράψει ο ανιχνευτής δεν θα αντικατοπτρίζει την πραγματική ποσότητα της ένωσης που βρίσκεται εντός του διαλύματος. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι επειδή το ηλεκτρόδιο έχει ένα όριο ανίχνευσης, πάνω από το οποίο είναι αδύνατον να δώσει σωστά αποτελέσματα. Ουσιαστικά, το ηλεκτρόδιο δεν προλαβαίνει να οξειδώσει όλη την ποσότητα της ένωσης που ανιχνεύεται, με αποτέλεσμα το σήμα που αποστέλλει να είναι ελλιπές και κατά συνέπεια ψευδές. Για την κατασκευή της καμπύλης, χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα διαλύματα εργασίας No2 και No3 και ελέγχθηκε η επαναληψιμότητα και η κανονικότητα. Η επαναληψιμότητα έγκειται στο να προκύπτει το ίδιο χρωματογράφημα κάθε φορά που αναλύονται τα πρότυπα διαλύματα μέσα στη μέρα. Όσον αφορά την κανονικότητα, θα πρέπει το εμβαδόν κάθε κορυφής να μειώνεται σχεδόν ανάλογα καθώς μειώνεται η συγκέντρωση των αμινοξέων στα πρότυπα διαλύματα. Σημειώνεται ότι η καμπύλη βαθμονόμησης κατασκευαζόταν καθημερινά πριν την ανάλυση των υπό εξέταση δειγμάτων και για κάθε αμινοξύ προέκυπτε μια βέλτιστη ευθεία. Όσο πιο κοντά στο 1 ήταν η τιμή του συντελεστή συσχέτισης (correlation factor) τόσο πιο έγκυρη ήταν η γραμμικότητα.

2.6 Στατιστική Ανάλυση

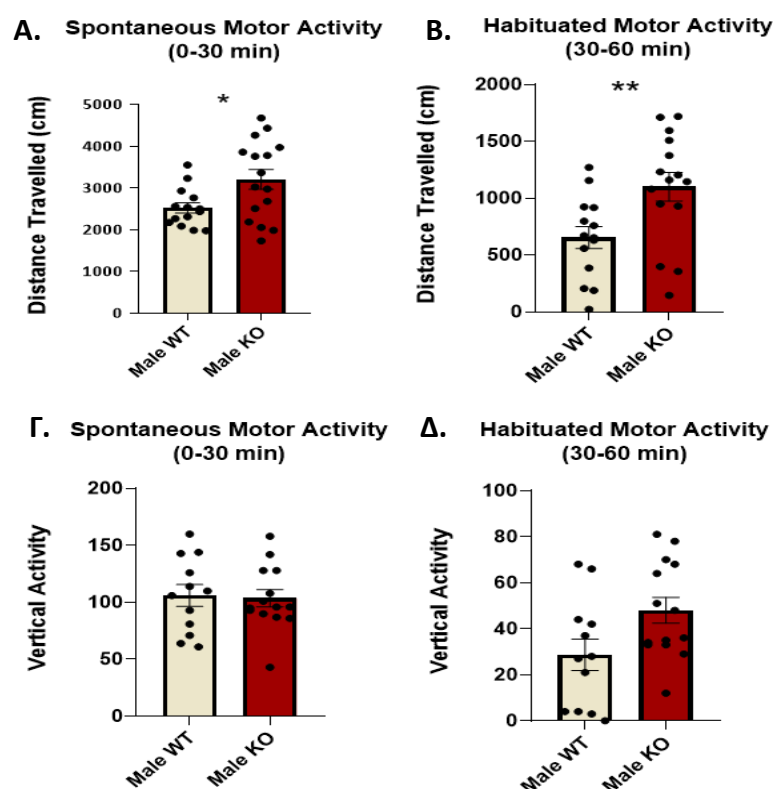
Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS (Version 26.0 για Windows). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων, δεδομένου ότι είχαμε να συγκρίνουμε δύο ομάδες (*Fmr1* KO και WT επίμυες), πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο Student's t-test για ανεξάρτητα δείγματα με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$. Η σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων έγινε ως προς την οριζόντια κινητικότητα, την κάθετη κινητικότητα, τον δείκτη διάκρισης, τα πρωτεϊνικά επίπεδα των υπομονάδων NMDA & AMPA, του λόγου GluN2A/GluN2B, του BDNF και του υποδοχέα του TrkB καθώς και ως προς τα ιστοικά επίπεδα των αμινοξέων Glu, GLN, και GABA και των λόγων GLN/Glu και Glu/GABA οι οποίοι χρησιμοποιούνται ως δείκτες του ρυθμού ανακύκλωσης.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Συμπεριφορικές Δοκιμασίες

3.1.1. Δοκιμασία Ανοικτού Πεδίου (Open Field Test)

Η στατιστική επεξεργασία έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ *Fmr1* KO και της ομάδας ελέγχου ως προς την συνολική διανυθείσα απόσταση (Γράφημα 1A,B). Συγκεκριμένα, οι KO επίμυες παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αυξημένη οριζόντια κινητικότητα σε σχέση με τα WT, τόσο κατά το πρώτο διάστημα της καταγραφής της αυθόρμητης κινητής δραστηριότητας ($p < 0.05$, Γράφημα 1A) όσο και κατά το δεύτερο διάστημα που αφορά στην κινητικότητα αφού το πειραματόζωο έχει εξοικειωθεί με το περιβάλλον ($p < 0.01$, Γράφημα 1B). Όσον αφορά την κάθετη κινητικότητα, δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων κατά το πρώτο διάστημα καταγραφής (Γράφημα 1Γ), ενώ στο διάστημα μετά την εξοικείωση με το νέο περιβάλλον, τα KO διατήρησαν αυξημένη την κάθετη κινητικότητα χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντική (Γράφημα 1B).



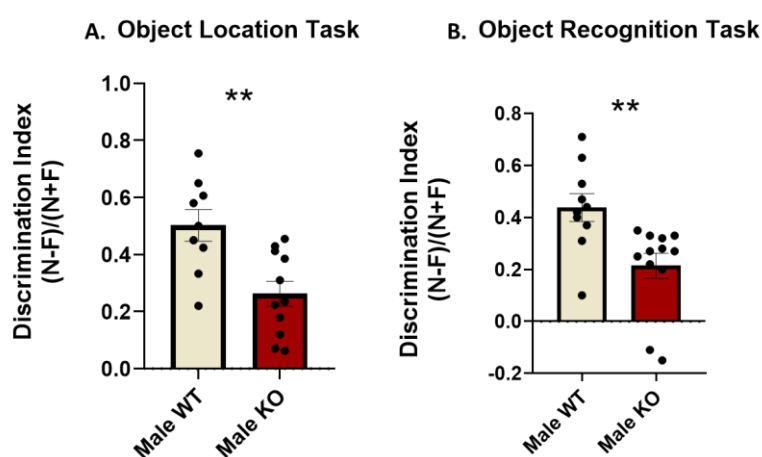
Γράφημα 1. Οριζόντια (A,B) και κάθετη (Γ,Δ) κινητικότητα για τους *Fmr1* KO και WT επίμυες για την το διάστημα καταγραφής αυθόρμητης κινητικότητας (0-30min, A, Γ) και το επόμενο διάστημα καταγραφής κατόπιν εξοικείωσης με το νέο περιβάλλον (30-60min, B, Δ) Μέσες τιμές \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n=11-13$.

3.1.2 Δοκιμασία Αναγνώρισης Θέσης Αντικειμένου (OLT)

Ο δείκτης διάκρισης στη δοκιμασία αναγνώρισης θέσης αντικειμένου ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένος στην ομάδα των KO επιμύων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.01$, **Γράφημα 2 A**) γεγονός που υποδηλώνει ότι τα *Fmr1* KO πειραματόζωα εμφάνισαν έλλειμα ως προς την βραχυπρόθεσμη χωρική μνήμη.

3.1.3 Δοκιμασία Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου (ORT)

Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι οι KO επίμυες παρουσίασαν μειωμένο δείκτη διάκρισης ως προς τη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου συγκριτικά με τα WT πειραματόζωα ($p < 0.01$, **Γράφημα 2 B**), υποδεικνύοντας ότι τα *Fmr1* KO πειραματόζωα εμφάνισαν έλλειμα ως προς την βραχυπρόθεσμη αναγνωριστική μνήμη.



Γράφημα 2. Δείκτης διάκρισης για τα *Fmr1* KO και τα WT πειραματόζωα κατά τη δοκιμασία αναγνώρισης θέσης αντικειμένου (A) και κατά τη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου (B). Μέσες τιμές \pm SEM, ** $p < 0.01$, $n=8-10$.

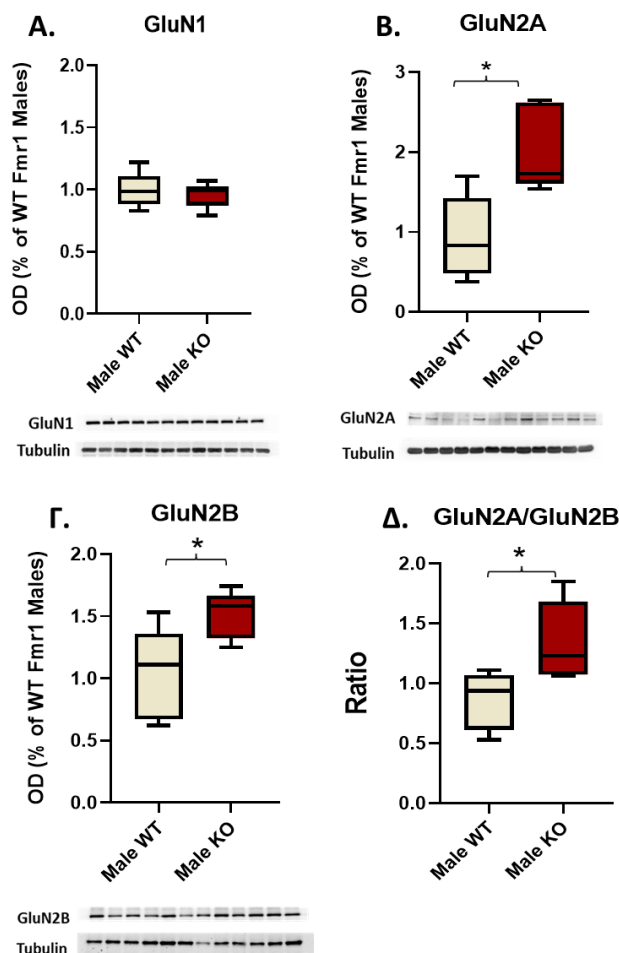
3.2 Western Blotting

3.2.1 Υποδοχείς NMDA

Προμετωπιαίος Φλοιός

Η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε διαφορά μεταξύ των KO και των WT επιμύων όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της δομικής υπομονάδας GluN1 (**Γράφημα 3 A**). Αντιθέτως, προέκυψε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης των υπομονάδων GluN2A ($p < 0.05$, **Γράφημα 3 B**) και GluN2B ($p < 0.05$,

Γράφημα 3 Γ) στα KO πειραματόζωα σε σχέση με τα WT. Όσον αφορά το λόγο GluN2A/GluN2B ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένος στους KO επίμυες συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$, **Γράφημα 3 Δ**)

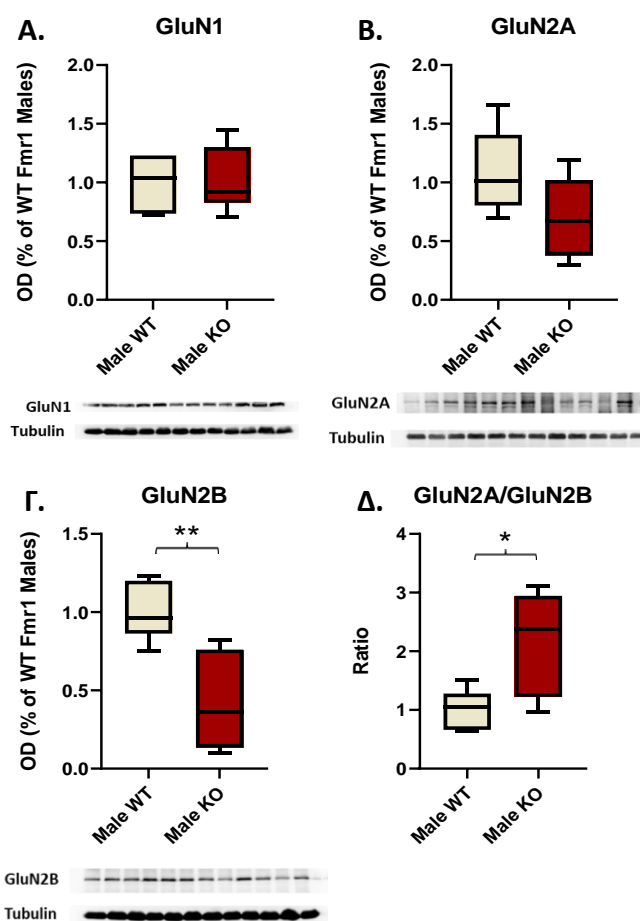


Γράφημα 3. Πρωτεϊνικά επίπεδα των υπομονάδων GluN1 (A), GluN2A (B), GluN2B (Γ), του υποδοχέα NMDA για τα KO και τα WT πειραματόζωα, καθώς και ο λόγος GluN2A/GluN2B για τον προμετωπιαίο φλοιό. Τα αποτελέσματα εκφράζονται μέσω θηκογράμματος, με την διάμεση τιμή (ενδιάμεση μαύρη γραμμή), και το διατεταρτημοριακό εύρος συμπεριλαμβανομένων της κάτω και άνω απόληξης, εκφρασμένες επί % της ομάδας ελέγχου της σχετικής οπτικής πυκνότητας (O.D.) της εκάστοτε υπομονάδας προς την α -τουμπουλίνη,, * $p < 0.05$, $n=5$.

Ραχιαίος Ιππόκαμπος

Η πρωτεϊνική έκφραση της υπομονάδας GluN1 δεν διέφερε μεταξύ των KO και των WT επιμύων (**Γράφημα 4 A**). Τα επίπεδα έκφρασης της υπομονάδας GluN2A εμφάνισαν μια τάση για μείωση στα KO πειραματόζωα σε σχέση με τα WT τύπου, χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική, (**Γράφημα 4 B**), ενώ στατιστικά σημαντικά μειωμένα ήταν τα επίπεδα της υπομονάδας GluN2B στους KO επίμυες ($p < 0.01$,

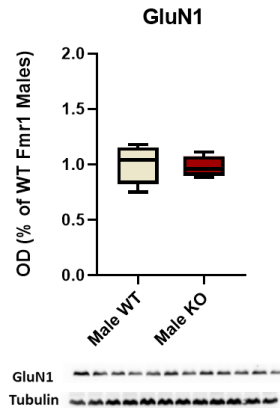
Γράφημα 4 Γ). Όσον αφορά το λόγο GluN2A/GluN2B βρέθηκε στατιστικά σημαντικά αυξημένος στα KO πειραματόζωα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$, **Γράφημα 4 Δ**).



Γράφημα 4. Πρωτεϊνικά επίπεδα των υπομονάδων GluN1 (A), GluN2A (B), GluN2B (Γ), του υποδοχέα NMDA για τα KO και τα WT πειραματόζωα, καθώς και ο λόγος GluN2A/GluN2B για τον ραχιαίο ιππόκαμπο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται μέσω θηκογράμματος, με την διάμεση τιμή (ενδιάμεση μαύρη γραμμή), και το διατεταρτημοριακό εύρος συμπεριλαμβανομένων της κάτω και άνω απόληξης, εκφρασμένες επί % της ομάδας ελέγχου της σχετικής οπτικής πυκνότητας (O.D.) της εκάστοτε υπομονάδας προς την α-τουμπουλίνη,, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n=5$.

Κοιλιακός ιππόκαμπος

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ KO και WT επιμύων ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας GluN1 (**Γράφημα 5**).

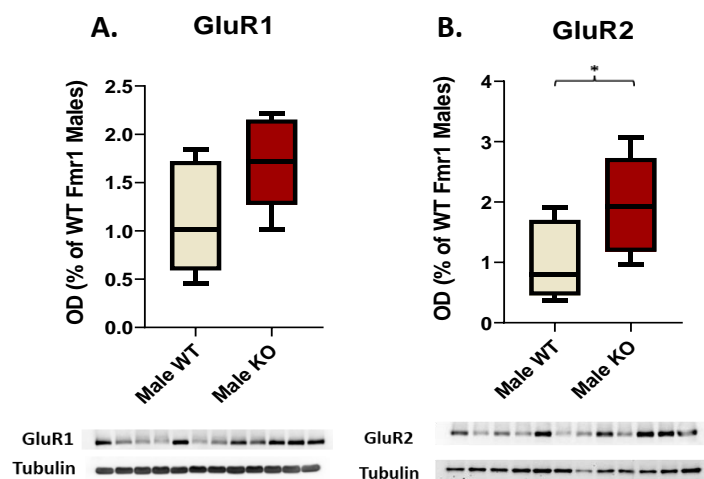


Γράφημα 5. Πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας *GluN1* του υποδοχέα *NMDA* για τα *KO* και τα *WT* πειραματόζωα, για τον κοιλιακό ιππόκαμπο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται μέσω θηκογράμματος, με την διάμεση τιμή (ενδιάμεση μαύρη γραμμή), και το διατεταρτημοριακό εύρος συμπεριλαμβανομένων της κάτω και άνω απόληξης, εκφρασμένες επί % της ομάδας ελέγχου της σχετικής οπτικής πυκνότητας (*O.D.*) της υπομονάδας *GluN1* προς την α -τουμπουλίνη,, $n=6$.

3.2.2 Υποδοχείς AMPA

Προμετωπιαίος Φλοιός

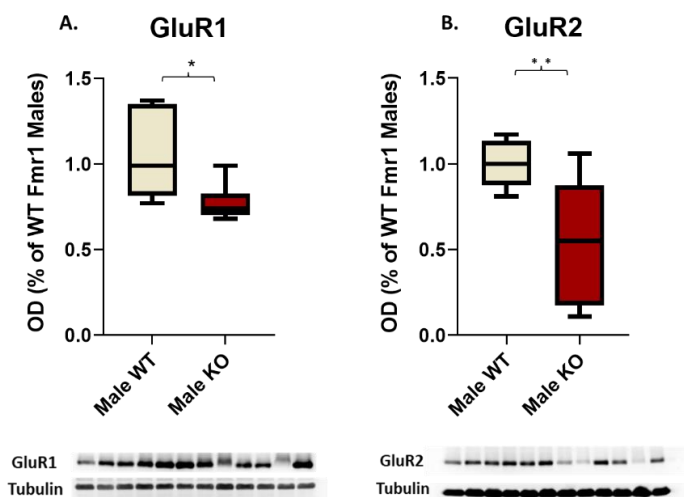
Η στατιστική επεξεργασία δεν έδειξε διαφορά ως προς τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης της υπομονάδας *GluR1* μεταξύ των *KO* και των *WT* επιμύων (**Γράφημα 6 A**) ενώ, βρέθηκε στατιστικά σημαντικά αυξημένη έκφραση της υπομονάδας *GluR2* στα *KO* πειραματόζωα ($p < 0.05$, **Γράφημα 6 B**).



Γράφημα 6. Πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων *GluR1*, *GluR2* του υποδοχέα *AMPA* για τα *KO* και τα *WT* πειραματόζωα, στον προμετωπιαίο φλοιό. Τα αποτελέσματα εκφράζονται μέσω θηκογράμματος, με την διάμεση τιμή (ενδιάμεση μαύρη γραμμή), και το διατεταρτημοριακό εύρος συμπεριλαμβανομένων της κάτω και άνω απόληξης, εκφρασμένες επί % της ομάδας ελέγχου της σχετικής οπτικής πυκνότητας (*O.D.*) της εκάστοτε υπομονάδας προς την α -τουμπουλίνη,* $p < 0.05$, $n=6$.

Ραχιαίος Ιππόκαμπος

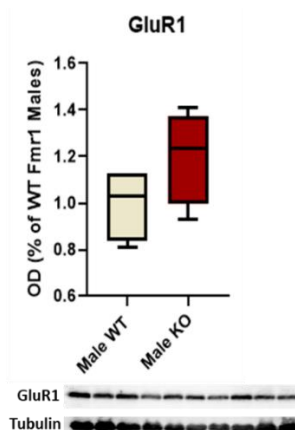
Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας GluR1 ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένα στους KO συγκριτικά με τους WT επίμυες ($p < 0.05$, **Γράφημα 7A**) όπως και της υπομονάδας GluR2 ($p < 0.01$, **Γράφημα 7 B**).



Γράφημα 7. Πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων *GluR1*, *GluR2* του υποδοχέα AMPA για τα KO και WT πειραματόζωα, στον ραχιαίο ιππόκαμπο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται μέσω θηκογράμματος, με την διάμεση τιμή (ενδιάμεση μαύρη γραμμή), και το διατεταρτημοριακό εύρος συμπεριλαμβανομένων της κάτω και άνω απόληξης, εκφρασμένες επί % της ομάδας ελέγχου της σχετικής οπτικής πυκνότητας (O.D.) της εκάστοτε υπομονάδας προς την α -τουμπουλίνη,, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n=6$.

Κοιλιακός ιππόκαμπος

Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας GluR1 δεν διέφεραν μεταξύ των KO και WT επιμύων (**Γράφημα 8**).

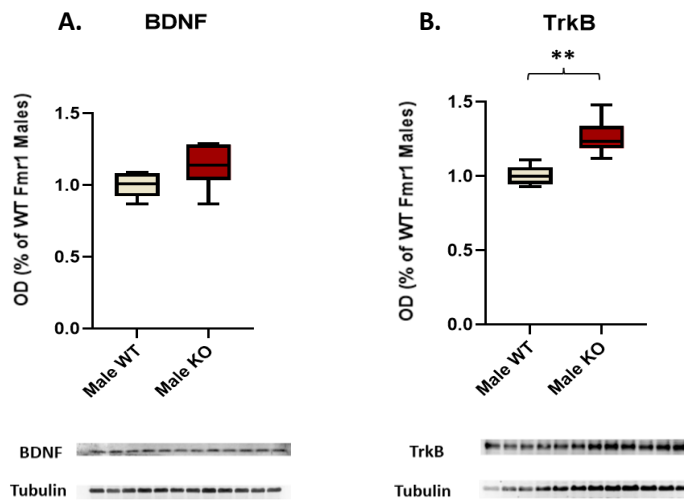


Γράφημα 8. Πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της υπομονάδας *GluR1* του υποδοχέα AMPA για τα KO και WT πειραματόζωα, στον κοιλιακό ιππόκαμπο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται μέσω θηκογράμματος, με την διάμεση τιμή (ενδιάμεση μαύρη γραμμή), και το διατεταρτημοριακό εύρος συμπεριλαμβανομένων της κάτω και άνω απόληξης, εκφρασμένες επί % της ομάδας ελέγχου της σχετικής οπτικής πυκνότητας (O.D.) της υπομονάδας *GluR1* προς την α -τουμπουλίνη,, $n=5$.

3.2.3 BDNF – TrkB

Προμετωπιαίος Φλοιός

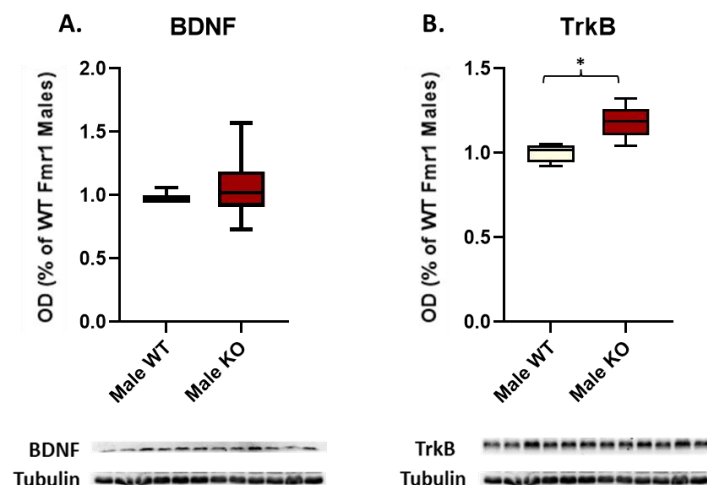
Τα επίπεδα του ώριμου BDNF ήταν αυξημένα στα KO σε σχέση με τα WT πειραματόζωα χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντικά (**Γράφημα 9 A**). Αντιθέτως, τα επίπεδα του υποδοχέα TrkB ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στα KO ζώα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.01$, **Γράφημα 9 B**).



Γράφημα 9. Πρωτεϊνικά επίπεδα ώριμου BDNF και του υποδοχέα TrkB για τα KO και τα WT πειραματόζωα, στον προμετωπιαίο φλοιό. Τα αποτελέσματα εκφράζονται μέσω θηκογράμματος, με την διάμεση τιμή (ενδιάμεση μαύρη γραμμή), και το διατεταρτημοριακό εύρος συμπεριλαμβανομένων της κάτω και άνω απόληξης, εκφρασμένες επί % της ομάδας ελέγχου της σχετικής οπτικής πυκνότητας (O.D.) της εκάστοτε υπομονάδας προς την α -τουμπουλίνη,, ** $p < 0.01$, $n=6$.

Ραχιαίος Ιππόκαμπος

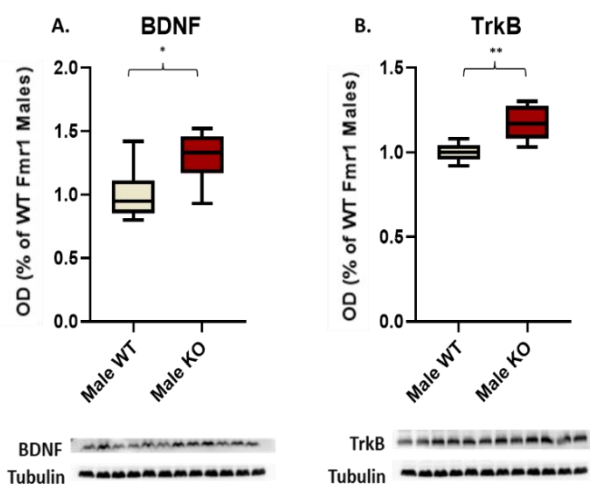
Η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε διαφορές ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ώριμης μορφής BDNF στα KO σε σχέση με τα WT πειραματόζωα (**Γράφημα 10 A**). Αντιθέτως, τα επίπεδα του υποδοχέα TrkB ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στα KO ζώα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$, **Γράφημα 10 B**).



Γράφημα 10. Πρωτεϊνικά επίπεδα ώριμου BDNF και του υποδοχέα TrkB για τα KO και τα WT πειραματόζωα, στον ραχιαίο ιππόκαμπο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται μέσω θηκογράμματος, με την διάμεση τιμή (ενδιάμεση μαύρη γραμμή), και το διατεταρτημοριακό εύρος συμπεριλαμβανομένων της κάτω και άνω απόληξης, εκφρασμένες επί % της ομάδας ελέγχου της σχετικής οπτικής πυκνότητας (O.D.) της εκάστοτε υπομονάδας προς την α -τουμπουλίνη,, * $p < 0.05$, $n=6$.

Κοιλιακός Ιππόκαμπος

Τα επίπεδα του ώριμου BDNF ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στα KO σε σχέση με τα WT πειραματόζωα ($p < 0.05$, **Γράφημα 11 A**). Επίσης, στατιστικά σημαντική αύξηση είχαν και τα επίπεδα του υποδοχέα TrkB στα KO ζώα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.01$, **Γράφημα 11 B**).

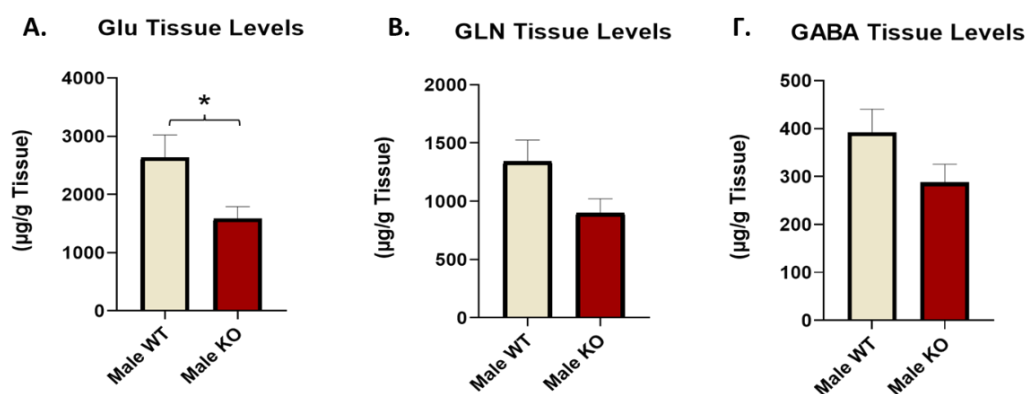


Γράφημα 11. Πρωτεϊνικά επίπεδα ώριμου BDNF και του υποδοχέα TrkB για τα KO και τα WT πειραματόζωα, στον κοιλιακό ιππόκαμπο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται μέσω θηκογράμματος, με την διάμεση τιμή (ενδιάμεση μαύρη γραμμή), και το διατεταρτημοριακό εύρος συμπεριλαμβανομένων της κάτω και άνω απόληξης, εκφρασμένες επί % της ομάδας ελέγχου της σχετικής οπτικής πυκνότητας (O.D.) της εκάστοτε υπομονάδας προς την α -τουμπουλίνη,, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n=6$.

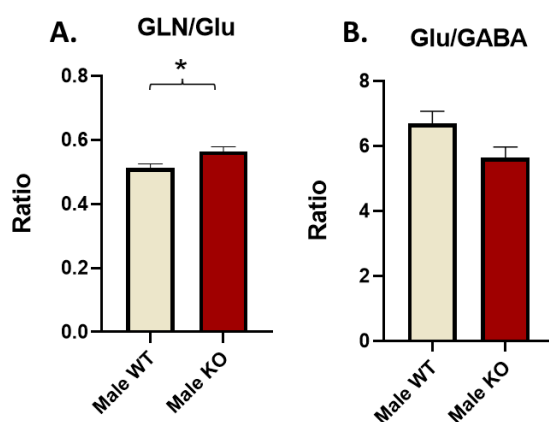
3.3 Νευροχημική Ανάλυση

3.3.1 Προμετωπιαίος Φλοιός

Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι τα ιστικά επίπεδα του γλουταμικού ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένα στα ΚΟ πειραματόζωα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$, **Γράφημα 12 Α**). Επίσης, οι ΚΟ επίμυες εμφάνισαν μια τάση προς μείωση των ιστικών επιπέδων της γλουταμίνης και του GABA, συγκριτικά με τα WT πειραματόζωα, χωρίς βέβαια να είναι στατιστικά σημαντική (**Γράφημα 12 Β,Γ**). Όσον αφορά το λόγο GLN/Glu, ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένος στα ΚΟ πειραματόζωα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$, **Γράφημα 13 Α**), ενώ ο λόγος Glu/GABA εμφάνισε μια τάση για μείωση στους ΚΟ επίμυες χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική (**Γράφημα 13 Β**).



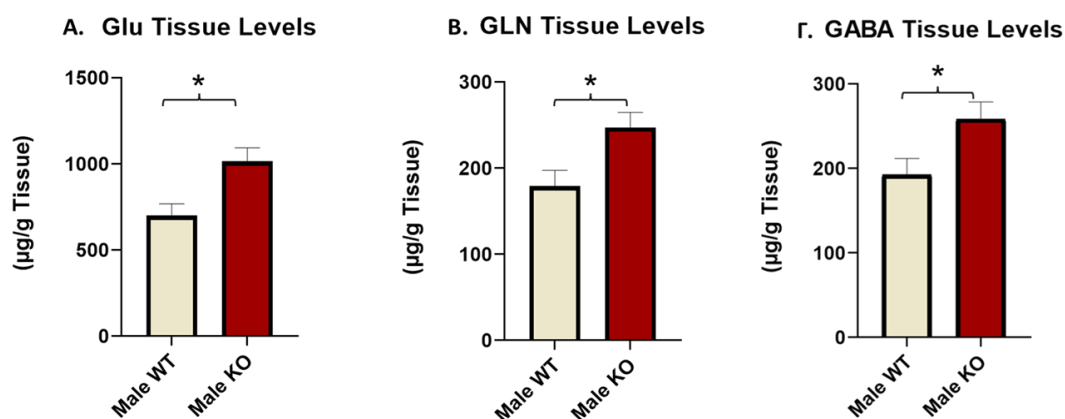
Γράφημα 12. Επίπεδα γλουταμικού (Glu), γλουταμίνης (GLN), GABA για τα ΚΟ και WT πειραματόζωα, στον προμετωπιαίο φλοιό. Μέσες τιμές \pm SEM, * $p < 0.05$, $n=8$.



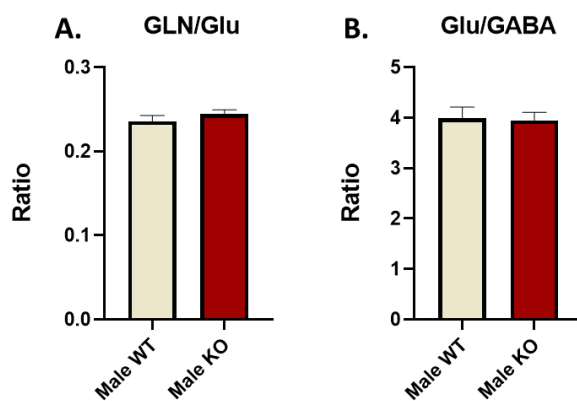
Γράφημα 13. Ρυθμοί ανακύκλωσης GLN/Glu (Α) και Glu/GABA (Β) για τα ΚΟ και WT πειραματόζωα, στον προμετωπιαίο φλοιό. Μέσες τιμές \pm SEM, * $p < 0.05$, $n=8$.

3.3.2 Ραχιαίος ιππόκαμπος

Η στατιστική επεξεργασία έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση των ιστικών επιπέδων του γλουταμικού, της γλουταμίνης και του GABA στους KO επίμυες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$, **Γράφημα 14 Α-Γ**). Μεταξύ των δύο ομάδων δεν υπήρχε διαφορά ως προς τους λόγους GLN/Glu και Glu/GABA (**Γράφημα 15**).



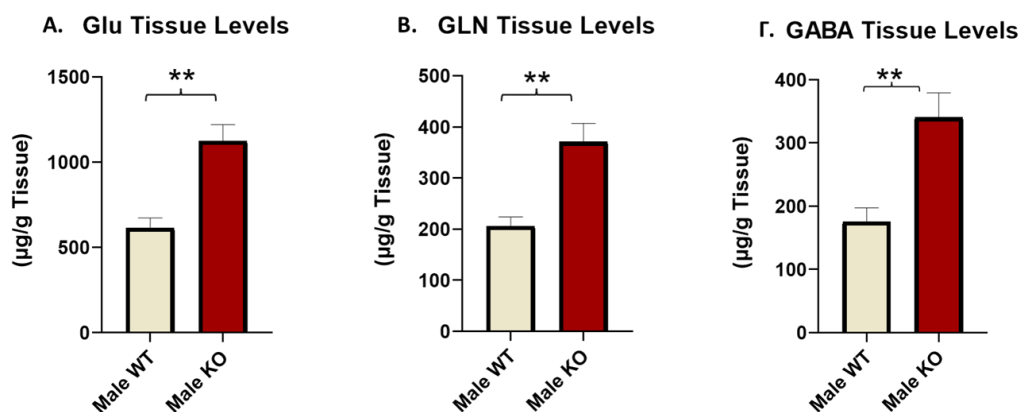
Γράφημα 14. Επίπεδα γλουταμικού (Glu), γλουταμίνης (GLN) και GABA για τα KO και τα WT πειραματόζωα στον ραχιαίο ιππόκαμπο. Μέσες τιμές \pm SEM, * $p < 0.05$, $n=8$.



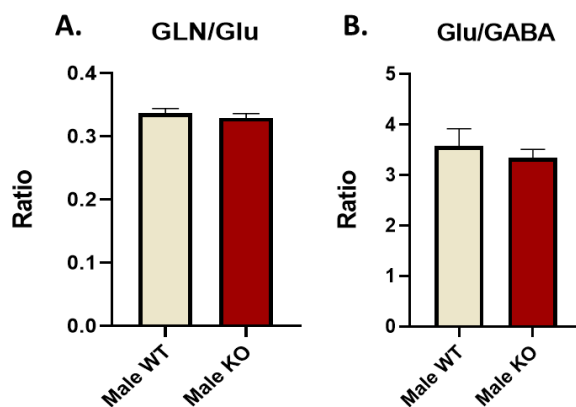
Γράφημα 15. Ρυθμοί ανακύκλωσης GLN/Glu (A) και Glu/GABA (B) για τα KO και WT πειραματόζωα, στον ραχιαίο ιππόκαμπο. Μέσες τιμές \pm SEM, $n=8$.

3.3.3 Κοιλιακός ιππόκαμπος

Τα επίπεδα του γλουταμικού, της γλουταμίνης και του GABA ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στους KO επίμυες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.01$, **Γράφημα 16 A-Γ**). Μεταξύ των δύο ομάδων δεν υπήρχε διαφορά ως προς τους λόγους GLN/Glu και Glu/GABA (**Γράφημα 17**).



Γράφημα 16. Επίπεδα γλουταμικού (Glu), γλουταμίνης (GLN) και GABA για τα KO και WT πειραματόζωα στον κοιλιακό ιππόκαμπο. Μέσες τιμές \pm SEM, $**p < 0.01$, $n=5$.



Γράφημα 17. Ρυθμοί ανακύκλωσης GLN/Glu (A) και Glu/GABA (B) για τα KO και WT πειραματόζωα, στον κοιλιακό ιππόκαμπο. Μέσες τιμές \pm SEM, $n=5$.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ένα προφίλ υπερκινητικότητας για τους *Fmr1* KO επίμυες και ταυτόχρονα ελλείματα γνωστικού τύπου αναφορικά με την χωρική και αναγνωριστική βραχυπρόθεσμη μνήμη. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης υπομονάδων των υποδοχέων NMDA και AMPA στον προμετωπιαίο φλοιό των KO επιμύων, ενώ στον υπόκαμπο παρατηρήθηκε το αντίθετο πρότυπο έκφρασης. Γονοτυπικές καθώς και τοπο-ειδικές διαφορές προέκυψαν επίσης για τα πρωτεϊνικά επίπεδα του νευροτροφικού παράγοντα BDNF και του υποδοχέα TrkB. Παράλληλα στον προμετωπιαίο φλοιό των KO επιμύων, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα γλουταμικού σε συνδυασμό με αυξημένο ρυθμό ανακύκλωσης του ενώ, στον υπόκαμπο προσδιορίστηκαν αυξημένα επίπεδα γλουταμικού, συγκριτικά με την ομάδα αγρίου τύπου. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ένα διαφοροποιημένο συμπεριφορικό προφίλ για τα KO πειραματόζωα σε συνδυασμό με διαταραχές στην γλουταματεργική νευροδιαβίβαση και στη συναπτική πλαστικότητα.

Τα KO πειραματόζωα όταν εκτέθηκαν σε ένα νέο περιβάλλον ανοικτού πεδίου παρουσίασαν αύξηση της αυθόρμητης κινητικής τους δραστηριότητας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε αυξημένη οριζόντια δραστηριότητα, γεγονός που υποδηλώνει διέγερση και υπερκινητικότητα των KO επιμύων. Αναφορικά με την κάθετη κινητικότητα, που αποτελεί δείκτη εξερεύνησης και «συναισθηματικής» αντίδρασης (Thiel *et al.*, 1998; Antoniou *et al.*, 2008), δεν εντοπίστηκαν γονοτυπικές διαφορές, υποδεικνύοντας ότι στους KO επίμυες δεν επηρεάζεται ένας δείκτης αυθόρμητης εξερευνητικότητας και άμεσης «συναισθηματικής» απόκρισης. Ένα διαφοροποιημένο προφίλ παρατηρήθηκε και ως προς την κινητική δραστηριότητα κατόπιν του διαστήματος εξοικείωσης. Όπως περιγράφεται από τους Thompson και Spencer (1966), η εξοικείωση είναι μια μορφή απλής μη συνειρμικής μάθησης, στην οποία η ένταση της απόκρισης σε ένα συγκεκριμένο ερέθισμα μειώνεται με την επανειλημμένη έκθεση σε αυτό. Επομένως, μετά το πρώτο διάστημα έκθεσης στο νέο περιβάλλον, τα πειραματόζωα εφόσον έχουν εξοικειωθεί με τον χώρο, αναμένεται να έχουν μείωση της συνολικότερης κινητικής τους δραστηριότητας. Οι KO επίμυες αν και συγκριτικά με την αυθόρμητη οριζόντια δραστηριότητά τους, εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα

οριζόντιας και κάθετης κινητικότητας μετά την εξοικείωση, παρέμειναν πιο υπερκινητικοί και διεγερμένοι σε σχέση με τα WT. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει διεγερσιμότητα και παράλληλη διαταραχή της μη συνειρμικής μάθησης στο μοντέλο των *Fmr1* KO επιμύων, χωρίς να έχει επηρεαστεί πλήρως η συγκεκριμένη διεργασία. Σε πρόσφατη μελέτη που διεξήχθη, ενώ βρέθηκε αυξημένη οριζόντια κινητικότητα των *Fmr1* KO επιμύων κατά το πρώτο διάστημα της καταγραφής, μετά την εξοικείωση εμφάνισαν τα ίδια επίπεδα κινητικότητας με τα WT πειραματόζωα (Kozono *et al.*, 2021). Προηγούμενες μελέτες που αξιολογούν την κινητική δραστηριότητα των *Fmr1* KO επιμύων, έχουν δείξει είτε μη μεταβολή (Hamilton *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2017; Golden *et al.*, 2019) είτε μείωση της αυθόρμητης κινητικότητας σε σύγκριση με την ομάδα αγρίου τύπου (Wong *et al.*, 2020; Hooper *et al.*, 2021).

Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα μπορούν να αποδοθούν στο διαφορετικό στέλεχος επίμου που χρησιμοποιήθηκε στις προαναφερόμενες μελέτες καθώς και στην τεχνική γενετικής τροποποίησης που εφαρμόστηκε στο εκάστοτε στέλεχος για τη δημιουργία του *Fmr1* KO μοντέλου. Επίσης, σημαντικός παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει την κινητική δραστηριότητα των επιμύων αποτελεί η εξοικείωση τους με τον ερευνητή πριν και κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας (Pritchard *et al.*, 2013), όσο και τα διαφορετικά αναπτυξιακά παράθυρα στα οποία διεξάγονται οι μελέτες.

Σχετικά με την αξιολόγηση μεταβολών, στο *Fmr1* KO μοντέλο, ως προς τις γνωστικές λειτουργίες σχετιζόμενες με την έκφραση αναγνωριστικής αλλά και χωρικής μνήμης και μάθησης, τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν στις δοκιμασίες αναγνώρισης νέου αντικειμένου και νέας θέσης αντικειμένου αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα και στις δύο δοκιμασίες έδειξαν ότι οι KO επίμυες εμφανίζουν σημαντικά μειωμένη ικανότητα διάκρισης. Αυτές οι συμπεριφορικές δοκιμασίες βασίζονται στην αυθόρμητη εξερευνητική ικανότητα των τρωκτικών (Ennaceur and Delacour, 1998) και όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η κάθετη κινητικότητα που αποτελεί δείκτη εξερεύνησης, δεν επηρεάστηκε στους KO επίμυες. Επομένως, η μειωμένη ικανότητα διάκρισης στις δοκιμασίες, υποδηλώνει αδυναμία εγκατάστασης βραχυπρόθεσμης αναγνωριστικής και χωρικής μνήμης στα KO πειραματόζωα. Τα αποτελέσματα μας βρίσκονται σε συμφωνία με ήδη

δημοσιευμένες μελέτες που έχουν δείξει μειωμένη ικανότητα διάκρισης στους *Fmr1 KO* επίμυες κατά την δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου (Schiavi *et al.*, 2022a; 2022b) αλλά και κατά την αναγνώριση νέας θέση αντικειμένου (Asiminas *et al.*, 2019). Σε μια μελέτη βέβαια οι *Fmr1 KO* επίμυες δεν έδειξαν να έχουν έλλειμμα στην αναγνωριστική και χωρική μνήμη σε σχέση με τα WT πειραμτόζωα (Till *et al.*, 2015). Τόσο το στέλεχος που επιλέγεται όσο και η αναπτυξιακή περίοδος που διεξάγονται οι δοκιμασίες σε συνδυασμό με τους πειραματικούς χειρισμούς, αποτελούν παράγοντες που πιθανώς εξηγούν τις αποκλίσεις μεταξύ των μελετών.

Συνοψίζοντας ως προς τα αποτελέσματα των συμπεριφορικών δοκιμασιών προκύπτει ότι το μοντέλο του *Fmr1 KO* επίμυος χαρακτηρίζεται από διέγερση της κινητικής δραστηριότητας και δυσλειτουργίες που αφορούν εκφάνσεις γνωστικών λειτουργιών όπως η μνήμη και η μάθηση. Αξίζει να σημειωθεί ότι, υπερκινητικότητα και γνωστικά ελλείματα εμφανίζονται σε άτομα με FXS, υποδεικνύοντας την ύπαρξη φαινομενολογικής ομοιότητας του μοντέλου *Fmr1 KO* επίμυος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Η ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων υπομονάδων των υποδοχέων του γλουταμικού ανέδειξε ένα διφασικό πρότυπο έκφρασης μεταξύ των περιοχών για τους *KO* επίμυες. Συγκεκριμένα, ενώ στον προμετωπιαίο φλοιό των *KO* επιμύων προσδιορίστηκαν αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα για τις υπομονάδες GluN2A και GluN2B σε σχέση με τα WT, στον ραχιαίο υπόκαμπο τα αντίστοιχα επίπεδα ήταν μειωμένα. Όμως, ο λόγος GluN2A/GluN2B βρέθηκε αυξημένος τόσο στον προμετωπιαίο φλοιό των *KO* επιμύων λόγω της έντονης αύξησης στα επίπεδα έκφρασης της GluN2A, όσο και στον ραχιαίο υπόκαμπο λόγω της έντονης μείωσης των επιπέδων έκφρασης της GluN2B. Σημειώνεται ότι και στις δύο περιοχές η έκφραση της δομικής υπομονάδας GluN1 του υποδοχέα NMDA παρέμεινε αμετάβλητη μεταξύ *KO* και WT. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν για πρώτη φορά μεταβολές ως προς την έκφραση των υπομονάδων του υποδοχέα NMDA σε μοντέλο *Fmr1 KO* επίμυος. Πειραματικές μελέτες με *Fmr1 KO* μυς, έχουν δείξει διαφορετικό προφίλ έκφρασης υπομονάδων σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ανάλογα με την περιοχή που εξετάστηκε. Συγκεκριμένα, στον προμετωπιαίο φλοιό δεν βρέθηκαν διαφορές ως προς τα

επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων GluN2A και GluN2B μεταξύ KO και WT (Xu *et al.*, 2012a; 2012b). Αντιθέτως σε άλλη μελέτη παρατηρήθηκε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των υπομονάδων GluN1, GluN2A και GluN2B στον προμετωπιαίο φλοιό των KO συγκριτικά με τα WT και αυτή η μείωση παρατηρήθηκε τόσο σε επίπεδο ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος όσο και σε επίπεδο συναπτοσωμάτων (Krueger *et al.* 2011). Όσον αφορά τον ιππόκαμπο, έχει βρεθεί μείωση των επιπέδων έκφρασης για τις υπομονάδες GluN1, GluN2A και GluN2B στην οδοντωτή έλικα των KO μυών (Bostrom *et al.*, 2015), ενώ σε άλλες μελέτες προσδιορίστηκαν αυξημένα επίπεδα για τις GluN2A και GluN2B τόσο σε ολικά εκχυλίσματα (Toftt *et al.*, 2016) όσο και σε συναπτοσώματα από τον ιππόκαμπο KO μυών (Lundbye *et al.*, 2018).

Οι αποκλίσεις μεταξύ των μελετών μπορεί να οφείλονται κατά βάση στο αναπτυξιακό στάδιο των πειραματοζώων κατά το οποίο μελετάται η έκφραση των υπομονάδων του NMDA, δεδομένου ότι το πρότυπο έκφρασης τους μεταβάλλεται κατά την ανάπτυξη, ενώ επηρεάζεται σημαντικά και από διεργασίες συναπτικής πλαστικότητας. Επιπρόσθετους παράγοντες αποτελούν, η επιλογή του στελέχους, το είδος της γενετικής τροποποίησης που φέρουν αλλά και το αν μελετάται ολόκληρη η περιοχή, μέρος αυτής ή το συναπτοσωμικό κλάσμα σε σχέση με το ολικό εκχύλισμα.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης καταδεικνύουν όπως ήδη αναφέρθηκε μια διφασικότητα ως προς το προφίλ έκφρασης των υπομονάδων NMDAR στους *Fmr1* KO επίμυες, με κυρίαρχη την αύξηση της GluN2A στον προμετωπιαίο φλοιό και την μείωση της GluN2B στον ιππόκαμπο. Ας σημειωθεί ότι οι συγκεκριμένες υπομονάδες έχουν ένα κυρίαρχο ρόλο στην συναπτική πλαστικότητα που μεσολαβείται μέσω του υποδοχέα NMDA (Liu *et al.*, 2004; Massey *et al.*, 2004). Ειδικότερα, ο λόγος GluN2A/GluN2B αντανακλά τη νευρωνική δραστηριότητα καθώς αυξημένη δραστηριότητα συνάδει με αύξηση της έκφρασης της υπομονάδας GluN2A και περιορισμένη έκφραση της GluN2B (Chen and Bear, 2007; Yashiro and Philpot, 2008; Xu *et al.*, 2009). Επομένως ο αυξημένος λόγος GluN2A/GluN2B που καταγράφηκε στον φλοιό παράλληλα με την έντονη αύξηση στην έκφραση της GluN2A υποδηλώνει μια έντονη γλουταματεργική δραστηριότητα. Ας σημειωθεί ότι

η υπερενεργοποίηση των υποδοχέων με την GluN2A υπομονάδα σχετίζεται με πρόκληση επιληπτικών κρίσεων (Myers *et al.*, 2019), χαρακτηριστικό άλλωστε που εκδηλώνουν τα άτομα με FXS. Σημαντικό ρόλο στα επίπεδα έκφρασης υπομονάδων των υποδοχέων NMDA κατέχει και η FMRP η οποία ασκεί ρυθμιστικό ρόλο κατά τη μετάφραση. Μελέτες έχουν δείξει ότι η GluN2A ανήκει στις πρωτεΐνες στόχους της FMRP (Edbauer *et al.*, 2010; Darnell *et al.*, 2011), ενώ σε μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκε ανταγωνιστής για την υπομονάδα GluN2A σε *Fmr1* KO μυ, παρατηρήθηκε αποκατάσταση του LTP (Lundbye *et al.*, 2018). Επιπλέον, η μείωση της υπομονάδας GluN2B στον ιππόκαμπο πιθανώς ευνοεί την επαγωγή του LTD, δεδομένου ότι οι υποδοχείς NMDA που περιέχουν την υπομονάδα GluN2B έχουν μεγαλύτερη αγωγιμότητα για το Ca^{2+} και αλληλοεπιδρούνε ισχυρότερα με την CaMKII (Yashiro and Philpot, 2008).

Αντίστοιχο, πρότυπο έκφρασης με αυτό των υπομονάδων του NMDAR, έδειξαν τα αποτελέσματά μας και για τις υπομονάδες του υποδοχέα AMPA. Συγκεκριμένα, βρέθηκαν αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα για τις GluR1 και GluR2 στον προμετωπιαίο φλοιό των KO επιμύων, ενώ τα επίπεδα για τις αντίστοιχες υπομονάδες ήταν μειωμένα στον ραχιαίο ιππόκαμπο. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν για πρώτη φορά αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων του AMPAR στο *Fmr1* KO μοντέλο επίμυος, καθώς δεν υπάρχουν σχετικά αποτελέσματα στην βιβλιογραφία για *Fmr1* KO επίμυες. Πειραματική μελέτη σε *Fmr1* KO μυ, έδειξε επίσης μείωση των επιπέδων της GluR1 στην περιοχή του ιπποκάμπου (Bostrom *et al.*, 2015), ενώ σε άλλη βρέθηκε μείωση των επιπέδων της GluR2 στο συναπτοσωμικό κλάσμα του ιπποκάμπου (Chatterjee *et al.*, 2018). Σε άλλη μελέτη παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της GluR1 σε συνάψεις του φλοιού (Li *et al.* 2002).

Οι υποδοχείς AMPA έχουν κρίσιμο ρόλο στη συναπτική πλαστικότητα καθώς η ενσωμάτωση ή η ενδοκυττάρωση τους από τη μετασυναπτική μεμβράνη ρυθμίζεται δυναμικά καθώς μεταβάλλεται η ισορροπία LTP/LTD. Μάλιστα η είσοδος Ca^{2+} μέσω των υποδοχέων NMDA αποτελεί σημαντικό παράγοντα ρύθμισης της ανακύκλησης τους και της σύστασης τους όσον αφορά τις υπομονάδες (Derkach *et al.*, 2007). Συνεπώς, η αύξηση των επιπέδων των υπομονάδων του NMDAR στον

προμετωπιαίο φλοιό των KO επιμύων, είναι πιθανό να προκάλεσε αντισταθμιστική αύξηση στην έκφραση των AMPA υποδοχέων στην ίδια περιοχή. Επίσης, η αύξηση των επιπέδων της GluR2, η παρουσία της οποίας μειώνει την αγωγιμότητα και διαπερατότητα του AMPAR σε Ca^{2+} , υποδηλώνει πιθανές διαταραχές στη συναπτική πλαστικότητα. Προς ενίσχυση του προαναφερθέντος συλλογισμού, μελέτες έχουν δείξει ότι κατά την πρώιμη φάση του LTP στρατολογούνται στη μεμβράνη υποδοχείς AMPA που δεν περιέχουν κατά βάση την υπομονάδα GluR2 (Plant *et al.*, 2006b; Thiagarajan *et al.*, 2005; Clem and Barth 2006). Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα, θα είχε ενδιαφέρον να μελετηθούν σε επόμενη φάση τα επίπεδα των υπομονάδων σε επίπεδο συναπτοσωμικού κλάσματος στους *Fmr1* KO επίμυες. Έχει προταθεί ότι σημαντικό ρόλο στην αυξημένη ενδοκυττάρωση των υποδοχέων AMPA κατέχει η έντονη σηματοδότηση των mGluR₅ που προκύπτει κατά την απώλεια της FMRP όπως έχει δειχθεί σε *Fmr1* KO μυς (Huber *et al.* 2002; Bear *et al.* 2004; Wang *et al.* 2010; Suvrathan *et al.* 2010), καθώς επάγει την έκφραση πρωτεϊνών που συμβάλλουν στην ενδοκυττάρωση των υποδοχέων (Cheng *et al.*, 2017). Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει πως η απουσία της FMRP διαταράσσει την έκφραση της GluR1 στους δενδρίτες η οποία φυσιολογικά επάγεται μέσω του ρετινοϊκού οξέος (Comery *et al.* 1997; Irwin *et al.* 2000; Braun *et al.* 2000). Ένας άλλος βασικός παράγοντας για τη ρύθμιση της ενδοκυττάρωσης αποτελούν οι φωσφορυλιώσεις των υπομονάδων του AMPA υποδοχέα. Χαρακτηριστικά, πειραματική μελέτη έδειξε μείωση της φωσφορυλίωσης στη σερίνη 831 της GluR1 στην οδοντωτή έλικα ενός *Fmr1* KO μοντέλου μυ, φωσφορυλίωση η οποία φυσιολογικά ενισχύει την ενσωμάτωση του AMPAR στη μεμβράνη (Bostrom *et al.*, 2015). Συνεπώς χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση για το αν αυτές οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων συνοδεύονται και από αλλαγές σε επίπεδο φωσφορυλιώσεων οι οποίες συμβάλλουν σε αλλαγές κατά τη διαδικασία ανακύκλωσης των υποδοχέων.

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν μεταβολές και στα επίπεδα έκφρασης του ώριμου BDNF για τις περιοχές ενδιαφέροντος. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα μόνο στον κοιλιακό ιππόκαμπο των *Fmr1* KO επιμύων σε σχέση με τα WT, ενώ στον προμετωπιαίο φλοιό των KO επιμύων η

αύξηση ήταν ασθενώς και στατιστικά μη σημαντική. Παράλληλα παρατηρήθηκαν αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα του BDNF, TrkB, τόσο στον προμετωπιαίο φλοιό όσο και στον ιππόκαμπο. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν δημοσιευμένες μελέτες που να αξιολογούν τα επίπεδα του BDNF σε *Fmr1* KO επίμυες. Σε μία πειραματική μελέτη *Fmr1* KO μυ, παρατηρήθηκαν αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα του BDNF στον ιππόκαμπο και μειωμένα στον φλοιό, γεγονός που υποδηλώνει μια ιστο-ειδική διαφοροποίηση μεταξύ των δύο γονοτύπων (Louhivuori *et al.*, 2011). Σε άλλη μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκε ένα *Fmr1* KO στέλεχος μύς με ταυτόχρονη γενετική τροποποίηση ώστε να έχει μειωμένη έκφραση του BDNF, παρατηρήθηκε μεταβολή στα επίπεδα του BDNF στον ιππόκαμπο ανάλογα με την ηλικία των πειραματοζώων και περαιτέρω διαφορές ως προς τις διαδικασίες της μνήμης και μάθησης, υποδεικνύοντας τοπο-ειδικό ρόλο του BDNF ως προς το συμπεριφορικό προφίλ γνωστικού τύπου στα πειραματόζωα (Uutela *et al.*, 2012).

Ο BDNF είναι ένας νευροτροφικός παράγοντας που κατέχει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες της συναπτικής διαβίβασης και της νευρωνικής πλαστικότητας (Lu *et al.*, 2014; Duman *et al.*, 2016) και η έκφραση του επάγεται ανάλογα και με την δραστηριότητα των υποδοχέων NMDA και AMPA. Επομένως, αύξηση στη δραστηριότητα αυτών των υποδοχέων στον φλοιό, μπορεί να εξηγεί και τα αυξημένα επίπεδα του ώριμου BDNF που προσδιορίστηκαν στον φλοιό των *Fmr1* KO επιμύων. Επίσης, έχει δειχθεί ότι ο BDNF με την FMRP ασκούν αρνητική ρύθμιση μεταξύ τους όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης (Castren *et al.*, 2002; Castren and Castren, 2014). Συνεπώς, είναι πιθανό να αυξάνονται τα επίπεδα του BDNF λόγω απουσίας του ρυθμιστικού ελέγχου από την FMRP. Σε μελέτες έχει αναφερθεί ότι αλλαγές στην σηματοδότηση του BDNF/TrkB μπορεί να είναι αποτέλεσμα αντισταθμιστικών αποκρίσεων λόγω επαγωγής του LTD από την έντονη σηματοδότηση μέσω mGluR5 (Louhivuori *et al.*, 2011; Kim and Cho, 2014). Συνεπώς αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω, κατά πόσο παρατηρούνται ανάλογες μεταβολές και στο συναπτοσωμικό κλάσμα, ο βαθμός ενεργοποίησης των υποδοχέων TrkB λόγω της πιθανής ύπαρξης φωσφορυλιώσεων καθοριστικών για την σηματοδότησή

του και αν αυτή η ενεργοποίηση συνοδεύεται με παράλληλη ενίσχυση της ενεργοποίησης των mGluR5.

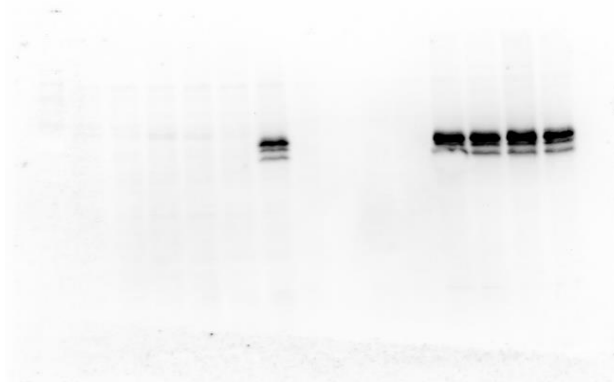
Τα αποτελέσματα από την νευροχημική ανάλυση έδειξαν μείωση των επιπέδων του γλουταμικού και σε μικρότερο βαθμό και της γλουταμίνης στον προμετωπιαίο φλοιό των *Fmr1* KO επιμύων. Δεδομένου ότι η ανάλυση έγινε σε ολικά εκχυλίσματα ιστών, τα επίπεδα αυτά αντιστοιχούν κατά βάση στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των αμινοξέων στα νευρικά αλλά και σε γλοιακά κύτταρα. Η μείωση των επιπέδων και του γλουταμικού και της γλουταμίνης η οποία αποτελεί ταυτόχρονα πρόδρομο μόριο αλλά και μεταβολίτη του γλουταμικού, υποδηλώνει μειωμένο ρυθμό βιοσύνθεσης γλουταμικού. Η συγκεκριμένη ανάγνωση των ευρημάτων μας σε συνδυασμό με το ότι ο ρυθμός ανακύκλωσης GLN/Glu βρέθηκε αυξημένος στον προμετωπιαίο φλοιό των KO επιμύων, υποδηλώνει αυξημένη δραστηριότητα γλουταματεργικής νευροδιαβίβασης. Όσον αφορά τα επίπεδα του GABA, παρατηρήθηκε μια τάση για μείωση στα επίπεδά του στον φλοιό των KO επιμύων, χωρίς ωστόσο να βρεθεί μεταβολή στο ρυθμό ανακύκλωσης Glu/GABA.

Τα αποτελέσματα στον υπόκαμπο έδειξαν ένα διαφορετικό προφίλ, με τα επίπεδα όλων των αμινοξέων να είναι αυξημένα στους KO επίμυες. Τα αυξημένα επίπεδα του γλουταμικού και της γλουταμίνης, υποδεικνύουν αυξημένο ρυθμό βιοσύνθεσης του γλουταμικού στα KO πειραματόζωα, χωρίς αυξημένο ρυθμό ανακύκλωσης GLN/Glu στον υπόκαμπο. Επίσης, αυξημένη βιοσύνθεση προκύπτει και για το GABA στον υπόκαμπο των KO επιμύων, χωρίς παράλληλη μεταβολή του ρυθμού ανακύκλωσης Glu/GABA. Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία δεν υπάρχουν μελέτες που να αξιολογούν τα επίπεδα αυτών των νευροδιαβιβαστών σε *Fmr1* KO επίμυες, ενώ περιορισμένες είναι και οι μελέτες στο αντίστοιχο μοντέλο με μύς. Συγκεκριμένα, σε μια μελέτη όπου μετρήθηκαν μέσω NMR ιστικά επίπεδα νευροδιαβιβαστών σε *Fmr1* KO μύς, βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα γλουταμικού στον φλοιό και μειωμένα επίπεδα GABA στην παρεγκεφαλίδα (Davidovic *et al.*, 2011). Σε πρόσφατη μελέτη όπου αξιολογήθηκαν μέσω LC-MS (Liquid chromatography - Mass spectrometry) τα επίπεδα διαφόρων μεταβολιτών στο πλάσμα *Fmr1* μυών, παρατηρήθηκε αύξηση τόσο στα επίπεδα του γλουταμικού όσο και της γλουταμίνης (Menzies *et al.*, 2021). Αξίζει να σημειωθεί ότι από τα αποτελέσματά μας,

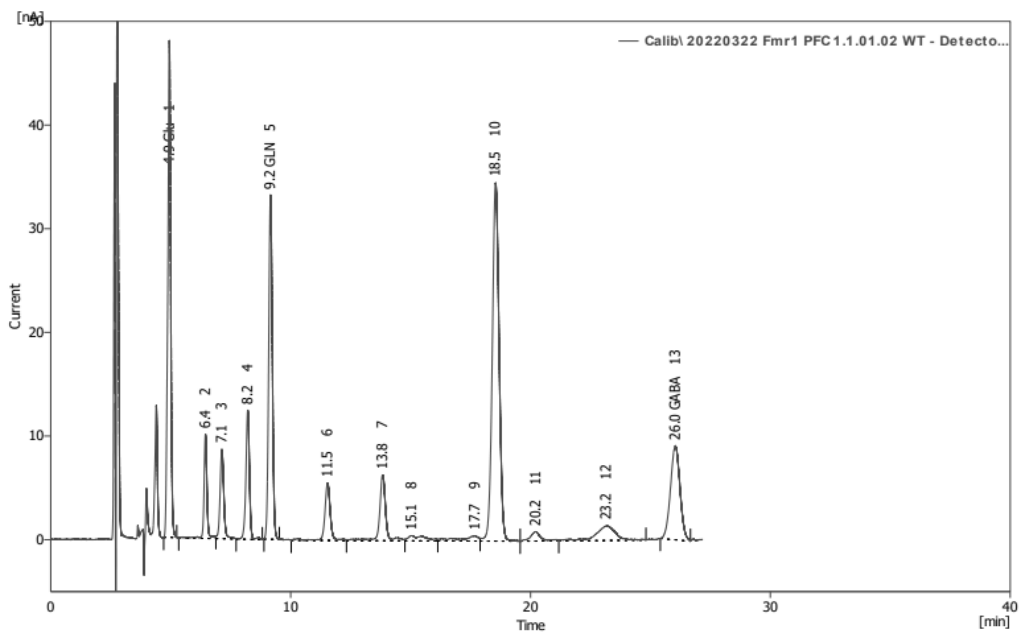
προέκυψαν κάποιες ενδείξεις για διαταραχές στη γλουταματεργική αλλά και στην GABAεργική δραστηριότητα των *Fmr1* KO επιμύων και η αποτύπωση των μεταβολών χαρακτηρίζεται από μια διφασικότητα μεταξύ προμετωπιαίου φλοιού και ιπποκάμπου.

Συνοψίζοντας, από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι το μοντέλο του *Fmr1* KO επίμου, χαρακτηρίζεται από ένα διεγερμένο κινητικό προφίλ και μειωμένη απόδοση ως προς διαφορετικές εκφάνσεις γνωστικών λειτουργιών όπως αυτές προσδιορίστηκαν μέσω συγκεκριμένων συμπεριφορικών δοκιμασιών. Παράλληλα, τα αποτελέσματα μας έδειξαν για πρώτη φορά ένα διφασικό προφίλ όσον αφορά τη γλουταματεργική διαβίβαση μεταξύ φλοιωδών και υποφλοιωδών δομών του εγκεφάλου *Fmr1* KO επιμύων. Ειδικότερα, στον προμετωπιαίο φλοιό των KO επιμύων παρατηρήθηκε αυξημένη γλουταματεργική διαβίβαση που πιθανώς συνδέεται με τον αυξημένο ρυθμό ανακύκλωσης και την ταυτόχρονη αύξηση των υπομονάδων των υποδοχέων του γλουταμικού. Η απορρύθμιση της λειτουργίας του γλουταματεργικού συστήματος πιθανώς να συνδέεται και με τις παρατηρούμενες αλλαγές στο μονοπάτι BDNF-TrkB. Τα νευροβιολογικά μας ευρήματα στον προμετωπιαίο φλοιό είναι πιθανό να εμπλέκονται στο υπόστρωμα του φαινοτύπου που εμφάνισαν τα πειραματόζωα (υπερκινητικότητα και γνωστικού τύπου διαταραχές), συμβάλλοντας στη υπόθεση που εξελίσσεται για την υψηλή μεταφραστική αξία του μοντέλου σε επίμους για τη μελέτη του FXS. Στον ιππόκαμπο, η απορρύθμιση του γλουταματεργικού συστήματος στους KO επίμους προκύπτει λόγω μείωσης της έκφρασης υπομονάδων των υποδοχέων του γλουταμικού, οι οποίοι είναι μείζονος σημασίας για την επίτευξη συναπτικής πλαστικότητας και μπορεί να συνδυαστεί με τα ελλείματα στην χωρική και αναγνωριστική μνήμη. Συμπερασματικά, τα ευρήματά μας καταδεικνύουν ότι το μοντέλο του *Fmr1* KO επίμου, χαρακτηρίζεται από φαινομενολογική ομοιότητα και υποκείμενους μηχανισμούς που σχετίζονται με διαδικασίες συναπτικής πλαστικότητας και συμβάλλουν περαιτέρω στη μελέτη της νευροβιολογίας του συνδρόμου και την ανάδειξη της δομικής εγκυρότητας του συγκεκριμένου μοντέλου.

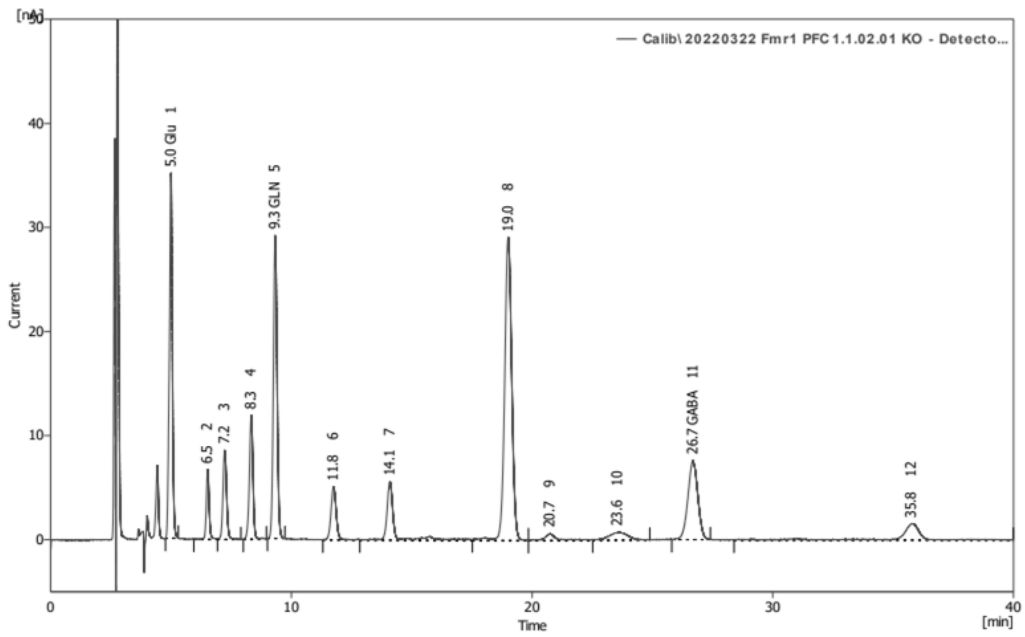
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



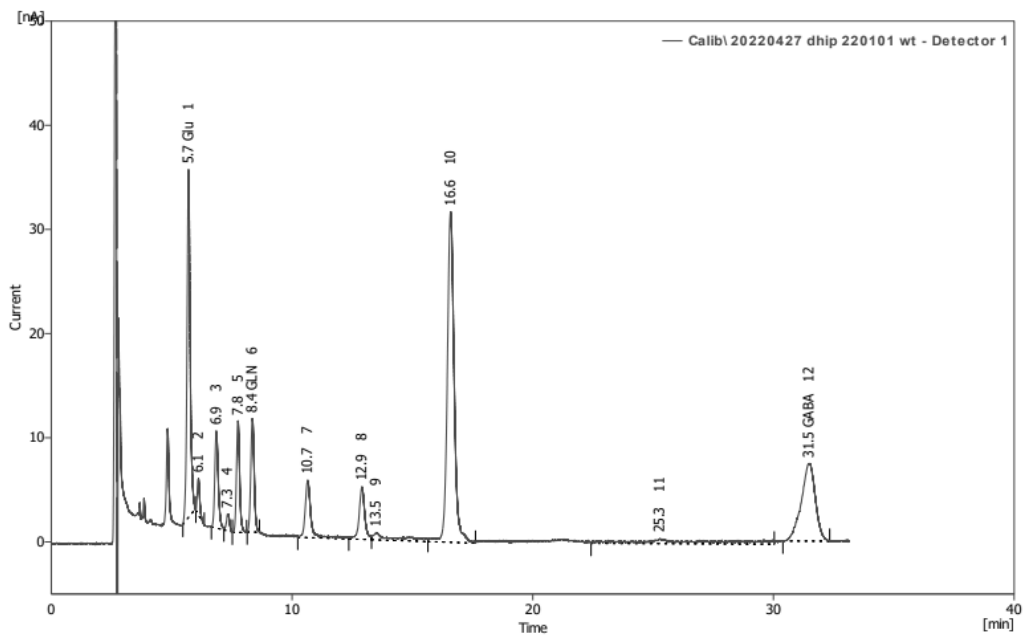
Εικόνα 33. Ενδεικτική εικόνα μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western για την ανίχνευση της πρωτεΐνης FMRP, με χρήση κατάλληλου αντισώματος. Η παρουσία μπάντας αντιστοιχεί σε έκφραση της πρωτεΐνης και συνεπώς σε WT πειραματόζωο.



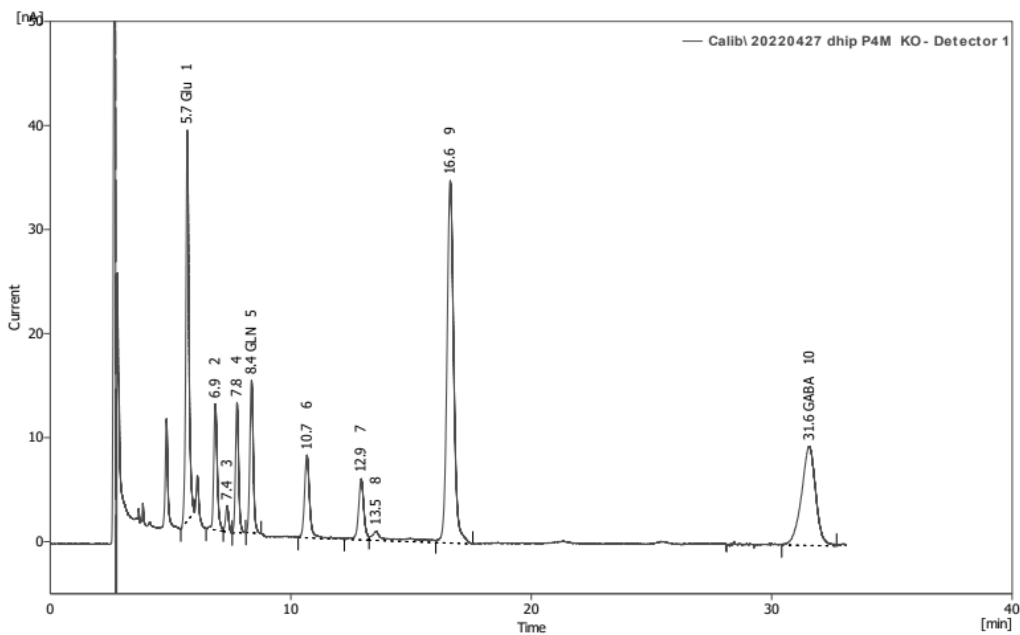
Εικόνα 34. Ενδεικτικό χρωματογράφημα όπως προέκυψε κατά την HPLC για δείγμα από τον προμετωπιαίο φλοιό WT επίμυ. Επισημαίνονται οι χρωματογραφικές κορυφές για τα αμινοξέα Glu, GLN και GABA.



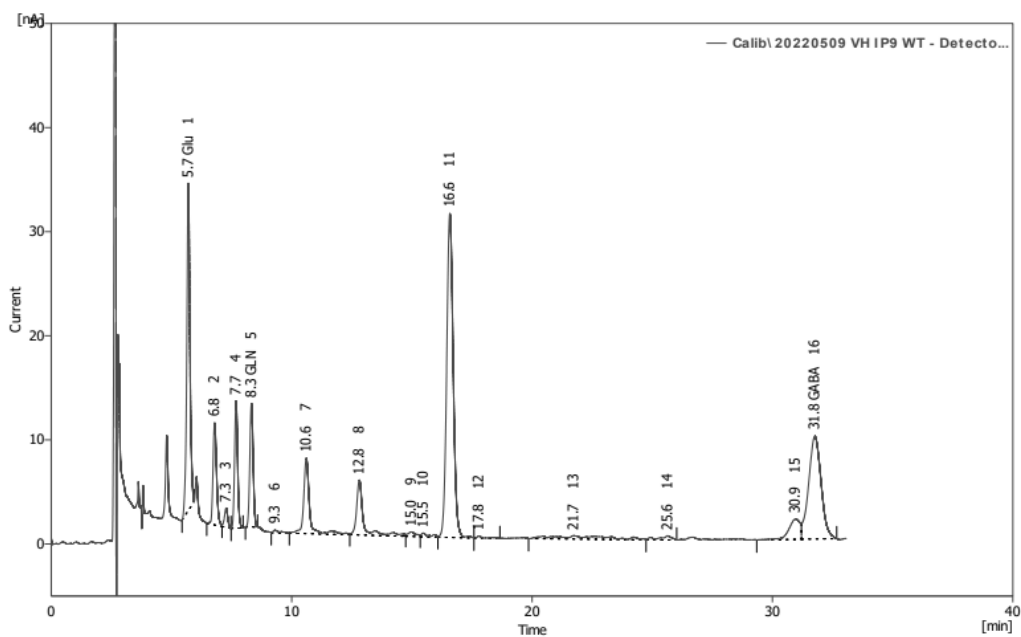
Εικόνα 35. Ενδεικτικό χρωματογράφημα όπως προέκυψε κατά την HPLC για δείγμα από τον προμετωπιαίο φλοιό KO επίμυ. Επισημαίνονται οι χρωματογραφικές κορυφές για τα αμινοξέα Glu, GLN και GABA.



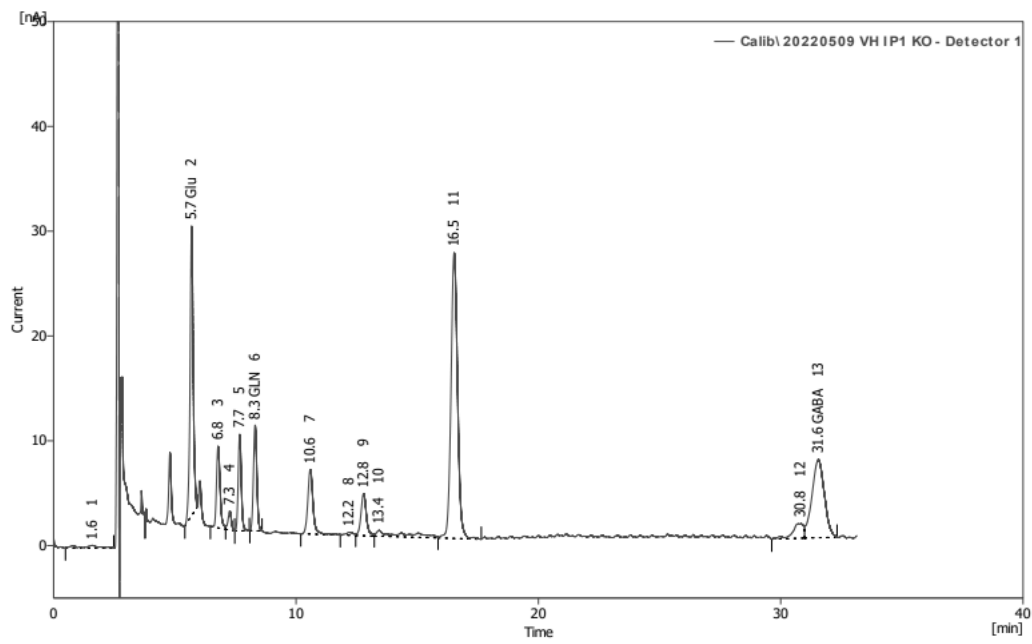
Εικόνα 36. Ενδεικτικό χρωματογράφημα όπως προέκυψε κατά την HPLC για δείγμα από τον ραχιαίο υπόκαμπο WT επίμυ. Επισημαίνονται οι χρωματογραφικές κορυφές για τα αμινοξέα Glu, GLN και GABA.



Εικόνα 37. Ενδεικτικό χρωματογράφημα όπως προέκυψε κατά την HPLC για δείγμα από τον ραχιαίο ιππόκαμπο KO επίμυ. Επισημαίνονται οι χρωματογραφικές κορυφές για τα αμινοξέα Glu, GLN και GABA.



Εικόνα 38. Ενδεικτικό χρωματογράφημα όπως προέκυψε κατά την HPLC για δείγμα από τον κοιλιακό ιππόκαμπο WT επίμυ. Επισημαίνονται οι χρωματογραφικές κορυφές για τα αμινοξέα Glu, GLN και GABA.



Εικόνα 39. Ενδεικτικό χρωματογράφημα όπως προέκυψε κατά την HPLC για δείγμα από τον κοιλιακό ιππόκαμπο ΚΟ επίμυ. Επισημαίνονται οι χρωματογραφικές κορυφές για τα αμινοξέα Glu, GLN και GABA.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adhikari A., Topiwala M. A., Gordon J. A. (2010). Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. *Neuron* 65, 257–269.
- Akhondzadeh, S. (1999). Hippocampal synaptic plasticity and cognition. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 24(4), 241–248.
- Allingham-Hawkins, D. J., Babul-Hirji, R., Chitayat, D., Holden, J. J., Yang, K. T., Lee, C., Hudson, R., Gorwill, H., Nolin, S. L., Glicksman, A., Jenkins, E. C., Brown, W. T., Howard-Peebles, P. N., Becchi, C., Cummings, E., Fallon, L., Seitz, S., Black, S. H., Vianna-Morgante, A. M., Costa, S. S., ... Vieri, F. (1999). Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study--preliminary data. *American journal of medical genetics*, 83(4), 322–325.
- Anand, K. S., & Dhikav, V. (2012). Hippocampus in health and disease: An overview. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 15(4), 239–246.
- Antoniou, K., Papathanasiou, G., Papalexi, E., Hyphantis, T., Nomikos, G. G., Spyraiki, C., & Papadopoulou-Daifoti, Z. (2008). Individual responses to novelty are associated with differences in behavioral and neurochemical profiles. *Behavioural brain research*, 187(2), 462–472.
- Ashley, C.T., Jr., Wilkinson, K.D., Reines, D., and Warren, S.T. (1993). FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science* 262:563–566.
- Asiminas, A., Jackson, A. D., Louros, S. R., Till, S. M., Spano, T., Dando, O., Bear, M. F., Chattarji, S., Hardingham, G. E., Osterweil, E. K., Wyllie, D., Wood, E. R., & Kind, P. C. (2019).
- Sustained correction of associative learning deficits after brief, early treatment in a rat model of Fragile X Syndrome. *Science translational medicine*, 11(494).
- Bear, M. F., Huber, K. M., & Warren, S. T. (2004). The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends in neurosciences*, 27(7), 370–377.
- Berry-Kravis, E., Raspa, M., Loggin-Hester, L., Bishop, E., Holiday, D., & Bailey, D. B. (2010). Seizures in fragile X syndrome: characteristics and comorbid diagnoses. *American journal on intellectual and developmental disabilities*, 115(6), 461–472.
- Bostrom, C. A., Majaess, N. M., Morch, K., White, E., Eadie, B. D., & Christie, B. R. (2015). Rescue of NMDAR-dependent synaptic plasticity in Fmr1 knock-out mice. *Cerebral cortex*, 25(1), 271–279.
- Braat, S., & Kooy, R. F. (2015). Insights into GABAergic system deficits in fragile X syndrome led to clinical trials. *Neuropharmacology*, 88, 48–54.
- Braat, S., & Kooy, R. F. (2015). The GABAA Receptor as a Therapeutic Target for Neurodevelopmental Disorders. *Neuron*, 86(5), 1119–1130.
- Bramham, C. R., & Messaoudi, E. (2005). BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Progress in neurobiology*, 76(2), 99–125.
- Braun, K., & Segal, M. (2000). FMRP involvement in formation of synapses among cultured hippocampal neurons. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 10(10), 1045–1052.
- Brosnan, J. T., & Brosnan, M. E. (2013). Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino acids*, 45(3), 413–418.
- Canteras N. S., Swanson L. W. (1992). Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 324, 180–194.
- Casey, B. J., Galvan, A., & Hare, T. A. (2005). Changes in cerebral functional organization during cognitive development. *Current Opinion in Neurobiology*, 15, 239–244.

- Castrén, M. L., & Castrén, E. (2014). BDNF in fragile X syndrome. *Neuropharmacology*, 76 Pt C, 729–736.
- Castrén, M., Lampinen, K. E., Miettinen, R., Koponen, E., Sipola, I., Bakker, C. E., Oostra, B. A., & Castrén, E. (2002). BDNF regulates the expression of fragile X mental retardation protein mRNA in the hippocampus. *Neurobiology of disease*, 11(1), 221–229.
- Castrén, M., Lampinen, K. E., Miettinen, R., Koponen, E., Sipola, I., Bakker, C. E., Oostra, B. A., & Castrén, E. (2002). BDNF regulates the expression of fragile X mental retardation protein mRNA in the hippocampus. *Neurobiology of disease*, 11(1), 221–229.
- Caviness, V. S., Kennedy, D. N., Richelme, C., Rademacher, J., & Filipek, P. A. (1996). The human brain age 7–11 years: A volumetric analysis based on magnetic resonance images. *Cerebral Cortex*, 6, 726–736.
- Cenquizca, L. A., and Swanson, L. W. (2007). Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res. Rev.* 56, 1–26.
- Cezario A. F., Ribeiro-Barbosa E. R., Baldo M. V., Canteras N. S. (2008). Hypothalamic sites responding to predator threats—the role of the dorsal premammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. *Eur. J. Neurosci.* 28, 1003–1015.
- Chatterjee, M., Kurup, P. K., Lundbye, C. J., Hugger Toft, A. K., Kwon, J., Benedict, J., Kamceva, M., Banke, T. G., & Lombroso, P. J. (2018). STEP inhibition reverses behavioral, electrophysiologic, and synaptic abnormalities in Fmr1 KO mice. *Neuropharmacology*, 128, 43–53.
- Chen, B. S., & Roche, K. W. (2007). Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. *Neuropharmacology*, 53(3), 362–368.
- Chen, E., & Joseph, S. (2015). Fragile X mental retardation protein: A paradigm for translational control by RNA-binding proteins. *Biochimie*, 114, 147–154.
- Chen, W. S., & Bear, M. F. (2007). Activity-dependent regulation of NR2B translation contributes to metaplasticity in mouse visual cortex. *Neuropharmacology*, 52(1), 200–214.
- Cheng, G. R., Li, X. Y., Xiang, Y. D., Liu, D., McClintock, S. M., & Zeng, Y. (2017). The implication of AMPA receptor in synaptic plasticity impairment and intellectual disability in fragile X syndrome. *Physiological research*, 66(5), 715–727.
- Chistiakova, M., Bannon, NM., Bazhenov, M., Volgushev M. (2014). Heterosynaptic plasticity: multiple mechanisms and multiple roles. *Neuroscientist* 20(5):483–498.
- Citri, A., & Malenka, R. C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(1), 18–41.
- Clem, R. L., & Barth, A. (2006). Pathway-specific trafficking of native AMPARs by in vivo experience. *Neuron*, 49(5), 663–670.
- Comery, T. A., Harris, J. B., Willems, P. J., Oostra, B. A., Irwin, S. A., Weiler, I. J., & Greenough, W. T. (1997). Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(10), 5401–5404.
- Contractor, A., Klyachko, V. A., & Portera-Cailliau, C. (2015). Altered Neuronal and Circuit Excitability in Fragile X Syndrome. *Neuron*, 87(4), 699–715.

- Cullinan W. E., Herman J. P., Watson S. J. (1993). Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *J. Comp. Neurol.* 332, 1–20.
- Curia, G., Papouin, T., Séguéla, P., & Avoli, M. (2009). Downregulation of tonic GABAergic inhibition in a mouse model of fragile X syndrome. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 19(7), 1515–1520.
- Darnell, J. C., Van Driesche, S. J., Zhang, C., Hung, K. Y., Mele, A., Fraser, C. E., Stone, E. F., Chen, C., Fak, J. J., Chi, S. W., Licatalosi, D. D., Richter, J. D., & Darnell, R. B. (2011). FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell*, 146(2), 247–261.
- Davidovic, L., Navratil, V., Bonaccorso, C. M., Catania, M. V., Bardoni, B., & Dumas, M. E. (2011). A metabolomic and systems biology perspective on the brain of the fragile X syndrome mouse model. *Genome research*, 21(12), 2190–2202.
- De Boule, K., Verkerk, A. J., Reyniers, E., Vits, L., Hendrickx, J., Van Roy, B., Van den Bos, F., de Graaff, E., Oostra, B. A., & Willems, P. J. (1993). A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nature genetics*, 3(1), 31–35.
- Derkach, V. A., Oh, M. C., Guire, E. S., & Soderling, T. R. (2007). Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(2), 101–113.
- D'Hulst, C., Heulens, I., Brouwer, J. R., Willemsen, R., De Geest, N., Reeve, S. P., De Deyn, P. P., Hassan, B. A., & Kooy, R. F. (2009). Expression of the GABAergic system in animal models for fragile X syndrome and fragile X associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Brain research*, 1253, 176–183.
- Dionne, O., & Corbin, F. (2021). An "Omic" Overview of Fragile X Syndrome. *Biology*, 10(5), 433.
- Dölen, G., & Bear, M. F. (2008). Role for metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) in the pathogenesis of fragile X syndrome. *The Journal of physiology*, 586(6), 1503–1508.
- Dölen, G., & Bear, M. F. (2008). Role for metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) in the pathogenesis of fragile X syndrome. *The Journal of physiology*, 586(6), 1503–1508.
- Duman, R. S., Aghajanian, G. K., Sanacora, G., & Krystal, J. H. (2016). Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. *Nature medicine*, 22(3), 238–249.
- Durai Ananda Kumar T, Sai Charan, Venkateswarlu A, & Supriya Reddy K. (2020). Evolution of liquid chromatography: Technologies and applications. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 11(3), 3204–3211.
- Edbauer, D., Neilson, J. R., Foster, K. A., Wang, C. F., Seeburg, D. P., Battersby, M. N., Tada, T., Dolan, B. M., Sharp, P. A., & Sheng, M. (2010). Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron*, 65(3), 373–384.
- Eichler, E.E., Richards, S., Gibbs, R.A., and Nelson, D.L. (1993). Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum. Mol. Genet.* 2:1147-1153.
- Eiges, R., Urbach, A., Malcov, M., Frumkin, T., Schwartz, T., Amit, A., Yaron, Y., Eden, A., Yanuka, O., Benvenisty, N., & Ben-Yosef, D. (2007). Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos. *Cell stem cell*, 1(5), 568–577.
- Ellenbroek, B., & Youn, J. (2016). Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? *Disease models & mechanisms*, 9(10), 1079–1087.

- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural brain research*, *31*(1), 47–59.
- Erecińska, M., & Silver, I. A. (1990). Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Progress in neurobiology*, *35*(4), 245–296.
- Galanopoulos, A., Polissidis, A., Georgiadou, G., Papadopoulou-Daifoti, Z., Nomikos, G. G., Pitsikas, N., & Antoniou, K. (2014). WIN55,212-2 impairs non-associative recognition and spatial memory in rats via CB1 receptor stimulation. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, *124*, 58–66.
- Géczi, J. (2010). Glutamate receptors and learning and memory. *Nature genetics*, *42*(11), 925–926.
- Gerhardt, J., Tomishima, M. J., Zaninovic, N., Colak, D., Yan, Z., Zhan, Q., Rosenwaks, Z., Jaffrey, S. R., & Schildkraut, C. L. (2014). The DNA replication program is altered at the FMR1 locus in fragile X embryonic stem cells. *Molecular cell*, *53*(1), 19–31.
- Gibson, J. R., Bartley, A. F., Hays, S. A., & Huber, K. M. (2008). Imbalance of neocortical excitation and inhibition and altered UP states reflect network hyperexcitability in the mouse model of fragile X syndrome. *Journal of neurophysiology*, *100*(5), 2615–2626.
- Giedd, J. N., Snell, J. W., Lange, N., Rajapakse, J. C., Casey, B. J., Kozuch, P. L., et al. (1996). Quantitative magnetic resonance imaging of human brain development: Ages 4–18. *Cerebral Cortex*, *6*, 551–560.
- Golden, C., Breen, M. S., Koro, L., Sonar, S., Niblo, K., Browne, A., Burlant, N., Di Marino, D., De Rubeis, S., Baxter, M. G., Buxbaum, J. D., & Harony-Nicolas, H. (2019). Deletion of the KH1 Domain of Fmr1 Leads to Transcriptional Alterations and Attentional Deficits in Rats. *Cerebral cortex*, *29*(5), 2228–2244.
- Guillen, J. (2012). FELASA guidelines and recommendations. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, *51*(3), 311–321.
- Hagerman, R. J., Berry-Kravis, E., Hazlett, H. C., Bailey, D. B., Jr, Moine, H., Kooy, R. F., Tassone, F., Gantois, I., Sonenberg, N., Mandel, J. L., & Hagerman, P. J. (2017). Fragile X syndrome. *Nature reviews. Disease primers*, *3*, 17065.
- Hagerman, R. J., Leehey, M., Heinrichs, W., Tassone, F., Wilson, R., Hills, J., Grigsby, J., Gage, B., & Hagerman, P. J. (2001). Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology*, *57*(1), 127–130
- Hamilton, S. M., Green, J. R., Veeraragavan, S., Yuva, L., McCoy, A., Wu, Y., Warren, J., Little, L., Ji, D., Cui, X., Weinstein, E., & Paylor, R. (2014). Fmr1 and Nlgn3 knockout rats: novel tools for investigating autism spectrum disorders. *Behavioral neuroscience*, *128*(2), 103–109.
- Heulens, I., Suttie, M., Postnov, A., De Clerck, N., Perrotta, C. S., Mattina, T., Faravelli, F., Forzano, F., Kooy, R. F., & Hammond, P. (2013). Craniofacial characteristics of fragile X syndrome in mouse and man. *European journal of human genetics: EJHG*, *21*(8), 816–823.
- Hirst, M., Grewal, P., Flannery, A., Slatter, R., Maher, E., Barton, D., Fryns, J. P., & Davies, K. (1995). Two new cases of FMR1 deletion associated with mental impairment. *American journal of human genetics*, *56*(1), 67–74.
- Hoeffler, C. A., Sanchez, E., Hagerman, R. J., Mu, Y., Nguyen, D. V., Wong, H., Whelan, A. M., Zukin, R. S., Klann, E., & Tassone, F. (2012). Altered mTOR signaling and enhanced CYFIP2 expression levels in subjects with fragile X syndrome. *Genes, brain, and behavior*, *11*(3), 332–341.

- Hogan, A. L., Caravella, K. E., Ezell, J., Rague, L., Hills, K., & Roberts, J. E. (2017). Autism Spectrum Disorder Symptoms in Infants with Fragile X Syndrome: A Prospective Case Series. *Journal of autism and developmental disorders*, 47(6), 1628–1644.
- Hong, A., Zhang, A., Ke, Y., El Idrissi, A., & Shen, C. H. (2012). Downregulation of GABA(A) β subunits is transcriptionally controlled by Fmr1p. *Journal of molecular neuroscience: MN*, 46(2), 272–275.
- Hooper, A., Wong, H., Niibori, Y., Abdoli, R., Karumuthil-Meilethil, S., Qiao, C., Danos, O., Bruder, J. T., & Hampson, D. R. (2021). Gene therapy using an ortholog of human fragile X mental retardation protein partially rescues behavioral abnormalities and EEG activity. *Molecular therapy. Methods & clinical development*, 22, 196–209.
- Hou, L., Antion, M. D., Hu, D., Spencer, C. M., Paylor, R., & Klann, E. (2006). Dynamic translational and proteasomal regulation of fragile X mental retardation protein controls mGluR-dependent long-term depression. *Neuron*, 51(4), 441–454.
- Huber, K. M., Gallagher, S. M., Warren, S. T., & Bear, M. F. (2002). Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7746–7750.
- Huttenlocher, P. R. (2009). *Neural plasticity*. Harvard University Press, Cambridge.
- Irwin, S. A., Galvez, R., & Greenough, W. T. (2000). Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 10(10), 1038–1044.
- Karkalousos, P., Georgiou, Z., Kroupis, C., Papaioannou, A., Plageras, P., Spyropoulos, V., Tsotsou, G. E., Fountzoula, C. (2015). Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας, Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (απόδοσης) στην κλινική χημεία. Βασικές αρχές και παραδείγματα. (Chapter 8), (pp. 1–40)., Kallipos publications.
- Kidd, S. A., Lachiewicz, A., Barbouth, D., Blitz, R. K., Delahunty, C., McBrien, D., Visootsak, J., & Berry-Kravis, E. (2014). Fragile X syndrome: a review of associated medical problems. *Pediatrics*, 134(5), 995–1005.
- Kim, S. W., & Cho, K. J. (2014). Activity-dependent alterations in the sensitivity to BDNF-TrkB signaling may promote excessive dendritic arborization and spinogenesis in fragile X syndrome in order to compensate for compromised postsynaptic activity. *Medical hypotheses*, 83(4), 429–435.
- Kokane, S. S., Armant, R. J., Bolaños-Guzmán, C. A., & Perrotti, L. I. (2020). Overlap in the neural circuitry and molecular mechanisms underlying ketamine abuse and its use as an antidepressant. *Behavioural brain research*, 384, 112548.
- Kourosh-Arami, M., Hosseini, N., & Komaki, A. (2021). Brain is modulated by neuronal plasticity during postnatal development. *The journal of physiological sciences : JPS*, 71(1), 34.
- Kowiański, P., Lietzau, G., Czuba, E., Waśkow, M., Steliga, A., & Moryś, J. (2018). BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cellular and molecular neurobiology*, 38(3), 579–593.
- Kozono, N., Okamura, A., Honda, S., Matsumoto, M., & Mihara, T. (2020). Gamma power abnormalities in a Fmr1-targeted transgenic rat model of fragile X syndrome. *Scientific reports*, 10(1), 18799.

- Krueger, D. D., Osterweil, E. K., Chen, S. P., Tye, L. D., & Bear, M. F. (2011). Cognitive dysfunction and prefrontal synaptic abnormalities in a mouse model of fragile X syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(6), 2587–2592.
- Li, J., Pelletier, M. R., Perez Velazquez, J. L., & Carlen, P. L. (2002). Reduced cortical synaptic plasticity and GluR1 expression associated with fragile X mental retardation protein deficiency. *Molecular and cellular neurosciences*, *19*(2), 138–151.
- Lisman J. (2003). Long-term potentiation: outstanding questions and attempted synthesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *358*(1432), 829–842.
- Liu, L., Wong, T. P., Pozza, M. F., Lingenhoehl, K., Wang, Y., Sheng, M., Auberson, Y. P., & Wang, Y. T. (2004). Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science (New York, N.Y.)*, *304*(5673), 1021–1024.
- Louhivuori, V., Vicario, A., Uutela, M., Rantamaki, T., Louhivuori, L. M., Castrén, E., et al. (2011). BDNF and TrkB in neuronal differentiation of *Fmr1*-knockout mouse. *Neurobiol. Dis.* *41*, 469–480
- Lu, B., Nagappan, G., & Lu, Y. (2014). BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handbook of experimental pharmacology*, *220*, 223–250.
- Lubs H. A. (1969). A marker X chromosome. *American journal of human genetics*, *21*(3), 231–244.
- Lundbye, C. J., Toft, A., & Banke, T. G. (2018). Inhibition of GluN2A NMDA receptors ameliorates synaptic plasticity deficits in the *Fmr1*^{-/-} mouse model. *The Journal of physiology*, *596*(20), 5017–5031.
- Luo, A. H., Tahsili-Fahadan, P., Wise, R. A., Lupica, C. R., and Aston-Jones, G. (2011). Linking context with reward: a functional circuit from hippocampal CA3 to ventral tegmental area. *Science*. *333*, 353–357.
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, *4*(9), 429–434.
- Martin, J. P., & Bell, J. (1943). A PEDIGREE OF MENTAL DEFECT SHOWING SEX-LINKAGE. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *6*(3-4), 154–157.
- Massey, P. V., Johnson, B. E., Moulton, P. R., Auberson, Y. P., Brown, M. W., Molnar, E., Collingridge, G. L., & Bashir, Z. I. (2004). Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *24*(36), 7821–7828.
- Mattson M. P. (2008). Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1144*, 97–112.
- McDonald A. J. (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog. Neurobiol.* *55*, 257–332.
- McDonald, J. W., & Johnston, M. V. (1990). Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain research. Brain research reviews*, *15*(1), 41–70.
- Menzies, C., Naz, S., Patten, D., Alquier, T., Bennett, B. M., & Lacoste, B. (2021). Distinct Basal Metabolism in Three Mouse Models of Neurodevelopmental Disorders. *eNeuro*, *8*(2), ENEURO.0292-20.2021.
- Mila, M., Alvarez-Mora, M. I., Madrigal, I., & Rodriguez-Revenga, L. (2018). Fragile X syndrome: An overview and update of the FMR1 gene. *Clinical genetics*, *93*(2), 197–205.

- Miller E. K. (2000). The prefrontal cortex and cognitive control. *Nature reviews. Neuroscience*, *1*(1), 59–65.
- Morin-Parent, F., Champigny, C., Lacroix, A., Corbin, F., & Lepage, J. F. (2019). Hyperexcitability and impaired intracortical inhibition in patients with fragile-X syndrome. *Translational psychiatry*, *9*(1), 312.
- Myers, S. J., Yuan, H., Kang, J. Q., Tan, F., Traynelis, S. F., & Low, C. M. (2019). Distinct roles of *GRIN2A* and *GRIN2B* variants in neurological conditions. *F1000Research*, *8*, F1000 Faculty Rev-1940.
- Myrick, L. K., Nakamoto-Kinoshita, M., Lindor, N. M., Kirmani, S., Cheng, X., & Warren, S. T. (2014). Fragile X syndrome due to a missense mutation. *European journal of human genetics: EJHG*, *22*(10), 1185–1189.
- Napoli, I., Mercaldo, V., Boyd, P. P., Eleuteri, B., Zalfa, F., De Rubeis, S., Di Marino, D., Mohr, E., Massimi, M., Falconi, M., Witke, W., Costa-Mattioli, M., Sonenberg, N., Achsel, T., & Bagni, C. (2008). The fragile X syndrome protein represses activity-dependent translation through CYFIP1, a new 4E-BP. *Cell*, *134*(6), 1042–1054.
- Nedergaard, M., Takano, T., & Hansen, A. J. (2002). Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nature reviews. Neuroscience*, *3*(9), 748–755.
- Niciu, M. J., Kelmendi, B., & Sanacora, G. (2012). Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, *100*(4), 656–664. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.08.008>
- Nicoll, R. A., Kauer, J. A., & Malenka, R. C. (1988). The current excitement in long-term potentiation. *Neuron*, *1*(2), 97–103.
- Oberlé, I., Rousseau, F., Heitz, D., Kretz, C., Devys, D., Hanauer, A., Boué, J., Bertheas, M. F., & Mandel, J. L. (1991). Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science (New York, N.Y.)*, *252*(5009), 1097–1102.
- Olmos-Serrano, J. L., Paluszkiwicz, S. M., Martin, B. S., Kaufmann, W. E., Corbin, J. G., & Huntsman, M. M. (2010). Defective GABAergic neurotransmission and pharmacological rescue of neuronal hyperexcitability in the amygdala in a mouse model of fragile X syndrome. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *30*(29), 9929–9938.
- O'Shea R. D. (2002). Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, *29*(11), 1018–1023.
- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature reviews. Neuroscience*, *14*(6), 383–400.
- Patterson, S. L., Grover, L. M., Schwartzkroin, P. A., & Bothwell, M. (1992). Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. *Neuron*, *9*(6), 1081–1088.
- Pitsikas, N., & Markou, A. (2014). The metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist LY379268 counteracted ketamine-and apomorphine-induced performance deficits in the object recognition task, but not object location task, in rats. *Neuropharmacology*, *85*, 27–35.
- Pitsikas, N., Boultsadakis, A., & Sakellaris, N. (2008). Effects of sub-anesthetic doses of ketamine on rats' spatial and non-spatial recognition memory. *Neuroscience*, *154*(2), 454–460.

- Plant, K., Pelkey, K. A., Bortolotto, Z. A., Morita, D., Terashima, A., McBain, C. J., Collingridge, G. L., & Isaac, J. T. (2006 b). Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation. *Nature neuroscience*, *9*(5), 602–604.
- Plante, I., Davidovic, L., Ouellet, D. L., Gobeil, L. A., Tremblay, S., Khandjian, E. W., & Provost, P. (2006). Dicer-derived microRNAs are utilized by the fragile X mental retardation protein for assembly on target RNAs. *Journal of biomedicine & biotechnology*, *2006*(4), 64347.
- Polissidis, A., Chouliara, O., Galanopoulos, A., Naxakis, G., Papahatjis, D., Papadopoulou-Daifoti, Z., & Antoniou, K. (2014). Cannabinoids negatively modulate striatal glutamate and dopamine release and behavioural output of acute D-amphetamine. *Behavioural brain research*, *270*, 261–269.
- Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B. S., & Sanacora, G. (2011). The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nature reviews. Neuroscience*, *13*(1), 22–37.
- Pradhan, J., Noakes, P. G., & Bellingham, M. C. (2019). The Role of Altered BDNF/TrkB Signaling in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in cellular neuroscience*, *13*, 368.
- Price, T. J., Rashid, M. H., Millecamps, M., Sanoja, R., Entrena, J. M., & Cervero, F. (2007). Decreased nociceptive sensitization in mice lacking the fragile X mental retardation protein: role of mGluR1/5 and mTOR. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *27*(51), 13958–13967.
- Pritchard, L. M., Van Kempen, T. A., & Zimmerberg, B. (2013). Behavioral effects of repeated handling differ in rats reared in social isolation and environmental enrichment. *Neuroscience letters*, *536*, 47–51.
- Rizo, J., & Rosenmund, C. (2008). Synaptic vesicle fusion. *Nature structural & molecular biology*, *15*(7), 665–674.
- Santos, S. D., Carvalho, A. L., Caldeira, M. V., & Duarte, C. B. (2009). Regulation of AMPA receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience*, *158*(1), 105–125.
- Sanz-Clemente, A., Nicoll, R. A., & Roche, K. W. (2013). Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, *19*(1), 62–75.
- Scheefhals, N., & MacGillavry, H. D. (2018). Functional organization of postsynaptic glutamate receptors. *Molecular and cellular neurosciences*, *91*, 82–94.
- Schiavi, S., Carbone, E., Melancia, F., Buzzelli, V., Manduca, A., Campolongo, P., Pallottini, V., & Trezza, V. (2022 b). Perinatal supplementation with omega-3 fatty acids corrects the aberrant social and cognitive traits observed in a genetic model of autism based on FMR1 deletion in rats. *Nutritional neuroscience*, *25*(5), 898–911.
- Schiavi, S., Carbone, E., Melancia, F., di Masi, A., Jarjat, M., Brau, F., Cardarelli, S., Giorgi, M., Bardoni, B., & Trezza, V. (2022 a). Phosphodiesterase 2A inhibition corrects the aberrant behavioral traits observed in genetic and environmental preclinical models of Autism Spectrum Disorder. *Translational psychiatry*, *12*(1), 119.
- Schultz, C., & Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the hippocampal formation. *Frontiers of neurology and neuroscience*, *34*, 6–17.

- Sharma, A., Hoeffler, C. A., Takayasu, Y., Miyawaki, T., McBride, S. M., Klann, E., & Zukin, R. S. (2010). Dysregulation of mTOR signaling in fragile X syndrome. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(2), 694–702.
- Sheridan, S. D., Theriault, K. M., Reis, S. A., Zhou, F., Madison, J. M., Daheron, L., Loring, J. F., & Haggarty, S. J. (2011). Epigenetic characterization of the FMR1 gene and aberrant neurodevelopment in human induced pluripotent stem cell models of fragile X syndrome. *PLoS one*, 6(10).
- Skoog, D., Holler, F., & Nieman, T. (2020). Principles of Instrumental Analysis / D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), 76–85.
- Snyder, J. S., Choe, J. S., Clifford, M. A., Jeurling, S. I., Hurley, P., Brown, A., Kamhi, J. F., & Cameron, H. A. (2009). Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(46), 14484–14495.
- Südhof, T. C., & Rothman, J. E. (2009). Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5913), 474–477.
- Suvrathan, A., Hoeffler, C. A., Wong, H., Klann, E., & Chattarji, S. (2010). Characterization and reversal of synaptic defects in the amygdala in a mouse model of fragile X syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(25), 11591–11596.
- Swadesh, J. K. (2000). HPLC: Practical and industrial applications, second edition. In *HPLC: Practical and Industrial Applications, Second Edition*, 461.
- Tannenholz, L., Jimenez, J. C., & Kheirbek, M. A. (2014). Local and regional heterogeneity underlying hippocampal modulation of cognition and mood. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8, 147.
- Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D. B., Shaywitz, A. J., and Greenberg, M. E. (1998). Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20, 709–726.
- Teffer, K., & Semendeferi, K. (2012). Human prefrontal cortex: evolution, development, and pathology. *Progress in brain research*, 195, 191–218.
- Tejeda, G. S., and Diaz-Guerra, M. (2017). Integral characterization of defective BDNF/TrkB signalling in neurological and psychiatric disorders leads the way to new therapies. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 268.
- Telias M. (2019). Fragile X Syndrome Pre-Clinical Research: Comparing Mouse- and Human-Based Models. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1942, 155–162.
- Telias M. (2019b). Molecular Mechanisms of Synaptic Dysregulation in Fragile X Syndrome and Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in molecular neuroscience*, 12, 51.
- The Dutch-Belgian Fragile X Consortium (1994). Fmr1 knockout mice: a model to study fragile X mental retardation. The Dutch-Belgian Fragile X Consortium. *Cell*, 78(1), 23–33.
- Thiagarajan, T. C., Lindskog, M., & Tsien, R. W. (2005). Adaptation to synaptic inactivity in hippocampal neurons. *Neuron*, 47(5), 725–737.

- Thiel, C. M., Huston, J. P., & Schwarting, R. K. (1998). Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience*, *85*(4), 1253–1262.
- Thompson, R. F., & Spencer, W. A. (1966). Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychological review*, *73*(1), 16–43.
- Tian, Y., Yang, C., Shang, S., Cai, Y., Deng, X., Zhang, J., Shao, F., Zhu, D., Liu, Y., Chen, G., Liang, J., Sun, Q., Qiu, Z., & Zhang, C. (2017). Loss of FMRP Impaired Hippocampal Long-Term Plasticity and Spatial Learning in Rats. *Frontiers in molecular neuroscience*, *10*, 269.
- Till, S. M., Asiminas, A., Jackson, A. D., Katsanevaki, D., Barnes, S. A., Osterweil, E. K., Bear, M. F., Chattarji, S., Wood, E. R., Wyllie, D. J., & Kind, P. C. (2015). Conserved hippocampal cellular pathophysiology but distinct behavioural deficits in a new rat model of FXS. *Human molecular genetics*, *24*(21), 5977–5984.
- Toft, A. K., Lundbye, C. J., & Banke, T. G. (2016). Dysregulated NMDA-Receptor Signaling Inhibits Long-Term Depression in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *36*(38), 9817–9827.
- Turner, K. M., & Burne, T. H. (2014). Comprehensive behavioural analysis of Long Evans and Sprague-Dawley rats reveals differential effects of housing conditions on tests relevant to neuropsychiatric disorders. *PLoS one*, *9*(3), e93411.
- Urbach, A., Bar-Nur, O., Daley, G. Q., & Benvenisty, N. (2010). Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*, *6*(5), 407–411.
- Uutela, M., Lindholm, J., Rantamäki, T., Umemori, J., Hunter, K., Vöikar, V., & Castrén, M. L. (2014). Distinctive behavioral and cellular responses to fluoxetine in the mouse model for Fragile X syndrome. *Frontiers in cellular neuroscience*, *8*, 150.
- Valenti O., Lodge D. J., Grace A. A. (2011). Aversive stimuli alter ventral tegmental area dopamine neuron activity via a common action in the ventral hippocampus. *J. Neurosci.* *31*, 4280–4289.
- Valverde, R., Edwards, L., & Regan, L. (2008). Structure and function of KH domains. *The FEBS journal*, *275*(11), 2712–2726.
- Van der Aa, N., & Kooy, R. F. (2020). GABAergic abnormalities in the fragile X syndrome. *European journal of paediatric neurology: EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society*, *24*, 100–104.
- Verkerk, A. J., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Fu, Y. H., Kuhl, D. P., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M. F., & Zhang, F. P. (1991). Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, *65*(5), 905–914.
- Vieira, M., Yong, X., Roche, K. W., & Anggono, V. (2020). Regulation of NMDA glutamate receptor functions by the GluN2 subunits. *Journal of neurochemistry*, *154*(2), 121–143.
- Vineyard, C., Verzi, S., Bernard, M., Taylor, S., Dubicka, I., Caudell, T. (2012). A multi-modal network architecture for knowledge discovery. *Security Informatics*. 1.
- Wang, H., Kim, S. S., & Zhuo, M. (2010). Roles of fragile X mental retardation protein in dopaminergic stimulation-induced synapse-associated protein synthesis and subsequent alpha-amino-3-hydroxy-5-

methyl-4-isoxazole-4-propionate (AMPA) receptor internalization. *The Journal of biological chemistry*, 285(28), 21888–21901.

- Wang, X., Snape, M., Klann, E., Stone, J. G., Singh, A., Petersen, R. B., Castellani, R. J., Casadesus, G., Smith, M. A., & Zhu, X. (2012). Activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway contributes to the behavioral deficit of fragile x-syndrome. *Journal of neurochemistry*, 121(4), 672–679.
- Wawryko, P., Ward, N. L., Whishaw, I. Q., & Ivanko, T. L. (2004). Anesthetized Long Evans rats show similar protein expression and long-term potentiation as Fischer 344 rats but reduced short-term potentiation in motor cortex. *Brain research*, 1029(1), 1–10.
- Weng, N., Weiler, I. J., Sumis, A., Berry-Kravis, E., & Greenough, W. T. (2008). Early-phase ERK activation as a biomarker for metabolic status in fragile X syndrome. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 147B(7), 1253–1257.
- Wong, H., Hooper, A., Niibori, Y., Lee, S. J., Hategan, L. A., Zhang, L., Karumuthil-Meilethil, S., Till, S. M., Kind, P. C., Danos, O., Bruder, J. T., & Hampson, D. R. (2020). Sexually dimorphic patterns in electroencephalography power spectrum and autism-related behaviors in a rat model of fragile X syndrome. *Neurobiology of disease*, 146, 105118.
- Wong, H., Hooper, A., Niibori, Y., Lee, S. J., Hategan, L. A., Zhang, L., Karumuthil-Meilethil, S., Till, S. M., Kind, P. C., Danos, O., Bruder, J. T., & Hampson, D. R. (2020). Sexually dimorphic patterns in electroencephalography power spectrum and autism-related behaviors in a rat model of fragile X syndrome. *Neurobiology of disease*, 146, 105118.
- Xu, Z. H., Yang, Q., Feng, B., Liu, S. B., Zhang, N., Xing, J. H., Li, X. Q., Wu, Y. M., Gao, G. D., & Zhao, M. G. (2012a). Group I mGluR antagonist rescues the deficit of D1-induced LTP in a mouse model of fragile X syndrome. *Molecular neurodegeneration*, 7, 24.
- Xu, Z. H., Yang, Q., Ma, L., Liu, S. B., Chen, G. S., Wu, Y. M., Li, X. Q., Liu, G., & Zhao, M. G. (2012). Deficits in LTP induction by 5-HT_{2A} receptor antagonist in a mouse model for fragile X syndrome. *PLoS one*, 7(10).
- Xu, Z., Chen, R. Q., Gu, Q. H., Yan, J. Z., Wang, S. H., Liu, S. Y., & Lu, W. (2009). Metaplastic regulation of long-term potentiation/long-term depression threshold by activity-dependent changes of NR2A/NR2B ratio. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(27), 8764–8773.
- Xu, Z., Chen, R. Q., Gu, Q. H., Yan, J. Z., Wang, S. H., Liu, S. Y., & Lu, W. (2009). Metaplastic regulation of long-term potentiation/long-term depression threshold by activity-dependent changes of NR2A/NR2B ratio. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(27), 8764–8773.
- Yang, X. D., Connor, J. A., & Faber, D. S. (1994). Weak excitation and simultaneous inhibition induce long-term depression in hippocampal CA1 neurons. *Journal of neurophysiology*, 71(4), 1586–1590.
- Yano, S., Tokumitsu, H., & Soderling, T. R. (1998). Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature*, 396(6711), 584–587.
- Yashiro, K., & Philpot, B. D. (2008). Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology*, 55(7), 1081–1094.

- Yashiro, K., & Philpot, B. D. (2008). Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology*, *55*(7), 1081–1094.
- Yu, S., Pritchard, M., Kremer, E., Lynch, M., Nancarrow, J., Baker, E., Holman, K., Mulley, J. C., Warren, S. T., & Schlessinger, D. (1991). Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science (New York, N.Y.)*, *252*(5009), 1179–1181.
- Zalfa, F., & Bagni, C. (2004). Molecular insights into mental retardation: multiple functions for the Fragile X mental retardation protein? *Current issues in molecular biology*, *6*(2), 73–88.
- Zhang, J., Wang, G., He, W. W., Losh, M., Berry-Kravis, E., & Funk, W. E. (2019). Expression and Characterization of Human Fragile X Mental Retardation Protein Isoforms and Interacting Proteins in Human Cells. *Proteomics insights*, *10*.
- Zucker, RS, Regehr, WG (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* *64*: 355–405.

