ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΑΣΙΚΩΝ ΝΕΥΡΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΥΝΑΦΕΙΑΣ ΤΑG-1 ΣΤΗΝ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΕΝΗΛΙΚΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΡΩΚΤΙΚΩΝ»

ΜΑΡΙΑ ΣΑΒΒΑΚΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2011

Πριν την παρουσίαση της διατριβής μου θα ήθελα να καταθέσω ότι τα τελευταία 5 χρόνια ήταν τα πιο δημιουργικά της έως τώρα ερευνητικής μου πορείας και θέλω να ευχαριστήσω θερμά στους ανθρώπους που συνέβαλαν σε αυτό. Τελειώνοντας το διδακτορικό μου έχω την αίσθηση πως ο καιρός πέρασε τελικά πολύ γρήγορα και δεν μου άφησε καμία πικρή παρά μόνο πολλές και ευχάριστες αναμνήσεις. Και οι συντελεστές αυτών των αναμνήσεων δεν είναι φυσικά οι πιππέτες και τα falcons αλλά οι άνθρωποι. Και δεν ήταν λίγοι....

Ο πρώτος άνθρωπος που θα ήθελα να ευχαριστήσω είναι η καθηγήτρια μου, η Δόμνα Καραγωγέως, η οποία ήταν και παραμένει ο άνθρωπος που πίστεψε από την πρώτη στιγμή σε μένα και με στήριξε περισσότερο από οποιονδήποτε άλλο. Την ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια και δεν θα το ξεχάσω ποτέ. Νιώθω πολύ τυχερή που συνεργάστηκα μαζί της και είχα την ελευθερία να «παίζω» και να πειραματίζομαι στο εργαστήριο προς απόδειξη της όποιας ιδέας μου ερχόταν. Εντάξει δεν βγήκαν όλες σε καλό αλλά δεν οδήγησαν ευτυχώς και σε καμία καταστροφή!! Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους ανθρώπους με τους οποίους συνεργάστηκα κατά καιρούς, τον Jean Leon Thomas και τον Κλεόπα, τον Αντώνη και την κα Στυλιανοπούλου. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Κλεόπα για την φιλοξενία του και την καλή του διάθεση. Η συνεργασία μας στα πλαίσια του Ελληνο-Κυπριακού προγράμματος μου προσέφερε και επιστημονικά αλλά και σε κοινωνικό επίπεδο. Γνώρισα σπουδαίους ανθρώπους και έκανα πολύ καλούς φίλους, όπως την Ρεβέκκα μου και το Μαράκι, τη Θάλεια, τη Ρηνούλα με τις φανταστικές κόρες της, την πελοΣοφία, την Έλενα και τη Νάταλι. Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τον κο Καρδάση και τον κο Ηλιόπουλο για τη στήριξη που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της διατριβής μου και την εκτίμηση που μου έδειξαν.

Περνώντας στο χώρο του εργαστηρίου μας θα ήθελα πρώτα από όλους να ευχαριστήσω τον Κώστα ή Κ.Θ. Είναι ο πρώτος άνθρωπος που γνώρισα στο εργαστήριο και αυτός που έχω συναναστραφεί περισσότερο τα τελευταία χρόνια. Από την αρχή ο Κώστας μου θύμιζε λίγο τον πατέρα μου με κάποια πιο νεανικά στοιχεία φυσικά. Με καθοδήγησε, όπως κάνει με ιδιαίτερη προθυμία με όλους και μου συμπαραστάθηκε σε πολλές προσωπικές και εργαστηριακές στιγμές. Ο Κ.Θ. είναι από τους ανθρώπους (λίγους!!!) που μπορεί να με εξοργίσει πάρα πολύ αλλά είναι ώρες ώρες και τόσο γλυκούλης που δεν μπορώ να του το κρατήσω για πολύ. Ισως βέβαια αυτό να δείχνει την εξοικείωση που έχουμε αποκτήσει αυτά τα χρόνια. Για να το δεις και γραμμένο λοιπόν, σε ευχαριστώ πολύ Κώστα για όσα μου έχεις προσφέρει και ελπίζω η φιλία μας να συνεχιστεί για πολλά χρόνια ακόμα. Ένας άλλος άνθρωπος με τον οποίο μοιράστηκα πολλές στιγμές, ιδίως τα τελευταία χρόνια είναι η Μαρίνα (το Ξεβιδάκι). Μαρινάκι μου σου εύχομαι ότι καλύτερο γιατί σου αξίζει! Να είσαι πάντα γερή, να κάνεις μία φανταστική οικογένεια (με τον Αντωνάκη σου φυσικά) και να έχεις μία δουλειά που να σε γεμίζει και να σε ευχαριστεί. Εύχομαι επίσης να είσαι πάντα στη ζωή μου με την καλή σου ενέργεια και να περνάμε πολύ πολύ όμορφα. Ληδάκι μου σε ευχαριστώ κι εσένα για όλα τα χρόνια που περάσαμε μαζί στη σχολή αλλά και στη συνέχεια στο διδακτορικό. Έχουμε περάσει μαζί πολύ ωραίες στιγμές και στη Λάρισα που ήμασταν πιο "νέες και ανέμελες" αλλά και στο Ηράκλειο. Εύχομαι να είσαι πάντα καλά, χαρούμενη και ξέγνοιαστη! Πως μπορώ να μην αναφερθώ εκτενώς στον GGB??? Ο Γιώργος είναι νομίζω ο άνθρωπος που έχω καταπιέσει και ταλαιπωρήσει περισσότερο από οποιονδήποτε άλλο στο εργαστήριο και αυτός ήταν πάντα τόσο υπομονετικός και καλός. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να προσπαθήσω ακόμη πιο σκληρά για να τον εκνευρίσω... Ψέματα, θα προσπαθήσω να είμαι καλή μαζί σου από δω και στο εξής, το υπόσγομαι! Ο Γιώργος είναι από τα καλύτερα παιδιά που έχουν περάσει από το εργαστήριο και του εύχομαι να είναι πάντα ευτυχισμένος με το Λενάκι του. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη Σημόνα, την πιο γλυκιά μανούλα του κόσμου και το πιο καλό παιδί. Η Σημόνα είναι πραγματικά ο πιο υπομονετικός και στοργικός άνθρωπος που ξέρω. Επίσης, τη Μαρκέλλα και της εύχομαι μέσα από την καρδιά μου από δω και στο εξής να πάνε όλα super τέλεια και φανταστικά! Ακόμα, τη Maura που είναι η πιο φιλόξενη του εργαστηρίου με τα φοβερά Χριστουγεννιάτικα πάρτυ που κάθε χρόνο με χαρά διοργανώνει. Τη Γιωργίτσα που είναι πάντα πολύ γλυκιά και ξέρει όλα τα επιστημονικά gadgetáκια! Τη Μαρίνα τη μικρή "Κυπραία" που "συγχίζεται" συνέχεια και μας κάνει να γελάμε καθώς και όλα τα παιδιά του εργαστηρίου, τη Μαριλένα, τη Μαργαρίτα, την Κατερίνα, τη Μελίνα και όλους αυτούς που έχουν περάσει κατά καιρούς από το εργαστήριο και αν αρχίσω να τους αναφέρω σίγουρα θα ξεχάσω κάποιους... Επίσης, όλα τα παιδιά από τα διπλανά εργαστήρια γιατί όλοι παίζουν σημαντικό ρόλο στο ευχάριστο κλίμα που υπάρχει πάντα στο εργαστήριο και την πτέρυγα.

Φυσικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους χωρίς τους οποίους η ζωή μου θα ήταν τελείως διαφορετική, που δεν μπορώ καν να τη φανταστώ. Γιατί είναι πολύ καλό να προοδεύεις στη ζωή σου αλλά το πιο σημαντικό είναι να έχεις

ανθρώπους που να σε αγαπούν και να σε εκτιμούν απλά γιατι είσαι "εσυ". Οι δικοί μου λοιπόν άνθρωποι είναι οι γονείς μου φυσικά και όλη μου η οικογένεια, τα αδέρφια μου, οι νύφες μου και τα φανταστικά μου ανίψια και ο Λάμπρος μου. Σας ευχαριστώ πολύ όλους γιατι γεμίζετε τη ζωή μου με ασφάλεια και αγάπη που με ακολουθεί πάντα. Εύχομαι να είμαστε πάντα όπως και τώρα μία δεμένη και αγαπημένη οικογένεια! Η μεγαλύτερη μου ευχή είναι να είστε όλοι πάντα καλά για να σας χαίρομαι και να με χαίρεστε! Ευχαριστώ το Λάμπρο μου που με αντέχει όλα αυτά τα χρόνια και είναι πάντα δίπλα μου στις όμορφες αλλά και τις άσχημες στιγμές. Τον ευχαριστώ που πάντα βρίσκει ένα τρόπο να με ηρεμεί και κυρίως γιατί ομορφαίνει τη ζωή μου με την αγάπη του! Και για το ότι έχει μάθει τα πάντα για την TAG-1... Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φιλαράκους μου που παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη ζωή μου και συμβάλουν στην ευτυχία μου! Το «Κατσούλι» μου, που είναι πάντα δίπλα μου και είναι η καλυτερότερη φίλη που θα μπορούσε να έχει κάποιος, το «Κασσούλι» μου το τρελοκαμπέρικο που το αγαπώ πολύ πολύ, τον Μανολάκο την πηγή της θετικής ενέργειας, τον John John τον απαράδεκτο, το Ρηνούλι μου, τον Τάκη και τον Νικολάκο, το Ντιάκη μου το μικρούλι, το Πεπάκι, τον Μανόλη και τη Μαριλού. Σας ευχαριστώ πολύ όλους που υπάρχετε στη ζωή μου!

Στους γονείς μου, το Λάμπρο και τα ανίψια μου...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ПЕРІЛНΨН	9
ABSTRACT	11
Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
A.1.1. TO EAYTPO MYEAINHS STO K.N.S. KAI TO Π .N.S.	13
Α.1.2. ΜΥΕΛΙΝΩΣΗ	18
A.2. MOPIA KYTTAPIKH Σ SYNA Φ EIA Σ (Cell Adhesion Molecules, CAMs)	21
Α.2.1. ΜΟΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΥΝΑΦΕΙΑΣ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΕ ΑΞΟΝΟΓΛΟΙΑΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ	ПОҮ 22
Ι. Μόρια κυτταρικής συνάφειας του νευρικού συστήματος της υπεροικογένειας των Neurexi	ns 23
ΙΙ. Μόρια κυτταρικής συνάφειας του νευρικού συστήματος της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών	24
A.3.1. O KOMBO Σ TOY RANVIER	26
А.З.2. Н ПАРАКОМВІКН ПЕРІОХН	28
Α.3.3. Η ΕΓΓΥΣ ΤΗΣ ΠΑΡΑΚΟΜΒΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗ	32
Α.3.4. ΤΟ ΜΕΣΟΚΟΜΒΙΚΟ ΤΜΗΜΑ	35
Α.3.5. ΑΠΟΜΥΕΛΙΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΠΟΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΩΝ ΕΜΜΥΕΛΩΝ ΙΝΩΝ	36
Α.4. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΥΝΑΦΕΙΑΣ ΤΑG-1 ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ	THΣ 38
ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	41
Β. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	43
ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ	43
ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ	44
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΙΣΤΩΝ ΓΙΑ ΚΡΥΟΤΟΜΕΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ	45
ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΣΕ ΤΟΜΕΣ ΚΡΥΟΤΟΜΟΥ ΑΠΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΜΥΩΝ	46
ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΕΝΕΣ ΙΝΕΣ ΑΠΟ ΚΟΙΛΙΑΚΟ ΝΩΤΙΑΙΟ ΜΥΕΛΟ	49
ΛΥΣΗ ΙΣΤΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΤΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	50
ANO Σ OKATAKPHMNI Σ H ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ (IMMUNOPRECIPITATION, IP)	50
ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ (WESTERN BLOT ANALYSIS)	51

ΕΝΔΟΚΑΡΔΙΑΚΗ ΕΓΧΥΣΗ 2.5% ΓΛΟΥΤΕΡΑΛΔΕΫΔΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΣΤΟ	Y KAI
ΤΟΜΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ	57
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	59
ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΗΕΚ293Τ	60
ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ	61
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΛΕΠΙΔΟΠΤΕΡΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ	TAG-1 62
ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	63
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	68
Γ.1.ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΤΑG-1 ^{-/-} ΜΥΩΝ	68
Γ.1.1. Συμπεριφορική ανάλυση των Tag-1-'- μυών	68
Γ.1.2. Ανοσοιστοχημική ανάλυση των Tag-1-/- μύων σε διάφορες περιοχές του Κ.Ν.Σ.	72
Γ.1.2.α Ανάλυση του ιπποκάμπειου σχηματισμού ενήλικων Tag-1 ^{-/-} μυών	74
Γ.1.2.β Ανάλυση του μεσολόβιου, της παρεγκεφαλίδας και του οσφρητικού συστήματος εν Tag-1 ^{-/-} μυών	ήλικων 78
Γ.1.3. Βιοχημική ανάλυση των Tag-1 μύων σε διάφορες περιοχές του Κ.Ν.Σ.	86
Γ.1.4. Ανοσοιστοχημική ανάλυση των κόμβων του Ranvier	90
Γ.2.ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΜΥΩΝ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΑG-1 ΑΠΟΚΛΕΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟ ΟΛΙΓΟΔΕΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ	ПОҮ ТА 93
Γ.2.1. Ανάλυση της τεκφράσης του διαγονιδίου και καθορισμός του εντοπισμού της r	TAG-1 94
Γ.2.2. Μελέτη της αρχιτεκτονικής της εγγύς της παρακομβικής περιοχής των εμματρικών ινών στους Tag-1 ^{-/-} ;plp ^{Tg(rTag-1)} μyes	ύελων 98
Γ.2.3. Ανόδοις τοχημική ανάλυση των κόμβων του Ranvier στους Tag-1-'-;plp ^{Tg(rTag-1}) μυες 104
Γ.2.4. Μελέτη των πρωτεινικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα μορία που συγκροτο συμπλοκό της εγγύς της παρακομβικής περιοχής των εμμυέλων ινών στου 1 ^{-/-} ;ρlp ^{Tg(rTag-1)} μυές	γνν το Σ Tag- 106
Γ.2.5. Μορφολογική ανάλυση του οπτικού νευρού των Tag-1-'-;plp $^{Tg(rTag-1)}$ μυών	109
Γ.2.6. Συμπεριφορική ανάλυση των Tag-1- ^{/-} και Tag-1- ^{/-} ; plp ^{Tg(rTag-1} μυών	112

$\Delta.\,\Sigma YZHTH\Sigma H$

116

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 137
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ 135
EMΦANIZONTAI ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ 131
ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΜΕ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΠΟΥ
ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ TAG-1 ^{-/-} ; plp ^{TG(rTag-1)} MYΩN 130
$1^{-/-} \operatorname{KAI} \operatorname{Tag-1}^{-/-}; \operatorname{PLP}^{\operatorname{Tg}(\operatorname{RTag-1})} \operatorname{MY} \Omega N $ 128
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΜΜΥΕΛΩΝ ΙΝΩΝ ΤΟΥ ΟΠΤΙΚΟΥ ΝΕΥΡΟΥ ΤΩΝ ΤΑG-
ANOΣOΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΟΜΒΩΝ ΤΟΥ RANVIER ΤΩΝ ΕΜΜΥΕΛΩΝ ΙΝΩΝ ΤΟΥ Κ.Ν.Σ. ΣΤΑ TAG-1 ^{-/-} KAI TAG-1 ^{-/-} ; plp ^{TG(rTag-1)} ZΩA 126
$\Pi EPIOX \Omega N TOY K.N.Σ. ΣΤΑ TAG-1-/-; PLPTG(RTAG-1) ZΩA$ 123
Η ΓΛΟΙΑΚΗ ΤΑG-1 ΕΙΝΑΙ ΙΚΑΝΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΩΝ ΕΓΓΥΣ ΤΩΝ
ΟΙ ΕΓΓΥΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΚΟΜΒΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΩΝ ΚΕΝΤΡΙΚΩΝ ΕΜΜΥΕΛΩΝ ΙΝΩΝ ΑΠΟΔΙΟΡΓΑΝΩΝΟΝΤΑΙ ΣΤΑ ΤΑG-1 ^{-/-} ΖΩΑ 119
ΟΙ ΤΑG-1 ^{-/-} ΜΥΕΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΟΥΝ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΑ ΣΕ ΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ 117

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι εμμύελες ίνες οργανώνονται σε μοριακά και δομικά διακριτές περιοχές που εξασφαλίζουν την ταχεία μεταγωγή του δυναμικού ενεργείας κατά μήκος του νευράξονα. Αυτός ο διαχωρισμός των εμμύελων αξόνων βασίζεται σε αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις στις οποίες βασικό ρόλο διαδραματίζουν μόρια κυτταρικής συνάφειας και δίαυλοι ιόντων. Το μόριο κυτταρικής συνάφειας της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών TAG-1 εκφράζεται από νευρικά και γλοιακά κύτταρα και εντοπίζεται στην εγγύς της παρακομβικής περιογή των εμμύελων ινών του ενήλικου κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος. Στην περιοχή αυτή η TAG-1 απαιτείται για τη συσσώρευση των διαύλων καλίου, οι οποίοι εμπλέκονται στη σταδιακή επαναπόλωση της μεμβράνης έπειτα από την αγωγή μίας ηλεκτρικής ώσης. Ειδικότερα έχει βρεθεί πως σχηματίζει τριμερές σύμπλοκο με την πρωτεΐνη του άξονα Caspr2 και τους διαύλους καλίου στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή. Η απουσία της οδηγεί σε αποδιοργάνωση της περιοχής αυτής με διάχυση των διαύλων καλίου όπως καταδεικνύουν μελέτες στο οπτικό και το ισχιακό νεύρο ομόζυγα μεταλλαγμένων Tag-1^{-/-} μυών. Περαιτέρω μορφολογική ανάλυση του οπτικού νεύρου των $Tag-1^{-/-}$ μυών έδειξε πως υπάργει υπομυελίνωση των νευρικών ινών και δραματική μείωση των μικρής διαμέτρου αξόνων που εντοπίζονται.

Στο πρώτο μέρος της παρούσας εργασίας μελετάμε τη συμπεριφορά των Tag-I^{-/-} ενήλικων μυών σε σύγκριση με τους αγρίου τύπου μύες, όπου διαπιστώνουμε ελλείμματα στις γνωστικές λειτουργίες της μάθησης και μνήμης καθώς και στον κινητικό συντονισμό. Στη συνέχεια, αναλύουμε τη μοριακή οργάνωση των εμμύελων ινών σε διάφορα τμήματα του Κ.Ν.Σ. των Tag-1^{-/-} μυών, συμπεριλαμβανομένων των περιοχών που εμπλέκονται στις προαναφερθείσες συμπεριφορές. Αποδεικνύουμε, πως η απουσία της TAG-1 έχει σαν αποτέλεσμα αποδιοργάνωση της εγγύς της παρακομβικής περιοχής όλων των κεντρικών εμμύελων ινών, ανεξαρτήτως περιοχής και οδηγεί σε βράχυνση των μεσοκομβικών τμημάτων. Οι παραπάνω μοριακές διαταραχές πιθανά ευθύνονται για το συμπεριφορικό φαινότυπο των ομόζυγα μεταλλαγμένων μυών.

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας εργασίας θελήσαμε να διερευνήσουμε το ρόλο της γλοιακής TAG-1, απουσία της αξονικής πρωτεΐνης, στην οργάνωση της εγγύς της παρακομβικής περιοχής, στη μορφολογία του οπτικού νεύρου και τη συμπεριφορά των μυών. Η σημασία αυτής της μελέτης έγκειται στο γεγονός ότι η πρωτεΐνη TAG-1 είναι το μόνο γνωστό μόριο που εντοπίζεται στη μεμβράνη του γλοιακού κυττάρου στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή και είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία του μοριακού της συμπλόκου. Επιγειρήσαμε να διασώσουμε το φαινότυπο των $Tag-1^{-/-}$ μυών δημιουργώντας νέους διαγονιδιακούς μύες ($Tag-1^{-/-}$ $plp^{Tg(rTag-1)}$), οι οποίοι εκφράζουν την πρωτεΐνη TAG-1 αποκλειστικά από τα κύτταρα γλοίας, ενώ απουσιάζει η ενδογενής έκφραση (από νευρικά και κύτταρα γλοίας). Φαινοτυπική ανάλυση των διαγονιδιακών ζώων σε σύγκριση με φυσιολογικά και $Tag-1^{-/-}$ έδειξε πως η έκφραση του μορίου TAG-1 μόνο από τα κύτταρα γλοίας είναι ικανή για τη δημιουργία και διατήρηση του συμπλόκου της εγγύς της παρακομβικής περιοχής στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Βιοχημική ανάλυση αποκάλυψε την άμεση αλληλεπίδραση της γλοιακής TAG-1 με τα μόρια Caspr2 και τους διαύλους καλίου που εντοπίζονται στον άξονα. Η μελέτη της μορφολογίας του οπτικού νεύρου των διαγονιδιακών μυών έδειξε πως η αποκλειστική έκφραση της TAG-1 από τα γλοιακά κύτταρα είναι ικανή και επαρκής για την πλήρη αποκατάσταση των ελλειμάτων που παρουσιάζουν οι $Tag-1^{-/-}$ μύες. Τέλος. συμπεριφορική ανάλυση των διαγονιδιακών ζώων αποκάλυψε πως η γλοιακή TAG-1 είναι σε θέση να διασώσει πλήρως τη συμπεριφορά των Tag-1^{-/-} μυών, ενισχύοντας τη σημασία των αξονογλοιακών αλληλεπιδράσεων στη σωστή λειτουργία του νευρικού συστήματος.

ABSTRACT

Myelinated fibers are organized into specialized domains that ensure the rapid propagation of action potentials and are characterized by specific protein complexes underlying essential interactions between glial and axonal membranes. These domains are the myelin-free node of Ranvier, the paranodes and the juxtaparanodes. TAG-1 (Transient Axonal Glycoprotein-1), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, is expressed by neurons as well as by myelinating glia and is concentrated at the juxtaparanodes of adult central and peripheral myelinated fibers. It is essential for the clustering of potassium channels in the juxtaparanodes that are important for the repolarization of the membrane after action potential propagation. More specifically, it forms a tripartite complex with Caspr2 and the potassium channels, whereas in its absence in $Tag-1^{-/-}$ mice, juxtaparanodes of the optic and the sciatic nerves are disrupted, showing diffusion of potassium channels. Morphologically, optic nerves from $Tag-1^{-/-}$ animals display hypomyelination as well as a severe loss of small calibre axons.

In the first part of this study we focused on the behavioral analysis of $Tag-I^{-/-}$ mice, examining their cognitive and motor abilities. We show that the absence of TAG-1 results in learning and memory deficits as well as motor coordination defets. We continued with a thorough analysis of the molecular organization of myelinated fibers in various areas of the central nervous system, including those implicated in the behaviors affected in $Tag-1^{-/-}$ mice. We demonstrate that TAG-1 absence results in the disruption of the juxtaparanodal domain of all central myelinated fibers and further causes shortening of the internodes. These molecular defects may underly the behavioral phenotype present in homozygous mutants for TAG-1.

In the second part of this study, we aimed to clarify the role of glial TAG-1 in the molecular organization of juxtaparanodes, the morphology of optic nerve fibers as well as the behaviour in mice. This analysis is important since TAG-1 is the only known component of the juxtaparanodal complex expressed by the glial cell. In our attempt to rescue the phenotype of the *Tag-1* deficient mice, we generated new transgenic mice (*Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)}*), that exclusively express TAG-1 in oligodendrocytes and lack endogenous gene expression. Immunohistochemical analysis clearly demonstrates that glial TAG-1 is sufficient for the proper organization and maintenance of the juxtaparanodal domain in the CNS. Biochemical analysis showed that glial TAG-1 physically interacts with Caspr2 and the potassium channels. Finally, subsequent ultrastructural analysis of the optic nerve as well as a thorough behavioral study of the transgenic mice showed that the expression of glial TAG-1 is sufficient to restore the axonal and myelin deficits as well as the behavioral defects observed in *Tag-1*^{-/-} animals. Together, these data highlight the pivotal role of myelinating glia on axonal domain differentiation and organization.

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή εστιάζουμε στη μελέτη του ρόλου του μορίου κυτταρικής συνάφειας TAG-1 (Transient Axonal Glycoprotein 1) στο ενήλικο κεντρικό νευρικό σύστημα (Κ.Ν.Σ.) και ειδικότερα στη μοριακή οργάνωση της εγγύς της παρακομβικής περιοχής. Οι εμμύελες ίνες οργανώνονται σε δομικά και μοριακά διακριτές περιοχές οι οποίες εξασφαλίζουν την ταχεία μετάδοση του δυναμικού ενεργείας κατά μήκος της νευρικής ίνας. Η οργάνωση αυτή επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ μορίων του άξονα και της μεμβράνης του γλοιακού κυττάρου που τον περιβάλλει. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές ονομάζονται αξονογλοιακές και διαμεσολαβούνται κυρίως από μόρια κυτταρικής συνάφειας και διαύλους ιόντων. Στην εισαγωγή θα αναφερθούμε στη διαδικασία της μυελίνωσης, στη συμμετοχή των μορίων κυτταρικής συνάφειας του νευρικού συστήματος στις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις και στη δημιουργία και οργάνωση των επιμέρους περιοχών των εμμύελων ινών του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος.

Α.1.1. ΤΟ ΕΛΥΤΡΟ ΜΥΕΛΙΝΗΣ ΣΤΟ Κ.Ν.Σ. ΚΑΙ ΤΟ Π.Ν.Σ.

Το έλυτρο της μυελίνης είναι η δομή που περιβάλλει τους περισσότερους νευράξονες, του περιφερικού και κεντρικού νευρικού συστήματος και αποτελεί χαρακτηριστικό εξελικτικό γνώρισμα των σπονδυλωτών. Είναι μια εξειδικευμένη μεμβράνη του εμμύελου γλοιακού κυττάρου που σχηματίζει έναν αριθμό στοιβάδων, οι οποίες διατάσσονται σπειροειδώς γύρω από το νευράξονα. Στις σπειροειδείς περιελίξεις της γλοιακής μεμβράνης το κυτταρόπλασμα εκτοπίζεται, λόγω της συμπίεσης σχηματίζοντας τη συμπαγή μυελίνη, η οποία αποτελεί το 99% της συνολικής μυελίνης. Η διαδικασία σχηματισμού του ελύτρου της μυελίνης παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1. Η διαδικασία της μυελίνωσης ενός άξονα. Αρχικά (1) το εμμύελο γλοιακό κύτταρο έρχεται σε επαφή με τον άξονα και στη συνέχεια (2,3) αρχίζει να περιελίσσεται γύρω από αυτόν εκτοπίζοντας το κυτταροπλασμα του. Στο τέλος (4) σχηματίζεται το έλυτρο της μυελίνης με τη χαρακτηριστική μορφή των δακτυλίων. Τροποποιημένη φωτογραφία από "Principles of neural Science", Kandel, Schwartz and Jessel.

Τα μοναδικά τμήματα τα οποία περιέχουν μη συμπαγή μυελίνη είναι οι παρακομβικές περιοχές οι οποίες θα αναλυθούν στη συνέχεια και οι διατομές Schmidt-Lanterman (Arroyo and Scherer, 2000). Επίσης, οι μοναδικές περιοχές των εμμύελων νευραξόνων που δεν καλύπτονται από μυελίνη είναι οι κόμβοι του Ranvier, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από τη συσσώρευση διαύλων νατρίου που είναι υπεύθυνοι για την ώση των δυναμικών ενεργείας (Εικόνα 2). Η σύσταση και η λειτουργία των κόμβων θα αναλυθεί στη συνέχεια.



Εικόνα 2. Η οργάνωση μία περιφερικής εμμύελης ίνας. Όπως φαίνεται τα εμμύελα τμήματα τα οποία απεικονίζονται με μπλε διακόπτονται περιοδικά από μη-εμμύελες περιοχές, τους κόμβους του Ranvier. Οι κόμβοι του Ranvier χαρακτηρίζονται από τη συσσώρευση των διαύλων νατρίου που είναι υπεύθυνοι για την εκπόλωση της μεμβράνης του άζονα και τη μετάδοση του δυναμικού ενεργέιας. Η αλματώδης μεταγωγή του σήματος από τον ένα κόμβο στον επόμενο, παρουσιάζεται με κόκκινα βέλη. Εικόνα από http://talkminer.com/viewtalk.jsp?videoid=d1p4rXAZb_s&q

Η μυελίνη λειτουργεί σαν μονωτικό του νευράξονα που εμποδίζει τη διαρροή ιόντων και επιτρέπει την ταχεία και αποτελεσματική μεταγωγή των δυναμικών ενεργείας από τον ένα κόμβο στον επόμενο κατά μήκος των νευραξόνων (αλματώδης μεταγωγή). Η αλματώδης αυτή μεταγωγή επιτυγχάνεται καθώς η μυελίνη αυξάνει την αντίσταση και ελαττώνει τη χωρητικότητα της μεμβράνης (membrane capacitance, Cm), αυξάνοντας έτσι την ταχύτητα αγωγής του σήματος στα εμμύελα τμήματα. Χαρακτηριστικό της μυελίνης είναι η υψηλή λιπιδική σύσταση της (τα λιπίδια αποτελούν το 70% του καθαρού βάρους της) και ο εμπλουτισμός της σε γλυκοσφιγκολιπίδια και χοληστερόλη (Arroyo and Scherer, 2002, Simons and Trajkovic, 2006). Τα βασικά γλυκοσφιγγολιπίδια που αποτελούν τη μυελίνη είναι το galactoceramide και το θειώδες του παράγωγο sulfatide. Τα δύο αυτά λιπίδια αποτελούν το 20% του ξηρού βάρους της μυελίνης. Οι κύριες πρωτεΐνες που εντοπίζονται στη μυελίνη στο Κ.Ν.Σ. είναι η βασική πρωτεΐνη της μυελίνης (myelin basic protein, MBP) και η proteolipid protein (PLP/DM20). Ένα άλλο μόριο, το οποίο εκφράζεται αποκλειστικά στο Κ.Ν.Σ. είναι η CNP (2',3'-cyclic nucleotide 3'- phosphodiesterase). Στο περιφερικό νευρικό σύστημα (Π.Ν.Σ.) το 50% της πρωτεϊνικής σύστασης της μυελίνης αποτελεί η πρωτεΐνη P0 και ακολουθούν οι MBP, η peripheral myelin protein 22 (PMP22), και η myelin-associated glycoprotein (MAG).

Το έλυτρο της μυελίνης σχηματίζεται από εξειδικευμένα κύτταρα γλοίας του νευρικού συστήματος. Αυτά είναι τα ολιγοδενδροκύτταρα στο Κ.Ν.Σ. και τα κύτταρα Π.Ν.Σ. Τα πρόδρομα κύτταρα των ολιγοδενδροκυττάρων Schwann στο (Oligodendocyte precursor cells, OPCs) προέρχονται από το νευροεπιθήλιο της κοιλιακής (ventricular zone, VZ) και υποκοιλιακής (subventricular zone, SVZ) ζώνης του αναπτυσσόμενου κεντρικού νευρικού συστήματος. Μετά τον πολλαπλασιασμό τους, μεταναστεύουν στην αναπτυσσόμενη λευκή ουσία ώσπου να συναντήσουν τους κατάλληλους άξονες. Στη συνέχεια, εξέρχονται του κυτταρικού κύκλου, γίνονται μημεταναστευτικά και διαφοροποιούνται προς εμμύελα ολιγοδενδροκύτταρα (Baumann and Pham-Dinh 2001). Τα κύτταρα Schwann του Π.Ν.Σ. προέρχονται από κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας (neural crest cells). Τα πολυδύναμα αυτά κύτταρα μεταναστεύουν στα περιφερικά νεύρα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, για να ωριμάσουν και να διαφοροποιηθούν στη συνέχεια σε εμμύελα κύτταρα Schwann (Jessen and Mirsky 2005).

Διάφορα σηματοδοτικά μόρια που προέρχονται από τα νευρικά κύτταρα έχουν βρεθεί να εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των γλοιακών κυττάρων του Κ.Ν.Σ. και του Π.Ν.Σ. Η παρουσία των νευραξόνων θεωρείται απαραίτητη και στις δύο περιπτώσεις τόσο για τη χρονική ρύθμιση της διαφοροποίησης των γλοιακών κυττάρων σε εμμύελα, όσο και για τον έλεγχο του αριθμού τους (Simons and Trajkovic, 2006; Baron, Colognato and Ffrench-Constant 2005; Colognato and Ffrench-Constant 2004). Ειδικότερα, οι ιντεγκρίνες (μόρια κυτταρικής συνάφειας) και διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, μεταξύ τους και ο PDGF-A (platelet derived growth factor A) που εκφράζονται από τους άξονες και τα αστροκύτταρα, φαίνεται να είναι σημαντικές για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των πρόδρομων ολιγοδενδροκυττάρων. Επιπλέον, το σηματοδοτικό μονοπάτι που εμπλέκει τον υποδοχέα Notch 1, που βρίσκεται στη μεμβράνη των OPCs, ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό τους και τη στιγμή της διαφοροποίησής τους. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι αλληλεπίδραση του υποδοχέα με την πρωτεΐνη Jagged στον άξονα έχει σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της διαφοροποίησης των OPCs προς εμμύελα ολιγοδενδροκύτταρα (Wang et al., 1998). Αντίθετα, πρόσδεση της

16

αξονικής πρωτεΐνης contactin στον Notch 1 φαίνεται να προάγει την παραπάνω διαφοροποίηση (Hu et al., 2003). Ένα μόριο το οποίο προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Schwann in vitro είναι η πρωτεΐνη Neuregulin 1 (type III) (Taveggia et al., 2005).

Μία μεγάλη διαφορά μεταξύ ολιγοδενδροκυττάρων και κυττάρων Schwann εντοπίζεται στο ότι τα πρώτα έχουν τη δυνατότητα να δημιουργούν έως και 40 τμήματα μυελίνης σε διαφορετικούς άξονες, ενώ φαίνεται να «επιλέγουν» άξονες με διάμετρο μεγαλύτερη από 0.2μm (Barres and Raff, 1999; Simons and Trajkovic, 2006). Αντίθετα, ενα κύτταρο Schwann πάντα συνδέεται με έναν νευράξονα (αναλογία 1:1) και οδηγεί στην μυελίνωσή του περιβάλλοντάς τον με την κυτταρική του μεμβράνη. Επίσης, το κύτταρο Schwann παράγει εξωτερικά της μυελίνης μία βασική στοιβάδα (basal lamina), που καλύπτει πλήρως την εμμύελη ίνα και συναντάται μόνο στο Π.Ν.Σ. Στην Εικόνα 3 παρουσιάζεται μία σύνοψη της δομής των κεντρικών και περιφερικών εμμύελων ινών.



Εικόνα 3. Δομή των εμμύελων ινών του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος. Το έλυτρο της μυελίνης καλύπτει τον άξονα, αφήνοντας γυμνές περιοχές που ονομάζονται κόμβοι (nodes) του Ranvier. Το υπόλοιπο τμήμα της συμπαγούς μυελίνης από τον ένα κόμβο στον επόμενο ονομάζεται μεσοκομβικό διάστημα (internodes). Εικόνα από Poliak and Peles, 2003.

Α.1.2. ΜΥΕΛΙΝΩΣΗ

Η μυελίνωση των αξόνων όπως αναφέρθηκε νωρίτερα είναι κρίσιμη για την ταχεία και αλματώδη μετάδοση των δυναμικών ενεργείας κατά μήκος τους. Ενδεικτικά αναφέρουμε πως σε έναν αμμύελο άξονα η ταχύτητα μεταγωγής του ηλεκτρικού σήματος είναι 1-3 m/sec, ενώ αυτή η ταχύτητα αυξάνεται στα 60 m/sec στην εμμύελη ίνα.

Η διαδικασία της μυελίνωσης αποτελείται από τρία βασικά στάδια, τα οποία είναι απαραίτητα για την τελική δημιουργία λειτουργικών εμμύελων ινών. Το πρώτο στάδιο αφορά στην επιλογή των αξόνων που θα μυελινωθούν και την έναρξη των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτών και των εμμύελων γλοιακών κυττάρων. Έχει αναφερθεί πως για να επιλεγεί ένας άξονας για μυελίνωση από τα γλοιακά κύτταρα θα πρέπει η διάμετρος του να ξεπερνάει το 1 μm (Sherman and Brophy 2005). Ο λόγος για τον οποίο μικρότεροι άξονες δεν μυελινώνονται παραμένει άγνωστος. Έχει βρεθεί πως η δομική πρωτεΐνη της μυελίνης MAG, η οποία είναι μέλος των ανοσοσφαιρινικών μορίων κυτταρικής συνάφειας εντοπίζεται στη μεμβράνη του γλοιακού κυττάρου που εφάπτεται με τον άξονα, διαμεσολαβόντας τις αρχικές απαραίτητες αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις (Owens and Bunge 1991). Επιπλέον, στις αλληλεπιδράσεις αυτού του σταδίου έχουν εμπλακεί διάφορες πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων είναι το μόριο Lingo-1 (Leucine rich repeat and Ig domain containing 1) το οποίο εκφράζεται από τα ολιγοδενδροκύτταρα και τους άξονες καθώς και το μόριο κυτταρικής συνάφειας NCAM (Neural cell adhesion molecule), τα οποία παρεμποδίζουν την έναρξη της μυελίνωσης (Mi et al., 2005; Coman et al., 2005). Τέλος, το μόριο Neuregulin 1 (type III), το οποίο εντοπίζεται προσδεδεμένο στη μεμβράνη των νευρικών κυττάρων είναι το βασικό μόριο που έχει βρεθεί να προάγει την επαφή των αξόνων με τη μεμβράνη των εμμύελων κυττάρων Scwhann, ρυθμίζοντας ποιοι άξονες θα μυελινωθούν καθώς και το ποσοστό της μυελίνωσης (Michailov et al., 2004; Taveggia et al., 2005).

Το επόμενο στάδιο αφορά στην ενεργή μυελίνωση κατά την οποία πραγματοποιείται σε πρώτη φάση η σύνθεση των διαφόρων μορίων της μυελίνης και μεταφορά τους πρός την επιφάνεια του άξονα. Διαταραχή των δομικών πρωτεϊνών της μυελίνης (MAG, CNP, MBP ή PLP) έχει σαν αποτέλεσμα αποσταθεροποίηση της μεμβράνης και επακόλουθη αναστολή της μυελίνωσης (Popko et al., 1987; Griffiths et al., 1998; Pernet et al., 2008). Στη συνέχεια, στο ίδιο στάδιο, η μεμβράνη του γλοιακού κυττάρου περιελίσσεται γύρω από τον άξονα σπειροειδώς και σχηματίζεται η συμπαγής μυελίνη. Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο ένα βασικό μόριο που ρυθμίζει τα επίπεδα της μυελίνωσης στο Π.Ν.Σ. είναι η αξονική Neuregulin 1 (type III). Έχει βρεθεί και παρουσιάζεται στην Εικόνα 4, πως υπερέκφραση του μορίου αυτού οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα μυελίνωσης των περιφερικών αξόνων, ενώ μύες στους οποίους έχει απενεργοποιηθεί το ένα από τα δύο αλληλόμορφα για το γονίδιο της Neuregulin 1 ($Nrg1^{+/-}$; τα $Nrg1^{-/-}$ ζώα πεθαίνουν νωρίς στην ανάπτυξη) παρουσιάζουν μειωμένο πάχος μυελίνης (Michailov et al., 2004; Taveggia et al., 2005). Όσον αφορά στο Κ.Ν.Σ., λίγες πρωτεΐνες έχουν εντοπιστεί οι οποίες επηρεάζουν το επίπεδο της μυελίνωσης. Μία από αυτές είναι η διαμεμβρανική πρωτεΐνη NogoA (Neurite outgrowth inhibitor A) που εκφράζεται από τα ολιγοδενδροκύτταρα και απώλεια της έχει σαν αποτέλεσμα σοβαρή αλλά παροδική υπομυελίνωση (Pernet et al., 2008). Επίσης, οι αυξητικοί παράγοντες Neuregulin 1 και PDGF-A φαίνεται να εμπλέκονται στη διαδικασία της μυελίνωσης στο Κ.Ν.Σ. ρυθμίζοντας το πάχος της μυελίνης (Fruttiger et al., 1999; Brinkmann et al., 2008).



Εικόνα 4. Τα επίπεδα έκφρασης του μορίου Neuregulin 1 (NRG1) type III επηρεάζουν το πάχος της μυελίνης στο Π.Ν.Σ. Α. Παρουσιάζονται τα στάδια δημιουργίας του ελύτρου της μυελίνης όμοια με την Εικόνα 1. Β. Σχηματική απεικόνιση του πάχους της μυελίνης περιφερικών εμμύελων ινών σε μύες με μειωμένα ($Nrg1^{+/-}$), φυσιολογικά (normal) και αυξημένα επίπεδα (†NRG1 type III) της πρωτεΐνης NRG1. Εικόνα από Ffrench-Constant, Colognato and Franklin 2004.

Το τρίτο στάδιο της μυελίνωσης αφορά στη δημιουργία αξονογλοιακών αλληλεπιδράσεων που εξασφαλίζουν τη σύνδεση της μεμβράνης του εμμύελου γλοιακού κυττάρου με τον άξονα, αφήνοντας ελεύθερες περιοχές ανά περιοδικά διαστήματα (τους κόμβους του Ranvier). Οι αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις εξασφαλίζουν την οργάνωση των εμμύελων ινών σε μοριακά και δομικά διακριτές περιοχές, η σωστή λειτουργία των οποίων είναι απαραίτητη για την ταχεία μετάδοση του δυναμικού ενεργείας κατά μήκος του άξονα. Οι περιοχές στις οποίες οργανώνονται οι κεντρικές και περιφερικές εμμύελες ίνες είναι ονομαστικά: ο κόμβος του Ranvier, η παρακομβική και η εγγύς της παρακομβικής περιοχή και το μεσοκομβικό διάστημα (Εικόνα 5). Στη δημιουργία των περιοχών αυτών συμμετέχουν κυρίως μόρια κυτταρικής συνάφειας και δίαυλοι ιόντων. Συνοπτικά, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, ο κόμβος του Ranvier είναι η περιοχή χωρίς μυελίνη και χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση των διαύλων νατρίου που είναι υπεύθυνοι για την εκπόλωση του άξονα και τη μετάδοση του δυναμικού ενεργείας. Η παρακομβική περιοχή βρίσκεται ακριβώς δίπλα στον κόμβο και χαρακτηρίζεται από ισχυρές αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις που σχηματίζουν συνδέσμους που ομοιάζουν στους διαφραγματοσυνδέσμους της Drosophila melanogaster. Η περιοχή αυτή χρησιμεύει στο να διαχωρίζει τους διαύλους νατρίου του κόμβου από τους διαύλους καλίου της εγγύς της παρακομβικής περιοχής και να παρεμποδίζει τη διάχυσή τους. Δίπλα στην παρακομβική περιοχή εντοπίζεται η εγγύς της παρακομβικής περιοχή η οποία αποτελεί το πρώτο τμήμα της συμπαγούς μυελίνης και χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση διαύλων καλίου που είναι σημαντικοί για τη σταδιακή επαναπόλωση της μεμβράνης έπειτα από μία ηλεκτρική ώση. Στην περιοχή αυτή εντοπίζεται το μόριο κυτταρικής συνάφειας TAG-1, του οποίου το ρόλο προσπαθούμε να διερευνήσουμε στην παρούσα μελέτη. Τέλος, το μεσοκομβικό διάστημα αντιπροσωπεύει το υπόλοιπο τμήμα της συμπαγούς μυελίνης από τον ένα κόμβο στον επόμενο. Στη συνέχεια της εισαγωγής, θα αναφερθούμε στα μόρια κυτταρικής συνάφειας και ειδικότερα σε αυτά που εμπλέκονται στις προαναφερθείσες αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις και καθορίζουν την αρχιτεκτονική των εμμύελων ινών. Θα ακολουθήσει ανάλυση της δομής, της λειτουργίας και της μοριακής οργάνωσης των επιμέρους περιοχών τους.



Εικόνα 5. Δομική οργάνωση μίας περιφερικής εμμύελης ίνας. Παρουσιάζεται μία οριζόντια διατομή μίας περιφερικής εμμύελης ίνας και επισημαίνονται ο κόμβος (node), η παρακομβική (paranodal junctions) και η εγγύς της παρακομβικής (juxtaparanode) περιοχή καθώς και το μεσοκομβικό διάστημα (internode). Ο άξονας εμφανίζεται με κόκκινο και τα κύτταρα Schwann με μπλε. Στον κόμβο του Ranvier, εφάπτονται προεκβολές της μεμβράνης των κυττάρων Schwann που ονομάζονται μικρολάχνες. Εικόνα από Salzer, Brophy and Peles, 2008

A.2. MOPIA KYTTAPIKHΣ ΣΥΝΑΦΕΙΑΣ (Cell Adhesion Molecules, CAMs)

Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες, όπως είναι η κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση, η ανοσολογική απόκριση καθώς και η μετάδοση σημάτων από το εξωτερικό του κυττάρου στο εσωτερικό του. Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας διαχωρίζονται σε 4 βασικές οικογένειες πρωτεϊνών: τις ιντεγκρίνες (integrins), τις καντερίνες (cadherins), τις σελεκτίνες (selectins) και την υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών (immunoglobulin superfamily, IgSF) (Silverstein et al., 1998; Hynes et al., 2000). Οι ιντεγκρίνες αποτελούν μια μεγάλη ομάδα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, που διαμεσολαβούν αλληλεπιδράσεις με μόρια που βρίσκονται στον εξωκυττάριο χώρο (Gonzalez-Amaro and Sanchez-Madrid, 1999). Η λαμινίνη και η φιμπρονεκτίνη, οι οποίες βρίσκονται στη βασική στοιβάδα (basal lamina) που περιβάλει το έλυτρο της μυελίνης στο Π.Ν.Σ., είναι χαρακτηριστικά μόρια με τα οποία συνδέονται οι ιντεγκρίνες. Οι καντερίνες είναι επίσης διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες εξαρτώνται από την πρόσδεση ιόντων ασβεστίου στο εξωκυττάριο τμήμα τους. Οι πρωτεΐνες αυτές διεκπεραιώνουν ομοφιλικές αλληλεπιδράσεις μέσω της εξωκυττάριας περιοχής τους, καθώς και αλληλεπιδράσεις με κατενίνες (συνδέονται στον κυτταροσκελετό) μέσω της κυτταροπλασματικής περιοχής τους (Gumbiner et al., 2000). Οι σελεκτίνες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες με μικρό κυτταροπλασματικό τμήμα, οι οποίες εξαρτώνται από την πρόσδεση δισθενών ιόντων (Gonzalez-Amaro and Sanchez-Madrid, 1999).

Τέλος, η υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινικών μορίων κυτταρικής συνάφειας (immunoglobulin superfamily, IgSF CAMs) αποτελείται από μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες μη-εξαρτώμενες από ιόντα ασβεστίου. Το χαρακτηριστικό των μελών αυτής της οικογένειας είναι το εξωκυττάριο τμήμα που περιέχει επαναλήψεις περιοχών που ομοιάζουν με τις σταθερές περιοχές των ανοσοσφαιρινών (Ig-like domains), συνδεδεμένων μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Συνήθως, οι πρωτεΐνες αυτές περιέχουν μία διαμεμβρανική περιοχή και ένα κυτταροπλασματικό τμήμα που αλληλεπιδρά με τον κυτταροσκελετό. Τυπικά τα μέλη αυτής της οικογένειας αλληλεπιδρούν με ιντεγκρίνες και άλλα μέλη της ίδιας οικογένειας. Στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών ανήκουν τα μόρια κυτταρικής συνάφειας του νευρικού συστήματος (Neural CAMs ή NCAMs) μέλος των οποίων αποτελεί η υπό μελέτη πρωτεΐνη, TAG-1.

Α.2.1. ΜΟΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΥΝΑΦΕΙΑΣ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΕ ΑΞΟΝΟΓΛΟΙΑΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τη μορφολογία και συντονισμένη λειτουργία του νευρικού συστήματος. Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας διαμεσολαβούν την αλληλεπίδραση των αξόνων με τους

στόχους τους κατά τη δημιουργία των συνάψεων. Επίσης, τα μόρια κυτταρικής συνάφειας είναι υπεύθυνα για την επαφή των νευρικών κυττάρων με τα κύτταρα γλοίας, συμπεριλαμβανομένων των ολιγοδενδροκυττάρων και των κυττάρων Schwann στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα αντίστοιχα (Sakisaka and Takai, 2005). Η πλειοψηφία των μορίων κυτταρικής συνάφειας που συμμετέχουν στις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις και είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της αρχιτεκτονικής των εμμύελων ινών ανήκουν στην υπεροικογένεια των Neurexins και στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών (IgSF).

I. Μόρια κυτταρικής συνάφειας του νευρικού συστήματος της υπεροικογένειας των Neurexins

Τα πρώτα μέλη της υπεροικογένειας των neurexins ανακαλύφθηκαν εξαιτίας της ικανότητας τους να προσδένουν την τοξίνη α-latrotoxin που περιέχεται στο δηλητήριο της αράχνης με την ονομασία 'μαύρη χήρα' και προκαλεί την έντονη απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών (Ushkaryov et al., 1992). Ο καλύτερα μελετημένος ρόλος των μελών της οικογένειας των neurexins αφορά στην αλληλεπίδραση τους με μόρια της οικογένειας των neuroligins κατά τη δημιουργία των συνάψεων (Dean and Dresbach 2006). Οι neurexins αποτελούν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες εντοπίζονται αποκλειστικά στο νευρικό σύστημα και στις οποίες το εξωκυττάριο τμήμα ομοιάζει με τα μόρια laminin A, slit και agrin τα οποία εμπλέκονται στην καθοδήγηση των νευραξόνων και τη συναπτογένεση.

Μία υποοικογένεια των neurexins, τα μέλη της οποίας εμπλέκονται στη δημιουργία αξονογλοιακών αλληλεπιδράσεων κατά μήκος των εμμύελων ινών, είναι η NCP (Neurexin IV/Caspr/Paranodin). Η υποοικογένεια αυτή περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Caspr, Caspr2, Caspr3 και Caspr4 των θηλαστικών, τα μόρια Neurexin IV και axotactin της Drosophila melanogaster και τις πρωτεΐνες του Caenorhabditis Intexin και Nlp (Bellen et al., 1998; Spiegel et al., 2002). H elegans, κυτταροπλασματική περιοχή των παραπάνω πρωτεϊνών χαρακτηρίζεται από μια αλληλουχία 4 αμινοξέων προς το καρβοξυτελικό άκρο της η οποία προσδένεται στην PDZ (PSD95, Dlg, ZO-1) περιοχή άλλων μορίων. Οι περιοχές PDZ εντοπίζονται σε πρωτεΐνες αγκυροβόλησης στη μεμβράνη, οι οποίες συμμετέχουν σε πολλαπλές μοριακές αλληλεπιδράσεις σχηματίζοντας μεγαλομοριακά σύμπλοκα (Nourry et al., 2003). μόρια της οικογένειας ΝCP διαμεσολαβούν Τα αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις στα θηλαστικά και αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων γλοίας στα

ασπόνδυλα. Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες Caspr και Caspr2 συμμετέχουν στην οργάνωση της παρακομβικής και της εγγύς της παρακομβικής περιοχής αντίστοιχα, όπως θα δούμε αναλυτικά παρακάτω. Η πρωτεΐνη Caspr2 (Εικόνα 6) παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς πρόσφατες μελέτες τη συσχετίζουν με τη διαταραχή του αυτισμού στον άνθρωπο (Alarcon et al., 2008; Arking et al., 2008; Bakkaloglu et al., 2008).



Εικόνα 6. Δομή της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης Caspr2. DISC: discoidin-like domain, FIB: a region similar to fibrinogen, LamG: laminin G domain, EGF: Epidermal Growth Factor repeats, JXT: cytoplasmic juxtamembrane region, PDZ-binding: PSD95, Dlg, ZO-1 binding domain. Aπό Spiegel et al., 2002.

ΙΙ. Μόρια κυτταρικής συνάφειας του νευρικού συστήματος της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών

Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας του νευρικού συστήματος που ανήκουν στην IgSF (IgSF NCAMs) χαρακτηρίζονται από την παρουσία τμημάτων που ομοιάζουν με τις περιοχές των ανοσοσφαιρινών (Ig-like) και είναι συνήθως ομόλογες με την σταθερή τους περιοχή, C2 (Williams και Barclay, 1988). Κάποια μέλη αυτής της οικογένειας περιέχουν επίσης ποικίλο αριθμό τμημάτων που ομοιάζουν με τις φιμπρονεκτίνες (FNIII-like). Η τελευταία κατηγορία πρωτεϊνών διαρείται περαιτέρω σε διαμεμβρανικές και σε πρωτεΐνες που είναι προσδεδεμένες στην κυτταρική μεμβράνη μέσω ενός τμήματος γλυκοφωσφατιδυλινοσιτόλης (GPI- anchor). Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας της IgSF είναι γνωστό πως διαμεσολαβούν την κυτταρική συνάφεια, την ανάπτυξη και αύξηση των νευριτών καθώς και τη μετανάστευση των νευρικών κυττάρων και είναι απαραίτητα τόσο κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος όσο και στο ενήλικο (Walsh και Doherty, 1997). Τα πρώτα μέλη της οικογένειας των IgSF NCAMs αποτελούν οι γλυκοπρωτεΐνες L1 (ή NgCAM) και NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule), οι οποίες είναι τα ιδρυτικά μέλη των αντίστοιχων υποοικογενειών. Αυτές οι πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση των νευρικών αξόνων, στη μετανάστευση και επιβίωση των νευρικών κυττάρων, στην πλαστικότητα των συνάψεων καθώς και στην αναγέννηση των νευρικών κυττάρων μετά από τραύμα (Ronn, Hartz and Bock 1998; Haspel et al., 2000). Η σημασία των μορίων των οικογενειών L1 και NCAM επισημαίνεται από το γεγονός πως μεταλλάξεις στα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την έκφραση τους έχουν βρεθεί να συμβαδίζουν με διάφορες νευρολογικές ασθένειες στον άνθρωπο. Κάποια παραδείγματα είναι η σχιζοφρένεια, η διπολική διαταραχή, το σύνδρομο του αυτισμού, το σύνδρομο L1 το οποίο χαρακτηρίζεται από νοητική στέρηση, η υδροκεφαλία και η νόσος Alzheimer (Maness και Schachner, 2007).

Τα μόρια των neurofascins και η NrCAM, ανήκουν στην υποοικογένεια L1 και συμμετέχουν στις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις των εμμύελων ινών. Από το γονίδιο της neurofascin προέρχονται πολλά εναλλακτικά μετάγραφα, από τα οποία τα βασικά είναι αυτά που δίνουν ως προϊόντα τις πρωτεΐνες neurofascin155 (NF155) και neurofascin186 (NF186) (Hassel et al., 1997). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι διαμεμβρανικές και αποτελούνται από 6 Ig-like καθώς και FNIII-like περιοχές. Από την ισομορφή NF155 απουσιάζει η πέμπτη FNIII-like περιοχή και μία περιοχή που ομοιάζει με τις πρωτεΐνες mucins των μεταζώων. Η NF155 εκφράζεται αποκλειστικά από τα κύτταρα γλοίας που μυελινώνουν τους άξονες στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα και είναι κρίσιμη για την οργάνωση των παρακομβικών περιοχών των εμμύελων ινών. Αντίθετα, η NF186 εκφράζεται μόνο από νευρικά κύτταρα και συμμετέχει στην οργάνωση του κόμβου του Ranvier. Η διαμεμβρανική πρωτεΐνη NrCAM (NgCAM-related cell adhesion molecule), αποτελείται από 6 Ig-like καθώς και 5 FNIII-like περιοχές και συμμετέχει στις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν στον κόμβο του Ranvier.

Μία άλλη μικρή οικογένεια της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινικών μορίων κυτταρικής συνάφειας του νευρικού συστήματος είναι η Necl (Nectin-like, ή SynCAM ή Cadm). Οι πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας αποτελούνται από 3 Ig-like περιοχές, μία διαμεμβρανική περιοχή και ένα μικρό κυτταροπλασματικό τμήμα. Τα μόρια Necl1 και Necl2 εκφράζονται από νευρικά κύτταρα στο Κ.Ν.Σ. και το Π.Ν.Σ., ενώ η έκφραση της Necl4 έχει εντοπιστεί στα κύτταρα Schwann. Οι παραπάνω πρωτεΐνες συμμετέχουν στις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν στο μεσοκομβικό τμήμα των εμμύελων ινών. Είναι επίσης ικανές να προσδένονται μέσω μίας αλληλουχίας PDZ στην κυτταροπλασματική τους περιοχής με το μόριο αγκυροβόλησης 4.1B και άλλες PDZ-προσδενόμενες πρωτεΐνες (Maurel et al., 2007; Spiegel et al., 2007; Salzer et al., 2008).

Η πρωτεΐνη TAG-1, η λειτουργία της οποίας είναι το αντικείμενο μελέτης αυτής της εργασίας ανήκει στην υποοικογένεια της IgSF που ονομάζεται F3/ contactin. Η υποοικογένεια αυτή αποτελείται από συνολικά 6 μέλη. Τα μέλη αυτά είναι η πρωτεΐνη contactin (αναφέρεται επίσης ως F3 ή F11), η πρωτεΐνη TAG-1 (αναφέρεται επίσης ως contactin 2 ή TAX1 στον άνθρωπο ή axonin-1 στην όρνιθα), οι πρωτεΐνες BIG1 και BIG2 καθώς και τα νεότερα μέλη NB2 και NB3. Τα μόρια contactin, TAG-1, BIG1 και BIG2 έχουν βρεθεί να επάγουν την ανάπτυξη νευριτών in vitro (Durbec et al., 1992; Furley et al., 1990; Yoshihara et al., 1994; Yoshihara et al., 1995). Όλα τα μέλη αυτής της οικογένειας παρουσιάζουν μεγάλο ποσοστό ομολογίας μεταξύ τους και αποτελούνται από 6 Ig-like περιοχές και 4 FNIII-like επαναλήψεις ενώ είναι προσδεδεμένες στην κυτταρική μεμβράνη μέσω μιας ομάδας γλυκοσυλφωσφατιδυλινοσινόλης (GPI anchor). Οι χρωμοσωμικές θέσεις στις οποίες εντοπίζονται τα γονίδια των πρωτεϊνών αυτής της οικογένειας έχουν συνδεθεί με νευρολογικά σύνδρομα και δυσλειτουργίες στον άνθρωπο όπως η μικροκεφαλία και η σχιζοφρένεια (Kozlov et al., 1995; Maziade et al., 1995; Kamei et al., 2000). Όλα τα μέλη της οικογένειας contactin εκφράζονται αποκλειστικά στο νευρικό σύστημα και όχι σε άλλους ιστούς με περισσότερο διαδεδομένη την έκφραση του ιδρυτικού μορίου contactin. Η TAG-1, όπως θα αναφερθεί αναλυτικά στη συνέχεια, ενέχεται στην επέκταση και καθοδήγηση νευραξόνων και οριζόντια μετανάστευση νευρώνων κατά την ανάπτυξη. Εκφράζεται από διάφορους υποπληθυσμούς νευρώνων του ΚΝΣ και ΠΝΣ παροδικά, καθώς ο νευράξονας εκβάλλει από το κυτταρικό σώμα. Στον ενήλικο οργανισμό, η πρωτεΐνη contactin καθώς και το μόριο υπό μελέτη TAG-1 διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του μοριακού συμπλόκου της παρακομβικής και της εγγύς της παρακομβικής περιοχής των εμμύελων ινών αντίστοιχα.

Α.3.1. Ο ΚΟΜΒΟΣ ΤΟΥ RANVIER

Το έλυτρο της μυελίνης διακόπτεται από αμμύελα τμήματα άξονα μήκους ~1μm, που ονομάζονται κόμβοι του Ranvier. Ο κόμβος του Ranvier είναι μία περιοχή

η οποία χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση τασεοελεγχόμενων διαύλων νατρίου (Na_v) μέσω των οποίων εισρέουν κατιόντα νατρίου (Vabnick et al., 1996). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την εκπόλωση της μεμβράνης και την επακόλουθη ώση του δυναμικού ενεργείας κατά μήκος του άξονα. Η μεταγωγή του ηλεκτρικού σήματος όπως αναφέρθηκε νωρίτερα πραγματοποιείται αλματωδώς από τον ένα κόμβο στον επόμενο. Στο Π.Ν.Σ. προεκβολές των κυττάρων Schwann, που ονομάζονται μικρολάχνες (microvilli), βρίσκονται σε στενή επαφή με τον κόμβο του Ranvier. Οι προεκβολές αυτές, απουσιάζουν από τις κεντρικές εμμύελες ίνες, θεωρούνται κρίσιμες για τη συσσώρευση των Na_v κατά τη δημιουργία του κόμβου και είναι πλούσιες σε πρωτεΐνες ERM (ezrin, radixin, moesin) που διαμεσολαβούν σύνδεση της μεμβράνης με τον κυτταροσκελετό (Salzer, Brophy and Peles 2008).

Οι τασεοελεγχόμενοι δίαυλοι νατρίου αποτελούνται από μία μεγάλη α υπομονάδα που σχηματίζει τον πόρο και μία ή περισσότερες μικρές β υπομονάδες που είναι υπεύθυνες για την πλειοψηφία των γνωστών αλληλεπιδράσεων των Na_v με μόρια κυτταρικής συνάφειας, πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και της εξωκυττάριας ουσίας. Ο υπότυπος 1.2 της α υπομονάδας των διαύλων νατρίου (Na_v1.2) εκφράζεται στον κόμβο κατά τη δημιουργία του και αντικαθίσταται από την υπομονάδα Na_v1.6 στον ώριμο κόμβο (Boiko et el., 2001; Kaplan et al., 2001). Πρόσφατα βρέθηκε πως ένας ακόμα υπότυπος της α υπομονάδας, ο 1.1, εκφράζεται στους κόμβους του Ranvier σε κάποιες περιοχές του Κ.Ν.Σ. (Duflocq et al., 2008).

Η μοριακή οργάνωση του κόμβου του Ranvier παρουσιάζει κάποιες ομοιότητες αλλά και σημαντικές διαφορές μεταξύ Κ.Ν.Σ. και Π.Ν.Σ. Και στα δύο συστήματα στις αλληλεπιδράσεις του κόμβου και τη συσσώρευση των διαύλων νατρίου, συμμετέχουν βασικά δύο μόρια κυτταρικής συνάφειας της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών: η πρωτεΐνη NrCAM και η neurofascin186 (NF186). Το μόριο NrCAM εκφράζεται από τα νευρικά αλλά και τα γλοιακά κύτταρα, ενώ η NF186 εντοπίζεται αποκλειστικά στη μεμβράνη των νευρικών κυττάρων. Μία πρόσφατη μελέτη στο Π.Ν.Σ. μυών έδειξε ότι η γλοιακή NrCAM είναι πολύ σημαντική για τη συσσώρευση των διαύλων νατρίου στον κόμβο πριν την ωρίμανσή του (Feinberg et al., 2010). Μία πρωτεΐνη που εντοπίζεται ειδικά στις μικρολάχνες των κυττάρων Schwann κατά τη δημιουργία του κόμβου είναι η gliomedin. Η gliomedin αλληλεπιδρά με τα μόρια του άζονα, NrCAM και NF186 και σχηματίζει ένα τριμερές σύμπλοκο που είναι απαραίτητο για την οργάνωση του κόμβου του Ranvier των εμμύελων ινών του Π.Ν.Σ. (Eshed et al., 2005; Eshed et al., 2007). Η gliomedin είναι

27

μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία τμημάτων κολλαγόνου και του μορίου olfactomedin στην εξωκυττάρια περιοχή της. Η περιοχή olfactomedin (από το ομώνυμο μόριο της εξωκυττάριας ουσίας του οσφρητικού νευροεπιθηλίου) που περιέχει, διαμεσολαβεί την αλληλεπίδραση της με την NrCAM και τη NF186 (Eshed at al., 2005).



Εικόνα 7. Μοριακή οργάνωση των αξονογλοιακών αλληλεπιδράσεων του κόμβου του Ranvier. Απεικονίζεται η οργάνωση του κόμβου σε μία νευρική ίνα του Π.Ν.Σ. (Feinberg et al., 2010).

Η δημιουργία και παγίωση του κόμβου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών της μεμβράνης του άξονα με τον κυτταροσκελετό. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές επιτυγχάνονται μέσω δύο πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με μόρια του κυτταροσκελετού και ανήκουν στα μόρια αγκυροβόλησης, την Ankyrin G και τη βIV spectrin. Η AnkyrinG είναι ένα μόριο υψηλού μοριακού βάρους που στρατολογείται στον κόμβο από τη NF186 και συνδέεται περαιτέρω με τη βIV spectrin η οποία συνδέει το πρωτεϊνικό σύμπλοκο του κόμβου με τον κυτταροσκελετό του άξονα (Lacas-Gervais et al., 2004; Susuki and Rasband 2008). In vitro απαλλοιφή της Ankyrin G σε νευρικά κύτταρα μυών από ρίζες νωτιαίων γαγγλίων (Dorsal Root Ganglion, DRG) έχει σαν αποτέλεσμα αποδιοργάνωση του μοριακού συμπλόκου του κόμβου του Ranvier (Susuki and Rasband 2008; Dzhashiashvilli et al., 2007).

А.З.2. Н ПАРАКОМВІКН ПЕРІОХН

Οι παρακομβικές περιοχές αποτελούν ένα μεμβρανικό φραγμό που εξυπηρετεί στο διαχωρισμό των διαύλων καλίου που εντοπίζονται στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή από τους δίαυλους νατρίου που συσσωρεύονται στον κόμβο του Ranvier. Ο διαχωρισμός αυτός είναι κρίσιμος για τη μετάδοση του δυναμικού ενεργείας κατά μήκος του άξονα και τη συνεπακόλουθη σωστή λειτουργία του. Μορφολογικά, οι παρακομβικές περιοχές χαρακτηρίζονται από μία σειρά δακτυλίων που ομοιάζουν με τους διαφραγματοσυνδέσμους της *Drosophila melanogaster* και σχηματίζονται στα σημεία επαφής μεταξύ της μεμβράνης του γλοιακού κυττάρου και του άξονα (παρακομβικοί δακτύλιοι). Η μοριακή σύσταση των παρακομβικών περιοχών έχει μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια εξαιτίας του θεμελιώδη ρόλου τους στην οργάνωση και διατήρηση της αρχιτεκτονικής των εμμύελων ινών του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος.

Τρεις πρωτεΐνες εμπλέκονται στις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις της παρακομβικής περιοχής. Οι δύο από αυτές, η contactin και η neurofascin155 (NF155), όπως αναφέρθηκε νωρίτερα ανήκουν στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινικών μορίων κυτταρικής συνάφειας του νευρικού συστήματος και εντοπίζονται στην αξονική και τη γλοιακή μεμβράνη αντίστοιγα. Το τρίτο μόριο αποτελεί η πρωτεΐνη της οικογένειας των NCP της υπεροικογένειας των Neurexins, Caspr (ή NCP1), η οποία συνδέει περαιτέρω το σύμπλοκο στον κυτταροσκελετό. Έλλειψη οποιουδήποτε από τα παραπάνω τρία μόρια έχει σαν αποτέλεσμα σταδιακή καταστροφή των παρακομβικών δακτυλίων και μετακίνηση των διαύλων καλίου από την εγγύς της παρακομβικής περιοχή πρός τον κόμβο με συνέπεια διαταραχή στην αγωγιμότητα της νευρικής ίνας (Bhat et al., 2001; Boyle et al., 2001; Pillai et al., 2009). Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε πως διαγονιδιακή έκφραση της γλοιακής NF155 σε ομόζυγα μεταλλαγμένους για το γονίδιο της neurofascin μύες (όπου οι κόμβοι και οι παρακομβικές περιοχές είναι αποδιοργανωμένες), είναι ικανή και επαρκής για τη διάσωση των παρακομβικών αλληλεπιδράσεων στο κεντρικό και το περιφερικό νευρικό σύστημα. Είναι ενδιαφέρον, ότι στα παραπάνω ζώα, η γλοιακή NF155 μπορεί επίσης να αποκαταστήσει το μοριακό σύμπλοκο του κόμβου στο κεντρικό αλλά όχι στο περιφερικό νευρικό σύστημα (Zonta et al., 2008). Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα οι παρακομβικοί δακτύλιοι των εμμύελων ινών των θηλαστικών ομοιάζουν με τους διαφραγματοσυνδέσμους που σχηματίζονται από τα επιθηλιακά κύτταρα της Drosophila melanogaster. Φαίνεται πως υπάρχει ένας συντηρημένος μηχανισμός μεταξύ των ειδών καθώς και στους διαφραγματοσυνδέσμους συμμετέχουν δύο μόρια της IgSF και ένα μέλος της οικογένειας NCP. Τα μόρια αυτά αποτελούν οι Neuroglian και D-Contactin καθώς και η Neurexin IV (NRX-IV) αντίστοιχα (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Οι μοριακές αλληλεπιδράσεις που διαμεσολαβούν τη δημιουργία των παρακομβικών περιοχών στα θηλαστικά και των διαφραγματοσυνδέσμων στη D. melanogaster είναι συντηρημένες. Εικόνα από Jean-Antoine Girault (μη δημοσιευμένη)

Η μελέτη των μοριακών αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν στην παρακομβική περιοχή αποτελεί ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον πεδίο για τους νευροεπιστήμονες και σκοπεύει στην αποσαφήνιση του μηχανισμού και του ρόλου των αξονογλοιακών αλληλεπιδράσεων. Τα μόρια του άξονα, Caspr και contactin σχηματίζουν ένα διμερές σύμπλοκο όταν ακόμα βρίσκονται στο εσωτερικό του νευρικού κυττάρου. Στη συνέχεια μεταφέρονται στην κυτταρική μεμβράνη όπου αλληλεπιδρούν in trans με τη γλοιακή NF155 (Pedraza et al., 2009). Μία νέα μελέτη πρότεινε ένα διαφορετικό μηχανισμό μεταξύ των κεντρικών και περιφερικών νευρικών ινών όσον αφορά στη συσσώρευση της Caspr στη μεμβράνη. Ο εντοπισμός της Caspr στις παρακομβικές περιοχές του Π.Ν.Σ. φαίνεται να συμβαίνει μόνο μετά την έναρξη της διαδικασίας της μυελίνωσης, ενώ στο Κ.Ν.Σ. η Caspr συσσωρεύεται στην παρακομβική περιοχή με την αρχική επαφή της μεμβράνης του γλοιακού κυττάρου με τον άξονα, πριν την έναρξη της μυελίνωσης (Eisenbach et al., 2009).

Το τριμερές μοριακό σύμπλοκο των παρακομβικών περιοχών συνδέεται με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης μέσω της αλληλεπίδρασης του ενδοκυττάριου τμήματος της Caspr με την πρωτεΐνη 4.1B, η οποία εντοπίζεται στον άξονα στην παρακομβική και την εγγύς της περιοχή (Denisenko-Nehrbrass et al., 2003). Οι πρωτεΐνες της οικογένειας 4.1 είναι μόρια που συνδέουν πρωτεΐνες κυτταρικής συνάφειας, διαύλους ιόντων και υποδοχείς της μεμβράνης με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης/σπεκτρίνης (Bennett and Baines, 2001). Σε μία πρόσφατη μελέτη, η ανάλυση των ομόζυγα μεταλλαγμένων για τη 4.1Β ζώων έδειξε πως οι παρακομβικές περιοχές παραμένουν αμετάβλητες, προτείνοντας πως η απώλεια της 4.1B ίσως αντισταθμίζεται από το μόριο 4.1R της ίδιας οικογένειας (Horresh et al., 2010). Τα τελευταία πέντε έτη, πολλές μελέτες εστιάζουν στην αναγνώριση νέων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο σύμπλοκο του παρακομβικού τμήματος και θα μπορούσαν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία της περιοχής. Πολλά μόρια που διαμεσολαβούν τη σύνδεση με τον κυτταροσκελετό, έχουν αποκαλυφθεί με μεθόδους πρωτεομικής, συμπεριλαμβανομένων των σπεκτρινών all και βΙΙ, της Ankyrin B, των β-adducin και septin 2 (Ogawa et al., 2006, Ogawa et al., 2009). Οι πρωτεΐνες αυτές εντοπίστηκαν στην παρακομβική περιοχή του οπτικού νεύρου και ο ρόλος τους παραμένει να διευκρινιστεί.



Εικόνα 9. Απεικονίζεται το μοριακό σύμπλοκο της παρακομβικής περιοχής. Εικόνα από Bhat 2003.

Πέρα από τα μόρια που συμμετέχουν στο σύμπλοκο των παρακομβικών περιοχών, άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες έχουν επίσης εντοπιστεί σε αυτά τα τμήματα. Τα πιο σημαντικά από αυτά τα μόρια είναι η πρωτεΐνη Nogo-A, η netrin-1 και ο υποδοχέας της DCC (Deleted in Colorectal Cancer). Η Nogo-A εκφράζεται από τα ολιγοδενδροκύτταρα και αλληλεπιδρά με την Caspr και τους διαύλους καλίου σε πρωτεινικά εκχυλισματα εγκεφάλου τρωκτικών. Έχει προταθεί ότι η Nogo-A ίσως διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη σταθεροποίηση των διαύλων καλίου στην παρακομβική περιοχή πριν την τελική τους καθοδήγηση στην εγγύς της περιοχή (Nie et al., 2003). Η netrin-1 και ο υποδοχέας της DCC εκφράζονται από τα ολιγοδενδροκύτταρα και εντοπίζονται στην παρακομβική περιοχή. Εχ vivo ανάλυση τομών παρεγκεφαλίδας από μύες ελλειματικούς για τα γονίδια των netrin-1 ή DCC και in vivo πειράματα μεταμόσχευσης έδειξαν ότι τα δύο αυτά μόρια δεν είναι απαραίτητα για τη μυελίνωση ή την ανάπτυξη και ωρίμανση των παρακομβικών δακτυλίων, αλλά είναι κρίσιμες για τη διατήρηση και σωστή μοριακή οργάνωση των παρακομβικών περιοχών (Janjour et al., 2008).

Α.3.3. Η ΕΓΓΥΣ ΤΗΣ ΠΑΡΑΚΟΜΒΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗ

Η εγγύς της παρακομβικής περιοχή εντοπίζεται δίπλα στο παρακομβικό τμήμα των εμμύελων ινών και αποτελεί μέρος της συμπαγούς μυελίνης. Χαρακτηρίζεται από την υψηλή συγκέντρωση σε διαύλους καλίου (Kv) τύπου shaker, οι οποίοι αποτελούνται απο τις Kv1.1/1.2 α-υπομονάδες και την Kvβ2 υπομονάδα και εμπλέκονται στη διατήρηση του δυναμικού ηρεμίας και την επαναπόλωση της μεμβράνης του νευράξονα (Vabnick et al, 1999; Brophy, 2003). Οι δύο α-υπομονάδες έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν τετραμερή, τα οποία αποτελούν και τους λειτουργικούς διαύλους, και η κάθε μία συνδέεται με μια Kvβ2 υπομονάδα (Arroyo and Scherer, 2000). Σε μύες ελλειμματικούς για την Kv1.1 υπομονάδα παρουσιάζεται υπερδιεγερσιμότητα των περιφερικών νευραξόνων η οποία ρυθμίζεται από τη θερμοκρασία (Zhou et al, 1999). Η οργάνωση και διατήρηση της εγγύς της παρακομβικής περιοχής βασίζεται στο συνδυασμό δύο διαφορετικών διαδικασιών. Η και επιτυγχάνεται από την παρακομβική περιοχή. Η δεύτερη αφορά στο σχηματισμό του μοριακού συμπλόκου των εγγύς των παρακομβικών περιοχών μεταξύ του άξονα και της μεμβράνης του γλοιακού κυττάρου και τη σύνδεσή του με τον αξονικό κυτταροσκελετό (Susuki and Rasband, 2008). Ο μηχανισμός δημιουργίας του συμπλόκου των εγγύς των παρακομβικών περιοχών παρουσιάζει μεγάλες ομοιότητες με το αντίστοιχο σύμπλοκο της παρακομβικής περιοχής ως προς τα μόρια που συμμετέχουν, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 10.





Το μοριακό σύμπλοκο της εγγύς της παρακομβικής περιοχής αποτελείται από την πρωτεΐνη TAG-1 που εκφραζεται από τα νευρικά και τα εμμύελα κύτταρα γλοίας, το μόριο της οικογένειας των neurexins, Caspr2 και τους τασεοελεγχόμενους διαύλους καλίου τύπου shaker που εντοπίζονται στη μεμβράνη του άξονα (Poliak et al., 2003; Traka et al., 2003; Tzimourakas et al., 2007). Απώλεια των μορίων TAG-1 ή Caspr2 έχει σαν αποτέλεσμα αποδιοργάνωση του παραπάνω συμπλόκου και επακόλουθη διάχυση των διαύλων καλίου προς το μεσοκομβικό διάστημα (Poliak et al., 2003; Traka et al., 2003, Savvaki et al., 2008). Η πρωτεΐνη TAG-1 είναι ικανή να σχηματίζει ομοδιμερή και μπορεί να αλληλεπιδρά άμεσα με τα άλλα δύο μέλη του συμπλόκου, την Caspr2 και τους διαύλους καλίου μέσω των ανοσοσφαιρινικών της περιοχών (Pavlou et al., 2002; Traka et al., 2003, Tzimourakas et al., 2007). Πειράματα σε οπτικό και ισχιακό νεύρο κατά την ανάπτυξη έδειξαν κάποιες διαφορές στην κατανομή των τασεοελεγχόμενων διαύλων καλίου μεταξύ κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος. Στο Π.Ν.Σ. οι δίαυλοι καλίου αρχικά εντοπίζονται στον κόμβο και στη συνέχεια μετακινούνται προς την παρακομβική περιοχή ώσπου να καταλήξουν συσσωρευμένοι στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή (Vabnick et al., 1999). Αντίθετα, στο Κ.Ν.Σ. οι δίαυλοι καλίου εντοπίζονται από την αρχή στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή χωρίς να συνεντοπίζονται σε κανένα στάδιο με πρωτεΐνες του κόμβου ή της παρακομβικής περιοχής (Rasband et al., 1999).

Το σύμπλοκο των εγγύς των παρακομβικών περιοχών (όπως και των παρακομβικών) συνδέεται με το κυτταροσκελετό της ακτίνης μέσω της αλληλεπίδρασης της κυτταροπλασματικής περιοχής της Caspr2 με την πρωτεΐνη 4.1B (Denisenko-Nehrbass et al., 2003; Horresh et al., 2010). Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε πως απώλεια του μορίου 4.1Β σε μεταλλαγμένους μύες είχε σαν αποτέλεσμα αποδιοργάνωση του συμπλόκου των εγγύς των παρακομβικών περιοχών στο Π.Ν.Σ., όμοια με τα ομόζυγα μεταλλαγμένα ζώα για την TAG-1 ή την Caspr2 (Horresh et al., 2010). Εκτός από την 4.1B, δύο ακόμα μόρια αγκυροβόλησης στη μεμβράνη έχουν εντοπιστεί στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές: η PSD-93 (post-synaptic density protein 93) και η PSD-95 (post-synaptic density protein 95) (Rasband et al., 2002; Horresh et al., 2008, Ogawa et al., 2008). Και οι δύο είναι ικανές να αλληλεπιδράσουν μέσω της PDZ-προσδενόμενης περιοχής τους με το καρβοξυτελικό άκρο της Caspr2 και την α υπομονάδα των διαύλων καλίου (Poliak et al., 2003; Horresh et al., 2010). A π ougía two PSD-93 και PSD-95 σε μεταλλαγμένους μύες δεν είχε καμία επίδραση στη δημιουργία και διατήρηση των μορίων του συμπλόκου των εγγύς των παρακομβικών περιοχών (Horresh et al., 2010). Τέλος, μία πρωτεΐνη που

εντοπίστηκε πρόσφατα στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή είναι η ADAM-22. Πρόκειται για μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που περιέχει μία καταλυτικά ανενεργή περιοχή μεταλλοπρωτεϊνάσης. Αποδείχθηκε ότι η ADAM-22 συμμετέχει σε σύμπλοκο με τους διαύλους καλίου των εγγύς των παρακομβικών περιοχών και είναι υπεύθυνη για τη συσσώρευση των μορίων PSD-93 και PSD-95 στην περιοχή, ενώ δεν είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό των διαύλων καλίου (Ogawa et al., 2010).



Εικόνα 11. Μοριακές αλληλεπιδράσεις στις εγγύς των παρακομβικές περιοχές των εμμύελων ινών. Poliak et al., 2003

Α.3.4. ΤΟ ΜΕΣΟΚΟΜΒΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

Η μεσοκομβική περιοχή αποτελεί το μεγαλύτερο τμήμα των εμμύελων ινών και είναι η περιοχή της συμπαγούς μυελίνης που βρίσκεται μεταξύ δύο γειτονικών κόμβων του Ranvier. Η μεσοκομβική περιοχή των εμμύελων ινών του Π.Ν.Σ. χαρακτηρίζεται από πολύ μικρά τμήματα χαλαρής μυελίνης που σχηματίζονται από το κυτταρόπλασμα των κυττάρων Schwann και ονομάζονται περιοχές Schmint-Lanterman (Schmint-Lanterman incisures). Οι περιοχές αυτές είναι σπάνιες στις κεντρικές εμμύελες ίνες.

Πρόσφατα, τα μέλη της οικογένειας Necl που ανήκουν στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινικών μορίων κυτταρικής συνάφειας ενεπλάκησαν σαν βασικοί ρυθμιστές της οργάνωσης του μεσοκομβικού τμήματος. Οι πρωτεΐνες Necl1 (SynCAM3) και Necl2 (SynCAM1) εκφράζονται κατά κύριο λόγο στον άξονα σε όλο το μήκος του μεσοκομβικού τμήματος, ενώ η Necl4 (SynCAM4) είναι το μόναδικό γνωστό μόριο της οικογένειας που εκφράζεται από τα κύτταρα Schwann (Kakunaga et al, 2005, Maurel et al., 2007, Spiegel et al., 2007). Οι Necl1 και Necl4 εντοπίζονται νωρίς στις μεμβράνες του άξονα και του γλοιακού κυττάρου αντίστοιχα στη μεσοκομβική περιοχή των εμμύελων ινών του Π.Ν.Σ. Εκεί, διαμεσολαβούν τις ισχυρών αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις μέσω ετεροφιλικών συνδέσεων. Παρεμπόδιση της προαναφερθείσας αλληλεπίδρασης οδηγεί σε αποτυχία της διαδικασίας έναρξης της μυελίνωσης. Πειράματα αναστολής της Neel4 είχαν σαν αποτέλεσμα κατάργηση του εντοπισμού της Necl1 αλλά όχι της Necl2 από το μεσοκομβικό τμήμα (Spiegel et al., 2007). Η αλληλεπίδραση μεταξύ των Necl4 και Necl2 είναι δυνατή αλλά πραγματοποιείται με μικρή συνάφεια, προτείνοντας πως η Necl2 αλληλεπιδρά πιθανώς με το κύτταρο Schwann μέσω κάποιου άγνωστου συνδέτη διαφορετικού από την Necl4 (Maurel et al., 2007, Spiegel et al., 2007).



Εικόνα 12. Μόρια που διαμεσολαβούν τις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις στη μεσοκομβική περιοχή των εμμύελων ινών του Π.Ν.Σ. (Maurel et al., 2007).

Α.3.5. ΑΠΟΜΥΕΛΙΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΠΟΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΩΝ ΕΜΜΥΕΛΩΝ ΙΝΩΝ

Απομυελίνωση είναι η απώλεια του ελύτρου της μυελίνης και αποτελεί το χαρακτηριστικό κάποιων νευροεκφυλιστικών αυτοάνοσων νόσων όπως η πολλαπλή σκλήρυνση ή σκλήρυνση κατά πλάκας (multiple sclerosis), η χρόνια φλεγμονώδη απομυελινωτική πολυνευροπάθεια (chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, CIDP) και η ασθένεια Charcot Marie Tooth. Οι δύο τελευταίες νόσοι προσβάλλουν το Π.Ν.Σ., ενώ η σκλήρυνση κατά πλάκας αποτελεί τη συχνότερη απομυελινωτική νόσο του Κ.Ν.Σ. Σε όλες τις περιπτώσεις η μεμβράνη της μυελίνης καταστρέφεται με αποτέλεσμα σοβαρή βλάβη στη μεταγωγή του σήματος που καταλήγει σε εκφυλισμό των νευρικών ινών (Εικόνα 13).


Εικόνα 13. καταστροφή του ελύτρου της μυελίνης κατά την απομυελίνωση. Εικόνα από <u>http://www.drsonis.blogspot.com/</u>

Η σκλήρυνση κατά πλάκας προσβάλλει 2,5 εκατομύρια ανθρώπους παγκοσμίως, συνήθως νεαρά άτομα ηλικίας 20-40 ετών. Τα κλινικά ευρήματα της νόσου είναι εστιακές βλάβες οξείας φλεγμονής ή απομυελίνωσης και εκφυλισμός νευραξόνων με περιορισμένη δυνατότητα επαναμυελίνωσης που οδηγούν τελικά στη δημιουργία χρόνιων απομυελινωτικών πλακών. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν κινητική δυσλειτουργία και αστάθεια στη βάδιση καθώς και διαταραχές όρασης και σε κάποιες περιπτώσεις έκπτωση γνωστικών λειτουργιών (Compston and Coles, 2002). Μοριακά, η καταστροφή της μυελίνης έχει σαν αποτέλεσμα σταδιακή αποδιοργάνωση των κόμβων του Ranvier και των γύρω του περιοχών. Μια ενδιαφέρουσα μελέτη έδειξε πως στις θέσεις επαναμυελίνωσης στον εγκέφαλο ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας η συσσώρευση των διαύλων νατρίου στους κόμβους και η μοριακή αναδόμηση των γύρω περιοχών (παρακομβικών και εγγύς των παρακομβικών) προηγείται της επαναμυελίνωσης (Coman et al., 2006). Στον ορό ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας έχουν εντοπιστεί αυτο-αντισώματα για τις περισσότερες από τις δομικές πρωτεΐνες της μυελίνης του Κ.Ν.Σ., όπως η MBP και η PLP (Quintana et al., 2008). Δύο πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως σε κάποιους ασθενείς εντοπίζονται αυτο-αντισώματα κατά των neurofascins και της TAG-1, συνδέοντας αυτά τα μέλη της IgSF υπεροικογένειας με βλάβη στη φαιά ουσία του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού (Derfuss et al., 2009; Mathey et al., 2007). Αυτές οι μελέτες προτείνουν για πρώτη φορά πρωτεΐνες του άξονα ως πιθανά αυτο-αντιγόνα στη σκλήρυνση κατά πλάκας.

Α.4. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΥΝΑΦΕΙΑΣ ΤΑG-1 ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Η πρωτεΐνη TAG-1 είναι μία υψηλά συντηρημένη γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 135 kDa, η οποία αποτελείται από μία υδρόφοβη αλληλουχία στο αμινοτελικό άκρο της ενώ ακολουθούν 6 Ig-like περιοχές, 4 FNIII-like επαναλήψεις και μία ουρά γλυκοσυλφωσφατιδυλινοσιτόλης στο καρβοξυτελικό άκρο της με την οποία προσδένεται στην κυτταρική μεμβράνη (Furley et al., 1990). Η δομή της πρωτεΐνης δίνεται στην Εικόνα 14. Εκτός από αυτήν τη μορφή η πρωτεΐνη TAG-1 εντοπίζεται επίσης και διαλυτή (Karagogeos et al., 1991). Η TAG-1 εκφράζεται αποκλειστικά στο νευρικό σύστημα από νευρώνες καθώς και από τα ολιγοδενδροκύτταρα και τα κύτταρα Schwann του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος αντίστοιχα (Traka et al., 2002).

Εικόνα 14. Η δομή της πρωτεΐνης TAG-1. Με κίτρινους κύκλους απεικονίζονται οι περιοχές που ομοιάζουν στις ανοσοσφαιρίνες και με μπλε ορθογώνια οι περιοχές που ομοιάζουν στη φιμπρονεκτίνη (Karagogeos et al., 1991)



Η έκφραση της πρωτεΐνης TAG-1 είναι σημαντικά ρυθμιζόμενη κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο, η έκφραση του μορίου TAG-1 είναι ιδιαίτερα υψηλή και εντοπίζεται κυρίως στον οσφρητικό λοβό, το νεοφλοιό, τον ιππόκαμπο κ.α.(Wolfer et al., 1998; Yoshihara et al., 1995; Denaxa et al., 2001). Κατά την ανάπτυξη, η πρωτεΐνη TAG-1 συμμετέχει σε ένα πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπιδράσεων και ρυθμίζει την συνάφεια ανάμεσα στα νευρικά κύτταρα, τη μετανάστευση των νευρικών κυττάρων, την αύξηση των νευρικών αξόνων καθώς και τη νευρογένεση (Furley et al., 1990; Stoeckli et al., 1991; Kunz et al., 1998; Fitzli et al., 2000; Denaxa et al., 2001; Kyriakopoulou et al., 2002; Liu and Halloran, 2005;

Ma et al., 2008; Mattson and van Praag, 2008; Wolman et al., 2008; Lieberoth et al., 2009).

Στον εγκέφαλο ενήλικων τρωκτικών, υψηλή έκφραση της TAG-1 εντοπίζεται στην κοκκώδη στοιβάδα της παρεγκεφαλίδας, στα πυραμιδικά κύτταρα των περιοχών CA1 και CA3 του ιπποκάμπου καθώς και στους βασικούς νευρώνες του οσφρητικού λοβού (Yoshihara et al., 1995; Wolfer et al., 1998; Denaxa et al., 2003). Ο μοναδικός ρόλος που έχει περιγραφεί έως τώρα για την πρωτεΐνη TAG-1 στο ενήλικο νευρικό σύστημα αφορά στην οργάνωση και διατήρηση του μοριακού συμπλόκου των εγγύς των παρακομβικών περιοχών των εμμύελων ινών. Μύες ελλειμματικοί για το γονίδιο που κωδικοποιεί την TAG-1 (*Tag-1^{-/-}*) αδυνατούν να οργανώσουν το μοριακό σύμπλοκο των εγγύς των παρακομβικών περιοχών (Poliak et al., 2003; Traka et al., 2003). Το σύμπλοκο αυτό, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση των τασεοελεγχόμενων διαύλων καλίου που συμμετέχουν στη σταδιακή επαναπόλωση της μεμβράνης του νευράξονα.

Δύο πρόσφατες μελέτες επισημαίνουν τη σημασία της πρωτεΐνης TAG-1, εμπλέκοντας την για πρώτη φορά σε νευρολογικές διαταραχές στον άνθρωπο. Στην πρώτη μελέτη ανιχνεύτηκαν αυτοαντισώματα για την TAG-1 στον ορό ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας. Στην ίδια εργασία η παρουσία αυτών των αντισωμάτων συνδέθηκε με την παθολογία της φαιάς ουσίας του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού (Derfuss et al., 2009). Η παθολογία στη φαιά ουσία στους ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας συνήθως συνάδει με έκπτωση γνωστικών λειτουργιών. Στη δεύτερη μελέτη, μία άλλη ερευνητική ομάδα κατάφερε να συσχετίσει έναν πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorfism, SNP) στο γονίδιο της TAG-1 με την απόκριση στη θεραπεία ασθενών με χρόνια φλεγμονώση πολυνευροπάθεια (chronic inflammatory απομυελινωτική demvelinating polyneuropathy, CIDP) (Iijima et al., 2009). Η ασθένεια διαμεσολαβείται από το ανοσοποιητικό σύστημα, αφορά στο περιφερικό νευρικό σύστημα και η κύρια θεραπεία που χρησιμοποιείται έως τώρα περιλαμβάνει ανοσοκαταστολή.

Όσον αφορά στα τρωκτικά, απώλεια του γονιδίου της TAG-1 (*Tag-1^{-/-}*) είχε σαν αποτέλεσμα αυξημένη ευαισθησία σε επιλεπτογενή ερεθίσματα, η οποία αποδόθηκε αρχικά σε μία αύξηση των A1 υποδοχέων της αδενοσίνης στον ιππόκαμπο (Fukamauchi et al., 2001). Αυτή ήταν η πρώτη φαινοτυπική διαφορά που ανακαλύφθηκε σε αυτά τα ζώα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά. Τα *Tag-1^{-/-}* ζώα αναπτύσσονται και αναπαράγονται φυσιολογικά, ενώ δεν υπάρχει κάποια αδρή

39

μορφολογική ανωμαλία στο νευρικό τους σύστημα. Μία πρόσφατη μελέτη του οπτικού συστήματος των *Tag-I^{-/-}* μυών, έδειξε μία μικρή αλλα σημαντική υπομυελίνωση στους άξονες του οπτικού νεύρου καθώς και μία σημαντική μείωση του αριθμού των νευρικών ινών που περιέχει η οποία οφείλεται στη δραματική μείωση των μικρής διαμέτρου αξόνων (Chatzopoulou, Miguez et al., 2008).

ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα μελέτη αποτελείται από δύο βασικά ερευνητικά μέρη. Ο γενικότερος στόχος της είναι η διερεύνηση του μηχανισμού με τον οποίο οργανώνονται οι διάφορες περιοχές των εμμύελων ινών του Κ.Ν.Σ. και οι επιπτώσεις της αποδιοργάνωσής τους στη συμπεριφορά των μυών. Ειδικότερα, μελετάμε το ρόλο των αξονογλοιακών αλληλεπιδράσεων στην οργάνωση των εγγύς των παρακομβικών περιοχών και πιθανή επίδρασή τους στη συμπεριφορά των μυών ως προς τις γνωστικές και κινητικές λειτουργίες. Επιπλέον, διερευνούμε το ρόλο του μορίου κυτταρικής συνάφειας TAG-1 στη διαδικασία της μυελίνωσης και του καθορισμού της μορφολογίας του οπτικού νεύρου.

Οπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, οι μύες που είναι ελλειμματικοί για το γονίδιο της TAG-1 (*Tag-1*^{-/-}) παρουσιάζουν αποδιοργάνωση των εγγύς των παρακομβικών περιοχών με την πρωτεΐνη Caspr2 και τους διαύλους καλίου να απουσιάζουν ή να εμφανίζονται διάχυτοι προς το μεσοκομβικό διάστημα. Η μελέτη αυτή είχε πραγματοποιηθεί σε οπτικό και ισχιακό νεύρο (Traka et al., 2003). Στην ίδια μελέτη παρουσιάστηκε η φυσική αλληλεπίδραση της TAG-1 με τις προαναφερθείσες πρωτεΐνες. Μία επόμενη in vitro μελέτη έδειζε την άμεση αλληλεπίδραση της TAG-1 με την Caspr2 και τους διαύλους καλίου μέσω των Ig-like περιοχών της πρώτης (Tzimourakas et al., 2007). Έτσι, έγινε σαφές ότι η πρωτεΐνη TAG-1 είναι απαραίτητη για τη δημιουργία του μοριακού συμπλόκου των εγγύς των παρακομβικών περιοχών και τη διατήρηση των τασεοελεγχόμενων διαύλων καλίου. Όσον αφορά στο φαινότυπο των *Tag-1*^{-/-} μυών, αυτοί αναπτύσσονται και αναπαράγονται φυσιολογικά, ενώ το μόνο που φάνηκε από μία πρώτη ανάλυση είναι ότι παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία σε επιλεπτογενή ερεθίσματα (Fukamauchi et al., 2001).

Στο πρώτο μέρος της μελέτης μας αναλύσαμε ενδελεχώς τη συμπεριφορά των *Tag-1^{-/-}* μυών. Οι συμπεριφορικές δοκιμασίες που εφαρμόσαμε αφορούν στον έλεγχο των γνωστικών λειτουργιών της μάθησης και μνήμης καθώς και των κινητικών λειτουργιών του κινητικού συντονισμού. Στη συνέχεια διερευνήσαμε τη μοριακή οργάνωση των εγγύς των παρακομβικών περιοχών σε διάφορα τμήματα του Κ.Ν.Σ. των *Tag-1^{-/-}* μυών, συμπεριλαμβανομένων αυτών που εμπλέκονται στις προαναφερθείσες συμπεριφορές. Στόχος μας είναι να μπορέσουμε να συνδέσουμε

41

πιθανά συμπεριφορικά ελλείμματα που εμφανίζονται στα ομόζυγα μεταλλαγμένα για την TAG-1 ζώα με πιθανή μοριακή αποδιοργάνωση των περιοχών που τις ρυθμίζουν. Επίσης, είναι σημαντικό να ελέγξουμε εάν η απουσία του μορίου TAG-1 έχει επιπτώσεις στην οργάνωση των εγγύς των παρακομβικών περιοχών στις εμμύελες ίνες ολόκληρου του Κ.Ν.Σ. η αν ο ρόλος της αυτός είναι ειδικός για το οπτικό νεύρο.

Όπως είναι γνωστό, η πρωτεΐνη TAG-1 εκφράζεται τόσο από νευρικά όσο και από κύτταρα γλοίας στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι η TAG-1 είναι το μόνο μόριο που έχει αναγνωριστεί έως σήμερα, το οποίο εντοπίζεται στο εμμύελο γλοιακό κύτταρο και συμμετέχει στη δημιουργία του συμπλόκου των εγγύς των παρακομβικών περιοχών. Στο δεύτερο μέρος αυτής της μελέτης εστιάσαμε στην ανάλυση ειδικά του ρόλου της γλοιακής πρωτεΐνης, απουσία του μορίου από τα νευρικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, δημιουργήσαμε διαγονιδιακούς μύες στους οποίους η TAG-1 εκφράζεται αποκλειστικά από τα ολιγοδενδροκύτταρα για να μελετήσουμε τα εξής:

 Είναι η γλοιακή TAG-1, απουσία της αξονικής, ικανή για τη δημιουργία του μοριακού συμπλόκου των εγγύς των παρακομβικών περιοχών;

 Μπορεί η γλοιακή πρωτεΐνη να επηρεάσει τη μυελίνωση και την κατανομή των αξόνων του οπτικού νεύρου;

3. Μπορεί η αποκλειστική έκφραση της γλοιακής TAG-1 να επιδράσει στη συμπεριφορά των ζώων και να διασώσει το φαινότυπο των *Tag-1^{-/-}* μυών;

Β. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής πειραματόζωα:

- Μύες ελλειμματικούς για την πρωτεΐνη TAG-1, του στελέχους C57B110/CBA (*Tag-1^{-/-}*). Στα συγκεκριμένα ζώα έχει αφαιρεθεί η αλληλουχία του γονιδίου *Tag-1* μεταξύ του 2^{ου} και 5^{ου} εξονίου (Fukamauchi et al, 2001)
- 2) Φυσιολογικούς μύες του στελέχους C57B110/CBA
- 3) Διαγονιδιακούς μύες οι οποίοι εκφράζουν το ομόλογο γονίδιο για την TAG-1 του αρουραίου (rTAG-1) υπο τον υποκινητή του γονιδίου της πρωτεΐνης PLP (proteolipid protein, ειδική πρωτεΐνη των ολιγοδενδροκυττάρων) ενώ έχουν απενεργοποιημένο το ενδογενές γονίδιο $(Tag-I^{-/-}; plp^{Tg(rTag-1)})$. Για τη δημιουργία των διαγονιδιακών μυών χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακή κατασκευή η οποία πραγματοποιήθηκε από τον Κώστα Θεοδωράκη στα εργαστήριο και περιγράφεται συνοπτικά παρακάτω: ο υποκινητής του plp γονιδίου που εκφράζεται αποκλειστικά στα ολιγοδενδροκύτταρα (Wight et al., 1993; Fuss et al., 2001) εισήχθει στις θέσεις περιορισμού ApaI και SacII του pBLscKS-II πλασμιδιακού φορέα. Στη συνέχεια, το cDNA του ομόλογου γονιδίου του αρουραίου για την TAG-1 (rTAG-1) εισήχθει στις θέσεις SacII και EcoRV του προηγούμενου φορέα. Ακολούθησε μικροέγχυση της πλασμιδιακής κατασκευής που δημιουργήθηκε (plp-rTag-1) σε έναν από τους δύο προπυρήνες γονιμοποιημένων ωοκυττάρων προερχομένων από F2 C57BL/6 DBA/2 έμβρυα, τα οποία μεταφέρθηκαν σε ψευδοέγκυες. Τα ζώα που γεννήθηκαν ταυτοποιήθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για το διαγονίδιο. Τελικά, 5 διαγονιδιακά ζώα αποκτήθηκαν τα οποία μπορούσαν να περάσουν το διαγονίδιο στους απογόνους τους (ετεροζυγώτες για το διαγονίδιο). Για τη δημιουργία ζώων στα οποία απουσιάζει η έκφραση της αξονικής TAG-1 και εκφράζεται αποκλειστικά η πρωτεΐνη στα γλοιακά κύτταρα (Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-} ¹⁾), τα προηγούμενα διαγονιδιακά ετερόζυγα ζώα διασταυρώθηκαν για αρκετές γενειές με $Tag-1^{-/-}$ μύες.
- 4) Αρουραίους του στελέχους Sprague Dawley

ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ

<u>Απομόνωση Γενωμικού DNA από ιστούς</u>

Τμήμα της ουράς του ζώου αφαιρείται και χρησιμοποιείται για απομόνωση γενετικού υλικού και γονοτύπηση. Παράλληλα, δίνονται στα ζώα αριθμοί με βάση μία μέθοδο σήμανσης των άκρων. Στη συνέχεια:

- Η ουρά επωάζεται με 400μl διαλύματος λύσης (tail digestion buffer: 100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, pH8.0, 25 mM EDTA, pH8.0, 0.5% SDS) και 8 μl διαλύματος πρωτεϊνάσης K (20 mg/ml) στους 55 °C ώσπου να διαλυθεί
- 2. Προσθήκη RNAse (10 mg/ml) και επώαση στους 37 °C για 10'
- Προσθήκη 400μl φαινόλης και ήπια ανάδευση για 10' σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 400μl χλωροφορμίου και ήπια ανάδευση για 10' σε θερμοκρασία δωματίου
- 5. Φυγοκέντρηση για 5' στις 13000rpm στους 10°C και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα σωληνάρια
- Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου και ήπια ανάδευση για 10' σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρηση για 5' στις 13000rpm στους 10°C και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα σωληνάρια
- Προσθήκη 1/2 όγκου οξικού αμμώνιου (αρχικής συγκέντρωσης 10M) και 2 όγκων αιθανόλης. Έντονη ανακίνηση και φυγοκέντρηση για 10' στις 13000rpm στους 4°C.
- 9. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα του DNA αφήνεται να στεγνώσει
- 10. Επαναδιάλυση του DNA σε 150 μl ddH2O

<u>Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)</u>

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τα $Tag^{+/-}$ και $Tag^{-/-}$ ζώα, περιγράφονται από τους Fukamauchi et al, 2001, ενώ οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη γονοτύπηση των *plp* διαγονιδιακών ζώων παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία
PLP internal 7846 Forward	5'- AAGGAGACTGGAGAGACCAGG- 3'
rTAG-1 143 Reverse	5'- GAATCAACTGGAGACTCAGGC- 3'

Οι συνθήκες και τα προγράμματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τις PCR αντιδράσεις περιγράφονται παρακάτω:

Όνομα	Συνθήκες αντίδοασης	Πρόγραμμα
αντίδρασης	Δυνοηκές αντισμάσης	αντίδρασης
TAG-1	1 μl DNA, 2 μl 10xbuffer F511 (Finzymes), 50 ng	#67
	από τον κάθε εκκινητή, 0.2 mM dNTPs, 0.5%	1. 94°C, 3'
	DMSO, 1.2 u Taq polymerase (Minotech). O	2 . 94°C, 30"
	συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 20 μl	3 . 59°C, 30"
		4 . 72°C, 1'
		5. Repeat steps
		2-4 for 32 cycles
		6 . 72°C, 5'
		7 . 4°C
PLP	0.8 µl DNA, 2 µl 10xbuffer F511 (Finzymes), 50	#PLP62
	ng από τον κάθε εκκινητή, 0.2 mM dNTPs, 1.2 u	1. 94°C, 4'
	Taq polymerase (Minotech). Ο συνολικός όγκος	2 . 94°C, 30"
	της αντίδρασης είναι 20 μl	3 . 62°C, 40"
		4 . 72°C, 1'
		5. Repeat steps
		2-4 for 32 cycles
		6 . 72°C, 5'
		7 . 4°C
1		

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΙΣΤΩΝ ΓΙΑ ΚΡΥΟΤΟΜΕΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

Ενήλικοι μύες αναισθητοποιούνται αρχικά με ενδοπεριτοναΐκή έγχυση πεντοβαρβιτάλης (DOLETHAL) σε συγκέντρωση 140μg/gr ζώου. Ακολουθεί τομή στην περιοχή της κοιλιάς, ώστε να αποκαλυφθεί η καρδιά και τα εσωτερικά όργανα. Κατόπιν, με τη βοήθεια αντλίας σταθερής ροής εγχύεται ενδοκαρδιακά στην αριστερή κοιλία 10-20 ml 0.1M PBS (1xPBS) με σκοπό τον καθαρισμό των ιστών από το αίμα. Για την εκτόνωση της πίεσης, δημιουργείται μικρής διαμέτρου οπή στο δεξιό κόλπο. Ακολούθως, εγχύεται, με τη βοήθεια της αντλίας 25-30 ml μονιμοποιητικού διαλύματος 4% παραφορμαλδεΰδης σε 1xPBS. Όταν ολοκληρωθεί η έγχυση, αφαιρείται το κρανίο με τα ειδικά χειρουργικά εργαλεία και απομονώνεται ο εγκέφαλος. Ο ιστός τοποθετείται σε 5-10 ml 4% παραφορμαλδεΰδης σε 1xPBS στους 4°C για 12-18 ώρες. Ακολουθούν:

- 1. Πλύση με 1x PBS
- Επώαση του ιστού στους 4°C, σε διάλυμα 30% σουκρόζης σε 1x PBS έως ότου καταβυθιστεί, για κρυοπροστασία
- Έγκλειση του ιστού σε πήκτωμα 15% σουκρόζης και 7,5% ζελατίνης σε 1x PBS
- 4. Πάγωμα του ιστού σε ισοπεντάνιο, στους -45°C και φύλαξη στους -80°C, έως ότου κοπεί σε κρυοτόμο (LEICA) σε τομές πάχους 10μm. Οι τομές συλλέγονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και μπορούν να διατηρηθούν στους -20°C

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΣΕ ΤΟΜΕΣ ΚΡΥΟΤΟΜΟΥ ΑΠΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΜΥΩΝ

- 1. Δευτερογενής μονιμοποίηση των τομών σε ακετόν
η 100% για 10΄στους -20° $\rm C$
- 2. Πλύση των τομών σε 1xPBS, 3 x 5' σε θερμοκρασία δωματίου
- Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων με 5% Bovine Serum Albumin (BSA) σε 1x PBS (blocking solution) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
- Επώαση των τομών με πρωτοταγές αντίσωμα, αραιωμένο σε 5% BSA, 0.5% Triton X-100 σε 1x PBS (antibody solution), για 12-18 ώρες στους 4°C
- 5. Πλύση των τομών με 1x PBS, 3 x 5΄ σε θερμοκρασία δωματίου
- Επώαση των τομών με δευτεροταγές αντίσωμα αραιωμένο σε antibody solution, για 2 ώρες στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου
- 7. Πλύση των τομών με 1x PBS, 3 x 5'
- Επώαση με To-Pro3 iodide (invitrogen) σε αραίωση 1:1000 σε 1x PBS για 3΄ σε θερμοκρασία δωματίου, για τη σήμανση των πυρήνων
- 9. Πλύση των τομών με 1x PBS για 5΄ σε θερμοκρασία δωματίου

 Προσθήκη 60 μl του μέσου προστασίας του φθορισμού Mowiol (Calbiochem) και καλυπτρίδων

Μετά την παραπάνω διαδικασία οι τομές μπορούν να παρατηρηθούν άμεσα και να φωτογραφηθούν στο ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού (TS2 SP2;Leica) είτε να αποθηκευτούν στους 4 °C ή στους -20 °C και να φωτογραφηθούν κάποια άλλη στιγμή. *Για την ανοσοϊστοχημεία τομών ενήλικου εγκεφάλου με πολυκλωνικό αντίσωμα για την TAG-1, οι αντικειμενοφόροι επωάστηκαν αρχικά σε διάλυμα κιτρικού νατρίου 10 mM για 1' υπό βρασμό. Στη συνέχεια οι αντικειμενοφόροι στο παραπάνω διάλυμα αφήνονται να κρυώσουν και ακολουθούν 3 πλύσεις x10' σε 1xPBS. Έπειτα, εφαρμόζεται το πρωτόκολο που περιγράφηκε παραπάνω.

Тα	αντισώματα	που	χρησιμοποιήθηκαν	για	τα	πειράματα	ανοσοιστοχημείας	και
ανο	σοφθορισμού	σε κ	ύτταρα περιγράφοντ	αισ	τον	πίνακα που (ακολουθεί:	

Оνоμа	Πορέλευση	Τύπος	FECISICON	Αραίωση σε	
αντισώματος	προενεοοι	αντισώματος	LSEIOIKEUOI	ανοσοφθορισμό	
TG1	Traka et al.,	Πολυκλωνικό	Mouse, Rat,	1.1000	
(a-TAG1)	2002	(rabbit)	Human	1. 1000	
	Developmental				
1C12	Studies,	Μονοκλωνικό	Dat human	1.2000	
(a-TAG1)	Hybridoma	(IgG)	Kat, iluillall	1:2000	
	Bank				
Pan Nav (sodium	Sigma	Μονοκλωνικό	Mouse rat	1: 50	
channels)	Sigina	(mouse IgG)	Wiouse, Iat	1.00	
a-Nav1.2 (sodium		Πολυκλωνικό		1: 100	
channels subunit	Sigma	(rabbit)	Mouse, Rat		
1.2)		(100010)			
a- Nav1.6		Πολυκλωνικό			
(sodium channels	Alomone Labs	(rabbit)	Mouse, Rat	1:100	
subunit 1.6)		(100010)			
a-Kv1.1					
(potassium	Lingtoto	Μονοκλωνικό	Mouse Pot	1.500	
channels subunit	Opsiale	(mouse IgG)		1.500	
1.1)					

a- Kv1.1 (potassium channels subunit 1.1)	Alomone Labs	Πολυκλωνικό (rabbit)	Mouse, Rat	1:200
a- Kv1.2 (potassium channels subunit 1.2)	Alomone Labs	Πολυκλωνικό (rabbit)	Mouse, Rat	1:200
a-Caspr (paranodin)	Dr L.Goutebroze, INSERM 536, Paris, France	Dr L.Goutebroze, Πολυκλωνικό NSERM 536, (rabbit) Paris, France		1:800
a-Caspr (paranodin)	Dr E. Peles, Weizmann Μονοκλωνικό Institute of (mouse IgG) Mouse, Rat Science		1:1000	
a-Caspr2 Sigma		Πολυκλωνικό (rabbit)	Mouse, Rat	1:100
a-Caspr2	Dr L.Goutebroze, INSERM 536, Paris, France	Πολυκλωνικό (rabbit)	Mouse, Rat	1:800
a-Olig2 (oligodendrocytes marker)	Millipore	Πολυκλωνικό (rabbit)	Mouse, Rat	1:1000
a-NeuN (pan- neuronal marker)	Millipore	Mονοκλωνικό (mouse IgG)	Mouse, Rat	1: 400
Fluorochrome- labeled secondary antibodies Alexa 488 and 555	Invitrogen		Rabbit IgG (H+L)	1:800
Fluorochrome- labeled	eled Invitrogen		Mouse IgG (H+L)	1:800

secondaries		
antibody Alexa		
488 and 555		

ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΕΝΕΣ ΙΝΕΣ ΑΠΟ ΚΟΙΛΙΑΚΟ ΝΩΤΙΑΙΟ ΜΥΕΛΟ

Το τμήμα του νωτιαίου μυελού απομονώθηκε από την αυχενική μοίρα της σπονδυλικής στήλης ενήλικων ζώων, τα οποία είχαν προηγουμένως υποβληθεί σε ενδοκαρδιακή έγχυση 4% παραφορμαλδεΰδης σε 1xPBS. Το δείγμα επωάζεται σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεΰδης σε 1xPBS για 30' σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια ξεπλένεται και επωάζεται σε 1xPBS στους 4°C ώς την απομόνωση των ινών. Στη συνέχεια με προσεκτικούς χειρισμούς στο στερεοσκόπιο απομονώνονται οι δεσμίδες ινών που βρίσκονται στη λευκή ουσία του πρόσθιου κοιλιακού νωτιαίου μυελού και αποτελούν ίνες κινητικών νευρώνων που προέρχονται από τον εγκεφαλικό φλοιό. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε μικρό όγκο 1xPBS. Αυτές οι ίνες διαχωρίζονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και αφήνονται 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου για να στεγνώσουν. Στη συνέχεια υποβάλονται στο παρακάτω πρωτόκολο ανοσοφθορισμού:

- 11. Δευτερογενής μονιμοποίηση των τομών σε ακετόνη 100% για 10΄στους -20°
 C
- 12. Πλύση των τομών σε 1xPBS, 3 x 5΄ σε θερμοκρασία δωματίου
- Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων με 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 0.5% teleostean gelatin, και 0.1% Triton-X σε 1xPBS (blocking solution) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
- 14. Επώαση των ινών με πρωτοταγές αντίσωμα, αραιωμένο σε 1% FBS, 0.5% teleostean gelatin, and 0.1% Triton-X σε 1xPBS (antibody solution), για 12-18 ώρες στους 4° C
- 15. Πλύση των ινών με 1x PBS, 3 x 5΄ σε θερμοκρασία δωματίου
- Επώαση των ινών με δευτεροταγές αντίσωμα αραιωμένο σε antibody solution,
 για 2 ώρες στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου
- 17. Πλύση των τομών με 1x PBS, 3 x 5'
- Προσθήκη 60 μl του μέσου προστασίας του φθορισμού Mowiol (Calbiochem) και καλυπτρίδων

Μετά την παραπάνω διαδικασία οι ίνες μπορούν να παρατηρηθούν άμεσα και να φωτογραφηθούν στο ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού (TS2 SP2;Leica) είτε να αποθηκευτούν στους 4 °C ή στους -20 °C και να φωτογραφηθούν κάποια άλλη στιγμή.

ΛΥΣΗ ΙΣΤΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΤΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ

Η λύση του ιστού πραγματοποιείται με ομογενοποιητή και στη συνέχεια με τη χρήση υπερήχων. Το διάλυμα που χρησιμοποιείται για τη λύση και ομογενοποίηση παρατίθεται στη συνέχεια:

Pyranoside lysis buffer για την απελευθέρωση πρωτεϊνών που συνδέονται με τη μεμβράνη

85mM Tris-HCl pH 7.5 30mM NaCl 1mM EDTA 120mM glucose 1% Triton X-100 60mM octyl β-D glucopyranoside (SIGMA) 1mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, προστίθεται τελευταίο)

Μετά την ομογενοποίηση, το πρωτεϊνικό εκχύλισμα χρησιμοποιείται για ανοσοκατακρήμνιση ή για ανοσοαποτύπωση ή φυλάσσεται στους -20°C για μελλοντική χρήση

ANOΣOKATAKPHMNIΣH ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ (immunoprecipitation, IP)

1. Ομογενοποίηση του ιστού στον κατάλληλο όγκο lysis buffer (π.χ. για 1 εγκεφαλικό ημισφαίριο ενήλικου μυός χρησιμοποιούμε περίπου 1 ml lysis buffer). Όλα τα βήματα που ακολουθούν θα πρέπει να πραγματοποιούνται στους 4°C

2. Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 30' στους 4°C

 Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε ένα καθαρό σωληνάριο 1.5 ml (επανάληψη του προηγούμενου βήματος αν το εκχύλισμα δεν είναι διαυγές)

4. Πλύση 20 μl protein G sepharose beads (GE Healthcare) 3 φορές με wash buffer

5. Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα επωάζεται με τα beads για 1-2 ώρες στους 4°C υπό ανάδευση (preclearance step), ώστε να απομακρυνθεί οτιδήποτε μη ειδικό αλληλεπιδρά με τα beads

6. Φυγοκέντρηση για 1' στις 4000 rpm και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε ένα καθαρό σωληνάριο (φυλάσσουμε τα beads εάν θέλουμε να ελέγξουμε εάν πιάνουν μη ειδικά την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει)

7. Προσθήκη 1 μg αντισώματος στο καθαρό πρωτεϊνικό εκχύλισμα (εξαρτάται από το αντίσωμα) για κάθε 100 μg πρωτεΐνης και επώαση στους 4°C υπό ανάδευση όλη τη νύχτα (overnight, O/N)

8. Το επόμενο πρωί πλένονται 20 μl beads 3 φορές με wash buffer και σε αυτά προστίθεται το εκχύλισμα με το αντίσωμα που ήταν στους 4°C O/N

9. Τα beads επωάζονται με το αντίσωμα και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα στους 4°C για
 1-2 hrs, υπό ανάδευση

10. Φυγοκέντρηση για 1' στις 4000 rpm. Το υπερκείμενο αφαιρείται και τα beads πλένονται 3 φορές με wash buffer

 11. Μετά το τελευταίο πλύσιμο το υγρό αφαιρείται από τα beads, προστίθεται sample buffer και 0,1 M DTT, το δείγμα βράζεται για 5' και είναι έτοιμο για διαχωρισμό σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ανοσοαποτύπωση

WASH BUFFER (για τα πλυσίματα):

5mM Tris-HCl pH 8.0 1% Triton X-100 50mM NaCl 2.5mM CaCl₂ 2.5mM MgCl

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ (WESTERN BLOT ANALYSIS)

Ποσοτικοποίηση και προετοιμασία πρωτεϊνικών δειγμάτων από ιστό:

Μετά την ομογενοποίηση, 1 μl από το πρωτεϊνικό εκχύλισμα χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση των συνολικών πρωτεϊνών στο δείγμα με τη μέθοδο Bradford ως εξής:

 Σε σωληνάρια όγκου 1,5 ml προστίθενται 799 μl ddH₂O και 1 μl από το πρωτεϊνικό εκχύλισμα, ώστε ο συνολικός όγκος να είναι 800 μl (σε περίπτωση μη ανιχνεύσιμης ποσότητας πρωτεΐνης, μπορόυμε να αυξήσουμε τον όγκο του δείγματος, μειώνοντας αναλογικά τον όγκο του ddH₂O)

2. Στη συνέχεια προστίθεται 200 μl από τη χρωστική Bradford (Biorad) και αναμιγνύουμε ισχυρά (vortex)

3. Τα δείγματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου 15'

4. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του δείγματος στα 595 nm

5. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται με βάση μία πρότυπη καμπύλη η οποία προκύπτει από την αντιστοίχηση γνωστών ποσοτήτων BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma) στο x άξονα με τις τιμές της οπτικής πυκνότητας τους στα 595 nm στο y άξονα

6. Μετά τον υπολογισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης στο δείγμα, η επιθυμητή ποσότητα μεταφέρεται σε ένα νέο σωληνάριο (το υπόλοιπο φυλάσσεται στους -20°C) και προστίθεται ίσος όγκος 2x Sample buffer καθώς και DTT (Dithiothreitol) σε τελική συγκέντρωση 100 mM

 Το δείγμα βράζεται για 5'στους 95°C και μετά από μία γρήγορη φυγοκέντρηση είναι έτοιμο για μοριακό διαχωρισμό σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Μοριακός διαχωρισμός των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS PAGE)

1. Προετοιμασία του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης και τοποθετησή του στη συσκευή σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας (Biorad)

 Προσθήκη 1 Lt από το 1x running buffer (γεμίζουμε όλο τον ενδιάμεσο των πηκτωμάτων χώρο και το μισό από τον χώρο που βρίσκεται γύρω από αυτά)

3. Φόρτωμα των δειγμάτων στα πηγάδια (wells)

4. Ρύθμιση της συσκευής ηλεκτροφόρησης στα 80V για όσο χρόνο τα δείγματα βρίσκονται στο πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel) (περίπου 30 min) και στη συνέχεια στα 100V μέχρι να φύγει η χρωστική από το πήκτωμα (σχεδόν 2 hrs)

Μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

 Ετοιμάζεται 1x transfer buffer περίπου 1 ώρα πριν τη χρήση και τοποθετείται στους 4°C

52

2. 1 κομμάτι μεμβράνης νιτροκυτταρίνης και 6 κομμάτια χαρτιού whattman κόβονται στις διαστάσεις του πηκτώματος

3. Το running buffer απομακρύνεται από τη συσκευή και απομονώνεται το πήκτωμα

4. Το τμήμα που αντιστοιχεί στο stacking gel απομακρύνεται και κρατάμε το τμήμα που αντιστοιχεί στο separating gel (πήκτωμα διαχωρισμού)

5. Τα χαρτιά whattman, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης καθώς και τα ειδικά σφουγγαράκια εμποτίζονται σε 1x transfer buffer

6. Πρώτα τοποθετείται το σφουγγάρι (στη μαύρη πλευρά της θήκης του sandwich), ενώ ακολουθούν με τη σειρά 3 whattman χαρτιά, το πήκτωμα, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, 3 whattman χαρτιά και ένα ακόμα σφουγγαράκι δημιουργώντας έτσι ένα sandwich

 Χρησιμοποιείται μια γυάλινη πιππέτα pasteur για να απομακρυνθούν οι φυσαλίδες αέρα που πιθανώς έχουν εγκλωβιστεί

 To sandwich ασφαλίζεται και τοποθετείται στη συσκευή, με τη μαύρη πλευρά της θήκης του sandwich στην μαύρη πλευρά της συσκευής

9. Η συσκευή γεμίζεται με κρύο transfer buffer και τοποθετείται πάγος γύρω από αυτή

 Η συσκευή της ηλεκτροφόρησης ρυθμίζεται στα 310 mA για 1 ώρα ώστε να μεταφερθούν οι πρωτεΐνες από το πήκτωμα στη μεμβράνη

<u>Ανοσοαποτύπωση</u>

 Η μεμβράνη απομακρύνεται από το sandwich και επωάζεται σε PBSMT (0.1% PBST με 5% γάλα) για 1 ώρα υπό ανακίνηση

0.1% PBST (500 ml):

500 ml 1xPBS500 μl Tween 100% (τελική συγκέντρωση 0.1%)

 Η μεμβράνη επωάζεται με το πρώτο αντίσωμα κατάλληλα αραιωμένο σε PBSMT Ο/Ν στους 4°C

3. Την επομένη, το αντίσωμα απομακρύνεται

4. Πλύση 3x με 0.1% PBST για 15'

53

5. Επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα (συνδεδεμένο με υπεροξειδάση) στην κατάλληλη συγκέντρωση σε PBSMT, για 1 ώρα υπό ανακίνηση

- 6. Πλύση 3x με 0.1% PBST για 15'
- 7. Η μεμβράνη στεγνώνεται ακουμπώντας την σε ένα κομμάτι whattman χαρτί

8. Η μεμβράνη επωάζεται με υπόστρωμα της υπεροξειδάσης για την αντίδραση χημειοφωταύγειας (PIERCE) για 1', στεγνώνεται και ακολουθεί έκθεσή της σε φωτογραφικό φιλμ ώστε να εμφανιστούν οι ειδικές ζώνες

10x RUNNING-TRANSFER BUFFER (1 Lt):

900 ml 10x Tris-Glycine 100 ml SDS 10%

(Fig 1 Lt 1x RUNNING BUFFER: 100 ml 10x RUNNING-TRANSFER BUFFER kai 900 ml ddH₂O. Fig 1 Lt 1x TRANSFER BUFFER: 100 ml 10x RUNNING-TRANSFER BUFFER, 200 ml $\mu\epsilon\theta$ avól η 100% kai 700 ml ddH₂O)

10x Tris-Glycine (1 Lt, pH 8.3):

30.2 gr Tris-base188 gr glycine

2x Sample Buffer:

100 mM Tris-Cl pH 6.8 4% SDS 0.2% bromophenol blue 20% glycerol

Προετοιμασία πηκτώματος πολυακρυλαμίδης

separating gel (πήκτωμα διαχωρισμού. Η περιεκτικότητα του σε ακρυλαμίδη μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την πρωτεΐνη- στόχο)
Για 5 ml separating gel (1 μικρό πήκτωμα πάχους 0,75 mm) με σύσταση 7.5%:
2.5 ml dH2O
1.25 ml 30% acrylamide
1.25 separating gel buffer (1.5 M Tris-Cl pH 8.8 + 0.4% SDS)

50 µl 10% APS (ammonium persulfate)

2.5 µl TEMED (N,N,N',N'- tetramethylethylenediamine, MERCK)

stacking gel (πήκτωμα πακεταρίσματος. Η περιεκτικότητα του σε ακρυλαμίδη είναι σταθερή: 4)

Για την προετοιμασία 3 ml (1 μικρό πήκτωμα πάχους 0,75 mm):

1.8 ml dH2O

- 450 μl 30% acrylamide
- 750 µl stacking gel buffer (1 M Tris-Cl pH 6.8 + 0.4%SDS)

 $30 \; \mu l \; 10\% \; APS$

 $3 \; \mu l \; TEMED$

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοκατακρήμνιση και ανοσοαποτύπωση κατά Western περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Όνομα	Πορέλευση	Τύπος	Freisucenan	Αραίωση	Αραίωση
αντισώματος	προενεροιί	αντισώματος	ESSIGIRSUOI	σε WB	σε ΙΡ
TG2	Traka et	Πολυκλωνικό	Mouse, Rat,	1.4000	5 µ1/ IP
(a-TAG1)	al., 2002	(rabbit)	Human	1.4000	5 μι/ Π
TG3	Traka et	Πολυκλωνικό	Mouse, Rat,	1.4000	5 µ1/ IP
(a-TAG1)	al., 2002	(rabbit)	Human	1.4000	5 μι/ 11
1C12 (a-TAG1)	Developm ental Studies, Hybridom a Bank	Μονοκλωνικό (IgG)	Rat, human	-	1.2 μl/IP
a-actin	Chemicon	Mονοκλωνικό (mouse IgG)	Mouse, rat, human	1: 4000	-
a-β actin	Sigma- Aldrich	Mονοκλωνικό (mouse IgG)	Mouse, rat, human	1: 4000	-
a- Kv1.1 (potassium channels	Upstate	Μονοκλωνικό (mouse IgG)	Mouse, Rat	1:1000	-

subunit 1.1)					
a- Kv1.2					
(potassium	Alomone	Πολυκλωνικό	Mouse Rat	1.1000	
channels	Labs	(rabbit)	Wiouse, Rat	1.1000	-
subunit 1.2)					
	Dr				
	L.Goutebr				
a-Caspr	oze,	Πολυκλωνικό	Mouso Pot	1.2000	
(paranodin)	INSERM	(rabbit)	Mouse, Rai	1.3000	-
	536, Paris,				
	France				
	Dr				
	L.Goutebr			1:3000	
a-Caspr2	oze,	Πολυκλωνικό	Mouse, Rat		
	INSERM	(rabbit)			-
	536, Paris,				
	France				
SMI-31	Sternberge				
(phosphorylat	r	Mouor) courcó			
ed	Monoclon		Mouse, Rat	1:1000	-
Neurofilament	al	(mouse igo)			
s H+L)	Antibodies				
Goot a rabbit	Boehringer				
	Mannheim		Rabbit IgG	1:5000	
HRP- conjugated	Biochemic		(H+L)		
	als				
Goat a-mouse IgG HRP- conjugated	Boehringer				
	Mannheim		Mouse IgG (H+L)	1:4000	
	Biochemic				
	als				

ΕΝΔΟΚΑΡΔΙΑΚΗ ΕΓΧΥΣΗ 2.5% ΓΛΟΥΤΕΡΑΛΔΕΫΔΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΣΤΟΥ ΚΑΙ ΤΟΜΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

ενδοπεριτοναΐκή Ενήλικοι μύες αναισθητοποιούνται αρχικά με έγχυση πεντοβαρβιτάλης (DOLETHAL) σε συγκέντρωση 140µg/gr ζώου. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται τομή στην περιοχή της κοιλιάς, ώστε να αποκαλυφθεί η καρδιά και τα εσωτερικά όργανα. Κατόπιν, με τη βοήθεια αντλίας σταθερής ροής εγχύουμε ενδοκαρδιακά στην αριστερή κοιλία 10-20 ml 1xPBS με σκοπό τον καθαρισμό των ιστών από το αίμα. Για την εκτόνωση της πίεσης, δημιουργούμε μικρής διαμέτρου οπή στο δεξιό κόλπο. Ακολούθως, εγχύουμε, με τη βοήθεια της αντλίας 25-30 ml μονιμοποιητικού διαλύματος 2.5% γλουτεραλδεΰδη σε 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.3. Όταν ολοκληρωθεί η έγχυση, αφαιρείται το κρανίο με τα ειδικά χειρουργικά εργαλεία και απομονώνεται το οπτικό νεύρο, από τα μάτια έως το οπτικό χίασμα. Τέλος, το οπτικό νεύρο τοποθετείται σε 5-10 ml 2.5% γλουτεραλδεΰδης σε 0.1 M PB, pH 7.3 στους 4°C O/N ή για 4 τουλάχιστον ώρες. Ακολουθούν:

- Πλύσιμο 3x 0.1M PB, pH 7.3 για 15'. Από το επόμενο στάδιο και στο εξής τα δείγματα μεταφέρονται σε ειδικά πλαστικά σωληνάρια με καπάκι
- Επώαση του ιστού σε 1 ml διαλύματος 1% Osmium Tetroxide σε 0.1 M PB, pH 7.3 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση (post-fixation)
- 3. Πλύση με dH₂O για 30 (αλλάζουμε τα καπάκια τα οποία έγιναν καφέ έπειτα από την προηγούμενη επώαση)
- 4. Επώαση σε διάλυμα αιθανόλης 50% για 5'
- 5. Επώαση σε διάλυμα αιθανόλης 50% για 15'
- 6. Επώαση σε διάλυμα αιθανόλης 70% για 15'
- 7. Επώαση σε διάλυμα αιθανόλης 90% για 15'
- 8. Επώαση σε διάλυμα αιθανόλης 95% για 15'
- 9. Επώαση σε αιθανόλη 100% για 20'
- 10. Επανάληψη του προηγούμενου βήματος
- 11. Επανάληψη του προηγούμενου βήματος
- 12. Επώαση σε οξίδιο του προπυλενίου (propylene oxide, P.O.) για 10'
- 13. Επανάληψη του προγούμενου βήματος
- 14. Επώαση σε 1 ml διαλύματος P.O./ρητίνης (epoxy resin, Durcupan, ACM Fluka, Sigma-Aldrich) σε αναλογία 1/1 για 1 ώρα
- 15. Επώαση σε 1 ml διαλύματος P.O./ρητίνης σε αναλογία 1/3 για 1 ώρα

- 16. Επώαση σε 1 ml διαλύματος καθαρής ρητίνης για 1 ώρα
- 17. Μεταφορά του δείγματος με πινέλο και τοποθέτηση του με τον κατάλληλο προσανατολισμό σε ειδικό καλούπι (στο καλούπι υπάρχει ήδη ένα στρώμα πολυμερισμένης ρητίνης). Συμπληρώνουμε με ρητίνη το καλούπι να γεμίσει και το τοποθετούμε σε ένα φούρνο στους 60°C ώσπου να πολυμεριστεί και να γίνει συμπαγές
- 18. Αφαιρούμε το δείγμα από το καλούπι και ακολουθεί επεξεργασία για την απόκτηση τομών 70 nm σε ειδικό μικροτόμο (ultramicrotome, Leica EM UC7, Germany). Οι τομές τοποθετούνται σε πλέγμα (grid) ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, το οποίο έχει διάμετρο 3mm και είναι συνήθως κατασκευασμένο από χαλκό
- 19. Για να δημιουργηθεί η απαιτούμενη αντίθεση (contrast), χρησιμοποιείται ένα διάλυμα κιτρικού μόλυβδου που δεσμεύεται εκλεκτικά από τα διάφορα συστατικά του κυττάρου, με αποτέλεσμα τη διαφορική σκέδαση των ηλεκτρονίων και το σχηματισμό της εικόνας. Το grid εμποτίζεται στο διάλυμα μολύβδου για 2' και ακολουθούν 3 γρήγορες πλύσεις με dH₂O. Το δείγμα αφυδατώνεται και είναι έτοιμο για παρατήρηση και φωτογράφηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διελεύσεως (Transmission Electron Microscope, JEOL 100C, Tokyo, Japan)
- 20. Οι μετρήσεις για το g ratio (διάμετρος του άξονα/ διάμετρος του άξονα συμπεριλαμβανομένου του στρώματος μυελίνης) πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα Image J. Η στατιστική ανάλυση (Unpaired Student's t test) και ο σχεδιασμός των διαγραμμάτων έγιναν με το πρόγραμμα GraphPad Prism 4.0. Για το g ratio και την κατανομή των αξόνων του οπτικού νεύρου 13 μύες χρησιμοποιήθηκαν: 3 αγρίου τύπου, 2 $Tag-1^{+/-}$, 4 $Tag-1^{-/-}$ και 4 $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$. Για το g ratio >100 άξονες μετρήθηκαν για κάθε ζώο, ενώ για την κατανομή των αξόνων.

0.1 M PB (4 Lt):

470 ml 0.2 M sodium dihydrogen phosphate monobasic ($Na_2H_2PO_4H_2O$) 1530 ml 0.2 M sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) Adjust pH to 7.2 ±0.05 using solution A or B Fill with dH₂O to 4 Lt

Lead Citrate solution (5 ml):

4.6 ml nano-pure H₂O
0.133 gr PB(II)NO₃
0.176 gr Na₂HC₆H₅O₇
0.4 ml 2N NaOH
Filtration with 0.2 μm filter
Note: Avoid contact with air! Don't use if the solution is not clear!

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Για τη συγκεκριμένη διατριβή χρησιμοποιήθηκε η σειρά προσκολλώμενων ευκαρυωτικών κυττάρων HEK293T (Human Embryonic Kidney). Για την καλλιέργεια αυτών των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, SIGMA) με 10% ορό εμβρύου μοσχαριού (Fetal Calf Serum, FCS, GIBCO), 100units/ml πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (GIBCO) και 1x Glutamax (100x GIBCO). Η επώαση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε ειδικό κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία 37°C και 5%CO₂. Όταν τα κύτταρα κάλυπταν το 80% της επιφάνειας της φλάσκας ή του τρυβλίου,

ακολουθούσε διαχωρισμός τους σε περισσότερες φλάσκες/τρυβλία, ως εξής:

- 1. Το θρεπτικό μέσο που καλύπτει τα κύτταρα απομακρύνεται
- 2. Προστίθεται αποστειρωμένο διάλυμα 0.25% τρυψίνης, 1mM EDTA σε 1xPBS αρκετό ώστε να καλύψει την επιφάνεια της καλλιέργειας (~1.5ml σε φλάσκα 25cm²) και επωάζεται για 3' στους 37°C. Η τρυψίνη βοηθάει τα κύτταρα να ξεκολλήσουν από το πάτο αλλά και μεταξύ τους, καθώς τα συσσωματώματα παρεμποδίζουν τη διαμόλυνση
- Προστίθεται θρεπτικό μέσο με FCS για να απενεργοποιηθεί η τρυψίνη (~διπλάσιος όγκος από τον όγκο της τρυψίνης) και τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωληνάρια και φυγοκεντρούνται για 5' στις 1200rpm
- Το υπερκείμενο μέσο απομακρύνεται και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού μέσου
- Η τελική ποσότητα των κυττάρων διαμοιράζεται σε νέες φλάσκες/τρυβλία στα οποία προστίθεται επιπλέον θρεπτικό μέσο (~5ml τελικού όγκου σε φλάσκες 25mm²).

ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΗΕΚ293Τ

Η διαμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων της σειράς ΗΕΚ293Τ πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του κατιονικού λιπιδίου λιποφεκταμίνης που εξασφαλίζει υψηλή απόδοση μετασχηματισμού πλασμιδίων σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Για το διαμόλυνση ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας της λιποφεκταμίνης (Invitrogen). Συνοπτικά:

- 24 ώρες πριν τη διαμόλυνση καλλιεργούνται 1x10⁶ κύτταρα σε 35x10 mm τρυβλία με 2 ml θρεπτικού μέσου
- Την επόμενη ημέρα αφαιρείται όλο το υπερκείμενο και προστίθεται 1.5 ml φρέσκο θρεπτικό μέσο
- Σε ένα σωληνάριο 1.5 ml διαλύονται 2 μg DNA (cDNA γνωστού γονιδίου σε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης) σε 250 μl θρεπτικού μέσου Optimem I με Glutamax I (GIBCO) και ανακινούνται
- 4. Σε ένα άλλο σωληνάριο 1.5 ml διαλύονται 6 μl λιποφεκταμίνη σε 250 μl θρεπτικού μέσου Optimem I με Glutamax I, ανακινούνται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5'
- Το περιεχόμενο των δύο σωληναρίων αναμιγνύεται και το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20'
- Το παραπάνω μείγμα προστίθεται στο τρυβλίο με τα ΗΕΚ293Τ κύτταρα προς διαμόλυνση και το τρυβλίο ανακινείται με ήπιες οριζόντιες κινήσεις
- 7. Τα κύτταρα καλλιεργούνται στους 37°C/ 5% CO₂ για 24 ώρες (σε αυτή τη χρονική στιγμή έχουν ελεγχθεί και εκφράζουν την πρωτεΐνη υπό έκφραση). Στη συνέχεια τα κύτταρα φυγοκεντρούνται και το ίζημα ομογενοποιείται σε διάλυμα λύσης: 5mM Tris-HCl pH 8.0, 2% NP-40 (octylphenol ethylene oxide, LKB Promma), 50mM NaCl, 2.5mM CaCl₂, 2.5mM MgCl₂, 1mM PMSF για την απελευθέρωση των πρωτεϊνών και το διαχωρισμό τους σε SDS-PAGE. Εναλλακτικά, τα κύτταρα συλλέγονται σε φρέσκο θρεπτικό, διαχωρίζονται με την πιπέτα και τοποθετούνται σε τρυβλίο στο οποίο βρίσκονται προσκολλημένα κύτταρα (σε πυκνότητα περίπου 40%) που εκφράζουν μία δεύτερη πρωτεΐνη και από τα οποία έχει αφαιρεθεί το υπερκέιμενο μέσο. Η δέυτερη μέθοδος εφαρμόστηκε για την ανίχνευση

αλληλεπίδρασης δύο πρωτεϊνών που εντοπίζονται σε μεμβράνες διαφορετικών κυττάρων (αλληλεπίδραση *in trans*).

Για τη διαμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν 2 πλασμιδιακές κατασκευές. Η πρώτη οδηγεί την έκφραση της πρωτεΐνης Caspr2 του ανθρώπου (#330, human *Caspr2* in pcDNA3), ενώ η δέυτερη κατασκευή οδηγεί την έκφραση του ομολόγου της TAG-1 του αρουραίου (#393, rat *Tag-1* in pcDNA3).

Η παραγωγή σε μεσαία κλίμακα των παραπάνω κατασκευών έγινε χρησιμοποιώντας το kit της εταιρείας Macherey-Nagel (nucleobond) σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού σε κύτταρα για την ανίχνευση των πρωτεϊνών Caspr2 και TAG-1. Η πρώτη είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη και το αντίσωμα που χρησιμοποιούμε αναγνωρίζει το κυτταροπλασματικό τμήμα της, ενώ η TAG-1 συνδέεται στην εξωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης μέσω μίας ομάδας γλυκοφωσφατιδυλινοσιτόλης.

- Απομάκρυνση των κυττάρων από τον επωαστήρα και πλύση με αποστειρωμένο 1x PBS
- Προσθήκη πρωτοταγούς αντισώματος (1c12) αραιωμένου σε 1%BSA σε 1x PBS για 30' σε θερμοκρασία δωματίου
- 3. Πλύση των κυττάρων με 1x PBS, 2 x 30" σε θερμοκρασία δωματίου
- Επώαση με το κατάλληλο δευτεροταγές αντίσωμα (a-mouse Alexa 488) αραιωμένο σε 1%BSA σε 1x PBS για 30' σε θερμοκρασία δωματίου
- 5. Μονιμοποίηση των κυττάρων με 4%PFA για 20' σε θερμοκρασία δωματίου
- 6. Επώαση με 0.02% Triton X-100 για 5' σε θερμοκρασία δωματίου. Ο χειρσιμός αυτός πραγματοποιείται για την αύξηση της διαπερατότητας των κυττάρων στο αντίσωμα για την Caspr2
- Προσθήκη πρωτοταγούς αντισώματος (a-Caspr2) αραιωμένου σε 1%BSA σε 1x PBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
- 8. Πλύση των κυττάρων με 1x PBS, 2 x 30" σε θερμοκρασία δωματίου
- Επώαση με το δευτεροταγές αντίσωμα (a-mouse Alexa 555) αραιωμένο σε 1%BSA σε 1x PBS για 30' σε θερμοκρασία δωματίου

- 10. Πλύση των κυττάρων με 1x PBS
- Επώαση με To-Pro3 iodide (invitrogen) σε αραίωση 1:1000 σε 1x PBS για 1΄ σε θερμοκρασία δωματίου, για τη σήμανση των πυρήνων
- 12. Πλύση των κυττάρων με 1x PBS
- Προσθήκη κατάλληλου όγκου του μέσου προστασίας του φθορισμού Mowiol (Calbiochem) σε αντικειμενοφόρο και τοποθέτηση της καλυπτρίδας με τα κύτταρα πάνω σε αυτήν

Μετά την παραπάνω διαδικασία τα κύτταρα μπορούν να παρατηρηθούν άμεσα και να φωτογραφηθούν στο ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού (TS2 SP2;Leica) είτε να αποθηκευτούν στους 4 °C ή στους -20 °C και να φωτογραφηθούν κάποια άλλη στιγμή

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΛΕΠΙΔΟΠΤΕΡΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΑG-1 ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

Για την έκφραση της πρωτεΐνης TAG-1 σε μεγάλες ποσότητες στο υπερκείμενο μέσο χρησιμοποιήσαμε μία κυτταρική σειρά από έμβρυα του λεπιδόπτερου *Trichoplusia ni* που εντοπίζεται στο λάχανο. Η κυτταρική αυτή σειρά ονομάζεται BTI-Tv-5B1-4 (ή High Five TM) και είναι ιδανική για την έκφραση πρωτεϊνών. Η πλασμιδιακή κατασκευή για την έκφραση του cDNA της TAG-1 είχε δημιουργηθεί στο εργαστήριο (rTAG-1 στον πλασμιδιακό φορέα pIE1/153A, ο οποίος εέχει τροποποιηθεί και περιέχει τον επίτοπο Xa-Myc-6xHis) και εστάλει στο εργαστήριο του Δρ Κ. Ιατρού (Ινστιτούτο Βιολογίας, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ, Αθήνα) για την παραγωγή της κυτταρικής σειράς που εκφράζει σταθερά την πρωτεΐνη TAG-1 ως χίμαιρα με 6 κατάλοιπα ιστιδίνης.

Για την καλλιέργεια των κυττάρων High Five ^{TAG-1} χρησιμοποιείται το θρεπτικό μέσο ESF-AF από την Expression Systems. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε επωαστήρες στους 28°C, χωρίς να είναι απαραίτητη η παροχή CO₂.

Για απλή συντήρηση των κυττάρων:

- Χρησιμοποιούνται φλάσκες 25 cm²
- Προσθήκη στο θρεπτικό μέσο αντιβιοτικού ευρείας χρήσης (gentamycin, σε τελική συγκέντρωση 50µg/ml) καθώς και ένα αντιβιοτικό εκλογής (puromycin, σε τελική συγκεντρωση 10µg/ml)

 Καλλιεργούνται 10⁶ κύτταρα/ φλάσκα και η καλλιέργεια ανανεώνεται κάθε 7 ημέρες με αραίωση των κυττάρων 1/10

Για την παραγωγή πρωτεΐνης σε μεσαία κλίμακα:

- Χρησιμοποιούνται φλάσκες 75 cm²
- Δεν χρησιμοποιείται αντιβιοτικό εκλογής παρά μόνο το αντιβιοτικό ευρείας
 χρήσης

Ξεκινώντας μία καλλιέργεια με 3x10⁶ κύτταρα/ φλάσκα, την αφήνουμε να αναπτυχθεί για 10 ημέρες στους 28°C

Το υπερκείμενο θρεπτικό απομακρύνεται και φυγοκεντρείται στα 200g για 5'
 ώστε να απομακρυνθούν κυτταρικά υπολλείματα

Στη συνέχεια το υπερκείμενο μέσο που περιέχει την υπο καθαρισμό πρωτεΐνη μεταφέρεται σε dialysis tubing membrane (12-14 kDa από Medicell) η οποία ασφαλίζεται με τα ειδικά κλιπ, δημιουργώντας μία κατασκευή που μοιάζει με καραμέλα

 Τοποθετούμε την «καραμέλα» σε 100πλάσιο όγκο διαλύματος 1xLew, pH 8.0
 για εξισσορόπηση. Για την παρασκευή 1 Lt 1xLew buffer διαλύουμε 6.9 gr NaH₂PO₄·H2O και 17.5gr NaCl σε dH₂O

• Μετά την εξισσορόπηση του διαλύματος που περιέχει την πρωτεΐνη, ακολουθεί καθαρισμός της με τη χρήση Protino Ni-IDA packed columns της εταιρείας Macherey Nagel. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας

 Τέλος, μία ποσότητα της καθαρισμένης πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε για μοριακό διαχωρισμό σε ένα gel ακρυλαμίδης 7.5% και ακολούθησε χρώση με το Colloidal Blue Staining Kit (Invitrogen) που επιβεβαίωσε την καθαρότητα της

ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η συμπεριφορική ανάλυση των *Tag-1^{-/-}* και *Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)}* μυών πραγματοποιήθηκε εξ'ολοκλήρου στο εργαστήριο Βιολογίας-Βιοχημείας της καθ. Φωτεινής Στυλιανοπούλου (Τμήμα Νοσηλευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών) από τους Αντώνη Σταματάκη και Θεοφάνη Παναγιωταρόπουλο (Savvaki, Panagiotaropoulos et al., 2008, Savvaki et al., 2010). 40 αρσενικοί ενήλικοι μύες (2-3 μηνών)

χρησιμοποιήθηκαν συνολικά για τα συμπεριφορικά πειράματα. 16 από αυτά ήταν αγρίου τύπου, 16 ήταν *Tag-1^{-/-}* και 8 ήταν διαγονιδιακά *Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)}*. Οι παραπάνω μύες υποβλήθηκαν και εκτέλεσαν με επιτυχία μία σειρά συμπεριφορικών δοκιμασιών: υδάτινος λαβύρινθος κατά Morris (Morris water maze), δοκιμασία αναγνώρισης καινοφανούς αντικειμένου (novel object recognition), δοκιμασία εξερεύνησης ανοιχτού πεδίου (open field exploration) και αυθόρμητης κινητικότητας (spontaneous locomotor activity), δοκιμασία περιστρεφόμενου τυμπάνου (rota-rod) και ανάλυση αποτυπωμάτων άκρων (footprint analysis).

Υδάτινος λαβύρινθος κατά Morris (Morris Water Maze, MWM): Ο υδάτινος λαβύρινθος κατά Morris, αποτελείται από μια κυκλική δεξαμενή (διαμέτρου 80 cm) η οποία γεμίζει με νερό (στους 24±1°C) στο οποίο προστίθεται γάλα για να μειωθεί η ορατότητα. Στο πρώτο μέρος του πειράματος (cued version) τα ζώα υποβάλλονται σε μία περίοδο μάθησης που διαρκεί 3 ημέρες και κατά την οποία οι μύες εκπαιδεύονται να εντοπίσουν μια διάφανη κινητή πλατφόρμα (8cmx 10cm) που βρίσκεται 1 εκατοστό κάτω από την επιφάνεια του νερού και έχει σημανθεί με μία μαύρη σημαία. Κάθε πειραματόζωο υποβαλλόταν καθημερινά σε τέσσερις συνεχόμενες δοκιμασίες (μέγιστης διάρκειας 60" με διαλλείμματα 15'). Σε κάθε μια δοκιμασία το πειραματόζωο απελευθερωνόταν μέσα στον υδάτινο λαβύρινθο από μια καινούρια θέση. Στο τέλος της κάθε δοκιμασίας, οι μύες αφήνονταν στην πλατφόρμα για 20".

Στη δεύτερη φάση του πειράματος (<u>hidden version</u>), τα ζώα δοκιμάστηκαν όπως στην πρώτη φάση με κάποιες τροποποιήσεις: η διαφανής πλατφόρμα δεν ήταν σημασμένη και το πρωτόκολλο που ακολούθησε αποτελούνταν από μία φάση προσαρμογής και τη φάση ελέγχου της μακροπρόθεσμης χωρικής μνήμης. Κατά τη φάση της προσαρμογής, οι μύες εκπαιδεύονταν να εντοπίζουν την κρυμμένη πλατφόρμα (που βρισκόταν σε σταθερό σημείο σε σχέση με εξωγενή ερεθίσματα). Κάθε πειραματόζωο υποβαλλόταν καθημερινά για τέσσερις ημέρες σε τέσσερις συνεχόμενες δοκιμασίες διάρκειας 60" (με διαλλείμματα 15'). Σε κάθε μια δοκιμασία το πειραματόζωο απελευθερωνόταν μέσα στον υδάτινο λαβύρινθο από μια καινούρια θέση. Στο τέλος της κάθε δοκιμασίας, τα ζώα αφήνονταν στην πλατφόρμα για 20". Για τον έλεγχο της χωρικής μνήμης, πραγματοποιούνταν μία δοκιμασία 24 ώρες μετά το τέλος της φάσης προσαρμογής. Ο έλεγχος πραγματοποιείται μέσω μίας και μοναδικής δοκιμασίας 60" για το κάθε ζώο, κατά τη διάρκεια της οποίας η πλατφόρμα έχει αφαιρεθεί (το σημείο εκκίνησης είναι απέναντι από το τεταρτημόριο

64

όπου βρίσκονταν η πλατφόρμα κατά τη φάση προσαρμογής). Η προτίμηση του πειραματόζωου για το τεταρτημόριο στο οποίο βρισκόταν η πλατφόρμα κατά την εκπαίδευση αποτελεί το μέτρο που υποδεικνύει την παγίωση και την ικανότητα ανάκλησης της μνήμης. Η καταγραφή των συμπεριφορικών δεδομένων έγινε με το σύστημα ανάλυσης συμπεριφοράς Ethovision Noldus[®] 3.0, το οποίο δίνει τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης δεδομένων, όπως η ταχύτητα κίνησης του πειραματόζωου και η διανυόμενη απόσταση κατά τη διάρκεια μιας συμπεριφορικής δοκιμασίας. Οι παράμετροι της συμπεριφοράς που καταγράφονταν για κάθε δοκιμασία ήταν ο χρόνος εύρεσης της πλατφόρμας (latency) καθώς και η ταχύτητα του ζώου κατά την κολύμβηση (cm/s) ώστε να αποκλείσουμε αλλαγές στη δραστηριότητα του. Στη δοκιμασία ελέγχου της μακρόχρονης μνήμης καταγράφηκε επίσης ο χρόνος παραμονής και η διανυόμενη απόσταση σε κάθε τεταρτημόριο του λαβύρινθου και η μορφή της διαδρομής. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η μέση τιμή για κάθε ζώο και κατά τη διάρκεια της κάθε ημέρας ξεχωριστά.

Δοκιμασία αναγνώρισης καινοφανούς αντικειμένου (novel object recognition): Η πειραματική διάταξη αυτής της δοκιμασίας αποτελείται από ένα κουτί διαστάσεων 40X40 cm, φτιαγμένο από αδιαφανές Plexiglas και ανοιχτό στο επάνω μέρος, έτσι ώστε να είναι εύκολη για τον πειραματιστή η τοποθέτηση και η απομάκρυνση των πειραματόζωων, καθώς και η παρακολούθησή τους. Κατά τη φάση της προσαρμογής, η οποία είχε διάρκεια 3 ημέρες, οι μύες αφήνονταν ελέυθεροι να εξερευνήσουν το χώρο για 5' καθημερινά. Μία ημέρα μετά, οι μύες υποβλήθηκαν σε 2 δοκιμασίες εξοικείωσης, με διαλλείμματα 10' κατά τα οποία τα ζώα επιστρέφονταν στο κλουβί τους. Κατά τη διάρκεια καθεμίας από αυτές τις 2 δοκιμασίες διάρκειας 10', τα ζώα τοποθετούνταν κέντρο του κουτιού και αφήνονταν να εξερευνήσει δύο καθ' όλα όμοια αντικείμενα. 10' μετά την ολοκλήρωση της φάσης εξοικείωσης, τα ζώα τοποθετούνταν στο ίδιο κουτί, όπου ένα από τα δύο αντικέιμενα είχε αντικατασταθεί από ένα νέο (διαφορετικού σχήματος). Ο χρόνος που πέρασε κάθε μυς εξερευνώντας το παλιό/οικείο αντικείμενο καταγράφηκε και υπολογίστηκε ο Δείκτης Διάκρισης (Discrimination Index) ως το πηλίκο: (χρόνος στο νέο - χρόνος στο παλιό)/(χρόνος στο νέο+χρόνος στο παλιό Αντικείμενο). Αν ο Δείκτης Διάκρισης προκύψει θετικός αριθμός, αυτό σημαίνει πως ο επίμυς εξερευνά περισσότερη ώρα το νέο αντικείμενο, αναγνωρίζοντας ότι αποτελεί ένα διαφορετικό ερέθισμα από το ήδη γνώριμο αντικείμενο. Η καταγραφή των δεδομένων έγινε με

αναλογική κάμερα, η οποία είχε τοποθετηθεί κάθετα και επάνω από την πειραματική διάταξη.

Δοκιμασία καταγραφής αυθόρμητης κινητικότητας (Spontaneous locomotor activity): για τη δοκιμασία αυτή, οι μύες τοποθετήθηκαν σε μία ειδική συσκευή (Lsi Letica Scientific Instruments-Panlab Animal Activity Monitor) που διαθέτει ανιχνευτές κίνησης για 1 ώρα επί δύο συνεχόμενες ημέρες. Ο χώρος της συσκευής είναι μικρός και σκιερός, απομονωμένος από εξωγενή ερεθίσματα. Η κινητική δραστηριότητα ελέγχονταν καθημερινά μεταξύ 10:00-14:00. Οι μετρήσεις (αριθμός που εκφράζει δραστηριότητα σύμφωνα με τη συσκευή) καταγράφονταν αυτόματα κάθε 5' για τη συνολική περίοδο των 60'. Ο συνολικός αριθμός (που εκφράζει το άθροισμα των μετρήσεων της κάθε ημέρας) χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση των κινητικότητας των μυών.

Δοκιμασία εξερεύνησης ανοικτού πεδίου (Open field exploration): το πάτωμα του πεδίου (40×40 cm) διαχωρίστηκε σε 9 τμήματα ίσου μεγέθους (3 σειρές των τριών τμημάτων). Το πάτωμα καλύπτονταν πλευρικά από ένα τείχος ύψους 38 cm επιτρέποντας την επίδραση περιβαλλοντικών ερεθισμάτων. Οι μύες τοποθετούνταν στην άκρη ενός γωνιακού τμήματος και η συμπεριφορά τους καταγράφονταν για 5' κάθε ημέρα, για 3 διαδοχικές ημέρες. Ο αριθμός των περασμάτων (crosses) και των ανυψώσεων της κεφαλής προς εξερεύνηση (rears) σε κάθε τμήμα, χρησιμοποιήθηκαν σαν δείκτες της οριζόντιας και κάθετης δραστηριότητας αντίστοιχα.

Δοκιμασία περιστρεφόμενου τυμπάνου (rota-rod): η κινητική ισορροπία και ο συντονισμός διερευνήθηκε με τη χρήση μίας επιταχυνόμενης διάταξης ράβδου που περιστρέφεται (τύμπανο). Η φάση εξάσκησης των ζώων είχε διάρκεια 3 συνεχόμενες ημέρες, κατά τις οποίες οι μύες υποβάλλονταν σε 4 δοκιμασίες ανά ημέρα (με διαλλείμματα 15' ανάμεσα στις δοκιμασίες). Οι μύες τοποθετούνταν στη περιστρεφόμενη ράβδο στα 4 rpm και σταδιακά η ταχύτητα αυξάνονταν στα 40 rpm με μία συχνότητα 0.12 rpm/s. Κάθε δοκιμασία διαρκούσε ώσπου το ζώο να πέσει από τη ράβδο ή το μέγιστο χρόνο των 300". Η δοκιμασία ελέγχου των ικανοτήτων συντονισμού των κινήσεων των ζώων πραγματοποιήθηκε 24 ώρες μετά την ολοκλήρωση της φάσης εξάσκησης και αποτελούνταν από 2 συνεχόμενες ημέρες που αποτελούνταν από 3 δοκιμασίες η καθεμία (μέγιστης διάρκειας 300"). Την πρώτη ημέρα εφαρμόστηκε σταθερή ταχύτητα 20 rpm και στη δεύτερη 32 rpm. Ο μέσος χρόνος που πέρασαν τα ζώα στη ράβδο ώσπου να πέσουν (σε δευτερόλεπτα) υπολογίστηκε για κάθε ημέρα καθώς και για κάθε ταχύτητα.

Ανάλυση αποτυπωμάτων άκρων (footprint analysis): για την ανάκτηση των αποτυπωμάτων των ζώων, οι πατούσες τους χρωματίστηκαν με μη-τοξικές βαφές και οι μύες αφέθηκαν να περπατούν κατά μήκος ενός στενού διαδρόμου (με ανοικτό το πάνω μέρος για εύκολη παρατήρηση) ο οποίος ήταν καλυμένος με λευκό χαρτί. Το μήκος του διαδρόμου ήταν 22cm και το πλάτος 10 cm. Το ύψος των τοιχωμάτων που κάλυπταν δεξιά και αριστερά το διάδρομο ήταν 11 cm. Τα ζώα εγκλιματίστηκαν στο περιβάλλον για τουλάχιστον 60' και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε δύο δοκιμασίες εξάσκησης πριν το χρωματισμό των άκρων τους. Για την επακόλουθη ανάλυση, τα εμπρός άκρα χρωματίστηκαν μπλε και τα πίσω κόκκινα. Κάθε ζώο υποβλήθηκε συνολικά σε 9 δοκιμασίες (3 δοκιμασίες την ημέρα για 3 συνεχόμενες ημέρες). Όταν τα αποτυπώματα στο χαρτί στέγνωσαν οι παρακάτω παράμετροι υπολογίστηκαν: το εύρος της επικάλυψης και το μήκος του βηματισμού για το κάθε άκρο ξεχωριστά.

Στατιστική ανάλυση: εφαρμόστηκε one-way ANOVA με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (ημέρα) και τον γονότυπο σαν ανεξάρτητο παράγοντα για την επίδραση του γονοτύπου στο χρόνο ώσπου να φτάσουν την πλατφόρμα κατά τη φάση εκμάθησης και προσαρμογής στο MWM, καθώς και στο χρόνο ώσπου να πέσουν από το περιστρεφόμενο τύμπανο στη φάση εξάσκησης. Η επίδραση του γονοτύπου στη φάση ελέγχου της μακροπρόθεσμης χωρικής μνήμης στο MWM αναλύθηκε στατιστικά με two-way ANOVA με το τεταρτημόριο και τον γονότυπο ως ανεξάρτητους παράγοντες. Τέλος, η επίδραση του γονοτύπου σε όλες τις υπόλοιπες παραμέτρους αξιολογήθηκε με one-way ANOVA με τον γονότυπο σαν ανεξάρτητο παράγοντα. Όλη η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα SPSS 13.01 για Windows

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1.ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ Tag-1^{-/-} ΜΥΩΝ

Οπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, προηγούμενη μελέτη από το εργαστήριο μας (Traka et al., 2003) έδειξε πως η απουσία της πρωτεΐνης TAG-1 έχει σαν αποτέλεσμα αποδιοργάνωση των εγγύς των παρακομβικών περιοχών. Η μεταβολή αυτή χαρακτηρίζεται από δραματική μείωση του εντοπισμού της πρωτεΐνης Caspr2 και των διαύλων καλίου, με τους διαύλους να εντοπίζονται διάχυτοι προς το μεσοκομβικό τμήμα. Η παραπάνω μελέτη πραγματοποιήθηκε σε μύες ομόζυγα μεταλλαγμένους για το γονίδιο της TAG-1 ($Tag-1^{-/-}$) και ειδκότερα στις περιοχές του οπτικού και του ισχιακού νεύρου, τμήματα του κεντρικού και του περιφερικού νευρικού συστήματος αντίστοιχα. Φαίνεται λοιπόν πως το μόριο κυτταρικής συνάφειας TAG-1 είναι κρίσιμο για τη δημιουργία των μοριακών αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν στην εγγύς της παρακομβικής περιοχής των εμμύελων ινών του οπτικού και του ισχιακού νεύρου και είναι υπεύθυνες για τη συσσώρευση των διαύλων καλίου. Οι $Tag-1^{-/-}$ μύες αναπτύσσονται και αναπαράγονται φυσιολογικά, ενώ ποτέ έως τώρα δεν έχει μελετηθεί εκτενώς η συμπεριφορά τους.

Γ.1.1. Συμπεριφορική ανάλυση των Tag-1^{-/-} μυών

Με σκοπό να ελέγξουμε τη συμπεριφορά των $Tag-1^{-/-}$ ενήλικων μυών και να εντοπίσουμε πιθανές επιπτώσεις της απώλειας της TAG-1 στις γνωστικές και κινητικές λειτουργίες των ζώων, εφαρμόσαμε διάφορες δοκιμασίες. Ο Επικ. Καθ. Αντώνης Σταματάκης και ο Δρ. Θεοφάνης Παναγιωταρόπουλος από το εργαστήριο Βιολογίας-Βιοχημείας της καθ. Φωτεινής Στυλιανοπούλου πραγματοποίησαν μία εκτενή συμπεριφορική ανάλυση των ενήλικων $Tag-1^{-/-}$ μυών σε σύγκριση με ίδιας ηλικίας και φύλου αγρίου τύπου ζώα (Savvaki, Panagiotaropoulos et al., 2008). Η ανάλυση αυτή περιελάμβανε δύο ειδών συμπεριφορικές δοκιμασίες: δοκιμασίες ελέγχου των γνωστικών διαδικασιών της μνήμης και της μάθησης και δοκιμασίες ελέγχου της κινητικότητας και του συντονισμού των κινήσεων των άκρων.

Για τον έλεγχο των διαδικασιών της μνήμης και μάθησης χρησιμοποιήθηκαν ο υδάτινος λαβύρινθος κατά Morris (Morris water maze, MWM) και η δοκιμασία

αναγνώρισης καινοφανούς αντικειμένου (novel object recognition). Ο MWM είναι η πιο αξιόπιστη μέθοδος ελέγχου της χωρικής μάθησης και μνήμης, στις οποίες εμπλέκεται άμεσα η περιοχή του ιπποκάμπου (Parron and Save, 2004). Συνοπτικά σε αυτήν τη δοκιμασία τα ζώα έπρεπε να κολυμπήσουν σε μία κυκλική δεξαμενή και να εντοπίσουν μία κρυμμένη πλατφόρμα, ώστε να αποφύγουν το νερό. Η επιτυχία της μεθόδου αυτής έγκειται στο ότι οι μύες δείχνουν αποστροφή προς το νερό και επιδιώκουν να ξεφύγουν από αυτό με την ελάχιστη δυνατή προσπάθεια, εντοπίζοντας την κρυμμένη πλατφόρμα και ανεβαίνοντας σε αυτήν. Στην πρώτη φάση αυτής της δοκιμασίας (φάση προσαρμογής) ελέγχεται η ικανότητα χωρικής μάθησης των ζώων, ενώ στη δεύτερη φάση η οποία εφαρμόζεται 24 ώρες μετά το τέλος της φάσης προσαρμογής ελέγχεται η μακροπρόθεσμη χωρική μνήμη. Στη δοκιμασία αναγνώρισης καινοφανούς αντικειμένου ελέγχεται η μνήμη αναγνώρισης η οποία έχει σχετιστεί με τη λειτουργία του ιπποκάμπου και του ενδορινικού φλοιού (Dere et al., 2007). Τα ζώα καλούνται να αναγνωρίσουν και να διακρίνουν ένα οικείο αντικείμενο (familiar) από ένα νέο (novel) που δεν έχουν ξαναδεί. Οι μύες αναμένεται να περάσουν περισσότερο χρόνο εξερευνώντας το νέο αντικείμενο σε σύγκριση με το γνωστό. Τα αποτελέσματα αυτών των δοκιμασιών (Εικόνα 15Α-C) έδειξαν πως οι $Tag-1^{-/-}$ μύες έχουν την ικανότητα μάθησης (μειώνουν το χρόνο που χρειάζονται για να εντοπίσουν την πλατφόρμα κατά τις 4 διαδοχικές ημέρες της φάσης προσαρμογής του MWM, Εικόνα 15A), αλλά αποδίδουν λιγότερο καλά από τα αγρίου τύπου ζώα, ενώ η χωρική καθώς και η μνήμη αναγνώρισής τους παρουσιάζει σοβαρές διαταραχές (Εικόνα 15 Β-C).

Για τον έλεγχο της κινητικότητας των ζώων αναλύθηκε η αυθόρμητη κινητικότητα (spontaneous locomotor activity) η οποία φάνηκε να είναι ελαφρώς μειωμένη στα $Tag-1^{-/-}$ ζώα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά (Εικόνα 15D). Επακόλουθη δοκιμασία των ζώων στο ανοιχτό πεδίο (open field), όπου οι μύες εκτίθενται και σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα δεν έδειξε διαφορά στη συμπεριφορά των $Tag-1^{-/-}$ μυών σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Για τον έλεγχο της οργάνωσης και του συντονισμού των κινήσεων εφαρμόστηκε η ανάλυση αποτυπωμάτων άκρων (footprint analysis). Στη δοκιμασία αυτή οι πατούσες των ζώων χρωματίστηκαν με μη-τοξικές βαφές (εμπρός άκρα: μπλε, πίσω άκρα: κόκκινα) και οι μύες αφέθηκαν να περπατούν κατά μήκος ενός στενού διαδρόμου ο οποίος ήταν καλυμμένος με λευκό χαρτί. Όταν τα αποτυπώματα στο χαρτί στέγνωσαν οι παρακάτω παράμετροι υπολογίστηκαν: το εύρος της

επικάλυψης και το μήκος του βηματισμού για το κάθε άκρο ξεχωριστά. Η μελέτη των $Tag-1^{-/-}$ μυών έδειξε διαταραχή του συντονισμού των κινήσεων, με μεγαλύτερο εύρος επικάλυψης και μικρότερο μήκος βηματισμού σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ζώα (Εικόνα 15 Ε). Αυτές οι διαταραχές έχουν συσχετιστεί με δυσλειτουργία της παρεγκεφαλίδας σε άλλα μοντέλα μυών (Oliver et al., 2007).





τύπου δείχνουν μια προτίμηση για το τεταρτημόριο 'στόχο' κάτι που δεν ισχύει για τα $Tag-1^{-/-}$ ζώα. Στα ραβδογράμματα παρουσιάζονται: mean, standard error of the mean (διαφορά ανάμεσα στους γονοτύπους † p<0.01; διαφορά μεταξύ τεταρτημορίων * p<0.05). ΙΙ. Αντιπροσωπευτικά μονοπάτια κολύμβησης τα οποία ακολούθησαν τα αγρίου τύπου (+/+) και τα Tag- $I^{-/-}$ ζώα στην προηγούμενη δοκιμασία. Το Τ δείχνει το τεταρτημόριο 'στόχο' όπου είχε τοποθετηθεί η πλατφόρμα κατά τις δοκιμασίες προσαρμογής και το βέλος το σημείο εκκίνησης. C. Επίδοση στη δοκιμασία αναγνώρισης καινοφανούς αντικειμένου, εκφραζόμενη με το δείκτη διάκρισης (discrimination index). Τα αγρίου τύπου ζώα αφιέρωσαν περισσότερο χρόνο στην εξερεύνηση του καινοφανούς αντικειμένου σε σύγκριση με το οικείο/παλιό, σε αντίθεση με τα ομόζυγα μεταλλαγμένα τα οποία δεν έδειξαν καμία προτίμηση προς το καινοφανές αντικείμενο (διαφορά ανάμεσα στους γονοτύπους *p<0.05). Στα ραβδογράμματα παρουσιάζονται: mean, standard error of the mean. D. Καταγραφή αυθόρμητης κινητικότητας των αγρίου τύπου και των Tag-1^{-/-} μυών. Και τις δύο ημέρες της δοκιμασίας οι $Tag-1^{-/-}$ μύες έδειξαν μειωμένη κινητική δραστηριότητα σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου ζώα (***, p<0.001). Οι μονάδες στον άξονα των γ είναι οι μετρήσεις σήματος όπως καταγράφηκαν από το μηχάνημα. Στα ραβδογράμματα παρουσιάζονται: mean, standard error of the mean. Τα ζώα και των δύο γονοτύπων μείωσαν την κινητική τους δραστηριότητα τη δεύτερη ημέρα της δοκιμασίας σε σύγκριση με την πρώτη (##, p<0.01). Ε. Ανάλυση αποτυπωμάτων άκρων. Ι. Το εύρος της επικάλυψης, για τα δεξιά αλλά και τα αριστερά άκρα, είναι σημαντικά μικρότερο στους αγρίου τύπου μύες σε σύγκριση με τους ομόζυγα μεταλλαγμένους (***p<0.001). ΙΙ. Το μήκος του βηματισμού, για τα εμπρός και πίσω άκρα (δέξια και αριστερά) είναι σημαντικά μεγαλύτερο στους $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ και αγρίου τύπου μύες σε σύγκριση με τους ομόζυγα μεταλλαγμένους (*p<0.05; **p < 0.01). Στα ραβδογράμματα παρουσιάζονται: mean, standard error of the mean. III. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία των αποτυπωμάτων από ένα $Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)}$ και ένα Tag-1^{-/-} ζώο, όπου εμφανίζονται οι παράμετροι που υπολογίστηκαν. α:μήκος του βηματισμού, b: εύρος της επικάλυψης. Με μπλε μπογιά απεικονίζονται τα εμπρός και με κόκκινο τα πίσω άκρα.

Γ.1.2. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση των Tag-1^{-/-} μυών σε διάφορες περιοχές του Κ.Ν.Σ.

Στην προηγούμενη παράγραφο δείξαμε πως οι λειτουργίες της μάθησης και μνήμης καθώς και η κινητικότητα και ο συντονισμός των κινήσεων των άκρων είναι συμπεριφορές οι οποίες διαταράσσονται απουσία της TAG-1 στα $Tag-1^{-/-}$ ζώα. Στη συνέχεια της μελέτης μας, η οποία επικεντρώνεται στο Κ.Ν.Σ., θελήσαμε να μελετήσουμε τη μοριακή οργάνωση των εμμύελων ινών σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου που εμπλέκονται στις προαναφερθείσες συμπεριφορές. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε σε φυσιολογικούς και $Tag-1^{-/-}$ μύες και αφορούσε στις περιοχές του ιπποκάμπειου σχηματισμού (εμπλέκεται στις διαδικασίες της μάθησης και μνήμης) καθώς και την παρεγκεφαλίδα (εμπλέκεται στον κινητικό συντονισμό και την ισορροπία). Επιπλέον, μελετήθηκε η περιοχή του μεσολόβιου, η οποία είναι πλούσια σε εμμύελες ίνες καθώς και ο οσφρητικός λοβός.

Αρχικά συγκρίθηκαν τα αγρίου τύπου ζώα «μάρτυρες» με τα ετερόζυγα μεταλλαγμένα. Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε με ανοσοϊστοχημεία σε οριζόντιες τομές οπτικού νεύρου χρησιμοποιώντας αντισώματα για την παρακομβική πρωτεΐνη Caspr και τις πρωτεΐνες της εγγύς της παρακομβικής περιοχής. Στην Εικόνα 16 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την συσσώρευση της Caspr2. Ποσοτικοποίηση του ποσοστού των εγγύς των παρακομβικών περιοχών με φυσιολογικά εντοπισμένη Caspr2 έδειξε πως δεν υπάρχει καμία διαφοροποίηση στους δυο γονοτύπους, υποδεικνύοντας πως τα ετερόζυγα μεταλλαγμένα ζώα παρουσιάζουν απόλυτα φυσιολογική οργάνωση της συγκεκριμένης περιοχής. Αντίστοιχα ήταν τα αποτελέσματα και για τους διαύλους καλίου (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).


Εικόνα 16. Τα ετερόζυγα μεταλλαγμένα για την TAG-1 ζώα είναι πανομοιότυπα με τα αγρίου τύπου ως προς το μοριακό τους φαινότυπο. Α-Β. Ανοσοϊστοχημεία σε οριζόντιες κρυοτομές οπτικού νεύρου από *Tag-1^{+/-}* και αγρίου τύπου ζώα με χρήση αντισωμάτων για την παρακομβική πρωτεΐνη Caspr και την πρωτεΐνη της εγγύς της παρακομβικής περιοχής Caspr2. C. Ποσοτικοποίηση του ποσοστού των παρακομβικών περιοχών με φυσιολογικά συσσωρευμένη Caspr2 στην εγγύς τους περιοχή. Δεν υπάρχει διαφορά ανάμεσα στα ετερόζυγα μεταλλαγμένα και τα αγρίου τύπου (WT, wild type) ζώα (n=3).

Στη συνέχεια θυσιάστηκαν ετερόζυγα και ομόζυγα μεταλλαγμένα για την TAG-1 ενήλικα ζώα (από την ίδια γέννα) και απομονώθηκαν τα δυο εγκεφαλικά ημισφαίρια με τους οσφρητικούς λοβούς καθώς και η παρεγκεφαλίδα. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν κρυοτομές και ακολούθησε μία σειρά πειραμάτων ανοσοϊστοχημείας για πρωτεΐνες του κόμβου του Ranvier και των γύρω του περιοχών.

Γ.1.2.α Ανάλυση του ιπποκάμπειου σχηματισμού ενήλικων Tag-1^{-/-} μυών

Ο ιππόκαμπειος σχηματισμός είναι μια εγκεφαλική δομή απαραίτητη για τις διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης. Αποτελείται από 6 διακριτές περιοχές: την οδοντωτή έλικα (dentate gyrus), τα 3 τμήματα του κύριου ιππόκαμπου (που ονομάζονται CA1, CA2 και CA3), το υπόθεμα (subiculum), το προϋπόθεμα (presubiculum), το παραϋπόθεμα (parasubiculum) και τον ενδορινικό φλοιό (entorhinal cortex) (Εικόνα 17). Οι διάφορες περιοχές του ιπποκάμπειου σχηματισμού συνδέονται μεταξύ τους με μονόδρομες προβολές, οι οποίες ειναι διεγερτικές και γλουταμινεργικές. Ειδικότερα, οι πληροφορίες από τον εγκεφαλικό φλοιό φτάνουν στα νευρικά κύτταρα του ενδορινικού φλοιού τα οποία προβάλλουν μέσω των αξόνων τους στην οδοντωτή έλικα και την περιοχή CA3 ή CA1. Στην πρώτη περίπτωση, τα κοκκιώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας στέλνουν τις ίνες τους (αμμύελες βρυώδεις ίνες, mossy fibers) στους δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων της CA3 περιοχής. Ακολούθως, οι παράπλευρες ίνες του Schaffer των πυραμιδικών κυττάρων της CA3 περιοχής (που βρίσκονται στην ακτινωτή στοιβάδα, stratum radiatum) συνάπτονται με τους δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων της CA1 περιοχής. Τέλος, τα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 περιοχής προβάλλουν μέσω του υποθέματος στον ενδορινικό φλοιό (Amaral and Witter 1995). Οι νευράξονες των πυραμιδικών κυττάρων του ιπποκάμπου και του ενδορινικού φλοιού καθώς και των κοκκιωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας είναι εμμύελοι.



Εικόνα 17. Σχηματική αναπαράσταση του ιπποκάμπειου σχηματισμού του αρουραίου. Απεικονίζονται οι κύριες συνδέσεις από τον ενδορινικό φλοιό προς τους δενδρίτες των πυραμιδικών νευρώνων στις περιοχές CA1 και CA3 του ιπποκάμπου. Dentate gyrus: οδοντωτή έλικα; Granule cells: κοκκιώδη κύτταρα; Mossy fibers: βρυώδεις ίνες; pyramidal cells: πυραμιδικά κύτταρα Εικόνα από http://thebrain.mcgill.ca/flash/index_a.html

Στην περιοχή του ιπποκάμπου των φυσιολογικών ζώων (από εδώ και στο εξής χρησιμοποιούνται τα ετερόζυγα μεταλλαγμένα ζώα σαν «μάρτυρες»), οι υπομονάδες των διαύλων καλίου Kv1.1 και Kv1.2, συνεντοπίζονται στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή, καθώς και στις αμμύελες βρυώδεις ίνες της CA3 περιοχής (όπου η υπομονάδα Kv1.2 είναι πιο έντονη). Επιπλέον, η πρωτεΐνη Caspr2 εντοπίζεται στο κυτταρικό σώμα και τις εγγύς των παρακομβικών περιοχές των πυραμιδικών νευρώνων του ιπποκάμπου. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 18, οι δίαυλοι καλίου καθώς και η πρωτεΐνη Caspr2 φαίνεται να απουσιάζουν σχεδόν πλήρως από τις εγγύς των παρακομβικών περιοχές στα $Tag-1^{-/-}$ ζώα ενώ παρουσιάζουν διάχυση προς το μεσοκομβικό τμήμα στις περιπτώσεις που εντοπίζονται (Εικόνα 18F). Στα άλλα

πρωτεΐνη Caspr η οποία χρησιμοποιήθηκε για τη σήμανση των παρακομβικών περιοχών δεν παρουσιάζει καμία διαφοροποίηση ώς προς τον εντοπισμό και την έκφραση της.



Εικόνα 18. Έκφραση των διαύλων καλίου και της πρωτεΐνης Caspr2 στον κύριο ιππόκαμπο ετερόζυγων (A,C,E) και ομόζυγα μεταλλαγμένων (B,D,F) μυών. Οβελιαίες κρυοτομές στις περιοχές CA1 (A και B) και CA3 (C–F) του ιπποκάμπου σημασμένες με συνδυασμούς αντισωμάτων για την παρακομβική Caspr (πράσινη) και τους διαύλους καλίου (Kv1.2: πράσινο) ή την πρωτεΐνη Caspr2 (πράσινο) και τους

διαύλους καλίου (Kv1.1: κόκκινο). Τα μόρια της εγγύς της παρακομβικής περιοχής εντοπίζονται φυσιολογικά στα ετερόζυγα μεταλλαγμένα ζώα, όπως αναμένονταν, ενώ σπάνια εντοπίζονται συσσωρευμένα στη σωστή περιοχή των εμμύελων ινών στα Tag- $I^{-/-}$ ζώα. Οι παραπάνω πρωτεΐνες όταν σπάνια εντοπίζονται, εμφανίζουν διάχυση προς το μεσοκομβικό τμήμα (* στο F). Αντίθετα, οι παρακομβικές περιοχές καθώς και ο εντοπισμός των διαύλων καλίου στις βρυώδεις ίνες παρουσιάζονται χωρίς καμία διαφορά. Με μπλε (To-Pro3 iodide) απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων. Με βέλη σημαίνονται οι παρακομβικές και οι εγγύς τους περιοχές. or: stratum oriens, πολυμορφική στοιβάδα από όπου περνούν οι άξονες των πυραμιδικών κυττάρων; rad: stratum radiatum, ακτινωτή στοιβάδα; mf: mossy fibers, βρυώδεις ίνες; pyr: pyramidal layer, πυραμιδική στοιβάδα. Κλίμακα: 10 μm.

Μια άλλη περιοχή του ιπποκάμπειου σχηματισμού που εξετάστηκε είναι ο ενδορινικός φλοιός. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοϊστοχημείας χρησιμοποιώντας αντισώματα για την παρακομβική πρωτεΐνη Caspr καθώς και τα μόρια υπό μελέτη, Caspr2, Kv1.1 και Kv1.2. Παρόμοια με τον ιππόκαμπο στα Tag-1^{-/-} ζώα, ο εντοπισμός των μορίων των εγγύς των παρακομβικών περιοχών διαταράσσεται, ενώ σε πολύ λίγες περιπτώσεις παρατηρείται εντοπισμός των διαύλων καλίου, που παρουσιάζουν διάχυτη έκφραση (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Έκφραση των διαύλων καλίου και της πρωτεΐνης Caspr2 στον ενδορινικό φλοιό ετερόζυγων φυσιολογικών (A,C) και Tag-1^{-/-} (B,D) μυών. Οβελιαίες κρυοτομές στο επίπεδο του ενδορινικού φλοιού και ανοσοϊστοχημεία για τις πρωτεΐνες που αναφέρονται στην εικόνα. Η Caspr εντοπίζεται φυσιολογικά στην παρακομβική περιοχή και στους δυο γονοτύπους, σε αντίθεση με τους διαύλους καλίου και την Caspr2, τα οποία δεν εντοπίζονται σωστά στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές στα Tag-1^{-/-} ζώα. Οι αστερίσκοι στο D υποδεικνύουν τον σπάνιο εντοπισμό των διαύλων καλίου στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές απουδιαύλων καλίου στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές και οι εγγύς τους περιοχές. Με μπλε (To-Pro3 iodide) απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων. Κλίμακα: 10 μm.

Γ.1.2.β Ανάλυση του μεσολόβιου, της παρεγκεφαλίδας και του οσφρητικού συστήματος ενήλικων Tag-1^{-/-} μυών

Το μεσολόβιο ή τυλώδες σώμα αποτελεί τη μεγαλύτερη δεσμίδα νευρικών ινών που συνδέει μεταξύ τους τα δύο εγκεφαλικά ημισφαίρια. Η κύρια λειτουργία του μεσολοβίου είναι να ενσωματώνει και να συνδυάζει κινητικές, αισθητικές και γνωστικές λειτουργίες ανάμεσα στα δύο ημισφαίρια. Το γεγονός ότι το μεσολόβιο αποτελείται από εκατομμύρια εμμύελες ίνες σε μία παράλληλη διάταξη, το καθιστά μια ιδανική περιοχή για τη μελέτη της μοριακής αρχιτεκτονικής των εμμύελων ινών στον εγκέφαλο. Στην Εικόνα 20 φαίνεται ανοσοϊστοχημεία σε οβελιαίες τομές ενήλικου εγκεφάλου από φυσιολογικούς και $Tag-1^{-/-}$ μύες στο επίπεδο του μεσολοβίου. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι της παρακομβικής πρωτεΐνης Caspr και των πρωτεϊνών της εγγύς της παρακομβικής περιοχής Caspr2 και διαύλων καλίου. Και στην περίπτωση του μεσολοβίου όπως και στον ιπποκάμπειο σχηματισμό, ο εντοπισμός των διαύλων καλίου και της Caspr2 διαταράσσεται στα $Tag-1^{-/-}$ ζώα, χωρίς μεταβολές στις παρακομβικές περιοχές ή την περιοχή του κόμβου του Ranvier (που σημαίνεται με το αντίσωμα για την υπομονάδα των διαύλων νατρίου Nav1.6). Παρατηρείται μία πιθανή αύξηση της αριθμού των κόμβων που σημαίνονται με τους διαύλους Nav1.6, η οποία θα διερευνηθεί στη συνέχεια.



Εικόνα 20. Έκφραση των διαύλων καλίου και της πρωτεΐνης Caspr2 στο μεσολόβιο ετερόζυγων φυσιολογικών (A,C,E) και Tag-1^{-/-} (B,D,F) μυών. Οβελιαίες κρυοτομές εγκεφάλου στο επίπεδο του μεσολοβίου σημασμένες με τα αντισώματα που υποδεικνύονται. Τα πειράματα της ανοσοϊστοχημείας έδειξαν πως ο εντοπισμός των διαύλων καλίου και της πρωτεΐνης Caspr2 διαταράσσονται απουσία της TAG-1 στα Tag-1^{-/-} ζώα, ενώ φυσιολογικός παραμένει ο εντοπισμός της Caspr και των Nav1.6 στις παρακομβικές περιοχές και τους κόμβους του Ranvier αντίστοιχα. Οι αστερίσκοι στα B, D και F υποδεικνύουν τη διάχυτη έκφραση των διαύλων καλίου απουσία συσσώρευσης της Caspr2 στις εμμύελες ίνες των Tag-1^{-/-} μυών. Με βέλη σημαίνονται οι κόμβοι του Ranvier και οι γύρω τους περιοχές. Με μπλε (To-Pro3 iodide) απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων. Κλίμακα: 10 μm.

Παρόμοια πειράματα ανοσοϊστοχημείας στις περιοχές της παρεγκεφαλίδας (Εικόνα 22) και του οσφρητικού λοβού (Εικόνα 24) έδειξαν επίσης αποδιοργάνωση των εγγύς των παρακομβικών περιοχών των εμμύελων ινών στα *Tag-1^{-/-}* ζώα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ετερόζυγα.

Η παρεγκεφαλίδα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο συντονισμό των κινήσεων και την ισορροπία. Διαχωρίζεται εγκάρσια σε 3 λειτουργικούς λοβούς (πρόσθιο, οπίσθιο και μικρό λοβό της κροκύδας και του οζιδίου), ενώ η επιφάνεια της χαρακτηρίζεται μορφολογικά από πολλές παράλληλες εγκάρσιες προεξοχές που ονομάζονται έλικες. Αυτός ο διαχωρισμός εξυπηρετεί στο να δέχεται ερεθίσματα από διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού και να εκτείνει τους άξονες της σε αντίστοιχες περιοχές του κινητικού φλοιού και του εγκεφαλικού στελέχους ώστε να επιτελέσει τη λειτουργία της. Η παρεγκεφαλίδα αποτελείται από το φλοιό, τη λευκή ουσία και τους εν τω βάθει πυρήνες. Τα κύτταρα των εν τω βάθει πυρήνων διαμεσολαβούν την έξοδο του μηνύματος προς τον κινητικό φλοιό και το στέλεχος. Στην παρούσα εργασία επικεντρωνόμαστε στη μελέτη του φλοιού της παρεγκεφαλίδας και της λευκής ουσίας. Ο φλοιός αποτελείται από 3 καλά διαχωρισμένες στοιβάδες: α) την εξωτερική μοριώδη στοιβάδα (molecular layer), όπου εντοπίζονται πολύ λίγα κύτταρα (ανασταλτικοί διάμεσοι νευρώνες, που ονομάζονται stellate και basket cells) και αποτελείται κυρίως από τους δενδρίτες των κυττάρων Purkinje και τους άξονες των κοκκιωδών κυττάρων, β) τη μονοστοιβάδα των κυττάρων Purkinje (Purkinje cell layer) τα οποία είναι ανασταλτικοί νευρώνες που στέλνουν τους άξονες τους στους εν τω βάθει πυρήνες και γ) την κοκκιώδη στοιβάδα (granular cell layer) η οποία αποτελείται από τα διεγερτικά κοκκιώδη κύτταρα σε πυκνή διάταξη και τους διάμεσους νευρώνες Golgi. Στη στοιβάδα αυτή συναντάμε τις βρυώδεις ίνες (mossy fibers) οι οποίες είναι προσαγωγες ίνες που φτάνουν στην παρεγκεφαλίδα από άλλες περιοχές του εγκεφάλου (Εικόνα 21).

Εικόνα 21. Σχηματική απεικόνιση εγκάρσιας τομής μίας έλικας παρεγκεφαλίδας.

Παρουσιάζονται οι στοιβάδες φλοιού του της παρεγκεφαλίδας από έξω προς τα μέσα ως εξής: molecular layer, μοριώδης στοιβάδα; Purkinje cell layer, στοιβάδα των κυττάρων Purkinje; granule cell layer: κοκκιώδης στοιβάδα. Στο εσωτερικό βρίσκεται η λευκή ουσία της παρεγκεφαλίδας (white matter). Εικόνα από http://thalamus.wustl.edu/course/



Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοϊστοχημείας κρυοτομές σε παρεγκεφαλίδας γρησιμοποιώντας αντισώματα για τους διαύλους καλίου και την Caspr2, την παρακομβική πρωτεΐνη Caspr και τους διαύλους νατρίου του κόμβου του Ranvier (Nav1.6). Η ανάλυση των $Tag-1^{-/-}$ μυών σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς (Εικόνα 22) έδειξε δραματική μείωση του εντοπισμού της Caspr2 και των διαύλων καλίου στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές της λευκής ουσίας των ομόζυγα μεταλλαγμένων ζώων, με τους διαύλους να παρουσιάζονται διάχυτοι προς το μεσοκομβικό τμήμα, όπου και όταν εντοπίζονται (Εικόνα 22B,D,F). Αντιθέτως, οι κόμβοι (Εικόνα 22D) και οι παρακομβικές περιοχές εμφανίζονται φυσιολογικά (Εικόνα 22B). Στην Εικόνα 22G-Η φαίνονται αποτελέσματα ανοσοϊστοχημείας στο επίπεδο του φλοιού της παρεγκεφαλίδας όπου οι δίαυλοι καλίου εκφράζονται πολύ έντονα στα pinceau (χαρακτηριστικές συνάψεις που σχηματίζονται από τις απολήξεις των ανασταλτικών κυττάρων «basket cells» και το αρχικό τμήμα του άξονα των κυττάρων Purkinje), χωρίς διαφοροποίηση στους $Tag-1^{-/-}$ μύες, ενώ η Caspr2 εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στο κυτταρικό σώμα των κυττάρων Purkinje με μικρή αύξηση αυτού του εντοπισμού της στα $Tag-1^{-/-}$ ζώα. Η παρατήρηση αυτή θα μπορούσε να υποδηλώνει πως η απουσία της TAG-1 οδηγεί σε μειωμένη έξοδο της Caspr2 από το κυτταρικό σώμα και συνεπακόλουθα μειωμένο εντοπισμό της πρωτεΐνης στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές.



Εικόνα 22. Έκφραση των διαύλων καλίου και της πρωτεΐνης Caspr2 στη λευκή ουσία (A-F) και το φλοιό της παρεγκεφαλίδας (G-H) ετερόζυγων φυσιολογικών (A,C,E,G) και Tag-1^{-/-} (B,D,F,H) μυών. Οβελιαίες κρυοτομές εγκεφάλου στο επίπεδο της παρεγκεφαλίδας σημασμένες με τα αντισώματα που υποδεικνύονται. Στη λευκή ουσία της παρεγκεφαλίδας των Tag-1^{-/-} ζώων παρατηρείται δραματική μείωση του εντοπισμού των διαύλων καλίου και της Caspr2 στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές (B,D,F). Καμία διαφοροποίηση δεν είναι εμφανής στον εντοπισμό της παρακομβικής πρωτεΐνης Caspr και της παρεγκεφαλίδας παρατηρούμε αδιαφοροποίητη την έκφραση των διαύλων καλίου αλλά μικρή αύξηση της συσσώρευσης της Caspr2 στο κυτταρικό σώμα των κυττάρων Purkinje, στα Tag-1^{-/-}

ζώα (H). Με μπλε (To-Pro3 iodide) απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων. Mol: Molecular layer; PC: Purkinje cell layer; GCL: Granule cell layer. Κλίμακα: 10 μm.

Ένα επιπλέον σύστημα το οποίο μελετήσαμε είναι το οσφρητικό. Το οσφρητικό σύστημα στα τρωκτικά διακρίνεται στο κύριο (main olfactory system) και το επιπρόσθετο (accessory olfactory system). Το κύριο οσφρητικό σύστημα επιτελεί την βασική λειτουργία της όσφρησης αναγνωρίζοντας τις διαφορετικές οσμές που υπάρχουν στο περιβάλλον σε αντίθεση με το επιπρόσθετο οσφρητικό σύστημα που αναγνωρίζει τις φερορμόνες. Η οργάνωση και των 2 οσφρητικών συστημάτων είναι παρόμοια. Στην παρούσα εργασία μελετάμε το κύριο οσφρητικό σύστημα (Εικόνα 23). Οι οσφρητικοί αισθητικοί νευρώνες που βρίσκονται στο οσφρητικό επιθήλιο προβάλλουν τους νευράξονες τους στη σπειραματική στοιβάδα (glomerular layer) του κύριου οσφρητικού λοβού. Τα σπειράματα της σπειραματικής στοιβάδας δημιουργούνται από τις συνάψεις των αξόνων των οσφρητικών νευρώνων με τους δενδρίτες των μητρικών (mitral cells), των θυσανωτών (tufted cells) και των περισπειραματικών κυττάρων (periglomerular cells, PgCs). Τα περισπειραματικά κύτταρα είναι ανασταλτικοί διάμεσοι νευρώνες, ενώ τα μητρικά και θυσανωτά κύτταρα, είναι διεγερτικοί νευρώνες τα κυτταρικά σώματα των οποίων εντοπίζονται στη στοιβάδα των μητρικών κυττάρων (mitral cell layer) και την εξωτερική δικτυωτή στοιβάδα (external plexiform layer) αντίστοιχα. Τα νευρικά αυτά κύτταρα προβάλλουν τους νευράξονές τους προς διαφορετικές περιοχές του οσφρητικού φλοιού. Εσωτερικά της μητρικής στοιβάδας υπάρχει η έσω δικτυωτή στοιβάδα (internal plexiform layer) που περιέχει τους άξονες των προβλητικών νευρώνων οι οποίοι οδεύουν προς τον φλοιό. Εν τω βάθει της έσω δικτυωτής στοιβάδας εντοπίζεται η στοιβάδα των κοκκιωδών κυττάρων (granular cell layer) που είναι η στοιβάδα με τα πολυπληθέστερα κύτταρα στον οσφρητικό λοβό τα οποία είναι ανασταλτικοί διάμεσοι νευρώνες και στέλνουν τους δενδρίτες τους σε όλο το μήκος της έξω δικτυωτής στοιβάδας ανάλογα με τη θέση τους.

Εικόνα 23. Σχηματική απεικόνιση του κύριου οσφρητικού λοβού. Παρουσιάζονται οι στοιβάδες σε μία οβελιαία τομή του οσφρητικού λοβού. ONL: Olfactory nerve layer, στοιβάδα του οσφρητικού νεύρου (μπλε); GL: glomerular layer, σπειραματική στοιβάδα (μπλε, εσωτερικά της ONL); EPL: external plexiform layer, εξωτερική δικτυωτή στοιβάδα (κόκκινο); MCL: mitral layer, στοιβάδα cell μητρικών κυττάρων (κόκκινο, σε γραμμική διάταξη); GCL: granular cell layer, στοιβάδα των κοκκιωδών κυττάρων (πράσινο). Εικόνα από Zou et al., 2009



Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε οβελιαίες κρυοτομές οσφρητικού λοβού από ενήλικα φυσιολογικά ετερόζυγα και ομόζυγα μεταλλαγμένα για την TAG-1 ζώα. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για τις υπομονάδες 1.1 και 1.2 των διαύλων καλίου, για τις πρωτεΐνες Caspr και Caspr2 καθώς και ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει όλες τις υπομονάδες των διαύλων νατρίου, συμπεριλαμβανομένων αυτών που εμφανίζονται στον κόμβο του Ranvier. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 24 η Caspr2 απουσιάζει από τις εγγύς των παρακομβικών περιοχές στα $Tag-1^{-/-}$ ζώα με την έκφραση των διαύλων καλίου να είναι δραματικά μειωμένη και διάχυτη προς το μεσοκομβικό τμήμα, όποτε εμφανίζεται. Αντίθετα δεν παρατηρούνται διαφορές στην έκφραση και τον εντοπισμό της παρακομβικής Caspr και των διαύλων νατρίου.



Εικόνα 24. Έκφραση των διαύλων καλίου και της πρωτεΐνης Caspr2 στον οσφρητικό λοβό ετερόζυγων φυσιολογικών (A,C,E) και Tag-1^{-/-} (B,D,F) μυών. Οβελιαίες κρυοτομές οσφρητικού λοβού σημασμένες με τα αντισώματα που υποδεικνύονται. Η έκφραση των διαύλων καλίου εντοπίζεται στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή του φυσιολογικού ζώου (A,C,E), ενώ εντοπίζεται σπάνια στο Tag-1^{-/-} ζώο (B,D,F), όπου τις περισσότερες φορές δεν είναι συσσωρευμένη αλλά διάχυτη προς το μεσοκομβικό τμήμα (αστερίσκος στο F). Αντίστοιχα, η πρωτεΐνη Caspr2 απουσιάζει από τις εμμύελες ίνες του οσφρητικού λοβού των Tag-1^{-/-} ζώων (F). Οι παρακομβικές περιοχές και οι κόμβοι του Ranvier παρουσιάζονται χωρίς μεταβολή στους Tag-1^{-/-} μύες (B,D). Με βέλη σημαίνονται οι κόμβοι του Ranvier

και οι γύρω τους περιοχές. Με μπλε (To-Pro3 iodide) απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων. GCL: Granular cell layer; IPL: Internal plexiform layer. Κλίμακα: 10 μm.

Γ.1.3. Βιοχημική ανάλυση των Tag-1^{-/-} μυών σε διάφορες περιοχές του Κ.Ν.Σ.

Η προηγούμενη ανοσοϊστοχημική ανάλυση έδειξε πως η αρχιτεκτονική των εγγύς των παρακομβικών περιοχών διαταράσσεται απουσία της TAG-1 σε ομόζυγα μεταλλαγμένους μύες. Ειδικότερα, σε όλες τις περιοχές του Κ.Ν.Σ. που ελέχθηκαν, συμπεριλαμβανομένων αυτών που εμπλέκονται στις λειτουργίες της μάθησης και μνήμης καθώς και συντονισμού των κινήσεων, παρατηρείται δραματική μείωση του εντοπισμού των διαύλων καλίου και της πρωτεΐνης Caspr2, με τους πρώτους να εμφανίζονται συχνά διάχυτοι προς τη μεσοκομβική περιοχή. Είναι σημαντικό ότι οι συμπεριφορικές διαταραχές που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 1.1. συνοδεύονται από μοριακές αλλοιώσεις στις εμπλεκόμενες περιοχές του εγκεφάλου των *Tag-1^{-/-}* μυών. Στη συνέχεια, στόχος μας είναι να μελετήσουμε για πιθανές αλλαγές στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων που αλληλεπιδρούν με την TAG-1 για τη δημιουργία του συμπλόκου των εγγύς των παρακομβικών περιοχών.

Στην Εικόνα 25 φαίνεται ένα πείραμα ανοσοαποτύπωσης σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από οσφρητικό λοβό, ενδορινικό φλοιό, ιππόκαμπο, παρεγκεφαλίδα και μεσολόβιο ενήλικων φυσιολογικών και *Tag-1^{-/-}* μυών. Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε για να επιβεβαιώσει την απώλεια της TAG-1 πρωτεΐνης από τα *Tag-1^{-/-}* ζώα. Χρησιμοποιήθηκε ένα πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της TAG-1 και ένα μονοκλωνικό εντίσωμα για την ανίχνευση της β-ακτίνης, τα επίπεδα έκφρασης της οποίας ελέγχουμε σαν εσωτερική πρωτεΐνη ελέγχου των δειγμάτων. Αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης ελέγχου παραπέμπουν σε αλλαγές στην ποσότητα του συνολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.



Εικόνα 25. Ανοσοαποτύπωση σε απομονωμένες περιοχές εγκεφάλου από αγρίου τύπου και *Tag-1^{-/-}* ενήλικα ζώα, για τον έλεγχο έκφρασης της πρωτεΐνης TAG-1. Η β-ακτίνη χρησιμοποιείται σαν πρωτεΐνη ελέγχου, τα επίπεδα έκφρασης της οποίας δεν αναμένονται να αλλάζουν από την απενεργοποίηση του γονιδίου για την TAG-1. Με αυτό το πείραμα επιβεβαιώνεται η απουσία της πρωτεΐνης TAG-1 από τις διάφορες περιοχές του Κ.Ν.Σ. των *Tag-1^{-/-}* μυών. OB: olfactory bulb, οσφρητικός λοβός; EC: entorhinal cortex, ενδορινικός φλοιός; hippoc.: hippocampus, ιππόκαμπος; cereb:cerebellum, παρεγκεφαλίδα; CC: corpus calossum, μεσολόβιο.

Ακολούθησε βιοχημική ανάλυση για τον έλεγχο πιθανών αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που φυσιολογικά εντοπίζονται στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή και αλληλεπιδρούν με την TAG-1. Στην Εικόνα 26 φαίνονται πειράματα ανοσοαποτύπωσης για τις πρωτεΐνες των εγγύς των παρακομβικών περιοχών Caspr2 και Kv1.1, ενώ μονοκλωνικά αντισώματα για την ακτίνη και τη βακτίνη χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ποσότητας του πρωτεϊνικού εκγυλίσματος. Ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων από 3 ζεύγη φυσιολογικών και Tag-Ι-- ενήλικων ζώων έδειξε πως υπάρχει δραματική μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης Caspr2 στον οσφρητικό λοβό και την παρεγκεφαλίδα των ομόζυγα μεταλλαγμένων ζώων και σε γαμηλότερα ποσοστά στον ιππόκαμπο. Τα επίπεδα των διαύλων καλίου εμφανίζονται επίσης μειωμένα στον οσφρητικό λοβό και την παρεγκεφαλίδα των $Tag-I^{-/-}$ ζώων, γωρίς να υπάργει διαφορά στον ιππόκαμπο και τον ενδορινικό φλοιό. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως η έκφραση της Caspr2 επηρεάζεται πολύ περισσότερο από την έλλειψη της πρωτεΐνης TAG-1 (μείωση της τάξεως των 60-67% στον οσφρητικό λοβό και την παρεγκεφαλίδα) σε σχέση με τους διαύλους καλίου στους οποίους η μείωση της έκφρασής τους κυμαίνεται σε σαφώς γαμηλότερα επίπεδα (24-38%). Επίσης, αξίζει να σημειωθεί πως οι αλλαγές τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών της εγγύς της παρακομβικής περιοχής είναι πολύ πιο έντονες στις περιοχές του οσφρητικού λοβού και της παρεγκεφαλίδας σε σύγκριση με τον ιπποκάμπειο σχηματισμό.



Εικόνα 26. Ανοσοαποτύπωση σε πρωτεϊνικά δείγματα από οσφρητικό λοβό (olfactory bulb, OB), παρεγκεφαλίδα (cerebellum, C), ιππόκαμπο (hippocampus, H) και ενδορινικό φλοιό (entorhinal cortex, EC) ενήλικων φυσιολογικών και *Tag-1^{-/-}* μυών. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για την Caspr2 και τους διαύλους καλίου (Kv1.1) καθώς και για την ακτίνη σαν πρωτεΐνη ελέγχου (A-D). Ε-F. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της Caspr2 και των διαύλων Kv1.1 στα

Tag-1^{-/-} ζώα ως προς ποσοστό επί τις % των αντίστοιχων επιπέδων έκφρασης στα αγρίου τύπου ζώα ίδιας ηλικίας και φύλου (θεωρείται 100%). Στον οσφρητικό λοβό των *Tag-1^{-/-}* μυών παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης της Caspr2 (67,49±4,45%) και των διαύλων Kv1.1 (38,30±16,86%), όπως και στην παρεγκεφαλίδα (60,60±9,12% για την Caspr2 και 23,78±0,036% για το Kv1.1). Στον ιππόκαμπο ανιχνεύεται στατιστικά σημαντική μείωση για την Caspr2 (24,71±8,52) αλλά όχι τους διαύλους καλίου, ενώ στον ενδορινικό φλοιό δεν υπάρχει σημαντική αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών των εγγύς των παρακομβικών περιοχών. Στα ραβδογράμματα παρουσιάζονται: mean, standard deviation.

Προχωρώντας ένα βήμα παραπέρα στη βιοχημική άναλυση των Tag-1^{-/-} μυών, θελήσαμε να ελέγξουμε τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων νευροϊνιδίων χρησιμοποιώντας το μονοκλωνικό αντίσωμα SMI31 (ανιχνεύει κυρίως τη βαριά υπομονάδα των νευροϊνιδίων). Τα νευροϊνίδια φωσφορυλιώνονται κατά την ανάπτυξη και μυελίνωση των νευραξόνων, ενώ υπερφωσφορυλίωσή τους παρατηρείται σε κάποιες παθολογικές καταστάσεις όπως η νόσος Alzheimer (Sternberger et al., 1985; Hu et al., 2002). Πειράματα ανοσοαποτύπωσης στις περιοχές του οσφρητικού λοβού, της παρεγκεφαλίδας, του ιππόκαμπου και του ενδορινικού φλοιού, έδειξαν μια μικρή αλλά σημαντική μείωση στον οσφρητικό λοβό των Tag-1^{-/-} ζώων (Εικόνα 27, p value=0,012, n=2). Η μείωση αυτή θα μπορούσε να υπονοεί βλάβη στα νευρικά κύτταρα που βρίσκονται εκεί και η υπόθεση αυτή βρίσκεται υπό μελέτη στο εργαστήριο. Στις υπόλοιπες περιοχές, τα επίπεδα έκφρασης των φωσφορυλιωμένων νευροϊνιδίων παραμένουν αμετάβλητα.



Εικόνα 27. Ανοσοαποτύπωση στον οσφρητικό λοβό (olfactory bulb), την παρεγκεφαλίδα (cerebellum), τον ιππόκαμπο (hippocampus) και τον ενδορινικό φλοιό (entorh.cortex) φυσιολογικών και Tag-1^{-/-} ενήλικων μυών. 2 ζώα από κάθε γονότυπο αναλύθηκαν σε αυτό το πείραμα. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για τη φωσφορυλιωμένη βαριά υπομονάδα των νευροϊνιδίων και τη β-ακτίνη σαν πρωτεΐνη μάρτυρα. Όπως φαίνεται στα ραβδογράμματα που αντιστοιχούν στην κάθε περιοχή, στατιστικά σημαντική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των νευροϊνιδίων εντοπίζεται μόνο στην περιοχή του οσφρητικού λοβού (της τάξεως του 40%). Στα ραβδογράμματα παρουσιάζονται: mean, standard deviation.

Γ.1.4. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση των κόμβων του Ranvier

Απο την ανοσοϊστοχημική ανάλυση που προηγήθηκε (παράγραφος 1.2.) δεν εντοπίστηκαν αλλαγές στον εντοπισμό των διαύλων Nav1.6 στους κόμβους τους

Ranvier, αλλά παρατηρήθηκε μια αύξηση του αριθμού των κόμβων στις περιοχές του μεσολοβίου και της λευκής ουσίας της παρεγκεφαλίδας των $Tag-1^{-/-}$ ζώων σε σύγκριση με τα φυσιολογικά. Για να διερευνήσουμε περαιτέρω αυτή την υπόθεση, πραγματοποιήθηκαν επιπλέον πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε κρυτομές εγκεφάλου και παρεγκεφαλίδας από αγρίου τύπου και $Tag-1^{-/-}$ ζώα (n=3). Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης Caspr και των διαύλων καλίου καθώς και έναντι των υπομονάδων 1.2 και 1.6 των διαύλων νατρίου. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή η υπομονάδα Nav1.2 εμφανίζεται στους κόμβους του Ranvier κατά την ανάπτυξή τους και παραμένει έως την ωρίμανση τους κατά την οποία αντικαθίσταται από την υπομονάδα Nav1.6. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 28, η υπομονάδα Nav1.2 απουσιάζει από τους ώριμους κόμβους τόσο στα αγρίου τύπου όσο και στα ομόζυγα μεταλλαγμένα για την TAG-1 ζώα (A-B, E-F). Αντίθετα η υπομονάδα 1.6 εντοπίζεται σε όλους τους κόμβους, ενώ ο αριθμός των σημασμένων κόμβων φαίνεται ελαφρώς αυξημένος στα $Tag-1^{-/-}$ ζώα σε σύγκριση με τα φυσιολογικα και στις δύο περιογές που μελετήθηκαν (C-D, G-H). Η αύξηση αυτή δείχνει με έμμεσο τρόπο μείωση του μεσοκομβικού διαστήματος λόγω της απουσίας της πρωτεΐνης TAG-1, ενώ ο μηγανισμός μέσω του οποίου αυτό μπορεί να συμβαίνει παραμένει να διερευνηθεί.



Εικόνα 28. Εκφραση των διαύλων νατρίου στο μεσολόβιο (A-D) και τη λευκή ουσία της παρεγκεφαλίδας (E-H) φυσιολογικών και $Tag-1^{-/-}$ μυών. Ανοσοϊστοχημεία σε κρυοτομές εγκεφάλου και παρεγκεφαλίδας χρησιμοποιώντας αντισώματα για την παρακομβική Caspr και την υπομονάδα των διαύλων καλίου Kv1.1 σε συνδυασμό με τους διαύλους νατρίου Nav1.6 και Nav1.2 αντίστοιχα (A-H). Παρατηρείται μικρή αύξηση του αριθμού των Nav1.6 θετικών κόμβων στα $Tag-1^{-/-}$ ζώα (D,H), ενώ απουσιάζει πλήρως η υπομονάδα 1.2 και από τους δύο γονοτύπους, όπως αναμένονταν (A-B, E-F).

Γ.2.ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΜΥΩΝ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΑG-1 ΑΠΟΚΛΕΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟ ΤΑ ΟΛΙΓΟΔΕΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ

Στο πρώτο μέρος της μελέτης μας, αποδείξαμε πως η έλλειψη της πρωτεΐνης TAG-1 οδηγεί σε συμπεριφορικά ελλείμματα τα οποία συνοδεύονται από διαταραχή της μοριακής οργάνωσης των εμμύελων ινών σε όλες τις περιοχές του Κ.Ν.Σ. που ελέγχθηκαν. Η μελέτη αυτή επιβεβαιώνει και ενισχύει τον απαραίτητο ρόλο της TAG-1 στη δημιουργία του συμπλόκου των εγγύς των παρακομβικών περιοχών. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, το μόριο TAG-1 εκφράζεται από τα νευρικά και τα κύτταρα γλοίας στο ενήλικο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα (Traka et al., 2002). Στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή, είναι η μοναδική πρωτεΐνη που έχει αναγνωριστεί έως σήμερα να εκφράζεται στην πλευρά του εμμύελου γλοιακού κυττάρου. Στο προτεινόμενο μοντέλο των αλληλεπιδράσεων της εγγύς της παρακομβικής περιοχής η γλοιακή TAG-1 αλληλεπιδρά ομοφιλικά με την αξονική TAG-1, η οποία στη συνέχεια αλληλεπιδρά *in trans* με τα μόρια του άξονα Caspr2 και τους διαύλους καλίου.

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής, στόχος μας είναι η μελέτη του ρόλου της γλοιακής TAG-1 στο Κ.Ν.Σ., απουσία της πρωτεΐνης από τον άξονα στα εξής: α) την οργάνωση των εγγύς των παρακομβικών περιοχών, β) τη ρύθμιση του μήκους του μεσοκομβικού διαστήματος, γ) τη μυελίνωση και κατανομή των αξόνων του οπτικού νεύρου και δ) τη συμπεριφορά των διαγονιδιακών μυών. Για το λόγο αυτό δημιουργήθηκαν διαγονιδιακοί μύες που εκφράζουν το ομόλογο της πρωτεΐνης TAG-1 του αρουραίου (rTAG-1) στα ολιγοδενδροκύτταρα του Κ.Ν.Σ. υπό τον έλεγχο του υποκινητή του *plp* γονιδίου. Η έκφραση των άλλων δομικών πρωτεϊνών της μυελίνης που ξεκινάει αμέσως μετά τη γέννηση στα τρωκτικά (Jiang et al., 2000). Προχωρήσαμε σε μία σειρά διασταυρώσεων των παραπάνω μυών με *Tag-1^{-/-}* ζώα, ώστε να αποκτήσουμε τελικά μύες οι οποίοι εκφράζουν την TAG-1 αποκλειστικά στα ολιγοδενδροκύτταρα.

Στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκαν αγρίου τύπου και ετερόζυγα για την TAG-1 ζώα (*Tag-1*^{+/-}), ομόζυγα μεταλλαγμένα ζώα (*Tag-1*^{-/-}) και τα διαγονιδιακά ζώα με την αποκλειστική γλοιακή έκφραση της TAG-1 στο K.N.Σ. (*Tag-1*^{-/-};*plp*^{Tg(rTag-1)}). Αντίστοιχα με την ανάλυσή του πρώτου μέρους, ακολουθήσαμε ανοσοϊστοχημικές και βιοχημικές προσεγγίσεις καθώς και μορφολογική μελέτη οπτικών νεύρων για την αναζήτηση βλαβών στο πάχος της μυελίνης και την κατανομή των αξόνων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε συμπεριφορική ανάλυση των $Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)}$ μυών και σύγκριση τους με $Tag-1^{-/-}$ και αγρίου τύπου ζώα.

Γ.2.1. Ανάλυση της έκφρασης του διαγονιδίου και καθορισμός του εντοπισμού της rTAG-1

Όπως αναφέρεται στην παράγραφο «Μέθοδοι και Υλικά», αποκτήθηκαν 5 διαγονιδιακές σειρές μυών θετικές στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για το διαγονίδιο *plp*-r*Tag-1*. Από αυτές, η μία (που ονομάζονταν RT27) παρουσίαζε προβλήματα στην αναπαραγωγή και έτσι εξαλείφθηκε. Οι άλλες 4 σειρές (που ονομάζονταν RT6, RT20, RT29 και RT38) ελέγχθηκαν για την έκφραση του διαγονιδίου με πειραμάτα ανοσοαποτύπωσης σε εγκεφαλικό φλοιό. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 29, η διαγονιδιακή πρωτεΐνη rTAG-1 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα *Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)}* ζώα από όλες τις διαγονιδιακές σειρές. Τα πειράματα που παρουσιάζονται στις επόμενες εικόνες (30-32 και 34-39) αφορούν σε ζώα της σειράς RT38, όμως όπως φαίνεται στην Εικόνα 33, ο φαινότυπος των ζώων όσον αφορά στην αρχιτεκτονική των εμμύελων ινών είναι όμοια σε όλες τις σειρές.

Εικόνα 29. Ανοσοαποτύπωση σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από εγκεφαλικό φλοιό με αντισώματα για την TAG-1 και την ακτίνη σαν εσωτερική πρωτεΐνη μάρτυρα. Η έκφραση της διαγονιδιακής πρωτεΐνης είναι υψηλή στα ζώα από όλες τις σειρές με υψηλότερα επίπεδα να εμφανίζονται στη σειρά RT6. Στις σειρές RT6, RT20 και RT38 εμφανίζεται διπλή ζώνη για την TAG-1. Η κάτω ζώνη, δεν αντιστοιχεί στην εκκρινόμενη μορφή της πρωτεΐνης (τα αποτελέσματα δεν



παρουσιάζονται) και εμφανίζεται κάποιες φορές και στα εκχυλίσματα από φυσιολογικούς μύες.

Επόμενος στόχος ήταν ο έλεγχος του εντοπισμού του διαγονιδιακού προϊόντος. Στην Εικόνα 30 φαίνονται αποτελέσματα ανοσοϊστοχημείας σε οβελιαίες κρυοτομές παρεγκεφαλίδας από ενήλικα φυσιολογικά ετερόζυγα ($Tag-1^{+/-}$), ομόζυγα $(Tag-l^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)}).$ $(Tag-1^{-/-})$ μεταλλαγμένα και διαγονιδιακά ζώα Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα πρωτεΐνη-μάρτυρα για την των ολιγοδενδροκυττάρων Olig2 και την παρακομβική πρωτεΐνη Caspr σε συνδυασμό με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει ειδικά την πρωτεΐνη TAG-1 του αρουραίου (rTAG-1) και όχι του μυός. Όπως φαίνεται στο συγκεκριμένο πείραμα, το διαγονιδιακό προϊόν εντοπίζεται στην επιφάνεια των ολιγοδενδροκυττάρων και διάσπαρτο σε ίνες στη λευκή ουσία της παρεγκεφαλίδας των $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ ζώων (Εικόνα 30C). Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων ανοσοϊστοχημείας (Εικόνα 30D-F) η rTAG-1 εντοπίζεται στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές δίπλα στην Caspr. Επομένως, το διαγονίδιο είναι ενεργό και η πρωτεΐνη rTAG-1 εκφράζεται όπως αναμένονταν από ολιγοδενδροκύτταρα, ενώ εντοπίζεται φυσιολογικά στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή.



Εικόνα 30. Η διαγονιδιακή πρωτεΐνη rTAG-1 εντοπίζεται φυσιολογικά στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή των εμμύελων ινών της παρεγκεφαλίδας των *Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)}* ζώων. Α-C. Ανοσοϊστοχημεία για τη rTAG-1 και την πρωτεΐνη μάρτυρα των ολιγοδενδροκυττάρων Olig2. Η rTAG-1 εντοπίζεται στην επιφάνεια

των ολιγοδενδροκυττάρων και διάσπαρτη στη λευκή ουσία. D-F. Παραπέρα πειράματα ανοσοϊστοχημείας δείχνουν τη rTAG-1 να εκφράζεται στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή στους *Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)}* μύες. Με μπλε (To-Pro3 iodide) απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων. Κλίμακα: 10 μm.

Για να ελέγξουμε εάν η διαγονιδιακή πρωτεΐνη βρίσκεται επίσης σε διαλυτή μορφή (εκτός από τη συνδεδεμένη στη μεμβράνη), πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοαποτύπωσης σε υπερκείμενο θρεπτικό μέσο από καλλιέργειες γλοιακών κυττάρων εγκεφάλου. Τα γλοιακά κύτταρα απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν (από τη Λήδα Ζούπη) από νεογέννητους *Tag-1^{-/-}* και *Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)}* μύες. Το παραπάνω πείραμα έδειξε πως το διαγονιδιακό προϊόν βρίσκεται και σε διαλυτή μορφή εκτός από τη μεμβρανική (Εικόνα 31Α).

Σύμφωνα με παλαιότερες μελέτες ο υποκινητής του *plp* γονιδίου είναι ενεργός σε κάποιες ομάδες νευρικών κυττάρων (Bongarzone et al., 1999; Miller et al., 2009; Gomez-Casati et al., 2009). Για να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο έκφρασης του διαγονιδίου μας σε νευρικά κύτταρα πραγματοποιήσαμε μια σειρά πειραμάτων ανοσοφθορισμού σε κρυοτομές παρεγκεφαλίδας και καλλιέργειες από διαχωρισμένα κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού (το πείραμα στις καλλιέργειες έγινε από τη Λήδα Ζούπη). Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για μία πρωτεΐνη-μάρτυρα των νευρικών κυττάρων (NeuN, Neuronal Nuclei) και την rTAG-1 (Εικόνα 31B-C). Όπως φαίνεται, σε καμία περίπτωση δεν υπάρχει έκφραση του διαγονιδίου στα νευρικά κύτταρα στα $Tag-1^{-/-}$; *plp*^{Tg(rTag-1)} ενήλικα ζώα.



Εικόνα 31. Η διαγονιδιακή πρωτεΐνη rTAG-1 εντοπίζεται και σε διαλυτή μορφή, ενώ η έκφρασή της αποκλείεται από τα νευρικά κύτταρα. Α. Ανοσοαποτύπωση για την TAG-1 ίσης ποσότητας υπερκέιμενου θρεπτικού μέσου από καλλιέργειες γλοιακών κυττάρων από νεογέννητα *Tag-1^{-/-}* (1) και *Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)}* (2) ζώα. Η ποσότητα των δειγμάτων ελέγχεται με τη χρώση του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με Colloidal Blue (κάτω τμήμα). Β. Ανοσοϊστοχημεία σε κρυοτομές παρεγκεφαλίδας από *Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)}* μύες με αντισώματα για τη πρωτεΐνη των νευρικών κυττάρων NeuN και τη rTAG-1. Η διαγονιδιακή πρωτεΐνη δεν εκφράζεται στα νευρικά κύτταρα. C. Πείραμα ανοσοφθορισμού σε dissociated κύτταρα από εγκεφαλικό φλοιό φυσιολογικών (πάνω σειρά φωτογραφιών) και *Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)}* (κάτω σειρά) ζώων. Χρησιμοποιήθηκε ένα πολυκλωνικό αντίσωμα για την TAG-1 που αναγνωρίζει τα ομόλογα του αρουραίου και του μυός. Η πρωτεΐνη TAG-1 εκφράζεται και σε νευρικά κυτταρα στα αγρίου τύπου ζώα, ενώ αυτό δεν ισχύει για τα *Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)}* ¹⁾. Με μπλε (To-Pro3 iodide) απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων. Κλίμακα: 10 μm.

Γ.2.2. Μελέτη της αρχιτεκτονικής της εγγύς της παρακομβικής περιοχής των εμμύελων κεντρικών ινών στους Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)} μύες

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ένας βασικός στόχος της δημιουργίας των Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)} μυών ήταν η μελέτη του ρόλου της γλοιακής TAG-1, απουσία της πρωτεΐνης στον άξονα, στην οργάνωση της εγγύς της παρακομβικής περιοχής. Στη συγκεκριμένη ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν ζώα από τους τρεις γονοτύπους: Tag-1^{+/-}, Tag-1^{-/-} και Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)}. Πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων ανοσοϊστοχημείας σε οβελιαίες κρυοτομές από οπτικό νέυρο, ιππόκαμπο, μεσολόβιο, ενδορινικό φλοιό και παρεγκεφαλίδα. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για την παρακομβική πρωτεΐνη Caspr και τα μόρια των εγγύς των παρακομβικών περιοχών Caspr2 και τους διαύλους καλίου Kv1.2.

Αρχικά μελετήσαμε τις εγγύς των παρακομβικών περιοχές σε οριζόντιες τομές οπτικού νεύρου (Εικόνα 32). Ανοσοϊστοχημεία για την Caspr και την Caspr2 ή την Caspr και τους διαύλους Kv1.2 έδειξε πως ο εντοπισμός των πρωτεϊνών στην εγγύς των παρακομβικών περιοχές είχε αποκατασταθεί στα Tag-1--;plp^{Tg(rTag-1)} ζώα, σε σύγκριση με τα ομόζυγα μεταλλαγμένα (Εικόνα 32A-F). Στα Tag-1^{-/-} ζώα, η Caspr2 απουσιάζει από τις εγγύς των παρακομβικών περιοχές, όπως και οι δίαυλοι καλίου, οι οποίοι εμφανίζονται σε κάποιες περιπτώσεις διάχυτοι προς το μεσοκομβικό διάστημα (Εικόνα 32C-D). Οι παρακομβικές περιοχές παραμένουν αμετάβλητες σε όλες τις περιπτώσεις. Για να ελέγξουμε αν η διάσωση του μοριακού φαινοτύπου των Tag-1ζώων είναι πλήρης όταν εκφράζεται η TAG-1 από το γλοιακό κύτταρο, προχωρήσαμε σε ποσοτικοποίηση του αριθμού των παρακομβικών περιοχών (σημασμένες με Caspr), δίπλα στις οποίες εντοπίζεται φυσιολογικά συσσωρευμένη Caspr2 ή Kv1.2. Στα ραβδογράμματα της Εικόνας 32, παρουσιάζεται το ποσοστό % των παρακομβικών περιοχών με συσσωρευμένη Caspr2(G) ή Kv1.2(H) στην εγγύς τους περιοχή. Όπως φαίνεται, στα $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ ζώα η έκφραση της γλοιακής TAG-1 είναι ικανή να διασώσει πλήρως το μοριακό φαινότυπο των Tag-1^{-/-} μυών, αποκαθιστώντας πλήρως τη συσσώρευση των πρωτεϊνών της εγγύς της παρακομβικής περιοχής.



Εικόνα 32. Η γλοιακή TAG-1 είναι επαρκής για τη διατήρηση του συμπλόκου των εγγύς των παρακομβικών περιοχών. Ανοσοϊστοχημεία σε οριζόντιες κρυοτομές οπτικού νέυρου από ενήλικα $Tag-1^{+/-}$, $Tag-1^{-/-}$ και $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ ζώα. Η πρωτεΐνη Caspr2 (A,C,E) και οι δίαυλοι Kv1.2 (B,D,F) εντοπίζονται φυσιολογικά στους Tag-1^{+/-} και Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)} μύες, ενώ απουσιάζουν από τα $Tag-1^{-/-}$ ζώα. Ποσοτικοποίηση του ποσοστού των εγγύς των παρακομβικών περιογών με σωστά συσσωρευμένη Caspr2 (G) ή διαύλους καλίου (Η) έδειξε πως υπάρχει δραματική μείωση στα $Tag-1^{-/-}$ ζώα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ή τα $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ (85% για την Caspr2 και 60% για τα Kv1.2, p value<0.05, n=3). Αντιθέτως, δεν εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις τιμές των $Tag-1^{+/-}$ και Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)} μυών. Κλίμακα: 10 μm. Στα ραβδογράμματα παρουσιάζονται: mean, standard error of the mean.

Στην Εικόνα 32 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη σειρά διαγονιδιακών ζώων RT38. Θελήσαμε να ελέγξουμε τη μοριακή αρχιτεκτονική των εμμύελων ινών και στις άλλες 3 διαγονιδιακές σειρές, ώστε να βεβαιωθούμε ότι τα αποτελέσματα μας οφείλονται στην έκφραση της γλοιακής rTAG-1 και δεν είναι τυχαία. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 33, πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε οριζόντιες κρυοτομές από οπτικό νεύρο $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ μυών από τις σειρές RT6, RT20 και RT29, έδειξαν πως ο φαινότυπος στα διαγονιδιακά ζώα είναι ο ίδιος ανεξάρτητα από τα επίπεδα έκφρασής του. Έτσι, η αποκλειστική έκφραση της TAG-1 στα γλοιακά κύτταρα του Κ.Ν.Σ. είναι ικανή και επαρκής για την οργάνωση και διατήρηση του συμπλόκου των εγγύς των παρακομβικών περιογών.



Tag-1--; plpTg(rTag-1)

Εικόνα 33. Η μοριακή οργάνωση των εγγύς των παρκομβικών περιοχών έχει αποκατασταθεί στα διαγονιδιακά ζώα από όλες τις σειρές. Ανοσοϊστοχημεία σε οριζόντιες κρυοτομές οπτικού νέυρου από ενήλικα Tag-1^{+/-}, Tag-1^{-/-} και Tag-1^{-/-} ;plp^{Tg(rTag-1)} ζώα από τις σειρές RT6, RT20 και RT29. Όπως φαίνεται οι πρωτεΐνες των εγγύς των παρακομβικών περιοχών Caspr2 και Kv1.2 εντοπίζονται φυσιολογικά στα διαγονιδιακά ζώα όλων των σειρών όμοια με τα φυσιολογικά ετερόζυγα. Κλίμακα: 10 μm.

Στη συνέχεια της ανάλυσής μας θελήσαμε να μελετήσουμε τη μοριακή οργάνωση των εγγύς των παρακομβικών περιοχών και σε άλλες περιοχές του Κ.Ν.Σ. πέραν του οπτικού νεύρου. Γι' αυτό το λόγο, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε οβελιαίες τομές ενήλικου εγκεφάλου στο επίπεδο του ιπποκάμπου και του ενδορινικού φλοιού, του μεσολοβίου και της παρεγκεφαλίδας. Χρησιμοποιήθηκαν και σε αυτήν την περίπτωση αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών Caspr2 και Kv1.2 σε συνδυασμό με αντισώματα για την παρακομβική Caspr. Στις Εικόνες 34 και 35 απεικονίζονται τα παραπάνω πειράματα για την Caspr2 και τους διαύλους καλίου αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 34 η Caspr2 εντοπίζεται φυσιολογικά στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές, δίπλα στην Caspr, στα Tag-1- $plp^{Tg(rTag-1)}$ ζώα σε αντίθεση με τα $Tag-1^{-/-}$ από τα οποία απουσιάζει. Αντίστοιγα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 35 οι δίαυλοι καλίου Κν1.2 εντοπίζονται συσσωρευμένοι στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές σε όλα τα τμήματα του εγκεφάλου που εξετάστηκαν στα $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ ζώα σε αντίθεση με τους $Tag-1^{-/-}$ μύες στους οποίους, στις λίγες περιπτώσεις που οι δίαυλοι εντοπίζονται, βρίσκονται διάγυτοι προς το μεσοκομβικό διάστημα.

Συμπερασματικά, η αποκλειστική έκφραση της πρωτεΐνης TAG-1 από τα ολιγοδενδροκύτταρα είναι επαρκής για την οργάνωση της εγγύς της παρακομβικής περιοχή των κεντρικών εμμύελων ινών και τη συσσώρευση των διαύλων καλίου στις περιοχές αυτές.



Εικόνα 34. Η πρωτεΐνη Caspr2 εντοπίζεται φυσιολογικά στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές των Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)} μυών σε διάφορες περιοχές του Κ.Ν.Σ. Ανοσοϊστοχημεία σε οβελιαίες κρυοτομές εγκεφάλου και παρεγκεφαλίδας ενήλικων Tag-1^{-/-} και Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)} μυών. Η πρωτεΐνη των εγγύς των παρακομβικών περιοχών Caspr2 εντοπίζεται φυσιολογικά στις εμμύελες ίνες της περιοχής CA3 του ιπποκάμπου, το μεσολόβιο (corpus calossum, CC), τον ενδορινικό

φλοιό (entorhinal cortex, EC) και τη λευκή ουσία της παρεγκεφαλίδας (cerebellum, CER). mf=mossy fibers, βρυώδεις ίνες; pyr: pyramidal cells, πυραμιδικά κύτταρα. Με μπλε (To-Pro3 iodide) απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων. Κλίμακα: 10 μm.



Εικόνα 35. Η πρωτέινη Kv1.2 εντοπίζεται φυσιολογικά στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές των Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)} μυών σε διάφορες περιοχές του K.N.Σ. Ανοσοιστοχημεία σε οβελιαίες κρυοτομές εγκεφάλου και παρεγκεφαλίδας ενήλικων Tag-1^{-/-} και Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)} μυών. Η πρωτείνη των εγγύς των παρακομβικών περιοχών Kv1.2 εντοπίζεται φυσιολογικά στις εμμύελες ίνες της περιοχής CA3 του ιπποκάμπου, το μεσολόβιο (corpus calossum, CC), τον ενδορινικό φλοιό (entorhinal cortex, EC) και τη λευκή ουσία της παρεγκεφαλίδας (cerebellum,

CER). mf=mossy fibers, βρυώδεις ίνες; pyr: pyramidal cells, πυραμιδικά κύτταρα. Με μπλε (To-Pro3 iodide) απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων. Κλίμακα: 10 μm. Οι αστερίσκοι επισημαίνουν την εγγύς της παρακομβικής περιοχή.

Γ.2.3. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση των κόμβων του Ranvier στους Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-} ¹⁾ μύες

Όπως αναφέρθηκε στο πρώτο μέρος των αποτελεσμάτων, στους Tag-1^{-/-} μύες παρατηρείται αυξημένη συχνότητα κόμβων του Ranvier η οποία υποδηλώνει μικρότερα μεσοκομβικά διαστήματα. Στόχος μας τώρα είναι η ανάλυση των Tag-1^{-/-} $plp^{Tg(rTag-1)}$ διαγονιδιακών μυών ως προς τον αριθμό των κόμβων του Ranvier. Για να ελέγξουμε εάν η αποκλειστική έκφραση της γλοιακής TAG-1 είναι ικανή να επηρεάσει τη συχνότητα των κόμβων του Ranvier, αναλύσαμε με πειράματα ανοσοϊστοχημείας τη λευκή ουσία της παρεγκεφαλίδας που βρίσκεται εσωτερικά δύο κοκιωδών στοιβάδων. Χρησιμοποιήθηκαν 3 ζώα από καθένα από τους παρακάτω $Tag-1^{+/-}$, $Tag-1^{-/-}$ και $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$. Πραγματοποιήθηκε γονοτύπους: ανοσοϊστοχημεία για τους διαύλους νατρίου, που σημαίνουν του κόμβους του Ranvier και την Caspr που σημαίνει την παρακομβική περιοχή (Εικόνα 36A-C και A'-C'). Παρατηρείται μια μικρή αύξηση του αριθμού των κόμβων του Ranvier στα Tag-1^{-/-} ζώα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά η οποία φαίνεται να αποκαθίσταται στους $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ μύες. Ποσοτικοποίηση του αριθμού των κόμβων σε περιοχή εμβαδού 65μm² απεικονίζεται στο ραβδόγραμμα D της Εικόνας 36, όπου φαίνεται αύξηση στα $Tag-1^{-/-}$ ζώα σε σύγκριση με τα $Tag-1^{-/-}$ και $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$, ενώ δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά ανάμεσα στα $Tag-1^{+/-}$ και $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ ζώα. Τα παραπάνω αποτελέσματα προτείνουν πως η έκφραση της TAG-1 από τα γλοιακά κύτταρα και όχι από τον άξονα είναι αυτή που επηρεάζει το μήκος του μεσοκομβικού διαστήματος.



Εικόνα 36. Η συχνότητα των κόμβων του Ranvier είναι φυσιολογική στα $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ ζώα. Α-C. Ανοσοϊστοχημεία σε οβελιαίες κρυοτομές παρεγκεφαλίδας στο επίπεδο της λευκής ουσίας, από $Tag-1^{-/-}$, $Tag-1^{-/-}$ και $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ ζώα.

Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για τους διαύλους νατρίου (κόμβοι του Ranvier) και την Caspr (παρακομβική περιοχή). A'-C'. Φαίνεται μόνο το σήμα από τους διαύλους νατρίου από τις ανοσοϊστοχημείες των A-C. Παρατηρείται μικρή αύξηση της συχνότητας των κόμβων στα $Tag-1^{-/-}$ ζώα που φαίνεται να αποκαθίσταται στα $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$. D. Ποσοτικοποίηση του αριθμού των κόμβων στα ζώα των τριών γονοτύπων. Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα $Tag-1^{+/-}$ και $Tag-1^{-/-}$ όπως και ανάμεσα στα $Tag-1^{-/-}$ και $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ ζώα (p value<0.05), ενώ δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους $Tag-1^{+/-}$ και $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ μύες (4 περιοχές μετρήθηκαν από κάθε ζώο. Η στατιστική σύγκριση περιλαμβάνει όλες τις μετρήσεις για όλα τα ζώα).

Γ.2.4. Μελέτη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα μόρια που συγκροτούν το σύμπλοκο της εγγύς της παρακομβικής περιοχής των εμμύελων ινών στους Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)} μύες

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, οι πρωτεΐνες της εγγύς της παρακομβικής περιοχής αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν ένα τριμερές σύμπλοκο που αποτελείται από τους διαύλους καλίου και την Caspr2 που αποτελούν μόρια του άξονα, καθώς και την TAG-1. Όπως δείξαμε έως τώρα στη μελέτη μας, η γλοιακή TAG-1 είναι ικανή, απουσία της αξονικής, να οργανώσει την εγγύς της παρακομβικής περιοχή και να διατηρήσει το σύμπλοκο της. Τα προηγούμενα λοιπόν αποτελέσματα συνηγορούν υπέρ της αλληλεπίδρασης της TAG-1 στο γλοιακό κύτταρο με τις άλλες πρωτεΐνες του συμπλόκου στον άξονα. Για να επιβεβαιώσουμε και να διερευνήσουμε παραπέρα αυτές τις αλληλεπιδράσεις, πραγματοποιήθηκαν πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης στα οποία χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει ειδικά την ομόλογη TAG-1 πρωτεΐνη του αρουραίου (Εικόνα 37). Σε μία πρώτη σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε πρωτεϊνικό εκχύλισμα από εγκεφαλικό φλοιό Tag-1--;plp^{Tg(rTag-1)} μυών και από εγκεφαλικό φλοιό ενήλικου αρουραίου που χρησιμοποιήθηκε σαν δείγμα-μάρτυρας για τις αλληλεπιδράσεις της TAG-1 με την Caspr2 και τους διαύλους καλίου. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 37Α, ανοσοαποτύπωση για τις πρωτεΐνες Caspr2 και Kv1.2 έδειξε πως αυτά τα μόρια αλληλεπιδρούν φυσικά με την γλοιακή rTAG-1 στα $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ ζώα.

Σε μία δεύτερη σειρά πειραμάτων, πραγματοποίηθηκαν μικτές καλλιέργειες ΗΕΚ293Τ κυττάρων στις οποίες συνδυάστηκαν κύτταρα που εκφράζουν την rTAG-1 με κύτταρα που εκφράζουν την Caspr2 ή την Caspr. Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε με σκοπό την ανίχνευση πιθανής αλληλεπίδρασης στο επίπεδο απεναντινών μεμβρανών (*in trans*) ανάμεσα στην TAG-1 και την Caspr2. Οι δύο πληθυσμοί κυττάρων συνδυάστηκαν και καλλιεργήθηκαν μαζί για μία ημέρα. Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα από αυτές τις καλλιέργειες υποβλήθηκε σε πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης με το αντίσωμα για τη rTAG-1. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 37B με ανοσοαποτύπωση για την Caspr2 ανιχνέυθηκε η άμεση αλληλεπίδρασή της *in trans* με τη rTAG-1, ενώ όπως αναμένονταν δεν ανιχνέυθηκε αντίστοιχη αλληλεπίδραση με την Caspr. Στην Εικόνα 37C (και D σε μεγαλύτερη μεγέθυνση) φαίνεται το σημείο της αλληλεπίδρασης ανάμεσα σε δύο κύτταρα σε καλλιέργεια, από τα οποία το ένα εκφράζει τη rTAG-1 και το άλλο την Caspr2.

Στα πλαίσια της μελέτης των αλληλεπιδράσεων που μπορεί να συμβαίνουν στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή των Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)} ζώων, εξετάσαμε παραπέρα εάν η διαλυτή rTAG-1 που εντοπίζεται στο υπερκείμενο μέσο της καλλιέργειας των γλοιακών κυττάρων από Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)} μύες μπορεί να προσδεθεί σε κύτταρα HEK293T που εκφράζουν την Caspr2 στην επιφάνεια τους. Πραγματοποιήθηκαν πολλά πειράματα με κυμαινόμενες ποσότητες υπερκείμενου μέσου (με μέγιστη την ποσότητα από τον εγκεφαλικό φλοιό ενός νεογέννητου ζώου) ανά τριβλίο διαμέτρου 35 mm με HEK293T-Caspr2 κύτταρα. Σε καμία περίπτωση δε μπορέσαμε να εντοπίσουμε τη διαλυτή πρωτεΐνη rTAG-1 προσδεδεμένη στην επιφάνεια των κυττάρων που εκφράζουν Caspr2 (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).



Εικόνα 37. Η διαγονιδιακή πρωτεΐνη rTAG-1 αλληλεπιδρά in trans με την Caspr2. Α. Συν-ανοσοκατακρήμνιση σε εγκεφαλικό φλοιό από ενήλικα Tag-1^{-/-} ;plp^{Tg(rTag-1)} ζώα και από ενήλικους αρουραίους. Χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα που αναγνωρίζει ειδικά και κατακρημνίζει τη rTAG-1. Ανοσοαποτύπωση για τη TAG-1 αποκαλύπτει πως η ανοσοκατακρήμνιση ήταν αποτελεσματική και ανοσοαποτύπωση για τις Caspr2 και Kv1.2 αποκαλύπει τη φυσική αλληλεπίδραση τους με τη rTAG-1. Β. Συν-ανοσοκατακρήμνιση σε μικτές καλλιέργειες κυττάρων HEK293T που εκφράζουν τη rTAG-1 με κύτταρα που εκφράζουν την Caspr2 ή την Caspr. Χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα που αναγνωρίζει ειδικά και κατακρημνίζει τη rTAG-1. Ανοσοαποτύπωση για τις Caspr2 και Caspr έδειξε πως η rTAG-1 αλληλεπιδρά in trans με την πρώτη αλλά όχι με τη δέυτερη. C. Ανοσοφθορισμός στις προηγούμενες μικτές καλλιέργειες για τη rTAG-1 (κόκκινο) και την Caspr2 (πράσινο). Οι δύο πρωτεΐνες συνεντοπίζονται στα σημεία επαφής των δύο κυττάρων. Κλίμακα: 10μm. D. Μεγαλύτερη μεγέθυνση του C. Κλίμακα: 5μm. Με μπλε (To-Pro3 iodide) στα C και D απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων.
Γ.2.5. Μορφολογική ανάλυση του οπτικού νεύρου των Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)} μυών

Σύμφωνα με τη μελέτη των Chatzopoulou, Miguez et al. που δημοσιεύθηκε το 2008, απουσία της πρωτεΐνης TAG-1 στους $Tag-I^{-/-}$ μύες έχει σαν αποτέλεσμα υπομυελίνωση και μείωση της πυκνότητας του οπτικού νεύρου που οφείλεται κυρίως στη δραματική μείωση του αριθμού των μικρής διαμέτρου αζόνων. Εκτός από τη μοριακή μελέτη των εγγύς των παρακομβικών περιοχών, ένας άλλος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η μορφολογική ανάλυση των ινών του οπτικού νεύρου των $Tag-I^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ μυών σε σύγκριση με τους $Tag-I^{-/-}$ και τους φυσιολογικούς. Δείγματα οπτικού νεύρου από ενήλικους φυσιολογικούς (αγρίου τύπου και ετερόζυγα μεταλλαγμένα), $Tag-I^{-/-}$ και $Tag-I^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ μύες επεξεργάστηκαν κατάλληλα και εγκάρσιες τομές τους παρατηρήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Το πρώτο θέμα που θελήσαμε να διερευνήσουμε αφορά στη μυελίνωση. Για το σκοπό αυτό μετρήσαμε το g ratio (διάμετρος του άξονα/ διάμετρος του άξονα συμπεριλαμβανομένου του στρώματος μυελίνης) των εμμύελων αξόνων του οπτικού νεύρου, που αποτελεί δείκτη για το πάχος της μυελίνης. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 38A, το g ratio αντικατοπτρίζει το πάχος της μυελίνης που περιλαμβάνεται στις στικτές λευκές γραμμές. Όσο μεγαλύτερη η τιμή του g ratio τόσο μικρότερο είναι το πάχος της μυελίνης. Στο διάγραμμα Β της ίδιας εικόνας παρουσιάζεται η διάμετρος των αξόνων στον άξονα των x και τα αντίστοιχα g ratios στον άξονα των y. Η μαύρη γραμμή αντιπροσωπεύει τις μέσες τιμές του g ratio για τις διάφορες διαμέτρους άξονα των $Tag-1^{-/-}$ μυών και η γκρι γραμμή των $Tag-1^{-/-}$ $;plp^{Tg(rTag-1)}$ ζώων. Όπως φαίνεται, οι άξονες των $Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)}$ ζώων παρουσιάζουν μία μικρή αύξηση του πάχους της μυελίνης σε σύγκριση με τα $Tag-1^{-1}$. Για τα $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ οπτικά νεύρα η μέση τιμή όλων των g ratio (g0) είναι 0.701, ενώ για τα $Tag-1^{-/-}$ ζώα είναι 0.735. Όταν συγκρίθηκαν τα $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ με τα φυσιολογικά ζώα δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά (αγρίου τύπου g0=0.7078 και για τα $Tag-1^{+/-}$ g0=0.7077). Συμπερασματικά, η έκφραση της TAG-1 αποκλειστικά από τα ολιγοδενδροκύτταρα είναι επαρκής για τη σωστή μυελίνωση των αξόνων του οπτικού νεύρου.



Εικόνα 38. Η μυελίνωση αποκαθίσταται από την αποκλειστική έκφραση της γλοιακής rTAG-1 στα Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)} ζώα. Α. Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εγκάρσιας τομής από μία νευρική ίνα ενός φυσιολογικού ζώου. Οι στικτές γραμμές υποδηλώνουν τις περιοχές που μετρήθηκαν για τον υπολογισμό της διαμέτρου του άξονα με και χωρίς τη μυελίνη και συνεπακόλουθα τον υπολογισμό του g ratio. Β. Διάγραμμα των g ratios για τα οπτικά νεύρα των Tag-1^{-/-} και τα Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)} ζώων. Υπάρχει μία μικρή αλλά στατιστικά σημαντική μείωση των g ratios στα Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)} (γκρι γραμμή) ζώα σε σύγκριση με τα Tag-1^{-/-} (μαύρη γραμμή) (p value<0.05).

Το δεύτερο θέμα που διερευνήθηκε αφορούσε στην κατανομή των αξόνων του οπτικού νεύρου με βάση τη διάμετρο τους. Για το σκοπό αυτό η διάμετρος του άξονα (χωρίς τη μυελίνη) υπολογίστηκε όπως προηγουμένως και το ποσοστό των αξόνων επί του συνόλου κατανεμήθηκε σε 5 κατηγορίες όπως φαίνεται στο διάγραμμα της Εικόνας 39. Από 0-500nm θεωρούνται μικρής διαμέτρου άξονες, από 500-1500nm μεσαίας διαμέτρου και >1500nm μεγάλης διαμέτρου. Όπως φαίνεται στο ραβδόγραμμα της Εικόνας 39, επαληθεύεται η δραματική μείωση του ποσοστού των μικρής διαμέτρου αξόνων στο οπτικό νεύρο των Tag-1^{-/-} ζώων και η αύξηση των μεσαίας και μεγάλης διαμέτρου αξόνων. Επίσης, είναι προφανές πως στους Tag-1^{-/-} ;plp^{Tg(rTag-1)} μύες η κατανομή των αξόνων επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα. Συνεπώς, η αποκλειστική έκφραση της rTAG-1 στα ολιγοδενδροκύτταρα των διαγονιδιακών ζώων είναι ικανή και επαρκής για τη διατήρηση των μικρής διαμέτρου αξόνων σε φυσιολογικά επίπεδα καθώς και για τη σωστή συνολική κατανομή των αξόνων με βάση τη διάμετρο τους.



Екко́va 39. А-В. Н έкфраση της γλοιακής rTAG-1 είναι επαρκής για τη διατήρηση των μικρής διαμέτρου αξόνων του οπτικού νεύρου. Ηλεκτρονικές φωτογραφίες από εγκάρσιες τομές οπτικού νεύρου από $Tag-1^{-/-}$ (A) και $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ (B) ζώα. Φαίνεται η μικρή υπομυελίνωση των $Tag-1^{-/-}$ αξόνων καθώς και η μείωση των μικρής διαμέτρου αξόνων σε σύγκριση με τα $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ ζώα. C. Ποσοτικοποίηση του ποσοστού των αξόνων με μικρή (500 nm), μεσαία (500 – 1500 nm), και μεγάλη (>1500 nm) διάμετρο στα αγρίου τύπου, $Tag-1^{-/-}$ και $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ οπτικά νεύρα. Το ποσοστό των μικρής διαμέτρου αξόνων έχει αυξηθεί σημαντικά και το ποσοστό των μεσαίας διαμέτρου αξόνων έχει μειωθεί στα $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ ζώα σε σύγκριση με τα $Tag-1^{-/-}$. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα αγρίου τύπου και τα $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ ζώα.

Student's t test, ***p value<0.001, **p value<0.005, *p value<0.05). Στα ραβδογράμματα παρουσιάζονται: mean, standard error of the mean.

Γ.2.6. Συμπεριφορική ανάλυση των Tag-1^{-/-} και Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1} μυών

Η έως τώρα ανάλυση των $Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)}$ μυών έχει δείξει πως η αποκλειστική έκφραση του μορίου TAG-1 από τα εμμύελα γλοιακά κύτταρα του Κ.Ν.Σ. είναι ικανή και επαρκής για: α) τη δημιουργία του μοριακού συμπλόκου των εγγύς των παρακομβικών περιοχών και την πλήρη διάσωση του μοριακού φαινοτύπου των $Tag-1^{-/-}$ μυών, β) την άμεση αλληλεπίδραση με τα άλλα μόρια που συγκροτούν το σύμπλοκο των εγγύς των παρακομβικών περιοχών και γ) τη διάσωση των φαινοτύπων της υπομυελίνωσης και της δραματικής μείωσης των μικρής διαμέτρου αξόνων που εμφανίζονται στο οπτικό νεύρο των Tag-1^{-/-} μυών. Στη συνέχεια της μελέτης μας αναρωτηθήκαμε αν η έκφραση της TAG-1 από τα γλοιακά κύτταρα και όχι από τον άξονα είναι σε θέση να αποκαταστήσει τα συμπεριφορικά ελλείμματα που παρουσιάζονται στα Tag-1^{-/-} ενήλικα ζώα. Έτσι, ο Επικ. Καθ. Αντώνης Σταματάκης από το εργαστήριο Βιολογίας-Βιοχημείας της καθ. Φωτεινής Στυλιανοπούλου πραγματοποίησε μία εκτενή συμπεριφορική ανάλυση των ενήλικων $Tag-1^{-/-}$:plp^{Tg(rTag-1)} μυών σε σύγκριση με τα φυσιολογικα και τα $Tag-1^{-/-}$ ζώα (Savvaki et al., 2010). Στην Εικόνα 40 παρουσιάζονται συνολικά τα αποτελέσματα της συμπεριφορικής ανάλυσης από αγρίου τύπου, $Tag-1^{-/-}$ και $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ μύες.

Όπως και στην ανάλυση των $Tag-1^{-/-}$ ενήλικων μυών που αναφέρθηκε στην παράγραφο 1.1. έτσι και για τα διαγονιδιακά $Tag-1^{-/-}$;plp^{Tg(rTag-1)} ζώα εφαρμόστηκαν δύο ειδών συμπεριφορικές δοκιμασίες: δοκιμασίες για τον έλεγχο των γνωστικών διαδικασιών της μνήμης και της μάθησης και δοκιμασίες για τον έλεγχο του συντονισμού των κινήσεων και την ισορροπία. Για τον έλεγχο των διαδικασιών της μνήμης και η ου ουδάτινος λαβύρινθος κατά Morris (Morris water maze, MWM) και η δοκιμασία αναγνώρισης καινοφανούς αντικειμένου (novel object recognition). Στην πρώτη δοκιμασία ελέγχεται η χωρική μάθηση και μνήμη, που έχει συνδεθεί με τη λειτουργία του ιπποκάμπου, ενώ στη δεύτερη δοκιμασία ελέγχεται η μνήμη αναγνώρισης η οποία έχει σχετιστεί με τη λειτουργία του ενδορινικού φλοιού (Parron and Save, 2004; Dere et al., 2007). Τα αποτελέσματα αυτών των δοκιμασίων επιβεβαίωσαν τα προηγούμενα αποτελέσματα που προέκυψαν

από τη μελέτη των $Tag-I^{-/-}$ ζώων και έδειξαν πως οι γνωστικές λειτουργιες των $Tag-I^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-I)}$ μυών είναι αδιαφοροποίητες από τους αγρίου τύπου μύες (Εικόνα 40 A-C).

Για τον έλεγχο της οργάνωσης και του συντονισμού των κινήσεων εφαρμόστηκαν: η δοκιμασία περιστρεφόμενου τυμπάνου (rota-rod) καθώς και η ανάλυση αποτυπωμάτων άκρων (footprint analysis). Στη δοκιμασία περιστρεφόμενου τυμπάνου τα ζώα τοποθετούνται πάνω σε μία περιστρεφόμενη ράβδο (η ταχύτητα της περιστροφής μπορεί να ρυθμίζεται) και καταγράφεται ο χρόνος από την έναρξη της δοκιμασίας έως την πτώση των μυών από τη ράβδο. Η μελέτη των *Tag-1^{-/-}* μυών έδειξε διαταραχή του συντονισμού των κινήσεων και της ισορροπίας σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ζώα και στις δύο προηγούμενες δοκιμασίες (Εικόνα 40 D-E). Αντίθετα, η αποκλειστική έκφραση της γλοιακής TAG-1 στους *Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)}* μύες ήταν ικανή για την πλήρη αποκατάσταση των παραπάνω λειτουργιών.

Συμπερασματικά, η προηγούμενη ανάλυση έδειξε πως η έκφραση της πρωτεΐνης TAG-1 αποκλειστικά στα ολιγοδενδροκύτταρα του Κ.Ν.Σ. είναι ικανή και επαρκής για την πλήρη διάσωση του συμπεριφορικού φαινοτύπου των $Tag-I^{-/-}$ μυών. Ειδικότερα, η απόδοση των διαγονιδιακών ζώων στις διαδικασίες της μνήμης και μάθησης, καθώς και οργάνωσης και συντονισμού των κινήσεων ήταν αδιαφοροποίηση σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου ζώα (Εικόνα 40).



Εικόνα 40. Ανάλυση του συμπεριφορικού φαινοτύπου των $Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)}$ μυών σε σύγκριση με αγρίου τύπου και $Tag-1^{-/-}$ ενήλικα ζώα. Α. Συμπεριφορά των ζώων στον υδάτινο λαβύρινθο κατά Morris. Παρουσιάζεται το μέσο χρονικό διάστημα (mean, standard error of the mean) κατά τις 4 διαδοχικές ημέρες της φάσης προσαρμογής. Τα $Tag-1^{-/-}$ ζώα φτάνουν στην κρυμμένη πλατφόρμα πιο αργά από τα $Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)}$ ζώα, τα οποία δεν παρουσιάζεται ο χωρικής μνήμης του υδάτινου μύες (###p<0.001). Β. Δοκιμασία μακροπρόθεσμης χωρικής μνήμης του υδάτινου λαβύρινθου κατά Morris. Ι. Παρουσιάζεται ο χρόνος που πέρασαν τα ζώα στο τεταρτημόριο 'στόχο' καθώς και σε αυτό που βρισκόταν στην αντίθετη πλευρά της δεξαμενής. Φαίνεται πως οι $Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)}$ μύες όπως και οι αγρίου τύπου δείχνουν μια προτίμηση για το τεταρτημόριο 'στόχο' κάτι που δεν ισχύει για τα $Tag-1^{-/-}$ ζώα. Στα ραβδογράμματα παρουσιάζονται: mean, standard error of the mean

(διαφορά ανάμεσα στους γονοτύπους [†]†*p*<0.01; διαφορά μεταξύ τεταρτημορίων ******* p<0.05). Π. Αντιπροσωπευτικά μονοπάτια κολύμβησης τα οποία ακολούθησαν τα $Tag-1^{-/-}; plp^{Tg(rTag-1)}$ και $Tag-1^{-/-}$ ζώα στην παραπάνω δοκιμασία. Το Τ δείχνει το τεταρτημόριο 'στόχο' όπου είχε τοποθετηθεί η πλατφόρμα κατά τις δοκιμασίες προσαρμογής και το βέλος το σημείο εκκίνησης. C. Επίδοση στη δοκιμασία αναγνώρισης καινοφανούς αντικειμένου, εκφραζόμενη με το δείκτη διάκρισης (discrimination index). Τα $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ όπως και τα αγρίου τύπου ζώα αφιέρωσαν περισσότερο χρόνο στην εξερεύνηση του καινοφανούς αντικειμένου σε σύγκριση με το οικείο/παλιό, σε αντίθεση με τα ομόζυγα μεταλλαγμένα τα οποία δεν έδειξαν καμία προτίμηση προς το καινοφανές αντικείμενο (διαφορά ανάμεσα στους γονοτύπους ***p < 0.001). Στα ραβδογράμματα παρουσιάζονται: mean, standard error of the mean. D. Κινητικός συντονισμός όπως αξιολογήθηκε από τη δοκιμασία περιστρεφόμενου τυμπάνου. Ι. Παρουσιάζεται ο μέσος χρόνος (mean, standard error of the mean) έως την πτώση από το περιστρεφόμενο τύμπανο κατά τις 3 διαδογικές ημέρες της εξάσκησης. ΙΙ. Παρουσιάζεται ο μέσος χρόνος (mean, standard error of the mean) έως την πτώση από το περιστρεφόμενο τύμπανο στη διάρκεια της δοκιμασίας σε δύο διαφορετικές ταχύτητες (20 και 32rpm). Τα διαγονιδιακά και τα αγρίου τύπου ζώα έμειναν περισσότερο χρόνο στο περιστρεφόμενο τύμπανο από τους *Tag-1*^{-/-} μύες κατά τη 2^η και 3^η ημέρα της περιόδου εξάσκησης (I) καθώς και κατά τη δοκιμασία (ΙΙ, και για τις δύο ταχύτητες). **p<0.01; ***p<0.001. Ε. Ανάλυση αποτυπωμάτων άκρων. Ι. Το εύρος της επικάλυψης, για τα δεξιά αλλά και τα αριστερά άκρα, είναι σημαντικά μικρότερο στους Tag-1--;plp^{Tg(rTag-1)} και αγρίου τύπου μύες σε σύγκριση με τους ομόζυγα μεταλλαγμένους (***p<0.001). ΙΙ. Το μήκος του βηματισμού, για τα εμπρός και πίσω άκρα (δέξια και αριστερά) είναι σημαντικά μεγαλύτερο στους $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ και αγρίου τύπου μύες σε σύγκριση με τους ομόζυγα μεταλλαγμένους (**p<0.01; ***p<0.001). Στα ραβδογράμματα παρουσιάζονται: mean, standard error of the mean. ΙΙΙ. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία των αποτυπωμάτων από ένα $Tag-I^{-/-}; plp^{Tg(rTag-I)}$ και ένα $Tag-I^{-/-}$ ζώο, όπου εμφανίζονται οι παράμετροι που υπολογίστηκαν. α:μήκος του βηματισμού, b: εύρος της επικάλυψης. Με μπλε μπογιά απεικονίζονται τα εμπρός και με κόκκινο τα πίσω άκρα.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη πραγματεύεται τις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις στο επίπεδο των εγγύς των παρακομβικών περιοχών και πως αυτές επηρεάζουν τη μορφολογία και τη λειτουργία των εμμύελων ινών του Κ.Ν.Σ. Επιπλέον, βασικοί μας στόχοι ήταν η περαιτέρω διερεύνηση ενός πιθανού ρόλου της πρωτεΐνης TAG-1 στην οργάνωση και μυελίνωση των νευρικών ινών του οπτικού νεύρου καθώς και η μελέτη των επιπτώσεων της απώλειας του συγκεκριμένου μορίου στην γνωστική και κινητική συμπεριφορά των μυών.

Είναι γνωστό από παλαιότερες μελέτες πως η απουσία της έκφρασης του μορίου κυτταρικής συνάφειας TAG-1 σε ομόζυγα μεταλλαγμένους (Tag-1^{-/-}) μύες έχει σαν αποτέλεσμα αποδιοργάνωση των εγγύς των παρακομβικών περιοχών, όπως διαπιστώθηκε στο οπτικό και ισχιακό νεύρο ενήλικων ζώων (Poliak et al., 2003; Traka et al., 2003). Ειδικότερα, καταργείται ο εντοπισμός των τασεοελεγχόμενων διαύλων καλίου, οι οποίοι είναι σημαντικοί για τη σταδιακή επαναπόλωση της μεμβράνης έπειτα από την αγωγή μιας ηλεκτρικής ώσης και τη διαμόρφωση του δυναμικού ηρεμίας της μεμβράνης του άξονα. Η αποδιοργάνωση της παραπάνω περιοχής οφείλεται σε αδυναμία σχηματισμού του μοριακού συμπλόκου των περιοχών αυτών που αποτελείται από τους διαύλους καλίου και το μόριο Caspr2 στον άξονα και την TAG-1 η οποία εντοπίζεται στον άξονα αλλά και τη μεμβράνη του γλοιακού κυττάρου (Traka et al., 2002; Traka et al., 2003). Επιπρόσθετα, από τη μελέτη των Tag-1^{-/-} μυών, έχει προκύψει πως απώλεια της πρωτεΐνης έχει σαν αποτέλεσμα αυξημένη ευαισθησία των ζώων σε επιλεπτογενή ερεθίσματα και όπως πρόσφατα βρέθηκε τα ζώα αυτά παρουσιάζουν μειωμένο πάχος μυελίνης και σημαντική απώλεια των μικρής διαμέτρου αξόνων του οπτικού νεύρου (Fukamauchi et al., 2001; Chatzopoulou, Miguez et al., 2008).

Στο πρώτο μέρος της παρούσας διατριβής περιγράφεται μια λεπτομερής συμπεριφορική και μοριακή ανάλυση σε $Tag-I^{-/-}$ μύες. Για πρώτη φορά, αποκαλύπτονται διαταραχές στις λειτουργίες της μάθησης και μνήμης καθώς και τον κινητικό συντονισμό που οφείλονται στην απουσία της πρωτεΐνης TAG-1. Επιπλέον, διαπιστώνεται διαταραχή της μοριακής οργάνωσης της εγγύς της παρακομβικής περιοχής σε διάφορα τμήματα του Κ.Ν.Σ., συμπεριλαμβανομένων αυτών που εμπλέκονται στις παραπάνω συμπεριφορές. Τελος, είναι σημαντικό ότι για πρώτη

116

φορά περιγράφεται διαταραχή στο μήκος του μεσοκομβικού διαστήματος στα Tag- $I^{-/-}$ ζώα.

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας μελέτης πραγματοποιείται η ανάλυση μυών οι οποίοι εκφράζουν την πρωτεΐνη TAG-1 αποκλειστικά στα ολιγοδενδροκύτταρα και όχι στα νευρικά κύτταρα (*Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)}*). Η ανάλυση αυτή περιλαμβάνει εκτενή πειράματα ανοσοϊστοχημείας, βιοχημείας και μορφολογική ανάλυση του οπτικού νεύρου. Αποδεικνύουμε πως η αποκλειστική έκφραση του μορίου TAG-1 από τα ολιγοδενδροκύτταρα στο Κ.Ν.Σ. είναι ικανή και επαρκής για τη δημιουργία του μοριακού συμπλόκου των εγγύς των παρακομβικών περιοχών και τη συσσώρευση των τασεοελεγχόμενων διαύλων καλίου. Επιπλέον, η γλοιακή TAG-1 φαίνεται να είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση του μήκους του μεσοκομβικού διαστήματος καθώς και για το επίπεδο της μυελίνωσης και τη διατήρηση της μορφολογίας των αξόνων του οπτικού νεύρου. Τέλος, η γλοιακή TAG-1, πιθανόν μέσω της αποκατάστασης της οργάνωσης των εμμύελων ινών, είναι σε θέση να ρυθμίζει τη συμπεριφορά των μυών και είναι επαρκής για να αποκαταστήσει πλήρως τα συμπεριφορικά ελλείμματα που παρουσιάζονται όταν η πρωτεΐνη απουσιάζει πλήρως από τους μύες.

ΟΙ Tag-1^{-/-} ΜΥΕΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΟΥΝ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΑ ΣΕ ΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ

Η συμπεριφορική ανάλυση των $Tag-I^{-/-}$ μυών αποτελείται από δύο μέρη: τη μελέτη των γνωστικών λειτουργιών της μάθησης και μνήμης και τη μελέτη της αυθόρμητης κινητικότητας και του συντονισμού των κινήσεων των άκρων. Από την παραπάνω μελέτη, διαπιστώσαμε ότι οι $Tag-I^{-/-}$ μύες έχουν την ικανότητα να μαθαίνουν αλλά αποδίδουν λιγότερο αποτελεσματικά από τους φυσιολογικούς, στις δοκιμασίες της χωρικής μάθησης που ελέγχθηκαν. Επιπλέον, παρουσιάζουν σημαντικά ελλείμματα στη μακροπρόθεσμη χωρική μνήμη και μνήμη αναγνώρισης. Είναι γνωστό πως οι βασικές δομές του εγκεφάλου που εμπλέκονται στη δημιουργία της μακροπρόθεσμης μνήμης περιλαμβάνονται στον ιπποκάμπειο σχηματισμό. Ειδικότερα, η χωρική μάθηση και η δημιουργία της μακροπρόθεσμης μνήμης έχουν συνδεθεί άμεσα με τη σωστή λειτουργία του ιπποκάμπου και του ενδορινικού φλοιού (Parron and Save, 2004; Dere et al., 2007).

Στο δεύτερο μέρος της συμπεριφορικής ανάλυσης, αποκαλύψαμε πως τα Tag- $I^{-/-}$ ζώα εμφανίζουν διαταραχές στην αυθόρμητη κινητικότητά τους και το

συντονισμό των κινήσεων των άκρων τους, όπως διαπιστώθηκε από τη δοκιμασία αυθόρμητης κινητικότητας και την ανάλυση αποτυπωμάτων άκρων αντίστοιχα. Αντίθετα, δεν διαπιστώθηκε διαταραχή στην κινητικότητα των ομόζυγα μεταλλαγμένων ζώων με τη δοκιμασία εξερεύνησης ανοιχτού πεδίου. Η διαφορά αυτή στα αποτελέσματα των δύο δοκιμασιών για τον έλεγχο της κινητικότητας θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι στην πρώτη (αυθόρμητη κινητικότητα) τα ζώα δεν επηρεάζονται από περιβαλλοντικά ερεθίσματα τα οποία θα μπορούσαν πιθανόν να τους δημιουργήσουν νευρικότητα, ενώ αντίθετα στη δεύτερη (εξερεύνηση ανοιχτού πεδίου) η απόδοση των μυών πιθανόν επηρεάζεται και από εξωγενή ερεθίσματα στα οποία εκτίθενται. Επομένως, η αδυναμία εντοπισμού μίας διαταραχής στην κινητικότητα των $Tag-1^{--}$ ζώων με τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου μπορεί να οφείλεται σε εξισσορόπηση αυτής από πιθανή αυξημένη απόκριση λόγω αυξημένου άγχους στα ζώα αυτά. Η κινητικότητα των μυών είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη σωστή λειτουργία του Κ.Ν.Σ., ενώ στο συντονισμό των κινήσεων των άκρων σημαντικός είναι ο ρόλος της παρεγκεφαλίδας (Oliver et al., 2007).

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι δύο ακόμα μόρια της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών των μορίων κυτταρικής συνάφειας εμπλέκονται σε γνωστικές λειτουργίες. Ειδικότερα, μύες ελλειμματικοί για το γονίδιο των μορίων L1 και NCAM παρουσιάζουν διαταραχή στη χωρική μνήμη, όπως διαπιστώθηκε από τη δοκιμασία του υδάτινου λαβύρινθου κατά Morris (Cremer et al., 1994; Fransen et al., 1998). Επιπλέον, διάφορες μελέτες προτείνουν ένα κρίσιμο ρόλο για την PSA (α-2,8linked polysialic acid) NCAM στην πλαστικότητα του ιπποκάμπου και την παγίωση της μακροπρόθεσμης μνήμης (Becker et al., 1996; Van der Borght et al., 2005).

Η διαταραχή των γνωστικών και κινητικών λειτουργιών μπορεί να οφείλεται στη διάχυση των τασεοελεγχόμενων διαύλων καλίου από τις εγγύς των παρακομβικών περιοχές καθώς και στη βράχυνση των μεσοκομβικών τμημάτων που παρουσιάζουν τα $Tag-1^{-/-}$ ζώα. Οι μοριακές αυτές αλλοιώσεις εκτείνονται σε ολόκληρο το Κ.Ν.Σ. Όσον αφορά στη διαταραχή της αυθόρμητης κινητικότητας, σε αυτή θα μπορούσε να συμβάλλει επίσης η διαταραχή της μορφολογικής και λειτουργικής οργάνωσης των περιφερικών εμμύελων ινών, όπως είχε παλαιότερα παρουσιαστεί για το ισχιακό νεύρο των $Tag-1^{-/-}$ μυών (Traka et al., 2003; Poliak et al., 2003). Δεν μπορούμε φυσικά να αποκλείσουμε την πιθανότητα αλλοιώσεων κατά την ανάπτυξη των συστημάτων που εμπλέκονται στις παραπάνω διαδικασίες, εξαιτίας της απουσίας της έκφρασης του γονιδίου της πρωτεΐνης TAG-1. Μια παλαιότερη μελέτη έδειξε πως παρεμπόδιση της έκφρασης των τασεοελεγχόμενων διαύλων καλίου Kv1.1., που εντοπίζονται στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή, έχει σαν αποτέλεσμα διαταραχή της μακροπρόθεσμης μνήμης όπως διαπιστώθηκε από τις δοκιμασίες της παθητικής αποφυγής (passive avoidance) και τον υδάτινο λαβύρινθο κατά Morris (Meiri et al., 1997). Το μοντέλο της παθητικής αποφυγής χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της μακροπρόθεσμης μνήμης σε πειραματόζωα και βασίζεται στο ότι τα ζώα θα πρέπει να θυμούνται μία συμπεριφορά τους η οποία είχε αρνητικές συνέπειες (π.χ. εφαρμογή επώδυνου ηλεκτρικού ερεθίσματος στα άκρα). Έτσι, αν τα ζώα έχουν την ικανότητα της μνήμης, θα αποφύγουν να επαναλάβουν τη συγκεκριμένη συμπεριφορά στο μέλλον.

ΟΙ ΕΓΓΥΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΚΟΜΒΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΩΝ ΚΕΝΤΡΙΚΩΝ ΕΜΜΥΕΛΩΝ ΙΝΩΝ ΑΠΟΔΙΟΡΓΑΝΩΝΟΝΤΑΙ ΣΤΑ Tag-1^{-/-} ΖΩΑ

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, η συμπεριφορική ανάλυση των Tag-1^{-/-} μυών έδειξε πως η απουσία της πρωτεΐνης TAG-1 επηρεάζει αρνητικά τις λειτουργίες της μάθησης και μνήμης καθώς και του κινητικού συντονισμού. Στην παρούσα εργασία αναλύσαμε ανοσοϊστοχημικά τις εμμύελες ίνες σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένων των τμημάτων που εμπλέκονται στις παραπάνω συμπεριφορές όπως τον ιπποκάμπειο σχηματισμό και την παρεγκεφαλίδα. Επιπλέον, μελετήσαμε ανοσοϊστοχημικά το μεσολόβιο και τον οσφρητικό λοβό. Το μεσολόβιο εξετάστηκε λόγω της υψηλής σύστασής του σε εμμύελες ίνες και ο οσφρητικός λοβός επιλέχθηκε γιατί αποτελεί αντικείμενο μελέτης στο εργαστήριο τα τελευταία έτη. Στόχος μας ήταν να ελέγξουμε εάν η πρωτεΐνη TAG-1 είναι κρίσιμη για τη δημιουργία του μοριακού συμπλόκου των εγγύς των παρακομβικών περιοχών και τη συσσώρευση των διαύλων καλίου στις εμμύελες ίνες ολόκληρου του Κ.Ν.Σ.

Στο πρώτο τμήμα αυτής της ανάλυσης εστιάσαμε στη μελέτη του μοριακού φαινοτύπου των $Tag-1^{-/-}$ μυών σε σύγκριση με φυσιολογικά ζώα ίδιας ηλικίας και φύλου. Διαπιστώσαμε ότι σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου που εξετάστηκαν, οι εγγύς των παρακομβικών περιοχές εμφανίζονται αλλοιωμένες στα $Tag-1^{-/-}$ ζώα με χαρακτηριστικά την απουσία εντοπισμού της πρωτεΐνης Caspr2 και τη διάχυση των διαύλων καλίου που φυσιολογικά απαντώνται εκεί (Kv1.1, Kv1.2). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με τα αντίστοιχα αποτελέσματα που προέκυψαν σε παλαιότερες μελέτες και αφορούσαν στην ανάλυση του οπτικού και του ισχιακού νεύρου $Tag-1^{-/-}$

ενήλικων μυών (Poliak et al., 2003; Traka et al., 2003). Όπως προκύπτει, η πρωτεΐνη TAG-1 είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του μοριακού συμπλόκου και τη συσσώρευση των τασεοελεγγόμενων διαύλων καλίου στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές σε ολόκληρο το Κ.Ν.Σ. Σημαντικό ρόλο στη συσσώρευση των διαύλων καλίου διαδραματίζει επίσης η πρωτεΐνη Caspr2, καθώς μύες ελλειπτικοί για το γονίδιο της παρουσιάζουν διάγυση των διαύλων καλίου προς το μεσοκομβικό τμήμα των κεντρικών και περιφερικών εμμύελων ινών, όμοια με τα $Tag-1^{-/-}$ ζώα (Poliak et al., 2003). Επιπλέον, ιδιαίτερα σημαντική για τη συσσώρευση των διαύλων καλίου στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή φαίνεται να είναι η αρτιότητα του παρακομβικού τμήματος. Έτσι, μύες οι οποίοι δεν μπορούν να συνθέσουν τα γαλακτολιπίδια της μυελίνης (CGT^{/-}) καθώς και μύες ομόζυγα μεταλλαγμένοι για τα γονίδια των παρακομβικών μορίων contactin και Caspr, παρουσιάζουν αποδιοργάνωση των αξονογλοιακών αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν στις παρακομβικές περιοχές και επακόλουθη διάχυση των διαύλων καλίου προς τον κόμβο (Dupree et al., 1999; Bhat et al., 2001; Boyle et al., 2001).

Παράλληλα με την ανοσοϊστοχημική ανάλυση, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης σε απομονωμένες περιοχές εγκεφάλου με τη χρήση αντισωμάτων για τις πρωτεΐνες των εγγύς των παρακομβικών περιοχών. Η ανάλυση αυτή έδειξε δραματική μείωση των επιπέδων έκφρασης της Caspr2 και μικρότερη μείωση στην ποσότητα των διαύλων καλίου, κυρίως στην παρεγκεφαλίδα και τον οσφρητικό λοβό των ομόζυγα μεταλλαγμένων μυών. Οι διαφορές στη σοβαρότητα του φαινοτύπου μεταξύ των διαφορετικών περιοχών του εγκεφάλου ίσως αντανακλούν διαφορές στο ποσοστό των εμμύελων ινών που περιέχει το κάθε τμήμα ή ακόμα και διαφορές στο ρόλο που η TAG-1 διαδραματίζει στην κάθε περιοχή. Δεν είναι γνωστό και παραμένει να διερευνηθεί εάν η μείωση των επιπέδων της Caspr2 και των διαύλων καλίου οφείλεται σε ρύθμιση των πρωτεϊνών σε μεταγραφικό/μεταφραστικό επίπεδο ή σε αυξημένη αποικοδόμησή τους απουσία του μορίου που τις συνδέει στη μεμβράνη. Η αυξημένη συσσώρευση της Caspr2 στα κυτταρικά σώματα των κυττάρων Purkinje της παρεγκεφαλίδας στα Tag-1^{-/-} ζώα (Εικόνα 22) θα μπορούσε να σημαίνει πως η πρωτεΐνη παράγεται αλλά αδυνατεί να κατευθυνθεί στο σωστό σημείο εντοπισμού της. Ίσως αυτή η παραμονή της πρωτεΐνης στο κυτταρικό σώμα αντί για τη μεμβράνη να έχει τελικά σαν αποτέλεσμα την αποικοδόμηση της.

Είναι ενδιαφέρον και αξίζει να σημειωθεί ότι η απουσία της TAG-1 επηρεάζει σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό τον εντοπισμό και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Caspr2 σε σύγκριση με τους διαύλους καλίου. Ένα μικρό ποσοστό διαύλων καλίου παραμένουν σωστά εντοπισμένοι στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή παρά την απουσιά της Caspr2. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην ύπαρξη ενός άλλου πιθανού μηχανισμού συσσώρευσης των διαύλων καλίου στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή που λειτουργεί ανεξάρτητα από την TAG-1. Έως τώρα δεν έχει βρεθεί άλλο μόριο που να είναι απαραίτητο για τη συσσώρευση των διαύλων καλίου στο Κ.Ν.Σ. Μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε μύες ελλειμματικούς για το γονίδιο του κυτταροσκελετό του άξονα, έδειξε πως οι δίαυλοι καλίου δεν εντοπίζονται συσσωρευμένοι σε ίνες ισχιακού νεύρου, όμοια με τα $Tag-1^{-/-}$ και $Caspr2^{-/-}$ ζώα (Horresh et al., 2010). Αντίστοιχη μελέτη των κεντρικών εμμύελων ινών θα πρέπει να πραγματοποιηθεί στα παραπάνω ζώα για να ελεγχθεί ο ρόλος της 4.1.Β στη συσσώρευση των διαύλων καλίου στο Κ.Ν.Σ.

Όπως είναι γνωστό, ο ρόλος των διαύλων νατρίου στον κόμβο του Ranvier είναι να διαμεσολαβούν την εκπόλωση του άξονα που απαιτείται για τη δημιουργία και προώθηση του δυναμικού ενεργείας. Ο ρόλος όμως των τασεοελεγχόμενων διαύλων καλίου στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή είναι πιο πολύπλοκος. Γενικά είναι γνωστό πως οι παραπάνω δίαυλοι καλίου ρυθμίζουν το χρονικό 'παράθυρο' κατά το οποίο μπορεί να δημιουργηθεί ένα δυναμικό ενεργείας, ελέγχοντας έτσι την απόκριση του άξονα σε επαναλαμβανόμενα διεγερτικά ερεθίσματα και προστατεύοντας τις νευρικές ίνες από υπερδιεγερσιμότητα (Rasband and Trimmer, 2001; Mert, 2007). Σε μύες ελλειμματικούς για την Κν1.1 υπομονάδα, που φυσιολογικά εντοπίζεται στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή, εντοπίστηκε υπερδιεγερσιμότητα των περιφερικών νευραζόνων, έπειτα από έκθεση σε γαμηλή θερμοκρασία που προκαλεί άγχος στους μύες (Zhou et al, 1998). Πειράματα σε οπτικό νεύρο από μύες μεταλλαγμένους για το γονίδιο της πρωτεΐνης PLP (Shiverer mice), οι οποίοι παρουσιάζουν υπομυελίνωση, έδειξαν πως οι δίαυλοι καλίου δεν είναι πλέον συσσωρευμένοι στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή, ενώ η έκφραση τους είναι αχνή έως μηδαμινή στον άξονα (Rasband et al., 1999). Επίσης, στις εμμύελες ίνες ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας, μία απομυελινωτική, νευροεκφυλιστική νόσο του Κ.Ν.Σ., οι δίαυλοι καλίου εντοπίζονται διάχυτοι στους απομυελινωμένους άξονες, ενώ εμφανίζονται ξανά εντοπισμένοι στην εγγύς της

παρακομβικής περιοχή σε κάποιους άξονες στις περιοχές επαναμυελίνωσης (Coman et al., 2006).

Η ΓΛΟΙΑΚΗ ΤΑG-1 ΕΙΝΑΙ ΙΚΑΝΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΩΝ ΕΓΓΥΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΚΟΜΒΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΩΝ ΚΕΝΤΡΙΚΩΝ ΕΜΜΥΕΛΩΝ ΙΝΩΝ

Έως τώρα έχουμε αποδείξει πως η έλλειψη της πρωτεΐνης TAG-1 οδηγεί σε συμπεριφορικά ελλείμματα τα οποία συνοδεύονται από διαταραχή της μοριακής οργάνωσης των εμμύελων ινών σε όλες τις περιοχές του Κ.Ν.Σ. που ελέγχθηκαν. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν και ενισχύουν τον απαραίτητο ρόλο της TAG-1 στη δημιουργία του συμπλόκου των εγγύς των παρακομβικών περιοχών. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η TAG-1 εκφράζεται από τα νευρικά και τα κύτταρα γλοίας στο ενήλικο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα (Traka et al., 2002). Στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή, είναι η μοναδική πρωτεΐνη που έχει αναγνωριστεί έως σήμερα να εκφράζεται στην πλευρά του εμμύελου γλοιακού κυττάρου. Στο προτεινόμενο μοντέλο των αλληλεπιδράσεων της εγγύς της παρακομβικής περιοχής η γλοιακή TAG-1 αλληλεπιδρά ομοφιλικά με την αξονική TAG-1, η οποία στη συνέχεια αλληλεπιδρά *in trans* με τα μόρια του άξονα Caspr2 και τους διαύλους καλίου.

Στη συνέχεια της μελέτης μας επικεντρωθήκαμε στη μοριακή ανάλυση των κεντρικών εμμύελων ινών σε ζώα στα οποία απουσιάζει η ενδογενής έκφραση της TAG-1, ενώ το ομόλογο της πρωτεΐνης του αρουραίου εκφράζεται αποκλειστικά στα ολιγοδενδροκύτταρα ($Tag-1^{-/-}$;plp^{Tg(rTag-1)}). Η δημιουργία αυτών των ζώων σχεδιάστηκε εξ'αρχής για να απαντήσει στο ερώτημα εάν η γλοιακή TAG-1, ως το μοναδικό μόριο των εγγύς των παρακομβικών περιοχών στη μεμβράνη του γλοιακού κυττάρου, είναι ικανή και επαρκής για το σχηματισμό του μοριακού συμπλόκου που διατηρεί τους διαύλους καλίου ή εάν είναι απαραίτητη η παρουσία της πρωτεΐνης και στον άζονα. Εκτενής ανοσοϊστοχημική ανάλυση των εγγύελων ινών των $Tag-1^{-/-}$;plp^{Tg(rTag-1)} από διάφορες περιοχές του εγκεφάλου αποκάλυψε πως η αποκλειστική έκφραση της γλοιακής TAG-1 είναι επαρκής για τη δημιουργία και διατήρηση του μοριακού συμπλόκου των εγγύς των παρακομβικών περιοχών στη μειβράνη του του ταν τασιατήσητη του μοριακού συμπλόκου των εγγύς των τασοσιστοχημική ανάλυση των εμμόελων ικών των τασιστά της πρωτεΐνης και στον άζονα. Εκτενής ανοσοϊστοχημική ανάλυση των εμμόελων με σωστά συσορευμένους διαύλους καλίου ή Caspr2 στις εγγύς των παρακομβικών περιοχών με σωστά συσσωρευμένους διαύλους καλίου ή Caspr2 στις εγγύς τους περιοχές σε οπτικό νεύρο από $Tag-1^{-/-}$; *plp*^{Tg(rTag-1)}, *Tag-1*^{-/-} και αγρίου τύπου μύες. Η σύγκριση των

γονοτύπων έδειξε πως η γλοιακή TAG-1, απουσία της πρωτεΐνης από τον άξονα, είναι ικανή να διασώσει πλήρως το μοριακό φαινότυπο των εγγύς των παρακομβικών περιοχών των *Tag-1^{-/-}* μυών.

Για τη δημιουργία των παραπάνω διαγονιδιακών ζώων χρησιμοποιήθηκε ο υποκινητής του *plp* γονιδίου για να οδηγήσει την έκφραση της TAG-1 ειδικά από τα ολιγοδενδροκύτταρα. Σύμφωνα με παλαιότερες μελέτες, ο υποκινητής του *plp* γονιδίου είναι ενεργός και σε κάποιες ομάδες νευρικών κυττάρων (Bongarzone et al., 1999; Miller et al., 2009; Gomez-Casati et al., 2009). Ειδικότερα, έχει εντοπιστεί η έκφραση πρωτεϊνικών προϊόντων που προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου του *plp* και εντοπίζονται σε νευρικά κύτταρα της παρεγκεφαλίδας, του ιπποκάμπου και του οσφρητικού συστήματος (Bongarzone et al., 1999). Επίσης, η μελέτη διαγονιδιακών μυών που χρησιμοποιούν τον υποκινητή του γονιδίου *plp*, έχει δείξει ότι ο υποκινητής είναι ενεργός σε νευρικά κύτταρα που εντοπίζονται στο έσω ους και τον προμήκη μυελό (Miller et al., 2009; Gomez-Casati et al., 2009). Με πειράματα ανοσοφθορισμού που πραγματοποιήσαμε αποκλείσαμε την έκφραση του διαγονιδίου (rTAG-1) από νευρικά κύτταρα και επιβεβαιώσαμε την αποκλειστική έκφρασή του από τα ολιγοδενδροκύτταρα.

Συμπερασματικά, αποδείξαμε πως η αποκλειστική έκφραση της TAG-1 από τα ολιγοδενδροκύτταρα είναι επαρκής για την οργάνωση των εγγύς των παρακομβικών περιοχών των κεντρικών εμμύελων ινών. Η απουσία του μορίου από τα νευρικά κύτταρα δεν έχει καμία απολύτως επίπτωση στον παραπάνω φαινότυπο των ζώων, προτείνοντας είτε πως η αξονική TAG-1 δεν συμμετέχει στο σύμπλοκο των εγγύς των παρακομβικών περιοχών, είτε πως μία πιθανή συμμετοχή της αντισταθμίζεται από την έκφραση της πρωτεΐνης από το γλοιακό κύτταρο.

ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΤΩΝ ΕΓΓΥΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΚΟΜΒΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ Κ.Ν.Σ. ΣΤΑ Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)} ΖΩΑ

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή σχηματίζεται ένα τριμερές σύμπλοκο το οποίο αποτελείται από τους διαύλους καλίου και την Caspr2 που εκφράζονται από τα νευρικά κύτταρα καθώς και την πρωτεΐνη TAG-1 η οποία εκφράζεται από τα νευρικά και τα κύτταρα γλοίας. Το έως τώρα προτεινόμενο μοντέλο των αλληλεπιδράσεων υποστήριζε πως η TAG-1 που βρίσκεται στην επιφάνεια του γλοιακού κυττάρου σχηματίζει ομοδιμερές με την πρωτεΐνη TAG-1 που βρίσκεται στον άξονα, η οποία με τη σειρά της αλληλεπιδρά *in cis* (στο επίπεδο της ίδιας μεμβράνης) με τους διαύλους καλίου και την Caspr2 (Tsiotra et al., 1996, Traka et al., 2003, Tzimourakas et al., 2007).

Η μελέτη των διαγονιδιακών ζώων που εκφράζουν την TAG-1 αποκλειστικά στα ολιγοδενδροκύτταρα συμβάλλει ουσιαστικά στην κατανόηση της δημιουργίας του συμπλόκου των εγγύς των παρακομβικών περιοχών. Όπως προαναφέρθηκε, ανοσοϊστοχημική ανάλυση έδειξε πως η γλοιακή TAG-1, απουσία του μορίου στον άξονα, είναι ικανή και επαρκής για τη σωστή συσσώρευση των διαύλων καλίου και της Caspr2 στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές. Όπως ήταν αναμενόμενο, μελέτη συν-ανοσοκατακρήμνισης σε ιστό εγκεφαλικού φλοιού από αυτά τα ζώα επιβεβαίωσε τη φυσική αλληλεπίδραση της γλοιακής TAG-1 με τα άλλα μόρια του συμπλόκου.

Όπως αναφέρεται στα αποτελέσματα, στα $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ ζώα, η προσδεδεμένη στη μεμβράνη διαγονιδιακή πρωτεΐνη εντοπίζεται των ολιγοδενδροκυττάρων αλλά και σε διαλυτή μορφή στο υπερκείμενο μέσο από καλλιέργειες γλοιακών κυττάρων εγκεφάλου. Επομένως, υπάρχουν 2 πιθανές υποθέσεις για την αλληλεπίδραση του διαγονιδιακού προϊόντος με τους διαύλους καλίου και την πρωτεΐνη Caspr2. Στην πρώτη, η TAG-1 που είναι προσδεδεμένη στη μεμβράνη του ολιγοδενδροκυττάρου αλληλεπιδρά άμεσα με τις πρωτεΐνες του άξονα (αλληλεπίδραση in trans). Στη δεύτερη υπόθεση, η διαλυτή TAG-1 είναι απαραίτητη σαν διαμεσολαβητής της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στην TAG-1 που είναι προσδεδεμένη στη μεμβράνη του ολιγοδενδροκυττάρου (ή σε ένα άγνωστο μόριο του γλοιακού κυττάρου) και τις πρωτεΐνες που βρίσκονται στον άξονα στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές.

Για να διερευνήσουμε περαιτέρω τον τύπο των αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή δημιουργήσαμε ένα in vitro σύστημα στο οποίο αναμίζαμε διαμολυσμένα κύτταρα που εκφράζουν στην επιφάνεια τους την πρωτεΐνη Caspr2 με κύτταρα που εκφράζουν την rTAG-1. Οι μικτές αυτές καλλιέργειες επωάστηκαν επιπλέον για 24 ώρες και στη συνέχεια τα κύτταρα λύθηκαν και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα υποβλήθηκε σε πείραμα συνανοσοκατακρήμνισης. Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος έδειξαν πως οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν άμεσα όταν εντοπίζονται προσδεδεμένες σε μεμβράνες κυττάρων που βρίσκονται το ένα απέναντι από το άλλο (αλληλεπίδραση *in trans*). Πειράματα ανοσοφθορισμού στα οποία κύτταρα που εκφράζουν την Caspr2 στην επιφάνειά τους επωάστηκαν με διαφορετικές ποσότητες διαλυτής TAG-1, δεν έδειξαν αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με παλαιότερα πειράματα τα οποία έδειχναν πως διαλυτή TAG-1 στη μορφή χίμαιρας με το Fc τμήμα των αντισωμάτων του ανθρώπου, δεν ήταν ικανή να προσδεθεί στην Caspr2 η οποία βρίσκονταν στην επιφάνεια διαμολυσμένων κυττάρων (Traka et al., 2003). Αυτό μπορεί να συμβαίνει είτε διότι όντως η διαλυτή TAG-1 δεν αλληλεπιδρά με την προσδεδεμένη Caspr2 είτε λόγω τεχνικής αδυναμίας ανίχνευσης μίας τέτοιας αλληλεπίδρασης. Ένας άλλος πιθανός λόγος για τον οποίο δεν μπορούμε να ανιχνεύσουμε αλληλεπίδραση της διαλυτής TAG-1 με την διαμεμβρανική Caspr2, θα μπορούσε να είναι ότι η πρώτη πρέπει να είναι προσδεδεμένη με κάποιο μεμβρανικό μόριο (για παράδειγμα την TAG-1 στη μεμβράνη του γλοιακού κυττάρου), ώστε να μπορέσει στη συνέχεια να αλληλεπιδράσει με την Caspr2. Στην Εικόνα 41 απεικονίζονται τα δύο πιθανά μοντέλα αλληλεπιδράσεων στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή των εμμύελων ινών του Κ.Ν.Σ. που προτείνονται μετά από τις μελέτες αυτές.



Εικόνα 41. Προτεινόμενα μοντέλα αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών της εγγύς της παρακομβικής περιοχής στο Κ.Ν.Σ. Α. Η γλοιακή TAG-1, ως προσδεδεμένη στη μεμβράνη, αλληλεπιδρά μέσω των ανοσοσφαιρινικών περιοχών της (μωβ κύκλοι) με τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη Caspr2 και τους διαύλους καλίου (Kv) που εντοπίζονται στον άξονα. Β. Η προσδεδεμένη στη μεμβράνη του γλοιακού κυττάρου TAG-1, αλληλεπιδρά και σχηματίζει ομοδιμερές με τη διαλυτή μορφή αφήνοντας ελεύθερες τις ανοσοσφαιρινικές περιοχές για ετεροφιλικές αλληλεπιδράσεις. Έπειτα ως διμερές πλέον αλληλεπιδρά με τα μόρια του άξονα σχηματίζοντας το σύμπλοκο των εγγύς των παρακομβικών περιοχών

Από την παρούσα πειραματική μελέτη δεν μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα για το ρόλο της αξονικής TAG-1 στη δημιουργία του συμπλόκου των εγγύς των παρακομβικών περιοχών στο Κ.Ν.Σ. Αυτό που γίνεται σαφές είναι πως η TAG-1 στην πλευρά του άξονα δεν είναι απαραίτητη για την οργάνωση του συμπλόκου, σε αντίθεση με τη γλοιακή TAG-1. Η αξονική πρωτεΐνη θα μπορούσε να συμβάλλει υπό φυσιολογικές συνθήκες στη σταθεροποίηση του μοριακού συμπλόκου των εγγύς των παρακομβικών περιοχών, μέσω ομοφιλικής αλληλεπίδρασής της με τη γλοιακή TAG-1. Αυτός ο υποθετικός ρόλος της αξονικής πρωτεΐνης ίσως αντικαθίσταται από τη διαλυτή TAG-1 στους διαγονιδιακούς μύες.

Ο κρίσιμος ρόλος του εμμύελου γλοιακού κυττάρου στην οργάνωση των περιοχών του άξονα, φάνηκε από δύο πρόσφατες μελέτες, οι οποίες πρότειναν ένα μοντέλο για τις αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν στην παρακομβική περιοχή. Στο μοντέλο αυτό η έκφραση και ο εντοπισμός της πρωτεΐνης Caspr στον άξονα ακολουθεί το ολιγοδενδροκύτταρο κατά τη μυελίνωση, μέσω της αλληλεπίδρασής της με τη γλοιακή Neurofascin 155 (Eisenbach et al., 2009; Pedraza et al., 2009). Αντίστοιχα, στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές θα μπορούσε η έκφραση της Caspr2 και επακόλουθα των διαύλων καλίου να οργανώνεται υπό την καθοδήγηση της γλοιακής TAG-1. Η υπόθεση αυτή είναι συμβατή με την άμεση δέσμευση της TAG-1 με την Caspr2 αλλά και με τους διαύλους καλίου που δείξαμε σε προηγούμενή μας εργασία (Tzimourakas et al., 2007).

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΟΜΒΩΝ ΤΟΥ RANVIER ΤΩΝ ΕΜΜΥΕΛΩΝ ΙΝΩΝ ΤΟΥ Κ.Ν.Σ. ΣΤΑ Tag-1^{-/-} ΚΑΙ Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)} ΖΩΑ

Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση των εμμύελων ινών του Κ.Ν.Σ. που πραγματοποιήθηκε περιελάμβανε επίσης πειράματα εντοπισμού των διαύλων νατρίου που εντοπίζονται στον κόμβο του Ranvier. Μια πρώτη σειρά πειραμάτων σε Tag-1^{-/-} και αγρίου τύπου ζώα έδειξε φυσιολογικό εντοπισμό των διαύλων νατρίου στους κόμβους, ανάμεσα σε δυο παρακομβικές περιοχές απουσία της TAG-1. Παρά το φυσιολογικό εντοπισμό τους, παρατηρήσαμε μια μικρή αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης των κόμβων στα ομόζυγα μεταλλαγμένα ζώα σε σύγκριση με τα

φυσιολογικά. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχα πειράματα ανοσοφθορισμού σε κρυοτομές παρεγκεφαλίδας από τα διαγονιδιακά Tag- $I^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ ζώα. Ποσοτικοποίηση του αριθμού των σημασμένων με τους διαύλους νατρίου κόμβων (ανά μm²) σε οβελιαίες τομές παρεγκεφαλίδας αποκάλυψε μία μικρή αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση του αριθμού των κόμ β ων στα Tag- $I^{-/-}$ ζώα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά. Η στατιστική ανάλυση έδειξε πως δεν υπάρχει διαφορά ανάμεσα στα φυσιολογικά και τα $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ ζώα όπου εκφράζεται αποκλειστικά η γλοιακή TAG-1. Συνεπώς, απουσία της πρωτεΐνης TAG-1 από τα ολιγοδενδροκύτταρα και τα νευρικά κύτταρα οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των κόμβων που υποδεικνύει μείωση του μεσοκομβικού διαστήματος. Η αποκλειστική έκφραση της πρωτεΐνης από τα ολιγοδενδροκύτταρα στα διαγονιδιακά ζώα είναι ικανή να επηρεάσει το μήκος του μεσοκομβικού διαστήματος και να το διατηρήσει στα φυσιολογικά επίπεδα. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η γλοιακή TAG-1 μπορεί να επηρεάζει το μήκος του μεσοκομβικού τμήματος παραμένει να αποσαφηνιστεί. Μια υπόθεση που θα μπορούσε να γίνει είναι πως η απουσία της TAG-1 από το γλοιακό κύτταρο επηρεάζει αρνητικά τις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις στις οποίες φυσιολογικά συμμετέχει και παρεμποδίζει την απόλυτη επαφή της μεμβράνης του ολιγοδενδροκυττάρου με τον άξονα, με αποτέλεσμα μειωμένο μήκος του μεσοκομβικού διαστήματος. Το μήκος του μεσοκομβικού διαστήματος μεταβάλλεται ανάλογα με το μέγεθος του άξονα και επηρεάζεται από τη διάμετρο του (Freide 1983). Μείωση του μήκους του μεσοκομβικού τμήματος των εμμύελων ινών οδηγεί σε διαταραχές στην αγωγή της ηλεκτρικής ώσης κατά μήκος του άξονα.

Πρόσφατες μελέτες έχουν προτείνει ένα μηχανισμό ο οποίος επηρεάζει το μήκος του μεσοκομβικού διαστήματος στο Π.Ν.Σ., ενώ αντίστοιχες μελέτες δεν έχουν γίνει για το Κ.Ν.Σ. Στις περιφερικές εμμύελες ίνες, κάθε κύτταρο Schwann περιελίσσεται γύρω από τον άξονα και σχηματίζει ένα μεσοκομβικό τμήμα. Το εξωτερικό τμήμα της μεμβράνης του κυττάρου Schwann αποτελείται από 2 διαμερίσματα: το ένα είναι αυτό που έρχεται σε επαφή με τη μυελίνη και το άλλο αποτελείται από περιοχές πλούσιες σε κυτταρόπλασμα που συνδέονται μεταξύ τους κατά μήκος του μεσοκομβικού διαστήματος (Cajal bands). Έχει προταθεί ότι αυτές οι κυτταροπλασματικές περιοχές εξυπηρετούν τη μεταφορά μορίων που είναι απαραίτητα για την επιμήκυνση του κυττάρου Scwhann (Court et al., 2004). Μία πρωτεΐνη η οποία εντοπίζεται στις Cajal bands είναι η periaxin. Αυτή η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο της dystroglycan (DGC) μέσω της DRP2 (dystrophinrelated protein 2) πρωτεΐνης. Ο ρόλος του συμπλόκου DGC στα κύτταρα Schwann είναι να συνδέει τις πρωτεΐνες laminins της βασικής στοιβάδας που περιβάλει το έλυτρο της μυελίνης με κυτταροπλασματικά μόρια (συμπεριλαμβανομένης της DRP2) (Sherman et al, 2001). Το σύμπλοκο που σχηματίζεται συνδέεται παραπέρα με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Απουσία της periaxin από το ισχιακό νεύρο μεταλλαγμένων μυών είχε σαν αποτέλεσμα μείωση του μήκους των μεσοκομβικών τμημάτων και της ταχύτητας μεταγωγής του σήματος (Court et al., 2004). Σε μία επόμενη μελέτη φάνηκε πως καταστροφή με οποιονδήποτε τρόπο του συμπλόκου που σχηματίζεται ανάμεσα στις πρωτεΐνες της βασικής στοιβάδας, το σύμπλοκο DGC και τον κυτταροσκελετό της ακτίνης οδηγεί σε αποδιοργάνωση των Cajal bands και μείωση του μεσοκομβικού διαστήματος (Court et al., 2009). Μία μετάλλαξη στο γονίδιο της periaxin ευθύνεται για τη νευρολογική ασθένεια του περιφερικού συστήματος Charot Marie Tooth, και ειδικότερα τη μορφή 4F (αυτοσωμική, υπολειπόμενη) (Guilbot et al., 2001). Μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί το μόριο της μυελίνης PMP22 και οδηγούν σε υπερέκφραση φαίνεται να ευθύνονται για την επικρατέστερη μορφή της ασθένειας Charot Marie Tooth (CMT1A), που αποτελεί το 50% των περιπτώσεων. Μια πρόσφατη μελέτη που αφορούσε στην ανάλυση περιφερικών εμμύελων ινών της επιδερμίδας, έδειξε πως το μήκος του μεσοκομβικού τμήματος ήταν σημαντικά μειωμένο σε ασθενείς με CMT1A σε σύγκριση με υγιή άτομα (Saporta et al., 2009).

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΜΜΥΕΛΩΝ ΙΝΩΝ ΤΟΥ ΟΠΤΙΚΟΥ ΝΕΥΡΟΥ ΤΩΝ Tag-1^{-/-} ΚΑΙ Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)} ΜΥΩΝ

Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε πως απώλεια της πρωτεΐνης TAG-1 είχε σαν αποτέλεσμα μια μικρή αλλά σημαντική υπομυελίνωση καθώς και μείωση της πυκνότητας και του συνολικού αριθμού των αξόνων στο οπτικό νεύρο. Ειδικότερα, η μείωση της πυκνότητας στο οπτικό νεύρο ενήλικων $Tag-1^{-/-}$ μυών αποδόθηκε στη δραματική μείωση των μικρής διαμέτρου αξόνων, η οποία συνοδεύονταν από μικρή αύξηση των μεσαίας και μεγάλης διαμέτρου αξόνων (Chatzopoulou, Miquez et al., 2008). Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε μορφολογική ανάλυση σε εγκάρσιες τομές οπτικού νεύρου με τη βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Μελετήθηκαν $Tag-1^{-/-}$ μύες σε σύγκριση με αγρίου τύπου και $Tag-1^{-/-}$; plp^{Tg(rTag-1)} ζώα ίδιας ηλικίας και φύλου. Η ανάλυση αυτή επαλήθευσε τα αποτελέσματα της μελέτης των Chatzopoulou, Miquez και απέδειξε πως η έκφραση της rTAG-1 αποκλειστικά από τα ολιγοδενδροκύτταρα είναι ικανή να επηρεάσει τις διαδικασίες της μυελίνωσης και κατανομής των αξόνων του οπτικού νεύρου και επαρκής να επαναφέρει πλήρως το φυσιολογικό φαινότυπο τους. Ειδικότερα, στο οπτικό νεύρο των *Tag-1^{-/-}*; plp^{Tg(rTag-1)} ζώων το g ratio, που αποτελεί δείκτη του πάχους της μυελίνης, είναι αδιαφοροποίητο σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου ζώα. Επιπλέον, το ποσοστό των μικρής διαμέτρου αξόνων έχει επανέλθει σε απόλυτα φυσιολογικά επίπεδα.

Έως σήμερα, λίγες πρωτεΐνες έχουν βρεθεί οι οποίες επηρεάζουν το επίπεδο της μυελίνωσης των κεντρικών νευρικών ινών, εκτός από εκείνες που ρυθμίζουν τη δομή της μυελίνης, όπως οι MBP (Myelin Basic Protein) και PLP (ProteoLipid Protein) (Popko et al., 1987; Griffiths et al., 1998). Κάποια από αυτά τα μόρια εκφράζονται από τα ολιγοδενδροκύτταρα και άλλα από τα νευρικά κύτταρα. Η διαμεμβρανική πρωτεΐνη NogoA εκφράζεται από τα ολιγοδενδροκύτταρα και απώλεια της έχει σαν αποτέλεσμα σοβαρή αλλά παροδική υπομυελίνωση (Pernet et al., 2008). Πρωτεΐνες των νευρικών κυττάρων που έχουν βρεθεί να εμπλέκονται στη διαδικασία της μυελίνωσης ρυθμίζοντας το πάχος της μυελίνης στο Κ.Ν.Σ. είναι οι αυξητικοί παράγοντες Nrg-1 (neuregulin-1) και PDGFA (platelet-derived growth factor A) (Fruttiger et al., 1999;Brinkmann et al., 2008).

Η απώλεια των μικρής διαμέτρου αξόνων που παρατηρείται στο οπτικό νεύρο των *Tag-1^{-/-}* μυών είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό σε διάφορους τύπους μεταβολικής οπτικής νευροπάθειας στους ανθρώπους (Saadati et al., 1998; Carelli et al., 2002; Sadun et al., 2002; Zoumalan et al., 2005). Στις μεταβολικές οπτικές νευροπάθειες λαμβάνει χώρα εκφυλισμός του οπτικού νεύρου. Γενικά, οι μικρής διαμέτρου άξονες του οπτικού νεύρου περιβάλλονται από λεπτό έλυτρο μυελίνης και διεγείρονται με υψηλή συχνότητα. Αυτά τα χαρακτηριστικά ίσως καθιστούν αυτούς τους άξονες πιο ευαίσθητους σε καταστροφή σε σύγκριση με τους μεγαλύτερους με παχύτερο έλυτρο μυελίνης άξονες, στις οπτικές νευροπάθειες. Στα τρωκτικά, η πρωτεΐνη TAG-1 αποτελεί το μόνο γνωστό μόριο το οποίο επηρεάζει την κατανομή των αξόνων στο οπτικό νεύρο. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό πως η γλοιακή TAG-1 είναι αυτή που διαμεσολαβεί τον παραπάνω ρόλο και από ότι φαίνεται μπορεί να διατηρεί και να ρυθμίζει θετικά τον αριθμό των μικρής διαμέτρου αξόνων.

Συνοπτικά, επιβεβαιώσαμε ότι η πρωτεΐνη TAG-1 εμπλέκεται στις διαδικασίες της μυελίνωσης καθώς και της μορφολογίας του οπτικού νεύρου. Τα πειράματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν στα διαγονιδιακά ζώα όπου η rTAG-1 εκφράζεται αποκλειστικά στα ολιγοδενδροκύτταρα, έδειξαν πως η γλοιακή πρωτεΐνη είναι ικανή και επαρκής να επαναφέρει το φαινότυπο του οπτικού νεύρου στα φυσιολογικά επίπεδα. Η προηγούμενη αποκάλυψη προτείνει πως η διαταραχή που παρατηρείται στο οπτικό νεύρο των Tag-1^{-/-} μυών πιθανότατα συμβαίνει μετά τη γέννηση κατά το στάδιο της μυελίνωσης και δεν οφείλεται σε αναπτυξιακή βλάβη των νευρικών κυττάρων. Ο ρόλος της πρωτεΐνης TAG-1 στη μυελίνωση των νευραξόνων του οπτικού νεύρου ίσως συνδέεται άμεσα με την επιβίωση των μικρής διαμέτρου αξόνων. Είναι γενικά γνωστό ότι εξωγενή σήματα από τα εμμύελα γλοιακά κύτταρα επηρεάζουν την ανάπτυξη των αξόνων, την αύξηση της διαμέτρου τους καθώς και την επιβίωσή τους. Ειδικότερα, σε μύες ελλειματικούς για τα γονίδια των πρωτεϊνών της μυελίνης MAG ή PLP, όπου οι άξονες μυελινώνονται αλλά παρουσιάζουν μειωμένο υπομυελίνωση, τα ζώα εκδηλώνουν σταδιακή ατροφία των αξόνων που περιλαμβάνει μείωση της διαμέτρου τους λόγω μείωσης της φωσφωρυλίωσης των νευροινιδίων και αυξημένο εκφυλισμό (Bjartmar, Yin and Trapp, 1999). Πιθανόν, στην περίπτωση των αξόνων του οπτικού νεύρου, η διαταραγή στο πάχος της μυελίνης που παρατηρείται στα $Tag-1^{-/-}$ ζώα να επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό την επιβίωση των μικρής διαμέτρου αξόνων. Επιπλέον, θεωρούμε πως ο ρόλος του μορίου TAG-1 και ειδικότερα της γλοιακής πρωτεΐνης στη μυελίνωση είναι ανεξάρτητος από το ρόλο της στην οργάνωση της εγγύς της παρακομβικής περιοχής, καθώς ο καθορισμός του πάχους της μυελίνης είναι μία διαδικασία η οποία ολοκληρώνεται πριν το μοριακό διαχωρισμό του άξονα στις περιοχές γύρω από τον κόμβο.

ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ Tag-1^{-/-};plp^{Tg(rTag-1)} ΜΥΩΝ

Το τελευταίο μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής περιλαμβάνει τα αποτελέσματα από τη συμπεριφορική ανάλυση των $Tag-I^{-/-}$; plp^{Tg(rTag-1)} μυών. Η ανάλυση αυτή αποτελείται από δύο μέρη: τη μελέτη των γνωστικών λειτουργιών της μάθησης και μνήμης και τη μελέτη του συντονισμού των κινήσεων και της ισορροπίας. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, αντίστοιχη ανάλυση των $Tag-I^{-/-}$ μυών έδειξε ότι παρουσιάζουν ελλείμματα στις λειτουργίες της μάθησης (χωρικής και αναγνώρισης) καθώς και στη μακροπρόθεσμη μνήμη. Επιπλέον, τα ζώα αυτά εμφανίζουν διαταραχές στον συντονισμό των κινήσεων των άκρων τους.

Πραγματοποιήσαμε συμπεριφορική ανάλυση των διαγονιδιακών Tag-1---; plp^{Tg(rTag-1)} ζώων, στα οποία η πρωτεΐνη TAG-1 εκφράζεται αποκλειστικά στα ολιγοδενδροκύτταρα και όχι στα νευρικά κύτταρα, υπό τον υποκινητή του plp γονιδίου. Αξίζει να σημειωθεί, πως στο κεντρικό νευρικό σύστημα, η έκφραση του γονιδίου *plp* στα ολιγοδενδροκύτταρα είναι συντονισμένη με την έκφραση των άλλων δομικών πρωτεϊνών της μυελίνης που ξεκινάει αμέσως μετά τη γέννηση στα τρωκτικά (Jiang et al., 2000). Η μελέτη αυτών των ζώων περιελάμβανε ακριβώς τις ίδιες δοκιμασίες με αυτές που αναφέρθηκαν προηγουμένως για τους ομόζυγα μεταλλαγμένους μύες καθώς και μία επιπλέον δοκιμασία για τον έλεγχο του συντονισμού των κινήσεων και την ισορροπία (τη δοκιμασία του περιστρεφόμενου τυμπάνου). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η αποκλειστική έκφραση της γλοιακής TAG-1 στο Κ.Ν.Σ. διασφαλίζει τη φυσιολογική συμπεριφορά των μυών, όσον αφορά στη μνήμη και μάθηση, το συντονισμό των κινήσεων και την ισορροπία. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά καθώς επιβεβαιώνουν και αποδεικνύουν παραπέρα τον κρίσιμο ρόλο της γλοιακής TAG-1 στις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις και συνεπακόλουθα στη σωστή λειτουργία του Κ.Ν.Σ. Η διάσωση του συμπεριφορικού φαινοτύπου στα $Tag-1^{-/-}$; $plp^{Tg(rTag-1)}$ ζώα στηρίζει την υπόθεση πως οι διαταραχές του Κ.Ν.Σ. που εμφανίζονται στα $Tag-1^{-/-}$ ζώα πιθανότατα οφείλονται στο ρόλο της γλοιακής TAG-1 στην οργάνωση των εγγύς των παρακομβικών περιοχών και των μεσοκομβικών τμημάτων καθώς και τη μυελίνωση και όχι σε κάποια αναπτυξιακή διαταραχή των νευρικών κυττάρων.

ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΜΕ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΠΟΥ ΕΜΦΑΝΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή ασχοληθήκαμε με τη μελέτη των αξονογλοιακών αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στις εμμύελες ίνες του κεντρικού νευρικού συστήματος και ειδικότερα στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές. Οι περιοχές αυτές των εμμύελων ινών είναι ιδιαίτερα σημαντικές εξαιτίας της συσσώρευσης σε αυτές των τασεοελεγχόμενων διαύλων καλίου (Kv1.1/1.2 αυπομονάδες και Kvβ2 υπομονάδα). Ο ρόλος των διαύλων καλίου είναι η σταδιακή επαναπόλωση της μεμβράνης του νευρικού κυττάρου έπειτα από την αγωγή μίας νευρικής ώσης, περιορίζοντας έτσι τη νευρική διεγερσιμότητα.

Η αρχική εξέταση των Tag-1^{-/-} μυών έδειξε πως τα ζώα αυτά αναπτύσσονται και αναπαράγονται φυσιολογικά αλλά παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία σε επιλεπτογενή (διεγερτικά) ερεθίσματα (Fukamauchi et al., 2001). Η διαταραγή αυτή αποδόθηκε κυρίως σε μία αύξηση των υποδοχέων Α1 της αδενοσίνης, στον ιππόκαμπο των ομόζυγα μεταλλαγμένων ζώων. Επόμενες μελέτες έδειξαν πως ο εντοπισμός των τασεοελεγγόμενων διαύλων καλίου και της πρωτεΐνης Caspr2 διαταράσσεται από την απουσία της TAG-1 στο οπτικό και το ισχιακό νεύρο ενήλικων μυών (Poliak et al., 2003; Traka et al., 2003). Αντίστοιχα ήταν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη των Caspr2^{-/-} μυών (Poliak et al., 2003). Πρόσφατες μελέτες παρουσίασαν μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την ανθρώπινη Caspr2 σε ασθενείς με κληρονομική δυσπλασία του εγκεφαλικού φλοιού, νοητική στέρηση και μία μορφή εστιακής επιληψίας (Strauss et al., 2006). Επιπλέον, αρκετές μελέτες συνδέουν την εμφάνιση αυτοαντισωμάτων για τους τασεοελεγγόμενους διαύλους καλίου, συμπεριλαμβανομένων των υπομονάδων που εμφανίζονται στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή, με διάφορους τύπους επιληψίας (Thieben et al., 2004; Vincent et al., 2006; Kleopa et al., 2006; Majoie et al., 2006). Είναι ενδιαφέρον ότι οι μύες οι οποίοι είναι ελλειμματικοί για το γονίδιο της υπομονάδας των διαύλων καλίου Kv1.1. είναι ευαίσθητοι σε διεγερτικά ερεθίσματα και αποτελούν πειραματικό μοντέλο για την αναπτυξιακή επιληψία (Smart et al., 1998; Rho et al., 1999; Santoro et al., 2010).

Η επιληψία είναι μία διαταραχή κατά την οποία αποδιοργανώνεται το ηλεκτροχημικό κύκλωμα του εγκεφάλου από δυσλειτουργία μίας ομάδας νευρικών κυττάρων. Οι νευρώνες φυσιολογικά εκπολώνονται στους κόμβους του Ranvier, όπως έχει ήδη αναφερθεί και αυτό είναι απαραίτητο για την αλματώδη μεταγωγή του ηλεκτρικού σήματος στην απόληξη του νευράξονα όπου προκαλεί την επακόλουθη απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών, που μπορούν να διεγείρουν ή να αναστείλουν τον επόμενο νευρώνα (μετασυναπτικό). Στην επιληψία μπορεί να λαμβάνουν χώρα υπερβολική αύξηση ή μείωση διεγερτικών ή ανασταλτικών ερεθισμάτων αντίστοιχα ή και τα δύο. Η επιληψία μπορεί να έχει επιπτώσεις στην κινητικότητα, στην αισθητικότητα και μπορεί δευτερογενώς να επιβαρύνει τη συνείδηση του ασθενούς.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζουμε αποτελέσματα από τη μελέτη των *Tag-1^{-/-}* μυών στα οποία αποδεικνύουμε πως τα ζώα αυτά εμφανίζουν απώλεια της πρωτεΐνης Caspr2 και δραματική διάχυση των διαύλων καλίου από τις εγγύς των παρακομβικών περιοχές προς τα μεσοκομβικά τμήματα του άξονα. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που εμπλέκονται στην επιληψία όπως ο ιππόκαμπος και ο ενδορινικός φλοιός. Επιπλέον, παρουσιάζουμε για πρώτη φορά αποτελέσματα όπου φαίνεται μια μικρή αλλά σημαντική μείωση του μεσοκομβικού διαστήματος όπως ανιχνεύθηκε στην παρεγκεφαλίδα των *Tag-1^{-/-}* μυών. Πειράματα σε υπολογιστικά μοντέλα περιφερικών εμμύελων ινών έδειξε πως μείωση του μεσοκομβικού διαστήματος στο τέλος του εμμύελων τμήματος της νευρικής ίνας αυξάνει τη διεγερσιμότητα (Zhou et al., 1999). Προτείνουμε πως πιθανόν η βράχυνση των μεσοκομβικών τμημάτων που παρατηρείται στον εγκέφαλο των *Tag-1^{-/-}* ζώων σε συνδυασμό με την απώλεια των διαύλων καλίου από τις εγγύς των παρακομβικών περιοχές να συμβάλλουν στην αυξημένη ευασθησία σε επιλεπτογόνα ερεθίσματα που αυτά παρουσιάζουν.

Μία πρόσφατη μελέτη αποκάλυψε την ύπαρξη αυτοαντισωμάτων για την πρωτεΐνη TAG-1 στον ορό ενός ποσοστού ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας και πρότεινε το μόριο αυτό ως αυτοαντιγόνο που εμπλέκεται στην παθολογία της φαιάς ουσίας του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού (Derfuss et al., 2009). Η σκλήρυνση κατά πλάκας είναι μία απομυελινωτική νευροεκφυλιστική νόσος του Κ.Ν.Σ. που διαμεσολαβείται από το ανοσοποιητικό σύστημα και προσβάλλει κυρίως νέους ενήλικες. Η βασική διαταραχή, η οποία αποτελεί το κύριο αντικείμενο μελέτης στην σκλήρυνση κατά πλάκας είναι η απομυελίνωση, η καταστροφή του ελύτρου της μυελίνης. Από νωρίς όμως είχε περιγραφεί ο εκφυλισμός των νευραξόνων στο Κ.Ν.Σ. ασθενών. Ειδικότερα, στη σκλήρυνση κατά πλάκας, ο εκφυλισμός των νευραξόνων προκύπτει είτε από άμεση καταστροφή είτε από την έμμεση επίδραση της απομυελίνωσης (Owens 2003). Η απώλεια των νευραξόνων που οδηγεί σε ατροφία του εγκεφάλου συμβάλλει σημαντικά στα νευρολογικά (κινητικά και γνωστικά) ελλείμματα που παρουσιάζονται στους ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας.

Έως σήμερα έχουν ανακαλυφθεί αυτοαντισώματα έναντι διαφόρων δομικών πρωτεϊνών της μυελίνης (MOG, MAG, MBP, PLP) αλλά και λιπιδίων, που φαίνεται να διαμεσολαβούν την απομυελίνωση που παρουσιάζεται στους ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας (Quintana et al., 2008). Δύο πρόσφατες μελέτες έδειξαν την ύπαρξη αυτοαντισωμάτων σε ορισμένους ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας, έναντι της αξονικής πρωτεΐνης NF155, της γλοιακής NF186 και του μορίου TAG-1 που εκφράζεται από τα νευρικά αλλά και τα εμμύελα κύτταρα γλοίας στο νευρικό σύστημα (Mathey et al., 2007; Derfuss et al., 2009). Ειδικότερα, όσον αφορά στην TAG-1, η μελέτη των Derfuss et al. απέδειξε περαιτέρω ότι η μεταφορά TAG-1ειδικών Τ λεμφοκυττάρων σε αρουραίους ήταν ικανή να επάγει τη δημιουργία φλεγμονής στη φαιά ουσία του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού. Επακόλουθη μεταφορά αντισωμάτων ειδικών για την πρωτεΐνη MOG στους αρουραίους είχε σαν αποτέλεσμα εκτεταμένη απομυελίνωση στη φαιά και τη λευκή ουσία και επιδείνωση των νευρολογικών συμπτωμάτων στα πειραματόζωα. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή γίνεται σαφής ο κρίσιμος ρόλος της TAG-1 στην οργάνωση των εμμύελων ινών, η οποία φαίνεται να είναι απαραίτητη για τη σωστή λειτουργία του νευρικού συστήματος. Επιπλέον, αναλύουμε τη σημαντική λειτουργία της πρωτεΐνης στη διαδικασία της μυελίνωσης όπου φαίνεται να ρυθμίζει το πάχος της μυελίνης και ίσως δευτερογενώς την επιβίωση των μικρής διαμέτρου νευραξόνων. Τα αποτελέσματα αυτά συμβάλλουν στην κατανόηση του ρόλου της TAG-1 στην οργάνωση και λειτουργία των εμμύελων ινών του Κ.Ν.Σ., οι οποίες εκφυλίζονται στην σκλήρυνση κατά πλάκας.

Τέλος, αξίζει να αναφερθούμε σε μία ακόμα μελέτη που εμπλέκει την πρωτεΐνη TAG-1 σε μία απομυελινωτική νόσο. Στη μελέτη αυτή παρουσιάζεται ένας πολυμορφισμός (single nucleotide polymorphism, SNP) στο γονίδιο που κωδικοποιεί την ανθρώπινη TAG-1 ο οποίος επηρεάζει την απόκριση ασθενών με χρόνια φλεγμονώδη απομυελινωτική πολυνευροπάθεια (chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, CIDP) στη θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά (ενδοφλέβια χορήγηση ανοσοσφαιρινών) (Iijima et al., 2009). Η CIDP είναι μία ασθένεια απομυελίνωσης του περιφερικού νευρικού συστήματος που διαμεσολαβείται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Στη μελέτη αυτή αναφέρεται ότι οι ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία παρουσιάζουν πιο εκτεταμένη αξονική βλάβη στο Π.Ν.Σ. Επομένως, ο πολυμορφισμός του γονιδίου για την TAG-1 που εμφανίζεται και στα δύο αλληλόμορφα στους ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία, πιθανόν συνδέεται με τη δράση της πρωτεΐνης στην οργάνωση των εμμύελων ινών και τη συσσώρευση των διαύλων καλίου στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές ή τη μυελίνωση. Οι προηγούμενες μελέτες προτείνουν ένα πιθανό σημαντικό ρόλο της πρωτεΐνης TAG-1 σε ασθένειες του ανθρώπου που προκαλούν απομυελίνωση και στις οποίες σημαντικός φαίνεται να είναι ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Μπορούμε να συνοψίσουμε τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής στα εξής:

- Σε ελλειματικούς μύες για το γονίδιο που κωδικοποιεί το μόριο κυτταρικής συνάφειας TAG-1 (*Tag-1^{-/-}*), οι γνωστικές λειτουργίες της μάθησης και μνήμης καθώς και η κινητικότητα και ο κινητικός συντονισμός των άκρων διαταράσσονται
- Η εγγύς της παρακομβικής περιοχή διαταράσσεται σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένων αυτών που εμπλέκονται στις προαναφερθείσες συμπεριφορές. Ειδικότερα, 0 εντοπισμός της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης Caspr2 απουσιάζει από τον άξονα και οι τασεοελεγχόμενοι δίαυλοι καλίου εμφανίζουν δραματική διάχυση προς το μεσοκομβικό διάστημα
- Για πρώτη φορά αναφέρεται η βράχυνση των μεσοκομβικών διαστημάτων στις εμμύελες ίνες του κεντρικού νευρικού συστήματος των Tag-1^{-/-} μυών
- Με τη χρήση διαγονιδιακών μυών (*Tag-I^{-/-}*; plp^{Tg(rTag-1)}), αποδεικνύουμε πως η γλοιακή TAG-1, απουσία της πρωτεΐνης από τον άξονα είναι ικανή να οργανώσει και να διατηρήσει πλήρως το μοριακό σύμπλοκο της εγγύς της παρακομβικής περιοχής. Επιπλέον, επαναφέρει το μήκος των μεσοκομβικών διαστημάτων στα φυσιολογικά επίπεδα
- Επιβεβαιώθηκε το έλλειμμα των Tag-1^{-/-} μυών όσον αφορά στη μυελίνωση και την κατανομή των αξόνων του οπτικού νεύρου. Επίσης, η μορφολογική μελέτη των Tag-1^{-/-}; plp^{Tg(rTag-1)} ζώων, αποκάλυψε το ρόλο της γλοιακής TAG-1 στη θετική ρύθμιση του επίπεδου της μυελίνωσης καθώς και στη διατήρηση των μικρής διαμέτρου αξόνων στο οπτικό νεύρο
- Τέλος, αποδείξαμε ότι η αποκλειστική έκφραση της πρωτεΐνης TAG-1 στα ολιγοδενδροκύτταρα του Κ.Ν.Σ. μπορεί να ρυθμίσει και να επαναφέρει πλήρως τη συμπεριφορά των μυών σε φυσιολογικά επίπεδα

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμβάλλουν στην κατανόηση του μοριακού μηχανισμού με τον οποίο λειτουργεί η TAG-1 και γενικότερα καθιστούν σαφή το σημαντικό ρόλο των αξονογλοιακών αλληλεπιδράσεων στη σωστή λειτουργία του νευρικού συστήματος, από την αρχιτεκτονική των εμμύελων ινών έως

τη μυελίνωση και τη συμπεριφορά. Επόμενος στόχος μας είναι η διερεύνηση ενός πιθανού ρόλου της αξονικής TAG-1 στις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις και γενικότερα στη λειτουργία του ενήλικου νευρικού συστήματος. Από τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής φαίνεται ότι η αξονική TAG-1 δεν είναι απαραίτητη για τη δημιουργία των μοριακών αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή στο Κ.Ν.Σ. και είναι κρίσιμες για τη συσσώρευση των διαύλων καλίου. Επομένως, με τη χρήση διαγονιδιακών μυών που εκφράζουν την TAG-1 αποκλειστικά στα νευρικά και όχι στα κύτταρα γλοίας, θα μπορούσαμε να μελετήσουμε τη σημασία αυτού του μορίου στον άξονα στο ενήλικο νευρικό σύστημα. Επίσης, θα ήταν ενδιαφέρουσα η διερεύνηση πιθανών διαφοροποιήσεων στην οργάνωση των εμμύελων ινών και το ρόλο του μορίου TAG-1 μεταξύ του κεντρικού και του περιφερικού νευρικού συστήματος. Αυτό θα μπορούσε να επιτευχθεί με μελέτη του Π.Ν.Σ. στους μύες που Εκφράζουν την TAG-1 αποκλειστικά στα κύτταρα γλοίας ή τα νευρικά κύτταρα του Π.Ν.Σ.

Οι διαγονιδιακοί μύες στους οποίους η πρωτεΐνη TAG-1 εκφράζεται αποκλειστικά στα ολιγοδενδροκύτταρα αποτελούν ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών που διέπουν τις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή. Ειδικότερα, θα ήταν ενδιαφέρον εάν μπορούσαμε να ανιχνεύσουμε μόρια στο επίπεδο του γλοιακού κυττάρου τα οποία συμμετέχουν στην καθοδήγηση της TAG-1 στο σωστό σημείο ή και τη σταθεροποίηση του συμπλόκου με τα μόρια του άξονα. Η μελέτη αυτή θα μπορούσε σε πρώτη φάση να πραγματοποιηθεί με την εφαρμογή πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης και επακόλουθης φασματομετρίας μάζας για την αναγνώριση νέων μορίων. Στη συνέχεια θα πρέπει να επαληθευτεί ο εντοπισμός αυτών των μορίων και η αλληλεπίδρασή τους με τη γλοιακή TAG-1. Μία άλλη μελέτη στην οποία θα ήταν χρήσιμοι οι διαγονιδιακοί μύες αφορά στη διερεύνηση του ρόλου της TAG-1 και ειδικότερα της γλοιακής μορφής στις διαδικασίες του νευροεκφυλισμού, της απομυελίνωσης και της επαναμυελίνωσης. Ένας πιθανός άμεσος ρόλος της πρωτεΐνης TAG-1 στις παραπάνω διαδικασίες δεν έχει διερευνηθεί έως σήμερα σε πειραματικά μοντέλα μυών και θα αποτελούσε σίγουρα ένα πολύ ενδιαφέρον πεδίο μελέτης.

<u>Βιβλιογραφία</u>

- Alarcon, M., B. S. Abrahams, et al. (2008). "Linkage, association, and geneexpression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene." <u>Am</u> <u>J Hum Genet</u> 82(1): 150-159.
- Amaral DG, Witter MP (1995). "Hippocampal formation." <u>Paxinos G.</u> The Rat Nervous System. Academic Press, 443-493
- Arking, D. E., D. J. Cutler, et al. (2008). "A common genetic variant in the neurexin superfamily member CNTNAP2 increases familial risk of autism." <u>Am J Hum</u> <u>Genet</u> 82(1): 160-164.
- Arroyo, E. J. and S. S. Scherer (2000). "On the molecular architecture of myelinated fibers." <u>Histochem Cell Biol</u> 113(1): 1-18.
- Bakkaloglu, B., B. J. O'Roak, et al. (2008). "Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders." <u>Am J Hum Genet</u> 82(1): 165-173.
- Baron, W., H. Colognato, et al. (2005). "Integrin-growth factor interactions as regulators of oligodendroglial development and function." <u>Glia</u> **49**(4): 467-479.
- Barres, B. A. and M. C. Raff (1999). "Axonal control of oligodendrocyte development." J Cell Biol 147(6): 1123-1128.
- Baumann, N. and D. Pham-Dinh (2001). "Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system." Physiol Rev **81**(2): 871-927.
- Becker, C. G., A. Artola, et al. (1996). "The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation." J Neurosci Res **45**(2): 143-152.
- Bellen, H. J., Y. Lu, et al. (1998). "Neurexin IV, caspr and paranodin--novel members of the neurexin family: encounters of axons and glia." <u>Trends Neurosci</u> 21(10): 444-449.
- Bennett, V. and A. J. Baines (2001). "Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues." <u>Physiol Rev</u> **81**(3): 1353-1392.
- Bhat, M. A. (2003). "Molecular organization of axo-glial junctions." <u>Curr Opin</u> <u>Neurobiol</u> **13**(5): 552-559.
- Bhat, M. A., J. C. Rios, et al. (2001). "Axon-glia interactions and the domain organization of myelinated axons requires neurexin IV/Caspr/Paranodin." <u>Neuron</u> 30(2): 369-383.
- Bjartmar, C., X. Yin, et al. (1999). "Axonal pathology in myelin disorders." J Neurocytol **28**(4-5): 383-395.

- Boiko, T., M. N. Rasband, et al. (2001). "Compact myelin dictates the differential targeting of two sodium channel isoforms in the same axon." <u>Neuron</u> **30**(1): 91-104.
- Bongarzone, E. R., C. W. Campagnoni, et al. (1999). "Identification of a new exon in the myelin proteolipid protein gene encoding novel protein isoforms that are restricted to the somata of oligodendrocytes and neurons." J Neurosci 19(19): 8349-8357.
- Boyle, M. E., E. O. Berglund, et al. (2001). "Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve." <u>Neuron</u> 30(2): 385-397.
- Brinkmann, B. G., A. Agarwal, et al. (2008). "Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system." <u>Neuron</u> 59(4): 581-595.
- Brinkmann, B. G., A. Agarwal, et al. (2008). "Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system." <u>Neuron</u> 59(4): 581-595.
- Brophy, P. J. (2003). "Myelinated nerves: filling in the juxtaparanodal gap." <u>Curr Biol</u> **13**(24): R956-957.
- Carelli, V., F. N. Ross-Cisneros, et al. (2002). "Optic nerve degeneration and mitochondrial dysfunction: genetic and acquired optic neuropathies." <u>Neurochem Int</u> **40**(6): 573-584.
- Chatzopoulou, E., A. Miguez, et al. (2008). "Structural requirement of TAG-1 for retinal ganglion cell axons and myelin in the mouse optic nerve." J Neurosci **28**(30): 7624-7636.
- Chatzopoulou, E., A. Miguez, et al. (2008). "Structural requirement of TAG-1 for retinal ganglion cell axons and myelin in the mouse optic nerve." J Neurosci **28**(30): 7624-7636.
- Colognato, H., S. Ramachandrappa, et al. (2004). "Integrins direct Src family kinases to regulate distinct phases of oligodendrocyte development." <u>J Cell Biol</u> **167**(2): 365-375.
- Coman, I., M. S. Aigrot, et al. (2006). "Nodal, paranodal and juxtaparanodal axonal proteins during demyelination and remyelination in multiple sclerosis." <u>Brain</u> **129**(Pt 12): 3186-3195.
- Coman, I., G. Barbin, et al. (2005). "Axonal signals in central nervous system myelination, demyelination and remyelination." J Neurol Sci 233(1-2): 67-71.
- Compston, A. and A. Coles (2002). "Multiple sclerosis." <u>Lancet</u> **359**(9313): 1221-1231.

- Court, F. A., J. E. Hewitt, et al. (2009). "A laminin-2, dystroglycan, utrophin axis is required for compartmentalization and elongation of myelin segments." J Neurosci **29**(12): 3908-3919.
- Court, F. A., D. L. Sherman, et al. (2004). "Restricted growth of Schwann cells lacking Cajal bands slows conduction in myelinated nerves." <u>Nature</u> 431(7005): 191-195.
- Court, F. A., D. L. Sherman, et al. (2004). "Restricted growth of Schwann cells lacking Cajal bands slows conduction in myelinated nerves." <u>Nature</u> 431(7005): 191-195.
- Cremer, H., R. Lange, et al. (1994). "Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning." <u>Nature</u> **367**(6462): 455-459.
- Dean, C. and T. Dresbach (2006). "Neuroligins and neurexins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function." <u>Trends Neurosci</u> **29**(1): 21-29.
- Denaxa, M., C. H. Chan, et al. (2001). "The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system." <u>Development</u> **128**(22): 4635-4644.
- Denaxa, M., O. Pavlou, et al. (2003). "The upstream regulatory region of the gene for the human homologue of the adhesion molecule TAG-1 contains elements driving neural specific expression in vivo." <u>Brain Res Mol Brain Res</u> 118(1-2): 91-101.
- Denisenko-Nehrbass, N., K. Oguievetskaia, et al. (2003). "Protein 4.1B associates with both Caspr/paranodin and Caspr2 at paranodes and juxtaparanodes of myelinated fibres." <u>Eur J Neurosci</u> **17**(2): 411-416.
- Dere, E., J. P. Huston, et al. (2007). "The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents." <u>Neurosci Biobehav</u> <u>Rev</u> **31**(5): 673-704.
- Derfuss, T., K. Parikh, et al. (2009). "Contactin-2/TAG-1-directed autoimmunity is identified in multiple sclerosis patients and mediates gray matter pathology in animals." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(20): 8302-8307.
- Duflocq, A., B. Le Bras, et al. (2008). "Nav1.1 is predominantly expressed in nodes of Ranvier and axon initial segments." <u>Mol Cell Neurosci</u> **39**(2): 180-192.
- Dupree, J. L., J. A. Girault, et al. (1999). "Axo-glial interactions regulate the localization of axonal paranodal proteins." J Cell Biol 147(6): 1145-1152.
- Durbec, P., G. Gennarini, et al. (1992). "A soluble form of the F3 neuronal cell adhesion molecule promotes neurite outgrowth." J Cell Biol 117(4): 877-887.
- Dzhashiashvili, Y., Y. Zhang, et al. (2007). "Nodes of Ranvier and axon initial segments are ankyrin G-dependent domains that assemble by distinct mechanisms." J Cell Biol 177(5): 857-870.

- Eisenbach, M., E. Kartvelishvily, et al. (2009). "Differential clustering of Caspr by oligodendrocytes and Schwann cells." J Neurosci Res 87(15): 3492-3501.
- Eshed, Y., K. Feinberg, et al. (2007). "Secreted gliomedin is a perinodal matrix component of peripheral nerves." J Cell Biol 177(3): 551-562.
- Eshed, Y., K. Feinberg, et al. (2005). "Gliomedin mediates Schwann cell-axon interaction and the molecular assembly of the nodes of Ranvier." <u>Neuron</u> **47**(2): 215-229.
- Feinberg, K., Y. Eshed-Eisenbach, et al. (2010). "A glial signal consisting of gliomedin and NrCAM clusters axonal Na+ channels during the formation of nodes of Ranvier." <u>Neuron</u> 65(4): 490-502.
- ffrench-Constant, C., H. Colognato, et al. (2004). "Neuroscience. The mysteries of myelin unwrapped." <u>Science</u> **304**(5671): 688-689.
- Fitzli, D., E. T. Stoeckli, et al. (2000). "A direct interaction of axonin-1 with NgCAM-related cell adhesion molecule (NrCAM) results in guidance, but not growth of commissural axons." <u>J Cell Biol</u> 149(4): 951-968.
- Fransen, E., R. D'Hooge, et al. (1998). "L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impaired exploration patterns." <u>Hum Mol Genet</u> 7(6): 999-1009.
- Friede, R. L. (1983). "Variance in relative internode length (l/d) in the rat and its presumed significance for the safety factor and neuropathy." J Neurol Sci **60**(1): 89-104.
- Fruttiger, M., L. Karlsson, et al. (1999). "Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice." <u>Development</u> 126(3): 457-467.
- Fukamauchi, F., O. Aihara, et al. (2001). "TAG-1-deficient mice have marked elevation of adenosine A1 receptors in the hippocampus." <u>Biochem Biophys</u> <u>Res Commun</u> **281**(1): 220-226.
- Furley, A. J., S. B. Morton, et al. (1990). "The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity." <u>Cell</u> **61**(1): 157-170.
- Fuss, B., F. S. Afshari, et al. (2001). "Normal CNS myelination in transgenic mice overexpressing MHC class I H-2L(d) in oligodendrocytes." <u>Mol Cell Neurosci</u> 18(2): 221-234.
- Gomez-Casati, M. E., J. Murtie, et al. (2009). "Cell-Specific Inducible Gene Recombination in Postnatal Inner Ear Supporting Cells and Glia." <u>J Assoc Res</u> <u>Otolaryngol</u>.
- Gonzalez-Amaro, R. and F. Sanchez-Madrid (1999). "Cell adhesion molecules: selectins and integrins." <u>Crit Rev Immunol</u> **19**(5-6): 389-429.

- Griffiths, I., M. Klugmann, et al. (1998). "Current concepts of PLP and its role in the nervous system." <u>Microsc Res Tech</u> **41**(5): 344-358.
- Guilbot, A., A. Williams, et al. (2001). "A mutation in periaxin is responsible for CMT4F, an autosomal recessive form of Charcot-Marie-Tooth disease." <u>Hum Mol Genet</u> **10**(4): 415-421.
- Gumbiner, B. M. (2000). "Regulation of cadherin adhesive activity." <u>J Cell Biol</u> **148**(3): 399-404.
- Haspel, J., D. R. Friedlander, et al. (2000). "Critical and optimal Ig domains for promotion of neurite outgrowth by L1/Ng-CAM." J Neurobiol 42(3): 287-302.
- Hassel, B., F. G. Rathjen, et al. (1997). "Organization of the neurofascin gene and analysis of developmentally regulated alternative splicing." <u>J Biol Chem</u> 272(45): 28742-28749.
- Horresh, I., V. Bar, et al. (2010). "Organization of myelinated axons by Caspr and Caspr2 requires the cytoskeletal adapter protein 4.1B." <u>J Neurosci</u> **30**(7): 2480-2489.
- Horresh, I., S. Poliak, et al. (2008). "Multiple molecular interactions determine the clustering of Caspr2 and Kv1 channels in myelinated axons." <u>J Neurosci</u> 28(52): 14213-14222.
- Hu, Q. D., B. T. Ang, et al. (2003). "F3/contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation." <u>Cell</u> 115(2): 163-175.
- Hu, Y. Y., S. S. He, et al. (2002). "Elevated levels of phosphorylated neurofilament proteins in cerebrospinal fluid of Alzheimer disease patients." <u>Neurosci Lett</u> 320(3): 156-160.
- Hynes, R. O. and Q. Zhao (2000). "The evolution of cell adhesion." <u>J Cell Biol</u> **150**(2): F89-96.
- Iijima, M., M. Tomita, et al. (2009). "Single nucleotide polymorphism of TAG-1 influences IVIg responsiveness of Japanese patients with CIDP." <u>Neurology</u> 73(17): 1348-1352.
- Jarjour, A. A., S. J. Bull, et al. (2008). "Maintenance of axo-oligodendroglial paranodal junctions requires DCC and netrin-1." <u>J Neurosci</u> 28(43): 11003-11014.
- Jessen, K. R. and R. Mirsky (2005). "The origin and development of glial cells in peripheral nerves." <u>Nat Rev Neurosci</u> 6(9): 671-682.
- Jiang, H., C. S. Duchala, et al. (2000). "Proteolipid protein mRNA stability is regulated by axonal contact in the rodent peripheral nervous system." J <u>Neurobiol</u> 44(1): 7-19.
- Kakunaga, S., W. Ikeda, et al. (2005). "Nectin-like molecule-1/TSLL1/SynCAM3: a neural tissue-specific immunoglobulin-like cell-cell adhesion molecule

localizing at non-junctional contact sites of presynaptic nerve terminals, axons and glia cell processes." J Cell Sci **118**(Pt 6): 1267-1277.

- Kamei, Y., Y. Takeda, et al. (2000). "Human NB-2 of the contactin subgroup molecules: chromosomal localization of the gene (CNTN5) and distinct expression pattern from other subgroup members." <u>Genomics</u> **69**(1): 113-119.
- Kaplan, M. R., M. H. Cho, et al. (2001). "Differential control of clustering of the sodium channels Na(v)1.2 and Na(v)1.6 at developing CNS nodes of Ranvier." <u>Neuron</u> **30**(1): 105-119.
- Karagogeos, D., S. B. Morton, et al. (1991). "Developmental expression of the axonal glycoprotein TAG-1: differential regulation by central and peripheral neurons in vitro." <u>Development</u> 112(1): 51-67.
- Kleopa, K. A., L. B. Elman, et al. (2006). "Neuromyotonia and limbic encephalitis sera target mature Shaker-type K+ channels: subunit specificity correlates with clinical manifestations." <u>Brain</u> **129**(Pt 6): 1570-1584.
- Kozlov, S. V., R. J. Giger, et al. (1995). "The human TAX1 gene encoding the axonassociated cell adhesion molecule TAG-1/axonin-1: genomic structure and basic promoter." <u>Genomics</u> 30(2): 141-148.
- Kunz, S., M. Spirig, et al. (1998). "Neurite fasciculation mediated by complexes of axonin-1 and Ng cell adhesion molecule." J Cell Biol 143(6): 1673-1690.
- Kyriakopoulou, K., I. de Diego, et al. (2002). "A combination of chain and neurophilic migration involving the adhesion molecule TAG-1 in the caudal medulla." <u>Development</u> **129**(2): 287-296.
- Lacas-Gervais, S., J. Guo, et al. (2004). "BetaIVSigma1 spectrin stabilizes the nodes of Ranvier and axon initial segments." J Cell Biol 166(7): 983-990.
- Lieberoth, A., F. Splittstoesser, et al. (2009). "Lewis(x) and alpha2,3-sialyl glycans and their receptors TAG-1, Contactin, and L1 mediate CD24-dependent neurite outgrowth." J Neurosci **29**(20): 6677-6690.
- Liu, Y. and M. C. Halloran (2005). "Central and peripheral axon branches from one neuron are guided differentially by Semaphorin3D and transient axonal glycoprotein-1." <u>J Neurosci</u> 25(45): 10556-10563.
- Ma, Q. H., T. Futagawa, et al. (2008). "A TAG1-APP signalling pathway through Fe65 negatively modulates neurogenesis." <u>Nat Cell Biol</u> **10**(3): 283-294.
- Majoie, H. J., M. de Baets, et al. (2006). "Antibodies to voltage-gated potassium and calcium channels in epilepsy." <u>Epilepsy Res</u> **71**(2-3): 135-141.
- Maness, P. F. and M. Schachner (2007). "Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration." <u>Nat Neurosci</u> **10**(1): 19-26.

- Mathey, E. K., T. Derfuss, et al. (2007). "Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury." J Exp Med **204**(10): 2363-2372.
- Mattson, M. P. and H. van Praag (2008). "TAGing APP constrains neurogenesis." <u>Nat</u> <u>Cell Biol</u> **10**(3): 249-250.
- Maurel, P., S. Einheber, et al. (2007). "Nectin-like proteins mediate axon Schwann cell interactions along the internode and are essential for myelination." <u>J Cell</u> <u>Biol</u> **178**(5): 861-874.
- Maziade, M., V. Raymond, et al. (1995). "Linkage results on 11Q21-22 in Eastern Quebec pedigrees densely affected by schizophrenia." <u>Am J Med Genet</u> **60**(6): 522-528.
- Meiri, N., C. Ghelardini, et al. (1997). "Reversible antisense inhibition of Shaker-like Kv1.1 potassium channel expression impairs associative memory in mouse and rat." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **94**(9): 4430-4434.
- Mert, T. (2007). "Roles of axonal voltage-dependent ion channels in damaged peripheral nerves." <u>Eur J Pharmacol</u> **568**(1-3): 25-30.
- Mi, S., R. H. Miller, et al. (2005). "LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes." <u>Nat Neurosci</u> 8(6): 745-751.
- Michailov, G. V., M. W. Sereda, et al. (2004). "Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness." <u>Science</u> **304**(5671): 700-703.
- Miller, M. J., C. D. Kangas, et al. (2009). "Neuronal expression of the proteolipid protein gene in the medulla of the mouse." J Neurosci Res 87(13): 2842-2853.
- Nie, D. Y., Z. H. Zhou, et al. (2003). "Nogo-A at CNS paranodes is a ligand of Caspr: possible regulation of K(+) channel localization." <u>Embo J</u> **22**(21): 5666-5678.
- Nourry, C., S. G. Grant, et al. (2003). "PDZ domain proteins: plug and play!" <u>Sci</u> <u>STKE</u> 2003(179): RE7.
- Ogawa, Y., I. Horresh, et al. (2008). "Postsynaptic density-93 clusters Kv1 channels at axon initial segments independently of Caspr2." <u>J Neurosci</u> 28(22): 5731-5739.
- Ogawa, Y., J. Oses-Prieto, et al. (2010). "ADAM22, a Kv1 channel-interacting protein, recruits membrane-associated guanylate kinases to juxtaparanodes of myelinated axons." J Neurosci **30**(3): 1038-1048.
- Ogawa, Y. and M. N. Rasband (2009). "Proteomic analysis of optic nerve lipid rafts reveals new paranodal proteins." J Neurosci Res 87(15): 3502-3510.
- Ogawa, Y., D. P. Schafer, et al. (2006). "Spectrins and ankyrinB constitute a specialized paranodal cytoskeleton." J Neurosci **26**(19): 5230-5239.
- Oliver, P. L., D. A. Keays, et al. (2007). "Behavioural characterisation of the robotic mouse mutant." <u>Behav Brain Res</u> 181(2): 239-247.

- Owens, G. C. and R. P. Bunge (1991). "Schwann cells infected with a recombinant retrovirus expressing myelin-associated glycoprotein antisense RNA do not form myelin." <u>Neuron</u> 7(4): 565-575.
- Owens, T. (2003). "The enigma of multiple sclerosis: inflammation and neurodegeneration cause heterogeneous dysfunction and damage." <u>Curr Opin Neurol</u> 16(3): 259-265.
- Parron, C. and E. Save (2004). "Comparison of the effects of entorhinal and retrosplenial cortical lesions on habituation, reaction to spatial and non-spatial changes during object exploration in the rat." <u>Neurobiol Learn Mem</u> **82**(1): 1-11.
- Pavlou, O., K. Theodorakis, et al. (2002). "Analysis of interactions of the adhesion molecule TAG-1 and its domains with other immunoglobulin superfamily members." <u>Mol Cell Neurosci</u> 20(3): 367-381.
- Pedraza, L., J. K. Huang, et al. (2009). "Disposition of axonal caspr with respect to glial cell membranes: Implications for the process of myelination." <u>J Neurosci</u> <u>Res</u> 87(15): 3480-3491.
- Pernet, V., S. Joly, et al. (2008). "Nogo-A and myelin-associated glycoprotein differently regulate oligodendrocyte maturation and myelin formation." J Neurosci 28(29): 7435-7444.
- Pillai, A. M., C. Thaxton, et al. (2009). "Spatiotemporal ablation of myelinating gliaspecific neurofascin (Nfasc NF155) in mice reveals gradual loss of paranodal axoglial junctions and concomitant disorganization of axonal domains." J <u>Neurosci Res</u> 87(8): 1773-1793.
- Poliak, S. and E. Peles (2003). "The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier." <u>Nat Rev Neurosci</u> 4(12): 968-980.
- Poliak, S., D. Salomon, et al. (2003). "Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K+ channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1." <u>J Cell Biol</u> **162**(6): 1149-1160.
- Popko, B., C. Puckett, et al. (1987). "Myelin deficient mice: expression of myelin basic protein and generation of mice with varying levels of myelin." <u>Cell</u> 48(4): 713-721.
- Quintana, F. J., M. F. Farez, et al. (2008). "Antigen microarrays identify unique serum autoantibody signatures in clinical and pathologic subtypes of multiple sclerosis." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **105**(48): 18889-18894.
- Rasband, M. N., E. W. Park, et al. (2002). "Clustering of neuronal potassium channels is independent of their interaction with PSD-95." J Cell Biol **159**(4): 663-672.
- Rasband, M. N. and J. S. Trimmer (2001). "Developmental clustering of ion channels at and near the node of Ranvier." <u>Dev Biol</u> 236(1): 5-16.
- Rasband, M. N., J. S. Trimmer, et al. (1999). "K+ channel distribution and clustering in developing and hypomyelinated axons of the optic nerve." <u>J Neurocytol</u> 28(4-5): 319-331.
- Rho, J. M., P. Szot, et al. (1999). "Developmental seizure susceptibility of kv1.1 potassium channel knockout mice." <u>Dev Neurosci</u> **21**(3-5): 320-327.
- Ronn, L. C., B. P. Hartz, et al. (1998). "The neural cell adhesion molecule (NCAM) in development and plasticity of the nervous system." <u>Exp Gerontol</u> 33(7-8): 853-864.
- Saadati, H. G., H. Y. Hsu, et al. (1998). "A histopathologic and morphometric differentiation of nerves in optic nerve hypoplasia and Leber hereditary optic neuropathy." <u>Arch Ophthalmol</u> 116(7): 911-916.
- Sadun, A. A. (2002). "Mitochondrial optic neuropathies." J Neurol Neurosurg <u>Psychiatry</u> 72(4): 423-425.
- Sakisaka, T. and Y. Takai (2005). "Cell adhesion molecules in the CNS." <u>J Cell Sci</u> 118(Pt 23): 5407-5410.
- Salzer, J. L. (2008). "Switching myelination on and off." J Cell Biol 181(4): 575-577.
- Salzer, J. L., P. J. Brophy, et al. (2008). "Molecular domains of myelinated axons in the peripheral nervous system." <u>Glia</u> **56**(14): 1532-1540.
- Santoro, B., J. Y. Lee, et al. (2010). "Increased seizure severity and seizure-related death in mice lacking HCN1 channels." <u>Epilepsia</u> **51**(8): 1624-1627.
- Saporta, M. A., I. Katona, et al. (2009). "Shortened internodal length of dermal myelinated nerve fibres in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A." <u>Brain</u> 132(Pt 12): 3263-3273.
- Savvaki, M., T. Panagiotaropoulos, et al. (2008). "Impairment of learning and memory in TAG-1 deficient mice associated with shorter CNS internodes and disrupted juxtaparanodes." <u>Mol Cell Neurosci</u> **39**(3): 478-490.
- Savvaki, M., T. Panagiotaropoulos, et al. (2008). "Impairment of learning and memory in TAG-1 deficient mice associated with shorter CNS internodes and disrupted juxtaparanodes." <u>Mol Cell Neurosci</u> **39**(3): 478-490.
- Sherman, D. L. and P. J. Brophy (2005). "Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth." <u>Nat Rev Neurosci</u> 6(9): 683-690.
- Sherman, D. L., C. Fabrizi, et al. (2001). "Specific disruption of a schwann cell dystrophin-related protein complex in a demyelinating neuropathy." <u>Neuron</u> 30(3): 677-687.
- Simons, M. and K. Trajkovic (2006). "Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis." <u>J Cell Sci</u> **119**(Pt 21): 4381-4389.

- Smart, S. L., V. Lopantsev, et al. (1998). "Deletion of the K(V)1.1 potassium channel causes epilepsy in mice." <u>Neuron</u> **20**(4): 809-819.
- Spiegel, I., K. Adamsky, et al. (2007). "A central role for Necl4 (SynCAM4) in Schwann cell-axon interaction and myelination." <u>Nat Neurosci</u> **10**(7): 861-869.
- Spiegel, I. and E. Peles (2002). "Cellular junctions of myelinated nerves (Review)." <u>Mol Membr Biol</u> 19(2): 95-101.
- Sternberger, N. H., L. A. Sternberger, et al. (1985). "Aberrant neurofilament phosphorylation in Alzheimer disease." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 82(12): 4274-4276.
- Stoeckli, E. T., T. B. Kuhn, et al. (1991). "The axonally secreted protein axonin-1 is a potent substratum for neurite growth." J Cell Biol **112**(3): 449-455.
- Strauss, K. A., E. G. Puffenberger, et al. (2006). "Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2." <u>N Engl J Med</u> 354(13): 1370-1377.
- Susuki, K. and M. N. Rasband (2008). "Molecular mechanisms of node of Ranvier formation." <u>Curr Opin Cell Biol</u> **20**(6): 616-623.
- Taveggia, C., G. Zanazzi, et al. (2005). "Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons." <u>Neuron</u> **47**(5): 681-694.
- Thieben, M. J., V. A. Lennon, et al. (2004). "Potentially reversible autoimmune limbic encephalitis with neuronal potassium channel antibody." <u>Neurology</u> 62(7): 1177-1182.
- Traka, M., J. L. Dupree, et al. (2002). "The neuronal adhesion protein TAG-1 is expressed by Schwann cells and oligodendrocytes and is localized to the juxtaparanodal region of myelinated fibers." J Neurosci 22(8): 3016-3024.
- Traka, M., L. Goutebroze, et al. (2003). "Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers." J Cell Biol 162(6): 1161-1172.
- Tsiotra, P. C., K. Theodorakis, et al. (1996). "The fibronectin domains of the neural adhesion molecule TAX-1 are necessary and sufficient for homophilic binding." J Biol Chem **271**(46): 29216-29222.
- Tzimourakas, A., S. Giasemi, et al. (2007). "Structure-function analysis of protein complexes involved in the molecular architecture of juxtaparanodal regions of myelinated fibers." <u>Biotechnol J</u> **2**(5): 577-583.
- Ushkaryov, Y. A., A. G. Petrenko, et al. (1992). "Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin." <u>Science</u> **257**(5066): 50-56.

- Vabnick, I., S. D. Novakovic, et al. (1996). "The clustering of axonal sodium channels during development of the peripheral nervous system." J Neurosci 16(16): 4914-4922.
- Vabnick, I., J. S. Trimmer, et al. (1999). "Dynamic potassium channel distributions during axonal development prevent aberrant firing patterns." J Neurosci 19(2): 747-758.
- Van der Borght, K., A. E. Wallinga, et al. (2005). "Morris water maze learning in two rat strains increases the expression of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule in the dentate gyrus but has no effect on hippocampal neurogenesis." <u>Behav Neurosci</u> 119(4): 926-932.
- Vincent, A., B. Lang, et al. (2006). "Autoimmune channelopathies and related neurological disorders." <u>Neuron</u> **52**(1): 123-138.
- Walsh, F. S. and P. Doherty (1997). "Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance." <u>Annu Rev</u> <u>Cell Dev Biol</u> 13: 425-456.
- Wang, S., A. D. Sdrulla, et al. (1998). "Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation." <u>Neuron</u> **21**(1): 63-75.
- Wight, P. A., C. S. Duchala, et al. (1993). "A myelin proteolipid protein-LacZ fusion protein is developmentally regulated and targeted to the myelin membrane in transgenic mice." J Cell Biol **123**(2): 443-454.
- Williams, A. F. and A. N. Barclay (1988). "The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition." <u>Annu Rev Immunol</u> 6: 381-405.
- Wolfer, D. P., R. J. Giger, et al. (1998). "Expression of the axon growth-related neural adhesion molecule TAG-1/axonin-1 in the adult mouse brain." <u>Anat Embryol</u> (Berl) 197(3): 177-185.
- Wolman, M. A., V. K. Sittaramane, et al. (2008). "Transient axonal glycoprotein-1 (TAG-1) and laminin-alpha1 regulate dynamic growth cone behaviors and initial axon direction in vivo." <u>Neural Dev</u> 3: 6.
- Yoshihara, Y., M. Kawasaki, et al. (1995). "Overlapping and differential expression of BIG-2, BIG-1, TAG-1, and F3: four members of an axon-associated cell adhesion molecule subgroup of the immunoglobulin superfamily." <u>J Neurobiol</u> 28(1): 51-69.
- Yoshihara, Y., M. Kawasaki, et al. (1994). "BIG-1: a new TAG-1/F3-related member of the immunoglobulin superfamily with neurite outgrowth-promoting activity." <u>Neuron</u> **13**(2): 415-426.
- Zhou, L., A. Messing, et al. (1999). "Determinants of excitability at transition zones in Kv1.1-deficient myelinated nerves." J Neurosci **19**(14): 5768-5781.

- Zonta, B., S. Tait, et al. (2008). "Glial and neuronal isoforms of Neurofascin have distinct roles in the assembly of nodes of Ranvier in the central nervous system." J Cell Biol **181**(7): 1169-1177.
- Zou, D. J., A. Chesler, et al. (2009). "How the olfactory bulb got its glomeruli: a just so story?" <u>Nat Rev Neurosci</u> **10**(8): 611-618.
- Zoumalan, C. I., M. Agarwal, et al. (2005). "Optical coherence tomography can measure axonal loss in patients with ethambutol-induced optic neuropathy." <u>Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol</u> **243**(5): 410-416.
- Zoupi, L., M. Savvaki and D. Karagogeos (2011). "Axons and myelinating glia: An intimate contact." <u>IUBMB Life</u> in press