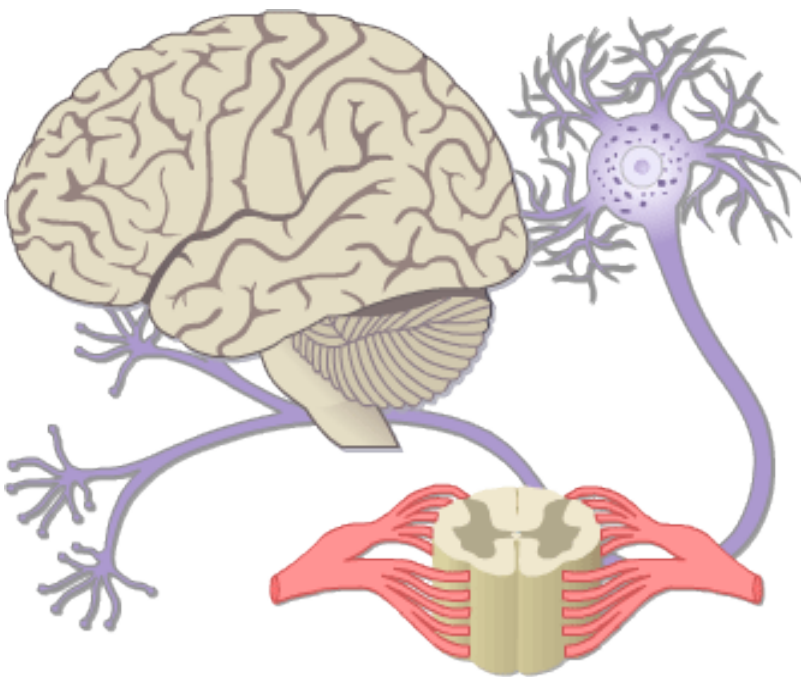


ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ TAG-1 ΣΤΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΣΕΙΡΑ

TAG-1^{TgCre}; Rosa26 YFP^{st/st}



ΒΑΡΓΙΑΜΗ ΜΑΡΓΑΡΙΤΑ (Α.Μ 1570)

Υπεύθυνοι Καθηγητές:

Καραγωγέως Δόμνα, Χαλεπάκης Γεώργιος

Επιβλέποντες Καθηγητές:

Καραγωγέως Δόμνα, Θεοδωράκης Κώστας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
ΣΚΟΠΟΣ	14
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	15
➤ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΤΙΣ ΟΠΟΙΕΣ ΒΑΣΙΣΤΗΚΕ Η ΜΕΛΕΤΗ ΜΑΣ	15
➤ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ ΚΑΙ ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΙΣ	16
➤ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ	17
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	21
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	29
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	30
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	31

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο φλοιός των εγκεφαλικών ημισφαιρίων των θηλαστικών, αποτελεί την έδρα όλων των ανώτερων αισθητικών, κινητικών και συνειρμικών λειτουργιών. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη σωστή λειτουργία του φλοιού, είναι η σωστή τοποθέτηση των νευρώνων κατά την ανάπτυξη, η διαφοροποίηση και η ενσωμάτωσή τους σε λειτουργικά νευρικά δίκτυα. Έχει παρατηρηθεί πως οποιαδήποτε ανωμαλία στις παραπάνω διεργασίες, συχνά αποτελεί τη βάση χρόνιων παθήσεων, όπως η επιληψία, η σχιζοφρένεια και ο αυτισμός. Επομένως, η κατανόηση των μηχανισμών που καθορίζουν την ανάπτυξη και τη σωστή λειτουργία των νευρικών κυττάρων του φλοιού, αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την κατανόηση της παθολογίας του εγκεφάλου και την αντιμετώπιση πολλών παθήσεων.

Οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν τα στάδια ανάπτυξης των ενδονευρώνων, από τη γέννησή τους, ως την οριζόντια μετανάστευση και τη διαφοροποίησή τους, έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας. Τελευταία έχουν χαρακτηριστεί αρκετά μόρια που μετέχουν στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων, κυρίως στο στάδιο της μετανάστευσής τους. Προκειμένου οι νεογέννητοι νευρώνες να καταλήξουν στις σωστές θέσεις τους στο φλοιό, απαιτείται ο συντονισμός εξωκυττάρων καθοδηγητικών σημάτων, αυξητικών παραγόντων και μορίων κυτταρικής συνάφειας, καθώς και ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών.

Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας, εντοπίζονται στην επιφάνεια των νευρικών κυττάρων και στο μικροπεριβάλλον του νευράξονα και διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο σε ποικίλες διεργασίες των κυττάρων αυτών, γεγονός που τα καθιστά πολύ σημαντικά για τη σωστή λειτουργία του φλοιού και του νευρικού συστήματος γενικότερα.

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία μελετήθηκε η έκφραση της TAG-1, που ανήκει στα μόρια κυτταρικής συνάφειας και παρατηρείται σε πληθώρα αξονικών και κυτταρικών πληθυσμών κατά την εμβρυογένεση.

Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν πως οι ενδονευρώνες μετακινούνται πάνω στους φλοιοθαλαμικούς άξονες, οι οποίοι εκφράζουν στην επιφάνειά τους την TAG-1, τόσο κατά την οριζόντια μετανάστευσή τους, όσο και όταν αλλάζουν κατεύθυνση και κινούνται ακτινωτά, προκειμένου να καταλάβουν τις τελικές θέσεις τους στο φλοιό.

Στόχος των πειραμάτων που περιγράφονται παρακάτω, είναι η κατανόηση του ρόλου των φλοιοθαλαμικών αξόνων στην οριζόντια μετανάστευση των ενδονευρώνων και στην ανάπτυξη του φλοιού γενικότερα. Επειδή η TAG-1 εκφράζεται στους φλοιοθαλαμικούς άξονες σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια χρησιμοποιήθηκε ως μοριακός δείκτης των αξόνων αυτών.

Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε μια διαγονιδιακή σειρά μυών, η οποία μελετήθηκε ως προς την *in vivo* έκφραση του διαγονιδίου *Tag-1^{TgCre}*, έτσι ώστε να διαπιστωθεί αν αυτή συμφωνεί με το πρότυπο έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου της TAG-1.

Η συγκεκριμένη σειρά διαγονιδιακών αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη πολλαπλών αναπτυξιακών διεργασιών στο νευρικό σύστημα. Μέσω της διασταύρωσης των ζώων αυτών με κατάλληλα διαγονιδιακά ζώα, που φέρουν loxP τόπους σε γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, είναι δυνατή η λεπτομερής μελέτη του ρόλου αυτών των γονιδίων, σε οποιαδήποτε διαδικασία συμμετέχουν.

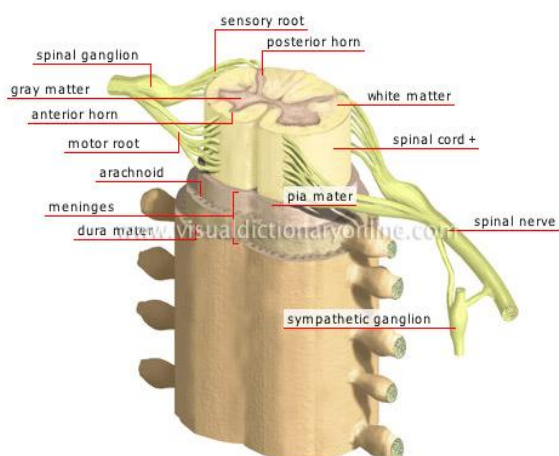
ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το νευρικό σύστημα διακρίνεται σε κεντρικό και περιφερικό και αποτελεί το σύστημα που ρυθμίζει και ελέγχει την λειτουργία όλων των οργάνων του σώματος, καθώς επίσης και την μεταξύ τους αρμονική συνεργασία. Παράλληλα αποτελεί την έδρα των ψυχικών λειτουργιών και επιπλέον μέσω των αισθητήριων οργάνων (μάτι, αυτί, δέρμα, γλώσσα, μύτη) συμβάλλει στην αντίληψη του περιβάλλοντος από τον οργανισμό.

Κατά κύριο λόγο αποτελείται κυρίως από εξειδικευμένα κύτταρα, τους νευρώνες, των οποίων η λειτουργία είναι να υποδέχονται αισθητικά ερεθίσματα και να τα μεταφέρουν στα εκτελεστικά όργανα, δηλαδή τους μυς και τους αδένες.

ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ

Ο εγκέφαλος αποτελεί το σπουδαιότερο και μεγαλύτερο τμήμα του κεντρικού νευρικού συστήματος. Εντοπίζεται στο εσωτερικό του κρανίου και περιβάλλεται από τρεις προστατευτικούς υμένες, τις μήνιγγες. Αποτελείται από δύο ημισφαίρια, τα οποία χωρίζονται μεταξύ τους μέσω της επιμήκης σχισμής. Από την κάτω επιφάνειά του εκφύονται τα νεύρα και ξεκινά ο νωτιαίος μυελός. Οι άνω και οι πλάγιες επιφάνειες του εγκεφάλου αποτελούν τον εγκεφαλικό φλοιό.



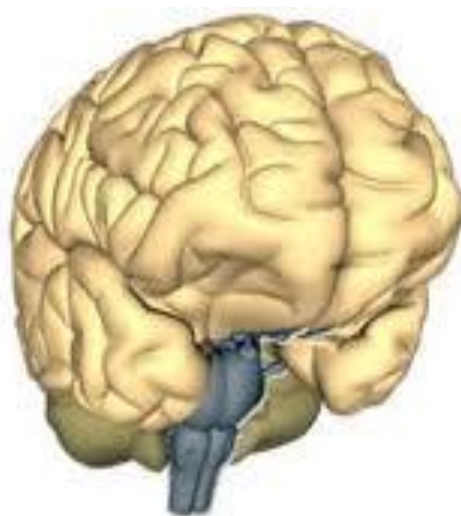
-Ο **νωτιαίος μυελός** αποτελεί βασική μονάδα του Κ.Ν.Σ και είναι ένας εσωτερικός σωλήνας της σπονδυλικής στήλης, μέσα στον οποίο διέρχονται οι νευρώνες.

Διακρίνεται στη φαιά ουσία που βρίσκεται στο κέντρο του νωτιαίου μυελού και στη λευκή ουσία, που αποτελείται κυρίως από νευρογλοιακά κύτταρα, και βρίσκεται εξωτερικά.

-Ο **εγκεφαλικός φλοιός** αποτελεί μια δομή στον εγκέφαλο των σπονδυλωτών με χαρακτηριστικές λειτουργικές και δομικές ιδιότητες, καθώς διαδραματίζει κεντρικό ρόλο σε όλες τις ανώτερες εγκεφαλικές λειτουργίες, όπως η μνήμη, η προσοχή, η αντίληψη, η σκέψη, η γλώσσα και η συνείδηση.

Η επιφάνεια του φλοιού περιέχει πολλές εγκοιλώσεις, τις έλικες, με αποτέλεσμα σχεδόν τα 2/3 του φλοιού να βρίσκονται κρυμμένα μέσα στις αύλακες που σχηματίζονται.

Ο εγκεφαλικός φλοιός αναπτύσσεται από την νευρική πλάκα, η οποία πτυχώνεται και κλείνει για να δημιουργηθεί ο νευρικός σωλήνας. Από την κοιλότητα του νευρικού σωλήνα αναπτύσσεται το κοιλιακό σύστημα, και από τα επιθηλιακά κύτταρα των τοιχωμάτων του αναπτύσσονται οι νευρώνες και τα γλοιακά κύτταρα. Από το πρόσθιο μέρος του νευρικού σωλήνα, τον Τελεγκέφαλο, προκύπτουν τα δύο εγκεφαλικά ημισφαίρια και ο νεοφλοιός.



ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Τα κύτταρα του νευρικού συστήματος διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες:

- Τα νευρογλοιακά κύτταρα που αποτελούν το 80% των κυττάρων αυτών
- και τους νευρώνες

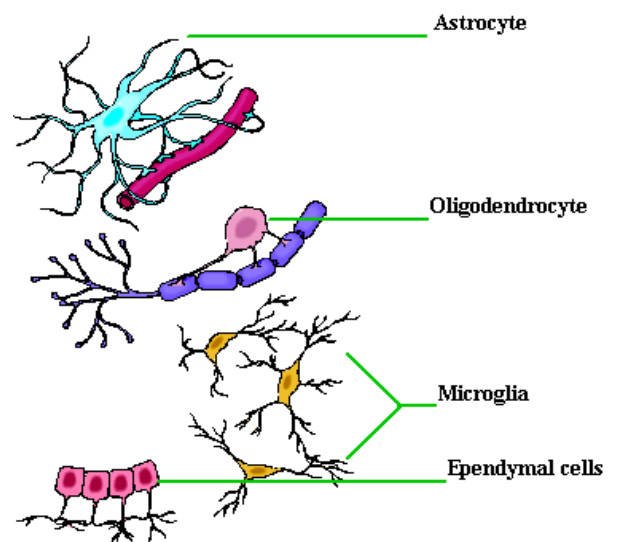
-Τα **νευρογλοιακά κύτταρα** συνιστούν μη νευρικά κύτταρα τα οποία συμβάλλουν στη διατήρηση της ομοιόστασης και στην προστασία των νευρώνων του ΚΝΣ και του ΠΝΣ. Πιο συγκεκριμένα, οι ρόλοι που διαδραματίζουν τα κύτταρα αυτά ως προς τους νευρώνες είναι οι εξής:

- τους περιβάλλουν και τους συγκρατούν στη θέση τους
- τους παρέχουν θρεπτικές ουσίες και οξυγόνο
- τους απομονώνουν τον έναν απ' τον άλλον
- εξουδετερώνουν παθογόνα και
- απομακρύνουν νεκρούς νευρώνες

Τα νευρογλοιακά κύτταρα διακρίνονται σε:

- Αστροκύτταρα, τα οποία έχουν κυρίως υποστηρικτικό –δομικό ρόλο, ενώ λαμβάνουν μέρος και σε πολύπλοκες διαδικασίες όπως του ανοσοποιητικού
- Ολιγοδενδροκύτταρα, τα οποία επενδύουν τους άξονες των νευρώνων με μια στιβάδα λιπιδίων που ονομάζεται μυελίνη
- Επενδυματικά κύτταρα, που διαδραματίζουν ρόλο στην προστασία του εγκεφαλονωτιαίου υγρού
- Μικρογλοιακά κύτταρα, που αποτελούν τα «μακροφάγα» κύτταρα του νευρικού συστήματος
- Κύτταρα Schwann, τα οποία επενδύουν τα περιφερικά νεύρα με μυελίνη και συμβάλλουν στην ανακατασκευή των κατεστραμμένων περιφερικών νεύρων.

Neuroglial Cells of the CNS

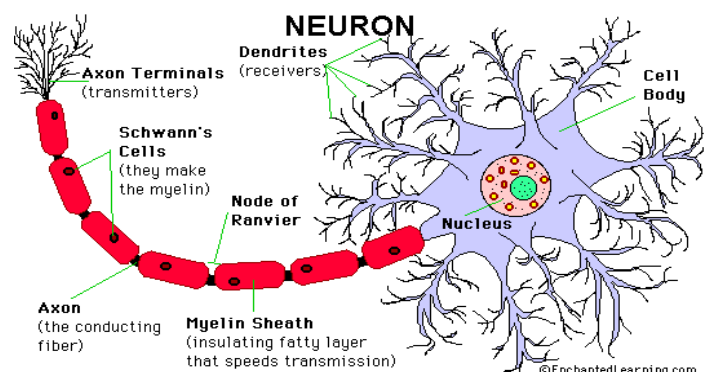


- Οι τέσσερις πρώτες κατηγορίες νευρογλοιακών κυττάρων κατατάσσονται στα κύτταρα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, ενώ η τελευταία κατηγορία στο Περιφερικό Νευρικό Σύστημα.

-Οι **νευρώνες** διαθέτουν δύο σημαντικές ιδιότητες, την αγωγιμότητα και την διεγερσιμότητα. Πρόκειται για ειδικευμένα κύτταρα που διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη διεγερση και μετάδοση νευρικής ώσης.

Η δομή τους διακρίνεται στα εξής χαρακτηριστικά:

- το κυτταρικό σώμα που περιλαμβάνει τον πυρήνα και μεγάλο αριθμό οργανιδίων
- και από μία ή περισσότερες αποφυάδες που διακρίνονται στους δενδρίτες όταν συλλέγουν τα σήματα που στέλνονται στο κύτταρο και στους άξονες όταν μεταδίδουν ώσεις από το κυτταρικό σώμα.



- Οι νευρώνες κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τον αριθμό των αποφυάδων τους σε μονοπολικούς, πολυπολικούς, αισθητικούς, κινητικούς και συνδετικούς.

ΦΛΟΙΟΣ

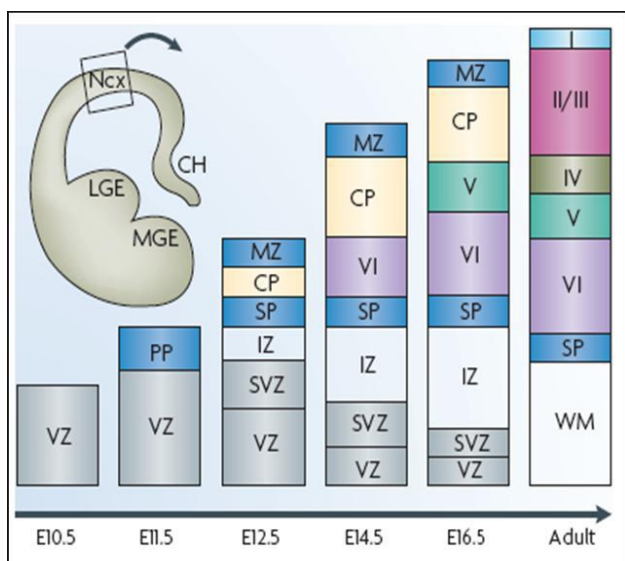
Ο φλοιός των εγκεφαλικών ημισφαιρίων αποτελεί μια εξελικτικά συντηρημένη δομή, η οποία είναι υπεύθυνη για όλες τις ανώτερες αισθητικές και κινητικές λειτουργίες των θηλαστικών. Αποτελεί την πιο πρόσφατη εξελικτικά περιοχή του κεντρικού νευρικού συστήματος και χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη δομική πολυπλοκότητα, αποτελούμενος από μεγάλη ποικιλία κυτταρικών πληθυσμών, οργανωμένων σε στιβάδες. Η οργάνωση και η ποικιλομορφία των κυττάρων του φλοιού, τα οποία διαφέρουν τόσο μορφολογικά όσο και σε λειτουργικό επίπεδο, ευθύνονται για τα μοναδικά χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης δομής.

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΦΛΟΙΟΥ

Οι νευρώνες και τα γλοιακά κύτταρα του φλοιού, προέρχονται από το νευροεπιθήλιο που περιβάλλει τις κοιλίες του τελεγκεφάλου, το οποίο ονομάζεται κοιλιακή ζώνη (Ventricular Zone, VZ) (Rakic, 1982). Κατά τα αρχικά στάδια της ανάπτυξης του εγκεφάλου, στην κοιλιακή ζώνη εντοπίζονται πρόδρομα κύτταρα, τα οποία μέσω συμμετρικής μιτωτικής διαίρεσης ανανεώνουν τον πληθυσμό των πρόδρομων κυττάρων.

Σταδιακά και μέχρι το τέλος της εμβρυογένεσης, τα πρόδρομα κύτταρα μειώνονται, καθώς η πλειοψηφία αυτών διαιρείται οριστικά, δημιουργώντας μόνο νευρικά κύτταρα (Caviness and Takahashi, 1995). Μόλις τα νευρικά κύτταρα εξέλθουν του κυτταρικού κύκλου, μεταναστεύουν από την κοιλιακή ζώνη προς την τελική θέση τους στον αναπτυσσόμενο φλοιό.

Κατά τις εμβρυικές ημέρες από E11.5 έως E18.5 παρατηρείται διαδοχική μετανάστευση νευρικών κυττάρων δημιουργώντας τις χαρακτηριστικές στοιβάδες στη δομή του φλοιού. (Hatten, 1999; Marin & Rubenstein 2003; Ayala et al, 2007; Molyneaux et al, 2007).



Πιο συγκεκριμένα οι στοιβάδες που προκύπτουν είναι οι εξής:

- Προφλοιϊκή Πλάκα (Preplate, PP)
- Επιχειλία Ζώνη (Marginal Zone, MZ)
- Υποφλοιϊκή Πλάκα (Subplate, SP)
- Φλοιϊκή Πλάκα (Cortical Plate, CP)
- Ενδιάμεση Ζώνη (Intermediate Zone, IZ)
- Υποκοιλιακή Ζώνη (Subventricular Zone, SVZ)

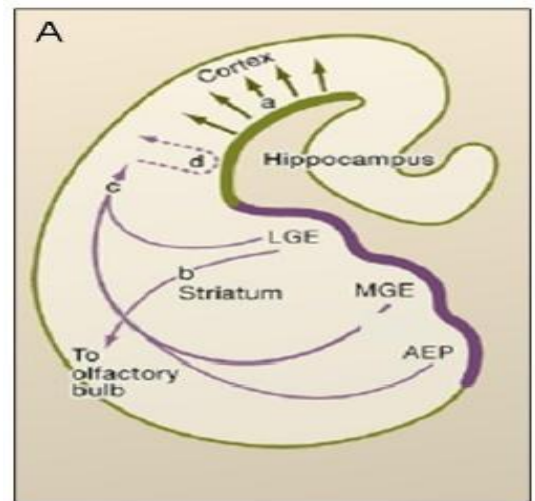
Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της ανάπτυξης του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Τα νευρικά κύτταρα εξέρχονται από την κοιλιακή ζώνη (VZ) και μεταναστεύουν προς το φλοιό, δημιουργώντας αρχικά την προφλοιϊκή πλάκα (PP), η οποία αργότερα χωρίζεται στην επιφανειακή επιχειλία ζώνη (MZ) και την εσωτερική υποφλοιϊκή πλάκα (SP). Η φλοιϊκή πλάκα (CP), η οποία θα δώσει τις στοιβάδες του φλοιού, σχηματίζεται ανάμεσα στις παραπάνω ζώνες. Διαδοχική μετανάστευση νευρώνων κατά την εμβρυογένεση, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία των στιβάδων του ώριμου φλοιού. (Molyneaux et al., 2007).

ΤΥΠΟΙ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΦΛΟΙΟΥ

Τα νευρικά κύτταρα μπορεί να μετακινούνται είτε κάθετα προς την εξωτερική επιφάνεια του φλοιού, είτε παράλληλα με αυτήν, ανάλογα με την περιοχή προέλευσής τους στον αναπτυσσόμενο Τελεγκέφαλο. Συχνά χρειάζεται να διανύσουν μεγάλες αποστάσεις από το σημείο γέννησής τους, μέχρι την τελική τους θέση.

Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα αυτά μεταναστεύουν ακολουθώντας δύο χαρακτηριστικούς τύπους μετακίνησης, κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος (Marin & Rubenstein, 2003; Ayala et al, 2007):

- **Ακτινωτή Κυτταρική Μετανάστευση**
Ακολουθείται από τα νευρικά κύτταρα που προέρχονται από την κοιλιακή ζώνη του ραχιαίου Τελεγκεφάλου.
- **Οριζόντια Κυτταρική Μετανάστευση**
Ακολουθείται από τα νευρικά κύτταρα που προέρχονται από την κοιλιακή ζώνη του βασικού Τελεγκεφάλου.
- Ωστόσο, τα νευρικά κύτταρα που δημιουργούνται κοιλιακά και μεταναστεύουν οριζόντια με τελικό προορισμό το φλοιό των ημισφαιρίων, μόλις εισέλθουν στο φλοιό, αλλάζουν την κατεύθυνση της κίνησής τους και μεταναστεύουν ακτινωτά, έτσι ώστε να εισέλθουν στη σωστή φλοιϊκή στιβάδα.



Εικόνα 2. Πρότυπα κυτταρικής μετανάστευσης στον αναπτυσσόμενο Τελεγκεφάλο. Τα νευρικά κύτταρα του ραχιαίου Τελεγκεφάλου μετακινούνται ακτινωτά προς το φλοιό (πράσινα βέλη, a), ενώ τα κύτταρα που γεννιούνται κοιλιακά, μετακινούνται με οριζόντια μετανάστευση προς τον τελικό προορισμό τους (μωβ βέλη, b, c). Τα κύτταρα που εισέρχονται στο φλοιό οριζόντια, συνεχίζουν με ακτινωτή μετακίνηση, προκειμένου να φθάσουν στη σωστή φλοιϊκή στιβάδα (μωβ στικτό βέλος, d) (Τροποποιημένη από Ayala et al, 2007; Kriegstein & Noctor, 2004).

ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟ ΦΛΟΙΟ ΤΩΝ ΗΜΙΣΦΑΙΡΙΩΝ

Τα νευρικά κύτταρα των στιβάδων, οργανώνονται σε νευρικά δίκτυα, η σωστή λειτουργία των οποίων είναι απαραίτητη για την κατανόηση και την ερμηνεία των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, καθώς και για και την απόκριση του οργανισμού σε αυτά.

Τα κύτταρα αυτά που απαρτίζουν το φλοιό των ημισφαιρίων, κατηγοριοποιούνται σε δύο βασικούς υποπληθυσμούς, τους πυραμιδικούς νευρώνες και τους μη-πυραμιδικούς ενδονευρώνες (Marin & Rubenstein, 2003).

-Οι **πυραμιδικοί νευρώνες** αποτελούν το 80% του συνολικού πληθυσμού νευρώνων και ακολουθούν ακτινωτή μεταναστευτική πορεία (Gorski et al, 2002). Η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση των πυραμιδικών νευρώνων είναι εκτενώς μελετημένη και η μετανάστευσή τους είναι καθοριστική για τη δημιουργία των στοιβάδων του φλοιού (Gurpta et al, 2002). Οι πυραμιδικοί νευρώνες δημιουργούν διεγερτικές συνάψεις χρησιμοποιώντας ως νευροδιαβιβαστή το γλουταμικό οξύ (glutamate).

-Οι **ενδονευρώνες** του φλοιού δημιουργούνται στο βασικό Τελεγκεφάλο και κατά την εμβρυογένεση μεταναστεύουν οριζόντια προς τον αναπτυσσόμενο φλοιό. Εκεί διαφοροποιούνται προς συγκεκριμένους υποπληθυσμούς και σχηματίζουν τοπικές ανασταλτικές συνάψεις, σημαντικές για τη σωστή λειτουργία των νευρικών δικτύων.

➤ Μέσω των ανασταλτικών συνάψεων που δημιουργούν με τους πυραμιδικούς νευρώνες, χρησιμοποιώντας ως νευροδιαβιβαστή το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA):

- εξισορροπούν την διέγερση του φλοιού
- ελέγχουν τη μετάδοση του σήματος και
- συντονίζουν την ηλεκτρική δραστηριότητα των κατά τόπους νευρικών δικτύων (Marin & Rubenstein, 2001; Molyneaux et al, 2007)

Οι νευρώνες αυτοί συνιστούν μια πολύ ετερογενή ομάδα, τόσο ως προς τη μορφολογία των κυττάρων και τις ηλεκτροφυσιολογικές τους ιδιότητες, όσο και ως προς το είδος του νευροπεπτιδίου και άλλων πρωτεϊνών που εκφράζουν (Sussel et al., 1999; Butt et al., 2008; Wonders et al., 2008), και είναι πολύ σημαντικοί σε λειτουργίες όπως η μνήμη και η μάθηση (Lee et al, 2008).

Οι ενδονευρώνες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν βάσει των ακόλουθων διακριτών χαρακτηριστικών τους:

- της έκφρασης των πρωτεϊνών για την δέσμευση ασβεστίου
- του νευροπεπτιδίου που εκφράζουν
- του σημείου προέλευσής τους στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο
- το χρόνο γέννησής τους

Είναι σημαντικό να αναφερθεί, ότι η σωστή τοποθέτηση των νευρώνων κατά τα στάδια της ανάπτυξης, η διαφοροποίηση και η ενσωμάτωσή τους στα κατάλληλα λειτουργικά νευρικά δίκτυα αποτελούν σημαντικές προϋποθέσεις για την ομαλή ανάπτυξη και την επίτευξη της σωστής λειτουργίας του οργανισμού.

Οποιαδήποτε ανωμαλία στις παραπάνω διεργασίες, συχνά αποτελεί τη βάση χρόνιων παθολογικών καταστάσεων, όπως η σχιζοφρένεια, η διανοητική καθυστέρηση οι επιληψίες και ο αυτισμός (Gressens, 2006; Suzuki, 2007) καθώς και σοβαρές εγκεφαλοπάθειες και σύνδρομα, (Suzuki, 2007). Επομένως, η κατανόηση των μηχανισμών που καθορίζουν την ανάπτυξη και τη σωστή λειτουργία των νευρικών τμημάτων του εγκεφάλου και πιο συγκεκριμένα του φλοιού, αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την κατανόηση της παθολογίας του εγκεφάλου και την αντιμετώπιση των παθήσεων.

ΟΡΙΖΟΝΤΙΑ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΩΝ ΠΡΟΣ ΤΟ ΦΛΟΙΟ

Μία θεμελιώδης απορία στο πεδίο των αναπτυξιακών νευροεπιστημών είναι πώς οι νευρώνες βρίσκουν την κατάλληλη θέση τους στο φλοιό. Από παλαιότερες μελέτες έχουμε αδιάσειστα στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η νευρωνική μετανάστευση επιτυγχάνεται μέσω ανακατανομής των κυτταροσκελετικών στοιχείων, ως απόκριση σε εξωκυττάρια σήματα, όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες, τα καθοδηγητικά σήματα και τα μόρια κυτταρικής συνάφειας, που διαμεσολαβούνται από πολυάριθμα ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια (Ayala et al, 2007).

ΜΟΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΥΝΑΦΕΙΑΣ (CAMs)

Κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, τα νευρικά κύτταρα χρειάζονται τη συνάφεια με το περιβάλλον τους προκειμένου να μετακινηθούν στη σωστή θέση τους, να εκτείνουν άξονες και να δημιουργήσουν συνάψεις.

Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας, εντοπίζονται στην επιφάνεια των νευρικών κυττάρων και στο μικροπεριβάλλον του νευράξονα και διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο σε πολλές διεργασίες, γεγονός που τα καθιστά πολύ σημαντικά για τη σωστή λειτουργία του νευρικού συστήματος (Katidou, Vidaki et al, 2008).

Πιο συγκεκριμένα, συμμετέχουν:

- I) στην κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση
- II) στην ανοσολογική απόκριση καθώς και
- III) στην μετάδοση σημάτων από το εξωτερικό του κυττάρου στο εσωτερικό του.

Τα μόρια αυτά κατηγοριοποιούνται σε κάποιες βασικές οικογένειες, βάσει της γενετικής συγγένειας και της δομικής και λειτουργικής ομοιότητάς τους. Οι σημαντικότερες από αυτές είναι: η οικογένεια των καντχερινών (Cadherins), οι ιντεγκρίνες (Integrins) και η οικογένεια των ανοσοσφαιρινών (Immunoglobulin Superfamily, IgSF).

IgCAMs

Η δομή των μορίων IgCAMs περιλαμβάνει περιοχές N-τερματικών Ig-like επαναλήψεων παρόμοιες με τις σταθερές επικράτειες των ανοσοσφαιρινών, συνήθως με την C2 περιοχή των Ig μορίων (Williams and Barclay), ακολουθούμενες σε κάποια μέλη από φμπρονεκτινικές τύπου III επικράτειες που εντοπίζονται πλησιέστερα στην πλασματική μεμβράνη (Williams et al., 1989).

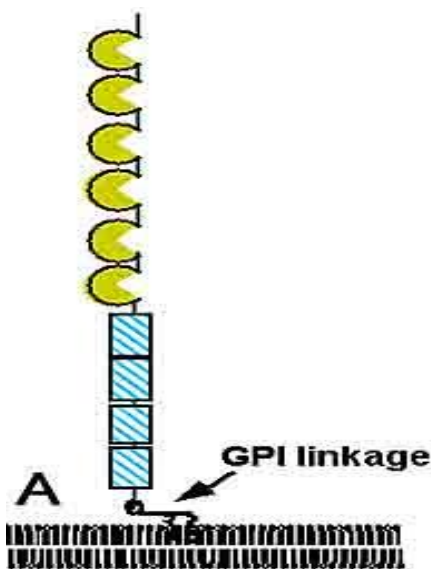
Οι Ig/FNIII-like πρωτεΐνες αποτελούν είτε διαμεμβρανικά CAMs και έχουν κυτταροπλασματικές περιοχές, είτε συνδέονται με τη μεμβράνη μέσω ουράς γλυκοσυλφωφατιδυλινοσιτόλης (GPI-linked). Επίσης, υπάρχουν και κάποια GPI-CAMs, τα οποία περιέχουν αποκλειστικά Ig επικράτειες (υποοικογένεια IgLON, Thy-1).

Οι IgSF πρωτεΐνες είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν με τον εαυτό τους (ομοφιλική δέσμευση) και με άλλα μόρια (ετεροφιλική δέσμευση), που είτε ανήκουν στην ίδια υπεροικογένεια, είτε όχι (Karagozeos 2003; Rougon και Hobert 2003).

Οι ρόλοι των IgCAMs έχουν διερευνηθεί κυρίως κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και πιο πρόσφατα στα πλαίσια του ενήλικου νευρικού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν την κυτταρική συνάφεια, την ανάπτυξη των νευριτών και τη μετανάστευση.

Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ TAG-1

Η πρωτεΐνη TAG-1 (Transient Axonal surface Glycoprotein 1 ή contactin2 ή axonin-1), είναι ένα νευρωνικό μόριο κυτταρικής συνάφειας, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών και συγκεκριμένα στην υπο-οικογένεια των contactins (Katidou, Vidaki et al, 2008; Shimoda & Watanabe, 2009).



Πρόκειται για μία GPI-συνδεδεμένη (GPI-linked) γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 135kDa. Αποτελείται από μια υδρόφοβη αλληλουχία στο αμινοτελικό άκρο της, 6 επαναλήψεις ομόλογες των C2 ανοσοσφαιρικών περιοχών, 4 επαναλήψεις με ομολογία στις φμπρονεκτινικές τύπου III περιοχές (Furley et al, 1990), και προσδέεται στην κυτταρική μεμβράνη μέσω της ουράς γλυκοσυλφωφατιδυλινοσιτόλης που περιέχει στο καρβοξυτελικό άκρο της. Η πρωτεΐνη TAG-1 εντοπίζεται επίσης και σε διαλυτή μορφή (Karagozeos et al., 1991). Εκφράζεται από διάφορους υποπληθυσμούς νευρώνων καθώς και από τα ολιγοδενδροκύτταρα του ΚΝΣ και τα κύτταρα Schwann του ΠΝΣ παροδικά, κατά τη διάρκεια που ο νευράξονας εκτείνεται από το κυτταρικό σώμα (Traka et al., 2002).

ΕΙΚΟΝΑ 3. 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 φμπρονεκτίνη (Karagozeos et al., 1991).

Η TAG-1, όπως και άλλα μόρια της Ig υπεροικογένειας, δεσμεύεται σε διάφορα άλλα μέλη της ίδιας οικογένειας και οι ετεροφιλικές αυτές αλληλεπιδράσεις μπορούν να διαδραματίζονται τόσο *in cis* (στην ίδια μεμβράνη) όσο και *in trans* (σε απέναντι μεμβράνες) (Brummendorf and Rathjen, 1996)

Παρόλο που τα GPI-CAM μόρια έχουν μελετηθεί κυρίως στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα, είναι προφανές τα τελευταία χρόνια ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στο ενήλικο νευρικό σύστημα. Χαμηλά επίπεδα TAG-1 mRNA παρατηρήθηκαν σε νευρώνες εγκεφάλων ενήλικων ποντικών και συγκεκριμένα στους προβλητικούς νευρώνες του σφρητικού λοβού, τους πυραμιδικούς νευρώνες του ιπποκάμπου και τα κοκκιώδη κύτταρα της παρεγκεφαλίδας (Karagozeos, 2003)

Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση της TAG-1 ανιχνεύθηκε:

1. στα γάγγλια της ραχιαίας ρίζας (Dorsal Root Ganglia, DRG) (Dodd et al, 1988, Karagogeos et al., 1991)
2. κατά τη διαφοροποίηση και δημιουργία νευραξόνων στους κινητικούς και συνδεσμικούς νευρώνες του νωτιαίου μυελού (Dodd et al, 1988).
3. στα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδή (Retinal Ganglion Cells, RGCs) (Chatzopoulou et al, 2008),
4. σε οριζόντια μεταναστεύοντες νευρώνες στην περιοχή του προμήκη μυελού, οι οποίοι σχηματίζουν τους πυρήνες του προπαραγκεφαλικού συστήματος (Kyriakopoulou et al, 2002; Denaxa, Kyriakopoulou et al, 2005) και
5. στους φλοιοθαλαμικούς άξονες, που εκτείνονται από πυραμιδικούς νευρώνες του φλοιού (Denaxa et al, 2001)
6. στο ενήλικο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, στις εγγύς των παρακομβικών περιοχών των εμμέλων ινών, όπου εκφράζεται από τα νευρικά κύτταρα και τα κύτταρα γλοίας (Traka et al., 2002, 2003).

Η έκφραση της TAG-1 σε πληθώρα αξονικών και κυτταρικών πληθυσμών κατά την εμβρυογένεση, αντικατοπτρίζει τον πολυσήμαντο ρόλο του μορίου στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος (Katidou, Vidaki et al, 2008; Shimoda & Watanabe, 2009).

Η TAG-1 μετέχει:

1. στην επέκταση και δεσμιδοποίηση των αξόνων (Buttiglione et al, 1998)
2. στην οριζόντια μετανάστευση των νευρώνων τόσο στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, όσο και στον προμήκη μυελό (Denaxa et al, 2001; Kyriakopoulou et al, 2002; Denaxa, Kyriakopoulou et al, 2005)
3. στη νευρογένεση στον εγκέφαλο, μέσω της επαγωγής του σηματοδοτικού μονοπατιού του APP (β-Amyloid Precursor Protein), υπογραμμίζοντας τον πιθανό ρόλο του μορίου στην πλαστικότητα και την παθολογία του ενήλικου εγκεφάλου (Ma et al, 2008; Mattson & van Praag, 2008)
4. και τέλος, στον ενήλικο οργανισμό, όπου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του μοριακού συμπλόκου της εγγύς παρακομβικής περιοχής των εμμέλων ινών, που είναι υπεύθυνο για τη συσσώρευση τασεοελεγχόμενων διαύλων καλίου, οι οποίοι συμμετέχουν στη σταδιακή επαναπόλωση των αξόνων (Traka et al, 2002; Traka et al, 2003)

Η αξονική γλυκοπρωτεΐνη TAG-1 έχει δειχτεί ότι παρουσιάζει τόσο χωρικούς όσο και χρονικούς περιορισμούς έκφρασης κατά τη διάρκεια της πρώιμης νευρικής ανάπτυξης (Yamamoto et al. 1986; Dodd et al 1988, Yamamoto et al.1990).

Αλλαγές στο περιβάλλον των νευρώνων του νωτιαίου μυελού δεν οδήγησαν σε μεταβολή της χρονικής περιόδου έκφρασης της TAG-1 υποδεικνύοντας ότι η ρύθμιση της πρωτεΐνης περιορίζεται κατά κύριο λόγο στο κύτταρο. Παρόλ' αυτά είναι πιθανόν η *in vivo* έκφραση της TAG-1 να ρυθμίζεται εν μέρει και από σήματα του περιβάλλοντος.

Τόσο η έκφραση της εκκρινόμενης μορφής της TAG-1, όσο και αυτής της επιφάνειας του κυττάρου, φαίνεται ότι ρυθμίζονται διαφορετικά από τους κεντρικούς και περιφερικούς νευρώνες (Karagogeos et al., 1991).

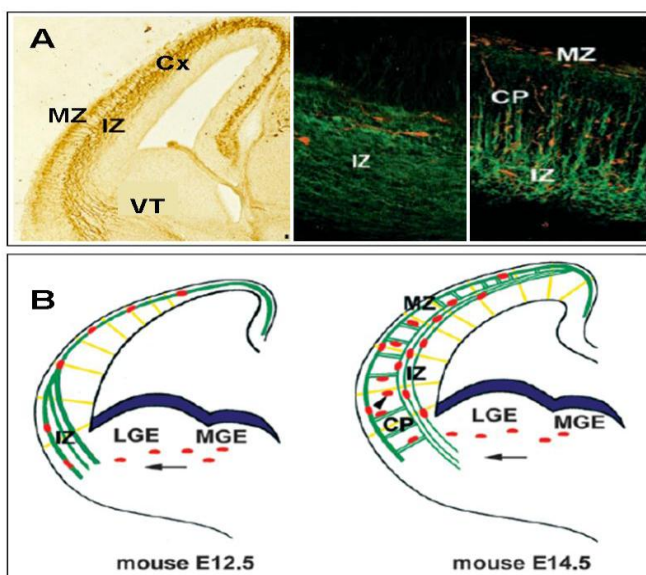
Η παροδική έκφραση της TAG-1 αποτελεί εντυπωσιακό παράδειγμα αναπτυξιακής ρύθμισης και περιορίζεται στην περίοδο επιμήκυνσης των αξόνων κατά την διάρκεια των δύο μεταγεννητικών εβδομάδων στο ποντίκι (Yamamoto et al. 1990; Bailly et al. 1996). Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι τα πρώιμα κύτταρα, αλλά όχι τα ώριμα, είναι ικανά να αισθανθούν τα τοπικά σήματα του μικροπεριβάλλοντος που καθορίζουν το σχηματισμό των στοιβάδων (Kriegstein and Noctor, 2004). Ως εκ τούτου, δεν αλλάζει μόνο η έκφραση των σημάτων, για παράδειγμα των μορίων κυτταρικής συνάφειας, που κατευθύνουν τους νευρώνες σε

συγκεκριμένες στοιβάδες, αλλά επίσης και η ικανότητα των νευρώνων να ανταποκρίνονται σε αυτά τα σήματα αλλάζει, καθώς η ανάπτυξη προχωρά.

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ TAG-1 ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΟΥ ΦΛΟΙΟΥ

Η TAG-1 εκφράζεται στη μεμβράνη των φλοιοθαλαμικών αξόνων (Denaxa et al, 2001), οι οποίοι κατά την ανάπτυξη εκτείνονται από πυραμιδικούς νευρώνες του φλοιού προς το θάλαμο και δομές του προμήκη και νωτιαίου μυελού. Στο ώριμο νευρικό σύστημα, οι άξονες αυτοί μεταφέρουν νευρικά σήματα από το φλοιό στις περιοχές αυτές, ρυθμίζοντας την απόκριση του οργανισμού σε ερεθίσματα του περιβάλλοντος (Worgotter et al, 2002; Chen et al, 2004; Molyneaux et al, 2007).

Κατά την ανάπτυξη, οι φλοιοθαλαμικοί άξονες φαίνεται ότι δημιουργούνται αρχικά ακτινωτά, από την επιχείλια προς την ενδιάμεση ζώνη του αναπτυσσόμενου φλοιού, και στη συνέχεια διατρέχουν το φλοιό κατά μήκος της ενδιάμεσης ζώνης (IZ) σε αναπτυξιακά στάδια που συμπίπτουν με τα στάδια της οριζόντιας μετανάστευσης των ενδονευρώνων (E12.5-14.5) (Molyneaux et al, 2007). Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι οι περιοχές εντοπισμού των φλοιοθαλαμικών αξόνων, ταυτίζονται με τα μονοπάτια που ακολουθούν οι ενδονευρώνες κατά την οριζόντια μετανάστευσή τους από το βασικό τελεγκέφαλο στο φλοιό (Corbin et al, 2001; Marin & Rubenstein 2001; Marin & Rubenstein, 2003) και πιθανολογούνταν πως οι ενδονευρώνες μετακινούνται πάνω στους εν λόγω άξονες, τόσο κατά την οριζόντια μετανάστευσή τους, όσο και όταν αλλάζουν κατεύθυνση και κινούνται ακτινωτά, προκειμένου να καταλάβουν τις τελικές θέσεις τους στο φλοιό (Denaxa et al, 2001).



ΕΙΚΟΝΑ 4. Η έκφραση της TAG-1 στον αναπτυσσόμενο φλοιό και ο πιθανός ρόλος της στην καθοδήγηση των ενδονευρώνων. (Α) Η έκφραση της TAG-1 στους φλοιοθαλαμικούς άξονες, που εντοπίζονται στην επιχείλια (MZ) και την ενδιάμεση ζώνη του φλοιού (IZ). Πάνω σε αυτούς του άξονες (με πράσινο στις δυο δεξιές φωτογραφίες) φαίνεται ότι μεταναστεύουν οι ενδονευρώνες που μετακινούνται οριζόντια από το βασικό τελεγκέφαλο (VT), προς το φλοιό (Cx), αλλά και κατά την ακτινωτή τους πορεία στις τελικές τους θέσεις στη φλοιϊκή πλάκα (CP) (κόκκινα κύτταρα στις δυο δεξιές φωτογραφίες). (Β) Προτεινόμενη πορεία μετανάστευσης των ενδονευρώνων (με κόκκινο), πάνω στους άξονες που εκφράζουν TAG-1 (με πράσινο) σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης του φλοιού (Denaxa et al, 2001).

ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΦΛΟΙΟΘΑΛΑΜΙΚΟΥΣ ΑΞΟΝΕΣ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΕΣ ΣΕ TAG-1 ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΙΚΑ ΕΜΒΡΥΑ

Προκειμένου να μελετηθεί η ανάπτυξη και η μορφολογία των φλοιοθαλαμικών αξόνων (TAG-1⁺ άξονες) και να διευκρινιστεί η εμπλοκή τους στη μεταναστευτική πορεία των ενδονευρώνων, χρησιμοποιήθηκαν εγκέφαλοι από έμβρυα ποντικού ελλειμματικά για την πρωτεΐνη TAG-1 (TAG-1^{-/-} ζώα). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αποτελεί βασικό μοριακό δείκτη των αξόνων αυτών, καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Στη συνέχεια, οι άξονες των TAG-1^{-/-} εμβρύων συγκρίθηκαν με τους άξονες εμβρύων TAG-1^{+/+}.

Από την παραπάνω πειραματική μελέτη προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

1. Η αναστολή της δράσης της TAG-1 στο φλοιό *in vitro*, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των νευρώνων που μεταναστεύουν οριζόντια προς το φλοιό, γεγονός που υποστηρίζει τον προτεινόμενο ρόλο της πρωτεΐνης ως υπόστρωμα για τη συγκεκριμένη μετανάστευση (Denaxa et al, 2001).
2. Ωστόσο, *in vivo*, σε TAG-1^{-/-} μύες δεν παρατηρείται αντίστοιχος φαινότυπος (Denaxa, Kyriakopoulou et al, 2005). Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην ύπαρξη άλλων μορίων κυτταρικής συνάφειας στην περιοχή, που αναπληρώνουν τη λειτουργία της TAG-1 όταν αυτή απουσιάζει *in vivo* (Denaxa, Kyriakopoulou et al, 2005; Shimoda & Watanabe, 2009).
3. Η αναστολή της δράσης της TAG-1 στο φλοιό φαίνεται ότι μειώνει αισθητά τους GABAεργικούς ενδονευρώνες. Παρόλα αυτά η μετανάστευση των GABAεργικών ενδονευρώνων είναι φυσιολογική στα TAG-1^{-/-} ποντίκια. Αυτό υποδεικνύει ότι η TAG-1 μπορεί να δρα ως μεταναστευτικό σήμα, αλλά δεν είναι απαραίτητη για τη μετανάστευση των ενδονευρώνων στο φλοιό, όπου άλλα μόρια πιθανόν αντισταθμίζουν την απώλειά της. (Shimoda & Watanabe, 2009)
4. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η αναστολή της λειτουργίας της TAG-1 σε νευρωνικούς πληθυσμούς του οπίσθιου προμήκη μυελού (caudal medulla), μεταβάλλει την επιφανειακή μετανάστευση. Παρόλο που τέτοια μετανάστευση παρατηρείται σε TAG-1^{-/-} ποντίκια, σημαντική ποσότητα των κυττάρων που ακολουθούν τη συγκεκριμένη πορεία πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της μετανάστευσης μειώνοντας το μέγεθος των πυρήνων στους οποίους κατευθύνονται (lateral reticular nuclei). Ως εκ τούτου η λειτουργία της TAG-1 είναι απαραίτητη για την επιβίωση των νευρώνων σε κάποιους προπαρεγκεφαλιδικούς πυρήνες. (Shimoda & Watanabe, 2009)
- Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι η TAG-1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για τη φυσιολογική μορφογένεση του εγκεφάλου.
5. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στους άξονες των TAG-1^{-/-} εμβρύων σε σύγκριση με τους άξονες εμβρύων TAG-1^{+/-} *in vivo*, καθώς στα TAG-1-ελλειμματικά ζώα, η μορφολογία και η έκταση των αξόνων ήταν φυσιολογικές. (Βιδάκη 2010).
6. Για να διαπιστωθεί αν η TAG-1 αποτελεί υπόστρωμα που όχι μόνο επιτρέπει αλλά και διευκολύνει την κυτταρική μετανάστευση, αναπτύχθηκε *in vitro* σύστημα μελέτης της μετανάστευσης των ενδονευρώνων πάνω σε διακριτά υποστρώματα. Η μεταναστευτική συμπεριφορά των ενδονευρώνων στις συγκεκριμένες καλλιέργειες μελετήθηκε ως προς τον αριθμό των νευρώνων που έχουν προσκολληθεί σε κάθε υπόστρωμα, το μήκος της καθοδηγητικής απόφυσης και τον αριθμό των πρωτοταγών διακλαδώσεων που εκτείνονται από κάθε νευρώνα πάνω στα διαφορετικά υποστρώματα. Από την ανάλυση αυτή, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων (Βιδάκη 2010).
7. Επιπλέον, φαίνεται ότι κατά την ανάπτυξη, η TAG-1 δεν εμπλέκεται στην οριζόντια μετανάστευση των ενδονευρώνων από το βασικό τελεγκέφαλο προς το φλοιό. Η απουσία του μορίου *in vivo*, δεν επηρέασε την οριζόντια μετανάστευση και την ανάπτυξη του φλοιού (Denaxa, Kyriakopoulou et al, 2005).
8. Εντούτοις, το γεγονός ότι η απενεργοποίηση της πρωτεΐνης *in vitro*, παρεμποδίζει τη φυσιολογική μετανάστευση των κυττάρων (Denaxa et al, 2001), υπογραμμίζει τη διαφορά μεταξύ των δυο συστημάτων και υποδηλώνει την πιθανή αναπλήρωση του ρόλου της TAG-1 από άλλα μόρια κυτταρικής συνάφειας, που δρουν στον αναπτυσσόμενο φλοιό *in vivo*, και ανήκουν στην ίδια οικογένεια, όπως η L1 που βρίσκεται στους θαλαμοφλοιϊκούς άξονες (Fukuda et al, 1997), ή η πρωτεΐνη neurofilament που εκφράζεται σε όλους τους αξονικούς πληθυσμούς του φλοιού (Denaxa et al, 2001).

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΜΥΩΝ ΩΣ ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΦΛΟΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Από τα παραπάνω αποτελέσματα δεν προκύπτουν σημαντικές πληροφορίες για το ρόλο της TAG-1 στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων και των φλοιοθαλαμικών αξόνων του φλοιού των ημισφαιρίων. Φαίνεται ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεν έχει κάποια σημαντική λειτουργία στις εν λόγω διεργασίες, ή ο ρόλος της αναπληρώνεται από άλλα μόρια της ίδιας οικογένειας.

Ωστόσο, προκύπτουν ενδιαφέροντα ερωτήματα ως προς το ρόλο των φλοιοθαλαμικών αξόνων στην οριζόντια μετανάστευση των ενδονευρώνων και στην ανάπτυξη του φλοιού γενικότερα.

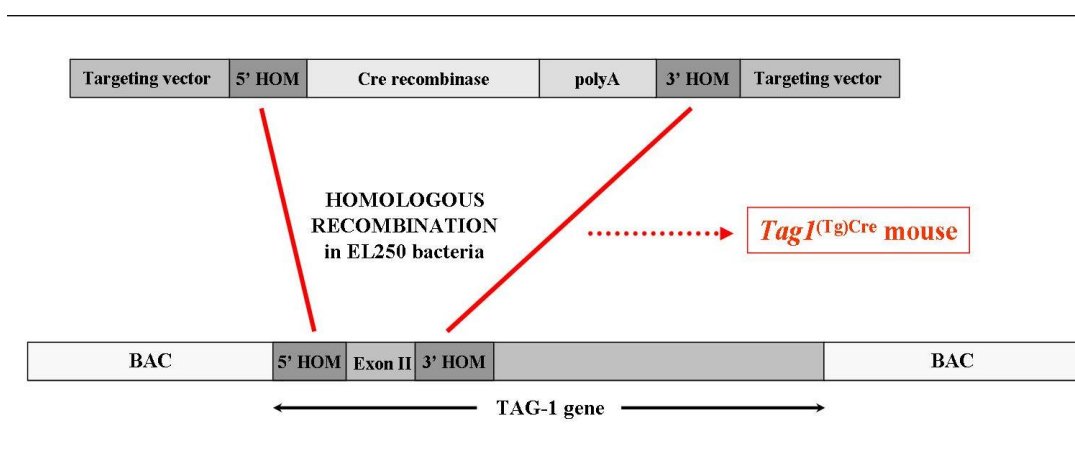
Με στόχο τη μελέτη του συγκεκριμένου πληθυσμού αξόνων και χρησιμοποιώντας την TAG-1 για την καθοδηγούμενη έκφραση διαγονιδίων στους άξονες αυτούς, δημιουργήθηκε μια σειρά γενετικά τροποποιημένων μυών, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά ως εργαλείο για περαιτέρω μελέτες πάνω στην ανάπτυξη του φλοιού των ημισφαιρίων.

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΥΩΝ TAG-1^{TgCre} (ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, ΜΑΡΙΝΑ ΒΙΔΑΚΗ 2010)

Οι διαγονιδιακοί μύες TAG-1^{TgCre}, δημιουργήθηκαν προκειμένου να εκφράζουν την Cre-ρεκομπινάση, υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της TAG-1.

Η δημιουργία τους στηρίχθηκε στην τεχνολογία κατασκευής διαγονιδιακών ζώων με χρήση τεχνητών βακτηριακών χρωμοσωμάτων (Bacterial Artificial Chromosomes, BACs) (Fogarty et al, 2005; Kessarlis et al, 2006).

Από βιβλιοθήκη BAC, επελέγησαν κλώνοι BAC ώστε να περιέχουν το τμήμα του χρωμοσώματος που φέρει ολόκληρο το γονίδιο της TAG-1 και όλες τις γενωμικές αλληλουχίες εκατέρωθέν του. Παράλληλα, δημιουργήθηκε διαγονιδιακή πλασμιδιακή κατασκευή που έφερε το γονίδιο της Cre-recombinase και εκατέρωθεν αυτού, αλληλουχίες ομόλογες με αλληλουχίες ανοδικά και καθοδικά του 2^{ου} εξονίου της TAG-1, στο οποίο εντοπίζεται το σημείο έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου. Τόσο ο κλώνος BAC, όσο και η πλασμιδιακή κατασκευή, εισήχθησαν σε κατάλληλα βακτηριακά στελέχη και ακολούθησε επαγωγή ομόλογου ανασυνδυασμού και αντικατάσταση του 2^{ου} εξονίου του γονιδίου της TAG-1 στον κλώνο, με το γονίδιο της Cre-recombinase.



Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση του κλώνου BAC και της διαγονιδιακής κατασκευής για τους TAG-1^{TgCre} μύες. Μέσα σε κατάλληλα βακτηριακά κύτταρα (EL250) πραγματοποιήθηκε ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ των περιοχών ομολογίας της πλασμιδιακής κατασκευής και του γονιδίου μέσα στον κλώνο BAC (5' HOM, 3' HOM). Έτσι, το 2^ο εξόνιο του γονιδίου της TAG-1 αντικαταστάθηκε από το γονίδιο της Cre-recombinase. Το ανασυνδυασμένο γονίδιο απομονώθηκε από τον κλώνο BAC και εισήχθη σε γονιμοποιημένα ωάρια μυών και προέκυψαν γενετικά ανασυνδυασμένα ζώα, στα οποία η παρουσία του διαγονιδίου εντοπίστηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

ΣΚΟΠΟΣ

Στόχος μας ήταν η μελέτη του προτύπου έκφρασης του διαγονιδίου TAG-1^{TgCre} in vivo, στους διαγονιδιακούς μύες TAG-1^{TgCre}. Οι γενετικά τροποποιημένοι μύες, μελετήθηκαν ως προς την in vivo έκφραση του διαγονιδίου TAG-1^{TgCre}, έτσι ώστε να διαπιστωθεί αν αυτή συμφωνεί με το πρότυπο έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου της TAG-1.

Προκειμένου να είναι δυνατή η ανίχνευση του διαγονιδίου, οι TAG-1^{TgCre} μύες διασταυρώθηκαν με μια άλλη σειρά διαγονιδιακών μυών, την Rosa26 YFP^{st/st}, προκειμένου να προκύψουν ζώα με γονότυπο TAG-1^{TgCre};Rosa26 YFP^{st/st}.

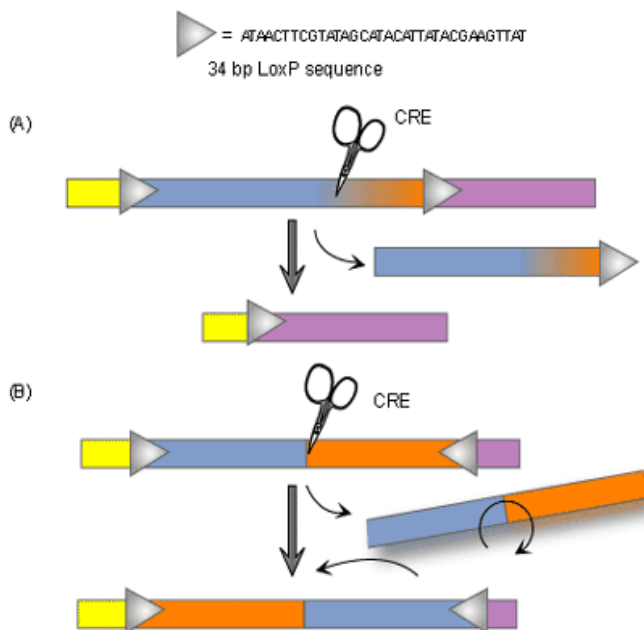
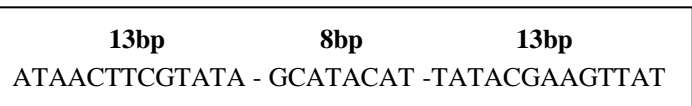
Στους διαγονιδιακούς μύες Rosa26 YFP^{st/st} έχει εισαχθεί διαγονίδιο που οδηγεί στην έκφραση της πρωτεΐνης YFP, ανοδικά του οποίου βρίσκεται μία αλληλουχία λήξης της μεταγραφής (transcription stop sites), εκατέρωθεν της οποίας εντοπίζονται loxP αλληλουχίες. Υπό την έκφραση της Cre recombinase, η αλληλουχία λήξης της μεταγραφής αφαιρείται και η πρωτεΐνη YFP εκφράζεται. Οι παραπάνω αλληλουχίες έχουν εισαχθεί στο γενετικό τόπο (locus) Rosa26 (Srinivas et al., 2001), ο οποίος είχε χαρακτηριστεί αρχικά ως ένας gene-trapped τόπος στο χρωμόσωμα 6, από τον οποίο η β-geo (marker) φαινόταν να εκφράζεται παντού σε όλο το σώμα του ποντικού. (Zambrowicz, 1997)

➤ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΤΙΣ ΟΠΟΙΕΣ ΒΑΣΙΣΤΗΚΕ Η ΜΕΛΕΤΗ ΜΑΣ

ΤΕΧΝΙΚΗ ΧΡΗΣΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ (BACTERIAL ARTIFICIAL CHROMOSOMES, BACS) ΜΕ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ Cre/Lox ΜΕΘΟΔΩΝ

Τα βακτηριακά τεχνητά χρωμοσώματα (BACs) αποτελούν κατάλληλους φορείς για πολλά πειράματα εξαιτίας της ικανότητάς τους να πολλαπλασιάζουν ενθέσεις DNA μεγάλου μεγέθους. Το μέγεθος και η ποικιλομορφία της αλληλουχίας αυτών των κατασκευών όμως, δεν επιτρέπει τη χρήση συμβατικών τεχνικών μοριακής βιολογίας ως εργαλεία για τον χειρισμό τους.

Γι' αυτό το λόγο τεχνικές όπως ο ανασυνδυασμός και οι Cre / Lox μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την χειραγώγηση BAC κατασκευών.



Οι τεχνικές Cre / Lox αποτελούν εργαλεία ζωτικής σημασίας για τη χρήση τους στον ομόλογο ανασυνδυασμό, εξαιτίας της απλής και στοχευμένης συμπεριφοράς τους. Η Cre recombinase είναι μία τοποϊσομεράση τύπου I που δεσμεύει μια περιοχή στόχο 34-bp, η οποία ορίζεται ως η Lox περιοχή ("Lox" site). Η Lox περιοχή αποτελείται από δύο ανεστραμμένες επαναλήψεις 13-bp που διαχωρίζονται από ένα ενδιάμεσο τμήμα 8-bp. Αφού η Cre δεσμευτεί ως ένα διμερές στην Lox-περιοχή στόχο ανταλλαγή κλώνων μπορεί να προκύψει με κάποια άλλη δεσμευμένη με Cre Lox-περιοχή. Το προϊόν της αντίδρασης καθορίζεται από τον προσανατολισμό του ενδιάμεσου τμήματος εντός των Lox περιοχών.

Ο ανασυνδυασμός με διαμεσολάβηση της Cre δεν απαιτεί ενέργεια, εκτός από τη θερμοκρασία που απαιτείται για ενζυμική δραστηριότητα και δεν προϋποθέτει την ύπαρξη άλλων συμπαραγόντων εκτός από ιόντα μαγνησίου.

Εικόνα 2: Το Cre-LoxP σύστημα. Η loxP περιοχή μπορεί να εισαχθεί εκατέρωθεν ενός τμήματος DNA. (A) Εάν η Cre recombinase εκφράζεται στο κύτταρο, οι loxP περιοχές θα κοπούν και θα ενωθούν μεταξύ τους, αφαιρώντας το κομμάτι του DNA μεταξύ των δύο περιοχών. (B) Εφόσον οι loxP περιοχές έχουν συγκεκριμένη κατεύθυνση μπορούν, επίσης, να χρησιμοποιηθούν για την αναστροφή τμημάτων DNA που συμπεριλαμβάνονται μεταξύ αυτών. Εδώ δύο loxP περιοχές έχουν εισαχθεί εκατέρωθεν ενός τμήματος DNA με αντίθετες κατευθύνσεις. Με την έκφραση της Cre, κόβονται οι περιοχές loxP και το κομμάτι του DNA αναστρέφεται και επανατοποθετείται.

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ GFP (Green fluorescence protein) ΣΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Η GFP ή αλλιώς πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, είναι μια πρωτεΐνη μεγέθους 27 kDa που προέρχεται από το jellyfish *Aequorea Victoria*, το οποίο απελευθερώνει πράσινο χρώμα όταν ακτινοβοληθεί με μπλε φως. Το πλεονέκτημα της πρωτεΐνης αυτής είναι ότι μπορεί να γίνει ορατή σε ζωντανά κύτταρα. Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σαν ιχνηθέτης για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, επιτρέποντας την οπτικοποίηση και τον εντοπισμό των σημασμένων με GFP πρωτεϊνών εντός των ζωντανών κυττάρων, χωρίς την ανάγκη χρήσης χημικής σήμανσης. Η ακολουθία GFP μπορεί να συνδεθεί εύκολα με την ακολουθία αμινοξέων διαφόρων πρωτεϊνών που αποτελούν αντικείμενο μελέτης. Όταν αυτές οι πρωτεΐνες εκφράζονται στα κύτταρα και τις πτυχές πρωτεϊνών, συνδέονται με ένα μόριο GFP και μπορούν εύκολα να ανιχνευθούν.

Η ΚΙΤΡΙΝΗ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗ EYFP (ENHANCED YELLOW FLUORESCENT PROTEIN) ΩΣ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ Cre recombinase

Η EYFP (κίτρινη φθορίζουσα πρωτεΐνη) συνιστά παραλλαγή της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) και έχει χρησιμοποιηθεί σε παλαιότερες μελέτες ως μοριακός δείκτης έκφρασης για τον έλεγχο της δράσης της Cre recombinase. Η πρωτεΐνη αυτή είναι αυτοφθορίζουσα (όπως και η GFP) και μπορεί να οπτικοποιηθεί σε ζωντανά κύτταρα, με αποτέλεσμα να αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την παρακολούθηση της έκφρασης γονιδίων σε ολόκληρα έμβρυα, ζώα ή καλλιιεργούμενα κύτταρα και όργανα.

Οι Srinivas et. al (2001) δημιούργησαν μια σειρά διαγονιδικών μυών, την R26R-YFP, στην οποία εισήχθη YFP cDNA στον ROSA26 γονιδιακό τόπο, ενώ προηγείται μία αλληλουχία λήξης με loxP περιοχές εκατέρωθεν.

Πιο συγκεκριμένα η σειρά αυτή μπορεί να εκμεταλλευτεί τις ιδιότητες της Cre-lox τεχνολογίας παρέχοντάς μας την δυνατότητα να παρακολουθήσουμε την ενεργότητα της Cre recombinase.

Όταν η σειρά R26R-YFP διασταυρωθεί με κάποια άλλη σειρά διαγονιδιακών μυών που εκφράζει την Cre recombinase υπό τον έλεγχο του υποκινητή ενός συγκεκριμένου γονιδίου, τότε τα κύτταρα που εκφράζουν την Cre-recombinase θα σημειωθούν με την YFP και θα είναι εύκολα ανιχνεύσιμα.

➤ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ ΚΑΙ ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΙΣ

Τα πειραματόζωα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της πειραματικής διαδικασίας ήταν :

- Μύες με γονότυπους:

- TAG-1^{TgCre} +/+
- Rosa26 YFP^{+/st}

Οι μύες αυτοί χρησιμοποιήθηκαν σε διασταυρώσεις προκειμένου να μας δώσουν απογόνους με γονότυπο: TAG-1^{TgCre};Rosa26 YFP^{st/st}.

➤ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ

1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΙΣΤΟΥΣ (DNA EXTRACTION ΑΠΟ ΟΥΡΑ ΠΟΝΤΙΚΟΥ)

Για την απομόνωση του γενωμικού DNA χρησιμοποιήθηκε τμήμα της ουράς των μυών σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία:

- Tail Digestion Buffer: 100mM NaCl
10mM Tris HCl (pH: 8)
25mM EDTA (pH: 8)
0.5% SDS
 - Tail snip in 400μl buffer
+15-20μl 10g/μl Prot K
+55° C O/N (oven)
- Τοποθέτηση του τμήματος της ουράς σε 400 μl διαλύματος λύσης (tail digestion buffer). Προσθέτουμε επίσης 10 μl πρωτεϊνάσης K (proteinase K) (20 mg/ml)
 - Επώαση στους 55 °C overnight
 - Προσθήκη RNAse (10 mg/μl) και επώαση στους 37 °C για 10'
 - Προσθήκη 400 μl φαινόλης και ήπια ανάδευση για 15' σε θερμοκρασία δωματίου
 - Προσθήκη 300 μl χλωροφόρμιου και ήπια ανάδευση για 15' σε θερμοκρασία δωματίου για την ανάμιξη των 2 φάσεων
 - Φυγοκέντρηση για 10' στις 13000rpm και απομόνωση του υπερκείμενου σε νέα eppendorf
 - Προσθήκη 400 μl χλωροφόρμιου και ήπια ανάδευση για 15' σε θερμοκρασία δωματίου για την ανάμιξη των 2 φάσεων
 - Φυγοκέντρηση για 10' στις 13000rpm και απομόνωση του υπερκείμενου σε νέα eppendorf
 - Προσθήκη V/2 οξικού αμμωνίου και 2V 100% αιθανόλης και ήπια ανάδευση
 - Επαναδιάλυση της πελλέτας σε 150 μl H₂O

2. ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΥΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR GENOTYPING)

Για τη γονοτύπηση των γενετικά τροποποιημένων μυών πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τα εξής χαρακτηριστικά:

-Προκειμένου να ελέγξουμε τον γονότυπο για το διαγονίδιο TAG-1^{TgCre} χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές και η αντίστοιχη αντίδραση πολυμεράσης:

ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

• TAG-Cre forward :	5'-TGAGTGCTTTAGCTCTACAGC-3'
• TAG-Cre reverse :	5'-GACACAGCATTGGAGTCAGA-3'

TAG-1/Cre PCR

0,8 µl genomic DNA
2 µl 10x Taq buffer Minotech
2 µl dNTPs 2mM
1 µl primer Forw (TAG-Cre For) (50ng/µl)
1 µl primer Rev (TAG-Cre Rev) (50ng/µl)
0,6 µl Taq polymerase Minotech (2u/µl)
12,5 µl H₂O

20 µl

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ: #67

94 ⁰ C	3'	} 32x
94 ⁰ C	30''	
59 ⁰ C	30''	
72 ⁰ C	1'	
72 ⁰ C	5'	
		4 ⁰ C

-Προκειμένου να ελέγξουμε τον γονότυπο για το διαγονίδιο TAG-1^{TgCre} χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές και η αντίστοιχη αντίδραση πολυμεράσης:

ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

• Rosa26-Lc	5' - GCTCTGAGTTGTTATCAGTAAGG-3'
• Rosa26-R2	5' - GCGAAGAGTTTGTCTCAACC-3'
• Rosa26-R3	5' - GGAGCGGGAGAAATGGATATG-3'

YFP-Lucy PCR

1 µl genomic DNA	1 µl genomic DNA
2,5 µl dNTPs, 2mM	2,5 µl dNTPs, 2mM
2,5 µl 10x Taq buffer Minotech	2,5 µl 10x Taq buffer Minotech
1 µl primer YFP-LC (25ng/µl)	1 µl primer YFP-LC (50ng/µl)
1 µl primer YFP-R2 (25ng/µl)	1 µl primer YFP-R3 (50ng/µl)
0,5 µl Taq Pol. Minot. (2u/µl)	0,5 µl Taq Pol. Minot. (2u/µl)
16,5 µl H ₂ O	16,5 µl H ₂ O
25 µl	25 µl

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ: YFP-Lucy

95 ⁰ C	2'	} 36x
96 ⁰ C	30''	
55 ⁰ C	30''	
72 ⁰ C	45''	
72 ⁰ C	10'	
		4 ⁰ C

3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΙΣΗ ΣΕ GEL ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Το πήκτωμα αγαρόζης παρασκευάζεται σε τελικό όγκο 120ml 1x TAE με προσθήκη 1.2g αγαρόζης (αναλογία αγαρόζης προς TAE 1%). Τοποθετούμε την κωνική φυάλη στα μικροκύματα για 4-5 min, συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 120ml και προσθέτουμε 2-2,5µl βρωμιούχου αιθιδίου. Ανακινούμε καλά και μεταφέρουμε το μείγμα σε ειδικό δοχείο (tray). Τέλος, φυλάμε το πήκτωμα αγαρόζης στους 4⁰ C μέχρι να πήξει. Φορτώνουμε τα δείγματά μας στη συσκευή ηλεκτροφόρισης με χρήση 6x loading buffer, που έχει σύσταση: 0.25% orange G, 0,25% xylene cyanol FF, 30% w/v glycerol σε H₂O

4. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΣΤΩΝ ΓΙΑ ΚΡΥΟΤΟΜΕΣ (CRYOSECTION)

- Απομόνωση εγκεφάλων μέσα σε 1x PBS και μονιμοποίηση σε 4% PFA για 12-18h στους 4°C
- Αλλαγή ιστών από 4% PFA σε 1x PBS. Κάνουμε δύο πλύσεις με PBS
- Αφαιρούμε το PBS από τους ιστούς και βάζουμε 30% sucrose σε 1x PBS και 0,1% NaN₃
- Ο ιστός παραμένει στο διάλυμα αυτό στους 4°C μέχρι να καταβυθιστεί (overnight)
- Έγκλιση του ιστού σε πήκτωμα 15% σουκρόζης και 7.5% ζελατίνης σε 1x PBS
- Πάγωμα του ιστού σε ισοπεντάνιο στους -45°C (με χρήση ξηρού πάγου) και φύλαξη στους -80°C, έως ότου κοπεί σε κρυοτόμο σε τομές πάχους 16 μm. Οι τομές συλλέγονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και διατηρούνται στους -20°C

5. ΔΙΠΛΗ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ (IMMUNOHISTOCHEMISTRY)

Με τη μέθοδο της διπλής ανοσοϊστοχημείας μελετήθηκε το πρότυπο έκφρασης του διαγονιδίου *Tag-1^{TgCre}* σε έμβρυα αναπτυξιακών σταδίων E12.5, E13.5 και E14.5.

ΗΜΕΡΑ 1^η:

- Αφήνουμε τα πλακάκια να ξεπαγώσουν
- Βάζουμε το στυλό DAKOPEN (υδροφόβο υλικό) γύρω απ' τις τομές
- Αφήνουμε 5' να στεγνώσει
- Βάζουμε τα πλακάκια για 10' σε PBS με Triton (PBT)
- Τα σκουπίζουμε από κάτω και τα τοποθετούμε σε γυάλινο δοχείο με θέσεις
- Παίρνουμε μια μαύρη θήκη με θέσεις, βάζουμε βρεγμένο χαρτί στον πάτο και τοποθετούμε τα πλακάκια από πάνω. Προσθέτουμε διάλυμα Blocking (πιάνει παντού μη ειδικά) 400-600 μ, 1% FCS σε PBT και τα αφήνουμε για 1' στον πάγο
- Όταν βάζουμε Blocking ή αντίσωμα φυλάμε τα πλακάκια στο σκοτάδι
- Αφαιρούμε το Blocking (πλαγιάζοντας τα πλακάκια) και βάζουμε το 1^ο αντίσωμα (δ/μα σε 0,1 FCS+PBT) και το τοποθετούμε πάνω στα πλακάκια
- Βάζουμε σε μια θήκη πάγο και εκεί μέσα βάζουμε το Antibody solution και τα αντισώματα
- Βάζουμε σ' ένα tube ~ 800μl απ το antibody solution {υπολογίζουμε ~120 μl σε κάθε πλακάκι} και προσθέτουμε 0,8 μl απ' το κάθε αντίσωμα ,ανάλογα με το αντίσωμα, (1/1000) και spin μετά από κάθε αντίσωμα (spin καλό στη φυγόκεντρο)
- Φυλάμε αμέσως τα αντισώματα
- Στραγγίζουμε τα πλακάκια πάνω στο χαρτί ώστε να μην έχουν blocking και προσθέτουμε 120μl του αντισώματος στο κάθε πλακάκι
- Τα αφήνουμε στο σκοτάδι O/N στους 4° C (coldroom)

ΗΜΕΡΑ 2^η:

- Παίρνουμε τη θήκη απ το coldroom (4°C)
- Στραγγίζουμε το αντίσωμα (όπως κάναμε με το Blocking) γυρνώντας το κάθε πλακάκι κάθετα πάνω στο χαρτί του πάτου
- Βάζουμε τα πλακάκια σε PBT (γυάλινες ή πλαστικές θήκες) για 3 πλύσεις των 10 min η καθεμιά

- Τοποθετούμε σε 0,1% FCS in PBT το 2^ο αντίσωμα (αφού κάνουμε vortex πρώτα).
- Φτιάχνουμε το διάλυμα με τον ίδιο τρόπο, όπως και για το 1^ο αντίσωμα
- Παίρνουμε πάλι σε πάγο τα 2 αντισώματα
- Επώαση για 1 ½ h με το αντίσωμα
- Στη συνέχεια κάνουμε 3 πλύσεις των 10 min σε PBT (διατηρούμε πάλι τα πλακάκια στο σκοτάδι όταν έχουμε φθορίζοντα Ab)
- Προσθέτουμε 60-80 μl μονοί και τοποθετούμε την καλυπτρίδα
- Σκουπίζουμε με χαρτί από πάνω προσέχοντας να μην μετακινηθεί η καλυπτρίδα

- Ms IgM 4D7, goat-a-mouse IgM 555(1/800) → κόκκινο
- Rab-a-GFP (1/500, αναγνωρίζει και τη YFP), Anti-rabbit 488 → πράσινο

6. Οι ανοσοϊστοχημίες που πραγματοποιήθηκαν παρατηρήθηκαν και φωτογραφήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Προκειμένου να ελεγχθεί το πρότυπο έκφρασης του διαγονιδίου TAG-1^{TgCre} in vivo και να επαληθευθεί ο συνεντοπισμός της έκφρασής του με το πρότυπο έκφρασης της ενδογενούς TAG-1 ακολουθήθηκε η παρακάτω πειραματική διαδικασία:

Για να γίνει δυνατή η ανίχνευση του διαγονιδίου, τα ζώα TAG-1^{TgCre} διασταυρώθηκαν με ζώα Rosa26-YFP^{st/st}. Η δεύτερη διαγονιδιακή σειρά μών έφερε διαγονίδιο που περιείχε τόπους loxP εκατέρωθεν αλληλουχιών, που εμποδίζουν τη μεταγραφή του γονιδίου της κίτρινης φθορίζουσας πρωτεΐνης YFP (transcription stop sites). Το διαγονίδιο αυτό βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου ROSA26. Στα ζώα αυτά η δράση της CRE recombinase, από το διαγονίδιο TAG-1^{TgCre}, οδηγεί σε έκφραση της πρωτεΐνης YFP, καθιστώντας δυνατό τον εντοπισμό του TAG-1^{TgCre} διαγονιδίου.

Τη διασταύρωση αυτή διαδέχτηκαν και άλλες διασταυρώσεις προκειμένου να αποκτήσουμε ζώα που φέρουν το διαγονίδιο έκφρασης της YFP, τόσο σε ετεροζυγωτία, όσο και σε ομοζυγωτία.

Για τη μελέτη του προτύπου έκφρασης της YFP και κατά συνέπεια του TAG-1^{TgCre} διαγονιδιακού τύπου χρησιμοποιήθηκαν έμβρυα αναπτυξιακών σταδίων E12.5-E14.5, κατά τα οποία η φυσιολογική έκφραση της TAG1 εντοπίζεται σε υψηλά επίπεδα, αντικατοπτρίζοντας την υψηλή ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου, την περίοδο αυτή.

➤ Ως ημέρα E0.5 θεωρήθηκε εκείνη κατά την οποία παρατηρήθηκε ότι ο θηλυκός μυς ήταν plugged.

Με τον τρόπο αυτό ελέγχσαμε αν το πρότυπο έκφρασης της YFP συνεντοπίζεται με το αντίστοιχο της ενδογενούς TAG-1.

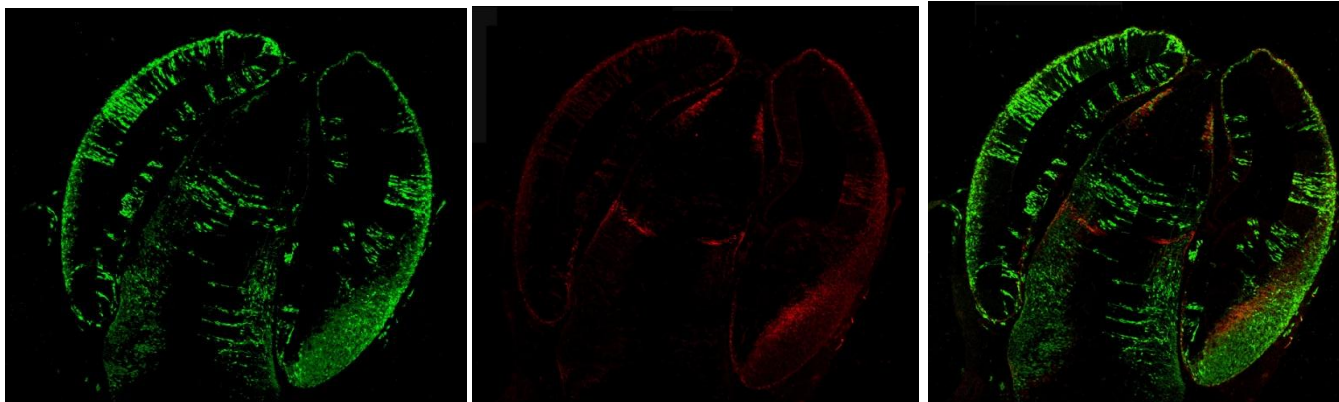
Προκειμένου να διαπιστωθεί ο γονότυπος των εμβρύων που προέκυψαν και να μελετηθεί το πρότυπο έκφρασης των διαγονιδίων ακολουθήθηκαν οι παρακάτω πειραματικές μέθοδοι:

1. Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρά ποντικού
2. Γονοτύπιση με τη μέθοδο της PCR
3. Ηλεκτροφόριση σε gel αγαρόζης και οπτικοποίηση των ζωνών με UV φθορισμό
4. Ανατομία σε έμβρυα μών με τη βοήθεια στεροσκοπείου, προκειμένου να αποκαλυφθεί ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός
5. Προετοιμασία εγκεφάλου για κρυστομές
6. Διπλή ανοσοϊστοχημεία
7. Παρατήρηση τομών εγκεφάλου στο συνεστιακό μικροσκόπιο

➤ Οι παραπάνω πειραματικές διαδικασίες περιγράφονται αναλυτικά στο παράρτημα *ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ*.

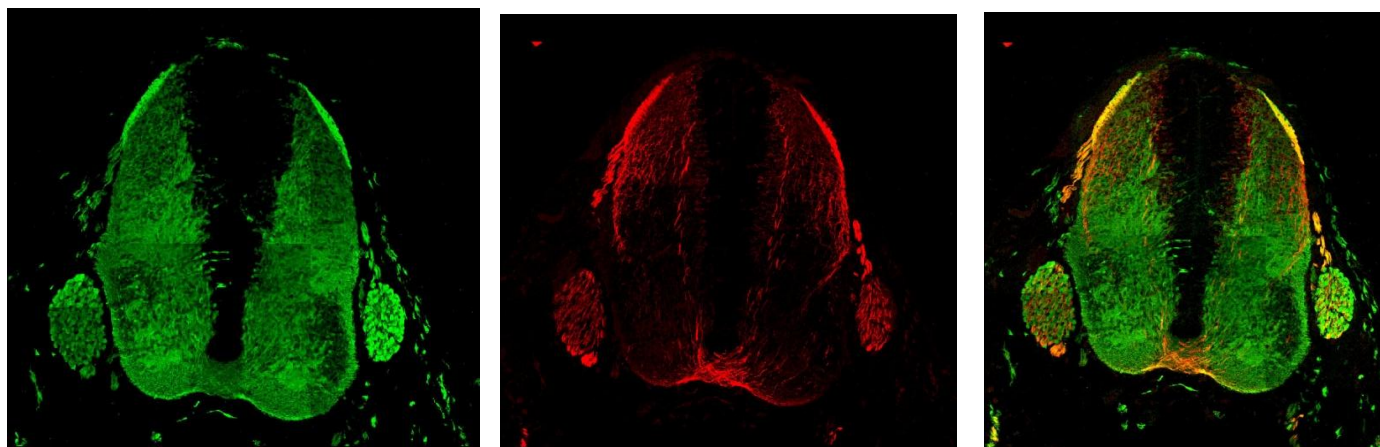
ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΗΤΑΝ ΤΑ ΕΞΗΣ:

Ανοσοϊστοχημική ανάλυση για τα E12.5 TAG-1^{TgCre};Rosa26 YFP^{+ /st} ζώα:



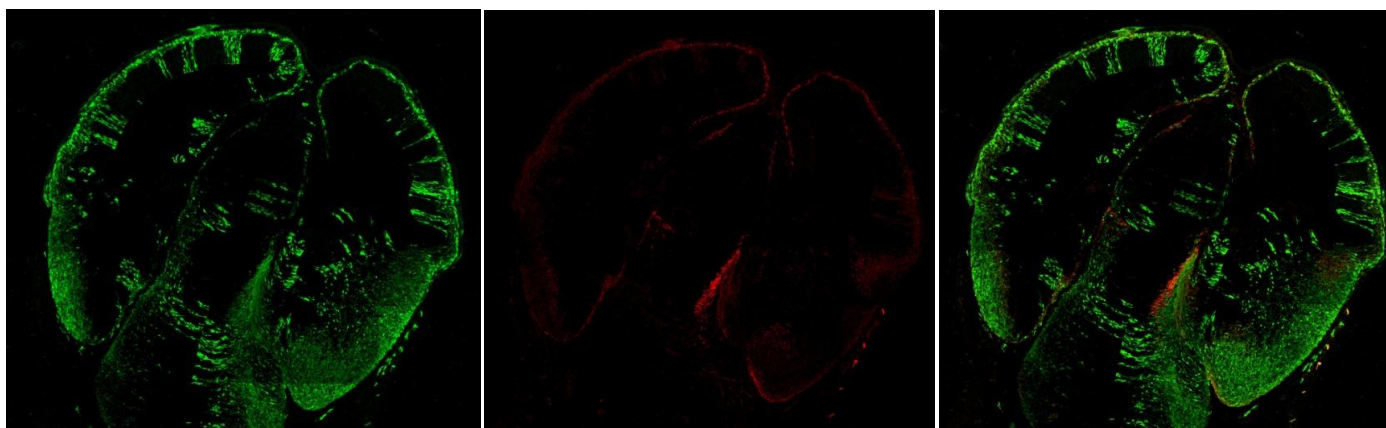
Φλοιός Εγκεφαλικών Ημισφαιρίων (cortex)

Αριστερά: έκφραση της YFP, Κέντρο: έκφραση της ενδογενούς TAG-1, Δεξιά: Συνεντοπισμός τους



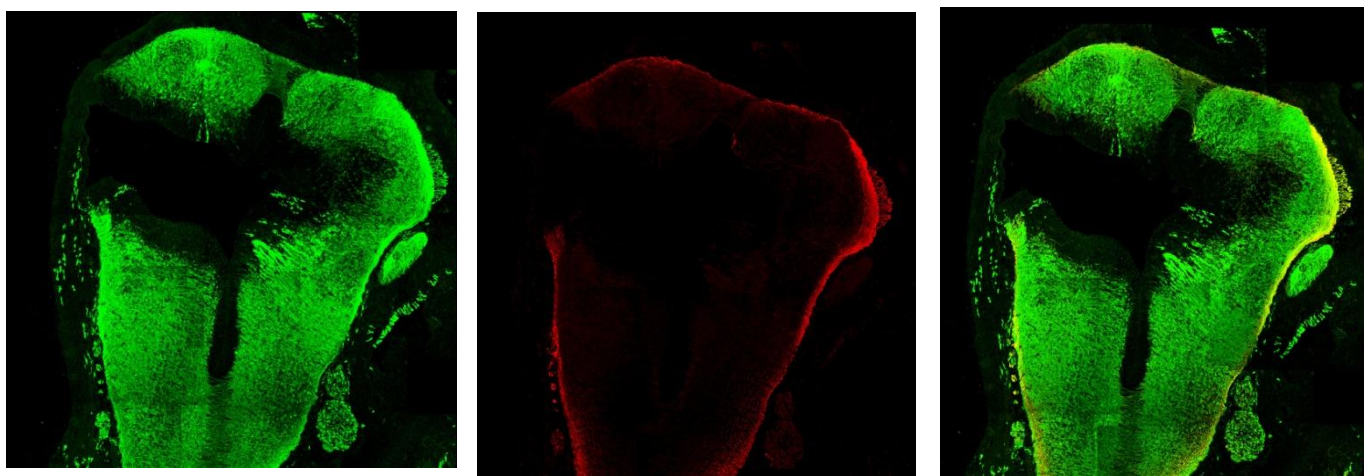
Νωτιαίος Μυελός (spinal cord)

Αριστερά: Έκφραση της YFP, Κέντρο: Έκφραση της ενδογενούς TAG-1, Δεξιά: Συνεντοπισμός τους



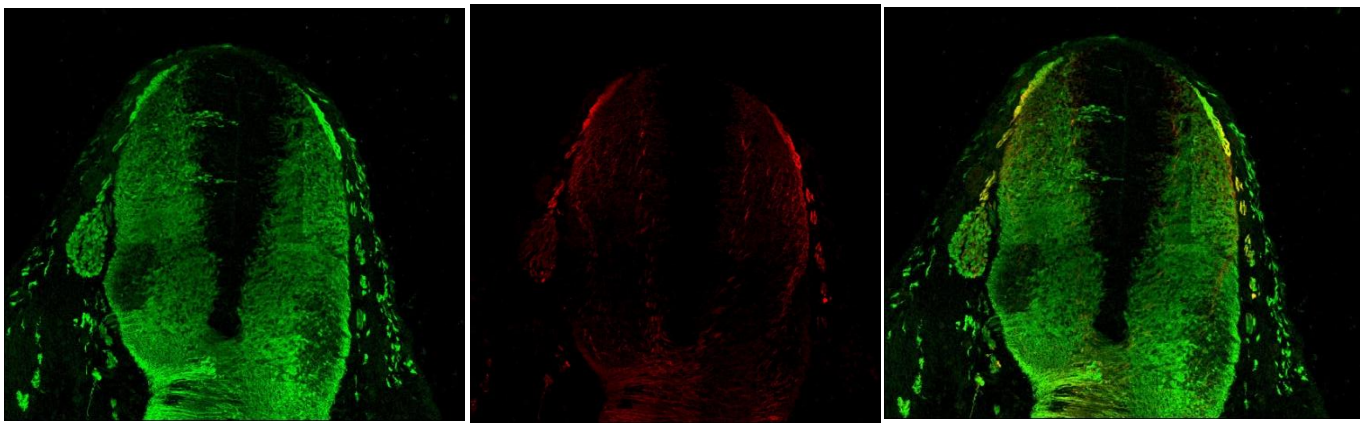
Φλοιός Εγκεφαλικών Ημισφαιρίων (cortex)

Αριστερά: Έκφραση της YFP, Κέντρο: Έκφραση της ενδογενούς TAG-1, Δεξιά: Συνεντοπισμός τους



Φλοιός Εγκεφαλικών Ημισφαιρίων (cortex)

Αριστερά: Έκφραση της YFP, Κέντρο: Έκφραση της ενδογενούς TAG-1, Δεξιά: Συνεντοπισμός τους

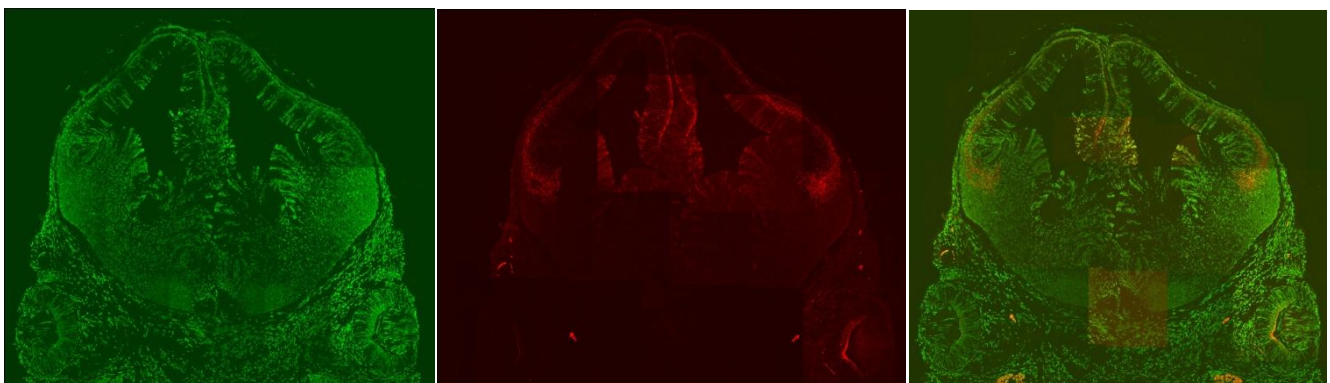


Νωτιαίος Μυελός (spinal cord)

Αριστερά: Έκφραση της YFP, Κέντρο: Έκφραση της ενδογενούς TAG-1, Δεξιά: Συνεντοπισμός τους

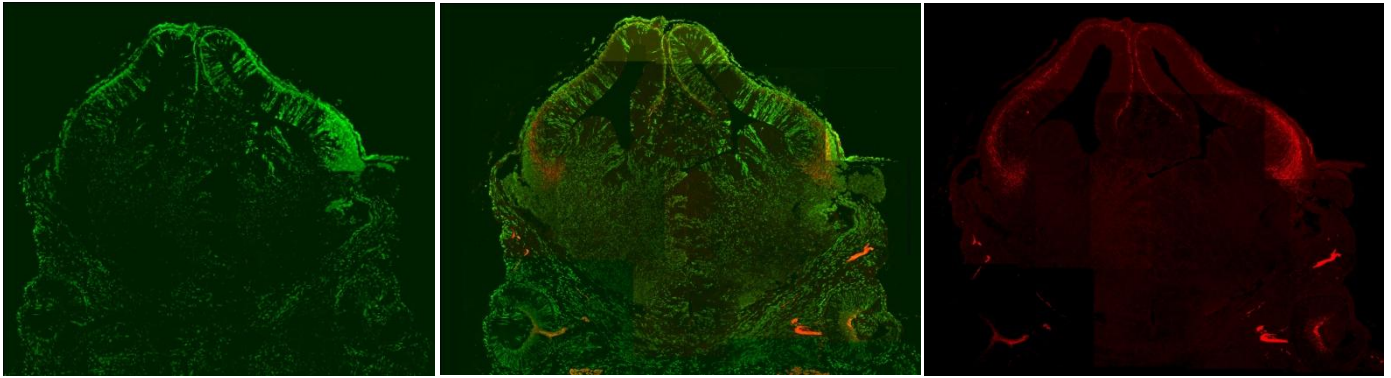
- Τα αποτελέσματα των πειραμάτων σε E12.5 διαγονιδιακά ζώα υποδεικνύουν πως δεν έχουμε το αναμενόμενο πρότυπο έκφρασης. Για το διαγονίδιο YFP (και κατά συνέπεια του Cre) παρατηρήθηκε διάχυτη έκφραση και πολύ υψηλό background. Η διάχυτη έκφραση του διαγονιδίου δε συμφωνεί με το πρότυπο έκφρασης της ενδογενούς πρωτεΐνης TAG1 με το οποίο θα έπρεπε να εμφάνιζε συνεντοπισμό (Βιδάκη 2010).

Ανοσοϊστοχημική ανάλυση για τα E13.5 TAG-1^{TgCre}; Rosa26 YFP^{+/-st} ζώα



Φλοιός Εγκεφαλικών Ημισφαιρίων (cortex)

Αριστερά: Έκφραση της YFP, Κέντρο: Έκφραση της ενδογενούς TAG-1, Δεξιά: Συνεντοπισμός τους

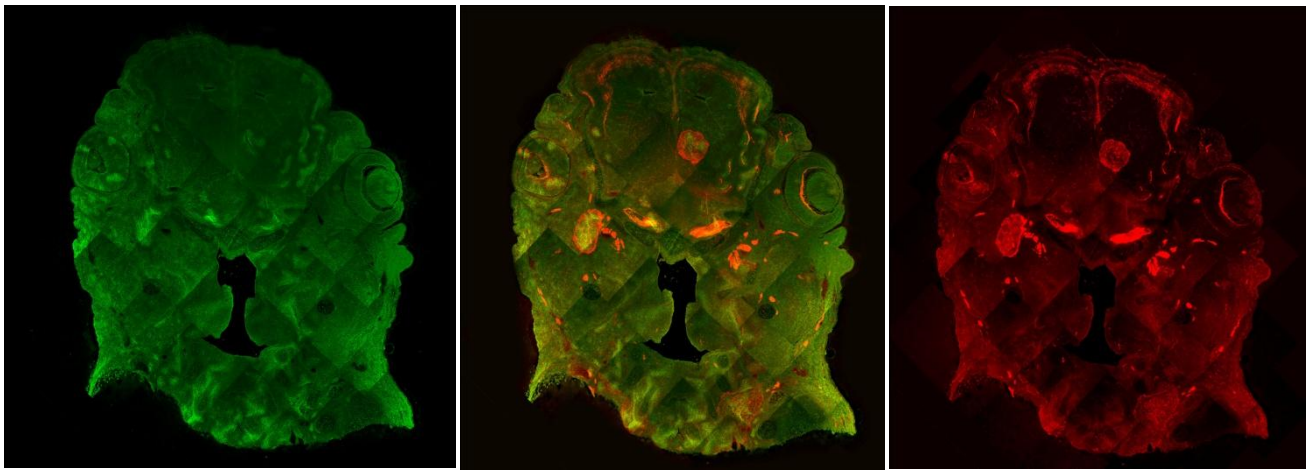


Φλοιός Εγκεφαλικών Ημισφαιρίων (cortex)

Αριστερά: Έκφραση της YFP, Κέντρο: Έκφραση της ενδογενούς TAG-1, Δεξιά: Συνεντοπισμός τους

- Τα αποτελέσματα των πειραμάτων σε E13.5 διαγονιδιακά ζώα υποδεικνύουν πως ούτε σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο δεν έχουμε το αναμενόμενο πρότυπο έκφρασης. Για το διαγονίδιο YFP παρατηρήθηκε και εδώ διάχυτη έκφραση και υψηλό background.

Ανοσοϊστοχημική ανάλυση για τα E14.5 TAG-1^{TgCre}; Rosa26 YFP^{+/-st} ζώα

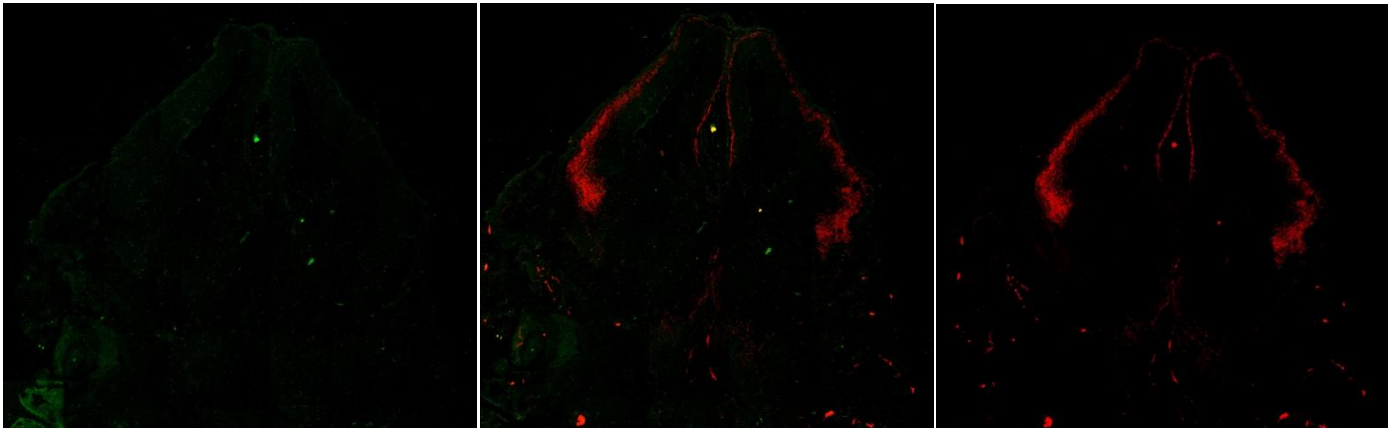


Φλοιός Εγκεφαλικών Ημισφαιρίων (cortex)

Αριστερά: Έκφραση της YFP, Κέντρο: Έκφραση της ενδογενούς TAG-1, Δεξιά: Συνεντοπισμός τους

- Τα αποτελέσματα των πειραμάτων σε E14.5 διαγονιδιακά ζώα είναι ίδια με αυτά των αναπτυξιακών σταδίων E12.5 και E13.5. Είναι φανερό, λοιπόν, πως στη διαγονιδιακή σειρά μυών που χρησιμοποιούμε δεν παρατηρούμε το αναμενόμενο πρότυπο έκφρασης των διαγονιδίων.

Ανοσοϊστοχημική ανάλυση σε TAG-1^{TgCre} ζώα, στα οποία δεν υπάρχει το διαγονίδιο Rosa26 (R26R-YFP⁻). Το πείραμα αυτό λειτούργησε σαν αρνητικό αποτέλεσμα ελέγχου (control)

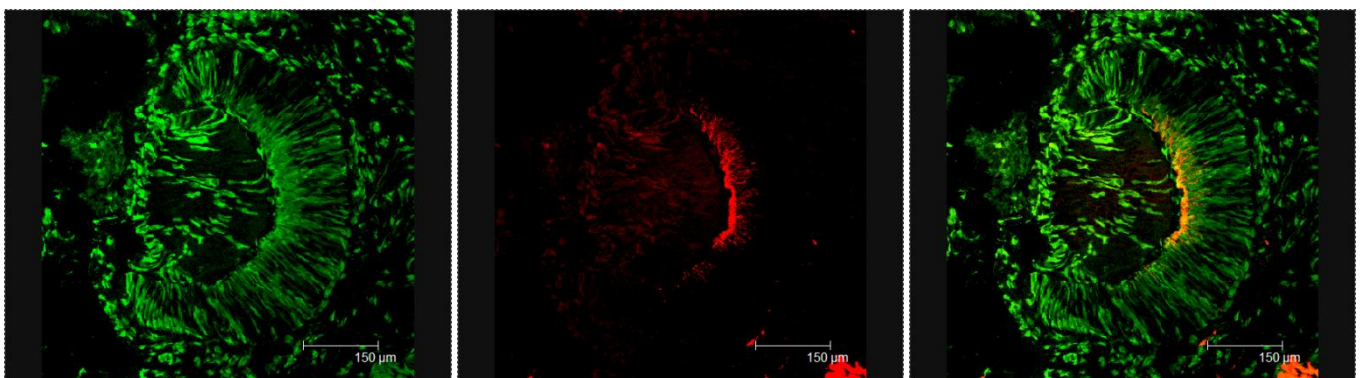


Φλοιός Εγκεφαλικών Ημισφαιρίων (cortex)

Αριστερά: Έκφραση της YFP, Κέντρο: Έκφραση της ενδογενούς TAG-1, Δεξιά: Συνεντοπισμός τους

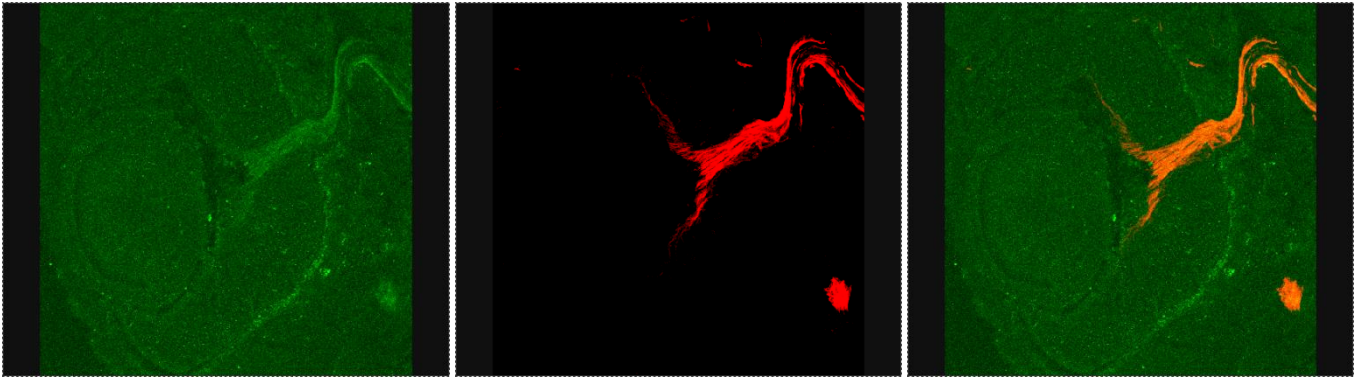
- Το TAG-1^{TgCre}; R26R-YFP- ζώο χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να ελέγξουμε ότι η διάχυτη έκφραση που παρατηρούσαμε στους μύες ήταν πραγματική και δεν οφειλόταν σε κάποιο τεχνικό λάθος της πειραματικής διαδικασίας. Από τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνεται η πιστότητα των πειραμάτων μας.

Ανοσοϊστοχημική ανάλυση σε αμφιβληστροειδή (retina) και γάνγγλια των ραχιαίων ριζών (DRGs) αναπτυξιακού σταδίου E13.5 μύων TAG-1^{TgCre};Rosa26 YFP^{+/-st} και TAG-1^{TgCre};Rosa26 YFP⁻(control):



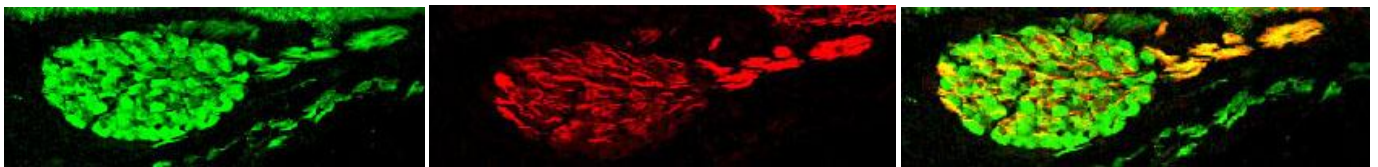
Αμφιβληστροειδής (retina) από TAG-1^{TgCre};Rosa26 YFP^{+/-st} μύες

Αριστερά: Έκφραση της YFP, Κέντρο: Έκφραση της ενδογενούς TAG-1, Δεξιά: Συνεντοπισμός τους



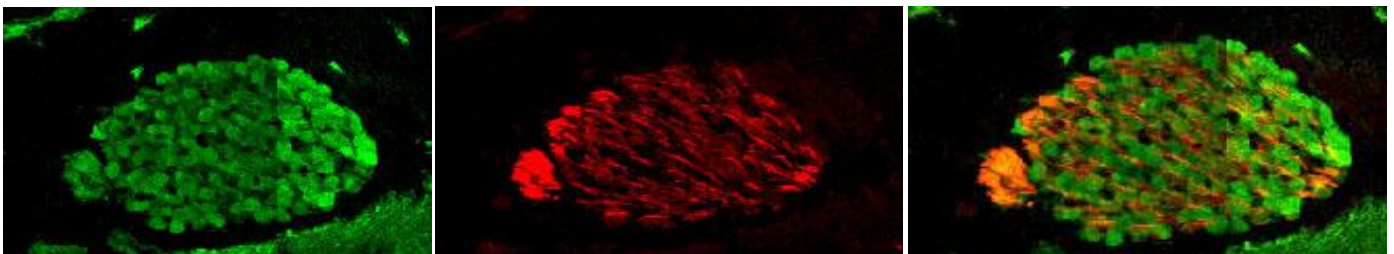
Αμφιβληστροειδής (retina) από TAG-1^{TgCre};Rosa26 YFP⁻ μύες

Αριστερά: Έκφραση της YFP, Κέντρο: Έκφραση της ενδογενούς TAG-1, Δεξιά: Συνεντοπισμός τους



Γάγγλια των ραχιαίων ριζών (DRGs)

Αριστερά: Έκφραση της YFP, Κέντρο: Έκφραση της ενδογενούς TAG-1, Δεξιά: Συνεντοπισμός τους

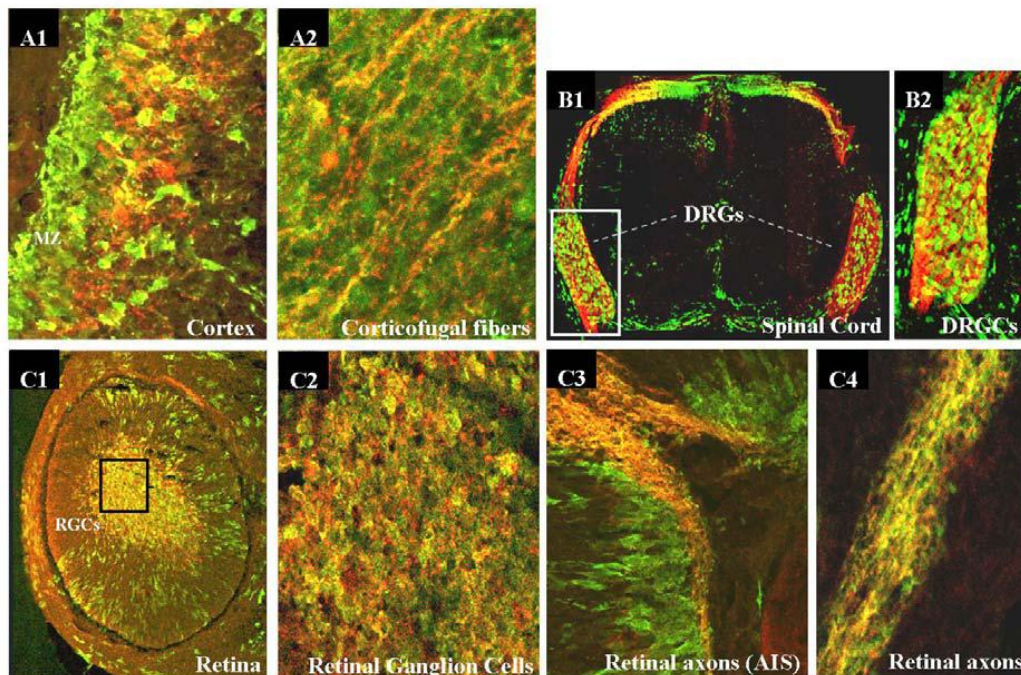


Γάγγλια των ραχιαίων ριζών (DRGs)

Αριστερά: Έκφραση της YFP, Κέντρο: Έκφραση της ενδογενούς TAG-1, Δεξιά: Συνεντοπισμός τους

- Στα πλαίσια της πειραματικής μας μελέτης πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία και στις περιοχές του αμφιβληστροειδή και των γάγγλιων των ραχιαίων ριζών στο αναπτυξιακό στάδιο E13.5. Η έκφραση της YFP φαίνεται διάχυτη και σε αυτές τις περιοχές όπως και στο φλοιό και το νωτιαίο μυελό.
- ❖ Οι παραπάνω διαδικασίες επαναλήφθησαν προκειμένου να διαπιστωθεί ότι δεν υπήρχε πιθανό τεχνικό λάθος κατά την πρώτη δοκιμή.

- ❖ Τα παραπάνω αποτελέσματα δεν συμφωνούν με παλαιότερη μελέτη στα συγκεκριμένα ζώα (Βιδάκη 2010). Πιο συγκεκριμένα αναμενόταν η έκφραση της YFP (και κατά συνέπεια της Cre recombinase) να ακολουθεί το πρότυπο έκφρασης της ενδογενούς TAG-1.



Εικόνα 5. Πρότυπο έκφρασης της Cre-ρεκομπινάσης, υπό τον έλεγχο του υποκινητή της TAG-1, στα διαγονιδιακά TAG-1Tg(Gre) ζώα. Ανοσοϊστοχημεία σε οβελιαίες τομές εμβρύων E13.5. Η έκφραση της YFP φαίνεται με πράσινο, η έκφραση της TAG-1 εντοπίζεται με κόκκινο και ο συνεντοπισμός τους, φαίνεται με κίτρινο χρώμα. Φαίνεται ότι το πρότυπο έκφρασης της YFP ακολουθεί το αντίστοιχο της ενδογενούς TAG-1. Cortex: φλοιός, Corticofugal fibers: φλοιοθαλαμικοί άξονες, Spinal cord: νωτιαίος μυελός, DRGs: γάγγλια των ραχιαίων ριζών, DRGCs: κύτταρα των DRGs, Retina: αμφιβληστροειδής, RGCs: γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, Retinal axons: άξονες των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς (AIS, axon initial segment: αρχικό τμήμα των αξόνων, κοντά στα κυτταρικά σώματα).

Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου (Βιδάκη 2010) είχε παρατηρηθεί συνεντοπισμός του διαγονιδίου αυτού με την ενδογενή TAG-1 στον φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων και συγκεκριμένα στους φλοιοθαλαμικούς άξονες, στο νωτιαίο μυελό και στα γάγγλια των ραχιαίων ριζών (DRGs), καθώς και στα κύτταρα των DRGs, στον αμφιβληστροειδή και συγκεκριμένα στα γαγγλιακά κύτταρα (RGCs) και τους άξονες των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήσαμε παρατηρήθηκε σε έμβρυα αναπτυξιακών σταδίων E12.5, E13.5 και E14.5 ότι το πρότυπο έκφρασης του διαγονιδίου Rosa26-YFP και κατά συνέπεια και του διαγονιδίου TAG-1^{TgCre} δεν ακολουθούν το πρότυπο έκφρασης της ενδογενούς πρωτεΐνης TAG-1, όπως αναμενόταν .

- Η YFP παρουσιάζει διάχυτη και μη ειδική έκφραση σε όλα τα εμβρυϊκά αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν.
- ❖ Μια πρώτη ερμηνεία του προβλήματος αυτού ήταν πως μπορεί η μη ειδική έκφραση να οφειλόταν σε απενεργοποίηση του κωδικονίου λήξης του διαγονιδίου ROSA26-YFP στα ομώνυμα ζώα. Η σειρά αυτή ζώων περιλαμβάνει μια αλληλουχία λήξης στο γενετικό τόπο ROSA26 που εμποδίζει την έκφραση της YFP που έχει εντεθεί εκεί. Η απενεργοποίηση του κωδικονίου αυτού λήξης θα είχε ως αποτέλεσμα τη συνεχή έκφραση της YFP και θα δικαιολογούσε τη διάχυτη-μη ειδική έκφρασή της.

Αυτό αντιμετωπίστηκε με αντικατάσταση του διαγονιδίου Rosa26-YFP με αντίστοιχο διαγονίδιο άλλης σειράς διαγονιδιακών μυών, στην οποία γνωρίζαμε ότι η YFP εμφάνιζε ειδική έκφραση. Πιο συγκεκριμένα προχωρήσαμε σε διασταυρώσεις μεταξύ των διαγονιδιακών μυών TAG-1^{TgCre} και Rosa26-YFP^{+/-st} προκειμένου να αντικαταστήσουμε το παλιό διαγονίδιο Rosa26-YFP με νέο που ακολουθούσε ειδικό πρότυπο έκφρασης.

Τα διαγονιδιακά έμβρυα που προέκυψαν από τις παραπάνω διασταυρώσεις υποβλήθηκαν επίσης στην πειραματική διαδικασία που αναφέρεται στο παράρτημα ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.

- Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτή τη σειρά διαγονιδιακών ζώων εμφάνιζαν ακριβώς το ίδιο πρότυπο έκφρασης της YFP (διάχυτη-μη ειδική έκφραση) με την προηγούμενη σειρά ζώων που μελετήθηκε. Αυτό υποδεικνύει πως η υπόθεση ότι το διαγονίδιο Rosa26-YFP ήταν ελαττωματικό είναι λανθασμένη.
- ❖ Μια εναλλακτική υπόθεση που θα μπορούσε να δικαιολογήσει το μη ειδικό πρότυπο έκφρασης της YFP είναι η περίπτωση το διαγονίδιο TAG-1^{TgCre} να έχει εντεθεί τυχαία σε μία περιοχή του γονιδιώματος που είναι συνεχώς μεταγραφικά ενεργή οδηγώντας σε διάχυτη έκφραση της Cre recombinase και κατά συνέπεια της YFP.

Αυτό αναμένεται να μελετηθεί σε περαιτέρω πειραματικές μελέτες του εργαστηρίου.

Είναι σημαντικό να επιτευχθεί η επιδιόρθωση της συγκεκριμένης διαγονιδιακής σειράς ζώων TAG-1^{TgCre}, διότι αποτελεί σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη πολλαπλών αναπτυξιακών διεργασιών στο νευρικό σύστημα.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Είναι γνωστό ότι κατά την ανάπτυξη του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, η TAG-1 εκφράζεται στη μεμβράνη των φλοιοθαλαμικών αξόνων, οι οποίοι συνδέουν το φλοιό με τις υπόλοιπες δομές του κεντρικού νευρικού συστήματος. Μάλιστα, η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αποτελεί βασικό μοριακό δείκτη των αξόνων αυτών, καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής τους.

Αποτελεί προτεραιότητα, λοιπόν, να επιδιορθωθεί η αναδημιουργηθεί η συγκεκριμένη σειρά διαγονιδιακών μυών TAG-1^{TgCre}, διότι θα μπορούσε να φανεί χρήσιμη σε πολλές μελλοντικές εφαρμογές αφού μέσω της διασταύρωσης των ζώων αυτών με κατάλληλα διαγονιδιακά ζώα, που φέρουν loxP τόπους σε γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, είναι δυνατή η λεπτομερής μελέτη του ρόλου αυτών των γονιδίων, σε οποιαδήποτε διαδικασία συμμετέχουν.

Υπάρχουν αρκετές σειρές γενετικά τροποποιημένων μυών που θα μπορούσαν να διασταυρωθούν με τα TAG-1^{TgCre} ζώα.

- Για παράδειγμα, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν τα Rac1fl/fl ζώα που περιγράφονται στην παρούσα διατριβή, προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος της GTPάσης Rac1 στην ανάπτυξη των φλοιοθαλαμικών αξόνων, καθώς και στην ανάπτυξη των αξόνων του αμφιβληστροειδούς και των γαγγλίων των ραχιαίων ριζών στο νωτιαίο μυελό. Η δημιουργία των εν λόγω αξονικών πληθυσμών, απαιτεί συντονισμένη και απόλυτα ελεγχόμενη αλληλεπίδραση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων, διαδικασίες στις οποίες μετέχουν ενεργά οι Rho-GTPάσες και η Rac1 (Jaffe & Hall, 2005).

- Οι TAG-1^{TgCre} μύες, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και για τη μελέτη του ρόλου άλλων μορίων κυτταρικής συνάφειας, στην ανάπτυξη των αξόνων και των νευρικών, ή γλοιακών κυττάρων στα οποία εκφράζεται το διαγονίδιο. Συγκεκριμένα, υπάρχουν διαθέσιμες διαγονιδιακές σειρές ποντικών, που φέρουν loxP τόπους σε γονίδια καντχερινών (π.χ. cadherin 1, www.jax.org/jaxmice/models/cre_flp_loxp), καθώς και σε γονίδια πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μηχανισμό δράσης των παραπάνω μορίων (π.χ. κατενίνες, που αλληλεπιδρούν με τις cadherins, www.jax.org/jaxmice/models/cre_flp_loxp). Η αδρανοποίηση των μορίων αυτών μέσω Cre-loxP ανασυνδυασμού, από τη διασταύρωσή τους με τα TAG-1^{TgCre} ζώα, θα μπορούσε να δώσει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με το ρόλο τους στα σηματοδοτικά μονοπάτια καθοδήγησης των αξόνων και της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος.

- Χρήσιμη θα ήταν επίσης η διασταύρωση των TAG-1^{TgCre} με ζώα που φέρουν loxP τόπους σε γονίδια της οικογένειας των εφρινών (π.χ. ephrin B2, www.jax.org/jaxmice/models/cre_flp_loxp). Παλαιότερες εργαστηριακές μελέτες, έχουν δείξει ότι τα μόρια αυτής της οικογένειας εμπλέκονται τόσο στην ανάπτυξη των αξόνων του αμφιβληστροειδούς (Drescher et al, 1997), όσο και στη γενικότερη καθοδήγηση αξόνων στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα (Niето et al, 1996). Επομένως, η χρησιμοποίηση του συστήματος Cre-loxP για τη στοχευμένη απενεργοποίηση μορίων της οικογένειας των ephrins ιστοειδικά, θα διαφωτίσει το μηχανισμό δράσης αυτών των μορίων. Αντίστοιχα, θα μπορούσε να μελετηθεί ο ρόλος μορίων όπως η neuropilin 1 (www.jax.org/jaxmice/models/cre_flp_loxp), που ως υποδοχέας σεμαφορινών εμπλέκεται ενεργά στην καθοδήγηση αξόνων στο νευρικό σύστημα (Gu et al, 2003).

- Τέλος, τα γενετικά τροποποιημένα ζώα TAG-1^{TgCre} θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και για την απάντηση πολύ εξειδικευμένων ερωτημάτων, ως προς την ανάπτυξη συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών. Για παράδειγμα, μέσω διασταύρωσης τους με σειρές loxP-ζώων όπως τα Grin1 (www.jax.org/jaxmice/models/cre_flp_loxp), θα μπορούσε να διαφωτιστεί ο ρόλος του υποδοχέα Grin1 του γλουταμικού, στην ανάπτυξη του πληθυσμού των πυραμιδικών νευρώνων που εκφράζουν την TAG-1 στο φλοιό.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Ayala, R., Shu, T., and Tsai, L. H. (2007).** Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell* 128, 29-43.
2. **Baily Y, Kyriakopoulou K, Delhay- Bouchaud N, Mariani J, Karagogeos SD (1996)** Cerebellar granule cell differentiation in mutant and X-irradiated rodents revealed by the expression of the neural adhesion molecule TAG-1. *J Comp Neurol* 369:150-161.
3. **Βιδάκη Μ., (2010),** Μελέτη των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων σημάτων κατά την ανάπτυξη των ενδονευρώνων, στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, σελ. 1-169.
4. **Brummendorf T, Rathjen F (1996)** Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr Opin Neurobiol* 6:584-592.
5. **Butt, S. J., Sousa, V. H., Fuccillo, M. V., Hjerling-Leffler, J., Miyoshi, G., Kimura, S., and Fishell, G. (2008).** The requirement of Nkx2-1 in the temporal specification of cortical interneuron subtypes. *Neuron* 59, 722-732.
6. **Buttiglione, M., Revest, J. M., Pavlou, O., Karagogeos, D., Furley, A., Rougon, G., and Faivre-Sarrailh, C. (1998).** A functional interaction between the neuronal adhesion molecules TAG-1 and F3 modulates neurite outgrowth and fasciculation of cerebellar granule cells. *J Neurosci* 18, 6853-6870.
7. **Caviness, V. S., Jr., and Takahashi, T. (1995).** Proliferative events in the cerebral ventricular zone. *Brain Dev* 17, 159-163.
8. **Chatzopoulou, E., Miguez, A., Savvaki, M., Levasseur, G., Muzerelle, A., Muriel, M. P., Goureau, O., Watanabe, K., Goutebroze, L., Gaspar, P., et al. (2008).** Structural requirement of TAG-1 for retinal ganglion cell axons and myelin in the mouse optic nerve. *J Neurosci* 28, 7624-7636.
9. **Chen, J., Magavi, S. S., and Macklis, J. D. (2004).** Neurogenesis of corticospinal motor neurons extending spinal projections in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16357-16362.
10. **Corbin, J. G., Nery, S., and Fishell, G. (2001).** Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain. *Nat Neurosci* 4 Suppl, 1177-1182.
11. **Denaxa M., Chan, C. H., Schachner, M., Parnavelas, J. G., and Karagogeos, D. (2001).** The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development* 128, 4635-4644.
12. **Karagogeos D.** Neural GPI-anchored cell adhesion molecules. *Front Biosci* 2003; 8:1304-20
13. **Denaxa, M., Kyriakopoulou, K., Theodorakis, K., Trichas, G., Vidaki, M., Takeda, Y., Watanabe, K., and Karagogeos, D. (2005).** The adhesion molecule TAG-1 is required for proper migration of the superficial migratory stream in the medulla but not of cortical interneurons. *Dev Biol* 288, 87-99.
14. **Dodd, J., and Jessell, T. M. (1988).** Axon guidance and the patterning of neuronal projections in vertebrates. *Science* 242, 692-699.
15. **Fogarty, M., Richardson, W. D., and Kessaris, N. (2005).** A subset of oligodendrocytes generated from radial glia in the dorsal spinal cord. *Development* 132, 1951-1959.
16. **Fukuda, T., Kawano, H., Ohyama, K., Li, H. P., Takeda, Y., Oohira, A., and Kawamura, K. (1997).** Immunohistochemical localization of neurocan and L1 in the formation of thalamocortical pathway of developing rats. *J Comp Neurol* 382, 141-152.
17. **Furley, A. J., Morton, S. B., Manalo, D., Karagogeos, D., Dodd, J., and Jessell, T. M. (1990).** The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity. *Cell* 61, 157-170.
18. **Gorski, J. A., Talley, T., Qiu, M., Puellas, L., Rubenstein, J. L., and Jones, K. R. (2002).** Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J Neurosci* 22, 6309-6314.

19. **Gressens, P. (2006).** Pathogenesis of migration disorders. *Curr Opin Neurol* 19, 135-140.
20. **Gupta, A., Tsai, L. H., and Wynshaw-Boris, A. (2002).** Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Genet* 3, 342-355.
21. **Hatten, M. E. (1999).** Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 22, 511-539
22. **Karagogeos, D., Morton, S. B., Casano, F., Dodd, J., and Jessell, T. M. (1991).** Developmental expression of the axonal glycoprotein TAG-1: differential regulation by central and peripheral neurons in vitro. *Development* 112, 51-67
23. **Katidou, M., Vidaki, M., Strigini, M., and Karagogeos, D. (2008).** The immunoglobulin superfamily of neuronal cell adhesion molecules: lessons from animal models and correlation with human disease. *Biotechnol J* 3, 1564-1580.
24. **Kessarlis, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M., and Richardson, W. D. (2006).** Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* 9, 173-179.
25. **Kriegstein, A. R., and Noctor, S. C. (2004).** Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci* 27, 392-399.
26. **Kyriakopoulou, K., de Diego, I., Wassef, M., and Karagogeos, D. (2002).** A combination of chain and neurophilic migration involving the adhesion molecule TAG-1 in the caudal medulla. *Development* 129, 287-296.
27. **Lee, W. C., Chen, J. L., Huang, H., Leslie, J. H., Amitai, Y., So, P. T., and Nedivi, E. (2008).** A dynamic zone defines interneuron remodeling in the adult neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19968-19973.
28. **Ma, Q. H., Bagnard, D., Xiao, Z. C., and Dawe, G. S. (2008a).** A TAG on to the neurogenic functions of APP. *Cell Adh Migr* 2, 2-8.
29. **Ma, Q. H., Futagawa, T., Yang, W. L., Jiang, X. D., Zeng, L., Takeda, Y., Xu, R. X., Bagnard, D., Schachner, M., Furley, A. J., et al. (2008b).** A TAG1-APP signalling pathway through Fe65 negatively modulates neurogenesis. *Nat Cell Biol* 10, 283-294.
30. **Marin, O., and Rubenstein, J. L. (2001).** A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2, 780-790.
31. **Marin, O., and Rubenstein, J. L. (2003).** Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* 26, 441-483.
32. **Mattson, M. P., and van Praag, H. (2008).** TAGing APP constrains neurogenesis. *Nat Cell Biol* 10, 249-250.
33. **Molyneaux, B. J., Arlotta, P., and Macklis, J. D. (2007a).** Molecular development of corticospinal motor neuron circuitry. *Novartis Found Symp* 288, 3-15; discussion 15-20, 96-18. **Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R., and Macklis, J. D. (2007b).** Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 8, 427-437.
34. **Rakic, P., and Goldman-Rakic, P. S. (1982).** The development and modifiability of the cerebral cortex. Overview. *Neurosci Res Program Bull* 20, 433-438
35. **Rougon G, Hobert O. Annu Rev Neurosci. (2003);26:207-38.** Epub 2003 Feb 13. New insights into the diversity and function of neuronal immunoglobulin superfamily molecules.
36. **Shimoda, Y., and Watanabe, K. (2009).** Contactins: Emerging key roles in the development and function of the nervous system. *Cell Adh Migr* 3, 64-70.
37. **Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C. S., William, C. M., Tanabe, Y., Jessell, T. M., and Costantini, F. (2001).** Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* 1, 4.
38. **Sussel, L., Marin, O., Kimura, S., and Rubenstein, J. L. (1999).** Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* 126, 3359-3370.
39. **Suzuki, K. (2007).** Neuropathology of developmental abnormalities. *Brain Dev* 29, 129-141.
40. **Traka, M., Dupree, J. L., Popko, B., and Karagogeos, D. (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, 3016-3024.
41. **Traka, M., Goutebroze, L., Denisenko, N., Bessa, M., Nifli, A., Havaki, S., Iwakura, Y., Fukamauchi, F., Watanabe, K., Soliven, B., 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, 1161-1172.

42. **Williams** AF, Davis SJ, He Q, Barclay AN. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. **1989**;54 Pt 2:637-47. Structural diversity in domains of the immunoglobulin superfamily.
43. **Wonders**, C. P., Taylor, L., Welagen, J., Mbata, I. C., Xiang, J. Z., and Anderson, S. A. (**2008**). A spatial bias for the origins of interneuron subgroups within the medial ganglionic eminence. Dev Biol 314, 127-136.
44. **Woo**, N. H., and Lu, B. (**2006**). Regulation of cortical interneurons by neurotrophins: from development to cognitive disorders. Neuroscientist 12, 43-56.
45. **Worgotter**, F., Eyding, D., Macklis, J. D., and Funke, K. (**2002**). The influence of the corticothalamic projection on responses in thalamus and cortex. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 357, 1823-1834.
46. **Yamamoto** M., Boyer AM, Crandall JE, Edwards M, Tanaka H. Distribution of stage-specific neurite-associated proteins in the developing murine nervous system recognized by a monoclonal antibody. J Neurosci **1986**; 6:3576-94.
47. **Yamamoto** M, Hassinger L, Crandall JE (**1990**). Ultrastructural localization of stage-specific neurite associated proteins in the developing rat cerebral and cerebellar cortices. J Neurocytol 19:619-627.
48. **Zambrowicz**, B.P., Imamoto, A., Fiering, S., Herzenberg, L.A., Kerr, W.G., Soriano, P. **1997** Disruption of overlapping transcripts in the ROSA β geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of β -galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells Proc. Natl Acad. Sci. USA 94:3789–3794