

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
Π.Μ.Σ.: ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ-ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ

Μεταπτυχιακή Εργασία

**«Μελέτη του ρόλου των φλοιοθαλαμικών ινών
στην ανάπτυξη του εγκεφάλου σε γενετικά
τροποποιημένα μοντέλα »**

Μαρίνα Θεοδοσίου
Υπεύθυνη Καθηγήτρια: κ. Δόμνα Καραγωγέως

ΗΡΑΚΛΕΙΟ
2011

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|-----------|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... | 5 |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 7 |
| 1 .Ανάπτυξη του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων | 7 |
| 2.Καθορισμός της ταυτότητας των πυραμιδικών νευρώνων και νευρικά δίκτυα..... | 9 |
| 3. Υποφλοιική πλάκα και καθοδηγητικοί νευρώνες (pioneer neurons)..... | 11 |
| 4. Handshake υπόθεση..... | 12 |
| 5. Η πρωτεΐνη TAG-1 και η έκφραση της στο νευρικό σύστημα..... | 14 |
| ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ..... | 16 |
| ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 17 |
| 1.Πειραματόζωα..... | 17 |
| 2. Γονοτύπηση..... | 17 |
| 2.1 Απομόνωση Γενωμικού DNA από ιστούς..... | 17 |
| 2.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης | 18 |
| 3. Βασικές Ιστολογικές Μέθοδοι | 19 |
| 3. 1 Επεξεργασία ιστών για κρυτομές..... | 19 |
| 3.2 Επεξεργασία ιστών για τομές σε μικροτόμο δόνησης..... | 19 |
| 4. Ιστοχημικές Χρώσεις | 20 |
| 4.1 Χρώση Cresyl Violet..... | 20 |
| 4.2 Χρώση Nissl..... | 20 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3 Ανοσοιστοχημεία σε τομές κρυοτόμου από εγκέφαλο ενήλικων ζώων..... | 20 |
| 4.4 Ανοσοιστοχημεία σε τομές κρυοτόμου και μικροτόμου δόνησης απο εγκεφάλους εμβρύων..... | 21 |
| 4.5 Υβριδοποίηση in situ για εντοπισμό mRNA σε κρυοτομές | 23 |
| 5. Σήμανση DiI..... | 24 |
| | |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 25 |
| A.Έλεγχος του προτύπου έκφρασης της πρωτεΐνης GFP στα <i>Tag1</i> ^{loxP-GFP-loxP-DTA} ζώα | 25 |
| B.Απαλοιφή των TAG-1 corticofugal αξόνων..... | 27 |
| 1B.Έλεγχος του προτύπου κυτταρικού θανάτου..... | 28 |
| 2B. Έλεγχος της έκφρασης της TAG-1 πρωτεΐνης στα διαγονιδιακά ζώα..... | 29 |
| Γ. Μορφολογικός χαρακτηρισμός των ζώων..... | 31 |
| Δ. Μελέτη των υποπληθυσμών των νευρικών κυττάρων στις στοιβάδες του φλοιού..... | 32 |
| E. Μελέτη της καθοδήγησης των θαλαμοφλοιικών και φλοιοθαλαμικών αξόνων..... | 33 |
| 1E. Σήμανση με DiI των θαλαμοφλοιικών και φλοιοθαλαμικών αξόνων..... | 33 |
| 2E. Μελέτη της καθοδήγησης με την χρήση αντισώματος..... | 35 |
| Z. Μελέτη του προτύπου μετανάστευσης των ενδονευρώνων | 36 |
| | |
| ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 37 |
| | |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 41 |

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Δόμνα Καραγωγέως που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω την μεταπτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο της. Την ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη της, για τις συμβουλές της και για το γεγονός ότι μέσα από την συγκεκριμένη δουλειά έμαθα να είμαι ανεξάρτητη.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο κ.Κώστα, δεν ήταν απλώς συνεργάτης αλλά το μεγάλο μου στήριγμα.

Και βέβαια δεν μπορώ να παραλείψω τα μέλη του εργαστηρίου. Λίντα μου σε ευχαριστώ για τις διορθώσεις σου και τις συμβουλές σου. Μαρία μου ένα μεγάλο ευχαριστώ για τα πειραματικές συμβουλές. Μπαστάκη!! σε ευχαριστώ για τις συμβουλές σου περι ανατομίας...Ευχαριστώ επίσης την Σιμόνα, που πάντα με την ψυχραιμία της και τις συμβουλές της με ηρεμούσε και βέβαια την Μαυρα και την Γεωργία που πάντα μου έδιναν συμβουλές για τα πειράματα μου. Επίσης, θέλω να ευχηθώ καλή αρχή στην Μαριλένα και στην Κατερίνα.

Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Κίμωνα που πάντα είναι δίπλα μου και με στηρίζει σε ότι κι αν κάνω και βέβαια τους κολλητούς μου Σωτήρη και Κωσταντίνο που πάντα άκουγαν τα προβλήματα και τις ανησυχίες μου. Θα μου λείψετε!!!!

Τέλος, θα ήθελα να αφιερώσω αυτή την εργασία στους γονείς μου που στηρίζουν κάθε μου βήμα και κάθε μου απόφαση. Ότι έχω καταφέρει μέχρι τώρα το οφείλω σε αυτούς.

SUMMARY

The cerebral cortex is a very complex structure, which is characterized by the presence of cortical circuits. Cortical circuits play a key role in the function of the cerebral cortex. Cortex receives the major sensory input from the thalamus through thalamocortical axons and sends information to other brain structures, like the spinal cord. Furthermore, neurons in the cortex create circuits between neurons in the same hemisphere (corticocortical axons) or the opposite hemisphere (callosal axons). The environment of the axons is essential for their navigation to their target. Signaling molecules and transcription factors, which are expressed with graded concentrations in the cortex are important to establish the cortical maps of topography.

For the thalamocortical connection, based on the handshake hypothesis, the interaction between the two different types of axons is very important. Early generated corticofugal axons from the subplate pioneer neurons interact with thalamocortical axons and compose a scaffold for their navigation. However, we do not know yet if this interaction is essential for the navigation of both set of axons.

TAG-1 protein is expressed early in the development by pioneer neurons and specifically in their axons. In this study, using the transgenic mice *Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}* and *Emx1^{Cre}*, we tried to study the role of TAG-1 corticofugal axons in the cerebral cortex development and their role in the establishment of thalamo-cortical circuit.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο φλοιός των εγκεφαλικών ημισφαιρίων είναι μια πολύπλοκη δομή η οποία χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη νευρικών δικτύων. Μέσω αυτών των νευρικών δικτύων εξυπηρετούνται οι λειτουργίες του. Ο φλοιός λαμβάνει τις κύριες αισθητικές πληροφορίες από τον θάλαμο, μέσω των φλοιοθαλαμικών ινών (αξόνων). Παράλληλα, στέλνει πληροφορίες σε άλλες δομές του εγκεφάλου που βρίσκονται εκτός του φλοιού, όπως ο νωτιαίος μυελός (corticospinal axons), και αναπτύσσει συνδέσεις μεταξύ νευρώνων του φλοιού, που βρίσκονται στο ίδιο ημισφαίριο (cortiocortical) ή και στο απέναντι ημισφαίριο (callosal axons). Η ανάπτυξη αυτών των δικτύων που είναι πολύ σημαντικά για την λειτουργία του φλοιού, στηρίζεται στην σωστή καθοδήγηση των αξόνων. Σηματοδοτικά μόρια και μεταγραφικοί παράγοντες που εκφράζονται σε διαφορετικές συγκενρώσεις στον φλοιό παίζουν ρόλο στην καθοδήγηση των αξόνων προς τους στόχους τους.

Συγκεκριμένα όσον αφορά την σύνδεση φλοιού θαλάμου, πέρα από τα σηματοδοτικά μόρια, υποστηρίζεται ότι η αλληλεπίδραση των θαλαμοφλοιικών αξόνων και των corticofugal αξόνων, που δημιουργούνται νωρίς στην ανάπτυξη από τους καθοδηγητικούς νευρώνες της υποφλοιικής πλακάκας (Subplate, SP), είναι καθοριστική για την σωστή καθοδήγηση των αξόνων. Μέχρι τώρα δεν έχει εξακριβωθεί αν η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση είναι απαραίτητη για την καθοδήγηση και των δύο ομάδων αξόνων.

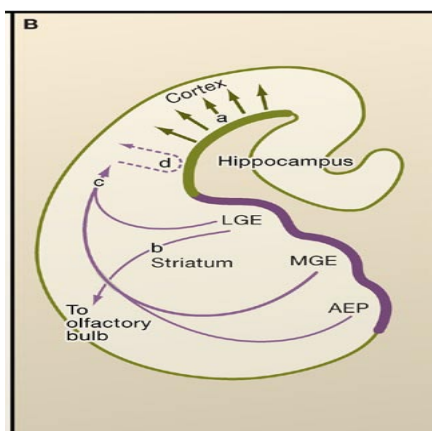
Γνωρίζουμε ότι η πρωτεΐνη TAG-1 εκφράζεται νωρίς στην ανάπτυξη από καθοδηγητικούς νευρώνες και εντοπίζεται στους corticofugal άξονες. Έτσι στην συγκεκριμένη εργασία, χρησιμοποιώντας τα διαγονιδιακά ζώα $Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}$ και $Emx1^{Cre}$, μελετήσαμε τον ρόλο των TAG-1 corticofugal αξόνων στην ανάπτυξη του φλοιού αλλά και τον ρόλο των αξόνων αυτών στην σύνδεση φλοιού- θαλάμου.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.Ανάπτυξη του νεοφλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων

Ο νεοφλοιός των εγκεφαλικών ημισφαιρίων είναι μια πολύπλοκη δομή, οργανωμένη σε έξι διακριτές στοιβάδες αποτελούμενες από πληθώρα νευρικών και γλοιακών κυττάρων

Υπάρχουν δύο βασικοί πληθυσμοί νευρικών κυττάρων οι οποίοι δομούν το φλοιό οι πυραμιδικοί νευρώνες και οι ενδονευρώνες. Οι πυραμιδικοί διεγερτικοί νευρώνες (προβλητικοί νευρώνες) σχηματίζουν διεγερτικές συνάψεις χρησιμοποιώντας ως νευροδιαβιβαστή το γλουταμινικό οξύ. Οι νευρώνες αυτοί γεννιούνται στην κοιλιακή ζώνη του ραχιαίου τελεγκεφάλου. Από την θέση αυτή καταλήγουν μέσω ακτινωτής μετανάστευσης στο φλοιό. Επιπλέον, οι πυραμιδικοί νευρώνες είναι υπεύθυνοι για τη μεταφορά πληροφοριών από τις περιοχές του φλοιού σε άλλα μέρη του εγκεφάλου. Οι μη πυραμιδικοί ανασταλτικοί ενδονευρώνες, δημιουργούνται στον κοιλιακό τελεγκέφαλο και μετακινούνται οριζόντια προς τον φλοιό μέσω χαρακτηριστικών μονοπατιών στην επιχείλια ζώνη (MZ, Marginal Zone), στην υποφλοιική πλάκα (Subplate, SP) και χαμηλότερα στα όρια ενδιάμεση ζώνης (Intermediate Zone, IZ) και υποκοιλιακής ζώνης (Subventricular Zone, SVZ) (μονοπάτι IZ/SVZ). Χρησιμοποιούν ως νευροδιαβιβαστή το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και μέσω των ανασταλτικών τους συνάψεων με τους πυραμιδικούς νευρώνες εξισορροπούν τη διέγερση του φλοιού (Εικ.1) (Marin,2010; Marin & Rubenstein, 2003).

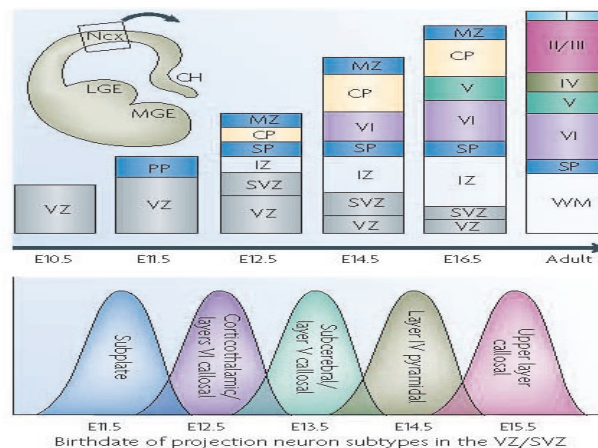


Εικ.1: Πρότυπα κυτταρικής μετανάστευσης στον αναπτυσσόμενο τελεγκέφαλο. Τα νευρικά κύτταρα του ραχιαίου τελεγκεφάλου μετακινούνται ακτινωτά προς τον φλοιό (πράσινα βέλη, a), ενώ τα κύτταρα που γεννιούνται κοιλιακά, μετακινούνται με οριζόντια μετανάστευση προς τον τελικό προορισμό τους (μωβ βέλη, b, c). (Ayalal,2007)

Τα πρόδρομα κύτταρα των πυραμιδικών νευρώνων βρίσκονται στο νευροεπιθήλιο το οποίο περιβάλλει τις κοιλίες του τελεγκεφάλου. στην περιοχή που

ονομάζεται κοιλιακή ζώνη (ventricular zone, VZ). Καθώς προχωρά η νευρογένεση, μια επιπρόσθετη στοιβάδα, η υποκοιλιακή ζώνη (subventricular zone, SVZ) δημιουργείται πάνω από την κοιλιακή. Από τις δύο αυτές περιοχές θα προκύψουν οι πυραμιδικοί νευρώνες.

Οι πρώτοι νευρώνες εμφανίζονται στα τρωκτικά την εμβρυική μέρα E11.5 και σχηματίζουν την προφλοιική πλάκα (preplate, PP). Στην συνέχεια ένας δεύτερος πληθυσμός νευρώνων μεταναστεύει από την κοιλιακή ζώνη και χωρίζει την προφλοιική πλάκα στην επιχειλία ζώνη (Marginal Zone, MZ) και στην υποφλοιική πλάκα (Subplate, SP). Η στοιβάδα που δημιουργείται ανάμεσα στις δύο αυτές ζώνες ονομάζεται φλοιική πλάκα (Cortical plate, CP) η οποία δέχεται διαδοχικές μεταναστεύσεις νευρώνων, με αποτέλεσμα την δημιουργία των στοιβάδων σύμφωνα με τον κανόνα από μέσα προς τα έξω (inside-out) (Εικ.2) (Molyneaux ,2007; Leonel, 2008).



Εικ.2: 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 προφλοιική πλάκα (PP), η οποία αργότερα χωρίζεται στην επιφανειακή επιχειλία ζώνη (MZ) και στην εσωτερική υποφλοιική πλάκα (SP). Η φλοιική 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 στοιβάδων του ώριμου φλοιού. (Molyneaux, 2007)

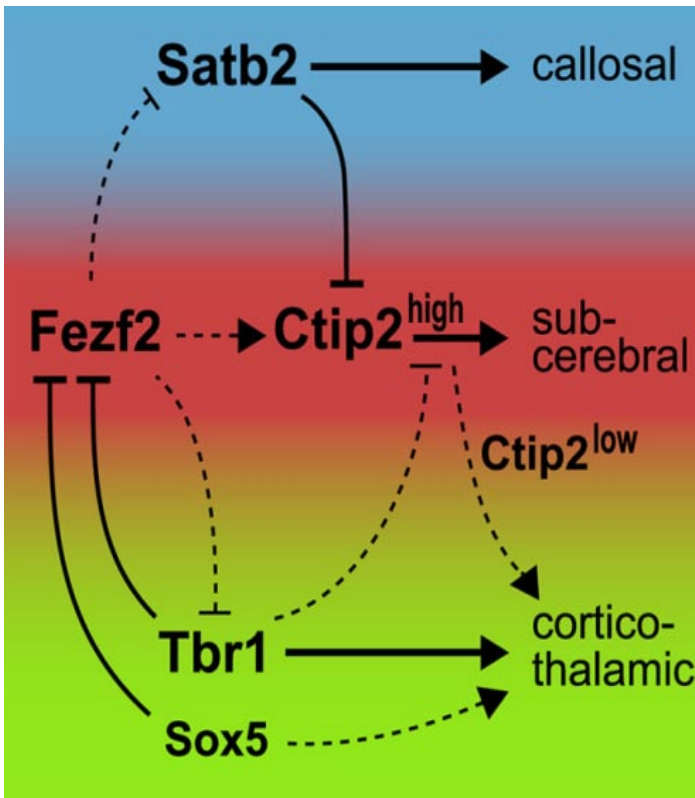
2. Καθορισμός της ταυτότητας των πυραμιδικών νευρώνων και νευρικά δίκτυα

Κάθε μία από τις έξι στοιβάδες του φλοιού διαφέρει όσον αφορά τις ιδιότητες και τις λειτουργίες της. Οι πυραμιδικοί προβλητικοί νευρώνες, που δομούν τις στοιβάδες του φλοιού, συνδέουν μεταξύ τους περιοχές του φλοιού ή φλοιικές περιοχές με άλλες δομές στο εγκέφαλο με απώτερο στόχο τη ταχεία και αποτελεσματική μεταφορά πληροφοριών.

Έρευνες έδειξαν ότι ένας αριθμός μεταγραφικών παραγόντων παίζει ρόλο στον καθορισμό της μοίρας των προβλητικών πυραμιδικών νευρώνων. Για παράδειγμα οι μεταγραφικοί παράγοντες Fezf2, Ctip2 οι οποίοι εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στους νευρώνες των στοιβάδων V, καθορίζουν την υποφλοιική τους μοίρα (Arlotta et al,2005). Στα ελλειμματικά ζώα για τα δύο αυτά γονίδια, οι φλοιονωτιαίοι άξονες απουσιάζουν. Επιπλέον, πειράματα εκτοπικής έκφρασης του Fezf2 σε νευρώνες των άνω στοιβάδων (που εκτείνουν άξονες προς το μεσολόβιο), βρέθηκε να είναι ικανή για την αλλαγή την μοίρας τους σε υποφλοιικούς νευρώνες. Από την άλλη η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Tbr1 είναι πολύ σημαντική για τον καθορισμό της μοίρας των φλοιοθλαμικών αξόνων (στοιβάδα VI). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ Tbr1 και Fezf2. Πιο συγκεκριμένα ο μεταγραφικός παράγοντας, Tbr1 καταστέλλει την έκφραση του Fezf2 στους νευρώνες της στοιβάδας VI και μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης καθορίζεται η μοίρα των νευρώνων της στοιβάδας VI (McKenna et al, 2011; Han et al,2011). Επιπλέον, η έκφραση του γονιδίου Sox5 περιορίζεται στους νευρώνες των στοιβάδων VI,V και SP και φαίνεται επίσης να παίζει ρόλο στον καθορισμό των φλοιοθλαμικών αξόνων (Lai et al,2008).

Όσον αφορά τους ενδοφλοιικούς νευρώνες που εκτείνουν προς το μεσολόβιο (callosal axons), η έκφραση της πρωτεΐνης SATB2 είναι απαραίτητη για τον καθορισμό της μοίρας τους. Ζώα ελλειμματικά για την πρωτεΐνη αυτή, χαρακτηρίζονται από έλλειψη μεσολοβίου αφού οι άνω νευρώνες δεν μπορούν να εκτείνουν άξονες προς το μεσολόβιο. Επιπλέον, η περιοχή έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Ctip2 αυξάνεται υποδηλώνοντας μια σχέση ρύθμισης μεταξύ των δύο. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη SATB2 επηρεάζει την διαμόρφωση της χρωματίνης του γενετικού τύπου για το γονίδιο Ctip2 καταστέλλοντας έτσι την έκφρασή του στους προβλητικούς πυραμιδικούς νευρώνες που θα εκτείνουν προς το μεσολόβιο (Εικ.3) (Leone D.P et.al, 2008) . Έτσι οι

προβλητικοί νευρώνες αποκτούν συγκεκριμένη ταυτότητα και συμμετέχουν στο σχηματισμό συγκεκριμένων νευρικών δικτύων.

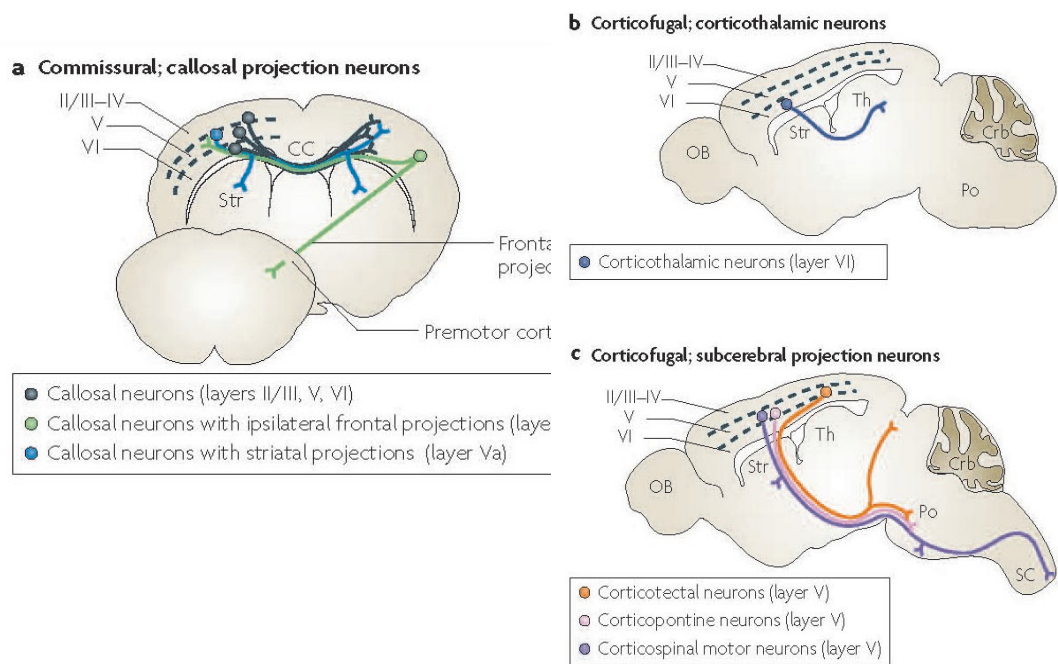


Εικ.3: Προτεινόμενος μηχανισμός του καθορισμού της μοίρας των πυραμιδικών νευρώνων του φλοιού. Συγκεκριμένα το Satb2 καταστέλλει την έκφραση του Ctip2 και έτσι καθορίζει την μοίρα των αξόνων που εκτείνουν προς το μεσολόβιο. Οι μεταγραφικοί παράγοντες Tbr1 και Sox5 καταστέλλουν την έκφραση του Fezf2 και έτσι οδηγούν στον καθορισμό της μοίρας των φλοιοθαλαμικών αξόνων. Ενώ το Fezf2 φαίνεται να καταστέλλει με κάποιο τρόπο την έκφραση των Satb2 και Tbr1 και να ενεργοποιεί την έκφραση του Ctip2 (McKenna, 2011).

Βασιζόμενοι στα μονοπάτια που ακολουθούνε, οι νευρώνες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες (Εικ4.):

A) **Ενδοφλοιικοί (Commissural) νευρώνες:** Πρόκειται για τους νευρώνες των στοιβάδων II, V και VI που εκτείνουν άξονες κατά μήκος του μεσολόβιου. Οι νευρώνες αυτοί συνδέουν μεταξύ τους διάφορες περιοχές του φλοιού.

B) **Corticofugal νευρώνες:** Ονομάζονται οι νευρώνες που προβάλλουν άξονες εκτός του τελεγκεφάλου. Η κατηγορία αυτή υποδιαιρείται στους φλοιοθαλαμικούς νευρώνες, τους νευρώνες της υποφλοιικής πλάκας (SP) και τους υποφλοιικούς νευρώνες (subcerebral). Οι υποφλοιικοί νευρώνες (subcerebral) από τη στοιβάδα V εκτείνουν τους άξονες τους προς το νωτιαίο μυελό (spinal cord), τα ανώτερα διδύμια (superior colliculus), τη γέφυρα (pons) και το εγκεφαλικό στέλεχος (brain stem) (Molyneaux et al,2007; Zhou et al,2009) Οι φλοιοθαλαμικοί νευρώνες αποτελούνται κυρίως από νευρώνες της στοιβάδας VI και ένα μικρό ποσοστό από την στοιβάδα V, καθώς και από τους νευρώνες της υποφλοιικής πλάκας (SP). Οι νευρώνες αυτοί εκτείνουν άξονες προς τους διάφορους πυρήνες του θαλάμου (Molyneaux et al,2007).



Εικ.4.: Οι κύριοι τύποι των πυραμιδικών νευρώνων (projection neurons) στο νεοφλοιό. (Molyneaux,2007)

Το αντίστοιχο συμβαίνει και με τους θαλαμοφλοιικούς άξονες, όπου κάθε πυρήνας του ραχιαίου θαλάμου εκτείνει άξονες προς την αντίστοιχη περιοχή του φλοιού (στοιβάδα IV). Με λίγα λόγια υπάρχει μια αμοιβαία αλληλεπίδραση μεταξύ του φλοιού και των πυρήνων του ραχιαίου θαλάμου που είναι πολύ συγκεκριμένη και ειδική. Έτσι, ο κοιλιακό-πλευρικός πυρήνας (VL) συνδέεται με την κινητική M1 περιοχή του φλοιού, ο κοιλιακό-πρόσθιος πυρήνας(VP) με τη σωματοσαιθητική S1, ο ραχιο-πλευρικός geniculate πυρήνας(dLGN) με την οπτική V1 και τέλος το κοιλιακό τμήμα του μεσαίου geniculate πυρήνα (MGv) με την ακουστική περιοχή A1.(O’Leary, 2007)

3. Υποφλοιική πλάκα και καθοδηγητικοί νευρώνες –pioneer neurons

Κατά την διάσπαση της προφλοιικής πλάκας (PP), οι νευρώνες της στοιβάδας αυτής διαχωρίζονται στην υποφλοιική πλάκα(SP) και στην επιφανειακή επιχειλία ζώνη (MZ). Η υποφλοιική πλάκα (SP) αποτελεί μια προσωρινή στοιβάδα στον αναπτυσσόμενο φλοιό, παρόλα αυτά κατά την ενήλικη ζωή σε διάφορα είδη βρέθηκε

να παραμένει ως ξεχωριστή στοιβάδα VIβ(Hevner & Zecevic ;Kanold & Luhmann, 2010). Στην συγκεκριμένη στοιβάδα συναντάμε διεγερτικούς πυραμιδικούς νευρώνες αλλά και ανασταλτικούς μη πυραμιδικούς ενδονευρώνες. Οι προβλητικοί νευρώνες της στοιβάδας αυτής ονομάζονται καθοδηγητικοί νευρώνες (pioneer neurons) και οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στην εγκαθίδρυση νευρικών δικτύων στον φλοιό. Χαρακτηριστικά των νευρώνων της στοιβάδας αυτής είναι ότι γεννιούνται πολύ νωρίς (earliest-generated neurons) και ωριμάζουν νωρίτερα από τους υπόλοιπους νευρώνες του φλοιού.

Η υποφλοιική πλάκα παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου. Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης οι νευρώνες της υποφλοιικής πλάκας έχουν διαφορετικό αναπτυξιακό ρόλο. Κατά την εμβρυϊκή και την πρώιμη ενήλικη ανάπτυξη οι υποφλοιικοί νευρώνες συμμετέχουν στην ανάπτυξη ένδο και υποφλοιικών συνδέσεων. Εκτείνουν άξονες από το ένα ημισφαίριο στο άλλο μέσω του μεσολόβιου και προς υποφλοιικές δομές μέσω της έσω κάψας. Κατά την ενήλικη ζωή οι νευρώνες αυτοί παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη της oscillatory ενεργότητας και στην ωρίμανση και ανάπτυξη των διεγερτικών και ανασταλτικών θαλαμοφλοιικών συνδέσεων. Ενώ οι εναπομείναντες νευρώνες πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στις ενδοφλοιικές συνδέσεις (Oeschger et al, 2011).

Πειράματα απαλοιφής τους οδήγησαν σε μη νεύρωση του φλοιού από τους θαλαμικούς άξονες αλλά και σε προβλήματα σε άλλα νευρικά δίκτυα. (Hevner & Zecevic ; Kanold & Luhmann, 2010). Η πιο καλά μελετημένη περίπτωση καθοδήγησης από αυτούς τους άξονες (pioneer axons) είναι η περίπτωση της καθοδήγησης των θαλαμοφλοιικών αξόνων.

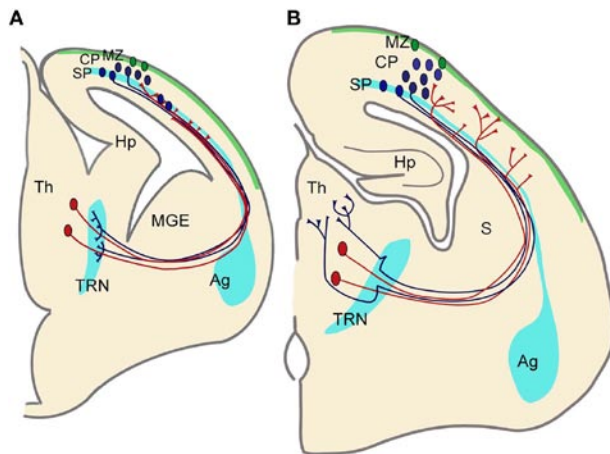
4. Handshake υπόθεση

Οι νευρώνες της υποφλοιικής πλάκας, αποτελούν τους πρώτους νευρώνες που εκτείνουν άξονες προς τον θάλαμο αλλά και τον πρώτο μετασυναπτικό στόχο των θαλαμοφλοιικών αξόνων.

Οι Molnar και Blakemore ανέπτυξαν την handshake υπόθεση, σύμφωνα με την οποία η αλληλεπίδραση των φλοιοθαλαμικών και των θαλαμοφλοιικών αξόνων στην έσω κάψα (internal capsule), είναι πολύ σημαντική για την σωστή καθοδήγηση τους. Παρόλα αυτά η υπόθεση αυτή δεν έχει πλήρως επιβεβαιωθεί.

Πιο συγκεκριμένα κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης (E13.5), οι καθοδηγητικοί (pioneer) νευρώνες εκτείνουν άξονες προς την έσω κάψα (internal

capsule) πριν ακόμα οι θalamοφλουικοί άξονες φτάσουν στην περιοχή αυτή. Στη συνέχεια, οι θalamοφλουικοί άξονες εισέρχονται στην περιοχή της έσω κάψας και μέσω της αλληλεπίδρασης τους με τους καθοδηγητικούς νευρώνες καταλήγουν στην υποφλουική πλάκα (SP) (E15.5), όπου και παραμένουν ως την γέννηση του οργανισμού(P0). Μετά την γέννηση ξεκινά η νεύρωση της στοιβάδας IV (Lopez Bendito G.et.al.,2003). Αντίθετα, οι φλοιοθλαμικοί άξονες αφού φτάσουν στην στον δικτυωτό πυρήνα του θαλάμου (E16.5) όπου και παραμένουν μέχρι τα τελευταία εμβρυϊκά στάδια (E18.5-P0) οδηγούνται στον ραχιαίο θάλαμο λίγο πριν την γέννηση. Η νεύρωση των πυρήνων του θαλάμου ολοκληρώνεται τις δύο πρώτες εβδομάδες μετά την γέννηση (P4.5-P14.5) (Jacobs et al,2007; Montiel et al,2011) (Εικ.5).



Εικ.5: Λειτουργική συσχέτιση των αναπτυσσομένων φλοιοθλαμικών (μπλέ) και θalamοφλουικών (κόκκινο) αξόνων της υποφλουικής πλάκας (SP) και του δικτυωτού πυρήνα του θαλάμου (TRN). (Montiel et al,2011)

Πέρα όμως από την αλληλεπίδραση των αξόνων αυτών, έχουν βρεθεί να παίζουν ρόλο για την σωστή καθοδήγηση των φλοιοθλαμικών και θalamοφλουικών αξόνων και άλλοι παράγοντες, όπως:

α) Η έκφραση μεταγραφικών παραγόντων. Αυτό προκύπτει από την μελέτη πολλών διαγονιδιακών ζώων ελλειμματικών (knock out) για διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες που εκφράζονται είτε στο φλοιό (π.χ Tbr1, Emx1/Emx2), είτε στον ραχιαίο θάλαμο (Gbx2). Στα συγκεκριμένα διαγονιδιακά ζώα παρατηρείται ανωμαλία στην καθοδήγηση των θalamοφλουικών και φλοιοθλαμικών αξόνων προς την έσω κάψα, περιοχή στην οποία δεν εκφράζονται (Lopez-Bendito G.et.al.,2003).

β) Οι ανατομικές περιοχές PSPB (pallial/subpallial boundary) και DTB(diencephalon/telencephalon boundary). Μελέτες στην διαδρομή που ακολουθούνε οι άξονες αποκάλυψαν ότι οι περιοχές αυτές, οι οποίες χαρακτηρίζονται από διαφορετικές μοριακές ιδιότητες και από συγκεκριμένο

πρότυπο έκφρασης γονιδίων, είναι σημαντικές για την καθοδήγηση των αξόνων πέρα από την αλληλεπίδραση τους (Hanashima C. et al. 2006; Price D.J et al. 2006).

γ) Τα κύτταρα διαδρόμου (corridor cells). Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από την πλάγια γαγγλιονική περιοχή (LGE) και είναι απαραίτητα για τη διέλευση των θαλαμοφλοιικών αξόνων από την περιοχή κάτω από τις γαγγλιονικές περιοχές προς την έσω κάψα (internal capsule) (Lopez-Bendito G. et al., 2006; Lopez-Bendito G. et al., 2003).

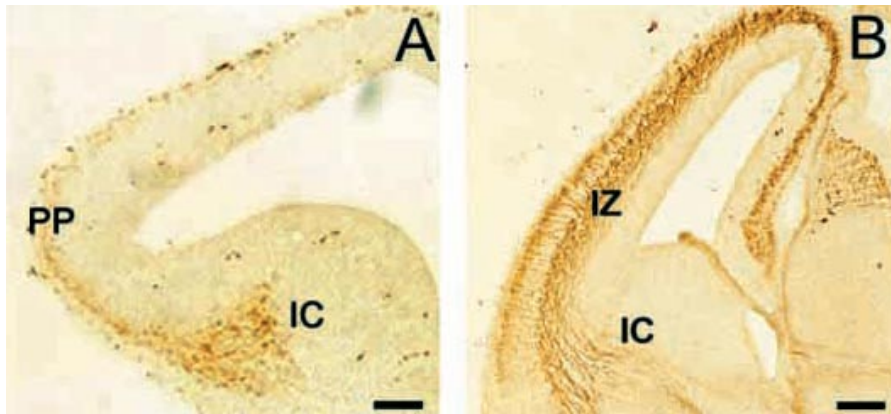
5. Η πρωτεΐνη TAG-1 και η έκφραση της στο νευρικό σύστημα

Η πρωτεΐνη TAG1 (transient axonal glycoprotein-1) /axonin/CNTN2 ανήκει στην υποκατηγορία contactin της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών. Εμπλέκεται σε διαδικασίες όπως η ανάπτυξη των αξόνων, η δεσμιδοποίηση (fasciculation) και η νευρική μετανάστευση κατά την διάρκεια της ανάπτυξης (Katidou et al., 2008; Shimoda & Watanabe, 2009). Σύμφωνα με διάφορες μελέτες, η πρωτεΐνη TAG-1 εκφράζεται στα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδή (Retinal Ganglion Cells), σε οριζόντια μεταναστεύοντες νευρώνες στην περιοχή του προμήκη μυελού, οι οποίοι σχηματίζουν τους πυρήνες του προπαρεγκεφαλιδικού συστήματος (Kyriakopoulou et al., 2002; Denaxa, Kyriakopoulou et al., 2005), στους πυραμιδικούς νευρώνες των περιοχών CA1 και CA3 του ιππόκαμπου και στους corticofugal άξονες (Denaxa et al., 2001).

Παλιότερη δημοσίευση του εργαστηρίου μας (Denaxa et al., 2001) έδειξε ότι TAG-1 εκφράζεται στο ποντίκι κατά την εμβρυϊκή ηλικία E12.5, στην περιοχή της προφλοιικής πλάκας (PP). Στα επόμενα εμβρυϊκά στάδια και αφού γίνει ο διαχωρισμός της προφλοιικής πλάκας (PP) σε επιχείλια ζώνη (MZ) και υποφλοιική πλάκα (SP), η TAG-1 εντοπίζεται στην επιχείλια ζώνη (MZ) και στην διάμεση ζώνη (IZ) (Εικ.6). Πειράματα DiI σε συνδυασμό με ανοσοϊστοχημεία, έδειξαν ότι η TAG-1 εκφράζεται στους corticofugal άξονες. Παρόλα αυτά τα γονιδιακά ζώα ελλειμματικά για την TAG-1 (TAG-1 KO) δεν παρουσιάζουν κάποιο πρόβλημα όσον αφορά τον αριθμό ή την μορφολογία των συγκεκριμένων αξόνων (Vidaki M.).

Οι TAG-1⁺ corticofugal άξονες, φαίνεται να παίζουν ρόλο στην μετανάστευση των ενδονευρώνων. Σε πειράματα αναστολής της δράσης της TAG-1 in vitro, παρατηρήθηκε μείωση στον αριθμό των μεταναστεύοντων ενδονευρώνων, οδηγώντας στην υπόθεση ότι οι συγκεκριμένοι άξονες πιθανόν να αποτελούν το υπόστρωμα για την μετανάστευση των ενδονευρώνων (Denaxa et al, 2001). Από την άλλη, μελέτη

του ελλειμματικού για την TAG-1 ζώου δεν έδειξε κάποια σημαντική αλλαγή στον αριθμό των μεταναστεύοντων ενδονευρώνων (Denaxa, Kyriakoroulou et al, 2005). Έτσι, ο ρόλος της συγκεκριμένης πρωτεΐνης και των συγκεκριμένων αξόνων στην μετανάστευση των ενδονευρώνων από τα βασικά γάγγλια στον φλοιό παραμένει αμφιλεγόμενος.



Εικ.6: Στην εικόνα A βλέπουμε με ανοσοϊστοχημεία σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλου (mE12.5) την έκφραση της πρωτεΐνης TAG-1 στην προφλοιική πλάκα (PP). Στην εικόνα B, βλέπουμε την έκφραση το αντίστοιχο στην ηλικία E14.5. (Denaxa et al.,2001)

Οι καθοδηγητικοί νευρώνες (pioneer neurons), όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, συναντιούνται στην προφλοιική πλάκα (PP) και στην συνέχεια στην υποφλοιική πλάκα (SP) και παίζουν σημαντικό ρόλο στην εγκαθίδρυση νευρικών δικτύων. Σύμφωνα με μια πρόσφατη δημοσίευση, υπάρχει μια άλλη ομάδα καθοδηγητικών νευρώνων, που μετά την διάσπαση της προφλοιικής πλάκας (PP), συναντιούνται στην επιχείλια ζώνη (MZ). Η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα ονόμασε τους νευρώνες αυτούς μη υποφλοιικούς καθοδηγητικούς νευρώνες (non-subplate pioneer neurons). Οι μη υποφλοιικοί καθοδηγητικοί νευρώνες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες σε αυτούς που εκφράζουν L1 και εκτείνουν άξονες προς τα βασικά γάγγλια αλλά αποφεύγουν την έσω κάψα και σε αυτούς που εκφράζουν TAG-1 και εκτείνουν άξονες προς την έσω κάψα (Espinosa et al, 2009). Βέβαια, η λειτουργία των συγκεκριμένων νευρώνων δεν έχει μέχρι τώρα μελετηθεί και έτσι δεν έχει εξακριβωθεί αν η λειτουργία τους είναι διαφορετική από αυτή των καθοδηγητικών νευρώνων της υποφλοιικής πλάκας (SP).

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο γενικότερος σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η μελέτη του ρόλου των corticofugal αξόνων στην ανάπτυξη του εγκεφάλου. Σύμφωνα με παλιότερη δημοσίευση του εργαστηρίου μας, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η πρωτεΐνη TAG-1 εκφράζεται από τους corticofugal άξονες (Denaxa, 2003). Έτσι, ο ειδικότερος στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη ενός συγκεκριμένου πληθυσμού corticofugal αξόνων που εκφράζουν TAG-1 και ο ρόλος των συγκεκριμένων αξόνων στην ανάπτυξη του εγκεφάλου.

Πιο συγκεκριμένα με την χρήση των διαγονιδιακών ζώων $Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}$, θα επιτευχθεί η απαλοιφή των TAG-1+ corticofugal αξόνων μέσω της διασταύρωσης με την διαγονιδική σειρά $Emx1^{Cre}$. Έτσι στα ζώα $Emx1^{Cre};Tag1^{DTA}$, θα χρησιμοποιηθούν για να μελετηθεί:

α) Ο ρόλος των TAG-1+ corticofugal αξόνων στην ανάπτυξη του εγκεφάλου.

β) Ο ρόλος των TAG-1+ corticofugal αξόνων στην καθοδήγηση των θαλαμοφλοιικών αξόνων και στην μελέτη της ισχύος της handshake υπόθεσης.

Επιπλέον η μελέτη των $Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}$ ζώων, λόγω του ότι η πρωτεΐνη GFP εκφράζεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της TAG-1, θα μας δώσει πληροφορίες σχετικά με την μοίρα που ακολουθούνε οι TAG-1+ corticofugal άξονες κατά την ανάπτυξη. Έτσι θα έχουμε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα, σχετικά με τον ρόλο των συγκεκριμένων αξόνων στην ανάπτυξη του εγκεφάλου.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα εξής πειραματόζωα:

- 1) Διαγονιδιακά ζώα Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}, (C57B110/CBA). Στα συγκεκριμένα ζώα, η έκφραση του γονιδίου eGFP (enhanced GFP) βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της TAG-1. Καθοδικά και ανοδικά του eGFP υπάρχουν θέσεις loxP και δίπλα από την δεύτερη θέση loxP βρίσκεται το γονίδιο που κωδικοποιεί την τοξίνη DTA (Diphtheria Toxin subunit A). Μέσω ελεγχόμενης επαγωγής Cre ρεκομπινάσης το τμήμα μεταξύ των δύο loxP θέσεων απομακρύνεται και το DTA έρχεται πλησιέστερα στον υποκινητή της TAG-1 όπου και εκφράζεται. Η παραπάνω πλασμιδιακή κατασκευή πραγματοποιήθηκε από τη Μαρίνα Βιδάκη.
- 2) Διαγονιδιακά ζώα Emx1^{Cre}, (C57B110/CBA). Στα συγκεκριμένα ζώα η έκφραση της Cre ρεκομπινάσης βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου Emx1 (Iwasato et al,2004).

2. ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ

2.1 Απομόνωση Γενομικού DNA από ιστούς

Τμήμα της ουράς του ζώου αφαιρείται και χρησιμοποιείται για απομόνωση γενετικού υλικού και γονοτύπηση. Για την απομόνωση γενομικού DNA από το τμήμα ουράς ακολουθεί η πιο κάτω διαδικασία:

1. Η ουρά επώαζεται 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 πρωτεΐνάσης K (20 mg/ml) στους 55 °C ώσπου να διαλυθεί.
2. Προσθήκη RNase (10 mg/ml) και επώαση στους 37 °C για 10'.
3. Προσθήκη 400μl φαινόλης και ήπια ανάδευση για 10' σε θερμοκρασία δωματίου.
4. 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.

6. Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου και ήπια ανάδευση για 10' σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Φυγοκέντρηση για 5' στις 13000rpm στους 10°C και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα σωληνάρια.
8. 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.

2.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την γονοτύπηση των Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA} και Emx1^{Cre} ζώων αναφέρονται στον πιο κάτω πίνακα:

| Εκκινητές | Συνθήκες |
|--|---|
| DTANcoI-F1: 5'-ccatggatcctgatgatgtgttg-3' DTAEcoRI-R1: 5'-gaattctcacaagaatcgctgaacacg-3' DTA band: 599bp | 4 min 94°C 30'' 94°C } 33x 45'' 61°C } 1min 72°C } 5 min 72°C |
| TK142: 5'-atccgaaaagaaaacgttga-3' TK140: 5'-atccaggttacggatatagt-3' Cre band: 600bp | 4 min 94°C 30'' 94°C } 32x 40'' 54°C } 1min 72°C } 5 min 72°C |

3. ΒΑΣΙΚΕΣ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Επεξεργασία ιστών για κρυτομές

Σε περίπτωση ενήλικων ζώων αρχικά, αναισθητοποιούμε τα ζώα με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση φαινοβαρβιτάλης (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% παραφορμαλδεΐδης (PFA) σε 1xPBS. Όταν ολοκληρωθεί η έγχυση, απομονώνεται ο εγκέφαλος.

Στην συνέχεια, η διαδικασία είναι η ίδια με την περίπτωση εμβρυικών εγκεφάλων.

1. Ο ιστός τοποθετείται 4% παραφορμαλδεΐδης σε 1xPBS στους 4°C για 12-18 ώρες.
2. Πλύση με 1x PBS
3. Επώαση του ιστού στους 4°C, σε διάλυμα 30% σουκρόζης σε 1x PBS έως ότου καταβυθιστεί, για κρυοπροστασία.
4. Έγκλιση του ιστού σε πήκτωμα 15% σουκρόζης και 7,5% ζελατίνης σε 1x PBS.
5. Πάγωμα του ιστού σε ισοπεντάνιο, στους -45°C και φύλαξη στους -80°C, έως ότου κοπεί σε κρυοτόμο σε τομές πάχους 14-16μm. Οι τομές συλλέγονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και μπορούν να διατηρηθούν στους -20°C.

3.2. Επεξεργασία ιστών για τομές σε μικροτόμο δόνησης (vibratome)

Απομόνωση εγκεφάλων μέσα σε 1x PBS και μονιμοποίηση τους σε 4% PFA μετά από επώαση 12-18 ώρες στους 4°C.

1. Έγκλιση του ιστού σε πήκτωμα 4% αραρόζης χαμηλού σημείου τήξεως, σε 1x PBS.
2. Ο ιστός κόβεται σε vibratome μέσα σε 1x PBS, σε τομές πάχους 60μm, οι οποίες συλλέγονται με την βοήθεια πινέλου τοποθετούνται σε 1x PBS και διατηρούνται στους 4°C.

4. ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΧΡΩΣΕΙΣ

4.1. Χρώση Cresyl Violet

1. Τομές κρυοτόμου εμβαπτίζονται με την ακόλουθη σειρά σε 95% αιθανόλη για 15', 70% αιθανόλη και 50% αιθανόλη για 1', αντίστοιχα.
2. Εμβάπτιση σε d H₂O αρχικά για 2' και στην συνέχεια για 1'.
3. Χρώση των τομών μέσω επώασης σε δια/μα 0.1% Cresyl Violet για 5'.
4. Εμβάπτιση 2x σε d H₂O από 1'.
5. Γρήγορες εμβαπτίσεις (περίπου πέντε), σε 50% αιθανόλη, 70% αιθανόλη+οξικό οξύ(1%), 95% και 100% αιθανόλη.
6. Τοποθέτηση σε ξυλόλη για 5'.
7. Προσθήκη μέσου entellan και τοποθέτηση καλυπτρίδων.

4.2. Χρώση Nissl

1. Τοποθέτηση τομών κρυοτόμου σε δια/μα αιθανόλη-χλωροφόρμιο (1:1) 12-18ώρες (ή και ολονύκτια) σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Εμβαπτίσεις σε 95% και σε 100% αιθανόλη για 5', αντίστοιχα.
3. Χρώση των τομών σε 0.1% Cresyl Violet για 5-10' στους 50°C.
4. Γρήγορες πλύσεις σε dH₂O.
5. Εμβαπτίσεις σε 95% αιθανόλη για 2-3 λεπτά και σε 100% αιθανόλη για 2x5'.
6. Τοποθέτηση σε ξυλόλη 2 x 5'.
7. Προσθήκη μέσου entellan και τοποθέτηση καλυπτρίδων.

4.3. Ανοσοϊστοχημεία σε τομές κρυοτόμου από εγκέφαλο ενήλικων ζώων

1. Δευτερογενής μονιμοποίηση των τομών σε ακετόνη 100% για 10' στους -20°C
2. Πλύση των τομών σε 1xPBS, 3 x 5' σε θερμοκρασία δωματίου.
3. 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.
4. 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.
6. 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'.
8. Επώαση με To-Pro3 iodide (invitrogen) σε αραιώση 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.
10. 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 συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού είτε να αποθηκευτούν στους 4 °C ή στους -20 °C.

4.4. Ανοσοϊστοχημεία σε τομές κρυοτόμου και μικροτόμου δόνησης από εγκέφαλους εμβρύων

4.4.A Για τομές κρυοτόμου

1. Πλύση των τομών σε PBS1x + 0,1% Triton, (1x PBT) για 5' σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων με 5% Fetal Bovine Serum (FBS) σε 1x PBT (blocking solution) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Επώαση των τομών με πρωτοταγές αντίσωμα, αραιωμένο σε 0,5% FBS σε 1x PBT (antibody solution), για 12-18 ώρες στους 4°C.
4. Πλύση των τομών σε 1xPBT, 3 x 5' σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Επώαση των τομών με δευτεροταγές αντίσωμα αραιωμένο σε antibody solution, για 2 ώρες στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Πλύση των τομών με 1x PBT, 3 x 5'.
7. Επώαση με To-Pro3 iodide σε αραιώση 1:1000 σε 1x PBS για 3' σε θερμοκρασία δωματίου, για τη σήμανση των πυρήνων
8. Πλύση των τομών με 1x PBT για 3 x 5' σε θερμοκρασία δωματίου
9. Προσθήκη 60 μl του μέσου προστασίας του φθορισμού Mowiol και καλυπτρίδων

4.4.B. Για τομές μικροτόμου δόνησης

1. Πλύση των τομών σε PBS1x + 0,1% Triton, (1x PBT) για 5' σε θερμοκρασία δωματίου

2. Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων με 5% Fetal Bovine Serum (FBS) σε 1x PBT (blocking solution) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
3. Επώαση των τομών με πρωτοταγές αντίσωμα, αραιωμένο σε 0,5% FBS σε 1x PBT (antibody solution), για 12-18 ώρες στους 4°C
4. Πλύση των τομών σε 1xPBS, 3 x 10' σε θερμοκρασία δωματίου
5. Επώαση των τομών με δευτεροταγές αντίσωμα αραιωμένο σε antibody solution, για 2 ώρες στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου
6. Πλύση των τομών με 1x PBS, 3 x 10'
7. Επώαση με To-Pro3 iodide σε αραιώση 1:1000 σε 1x PBS για 3' σε θερμοκρασία δωματίου, για τη σήμανση των πυρήνων
8. Πλύση των τομών με 1x PBS για 10' σε θερμοκρασία δωματίου
9. Οι τομές εμβαπτίζονται σε δ/μα 0.2% (m/v) ζελατίνης (porcine skin gelatin) σε dH₂O με 50 mM Tris HCl, pH7.5.
10. Προσθήκη 60 μl του μέσου προστασίας του φθορισμού Mowiol και καλυπτρίδων.

| Πρωτοταγή αντισώματα | Αραίωση | Ισότυπος |
|--|----------------|-----------------|
| 4D7(Developmental Studies Hybridoma Bank) | 1:1000 | Mouse IgM |
| Anti-GFP (Minotech) | 1:5000 | Rabbit IgG |
| Anti-GFP (Nacalai Tesque) | 1:1000 | Rat IgG |
| Anti-Caspase3 (Millipore) | 1:200 | Rabbit IgG |
| Anti-Neurofilament (COVANCE) | 1:500 | Rabbit IgG |
| Anti-Tbr1 (Abcam) | 1:100 | Rabbit IgG |
| Anti-GABA (Sigma) | 1:1000 | Rabbit IgG |

| Δευτεροταγή αντισώματα | Αραίωση |
|---|----------------|
| Goat-anti-mouse IgG_ALEXA 555 (Molecular Probes) | 1:800 |
| Goat-anti-rabbit IgG_ALEXA 488 (Molecular Probes) | 1:800 |
| Goat-anti-rabbit IgG_ALEXA 555 (Molecular Probes) | 1:800 |
| Donkey-anti-Rat-IgG_ALEXA 488 (Molecular Probes) | 1:800 |

4.5. Υβριδοποίηση in situ για τον εντοπισμό mRNA σε κρυοτομές

4.5.A. Παρασκευή του ανιχνευτή (probe) με μεταγραφή in vitro

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι πρόσφατα παρασκευασμένα και απαλλαγμένα από ριβονουκλεάσες (RNases).

1. Σε αποστειρωμένα erpedorf tubes (1.5ml) προσθέτουμε με την ακόλουθη σειρά:
 - nuclease free H₂O 7μl
 - 5x transcription buffer 4μl
 - 0,1 M DTT 2μl
 - 10 mM rGTP 1μl
 - 10 mM rCTP 1μl
 - 10 mM rUTP 1μl
 - 10 mM 11-DIGrUTP 0.35 μl
 - RNAsin 1μl
 - RNA polymerase 1μl
 - 1μg/μl linear template DNA
2. Έπώαση για τουλάχιστον 2 ώρες στους 37°C
3. Ποσότητα 1 μl ηλεκτροφορεύεται για έλεγχο/ποσοτικοποίηση του ανιχνευτή
4. Προσθήκη 2 μl DNase RNase free για 15' στους 37°C
5. Προσθήκη: 90μl EDTA, 12μl LiCl 4 M, 360 μl EtOH και επώαση για τουλάχιστον 30 λεπτά στους -20°C.
6. Φυγοκέντρηση στις 12000rpm, 15 λεπτά στους 4°C
7. Το RNA αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλύεται σε 100μl T.E. Μέχρι την χρήση του διατηρείται στους -20°C ή -80°C.

| Μόριο | Πλασμιδιακός Φορέας | Μη νοηματικό RNA Antisense RNA | |
|--------|---------------------|-----------------------------------|------------|
| | | Ένζυμο | Πολυμεράση |
| ER81 | pBL | SpeI | T7 |
| RoRβ | pBL | XhoI | T3 |
| Reelin | pBL | XhoI | T3 |

4.5.B Πρωτόκολλο Υβριδοποίησης σε τομές κρυοτόμου

1. Επώαση των τομών με 4% PFA, 10' σε θερμοκρασία δωματίου
2. Πλύσεις με 1xPBS, 3 x 5'
3. Ακετυλίωση των τομών με δ/μα: 4ml τριαιθανολαμίνη, 0.525 ml HCl (37%) και 0.75ml οξικός ανυδρίτης σε 295 ml H₂O, για 10' σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Επώαση για 30' σε θερμοκρασία δωματίου σε 1xPBS + 1% Triton
5. Πλύσεις με 1x PBS, 3 x 10'
6. Προϋβριδοποίηση των τομών σε δ/μα το οποίο περιέχει: 50% φορμαμίδιο, 5xSSC, 5x Denharts, 250mg/ml yeast RNA, 500mg/ml herring sperm DNA, για 6 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή για 12-18 ώρες στους 4°C
7. Υβριδοποίηση των τομών με 400ng/ml ανιχνευτή RNA σημασμένου με διγοξυγενίνη (DIG-labeled-probe), σε δ/μα προϋβριδοποίησης, για 12-18 ώρες, στους 72°C
8. Μεταφορά των τομών σε δ/μα 0,2xSSC, για 1 ώρα στους 72°C
9. Μεταφορά των τομών σε δ/μα 0,2x SSC, για 5' σε θερμοκρασία δωματίου
10. Πλύσεις των τομών σε δ/μα B1 που περιέχει 0.1M Tris pH7.5, 0.15M NaCl, 3x 5'.
11. Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του αντισώματος με 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) σε δ/μα B1, 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Επώαση των τομών σε αντίσωμα anti-DIG-AP(Roche) αραιωμένο 1: 5000 σε 1% FBS σε δ/μα B1, για 12-18 ώρες στους 4°C
13. Πλύσεις των τομών με δ/μα B1, 3 x 10'
14. Πλύσεις των τομών με δ/μα B2 που περιέχει: 0.1M Tris pH9.5, 0.1M NaCl, 50mM MgCl₂, 3 x10'
15. Επώαση με το χρωμογόνο διάλυμα: 75mg/ml NBT (Nitroblue tetrazolium chloride, Roche) και 50mg/ml BCIP(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate,4-toluidine salt, Roche) σε διάλυμα B2. Η αντίδραση πραγματοποιείται στο σκοτάδι, μέχρι να δώσει ικανοποιητική χρώση.
16. Πλύσεις των τομών σε 1x PBS, 3 x10'
17. Προσθήκη μείγματος 50% ζελατίνης και 50% γλυκερόλης και καλυπτρίδων στις τομές.

|

5. ΣΗΜΑΝΣΗ ΜΕ DiI

Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης μελέτης πραγματοποιήθηκε σήμανση τόσο των θαλαμοφλοιικών όσο και των φλοιοθαλαμικών αξόνων με 1,1' -dioctodecyl-3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanine (DiI) σε εγκεφάλους από έμβρυα. Το συγκεκριμένο μόριο είναι λιπόφιλο και ενσωματώνεται στην κυτταρική μεμβράνη των νευρικών κυττάρων. Έτσι μέσω διάχυσης είναι δυνατή η σήμανση τόσο των κυτταρικών σωμάτων, όσο και των καθοδηγητικών αποφύσεων και των αξόνων των νευρώνων.

Στη συγκεκριμένη εργασία, χρησιμοποιήθηκαν μονιμοποιημένοι εγκεφαλοι, οι οποίοι επώαστηκαν για 12-18 ώρες σε 4% PFA στους 4°C. Κρύσταλλοι DiI τοποθετήθηκαν είτε στο φλοιό είτε στο θάλαμο. Έπειτα, οι εγκεφαλοι τοποθετήθηκαν σε 1xPBS με 0.01%NaN₃ στο σκοτάδι, στους 37 °C για 47 μέρες στην περίπτωση εγκεφάλων εμβρυικής ηλικίας E18.5.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων μετά την διαδικασία της σήμανσης οι εγκεφαλοι εγκλείονται σε πήκτωμα 4% αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως σε 1xPBS και κόβονται σε vibratome μέσα σε 1x PBS, σε τομές πάχους 100-150μm.. Στην συνέχεια, για την παρατήρηση των τομών, οι τομές εμβαπτίζονται σε δ/μα 0.2% (m/v) ζελατίνης (porcine skin gelatin) σε dH₂O με 50 mM Tris HCl, pH7.5 και με τη βοήθεια πινέλου τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Έπειτα προστίθεται 60 μl του μέσου προστασίας του φθορισμού Mowiol και καλυπτρίδα.

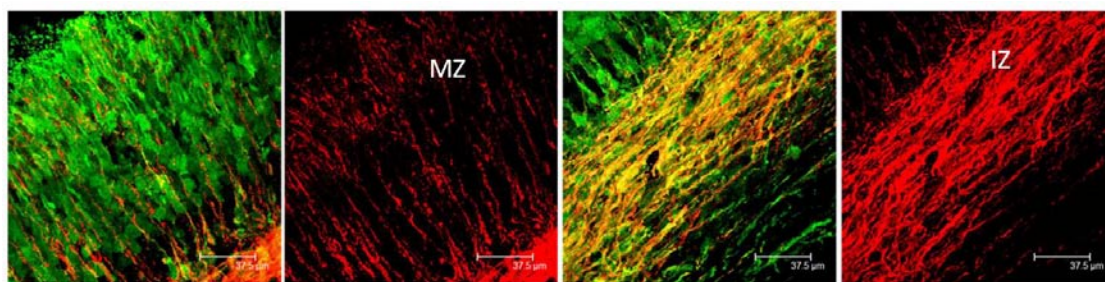
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Α. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ GFP ΣΤΑ *Tag1*

loxP-GFP-loxP-DTA ΖΩΑ

Προκειμένου να μελετήσουμε το πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης TAG-1, ειδικότερα σε ενήλικα στάδια, δημιουργήθηκαν τα ζώα *Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}*. Μέσω της μελέτης του προτύπου έκφρασης της πρωτεΐνης GFP μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες για το πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης TAG-1. Ένα από τα πρώτα πειράματα που έγιναν, στόχο είχαν την ανίχνευση συνεντοπισμού μεταξύ των πρωτεϊνών GFP και TAG-1. Έτσι μετά από μια σειρά πειραμάτων ανοσοιστοχημείας, καθορίστηκε αν τα συγκεκριμένα ζώα είναι κατάλληλα για να χρησιμοποιηθούν για τον πιο πάνω σκοπό.

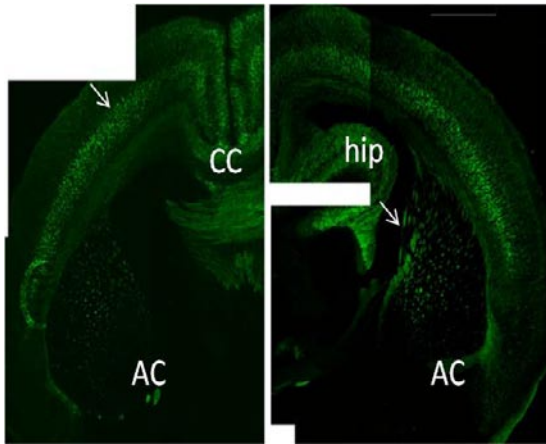
Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν στεφανιαίες τομές εγκεφάλων από διάφορα αναπτυξιακά στάδια (E11.5- E17.5) με έμφαση στα E12.5- E15.5 (Εικόνα 1), στάδια στα οποία η πρωτεΐνη TAG-1 ανιχνεύεται σε πολύ υψηλά επίπεδα μέσω ανοσοιστοχημείας. Βέβαια, μιας και η πρωτεΐνη GFP είναι κυτταροπλασματική ενώ η πρωτεΐνη TAG-1 είναι διαμεμβρανική, δεν μπορεί να υπάρξει πλήρης αλληλεπικάλυψη (όπου πράσινο και κόκκινο). Πέρα από αυτό, πατηρήθηκε μεγάλο ποσοστό αλληλεπικάλυψης και άρα τα ζώα αυτά αποτελούν ένα σωστό εργαλείο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον σκοπό της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.



Εικόνα 1: Ανοσοιστοχημεία με τη χρήση αντισωμάτων 4D7 (για την ανίχνευση TAG-1) (κόκκινο) και GFP (πράσινο) σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλων αναπτυξιακής ηλικίας E15.5. Ενδιάμεση ζώνη (Intermediated Zone, IZ), επιφανειακή επιχείλια ζώνη (Marginal Zone, MZ).

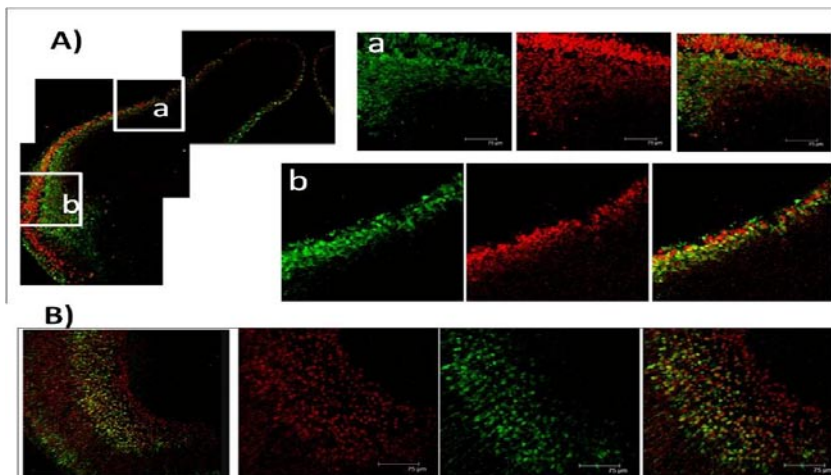
Επιπλέον, το συγκεκριμένο ζώο λόγω του ότι η έκφραση του GFP βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της TAG-1, μας επιτρέπει έμμεσα να μελετήσουμε το πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης TAG-1 σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια στα οποία η πρωτεΐνη (TAG-1) δεν είναι ανιχνεύσιμη με μεθόδους

ανοσοιστοχημείας πράγμα αντίθετο με τα αποτελέσματα πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης για την πρωτεΐνη. Πειράματα για την μελέτη του προτύπου έκφρασης της TAG-1 έγινε χρησιμοποιώντας στεφανιαίες τομές εγκεφάλων αναπτυξιακού σταδίου P0 (postnatal day 0) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2 : Ανοσοιστοχημεία για την ανίχνευση της πρωτεΐνης GFP σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλων P0. Παρατηρούμε έκφραση της GFP στο Anterior Commisure(AC) στο μεσολόβιο (Corpus Callosum CC), στον ιππόκαμπο(hip), σε συγκεκριμένο πληθυσμό νευρικών κυττάρων στο νεοφλοιό αλλά και σε υποφλοιικούς άξονες (βελάκια).

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοιστοχημείας για την πρωτεΐνη GFP σε συνδυασμό με άλλους μάρτυρες για κυτταρικούς υποπληθυσμούς των στοιβάδων του φλοιού, ώστε να εξακριβωθεί η ταυτότητα του συγκεκριμένου κυτταρικού υποπληθυσμού που εκφράζει την πρωτεΐνη TAG-1 σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Ένας τέτοιος μάρτυρας είναι και ο μεταγραφικός παράγοντας Tbr1, οποίος εκφράζεται πολύ νωρίς στην ανάπτυξη από τους νευρώνες της υποφλοιικής πλάκας (subplate, SP), ενώ στα τελευταία εμβρυϊκά στάδια και μετά την γέννηση εκφράζεται από τους νευρώνες της στοιβάδας 6 (φλοιοθαλαμικούς). (Εικόνα 3). Με τον τρόπο αυτό λαμβάνουμε πληροφορίες για τους κυτταρικούς πληθυσμούς ή/και την μοίρα των κυτταρικών πληθυσμών που έκφρασαν ή εκφράζουν TAG-1 (lineage).



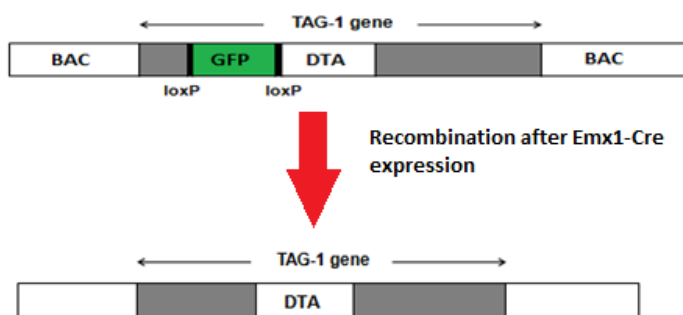
Εικόνα3: Ανοσοιστοχημεία για Tbr1 (κόκκινο) και για GFP (πράσινο).Στις εικόνες: A)παρατηρούμε συνεντοπισμό της έκφρασης του GFP και Tbr1 σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλων ηλικίας E13.5, B) χρησιμοποιήθηκαν στεφανιαίες τομές αναπτυξιακής ηλικίας P0.

B. ΑΠΑΛΟΙΦΗ ΤΩΝ TAG-1⁺ CORTICOFUGAL ΑΞΟΝΩΝ

Για την απαλοιφή των TAG-1⁺ corticofugal αξόνων, τα ζώα Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA} διασταυρώθηκαν με τη διαγονιδιακή σειρά Emx1^{Cre}. Στα Emx1^{Cre}, η Cre ρεκομπινάση εκφράζεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου Emx1, η έκφραση του οποίου περιορίζεται στο νεοφλοιό.

Το Emx1 είναι ένα homeobox γονίδιο ομόλογο με το γονίδιο *ems* της *Drosophila* (empty spiracles). Αρχίζει να εκφράζεται από το αναπτυξιακό στάδιο E9.5 και συνεχίζει μέχρι και την ενήλικη ζωή (Chan. C.H et al, 2001). Κατά τα αρχικά στάδια της νευρογένεσης το γονίδιο Emx1 εκφράζεται σχεδόν σε όλα τα μιτωτικά κύτταρα και σε όλους τους φλοιικούς νευρώνες ανεξάρτητα από το στάδιο διαφοροποίησης στο οποίο βρίσκονται (Cecchi & Boncinelli, 2000). Επιπλέον, δεν εκφράζεται στο ραχιαίο θάλαμο (dorsal thalamus) ή κατά μήκος του μονοπατιού των θαλαμοφλοιικών αξόνων (Bishop K.M et al., 2003).

Έτσι, μέσω της συγκεκριμένης διασταύρωσης, η έκφραση της Cre ρεκομπινάσης στην περιοχή του νεοφλοιού οδηγεί στην απομάκρυνση της περιοχής μεταξύ των loxP θέσεων (απομάκρυνση του eGFP) και το γονίδιο DTA (diphtheria toxin A subunit), έρχεται πλησιέστερα στον υποκινητή της TAG1 και εκφράζεται. Λόγω της τοξικότητας του τα κύτταρα που εκφράζουν DTA πεθαίνουν. Η επαγωγή του ανασυνδυασμού και η έκφραση του DTA, αναμένεται πολύ νωρίς κατά την ανάπτυξη μετά την εμβρυϊκή μέρα E11.5, καθώς τότε αρχίζει να εκφράζεται η TAG-1 και συνεχίζει να εκφράζεται το Emx1 (Σχήμα 1).

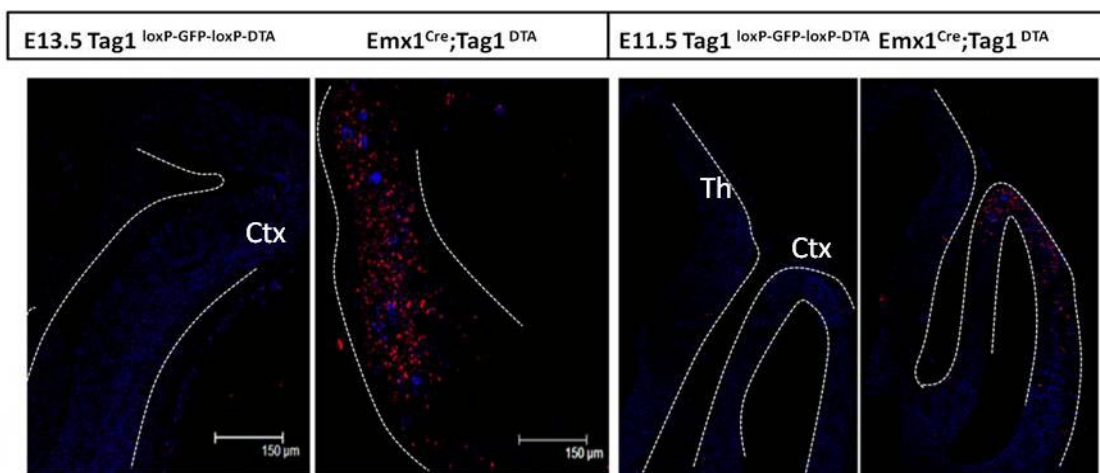


Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας του ανασυνδυασμού μετά την έκφραση του γονιδίου Emx1, που οδηγεί στην έκφραση της τοξίνης DTA.

1B. Έλεγχος του προτύπου κυτταρικού θανάτου

Για την επιβεβαίωση του επιτυχούς ανασυνδυσμού στα διαγονιδιακά ζώα και επομένως της απαλοιφής των TAG-1+ corticofugal αξόνων, έγινε μια σειρά από πειράματα για την ύπαρξη κυτταρικού θανάτου σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια.

Για τον σκοπό αυτό έγιναν πειράματα ανοσοιστοχημείας για τον εντοπισμό της έκφρασης της ενεργού μορφής της Caspase3, που είναι γνωστός μάρτυρας αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοιστοχημείας σε οβελιαίες κρυτομές από εγκεφάλους E11.5, E12.5, E13.5, E15.5 και P0 στα οποία παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα κυτταρικού θανάτου στα $Emx1^{Cre};Tag1^{DTA}$ σε σχέση με τα $Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}$ (μάρτυρες) ζώα. Το συγκεκριμένο πρότυπο αύξησης του κυτταρικού θανάτου περιορίζεται στην περιοχή έκφρασης του $Emx1$ και στις ηλικίες E11.5-E13.5 (Εικόνα 4). Κατά τις αναπτυξιακές ηλικίες E15.5 και P0 δεν παρατηρούνται υψηλά επίπεδα κυτταρικού θανάτου στα ζώα $Emx1^{Cre};Tag1^{DTA}$, αντιθέτως δεν παρουσιάζουν κάποια διαφορά σε σύγκριση με το πρότυπο κυτταρικού θανάτου των $Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}$.

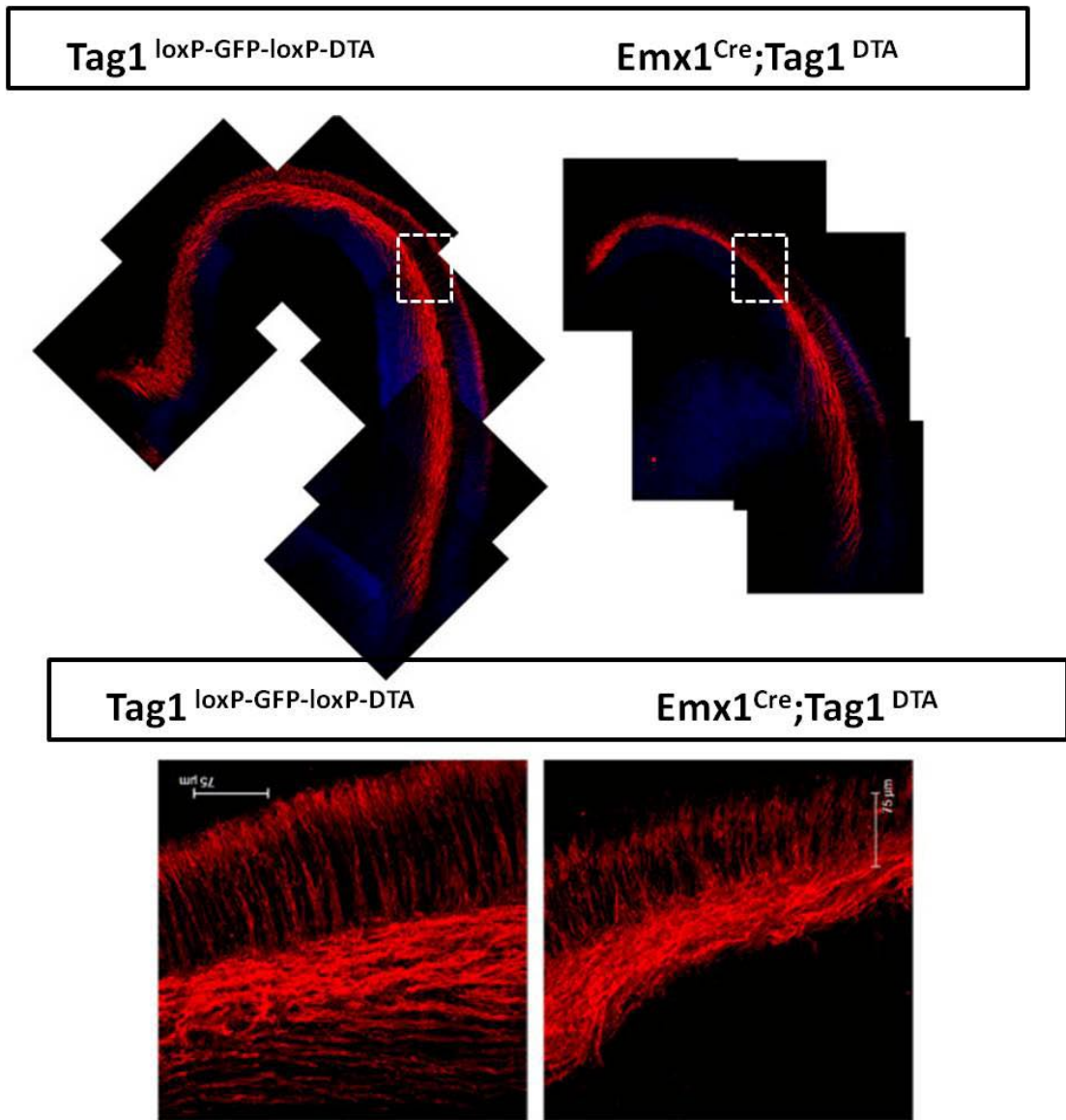


Εικόνα 4: Ανοσοιστοχημεία για τον εντοπισμό της έκφρασης της ενεργού μορφής της Caspase3 (κόκκινο), γνωστός μάρτυρας αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου, στα αναπτυξιακά στάδια E13.5 και E11.5.

2B. Έλεγχος της έκφρασης της TAG-1 πρωτεΐνης στα διαγονιδιακά ζώα

Μέσω του πιο πάνω πειράματος, επιβεβαιώσαμε την ύπαρξη κυτταρικού θανάτου στη σωστή περιοχή του φλοιού και στα σωστά αναπτυξιακά στάδια. Για να

επιβεβαιώσουμε και την απαλοιφή των TAG-1 corticofugal αξόνων, κάναμε ανοσοιστοχημεία σε τομές εγκεφάλων E15.5, από μικροτόμο δόνησης, για την πρωτεΐνη TAG-1 (Εικόνα 5).

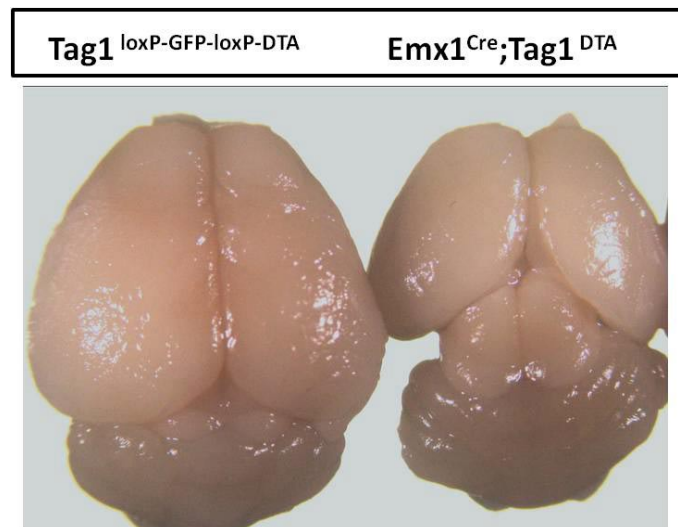


Εικόνα 5: Ανοσοιστοχημεία με την χρήση αντισώματος 4D7 σε τομές μικροτόμου δόνησης από εγκεφάλους αναπτυξιακού σταδίου E15.5.

Παρατηρήθηκε ότι δεν έγινε πλήρης απαλοιφή των TAG-1 corticofugal αξόνων στα $Emx1^{Cre};Tag1^{DTA}$ ζώα, παρόλα αυτά αξιοσημείωτη είναι η μείωση του αριθμού των αξόνων αυτών σε σύγκριση με τους TAG-1 corticofugal άξονες στα $Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}$ ζώα. Τα πιο πάνω μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο ανασυνδυασμός έγινε αλλά σε μικρότερο ποσοτό αξόνων από ότι απαιτείται για την απαλοιφή του συνόλου των TAG-1 corticofugal αξόνων.

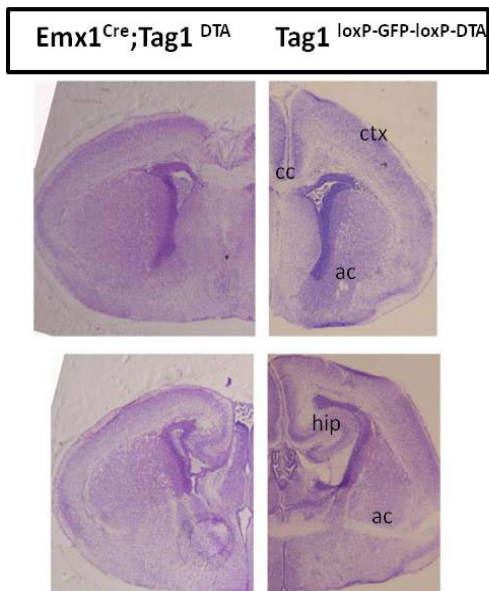
Γ. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ $Emx1^{Cre};Tag1^{DTA}$ ΖΩΩΝ

Στην συνέχεια ακολούθησε η μορφολογική μελέτη του εγκεφάλου καθώς και των βασικών αξόνων. Αρχικά μελετήθηκε μακροσκοπικά η μορφολογία του εγκεφάλου, κατά την ηλικία P35, όπου παρατηρήθηκε μεγάλη διαφορά όσον αφορά το μέγεθος του νεοφλοιού μεταξύ των εγκεφάλων των ζώων $Emx1^{Cre};Tag1^{DTA}$ και $Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}$ (Εικόνα 6).



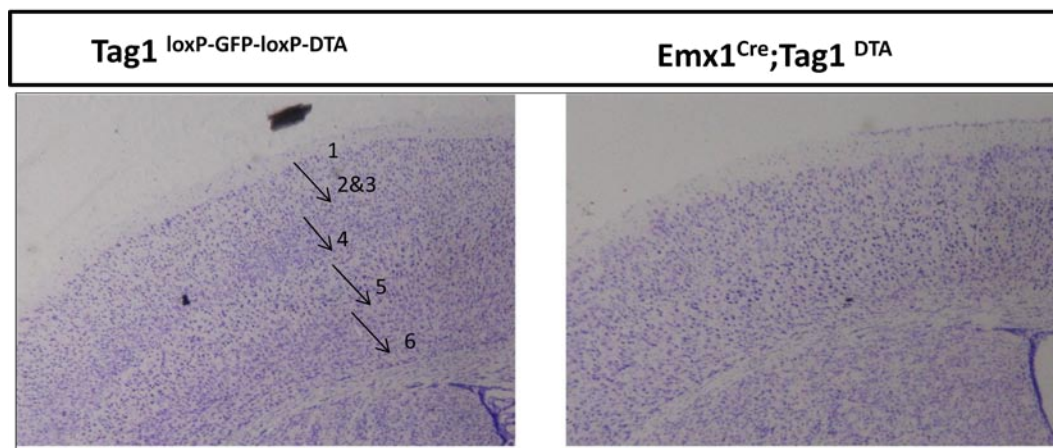
Εικόνα 6: Εγκέφαλοι ζώων ηλικίας P35. Αξιοσημείωτη η μεγάλη διαφορά στο μέγεθος του νεοφλοιού.

Στην συνέχεια έγιναν διάφορες ιστοχημικές χρώσεις σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. (Εικόνα 7 & 8). Μέσω των συγκεκριμένων ιστοχημικών χρώσεων παρατηρήθηκε ότι στα $Emx1^{Cre};Tag1^{DTA}$ ζώα ο φλοιός είναι πολύ μικρότερος σε σχέση με αυτό των $Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}$ ζώων. Επίσης, στα ζώα $Emx1^{Cre};Tag1^{DTA}$ απουσιάζει το anterior commissure και οι ίνες του μερολοβίου παρουσιάζουν διαφορετική μορφολογία σε σχέση με αυτές των $Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}$ ζώων και το μέγεθος του ιπποκάμπου είναι πιο μικρό.



Εικόνα 7 : Ιστολογικές χρώσεις Cresyl Violet σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλων ηλικίας P0. Από τις εικόνες παρατηρούμε την έλλειψη του anterior commissure (AC), αλλαγές στην μορφολογία του ιπποκάμου (Hippocampus, hip), του μεσολοβίου (Corpus Callosum, CC) και του νεοφλοιού (Cortex, Ctx).

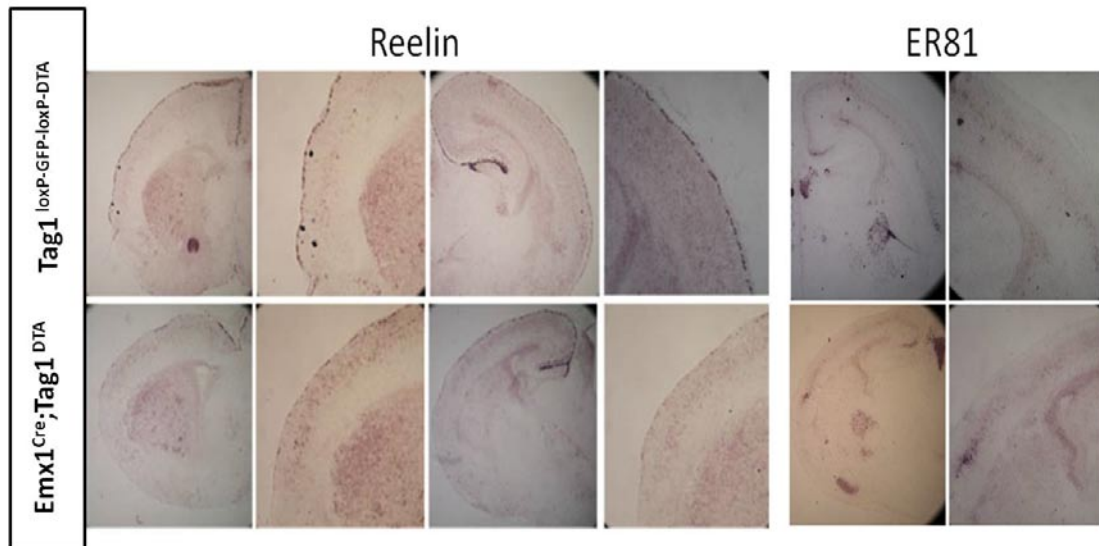
Επιπλέον, η οργάνωση των στοιβάδων του νεοφλοιού στα Emx1^{Cre};Tag1^{DTA} είναι διαφορετική σε σύγκριση με αυτή των Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA} ζώων (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Ιστολογική χρώση Nissl, σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλου από ζώα αναπτυξιακού σταδίου P35. Με βελάκια διακρίνονται οι έξι στοιβάδες του φλοιού.

Δ.ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΙΣ ΣΤΟΙΒΑΔΕΣ ΤΟΥ ΦΛΟΙΟΥ

Για να εξακριβώσουμε ποιες στοιβάδες και ποιοι υποπληθυσμοί νευρικών κυττάρων επηρεάζονται με την απαλοιφή των TAG-1⁺ corticofugal αξόνων, έγινε μια σειρά πειραμάτων υβριδοποίησης in situ για τον εντοπισμό mRNA μαρτύρων για διαφορετικούς πληθυσμούς κυττάρων που δομούν τις έξι διακριτές στοιβάδες του φλοιού. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ανιχνευτές για τα mRNA Reelin (layer I) και ER81 (layer V). (Εικόνα 8)



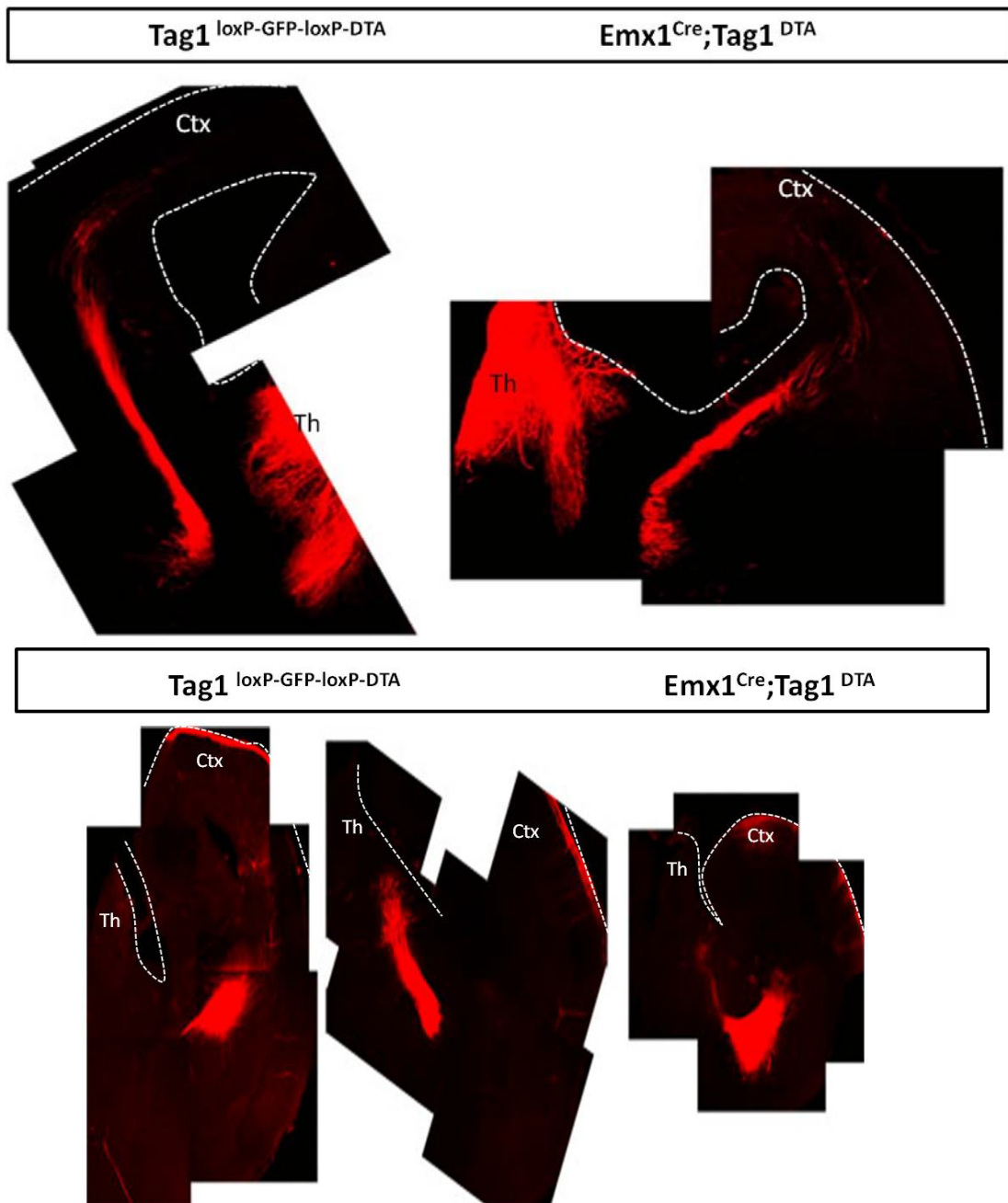
Εικόνα 8: Υβριδοποίηση In situ για τον εντοπισμό των mRNA Reelin (layer I) και ER81 (layer V) σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλων αναπτυξιακής ηλικίας P0.

Από την συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του mRNA Reelin στη στοιβάδα I, ενώ δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη διαφορά στο πρότυπο έκφρασης του mRNA ER81.

Ε. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗΣ ΤΩΝ ΘΑΛΑΜΟΦΛΟΠΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΛΟΙΟΘΑΛΑΜΙΚΩΝ ΑΞΟΝΩΝ

1Ε. Σήμανση με DiI των θαλαμοφλοιικών και φλοιοθαλαμικών αξόνων

Για την μελέτη του προτύπου καθοδήγησης των θαλαμοφλοιικών αλλά και των φλοιοθαλαμικών αξόνων έγιναν κάποια πειράματα σήμανσης με DiI. Μέσω του συγκεκριμένου πειράματος στόχο είχαμε να δούμε αν η μείωση των TAG-1 corticofugal αξόνων επηρεάζει την καθοδήγηση των θαλαμοφλοιικών αξόνων προς το φλοιό αλλά και τη διαδρομή που ακολουθούν οι εναπομείναντες corticofugal άξονες. Έτσι, κρύσταλλοι DiI τοποθετήθηκαν τόσο στην περιοχή του θάλαμου αλλά και του φλοιού σε εγκεφάλους εμβρύων E18.5, οι οποίοι επώαστηκαν για 47 μέρες σε σκοτάδι στους 37 °C (Εικόνα 9).

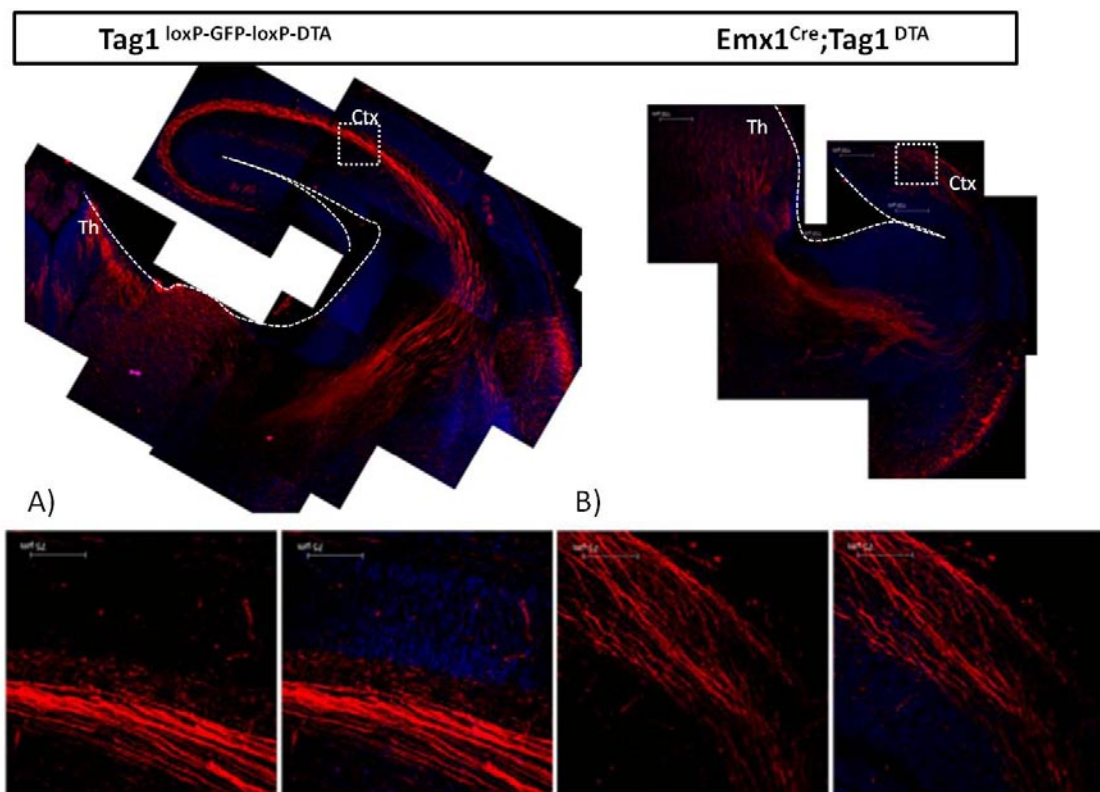


Εικόνα 9: Σήμανση των θαλαμοφλοιικών (πάνω) και των φλοιοθαλαμικών αξόνων (κάτω) μέσω τοποθέτησης κρυστάλλου DiI στο θάλαμο (Thalamus, Th) και στο φλοιό (Cortex, Ctx), αντίστοιχα, σε εγκεφάλους αναπτυξιακού σταδίου E18.5.

Μελέτη των τομών από τους συγκεκριμένους εγκεφάλους, δεν έδειξε κάποια αλλαγή στην καθοδήγηση των δυο αυτών ομάδων αξόνων προς τους στόχους τους στα **Emx1^{Cre};Tag1^{DTA}** ζώα σε σύγκριση με τα **Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}**.

2Ε. Μελέτη της καθοδήγησης με την χρήση ανοσοιστοχημείας (Nfm)

Για την απόκτηση περαιτέρω πληροφοριών όσον αφορά την καθοδήγηση των αξόνων χρησιμοποιήσαμε μεθόδους ανοσοιστοχημείας σε τομές εγκεφάλων από μικροτόμο δόνησης. Πιο συγκεκριμένα, έγιναν πειράματα ανοσοιστοχημείας για την πρωτεΐνη των ενδιάμεσων νευρικών ινιδίων (Neurofilament), πρωτεΐνη που εντοπίζεται στις αποφύσεις και στους άξονες των νευρώνων, σε τομές εγκεφάλων από έμβρυα ηλικίας E16.5 (Εικόνα 10).

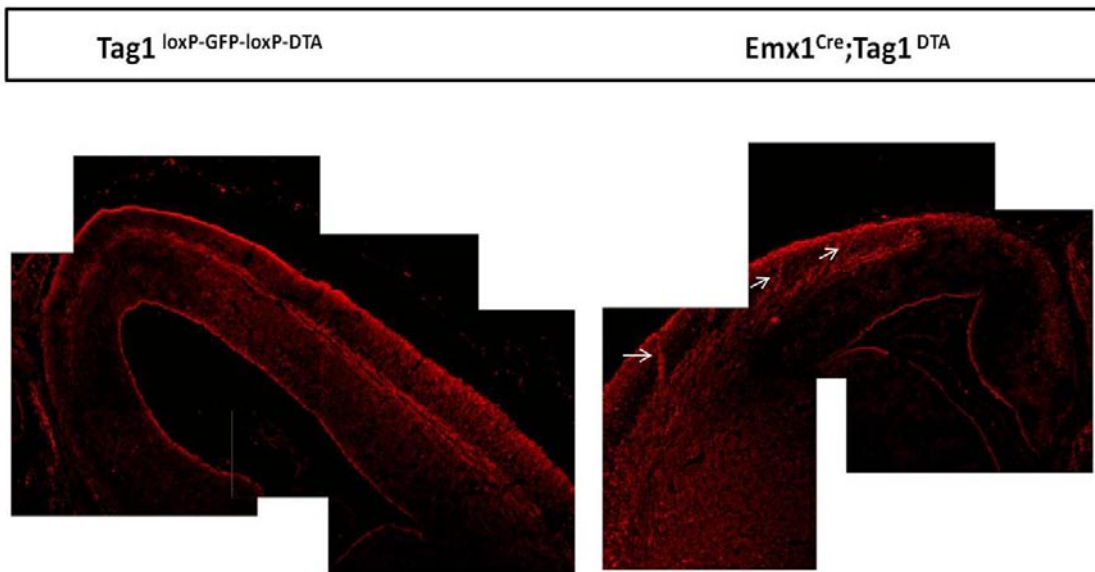


Εικόνα 10: Ανοσοιστοχημεία έναντι της πρωτεΐνης Nfm, σε στεφανιαίες τομές μικροτόμου δόνησης από εγκεφάλους αναπτυξιακής ηλικίας E16.5. Στις εικόνες A και B παρουσιάζονται περιοχές των εικόνων σε μεγαλύτερη μεγένθυση.

Από τις εικόνες που πήραμε παρατηρήσαμε πρόβλημα στην καθοδήγηση των αξόνων προς τον φλοιό, αλλά το πιο αξιοσημείωτο είναι το πρόβλημα στη σωστή διεύθυνση των αξόνων στον φλοιό (arborization) στα *Emx1^{Cre};**Tag1^{DTA}* σε σχέση με τα *Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}* (Εικόνα 10, A & B).

Z. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗΣ ΤΩΝ
ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΩΝ

Γνωρίζοντας τον πιθανό ρόλο των TAG-1 corticofugal αξόνων στην μετανάστευση των ενδονευρώνων, αποφασίσαμε να ελέγξουμε αν επηρεάζεται η μετανάστευση ή το πρότυπο μετανάστευσης μετά την μείωση του αριθμού των συγκεκριμένων αξόνων. Για τον σκοπό αυτό έγιναν πειράματα ανοσοιστοχημείας για την πρωτεΐνη GABA_A (υποδοχέας γ-αμινοβουτυρικού οξέος) σε στεφανιαίες κρυστομές από τα αναπτυξιακά στάδια E13.5 και E15.5 (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Ανοσοιστοχημεία για την ανίχνευση της πρωτεΐνης GABA_A, σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλων αναπτυξιακής ηλικίας E15.5. Παρατηρείται αλλαγή στο πρότυπο μετανάστευσης των ενδονευρώνων (βελάκια).

Παρατηρείτε αλλαγή σε ένα από τα χαρακτηρισικά μονοπάτια που ακολουθούν οι ενδονευρώνες προς τον φλοιό (IZ/SVZ και MZ) και πιο συγκεκριμένα στο μονοπάτι IZ/SVZ. Δυστυχώς, η ανοσοιστοχημεία δεν ήταν καλής ποιότητας αλλά ούτε και τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πολλά ώστε να οδηγηθούμε σε ένα ασφαλές συμπέρασμα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η έκφραση της πρωτεΐνης TAG-1 στον φλοιό και ο ρόλος των κυτταρικών πληθυσμών που εκφράζουν την πρωτεΐνη αυτή στην ανάπτυξη του φλοιού δεν έχουν πλήρως μελετηθεί. Μέχρι τώρα, μέσω πειραμάτων ανοσοιστοχημείας ανιχνεύουμε την συγκεκριμένη πρωτεΐνη στους corticofugal άξονες σε εμβρυϊκές ηλικίες ενώ μετά την γέννηση δεν μπορεί να ανιχνευθεί μέσω ανοιστοχημείας. Το γεγονός όμως ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη μπορεί να ανιχνευθεί μέσω πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης στον εγκέφαλο ενήλικων ζώων, δηλώνει την παρουσία της κατά τα ενήλικα στάδια χωρίς όμως να μπορούμε να γνωρίζουμε από ποιους κυτταρικούς πληθυσμούς εκφράζεται και ποιος είναι ο ρόλος της.

Για να μπορούμε εύκολα, να καθορίσουμε και να μελετήσουμε την έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, δημιουργήσαμε το συγκεκριμένο διαγονιδιακό ζώο Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}. Στο συγκεκριμένο διαγονιδιακό ζώο, η πρωτεΐνη GFP εκφράζεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της TAG-1 και αυτό μας επιτρέπει να μελετήσουμε την έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης ή και τον ρόλο των κυτταρικών πληθυσμών που έκφρασαν ή εκφράζουν TAG-1. Αρχικά, πειράματα ανοσοιστοχημείας σε εμβρυϊκά στάδια έδειξαν ότι υπάρχει μεγάλο ποσοστό αλληλοεπικάλυψη μεταξύ του προτύπου έκφρασης της TAG-1 και της πρωτεΐνης GFP. Βέβαια, το γεγονός ότι η πρωτεΐνη GFP είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη σε αντίθεση με την διαμεμβρανική TAG-1 που εκφράζεται κυρίως στους άξονες είναι ο κύριος λόγος που δεν υπάρχει πλήρης αλληλοεπικάλυψη στα δύο αυτά πρότυπα. Παρόλα αυτά δεν παρατηρείται έκφραση της GFP σε περιοχές που δεν εκφράζεται η TAG-1, πράγμα που ενισχύει το γεγονός ότι το ζώο αυτό πληρεί τις προϋποθέσεις για να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη του προτύπου έκφραση της TAG-1.

Στα πρώτα πειράματα για την μελέτη του προτύπου της GFP μετά την γέννηση (P0), παρατηρήθηκε έκφραση στον υπόκαμπο, στους άξονες του Anterior Commissure, στους άξονες του μεσολοβίου (Corpus Callosum), σε νευρώνες των στοιβάδων του φλοιού αλλά και σε υποφλοιικούς άξονες. Η διπλή ανοσοιστοχημεία για την έκφραση την πρωτεΐνη GFP και για τον μεταγραφικό παράγοντα Tbr1, έγινε για την ταυτοποίηση των νευρικών κυττάρων στο φλοιό που εκφράζουν GFP. Ο συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας, μετά την γέννηση, εκφράζεται κυρίως από τους φλοιοθαλαμικούς νευρώνες(στοιβάδα VI). Από την ανοσοιστοχημεία

παρατηρήθηκε ότι, σχεδόν όλα τα GFP+ κύτταρα είναι και Tbr1+, πράγμα που αποτελεί μια πρώτη ένδειξη για την ταυτότητα των συγκεκριμένων νευρώνων. Παρόλα αυτά, η χρήση περισσότερων μαρτύρων για την ταυτοποίηση των συγκεκριμένων κυττάρων όπως Ctir2, SATB2 θα οδηγήσει σε ένα πιο ασφαλές συμπέρασμα.

Ο ρόλος των TAG-1 corticofugal αξόνων στην ανάπτυξη του φλοιού και ο πιθανός ρόλος τους στην σύνδεση φλοιού θαλάμου δεν έχει ακόμη μελετηθεί. Το διαγονιδιακό ζώο Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}, λόγω των συγκεκριμένων loxP θέσεων γύρω από το GFP και την έκφραση του γονιδίου DTA, μετά από επαγόμενο ανασυνδυασμό μας επιτρέπει να απαλείψουμε τους κυτταρικούς πληθυσμούς που εκφράζουν TAG-1 σε περιοχές που μας ενδιαφέρουν και να μελετήσουμε τον ρόλο τους. Έτσι, για την μελέτη του ρόλου των TAG-1 corticofugal αξόνων επιλέχθηκε η διαγονιδιακή σειρά Emx1^{Cre}, η οποία λόγω της περιορισμένης έκφρασης του Emx1 στην περιοχή του νεοφλοιού, μας επιτρέπει να απαλείψουμε τους συγκεκριμένους άξονες.

Μετά την συγκεκριμένη διασταύρωση, τα πρώτα πειράματα που έγιναν για την μελέτη της συγκεκριμένης διαγονιδιακής σειράς (Emx1^{Cre};Tag1^{DTA}) είχαν στόχο να ελέγξουν την επαγωγή του ανασυνδυασμού και άρα την λειτουργικότητα τους συστήματος. Σε πειράματα ανοσοιστοχημεία για την ανίχνευση της πρωτεΐνης TAG-1 παρατηρήθηκε ότι δεν έγινε πλήρης απαλοιφή των TAG-1 corticofugal αξόνων. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η διαγονιδιακή σειρά (Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}) έχει δημιουργηθεί με την χρήση της τεχνολογίας του BAC. Πιθανόν, όλα τα κύτταρα που εκφράζουν TAG-1 να μην εκφράζουν και τον BAC κλώνο και έτσι να μην έχουμε πλήρη απαλοιφή. Παρόλα αυτά η απαλοιφή των αξόνων συμβαίνει σε μεγάλο ποσοστό και ο φαινότυπος που παρατηρούμε στα ζώα είναι πολύ σημαντικός.

Επιπλέον, κυτταρικός θάνατος σύμφωνα με τα πειράματα ανοσοιστοχημείας για την πρωτεΐνη Caspase3, εντοπίζεται στην περιοχή αλληλοεπικάλυψης της έκφρασης του Emx1 αλλά και της TAG-1. Το γεγονός ότι παρατηρήθηκε κυτταρικός θάνατος μόνο στις ηλικίες E11.5 – E13.5 και όχι στις ηλικίες E15.5 και P0, αποτελεί μια πρώτη πληροφορία για τους τύπους των νευρικών κυττάρων που σκοτώνουμε. Σύμφωνα με τις ηλικίες αυτές, φαίνεται να σκοτώνουμε τους νευρώνες που γεννιούνται νωρίς στην ανάπτυξη (early generated deep layers neurons). Βέβαια, πειράματα με την χρήση BrdU σε συνδυασμό με ανοσοιστοχημεία για μάρτυρες νευρικών κυτταρικών τύπων θα δώσουν περισσότερες πληροφορίες.

Στην συνέχεια μελετήθηκε η μορφολογία των συγκεκριμένων διαγονιδιακών ζώων $Emx1^{Cre};Tag1^{DTA}$, σε σύγκριση πάντα με $Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}$ διαγονιδιακά ζώα που θεωρούνται ως control. Σε ιστοχημικές χρώσεις σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλων μετά την γέννηση (P0), παρατηρήθηκε απουσία του Anterior Commissure (AC), αλλαγή στην μορφολογία του ιπποκάμπου, του μεσολοβίου (corpus callosum, CC) αλλά και αξιοσημείωτη μείωση στο μέγεθος του φλοιού. Σε μακροσκοπική μελέτη του μεγέθους του εγκεφάλου των διαγονιδιακών αυτών ζώων, παρατηρήθηκε δραματική μείωση στο μέγεθος του νεοφλοιού. Σύμφωνα, με τους Jacobs et al, οι καθοδηγητικοί νευρώνες της υποφλοιικής πλάκας (SP) εκτείνουν άξονες όχι μόνο στο θάλαμο αλλά και προς στο μεσολόβιο (Corpus Callosum, CC) αλλά και προς το Anterior Commissure (AC). Αυτό ενισχύει την πιθανότητα οι TAG-1 corticofugal νευρώνες να έχουν τον ίδιο ρόλο με τους νευρώνες της υποφλοιικής πλάκας, μιας και απαλοιφή αυτών φαίνεται να επηρεάζει τον σχηματισμό των δομών αυτών.

Επιπλέον σε ιστοχημικές χρώσεις σε τομές εγκεφάλων από ενήλικα στάδια, όπου έχει γίνει ο πλήρης καθορισμός των έξι στοιβάδων, παρατηρήθηκε αποδιοργάνωση της χαρακτηριστικής δομής των στοιβάδων. Η αποδιοργάνωση αυτή εντοπίζεται κυρίως στις άνω στοιβάδες που δομούνται από τους νευρώνες που γεννιούνται αργότερα κατά την ανάπτυξη (late generated upper layers neurons). Στην συνέχεια, πειράματα ανίχνευσης γνωστών mRNA για τις στοιβάδες του φλοιού, έγιναν με στόχο τον εντοπισμό κάποιων διαφορών στο πρότυπο έκφρασης τους. Η μελέτη του προτύπου έκφρασης του ER81 mRNA, μάρτυρας για την στοιβάδα V, δεν έδειξε κάποια σημαντική διαφορά σε αντίθεση με το πρότυπο έκφρασης του Reelin mRNA, μάρτυρας για την στοιβάδα I. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του mRNA Reelin στην στοιβάδα I. Βέβαια, περαιτέρω πειράματα με την χρήση ανιχνευτών mRNA όπως Fezf2, RORβ, Cux, Tbr1 θα δώσουν μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για το πως επηρεάζεται η δομή και η αρχιτεκτονική του φλοιού, στα συγκεκριμένα ζώα.

Απώτερος στόχος μας ήταν να ελέγξουμε τον ρόλο των συγκεκριμένων corticofugal αξόνων στην φλοιο-θαλαμική σύνδεση. Μέσω πειραμάτων σήμανσης με την χρήση κρυστάλλων DiI, δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη διαφορά, όσον αφορά την καθοδήγηση των θαλαμοφλοιικών αλλά και των φλοιοθαλαμικών αξόνων. Επιπλέον, πειράματα ανοσοιστοχημείας για την πρωτεΐνη των ενδιάμεσων νευρικών ινιδίων (NFm), φανέρωσαν ένα μεγάλο πρόβλημα στην διευθέτηση των αξόνων στον φλοιό.

Γνωρίζοντας ότι οι TAG-1 corticofugal άξονες, πιθανόν να αποτελούν υπόστρωμα των ενδονευρώνων για μετανάστευση στον φλοιό, ελέγξαμε το πρότυπο μετανάστευσης των νευρώνων αυτών μετά την απαλοιφή των αξόνων. Απο τα πειράματα ανοσοιστοχημείας για την πρωτεΐνη GABA_A (υποδοχέας γ-αμινοβουτυρικού οξέος), παρατηρήθηκε αλλαγή στα χαρακτηριστικά μονοπάτια που ακολουθούν οι συγκεκριμένοι νευρώνες. Πιο συγκεκριμένα ενδονευρώνες από την ενδιάμεση ζώνη φαίνεται να μεταναστεύουν προς την επιχείλια ζώνη. Επιπλέον πειράματα ανοσοιστοχημείας θα πρέπει να γίνουν ώστε να επιβεβαιωθεί το συγκεκριμένο πρότυπο που παρατηρήθηκε.

Μέσα από αυτή την σειρά πειραμάτων που έγιναν προσπαθήσαμε να χαρακτηρίσουμε τις επιπτώσεις στην ανάπτυξη του φλοιού αλλά και στη σύνδεση φλοιού-θαλάμου, από την απαλοιφή ενός μεγάλου ποσοστού των TAG-1 corticofugal αξόνων και έτσι να μπορέσουμε να οδηγηθούμε σε ένα συμπέρασμα όσον αφορά τον ρόλο αυτών των αξόνων. Βέβαια, αυτά που διαθέτουμε στα χέρια μας είναι οι πρώτες ενδείξεις και περαιτέρω μελέτη κρίνεται αναγκαία.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Arlotta P. et al, 2005, *Neuronal Subtype-Specific Genes that Control corticospinal Motor Neuron Development In vivo*, Neuron 45,207-221
- Ayala, R. et al, 2007, *Trekking across the brain: the journey of neuronal migration*. Cell 128, 29-43
- Bishop K.M et al, 2003, *Emx1 and Emx2 cooperate to regulate cortical size, lamination, neuronal differentiation, development of cortical efferents and thalamocortical pathfinding*, J C Neurobio 457:345-360
- Cecchi Chiara and Edoardo Boncinelli, 2000, *Emx homeogenes and mouse brain development*, TINS, 23
- Chan C.H et al, 2001, *Emx1 is a marker for pyramidal neurons of the Cerebral cortex*, Cerebral Cortex, 1191-1198
- Denaxa M et al, 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
- Denaxa M et al, 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
- Espinosa A. et al, 2009, *Two separate subtypes of early born non-subplate projection neurons in the developing cerebral cortex of rodents*, Frontiers in Neuroanatomy, 3(27) 1-12
- Hevner Robert F. and Nada Zecevic, (2006)*Pioneer Neurons and Interneurons in the Developing Subplate: Molecular Markers, Cell Birthdays and Neurotransmitters*. Development and Plasticity in Sensory Thalamus and Cortex, 1-18
- Iwasato T et al, 2004, *Dorsal telencephalon-Specific Expression of Cre recombinase in PAC transgenic mice*, Genesis 38, 130-138
- Jacobs E.C et al, 2007, *Visualization of corticofugal projections during early cortical development in a τ -GFP- transgenic mouse*, E. J. Neurosci 25, 17-30
- Kanold Patrick O. and Heiko J.Luhmann, 2010, *The subplate and early cortical circuits*, Annu. Rev.Neurosci. 33:23-48
- Katidou M. et al, 2008, *The immunoglobulin superfamily of neuronal cell adhesion molecules: Lessons from animal models and correlation with human disease*, Biotechnology journal 3, 1564-1580

- Kyriakopoulou K et al, 2002, *A combination of chain and neurophilic migration involving the adhesion molecule TAG-1 in the caudal medulla*, Development 129, 287-296
- Lai T. et al, 2008, *SOX5 controls the sequential generation of Distinct corticofugal neuron subtypes*, Neurons 57,232-247
- Leone P.D. et al, 2008, *The determination of projection neuron identity in the developing cerebral cortex*. Curr Opin Neurobiol. 18(1):28-35
- Lopez-Bendito Guillermina and Zoltan Molnar, 2003, *Thalamocortical development: How are we going to get there?*, Nature Reviews,276-289
- Lopez-Bendito G. et al, 2006, *Tangential neuronal migration controls axon guidance: A role for neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation*, Cell 125,127-142
- Marin O. and Rubenstein, J. L.,2003. *Cell migration in the forebrain*. Annu Rev NEurosci 26, 441-483.
- McKenna W.L et al, 2011, *Tbr1 and FezF2 regulate alternate corticofugal neuronal identities during neocortical development*, J Neurosci 31, 549-564
- Molnar Z and Blakemore C, 1995, *How do thalamic axons find their way to the cortex?* , Trends Neurosci., 18, 52723-45
- Montiel J et al, 2011, *Hypothesis on the dual origin of the mammalian subplate*, Fron Neuroan, 5
- Molnar Z et al, 2007, *Genes involved in the formation of the earliest cortical circuits*, Cortical development p212-229
- Molyneaux B.J. et al, 2007, *Neuronal subtypes specification in the cerebral cortex*, Nature Reviews, 427-437
- O' Leary D.D.M et al, 2007, *Area Patterning of the Mammalian Cortex*, Neuron 56 258-269
- Oeschger M.F.. et al, 2011, *Gene Expression Analysis of the Embryonic Subplate, Cerebral Cortex*
- Price J.D. et al, 2006, *The development of cortical connections*, E.J. Neurosciences, 23, 910-920
- Shimoda Y.et al, 2009, *Contactins emerging key roles in the development and function of the nervous system*, Cell adhesion & migration,64-70
- Wengi Han et.al., 2011, *Tbr1 directly represses FezF2 to control the laminar origin and development of the corticospinal tract*, PNAS,3041-3046

