

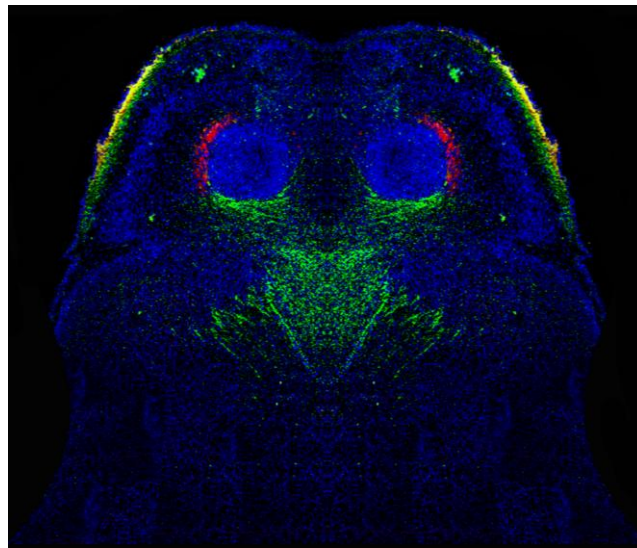
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗΣ ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΕΡΕΥΝΑΣ**

**ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



**Διδακτορική διατριβή**

**«Μελέτη των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων  
μήνυμαδοτικών μορίων στην ανάπτυξη και την  
οργάνωση των αισθητήριων συστημάτων και του  
εγκεφαλικού φλοιού»**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ Γ.ΜΠΑΣΤΑΚΗΣ**

**ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2017**

Τελειώνοντας ένα πολύ μακρύ δρόμο που άρχισε το τελευταίο τρίμηνο του 2010 μέχρι σήμερα που το ημερολόγιο γράφει Ιανουάριος 2017 πολλά θα μπορούσα να γράψω και να πω. Νομίζω όμως πως μια σελίδα A4 θα τα χωρέσει. Άλλωστε δεν χρειάζονται πολλά λόγια για να πεις ευχαριστώ, η λέξη από μόνη της τα λέει όλα. Τα λέει όλα ανεξάρτητα του πόσα πολλά θα προστεθούν πριν από αυτήν.

Ευχαριστώ λοιπόν για αυτά τα 6 δημιουργικότερα χρόνια της ζωής μου μέχρι τώρα, τον άνθρωπο που με εμπιστεύτηκε για την πραγματοποίηση αυτής της δουλειάς. Ευχαριστώ την καθηγήτρια Δόμνα Καραγωγέως που με την καθοδήγηση, την οξεία κρίση της και την δημιουργική ελευθερία που μου προσέφερε με βοήθησε να αγαπήσω ακόμα περισσότερο τη βασική έρευνα. Την ευχαριστώ για τις ευκαιρίες μου έδωσε και που δουλεύοντας δίπλα της αυτά τα χρόνια έγινα αυτός που είμαι σήμερα ως επιστήμονας.

Ευχαριστώ την Γαλλίδα με τις Αιγυπτιακές ρίζες την Μαριόν (Marrion Wassef) για την φιλοξενία της στο Παρίσι το 2012. Η Μαριον ήταν ο ορισμός της φιλοξενίας, καθώς, έμενα σε δικό της σπίτι στην αξέχαστη “Rue Buffon” δίπλα στον πανέμορφο Βοτανικό κήπο, χωρίς να πληρώσω τίποτα για 6 μήνες. Πέραν τούτου από την πρώτη μέρα που έφτασα στο Παρίσι δεν ένιωσα ποτέ ξένος. Ήταν σαν να πήγα να δουλέψω σε μια πόλη όπου είχα κάποιο συγγενικό μου πρόσωπο. Επίσης την ευχαριστώ που με τον τρόπο της και την στήριξη της με βοήθησε να διευρύνω τους επιστημονικούς μου ορίζοντες αλλά και να οξύνω τον τρόπο σκέψης μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τους καθηγητές Γιώργο Χαλεπάκη και Νεκτάριο Ταβερναράκη που με τις καίριες παρεμβάσεις τους ,τις πολύτιμες συμβουλές τους όλα αυτά τα χρόνια βοήθησαν στην βελτιστοποίηση της παρούσας δουλειάς. Ακόμα ευχαριστώ και τα μέλη της επταμελούς επιτροπής, τον κύριο Χαραλαμπόπουλο, τον Κύριο Τσιλιμπάρη, την κυρία Σιδηροπούλου και την κυρία Σπανάκη που δέχτηκαν με χαρά να διαβάσουν και να αξιολογήσουν τη παρούσα εργασία.

Μαρία Σαββάκη σε ευχαριστώ για όλες τις τεχνικές που μου έμαθες όλα αυτά τα χρόνια. Σε ευχαριστώ που με δίδαξε από όταν ήμουν ακόμα φοιτητής στο master τα πάντα γύρω από την κυτταρική βιολογία (στην πράξη). Ευχαριστώ για την στήριξη και τον αγώνα που δώσαμε μαζί μέρες ,νύχτες, γιορτές ,αργίες καλοκαίρια και χειμώνες (σαν τραγούδι του Μητροπάνου ακούστηκε) για την ολοκλήρωση του Olfactory project. Σε ευχαριστώ που ποτέ δεν τα παράτησες και που όποτε χρειάστηκε ήσουν εκεί. Πιστεύω πως δεν θα είχα καταφέρει τίποτα χωρίς εσένα. Μα πιο πολύ σε ευχαριστώ για την φιλία σου όλα αυτά τα χρόνια εσένα και τον Λάμπρο. Λάμπρο, δυστυχώς παρά τις προσπάθειες μέρες, νύχτες, γιορτές, αργίες κλπ... όπως πριν, ποτέ δεν καταφέραμε να φτιάξουμε μια αξιόλογη μπίρα. Αλλά όμως ήπιαμε πολλές μπίρες άλλων, ελπίζοντας πως και «η δική μας μπίρα» θα έχει μια τέτοια γεύση. Σε ευχαριστώ για τις επιστημονικές συζητήσεις που κάναμε πίνοντας μπίρες (γιατί όχι).

Ευχαριστώ και εσένα φίλε μου Κώστα (Θεοδωράκη) γιατί με δίδαξες να έχω τάξη και οργάνωση στην δουλειά μου. Σε ευχαριστώ για τις μοριακές τεχνικές που μου έμαθες και για το troubleshooting όποτε το είχα ανάγκη .Σε ευχαριστώ επίσης για τις πολύτιμες συμβουλές σου και για την στήριξη σου όλα αυτά τα χρόνια.

Λήδα Ζούπη σε ευχαριστώ για τις συζητήσεις που κάναμε για τα project μας, για τα genotyping που έκανες για μένα όσο ήμουν στην Γαλλία και που μου έστειλες αυτά τα L1 ζώα που έπρεπε να ζητάς 100 plugs για να πάρουμε 4-5 KO.

Μαρίνα Βιδάκη, όπως γνωρίζεις όλη την κληρονομιά σου στο εργαστήριο την πήρα εγώ. Πήρα το γραφείο σου, τα εργαλεία σου, τα κυτταρικά σου πρωτόκολλα και σε ευχαριστώ πάρα πολύ γι αυτό. Ελπίζω να στάθηκε άξιος συνεχιστής στον neuronal κομμάτι του εργαστηρίου.

Σήφη (Πεδιαδιτάκης) και Πασχάλη (Ευσταθόπουλος) ευχαριστώ για την φιλία σας και τις ωραίες στιγμές που περάσαμε στις ίδιες εγκαταστάσεις όλα αυτά τα χρόνια. Μπορεί να μην καταφέραμε να δημοσιεύσουμε στο Cell ("under or over the table"), αλλά όμως κάναμε την δουλειά μας με υπευθυνότητα και περνώντας καλά γιατί το κάναμε με μεράκι.

Κατερίνα (Καλεμάκη), σε ευχαριστώ για την παρέα που κάναμε στο εργαστήριο και που μαζί με την Ζουζάνα (Κούνουπα) παίξατε καθοριστικό ρόλο στην δημιουργία του υπέροχου κλίματος θετικής ενέργειας που δεν θα ξεχάσω ποτέ.

Ηλία (Καλαφατάκη) μπορεί να έχασε πολλές φορές η ομάδα σου από την δική μου, όμως σε ευχαριστώ που όταν έχανε η δική μου, η καζούρα δεν ήταν ποτέ τόσο βαριά ώστε να θέλω να σου επιμολύνω τα αντιδραστήρια. Συνέχισε όπως είσαι γιατί είσαι ωραίος τύπος.

Τέλος Ευχαριστώ την οικογένεια μου την μητέρα μου Βαγγελιώ που ήταν πάντα δίπλα σε μένα και τον αδερφό μου παρά τις δυσκολίες, την θεία μου Αλκιόνη, τον αδελφό μου Μανώλη και τον πατέρα μου Γιώργο.

Πατέρα σε ευχαριστώ μου με έμαθες να έχω ελεύθερη σκέψη, να αγαπάω την δουλειά μου και να είμαι ένας σωστός άνθρωπος. Σε ευχαριστώ που με άφησες να έχω εγώ τις επιλογές της ζωής μου και που πάντα ήσουν εκεί να με στηρίζεις. Ότι είμαι σήμερα το οφείλω σε εσένα. Λυπάμαι που δεν είσαι εδώ, αλλά ελπίζω να είσαι περήφανος εκεί που είσαι.

Ελένη μου σε ευχαριστώ που όλα αυτά τα χρόνια έκανες πολύ υπομονή μαζί μου. Ευχαριστώ που με στηρίζεις ακόμα σε κάθε βήμα μου και που είσαι δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια. Σε ευχαριστώ και για τον γιό που μου χάρισες. Μικιό Γιωργάκη σε ευχαριστώ και εσένα που όταν έγραφα ή έκανα δουλειά στο laptop εσύ ήθελες να δούμε τον Thomas το τρενάκι και γκρίνιαζες, έτσι καταλάβαινα πόσο σημαντικά είναι κάποια πράγματα στην ζωή μου.

Ευχαριστώ και όλη την οικογένεια Καμπουράκη γιατί στάθηκε πλάι μου σαν δεύτερη οικογένεια μου στα όμορφα και στα άσχημα με αμέριστη βοήθεια και αγάπη.

Τέλος ευχαριστώ όλους όσους συνεργάστηκα (και πιθανός ξέχασα) στο DK.Lab αλλά και του IMBB και την Ιατρικής. Πραγματικά λυπάμαι που μετά από 15 χρόνια αφήνω την οικογένεια του UOC τυπικά τουλάχιστον γιατί στην πραγματικότητα αυτό είναι κάτι που δεν πρόκειται να συμβεί ποτέ.

Τελικά μία σελίδα δεν ήταν αρκετή...

*Στο πατέρα μου Γιώργο*

*Στο γιό μου Γιώργο (Jr II)*

*Και στην Ελένη...*



# Περιεχόμενα

Περίληψη/Abstract σελ.9

ΕΙΣΑΓΩΓΗ σελ.15

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 σελ.15-33

Εισαγωγή στατικό-ακουστικού/παρεγκεφαλίδας

1.1 Οργάνωση της παρεγκεφαλίδας του ενήλικου σελ. 14-22

Φαία ουσία παρεγκεφαλίδας και πυρήνες.

*A) Φλοιός της παρεγκεφαλίδας*

*B) Πυρήνες της παρεγκεφαλίδας*

Λευκή ουσία της παρεγκεφαλίδας

A. Προσαγωγές ίνες:

B. Απαγωγές ίνες:

1.2 Οργάνωση αιθουσαίου συστήματος σελ.22-27

*A) Οργάνωση κεντρικού αισθητηρίου οργάνου αιθουσαίου συστήματος.*

*B) Σύμπλεγμα αιθουσαίων πυρήνων*

1.3 Εμβρυική ανάπτυξη παρεγκεφαλίδας και του αιθουσαίου συστήματος.

σελ.27-33

*A) Χρονική και χωρική εξέλιξη των νευρωνικών πληθυσμών της παρεγκεφαλίδας και του αιθουσαίου συστήματος.*

*B) Η αναπτυσσόμενη παρεγκεφαλίδα και οι πρωτογενείς αιθουσαίο-παρεγκεφαλιδικές ίνες (PVF).*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 σελ.33-56

Εισαγωγή οσφρητικού

2.1 Ανατομία και οργάνωση του οσφρητικού συστήματος σελ.33-47

A) Κύριο οσφρητικό σύστημα

1.Οσφρητικό επιθήλιο

2.Οσφρητικός λοβός

3.Οσφρητικός φλοιός

B) Επικουρικό οσφρητικό σύστημα

1.Περιφερικό αισθητήριο όργανο AOS (Vomeronasal organ)

2.Επικουρικός οσφρητικός λοβός (accessory olfactory bulb, AOB)

### 3.Οσφρητικός φλοιός στο AOS

#### 2.2 Ανάπτυξη του οσφρητικού συστήματος κατά την εμβρυϊκή περίοδο

σελ.47-56

##### A) Ανάπτυξη οσφρητικού επιθηλίου και του VNO

##### B) Ανάπτυξη οσφρητικού λοβού (OB)

1. Γενεαλογία κυτταρικών πληθυσμών OB
2. Πληθυσμός των προβλητικών νευρώνων (MCs, TCs)
3. Πληθυσμός των ενδονευρώνων (GCs)

##### Γ. Αξονες προβλητικών νευρώνων και δημιουργία LOT

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 σελ.56-66

#### Μόρια κυτταρικής συνάφειας

#### Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας του νευρικού συστήματος

##### 3.1 Υπεροικογένεια ανοσοσφαιρινών και η TAG-1 στο αναπτυσσόμενο

ΚΝΣ. σελ.59-65

A) NCAM

B) L1-CAM

Γ) Contactins

### ΣΤΟΧΟΙ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ σελ.65-66

#### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ I σελ.67-114

##### A. ΟΣΦΡΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

##### A1. Η έκφραση της TAG-1 στο αναπτυσσόμενο οσφρητικό σύστημα

σελ.67-74

##### A2. Ο ρόλος της TAG-1 στην οργάνωση και την ανάπτυξη του οσφρητικού συστήματος σελ.74-96

2i. Η έλλειψη της TAG-1 δεν επηρεάζει την οργάνωση και την ανάπτυξη του OE και των σπειραμάτων του OB. σελ.74

2ii. Ο αριθμός των κύριων προβλητικών νευρώνων του OB (MCs) παρουσιάζεται επηρεασμένος στα μεταλλαγμένα για την TAG-1 ποντίκια. σελ.79

2iii. Ο πληθυσμός των MCs που γεννιούνται στην ηλικία E11,5 εμφανίζεται μειωμένος στην MCL των Tag-1<sup>-/-</sup> μυών. σελ. 84

2iv. Τα E11,5 MCS που λείπουν από το MOB των *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώων ανευρίσκονται έκτοπα, εντοπιζόμενα εντός του AOB τους. σελ.87

2v. Οι νευρικές ίνες των προβλητικών νευρώνων που δομούν το LOT δεν παρουσιάζονται διαταραγμένες στους *Tag-1<sup>-/-</sup>* μύες. σελ.94

A3. Οι ελλειμματικοί για την TAG-1 μύες παρουσιάζουν σοβαρές μεταβολές στην οσφρητική τους ικανότητα. σελ.95

A4. Σημαντικές διαταραχές στο προφίλ νευρωνικής ενεργοποίησης του OB και του OC συνοδεύουν την διαταραγμένη οσφρητική ικανότητα των *Tag-1<sup>-/-</sup>* μυών. σελ.102

A5. Ειδικά γονίδια υποπληθυσμών του νεοφλοιού εκφράζονται στο αναπτυσσόμενο OS με συγκεκριμένο χορικό, χρονικό και κυτταρικά ειδικό τρόπο. σελ.107

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ I σελ.115-126

1. Η TAG-1 στο αναπτυσσόμενο οσφρητικό σύστημα εκφράζεται από υποπληθυσμό OSN/VSN, από τους προβλητικούς νευρώνες του MOB και από μικρό πληθυσμό κυττάρων του AON. σελ.115

2.Η έλλειψη της TAG-1 οδηγεί σε διαταραχή του αριθμού των MCs στην στοιβάδα των μητρικών κυττάρων του MOB από την ηλικία P0. Αντιθέτως οι δομές του OE και οι υπόλοιποι πληθυσμοί του OB είναι φυσιολογικοί. σελ.117

3.Η μείωση των MCs του MOB δεν είναι αποτέλεσμα ούτε κυτταρικού θανάτου ούτε διαταραχών στον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των προγεννητικών τους κυττάρων. σελ.118

4. Μόνο οι κυτταρικοί πληθυσμοί των MCs που γεννιούνται κατά την ηλικία E11,5 και E12,5 εκφράζουν το μόριο της TAG-1, ενώ από αυτούς ο υποπληθυσμός των E11,5 MCs παρουσιάζεται μειωμένος στην αναπτυσσόμενη MCL του MOB και αυξημένος εντός του AOB στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ποντίκια. σελ.119

5.Η μείωση των MCs του MOB στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώα είναι αποτέλεσμα ανακατανομής των E11,5 MCs, που συμβαίνει σταδιακά μετά την ηλικία E14,5, πιθανώς λόγω σφάλματος στην μετανάστευσή τους. σελ.120

6.Τα ομόζυγα και ετερόζυγα μεταλλαγμένα για την TAG-1 ποντίκια παρουσιάζουν σημαντικές διαταραχές στην οσφρητική τους ικανότητα. 121

7.Ο συμπεριφορικός φαινότυπος των *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώων είναι αποτέλεσμα διαταραγμένης νευρωνικής ενεργοποίησης στον MOB και του PC από τα οσμηρά σήματα του περιβάλλοντος. σελ.123

8.Δημιουργία βάσης δεδομένων για την έκφραση ειδικών μαρτύρων του νεοφλοιού, σε υποπληθυσμού και υποπεριοχές του OS. σελ.125

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ II σελ.127-159

### B. Στατικο-ακουστικό σύστημα/παρεγκεφαλίδα

B1.Χαρακτηρισμός της οργάνωσης και δομής της ενδιάμεσης ινώδους στοιβάδας (IFL) στην αναπτυσσόμενη παρεγκεφαλίδα του ποντικού.

σελ.127

B2.Οι νευρικές ίνες των Calbindin+ PCs δεσμιδοποιούνται μαζί με τις ίνες των PVFs κατά την ανάπτυξη. σελ.133

B3.Η απουσία των PVFs στα ομόζυγα μεταλλαγμένα για την *Six-1* ποντίκια οδηγεί σε διαταραχές στην οργάνωση και την καθοδήγηση των αξόνων των PCs. σελ.140

B4.Η έλλειψη του μορίου κυτταρικής συνάφειας L1 οδηγεί σε διαταραχές στην οργάνωση και την καθοδήγηση των Calbindin+ PCs αξόνων. σελ.145

B5. Ανάλυση και μέτρηση των ανατομικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών των αξονικών δεσμίδων στα *Six1* και L1 μεταλλαγμένα ζώα.

σελ.156

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ II σελ.159-166

1.Οι PV+ άξονες εντός τις αναπτυσσόμενης παρεγκεφαλίδας είναι οι άξονες αποκλειστικά των PVF και δεσμιδοποιούνται μαζί με τους άξονες των CalB+ PCs. σελ.160

2.Η παρουσία των PVFs εντός της αναπτυσσόμενης παρεγκεφαλίδας είναι απαραίτητη για την ορθή οργάνωση και καθοδήγηση των CalB+ PCs αξόνων.

σελ.161

3.Απο τα μόρια κυτταρικής συνάφειας που εκφράζονται στο IFL κατά την ανάπτυξη, μόνο η έλλειψη του L1 οδηγεί σε διαταραχές στην δεσμίδες των αξόνων του. σελ.161

## Γ.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ σελ.166-186

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ σελ.186-197

## Περίληψη

Κατά την ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) μία πλειάδα ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων μορίων παίζουν ρόλο στην ορθή οργάνωση και συντονισμό των νευρωνικών πληθυσμών. Από τα εξωκυττάρια μόρια, τα μόρια κυτταρικής συνάφειας (cell adhesion molecules, CAMs) είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στην επικοινωνία των κυττάρων που δομούν το ΚΝΣ. Οι επαφές που δημιουργούνται μέσω των CAMs είναι τόσο μεταξύ νευρώνων όσο και μεταξύ νευρώνων και υποστηρικτικών κυττάρων τους (Γλιακά κύτταρα). Επίσης τα CAMs βοηθούν στην επικοινωνία των νευρώνων με το περιβάλλον τους μέσω των επαφών που σχηματίζονται με μόρια τις εξωκυτταρικής ουσίας. Ορισμένες από τις αναπτυξιακές δραστηριότητες στις οποίες συμμετέχουν τα CAMs μέσω των ανωτέρω επαφών είναι οι νευρωνική μετανάστευση, η προβολή και η καθοδήγηση των νευραξόνων, η δημιουργία συνάψεων και οι δεσμιδοποίηση των νευρικών ινών. Ο ρόλος των CAMs στην ανάπτυξη των αισθητήριων συστημάτων έχει μελετηθεί αρκετά στο παρελθόν κυρίως στο οπτικό αλλά και στο οσφρητικό σύστημα.

Στο πρώτο μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής μελετήθηκε ο ρόλος του μορίου κυτταρικής συνάφειας TAG-1 στην ανάπτυξη και την οργάνωση των προβλητικών νευρώνων του οσφρητικού λοβού (OB) στους οποίους εκφράζεται. Είναι γνωστός ο τρόπος με τον οποίο οι οσφρητικοί αισθητικοί νευρώνες και οι άξονες τους από το οσφρητικό επιθήλιο (OE) οργανώνονται ανάλογα με τον υποδοχέα που εκφράζουν. Αυτός παίζει ρόλο στις συνάψεις που θα δημιουργηθούν με τα σπειράματα (GL) εντός του OB, σχηματίζοντας τον οσφρητικό υποδεκτικό χάρτη (ORM). Παρόλα αυτά ο τρόπος με τον οποίο οι κύριοι αισθητικοί νευρώνες του OB, τα μητρικά κύτταρα (MCs), οργανώνονται αναπτυξιακά εντός του OB ώστε να λάβουν την πληροφορία από συγκεκριμένα GL δεν είναι ακόμα γνωστός. Στην παρούσα εργασία δείξαμε ότι η TAG-1 είναι απαραίτητη για την σωστή κατανομή και καθοδήγηση των αναπτυσσόμενων MCs που γεννιούνται συγκεκριμένα στην αναπτυξιακή ηλικία E11,5. Χωρίς αυτήν τα MCs (E11,5) δεν καταλαμβάνουν τις σωστές θέσεις τους εντός του κύριου οσφρητικού λοβού (MOB), αλλά παραμένουν εντός περιοχών του επικουρικού οσφρητικού λοβού (AOB) μέχρι και την ενήλικη ζωή. Η παραπάνω δυσλειτουργία οδηγεί σε μεταβολές στην νευρωνική ενεργοποίηση τόσο του MOB όσο και του κύριου οσφρητικού φλοιού (piriform cortex, PC), όχι όμως και του AOB. Οι ανωτέρω αναπτυξιακές διαταραχές οδηγούν στον επηρεασμό της οσφρητικής ικανότητας των μεταλλαγμένων για την TAG-1 ζώων. Αυτά παρουσιάζουν μειωμένη μακρό-χρονη οσφρητική κοινωνική μνήμη και επηρεασμένη ικανότητα αναγνώρισης και διαχωρισμού

οσμηρών σημάτων του περιβάλλοντος. Επιπλέον δημιουργήσαμε μία βάση δεδομένων και ξεχωρίσαμε ειδικούς μοριακούς μάρτυρες κυτταρικών υποπληθυσμών στο οσφρητικό σύστημα (απο E11,5-P56), Αυτό θα μπορούσε να φανεί χρήσιμος σε μελλοντικές μελέτες της ανάπτυξης του οσφρητικού συστήματος.

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας εργασίας ασχοληθήκαμε με την αποσαφήνιση του ρόλου μιας υποκατηγορίας νευραξόνων του αιθουσαίου συστήματος, των πρωτοταγών αιθουσαίων ινών (primary vestibular fibers, PVFs), στην ανάπτυξη και την οργάνωση της παρεγκεφαλίδας. Είναι γνωστό από μελέτες στον αρουραίο ότι οι PVF εισέρχονται εντός της παρεγκεφαλίδας στην ηλικία E11,5, ως οι πρώτοι προσαγωγοί άξονες κατά την ανάπτυξη της. Στα αμέσως επόμενα αναπτυξιακά στάδια οι PVFs δεσμιδοποιημένοι, καταλαμβάνουν μεγάλη έκταση εντός τις παρεγκεφαλίδας καθώς οδεύουν προς πιο οπίσθιες περιοχές του ιστού. Παλαιότερες μελέτες δεν ανέδειξαν ξεκάθαρα τον ρόλο των PVF που δεν φάνηκε να δρουν ως σκαλωσιά στην πορεία μεταγενέστερων προσαγωγών ινών της παρεγκεφαλίδα, ούτε ως οργανωτές στην καθοδήγηση της μετανάστευσης των κοκκωδών κυττάρων (GCs) της έξω κοκκώδους στοιβάδας (EGL) προς τις τελικές τους θέσεις. Στην παρούσα μελέτη παρουσιάσαμε ότι οι PVF εισέρχονται εντός της παρεγκεφαλίδας στην αναπτυξιακή ηλικία E11,5 (όπως και στον αρουραίο). Αργότερα κατά την ανάπτυξη οι άξονες των PVFs συνδεσμιδοποιούνται (E13,5) με τους άξονες των CalB+ Purkinje κυττάρων (PCs). Επίσης παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το γεγονός ότι οι άξονες των CalB+ PCs ακολουθούν την πορεία των PVFs και ποσοστό τους πορεύεται εκτός παρεγκεφαλίδας, μέσω του κάτω παρεγκεφαλιδικού σκέλους (ICP), προς τους αιθουσαίους πυρήνες (VN). Επίσης στα Six1-/- ζώα όπου οι PVFs δεν δημιουργούνται, οι CalB+ PCs άξονες παρουσιάζουν διαταραχές στην δεσμιδοποίηση τους (υπερδεσμιδοποιημένοι) και στην κατεύθυνση τους εντός της παρεγκεφαλίδας. Καθώς αυτοί ακολουθούν ποικίλες μη οργανωμένες κατευθύνσεις εντός του ιστού, ένα μικρό ποσοστό τους καταφέρνει και εξέρχεται από την παρεγκεφαλίδα όχι μέσω του ICP αλλά μέσω του restiform body (RB). Στο μονοπάτι αυτό το L1 εκφράζεται, όπως εκφράζεται και στους άξονες των PVFs και των PCs. Απο τα CAMs που εκφράζονταν στο μονοπάτι των PVFs μόνο η απουσία του L1 οδήγησε σε διαταραχή στην δεσμιδοποίηση (ολιγάριθμες μικρές δεσμίδες) και την κατεύθυνση των PCs αξόνων, οι οποίοι δεν κατάφεραν ποτέ να εξέλθουν από την παρεγκεφαλίδα. Συνοψίζοντας δίδαμε ότι το μόριο L1 πιθανός παίζει ρόλο στην δράση των PVFs ως κυτταρική σκαλωσιά στην δεσμιδοποίηση των CalB+PCs αξόνων και την καθοδήγηση τους στην έξοδο από την παρεγκεφαλίδα μέσω του ICP προς τους VN.

## **Abstract**

During central nervous system (CNS) development a plurality of intracellular and extracellular molecules plays crucial role in the organization and coordination of different neuronal populations. Cell adhesion molecules (cell adhesion molecules, CAMs), as key members of extracellular molecules, are known to participate in the communication of neurons inside CNS. The contacts created by CAMs are between neurons as well as between neurons and supporting cells (glial cells). Moreover CAMs participates in neurons communication with their environment, by creating contacts with extracellular matrix molecules. The developmental activities integrated by CAMs through the above contacts are neuronal migration, the elongation and guidance of axons, the creation of synapses and the fasciculation of nerve fibers. The role of CAMs in the development of sensory systems is well studied mainly in the optical and olfactory system.

In the first part of current thesis we studied the role of CAM TAG-1, in the development and organization of projection neurons in the olfactory bulb (OB). It is well known how the olfactory sensory neurons and their axons from the olfactory epithelium (OE) are organized according to the olfactory receptors expressed on their surface. The above organization pattern plays a role in the correct synapses formation at the level of glomeruli (GL) in OB forming the olfactory receptor map (ORM). However the way in which the major projection neurons of the OB, mitral cells (MCs), are organized during the development to receive information from specific GL is still elusive. In current study we have shown that TAG-1 is crucial for the proper distribution and guidance of developing MCs, specifically those born in developmental stage E11,5. When it is absent the MCs (E11,5) do not occupy the correct positions inside the main olfactory bulb (MOB), but remain within areas of accessory olfactory bulb (AOB) until adulthood. The above mentioned defects results in changes of neuronal activation profile of both MOB and the primary olfactory cortex (piriform cortex, PC), but not the AOB. These developmental disorders influence the olfactory ability of the TAG-1 mutant mice. As a result they present reduced long-term olfactory social memory and impaired olfactory recognition and discrimination abilities. Furthermore we created a database and highlighted specific molecules that can be used as olfactory system cell subpopulations special markers (from E11,5-P56). The above data could be useful in future studies related with the olfactory system development.

Through the second part of this work we tried to elucidate the role of a subset of vestibular axons, the primary vestibular fibers (primary vestibular fibers, PVFs), in the development and organization of the cerebellum. It is known from previous studies in rat that PVF enters the cerebellum as early as E11,5 and constitute the first afferent fibers during development. In the next developmental stages fasciculated PVFs, occupy a large area in the cerebellum as they travel to more posterior regions of the tissue. Previous studies have clearly highlighted that the role of PVF is not to act as a scaffold in the course of subsequent afferents fibers in the cerebellum. In addition PVFs does not act as guidance organizers in granular cell migration (GCs) from external granular layer (EGL) to their end positions.

In the second part of the current study we presented that PVF enters inside the cerebellar primordium in developmental stage E11,5 (as in rats) .Later on we showed that the axons of PVFs co-fasciculates (at E13,5) with the CalB+ Purkinje cell (PCs) axons. More over for first time we shown that the axonal bundles of CalB + PCs follow the course of PVFs bundles and exits outside the cerebellum through the inferior cerebellar peduncle (ICP), toward the vestibular nuclei (VN). Furthermore in  $Six1^{-/-}$  animals where PVFs never generates, the CalB+ PCs axons presents severe fasciculation deficits (hyper-fasciculation) as well as defects in axonal orientation inside the cerebellum. As the above PCs axons follow diverse disorganized directions within the tissue, a small proportion succeeds to exits the cerebellum through restiform body (RB) and not through ICP. In this pathway L1 is expressed, as it is expressed on PVFs and PCs axons. From the CAMs that we checked and was expressed in the pathway of PVFs only the absence of L1 led to defects in fasciculation (small bundles) and orientation of PCs axons, that never exits the cerebellum properly. In conclusion we presented that L1 CAM is possible a key molecule in PVFs actions as cellular scaffold and fasciculation organizer of Calb+ PCs axons. Through this role it helps PCs axons to be well oriented inside the cerebellum and exits through ICP toward VNs.





## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος πληθώρα ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων μηνυμάτων θα αναδυθούν από τους άωρους κυτταρικούς πληθυσμούς του νευροεπιθηλίου, ώστε σταδιακά να ενορχηστρώσουν την σύνθεση του κεντρικού νευρικού συστήματος και των αισθητήριων συστημάτων. Αυτή η μοριακή και κυτταρική σύνθεση, όπως συμβαίνει με τα όργανα σε μια μουσική ορχηστρική σύνθεση, βασίζεται στην σωστή χρονικά είσοδο των κατάλληλων μοριακών και κυτταρικών στοιχείων, στην ορθή ένταση και χρονική διάρκεια. Όπως τα όργανα της συμφωνικής ορχήστρας χωρίζονται σε διαφορετικές ομάδες ανάλογα με τα κοινά τους χαρακτηριστικά στον τρόπο που παράγουν τον ήχο, όπως ορίζει η μουσικολογία (ιδιόφωνα, μεμβρανόφωνα, χορδόφωνα, αερόφωνα κτλ), ομοίως τα μόρια και οι κυτταρικοί πληθυσμοί που συμμετέχουν στην ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τα κοινά δομικά, μορφολογικά ή λειτουργικά τους χαρακτηριστικά σύμφωνα με την αναπτυξιακή νευροβιολογία. Στην παρούσα μελέτη επικεντρωνόμαστε στον ρόλο συγκεκριμένων μορίων κυτταρικής συνάφειας στην οργάνωση, την ανάπτυξη και την λειτουργική ολοκλήρωση των αισθητήριων συστημάτων του οσφρητικού και του αιθουσαίου συστήματος.

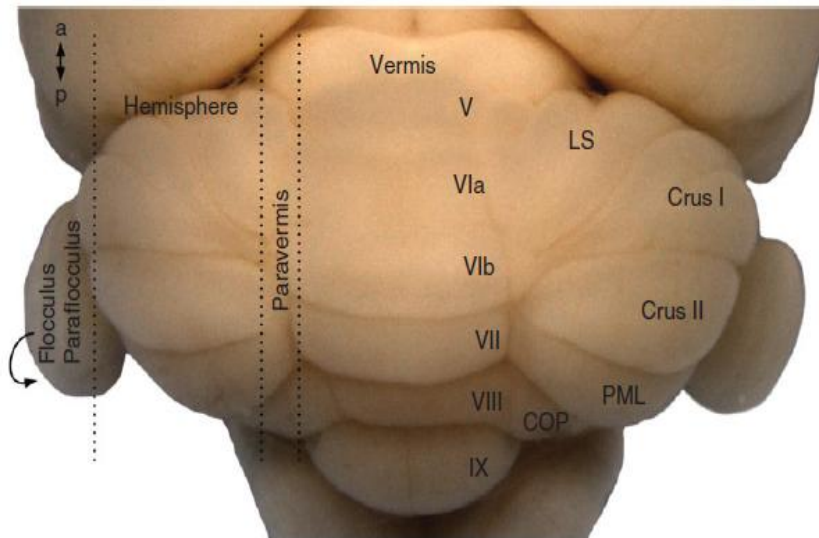
## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

### **Εισαγωγή στατικό-ακουστικού/παρεγκεφαλίδας**

#### **1.1 Οργάνωση της παρεγκεφαλίδας του ενηλίκου**

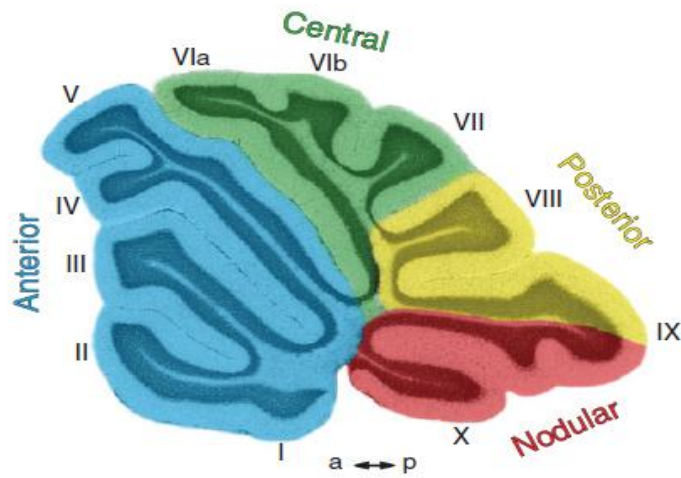
Η παρεγκεφαλίδα αποτελεί το μεγαλύτερο τμήμα του οπίσθιου εγκεφάλου υπεύθυνο κυρίως για την διατήρηση της ισορροπίας του σώματος, τον συντονισμό των κινήσεων καθώς και διάφορων άλλων συμπεριφορικών, γνωσιακών και συναισθηματικών λειτουργιών <sup>1,2</sup>. Μορφολογικά διαχωρίζεται σε 2 όμοια ημισφαίρια εκατέρωθεν της μέσης γραμμής όπου κάθε ένα διαιρείται σε 3 μεγάλες επιμήκεις περιοχές από έσω (μέση γραμμή) προς τα έξω.

Οι περιοχές αυτές είναι ο σκώληκας, η περιοχή παρά τον σκώληκα και τα παρεγκεφαλιδικά ημισφαίρια (**Graph 1 A**).

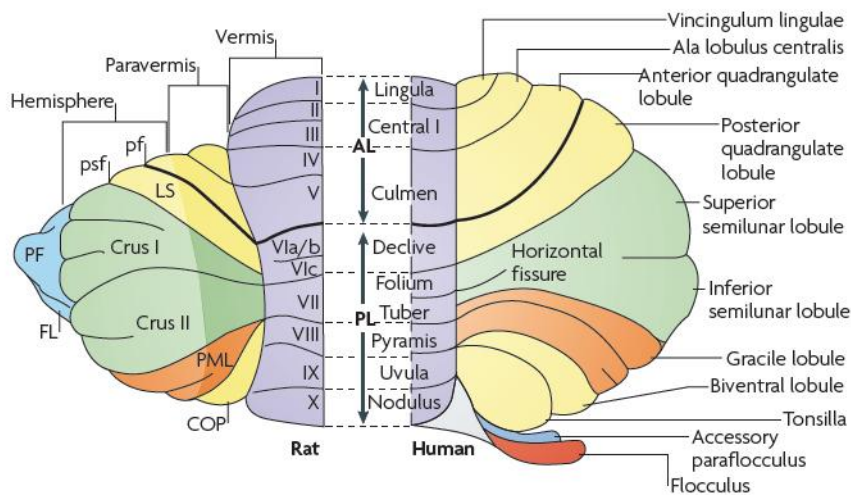


**Graph1A: Απεικόνιση των ανατομικών δομών τις παρεγκεφαλίδας του ενηλίκου μυός.** Οι στικτές γραμμές διαχωρίζουν τις δομές από έσω προς τα έξω στον σκώληκα (vermis), την περιοχή παρά τον σκώληκα (paravermis), τα παρεγκεφαλιδικά ημισφαίρια (hemispheres) και τον κροκιδώδη λοβό(floculus). Στην αριστερή πλευρά αριθμούνται τα λοβίδια του σκώληκα και των ημισφαιρίων.(Τροποποιημένη από White & Sillitoe,2012)

επίσης, στα τρωκτικά πλευρικά των ημισφαιρίων της παρεγκεφαλίδας παρατηρούνται ο κροκιδώδης και ο παρακροκιδώδης λοβός, περιοχές που στον άνθρωπο απαντώνται στο πλέον οπίσθιο άκρο του ιστού (κροκιδωζώδης λοβός, **Graph 1 C** ). Όλες οι παραπάνω δομές κατά μήκος του προσθοπίσθιου άξονα τους διαχωρίζονται σε λοβούς, λοβίδια και έλικες με την δημιουργία αυλακών, σχισμών και πτυχών εντός του παρεγκεφαλιδικού ιστού. Εσχάτως η θεμελιώδης αρχιτεκτονική της παρεγκεφαλίδας έχει αρχίσει να αναθεωρείται βασιζόμενη σε πρότυπα έκφρασης γονιδίων (από ομάδες κυττάρων Purkinje) και στους τελικούς στόχους των απαγωγών νευρικών απολήξεων<sup>3-6</sup>. Με βάση την πιο σύγχρονη περιγραφή η παρεγκεφαλίδα μπορεί να διαχωριστεί σε 4 εγκάρσιες ζώνες: Την *πρόσθια ζώνη* (ΠΖ/ΑΖ: λοβίδια I-V), την *κεντρική ζώνη* (ΚΖ/ΚΖ: λοβίδια VI-VII) που μπορεί να υποδιαιρεθεί και σε πρόσθιο και οπίσθιο τμήμα, την *οπίσθια ζώνη* (ΟΖ/ΠΖ: λοβίδια VIII-ραχιαίο τμήμα IX) και την *οζώδη ζώνη* (ΟΟ/ΝΖ: κοιλιακό τμήμα λοβιδίου IX-X)<sup>4</sup> (**Graph1 B**).



**Graph 1B:** Οβελιαία τομή της παρεγκεφαλίδας του ενήλικου μύς. Παρουσιάζεται η νεότερη ανατομική οργάνωση της παρεγκεφαλίδας στις 4 αυτές εγκάρσιες ανατομικές ζώνες, πρόσθια (μπλέ), κεντρική (πράσινο), οπίσθια (κίτρινο) και οζώδης (κόκκινο). Επίσης παρουσιάζονται τα διαφορετικά λοβίδια με λατινικούς αριθμούς. Η διατομή έχει γίνει στη μέση γραμμή στο επίπεδο του σκώληκα. (Τροποποιημένη από White & Sillitoe, 2012)



**Graph 1C:** Αδρή ανατομία παρεγκεφαλίδας σε αρουραίο (αριστερά) και άνθρωπο (δεξιά). Οι περιοχές με όμοιο χρώμα αποτελούν ίδιες περιοχές μεταξύ των δύο ειδών. Η ονοματολογία των λοβιδίων αριστερά είναι σύμφωνα με το σχήμα του Larsell's ενώ δεξιά σύμφωνα με του Bolk. (Τροποποιημένη από Apps & Hawkes, 2019)

## **Φαία ουσία παρεγκεφαλίδας και πυρήνες.**

Η φαία ουσία της παρεγκεφαλίδας απαντάται στην περιφέρειά της ως φλοιός της παρεγκεφαλίδας (A) και εσωτερικά της λευκής ουσίας σε περιοχές συνάθροισης φαίας ουσίας γνωστοί ως (B) πυρήνες της παρεγκεφαλίδας (deep cerebellar nuclei).

### **A) Φλοιός της παρεγκεφαλίδας**

Ο φλοιός παρουσιάζεται πτυχωτός λόγω των πολλαπλών παράλληλων εγκάρσιων πτυχών που δημιουργούνται και σχηματίζουν τις έλικες της παρεγκεφαλίδας (ή φύλλα). Κάθε έλικα αποτελείται από μια κεντρική μάζα λευκής ουσίας που επικαλύπτεται εξωτερικά από την φαία ουσία του φλοιού.

Ο φλοιός παρουσιάζει μια συγκεκριμένη διαστρωμάτωση και οργάνωση σε όλη την έκταση της παρεγκεφαλίδας. Έτσι λοιπόν οργανώνεται σε 3 κυτταρικές στοιβάδες από έσω προς τα έξω:

#### **1.Κοκκώδης στιβάδα:**

Αποτελούμενη κυρίως από μικρά κοκκώδη κύτταρα αλλά και κύτταρα Golgi, Lugaro και unipolar brush cells (UBCs). Οι άξονες των κοκκοειδών κυττάρων (granule cells, GCs) καταλήγουν στην μοριώδη στιβάδα όπου διχάζονται σαν «T» παράλληλα προς τον επιμήκη άξονα της έλικας δημιουργώντας τις παράλληλες ίνες της στιβάδας. Οι παράλληλες ίνες συνάπτονται με τις δενδριτικές άκανθες των δενδριτών των κυττάρων Purkinje που προβάλλουν επίσης στην μοριώδη στιβάδα. Η κοκκώδης στιβάδα δέχεται επιπροσθέτως τις τελικές απολήξεις βρυωδών ινών (mossy fibers)<sup>4,7</sup> (**Graph1 D**).

#### **2.Στιβάδα κυττάρων Purkinje:**

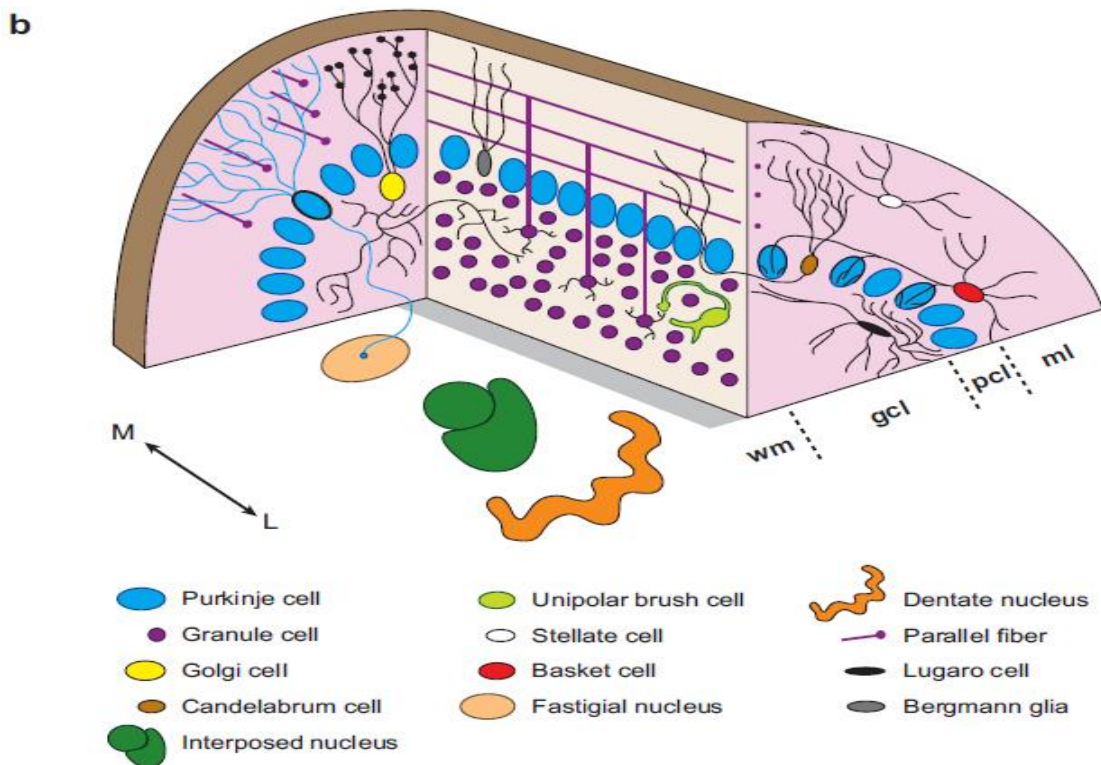
Τα κύτταρα Purkinje αποτελούν μεγάλους νευρώνες που διατάσσονται σε μία μονήρη στιβάδα από κύτταρα που προβάλλουν τους δενδρίτες τους προς την μοριώδη στιβάδα. Οι άξονες των κυττάρων Purkinje εκφύονται από την βάση των κυττάρων, διασχίζουν την κοκκώδη στιβάδα και εισέρχονται εντός της λευκής ουσίας όπου και αποκτούν έλυτρο μυελίνης. Οι περισσότεροι άξονες τους δημιουργούν συνάψεις με τους παρεγκεφαλιδικούς πυρήνες που βρίσκονται εν τω βάθει της λευκής ουσίας (deep cerebellar nuclei) της

παρεγκεφαλίδας. Οι άξονες ολιγάριθμων κυττάρων Purkinje πραγματοποιούν απευθείας συνάψεις με τους αιθουσαίους πυρήνες του εγκεφαλικού στελέχους<sup>8,9</sup>. Εκτός από τα ομώνυμα κύτταρα της στοιβάδας, εντός αυτής παρατηρούνται και γλοιακά κύτταρα Bergmann.

Τα κύτταρα Purkinje επεξεργάζονται εισερχόμενα διεγερτικά και ανασταλτικά σήματα. Έτσι μπορούν τελικά να ανταποκριθούν στις εισερχόμενες αισθητικές πληροφορίες ρυθμίζοντας την απόκριση των παρεγκεφαλιδικών και αιθουσαίων πυρήνων προς τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό<sup>8</sup>.

### 3.Μοριώδη στιβάδα:

Η εξώτερη αυτή στιβάδα του φλοιού περιέχει κυρίως 2 τύπους νευρώνων, εσωτερικά περιέχει τα καλαθιοφόρα κύτταρα και εξωτερικά τα αστεροειδή κύτταρα. Αυτά τα κύτταρα κατανέμονται διάσπαρτα εντός των πυκνών δενδριτικών διακλαδώσεων (Purkinje) και των παράλληλων αξόνων (κοκκιωδών κυττάρων, αναρριχητικές ίνες) μαζί με γλοιακά κύτταρα (Graph1 D)<sup>7</sup>.



**Graph 1D: Οργάνωση φλοιού, εν τω βάθει πυρήνων και νευρωνικών κυκλωμάτων εντός της παρεγκεφαλίδας.** Παρουσιάζονται οι διαφορετικοί κυτταρικοί πληθυσμοί και η κατανομή τους εντός του παρεγχύματος. ml: μοριώδης στοιβάδα, pcl:στοιβάδα κυττάρων Purkinje, gcl:κοκκώδης στοιβάδα, wm: λευκή ουσία (τροποποιημένη από Sillitoe & Loyner, 2007)

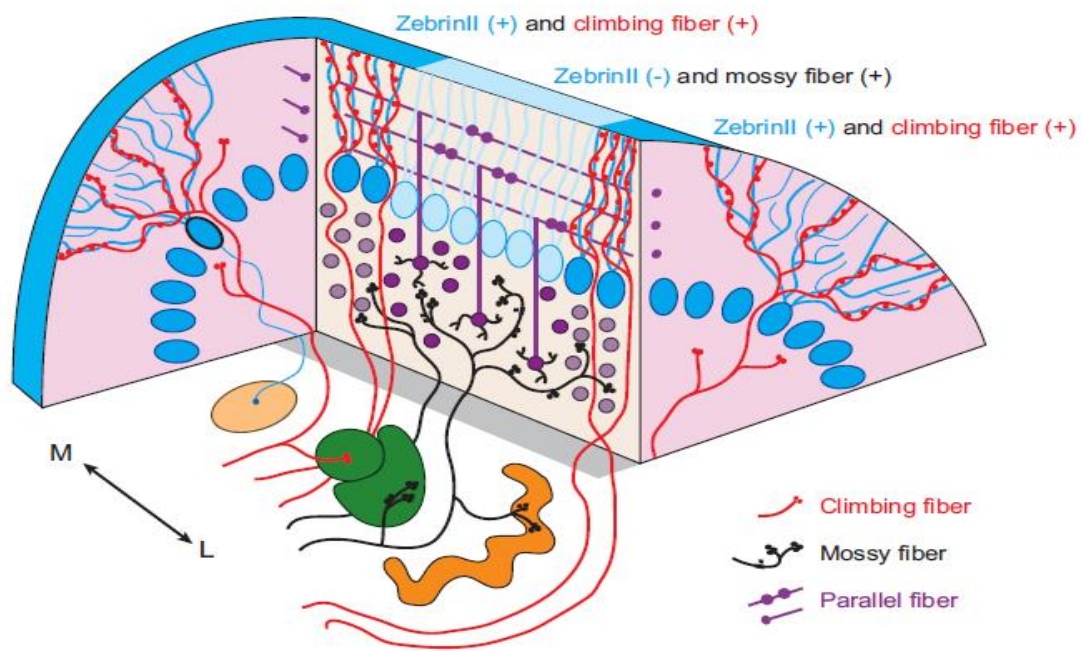
## **B) Πυρήνες της παρεγκεφαλίδας**

Στον άνθρωπο, εντός της λευκής ουσίας της παρεγκεφαλίδας παρουσιάζονται 4 μάζες φαιάς ουσίας που αποτελούν τους παρεγκεφαλιδικούς πυρήνες. Στον ποντικό οι παρεγκεφαλιδικοί αυτοί πυρήνες ονομάζονται εν τω βάθει παρεγκεφαλιδικοί πυρήνες (deep cerebellar nuclei, DCN) και αποτελούνται από 3 μάζες φαιάς ουσίας. Από έξω προς την μέση γραμμή αμφοτερόπλευρα οι πυρήνες κατανέμονται ως εξής:

1. Οδοντωτός πυρήνας/dentate nucleus (ή *πλευρικός πυρήνας στον ποντικό*): Αποτελεί τον μεγαλύτερο από τους παρεγκεφαλιδικούς πυρήνες.
2. Εμβολοειδής πυρήνας/ emboliform nucleus (όμοια ονομασία στον ποντικό): Εντοπίζεται στο έσω στόμιο του οδοντωτού πυρήνα.
3. Σφαιροειδής πυρήνας/ globose nucleus: Εντοπίζεται έσω του εμβολοειδούς και δεν παρουσιάζεται στα τρωκτικά σαν ξεχωριστή δομή. Συχνά ο εμβολοειδής και ο σφαιροειδής πυρήνας μαζί αναφέρονται ως “interposed nucleus” σε αρκετές μελέτες.
4. Οροφιαίος πυρήνας/ fastigial nucleus (ή έσω πυρήνας στον ποντικό): Βρίσκεται εγγύς της μέσης γραμμής εντός του σκώληκα.

Οι άξονες των νευρώνων που εκβάλουν από τους πυρήνες της παρεγκεφαλίδας δημιουργούν τις κύριες απαγωγές ίνες της παρεγκεφαλίδας. Οι νευρώνες αυτοί διαχωρίζονται βάσει του νευροδιαβιβαστή που εκφράζουν, σε γλουταμινεργικούς, γ-αμινοβουτυρικούς (GABA-εργικούς) και σε νευρώνες που εκφράζουν γλυκίνη<sup>7,10</sup>(**Graph2 A**).





**Graph 2A:** Νευρωνικό κύκλωμα παρεγκεφαλίδας. Παρουσιάζονται οι προσαγωγές και απαγωγές ίνες και οι συνάψεις τους. DCN στην βάση της εικόνας. Ρόζ χρώμα έσω: fastigial nucleus, Πράσινο χρώμα: interposed nucleus, Πορτοκαλί χρώμα : dentate nucleus. M:medial, L:lateral.(Τροποποιημένη από Sillitoe & Loyner, 2007)

## Λευκή ουσία της παρεγκεφαλίδας

Η λευκή ουσία της παρεγκεφαλίδας αποτελείται από τρεις τύπους νευρικών ινών: Από νευρικές ίνες που εισέρχονται στην παρεγκεφαλίδα από νευρώνες εκτός αυτής και ονομάζονται **προσαγωγές ίνες**, από νευρικές ίνες που προβάλουν από νευρώνες εντός της παρεγκεφαλίδας προς περιοχές εκτός αυτής και αποτελούν τις **απαγωγές ίνες** και τέλος από νευρικές ίνες που συνδέουν περιοχές εντός της παρεγκεφαλίδας και ονομάζονται **ενδογενείς ίνες**.

Όλοι οι άξονες των προσαγωγών και των απαγωγών νευρικών ινών εισέρχονται και εξέρχονται από την παρεγκεφαλίδα μεταφέροντας από και προς αυτήν πληροφορίες. Οι νευρικές ίνες αυτές οργανώνονται σε 3 μεγάλα δεμάτια αξόνων αμφοτερόπλευρα που αποτελούν τα άνω, τα μέσα και τα κάτω παρεγκεφαλιδικά σκέλη.



## **Αναλυτικότερα:**

**A. Προσαγωγές ίνες:** Αποτελούν το μεγαλύτερο όγκο νευρικών ινών της παρεγκεφαλίδας και εισέρχονται κυρίως μέσω του κάτω και του μέσου παρεγκεφαλιδικού σκέλους. Μπορούν να ομαδοποιηθούν σε 2 μεγάλες ομάδες, τις αναρριχόμενες και τις βρυώδεις ίνες:

**i) Οι Αναρριχόμενες νευρικές ίνες** αποτελούν αποκλειστικά νευρικές ίνες από τον κάτω ελαϊκό πυρήνα του προμήκους μυελού στο εγκεφαλικό στέλεχος. Οι νευράξονες αυτοί καθώς ανέρχονται προς την παρεγκεφαλίδα χιάζονται στην μέση γραμμή και εισέρχονται εντός της παρεγκεφαλίδας από το αντίπλευρο κάτω παρεγκεφαλιδικό σκέλος. Μετά την είσοδο τους πραγματοποιούν συνάψεις τόσο με τους δενδρίτες των κυττάρων Purkinje στην μοριώδη στιβάδα του φλοιού, όσο και με τους νευρώνες των παρεγκεφαλιδικών πυρήνων<sup>7</sup> (**Graph2 A**).

**ii) Οι Βρυώδης νευρικές ίνες** αποτελούν τις κύριες προσαγωγές νευρικές ίνες προς την παρεγκεφαλίδα και προέρχονται από πολλές διαφορετικές περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος. Έτσι οι βρυώδεις ίνες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 3 κύριες ομάδες που προβάλλουν σε συγκεκριμένες περιοχές της παρεγκεφαλίδας<sup>11</sup>. Οι ομάδες των βρυωδών ινών είναι οι ακόλουθες:

**α) Οι σωματο-αισθητικές ίνες** (τριδυμο-παρεγκεφαλιδικές και νωτιαιο-παρεγκεφαλιδικές) που εκβάλλουν από τους αντίστοιχους πυρήνες και τα γάγγλια του τριδύμου και από τον νωτιαίο μυελό. Προβάλλουν κυρίως στα λοβίδια I-IV και στο VIII της παρεγκεφαλίδας.

**β) Δικτυωτο-παρεγκεφαλιδικές ίνες** που εκβάλλουν από τους αντίστοιχους πυρήνες του δικτυωτού σχηματισμού της γέφυρας και του προμήκους μυελού.

**γ) Οι Αιθουσαίο-παρεγκεφαλιδικές ίνες** που εκβάλλουν από τους αιθουσαίους πυρήνες του στελέχους και το αντίστοιχο γάγγλιο προς τα κοιλιακά λοβίδια IX και το κροκιδουζώδες λοβίο της παρεγκεφαλίδας, μέσω του κάτω παρεγκεφαλιδικού σκέλους.

Οι αιθουσαίο-παρεγκεφαλιδικές ίνες διαχωρίζονται σε πρωτογενείς (primary vestibular mossy fibers, PVF) και δευτερογενείς (secondary vestibular mossy fibers,SVF). Οι πρωτογενείς νευρικές ίνες (PVF) από το αιθουσαίο γάγγλιο (VIII) εισέρχονται άμεσα στην παρεγκεφαλίδα μέσω του κάτω παρεγκεφαλιδικού σκέλους, χωρίς να περάσουν ενδιάμεσα από τους αιθουσαίους πυρήνες. Αντιθέτως οι δευτερογενείς νευρικές ίνες (PVF) προβάλλουν από τους αιθουσαίους πυρήνες προς την παρεγκεφαλίδα<sup>11</sup>. Οι πρώτες προσαγωγές ίνες που εισέρχονται στην παρεγκεφαλίδα κατά την περίοδο της ανάπτυξης είναι οι PVF σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει στον αρουραίο<sup>12</sup>.

Οι τελικές απολήξεις των βρυωδών ινών, γνωστές και ως ροζέτες (rosettes), τελικώς ανευρίσκονται εντός της κοκκώδους στιβάδας του φλοιού της παρεγκεφαλίδας. Οι ροζέτες μαζί με τα δενδριτικά κομβία των κοκκιωδών κυττάρων και τους άξονες των κυττάρων Golgi δημιουργούν τα σπειράματα της κοκκώδους στιβάδας μέσω των συνάψεων τους<sup>13</sup>.

### **B. Απαγωγές ίνες:**

Ο μεγαλύτερος αριθμός των απαγωγών ινών εντός της παρεγκεφαλίδας (ενδογενείς ίνες) αποτελείται από τους άξονες των κυττάρων Purkinje. Η πλειοψηφία αυτών των απαγωγών ινών θα πραγματοποιήσουν τελικά συνάψεις με τους πυρήνες της παρεγκεφαλίδας. Ένα μικρό ποσοστό τους θα εξέλθει από την παρεγκεφαλίδα και θα καταλήξει άμεσα στην περιοχή των αιθουσαίων πυρήνων<sup>14</sup>.

Οι νευράξονες των νευρώνων των παρεγκεφαλιδικών πυρήνων αποτελούν τις κύριες απαγωγές ίνες της παρεγκεφαλίδας προς άλλες περιοχές του εγκεφάλου (Θάλαμο, ερυθρό πυρήνα, δικτυωτό σχηματισμό και σύμπλεγμα αιθουσαίων πυρήνων).

## **1.2 Οργάνωση αιθουσαίου συστήματος**

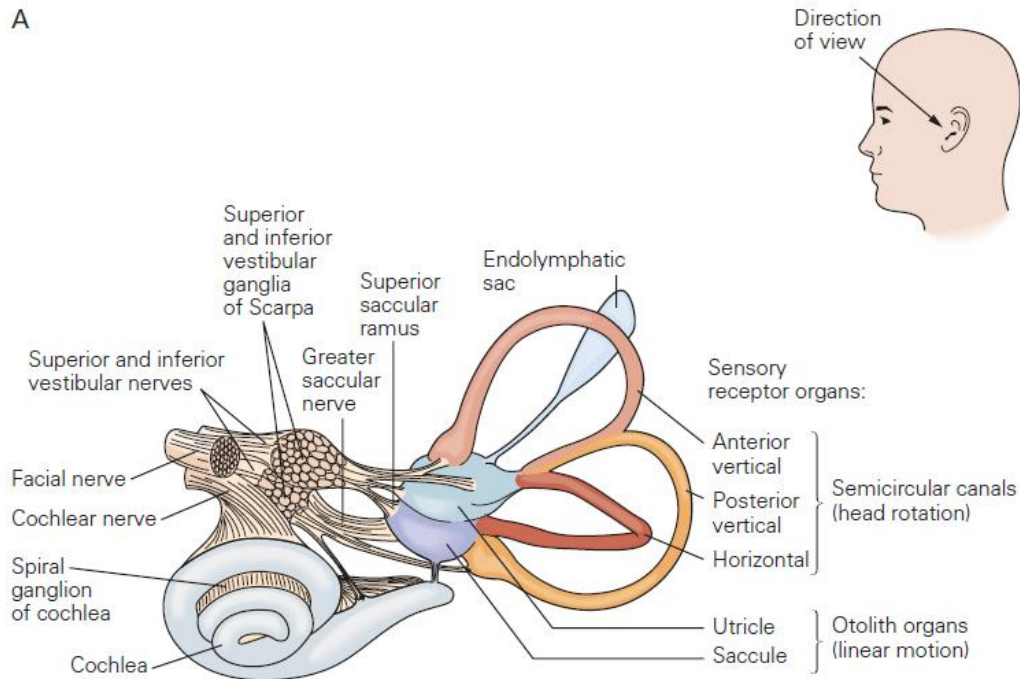
Το αιθουσαίο σύστημα είναι απαραίτητο για την ολοκλήρωση των λειτουργιών του προσανατολισμού στον χώρο, της τροποποίησης του μυϊκού τόνου και της ισορροπίας. Ανατομικά στην ενήλικη ζωή δομείται από 3 κέντρα: α) *Το περιφερικό αισθητικό κέντρο*, όπου παρέχονται πληροφορίες από τις αισθήσεις της όρασης, της ιδιοδεκτικότητας και από το αιθουσαίο όργανο του λαβύρινθου του έσω ωτός. β) *Το κέντρο επεξεργασίας* των ανωτέρω πληροφοριών που αποτελείται από το σύμπλεγμα των αιθουσαίων πυρήνων του εγκεφαλικού στελέχους και την παρεγκεφαλίδα (προσαρμοστική επεξεργασία πληροφοριών)<sup>14</sup>. γ) *Το κινητικό κέντρο* που δομείται από κινητικούς νευρώνες που ρυθμίζουν την κίνηση των οφθαλμών και των γραμμωτών μυών που σχετίζονται με την τελική στάση του σώματος<sup>15</sup>.

### **A) Οργάνωση κεντρικού αισθητηρίου οργάνου αιθουσαίου συστήματος.**

Το κύριο αισθητικό όργανο του αιθουσαίου συστήματος εδρεύει μαζί με το όργανο της ακοής εντός της κοιλότητας του έσω ωτός και ονομάζεται λαβύρινθος. Ο λαβύρινθος βρίσκεται οπισθίως του κοχλία (αισθητήριο της ακοής), ενώ περιστοιχίζεται από το κροταφικό οστό και εξωτερικά από την κοιλότητα του μέσου ωτός.

Ο λαβύρινθος αποτελείται από 2 τμήματα, το οστέινο εξωτερικά και το μεμβρανώδες εσωτερικά. Ο οστέινος λαβύρινθος σχηματίζεται από τρεις ημικύκλιους σωλήνες και την περιοχή πρόσθια αυτών που ονομάζεται αίθουσα. Η κοιλότητα του οστέινου λαβυρίνθου πληρούται με υγρό όμοιας σύστασης με το εγκέφαλο νωτιαίο υγρό και ονομάζεται περιλεμφικό υγρό (ή περίλεμφος). Εσωτερικά του οστέινου λαβυρίνθου, μια όμοια ανατομικά δομή αναρτάται με υποστηρικτικό συνδετικό ιστό, περιστοιχίζεται από το περιλεμφικό υγρό και ονομάζεται υμενώδης λαβύρινθος<sup>16</sup>. Εντός της δομής του συναντώνται τα 5 αισθητικά όργανα που θα σχηματίσουν την αιθουσαία αισθητική πληροφορία. Τα όργανα αυτά είναι: τα τρία υμενώδη τμήματα των ημικύκλιων σωλήνων και τα δύο όργανα των ωτολίθων (ελλειπτικό και σφαιρικό κυστίδιο). Οι τρεις ημικύκλιοι σωλήνες είναι ο πρόσθιος (ή άνω), ο οριζόντιος (ή έξω) και ο οπίσθιος και κάθε ένας από αυτούς στο άκρο τους προς την αίθουσα διευρύνονται και σχηματίζουν την λήκυθο. Εσωτερικά ο υμενώδης λαβύρινθος περιέχει το ενδολεμφικό υγρό που σε αντίθεση με το περιλεμφικό ομοιάζει σε ηλεκτρολυτική σύσταση με το ενδοκυττάριο υγρό (υψηλός λόγος  $K^+/Na^+$ ). Εντός της ληκύθου κάθε ημικύκλιου υμενώδους σωληναρίου εδρεύουν τα τριχωτά κύτταρα που αποτελούν τα υποδεκτικά στοιχεία του λαβυρίνθου<sup>17,18</sup>. Κάθε τριχωτό κύτταρο είναι τοποθετημένο στην ληκυθική ακρολοφία που αποτελεί την βάση υποστήριξης του και περιέχει νευρικές συνάψεις, τροφικούς αγγειακούς θυσάνους και συνδετικό ιστό (**Graph2 B**).

A

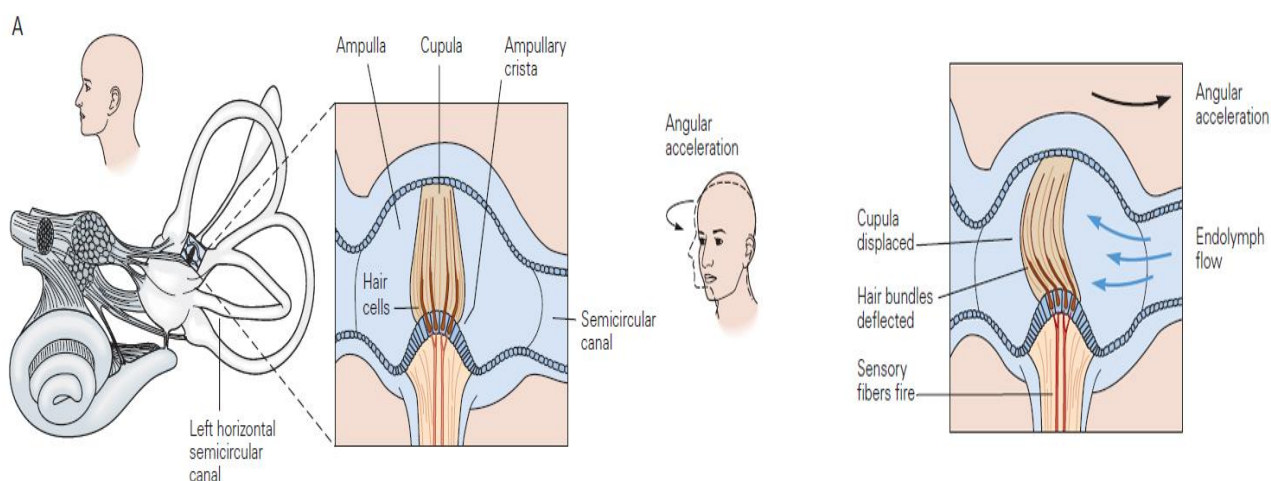


**Graph 2B:** Αδρή ανατομία του αισθησαίο-ακουστικού οργάνου. Παρουσιάζονται τα υποδεκτικά όργανα του λαβυρίνθου και του κοχλίου. Κάθε ημικύκλιος σωλήνας παρουσιάζεται με ξεχωριστό χρώμα, **πρόσθιος**, **οριζόντιος** και **οπίσθιος**. (Τροποποιημένη από Kandel, principles of neural science, 4<sup>th</sup> edition.)

Στο κορυφαίο άκρο των κυττάρων παρουσιάζονται οι στερεοκροσσοί που εντοπίζονται με κλιμακούμενη αύξηση του μήκους τους έως τον τελευταίο που είναι και ο μακρύτερος και ονομάζεται κινητοκροσσός (Kinocilium). Η κίνηση των κροσσών προς τον κινητοκροσσό οδηγεί το εκάστοτε τριχωτό κύτταρο σε εκπόλωση ενώ η αντίθετη κίνηση το οδηγεί σε υπερπόλωση. Την κορυφή των τριχωτών κυττάρων καλύπτει ένα μεμβρανώδες υμένας (cupula) ζελατινοειδούς σύστασης που κλείνει το άκρο κάθε ημικύκλιου σωλήνα από την ληκυθική ακρολοφία προς την αίθουσα. Η κίνηση του μεμβρανώδους υμένα από την ενδόλεμφο που εισέρχεται ή εξέρχεται από το άλλο άκρο του σωληναρίου προς την αίθουσα προκαλεί τελικά και την κίνηση των κροσσών. Η απόφραξη που προκαλεί στο ληκυθικό άκρο του σωληναρίου ο μεμβρανώδης υμένας το απομονώνει από τα άλλα αισθησαία όργανα μην επιτρέποντας την λανθασμένη διέγερση τους από την κινούμενη ενδόλεμφο που θα διέφευγε (**Graph2 C**).

Εντός της αίθουσας τα άλλα δύο όργανα, το ελλειπτικό και το σφαιρικό κυστίδιο, έχουν επίσης ως υποδεκτικά στοιχεία τα τριχωτά κύτταρα με παρόμοια μορφολογία και δομή,

όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Το χαρακτηριστικό που τροποποιεί την δράση αυτών των οργάνων είναι το γεγονός ότι αντί για τον μεμβρανώδη υμένα στην κορυφή των τριχωτών κυττάρων υπάρχει η ωτολιθική μεμβράνη<sup>19</sup>.



**Graph 2C:** Ανατομία ληκύθου ημικόκλιου υμενώδους σωλήνα (αριστερά) και δραστηριότητα τριχωτών κυττάρων κατά την κίνηση κεφαλής δεξιά (Τροποποιημένη από Kandel, principles of neural science, 4<sup>th</sup> edition.)

Η ωτολιθική μεμβράνη έχει επίσης ζελατινώδη σύσταση αλλά εξαιτίας του ότι περιέχει και κρυστάλλους ανθρακικού ασβεστίου (ωτοκονία) παρουσιάζει αυξημένη μάζα και καθίσταται ευαίσθητη στις βαρυτικές δυνάμεις<sup>20</sup>. Ο μεμβρανώδης υμένας (cupula) έχει ακριβώς την ίδια πυκνότητα με την περιβάλλουσα ενδόλεμφο με αποτέλεσμα να μην επηρεάζεται από την βαρύτητα<sup>16</sup>.

Οι 3 ημικόκλιοι σωλήνες κάθε ημιμορίου λόγω της κατοπτρικής τους συμμετρίας δημιουργούν 3 συνεπίπεδα ζεύγη που δρουν συνεργικά. Τα ζεύγη αυτά είναι μεταξύ του αριστερού έξω σωληναρίου με το δεξί έξω, του αριστερού άνω με το δεξιό οπίσθιο και του δεξιού άνω με το αριστερό οπίσθιο. Η δράση των σωληναρίων επιτρέπει την αισθητική αναγνώριση γωνιακών μεταβολών της ταχύτητας της κεφαλής σε διαφορετικά επίπεδα στο χώρο. Μέσω αυτών των εισερχόμενων πληροφοριών συντονίζεται η ομαλή ταυτόχρονη κίνηση των οφθαλμών, ώστε η εικόνα να λαμβάνεται (προβολή στην ωχρά) ανεπηρέαστη. Αυτό το αντανακλαστικό ονομάζεται αισθουσαίο-οφθαλμικό αντανακλαστικό (vestibule-ocular reflex ,VOR)<sup>21</sup>. Τα όργανα της αίθουσας (ελλειπτικό και σφαιρικό κυστίδιο) είναι υπεύθυνα

για την αισθητική αναγνώριση της γραμμικής επιτάχυνσης της κεφαλής στις 3 διαστάσεις (κάθετο, προσθιο-οπίσθιο και πλάγιο άξονα) αλλά και στις στατικές κλίσης της κεφαλής (κάμψη, πλάγια κλίση ή πρωτεύουσα θέση κεφαλής<sup>16</sup>.

Οι πληροφορίες από τα τριχωτά κύτταρα του λαβυρίνθου μεταφέρονται διεγείροντας τα δίπολα κύτταρα του αιθουσαίου γάγγλιου (Scarpa's ganglion, VIII αισθητικό γάγγλιο) με τα οποία συνάπτονται. Οι άξονες των δίπολων κυττάρων του αιθουσαίου γάγγλιου σχηματίζουν το αιθουσαίο νεύρο. Οι απαγωγές ίνες των δίπολων νευρώνων του γάγγλιου προβάλλουν προς το σύμπλεγμα των αιθουσαίων πυρήνων του εγκεφαλικού στελέχους, ενώ ένα μέρος τους προβάλλει άμεσα προς περιοχές κυρίως του κροκιδό-οζώδους λοβού και του κοιλιακού λοβού IX<sup>12,22</sup>. Οι πρωτογενείς αιθουσαίο-παρεγκεφαλιδικές ίνες (PVF) όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως αποτελούν τις πρώτες προσαγωγές ίνες που εισέρχονται στον αρχέγονο παρεγκεφαλιδικό ιστό κατά την ανάπτυξη.

### ***B) Σύμπλεγμα αιθουσαίων πυρήνων***

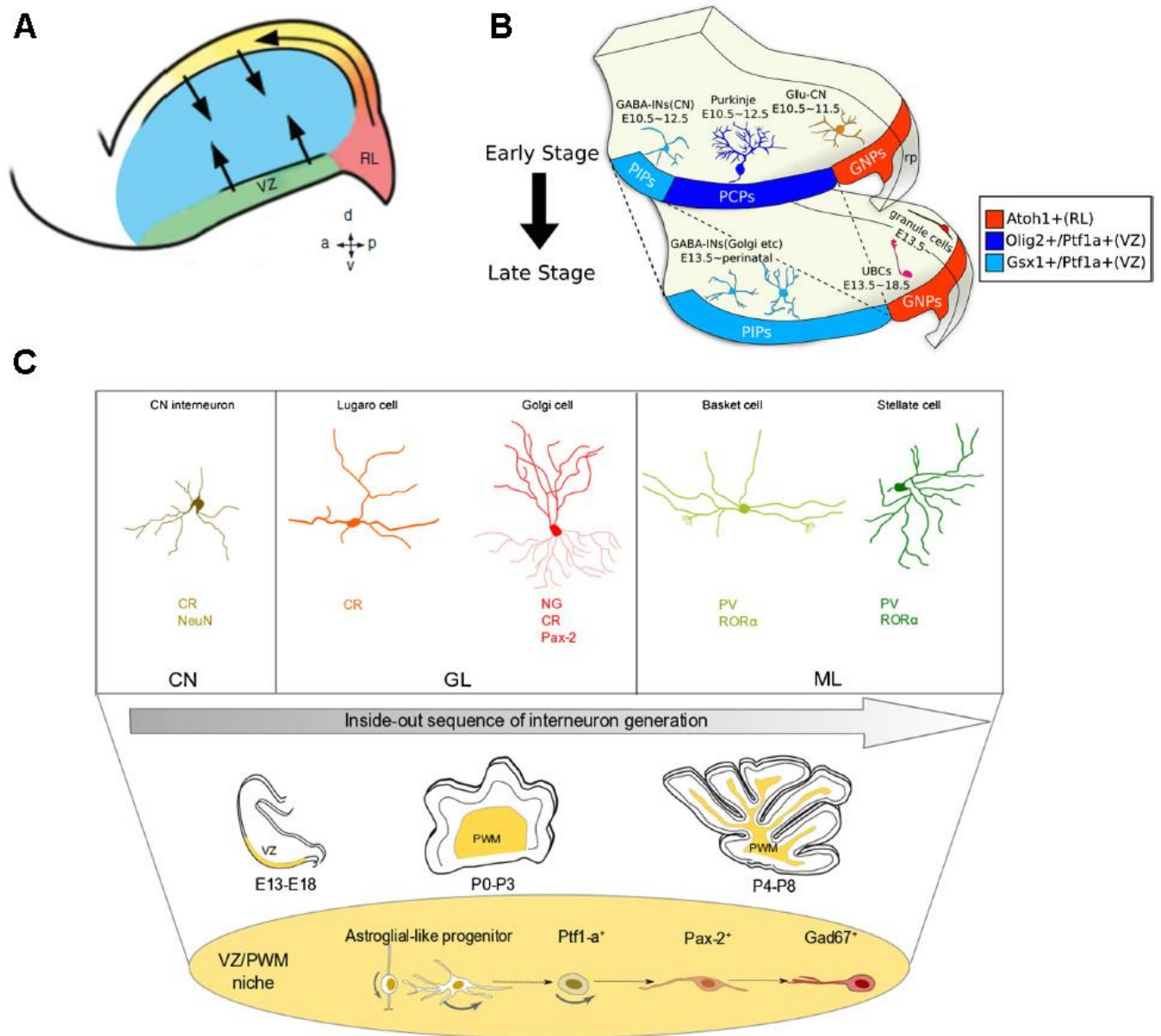
Το σύμπλεγμα των αιθουσαίων πυρήνων όπου καταλήγει η πλειοψηφία των νευρικών ινών του αιθουσαίου νεύρου αποτελείται από 4 πυρήνες:

α) τον άνω, β) τον κάτω, γ) τον έσω και τον έξω αιθουσαίο πυρήνα<sup>14</sup>. Οι παραπάνω πυρήνες ανευρίσκονται στην περιοχή του προμήκους μυελού και της γέφυρας. Επιπρόσθετα των κλασικών αιθουσαίων πυρήνων και άλλοι πυρήνες λαμβάνουν πρωτογενείς προσαγωγές ίνες από το αιθουσαίο νεύρο παρόλα αυτά δεν θα συζητηθούν περεταίρω (Υ-group, parasolitary nucleus, nucleus intracalatus).

Οι κλασικοί αιθουσαίοι πυρήνες δέχονται προσαγωγές ίνες από το αιθουσαίο νεύρο και τις προσαγωγές από την παρεγκεφαλίδα, (ως άμεσες από τα κύτταρα rugkinje ή από τους DCN) που συζητήθηκαν παραπάνω<sup>23</sup>. Επιπροσθέτως των απαγωγών ινών προς την παρεγκεφαλίδα, απαγωγοί ίνες φέρονται και προς τους πυρήνες του απαγωγού, κοινού κινητικού και του τροχλιακού νεύρου (ενεύρωση εξοφθάλμιων μυών). Επίσης απαγωγές ίνες από τον έξω αιθουσαίο πυρήνα κατέρχονται αχίαστες προς τον νωτιαίο μυελό δημιουργώντας το αιθουσονωτιαίο δεμάτιο<sup>23</sup> (hain and helminki chapter 1). Το σύμπλεγμα των αιθουσαίων πυρήνων αποτελεί μαζί με ορισμένες περιοχές της παρεγκεφαλίδας την κεντρική μονάδα επεξεργασίας των αιθουσαίων αισθητικών πληροφοριών.

### 1.3 Εμβρυική ανάπτυξη παρεγκεφαλίδας και του αιθουσαίου συστήματος.

Η ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας αρχίζει από το ραχιαίο ρομβομερές 1 της νευρικής ακρολοφίας μέσω της δράσης συγκεκριμένων μορφογόνων που την διαμορφώνουν ως δομή του οπισθίου εγκεφάλου. Η γενεαλογία των νευρωνικών κυτταρικών πληθυσμών της παρεγκεφαλίδας αρχίζει στον ποντικό νωρίς κατά την ανάπτυξη περίπου από την εμβρυική ημέρα E10<sup>24</sup>. Η γένεση και η μετανάστευση των νευρώνων πραγματοποιείται από δύο βλαστικές περιοχές του νευροεπιθηλίου, την κοιλιακή βλαστική ζώνη (ventricular zone, VZ) και την περιοχή του ρομβοειδούς χείλους (rhombic lip, RL). Τα κύτταρα της κοιλιακής ζώνης (VZ) είναι αυτά που θα οδηγήσουν στη δημιουργία όλων των GABA-εργικών νευρώνων της παρεγκεφαλίδας (κύτταρα Purkinje, Golgi, καλαθιοφόρα, αστεροειδή). Εν αντιθέσει, από την περιοχή του ρομβοειδούς χείλους (RL), θα προέλθουν όλοι οι γλουταμινεργικοί νευρώνες της παρεγκεφαλίδας (γλουταμινεργικοί νευρώνες των παρεγκεφαλιδικών πυρήνων (DCN), κοκκώδη κύτταρα και Unipolar brush cells)<sup>8,24</sup>. (**Graph4, Graph5B**)<sup>24</sup>. Ο σχηματισμός όλων των κυτταρικών πληθυσμών που αναφέρθηκαν παραπάνω από την VZ και το RL πραγματοποιείται από πολυδύναμα προγονικά ακτινωτά νευρογλοιακά κύτταρα (multipotent radial glia progenitors cells)<sup>25</sup>.



**Graph 4 (A)** Οβελιαία τομή αρχέγονης παρεγκεφαλίδας, όπου παρουσιάζονται οι 2 βλαστικές ζώνες του ρομβοειδούς χείλους (RL) και της κοιλιακής βλαστικής ζώνης (VZ). Επίσης με βέλη παρουσιάζεται ο τρόπος μετανάστευσης των πρόδρομων κυττάρων που προκύπτουν από αυτές. **(B)** Προγονικοί πληθυσμοί των νευρώνων της παρεγκεφαλίδας στα πρώιμα και όψιμα στάδια της ανάπτυξης (cerebella progenitors). **(C)** Γενεαλογία των παρεγκεφαλιδικών ενδονευρώνων σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης και ειδικοί μοριακοί μάρτυρες που εκφράζουν κατά την ανάπτυξη. GNPps (glutamatergic neuron progenitors), PIPs (Pax-2+ IN progenitors), PCPs (Purkinje cell progenitors), rp (roof plate), GABA-Ins CN (GABAergic interneurons in the Deep cerebellar nuclei), Glu-CN



(glutamatergic neurons in the deep cerebellar nuclei).(Τροποποιημένη από White & Sillitoe 2012, Leto, et al 2015.

### **A) Χρονική και χωρική εξέλιξη των νευρωνικών πληθυσμών της παρεγκεφαλίδας και του αιθουσαίου συστήματος.**

Δύο μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας των πρωτεϊνών βασικής έλικας-θηλιάς-έλικας είναι υπεύθυνοι για τον καθορισμό των χωρικών χαρακτηριστικών του RL και της VZ της παρεγκεφαλίδας. Επίσης αυτοί οι παράγοντες καθορίζουν τον τύπο των μετα-μιτωτικών νευρικών πληθυσμών που προκύπτουν από τις ανωτέρω βλαστικές περιοχές. Τα δύο αυτά γονίδια είναι το *Atho1* (ή *Math1*)<sup>26</sup> που εκφράζεται στα προγονικά κύτταρα του RL και το *Ptf1a* που εκφράζεται από τα προγονικά κύτταρα της VZ, δίδοντας τελικά γλουταμινεργικούς και GABA-εργικούς νευρώνες αντίστοιχα<sup>24</sup>.

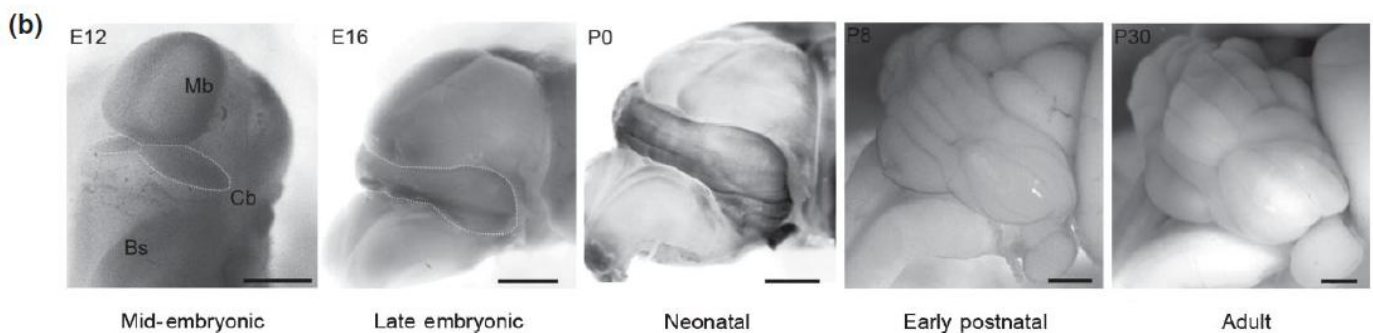
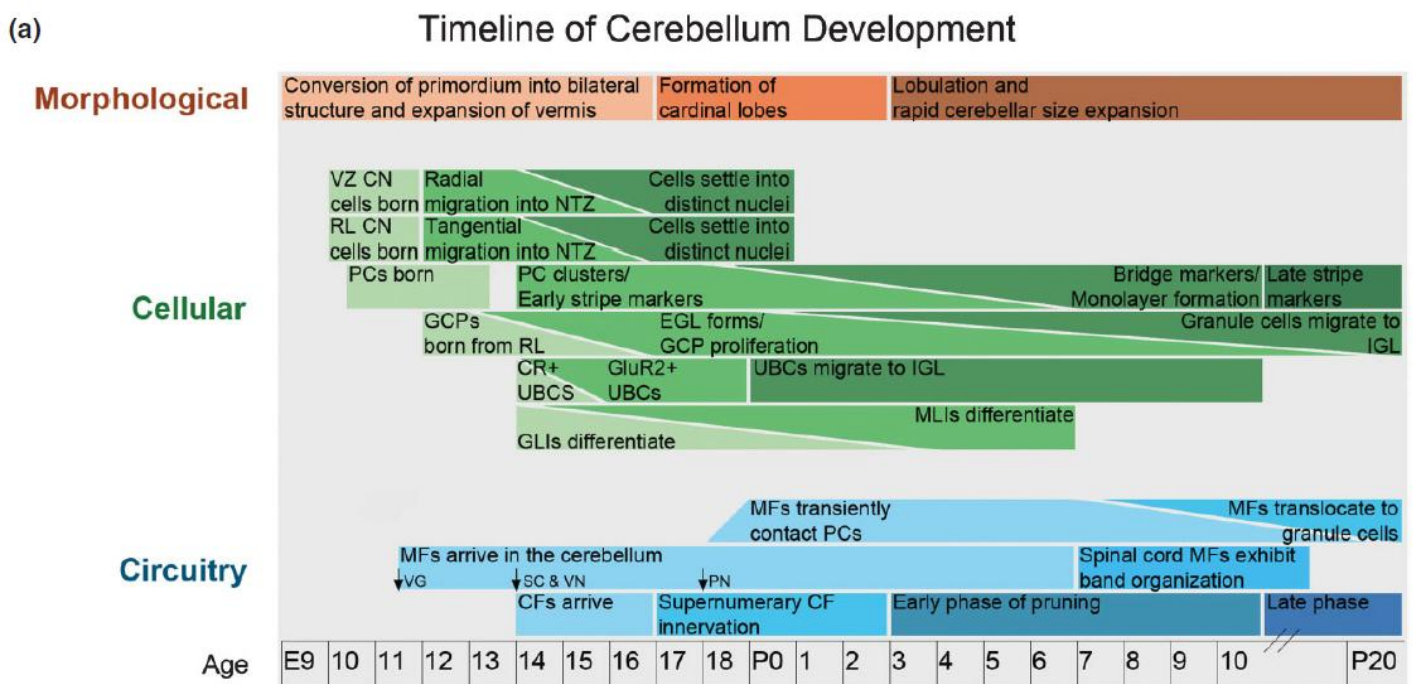
Κατά την ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας στον ποντικό, ο πρώτος τύπος κυττάρων που διαφοροποιείται από τα προγονικά του κύτταρα είναι οι γλουταμινεργικοί νευρώνες των παρεγκεφαλιδικών πυρήνων (DCN). Αυτοί οι νευρώνες μεταπίπτουν σε μετα-μιτωτικούς νευρώνες από την περιοχή του ρομβοειδούς χείλους RL μεταξύ E10-E12. Ακολούθως μετά την γένεσή τους αρχίζουν να μεταναστεύουν οριζόντια στην ραχιαία επιφάνια του αρχέγονου παρεγκεφαλιδικού ιστού έως ότου φτάσουν στην πρόσθια και ραχιαία επιφάνια της παρεγκεφαλίδας. Στην περιοχή αυτή, όπου τελικά συγκεντρώνονται, δημιουργούν την πυρηνική ζώνη μετάπτωσης (Nuclear transitory zone, NTZ)<sup>8,24</sup>. Κατά την πρόοδο της ανάπτυξης της παρεγκεφαλίδας ο παραπάνω πληθυσμός από την NTZ θα καταδυθεί εντός του παρεγκεφαλιδικού ιστού μετά την E15,5 για να καταλάβει την τελική του θέση (DCN)<sup>27</sup>. **(Graph5 A,B).**

Ο επόμενος πληθυσμός που προκύπτει από τα προγονικά κύτταρα του RL μετά τους DCN νευρώνες είναι οι γλουταμινεργικοί διεγερτικοί νευρώνες του φλοιού της παρεγκεφαλίδας, τα κοκκώδη κύτταρα (Granule cells, GCs). Μετά την εμβρυϊκή ηλικία E12,5 (E13-E16,5) στον ποντικό τα κύτταρα που προκύπτουν από την βλαστική περιοχή του RL θα δημιουργήσουν τελικά τον πληθυσμό των GCs του φλοιού (Graph5 B). Από αυτά τα κύτταρα προκύπτουν διαφορετικές ομάδες GCs ανάλογα με την περίοδο γένεσής τους. Έτσι τα GCs που προκύπτουν πρώτα (~E12,5) καταλήγουν στα πρόσθια τμήματα του φλοιού ενώ διαδοχικά τα πιο ουραία ευρισκόμενα προκύπτουν μεταξύ των ηλικιών E15,5-E16,5<sup>26</sup>. Η πορεία της μετανάστευσης του ακολουθούν αυτά τα κύτταρα μετά την δημιουργία τους από το RL είναι παρόμοια με αυτή των DCN γλουταμινεργικών νευρώνων. Μεταναστεύουν οριζόντια στην

ραχιαία επιφάνεια της παρεγκεφαλίδας δημιουργώντας την έξω κοκκώδη στιβάδα (external granular layer, EGL)<sup>24</sup>. Καθώς η αναπτυξιακή διαδικασία της παρεγκεφαλίδας προχωρά και τα προγονικά κύτταρα των GCs στην EGL έχουν αυξηθεί, αρχίζει η μείωση των επιπέδων του ATOH1 και η αύξηση του NeuroD1<sup>28</sup>. Η παραπάνω διαδικασία καθιστά τα κύτταρα μετά-μιτωτικά και αρχίζουν να μεταναστεύουν κάθετα εντός του φλοιού. Αρχικά θα δημιουργήσουν τις παράλληλες αξονικές προεκβολές τους και μετά μέσω των γλοιακών κυττάρων Bergmann θα μεταναστεύσουν στην τελική τους θέση στην έσω στιβάδα του φλοιού<sup>29</sup>. Οι παράλληλες ίνες των GCs εκφράζουν το μόριο κυτταρικής συνάφειας TAG-1(ή Contactin-2) στην επιφάνειά τους<sup>30</sup>. Ο τελευταίος χρονικά κυτταρικός πληθυσμός που γεννιέται από το RL μετά τα GCs είναι αυτός των unipolar brush cells (UBCs). Αυτός ο κυτταρικός πληθυσμός των διεγερτικών γλουταμινεργικών ενδονευρώνων εντοπίζεται στην κοκκώδη στιβάδα του παρεγκεφαλιδικού φλοιού. Η γένεση του πραγματοποιείται από την ημέρα E14,5 έως την E18,5. Μετά την διαφοροποίησή τους παραμένουν στην περιοχή του RL για 1-2 ημέρες πριν αρχίσουν την μετανάστευση τους προς την τελική στιβάδα των GCs<sup>31</sup>.

Αμέσως μετά την γένεση των DCN νευρώνων από το RL και την έναρξη της μετανάστευσής τους προς την NTZ, ο επόμενος πληθυσμός που γεννιέται είναι αυτός των κυττάρων Purkinje μετά την ημέρα E10,5. Μέχρι την εμβρυϊκή μέρα E14,5 η πλειοψηφία των κυττάρων Purkinje έχει μεταναστεύσει από την κοιλιακή περιοχή της VZ εντός της παρεγκεφαλίδας και έχει αρχίσει να σχηματίζει την νευρωνική πλάκα των κυττάρων Purkinje (Purkinje plate, PP)<sup>32</sup>. Τα κύτταρα Purkinje ήδη από την ηλικία E12,5 έχουν προβάλλει τους άξονες τους ενώ ακόμα μεταναστεύουν προς την PP. Βάσει του χρόνου γέννησής τους τα κύτταρα Purkinje μπορούν να διαχωριστούν σε 2 ομάδες: τα πρώιμα (από E10,5-E11,5) και τα όψιμα (από E11,5-E13,5). Ο πρώιμος πληθυσμός των κυττάρων Purkinje πρώτος ολοκληρώνει την μετανάστευση του μέχρι την εμβρυϊκή ημέρα E14,5 και σχηματίζει την PP. Από τα πρώιμα αυτά κύτταρα ο πληθυσμός που γεννιέται από την ουραία περιοχή της VZ κοντά στο RL είναι αυτός που πρώτος θα φτάσει στην PP, ακολουθώντας ένα διαφορετικό τρόπο μετανάστευσης σε σχέση με τα πιο προσθίως γεννώμενα Purkinje κύτταρα. Αυτά τα κύτταρα, μετά από μια σύντομη κάθετη πορεία μετανάστευσης πάνω σε άξονες ακτινωτών γλοιακών κυττάρων (radial glial cells, RGs), θα αρχίσουν να ακολουθούν μια οριζόντια μετανάστευση μέχρι την περιοχή της μελλοντικά σχηματιζόμενης PP<sup>24,32</sup>. Εκεί, μέσω της δράσης του μορίου Reelin (RELN) αλλάζουν προσανατολισμό και θα τοποθετηθούν κάθετα προβάλλοντας την συρόμενη προεκβολή τους προς την ραχιαία επιφάνεια της

παρεγκεφαλίδας<sup>32</sup>. Αυτή η αλλαγή προσανατολισμού από οριζόντια σε κάθετη κατεύθυνση μεταξύ E13,5-E14,5 εξαρτάται από την RELN, που σε αυτό το στάδιο εκφράζεται από τα ραχιαία εντοπιζόμενα κύτταρα της NTZ. Ακολούθως τα όψιμα κύτταρα Purkinje με χρόνο γέννησης E11,5 και E12,5 θα ενσωματωθούν στην PP κατά την E15,5 και E16,5 αντίστοιχα ακολουθώντας όμως το κλασικό κάθετο μοτίβο μετανάστευσης από την VZ προς την PP (Graph 4).



**Graph 5: (a)** Χρονοδιάγραμμα ανάπτυξης παρεγκεφαλίδας. Παρουσιάζονται τα **μορφολογικά** χαρακτηριστικά, η **κυτταρική γενεαλογία** και η δημιουργία των **νευρωνικών κυκλωμάτων** κατά την εμβρυϊκή και ενήλικη ανάπτυξη με διαφορετικά χρώματα. **(b)** Μορφολογική απεικόνιση παρεγκεφαλίδας από την μέση εμβρυϊκή έως την ενήλικη περίοδο. (Τροποποιημένη από White & Sillitoe 2012.)

Η κοιλιακή βλαστική ζώνη (VZ) θα είναι αυτή που θα δημιουργήσει και τον τελευταίο χρονικά κυτταρικό πληθυσμό της παρεγκεφαλίδας, αυτό των GABA-εργικών ενδονευρώνων των DCN, της κοκκώδους στιβάδας (GL) και της μοριώδους στιβάδας (ML). Οι GABA-εργικοί ενδονευρώνες της παρεγκεφαλίδας αποτελούν ένα ετερογενή πληθυσμό κυττάρων που προκύπτει από τα προγονικά κύτταρα της VZ μέσω διαφορετικής χρονικά γένεσης και διαφοροποίησης από την περίοδο E13,5-P15. Έτσι οι ενδονευρώνες των DCN δημιουργούνται από την VZ την όψιμη εμβρυϊκή περίοδο (13,5-E18,5) και σε μικρότερο βαθμό τις πρώτες μεταγεννητικές ημέρες. Στην συνέχεια ακολουθούν οι ενδονευρωνικοί πληθυσμοί της κοκκώδους στιβάδας (κύτταρα Golgi και Lugaro) που προκύπτουν από προγονικά κύτταρα εντός της λευκής ουσίας του παρεγχύματος της παρεγκεφαλίδας, που είχαν μεταναστεύσει εκεί από την VZ<sup>33</sup>. Τελευταία δημιουργούνται τα κύτταρα της μοριώδους στιβάδας (καλαθοφόρα και αστεροειδή κύτταρα) ξανά από προγονικά κύτταρα εντός της λευκής ουσίας. Έτσι θα μπορούσαμε να πούμε ότι η γενεαλογία των GABA-εργικών ενδονευρώνων ακολουθεί μία από μέσα προς τα έξω αλληλουχία γένεσης από τα προγονικά τους κύτταρα<sup>34</sup>(**Graph4 C**).

## **B) Η αναπτυσσόμενη παρεγκεφαλίδα και οι πρωτογενείς αιθουσαιο-παρεγκεφαλιδικές ίνες (PVF).**

Κατά την πρώιμη περίοδο ανάπτυξης της αρχέγονης παρεγκεφαλίδας όπως αυτή περιγράφηκε προηγουμένως τα κύτταρα των DCN έχουν μεταναστεύσει αρχικά ραχιαία του ιστού (E10-E12) και τα πρώτα PCs μεταναστεύουν εσωτερικά αυτού (E10,5-E13,5). Ήδη τόσο νωρίς κατά την ανάπτυξη οι πρώτες προσαγωγές ίνες που έχουν εισέλθει στην αρχέγονη παρεγκεφαλίδα είναι οι PVF (E11,5)<sup>35</sup>. Καθώς οι απαγωγές ίνες του VIII γάγγλιου εξέρχονται από αυτό προς τον οπίσθιο εγκέφαλο διχάζονται απότομα σε δύο σκέλη<sup>36</sup>. Το πρώτο οδεύει κεφαλικά δημιουργώντας τις PVF και το δεύτερο οδεύει ουραία. Καθώς τα PVF καταλαμβάνουν μεγάλο όγκο της παρεγκεφαλίδας αρχικά και πορεύονται από το VIII γάγγλιο δεσμιδοποιημένες εκφράζουν την παρβαλβουμίνη (parvalbumin,PV) ως μάρτυρα όπως έχει φανεί σε μελέτες στον αρουραίο<sup>12,37</sup>. Καθώς οι PVF οδεύουν οπίσθια προς την αρχέγονη παρεγκεφαλίδα με την πρόοδο της ανάπτυξης αποδεσμιδοποιούνται προς τους τελικούς τους στόχους τους<sup>35,36</sup>. Την ίδια περίοδο οι άξονες των PCs έχουν αρχίσει να επιμηκύνονται (E12,5) καθώς αυτά μεταναστεύουν προς την PP. Η πρώιμη και μαζική

είσοδος των PVF εντός της αρχέγονης παρεγκεφαλίδας, καθώς και η πορεία με την οργάνωσή τους εντός αυτής, συνηγορούν υπέρ του ότι η συγκεκριμένη ομάδα νευρικών ινών πιθανώς να παίζει σημαντικό ρόλο στην οργάνωση και την ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας. Επίσης μεγάλος αριθμός των VIII γαγγλιακών κυττάρων οδηγείται στην απόπτωση μετά την ηλικία των E19. Το παραπάνω συνηγορεί στο ότι τα PVFs πιθανώς συμβάλουν στην πρώιμη ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας έτσι ώστε όταν αυτή έχει ολοκληρωθεί, τα κύτταρα που πραγματοποίησαν το σκοπό τους απομακρύνονται. Παλαιότερες μελέτες προς αυτήν την κατεύθυνση δεν ανέδειξαν ξεκάθαρα τον ρόλο των PVF. Καθώς δεν φάνηκε να δρουν ως σκαλωσιά στην πορεία μετέπιπτα προσαγωγών ινών προς την παρεγκεφαλίδα, ούτε ως οργανωτές στην καθοδήγηση της μετανάστευσης των GCs κυττάρων της EGL προς τις τελικές τους θέσεις, όπως είχε προταθεί στο παρελθόν<sup>38</sup>.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

### **Εισαγωγή οσφρητικού**

#### **2.1 Ανατομία και οργάνωση του οσφρητικού συστήματος**

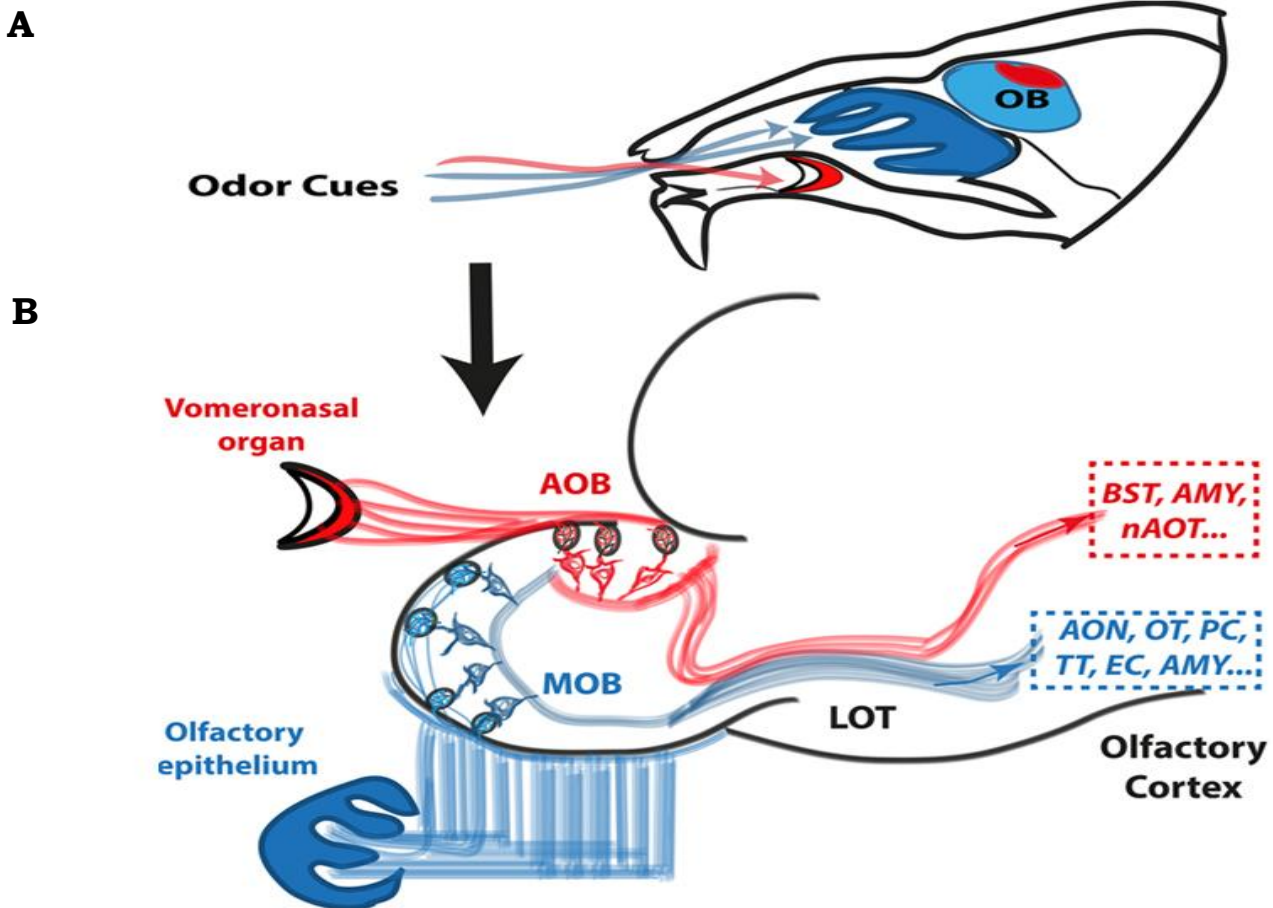
Το οσφρητικό σύστημα στα τρωκτικά αλλά και σε άλλα είδη, διαιρείται σε δύο ξεχωριστές περιοχές τόσο τοπογραφικά όσο και λειτουργικά. Οι δύο αυτές υποκατηγορίες του οσφρητικού συστήματος είναι το κύριο (main olfactory system, MOS) και το επικουρικό οσφρητικό σύστημα (accessory olfactory system, AOS). Τα δύο αυτά υπο-συστήματα οργανώνονται με παρόμοιο τρόπο σε κυτταρικό επίπεδο αλλά αποτελούν διακριτές ανατομικά περιοχές. Εν τέλει επιτελούν διαφορετικές αλλά πολλές φορές επικαλυπτόμενες και αλληλοσυμπληρούμενες δράσεις.

#### **A) Κύριο οσφρητικό σύστημα**

##### **1. Οσφρητικό επιθήλιο**

Η υποδεκτική περιοχή για το κύριο οσφρητικό σύστημα (MOB) όπου ανευρίσκονται οι οσφρητικοί αισθητικοί νευρώνες (olfactory sensory neurons, OSN) ονομάζεται οσφρητικό επιθήλιο (olfactory epithelium, OE) (**Εικ.10**). Το οσφρητικό επιθήλιο εντοπίζεται ραχιαία και οπίσθια εντός των ρινικών θαλάμων, στην περιοχή της ηθμοειδούς πλάκας και στο έσω τοίχωμα της άνω ρινικής κόγχης. Ιστολογικά το οσφρητικό επιθήλιο (OE) είναι ένα

ψευδοπολύστιβο κυλινδρικό επιθήλιο, που είναι παχύτερο από το κλασικό αναπνευστικό επιθήλιο των ρινικών κοιλοτήτων. Επτά τύποι διαφορετικών κυττάρων δομούν το ΟΕ: Οι δίπολοι οσφρητικοί αισθητικοί νευρώνες (OSN), τα βασικά κύτταρα (σφαιροειδή και οριζόντια), τα μικρολαχνωτά κύτταρα, τα υποστηρικτικά κύτταρα, τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (mesenchymal stem cells), τα επενδυματικά κύτταρα (ensheathing cells) και τέλος οι αδένες του Bowman εντός του υποβλεννογόνιου χιτώνα (**Εικ.11Α**). Σε αντίθεση με άλλα αισθητικά συστήματα (όπως γευστικό), τα αισθητικά υποδοκτικά κύτταρα (OSN) στο οσφρητικό είναι αληθείς δίπολοι νευρώνες και όχι τροποποιημένα επιθηλιακά κύτταρα. Ο συνολικός αριθμός των OSN είναι μεταξύ 6-10 εκατομμυρίων ανάλογα το είδος<sup>39</sup>. Το άκρο των OSN προς την ρινική κοιλότητα παρουσιάζει 20-30 προεκβολές που ονομάζονται βλεφαρίδες (cilia) και που προβάλλουν εντός της βλέννας που καλύπτει τον βλεννογόνο<sup>39</sup>. Στην επιφάνεια των βλεφαρίδων εντοπίζονται οι οσφρητικοί υποδοχείς (olfactory receptors, OR), οι οποίοι αναγνωρίζουν τις διαφορετικές χημικές δομές των οσμών (πτητικών χημικών μορίων) που διαλύονται στην βλέννα των ρινικών κοιλοτήτων. Κάθε OSN για την όσφρηση εκφράζει μόνο 1 οσφρητικό υποδοχέα στην επιφάνεια των βλεφαρίδων από ένα σύνολο περίπου 1300 διαφορετικών υποδοχέων<sup>40-42</sup>.

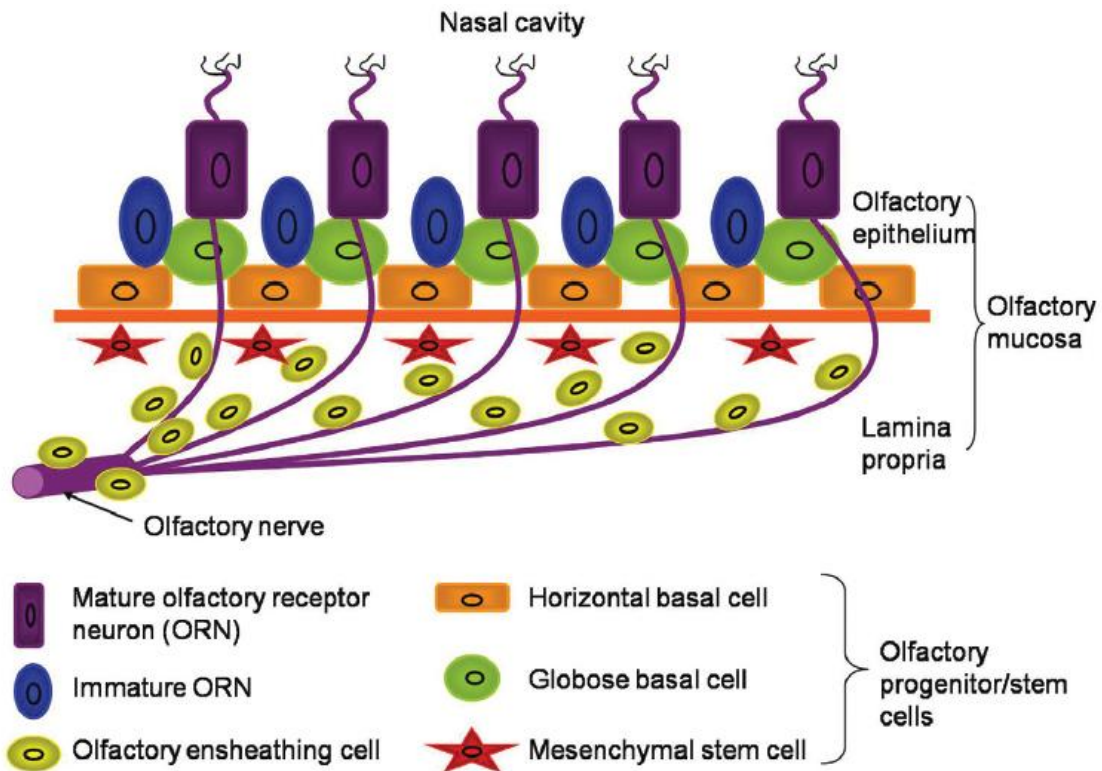


**Εικ.10:** Αδρή ανατομική απεικόνιση οσφρητικού συστήματος των τρωκτικών. Οι δομές που σχετίζονται με το κύριο οσφρητικό σύστημα (MOS) παρουσιάζονται με **μπλε**, ενώ με **κόκκινο** παρουσιάζονται οι δομές του επικουρικού οσφρητικού συστήματος (AOS). **(A)** Η εντόπιση των δομών του οσφρητικού συστήματος εντός του κρανίου. Πορεία της οσφρητικής πληροφορίας από τα χημικά μόρια του περιβάλλοντος προς τα υποδεκτικά όργανα (olfactory epithelium, Vomeronasal organ) και τις περιοχές του ΚΝΣ (MOB, AOB, LOT και olfactory cortex) **(B)**. OB (olfactory bulb), MOB (main olfactory bulb), AOB (accessory olfactory bulb), LOT (lateral olfactory tract), AON (anterior olfactory nucleus), OT (olfactory tubercle), PC (piriform cortex), EC (entorhinal cortex), AMY (amygdaloid nuclei), TT (tenia tecta), BST (bed nucleus of stria terminalis), nAOT (nucleus of accessory olfactory tract).

Η δομή των OR αποτελείται από 7 διαμεμβρανικές υδρόφοβες περιοχές συνδεδεμένες μεταξύ τους με υδρόφιλες αγκύλες. Το τμήμα του υποδοχέα υπεύθυνο για την αναγνώριση των χημικών μορίων των οσμών βρίσκεται εντός του υδρόφοβου τμήματος που σχηματίζουν οι 7 διαμεμβρανικές περιοχές<sup>43</sup> του. Το καρβοξυτελικό άκρο είναι συζευγμένο

με G-πρωτεΐνες και επάγει την ενεργοποίηση είτε της αδενυλικής κυκλάσης (παραγωγή cAMP) είτε της φωσφολιπάσης-C (παραγωγή φωσφοινοσουλφολης-3,IP<sub>3</sub>). Τα παραπάνω δευτερογενή μηνύματα θα επάγουν την διάνοιξη διαύλων ιόντων (Na<sup>+</sup>,Ca<sup>++</sup>) που θα εισέλθουν εντός του κυττάρου και θα το διεγείρουν<sup>44</sup>. Οι OSN είναι γνωστό ότι μπορούν και αναγεννούνται καθόλη την διάρκεια της ζωής από τα βασικά κύτταρα του επιθηλίου με την δράση και των υποστηρικτικών κυττάρων<sup>45</sup>. Από τα βασικά κύτταρα του OE τα οριζόντια (horizontal basal cells) αποτελούν ένα πολυδύναμο βλαστικό πληθυσμό που μπορεί να αναγεννήσει τόσο τους οσφρητικούς νευρώνες όσο και τα υπόλοιπα κύτταρα του OE<sup>46</sup>. Τα σφαιροειδή βασικά κύτταρα (globose basal cells) πιστεύεται ότι αποτελούν τον πληθυσμό που προκύπτει από το οριζόντια κύτταρα και που μέσω διαφοροποίησης θα δώσουν τα OSN. Τέλος, τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (mesenchymal stem cells, MSCs) κατά κύριο λόγο είναι αυτά που μπορούν να δώσουν τον πληθυσμό των οσφρητικών επενδυματικών κυττάρων (Olfactory ensheathing cells, OSCs) που περιβάλουν τους άξονες των OSN καθώς πορεύονται προς τον οσφρητικό λοβό (olfactory bulb, OB) (**Εικ11A**). Επίσης αυτά τα κύτταρα εκτός από την ικανότητα γένεσης OSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν και σε νευρωνικούς πληθυσμούς<sup>47</sup>, ενώ παράγουν μόρια που βοηθούν στην μείωση της φλεγμονής, της απόπτωσης και στην προστασία των ιστών<sup>48</sup>. Λόγω των παραπάνω ιδιοτήτων που παρουσιάζουν οι πολυδύναμοι αυτοί πληθυσμοί χρησιμοποιήθηκαν από πολλές ερευνητικές ομάδες για την επίτευξη αναγέννησης νευρικών ιστών<sup>49-52</sup>.





**Εικ.11Α: Ανατομία οσφρητικού επιθηλίου (ΟΕ).** Με διαφορετικά χρώματα και σχήματα παρουσιάζονται οι προγονικοί κυτταρικοί πληθυσμοί (Horizontal & globose basal cells, Mesenchymal stem cells, olfactory) και τα ώριμα κύτταρα του ΟΕ.

## 2. Οσφρητικός λοβός

Ο οσφρητικός λοβός (ΟΒ) αποτελεί τον πρώτο σταθμό αναμετάδοσης και επεξεργασίας της οσφρητικής πληροφορίας προς τις περιοχές του οσφρητικού φλοιού. Ανατομικά αποτελείται από 6 στοιβάδες που από επιπολής προς εν τω βάθει είναι (Εικ11Β):

Α) Η στοιβάδα των νευρικών ινών των OSN (olfactory nerve layer, ONL) που βρίσκονται στην επιφάνια του ΟΒ καθώς πορεύονται προς το αντίστοιχο σπείραμα.

Β) Η στοιβάδα των σπειραμάτων (Glomerular layer, GL), όπου πραγματοποιούνται οι συνάψεις μεταξύ νευραξόνων των OSN και δενδριτών προβλητικών νευρώνων του ΟΒ (μητρικά και θυσανωτά κύτταρα) δημιουργώντας την δομή του σπειράματος<sup>53</sup>.

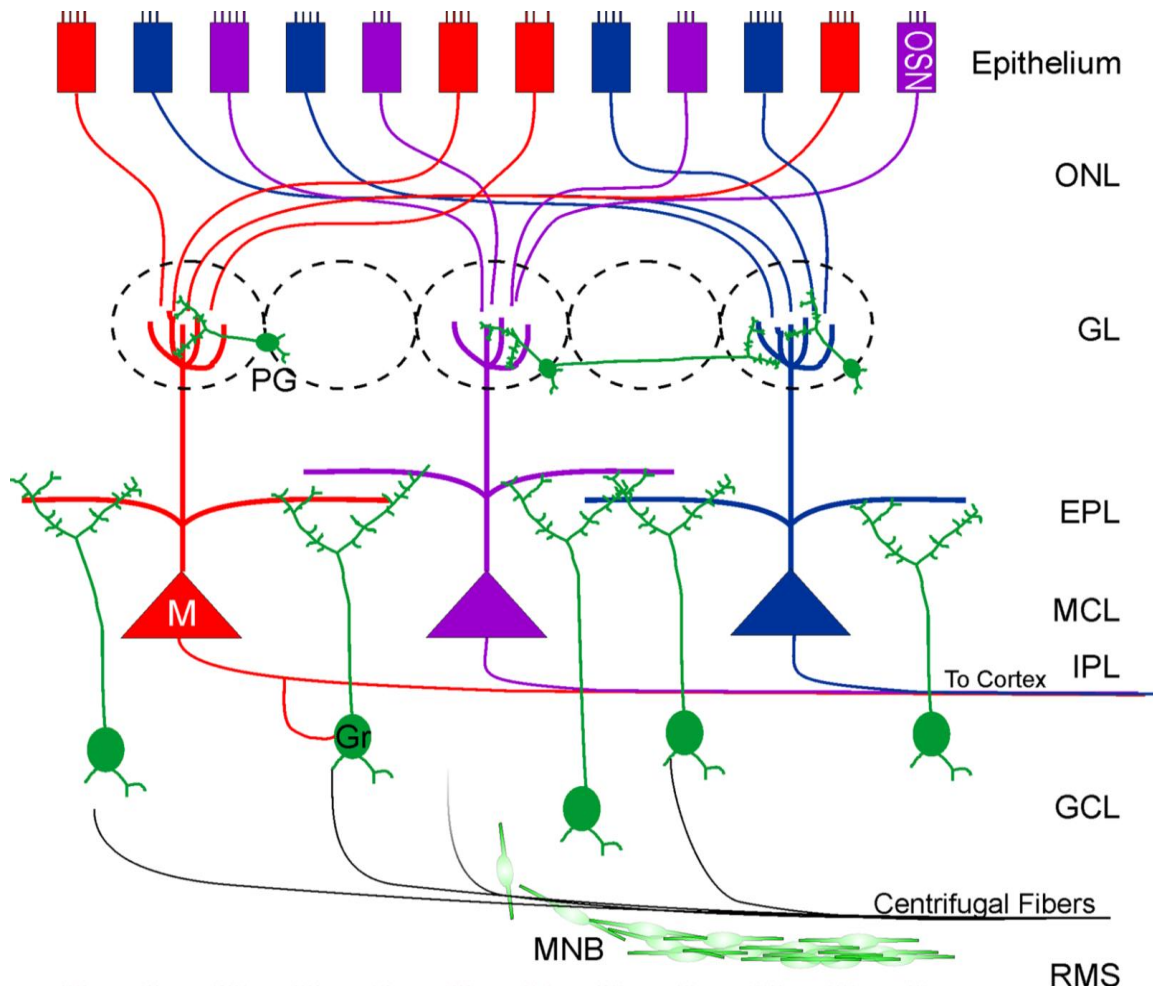
Γ) Έξω δικτυωτή στοιβάδα (external plexiform layer, EPL) που περιέχει ενδονευρώνες που ρυθμίζουν το σήμα των σπειραμάτων και τους εξώτερους προβλητικούς νευρώνες του ΟΒ, τα θυσανωτά κύτταρα (tufted cells, TCs).

Δ) Στοιβάδα των μητρικών κυττάρων (mitral cells layer, MCL), που περιέχει τους κύριους προβλητικούς νευρώνες του (mitral cells, MCs)

Ε) Η έσω δικτυωτή στοιβάδα (internal plexiform layer, IPL) που περιέχει τους νευράξονες των MCs και TCs κατά κύριο λόγο.

ΣΤ) Η στοιβάδα των κοκκωδών κυττάρων (granule cells layer, GCL), που αποτελούν τον πολυπληθή πληθυσμό των ενδονευρώνων του OB που αναγεννιάται καθόλη την ζωή. Τα κύτταρα που αναγεννούν τον πληθυσμό των GCs μεταναστεύουν από την υποκοιλιακή περιοχή των πλάγιων κοιλιών του εγκεφάλου μέσω του πρόσθιου μεταναστευτικού ρεύματος (rostral migratory stream).

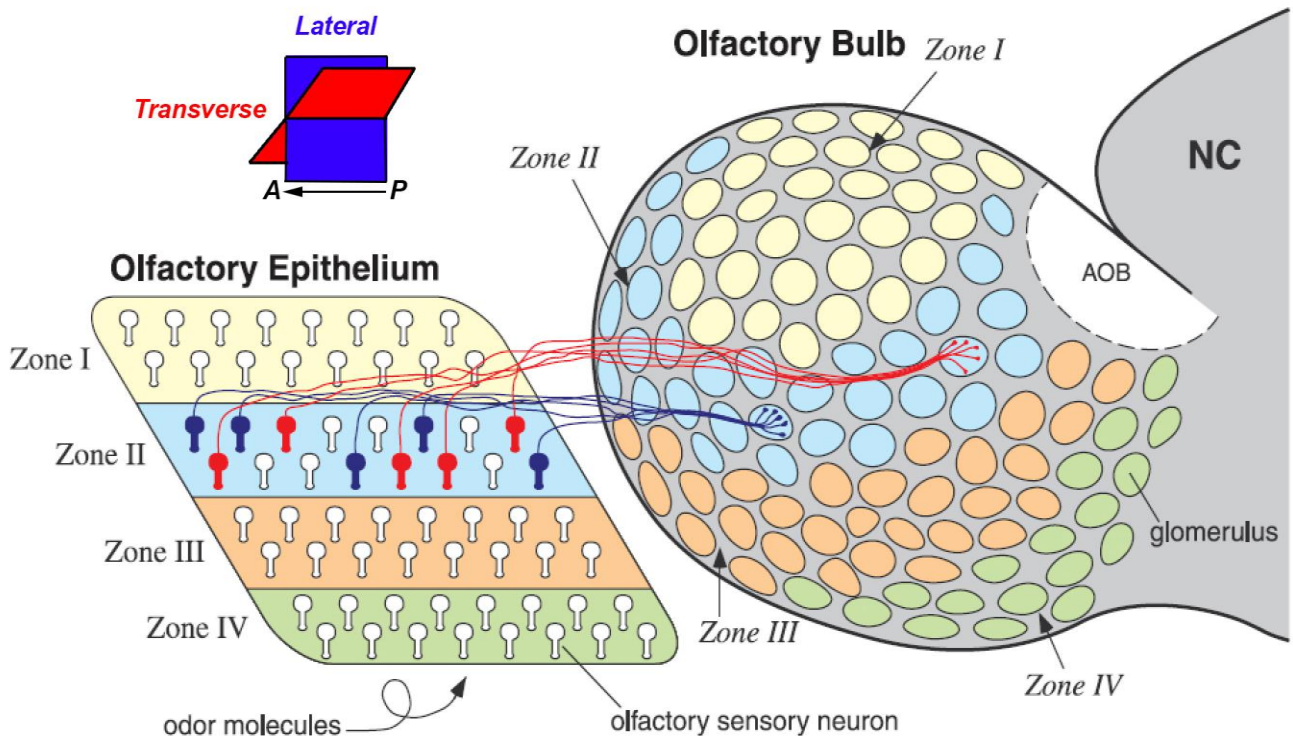
Οι OSN του OE όπως επισημάνθηκε προβάλλουν τους νευράξονες τους και περνούν το τετριμμένο πέταλο του ηθμοειδούς οστού (οσφρητικό νεύρο, εγκεφαλική συζυγία I). Εν συνεχεία εισχωρούν στην δομή του κύριου οσφρητικού λοβού (Main olfactory bulb, MOB) όπου καταλήγουν στην σπειραματική στοιβάδα (Glomerular Layer, GL) πραγματοποιώντας συνάψεις. Παρότι ο συνολικός αριθμός των OR στον άνθρωπο είναι μόλις 350 και στον ποντικό ~1300, ο λόγος σύγκλισης υποδοχέων ανά σπειράματα είναι 1:16 και 1:2 αντίστοιχα<sup>54</sup>. Όλοι οι αισθητικοί νευρώνες που εκφράζουν τον ίδιο οσφρητικό υποδοχέα προβάλλουν σε 1-4 μόνο σπειράματα (από το σύνολο των περίπου 2000 σπειραμάτων του OB στον ποντικό), οπότε κάθε σπείραμα δέχεται μόνο νευρώνες που εκφράζουν τον ίδιο υποδοχέα<sup>55,56</sup>. Παρατηρείται μεγάλη διαφορά στον αριθμό των υποδοχέων μεταξύ ανθρώπου και ποντικού καθώς και διαφορετικός λόγος σύγκλισης στα σπειράματα. Το παραπάνω υποδηλώνει την σημαντική ελάττωση της εξελικτικής πίεσης στον άνθρωπο, λόγω μείωσης της αναγκαιότητας αναγνώρισης οσφρητικών σημάτων για την επιβίωση του<sup>54</sup>. Αντιθέτως, στον ποντικό η αναγνώριση οσφρητικών σημάτων από το περιβάλλον αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την επιβίωση του ζώου, καθιστώντας την όσφρηση μία από τις βασικότερες αισθήσεις.



**Εικ.11B: Ανατομία οσφρητικού λοβού (OB).** Με διαφορετικά χρώματα και σχήματα παρουσιάζονται οι διαφορετικοί κυτταρικοί πληθυσμοί και υποπληθυσμοί του OB και οι νευρικές τους απολήξεις. Το χρώμα σε κάθε MCs σχετίζεται με τους υποπληθυσμούς των OSNs που προβάλλουν σε αυτό (όμοιος OR). Στο δεξιό περιθώριο του σχήματος παρουσιάζονται οι διαφορετικές στοιβάδες του OB από έξω (άνω μέρος εικόνας) προς τα έσω (κάτω μέρος εικόνας). Τρίγωνα: MCs, παραλληλόγραμμο: OSNs, κύκλοι και οβάλ πράσινα: PGs και GCs, περιοχή εντός σικτικής γραμμής: Glomeruli, ONL: olfactory nerve layer, GL: Glomerular layer, EPL: external plexiform layer, MCL: mitral cell layer, IPL: internal plexiform layer, GCL: granule cell layer, MNB: migrating neuroblast, RMS: rostral migratory stream. Απο Whitman&Greer 2009<sup>57</sup>.

Ο κάθε OSN που εκφράζει τον ίδιο οσφρητικό υποδοχέα θα προβάλλει σε 2 συγκεκριμένα σπειράματα ένα έσω και ένα έξω (εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων) και θα δημιουργήσει πάνω στον OB τον οσφρητικό χάρτη των οσφρητικών υποδοχέων (olfactory receptor map). Με αυτόν τον τρόπο οι OSN στο OE οργανώνονται σε τέσσερις (I-IV) οριοθετημένες ζώνες

ανάλογα με τον υποδοχέα που εκφράζουν και την περιοχή από ραχιαία-έσω έως κοιλιακά-έξω που βρίσκονται στο επιθήλιο<sup>58</sup>. (Εικ12).



**Εικ.12Α:** Σχηματική απεικόνιση των συνδέσεων του ΟΕ με τον ΜΟΒ και της δημιουργίας των ζωνών του οσφρητικού χάρτη των οσφρητικών υποδοχέων (olfactory receptor map,ORM) του ΟΒ. Παρατηρείται πώς οι OSN που εκφράζουν τον ίδιο OR (ίδιο χρώμα, κόκκινο ή μπλε) προβάλλουν σε συγκεκριμένα GL του ΟΒ που εντοπίζονται εντός της ίδια ζώνης όπως στο ΟΕ (Zone II). A: anterior, P: posterior. (τροποποιημένη από Mori,et al,1999)

Η προβολή από τις παραπάνω ζώνες του ΟΕ προς συγκεκριμένες περιοχές που περιέχουν τα σωστά σπειράματα στόχους πραγματοποιείται στον εγκάρσιο (ραχιαίο-κοιλιακό, **transverse**) τον οβελιαίο άξονα (έσω-έξω,**lateral**) και τον στεφανιαίο (προσθο-οπίσθιο, P→A) άξονα (**Εικ12Α**). Οι προβολή στον εγκάρσιο και τον οβελιαίο άξονα είναι ανεξάρτητη από την δραστηριότητα των OSN σε αντίθεση με το τι συμβαίνει σε άλλα αισθητικά συστήματα<sup>59</sup>. Η σωστή καθοδήγηση των αξόνων των OSN εξαρτάται από την δράση των ελκτικών και απωθητικών καθοδηγητικών μοριακών συστημάτων του Robo-2/Slit-1 και Semaphorin3F/Neuropilin-2<sup>60,61</sup> για τον εγκάρσιο και του IGF για το οβελιαίο άξονα<sup>62</sup>. Η καθοδήγηση στον στεφανιαίο άξονα είναι η μόνη που δεν εξαρτάται από την περιοχή εύρεσης του OSN στο ΟΕ αλλά από την ενδογενή ενεργότητα των OR που εκφράζονται

από κάθε νευρώνα, μία διαδικασία που εξαρτάται από την ποσότητα του cAMP<sup>63</sup>. Οι άξονες των OSN είναι οργανωμένοι σε πρόσθιους και οπίσθιους πριν αρχίσει η είσοδος τους στον OB (όσο αυξάνεται το cAMP τόσο πιο οπίσθια τοποθετούνται οι άξονες). Για την οργάνωση τους αυτή συμμετέχει και το σύστημα των καθοδηγητικών μορίων Semaphorin3A/Neuropilin-1<sup>64</sup> που η έκφραση των γονιδίων του εξαρτάται από τα επίπεδα του cAMP. Με τον παραπάνω τρόπο οι 4 διαφορετικές ζώνες των OR του OE προβάλλουν σε 4 ζώνες στα σπειράματα του OB (**Εικ.12**).

Στους σχηματισμούς των σπειραμάτων της GL θα πραγματοποιηθεί η διέγερση των μητρικών και των θυσανωτών κυττάρων του OB. Ανάλογα με τους ORs που θα διεγερθούν από τα πτητικά μόρια των οσφρητικών πληροφοριών στο OE οι αντίστοιχες περιοχές των σπειραμάτων του OB θα ενεργοποιηθούν. Οι προβλητικοί νευρώνες προβάλλουν τις δενδριτικές τους απολήξεις σε ένα μόνο σπείραμα. Με την σειρά τους οι προβλητικοί νευρώνες του OB (MCs και TCs) θα διεγερθούν και μετά από ένα σύντομο συντονισμό στο λαμβανόμενο σήμα από τους ενδονευρώνες του OB θα μεταβιβάσουν την αισθητική πληροφορία προς τις περιοχές του οσφρητικού φλοιού (olfactory cortex, OC)<sup>65</sup>. Ο συντονισμός και η ρύθμιση της αισθητικής πληροφορίας πραγματοποιείται τόσο κατά την εισαγωγή της στον OB (σπειράματα, περισπειραματικοί και ένδοσπειραματικοί ενδονευρώνες) όσο και στο επίπεδο των προβλητικών νευρώνων (από τους GCs ενδονευρώνες)<sup>66,67</sup>. Καθώς οι άξονες των MCs TCs οδεύουν οπίσθια προς την έξοδο του OB δημιουργούν μια δέσμη νευρικών ινών, την ονομαζόμενη οσφρητική ταινία. Όταν οι άξονες της οσφρητικής ταινίας εξέλθουν από τον OB και αρχίσουν να εισέρχονται στον τελγκέφαλο δημιουργούν την οσφρητική χορδή. Στον ποντικό η έξω οσφρητική χορδή (lateral olfactory track) περιέχει σχεδόν το σύνολο των προβλητικών αξόνων προς τις περιοχές του OC. Αναπτυξιακά οι πιο ώριμοι γεννώμενοι νευρώνες έχουν τους άξονες τους στην επιπολής περιοχή του LOT ενώ οι πιο πρώιμοι είναι τοποθετημένοι εν τω βάθει<sup>68</sup>. Οι άξονες των προβλητικών νευρώνων στο LOT εκφράζουν αρκετά μόρια κυτταρικής συνάφειας στην επιφάνια τους κατά την ανάπτυξη τους αλλά και κατά την ενήλικη ζωή<sup>69</sup> (Εικ.10).

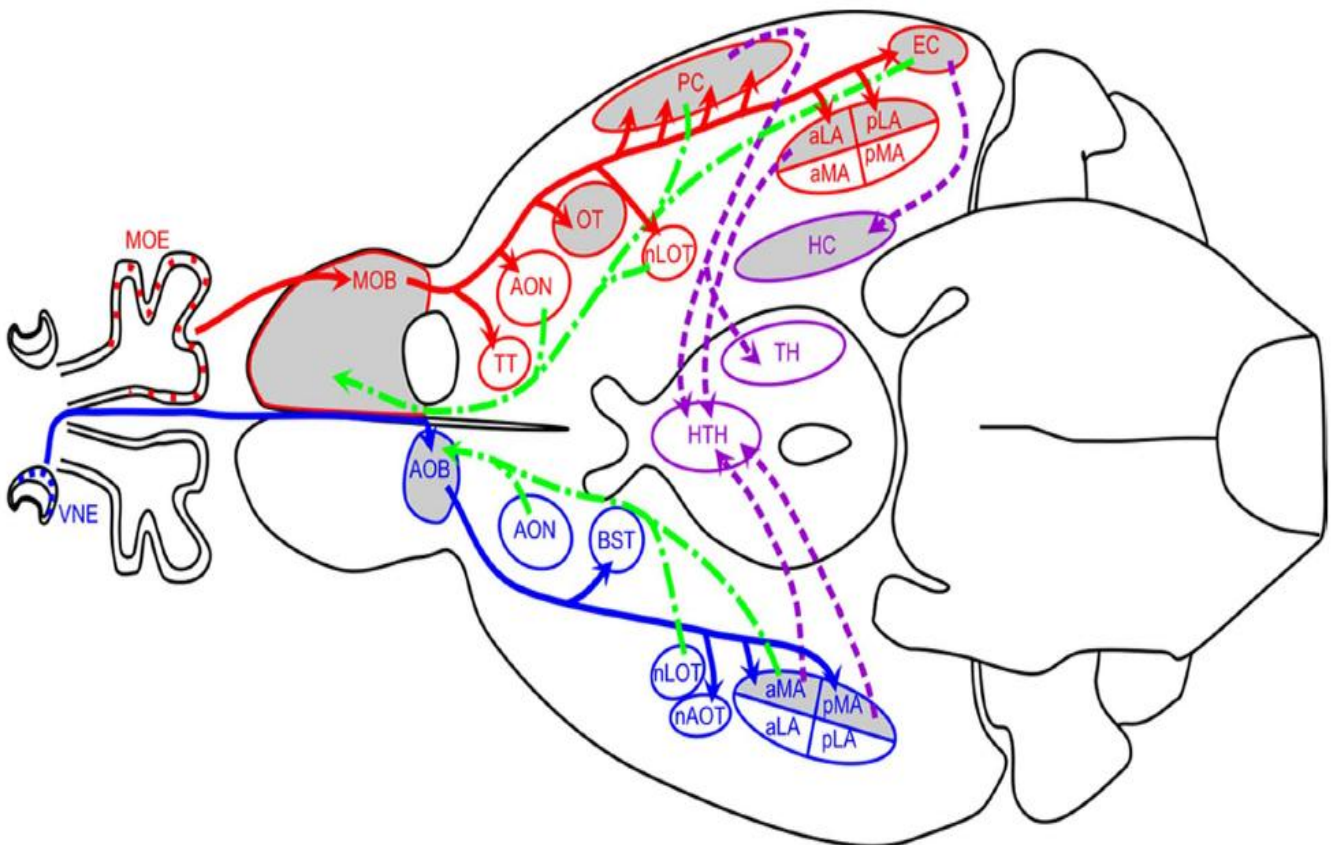
### **3.Οσφρητικός φλοιός**

Το οσφρητικό σύστημα αποτελεί την εξαίρεση μεταξύ των αισθητήριων συστημάτων των οποίων οι λαμβανόμενες από τα υποδοκτικά όργανα πληροφορίες δεν περνούν από τον



συναπτικό κυτταρικό σταθμό του θαλάμου. Αντιθέτως η οργάνωση πραγματοποιείται με τον ακόλουθο τρόπο:

Τα μητρικά και τα θυσανωτά κύτταρα του MOB μέσω του LOT προβάλλουν στους ακόλουθους πυρήνες που δομούν τον οσφρητικό φλοιό (από πρόσθια προς οπίσθια): Πρόσθιος οσφρητικός πυρήνας (anterior olfactory nucleus, AON), οσφρητικό φύμα (olfactory tubercle, OT), απιοειδής πυρήνας (piriform cortex, PC), πρόσθια αμυγδαλή (anterior amygdala, AA), μέσος αμυγδαλοειδής πυρήνας (medial amygdaloid nucleus, AMe), πρόσθιος φλοιϊκός αμυγδαλοειδής πυρήνας (anterior cortical amygdaloid nucleus, ACo), οπισθοπλάγιος φλοιϊκός αμυγδαλοειδής πυρήνας (posterolateral cortical amygdaloid nucleus, APLCo) και ενδορινικός φλοιός (entorhinal cortex, EC) ( **Εικ.13**).



**Εικ13:Πλήρες κύκλωμα οσφρητικού συστήματος.** Με **κόκκινο** απεικονίζεται το MOS, ενώ με **μπλε** το AOS. Τα **πράσινα** βέλη υποδηλώνουν παλίνδρομες συνδέσεις προς τον OB από περιοχές του OC, ενώ τα **μωβ** ενδοφλοιϊκές διασυνδέσεις. aLA(anterior lateral amygdala), aMA (anterior medial amygdala), AOB (accessory olfactory bulb), AON (anterior olfactory nucleus) AOT (accessory olfactory tract), BST (bed nucleus of the stria terminalis), EC (entorhinal cortex), HC (hippocampus), HTH (hypothalamus), LOT (lateral olfactory tract), MOB (main

olfactory bulb), MOE (main olfactory epithelium), nAOT (nucleus of the accessory olfactory tract), nLOT (nucleus of the lateral olfactory tract), OT (olfactory tubercle), PC (Piriform cortex), pLA (posterior lateral amygdale), pMA (posteromedial amygdale), TH (thalamus), TT (tenia tecta), VMH (ventromedial hypothalamus), VNE( vomeronasal epithelium).(τροποποιημένη από Canavan et al, 2011)

Ο απιοειδής πυρήνας (PC) που ονομάζεται και πρωτοταγής οσφρητικός φλοιός παίζει τον σημαντικότερο ρόλο στην επεξεργασία των οσφρητικών πληροφοριών σε σχέση με τους άλλους πυρήνες του OC. Σε αντίθεση με τον νεοφλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων ο PC, ως φυλογενετικά παλιότερος, έχει δομή παλαιοφλοιού με αρχιτεκτονική τριών στοιβάδων. Από τις 3 στοιβάδες του PC οι στοιβάδες II και III περιέχουν γλουταμινεργικά πυραμιδικά κύτταρα, με τα κύτταρα της στοιβάδας 2 να είναι πολύ πιο πυκνά διατεταγμένα. Οι δενδρίτες των παραπάνω κυττάρων προβάλλουν στην στοιβάδα I όπου κάνουν συνάψεις με τις προσαγωγές ίνες των MCs και TCs (στοιβάδα Ia, επιπολής) καθώς και με προσαγωγές ίνες από άλλες περιοχές του οσφρητικού φλοιού (στοιβάδα Ib, εν τω βάθει)<sup>65,70</sup>. Επίσης αξίζει να αναφερθεί ο ρόλος του πρόσθιου οσφρητικού πυρήνα (AON) ο οποίος είναι ο πρώτος πυρήνας που συναντούν οι ίνες των MCs και TCs καθώς εξέρχονται από το OB. Ο AON δέχεται τις κύριες προσαγωγές πληροφορίες τόσο από τον σύστοιχο OB όσο και από τον ετερόπλευρο AON<sup>71</sup>. Επίσης ο AON δέχεται πληροφορίες και από άλλες περιοχές του OC. Οι συνδέσεις αυτές τον καθιστούν υπεύθυνο για την επεξεργασία και το συντονισμό των οσφρητικών πληροφοριών που προέρχονται και από τα 2 ημισφαίρια. Μια σημαντική δράση του είναι η αναγνώριση της χωρικής θέσης μίας οσμής<sup>72</sup>.

### **B) Επικουρικό οσφρητικό σύστημα**

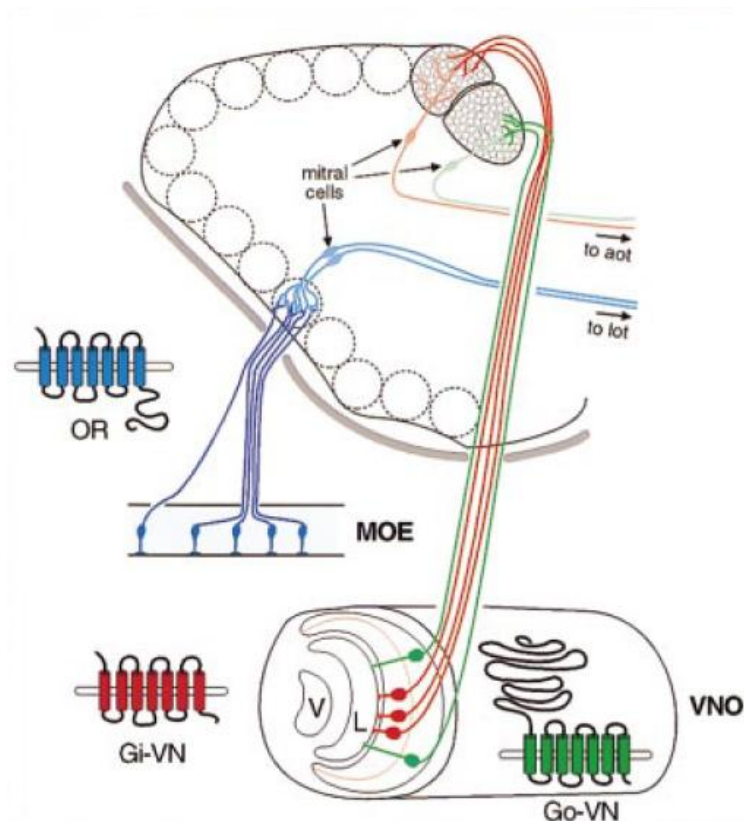
Το επικουρικό οσφρητικό σύστημα (AOS) παρουσιάζεται ως ανατομική οντότητα στα περισσότερα τετράποδα θηλαστικά. Σε αντίθεση με το MOS που ανιχνεύει οσμηρές χημικές ενώσεις που υπάρχουν στην ατμόσφαιρα το AOS ανιχνεύει μη πτητικές ουσίες στο περιβάλλον που το ζώο μπορεί να έρθει σε άμεση επαφή μέσω εισρόφησης τους στην ρινική κοιλότητα. Η λειτουργία του φαίνεται ότι σχετίζεται με την αναγνώριση φερομονών (πτητικών και μη) και άλλων μη πτητικών ουσιών που σχετίζονται με σεξουαλικές, κοινωνικές και μητρικές πτυχές της συμπεριφοράς του ζώου<sup>73-75</sup>. Η οργάνωση του AOS ομοιάζει πολύ με αυτή του MOS. Παρατηρείται λοιπόν το περιφερικό υποδεκτικό όργανο

που ονομάζεται όργανο του Jacobson (ή vomeronasal organ, VNO), όπως το OE στο MOS. Το VNO προβάλλει στον επικουρικό οσφρητικό λοβό (accessory olfactory bulb, AOB), που με την σειρά του θα μεταδώσει τις πληροφορίες προς περιοχές του οσφρητικού φλοιού (Εικ.10). Αναλυτικότερα η οργάνωση έχει ως εξής:

### **1.Περιφερικό αισθητήριο όργανο AOS (Vomeronasal organ)**

Το όργανο του Jacobson (VNO) πήρε το όνομα του από τον Δανό παθοφυσιολόγο Ludvig Jacobson ο οποίος και το ανακάλυψε το 1813. Το VNO έχει εξελικτικά χαθεί σε αρκετά είδη<sup>76,77</sup> ενώ στον άνθρωπο παρουσιάζεται στοιχειωδώς ως δομή περίπου στο 73% των ατόμων στην ενήλικη ζωή ενώ παρουσιάζεται σαν δομή από την περίοδο της ανάπτυξης. Παρά την ανατομική του παρουσία φαίνεται ότι στερείται λειτουργικότητας<sup>78,79</sup> στον άνθρωπο. Στα τρωκτικά το VNO εντοπίζεται στην βάση του ρινικού διαφράγματος πάνω στο οστό της ύνιδας. Ανατομικά περιβάλεται από οστό και εν τω βάθει στον ιστό του δημιουργείται ένας αυλός που προβάλλει προς την πρόσθια ρινική κοιλότητα. Από την έσω πλευρά περιέχει αισθητικό επιθήλιο ενώ ο υπόλοιπος αυλός περιβάλεται από μη αισθητικό επιθήλιο. Το VNO διαθέτει μηχανισμό αντλίας που μπορεί να οδηγήσει ουσίες εντός του αυλού προς την αισθητηριακή περιοχή<sup>80</sup>. Το αισθητικό πολύστοιβο επιθήλιο του VNO αποτελείται από δίπολους αισθητικούς νευρώνες, υποστηρικτικά κύτταρα και βλαστικά κύτταρα που αναγεννούν τα κύτταρα του επιθηλίου. Οι αισθητικοί νευρώνες του VNO (vomeronasal receptor neurons, VSN) προβάλλουν τις δενδριτικές τους απολήξεις που περιέχουν τους αισθητικούς υποδοχείς προς τον αυλό του οργάνου. Ο άξονας των VRN προβάλλει προς τον AOB στην ραχιαία και οπίσθια επιφάνια του OB. Η αναγέννηση των VSN πραγματοποιείται με μετανάστευση των βλαστικών κυττάρων και μετέπειτα διαφοροποίησή τους<sup>80</sup>. Η μετανάστευση γίνεται από το όριο μεταξύ αισθητικού και μη αισθητικού επιθηλίου όπου τα βλαστικά κύτταρα εδράζουν<sup>81</sup>. Οι VSN μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με την θέση τους στο αισθητικό επιθήλιο, την έκφραση συγκεκριμένων G-πρωτεϊνών και την περιοχή που προβάλλουν στον AOB. Τοιουτοτρόπως οι VSN που βρίσκονται στην επιπολής περιοχή του επιθηλίου εκφράζουν την υπομονάδα Gi2a και προβάλλουν τους άξονες τους προς τον πρόσθιο AOB. Αντιθέτως οι υποδοχείς που βρίσκονται στην εν τω βάθει περιοχή του επιθηλίου εκφράζουν την G0a υπομονάδα και προβάλλουν προς το οπίσθιο τμήμα του AOB (Εικ.14) .





**Εικ.14:** Προβολές των OSN (VSN) του MOE και VNO στον MOB και AOB αντίστοιχα. Με **κόκκινο** χρώμα σημαίνονται οι επιπολής VSN που προβάλλουν στον πρόσθιο AOB και με **πράσινο** οι εν τω βάθει VSN που προβάλλουν στον οπίσθιο AOB. Αντίστοιχα με διαφορετικά χρώματα παρουσιάζονται οι δομές των ORs ( τροποποιημένη από Belluscio et al, 1999)

Η έκφραση των συγκεκριμένων G-πρωτεϊνών από τους VSN σχετίζεται και με την έκφραση συγκεκριμένων υποδοχών στην επιφάνεια των βλεφαρίδων τους. Έτσι οι επιπολείς νευρώνες που εκφράζουν την Gi2a υπομονάδα διαθέτουν και τους V1R (vomeronasal receptor 1) υποδοχείς ενώ οι εν τω βάθει που εκφράζουν την G0a υπομονάδα διαθέτουν τους V2R (vomeronasal receptor 2)<sup>82</sup>. Οι οικογένεια των V1R υποδοχέων αναγνωρίζουν και πτητικές φερομόνες που εισέρχονται στο VNO ενώ οι V2R αναγνωρίζουν μόνο μη πτητικές ουσίες. Πέραν των κλασικών οικογενειών υποδοχέων (V1 και V2Rs) στην

επιφάνεια κάποιων VSN παρουσιάζονται και μία τρίτη ομάδα υποδοχέων αυτή των υποδοχέων του φορμυλικού πεπτιδίου (formyl peptide receptors, FPRs). Οι FPRs παρουσιάζονται σε αισθητικούς νευρώνες που εκφράζουν τόσο την Gi2a όσο και την G0a υπομονάδα<sup>83</sup>. Δομικά οι πρωτεΐνες όλων των οικογενειών υποδοχέων έχουν την ίδια δομή με τους υποδοχείς του ΟΕ δηλαδή πρόκειται για μόρια με 7 διαμεμβρανικές περιοχές και την υδρόφοβη υποδεκτική περιοχή στο κέντρο αυτού του σχηματισμού. Ενδοκυτταρικά μετά την πρόσδεση του κατάλληλου μορίου ενεργοποιούν το μονοπάτι της φωσφολιπάσης C (PLC) οδηγώντας τελικά στην διάνοιξη διαύλων ιόντων<sup>84</sup>. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι κάθε επιπολής VSN εκφράζει V1R ενός τύπου στην επιφάνεια του σε αντίθεση με τα εν τω βάθει κύτταρα που μπορούν να εκφράζουν παραπάνω από ένα τύπο V2R . Οι FPR εκφράζονται επίσης με μοναδικό τρόπο πάνω τους χωρίς να συνδυάζονται με υποδοχείς της ίδιας ή άλλης οικογένειας<sup>85</sup>.

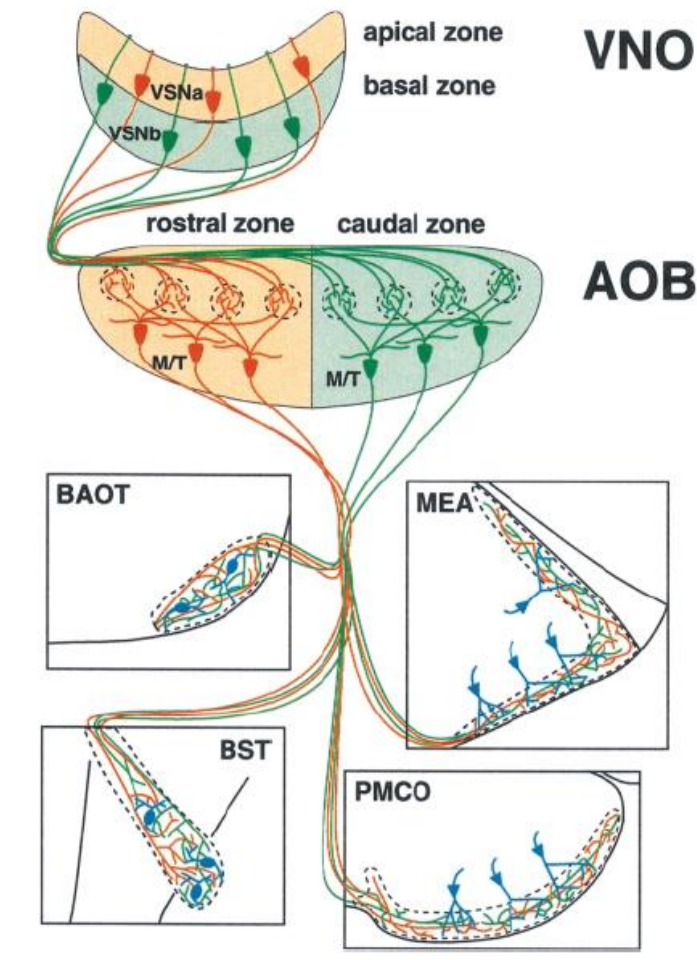
## **2.Επικουρικός οσφρητικός λοβός (accessory olfactory bulb, AOB)**

Η περιοχή του OB που είναι υπεύθυνη για την λήψη των οσφρητικών πληροφοριών από το VNO ονομάζεται επικουρικός οσφρητικός λοβός (accessory olfactory bulb). Ανατομικά ο AOB διακρίνεται στην ραχιαία και οπίσθια περιοχή του OB. Οι στοιβάδες του σχηματίζουν το λοβό είναι όμοιες με αυτές του MOB με την διαφορά του ότι λόγω του μικρού όγκου του ιστού όλες εμφανίζονται συμπυκνωμένες. Τα σπειράματα που δημιουργούνται από τους άξονες των VSN και τους δενδρίτες των προβλητικών νευρώνων είναι σημαντικά μικρότερα σε μέγεθος σε σχέση με αυτά του MOB. Το ίδιο συμβαίνει και με την EPL (έξω δικτυωτή στοιβάδα), ενώ τα κύτταρα των μητρικών και θυσανωτών κυττάρων χαρακτηρίζονται ως μία στοιβάδα λόγω της στενής γειννιάσής τους από κάποιους συγγραφείς<sup>86</sup>. Επιπροσθέτως η υποδιαίρεση του AOB σε πρόσθιο και οπίσθιο που αναφέρθηκε και προηγουμένως, σχετίζεται με τους OSN που προβάλλουν σε αυτές τις περιοχές (επιπολείς ή εν τω βάθει)<sup>87</sup>(Εικ.14). Ο κανόνας που ισχύει για την προβολή των OSN στον MOB δεν ισχύει για το AOB. Δηλαδή οι αισθητικοί νευρώνες που εκφράζουν τον ίδιο υποδοχέα στο AOS δεν προβάλλουν σε 1 έως 2 σπειράματα μόνο όπως συμβαίνει στο MOS αλλά σε συγκεκριμένα πολλαπλά σπειράματα της ίδιας περιοχής (πρόσθια ή οπίσθια). Έτσι η δράση μιας φερομόνης σε ένα υποδοχέα του VNO στο AOS φαίνεται σαν ένα διαφορετικό μοτίβο ενεργοποίησης σπειραμάτων και όχι σαν συγκεκριμένη ενεργοποίηση 2 σπειραμάτων στον οσφρητικό λοβό (όπως η ενεργοποίηση ενός OR). Επίσης σε αντίθεση με τον MOB που

κάθε MC δίνει δενδρίτες σε ένα σπείραμα, ένα MC προβάλλει σε πολλαπλά σπειράματα στον AOB<sup>88</sup>.

### **3. Οσφρητικός φλοιός στο AOS**

Οι άξονες των MCs και TCs που εξέρχονται από τον AOB πορεύονται εντός του LOT έως ότου φτάσουνε στις περιοχές στόχους στον OC. Από αναπτυξιακές μελέτες έχει δειχθεί ότι οι νευράξονες από το AOB πορεύονται στην εν τω βάθει στοιβάδα του LOT σε αντίθεση με αυτές του MOB που καταλαμβάνουν πιο επιφανειακή θέση<sup>69</sup>. Οι περιοχές που θα λάβουν συνάψεις από τον AOB είναι συναφείς αλλά όχι επικαλυπτόμενες με αυτές του MOB. Έτσι οι περιοχές του OC που νευρώνονται από το AOB είναι: το έσω τμήμα του πρόσθιου οσφρυτικού πυρήνα (AONm), ο έσω αμυγδαλοειδής πυρήνας, ο έσω οπίσθιος φλοιϊκός αμυγδαλοειδής πυρήνας (APMCo) και ο επικλινής πυρήνας της επικουρικής οσφρητικής χορδής (accessory olfactory track) και της stria terminalis<sup>80</sup> (**σχημα Shipley 1996 or 2008**). Η αμυγδαλή συμμετέχει στην διαμόρφωση συμπεριφορών σχετικών με τον φόβο, το άγχος, καθώς και πολλών διαφορετικών συμπεριφορών σχετικών με την αναπαραγωγή και την επιθετικότητα. Έτσι δεν είναι παράξενο το γεγονός ότι ο AOB προβάλλει άμεσα στην αμυγδαλή για την επεξεργασία των πληροφοριών το VNO. Οι περιοχές της αμυγδαλής φαίνεται ότι είναι εκείνες που τελικά καταφέρνουν να φέρουν σε επαφή τις πληροφορίες από τα 2 οσφρητικά συστήματα<sup>89</sup>(**Εικ.15A**). Οι 2 περιοχές του AOB (πρόσθια και οπίσθια) που λαμβάνουν αισθητικά σήματα από τις επιπολείς και εν τω βάθει περιοχές του VNO προβάλλουν εξίσου σε όλους τους πυρήνες του OC που σχετίζονται με το AOS<sup>90</sup>.



**Εικ15Α:** Το κύκλωμα του AOS από το VNO και πώς προβάλλει στους διαφορετικούς πυρήνες της Αμυγδαλής μέσω του AOB. ( τροποποιημένη από Von campenhausen et al, 2000)

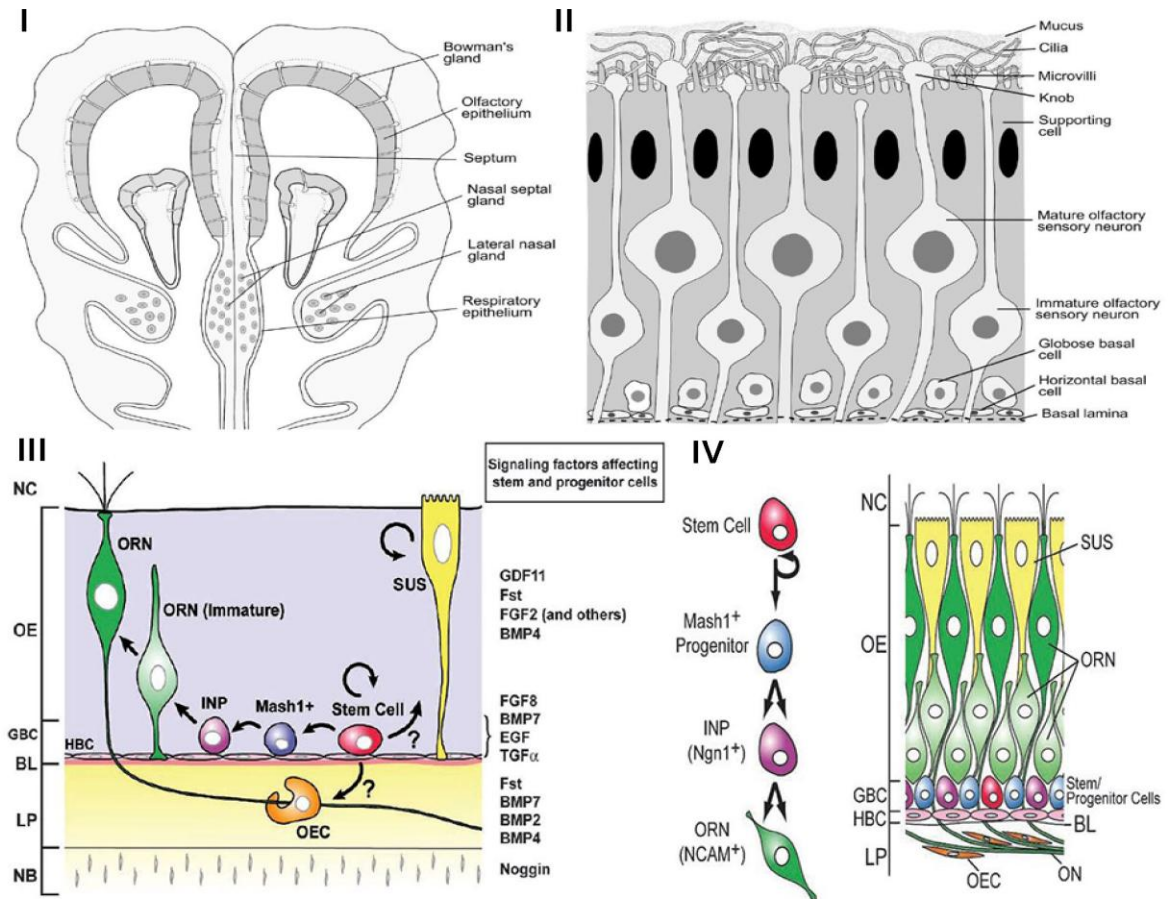
## **2.2 Ανάπτυξη του οσφρητικού συστήματος κατά την εμβρυϊκή περίοδο**

Κατά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του οσφρητικού συστήματος στις δομές του αρχέγονου OE, OB και OC πραγματοποιούνται μια σειρά από παράλληλες αναπτυξιακές διαδικασίες ανεξάρτητες όμως η μία από την άλλη<sup>91</sup>.

### **A) Ανάπτυξη οσφρητικού επιθηλίου και του VNO**

Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης η πλειοψηφία των κύτταρων που δομούν τα αισθητήρια συστήματα προέρχονται από τις εξωδερματικές παχύνσεις εκατέρωθεν του νευρικού σωλήνα που ονομάζονται κρνιακά πλακώδη<sup>92</sup>. Το OE προκύπτει ως δομή (περιφερική ) από την διαφοροποίηση κυττάρων του αντίστοιχου κρνιακού πλακώδους (οσφρητικό πλακώδες)<sup>93</sup>. Το οσφρητικό πλακώδες (olfactory placode, OP) πρωτοεμφανίζεται ως δομή

στην αναπτυξιακή ηλικία E9,5 ως μία πάχυνση πρόσθια και πλάγια της νευρικής πλάκας (αμέσως μετά την σύγκληση του νευρικού σωλήνα)<sup>94</sup>. Την επόμενη εμβρυική ημέρα έχει αρχίσει να δημιουργεί μία κοίλανση (οσφρητικό κυστίδιο) που σταδιακά θα δημιουργήσει την ρινική κοιλότητα<sup>95</sup>. Από την περίοδο αυτήν μπορούν να ξεχωρίσουν οι πρόδρομοι πληθυσμοί των OSN<sup>96</sup>. Την ίδια περίοδο έχουμε και την δημιουργία του VNO στην έσω πλευρά των ρινικών κοιλοτήτων (**Εικ15B,I-II**). Μία σειρά από διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες θα παίξουν καθοριστικό ρόλο στην δημιουργία του OP αλλά και στην διαφοροποίηση των άωρων κυττάρων του σε νευρικούς ή μη νευρικούς πληθυσμούς. Οι σημαντικότεροι μεταγραφικοί παράγοντες είναι ο Pax6, Dlx5, Hes1 και Hes5. Ο Pax6 αποτελεί καθοριστικό μόριο στην δημιουργία τόσο των νευρώνων του OE όσο και του OB<sup>97,98</sup>. Καθώς η ανάπτυξη προχωράει τα επίπεδα του Pax6 πέφτουν ενώ τα επίπεδα του Dlx5 αυξάνουν<sup>99</sup>. Τα μόρια Hes1 και Hes5 είναι αυτά που τελικά θα καθορίσουν την μοίρα των κυττάρων του OP προς νευρικούς ή μη νευρικούς πληθυσμούς<sup>100,101</sup>. Τέλος, αρκετά μορφογόνα συμμετέχουν στην δημιουργία και την μετέπειτα διαφοροποίηση των κυττάρων του OP όπως είναι το BMP (bone morphogenic protein), ο FGF (fibroblast growth factor) και το RA (retinoic acid)<sup>102</sup>(**Εικ.15B,III-IV**).



**Εικ.15B: Στεφανιαία τομή των ρινικών κοιλοτήτων όπου παρουσιάζεται η περιοχή του ΟΕ (I,Γκρι) και οι στοιβάδες με τους κυτταρικούς πληθυσμούς που το δομούν στην ενήλικο ζωή (II).III.Τα προγονικά κύτταρα του ΟΕ και οι απόγονοι τους καθώς και τα διαφορετικά μορφογόνα που καθορίζουν την διαφοροποίησή τους.IV.Τα διαδοχικά βήματα από τα προγονικά κύτταρα μέχρι τους ώριμους ORN και πώς αυτοί οι κυτταρικοί πληθυσμοί κατανέμονται εντός του ΟΕ. SUS: Sustentacular cells, ORN: olfactory receptor neuron layers; GBC:globose basal cell layer, HBC:horizontal basal cell layer; INPs: immediate neuronal precursors; LP: lamina propria; OEC: olfactory ensheathing cells; ON: olfactory nerve (axons of ORNs); BL:Basal lamina;NC: nasal cavity; NB:nasal bone.Τροποποιημένα από D,K,Maurya,et al.2015<sup>103</sup>, και Crestina L. Beites, et al,2005.<sup>104</sup>**

Το ΟΕ κατά την διάρκεια της ανάπτυξης δέχεται 2 κύματα νευρογένεσης, το πρωτογενές και το δευτερογενές. Κατά την πρωτογενή νευρογένεση (E10) δημιουργούνται από το ΟΡ όλες οι υποστηρικτικές δομές του ΟΕ καθώς και οι άωροι πληθυσμοί των OSN. Επίσης, οι άξονες των πρώιμων OSN αρχίζουν να προβάλλουν προς την περιοχή του μελλοντικού ΟΒ

<sup>101,105</sup>. Καθώς κύτταρα από το OP μεταναστεύουν προς το αρχέγονο OE μαζί με τους άξονες των πρώιμων OSN δημιουργούν την επονομαζόμενη μεταναστευτική μάζα (migratory mass) <sup>106</sup> που περιέχει πληθώρα διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών. Ο ρόλος της μεταναστευτικής μάζας στη ανάπτυξη του OS δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Μετά την ημέρα E11.5-E12.5 το OE έχει αρχίσει να οργανώνεται σε μορφή ψευδοπολύστοιβου κυλινδρικού επιθηλίου και η δευτερογενής νευρογένεση αρχίζει αμέσως μετά καθόλη την ενήλικη ζωή<sup>101</sup>.

Στην ηλικία E12 η δομή του VNO έχει αρχίσει να παρουσιάζεται μόλις στο OP την περίοδο που στο OE έχει ήδη αρχίσει το πρώτο κύμα νευρογένεσης και ο ιστός αποκτά την τελική του διαστρωμάτωση<sup>107</sup>. Οι πρώτοι VSN μπορούν να αναγνωριστούν στο αισθητικό επιθήλιο του VNO κατά την περίοδο E14,5<sup>108</sup> <sup>109</sup>. Κατά την γέννηση το VNO έχει πλέον αποκτήσει την τελική λειτουργική του μορφή. Παρόλα αυτά ο αυλός που συνδέει το αισθητικό επιθήλιο με την ρινική κοιλότητα γίνεται βατός τις επόμενες μέρες μετά την γέννηση<sup>110</sup>.

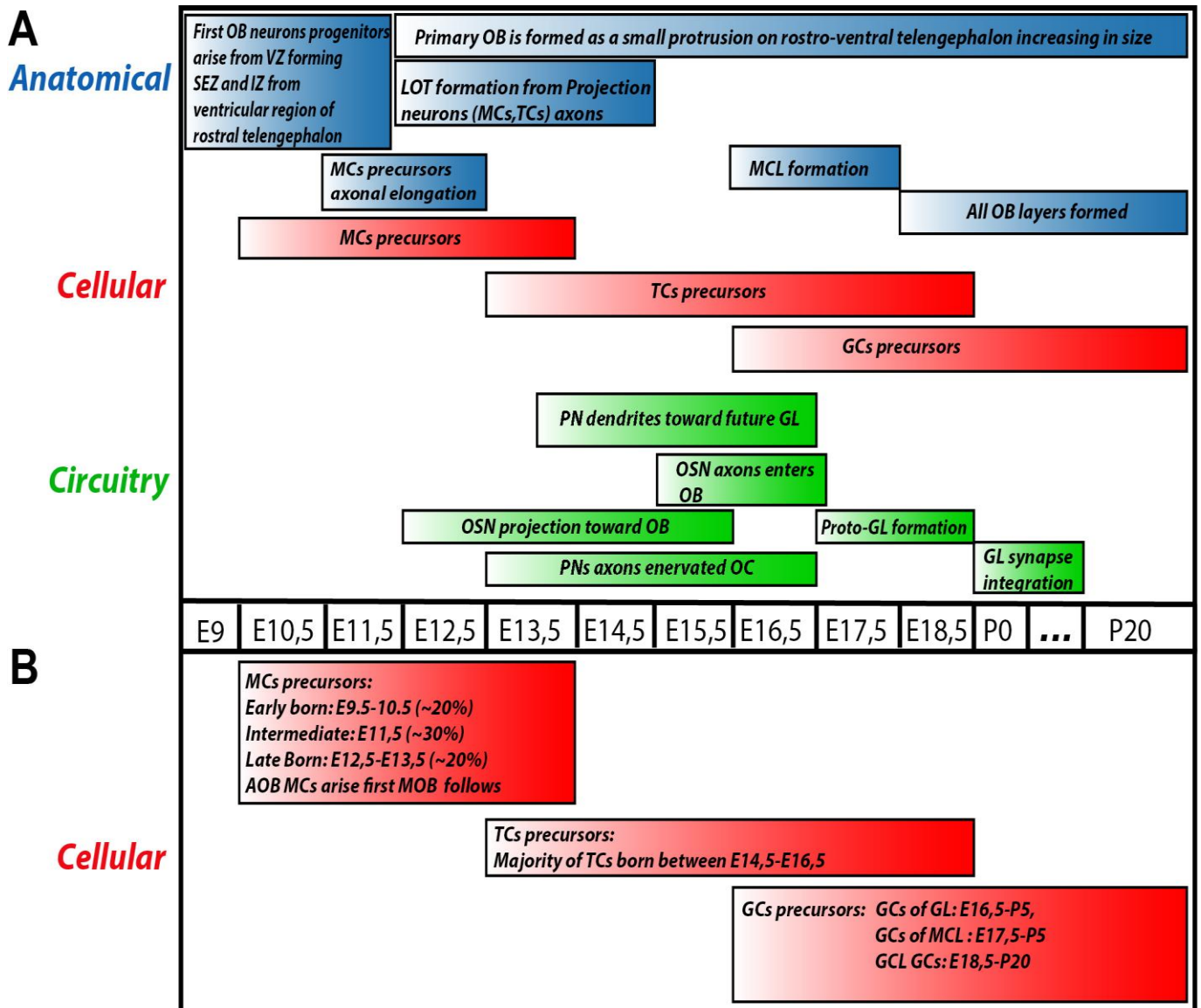
Συνοψίζοντας τα αισθητικά οσφρητικά επιθήλια τόσο του MOS όσο και του AOS προέρχονται αμφότερα από την δομή του οσφρητικού πλακώδους. Επιπλέον η ανάπτυξη του OE προηγείται χρονικά αυτής του VNO σε αντίθεση με την ανάπτυξη του AOB σε σχέση με το MOB όπως θα δηχθεί παρακάτω.

## **B) Ανάπτυξη οσφρητικού λοβού (OB)**

### **1. Γενεαλογία κυτταρικών πληθυσμών OB**

Νωρίς κατά την διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης (E10,5) του κεντρικού νευρικού συστήματος, από την ρυγχιαία και κοιλιακή περιοχή του τελεγκεφάλου αναπτύσσεται ο αρχέγονος OB. Αρχικά αποτελείται από δύο μόνο στοιβάδες αρχέγονων κυττάρων την υποεπενδυματική ζώνη (subependymal zone, SEZ), πάνω από την κοιλιακή βλαστική ζώνη (VZ), που βρίσκεται εν τω βάθει και την μεθόριο ζώνη επιπολής, που ονομάζεται ενδιάμεση ζώνη (intermediate zone, IZ)<sup>111,112</sup>. Από την κοιλιακή βλαστική ζώνη (VZ) θα προέλθουν όλοι οι κυτταρικοί πληθυσμοί του OB μετά από διαφοροποίηση σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Έτσι με μερικώς επικαλυπτόμενη χρονολογική σειρά θα προκύψουν οι νευρωνικοί πληθυσμοί των MCs, TCs, GCs και των υπολοίπων κυττάρων του OB.<sup>95</sup>. Συνοπτικά η γενεαλογία των κυτταρικών πληθυσμών του OB παρουσιάζονται στο **γράφημα 1**.





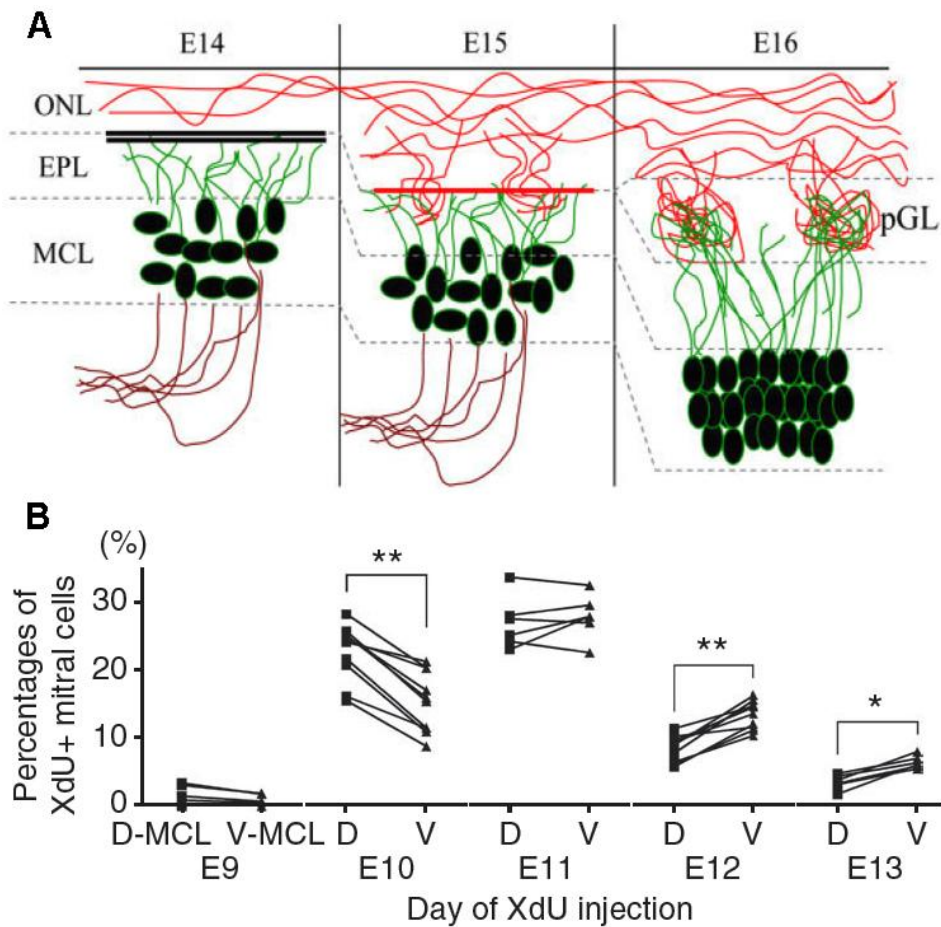
**Γράφημα 1: Χρονοδιάγραμμα ανάπτυξης του OB. A.** Ανατομικά (μπλέ), κυτταρικά (κόκκινο) και συναπτικά (πράσινο) χαρακτηριστικά του αναπτυσσόμενου OB. **B.** Ανάλυση της γενεαλογίας των διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών που δομούν τον OB. VZ: ventricular zone, IZ: intermediate zone, SEZ: subependymal zone, MCs: mitral cells, TCs: tufted cells, GCs: granule cells, MCL: mitral cell layer, GCL: granule cell layer, OSN olfactory cells neurons, PN: projection neurons, OB: olfactory bulb, AOB: accessory olfactory bulb.



## 2.Πληθυσμός των προβλητικών νευρώνων (MCs,TCs)

Κατά την ηλικία E12,5 μακροσκοπικά ο αρχέγονος OB πρωτοεμφανίζεται ως μία προεκβολή του ρυγχαίου και κοιλιακού τελενγκεφάλου<sup>111</sup>. Η νευρογένεση στον OB αρχίζει με την δημιουργία των πρόδρομων κυττάρων των MCs, των κύριων προβλητικών νευρώνων του OB, κατά την εμβρυϊκή περίοδο E9,5-E13,5<sup>113,114</sup>. Τα MCs που προκύπτουν μπορούν να χωριστούν σε πρώιμα (E9,5-10,5),ενδιάμεσα (E11,5) και όψιμα (E12,5-E13,5). Τα ποσοστά του συνολικού αριθμού των MCs που προκύπτουν σε κάθε περίοδο είναι: 1% του πληθυσμού γεννιέται στην ηλικία E9,5 ,18% στην E10,5, 28% στην E11,5 12% στην E12,5 και τέλος 6% στην E13,5<sup>114</sup>. Ο πληθυσμός των ενδιάμεσων MCs είναι ο πολυπληθέστερος καθώς αποτελεί ~30% του συνολικού αριθμού των MCs στον ενήλικο OB. Μετά την γέννησή τους από τα βλαστικά τους κύτταρα, τα πρόδρομα MCs εκφράζουν μια σειρά από διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες πριν διαφοροποιηθούν σε ώριμα MCs. Οι κυριότεροι μεταγραφικοί παράγοντες ανήκουν στην οικογένεια των t-box transcription factors και είναι οι Tbr1, Tbr2 και Tbx21 όπου εκφράζονται με αυτήν την σειρά χρονολογικά από τα πρώτα μετάμιτωτικά κύτταρα έως τα ώριμα MCs. Παρότι ο Tbr1 είναι πάντα ο πρώτος μετά-μιτωτικός μάρτυρας για τα MCs, υπάρχουν MCs που δεν θα εκφράσουν ακολούθως των Tbr2 κατά την διαφοροποίηση τους αλλά άμεσα Tbx21<sup>112</sup> ενώ δεν ισχύει το αντίθετο. Καθοριστικός παράγοντας για την έναρξη της έκφρασης των t-box transcription factors είναι η μείωση των επιπέδων του γονιδίου Pax6 που έχει υψηλά επίπεδα στα βλαστικά κύτταρα της SEZ<sup>112</sup>. Η αξονογένεση στα πρώτα μεταμιτωτικά MCs θα αρχίσει νωρίς μετά την δημιουργία τους στην ηλικία E11,5. Κατά την εμβρυϊκή περίοδο E12,5-E14,5 οι άξονες αυτών των κυττάρων επιμηκύνονται αρχίζοντας να δημιουργούν την δεσμίδα αξόνων που θα εξελιχθεί στο LOT<sup>115</sup>. Καθώς τα MCs εκπορεύονται από τον VZ αρχικά μεταναστεύουν ακτινωτά προς την IZ<sup>68,114</sup> (**γράφημα 1**). Όταν φτάσουν στην IZ βρίσκονται σε οριζόντιο προσανατολισμό εντός της στοιβάδας και τα όψιμα MCs (E12,5) φαίνεται ότι αρχίζουν να μεταναστεύουν οριζόντια πάνω στους άξονες των πρώιμων κυττάρων ώστε να καταλάβουν τις τελικές τους θέσεις στην αναπτυσσόμενη MCL<sup>114</sup>. Εν συνεχεία εφόσον καταλάβουν την τελική τους θέση αποκτούν ξανά κάθετο προσανατολισμό και προβάλουν τους δένδριτες τους προς την επιφάνια του OB (μελλοντική GL)<sup>68</sup>.Τέλος στον αναπτυγμένο OB οι πλειοψηφία των πρώιμων κυττάρων καταλαμβάνουν θέση έσω

και ραχιαία ενώ των όψιμων έξω και κοιλιακά. Ο πληθυσμός των ενδιάμεσα γεννώμενων MCs κατανέμεται ομοιόμορφα σε όλα τα τεταρτημόρια του OB<sup>114</sup>(Εικ.16).



**Εικ.16: Προσανατολισμός και θέση των MCs σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης του MOB (A). Κατανομή των διαφορετικών υποπληθυσμών των MCs εντός του ώριμου OB (B).** (τροποποιημένη από Blanchart et al, 2006 και Imamura et al, 2011)

Ο πληθυσμός των TCs αρχίζει να εμφανίζεται αμέσως μετά τα MCs (E10,5) σε πάρα πολύ μικρά ποσοστά, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό τους γεννάται από τα βλαστικά κύτταρα της VZ στην ηλικία E14,5-E17,5. Συγκεκριμένα η πλειοψηφία των εν τω βάθει TCs προκύπτουν στην ηλικία E14,5-E15,5, των ενδιάμεσων TCs κατά την περίοδο E14,5-E16,5 και των επιπολής στην ηλικία E16,5-E18,5<sup>113</sup>. Τα συγκεκριμένα κύτταρα όπως και τα MCs μεταμιτωπικά εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα Tbr1 ενώ ένα ποσοστό των ώριμων TCs (~70%) εκφράζουν τον Tbx21 (το σύνολο των TCs της επιπολής στοιβάδας εκφράζουν Reelin)<sup>116,117</sup>.

Η στοιβάδα των MCs αρχίζει να γίνεται εμφανής ως δομή κατά την ηλικία E16,5. Μεταξύ E14,5-E16,5 οι προβλητικοί νευρώνες αρχίζουν να προβάλουν τους πρώτους δενδρίτες

προς την εξωτερική περιοχή του OB. Οι άξονες των OSN παραμένουν στην ONL μέχρι το E15,5<sup>68,118</sup>. Από εκείνη την ηλικία και μετά θα αρχίσουν να διεισδύουν εντός του OB για να δημιουργήσουν τα πρωτοσπειράματα<sup>118</sup>. Τα πρωτοσπειράματα ως δομές είναι εμφανείς μετά την E17,5 ενώ παρά του ότι οι δενδρίτες των προβλητικών νευρώνων βρίσκονται στην περιοχή, συνάψεις με τα πρωτοσπειράματα θα πραγματοποιηθούν πριν την γέννηση<sup>118</sup>(**γράφημα 1**). Η πλήρης ανάπτυξη και ωρίμανση των δενδριτικών συνάψεων των προβλητικών νευρώνων θα γίνει μετά την γέννηση και θα βοηθηθεί από την δραστηριότητα των OSN<sup>119</sup>.

### **3.Πληθυσμός των ενδονευρώνων (GCs)**

Ο μεγάλος όγκος των ενδονευρώνων του OB ακολουθεί χρονικά την δημιουργία των προβλητικών νευρώνων. Έτσι πριν την ηλικία των E15,5 ελάχιστος αριθμός ενδονευρώνων παρουσιάζεται τόσο στον MOB όσο και στον AOB. Μετά την ηλικία των E15,5 αρχίζει σταδιακά έως και μετά την γέννηση η αύξηση των ποσοστών των GCs που δημιουργούνται από τα βλαστικά κύτταρα<sup>113,120</sup>. Το μεγαλύτερο ποσοστό των GCs του MOB δημιουργείται μεταξύ E18,5-P5. Οι ενδονευρώνες της περιοχής του AOB, όπως συμβαίνει και με τους προβλητικούς νευρώνες, δημιουργούνται πρώτοι με διαφορά 1-2 ημερών σε σχέση με το MOB<sup>113</sup>. Η πλειοψηφία των GCs ανά περιοχή του MOB προκύπτουν στις συγκεκριμένες ηλικίες: επιπολής GCs(GL) E16,5-P5, GCs της MCL E17,5-P5 εν τω βάθει GCs E18,5-P20.<sup>111,120</sup>(**γράφημα 1**). Αξίζει να σημειωθεί ότι ένα μικρό ποσοστό πρώιμων ενδονευρώνων του OB γεννάται νωρίς από κύτταρα της έξω γαγγλιονικής προεξοχής (lateral ganglionic eminence,LGE) και όχι της SEZ του OB<sup>121</sup>.

### **Γ. Άξονες προβλητικών νευρώνων και δημιουργία LOT**

Νωρίς μετά την γέννηση των MCs και κοντά στην ηλικία E11,5 λαμβάνει χώρα η προβολή του νευράξονά τους<sup>122</sup>. Μεταξύ E12,5-E14,5 η προβολή των νευραξόνων εντός του πρώιμου LOT έχει πραγματοποιηθεί<sup>68,115</sup>. Το μονοπάτι πάνω στο οποίο θα πορευθούν οι άξονες του LOT έχει δημιουργηθεί πριν ακόμα γίνει η προβολή των νευραξόνων των προβλητικών νευρώνων σε αυτό. Το μονοπάτι σχηματίζεται από τους Lot1<sup>+</sup> νευρώνες (ειδικός μάρτυρας για αυτόν τον κυτταρικό πληθυσμό) που μεταναστεύουν από την περιοχή του άωρου PC (E9,5-E10,5)<sup>123</sup>. Μετά την μετανάστευσή τους μαρκάρουν την πορεία του μελλοντικού LOT και σχηματίζουν ένα ανατομικό μονοπάτι για να έρθουν και να οδηγηθούν σωστά οι άξονες των MCs/TCs. Χωρίς την παρουσία των Lot1<sup>+</sup> νευρώνων η δεσμίδα των νευραξόνων του LOT αδυνατεί να δημιουργηθεί<sup>123</sup>. Τέλος στην εμβρυϊκή ηλικία E16,5-E17,5

οι άξονες του LOT έχουν αναπτυχθεί πλήρως φτάνοντας έως την ουραία περιοχή του τελενγκεφάλου όπου βρίσκεται ο οπίσθιος PC (pPC) <sup>115</sup>. Μεταξύ των δύο διαφορετικών ομάδων προβλητικών νευρώνων η πλειοψηφία των MCs θα προβάλουν σε πιο οπίσθιες δομές του OC (απιοειδής πυρήνας, PC), ενώ η πλειοψηφία των TCs θα προβάλουν σε πιο πρόσθιες δομές όπως το οσφρητικό κυστίδιο (olfactory tubercle, OT) <sup>124</sup>. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως μια σειρά διαφορετικών μορίων κυτταρικής συνάφειας εκφράζονται από τα MCs και TCs κατά την διάρκεια της ανάπτυξης. Η οργάνωση των νευρικών ινών του LOT γίνεται σε 3 στοιβάδες την εν τω βάθει, την ενδιάμεση και την επιπολής όπως προαναφέρθηκε. Μια ποικιλία διαφορετικών CAMs που παρουσιάζονται στην επιφάνεια των αξόνων κάθε στοιβάδας. Είναι γνωστό ότι το σύνολο των αξόνων του LOT εκφράζουν το μόριο L1 στην επιφάνια τους. Οι εν τω βάθει και ενδιάμεσες στοιβάδες των αξόνων του LOT εκφράζουν το NCAM και OCAM (NCAM2) ενώ οι επιπολής εκφράζουν την TAG-1 (contactin-2) και το DCC<sup>69</sup>. Εκτός των μορίων κυτταρικής συνάφειας που εκφράζονται στους άξονες του LOT και άλλα μόρια που παίζουν ρόλο στην αξονική καθοδήγηση εκφράζονται. Η Neuropilin-1 εντοπίζεται στις ενδιάμεσες και επιπολείς στοιβάδες του LOT σε αντίθεση με την neuropilin-2 που εντοπίζεται εν τω βάθει<sup>69</sup>. Επιπροσθέτως αξίζει να σημειωθεί ότι καθώς τα MCs ωριμάζουν καταλαμβάνουν πιο επιπολείς θέσεις στην MCL ενώ οι άξονες τους τοποθετούνται σε πιο εν τω βάθει στοιβάδες του LOT. Έτσι κατά την διάρκεια της ανάπτυξης θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι άξονες των MCs ταξινομούνται από έσω προς τα έξω κατά χρονολογική σειρά γέννησης<sup>68,125</sup>. Τέλος οι ίνες των αξόνων του LOT περιβάλλονται κανονικά από έλυτρο μυελίνης που ρυθμίζει την ομαλή αγωγή του νευρικού σήματος .

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**

### **Μόρια κυτταρικής συνάφειας**

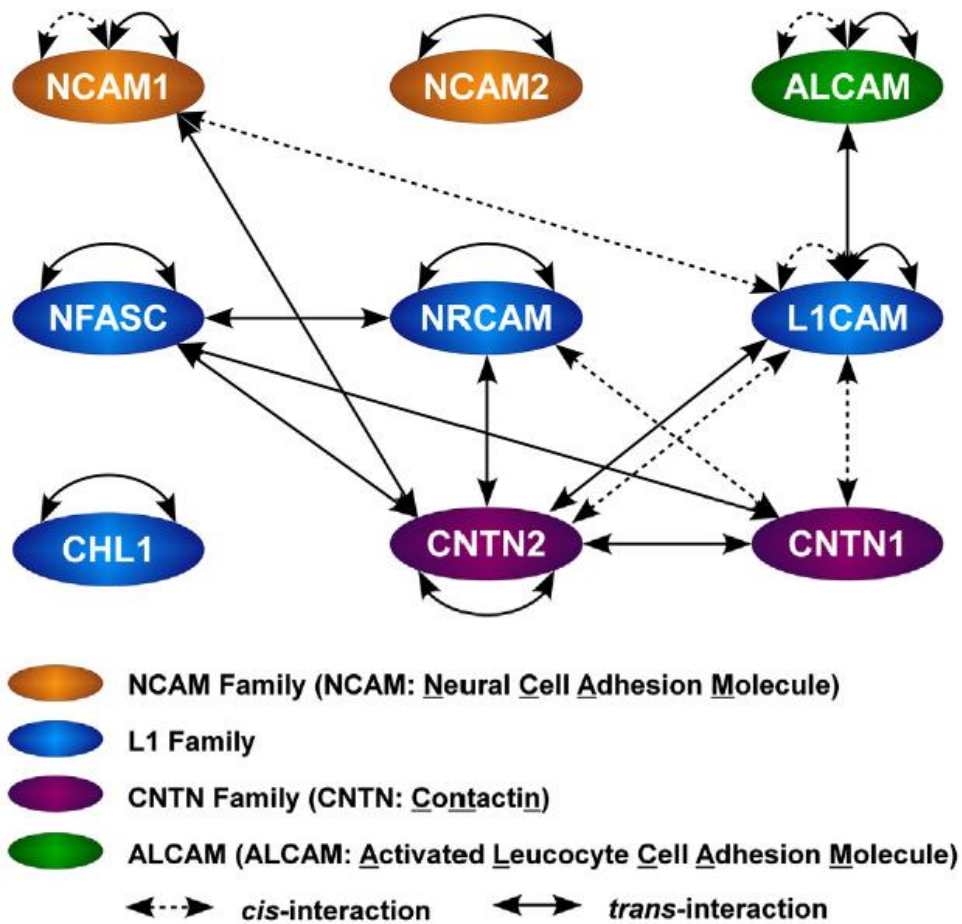
Η πλειοψηφία των μορίων κυτταρικής συνάφειας που απαντώνται στους ζωντανούς οργανισμούς ανήκει σε μία από τις πέντε κατηγορίες των: Ιντεγκρινών (integrins), Καντχερινών (cadherins), υπεροικογένειας ανοσοσφαιρινών (immunoglobulin super family), σελεκτινών (selectins) και μουκινών (mucins)<sup>126</sup>.

Θα επικεντρωθούμε στην υπερ-οικογένεια των ανοσοσφαιρινών που αποτελεί την μεγαλύτερη οικογένεια μορίων κυτταρικής συνάφειας στον οργανισμό<sup>127</sup>. Όλα τα μέλη της οικογένειας μοιράζονται ως κοινό χαρακτηριστικό τους την ύπαρξη στο εξωκυττάριο τμήμα

τους περιοχές που ομοιάζουν με το σταθερό τμήμα των ανοσοσφαιρινών (Ig like-domain ). Μέσα στις Ig περιοχές τους τα μέλη συνήθως διατηρούν ομολογία για την περιοχή C2 του σταθερού τμήματος<sup>128</sup>. Επίσης ο αριθμός και η ποικιλία των επαναλαμβανόμενων περιοχών στο εξωκυττάριο τμήμα των γλυκοπρωτεϊνών της IgSF μπορεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των μελών. Έτσι υπάρχουν μέλη που έχουν μόνο Ig επαναλαμβανόμενες εξωκυτταρίες περιοχές, ή Ig μαζί με περιοχές φιβρονεκτίνης τυπου III (fibronectin type III domains), ενώ μπορεί να είναι διαμεμβρανικές ή να προσδένονται στην μεμβράνη μέσω μιας άγκυρας γλυκοσυλο-φωσφατιδυλινοσίτης (Glycosylphosphatidylinositol, GPI)<sup>129</sup>. Τα μόρια της IgSF δεν εξαρτώνται από την πρόσδεση ασβεστίου για την εκτέλεση των λειτουργιών τους.

### **Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας του νευρικού συστήματος**

Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του κεντρικού νευρικού συστήματος τα νευρικά και γλοιακά κύτταρα είναι απαραίτητο να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους, αλλά και με το αναπτυσσόμενο νευρωνικό περιβάλλον μέσω άμεσης επαφής. Λειτουργίες όπως η μετανάστευση των νευρώνων, η επιμήκυνση των νευραξόνων, η δεσμιδοποίηση τους, η καθοδήγηση προς τους τελικούς στόχους και η δημιουργία των αξονο-δενδρικών συνάψεων με αυτούς πραγματοποιείται μέσω της δράσης των μορίων κυτταρικής συνάφειας (cell adhesion molecules, CAMs)<sup>130</sup>. Τα CAMs του νευρικού συστήματος μέσω ομοφυλικών ή ετεροφυλικών αλληλεπιδράσεων, μεταξύ τους ή μέσω αναγνώρισης από άλλα μόρια στην επιφάνεια των νευρώνων ,συνεισφέρουν στις παραπάνω δράσεις<sup>129</sup>,**Εικ.18**. Οι ομάδες των CAMs που εκφράζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα είναι κυρίως μέλη της immunoglobulin super family(IgSF), cadherins super family, των νευρεξινών (neurexins) και των εφρινών (ephrin/Eph)<sup>131</sup>(**Πίνακας 1**).



Εικ.18: Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των καλύτερα μελετημένων CAMs της υπεροικογένειας των Igs, που εντοπίζονται στους αναπτυσσόμενους νευράξονες. (τροποποιημένη από Pollerberg et al, 2013)

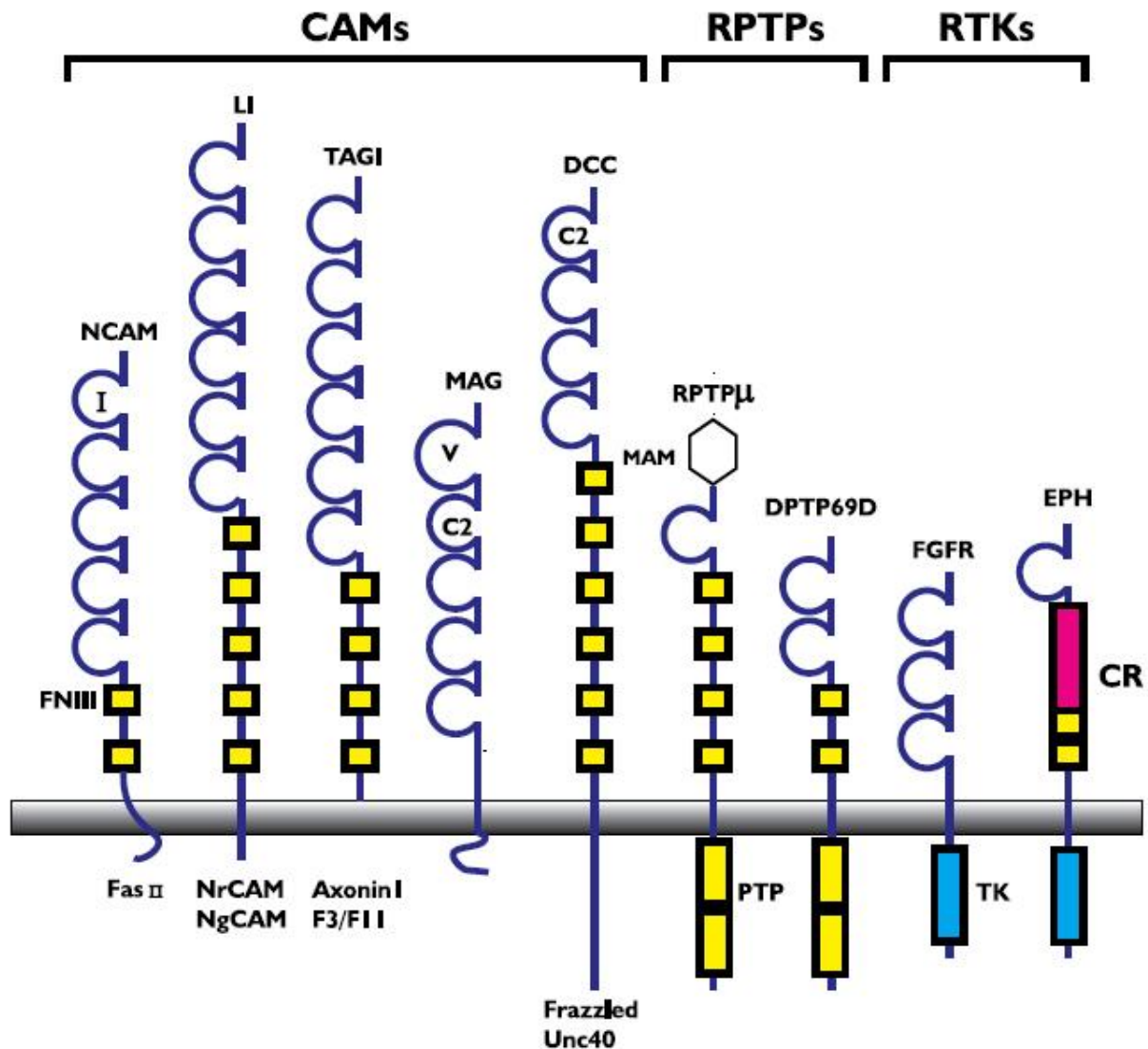
**Table 1 Lists of the neuron-neuron and neuron-glia interactions in the nervous systems**

<b>Classification</b>	<b>Adhesion molecules</b>	<b>Localization</b>
Cadherin Super Family	Classic cadherins	Synapse (PAJs), Neuron-Glia
	Proto-cadherins	Synapse (?)
Ig-like Molecules	Nectins	Synapse (PAJs), Neuron-Glia
	Nectin-like molecules (Necls)	Neuron-Glia
	NCAM	Synapse
	Syg-1, Syg-2	Synapse
	Sidekicks	Synapse
Others	Integrins	Synapse, Neuron-Glia
	Neuroligins, neuexins	Synapse (SJs)
	Eph receptors, ephrins	Synapse (SJs)

**Πίνακας 1:** Αλληλεπιδράσεις μεταξύ νευρώνων και νευρώνων γλοίας στο νευρικό σύστημα από ανάλογα την ομάδα CAMs.( τροποποιημένη από Togashi et al, 2009).

### **3.1 Υπεροικογένεια ανοσοσφαιρινών και η TAG-1 στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ.**

Από την υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών που εκφράζονται στο νευρικό σύστημα η NCAM, η L1-CAM και το μόριο DCC (deleted in colorectal cancer) ήταν από τα πρώτα μέλη που μελετήθηκαν και αναλύθηκαν. Τα ανωτέρω μόρια κυτταρικής συνάφειας καθένα με τον δικό του ξεχωριστό μηχανισμό συμβάλουν στην ανάπτυξη, την προεκβολή και την καθοδήγηση των νευραξόνων των νευρικών κυττάρων<sup>132</sup>. Από την αρχική ανακάλυψη και ανάλυση των πρώτων νευρονικών CAMs μέχρι σήμερα μεγάλος αριθμός νέων μορίων έχουν εμπλουτίσει την ομάδα αυτή οδηγώντας στην κατηγοριοποίηση τους σε μικρότερες υποοικογένειες μορίων. Οι τρεις κύριες υποοικογένειες νευρωνικών CAMs είναι NCAM, η L1-CAM και οι Contactins (**Εικ19**)<sup>129,133</sup>.



**Εικ.19: Δομή ορισμένων CAMs της υποοικογένειας των Igs.** Με δομή μπλέ αγκύλης παρουσιάζονται οι Ig περιοχές, FNIII (περιοχές φιμπρονεκτίνης τυπου III), PTP (protein tyrosine phosphatase), CR (cysteine-rich domain), TK (περιοχή τυροσινικής κινάσης). (τροποποιημένη από Waltz et al, 1997)

### A) NCAM

Η υποοικογένεια του NCAM, του πρώτου νευρωνικού CAM που μελετήθηκε, αποτελείται από το NCAM1 που παρουσιάζεται σε 3 διαφορετικές ισομορφές (NCAM180, NCAM140 και NCAM120). Όλες οι ισομορφές έχουν όμοια εξωκυττάρια περιοχή που αποτελείται από 5 Ig-like επαναλαμβανόμενες περιοχές και 2 FNIII επαναλαμβανόμενες περιοχές. Η διαφορά μεταξύ των ισομορφών έγκειται στο μεταβαλλόμενο καρβοξυτελικό άκρο όπου οι



NCAM180 και NCAM140 περιέχουν διαμεμβρανικό τμήμα και ενδοκυττάρια περιοχή ενώ η ισομορφή NCAM120 προσδένεται στην πλασματική μεμβράνη μέσω GPI άγκυρας<sup>134</sup>. Επίσης το μόριο NCAM είναι το μόνο που δέχεται μεταμεταφραστική τροποποίηση (από τα IgSF) στην 5<sup>η</sup> Ig περιοχή μέσω προσθήκης αλυσίδων πολυσιαλικού οξέος (polysialic acid, PSA). Το γεγονός αυτό προσδίδει σημαντικές ιδιότητες στο NCAM κατά την διάρκεια την ανάπτυξης<sup>135,136</sup> αλλά και κατά την αναγέννηση συμβάλλοντας στην πλαστικότητα των νευρικών ινών<sup>137</sup>. Το νεότερο μέλος της υποοικογένειας του NCAM γνωστό και ως NCAM2 ή OCAM (olfactory cell adhesion molecule) αποτελείται όπως και το NCAM1 από 5 Ig-like περιοχές και 2 FNIII. Επιπροσθέτως μπορεί και αυτό να παρουσιαστεί σε 2 ισομορφές μία με διαμεμβρανική και ενδοκυττάρια περιοχή και μία που το προσδένει στην πλασματική μεμβράνη με GPI άγκυρας. Η ανακάλυψη αυτού του μορίου ήταν σημαντική καθώς βοήθησε στην χαρτογράφηση των αξόνων των οσφρητικών αισθητικών νευρώνων (olfactory sensory neurons ,OSN) καθώς προβάλλουν από το οσφρητικό επιθήλιο (olfactory epithelium, OE) προς την στοιβάδα των σπειραμάτων του κύριου οσφρητικού λοβού (Main olfactory bulb, MOB). Το OCAM ανευρίσκεται μονάχα στην ομάδα των νευραξόνων που προβάλλουν έξω και κοιλιακά στα σπειράματα του OB σε αντίθεση με το NCAM που ανευρίσκεται σε όλους τους άξονες των OSN<sup>138</sup>. Στο AOS το OCAM εκφράζεται στους επιπολής αισθητικούς νευρώνες του OE και κατ' επέκταση στους άξονες των OSN που προβάλλουν στα GL του πρόσθιου AOB<sup>138</sup>. Επίσης το συγκεκριμένο CAM εκφράζεται στους άξονες των προσβλητικών νευρώνων του OB κατά την διάρκεια της ανάπτυξης<sup>139</sup>. Το μόριο NCAM έχει συσχετιστεί με νευροψυχιατρικές (κατάθλιψη, σχιζοφρένια) και νευροεκφυλιστικές διαταραχές στο παρελθόν<sup>140-142</sup>.

## **B) L1-CAM**

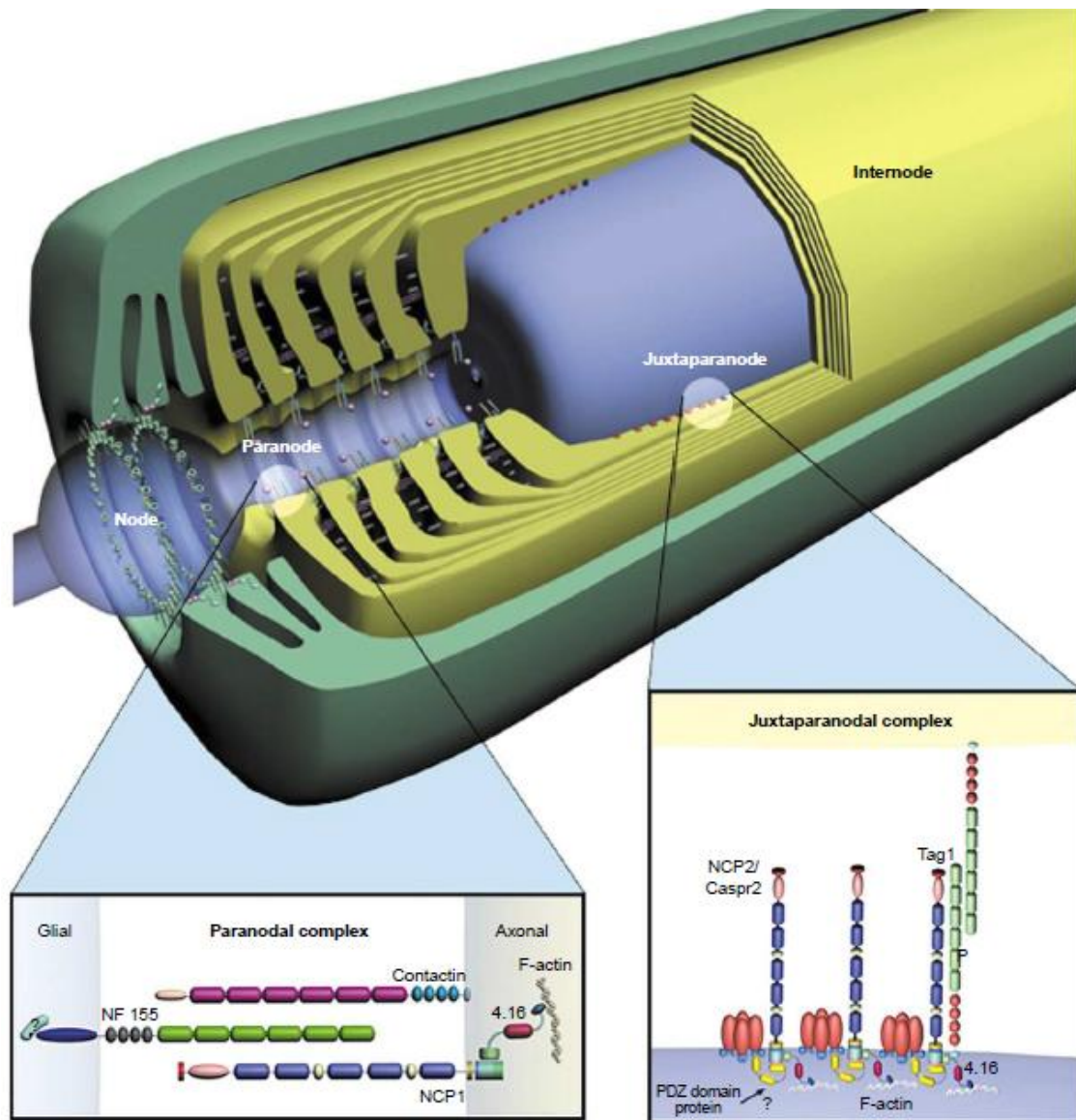
Τα μέλη της υποοικογένειας του L1 στον ποντικό είναι το L1, το CHL1( close homolog of L1), το NrCAM και οι neurofascins. Όλα τα παραπάνω μόρια αποτελούνται από 6 Ig-like επαναλαμβανόμενες περιοχές και από 4-5 FNIII περιοχές ακολουθούμενες από το διαμεμβρανικό τμήμα και την ενδοκυττάρια περιοχή που τις συνδέει με τις ανκυρίνες (ankyrins) και τον κυτταροσκελετό (**Εικ19**). Είναι γνωστό πως τα L1-CAMs παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των νευραξόνων, την δεσμιδοποίηση των νευρικών ινών, την καθοδήγησή τους, την μετανάστευση των νευρώνων και την πλαστικότητα των νευρικών συνάψεων<sup>134,143</sup>.

Το μόριο της L1 αλληλεπιδρά με το σύστημα των EphrinB/EphB συνεισφέροντας στην τοπογραφική οργάνωση των αξόνων των αμφιβληστροειδικών γαγγλιακών κυττάρων μέσω

της αλληλεπιδράσεως με την ankyrin-B<sup>144</sup>. Παράλληλα συμμετέχει στην ανταπόκριση των αξόνων στην απωθητική δράση του καθοδηγητικού μορίου Sema3a μέσω αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα του NP-1(neuropilin-1) στην επιφάνεια των αξόνων<sup>145</sup> οδηγώντας στην ενδοκύττωσή του. Το γνωστό νευρολογικό σύνδρομο CRASH (Corpus callosum hypoplasia, Retardation, Adducted thumbs, Spastic paraplegia, and Hydrocephalus) είναι αποτέλεσμα μετάλλαξης του ανθρώπινου L1 ομόλογου γονιδίου που εντοπίζεται στην Xq28 περιοχή του X χρωμοσώματος<sup>146</sup>. Το CHL1 φαίνεται να παίζει ρόλο επίσης μέσω του καθοδηγητικού μονοπατιού του Semaphorin/Neuropilin στην καθοδήγηση των θαλαμοφλοιικών ινών στον κοιλιακό τελεγκέφαλο<sup>147</sup>. Επίσης συμβάλει στην σωστή συναπτική στόχευση των αστεροειδών ενδονευρώνων της παρεγκεφαλλίδας (stellate cells) μέσω του μορίου NB3 στους δενδρίτες των κυττάρων Purkinje<sup>148</sup>.

Το NrCAM είναι ένα μόριο που οι λειτουργίες του και ο ρόλος του στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ συμβαδίζει αρκετά με αυτές των L1 και του CHL1 όπως αναφέρθηκαν προηγουμένως (ανάπτυξη των νευραξόνων, καθοδήγηση τους, πλαστικότητα των νευρικών συνάψεων). Το NrCAM αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες των συνάψεων SAP90/PSD95 και SAP97 όπου βρίσκονται στους δενδρίτες των φωτουποδοχέων του αμφιβληστροειδούς<sup>149</sup>. Επίσης εντοπίζεται στους κόμβους του Ranvier των εμμέλων ινών του περιφερικού νευρικού συστήματος και όχι του ΚΝΣ όπου συνεντοπίζεται με τις neurofascins της ίδιας υποοικογενείας<sup>150,151</sup>. Η παρουσία του στους κόμβους του Ranvier φαίνεται ότι σχετίζεται με την κυκλοφορία των διαύλων νατρίου<sup>150</sup>. Συγκεκριμένοι γονιδιακοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο του NrCAM έχουν σχετιστεί με σύνδρομα αυτισμού<sup>152</sup> όπως και με ευπάθεια σε εξαρτησιογόνες ουσίες<sup>153</sup>.

Τέλος οι neurofascins αποτελούν οργανωτικούς παράγοντες των τμημάτων των εμμέλων ινών και παρουσιάζονται σε 2 ισομορφές, την NF155 και την NF186. Η NF155 εντοπίζεται στην γλοιακή πλευρά των παρακομβικών περιοχών (paranodal regions) του ελύτρου της μυελίνης δημιουργώντας σύμπλωκο με την Caspr και την contactin. Αντιθέτως η NF186 εντοπίζεται στην νευρωνική επιφάνεια του ελύτρου στους κόμβους του Ranvier όπου δημιουργεί σύμπλοκα με τους διαύλους νατρίου<sup>154,155</sup> (**Εικ.20**).



**Εικ.20: Απεικόνιση δομής εμμέλου άξονα και των διαφορετικών περιοχών του. Παρουσιάζονται τα μόρια που εντοπίζονται στις παρακομβικές και στην εγγύς των παρακομβικών περιοχές σε ενθέσεις (τροποποιημένη από Bhat, 2003)**

### **Γ) Contactins**

Η υποοικογένεια των contactins αποτελείται από 6 μέλη: την Contactin (F3/F11), TAG-1 (Contactin2/Axonin-1/TAX-1), BIG-1 (Contactin3), BIG-2 (Contactin4), NB-2 (Contactin5) και NB3 (Contactin6). Από τα όλα μέλη αυτής της ομάδας η contactin και η TAG-1 έχουν μελετηθεί εκτενώς σε σχέση με τα υπόλοιπα 4 μέλη. Είναι γνωστό ότι αποτελούν μόρια που παίζουν κάρριο ρόλο στην μετανάστευση των νευρώνων, την καθοδήγηση και την ανάπτυξη των αξόνων τους όπως και στην οργάνωση του ελύτρου της μυελίνης κατά την ενήλικη ζωή.

Δομικά αποτελούν γλυκοπρωτεΐνες με 6 Ig-like επαναλαμβανόμενες περιοχές και από 4 FNIII περιοχές και προσδένονται στην μεμβράνη των κυττάρων μέσω μιας GPI άγκυρας (Εικ.19).

Η contactin-1 εκφράζεται ευρέως σε πολλές περιοχές του νευρικού συστήματος όπως στον φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, στον ιππόκαμπο, σε όλες τις στοιβάδες του οσφρητικού λοβού, στις στοιβάδες των κυττάρων Purkinje και των κοκκωδών κυττάρων της παρεγκεφαλίδας, θάλαμο, υποθάλαμο και νωτιαίο μυελό. Το συγκεκριμένο μόριο κυτταρικής συνάφειας δεν εκφράζεται καθόλου στον ραβδωτό σχηματισμό (striatum)<sup>156</sup>. Σε *in vitro* μελέτες έχει παρουσιαστεί η δράση της στην ανάπτυξη των νευραξόνων και στην καθοδήγησή τους. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σημαντική λειτουργία της είναι η δημιουργία του συμπλόκου στην παρακομβική περιοχή του εμμύελου νευράξονα με την Caspr και το NF155<sup>157</sup> (Εικ.20). Επί της απουσίας της, η μετακίνηση της Caspr στην παρακομβική περιοχή παρεμποδίζεται.

Η TAG-1/Contactin2 επίσης συμμετέχει σε πληθώρα λειτουργιών στο νευρικό σύστημα κυρίως κατά την διάρκεια της ανάπτυξης αλλά και στην ενήλικη ζωή. Η TAG-1 έχει βρεθεί και σε διαλυτή μορφή εκτός από την προσδεσμένη στην μεμβράνη μέσω GPI άγκυρας<sup>158,159</sup>. Στο νευρικό σύστημα η TAG-1 εκφράζεται τόσο στους αναπτυσσόμενους νευράξονες όσο και στους μεταναστευτικούς νευρώνες πάντα σε σχέση με την φάση της ανάπτυξης του εγκεφάλου. Επιπλέον μπορεί να εντοπιστεί και στα κυτταρικά σώματα των νευρικών κυττάρων σε πρώιμα στάδια. Συγκεκριμένα έχει καταγραφεί στο νευρικό σύστημα η έκφραση της TAG-1 σε περιοχές όπως, στους χιαζόμενους άξονες (commissural fibers) του νωτιαίου μυελού, τους κινητικούς νευρώνες αυτού<sup>160</sup>, στα νωτιαία αισθητικά γάγγλια του νωτιαίου μυελού (dorsal root ganglia, DRGs), στα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, στην στοιβάδα των κοκκωδών κυττάρων της παρεγκεφαλίδας, στα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 περιοχής του ιπποκάμπου, στην οδό των φλοιοθαλαμικών αξόνων όπου βοηθούν την μετανάστευση των ενδονευρώνων και τέλος στα μητρικά και θυσανωτά προβλητικά νευρικά κύτταρα του οσφρητικού λοβού<sup>156,161-164</sup>. Η TAG-1 στους παραπάνω νευρώνες συμμετέχει στην μετανάστευση νευρικών κυττάρων, στην προεκβολή και ανάπτυξη των νευραξόνων, στην σωστή καθοδήγηση αυτών καθώς και στην δεσμιδοποίηση των αξόνων<sup>165</sup>. Εκτός από τις παραπάνω λειτουργίες η TAG-1 είναι ένα μόριο το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην φυσιολογική οργάνωση και λειτουργία των εμμύελων νευρικών ινών κατά την ενήλικη ζωή. Η έκφρασή της εντοπίζεται στους εμμύελους άξονες όσο και στα γλοιακά κύτταρα που σχηματίζουν το έλυτρο της μυελίνης

γύρο από αυτούς τόσο στο ΚΝΣ δηλαδή στα ολιγοδενδροκύτταρα όσο και στο ΠΝΣ από τα κύτταρα Schwann<sup>166</sup>. Στις ώριμες εμμύελος ίνες η TAG-1 εντοπίζεται στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή (Juxtaranodal Region) όπου εντοπίζεται μαζί με τους διαύλους καλίου Kv1.1 και την Caspr2 (μόριο της οικογένειας των neurexin-IV/Caspr/paranodin) με την οποία αλληλεπιδρά in cis (και in trans με τον εαυτό της) συμμετέχοντας στην οργάνωση της εγγύς της παρακομβικής περιοχής των εμμυελων ινών <sup>167</sup>(**Εικ.20**).

Η έλλειψη της TAG-1 οδηγεί σε αποδιοργάνωση των εγγύς της παρακομβικής περιοχών και σε υπομυελίνωση του ελύτρου, οδηγώντας συμπεριφορικά ελλείματα σε επηρεασμό της μνήμης, της μάθησης και του συντονισμού των κινήσεων. Η αποκλειστικά γλοιακή έκφραση της TAG-1 είναι αρκετή για την αποκατάσταση της οργάνωσης των εγγύς της παρακομβικής περιοχών και της φυσιολογικής λειτουργίας των εμμύελων ινών<sup>168,169</sup>. Η έκφραση του μορίου BIG-1 εντοπίζεται σε περιορισμένες περιοχές του νευρικού συστήματος όπως στα κύτταρα Purkinje της παρεγκεφαλίδας, στον ιππόκαμπο, στον οσφρητικό λοβό<sup>170</sup>. Το BIG-2 ακολούθως εκφράζεται και παίζει ιδιαίτερο ρόλο στο οσφρητικό σύστημα και πιο συγκεκριμένα στην ορθή τοπογραφικά καθοδήγηση των αξόνων των OSN στα σπειράματα στόχους του OB<sup>171,172</sup>. Τα υπόλοιπα μέλη NB-2 και NB-3 της υποοικογένειας των contactins λόγω του ότι εκφράζονται κυρίως μετά την γέννηση στον ποντικό δεν θα συζητηθούν περαιτέρω.

## **ΣΤΟΧΟΙ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

Η μελέτη των μορίων κυτταρικής συνάφειας της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών (Ig-super family CAMs) κατά την ανάπτυξη του εγκεφαλικού φλοιού, του νωτιαίου μυελού, του οπτικού και του αισθητικού συστήματος έχει μελετηθεί εκτενώς στο παρελθόν<sup>173-176</sup>. Η συνεισφορά τους στην προβολή των νευραξόνων, στην δεσμιδοποίηση, την καθοδήγηση των νευρικών ινών και την μετανάστευση των νευρώνων είναι γνωστή στα παραπάνω συστήματα. Ελάχιστα είναι γνωστά όμως για τον ρόλο τους στην ανάπτυξη και την οργάνωση τόσο του οσφρητικού συστήματος όσο και των πρωτογενών αιθουσαίο-παρεγκεφαλιδικών ινών του αιθουσαίου συστήματος. Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να αποσαφηνίσουμε τον ρόλο τους σε αυτά τα 2 αισθητήρια συστήματα ώστε να αναδείξουμε παραπάνω λεπτομέρειες σχετικές με τον μηχανισμό ανάπτυξής τους.

Πιο αναλυτικά:

**A.** Για το οσφρητικό σύστημα, ο βασικός μας στόχος είναι η μελέτη του ρόλου του μορίου κυτταρικής συνάφειας TAG-1, και πώς αυτό πιθανώς συμβάλλει στην ανάπτυξη και την οργάνωση του οσφρητικού συστήματος. Για τον παραπάνω σκοπό όλες οι περιοχές του οσφρητικού συστήματος από τα περιφερικά υποδεκτικά όργανα (OE, VNO), τον πρώτο σταθμό αναμετάδοσης της οσφρητικής πληροφορίας (MOB, AOB) και τον τελικό σταθμό επεξεργασίας (OC) θα πρέπει να αναλυθούν όσον αφορά την έκφραση της TAG-1. Στις παραπάνω περιοχές όλοι οι νευρωνικοί πληθυσμοί που εκφράζουν TAG-1 και θα μπορούσαν να επηρεαστούν από την έλλειψή της, θα πρέπει να μελετηθούν σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης. Η ανάλυση θα περιλαμβάνει γνωστές δράσεις του μορίου σε άλλα συστήματα όπως: πιθανές μεταβολές στην μετανάστευσή τους, στην οργάνωση και την καθοδήγηση των νευρικών ινών τους, ή την αγωγή του οσφρητικού σήματος προς τον OC. Τελικό σκοπό θα αποτελεί η ανάλυση των ελλειμματικών για την TAG-1 μυών, σε ειδικές συμπεριφορικές δοκιμασίες σχετιζόμενες με την λειτουργία του οσφρητικού συστήματος.

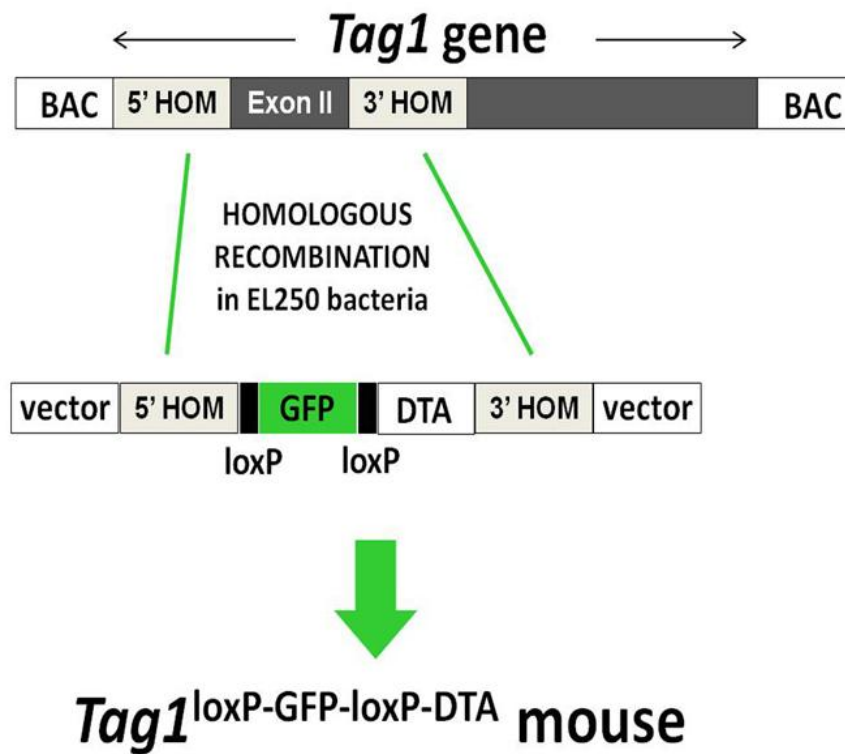
**B.** Στο δεύτερο τμήμα της παρούσας μελέτης θα μελετηθεί ο ρόλος των πρωτογενών αιθουσαίο-παρεγκεφαλιδικών ινών (PVF) στην πρώιμη ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας και στην οργάνωσή της. Είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες ότι οι PVF είναι οι πρώτοι προσαγωγοί νευράξονες που εισέρχονται εντός της αρχέγονης παρεγκεφαλίδας<sup>177</sup> σε ηλικία E11.. Επιπλέον οι άξονες των κυττάρων Purkinje (PCs) που γεννιούνται στην αναπτυξιακή ηλικία E10,5 από την VZ σύντομα μετά την ανάπτυξή τους προβάλλουν τους άξονές τους προς τις τελικές τους θέσεις<sup>24,32</sup>. Πιθανώς η τόσο πρώιμη είσοδος των PVFs εντός της παρεγκεφαλίδας να διαδραματίζει καίριο ρόλο στην ανάπτυξη του συγκεκριμένου ιστού καθώς και στην καθοδήγηση των νευραξόνων εντός και εκτός αυτού. Η παραπάνω υπόθεση καθώς και ο τρόπος με τον οποίο οι PVF και τα CAMs που εκφράζουν μπορεί να οργανώνουν τους κυτταρικούς πληθυσμούς της αναπτυσσόμενης παρεγκεφαλίδας και βοηθούν στην προβολή των αξόνων των PCs θα μελετηθούν παρακάτω.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ I**

### **A. ΟΣΦΡΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ**

#### **A1. Η έκφραση της TAG-1 στο αναπτυσσόμενο οσφρητικό σύστημα.**

Είναι γνωστό από παλιότερες μελέτες ότι η TAG-1 εκφράζεται στα MCs και TCs του OB κατά την διάρκεια της ανάπτυξης όπως και στους άξονες αυτών στο LOT<sup>178</sup>. Θέλοντας με μεγαλύτερη λεπτομέρεια να αναλύσουμε της έκφραση της TAG-1 στο οσφρητικό σύστημα μελετήσαμε όλες τις περιοχές που το δομούν. Προκειμένου να επιτύχουμε τον παραπάνω στόχο έγινε χρήση των γενετικά τροποποιημένων μυών *Tag1<sup>loxP-GFP-loxP-DTA</sup>* που είχαν δημιουργηθεί στο εργαστήριο μας από την Βιδάκη Μαρίνα<sup>179</sup>. Σε αυτά τα διαγονιδιακά ζώα στην περιοχή του εξονίου 2 του γονιδίου της *Tag-1* έχει ενθεθεί μια διαγονιδιακή κατασκευή με 2 loxP άκρα ανασυνδιαμού εκατέρωθεν του γονιδίου *eGFP*. Το *eGFP* γονίδιο διαχωρίζεται από το γονίδιο για την διφθεριδική τοξίνη (diphtheria toxin A subunit) από μια poly-A περιοχή τερματισμού. Μετά την εισαγωγή του διαγονιδίου που έγινε με τεχνολογία των BACs (Bacterial Artificial Chromosomes), είχαν προκύψει μύες οι οποίοι κάτω από τον υποκινητή της TAG-1 εξέφραζαν και την GFP ιχθυετόντας πράσινα τα κύτταρα αυτά. Εν συντομία τα παραπάνω διαγονιδιακά ζώα θα ονομάζονται *Tag-1<sup>+/+</sup>;GFP*. (**Σχήμα1,MB**)



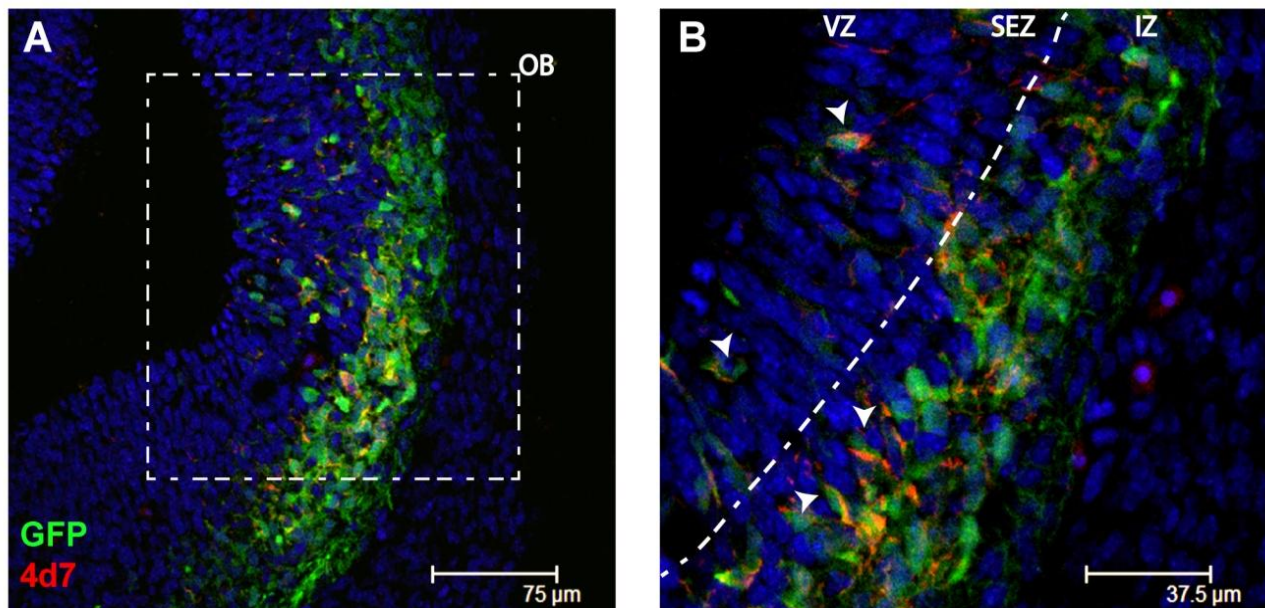
**Σχήμα 1. Σχεδιασμός του *Tag1<sup>loxP-GFP-loxP-DTA</sup>* ζώου που εκφράζει GFP κάτω από τον υποκινητή του γονιδίου *Tag1*. (Απο Μαρίνα Βιδάκη)**

Με την χρήση ειδικών αντισωμάτων για την GFP και την TAG-1 (4D7) στους διαγονιδιακούς *Tag1<sup>+/+</sup>;GFP* μύες προσπαθήσαμε από την ηλικία E12,5-P0 να ανιχνεύσουμε πού εκφράζεται η TAG-1 στο OS. Στην ηλικία E12,5 η αρχέγονη περιοχή του OB εμφανίζεται πρώτη φορά ως προεκβολή του ρυγχαίου και κοιλιακού τελεγκεφάλου. Σε εκείνη την χρονική στιγμή πραγματοποιήσαμε ανοσοϊστοχημεία (immunohistochemistry, IHC) με μάρτυρες GFP και 4D7 οι οποίοι συνεντοπίζονται στα ίδια κύτταρα.

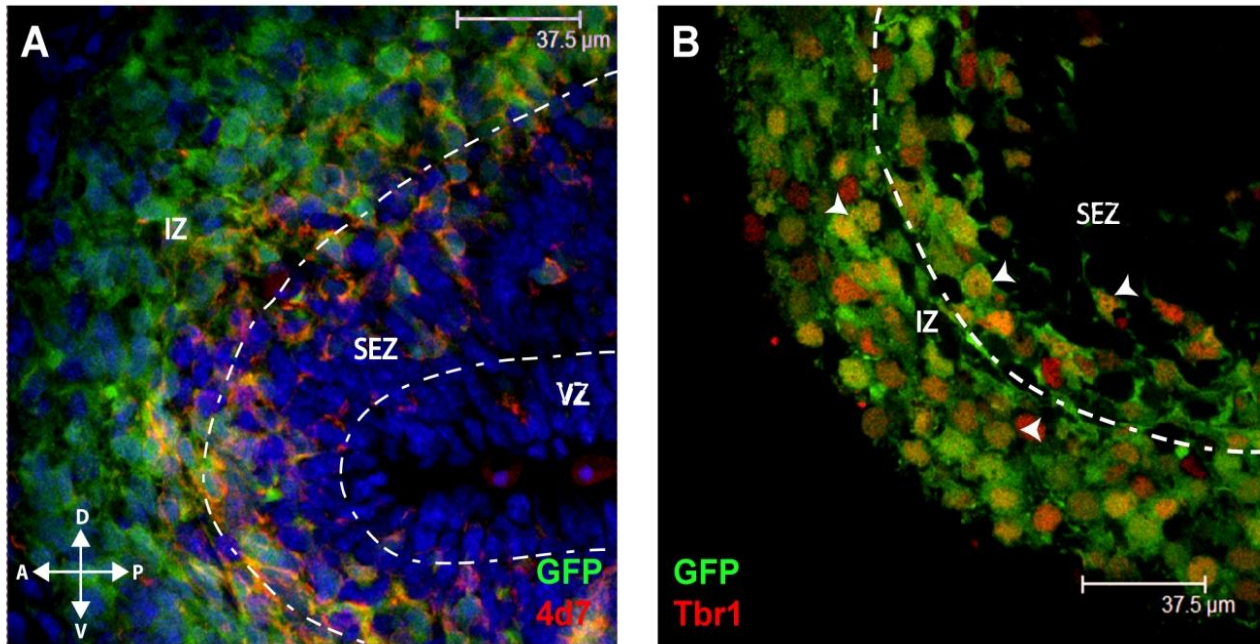
Παρατηρήσαμε ότι νωρίς κατά την ανάπτυξη (E12,5) του OB, η TAG-1 εντοπιζόταν τόσο στα κυτταρικά σώματα όσο και στους άξονες των κυττάρων που γεννιόταν από την VZ και παρουσιάζονταν στην SEZ και κυρίως στην IZ (**Εικ. 1 A,B**). Ο όγκος του OB αυξάνεται στις επόμενες αναπτυξιακές ημέρες από E13,5-E14,5, λόγω της αύξησης του αριθμού των κυττάρων που γεννιούνται και οδεύουν προς την επιφάνεια του ιστού (**Εικ. 2 A, E13,5**).



Ακολούθως ο αριθμός των κυττάρων που παρουσιάζονται στις SEZ και IZ και εκφράζουν την TAG-1 αυξάνεται, καθώς περισσότερα κύτταρα έχουν γίνει πρώιμοι μεταμιτωτικοί νευρώνες (E14,5) και μεταναστεύουν προς την τελική τους θέση. Αυτό γίνεται εμφανές με τον συνεντοπισμό της TAG-1 (μέσω του GFP) με τον πρώτο μεταμιτωτικό μάρτυρα των προβλητικών νευρώνων (στην παρούσα φάση MCs) τον Tbr1 (**Εικ.2B E14,5 tbr1/gfp**). Στις επόμενες αναπτυξιακές μέρες E15,5-E16,5 η έκφραση της TAG-1 εντοπίζεται κυρίως στους άξονες των προβλητικών νευρώνων (4D7) και λιγότερο στα κυτταρικά σώματα (**Εικ.3**).

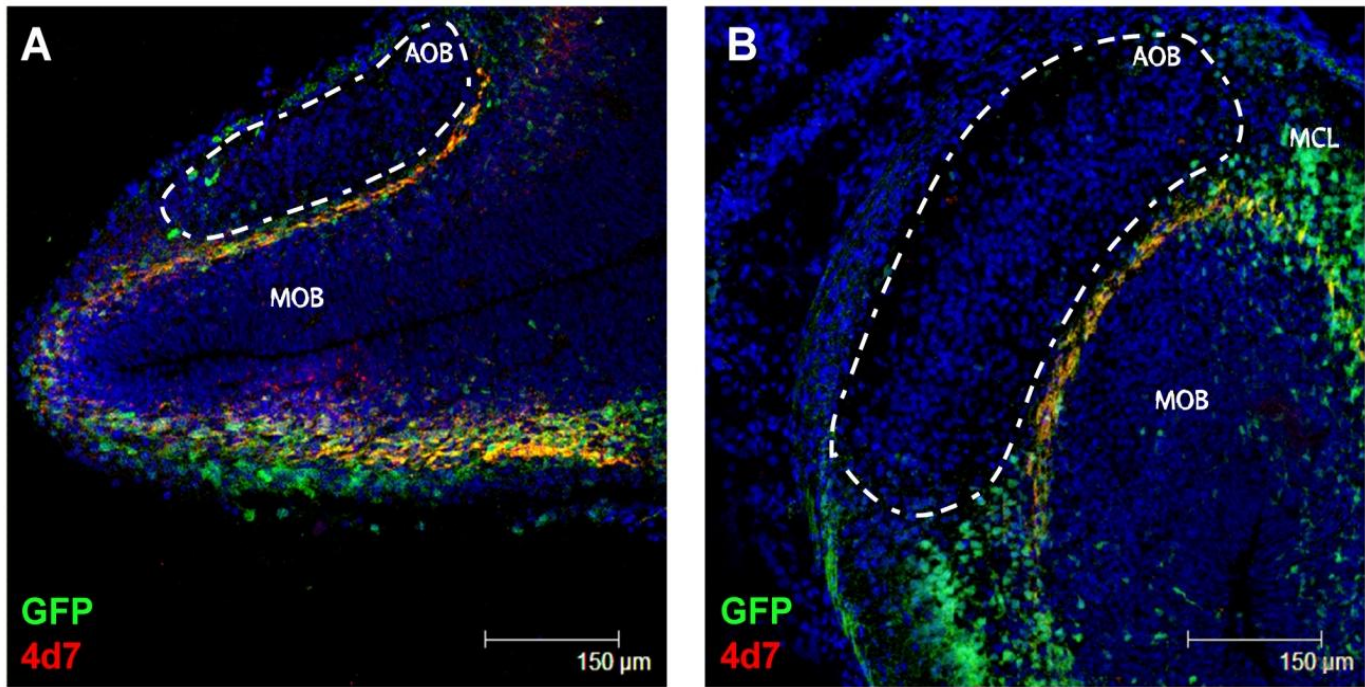


**Εικ.1:** Η TAG-1 εκφράζεται νωρίς κατά την ανάπτυξη του αρχέγονου OB. Ανοσοϊστοχημεία σε οβελιαίες κρουστομές εγκεφάλου E12,5 Tag-1<sup>+/+</sup>;GFP μυών με χρήση των μαρτύρων GFP και 4D7. Στην εικόνα **A** εντός του διακεκομμένου πλαισίου βρίσκεται η προεκβολή του ρυγχαίου τελεεγκεφάλου που θα δημιουργήσει τον OB. Στην **B** παρουσιάζεται σε μεγέθυνση η ίδια περιοχή όπου παρουσιάζονται οι αναπτυσσόμενες ζώνες του OB (VZ,SEZ,IZ).Οι σφήνες επισημαίνουν διπλά θετικά κύτταρα για GFP/4D7.Η TAG-1 σε αυτή την περίοδο εντοπίζεται τόσο στα κυτταρικά σώματα των νευρώνων όσο και στους νευράξονες τους.VZ (κοιλιακή βλαστική ζώνη), SEZ (υποεπενδυματική ζώνη), IZ (ενδιάμεση ζώνη).



**Εικ.2:** Μετά την ηλικία E13,5 ο αριθμός των TAG-1+ κυττάρων αυξάνει στις εξώτερες στοιβάδες του OB καθώς εκφράζεται από τους προβλητικούς νευρώνες του. Ανοσοϊστοχημεία οβελιαίων κρουτομών OB για GFP /4D7 **(A)** και GFP/Tbr1 **(B)**. Παρατηρείτε η έκφραση της TAG-1 από κύτταρα που μεταναστεύουν από την VZ και οδεύουν προς την τελική τους θέση (IZ) **(A)**. Όλα τα κύτταρα που εκφράζουν την TAG-1 (GFP+) είναι προβλητικοί νευρώνες του OB καθώς εκφράζουν και Tbr1 στην ηλικία E14,5 **(B)**. IZ (intermediate zone), VZ (ventricular zone), SEZ (subependymal zone), D (dorsal), V (ventral), L (Lateral), M (Medial).

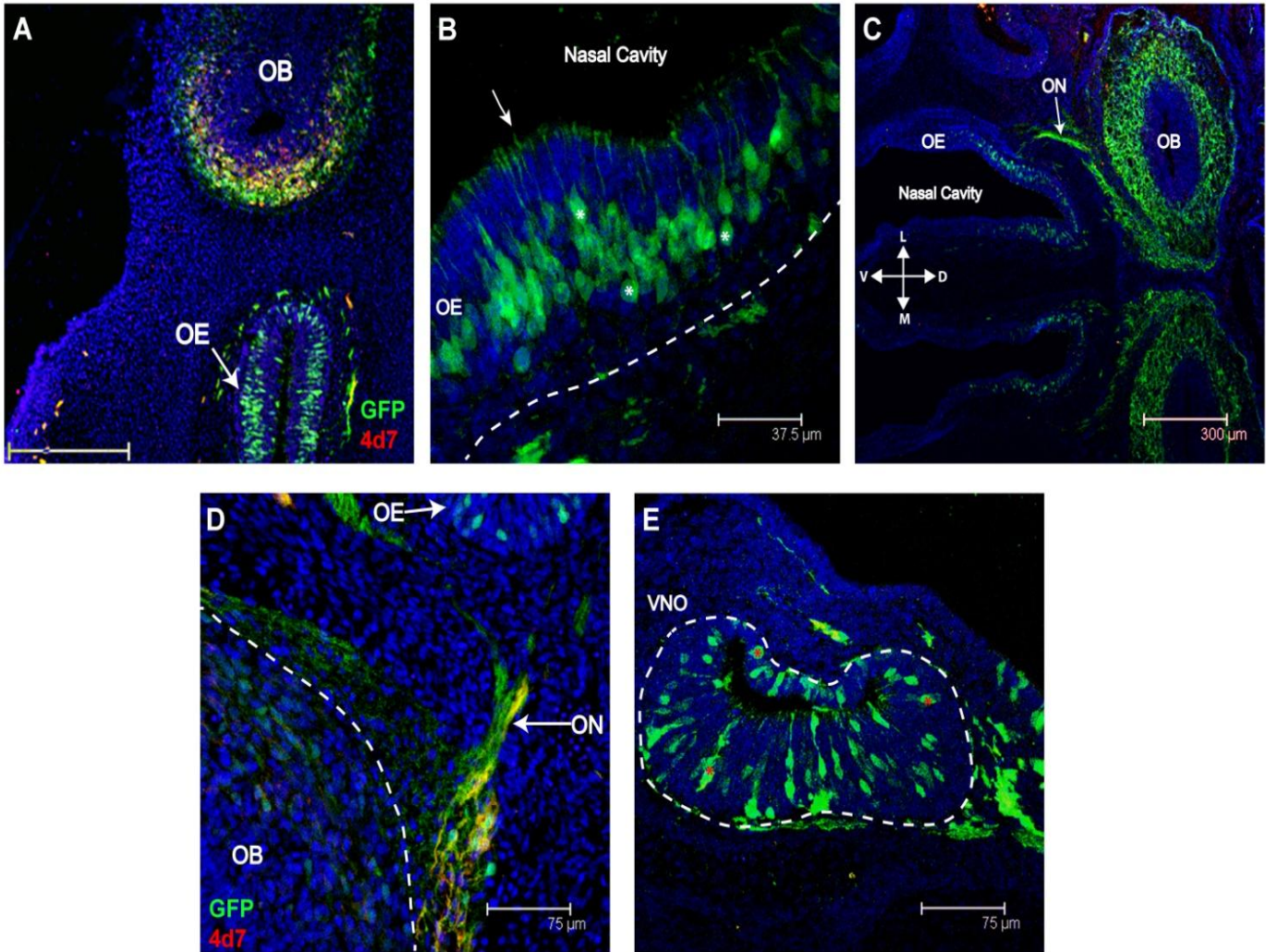
Στην ηλικία E15,5, όπου ο AOB εμφανίζεται πρώτη φορά ως ξεχωριστή δομή, παρατηρούμε παντελή έλλειψη έκφρασης TAG-1 εντός αυτού (**Εικ. 3 A, E15,5 sag GFP/4D7**). Η απουσία έκφρασης TAG-1 από τους νευρώνες που δομούν τον AOB είναι πολύ πιο εμφανής στις επόμενες αναπτυξιακές ηλικίες E16,5-E17,5. Σε αυτή την περίοδο ο AOB αποκτά μεγαλύτερο όγκο και παρουσιάζεται ως μία GFP<sup>-</sup> περιοχή εντός του αναπτυσσόμενου GFP<sup>+</sup> MOB (**Εικ.3 B, E17,5 cor GFP/4D7.**)



**Εικ.3:** Η TAG-1 δεν εκφράζεται στην περιοχή του AOB κατά την ανάπτυξη. **(A)** Κατά την ηλικία E15,5 δεν εντοπίζεται με ανοσοϊστοχημεία για GFP και 4D7 η παρουσία της TAG-1 στο AOB όπως επίσης και στην ηλικία E17,5 **(B)**.

Με την χρήση των ίδιων μαρτύρων όπως και προηγουμένως πραγματοποιήσαμε IHC σε τομές ΟΕ στην ηλικία E13,5 (**Εικ.4 A E13,5**).. Στο ΟΕ η TAG-1 εκφράζεται από τους OSN όπως φαίνετε από την μορφολογία των GFP+ κυττάρων, που είναι δίπολα με το ένα άκρο να προβάλλει στην επιφάνεια του ΟΕ προς την ρινική κοιλότητα και το άλλο προς το οσφρητικό νεύρο (**Εικ. 4 B, E15,5**). Επίσης η έκφραση της TAG-1 δεν εμφανίζεται σε όλη την έκταση του ΟΕ αλλά στα κύτταρα που βρίσκονται σε περισσότερο οπίσθιες περιοχές αυτού και ραχιαίες (**Εικ.4 C**). Στις οπίσθιες και ραχιαίες τομές του ΟΕ είναι εμφανείς η έκφραση της TAG-1 και από κάποιους άξονες OSN καθώς οδεύουν προς τον OB (**Εικ.4C,D**). Τέλος είναι εμφανές ότι η TAG-1 εκφράζεται και από τους OSN του VNO κατά την διάρκεια της ανάπτυξης όπως φαίνετε στην εικόνα (**Εικ.4<sup>E</sup>**)

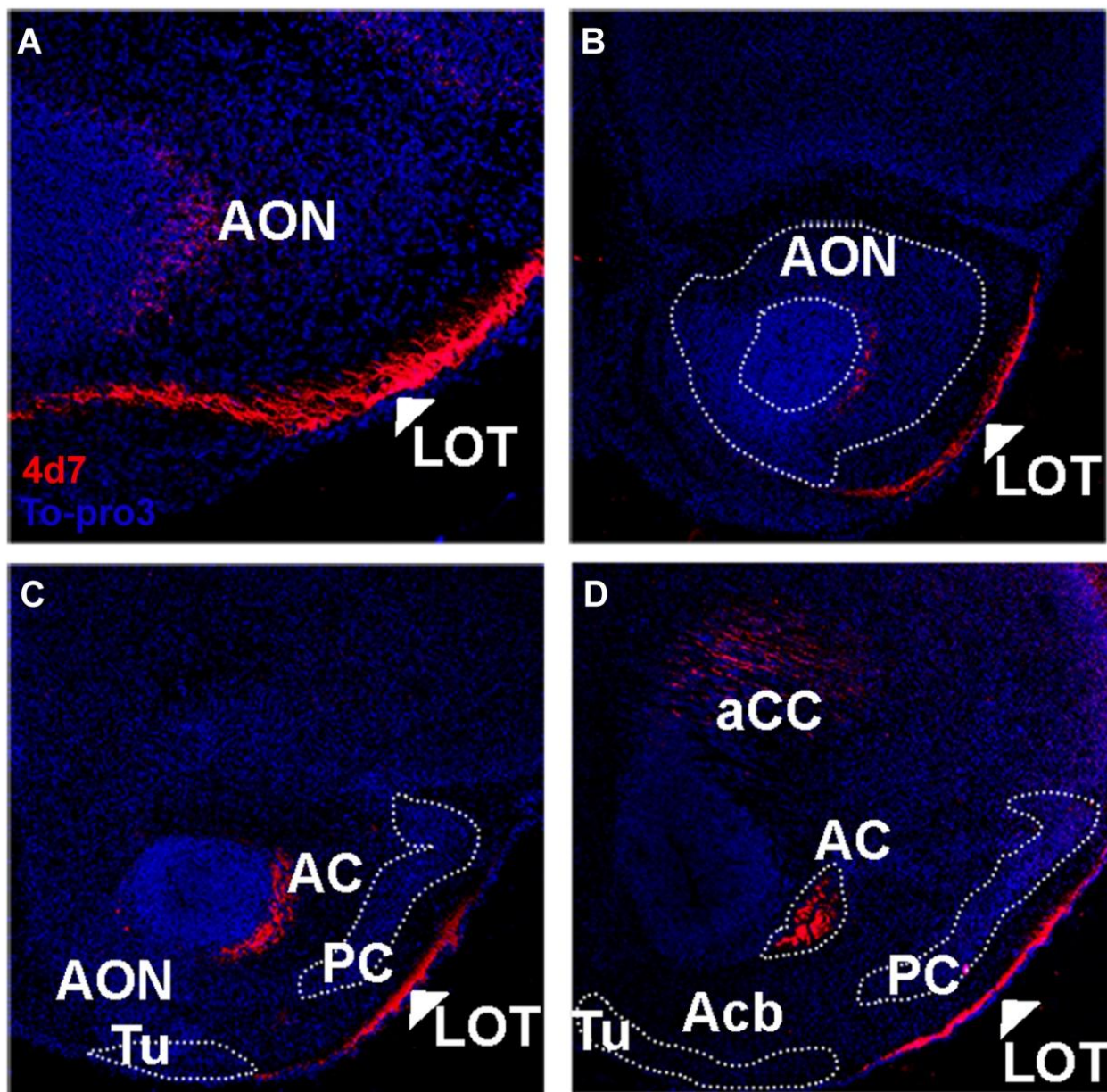




**Εικ.4:** Η TAG-1 εκφράζεται από ορισμένους OSN του OE και τους άξονες τους μετά την ηλικία E13,5. Στην ηλικία E13,5 με ανοσοϊστοχημεία εντοπίζεται η έκφραση της TAG-1 από κύτταρα του OE (GFP+) (A). Τα κύτταρα που εκφράζουν την TAG-1 φαίνεται σε μεγέθυνση στεφανιαίας τομής E15,5 Tag-1<sup>+/+</sup>;GFP ζώου ότι είναι οι δίπολοι OSN του OE (B). Τα OSN που εκφράζουν την TAG-1 εντοπίζονται στις οπίσθιες και ραχιαίες περιοχές του OE κυρίως (C). Σε μεγέθυνση οπίσθιων τομών E15,5 ζώων του OE, παρουσιάζεται σε ανοσοϊστοχημεία για GFP-4D7 η έκφραση της TAG-1 σε τμήμα του οσφρητικού νεύρου (ON) (D). Στην ίδια ηλικία η TAG-1 εκφράζεται και από τους OSN του VNO. OSN (olfactory sensory neurons), VNO (vomeronasal organ), OE (olfactory epithelium), ON (olfactory nerve), D (dorsal), V (ventral), L (Lateral), M (Medial).

Η ανάλυση της έκφρασης της TAG-1 σε πιο οπίσθιες δομές του OS πραγματοποιήθηκε με την χρήση του ειδικού αντισώματος 4D7 όπως και προηγουμένως. Παρατηρήσαμε την

έκφρασή της από τους επιπολής άξονες του LOT, καθώς και από τα κύτταρα του AON και τους άξονές τους, που δομούν τον πρόσθιο σύνδεσμο (anterior commissure, AC) **Εικ.5 A,B**. Τέλος η TAG-1 δεν εντοπίζεται στους κυτταρικούς πληθυσμούς ή τις προσεκβολές του Tu, του PC και του επικλινούς πυρήνα (Nucleus accumbens, Acb) (**Εικ 5 C,D**)



**Εικ.5:** Η TAG-1 εκφράζεται από τμήμα του LOT και κύτταρα του AON και τους άξονες τους κατά την ανάπτυξη. Σε ανοσοϊστοχημεία για 4D7 σε E17,5 (A) και P0 (B-D) στεφανιαίες κρουτομές η TAG-1 εκφράζεται από μέρος του LOT. Επίσης κύτταρα του AON (εντός στικτών γραμμών) εκφράζουν TAG-1 (B), όπως και οι άξονες αυτών πιο οπίσθια σχηματίζοντας τον πρόσθιο σύνδεσμο (anterior commissure, AC). Η TAG-1 δεν εντοπίζεται στον απιοειδή πυρήνα (PC, piriform cortex), το οσφρητικό φύμα (Tu, olfactory tubercle) και

τον επικλινή πυρήνα (Acb, nucleus accumbens). Οι πυρήνες είναι σημασμένοι με Torro-3 (μπλε)

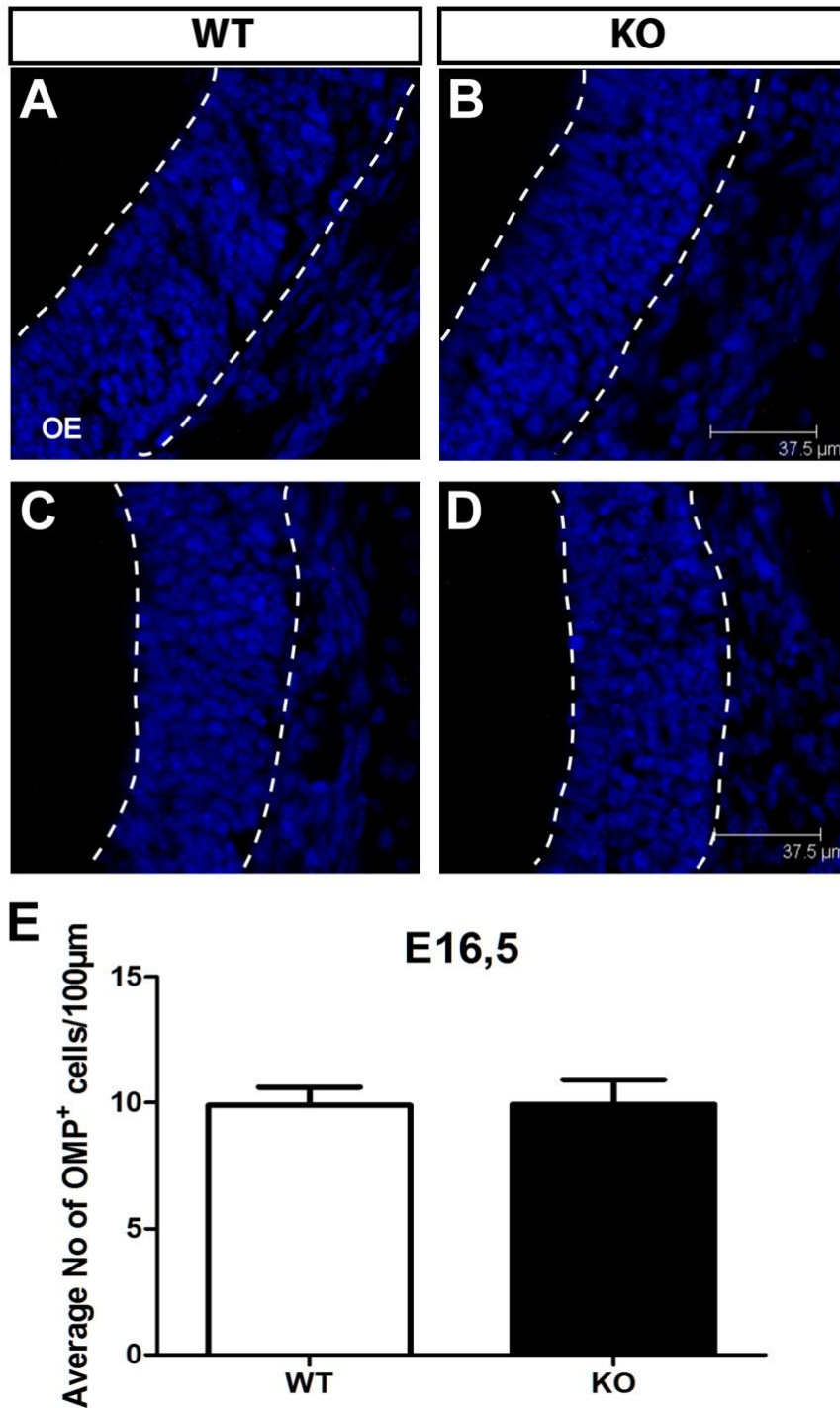
## **A2. Ο ρόλος της TAG-1 στην οργάνωση και την ανάπτυξη του οσφρητικού συστήματος**

Μετά τον αναλυτικό χαρακτηρισμό της έκφρασης της TAG-1 στα διαφορετικά τμήματα του οσφρητικού συστήματος, καθώς και των κυτταρικών πληθυσμών που το συνθέτουν, προχωρήσαμε στην μελέτη του πιθανού ρόλου της σε αυτά. Για την επίτευξη του παραπάνω σκοπού έγινε χρήση ομόζυγων και ετερόζυγων μεταλλαγμένων μυών για το γονίδιο της TAG-1 (*Tag-1<sup>-/-</sup>* και *Tag-1<sup>+/-</sup>*).

### **2i. Η έλλειψη της TAG-1 δεν επηρεάζει την οργάνωση και την ανάπτυξη του ΟΕ και των σπειραμάτων του ΟΒ.**

Η TAG-1 εκφράζεται αρκετά πρώιμα κατά την ανάπτυξη του ΟΕ από τους OSN και τους άξονές τους που δομούν το οσφρητικό νεύρο (olfactory nerve, ON) όπως δείξαμε προηγουμένως. Γι τον λόγο αυτό αρχικά μελετήσαμε την αδρή ανατομία του ΟΕ με κυτταρική χρώση Nissl αλλά και τον γενικό πυρηνικό μάρτυρα των κυττάρων Το-pro3. Μεταξύ φυσιολογικών και ομόζυγα μεταλλαγμένων για την TAG-1(*Tag-1<sup>-/-</sup>*) ζώων δεν παρατηρήθηκε καμία εμφανής αλλοίωση στην δομή και την κυτταρική σύσταση του ΟΕ (**Εικ.6 A-D**). Εν συνεχεία με την χρήση ενός ειδικού μάρτυρα για τα ώριμα OSN του ΟΕ (OMP, olfactory marker protein) πραγματοποιήθηκε In situ υβριδισμός στο ΟΕ στην αναπτυξιακή ηλικία E16,5 όπου οι OSN έχουν οργανωθεί στο ΟΕ και έχουν προβάλλει τον άξονά τους εντός ΟΒ<sup>68,118</sup>. Η ποσοτική ανάλυση των OMP<sup>+</sup> OSN δεν παρουσίασε καμία διαφορά μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων για την TAG-1(**Εικ.6,E**) σε όμοιες ανατομικά περιοχές του ΟΕ. Το παραπάνω υποδεικνύει την ακεραιότητα του συγκεκριμένου νευρωνικού πληθυσμού που δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την έλλειψη της TAG-1.

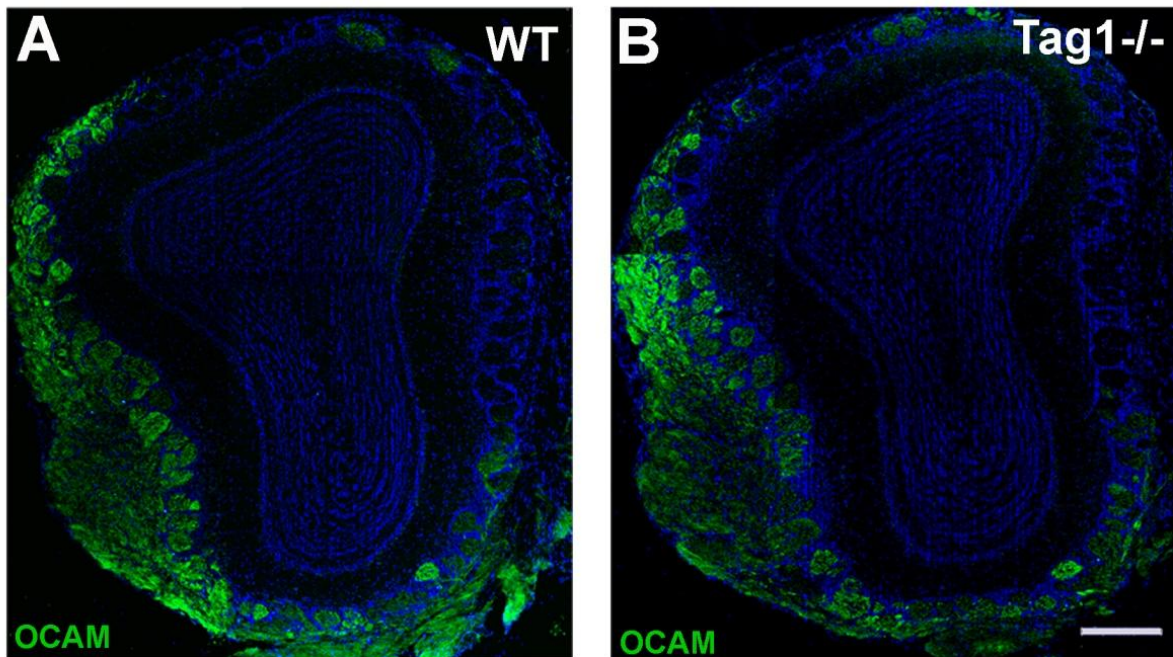




**Εικ.6 :** Η δομή του ΟΕ και ο αριθμός των ώριμων OSN είναι ακέραιος στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ποντίκια. Με ανοσοϊστοχημεία για τους πυρήνες των κυττάρων του ΟΕ με Topro-3 δεν παρουσιάστηκε διαφορά στις διαστάσεις ή στην μορφολογία του ΟΕ μεταξύ WT (**A,C**) και *Tag-1<sup>-/-</sup>* (**B,D**) ποντικών. Η ποσοτικοποίηση των ώριμων OSN με in situ υβριδισμό με χρήση του OMP δεν παρουσίασε καμία διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων στην ηλικία E16,5

(E). Τα error bars στα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν την τιμή Standard Error of Mean (SEM).

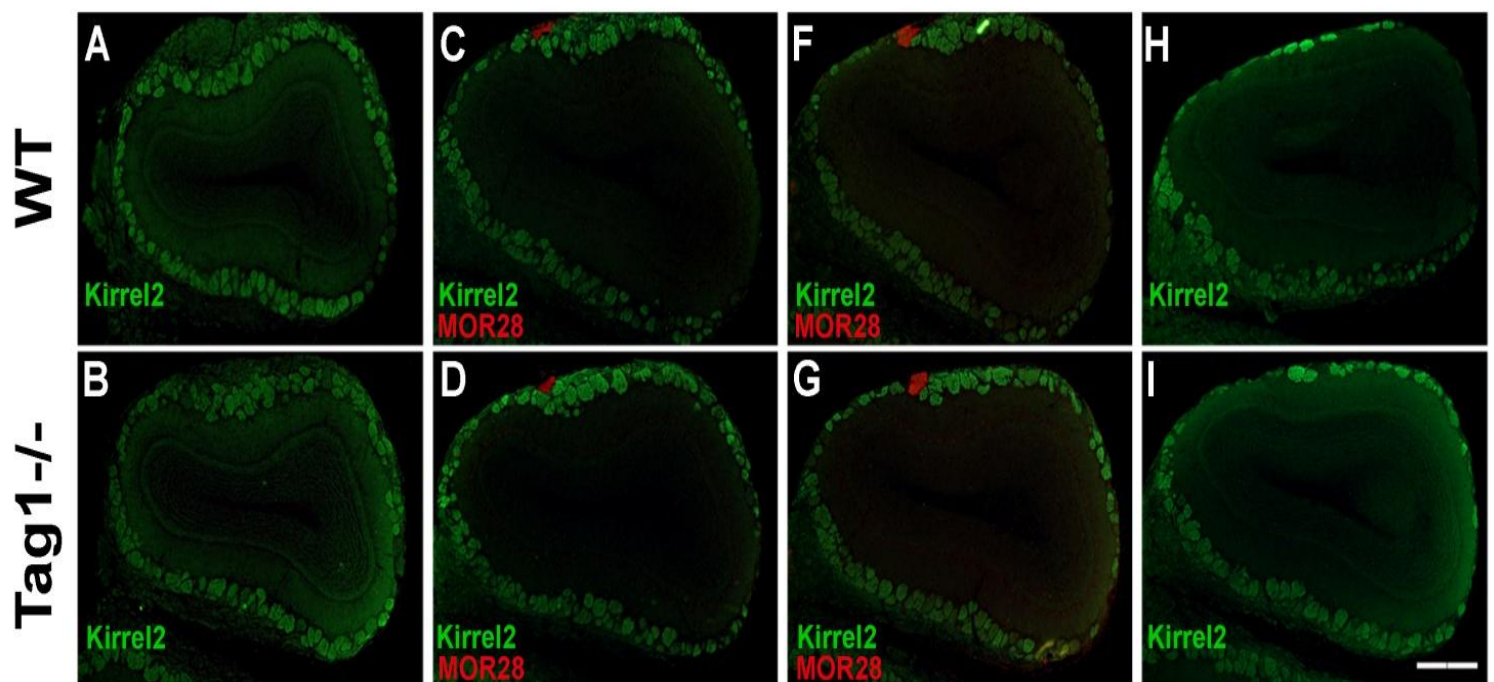
Ακολουθώντας αναλύσαμε την προβολή των αξόνων των OSN προς τα σπειράματα του OB και εάν αυτή επηρεάζεται στους μεταλλαγμένους μύες με την χρήση του μοριακού μάρτυρα OCAM. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, το μόριο κυτταρικής συνάφειας OCAM εντοπίζεται στους άξονες των OSN που προβάλλουν ειδικά στην έξω και κοιλιακή περιοχή της GL του MOB και την πρόσθια περιοχή του AOB<sup>138</sup>. Η παραπάνω ανάλυση δεν αποκάλυψε καμία τροποποίηση στην προβολή των αξόνων στην GL μεταξύ Φυσιολογικών (wild type, WT) και *Tag-1*<sup>-/-</sup> μυών (Εικ.7 A,B,).



**Εικ.7:** Οι άξονες των OSN φαίνεται να προβάλλουν και να σχηματίζουν φυσιολογικά σπειράματα στον OB των TAG-1 ζώων. Σε ανοσοϊστοχημεία OB με τον μάρτυρα OCAM παρατηρείται παρόμοια ένταση και εντοπισμός του μεταξύ ανήλικων WT (A) και *Tag-1*<sup>-/-</sup> (B) μυών. Γραμμή κλίμακας 300μμ, οι πυρήνες είναι σημασμενοι με Topro-3 (μπλε)

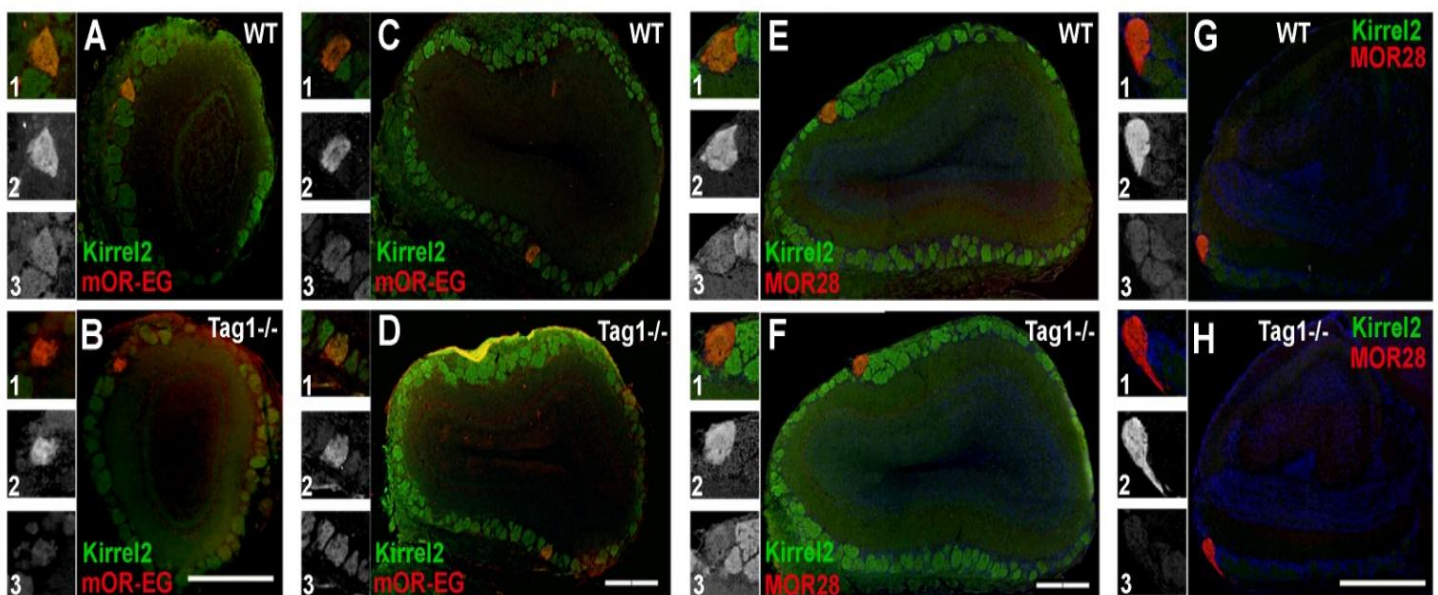


Τέλος προσπαθήσαμε να διαλευκάνουμε την οργάνωση του χωρικού αισθητικού χάρτη των σπειραμάτων (olfactory receptor map of GL, ORM) καθώς και την δραστηριότητα τους στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώα . Όπως είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες τα CAM Kirrel2 και Kirrel3 μεταφράζονται και παρουσιάζονται στην GL με συγκεκριμένο τρόπο, εξαρτώμενο από την δραστηριότητα των σπειραμάτων<sup>171,180</sup>. Επίσης είναι γνωστό ότι στο MOB οι περισσότεροι OR παρουσιάζονται πάντα στις ίδιες στερεοτυπικά καθορισμένες θέσεις. Συνήθως αυτές εντοπίζονται μία στην έξω πλευρά και μία στην έσω πλευρά του OB σε διαφορετικά σημεία στον προσθοπίσθιο άξονα<sup>181,182</sup>. Με την χρήση του Kirrel2 ως ειδικού μάρτυρα για την δραστηριότητα των σπειραμάτων του OB, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική ανάλυση σε κρουτομές ολόκληρου του OB (Εικ.8 A-H,). Η παραπάνω ανάλυση παρουσίασε παρόμοια σπειραματική δραστηριότητα μεταξύ WT και *Tag-1<sup>-/-</sup>* χωρίς διαφορές σε καμία περιοχή του OB.



**Εικ.8:** Η ενεργοποίηση των σπειραμάτων δεν μεταβάλλεται στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώα. Ανοσοϊστοχημεία για τον μάρτυρα Kirrel2 και τον οσφρητικό υποδοχέα MOR28 σε OB ενηλίκων. Η ενεργοποίηση των σπειραμάτων (Kirrel2+) είναι όμοια μεταξύ WT (A,C,F,H) και *Tag-1<sup>-/-</sup>* (B,D,G,I)-μυών σε αντίστοιχες τομές από πρόσθια έως οπίσθια. Κλίμακα : 500μm A-I.

Για να εξετάσουμε εάν η έλλειψη της TAG-1 από τους άξονες των OSN θα μπορούσε να επηρεάσει την στερεοτυπική οργάνωση των σπειραμάτων, έγινε χρήση ειδικών αντισωμάτων για τον εντοπισμό των υποδοχέων MOR-28 και MOR-EG. Οι δύο αυτές ομάδες ORs καταλαμβάνουν στερεοτυπικά 2 σπειράματα ένα πρόσθια και έξω και ένα οπίσθια και έσω<sup>171,182</sup>. Με την παραπάνω ανοσοϊστοχημική διερεύνηση του OB διαπιστώσαμε ότι τα σπειράματά του δέχονται τους άξονες τόσο των MOR-28 όσο και των MOR-EG OSN βρίσκονται στην ίδια θέση στο OB των *Tag-1*<sup>-/-</sup> μυών. Επίσης τα σπειράματα αυτά έχουν ακριβώς την ίδια δραστηριότητα (*kirrel2*/MOR διπλή χρώση) με τα φυσιολογικά ζώα (Εικ9.A-H). Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα θα μπορούσαμε να πούμε ότι η TAG-1 παρότι εκφράζεται στο OE και τους άξονες των OSN, η έλλειψη της δεν επηρεάζει ούτε τον πληθυσμό των OSN ούτε την δημιουργία του σπειραματικού οσφρητικού χάρτη στον OB.

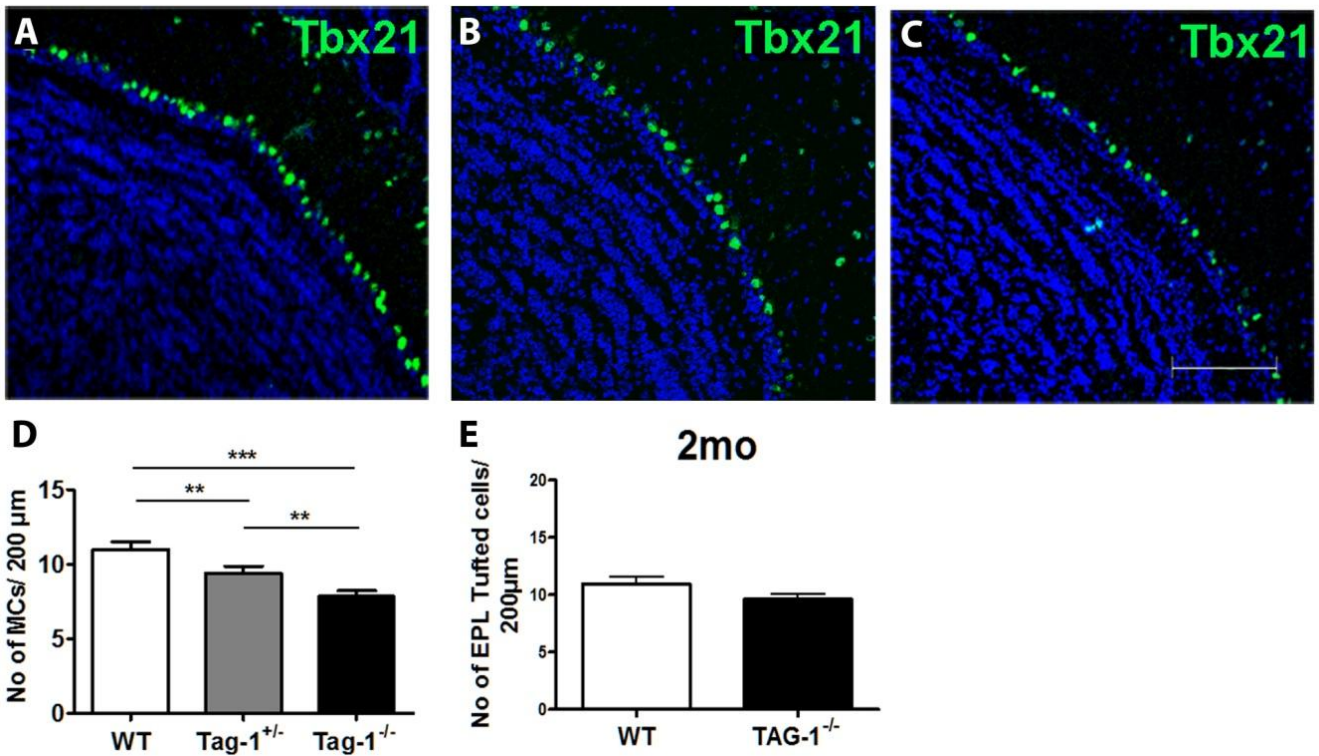


**Εικ.9:** Η θέση και ο αριθμός των σπειραμάτων του OB δεν φαίνεται διαταραγμένος μεταξύ WT και *Tag-1*<sup>-/-</sup> μυών. Λεπτομερής ανάλυση των MOR-EG<sup>+</sup> και MOR28<sup>+</sup> σπειραμάτων σε WT και *Tag-1*<sup>-/-</sup> ποντίκια δεν ανέδειξε διαφορά μεταξύ τους. Το πρώτο MOR-EG<sup>+</sup> σπείραμα εντοπίζεται στην πρόσθια ραχιαία-έξω περιοχή του OB (A, B), και το δεύτερο στη μεσαία περιοχή του OB (C,D). Η θέση και η *Kirrel2* δραστηριότητα είναι παρόμοια και στις δύο γονότυπους. Τα δύο MOR28<sup>+</sup> σπειράματα εντοπίζονται στην έξω περιοχή του οπίσθιου OB (E, F) και στην έσω και κοιλιακή περιοχή του ουραίου άκρου του OB (G, H). Τα σπειράματα MOR28 εμφανίζουν χαμηλή έκφραση του *Kirrel2* και ανιχνεύονται στην ίδια θέση και στους δύο γονοτύπους. Στο

αριστερό περιθώριο κάθε εικόνας παρουσιάζονται 3 κανάλια: 1.Συνδυασμός Kirrel2/OR, 2.Ο εκάστοτε OR, 3. Το Kirrel2. Κλίμακα: 500μm A-H.

**2ii. Ο αριθμός των κύριων προβλητικών νευρώνων του OB (MCs) παρουσιάζεται επηρεασμένος στα μεταλλαγμένα για την TAG-1 ποντίκια.**

Ακολούθως προσπαθήσαμε να αποσαφηνίσουμε εάν η TAG-1 συμμετέχει στην ανάπτυξη και την οργάνωση των προβλητικών νευρώνων του OB στους οποίους εκφράζεται. Για τον παραπάνω σκοπό χρησιμοποιήσαμε μια σειρά διαφορετικών ανοσοϊστοχημικών δοκιμασιών που πραγματοποιήθηκαν σε WT, ομόζυγα και ετερόζυγα μεταλλαγμένους μύες. Αρχικά μελετήσαμε τον πληθυσμό των TCs, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα το μόριο Tbx21 που σημαίνει το 70% του συνολικού αριθμού των συγκεκριμένων νευρώνων σε όλα τα επίπεδα τις EPL<sup>116</sup>. Η ανάλυση δεν εντόπισε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό ή τον εντοπισμό των TCs μεταξύ φυσιολογικών και μεταλλαγμένων για την TAG-1 ενήλικων ποντικών (**Εικ.10Ε**). Με την χρήση του ίδιου μοριακού μάρτυρα (Tbx21) έγινε ανάλυση και του πληθυσμού των MCs στο ενήλικο ιστό του OB. Το Tbx21 σημαίνει το σύνολο των ώριμων MCs στην MCL του OB. Η παραπάνω ανάλυση ανέδειξε σημαντική μείωση στον αριθμό των MCs του MOB τόσο στα *Tag-1<sup>+/-</sup>* όσο και στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* πειραματόζωα σε σχέση με τα WT. Η στατιστικά σημαντική αυτή διαφορά ήταν της τάξεως του 14,2% για τα ετερόζυγα και 28,7% για τα ομόζυγα μεταλλαγμένα για την TAG-1 ποντίκια (**Εικ.10 A-D**).

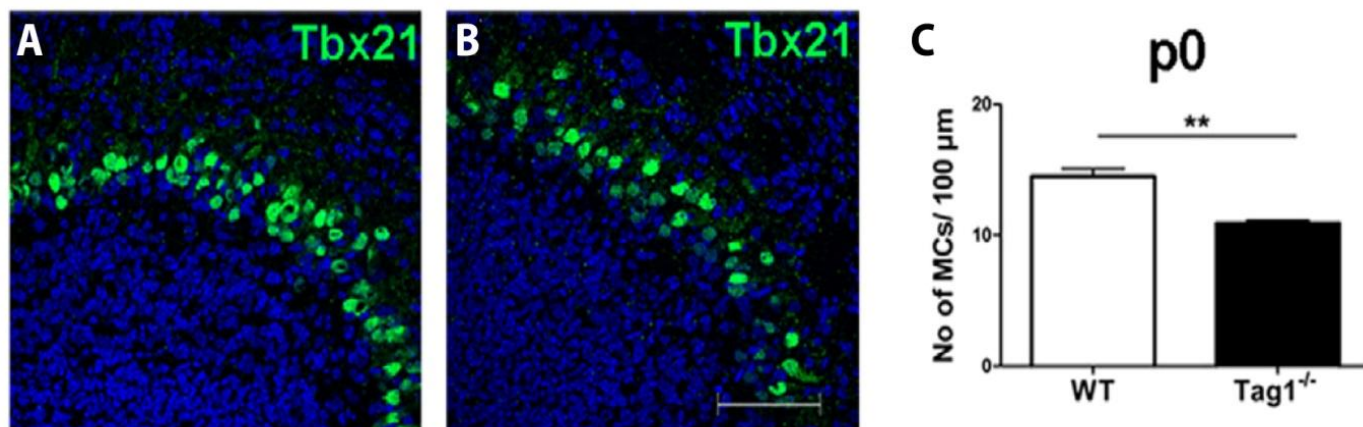


**Εικ.10:** Ο αριθμός των MCs του MOB είναι σημαντικά μειωμένος στα ομόζυγα και ετερόζυγα για την TAG-1 ποντίκια, ενώ ο αριθμός των TCs παραμένει ανεπηρέαστος. Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση της MCL του MOB ενηλίκων WT (A), *Tag-1<sup>+/-</sup>* (B) και *Tag-1<sup>-/-</sup>* (C) μυών με χρήση του μάρτυρα Tbx21 παρουσίασε μείωση των MCs στα μεταλλαγμένα ζώα. Η στατιστική ανάλυση των παραπάνω κρουτομών ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των γονοτύπων (D). Ο αριθμός των TCs στην EPL δεν παρουσίασε μεταβολές μεταξύ των γονοτύπων με την χρήση του ίδιου μάρτυρα (E). Οι πυρήνες είναι σημασμένοι με Τοπρο-3 (μπλε) , κλίμακας 150 μm, τα Error bars αντιπροσωπεύουν SEM,\*\*\* p<0.001,\*\* p<0.01,.

Θέλοντας να εντοπίσουμε εάν η μείωση αυτή πραγματοποιείται μετά την γέννηση ή κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του OB η ίδια πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε στην πρώτη μεταγεννητική ημέρα(P0). Η μείωση στον αριθμό των MCs του MOB ήταν παρούσα στην ηλικία P0 στους *Tag-1<sup>-/-</sup>* μύες σε ποσοστό 24,8% (Εικ.11 A-C). Τα ανωτέρω αποτελέσματα υποδεικνύουν ξεκάθαρα ότι η αιτία της μείωσης του πληθυσμού των MCs στην MCL του MOB συμβαίνει κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του OB. Επίσης φαίνεται



να εξαρτάται και από την ποσότητα της TAG-1 στα κύτταρα που εκφράζεται καθώς η μείωση είναι σχεδόν η μισή στα *Tag-1<sup>+/-</sup>* ζώα σε σχέση με τα *Tag-1<sup>-/-</sup>*.

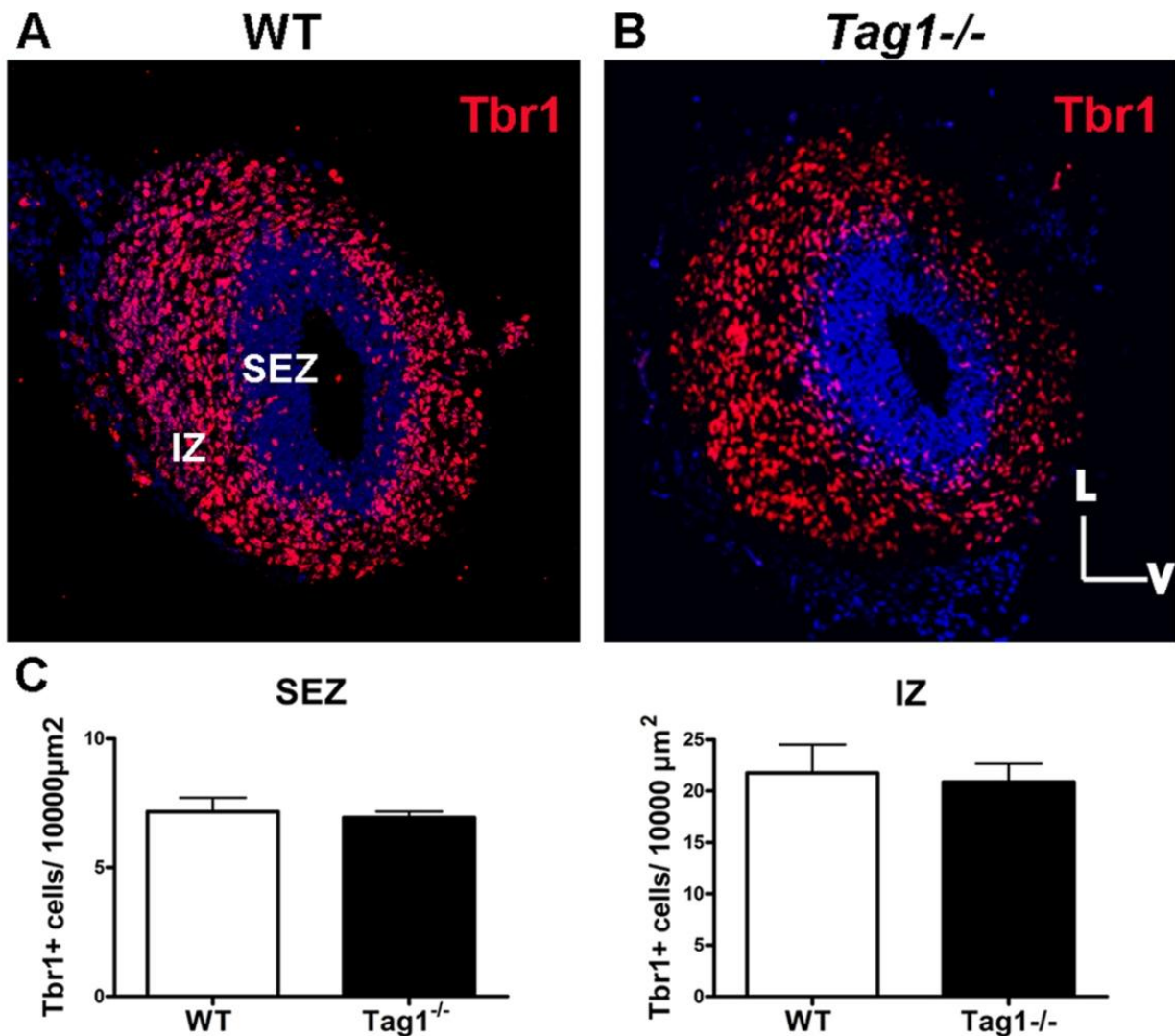


**Εικ.11:** Η μείωση στον πληθυσμό των MCs του MOB παρατηρείται από την πρώτη μεταγεννητική ημέρα (P0) στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώα. Ανοσοϊστοχημεία με Tbx21 σε WT (A) και *Tag-1<sup>-/-</sup>* (B) P0 μύες παρουσίασε επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των γονοτύπων (C) όπως και στα ενήλικα ζώα. Οι πυρήνες είναι σημασμένοι με Torro-3 (μπλε), Κλίμακας 75μm, Error bars SEM.

Η έλλειψη της TAG-1 θα μπορούσε να οδηγήσει στην παραπάνω μείωση στον πληθυσμό των MCs:

- α) Λόγω προβλημάτων στον πολλαπλασιασμό ή την διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων των MCs.
- β) Λόγω κυτταρικού θανάτου των MCs κατά την διάρκεια της ανάπτυξης.
- γ) Λόγω προβλημάτων στην μετανάστευση ή καθοδήγησή τους εντός του αναπτυσσόμενου OB.

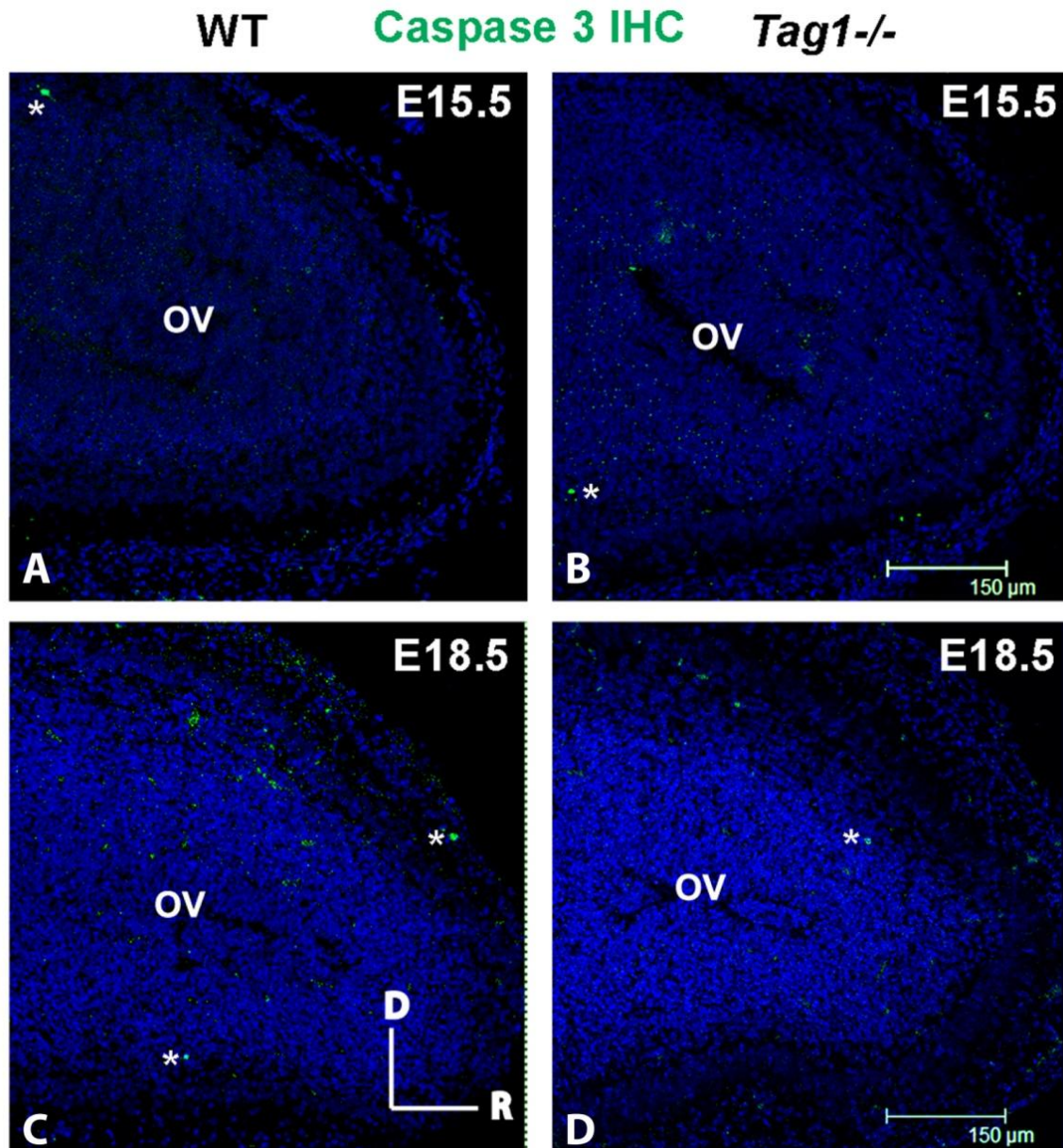
Στην προσπάθειά μας να εντοπίσουμε τον αιτιολογικό παράγοντα της μείωσης των MCs, αρχικά δοκιμάσαμε την πρώτη πιθανότητα χρησιμοποιώντας τον πρώτο μετα-μιτωτικό μάρτυρα του πληθυσμού των MCs τον Tbr1. Η χρήση του Tbr1 έγινε σε ανοσοϊστοχημεία κρουτομών του OB στην ηλικία E14,5 σε WT και *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώα. Σε αυτή την εμβρυϊκή ηλικία σχεδόν το σύνολο των πρώιμων MCs έχουν δημιουργηθεί (από E9,5-E13,5) από τα προγονικά κύτταρα της VZ και μεταναστεύουν εντός της SEZ και της IZ ώστε να σχηματίσουν στην ηλικία E16,5 την πρώιμη MCL<sup>68,112,114</sup>. Από την παραπάνω πειραματική διαδικασία δεν ανιχνεύθηκαν διαφορές στον συνολικό αριθμό των μετα-μιτωτικών MCs στις δύο μεταβατικές στοιβάδες του OB (SEZ, IZ) μεταξύ των 2 γονοτύπων (Εικ.12 A-C).



**Εικ.12:** Η απουσία της TAG-1 από το οσφρητικό σύστημα δεν επηρεάζει τον προγονικό πληθυσμό των προβλητικών νευρώνων. Ανοσοϊστοχημεία με Tbr1 τον πρώτο μεταμιτωτικό μάρτυρα των προβλητικών νευρώνων (και Torpro-3,μπλέ) σε κρουτομές OB, E14,5 σε WT και *Tag1*<sup>-/-</sup> ποντίκια (**A,B**).Η ποσοτικοποίηση των Tbr-1+ κυττάρων τόσο στην SEZ όσο και στην IZ (**C**) δεν παρουσίασε καμία αλλαγή μεταξύ των γονοτύπων.

Έτσι η πιθανότητα η έλλειψη της TAG-1 να δημιουργεί προβλήματα στον πληθυσμό των προγονικών κυττάρων των MCs αποκλείστηκε. Ακολούθως με την χρήση γενικών μαρτύρων για τον κυτταρικό θάνατο και την απόπτωση (TUNEL και Caspase3 αντίστοιχα) έγινε προσπάθεια να ανιχνεύσουμε πιθανές διαφορές σε αυτές τις κυτταρικές διαδικασίες μεταξύ φυσιολογικών και *Tag1*<sup>-/-</sup> μυών. Η μελέτη δεν παρουσίασε καμία διαφορά στα

ποσοστά κυτταρικού θανάτου (δεν παρουσιάζονται) ή απόπτωση (Εικ.13 ) από τις ηλικίες E15,5-E18,5 μεταξύ WT και *Tag-1*<sup>-/-</sup> ζώων στους αναπτυσσόμενους OB τους.



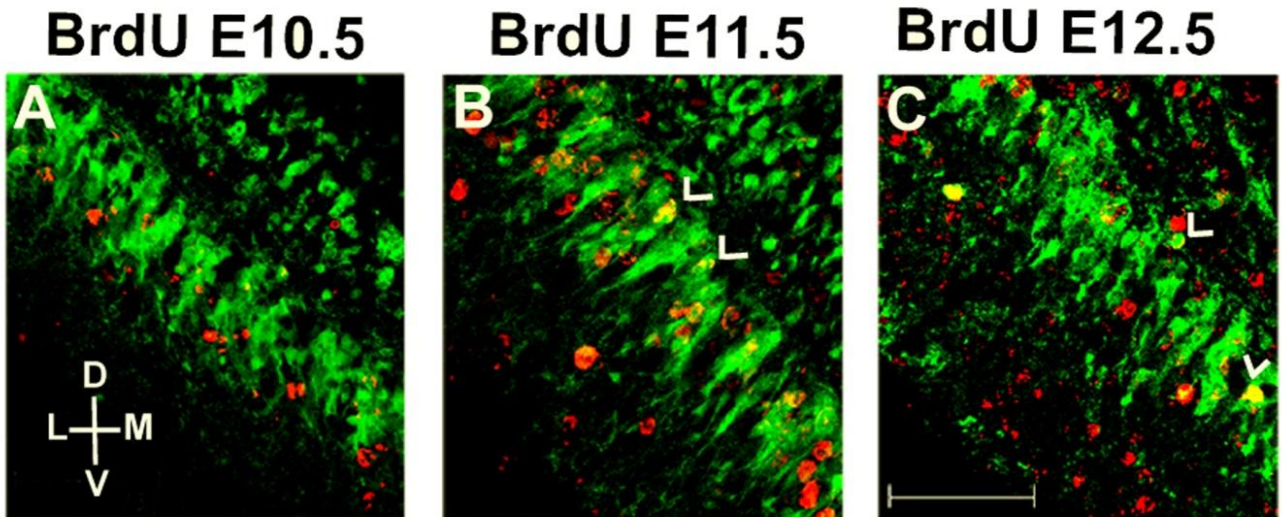
**Εικ.13: Ο κυτταρικός θάνατος δεν αυξάνει στα ελλειμματικά για την TAG-1 ζώα. Με την χρήση του μάρτυρα Caspase 3 πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία κρουτομών OB από την ηλικία E15,5-E18,5 σε WT και *Tag-1*<sup>-/-</sup> ζώα. Δεν ανευρέθηκε σημαντική διαφορά στον κυτταρικό θάνατο μεταξύ των γονοτύπων. Παρουσιάζονται ενδεικτικά οι ηλικίες E15,5 (A,B) και E18,5 (C,D), οι αστέρισκοι (\*) σημαίνουν τα Caspase 3+ κύτταρα.**

**2iii. Ο πληθυσμός των MCs που γεννιούνται στην ηλικία E11,5 εμφανίζεται μειωμένος στην MCL των Tag-1<sup>-/-</sup> μυών.**

Όπως παρουσιάστηκε και στην εισαγωγή (Κεφάλαιο 2 ενότητα 2.B.2) κατά την ανάπτυξη του OB το σύνολο των MCs προκύπτουν από τα βλαστικά κύτταρα της VZ από την ηλικία E9,5-E13,5<sup>113,114</sup>. Το μεγαλύτερο ποσοστό των MCs γεννάτε κατά την E11,5 (28%) ενώ ακολουθούν η E10,5(18%) και η E12,5(12%). Επιπλέον πρέπει να σημειωθεί ότι ανάλογα με την εμβρυϊκή ηλικία γέννησής τους τα MCs κατηγοριοποιούνται σε 3 υποπληθυσμούς τα πρώιμα (E9,5-E10,5), τα ενδιάμεσα (E11,5) και τα όψιμα (E12,5-E13,5) προκύπτοντα MCs<sup>114</sup>. Στην συνέχεια προσπαθήσαμε να διευκρινίσουμε σε ποιους από τους 3 μεγάλους υποπληθυσμούς που δημιουργούν το μεγαλύτερο ποσοστό των MCs (E10,5-E12,5) εκφράζεται η TAG-1. Προκειμένου να επιτύχουμε τον παραπάνω στόχο έγινε χρήση των γενετικά τροποποιημένων μυών *Tag1<sup>loxP-GFP-loxP-DTA</sup>* (*Tag-1<sup>+/+</sup>;GFP*)

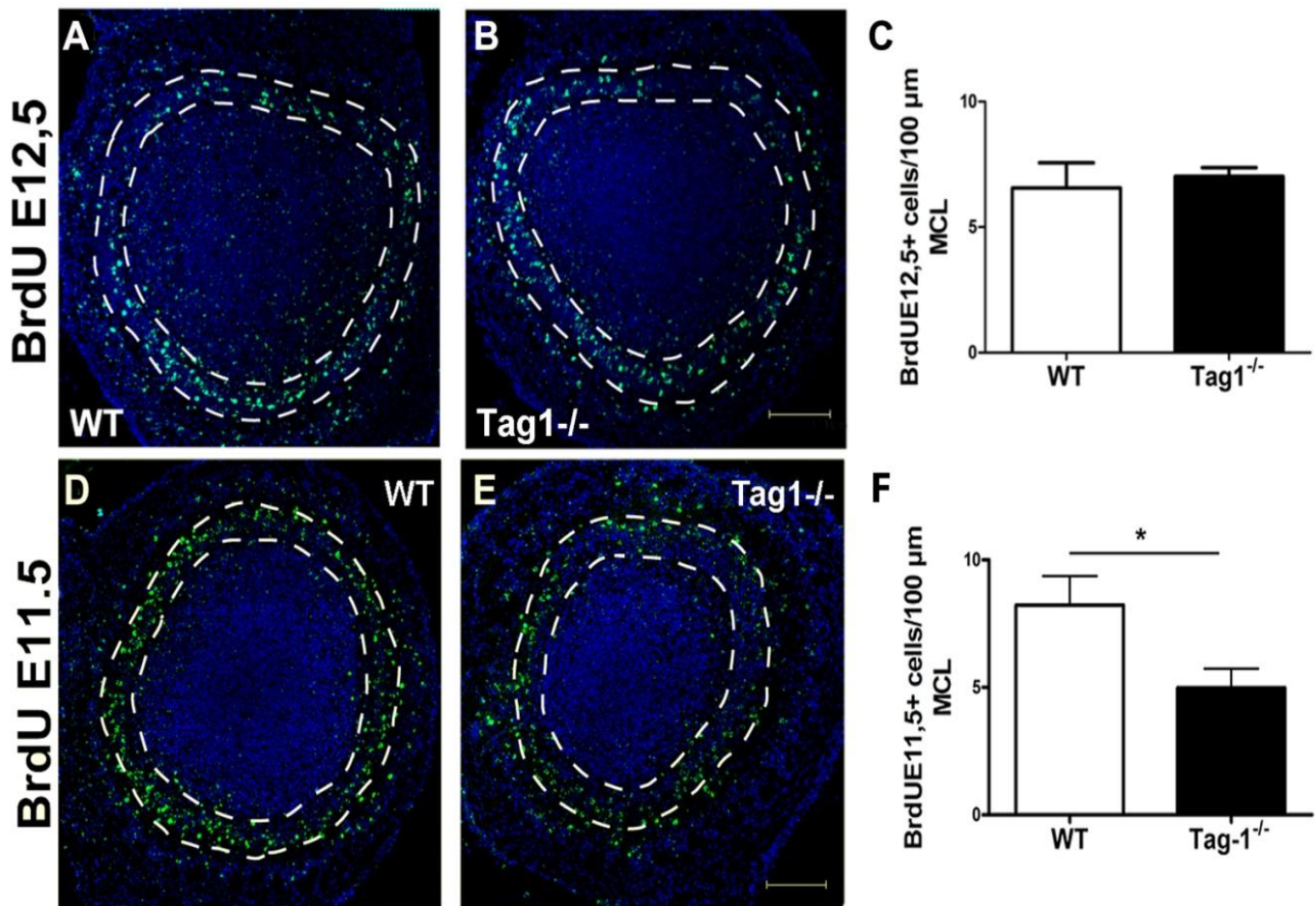
Πραγματοποιήθηκε χρήση εγκύων *Tag-1<sup>+/+</sup>;GFP* ζώων στα οποία έγινε και ενδοπεριτοναϊκή έγχυση του αναλόγου της θυμιδίνης, BrdU (5-bromodeoxyuridine). Οι BrdU ενέσεις έγιναν στις ηλικίες E10,5, E11,5 και E12,5 προκειμένου να ανιχνεύσουμε στην ηλικία P0 (ανατομικά ώριμο OB) τους υποπληθυσμούς των MCs που εκφράζουν TAG-1 κατά την ανάπτυξη (δίπλα θετικά GFP<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> κύτταρα). Πραγματοποιώντας διπλή ανοσοϊστοχημεία για τους μάρτυρες BrdU και GFP στους OB των P0 ζώων διαπιστώσαμε ότι μόνο οι υποπληθυσμοί E11,5 και E12,5 εκφράζουν την TAG-1 κατά την διάρκεια της ανάπτυξης (**Εικ.14 A-C**).





**Εικ.14:** Οι υποπληθυσμοί των MCs που γεννιούνται στην ηλικία E11,5 και E12,5 εκφράζουν TAG-1 κατά την διάρκεια της ανάπτυξης. Με την χρήση των *Tag-1<sup>+/+</sup>;GFP* ζώων πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία για GFP/BrdU σε στεφανιαίες κρυστομές σε ηλικία P0. Τα ζώα που είχαν λάβει ένεση BrdU σε ηλικία E11,5 και E12,5 συνεντοπίζονταν με την TAG-1 (GFP+/BrdU+) (**B-C κεφαλές βέλους**) σε αντίθεση όσα είχαν λάβει BrdU σε ηλικία E10,5 (**A**). Γραμμή κλίμακας 75  $\mu\text{m}$

Ακολουθώντας προχωρήσαμε σε εκτενή ποσοτική ανάλυση των BrdU<sup>+</sup> κυττάρων στο MCL του MOB στα WT και *Tag-1<sup>-/-</sup>* στην ηλικία P0. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δεν αποκάλυψαν καμία διαφορά στα κύτταρα της ηλικίας E12,5 (**Εικ.15 A-C**). Αντιθέτως τα κύτταρα που γεννήθηκαν στην E11,5 παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των γονοτύπων, με την μείωση στο MCL των *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώων να φτάνει στο 39,42% (**Εικ.15 D-F**).



**Εικ.15:** Από τους υποπληθυσμούς των MCs που εκφράζουν την TAG-1 κατά την ανάπτυξη, αυτός των E11,5 παρουσιάζεται μειωμένος στην MCL των *Tag1*<sup>-/-</sup> μυών. Σε εγκύους WT και *Tag1*<sup>-/-</sup> μύες πραγματοποιήθηκε έγχυση BrdU στις ηλικίες E11,5 και E12,5. Εν συνεχεία στις τομές των P0 εμβρύων πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία για BrdU και torp-3. Στον πληθυσμό των E12,5 (A,B) δεν παρουσιάστηκε διαφορά στον αριθμό των BrdU+ κυττάρων της MCL (περιοχή εντός στικτών γραμμών) μεταξύ των γονοτύπων (C). Αντιθέτως στον πληθυσμό των E11,5 παρουσιάστηκε μείωση των BrdU+ κυττάρων της MCL στα *Tag1*<sup>-/-</sup> ζώα (D,E), η οποία ήταν στατιστικά σημαντική (F).Κλίμακα:150μm

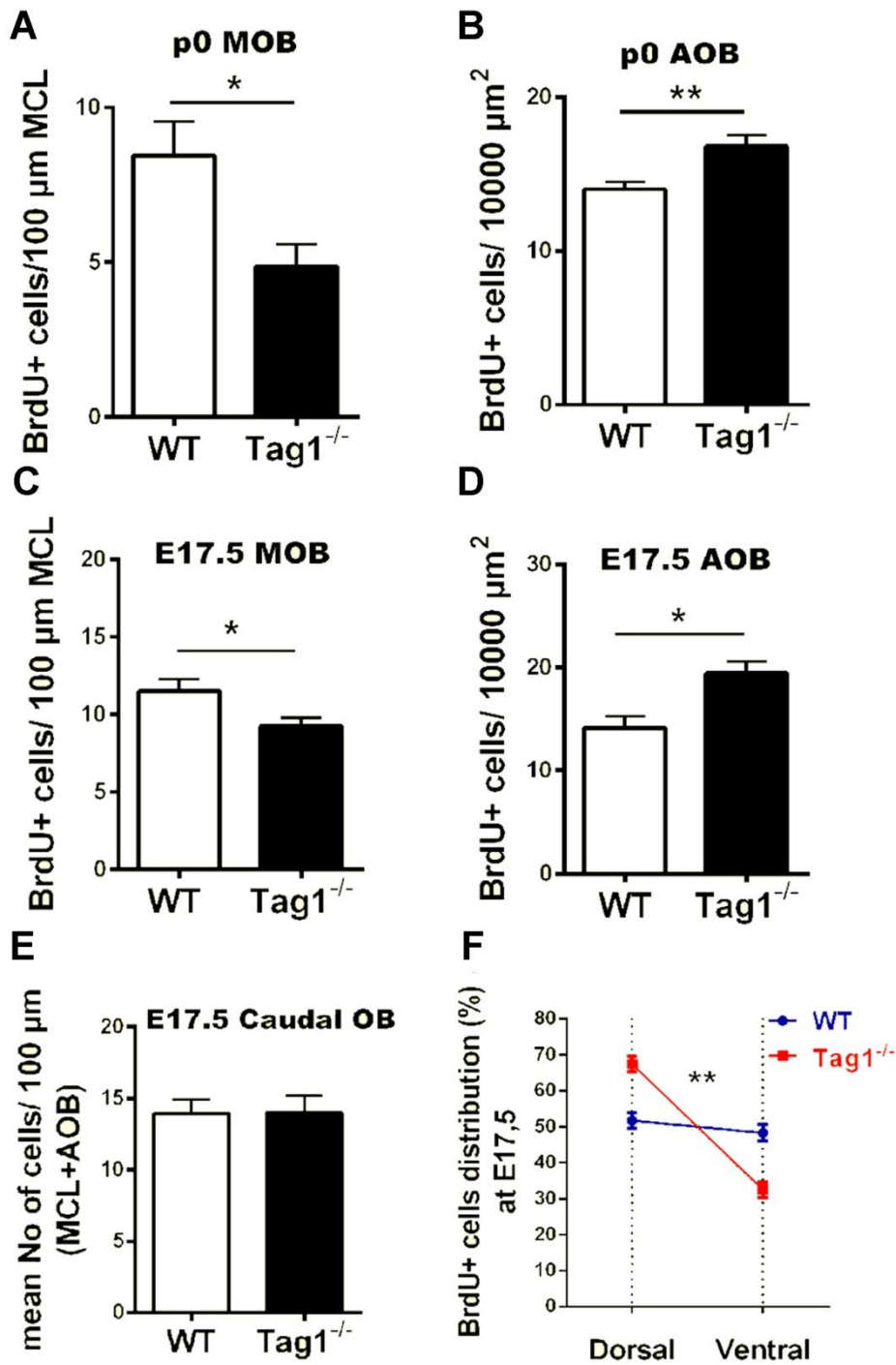
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μέχρι στιγμής αποκαλύπτουν μία μείωση στον αριθμό των MCs του MOB στους *Tag1*<sup>-/-</sup> μύες, με τον ενδιάμεσο υποπληθυσμό (E11,5) των MCs να επηρεάζεται λόγω της έλλειψης της TAG-1. Τα παραπάνω αποτελέσματα θα μπορούσαν να ενισχύσουν την θεωρία της ελαττωματικής μετανάστευσης /καθοδήγησης των MCs κατά την ανάπτυξη του OB. Αυτό θα μπορούσε να επικυρωθεί εφόσον ήταν

δυνατόν να ανιχνευθούν έκτοπα MCs εντός του αναπτυσσόμενου OB στα ελλειμματικά για την TAG-1 ζώα.

#### **2iv. Τα E11,5 MCS που λείπουν από το MOB των *Tag-1*<sup>-/-</sup> ζώων ανευρίσκονται έκτοπα, εντοπιζόμενα εντός του AOB τους.**

Είναι γνωστό από παλαιότερες μελέτες ότι η TAG-1 αποτελεί ένα μόριο κυτταρικής συνάφειας που σχετίζεται με την προβολή των νευραξόνων, την καθοδήγησή τους, αλλά και την μετανάστευση των νευρώνων<sup>162,165,183</sup>. Όπως έχειδειχθεί η TAG-1 συμμετέχει στην μετανάστευση των ενδονευρώνων τόσο του φλοιού όσο και του προμήκου μυελού<sup>162,183</sup>. Ομοίως η θα μπορούσε να συμμετέχει στην μετανάστευση και την καθοδήγηση των MCs εντός του αναπτυσσόμενου OB. Προσπαθώντας να επιβεβαιώσουμε την προηγούμενη θεωρία δοκιμάσαμε να ανιχνεύσουμε περιοχές έκτοπων MCs (E11,5) εντός του OB που δεν κατάφεραν να μεταναστεύσουν φυσιολογικά προς την MCL στα *Tag-1*<sup>-/-</sup> ζώων. Για τον σκοπό αυτό ελέγξαμε την κατανομή των E11,5 BrdU<sup>+</sup> κυττάρων στον συνολικό όγκο του OB στην ηλικία P0 όπως είχε πραγματοποιηθεί προηγουμένως. Η παραπάνω ανάλυση παρουσίασε μία αύξηση στον αριθμό των BrdU<sup>+</sup> κυττάρων στην περιοχή του AOB στα *Tag-1*<sup>-/-</sup> ποντίκια σε σχέση με τα WT. Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι στην περιοχή του AOB όπως παρουσιάστηκε αρχικά δεν υπάρχει έκφραση της TAG-1 σε χρονικό σημείο της ανάπτυξης. Η ποσοτική ανάλυση των παραπάνω δεδομένων αποκάλυψε μια στατιστικά σημαντική αύξηση στον αριθμό των E11,5 BrdU<sup>+</sup> κυττάρων εντός του AOB, με μία αντίστοιχη μείωση στην MCL του MOB στους *Tag-1*<sup>-/-</sup> μύες όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (**Εικ.16 A**). Αυτές οι διαφορές εμφανίζονται σταθερά στα *Tag-1*<sup>-/-</sup> ζώα από την ηλικία E16,5-P0 (**Εικ.16 B-D**). Αυτό συνηγορεί υπέρ του ότι το αίτιο του συγκεκριμένου φαινοτύπου συμβαίνει στο αναπτυξιακό παράθυρο κατά το οποίο τα MCs μεταναστεύουν από την IZ προς τις τελικές του θέσεις εντός της MCL<sup>68</sup>. Στην συνέχεια έγινε προσπάθεια στις οπίσθιες κρυστομές του OB που περιέχουν τόσο AOB (ραχιαία) όσο και MOB να γίνει ποσοτική ανάλυση του συνολικού αριθμού των E11,5 BrdU<sup>+</sup> κυττάρων μεταξύ φυσιολογικών και ομόζυγα μεταλλαγμένων για την TAG-1 ποντικών. Στην ηλικία E17,5 (**Εικ.16 E**) και P0 (δεν παρουσιάζονται) παρατηρήθηκε ότι ο συνολικός αριθμός των BrdU<sup>+</sup> (MOB και AOB) κυττάρων ανά τομή είναι όμοιος μεταξύ WT και *Tag-1*<sup>-/-</sup> ζώων. Συνοψίζοντας τα ανωτέρω αποτελέσματα εν τέλει παρατηρείται ότι δεν υπάρχει αλλαγή στον αριθμό των E11,5 MCs αλλά λανθασμένη κατανομή τους εντός του OB, όπου στα

*Tag1*<sup>-/-</sup> ζώα καταλαμβάνουν περισσότερο ραχιαίες περιοχές (AOB) και λιγότερο κοιλιακές (Εικ.16 F).

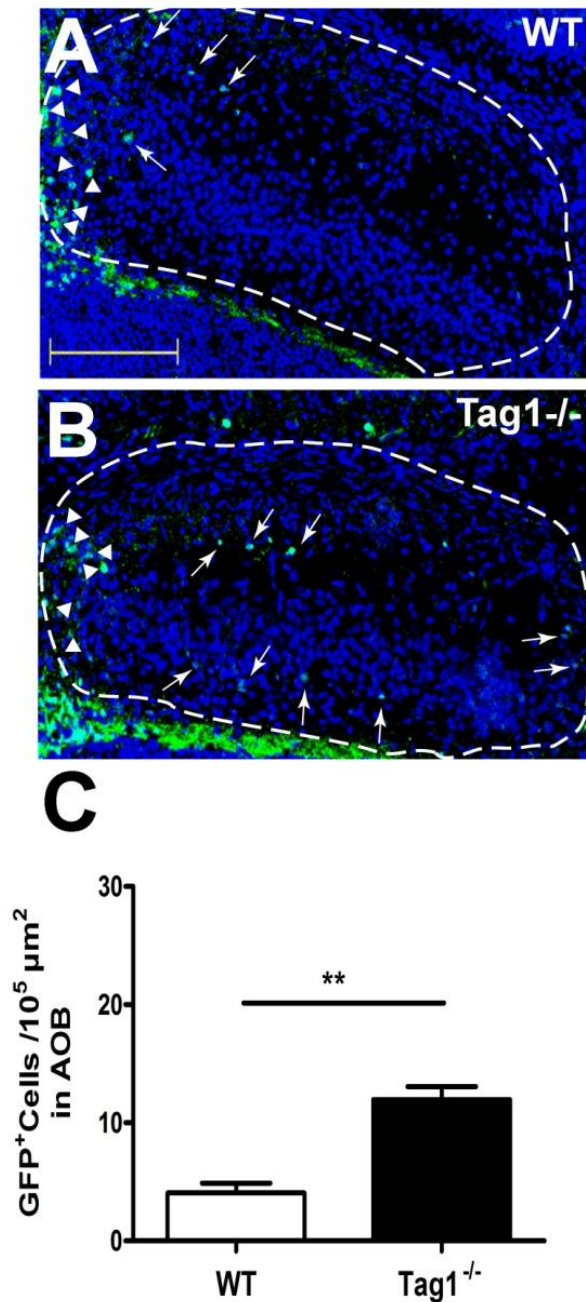


Εικ.16: Η μείωση του αριθμού των E11,5 κυττάρων της MCL του MOB συνοδεύεται με μία αύξηση στον αριθμό των E11,5 κυττάρων του AOB στα *Tag1*<sup>-/-</sup> ποντίκια. Όμοια πειράματα όπως προηγουμένως με BrdU στην ηλικία E11,5, πραγματοποιήθηκαν από τις ηλικίες E16,5-P0, μεταξύ WT και *Tag1*<sup>-/-</sup> μύων. Ποσοτική ανάλυση των BrdU+ κυττάρων

πραγματοποιήθηκε στην MCL του MOB και εντός του AOB. Σε όλες τις ηλικίες την μείωση των E11,5 κυττάρων του MOB (**A,C**) ακολουθεί μία αντίστοιχη αύξηση του αριθμού στον AOB (**B,D**) (παρουσιάζονται οι ηλικίες P0 και E17,5). Όταν έγινε ανάλυση του συνολικού αριθμού των BrdU+ κυττάρων σε οπίσθιες τομές OB που περιέχουν τόσο MOB (MCL) όσο και AOB δεν παρουσιάστηκε διαφορά στον συνολικό αριθμό των BrdU+ κυττάρων (**E**). Όπως φαίνεται και στο γράφημα **F** δεν υπάρχει μείωση στον συνολικό αριθμό, αλλά μία διαφορά στην κατανομή των κυττάρων με τα E11,5 κύτταρα στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώα να έχουν περισσότερο ραχιαία κατανομή (AOB) σε σχέση με τα WT.

Στην συνέχεια χρησιμοποιήσαμε τα διαγονιδιακά ζώα *Tag-1<sup>+/+</sup>;GFP* και *Tag-1<sup>-/-</sup>;GFP* με μάρτυρα το GFP για την παρατήρηση του AOB στις ηλικίες E17,5 (δεν παρουσιάζεται) και P0. Υπενθυμίζεται ότι η TAG-1 δεν εκφράζεται εντός του AOB και έτσι δεν ανιχνεύονται και GFP<sup>+</sup> κύτταρα φυσιολογικά εντός αυτού. Η παραπάνω πειραματική διαδικασία, αποκάλυψε ότι εντός του AOB των *Tag-1<sup>-/-</sup>;GFP* ζώων ανιχνεύονταν σημαντικά περισσότερα GFP<sup>+</sup> κύτταρα σε σχέση με τα *Tag-1<sup>+/+</sup>;GFP* ζώα πράγμα που επιβεβαιώνει τις προηγούμενες παρατηρήσεις μας (**Εικ.17 A-C**).





**Εικ.17 :** Ο αριθμός των GFP+ κυττάρων εντός του OB των *Tag1*<sup>-/-</sup> μυών είναι αυξημένος, επιβεβαιώνοντας τις παραπάνω παρατηρήσεις. Η ανοσοϊστοχημεία για GFP σε P0, *Tag1*<sup>+/+</sup>;GFP (A) και *Tag1*<sup>-/-</sup>;GFP (B) ζώα, παρουσίασε αύξηση των GFP κυττάρων εντός του AOB στα ελλειμματικά για την TAG-1 ποντίκια (C). Κλίμακα: 150μm.

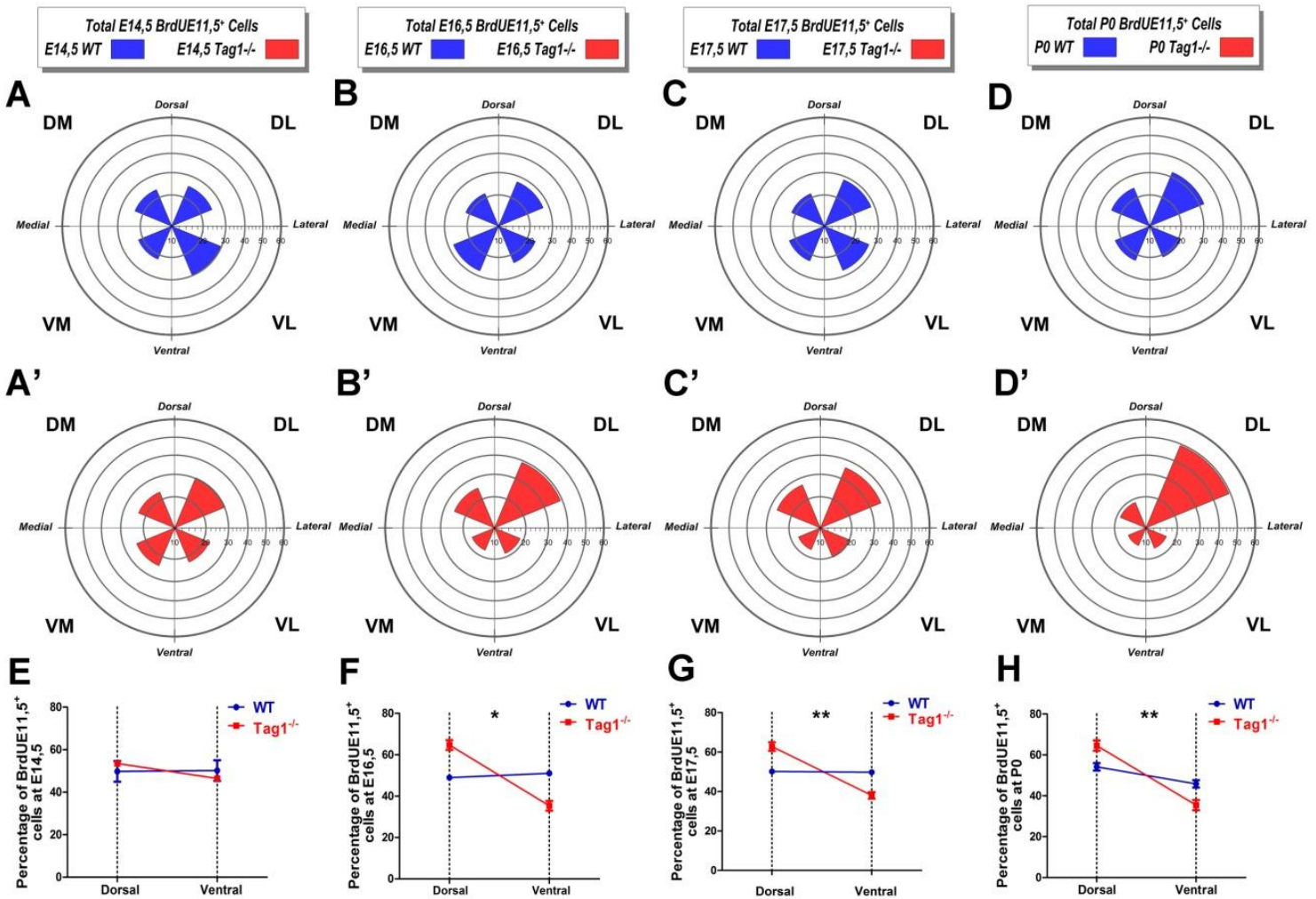
Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι οι διαφορετικοί υποπληθυσμοί των MCs (E9,5-E13,5) γεννιούνται με διαφορετική κατανομή εντός του OB και μέχρι την ηλικία P0 έχουν αποκτήσει την τελική κατανομή τους στην MCL του OB<sup>14</sup>. Έτσι είναι γνωστό ότι ο πρώιμος

υποπληθυσμός των MCs (E10,5) γεννιέται με μία ομοιόμορφη κατανομή εντός του OB ενώ μέχρι την ενήλικη ζωή το μεγαλύτερο ποσοστό των E10,5 MCs έχει αποκτήσει μία ραχιαία και έσω κατανομή. Αντίστοιχα τα E12,5 MCs γεννιούνται με μία κατανομή έξω-ραχιαία (~E13,5) που στην ενηλικίωση έχει μετατραπεί σε έξω-κοιλιακή. Ο πληθυσμός των E11,5 παρουσιάζει μία κατανομή που από την ηλικία E15,5 θα γίνει περισσότερο έξω-κοιλιακή και στην ενήλικη ζωή θα είναι ομοιόμορφη εντός του OB<sup>114</sup>. Έτσι έχει τεκμηριωθεί ότι ένα ποσοστό του E12,5 πληθυσμού των MCs ακολουθεί μία οριζόντια μετανάστευση μετά την ηλικία E13,5 πάνω στους άξονες των πρώιμων MCs (E9,5-E10,5) από την ραχιαία-έξω περιοχή προς την έξω-κοιλιακή μέχρι την ενηλικίωση<sup>114</sup>. Πιθανολογείται ότι και οι υπόλοιποι πληθυσμοί MCs μπορούν να ακολουθούν ένα παρόμοιο μοτίβο μετανάστευσης έως ότου καταλάβουν τις τελικές τους θέσεις εντός του OB.

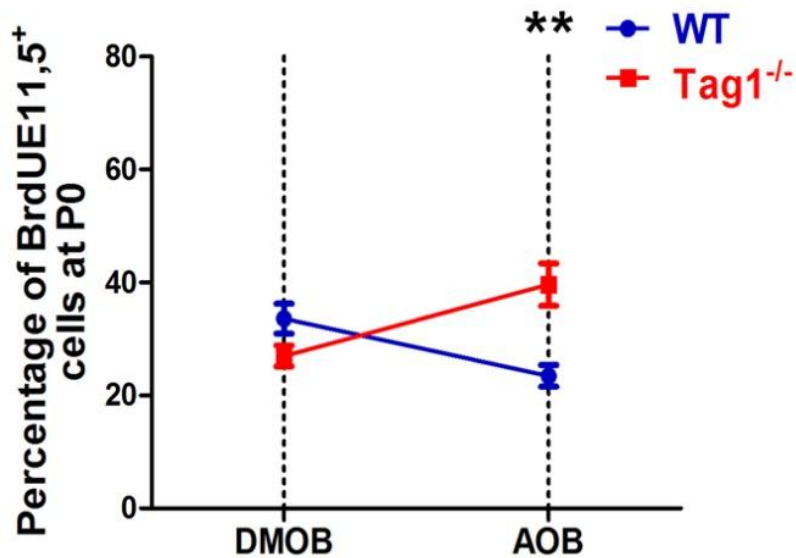
Ακολουθώντας πραγματοποιήσαμε σε εγκύους μύες που είχαν λάβει ένεση BrdU στην ηλικία E11,5 ανοσοϊστοχημεία χρησιμοποιώντας τους μάρτυρες για BrdU και Tbr1. Όλα τα BrdU θετικά κύτταρα ήταν θετικά και για τον μάρτυρα Tbr1 (δεν παρουσιάζεται). Κρυστομές κατά μήκος ολόκληρου του προσθιο-οπίσθιου άξονα αναλύθηκαν με την χρήση των ανωτέρω μοριακών μαρτύρων. Στην ανάλυση υπήρχαν τομές που περιέχουν μόνο MOB αλλά και οπίσθιες τομές που περιέχουν και MOB και AOB. Οι στεφανιαίες τομές (coronal) υποδιαιρέθηκαν ανάλογα την ανατομική περιοχή του OB σε άνω-έσω (dorsomedial, DM), άνω-έξω (dorsolateral, DL) , έξω-κοιλιακό (ventrolateral, VL) και έσω-κοιλιακό (ventromedial, VM) τεταρτημόριο. Προκειμένου να εντοπίσουμε τα E11,5 MCs σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του OB ιχνηθετήσαμε και αναλύσαμε τα BrdU<sup>+</sup>/Tbr1<sup>+</sup> κύτταρα. Από το σύνολο των τομών του OB στον πρόσθιο-οπίσθιο άξονα , προσπαθήσαμε να εντοπίσουμε τα πρώιμα MCs που γεννήθηκαν στην E11,5 (BrdU<sup>+</sup>/Tbr1<sup>+</sup>) καθώς κατανέμονται εντός του OB σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, σε όλες τις ηλικίες από E14,5-P0. Το συνολικό ποσοστό των BrdU<sup>+</sup>/Tbr1<sup>+</sup> διπλά θετικών κυττάρων ανά τεταρτημόριο OB και η κατανομή τους εντός του OB, απεικονίζεται γραφικά στην εικόνα (**Εικ.18 A-D'**) στις διαφορετικές αναπτυξιακές ηλικίες. Στην ηλικία των E14,5 δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά στην κατανομή των BrdU<sup>+</sup>/Tbr1<sup>+</sup> κυττάρων μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων (**Εικ.18 E**). Αντιθέτως στις επόμενες αναπτυξιακές ηλικίες (E16,5-P0) σταδιακά στα *Tag-1*<sup>-/-</sup> ποντίκια εγκαθίσταται μια προτίμηση των BrdU<sup>+</sup>/Tbr1<sup>+</sup> κυττάρων να καταλαμβάνουν το DL τεταρτημόριο έναντι των υπόλοιπων (**Εικ.18 B'-D'**). Αντιθέτως στα WT ζώα η κατανομή τους εντός του OB γίνεται ομοιόμορφη (**Εικ.18 B-D**). Η ποσοτικοποίηση του συνόλου αυτών των κυττάρων στις ραχιαίες έναντι των κοιλιακών

περιοχών επιβεβαιώνει την τάση τους στα ελλειμματικά για την TAG-1 ζώα να παραμένουν σε ραχιαίες περιοχές του OB (**Εικ.18 F-H**). Τέλος ακολούθησε ποσοτικοποίηση των BrdU<sup>+</sup>/Tbr1<sup>+</sup> κυττάρων μόνο στις ραχιαίες περιοχές του MOB (dorsal MOB,DMOB) και στον AOB σε P0 WT και *Tag-1*<sup>-/-</sup> ποντίκια. Η παραπάνω ανάλυση επιβεβαιώνει ότι η αύξηση των κυττάρων στην DL περιοχή του OB στα *Tag-1*<sup>-/-</sup> ποντίκια οφείλεται σε ανακατανομή του πληθυσμού των E11,5 MCs εντός του AOB πιθανός λόγω μη σωστής μετανάστευσης προς περιοχές τόσο ραχιαίες (μείωση) αλλά και κοιλιακές (**Εικ.19**). Το παραπάνω φαίνεται από τις ποσοτικές διαφορές μεταξύ WT και ζώων τόσο στην DMOB περιοχή όσο και στην AOB περιοχή.





**Εικ.18: Εντοπισμός της θέσης των E11.5 MCs σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης του OB.** Γραφήματα-στόχοι που δείχνουν τα ποσοστά των BrdU+/Tbr1+ MCs σε διαφορετικά τεταρτημόρια ολόκληρου του OB. Η BrdU εγχύθηκε στην εμβρυϊκή ημέρα E11.5, σε έγκυα WT (A-D) και Tag1<sup>-/-</sup> (A'-D') ποντίκια και η ανάλυση διεξήχθη σε E14.5 (A-A'), E16.5 (B, B'), E17.5 (C, C') και P0 (D,D'). Γραφική παράσταση της κατανομής των E11.5-γεννημένων MCs του OB στον ραχιαίο-κοιλιακό άξονα σε ηλικίες E14.5-P0 (E-H). Είναι φανερή η σταθερή αύξηση των κυττάρων που μένουν στα Tag1<sup>-/-</sup> ζώα στην ραχιαία περιοχή του OB μετά την ηλικία E14,5, σε αντίθεση με αυτά των WT που κατανέμονται σχεδόν ομοιόμορφα μέχρι την ηλικία P0.

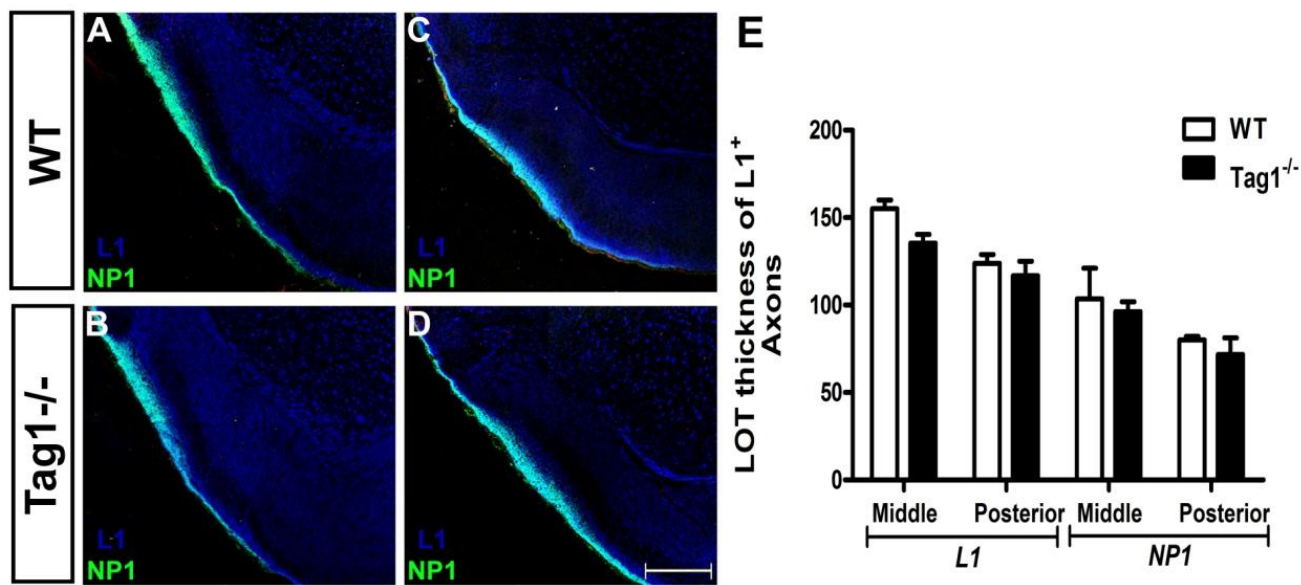


Εικ.19: Τα E11,5 MCs που βρίσκονται εντός του AOB στα *Tag1<sup>-/-</sup>* ζώα, φυσιολογικά θα καταλάμβαναν και ραχιαίες αλλά και κοιλιακές θέσεις εντός του φυσιολογικού OB. DMOB: dorsal MOB (ραχιαίος MOB)

## 2ν. Οι νευρικές ίνες των προβλητικών νευρώνων που δομούν το LOT δεν παρουσιάζονται διαταραγμένες στους *Tag1<sup>-/-</sup>* μύες.

Οι προβλητικοί νευρώνες (TCs, MCs) σχετικά σύντομα μετά την δημιουργία τους από τα προγονικά τους κύτταρα στον αρχέγονο OB προβάλλουν και τον άξονα τους προς το LOT (E12,5-E14,5)<sup>68,115,122</sup>. Ακόμα είναι γνωστό ότι ανάλογα με την αναπτυξιακή ημερομηνία γέννησής τους θα καταλάβουν και αντίστοιχη θέση εντός του LOT. Οι πιο πρώιμοι νευρώνες προβάλλουν τους άξονές τους κυρίως στις εν τω βάθει στοιβάδες του LOT, ενώ οι πιο όψιμοι στις επιπολής<sup>114,125</sup>. Λόγω της λανθασμένης θέσης που ανακαλύψαμε ότι καταλαμβάνουν τα MCs των ελλειμματικών για την TAG-1 ζώων θελήσαμε να δούμε εάν αυτή η διαταραχή επηρεάζει την προβολή των αξόνων στο LOT. Για την παραπάνω αδρή μελέτη του LOT έγινε χρήση του L1 που είναι γνωστό ότι σημαίνει όλους τους άξονες του LOT και του NP-1 που σημαίνει τους άξονες που βρίσκονται σε ενδιάμεσες και επιπολής περιοχές του LOT<sup>69</sup>. Έτσι γνωρίζουμε ότι με αυτούς τους 2 μάρτυρες χωρίζουμε το LOT σε 2 περιοχές την L1<sup>+</sup>/Nr1<sup>-</sup> που περιέχει κυρίως τους άξονες από το AOB και την περιοχή που είναι L1<sup>+</sup>/Nr1<sup>+</sup> που περιέχει κυρίως τους άξονες του MOB. Με τα παραπάνω ειδικά αντισώματα πραγματοποιήσαμε ανοσοϊστοχημική ανάλυση και ποσοτικοποίηση του

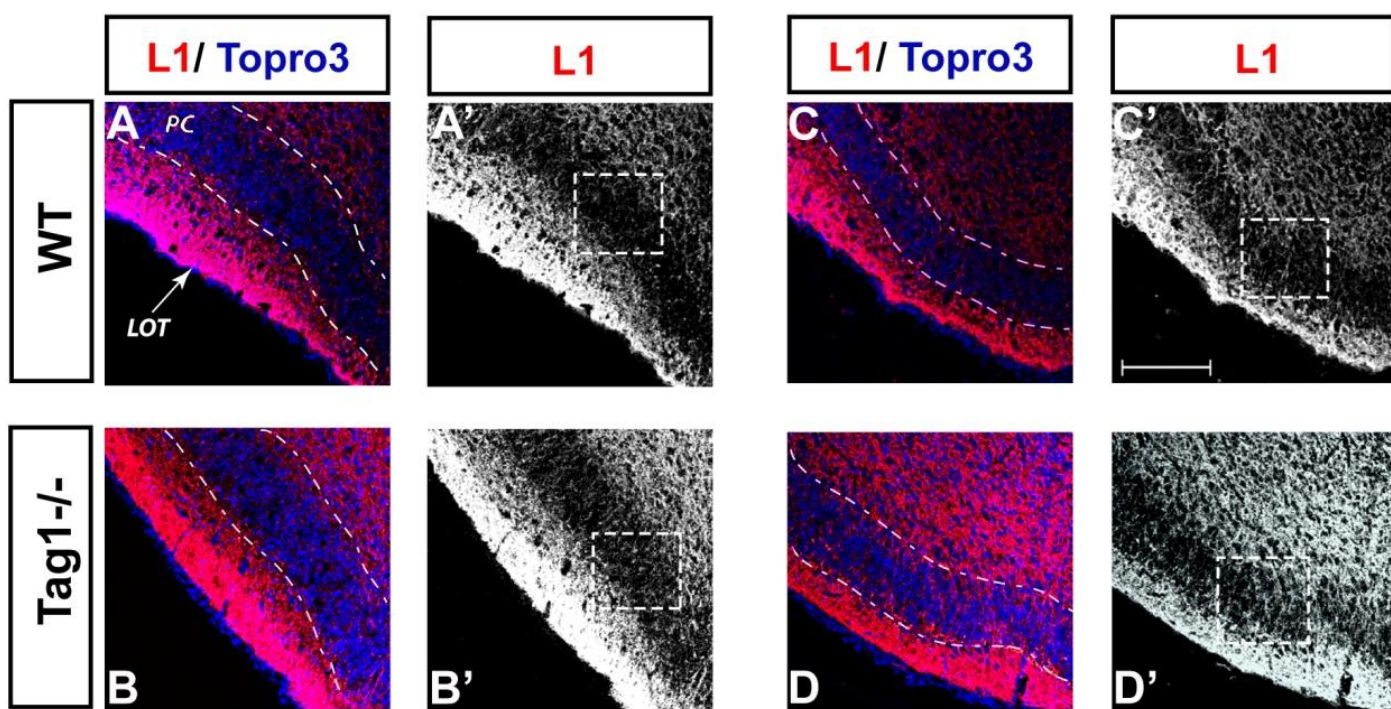
πάχους των διαφορετικών στοιβάδων του LOT σε WT και *Tag-1*<sup>-/-</sup> ποντίκια. Τα δεδομένα που προέκυψαν από την προαναφερθείσα πειραματική διαδικασία και παρουσιάζονται στην (Εικ.20 (A-E)) δεν ανέδειξαν καμία διαφορά στο συνολικό πάχος του LOT αλλά ούτε και στον πάχος της δεσμίδας των νευρικών ινών που περιέχει τους άξονες του MOB (L1<sup>+</sup>/Np1<sup>+</sup>) (Εικ.20 E).



**Εικ.20: Οι άξονες των MCs και των TCS στον LOT και τον οσφρητικό φλοιό δεν παρουσιάζουν μεταβολές στα *Tag-1*<sup>-/-</sup> ποντίκια. A-E.** Πειράματα ανοσοϊστοχημείας στο επίπεδο της LOT σε στεφανιαίες τομές, αρχίζοντας από το τέλος του AON προς τον PC, χρησιμοποιώντας αντισώματα για τα CAMs L1 και NP1. Το L1 σημαίνει όλους τους άξονες του LOT ενώ το NP1 συγκεκριμένα τους άξονες που προέρχονται από το MOB. Καμία διαφορά μεταξύ WT και *Tag-1*<sup>-/-</sup> ζώων δεν ανιχνεύθηκε στο πάχος του LOT, όπως υποδεικνύεται από τις τα L1 και NP1 (E) σε όλα τα τμήματα από το πρόσθιο (A και B), έως περισσότερο οπίσθια τμήματα (C, D). Τα τμήματα που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση διαχωρίστηκαν σε μεσαίο LOT (middle) (μετά AON) και οπίσθιο LOT (posterior) (στο επίπεδο του οπίσθιου PC). Κλίμακα 300 μm (A-D).

Όλα αυτά υποδεικνύουν ότι τα έκτοπα MCs εντός του AOB στα *Tag-1*<sup>-/-</sup> ζώα, παρότι δεν καταφέρνουν να βρεθούν εντός του MCL του MOB φαίνεται να προβάλλουν τους άξονες τους φυσιολογικά εντός του LOT προς τον OC. Επιπλέον η θέση των αξόνων τους φαίνεται να μην επηρεάζεται και να παραμένει εντός της ενδιάμεσης-επιπολής στοιβάδας του LOT

(L1<sup>+</sup>/Nr1<sup>+</sup>) καθώς το πάχος της μένει ανεπηρέαστο. Αυτό ενισχύει την θεωρία περί οργάνωσης των αξόνων στο LOT βάση της ημερομηνίας γένεσης των προβλητικών νευρώνων και όχι βάσει της θέσης τους στο OB. Τέλος έγινε προσπάθεια με την χρήση του L1 να δούμε αδρά την ενεύρωση της στοιβάδας II του PC από τους άξονες του LOT στους δύο διαφορετικούς γονότυπους. Η παρατήρηση της έντασης και της έκτασης του L1 σήματος από τους μεμονωμένους άξονες εντός της στοιβάδας II του PC πραγματοποιήθηκε. Τόσο σε πρόσθιες όσο και σε οπίσθιες παρόμοιες τοπογραφικά τομές δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και μεταλλαγμένων για την TAG-1 ποντικών (Εικ.21 A-D').



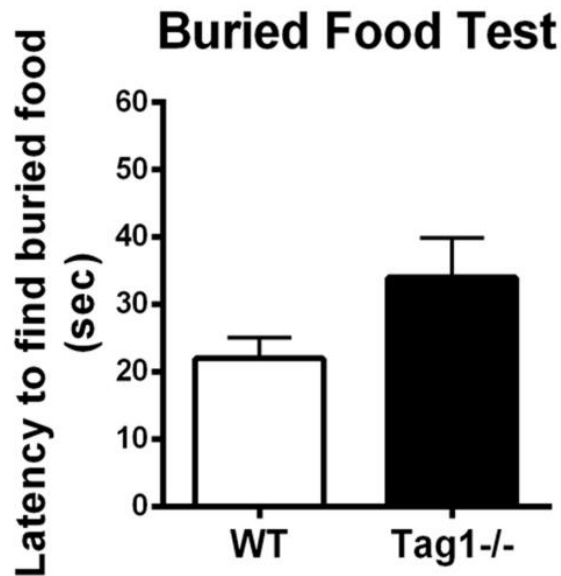
**Εικ.21:** Στο επίπεδο του PC οι άξονες του LOT φαίνεται να κατανέμονται εντός χωρίς εμφανείς διαφορές μεταξύ των γονοτύπων. Ανοσοϊστοχημεία για L1 στο επίπεδο του PC (περιοχή εντός διακεκομμένων γραμμών). Καμία διαφορά δεν εντοπίζεται μεταξύ των γονοτύπων, στον πρόσθιο (A, A' , B, B') και οπίσθιο (C, C' , D ,D') τμήμα του PC. Το-Pro-3 (μπλε) χρησιμοποιήθηκε για χρώση των πυρήνων. Κλίμακα :150 μm

### **A3. Οι ελλειμματικοί για την TAG-1 μύες παρουσιάζουν σοβαρές μεταβολές στην οσφρητική τους ικανότητα.**

Είναι γνωστό ότι το οσφρητικό σύστημα στα ποντίκια είναι απαραίτητο για μία πλειάδα διαφορετικών συμπεριφορικών και κοινωνικών διεργασιών. Έτσι είναι απαραίτητο για την ανεύρεση τροφής, την αναγνώριση κινδύνων στο περιβάλλον, την αναγνώριση ομοίων ζώων του ίδιου ή διαφορετικού φύλου, την έναρξη της ενηλικίωσης και της αναπαραγωγικής διαδικασίας, το ζευγάρωμα και την αναγνώριση της μητέρας από τα νεογέννητα και αντίστροφα<sup>74,184,185</sup>. Η σημασία των παραπάνω συμπεριφορικών διεργασιών κατατάσσει το οσφρητικό σύστημα ως ένα από τα κύρια αισθητήρια συστήματα για τα τρωκτικά καθώς οργανώνει την επιβίωση, την αναπαραγωγή και την κοινωνική ενσωμάτωση των ζώων.

Προκειμένου να διερευνήσουμε εάν η προαναφερθείσα διαταραχή που εμφανίζεται στον OB των *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώων επηρεάζει την οσφρητική ικανότητά τους, πραγματοποιήσαμε μια σειρά από διαφορετικές οσφρητικές δοκιμασίες. Αρχικά υποβάλλαμε τα πειραματόζωα μας στην συμπεριφορική διαδικασία της ανεύρεσης θαμμένης τροφής (Buried food test) στο περιβάλλον. Η παραπάνω διαδικασία μπορεί να αναδείξει εάν υπάρχει ή όχι στοιχειώδης ικανότητα όσφρησης, καθώς βασίζεται στην έμφυτη ικανότητα των ποντικών να ψάχνουν το περιβάλλον για τροφή σε συνθήκες νηστείας<sup>186</sup>. Εν συνεχεία μετά από εικοσιτετράωρη αποστέρηση τροφής τα πειραματόζωα εισάγονται εντός κλουβιού στο οποίο έχει τοποθετηθεί κάτω από το πριονίδι πελέτα τροφής. Ο χρόνος που χρειάζεται το ζώο από την εισαγωγή στο κλουβί μέχρι την ανεύρεση της πελέτας και την έναρξη του γεύματος μετράται κάθε φορά. Σε αυτήν την δοκιμασία τα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ποντίκια δεν παρουσίασαν καμία διαφορά στον ικανότητα ανεύρεση της τροφής σε σχέση με τα φυσιολογικά ζώα και μάλιστα ανταποκρίθηκαν και ελαφρώς καλύτερα (**Εικ.22,**).

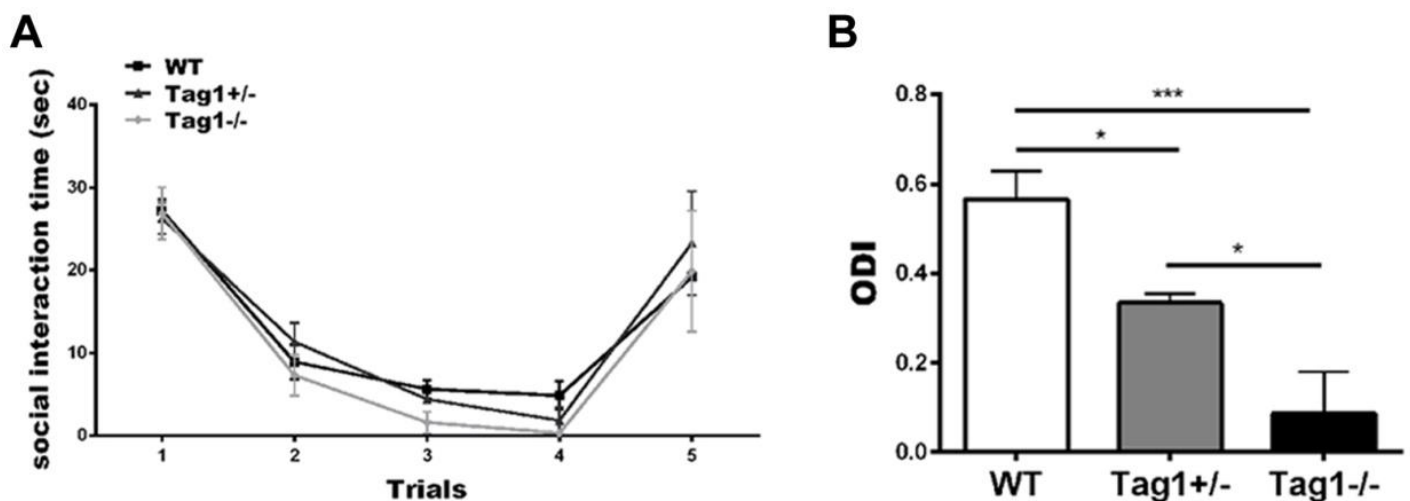




**Εικ.22: Αδρά η αίσθηση της όσφρησης διατηρείται στους *Tag1<sup>-/-</sup>* μύες.** Ο χρόνος που απαιτείται για τα WT και *Tag1<sup>-/-</sup>* ποντίκια για να εντοπίσουν το θαμμένη πελέτα τροφής μετά από 24h νηστείας μετρήθηκε παραπάνω. Δεν παρουσιάστηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά.

Το ανωτέρω αποτέλεσμα μας δείχνει ότι τα μεταλλαγμένα για την TAG-1 ζώα έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν οσφρητικά σήματα στο περιβάλλον τους. Ακολούθως πραγματοποιήσαμε μια δεύτερη συμπεριφορική δοκιμασία την δοκιμασία κοινωνική αλληλεπίδρασης (social interaction test, SIT). Σε αυτήν τα αρσενικά πειραματόζωα οσφραίνονται ένα αναισθητοποιημένο ζώο ομοίου είδους και φύλλου σε επαναλαμβανόμενες χρονικά δοκιμασίες. Φυσιολογικά καθώς προχωρούν οι δοκιμασίες (δοκιμασία 1-4) τα πειραματόζωα οσφραίνονται όλο και λιγότερο χρόνο το αναισθητοποιημένο ζώο<sup>187</sup>. Αυτό συμβαίνει γιατί έχουν μάθει το συγκεκριμένο ερέθισμα και έχει δημιουργηθεί η βραχύχρονη μνήμη για αυτό. Η επιβεβαίωση για το ότι έχει πραγματοποιηθεί μάθηση και προσωρινή μνήμη γίνεται στην πέμπτη και τελευταία δοκιμασία όπου αντί του συνήθους αναισθητοποιημένου ζώου εισάγεται ένα νέο αναισθητοποιημένο ζώο. Τα ζώα που έχουν πραγματοποιήσει μάθηση για το προηγούμενο ερέθισμα, θα συμπεριφερθούν στο νέο ζώο οσφραίνοντάς το για περισσότερο χρόνο (δοκιμασία 5). Στην παραπάνω δοκιμασία τα φυσιολογικά, τα *Tag1<sup>+/-</sup>* και *Tag1<sup>-/-</sup>* ζώα εξετάστηκαν όπως φαίνεται στην **Εικ.23 A** όπου δεν παρουσιάστηκε καμία σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών γονοτύπων. Αυτό υποδεικνύει ότι τα ετερόζυγα αλλά και τα

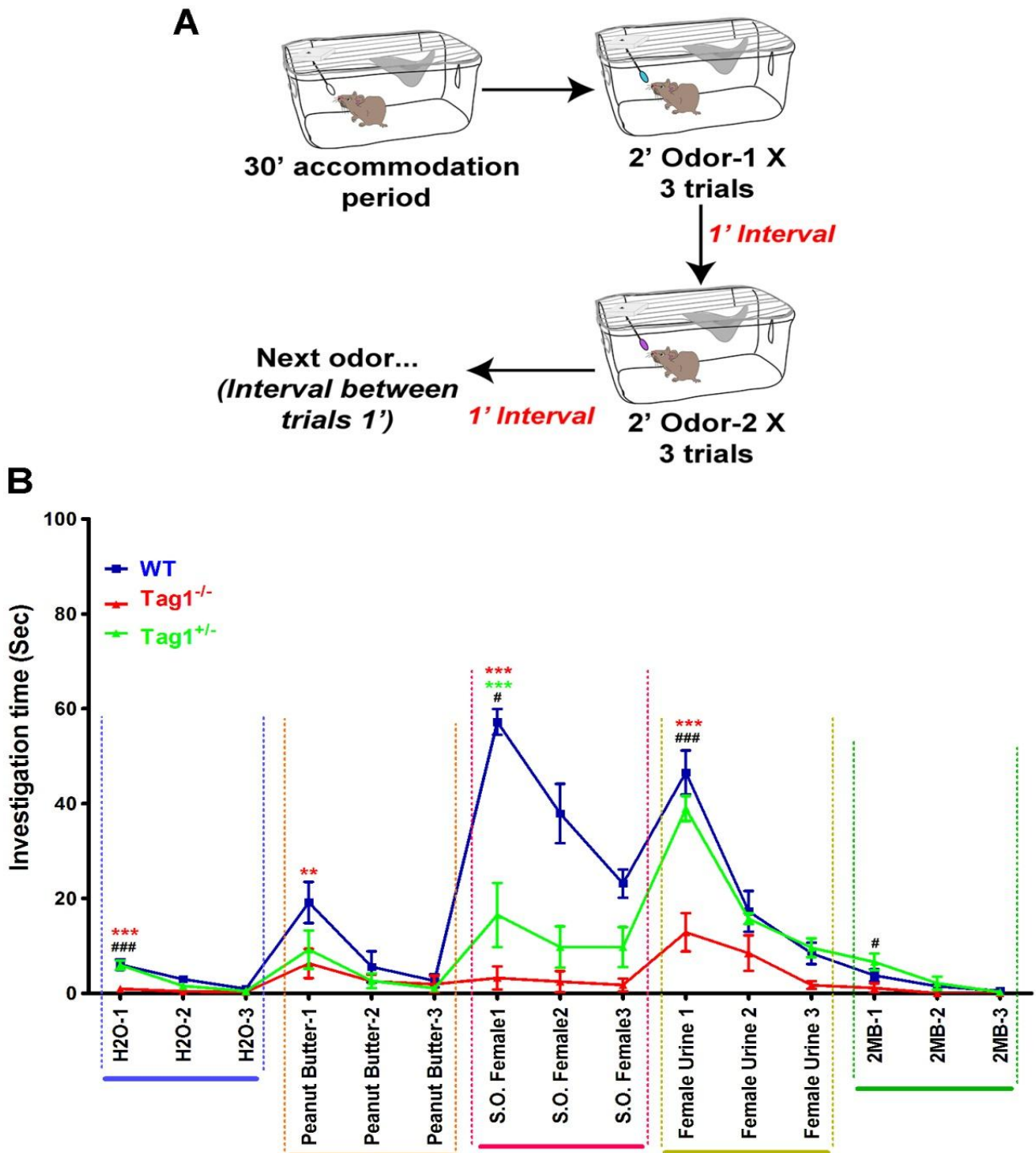
ομόζυγα για την TAG-1 ζώα έχουν την ικανότητα να μαθαίνουν ένα κοινωνικό οσφρητικό ερέθισμα και να το θυμούνται για βραχύ χρονικό διάστημα. Εικοσιτέσσερις ώρες μετά την δοκιμασία κοινωνική αλληλεπίδρασης (social interaction test, SIT) στα ίδια ζώα με προηγουμένως διεξήχθη η δοκιμασία της οσφρητικής μνήμης. Σε αυτήν τα πειραματόζωα εκτέθηκαν στο αναισθητοποιημένο ζώο που είχαν μάθει από την προηγούμενη δοκιμασία παράλληλα με ένα νέο αναισθητοποιημένο ζώο που δεν είχαν έρθει σε επαφή μαζί του ποτέ ξανά. Στην ακόλουθη δοκιμασία ο δείκτης οσφρητικής διάκρισης (olfactory discrimination index, ODI) μετρήθηκε σε κάθε ζώο. Ο ODI είναι ο χρόνος που το ζώο μυρίζει το καινούργιο ζώο μείον το χρόνο που μυρίζει το γνωστό ζώο προς τον συνολικό χρόνο εξερεύνησης και των δύο ζώων. Στην προαναφερθείσα διαδικασία ο ODI των *Tag-1<sup>+/-</sup>* ζώων παρουσιάζεται σημαντικά χαμηλότερος από αυτό των WT και υψηλότερος από αυτόν των *Tag-1<sup>-/-</sup>* μυών (**Εικ.23 B**).



**Εικ.23:** Η μάθηση οσφρητικών ερεθισμάτων και η βραχύχρονη κοινωνική μνήμη είναι ανεπηρέαστη στα *Tag-1<sup>+/-</sup>* και *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώα. Αντιθέτως η μακροχρόνια κοινωνική τους μνήμη είναι σημαντικά επηρεασμένη. Ο χρόνος της κοινωνικής αλληλεπίδρασης (social interaction time μετρήθηκε στο κατά τη διάρκεια της οσφρητικής μάθησης στα WT, *Tag-1<sup>+/-</sup>* και *Tag-1<sup>-/-</sup>* ποντίκια (**A**). Στην δοκιμασία 5, χρησιμοποιήσαμε ένα νέο ζώο. Η δοκιμασία την κοινωνική μνήμη παρουσιάζεται στο **B**. Ο δείκτης οσφρητικής διάκρισης (ODI) υπολογίστηκε για τους 3 γονότυπους. Τα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ποντίκια δείχνουν έναν ODI κοντά στο 0 ( $P = 0,0054$ ,  $\eta = 4$ ) ενώ τα *Tag-1<sup>+/-</sup>* ζώα παρουσιάζουν ένα ενδιάμεσο ODI μεταξύ WT και *Tag-1<sup>-/-</sup>* υποδηλώνοντας διαταραχές στην μακροχρόνια κοινωνική μνήμη που εξαρτάται από την όσφρηση.

Είναι εντυπωσιακό το ότι η σοβαρότητα της διαταραχής στην ικανότητα μακρόχρονης οσφρητικής μνήμης που παρουσίασαν τα μεταλλαγμένα για την TAG-1 ζώα σε σχέση με τα WT φαίνεται να είναι συνδεδεμένη με το ποσοτικό έλλειμμα των MCs εντός του OB αυτών των ζώων. Τέλος πραγματοποιήθηκε μία πιο εξειδικευμένη συμπεριφορική δοκιμασία για την αξιολόγηση της ικανότητας όσφρησης των μεταλλαγμένων για την TAG-1 ζώων. Η δοκιμασία αυτή είναι γνωστή ως δοκιμασία ευαισθητοποίησης /απευαισθητοποίησης οσφρητικού ερεθίσματος (habituation/dishabituation test, HDT). Σε αυτήν τα πειραματόζωα όλων των γονοτύπων εκτίθενται σε ένα οσμηρό ερέθισμα σε 3 συνεχόμενες δοκιμασίες των δύο λεπτών με μεσοδιάστημα 1 λεπτού μεταξύ των δοκιμασιών. Στην συνέχεια ακολουθεί μια νέα δοκιμασία, με νέο οσμηρό ερέθισμα και ούτω καθεξής (**Εικ24 A**). Σε αυτήν την δοκιμασία μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές πτητικές ή μη πτητικές ουσίες, ελκυστικές ή απωθητικές και να μετρηθεί ο χρόνος αλληλεπίδρασης των ζώων με αυτές<sup>186,188</sup>. Αυτή η μέτρηση μας δείχνει πιο λεπτομερώς την ικανότητα αναγνώρισης και διαχωρισμού διαφορετικών οσφρητικών σημάτων. Στο HDT που διεξαγάγαμε σε όλες τις ομάδες των πειραματόζωων μας έγινε χρήση διαφορετικών κοινωνικών οσφρητικών σημάτων (κοινωνικό οσφρητικό σήμα θηλυκού ζώου, ούρο θηλυκού ζώου αναπαραγωγικής ηλικίας) και μη κοινωνικών οσφρητικών σημάτων(ύδωρ, φυστικοβούτυρο/PB,2-μεθυλβουτιρικό οξύ/2-MB). Το ρεπερτόριο των παραπάνω οσμών περιέχει τόσο ελκυστικές (όλες οι κοινωνικές οσμές, φυστικοβούτυρο) όσο και απωθητικά οσμηρά μόρια (2-MB). Σε όλα τα οσμηρά σήματα που χρησιμοποιήθηκαν η οσφρητική ικανότητα των *Tag-1<sup>-/-</sup>* μυών ήταν πάντα σημαντικά χαμηλότερη από αυτή των φυσιολογικών (**Εικ.24 B**). Η πλέον εκσεσημασμένη διαφορά μεταξύ των WT και *Tag-1<sup>-/-</sup>* παρατηρείται στο πτητικό μόριο του PB και στην πτητική κοινωνική οσμή του θηλυκού ζώου. Τα αποτελέσματα του HDT αποκάλυψαν μία σημαντική διαταραχή στην οσφρητική ικανότητα των *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώων σχετιζόμενη με την αναγνώριση και των διαχωρισμό διαφορετικών οσμών. Τα *Tag-1<sup>+/-</sup>* ζώα στην ίδια δοκιμασία εμφάνισαν επίσης μία επηρεασμένη ικανότητα αναγνώρισης και διαχωρισμού οσμηρών σημάτων αλλά σε μικρότερη έκταση με αυτή των *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώων (**Εικ.24 B**). Έτσι τα μεταλλαγμένα για την TAG-1 ζώα ακολουθούν και στην συμπεριφορά τους ένα δόσο-εξαρτώμενο επηρεασμένο πρότυπο οσφρητικής ικανότητας, που φαίνεται να σχετίζεται με την ποσότητα των MCs εντός του OB.





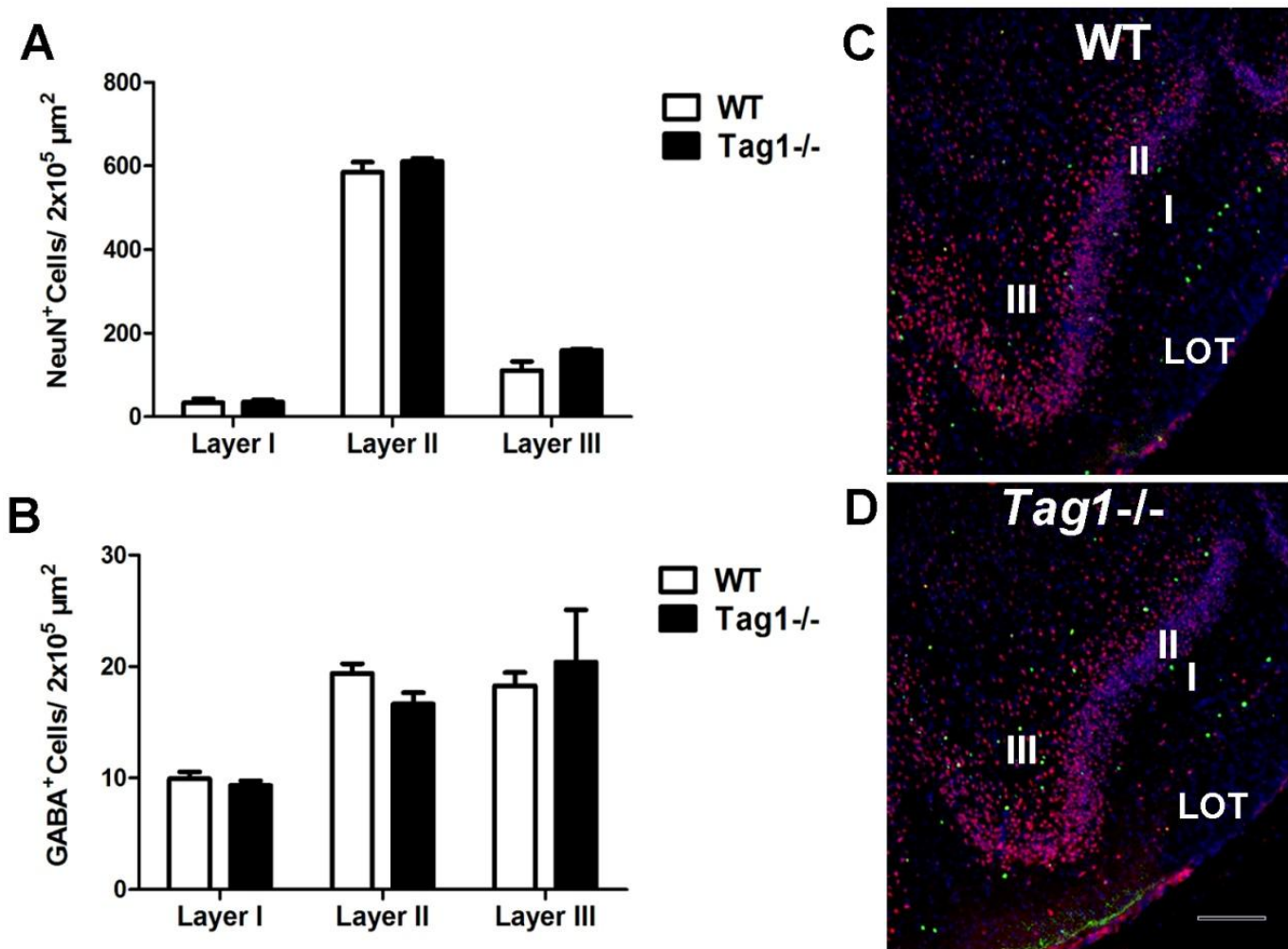
**Εικ.24: A.** Σύντομη γραφική παρουσίαση του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε στην δοκιμασία ευαισθητοποίησης/απευαισθητοποίησης οσφρητικού ερεθίσματος (HDT). **B.** Η HDT με κοινωνικά και μη κοινωνικά οσφρητικά ερεθίσματα αποκάλυψε διαταραγμένη ικανότητα αναγνώρισης και διαχωρισμού τους από τα *Tag-1<sup>-/-</sup>* και *Tag-1<sup>+/-</sup>* ποντίκια. Εντός των στικτών γραμμών και άνωθεν της μπάρας διαφορετικού χρώματος, βρίσκονται οι 3 δοκιμασίες κάθε οσφρητικού ερεθίσματος. Οι κόκκινοι αστερίσκοι (\*) χαρακτηρίζουν την στατιστικά σημαντική

διαφορά μεταξύ WT και *Tag-1<sup>-/-</sup>*, ενώ οι πράσινοι μεταξύ WT και *Tag-1<sup>+/-</sup>*, η δίεση (#) αντιπροσωπεύει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ *Tag-1<sup>+/-</sup>* και *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώων.

#### **A4. Σημαντικές διαταραχές στο προφίλ νευρωνικής ενεργοποίησης του OB και του OC συνοδεύουν την διαταραγμένη οσφρητική ικανότητα των *Tag-1<sup>-/-</sup>* μυών.**

Όπως περιγράφηκε κατά την διάρκεια της εισαγωγής ο άξονας που ακολουθούν οι αισθητικές πληροφορίες της όσφρησης είναι από το υποδεκτικό όργανο του OE (και VNO) προς τον OB και από εκεί στις διαφορετικές περιοχές του OC (AON, PC, TB κλπ.). Τα δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση των ελλειμματικών για την TAG-1 ζώων αποκάλυψαν την εσφαλμένη κατανομή του υποπληθυσμού των E11,5 MCs εντός του OB. Επιπλέον τα μεταλλαγμένα για την TAG-1 ποντίκια παρουσίαζαν σημαντικές διαταραχές όσον αφορά την οσφρητική τους ικανότητα σε σχέση με τα φυσιολογικά, όπως παρουσιάστηκε στην προηγούμενη ενότητα. Οι ανωτέρω συμπεριφορικές διαταραχές θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα των μεταβολών στον OB είτε μεταβολών στην οργάνωση ή την λειτουργία άλλων περιοχών του OS.

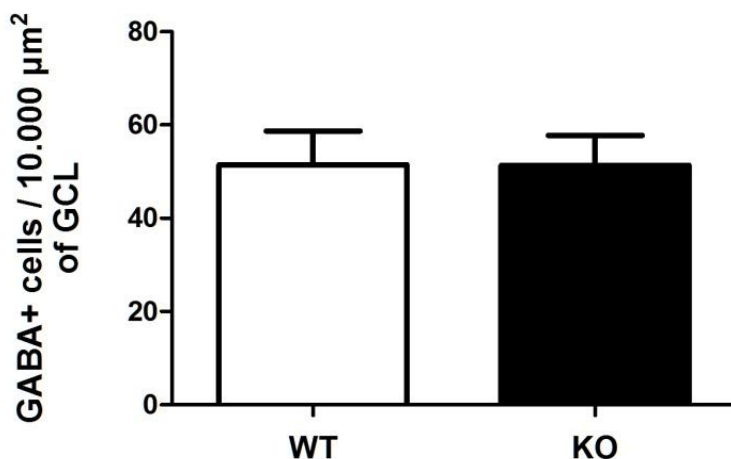
Θέλοντας να αποσαφηνίσουμε την αιτία των παραπάνω διαταραχών αρχικά αναλύσαμε την οργάνωση και την κυτταρική σύσταση του κύριου οσφρητικού φλοιού (PC). Ο PC ήταν η μόνη περιοχή που δεν είχε αναλυθεί ακόμα και που θα μπορούσε να σχετίζεται με αλλοίωση της οσφρητικής λειτουργίας. Με την χρήση γενικών νευρωνικών μαρτύρων αλλά και μαρτύρων για τους ενδονευρώνες προχωρήσαμε σε IHC ανατομική ανάλυση, αλλά και ποσοτική ανάλυση των πληθυσμών που δομούν τον PC (τόσο πρόσθιο όσο και οπίσθιο PC). Τα δεδομένα που προέκυψαν δεν αποκάλυψαν καμία μεταβολή στην μορφολογία του PC μεταξύ WT και *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώων. Η δομή των τριών στοιβάδων, δίκην παλαιοφλοιού, που παρουσιάζει ο PC εμφανιζόταν ακέραια μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων (**Εικ.26 C,D**). Επίσης ο αριθμός του συνόλου των νευρώνων σε κάθε στοιβάδα (I-III) του PC, με την χρήση του γενικού νευρωνικού μάρτυρα NeuN, παρέμενε χωρίς μεταβολές στους *Tag-1<sup>-/-</sup>* μύες (**Εικ.26 A**). Όμοια ήταν τα αποτελέσματα με την χρήση του γενικού μάρτυρα για τους GABA-εργικούς ενδονευρώνες, GABA (**Εικ.26 B**). Τα ανωτέρω αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η δομή και η οργάνωση του PC δεν θα μπορούσε να συνεισφέρει στην δημιουργία των παρατηρούμενων συμπεριφορικών μεταβολών στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώα.



**Εικ.26:** Η μορφολογία και ο αριθμός των νευρώνων του PC στα *Tag1<sup>-/-</sup>* ζώα είναι ανεπηρέαστος. **A-B.** Κατόπιν πειραμάτων ανοσοϊστοχημείας οι αριθμοί των NeuN+ και GABA+ νευρώνων ποσοτικοποιήθηκαν στις διαφορετικές στοιβάδες του PC (Layers I-III) από πρόσθιες, ενδιάμεσες και οπίσθιες τομές. Δεν παρουσιάστηκε καμία διαφορά στον συνολικό αριθμό των νευρώνων (NeuN+), ούτε των ενδονευρωνων (GABA+) στα ελλειμματικά για την TAG-1 ποντίκια **C-D.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες από την ανοσοϊστοχημεία με NeuN/GABA από στεφανιαίες τομές του πρόσθιου PC, WT και *Tag1<sup>-/-</sup>* ζώων. Το-Pro-3 (μπλε) χρησιμοποιήθηκε για χρώση των πυρήνων. Κλίμακα :150 μm.

Ένας άλλος παράγοντας που θα μπορούσε να έχει συμμετοχή στις μεταβολές της οσφρητικής ικανότητας θα μπορούσε να είναι ο πληθυσμός των ενδονευρώνων του OB. Οι νευρώνες αυτοί δεν εκφράζουν την TAG-1 σε καμία φάση της ανάπτυξης και της ενηλίκου ζωής, όμως εάν έμμεσα η TAG-1 επηρέαζε την οργάνωσή τους δεν ήταν γνωστό.

Γνωρίζουμε από παλαιότερες μελέτες ότι το μόριο κυτταρικής συνάφειας NCAM που ανήκει επίσης στην ίδια υπερικογένεια με την TAG-1 όταν απουσιάζει οδηγεί σε μικρότερο OB λόγω λιγότερων κυττάρων στην GCL<sup>189</sup>. Παρόλα αυτά η ανάλυση του πληθυσμού των ενδονευρώνων, με την χρήση του GABA, στην στοιβάδα των GCs του OB, δεν παρουσίασε μεταβολές μεταξύ WT και *Tag-1*<sup>-/-</sup> μυών (**Εικ.27**).

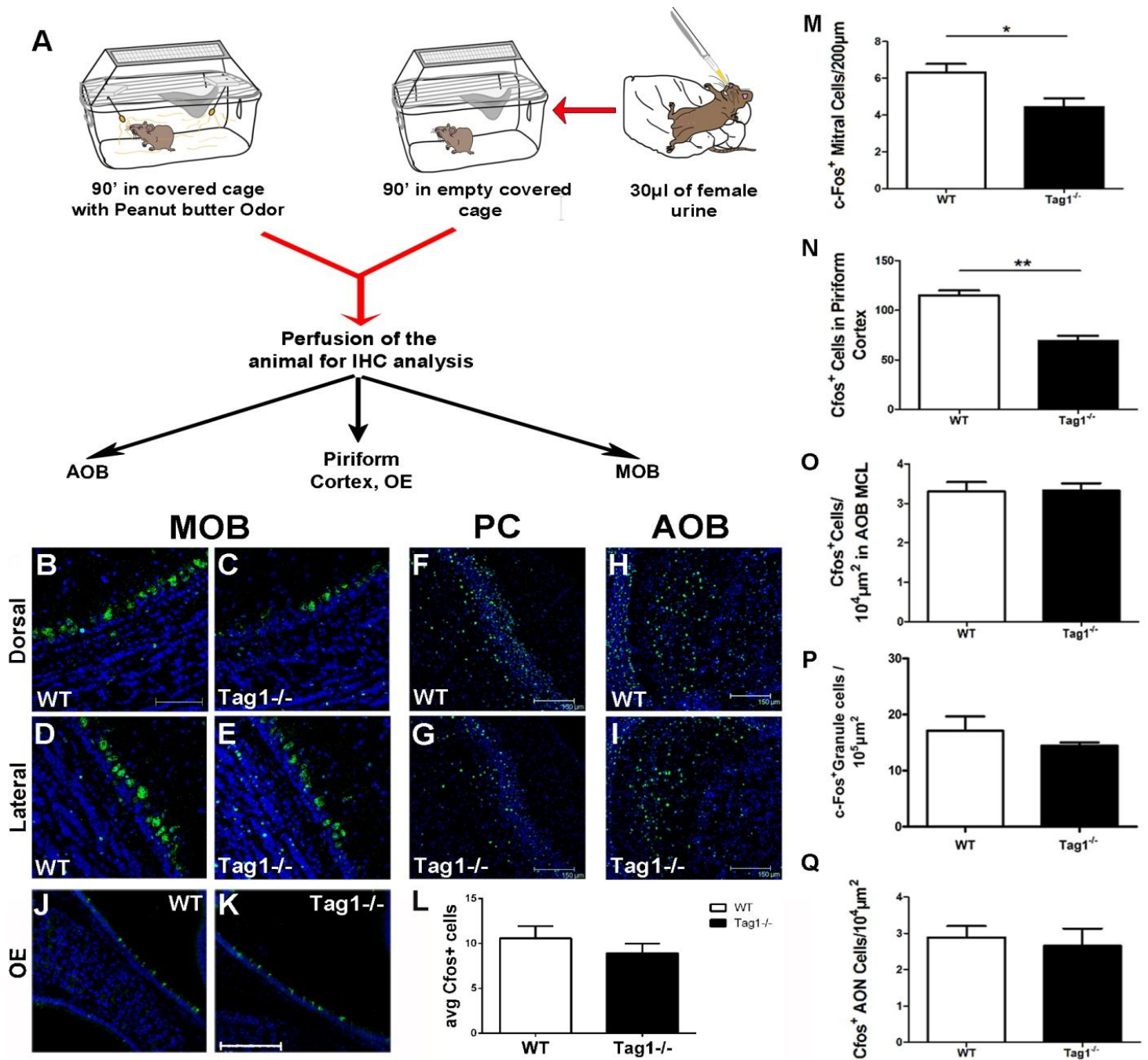


**Εικ.27:** Ο αριθμός των ενδονευρώνων του OB στην στοιβάδα των GCL είναι φυσιολογικός στα *Tag1*<sup>-/-</sup> ποντίκια. Πειράματα ανοσοϊστοχημείας με τον γενικό μάρτυρα των ενδονευρώνων GABA σε τομές ενήλικου OB, και ποσοτική ανάλυση των GABA+ κυττάρων σε WT και *Tag1*<sup>-/-</sup> ποντίκια.

Ο επόμενος στόχος μας ήταν να αναλύσουμε πώς πραγματοποιείται η νευρωνική ενεργοποίηση σε όλους τους σταθμούς της αισθητικής οσφρητικής πληροφορίας, στα *Tag1*<sup>-/-</sup> ποντίκια ποντίκια σε σχέση με τα WT. Για τον παραπάνω σκοπό μια συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε όπως περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα των υλικών και μεθόδων και παρουσιάζεται γραφικά στην **Εικ.28**. Συνοπτικά, διαφορετικές ομάδες φυσιολογικών και ομόζυγων μεταλλαγμένων για την TAG-1 αρσενικών ζώων εκτέθηκαν είτε σε PB, για την διέγερση του MOS, είτε σε ποσότητα ούρων θηλυκών ζώων, για την διέγερση του AOS. Σαν ειδικό μάρτυρα για την διέγερση των νευρώνων χρησιμοποιήσαμε την πρωτεΐνη που γονιδίου *c-Fos*, του οποίου η έκφραση αυξάνει αμέσως μετά την συναπτική διέγερση των νευρώνων. Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση κρυτομών των παραπάνω ενήλικων ζώων πραγματοποιήθηκε με την χρήση ειδικών αντισωμάτων για το *c-Fos*. Στα ανωτέρω πειραματόζωα αναλύθηκε η διέγερση των νευρώνων διαφορετικών ανατομικά περιοχών ολόκληρης της MCL (ραχιαία, κοιλιακή έως

και έξω) του MOB, η περιοχή του AOB, της GCL του MOB, διαφορετικές περιοχές από τον πρόσθιο και οπίσθιο PC, περιοχές του AON και τέλος περιοχές του OE. Η νευρωνική διέγερση των MCs (αριθμός c-Fos<sup>+</sup> κυττάρων) στην MCL του MOB των *Tag-1<sup>-/-</sup>* μυσών ήταν σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τους WT σε ποσοστό 30%. Αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς ένα ποσοστό αυτής της τάξεως ήταν και αυτό που έλλειπε από την MCL των *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώων, επιβεβαιώνοντας τις προηγούμενες παρατηρήσεις μας. Αντιστοίχως στην περιοχή του PC όπου οι κύριοι προβλητικοί νευρώνες προβάλουν παρατηρήθηκε μία μείωση στην διέγερση κατά 40,1% (**Εικ.28 B-G,M-N**) στα ομόζυγα ελλειμματικά για την TAG-1 ποντίκια. Μια άλλη περιοχή του OC που δέχεται νευρικές ίνες από τον MOB, ο AON, δεν παρουσίασε επίσης καμία διαφορά στην διέγερση των νευρώνων του μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων(**Εικ.28 Q**). Επιπλέον ο αριθμός των κύριων ενδονευρώνων του MOB (GCs) φαίνεται ότι διεγείρεται με όμοιο τρόπο μεταξύ φυσιολογικών και *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώων (**Εικ.28 P**). Ακολουθώντας με την διαδικασία διέγερσης του MOS όπως έγινε και προηγουμένως αναλύσαμε τον αριθμό των c-Fos<sup>+</sup> κυττάρων στο OE (στην 4<sup>η</sup> ηθμοειδή κόγχη) χωρίς να ανευρεθεί διαφορά μεταξύ των γονοτύπων. Αυτό το αποτέλεσμα μας δείχνει ότι εκτός από την ακέραια ανατομική μορφολογία του OE και η λειτουργική κατάσταση του αρχικού σταθμού λήψης της οσφρητικής πληροφορίας είναι ανεπηρέαστη στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώα (**Εικ.28 J-L**). Τέλος διεγείροντας το AOS με χρήση ούρων θηλυκών ζώων (αναπαραγωγικής ηλικίας) που περιέχουν και μη-πτητικές ουσίες δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στον αριθμό των c-Fos<sup>+</sup> κυττάρων στην MCL του AOB(**Εικ.28 H-I και O**). Συνοψίζοντας τα τελευταία δεδομένα από την ανάλυσή μας, φάνηκε ότι ο επηρεασμένος πληθυσμός των MCs του MOB και η συνακόλουθη αυτού μειωμένη διέγερση του κύριου οσφρητικού φλοιού (PC), είναι τα κύρια αίτια της παρατηρούμενης οσφρητικής συμπεριφορικής διαταραχής στους *Tag-1<sup>-/-</sup>* μύες.





**Εικ.28:** Η ανάλυση του προφίλ νευρωνικής ενεργοποίησης του οσφρητικού συστήματος, αποκάλυψε διαταραχές στην MCL του MOB και τον PC. **A.** Σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε για την ανάλυση της νευρωνικής ενεργοποίησης του OS. Το αριστερό άνω μέρος αποτελεί την διέγερση του MOS, ενώ το δεξιό άνω του AOS. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση κρυστομών ενήλικων ζώων με c-Fos σε OB (**B-E**), PC (**F-G**), AOB (**H-I**), AON (δεν παρουσιάζεται) και OE (**J,K**). Η ποσοτικοποίηση των c-Fos+ κυττάρων στις ανωτέρω περιοχές πραγματοποιήθηκε. Στην περιοχή του MOB παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό των MCs που ενεργοποιούνται στην MCL, όπως και στον αριθμό των

κυττάρων του PC στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώα (**M,N**). Οι ενδονευρώνες του GCL του MOB δραστηριοποιούνται ομοίως μεταξύ των γονοτύπων (**P**). Αντιθέτως τα κύτταρα που ενεργοποιούνται στο OE (**L**), στον AOB (**O**), και τον AON (**Q**) δεν διαφέρουν μεταξύ WT και *Tag-1<sup>-/-</sup>* μυών. B-E κλίμακα:75μm, F-I κλίμακα:150μm, J-K κλίμακα:150μm. Το-Pro-3 (μπλε) χρησιμοποιήθηκε για χρώση των πυρήνων.

#### **A5. Ειδικά γονίδια υποπληθυσμών του νεοφλοιού εκφράζονται στο αναπτυσσόμενο OS με συγκεκριμένο χωρικό, χρονικό και κυτταρικά ειδικό τρόπο.**

Στο τελευταίο τμήμα της μελέτης του οσφρητικού συστήματος πραγματοποιήσαμε μια ανάλυση στοιχείων από βάσεις δεδομένων έκφρασης γονιδίων στο OS. Τα γονίδια τα οποία αρχικά ψάξαμε βιβλιογραφικά ήταν ειδικά γονίδια μάρτυρες υποπληθυσμών ή στοιβάδων του νεοφλοιού. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων αυτών, στην βάση δεδομένων «Allen developing mouse brain atlas», για την έκφρασή τους στο αναπτυσσόμενο ή ενήλικο OS. Σκοπός της παραπάνω έρευνας ήταν η ανεύρεση γονιδίων του νεοφλοιού που εκφράζονται με συγκεκριμένο χρονικό, χωρικό ή κυτταρικό τρόπο εντός των δομών του OS. Πιο συγκεκριμένα, πιθανώς τα γονίδια αυτά να μας επέτρεπαν την κατηγοριοποίηση των νευρώνων του OB/OS σε συγκεκριμένους υποπληθυσμούς. Επίσης θα βοηθούσε να κατανοήσουμε καλύτερα τον μηχανισμό με τον οποίο ενσωματώνονται και σχηματίζουν τις στοιβάδες του OB. Ενώ τέλος, ενδεχομένως κάποια από αυτά τα γονίδια να εκφράζονται με ειδικό τρόπο σε κυτταρικούς πληθυσμούς ή περιοχές του OS συνεισφέροντας στην ανακάλυψη νέων ειδικών μαρτύρων για τις δομές αυτές.

Από την βιβλιογραφική αναζήτηση προέκυψαν τα γονίδια που παρουσιάζονται στον πίνακα 1 ως μοριακοί μάρτυρες του νεοφλοιού. Εν συνεχεία, έρευνα για αυτούς τους μάρτυρες πραγματοποιήθηκε στην βάση δεδομένων «Allen developing mouse brain atlas». Εκεί φιλοξενούνται δεδομένα για την έκφραση γονιδίων στο κεντρικό νευρικό σύστημα του ποντικού κατά την ανάπτυξη αλλά και την ενήλικη ζωή. Από τα 93 υποψήφια γονίδια που ανευρέθηκαν βιβλιογραφικά μόνο τα 78 υπήρχαν ως καταχωρήσεις στην συγκεκριμένη βάση δεδομένων (**Εικ.29**). Από τα 78 αυτά γονίδια μόνο 61 εκφραζόταν στην ευρύτερη περιοχή του OS. Ανατομικά οι περιοχές που ελέγξαμε την έκφραση των γονιδίων στο OS ήταν το OE, MOB, AOB και OC. Οι ηλικίες που μελετήθηκαν ήταν η E11,5, E13,5, E15,5, E18,5 και P4 για την αναπτυξιακή περίοδο καθώς και οι P28 με P56 για την ενήλικη περίοδο (**Εικ.29**). Από τα 61 αυτά γονίδια θα συζητηθούν παρακάτω αυτά που αποτελούν

χρήσιμους μάρτυρες, είτε λόγω της χρονικής περιόδου έκφρασής τους, είτε λόγω της χωρικής τους εντόπισης ή τέλος λόγω της ειδικής έκφρασης από συγκεκριμένους υποπληθυσμούς του OS. Το μόριο *Cntn6* (contactin-6/NB3) ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών όπως και η TAG-1. Η έκφρασή του εντοπίζεται στην ηλικία E15,5 στον AOB ενώ εξακολουθεί να εκφράζεται και στην ενήλικη ζωή (P56). Η έκφρασή του στην περιοχή του AOB περιορίζεται στην στοιβάδα των προβλητικών νευρώνων (MCs/TCs) καθιστώντας τον σημαντικό μάρτυρα τόσο αναπτυξιακά όσο και μετά την γέννηση για τους προβλητικούς νευρώνες του AOB. Η έκφρασή του εντοπίζεται στην ηλικία E13,5 στο OS ενώ εξακολουθεί να εκφράζεται και στην ενήλικη ζωή (P56). Εντοπίζεται συγκεκριμένα πρώιμα στις ίνες του OSN (E13,5-E15,5) και μόνο στην περιοχή του AOB και μάλιστα στην στοιβάδα των προβλητικών νευρώνων (MCs/TCs) μετά την γέννηση (P5-P56). Την ίδια περίοδο εντοπίζεται και στον AON και Ot. Το επόμενο γονίδιο είναι το *Crym* που μεταφράζεται σε μία NADP-εξαρτώμενη πρωτεΐνη πρόσδεσης θυρεοειδικής ορμόνης. Η έκφραση του αρχίζει στην ηλικία E13,5 στο OS ενώ εξακολουθεί να εκφράζεται και στην ενήλικη ζωή (P56). Εντοπίζεται συγκεκριμένα πρώιμα στις ίνες του OSN (από E13,5 έως E15,5) και μόνο σε ορισμένα MCs εντός του MOB και AOB από την ηλικία P4 –P56. Μετά την γέννηση, την ίδια περίοδο, εντοπίζεται και στον AON και Ot. Η επιλεκτική σήμανση ορισμένων MCs και όχι ολόκληρου του πληθυσμού τους, θα μπορούσε να υποδεικνύει ένα επιλεκτικό μάρτυρα συγκεκριμένου υποπληθυσμού MCs εντός του OB. Ένα άλλο γονίδιο που παρουσιάζει έκφραση μετά την γέννηση στο OS με ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά είναι το *Cux-1*. Το *Cux-1* είναι γνωστό γονίδιο που εκφράζεται στις στοιβάδες II/II και IV του νεοφλοιού. Μεταφράζεται σε πρωτεΐνη πρόσδεσης με τον DNA προάγοντας και ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων σχετικών με την διαφοροποίηση, την μορφογένεση και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Στο OS εντοπίζεται μετά την ηλικία P4 έως την P56 σε ορισμένα κύτταρα της MCL στοιβάδας του MOB και του AOB, καθιστώντας το πιθανό ειδικό μάρτυρα για υποπληθυσμούς του OB. Παρόμοια έκφραση και ενδιαφέρον παρουσιάζει και το μόριο *Dkk3* που δίνει λιγότερο έντονο σήμα αλλά εξειδικευμένα και μόνο σε μερικά MCs του MOB στην ίδια περίοδο με το *Cux-1* (P4-P56). Η συγκεκριμένη έκφραση νωρίς κατά την ανάπτυξη (E11,5-E15,5) των γονιδίων *Dlx5/6* και εντοπιζόμενα μόνο στο OE (OSN) τα κατατάσσει σε καλούς υποψήφιους μάρτυρες για αυτήν την περιοχή του OS. Τα επόμενα γονίδια ανήκουν στην οικογένεια των μορίων που περιέχουν LIM περιοχές πρόσδεσης και δρουν ως μεταγραφικοί ρυθμιστές γονιδίων που σχετίζονται με την διαφοροποίηση και ανάπτυξη του προσθίου-εγκεφάλου. Το γονίδιο *Lhx5* αυτής της οικογένειας εκφράζεται

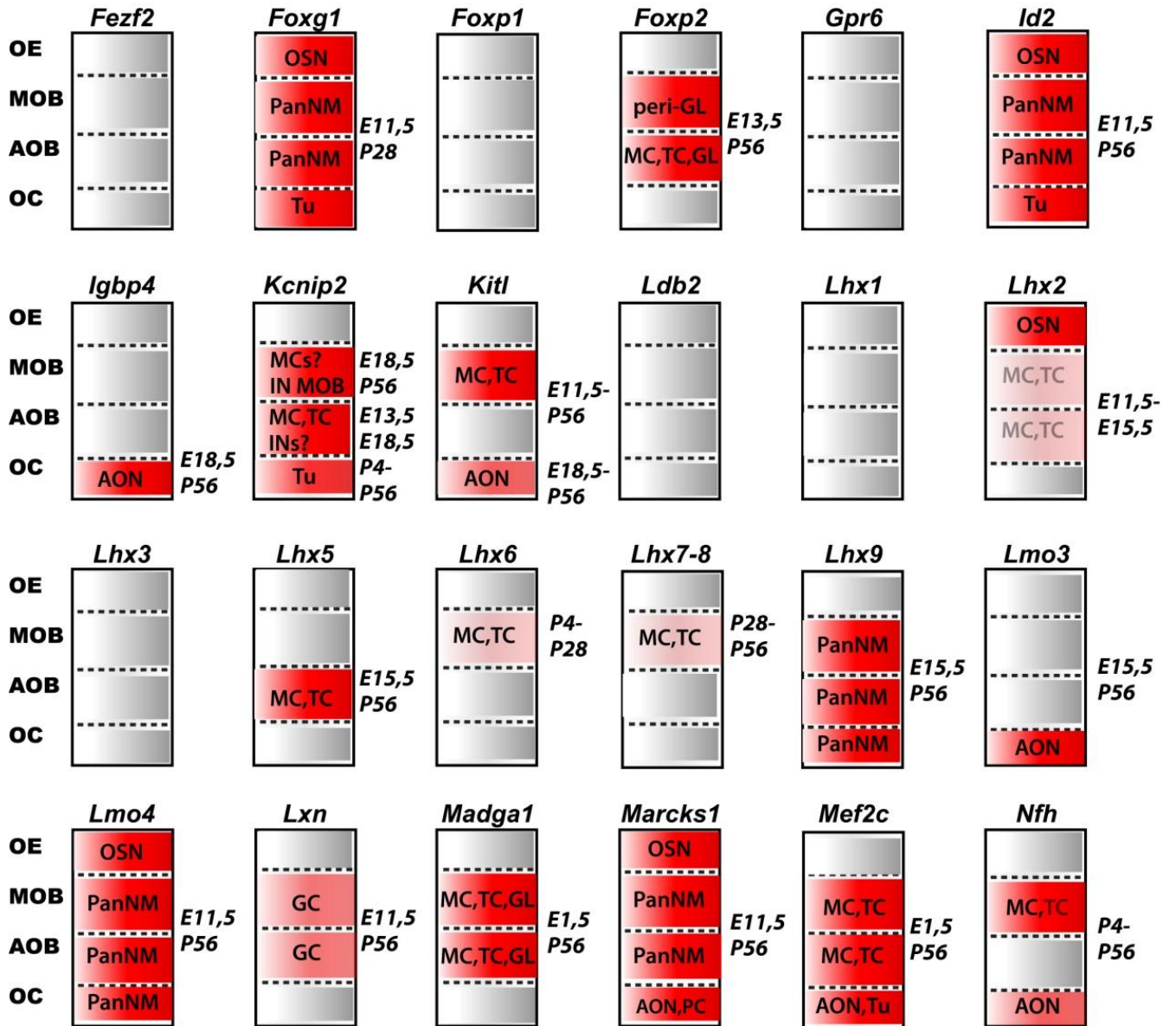


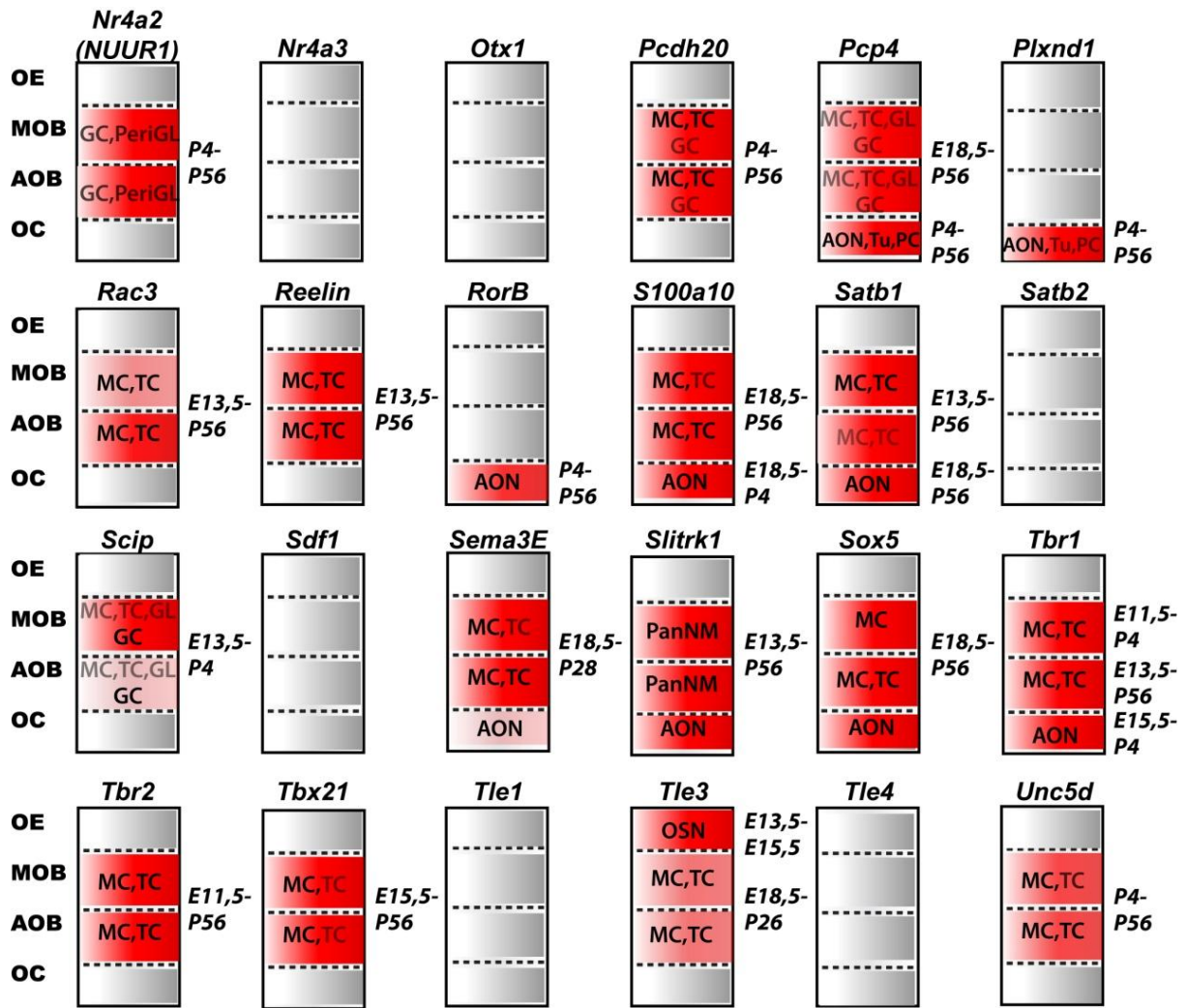
στους προβλητικούς νευρώνες του AOB από την ηλικία E15,5 έως και την ενήλικη ζωή, ενώ φαίνεται να εντοπίζεται κυρίως στον οπίσθιο AOB. Το επόμενο γονίδιο της ίδιας οικογενείας, το *Lhx6*, δίνει την εικόνα ενός όψιμου μάρτυρα των MCs του MOB αφού εκφράζεται ειδικά σε αυτόν τον κυτταρικό πληθυσμό από την ηλικία P4-P28. Ακολούθως το γονίδιο *Nfh* που κωδικοποιεί την βαριά άλυσσο των νευροϊνιδίων εκφράζεται μετά την γέννηση (P4) μόνο στα MCs του MOB ενώ αργότερα στην ενήλικη ζωή σημαίνει και ορισμένα TCs στην εξωτερική EPL. Τα χαρακτηριστικά του αυτά τον κάνουν καλό υποψήφιο ειδικό όψιμο μάρτυρα των MCs του MOB. Το γονίδιο *Lmo3* το οποίο ανήκει στην οικογένεια των ρομβοτινών (LIM domain proteins) είναι ένας από τους λίγους μάρτυρες που κατά την ανάλυση μας εμφάνισε ειδική εντόπιση στον AON του OC, από την περίοδο της ανάπτυξης (E15,5) έως την ενήλικη ζωή (P28). Αυτό τον κάνει καλό υποψήφιο μάρτυρα για τον συγκεκριμένο πυρήνα του OC από την αναπτυξιακή περίοδο έως την μεταγεννητική. Στην λίστα των ειδικών υποψήφιων μαρτύρων του OS το γονίδιο *Sox5* εντάσσεται λόγω της έκφρασής του μόνο από τα MCs του MOB και τα MCs/TCs του AOB κατά την περίοδο E18,5-P56. Στην ίδια περίοδο παρουσιάζει έκφραση και από την περιοχή του AON πιθανώς από τους άξονες των προβλητικών νευρώνων που φτάνουν στον πυρήνα. Από τους πρώιμους μάρτυρες του OS που ανέδειξε αυτή η έρευνα ήταν και το γονίδιο *Kitl*. Το συγκεκριμένο μόριο αποτελεί προσδέτη του υποδοχέα της τυροσινικής κινάσης ο οποίος σχετίζεται με δράσεις στην νευρωνική ανάπτυξη και μετανάστευση καθώς και στην αιμοποίηση. Πρώιμα εκφράζεται στην κοιλιακή και ρυγχαία περιοχή του τελεγκεφάλου που μελλοντικά θα δώσει τον OB (E11,5-E15,5). Προς το τέλος της αναπτυξιακής περιόδου (E18,5) και μέχρι την ενήλικη περίοδο παρουσιάζεται αποκλειστικά στα MCs του MOB έως την ηλικία P4. Μετά την P4 αρχίζει να εμφανίζεται και στα TCs του MOB. Λιγότερο έντονη σήμανση παρουσιάζεται και στα κύτταρα του AON μετά την γέννηση. Ένας από τους λίγους πιθανούς ειδικούς μάρτυρες για τους ενδονευρώνες του OB που στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια φαίνεται να εκφράζεται από τους προβλητικούς νευρώνες είναι ο *Kcnp2*. Από την ηλικία E13,5 έως την E18,5 παρουσιάζεται σε περιοχές που βρίσκονται οι προβλητικοί νευρώνες του MOB. Παρά την αρχική του έκφραση από τους προβλητικούς νευρώνες, μετά την ηλικία E18,5 μέχρι την ενήλικη ζωή εντοπίζεται στους περι-σπειραματικούς, τους MCL και GCL ενδονευρώνες του MOB. Έτσι αποτελεί έναν ειδικό όψιμο ενδονευρωνικό μάρτυρα του MOB. Ένας ακόμα όψιμος ειδικός μάρτυρας των ενδονευρώνων του OB που εμφανίζεται σε αντίθεση με τον προηγούμενο και στο AOB είναι ο *Nr4a2* ο οποίος εντοπίζεται στους ενδονευρώνες του OB μετά την γέννηση έως και την ενήλικη περίοδο.

Ένας ακόμη ειδικός όψιμος μάρτυρας για τα MCs του OB θα μπορούσε να είναι το *Kiaa1456* που είναι μία tRNA μεθυλ-τρανσφεράση. Μέχρι την ηλικία E15,5 δεν παρουσιάζει καμία έκφραση στο OS ενώ μετά την E18,5 αρχικά εντοπίζεται στα MCs του MOB και μετά την P4 παρουσιάζεται και στα MCs του AOB. Την ίδια περίοδο παρουσιάζει έκφραση και στον AON.

Η επιπλέον μοριακή και κυτταρική ανάλυση των παραπάνω υποψηφίων ειδικών μοριακών μαρτύρων θα μπορούσε να αναδείξει εν τέλει χρήσιμα μόρια για την ανάδειξη και μελέτη συγκεκριμένων υποπληθυσμών του OS.







		<i>C030003D03</i>					
		<i>Map1b</i>	<i>Nse</i>	<i>Rik</i>	<i>Crim1</i>	<i>Diap3</i>	<i>Dtx4</i>
<b>OE</b>							
<b>MOB</b>		Not In Database	Not In Database	Not In Database	Not In Database	Not In Database	Not In Database
<b>AOB</b>							
<b>OC</b>							
		<i>Ecpn</i>	<i>Igh-6</i>	<i>Lix1</i>	<i>Mirn189</i>	<i>Oma1</i>	<i>Rgs8</i>
<b>OE</b>							
<b>MOB</b>		Not In Database	Not In Database	Not In Database	Not In Database	Not In Database	Not In Database
<b>AOB</b>							
<b>OC</b>							
		<i>Svet1</i>	<i>Syt9</i>	<i>TcrB</i>			
<b>OE</b>							
<b>MOB</b>		Not In Database	Not In Database	Not In Database			
<b>AOB</b>							
<b>OC</b>							

**Εικ.29: Βάση δεδομένων για νευρωνικούς μάρτυρες του νεοφλοιού που εκφράζονται με ειδικό τρόπο σε νευρώνες του OS.** Η ανεύρεση βιβλιογραφικά 93 γονιδίων ειδικών μαρτύρων του νεοφλοιού αποκάλυψε 61 που εκφραζόταν στην ευρύτερη περιοχή του OS. Κάθε γονίδιο αποτελείται από μία κολόνα έκφρασης που διαχωρίζεται σε 4 τμήματα. Ορισμένα από αυτά εκφράζονται με ειδικό τρόπο σε περιοχές και κυτταρικούς πληθυσμούς του OS. Αυτά τα 4 τμήματα αποτελούν τις ανατομικές περιοχές στις οποίες ελέγξαμε την έκφραση των γονιδίων (OE, MOB, AOB και OC αριστερά των κολόνων). Οι μελετούμενες ηλικίες παρουσιάζονται δεξιά των κολόνων (E11,5, E13,5, E15,5, E18,5, P4 για την αναπτυξιακή περίοδο και P28 με P56 για την ενήλική περίοδο). Η έκφραση του γονιδίου σε κάποιο τμήμα του οσφρητικού συστήματος σημαίνεται με κόκκινο χρώμα. Το ασημί χρώμα υποδηλώνει μη παρουσία έκφρασης. Εντός κάθε τμήματος της κολόνας έκφρασης κάθε γονιδίου παρουσιάζονται με μαύρα γράμματα οι κυτταρικοί πληθυσμοί που το εκφράζουν. Η ένταση των γραμμάτων υποδηλώνει τον αριθμό των κυττάρων που παρουσιάζουν το γονίδιο εντός της συγκεκριμένης περιοχής του OS. Η ένταση του κόκκινου χρώματος υποδηλώνει την ισχύ του σήματος στον συγκεκριμένο πληθυσμό. Τα λευκές κολόνες γονιδίων χαρακτηρίζουν τα γονίδια που δεν βρέθηκαν στην βάση δεδομένων της «Allen developing mouse brain atlas». MC (mitral cells), TC (tufted cells), GC (granule cells), GL (olfactory bulb glomeruli), IN (interneurons), PanNM (panneuronal marker), AON (anterior

olfactory nucleus), PC (piriform cortex), Tu (olfactory tubercle), OSN (olfactory sensory neurons).

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ I**

Στο πρώτο μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής μελετήσαμε τον ρόλο του μορίου κυτταρικής συνάφειας TAG-1 στην ανάπτυξη και την οργάνωση του οσφρητικού συστήματος. Ολόκληρο το οσφρητικό σύστημα μελετήθηκε, από τα περιφερικά αισθητικά όργανα μέχρι τις περιοχές επεξεργασίας της οσφρητικής πληροφορίας στον οσφρητικό φλοιό. Τόσο οι ανατομικές περιοχές και οι κυτταρικοί πληθυσμοί που εκφράζουν την TAG-1 όσο και η συγκεκριμένη χρονική περίοδος της έκφρασης αναλύθηκε εκτενώς. Επιπλέον πολλές μελέτες έχουν ερευνήσει σε λεπτομέρεια την ανάπτυξη και τον τρόπο δόμησης των αξόνων των οσφρητικών αισθητικών νευρώνων (OSN, VSN) πάνω στον OB, καθώς και την δράση πολλών CAMs στην δημιουργία του ανωτέρω οσφρητικού υποδεκτικού χάρτη (ORM, olfactory receptor map)<sup>58,60,138,180</sup>. Αντιθέτως λίγα δεδομένα υπάρχουν σχετικά με την ανάπτυξη, την οργάνωση, την συναπτική ολοκλήρωση και ενσωμάτωση των προβλητικών νευρώνων (MCs, TCs) του OB στο OS. Στην παρούσα μελέτη συμβάλλαμε επιπροσθέτως στην κατανόηση του ρόλου της TAG-1 στην σωστή χωρική και χρονική τοποθέτηση συγκεκριμένων υποπληθυσμών MCs (E11,5) στο κύκλωμα του OB. Τέλος ο τρόπος με τον οποίο το κύριο και το επικουρικό οσφρητικό σύστημα (MOS, AOS) ενεργοποιούνται από πτητικά και μη-πτητικά οσφρητικά σήματα μελετήθηκε επί της απουσίας της TAG-1. Το παραπάνω συνδυάστηκε με την συμπεριφορική ανάλυση του οσφρητικού συστήματος, χρησιμοποιώντας μια πλειάδα ειδικών δοκιμασιών για το οσφρητικό και παρουσιάζοντας τον τρόπο με τον οποίο η έλλειψη της TAG-1 επηρεάζει την οσφρητική συμπεριφορά των μυών.

### **1. Η TAG-1 στο αναπτυσσόμενο οσφρητικό σύστημα εκφράζεται από υποπληθυσμό OSN/VSN, από τους προβλητικούς νευρώνες του MOB και από μικρό πληθυσμό κυττάρων του AON.**

Παλιότερες μελέτες σχετικές με την έκφραση της TAG-1 ανέφεραν ότι κατά την διάρκεια της ανάπτυξης στο OS η πρωτεΐνη αυτή εκφραζόταν από τα MCs και TCs του OB και τους άξονες τους στο LOT, ενώ μικρότερης έντασης σήμα μπορούσε να ανιχνευθεί και στο OE<sup>69,156,164</sup>. Με την χρήση του διαγονιδιακού μύδου Tag-1<sup>+/+</sup>;GFP αναλύσαμε εκτενέστερα και χωρικά και χρονικά την έκφραση της TAG-1 στο οσφρητικό σύστημα.



Διαπιστώσαμε ότι νωρίς κατά την ανάπτυξη στην φάση που οι προβλητικοί νευρώνες του MOB έχουν αρχίσει να μεταναστεύουν ακτινωτά από την VZ προς την IZ η TAG-1 παρουσιάζεται στα κυτταρικά σώματα και στους νευράξονες τους (ηλικία E12,5). Καθώς τα MCs από τις ηλικίες E13,5-E15,5 συνεχίζουν την μετανάστευσή τους προς την επιφάνεια του OB και εντός της IZ, η TAG-1 σταδιακά παρουσιάζεται κυρίως στους άξονές τους παρά στα κυτταρικά τους σώματα. Επιπλέον δείξαμε με την χρήση του πρώτου μετα-μιτωτικού μάρτυρα των προβλητικών νευρώνων του OB τον Tbr1 ότι όλα τα κύτταρα που εκφράζουν TAG-1 είναι προβλητικοί νευρώνες (GFP+/Tbr1+), αλλά όλοι οι ενδονευρώνες δεν εκφράζουν TAG-1 (ύπαρξη GFP-/Tbr1+ κυττάρων στον αναπτυσσόμενο OB, στην ηλικία E14,5). Ακολούθως η στοιβάδα MCL δημιουργείται σταδιακά από την ηλικία E15,5, ενώ ο AOB είναι πλήρως ανεπτυγμένος πλέον και διακριτός από τον MOB. Στον διακριτό ανατομικά AOB δεν παρατηρείται καμία έκφραση της TAG-1 σε καμία φάση της ανάπτυξης (από E15,5 που δημιουργείται έως και την ενήλικη ζωή). Τα παραπάνω αποτελέσματα επικυρώθηκαν και από σειρά πειραμάτων *in situ* και *fluorescence in situ* για το μόριο της TAG-1 που πραγματοποιήθηκαν από την Μαρία Σαββάκη και παρουσιάζονται σε δημοσιευμένη εργασία<sup>179</sup>.

Στο OE παρουσιάσαμε ότι η έκφραση της TAG-1 είναι αρκετά ισχυρή νωρίς κατά την ανάπτυξη (E13,5) αλλά όχι σε ολόκληρη την περιοχή του OE. Οι περιοχές που παρουσιάζουν έκφραση είναι κυρίως στο οπίσθιο και ραχιαίο τμήμα του OE νωρίς κατά την ανάπτυξη (E13,5) ενώ μέχρι την γέννηση η έκφραση έχει σιγήσει. Η παρουσία της TAG-1 εντοπίζεται στους OSN του OE (GFP+ κύτταρα), και όχι από άλλα κύτταρα όπως δείξαμε σε σχετική δημοσίευση από το εργαστήριό μας<sup>179</sup>. Οι άξονες των OSN που εκφράζουν TAG-1 παρουσιάζονται στο οπίσθιο τμήμα του ON καθώς προβάλλουν στον αναπτυσσόμενο OB από την ηλικία E15,5.

Οι VSN του VNO επίσης εκφράζουν TAG-1 στην ίδια χρονική περίοδο όπως και οι OSN του OE. Τέλος με την χρήση ειδικών μαρτύρων από έχειδει ότι μόνο οι πληθυσμοί των άωρων OSN εκφράζουν TAG-1 και μάλιστα κυρίως ο υποπληθυσμός των Mash-1+ OSN (πειράματα που πραγματοποιήθηκαν από την Μ. Σαββάκη)<sup>179</sup>.

Τέλος η ανάλυση των δομών του οσφρητικού φλοιού παρουσίασε την έκφραση της TAG-1 στους επιπολής άξονες του LOT και σε νευρώνες στο έσω τμήμα του AON. Επίσης οι άξονες πιθανώς των ανωτέρω νευρώνων του AON που χιάζονται στον πρόσθιο σύνδεσμο του εγκεφάλου (AC) παρουσιάζουν στην επιφάνειά τους TAG-1. Οι περιοχές του

οσφρητικού φύματος (Tu) και του απιοειδούς φλοιού (PC) δεν παρουσιάζουν έκφραση της TAG-1.

## **2. Η έλλειψη της TAG-1 οδηγεί σε διαταραχή του αριθμού των MCs στην στοιβάδα των μητρικών κυττάρων του MOB από την ηλικία P0. Αντιθέτως οι δομές του OE και οι υπόλοιποι πληθυσμοί του OB είναι φυσιολογικοί.**

Η μελέτη των δομών και των κυτταρικών πληθυσμών όπου παρατηρήσαμε την έκφραση της TAG-1 πραγματοποιήθηκε στα ελλειμματικά γι αυτήν ποντίκια. Παρά την έλλειψη της TAG-1 ούτε η ανατομία ούτε και ο αριθμός των OSNs και η οργάνωση των κυττάρων του OE φάνηκαν επηρεασμένοι. Αυτό φάνηκε από τα πειράματα αδρής μορφολογίας που πραγματοποιήθηκαν και περιγράφηκαν στα αποτελέσματα αλλά και από την ποσοτικοποίηση των ώριμων OSN (OMP+) στο OE που δεν παρουσίασαν καμία διαφορά μεταξύ των γονοτύπων. Επίσης όπως είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες το μόριο κυτταρικής συνάφειας OCAM εντοπίζεται στους άξονες του ON που καταλήγουν στην πλάγια και κοιλιακή περιοχή του GL στο OB και στον πρόσθιο AOB<sup>138,139</sup>. Επίσης είναι γνωστό ότι οι άξονες των OSN που εκφράζουν OCAM πάντα προβάλλουν σε σπειράματα στα οποία οι προβλητικοί νευρώνες που στέλνουν τους δένδριτες τους, δεν εκφράζουν το συγκεκριμένο μόριο<sup>190</sup>. Αντιθέτως το συγγενές μόριο NCAM εντοπίζεται σε όλους τους άξονες του ON που προβάλλουν στο σύνολο των σπειραμάτων της GL<sup>190</sup>. Η μορφή και η οργάνωση των σπειραμάτων στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώα δεν φάνηκε επηρεασμένη καθώς ούτε το μέγεθός ούτε και η διάταξή τους εντός του OB τροποποιήθηκαν (συγκεκριμένα σπειράματα MOR28, mOR-EG). Επιπλέον ο τρόπος με τον οποίο οι άξονες των OSN προβάλλουν στα σπειράματα του OB παρέμεινε ανέπαφος όπως στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ποντίκια (OCAM, NCAM). Τέλος όπως είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες το μόριο κυτταρικής συνάφειας Kirrel2 μεταφράζεται και παρουσιάζεται ποσοτικά στην GL με συγκεκριμένο τρόπο εξαρτώμενο από την δραστηριότητα των σπειραμάτων<sup>171,180</sup>. Κατά την μελέτη της δραστηριότητας των σπειραμάτων με την χρήση του Kirrel2 δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των φυσιολογικών και των *Tag-1<sup>-/-</sup>* μυών. Σε προηγούμενες μελέτες του OB είχε φανεί ότι η έλλειψη του μορίου κυτταρικής συνάφειας NCAM, που ανήκει στην ίδια οικογένεια με την TAG-1, οδηγούσε σε μικρότερου μεγέθους OB και σε σοβαρή διαταραχή στον αριθμό των ενδονευρώνων (GCs) αυτού<sup>189</sup>. Ο συγκεκριμένος πληθυσμός του OB δεν παρουσίασε καμία μεταβολή στα ποντίκια που δεν εκφράζουν TAG-1 με την χρήση του γενικού ενδονευρωνικού μάρτυρα GABA.

Ο μόνος πληθυσμός ο οποίος παρουσιάστηκε διαταραγμένος στην παρούσα μελέτη ήταν αυτός των προβλητικών νευρώνων και πιο συγκεκριμένα των MCs του MOB. Η έλλειψη της TAG-1 οδηγούσε σε μείωση της τάξεως του 28,7% στα όμοζυγα και 14,2% στα ετερόζυγα μεταλλαγμένα ποντίκια σε σχέση με τα φυσιολογικά στην ενήλικη ζωή. Αυτή η μείωση παρατηρήσαμε ότι ήταν παρούσα από την πρώτη μεταγεννητική ημέρα (P0), γεγονός που τοποθετεί την αιτία της μείωσης κατά την εμβρυϊκή περίοδο. Εντυπωσιακό είναι το ότι το ποσοστό της μείωσης φαίνεται να εξαρτάται από την δοσολογία του γονιδίου που εκφράζεται στους μεταλλαγμένους μύες. Οι προβλητικοί νευρώνες των TCs παρουσιάσαμε ότι παρέμεναν αμετάβλητοι στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώα. Παρά την μείωση στον αριθμό των MCs η ανάλυση των χαρακτηριστικών του LOT, εντός του οποίου όλοι οι άξονες των προβλητικών νευρώνων πορεύονται, δεν παρουσίασε μεταβολές στο μέγεθος, στην δεσμιδοποίηση ή την προβολή των ινών στον OC.

Τέλος η δομική και μορφολογική ανάλυση του PC, του πρωτογενούς οσφρητικού φλοιού στα τρωκτικά, δεν ανέδειξε καμία μεταβολή στους κυτταρικούς πληθυσμούς που τον δομούν, ούτε στον τρόπο που αυτοί οργανώνονται εντός του φλοιού.

### **3. Η μείωση των MCs του MOB δεν είναι αποτέλεσμα ούτε κυτταρικού θανάτου ούτε διαταραχών στον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των προγεννητικών τους κυττάρων.**

Η μείωση στον αριθμό των κύριων προβλητικών νευρώνων του MOB των MCs στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ποντίκια θα μπορούσε να οφείλεται σε διαφορετικές αιτίες κατά την διάρκεια της ανάπτυξης. Είναι γνωστό από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί στο πεδίο της νευρωνικής εκφύλισης και των σχετικών με αυτήν νόσων (π.χ. Alzheimer's disease) ότι το μόριο της TAG-1 σχετίζεται με τους μηχανισμούς απόπτωσης των νευρώνων. Σε πρόσφατες μελέτες φάνηκε ότι η TAG-1 αποτελεί ένα φυσιολογικό προσδέτη του μορίου της APP (amyloid-β precursor protein). Μέσω της πρόσδεσης της TAG-1 με το μόριο της APP προκαλείται η απελευθέρωση του ενδοκυττάριου τμήματός της (AICD, APP intracellular domain) σε μία διαδικασία εξαρτώμενη από την γ-σεκρετάση (γ-secretase). Η απελευθέρωση της AICD οδηγεί στην αλληλεπίδραση του με τον μεταγραφικό παράγοντα FE65 οδηγώντας σε ρύθμιση της νευρογένεσης στους προγονικούς νευρωνικούς πληθυσμούς<sup>191</sup>. Μέσω της ίδιας αλληλεπίδρασης TAG-1/APP σε μεταγενέστερη έρευνα παρουσιάστηκε ο ρόλος της TAG-1 στην προφύλαξη των νευρώνων από τον κυτταρικό θάνατο. Αυτό πραγματοποιείται μέσω της δράσης του μορίου της TAG-1 ως ανταγωνιστή

στην πρόσδεση του παράγοντα TGFβ2 στο μόριο της APP<sup>192</sup>. Είναι γνωστό ότι η πρόσδεση του TGFβ2 στο μόριο της APP οδηγεί σε ενεργοποίηση του μηχανισμού κυτταρικού θανάτου μέσω του μονοπατιού της Go, JNK, NADPH οξειδάσης και της caspase3<sup>193</sup>. Η δράση του μορίου της TAG-1 τόσο σε διαδικασίες ρύθμισης της νευρογένεσης, όσο και στην προστασία των νευρώνων από τον κυτταρικό θάνατο, μας οδήγησε στην διερεύνηση των παραπάνω διαδικασιών στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώα ως πιθανές αιτίες της μείωσης των MCs. Η μελέτη των προγονικών πληθυσμών των MCs και η διαφοροποίησή τους σε άωρα MCs δεν παρουσίασε διαταραχές στα ελλειμματικά για την TAG-1 ζώα, ούτε παρουσιάστηκε καμία αύξηση στα ποσοστά του κυτταρικού θανάτου κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του OB. Τα ανωτέρω απέκλιναν ως πιθανά αίτια των διαταραχών στα MCs του MOB, τον κυτταρικό θάνατο και την διαταραχή στην νευρογένεση /διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων.

**4. Μόνο οι κυτταρικοί πληθυσμοί των MCs που γεννιούνται κατά την ηλικία E11,5 και E12,5 εκφράζουν το μόριο της TAG-1, ενώ από αυτούς ο υποπληθυσμός των E11,5 MCs παρουσιάζεται μειωμένος στην αναπτυσσόμενη MCL του MOB και αυξημένος εντός του AOB στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ποντίκια.**

Είναι γνωστό ότι η πλειοψηφία των MCs του MOB γεννιούνται στην εμβρυϊκή ηλικία E11,5 με μικρότερα σταδιακά ποσοστά να προκύπτουν στις ηλικίες E10,5, E12,5, E13,5 και E9,5<sup>113,114</sup>. Στην παρούσα μελέτη για πρώτη φορά δείξαμε ότι μόνο τα MCs που γεννιούνται κατά την ηλικία E11,5 και E12,5 εκφράζουν TAG-1. Αυτό καθιστούσε τους παραπάνω υποπληθυσμούς ευάλωτους στην απουσία της TAG-1 και πιθανώς να επηρέαζε την φυσιολογική τους ανάπτυξη και ενσωμάτωση στον αναπτυσσόμενο OB. Στην παρούσα μελέτη αποδείξαμε ότι μόνο ο υποπληθυσμός των E11,5 MCs παρουσιαζόταν μειωμένος στον MOB των *Tag-1<sup>-/-</sup>* μυών οδηγώντας στην διαταραχή των προβλητικών νευρώνων που παρουσιάστηκε παραπάνω. Η ανωτέρω μείωση των E11,5 MCs στον MOB μετά την ηλικία E15,5, ακολουθούνταν πάντα από μία αντίστοιχη αύξηση στον αριθμό των E11,5 MCs εντός του AOB μόνο στα ελλειμματικά για την TAG-1 ποντίκια. Αυτό παρατηρήθηκε όταν αναλύσαμε τον αριθμό των E11,5 κυττάρων στον συνολικό όγκο του OB. Αυτό επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με την χρήση του διαγονιδιακών ζώων *Tag-1<sup>+/+</sup>;GFP* και *Tag-1<sup>-/-</sup>;GFP*. Στα τελευταία παρουσιάστηκε μια στατιστικά σημαντική αύξηση στον αριθμό των TAG-1+ (GFP+) κυττάρων εντός του AOB, στον οποίο φυσιολογικά η TAG-1 δεν εκφράζεται όπως δείξαμε στην αρχή της μελέτης μας.

Τέλος ο συνολικός αριθμός των E11,5 κυττάρων σε οπίσθιες τομές που περιέχουν τόσο AOB όσο και MOB παρουσιάζονται όμοιοι μεταξύ των γονοτύπων, υποδεικνύοντας την ύπαρξη εν τέλει μιας τροποποιημένης κατανομής των MCs στο OB των *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώων.

**5. Η μείωση των MCs του MOB στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώα είναι αποτέλεσμα ανακατανομής των E11,5 MCs, που συμβαίνει σταδιακά μετά την ηλικία E14,5, πιθανώς λόγω σφάλματος στην μετανάστευσή τους.**

Από προηγούμενες μελέτες είναι γνωστό ότι ανάλογα με την ηλικία γέννησής τους τα MCs κατηγοριοποιούνται σε πρώιμα (early born, E9,5-E10,5) σε όψιμα (late born, E12,5-E13,5) και τον ενδιάμεσο πληθυσμό των E11,5<sup>114</sup>. Κάθε υποπληθυσμός παρουσιάζει διαφορετική κατανομή εντός του MCL του MOB. Έτσι το μεγαλύτερο ποσοστό των early born MCs παρουσιάζουν, στην πλήρως αναπτυγμένη MCL, μία έσω και ραχιαία κατανομή ενώ η πλειοψηφία των late born μία έξω και κοιλιακή κατανομή. Αντιθέτως ο ενδιάμεσος πληθυσμός των E11,5 παρουσιάζουν μία ομοιόμορφη κατανομή<sup>114</sup>. Επιπλέον είναι γνωστό ότι αρχικά τα πρώιμα MCs μεταναστεύουν ακτινωτά από το σημείο γέννησής τους (VZ), προς την επιφάνεια του αρχέγονου OB (IZ) πάνω στις προεκβολές ακτινωτής γλοίας (radial glia). Στην συνέχεια αρχίζουν να μεταναστεύουν οριζόντια μέχρι να καταλάβουν την τελική τους θέση στην πρώιμη MCL<sup>68,114</sup>. Όταν έχουν καταλάβει την τελική θέση αποκτούν τελικά ξανά ακτινωτό κάθετο προσανατολισμό και καθώς ωριμάζουν τοποθετούνται στην έξω τμήμα της MCL<sup>68,125</sup>. Η οριζόντια μετανάστευση που πραγματοποιούν τα όψιμα MCs κατά την ανάπτυξη του MOB πραγματοποιείται πάνω στους άξονες των πρώιμων MCs που εκφράζουν OCAM στην επιφάνειά τους, χρησιμοποιώντας τα σαν σκαλωσιά, όπως έχει αποδειχτεί από πρόσφατη μελέτη<sup>114</sup>.

Θέλοντας να παρακολουθήσουμε και να εντοπίσουμε πώς δημιουργείται η παραπάνω τροποποίηση στην κατανομή των MCs (E11,5) στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώα κατά την διάρκεια της ανάπτυξης, παρακολουθήσαμε την κατανομή τους σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια μετά την ηλικία E14,5. Στην ηλικία E14,5 τόσο τα φυσιολογικά όσο και τα *Tag-1<sup>-/-</sup>* πειραματόζωα παρουσίαζαν μία παρόμοια κατανομή στα διαφορετικά τεταρτημόρια του OB. Η παραπάνω παρατήρησή μας αποκάλυψε ότι η αρχική ακτινωτή μετανάστευση των E11,5 MCs παρά την έλλειψη της TAG-1 πραγματοποιείται φυσιολογικά. Στα επόμενα αναπτυξιακά στάδια (E15,5-P0) σταδιακά τα E11,5 MCs θα πρέπει να αρχίσουν να μεταναστεύουν οριζόντια προς τις τελικές τους θέσεις. Ένα ποσοστό αυτών ολοένα αυξανόμενο με την πάροδο της ανάπτυξης, παραμένει σε περισσότερο ραχιαίες θέσεις του OB των *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώων. Έτσι από

τα αποτελέσματά μας μέχρι τώρα και από τα ήδη γνωστά δεδομένα από την βιβλιογραφία, η διαταραγμένη κατανομή των E11,5 MCs φαίνεται να οφείλεται σε πιθανό πρόβλημα κατά την οριζόντια μετανάστευσή τους. Η απόδειξη της παραπάνω υπόθεσης πραγματοποιήθηκε σε πρόσφατη δημοσίευση από το εργαστήριο, μας μέσω πειραμάτων οργανοτυπικών καλλιιεργειών μεταμοσχευόμενων ιστοτεμαχίων) που πραγματοποιήθηκαν από την Μαρία Σαββάκη<sup>179</sup>

Τα ανωτέρω αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τον γνωστό ρόλο της TAG-1 στην οριζόντια μετανάστευση των νευρώνων σε άλλα συστήματα όπως αυτό του εγκεφαλικού στελέχους.<sup>183,194</sup> Σε αυτές τις μελέτες το μόριο της TAG-1 συμμετέχει στην αλυσιδωτή μετανάστευση των νευρώνων μέσω σωματο-αξονικής τοποθέτησης των TAG-1+ κυττάρων κοντά σε TAG-1- άξονες. Όπως αναφέραμε και προηγουμένως τα όψιμα MCs μεταναστεύουν οριζόντια πάνω στους OCAM+ άξονες των πρώιμων MCs.<sup>114</sup> Έτσι είναι πιθανών MCs τα οποία εκφράζουν TAG-1 και στα κυτταρικά σώματα και στους άξονες τους νωρίς κατά την ανάπτυξη (E12,5-E16,5) όπως δείξαμε παραπάνω, να έρχονται σε σωματο-αξονική επαφή και συνακόλουθη οριζόντια μετανάστευση πάνω στους πρώιμους άξονες.

Πιθανά μόρια με τα οποία θα μπορούσε να η TAG-1 να αλληλεπιδράσει ετεροφιλικά κατά την παραπάνω διαδικασία είναι τόσο το μόριο της L1 όσο και αυτό της OCAM, τα οποία εκφράζονται αναπτυξιακά στους άξονες των προβλητικών νευρώνων του OB.<sup>69,190</sup>

## **6.Τα ομόζυγα και ετερόζυγα μεταλλαγμένα για την TAG-1 ποντίκια παρουσιάζουν σημαντικές διαταραχές στην οσφρητική τους ικανότητα.**

Τα ομόζυγα μεταλλαγμένα για την TAG-1 ζώα σε προηγούμενες μελέτες έχει δειχθεί ότι παρουσιάζουν σοβαρές συμπεριφορικές διαταραχές στον συντονισμό των κινήσεων, στην ισορροπία, στην μνήμη και την μάθηση<sup>168</sup>. Οι παραπάνω διαταραχές οφείλονται στην αποδιοργάνωση της εγγύς της παρακομβικής περιοχής των εμμέλων ινών λόγω της έλλειψης της TAG-1.<sup>167,169</sup> Παρόλα αυτά όταν πραγματοποιείται διάσωση της οργάνωσης της εγγύς της παρακομβικής περιοχής των εμμέλων ινών, οι ανωτέρω συμπεριφορικοί φαινότυποι αποκαθίστώνται πλήρως<sup>169</sup>. Στην συμπεριφορική ανάλυση του οσφρητικού συστήματος των μεταλλαγμένων για την TAG-1 ζώων, αυτά παρουσιάστηκαν ικανά να οσμίζονται πτητικά και μη-πτητικά μόρια στο περιβάλλον τους, όπως παρουσιάστηκε στην δοκιμασία κρυμμένης τροφής και την δοκιμασία κοινωνική αλληλεπίδρασης. Παρόλα αυτά, στις πιο αναλυτικές δοκιμασίες για την οσφρητική ικανότητα, παρουσιάστηκαν σοβαρές

διαταραχές στην μακρό-χρονη οσφρητική κοινωνική μνήμη και στην ικανότητα αναγνώρισης και διαχωρισμού οσμηρών σημάτων του περιβάλλοντος.

Είναι γνωστό ότι για την αναγνώριση του έτερου φύλου η δράση τόσο του MOS όσο και του AOS είναι απαραίτητη. Αυτό πραγματοποιείται με την αναγνώριση πτητικών και μη-πτητικών σημάτων από το σώμα και τα ούρα των ζώων.<sup>195,196</sup> Σε αυτήν την διαδικασία τα πτητικά σήματα σχετιζόμενα με το φύλο, ανιχνεύονται κυρίως από το MOS και ένα τμήμα του AOS, ενώ τα μη-πτητικά ανιχνεύονται από το AOS αποκλειστικά. Η αναγνώριση των πτητικών σημάτων από το MOS οδηγεί το ζώο προς την πηγή του οσφρητικού σήματος. Τότε μέσω άμεσης επαφής με τις μη-πτητικές χημικές ουσίες, το AOS ενεργοποιείται προκαλώντας την έναρξη συγκεκριμένων συμπεριφορικών και νευροενδοκρινικών αποκρίσεων<sup>195,197,198</sup> Στην δοκιμασία ευαισθητοποίησης /απευαισθητοποίησης οσφρητικού ερεθίσματος (habituation/dishabituation test, HDT) παρουσιάσαμε δεδομένα που συνιστούν ανικανότητα των ελλειμματικών για την TAG-1 ποντικών να διαχωρίσουν και να αναγνωρίσουν ορθά πτητικά οσφρητικά ερεθίσματα (PB,2MB,κοινωνικό οσφρητικό σήμα θηλυκού). Στο οσφρητικό ερέθισμα από ούρα θηλυκού ζώου αναπαραγωγικής ηλικίας, η απόδοση των *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώων ήταν καλύτερη αλλά σημαντικά διαταραγμένη σε σχέση με τα φυσιολογικά. Αυτό παρατηρούνταν κυρίως στις περιπτώσεις που τα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ποντίκια έρχονταν σε άμεση επαφή με την πηγή του ερεθίσματος. Τα παραπάνω αποτελέσματα συνηγορούν υπέρ του ότι το AOS παρουσιάζεται λειτουργικά σχετικά ανεπηρέαστο, σε αντίθεση με το MOS του οποίου οι διαταραχές καθιστούν τα ζώα δυσλειτουργικά στην ορθή αναγνώριση οσφρητικών πληροφοριών. Τα *Tag-1<sup>+/-</sup>* ποντίκια σε όλα τα οσφρητικά ερεθίσματα ανταποκρίνονταν καλύτερα από τα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ποντίκια αλλά και πάλι με διαταραγμένη οσφρητική απόδοση σε σχέση με τα φυσιολογικά ζώα. Η παραπάνω παρατήρηση συνηγορεί υπέρ της συμμετοχής της δοσολογίας του γονιδίου στο μοριακό αλλά και κυτταρικό φαινότυπο που έχουμε εντοπίσει μέχρι τώρα.

Επιπλέον η δοκιμασία SIT μας έδειξε ότι τα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ποντίκια είναι σε θέση να εντοπίζουν και να διερευνούν κοινωνικά ερεθίσματα και να αναπτύξουν φυσιολογικά βραχυπρόθεσμη κοινωνική μνήμη. Παρόλα αυτά, παρουσιάζουν σημαντικές διαταραχές στην μακροπρόθεσμη κοινωνική μνήμη. Αυτές οι διαταραχές μπορεί να αποδοθούν τόσο σε πιθανά προβλήματα στην περιοχή του ιπποκάμπου, στην ευρύτερη διαταραχή στην οργάνωση της μυελίνης, όσο και στα οσφρητικά ελαττώματα που έχουμε παρατηρήσει στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώα. Από παλαιότερα δεδομένα είναι γνωστό ότι στα *Tag-<sup>+/-</sup>* ποντίκια οι εμμύελες ίνες δεν παρουσιάζονται επηρεασμένες στον ιππόκαμπο αλλά ούτε και σε άλλες περιοχές

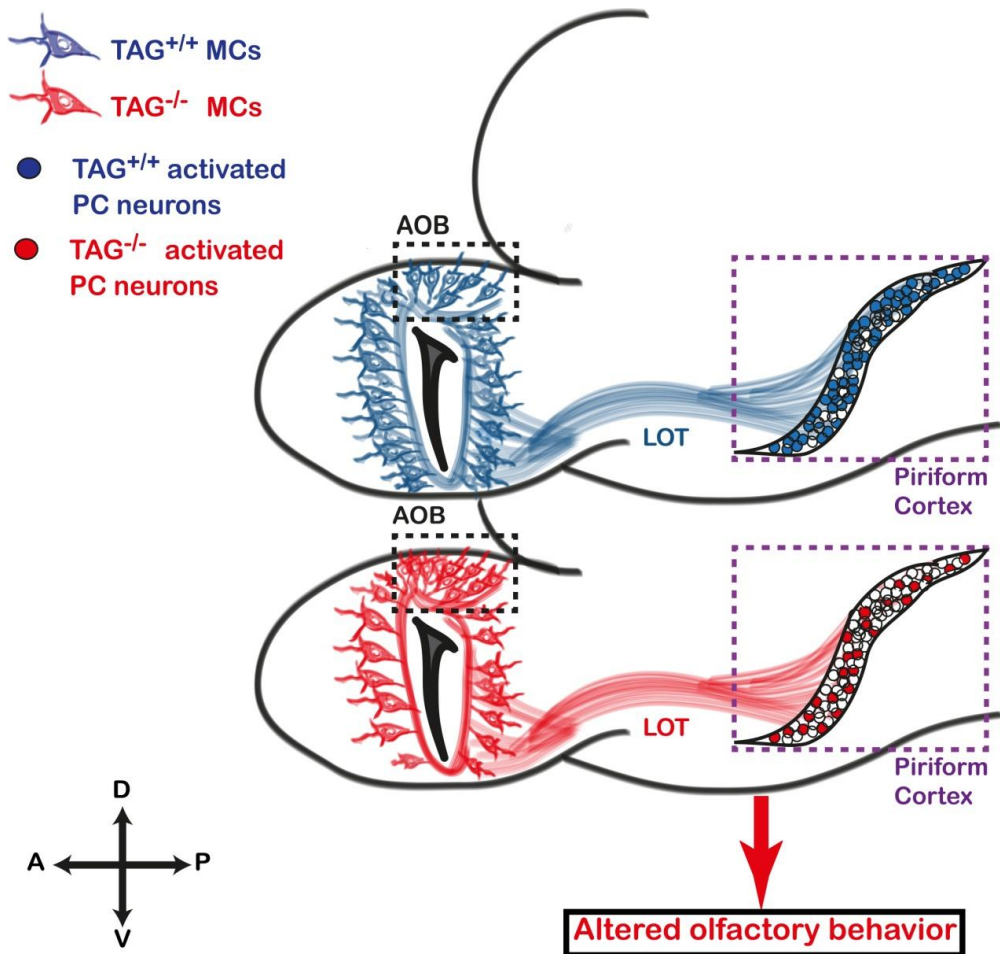


του εγκεφάλου<sup>168</sup>. Παρόλα αυτά η μακροπρόθεσμη κοινωνική μνήμη τους και η οσφρητική συμπεριφορά τους παρουσιάζεται επηρεασμένη σε σχέση με τους WT μύες. Τα ανωτέρω ενισχύουν την θεωρία μας ότι κυρίως οι διαταραχές του οσφρητικού συστήματος είναι αυτές που συνεισφέρουν στον παραπάνω φαινότυπο. Τέλος είναι γνωστό από πρόσφατη μελέτη<sup>199</sup> ότι η μακροπρόθεσμη κοινωνική αναγνώριση στα ποντίκια περιλαμβάνει την νευρωνική ενεργοποίηση τόσο του MOB όσο και του AOB, σε αντίθεση με τους αρουραίους, όπου ο AOB είναι αυτός που κυρίως ενεργοποιείται. Επιπλέον, έχει δειχθεί στην ίδια μελέτη ότι τα μη-πτητικό κλάσματα (που λαμβάνονται από AOS) είναι επαρκή για τον σχηματισμό της βραχυπρόθεσμης κοινωνικής μνήμης, ενώ στην περίπτωση του σχηματισμού της μακροπρόθεσμης κοινωνικής μνήμης, τόσο τα πτητικά και μη-πτητικά κλάσματα και από τα δύο τμήματα του OS είναι απαραίτητα.

### **7.0 συμπεριφορικός φαινότυπος των *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώων είναι αποτέλεσμα διαταραγμένης νευρωνικής ενεργοποίησης στον MOB και του PC από τα οσμηρά σήματα του περιβάλλοντος.**

Η παρατήρηση του τρόπου με τον οποίο πραγματοποιείται η νευρωνική ενεργοποίηση του MOS και του AOS στα ελλειμματικά για την TAG-1 ποντίκια, μας έδειξε ότι η διαταραχή στην κατανομή των MCs εντός του OB μεταφράζεται και σε διαταραγμένη λειτουργία στον OC. Πιο αναλυτικά, διεγείραμε πάντα με το ίδιο οσφρητικό ερέθισμα επιλεκτικά είτε το MOS, είτε το AOS των WT και των *Tag-1<sup>-/-</sup>* μυών. Παρατηρήσαμε ότι όταν διεγείραμε το MOS η νευρωνική ενεργοποίηση τόσο του MOB όσο και του πρωτογενούς οσφρητικού φλοιού (PC) ήταν διαταραγμένη στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώα. Αντιθέτως η περιοχή του OE δεν παρουσίαζε διαταραχές στην ενεργοποίησή της. Τα παραπάνω συμβαδίζουν απόλυτα με τα δεδομένα μας όπου το OE ήταν ακέραιο στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώα, ενώ η μείωση στον πληθυσμό των E11,5 MCs στο MOB που είχαμε παρατηρήσει ερχόταν σε συμφωνία με την μειωμένη ενεργοποίηση των MCs του MOB. Παρότι ανατομικά και κυτταρικά ο PC δεν παρουσίαζε διαφορές μεταξύ των γονοτύπων όπως είχαμε δείξει, η ενεργοποίηση του παρουσιαζόταν μειωμένη, ως αποτέλεσμα των γνωστών ελλειμμάτων στα MCs του MOB που προβάλλουν κατά πλειοψηφία σε αυτόν. Η ενεργοποίηση του AOS (AOB) δεν παρουσίασε καμία μεταβολή μεταξύ WT και *Tag-1<sup>-/-</sup>* μυών, αποδεικνύοντας ότι τα εσφαλμένως ευρισκόμενα E11,5 MCs εντός του AOB στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώα δεν επηρέαζαν την λειτουργικότητα του AOB. Συνοψίζοντας τα παραπάνω δεδομένα θα μπορούσαμε να πούμε ότι η έλλειψη της TAG-1 οδηγεί στην εσφαλμένη μετανάστευση και κατανομή των μείωση των MCs που γεννιούνται

στην ηλικία E11,5. Ακολούθως ο αριθμός των MCs του MOB στα ελλειμματικά για την TAG-1 ζώα είναι μειωμένος περίπου κατά 28%. Λόγο τις απουσίας των παραπάνω MCs από τις φυσιολογικές τους θέσεις εντός στην MCL οι πληροφορίες από τα αντίστοιχα σπειράματα του MOB δεν καταλήγουν στην ενεργοποίηση των συζευγμένων με αυτά MCs. Κατά αυτόν τον τρόπο η μείωση οδηγεί και σε μειωμένη νευρωνική ενεργοποίηση των MCs του MOB και εν συνεχεία σε μειωμένη ενεργοποίηση του PC στον οποίο η πλειοψηφία των MCs προβάλλει. Τελικά η διαταραχή αυτή στην ενεργοποίηση του πρωτοταγούς οσφρητικού φλοιού οδηγεί και σε διαταραχές στην οσφρητική λειτουργία των μεταλλαγμένων για την TAG-1 μυών (**Εικ.30**) Η παραπάνω υπόθεση ενισχύεται από προηγούμενες μελέτες που έχουν δείξει ότι ακόμα και μία μικρή αλλαγή στον πληθυσμό των MCs μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικό επίδραση της λειτουργίας του OB<sup>200</sup>. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας του ότι το 1/3 του πληθυσμού των MCs και των TCs βρίσκονται σε χαμηλή βασική δραστηριότητα γνωστή και ως «κατάσταση σίγησης» (silent state). Αυτοί οι προβλητικοί νευρώνες σε αντίθεση με τους υψηλής ενεργότητας (highly active) προβλητικούς νευρώνες του OB μπορούν ταχέως να ανταποκριθούν σε ένα οσφρητικό ερέθισμα<sup>200</sup>. Έτσι μια μικρή μείωση της τάξεως του 28% στον υποπληθυσμό των MCs που γεννήθηκαν στην ηλικία E11,5, που κατανέμονται ομοιόμορφα σε ολόκληρο τον OB, είναι ικανό να προκαλέσει σοβαρές διαταραχές στην αναγνώριση και τον διαχωρισμό των οσφρητικών ερεθισμάτων.



**Εικ.30: Μοντέλο οργάνωσης και λειτουργίας οσφρητικού συστήματος σε φυσιολογικούς και *Tag-1<sup>-/-</sup>* μύες.** Στο παρόν σχήμα συνοψίζονται τα αποτελέσματα της μελέτης που παρατηρούνται στο OS, λόγω της έλλειψης της TAG-1. Τα MCs του MOB παρουσιάζονται μειωμένα και έτσι καθώς λιγότερα από αυτά ενεργοποιούνται, μειώνεται και ο πληθυσμός των νευρώνων του PC που δραστηριοποιούνται. Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν σε αλλοιώσεις στην οσφρητική ικανότητα των *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώων. Με **μπλε** χρώμα παρουσιάζονται οι δομές του WT ενώ με **κόκκινο** του *Tag-1<sup>-/-</sup>* OS.

**8.Δημιουργία βάσης δεδομένων για την έκφραση ειδικών μαρτύρων του νεοφλοιού, σε υποπληθυσμού και υποπεριοχές του OS.**

Όπως και στον αναπτυσσόμενο νεοφλοιό έτσι και στον OS ,κάποια γονίδια πιθανώς αποτελούν ειδικούς μάρτυρες υποπληθυσμών και ανατομικών περιοχών του. Η μελέτη των χωρικών, χρονικών και ανατομικών χαρακτηριστικών των ανωτέρω μαρτύρων, αποκάλυψε γονίδια που αποτελούν ισχυρούς υποψήφιους ειδικούς μάρτυρες κυτταρικών

υποπληθυσμών του OS. Η μοριακή επιβεβαίωση των ανωτέρω δεδομένων με κυτταρικές και μοριακές τεχνικές θα αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο στην μελέτη του OS. Έτσι τελικά θα μπορούμε να έχουμε στην ερευνητική μας φαρέτρα μάρτυρες που θα μπορούν να βοηθήσουν εκτενέστερη μελέτη της ανάπτυξης και της οργάνωσης του OS και των κυκλωμάτων αυτού.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα του πρώτου μέρους της παρούσας διδακτορικής διατριβής παρουσιάσαμε ότι:

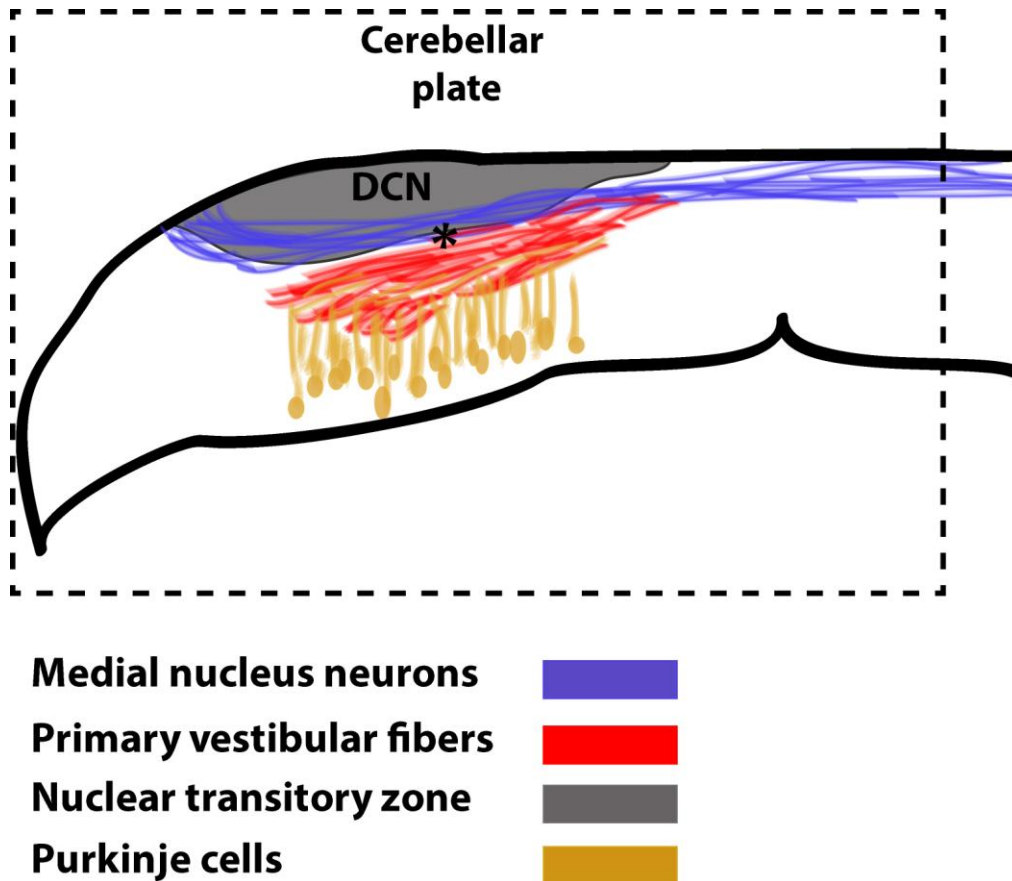
- Η TAG-1 εκφράζεται από τους υποδεκτικούς αισθητικούς νευρώνες τόσο του OE όσο και του VNO κατά την ανάπτυξη. Επίσης εκφράζεται από τα MCs και τα TCs όπως και από τους άξονες τους (LOT) κατά την ανάπτυξη. Από τα MCs μόνο οι υποπληθυσμοί που γεννιούνται κατά την περίοδο E11,5 και E12,5 εκφράζουν TAG-1.
- Ο αριθμός των MCs στο MOB των *Tag-1<sup>-/-</sup>* και *Tag-1<sup>+/-</sup>* ζώων είναι μειωμένος κατά 28% και 14% αντίστοιχα στα ενήλικα ζώα, δείχνοντας ένα χαρακτήρα δοσο-εξαρτώμενης μείωσης ανάλογα με την ποσότητα του γονιδίου της TAG-1. Η αιτία της μείωσης παρουσιάζεται κατά την ανάπτυξη.
- Ο υποπληθυσμός των E11,5 MCs είναι αυτός που παρουσιάζεται μειωμένος στον MOB στα ελλειμματικά για την TAG-1 ζώα, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται μία αύξηση των E11,5 νευρώνων εντός του AOB. Αυτό υποδεικνύει ότι η αιτία της μείωσης είναι λόγω διαταραχής στην κατανομή των E11,5 MCs εντός του OB.
- Η κατανομή των E11,5 MCs κατά την ανάπτυξη μετά την ηλικία E15,5 όπου αυτά σταδιακά αρχίζουν να μεταναστεύουν οριζόντια προς τις τελικές τους θέσεις παρουσιάζει ένα εντοπισμό στις ραχιαίες περιοχές του OB στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώα. Αυτό αποτελεί ισχυρό στοιχείο υπέρ του πιθανού προβλήματος στην οριζόντια μετανάστευση αυτών των κυττάρων, λόγω της έλλειψης της TAG-1.
- Τα *Tag-1<sup>-/-</sup>* και *Tag-1<sup>+/-</sup>* ποντίκια παρουσιάζουν διαταραχές στην μακρόχρονη κοινωνική μνήμη, όπως και στην ορθή αναγνώριση και τον διαχωρισμό οσφρητικών ερεθισμάτων.
- Ο παραπάνω συμπεριφορικός φαινότυπος στα *Tag-1<sup>-/-</sup>* ζώα είναι αποτέλεσμα μειωμένης νευρωνικής δραστηριότητας στον MOB και ακολούθως στον πρωταταγή οσφρητικό φλοιό (PC).

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ II**

### **B. Στατικό-ακουστικό σύστημα/παρεγκεφαλίδα**

#### **B1.Χαρακτηρισμός της οργάνωσης και δομής της ενδιάμεσης ινώδους στοιβάδας (IFL) στην αναπτυσσόμενη παρεγκεφαλίδα του ποντικού.**

Η πλειοψηφία των μελετών που σχετίζονται με τους πρωτοταγής αιθουσαίες νευρικές ίνες (primary vestibular fibers ,PVF) ,τους αιθουσαίους πυρήνες και την παρεγκεφαλίδα έχουν πραγματοποιηθεί στον αρουραίο. Γι αυτόν τον λόγο αρχικά προσπαθήσαμε να χαρακτηρίσουμε την οργάνωση και την ανάπτυξη των παραπάνω δομών στον ποντικό και να επιβεβαιώσουμε λεπτομερώς την χρονική και χωρική τους εξέλιξη. Μεταξύ των ηλικιών E12.5 και E13.5 η IFL (**Εικ.1Α\***) χωρίζει τους πληθυσμούς των εν τω βάθει παρεγκεφαλιδικών πυρήνων (deep cerebellar nuclei, DCN) και των Purkinje cells (PC) νευρώνων. Κατά την διάρκεια της ανωτέρω περιόδου οι νευρώνες των DCN παρουσιάζονται ήδη εντός της «πυρηνικής μεταβατικής ζώνης" (**NTZ, Nuclear transition zone, Εικ.1Α,Γκρί**) επιφανειακά και ραχιαία στην αναπτυσσόμενη παρεγκεφαλίδα ενώ οι χιαζόμενοι άξονες του μέσου πυρήνα (MCN) και τα κύτταρα του βρίσκονται πιο εν τω βάθει.



**Εικ.1A:** Σχηματική απεικόνιση τις αναπτυσσόμενης παρεγκεφαλίδας σε στεφανιαία τομή (εντός σπικτού πλαισίου). Απεικονίζονται οι ίνες που δομούν την ενδιάμεση ινώδη στοιβάδα (IFL,\*),καθώς και οι πληθυσμοί των DCN (γκρί) και των PCs (πορτοκαλί) νευρώνων.

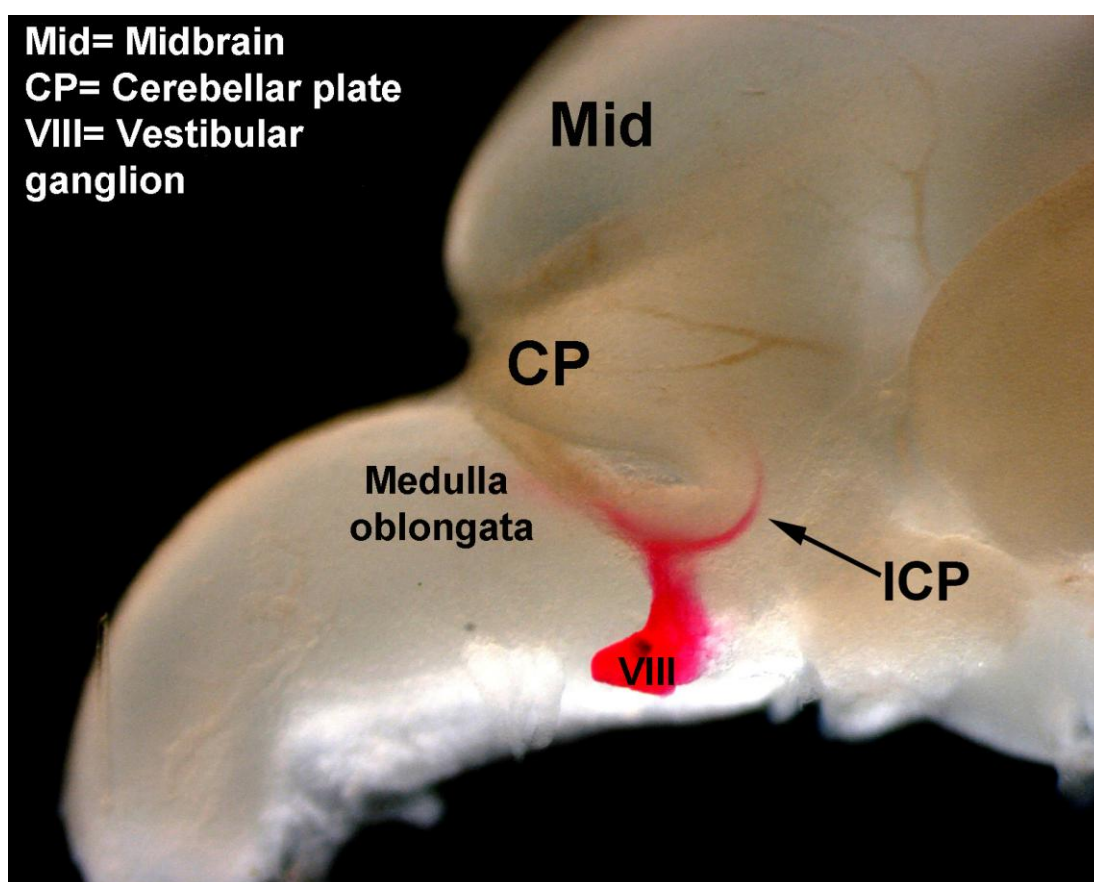
Οι πλειοψηφία των αξόνων των DCN, εξέρχονται διαμέσου του ανώτερου παρεγκεφαλιδικού σκέλους (ACP)<sup>201</sup>. Τα κύτταρα Purkinje (PCs) σε αυτήν την περίοδο (E11,5-E12,5) βρίσκονται κάτωθεν του στην κοιλιακή περιοχή της παρεγκεφαλίδας και διαχωρίζονται μέσω του IFL από τους τελικούς τους στόχους (DCN). Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση της παρεγκεφαλίδας σε αυτήν την φάση αναδεικνύει ότι η IFL αποτελείται από 3 ομάδες αξόνων:

α)Τους χιαζόμενους άξονες του MCN που μέσω της αγκιστρωτής δεσμίδας εξέρχονται από το ACP (**Εικ.1A μπλέ,Εικ.2A Calretinin+**).

β)Τους PVF που από την ηλικία E11,5 βρίσκονται στο χείλος της παρεγκεφαλιδικής πλάκας (CP) στην οποία εισέρχονται μία μέρα μετά (**Εικ2C**). Κατά την ηλικία E13,5 αποτελούν την πλειοψηφία των αξόνων εντός του IFL (**Εικ.2B**). Οι οριζόντια διατεταγμένες

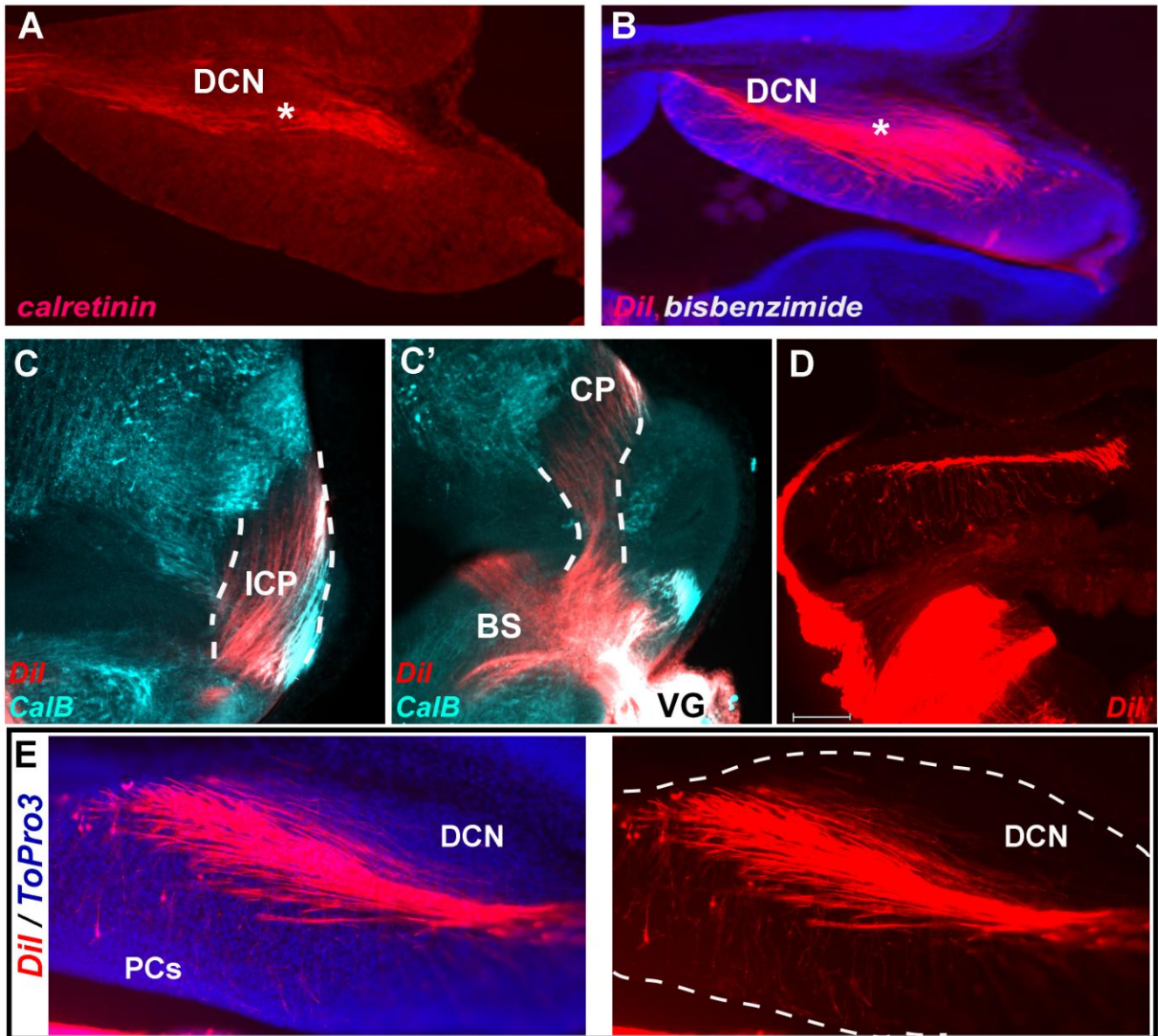
δεσμίδες ινών των PVF (στο στεφανιαίο επίπεδο) παρουσιάζουν κάθετες μονήρεις αξονικές προσεκβολές προς την κοιλιακή περιοχή της παρεγκεφαλίδας όπου εδρεύουν τα πρώιμα PCs **Εικ.2D,E image zoom radial PVF**).

γ) Οι νευράξονες των πρώιμων PCs αποτελούν την τελευταία ομάδα ινών του IFL (**Εικ.1A, κίτρινο**). Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως από την ηλικία E12,5 τα PCs<sup>32</sup> που μεταναστεύουν από την VZ προς την PP, επιμηκύνουν τους νευράξονές τους. Τα καθοδηγητικά άκρα των νευραξόνων των Calbindin+ (CalB) PCs βρίσκονται εντός της IFL ήδη στην εμβρυϊκή ημέρα E13,5 (**Εικ.3A,**).



**Εικ.1B:** Απεικόνιση εμβρυϊκού εγκεφάλου ποντικού ηλικία E13,5 όπου κρύσταλλος Dil έχει τοποθετηθεί στο vestibular ganglion(VIII). Παρουσιάζεται η πορεία των PVF μέσω του ICP εντός της αναπτυσσόμενης CP. Οι υπόλοιποι άξονες πορεύονται εντός του εγκεφαλικού στελέχους στις περιοχές των αισθησίων πυρήνων (Vestibular nuclei, VN).



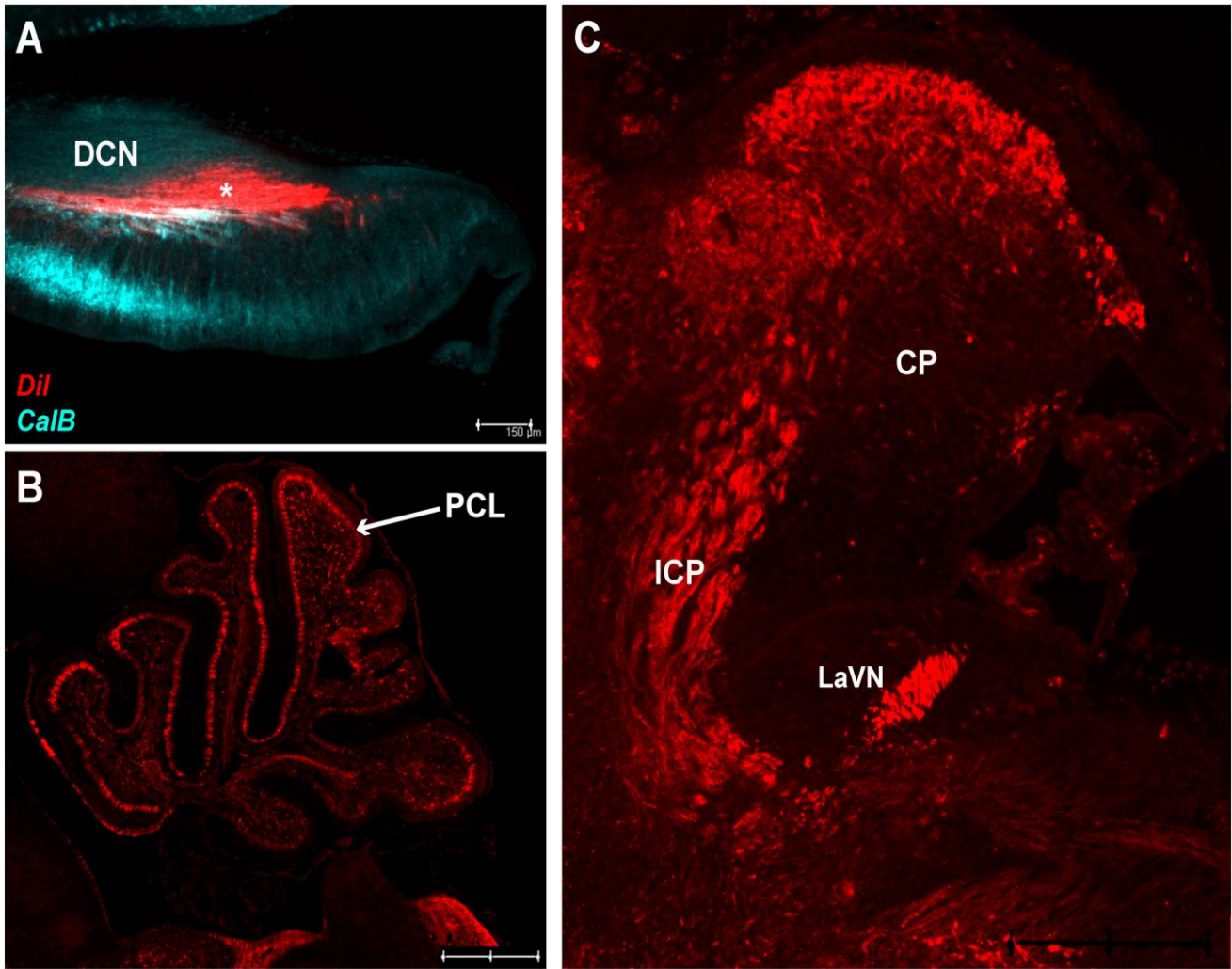


**Εικ.2:Οργάνωση IFL και PVF αναπτυσσόμενη παρεγκεφαλίδα.(A)** Ανοσοϊστοχημεία με χρήση του μάρτυρα Calretinin που παρουσιάζει τους χιαζόμενους άξονες του MCN εντός του IFL σε ηλικία E14,5.**(B)** Ανοσοφθορισμός σε τομές παρεγκεφαλίδας E13,5 όπου κρύσταλλος Dil (κόκκινο) έχει τοποθετηθεί στο VG και έχουν σημειωθεί οι PVF εντός του IFL(\*)**(B)**, οι πυρήνες έχουν σημειωθεί με bizbenzimidide (μπλε). Σε παρόμοια πειράματα με τα παραπάνω έχει πραγματοποιηθεί ανοσοϊστοχημεία σε τομές ζώων όπου είχε τοποθετηθεί Dil στο VG.Ο μάρτυρας CalB εμφανίζεται κυανός στους ολίγους PCs άξονες που εξέρχονται από το ICP (περιοχή εντός διακεκομμένων γραμμών) στην ηλικία E13,5 **(C)**. Στην ίδια περιοχή οι PVF (Dil+,κόκκινο) παρουσιάζονται να ανέρχονται εντός του ICP στις πρόσθιες τομές καθώς εξέρχονται του VG **(C)**. Οι PVF παρουσιάζονται εντός της αναπτυσσόμενης παρεγκεφαλίδας

σε δεσμίδες στην επόμενη οπίσθια τομή από το C ενώ ολίγοι CalB+ άξονες συνεντοπίζονται μαζί τους (λευκό, ραχιαία Dil δεσμίδων) **(C')**. **(D)** Dil πειράματα ανοσοφθορισμού όπως παραπάνω σε τομές παρεγκεφαλίδας όπου παρατηρούνται οι μονήρεις PVF άξονες που καταδύονται κάθετα προς την κοιλιακή περιοχή που βρίσκονται τα PCs. Όμοιες εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο σε ανοσοϊστοχημικά πειράματα τομών ηλικίας E15,5 σε μεγέθυνση με χρήση Τοπο3 για τους πυρήνες **(E)**. Τα όρια της παρεγκεφαλίδας παρουσιάζονται εντός των διακεκομμένων γραμμών στο κόκκινο κανάλι **(E δεξιά)**. CP: Cerebellar plate, VG: Vestibular ganglion, BS: Brain stem, DCN: Deep cerebellar nuclei, ICP: inferior cerebellar peduncle, PCs: Purkinje cells

Μετά την ηλικία E13,5 είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες ότι από την ραχιαία περιοχή του προμήκους μυελού και πιο συγκεκριμένα από τον πυρήνα της ελαίας, δεσμίδες νευρικών ινών προβάλλουν προς το κάτω παρεγκεφαλιδικό σκέλος σχηματίζοντας το restiform body (ICP). Σε εκείνη την φάση και για περίοδο 24 ωρών οι άξονες σταματούν πριν την είσοδό τους εντός της CP από όπου εισέρχονται από το πρόσθιο τμήμα του<sup>202</sup>. Τα παραπάνω δεδομένα εν κατακλείδι συνηγορούν υπέρ του ότι η πρώιμη IFL δομείται από τους PVF, τους άξονες των CalB+ PCs και τους χιαζόμενους MCN άξονες στον ποντικό **(Εικ1B)**.

Τέλος είναι γνωστό ότι οι DCN δεν είναι οι αποκλειστικοί στόχοι των PCs αλλά ένα ποσοστό τους προβάλλει άμεσα προς τους αιθουσαίους πυρήνες του εγκεφαλικού στελέχους<sup>203,204</sup>. Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης η Calbindin (CalB), ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος μάρτυρας των PCs στην ενήλικη ζωή, εκφράζεται σε έναν υποπληθυσμό PCs. Μετά την δημιουργία της πλάκας των PC (PP) τα PCs διατάσσονται σε ομάδες CalB+ κυττάρων εναλλασσόμενες με ομάδες CaBP- PCs **(Εικ.3B)**<sup>205</sup>. Ένα υποσύνολο των CalB+ αξόνων προβάλλει εκτός της παρεγκεφαλιδικής πλάκας (CC) μέσα από το (ICP) και καταλήγει σε ορισμένες περιοχές των αιθουσαίων πυρήνων του εγκεφαλικού στελέχους αργότερα κατά την ανάπτυξη **(Εικ.2C E13,5,Εικ.3C E15,5)**. Οι άξονες αυτοί φαίνεται να ακολουθούν πορεία αντίστοιχη με τους PVF καθώς οδεύουν προς την έξοδο τους από το ICP **(Εικ.2C,C')**.



**Εικ.3:** Οι άξονες των CalB+ PCs προβάλλουν κάθετα τους άξονες τους εντός του IFL όπου οδεύουν παράλληλα με τα PVF. Εξερχόμενοι από το ICP τελικά νευρώνουν περιοχές των VN. **(A)** Ανοσοϊστοχημικά πειράματα σε τομές ζώων όπου είχε τοποθετηθεί Dil κρύσταλλος στο VG. Στην στεφανιαία αυτή τομή της παρεγκεφαλίδας E13,5 παρουσιάζονται οι άξονες των CalB+ (Κυανό) PCs καθώς ανέρχονται προς το IFL (\*). Εκεί οι PVF (κόκκινο, Dil) αποτελούν την πλειοψηφία των αξόνων στην παρούσα φάση και συμπορεύονται με τους Calb+ άξονες. Στην παρεγκεφαλίδα τα PCs μπορούν να χωριστούν στα CalB+ και στα CalB- όπως φαίνεται στο PCL σε οβελιαία τομή παρεγκεφαλίδας σε ηλικία P5 **(C)** Ανοσοϊστοχημεία με μάρτυρα την CalB (κόκκινο) όπως και προηγουμένως, σε ηλικία E15,5 σε οβελιαία τομή παρεγκεφαλίδας. Οι CalB+ PCs άξονες παρουσιάζονται καθώς εξέρχονται διαμέσου του ICP από την CP και τελικά εντοπίζονται στον LaVN του εγκεφαλικού στελέχους. PCL: Purkinje cells layer, CP: Cerebellar plate, ICP: inferior cerebellar peduncle, LaVN: Lateral vestibular nucleus, DCN: Deep cerebellar nuclei. Κλίμακα 150μm A, 300μm B, C.

## **B2.Οι νευρικές ίνες των Calbindin+ PCs δεσμιδοποιούνται μαζί με τις ίνες των PVFs κατά την ανάπτυξη.**

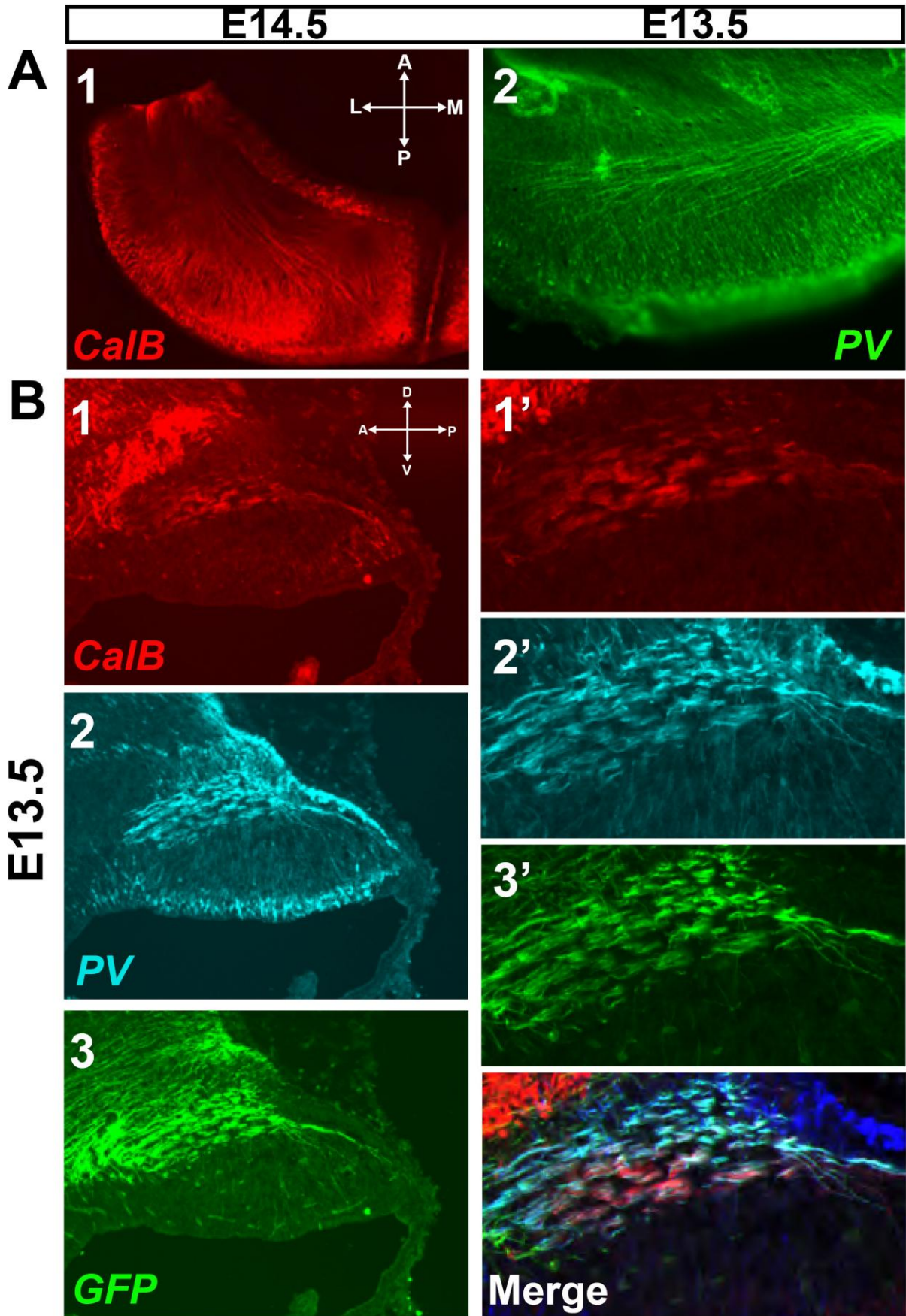
Με την χρήση ανοσοϊστοχημικών μεθόδων για τον μάρτυρα των PCs CalB προσπαθήσαμε να συλλέξουμε πληροφορίες σχετικές με την οργάνωση των PCs αξόνων της παρεγκεφαλίδικής πλάκας (CP). Νωρίς κατά την ανάπτυξη στην ηλικία E13,5 η πλειοψηφία των CalB+ PCs εντοπίζεται έσω από την VZ όπως δείξαμε προηγουμένως (**Εικ.3A**). Στην ηλικία E14.5 παρατηρώντας την προβολή και οργάνωση των CalB+ αξόνων (**Εικ.4A,B1,red**) είδαμε ότι σε αυτό το στάδιο ένα μεγάλο ποσοστό του CalB+ PC είναι ακόμα κοντά στην VZ της παρεγκεφαλίδας αλλά πιο συγκεκριμένα στο ουραίο άκρο της CP. Οι CalB + νευράξονες διατάσσονται σε μικρές οριζόντιες δεσμίδες εντός της αναπτυσσόμενης παρεγκεφαλίδας (**Εικ.4B1,B1'**). Καθώς οδεύουμε σε πιο πρόσθιες ανατομικά περιοχές της παρεγκεφαλίδας οι δεσμίδες αυτές αποκτούν μία πορεία πιο κάθετη, που ακολουθεί την έξοδο προς το ICP (**Εικ.5A1**). Η παραπάνω οργάνωση των CalB+ PCs αξόνων ομοιάζει με την οργάνωση των PVF όπως αυτή μελετήθηκε μέσω τοποθέτησης Dil κρυστάλλου στο αιθουσαίο Γαγγλίο (**Εικ.2B-D**) και παρουσιάστηκε παραπάνω. Καθώς η χρώση από τον Dil κρύσταλλο σημαίνει τους άξονες που προβάλλουν εκτός του VIII γαγγλίου, σημαίνει και τους PVF που εκπορεύονται από αυτό.

Λόγω της παραπάνω παρατήρησης όπου οι δύο διαφορετικές δεσμίδες νευρικών ινών ακολουθούν όμοια πορεία, η σχέση μεταξύ των δεσμίδων των CalB+ PCs και των PVF εξετάστηκε λεπτομερέστερα σε μία σειρά πειραμάτων με ειδικούς μοριακούς μάρτυρες. Η Παρβαλβουμίνη (parvalbumin, PV) έχει δειχθεί ότι αποτελεί έναν ειδικό μάρτυρα των PVF σε έμβρυα και νεογέννητα αρουραίων όχι όμως και στον ποντικό<sup>37</sup>. Σε έμβρυα ποντικού, ιδιαίτερα στα πρώιμα στάδια, διαφορετικοί κυτταρικοί πληθυσμοί της παρεγκεφαλίδας εκφράζουν PV εκτός από τους PVF. Σε αποτελέσματα από προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριό μας είχε δειχθεί ότι η PV εκφράζεται από τα όψιμα PCs και από ένα μικρό πληθυσμό ενδονευρώνων της παρεγκεφαλίδας.

Όπως όμως συμβαίνει και στον αρουραίο, έτσι και στον ποντικό παρατηρήσαμε ότι η PV εκφράζεται στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια της παρεγκεφαλίδας από τα PVFs και εντοπίζεται στην ίδια περιοχή με τις δεσμίδες των CalB+ αξόνων εντός της παρεγκεφαλίδας (**Εκ.4A2,B2, B'merge,**) στις ηλικίες E13,5-E15,5. Πέρα από την κοινή τους πορεία εντός της παρεγκεφαλίδας σε εικόνες μεγαλύτερης ανάλυσης από τις δεσμίδες του IFL διαπιστώθηκε

ότι οι 2 ομάδες ινών δεσμιδοποιούνται και μαζί. Έτσι διακρίνουμε τις PV+ ίνες να περιβάλλουν και να εντοπίζονται εντός των δεσμίδων των CalB+ PCs αξόνων (**Εικ.5B1-merge**). Επιπλέον κατά την διάρκεια της ανάπτυξης οι δύο διαφορετικές δεσμίδες ινών φαίνονται δεσμιδοποιημένες να πορεύονται μέχρι την έξοδο από το ICP προς το εγκεφαλικό στέλεχος. (**Εικ5.A1-2,A merge**).

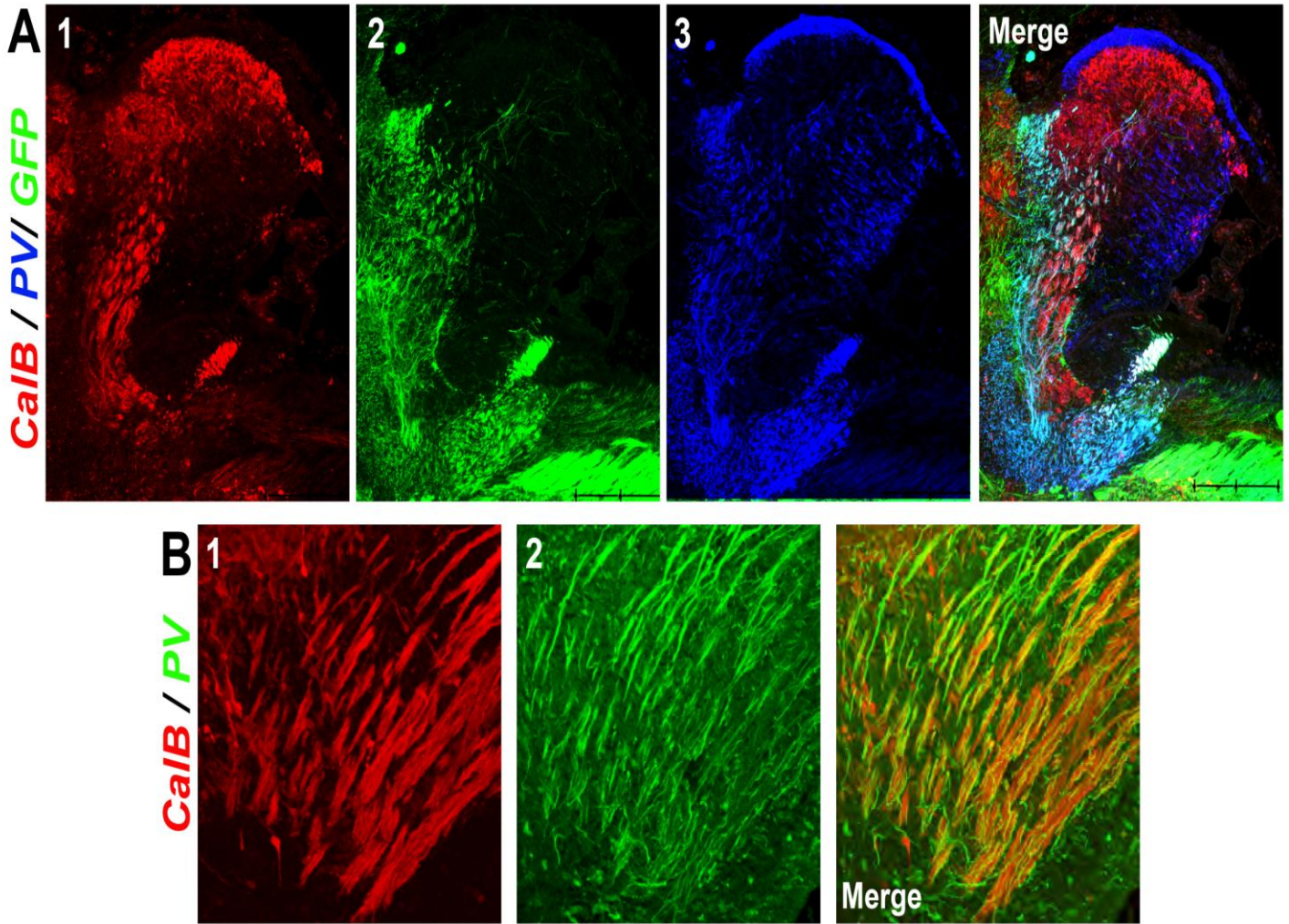




**Εικ.4: Οι PVFs άξονες είναι θετικοί για την PV και αποτελούν τους μοναδικούς PV+ άξονες εντός του IFL. PVF και CalB+ PCs άξονες δεσμιδοποιούνται μαζί και εντός των δεσμιδών του IFL.** Ανοσοϊστοχημική ανάλυση τομών παρεγκεφαλίδας σε διαφορετικές εμβρυϊκές ηλικίες. **A1.** Οι CalB+ άξονες στην ηλικία E14,5 εντοπίζονται κυρίως σε PCs της οπίσθια και κοιλιακής παρεγκεφαλίδας που προβάλλουν εντός του IFL όπως φαίνεται χρησιμοποιώντας την CalB ως μάρτυρα. **A2.** Στην ηλικία E13,5 εντός του IFL παρουσιάζονται PV+ άξονες που πιθανώς αποτελούν άξονες των PVF. **B.** Ανοσοϊστοχημική ανάλυση E13,5 οβελιαίων τομών των ζώων Islet-1-Cre;Tau-GFP με μάρτυρες την CalB, την PV και το GFP που σημαίνει όλους τους PVF άξονες που εισέρχονται στην παρεγκεφαλίδα από το VG. Παρατηρείται ότι όλοι οι GFP+ άξονες είναι και PV θετικοί ενώ εντός της παρεγκεφαλίδας υπάρχουν και άλλοι PV+ (κυανό) κυτταρικοί πληθυσμοί (**B2,3,2',3'Merge**). Οι άξονες των PVF δεσμιδοποιούνται με τους άξονες των CalB+ PCs καθώς πορεύονται μαζί (**B1,Merge**).

Προκειμένου να διευκρινιστεί εάν η PV εκφράζεται στο μονοπάτι του IFL αποκλειστικά από τους PVF και όχι από άξονες άλλων PV+ κυττάρων που βρίσκονται στην παρεγκεφαλίδα κατά την διάρκεια της ανάπτυξης, χρησιμοποιήσαμε τα διαγονιδιακά ποντίκια Islet-1-Cre;Tau-GFP. Το Islet1 είναι ένας LIM homeodomain μεταγραφικός παράγοντας που εκφράζεται σε κινητικούς νευρώνες, DRGs (dorsal root ganglia) και κρανιακά αισθητικά γάγγλια, όπως το αιθουσαίο γάγγλιο. Τα Islet-1-Cre;Tau-GFP ποντίκια διαθέτουν μία loxP-stop-loxP κασέτα η οποία βρίσκεται τοποθετημένη μεταξύ του υποκινητή και της έναρξης του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF, open reading frame) της Tau-GFP. Με αυτόν τον τρόπο τα διαγονιδιακά ζώα παράγουν με ιστο-ειδική έκφραση την Tau-GFP από όλα τα κύτταρα που εκφράζουν και το γονίδιο Islet1 (όπως αιθουσαίου γαγγλίου). Αυτό συμβαίνει όταν η κασέτα με το κωδικόνιο τερματισμού απομακρυνθεί από την Cre ρεκομπινάση που βρίσκεται κάτω από τον υποκινητή του Islet1. Η πρωτεΐνη TAU είναι μία πρωτεΐνη που δεσμεύεται στους μικροσωληνίσκους και παρουσιάζεται σε υψηλά επίπεδα στους νευράξονες. Όταν η TAU είναι συζευγμένη με την GFP η πρωτεΐνη GFP αποτελεσματικά μεταφέρεται και σημαίνει τους νευράξονες των κυττάρων που την εκφράζουν.

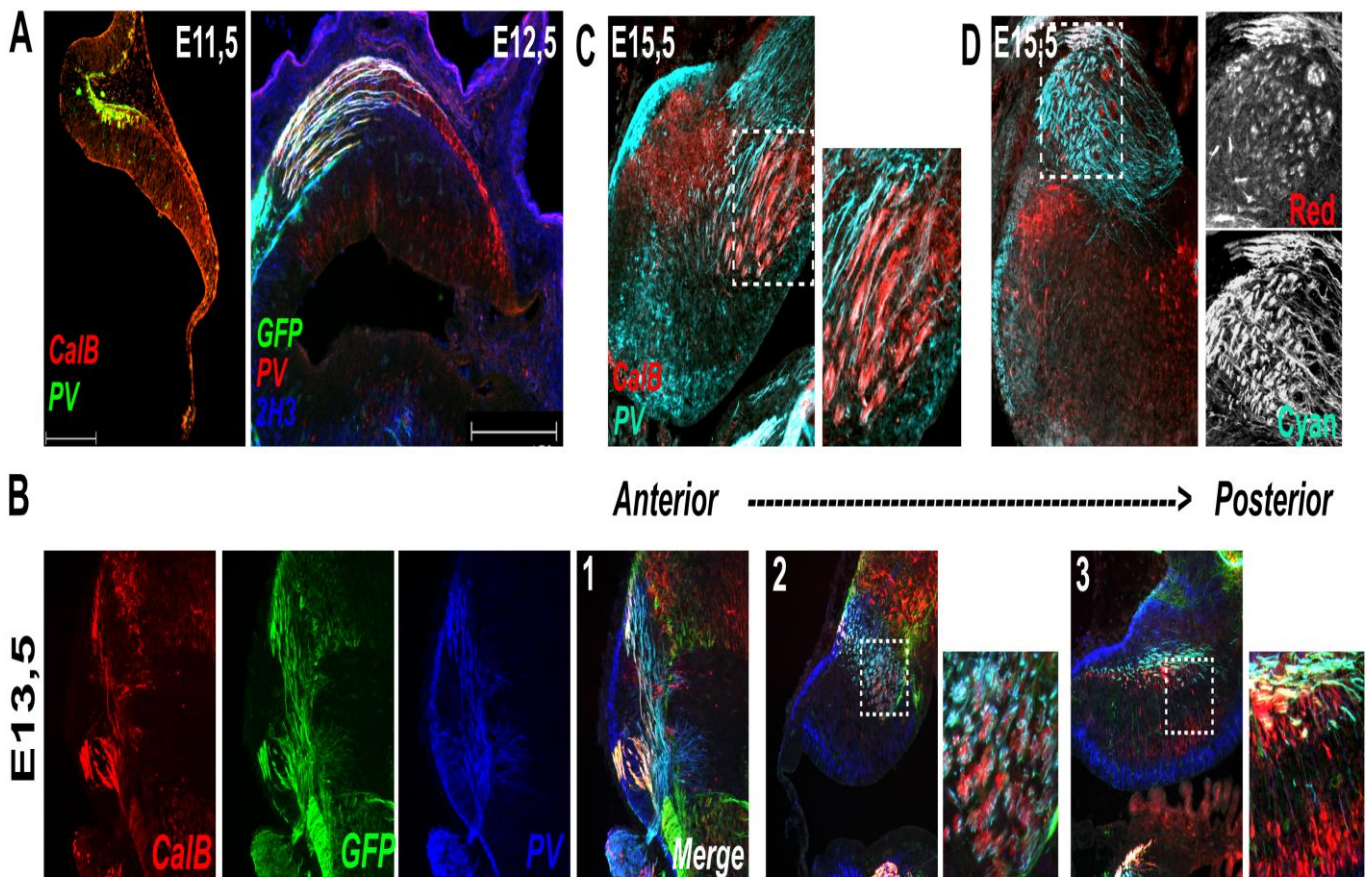




**Εικ.5:** Οι δεσμιδοποιημένοι άξονες των CalB+ PCs και των PVFs (GFP/PV+) ακολουθούν κοινή πορεία από την παρεγκεφαλίδα έως και το ICP. Η συνδεσμιδοποίηση των PV+ PVFs και των CalB+ αξόνων παρουσιάζεται με τους PVFs να περιβάλλουν και να διατάσσονται εντός CalB+ δεσμίδων. **A.** Ανοσοϊστοχημεία σε οβελιαίες τομές E15,5 με μάρτυρες για την CalB (A1), PV (A3) και το GFP (A3) Islet-1-Cre;Tau-GFP ζώα. Παρατηρείται η συνδεσμιδοποίηση των δύο ομάδων ινών (PVF/CalB) και η έξοδος των CalB+ από το ίδιο μονοπάτι από το οποίο είχαν εισέλθει οι PVF νωρύτερα κατά την ανάπτυξη (A1-Merge). Μετά το ICP η πορεία τους παύει να είναι όμοια στο εγκεφαλικό στέλεχος (A1-3). **B.** Ανοσοϊστοχημικά πειράματα όπως προηγουμένως σε ηλικία E15,5 σε στεφανιαίες τομές. Οι PVF (B2) περιβάλλουν και παρουσιάζονται εντός των CalB+ δεσμίδων (B1) καθώς δεσμιδοποιούνται μαζί τους (B,Merge). Κλίμακα 300μm A.75μm B.

Όπως και παραπάνω πραγματοποιήσαμε ανοσοιστοχημικά πειράματα σε κρυτομές Islet-1-Cre;Tau-GFP ζώων για του μάρτυρες CalB, PV και GFP. Διαπιστώσαμε ότι όλοι οι άξονες που ήταν GFP+ ήταν και PV+ (**Εικ.4B3-3' merge, Εικ.5A2,A merge**) σε ηλικίες από E13,5 και E15,5, ενώ πορεύονταν στις ίδιες δεσμίδες νευρικών ινών με τους CalB+ PCs άξονες. Με τα παραπάνω δεδομένα επιβεβαιώσαμε ότι όλοι οι PV+ άξονες εντός του IFL είναι PVF άξονες (GFP+). Οι άξονες αυτοί εισέρχονται νωρίς από την ηλικία E11,5 εντός της CP και δεν αποτελούν άξονες από άλλα κύτταρα που εκφράζουν PV εντός της παρεγκεφαλίδας (**Εικ6A, E11,5**). Η εικόνα των PV+ PVFs γίνεται εντονότερη εντός της αναπτυσσόμενης παρεγκεφαλίδας την επόμενη αναπτυξιακή ημέρα (E12,5), όπου οι άξονες απλώνονται και καταλαμβάνουν το σύνολο του ιστού (E6A, E12,5). Επιπρόσθετα εντοπίσαμε ότι η πρώτη φορά που οι CalB+ PCs άξονες συναντούν και δεσμιδοποιούνται μαζί με τους άξονες των PVFs είναι αυτή του E13,5 (**Εικ6B**). Σε αυτήν την φάση οι CalB+ άξονες εξέρχονται από το ICP πρόσθια του ιστού της παρεγκεφαλίδας μαζί με τους PV+ PVF. Σε ενδιάμεσες τομές της CP οι 2 ομάδες ινών δεσμιδοποιούνται μαζί και σε πιο οπίσθιες τομές οι μονήρεις άξονες των CalB+ PCs πορεύονται σε επαφή με τους PV+ PVF άξονες που βρίσκονται κάθετα των δεσμίδων τους. Καθώς οδεύουμε προς την ηλικία E15,5 αυτή η συνδεσμιδοποίηση ενισχύεται περισσότερο όπως είδαμε και παραπάνω (**Εικ.6C**). Τέλος στο ραχιαίο τμήμα του προμήκη μυελού, παρατηρούμε τον διαχωρισμό των δύο αξονικών πληθυσμών που ακολουθούν τελικά διαφορετικά μονοπάτια εντός των αιθουσαίων πυρήνων (**Εικ.6D, CalB+ δεσμίδες εντός του LaVN και PV+ δεσμίδες εντός του ίδιου πυρήνα**).





**Εικ.6:** Οι άξονες των PVF εισέρχονται πρώτη φορά εντός τις CP στην ηλικία E11,5 στον ποντικό. Κατά την ηλικία E12,5 έχουν εξαπλωθεί εντός του ιστού, ενώ πορεύονται και σε πιο οπίσθιες περιοχές του. Μεταξύ E13,5-E15,5 οι CalB+ PC άξονες και οι PV+ PVF άξονες παρουσιάζονται συνδεσμιδοποιημένοι σε όλον τον ιστό έως την έξοδο από το ICP. Η πρώτη μέρα εισόδου των PVF στην CP (όπως φαίνεται στην ανοσοιστοχημεία (A) με CalB και PV σε ηλικία E11,5. Οι PVFs καταλαμβάνουν μεγαλύτερη περιοχή εντός του CP καθώς επεκτείνονται πιο οπίσθια στην ηλικία E12,5 (B). Από πρόσθιες (ICP, B1) μέχρι οπίσθιες τομές (B3) φαίνεται ότι όλοι οι άξονες των PVFs είναι και PV+ ( ) και δεσμιδοποιούνται παράλληλα (B1-3) με τους CalB+ άξονες. Ακόμα και οι κάθετα διατεταγμένοι μονήρεις άξονες βρίσκονται σε συνάφεια με τους PVF άξονες (B3, high magnification). Αυτό εξακολουθεί να εμφανίζεται έντονα και στην ηλικία E15,5 (C). Ενώ, στην ίδια ηλικία, όταν οι CalB+ PCs άξονες βρίσκονται εντός των VN νευρώνουν κυρίως περιοχές που δεν νευρώνονται από του PV+ άξονες. (D). Κλίμακα A,B 300μm, περιοχές εντός στικτών σχημάτων (μεγέθυνση περιοχών σε εικόνα δίπλα από αρχική εικόνα)

Συνοψίζοντας τα παραπάνω παρατηρήσαμε ότι οι άξονες των PVFs εισέρχονται στην CP σε ηλικία E11,5 όπου δεσμιδοποιούνται μαζί με τους PCs στην ηλικία E13,5. Τα παραπάνω συμβαίνουν πριν οι συναπτικοί τελικοί τους στόχοι (DCN) μεταναστεύσουν στην φυσιολογική θέση τους αλλά και άλλα κύτταρα (GCs και τα UBC) με τα οποία δημιουργούν συνάψεις γεννηθούν. Αυτή η συμπεριφορά των PVF πιθανός να υποδηλώνει την συμμετοχή τους στην οργάνωση των νευραξόνων PCs στο IFL και την ορθή καθοδήγηση τους. Για να εξετάσουμε την παραπάνω υπόθεση μας σχεδιάσαμε την μελέτη της οργάνωσης των PCs αξόνων επί της απουσίας PVFs εντός της αναπτυσσόμενης παρεγκεφαλίδας.

### **B3.Η απουσία των PVFs στα ομόζυγα μεταλλαγμένα για την SIX-1 ποντίκια οδηγεί σε διαταραχές στην οργάνωση και την καθοδήγηση των αξόνων των PCs.**

Θέλοντας να μελετήσουμε την παραπάνω υπόθεση μας προσπαθήσαμε να εντοπίσουμε τη οργάνωση των νευραξόνων των PCs (CalB+) κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης σε μεταλλαγμένα ποντίκια όπου οι PVFs είναι απόντες.

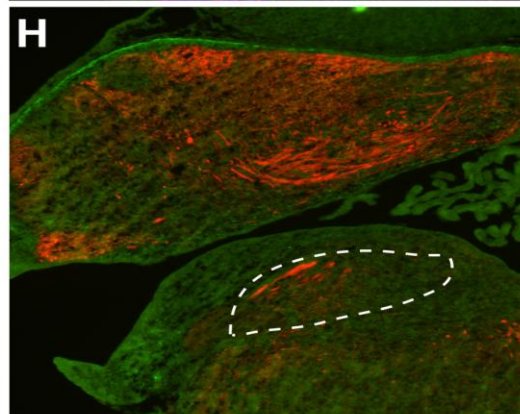
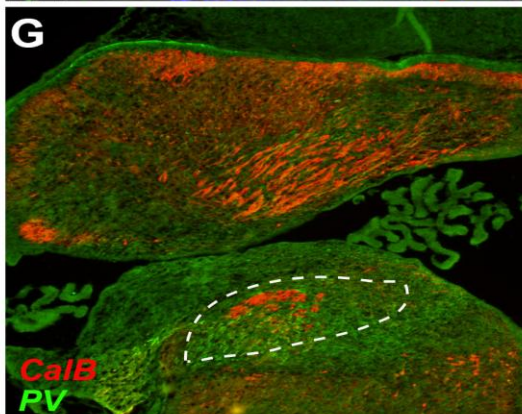
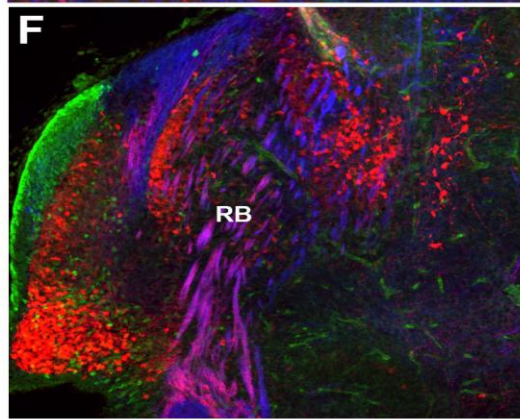
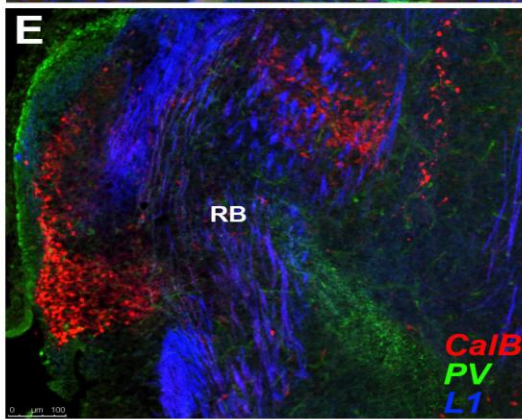
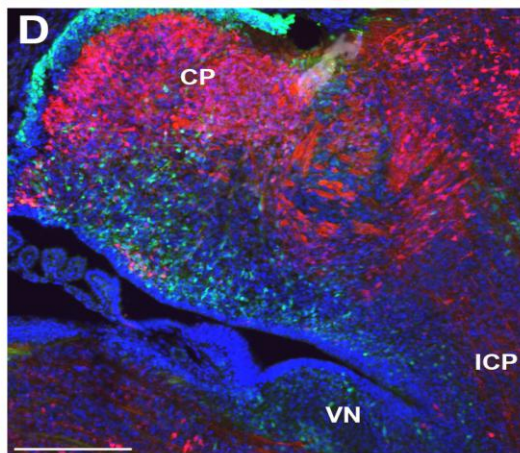
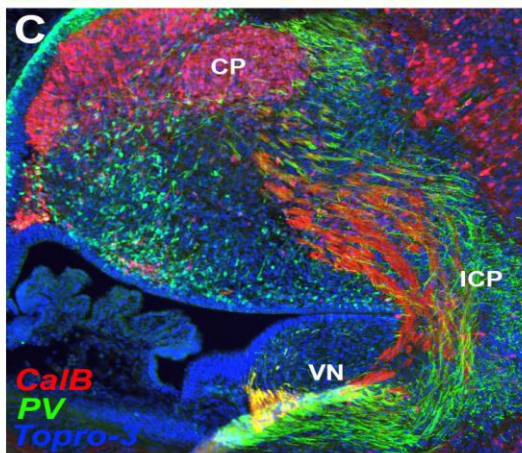
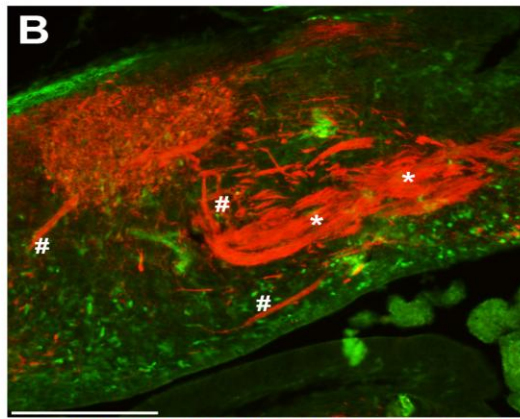
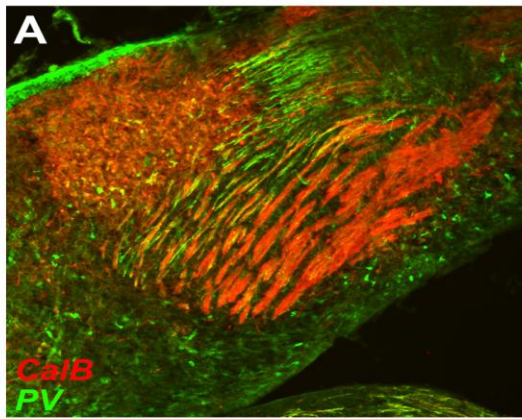
Η οικογένεια των Six γονιδίων στα σπονδυλωτά αποτελούν ομόλογα του γονιδίου 'sine oculis' (so) της Drosophila που είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των οφθαλμών<sup>206</sup>. Το γονίδιο Six1 (Sineoculis homeobox homolog 1) συμμετέχει στην ανάπτυξη των οφθαλμών και πολλών άλλων αισθητικών συστημάτων, των κρανιακών γαγγλίων, των νεφρών, των σκελετικών μυών και των πνευμόνων στον ποντικό<sup>207-211</sup>. Στα ομόζυγα μεταλλαγμένα ποντίκια για το γονίδιο Six1 παρουσιάζονται σοβαρές ελλείψεις σε όλα τα ανατομικά επίπεδα του στατικό-ακουστικού συστήματος κατά την διάρκεια της ανάπτυξης<sup>211</sup>. Μαζί με πολλά άλλα ελλείμματα του έσω ωτός (μικρότερο και μη φυσιολογικό ακουστικό κυστίδιο, ανατομικά δύσμορφοι ημικυκλικοί σωλήνες κλπ), οι Six1 μεταλλαγμένοι μύες παρουσιάζουν πλήρη απουσία του VIII (αιθουσαίο γάγγλιο) και του IX κρανιακού γαγγλίου<sup>211</sup>. Η αγενεσία του VIII γαγγλίου στα ομόζυγα μεταλλαγμένα Six1 ποντίκια είναι υπεύθυνη για την έλλειψη των PVFs βοηθώντας μας να μελετήσουμε την θεωρία μας. Ο μεταγραφικός παράγοντας SIX1 δεν παρουσιάζει έκφραση κατά την διάρκεια της ανάπτυξης στην παρεγκεφαλίδα όπως είναι γνωστό από πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν στο εργαστήριο μας (δεν παρουσιάζονται).

Οι νευράξονες των CalB+ PCs στην αναπτυσσόμενη παρεγκεφαλίδα των Six1<sup>-/-</sup> ζώων παρουσίασαν αξιοσημείωτες μεταβολές στην οργάνωση και την καθοδήγησή τους. Η παραπάνω ανάλυση πραγματοποιήθηκε με ανοϊστοχημικές μεθόδους από τις ηλικίες E15,5-E18,5 σε Six1<sup>+/+</sup> και Six1<sup>-/-</sup> ποντίκια. Στα ελλειμματικά για τον SIX1 ζώα οι CalB+ νευράξονες παρουσιάζονταν υπερ-δεσμιδοποιημένοι (αυξημένη διάμετρος δεσμίδων) και με αποδιοργανωμένη κατεύθυνση καθώς δεν ακολουθούσαν την οριζόντια πορεία των φυσιολογικών δεσμίδων (**Εικ.7A,B**). Επίσης οι CalB+ δεσμίδες των νευραξόνων δεν καταφέρνουν να εξέλθουν από την CP όπως στα φυσιολογικά ποντίκια μεταξύ του στενού περάσματος κατά μήκος της 4<sup>ης</sup> κοιλίας, από την οπίσθια περιοχή του ICP (**Εικ.7C,D, anterior**). Αντιθέτως διαπιστώθηκε ότι ένα μικρό μέρος των CalB+ νευραξόνων που καταφέρνουν να εξέλθουν από την CP στα Six1<sup>-/-</sup> ζώα ακολουθεί μια παθολογική πορεία και τελικά εξέρχεται από το πλέον πρόσθιο τμήμα του ICP, όπου βρίσκεται το ελαιο-παρεγκεφαλιδικό δεμάτιο (Restiform body, RB) (**Εικ.7E,F RB images**). Οι παραπάνω άξονες εν τέλει καταλήγουν στην πλάγια περιοχή του έξω VN (**Εικ.7G,H VN**). Ο περιορισμένος αριθμός CalB+ αξόνων στους VN υποδηλώνει ότι ένα μεγάλο ποσοστό δεν καταφέρνει να καθοδηγηθεί σωστά και να εξέλθει της παρεγκεφαλίδας προς τους τελικούς του στόχους.



**Six1<sup>+/+</sup>**

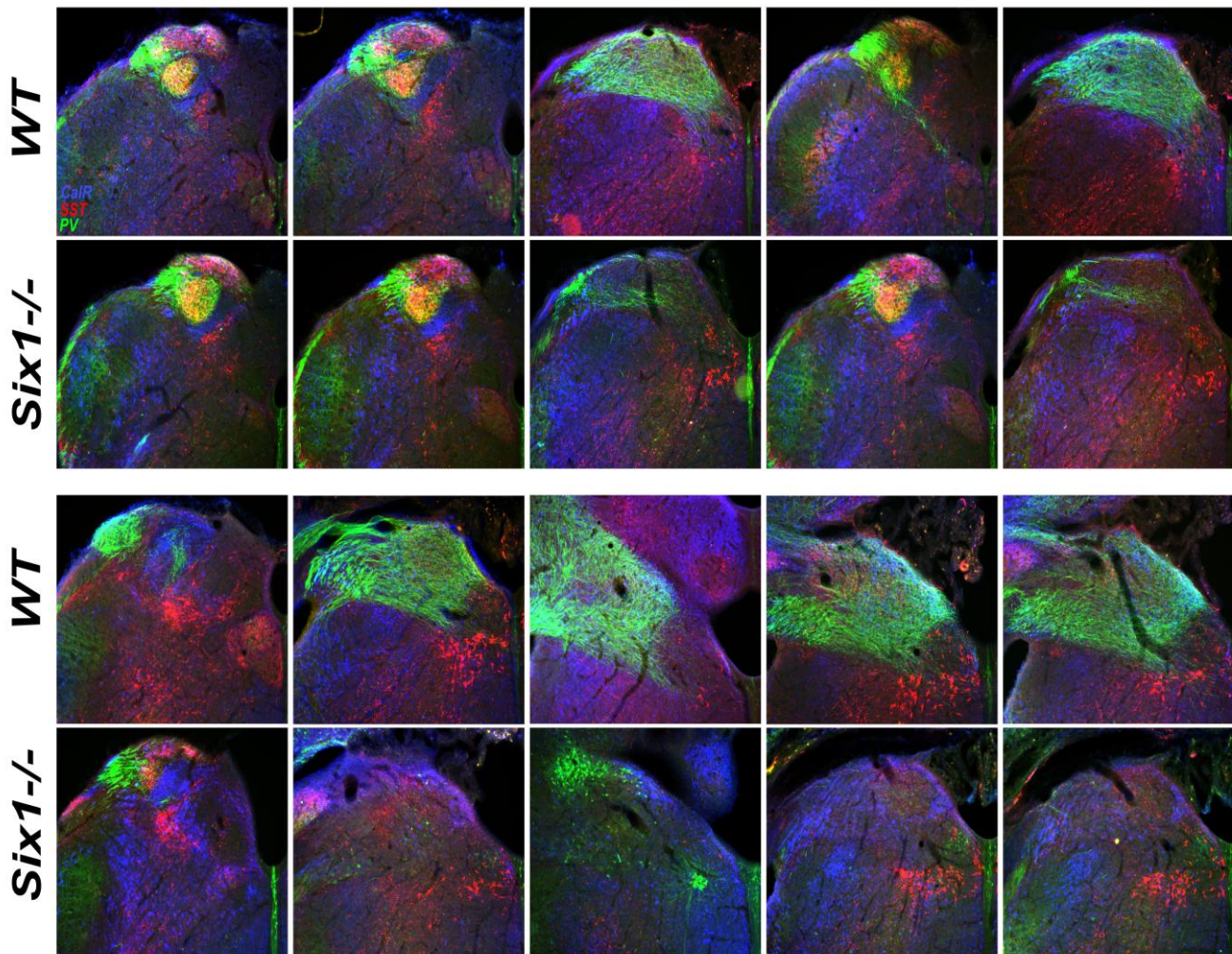
**Six1<sup>-/-</sup>**



**Εικ.7:** Στα  $Six1^{-/-}$  ποντίκια όπου υπάρχει πλήρης απουσία των PVFs, οι άξονες των CalB+ PCs παρουσιάζουν προβλήματα στην δεσμιδοποίηση και στην καθοδήγησή τους. Ανοσοϊστοχημεία σε στεφανιαίες τομές παρεγκεφαλίδας, ηλικίας E15,5 με μάρτυρες CalB και PV σε  $Six1^{+/+}$  (A) και  $Six1^{-/-}$  (B). Στα ομόζυγα μεταλλαγμένα ζώα οι άξονες των CalB+ PCs παρουσιάζονται υπερδεσμιδοποιημένοι (B,\*), και προβάλλουν προς διάφορες κατευθύνσεις (B,#) σε αντίθεση με τις οριζόντια διατεταγμένες δεσμίδες των WT (A). Σε οβελιαίες τομές ίδιας ηλικίας (E15,5) παρατηρείται ότι οι CalB+ άξονες δεν καταφέρνουν να εξέλθουν φυσιολογικά μέσω του ICP όπως συμβαίνει στα  $Six1^{+/+}$  ποντίκια (C,D). Αντιθέτως στα  $Six1^{-/-}$  ποντίκια αρκετοί CalB+ άξονες εξέρχονται από την παρεγκεφαλίδα μέσω της πρόσθιας δομής του restiform body (F) σε αντίθεση με τα WT (E). Πολλοί άξονες εντός του RB είναι L1+. Σε ανοσοϊστοχημικά πειράματα σε ηλικία E17,5 παρατηρήσαμε ότι μικρό ποσοστό αυτών των CalB+ αξόνων που εξέρχονται στα  $Six1^{-/-}$  ποντίκια από το RB καταλήγουν στην ραχιαία και πλάγια περιοχή του Lateral Vestibular Nucleus (laVN) (H). Η περιοχή που καταλαμβάνουν εντός του VN είναι σαφώς περιορισμένη σε σχέση με τα φυσιολογικά ποντίκια (G) καθώς ένα μεγάλο ποσοστό τους πιθανώς λόγω της εσφαλμένης καθοδήγησης δεν εξέρχεται ποτέ από την CP. CP: Cerebellar plate, ICP: inferior cerebellar peduncle, RB: Restiform body, VN: Vestibular nucleus.

Στην συνέχεια προσπαθήσαμε να εξακριβώσουμε εάν ο παραπάνω φαινότυπος είναι αποτέλεσμα παθολογιών των τελικών στόχων των CalB+ αξόνων, των αιθουσαίων πυρήνων (vestibular nuclei, VN). Με την χρήση γενικών μαρτύρων για τους VN όπως η CalR, η SST (somatostatin), και η PV αναλύσαμε σε ηλικία E18,5 όπου οι πυρήνες είναι ώριμοι ανατομικά, την μορφολογία τους σε  $Six1^{+/+}$  και  $Six1^{-/-}$  ποντίκια. (Εικ.8). Ανατομικά και τοπογραφικά οι VN δε παρουσίαζαν μεταβολές μεταξύ ομόζυγα μεταλλαγμένων και φυσιολογικών ζώων. (Εικ.8). Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα τελικά η απουσία των PVF είναι αυτή που οδηγεί στις ανατομικές μεταβολές στους άξονες των PCs.





**Εικ.8:** Οι VN στα ομόζυγα μεταλλαγμένα ποντίκια για την **SIX1** δεν παρουσιάζουν μεταβολές στην δομή και την ανατομική θέση σε σχέση με τα φυσιολογικά ζώα. Από αριστερά προς τα δεξιά παρατηρούμε συνεχόμενες τομές από πρόσθιες προς οπίσθιες δομές του εγκεφαλικού στελέχους σε WT και Six1<sup>-/-</sup> ζώα. Η ανοσοϊστοχημεία πραγματοποιήθηκε σε ηλικία E17,5 για τους μάρτυρες **SST**, **PV** και **CalR** σε στεφανιαίες τομές. Η μόνη διαφορά που παρατηρείται είναι η έλλειψη των **PV+** αξόνων στους VN που προέρχονται απευθείας από το VG και απουσιάζει στα Six1<sup>-/-</sup> ποντίκια.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω στοιχεία καταλήγουμε ότι οι PCs άξονες, προκειμένου να εξέλθουν από την CP και να πορευθούν ορθά προς το στόχο τους εκτός παρεγκεφαλίδας (VN), θα μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν τους άξονες των PVF σαν σκαλωσιά. Η απουσία τους οδηγεί σε υπερ-δεμιδοποιημένους και εσφαλμένα κατευθυνόμενους άξονες εντός της CP. Σε περίπτωση απουσίας των PVF από την

παρεγκεφαλίδα μικρό ποσοστό CalB+ PCs αξόνων καταφέρνει να εξέλθει από την παρεγκεφαλίδα μέσω της πιο πρόσθιας περιοχής του ICP του RB. Αυτό πιθανώς να συμβαίνει λόγω της παρουσίας κάποιου καθοδηγητικού μορίου στο παραπάνω μονοπάτι που δεν παρουσιάζεται στην υπόλοιπη παρεγκεφαλίδα λόγω της έλλειψης των PVF.

#### **B4. Η έλλειψη του μορίου κυτταρικής συνάφειας L1 οδηγεί σε διαταραχές στην οργάνωση και την καθοδήγηση των Calbindin+ PCs αξόνων.**

Ακολουθώντας προσπαθήσαμε να ανιχνεύσουμε μόρια κυτταρικής συνάφειας που να εκφράζονται πάνω στους PVF και που θα μπορούσαν συμμετέχουν στην σωστή καθοδήγηση των CalB+ αξόνων εκτός CP.

Είναι γνωστό ότι μια πλειάδα διαφορετικών μορίων κυτταρικής συνάφειας τόσο της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών (IgSF CAMs)<sup>212</sup>, όσο και των καντχερινών (cadherins)<sup>213,214</sup> εκφράζονται κατά την ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας αλλά και μετά την γέννηση. Από τα μόρια της IgSF είναι γνωστό ότι η contactin-2 (TAG-1/Cnt-2) είναι αυτή που εκφράζεται αρκετά νωρίς κατά την ανάπτυξη από τα πρόδρομα των GCs κύτταρα και τις νευρικές τους απολήξεις. Στον ίδιο κυτταρικό πληθυσμό μετά την Cnt-2 εκφράζονται τόσο το μόριο L1-CAM όσο και οι Cnt-1 και Cnt-6. Εκτός των GCs και τα PCs εκφράζουν μόρια της ίδιας οικογένειας όπως το L1, το NCAM, ALCAM και το NrCAM. Αυτό επιβεβαιώνεται τόσο από προηγούμενες μελέτες αλλά και κατόπιν μελέτης της έκφρασης των γονιδίων αυτών μέσω του Allen Brain Atlas ([www.alleninstitute.org](http://www.alleninstitute.org)) που πραγματοποιήσαμε (data not shown). Λόγο του ότι τα μόρια L1, NCAM, ALCAM εκφράζονταν στους άξονες των PC στο IFL, και επειδή τα μεταλλαγμένα για αυτά ποντίκια ήταν διαθέσιμα στο εργαστήριό μας, πραγματοποιήσαμε ανάλυση της οργάνωσης των PVF και των CalB+ PC στα ομόζυγα μεταλλαγμένα για αυτά τα ζώα.

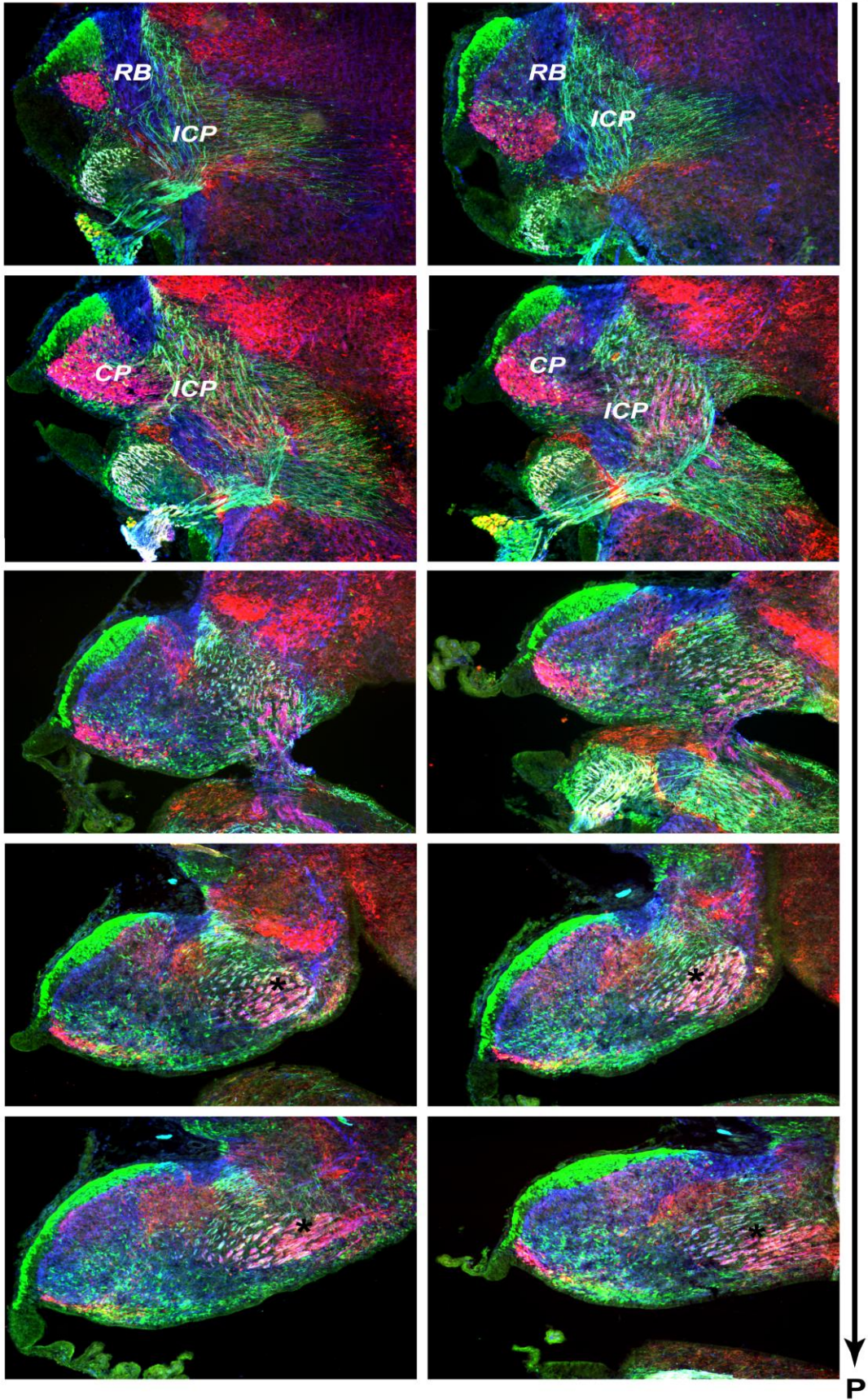
Ως πρώτο βήμα προς την κατανόηση του πιθανού ρόλου των διαφορετικών CAM στο σύστημά μας αναλύσαμε το μεταλλαγμένο ποντίκι ALCAM (CD160/BEN/SC1). Ήταν γνωστό από προηγούμενα πειράματα που είχαν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριό μας ότι τόσο το ALCAM, όσο και ο προσδέτης του CD-6 του εκφράζεται από τους νευράξονες του IFL και του ICP που εξέρχονται από το παρεγκεφαλίδα (Said Malem data). Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση στις ηλικίες E15,5 και E17,5 στα Alcam<sup>+/+</sup> και Alcam<sup>-/-</sup> ποντίκια δεν ανέδειξε καμία διαφορά τόσο στην οργάνωση και την ανάπτυξη

των PCs αξόνων, όσο και στην δεσμιδοποίησή τους. Επιπλέον νευράξονες των ελλειματικών για το ALCAM ζώων, εξέρχονταν φυσιολογικά μέσω του ICP προς τους VN χωρίς κανένα ελάττωμα όπως και στα WT ζώα (**Εικ.9.1**). Η ανάλυση των NCAM ομόζυγα μεταλλαγμένων ζώων επίσης δεν ανέδειξε μεταβολές στην οργάνωση, την ανάπτυξη και την ορθή καθοδήγηση των νευραξόνων των PCs. Ομοίως τα NCAM ομόζυγα μεταλλαγμένα ζώα δεν παρουσίαζαν παθολογίες στην δομή του IFL σε σχέση με τα φυσιολογικά ζώα (**Εικ.9.1**).



ALCAM <sup>+/+</sup>

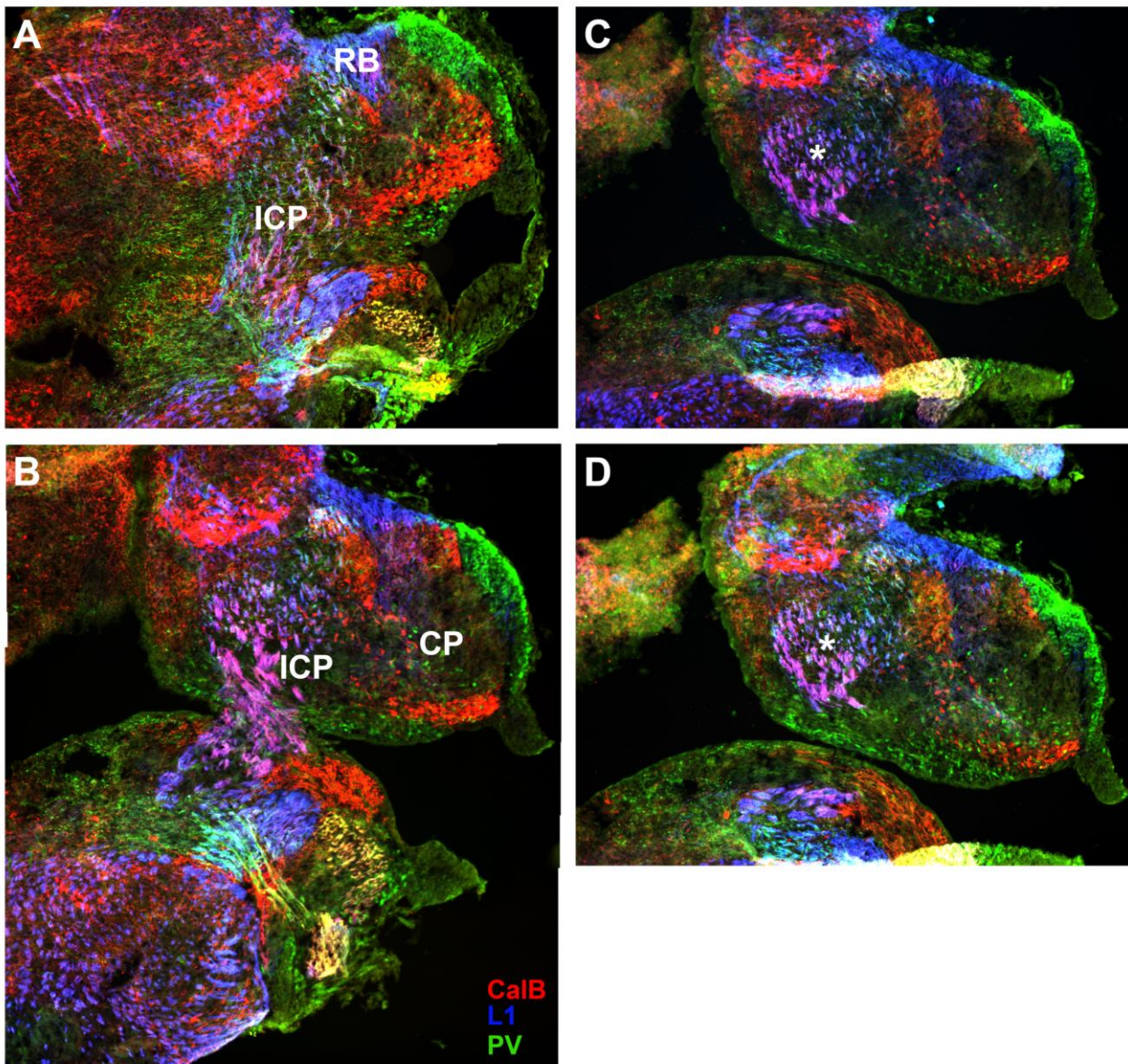
ALCAM <sup>-/-</sup>



**Εικ.9.1:Οι δεσμίδες των CalB+ PCs και των PVFs δεν παρουσιάζουν αλλαγές στην δεσμιδοποίηση την κατεύθυνση ή την καθοδήγησή τους στα ALCAM-/- ποντίκια.** Σε ηλικία E15,5 βλέπουμε μία ακολουθία στεφανιαίων τομών από τις πρόσθιες προς τις οπίσθιες δομές της CP. Η ανοσοιστοχημεία έγινε με την χρήση των μαρτύρων **CalB**, **PV** και 2H3. Μαύρος \*: IFL, CP:Cerebellar plate, ICP: inferior cerebellar peduncle, RB: Restiform body.

Στη συνέχεια, εξετάσαμε τον πιθανό ρόλο του μορίου L1-CAM στην υπόθεσή μας. Επιβεβαιώσαμε ότι η L1 εκφράζεται τόσο στους άξονες των PCs όσο και στους PVF άξονες καθώς και σε άλλες οδούς που σχετίζονται με την παρεγκεφαλίδα (**restiform body κ.λπ.Εικ.9.2**). Όπως είναι γνωστό από παλαιότερες μελέτες το μόριο L1 ανήκει στην IgSF των μορίων κυτταρικής συνάφειας και εμπλέκεται στην έκφυση των νευραξόνων, στην καθοδήγηση, στην δεσμίδωση κλπ.<sup>215-217</sup>. Ακολούθως προσπαθήσαμε να μελετήσουμε την πιθανή σχέση του L1 στην οργάνωση των νευραξόνων των PCs εντός της παρεγκεφαλίδας και στην προβολή τους προς τους VN. Για την απάντηση των ανωτέρω ερωτημάτων χρησιμοποιήσαμε ομόζυγα μεταλλαγμένα ποντίκια για την L1.





**Εικ.9.2:** Το CAM L1 εντοπίζεται στο σύνολο των αξόνων του ICP καθώς και στους άξονες που δομού το IFL. Σε ανοσοϊστοχημεία σε στεφαναίες (coronal) κρουτομές ποντικών ηλικίας E15,5 έγινε χρήση των μαρτύρων L1,PV(για τα PVFs) CalB (για υποπληθυσμό PCs).Σε πρόσθιες τομές διαπιστώσαμε ότι το L1 εντοπίζεται στους άξονες του ICP συνολικά **(A,B)** ακόμα και στο πρόσθιο τμήμα του το RB **(A)**. Επιπλέον στον παρεγκεφαλιδικό ιστό το L1 συνεντοπίζεται με τα μόρια CalB και PV στις αξονικές δεσμίδες που δομούν το IFL **(C,D\*)**. CP: cerebellar plate, ICP: inferior cerebellar penducle, RB: restiform body.

Με την χρήση των μαρτύρων CalB για τους άξονες των PCs, PV για τους PVF και 2H3 ως γενικό μάρτυρα για όλους τους νευράξονες (δείκτης για τα νευροίνια),



πραγματοποιήσαμε ανοσοϊστοχημική ανάλυση σε WT και L1<sup>-/-</sup> ποντίκια στις ηλικίες E14,5-E17,5. Από την ηλικία E14,5-17,5 παρατηρήσαμε ότι οι CalB<sup>+</sup> PCs άξονες δεν εξέρχονταν από το ICP στα L1<sup>-/-</sup> ποντίκια σε αντίθεση με τα L1<sup>+/+</sup> (**Εικ.11 A,B**). Παράλληλα εντοπίσαμε έλλειψη στις δεσμίδες των CalB<sup>+</sup> αξόνων στα πρόσθια τμήματα της παρεγκεφαλίδας (**Εικ.10A-F**). Γενικώς στα περισσότερα τμήματα της παρεγκεφαλίδας οι υπάρχουσες δεσμίδες ήταν λεπτότερες σε μικρότερο αριθμό και σημαντικά αποδιοργανωμένες στα L1<sup>-/-</sup> σε σχέση με τα WT ζώα (**Εικ.10 A-H'**).

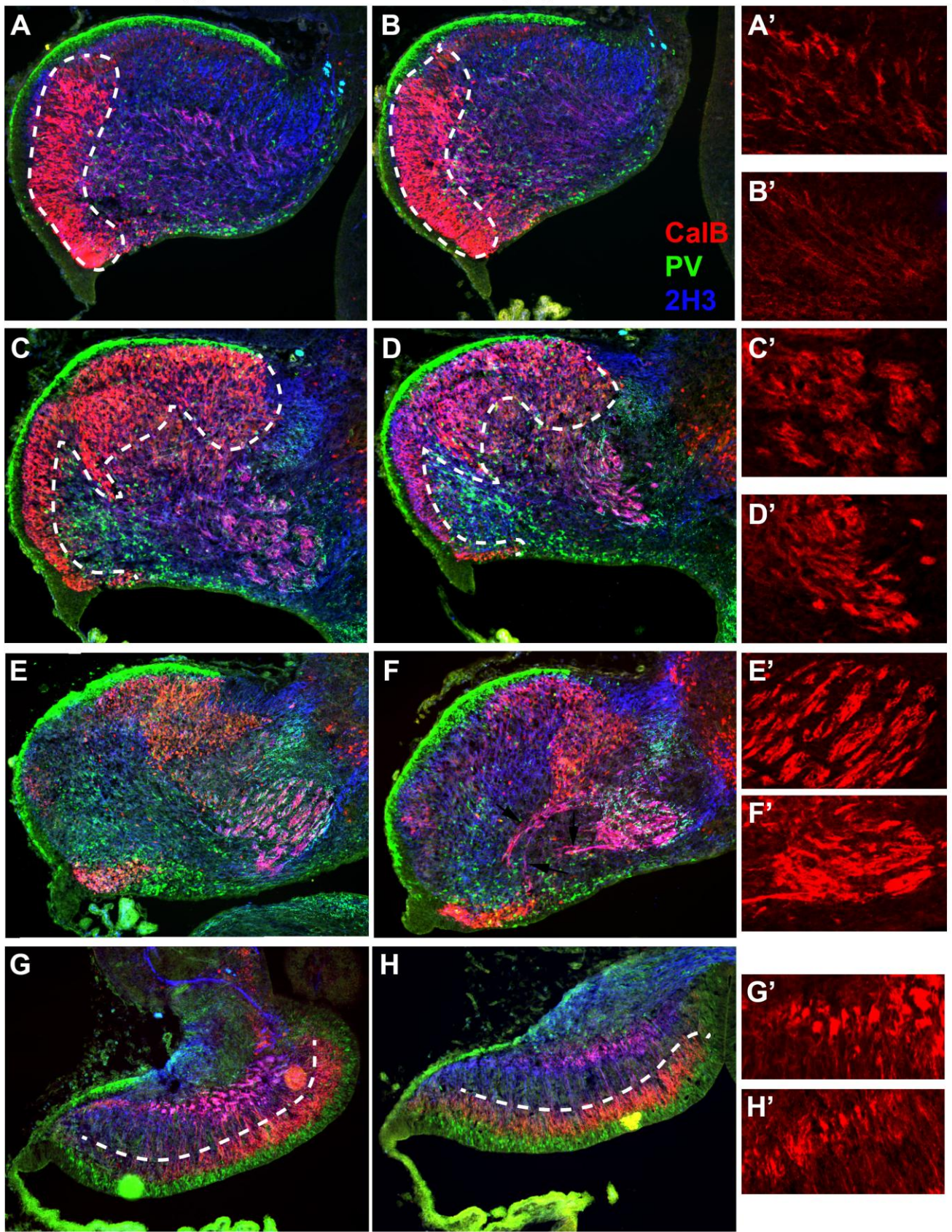
Τέλος προσπαθήσαμε να μελετήσουμε εάν οι CalB<sup>+</sup> PCs άξονες καταφέρνουν να εξέλθουν από κάποιο άλλο μονοπάτι όπως συνέβαινε στα Six1<sup>-/-</sup> ποντίκια και εάν οι τελικοί τους στόχοι (VN) ήταν ακέραιοι. Χρησιμοποιώντας τους ίδιους μάρτυρες όπως προηγουμένως δεν διαπιστώσαμε σε καμία πρόσθια τομή της παρεγκεφαλίδας έξοδο CalB<sup>+</sup> αξόνων στα ομόζυγα μεταλλαγμένα για το L1 ποντίκια (**Εικ.11E,F**). Παράλληλα στο προμήκη μυελό αυτών των ζώων στους VN δεν εντοπίστηκαν καθόλου CalB<sup>+</sup> άξονες όπως συνέβαινε στα WT ζώα (**Εικ.11C,D**).

Επιπροσθέτως οι άξονες των PVF (PV<sup>+</sup>) εισέρχονταν κανονικά εντός της παρεγκεφαλίδας από το ICP στα L1<sup>-/-</sup> ζώα (**Εικ.11B,E**). Οι άξονες όμως των PVFs δεν ήταν τόσο καλά οργανωμένοι στα μεταλλαγμένα ζώα όπως συνέβαινε και με τους CalB<sup>+</sup> άξονες (**Εικ.10-11**). Αυτό υποδηλώνει ότι το L1 πιθανώς να είναι καθοριστικό για την συν-δεσμιδοποίηση των δύο αυτών ομάδων αξόνων που ακολούθως να είναι απαραίτητη για την σωστή καθοδήγησή τους.

Μία αιτία που θα μπορούσε να επίσης να δικαιολογήσει τις παρατηρούμενες διαταραχές των CalB<sup>+</sup> δεσμιδών στα L1<sup>-/-</sup> ποντίκια θα ήταν ο πληθυσμός των CalB<sup>+</sup> PCs να ήταν είτε μειωμένος είτε να βρίσκονταν σε άλλη ανατομική θέση από το φυσιολογικό. Όπως παρατηρείται στις περιοχές εντός των στικτών γραμμών στην εικόνα **Εικ.10(A-D,G-H)** τα νησίδια των CalB<sup>+</sup> PCs εντός της αναπτυσσόμενης παρεγκεφαλίδας δεν φαίνεται να διαφέρουν μεταξύ L1<sup>-/-</sup> και WT ποντικών. Οι παραπάνω παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν ότι όταν το L1 απουσιάζει οι CalB<sup>+</sup> άξονες δεν καταφέρνουν να οργανωθούν εντός της παρεγκεφαλίδας, να συνδεσμιδοποιηθούν με τους PVFs και να καθοδηγηθούν αποτελεσματικά εκτός αυτής, προς τους τελικούς στόχους τους.

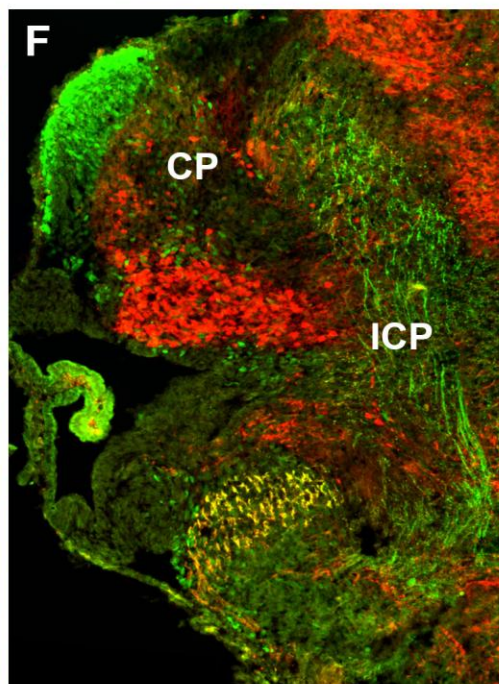
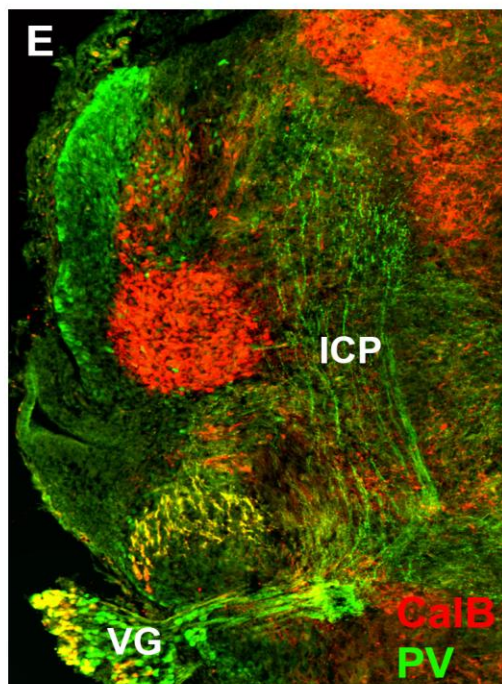
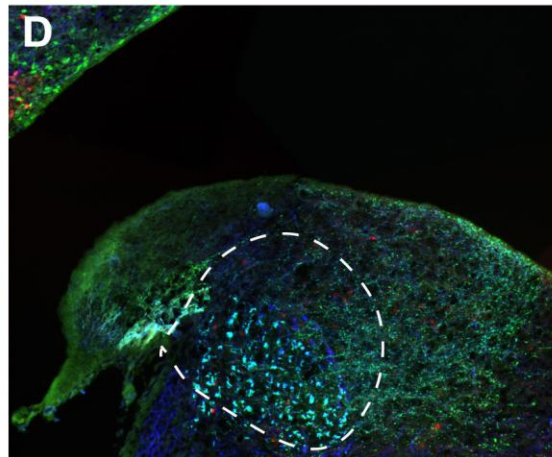
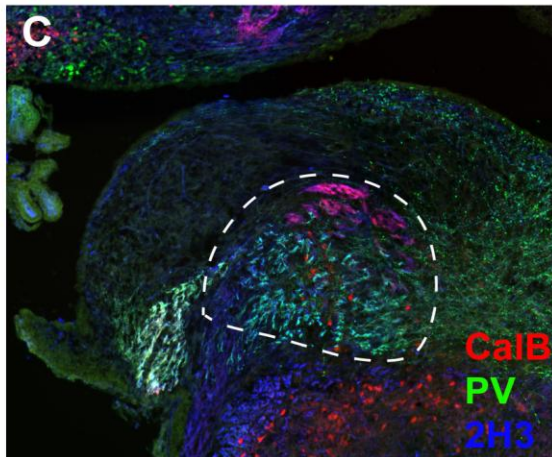
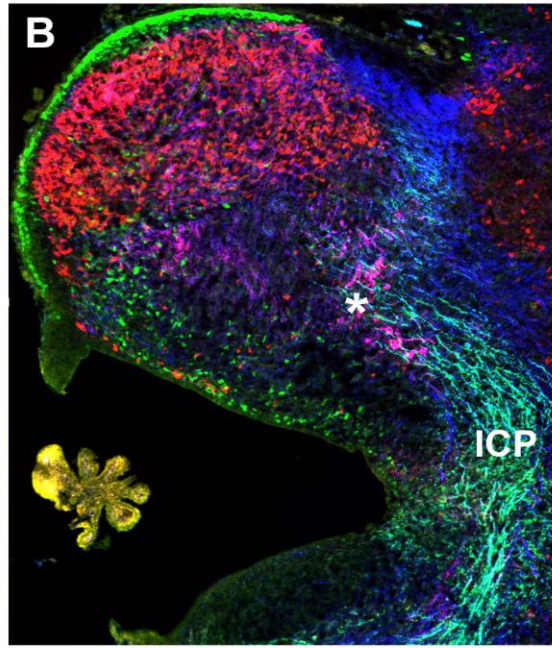
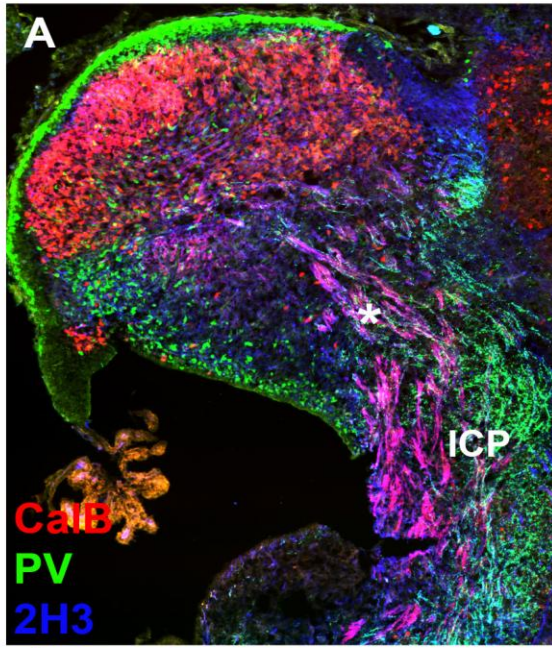
L1<sup>+/+</sup>

L1<sup>-/-</sup>



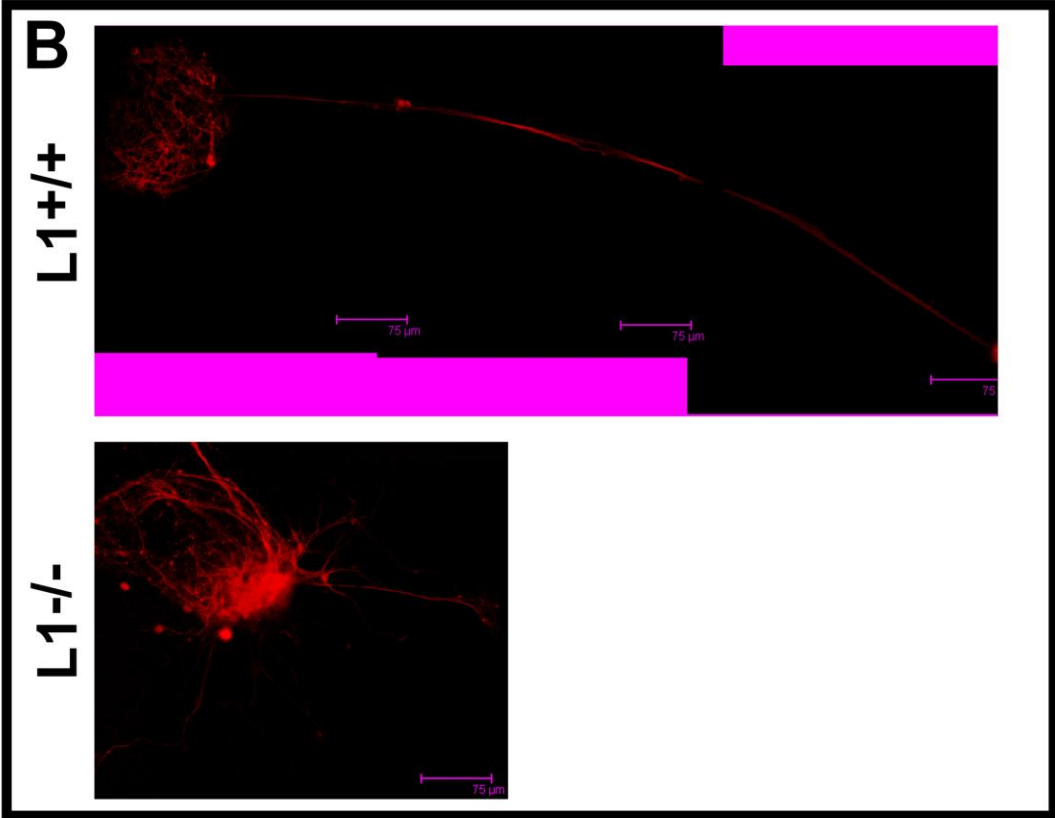
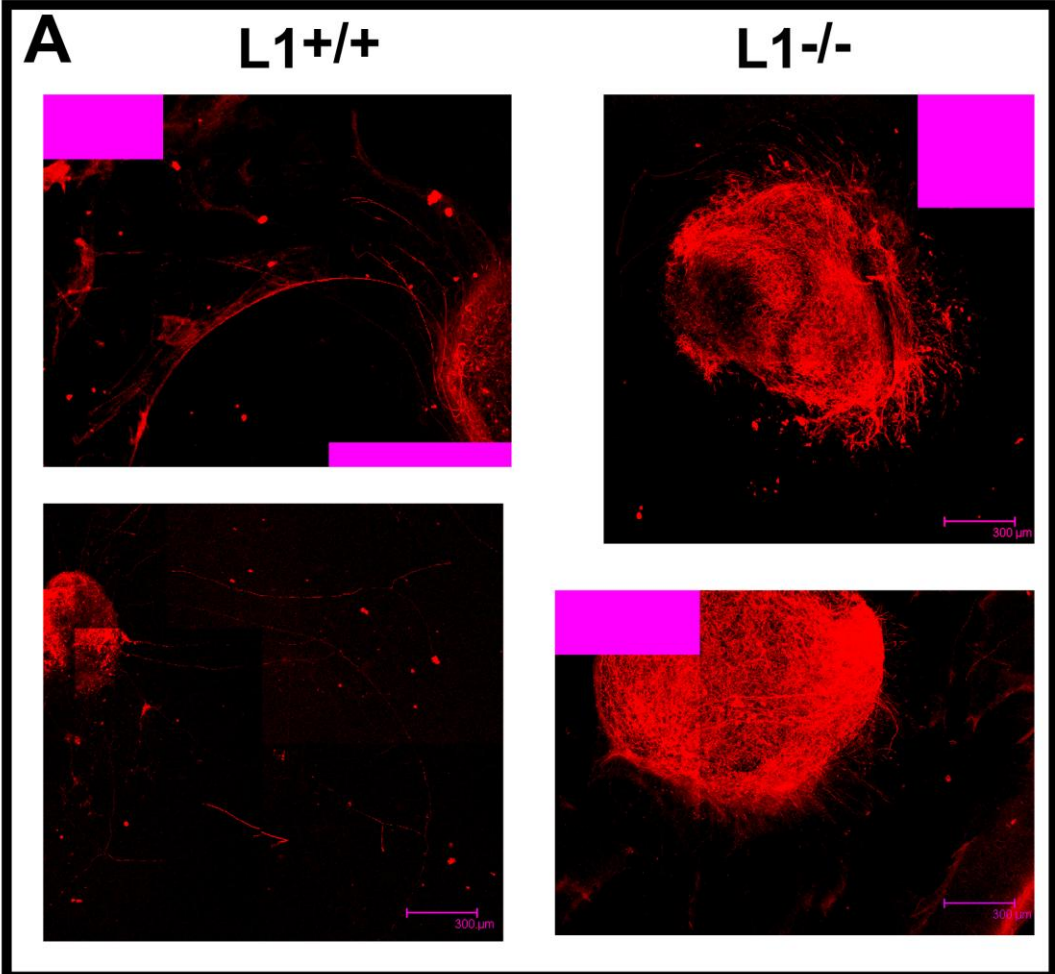
**Εικ.10:** Η έλλειψη του CAM L1 οδηγεί σε μείωση της δεσμιδοποίησης των CalB+ αξόνων στην CP και σε εσφαλμένη καθοδήγηση τους εντός του ιστού. Ανοσοϊστοχημικά πειράματα με την χρήση CalB, PV και 2H3 σε στεφανιαίες (E-H) και οβελιαίες (A-D) τομές ηλικίας E15,5. Στα φυσιολογικά και τα L1-/- ζώα οι πληθυσμοί των CalB+ PCs δεν φαίνεται να είναι διαφορετικοί όπως παρουσιάζονται εντός των στικτών γραμμών (A-D,G-H). Αντιθέτως η δεσμιδοποίηση των αξόνων τους παρουσιάζεται μειωμένη στα L1-/- ποντίκια με πολλούς μονήρεις άξονες μεταξύ των δεσμίδων (A-D'). Πέραν της μειωμένης δεσμιδοποίησης οι άξονες παρουσιάζονται να προβάλλουν προς διάφορες κατευθύνσεις και να μην ακολουθούν το μοτίβο των φυσιολογικών ζώων (C-F, μαύρα βέλη).





**Εικ.11: Στα ομόζυγα ελλειμματικά για το L1 ποντίκια οι άξονες των CalB+ PCs δεν εξέρχονται από την παρεγκεφαλίδα προς τους αιθουσαιούς πυρήνες. Οι άξονες των PVFs εισέρχονται φυσιολογικά εντός της CP.** Οβελιαίες κρυστομές E17,5 σε L1 <sup>+/+</sup> (**A**) και L1 <sup>-/-</sup> (**B**) στο επίπεδο του ICP και της εξόδου των CalB+ αξόνων με την χρήση των μαρτύρων CalB,L1,PV. Οι άξονες των PVF (PV+ άξονες) εισέρχονται φυσιολογικά στην αναπτυσσόμενη παρεγκεφαλίδα των L1 <sup>-/-</sup> ζώων (**F,coronal** και **B, sagittal**) όπως συμβαίνει και στα L1 <sup>+/+</sup> ζώα (**E,coronal** και **A, sagittal**) μέσω του ICP. Οι άξονες των CalB+ PCs στα L1 <sup>-/-</sup> ποντίκια (**D**) δεν καταλήγουν ποτέ στους VN (περιοχή εντός στικτών γραμμών (**C,D**), σε αντίθεση με τα L1 <sup>+/+</sup> (**C**) όπως φαίνεται σε αντίστοιχες τομές. CP: cerebellar plate, ICP: inferior cerebellar peduncle, VG: vestibular ganglion.

Τέλος είναι γνωστό από παλαιότερες μελέτες ότι το μόριο L1-CAM εκτός από τον ρόλο του στην δεσμιδοποίηση και την καθοδήγηση των αξόνων διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο στην ορθή έκφυση του νευράξονα<sup>143,218,219</sup>. Προκειμένου να διευκρινίσουμε εάν εκτός από τα ανωτέρω παρατηρούμενα προβλήματα στην αναπτυσσόμενη παρεγκεφαλίδα των L1 ζώων συνυπήρχε και πρόβλημα στην έκφυση και την επιμήκυνση του νευράξονα, πραγματοποιήσαμε μια σειρά πειραμάτων. Για την επίτευξη του παραπάνω στόχου καλλιιεργήσαμε ιστοτεμάχια παρεγκεφαλίδας ηλικίας E13,5 in vitro για 3 ημέρες από L1 <sup>+/+</sup> και L1 <sup>-/-</sup> ποντίκια σε μήτρες από matrigel (**Εικ.12**). Στο τέλος της 3<sup>η</sup> ημέρας πραγματοποιήσαμε ανοσοφθορισμό με CalB ως δείκτη για τους άξονες των PCs και 2H3 ως γενικό δείκτη των νευροϊνιδίων. Στα L1<sup>+/+</sup> ζώα η έκφυση του άξονα παρουσιάζονταν κανονική και σε ορισμένες περιπτώσεις το μήκος τους (CalB+) έφτανε σε μεγάλη απόσταση στο εσωτερικό του matrigel. Σε αντίθεση με τα WT στα L1 <sup>-/-</sup> ζώα οι νευράξονες παρουσιάζονταν περισσότερο αποδιοργανωμένοι και με μείωση στο μήκος των αξόνων.





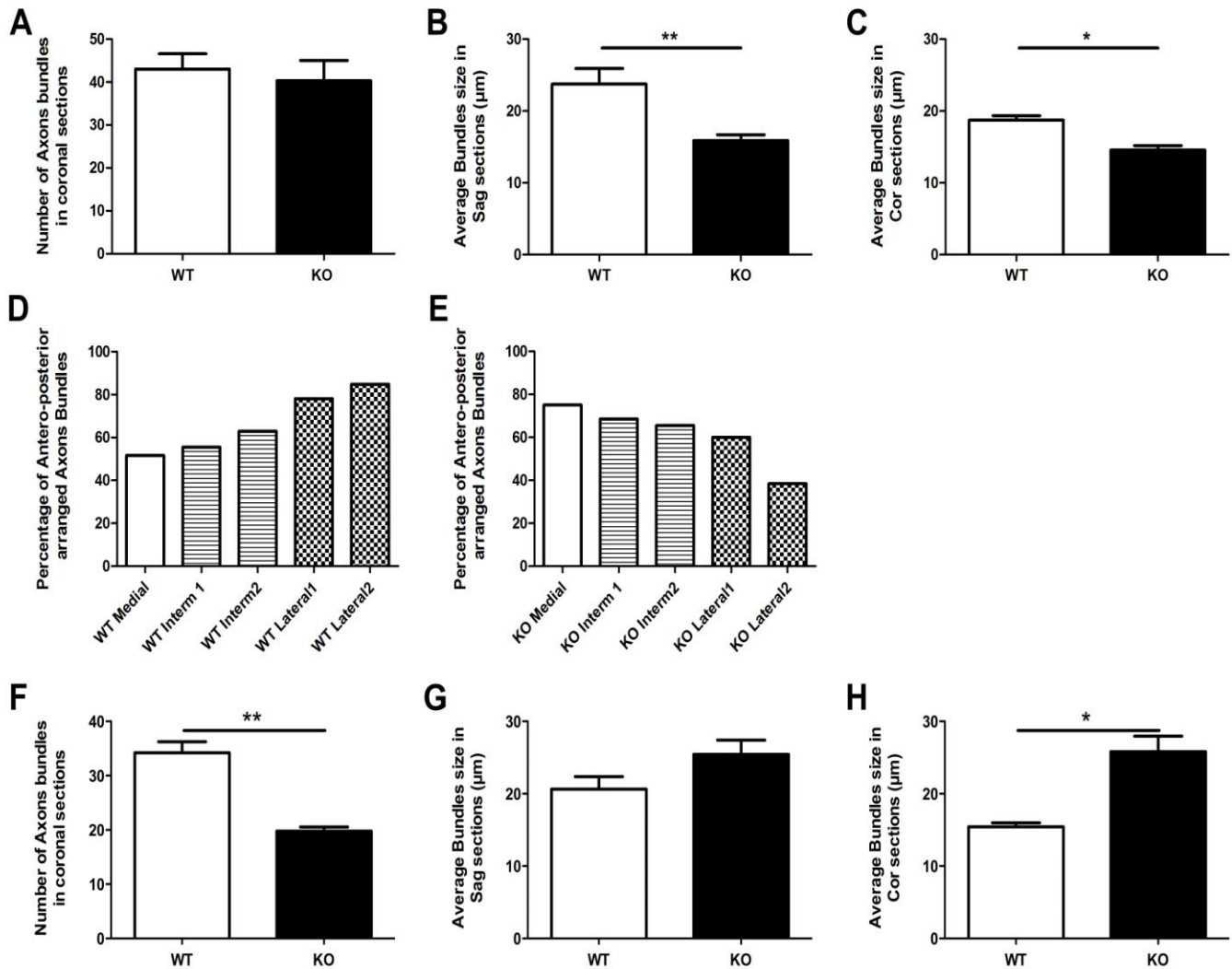
**Εικ.12:** Στα  $L1^{-/-}$  ζώα η έκφυση των νευράξόνων και το μήκος τους παρουσιάζονταν επηρεασμένα σε σχέση με τα  $L1^{+/+}$  (**A και B**). Επίσης στα  $L1^{-/-}$  ποντίκια οι νευράξονες παρουσιάζονταν περισσότερο αποδιοργανωμένοι (**A**). Οι εικόνες προέρχονται από καλλιεργημένα ιστοτεμάχια για περίοδο 3 ημερών σε matrigel και IHC με χρήση **CalB**. Κλίμακα A:300μm,B:75μm.

### **B5. Ανάλυση και μέτρηση των ανατομικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών των αξονικών δεσμίδων στα Six1 και L1 μεταλλαγμένα ζώα.**

Θέλοντας να αναλύσουμε και να ποσοτικοποιήσουμε τις αλλαγές που παρατηρήθηκαν στα Six1 και L1 μεταλλαγμένα ζώα πραγματοποιήσαμε ανάλυση του αριθμού των αξονικών δεσμίδων, του μεγέθους τους και της κατεύθυνσης τους σε τομές τόσο στεφανιαίες (προσθιο-οπίσθιος άξονας) όσο και οβελιαίες (έσω-έξω άξονας) σε όλο το πάχος της παρεγκεφαλίδας στην ηλικία E15,5 και E17,5. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε αντίστοιχες ανατομικά τομές μεταξύ WT και ομόζυγα μεταλλαγμένων ζώων.

Ο αριθμός των αξονικών δεσμίδων (axons bundles) μεταξύ φυσιολογικών και  $L1^{-/-}$  μυών δεν παρουσίαζε διαφορά (μέσος αριθμός δεσμίδων στο σύνολο της παρεγκεφαλίδας) τόσο στις στεφανιαίες όσο και στις οβελιαίες τομές (**Εικ.13A**). Αντιθέτως το μέσο μέγεθος των αξονικών δεσμίδων διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο γονοτύπων τόσο στις στεφανιαίες (coronal,cor) όσο και στις οβελιαίες (sagittal,sag) τομές, με τα  $L1^{-/-}$  ζώα να παρουσιάζουν μικρότερου πάχους δεσμίδες (**Εικ.13B,C**). Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαίωσαν τις παρατηρήσεις μας στον φαινότυπο των  $L1^{-/-}$  ζώων σχετικά με τις δεσμίδες των CalB+ PC αξόνων. Στα παραπάνω πειραματόζωα το μικρότερο μέγεθος των δεσμίδων πιθανώς οφείλεται στην μη σωστή δεσμιδοποίηση των αξόνων, με πολλούς μεμονωμένους νευράξονες να πορεύονται μεταξύ των δεσμίδων λόγω της έλλειψης του L1(confocal image,data not shown). Στην ανάλυση της κατεύθυνσης και της κατανομής των αξονικών δεσμίδων εντός της παρεγκεφαλίδας διαπιστώθηκε επίσης ανομοιογένεια μεταξύ WT και  $L1^{-/-}$  ζώων. Στις οβελιαίες τομές το ποσοστό των προθιο-οπίσθια κατευθυνόμενων αξόνων (επιμήκης φορά) στα φυσιολογικά ζώα αυξανόταν σταδιακά από τις εσωτερικές προς τις εξωτερικές τομές του ιστού από όπου εξέρχονταν μέσω του ICP(**Εικ.13D,E**). Εν αντιθέσει με τα παραπάνω αποτέλεσμα, στα  $L1^{-/-}$  ζώα παρατηρούνταν ακριβώς η αντίθετη κατεύθυνση στις δεσμίδες των CalB+ PCs. Εδώ το ποσοστό των προσθιο-

οπίσθια κατευθυνόμενων δεσμίδων σταδιακά μειωνόταν καθώς οδεύουμε από τις έσω προς τις έξω τομές του ιστού. Η ύπαρξη περισσότερων κάθετων δεσμίδων στις έξω τομές του ιστού (κάθετες στον οβελιαίο επίπεδο) στα ομόζυγα μεταλλαγμένα για το L1 ζώα συμβαδίζει και με την παρατηρούμενη απουσία εξόδου τους προς το εγκεφαλικό στέλεχος. Στην ανάλυση των Six1<sup>+/+</sup> και Six1<sup>-/-</sup> ζώων διαπιστώσαμε μια στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό των αξονικών δεσμίδων (CalB+) εντός του αναπτυσσόμενου ιστού (E15,5) μεταξύ τους (**Εικ.13F**). Στα ομόζυγα μεταλλαγμένα ζώα ο αριθμός των δεσμίδων ήταν σημαντικά μειωμένος. Παράλληλα το μέγεθος των δεσμίδων ήταν σημαντικά αυξημένο στα Six1<sup>-/-</sup> ζώα σε σχέση με τα φυσιολογικά. Τα ανωτέρω αποτελέσματα παρατηρήθηκαν τόσο στις στεφανιαίες όσο και στις οβελιαίες τομές (**Εικ.13G,H**).



**Εικ.13: Μορφολογικά και ανατομικά χαρακτηριστικά των αξονικών δεσμίδων των PCs στα L1 και Six1 (F-H) ομόζυγα μεταλλαγμένα ζώα σε σχέση με τα φυσιολογικά. Στα L1 ζώα (A-C) ο αριθμός των αξονικών δεσμίδων δεν διαφέρει μεταξύ των γονοτύπων (A), ενώ και στις στεφανιαίες και στις οβελιαίες τομές το μέγεθος των δεσμίδων είναι στατιστικά σημαντικά μειωμένο στους L1<sup>-/-</sup> μύες (B,C). Η ποσοτική κατανομή των οριζόντιων αξονικών δεσμίδων στο οβελιαίο επίπεδο από τις εσωτέρες περιοχές της παρεγκεφαλίδας έως τις εξώτερες όπου εξέρχονται μέσω του ICP (D,E). Παρουσιάζεται σημαντική διαφορά στην κατανομή των δεσμίδων στα L1 ζώα σε σχέση με τα φυσιολογικά. Αντιθέτως στα Six1<sup>-/-</sup> ποντίκια υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό (F) των αξονικών δεσμίδων αλλά και στο μέγεθος τους (G,H).**

Όσον αφορά την ανάλυση της κατεύθυνσης των δεσμίδων στις διαφορετικές τομές οι άξονες των Six1<sup>-/-</sup> ζώων δεν ακολουθούν κανένα συγκεκριμένο μοτίβο όπως συνέβαινε με τα L1<sup>-/-</sup> ζώα. Αντιθέτως οι δεσμίδες ήταν αποδιοργανωμένες οδεύοντας προς ποικίλες κατευθύνσεις εντός του ιστού. Όσες από αυτές κατάφερναν να φτάσουν πρόσθια, εξέρχονταν από το πιο πρόσθιο τμήμα του Restiform body όπως παρουσιάστηκε προηγουμένως αντί από το ICP (πρόσθια και έξω). Τα παραπάνω δεδομένα συμβαδίζουν με τις υπερ-δεσμιδοποιημένες αξονικές δεσμίδες που εντοπίσαμε στα Six1<sup>-/-</sup> ποντίκια στα οποία πιθανώς η έλλειψη των PVFs εντός αυτών οδηγεί στα προβλήματα στην δεσμιδοποίηση, αλλά και στην μετέπειτα εσφαλμένη καθοδήγηση τους προς το ICP.

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ II**

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής μελετήσαμε τον ρόλο των πρωτογενών αιθουσαίων ιών (PVF) στην οργάνωση και ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας και του αιθουσαίου συστήματος, κατά την πρώιμη αναπτυξιακή περίοδο. Η μοριακή ταυτότητα των αξόνων που δομούν το IFL ήταν γνωστή από παλαιότερες μελέτες στον αρουραίο. Ομοίως η προβολή και η οργάνωση των PVF χρονικά στον αρουραίο είχε μελετηθεί παλαιότερα<sup>12,220,221</sup>, πράγμα που στην παρούσα μελέτη αναλύθηκε εκτενέστερα στον ποντικό. Η χρονική περίοδος όπου πρώτη φορά οι PVF εισέρχονται εντός τις παρεγκεφαλδικής πλάκας νωρίς κατά την ανάπτυξη καθώς και η συμπόρευση με άλλους νευρικούς άξονες μελετήθηκε σε διαφορετικές αναπτυξιακές ηλικίες. Αυτή ή νέα πληροφορία συνεισέφερε στην δημιουργία της βασικής θεωρίας μας για τον πιθανό ρόλο των PVF (πρώτων προσαγωγών ιών εντός τις παρεγκεφαλίδας) στην οργάνωση και την ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας.

Συνοπτικά στην παρούσα μελέτη διαπιστώσαμε ότι όταν οι PVF απουσιάζουν πλήρως, ένα υποσύνολο των δεσμίδων των PCs δεν καταφέρνει να δεσμιδοποιηθεί και να καθοδηγηθεί σωστά εντός του ιστού. Επιπλέον το μόριο κυτταρικής συνάφειας L1 δείξαμε για πρώτη φορά ότι πιθανώς συμμετέχει ενεργά στις παραπάνω διεργασίες. Επίσης παρουσιάσαμε ότι οι άξονες των CalB+ PCs δεν δεσμιδοποιούνται σωστά ούτε εξέρχονται φυσιολογικά προς τους VN στα L1<sup>-/-</sup> ποντίκια. Αυτό μέχρι

τώρα δεν είχε ποτέ παρουσιαστεί σε ένα πολύ καλά χαρακτηρισμένο κατά τα άλλα μεταλλαγμένο ζώο (L1-/-) ιδιαιτέρως για την περιοχή της παρεγκεφαλίδας.<sup>222</sup> Πλην του L1 άλλα γνωστά μόρια κυτταρικής συνάφειας που εκφράζονται στο παραπάνω μονοπάτι δεν επηρεάζουν την οργάνωση του όταν αυτά απουσιάζουν.

### **1.Οι PV+ άξονες εντός τις αναπτυσσόμενης παρεγκεφαλίδας είναι οι άξονες αποκλειστικά των PVF και δεσμιδοποιούνται μαζί με τους άξονες των CalB+ PCs.**

Κατά την ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας όπως είχε δειχθεί και σε άλλες μελέτες στον αρουραίο οι PVF εισέρχονται πρώτοι εντός της παρεγκεφαλίδας. Παρουσιάσαμε ότι στην ηλικία E11,5 οι PVF που εισέρχονταν εντός της CP ήταν θετικοί για το μόριο της PV. Τα παραπάνω ήταν γνωστά από μελέτες στον αρουραίο<sup>37</sup>. Καθώς κατά την πρώιμη ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας και άλλοι κυτταρικοί πληθυσμοί ήταν θετικοί για την PV κάναμε χρήση του διαγονιδιακών ποντικών Islet-1-Cre;Tau-GFP. Σε αυτά τα πειραματόζωα οι άξονες των νευρώνων που εκφράζουν το Islet-1 σημαίνονταν με GFP. Το Islet-1 εκφράζεται από τα DRGs, κινητικούς νευρώνες και τα γάγγλια των αισθητικών κρανιακών νεύρων<sup>223-225</sup>. Έτσι καταφέραμε να σημάνουμε με GFP τους PVF που εκπορεύονταν από το VG και διαπιστώσαμε ότι υπήρχε πλήρης ταύτιση με τους άξονες που σημαίνονταν με PV εντός της IFL της παρεγκεφαλίδας.

Επιπλέον δείξαμε ότι οι PV άξονες του IFL συναντούν για πρώτη φορά τους CalB+ άξονες των PCs μετά την ηλικία E12,5 και μετέπειτα οργανώνονται και πορεύονται μαζί σχηματίζοντας δεσμίδες (E13,5-E15,5). Οι μονήρεις άξονες των PVF καταλήγουν στις οπίσθιες και κοιλιακές περιοχές της παρεγκεφαλίδας (περιοχή PCS) καθώς φεύγουν από την IFL. Παράλληλα οι μονήρεις άξονες των PCs ανέρχονται κάθετα σε επαφή με ανωτέρω άξονες και εισέρχονται εντός του IFL σχηματίζοντας δεσμίδες μαζί τους. Οι δεσμίδες αυτές στις περιοχές της οπίσθιας παρεγκεφαλίδας ακολουθούν οριζόντια πορεία που καθώς πλησιάζουμε στο πρόσθιο τμήμα γίνεται κάθετη. Η κάθετη πορεία τους συνεχίζεται εντός του ICP και μετά την είσοδο τους στο εγκεφαλικό στέλεχος οι CalB+ άξονες διαχωρίζονται και πορεύονται προς τους VN. Αυτή είναι η πρώτη φορά που το μονοπάτι των PVF και των CalB+ PCs μελετήθηκε εκτενώς και συσχετίστηκε με την παράλληλη οργάνωση των δύο ομάδων ινών.

## **2.Η παρουσία των PVFs εντός της αναπτυσσόμενης παρεγκεφαλίδας είναι απαραίτητη για την ορθή οργάνωση και καθοδήγηση των CalB+ PCs αξόνων.**

Θέλοντας να αποσαφηνίσουμε τον πραγματικό ρόλο των PVF στην ανάπτυξη και την οργάνωση της παρεγκεφαλίδας χρησιμοποιήσαμε τα μεταλλαγμένα για την SIX1<sup>-/-</sup> ποντίκια. Σε αυτά τα ζώα παρουσιάζονται σημαντικές διαταραχές σε όλα τα ανατομικά επίπεδα του στατικο-ακουστικού συστήματος κατά την διάρκεια της ανάπτυξης<sup>207,208</sup>. Είναι γνωστό ότι στα Six1<sup>-/-</sup> εκδηλώνεται αγενεσία του VIII αισθητικού γαγγλίου με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν PVF για να εισέλθουν εντός της παρεγκεφαλίδας. Σε αυτά τα ζώα διαπιστώσαμε ότι η έλλειψη των PVF οδηγούσε νωρίς κατά την ανάπτυξη σε υπερδεσμιδοποίηση των CalB+ PCs αξόνων. Οι αξονικές δεσμίδες του IFL παρουσιάζονταν με σημαντικά αυξημένη διάμετρο ενώ η κατεύθυνσή τους δεν ακολουθούσε την φυσιολογική πορεία που παρουσιάστηκε παραπάνω. Οι δεσμίδες πορεύονταν προς όλες τις κατευθύνσεις από τις οπίσθιες τομές έως και τις πρόσθιες. Επιπλέον δεν κατάφερναν να εξέλθουν από το οπίσθιο τμήμα του ICP όπως στα φυσιολογικά ζώα. Ένα μικρό ποσοστό τους που έφτανε στο πρόσθιο τμήμα της CP ακολουθούσε μία πορεία εντός του Restiform body (πρόσθιο ICP) και εξέρχονταν εκτός της παρεγκεφαλίδας. Αυτές οι δεσμίδες εν τέλει κατέληγαν στην ραχιαία και έξω περιοχή του πλάγιου VN.

Τα παραπάνω δεδομένα μας βοήθησαν να παρουσιάσουμε για πρώτη φορά ότι οι PVF διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην οργάνωση των δεσμιδών του IFL (CalB+ άξονες) όταν συνδεσμιδοποιούνται με αυτούς. Παράλληλα συμμετέχουν στην σωστή καθοδήγησή τους εντός του αναπτυσσόμενου παρεγκεφαλιδικού ιστού και στην ορθή έξοδό τους προς τους VN.

## **3.Απο τα μόρια κυτταρικής συνάφειας που εκφράζονται στο IFL κατά την ανάπτυξη, μόνο η έλλειψη του L1 οδηγεί σε διαταραχές στην δεσμίδες των αξόνων του.**

Από πειράματα τόσο του εργαστηρίου μας όσο και από παλιότερες μελέτες είναι γνωστό ότι μία ποικιλία μορίων κυτταρικής συνάφειας εκφράζεται στο μονοπάτι των ινών του IFL. Από τα μόρια αυτά πραγματοποιήσαμε ανάλυση για τα ALCAM (BEN/NSC1), NCAM και L1<sup>226,227</sup>. Αναδείξαμε ότι η απουσία των ALCAM και NCAM δεν επηρέασε την οργάνωση του μονοπατιού των PVF των πυρήνων του αιθουσαίου συστήματος (VN) ή των δεσμιδών των CalB+ PCs αξόνων. Αυτό πραγματοποιήθηκε μέσω μελέτης των παραπάνω ανατομικών δομών σε διαφορετικές αναπτυξιακές



περιόδους (E14,5-E17,5) σε ομόζυγα μεταλλαγμένα για τα παραπάνω CAMs ποντίκια.

Η έλλειψη του μορίου L1 έχει γνωστές από προηγούμενες μελέτες επιδράσεις στην μορφολογία της παρεγκεφαλίδας και του εγκεφάλου<sup>228</sup>. Παρουσιάσαμε δεδομένα που δείχνουν την έκφραση του L1 τόσο από τους PVFs όσο και από τους CalB+ PCs άξονες. Επίσης το μόριο L1 εκφράζεται από το σύνολο των αξόνων του ICP συμπεριλαμβανομένου και του RB. Στην παρούσα μελέτη ήταν η πρώτη φορά που παρουσιάστηκαν μεταβολές στην οργάνωση των CalB+ PCs αξόνων καθώς και των VN. Αναλυτικότερα οι δεσμίδες παρότι δεν ήταν λιγότερες σε αριθμό παρουσιάζονταν μικρότερες σε μέγεθος. Αρκετές από αυτές βρίσκονταν σε παράδοξη κατεύθυνση κυρίως στις πιο πρόσθιες περιοχές του ιστού, ενώ ποτέ δεν κατάφερναν να εξέλθουν μέσω του ICP προς το εγκεφαλικό στέλεχος. Έτσι CalB+ άξονες κατά την ανάπτυξη δεν εισέρχονταν στους VN σε κανένα επίπεδο.

Η έλλειψη του L1 συνοψίζοντας οδηγούσε σε υποδεσμιδοποίηση των ινών του IFL παρότι οι άξονες των PVF εισέρχονταν φυσιολογικά στην παρεγκεφαλίδα. Αυτό πιθανός να οφείλεται στο γεγονός του ότι το L1 θα μπορούσε μέσω ομοφυλικών ή ετεροφυλικών αλληλεπιδράσεων να οδηγήσει στην ορθή δεσμιδοποίηση και μετέπειτα ορθή καθοδήγηση των αξόνων.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα του δευτέρου μέρους της παρούσας διδακτορικής διατριβής παρουσιάσαμε ότι:

Όπως και στον αρουραίο έτσι και στον ποντικό οι πρώτες προσαγωγές ίνες προς την αναπτυσσόμενη παρεγκεφαλίδα είναι οι PVFs που από την ηλικία E11,5 εισέρχονται στην αρχέγονη παρεγκεφαλίδα<sup>36,37</sup>. Όπως και στον αρουραίο οι άξονες των PVF είναι PV+ και πορεύονται μαζικά προς το οπίσθιο τμήμα της παρεγκεφαλίδας όπου αποδεσμιδοποιούνται<sup>37,177</sup>.

Στο παρελθόν αρκετές ερευνητικές ομάδες θεώρησαν ότι η πρώιμη είσοδος των PVF καθώς και η μαζική τους επέκταση εντός τις αρχέγονης παρεγκεφαλίδας τόσο νωρίς κατά την ανάπτυξη, έπαιξε κάποιο ρόλο στην καθοδήγηση άλλων προσαγωγών ινών εντός της CP<sup>12,37</sup>. Έτσι έδιναν στα PVFs το ρόλο κυτταρικής σκαλωσιάς πάνω στην οποία οι μετέπειτα προσαγωγές ίνες πορεύονταν. Επιπλέον είχε αναφερθεί ότι καθώς προχωρούσαμε προς το τέλος της αναπτυξιακής περιόδου και κυρίως μετά την ηλικία E16,5 ο όγκος των PVF μειωνόταν σταθερά. Αρχικά οι νευρικές ίνες τους γίνονταν λιγότερο δεσμιδοποιημένες και τελικά ο αριθμός των νευρώνων του VG μειωνόταν

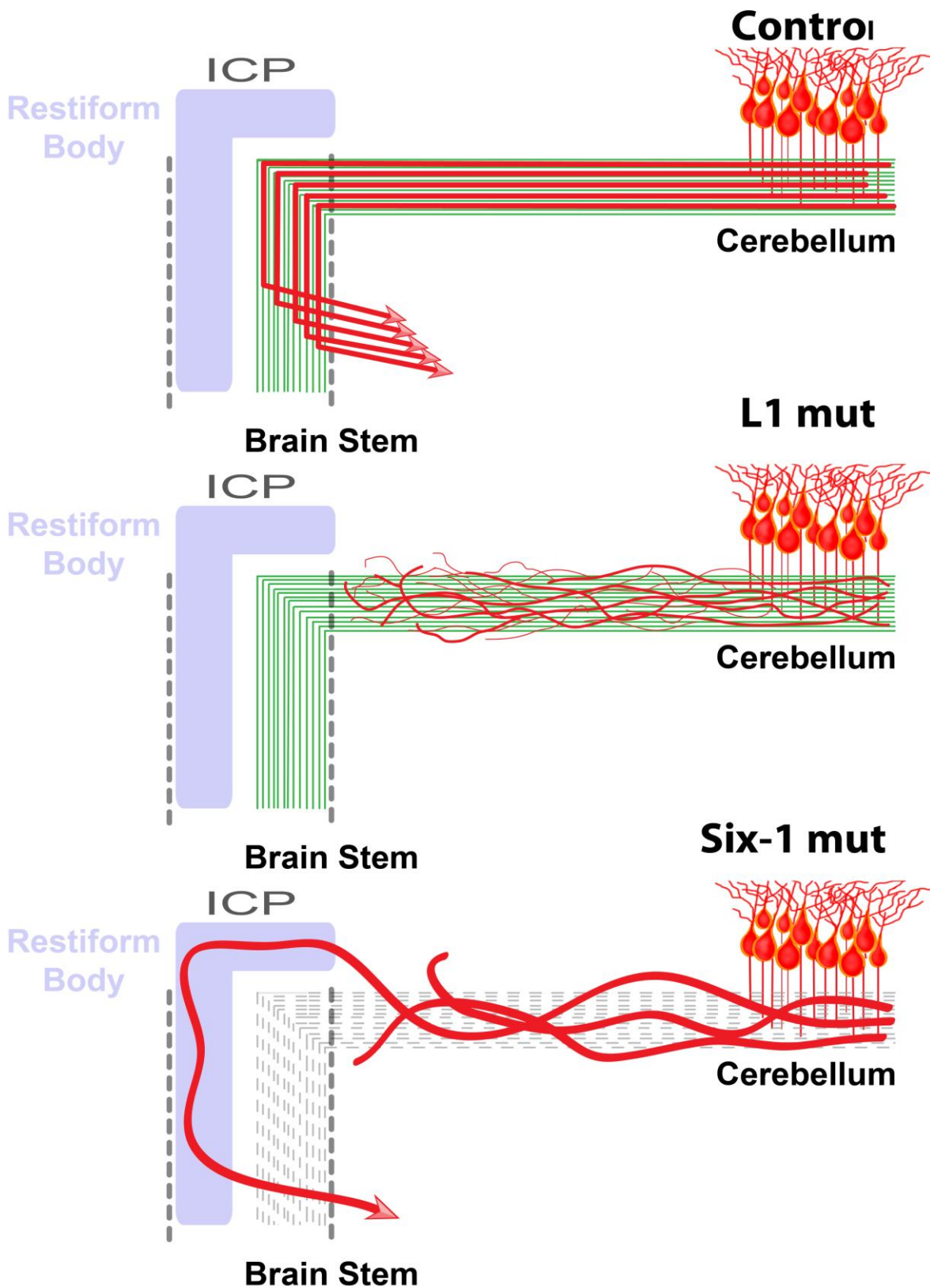
αντιστοίχως, εφόσον είχε επιτελέσει τον βασικό του ρόλο<sup>38</sup>. Η μείωση αυτή είχε σχετιστεί με αλλαγές στο αισθητικό επιθήλιο του αιθουσαίου συστήματος και πιο συγκεκριμένα την παρουσία των βλεφαρίδων στην κορυφή των αναπτυσσόμενων τριχωτών κυττάρων. Στην παρούσα μελέτη δείξαμε οι PVF εντός της παρεγκεφαλίδας συμπορεύονται και δεσμιδοποιούνται μαζί με τους άξονες των CalB+ PCs. Αυτό συμβαίνει έντονα από την ηλικία E13,5, ενώ παράλληλα στα οπίσθια τμήματα της παρεγκεφαλίδας παρουσιάζονται μονήρεις άξονες PVF και PC που πορεύονται μαζί. Η γνωστή όπως αναφέρθηκε παραπάνω αποδεσμιδοποίηση των PVF και η κατάδυσή τους στα οπίσθια τμήματα της παρεγκεφαλίδας, θα μπορούσε να πραγματοποιείται για την ορθή καθοδήγηση των CalB+ αξόνων εντός του IFL. Εκεί, εφόσον έχουν δεσμιδοποιηθεί μαζί οι CalB+ άξονες ακολουθούν την πορεία εισόδου των PVF και έτσι εξέρχονται πρόσθια της CP μέσω του ICP. Τέλος μετά την έξοδο από την CP πορεύονται προς τους VN όπου από τελούν και τους τελικούς τους στόχους ενός ποσοστού των CalB+ PC αξόνων.

Τα ανωτέρω αποτελέσματα στηρίχτηκαν στην μορφολογία του IFL μονοπατιού σε ποντίκια όπου οι PVF ήταν απόντες. Έτσι στα Six1<sup>-/-</sup> ποντίκια οι αξονικές δεσμίδες των CalB+ PC παρουσιάζονταν υπερδεσμιδοποιημένες και πορεύονταν προς ποικίλες λανθασμένες κατευθύνσεις. Η έλλειψη οργάνωσης των δεσμίδων και η λανθασμένη καθοδήγησή τους ήταν αποτέλεσμα της απουσίας των PVF. Επιπλέον ένα μικρό ποσοστό των αξόνων που έφθανε ορθά στις πιο πρόσθιες περιοχές της παρεγκεφαλίδας δεν εξέρχονταν από το οπίσθιο τμήμα του ICP προς το εγκεφαλικό στέλεχος όπως στα φυσιολογικά ζώα. Αυτές οι λίγες δεσμίδες εξέρχονταν μέσω του RB από το πρόσθιο τμήμα του ICP ενώ τελικά κατέληγαν στους VN.

Η έξοδος ενός μικρού ποσοστού CalB+ αξόνων που έφτανε στις πρόσθιες περιοχές της παρεγκεφαλίδας στα Six1<sup>-/-</sup> ζώα μας έδειξε ότι πιθανώς κάποιος μόριος στους άξονες του RB, που πιθανώς παρουσιάζεται και στους PVF, παίζει καθοριστικό ρόλο στην σωστή καθοδήγησή τους. Από τα μόρια κυτταρικής συνάφειας που μελετήθηκαν μόνο η απουσία του L1 οδηγούσε σε διαταραχές στις δεσμίδες του IFL. Επί της απουσίας του L1 οι δεσμίδες των PVF εισέρχονταν φυσιολογικά εντός της CP. Παρόλα αυτά οι άξονες των CalB+ PCs παρουσιάζονταν υποδεσμιδοποιημένοι και πλήρως αποδιοργανωμένοι, ενώ ποτέ δεν κατάφεραν να εξέλθουν από την παρεγκεφαλίδα. Απο παλαιότερες μελέτες του παρεγκεφαλιδικού ιστού στα L1<sup>-/-</sup> ζώα είναι γνωστό ότι αυτή παρουσιάζει συγκεκριμένες διαταραχές. Έτσι στα L1<sup>-/-</sup> ποντίκια το μέγεθος της 4<sup>ns</sup> κοιλίας παρουσιάζεται αυξημένο ενώ το μέγεθος του σκώληκα

μειωμένο<sup>229</sup>. Αυτή είναι η πρώτη φορά που παρουσιάζονται διαταραχές στην καθοδήγηση και την οργάνωση αξονικών δεσμίδων της παρεγκεφαλίδας στα L1<sup>-/-</sup> ζώα.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα οι PVF αποτελούν το καθοδηγητικό μονοπάτι για την δεσμιδοποίηση των CalB+ PCs ινών και την καθοδήγηση τους εκτός παρεγκεφαλίδας μέσω του ICP. Πιθανό η παρουσία του L1 στην επιφάνια των PVF αξόνων βοηθά στην συνδεσμιδοποίηση και την καθοδήγηση μέσω Cis αλληλεπιδράσεων, πιθανός ομοφυλικών ή ετεροφυλικών. Επίσης, η πλήρης απουσία του μορίου L1 παρά την ύπαρξη της κυτταρικής σκαλωσιάς (PVF) οδηγεί σε ελλιπώς δεσμιδοποιημένες και λανθασμένα προσανατολισμένες νευρικές ίνες που δεν εξέρχονται από την CP (**Εικ.14**).



Εικ.14: Παρουσία του φαινοτύπου στις δεσμίδες των CalB+ PCs αξόνων καθώς και του PVF μονοπατιού στα διαφορετικά μεταλλαγμένα ζώα που μελετήθηκαν.

Μεγαλύτερη ανάλυση του τύπου των αλληλεπιδράσεων μεταξύ PVF και PCs (calb+) αξόνων πρέπει να πραγματοποιηθεί για την ανάδειξη του μηχανισμού που οδηγεί στο παραπάνω αποτέλεσμα. Επίσης επιπλέον όρια που μπορούν να συμμετέχουν στο παραπάνω μονοπάτι πρέπει να αναδεχθούν. Τέλος η μελέτη του πληθυσμού των DCN τόσο στα Six1 όσο και στα L1 μεταλλαγμένα πρέπει να πραγματοποιηθεί. Αυτό θα μπορούσε να βοηθήσει στην ανάδειξη του πιθανού ρόλου της IFL στην οργάνωση και άλλων κυτταρικών πληθυσμών της CP λόγο της κομβικής του θέσης κατά την ανάπτυξη.

## **Γ.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **Γ1.1.ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ**

#### **Απομόνωση Γενωμικού DNA από ιστούς**

Τμήμα της ουράς του ζώου, χρησιμοποιείται για απομόνωση γενετικού υλικού και γονοτύπηση.

A. Για ενήλικα ζώα, ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

1. Η ουρά τοποθετείται σε 400μl διαλύματος λύσης (tail digestion buffer: 100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, pH8, 25 mM EDTA, pH: 8.0, 0.5% SDS
2. Επώαση για 30' στους 37 °C.
3. Προσθήκη 15 μl πρωτεΐνάσης K (10 μg/μl) και επώαση στους 55 °C για 6-18 ώρες.
4. Προσθήκη RNase (10 μg/μl) και επώαση στους 37 °C για 10'.
5. Φυγοκέντρηση για 5' στις 13000rpm και απομόνωση του υπερκείμενου σε νέα σωληνάρια.
6. Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης και ήπια ανάδευση για την ανάμιξη των φάσεων.

7. Φυγοκέντρωση για 10' στις 13200rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου
8. Πλύση της πελέτας με 70% αιθανόλη
9. Φυγοκέντρωση για 5' στις 13200rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου
10. Επαναδιάλυση της πελέτας σε 100 μl T.E.

### **Γ1.2. Πειραματόζωα και αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)**

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τα *Tag+/-* και *Tag-/-* ζώα, περιγράφονται από τους Fukamauchi et al, 2001. Οι εκκινητές και η κατασκευή των *Six1+/+* *Six1-/-* ζώων περιγράφεται από τους Christine Laclef et al, 2003. Τα *Six1* πειραματόζωα χορηγούνταν από το εργαστήριο του Pascal Maire (Département Génétique, Développement et Pathologie Moléculaire). Τα *islet1;Cre*, *ALCAM* και *Tau;GFP* ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν διαθέσιμα και χορηγούνταν κατόπιν αιτήματος από το animal house του IBENS (Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure, Paris).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη γονοτύπηση των *L1* και *TAG;GFP* διαγονιδιακών ζώων παρουσιάζονται παρακάτω:

#### ***Tag1<sup>loxP-GFP-loxP-DTA</sup>***

- **DTANcoI-F1: 5'-ccatggatcctgatgatgtgttg-3'**
- **DTAEcoRI-R1: 5'-gaattctcacaagaatcgcctgacacg-3'**

Οι παραπάνω εκκινητές χρησιμοποιούνται σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και επιτρέπουν την ανίχνευση του DTA στο γονιδίωμα των ζώων, ως προϊόν μεγέθους ~599bp. Το πρόγραμμα για την αντίδραση περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:



4 λεπτά στους 94°C, 32 κύκλοι από 30" στους 94°C, 45" στους 61°C και 1 λεπτό στους 72°C ακολουθούμενοι από 5 λεπτά στους 72°C. Διατήρηση της αντίδρασης στους 4°C.

**L1** (όπως περιγράφηκαν στο Xuezhai Cui et al, 2011)<sup>230</sup>

Η ημέρα της σύλληψης θεωρήθηκε η εμβρυϊκή ημέρα 0.5 (E0.5). Οι έγκυες θηλυκές θυσιάστηκαν με αποσύνδεση της σπονδυλικής τους στήλης (cervical dislocation) για συλλογή των εμβρύων, ενώ οι μύες σε μετεμβρυϊκή ηλικία (P0-P5) θυσιάστηκαν με αποκεφαλισμό. Στα ζώα μεγαλύτερων μεταγεννητικών σταδίων (>P5) και στα ενήλικα, πραγματοποιήθηκε ενδοκαρδιακή έγχυση μονιμοποιητικού δ/ματος 4% PFA σε 1xPBS. Τα έμβρυα και οι ιστοί από τα ενήλικα ζώα συλλέχθηκαν σε φωσφορικό διάλυμα PBS 1x.

Σε κάθε περίπτωση, οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις παρακάτω συνθήκες, σε προγράμματα κατάλληλα για τους εκκινητές κάθε αντίδρασης:

Γενωμικό DNA από ουρά έως 500pg, 2.5ng από κάθε εκκινητή, 0.2μM dNTPs

και 1-2units Taq polymerase (Minotech ή Finzymes) σε 1x από το αντίστοιχο PCR buffer.

Αντίδραση PCR	Πρόγραμμα αντίδρασης
<b><u>TAG1</u></b>	2 λεπτά στους 94°C, 30 κύκλοι από 30"στους 94°C, 30"στους 54°C και 30"στους 72°C ακολουθούμενοι από 10 λεπτά στους 72°C. Συντήρηση στους 4°C.
<b><u>L1</u></b>	2 λεπτά στους 94°C, 30 κύκλοι από 30"στους 94°C, 30"στους 54°C και 30"στους 72°C ακολουθούμενοι από 10 λεπτά στους 72°C. Συντήρηση στους 4°C.
<b><u>TAG1;GFP</u></b> <b><u>(TAG;DTA)</u></b>	4 λεπτά στους 94°C, 32 κύκλοι από 30"στους 94°C, 45"στους 61°C και 1 λεπτό στους 72°C ακολουθούμενοι από 5 λεπτά στους 72°C. Διατήρηση της αντίδρασης στους 4°C.

## **Γ2.ΒΑΣΙΚΕΣ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΙΣΤΩΝ ΓΙΑ ΚΡΥΟΤΟΜΕΣ ΚΑΙ ΚΑΛΜΙΕΡΓΙΕΣ**

#### **2.1.1 Επεξεργασία ιστών για κρυτομές και ανοσοϊστοχημεία.**

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

εγκέφαλος. Ο ιστός τοποθετείται σε 5-10 ml 4% παραφορμαλδεΐδης σε 1xPBS στους 4°C για 12-18 ώρες. Ακολουθούν:

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

### **2.1.2 Μικροτόμο δόνησης (Vibratome)**

1. Απομόνωση εγκεφάλων μέσα σε 1x PBS και μονιμοποίηση σε 4% PFA, για 12-18 ώρες στους 4°C. Αν οι ιστοί προέρχονται από ζώα μεταγεννητικών σταδίων, ή ενήλικα, τότε πριν την απομόνωση πραγματοποιείται ενδοκαρδιακή έγχυση 1x PBS και ακολούθως 4%PFA στο ζώο, για απομάκρυνση του αίματος από τα αγγεία και βέλτιστη μονιμοποίηση του εγκεφάλου.
2. Πλύση με 1x PBS

### **2.1.2. A. Για κρυοτομές**

1. Τοποθέτηση του ιστού σε δ/μα 30% σουκρόζης σε 1x PBS, για κρυοπροστασία. Ο ιστός παραμένει στο δ/μα αυτό στους 4°C, έως ότου καταβυθιστεί.
2. Έγκλιση του ιστού σε πήκτωμα 15% σουκρόζης και 7,5% ζελατίνης σε 1x PBS.
3. Πάγωμα του ιστού σε ισοπεντάνιο, στους -45°C και φύλαξη στους -80°C, έως ότου κοπεί σε κρυοτόμο (LEICA) σε τομές πάχους 10μm. Οι τομές συλλέγονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και διατηρούνται στους -20°C.

### **2.1.2. B. Για vibratome**

1. Έγκλιση του ιστού σε πήκτωμα 4% αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως, σε 1x PBS.
2. Ο ιστός κόβεται σε vibratome (LEICA) μέσα σε 1x PBS, σε τομές πάχους 40μm, οι οποίες συλλέγονται με πινέλο μέσα σε 1x PBS και διατηρούνται στους 4°C.

## **2.2. ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ**

### **2.2. A1. Σε τομές κρυοτόμου**

1. Πλύση των τομών σε PBS 1x + 0,1% Triton (1x PBT) για 5'.
2. Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων με 1% Fetal Bovine Serum (FBS) σε 1x PBT (blocking solution), 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Επώαση των τομών με πρωτοταγές αντίσωμα, αραιωμένο σε blocking solution, για 12-18 ώρες στους 4°C.
4. Πλύση των τομών με 1x PBT, 3 x 10'.
5. Επώαση των τομών στο σκοτάδι, με δευτεροταγές αντίσωμα αραιωμένο σε blocking solution, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Πλύση των τομών με 1x PBT, 3 x 10'.
7. Επώαση με DAPI ή TOPRO, αραιωμένα 1:1000 σε 1x PBS, για 10' σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Πλύσεις με 1x PBT 3 x 5'

9. Προσθήκη MOWIOL και καλυπτριδων.

### **2.2 .A2. Σε κρυοτομές ενηλίκων ζώων**

1. Δεύτερη 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 4oC

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. Πλύση με To-Pro3 iodide (invitrogen) σε αραιωμένο 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 καλυπτριδων

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

\*Για την ανοσοϊστοχημεία τομών ενήλικου εγκεφάλου με πολυκλωνικό αντίσωμα για την TAG-1, οι αντικειμενοφόροι επωάστηκαν αρχικά σε διάλυμα κιτρικού νατρίου 10 mM για 1΄ υπό βρασμό. Στη συνέχεια οι αντικειμενοφόροι στο παραπάνω διάλυμα αφήνονται να κρυώσουν και ακολουθούν 3 πλύσεις x10΄ σε 1xPBS. Έπειτα, εφαρμόζεται το πρωτόκολο που περιγράφηκε παραπάνω.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα ανοσοιστοχημείας και ανοσοφθορισμού σε κύτταρα περιγράφονται παρακάτω.

### **2.2.B. c-Fos ανοσοφθορισμός σε κρυοτομές**

Εν συντομία:

1. Τα πλακίδια επώαστηκαν σε 1xTBS-T (50 mM Tris-HCL, 150 NaCl, 0,1% Tween-20 σε dH<sub>2</sub>O, pH7,6) για 5-10 λεπτά
1. Μεταφορά για 60 λεπτά σε PGTA (1xPBS, 0.2% ζελατίνη, 0,25% Triton, 0,1% αζίδιο του νατρίου).
2. Επώαση για 16-18h με πρωτοταγές αντίσωμα anti-cFos κουνελιού (1: 1000, Santa Cruz Biotechnology, ευγενική δωρεά του Σ Garel, Εργαστήριο Brain Ανάπτυξης και πλαστικότητα, IBENS-INSERM-CNRS, Παρίσι, Γαλλία) σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Πλύση 3 φορές για 10 λεπτά (3x10') εντός 1X PBT (1 x PBS, 0,1% Tween-20) υπό ήπιο λίκνισμα
4. Επώαση με δευτερογενές αντίσωμα anti-Rb-488 (Molecular Probes, Eugene, OR, 1: 800) αραιωμένο σε PGTA για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Πλύση 3 φορές για 10 λεπτά (3x10') εντός 1X PBT και τοποθετείται Mowiol και καλυπτρίδες

### **2.2. Γ. Σε τομές vibratome**

1. Πλύση των τομών σε PBS 1x + 0,1% Triton (1x PBT) για 5'.
2. Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων με 1% Fetal Bovine Serum (FBS) σε 1x PBT (blocking solution), 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Προσθήκη πρωτοταγούς αντισώματος, αραιωμένου σε blocking solution, για 12-18 ώρες στους 4°C.
4. Πλύσεις των τομών σε PBS 1x υπό ανάδευση, 3 x 10'
5. Προσθήκη δευτεροταγούς αντισώματος αραιωμένου σε blocking solution και επώαση των τομών στο σκοτάδι, για 12-18 ώρες στους 4°C.



6. Πλύσεις των τομών σε PBS 1x υπό ανάδευση, 3 x 10΄
7. Επώαση με DAPI ή TOPRO, αραιωμένα 1:1000 σε 1x PBS, για 10΄ σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Οι τομές εμβαπτίζονται σε δ/μα 0.2% (m/v) ζελατίνης (porcine skin gelatin, SIGMA) σε dH<sub>2</sub>O με 50mM Tris-HCl, pH 7.5.
9. Τοποθέτηση των τομών σε αντικειμενοφόρους πλάκες με MOWIOL και καλυπτρίδες.

### **2.2.Δ. Αντισώματα**

<b>Πρωτοταγή αντισώματα</b>	<b>Αραίωση</b>	<b>Ισότυπος</b>
Anti-Tag1 (TG3, Traka et al., 2003)	1:1000	Rabbit polyclonal
Anti-GFP (Invitrogen)	1:500	Mouse IgG
Anti-GFP (Minotech)	1:5000	Rabbit IgG
Anti-GFP (Nacalai Tesque)	1:1000	Rat IgG
4D7 (Developmental Studies Hybridoma Bank)	1:1000	Mouse IgM
Anti-GABA (Sigma)	1:1000	Rabbit IgG
Anti-PV (Chemicon)	1:1000	Mouse IgG
Anti-Tuj1 (COVANCE)	1:1000	Mouse IgG
Anti-CR (Swant)	1:1000	Rabbit IgG
Anti-Caspase3 (Cell Signaling)	1:200	Rabbit IgG
Anti-Neurofilament (COVANCE)	1:1000	Rabbit IgG

Anti-Tbr-1 (cat. no. Ab31940, Abcam,)	1:600	Rabbit IgG
Anti-Tbx21 (T-box transcription factor, kind gift from Y. Yoshihara)	1:10,000	Rabbit IgG
Anti-BrdU (Oxford Biotech)	1:1000	Rat IgG
Anti-OCAM (kind gift from Y. Yoshihara)	1:1000	Rabbit polyclonal
Anti-mOR-EG (kind gift from Y. Yoshihara)	1:1000	Guinea pig IgG
Anti-OR-I7 (kind gift from Y. Yoshihara)	1:5000	Guinea pig IgG
Anti-Kirrel2 protocol described in Serizawa et al. (2006), kind gift from H. Sakano)	1:1000	Rabbit IgG
Anti-calbindin 1(28kD) (Millipore, AB1778)	1:800	Rabbit polyclonal
Anti-Parvalbumin antibody (Abcam, ab11427)	1:1000	Rabbit polyclonal
Anti-Parvalbumin antibody (Sigma, SAB2500752)	1:500	Goat polyclonal
Anti-L1 (Millipore, MAB5272)	1:1000	Rat monoclonal
Anti-Cfos (Santa Cruz Biotechnology, kind gift from S., Garel)	1: 1000	Rabbit polyclonal
Anti-L1 (Abcam, ab24345)	1:500	Mouse IgG

<b>Δευτεροταγή αντισώματα</b>	<b>Αραίωση</b>
Goat-anti-mouse IgG_ALEXA 488 (Molecular Probes)	1:800
Goat-anti-mouse IgG_ALEXA 555 (Molecular Probes)	1:800
Goat-anti-mouse IgG_ALEXA 633 (Molecular Probes)	1:800
Goat-anti-mouse IgM_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
Goat-anti-rabbit IgG_ALEXA 633 (Molecular Probes)	1:800
Donkey-anti-Rat IgG_ALEXA 488 (Molecular Probes)	1:800
Donkey-anti-Rat IgG_ALEXA 633 (Molecular Probes)	1:800
Donkey-anti-Goat IgG_ALEXA 555 (Molecular Probes)	1:800
Donkey-anti-Goat IgG_ALEXA 488(Molecular Probes)	1:800
Goat Anti-Guinea pig ALEXA 488 (Abcam)	1:800
Goat Anti-Guinea pig ALEXA 555 (Abcam)	1:800

### **2.2.E. Ιστολογική χρώση αιματοξυλίνης –ηωσίνης**

Η συγκεκριμένη ιστολογική χρώση μας δίνει τη δυνατότητα παρατήρησης των δομών του εγκεφάλου, σε επίπεδο κυττάρων. Εμβαπτίζοντας τομές εγκεφαλικού φλοιού σε διαδοχικά διαλύματα αιματοξυλίνης και ηωσίνης επιτυγχάνουμε τη χρώση των κυτταρικών πυρήνων με σκούρο μπλε χρώμα και του κυτταροπλάσματος με σκούρο ροζ. Στη συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιήσαμε τομές κρουστού πάχους 10-14μm. Ακολούθησαν:

1. Εμβάπτιση τομών σε 100% αιθανόλη για 2 λεπτά
2. Πλύσεις με απιονισμένο νερό
3. 20-30 εμβαπτίσεις τομών σε διάλυμα αιματοξυλίνη
4. Πλύσεις με απιονισμένο νερό
5. 15-20 εμβαπτίσεις σε διάλυμα ηωσίνης
6. 5 εμβαπτίσεις σε 70% αιθανόλη
7. 5 εμβαπτίσεις σε 80% αιθανόλη
8. 5 εμβαπτίσεις σε 96% αιθανόλη
9. 5 εμβαπτίσεις σε 100% αιθανόλη

10. Εμβάπτιση τομών σε ξυλένιο
11. Προσθήκη ρητινώδους μέσου Endellan και τοποθέτηση καλυπτρίδων

### Απαραίτητα Διαλύματα

<u>Διάλυμα ηωσίνης</u>	<u>Διάλυμα Αιματοξυλίνης</u>
0.25% ηωσίνη	Σκόνη αιματοξυλίνης 10%
80% αιθανόλη	95% αιθανόλη
0.5% οξικό οξύ	

## 2.3. ΣΗΜΑΝΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΒΡΩΜΟΔΕΟΞΥΟΥΡΙΔΙΝΗΣ (BrdU)

### 2.3. 1. Ένεση με BrdU

1. Η BrdU διαλύεται μέσα σε H<sub>2</sub>O σε συγκέντρωση ~10mg/ml. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C και ξεπαγώνεται πριν από τη χρήση στους 37°C.
2. Στις εγκύους πραγματοποιείται ενδοπεριτοναϊκή ένεση με διάλυμα BrdU, σε δόση 50-100μg ανά γραμμάριο βάρους του ζώου. Ο μέγιστος όγκος που ενύεται είναι 150μl και η αραίωση της BrdU γίνεται σε διάλυμα PBS 1x.
3. Η ουσία αφήνεται να ενσωματωθεί στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα για ½-24 ώρες, ανάλογα με το επιθυμητό αποτέλεσμα.  
ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η BrdU ενσωματώνεται για ~6 ώρες πριν αποσυντεθεί. Επομένως αν χρειάζεται εκτενής σήμανση μεγάλου αριθμού κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα, η ένεση πρέπει να επαναλαμβάνεται ανά 6 ώρες.

### **2.3. 2. Επεξεργασία των εμβρύων**

1. Τα έμβρυα συλλέγονται στο επιθυμητό αναπτυξιακό στάδιο μετά την ένεση και απομονώνεται ο εγκέφαλος.
2. Μονιμοποίηση με 4%PFA σε PBS 1x, για 12-18 ώρες στους 4°C.
3. Ακολουθεί επεξεργασία των ιστών σύμφωνα με το πρωτόκολλο για κρυοτομές

### **2.3. 3. Ανοσοφθορισμός**

1. Αν η σήμανση της BrdU ακολουθεί έπειτα από άλλη ανοσοϊστοχημεία, ή υβριδοποίηση *in situ*, τότε οι τομές μονιμοποιούνται για 10' με δ/μα 4%PFA σε PBS 1x σε θερμοκρασία δωματίου και όλα τα επόμενα βήματα πραγματοποιούνται στο σκοτάδι.
  2. Πλύσεις με PBS 1x, 3 x 5'
  3. Αποδιάταξη του DNA
    - Αν η σήμανση της BrdU ακολουθεί έπειτα από υβριδοποίηση *in situ*, η αποδιάταξη του DNA πραγματοποιείται με επώαση των τομών σε δ/μα 2N HCl σε PBS 1x , με 0,1% Triton-X100, για 15' στους 37°C.
    - Αν η σήμανση της BrdU ακολουθεί έπειτα από άλλη ανοσοϊστοχημεία, η αποδιάταξη του DNA πραγματοποιείται με επώαση των τομών σε δ/μα 2N HCl σε PBS 1x , με 0.1% Triton-X100, για 30' στους 37°C.
- ΣΗΜΕΙΩΣΗ: 37% HCl αντιστοιχεί σε κανονικότητα 12N.
4. Επώαση των τομών με δ/μα εξουδετέρωσης (Sodium Tetraborate 0.1M, pH 8.5), 3 x 8' σε θερμοκρασία δωματίου.
  5. Πλύση με PBS 1x και 0.01% Triton.



6. Επώαση με αντίσωμα για BrdU, αραιωμένο σε PBS 1x, 10% FBS, 0.1% Triton, 12-18 ώρες στους 4<sup>o</sup>C.
7. Πλύσεις με PBS 1x, 0.01% Triton, 3 x 10' σε θερμοκρασία δωματίου
8. Επώαση με το δευτεροταγές αντίσωμα αραιωμένο σε PBS 1x, 10% FBS, 0.1% Triton, 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Πλύσεις με PBS 1x, 0.01% Triton, 3 x 10' σε θερμοκρασία δωματίου
10. Προσθήκη MOWIOL και καλυπτριδων

Σημείωση: Για το συνδυαστικό c-Fos / BrdU πρωτόκολλο IHC το c-Fos πραγματοποιείται πριν από το πρωτόκολλο BrdU.

### **Γ.3.ΟΡΓΑΝΟΤΥΠΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ**

#### **3.1ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΙΣΤΟΥ ΠΑΡΕΓΚΕΦΑΛΪΔΑΣ**

##### **3.1.1. Ιστοτεμάχια παρεγκεφαλίδας (*matrigel explants*)**

Για το συγκεκριμένο πείραμα, χρησιμοποιήθηκε Matrigel (BD Biosciences) το οποίο σε θερμοκρασία 4<sup>o</sup>C είναι σε υγρή μορφή, ενώ στους 37<sup>o</sup>C δημιουργεί πήκτωμα. Την προηγούμενη ημέρα της καλλιέργειας, το Matrigel τοποθετείται σε πάγο και αφήνεται στους 4<sup>o</sup>C για να ξεπαγώσει.

Παρεγκεφαλίδες εμβρύων E13.5 –E15,5 απομονώνονται μέσα σε θρεπτικό μέσο L15-Leibovitz με αντιβιοτικά. Κάτω από στερεοσκόπιο, απομακρύνονται οι μήνιγγες και τα 2 ημισφαίρια χωρίζονται, αποκαλύπτοντας τις κοιλίες και τις εσωτερικές δομές του εγκεφάλου. Ακολουθεί απομόνωση της παρεγκεφαλίδας τους μέσα στο ίδιο θρεπτικό μέσο και τομή της σε 8-10 ιστοτεμάχια. Τα ιστοτεμάχια επωάζονται μέσα σε θρεπτικό L15-Leibovitz με αντιβιοτικά και 10% FCS για 1 ώρα σε κλίβανο με 5%CO<sub>2</sub> στους 37<sup>o</sup>C.

Για τη συγκεκριμένη διατριβή πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες τομών παρεγκεφαλίδων εμβρύων E13.5 και E15.5, με την ακόλουθη διαδικασία:

Κατά τη διάρκεια της επώασης, παρασκευάζεται το πήκτωμα του Matrigel, ως εξής:

Το Matrigel αναμιγνύεται με θρεπτικό Neurobasal/B27 σε αναλογία 1:1. ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τόσο το θρεπτικό υλικό, όσο και οι πιπέτες και τα tips που χρησιμοποιούνται για την ανάμιξη, πρέπει να είναι παγωμένα, έτσι ώστε το matrigel να παραμείνει σε υγρή μορφή. Όλες οι διεργασίες πραγματοποιούνται στον πάγο.

Με τη βοήθεια πιπέτας Gilson, δημιουργείται ένα πολύ λεπτό στρώμα matrigel (~150-200μl) στην επιφάνεια τρυβλίου/καλυπτρίδας (στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν 4-well plates, NUNC). Στη συνέχεια τα τρυβλία τοποθετούνται στον κλίβανο, σε θερμοκρασία 37°C για 45-60', προκειμένου να δημιουργηθεί πήκτωμα.

Μόλις δημιουργηθεί το πήκτωμα, τοποθετούνται πάνω του τα ιστοτεμάχια, με τη βοήθεια πιπέτας Gilson, ή Pasteur. Στη συνέχεια, πάνω σε κάθε ιστοτεμάχιο προστίθεται μια σταγόνα matrigel/neurobasal 1:1 και τα τρυβλία επανατοποθετούνται στον κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C για 45', προκειμένου να δημιουργηθεί και πάλι πήκτωμα. Ακολούθως, προστίθεται σε κάθε τρυβλίο θρεπτικό Neurobasal/B27 και τα ιστοτεμάχια καλλιεργούνται σε κλίβανο με 5%CO<sub>2</sub> στους 37°C, για 72 ώρες.

Οι καλλιέργειες μονιμοποιούνται (PFA 4% για 15 λεπτά) και χρησιμοποιούνται για ανοσοφθορισμό, όπως περιγράφεται παραπάνω στην παράγραφο του ανοσοφθορισμού .

### **3.1.2 Τοποθέτηση κρυστάλλων Dil σε τομές εγκεφάλου σε καλλιέργεια**

Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης διατριβής, πραγματοποιήθηκε σήμανση της περιοχής του αισθητικού γαγγλίου VIII (VG, vestibular ganglion) με 1,1'-dioctodecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine (Dil) ((NeuroTrace™ CM-Dil tissue labeling paste and FAST Dil solid, Molecular Probes), σε καλλιέργειες τομών παρεγκεφαλίδας και μονιμοποιημένων ιστών παρεγκεφαλίδας σε 4%PFA. 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, ο κρύσταλλος Dil τοποθετήθηκε στην περιοχή του VG (Vestibular ganglion) με τη βοήθεια

χειρουργικών βελόνων, πριν από την αλλαγή του θρεπτικού μέσου σε Neurobasal/B27. Στη συνέχεια οι τομές καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες σε κλίβανο με 5%CO<sub>2</sub> στους 37°C. Στις περιπτώσεις μονιμοποιημένων τομών ή ιστών παρεγκεφαλίδας σε 4% PFA Μετά το τέλος της καλλιέργειας, οι τομές επεξεργάζονται για ανοσοφθορισμό, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε πιο πάνω.

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Λόγω του Dil, δε χρησιμοποιείται Triton-X100, ούτε και άλλο απορρυπαντικό για τον ανοσοφθορισμό, έτσι ώστε να μην καταστραφούν οι μεμβράνες που έχουν ενσωματώσει τον κρύσταλλο.

## **Γ.4.ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΉ ΑΝΑΛΥΣΗ**

### **4.1 Buried Food test (δοκιμασία ανεύρεσης θαμμένης τροφής)**

Αρσενικά WT και TAG1<sup>-/-</sup> ποντίκια ηλικίας 2 μηνών, (n= 6) υποβλήθηκαν στην δοκιμασία για μελέτη της ικανότητάς τους να εντοπίζουν ένα κρυφό, ελκυστικό κομμάτι τροφής (chips τυριού)κάτω από το πριονίδι του κλουβιού τους όπως περιγράφεται από Yang και Crawley, 2009<sup>186</sup> με μικρές τροποποιήσεις.

Αρχικά το τυρί ήταν κρυμμένο περίπου 1 cm κάτω από το κλουβί εντός του υποστρώματος σε μια τυχαία γωνία του πειραματικού κλουβιού. Θεωρήσαμε ότι το ζώο είχε βρει το αντικείμενο (τυρί) όταν το συλλάβει με τα μπροστινά πόδια του και αρχίσει να τρώει.

### **4.2 Social interaction (δοκιμασία κοινωνικής αλληλεπίδρασης)**

Αρσενικά παρθένα WT και TAG1<sup>-/-</sup> ποντίκια ηλικίας 2 μηνών αφέθηκαν να εγκλιματιστούν για 10 λεπτά εντός του πειραματικού περιβάλλοντος, 24 ώρες πριν από το πείραμα (κουτί με χαρτί Whatmann στο πάτωμα με διαστάσεις 42x42x30cm). Την επόμενη ημέρα κάθε πειραματικός ποντικός τοποθετήθηκε μέσα στο πειραματικό κουτί με ένα άγνωστο αναισθητοποιημένο νεαρό αρσενικό ζώο (A) για 1 λεπτό (4 επαναλαμβανόμενες δοκιμές διεξήχθησαν με 5 λεπτά διάστημα μεταξύ των δοκιμασιών). Κατά την 5<sup>η</sup> δοκιμασία ένα νέο ζώο (B) χρησιμοποιήθηκε για να επιβεβαιωθεί ότι τα πειραματόζωα είχαν μάθει αποτελεσματικά το προηγούμενο ερέθισμα. Ο χρόνος που μυρίζονταν το αναισθητοποιημένο ζώο μετρήθηκε με ένα ψηφιακό χρονόμετρο από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές που αγνοούσαν τον γονότυπο των ζώων. Για την εκτίμηση της οσφρητική

μνήμης, 24 ώρες μετά την φάση εκμάθησης της παραπάνω δοκιμασίας, τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν για 1 λεπτό σε ένα νέο αναισθητοποιημένο ζώο (C) ταυτόχρονα με το ήδη γνωστό αναισθητοποιημένο ζώο A και ο δείκτη οσφρητική διάκριση τους εκτιμήθηκε (ODI). (ODI): χρόνος για την έρευνα μυρίζοντας ζώο C - χρόνος για την έρευνα μυρίζοντας το οικείο ζώο A/ συνολικός χρόνος έρευνας.

#### **4.3 Habituation/dishabituation test (δοκιμασία**

##### **ευαισθητοποίησης/απευαισθητοποίησης οσφρητικού ερεθίσματος)**

Το Πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν όπως το Basic Protocol 2 από Yang and Crawley, 2009<sup>186</sup> με μικρές τροποποιήσεις. Σε αυτήν την δοκιμασία WT, TAG1<sup>+/-</sup> και TAG1<sup>-/-</sup> ποντίκια υποβλήθηκαν σε μία ποικιλία διαφορετικών οσφρητικών ερεθισμάτων μέσω βαμβακοφόρων σπειλών που είχαν εμποτιστεί με αυτές. Τα ερεθίσματα παρουσιάστηκαν στα πειραματόζωα για 2 λεπτά σε 3 διαδοχικές δοκιμές, με διάστημα μεταξύ των δοκιμών 1 λεπτό. Ο χρόνος εξερεύνησης μετρήθηκε με ψηφιακό χρονόμετρο ως ο χρόνος που το αντικείμενο πέρασε μυρίζοντας την άκρη του βαμβακιού (σε επαφή ή 1-2 mm από την άκρη του). Μη-κοινωνικά οσμηρά ερεθίσματα που χρησιμοποιήθηκαν: Το φυστικοβούτυρο (PB, 10% w / v σε οσμή λιγότερο παραφινέλαιο, ιδιαίτερα ελκυστική οσμή), 2-μεθυλβουτυρικό οξύ (2MB, Sigma-Aldrich, 174μM, απωθητική οσμή). Κοινωνικά οσμηρά ερεθίσματα που χρησιμοποιήθηκαν: οσμή από θηλυκά ποντίκια (το βαμβάκι σκουπίζεται στο έδαφος από ένα κλουβί που περιείχε τουλάχιστον 4 ενήλικα θηλυκά ζώα κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής τους περιόδου), οσμή αρσενικών ποντικιών (βαμβάκι σκουπίζεται στο έδαφος από ένα κλουβί που περιείχε τουλάχιστον 4 ενήλικα αρσενικά ζώα) και ούρα θηλυκών ποντικών (συλλέγεται όπως περιγράφεται αλλού, Yang και Crawley, 2009. Veyrac et al, 2011)<sup>185,186</sup> αποθηκεύεται και συγκεντρώνονται στους -20 ° C, 2-3 ημέρες πριν από τη χρήση). Όλες οι μη-κοινωνικές οσμές ελέγχθηκαν σε μία δοκιμασία συμπεριφοράς ευαισθησίας. Διαφορετικές συγκεντρώσεις του κάθε ερεθίσματος χρησιμοποιήθηκαν για να βρεθεί ο ουδός όπου όλα τα ζώα ελέγχου ήταν σε θέση να ανιχνεύσουν την οσμή. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι ποντικοί πρώτα εκτέθηκαν σε άοσμο ερέθισμα από νερό (H<sub>2</sub>O), πριν την έναρξη της δοκιμασίας.

#### **4.4 Δοκιμασία ελέγχου νευρωνικής δραστηριότητας κύριου και επικουρικού οσφρητικού συστήματος με την χρήση του μορίου c-Fos**

Αρχικά για την ενεργοποίηση των νευρώνων του MOS ή του AOS η παρακάτω πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε για την επισήμανση και την ανάλυση του πρώιμου νευρωνικού μάρτυρα c-Fos.

Χρησιμοποιήθηκαν ενήλικα αρσενικά ποντίκια ηλικίας δύο μηνών. Για την ενεργοποίηση του MOS, χρησιμοποιήθηκε ένα ερέθισμα 10% w / v PB (Φιστικοβούτυρο, διαλυμένο σε άοσμο παραφινέλαιο) ή H<sub>2</sub>O. Τρεις με

τέσσερις ώρες πριν από την έναρξη της δοκιμής, κάθε ζώο μεταφέρθηκε σε ένα καθαρό κλουβί (με οροφή που είχε φίλτρο) χωρίς τροφή, H<sub>2</sub>O ή πριονίδι κάτω από την απαγωγή.

Στη συνέχεια, η οσμή PB εισήχθη στο κλουβί μέσω δύο βαμβακοφόρων

στειλεών (το καθένα περιέχει 150 μl του PB) στις δύο άκρες του κλουβιού. Τα ποντίκια αφέθηκαν να μυρίζουν το ερέθισμα για 90 λεπτά . Στη συνέχεια, τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν με την χρήση πεντοβαρβιτάλης και πραγματοποιήθηκε καθετηριασμός τις καρδιάς και έγχυση 4% PFA για μονιμοποίηση ιστών μετά την απομάκρυνση του αίματος με 1XPBS. Οι εγκέφαλοι απομονώθηκαν και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως στην παράγραφο 2.1.1

Για την AOS ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο από Pierman et al. (2008)<sup>231</sup> και Veyrac et al. (2011)<sup>185</sup> με μικρές τροποποιήσεις. Μετά την περίοδο εγκλιματισμού, 30 λεπτών δόγμα από ούρα θηλυκών ποντικών (από μία δεξαμενή συλλογής ούρων θηλυκών σε αναπαραγωγική ηλικία) εφαρμόστηκε στο εσωτερικό της μύτης των πειραματόζωων (ή H<sub>2</sub>O στους μάρτυρες ) και τα ποντίκια στη συνέχεια τοποθετήθηκαν πίσω στο κλουβί (με φίλτρο στην οροφή) για 90 λεπτά. Τα ακόλουθα στάδια ήταν τα ίδια όπως στο πρωτόκολλο ενεργοποίησης MOS.

Το τροποποιημένο πρωτόκολλο για την IHC για τον μάρτυρα c-Fos χρησιμοποιήθηκε σε κρουτομές OB και PC ενηλίκων ζώων (Sundquist και Nisenbaum, 2005)<sup>232</sup> όπως περιγράφηκε στο 2,2,B.

## **Γ.5. ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

### **5.1 Ανάλυση εικόνων και στατιστικά στοιχεία**

Για την ανάλυση της ενεργοποίησης του MOS, συνεχόμενες τομές λήφθηκαν σε 10× και 40× μεγέθυνση. Στην μεγέθυνση 40× όμοιες εικόνες στο ίδιο ανατομικό επίπεδο από το MOB αποκτήθηκαν με τις ίδιες ρυθμίσεις για όλα τα ζώα (και των δύο γονοτύπων).

Για την μελέτη του PC η ανάλυση των ενεργοποιημένων νευρώνων έγινε από τέσσερις εικόνες από συνεχόμενες τομές στον προσθοπίσθιο άξονα. Οι ενεργοποιημένοι (c-Fos+)νευρώνες μετρήθηκαν σε όλες τις στοιβάδες του PC (I-III) σε 20 × μεγέθυνση.

Για την ενεργοποίηση του AOS η ανάλυση έγινε σε μεγέθυνση 20X. Οι εικόνες αποκτήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν από δύο περιοχές του AOB (πρόσθια και οπίσθια). Σε όλες τις περιπτώσεις, η ποσοτικοποίηση των νευρώνων διεξήχθη με την χρήση του λογισμικού ImageJ (National Institutes of Health) και την λειτουργία μέτρησης σωματιδίων.

Οι εικόνες αποκτήθηκαν με την χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου Leica SP2 II και SP5 II inverted καθώς και με μικροσκοπίου φθορισμού Leica DM6 B.H ανάλυση των φωτογραφιών έγινε με την χρήση του photoshop cs2 (adobe systems incorporated), image J (Wayne Rasband,NIH,USA,V1.45s).Τα γραφήματα και τα σχήματα πραγματοποιήθηκαν με την χρήση του Adobe Illustrator cs6.

### **5.2 Ανάλυση στατιστικών στοιχείων / ακτινωτά διαγράμματα (radial statistics)**

Τα στατιστικά εργαλεία Student t-test και one way ANOVA χρησιμοποιήθηκαν για την στατιστική ανάλυση (από GraphPad Prism έκδοση 5.00.) Αναφορικά με τις αναλύσεις των radial statistics, για όλα τα αναπτυξιακά στάδια λάβαμε τμήματα αντιπροσωπευτικά ολόκληρου του ιστού του OB στον προσθοπίσθιο (AP) άξονα. Σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια χρησιμοποιήθηκαν 3-4 τομές από τον AP άξονα και στους δύο γονότυπους. Κάθε τομή χωρίστηκε σε τέσσερα διαφορετικά ανατομικά τεταρτημόρια (dorsolateral, ventrolateral, dorsomedial και ventromedial). Στη συνέχεια, κάντε διπλό θετικό (Tbr1+ /BrdU+) κύτταρο μετρήθηκαν χειροκίνητα και ο συνολικός αριθμός των κυττάρων ανά τεταρτημόριο, καθώς και το συνολικό ποσοστό των κυττάρων ανά τεταρτημόριο υπολογίστηκε σε κάθε τομή.Με τον παραπάνω τρόπο τα Radial statistics γραφήματα



δημιουργήθηκαν με την χρήση του Grapher 8 (v8.7, Golden software), με βάση το μέσο ποσοστό των κυττάρων ανά τεταρτημόριο (σε όλες τις τομές) για όλα τα ζώα του κάθε γονότυπου.

### **5.3 Ανάλυση ραχιαίων-κοιλιακών στατιστικών του OB**

Η ανάλυση και τα γραφήματα πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των μέσων ποσοστών των κυττάρων που βρίσκονται στο ραχιαίο τμήμα (DL, DM) και το κοιλιακό (VL, VM) τμήμα αντίστοιχα. Όλα τα αντίστοιχα τεταρτημόρια σε όλες τις διαθέσιμες τομές του OB για κάθε ζώο πραγματοποιήθηκε. Η στατιστική ανάλυση έγινε με την χρήση Student t-test (GraphPad Prism version 5.00).

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Leiner HC, Leiner AL, Dow RS. Does the cerebellum contribute to mental skills? Behavioral neuroscience 1986;100:443-54.
2. Schmahmann JD. From movement to thought: anatomic substrates of the cerebellar contribution to cognitive processing. Human brain mapping 1996;4:174-98.
3. Brochu G, Maler L, Hawkes R. Zebrin II: a polypeptide antigen expressed selectively by Purkinje cells reveals compartments in rat and fish cerebellum. The Journal of comparative neurology 1990;291:538-52.
4. Ozol K, Hayden JM, Oberdick J, Hawkes R. Transverse zones in the vermis of the mouse cerebellum. The Journal of comparative neurology 1999;412:95-111.
5. Sillitoe RV, Stephen D, Lao Z, Joyner AL. Engrailed homeobox genes determine the organization of Purkinje cell sagittal stripe gene expression in the adult cerebellum. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 2008;28:12150-62.
6. Sillitoe RV, Vogel MW, Joyner AL. Engrailed homeobox genes regulate establishment of the cerebellar afferent circuit map. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 2010;30:10015-24.
7. Sillitoe RV, Joyner AL. Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. Annual review of cell and developmental biology 2007;23:549-77.
8. White JJ, Sillitoe RV. Development of the cerebellum: from gene expression patterns to circuit maps. Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology 2013;2:149-64.

9. Ito-Ishida A, Okabe S, Yuzaki M. The role of Cbln1 on Purkinje cell synapse formation. *Neuroscience research* 2014;83:64-8.
10. Uusisaari M, Knopfel T. Functional classification of neurons in the mouse lateral cerebellar nuclei. *Cerebellum* 2011;10:637-46.
11. Rahimi-Balaei M, Afsharinezhad P, Bailey K, Buchok M, Yeganeh B, Marzban H. Embryonic stages in cerebellar afferent development. *Cerebellum & ataxias* 2015;2:7.
12. Ashwell KW, Zhang LL. Ontogeny of afferents to the fetal rat cerebellum. *Acta anatomica* 1992;145:17-23.
13. Morin F, Dino MR, Mugnaini E. Postnatal differentiation of unipolar brush cells and mossy fiber-unipolar brush cell synapses in rat cerebellum. *Neuroscience* 2001;104:1127-39.
14. Barmack NH. Central vestibular system: vestibular nuclei and posterior cerebellum. *Brain research bulletin* 2003;60:511-41.
15. Schubert MC, Minor LB. Vestibulo-ocular physiology underlying vestibular hypofunction. *Physical therapy* 2004;84:373-85.
16. Baloh RW, Honrubia V. Clinical neurophysiology of the vestibular system. *Contemporary neurology series* 1979;18:1-21.
17. Baloh RW, Kerber KA. Clinical neurophysiology of the vestibular system. 4th ed. New York: Oxford University Press; 2011.
18. Wilson VJ, Melvill Jones G. Mammalian vestibular physiology. New York: Plenum Press; 1979.
19. Kandel ER. Principles of neural science. 5th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2013.
20. Waxman SG. Clinical neuroanatomy. 26th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2010.
21. Dieterich M, Brandt T. Vestibulo-ocular reflex. *Current opinion in neurology* 1995;8:83-8.
22. Epema AH, Gerrits NM, Voogd J. Secondary vestibulocerebellar projections to the flocculus and uvulo-nodular lobule of the rabbit: a study using HRP and double fluorescent tracer techniques. *Experimental brain research* 1990;80:72-82.
23. Snell RS. Clinical neuroanatomy. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins; 2010.
24. Leto K, Arancillo M, Becker EB, et al. Consensus Paper: Cerebellar Development. *Cerebellum* 2015.
25. Anthony TE, Klein C, Fishell G, Heintz N. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* 2004;41:881-90.
26. Machold R, Fishell G. Math1 is expressed in temporally discrete pools of cerebellar rhombic-lip neural progenitors. *Neuron* 2005;48:17-24.
27. Fink AJ, Englund C, Daza RA, et al. Development of the deep cerebellar nuclei: transcription factors and cell migration from the rhombic lip. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2006;26:3066-76.
28. Miyata T, Maeda T, Lee JE. NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes & development* 1999;13:1647-52.
29. Kerjan G, Dolan J, Haumaitre C, et al. The transmembrane semaphorin Sema6A controls cerebellar granule cell migration. *Nature neuroscience* 2005;8:1516-24.
30. Furley AJ, Morton SB, Manalo D, Karagogeos D, Dodd J, Jessell TM. The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity. *Cell* 1990;61:157-70.
31. Englund C, Kowalczyk T, Daza RA, et al. Unipolar brush cells of the cerebellum are produced in the rhombic lip and migrate through developing white matter. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2006;26:9184-95.
32. Miyata T, Ono Y, Okamoto M, et al. Migration, early axonogenesis, and Reelin-dependent layer-forming behavior of early/posterior-born Purkinje cells in the developing mouse lateral cerebellum. *Neural development* 2010;5:23.
33. Zhang L, Goldman JE. Generation of cerebellar interneurons from dividing progenitors in white matter. *Neuron* 1996;16:47-54.

34. Leto K, Carletti B, Williams IM, Magrassi L, Rossi F. Different types of cerebellar GABAergic interneurons originate from a common pool of multipotent progenitor cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2006;26:11682-94.
35. Kawauchi D, Kobayashi H, Sekine-Aizawa Y, Fujita SC, Murakami F. MuSC is involved in regulating axonal fasciculation of mouse primary vestibular afferents. *The European journal of neuroscience* 2003;18:2244-52.
36. Tashiro Y, Endo T, Shirasaki R, Miyahara M, Heizmann CW, Murakami F. Afferents of cranial sensory ganglia pathfind to their target independent of the site of entry into the hindbrain. *The Journal of comparative neurology* 2000;417:491-500.
37. Morris RJ, Beech JN, Heizmann CW. Two distinct phases and mechanisms of axonal growth shown by primary vestibular fibres in the brain, demonstrated by parvalbumin immunohistochemistry. *Neuroscience* 1988;27:571-96.
38. Ashwell KW, Zhang LI. Prenatal development of the vestibular ganglion and vestibulocerebellar fibres in the rat. *Anatomy and embryology* 1998;198:149-61.
39. Firestein S. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 2001;413:211-8.
40. Zhang X, Zhang X, Firestein S. Comparative genomics of odorant and pheromone receptor genes in rodents. *Genomics* 2007;89:441-50.
41. Serizawa S, Miyamichi K, Nakatani H, et al. Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse. *Science* 2003;302:2088-94.
42. Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 1991;65:175-87.
43. Strader CD, Sigal IS, Dixon RA. Structural basis of beta-adrenergic receptor function. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1989;3:1825-32.
44. Anholt RR. Molecular physiology of olfaction. *The American journal of physiology* 1989;257:C1043-54.
45. Mackay-Sim A, Kittel PW. On the Life Span of Olfactory Receptor Neurons. *The European journal of neuroscience* 1991;3:209-15.
46. Iwai N, Zhou Z, Roop DR, Behringer RR. Horizontal basal cells are multipotent progenitors in normal and injured adult olfactory epithelium. *Stem cells* 2008;26:1298-306.
47. Goldstein BJ, Hare JM, Lieberman S, Casiano R. Adult human nasal mesenchymal stem cells have an unexpected broad anatomic distribution. *International forum of allergy & rhinology* 2013;3:550-5.
48. Yin F, Guo L, Meng CY, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells exerts anti-apoptotic effects in adult rats after spinal cord ischemia-reperfusion injury. *Brain research* 2014;1561:1-10.
49. Rao YJ, Zhu WX, Du ZQ, et al. Effectiveness of olfactory ensheathing cell transplantation for treatment of spinal cord injury. *Genetics and molecular research : GMR* 2014;13:4124-9.
50. Srivastava N, Seth K, Khanna VK, Ansari RW, Agrawal AK. Long-term functional restoration by neural progenitor cell transplantation in rat model of cognitive dysfunction: co-transplantation with olfactory ensheathing cells for neurotrophic factor support. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 2009;27:103-10.
51. Wakeman DR, Redmond DE, Jr., Dodiya HB, et al. Human neural stem cells survive long term in the midbrain of dopamine-depleted monkeys after GDNF overexpression and project neurites toward an appropriate target. *Stem cells translational medicine* 2014;3:692-701.
52. Lima C, Pratas-Vital J, Escada P, Hasse-Ferreira A, Capucho C, Peduzzi JD. Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study. *The journal of spinal cord medicine* 2006;29:191-203; discussion 4-6.
53. Kasowski HJ, Kim H, Greer CA. Compartmental organization of the olfactory bulb glomerulus. *The Journal of comparative neurology* 1999;407:261-74.
54. Maresh A, Rodriguez Gil D, Whitman MC, Greer CA. Principles of glomerular organization in the human olfactory bulb--implications for odor processing. *PloS one* 2008;3:e2640.

55. Feinstein P, Mombaerts P. A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. *Cell* 2004;117:817-31.
56. Treloar HB, Feinstein P, Mombaerts P, Greer CA. Specificity of glomerular targeting by olfactory sensory axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2002;22:2469-77.
57. Whitman MC, Greer CA. Adult neurogenesis and the olfactory system. *Progress in neurobiology* 2009;89:162-75.
58. Mori K, Nagao H, Yoshihara Y. The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science* 1999;286:711-5.
59. Fox K, Wong RO. A comparison of experience-dependent plasticity in the visual and somatosensory systems. *Neuron* 2005;48:465-77.
60. Takeuchi H, Inokuchi K, Aoki M, et al. Sequential arrival and graded secretion of Sema3F by olfactory neuron axons specify map topography at the bulb. *Cell* 2010;141:1056-67.
61. Cho JH, Lepine M, Andrews W, Parnavelas J, Cloutier JF. Requirement for Slit-1 and Robo-2 in zonal segregation of olfactory sensory neuron axons in the main olfactory bulb. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2007;27:9094-104.
62. Scolnick JA, Cui K, Duggan CD, et al. Role of IGF signaling in olfactory sensory map formation and axon guidance. *Neuron* 2008;57:847-57.
63. Imai T, Suzuki M, Sakano H. Odorant receptor-derived cAMP signals direct axonal targeting. *Science* 2006;314:657-61.
64. Imai T, Yamazaki T, Kobayakawa R, et al. Pre-target axon sorting establishes the neural map topography. *Science* 2009;325:585-90.
65. Franks KM, Isaacson JS. Strong single-fiber sensory inputs to olfactory cortex: implications for olfactory coding. *Neuron* 2006;49:357-63.
66. Schoppa NE, Urban NN. Dendritic processing within olfactory bulb circuits. *Trends in neurosciences* 2003;26:501-6.
67. Yokoi M, Mori K, Nakanishi S. Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995;92:3371-5.
68. Blanchart A, De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L. Time frame of mitral cell development in the mice olfactory bulb. *The Journal of comparative neurology* 2006;496:529-43.
69. Inaki K, Nishimura S, Nakashiba T, Itohara S, Yoshihara Y. Laminar organization of the developing lateral olfactory tract revealed by differential expression of cell recognition molecules. *The Journal of comparative neurology* 2004;479:243-56.
70. Wilson M, Shepherd GM. *Olfactory cortex*. Cambridge, MA: MIT Press; 1995.
71. De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Valverde F. Connections of the olfactory bulb and nucleus olfactorius anterior in the hedgehog (*Erinaceus europaeus*): fluorescent tracers and HRP study. *The Journal of comparative neurology* 1989;279:601-18.
72. Shipley MT, Ennis M. Functional organization of olfactory system. *Journal of neurobiology* 1996;30:123-76.
73. Levy F, Keller M, Poindron P. Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. *Hormones and behavior* 2004;46:284-302.
74. Brennan PA, Kendrick KM. Mammalian social odours: attraction and individual recognition. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 2006;361:2061-78.
75. Baum MJ, Kelliher KR. Complementary roles of the main and accessory olfactory systems in mammalian mate recognition. *Annual review of physiology* 2009;71:141-60.
76. Halpern M, Martinez-Marcos A. Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Progress in neurobiology* 2003;70:245-318.
77. Meisami E, Bhatnagar KP. Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. *Microscopy research and technique* 1998;43:476-99.

78. Trotier D, Eloit C, Wassef M, et al. The vomeronasal cavity in adult humans. *Chemical senses* 2000;25:369-80.
79. Smith TD, Bhatnagar KP. The human vomeronasal organ. Part II: prenatal development. *Journal of anatomy* 2000;197 Pt 3:421-36.
80. Mucignat-Caretta C. The rodent accessory olfactory system. *Journal of comparative physiology A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology* 2010;196:767-77.
81. De La Rosa-Prieto C, Saiz-Sanchez D, Ubeda-Banon I, Argandona-Palacios L, Garcia-Munozguren S, Martinez-Marcos A. Fate of marginal neuroblasts in the vomeronasal epithelium of adult mice. *The Journal of comparative neurology* 2009;517:723-36.
82. Jia C, Halpern M. Subclasses of vomeronasal receptor neurons: differential expression of G proteins (Gi alpha 2 and G(o alpha)) and segregated projections to the accessory olfactory bulb. *Brain research* 1996;719:117-28.
83. Liberles SD, Horowitz LF, Kuang D, et al. Formyl peptide receptors are candidate chemosensory receptors in the vomeronasal organ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:9842-7.
84. Chamero P, Katsoulidou V, Hendrix P, et al. G protein G(alpha)o is essential for vomeronasal function and aggressive behavior in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108:12898-903.
85. Perez-Gomez A, Stein B, Leinders-Zufall T, Chamero P. Signaling mechanisms and behavioral function of the mouse basal vomeronasal neuroepithelium. *Frontiers in neuroanatomy* 2014;8:135.
86. Larriva-Sahd J. The accessory olfactory bulb in the adult rat: a cytological study of its cell types, neuropil, neuronal modules, and interactions with the main olfactory system. *The Journal of comparative neurology* 2008;510:309-50.
87. Jia C, Halpern M. Segregated populations of mitral/tufted cells in the accessory olfactory bulb. *Neuroreport* 1997;8:1887-90.
88. Belluscio L, Koentges G, Axel R, Dulac C. A map of pheromone receptor activation in the mammalian brain. *Cell* 1999;97:209-20.
89. Martinez-Garcia F, Novejarque A, Lanuza E. Two interconnected functional systems in the amygdala of amniote vertebrates. *Brain research bulletin* 2008;75:206-13.
90. von Campenhausen H, Mori K. Convergence of segregated pheromonal pathways from the accessory olfactory bulb to the cortex in the mouse. *The European journal of neuroscience* 2000;12:33-46.
91. Lopez-Mascaraque L, de Castro F. The olfactory bulb as an independent developmental domain. *Cell death and differentiation* 2002;9:1279-86.
92. Whitlock KE. Developing a sense of scents: plasticity in olfactory placode formation. *Brain research bulletin* 2008;75:340-7.
93. Kawachi S, Beites CL, Crocker CE, et al. Molecular signals regulating proliferation of stem and progenitor cells in mouse olfactory epithelium. *Developmental neuroscience* 2004;26:166-80.
94. Suzuki J, Osumi N. Neural crest and placode contributions to olfactory development. *Current topics in developmental biology* 2015;111:351-74.
95. Forni PE, Wray S. Neural crest and olfactory system: new prospective. *Molecular neurobiology* 2012;46:349-60.
96. Cau E, Gradwohl G, Fode C, Guillemot F. Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Development* 1997;124:1611-21.
97. Grindley JC, Davidson DR, Hill RE. The role of Pax-6 in eye and nasal development. *Development* 1995;121:1433-42.
98. Matsuo T, Osumi-Yamashita N, Noji S, et al. A mutation in the Pax-6 gene in rat small eye is associated with impaired migration of midbrain crest cells. *Nature genetics* 1993;3:299-304.
99. Bhattacharyya S, Bronner-Fraser M. Competence, specification and commitment to an olfactory placode fate. *Development* 2008;135:4165-77.

100. Cau E, Gradwohl G, Casarosa S, Kageyama R, Guillemot F. Hes genes regulate sequential stages of neurogenesis in the olfactory epithelium. *Development* 2000;127:2323-32.
101. Maier EC, Saxena A, Alsina B, Bronner ME, Whitfield TT. Sensational placodes: neurogenesis in the otic and olfactory systems. *Developmental biology* 2014;389:50-67.
102. Bhasin N, Maynard TM, Gallagher PA, LaMantia AS. Mesenchymal/epithelial regulation of retinoic acid signaling in the olfactory placode. *Developmental biology* 2003;261:82-98.
103. Maurya DK, Henriques T, Marini M, et al. Development of the Olfactory Epithelium and Nasal Glands in TMEM16A<sup>-/-</sup> and TMEM16A<sup>+/+</sup> Mice. *PloS one* 2015;10:e0129171.
104. Beites CL, Kawauchi S, Crocker CE, Calof AL. Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. *Experimental cell research* 2005;306:309-16.
105. Treloar HB, Miller AM, Ray A, Greer CA. Development of the Olfactory System. In: Menini A, ed. *The Neurobiology of Olfaction*. Boca Raton (FL)2010.
106. Miller AM, Treloar HB, Greer CA. Composition of the migratory mass during development of the olfactory nerve. *The Journal of comparative neurology* 2010;518:4825-41.
107. Brunjes PC, Frazier LL. Maturation and plasticity in the olfactory system of vertebrates. *Brain research* 1986;396:1-45.
108. Tarozzo G, Cappello P, De Andrea M, et al. Prenatal differentiation of mouse vomeronasal neurones. *The European journal of neuroscience* 1998;10:392-6.
109. Tarozzo G, De Andrea M, Feuilloley M, Vaudry H, Fasolo A. Molecular and cellular guidance of neuronal migration in the developing olfactory system of rodents. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998;839:196-200.
110. Coppola DM, O'Connell RJ. Stimulus access to olfactory and vomeronasal receptors in utero. *Neuroscience letters* 1989;106:241-8.
111. Hinds JW. Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. II. Cell proliferation and migration. *The Journal of comparative neurology* 1968;134:305-22.
112. Imamura F, Greer CA. Pax6 regulates Tbr1 and Tbr2 expressions in olfactory bulb mitral cells. *Molecular and cellular neurosciences* 2013;54:58-70.
113. Hinds JW. Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. I. Time of origin of neurons and neuroglia. *The Journal of comparative neurology* 1968;134:287-304.
114. Imamura F, Ayoub AE, Rakic P, Greer CA. Timing of neurogenesis is a determinant of olfactory circuitry. *Nature neuroscience* 2011;14:331-7.
115. Walz A, Omura M, Mombaerts P. Development and topography of the lateral olfactory tract in the mouse: imaging by genetically encoded and injected fluorescent markers. *Journal of neurobiology* 2006;66:835-46.
116. Mitsui S, Igarashi KM, Mori K, Yoshihara Y. Genetic visualization of the secondary olfactory pathway in Tbx21 transgenic mice. *Neural systems & circuits* 2011;1:5.
117. Okuyama-Yamamoto A, Yamamoto T, Miki A, Terashima T. Changes in reelin expression in the mouse olfactory bulb after chemical lesion to the olfactory epithelium. *The European journal of neuroscience* 2005;21:2586-92.
118. Treloar HB, Purcell AL, Greer CA. Glomerular formation in the developing rat olfactory bulb. *The Journal of comparative neurology* 1999;413:289-304.
119. Lin DM, Wang F, Lowe G, et al. Formation of precise connections in the olfactory bulb occurs in the absence of odorant-evoked neuronal activity. *Neuron* 2000;26:69-80.
120. Bayer SA. 3H-thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Experimental brain research* 1983;50:329-40.
121. Tucker ES, Polleux F, LaMantia AS. Position and time specify the migration of a pioneering population of olfactory bulb interneurons. *Developmental biology* 2006;297:387-401.
122. Lopez-Mascaraque L, De Carlos JA, Valverde F. Early onset of the rat olfactory bulb projections. *Neuroscience* 1996;70:255-66.



123. Sato Y, Hirata T, Ogawa M, Fujisawa H. Requirement for early-generated neurons recognized by monoclonal antibody lot1 in the formation of lateral olfactory tract. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1998;18:7800-10.
124. Nagayama S, Enerva A, Fletcher ML, et al. Differential axonal projection of mitral and tufted cells in the mouse main olfactory system. *Frontiers in neural circuits* 2010;4.
125. Yamatani H, Sato Y, Fujisawa H, Hirata T. Chronotopic organization of olfactory bulb axons in the lateral olfactory tract. *The Journal of comparative neurology* 2004;475:247-60.
126. Lodish HF. *Molecular cell biology*. 5th ed. New York: W.H. Freeman; 2004.
127. Brummendorf T, Lemmon V. Immunoglobulin superfamily receptors: cis-interactions, intracellular adapters and alternative splicing regulate adhesion. *Current opinion in cell biology* 2001;13:611-8.
128. Williams AF, Barclay AN. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annual review of immunology* 1988;6:381-405.
129. Pollerberg GE, Thelen K, Theiss MO, Hochlehnert BC. The role of cell adhesion molecules for navigating axons: density matters. *Mechanisms of development* 2013;130:359-72.
130. Sakisaka T, Takai Y. Cell adhesion molecules in the CNS. *Journal of cell science* 2005;118:5407-10.
131. Togashi H, Sakisaka T, Takai Y. Cell adhesion molecules in the central nervous system. *Cell adhesion & migration* 2009;3:29-35.
132. Walsh FS, Doherty P. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annual review of cell and developmental biology* 1997;13:425-56.
133. Katidou M, Vidaki M, Strigini M, Karagogeos D. The immunoglobulin superfamily of neuronal cell adhesion molecules: lessons from animal models and correlation with human disease. *Biotechnology journal* 2008;3:1564-80.
134. Maness PF, Schachner M. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nature neuroscience* 2007;10:19-26.
135. Petridis AK, El-Maarouf A, Rutishauser U. Polysialic acid regulates cell contact-dependent neuronal differentiation of progenitor cells from the subventricular zone. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2004;230:675-84.
136. Kleene R, Schachner M. Glycans and neural cell interactions. *Nature reviews Neuroscience* 2004;5:195-208.
137. Rutishauser U. Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nature reviews Neuroscience* 2008;9:26-35.
138. Yoshihara Y, Kawasaki M, Tamada A, et al. OCAM: A new member of the neural cell adhesion molecule family related to zone-to-zone projection of olfactory and vomeronasal axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1997;17:5830-42.
139. von Campenhausen H, Yoshihara Y, Mori K. OCAM reveals segregated mitral/tufted cell pathways in developing accessory olfactory bulb. *Neuroreport* 1997;8:2607-12.
140. Barbeau D, Liang JJ, Robitalille Y, Quirion R, Srivastava LK. Decreased expression of the embryonic form of the neural cell adhesion molecule in schizophrenic brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995;92:2785-9.
141. Vicente AM, Macciardi F, Verga M, et al. NCAM and schizophrenia: genetic studies. *Molecular psychiatry* 1997;2:65-9.
142. Brennaman LH, Maness PF. NCAM in neuropsychiatric and neurodegenerative disorders. *Advances in experimental medicine and biology* 2010;663:299-317.
143. Wiencken-Barger AE, Mavity-Hudson J, Bartsch U, Schachner M, Casagrande VA. The role of L1 in axon pathfinding and fasciculation. *Cerebral cortex* 2004;14:121-31.
144. Buhusi M, Schlatter MC, Demyanenko GP, Thresher R, Maness PF. L1 interaction with ankyrin regulates mediolateral topography in the retinocollicular projection. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2008;28:177-88.
145. Castellani V, Falk J, Rougon G. Semaphorin3A-induced receptor endocytosis during axon guidance responses is mediated by L1 CAM. *Molecular and cellular neurosciences* 2004;26:89-100.

146. Fransen E, Lemmon V, Van Camp G, Vits L, Coucke P, Willems PJ. CRASH syndrome: clinical spectrum of corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraparesis and hydrocephalus due to mutations in one single gene, L1. *European journal of human genetics* : EJHG 1995;3:273-84.
147. Wright AG, Demyanenko GP, Powell A, et al. Close homolog of L1 and neuropilin 1 mediate guidance of thalamocortical axons at the ventral telencephalon. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2007;27:13667-79.
148. Ango F, Wu C, Van der Want JJ, Wu P, Schachner M, Huang ZJ. Bergmann glia and the recognition molecule CHL1 organize GABAergic axons and direct innervation of Purkinje cell dendrites. *PLoS biology* 2008;6:e103.
149. Dirks P, Thomas U, Montag D. The cytoplasmic domain of NrCAM binds to PDZ domains of synapse-associated proteins SAP90/PSD95 and SAP97. *The European journal of neuroscience* 2006;24:25-31.
150. Custer AW, Kazarinova-Noyes K, Sakurai T, et al. The role of the ankyrin-binding protein NrCAM in node of Ranvier formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2003;23:10032-9.
151. Koticha D, Maurel P, Zanazzi G, et al. Neurofascin interactions play a critical role in clustering sodium channels, ankyrin G and beta IV spectrin at peripheral nodes of Ranvier. *Developmental biology* 2006;293:1-12.
152. Sakurai T, Ramoz N, Reichert JG, et al. Association analysis of the NrCAM gene in autism and in subsets of families with severe obsessive-compulsive or self-stimulatory behaviors. *Psychiatric genetics* 2006;16:251-7.
153. Ishiguro H, Liu QR, Gong JP, et al. NrCAM in addiction vulnerability: positional cloning, drug-regulation, haplotype-specific expression, and altered drug reward in knockout mice. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 2006;31:572-84.
154. Sherman DL, Tait S, Melrose S, et al. Neurofascins are required to establish axonal domains for saltatory conduction. *Neuron* 2005;48:737-42.
155. Charles P, Tait S, Faivre-Sarrailh C, et al. Neurofascin is a glial receptor for the paranodin/Caspr-contactin axonal complex at the axoglial junction. *Current biology : CB* 2002;12:217-20.
156. Yoshihara Y, Kawasaki M, Tamada A, Nagata S, Kagamiyama H, Mori K. Overlapping and differential expression of BIG-2, BIG-1, TAG-1, and F3: four members of an axon-associated cell adhesion molecule subgroup of the immunoglobulin superfamily. *Journal of neurobiology* 1995;28:51-69.
157. Boyle ME, Berglund EO, Murai KK, Weber L, Peles E, Ranscht B. Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve. *Neuron* 2001;30:385-97.
158. Karagogeos D. Neural GPI-anchored cell adhesion molecules. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2003;8:s1304-20.
159. Karagogeos D, Morton SB, Casano F, Dodd J, Jessell TM. Developmental expression of the axonal glycoprotein TAG-1: differential regulation by central and peripheral neurons in vitro. *Development* 1991;112:51-67.
160. Dodd J, Morton SB, Karagogeos D, Yamamoto M, Jessell TM. Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons. *Neuron* 1988;1:105-16.
161. Wolfer DP, Giger RJ, Stagliar M, Sonderegger P, Lipp HP. Expression of the axon growth-related neural adhesion molecule TAG-1/axonin-1 in the adult mouse brain. *Anatomy and embryology* 1998;197:177-85.
162. Denaxa M, Chan CH, Schachner M, Parnavelas JG, Karagogeos D. The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development* 2001;128:4635-44.
163. Jung M, Petrusch B, Stuermer CA. Axon-regenerating retinal ganglion cells in adult rats synthesize the cell adhesion molecule L1 but not TAG-1 or SC-1. *Molecular and cellular neurosciences* 1997;9:116-31.

164. Wolfer DP, Henehan-Beatty A, Stoeckli ET, Sonderegger P, Lipp HP. Distribution of TAG-1/axonin-1 in fibre tracts and migratory streams of the developing mouse nervous system. *The Journal of comparative neurology* 1994;345:1-32.
165. Wolman MA, Sittaramane VK, Essner JJ, Yost HJ, Chandrasekhar A, Halloran MC. Transient axonal glycoprotein-1 (TAG-1) and laminin-alpha1 regulate dynamic growth cone behaviors and initial axon direction in vivo. *Neural development* 2008;3:6.
166. Traka M, Dupree JL, Popko B, Karagogeos D. The neuronal adhesion protein TAG-1 is expressed by Schwann cells and oligodendrocytes and is localized to the juxtaparanodal region of myelinated fibers. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2002;22:3016-24.
167. Traka M, Goutebroze L, Denisenko N, et al. Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *The Journal of cell biology* 2003;162:1161-72.
168. Savvaki M, Panagiotaropoulos T, Stamatakis A, et al. Impairment of learning and memory in TAG-1 deficient mice associated with shorter CNS internodes and disrupted juxtaparanodes. *Molecular and cellular neurosciences* 2008;39:478-90.
169. Savvaki M, Theodorakis K, Zoupi L, et al. The expression of TAG-1 in glial cells is sufficient for the formation of the juxtaparanodal complex and the phenotypic rescue of tag-1 homozygous mutants in the CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2010;30:13943-54.
170. Yoshihara Y, Kawasaki M, Tani A, et al. BIG-1: a new TAG-1/F3-related member of the immunoglobulin superfamily with neurite outgrowth-promoting activity. *Neuron* 1994;13:415-26.
171. Kaneko-Goto T, Yoshihara S, Miyazaki H, Yoshihara Y. BIG-2 mediates olfactory axon convergence to target glomeruli. *Neuron* 2008;57:834-46.
172. Mimmack ML, Saito H, Evans G, Bresler M, Keverne EB, Emson PC. A novel splice variant of the cell adhesion molecule BIG-2 is expressed in the olfactory and vomeronasal neuroepithelia. *Brain research Molecular brain research* 1997;47:345-50.
173. Missaire M, Hindges R. The role of cell adhesion molecules in visual circuit formation: from neurite outgrowth to maps and synaptic specificity. *Developmental neurobiology* 2015;75:569-83.
174. Leung HW, Zhao SM, Yue GG, et al. RA-XII inhibits tumour growth and metastasis in breast tumour-bearing mice via reducing cell adhesion and invasion and promoting matrix degradation. *Scientific reports* 2015;5:16985.
175. Brand Y, Sung M, Pak K, et al. Neural cell adhesion molecule NrCAM is expressed in the mammalian inner ear and modulates spiral ganglion neurite outgrowth in an in vitro alternate choice assay. *Journal of molecular neuroscience : MN* 2015;55:836-44.
176. Gu Z, Imai F, Kim IJ, et al. Expression of the immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in the developing spinal cord and dorsal root ganglion. *PloS one* 2015;10:e0121550.
177. Tashiro Y, Miyahara M, Shirasaki R, Okabe M, Heizmann CW, Murakami F. Local nonpermissive and oriented permissive cues guide vestibular axons to the cerebellum. *Development* 2001;128:973-81.
178. !!! INVALID CITATION !!!
179. Bastakis GG, Savvaki M, Stamatakis A, Vidaki M, Karagogeos D. Tag1 deficiency results in olfactory dysfunction through impaired migration of mitral cells. *Development* 2015;142:4318-28.
180. Serizawa S, Miyamichi K, Takeuchi H, Yamagishi Y, Suzuki M, Sakano H. A neuronal identity code for the odorant receptor-specific and activity-dependent axon sorting. *Cell* 2006;127:1057-69.
181. Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB. A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* 1993;73:597-609.
182. Tsuboi A, Yoshihara S, Yamazaki N, et al. Olfactory neurons expressing closely linked and homologous odorant receptor genes tend to project their axons to neighboring glomeruli on the olfactory bulb. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1999;19:8409-18.
183. Denaxa M, Kyriakopoulou K, Theodorakis K, et al. The adhesion molecule TAG-1 is required for proper migration of the superficial migratory stream in the medulla but not of cortical interneurons. *Developmental biology* 2005;288:87-99.

184. Sanchez-Andrade G, Kendrick KM. The main olfactory system and social learning in mammals. *Behavioural brain research* 2009;200:323-35.
185. Veyrac A, Wang G, Baum MJ, Bakker J. The main and accessory olfactory systems of female mice are activated differentially by dominant versus subordinate male urinary odors. *Brain research* 2011;1402:20-9.
186. Yang M, Crawley JN. Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N Crawley [et al]* 2009;Chapter 8:Unit 8 24.
187. Kogan JH, Frankland PW, Silva AJ. Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus* 2000;10:47-56.
188. Witt RM, Galligan MM, Despinoy JR, Segal R. Olfactory behavioral testing in the adult mouse. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2009.
189. Cremer H, Lange R, Christoph A, et al. Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 1994;367:455-9.
190. Treloar HB, Gabeau D, Yoshihara Y, Mori K, Greer CA. Inverse expression of olfactory cell adhesion molecule in a subset of olfactory axons and a subset of mitral/tufted cells in the developing rat main olfactory bulb. *The Journal of comparative neurology* 2003;458:389-403.
191. Ma QH, Futagawa T, Yang WL, et al. A TAG1-APP signalling pathway through Fe65 negatively modulates neurogenesis. *Nature cell biology* 2008;10:283-94.
192. Tachi N, Hashimoto Y, Nawa M, Matsuoka M. TAG-1 is an inhibitor of TGFbeta2-induced neuronal death via amyloid beta precursor protein. *Biochemical and biophysical research communications* 2010;394:119-25.
193. Hashimoto Y, Chiba T, Yamada M, et al. Transforming growth factor beta2 is a neuronal death-inducing ligand for amyloid-beta precursor protein. *Molecular and cellular biology* 2005;25:9304-17.
194. Kyriakopoulou K, de Diego I, Wassef M, Karagogeos D. A combination of chain and neurophilic migration involving the adhesion molecule TAG-1 in the caudal medulla. *Development* 2002;129:287-96.
195. Pankevich DE, Baum MJ, Cherry JA. Olfactory sex discrimination persists, whereas the preference for urinary odorants from estrous females disappears in male mice after vomeronasal organ removal. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2004;24:9451-7.
196. O'Connell RJ, Meredith M. Effects of volatile and nonvolatile chemical signals on male sex behaviors mediated by the main and accessory olfactory systems. *Behavioral neuroscience* 1984;98:1083-93.
197. Hurst JL. Female recognition and assessment of males through scent. *Behavioural brain research* 2009;200:295-303.
198. Humphries RE, Robertson DH, Beynon RJ, Hurst JL. Unravelling the chemical basis of competitive scent marking in house mice. *Animal behaviour* 1999;58:1177-90.
199. Noack J, Richter K, Laube G, Haghgoo HA, Veh RW, Engelmann M. Different importance of the volatile and non-volatile fractions of an olfactory signature for individual social recognition in rats versus mice and short-term versus long-term memory. *Neurobiology of learning and memory* 2010;94:568-75.
200. Kollo M, Schmaltz A, Abdelhamid M, Fukunaga I, Schaefer AT. 'Silent' mitral cells dominate odor responses in the olfactory bulb of awake mice. *Nature neuroscience* 2014;17:1313-5.
201. Altman J, Bayer SA. Embryonic development of the rat cerebellum. II. Translocation and regional distribution of the deep neurons. *The Journal of comparative neurology* 1985;231:27-41.
202. Wassef M, Chedotal A, Cholley B, Thomasset M, Heizmann CW, Sotelo C. Development of the olivocerebellar projection in the rat: I. Transient biochemical compartmentation of the inferior olive. *The Journal of comparative neurology* 1992;323:519-36.
203. De Camilli P, Miller PE, Levitt P, Walter U, Greengard P. Anatomy of cerebellar Purkinje cells in the rat determined by a specific immunohistochemical marker. *Neuroscience* 1984;11:761-817.
204. Shin BS, Oh SY, Kim JS, et al. Cervical and ocular vestibular-evoked myogenic potentials in acute vestibular neuritis. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 2012;123:369-75.
205. Wassef M, Zanetta JP, Brehier A, Sotelo C. Transient biochemical compartmentalization of Purkinje cells during early cerebellar development. *Developmental biology* 1985;111:129-37.

206. Cheyette BN, Green PJ, Martin K, Garren H, Hartenstein V, Zipursky SL. The *Drosophila sine oculis* locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron* 1994;12:977-96.
207. Laclef C, Hamard G, Demignon J, Souil E, Houbron C, Maire P. Altered myogenesis in Six1-deficient mice. *Development* 2003;130:2239-52.
208. Laclef C, Souil E, Demignon J, Maire P. Thymus, kidney and craniofacial abnormalities in Six 1 deficient mice. *Mechanisms of development* 2003;120:669-79.
209. Xu PX, Zheng W, Huang L, Maire P, Laclef C, Silvius D. Six1 is required for the early organogenesis of mammalian kidney. *Development* 2003;130:3085-94.
210. Zou D, Silvius D, Fritsch B, Xu PX. Eya1 and Six1 are essential for early steps of sensory neurogenesis in mammalian cranial placodes. *Development* 2004;131:5561-72.
211. Zheng W, Huang L, Wei ZB, Silvius D, Tang B, Xu PX. The role of Six1 in mammalian auditory system development. *Development* 2003;130:3989-4000.
212. Stoeckli ET, Landmesser LT. Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play different roles in the in vivo guidance of chick commissural neurons. *Neuron* 1995;14:1165-79.
213. Redies C, Neudert F, Lin J. Cadherins in cerebellar development: translation of embryonic patterning into mature functional compartmentalization. *Cerebellum* 2011;10:393-408.
214. Luo J, Treubert-Zimmermann U, Redies C. Cadherins guide migrating Purkinje cells to specific parasagittal domains during cerebellar development. *Molecular and cellular neurosciences* 2004;25:138-52.
215. Brummendorf T, Rathjen FG. Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein profile* 1995;2:963-1108.
216. Hortsch M. The L1 family of neural cell adhesion molecules: old proteins performing new tricks. *Neuron* 1996;17:587-93.
217. Fransen E, Van Camp G, Vits L, Willems PJ. L1-associated diseases: clinical geneticists divide, molecular geneticists unite. *Human molecular genetics* 1997;6:1625-32.
218. Cohen NR, Taylor JS, Scott LB, Guillery RW, Soriano P, Furley AJ. Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Current biology : CB* 1998;8:26-33.
219. Kamiguchi H. The mechanism of axon growth: what we have learned from the cell adhesion molecule L1. *Molecular neurobiology* 2003;28:219-28.
220. Altman J, Bayer SA. Embryonic development of the rat cerebellum. I. Delineation of the cerebellar primordium and early cell movements. *The Journal of comparative neurology* 1985;231:1-26.
221. Altman J, Bayer SA. Development of the cranial nerve ganglia and related nuclei in the rat. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology* 1982;74:1-90.
222. Lindner J, Rathjen FG, Schachner M. L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature* 1983;305:427-30.
223. Sun Y, Dykes IM, Liang X, Eng SR, Evans SM, Turner EE. A central role for Islet1 in sensory neuron development linking sensory and spinal gene regulatory programs. *Nature neuroscience* 2008;11:1283-93.
224. Radde-Gallwitz K, Pan L, Gan L, Lin X, Segil N, Chen P. Expression of Islet1 marks the sensory and neuronal lineages in the mammalian inner ear. *The Journal of comparative neurology* 2004;477:412-21.
225. Bohuslavova R, Dodd N, Macova I, et al. Pax2-Islet1 Transgenic Mice Are Hyperactive and Have Altered Cerebellar Foliation. *Molecular neurobiology* 2016.
226. Sekine-Aizawa Y, Omori A, Fujita SC. MuSC, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is expressed in neurons of a subset of cranial sensory ganglia in the mouse embryo. *The European journal of neuroscience* 1998;10:2810-24.
227. Persohn E, Schachner M. Immunoelectron microscopic localization of the neural cell adhesion molecules L1 and N-CAM during postnatal development of the mouse cerebellum. *The Journal of cell biology* 1987;105:569-76.
228. Dahme M, Bartsch U, Martini R, Anliker B, Schachner M, Mantei N. Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nature genetics* 1997;17:346-9.

229. Fransen E, D'Hooge R, Van Camp G, et al. L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impaired exploration patterns. *Human molecular genetics* 1998;7:999-1009.
230. Cui X, Weng YQ, Frappe I, et al. The cell adhesion molecule L1 regulates the expression of choline acetyltransferase and the development of septal cholinergic neurons. *Brain and behavior* 2011;1:73-86.
231. Pierman S, Douhard Q, Bakker J. Evidence for a role of early oestrogens in the central processing of sexually relevant olfactory cues in female mice. *The European journal of neuroscience* 2008;27:423-31.
232. Sundquist SJ, Nisenbaum LK. Fast Fos: rapid protocols for single- and double-labeling c-Fos immunohistochemistry in fresh frozen brain sections. *Journal of neuroscience methods* 2005;141:9-20.