

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗΣ ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΥΝΑΦΕΙΑΣ TAG-1 ΣΤΗΝ
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΟΣΦΡΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ»**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ Γ. ΜΠΑΣΤΑΚΗΣ
ΗΡΑΚΛΕΙΟ
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2010**

*Στον Πατέρα μου Γιώργο
Που αν και μακριά θα είναι
πάντα δίπλα μου ...*

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας όπως συμβαίνει για την πραγματοποίηση οποιουδήποτε ανθρώπινου έργου πολλά άτομα συνέβαλαν καθένα με τον δικό του ξεχωριστό τρόπο. Γι αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω καθένα ξεχωριστά.

Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Δόμνα Καραγωγέως, τον άνθρωπο που με την εμπιστοσύνη, την στήριξη, την πίστη και την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω κοντά της βοήθησε να αρχίσει και να πραγματοποιηθεί τούτη η εργασία.

Ευχαριστώ: Την Μαρία Σαββάκη για όλο το χρόνο (∞), τον κόπο (∞), την υπομονή (∞) και την βοήθεια (∞) που αφιέρωσε ως supervisor μου και για όσα επιτυχώς (ελπίζω) μου δίδαξε. Χωρίς την συμβολή της η εργασία δεν θα ολοκληρώνονταν ποτέ. Τον Κώστα Θεοδωράκη για όλες τις ώρες που περάσαμε στο εργαστήριο, τις εργαστηριακές τεχνικές και τις μικρές λεπτομέρειες (που σε γλιτώνουν από άσκοπες επαναλήψεις πειραμάτων) που μου δίδαξε με μεγάλη υπομονή. Την Λήδα Ζούπη για όλη την υποστήριξη και βοήθεια καθώς και για την πρώτη IHC έμαθα στο εργαστήριο. Την Μαρίνα Βιδάκη για όλα (όλα =Ψαλίδια, λαβίδες, ακίδες ,timer, markers, solutions, πρωτόκολλα...) όσα απέκτησα από αυτήν. Την Simona Tivodar για την ηρεμία που πάντα μεταδίδει στο εργαστήριο και για τα πολύ ωραία και βοηθητικά papers που μου έχει δώσει. Την Μαρκέλλα Κατίδου για τις χρήσιμες συμβουλές στα Lab meetings καθώς και το συρτάρι στους -20°C .

Ευχαριστώ όλα τα παραπάνω παιδιά που συνέβαλαν στην δημιουργία ενός υπέροχου περιβάλλοντος στο οποίο χαίρεσαι να εργάζεσαι.

Ευχαριστώ ακόμα τη Γεωργία, τη Maura,την Πηνελόπη, τον Μιχάλη, τις Γαλλίδες μας, Τη Νάντια, Την Άρια και το Νίκο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την Οικογένεια μου που πάντα πίστευε σε μένα Ευαγγελία, Αλκυόνη, Μανώλη, το Γιώργο και την Φωτούλα για την αμέριστη στήριξη τους και την Ελένη μου που όλα αυτά τα χρόνια με στηρίζει αδιαμαρτύρητα, υπομονετικά και αληθινά.

Περίληψη

Κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, η πρωτεΐνη κυτταρικής συνάφειας TAG-1 της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών παίζει σημαντικό ρόλο στη δεσμιδοποίηση και ανάπτυξη των νευραξόνων καθώς και τη μετανάστευση και καθοδήγηση των νευρικών κυττάρων. Η TAG-1 εκφράζεται από τους βασικούς προβλητικούς νευρώνες του οσφρητικού λοβού (μητρικά και θυσανωτά κύτταρα) κατά την ανάπτυξή του, αλλά ο ρόλος της στο σύστημα αυτό δεν έχει διερευνηθεί. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι να μελετήσουμε την ανάπτυξη και οργάνωση του οσφρητικού συστήματος σε μύες ελλειμματικούς για το γονίδιο της πρωτεΐνης TAG-1 (Tag-1^{-/-}).

Χρησιμοποιώντας μεθόδους ανοσοϊστοχημείας σε κρυτομές οσφρητικού λοβού (Olfactory bulb, OB) από ενήλικους ελλειμματικούς και φυσιολογικούς μύες, διαπιστώσαμε σημαντική μείωση του αριθμού των μητρικών κυττάρων στα Tag-1^{-/-} ζώα. Η μείωση του ποσοστού των μητρικών κυττάρων ήταν παρόμοια και σε νεογέννητα ζώα (p0) υποδηλώνοντας απώλειά τους κατά την ανάπτυξη και όχι μετά την ωρίμανση του οσφρητικού λοβού. Θελήσαμε να ελέγξουμε αν η παραπάνω μείωση οφείλεται σε απόπτωση είτε σε μειωμένο πολλαπλασιασμό των μητρικών κυττάρων. Πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε κρυτομές OB σε διαφορετικά εμβρυϊκά στάδια δεν έδειξαν διαφορές όσον αφορά στην απόπτωση των κυττάρων. Στη συνέχεια, για να διερευνήσουμε την περίπτωση μη-φυσιολογικού πολλαπλασιασμού, χορηγήσαμε 5'-βρωμο 2-δεοξουριδίνη (BrdU) σε μύες κατά την 11.5 ημέρα κύησης (E11.5, ηλικία γένεσης των περισσότερων μητρικών κυττάρων) και θανατώσαμε τα έμβρυα την ημέρα E18.5. Σε κρυτομές OB από αυτά τα ζώα, διαπιστώσαμε μείωση των BrdU⁺ κυττάρων στη στοιβάδα των μητρικών κυττάρων (MCL) στα Tag-1^{-/-} ζώα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά. Τα μέχρι τώρα αποτελέσματά μας προτείνουν πως η έλλειψη της πρωτεΐνης TAG-1 οδηγεί σε ελλείμματα κατά την ανάπτυξη του οσφρητικού συστήματος που θα μπορούσαν να οφείλονται σε διαταραχές στον πολλαπλασιασμό των μητρικών κυττάρων ή σε αποπροσανατολισμό αυτών των κυττάρων κατά τη μετανάστευσή τους στον οσφρητικό λοβό.

Abstract

The immunoglobulin superfamily member TAG-1 plays an important role in neurite outgrowth, fasciculation, neuronal migration and axon guidance during development. The main projection neurons of the olfactory bulb (mitral and tufted cells) express TAG-1 during development but the exact role of this molecule in the olfactory system has not yet been investigated. The aim of the present project is to study the organization and development of the olfactory system in mice deficient for TAG-1 (Tag-1^{-/-}).

Using immunohistochemistry against mitral-cell markers on cryosections of adult olfactory bulb (OB) from mutant and control mice, we observed significantly decreased numbers of mitral cells in Tag-1^{-/-} mice when compared with wild type animals. Furthermore, this defect in mitral cells number was already evident at the day of birth (P0) in the OB of Tag-1^{-/-} mice. These results suggest that the defect in mitral cells number can be attributed to deficits during the development of the olfactory bulb, either affecting apoptosis or cell proliferation. Immunohistochemical experiments in OB cryosections at various developmental stages revealed no difference in cell apoptosis. In order to study the proliferation capacity of the mitral cells population, we administrated 5²-bromo 2-deoxyuridine (BrdU) at embryonic day 11.5 (E11.5, generation of the majority of mitral cells) and sacrificed the embryos at E18.5 (mature OB). In cryosections from the above animals we detected a decrease in BrdU⁺ cells found in mitral cell layer (MCL) of Tag-1^{-/-} compared to wild type. The above data suggest that lack of TAG-1 leads to defects during development of the olfactory system that could result either from proliferation deficits of mitral cells progenitors nor from misguidance defects. We are currently investigating these possibilities.

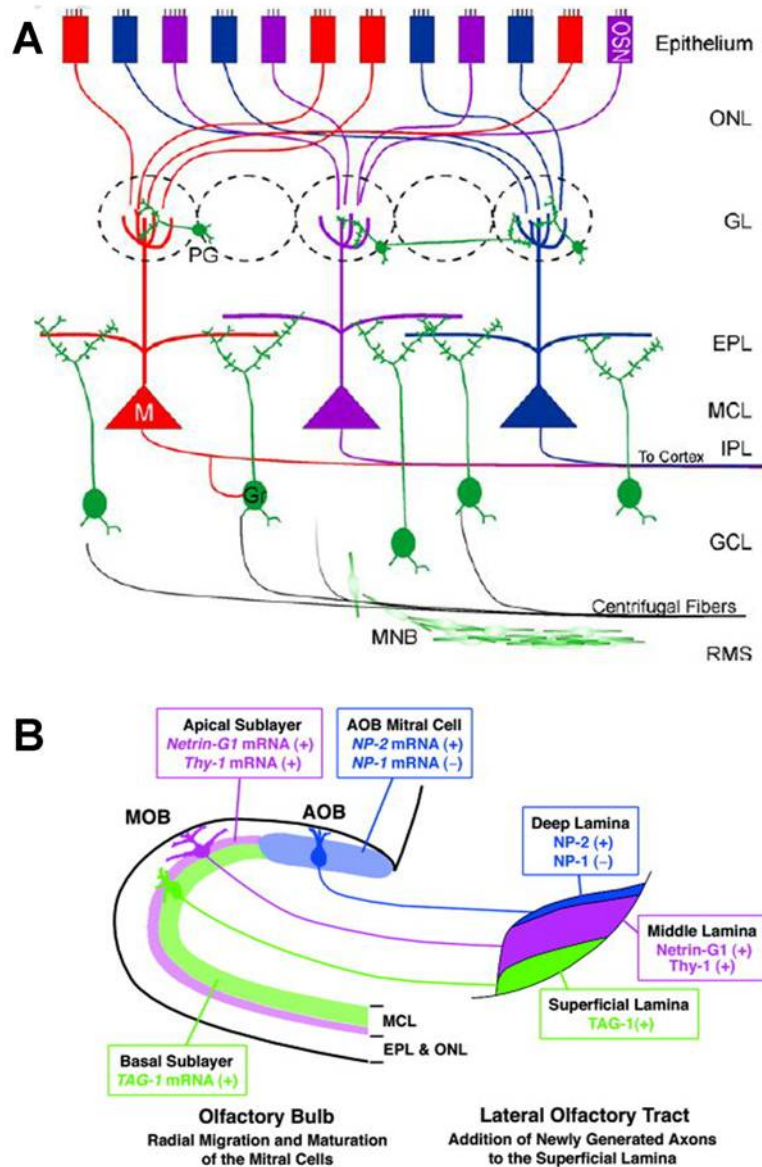
Εισαγωγή

Η πρωτεΐνη TAG-1 είναι ένα μόριο κυτταρικής συνάφειας το οποίο ανήκει στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών (IgSF) και συμμετέχει σε πληθώρα λειτουργιών στο νευρικό σύστημα τόσο κατά την διάρκεια της ανάπτυξης όσο και κατά την ενήλικη ζωή. Η TAG-1 αποτελείται από 6 ανοσοσφαιρινικές (Ig) και 4 φμπρονεκτινικές (FNIII-like) περιοχές και μπορεί να προσδένεται στην κυτταρική μεμβράνη μέσω μιας περιοχής γλυκοσυλ-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (GPI) (Karagogeos, 2003; Karagogeos et al., 1991). Στο νευρικό σύστημα η TAG-1 εκφράζεται από διάφορες ομάδες κυττάρων τόσο κατά την ανάπτυξη όσο και κατά τη μετανάστευσή τους. Συγκεκριμένα έχει καταγραφεί στο νευρικό σύστημα η έκφραση της TAG-1 σε περιοχές όπως: τους συνδεσμιακούς άξονες (commissural fibers) και τους κινητικούς νευρώνες του νωτιαίου μυελού (Dodd et al., 1988), τα νωτιαία αισθητικά γάγγλια (DRGs), τα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, την παρεγκεφαλίδα, τους φλοιοθαλαμικούς άξονες (όπου βοηθούν στη μετανάστευση των ενδονευρώνων) καθώς και στα μητρικά και θυσανωτά προβλητικά νευρικά κύτταρα του οσφρητικού συστήματος (Wolfer et al., 1994; 1998, Jung et al., 1997, Denaxa et al., 2001). Το μόριο TAG-1 εμπλέκεται στη μετανάστευση νευρικών κυττάρων, στην προεκβολή και ανάπτυξη των νευραξόνων, στη σωστή καθοδήγηση αυτών και τη δεσμιδοποίηση των αξόνων (Wolman et al., 2008; Denaxa et al., 2001; Baeriswyl et al., 2008).

Εκτός από τις παραπάνω λειτουργίες η TAG-1 είναι ένα μόριο το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική οργάνωση και λειτουργία των εμύελων νευρικών ινών. Η έκφρασή της εντοπίζεται τόσο στα νευρικά όσο και στα γλοιακά κύτταρα που σχηματίζουν το έλυτρο της μυελίνης που τυλίγει τους νευράξονες (Traka et al., 2002). Τα κύτταρα γλοίας που συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία είναι τα ολιγοδεντροκύτταρα στο κεντρικό νευρικό σύστημα και τα κύτταρα Schwann στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Στις ώριμες εμύελες ίνες η TAG-1 εντοπίζεται στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή (Juxtaparanodal Region) όπου βρίσκεται μαζί με τα κανάλια καλίου και την Caspr2 (μόριο της οικογένειας των neurexin-IV-Caspr-paranodin) με τα οποία αλληλεπιδρά συμμετέχοντας στην οργάνωση της εγγύς της παρακομβικής περιοχής των εμύελων ινών (Traka et al., 2002; 2003).

Το οσφρητικό σύστημα στα τρωκτικά χωρίζεται στο κύριο (main olfactory system,) και στο επιπρόσθετο (accessory olfactory system). Το κύριο οσφρητικό σύστημα επιτελεί την βασική λειτουργία της όσφρησης αναγνωρίζοντας τις διαφορετικές οσμές που υπάρχουν στο περιβάλλον

σε αντίθεση με το επιπρόσθετο οσφρητικό σύστημα που αναγνωρίζει τις φερομόνες. Η οργάνωση και των 2 οσφρητικών συστημάτων είναι παρόμοια. Στο κύριο οσφρητικό σύστημα οι οσφρητικοί υποδοχείς οι οποίοι υπάρχουν στις βλεφαρίδες (cilia) των αισθητικών νευρώνων της όσφρησης στο οσφρητικό επιθήλιο αναγνωρίζουν τις διαφορετικές χημικές δομές των οσμών (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. A. Τροποποιημένο σχήμα από Whitman and Greer, 2009. Απεικονίζονται όλες οι δομικές στοιβάδες του MOB και η λειτουργική οργάνωση του OB, καθώς και οι προσαγωγές και απαγωγές οδοί. B. Τροποποιημένο σχήμα από Inaki et al, 2004. Εμφανίζονται τα ώριμα(μώβ) και

τα πιο πρόσφατα(πράσινα) MCs και η θέση τους στο αναπτυσσόμενο MCL. Επίσης εμφανίζονται οι διαφορετικές πρωτεΐνες-μάρτυρες που εκφράζουν τα MCs καθώς και οι διαφορετικές στοιβάδες του LOT (*deep-εν τω βάθει, middle-ενδιάμεση, superficial-επιπολής*) όπου προβάλλουν τους νευράξονες τους. (*NSO-olfactory sensory neurons* αισθητικοί νευρώνες οσφρητικού, *ONL-olfactory nerve layer*, στοιβάδα οσφρητικού νεύρου, *GL, glomerular layer*, σπειραματική στοιβάδα, *EPL-external plexiform layer*, έξω δικτυωτή στοιβάδα, *MCL-mitral cell layer*, στοιβάδα των μητρικών κυττάρων, *IPL-internal plexiform layer*, έσω δικτυωτή στοιβάδα, *GCL-granular cell layer*,στοιβάδα κοκκιωδών κυττάρων, *MNB-migrating neuroblasts*,μεταναστεύοντες νευροβλάστες, *RMS-rostral migratory stream*, ρυγχαίο μεταναστευτικό μονοπάτι, *Gr-Granule cell*, κοκκιώδη κύτταρο, *M-mitral cell*,μητρικό κύτταρο,*Pg-periglomerular cell* περισπειραματικό κύτταρο)

Κάθε αισθητικός νευρώνας για την όσφρηση εκφράζει μόνο 1 οσφρητικό υποδοχέα από ένα σύνολο περίπου 1200 υποδοχέων (Zhang et al., 2007; Serizawa et al., 2003). Στη συνέχεια οι οσφρητικοί αισθητικοί νευρώνες προβάλλουν τους νευράξονες τους και περνούν το τετρημένο πέταλο του ηθμοειδούς οστού (οσφρητικό νεύρο, εγκεφαλική συζυγία I) και εισάγονται ενδότερα στην δομή του κύριου οσφρητικού λοβού (Main olfactory bulb, MOB) όπου καταλήγουν στην σπειραματική στοιβάδα (Glomerular Layer, GL) αυτού. Όλοι οι αισθητικοί νευρώνες που εκφράζουν τον ίδιο οσφρητικό υποδοχέα προβάλλουν σε 1-4 μόνο σπειράματα (από το σύνολο των περίπου 2000), οπότε κάθε σπείραμα δέχεται μόνο νευρώνες που εκφράζουν τον ίδιο υποδοχέα (Feinstein and Mombaert, 2004; Treloar et al., 2002). Τα σπειράματα δημιουργούνται από τις συνάψεις των αξόνων των οσφρητικών νευρώνων με τους δενδρικές των μητρικών (mitral cells, MCs), των θυσανωτών (tufted cells, TCs) κυττάρων καθώς και των περισπειραματικών κυττάρων (periglomerular cells, PgCs) τα οποία είναι ενδονευρώνες (Kasowski et al,1999). Τα μητρικά και θυσανωτά κύτταρα, που αποτελούν τους προβλητικούς νευρώνες του οσφρητικού λοβού, εντοπίζονται στη στοιβάδα των μητρικών κυττάρων (Mitral cells Layer, MCL) και την εξωτερική δικτυωτή στοιβάδα (External plexiform layer, EPL) αντίστοιχα, και στέλνουν τους νευράξονές τους προς διαφορετικές περιοχές του οσφρητικού φλοιού. Τα MCs προβάλλουν τους νευράξονες τους προς όλες τις περιοχές του οσφρητικού φλοιού (πρόσθιο οσφρητικό πυρήνα, οσφρητικό φύμα, απιοειδή φλοιό, ενδορινικό φλοιό, περιαμυγδαλοειδή φλοιό κτλπ) σε αντίθεση με τα TCs που προβάλλουν προς τις πρόσθιες περιοχές του οσφρητικού φλοιού (πρόσθιο οσφρητικό πυρήνα, οσφρητικό φύμα, ρυγχαίο-

κοιλιακό τμήμα του πρόσθιου απιοειδή φλοιού) (Nagayama et al.,2004). Έσω από την μητρική στοιβάδα υπάρχει η έσω δικτυωτή στοιβάδα (Internal plexiform layer, IPL) που περιέχει τους άξονες των προβλητικών νευρώνων οι οποίοι οδεύουν προς τον φλοιό. Εν τω βάθει της έσω δικτυωτής στοιβάδας (IPL) εντοπίζεται η στοιβάδα των κοκκιωδών κυττάρων (Granular Cell Layer, GCL) που είναι η στοιβάδα με τα πολυπληθέστερα κύτταρα στον οσφρητικό λοβό (αναλογία με μητρικά 100:1) τα οποία είναι ενδονευρώνες και στέλνουν τους δενδρίτες τους σε όλο το μήκος της έξω δικτυωτής στοιβάδας (EPL) ανάλογα με την εντόπισή τους (Shepherd et al., 2004; Imamura et al., 2006) (Στο Σχήμα 1 Α εμφανίζονται όλες οι στοιβάδες του MOB και τα κύτταρα που τις δομούν). Οι αισθητικοί νευρώνες του επιπρόσθετου οσφρητικού συστήματος διεγείρονται από φερομόνες και η πληροφορία προχωρά σε δομές όμοιες με αυτές του κύριου οσφρητικού λοβού (GL, MC, TC, κτλπ) σε μία περιοχή που ονομάζεται επιπρόσθετος οσφρητικός λοβός (accessory olfactory bulb, AOB) και βρίσκεται ραχιαία και οπίσθια πάνω σε αυτόν. Τέλος τα μητρικά (MCs) και τα θυσανωτά (TCs) κύτταρα του AOB θα στείλουν τους άξονές τους σε περιοχές του φλοιού σχετικές με την αναγνώριση των φερομόνων του αντίθετου φύλου (Halpern and Martínez, 2003).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η TAG-1 εκφράζεται στο οσφρητικό σύστημα και πιο συγκεκριμένα κυρίως στους προβλητικούς νευρώνες που στέλνουν τους νευράξονες σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφαλικού φλοιού. Το mRNA της TAG-1 έχει βρεθεί να εκφράζεται σε όλες τις στοιβάδες του MOB εκτός τις στοιβάδας των κοκκιωδών κυττάρων με την μεγαλύτερη ένταση να εμφανίζεται στη MCL (Wolfer et al.,1998, Yoshihara et al.,1995)). Τα MCs (και τα TCs) του οσφρητικού βολβού προβάλλουν στον οσφρητικό φλοιό μέσω της πλευρικής οσφρητικής οδού (Lateral olfactory track, LOT) όπου κάποιοι άξονες εκφράζουν TAG-1 και άλλα μόρια της υπεροικογένειας IgSF. Η πλάγια οσφρητική οδός (LOT) δημιουργείται πριν ακόμα τα πρόδρομα MCs αρχίσουν να προβάλουν τους νευράξονες τους σε αυτήν και περιβάλλεται από κύτταρα οδηγούς (Guidepost cells). Τα κύτταρα οδηγοί είναι Lot+ κύτταρα, απαραίτητα για τη σωστή έναρξη της προεκβολής των αξόνων των προβλητικών νευρώνων του OB (MCs,TCs) προς την LOT (Sato et al.,1998). Συγκεκριμένα η LOT αποτελείται από 3 στοιβάδες νευραξόνων: την επιπολής, την ενδιάμεση και την εν τω βάθει στοιβάδα. Οι νευράξονες οι οποίοι εκφράζουν την TAG-1 (έκφραση εμφανίζεται σε ηλικία E13,5 και μετά) βρίσκονται μόνο στην επιπολής στοιβάδα της LOT σε αντίθεση με αυτούς που εκφράζουν την L1 (μόριο κυτταρικής συνάφειας της υπεροικογένειας IgSF) που βρίσκονται σε

όλες τις στοιβάδες και την NP1 (neuropilin-1, έκφραση E13,5 και μετά) που εκφράζεται στην ενδιάμεση και την επιπολής στοιβάδα (Inaki et al., 2004). Τα πιο ώριμα MCs που εκφράζονται προκύπτει νωρίτερα κατά την εξέλιξη του OB έχουν τους άξονες τους βαθύτερα στο LOT. Τα ώριμα MCs του MOB, των οποίων ο πυρήνας βρίσκεται στην κορυφή του MCL, προβάλλουν τους άξονές τους στην ενδιάμεση στοιβάδα του LOT. Τέλος τα MCs που εκφράζουν την TAG-1 στους νευράξονες τους είναι τα κύτταρα που δεν είναι ακόμα ώριμα και ο πυρήνας τους βρίσκεται στην πιο βασική περιοχή του MCL. Οι νευράξονες αυτοί βρίσκονται στην επιπολής στοιβάδα του LOT (Inaki et al., 2004 ; Yamatani et al., 2004; Blanchart et al., 2006)(Σχήμα 1 B).

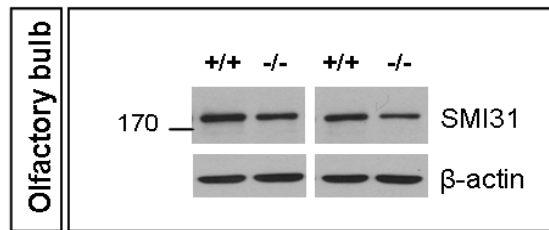
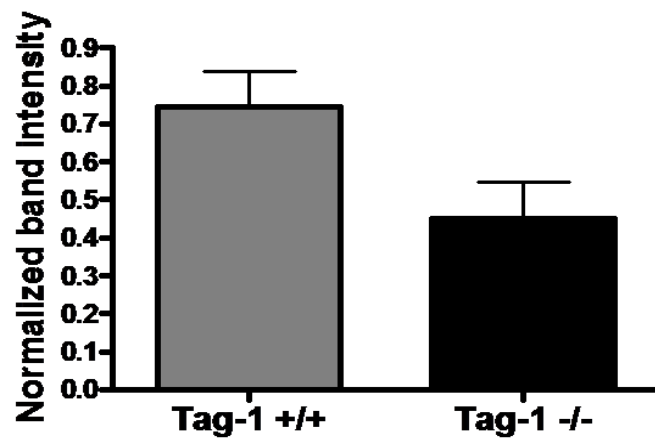
Οι διαφορετικές στοιβάδες του οσφρητικού λοβού και τα ποικίλα κύτταρα τα οποία τις δομούν προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση συγκεκριμένων χωρικά προγονικών κυττάρων τα οποία ακολουθούν διαφορετική εξελικτικά πορεία ανάλογα με την χρονική περίοδο της ανάπτυξης. Τα MCs, τα TCs, τα GCs καθώς και οι αισθητικοί νευρώνες και τα γλοιακά κύτταρα του OB γεννιούνται από τον προγονικό πληθυσμό των κυττάρων που περιβάλλουν (νευροεπιθήλιο) το ρυγχαίο άκρο της εγκεφαλικής κοιλίας του πρόδρομου εγκεφάλου από το οποίο μελλοντικά θα εκβάλει η δομή του OB. Σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια αυτά τα προγονικά κύτταρα δίνουν τους διαφορετικούς πληθυσμούς του OB σε μεγαλύτερα ή μικρότερα ποσοστά, όπως έχει φανεί από τα πρώτα αυτοραδιογραφικά πειράματα (θυμιδίνη- H^3) που έγιναν (Hinds 1968^I, 1968^{II}). Όλος ο αριθμός των MCs του MOB προκύπτει από τον πολλαπλασιασμό των προγονικών (και αργότερα την διαφοροποίηση των πρόδρομων μητρικών κυττάρων) στην περίοδο από E11,5-E14,5. Το μεγαλύτερο ποσοστό των μητρικών κυττάρων του MOB γνωρίζουμε ότι γεννιούνται στην εμβρυϊκή ημέρα 11,5 (E11,5) ενώ σε μικρότερο ποσοστό μητρικά κύτταρα προκύπτουν και κατά την E12,5 και E13,5 εμβρυϊκή ημέρα (Hinds 1968^I, Hinds 1968^{II}, Blanchart et al., 2006). Τα μεγαλύτερα ποσοστά των TCs και τα GCs προκύπτουν κατά τις περιόδους E13,5-E18,5 και E17,5-P20 αντίστοιχα. Οι ενδονευρώνες του OB (GCs και περισπειραματικά GCs) είναι ένας πληθυσμός που αναγεννάται από κύτταρα της υποκοιλιακής ζώνης (Subventricular zone) και πορεύονται προς το GCL και σε άλλες περιοχές του OB μέσω του ρυγχαίου μεταναστευτικού μονοπατιού (Rostal migratory stream, RMS) (Whitman and Greer 2009, Panzanelli et al., 2009).

Ένα σύνολο εξωκυττάρων σημάτων, κυτταρικών αλληλεπιδράσεων και μεταγραφικών παραγόντων είναι αυτό που θα οδηγήσει στη σωστή ανάπτυξη και οργάνωση του OB μέσω της

διαφοροποίησης, μετανάστευσης και αλληλεπίδρασης των κυτταρικών πληθυσμών του (Harrison et al.,2007, Schlosser 2006, Nomura and Osumi,2003, Long et al.,2003).

Αποτελέσματα

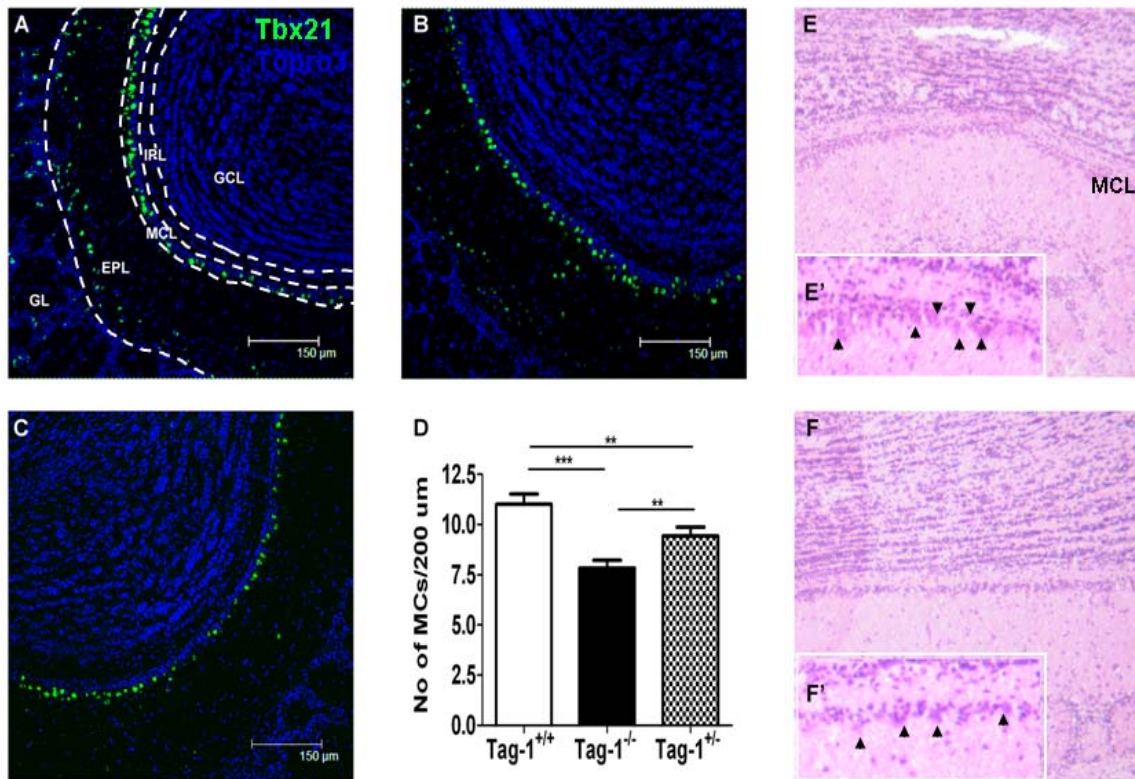
Με στόχο τη διερεύνηση ενός πιθανού ρόλου του μορίου κυτταρικής συνάφειας TAG-1 στην οργάνωση, ανάπτυξη και λειτουργία του οσφρητικού συστήματος αρχικά απομονώθηκαν OBs από 2 wt και 2 Tag-1^{-/-} ενήλικα ποντίκια και έπειτα από ομογενοποίηση των ιστών πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Western για την ανίχνευση των πρωτεϊνών των νευροινιδίων (neurofilaments, τα κύρια ενδιάμεσα ινίδια που ευρίσκονται κατά κύριο λόγο στους άξονες των νευρώνων). Με τη χρήση του ειδικού αντισώματος SMI31 (Covance, 1:1000, έναντι υπερφωσφοριλιωμένων νευροινιδίων) ανιχνεύθηκε η βαριά αλυσίδα των νευροινιδίων. Πιθανές μεταβολές θα μας έδιναν μία αδρή πληροφορία για αλλοιώσεις στους νευράξονες που εντοπίζονται στον OB (Εικόνα 1). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1Α η ποσότητα των νευροινιδίων στα Tag-1^{-/-} ζώα είναι εμφανώς μειωμένη σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες . Η μείωση ήταν εμφανής και μετά από τη μέτρηση της έντασης κάθε ζώνης (εικόνα 1B). Τα παραπάνω δεδομένα μας έδωσαν το έναυσμα να μελετήσουμε περαιτέρω την οργάνωση του OB σε σχέση με την πρωτεΐνη Tag-1. Το παραπάνω πείραμα είχε πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο πριν την έναρξη της παρούσας εργασίας και μας έδωσε το έναυσμα να μελετήσουμε περαιτέρω την οργάνωση του OB.

A**B Neurofilament expression in OB**

Εικόνα 1. Α. Ανάλυση κατά Western σε 2 wt και 2 Tag-1 ko μύες με αντίσωμα SMI31 για την ανίχνευση των πρωτεϊνών των νευροινιδίων Β.Στο διάγραμμα εμφανίζεται μετά από μέτρηση της έντασης κάθε ζώνης η φανερή μείωση των νευροινιδίων στα ko ζώα.

Για τη μελέτη της οργάνωσης του οσφρητικού λοβού αρχικά κάναμε χρήση ανατομικών χρώσεων αιματοξυλίνης-ηωσίνης σε κρυτομές από OBs ενηλίκων φυσιολογικών και ομόζυγα μεταλλαγμένων για την TAG-1 ζώων. Οι ανατομικές χρώσεις αποκάλυψαν κάποια διαφορά στη δομή του MCL(εικόνα 2E, 2F). Πιο συγκεκριμένα τα μεγάλα και αραιοχρωματικά κύτταρα που αντιπροσωπεύουν τα MCs του MCL φαίνονται λιγότερα στα Tag-1^{-/-} σε σχέση με τα wt (εικόνα 2E', 2F', σφήνες).

Για να απαντήσουμε στο ερώτημα εάν τα MCs του MCL στο MOB στα Tag-1^{-/-} ήταν πραγματικά λιγότερα σε αριθμό, απομονώσαμε εγκεφάλους μαζί με τα OBs από ενήλικα ζώα φυσιολογικά, ετερόζυγα και ομόζυγα μεταλλαγμένα για τα το γονίδιο της TAG-1. Με τη χρήση ανοσοιστοχημικών τεχνικών σε κρυτομές και ειδικών αντισωμάτων για τα MCs προσπαθήσαμε να απαντήσουμε στο παραπάνω ερώτημα. Με ανοσοεντοπισμό του Tbx21, που είναι ένας μάρτυρας (Faedo et al., 2002)) των μητρικών και θυσανωτών κυττάρων, διαπιστώσαμε μία στατιστικά σημαντική μείωση στον αριθμό των MCs στα Tag-1^{+/-} και Tag-1^{-/-} ζώα σε σχέση με τα φυσιολογικά (εικόνα2A, 2B, 2C, γράφημα 2D). Η μείωση των MCs στα Tag-1^{-/-} και Tag-1^{+/-} σε σχέση με τα wt ήταν 29% και 16% αντίστοιχα. Φαίνεται πως η έλλειψη της πρωτεΐνης TAG-1 επηρεάζει σημαντικά τον αριθμό των μητρικών κυττάρων που εδράζονται στη MCL. Εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι το ποσοστό μείωσης των MCs στα μεταλλαγμένα ζώα σχετίζεται άμεσα με την ολική ή μερική απενεργοποίηση του *Tag-1* γονιδίου (στα Tag-1^{-/-} και Tag-1^{+/-} αντίστοιχα).



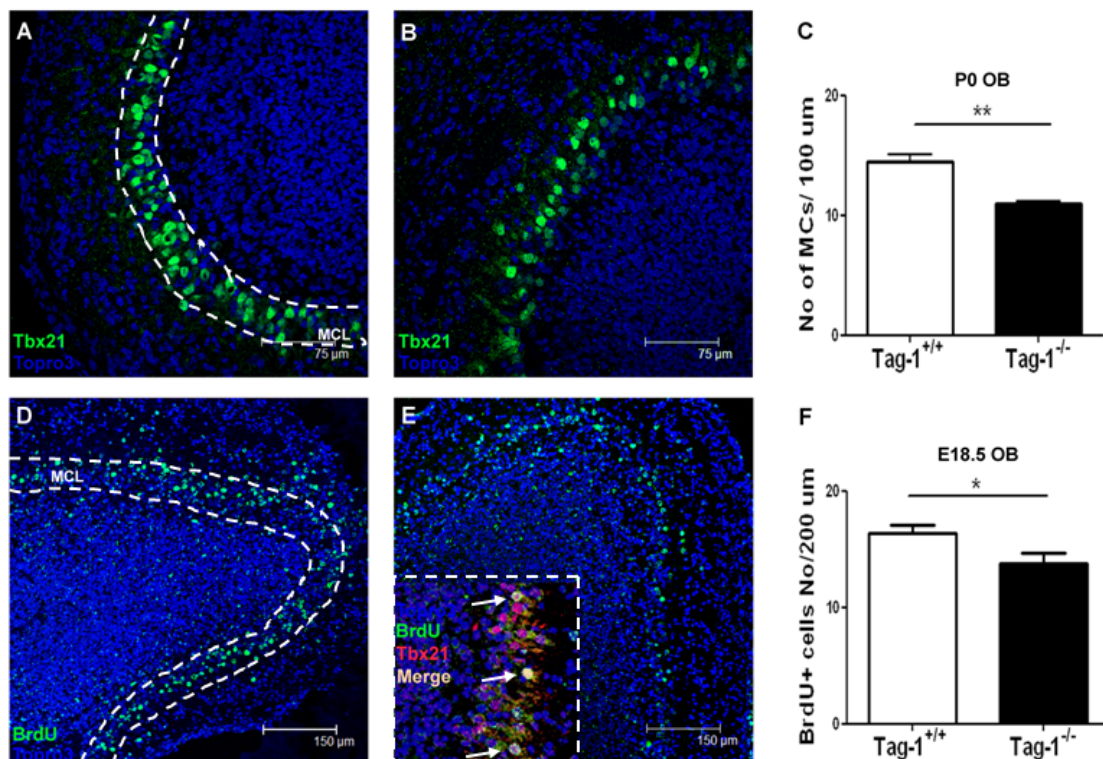
Εικόνα 2.Ανοσοεντοπισμός με την χρήση του αντισώματος *Tbx21* (πράσινο) σε κρυτομές από OBs ενηλίκων. Οι πυρήνες των κυττάρων έχουν σημανθεί με *Topro-3* (μπλέ) (A-C). A Οι στικτές γραμμές υποδεικνύουν τα όρια των στοιβάδων του MOB. Εμφανής είναι μακροσκοπικά η αριθμητική διαφορά των MCs ανα 200μm στην MCL μεταξύ wt,het και ko(A-C). Μετά από μέτρηση των MCs (*Tbx21*⁺ κυττάρων) της MCL διαπιστώσαμε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ wt,het και ko όπως παρουσιάζεται στο ιστόγραμμα D. E και F ανατομική χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης σε OBs ενηλίκων ζώων wt(E) και ko (F) για την *Tag-1*. Στα ένθετα των εικόνων E και F (E' και F' αντίστοιχα) εμφανίζονται σε μεγέθυνση περιοχές από τη MCL όπου οι σφήνες υποδεικνύουν τα MCs (αραιοχρωματικά μεγάλα κύτταρα). GL glomerular layer ,EPL external plexiform layer, MCL mitral cell layer ,IPL internal plexiform layer ,GCL granular cell layer, ** Statistically significant $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Λαμβάνοντας υπόψη μας τα δεδομένα που προέκυψαν από τα προηγούμενα πειράματα θελήσαμε να αποσαφηνίσουμε τα αίτια της μείωσης των MCs στα Tag-1^{-/-} ζώα. Η υπάρχουσα μείωση των MCs θα μπορούσε να απορρέει είτε από την απόπτωση αυτών των κυττάρων κατά τη διάρκεια ή μετά την ανάπτυξή τους είτε από διαταραχή κατά τη φάση του πολλαπλασιασμού τους. Με σκοπό να διερευνήσουμε εάν το έλλειμμα στον αριθμό των MCs που παρουσιάζεται στα Tag-1^{-/-} ζώα είναι εμφανές κατά την ημέρα της γέννησης τους (P0, όπου ο οσφρητικός λοβός είναι πλήρως αναπτυγμένος) πραγματοποιήσαμε μια σειρά πειραμάτων ανοσοϊστοχημείας. Ανοσοϊστοχημεία για τον Tbx21 σε κρυτομές από wt και Tag-1^{-/-} μύες, ηλικίας P0 έδειξαν μία στατιστικά σημαντική μείωση των MCs στα Tag-1^{-/-} ζώα σε σχέση με τα wt (Εικόνα 3A, 3B, 3C). Αυτή η μείωση (25%) κατά την ημέρα P0 υποδεικνύει έλλειμμα κατά την ανάπτυξη του OB.

Για τη διερεύνηση της πρώτης υπόθεσης, εάν δηλαδή τα MCs κάποια στιγμή πεθαίνουν κατά την ανάπτυξη του OB προβήκαμε σε πειράματα ανοσο-ανίχνευσης μορίων-μαρτύρων για αποπτωτικό θάνατο. Χρησιμοποιώντας σαν μάρτυρα την Caspase 3 πραγματοποιήσαμε ανοσοϊστοχημεία σε κρυτομές από έμβρυα διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης: από E13,5 (τα πρώτα MCs έχουν αρχίσει να μεταναστεύουν στον πρόδρομο OB), E14,5 και E16,5 (ηλικία διακριτού MCL). Η επιλογή των παραπάνω εμβρυϊκών σταδίων έγινε με βάση την περίοδο γένεσης των πρόδρομων MCs που θα καταλήξουν στο MCL (E11,5-E13,5). Από τα αποτελέσματα της παραπάνω πειραματικής διαδικασίας δεν εμφανίστηκε καμία διαφορά στον αριθμό των αποπτωτικών κυττάρων στα πρόδρομα OBs μεταξύ wt και Tag-1^{-/-} ζώων. Συνεπώς η μείωση των MCs που εμφανίζεται στα Tag-1^{-/-} ζώα δεν οφείλεται σε κυτταρικό θάνατο των κυττάρων κατά την ανάπτυξη. Στην εικόνα 4 φαίνεται ο ανοσοεντοπισμός της Caspase 3 σε ζώα ηλικίας E14,5 στην περιοχή μέσα στο πρόδρομο OB (πάνω εικόνες σε wt και Tag-1^{-/-}) και την περιοχή οπίσθια και μεταξύ των 2 OBs (κάτω εικόνες σε wt και Tag-1^{-/-}).

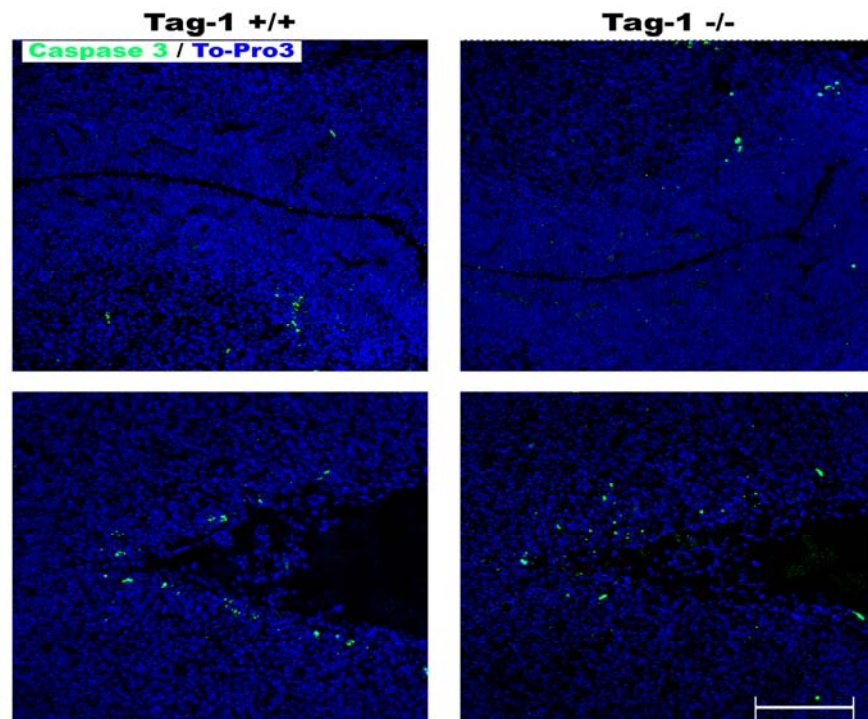
Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στη διερεύνηση της δεύτερης υπόθεσης κατά την οποία η μείωση των MCs στα ομόζυγα μεταλλαγμένα ζώα θα μπορούσε να απορρέει από διαταραχή κατά τη δημιουργία τους από προγονικούς πληθυσμούς. Από παλιότερες μελέτες γνωρίζουμε ότι τα προγονικά κύτταρα που πολλαπλασιάζονται κατά την εμβρυϊκή μέρα E11,5 δίνουν στην πλειοψηφία τους πρόδρομα κύτταρα που θα δώσουν το μεγαλύτερο ποσοστό των MCs του MOB (Hinds 1968^I; Hinds 1968^{II}, Blanchart et al., 2006). Έτσι, χρησιμοποιώντας ένα συνθετικό

ανάλογο της θυμιδίνης (5-Βρωμο- 2-δεοξυ-ουριδίνη ,BrdU) σημάναμε τα κύτταρα που πολλαπλασιάστηκαν κατά την ημέρα E11,5. Πραγματοποιήθηκε έγχυση της BrdU ενδοπεριτοναϊκά σε εγγυμονούσες μητέρες (με έμβρυα σε ηλικία E11,5). Στην συνέχεια σε κρυοτομές από τα έμβρυα αυτά έγινε ανοσοεντοπισμός της BrdU τόσο στα wt όσο και στα ko στην εμβρυϊκή ηλικία E18,5 (ημέρα θανάτωσης) στην οποία όλες οι στοιβάδες του OB είναι παρούσες (όπως και στο ενήλικο). Μέτρηση του αριθμού των BrdU⁺ κυττάρων (κύτταρα που προέκυψαν από πολλαπλασιασμό την ημέρα E11,5) στη MCL έδειξαν μία στατιστικά σημαντική μείωση της τάξεως του 16% Tag-1^{-/-} ζώα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά (εικόνα 3D, 3E, 3F). Διπλή ανοσοϊστοχημεία για BrdU και Tbx21 έδειξε συνεντοπισμό των 2 μαρτύρων (λευκό χρώμα Εικόνα 3F εντός πλαισίου) και επιβεβαίωσε την ταυτότητα των BrdU⁺ κυττάρων ως MCs. Η μείωση της τάξεως του 16% δεν αντιπροσωπεύει πλήρως το έλλειμμα των MCs στα Tag-1^{-/-} ζώα, αποτέλεσμα αναμενόμενο μιας και μητρικά κύτταρα προκύπτουν και από πολλαπλασιασμό σε άλλα αναπτυξιακά στάδια (E12,5 και E13,5).



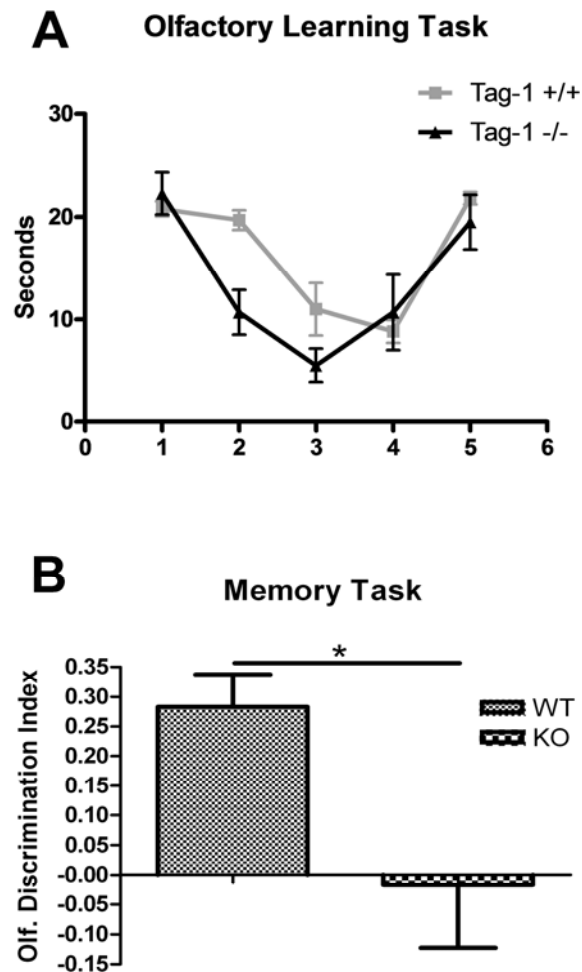
Εικόνα 3. Ανοσοϊστοχημεία σε wt (A) και Tag-1^{-/-} (B) P0 ζώα. Εντός των στικτών γραμμών εμφανίζεται η στοιβάδα των μητρικών κυττάρων όπου είναι σημασμένα με Tbx21 τα μητρικά

κύτταρα (πράσινο) ενώ οι πυρήνες παρουσιάζονται με *To-Pro-3* (Μπλέ). C. Ραβδόγραμμα στατιστικής ανάλυσης του αριθμού των MCs ανα 100μm από wt και *Tag-1^{-/-}* P0 ζώα. Η διαφορά στον αριθμό τους είναι στατιστικά σημαντική. D και E. Ανοσοεντοπισμός για *BrdU* (πράσινο) σε E18,5 wt (D) και ko (E) έμβρυα που προέκυψαν από έγχυση *BrdU* κατά την εμβρυϊκή ημέρα E11,5. Εντός πλαισίου στην εικόνα E παρουσιάζεται ο συνεντοπισμός του μάρτυρα των MCs *Tbx21*(κόκκινο) και της *BrdU* (πράσινο) στο MCL (λευκό). F.Ραβδόγραμμα στατιστικής ανάλυσης αριθμού *BrdU⁺* κυττάρων στην MCL του OB E18,5 wt και *Tag-1^{-/-}* ζώων. Η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική(* $p < 0,05$).



Εικόνα 4. Ανοσοεντοπισμός της *Caspase 3* (πράσινο) σε wt και *Tag-1^{-/-}* μύες στο εσωτερικό του πρόδρομου OB (πάνω εικόνες) και στην περιοχή οπίσθια και μεταξύ των δύο OBs (κάτω εικόνες) σε ηλικία E14,5. Τα αποπτωτικά κύτταρα είναι λίγα και χωρίς διαφορές στον αριθμό μεταξύ wt και *Tag-1^{-/-}*.

Συμπληρωματικά με τα παραπάνω πειράματα διεξήχθησαν και συμπεριφορικά πειράματα για να διαπιστώσουμε διαταραχές στην λειτουργία της οσφρητικής μνήμης και μάθησης. Τα συμπεριφορικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε 2 συνεχόμενες ημέρες. Το πρώτο (1^η μέρα) ήταν ένα πείραμα με το οποίο μελετήσαμε ικανότητα οσφρητικής μάθησης (olfactory learning task). Σε ένα πεδίο 40x40x20cm τοποθετήθηκε ένα αναισθητοποιημένο ζώο (ζώο A) και καταγράφηκε ο χρόνος όσφρησης ως προς αυτό από 6 wt και 6 Tag-1^{-/-} ζώα. Πραγματοποιήθηκαν 5 διαδοχικές (με χρονική απόσταση 10 λεπτών) δοκιμασίες που η κάθε μία διαρκούσε 1 λεπτό. Παρατηρήσαμε ότι όλα τα ζώα, ανεξαρτήτως γονοτύπου, μείωναν το χρόνο που περνούσαν οσφραίνοντας το ζώο A με την πάροδο των 4 πρώτων δοκιμασιών. Η μόνη διαφορά μεταξύ των 2 γονότυπων ανιχνεύτηκε στο ότι τα Tag-1^{-/-} φάνηκε να μειώνουν το χρόνο που ξόδευαν απέναντι στο ζώο A πιο δραματικά από ότι τα φυσιολογικά μετά την πρώτη δοκιμασία. Έκθεση των πειραματικών ζώων κατά την πέμπτη δοκιμασία σε ένα νέο αναισθητοποιημένο ζώο B έδειξε την αξιοπιστία του προηγούμενου πειράματος οσφρητικής μάθησης καθώς τα ζώα ανταποκρίθηκαν σωστά στο νέο ερέθισμα, ανεξαρτήτως γονοτύπου (εικόνα 5A). Κατά τη δεύτερη ημέρα των συμπεριφορικών πειραμάτων διεξήχθη το πείραμα της οσφρητικής μνήμης (olfactory learning test). Εντός του ίδιου πεδίου που χρησιμοποιήθηκε και στο 1^ο πείραμα τοποθετήθηκαν 2 αναισθητοποιημένα ζώα (το ζώο A και ένα νέο ζώο C). Στο παρόν πείραμα στόχος μας ήταν να καταγράψουμε τον χρόνο που το κάθε πειραματικό ζώο περνούσε μυρίζοντας το γνωστό ζώο A είτε το άγνωστο ζώο C, σε μία δοκιμασία των 2 λεπτών. Μετά το πέρας της παρούσας πειραματικής δοκιμασίας υπολογίσαμε τον οσφρητικό δείκτη διάκρισης ($T_{\zeta_{\omega} C} - T_{\zeta_{\omega} A} / T_{\zeta_{\omega} A} + T_{\zeta_{\omega} C}$) για κάθε ένα από τα ζώα των 2 ομάδων (wt και Tag-1^{-/-}). Η στατιστική σύγκριση των δεικτών οσφρητικής διάκρισης έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση στα Tag-1^{-/-} ζώα σε σχέση με τα φυσιολογικά (εικόνα 5B), προτείνοντας διαταραχή στην μνήμη κοινωνικής αναγνώρισης, η οποία είναι άμεσα συνδεδεμένη με την όσφρηση.



Εικόνα 5. Α. Γράφημα που αναπαριστά το πείραμα οσφρητικής μάθησης (olfactory learning test). Κάθε ένα από τα 6 ζώα wt είτε Tag-1^{-/-} υποβάλλονται σε 4 διαδοχικές δοκιμασίες του 1 λεπτού (10 λεπτά διαφορά μεταξύ συνεχόμενων δοκιμασιών) οσφραϊνόμενα το ίδιο αναισθητοποιημένο ζώο. Στην 5^η δοκιμασία τοποθετούμε νέο αναισθητοποιημένο ζώο για να επικυρώσουμε την αποτελεσματικότητα της δοκιμασίας μάθησης που χρησιμοποιήσαμε.. Τόσο τα wt όσο και τα Tag-1^{-/-} ζώα φαίνεται να εξοικειώνονται με το αναισθητοποιημένο ζώο με την πάροδο των δοκιμασιών. Τα ko ζώα παρουσιάζουν κάποια διαταραχή σε σχέση με τα φυσιολογικά που αφορά στην ταχύτερη μάθηση της δοκιμασίας. Β. Ραβδόγραμμα που αναπαριστά το πείραμα οσφρητικής μνήμης και σύγκριση του δείκτη οσφρητικής αναγνώρισης στα wt και Tag-1^{-/-} ζώα (βλ. αποτελέσματα). Παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση του δείκτη οσφρητικής αναγνώρισης στα Tag-1^{-/-} ζώα που συνεπάγεται μειωμένη ικανότητα μνήμης (*p<0.05).

Συζήτηση

Συνοψίζοντας τα υπάρχοντα έως τώρα δεδομένα καταλήξαμε σε 3 βασικά συμπεράσματα: 1) Ο αριθμός των MCs στα διπλά ελλειμματικά όπως και στα ετερόζυγα για την Tag-1 ενήλικα ποντίκια, είναι σημαντικά μειωμένος σε σχέση με τα φυσιολογικά, 2) Η μείωση αυτή παρατηρείται και στους OBs των Tag-1^{-/-} μύων κατά την ηλικία P0, συνεπώς η διαταραχή που είναι υπεύθυνη λαμβάνει χώρα κατά την εμβρυϊκή ζωή όπου έχουμε την ανάπτυξη των OBs, 3) Κατά την περίοδο της εμβρυϊκής ανάπτυξης ο ελαττωμένος αριθμός των MCs δεν οφείλεται σε απόπτωση αυτών των κυττάρων αλλά είναι αποτέλεσμα διαταραχής που συμβαίνει κατά τη φάση της δημιουργίας τους από τα πρόδρομα ή προγονικά τους κύτταρα είτε κατά τη φάση της μετανάστευσής τους στον ώριμο OB.

Μια σειρά περαιτέρω πειραμάτων θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με σκοπό τη διερεύνηση της αιτίας για την παρατηρούμενη μείωση των BrdU⁺ κυττάρων στο ώριμο MCL των Tag-1 κοζών. Προτείνουμε τη χρήση πιο πρώιμων μαρτύρων από το Tbx21 όπως είναι το Tbr-1 που εμφανίζεται πρώτη φορά στην ηλικία E14,5 (σε αντίθεση με το Tbx21 που εμφανίζεται στο E16,5) στο αναπτυσσόμενο OB (Bulfone et al., 1995; 1998; Faedo et al., 2002). Επιπλέον θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν καλλιέργειες είτε από διαμήκεις τομές εγκεφάλου (που περιέχουν τις περιοχές από τις οποίες προκύπτει ο OB) είτε από OB ηλικιών E11,5-E13,5. Με τη μέθοδο αυτή θα μπορούσε κάποιος να παρακολουθήσει εάν υπάρχει διαταραχή της μετανάστευσης, της πολικότητας ή της μορφολογίας των πρόδρομων μητρικών κυττάρων κατά την μετανάστευσή τους. Τέλος θα ήταν πολύ σημαντικό να μελετηθεί η δομή και η οργάνωση της κύριας οδού των προβλητικών νευρώνων προς τον οσφρητικό φλοιό (Lateral Olfactory Tract, LOT), όπως και τι είδους γνωστά μόρια με τα οποία γνωρίζουμε ότι η TAG-1 αλληλεπιδρά βρίσκονται σε αυτήν την οδό και πιθανόν επηρεάζονται στα Tag-1^{-/-} ζώα.

Από τα δεδομένα που προέκυψαν από το δεύτερο συμπεριφορικό πείραμα ήταν εμφανές ότι τα Tag-1^{-/-} δεν μπορούσαν να ξεχωρίσουν ποιο ήταν το ήδη γνωστό σε αυτά ζώο και πιο το άγνωστο με αποτέλεσμα να αφιερώνουν παρόμοιο χρονικό διάστημα και στα δύο. Αποτέλεσμα όλων των παραπάνω παρατηρήσεων είναι ότι τα Tag-1^{-/-} ποντίκια μας φαίνεται να μπορούν σε συνεχόμενες δοκιμασίες με μικρή χρονική διαφορά μεταξύ τους να διαχωρίσουν ένα γνωστό δείγμα άρα δεν υπάρχει διαταραχή της βραχύχρονης μνήμης αναγνώρισης (1^η μέρα). Παρόλα αυτά όταν καλούνταν να ανακαλέσουν μία μακρόχρονη μνήμη 24h μετά δεν το έκαναν

αποτελεσματικά (2^η μέρα). Η εξήγηση η οποία θα μπορούσε να στηρίξει τα παραπάνω αποτελέσματα είναι η ακόλουθη: τα MCs προβάλλουν προς τον οσφρητικό φλοιό (οσφρητικό φυμάτιο, ενδορινικός φλοιός, απιοειδής φλοιός κλπ) του οποίου οι δομές εν συνεχεία προβάλλουν προς άλλες περιοχές (ιππόκαμπος, cortico-medial περιοχή αμυγδαλής) που σχετίζονται με την οσφρητική μνήμη, την μνήμη της κοινωνικής αναγνώρισης (social recognition) και την κοινωνική συμπεριφορά των ζώων (Maaswinkel et al., 1996; Kogan et al., 2000; Brennan and Kendrick, 2006). Προτείνουμε πως πιθανόν όλες οι προαναφερθείσες λειτουργίες επηρεάζονται από τη μείωση των MCs που διαπιστώσαμε μοριακά.

Υλικά και Μέθοδοι

Πειραματόζωα. Τα Tag1 ko ποντίκια δημιουργήθηκαν όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενη μελέτη (Fukamauchi et al., 2001) και διατηρούνται σε ζευγάρια ετεροζυγοτών για αναπαραγωγή. Η εκτροφή και διατήρηση των ζώων καθώς και οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν σε αυτά είναι σε συμφωνία με τις οδηγίες της ευρωπαϊκής ένωσης (86/609/EEC). Η ημέρα κατά την οποία ανιχνεύθηκε σπερματικό βύσμα στον κόλπο (Vaginal plug) του θηλυκού καταγράφεται ως μέρα E0.5.

Στα πειράματα καταμέτρησης των MCs στην MCL του MOB σε ενήλικου μύες έγινε χρήση 6 ζώων από κάθε γονότυπο (φυσιολογικά-wt, ετερόζυγα- Tag-1^{+/-} και ελλειμματικά-Tag-1^{-/-} για την Tag-1). Στα πειράματα καταμέτρησης MCs σε ηλικία P0 χρησιμοποιήθηκαν 4 ζώα από κάθε γονότυπο (wt και Tag-1^{-/-}) ενώ για τα πειράματα της ανίχνευσης των BrdU⁺ κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν 6 E18,5 έμβρυα (wt και Tag-1^{-/-})

Επεξεργασία Ιστών για κρυστομές. Η μητέρες των εμβρύων θανατώθηκαν με παρεκτόπιση της αυχενικής μοίρας της σπονδυλικής στήλης τους και εν συνεχεία με διάνοιξη της περιτοναϊκής κοιλότητας έγινε η συλλογή των εμβρύων. Η απομόνωση των εμβρυϊκών εγκεφάλων (E13,5; E14,5; E16,5; E18,5 και P0) πραγματοποιήθηκε μέσα σε 1x PBS και η μονιμοποίηση σε 4% PFA (παραφορμαλδεΰδη) για 12-18 ώρες στους 4 °C.

Για τους ιστούς που προέρχονται από ενήλικα ζώα (2-4 μηνών μεταγεννητικά) πριν την απομόνωση του εγκεφάλου πραγματοποιείται ενδοκαρδιακή έγχυση 1x PBS και ακολούθως 4%PFA στο ζώο, για απομάκρυνση του αίματος από τα αγγεία και βέλτιστη μονιμοποίηση του εγκεφάλου. Τα ζώα είχαν αναισθητοποιηθεί με πεντοβαρβιτάλη (Dolethal δόση 1,05μl/gr ζώου) πριν την παραπάνω επέμβαση. Οι εγκεφαλοι αυτοί διατηρήθηκαν σε 4%PFA για 30 λεπτά στους 4^ο C και στην συνέχεια έγινε πλύση με 1x PBS και εισαγωγή τους σε διάλυμα 30% σουκρόζης σε 1x PBS, για κρυοπροστασία. Ο ιστός παραμένει στο δ/μα αυτό στους 4^ο C, έως ότου καταβυθιστεί.

Πάγωμα των ιστών. Έγκλειση του ιστού σε πήκτωμα Ζελατίνης-Σουκρόζης (15% σουκρόζης και 7,5% ζελατίνης σε 1x PBS). Το πάγωμα του ιστού έγινε σε ισοπεντάνιο με χρήση OCT (Tissue-Tek; Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan) στους -45^ο C και οι παγωμένοι ιστοί διατηρούνται στους -80^ο C, έως ότου κοπούν σε κρυοτόμο (LEICA) σε τομές πάχους 10-14 μm. Οι τομές συλλέγονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες (superfrost) και διατηρούνται στους -20^ο C.

Ανοσοιστοχημεία. Στις εμβρυϊκές κρυοτομές (πάχους 10μm) έγινε πλύση με 1X PBT (1X PBS, 0,1% triton) για 5 λεπτά και χρήση Blocking solution 1%FCS σε 1XPBT για 1 ώρα. Στη συνέχεια προστέθηκαν τα αντισώματα (τόσο τα πρωτογενή όσο και τα δευτερογενή) σε διάλυμα 0,1%FCS σε 1XPBT για το κατάλληλο χρονικό διάστημα.

Στις κρυοτομές από ενήλικα ζώα αρχικά αυτές μονιμοποιούνται (permeabilise) με την εισαγωγή τους για 10 λεπτά σε ακετόνη στους -20^ο C. Η διαδικασία του Blocking γίνεται με δ/μα 5%BSA σε 1XPBS ενώ οι αραιώσεις των αντισωμάτων γίνονται σε δ/μα 5%BSA, 0,5%triton σε 1XPBS.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοιστοχημείας ήταν Rb-Tbx21 (1:10.000, δωρεά από τον Dr. Y. Yoshihara), Rt-BrdU (1:1000 AbD Serotec), Rb-Caspase3 (1:200*). Τα δευτερογενή αντισώματα ήταν a-Rb-Alexa 488/555(1:800), a-Rat-Alexa 488(1:800) ενώ η σήμανση των πυρήνων έγινε με Topro-3 (1:1000 *)

Σήμανση με 5-Βρωμο- 2-δεοξύ-ουριδίνη (BrdU) και ανοσοϊστοχημική εύρεση αυτής. Τα ζώα στα οποία έγινε ενδοπεριτοναϊκή έγχυση δ/ματος BrdU (75μg/gr ζώου) είχαν έμβρυα σε ηλικία E10,5 (data not shown) και E11,5. Τα ζώα αυτά θυσιάστηκαν και οι ιστοί απομονώθηκαν και

παγώθηκαν όταν τα έμβρυα ήταν σε ηλικία E18,5 ή P0 όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο «*Επεξεργασία Ιστών για κρυτομές*».

Πάντα στις περιπτώσεις συνδυασμού αντισωμάτων για ανοσοιστοχημεία σε κρυτομές που θα γινόταν χρήση και anti-BrdU αντισώματος το πρωτόκολλο για την ανοσοιστοχημεία της BrdU ακολουθούσε μετά το τέλος της πρώτης ανοσοιστοχημείας. Έτσι είχαμε πρώτα την ολοκλήρωση του εμβρυϊκού πρωτοκόλλου ανοσοιστοχημείας για Rb-Ab-Tbx21(1:10,000). Στη συνέχεια οι κρυτομές εμβαπτίζονταν για 10 λεπτά σε 4% PFA για να μονιμοποιηθούν και ακολουθούσε η χρήση δ/ματος αποδιάταξης (denaturation buffer) 4N HCL, 0,1% triton σε 1XPBS για 10 λεπτά. Στο επόμενο βήμα εισάγαμε τις κρυτομές σε διάλυμα εξουδετέρωσης (neutralization buffer) 0,1M τετραβορικό-νάτριο (sodium tetraborate) pH 8.5. Μετά την παραπάνω διαδικασία γινόταν χρήση του Rt-Anti-BrdU(1:1000) αντισώματος.

Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία εικόνων. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις και τα γραφήματα έγιναν με την χρήση του λογισμικού στατιστικής ανάλυσης GraphPad Prism 4.0 (graphpad software inc.). Η δημιουργία των εικόνων και η επεξεργασία τους έγινε με το λογισμικό Photoshop CS 4 (Adobe Systems Inc.). Η μέτρηση των MCs Tbx21⁺ κυττάρων έγινε τομές παρόμοιων ηλικιακά ζώων και μόνο τα μαρκαρισμένα κύτταρα εντός των ορίων της MCL μετρήθηκαν. Οι μετρήσεις έγιναν σε εικόνες με κλίμακα 150μm από συνεστιακή μικροσκοπία σε κρυτομές που είχε πραγματοποιηθεί ανοσοιστοχημεία (Leica confocal LEsxxx*). Το μήκος της απόστασης στην οποία τα κύτταρα μετρήθηκαν στο MCL μετρήθηκε με freehand tool του ImageJ (έκδοση 1,43, Wayne Rasband National institute of health, USA) και εν συνεχεία έγινε αναγωγή των pixels σε απόσταση μικρομέτρων. Έτσι τελικά είχαμε αριθμό κυττάρων ανά συγκεκριμένη απόσταση σε μικρόμετρα. Η ίδια μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε για όλες τις μετρήσεις κυττάρων στα πειράματα που αναφέρθηκαν (πχ. BrdU). Για την στατιστική ανάλυση των δηγμάτων έγινε student t-test, unpaired, two tailed, ενώ για τα συμπεριφορικά oneway-ANOVA repeated measures στο olfactory Learning task και student t-test, paired, two tailed στο olfactory memory task.

Βιβλιογραφία

Baeriswyl T, Stoeckli ET. Axonin-1/TAG-1 is required for pathfinding of granule cell axons in the developing cerebellum. *Neural Dev.* 2008 Mar 17;3:7.

Blanchart A, De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L. Time frame of mitral cell development in the mice olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 2006 Jun 1;496(4):529-43.

Brennan PA, Kendrick KM. Mammalian social odours: attraction and individual recognition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006 Dec 29;361(1476):2061-78.

Bulfone A, Smiga SM, Shimamura K, Peterson A, Puelles L, Rubenstein JL. T-brain-1: a homolog of Brachyury whose expression defines molecularly distinct domains within the cerebral cortex. *Neuron.* 1995 Jul;15(1):63-78.

Bulfone A, Wang F, Hevner R, Anderson S, Cutforth T, Chen S, Meneses J, Pedersen R, Axel R, Rubenstein JL. An olfactory sensory map develops in the absence of normal projection neurons or GABAergic interneurons. *Neuron.* 1998 Dec;21(6):1273-82.

Denaxa, M., Chan, C.H., Schachner, M., Parnavelas, J.G., and Karagogeos, D. The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development.* 128(22): 4635-4644, (2001).

Dodd, J., Morton, S.B., Karagogeos, D., Yamamoto, M., and Jessell, T.M. Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons. *Neuron.* 1(2): 105-116, (1988).

Faedo A, Ficara F, Ghiani M, Aiuti A, Rubenstein JL, Bulfone A. Developmental expression of the T-box transcription factor T-bet/Tbx21 during mouse embryogenesis. *Mech Dev.* 2002 Aug;116(1-2):157-60.

Feinstein, P., Mombaerts, P., 2004. A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. *Cell* 117, 817-831.

Fukamauchi F, Aihara O, Wang YJ, Akasaka K, Takeda Y, Horie M, Kawano H, Sudo K, Asano M, Watanabe K, Iwakura Y. TAG-1-deficient mice have marked elevation of adenosine A1 receptors in the hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Feb 16;281(1):220-6

Halpern, M. and Martinez-Marcos, A. Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Progress in Neurobiology*, 70, 245-318, 2003.

Harrison SJ, Nishinakamura R, Monaghan AP. Sall1 regulates mitral cell development and olfactory nerve extension in the developing olfactory bulb. *Cereb Cortex.* 2008 Jul;18(7):1604-17. Epub 2007 Nov 17

Hinds JW. Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. I. Time of origin of neurons and neuroglia. *J Comp Neurol.* 1968 Nov;134(3):287-304.

Hinds JW. Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. II. Cell proliferation and migration. *J Comp Neurol.* 1968 Nov;134(3):305-22.

Imamura, F., Nagao, H., Naritsuka, H., Murata, Y., Taniguchi, H., Mori, K., 2006. A leucine-rich repeat membrane protein, 5T4, is expressed by a subtype of granule cells with dendritic arbors in specific strata of the mouse olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 495, 754-768

Inaki K, Nishimura S, Toshiaki N, Itohara S, and Yoshihara Y. 2004. Laminar organization of the developing lateral olfactory tract revealed by differential expression of cell recognition molecules. *J. of Comp. Neurol.* 479:243-256

Jung, M., Petrusch, B., and Stuermer, C.A. Axon-regenerating retinal ganglion cells in adult rats synthesize the cell adhesion molecule L1 but not TAG-1 or SC-1. *Mol Cell Neurosci.* 9(2): 116-131, (1997).

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 May;112(1):51-67.

Karagogeos D. Neural GPI-anchored cell adhesion molecules. *Front Biosci.* 2003 Sep 1;8:s1304-20.

Kasowski, H.J., Kim, H., Greer, C.A., 1999. Compartmental organization of the olfactory bulb glomerulus. *J. Comp. Neurol.* 407, 261-274.

Kogan, J. H., Frankland, P. W. & Silva, A. J. 2000 Long term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus* 10, 45–56.

Long JE, Garel S, Depew MJ, Tobet S, Rubenstein JL DLX5 regulates development of peripheral and central components of the olfactory system. *J Neurosci.* 2003 Jan 15;23(2):568-78.

Maaswinkel H, Baars AM, Gispen WH, Spruijt BM. Roles of the basolateral amygdala and hippocampus in social recognition in rats. *Physiol Behav.* 1996 Jul;60(1):55-63.

Nagayama S, Takahashi YK, Yoshihara Y, Mori K. 2004. Mitral and tufted cells differ in the decoding manner of odor maps in the rat olfactory bulb. *J. Neurophysiol.* 91:2532-2540

Nomura T, Osumi N. Misrouting of mitral cell progenitors in the Pax6/small eye rat telencephalon. *Development.* 2004 Feb;131(4):787-96. Epub 2004 Jan 21

Panzanelli P, Bardy C, Nissant A, Pallotto M, Sasso P, Pognetto M, Lledo PM, Fritschy JM. Early synapse formation in developing interneurons of the adult olfactory bulb. *J Neurosci.* 2009 Dec 2;29(48):15039-52.

Sato Y, Hirata T, Ogawa M, and Hajime F. 1998. Requirement for early-generated neurons recognized by monoclonal antibody Lot1 in the formation of lateral olfactory tract. *J. of Neuroscience* 18(19):7800-7810

Schlosser G. Induction and specification of cranial placodes. *Dev Biol.* 2006 Jun 15;294(2):303-51. Epub 2006 May 3.

Serizawa, S., Miyamichi, K., Nakatani, H., Suzuki, M., Saito, M., Yoshihara, Y., Sakano, H., 2003. Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse. *Science* 302, 2088-2094.

Shepherd, G.M., Chen, W.R., Greer, C.A., 2004. Olfactory bulb. In: Shepherd, G.M. (Ed.), *Synaptic Organization of the Brain*. fifth edition. Oxford University Press, Oxford, pp. 165-216.

Traka M, Gouterbroze L, Denisenko N, Bessa M, Nifli A, Havaki S, Iwakura Y, Fucamauchi F, Watanabe K, Soliven B, Girault JA, and Karagogeos D. Association of TAG1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *J. of Cell Biol.* 2003 162 (6):1161-1172

Traka, M., Dupree, J.L., Popko, B., and 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. *J Neurosci.* 22(8): 3016-3024, (2002).

Treloar, H.B., Feinstein, P., Mombaerts, P., Greer, C.A., 2002. Specificity of glomerular targeting by olfactory sensory axons. *J. Neurosci.* 22, 2469-2477.

Whitman MC, Greer CA. Adult neurogenesis and the olfactory system. *Prog Neurobiol.* 2009 Oct;89(2):162-75. Epub 2009 Jul 15.

Wolfer, D.P., Giger, R.J., Stagliar, M., Sonderegger, P., and Lipp, H.P. Expression of the axon growth-related neural adhesion molecule TAG-1/axonin-1 in the adult mouse brain. *Anat Embryol (Berl).* 197(3): 177-185, (1998).

Wolfer, D.P., Henehan-Beatty, A., Stoeckli, ET., Sonderegger, P., and Lipp, H.P. Distribution of TAG-1/axonin-1 in fibre tracts and migratory streams of the developing mouse nervous system. *J Comp Neurol.* 345(1): 1-32, (1994).

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 Dev.* 2008 Feb 20;3:6.

Yamatani H, Sato Y, Fujisawa H, Hirata T. Chronotopic organization of olfactory bulb axons in the lateral olfactory tract. *J Comp Neurol.* 2004 Jul 19;475(2):247-60.

Yoshihara Y, Kawasaki M, Tamada A, Nagata S, Kagamiyama H, and Mori K. 1995. Overlapping and differential expression of BIG2, BIG1, TAG1 and F3: four members of an axon

associated cell adhesion molecule subgroup of the immunoglobulin superfamily. *J. of Neurobiol.* 28 (1):51-69

Zhang, X., Zhang, X., Firestein, S., 2007. Comparative genomics of odorant and pheromone receptor genes in rodents. *Genomics* 89, 441-450