

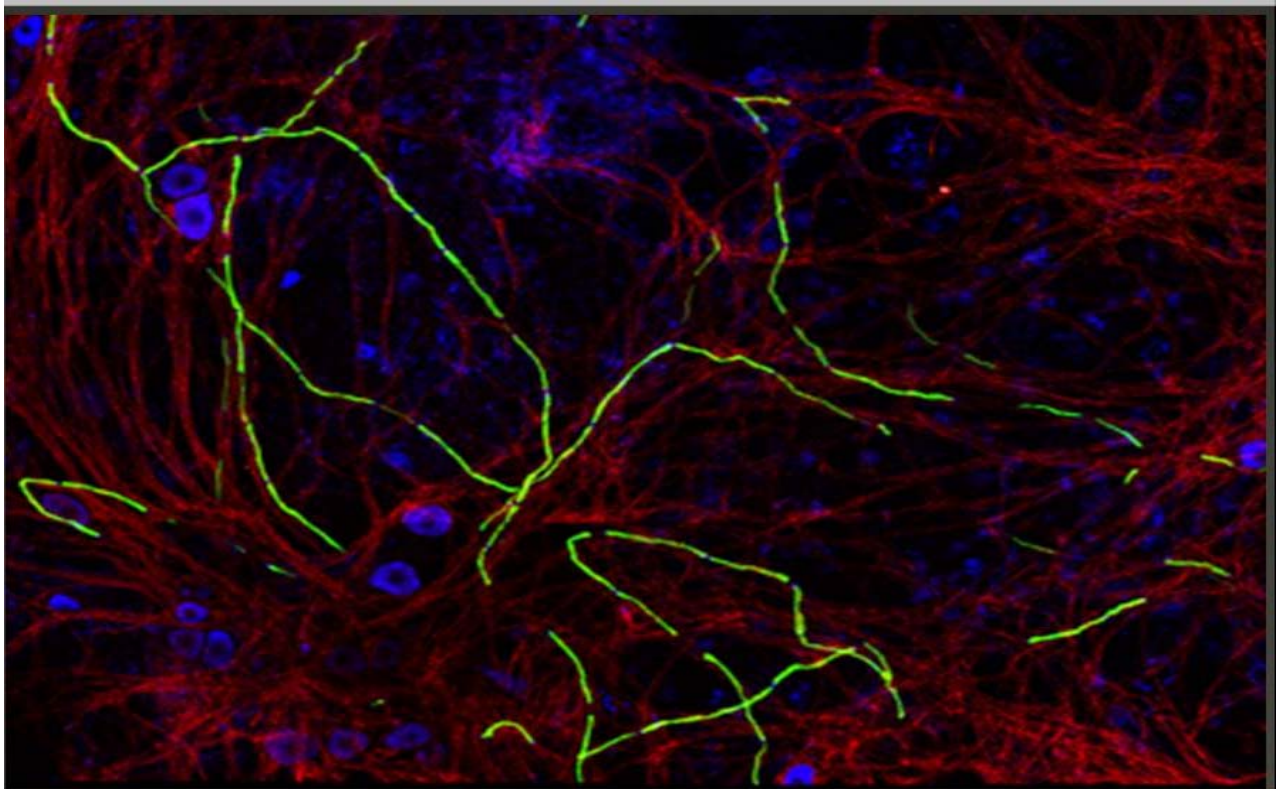


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μοριακές αλληλεπιδράσεις στην εγγύς της παρακομβικής
περιοχή των εμύελων νευρικών ινών**



ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΤΖΗΜΟΥΡΑΚΑΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2007

Στην οικογένειά μου...

«Μακάριον ἐστὶν δίδοναι μᾶλλον ἢ λαμβάνειν»
-Ἰησοῦς ὁ Ναζωραῖος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες	1-3
Περίληψη	4-8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9-45
1.1 Το μυελώδες έλυτρο και η ανάπτυξή του στο ΚΝΣ και το ΠΝΣ	10
1.2 Κύτταρα του Schwann: διαφοροποίηση και ανάπτυξη	11
1.3 Ολιγοδενδροκύτταρα: διαφοροποίηση και ανάπτυξη	12
1.4 Μυελίνη και κόμβοι του Ranvier	14
1.5 Μόρια κυτταρικής συνάφειας (Cell Adhesion Molecules ή CAMs)	17
1.6 Μόρια κυτταρικής συνάφειας της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών στο νευρικό σύστημα (IgSF neural CAMs)	20
1.7 Μόρια κυτταρικής συνάφειας με τμήμα αγκυροβόλησης γλυκοσύλ-φωσφατιδύλ-ινοσιτόλης (GPI-anchor)	23
1.8 Υποοικογένεια TAG-1/axonin GPI-προσδεδεμένων IgCAMs	24
1.9 Υποοικογένεια Contactin/F3 GPI-προσδεδεμένων IgCAMs	26
1.10 Ρόλος των CAMs στο σχηματισμό και στη διατήρηση του ελύτρου της μυελίνης	27
1.11 Αξονο-γλοιακές αλληλεπιδράσεις και κόμβος του Ranvier	30
1.12 Μοριακή οργάνωση του κόμβου του Ranvier	31
1.13 Μοριακή οργάνωση της παρακομβικής περιοχής	34
1.14 Μοριακή οργάνωση της εγγύς της παρακομβικής περιοχής	36
1.15 Επιπτώσεις της απομυελίνωσης των εμμύλων νευραξόνων και της μοριακής αποδιοργάνωσης των περιοχών του κόμβου του Ranvier	39
1.16 Σημασία της μοριακής οργάνωσης της εγγύς της παρακομβικής περιοχής και των μορίων που συγκεντρώνονται σε αυτή	41
➤ Σκοπός της μελέτης	44

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	46-72
2.1 ΥΛΙΚΑ	47-49
2.1.1 Πειραματόζωα	47
2.1.2 Αντιδραστήρια	47
2.1.3 Αντισώματα	48
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	50-72
2.2.1 Προετοιμασία επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων ηλεκτρικού μετασχηματισμού	50
2.2.2 Ηλεκτρικός μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων (Electroporation)	50
2.2.3 Προετοιμασία επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων μετασχηματισμού	51
2.2.4 Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων	52
2.2.5 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές αποικίες (Mini-preps)	52
2.2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα από βακτήρια και καθαρισμός του με τη μέθοδο CsCl	53
2.2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (large scale plasmid DNA prep.) με χρήση Qiagen Plasmid Maxi Kit	55
2.2.8 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	56
2.2.9 Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης	57
2.2.10 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών θηλαστικών σε καλλιέργεια	57
2.2.11 Έμμεσος ανοσοφθορισμός ευκαρυωτικών κυττάρων	58
2.2.12 Απομόνωση πρωτεϊνών από κυτταρικές σειρές θηλαστικών σε καλλιέργεια ή ιστό μυός.	59
2.2.13 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών	60

2.2.14	Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης	60
2.2.15	Ανάλυση πρωτεϊνών κατά Western	61
2.2.16	Απομάκρυνση αντισωμάτων για την επανάληψη της ανοσοανίχνευσης	63
2.2.17	Καλλιέργεια νωτιαίων αισθητικών γαγγλίων (DRG explants)	64
2.2.18	Απομόνωση και καλλιέργεια των κυττάρων Schwann	64
2.2.19	Αποσύνδεση νωτιαίων γαγγλίων	65
2.2.20	Συγκαλλιέργειες DRG νευρώνων και κυττάρων Schwann	66
2.2.21	Ανοσοϊστοχημική ανάλυση καλλιιεργειών νωτιαίων γαγγλίων	66
2.2.22	Διαχωρισμός νευρικών ινών και ανοσοϊστοχημική ανάλυση	67
2.2.23	Παρατήρηση, φωτογράφιση, ανασύσταση και ανάλυση εικόνων	67
2.2.24	Κατασκευές DNA	68-72
	• Κατασκευές IgC ₂ -GFP και FN _{III} -GFP	68
	• PLP κατασκευή	70
	• Thy1 κατασκευή	71
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	73-110
3.1	DNA κατασκευές για την μελέτη των επιμέρους περιοχών της TAG-1	74
3.2	Αλληλεπιδράσεις της TAG-1 και των επιμέρους περιοχών της με τους διαύλους καλίου (Kv)	78
3.2.1	Η TAG-1 αλληλεπιδρά απευθείας με τους διαύλους καλίου	79
3.2.2	Μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαύλων καλίου (Kv) και της πρωτεΐνης Caspr2	82
3.2.3	Οι ανοσοσφαιρινικές περιοχές της TAG-1 αλληλεπιδρούν απευθείας με τους διαύλους καλίου	84

3.2.4 Οι φιμπρονεκτινικές περιοχές της TAG-1 δεν αλληλεπιδρούν απευθείας με τους διαύλους καλίου	87
3.3 Αλληλεπιδράσεις της TAG-1 και των επιμέρους περιοχών της με την πρωτεΐνη Caspr2	88
3.3.1 Οι ανοσοσφαιρινικές περιοχές της TAG-1 αλληλεπιδρούν απευθείας με την Caspr2	89
3.3.2 Οι φιμπρονεκτινικές περιοχές της TAG-1 δεν αλληλεπιδρούν απευθείας με την Caspr2	92
3.4 Μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της TAG-1 και της πρωτεΐνης Connexin-29 (Cx29)	94
3.5 DNA κατασκευές για την μοριακή διάσωση του φαινοτύπου των <i>Tag1^{-/-}</i> μυών	97
3.5.1 PLP κατασκευή	98
3.5.2 Thy1 κατασκευή	100
3.6 Μελέτη της έκφρασης της TAG-1 και των αλληλεπιδράσεών της, χρησιμοποιώντας καλλιέργειες νωτιαίων γαγγλίων (Dorsal Root Ganglia: DRG)	101
3.6.1 Διατήρηση του φαινοτύπου των <i>Tag1^{-/-}</i> ζώων σε καλλιέργειες νωτιαίων αισθητικών γαγγλίων και συγκαλλιέργειες <i>Tag1^{-/-}</i> και αγρίου τύπου DRG's και κυττάρων Schwann.	102
3.7 <i>In vitro</i> και <i>in vivo</i> ανάλυση του μήκους μεσοκομβικών τμημάτων νευρικών ινών από <i>Tag1^{-/-}</i> και αγρίου τύπου μύες	105
3.7.1 Ανάλυση του μήκους μεσοκομβικών τμημάτων νευρικών ινών σε καλλιέργειες DRG νευρώνων και σε διαχωρισμένες νευρικές ίνες ισχιακών νεύρων	107

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ **111-134**

- 4.1** Μοριακές αλληλεπιδράσεις στις κομβικές και περικομβικές περιοχές εμμέλων ινών και η σημασία τους σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες του ανθρώπου 112
- 4.2** Μοριακές αλληλεπιδράσεις στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή και λειτουργική ανάλυση των επιμέρους δομικών περιοχών της πρωτεΐνης TAG-1 117
- 4.3** Μελέτες διάσωσης (rescue) του φαινοτύπου των *Tag-1^{-/-}* μυών με την δημιουργία των PLP και Thy-1 DNA κατασκευών 122
- 4.4** Μελέτη της έκφρασης της TAG-1 και των αλληλεπιδράσεών της με χρήση καλλιιεργειών νωτιαίων γαγγλίων (Dorsal Root Ganglia: DRG) 124
- 4.5** Μελέτη της εμπλοκής της TAG-1 στην μορφολογία των μεσοκομβικών τμημάτων εμμέλων ινών, μέσω καλλιιεργειών DRG νευρώνων και ανοσοϊστοχημικών μελετών σε μύες αγρίου τύπου και *Tag1^{-/-}* 127
- 4.6** Συμπεράσματα 131
- 4.7** Μελλοντικοί στόχοι 133

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ **135-145**

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρωταρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτριά μου, Δόμνα Καραγωγέως, για την ευκαιρία που μου έδωσε, να πραγματοποιήσω την διατριβή μου σε ένα άρτιο εργαστήριο, για την καθοδήγηση, τις συμβουλές της και για την πολύτιμη στήριξη όλα αυτά τα χρόνια, σε καλές και κακές στιγμές της έρευνάς μου σε Κρήτη και Παρίσι.

Ευχαριστώ θερμότατα και τον καθηγητή Jean-Antoine Girault του INSERM U536, Institute du Fer a Moulin, στο Παρίσι, Γαλλία, για την φιλοξενία, την στήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς και για την καθοδήγηση και τις συμβουλές που μου έδωσε απλόχερα για την βελτίωσή μου ως επιστήμονα. Ήταν τιμή μου που συνεργάστηκα μαζί του.

Ευχαριστώ επίσης τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τον καθηγητή Ανδρέα Πλαϊτάκη και την αναπληρώτρια καθηγήτρια Κυριακή Θερμού, για τις χρήσιμες συμβουλές τους, το πραγματικό ενδιαφέρον τους για την πρόοδο της διατριβής μου και για τα εφόδια και τη βοήθεια που πήρα από αυτούς κατά το μεταπτυχιακό των νευροεπιστημών. Ευχαριστώ πολύ και τα μέλη της επταμελούς μου επιτροπής για τις εύστοχες παρατηρήσεις και ερωτήσεις τους με τις οποίες μπόρεσα να βελτιώσω την διατριβή μου αλλά και να δώ το θέμα που ανέπτυξα από διαφορετικές οπτικές γωνίες.

Θέλω ακόμη να ευχαριστήσω τον Κώστα Θεοδωράκη, χωρίς τον οποίον η δουλειά στο εργαστήριο θα ήταν πολύ πιο δύσκολη, για τις συμβουλές του, για την απεριόριστη γνώση του, που ποτέ δεν αρνείται να μοιραστεί, για το κουράγιο που μου έδινε και για την συμπαράσταση σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπισα

Ένα μεγάλο ευχαριστώ και σε δύο άτομα που με βοήθησαν πραγματικά πολύ στη δουλειά μου και εδώ στο Ηράκλειο αλλά και όσο έλειπα στην Γαλλία, την Μαρία Σαββάκη και την Σέβη Γιασεμή. Δεν πίστευα ότι θα το έλεγα ποτέ αυτό αλλά μάλλον θα μου λείψουν τα brainstormings που κάναμε μαζί. Ευχαριστώ επίσης και την Μαρία Μπέσσα που με «μύησε» στον κόσμο της βιοχημείας και με βοήθησε στο project μου. Δεν μπορώ να παραλείψω και τον Γιώργο Τριχά, με τον οποίο περνούσαν πιο εύκολα κι ευχάριστα οι μέρες στο εργαστήριο όσο ήταν εδώ, και τους «παλιούς» του lab, Μαρίνα Βιδάκη, Μαρκέλλα Κατίδου και Maura Stringini. Ακόμη, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα παιδιά που δουλεύουν ακόμα ή πέρασαν από το εργαστήριο και με βοήθησαν είτε πρακτικά είτε ψυχολογικά αυτά τα χρόνια

(συγγνώμη που δεν σας γράφω έναν έναν αλλά είστε πολλοί και φοβάμαι μην ξεχάσω κάποιον).

Ευχαριστώ θερμά και τα παιδιά από τα διπλανά εργαστήρια, τον Μιχάλη, τον Κωνσταντίνο, τον Σαράντη, την Τώνια, την Χαρά, τον Νικόλα και τον Γιάννη για τις επιστημονικές τους συμβουλές και κυρίως για την φιλία τους και την ευχάριστη παρουσία τους στον χώρο της πτέρυγας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον υπεύθυνο του ζωοκομείου του ΙΤΕ, Κώστα Κουρουνιώτη, για την υπομονή του, την ευγένειά του, τις πληροφορίες που μου έδωσε και τον άψογο επαγγελματισμό που επέδειξε όλον αυτόν τον καιρό που συνεργαστήκαμε.

Το εργαστήριο στην Ιατρική σχολή του Ηρακλείου όμως δεν ήταν το μόνο εργαστήριο στο οποίο βρέθηκα και εργάστηκα. Έτσι στις ευχαριστίες μου κατέχουν διακεκριμένη θέση οι συνεργάτες και φίλοι μου στην Γαλλία, στο INSERM U536, Institute du Fer a Moulin. Πρώτα απ' όλους θέλω να ευχαριστήσω τον «Chef» μου στις DRG καλλιέργειες και φίλο, Gregoire Levasseur, για όσα εκπληκτικά έμαθα στο πλάι του, για τις πολύ δύσκολες και αγχώδεις στιγμές που περάσαμε πάνω από τα χιλιάδες culture-dishes που προετοιμάζαμε, φροντίζαμε και περιμέναμε καρτερικά να μεγαλώσουν και να μη μολυνθούν, για την βοήθειά του σε όλους τους τομείς της ζωής μου στο Παρίσι (επιστήμη, προσαρμογή, στέγη, τροφή, κοινωνικότητα) και γενικότερα γιατί είναι αυτός που είναι και στάθηκε καλός συνεργάτης και πραγματικός φίλος. Ευχαριστώ πολύ και τα άλλα παιδιά του labo, τον Jean-Mark, τον Jean, την Ksenia και τον Geoffrey καθώς και τους φίλους από την Maison Hellenique που με τους καταπληκτικούς χαρακτήρες τους και την ανιδιοτελή φιλία τους έκαναν την παραμονή μου στο Παρίσι μια καταπληκτική εμπειρία, παρ' όλες τις δυσκολίες. Με έχουν σκλαβώσει για πάντα και ελπίζω να είμαι αντάξιος της αγάπης που μου έδειξαν. Θα τους θυμάμαι και τους εύχομαι ότι καλύτερο. Merci beaucoup les gars et les filles!

Από εδώ και πέρα θέλω να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που, παρ' όλο που δεν είχαν άμεση σχέση με την διατριβή μου και το εργαστήριο, έκαναν την ζωή μου στην Κρήτη όμορφη, ευχάριστη και εύκολη. Ευχαριστώ κατ' αρχάς την σύντροφό μου Κάσση Ψηφογεώργου για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξη που μου έδωσε όλα αυτά τα χρόνια σε επιστημονικό και προσωπικό επίπεδο, για την αγάπη της και την κατανόηση που επέδειξε σε καλές αλλά και δύσκολες στιγμές και για την ύπαρξή της στο πλευρό μου γενικότερα. Η ζωή μου εδώ και το έργο μου θα φάνταζαν

ακατόρθωτα χωρίς αυτήν. Ευχαριστώ επίσης τους φίλους μου εδώ στην Κρήτη, Μανόλη, Νικόλα, Έφη, Λάμπρο, Βασίλη, Νίκη, Κώστα, Ελένη και Κώστα για την αγάπη τους, την βοήθειά τους (ενίοτε και στην εργασία μου) και την συμπαράστασή τους.

Τέλος η πιο σημαντική ευχαριστία μου προορίζεται για την οικογένειά μου. Στους γονείς μου, Σωκράτη και Καίτη, οφείλω το μεγαλύτερο ευχαριστώ για την αγάπη τους, την τεράστια υποστήριξη, ψυχολογική, ηθική και υλική, που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου και την αναντίρρητη στήριξη της απόφασής μου να συνεχίσω στην διδακτορική μου διατριβή. Τους ευχαριστώ, όχι μόνο επειδή με την βοήθειά τους κατάφερα να ολοκληρώσω την διατριβή μου αλλά και γιατί σε αυτούς, και στα εφόδια που μου έδωσαν, οφείλω ότι έχω κατακτήσει μέχρι σήμερα. Ευχαριστώ ακόμη τη γιαγιά μου, Βέτα, τον αδερφό μου, Κωνσταντίνο και την υπέροχη οικογένειά του, για την επίσης τεράστια συμπαράσταση που μου έδειξαν όλο αυτόν τον καιρό και για την αναμονή τους να γυρίσω κάποια μέρα μόνιμα στην «πατρίδα».

Το ταξίδι ήταν μακρύ και η Ιθάκη περιμένει...

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η ανάλυση των μοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ νευραξόνων και γλοιακών κυττάρων στις εμμύελες ίνες του νευρικού συστήματος. Τα γλοιακά κύτταρα, που σχηματίζουν το έλυτρο της μυελίνης [ολιγοδενδροκύτταρα στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και κύτταρα Schwann στο περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ)], και οι νευράξονες αλληλεπιδρούν και επηρεάζουν αμοιβαία την ανάπτυξή τους. Οι εμμύελες ίνες στο κεντρικό νευρικό σύστημα, όπως και στο περιφερικό, είναι οργανωμένες σε καλά καθορισμένες και διακριτές περιοχές: τον κόμβο του Ranvier, τις παρακομβικές, τις εγγύς των παρακομβικών και τις μεσοκομβικές περιοχές (Poliak and Peles, 2003). Η φυσιολογική δομή της περιοχής του κόμβου του Ranvier διαταράσσεται σε περιπτώσεις νευρολογικών διαταραχών, όπως σκλήρυνση κατά πλάκας (MS), σύνδρομο Guillain-Barre κλπ. Στο ενήλικο άτομο οι διάλυοι συσσωρεύονται σε διακριτές περιοχές (στον κόμβο του Ranvier οι διάλυοι Na^+ και στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή οι διάλυοι K^+). Πρόσφατα, αρκετά μέλη της υπέρ-οικογένειας μορίων συνάφειας IgSF αναγνωρίστηκαν ως συστατικά του μακρομοριακού συμπλόκου που μεσολαβεί για τις αξονο-γλοιακές αλληλεπιδράσεις στις παραπάνω περιοχές. Αυτή η έρευνα συγκεντρώνεται στο μέλος των IgSF, TAG-1, το οποίο βρίσκεται σε αυξημένα ποσοστά στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές εμμύελων ινών στο ΚΝΣ και στο ΠΝΣ μαζί με τους διαλύτες K^+ και το μέλος της υπέρ-οικογένειας των Neurexin πρωτεϊνών, τη Caspr2 (Traka et al., 2002). Προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει ότι η TAG-1, η οποία αλληλεπιδρά με την Caspr2, είναι απαραίτητη για την συσσώρευση των διαύλων K^+ στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές, καθώς η απαλοιφή του γονιδίου της TAG-1 έχει ως αποτέλεσμα την δραματική μετατόπιση και διάχυση των καναλιών αυτών από τις περιοχές αυτές (Traka, Gouterbroze et al., 2003). Στην παρούσα μελέτη έγινε ανάλυση των αλληλεπιδράσεων της TAG-1 με άλλα μόρια στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, με τα οποία διαπιστώνεται αν υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ TAG-1 και Caspr2 και TAG-1 και διαύλων καλίου. Επίσης έγινε ταυτοποίηση των δομικών περιοχών της TAG-1 που αλληλεπιδρούν με την Caspr2 και τους διαλύτες καλίου με τη δημιουργία ελλειμματικών κατασκευών για τις περιοχές ανοσοσφαιρίνης (Ig) και φμπρονεκτίνης (FN) της TAG-1. Παρατηρήθηκε άμεση αλληλεπίδραση της TAG-1 με τους διαλύτες καλίου καθώς και απουσία απ' ευθείας αλληλεπίδρασης των διαύλων με την Caspr2.

Επίσης βρέθηκε ότι οι ανοσοσφαιρινικές περιοχές (IgC2) της πρωτεΐνης TAG-1 αλληλεπιδρούν απευθείας με τους διαύλους K^+ και την Caspr2, ενώ δεν υπάρχει τέτοια αλληλεπίδραση με τις φιμπρονεκτινικές περιοχές της TAG-1.

Με σκοπό να διερευνήσουμε εάν η έκφραση της TAG-1 αποκλειστικά στα ολιγοδενδροκύτταρα είναι σε θέση να αναστρέψει τον φαινότυπο των *Tag1^{-/-}* στελεχών, δημιουργήσαμε DNA κατασκευή (PLP-TAG-1-GFP) η οποία οδηγεί την έκφραση του cDNA της TAG-1 στα ολιγοδενδροκύτταρα λόγω του υποκινητή του γονιδίου PLP, που κωδικοποιεί την ολιγοδενδροκυτταρική πρωτεΐνη PLP. Αντίστοιχη DNA κατασκευή δημιουργήσαμε, η οποία οδηγεί την έκφραση του cDNA της TAG-1 σε νευρώνες (κατασκευή Thy1). Οι κατασκευές χρησιμοποιούνται για την δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών μυών.

Ταυτόχρονα για να εξεταστεί περαιτέρω ο ρόλος της γλοιακής ή νευρωνικής TAG-1 στον σχηματισμό αξονογλοιακών συνδέσμων και γενικά στην δυναμική αυτών σε ζωντανά κύτταρα, έγιναν πειράματα καλλιέργειας και συγκαλλιέργειας αισθητικών γαγγλίων (DRG) από ζώα *Tag1^{-/-}* και γλοιακών κυττάρων (Schwann cells) από ζώα αγρίου τύπου και το αντίστροφο, σε συνθήκες που επιτρέπουν in vitro μυελίνωση. Από αυτά τα πειράματα προέκυψε ότι αφενός μπορεί να επιτευχθεί επαρκής μυελίνωση σε άξονες που αναπτύσσονται από τους νευρώνες και αφετέρου ότι ο φαινότυπος που παρατηρείται στα *Tag1^{-/-}* ζώα (Traka, Gouterbroze et al., 2003) διατηρείται σε αυτού του είδους τις καλλιέργειες. Μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση αποτέλεσε το γεγονός ότι τα μεσοκομβικά τμήματα των καλλιεργημένων *Tag1^{-/-}* νευρώνων παρουσιάζονται μικρότερα σε μήκος και με ανώμαλα κατανεμημένη μυελίνη κατά μήκος του άξονα. Μετρήσεις και στατιστική ανάλυση που έγιναν σε καλλιεργημένες νευρικές ίνες, αλλά και σε νευρικές ίνες προερχόμενες από ισχιακά νεύρα μυών αγρίου τύπου και *Tag^{-/-}*, έδειξαν ότι τα *Tag^{-/-}* μεσοκομβικά τμήματα είναι στατιστικώς σημαντικά κοντότερα από τις αγρίου τύπου.

ABSTRACT

The aim of this thesis is the analysis of the molecular interactions between neurons and glia in the myelinated fibers of the nervous system. The glial cells, that form the myelin sheath, and the neural axons interact and mutually affect each others fate and development. These interactions are necessary for the formation of distinct areas on the myelinated neural axons, which mediate the rapid propagation of the action potentials. Myelinated fibers in both the PNS (peripheral nervous system) and CNS (central nervous system) are well organized in the following distinct areas: the node of Ranvier, the paranodes, the juxtapanodes and the internode. The normal structure of the node of Ranvier, and the perinodal areas, is disrupted during neurological disorders such as multiple sclerosis (MS), Guillain-Barre syndrome etc. In the adult, voltage gated ion channels are concentrated in these areas (Na^+ channels in the node of Ranvier and K^+ channels in the juxtapanode) which are responsible for the propagation of the action potential and in cases of defects in the myelin sheath these channels are diffusely distributed. Lately, members of the cell adhesion molecules of the Ig-superfamily were characterized as components of the macromolecular complex that mediates the axo-glial interactions in the above areas. This research is concentrated on the IgSF-CAM member, TAG-1, which is found highly enriched in the juxtapanodal regions of myelinated fibers, in both PNS and CNS. TAG-1 is, so far, the only IgSF molecule identified in the juxtapanodal region of myelinated fibers. In this area, it is present in both axonal and glial membranes which are in close apposition, and it is required for the clustering of the *Shaker*-type potassium channels (K^+) and Caspr2. It was recently shown that TAG-1 is able to associate *in cis* with Caspr2 and *in trans* with the complex Caspr2-(TAG-1). This complex is necessary for the accumulation of the Kv channels at the juxtapanodes, since in *Tag*^{-/-} mice the Kv channels and Caspr2 are not clustered in the juxtapanode.

We investigated the domains of TAG-1 responsible for its interactions with other juxtapanodal proteins. By using co-transfection experiments we found that the IgC2-GFP and FN_{III}-GFP constructs we generated produce functional proteins which are externalized to the cell membrane. We also established that the Caspr2 protein does not interact directly with Kv channels but it interacts with the immunoglobulin domains of hTAG-1 and not with its fibronectin domains. We then directed our attention to the association of TAG-1 with Kv in brain lysates where they are able to

co-immunoprecipitate. This association is not present in the TAG-1 mutant brain. In addition, K⁺ channels directly interact with the immunoglobulin (IgC2) domains of hTAG-1 but not its fibronectin-like repeats. We also looked into the putative association of TAG-1 with the gap junction protein connexin 29 which also localizes in the juxtaparanodes. We have examined whether this juxtaparanodal localization was perturbed in *Tag1*^{-/-} mice as but they did not display any change in the distribution of Cx29. We conclude the juxtaparanodal complex that holds the Kv channels in this region does not include Cx29 but is specific to TAG-1 and Caspr2. We provide evidence that TAG-1, Caspr2 and Kv form a specific juxtaparanodal complex where the three proteins directly interact via the Ig domains of TAG-1. This is the first evidence so far that addresses structural issues involved in the axo-glial interactions known to be essential for the proper organization of myelinated fibers. These results, taken together, refine our model of interactions of juxtaparanodal proteins in that it predicts that the homophilic interaction between glial and axonal TAG-1 occurs via the FN domains thus allowing the Ig domains to bind Caspr2 and Kv.

It is known that TAG-1 is expressed in both neural and glial cell membranes and that it has the ability to bind homophilically to itself via its fibronectin-like domains. Although the model predicts a homophilic interaction between two molecules of TAG-1, a glial one and a neural one, mediating the axoglia interaction of the juxtaparanode, this has not been formally shown. To assess the role of TAG-1, specifically in the CNS, and also in an attempt to rescue the phenotype of TAG-1 deficient animals, we produced DNA constructs that will allow the generation of transgenic animals specifically expressing TAG-1 in myelin-making glia. In addition, we generated another construct that would drive expression of TAG-1 in adult neurons. By crossing these animals to the TAG-1 deficient background we will test the function of TAG-1 specifically in the CNS glia as well as neurons.

In order to obtain a further insight into the putative function of glial or neuronal TAG-1 in the formation of axoglia contacts and in the dynamics of their association in living cells, we used explant and dissociated cultures of dorsal root ganglion (DRG) neurons and Schwann cells from *Tag1*^{-/-} and wild type (WT) mice, as well as co-cultures of *Tag1*^{-/-} DRG neurons and WT Schwann cells (and vice versa), in conditions allowing *in vitro* myelination. Using immunocytochemistry, we examined the localization and enrichment of TAG-1, K⁺ channels and Caspr2 and it was

observed that, in addition to the fact that myelin was produced normally, the altered phenotype observed in *Tag1*^{-/-} mutant mice (no clustering of Caspr2 and K⁺ channels at juxtaparanodes) can be retained. The most striking discovery of our work though, was the fact that the internodal lengths on the processes of cultured *Tag1*^{-/-} DRG's appeared variable and sometimes much shorter, compared to the wild type cultures. This led us to measuring these internodal lengths. The statistical analysis of the comparison between *Tag1*^{-/-} and wild type derived segments showed that the *Tag1*^{-/-} internodes are significantly (P value: P<0.0001) shorter than the controls. Next, immunohistochemistry on teased fibers from sciatic nerves of *Tag1*^{-/-} and wild type mice, allowed us to measure the length of the internodal segments in a similar manner and confirm that in vivo the mutant internodal segments were shorter than the controls (P value: P<0.0001) as well.

Κεφάλαιο 1:

Εισαγωγή

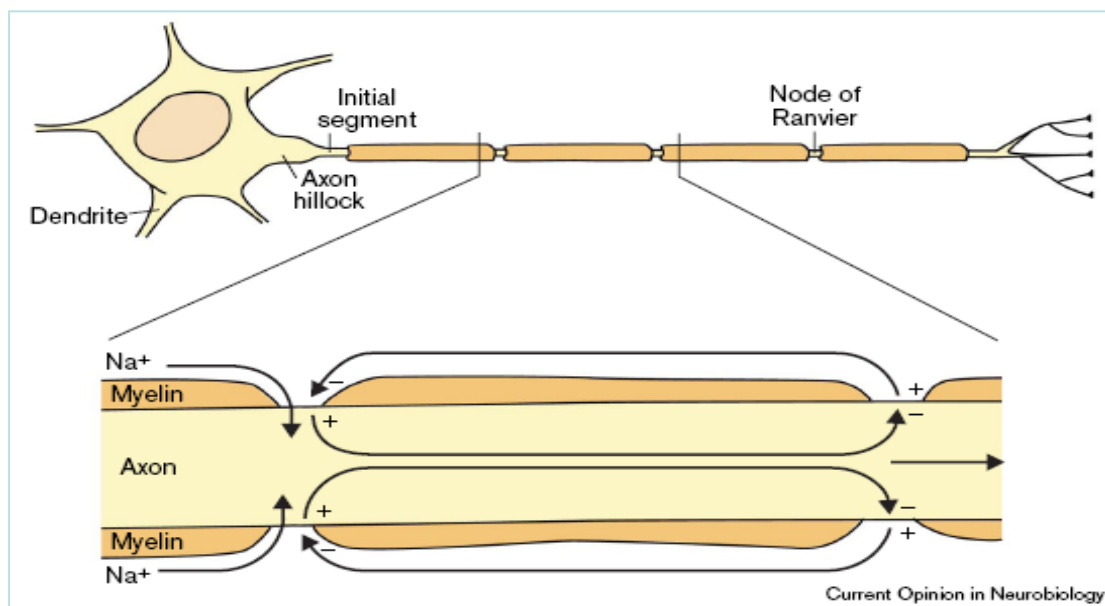
“Facilius per partes in cognitionem totius adducimur”

«Είναι πιο εύκολο να φτάσεις στην κατανόηση του όλου, μελετώντας τμήματά του»

-Σένεκας

1.1 Το μυελώδες έλυτρο και η ανάπτυξή του στο ΚΝΣ και το ΠΝΣ

Το έλυτρο της μυελίνης είναι η δομή που περιβάλλει τους περισσότερους νευρικούς άξονες, του περιφερικού (ΠΝΣ) και κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) και αποτελεί χαρακτηριστικό εξελικτικό γνώρισμα των σπονδυλωτών. Είναι μια εξειδικευμένη μεμβράνη του εμύελου γλοιακού κυττάρου, κυττάρου του Schwann στο ΠΝΣ και ολιγοδενδροκυττάρου στο ΚΝΣ, που σχηματίζει έναν αριθμό στοιβάδων, οι οποίες διατάσσονται σπειροειδώς γύρω από τον νευράξονα ενός νευρικού κυττάρου και επιτρέπουν την ταχεία και αποτελεσματική προώθηση των δυναμικών ενεργείας κατά μήκος των νευραξόνων, καθώς αυξάνουν την αντίσταση και ελαττώνουν την αγωγιμότητα της νευρικής μεμβράνης. Σε αντίθεση με τις περισσότερες πλασματικές μεμβράνες, η μυελίνη παρουσιάζει υψηλή λιπιδική σύσταση (τα λιπίδια αποτελούν το 70% του καθαρού βάρους της) και είναι εμπλουτισμένη σε μεγάλο ποσοστό με γλυκοσφιγκολιπίδια και χοληστερόλη (για ανασκόπηση βλέπε Arroyo and Scherer, 2002; Simons and Trajkovic, 2006).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση A) ενός εμύελου νευρικού κυττάρου και B) της αλματώδους μετάδοσης δυναμικού ενεργείας μεταξύ κόμβων του Ranvier. (Peles and Salzer, 2000)

1.2 Κύτταρα του Schwann: διαφοροποίηση και ανάπτυξη

Τα κύτταρα του Schwann, και οι διαφορετικοί υπό-τύποι τους, προέρχονται από έναν τύπο προγόνων κυττάρων, τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας. Τα πολυδύναμα αυτά κύτταρα μεταναστεύουν στα περιφερικά νεύρα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, για να ωριμάσουν και να εξελιχθούν σε κύτταρα του Schwann. Η παρουσία των νευραξόνων θεωρείται απαραίτητη, σε αυτήν την περίοδο, για την επιβίωση των προδρόμων γλοιακών αυτών κυττάρων, καθώς έχει αποδειχθεί η ύπαρξη αξονικών σηματοδοτικών πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των κυττάρων Schwann και την δημιουργία της μυελίνης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτού του σταδίου ανάπτυξης στο ΠΝΣ αποτελεί η αξονική, μεμβρανική πρωτεΐνη neuregulin-1 (NRG1, ισομορφή III) η οποία αλληλεπιδρά με τον γλοιακό υποδοχέα ErbB2-ErbB3 και είναι απαραίτητη για την επιβίωση και την αναπαραγωγή των κυττάρων Schwann (Michailov et al, 2004). Κατά το εμβρυϊκό στάδιο του μύος E13 (Εμβρυϊκή ημέρα 13) τα πρόδρομα κύτταρα Schwann ξεκινούν να εκφράζουν τρεις παράγοντες διαφοροποίησης: την myelin protein 0 (P0), η οποία και αποτελεί το 50% των συνολικών πρωτεϊνών που βρίσκονται στην μυελίνη του ΠΝΣ (Oguievetskaia et al, 2007), την growth associated protein 43 (GAP43) και την F-spondin (Corfas et al, 2004). Από το κυτταρικό στάδιο E15 έως την γέννηση προκύπτουν τα ανώριμα κύτταρα Schwann, των οποίων η επιβίωση δεν εξαρτάται πλέον από την παρουσία νευρώνων αλλά επάγεται από αυξητικούς παράγοντες όπως ο PDGF-BB, ο NT-3 και ο IGF2. Από την γέννηση και έπειτα τα ανώριμα κύτταρα Schwann διαφοροποιούνται σε τρεις τελικούς φαινοτύπους: τα εμμύελα, τα αμύελα και τα περισυναπτικά κύτταρα Schwann. Οι τρεις αυτοί υπό-τύποι διαφέρουν ως προς τους τύπους νευραξόνων με τους οποίους αλληλεπιδρούν, καθώς εικάζεται ότι η ίδια η διαφοροποίηση των κυττάρων Schwann ρυθμίζεται από αξονική, μηχανιστική και μοριακή,

σηματοδότηση (Corfas et al, 2004; Mirsky et al, 2002), αλλά οι διαφορές τους δεν σταματούν εκεί. Η μορφολογία τους, όπως επίσης και η βιοχημική τους σύσταση διαφέρει σημαντικά. Αναμφίβολα τα εμμύελα κύτταρα Schwann είναι τα πιο λεπτομερώς μελετημένα από τους τρεις υπό-τύπους, αφού είναι υπεύθυνα για την δημιουργία του ελύτρου της μυελίνης ενώ επηρεάζουν και την δομή των νευραξόνων που περικλείουν. Έχει βρεθεί ότι μια σειρά σημαντικών πρωτεϊνών, για τον σχηματισμό και την λειτουργία, της μυελίνης εκφράζεται σε αυτού του είδους τα κύτταρα, όπως η myelin basic protein (MBP), η peripheral myelin protein 22 P(MP22), η P0, και η myelin-associated glycoprotein (MAG) (για ανασκόπηση βλέπε Corfas et al, 2004; Jessen and Mirsky, 1999; Meintanis et al, 2004).

Ένα κύτταρο Schwann πάντα συνδέεται με έναν νευράξονα (αναλογία 1:1) και οδηγεί στην μυελίνωσή του περιβάλλοντάς τον με την κυτταρική του μεμβράνη. Στις σπειροειδείς περιελίξεις της γλοιακής μεμβράνης το κυτταρόπλασμα εκτοπίζεται, λόγω της συμπίεσης της μεμβράνης, και έτσι σχηματίζεται η συμπαγής μυελίνη. Η μη συμπαγής μυελίνη εντοπίζεται στα σημεία όπου συναντάται κυτταρόπλασμα, όπως για παράδειγμα στους παρακομβικούς δακτυλίους ή στις τομές Schmidt-Lanterman (Arroyo and Scherer, 2000; Oguievetskaia et al, 2007). Επίσης, το κύτταρο Schwann παράγει εξωτερικά της μυελίνης μία βασική στοιβάδα (basal lamina), που καλύπτει πλήρως την εμμύελη ίνα και συναντάται μόνο στο ΠΝΣ.

1.3 Ολιγοδενδροκύτταρα: διαφοροποίηση και ανάπτυξη

Η διαδικασία της γλοιογένεσης στο ΚΝΣ, από την οποία προέρχονται τα ολιγοδενδροκύτταρα και τα αστροκύτταρα, ξεκινάει κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη (E7-8 στους μύες) και συνεχίζει μέχρι, μετά την γέννηση, και την μυελίνωση των

νευραξόνων. Παρόλο που τα τελευταία χρόνια, η προέλευση των γλοιακών κυττάρων έχει αποτελέσει πεδίο διένεξης ανάμεσα σε πολλές επιστημονικές ομάδες (για ανασκόπηση βλέπε στο Richardson et al, 2006; Carmen et al, 2007) η πιο διαδεδομένη θεωρία είναι ότι τα πρόδρομα κύτταρα O-2A, που προέρχονται από την κοιλιακή περιοχή της βλαστικής στοιβάδας του νωτιαίου μυελού και του διεγκεφάλου, διαφοροποιούνται (όπως έχει αποδειχθεί *in vitro*) σε προ-ολιγοδενδροκύτταρα (oligodendrocyte precursor cells ή OPCs) και αστροκύτταρα τύπου I ή II. Κατά την γέννηση τα OPCs πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν σε διάφορες περιοχές του αναπτυσσόμενου ΚΝΣ μέχρι να φτάσουν στους κατάλληλους νευράξονες. Μόλις βρεθούν στον τελικό τους προορισμό τα OPCs συνδέονται με τους νευράξονες, εξέρχονται του κυτταρικού κύκλου, μετατρέπονται σε μη-μεταναστευτικά κύτταρα και διαφοροποιούνται σε εμμέλα ολιγοδενδροκύτταρα. Όπως στα κύτταρα Schwann στο ΠΝΣ, έτσι και στο ΚΝΣ, πολλά στάδια της ανάπτυξης των ολιγοδενδροκυττάρων είναι συνδεδεμένα με εξωτερική σηματοδότηση από μόρια που βρίσκονται στους νευρώνες. Η σηματοδότηση αυτή βοηθάει α) στον συγχρονισμό της διαφοροποίησης των OPCs και της μυελίνωσης στον σωστό χώρο και χρόνο και β) στον έλεγχο του αριθμού των ολιγοδενδροκυττάρων που αντιστοιχούν σε νευρώνες. Έχει αποδειχθεί ότι πολλοί αυξητικοί και τροφικοί παράγοντες, όπως ο PDGF-A (platelet-derived growth factor-A), ο FGF (fibroblast growth factor), ο CNTF (ciliary neurotrophic factor) και ο NT3 (neurotrophic factor-3), ρυθμίζουν την ανάπτυξη των ολιγοδενδροκυττάρων. Για παράδειγμα ο PDGF-A παράγεται από νευρώνες και αστροκύτταρα και ρυθμίζει την αναπαραγωγή και την επιβίωση των OPCs, τα οποία εκφράζουν τον υποδοχέα του PDGF-A, τον PDGFR-α. Η υπέρ-έκφραση του PDGF-A σε διαγονιδιακούς μύες προκαλεί δραματική αύξηση στον αριθμό των OPCs στον νωτιαίο μυελό εμβρύων.

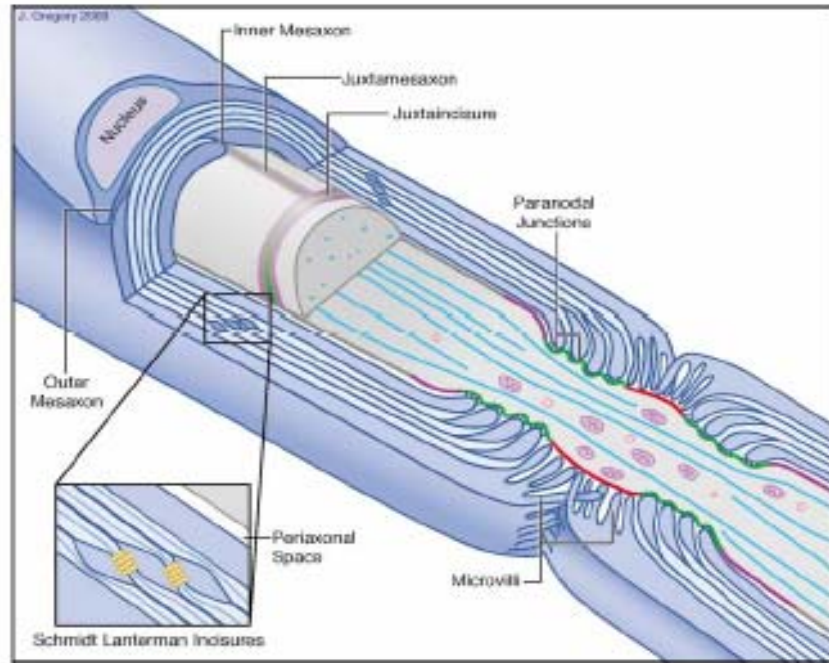
Επίσης, σημαντικός νευρωνικός παράγοντας σηματοδότησης είναι η μεμβρανική πρωτεΐνη neuregulin (NRG) (που συναντάται και στο ΠΝΣ) η οποία ενεργοποιεί μέσω ενός epidermal growth factor (EGF) τμήματος την μεμβρανική κινάση της τυροσίνης ErbB2 που βρίσκεται στο ολιγοδενδροκύτταρο. Κατά την απουσία της ErbB2, τα ολιγοδενδροκύτταρα αποτυγχάνουν να διαφοροποιηθούν και να προχωρήσουν στην μυελίνωση αξόνων (Park et al 2001), γεγονός που οδηγεί στον θάνατό τους (Cologniato et al, 2004)

Αφού τα εμμύελα ολιγοδενδροκύτταρα εξασφαλίσουν την σύνδεση με την αξονική μεμβράνη, αρχίζουν να εκφράζουν το γαλακτολιπίδιο γαλακτοκερεβροσίδιο (Galc), ξεκινούν να παράγουν τις πρωτεΐνες της μυελίνης, όπως η PLP/DM-20 (proteolipid protein) και η MBP, και εξαπλώνουν την μεμβράνη τους σπειροειδώς γύρω από τον άξονα. Μία μεγάλη διαφορά μεταξύ ολιγοδενδροκυττάρων και κυττάρων Schwann εντοπίζεται στο ότι τα πρώτα έχουν την δυνατότητα να κατασκευάζουν έως και 40 τμήματα μυελίνης σε διαφορετικούς άξονες, ενώ φαίνεται να «επιλέγουν» άξονες με διάμετρο μεγαλύτερη από 0.2μm (για ανασκόπηση βλέπε Barres and Raff, 1999; Simons and Trajkovic, 2006).

1.4 Μυελίνη και κόμβοι του Ranvier

Η παρουσία ή η απουσία της μυελίνης σε έναν νευράξονα τον χαρακτηρίζει εμμύελο ή αμύελο. Η συνέχεια της μυελίνης διακόπτεται από τον κόμβο του Ranvier, ο οποίος είναι ένα διάκενο, συνήθως μήκους ~1μm, κατανεμημένο σε περιοδικά διαστήματα που αντιστοιχούν στο μήκος ενός μεσοκομβικού τμήματος (δηλαδή στην έκταση που καλύπτει η μεμβράνη ενός εμμύελου κυττάρου Schwann πάνω σε έναν νευράξονα). Στην δομή αυτή απαντώνται τρεις τύποι επαφής οι οποίοι ορίζουν ισάριθμα τμήματα,

διαφορετικά και ανατομικά αλλά και λειτουργικά, κατά μήκος του νευράξονα. Τα τμήματα αυτά είναι ο κόμβος του Ranvier, η παρακομβική και η εγγύς της παρακομβικής περιοχή (βλέπε εικόνα 1). Η διάκριση του νευράξονα στις περιοχές αυτές εξυπηρετεί τη συγχρονισμένη λειτουργία των τασεοελεγχόμενων διαύλων Na^+ και K^+ , η οποία είναι απαραίτητη για την ταχεία αγωγή του δυναμικού ενεργείας κατά μήκος των εμμέλων ινών. Η φυσιολογική δομή της περιοχής του κόμβου του Ranvier διαταράσσεται σε περιπτώσεις νευρολογικών διαταραχών, όπως σκλήρυνση κατά πλάκας, σύνδρομο Guillain-Barre κλπ. Στο ενήλικο άτομο οι διάυλοι συσσωρεύονται σε διακριτές περιοχές (στον κόμβο του Ranvier οι διάυλοι Na^+ και στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή οι διάυλοι K^+), ενώ σε περιπτώσεις ελλιπούς μυελίνωσης η κατατομή τους είναι διάχυτη. Ο κόμβος του Ranvier, ο οποίος χαρακτηρίζεται από την συγκέντρωση μεγάλων ποσοτήτων διαύλων νατρίου, καλύπτεται εν μέρη από τις μικρολάχνες (microvilli) του κυττάρου Schwann στο ΠΝΣ (αλλά όχι και στο ΚΝΣ). Εν τω μεταξύ, στην παρακομβική (paranodal) περιοχή, το έλυτρο της μυελίνης σχηματίζει μια σειρά δακτυλίων (loops) οι οποίοι έρχονται, στο σύνολό τους, σε επαφή με το αξονόλημα, μέσω διαφραγματοσυνδέσμων (septate-like junctions), και το περικλείουν. Η εγγύς της παρακομβικής (juxtapanodal) περιοχή είναι πλούσια σε διάυλους καλίου (K^+) τύπου Shaker και αποτελεί το όριο μεταξύ των κομβικών περιοχών με το μεσοκομβικό τμήμα (για ανασκόπηση βλέπε: Arroyo and Scherer, 2002; Oguievetskaia et al, 2007).



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης μιας εμμύελης νευρικής ίνας του ΠΝΣ. Εδώ φαίνεται μια οριζόντια διατομή ενός εμμύελου νευράξονα (γκρι), που καλύπτεται από δύο μυελώδη έλυτρα, προερχόμενα από δύο διαφορετικά κύτταρα Schwann (μπλέ), τα οποία δημιουργούν έναν κόμβο του Ranvier. Εκεί είναι εμφανή τα σημεία των κυττάρων Schwann που έρχονται σε επαφή και δημιουργούν στενές συνδέσεις με τον νευράξονα όπως οι μικρολάχνες (κόκκινο) στον κόμβο, οι παρακομβικοί δακτύλιοι (πράσινο) και η εγγύς της παρακομβικής περιοχή (μοβ). Επίσης, διακρίνονται οι διατομές Schmidt-Lanterman (μεγέθυνση) όπως και η συμπαγής μυελίνη (ανοιχτό μπλε). (Salzer, 2003)

Οι μοριακές διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις που συναντώνται στις παρακομβικές και στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές επιδεικνύουν ένα εξαιρετικά μεγάλο βαθμό συντηρημένης μοριακής οργάνωσης. Στην οργάνωση αυτή διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο διάλυτοι ιόντων, κυτταροσκελετικές, δομικές πρωτεΐνες και, ιδιαίτερος, μόρια κυτταρικής συνάφειας CAMs (Cell Adhesion Molecules), που εμπλέκονται γενικότερα στην νευρική και γλοιακή διαφοροποίηση και καθοδήγηση, όπως και στις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις .

1.5 Μόρια κυτταρικής συνάφειας (Cell Adhesion Molecules ή CAMs)

Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας (cell adhesion molecules ή CAMs) είναι πολυλειτουργικές πρωτεΐνες που πρωτίστως διαμεσολαβούν τις αλληλεπιδράσεις συνάφειας μεταξύ κυτταρικών μεμβρανών που βρίσκονται σε επαφή, όμως διαδραματίζουν επίσης σημαντικούς ρόλους και σε άλλες κυτταρικές διαδικασίες, όπως είναι η κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση, ή η ενδοκυττάρια σηματοδότηση. Τα μόρια αυτά έχουν κατηγοριοποιηθεί σε 4 βασικές οικογένειες πρωτεϊνών: τις καντερίνες (cadherins), τις ιντεγκρίνες (integrins), τις σελεκτίνες (selectins) και την υπέρ-οικογένεια των ανοσοσφαιρινών (immunoglobulin superfamily, IgSF) (Hynes et al, 1999). Υπάρχουν επίσης δύο ξεχωριστές ομάδες CAMs, μία στην οποία τα μόρια εξαρτώνται από ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}) και μία δεύτερη στην οποία η εξάρτηση από τα ιόντα ασβεστίου δεν υφίσταται, με την πρώτη να συμπεριλαμβάνει τις καντερίνες, τις ιντεγκρίνες και τις σελεκτίνες και την δεύτερη να αποτελείται κυρίως από την υπέρ-οικογένεια των ανοσοσφαιρινών.

Οι cadherins είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, υπεύθυνες για την, εξαρτώμενη από ιόντα ασβεστίου, σύνδεση σε διάφορους ιστούς των σπονδυλωτών. Οι τρεις πρώτες πρωτεΐνες που ανακαλύφθηκαν από αυτή την οικογένεια, και πήραν την ονομασία τους σύμφωνα με τον τύπο ιστού στον οποίο εντοπίζονται, είναι η E-καντερίνη που βρίσκεται στα επιθηλιακά κύτταρα, η N-καντερίνη που βρίσκεται στα νευρικά και μυϊκά κύτταρα και η P-καντερίνη που βρίσκεται σε κύτταρα στον πλακούντα. Οι πρωτεΐνες αυτές συνάπτουν ομοφιλικούς δεσμούς μέσω της εξωκυττάριας περιοχής τους, και αλληλεπιδρούν ετεροφιλικά με μία ομάδα πρωτεϊνών ενδοκυττάριας σύνδεσης, τις κατενίνες (catenins), μέσω της κυτταροπλασματικής περιοχής τους. Επίσης, το εξωκυττάριο τμήμα τους περιέχει σημεία πρόσδεσης ιόντων ασβεστίου και, κατά την απουσία τέτοιων ιόντων, οι

καντερίνες υφίστανται σημαντικές δομικές αλλαγές, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την αποσύνθεσή τους από πρωτεολυτικά ένζυμα. Οι ιντεγκρίνες είναι και αυτές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, που αποτελούνται από δύο μη-ομοιοπολικά συνδεδεμένες υπομονάδες και το εξωκυτταρικό τους τμήμα συνδέεται με συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας ενώ το ενδοκυτταρικό τους τμήμα συνδέεται με ινίδια ακτίνης, με τη διαμεσολάβηση άλλων μορίων. Η λαμινίνη και η φιμπρονεκτίνη, οι οποίες βρίσκονται στη βασική στοιβάδα (basal lamina) που περιβάλλει το έλυτρο της μυελίνης στο ΠΝΣ, είναι χαρακτηριστικά δείγματα ιντεγκρινών. Οι σελεκτίνες είναι μια υποοικογένεια επιφανειακών πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με υδατάνθρακες και διαθέτουν ένα συντηρημένο τμήμα (που συναντάται σε όλες τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με υδατάνθρακες και ονομάζονται λεκτίνες-lectins) που, υπό την παρουσία ιόντων ασβεστίου, συνάπτουν ετεροφιλικό δεσμό με συγκεκριμένους ολιγοσακχαρίτες. Η οικογένεια των σελεκτινών αποτελείται από τρία μέλη: την E-σελεκτίνη, την L-σελεκτίνη και την P-σελεκτίνη (για ανασκόπηση βλέπε Gonzalez-Amaro and Sanchez-Madrid, 1999; Hynes, 1999)

Από την άλλη πλευρά, οι πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για τις ανεξάρτητες από ιόντα Ca^{2+} διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις συνάφειας ανήκουν κυρίως στην υπέρ-οικογένεια των ανοσοσφαιρινών (IgSF). Οι πρωτεΐνες αυτές (IgCAMs) διαθέτουν εξωκυτταρικό τμήμα που περιέχει μία ή περισσότερες περιοχές που μοιάζουν με ανοσοσφαιρινικές περιοχές (Immunoglobulin-like domains ή Ig-like domains) τύπου C2, συνδεδεμένες μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς, ενώ κάποια μέλη συμπεριλαμβάνουν και περιοχές που μοιάζουν με φιμπρονεκτινικές περιοχές (Fibronectin-like domains ή FN-like domains) τύπου III στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Στην περίπτωση μάλιστα των IgCAM που συμπεριλαμβάνουν και FN περιοχές, υπάρχει ένας υπό-τύπος που διαθέτει διαμεμβρανική περιοχή και ένας του οποίου τα

μέλη ενώνονται με την κυτταρική μεμβράνη μέσω ενός μορίου γλυκοσυλ-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (GPI-anchor) και έχουν τη δυνατότητα να μεταδίδουν ενδοκυτταρικά σήματα μέσω αλληλεπιδράσεών τους με άλλα IgCAMs (π.χ. μέλη της υποοικογένειας L1) (Sanes and Jessel, 2000). Στην υπέρ-οικογένεια των IgCAMs συμπεριλαμβάνονται πολλές υποοικογένειες πρωτεϊνών, κάποιες από τις οποίες εκφράζονται σε νευρικά κύτταρα και χαρακτηρίζονται ως μόρια κυτταρικής συνάφειας του νευρικού συστήματος (Neural CAMs). Οι τελευταίες είναι γνωστό πως όχι μόνο εξασφαλίζουν την κυτταρική συνάφεια αλλά επάγουν επίσης την ανάπτυξη και αύξηση των νευραξόνων (καθώς κάποιες εκφράζονται στον αυξητικό κώνο των νευριτών), τη μετανάστευση και διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων, τη συναπτική πλαστικότητα και γενικότερα τη μετάδοση ενδοκυτταρικών σημάτων, λειτουργίες απαραίτητες τόσο κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος στο έμβryo ή το νεογέννητο όσο και στο ενήλικο άτομο. (Walsh and Doherty, 1997). Οι IgSF πρωτεΐνες κυτταρικής συνάφειας του νευρικού συστήματος, μάλιστα, διαιρούνται σε δύο μεγάλες υποομάδες: στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και σε πρωτεΐνες που είναι προσδεμένες στην κυτταρική μεμβράνη μέσω ενός τμήματος γλυκοσυλ-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (GPI- anchor). Αυτές αναλύονται περαιτέρω στα κεφάλαια που ακολουθούν.

1.6 Μόρια κυτταρικής συνάφειας της υπέρ-οικογένειας των ανοσοσφαιρινών στο νευρικό σύστημα (IgSF neural CAMs)

Το πρώτο IgSF μόριο κυτταρικής συνάφειας του νευρικού συστήματος που απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε ήταν η πρωτεΐνη N-CAM (neural cell adhesion molecule) (Cunningham et al, 1987). Τρεις βασικές ισομορφές της N-CAM προκύπτουν μετά το εναλλακτικό μάτισμα ενός αρχικού μεταγράφου από ένα γονίδιο. Δύο από αυτές τις ισομορφές, μεγέθους 140 kDa η μία και 180 kDa η άλλη, διαθέτουν διαμεμβρανικό τμήμα, ενώ η τρίτη, μεγέθους 120 kDa, διαθέτει τμήμα αγκυροβόλησης GPI. Όλες οι ισομορφές αποτελούνται, στο αμινοτελικό τους άκρο, από πέντε περιοχές που είναι ομόλογες με τις ανοσοσφαιρινικές περιοχές, οι οποίες ακολουθούνται από δύο περιοχές ομόλογες με αυτές της φμπρονεκτίνης. Επίσης, όλες οι ισομορφές της N-CAM μπορούν να συνάψουν ομοφιλικούς δεσμούς, στους οποίους έρευνες προτείνουν ότι συμβάλουν και οι πέντε Ig περιοχές της N-CAM, ενώ έχουν περιγραφεί στο παρελθόν και ετεροφιλικό δεσμοί με διάφορα μόρια (Friedlander et al, 1994). Μία ιδιαιτερότητα της πρωτεΐνης αυτής, σε σχέση με άλλα μόρια κυτταρικής συνάφειας, είναι το ότι φέρει μεγάλη ποσότητα πολυσιαλικού οξέως (PSA), το οποίο μάλιστα κατά την ανάπτυξη μειώνεται σταδιακά. Η παρουσία πολυσιαλικού οξέως επηρεάζει την κινητικότητα της N-CAM, κατά τέτοιο τρόπο ώστε η N-CAM που φέρει PSA να συσσωρεύεται πιο δύσκολα απ' ό,τι η N-CAM που δεν φέρει το συγκεκριμένο σάκχαρο (Crossin and Krushel, 2000). Οι διάφορες ισομορφές της πρωτεΐνης NCAM διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά τη μετανάστευση των νευρικών κυττάρων, τον προσανατολισμό των αξόνων και στην πλαστικότητα της σύναψης. Τέλος, η πρωτεΐνη NCAM έχει συνδεθεί με εγκεφαλικές διαταραχές στον άνθρωπο όπως είναι η σχιζοφρένεια, όπου έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης και έκφρασής της στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό σχιζοφρενών, η

διπολική διαταραχή ή η νόσος του Alzheimer, αλλά και με λειτουργίες όπως η μάθηση και η μνήμη (Poltorak et al, 1997; Maness και Schachner, 2007).

Η οικογένεια L1 ανήκει επίσης στα IgSF μόρια κυτταρικής συνάφειας του νευρικού συστήματος και αποτελεί σημαντικό μέλος τους. Αποτελείται από τις πρωτεΐνες L1, neurofascin, NrCAM, NgCAM, neuroglian, ABGP και CHL των οποίων χαρακτηριστικό είναι η ύπαρξη έξι περιοχών ανοσοσφαιρίνης και τριών έως πέντε περιοχών φμπρονεκτίνης τύπου III, στην δομή τους. Η πρωτεΐνη L1, από την οποία πήρε και το όνομά της η υποοικογένεια αυτού του είδους πρωτεϊνών, διακρίνεται σε δύο ισομορφές (προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος) μεγέθους 180 kDa και 140 kDa. Έχει τη δυνατότητα να προσδέεται ομοφιλικά ή και ετεροφιλικά με άλλα Ig-CAMs, τα οποία συμπεριλαμβάνουν την NCAM, την contactin/F3/F11 και την axonin1/TAG-1, αλλά και με ιντεγκρίνες. Ένα άλλο σημαντικό μέλος της οικογένειας L1 είναι η πρωτεΐνη neurofascin, η οποία παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με την L1 και έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στις νευρογλοιακές αλληλεπιδράσεις και στη μυελίνωση (Tait et al, 2000). Η neurofascin με τη σειρά της διακρίνεται σε δύο ισομορφές, προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος με μεγέθη 155 kDa και 186 kDa οι οποίες εκφράζονται στις παρακομβικές περιοχές και στους κόμβους Ranvier εμμύελων ινών, αντιστοίχως (Sherman et al, 2005). Τα μέλη της L1 οικογένειας γενικότερα παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση και καθοδήγηση των νευρικών αξόνων, στη δεσμιδοποίηση των νευριτών καθώς και στη μετανάστευση και επιβίωση των νευρικών κυττάρων (Brummendorf et al, 1998). Μεταλλάξεις στα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την έκφραση των πρωτεϊνών αυτών έχουν συνδεθεί με γνωστές νευρολογικές παθήσεις στον άνθρωπο, γεγονός που καταδεικνύει την σημασία της L1 οικογένειας στο νευρικό σύστημα. Κάποια παραδείγματα τέτοιων παθήσεων είναι η σκλήρυνση κατά πλάκας (μεταλλάξεις στο γονίδιο της neurofascin), το σύνδρομο του

αυτισμού (μεταλλάξεις στο γονίδιο του NrCAM) και το σύνδρομο L1 ή η σπαστική παραπληγία (μεταλλάξεις στο γονίδιο της πρωτεΐνης L1) (για ανασκόπηση βλέπε Crossin and Krushel 2000; Maness και Schachner, 2007).

Οι πρωτεΐνες της μυελίνης MAG (στο ΚΝΣ και στο ΠΝΣ) και P₀ (μόνο στο ΠΝΣ) είναι επίσης σημαντικά μέλη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών του νευρικού συστήματος. Η MAG (myelin associated glycoprotein) διακρίνεται σε δύο ισομορφές, μία 68 kDa και μία 72 kDa, οι οποίες προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα RNA, με την πρώτη να αντικαθιστά σταδιακά την δεύτερη κατά την ανάπτυξη και ενηλικίωση. Η δομική της ομοιότητα με άλλα μέλη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών του νευρικού συστήματος, όπως και η έκφρασή της σε αρχικά στάδια της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος καταδεικνύουν ότι είναι ένα μόριο απαραίτητο για την εκκίνηση της διαδικασίας της μυελίνωσης (Hildebrand et al, 1993) ενώ στο ενήλικο ΚΝΣ έχει βρεθεί ότι είναι αναστολέας της αξονικής αναγέννησης μετά από τραυματισμό (Domeniconi et al, 2002). Από την άλλη πλευρά η P₀ (myelin protein zero) διαθέτει ένα βασικό ενδοκυττάριο τμήμα και ένα γλυκοσυλιωμένο εξωκυττάριο που περιέχει μια περιοχή η οποία ομοιάζει με τις δομικές περιοχές των ανοσοσφαιρινών (Ig-like domain). Αυτό το εξωκυττάριο τμήμα δημιουργεί τετραμερή τα οποία έχουν τη δυνατότητα ομοφιλικής σύνδεσης, κατά την μυελίνωση νευραξόνων από γλοιακά κύτταρα, μεταξύ αυτών και ίδιων τμημάτων που βρίσκονται στην επιφάνεια της παρακείμενης μεμβράνης. Η P₀ αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην δημιουργία της συμπαγούς μυελίνης, καθώς σε μύες που έχουν τροποποιηθεί γενετικά και δεν την εκφράζουν παρατηρείται μεν μυελίνη, αλλά όχι και συμπύκνωση αυτής γύρω από τον νευράξονα (Arroyo and Scherer, 2000).

1.7 Μόρια κυτταρικής συνάφειας με τμήμα αγκυροβόλησης γλυκοσύλ-φωσφατιδύλο-ινοσιτόλης (GPI-anchor)

Ένα ιδιαίτερο και σημαντικό κεφάλαιο των IgSF μορίων κυτταρικής συνάφειας του νευρικού συστήματος αποτελούν τα μόρια κυτταρικής συνάφειας με τμήμα αγκυροβόλησης γλυκοσύλ-φωσφατιδύλο-ινοσιτόλης (glycosyl-phosphatidyl-inositol anchor ή GPI-anchor). Τα μόρια αυτά οφείλουν την ιδιαιτερότητά τους στο τμήμα GPI που φέρουν για να συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη, καθώς στερούνται κυτταροπλασματικού τμήματος, όπως και στο γεγονός ότι συναντώνται και σε διαλυτή μορφή στον οργανισμό. Παρόλα αυτά έχουν τη δυνατότητα να διαμεσολαβούν αλληλεπιδράσεις παρόμοιες με αυτές στις οποίες εμπλέκονται και οι υπόλοιπες Ig-CAMs, όπως είναι η κυτταρική συνάφεια, η ανάπτυξη και αύξηση των νευραξόνων, η δεσμιδοποίηση νευριτών και η μετάδοση ενδοκυτταρικών σημάτων (Crossin and Krushel, 2000). Ειδικά για την μετάδοση ενδοκυττάρων σημάτων, έρευνες δείχνουν ότι η συγκέντρωση GPI-προσδεμένων IgCAMs σε συγκεκριμένες περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης και η σύνδεσή τους με μόρια ενδοκυττάριας σηματοδότησης, όπως οι Src και Fyn κινάσες της τυροσίνης, οφείλεται σε τμήματα της μεμβράνης που είναι πλούσια σε σφιγκολιπίδια και χοληστερόλη και ονομάζονται λιπιδικές «πλατφόρμες» (lipid «rafts») (Kashahara et al, 1999; Kramer et al, 1999).

Οι δύο κύριες υποομάδες των μορίων κυτταρικής συνάφειας με τμήμα GPI είναι η οικογένεια TAG-1/contactin και η οικογένεια IgLON. Η οικογένεια TAG-1/contactin, που είναι και η εκτενέστερα μελετημένη οικογένεια από τις δύο, αποτελείται από 6 μέλη: την πρωτεΐνη contactin/F3 (και την αντίστοιχή της στην όρνιθα F11), την πρωτεΐνη TAG-1 (ή contactin 2 και τις αντίστοιχες της στον άνθρωπο TAX-1 και την όρνιθα axonin-1), τις πρωτεΐνες BIG1 και BIG2 καθώς και τα νεότερα μέλη NB2 και NB3 (για ανασκόπηση βλέπε: Karagogeos, 2003) Όλα τα μέλη αυτής της οικογένειας

παρουσιάζουν μεγάλο ποσοστό ομολογίας μεταξύ τους και αποτελούνται από 6 ανοσοσφαιρινικές (Ig-like) περιοχές και 4 φιβρονεκτινικές (FN-like) περιοχές τύπου III (Kasper et al, 2000).

1.8 Υποοικογένεια TAG-1/axonin των IgCAMs με τμήμα GPI

Ένα από τα πιο χαρακτηριστικά CAMS με ανοσοσφαιρινικά τμήματα (Ig-like domains) είναι η πρωτεΐνη TAG-1/axonin-1, η οποία, κατά την ανάπτυξη, εκφράζεται σε αναπτυσσόμενες νευρωνικές οδούς (developing fiber tracts) καθώς και σε νευρώνες (στο κυτταρικό σώμα) που μεταναστεύουν. Από την άλλη πλευρά, στο ενήλικο άτομο, η ίδια πρωτεΐνη, εντοπίζεται στις παρακομβικές περιοχές εμμύλων ινών. Γενικά, από λειτουργικές *in vitro* μελέτες, η TAG-1/axonin έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη των νευραξόνων, την μετανάστευση των νευρικών κυττάρων και την κυτταρική συνάφεια (Yoshihara et al., 1995, Denaxa et al., 2003).

Η TAG-1/axonin-1 έχει την δυνατότητα να συνάπτει ομοφιλικούς δεσμούς, όπου το μόριο συνδέεται με ένα όμοιό του, αλλά και ετεροφιλικούς δεσμούς (*in cis* ή *in trans*), με άλλα μόρια κυτταρικής συνάφειας (Pavlou et al, 2002; Traka et al, 2003).

Στην περίπτωση της TAG-1, ο ομοφιλικός δεσμός διενεργείται *in trans* μέσω των φιβρονεκτινικών περιοχών (FNIII) της πρωτεΐνης, ενώ η axonin-1 χρησιμοποιεί περιοχές των φιβρονεκτινικών και των ανοσοσφαιρινικών (Ig) περιοχών της για τον ίδιο σκοπό (Tsiotra et al, 1996). Όσον αφορά στις ετεροφιλικές αλληλεπιδράσεις, η TAG-1 συνδέεται *in cis* με την L1, και το σύμπλοκο αυτό με τη σειρά του συνδέεται με την κυτταροσκελετική πρωτεΐνη αγκυρίνη (ankyrin), σε σημεία κυτταρικής σύνδεσης, επιτρέποντας έτσι την επικοινωνία της TAG-1 με το κυτταρόπλασμα (Malhotra et al, 1998). Με χρήση χημικών-Fc πρωτεϊνών, το εργαστήριό μας έδειξε

ότι είναι συγκεκριμένα οι ανοσοσφαιρινικές περιοχές της TAG-1 που συνδέονται με την L1, αλλά και με την NrCAM (Pavlou et al, 2002). Επίσης, από έρευνα της ομάδας μας, σε διαμολυσμένα κύτταρα, προέκυψε ότι η TAG-1 συνδέεται *in cis* με ένα μέλος της οικογένειας των neurexins, την Caspr2, με την οποία συνεντοπίζονται στις εγγύς παρακομβικές περιοχές εμμύελων ινών, ενώ έχει προηγηθεί *in trans* ομοφιλική σύνδεση μεταξύ γλοιακής και αξονικής TAG-1 (Traka et al, 2003). Η axonin-1 αλληλεπιδρά *in cis* με την NgCAM (την αντίστοιχη πρωτεΐνη της L1 στην όρνιθα) και την NrCAM (Buchstaller et al, 1996; Suter et al, 1995).

Σε γενετικώς τροποποιημένους μύες οι οποίοι στερούνται της παρουσίας TAG-1 στον οργανισμό τους, αρχικά δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή στον φαινότυπό τους, καθώς αναπαράγονται και αναπτύσσονται κανονικά. Ανάλυση όμως σε μοριακό επίπεδο έδειξε ότι τα άτομα αυτά, παρόλο που δεν παρουσιάζουν αλλαγές στις κομβικές και παρακομβικές περιοχές του κόμβου του Ranvier, παρουσιάζουν δραματικές αλλαγές στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές, όπου εκτός από την TAG-1 εκφράζονται η Caspr2 και οι διάυλοι καλίου τύπου shaker. Τα δύο τελευταία μόρια (Caspr2 και διάυλοι K^+), κατά την απουσία της TAG-1, αδυνατούν να συγκεντρωθούν στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή, που είναι και η φυσική τους θέση, καταδεικνύοντας την σημασία της TAG-1 στην μοριακή οργάνωση της περιοχής (Traka et al, 2003).

1.9 Υποοικογένεια Contactin/F3 GPI-προσδεδεμένων IgCAMs

Ένα άλλο βασικό μόριο της υποομάδας TAG-1/contactin, που παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με την αλληλουχία της TAG-1 (50%), είναι η πρωτεΐνη contactin/F3 (Genarini et al, 1989). Η πρωτεΐνη αυτή έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη και δεσμιδοποίηση νευριτών καθώς και με κυτταρική συνάφεια (Pesheva et al, 1993; Buttiglione et al, 1998). Στο ενήλικο νευρικό σύστημα (κεντρικό και περιφερικό) έχει εντοπιστεί στις παρακομβικές περιοχές εμμύελων ιών, και πίο συγκεκριμένα στο αξονόλημα, όπου αλληλεπιδρά με ένα μέλος της οικογένειας των neurexins, την Caspr/paranodin, και μία από της ισομορφές της Ig-CAM neurofascin, την NF-155. Εκεί, η contactin/F3 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην συνάφεια μεταξύ αξονικής και γλοιακής μεμβράνης (Poliak and Peles, 2003).

Σε αντίθεση με την πλειοψηφία των πρωτεϊνών κυτταρικής συνάφειας της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών, η contactin/F3 δεν διαθέτει την ικανότητα ομοφιλικής σύνδεσης, όμως μπορεί και συνδέεται ετεροφιλικά με μία σειρά πρωτεϊνών, μέσω των περιοχών ανοσοσφαιρίνης και φμπρονεκτίνης που περιέχει (για ανασκόπηση βλέπε: Karagogeos, 2003). Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι οι Ig περιοχές της contactin/F3 συνδέονται με την πρωτεΐνη NrCAM στους αυξητικούς κώνους κοκκωδών κυττάρων, σταματώντας την ανάπτυξη των νευριτών (Buttiglione et al, 1996).

Επιπλέον, η contactin/F3 συνδέεται *in cis* με το μέλος των neurexins, Caspr/paranodin, στις παρακομβικές περιοχές εμμύελων ιών. Το σύμπλοκο αυτό, που δημιουργείται στο επίπεδο του νευράξονα, με τη σειρά του αλληλεπιδρά με την IgCAM neurofascin-155, που βρίσκεται στο γλοιακό κύτταρο, για να δημιουργηθεί η παρακομβική σύναψη (Rios et al, 2000; Boyle et al, 2001). Η σύνδεση contactin/F3-Caspr/paranodin επίσης εξυπηρετεί και την μεταφορά της Caspr/paranodin στην

κυτταρική μεμβράνη και την συγκέντρωσή της στις μεμβρανικές πλατφόρμες (Faivre-Sarreilh et al, 2000).

Σε μελέτες, όπου δημιουργήθηκαν διαγονιδιακοί μύες με μεταλλάξεις στο γονίδιο της contactin/F3, βρέθηκε ότι η παρακομβική σύναψη που προαναφέρθηκε παρουσιάζει σοβαρές αλλαγές (Charles et al, 2002). Επίσης, σε αυτούς τους γενετικά τροποποιημένους μύες παρουσιάζονται νευρολογικές βλάβες όπως παρεγκεφαλιδική αταξία (cerebellar ataxia), ανεξέλεγκτη κίνηση και αδυναμία των οπισθίων άκρων, οι οποίες είναι αποτελέσματα ελαττωματικής αξονικής καθοδήγησης και αποδιοργάνωσης των παρακομβικών συνδέσεων (Berglung et al, 1999; Boyle et al, 2001).

1.10 Ρόλος των CAMs στο σχηματισμό και στη διατήρηση του ελύτρου της μυελίνης

Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας είναι άρρηκτα συνδεδεμένα με όλα τα στάδια της ανάπτυξης του εμμύελου κυττάρου καθώς και του ελύτρου της μυελίνης που περιελίσσεται γύρω από αυτό, λαμβάνοντας μέρος, με αυστηρή χώρο-χρονική έκφραση, σε σημαντικές αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις. Ειδικότερα, μετά την προσκόλληση του γλοιακού κυττάρου στον νευράξονα και έπειτα, συγκεκριμένα μέλη των CAMs του νευρικού συστήματος (και πιο συγκεκριμένα της υπέρ-οικογένειας των ανοσοσφαιρινών), σε συνδυασμό με άλλα χαρακτηριστικά μόρια της μυελίνης, διαμεσολαβούν σε ξεχωριστές αλληλεπιδράσεις κατά την ανάπτυξη και διατήρηση του ελύτρου της μυελίνης.

Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας N-CAM και L1, τα οποία εκφράζονται στους νευράξονες αλλά και στα γλοιακά κύτταρα πριν την μυελίνωση, με την έναρξη της δημιουργίας της μυελίνης παρουσιάζουν δραματική μείωση στην έκφραση τους. Την ίδια χρονική περίοδο αντιθέτως, δύο άλλα μέλη των IgSF νευρικών-CAMs, οι πρωτεΐνες MAG και P₀, παρουσιάζουν αύξηση στην έκφρασή τους, με την δεύτερη να εκφράζεται μόνο στο ΠΝΣ. Παρόλο που, στο ΠΝΣ, αυτά τα δύο μόρια εντοπίζονται υποκυτταρικά στις ίδιες περιοχές πριν την μυελίνωση, κατά την μυελίνωση, και πιο συγκεκριμένα μετά την συμύκνωση του ελύτρου, ο εντοπισμός τους διαφέρει. Η MAG περιορίζεται στις μη συμπαγείς περιοχές του μυελώδους ελύτρου και στην βασική στοιβάδα ενώ η P₀ εντοπίζεται μόνο στην συμπαγή μυελίνη (Martini and Carenini, 1998).

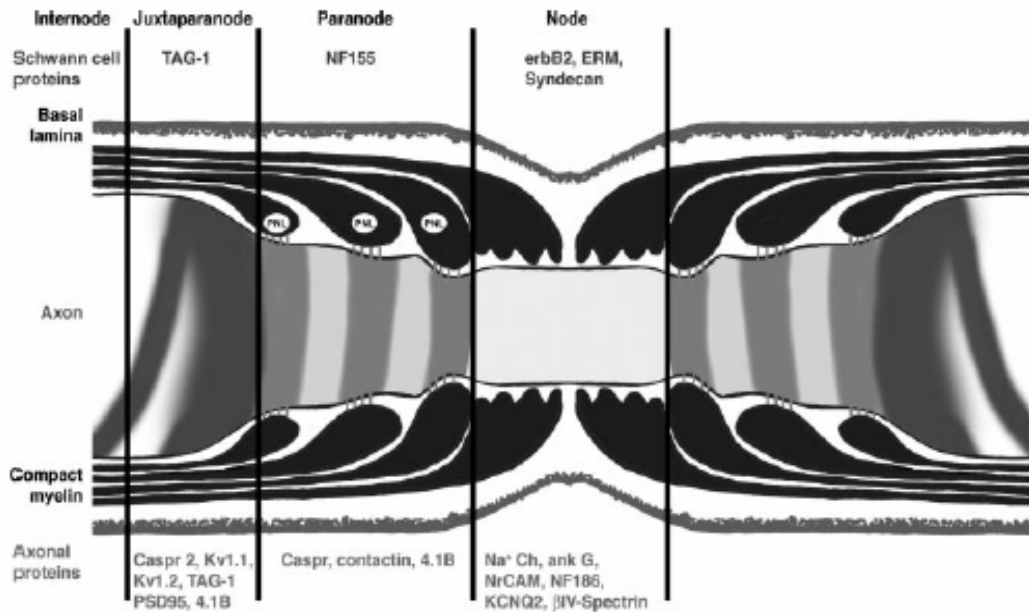
Ο ρόλος της καθεμίας από τις παραπάνω πρωτεΐνες αναλύθηκε διεξοδικότερα με την δημιουργία διαγονιδιακών ζώων, τα οποία δεν εκφράζουν κάποια από τις πρωτεΐνες αυτές. Από αυτές τις πρωτεΐνες, που θεωρούνταν σημαντικές στον σχηματισμό και τη διατήρηση του ελύτρου της μυελίνης, μόνο η πρωτεΐνη P₀ βρέθηκε να διαδραματίζει καταλυτικό ρόλο στην ανάπτυξη της μυελίνης, στο ΠΝΣ. Σε περιφερικά νεύρα τα οποία είχαν εξαχθεί από ομόζυγους μύες P₀^{-/-} παρατηρήθηκε σημαντική υπομυελίνωση και μάλιστα στα ενήλικα εμφανίστηκαν νευρώνες πλήρως απομυελινωμένοι, ενώ σε νεογέννητα η περιέλιξη γύρω από τον νευράξονα καθυστέρησε σε σύγκριση με ζώα αγρίου τύπου. Επίσης, σε κάποιες περιπτώσεις όπου υπήρχε μυελίνη, το κύτταρο του Schwann περιελισσόταν ακανόνιστα γύρω από τον νευράξονα και αδυνατούσε να συμυκνώσει τις σπείρες της μεμβράνης του στις περιοχές όπου έπρεπε να υπάρχει συμπαγής μυελίνη (Martini et al, 1995; Arroyo and Scherer, 2000; Takeda et al, 2001). Όμως και σε ετερόζυγα P₀^{+/-} άτομα παρατηρήθηκε νευροπάθεια που συνοδευόταν από απομυελίνωση (Shy et al, 1997).

Οι παραπάνω φαινότυποι μπορούν να εξηγηθούν από το γεγονός ότι το ανοσοσφαιρινικό εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης P₀ μπορεί να σχηματίζει τετραμερή *in cis* στην μεμβράνη του γλοιακού κυττάρου, τα οποία αλληλεπιδρούν *in trans* με αντίστοιχα τετραμερή στην μεμβράνη του νευράξονα, δημιουργώντας έτσι σύμπλοκο συνάφειας (Shapiro et al, 1996; Ανασκόπηση Arroyo and Scherer, 2000; Takeda et al, 2001). Τέλος, γενετικές μελέτες στον άνθρωπο έδειξαν ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την P₀ είναι συνδεδεμένες με νευροπάθειες στο ΠΝΣ, όπως η Dejerine-Sottas και η Charcot-Marie-Tooth τύπου 1B (Martini et al, 1997).

Αντίθετα με την πρωτεΐνη P₀, σε μύες που φέρουν μεταλλαγές στα γονίδια που κωδικοποιούν είτε την L1, είτε την N-CAM, είτε την MAG, δεν παρατηρείται καμία αλλαγή στην ανάπτυξη του μυελώδους ελύτρου στο ΠΝΣ. Στην περίπτωση της MAG παρόλα αυτά, παρατηρήθηκαν μορφολογικές αλλαγές σε νεύρα ενήλικων ζώων, όπως ενδείξεις εκφυλιζόμενης μυελίνης και υπεράριθμα κύτταρα του Schwann, γεγονός που προσδίδει στην MAG την ιδιότητα μορίου υπεύθυνου για την διατήρηση της μυελίνης. Μάλιστα σε διπλά μεταλλαγμένους μύες, στα γονίδια που κωδικοποιούν τα μόρια P₀ και MAG, παρατηρήθηκε και καθυστέρηση στην περιέλιξη του κυττάρου του Schwann γύρω από τον νευράξονα, σε σχέση με ζώα που φέρουν μετάλλαξη μόνο για την P₀ (Carenini et al, 1999; ανασκόπηση από Takeda et al, 2001). Από την άλλη πλευρά, στο ΚΝΣ, η MAG εμφανίζεται να διαδραματίζει ακόμη σημαντικότερο ρόλο. Αυτό διαφαίνεται σε μεταλλαγμένα ζώα που δεν εκφράζουν MAG, τα οποία παρουσιάζουν καθυστέρηση στην έναρξη δημιουργίας μυελίνης και μεγάλο αριθμό αμύελων αξόνων. Αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η MAG στο ΚΝΣ είναι απαραίτητη και για την ανάπτυξη αλλά και για την διατήρηση της μυελίνης (Bartsch et al, 1997; για ανασκόπηση βλέπε Martini and Carenini, 1998).

1.11 Αξονο-γλοιακές αλληλεπιδράσεις και κόμβος του Ranvier

Όπως προαναφέρθηκε, η μυελίνη είναι απαραίτητη για την ταχεία και αποτελεσματική μετάδοση των δυναμικών ενεργείας. Παρόλα αυτά, η τελευταία λειτουργία εξαρτάται και από την μοριακή οργάνωση περιοχών στον κόμβο του Ranvier. Η περιοδική αυτή διακοπή στο έλυτρο της μυελίνης είναι διαχωρισμένη σε τρία ξεχωριστά τμήματα: τον κόμβο, την παρακομβική περιοχή και την εγγύς παρακομβική περιοχή. Κάθε ένα από αυτά τα τμήματα περιέχει μία χαρακτηριστική ομάδα ετερογενών μορίων, τα οποία συμπεριλαμβάνουν μόρια κυτταρικής συνάφειας, διάυλους ιόντων καθώς και ρυθμιστικές πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος. Το εμμέλο τμήμα μεταξύ δυο κόμβων, που ισοδυναμεί περίπου με την αξονική διάμετρο επί 100 φορές, ονομάζεται μεσοκομβικό τμήμα. Τα τμήματα αυτά δημιουργούνται διαδοχικά, μετά από αμοιβαίες αλληλεπιδράσεις μεταξύ νευρώνων και γλοιακών κυττάρων. Η ομαδοποίηση και εγκατάσταση μορίων, όπως και η επαφή της γλοιακής με την αξονική μεμβράνη, ξεκινούν στην περιοχή του κόμβου του Ranvier συνεχίζοντας στην παρακομβική και έπειτα στην εγγύς παρακομβική περιοχή (Salzer, 2003; Corfas et al, 2004). Παρά τις διαφορές που παρουσιάζουν τα εμμέλα κύτταρα του Schwann με τα ολιγοδενδροκύτταρα, και τα έλυτρα της μυελίνης που κατασκευάζουν, η οργάνωση του εμμέλου άξονα και των κομβικών περιοχών είναι παρόμοια στο ΠΝΣ και στο ΚΝΣ (Arroyo and Scherer, 2002).



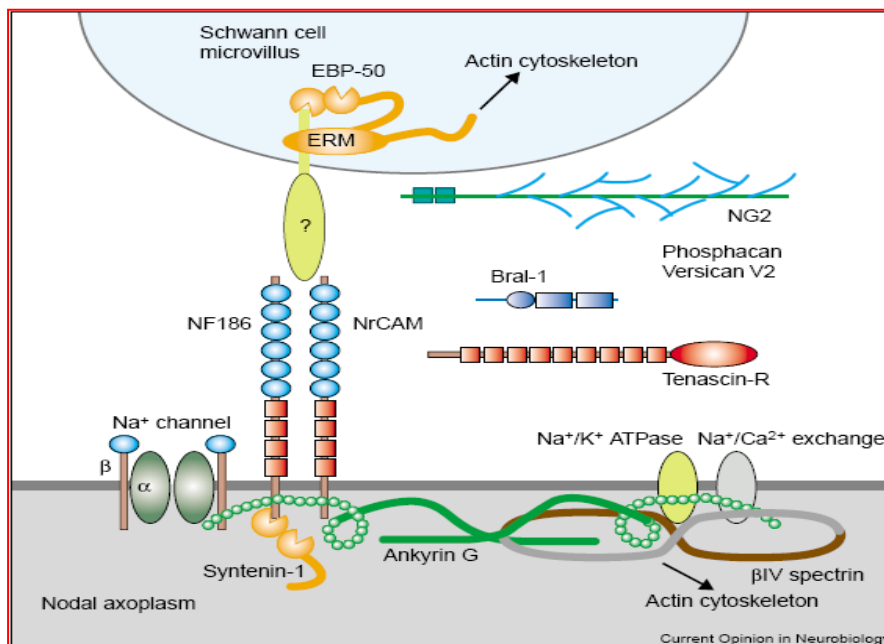
Εικόνα 3: Μοριακή οργάνωση του κόμβου του Ranvier. Επιμήκης διατομή της κομβικής περιοχής μιας εμμύελης νευρικής ίνας του ΠΝΣ. (Corfas et al, 2004)

1.12 Μοριακή οργάνωση του κόμβου του Ranvier

Στην περιοχή του κόμβου, το αξονόλημα χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση τασεοεξαρτώμενων διαύλων νατρίου (Na^+), και κυρίως του υπό-τύπου NaV1.6 , τα οποία είναι απαραίτητα για την αποτελεσματική αλματώδη μετάδοση (saltatory conduction) της νευρικής ώσης. Οι διάυλοι νατρίου αποτελούνται από την υπομονάδα η οποία σχηματίζει τον πόρο του διαύλου και δύο βοηθητικές β υπομονάδες που συνδέονται ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά με μόρια κυτταρικής συνάφειας τα οποία σταθεροποιούν το κανάλι στη μεμβράνη. Έχει παρατηρηθεί ότι, πριν έρθουν σε επαφή τα γλοιακά εμμύελα κύτταρα με τους άξονες, οι διάυλοι αυτοί είναι διάχυτα κατανεμημένοι στην αξονική μεμβράνη. Στο ΠΝΣ, η συγκέντρωση των διαύλων Na^+ δεν επέρχεται πριν εξασφαλιστεί επαφή με το κύτταρο του Schwann, ενώ, ίσως σε μια από τις λίγες διαφορές μεταξύ των νευρικών συστημάτων, στο ΚΝΣ

δεν υφίσταται ανάγκη επαφής του ολιγοδενδροκυττάρου με τον άξονα για την έναρξη συγκέντρωσης μορίων στις κομβικές περιοχές (Gatto et al, 2003 ;Kaplan et al, 2001). Στις περιφερικές νευρικές ίνες λοιπόν, το κομβικό αξονόλημα έρχεται σε επαφή με λεπτές προεκβολές της μεμβράνης, τις μικρολάχνες (microvilli), του εμμύελου κυττάρου Schwann, όπου ξεκινάει η συγκέντρωση πρωτεϊνών και διαύλων, οι οποίες είναι εμπλουτισμένες με τρεις πρωτεΐνες της οικογένειας των ERM (ezrin, radixin και moesin) που συνδέονται με την ακτίνη, καθώς και με την πρωτεΐνη EBP50, που προσδέεται με την ezrin, και μία GTP-άση, την Rho-A (Mendelez-Vasquez et al, 2001; Gatto et al, 2003). Τα μέλη της L1 οικογένειας των Ig-CAMs, neurofascin (ισομορφή 186kDa) και NrCAM βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση στην περιοχή του κόμβου, στον νευράξονα, και εκεί συνδέονται *in cis*. Αυτό το σύμπλοκο με τη σειρά του συνδέεται, μέσω των κυτταροπλασματικών περιοχών των νευραξονικών CAMs, με την ankyrin-G, μια κυτταροσκελετική μεμβράνη που περιέχει σημεία πρόσδεσης και για την κυτταροπλασματική περιοχή των διαύλων Na⁺. Η ankyrin-G, τέλος, συνδέεται με το κυτταροπλασματικό σταθεροποιητικό μόριο βIV-spectrin, που ενισχύει την συγκέντρωση του όλου συμπλόκου περαιτέρω (Garrido et al, 2003; Lacas-Gervais et al, 2004; Arroyo and Scherer 2002). Το γλοιικό μόριο του οποίου η παρουσία είναι απαραίτητη για την συγκέντρωση των διαύλων νατρίου στον κόμβο δεν είχε χαρακτηριστεί μέχρι πρόσφατα. Νέες μελέτες όμως έδειξαν ότι ένα μόριο σύνδεσης για την neurofascin186 και την NrCAM, παρουσιάζεται ως ο διαμεσολαβητής για την συγκέντρωση των διαύλων νατρίου στον κόμβο (Eshed et al, 2005). Η gliomedin, όπως ονομάζεται το μόριο αυτό, βρίσκεται επίσης στις προεκβολές της μεμβράνης του κυττάρου Schwann που προσεγγίζουν τον νευράξονα και αλληλεπιδρά με την neurofascin και την NrCAM (Simons and Trajkovic, 2006). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις, όχι μόνο διαμεσολαβούν την συγκέντρωση των

συγκεκριμένων μορίων στον κόμβο, αλλά είναι πολύ πιθανό να αποτρέπουν την ενδοκύττωσή τους, συνεπώς την αποδόμησή τους, και να δημιουργούν έναν φραγμό ο οποίος δεν επιτρέπει την διάχυσή τους προς τις υπόλοιπες κομβικές περιοχές και το μεσοκομβικό τμήμα (Fache et al, 2004; Pedraza et al, 2001; Simons and Trajkovic, 2006).

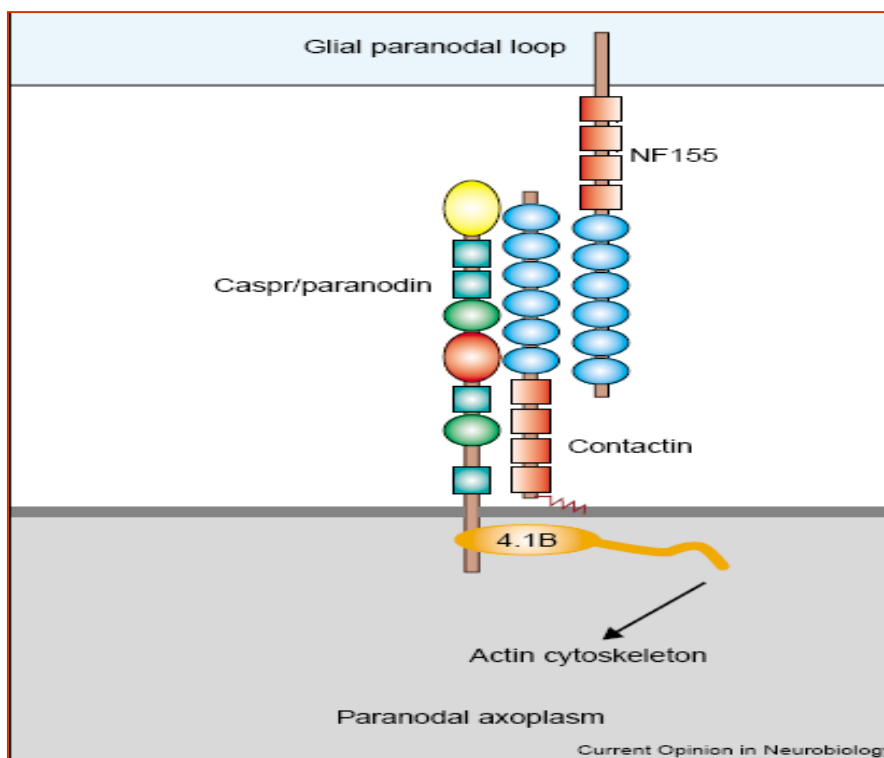


Εικόνα 4: Μοριακή οργάνωση της κομβικής περιοχής εμμέλης νευρικής ίνας. Στην επιφάνεια του νευράξονα διακρίνονται η NrCAM, η neurofascin186 και ένα τριμερές σύμπλοκο NaV1.6 διαύλων που συνδέεται είτε με τις υπομονάδες β1/β3 είτε με τις υπομονάδες β2/β4. Κυτταροπλασματικά αυτές οι πρωτεΐνες συνδέονται με την ankyrin G η οποία με τη σειρά της προσδένεται με ένα ετεροδιμερές βIV-spectrin. Η neurofascin αλληλεπιδρά *in trans* με έναν άγνωστο, μέχρι στιγμής, μόριο που βρίσκεται στα microvilli του κυττάρου Schwann, το οποίο δημιουργεί το μυελώδες έλυτρο γύρω από τον νευράξονα, και *in cis* με τους διαύλους νατρίου. (Peles and Salzer, 2000)

1.13 Μοριακή οργάνωση της παρακομβικής περιοχής

Οι παρακομβικές περιοχές εφάπτονται στον κόμβο, στο σημείο όπου οι σπείρες που σχηματίζει το γλοιακό κύτταρο γύρω από τον νευράξονα, στην συμπαγή στοιβάδα του ελύτρου, διευρύνονται, περιέχοντας κυτταροπλασματικό υλικό που δημιουργεί «δακτυλίους», και εφάπτονται στην μεμβράνη του άξονα σχηματίζοντας τις παρακομβικές συνδέσεις διαφραγματικού τύπου. Οι συνδέσεις αυτές έχουν ονομαστεί έτσι λόγω της ομοιότητάς τους με τις διαφραγματοσυνδέσεις των ασπόνδυλων οργανισμών, οι οποίες είναι ενδοκυτταρικές συνδέσεις που αποτρέπουν την διάχυση μορίων μικρού μεγέθους και ιόντων (Einheber et al, 1997). Αυτές οι συνδέσεις προκύπτουν αργά κατά την διαδικασία της μυελίνωσης, καθώς είναι απαραίτητη πρώτα η περιέλιξη του γλοιακού κυττάρου γύρω από τον άξονα και η συμπύκνωση της μυελίνης, και δημιουργούνται σταδιακά ξεκινώντας δίπλα ακριβώς από τον κόμβο και συνεχίζοντας προς το εσωτερικό του ελύτρου της μυελίνης (Corfas et al, 2004). Στην αξονική μεμβράνη η παρακομβική περιοχή περιέχει την γλυκοπρωτεΐνη Caspr (contactin-associated protein επίσης γνωστή και ως paranodin), η οποία ανήκει στην υπέρ-οικογένεια των neurexins, και το Ig-CAM με τμήμα GPI contactin (Einheber et al, 1997; Menegoz et al, 1997; Poliak et al, 1999; Rios et al, 2000). Αυτές οι δύο πρωτεΐνες συνδέονται μεταξύ τους *in cis* και έπειτα το σύμπλοκό τους συνδέεται με την πρωτεΐνη 4.1B που με την σειρά της αλληλεπιδρά με τις α/β II spectrins και την ankyrin B (Denisenko-Nehrbass et al, 2003; Ogawa et al, 2006). Οι τελευταίες, είναι κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες οι οποίες ενισχύουν την συγκέντρωση και την σταθερότητα των μορίων συνάφειας στην μεμβράνη του νευράξονα. Στους παρακομβικούς δακτυλίους της γλοιακής μεμβράνης, το βασικότερο μόριο είναι μια ισομορφή του μορίου κυτταρικής συνάφειας neurofascin, η neurofascin155 (NF155). Η contactin έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά, άμεσα ή έμμεσα δεν έχει

ξεκαθαριστεί ακόμη, με την neurofascin 155, με το σύμπλοκο αυτό, μαζί με την Caspr, να αποτελεί τον σύνδεσμο της ισχυρής αξονογλοιακής επαφής στην παρακομβική περιοχή (Charles et al, 2002; Gollan et al 2003; Corfas et al, 2004; Sherman et al, 2005).



Εικόνα 5: Μοριακή οργάνωση της παρακομβικής περιοχής εμύελης νευρικής ίνας. Στην επιφάνεια του νευράξονα διακρίνεται ένα *in cis* σύμπλοκο που δημιουργείται μεταξύ της Caspr και της contactin, το οποίο αλληλεπιδρά κυτταροπλασματικά με την 4.1B και *in trans* με την neurofascin155, που βρίσκεται στους παρακομβικούς δακτύλιους του κυττάρου Schwann. Στο ΚΝΣ, η contactin εκφράζεται επίσης στα ολιγοδενδροκύτταρα και είναι πιθανή η αλληλεπίδρασή της με την αξονική contactin. (Peles and Salzer, 2000)

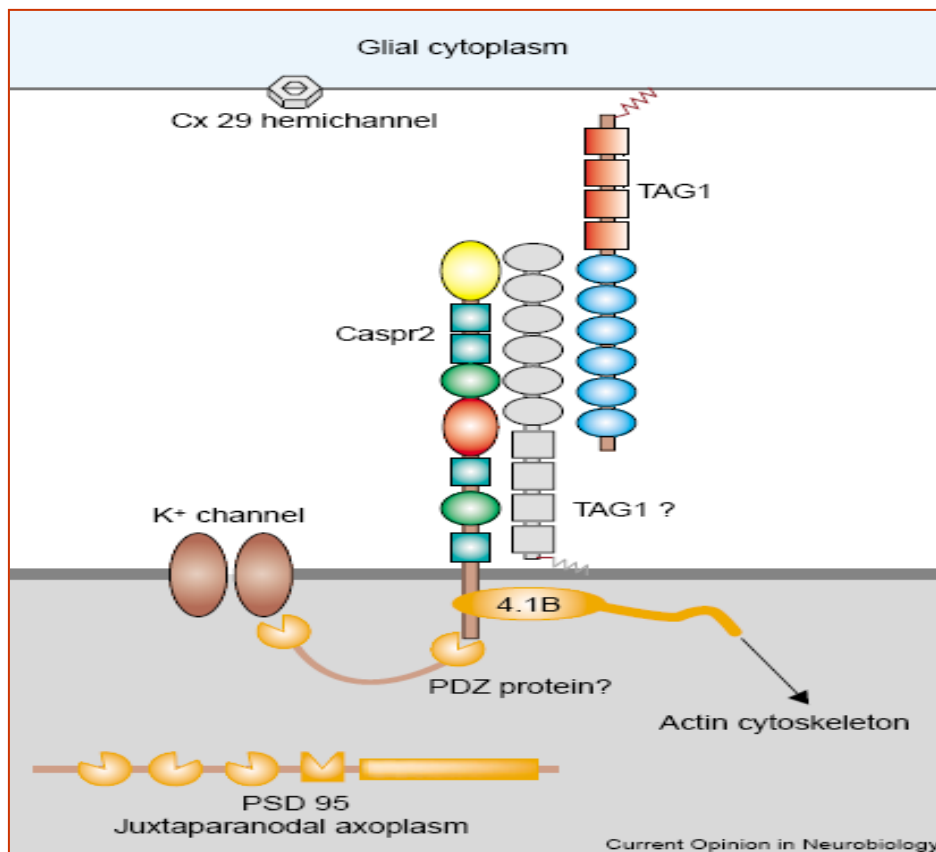
Μελέτες με διαγονιδιακούς μύες που δεν εκφράζουν είτε Caspr είτε contactin δείχνουν ότι οι αξονογλοιακές συνδέσεις παρουσιάζουν βλάβες, καθώς τα υπόλοιπα μόρια της παρακομβικής περιοχής αδυνατούν να συγκεντρωθούν και διαχέονται κατά μήκος του νευράξονα (Bhat et al, 2001; Boyle et al, 2001). Σε πιο πρόσφατες έρευνες, όπου χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακοί μύες που δεν εκφράζουν neurofascin155, αποκαλύφθηκε ότι και η Caspr αλλά και η contactin δεν εντοπίζονται στις παρακομβικές περιοχές, ενώ στο ΠΝΣ απουσίαζαν οι διαφραγματοσυνδέσεις, μεταξύ γλοίας και νευράξονα. Παρόλα αυτά, διαγονιδιακή έκφραση της neurofascin155, στοχευμένη στην εμμύελη γλοία ατόμων που δεν εκφράζουν neurofascin155, «διέσωσε» (rescued) τις αξονογλοιακές συνδέσεις και, όπως σε αγρίου τύπου ζώα, παρατηρήθηκε συγκέντρωση Caspr και contactin στην παρακομβική περιοχή (Sherman et al, 2005).

1.14 Μοριακή οργάνωση της εγγύς της παρακομβικής περιοχής

Το τρίτο κατά χώρο-χρονική σειρά, μοριακά διαχωρισμένο, τμήμα του κόμβου του Ranvier που δημιουργείται κατά την μυελίνωση είναι η εγγύς της παρακομβικής περιοχή. Η περιοχή αυτή βρίσκεται έγκλειστη στο σημείο όπου εφάπτεται η αρχή της συμπαγούς μυελίνης στον άξονα και δίπλα ακριβώς στην παρακομβική περιοχή. Χαρακτηρίζεται από την υψηλή συγκέντρωση σε διαύλους καλίου (Kv) τύπου shaker, τα οποία αποτελούνται από τις Kv1.1/1.2 α-υπομονάδες και την Kvβ2 υπομονάδα και θεωρείται ότι εμπλέκονται στην διατήρηση του δυναμικού ηρεμίας και στην επαναπόλωση της μεμβράνης του νευράξονα (Vabnick et al, 1999; Brophy, 2003). Οι δύο α-υπομονάδες έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν τετραμερή, τα οποία αποτελούν και τους λειτουργικούς διαύλους, και η κάθε μία συνδέεται με μια Kvβ2

υπομονάδα (Arroyo and Scherer, 2000). Άλλωστε, σε μεταλλαγμένους μύες που δεν εκφράζουν την Kv1.1 υπομονάδα παρουσιάζονται προβλήματα στην δημιουργία νευρικών ώσεων και υπερβολική νευρική διεγερσιμότητα (Zhou et al, 1998), ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την ίδια υπομονάδα προκαλούν familial episodic ataxia (για ανασκόπηση Arroyo and Scherer, 2000). Οι διάυλοι καλίου, στην εγγύς της παρακομβικής περιοχής, δημιουργούν σύμπλοκο με ένα μέλος της υπέρ-οικογένειας των neurexins, την Caspr2. Αυτή παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με την Caspr, που συναντάται στην παρακομβική περιοχή, και μοιράζονται παρόμοια τμηματική οργάνωση, ειδικά στο εξοκυττάριο κομμάτι, με τη διαφορά ότι η Caspr2 διαθέτει ένα PDZ τμήμα στο ενδοκυττάριο κομμάτι της (Poliak et al, 2001). Η Caspr2 έχει ένα ενδοκυτταρικό GNP τμήμα μέσω του οποίου αλληλεπιδρά με την 4.1B, πρωτεΐνη παρούσα στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές όπως και στις παρακομβικές, η οποία αλληλεπιδρά με την ακτίνη του κυτταροσκελετού (Denisenco-Nehrbass, 2003). Η Caspr2 όπως και οι διάυλοι καλίου, στα αρχικά στάδια της μυελίνωσης εμφανίζονται σταδιακά στην περιοχή του κόμβου και στις παρακομβικές περιοχές, αλλά με την ολοκλήρωση της διαδικασίας μετατοπίζονται προς τις εγγύς των παρακομβικών περιοχές, όπου συγκεντρώνονται και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Ακόμη δύο πρωτεΐνες εντοπίζονται στις εγγύς παρακομβικές περιοχές: η connexin29 (ή Cx29), μία πρωτεΐνη χασματοσυνδέσεων η οποία εκφράζεται στα γλοιακά κύτταρα του ΠΝΣ και του ΚΝΣ (Altevogt et al, 2002), και η transient axonal glycoprotein-1 (TAG-1), ένα μέλος των GPI-προσδεμένων μορίων κυτταρικής συνάφειας της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών που εντοπίζεται στις μεμβράνες και των γλοιακών αλλά και των νευρικών κυττάρων (Tsiotra et al, 1996; Traka et al, 2002). Η τελευταία μπορεί και συνάπτει ομοφιλική σύνδεση *in trans* με τον εαυτό της (γλοιακή με νευρωνική TAG-1) και *in cis* ετεροφιλική σύνδεση με την Caspr2, με το σύμπλοκο

αυτό να αλληλεπιδρά με τους διαύλους καλίου πιθανώς, όπως ήθελε η υπόθεση εργασίας μέχρι τώρα, μέσω μιας άγνωστης πρωτεΐνης με PDZ-τμήμα (Traka et al, 2003; Rasband et al, 2002).



Εικόνα 6: Μοριακή οργάνωση της εγγύς της παρακομβικής περιοχής εμμέλης νευρικής ίνας. Στην επιφάνεια του νευράξονα διακρίνεται ένα *in cis* σύμπλοκο μεταξύ TAG-1 και Caspr2, το οποίο αλληλεπιδρά με την γλοιακή TAG-1 *in trans* μέσω ομοφιλικής σύνδεσης. Το σύμπλοκο αυτό, πιθανώς μέσω μιας πρωτεΐνης που περιέχει PDZ τμήματα, αλληλεπιδρά και με τους διαύλους καλίου K_v1.1 και K_v1.2 στην μεμβρανική περιοχή. Κυτταροπλασματικά το σύμπλοκο TAG-1/Caspr2 αλληλεπιδρά με την 4.1B. (Peles and Salzer, 2000)

Σε μελέτες που διενεργήθηκαν σε μεταλλαγμένους μύες που δεν εκφράζουν είτε την Caspr2 είτε την TAG-1, παρόλο που δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στην μορφολογία της μυελίνης σε εμμέλες νευρικές ίνες, παρατηρήθηκαν δραματικές αλλαγές στην μοριακή οργάνωση των εγγύς των παρακομβικών περιοχών. Και στις δύο περιπτώσεις οι διάυλοι καλίου εντοπίζονται διάχυτοι στα μεσοκομβικά τμήματα

αδυνατώντας να συγκεντρωθούν στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή, ενώ στη δεύτερη περίπτωση, απουσία της TAG-1, η Caspr2 δεν ανιχνεύεται καθόλου στις εμύελες ίνες είτε του ΠΝΣ είτε του ΚΝΣ (Poliak et al, 2003; Traka et al, 2003). Τα γεγονότα αυτά καταδεικνύουν ότι το σύμπλοκο Caspr2/TAG-1 διαμεσολαβεί την συγκέντρωση των διαύλων καλίου στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές και ότι γενικότερα οι πρωτεΐνες μέλη της NCP οικογένειας (Caspr, Caspr2) και των GPI-linked IgSF-CAMs (contactin, TAG-1) δημιουργούν συντηρημένα σύμπλοκα που οργανώνουν διαφορετικές περιοχές του κόμβου, στον εμύελο νευράξονα (Traka et al 2003).

1.15 Επιπτώσεις της απομυελίνωσης των εμύελων νευραξόνων και της μοριακής αποδιοργάνωσης των περιοχών του κόμβου του Ranvier

Όπως γίνεται αντιληπτό, οι αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις και η μοριακή οργάνωση στις περιοχές των κόμβων του Ranvier εμύελων νευρικών κυττάρων, είναι σημαντικές για την στενή σύνδεση του ελύτρου της μυελίνης με τον νευράξονα καθώς και για την αλματώδη προώθηση των δυναμικών ενεργείας. Αυτή η θεωρία ενισχύεται περαιτέρω με την ανάλυση των φαινοτύπων διαγονιδιακών ζώων με μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της μυελίνης και παρουσιάζουν απομυελίνωση ή με μεταλλάξεις στις περιοχές του κόμβου του Ranvier καθώς και ιστών από άτομα που πάσχουν από νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπου παρατηρείται βλάβη ή αποδόμηση του μυελώδους ελύτρου και αλλοίωση της μετάδοσης δυναμικών ενεργείας.

Σε μεταλλάξεις που προκαλούν διαταραχές στον σχηματισμό της μυελίνης, όπως είναι οι μύες *jimpy* που χαρακτηρίζονται από μια μετάλλαξη στο γονίδιο PLP ή οι

μύες που δεν εκφράζουν το ένζυμο ceramide galactosyltransferase (CGT) οι οποίοι παρουσιάζουν έλλειψη σημαντικών γαλακτολιπιδίων της μυελίνης, παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στις παρακομβικές συνδέσεις με την παρακομβική πρωτεΐνη Caspr να αδυνατεί να συγκεντρωθεί στην περιοχή αυτή (Dupree et al, 1999; Mathis et al, 2001; Arroyo et al, 2002). Ακόμη, στα CGT-μεταλλαγμένα ζώα παρατηρήθηκε βλάβη και στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές, καθώς η πρωτεΐνη TAG-1 απουσιάζει ενώ οι διάλυλοι καλίου, που εντοπίζονται φυσιολογικά στην περιοχή, παρουσιάστηκαν να διαχέονται προς την παρακομβική περιοχή (Dupree et al, 1999; Traka et al, 2002).

Σε μεταλλαγμένους μύες που δεν εκφράζουν μια από τις παρακομβικές πρωτεΐνες, Caspr ή contactin, παρατηρείται επίσης αποδιοργάνωση της παρακομβικής περιοχής, διεύρυνση των κόμβων και διάχυση των διαύλων καλίου από τις εγγύς των παρακομβικών περιοχές, στις παρακομβικές περιοχές (Bhat et al, 2001; Boyle et al, 2001). Και στην περίπτωση μελετών σε απομυελινωμένους νευράξονες ατόμων που πάσχουν από σκλήρυνση κατά πλάκας (multiple sclerosis ή MS), έχει παρατηρηθεί ότι τα παρακομβικά (Caspr) και εγγύς παρακομβικά μόρια (Caspr2, διάλυλοι K_v) μετατοπίζονται επίσης προς την κομβική και παρακομβική περιοχή αντίστοιχα (Coman et al, 2006).

Μια πολύ ενδιαφέρουσα παρατήρηση αποτέλεσε το ότι σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, και ενώ οι διάλυλοι καλίου πάντα διαχέονται προς την παρακομβική και κομβική περιοχή, τα μόρια του κόμβου του Ranvier και ειδικότερα οι διάλυλοι νατρίου παρουσιάζουν φυσιολογική συγκέντρωση στην περιοχή αυτή, με εξαίρεση τους απομυελινωμένους νευράξονες ατόμων που πάσχουν από MS, όπου και πάλι υπάρχουν κάποια σημεία με συσσωρεύσεις διαύλων Na⁺ (Coman et al, 2006). Παρόλη την φυσιολογική αυτή συγκέντρωση των διαύλων νατρίου, παρατηρούνται

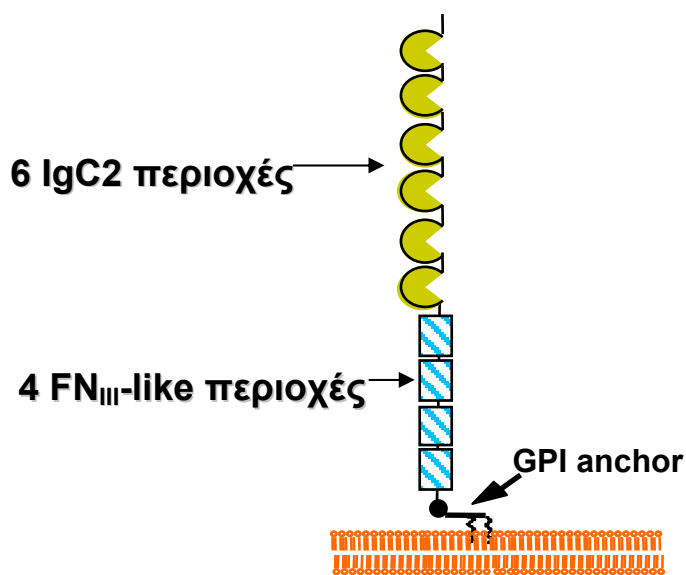
σε κάθε περίπτωση νευρολογικές διαταραχές συνδεδεμένες με την μείωση της ταχύτητας διάδοσης της νευρικής ώσης. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν σε τρία ασφαλή συμπεράσματα: 1) η παρακομβική περιοχή και οι αλληλεπιδράσεις που συντελούνται σε αυτή λειτουργούν σαν «φραγμός» για τον περιορισμό των διαύλων καλίου στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές και χωριστά από τους διαύλους νατρίου στον κόμβο, 2) οι δίαυλοι νατρίου δεν απαιτούν την συγκέντρωση των μορίων στις κομβικές και παρακομβικές περιοχές για την σωστή τοποθέτησή τους στους κόμβους και 3) οι δίαυλοι καλίου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην μετάδοση του δυναμικού ενεργείας στους εμμύελους νευράξονες και η συγκέντρωσή τους στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή φαίνεται να εξαρτάται από την ακεραιότητα των αξονογλοιακών αλληλεπιδράσεων σε εγγύς της παρακομβικής και παρακομβική περιοχή καθώς και από την ορθή μυελίνωση του άξονα.

1.16 Σημασία της μοριακής οργάνωσης της εγγύς της παρακομβικής περιοχής και των μορίων που συγκεντρώνονται σε αυτή

Είναι λοιπόν απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη των αξονογλοιακών αλληλεπιδράσεων που συντελούνται στις περιοχές του κόμβου του Ranvier, με στόχο την αποσαφήνιση της διατήρησης των διαύλων καλίου στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή. Ο καθορισμός των μορίων, νευρικών και γλοιακών, που είναι υπεύθυνα για την συγκέντρωση των διαύλων αυτών στην θέση τους στον εμμύελο άξονα είναι σημαντικός. Με τα μέχρι σήμερα δεδομένα το προτεινόμενο μοντέλο οργάνωσης αυτής της περιοχής θέλει την αξονική TAG-1 να αλληλεπιδρά *in trans* με τον εαυτό

της στην γλοία και *in cis* με την Caspr2 και, ίσως μέσω μιας άλλης πρωτεΐνης, με τους διαύλους καλίου. Η διερεύνηση της γλοιακής ή αξονικής έκφρασης της TAG-1 και της πιθανής *in trans* αλληλεπίδρασης της με τον εαυτό της, καθώς και η διαλεύκανση της σύνδεσης του συμπλόκου TAG-1/Caspr2 με τους διαύλους καλίου είναι για την ώρα οι πιο επιτακτικοί στόχοι.

Επιπροσθέτως, όπως προαναφέρθηκε, η TAG-1 είναι μία πολύ συντηρημένη γλυκοπρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από μία υδρόφοβη αλληλουχία στο N-τελικό άκρο της ενώ ακολουθούν έξι ανοσοσφαιρινικές περιοχές, τέσσερις φιμπροεκτινικές περιοχές και ένα τμήμα γλυκοσυλ-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης στο καρβοξυτελικό άκρο της με την οποία προσδένεται στην κυτταρική μεμβράνη (Furley et al., 1990).



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση του μορίου της TAG-1. Διακρίνεται στην μεμβράνη του νευράξονα το GPI τμήμα ακολουθούμενο από τις φιμπροεκτινικές (FNIII) περιοχές (σκιασμένοι κύβοι) και τις ανοσοσφαιρινικές (IgC2) περιοχές (ημικύκλια) της TAG-1.

Οι ανοσοσφαιρινικές περιοχές της TAG-1 είναι σημαντικές για την διεκπεραίωση των ετεροφιλικών αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά την ανάπτυξη των νευριτών, ενώ οι φμπρονεκτινικές της περιοχές είναι απαραίτητες για τις ομοφιλικές αλληλεπιδράσεις που εμπλέκονται στην κυτταρική συνάφεια (Tsiotra et al, 1996; Pavlou et al, 2002). Ωστόσο, στους εμμύελους νευράξονες, στο ΠΝΣ και στο ΚΝΣ, όπου δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως η συμμετοχή της TAG-1 στις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις της εγγύς της παρακομβικής περιοχής, η μελέτη των επιμέρους περιοχών της για την συμβολή τους στις αλληλεπιδράσεις αυτές, θα μπορούσε ίσως να προσφέρει στρατηγικής σημασίας πληροφορίες για τον ρόλο της στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή.

Σκοπός της μελέτης

Η πρωτεΐνη TAG-1 είναι το πρώτο IgSF μόριο κυτταρικής συνάφειας που ανιχνεύεται στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή εμμύελων νευρικών ινών, στο νευρικό σύστημα ενηλίκου. Δεδομένα από το εργαστήριό μας έδειξαν ότι σε μύες που δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη αυτή (*Tag1^{-/-}*), επηρεάζεται αποκλειστικά η εγγύς της παρακομβικής περιοχή και μέχρι στιγμής αυτό το στέλεχος είναι το μοναδικό με φαινότυπο σε αυτήν την περιοχή (Traka et al, 2003). Από αυτές τις μελέτες προέκυψε ότι η TAG-1 κατέχει σημαντικό ρόλο στις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές, ρυθμίζοντας εκεί την συγκέντρωση των διαύλων καλίου και της neurexin πρωτεΐνης Caspr2. Άλλες έρευνες του εργαστηρίου μας (Tsiotra et al, 1996; Pavlou et al, 2002) έδειξαν, με την κατασκευή και χρήση Fc-χμαιοτικών πρωτεϊνών που περιέχουν είτε τις ανοσοσφαιρινικές [TAG-1(Ig)-Fc] είτε τις φμπρονεκτινικές περιοχές [TAG-1(FNIII)-Fc] της TAG-1, ότι η ομοφιλική δραστηριότητα του μορίου διαμεσολαβείται από τις φμπρονεκτινικές περιοχές του. Από την άλλη πλευρά, οι ίδιες έρευνες οδήγησαν στην παρατήρηση ότι στις ανοσοσφαιρινικές περιοχές της TAG-1 οφείλονται οι ετεροφιλικές συνδέσεις που αυτή παρουσιάζει, με άλλα μόρια όπως η L1, η NrCAM και η contactin/F3 στον αυξητικό κώνο του νευρικού κυττάρου, κατά την ανάπτυξη των νευριτών. Αυτές οι πληροφορίες δημιούργησαν πρόσφορο έδαφος για την μελέτη και κατανόηση των αξονογλοιακών αλληλεπιδράσεων στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές εμμύελων νευραξόνων, στις οποίες εμπλέκεται η πρωτεΐνη TAG-1. Επίσης, το γεγονός ότι η TAG-1

εκφράζεται και σε νευρώνες αλλά και σε γλοιακά κύτταρα (Traka et al, 2002) επιβάλλει την διερεύνηση της ύπαρξης αξονικής ή γλοιακής έκφρασης (ή και τα δύο ταυτόχρονα) της πρωτεΐνης αυτής στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή.

Στόχοι αυτής της εργασίας είναι οι εξής:

- Αποσαφήνιση της συμμετοχής των επιμέρους περιοχών της TAG-1 (ανοσοσφαιρινικών και φμπρονεκτινικών) στις εγγύς των παρακομβικών αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις του μορίου.
- Διερεύνηση πιθανής αλληλεπίδρασης της TAG-1 με άλλες συνεντοπιζόμενες πρωτεΐνες στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή.
- Διαλεύκανση της γλοιακής, αξονικής ή διπλής έκφρασης της TAG-1 στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή
- Περαιτέρω ανάλυση του φαινοτύπου των μυών που δεν εκφράζουν TAG-1.

Κεφάλαιο 2:

Υλικά και μέθοδοι

«Πρώτον, πρέπει να έχεις μια ξεκάθαρη και πρακτική ιδέα: έναν στόχο. Δεύτερον, πρέπει να έχεις όλα τα απαραίτητα μέσα: σοφία, χρήματα, υλικά και μεθόδους. Τρίτον, πρέπει να συνδυάσεις και να προσαρμόσεις σωστά όλα σου τα μέσα για να πετύχεις τον στόχο σου»

- Αριστοτέλης

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Πειραματόζωα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μύες αγρίου τύπου των στελεχών CBAx C57B1/10 και μύες που φέρουν το μεταλλαγμένο γονίδιο της TAG-1 οι οποίοι μας χορηγήθηκαν από τον Dr. Kazutada Watanabe (Dept. Of Molecular Medical Science, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Japan). Η επέκταση του δεύτερου στελέχους πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις πειραματόζωων της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Η ημέρα της σύλληψης θεωρήθηκε η εμβρυϊκή ημέρα 0.5 (E0.5). Τα έγκυα ζώα θυσιάστηκαν είτε με μεγάλη δόση αιθέρα ή χλωροφορμίου είτε με αποσύνδεση της σπονδυλικής τους στήλης (cervical dislocation) και τα έμβρυα συλλέχθηκαν σε μέσο HBSS (GIBCO).

2.1.2 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη προήλθαν από τις ακόλουθες εταιρείες: Aldrich, Boehringer Mannheim, Biorad, Gibco-BRL, Merck, Amersham-Pharmacia, Promega, Roche, Sigma, Stratagene, και United States Biochemicals. Τα περιοριστικά και τροποποιητικά ένζυμα προήλθαν από τις εταιρείες: Promega, Gibco-BRL, Minotech, Finnzymes, New England Biolabs, Amersham-Pharmacia, Roche και Stratagene. Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης είναι προϊόντα των εταιρειών Schleicher & Schuel και BDH, οι μεμβράνες διαπίδυσης της Medicell και τα φιλμ αυτοραδιογραφίας της Kodak και Fuji. Τέλος, τα θρεπτικά υλικά καλλιέργειας βακτηριακών στελεχών αγοράστηκαν από τις εταιρείες Difco και Merck ενώ τα θρεπτικά και υλικά καλλιέργειας ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών από τις εταιρείες Gibco-BRL, Sigma, Nalgene, MatTEK Corp. και Nunc.

2.1.3 Αντισώματα

<u>Πρωτεύοντα αντισώματα</u>	Αραίωση σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης (Western Blot)	Αραίωση σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης (IP)	Αραίωση σε ανοσοϊστοχημεία (Immunocytochemistry)
Rabbit TG2 (anti-TAG-1, πολυκλωνικό)	1/4000	-	1/1000
Rabbit TG3 (anti-TAG-1, πολυκλωνικό)	1/4000	-	1/1000
Mouse 1C12 (anti-TAG-1, μονοκλωνικό)	-	1μg/100μl διαλύματος IP	1/5000
Mouse anti-Kv1.1 (μονοκλωνικό)	1/2000	1μg/100μl διαλύματος IP	1/200
Mouse anti-Kv1.2 (μονοκλωνικό)	1/2000	1μg/100μl διαλύματος IP	1/200
Rabbit anti-Caspr2 (πολυκλωνικό)	1/3000	1μg/100μl διαλύματος IP	1/800
Rabbit anti-Caspr (πολυκλωνικό)	1/3000	-	1/800
anti-GFP (πολυκλωνικό)	1/10000	-	1/2000
Rat anti-MBP (πολυκλωνικό)	1/500	-	1/200
Mouse anti-NaV (μονοκλωνικό)	1/1000	-	1/200

<u>Δευτερεύοντα αντισώματα</u>	Αραίωση σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης (Western Blot)	Αραίωση σε ανοσοϊστοχημεία (Immunocytochemistry)
anti-mouse HRP	1/3000	-
anti-rabbit HRP	1/5000	-
anti-rat HRP	1/5000	-
anti-mouse FITC	-	1/500
anti-rabbit Cy3	-	1/500
anti-rat 488	-	1/500
anti-rabbit 488	-	1/500
anti-mouse 488	-	1/500
anti-rabbit 555	-	1/800
anti-mouse 555	-	1/800
anti-rabbit 633	-	1/800
anti-rat 633	-	1/800

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Προετοιμασία επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων ηλεκτρικού μετασχηματισμού

Από απόθεμα βακτηριακών κυττάρων (σειρές DH5a και DH10b) που φυλάσσεται στους -80°C ή από αποικία κυττάρων σε τριβλίο Petri, λαμβάνονται κύτταρα τα οποία και επωάζονται σε 3ml θρεπτικό LB* (10gr bacto-tryptone, 5gr bacto-yeast extract, 2gr NaCl για 1lt θρεπτικού) στους 37°C για ~16 ώρες. Έπειτα, αυτή η καλλιέργεια μεταφέρεται σε 500ml LB* και επωάζεται για άλλες ~4 ώρες μέσα σε γυάλινη φλάσκα των 2lt. Κατόπιν, και πάντα στους 4°C , η καλλιέργεια υπόκειται αλληπάλληλες φυγοκεντρήσεις, στις 4000σ.α.λ. για 15 λεπτά, και εκπλύσεις (με στείρο απ-ιονισμένο νερό προερχόμενο από στήλη Nanopure) του ιζήματος που δημιουργείται από αυτές, μειώνοντας μετά από κάθε φυγοκέντρηση τον όγκο του νερού που χρησιμοποιείται μέχρι να φτάσει τα 10ml. Τότε, η τελευταία φυγοκέντρηση πραγματοποιείται στις 2000σ.α.λ. για 5 λεπτά, σε δοχείο τύπου Falcon, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε διάλυμα 10% γλυκόζης σε νερό Nanopure και φυλάσσονται στους -80°C διαχωρισμένα σε ίσα μέρη των 50μl, μέχρι την χρήση τους.

2.2.2 Ηλεκτρικός μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων (Electroporation)

Τα βακτηριακά κύτταρα ηλεκτρικού μετασχηματισμού αποψύχονται σε πάγο και 50μl από αυτά αναμιγνύονται απευθείας με το επιθυμητό πλασμιδιακό DNA. Το μείγμα κυττάρων-DNA τοποθετείται σε αποστειρωμένη μεταλλική Electroporation Cuvette, της Beckman, η οποία με τη σειρά της τοποθετείται σε μια συσκευή Electroporation,

Electroporator 1800 Beckman, όπου γίνεται ηλεκτροσόκ στα 1600Volts για 5msec, για να ανοίξουν οι μεμβράνες των κυττάρων και να εισαχθεί το πλασμιδιακό DNA στο κυτταρόπλασμά τους. Έπειτα, τα κύτταρα μεταφέρονται σε δοχεία τύπου Falcon, όπου ήδη υπάρχει 1ml θρεπτικό LB σε θερμοκρασία 37°C, και επωάζονται με ανάδευση για 2 ώρες στους 37 °C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 6 λεπτών στις 1500σ.α.λ. και αποβολή 800μl του υπερκείμενου υγρού. Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται στο υπολειπόμενο υπερκείμενο υγρό και απλώνεται σε βακτηριολογικό τριβλίο petri το οποίο περιέχει υπόστρωμα πηχτού Agar-2XYT-πενικιλίνης. Το τριβλίο αυτό επωάζεται στους 37°C για περίπου 16 ώρες για τον σχηματισμό βακτηριακών αποικιών.

2.2.3 Προετοιμασία επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων μετασχηματισμού

Από απόθεμα βακτηριακών κυττάρων (σειρές DH5a, DH10b και XL10 Gold[®]) που φυλάσσεται στους -80°C ή από αποικία κυττάρων σε τριβλίο Petri, λαμβάνονται κύτταρα τα οποία και επωάζονται σε 3ml θρεπτικό 2XYT ή LB στους 37°C για ~16 ώρες. Έπειτα, αυτή η καλλιέργεια μεταφέρεται σε 100ml 2XYT και επωάζεται για άλλες ~6 ώρες μέσα σε γυάλινη φιάσκα των 500ml. Αυτή η φιάσκα, μετά την ολοκλήρωση της επώασης, τοποθετείται σε πάγο για 10 λεπτά και μετά χωρίζεται σε δύο δοχεία τύπου Falcon των 50ml, τα οποία φυγοκεντρώνονται στις 5000 σ.α.λ. για 15 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 0.5ml κρύο 2XYT και σε αυτό προστίθενται 2.5ml θρεπτικό LB-PEG (36% γλυκερόλη, 12% PEG 8000, 1.2% 1M MgSO₄ διαλυμένα σε LB). Το τελικό αυτό διάλυμα χωρίζεται σε ισόποσα μέρη των 200μl τα οποία αποθηκεύονται σε καταψύκτη των -80°C.

2.2.4 Μετασχηματισμός επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων

Τα βακτηριακά κύτταρα μετασχηματισμού αποψύχονται σε πάγο και 100μl από αυτά αναμιγνύονται απευθείας με το πλασμιδιακό DNA και επωάζονται για 15 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης στον πάγο, μεταφέρονται στους 42°C για 1 λεπτό και ξανά στον πάγο για 5 λεπτά. Κατόπιν, προστίθενται 900μl θρεπτικού 2XYT για να επωαστεί το όλο μείγμα στους 37°C για 1 ώρα, ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση 5 λεπτών στις 5000σ.α.λ. και αποβολή 800μl του υπερκείμενου υγρού. Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται στο υπολειπόμενο υπερκείμενο υγρό και απλώνεται σε βακτηριολογικό τριβλίο petri το οποίο περιέχει υπόστρωμα πηχτού Agar-2XYT-πενικιλίνης. Το τριβλίο αυτό επωάζεται στους 37°C για περίπου 16 ώρες για τον σχηματισμό βακτηριακών αποικιών.

2.2.5 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές αποικίες (Mini-preps)

Για τις ανάγκες των DNA κατασκευών αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της απομόνωσης DNA από βακτηριακές αποικίες σε μικρή κλίμακα. Μετά τον μετασχηματισμό των βακτηρίων με το επιθυμητό πλασμίδιο-DNA κατασκευή, οι βακτηριακές αποικίες που αναπτύχθηκαν καλλιεργούνται περαιτέρω, τοποθετώντας την κάθε μια σε 3ml θρεπτικού 2XYT με αντιβιοτικό (συνήθως πενικιλίνη). Οι καλλιέργειες αυτές επωάζονται στους 37°C για 14-18 ώρες σε αναδευτήρα. Κατόπιν, 1.5ml από την καλλιέργεια μεταφέρεται σε 1.5ml δοχεία eppendorf και φυγοκεντρείται στις 12000σ.α.λ. για 30 δευτερόλεπτα. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 100μl κρούου διαλύματος 50mM γλυκόζης, 25mM TrisCl (pH8), 10mM EDTA (pH8). Έπειτα προστίθενται 200μl διαλύματος 4% NaOH, 5% SDS (20%) (διαλυμένα σε νερό), το μείγμα

αναδεύεται και επωάζεται για 5 λεπτά σε πάγο και σε αυτό προστίθενται άλλα 150μl διαλύματος 5M καυστικού Καλίου, 11.5% Glacial Acetic Acid σε νερό. Ακολουθεί ανάδευση για 10 sec, τοποθέτηση στον πάγο για 5 min και φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 5 min (στους 4 °C). Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται σε νέα σωληνάρια και προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης:χλωροφορμίου σε κάθε δείγμα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 3 min και η υπερκείμενη υγρή φάση μεταφέρεται σε νέα erpendorf σωληνάρια. Σε αυτά προστίθεται διπλάσιος όγκος αιθανόλης, αναδεύονται, επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και φυγοκεντρούνται στις 12.000 rpm για 5 min (στους 4 °C). Το υπερκείμενο υγρό χύνεται και τα δείγματα αφήνονται να στεγνώσουν κάτω από τον απορροφητήρα σε ΘΔ. Κάθε δείγμα επαναδιαλύεται σε 60 μl H₂O και προστίθεται σε αυτό 1μl RNase (10μg/μl).

2.2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα από βακτήρια και καθαρισμός του με τη μέθοδο CsCl

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αλκαλικής λύσης σε συνδυασμό με καθαρισμό CsCl gradient όπως έχει περιγραφεί από τους Sambrook et al, 1989 (κεφ. 1.38 και 1.42-1.46) . Το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε είναι το εξής: τα βακτηριακά κύτταρα από μία καλλιέργεια, 14-18 ωρών, των 400 ml κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση στους 4 °C, στις 4000 rpm για 15 min σε έναν Sorvall GS3 ρότορα και απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό. Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 10 ml διαλύματος 1 (GTE, βλέπε απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα) και σε αυτή προστίθενται 1 ml διαλύματος λυσοζύμης συγκέντρωσης 10 mg/ml σε 10 mM Tris·Cl [pH 8.0] και 20 ml διαλύματος 2 (βλέπε απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα), τα οποία

αναδεύονται καλά. Το δοχείο φυγοκέντρωσης επωάζεται σε ΘΔ για 5-10 min, έπειτα προστίθενται 15 ml κρύου διαλύματος 3 (βλέπε απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα) και το όλο διάλυμα ανακινείται καλά και τοποθετείται στον πάγο για 10 min. Το άσπρο ίζημα που δημιουργείται αποτελείται από χρωμοσωμικό DNA, υψηλού M.B RNA καθώς και σύμπλοκα καλίου/SDS/πρωτεΐνης/ μεμβράνες. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στους 4 °C, στις 4000 rpm για 15 min σε έναν Sorvall GS3 ρότορα (χωρίς την εφαρμογή φρένου) και έτσι δημιουργείται συμπαγές άσπρο ίζημα που περιέχει τα υπολείμματα των βακτηρίων. Η υπερκείμενη υγρή φάση μεταφέρεται σε δοχείο φυγοκέντρωσης των 250 ml με ένα χωνί που περιέχει υαλοβάμβακα και φίλτρο κατασκευασμένο από διηθητικό χαρτί τύπου Wattman και σε αυτή προστίθεται ισοπροπανόλη, 60% του όγκου της.. Το μείγμα ανακινείται καλά, επωάζεται σε ΘΔ για 10 min και έπειτα φυγοκεντρείται στις 5000 rpm για 15 min σε ΘΔ ώστε να κατακρημνιστεί το πλασμιδιακό DNA. Το ίζημα με DNA που σχηματίζεται, μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού, ξεπλένεται με 70% αιθανόλη, αποξηραίνεται κάτω από τον απορροφητήρα σε ΘΔ και επαναδιαλύεται σε 3 ml αποστειρωμένο H₂O. Ακολουθεί ο καθαρισμός του DNA ως εξής: υπολογίζεται ο ακριβής όγκος του διαλύματος του DNA και σε αυτό προστίθενται 60-100μl EtBr (συγκέντρωσης 10mg/ml σε H₂O) όπως και 1,15gr CsCl/(ml διαλύματος DNA-EtBr). Το όλο αυτό διάλυμα μεταφέρεται σε ένα δοχείο τύπου Beckman Quick-Seal, μέσω μιας Pasteur Pipette, σφραγίζεται με θερμότητα και υπέρ-φυγοκεντρείται για 16 ώρες, στις 55000σ.α.λ., σε μια υπέρ-φυγόκεντρο τύπου VTi 65 Beckman vertical rotor. Μετά την υπερφυγοκέντρωση δημιουργούνται δύο ζώνες DNA στο κέντρο περίπου του σωληναρίου υπερφυγοκέντρωσης. Η κάτω ζώνη περιέχει το πλασμιδιακό DNA που μας ενδιαφέρει ενώ η επάνω ζώνη αποτελείται από γραμμικό DNA. Το πλασμιδιακό DNA αφαιρείται προσεκτικά με μία σύριγγα και μεταφέρεται σε ένα

καθαρό νέο πλαστικό σωληνάριο. Ακολουθούν διαδοχικές εκχυλίσεις με κορεσμένο διάλυμα CsCl/ ισοπροπανόλης/ H₂O ώσπου να μη διακρίνεται διαφορά χρώματος ανάμεσα στις δύο φάσεις που δημιουργούνται στο διάλυμα, γεγονός που μαρτυρά την εξάλειψη του EtBr. Το διάλυμα του DNA μεταφέρεται σε γυάλινο σωληνάριο COREX όπου προστίθενται δύο όγκοι H₂O και σε αυτό το νέο διάλυμα προστίθεται ο διπλάσιος όγκος αιθανόλη 100%. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου (18 °C) για να κατακρημνιστεί το DNA, το οποίο μεταφέρεται σε σωληνάριο erpendorf του 1.5 ml και διαλύεται σε 500-1000 μl διπλά αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.

2.2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (large scale plasmid DNA preparation) με χρήση Qiagen Plasmid Maxi Kit

Η απομόνωση έγινε με χρωματογραφία σε στήλη Qiagen-tip 500 χρησιμοποιώντας το σύστημα Qiagen Plasmid Maxi Kit με βάση τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Συγκεκριμένα τα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε καλλιέργεια των 250ml για 16 ώρες και συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 5.000 στροφές ανά λεπτό (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SLA-3000) για 10 λεπτά στους 4°C. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 10ml διαλύματος P1 (resuspension buffer: 50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0, RNase 100μg/ml), λύθηκαν με προσθήκη 10ml διαλύματος P2 (lysis buffer: NaOH 0.2M, 1% w/v SDS) και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και τέλος οι πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA κατακρημνίστηκαν με 10ml κρύου διαλύματος P3 (neutralization buffer: 3M οξικό οξύ pH 5.5) και επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Με φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές ανά λεπτό για 30 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SS-34), απομακρύνθηκαν

πρωτεΐνες, χρωμοσωμικό DNA και κυτταρικά υπολείμματα. Παράλληλα η στήλη Qiagen-tip 500 εξισορροπήθηκε με 10ml διαλύματος QBT (equilibration buffer: 50mM MOPS pH 7.0, 0.75M NaCl, 0.15% v/v Triton X-100, 15% v/v αιθανόλη). Το υπερκείμενο διαβιβάστηκε στην κολώνα, ακολούθησαν 2 εκπλύσεις με 30ml διαλύματος QC (wash buffer: 50mM MOPS pH 7.0, 1M NaCl, 15%v/v αιθανόλη) την κάθε φορά και τέλος έκλουση του DNA με 15ml διαλύματος QF (elution buffer: 10mM Tris-HCl pH 8.5, 1.25M NaCl, 15% v/v αιθανόλη). Το DNA κατακρημνίστηκε από το διάλυμα έκλουσης με προσθήκη 10.5ml ισοπροπανόλης και συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές ανά λεπτό για 30 λεπτά στους 4° C (φυγόκεντρος Sorvall, κεφαλή SS-34). Το ίζημα εκπλύθηκε με διάλυμα 70% αιθανόλης, ξηράθηκε και επαναδιαλύθηκε σε διπλά αποσταγμένο και αποστειρωμένο H₂O. Η συγκέντρωση του DNA μετρήθηκε με φωτομέτρηση στα 260nm ενώ η ποιότητά του εκτιμήθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

2.2.8 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Για την ηλεκτροφόρηση DNA χρησιμοποιήθηκε πηκτική αγαρόζης 0,8-1,2% σε διάλυμα 1X TAE (50X TAE: 2M Tris-HCl pH 7.5, 2mM EDTA, οξικό οξύ για τη ρύθμιση του pH). Συγκεκριμένα, το μείγμα TAE και αγαρόζης θερμάνθηκε μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη, αφέθηκε να κρυώσει και στη συνέχεια προστέθηκε 1X βρωμιούχο αιθίδιο (10.000X stock). Το DNA ηλεκτροφορήθηκε στα 100V, σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιείχε 1X TAE. Η αποτύπωση του αποτελέσματος έγινε με έκθεση της πηκτής σε UV ακτινοβολία και φωτογράφιση με ψηφιακή κάμερα.

2.2.9 Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Τα τμήματα DNA διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης, το οποίο τοποθετείται έπειτα επάνω σε τράπεζα UV φωτός και το επιθυμητό τμήμα DNA εξάγεται και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (TAE). Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση και στη συνέχεια αλλαγή της πολικότητας του ηλεκτρικού πεδίου για 30 sec ώστε να απομακρυνθεί από τη μεμβράνη το DNA που πιθανόν έχει κολλήσει στην μεμβράνη. Ακολούθως, όπως περιγράφεται από τους Sambrook et al (1989), το DNA καθαρίζεται μέσω διάχυσης του εκχυλίσματος της ηλεκτροέκλουσης μέσα από κολώνα σφαιριδίων Sephadex-G50. Δημιουργείται στήλη από Sephadex G50 σε σύριγγα του 1ml και το διάλυμα περνά από τη στήλη με φυγοκέντρηση στις 2500rpm για 5min. Ακολουθεί προσθήκη ίσου όγκου μίγματος φαινόλης-χλωροφόρμιου, ανάδευση και φυγοκέντρηση για 5min στις 13000rpm. Στο υπερκείμενο προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου και μετά από ανάδευση και φυγοκέντρηση το νέο υπερκείμενο κατακρημνίζεται προσθέτοντας 1/10 του όγκου οξικό νάτριο 3M, pH 5.2 και διπλάσιο όγκο 100% αιθανόλης. Ακολουθεί ψύξη για 10min στους -20°C και φυγοκέντρηση για 15min στις 13000 rpm στους 4°C . Το κατακρημνισμένο DNA αποξηραίνεται κάτω από τον απορροφητήρα και επαναδιαλύεται στον επιθυμητό όγκο H_2O .

2.2.10 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών θηλαστικών σε καλλιέργεια

Κύτταρα τύπου HEK293T (Human Embryonic Kidney) μεγαλώνουν σε τριβλία κυτταροκαλλιέργειας τύπου Petri 10cm σε θρεπτικό μέσο DMEM (SIGMA), 10%FCS, 100μg/ml πενικιλίνη, 100μg/ml στρεπτομυκίνη. Μόλις φτάσουν σε 70% πληρότητα του τριβλίου εγχύεται σε αυτά διάλυμα, όγκου 500μl, διπλά

αποσταγμένου και αποστειρωμένου νερού που περιέχει 10μg του πλασμιδιακού DNA με το οποίο επιθυμούμε να επιμολύνουμε τα κύτταρα και 62μl 2M CaCl₂, στο οποίο έχουν προστεθεί, κατά σταγονίδια, άλλα 500μl 2xHBS [Hepes Buffered Saline (2X HBS: 42mM Hepes pH 7.1, 274mM NaCl, 10mM KCl, 1.5mM Na₂HPO₄·7H₂O, 12mM δεξτρόζη] και έχει επωαστεί σε Θ.Δ. για 15 λεπτά. Ακολούθως τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C με 5%CO₂ για 6 ώρες, ξεπλένονται με θρεπτικό DMEM και τοποθετούνται σε επωαστήρα 37°C με 5%CO₂ σε θρεπτικό DMEM με 100μg/ml penicillin, 100μg/ml streptomycin για 36 ώρες, με στόχο την έκφραση της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το DNA με το οποίο επιμολύνθηκαν τα κύτταρα.

2.2.11 Έμμεσος ανοσοφθορισμός ευκαρυωτικών κυττάρων

Τα αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον καθορισμό της κατανομής των αντιγόνων στον κυτταρικό χώρο, μετά από διαμόλυνση κυττάρων με πλασμίδια που κωδικοποιούν συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Τα κύτταρα μπορούν να σημανθούν με χρήση αντισωμάτων σημασμένων με φθοριοχρώματα και να αναλυθούν με μικροσκοπία φθορισμού για να αποκαλύψουν την θέση των πρωτεϊνών που ενδιαφέρουν. Στον έμμεσο ανοσοφθορισμό το φθοριόχρωμα βρίσκεται συνδεδεμένο σε ένα δεύτερο αντίσωμα, ειδικό για την αναγνώριση του πρώτου αντισώματος. Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται (HEK293T) καλλιεργείται για 24 ώρες είτε σε καλυπτρίδες 18X18mm είτε σε labtech τριβλία. Αρχικά, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και έγινε έκπλυση με 1X PBS. Ακολουθεί μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα φορμαλδεΰδης (4% ή 1% σε 1X PBS) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και επιμονιμοποίηση με παγωμένη αιθανόλη για 5 λεπτά στους -20°C. Για την απενεργοποίηση της φορμαλδεΰδης τα κύτταρα επωάζονται με διάλυμα 20mM γλυκίνη σε 1X PBS (Quench) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προκειμένου να

διανοιχτούν οπές στις κυτταρικές μεμβράνες ώστε να γίνει δυνατή η είσοδος του αντισώματος, αλλά και να αποφευχθεί η δέσμευσή του σε μη-ειδικές θέσεις, τα κύτταρα επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα 1X PBS, 0.2% Triton X-100, 0.5% ζελατίνη και 2mM MgCl₂ (blocking buffer). Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων με το πρώτο αντίσωμα για 45 λεπτά. Κατόπιν τα δείγματα επωάζονται με blocking buffer για 10 λεπτά ώστε να απομακρυνθεί το πρωτεύον αντίσωμα που δεν έχει συνδεθεί ειδικά και έπειτα με το δευτερεύον αντίσωμα για 45 λεπτά. Στη συνέχεια επωάζονται με 1X PBS για την απομάκρυνση της περίσσειας του αντισώματος και παρατηρούνται με συν-εστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (TCS-NT Laser Scanning microscope, Leica).

2.2.12 Απομόνωση πρωτεϊνών από κυτταρικές σειρές θηλαστικών σε καλλιέργεια ή ιστό μυός.

Η λύση των κυττάρων γίνεται με τη χρήση υπερήχων, ενώ για τη λύση του ιστού χρησιμοποιούμε ομογενοποιητή και στη συνέχεια υπερήχους. Τα κύτταρα τα οποία μεγαλώνουν σε τριβλίο τύπου Petri (μετά από διαμόλυνση με DNA), πλένονται δύο φορές με αποστειρωμένο διάλυμα PBS, κατόπιν αποξύνονται από το τριβλίο και λύνονται με υπέρηχους σε διάλυμα 30mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 120mM γλυκόζη, 1% Triton, 60mM N-octyl-glucoside, 2μg/ml leupeptin και 2μg/ml aprotinin. Έπειτα φυγοκεντρώνονται στις 14000σ.α.λ. για 20 λεπτά, και πλέον το συνολικό κυτταρικό εκχύλισμα πρωτεϊνών βρίσκεται στο υπερκείμενο υγρό, το οποίο απομονώνεται είτε για απευθείας ανάλυση κατά Western (με την προσθήκη ίσου όγκου 4x διαλύματος φόρτωσης 250mM Tris, 9.2% SDS, 40% Glycerin, 0.2% bromophenol blue, 100mM DTT, και θέρμανση στους 95°C για 10 λεπτά) είτε για

χρήση σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Όσον αφορά τον ιστό από μύες χρησιμοποιείται πρώτα μηχανικός ομογενοποιητής και στη συνέχεια υπέρηχοι για την λύση των κυττάρων. Το διάλυμα μέσα στο οποίο λαμβάνουν χώρα τα παραπάνω είναι το Pyranoside lysis buffer, που αποτελείται από 85mM Tris-HCl pH 7.5, 30mM NaCl, 1mM EDTA, 120mM glucose, 1% Triton X-100, 60mM octyl β-D glucopyranoside (SIGMA) και 1mM PMSF.

2.2.13 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος Bradford (Bradford 1976), η οποία στηρίζεται στο σχηματισμό έγχρωμων συμπλόκων μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων και μορίων χρωστικής Coomassie brilliant blue, τα οποία απορροφούν σε μήκος κύματος 595nm. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης αγνώστου δείγματος χρησιμοποιήθηκε μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς, η οποία κατασκευάστηκε με μέτρηση της απορρόφησης δειγμάτων με γνωστές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης BSA (αλβουμίνη ορού βοδινού).

2.2.14 Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης

Τα κυτταρικά εκχυλίσματα που προέρχονται από ιστούς μυών ή από την απομόνωση πρωτεϊνών από κυτταρικές σειρές θηλαστικών σε καλλιέργεια επωάζονται, σε περιστρεφόμενη βάση στους 4°C για 1 ώρα, με 20μl σφαιρίδια protein G (Santa Cruze) ή protein A (Biorad) αγαρόζης, τα οποία έχουν εκπλυθεί 3 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα (wash buffer) (5mM Tris-HCl pH 8.0, 1% Triton X-100, 50mM NaCl, 2.5mM CaCl₂, 2.5mM MgCl), κατόπιν φυγοκεντρώνονται στις 4000rpm για 1' λεπτό και το υπερκείμενο υγρό επωάζεται για 16 ώρες στους 4°C με το επιθυμητό αντίσωμα, σε περιστρεφόμενη βάση και για 16-18 ώρες. Έπειτα προστίθενται νέα

σφαιρίδια protein G ή protein A agarose στο διάλυμα, το οποίο επωάζεται εκ νέου στους 4°C, σε περιστρεφόμενη βάση για 2 ώρες. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις των αντιδράσεων με διάλυμα 20mM HEPES 7.5, 50mM NaCl, 0.5% Triton, 2.5mM CaCl₂, 2.5mM MgCl₂, 1mM PMSF, φυγοκέντρηση και το υπερκείμενο υγρό αποβάλλεται, για να προστεθεί, στα σφαιρίδια που έχουν κατακαθίσει, διάλυμα φόρτωσης 1x (250mM Tris, 9.2% SDS, 40% glycerine, 0.2% bromophenol blue) και DTT 100mM και να γίνει στα δείγματα ανάλυση πρωτεϊνών κατά Western.

2.2.15 Ανάλυση πρωτεϊνών κατά Western

- **Προετοιμασία πηκτής πολυακρυλαμίδης**

Για την προετοιμασία των δύο επιμέρους πηκτωμάτων (running gel, stacking gel), αναμείχθηκαν όλα τα συστατικά των διαλυμάτων εκτός του APS και του TEMED τα οποία λειτουργούν σαν καταλύτες για την έναρξη και τη διατήρηση του πολυμερισμού αντίστοιχα και προστέθηκαν στο τέλος. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στον κενό χώρο που δημιουργείται μεταξύ δύο γυάλινων πλακών, με την μία να διαθέτει τοιχώματα πάχους 1.0mm (spacer). Αρχικά τοποθετείται το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel: 8-15% διάλυμα πολυακρυλαμίδης, 25% separating buffer, 0.1% APS, 0.05% TEMED σε H₂O) και αφού πολυμεριστεί προστίθεται το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel: 4.5% διάλυμα πολυακρυλαμίδης, 25% stacking buffer, 0.1% APS, 0.1% TEMED σε H₂O) μέσα στο οποίο τοποθετείται και το χτένι για το σχηματισμό των θέσεων (πηγαδιών) στις οποίες θα γίνει η προσθήκη των δειγμάτων στην πηκτή. Η σύσταση του separating buffer και του stacking buffer είναι 1.5M Tris-HCl pH 8.8, 0.4% SDS σε H₂O και 0.5M Tris-HCl pH 6.8, 0.4% SDS σε H₂O αντίστοιχα.

- **Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)**

Τα πρωτεϊνικά δείγματα θερμαίνονται στους 100 °C για 2 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις που έχουν δημιουργηθεί, στο δοχείο ηλεκτροφόρησης προστίθεται διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1X Electrophoresis buffer: 25mM Tris base, 192mM γλυκίνη, 0.1% SDS σε H₂O) και η πηκτή ηλεκτροφορεύεται στα 120Volts για 2-3.5 ώρες, έως ότου οι πρωτεΐνες τους, καθώς και οι πρωτεϊνικοί δείκτες (Biorad protein standards) που έχουν φορτωθεί παράλληλα, να διαχωριστούν με βάση το μοριακό τους βάρος. Μετά τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται μεταφορά αυτών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (PROTRAN 0.2μm) με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τάσης 320mAmpere για 1 ώρα. Το διάλυμα μεταφοράς που χρησιμοποιείται περιέχει 25mM Tris base, 192mM γλυκίνη, 0.1% SDS και 20% μεθανόλη σε H₂O.

- **Μέθοδος ανοσοαποτύπωσης Western-Blotting**

Έπειτα ακολουθεί η μέθοδος ανοσοανίχνευσης, η οποία στηρίζεται στη σύνδεση του αντισώματος κατά της πρωτεΐνης που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε, με το συγκεκριμένο αντιγόνο που βρίσκεται ακινητοποιημένο στη μεμβράνη. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται ανοσοσφαιρίνη κατά αντιορού του ζώου ξενιστή που έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή του πρώτου αντισώματος, η οποία αναγνωρίζει την ανοσοσφαιρίνη του πρώτου ειδικού αντισώματος και συνδέεται με αυτό. Στη δεύτερη ανοσοσφαιρίνη έχει συνδεθεί μέσω χημικού δεσμού το ένζυμο της υπεροξειδάσης (Horseradish Peroxidase, HRP). Για την ανίχνευση του ενζύμου και κατά συνέπεια και της πρωτεΐνης που ανιχνεύεται χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο ECL

(Chemicon). Η αντίδραση του υποστρώματος με την υπεροξειδάση έχει ως συνέπεια την παραγωγή χημειοφωταύγειας (Chemiluminescence) η οποία ανιχνεύεται με τη χρήση ειδικού φιλμ.

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης απαλλάσσεται από υπολείμματα του πηκτώματος SDS-πολυακρυλαμιδίου με εκπλύσεις με διάλυμα PBS και έπειτα επωάζεται για 1 ώρα σε Θ.Δ. με διάλυμα γάλακτος 5% σε PBS-Tween(0,5%) για τον αποκλεισμό των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων. Κατόπιν επωάζεται με το πρωτεύον αντίσωμα στο ίδιο διάλυμα γάλακτος 5% σε PBS-Tween(0,5%) για 16 ώρες στους 4°C και στη συνέχεια 3 φορές με PBST, για να επωαστεί εκ νέου για 1 ώρα με δευτερεύον αντίσωμα το οποίο είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση. Οι ανοσοεντοπιζόμενες πρωτεϊνικές ζώνες ανιχνεύονται μέσω του συστήματος ενισχυμένης χρωμοφωταύγειας ECL, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Amersham Pharmacia Biotech, σε ακτινογραφικό φιλμ, για χρόνο που εξαρτάται από την ένταση του σήματος της χημειοφωταύγειας.

2.2.16 Απομάκρυνση αντισωμάτων για την επανάληψη της ανοσοανίχνευσης

Η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε διάλυμα 62.5 mM Tris HCl pH 6.7, 2% w/v SDS, 100mM β-μερκαπτοαιθανόλη και θερμάνθηκε για 30 λεπτά στους 50°C. Ακολούθησαν 3 εκπλύσεις των 10 λεπτών με Washing buffer και επανάληψη της διαδικασίας ανοσοανίχνευσης.

2.2.17 Καλλιέργεια νωτιαίων γαγγλίων (DRG explants)

Εγκυμονούντες θηλυκοί μύες αγρίου τύπου (F1) και μεταλλαγμένοι (TAG^{-/-}) οι οποίοι φέρουν μικρά εμβρυϊκής ηλικίας E12-E14 θυσιάζονται με αποκεφαλισμό, μετά από βαθιά αναισθητοποίηση με αιθέρα, και η μήτρα που περιέχει τα έμβρυα αφαιρείται και τοποθετείται σε ένα τριβλίο τύπου Petri. Τα έμβρυα διαχωρίζονται, αποκόπτονται από το αμνιακό σάκο και τον πλακούντα και τοποθετούνται σε νέο τριβλίο Petri που περιέχει θρεπτικό μέσο L15 (GIBCO). Έπειτα τα έμβρυα χειρουργούνται ένα προς ένα κάτω από στερεοσκόπιο με στόχο την απομάκρυνση των νωτιαίων γαγγλίων από την σπονδυλική στήλη και τον νωτιαίο μυελό. Μόλις τα DRG απομακρυνθούν από το έμβρυο και εκπλυθούν με θρεπτικό, τοποθετούνται σε ένα τριβλίο τύπου Petri των 10mm το οποίο διαθέτει γυάλινο υπόστρωμα επικαλυμμένο με Matrigel (GIBCO) και είναι καλυμμένο από μια σταγόνα θρεπτικού μέσου BME, BSA 30%, Γλυκόζη 45%, HEPES 1M, Glutamax I 100x, NGF 2.5S 100μg/ml. Τα νωτιαία γάγγλια επωάζονται στους 37°C και 5% CO₂ για 16 ώρες και έπειτα προστίθεται άλλο 1.5ml του ίδιου θρεπτικού. Οι καλλιέργειες διατηρούνται για 3 εβδομάδες, κάνοντας αλλαγή του θρεπτικού μέσου ανά 2 ημέρες, και μετά εισέρχονται σε φάση μυελίνωσης με την πρόσθεση ασκορβικού οξέος 50μg/ml και προγεστερόνης (10x) στο παραπάνω θρεπτικό (θρεπτικό μυελίνωσης). Η μυελίνωση συνεχίζεται για 3 ακόμη εβδομάδες με συχνές αλλαγές θρεπτικού με ασκορβικό οξύ και προγεστερόνη.

2.2.18 Απομόνωση και καλλιέργεια των κυττάρων Schwann

Μικροί μύες ηλικίας 4 ημερών θυσιάζονται με αποκεφαλισμό, τα ισχιακά τους νεύρα εξάγονται, μετά από εγχείρηση με λεπτές λαβίδες, και τοποθετούνται σε τριβλίο

τύπου Petri που περιέχει 1xPBS με 50μg/ml αμπικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα νεύρα απογυμνώνονται, στερεοσκοπικά και με την χρήση λεπτών λαβίδων, από κάθε συνδετικό ιστό, μεταφέρονται σε νέο τριβλίο με PBS, κόβονται σε μικρά κομμάτια με λαβίδες και μεταφέρονται σε ένα δοχείο τύπου Falcon που περιέχει διάλυμα PBS, 2.5% τρυψίνη, 1% κολαγενάση A. Τα νεύρα επωάζονται στους 37°C για 30 λεπτά και έπειτα φυγοκεντρώνονται, καθαρίζονται με εκπλύσεις με θρεπτικό υγρό, αναμιγνύονται και επαναφυγοκεντρώνονται χρησιμοποιώντας DMEM(HG) με 10% FBS. Τα κύτταρα, πλέον, επαναδιαλύονται και τοποθετούνται σε τριβλίο κυτταροκαλλιιεργειών τύπου Petri, με γυάλινο υπόστρωμα και επικάλυψη Matrigel/πολυλυσίνης, το οποίο περιέχει DMEM (4500mg/l glucose) 10% FCS, Forskolin 5mM, HRG-beta1 (50ng/μL), 50μg/ml αμπικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα διατηρούνται στους 37°C και σε σταθερή ατμόσφαιρα 5% CO₂, προσκολλώνται στο υπόστρωμα, μεγαλώνουν κανονικά και σε περίπτωση πληρότητας του τριβλίου διαιρούνται αναλόγως.

2.2.19 Αποσύνδεση νωτιαίων γαγγλίων

Η αποσύνδεση των νωτιαίων γαγγλίων επιτυγχάνεται με παρόμοιο τρόπο, όπως και η καλλιέργεια των νωτιαίων γαγγλίων. Αντί όμως να τοποθετηθούν τα DRG απευθείας σε τριβλία και να καλλιεργηθούν αυτούσια, αυτά επωάζονται με τρυψίνη σε L15 στους 37°C για 45 λεπτά. Η τρυψίνη απενεργοποιείται με την πρόσθεση FCS και τα γάγγλια μεταφέρονται σε δοχείο τύπου Falcon, φυγοκεντρώνονται και γίνεται μηχανική αποσύνδεση των νευρώνων των γαγγλίων μέσω σύριγγας ινσουλίνης. Μετά την μηχανική αποσύνδεση τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται ακόμη μια φορά στις 900σ.α.λ., το υπερκείμενο αφαιρείται και προστίθεται θρεπτικό Neurobasal, 2% B27,

NGF (100ng/mL). Οι αποσυνδεδεμένοι νευρώνες τοποθετούνται σε τριβλίο κυτταροκαλλιιεργειών τύπου Petri, με γυάλινο υπόστρωμα και επικάλυψη Matrigel/πολυλυσίνης και η διαδικασία που ακολουθείται έπειτα είναι παρόμοια με τα DRG explants.

2.2.20 Συγκαλλιέργειες DRG νευρώνων και κυττάρων Schwann

50000 κύτταρα Schwann τοποθετούνται σε κάθε τριβλίο που περιέχει DRG explants ή DRG αποσυνδεδεμένους νευρώνες, σε κατάλληλο για την κάθε καλλιέργεια θρεπτικό, και αφήνονται να προσκολληθούν στους νευρώνες για 16 ώρες. Μετά το πέρας των 16 ωρών το θρεπτικό απομακρύνεται και εγχύεται νέο θρεπτικό που αποτελείται από DMEM, HamsF12, NGF, N2-supplement για να διαφοροποιηθούν τα κύτταρα του Schwann. Μια εβδομάδα αργότερα επάγεται μυελίνωση χρησιμοποιώντας θρεπτικό μυελίνωσης (βλέπε παράγραφο 2.2.17).

2.2.21 Ανοσοϊστοχημική ανάλυση καλλιιεργειών νωτιαίων γαγγλίων

Οι καλλιέργειες και συγκαλλιέργειες των νωτιαίων γαγγλίων και των αποσυνδεδεμένων νευρώνων τους με τα κύτταρα Schwann μονιμοποιούνται με 4%PFA+4%Sucrose σε PBS, για 30 λεπτά στους 4°C. Έπειτα επωάζονται με 1X PBS και έπειτα για τον αποκλεισμό των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων με 10%BSA σε PBS-T για 1 ώρα στους 37°C. Τα πρωτεύοντα αντισώματα διαλύονται σε 2%BSA σε PBS-T και η επώαση με τις καλλιέργειες διαρκεί 2 ώρες στους 4°C. Μετά από τρεις εκπλύσεις με 1X PBS, τα δευτερεύοντα φθορίζοντα αντισώματα διαλύονται σε ίδιο μέσο με τα πρωτεύοντα και επωάζονται με τις καλλιέργειες για 1 ώρα σε Θ.Δ. και

συνθήκες σκότους. Κατόπιν, ακολουθούν τρεις ακόμη εκπλύσεις με 1X PBS και οι καλλιέργειες παραμένουν σε 1X PBS+αζίδιο του νατρίου μέχρι να παρατηρηθούν κάτω από μικροσκόπιο φθορισμού ή συν-εστιακό μικροσκόπιο.

2.2.22 Διαχωρισμός νευρικών ινών και ανοσοϊστοχημική ανάλυση

Μύες, μετά από βαθιά αναισθητοποίηση με αιθέρα, θυσιάζονται με αποκεφαλισμό και χειρουργούνται για την εξαγωγή των ισχιακών τους νεύρων. Τα νεύρα μονιμοποιούνται σε 2% παραφορμαλδεΐδη (PFA) για 30 λεπτά σε Θ.Δ. και επωάζονται 3 φορές με 1xPBS. Κάτω από στερεοσκόπιο, με λεπτές βελόνες από κράμα τιτανίου και πάνω σε αντικειμενοφόρες γυάλινες πλάκες τύπου Superfrost[®], γίνεται διαχωρισμός των ινών. Οι ίνες αφυδατώνονται για 16 ώρες σε Θ.Δ. και έπειτα επωάζονται με ακετόνη στους -20°C για 20 λεπτά, για περαιτέρω μονιμοποίησή τους επάνω στις αντικειμενοφόρες πλάκες. Κατόπιν γίνεται επώαση με διάλυμα 10%FCS, 0.1% Triton, 0.5% ζελατίνη σε 1x PBS (blocking solution) για 1 ώρα σε Θ.Δ. για τον αποκλεισμό των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων και ακολούθως γίνεται επώαση με το πρώτο αντίσωμα (διαλυμένο στο blocking solution) για 16 ώρες στους 4°C. Έπειτα γίνονται τρεις εκπλύσεις με 1X PBS και επώαση με το δευτερεύον φθορίζον αντίσωμα για 2 ώρες σε Θ.Δ.. Τέλος τα δείγματα επωάζονται ακόμη τρεις φορές με 1X PBS και στερεώνονται με γυάλινες καλυπτρίδες σε μέσο διατήρησης Mowiol.

2.2.23 Παρατήρηση, φωτογράφιση, ανασύσταση και ανάλυση εικόνων

Για την παρατήρηση και φωτογράφιση δειγμάτων στα πειράματα που συμπεριλάμβαναν διαχωρισμένες νευρικές ίνες ισχιακών νεύρων μυών ή καλλιέργειες

DRG νευρώνων χρησιμοποιήθηκαν το συμβατικό μικροσκόπιο Zeiss Axioscope και το συν-εστιακό μικροσκόπιο Confocal TCS-NT Laser Scanning microscope (Leica). Για την τελική ανασύσταση της εικόνας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Adobe Photoshop και για την ανάλυση των εικόνων για τις ανάγκες των μετρήσεων των μεσοκομβικών τμημάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Metamorph (της Molecular Devices), ενώ για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Prism (της Delta Graph).

2.2.24 Κατασκευές DNA

A. Κατασκευές IgC₂-GFP και FN_{III}-GFP

Ανθρώπινοι cDNA κλώνοι που κωδικοποιούν τις IgC₂ περιοχές της hTAG-1 και τις FN_{III} περιοχές της απομονώθηκαν ως προϊόντα PCR από προηγούμενες κατασκευές σε pRmHa3 πλασμιδιακό φορέα. Και οι δυο κλώνοι είχαν την ίδια αρχική αλληλουχία (start sequence) και την αλληλουχία GPI στο καρβοξυτελικό άκρο τους προκειμένου να καταλήγουν και οι δυο πρωτεΐνες στη μεμβράνη. Περιοριστικές θέσεις για τα ένζυμα BglIII και XbaI δημιουργήθηκαν στα άκρα των δυο προϊόντων PCR με χρήση κατάλληλων εκκινητών και καθένα από αυτά κλωνοποιήθηκε έπειτα μεταξύ των περιοριστικών θέσεων BglIII και XbaI του pEGFP-C1 πλασμιδιακού φορέα (στο καρβοξυτελικό άκρο της GFP- Green Fluorescent Protein). Ένα πρόγραμμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σχεδιάστηκε ειδικά για να πληροί τις προϋποθέσεις της αντίδρασης, βάσει του μεγέθους και της αναλογίας GC στα προϊόντα μας (IgC₂ και FN_{III}) και η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Hi-Fidelity DNA polymerase. Τα δυο προϊόντα από την PCR καθαρίστηκαν από τυχόν προσμίξεις με το σύστημα NucleoSpin (Macherey Nagel). Έπειτα ακολούθησε πέψη

και των δυο προϊόντων με τα ένζυμα BglIII και XbaI για να εκτεθούν τα άκρα τους (sticky ends). Όσον αφορά στον πλασμιδιακό φορέα που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση, ο pEGFP-C1 είναι ένας πλασμιδιακός φορέας ανθεκτικός στην καναμυκίνη, γι' αυτό και η παραγωγή του έπρεπε να γίνει σε θρεπτικό που περιείχε καναμυκίνη (LB medium + Kanamycin). Η βακτηριακή κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για μετασχηματισμό προς παραγωγή του πλασμιδιακού μας φορέα ήταν η σειρά NEB 316 E. Coli dam⁻ electrocompetent. Ο λόγος για τον οποίο η παραγωγή του πλασμιδιακού φορέα έγινε σε αυτή την κυτταρική σειρά είναι διότι η περιοριστική θέση XbaI είναι ευαίσθητη σε μεθυλίωση από dam μεθυλάσες, με αποτέλεσμα να καλύπτεται από τη μεθυλ-ομάδα όταν μετασχηματίζονταν οποιαδήποτε άλλη κυτταρική βακτηριακή σειρά με το φορέα μας, καθιστώντας αδύνατο για το ένζυμο (XbaI) να «κόψει» σε εκείνη τη θέση. Ο μετασχηματισμός των βακτηρίων έγινε ασφαλώς με την τεχνική του ηλεκτρικού μετασχηματισμού επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων. Μια μεγαλύτερη καλλιέργεια εμβολιάστηκε έπειτα, με τα μετασχηματισμένα βακτήρια από την οποία την επόμενη μέρα απομονώθηκε μια μεγάλη ποσότητα pEGFP-C1 DNA με το σύστημα «large scale DNA preparation» (MAXI-prep) της Qiagen. Ακολούθησε πέψη του pEGFP-C1 (μη μεθυλιωμένου πλέον στη θέση XbaI) με τα περιοριστικά ένζυμα BglIII και XbaI για να εκτεθούν τα άκρα (sticky ends) του. Μικρές ποσότητες των πέψεων των δυο προϊόντων PCR και του pEGFP-C1 ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης. Έπειτα όλη η υπόλοιπη ποσότητα της πέψης του pEGFP-C1 απομονώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε παρασκευαστικό gel αγαρόζης (0,8%) και ηλεκτροέκλυση. Το προϊόν της ηλεκτροέκλυσης καθαρίστηκε έπειτα περαιτέρω με το σύστημα NucleoSpin (Macherey Nagel). Ο πλήρως καθαρισμένος και κομμένος (με BglIII/XbaI) pEGFP-C1 αποφωσφορυλιώθηκε με αλκαλική φωσφατάση (SAP: shrimp

alkaline phosphatase). Καθένα από τα δυο προϊόντα PCR (IgC₂ και FN_{III}) συνενώθηκε (ligation) με τον αποφωσφορυλιωμένο pEGFP-C1 με τη λιγάση T4. Οι δυο συνενώσεις εισήχθησαν με μετασχηματισμό στην ηλεκτροεπιδεκτική βακτηριακή κυτταρική σειρά DH5a E.coli και επώαστηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 37°C σε θρεπτικό 2XYT με καναμυκίνη. Την επόμενη μέρα οι δυο καλλιέργειες των συνενώσεων απλώθηκαν σε τριβλία για απομόνωση μονών αποικιών βακτηρίων και από τις αποικίες αυτές απομονώθηκε έπειτα το DNA των κατασκευών μας με μικρής κλίμακας απομόνωση DNA, το οποίο και ελέγχθηκε με πολλαπλές πέψεις προς έλεγχο του μεγέθους και των θέσεων περιορισμού. Οι κατασκευές στάλθηκαν έπειτα για αλληλούχιση (sequencing) τα αποτελέσματα της οποίας πιστοποίησαν ότι και τα δυο ένθετα (IgC₂ και FN_{III}) στις κατασκευές μας ήταν σωστά ως προς την αλληλουχία τους και in frame στη μετάφραση με τη GFP πρωτεΐνη.

B. PLP κατασκευή

Για τις ανάγκες της δημιουργίας της DNA κατασκευής PLP-TAG1 η οποία οδηγεί την έκφραση του cDNA της TAG-1 στα ολιγοδενδροκύτταρα, ο PLP υποκινητής (Furley et al., 1990; Wight et al., 1993; Fuss et al., 2001) εξήχθη από πλασμιδιακή κατασκευή, που φέρει τον εν λόγω υποκινητή, η οποία υπέστη ενζυμική πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα ApaI και SacII. Ο υποκινητής εισήχθη στον πλασμιδιακό φορέα pBLscKS-II ο οποίος είχε επίσης «κοπεί» με τα περιοριστικά ένζυμα ApaI και SacII. Κατόπιν, το νέο αυτό πλασμίδιο υπέστη εκ νέου ενζυμική πέψη με το περιοριστικό ένζυμο AscI, για να αποφωσφορυλιωθεί με αλκαλική φωσφατάση (SAP) και να συνενωθεί, με χρήση της λιγάσης T4, με την αλληλουχία που κωδικοποιεί την rat-TAG πρωτεΐνη και η οποία με τη σειρά της είχε εξαχθεί από πλασμιδιακό φορέα με

τη χρήση των ενζύμων SacII και EcoRV. Έπειτα, ακολούθησε παρασκευαστική ενζυμική πέψη για να εξαχθεί το PLP-TAG1 τμήμα του πλασμιδίου που ενέθηκε σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωοκυττάρων προερχομένων από άτομα F1 (C57B110xCBA). Ακολούθησαν ενέσεις του DNA αυτού σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωοκυττάρων προερχομένων από άτομα F1 (C57B110xCBA) με στόχο την παραγωγή ετερόζυγων ατόμων που θα φέρουν την μετάλλαξη στο γένωμά τους.

Γ. Thy1 κατασκευή

Για τις ανάγκες της δημιουργίας αυτής της DNA κατασκευής, η οποία οδηγεί την έκφραση του cDNA της TAG-1 σε νευρώνες (κατασκευή Thy1: ThyI-GFP-TAG1) (Gordon et al., 1987; Vidal et al., 1990; Caroni, 1997), αρχικά χρησιμοποιήθηκαν το πλασμίδιο το οποίο φέρει την ThyI κασέτα και έχει ως μοναδική θέση κλωνοποίησης την XhoI, και ο pEGFP-C1 πλασμιδιακός φορέας. Από τον pEGFP-C1 απομονώθηκε με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης η αλληλουχία της GFP πρωτεΐνης με SalI άκρα, με την χρήση των εκκινητών GFP-Sal-F606 (5'-ACGCGTCGACGCCACCATGGTGAGCAAGGG-3')* και GFP-R-1389 (5'-CGGGCCCGCGGTACCGTCGACTGTC-3'), και κλωνοποιήθηκε ως θραύσμα DNA στην θέση XhoI (συμβατή θέση με την SalI) της ThyI κασέτας. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την χιμαιρική κλωνοποίηση της rat-TAG πρωτεΐνης στο ThyI-GFP πλασμίδιο, η οποία επίσης απομονώθηκε με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης φέροντας SalI άκρα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αυτή τη φορά ήταν οι εξής: RTAG-SalI-F-224 (5'-ACGCGTCGACAATGGGGACACACGCCAGGAAA-3') και ο RTAG-SalI-R-3346 (5'-ACGCGTCGACTGAGAGCTTCTGGTAGCCAGCGAG-3'). Έπειτα, η

απομονωμένη SalI-rTAG-SalI κλωνοποιήθηκε ως θραύσμα DNA στην θέση XhoI, που υπήρχε στο Multiple Cloning Site (MCS) του pEGFP-C1 από όπου απομονώθηκε η αλληλουχία της πρωτεΐνης GFP, στο πλασμίδιο ThyI-GFP-XhoI. Ακολούθησε παρασκευαστική ενζυμική πέψη για να εξαχθεί το ThyI-GFP-rTAG θραύσμα του πλασμιδίου που ενέθηκε σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωοκυττάρων προερχομένων από άτομα F1 (C57B110xCBA).

Κεφάλαιο 3:

Αποτελέσματα

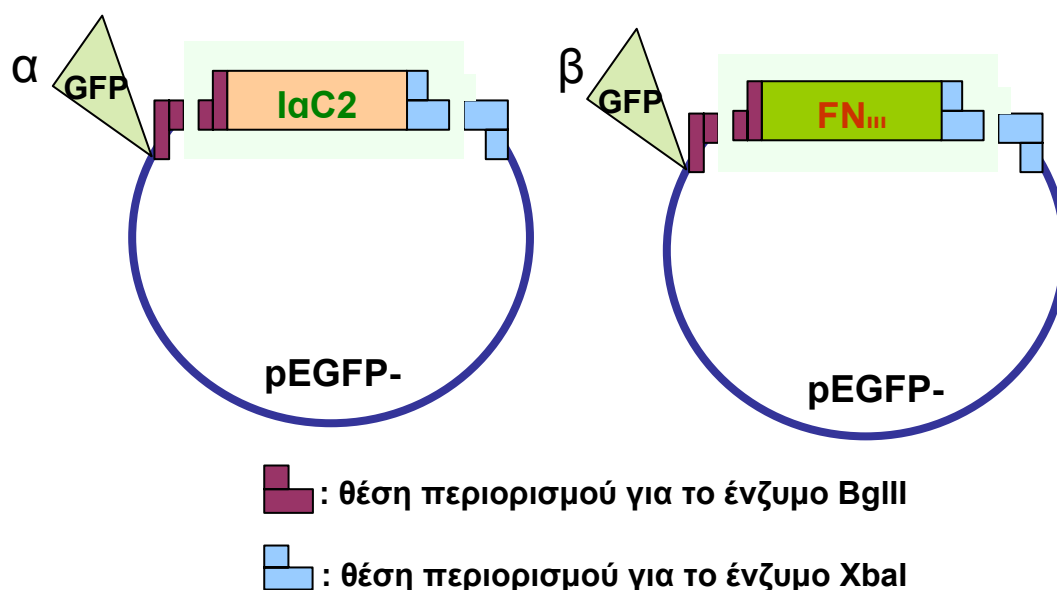
“We cannot advance without new experiments
in living, but no wise man tries every day what
he has proved wrong the day before”

-James Truslow Adams

3.1 DNA κατασκευές για την μελέτη των επιμέρους περιοχών της TAG-1.

Προηγούμενες έρευνες του εργαστηρίου μας (Tsiotra et al, 1996; Pavlou et al, 2002) έδειξαν, με την κατασκευή και χρήση Fc-χιμαιρικών πρωτεϊνών που περιέχουν είτε τις ανοσοσφαιρινικές [TAG-1(Ig)-Fc] είτε τις φμπρονεκτινικές περιοχές [TAG-1(FNIII)-Fc] της TAG-1, ότι η ομοφιλική δραστηριότητα της TAG-1 διαμεσολαβείται από τις φμπρονεκτινικές περιοχές της, ενώ οι ετεροφιλικές συνδέσεις που παρουσιάζει με άλλα μόρια κυτταρικής συνάφειας οφείλονται στις ανοσοσφαιρινικές περιοχές της. Επίσης αποδείχθηκε ότι οι συγκεκριμένες περιοχές του μορίου, όταν αποκοπούν, παραμένουν λειτουργικές και μπορούν μάλιστα να μεσολαβήσουν στην ανάπτυξη νευριτών και στις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες. Έτσι, για τις ανάγκες της μελέτης των επιμέρους περιοχών της TAG-1 και της διερεύνησης των αλληλεπιδράσεών τους με άλλες πρωτεΐνες των εγγύς των παρακομβικών περιοχών του κόμβου του Ranvier, επιχειρήθηκε η δημιουργία DNA κατασκευών που να φέρουν είτε τις ανοσοσφαιρινικές είτε τις φμπρονεκτινικές περιοχές της TAG-1, συνδεδεμένες όμως με την GFP πρωτεΐνη. Ανθρώπινοι cDNA κλώνοι που κωδικοποιούν τις IgC₂ περιοχές της hTAG-1 και τις FN_{III} περιοχές της απομονώθηκαν ως προϊόντα PCR από προηγούμενες κατασκευές σε pRmHA3 πλασμιδιακό φορέα (pRmHA-Ig και pRmHA-FN πλασμίδια, βλέπε Tsiotra et al, 1996). Και οι δυο κλώνοι περιείχαν την ίδια αρχική αλληλουχία καθώς και την αλληλουχία GPI στο καρβοξυτελικό τους άκρο, η οποία οδηγεί την έκφραση των δύο αυτών πρωτεϊνών στη κυτταρική μεμβράνη και τις συνδέει με αυτήν. Άλλωστε, όπως είναι γνωστό, η TAG-1 συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη μέσω του GPI τμήματός της και η φυσιολογική αλληλεπίδραση της TAG-1 με την Caspr2 και τους διάυλους καλίου λαμβάνει χώρα επίσης στη μεμβράνη των νευρικών κυττάρων (Traka et al, 2003; Rasband et al, 2002). Περιοριστικές θέσεις για τα ένζυμα BglIII και

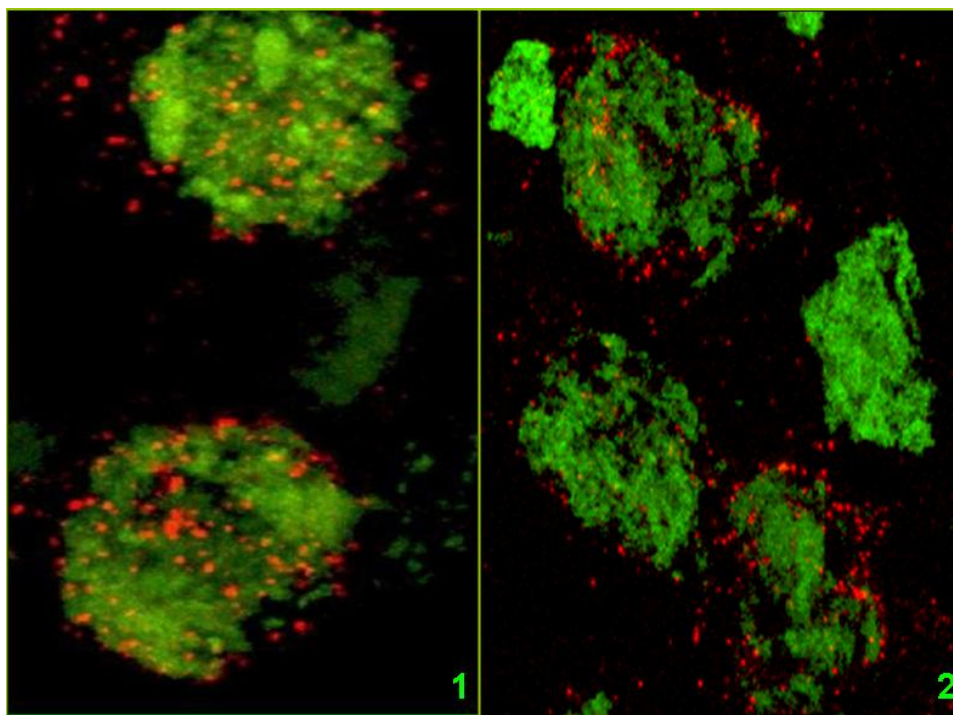
XbaI δημιουργήθηκαν στα άκρα των δυο προϊόντων PCR με χρήση κατάλληλων εκκινητών και καθένα από αυτά κλωνοποιήθηκε έπειτα μεταξύ των περιοριστικών θέσεων BglIII και XbaI του pEGFP-C1 πλασμιδιακού φορέα (στο καρβοξυτελικό άκρο της Green Fluorescent Protein). Έτσι παράχθηκαν οι δύο νέες DNA κατασκευές, IgC2-GFP και FN_{III}-GFP, διάγραμμα των οποίων παρατίθεται ακολούθως (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση της πλασμιδιακής κατασκευής που κωδικοποιεί τις IgC2 (α) και της κατασκευής που κωδικοποιεί τις FN_{III} (β) περιοχές της hTAG-1 σε GFP.

Για να πιστοποιηθεί εάν οι δυο κατασκευές όντως καταλήγουν στην κυτταρική μεμβράνη, και συνεπώς είναι λειτουργικές και σε θέση να αλληλεπιδράσουν με την Caspr2 ή τους διάυλους καλίου, διενεργήθηκε ανοσοκυτταροχημεία σε ζωντανά HEK 293T κύτταρα, τα οποία είχαν προηγουμένως διαμολυνθεί είτε με τη IgC2-GFP είτε με την FN_{III}-GFP κατασκευή. Για την σήμανση των πρωτεϊνών που παράγονται (Ig-GFP και FN-GFP) χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό anti-GFP αντίσωμα, το οποίο

είναι ειδικό για την GFP πρωτεΐνη, ενώ το δεύτερο-φθορίζον αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το anti-rabbit Alexa 555 (κόκκινο). Με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού, παρατηρήθηκε ότι κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία η GFP πρωτεΐνη προσδίδει πράσινο χρωματισμό στα κύτταρα, ενώ υπό ακτινοβολία μήκους κύματος 555nm εμφανίζεται ειδική κόκκινη χρώση συγκεκριμένα στην μεμβράνη των κυττάρων. Αυτή η κόκκινη χρώση αντιστοιχεί στο δεύτερο αντίσωμα που έχει προσκολληθεί στο πρωτεύον anti-GFP αντίσωμα, το οποίο με τη σειρά του είναι συνδεδεμένο με τις Ig-GFP και FN-GFP πρωτεΐνες. Έτσι κατανοεί κανείς ότι οι Ig-GFP και FN-GFP πρωτεΐνες έχουν την δυνατότητα να συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη, προφανώς μέσω του GPI τμήματος που φέρουν. Συνεπώς οι κατασκευές IgC2-GFP και FN_{III}-GFP μπορούν να παράγουν χμιαϊκές πρωτεΐνες που καταλήγουν στην κυτταρική μεμβράνη (Εικόνα 3.2), γεγονός που βοηθάει στην μελέτη των αλληλεπιδράσεων της TAG-1, σε πλησιέστερες στο φυσιολογικό συνθήκες, μέσω των επιμέρους περιοχών της στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές των εμμέλων ινών.



Εικόνα 3.2: Ανοσοκυτταροχημικά πειράματα σε ζωντανά HEK 293T (live-immunocytochemistry) διαμολυσμένα με τις ελλειμματικές πλασμιδιακές κατασκευές IgC2-GFP (1) και FNIII-GFP (2). Το πράσινο χρώμα οφείλεται στην GFP πρωτεΐνη, η οποία κωδικοποιείται από τις πλασμιδιακές κατασκευές. Η κόκκινη χρώση που εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη οφείλεται στο δευτερεύον αντίσωμα anti-rabbit 555 (Alexa), το οποίο έχει προσδεθεί ειδικά, λόγω του anti-GFP πρωτεύοντος αντισώματος, στις ανοσοσφαιρινικές και τις φμπρονεκτινικές περιοχές της TAG-1 αντίστοιχα.

3.2 Αλληλεπιδράσεις της TAG-1 και των επιμέρους περιοχών της με τους διαύλους καλίου (Kv)

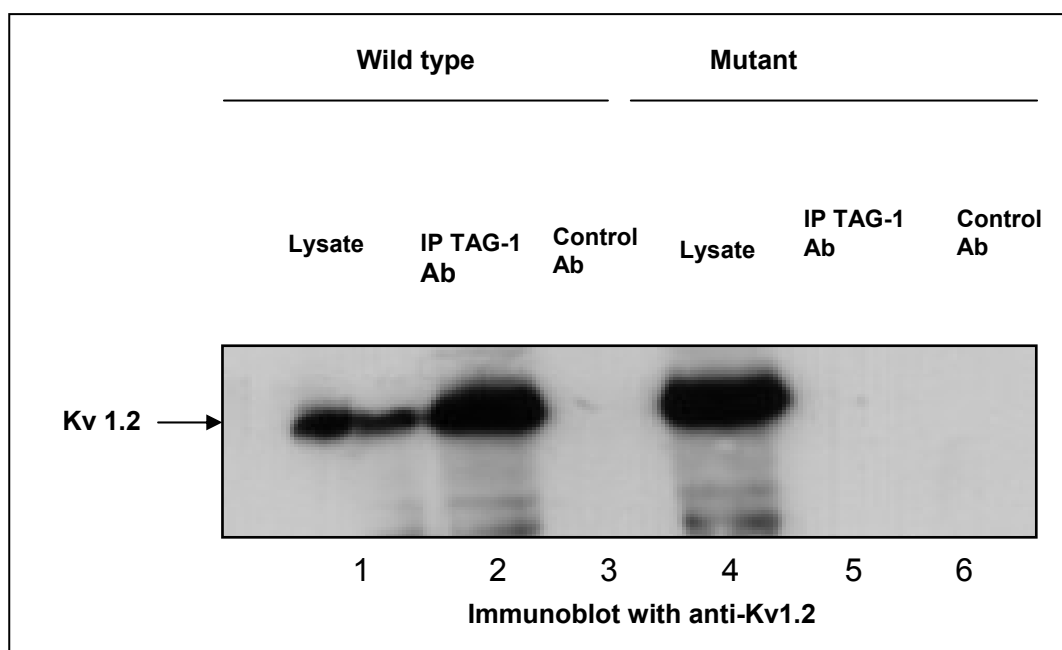
Από προηγούμενες έρευνες είναι γνωστό ότι η TAG-1 συνεντοπίζεται πάντα, εκτός από την Caspr2, και με τους δίαυλους καλίου (Shaker-type) στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές. Εκεί, οι υπομονάδες των διαύλων αυτών σχηματίζουν ομο- και ετερο-πολυμερή (κυρίως τα εξής: Kv1.1/1.2/Kvβ2, Kv1.1/1.4/Kvβ2 και Kv1.1/1.2/1.4/Kvβ2) τα οποία οδηγούν στην δημιουργία διαύλων K⁺. Έχει δειχθεί ότι τέτοιες υπομονάδες (π.χ. Kv1.4, Kvβ) μπορούν να καθορίσουν τα χαρακτηριστικά της μεμβρανικής έκφρασης των Kv1 διαύλων σε κυτταρικές σειρές, και πιο συγκεκριμένα ότι χρήση της Kv1.4 υπομονάδας οδηγεί στην δημιουργία ετεροπολυμερούς συμπλόκου, με τις άλλες υπομονάδες, που εκφράζεται στην κυτταρική μεμβράνη (Manganas and Trimmer, 2000) σε μεγαλύτερο ποσοστό. Εν τω μεταξύ, η απαλοιφή του γονιδίου της TAG-1 έχει ως αποτέλεσμα την δραματική μετατόπιση και διάχυση των διαύλων K⁺ από την εγγύς της παρακομβικής περιοχή προς το μεσοκομβικό τμήμα, στους εμμύελους νευράξονες του ΚΝΣ και του ΠΝΣ, υποδηλώνοντας ότι η αλληλεπίδραση της TAG-1 με τους διαύλους K⁺ είναι ειδική (Traka, Gouterbroze et al., 2003). Αυτό που δεν είχε αποσαφηνιστεί μέχρι σήμερα ήταν το εάν η αλληλεπίδραση της TAG-1 με τους δίαυλους καλίου στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή είναι άμεση ή έμμεση. Δηλαδή εάν, όπως είχε υποτεθεί παλαιότερα (Rasband et al, 2002; Traka et al, 2003; Poliak et al, 2003), το σύμπλοκο TAG-1/Caspr2 συνδέεται μέσω μίας άγνωστης πρωτεΐνης (που περιέχει PDZ τμήμα) με τους διαύλους καλίου ή εάν συνδέεται απ' ευθείας με αυτούς, κι αν ναι ποιο από τα δύο μόρια του συμπλόκου είναι υπεύθυνο για την σύνδεση. Έτσι, χρησιμοποιώντας ιστό από αγρίου τύπου και *Tag-1*^{-/-} μύες, διενεργήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και ανοσοαποτύπωσης για να διαπιστωθεί εάν υπάρχει απ' ευθείας αλληλεπίδραση

μεταξύ TAG-1 και Kv, δηλαδή εάν παρουσία της TAG-1 (αγρίου τύπου ζώα) παρατηρείται απ' ευθείας σύνδεση *in vivo* με τους διαύλους καλίου ενώ κατά την απουσία της (*Tag1*^{-/-} ζώα) ένα τέτοιο σύμπλοκο απουσιάζει. Για την επαλήθευση του πρώτου πειράματος (*in vivo* μελέτη), χρησιμοποιήθηκαν πλασμιδιακές κατασκευές που κωδικοποιούν την TAG1 (προσδεμένη με την πρωτεΐνη GFP, συνεπώς το μόριο TAG-1-GFP) ή την Caspr2 και τις υπομονάδες των διαύλων Καλίου Kv1.1, Kv1.2 και Kv1.4, για πειράματα διαμόλυνσης κυττάρων και ανοσοκατακρήμνισης, και διερευνήθηκε η άμεση ή έμμεση αλληλεπίδραση της TAG-1 ή της Caspr2 με τους διαύλους καλίου (K⁺) (*in vitro* μελέτη). Μόλις ολοκληρώθηκε αυτή η σειρά πειραμάτων, διενεργήθηκε ταυτοποίηση των δομικών περιοχών της TAG1 που αλληλεπιδρούν με τους διαύλους καλίου με τη χρήση, αυτή τη φορά, των ελλειμματικών κατασκευών για τις περιοχές ανοσοσφαιρίνης (Ig) και φμπρονεκτίνης (FN) της TAG1 (βλέπε κεφάλαιο 3.1) και των κατασκευών που κωδικοποιούν τις υπομονάδες διαύλων Καλίου Kv1.1, Kv1.2 και Kv1.4.

3.2.1 Η TAG-1 αλληλεπιδρά απευθείας με τους διαύλους καλίου

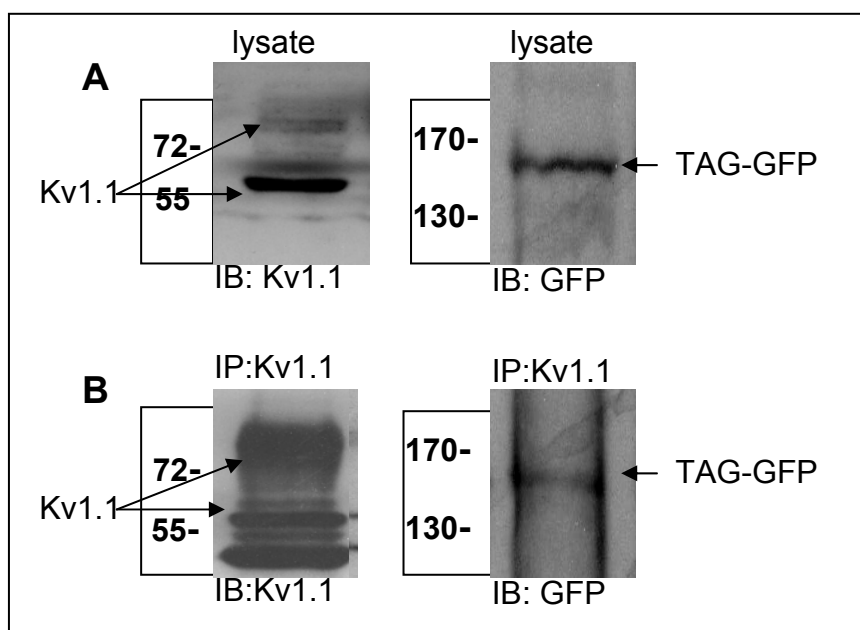
Σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προήλθαν από εγκέφαλους μυών είτε αγρίου τύπου είτε *Tag1*^{-/-}, έγινε ανάλυση κατά Western και ανοσοαποτύπωση, με αντίσωμα ειδικό για τις Kv1.2 υπομονάδες των διαύλων καλίου, και παρατηρήθηκε ότι οι διάυλοι καλίου (εικόνα 2.1, σειρές 1 και 4 αντίστοιχα) εντοπίζονται και στους δύο τύπους ζώων (~65kD για τις Kv1.2 υπομονάδες). Αυτό σημαίνει ότι μπορεί οι διάυλοι καλίου να μην συγκεντρώνονται στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή στα *Tag1*^{-/-} ζώα,

αλλά τα πρωτεϊνικά επίπεδα δεν αλλάζουν σε σχέση με τα αγρίου τύπου ζώα και οι διάλυλοι υπάρχουν διάχυτοι κατά μήκος του εμμύελου νευράξονα. Έτσι, προκύπτει ότι η TAG-1 είναι σημαντική για την συγκέντρωση των διαύλων καλίου όπως είχε αναφερθεί και παλαιότερα (Traka et al, 2003). Τα ίδια εκχυλίσματα, υπέστησαν έπειτα ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα ειδικό για την TAG-1 και η ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα ειδικό για διαύλους K^+ (Kv1.2) έδειξε ότι στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα από αγρίου τύπου ζώα οι διάλυλοι κατακρημνίζονται με το αντίσωμα που προσδένεται στην TAG-1 (εικόνα 3.3, στήλη 2), ενώ στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα από *Tag1^{-/-}* ζώα οι διάλυλοι δεν κατακρημνίζονται με το ίδιο αντίσωμα (εικόνα 3.3, στήλη 5). Έτσι, γίνεται αντιληπτό ότι παρουσία της TAG-1 δημιουργείται συγκεκριμένο σύμπλοκο μεταξύ TAG-1 και Kv, πράγμα το οποίο δεν συμβαίνει κατά την απουσία της TAG-1 στα *Tag1^{-/-}* ζώα, και συνεπώς τα δύο αυτά μόρια αλληλεπιδρούν.



Εικόνα 3.3: Απ' ευθείας αλληλεπίδραση της TAG-1 με τα κανάλια Καλίου στον εγκέφαλο του μυός. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και ανάλυσης κατά Western-ανοσοαποτύπωσης σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προερχόμενα από εγκεφάλους μυών αγρίου τύπου (σειρές 1-3) και TAG-/- (σειρές 4-5).

Για την επαλήθευση του παραπάνω αποτελέσματος *in vitro* και την διαπίστωση της απευθείας αλληλεπίδρασης της TAG-1 με τους διαύλους K^+ , κύτταρα HEK 293T χρησιμοποιήθηκαν για διαμόλυνση με πλασμίδιο που φέρει την πλήρη αλληλουχία της πρωτεΐνης TAG-1 συνδεδεμένης με την GFP και τρία ακόμη πλασμίδια που φέρουν αλληλουχίες των υπομονάδων των διαύλων καλίου Kv1.1, Kv1.2 και Kv1.4. Τα κύτταρα λύθηκαν και συλλέχθηκε το πρωτεϊνικό τους εκχύλισμα το οποίο υπέστη ανάλυση κατά Western και ανοσοαποτύπωση, χρησιμοποιώντας το πολυκλωνικό anti-GFP αντίσωμα, για την ανίχνευση της TAG-1-GFP, και το μονοκλωνικό anti-Kv1.1, για την ανίχνευση των Kv1.1 υπομονάδων των διαύλων καλίου, που βρίσκονται σε σύμπλοκο με τις Kv1.2 και Kv1.4 υπομονάδες. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι και η TAG-1-GFP και τα Kv1.1 εκφράζονται με το σωστό μοριακό βάρος (Εικόνα 3.4.A, 150 kD για την TAG-1-GFP και 80-85kD και 60-65kD για τις Kv1.1 υπομονάδες σε διαμολυσμένα κύτταρα, Manganas and Trimmer, 2000). Το εκχύλισμα ανοσοκατακρημνίστηκε με anti-Kv1.1 αντίσωμα και έπειτα από ανοσοαποτύπωση με χρήση του anti-GFP αντισώματος υπήρξε εντοπισμός της TAG-1-GFP (Εικόνα 3.4.B, δεξιά) γεγονός που αποδεικνύει ότι υπάρχει απ' ευθείας αλληλεπίδραση της TAG-1 με τους διαύλους καλίου. Στην περίπτωση που το ίδιο πρωτεϊνικό εκχύλισμα ανοσοκατακρημνίστηκε με anti-Kv1.1 αντίσωμα και έπειτα υπέστη ανοσοαποτύπωση με χρήση του ίδιου αντισώματος, υπήρξε εντοπισμός της Kv1.1 υπομονάδας, γεγονός που μαρτυρά ότι το αντίσωμα anti-Kv1.1 είναι ικανό να κατακρημνίσει την Kv1.1 υπομονάδα καθώς και ότι η εν λόγω υπομονάδα διαμολύνθηκε επιτυχώς στα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν.



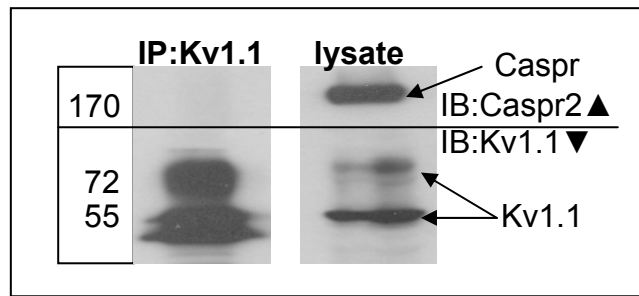
Εικόνα 3.4: Απ' ευθείας αλληλεπίδραση της TAG-1 με τα κανάλια Καλίου σε διαμολυσμένα κύτταρα HEK293T. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και ανάλυσης κατά Western-ανοσοαποτύπωσης σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προερχόμενα από διαμολυσμένα HEK 293T κύτταρα με TAG-GFP και Kv1.1/Kv1.2/Kv1.4. Η TAG-1 ανοσοκατακρημνίζεται από τα κανάλια K⁺. Α) Πείραμα μάρτυρας για την διαπίστωση της ορθής διαμόλυνσης των κυττάρων με τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν. Β) Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα από διαμολυσμένα κύτταρα, με αντίσωμα anti-Kv1.1.

3.2.2 Μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαύλων καλίου (Kv⁺) και της πρωτεΐνης Caspr2

Παρά το γεγονός ότι σε προηγούμενες έρευνες (Poliak et al, 2003; Traka et al, 2003) οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ TAG-1 και Caspr2, TAG-1 και διαύλων K⁺ καθώς και άλλων μορίων, υποψηφίων για την συμμετοχή σε σύμπλοκο συνάφειας νευράξονα και γλοιακού κυττάρου, είχαν διερευνηθεί και υπήρχαν ήδη προτεινόμενα μοντέλα για την μοριακή δομή των εγγύς των παρακομβικών περιοχών, δεν είχε ποτέ

διερευνηθεί η πιθανότητα απ' ευθείας αλληλεπίδρασης των διαύλων Καλίου και της Caspr2. Μια τέτοια μελέτη είναι απαραίτητη για την αποσαφήνιση των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή και, πιο συγκεκριμένα, για τον αποκλεισμό της πιθανότητας απευθείας σύνδεσης των δύο αυτών μορίων.

Κύτταρα HEK 293T χρησιμοποιήθηκαν για διαμόλυνση με πλασμίδιο που φέρει την αλληλουχία της πρωτεΐνης Caspr2 και τα τρία πλασμίδια που φέρουν αλληλουχίες των υπομονάδων των διαύλων Καλίου Kv1.1, Kv1.2 και Kv1.4. Στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα που προήλθε από την λύση των διαμολυσμένων κυττάρων εντοπίστηκαν κανονικά τα Kv⁺ (80-85kD και 60-65kD για τις Kv1.1 υπομονάδες, εικόνα 3.5 δεξιά κάτω) και η Caspr2 (190kD, εικόνα 3.5 δεξιά επάνω), σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης και χρησιμοποιώντας anti-Kv1.1 και anti-Caspr2 αντισώματα, αντίστοιχα. Όταν το εκχύλισμα αυτό ανοσοκατακρημνίστηκε με anti-Kv1.1 αντίσωμα και χρησιμοποιήθηκε anti-Caspr2 αντίσωμα για ανοσοαποτύπωση, δεν παρατηρήθηκε εντοπισμός της Caspr2 (εικόνα 3.5 αριστερά επάνω). Όταν, παρ' όλα αυτά, χρησιμοποιήθηκε anti-Kv1.1 αντίσωμα στην ανάλυση κατά Western, οι διάλυοι καλίου εντοπίστηκαν κανονικά (εικόνα 3.5 αριστερά κάτω), καταδεικνύοντας την ορθότητα της επιμόλυνσης των κυττάρων καθώς και της διαδικασίας ανοσοκατακρήμνισης. Με το αποτέλεσμα αυτό, εξάγεται με ασφάλεια το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει απ' ευθείας σύνδεση των διαύλων Καλίου και της πρωτεΐνης Caspr2.

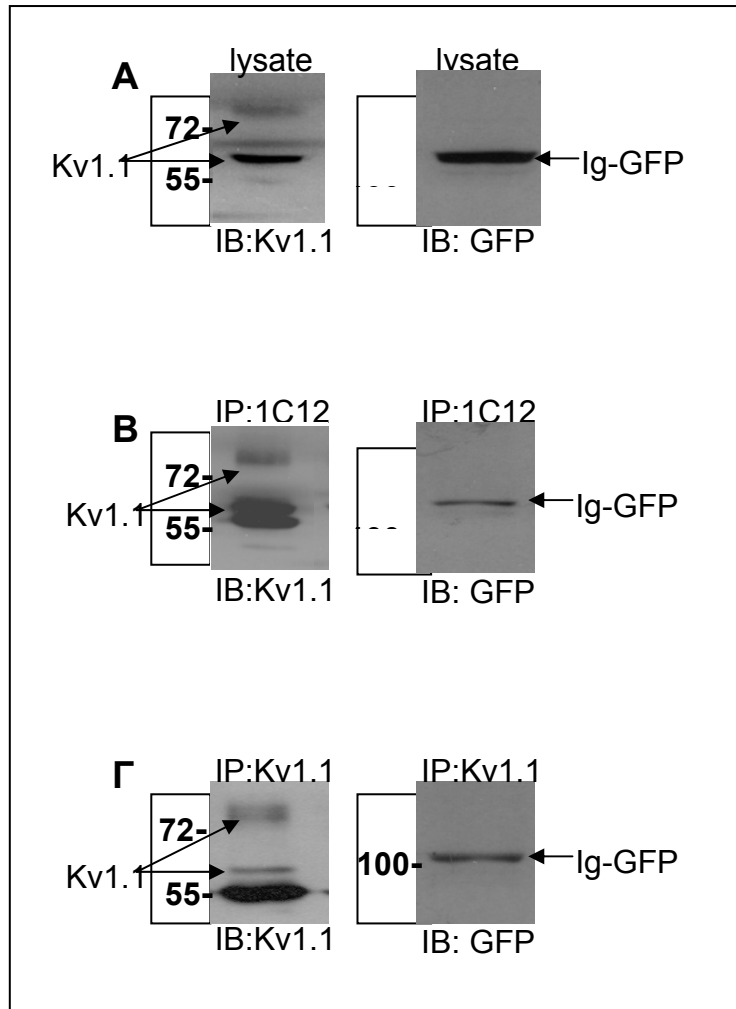


Εικόνα 3.5: Δεν υπάρχει απ' ευθείας αλληλεπίδραση της Caspr2 με τα κανάλια Καλίου. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και ανάλυσης κατά Western-ανοσοαποτύπωσης σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προερχόμενα από διαμολυσμένα HEK 293T κύτταρα με πλασμίδια που φέρουν την Caspr2 και τις υπομονάδες Kv1.1/Kv1.2/Kv1.4. Ανοσοαποτύπωση σε εκχυλίσματα για Kv1.1(δεξιά κάτω) και Caspr2(δεξιά πάνω). Η Caspr2 δεν ανοσοκατακρημνίζεται από τα κανάλια K⁺ (αριστερά πάνω).

3.2.3 Οι ανοσοσφαιρινικές περιοχές της TAG-1 αλληλεπιδρούν απευθείας με τους διαύλους καλίου

Έχοντας υπ' όψη το γεγονός ότι οι διάυλοι K⁺ αλληλεπιδρούν απευθείας με την TAG-1 και όχι με την Caspr2 στο σύμπλοκο TAG-1/Caspr2/Kv, πραγματοποιήσαμε αντίστοιχα πειράματα, διαμολύνοντας αυτή τη φορά κύτταρα με το πλασμίδιο που φέρει τις ανοσοσφαιρινικές περιοχές της TAG-1 (IgC2-GFP, βλέπε κεφάλαιο 3.1) καθώς και με τα τρία πλασμίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες των διαύλων Καλίου (Kv1.1, Kv1.2 και Kv1.4). Οι ανοσοσφαιρινικές περιοχές ανιχνεύθηκαν με το anti-GFP αντίσωμα [105 kD για την Ig(TAG)GFP], ενώ οι διάυλοι K⁺ ανιχνεύθηκαν με το anti-Kv1.1 αντίσωμα (80-85kD και 60-65kD για τις Kv1.1 υπομονάδες), στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα που υπέστη ανάλυση κατά Western και ανοσοαποτύπωση με τα αντίστοιχα αντισώματα (Εικόνα 3.6.A). Όταν το ίδιο εκχύλισμα ανοσοκατακρημνίστηκε με anti-Kv1.1 αντίσωμα και διενεργήθηκε ανοσοαποτύπωση με anti-GFP αντίσωμα, εντοπίστηκαν οι Ig περιοχές της TAG-1 (Εικόνα 3.6.Γ, δεξιά).

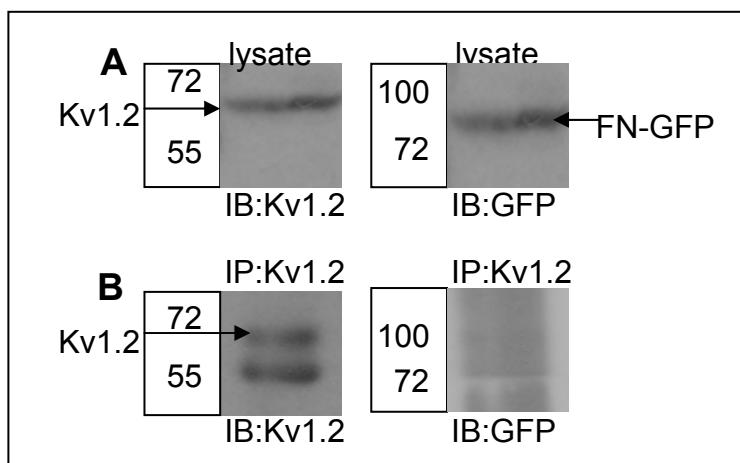
Αυτό σημαίνει ότι οι Ig περιοχές δημιουργούν σύμπλοκο με τους διαλύτες K^+ , οι οποίοι επίσης εντοπίζονται στο Kv1.1 κατακρήμισμα, που λειτουργεί ως πείραμα μάρτυρας (Εικόνα 3.6.Γ, αριστερά). Στο αντίστροφο πείραμα, το πρωτεϊνικό εκχύλισμα ανοσοκατακρημνίστηκε με το, ειδικό για τις ανοσοσφαιρινικές περιοχές της TAG-1, μονοκλωνικό αντίσωμα 1C12. Η ανάλυση κατά Western και η ανοσοαποτύπωση με το anti-GFP αντίσωμα έδειξαν ότι το κατακρήμισμα-μάρτυρας περιέχει τις Ig περιοχές της TAG-1 (Εικόνα 3.6.Β, δεξιά), ως όφειλε, ενώ όταν χρησιμοποιήθηκε το anti-Kv1.1 εντοπίστηκαν και οι διάλυτοι Καλίου (Εικόνα 3.6.Β αριστερά), υποδηλώνοντας σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ TAG-1 και Kv. Τα παραπάνω αποδεικνύουν ότι οι ανοσοσφαιρινικές περιοχές της TAG-1 αλληλεπιδρούν απευθείας με τα κανάλια K^+ και αποτελούν το μέσο σύνδεσης των δύο μορίων στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή του εμμέλου νευράξονα.



Εικόνα 3.6: Απ' ευθείας αλληλεπίδραση των ανοσοσφαιρινικών περιοχών της TAG-1 με τα κανάλια Καλίου. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και ανάλυσης κατά Western-ανοσοαποτύπωσης σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προερχόμενα από διαμολυσμένα HEK 293T κύτταρα με πλασμίδια που φέρουν την Ig(TAG)GFP και τις υπομονάδες Kv1.1/Kv1.2/Kv1.4. Ανοσοαποτύπωση σε εκχυλίσματα για Kv1.1 και Ig-GFP (A) Οι Ig περιοχές της TAG-1 ανοσοκατακρημνίζονται από τους διαύλους K⁺ (Γ) και το αντίστροφο (B).

3.2.4 Οι φιμπροεκτινικές περιοχές της TAG-1 δεν αλληλεπιδρούν απευθείας με τους διαύλους καλίου

Για την διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των φιμπροεκτινικών (FN) περιοχών της TAG-1 με τους διαύλους Καλίου, HEK 293T κύτταρα διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο FN_{III}(TAG)GFP και με τα τρία πλασμίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες των διαύλων Καλίου (Kv1.1, Kv1.2 και Kv1.4). Οι FN περιοχές ανιχνεύθηκαν με το anti-GFP αντίσωμα [95 kD για την FN_{III}(TAG)GFP], ενώ οι διαύλοι K⁺ ανιχνεύθηκαν με το anti-Kv1.2 (~65Kd για τις Kv1.2 υπομονάδες) στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα των διαμολυσμένων κυττάρων που υπέστη ανάλυση κατά Western και ανοσοαποτύπωση με τα αντίστοιχα αντισώματα (Εικόνα 3.7.A). Όταν το ίδιο εκχύλισμα υποβλήθηκε σε ανοσοκατακρήμνιση με το anti-Kv1.2, δεν εντοπίστηκε καμία ειδική ζώνη για τις FN_{III} περιοχές της TAG-1 κατά την ανοσοαποτύπωση με anti-GFP αντίσωμα (Εικόνα 3.7.B, δεξιά), υποδηλώνοντας αδυναμία σχηματισμού συμπλόκου μεταξύ των διαύλων καλίου και των FN_{III} περιοχών της TAG-1. Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι φιμπροεκτινικές περιοχές της TAG-1 δεν αλληλεπιδρούν απ' ευθείας με τους διαύλους καλίου.



Εικόνα 3.7: Δεν υπάρχει απ' ευθείας αλληλεπίδραση των φμπρονεκτινικών περιοχών της TAG-1 με τα κανάλια Καλίου. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και ανάλυσης κατά Western-ανοσοαποτύπωσης σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προερχόμενα από διαμολυσμένα HEK 293T κύτταρα με πλασμίδια που φέρουν την FN(TAG)GFP και τις υπομονάδες Kv1.1/Kv1.2/Kv1.4. Ανοσοαποτύπωση σε εκχυλίσματα για Kv1.1 και FNIII-GFP (A) Οι FNIII περιοχές της TAG-1 δεν ανοσοκατακρημνίζονται από τα κανάλια K⁺ (B).

3.3 Αλληλεπιδράσεις της TAG-1 και των επιμέρους περιοχών της με την πρωτεΐνη Caspr2

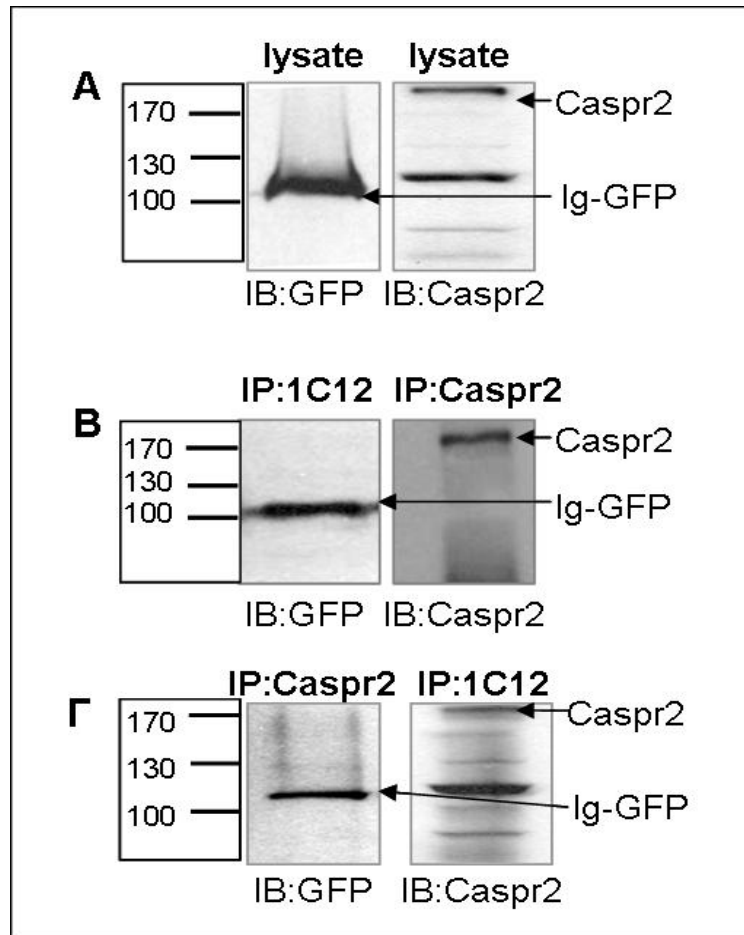
Η Caspr2 (190kDa) είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που εκφράζεται στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές των εμύελων νευραξόνων, στο ΚΝΣ και το ΠΝΣ, και εμπλέκεται στη διαμεσολάβηση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, ενώ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, μαζί με την TAG-1, και στην συγκέντρωση και διατήρηση των διαύλων καλίου στις ίδιες περιοχές. Σε μύες που δεν εκφράζουν Caspr2 οι διάυλοι αυτοί συγκεντρώνονται ελάχιστα σε σχέση με τα αγρίου τύπου ζώα (Poliak et al, 2003). Ανήκει στην υποοικογένεια NCP της οικογένειας των neurexins, η οποία συμπεριλαμβάνει και άλλα μέλη που εκφράζονται στο νευρικό σύστημα, όπως η

Paranodin/Caspr που συναντάται στις παρακομβικές περιοχές των εμμύλων νευρικών ιών (Poliak et al, 1999). Μελέτες σε *Tag1^{-/-}* ζώα έχουν δείξει ότι, παρόλο που η Caspr2 εκφράζεται σε φυσιολογικές ποσότητες, η κατανομή της στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή δεν είναι φυσιολογική. Σε αντίθεση με την κατανομή της στις εμμύλες ίνες φυσιολογικών ζώων, βρίσκεται διάχυτη σε όλο το μήκος του νευράξονα και αποτυγχάνει να συγκεντρωθεί στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή όπου φυσιολογικά θα δημιουργούσε σύμπλοκο με την TAG-1 και τους διαύλους καλίου (Poliak et al, 2003; Traka et al, 2003). Αυτό καταδεικνύει ότι η παρουσία της TAG-1 είναι απαραίτητη στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή για την φυσιολογική κατανομή της Caspr2 σε αυτήν την περιοχή. Επίσης, προηγούμενες έρευνες από το εργαστήριό μας έδειξαν συγκεκριμένα ότι η TAG-1 αλληλεπιδρά απευθείας με την Caspr2 (Traka et al., 2003). Το γεγονός αυτό οδήγησε στην προσπάθεια διερεύνησης των επιμέρους δομικών περιοχών της TAG-1 και την πιθανή εμπλοκή τους σε αυτήν την αλληλεπίδραση, κάνοντας χρήση των δύο πλασμιδίων που φέρουν τις ανοσοσφαιρινικές και φμπρονεκτινικές περιοχές της TAG-1 αντίστοιχα (βλέπε κεφάλαιο 3.1), ενός πλασμιδίου που κωδικοποιεί την Caspr2, καθώς επίσης πραγματοποιώντας πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και ανοσοαποτύπωσης.

3.3.1 Οι ανοσοσφαιρινικές περιοχές της TAG-1 αλληλεπιδρούν απευθείας με την Caspr2

Έπειτα από διπλή διαμόλυνση HEK 293T κυττάρων με πλασμίδια που κωδικοποιούν τις ανοσοσφαιρινικές περιοχές της TAG-1 και την πρωτεΐνη Caspr2, τα κύτταρα λύθηκαν και συλλέχθηκε το πρωτεϊνικό τους εκχύλισμα. Ανάλυση κατά Western και

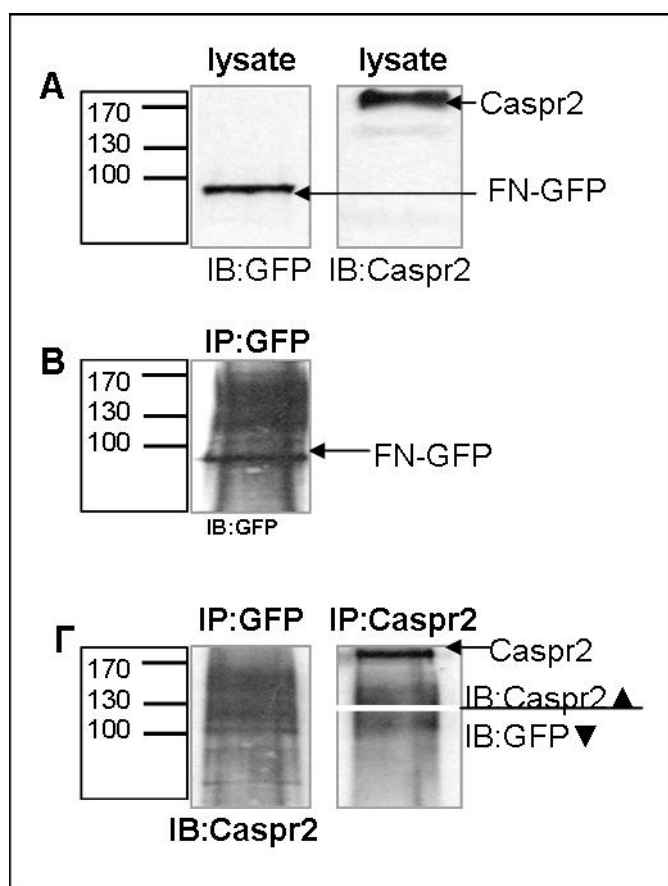
πειράματα ανοσοαποτύπωσης στο εκχύλισμα αυτό, έδειξαν ότι και οι δύο πρωτεΐνες εκφράζονται με το σωστό μοριακό βάρος (190 kD για την Caspr2, 105 kD για την Ig(TAG)GFP) (Εικόνα 3.8.A). Ακολούθως, το ίδιο εκχύλισμα υποβλήθηκε σε ανοσοκατακρήμιση. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το μονοκλωνικό αντίσωμα 1C12, ειδικό για τις Ig περιοχές της TAG-1, και το πολυκλωνικό anti-Caspr2. Νέα πειράματα ανοσοαποτύπωσης έδειξαν ότι τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι σε θέση να κατακρημνίσουν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες. (Εικόνα 3.8.B). Όταν το ίδιο εκχύλισμα κατακρημνίστηκε με αντίσωμα ειδικό για Caspr2 και έπειτα υποβλήθηκε σε ανοσοαποτύπωση, για να διερευνηθεί εάν η Ig (TAG)GFP ήταν παρούσα σε σύμπλοκο με την Caspr2 (χρησιμοποιώντας αντίσωμα ειδικό για GFP), οι ανοσοσφαιρινικές περιοχές της TAG-1 εντοπίστηκαν στο κατακρήμισμα (Εικόνα 3.8.Γ, αριστερά), υποδηλώνοντας σύνδεση των Ig περιοχών της TAG-1 με την Caspr2. Από την άλλη πλευρά, στην περίπτωση ανοσοκατακρήμισης με αντίσωμα ειδικό για τις Ig περιοχές της TAG-1 (1C12) και ανοσοαποτύπωσης με αντίσωμα ειδικό για την Caspr2 παρατηρήθηκε ανίχνευση της Caspr2 (Εικόνα 3.8.B, δεξιά), πράγμα το οποίο επαληθεύει το ότι οι ανοσοσφαιρινικές περιοχές της TAG-1 έχουν την ικανότητα δημιουργίας συμπλόκου με την Caspr2. Αυτά τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι Ig περιοχές της TAG-1 αρκούν για την απευθείας αλληλεπίδραση της TAG-1 και της Caspr2 στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές εμμύελων νευραξόνων.



Εικόνα 3.8: Απ' ευθείας αλληλεπίδραση των ανοσοσφαιρινικών περιοχών της TAG-1 με την πρωτεΐνη Caspr2. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και ανάλυσης κατά Western-ανοσοαποτύπωσης σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προερχόμενα από διαμολυσμένα HEK 293T κύτταρα με πλασμίδια που φέρουν την Ig(TAG)GFP και την Caspr2. Ανοσοαποτύπωση σε εκχυλίσματα για Caspr2 και Ig-GFP (A). Οι Ig περιοχές της TAG-1 ανοσοκατακρημνίζονται από την Caspr2 (Γ, αριστερά) και το αντίστροφο (Γ, δεξιά).

3.3.2 Οι φιμπροεκτινικές περιοχές της TAG-1 δεν αλληλεπιδρούν απευθείας με την Caspr2

Έπειτα από διπλή διαμόλυνση HEK 293T κυττάρων με πλασμίδια που κωδικοποιούν τις φιμπροεκτινικές, αυτή τη φορά, περιοχές της TAG-1 και την πρωτεΐνη Caspr2, τα κύτταρα λύθηκαν και συλλέχθηκε το πρωτεϊνικό τους εκχύλισμα. Πειράματα ανάλυσης Western και ανοσοαποτύπωσης έδειξαν ότι και οι δύο πρωτεΐνες εκφράζονται με το σωστό μοριακό βάρος (190 kD για την Caspr2, 95 kD για την FN_{III}-GFP (Εικόνα 3.9.A). Ακολούθως, το ίδιο εκχύλισμα υποβλήθηκε σε ανοσοκατακρήμιση. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των FN_{III} περιοχών της TAG-1 ήταν το πολυκλωνικό anti-GFP, ειδικό για την GFP πρωτεΐνη που βρίσκεται συνδεδεμένη με τις FN περιοχές, και στα πειράματα ανοσοκατακρήμισης αποδείχθηκε ικανό να κατακρημνίζει τις FN περιοχές (Εικόνα 3.9.B) μετά από ανοσοαποτύπωση με χρήση του ίδιου αντισώματος. Ωστόσο, όταν το κατακρήμισμα αυτό υπέστη ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα ειδικό για την Caspr2, η αντίστοιχη πρωτεΐνη δεν ανιχνεύθηκε (Εικόνα 3.9.Γ, αριστερά). Στην αντίθετη περίπτωση, όπου χρησιμοποιήθηκε anti-Caspr2 αντίσωμα για την ανοσοκατακρήμιση, η Caspr2 ανιχνεύθηκε στην ανοσοαποτύπωση με anti-Caspr2 αντίσωμα (Εικόνα 3.9.Γ, δεξιά επάνω), καταδεικνύοντας ότι η επιμόλυνση των κυττάρων και η ανοσοκατακρήμιση ήταν επιτυχείς, αλλά και ότι το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα ήταν λειτουργικό. Στην περίπτωση, όμως που χρησιμοποιήθηκε anti-GFP αντίσωμα για την ανοσοαποτύπωση δεν παρατηρήθηκε καμία ειδική ζώνη που να προδίδει παρουσία των FN περιοχών σε σύμπλοκο με την Caspr2 (Εικόνα 3.9.Γ, δεξιά κάτω). Έτσι, συνάγεται ότι, σε αντίθεση με τις ανοσοσφαιρινικές περιοχές της TAG-1, οι φιμπροεκτινικές περιοχές της δεν αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Caspr2.



Εικόνα 3.9: Δεν υπάρχει απ' ευθείας αλληλεπίδραση των φμπρονεκτινικών περιοχών της TAG-1 με την πρωτεΐνη Caspr2. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και ανάλυσης κατά Western-ανοσοαποτύπωσης σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προερχόμενα από διαμολυσμένα HEK 293T κύτταρα με πλασμίδια που φέρουν την FN(TAG)GFP και την Caspr2. Ανοσοαποτύπωση σε εκχυλίσματα για Caspr2 και FNIII-GFP (A). Οι FNIII περιοχές της TAG-1 δεν ανοσοκατακρημνίζονται από την Caspr2 (Γ, δεξιά κάτω) και το αντίστροφο (Γ, αριστερά).

3.4 Μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της TAG-1 και της πρωτεΐνης Connexin-29 (Cx29)

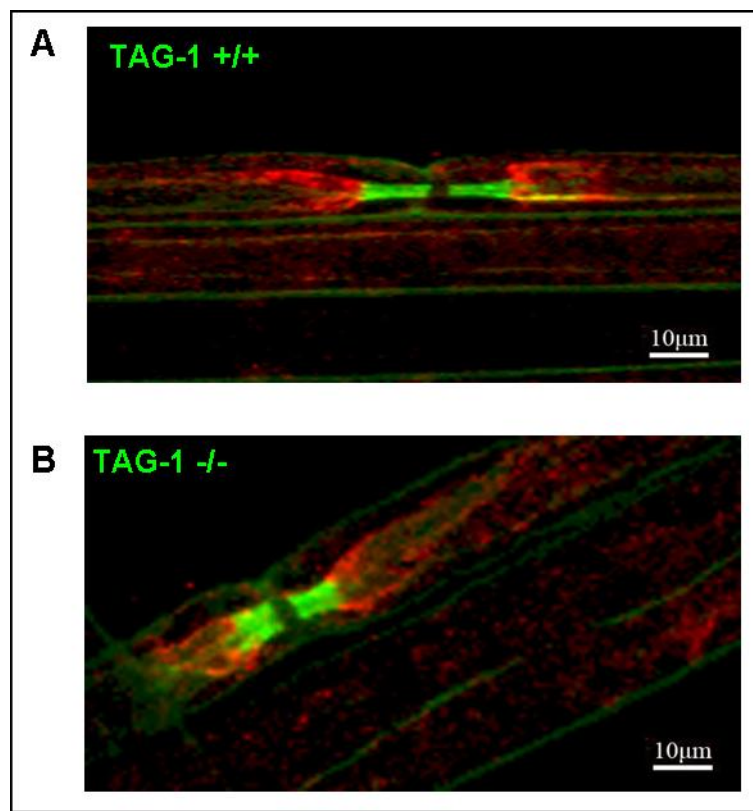
Εκτός από τις TAG-1, Caspr2 και Kv⁺, άλλες γνωστές πρωτεΐνες που εκφράζονται στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές των εμύελων νευρικών ιών είναι η χασματοσυνδετική πρωτεΐνη Connexin 29 (Altevogt et al, 2002) και η κυτταροσκελετική πρωτεΐνη 4.1B, η οποία βρίσκεται επίσης και στις παρακομβικές περιοχές (Denisenko et al., 2003). Παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ 4.1B και TAG-1 (Traka et al., 2003), όμως δεν έχει γίνει κάτι αντίστοιχο και στην περίπτωση της Connexin 29 (Cx29).

Η Cx29 είναι μια χασματοσυνδετική πρωτεΐνη (gap junction protein), η οποία εντοπίζεται στα εμύελα γλοιακά κύτταρα του ΠΝΣ και του ΚΝΣ. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίζεται κυρίως στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή και στις εντομές Schmidt-Lanterman (Altevogt et al, 2002). Τα εμύελα γλοιακά κύτταρα διαθέτουν χασματοσυνδέσεις ανάμεσα στις επιστρώσεις του ελύτρου της μυελίνης (π.χ. στις εντομές Schmidt-Lanterman) οι οποίες εξυπηρετούν στην ταχεία μεταφορά μορίων από το κυτταρόπλασμα ή την εξωτερική στοιβάδα της μυελίνης προς το εσωτερικό/αξονικό κομμάτι, και διαμεσολαβούνται από χασματοσυνδετικές πρωτεΐνες όπως η Cx29. Από άλλα παραδείγματα χασματοσυνδετικών πρωτεϊνών, έχει τονιστεί ότι τα μόρια αυτά διαδραματίζουν ρόλο και στην διατήρηση του ελύτρου της μυελίνης, ενώ μεταλλάξεις σε αυτά έχουν συνδεθεί με νευροεκφυλιστικές νόσους στον άνθρωπο. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η Cx32, η οποία επίσης εντοπίζεται στις εντομές Schmidt-Lanterman και στις παρακομβικές περιοχές εμύελων ιών. Σε μεταλλαγμένους μύες που δεν εκφράζουν Cx32 έχει παρατηρηθεί ότι, παρόλη την αρχικά φυσιολογική μυελίνωση, επέρχεται εκφυλισμός

του μυελώδους ελύτρου και του νευράξονα. Επίσης, μεταλλάξεις σε αυτήν την πρωτεΐνη έχουν συνδεθεί με την ανθρώπινη νόσο Charcot-Marie-Tooth και οι παθολογικές αλλαγές σε αυτήν την νόσο ομοιάζουν σε μεγάλο βαθμό με τις αλλαγές που παρατηρούνται στα μεταλλαγμένα ζώα που δεν εκφράζουν Cx32 (Martini and Carenini, 1998). Όπως γίνεται αντιληπτό από τα παραπάνω, είναι πιθανός ένας ρόλος και της Cx29, όχι μόνο στην δομή της εγγύς της παρακομβικής περιοχής, όπου συναντάται, αλλά και στην διατήρηση του ελύτρου της μυελίνης. Έτσι, αποφασίστηκε η διερεύνηση της πιθανότητας αλληλεπίδρασης της TAG-1 (ή των μορίων που δημιουργούν σύμπλοκο με αυτή, όπως τους δίαυλους καλίου και η Caspr2) με την Cx29.

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες σε διαχωρισμένες νευρικές ίνες, προερχόμενες από ισχιακά νεύρα μυών, έδειξαν, όπως είναι ήδη γνωστό, ότι η Cx29 βρίσκεται στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή ινών από αγρίου τύπου ζώα (Εικόνα 3.10.A), όπως άλλωστε και η πρωτεΐνη TAG-1. Παρομοίως, εξετάστηκε εάν αυτού του είδους ο εντοπισμός διατηρείται και σε *Tag1*^{-/-} μύες ή εάν διαταράσσεται, όπως γίνεται στην περίπτωση της Caspr2 και των διαύλων καλίου (Traka et al., 2003). Σε διαχωρισμένες νευρικές ίνες, από *Tag1*^{-/-} και αγρίου τύπου ζώων ισχιακά νεύρα, ανοσοσημασμένες με πολυκλωνικό anti-Cx29 αντίσωμα (δεύτερο φθορίζον αντίσωμα κόκκινο) και μονοκλωνικό αντίσωμα anti-Caspr (Paranodin), ειδικό για τις παρακομβικές περιοχές (δεύτερο φθορίζον αντίσωμα πράσινο), δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στην κατανομή της Cx29 (Εικόνα 3.10.A και 3.10.B), παρόλη την απουσία της TAG-1, στα *Tag1*^{-/-} ζώα. Η Cx29 βρίσκεται στην φυσιολογική της θέση, σε σύγκριση με ίνες από αγρίου τύπου ζώα, στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή, δίπλα ακριβώς από την πρωτεΐνη Caspr/paranodin, η οποία εδώ λειτουργεί ως μόριο-μάρτυρας για τις παρακομβικές περιοχές. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η Cx29

πιθανότητα δεν αλληλεπιδρά με την TAG-1 και δεν συμπεριλαμβάνεται στο σύμπλοκο TAG-1-Caspr2-Kv που διατηρεί τους διάυλους καλίου στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή.



Εικόνα 3.10: Η κατανομή της εγγύς της παρακομβικής περιοχής πρωτεΐνης connexin29 (Cx29) δεν αλλοιώνεται κατά την απουσία της TAG-1. (A, B) Ανοσοϊστοχημικά πειράματα σε διαχωρισμένες ίνες προερχόμενες από ισχιακά νεύρα ενήλικων μυών αγρίου τύπου (A) και *Tag-1*^{-/-} (B) για paranodin/Caspr (πράσινο) και Cx29 (κόκκινο).

3.5 DNA κατασκευές για την μοριακή διάσωση του φαινοτύπου των *Tag1*^{-/-} ζώων.

Δεδομένα από προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι σε *Tag1*^{-/-} μύες επηρεάζεται αποκλειστικά η εγγύς της παρακομβικής περιοχή. Μέχρι στιγμής αυτό το στέλεχος, καθώς και το στέλεχος *Caspr2*^{-/-}, είναι τα μοναδικά με φαινότυπο στην περιοχή αυτή και η ανάλυση του φαινοτύπου δείχνει ότι απουσία της TAG-1 οι διάλυτοι K⁺ και η πρωτεΐνη Caspr2 δεν ανιχνεύονται στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή (Traka et al, 2003). Παρόλο που από προηγούμενες μελέτες έχει καταστεί σαφές ότι η TAG-1 εκφράζεται και στον νευράξονα (Traka et al, 2002), εκτός από την μεμβράνη του γλοιακού κυττάρου, δεν υπάρχουν άμεσες αποδείξεις ότι η ομοφιλική *in trans* σύνδεση της γλοιακής TAG-1 με την αξονική είναι αυτή που διαμεσολαβεί την αξονογλοιακή αλληλεπίδραση στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή. Για να διερευνηθεί η ακριβής έκφραση της TAG-1 και επίσης να εξεταστεί εάν η έκφρασή της στα ολιγοδενδροκύτταρα είναι σε θέση να διασώσει (rescue) τον φαινότυπο των *Tag1*^{-/-} στελεχών, έγινε προσπάθεια δημιουργίας DNA κατασκευής (PLP-TAG1) η οποία οδηγεί την έκφραση του cDNA της TAG-1 στα ολιγοδενδροκύτταρα λόγω του υποκινητή του γονιδίου PLP, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PLP και έχει χρησιμοποιηθεί για έκφραση πρωτεϊνών σε ολιγοδενδροκύτταρα σε διαγονιδιακά ζώα στο παρελθόν (Furley et al., 1990; Wight et al., 1993; Fuss et al., 2001). Επίσης, έγινε προσπάθεια δημιουργίας αντίστοιχης DNA κατασκευής, η οποία οδηγεί την έκφραση του cDNA της TAG-1 σε νευρώνες (κατασκευή Thy1: ThyI-GFP-TAG1) (Gordon et al., 1987; Vidal et al., 1990; Caroni, 1997). Μετά την δημιουργία τους, οι κατασκευές αυτές θα εννύονταν σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωοκυττάρων προερχομένων από άτομα F1 (μύες) (C57B110xCBA). Άτομα που θα έφεραν την μεταλλαγή θα

διασταυρώνονταν μεταξύ τους για την παραγωγή ομόζυγων ατόμων τα οποία στη συνέχεια θα διασταυρώνονταν με τα *Tag1*^{-/-} ζώα. Μετά τις 3 πρώτες διασταυρώσεις θα υπήρχε δημιουργία μυών που θα εξέφραζαν το γονίδιο της TAG-1 επιλεκτικά στα ολιγοδενδροκύτταρα ή στους νευρώνες μόνο, αντίστοιχα. Σε κάθε περίπτωση θα εξεταζόταν με ανοσοϊστοχημικές μελέτες η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που εντοπίζονται φυσιολογικά στην εγγύς της παρακομβικής περιοχής. Εάν αυτές οι πρωτεΐνες συγκεντρώνονταν κανονικά τότε θα μπορούσε να υποθεθεί ότι η μόνο η γλοιακή ή η νευρωνική (ανάλογα με το αποτέλεσμα) TAG-1 διαμεσολαβεί τις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις της περιοχής και πιθανώς προσδέεται με μία άλλη άγνωστη πρωτεΐνη στο εφαπτόμενο κύτταρο. Στην περίπτωση όμως που οι πρωτεΐνες που εντοπίζονται φυσιολογικά στην εγγύς της παρακομβικής περιοχής αδυνατούσαν να συγκεντρωθούν σε αυτή, τότε θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι η παρουσία της TAG-1 είναι απαραίτητη και στην γλοία αλλά και στον νευράξονα, για την ορθή μοριακή οργάνωση της εγγύς της παρακομβικής περιοχής.

3.5.1 PLP κατασκευή

Η DNA κατασκευή για το PLP ολοκληρώθηκε επιτυχώς. Για τις ανάγκες της δημιουργίας αυτής της κατασκευής ο PLP υποκινητής εξήχθη από πλασμιδιακή κατασκευή, που φέρει τον εν λόγω υποκινητή και ευγενώς μας χορήγησε ο καθηγητής B. Boroko, η οποία υπέστη ενζυμική πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *ApaI* και *SacII*. Ο υποκινητής εισήχθη στον πλασμιδιακό φορέα pBLscKS-II ο οποίος είχε επίσης «κοπεί» με τα περιοριστικά ένζυμα *ApaI* και *SacII*. Κατόπιν, το νέο αυτό πλασμίδιο υπέστη εκ νέου ενζυμική πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *AscI*, για να δεχθεί την αλληλουχία που κωδικοποιεί την rat-TAG πρωτεΐνη και η οποία με τη σειρά της είχε εξαχθεί από πλασμιδιακό φορέα με τη χρήση των ενζύμων *SacII* και *EcoRV*. Η όλη

κατασκευή πραγματοποιήθηκε με μεγάλη καθυστέρηση που οφείλεται κυρίως στο μεγάλο μέγεθος του PLP υποκινητή (18Kb). Έπειτα, ακολούθησε παρασκευαστική ενζυμική πέψη για να εξαχθεί το PLP-TAG1 θραύσμα του πλασμιδίου (εικόνα 3.11) που ενέθηκε σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωοκυττάρων προερχομένων από άτομα (μύες) F1 (C57B110xCBA).



Εικόνα 3.11: PLP-TAG κατασκευή. Μέγεθος:~18kb

Έγιναν συνολικά 16 ενέσεις που απέφεραν συνολικά 50 απογόνους, με μόλις έναν όμως να φέρει την μετάλλαξη. Το πολύ μικρό αυτό ποσοστό στην επιτυχία δημιουργίας διαγονιδιακού ζώου δεν είχε ποτέ παρατηρηθεί στο παρελθόν σε μελέτες του εργαστηρίου μας που συμπεριλάμβαναν χρήση και κατασκευή διαγονιδιακών ζώων. Επιπλέον, το μοναδικό θηλυκό άτομο που έφερε την μετάλλαξη διασταυρώθηκε με *Tag1*^{-/-} αρσενικά ζώα για την παραγωγή απογόνων, ετερόζυγων ως προς την μετάλλαξη, οι οποίοι με την σειρά τους θα διασταυρώνονταν μεταξύ τους για να προκύψουν ομόζυγα άτομα που θα εξέφραζαν την TAG-1 μόνο σε ολιγοδενδροκύτταρα. Κατά την διάρκεια του τελευταίου έτους, έλαβε χώρα ένας σημαντικός αριθμός τέτοιων διασταυρώσεων, χωρίς όμως να υπάρξει το επιθυμητό αποτέλεσμα. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το πολύ μεγάλο μέγεθος της PLP-TAG κατασκευής μάλλον λειτουργεί ως ανασταλτικός παράγοντας για την εισαγωγή της μετάλλαξης στο γένωμα του μυός.

3.5.2 Thy1 κατασκευή

Η DNA κατασκευή για το ThyI επίσης ολοκληρώθηκε επιτυχώς. Για τις ανάγκες της δημιουργίας αυτής της κατασκευής αρχικά χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο το οποίο φέρει την ThyI κασέτα και έχει ως μοναδική θέση κλωνοποίησης την XhoI και ο pEGFP-C1 πλασμιδιακός φορέας. Από τον pEGFP-C1 απομονώθηκε με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης η αλληλουχία της GFP πρωτεΐνης με SalI άκρα, με την χρήση των κατάλληλων εκκινητών, και κλωνοποιήθηκε ως θραύσμα DNA στην θέση XhoI (συμβατή θέση με την SalI) της ThyI κασέτας. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την χμαιρική κλωνοποίηση της rat-TAG πρωτεΐνης στο ThyI-GFP πλασμίδιο, η οποία επίσης απομονώθηκε με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης φέροντας SalI άκρα. Έπειτα, η απομονωμένη SalI-rTAG-SalI κλωνοποιήθηκε ως θραύσμα DNA στην θέση XhoI, που υπήρχε στο Multiple Cloning Site (MCS) του pEGFP-C1 από όπου απομονώθηκε η αλληλουχία της πρωτεΐνης GFP, στο πλασμίδιο ThyI-GFP-XhoI. Ακολούθησε παρασκευαστική ενζυμική πέψη για να εξαχθεί το ThyI-GFP-rTAG θραύσμα του πλασμιδίου (εικόνα 3.12) που ενέθηκε σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωοκυττάρων προερχομένων από άτομα F1 (C57B110xCBA). Μέχρι στιγμής έχουν γίνει συνολικά 2 ενέσεις που δεν απέφεραν κανέναν απόγονο με την μετάλλαξη.



Εικόνα 3.12: ThyI κατασκευή. Μέγεθος:~11kb

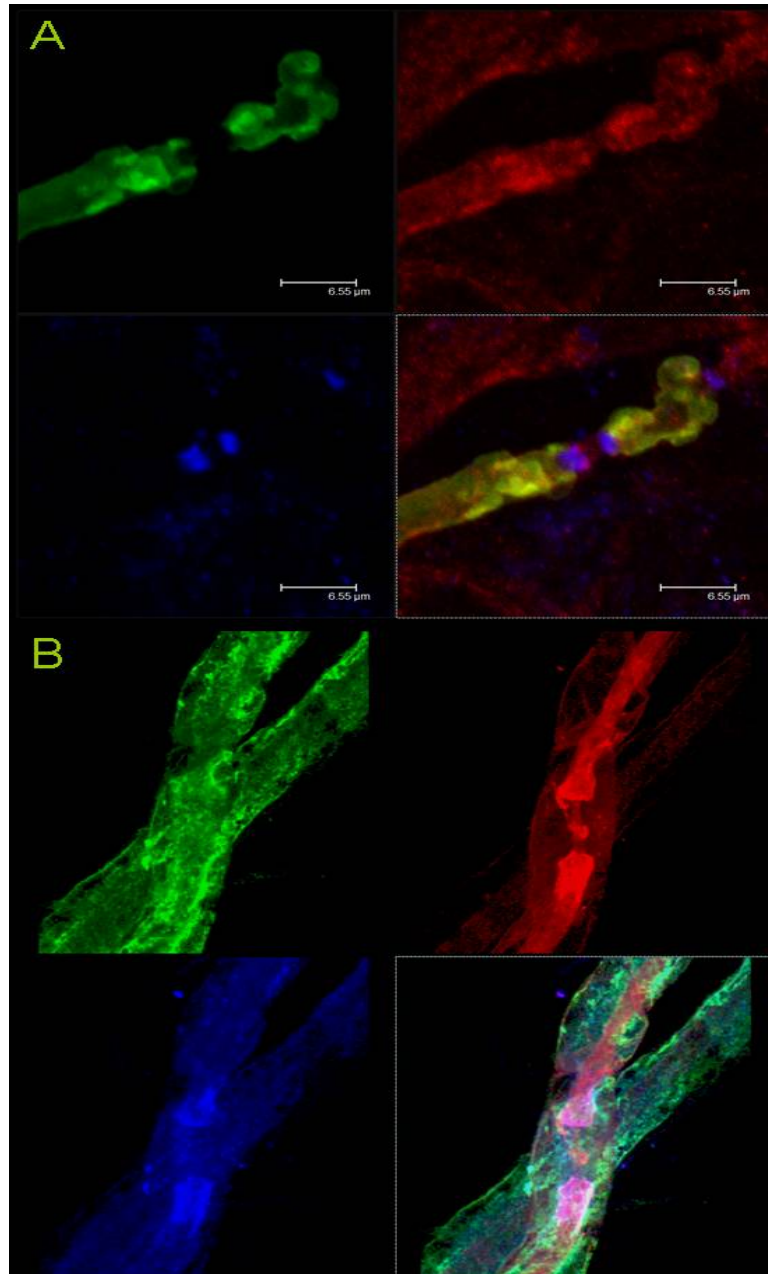
3.6 Μελέτη της έκφρασης της TAG-1 και των αλληλεπιδράσεών της, χρησιμοποιώντας καλλιέργειες νωτιαίων γαγγλίων (Dorsal Root Ganglia: DRG)

Στο παρελθόν έχουν περιγραφεί μελέτες σε καλλιέργειες νωτιαίων αισθητικών γαγγλίων (Dorsal Root Ganglia ή DRG) και συν-καλλιέργειες DRG's με κύτταρα Schwann μυών, οι οποίες υπόκεινται σε μυελίνωση *in vitro* με την χρήση κατάλληλων θρεπτικών μέσων, όπου είναι δυνατό να μελετηθούν ευκολότερα οι αναπτυξιακές φάσεις του ελύτρου της μυελίνης γύρω από τους νευράξονες καθώς και η συμμετοχή διαφόρων μορίων στις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις (Einheber et al, 1997; Svenningsen et al, 2003). Για να εξεταστεί περαιτέρω ο ρόλος της TAG-1 στον σχηματισμό αξονογλοιακών συνδέσμων και γενικά στην δυναμική αυτών σε ζωντανά κύτταρα, όπως και για να αποσαφηνιστεί η γλοιακή ή νευρωνική της δράση στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές των εμμέλων ινών, έγιναν πειράματα καλλιέργειας και συγκαλλιέργειας νωτιαίων αισθητικών γαγγλίων και γλοιακών κυττάρων (κύτταρα Schwann) μυών, σε συνθήκες που επιτρέπουν *in vitro* μυελίνωση. Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν μύες αγρίου τύπου καθώς και *Tag1*^{-/-} (Fukamauchi et al, 2001), από τους οποίους απομονώθηκαν τα DRG's και τα κύτταρα Schwann. Με χρήση ανοσοϊστοχημείας εξετάστηκαν ο εντοπισμός και ο εμπλουτισμός της TAG-1, των διαύλων καλίου και της Caspr2, σε εμμέλους άξονες, για να διευκρινιστεί εάν ο διαφορετικός φαινότυπος που παρατηρείται στους *Tag1*^{-/-} μεταλλαγμένους μύες (δηλ. μη εντοπισμός των Caspr2 και διαύλων Καλίου στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή) μπορεί να διατηρηθεί σε καλλιέργειες αλλά και αν μπορεί να «διασωθεί» (rescue) μέσω γλοιακής ή αξονικής έκφρασης της TAG-1 σε συγκαλλιέργειες. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με το εργαστήριο του Dr. Jean-Antoine Girault (INSERM U 536, Institute du Fer a Moulin, Paris, France).

3.6.1 Διατήρηση του φαινοτύπου των *Tag1^{-/-}* ζώων σε καλλιέργειες νωτιαίων αισθητικών γαγγλίων και συγκαλλιέργειες *Tag1^{-/-}* και αγρίου τύπου DRG's και κυττάρων Schwann.

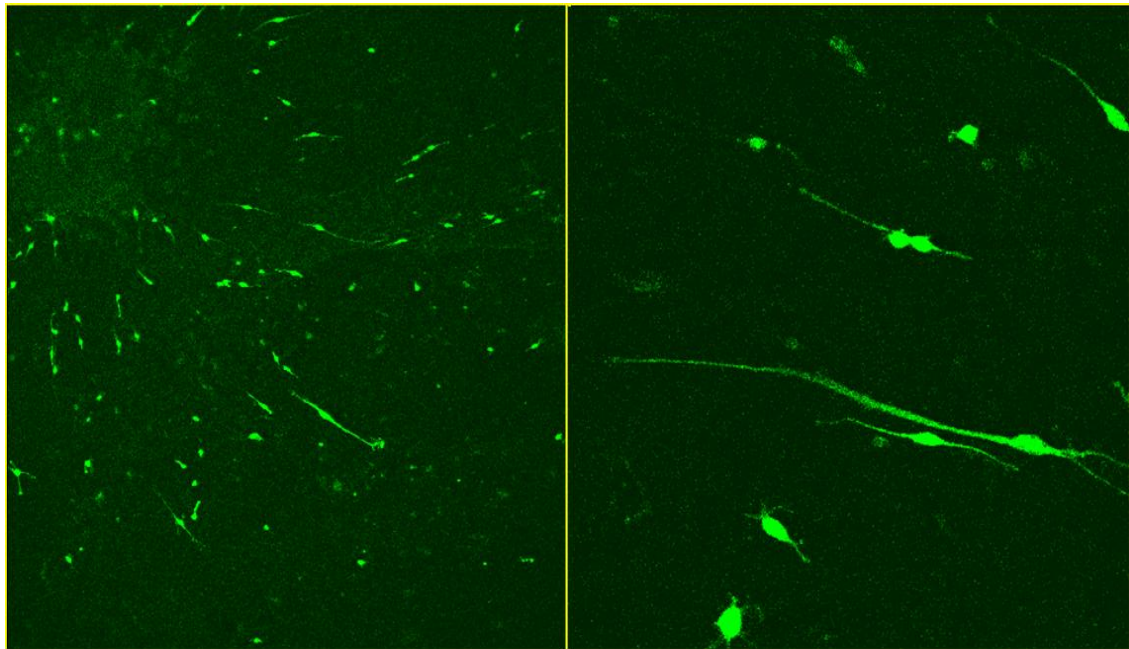
Νωτιαία αισθητικά γάγγλια (DRG's) εξήχθησαν από νωτιαίο μυελό μύων εμβρυϊκού σταδίου E13,5 και είτε χρησιμοποιήθηκαν ολόκληρα (explants) είτε υπέστησαν διαχωρισμό (dissociation) για καλλιέργεια σε τριβλία MatTek (MatTek Corporation), με ενσωματωμένο cover-slip, τα οποία είχαν επικαλυφθεί με matrigel και πολυλυσίνη. Οι DRG νευρώνες παρέμειναν σε θρεπτικό υλικό με NGF (nerve growth factor) και αφέθηκαν να αναπτύξουν νευρίτες για περίπου 20 ημέρες. Έπειτα το θρεπτικό υλικό εμπλουτίστηκε με ασκορβικό οξύ για να επέλθει μυελίνωση στους νευράξονες είτε από τα ενδογενή κύτταρα Schwann των νωτιαίων γαγγλίων είτε από κύτταρα Schwann που είχαν προηγουμένως απομονωθεί από ισχιακά νεύρα μύων μεταγενετικού σταδίου P5 και είχαν προστεθεί στους DRG νευρώνες. Κατά την ολοκλήρωση των πειραμάτων καλλιέργειών και συγκαλλιέργειών των DRG explants και DRG απομονωμένων (dissociated) νευρώνων διενεργήθηκε ανοσοϊστοχημεία με αντισώματα ειδικά για τις πρωτεΐνες που βρίσκονται στην εγγύς της παρακομβικής περιοχής, καθώς και στην παρακομβική και κομβική περιοχή, με τα τελευταία να λειτουργούν ως μάρτυρες. Από αυτή την σειρά πειραμάτων προέκυψε ότι είναι δυνατό να επιτευχθεί επαρκής μυελίνωση σε άξονες που αναπτύσσονται από τους καλλιεργημένους νευρώνες. Επίσης παρατηρήθηκε ότι ο φαινότυπος των *Tag1^{-/-}* ζώων (Traka et al., 2003) διατηρείται σε αυτού του είδους τις καλλιέργειες. Δηλαδή, παρατηρείται διάχυτη κατανομή των συνεντοπιζόμενων, στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές με την TAG-1, πρωτεϊνών (Caspr2 και κανάλια Καλίου) σε *Tag1^{-/-}* νευρώνες, σε αντίθεση με τους νευρώνες που απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν από αγρίου τύπου ζώα (Εικόνα 7.1). Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση

σε αυτές τις καλλιέργειες αποτέλεσε το γεγονός ότι τα μεσοκομβικά τμήματα στις νευρικές ίνες που προέρχονταν από DRG's *Tag1*^{-/-} ζώα εμφανίζονταν κοντύτερα και η μυελίνη τους είχε ανώμαλα κατανομημένη, παρουσιαζόμενη πολύ λεπτότερη ή πολύ φαρδύτερη σε κάποια σημεία, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά.



Εικόνα 3.13: Ο φαινότυπος που παρατηρείται στα TAG-1^{-/-} μεταλλαγμένα ποντίκια διατηρείται σε καλλιέργειες. Εικόνες από καλλιέργειες DRG dissociated TAG-1^{-/-} (A) και αγρίου τύπου (B) νευρώνες. Ανοσοϊστοχημικά πειράματα χρησιμοποιώντας mouse anti-Kv1.1 (κόκκινο), rat anti-MBP (πράσινο) και rabbit anti-PND (μπλε) για την TAG-1^{-/-} καλλιέργεια και mouse anti-Kv1.1 (κόκκινο), rat anti-MBP(πράσινο) και rabbit anti-TAG-1 (μπλε).

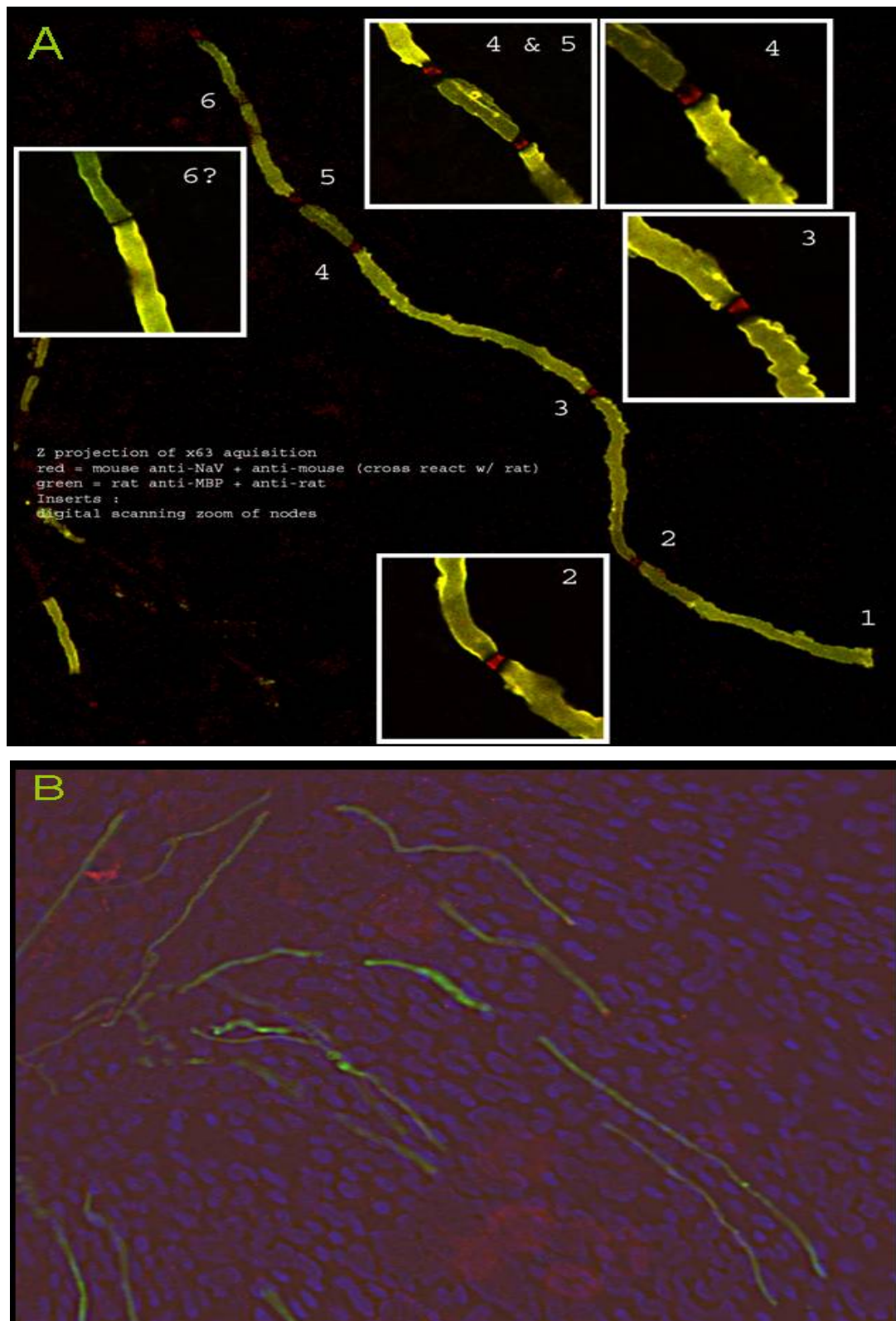
Επίσης επιχειρήθηκαν αρκετοί συνδυασμοί συγκαλλιέργιων με νευρώνες (DRG) προερχόμενους από *Tag1^{-/-}* μεταλλαγμένους μύες και κύτταρα Schwann από αγρίου-τύπου μύες, ή το αντίστροφο. Τα πρώτα στοιχεία από αυτού του τύπου τις καλλιέργειες ήταν ενθαρρυντικά, υποδεικνύοντας ορθή περιέλιξη των αξόνων των κυττάρων Schwann γύρω από τους νευρώνες DRG, με στόχο τη μυελίνωση των τελευταίων(Εικόνα 3.14). Δυστυχώς, μέχρι στιγμής δεν έχει παρατηρηθεί πλήρης μυελίνωση και φυσιολογικός σχηματισμός κόμβων του Ranvier. Το πρόβλημα που παρατηρήθηκε ίσως έχει σχέση με τον χρόνο της διαδικασίας της μυελίνωσης των συγκαλλιέργιων, καθώς και με το γεγονός ότι τέτοιου είδους καλλιέργειες έχουν επιτευχθεί μόνο σε νευρώνες προερχόμενους από επίμυες, μέχρι στιγμής. Κατά συνέπεια ακολουθήθηκαν τα πρωτόκολλα πειραμάτων που αφορούν τον επίμυ, τα οποία μπορεί να μην είναι συμβατά με νευρώνες μυών.



Εικόνα 3.14: Έναρξη περιέλιξης αξόνων κυττάρων Schwann γύρω από νευρώνες DRG σε συγκαλλιέργεια, με στόχο τη μυελίνωση των τελευταίων. Εικόνες από συγκαλλιέργεια DRG explant TAG-1^{-/-} νευρώνων και αγρίου τύπου κύτταρα Schwann. Ανοσοϊστοχημικά πειράματα χρησιμοποιώντας rat anti-MBP (πράσινο).

3.7 *In vitro* και *in vivo* ανάλυση του μήκους μεσοκομβικών τμημάτων νευρικών ινών από *Tag1^{-/-}* και αγρίου τύπου ζώα

Το έλυτρο της μυελίνης είναι μια σημαντική δομή που παράγεται από τα γλοιακά κύτταρα και συμβάλει στην ταχεία και ορθή προώθηση των δυναμικών ενεργείας κατά μήκος των νευραξόνων. Η συνέχεια της μυελίνης διακόπτεται από τον κόμβο του Ranvier, και το εμμέλο διάστημα ανάμεσα σε δύο τέτοιους κόμβους ονομάζεται μεσοκομβικό τμήμα. Μέσω των μεσοκομβικών τμημάτων, και από κόμβο σε κόμβο, διενεργείται η «αλματώδης» προώθηση των δυναμικών ενεργείας. Προηγούμενες έρευνες έχουν προτείνει ότι, είναι πιθανό, η μορφολογία, και πιο συγκεκριμένα το μήκος των μεσοκομβικών τμημάτων στους εμμέλους νευράξονες να επηρεάζει τον ρυθμό μετάδοσης της νευρικής ώσης (για ανασκόπηση βλέπε Sherman and Brophy, 2005). Παραδείγματα σε αυτόν τον τομέα έχουν προκύψει από έρευνες σε διαφορετικούς τομείς και πολλά από αυτά συνηγορούν στο ότι το μήκος των μεσοκομβικών περιοχών των εμμέλων νευρικών ινών εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως οι αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις, η δομή του γλοιακού κυττάρου και η ορθή περιέλιξή του γύρω από τον νευράξονα (Sherman et al, 2001; Court et al, 2004; Darbas et al, 2004; Mendelez-Vasquez et al, 2004). Σε αυτά τα παραδείγματα προστίθεται και η παρατήρηση που έγινε στο εργαστήριό μας, δηλαδή ότι σε καλλιέργειες και συγκαλλιέργειες νοτιαίων αισθητικών γαγγλίων και κυττάρων Schwann μυών (βλέπε κεφάλαιο 3.7) οι εμμέλοι άξονες των καλλιεργημένων *Tag1^{-/-}* νευρώνων παρουσιάζουν διαφορετική μορφολογία από τους αγρίου τύπου άξονες. Τα μεσοκομβικά τμήματα παρουσιάζονται μικρότερα σε μήκος και με μυελίνη ακανόνιστου πάχους κατά μήκος του άξονα (Εικόνα 3.15).



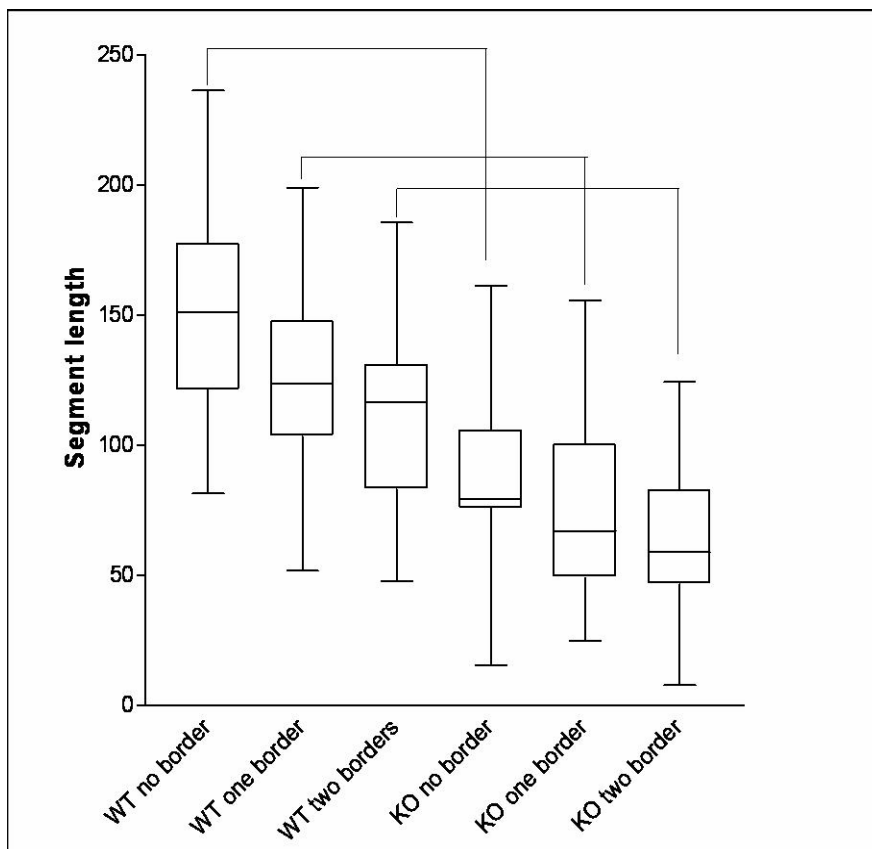
Εικόνα 3.15: Οι εμμέλοι άξονες των καλλιεργημένων TAG-1^{-/-} νευρώνων παρουσιάζονται μικρότεροι σε μήκος και με ανομοιόμορφα κατανεμημένη μυελίνη σε σχέση με τους αντίστοιχους αγρίου τύπου. Εικόνες από DRG dissociated και DRG explant καλλιέργειες TAG-1^{-/-} (A) και αγρίου τύπου (B) νευρώνων, αντίστοιχα. Ανοσοϊστοχημικά πειράματα διενεργήθηκαν χρησιμοποιώντας mouse anti-NaV (πράσινο) and rat anti-MBP (κόκκινο).

Αυτές οι παρατηρήσεις μας ώθησαν στο να διενεργήσουμε μετρήσεις στα μεσοκομβικά τμήματα των καλλιεργημένων DRG νευρώνων και να πραγματοποιήσουμε στατιστική ανάλυση για να επιβεβαιώσουμε εάν όντως οι εμμύελες ίνες των *Tag1^{-/-}* νευρώνων είναι μικρότερες σε μήκος από τις αντίστοιχες αγρίου τύπου.

3.7.1 Ανάλυση του μήκους μεσοκομβικών τμημάτων νευρικών ινών σε καλλιέργειες νευρώνων νοτιαίων γαγγλίων και σε διαχωρισμένες νευρικές ίνες ισχιακών νεύρων.

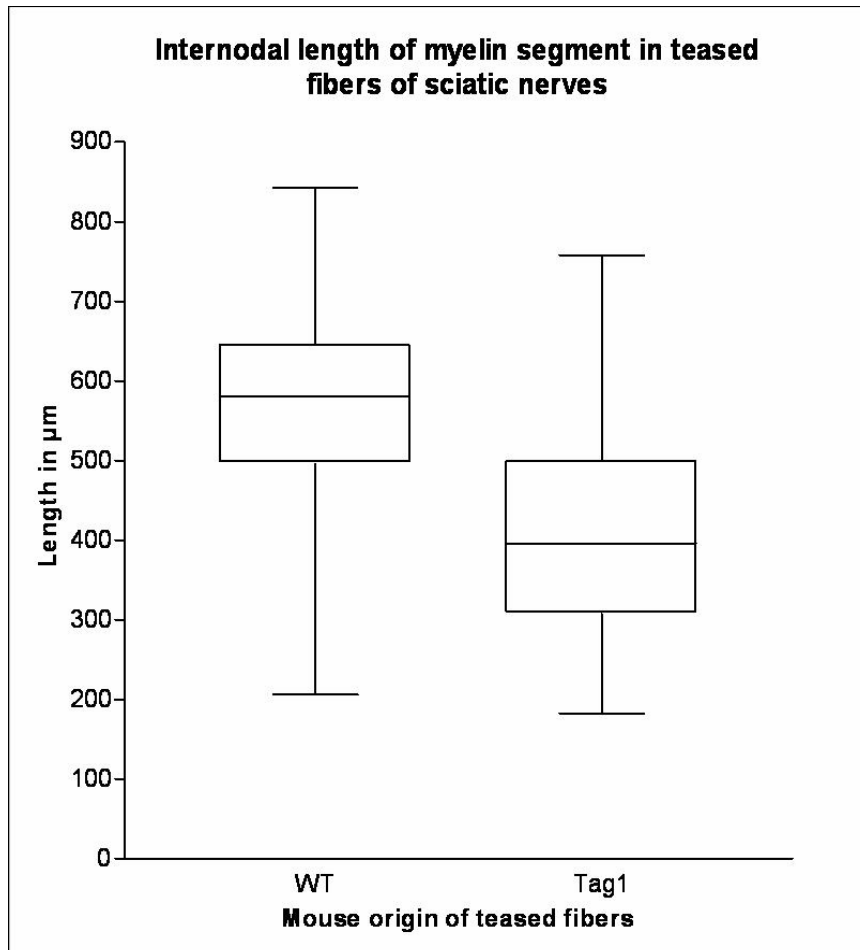
Διενεργήθηκαν μετρήσεις σε δύο βασικές κατηγορίες μεσοκομβικών τμημάτων εμμύελων ινών, α) από αγρίου τύπου καλλιεργημένου DRG νευρώνες με αγρίου τύπου κύτταρα Schwann και β) από *Tag1^{-/-}* καλλιεργημένου DRG νευρώνες με *Tag1^{-/-}* κύτταρα Schwann. Αυτές με τη σειρά τους χωρίστηκαν σε τρεις υποκατηγορίες οι οποίες σχετίζονται με την μορφολογία και τον τρόπο ανάπτυξης των νευραξόνων: 1) ίνες που δεν συνορεύουν (No Border) με άλλες και οριοθετούνται από δύο ημικομβικούς σχηματισμούς (heminodes), 2) ίνες που συνορεύουν με μία ακόμη ίνα και δημιουργούν έναν πλήρη κόμβο του Ranvier και έναν ημικόμβο (μισός κόμβος: heminode) (one border) και 3) ίνες που συνορεύουν και στα δύο άκρα τους με άλλες ίνες και συνεπώς περικλείονται από δύο φυσιολογικά σχηματισμένους κόμβους (two borders). Τα μήκη των μεσοκομβικών τμημάτων μετρήθηκαν κατά μονάδες, από κόμβο σε κόμβο, με την βοήθεια του προγράμματος Metamorph (Molecular Devices), όπου εισήχθησαν οι εικόνες της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης που έγινε στις καλλιέργειες των DRG νευρώνων (βλέπε παράγραφο 3.7.1). Συνολικά μετρήθηκαν τα

μήκη 167 μεσοκομβικών τμημάτων από αγρίου τύπου νευρικές ίνες και 106 από *Tag1^{-/-}* νευρικές ίνες. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Prism (Delta Graph). Η ανάλυση της σύγκρισης μεταξύ μηκών των μεσοκομβικών περιοχών από *Tag1^{-/-}* και αγρίου τύπου καλλιεργημένων νευρώνων έδειξε ότι τα *Tag^{-/-}* μεσοκομβικά τμήματα είναι στατιστικώς σημαντικά (P value: P<0.0001) κοντύτερα από τα αγρίου τύπου (Εικόνα 3.16). Από το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να υποθεθεί πως η παρουσία της πρωτεΐνης TAG-1, εκτός από την ρύθμιση των αξονογλοιακών αλληλεπιδράσεων και την συγκέντρωση των διαύλων καλίου στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή των εμύελων ινών, είναι απαραίτητη και για τον σχηματισμό του φυσιολογικού ελύτρου της μυελίνης.



Εικόνα 3.16: Ανάλυση της σύγκρισης μεταξύ μεσοκομβικών τμημάτων από *Tag1^{-/-}* και αγρίου τύπου καλλιεργημένων νευρώνων. Τα *Tag1^{-/-}* (KO) μεσοκομβικά τμήματα είναι στατιστικώς σημαντικά (P value: P<0.0001) κοντύτερα από τα αγρίου τύπου (WT).

Το επόμενο βήμα σε αυτή τη μελέτη ήταν το να επιβεβαιωθεί εάν κάτι παρόμοιο συμβαίνει *in vivo*. Με ανοσοϊστοχημεία σε ίνες από ισχιακά νεύρα *Tag1^{-/-}* και αγρίου τύπου μυών, χρησιμοποιώντας αντισώματα ειδικά για Caspr και NaV (ειδικά για τις παρακομβικές και κομβικές περιοχές αντίστοιχα), διενεργήθηκαν ανάλογες μετρήσεις σε μεσοκομβικά τμήματα όπως και στις καλλιέργειες DRG νευρώνων. Συνολικά μετρήθηκαν τα μήκη 42 μεσοκομβικών τμημάτων από αγρίου τύπου νευρικές ίνες και 42 από *Tag1^{-/-}*. Και σε αυτήν την περίπτωση η ανάλυση της σύγκρισης μεταξύ μεσοκομβικών τμημάτων από *Tag1^{-/-}* και αγρίου τύπου νευρικές ίνες έδειξε ότι τα *Tag1^{-/-}* μεσοκομβικά τμήματα έχουν στατιστικώς σημαντικά (P value: P<0.0001) μικρότερο μήκος από τα αγρίου τύπου (Εικόνα 8.3). Το τελευταίο αποτέλεσμα αποτελεί μια ισχυρή επαλήθευση της παρατήρησης που έγινε στις καλλιέργειες νευρώνων νωτιαίων γαγγλίων, και μας επιτρέπει να αναφέρουμε ότι, γενικά, σε εμύελες νευρικές ίνες, απουσία της TAG-1, τα μεσοκομβικά τμήματα παρουσιάζονται κοντύτερα, σε σύγκριση με φυσιολογικές νευρικές ίνες που περιέχουν την TAG-1 πρωτεΐνη.



Εικόνα 3.17: Ανάλυση της σύγκρισης μεταξύ μεσοκομβικών τμημάτων από *Tag-1^{-/-}* και αγρίου τύπου νευρικές ίνες. Τα *Tag-1^{-/-}* μεσοκομβικά τμήματα έχουν στατιστικώς σημαντικά (P value: $P < 0.0001$) μικρότερο μήκος από τις αγρίου τύπου (WT).

Κεφάλαιο 4:

Συζήτηση

«Να θυμάστε, από την διαγωγή του ενός εξαρτάται η μοίρα όλων»

-Αλέξανδρος ο Μέγας

4.1 Μοριακές αλληλεπιδράσεις στις κομβικές και περικομβικές περιοχές εμύελων ινών και η σημασία τους σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες του ανθρώπου

Οι εμύελες ίνες του ΠΝΣ και του ΚΝΣ είναι οργανωμένες σε καλά διαχωρισμένες περιοχές, που χαρακτηρίζονται από την παρουσία συγκεκριμένων πρωτεϊνικών συμπλόκων (Peles and Salzer, 2000): τον κόμβο του Ranvier, τις παρακομβικές και τις εγγύς των παρακομβικών περιοχές οι οποίες καθορίζουν και το μεγαλύτερο μέρος της νευρικής ίνας, το μεσοκομβικό τμήμα που καλύπτεται πλήρως από το μυελώδες έλυτρο (για ανασκόπηση βλέπε: Peles and Salzer, 2000; Girault and Peles, 2002; Salzer, 2003). Ο κόμβος του Ranvier παρουσιάζει μεγάλο εμπλουτισμό σε τασεοεξαρτώμενους διαύλους νατρίου, που συνδέονται *in cis* με το σύμπλοκο NrCAM/neurofascin186/ankyrin-G, των οποίων η ορθή συγκέντρωση διασφαλίζει την «αλματώδη» προώθηση των δυναμικών ενεργείας στους νευράξονες (Jenkins and Bennett, 2001; Schafer et al, 2006). Στις παρακομβικές περιοχές, οι παρακομβικοί δακτύλιοι της μυελίνης έρχονται σε επαφή με τον νευρικό κύτταρο μέσω διαφραγματοσυνδέσμων (septate-like), οι οποίοι διαμεσολαβούνται από το νευραξονικό σύμπλοκο Caspr/contactin και το γλοιακό μόριο neurofascin155 (Rios et al, 2000; Faivre-Sarrailh et al, 2000; Charles et al, 2002; Sherman et al, 2005). Οι εγγύς των παρακομβικών περιοχές παρουσιάζουν υψηλή συγκέντρωση σε τύπου Shaker δίαυλους καλίου, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με την Caspr2 και πιθανώς την TAG-1 *in cis* στον νευράξονα, με το σύμπλοκο αυτό να αλληλεπιδρά *in trans* με την γλοιακή TAG-1 (Traka et al, 2003; Brophy, 2003). Παρόλο που ο ρόλος των διαύλων καλίου δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, πιστεύεται ότι και η δική τους φυσιολογική συγκέντρωση στην εγγύς παρακομβική περιοχή συμβάλει στην ταχεία μετάδοση των δυναμικών ενεργείας

κατά μήκος των νευραξόνων. Πιο συγκεκριμένα, εικάζεται ότι τα Κν βοηθούν στην επαναπόλωση του άξονα έπειτα από την προώθηση του δυναμικού ενεργείας (Brophy, 2003). Οι περιοχές που προαναφέρθηκαν διασφαλίζουν την συγκέντρωση των διαύλων νατρίου και καλίου σε συγκεκριμένες περιοχές, γύρω από και, στον κόμβο καθώς και την συγχρονισμένη λειτουργία τους, που είναι απαραίτητη για την ορθή και ταχεία (αλματώδη) προώθηση των δυναμικών ενεργείας. Οι περιοχές αυτές, όπως και τα μακρομοριακά σύμπλοκα που διαμεσολαβούν τις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις τους, προσβάλλονται εύκολα και υπόκεινται σοβαρή αποδιοργάνωση σε περιπτώσεις αυτοάνοσων ασθενειών της μυελίνης όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας (multiple sclerosis ή MS), το σύνδρομο Guillain-Barre ή η ασθένεια Charcot-Marie-Tooth, που χαρακτηρίζονται από απομυελίνωση και εκφυλισμό των νευρικών ινών στο ΚΝΣ και στο ΠΝΣ, αδυναμία προώθησης των δυναμικών ενεργείας και κινητικές δυσλειτουργίες των ατόμων που πάσχουν από αυτές. Ειδικά στην περίπτωση της MS, όπου η απομυελίνωση των νευραξόνων ακολουθείται από προσπάθειες του οργανισμού για, συνήθως αποτυχημένη, επαναμυελίνωση, τα τελευταία χρόνια έχουν προκύψει εκτεταμένες μελέτες που αφορούν τις αλλαγές στις εξειδικευμένες περιοχές του κόμβου, των παρακομβικών και εγγύς των παρακομβικών τμημάτων κατά την πρόοδο της ασθένειας (για ανασκόπηση βλέπε Zawadzka and Franklin, 2007). Από έρευνες σε ιστό ασθενών που έπασχαν από MS βρέθηκε ότι κατά την απομυελίνωση των νευρικών ινών του ΚΝΣ η μοριακή οργάνωση της παρακομβικής περιοχής διαταράσσεται, και πιο συγκεκριμένα ότι η γλοιακή πρωτεΐνη neurofascin155 που αλληλεπιδρά με το παρακομβικό αξονικό σύμπλοκο Caspr/contactin δεν εντοπίζεται στην συγκεκριμένη περιοχή (Howell et al, 2006). Η παρακομβική περιοχή εξυπηρετεί τον διαχωρισμό των διαύλων νατρίου, που είναι συνήθως συγκεντρωμένοι στον κόμβο, και των διαύλων καλίου, που είναι συγκεντρωμένοι στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή υπό

φυσιολογικές συνθήκες. Η καταστροφή της μοριακής οργάνωσης της παρακομβικής περιοχής οδηγεί στην διάχυση των διαύλων καλίου προς τον κόμβο, γεγονός το οποίο συνεπάγεται μείωση της ταχύτητας μετάδοσης των δυναμικών ενεργείας κατά μήκος του νευράξονα. Κάτι ανάλογο έχει αναφερθεί στο παρελθόν και σε διαγονιδιακά ζώα που είτε φέρουν μεταλλάξεις σε πρωτεΐνες σχετιζόμενες με την ανάπτυξη της μυελίνης, όπως οι *jimpy* μύες (μετάλλαξη στην πρωτεΐνη PLP) ή οι επίμυες που δεν εκφράζουν γαλακτοκερεβροσίδιο (Aigouo et al, 2002), είτε φέρουν μεταλλάξεις σε πρωτεΐνες-συστατικά της παρακομβικής αξονογλοιακής αλληλεπίδρασης, όπως η Caspr, η contactin ή η neurofascin155 (Rios et al, 2000; Boyle et al, 2001; Sherman et al, 2005), όπου η αποδιοργάνωση της παρακομβικής περιοχής οδήγησε στην διάχυση, εκτός από την παρακομβική πρωτεΐνη Caspr, και των εγγύς των παρακομβικών διαύλων καλίου προς την παρακομβική περιοχή. Παρόλα αυτά, σε περιοχές όπου εμφανίστηκε επαναμυελίνωση σε νευρικές ίνες, η neurofascin155 και η Caspr εντοπίστηκαν φυσιολογικά στην παρακομβική περιοχή καθώς και οι δίαυλοι καλίου στην εγγύς παρακομβική, καταδεικνύοντας ότι η επιδιόρθωση του μυελώδους ελύτρου συνδέεται με την ορθή αναδιάρθρωση αυτών των περιοχών. Από άλλη έρευνα, επίσης σε ιστό ασθενών που έπασχαν από MS, βρέθηκε ότι διαταράσσεται, εκτός από τον κόμβο και την παρακομβική περιοχή, και η μοριακή οργάνωση της εγγύς της παρακομβικής περιοχής, κατά την απομυελίνωση των νευρικών ινών του ΚΝΣ. Σε αυτή τη μελέτη αναφέρονται η μερικώς συγκεντρωμένη κατανομή των κομβικών διαύλων νατρίου και η διάχυτη κατανομή της παρακομβικής πρωτεΐνης Caspr και των εγγύς των παρακομβικών πρωτεϊνών Caspr2 και διαύλων K_v σε νευράξονες απομυελινωμένων περιοχών (Coman et al, 2006). Ακόμη, αναφέρεται και η συγκέντρωση των παραπάνω μορίων σε συγκεκριμένες θέσεις που ομοιάζουν με την οργάνωση των κομβικών, παρακομβικών και εγγύς των παρακομβικών περιοχών αντίστοιχα, πριν την έναρξη της

επαναμυελίνωσης. Μάλιστα, παραθέτονται αποδεικτικά στοιχεία τα οποία υποστηρίζουν την θεωρία ότι η επαναμυελίνωση σε ασθενείς MS «αντιγράφει» την διαδικασία της φυσιολογικής δημιουργίας του κόμβου του Ranvier κατά την ανάπτυξη, με την συγκέντρωση των διαύλων νατρίου να αποτελεί το αρχικό γεγονός, ακολουθούμενη από την συγκέντρωση των παρακομβικών και εγγύς των παρακομβικών αξονικών πρωτεϊνών. Πάντως και στην περίπτωση μελετών σε διαγονιδιακούς μύες με μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες των εγγύς των παρακομβικών περιοχών, όπως Caspr2 (Poliak et al, 2003) και TAG-1 (Traka et al, 2003), παρατηρήθηκε παρόμοια διάχυτη κατανομή των διαύλων καλίου (και της Caspr2 στην δεύτερη περίπτωση) με αυτή που υπάρχει στους νευράξονες απομυελινωμένων περιοχών του εγκεφάλου ασθενών με MS, ενώ στις μελέτες που διενεργήθηκαν στα *CGT^{-/-}* ζώα παρατηρήθηκε μετατόπιση των εγγύς των παρακομβικών μορίων TAG-1, Caspr2 και Kv προς την παρακομβική περιοχή (Poliak et al, 2001; Traka et al, 2002).

Από τις βασικότερες προκλήσεις στην έρευνα για τις αυτοάνοσες ασθένειες της μυελίνης είναι η κατανόηση του λόγου του εκφυλισμού των νευραξόνων που υπόκεινται απομυελίνωση κατά τις ασθένειες αυτές καθώς και η ανακάλυψη τρόπων διόρθωσης αυτού του φαινοτύπου ή βελτίωσης της ενδογενούς επαναμυελίνωσης. Ένα από τα πρώτα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα κατά τη πρόοδο τέτοιων ασθενειών είναι η αποδιοργάνωση της σύνδεσης μεταξύ του μυελώδους ελύτρου και του νευράξονα (Brophy, 2001) με αποτέλεσμα, όπως γίνεται αντιληπτό από τις προαναφερθείσες έρευνες, την διαταραχή των μοριακών αξονογλοιακών αλληλεπιδράσεων που διαμεσολαβούν αυτήν την σύνδεση. Επίσης, ενισχύεται η θεωρία ότι τα μόρια κυτταρικής συνάφειας που συμμετέχουν στα σύμπλοκα των αξονογλοιακών επιδράσεων, δεν είναι σημαντικά μόνο για την οργάνωση/συντήρηση

των περιοχών του κόμβου και τον διαχωρισμό των διαύλων νατρίου και καλίου για την διάδοση των δυναμικών ενεργείας αλλά διαδραματίζουν σοβαρό ρόλο και στην διαδικασία επαναμυελίνωσης των νευραξόνων. Συνεπώς, είναι πρωτίστως σημαντική η πλήρης κατανόηση των αξονογλοιακών αλληλεπιδράσεων, που συντελούνται στις κομβικές και περικομβικές περιοχές, για την αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών και αυτοάνοσων διαταραχών της μυελίνης. Στην κατεύθυνση αυτή παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον ο εντοπισμός και η αποσαφήνιση των αλληλεπιδράσεων μορίων που εκφράζονται στις καθορισμένες υπό-περιοχές της εμύελης νευρικής ίνας. Παρόλο που πολλές και σημαντικές πτυχές των αλληλεπιδράσεων αυτών έχουν ερευνηθεί και αναλυθεί, υπάρχουν ακόμη ερωτηματικά. Με βάση τα παραπάνω, μελετήσαμε στην παρούσα έρευνα τον εντοπισμό, τις αλληλεπιδράσεις (και τις επιπτώσεις τους) μορίων στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή των εμύελων νευρικών ινών και πιο συγκεκριμένα τον ρόλο που διαδραματίζει το IgSF μόριο κυτταρικής συνάφειας TAG-1 στην περιοχή αυτή.

4.2 Μοριακές αλληλεπιδράσεις στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή και λειτουργική ανάλυση των επιμέρους δομικών περιοχών της πρωτεΐνης TAG-1

Προηγούμενες έρευνες από το εργαστήριο μας έδειξαν ότι το IgSF μόριο κυτταρικής συνάφειας, με τμήμα GPI, TAG-1 συνεντοπίζεται και αλληλεπιδρά με το μέλος των neurexins Caspr2 και τους διάυλους καλίου, στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές εμύελων ινών στο ΚΝΣ και στο ΠΝΣ, διαμεσολαβώντας την αξονογλοιακή σύνδεση και την συγκράτηση των υπολοίπων πρωτεϊνών σε αυτές τις περιοχές (Traka et al, 2002; Traka et al, 2003). Με την Caspr2 μάλιστα έχει αναφερθεί απευθείας αλληλεπίδραση της TAG-1 (Traka et al, 2003). Επιπροσθέτως, έχει δειχθεί ότι η TAG-1 εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη των νευρικών κυττάρων όπως και των γλοιακών (ολιγοδενδροκυττάρων και κυττάρων Schwann) (Traka et al, 2002), πράγμα το οποίο ισχύει και για άλλες IgSF πρωτεΐνες, όπως η L1 ή η F3/contactin (Itoh et al, 2000; Rios et al, 2000), και έχει την δυνατότητα να αλληλεπιδρά με τον εαυτό της σε επίπεδο διαφορετικών μεμβρανών (*in trans*) μέσω των φιμπρονεκτινικών της περιοχών (Tsiotra et al, 1996; Pavlou et al, 2002). Επίσης μπορεί να συνάπτει ετεροφιλικές συνδέσεις *in cis* με άλλα μόρια, όπως η L1 και η NrCAM, μέσω των ανοσοσφαιρινικών της περιοχών (Pavlou et al, 2002; Malhotra et al, 1998). Ακόμη, στην παρακομβική περιοχή έχει αποδειχθεί η ύπαρξη *in cis* αλληλεπίδρασης της IgSF πρωτεΐνης, με GPI-τμήμα, F3/contactin με μια άλλη neurexin, την Caspr/paranodin, στο αξονόλημα και *in trans* αλληλεπίδρασης του συμπλόκου contactin/Caspr με το γλοιακό μόριο κυτταρικής συνάφειας neurofascin155 (Rios et al, 2000; Charles et al, 2002). Έτσι, εξήχθη το συμπέρασμα ότι τα μέλη της υπερικογένειας των neurexin πρωτεϊνών και τα IgSF-CAMs με τμήμα GPI σχηματίζουν *in cis* συντηρημένα σύμπλοκα, που αλληλεπιδρούν *in trans* με γλοιακά CAMs, τα οποία είναι σημαντικά

για την οργάνωση διαφορετικών αξονικών τμημάτων στις κομβικές περιοχές εμμύελων ινών (Traka et al, 2003). Λαμβάνοντας όλα τα παραπάνω υπ' όψη, προτείνουμε την υπόθεση εργασίας ότι στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή η αξονική TAG-1 αλληλεπιδρά *in trans* με τον εαυτό της στην γλοία και *in cis* με την Caspr2 και, ίσως μέσω μιας άλλης πρωτεΐνης, με τους διαύλους καλίου στο αξονόλημα (Traka et al, 2003).

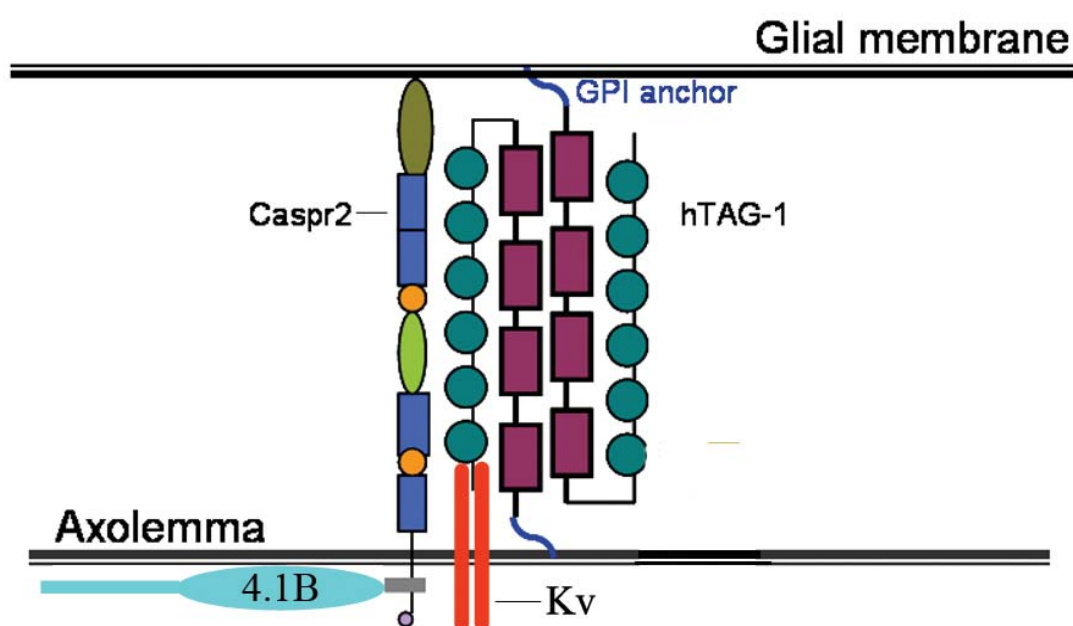
Στην παρούσα έρευνα, για να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης του συμπλόκου Caspr2/TAG-1 με τους διαύλους καλίου διενεργήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμισης σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από ιστό (εγκέφαλος) μυών αγρίου τύπου και διαγονιδιακών *Tag1^{-/-}* καθώς και πειράματα διαμόλυνσης HEK κυττάρων. Παρόλο που σε προηγούμενες μελέτες είχε αναφερθεί η απ' ευθείας αλληλεπίδραση της TAG-1 με την Caspr2 (Traka et al, 2003), κάτι ανάλογο δεν είχε διερευνηθεί για την πιθανότητα άμεσης αλληλεπίδρασης των διαύλων καλίου με την Caspr2. Έτσι σε πείραμα διπλής διαμόλυνσης HEK κυττάρων με Caspr2 και διαύλους καλίου αποδείξαμε ότι δεν υπάρχει άμεση σύνδεση των μορίων αυτών, όπως αποκαλύπτεται από ανοσοκατακρήμιση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος των διαμολυσμένων κυττάρων με αντισώματα ειδικά για Caspr2 και Kv. Το αποτέλεσμα αυτό ενίσχυσε την θέση που υποστήριζε ότι η αλληλεπίδραση της Caspr2 με τους διαύλους καλίου διαμεσολαβείται από μια τρίτη πρωτεΐνη, που πιθανώς εμπεριέχει PDZ περιοχή. Παρ' όλα αυτά η μοναδική πρωτεΐνη που είχε ανιχνευθεί μέχρι στιγμής να εκφράζεται στο αξονόλημα της εγγύς της παρακομβικής περιοχής και να περιέχει πολλαπλές PDZ περιοχές, η MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) PSD-95, βρέθηκε ότι δεν αλληλεπιδρά άμεσα με τους διαύλους καλίου και δεν ευθύνεται για την συγκέντρωσή τους στην περιοχή (Rasband et al, 2002). Επίσης, ήταν γνωστό

ότι σε διαγονιδιακά ζώα που δεν εκφράζουν TAG-1 οι διάλυλοι καλίου αδυνατούν να συγκεντρωθούν στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή και παρουσιάζονται διάχυτοι στο μεσοκομβικό τμήμα της νευρικής ίνας (Traka et al, 2003), γεγονός που καταδεικνύει στενή σχέση των δύο μορίων. Έτσι το ενδιαφέρον μας στράφηκε στην TAG-1, η οποία είχε αναφερθεί στο παρελθόν ότι διαθέτει την ικανότητα *in cis* και *in trans* σύνδεσης με άλλα μόρια, μέσω των ανοσοσφαιρινικών της περιοχών κατά την ανάπτυξη των νευρικών κυττάρων (Malhotra et al, 1998; Pavlou et al, 2002). Χρησιμοποιώντας, αρχικά, πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από εγκεφάλους μυών αγρίου τύπου αλλά και *Tag1^{-/-}* για πειράματα ανοσοκατακρήμνισης με αντίσωμα ειδικό για την TAG-1, παρατηρήθηκε ότι υπάρχει σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ της πρωτεΐνης TAG-1 και των διαύλων καλίου στα αγρίου τύπου ζώα, καθώς παρουσία της TAG-1 εντοπίζονται οι διάλυλοι καλίου ενώ στην περίπτωση των *Tag1^{-/-}* ζώων δεν εντοπίζονται. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην περαιτέρω διερεύνηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ TAG-1 και Kv, σε διαμολυσμένα κύτταρα HEK, όπου επίσης παρατηρήθηκε η, απ' ευθείας αυτή τη φορά, σύνδεση των δύο μορίων. Τα παραπάνω αποτελέσματα καταρρίπτουν λοιπόν την έως τώρα θεωρία που ήθελε την αλληλεπίδραση του συμπλόκου Caspr2/TAG-1 με τους διαύλους καλίου να διαμεσολαβείται από ένα τέταρτο, άγνωστο, μόριο που περιέχει PDZ-τμήμα. Επίσης, γίνεται κατανοητή η σημασία του ρόλου που διαδραματίζει η TAG-1 στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή, καθώς αναδεικνύεται στο βασικό μόριο που διαμεσολαβεί τις *in trans* αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις αλλά και την συγκέντρωση των υπολοίπων πρωτεϊνών στην μεμβράνη του νευράξονα, στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή. Έτσι η κατανόηση των μηχανισμών σύνδεσης της TAG-1 με τα άλλα μόρια της περιοχής και της συμβολής, σε αυτούς, των επιμέρους δομικών περιοχών του μορίου,

θεωρήθηκε επιβεβλημένη για να αποσαφηνιστεί πλήρως ο μηχανισμός σύνδεσης του μακρομοριακού συμπλόκου της εγγύς της παρακομβικής περιοχής.

Για τον λόγο αυτό κατασκευάστηκαν DNA κατασκευές που φέρουν είτε τις ανοσοσφαιρινικές (IgC₂) είτε τις φμπρονεκτινικές (FN_{III}) περιοχές της TAG-1, συνδεδεμένες με την GFP πρωτεΐνη και χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα πολλαπλής διαμόλυνσης κυττάρων HEK και ανοσοκατακρήμνισης σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέρχονταν από τα διαμολυσμένα κύτταρα. Σε πρώτη φάση διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση των ανοσοσφαιρινικών περιοχών της TAG-1 με τους διαύλους καλίου, όπου παρατηρήθηκε απευθείας σύνδεση των περιοχών αυτών με τα Κν. Αντιθέτως δεν παρουσιάστηκε αλληλεπίδραση των φμπρονεκτινικών περιοχών της TAG-1 με τους διαύλους καλίου, γεγονός που επιτρέπει την εξαγωγή του συμπεράσματος ότι η πρωτεΐνη TAG-1 συνδέεται απ' ευθείας με τους διαύλους καλίου, μέσω των ανοσοσφαιρινικών της περιοχών. Παρόμοια πειράματα διεξήχθησαν και για την ανεύρεση των δομικών τμημάτων της TAG-1 που αλληλεπιδρούν με την neurexin Caspr2. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων έδειξαν ότι και η Caspr2 συνδέεται απ' ευθείας με τις ανοσοσφαιρινικές περιοχές της TAG-1, ενώ δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση με τις φμπρονεκτινικές περιοχές της TAG-1. Συνεπώς και η Caspr2 συνδέεται απ' ευθείας με την TAG-1, μέσω των ανοσοσφαιρινικών περιοχών της δεύτερης, όπως και οι διάλυλοι καλίου, συμπληρώνοντας την εικόνα της *in cis* αλληλεπίδρασης των εγγύς των παρακομβικών μορίων. Τα αποτελέσματα αυτά είναι τα πρώτα που απευθύνονται σε ερωτήματα δομικής φύσης, τα οποία εμπλέκονται στις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις που ευθύνονται για την οργάνωση εμμέλων νευραξόνων. Οδηγούν δε στο συμπέρασμα ότι η αξονική TAG-1 συνάπτει *in cis* ετεροφιλικές συνδέσεις με την Caspr2 και τα

Kv, μέσω των ανοσοσφαιρινικών δομικών περιοχών της, ενώ οι φιμπρονεκτινικές της περιοχές προφανώς συνδέονται *in trans* με τις αντίστοιχες περιοχές της γλοιακής TAG-1, στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές των εμμύελων νευρικών ινών. Τέλος, από ανοσοϊστοχημικές μελέτες που διενεργήθηκαν σε διαχωρισμένες ίνες ισχιακών νεύρων, από μύες αγρίου τύπου και *Tag1^{-/-}*, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η TAG-1 πολύ πιθανώς δεν αλληλεπιδρά με την χασματοσυνδετική πρωτεΐνη Cx29, η οποία επίσης εντοπίζεται σε μεγάλο βαθμό στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή, καθώς κατά την απουσία της πρώτης (*Tag1^{-/-}* ζώα) η δεύτερη συγκεντρώνεται φυσιολογικά στην εν λόγω περιοχή. Έτσι το προτεινόμενο μοντέλο των μοριακών αλληλεπιδράσεων στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή που προτάθηκε στο παρελθόν (Traka et al, 2003), μπορεί πλέον να τροποποιηθεί και να αντικατασταθεί με την διάταξη που παρατίθεται στο σχήμα 4.1 (Tzimourakas et al, 2007).



Εικόνα 4.1: Προτεινόμενο μοντέλο της μοριακής οργάνωσης της εγγύς της παρακομβικής περιοχής. Σχηματική αναπαράσταση της ομοφιλικής αλληλεπίδρασης δύο μορίων TAG-1, ενός γλοιακού κι ενός νευραξονικού, μέσω των φιμπρονεκτινικών περιοχών τους (μοβ ορθογώνια) και για τις ετεροφιλικές αλληλεπιδράσεις της TAG-1, με την Caspr2 και τα Kv, μέσω των ανοσοσφαιρινικών της περιοχών (πράσινοι κύκλοι).

4.3 Μελέτες διάσωσης (rescue) του φαινοτύπου των *Tag1^{-/-}* μυών με την δημιουργία των PLP και Thy-1 DNA κατασκευών

Για την επιβεβαίωση της αξονογλοιακής ομοφιλικής σύνδεσης μεταξύ δύο μορίων TAG-1 στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή, που όπως προαναφέρθηκε θεωρείται πολύ πιθανό να πραγματοποιείται μέσω των φιμπροεκτινικών περιοχών της πρωτεΐνης, δημιουργήθηκαν DNA κατασκευές οι οποίες θα καταστήσουν δυνατή την δημιουργία, σε συνδυασμό με τους διαγονιδιακούς μύες που δεν εκφράζουν την TAG-1, διαγονιδιακών μυών που θα εκφράζουν την TAG-1 σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, δημιουργήθηκε DNA κατασκευή που κωδικοποιεί την αλληλουχία της TAG-1 μαζί με τον υποκινητή του γονιδίου της PLP πρωτεΐνης (PLP-TAG-1 κατασκευή), μίας από τις βασικές πρωτεΐνες των ολιγοδενδροκυττάρων, και οδηγεί την έκφραση του cDNA της TAG-1 στα ολιγοδενδροκύτταρα. Ο ίδιος υποκινητής έχει χρησιμοποιηθεί και σε προηγούμενες μελέτες για έκφραση πρωτεϊνών σε ολιγοδενδροκύτταρα σε διαγονιδιακά ζώα (Wight et al., 1993; Fuss et al., 2001). Επίσης δημιουργήθηκε και δεύτερη DNA κατασκευή, που κωδικοποιεί την αλληλουχία της TAG-1 μαζί με τον υποκινητή του γονιδίου της Thy1 πρωτεΐνης (Thy1-TAG-1 κατασκευή), η οποία οδηγεί την έκφραση του cDNA της TAG-1 σε νευρώνες (Gordon et al., 1987; Vidal et al., 1990; Caroni, 1997). Οι δύο αυτές κατασκευές εάν εννεθούν σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωοκυττάρων προερχομένων από άτομα *Tag1^{-/-}* θα οδηγούσαν σε παραγωγή ετερόζυγων ατόμων που θα έφεραν την αντίστοιχη μετάλλαξη στο γονιδιώμά τους, κι έτσι διασταύρωση μεταξύ τέτοιων ετερόζυγων ατόμων θα απέφερε ομόζυγα άτομα που θα εξέφραζαν την TAG-1 στα ολιγοδενδροκύτταρα ή στους νευρώνες αντίστοιχα. Αυτή η στρατηγική απέτυχε, καθώς οι ενέσεις των DNA κατασκευών σε *Tag1^{-/-}* μύες δεν

απέφεραν κανέναν απόγονο και πολύ συχνά η εγκυμοσύνη των ζώων αυτών τερματιζόταν πρόωρα, ίσως λόγω κάποιας άγνωστης σε εμάς δυσλειτουργίας του αναπαραγωγικού συστήματος που προκαλεί η έλλειψη της TAG-1 σε συνδυασμό με τις ενέσεις των DNA κατασκευών ή λόγω αυξημένου στρες στα *Tag1^{-/-}* ζώα. Έτσι αποφασίστηκε η ένεση των DNA κατασκευών σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωοκυττάρων προερχομένων από άτομα F1 (C57B110xCBA). Άτομα που θα έφεραν την εκάστοτε μεταλλαγή θα διασταυρώνονταν μεταξύ τους για την παραγωγή ομόζυγων ατόμων τα οποία στη συνέχεια θα διασταυρώνονταν με τα *Tag1^{-/-}* ζώα. Μετά τις 3 πρώτες διασταυρώσεις θα υπήρχε δημιουργία μυών που θα εξέφραζαν το γονίδιο της TAG-1 επιλεκτικά στα ολιγοδενδροκύτταρα ή στους νευρώνες μόνο, αντίστοιχα. Αυτή η διαδικασία αποδείχτηκε εξαιρετικά χρονοβόρα, γεγονός που πολύ πιθανώς προσάπτεται και στο εξαιρετικά μεγάλο μέγεθος της PLP-TAG-1 κατασκευής (δεν μπορεί να ειπωθεί κάτι παρόμοιο για την κατασκευή ThyI-TAG-1 καθώς είναι σαφώς μικρότερη αλλά έγιναν και πολύ λιγότερες προσπάθειες ένεσής της σε F1 ζώα), και παρ' όλες τις πολλαπλές προσπάθειες δημιουργίας ομόζυγων ατόμων που να εκφράζουν την TAG-1 στα ολιγοδενδροκύτταρα ή στους νευρώνες αντίστοιχα, δεν κατέστη δυνατό μέχρι σήμερα κάτι τέτοιο.

4.4 Μελέτη της έκφρασης της TAG-1 και των αλληλεπιδράσεών της με χρήση καλλιεργείων νωτιαίων γαγγλίων (Dorsal Root Ganglia: DRG)

Για να εξεταστεί περαιτέρω ο ρόλος της TAG-1 στον σχηματισμό αξονογλοιακών συνδέσμων, όπως και για να αποσαφηνιστεί η γλοιακή ή νευρωνική της δράση στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές των εμμύελων ινών, χρησιμοποιήθηκε μια εναλλακτική προσέγγιση πέρα από τις DNA κατασκευές που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 4.3. Στο παρελθόν έχουν περιγραφεί μελέτες σε καλλιέργειες νωτιαίων αισθητικών γαγγλίων (Dorsal Root Ganglia ή DRG) και συν-καλλιέργειες DRG's με κύτταρα Schwann, προερχόμενα από επίμυες, οι οποίες υπόκεινται σε μυελίνωση *in vitro* με την χρήση κατάλληλων θρεπτικών μέσων, όπου είναι δυνατό να μελετηθούν ευκολότερα οι αναπτυξιακές φάσεις του ελύτρου της μυελίνης γύρω από τους νευράξονες καθώς και η συμμετοχή διαφόρων μορίων στις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις (Einheber et al, 1997; Svenningsen et al, 2003). Έτσι επιχειρήσαμε πειράματα καλλιέργειας και συγκαλλιέργειας νευρώνων νωτιαίων αισθητικών γαγγλίων και κυττάρων Schwann, σε συνθήκες που επιτρέπουν *in vitro* μυελίνωση, απομονώνοντας DRG νευρώνες και κύτταρα Schwann από μύες αγρίου τύπου αλλά και *Tag1^{-/-}*. Σε περίπτωση που θα συγκαλλιεργούνταν DRG νευρώνες, απομονωμένοι από αγρίου τύπου ζώα, με κύτταρα Schwann, απομονωμένα από *Tag1^{-/-}* ζώα, ή ο αντίστροφος συνδυασμός, θα μπορούσε να παρατηρηθεί εάν η αξονική TAG-1, ή η γλοιακή, είναι σε θέση να διεκπεραιώσει την αξονογλοιακή αλληλεπίδραση στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή και να αποδειχτεί εάν όντως πραγματοποιείται ομοφυλική σύνδεση *in trans* μεταξύ δύο μορίων TAG-1. Στην πρώτη φάση αυτής της σειράς πειραμάτων, σε απλές καλλιέργειες ανέπαφων (explants) αισθητικών γαγγλίων αλλά και διαχωρισμένων (dissociated) DRG νευρώνων που προήλθαν από αγρίου

τύπου και *Tag1^{-/-}* ζώα διαπιστώθηκε η ανάπτυξη μυελώδους ελύτρου και ο φυσιολογικός σχηματισμός κόμβων του Ranvier, γεγονός που αποτέλεσε μια από τις ελάχιστες τέτοιες παρατηρήσεις μέχρι σήμερα σε κύτταρα προερχόμενα από μύες. Επίσης, μετά από ανοσοϊστοχημικό έλεγχο, παρατηρήθηκε ότι η φυσιολογική οργάνωση της κομβικής και των περικομβικών περιοχών που συναντάται στους αγρίου τύπου μύες συναντάται και στις καλλιέργειες νευρώνων που προέρχονται από τον ίδιο τύπο ζώων, ενώ και στις καλλιέργειες νευρώνων που προέρχονται από *Tag1^{-/-}* μύες παρουσιάζεται ο ίδιος φαινότυπος που παρατηρείται στα *Tag1^{-/-}* ζώα (δηλαδή απουσία της TAG-1 υπάρχει διάχυτη κατανομή των διαύλων καλίου και της Caspr2 από την εγγύς της παρακομβικής περιοχή προς το μεσοκομβικό τμήμα). Αφού κατέστη δυνατό να αναπαράγουμε *in vitro* τις συνθήκες που επικρατούν στις εμμύελες νευρικές ίνες των μυών και να τις καλλιεργήσουμε επιτυχώς, ακολούθησαν πολλαπλές προσπάθειες συγκαλλιέργειας DRG νευρώνων, προερχόμενων από αγρίου τύπου ζώα, με κύτταρα Schwann, προερχόμενων από *Tag1^{-/-}* ζώα, και ο αντίστροφος συνδυασμός, για τη διερεύνηση του ρόλου της αξονικής και γλοιακής TAG-1. Παρόλο που οι DRG νευρώνες, αγρίου τύπου και *Tag1^{-/-}*, προέβαλλαν νευράξονες και αναπτύσσονταν φυσιολογικά στην καλλιέργεια, όπως και τα κύτταρα Schwann αγρίου τύπου και *Tag1^{-/-}*, όταν επιχειρήθηκαν συγκαλλιέργειες, δηλαδή εναπόθεση των καλλιεργημένων κυττάρων Schwann επάνω σε καλλιεργημένους DRG νευρώνες απαλλαγμένους από τα ενδογενή κύτταρα Schwann, δεν κατέστη δυνατή η φυσιολογική μυελίνωση των νευραξόνων από τα γλοιακά κύτταρα. Δυστυχώς όμως κάτι παρόμοιο παρατηρήθηκε και στα πειράματα μάρτυρες (controls), όπου συγκαλλιεργήθηκαν νευρώνες και κύτταρα Schwann αγρίου τύπου ή *Tag1^{-/-}*. Πολύ συχνά παρατηρήθηκε εκφυλισμός των καλλιεργημένων κυττάρων Schwann και νευρώνων και αποκόλλησή τους από τα τριβλία καλλιέργειας ενώ σε

ανοσοϊστοχημική ανάλυση των συγκαλλιέργειών αυτών, σε κάποιες περιπτώσεις, εντοπίστηκαν αρχικά στάδια μυελίνωσης, δηλαδή περιέλιξη των γλοιακών κυττάρων και έκφραση της MBP πρωτεΐνης γύρω από τους νευράξονες. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι, μέχρι στιγμής τουλάχιστον, η συγκαλλιέργεια αδυνατεί να δημιουργήσει μυελίνη ανεξαρτήτως της προέλευσης των κυττάρων και ύπαρξης ή μη της πρωτεΐνης TAG-1 στην γλοία ή στον νευράξονα. Το πρόβλημα αυτό αρχικά θεωρήθηκε ότι έχει σχέση με τον χρόνο της διαδικασίας της μυελίνωσης των συγκαλλιέργειών, καθώς θα μπορούσε να είναι απαραίτητο μεγαλύτερο χρονικό διάστημα καλλιέργειας για την επίτευξη της μυελίνωσης. Αυτή η εκδοχή εξετάστηκε και σε επόμενες συγκαλλιέργειες αλλά, παρόλη την αύξηση του χρόνου συγκαλλιέργειας των DRG νευρώνων και κυττάρων Schwann με θρεπτικό μέσο που προάγει την μυελίνωση, δεν παρατηρήθηκε κάποια δραματική αλλαγή σε σχέση με προηγούμενες συγκαλλιέργειες. Ο επικρατέστερος λόγος της αποτυχίας μυελίνωσης στις συγκαλλιέργειες αυτές είναι πιθανώς το ότι τέτοιου είδους συγκαλλιέργειες έχουν επιτευχθεί μόνο με DRG νευρώνες προερχόμενους από επίμυες, μέχρι στιγμής, και κατά συνέπεια ακολουθήθηκαν τα πρωτόκολλα πειραμάτων που αφορούν το συγκεκριμένο πειραματόζωο. Τα πρωτόκολλα αυτά είναι πιθανό να μην είναι συμβατά με τους νευρώνες μυών, ή ακόμη περισσότερο με τα κύτταρα Schwann μυών τα οποία μπορεί να μην επιβιώνουν από τους αντί-μιτωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την καταστροφή των ενδογενών κυττάρων Schwann των νωτιαίων γαγγλίων στον αρουραίο. Έτσι, είναι μάλλον απαραίτητη η καλύτερη προσαρμογή των διαδικασιών που ακολουθούνται στις συγκαλλιέργειες νευρώνων και κυττάρων Schwann αρουραίου, στις αντίστοιχες συγκαλλιέργειες νευρώνων και κυττάρων Schwann από μύες για να επιτευχθεί πλήρης μυελίνωση στις τελευταίες.

4.5 Μελέτη της εμπλοκής της TAG-1 στην μορφολογία των μεσοκομβικών τμημάτων εμύελων ιών, μέσω καλλιέργειών DRG νευρώνων και ανοσοϊστοχημικών μελετών σε μύες αγρίου τύπου και *Tag1*^{-/-}.

Όπως προαναφέρθηκε στην εισαγωγή αυτής της διατριβής, το έλυτρο της μυελίνης είναι η δομή εκείνη που επιτρέπει την ταχεία και αποτελεσματική προώθηση των δυναμικών ενεργείας κατά μήκος των νευραξόνων, καθώς αυξάνει την αντίσταση και ελαττώνει την αγωγιμότητα της νευρικής μεμβράνης. Η συνέχεια της μυελίνης διακόπτεται από τον κόμβο του Ranvier, ο οποίος είναι ένα διάκενο κατανεμημένο σε περιοδικά διαστήματα που αντιστοιχούν στο μήκος ενός μεσοκομβικού τμήματος (δηλαδή στην έκταση που καλύπτει η μεμβράνη ενός εμύελου κυττάρου Schwann πάνω σε έναν νευράξονα). Μέσω των μεσοκομβικών τμημάτων λοιπόν, και από κόμβο σε κόμβο, διενεργείται η ταχεία προώθηση των δυναμικών ενεργείας που έχει ονομαστεί «αλματώδης» λόγω της υψηλής ταχύτητας της μεταξύ κόμβων. Έχει προταθεί από παλαιότερες έρευνες ότι, είναι πιθανό, η μορφολογία, και πιο συγκεκριμένα το μήκος, των μεσοκομβικών τμημάτων στους εμύελους νευράξονες να επηρεάζει τον ρυθμό μετάδοσης της νευρικής ώσης (για ανασκόπηση βλέπε Sherman and Brophy, 2005). Παραδείγματα σε αυτόν τον τομέα έχουν προκύψει από διαφορετικά μοντέλα ερευνών και πολλά από αυτά συνηγορούν στο ότι το μήκος των μεσοκομβικών περιοχών των εμύελων νευρικών ιών εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως οι αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις, η δομή του γλοιακού κυττάρου και η ορθή περιέλιξή του γύρω από τον νευράξονα. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση της παραγωγής και μελέτης διαγονιδιακών μυών που δεν εκφράζουν την χαρακτηριστική για κύτταρα Schwann πρωτεΐνη L-periaxin. Αυτή η πρωτεΐνη βρίσκεται στις ζώνες Cajal των εμύελων νευρικών ιών του ΠΝΣ και σχηματίζει

σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες dystroglycan και DRP2 (dystrophin-related protein 2) για να δημιουργήσουν υποδοχέα για την μεμβρανική πρωτεΐνη λαμινίνη (Sherman et al, 2001). Όταν λοιπόν η L-periaxin δεν εκφράζεται στο ΠΝΣ οι ζώνες Cajal αποδιοργανώνονται και, στα αρχικά στάδια ανάπτυξης, παρατηρείται μειωμένο μήκος των μεσοκομβικών τμημάτων στους εμμύελους νευράξονες. Ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες σε αυτά τα κοντύτερα μεσοκομβικά τμήματα έδειξαν ότι η μετάδοση της νευρικής ώσης επιβραδύνεται σε σχέση με τα φυσιολογικά (Court et al, 2004). Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει και στην περίπτωση της *claw-paw (clp)* μετάλλαξης στον μυ (Darbas et al, 2004). Εκεί παρουσιάζονται συμπτώματα ανάλογα με τις συγγενείς ανωμαλίες στην στάση των άκρων (congenital limb posture abnormalities) που εμφανίζονται στον άνθρωπο, και έχει παρατηρηθεί ότι το μέσο μήκος των μεσοκομβικών περιοχών, στις εμμύελες ίνες αυτών των μεταλλαγμένων μυών, μειώνεται κατά πολύ (στο μισό περίπου) σε σύγκριση με τις φυσιολογικές. Ακολούθως, σε μετρήσεις ταχύτητας νευρικής αγωγής (nerve conduction velocity) παρατηρήθηκε μείωση της ταχύτητας μετάδοσης της νευρικής ώσης κατά ~35% σε νευρικές ίνες προερχόμενες από ομόζυγα ζώα για την μετάλλαξη *claw-paw (clp/clp)*, σε σχέση με νευρικές ίνες προερχόμενες από αγρίου τύπου ζώα (Darbas et al, 2004). Τέλος, ένα ακόμη παράδειγμα μειωμένου μεσοκομβικού μήκους σε εμμύελες νευρικές ίνες, είναι η έρευνα που διεξήχθη σε συν-καλλιέργειες DRG νευρώνων και κυττάρων Schwann, στις οποίες αναστάλθηκε φαρμακολογικά η δράση της Rho κινάσης (ROCK). Η ROCK είναι ένας βασικός καθοδικός (downstream) ρυθμιστής της Rho GTP-άσης, η οποία με τη σειρά της ρυθμίζει την κατεύθυνση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, κατά την μυελίνωση των νευραξόνων. Η φαρμακολογική αναστολή της δράσης της ROCK, σε τέτοιου είδους καλλιέργειες, οδηγεί σε απαλοιφή των μικρολαχνών (microvilli) των κυττάρων Schwann, που

έρχονται σε επαφή με τον νευράξονα στην παρακομβική περιοχή της εμμύελης ίνας, και στην δημιουργία κοντών και με ανώμαλα κατανεμημένη μυελίνη μεσοκομβικών περιοχών (Mendelez-Vasquez et al, 2004). Στις παραπάνω έρευνες έρχεται να προστεθεί και η παρατήρηση που έγινε στο εργαστήριό μας, δηλαδή ότι σε καλλιέργειες νωπιαίων αισθητικών γαγγλίων οι εμμύελοι άξονες των καλλιεργημένων *Tag1^{-/-}* νευρώνων παρουσιάζουν διαφορετική μορφολογία από τους αγρίου τύπου άξονες. Τα μεσοκομβικά τμήματα παρουσιάζονται σημαντικά μικρότερα σε μήκος και το μυελώδες έλυτρό τους εμφανίζει διακυμάνσεις στο πάχος του κατά μήκος του άξονα. Αυτές οι παρατηρήσεις μας ώθησαν στο να διενεργήσουμε μετρήσεις στα μεσοκομβικά τμήματα των καλλιεργημένων DRG νευρώνων και να πραγματοποιήσουμε στατιστική ανάλυση για να επιβεβαιώσουμε εάν όντως οι εμμύελες ίνες των *Tag1^{-/-}* νευρώνων είναι μικρότερες σε μήκος από τις αντίστοιχες αγρίου τύπου.

Η ανάλυση της σύγκρισης μεταξύ μεσοκομβικών τμημάτων από *Tag1^{-/-}* και αγρίου τύπου καλλιεργημένων νευρώνων έδειξε ότι τα *Tag1^{-/-}* τμήματα έχουν στατιστικώς σημαντικά μικρότερο μήκος από τα αγρίου τύπου, σε όλες τις υποκατηγορίες που εξετάστηκαν (βλέπε κεφάλαιο 3.8.1). Το αποτέλεσμα αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι η TAG-1 πρωτεΐνη ίσως διαθέτει τη δυνατότητα να ρυθμίζει, εκτός τις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις και την συγκέντρωση των διαύλων καλίου στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή των εμμύελων ινών, και τον σχηματισμό του φυσιολογικού ελύτρου της μυελίνης. Παρόλα αυτά το συγκεκριμένο αποτέλεσμα, καθώς προέρχεται από καλλιέργειες κυττάρων, δεν θα μπορούσε να αποτελέσει από μόνο του οριστική και απόλυτα εμπειριστατωμένη απόδειξη της συμβολής της παρουσίας της TAG-1 στην δημιουργία μυελώδους ελύτρου με φυσιολογικό μήκος.

Συνεπώς το επόμενο φυσιολογικό βήμα ήταν να επιβεβαιώσουμε εάν κάτι παρόμοιο συμβαίνει *in vivo*, υποβοηθούμενοι και από την ύπαρξη των διαγονιδιακών μυών που δεν εκφράζουν TAG-1 (*Tag1^{-/-}*). Σε αντίστοιχες μετρήσεις σε μεσοκομβικά τμήματα νευρικών ινών, απομονωμένων από ισχιακά νεύρα *Tag1^{-/-}* και αγρίου τύπου μυών, η ανάλυση της σύγκρισης μεταξύ μεσοκομβικών τμημάτων έδειξε ότι τα *Tag1^{-/-}* μεσοκομβικά τμήματα έχουν στατιστικώς σημαντικά (P value: P<0.0001) μικρότερο μήκος από τα αγρίου τύπου. Το τελευταίο αποτέλεσμα αποτελεί μια ισχυρή επαλήθευση της παρατήρησης που έγινε στις καλλιέργειες νευρώνων νοτιαίων γαγγλίων, και μας επιτρέπει να εξάγουμε το εξής συμπέρασμα: γενικά, σε εμμύελες νευρικές ίνες, απουσία της TAG-1, τα μεσοκομβικά τμήματα παρουσιάζονται κοντότερα, σε σύγκριση με φυσιολογικές νευρικές ίνες που περιέχουν την TAG-1 πρωτεΐνη. Το συμπέρασμα αυτό προσδίδει έναν ακόμη ρόλο στην πρωτεΐνη TAG-1 και ενισχύει την σημαντικότητα που αυτή κατέχει στην διαμεσολάβηση των αξονογλοιακών αλληλεπιδράσεων στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές εμμύελων ινών.

4.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- ✓ Η TAG-1 με την Caspr2 και τους διαύλους καλίου (Kv) σχηματίζουν συγκεκριμένο σύμπλοκο στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές εμμύλων ινών, όπου οι τρεις αυτές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν άμεσα μέσω των ανοσοσφαιρινικών (Ig-like domains) περιοχών της TAG-1. Αυτή η έρευνα είναι η πρώτη που απευθύνεται σε θέματα δομικής φύσης πρωτεϊνών, οι οποίες εμπλέκονται στις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις που ευθύνονται για την οργάνωση εμμύλων νευραξόνων. Επίσης η TAG-1 είναι η μόνη από τις τρεις πρωτεΐνες που αναγνωρίζει άμεσα τις άλλες δύο.
- ✓ Ενισχύεται η θεωρία που ορίζει την TAG-1 ως το μόριο που είναι υπεύθυνο για την αξονογλοιακή αλληλεπίδραση στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή, με την ομοφιλική *in trans* σύνδεση μεταξύ γλοιακής και αξονικής TAG-1 μέσω των φιμπρονεκτινικών περιοχών του μορίου, καθώς δεν υπάρχει αναφορά αλληλεπίδρασης των περιοχών αυτών με άλλο μόριο στην περιοχή.
- ✓ Η TAG-1 δεν αλληλεπιδρά με την χασματοσυνδετική πρωτεΐνη connexin29, η οποία επίσης εντοπίζεται συγκεντρωμένη στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές εμμύλων ινών, όπως προκύπτει από μελέτη των *Tag^{-/-}* μυών.
- ✓ Ο φαινότυπος των *Tag1^{-/-}* διαγονιδιακών μυών μπορεί να αναπαραχθεί σε καλλιέργειες νευρώνων νωτιαίων γαγγλίων που επιτρέπουν την *in vitro* μυελίνωση.

- ✓ Σε εμμύελες νευρικές ίνες, *in vitro* και *in vivo*, όπου απουσιάζει η πρωτεΐνη TAG-1 παρατηρείται μείωση του μήκους των μεσοκομβικών τμημάτων, σε σύγκριση με φυσιολογικές νευρικές ίνες που περιέχουν την TAG-1 πρωτεΐνη. Συνεπώς, η TAG-1 διαθέτει τη δυνατότητα να ρυθμίζει, εκτός τις αξονογλοιακές αλληλεπιδράσεις και την συγκέντρωση των διαύλων καλίου και της Caspr2 στην εγγύς της παρακομβικής περιοχή των εμμύελων ινών, και τον σχηματισμό του φυσιολογικού ελύτρου της μυελίνης.

4.7 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

- Διερεύνηση του ρόλου της γλοιακής και της νευρωνικής TAG-1 και της ύπαρξης *in trans* ομοφιλικής σύνδεσης μεταξύ των δύο αυτών μορίων TAG-1 στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές, μέσω πειραμάτων «διάσωσης» (rescue) του φαινοτύπου σε *Tag1^{-/-}* μύες με τη χρήση των DNA κατασκευών (PLP και Thy1) που προέκυψαν από την παρούσα έρευνα. Συνέχιση των συγκαλλιιεργειών DRG νευρώνων και κυττάρων Schwann προερχόμενων από μύες αγρίου τύπου και *Tag1^{-/-}*, με προσαρμογή των διαδικασιών καλλιέργειας σε ευνοϊκότερες συνθήκες για τα κύτταρα του μυός, για τον ίδιο σκοπό.
- Περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της γλοιακής και της νευρωνικής TAG-1 με προσπάθεια «διάσωσης» του *Tag1^{-/-}* φαινοτύπου μέσω πειραμάτων μεταμόσχευσης νεύρων (Rath *et al*, 1995), από μύες αγρίου τύπου σε *Tag1^{-/-}* και το αντίστροφο, και πειραμάτων συγκαλλιέργειας DRG νευρώνων μυός και κυττάρων Schwann επίμυος όπου θα έχει επαχθεί μείωση της έκφρασης της TAG-1 με χρήση siRNA (Chojnowski *et al*, 2007)
- Καθώς στις περισσότερες μελέτες που αφορούν το μήκος των μεσοκομβικών τμημάτων (Sherman *et al*, 2001; Court *et al*, 2004; Darbas *et al*, 2004; Melendez-Vasquez *et al*, 2004) παρατηρούνται ανωμαλίες στα γλοιακά κύτταρα, θα ήταν χρήσιμη η καλλιέργεια κυττάρων Schwann από αγρίου τύπου και *Tag1^{-/-}* μύες και η σύγκριση της ανάπτυξής τους και των προσφυτικών ικανοτήτων τους όπως και η διερεύνηση, με ανοσοϊστοχημεία, της έκφρασης χαρακτηριστικών γλοιακών μορίων.
- Διερεύνηση, με ανοσοϊστοχημικές μελέτες, της φυσιολογικής ή μη έκφρασης των κομβικών πρωτεϊνών, στην περιοχή του κόμβου του Ranvier, και των

σηματοδοτικών μορίων, στα κύτταρα Schwann κατά την ανάπτυξη, σε *Tag1^{-/-}* μύες.

- Προσπάθεια ανεύρεσης νέων μορίων που να αλληλεπιδρούν με την TAG-1 στις εγγύς των παρακομβικών περιοχές, μέσω απομόνωσης των λιπιδικών υποστρωμάτων, στα οποία βρίσκεται η TAG-1, από ισχιακά και οπτικά νεύρα μυών και διεξαγωγής βιοχημικών μελετών.

Βιβλιογραφία

Altevogt, B.M., Kleopa, K.A., Postma, F.R., Schere, S.S. and Paul, D.L. (2002). Connexin29 is uniquely distributed within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems. *J. Neuroscience* **22**:6458-6470.

Arroyo EJ, Xu T, Grinspan J, Lambert S, Levinson SR, Brophy PJ *et al*, (2002). Genetic dysmyelination alters the molecular architecture of the nodal region. *J. Neurosci.*, **22**: 1726-1737.

Arroyo, E.J. and Scherer, S.S., (2000). On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem. Cell Biol.*, **113**: 1-18.

Barres, B.A. and Raff, M.C. (1999). Axonal control of oligodendrocyte development. *J. Cell Biol.* **147**:1123-1128.

Bartsch S., Montag D., Schachner M., Bartsch U., (1997). Increased number of unmyelinated axons in optic nerves of adult mice deficient in the myelin-associated glycoprotein (MAG). *Brain Res.*, **762**(1-2):231-4.

Berglund EO, Murai KK, Fredette B, Sekerkova G, Marturano B, Weber L, Mugnaini E, Ranscht B (1999). Ataxia and abnormal cerebellar microorganization in mice with ablated contactin gene expression. *Neuron* **24**(3): 739-50.

Bhat, M.A., Rios, J.C., Lu, Y., Garcı-Fresc, G.P., *et al*, (2001). Axon-glia interactions and the domain organization of myelinated axons requires neurexin IV/Caspr/Paranodin. *Neuron*, **30**: 369–383.

Boyle, M.E., Berglund, E.O., Murai, K.K., Weber, L., Peles, E. and Ranscht, B., (2001). Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve. *Neuron* **30**(2): 385-397.

Boyle, M.E., Berglund, E.O., Murai, K.K., Weber, L., Peles, E., Ranscht, B (2001). Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve. *Neuron* **30**(2): 385-397.

Brophy P.J., (2003). Myelinated nerves: filling in the juxtaparanodal gap. *Curr Biol.*, **13**(24):R956-7.

Brophy, P.J., (2001). Axoglial junctions: separate the channels or scramble the message. *Curr Biol.*, **11**(14), R555-7.

Brummendorf, T., Kenwrick, S. and Rathjen, F.G. (1998). Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Current Opinion in Neurobiology* **8**:87-97.

Buchstaller, A., Kunz, S., Berger, P., Kunz, B., Ziegler, U., Rader, C., and Sonderegger, P (1996). Cell adhesion molecules NgCAM and axonin-1 form heterodimers in the neuronal membrane and cooperate in neurite outgrowth promotion. *J Cell Biol.* **135**(6 Pt1): 1593-1607.

Buttiglione, M., Revest, J.M., Pavlou, O., Karagogeos, D., Furley, A., Rougon, G., and Faivre-Sarrailh, C (1998). A functional interaction between the neuronal adhesion molecules TAG-1 and F3 modulates neurite outgrowth and fasciculation of cerebellar granule cells. *J Neurosci.* **18**(17): 6853-6870.

Buttiglione, M., Revest, J.M., Rougon, G., Faivre-Sarrailh, C (1996). F3 neuronal adhesion molecule controls outgrowth and fasciculation of cerebellar granule cell neurites: a cell-type-specific effect mediated by the Ig-like domains. *Mol Cell Neurosci.* **8**(1):53-69.

Carenini, S., Montag, D., Schachner, M. and Martini, R. (1999). Subtle roles of neural cell adhesion molecule and myelin-associated glycoprotein during Schwann cell spiraling in P0-deficient mice. *Glia* **27**:203-212.

Carmen J., Magnus T., Cassiani-Ingoni R., Sherman L., Rao M.S. and Mattson M.P., (2007). Revisiting the astrocyte-oligodendrocyte relationship in the adult CNS. *Progress in Neurobiol.*, (e-pub ahead of print).

Caroni, P (1997) Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *J. Neurosci. Methods.* **71** (1):3-9

Charles, P., Tait, S., Faivre-Sarrailh, C., Barbin, G., Gunn-Moore, F., Deisenko-Nehrbass, N., Guennoc, A.M., Girault, J.A., Brophy, P.J. and Lubetzki, C. (2002). Neurofascin is a glial receptor for the paranodin/Caspr-contactin axonal complex at the axoglial junction. *Current Biology* **12**:217-220.

Chojnowski, A., Ravise, N., Bachelin, C., Depienne, C., Ruberg, M., Brugg, B., Laporte, J., Baron-Van Evercooren, A. and LeGuern, E., (2007). Silencing the Charcot-Marie-tooth associated MTMR2 gene decrease proliferation and enhances cell death in primary cultures of Schwann cells. *Neurobiol. Dis.*, **26**: 323-331

Colognato, H., Ramachandrapa, S., Olsen, I.M and French-Constant, C. (2004) Integrins direct Src family kinases to regulate distinct phases of oligodendrocyte development. *J. Cell Biol.* **167**:365-375.

Coman, I., Aigrot, M.S., Seilhean, D., Reynolds, R., Girault, J.A., Zalc, B. and Lubetzki, C. (2006). Nodal, paranodal and juxtaparanodal axonal proteins during demyelination and remyelination in multiple sclerosis. *Brain*, **129**(Pt 12):3186-95

Corfas, G., Velardez, M. O., Ko, C.P., Ratner, N and Peles, E. (2004). Mechanisms and roles of Axon-Schwann cell interactions. *The Journal of Neuroscience* **24**(42):9250-9260.

Court, F.A., Sherman D.L., Pratt T., Garry E.M., Ribchester R.R., Cottrell D.F., Fleetwood-Walker S.M. and Brophy P.J., (2004). Restricted growth of Schwann cells lacking Cajal bands slows conduction in myelinated nerves. *Nature*, **431**: 191-195.

Crossin, K.L. and Krushel, L.A. (2000). Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Developmental Dynamics* **218**:260-279.

- Cunningham, B.A, Hemperly, J.J, Murray, B.A, Prediger, E.A, Brackenbury, R. and Edelman, G.M. (1987). Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* **236**:799-806.
- Darbas, A., Jacgle, M., Walbeehm, E., Van de Burg, I.I., Driegen, S., Broos, L., Uyl, M., Visser, P., Grosveld, F. and Meijer D. (2004). Cell autonomy of the mouse claw paw mutation. *Developmental Biology* **272**:470-482.
- Denaxa, M., Pavlou, O., Tsiotra, P., Papadopoulos, G.C., *et al*, (2003). The upstream regulatory region of the gene for the human homologue of the adhesion molecule TAG-1 contains elements driving neural specific expression in vivo. *Mol. Brain Res.*, **118**: 91-101.
- Denisenko- Nehrbass, N., Oguievetskaia, K., Goutebroze, L., Galvez, T., Yamakawa, H., Ohara, O., Carnaud, M. and Girault, J.A. (2003). Protein 4.1B associates with both Caspr/paranodin and Caspr2 at paranodes and juxtaparanodes of myelinated fibres. *Eur. J.Neuroscience* **17**:411-416.
- Denisenko-Nehrbass N, Oguievetskaia K, Goutebroze L, Galvez T, Yamakawa H, Ohara O, Carnaud M, Girault JA., (2003). Protein 4.1B associates with both Caspr/paranodin and Caspr2 at paranodes and juxtaparanodes of myelinated fibers. *European Journal of Neuroscience*, **17**: 411-416.
- Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, Sivasankaran R, Wang K, Nikulina E, Kimura N, Cai H, Deng K, Gao Y, He Z, Filbin M, (2002). Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron*, **18**;35(2): 283-90.
- Dupree JL, Girault JA and Popko B, (1999). Axo-glial interactions regulate the localization of axonal paranodal proteins. *J. Cell Biol.*, **147**: 1145-1152
- Einheber S, Zanazzi G, Ching W, Scherer S, Milner TA, Peles E, and Salzer JL, (1997). The Axonal Membrane Protein Caspr, a Homologue of Neurexin IV, Is a Component of the Septate-like Paranodal Junctions That Assemble during Myelination. *J. Cell Biol.*, **139**(6): 1495-1506.
- Eshed, Y., Feinberg, K., Poliak, S., Sabanay, H., Sarig-Nadir, O., Spiegel, I., Bermingham, J.R. and Peles, E. (2005). Gliomedin mediates Schwann cell-axon interaction and the molecular assembly of the nodes of Ranvier. *Neuron* **47**: 215-229.
- Fache, M.P., Moussif, A., Fernadez, F., Giraud, P., Garrido, J.J. and Dargent, B. (2004). Endocytic elimination and domain-selective tethering constitute a potential mechanism of protein segregation at the axonal initial segment. *J.Cell. Biol.* **166**:571-578.
- Faivre-Sarrailh, C., Gauthier, F., Denisenko-Nehrbass, N., Le Bivic, A., *et al*, (2000). The GPI-anchored adhesion molecule F3/contactin is required for surface transport of paranodin/caspr. *J. Cell Biol.*, **149**, 491–502.

- Friedlander, D.R, Milev, P, Karthikeyan, L., Margolis, R.K., Margolis, R.U. and Grumet, M. (1994). The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J.Cell Biol* **125**:669-680.
- Fukamauchi F, Aihara O, Wang YJ, Akasaka K, Takeda Y, Horie M, Kawano H, Sudo K, Asano M, Watanabe K, Iwakura Y., (2001). TAG-1-deficient mice have marked elevation of adenosine A1 receptors in the hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun.*, **281**(1):220-6.
- Fukamauchi, F., Aihara, O., Wang, Y., Akasaka, K., *et al.*, (2001). TAG-1 Deficient Mice Have Marked Elevation of Adenosine A1 Receptors in the Hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **281**: 220-226.
- Furley, A.J., Morton, S.B., Manalo, D., Karagogeos, D., *et al*, (1990). The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity. *Cell*, **61**: 157-170.
- Fuss, B, Mallon, B, Phan,T, Ohlemeyer, C, Kirchhoff, F, Nishiyama, A, Macklin, WB (2000) Purification and analysis of in vivo-differentiated oligodendrocytes expressing the green fluorescent protein. *Dev. Biol.* **218** (2): 259-74
- Garrido J.J., Fernandes F., Moussif A., Fache M.P., Giraud P. and Dargent B., (2003). Dynamic compartmentalization of the voltage-gated sodium channels in axons. *Biol Cell.*, **95**(7):437-45.
- Gatto, C.L., Walker, B.J. and Lambert, S. (2003). Local ERM activation and dynamic growth cones at Schwann cell tips implicated in efficient formation of nodes of Ranvier. *J. Cell Biology* **162**:489-498.
- Gennarini, G., Cibelli, G., Rougon, G., Mattei, M.G. and Goridis, C., (1989). The mouse neuronal cell surface protein F3: a phosphatidylinositol-anchored member of the immunoglobulin superfamily related to chicken contactin. *J Cell Biol.* **109**(2): 775-788.
- Girault, J.A. and Peles, E., (2002). Development of nodes of Ranvier. Current opinion in *Neurobiol.*, **12**, 476-485.
- Gollan, L., Salomon, D., Salzer, J.L. and Peles, E. (2003). Caspr regulates the processing of contactin and inhibits its binding to neurofascin. *J Cell Biology* **137**:1213-1218.
- Gonzalez-Amaro R. and Sanchez-Madrid F., (1999). Cell adhesion molecules: selectins and integrins. *Crit. Rev. Immunol.* **19**(5-6):389-429.
- Gordon, JW, Chesa, PG, Nishimura, H, Rettig, WJ, Maccari, JE, Endo, T, Seravalli, E, Seki, T, Silver, J (1987) Regulation of Thy-1 gene expression in transgenic mice. *Cell.* **50** (3): 445-52

- Hildebrand C, Bowe CM and Remahl IN, (1994). Myelination and myelin sheath remodelling in normal and pathological PNS nerve fibers. *Prog. Neurobiol.*, **43**:85-141.
- Howell OW, Palser A, Polito A *et al*, (2006). Disruption of neurofascin localization reveals early changes preceding demyelination and remyelination in multiple sclerosis. *Brain*, **129**: 3173-3185.
- Hynes R.O., (1999). Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol.*, **9**(12):M33-7.
- Hynes RO, Bader BL, Hodivala-Dilke K. Integrins in vascular development. *Braz J Med Biol Res.*, **32**(5):501-10.
- Jenkins, S.M. and Bennet, V. (2001). Developing nodes of Ranvier are defined by ankyrin-G clustering and are independent of paranodal axoglial adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**:2303-2308.
- Jessen K and Mirsky R, (1999). Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends Neurosci.*, **22**: 402-410.
- Kaplan MR, Cho MH, Ullian EM, Isom LL, Levinson SR and Barres BA, (2001). Differential control of clustering of the sodium channels Na(v)1.2 and Na(v)1.6 at developing CNS nodes of Ranvier. *Neuron*, **30**: 105-119.
- Karagogeos, D., (2003). Neural GPI-anchored cell adhesion molecules. *Front. Biosci.*, **8**, S13011-1320.
- Kasahara, K., Watanabe, K., Tamamoto, T. And Sanai, Y. (1999). Regulation of GPI-anchored neuronal cell adhesion molecule TAG-1 signaling via Src-family tyrosine kinase lyn by glycosphingolipids in lipid rafts. *Mol Biol Cell (Suppl.)* **10**:306A.
- Kramer, E.M., Klein, C., Koch, T., Boytinck, M. and Trotter, J. (1999). Compartmentation of Fyn kinase with glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules in oligodendrocytes facilitates kinase activation during myelination. *J. Biol Chem* **274**:29042-29049.
- Lacas-Gervais S., Guo J., Strenzke N., Scarfone E., Kolpe M., Jahkel M., De Camilli P., Moser T., Rasband M.N. and Solimena M., (2004). BetaIVSigma1 spectrin stabilizes the nodes of Ranvier and axon initial segments. *J Cell Biol.*, **166**(7):983-90.
- Kasper C, Rasmussen H, Kastrup JS, Ikemizu S, Jones EY, Berezin V, Bock E and Larsen IK (2000). Structural basis of cell-cell adhesion. *Nat Struct Biol* **5**:389-93
- Malhotra, J.D., Tsiotra, P., Karagogeos, D., and Hortsch, M(1998). Cis-activation of L1-mediated ankyrin recruitment by TAG-1 homophilic cell adhesion. *J Biol Chem.* **273**(50):33354-33359.

- Maness, P.F. and Schachner, M., (2007). Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci.*, **10**(1): 19-26.
- Manganas, L.N. and Trimmer, J.S., (2000). Subunit composition determines Kv1 potassium channel surface expression. *J. Biol. Chem.*, **275**: 29685-29693.
- Martini, R. and Carenini, S. (1998). Formation and maintenance of the myelin sheath in the peripheral nerve: Roles of cell adhesion molecules and the Gap junction protein connexin 32. *Microscopy research and technique* **41**:403-415.
- Martini, R. and Schachner, M. (1997). Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules. *Glia*, **19**:298-310.
- Martini, R., Mohajeri, M.H., Kasper, S., Kiese, K.P. and Schachner, M. (1995). Mice doubly deficient in the genes for P0 and myelin basic protein show that both proteins contribute to the formation of major dense line in peripheral nerve myelin. *J. Neuroscience* **15**:4488-4495.
- Mathis C, Denisenko-Nehrbass N, Girault JA and Borelli E, (2001). Essential role of oligodendrocytes in the formation and maintenance of central nervous system nodal regions. *Development*, **128**: 4881-4890.
- Meintanis S., Thomaidou D., Jessen K.R., Mirsky R. and Matsas R., (2004). Novel method for studying myelination in vivo reveals that EDTA is a potent inhibitor of myelin protein and mRNA expression during development of the rat sciatic nerve. *Glia*, **48**(2):132-44.
- Melendez-Vasquez C.V., Einheber S. and Salzer J.L., (2004). Rho kinase regulates schwann cell myelination and formation of associated axonal domains. *J Neurosci.*, **24**(16):3953-63.
- Melendez-Vasquez, C.V., Rios, J.C., Zanazzi, G., Lambert, S., Bretscher, A. and Salzer, J.L. (2001). Nodes of Ranvier form in association with ezrin-radixin-moesin (ERM)-positive Schwann cell processes. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:1235-1240.
- Menegoz, M., Gaspar, P., Le Bert, M., Galvez, T., Burgaya, F., Palfrey, C., Ezan, P., Arnos, F. and Girault, J.A., (1997). Paranodin, a glycoprotein of neuronal paranodal membranes. *Neuron* **19**(2): 319-331.
- Michailov, G.V., Sereda M.W., Brinkmann B.G., Fischer T.M., Haug B., Birchmeier C., Role L., Lai C., Schwab M.H. and Nave KA., (2004). Axonal neurogulin 1 regulates myelin sheath thickness. *Science* **304**(5671):700-3
- Mirsky R, Jessen K, Brennan A, Parkinson D, Dong Z, Meier C, Parmantier E and Lawson D, (2002). Schwann cells as regulators of nerve development. *J. Physiol. Paris.*, **96**: 17-24.

Ogawa, Y., Schafer, D.P., Horresh, I., Bar, V., Hales, K., Yang, Y., Suzuki, K., Peles, E., Stankewich, M.C. and Rasband, M.N. (2006). Spectrins and ankyrinB constitute a specialized paranodal cytoskeleton. *J. Neuroscience* **26**:5230-5239.

Oguievetskaia, K., Cifuentes-Diaz, C., Girault, J.A. and Goutebroze, L. (2005). Contacts cellulaires des fibres myelinisees du systeme nerveux peripherique. *Medecine/Science* **21**:162-9.

Park, S.K., Miller, R., Krane, I. and Vartanian, T. (2001). The erbB2 gene is required for the development of terminally differentiated, spinal cord oligodendrocytes. *J. Cell Biology* **154**:1245-1258.

Pavlou, O., Theodorakis, K., Falk, J., Kutsche, M., Schachner, M., Faivre-Sarrailh, C., and Karagogeos D (2002). Analysis of interactions of the adhesion molecule TAG-1 and its domains with other immunoglobulin superfamily members. *Mol Cell Neurosci.* **20**(3): 367-381.

Pedraza, L., Huang, J.K. and Colman, D.R. (2001). Organizing principles of the axoglial apparatus. *Neuron* **30**: 335-344.

Peles, E. and Salzer, J.L., (2000). Molecular domains of myelinated axons. *Curr. Op. Neurobiol.*, **10**, 558-565.

Pesheva, P., Gennarini, G., Goridis, C., Schachner, M (1993). The F3/11 cell adhesion molecule mediates the repulsion of neurons by the extracellular matrix glycoprotein J1-160/180. *Neuron.* **10**(1): 69-82.

Poliak S, Gollan L, Salomon D, Berglund EO, Ohara R, Ranscht B, Peles E., (2001). Localization of Caspr2 in myelinated nerves depends on axon-glia interactions and the generation of barriers along the axon. *The Journal of Neuroscience*, **21**: 7568-7575.

Poliak, S. and Peles, E. (2003). The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neuroscience* **4**:968-980.

Poliak, S., Gollan, L., Martinez, R., Custer, A., *et al.*, (1999). Caspr2, a new member of the Neurexin superfamily is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K⁺ channels. *Neuron*, **24**: 1037-1047.

Poliak, S., Salomon, D., Elhanany, H., Sabanay, H., Kiernan, B., Penvy, L., Stewart, C.L., Xu, X., Chiu, S.Y., Shrager, P. (2003). Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K⁺ channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. *J. Cell Biology*, **162**:1149-1160.

Poltorak, M., Wright, R., Hemperly, J.J., Torrey, E.F., Issa, F., Wyatt, R.J. and Freed, W.J. (1997). Monozygotic twins discordant for schizophrenia are discordant for N-CAM and L1 in CSF. *Brain Res* **751**:152-154.

Rasband, M.N., Park, E.W., Zhen, D., Arbuckle, M.I., Poliak, S., Peles, E., Grant, S.G.N. and Trimmer, J.S. (2002). Clustering of neuronal potassium channels is

independent of their interaction with PSD-95. *The Journal of Cell Biology* **159**(4):663-672.

Rath, E.M., Kelly, D., Bouldin, T.W. and Popko, B., (1995). Impaired peripheral nerve regeneration in a mutant strain of mice (Enr) with a Schwann cell defect. *J Neurosci.*, **15**:7226-37.

Richardson W.D., Kessaris N. and Pringle N., (2006). Oligodendrocyte wars. *Nature Reviews- Neuroscience*, **7**: 11-18.

Rios, J.C., Melendez-Vasquez, C.V., Einheber, S., Lustig, M., *et al.*, (2000). Contactin associated protein (Caspr) and contactin form a complex that is targeted to the paranodal junctions during myelination. *J. Neurosci.*, **20**, 8354–8364.

Salzer, J.L., (2003). Polarized domains of myelinated axons. *Neuron*, **40**(2), 297-318.
Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T., (1989). In molecular cloning. (Editor: Nolan C, New York)
Sanes, J. and Jessel, T., (2000). In principles of neural science (Editors: Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessel, T.M., New York)

Schafer, D.P., Custer, A.W., Shrager, P. and Rasband, M.N., (2006). Early events in node of Ranvier formation during myelination and remyelination in the PNS. *Neuro Glia Biol.*, **2**(2), 69–79.

Shapiro L, Doyle JP, Hensley P, Colman DR and Hendrickson WA, (1996). Crystal structure of the extracellular domain from P₀, the major structural protein of peripheral nerve myelin. *Neuron*, **17**: 435-449.

Sherman D, Fabrizi C, Gillespie C and Brophy P, (2001). Specific disruption of a Schwann cell dystrophin-related protein complex in a demyelinating neuropathy. *Neuron*, **30**: 677-687.

Sherman, D.L. and Brophy, P.J. (2005). Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Neuroscience* **6**:683-690.

Sherman, D.L., Tait, S., Meirose, S., Hohnson, R., Zonta, B., Court, F.A., Macklin, W.B., Meek, S., Smith, A.J.H., Cottrell, D.F. and Brophy, P.J. (2005). Neurofascins are required to establish axonal domains for salutatory conduction. *Neuron* **48**:737-742.

Shy ME, Arroyo E, Sladky J, Menichella D, Jiang H, Kamholz J and Scherer SS, (1997). Heterozygous P₀ knockout mice develop a peripheral neuropathy that resembles chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **56**: 811-821.

Simons, M. and Trajkovic, K. (2006). Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *Journal of Cell Science* **119**:4381-4389.

- Suter, D.M., Pollerberg, G.E., Buchstaller, A., Giger, R.J., Dreyer, W.J., and Sonderegger, P (1995). Binding between the neural cell adhesion molecules axonin-1 and Nr-CAM/Bravo is involved in neuron-glia interaction. *J Cell Biol.* **131**(4): 1067-1081.
- Svenningsen AF, Shan WS, Colman DR, and Pedraza L. (2003). Rapid method for culturing embryonic neuron-glia cell cocultures. *J Neurosci Res.*, **72**(5):565-73.
- Tait S, Gunn-Moore F, Collinson J, Huang J, Lubetzki C, Pedraza L, Sherman D, Colman D and Brophy P, (2000). An oligodendrocyte cell adhesion molecule at the site of assembly of the paranodal axo-glia junction. *J. Cell Biol.*, **150**: 657-666.
- Takeda, Y., Murakami, Y., Asou, H. and Uyemura, K. (2001). The roles of cell adhesion molecules on the formation of peripheral system. *Keio J Med* **50** (4): 240-248.
- Traka, M., Dupree, J.L., Popko, B., Karagogeos, D., (2002). The neuronal adhesion protein TAG-1 is expressed by Schwann cells and oligodendrocytes and is localized to the juxtaparanodal region of myelinated fibers. *J. Neurosci.*, **22**: 3016-3024.
- Traka, M., Goutebroze, L., Denisenko, N., Bessa, M., Nifli, A., Havaki, S., Iwakura, Y, Fukamauchi, F., Watanabe, K., Soliven, B., Girault, J.A. and Karagogeos, D. (2003). Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *J.Cell Biology* **162**:1161-1172.
- Tsiotra, P.C., Theodorakis, K., Papamatheakis, J., and Karagogeos, D (1996). The fibronectin domains of the neural adhesion molecule TAX-1 are necessary and sufficient for homophilic binding. *J Biol Chem.* **271**(46): 29216-29222.
- Tzimourakas A, Giasemi S, Mouratidou M and Karagogeos D, (2007). Structure-function analysis of protein complexes involved in the molecular architecture of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *Biotechnol. J.*, **2**(5):577-83.
- Vabnick, I., Trimmer, J.S., Levinson S.R., Risal, D. and Shrager, P. (1999). Dynamic potassium channel distributions during axonal development prevent aberrant firing patterns. *J. Neuroscience* **19**: 747-758.
- Vidal, M, Morris, R, Grosveld, F, Spanopoulou, E (1990) Tissue specific control elements of the Thy-1 gene. *EMBO J.* **9** (3): 833-40
- Walsh, F.S. and Doherty, P. (1996). Cell adhesion molecules and neuronal regeneration. *Current Opinion in Cell Biology* **8**:707-713.
- Wight, PA, Duchala, CS, Readhead, C, Macklin, WB (1993) A myelin proteolipid protein-LacZ fusion protein is developmentally regulated and targeted to the myelin membrane in transgenic mice. *J Cell Biol.* **123**:443-54
- Yoshihara Y, Kawasaki M, Tamada A, Nagata S, Kagamiyama H, Mori K., (1995). Overlapping and differential expression of BIG-2, BIG-1, TAG-1 and F3: four

members of an axon associated cell adhesion molecule subgroup of the immunoglobulin superfamily. *Journal of Neurobiology*, **28**: 51-69.

Zawadzka M. and Franklin R.J., (2007). Myelin regeneration in demyelinating disorders: new developments in biology and clinical pathology. *Curr Opin Neurol.*, **20**(3):294-8.

Zhou L, Zhang CL, Messing A and Chiu SY, (1998). Temperature-sensitive neuromuscular transmission in Kv1.1 null mice: role of potassium channels under the myelin sheath in young nerves. *J. Neurosci.*, **18**: 7200-7215.

“ALTIUS, CITIUS, FORTIUS”
-Φιλοσοφία των μοντέρνων ολυμπιακών αγώνων

Research Article

Structure-function analysis of protein complexes involved in the molecular architecture of juxtaparanodal regions of myelinated fibers

Alexandros Tzimourakas¹, Sevasti Giasemi¹, Maria Mouratidou^{1a} and Domna Karagogeos^{1, 2}

¹Department of Basic Science, Neuroscience Graduate Program, University of Crete Medical School, Heraklion, Crete, Greece

²Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Heraklion, Crete, Greece

Demyelinating disorders, including multiple sclerosis (MS), are common causes of neurological disability. One critical step towards the management and therapy of demyelinating diseases is to understand the basic functions of myelinating glia and their relationship with axons. Axons and myelinating glia, oligodendrocytes in the central (CNS) and Schwann cells in the peripheral (PNS) nervous systems, reciprocally influence each other's development and trophism. These interactions are critical for the formation of distinct axonal domains in myelinated fibers that ensure the rapid propagation of action potentials. Macromolecular complexes mediating axo–glial interactions in these domains have been identified, consisting of members of the immunoglobulin superfamily (IgSF) of adhesion molecules and the neurexin/NCP superfamily as well as other proteins. We have investigated the molecular details of axo–glial interactions in the juxtaparanodal region of myelinated fibers by utilizing domain-specific GFP constructs and immunoprecipitation assays on transfected cells. We have shown that the immunoglobulin domains of the IgSF member TAG-1/Cnt-2 are necessary and sufficient for the direct, *cis* interaction of this protein with Caspr2 and potassium channels.

Received 31 January 2007
Revised 13 February 2007
Accepted 26 February 2007

Keywords: Adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily · Caspr2 · Nodes of Ranvier · Potassium channels · TAG-1; axonin-1; contactin-2

1 Introduction

Myelinated fibers of the central nervous system (CNS) and the PNS are organized into distinct domains: the node of Ranvier, the paranodal, and juxtaparanodal regions as well as the internodes (reviewed in [1–5]). These regions ensure the coordinated function of voltage-activated sodium and potassium channels essential for the rapid propagation of action potential along the nerve. The site

of the node of Ranvier is disrupted in neurological diseases (multiple sclerosis, MS, Guillain-Barre syndrome, merosin-deficient congenital muscular dystrophy, and other neuropathies) as is manifested by conduction velocity failures leading to sensory and motor dysfunction. Sodium and potassium channels cluster at the node and juxtaparanode during myelination and disperse following demyelination [6, 7], indicating that glial cells play a key role in the organization of axonal domains. The correct clustering of the sodium channels in the node ensures the saltatory conduction of the action potential along the myelinated fiber. Although the functional role of potassium channel clustering in the juxtaparanode is not well understood, the mislocalization of these channels in de-

Correspondence: Dr. Domna Karagogeos, IMBB, P.O. Box 1385, Vassilika Vouton, Heraklion 711 10, Crete, Greece

Fax: +30-2810-394530

E-mail: karagoge@imbb.forth.gr

Abbreviations: GPI, glycosylphosphatidylinositol; IB, immunoblot; IgSF, immunoglobulin superfamily; IP, immunoprecipitation; MS, multiple sclerosis

^aPresent Address: Institute for Biomedical Research of the Academy of Athens, Athens, Greece.

myelinating diseases is believed to contribute further to the conduction failure. More recently, it has been shown that paranodal and juxtaparanodal proteins are also diffusely distributed along naked axons in MS lesions [8]. During the myelin repair process, axo–glial interactions are also known to be important (reviewed in [9, 10]). In remyelinated lesions, nodal, paranodal, and juxtaparanodal molecules aggregate recapitulating their developmental program [8].

The periodic structures of the nodes of Ranvier (devoid of myelin) are separated from the internodes (the axons under the myelin sheath) by two distinct regions of the axolemma, the paranodal junctions, and the juxtaparanodal region. Both are characterized by the expression of macromolecular complexes (see reviews above). Sodium channels, ankyrin G and members of the Ig superfamily (IgSF), NrCAM, and neurofascin 186 are clustered in the nodes (reviewed in [11]). At the paranodes, myelin is anchored to axons through septate junctions expressing the Neurexin IV/NCP protein paranodin/Caspr, the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked IgSF protein contactin and neurofascin-155 [12–17]. At the juxtaparanodal regions, just beyond the innermost paranodal junction and next to the internodes, the axolemma is enriched in Shaker-type potassium channels (Kv) in association with the Neurexin IV/NCP homolog Caspr2 [18] and the GPI-linked IgSF member TAG-1/Contactin-2 [19] which is also present in the myelin membrane [20, 21]. Although these complexes have been identified, the details of the structural motifs responsible for these interactions have not been elucidated yet.

We have shown in the past that TAG-1 is required *in vivo* for the clustering of Caspr2 and Kv in the juxtaparanode [21]. Our working hypothesis is that *trans* homophilic binding of glial and axonal TAG-1 through its fibronectin type III domains leads to the *cis* interaction of axonal proteins TAG-1, Caspr2, and Kv. Direct association of TAG-1 and Caspr2 has been demonstrated [21]; however, the association of Caspr2 with Kv is indirect [19 and this report] while the direct interaction of TAG-1 and Kv has not been shown. In this report, we set out investigating the domains of TAG-1 responsible for its interactions with other juxtaparanodal proteins.

2 Materials and methods

2.1 PCR conditions

PCR was performed with Hi-Fidelity Taq DNA polymerase (Roche) with 30 cycles of denaturation (94°C, 30"), annealing (10 × (58°C, 40"), 20 × (60°C, 40")), elongation (72°C, 1'40"). The two primers used for both PCR reactions were the same: (i) HTAG-*Bgl*III: 5' GGA **AGA TCT** ATG GGG ACA GGC ACC AGG 3' and (ii) HTAG-*Xba*I: 5' GC **TCT AGA** TCA GAG CTC CAG GGA GCC 3'.

2.2 Construct generation

cDNA clones coding for either the IgC2 domains of hTAG-1 or its FN_{III} domains were obtained as PCR products from constructs expressing them in the pRmHa3 plasmid vector [22]. Both clones had the same signal sequence at their N-terminal and the GPI anchor sequence at their C-terminal, to ensure membrane targeting. Restriction sites for enzymes *Bgl*III and *Xba*I were created at the ends of the two PCR products by means of appropriate primers ((i) HTAG-*Bgl*III: 5'-GGA **AGA TCT** ATG GGG ACA GGC ACC AGG-3' and (ii) HTAG-*Xba*I: 5'-GC **TCT AGA** TCA GAG CTC CAG GGA GCC-3'). Each of the two PCR products was cloned between *Bgl*III and *Xba*I restriction sites at the C-terminal and in frame with green fluorescent protein (GFP) in the pEGFP-C1 (Clontech) plasmid vector, after digestion of both the PCR products and pEGFP-C1 with *Bgl*III and *Xba*I and dephosphorylation of the vector with shrimp alkaline phosphatase (SAP by Roche). T4 DNA ligase (New England Biolabs) was used for their ligation. Sequencing of the two DNA constructs showed that both domains were properly inserted into the carrying vectors and in frame to the GFP. The rat TAG-1-GFP was generated by inserting rat TAG-1 *Nco*I-filled-RV into the pEGFP-C1-*Sa*I-filled-*Sma*I vector.

2.3 Bacterial transformation and DNA purification

Transformation of DH5a electrocompetent *E. coli* bacteria with each of the two constructs was performed by standard procedure electroporation in an ECM 399 PEP (Personal Electroporation Pack), by BTX. DNA was produced by large scale DNA preparation (MAXI-prep) with the Macherey Nagel kit. Prep-DNA was purified with the NucleoSpin kit (by Macherey Nagel). Both constructs were subjected to DNA sequencing to confirm the sequence of PCR products and whether they are in-frame with GFP.

2.4 HEK 293T cell transfection

In order to overexpress the two chimeric proteins, Ig(TAG)GFP and FN(TAG)GFP, as well as rTAG-1-GFP(rTAG in pEGFP), Kv1.1 and Kv1.2 (rKCNA1 and rKCNA2 each in pCDNA3, kindly provided by Dr. O. Pongs), Kv1.4 (in pRGB4^{Amp^R}, kindly provided by Dr. Kleopas Kleopa, The Cyprus Institute of Neurology and Genetics) and Caspr2 (in pCDNA, kindly provided by Dr. Laurence Gouterbroze, Inserm U536, Paris) in HEK 293T cells, the CaCl₂ transfection method was used. The mix used for transfecting each 10 cm² cell culture dish consisted of 1 × HBS, 43.5% ddH₂O, 0.125 M CaCl₂, and 10 µg DNA for single transfections and 6–7 µg DNA from each plasmid for double transfections ($V_{\text{final}} = 1$ mL). Cells were incubated in transfection mix for 6–15 h, then rinsed and incubated in low FBS medium (2–3%) for 2–3 d before live-immunocytochemistry, or lysis and homogenization.

2.5 Immunocytochemistry on live cells

Immunocytochemistry on live cells was performed as described in Ref. [21], on HEK 293T cells transfected either with Ig(TAG)GFP or FN(TAG)GFP or the combination of Kv1.1/Kv1.2/Kv1.4 plasmids. The medium used for live-immunocytochemistry was L.15 (Leibowitz) with BSA (0.5 mg/mL). The primary antibodies used were the rabbit polyclonal anti-GFP (Minotech) to detect the GFP constructs and the mouse monoclonal Kv1.1 (Upstate) for the K⁺ channels. The secondary antibodies used were anti-rabbit Alexa 555 red (Molecular Probes) and anti-mouse FITC (Jackson Immuno-Research Labs), respectively.

■verify change (anti) ■

2.6 Immunoprecipitation (IP)

For IP, HEK-293-T cells, transfected with TAG, Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4, Ig(TAG)GFP, FN(TAG)GFP, Caspr2, or combinations of the above, were washed two times with ice-cold PBS and collected in lysis buffer (20 mM Tris-Cl, pH = 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100) supplemented with protease inhibitors (1 mM PMSF, 0.5 mM benzamidine). Cells were lysed on ice for 30 min with occasional vigorous vortexing and sonication. Cell lysates were cleared by centrifugation at 13 000 rpm for 30 min at 4°C and precleared with 30 µL slurry of protein G agarose (Santa Cruz) or protein A agarose (BioRad) beads, depending on the type of primary antibody used for IP (monoclonal or polyclonal, respectively), for 2 h at 4°C and centrifugation for 15 s at 10 000 rpm. IP was performed by incubating the supernatants, with either an anti-Kv1.1 (Upstate) mAb, or an anti-GFP (Minotech) or anti-TAG-1 mAb 1C12 (Developmental Studies Hybridoma Bank) or anti-Caspr2 (kindly provided by Dr. Laurence Goutebroze, Inserm 536, Paris) polyclonal antibodies, on a rotating platform overnight at 4°C. This was followed by incubation with 30 µL slurry Protein G (agarose, Santa Cruz Biotechnology) or protein A (agarose, BioRad) beads for 2 h at 4°C. After a brief centrifugation at 13 000 rpm the supernatants were removed and the beads were washed three times in lysis buffer, precipitated, and resuspended in equal volume of 2× SDS loading buffer.

2.7 SDS-PAGE and Western blotting

Immunoprecipitated proteins were analyzed by 9% SDS-PAGE followed by electrotransfer to 0.45 µm Protran nitrocellulose transfer membrane (Schleicher & Schuel, BioScience). Immunoblotting (IB) was performed with anti-Kv1.1 or 1C12 mAb or with anti-Caspr2 or anti-GFP polyclonal antibodies followed by incubation with HRP-conjugated antimouse or antirabbit antibody, respectively. Bands were visualized with ECL (Chemicon).

2.8 Teasing of sciatic nerve fibers and immunohistochemical analysis

Mice deficient for TAG-1 (Tag^{-/-}) [23] were kept as heterozygous pairs according to the rules and regulations of the EU (authorization number ■ please add■). Mice were sacrificed by servical dislocation before dissecting their sciatic nerves. The nerves were fixed in 2% paraformaldehyde (PFA) for 30 min, in room temperature, and washed three times with 1 × PBS. Teasing of the sciatic nerve fibers took place under an MZ12 (Leica) stereoscope, on Superfrost[®] Plus microscope slides (O. Kindler), using fine Titanium needles. The fibers were dehydrated in room temperature overnight and then postfixed with acetone at -20°C for 20 min. After that, the fibers were treated with a 10% FCS, 0.1% Triton, 0.5% gelatin blocking solution (in 1xPBS) for 1 h. Incubation for 16 h at 4°C followed for the primary antibody, which was diluted in a solution similar to the blocking step. Three washes with 1 × PBS preceded the 2 h incubation, in room temperature, of the secondary antibody that was also diluted in the blocking solution. Finally, glass coverslips (O. Kindler) were mounted on the slides with the use of Mowiol and the fibers were visualized with the aid of a confocal microscope (DMRE-TCS SP2 SE, Leica). The primary antibodies used for staining Connexin29 and Caspr/Paranodin were: rabbit a-Cx29 (Zymed Laboratories) and mouse anti-Caspr/Paranodin (kindly provided by Dr. Elior Peles). Alexa Fluor 555 and 488 (Molecular Probes) were used as secondary antibodies.

3 Results

3.1 The IgC2-GFP and FN_{III}-GFP constructs produce functional proteins which are externalized to the cell membrane

Previous work from our laboratory [22, 24] has shown that truncated proteins encompassing Ig or FN domains are functional in mediating neurite-outgrowth and homophilic adhesion. In order to verify that the constructs are indeed externalized to the cell membrane, where they should normally interact with K⁺ channels and Caspr2 protein, HEK 293T cells were transfected with either the Ig(TAG)GFP or the FN(TAG)GFP construct and immunocytochemistry on live cells was performed. As shown in Fig. 1, both chimeric proteins (stained with an antirabbit Cy3 secondary antibody) produced after transfection, are targeted to the cell membrane.

3.2 Caspr2 interacts with the Immunoglobulin (IgC2) domains of hTAG-1

We had shown previously that TAG-1 interacts directly with Caspr2 [21]. We set out to investigate the domains of

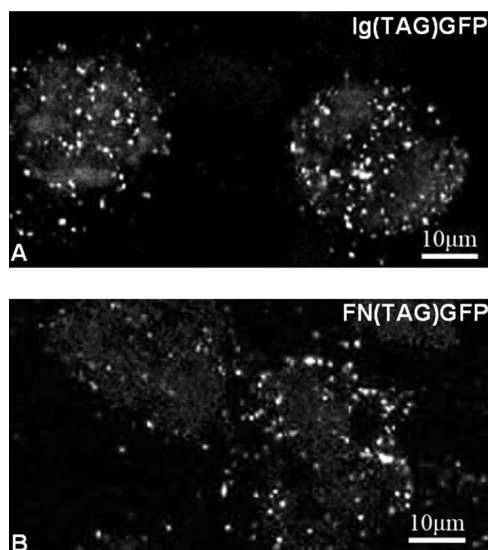


Figure 1. Surface localization of chimeric proteins produced by (A) the Ig(TAG)GFP construct and (B) the FN(TAG)GFP in HEK 293T cells. Immunohistochemistry on live cells was performed using a polyclonal anti-GFP Ab.

TAG-1 involved in this interaction. After a double transfection of HEK 293T cells with Ig(TAG)GFP and Caspr2, the cells were lysed and their protein extract was obtained. IB analysis (Fig. 2A) shows that both proteins are expressed with the correct molecular weight (approximately 105 kDa for Ig(TAG)GFP, 190 kDa for Caspr2). The lysates were subjected to IP. The antibodies used were the monoclonal 1C12, against the Ig domains of TAG-1, and the polyclonal anti-Caspr2. IB analysis of these IPs showed that indeed the antibodies used were able to precipitate the respective proteins (Fig. 2B). When the lysate was precipitated with anti-Caspr2 and then subjected to IB analysis to investigate if Ig(TAG)GFP was present in the complex (using an anti-GFP antibody), the Ig domains of TAG-1 were detected in the immunoprecipitate (Fig. 2C, left panel). The opposite combination was performed in which Caspr2 was detected in the immunoprecipitates of Ig(TAG)GFP performed with an antibody against the Ig domains of TAG-1 (Fig. 2C, right panel). These results indicate that Ig domains of TAG-1 are sufficient for the direct interaction of TAG-1 and Caspr2.

3.3 Caspr2 protein does not interact directly with the fibronectin-like (FN_{III}) domains of hTAG-1

HEK 293T cells were transfected with FN_{III}-GFP and Caspr2 and the protein extracts were subjected to IP. The antibodies used were the polyclonal anti-GFP, against the FN domains (tagged with GFP) of hTAG-1, and the polyclonal anti-Caspr2. The FN(TAG)GFP were expressed with the right molecular weight (approximately 95 kDa) as detected with an anti-GFP antibody (Fig. 2D, left panel).

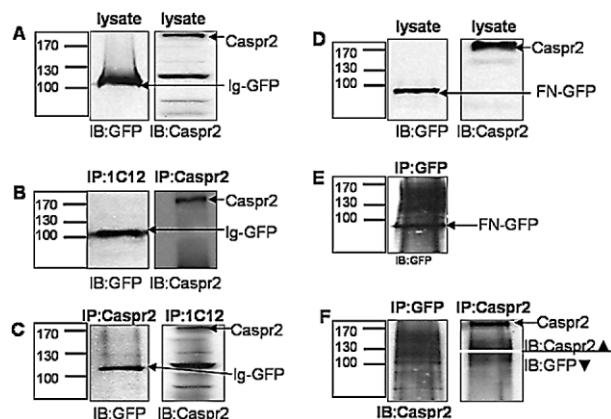


Figure 2. Direct interaction of IgC2-TAG-1 domains with Caspr2. IB analysis of lysates and IPs from transfected HEK 293T cells with either Ig(TAG)GFP/Caspr2 (A–C) or FN(TAG)GFP/Caspr2 (D–F). (A, D) Expression of Caspr2 and GFP in the lysates. (B, E) Positive control IP with aTAG-1, aCaspr2 (B), and aGFP (E) to show that the antibodies used for IP are able to precipitate the respective proteins. (C, F) Experimental IPs show that Caspr2 coimmunoprecipitates with the Ig (C), but not with the FN domains of TAG-1 (F). In Fig. 2F right panel, the membrane was cut in half and blotted with two different antibodies.

Furthermore, the FN domains were immunoprecipitated with the same antibody (Fig. 2E). When IB analysis followed on this immunoprecipitate, Caspr2 was not detected in the complex (Fig. 2F, left panel). In the reverse experiment, Caspr2 was immunoprecipitated by the anti-Caspr2 antibody (Fig. 2F, right panel), but the IB with aGFP still does not reveal a FN-specific band (Fig. 2F, right panel, bottom). Therefore, in contrast to the Ig domains, the FN_{III} domains of hTAG-1 do not interact with Caspr2 (Fig. 2F).

3.4 K⁺ channels directly interact with the immunoglobulin (IgC2) domains of hTAG-1 but not its fibronectin-like repeats

HEK 293T cells were transfected with a plasmid encoding the entire sequence of TAG-1 tagged with GFP, Kv1.1, Kv1.2, and Kv1.4 plasmids. Kv1.4 plasmid has been reported to enhance the membrane localization of Kv1.1 and 1.2, which form heterodimers [25]. The proteins were expressed with the correct molecular weight (Fig. 3A, 150 kDa for TAG-1-GFP and approximately 80–85 and 60–65 for Kv1.1 subunits in transfected cells, [25]). The lysates were subjected to IP using the anti-Kv1.1 mAb directed against the Kv1.1 subunit of K⁺ channels. IB analysis shows that in the immunoprecipitate for Kv1.1, TAG-1-GFP is detected (Fig. 3B, right panel). Cells were also transfected with FN(TAG)GFP and the three Kv channels (Fig. 3C). When cell extracts were immunoprecipitated with anti-Kv1.2, no specific GFP immunoreactive band was revealed (Fig. 3D). The same result was obtained with anti-Kv1.1 (data not shown), indicating that the FN

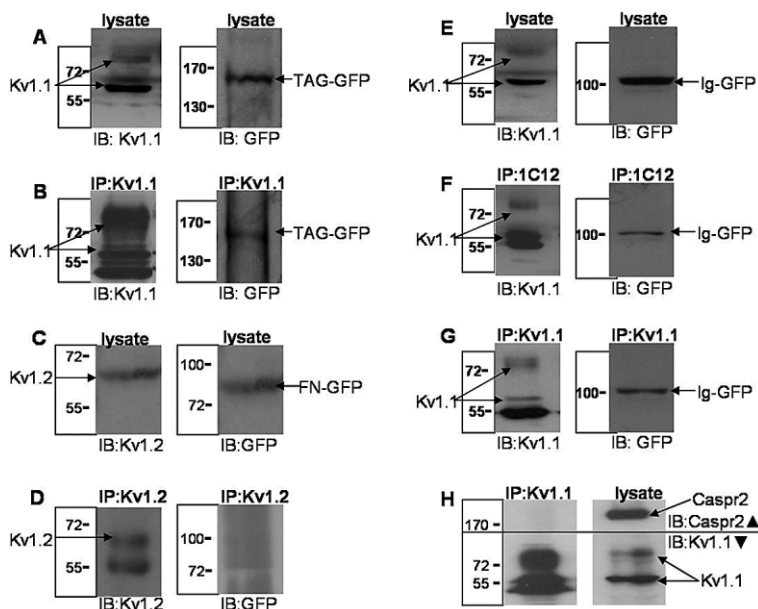


Figure 3. Direct interaction of IgC2-TAG-1 domains with potassium channels. IB analysis of lysates and IPs in transfected HEK 293T cells with combinations of either TAG-GFP (A, B), FN(TAG)GFP (C, D), or Ig(TAG)GFP (E–G) with Kv1.1/Kv1.2/Kv1.4 channels. (A, C, E) IB of lysates for Kv, TAG-GFP, FN-GFP, and Ig-GFP; (B) TAG-1 immunoprecipitates with Kv. (D) FN (TAG)GFP does not immunoprecipitate with Kv. (F) Kv immunoprecipitates with Ig(TAG)GFP. (G) The Ig domains of TAG-1 immunoprecipitate with Kv. The lower band in 3D left panel is due to antibody excess in the IP. (H) Caspr2 is not immunoprecipitated by anti-Kv1.1 in lysates from cells transfected with the three Kv plasmids and Caspr2. Monoclonal Abs to Kv1.1 or 1.2, monoclonal Ab to TAG-1 (1C12) or polyclonal Ab to TAG-1 and polyclonal Ab to GFP were used as indicated on the panels.

repeats of TAG-1 are not able to interact with Kv subunits.

Cells were then transfected with IgC2-GFP as well as the three Kv plasmids, as above. Ig(TAG)GFP was detected with the anti-GFP antibody while K⁺ channels were detected with the anti-Kv1.1 antibody (Fig. 3E). The immunoglobulin domains of TAG-1 co-IP with K⁺ channels since the channels are detected in the Ig(TAG) immunoprecipitate (Fig. 3F, left panel). In the reverse combination, lysates immunoprecipitated with aKv1.1 and immunoblotted with an anti-GFP antibody show (Fig. 3G, right panel) that TAG-1-Ig domains are detected in the IP. In addition, panel H shows that Caspr2 does not associate directly with Kv. In transfected cells with the three Kv plasmids and Caspr2, Kv1.1 is immunoprecipitated by the anti-Kv1.1 mAb but Caspr2 is not detected in the immunoprecipitate (left panel).

3.5 Connexin29 is located in the juxtaparanodal area of the node of Ranvier in wild type and Tag-/- mice

Other known protein expressed in the juxtaparanodal domains is the gap junction protein connexin29 (Cx29, [26]) and the cytoskeletal protein 4.1B, which also localizes in the paranodes [27]. We have previously demonstrated that there is no major change in the distribution of 4.1B in Tag-1^{-/-} mice [21]. Here, we investigated whether the complex comprising of TAG-1, Caspr2, and Kv also includes Cx29. Immunohistochemistry on teased fibers, from mouse sciatic nerves, showed that Cx29 is localized in the juxtaparanode of wild type animals (Fig. 4A), similar to TAG-1. We have examined whether this localization was perturbed in TAG-1^{-/-} mice as is the case with

Caspr2 and potassium channels [21]. Teased fibers obtained from Tag-1^{-/-} and wild type mouse sciatic nerves, stained with anti-Cx29 antibody, did not display any change in the distribution of Cx29 (Fig. 4A and B), despite the absence of TAG-1. This observation strongly suggests that the juxtaparanodal complex that holds the Kv channels in this region does not include Cx29 but is specific to TAG-1 and Caspr2.

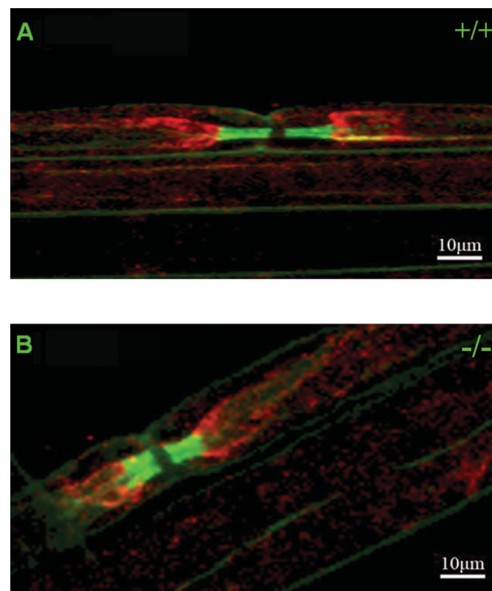


Figure 4. The distribution of the juxtaparanodal gap junction protein connexin29 (Cx29) is not altered in the absence of TAG-1. (A, B) Immunohistochemistry on teased sciatic nerves from adult wild type (A) and Tag-1^{-/-} mice (B) for paranodin/Caspr (green) and Cx39 (red).

4 Discussion

In this report, we provide evidence that TAG-1, Caspr2, and Kv form a specific juxtapanodal complex where the three proteins directly interact *via* the Ig domains of TAG-1. This is the first evidence so far that addresses structural issues involved in the axo–glial interactions known to be essential for the proper organization of myelinated fibers. In addition, this is the first report of a direct interaction of TAG-1 and potassium channels. This tripartite juxtapanodal complex seems to be required for the correct positioning of potassium channels in the area.

Recognition molecules of the IgSF are involved in complex processes during neuronal development such as adhesion, neurite extension, migration, axon pathfinding, synaptic targeting, and are also involved in the organization of the adult nervous system (recently reviewed in [28]). TAG-1, a paradigm of a neuronal-specific, GPI-anchored molecule of the IgSF, is expressed and interacts in a dynamic fashion in the developing and adult nervous system with multiple receptors to carry out its diverse functions ([29–34]; reviewed in [35]). Recently, mutations in the gene encoding Caspr2 have been identified in patients with recessive symptomatic focal epilepsy and cortical dysplasia, suggesting a role for Caspr2 in brain development as well [36].

Functional domain interactions among IgSF proteins have pointed out to the major role played by the Ig domains. In the case of TAG-1, these domains are important for carrying out the heterophilic, neurite-outgrowth ability of the molecule, while its fibronectin-like repeats are essential for the homophilic properties of adhesion and aggregation [22, 24]. In addition, heterophilic binding of TAG-1 to L1 and NrCAM is shown to occur *via* the Ig domains of TAG-1 [24].

The current simplest model that accounts for all data on the interactions of juxtapanodal proteins postulates that glial TAG-1 recognizes in a *trans* fashion axonal TAG-1. This event brings about the *cis* interaction of axonal TAG-1 with Caspr2 and potassium channels (Fig. 8 in [21]). A precedent for this type of interaction has been shown to occur between TAG-1 and L1, where the *trans* homophilic interaction between TAG-1 molecules resulted in *cis* activation of L1, inducing its binding to ankyrin [37]. The data presented here reinforce this model by predicting that the homophilic interaction between glial and axonal TAG-1 occurs *via* the FN domains thus allowing the Ig domains to bind Caspr2 and Kv (Fig. 5). Other juxtapanodal proteins that are shown to be indirectly associated with Caspr2 and Kv, such as PSD95, are not shown to be necessary *in vivo* for the functional accumulation of potassium channels to the juxtapanodes [38]. It is evident that TAG-1 plays a major role in organizing the juxtapanodal components since it is the only protein that directly interacts with both Caspr2 and potassium channels.

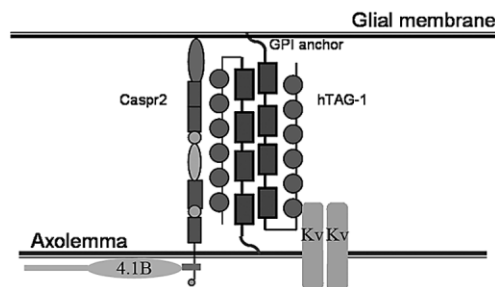


Figure 5. Proposed model for the *trans* homophilic interaction of glial TAG-1 with axonal TAG-1 *via* their fibronectin-like domains, and the *cis* heterophilic interaction with Caspr2 and Kv *via* its immunoglobulin domains.

It is currently believed that the myelin-forming glia of the CNS (the oligodendrocyte) is the primary site of insult in MS patients [39]. One of the major challenges in MS research is to try to understand why, without a myelin sheath, adult nerves degenerate and try to promote nerve repair. Disruption of the interaction between myelin-forming glia and the axon is one of the earliest correlates of axonal dysfunction in demyelinating disease [40]. Adhesion molecules participate in the macromolecular complexes that mediate axo–glial interactions critical for the organization and maintenance of the nodal regions. Since the integrity of these complexes is disrupted in demyelinating diseases, it is probably essential to restore it for promoting the remyelination process that is usually observed in the myelin lesions. However, many aspects of these interactions need to be resolved; this work represents an effort to understand better the molecular determinants of the axo–glial communication that the IgSF adhesion protein TAG-1 delivers in the juxtapanodal region.

We would like to thank Dr. L. Goutebroze, Dr. K. Kleopa, Dr. E. Peles, and Dr. O. Pongs for providing reagents and Dr. M. Traka for helpful discussions. We also acknowledge the technical help of M. Vlavaki, D. Kotzamani, M. Bessa, K. Theodorakis, and M. Savvaki at various stages of this project. This work was supported by a grant (to D. K., RG3368A1) by the National Society for Multiple Sclerosis (US); A. T. is a recipient of an Herakleitos graduate fellowship funded by the Greek Ministry of Education (EPEAEK) and the European Social Fund and M. M. is a recipient of a Manasaki graduate fellowship of the University of Crete.

5 References

- [1] Arroyo, E. J., Scherer, S. S., On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem. Cell Biol.* 2000, 113, 1–18.
- [2] Peles, E., Salzer, J. L., Molecular domains of myelinated axons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000, 10, 558–565.

- [3] Girault, J. A., Peles, E., Development of nodes of Ranvier. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2002, *12*, 476–485.
- [4] Poliak, S., Peles, E., The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003, *4*, 968–980.
- [5] Salzer, J. L., Polarized domains of myelinated axons. *Neuron* 2003, *40*, 297–318.
- [6] England, J. D., Levinson, S. R., Shrager, P., Immunocytochemical investigations of sodium channels along nodal and internodal portions of demyelinated axons. *Microsc. Res. Tech.* 1996, *34*, 445–451.
- [7] Novakovic, S. D., Eglen, R. M., Hunter, J. C., Regulation of Na⁺ channel distribution in the nervous system. *Trends Neurosci.* 2001, *24*, 473–478.
- [8] Coman, I., Aigrot, M. S., Seilhean, D., Reynolds, R. *et al.*, Nodal, paranodal and juxtaparanodal axonal proteins during demyelination and remyelination in multiple sclerosis. *Brain* 2006, *129*, 3147–9.
- [9] Franklin, R. J., Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nat. Rev.* 2002, *3*, 705–714.
- [10] Lubetzki, C., Williams, A., Stankoff, B., Promoting repair in multiple sclerosis: problems and prospects. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2005, *18*, 237–244.
- [11] Schafer, D. P., Custer, A. W., Shrager, P., Rasband, M. N., Early events in node of Ranvier formation during myelination and remyelination in the PNS. *Neuron Glia Biol.* 2006, *2*, 69–79.
- [12] Rios, J. C., Melendez-Vasquez, C. V., Einheber, S., Lustig, M. *et al.*, Contactin-associated protein (Caspr) and contactin form a complex that is targeted to the paranodal junctions during myelination. *J. Neurosci.* 2000, *20*, 8354–8364.
- [13] Faivre-Sarrailh, C., Gauthier, F., Denisenko-Nehrbass, N., Le Bivic, A. *et al.*, The GPI-anchored adhesion molecule F3/contactin is required for surface transport of paranodin/caspr. *J. Cell Biol.* 2000, *149*, 491–502.
- [14] Bhat, M. A., Rios, J. C., Lu, Y., Garci-Fresc, G. P. *et al.*, Axon-glia interactions and the domain organization of myelinated axons requires neurexin IV/Caspr/Paranodin. *Neuron* 2001, *30*, 369–383.
- [15] Boyle, M. E., Berglund, E. O., Murai, K. K., Weber, L. *et al.*, Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve. *Neuron* 2001, *30*, 385–397.
- [16] Charles, P., Tait, S., Faivre-Sarrailh, C., Barbin, G. *et al.*, Neurofascin is a glial receptor for the paranodin/Caspr-contactin axonal complex at the axoglial junction. *Curr. Opin. Biol.* 2002, *12*, 217–220.
- [17] Sherman, D. L., Tait, S., Melrose, S., Johnson, R. *et al.*, Neurofascins are required to establish axonal domains for saltatory conduction. *Neuron* 2005, *48*, 737–742.
- [18] Furley, A. J., Morton, S. B., Manalo, D., Karagogeos, D. *et al.*, The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity. *Cell* 1990, *61*, 157–170.
- [19] Poliak, S., Gollan, L., Martinez, R., Custer, A. *et al.*, Caspr2, a new member of the Neurexin superfamily is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K⁺ channels. *Neuron* 1999, *24*, 1037–1047.
- [20] Traka, M., Dupree, J. L., 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. *J. Neurosci.* 2002, *22*, 3016–3024.
- [21] Traka, M., Goutebroze, L., Denisenko, N., Bessa, M. *et al.*, Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *J. Cell Biol.* 2003, *162*, 1161–1172.
- [22] Tsiotra, P. C., Theodorakis, K., Papamatheakis, J., Karagogeos, D., The fibronectin domains of the neural adhesion molecule TAX-1 are necessary and sufficient for homophilic binding. *J. Biol. Chem.* 1996, *271*, 29216–29222.
- [23] Fukamauchi, F., Aihara, O., Wang, Y., Akasaka, K. *et al.*, TAG-1 Deficient Mice Have Marked Elevation of Adenosine A1 Receptors in the Hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, *281*, 220–226.
- [24] Pavlou, O., Theodorakis, K., Falk, J., Kutche, M. *et al.*, Analysis of interactions of the adhesion molecule TAG-1 and its domains with other Immunoglobulin superfamily members. *Mol. Cell. Neurosci.* 2002, *20*, 367–381.
- [25] Manganas, L. N., Trimmer, J. S., Subunit composition determines Kv1 potassium channel surface expression. *J. Biol. Chem.* 2000, *275*, 29685–29693.
- [26] Altevogt, B. M., Kleopa, K. A., Postma, F. R., Scherer, S. S. *et al.*, Connexin29 Is Uniquely Distributed within Myelinating Glial Cells of the Central and Peripheral Nervous Systems. *J. Neurosci.* 2002, *22*, 6458–6470.
- [27] Denisenko-Nehrbass, N., Oguievetskaia, K., Goutebroze, L., Galvez, T. *et al.*, Protein 4.1B associates with both Caspr/paranodin and Caspr2 at paranodes and juxtaparanodes of myelinated fibers. *Eur. J. Neurosci.* 2003, *17*, 411–416.
- [28] Maness, P. F., Schachner, M., Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: Signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat. Neurosci.* 2007, *10*, 19–26.
- [29] Dodd, J., Morton, S. B., Karagogeos, D., Yamamoto, M., Jessell, T. M., Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons. *Neuron* 1988, *1*, 105–116.
- [30] Denaxa, M., Chan, C. H., Schachner, M., Parnavelas, J. G., Karagogeos, D., The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons along the corticofugal fiber system. *Development* 2001, *128*, 4635–4644.
- [31] Kyriakopoulou, K., DeDiego, 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*, 287–296.
- [32] Denaxa, M., Pavlou, O., Tsiotra, P., Papadopoulos, G. C. *et al.*, The upstream regulatory region of the gene for the human homologue of the adhesion molecule TAG-1 contains elements driving neural specific expression *in vivo*. *Mol. Brain Res.* 2003, *118*, 91–101.
- [33] Denaxa, M., Kyriakopoulou, K., Theodorakis, K., Trichas, G. *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 *Dev. Biol.* 2005, *288*, 87–99.
- [34] Soares, S., Traka, M., vonBoxberg, Y., Karagogeos, D. *et al.*, Neuronal and glial expression of the adhesion molecule TAG-1 is regulated after peripheral nerve lesion or central neurodegeneration of adult nervous system. *Eur. J. Neurosci.* 2005, *21*, 1169–1180.
- [35] Karagogeos, D., Neural GPI-anchored cell adhesion molecules. *Front. Biosci.* 2003, *8*, 1304–1320.
- [36] Strauss, K. A., Puffenburger, E. G., Huentelman, M. J., Gottlieb, S. *et al.*, Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant Contactin-associated protein-like 2. *N. Eng. J. Med.* 2006, *354*, 1370–1377.
- [37] Malhotra, J. D., Tsiotra, P., Karagogeos, D., Hortsch, M. Cis-activation of L1-mediated ankyrin recruitment by TAG-1 homophilic cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 1998, *273*, 33354–33359.
- [38] Rasband, M. N., Park, E. W., Zhen, D., Arbuckle, M. I. Clustering of neuronal potassium channels is independent of their interaction with PSD-95. *J. Cell Biol.* 2002, *159*, 663–672.
- [39] Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B. *et al.*, A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions: A study of 113 cases. *Brain* 1999, *122*, 2279–2295.
- [40] Brophy, P. J., Axoglial junctions: Separate the channels or scramble the message. *Curr Biol.* 2001, *11*, R555–R557.