ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΝΕΥΡΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη των μηχανισμών μετανάστευσης κυττάρων στο προπαρεγκεφαλιδικό σύστημα

Κατερίνα-Μαρία Κυριακοπούλου

ΙΟΥΛΙΟΣ 2002

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ……1
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ……..……..…...6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ……..……7
SUMMARY……10
ΕΙΣΑΓΩΓΗ…….……...……12
1. ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ……...13
1.1 Ακτινωτή μετανάστευση…….……...13
1.2 Οριζόντια ή επιφανειακή μετανάστευση……18
2. ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΤΟΝ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΟ ΡΟΜΒΟΕΙΔΗ ΕΓΚΕΦΑΛΟ……22
2.1 Πρόσθιο επιφανειακό μεταναστευτικό μονοπάτι (ΠΕΜΜ)……...25
2.2 Οπίσθιο επιφανειακό μεταναστευτικό μονοπάτι (ΟΕΜΜ)……26
2.3 Μεταναστευτικό μονοπάτι της κάτω ελαίας (ΜΜΚΕ)……..27
3. ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΣΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ……..28
4. ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΝΕΥΡΑΞΟΝΩΝ ΣΤΟ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ……...29
4.1 Εδαφιαίο πέταλο…….29
4.2 Καθοδηγητικά μόρια στο κεντρικό νευρικό σύστημα……...31
4.2.1 Πρωτεΐνες που δρουν εξ' επαφής……32
4.2.1.1 Μόρια συνάφειας……32
4.2.1.2 Eph/ephrins……...39
4.2.1.3 Στοιχεία εξωκυττάριου χώρου (extracellular matrix components, ECM)……...41
4.2.1.4 Σεμαφορίνες (Semaphorins)……41
4.2.2 Πρωτεΐνες που δρουν με διάχυση εξ' αποστάσεως……43
4.2.2.1 Νετρίνες και υποδοχείς……43
4.2.2.2 F-σπονδίνη (F-spondin)……46
4.2.2.3 Slit-Robo……..46

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ……..……..49

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ……...50

1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ……..50

2. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ……..51

2.1 Βακτηριακές καλλιέργειες……51

2.2 Μετασχηματισμός (transformation) βακτηριακών κυττάρων……51

2.3 Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων……52

2.3.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα…..……52

2.3.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα……..……..52

2.3.3 Απομόνωση γενωμικού DNA από ιστούς……...52

2.4 Πέψη μορίων DNA με ένζυμα περιορισμού……..53

2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)……53

3. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ……53

3.1 Προετοιμασία ιστών……...53

3.2 Ιστοχημικές χρώσεις……...54

3.2.1 Χρώση cresyl violet……54

3.2.2 Χρώση ανίχνευσης β-γαλακτοσιδάσης ……..54

3.2.3 DiI σήμανση και φωτο-οξείδωση (φωτομετατροπή, Photo-oxidation)..54

3.3 Ανοσοϊστοχημεία……...55

3.3.1 Διαδικασία ανοσοϊστοχημείας……55

3.3.2 Πρωτοταγή αντισώματα (primary abs)……...56

3.3.3 Δευτεροταγή αντισώματα. (secondary abs)……56

3.4 In situ υβριδοποίηση……..56

3.4.1 Διαδικασία in situ υβριδοποίησης……...56

3.4.2 Ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν……58

4. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ……..60

4.1 Ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές……...60

4.2 Μέθοδοι διαμόλυνσης……60

4.3 Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για διαμόλυνση……..61

5. ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ……61

5.1 Δημιουργία καλλιεργούμενων ιστοτεμαχίων (explants)……61

5.2 Δημιουργία χιμαιρικών ιστοτεμαχίων όρνιθας-ορτυκίου……..63

5.3 Σήμανση με DiI……..63

5.4 Πήκτωμα κολλαγόνου……63

5.5 Πηγές εκκρινόμμενων πρωτεϊνών……..64
5.5.1 Παρασκευή συσσωματωμάτων κυττάρων COS, που εκκρίνουν διαλυτές πρωτεΐνες……..64
5.5.2 Αγαρόζη χαμηλού σημείου πήξεως ως πηγή εκκρινόμενων πρωτεϊνών64
5.5.3 Σφαιρίδια affigel……64
5.5.4. Διαλυτή νετρίνη στο θρεπτικό υλικό…….….65
5.6 Πειράματα αναστολής δράσης πρωτεϊνών……65
5.6.1 Αναστολή της δράσης πρωτεϊνών με ενζυματικό τρόπο…….…65
5.6.2 Αναστολή της δράσης πρωτεϊνών με τη χρήση αντισωμάτων……66
5.6.3 Αναστολή της δράσης πρωτεϊνών με τη χρήση διαλυτών πρωτεϊνών…67
5.6.3.1 Παραγωγή διαλυτών πρωτεϊνών……..67
5.6.3.2 SDS-ηλεκτροφόρηση……...68
5.6.3.3 Ανοσοαποτύπωσης (Western blots)…….69
6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ……..70
7. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ……..70
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ……...71
1. ΟΡΙΖΟΝΤΙΑ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΩΝ ΑΚΤΙΝΩΤΩΝ ΓΛΟΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟΝ ΟΠΙΣΘΙΟ ΡΟΜΒΟΕΙΔΗ ΕΓΚΕΦΑΛΟ……71
2. ΟΠΙΣΘΙΟ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΟ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ (ΟΕΜΜ)……74
2.1 Έκφραση της TAG-1 από τα κύτταρα του ΟΕΜΜ *in vivo*……74
2.2 Έκφραση της TAG-1 από τα κύτταρα του ΟΕΜΜ *in vitro*……...76
2.3. Μελέτη του ΟΕΜΜ με τη χρήση ενσωματούμενης 5-βρώμο-2-δεόξυ-ουριδίνης.……...80
2.4 Μηχανισμοί μετανάστευσης κυττάρων στο ΟΕΜΜ……..83
2.4.1 Μορφολογία μεταναστευόντων κυττάρων του ΟΕΜΜ……..83
2.4.2 Τρόποι μετανάστευσης των κυττάρων του ΟΕΜΜ……85
2.5 Επίδραση της αναστολής της δράσης της TAG-1 στην μετανάστευση των κυττάρων του ΟΕΜΜ……..88
2.6 Φαινότυπος των μυών με απώλεια δράσης του γονιδίου της TAG-1……92
2.7 Έκφραση άλλων μορίων συνάφειας και επίδραση της αναστολής δράση τους στο ΟΕΜΜ…….95
2.8 Επίδραση του εδαφιαίου πετάλου στο ΟΕΜΜ……..98
2.9 Επίδραση της εκκρινόμενης από το εδαφιαίο πέταλο νετρίνης στο ΟΕΜΜ…...101

3. ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΚΑΤΩ ΕΛΑΙΑΣ (ΜΜΚΕ)……103
3.1 Μετανάστευση των κυττάρων του ΜΜΚΕ *in vivo*……..103
3.2 Μετανάστευση των κυττάρων του ΜΜΚΕ *in vitro*…….105
3.3 Εσωτερική μοίρα των κυττάρων και παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος που εμπλέκονται στη δημιουργία του πυρήνα της κάτω ελαίας……...107
3.3.1 Μεταμοσχεύσεις τύπου I……...108
3.3.2 Μεταμοσχεύσεις τύπου II……..109
3.3.3 Μεταμοσχεύσεις τύπου III……109
3.3.4 Μεταμοσχεύσεις τύπου IV……113
3.4 Επίδραση του εδαφιαίου πετάλου στη μετανάστευση των κυττάρων του ΜΜΚΕ……...115
3.5 Επίδραση της νετρίνης στη μετανάστευση των κυττάρων του ΜΜΚΕ……..119
3.6 Έκφραση μορίων της οικογένειας ephrin/Eph και επίδρασή τους στη μετανάστευση των κυττάρων του ΜΜΚΕ…….125
ΣΥΖΗΤΗΣΗ……..128
1. Γενικά…….128
2. *In vitro* σύστημα καλλιέργειας, για τη μελέτη των δύο μεταναστευτικών μονοπατιών…….129
3. Αλυσιδωτή και νευροφιλική μετανάστευση από τα κύτταρα του οπίσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού (ΟΕΜΜ)…….…….133
4. Το μόριο συνάφεια TAG-1 εμπλέκεται στη μετανάστευση των κυττάρων του οπίσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού (ΟΕΜΜ)……..134
5. Ρόλος άλλων μορίων συνάφειας στη μετανάστευση των κυττάρων του οπίσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού (ΟΕΜΜ)……..138
6. Η εσωτερική μοίρα και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες καθορίζουν τη πορεία των κυττάρων του μεταναστευτικού μονοπατιού της κάτω ελαίας (ΜΜΚΕ)……..142
7. Ρόλος του εδαφιαίου πετάλου στην καθοδήγηση των κυττάρων του οπίσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού (ΟΕΜΜ) και του μεταναστευτικού μονοπατιού της κάτω ελαίας (ΜΜΚΕ)…….…….144
8. Επίδραση της νετρίνης στην καθοδήγηση των κυττάρων του οπίσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού (ΟΕΜΜ) και του μεταναστευτικού μονοπατιού της κάτω ελαίας (ΜΜΚΕ)……..147
9. Επίδραση μορίων της οικογένειας των ephrin/Eph στη μετανάστευση των κυττάρων του μεταναστευτικού μονοπατιού της κάτω ελαίας (ΜΜΚΕ)……..152

Συνοψίζοντας……...…..…157
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ……..159
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ……176
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ……..197

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ΕΔ: Εδαφιαίο πέταλο
ΕΣΠ: Έξω Σφηνοειδής Πυρήνας
ΜΜΚΕ: Μεταναστευτικό Μονοπάτι Κάτω Ελαίας
ΟΕΜΜ: Οπίσθιο Επιφανειακό Μεταναστευτικό Μονοπάτι
ΠΔΠ: Πλάγιος Δικτυωτός Πυρήνας
ΠΕΜΜ: Πρόσθιο επιφανειακό μεταναστευτικό μονοπάτι.
ΡΧ: ρομβικό χείλος,

CE: cerebellum (παρεγκεφαλίδα)
EC(N): External Cuneate (Nucleus) (έξω σφηνοειδής πυρήνας)
EGL: External Granule Layer (εξωτερική κοκκώδης στοιβάδα)
fbm: facial branchiomotor nucleus (κινητικός πυρήνας του προσωπικού νεύρου)
GC: Growth Cone (αυξητικός κώνος)
GPI: Glycosil-Phosphatidyl-Inositol
IC: Inferior Colliculus (άνω διδύμιο)
IGL: Internal Granule Layer (εσωτερική κοκκώδης στοιβάδα)
IO: Inferior Olive (κάτω ελαία)
LGE: Lateral Ganglionic Eminence (πλάγια περιοχή πρόδρομων βασικών γαγγλίων)
LHRH: Luteinizing Hormone-Releasing Hormone neurons
LRL: Lateral Rhombic Lip (πλάγιο ρομβικό χείλος)
LR(N): Lateral Reticular (Nucleus) (πλάγιος δικτυωτός πυρήνας)
ME: medulla (προμήκης)
MF: Mossy Fibers (βρυώδεις ίνες)
MGE: Medial Ganglionic Eminence (μέση περιοχή πρόδρομων βασικών γαγγλίων)
PBS: Phosphate Buffer Saline
PCL: Purkinje Cell Layer (στοιβάδα Purkinje κυττάρων)
PCNa: Precerebellar Neuroepithelium, anterior (πρόσθιο προπαρεγκεφαλιδικό νευροεπιθήλιο)
PCNp: Precerebellar Neuroepithelium, posterior (οπίσθιο προπαραγκεφαλιδικό νευροεπιθήλιο)
PG(N): Pontine Gray Nucleus (βασικός γεφυριδικός πυρήνας)
PI-PLC: Phosphatidyl-Inositol Phospholipase C
PO: pons (γέφυρα)
RT(N): (Pontine) Reticulo-Tegmental Nucleus (δικτυωτός πυρήνας της καλύπτρας της γέφυρας)
UPL: Upper Rhombic Lip (άνω ρομβικό χείλος)
v4a: 4th ventricle, anterior (πρόσθια 4η κοιλία)
v4p: 4th ventricle, posterior (οπίσθια 4η κοιλία)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος των σπονδυλωτών τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα χρειάζεται να μεταναστεύσουν, πολλές φορές διανύοντας μεγάλες αποστάσεις, ώσπου να φτάσουν στις τελικές τους θέσεις και να δημιουργήσουν τις απαραίτητες συνάψεις. Η μετανάστευση των νευρώνων μπορεί να γίνει είτε ακτινωτά είτε οριζόντια. Στην περιοχή του αναπτυσσόμενου ρομβοειδούς εγκεφάλου παρατηρούνται αρκετά οριζόντια μεταναστευτικά μονοπάτια. Στη συγκεκριμένη εργασία εστιαστήκαμε σε δύο πληθυσμούς νευρώνων που δημιουργούνται στην περιοχή του ρομβικού χείλους των ρομβομερών 7 και 8 και μεταναστεύουν κοιλιακά, ακολουθώντας δύο διαφορετικά μεταναστευτικά μονοπάτια. Τα κύτταρα του οπίσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού (ΟΕΜΜ) μεταναστεύουν ακριβώς κάτω από την εξωτερική (pial) επιφάνεια, διασχίζουν τη μέση γραμμή και δημιουργούν τον πλάγιο δικτυωτό (ΠΔΠ) και τον έξω σφηνοειδή πυρήνα (ΕΣΠ) ετερόπλευρα από το σημείο που ξεκίνησαν. Τα κύτταρα του μεταναστευτικού μονοπατιού της κάτω ελαίας (ΜΜΚΕ) μεταναστεύουν βαθιά στο παρέγχυμα και σταματούν ομόπλευρα, εκατέρωθεν του εδαφιαίου πετάλου σχηματίζοντας τους πυρήνες της κάτω ελαίας ΠΚΕ).

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε ένα σύστημα *in vitro* καλλιέργειας και αναλύσαμε τη μορφολογία των κυττάρων του ΟΕΜΜ. Δείξαμε ότι τα κύτταρα του συγκεκριμένου μονοπατιού εκτείνουν μεγάλες καθοδηγητικές αποφύσεις και ακολουθούν δύο διαφορετικά πρότυπα μετανάστευσης. Στην αρχή της μεταναστευτικής τους πορείας και όταν βρίσκονται ακόμα στη ραχιαία πλευρά του νευρικού σωλήνα, μεταναστεύουν σε στενή επαφή το ένα με το άλλο σχηματίζοντας αλυσίδες. Αντίθετα, όταν τα κύτταρα φτάνουν στην κοιλιακή πλευρά του νευρικού σωλήνα ακολουθούν προϋπάρχοντες Tuj-1 θετικούς άξονες ως φορείς στήριξης. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι στο ΟΕΜΜ συνυπάρχουν ομοτυπικοί και ετεροτυπικοί μηχανισμοί αλληλεπίδρασης.

Δείξαμε επίσης ότι το μόριο συνάφειας TAG-1 εκφράζεται από τα κύτταρα του ΟΕΜΜ μόνο κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους. Αναστέλλοντας τη δράση του συγκεκριμένου μορίου, προκαλούνται προβλήματα στη μετανάστευση των κυττάρων του ΟΕΜΜ, γεγονός που φανερώνει ότι η TAG-1 εμπλέκεται στη διαδικασία της μετανάστευσης. Επιπλέον, στα ζώα που εμφανίζουν απώλεια δράσης

του γονιδίου της TAG-1 παρατηρούνται λιγότερα κύτταρα στο OEMM. Άλλα μέλη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών και γνωστοί προσδέτες της TAG-1, που εκφράζονται στην περιοχή του OEMM, δεν φαίνεται να εμπλέκονται στη διαδικασία της μετανάστευσης. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η TAG-1 δρα ως ένα εξ' επαφής καθοδηγητικό σήμα, που εμπλέκεται όχι μόνο στην επέκταση νευραξόνων, αλλά και στην καθοδήγηση κυτταρικών σωμάτων, πιθανότατα μέσω ενός ομοφιλικού τύπου σύνδεσης.

Τα κύτταρα του MMKE εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα Brn3.2 τόσο κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους όσο και μετά την τοποθέτησή τους στις τελικές τους θέσεις. Με τη χρήση χιμαιρικών ιστοτεμαχίων όρνιθας-ορτυκίου, δείξαμε ότι τόσο η εσωτερική μοίρα των κυττάρων, όσο και το περιβάλλον, στο οποίο συντελείται η μετανάστευση, επηρεάζουν την τελική δημιουργία του πυρήνα της κάτω ελαίας. Επιπλέον δείξαμε ότι το εδαφιαίο πέταλο ασκεί ελκτική δράση στα κύτταρα και των δύο μεταναστευτικών μονοπατιών, καθώς όταν τοποθετηθεί σε έκτοπη θέση, τα κύτταρα παρεκκλίνουν της φυσιολογικής τους πορείας και συσσωρεύονται γύρω από το έκτοπο εδαφιαίο πέταλο. Επίσης, το εδαφιαίο πέταλο φαίνεται ότι παρέχει ένα εξ΄ επαφής σήμα σταματήματος των κυττάρων της κάτω ελαίας, τα οποία συσσωρεύονται γύρω από τη συγκεκριμένη δομή χωρίς να τη διαπερνούν.

Έκτοπες πηγές νετρίνης μπορούν να μιμηθούν την ελκτική δράση του εδαφιαίου πετάλου στα κύτταρα του OEMM, τα οποία εκφράζουν τον υποδοχέα της νετρίνης DCC καθόλη τη διάρκεια της μετανάστευσή τους. Αντίθετα τα κύτταρα του MMKE εκφράζουν DCC όταν βρίσκονται κοντά στο ρομβικό χείλος και όταν φτάνουν την τελική τους θέση στη μέση γραμμή, και για αυτό το λόγο η έκτοπη πηγή νετρίνης έλκει τα συγκεκριμένα κύτταρα μόνο όταν βρίσκονται στη ραχιαία πλευρά του νευρικού σωλήνα.

Επιπλέον, δείξαμε ότι το σήμα τερματισμού που παρέχει το εδαφιαίο πέταλο στα κύτταρα του MMKE πιθανόν να είναι η αλληλεπίδραση των μορίων ephrin-B3, που εκφράζεται από τα κύτταρα του εδαφιαίου πετάλου, με την EphA4, που εκφράζεται από τα κύτταρα του MMKE. Στα ζώα που εμφανίζουν απώλεια δράσης του γονιδίου της EphA4 τα κύτταρα του πυρήνα της κάτω ελαίας δεν έχουν σταματήσει στη φυσιολογική τους θέση, αλλά ανιχνεύονται και πάνω στη μέση γραμμή.

Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι σήματα που δρουν εξ΄ επαφής και σήματα που δρουν εξ΄ αποστάσεως εμπλέκονται στην καθοδήγηση των μεταναστευόντων κυττάρων και των δύο προς μελέτη μονοπατιών. Επιπλέον, μόρια που εμπλέκονται στην καθοδήγηση αναπτυσσόμενων νευραξόνων παίζουν τον ίδιο σημαντικό ρόλο και στην καθοδήγηση των μεταναστευόντων κυτταρικών σωμάτων.

SUMMARY

In the developing nervous system neurons need to migrate often long distances to reach their final position and form the appropriate synaptic contacts. The migration of neurons takes place in two directions: radially and tangentially. In the region of the developing rhombencephalon many tangential migratory streams are observed. In this study we focused on two populations of neurons generated in the rhombic lip of rhombomeres 7 and 8 which migrate ventrally following two different migratory steams. The neurons of the caudal superficial migratory stream migrate just beneath the pial surface, cross the ventral midline and form the lateral reticular (LRN) and the external cuneate nucleus (ECN) at the contralateral side of their origin. The cells of the olivary stream migrate deep in the parenchyma and stop ipsilaterally against the floor plate to form the inferior olive nucleus (ION).

First, in this study we use an *in vitro* assay for the culture of the region where these migrations take place and we analyze the morphology of the migrating cells of the superficial stream. We show evidence that these cells are preceded by long leading processes and during their migration they follow two different migratory patterns. At the beginning of their migration in the dorsal neural tube, they migrate in close apposition to each other and form distinct chains, whereas they disperse and follow Tuj-1 immunoreactive axons on reaching the ventral hindbrain. This suggests that, in the superficial stream, neuronal migration combines both homotypic and heterotypic mechanisms.

We also show that the adhesion molecule TAG-1 is expressed by the migrating cells only during the period of migration. Blocking TAG-1 function results in alterations in the superficial migration, indicating that TAG-1 is involved in the superficial migration. Moreover, in TAG-1-deficient animals we observed fewer migrating cells at the superficial stream. Other members of the immunoglobulin superfamily and known ligands of TAG-1 are also expressed in the region of the migration but are not involved in the migration. These findings provide evidence that the TAG-1 protein is involved as a contact-dependent signal guiding not only axonal outgrowth but also cell migration probably via a homophilic type of interaction.

The cells of the olivary migratory stream express the transcription factor Brn3.2 during their migration and after they settle to their final position. In this study,

by using chick-quail chimeras, we provide evidence that not only the intrinsic fate of the migrating cells but also the environment of the migration is important for the formation of the appropriate nuclei. Moreover, we show that the floor plate exhibites a strong chemoattractive influence on both migratory streams that deviate from their normal path and follow the direction of ectopic floor plate fragments. In addition, the floor plate produces a short-range stop signal to the olivary cells which aggregate at both sides of this region.

Ectopic sources of netrin can mimic the effect of the floor plate in the cell of the superficial migratory stream, which express the DCC netrin receptor during their migration. In contrast, the olivary cells express the DCC receptor when they are located near the rhombic lip and when they reach the midline, so ectopic netrin sources attract the olivary cells only when they are at the dorsal neural tube.

In addition, we show evidence that the stop signal provided by the floor plate to the migrating olivary cells is probably the interaction between ephrin-B3, expressed by the floor plate, and EphA4, which is expressed by the migrating cells. In EphA4-deficient mice some cells of the inferior olive nucleus do not stopped before the floor plate and they are detected on the midline.

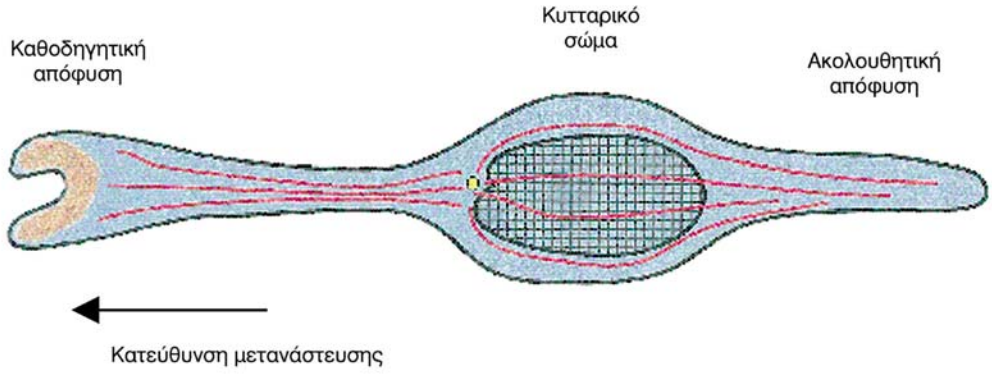
In general, our findings provide evidence that both contact-dependent signals and chemoattractive cues influence the migration of the cells of the superficial migratory and olivary steams in the caudal medulla. Moreover, in this study we provide another example of common cues involved in both axonal guidance and cell migrations.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το νευρικό σύστημα αποτελεί ένα πολύπλοκο δίκτυο, που απαρτίζεται από 10^{12} νευρώνες, οι οποίοι συνδέονται με πολύ συγκεκριμένο, ακριβή και σταθερό τρόπο, δημιουργώντας τις συνάψεις που απαιτούνται για την άρτια λειτουργία του. Μια πολύ βασική διαδικασία για την σωστή διάταξη των νευρώνων στις τελικές τους θέσεις είναι η μετανάστευση των πρόδρομων νευρικών κυττάρων. Η σημασία αυτής της διαδικασίας είναι πολύ μεγάλη, καθώς μια λανθασμένη τοποθέτηση των νευρικών κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε μη-λειτουργική σύναψη, άρα και σε μη-σωστή λειτουργία του συγκεκριμένου νευρωνικού δικτύου.

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα δημιουργούνται σε συγκεκριμένα σημεία και στη συνέχεια μεταναστεύουν διανύοντας πολλές φορές μεγάλες αποστάσεις, ώσπου να φτάσουν στις τελικές τους θέσεις. Εκεί συνεχίζουν τη διαφοροποίησή τους, εκτείνουν νευράξονες και δημιουργούν τις απαραίτητες συνάψεις με άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς, ώστε να δημιουργηθεί σωστά και με ακρίβεια το εκτενές δίκτυο του νευρικού συστήματος. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της μετανάστευσης, αλλά και της επέκτασης των νευραξόνων τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα δέχονται επιδράσεις από πολλά μόρια, τα οποία προέρχονται τόσο από τα γειτονικά κύτταρα, όσο και από το ευρύτερο περιβάλλον.

Το μεταναστεύον κύτταρο εμφανίζει τη χαρακτηριστική επιμήκη μορφή που φαίνεται στην εικόνα 1. Προς την κατεύθυνση που γίνεται η μετανάστευση εκτείνεται καθοδηγητική απόφυση (leading process), η οποία αναλόγως το είδος του κυττάρου που τη φέρει και το είδος της μετανάστευσης που εκτελεί μπορεί να φτάνει σε μήκος και το 1 mm (Yee et al., 1999). Στην άκρη της η δομή αυτή φέρει φιλοπόδια και λαμελιπόδια, ενώ η επέκτασή της επιτυγχάνεται μέσω πολυμερισμού του δικτύου ακτίνης που περιέχει (Hatten and Mason, 1990; Lambert de Rouvoit and Goffinet, 2001). Το κυτταρικό σώμα ακολουθεί την καθοδηγητική απόφυση, μια διαδικασία που ονομάζεται νουκλεοκίνηση (Morris et al., 1998). Τέλος, την δομή του κυττάρου ολοκληρώνει σε ορισμένες περιπτώσεις η ακολουθητική απόφυση (trailing process).



***Εικόνα 1*:** Μεταναστεύον κύτταρο με χαρακτηριστική επιμήκη δομή. Το κυτταρικό σώμα ακολουθεί την καθοδηγητική απόφυση, η οποία επεκτείνεται προς την κατεύθυνση της μετανάστευση.

1. ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) έχουν χαρακτηριστεί δύο είδη μεταναστεύσεων: η ακτινωτή και η οριζόντια ή επιφανειακή μετανάστευση.

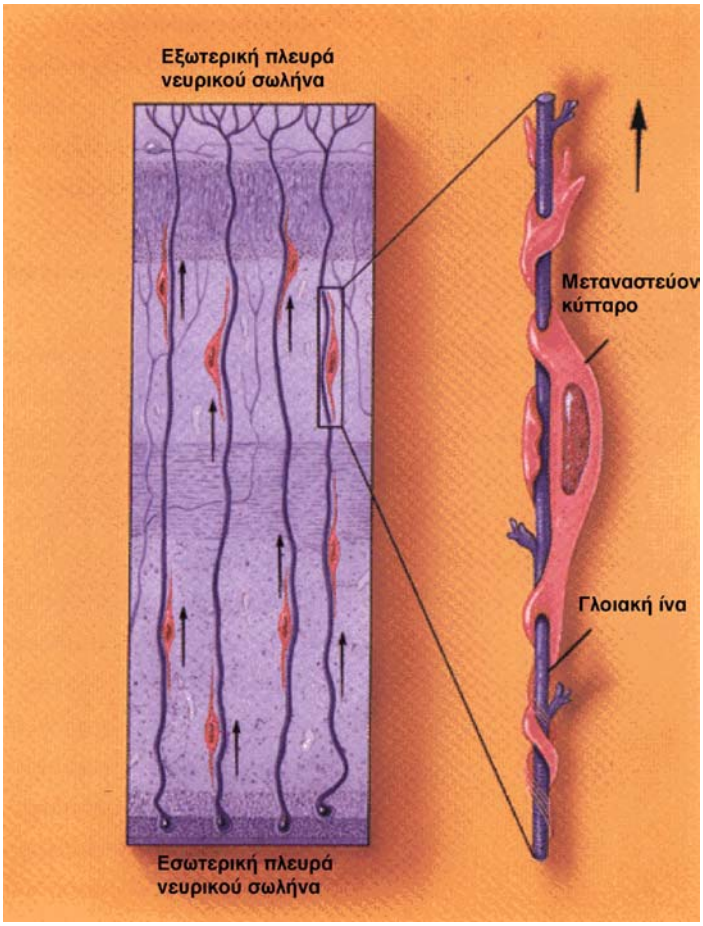
1.1 Ακτινωτή μετανάστευση

Οι πρώτες μελέτες που εστιάστηκαν στην ανάπτυξη του ΚΝΣ άρχισαν να φανερώνουν ακτινωτά μονοπάτια ανάπτυξης, όπου τα κύτταρα δημιουργούνταν στις κοιλιακές ζώνες του εγκεφάλου και μετανάστευαν ακτινωτά προς τις τελικές τους θέσεις ακολουθώντας ως φορείς στήριξης τις αποφύσεις των γλοιακών κυττάρων, οι οποίες είναι διατεταγμένες με ακτινωτό τρόπο στο νευρικό σωλήνα (Sidman and Rakic, 1973).

Ως εκ τούτου, ο τρόπος αυτός μετανάστευσης ονομάστηκε ακτινωτή μετανάστευση και παρατηρείται κυρίως σε δομές που εμφανίζουν στοιβάδες όπως είναι ο φλοιός των εγκεφαλικών ημισφαιρίων (Rakic, 1971a; Rakic, 1972), της παρεγκεφαλίδας (Rakic, 1971b) και ο ιππόκαμπος (Eckenhoff and Rakic, 1984; Nowakowski and Rakic, 1979). Ωστόσο, εμφανίζεται, αν και σε μικρότερο βαθμό, σε δομές όπως ο διεγκέφαλος, το στέλεχος και ο νωτιαίος μυελός (Rakic, 1977; Rakic, 1990). Τις πρώτες ανατομικές μελέτες ήρθαν να επιβεβαιώσουν δεδομένα από *in vitro*

και *in vivo* πειράματα, που ανέλυσαν με περισσότερες λεπτομέρειες τον τρόπο και τα μόρια που εμπλέκονται σε αυτού του τύπου τη μετανάστευση (Edmondson and Hatten, 1987; Fishell and Hatten, 1991; Gao and Hatten, 1994; Hatten, 1993; Hatten and Mason, 1990).

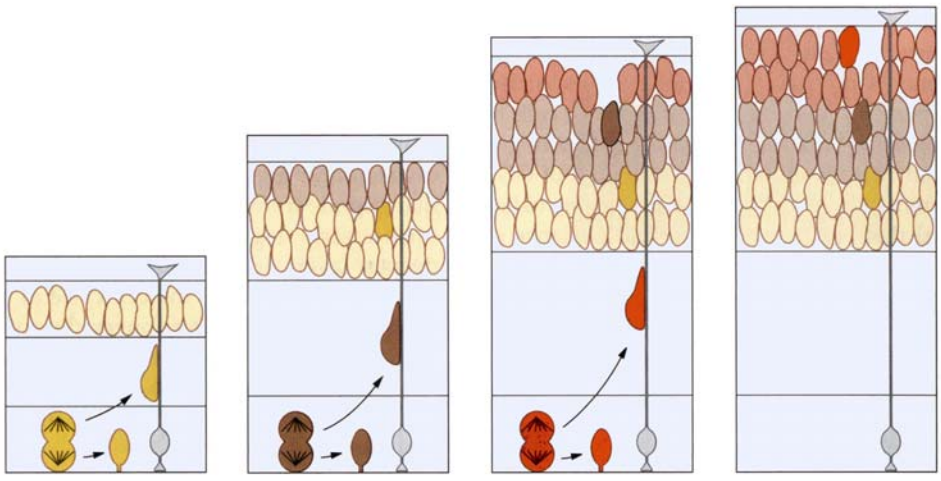
Όπως προαναφέρθηκε, ως φορείς στήριξης για αυτού του τύπου τη μετανάστευση χρησιμοποιούνται οι αποφύσεις των ακτινωτών γλοιακών κυττάρων. Στη φάση της μετανάστευσης τα συγκεκριμένα γλοιακά κύτταρα έχουν τη χαρακτηριστική μορφή που φαίνεται στην εικόνα 2. Το κυτταρικό τους σώμα βρίσκεται κοντά στην κοιλιακή ζώνη, ενώ οι μακριές αποφύσεις φτάνουν ως την εξωτερική (pial) επιφάνεια του νευρικού σωλήνα (Rakic, 1990). Η συγκεκριμένη μορφή των γλοιακών κυττάρων είναι παροδική και μετά το τέλος της μετανάστευσης



Εικόνα 2: Ακτινωτή μετανάστευση. Τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα (ροζ) δημιουργούνται στην εσωτερική πλευρά του νευρικού σωλήνα και μεταναστεύουν ως τις τελικές τους θέσεις ακολουθώντας τις ίνες των γλοιακών κυττάρων (μωβ), που είναι ακτινωτά διατεταγμένες. Τα κυτταρικά σώματα των γλοιακών κυττάρων βρίσκονται στην εσωτερική πλευρά του νευρικού σωλήνα, ενώ οι αποφύσεις τους φτάνουν ως την εξωτερική (pial) επιφάνεια.

τα κύτταρα αυτά παίρνουν την τελική τους μορφή και γίνονται αστροκύτταρα (Hatten, 1999). Στην παρεγκεφαλίδα συναντάται μια ειδική κατηγορία ακτινωτών γλοιακών κυττάρων, τα Bergmann γλοιακά κύτταρα (Feng et al., 1994), τα οποία διαφέρουν από τα άλλα κύτταρα ως προς τα μόρια δείκτες που εκφράζουν αλλά και ως προς τη δομή τους, καθώς διατρέχουν τον μισό φλοιό της παρεγκεφαλίδας (Hatten, 1999). Τα Bergmann γλοιακά κύτταρα στηρίζουν την ακτινωτή μετανάστευση των κοκκωδών κυττάρων του φλοιού της παρεγκεφαλίδας (Edmondson and Hatten, 1987; Mason et al., 1988).

Οι δύο δομές στις οποίες έχει μελετηθεί εκτενώς η ακτινωτή μετανάστευση είναι ο φλοιός των εγκεφαλικών ημισφαιρίων και η παρεγκεφαλίδα. Στην περιοχή των εγκεφαλικών ημισφαιρίων τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα γεννιούνται στην κοιλιακή ζώνη και στη συνέχεια μεταναστεύουν σε στενή επαφή με τις αποφύσεις των ακτινωτών γλοιακών κυττάρων, ώσπου να φτάσουν στις τελικές τους θέσεις και να δημιουργήσουν τις γνωστές στοιβάδες του ώριμου φλοιού (εικόνα 3). Οι στοιβάδες αυτές δημιουργούνται με το λεγόμενο «από μέσα προς τα έξω» (inside out) πρότυπο, καθώς τα κύτταρα που μεταναστεύουν πρώτα καταλαμβάνουν την κατώτατη στοιβάδα και τα επόμενα αναγκάζονται να περάσουν μέσα από αυτήν, ώσπου να φτάσουν και να δημιουργήσουν την αμέσως επόμενη (Angevine and Sidman, 1961; Hatten, 1999; McConnell, 1990).



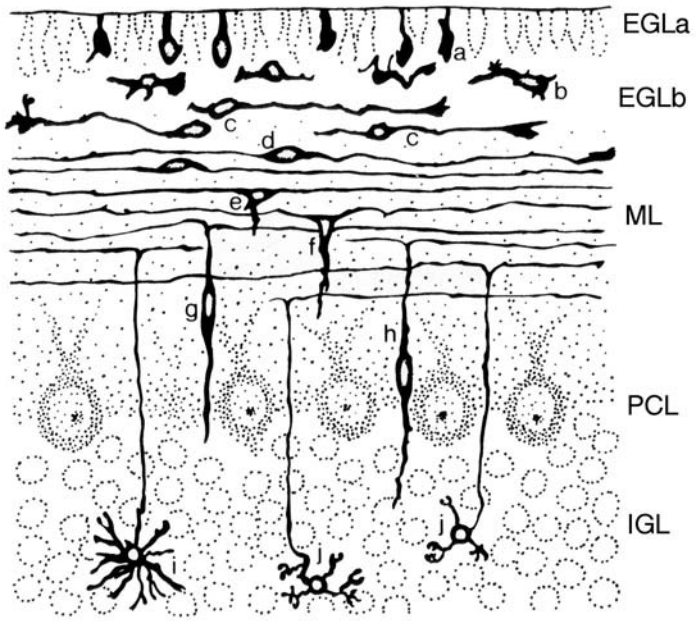
Εικόνα 3: Ακτινωτή μετανάστευση στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Ακολουθείται το «από μέσα προς τα έξω» πρότυπο μετανάστευσης. Τα κύτταρα που δημιουργούνται πρώτα καταλαμβάνουν τις εσωτερικές (κατώτερες) στοιβάδες, ενώ αυτά που γεννιούνται αργότερα τις εξωτερικές (ανώτερες).

Μια πολύ γνωστή ανωμαλία στη δημιουργία του συγκεκριμένου προτύπου παρατηρείται στους reeler μύες, όπου οι στοιβάδες του φλοιού είναι διατεταγμένες με ανάποδο τρόπο από τον φυσιολογικό (Goffinet, 1979). Η πρωτεΐνη που είναι μεταλλαγμένη στα συγκεκριμένα ζώα ονομάστηκε reelin και πρόκειται για μια πρωτεΐνη του εξωκυττάριου χώρου (D'Arcangelo et al., 1995), η οποία φαίνεται ότι δρα δίνοντας ένα σήμα σταματήματος στα μεταναστεύοντα κύτταρα (Pearlman et al., 1998; Pearlman and Sheppard, 1996)

Στην αναπτυσσόμενη παρεγκεφαλίδα, οι περισσότερες μελέτες έχουν εστιαστεί στην ακτινωτή μετανάστευση που εκτελούν τα κοκκώδη κύτταρα του φλοιού. Αυτά τα κύτταρα, τα οποία πολλαπλασιάζονται στην εξωτερική κοκκώδη στοιβάδα του φλοιού, μετά την τελική τους μίτωση εκτείνουν δύο άξονες παράλληλους προς την εξωτερική επιφάνεια της παρεγκεφαλίδας και στη συνέχεια αρχίζουν να μεταναστεύουν κάθετα σε αυτούς τους άξονες σε στενή επαφή με τις ακτινωτές αποφύσεις των Bergmann γλοιακών κυττάρων, ώσπου να φτάσουν στην τελική τους θέση στην εσωτερική κοκκώδη στοιβάδα (εικόνα 4) (Rakic, 1971b). Κατά τη διάρκεια αυτής της μετανάστευσης τα κοκκώδη κύτταρα εκφράζουν διαφορετικά μόρια-δείκτες ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσής τους (Hatten, 1999).

Στη διαδικασία της καθοδήγησης των μεταναστευόντων κυττάρων εμπλέκεται η πρωτεΐνη αστροτακτίνη (Edmondson et al., 1988; Fishell and Hatten, 1991; Fishman and Hatten, 1993). Το συγκεκριμένο μόριο βρέθηκε ότι απαιτείται για την αλληλεπίδραση των κοκκωδών κυττάρων με τις γλοιακές ίνες, καθώς αναστέλλοντας τη δράση του με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων, βρέθηκε ότι αναστέλλεται σε μεγάλο βαθμό η σύνδεση των κυττάρων με τις γλοιακές ίνες και η μετανάστευση τους (Fishell and Hatten, 1991). Μετά την κλωνοποίηση του γονιδίου της αστροτακτίνης (Zheng et al., 1996), δημιουργήθηκαν μύες με απώλεια δράσης του συγκεκριμένου γονιδίου και βρέθηκε ότι τα κοκκώδη κύτταρα του φλοιού της παρεγκεφαλίδας στα μεταλλαγμένα ζώα εμφάνιζαν πιο αργή μετανάστευση και πολλά από αυτά έμεναν σε έκτοπες θέσεις λόγω της αδυναμίας τους να μεταναστεύσουν (Adams et al., 2002).

Σημαντικές πληροφορίες για τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην καθοδήγηση της ακτινωτής μετανάστευσης στην παρεγκεφαλίδα έχουν δώσει οι μύες με τη μεταλλαγή weaver. Τα weaver, τα οποία έχουν περιγραφεί εδώ και αρκετές δεκαετίες (Sidman et al., 1965), εμφανίζουν πρόβλημα στη μετανάστευση των κοκκωδών κυττάρων. Συγκεκριμένα, τα κοκκώδη κύτταρα ενώ γεννιούνται κανονικά



Εικόνα 4: Ακτινωτή μετανάστευση στο φλοιό της παρεγκεφαλίδας. Τα κοκκώδη κύτταρα (a) πολλαπλασιάζονται στο εξωτερικό τμήμα της εξωτερικής κοκκώδους στοιβάδας (EGLa). Στο εσωτερικό τμήμα της εξωτερικής κοκκώδους στοιβάδας (EGLb) βρίσκονται τα μεταμιτωτικά κοκκώδη κύτταρα (b), τα οποία αρχίζουν να εκτείνουν δύο παράλληλους άξονες (c, d) και στη συνέχεια έναν κάθετο σε σχήμα «Τ» (e, f), τον οποίο και ακολουθεί το κυτταρικό σώμα (g, h), μεταναστεύοντας προς την τελική του θέση (i, j) στην εσωτερική κοκκώδη στοιβάδα (IGL). (PCL: στοιβάδα Purkinje κυττάρων, ML: μοριακή στοιβάδα)

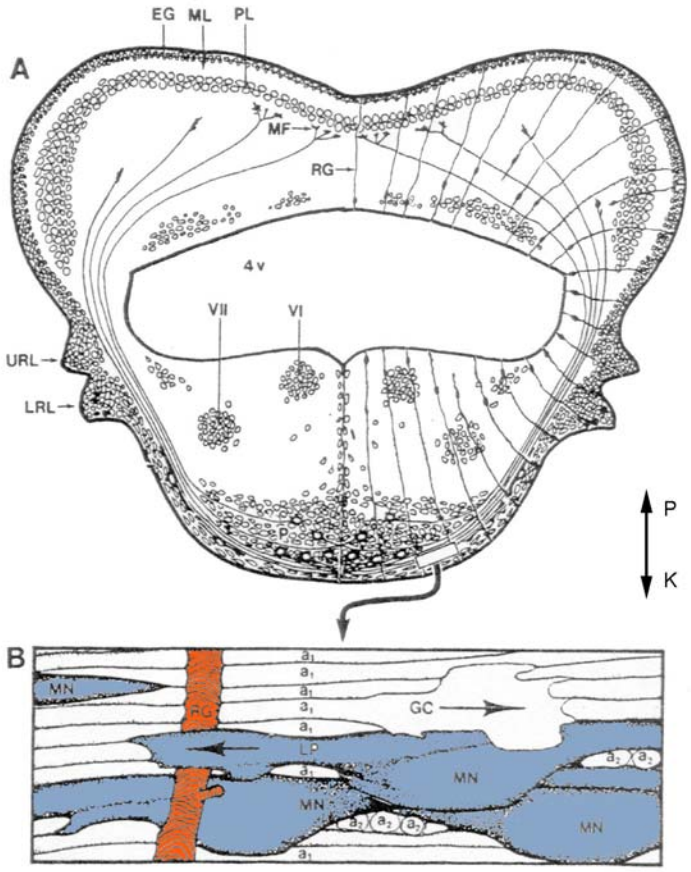
στην εξωτερική κοκκώδη στοιβάδα, αδυνατούν να μεταναστεύσουν και μένουν σε αυτό το σημείο, όπου και πεθαίνουν μέσα στις πρώτες δύο εβδομάδες της ζωής του ζώου (Rakic and Sidman, 1973a; Rakic and Sidman, 1973b; Rezai and Yoon, 1972). Η αδυναμία των κοκκωδών κυττάρων να εκτελέσουν την ακτινωτή μετανάστευση και να φτάσουν στην εσωτερική κοκκώδη στοιβάδα οφείλεται σε πρόβλημα των ίδιων των κυττάρων αυτών και όχι των ακτινωτών γλοιακών ινών, πάνω στις οποίες γίνεται αυτού του τύπου η μετανάστευση (Gao and Hatten, 1994; Goldowitz, 1989). Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι τα weaver ζώα φέρουν μια σημειακή μεταλλαγή σε ένα γονίδιο, που κωδικοποιεί ένα κανάλι καλίου (GIRK2) (Kofuji et al., 1996; Patil et al., 1995; Slesinger et al., 1996).

1.2 Οριζόντια ή επιφανειακή μετανάστευση

Με τον όρο οριζόντια ή επιφανειακή μετανάστευση (horizontal or tangential migration) περιγράφονται οι μεταναστεύσεις που γίνονται από κυτταρικούς πληθυσμούς οριζόντια στην εξωτερική επιφάνεια του νευρικού σωλήνα και κάθετα στο δίκτυο των ακτινωτών γλοιακών ινών. Αυτού του τύπου οι μεταναστεύσεις παρατηρήθηκαν αρχικά σε περιοχές δίπλα από την εξωτερική πλευρά του νευρικού συστήματος και για αυτό το λόγο χαρακτηρίστηκαν επιφανειακές. (Rakic, 1985; Rakic, 1990). Ανάλογα με το υπόστρωμα πάνω στο οποίο συντελείται αυτού του τύπου η μετανάστευση μπορεί να ονομαστεί **νευροφιλική** ή **αλυσιδωτή**. Νευροφιλική ονομάζεται όταν τα μεταναστεύοντα κύτταρα ακολουθούν ως φορείς στήριξης προϋπάρχοντες νευράξονες (εικόνα 5), ενώ αλυσιδωτή χαρακτηρίζεται η μετανάστευση όπου τα κύτταρα μεταναστεύουν σε πολύ στενή επαφή το ένα με το άλλο, χωρίς να χρησιμοποιούν κάποιον φορέα στήριξης (εικόνα 6) (Lois et al., 1996).

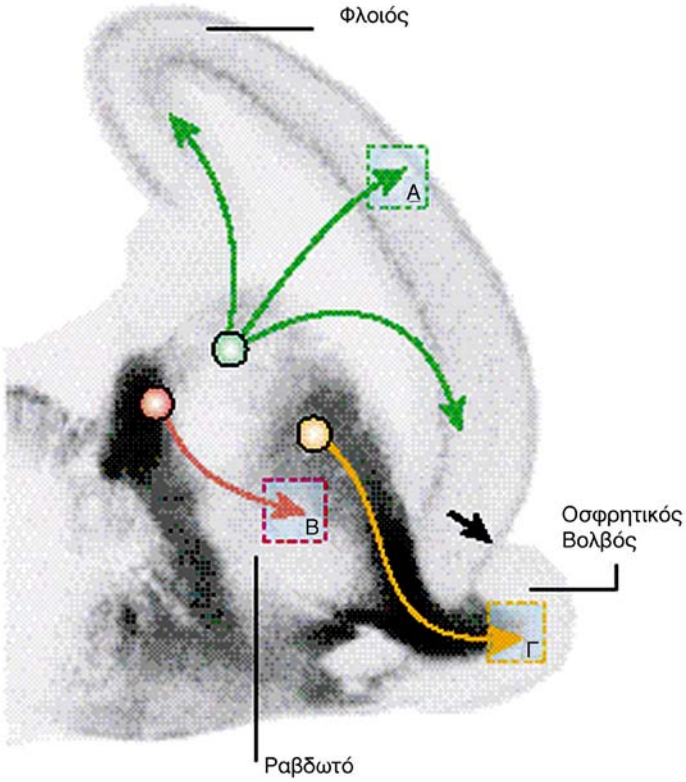
Οριζόντιες μεταναστεύσεις παρατηρήθηκαν καταρχάς στον αναπτυσσόμενο ρομβοειδή εγκέφαλο (Altman and Bayer, 1987b; Altman and Bayer, 1987c; Altman and Bayer, 1987d; Ono and Kawamura, 1989), αλλά στη συνέχεια βρέθηκε να συμβαίνει και σε πολλές άλλες περιοχές του νευρικού συστήματος, κυρίως από πληθυσμούς οι οποίοι χρειάζεται να διανύσουν μεγάλη απόσταση περνώντας όρια δομών ή την κοιλιακή μέση γραμμή, ώσπου να καταλάβουν τις τελικές τους θέσεις (Schwanzel-Fukuda and Pfaff, 1990). Ωστόσο, ακόμα και σε δομές όπου κυρίως παρατηρείται μετανάστευση ακτινωτού τύπου, υπάρχουν και πληθυσμοί κυττάρων που εκτελούν οριζόντια μετανάστευση.

Αρχικά στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων παρατηρήθηκαν κύτταρα που είχαν προέλθει από κοινό πρόγονο και ήταν σημασμένα με ρετροϊούς, να έχουν διασπαρθεί οριζόντια (Austin and Cepko, 1990; Price and Thurlow, 1988; Reid et al., 1995; Walsh and Cepko, 1988; Walsh and Cepko, 1992). Σε πειράματα καλλιέργειας τομών από το φλοιό των ημισφαιρίων, δείχθηκε ότι κύτταρα σημασμένα με τη λιπόφιλη ουσία DiI μεταναστεύουν κάθετα στις ακτινωτές αποφύσεις των γλοιακών κυττάρων του φλοιού (O'Rourke et al., 1997; O'Rourke et al., 1992; O'Rourke et al., 1995). Πολυάριθμες μελέτες έως σήμερα έχουν περιγράψει πολλά οριζόντια μεταναστευτικά μονοπάτια στην περιοχή του φλοιού. Συγκεκριμένα από την βλαστική στοιβάδα του βασικού τελεγκεφάλου (basal telencephalon) ξεκινούν τρία έως τώρα χαρακτηρισμένα μεταναστευτικά μονοπάτια (εικόνα 7).



Εικόνα 5: **Α:** Απεικόνιση εγκάρσιας τομής στο επίπεδο του ρομβοειδούς εγκεφάλου. Στο κέντρο φαίνεται η 4η κοιλία του εγκεφάλου (4v). Στη ραχιαία περιοχή θα δημιουργηθεί η παρεγκεφαλίδα, όπου διακρίνονται οι στοιβάδες έξω κοκκώδης (EG), μοριακή (ML) και η στοιβάδα των Purkinje κυττάρων (PC) ενώ στην κοιλιακή περιοχή θα δημιουργηθεί η γέφυρα. Διακρίνονται τα ακτινωτά γλοιακά κύτταρα (RG), πάνω στα οποία μεταναστεύουν ακτινωτά τα νευρικά κύτταρα που δημιουργούνται στην κοιλιακή ζώνη. Τα κύτταρα που δημιουργούνται στο άνω και στο πλάγιο ρομβικό χείλος (URL και LRL αντίστοιχα) μεταναστεύουν οριζόντια και επιφανειακά. **Β:** Κύτταρα που μεταναστεύουν επιφανειακά (μπλε, MN), παράλληλα με τους προϋπάρχοντες νευρικούς άξονες (a1) και κάθετα στα ακτινωτά γλοιακά κύτταρα (κόκκινο, RG). Διακρίνονται επίσης οι αυξητικοί κώνοι (GC) και οι κατά μήκος διατεταγμένοι νευρικοί άξονες (a2). MF: βρυώδεις ίνες, VI και VII: πυρήνες απαγωγού και προσωπικού νεύρου αντίστοιχα, K: Κοιλιακά, P: Ραχιαία.

Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση κυττάρων που εκτελούν μετανάστευση αλυσιδωτού τύπου. Το σχήμα τους είναι ατρακτοειδές και εξωτερικά περιβάλλονται από τις αποφύσεις γλοιακών κυττάρων.



Εικόνα 7: Οριζόντια μεταναστευτικά μονοπάτια στο πρόσθιο εγκέφαλο. Από την περιοχή των πρόδρομων βασικών γαγγλίων ξεκινούν τρία μεταναστευτικά μονοπάτια προς το φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων (Α), προς το ραβδωτό (Β) και προς τον οσφρητικό βολβό (Γ).

Α) Το πλάγιο-οπίσθιο μονοπάτι, το οποίο απαρτίζεται από GABAεργικούς ενδονευρώνες, που ξεκινούν από την βλαστική στοιβάδα της μέσης περιοχής των πρόδρομων βασικών γαγγλίων (medial ganglionic eminence, MGE) και καταλήγουν στο αναπτυσσόμενο φλοιό (Anderson et al., 1997a; De Carlos et al., 1996; Lavdas et al., 1999; Marin and Rubenstein, 2001; Parnavelas, 2000; Sussel et al., 1999; Tamamaki et al., 1997; Wichterle et al., 1999). Τα συγκεκριμένα κύτταρα μεταναστεύουν πάνω στους φλοιοθαλαμικούς άξονες, εκτελώντας μια νευροφιλικού τύπου μετανάστευση (Denaxa et al., 2001).

Β) Το πλάγιο-οπίσθιο μονοπάτι, του οποίου τα κύτταρα ξεκινούν από την βλαστική στοιβάδα της πλάγιας περιοχής των πρόδρομων βασικών γαγγλίων (lateral ganglionic eminence, LGE) και καταλήγουν στο αναπτυσσόμενο ραβδωτό (Anderson et al., 1997a; Anderson et al., 1997b; Marin et al., 2000; Marin and Rubenstein, 2001; Sussel et al., 1999; van der Kooy and Fishell, 1987).

Γ) Το πρόσθιο μεταναστευτικό μονοπάτι, το οποίο απαρτίζεται από κύτταρα που δημιουργούνται και αυτά στη βλαστική στοιβάδα της μέσης περιοχής των πρόδρομων βασικών γαγγλίων (medial ganglionic eminence, MGE) και μεταναστεύουν αλυσιδωτά προς τον οσφρητικό φλοιό (Altman, 1969; Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Marin and Rubenstein, 2001; Wichterle et al., 1997; Wichterle et al., 1999). Αυτό το μονοπάτι ήταν το πρώτο στο οποίο χαρακτηρίστηκε η αλυσιδωτού τύπου οριζόντια μετανάστευση (Lois et al., 1996). Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι οι νευρώνες του πρόσθιου μεταναστευτικού μονοπατιού δεν καθοδηγούνται ούτε από νευρικά ούτε από γλοιακά υποστρώματα, αλλά περιβάλλονται εξωτερικά από ένα περίβλημα γλοιακών κυττάρων (Lois et al., 1996). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι αυτό το μεταναστευτικό μονοπάτι λαμβάνει χώρα και στον εγκέφαλο ενήλικων μυών (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996).

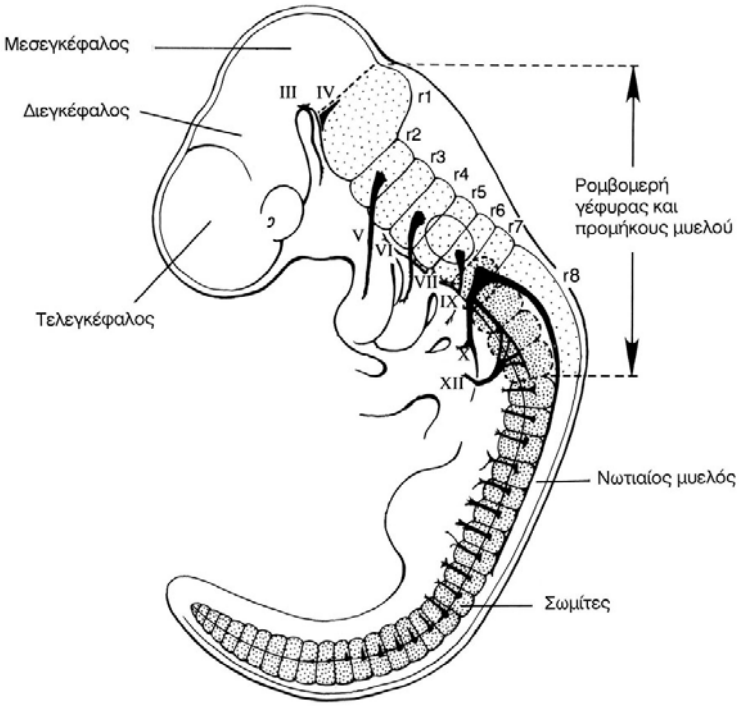
Ωστόσο, εκτός από το μονοπάτι που περιγράψαμε από το βασικό τελεγκέφαλο προς τον οσφρητικό βολβό, υπάρχουν και κύτταρα που ξεκινούν από τον οσφρητικό βολβό και καταλήγουν στο βασικό τελεγκέφαλο. Συγκεκριμένα, οι LHRH νευρώνες (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone neurons) ξεκινούν από τον οσφρητικό βολβό και μεταναστεύουν πάνω σε έναν υποπληθυσμό αξόνων του οσφρητικού νεύρου (νευροφιλικού τύπου μετανάστευση) ως τις τελικές τους θέσεις στον βασικό τελεγκέφαλο (Schwanzel-Fukuda and Pfaff, 1989; Schwanzel-Fukuda and Pfaff, 1990; Wray et al., 1989).

Εκτός από το φλοιό των ημισφαιρίων και ο φλοιός της αναπτυσσόμενης παρεγκεφαλίδας είναι άλλη μια δομή, στην οποία παρατηρείται εκτός από την ακτινωτή μετανάστευση που περιγράψαμε, και οριζόντια μετανάστευση. Από τους (Ryder and Cepko, 1994) περιγράφηκε για πρώτη φορά η ύπαρξη οριζόντιας μετανάστευσης από τα κοκκώδη κύτταρα της παρεγκεφαλίδας. Συγκεκριμένα, σε έμβρυα όρνιθας, στα οποία τα πρόδρομα κοκκώδη κύτταρα είχαν σημανθεί με ρετροϊούς που αδυνατούν να πολλαπλασιαστούν (replication-incompetent), παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα μετανάστευσαν κατά μήκος της εξωτερικής κοκκώδους στοιβάδας του φλοιού πριν να αρχίσουν την ακτινωτή τους μετανάστευση προς την εσωτερική κοκκώδη στοιβάδα (Ryder and Cepko, 1994). Αρκετά χρόνια αργότερα διαπιστώθηκε ότι και στα θηλαστικά συμβαίνει οριζόντια μετανάστευση (Komuro et al., 2001). Συγκεκριμένα, με τη χρήση της βιντεο-μικροσκοπίας (video lapse microscopy) δείχθηκε ότι τα κοκκώδη κύτταρα του φλοιού της παρεγκεφαλίδας μυών, αφού κάνουν την τελευταία μιτωτική τους διαίρεση και πριν αρχίσουν την

ακτινωτή τους μετανάστευση, κινούνται κατά μήκος της εξωτερικής κοκκώδους στοιβάδας και μάλιστα με τρόπο ώστε να πλησιάζουν προς τη μέση γραμμή (Komuro et al., 2001).

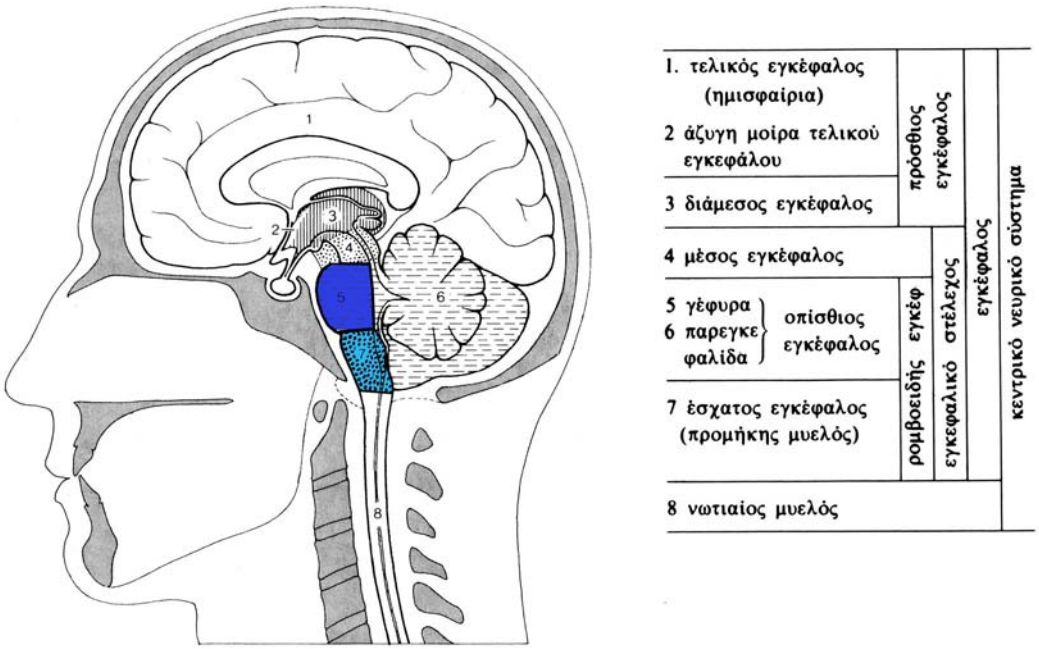
2. ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΤΟΝ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΟ ΡΟΜΒΟΕΙΔΗ ΕΓΚΕΦΑΛΟ

Ο ρομβοειδής εγκέφαλος είναι η περιοχή του αναπτυσσόμενου νευρικού συστήματος που περιβάλλει την 4η κοιλία. Νωρίς κατά την ανάπτυξη, στην περιοχή του ρομβεγκεφάλου παρατηρείται διαμερισματοποίηση (segmentation) του νευροεπιθηλίου και δημιουργούνται τα λεγόμενα ρομβομερή (εικόνα 8). Τα ρομβομερή (1 έως 8) είναι παροδικές δομές, που παρουσιάζουν συνδυαστική έκφραση Hox γονιδίων και άλλων μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. Krox20), που ευθύνονται για τον καθορισμό κυτταρικής μοίρας (Lumsden and Krumlauf, 1996). Επιπλέον, τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα που ανήκουν σε καθένα από τα ρομβομερή εμφανίζουν συγκεκριμένες ιδιότητες και δίνουν καθορισμένους κυτταρικούς πληθυσμούς (Kandel et al., 1991).



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση εμβρύου όρνιθας, όπου διακρίνονται τα διάφορα τμήματα του αναπτυσσόμενου νευρικού συστήματος.

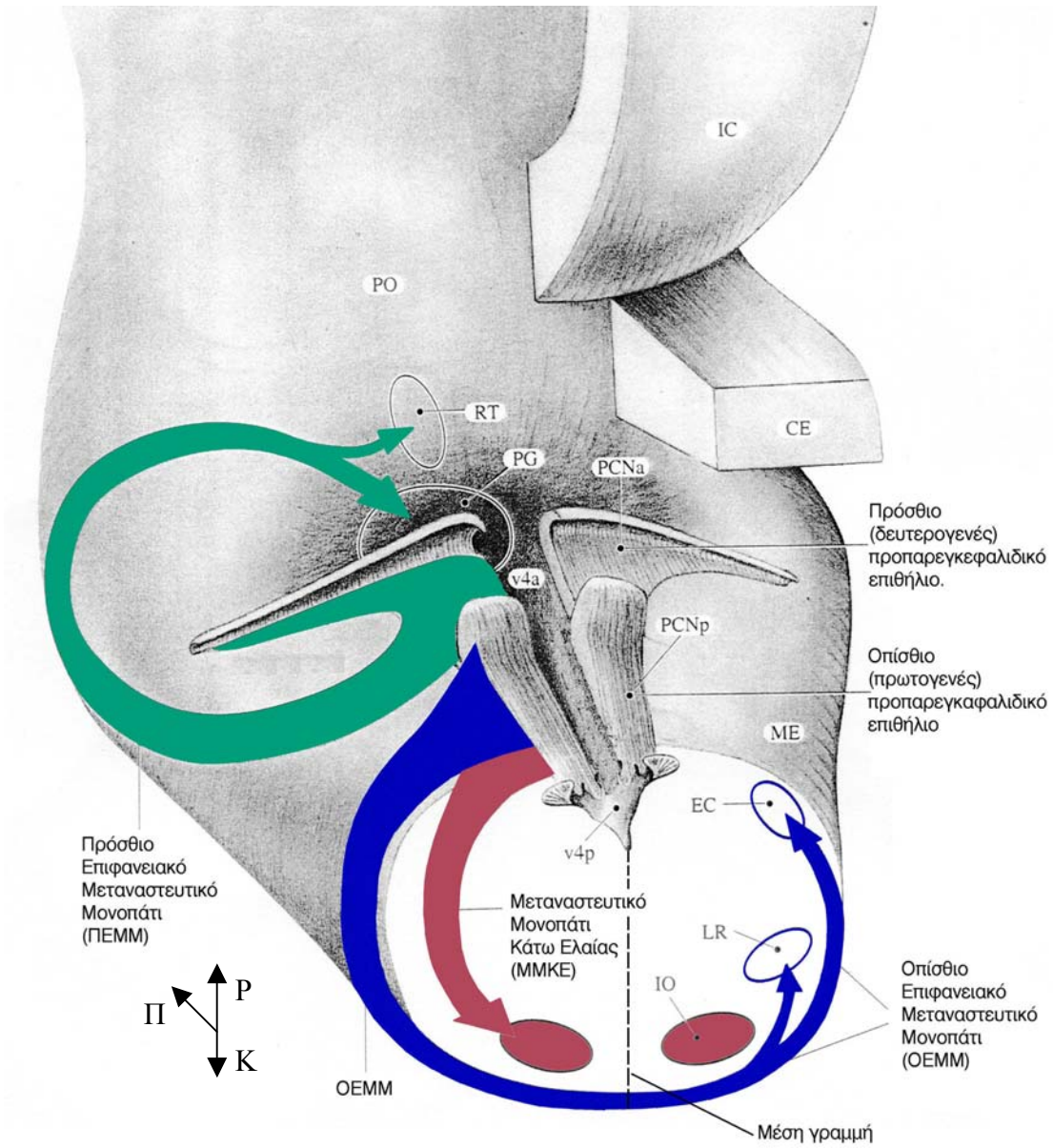
Η δομή αυτή του ρομβοειδούς εγκεφάλου χωρίζεται εμβρυολογικά στον μυελεγκέφαλο και στον μετεγκέφαλο. Ο μυελεγκέφαλος ωριμάζοντας δίνει τον προμήκη μυελό, ενώ από την ραχιαία περιοχή του μετεγκεφάλου δημιουργείται η παρεγκεφαλίδα και από την κοιλιακή η γέφυρα (Patten and Carlson, 1974) (εικόνα 9). Με πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκε ραδιοσημασμένη θυμιδίνη, δείχθηκε ότι η παρεγκεφαλίδα προέρχεται από το ραχιαίο νευροεπιθήλιο του ρομβοειδούς εγκεφάλου (παρεγκεφαλιδικό επιθήλιο), ενώ η γέφυρα και ο προμήκης προέρχονται από το κοιλιακό (ventral) νευροεπιθήλιο (προπαρεγκεφαλιδικό επιθήλιο) (Altman and Bayer, 1987a). Η δομή του ρομβοειδούς εγκεφάλου είναι ένα σημείο του κεντρικού νευρικού συστήματος όπου παρατηρούνται αρκετά οριζόντια μεταναστευτικά μονοπάτια. Για το λόγο αυτό αποτελεί πολύ ενδιαφέρον μοντέλο για την έρευνα μηχανισμών που διέπουν την οριζόντια μετανάστευση.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του κεντρικού νευρικού συστήματος στον άνθρωπο. Η ραχιαία πλευρά του ρομβοειδούς εγκεφάλου δίνει την παρεγκεφαλίδα, ενώ η κοιλιακή την γέφυρα (μπλε) και τον προμήκη (γαλάζιο).

Τα βασικά μεταναστευτικά μονοπάτια που έχουν χαρακτηριστεί στην περιοχή του ρομβοειδούς εγκεφάλου είναι τρία: Το πρόσθιο επιφανειακό μεταναστευτικό μονοπάτι (ΠΕΜΜ), το οπίσθιο επιφανειακό μεταναστευτικό

μονοπάτι (ΟΕΜΜ) και το μεταναστευτικό μονοπάτι της κάτω ελαίας (ΜΜΚΕ) (εικόνα 10).



Εικόνα 10: Οριζόντια μεταναστευτικά μονοπάτια στον ρομβοειδή εγκέφαλο. Το πρόσθιο επιφανειακό μεταναστευτικό μονοπάτι (ΠΕΜΜ, πράσινο) δίνει τον δικτυωτό πυρήνα της καλύπτρας (RT) και το βασικό γεφυριδικό πυρήνα (PG). Το οπίσθιο επιφανειακό μεταναστευτικό μονοπάτι (ΟΕΜΜ, μπλε) δίνει τον πλάγιο δικτυωτό (LR) και τον έξω σφηνοειδή πυρήνα (EC), ενώ το μεταναστευτικό μονοπάτι της κάτω ελαίας (ΜΜΚΕ, κόκκινο) δίνει τον πυρήνα της κάτω ελαίας (IO, inferior olive). IC: άνω διδύμιο, PO: γέφυρα, CE: παρεγκεφαλίδα, PCNa: πρόσθιο προπαρεγκεφαλιδικό επιθήλιο, PCNb: οπίσθιο προπαρεγκεφαλιδικό επιθήλιο, v4a: 4^{η} κοιλία, ΜΕ: προμήκης, Π: πρόσθια, Ρ: ραχιαία, Κ: κοιλιακά.

2.1 Πρόσθιο επιφανειακό μεταναστευτικό μονοπάτι (ΠΕΜΜ)

Το πρόσθιο επιφανειακό μεταναστευτικό μονοπάτι (ΠΕΜΜ) είναι το μονοπάτι που ακολουθούν τα κύτταρα του βασικού πυρήνα της γέφυρας (basal pontine gray) και του δικτυωτού πυρήνα της καλύπτρας της γέφυρας (nucleus reticularis tegmenti pontis) από το σημείο που δημιουργούνται ως τις τελικές τους θέσεις (Altman and Bayer, 1987d) (εικόνα 10). Και οι δύο αυτοί πυρήνες δέχονται νευρικές ίνες από το φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων και στέλνουν ίνες προς την παρεγκεφαλίδα (Allen and Tsukahara, 1974; Azizi et al., 1981; Brodal, 1972; Brodal and Brodal, 1971; Brodal, 1980a; Brodal, 1980b; Michailoff et al., 1978).

Με πειράματα ραδιοσημασμένης θυμιδίνης (^{3}Η-θυμιδίνης) είχε δειχθεί από τη δεκαετία του `70 ότι οι νευρώνες του βασικού πυρήνα της γέφυρας δημιουργούνται στους επίμυες τις εμβρυονικές ημέρες Ε16-19, με τον μεγαλύτερο πληθυσμό να γεννιέται την Ε17. Οι νευρώνες του δικτυωτού πυρήνα της καλύπτρας της γέφυρας δημιουργούνται λίγο νωρίτερα την Ε15-17, με τον μεγαλύτερο πληθυσμό να δημιουργείται την Ε16 (Altman and Bayer, 1978). Αργότερα, στο τέλος της δεκαετίας του `80 χαρακτηρίστηκε πιο αναλυτικά όλη η μεταναστευτική πορεία των συγκεκριμένων κυττάρων. Με τη χρήση και πάλι ραδιοσημασμένης θυμιδίνης, η οποία χορηγήθηκε στους επίμυες συγκεκριμένη ημέρα της εμβρυονικής ανάπτυξης και θυσιάζοντας πειραματόζωα διαδοχικές ημέρες, παρακολουθήθηκε η πορεία των κυττάρων που σημάνθηκαν την ημέρα της χορήγησης της θυμιδίνης. Βρέθηκε, ότι τα κύτταρα που απαρτίζουν τον δικτυωτό πυρήνα της καλύπτρας της γέφυρας δημιουργούνται στην περιοχή του πρωτογενούς νευροεπιθηλίου κυρίως την Ε16 και αρχίζουν να μεταναστεύουν επιφανειακά και πρόσθια, ώσπου να φτάσουν στις τελικές τους θέσεις περίπου την Ε19-20, ομόπλευρα του σημείου που δημιουργήθηκαν (Altman and Bayer, 1987d). Αντίθετα, οι νευρώνες του βασικού πυρήνα της γέφυρας δημιουργούνται κυρίως την Ε17 από το δευτερογενές νευροεπιθήλιο και ακολουθούν την ίδια ακριβώς πορεία επιφανειακά και πρόσθια, ώσπου να σχηματίσουν τον τελικό τους πυρήνα την Ε20-21, ομόπλευρα από το σημείο που ξεκίνησαν (εικόνα 10) (Altman and Bayer, 1987d).

Αντίστοιχα, σε έμβρυα μυών έχει βρεθεί ότι τα κύτταρα των συγκεκριμένων πυρήνων δημιουργούνται τις εμβρυονικές ημέρες Ε12.5-Ε16.5 και ακολουθούν την ίδια μεταναστευτική πορεία όπως περιγράφηκε για τους επίμυες (Taber-Pierce, 1966). Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα μεταναστεύουν χωρίς την στήριξη οποιουδήποτε υποστρώματος νευρωνικής ή γλοιακής φύσης (Ono and

Kawamura, 1990). Τέλος, δείχθηκε ότι κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους εκτείνουν μεγάλες καθοδηγητικές αποφύσεις, που φτάνουν και το 1 mm σε μήκος, τις οποίες και ακολουθούν τα κυτταρικά σώματα ως τις τελικές τους θέσεις (Yee et al., 1999). Από όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά φαίνεται ότι τα κύτταρα του πρόσθιου επιφανειακού μονοπατιού του ρομβοειδούς εγκεφάλου εκτελούν ενός τύπου αλυσιδωτή μετανάστευση (Yee et al., 1999).

2.2 Οπίσθιο επιφανειακό μεταναστευτικό μονοπάτι (OEMM)

Το οπίσθιο επιφανειακό μεταναστευτικό μονοπάτι αποτελείται από τους νευρώνες που δημιουργούν τον πλάγιο δικτυωτό (lateral reticular) και τον έξω σφηνοειδή (external cuneate) πυρήνα (Altman and Bayer, 1978; Altman and Bayer, 1987c). Ανατομικά, ο πλάγιος δικτυωτός πυρήνας δέχεται πληροφορίες από τον νωτιαίο μυελό και άλλες δομές του προμήκους και του μεσεγκεφάλου και στέλνει βρυώδεις ίνες (mossy fibers) προς την παρεγκεφαλίδα (Roste et al., 1985). Αντίθετα ο έξω σφηνοειδής πυρήνας μεταφέρει πληροφορίες από τους μύες των άνω άκρων και τον λαιμό στην παρεγκεφαλίδα μέσω βρυωδών ινών (Cooke et al., 1971; Grant, 1962; Holmqvist et al., 1963; Rosen and Sjolung, 1973).

Με πειράματα ραδιοσημασμένης θυμιδίνης, όπως περιγράφηκαν και για το πρόσθιο μεταναστευτικό μονοπάτι, βρέθηκε ότι τα κύτταρα και των δύο αυτών πυρήνων δημιουργούνται την εμβρυονική ημέρα E14-15 σε επίμυες στην περιοχή που ονομάζεται πρωτογενές νευροεπιθήλιο ή ρομβικό χείλος. Στη συνέχεια μεταναστεύουν κοιλιακά ακολουθώντας εντελώς επιφανειακή πορεία, ακριβώς κάτω από την pial επιφάνεια του νευρικού σωλήνα, διασχίζουν τη μέση γραμμή και δημιουργούν τους τελικούς τους πυρήνες στο αντίπλευρο ημισφαίριο από αυτό που ξεκίνησαν (εικόνα 10) (Bourrat and Sotelo, 1990). Στις τελικές τους θέσεις τα κύτταρα του OEMM αρχίζουν να φτάνουν 3 ημέρες μετά την έναρξη της μετανάστευσή τους (Altman and Bayer, 1987c).

Στους μύες τα κύτταρα του OEMM δημιουργούνται λίγο νωρίτερα από ότι στους επίμυες, την εμβρυονική ημέρα E12.5, μεταναστεύουν επιφανειακά, όπως περιγράφηκε παραπάνω για τους επίμυες και φτάνουν στις τελικές τους θέσεις περίπου την E16 (Ono and Kawamura, 1989). Μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έχουν δείξει ότι τα κύτταρα του OEMM όταν βρίσκονται κοντά στην περιοχή της μέσης γραμμής ακολουθούν προϋπάρχοντες νευρικούς άξονες ως φορείς στήριξης, ακολουθώντας νευροφιλικού τύπου μετανάστευση (Ono and Kawamura, 1989).

Ανάλογες μελέτες έγιναν και σε έμβρυα όρνιθας και ορτυκιού. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της δημιουργίας χιμαιρικών οργανισμών όρνιθας-ορτυκιού, βρέθηκε ότι το ΟΕΜΜ παρατηρείται και στα πτηνά (Cambronero and Puelles, 2000; Tan and Le Dourin, 1991). Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα δημιουργούνται στο επίπεδο του 7ου και 8ου ρομβομερούς στο αναπτυξιακό στάδιο 22-24 κατά Hamburger & Hamilton (HH22-24) (Hamburger and Hamilton, 1951), το οποίο αντιστοιχεί στην εμβρυονική ημέρα E3.5-E4.0 (Ambrosiani et al., 1996). Η πορεία της μετανάστευσης είναι ίδια με αυτήν που ήδη περιγράφηκε στα θηλαστικά.

2.3 Μεταναστευτικό μονοπάτι της κάτω ελαίας (ΜΜΚΕ)

Ένα ακόμα μεταναστευτικό μονοπάτι που λαμβάνει χώρα στον αναπτυσσόμενο ρομβοειδή εγκέφαλο είναι το μεταναστευτικό μονοπάτι της κάτω ελαίας. Ακόμα και από τον 19^{ο} αιώνα, ο πυρήνας της κάτω ελαίας είχε χαρακτηριστεί με αρκετή ακρίβεια (His, 1891). Από πολύ νωρίς ήταν γνωστό ότι τα κύτταρα που απαρτίζουν το συγκεκριμένο πυρήνα γεννιούνται στην περιοχή του ρομβικού χείλους στην ραχιαία περιοχή του ρομβοειδούς εγκεφάλου (Harkmark, 1954). Ανατομικά ο πυρήνας της κάτω ελαίας δέχεται ίνες από το νωτιαίο μυελό αλλά και από τους πυρήνες της παρεγκεφαλίδας, ενώ στέλνει τις αναρριχόμενες ίνες στα Purkinje κύτταρα του φλοιού της παρεγκεφαλίδας (Campbell and Armstrong, 1983).

Με πειράματα ραδιοσημασμένης θυμιδίνης δείχθηκε ότι τα κύτταρα που δημιουργούν τον πυρήνα της ελαίας δημιουργούνται στο ρομβικό χείλος την εμβρυονική ημέρα E13-E14 στους επίμυες και την E10.5-E11.5 στους μύες. Στη συνέχεια τα κύτταρα αυτά μεταναστεύουν κοιλιακά, στο ίδιο προσθιο-οπίσθιο επίπεδο με τα κύτταρα του οπίσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού, αλλά πιο εσωτερικά στο παρέγχυμα και δημιουργούν τους πυρήνες της κάτω ελαίας εκατέρωθεν της μέσης γραμμής χωρίς να την έχουν διασχίσει (Altman and Bayer, 1987b).

Στα έμβρυα όρνιθας και ορτυκιού βρέθηκε ότι ο πυρήνας της κάτω ελαίας δημιουργείται από κύτταρα που δημιουργούνται στο ρομβικό χείλος του 7ου και 8ου ρομβομερούς στα αναπτυξιακά στάδια HH22-24 όπως και τα κύτταρα του οπίσθιου επιφανειακού μονοπατιού (Tan and Le Dourin, 1991).

3. ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΣΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Περισσότερα από 25 κλινικά σύνδρομα που έχουν παρατηρηθεί στον άνθρωπο οφείλονται σε δυσμορφίες του εγκεφαλικού φλοιού, οι οποίες προέρχονται από προβλήματα στη διαδικασία της μετανάστευσης των νευρώνων της συγκεκριμένης περιοχής (Dobyns and Truwit, 1995; Norman et al., 1995). Επιπλέον έχει ήδη δειχθεί ότι περισσότερο από το 25% των παιδικών επιληψιών οφείλονται σε ετεροτοπία, μια κατάσταση που δημιουργείται όταν οι νευρώνες δεν φτάνουν στον τελικό τους προορισμό και μένουν σε έκτοπες θέσεις (Kuzniecky et al., 1993). Μεταξύ των παθήσεων που εμφανίζουν ετεροτυπίες είναι οι λισσεγκεφαλίες. Με τον όρο λισσεγκεφαλίες περιγράφονται οι καταστάσεις κατά τις οποίες ο φλοιός των εγκεφαλικών ημισφαιρίων δεν εμφανίζει τις φυσιολογικές έλικες και αύλακες, αλλά παρουσιάζει μια πιο λεία επιφάνεια, ενώ παράλληλα παρατηρείται μεγάλο πάχος του φλοιού των ημισφαιρίων (Feng and Walsh, 2001).

Οι δύο συχνότερες και πιο μελετημένες λισσεγκεφαλίες είναι οι εξής:

Α. Λισσεγκεφαλία προερχόμενη από το χρωμόσωμα 17

Το πρώτο σύνδρομο λισσεγκεφαλίας που αναγνωρίστηκε ήταν το Miller-Dieker σύνδρομο, το οποίο χαρακτηρίζεται από σοβαρή λισσεγκεφαλία και ανωμαλίες του προσώπου. Στο 90% των ασθενών που φέρουν το συγκεκριμένο σύνδρομο, παρατηρείται μια έλλειψη στο χρωμόσωμα 17p13.3, ενώ αργότερα κλωνοποιήθηκε ένα γονίδιο υπεύθυνο για την εμφάνιση λισσεγκεφαλίας το Lis1 (Dobyns et al., 1994; Dobyns et al., 1993). Το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί μια υπομονάδα G-like πρωτεΐνης (Reiner et al., 1993).

Β. Λισσεγκεφαλία προερχόμενη από το Χ-χρωμόσωμα

Τα κλινικά συμπτώματα αυτής της λισσεγκεφαλίας εξαρτώνται από το φύλο. Στους αρσενικούς ημιζυγώτες παρατηρούνται συμπτώματα ίδια με της λισσεγκεφαλίας που περιγράφηκε παραπάνω, ενώ στους θηλυκούς ετεροζυγώτες παρατηρείται μια λεπτή γραμμή φαιάς ουσίας κάτω από το φλοιό με τον οποίο διαχωρίζεται από μια λεπτή γραμμή λευκής ουσίας (Ross and Walsh, 2001). Το γονίδιο που ευθύνεται για αυτού τη είδους τη λισσεγκεφαλία λέγεται DCX και κωδικοποιεί μια διαλυτή πρωτεΐνη μεγέθους 40kD, που ονομάζεται doublecortin (Dbcn) (Gleeson et al., 1998). Αντίθετα με την Lis1 πρωτεΐνη που έχει ευρεία έκφραση, η Dbcn ανιχνεύεται μόνο σε νευρώνες του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος (Gleeson et al., 1999).

Εκτός από τις συγκεκριμένες λισσεγκεφαλίες που αφορούν το φλοιό των ημισφαιρίων, έχουν περιγραφεί και ορισμένοι τύποι λισσεγκεφαλιών που αφορούν το φλοιό της παρεγκεφαλίδας (Ross et al., 2001). Αυτές οι λισσεγκεφαλίες οφείλονται είτε στα ίδια γονίδια που προκαλούν τους φαινοτύπους που περιγράψαμε στο φλοιό των ημισφαιρίων είτε σε διαφορετικά (Ross et al., 2001; Ross and Walsh, 2001).

Το σύνδρομο Joubert είναι άλλη μία αιτία εμφάνισης προβλημάτων στην περιοχή της παρεγκεφαλίδας και του ρομβοειδούς εγκεφάλου. Τα άτομα που πάσχουν από αυτό το σύνδρομο εμφανίζουν αταξία, ανωμαλία στις κινήσεις των ματιών και νοητική υστέρηση (Boltshauser and Isler, 1977; Joubert, 1972). Τα κλινικά αυτά συμπτώματα οφείλονται σε απλασία του σκώληκα της παρεγκεφαλίδας και δυσπλασία δομών του ρομβοειδούς εγκεφάλου. Αναλυτικότερα, έχει δειχθεί ότι εμφανίζουν υποπλασία του πυρήνα της κάτω ελαίας, του οδοντωτού πυρήνα, του βασικού πυρήνα της γέφυρας και του τριδύμου νεύρου (Boltshauser and Isler, 1977; Yachnis and Rorke, 1999a; Yachnis and Rorke, 1999b). Αν και δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τα ακριβή αίτια που προκαλούν τις προαναφερθείσες ανωμαλίες, θεωρείται ότι η κρίσιμη περίοδος στην έναρξη της εμφάνισης των δυσπασιών είναι η 6η – 8η εβδομάδα κύησης, γιατί σε αυτό το χρονικό διάστημα αρχίζει ο σχηματισμός των παραπάνω δομών (Yachnis and Rorke, 1999a; Yachnis and Rorke, 1999b).

4. ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΝΕΥΡΑΞΟΝΩΝ ΣΤΟ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

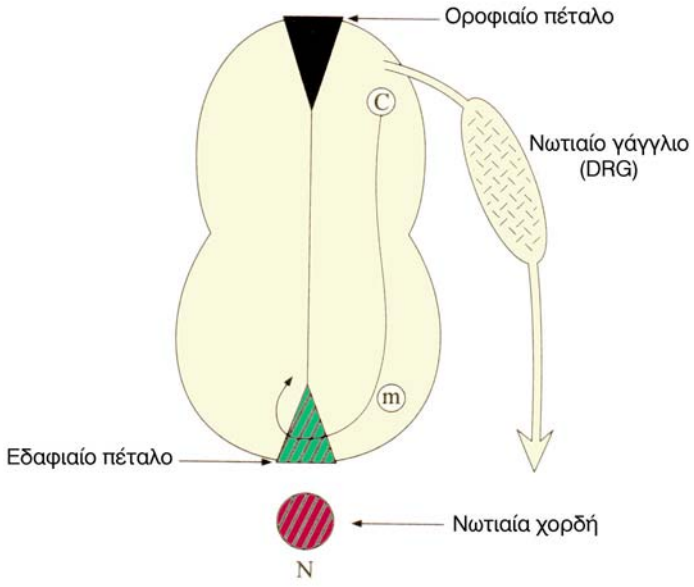
Από τα τέλη του 19^{ου} αιώνα όταν ο Ramon y Cajal περιέγραψε για πρώτη φορά την μορφολογία του αυξητικού κώνου κατά τη διάρκεια της επέκτασης των νευραξόνων, διατύπωσε και την άποψη ότι αυτοί οι αυξητικοί κώνοι δεν μετακινούνται τυχαία, αλλά κατευθύνονται προς τους συγκεκριμένους στόχους τους ακολουθώντας στερεότυπα μονοπάτια. Οι στόχοι αυτοί, αλλά και το περιβάλλον που συναντούν οι νευράξονες καθ' οδόν παρέχουν μόρια-σήματα, τα οποία ευθύνονται όχι μόνο για την καθοδήγηση της επέκτασης των νευραξόνων, αλλά και μετανάστευσης των ίδιων των κυττάρων.

4.1 Εδαφιαίο πέταλο

Μια δομή, η οποία χαρακτηρίστηκε αρχικά ως ενδιάμεσος στόχος στην πορεία των αναπτυσσόμενων νευραξόνων είναι το εδαφιαίο πέταλο (floor plate). Το

εδαφιαίο πέταλο είναι μια παροδική δομή, που βρίσκεται στην κοιλιακή μέση γραμμή κατά μήκος του νευρικού σωλήνα, αποτελείται από επιθηλιακά κύτταρα και επάγεται από την υποκείμενη νωτοχορδή (εικόνα 11) (Jessell et al., 1989). Έχει δειχθεί ότι η συγκεκριμένη δομή μαζί με την νωτοχορδή επάγουν τη διαφοροποίηση των κινητικών νευρώνων της κοιλιακής πλευράς του νωτιαίου μυελού (Bronner-Fraser and Fraser, 1997).

Οι περισσότερες μελέτες σχετικά με το εδαφιαίο πέταλο έχουν εστιαστεί στην δράση που παρέχει στην καθοδήγηση των νευραξόνων. Έχει δειχθεί ότι οι αναπτυσσόμενοι νευράξονες των συνδεσμικών νευρώνων της ραχιαίας περιοχής του νωτιαίου μυελού έλκονται από το εδαφιαίο πέταλο και προβάλουν προς αυτό στην κοιλιακή πλευρά του νωτιαίου μυελού (Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995b). Αφού διασχίσουν τη μέση γραμμή οι συγκεκριμένοι άξονες στρίβουν κάθετα και συνεχίζουν την πορεία τους προς την πρόσθια πλευρά του νευρικού συστήματος. Όταν οι αυξητικοί κώνοι των νευραξόνων έρθουν σε επαφή με τη δομή του εδαφιαίου πετάλου, αλλάζουν μορφολογία, γεγονός που φανερώνει ότι υπάρχουν στο συγκεκριμένο σημείο παράγοντες που αναγνωρίζονται από τον αυξητικό κώνο (Bovolenta and Dodd, 1990).



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση εγκάρσιας τομής του νωτιαίου μυελού. Διακρίνονται το οροφιαίο (μαύρο) και το εδαφιαίο (πράσινο) πέταλο, καθώς και η νωτιαία χορδή (κόκκινο). Στην ραχιαία πλευρά του νωτιαίου μυελού υπάρχουν τα κυτταρικά σώματα των συνδεσμικών νευρώνων (C) και στην κοιλιακή των κινητικών (m). Διακρίνονται επίσης τα νωτιαία γάγγλια (DRG) που βρίσκονται εκατέρωθεν του νωτιαίου μυελού.

Εκτός από την ελκτική του δράση, το εδαφιαίο πέταλο εμπλέκεται και σε απωθητικού τύπου καθοδήγηση. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι ασκεί απωθητική δράση κυρίως σε νευράξονες των κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού, αλλά και του τροχιλιακού νεύρου (Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995a). Επιπλέον, φαίνεται ότι η συγκεκριμένη δομή ασκεί ελκτική δράση σε άξονες που πρόκειται να διασχίσουν τη μέση γραμμή, ενώ ασκεί απωθητική δράση σε άξονες που δεν διασχίζουν τη μέση γραμμή (Tamada et al., 1995).

Ένα αρκετά χρήσιμο «εργαλείο» στη μελέτη της δράσης του εδαφιαίου πετάλου, αποτέλεσαν οι μύες Danforth's short tail, από τους οποίους λείπει το εδαφιαίο πέταλο από την οπίσθια πλευρά του νευρικού συστήματος (Bovolenta and Dodd, 1991). Στα συγκεκριμένα ζώα βρέθηκε ότι στο σημείο που δεν υπήρχε εδαφιαίο πέταλο, οι άξονες των συνδεσμικών νευρώνων δεν είχαν ακολουθήσει την φυσιολογική τους πορεία, ενώ δεν ανιχνεύονταν παρά μόνο ελάχιστοι κινητικοί νευρώνες (Bovolenta and Dodd, 1991). Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ακόμα μία φορά τη δράση του εδαφιαίου πετάλου τόσο στην καθοδήγηση των αναπτυσσόμενων νευραξόνων όσο και στην επαγωγή της διαφοροποίησης κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού.

Εκτός από την καθοδήγηση των αναπτυσσόμενων νευραξόνων, τα τελευταία χρόνια αρχίζουν να παρουσιάζονται δεδομένα που αποδεικνύουν ότι το εδαφιαίο πέταλο παίζει ρόλο και στην καθοδήγηση της μετανάστευσης των κυτταρικών σωμάτων. Συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι ασκεί ελκτική δράση στα κύτταρα του πρόσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού (ΠΕΜΜ) στην περιοχή του αναπτυσσόμενου ρομβοειδούς εγκεφάλου (εικόνα 10) (Yee et al., 1999).

4.2 Καθοδηγητικά μόρια στο κεντρικό νευρικό σύστημα

Έρευνες κυρίως της τελευταίας δεκαετίας έχουν αρχίσει να καταδεικνύουν ότι οι πολυποίκιλες δράσεις του εδαφιαίου πετάλου που περιγράφηκαν ως τώρα οφείλονται σε ορισμένα μόρια που εκφράζονται στη περιοχή αυτή. Οι δράσεις των μορίων που παράγονται από το εδαφιαίο πέταλο και δρουν σε διάφορους τύπους κυτταρικών πληθυσμών είναι διαφορετικές και εξαρτώνται από τους τύπους των υποδοχέων που φέρουν οι πληθυσμοί αυτοί.

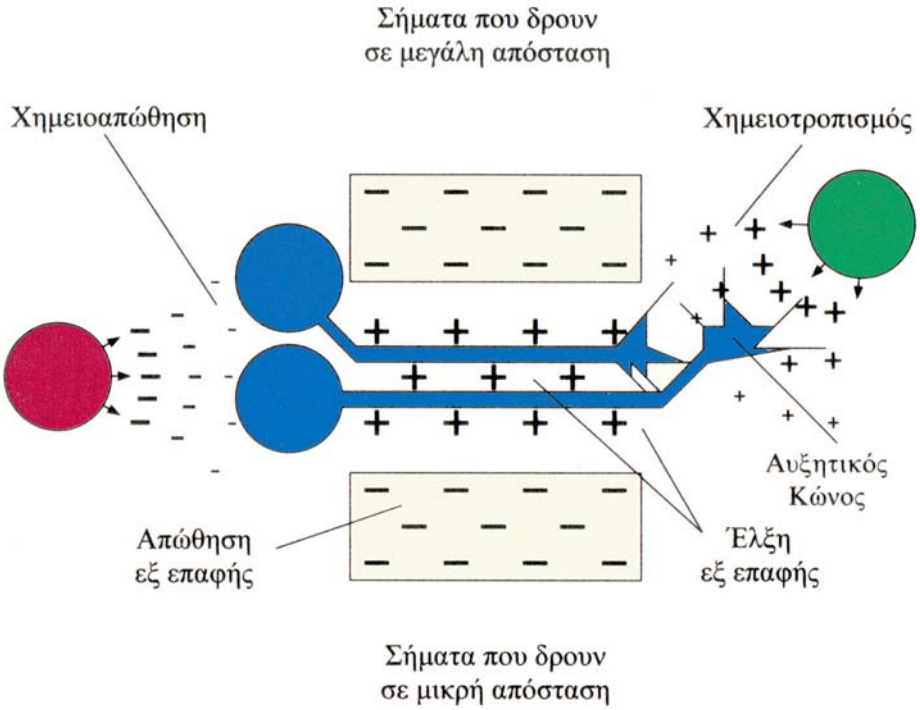
Οι κατηγορίες στις οποίες χωρίζονται οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε τέτοιου είδους καθοδήγηση, είτε αυτές προέρχονται από το εδαφιαίο πέταλο είτε όχι είναι οι εξής (εικόνα 12):

α) Πρωτεΐνες που δρουν εξ' επαφής ελκτικά.

β) Πρωτεΐνες που δρουν εξ' επαφής απωθητικά.

γ) Πρωτεΐνες που δρουν με διάχυση (εξ' αποστάσεως) ελκτικά.

δ) Πρωτεΐνες που δρουν με διάχυση (εξ' αποστάσεως) απωθητικά.



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση των επιδράσεων που δέχεται ο αναπτυσσόμενος νευράξονας.

4.2.1 Πρωτεΐνες που δρουν εξ' επαφής

4.2.1.1 Μόρια συνάφειας

Κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους και της επέκτασης των νευραξόνων τους, οι νευρώνες καθοδηγούνται από μόρια που προέρχονται είτε από τα ίδια τα κύτταρα είτε από στοιχεία του μικροπεριβάλλοντός τους. Όταν οι πρωτεΐνες αυτές βρίσκονται στην επιφάνεια των νευρώνων και εμπλέκονται στη διαδικασία συνάφειας του αυξητικού κώνου ή της καθοδηγητικής απόφυσης με στοιχεία του περιβάλλοντός τους ορίζονται ως μόρια συνάφειας. Τα μόρια συνάφειας

μπορούν να χωριστούν περαιτέρω στις τρεις παρακάτω κατηγορίες ανάλογα με την οικογένεια στην οποία ανήκουν:

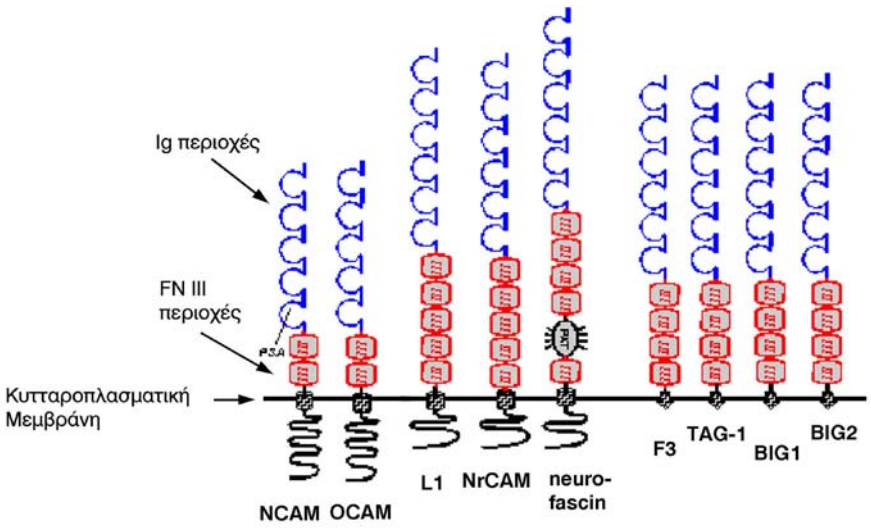
1. Πρωτεΐνες που ανήκουν στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών,
2. Πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των καντχερινών (cadherins)
3. Πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των ιντεγκρινών (integrins).

1. Πρωτεΐνες που ανήκουν στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών

Οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών είναι μόρια που περιλαμβάνουν στη δομή τους τμήματα, τα οποία εμφανίζουν ομολογία με τη δομή των ανοσοσφαιρινών, καθώς και δομές που εμφανίζουν ομολογία με τις τύπου ΙΙΙ επαναλήψεις του μορίου της φιμπρονεκτίνης. Η κάθε μία πρωτεΐνη περιλαμβάνει διαφορετικό αριθμό τέτοιων επαναλήψεων (εικόνα 13).

Η πρώτη πρωτεΐνη της συγκεκριμένης οικογένειας που βρέθηκε να εκφράζεται στο νευρικό σύστημα, είναι η **NCAM** (Neural Cell Adhesion Molecule), η οποία είναι και το πιο άφθονο μόριο συνάφειας στο νευρικό σύστημα. Δομικά εμφανίζει 5 επαναλήψεις ομόλογες των C2 περιοχών των ανοσοσφαιρινών και 2 επαναλήψεις με ομολογία στις φιμπρονεκτινικές τύπου ΙΙΙ περιοχές και μπορεί να είναι είτε διαμεμβρανικό, όπως η μορφή που φαίνεται στην εικόνα 13, είτε συνδεδεμένο με GPI δεσμό στην επιφάνεια των κυττάρων (Edelman, 1986). Έχει βρεθεί ότι υπάρχει ένα μόνο γονίδιο υπεύθυνο για την έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, αλλά με εναλλακτικό μάτισμα (alternative splicing) προέρχονται τελικά διάφοροι τύποι πρωτεϊνών. Επιπλέον, υπάρχουν και μεταμεταγραφικές τροποποιήσεις που παίζουν ρόλο στην τελική μορφή της πρωτεΐνης με σημαντικότερη τη γλυκοσυλίωση (Kandel et al., 1991). Στη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης του νευρικού συστήματος προστίθενται μόρια πολυσιαλικού οξέως (PSA) στο μόριο της NCAM (PSA-NCAM), σε ποσοστό που μπορεί να φτάσει και το 30% του βάρους της πρωτεΐνης (Skaper et al., 2001). Η προσθήκη του πολυσιαλικού οξέως στο NCAM δημιουργεί μια πρωτεΐνη που εμφανίζει μικρότερο βαθμό συνάφειας και άρα με αυτό τον τρόπο επηρεάζεται η δράση της (Murakami et al., 2000; Rutishauser and Landmesser, 1996; Skaper et al., 2001).

Η PSA-NCAM έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται σε καταστάσεις συνάφειας κυττάρων, καθοδήγησης νευραξόνων και μεταναστευόντων κυττάρων. Συγκεκριμένα,



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση της δομής μελών της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών στα σπονδυλωτά.

έχει βρεθεί ότι η ενζυματική αφαίρεση του πολυσιαλικού οξέως από το μόριο του NCAM που εκφράζεται στην επιφάνεια αναπτυσσόμενων νευραξόνων, προκαλεί λάθη στην καθοδήγηση τους και επηρεάζει τη δεσμιδοποίηση τους (Tang et al., 1994). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι το PSA-NCAM εμπλέκεται και στην καθοδήγηση της μετανάστευσης νευρώνων. Συγκεκριμένα, εκφράζεται από τα κύτταρα που δημιουργούνται στη βλαστική στοιβάδα της μέσης περιοχής των πρόδρομων βασικών γαγγλίων (medial ganglionic eminence, MGE) και μεταναστεύουν αλυσιδωτά προς τον οσφρητικό φλοιό (μονοπάτι Γ στην εικόνα 7) (Rousselot et al., 1995). Τα συγκεκριμένα κύτταρα ακολουθούν μια αλυσιδωτού τύπου μετανάστευση, όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην παράγραφο 1.2 (Altman, 1969; Lois and Alvarez-Buylla, 1994). Όταν αφαιρέθηκε το πολυσιαλικό οξύ από τα κύτταρα αυτά με ενζυματικό τρόπο ή με συγκεκριμένη μεταλλαγή παρατηρήθηκε αναστολή στη μετανάστευση αυτών των κυττάρων (Hu et al., 1996; Ono et al., 1994; Tomasiewicz et al., 1993).

Εκτός από το ρόλο που παίζει το PSA-NCAM στην καθοδήγηση των κυττάρων που εκτελούν αλυσιδωτού τύπου μετανάστευση, δείχθηκε ότι εμπλέκεται και στη ρύθμιση της νευροφιλικής μετανάστευσης. Συγκεκριμένα, οι LHRH νευρώνες, οι οποίοι μεταναστεύουν από τον οσφρητικό βολβό προς τον προσεγκέφαλο, ακολουθούν ως φορέα στήριξης υποπληθυσμό αξόνων του οσφρητικού νεύρου (Schwanzel-Fukuda and Pfaff, 1989; Schwanzel-Fukuda and

Pfaff, 1990; Wray et al., 1989). Το PSA-NCAM εκφράζεται τόσο από τα μεταναστεύοντα κύτταρα, όσο και από τους άξονες πάνω στους οποίους γίνεται η μετανάστευση (Murakami et al., 2000; Yoshida et al., 1995). Η ενζυματική αφαίρεση του πολυσιαλικού οξέως από το μόριο του NCAM προκαλεί μείωση του αριθμού των μεταναστευόντων κυττάρων στο συγκεκριμένο σύστημα (Murakami et al., 2000; Yoshida et al., 1999).

Ένα άλλο μόριο της ίδιας υπεροικογένειας, που έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται και αυτό σε διάφορες λειτουργίες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος είναι η **L1** (NILE στους επίμυες και NgCAM στην όρνιθα). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι και αυτή διαμεμβρανική και αποτελείται από 6 επαναλήψεις ομόλογες των C2 ανοσοσφαιρινικών περιοχών και 5 επαναλήψεις με ομολογία στις φιμπρονεκτινικές τύπου III περιοχές (εικόνα 13) (Rathjen and Schachner, 1984). Με πειράματα αναστολής της δράσης της με τη χρήση αντισωμάτων έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της επέκτασης νευραξόνων (Chang et al., 1987). Η επέκταση των νευραξόνων επάγεται είτε από ομοφιλικού τύπου αλληλεπίδραση των μορίων της L1 με άλλα μόρια της L1, σχηματίζοντας ομοδιμερή, (Appel et al., 1993; Lemmon et al., 1989; Sugawa et al., 1997) είτε με ετεροφιλικού τύπου σύνδεση, των μορίων της L1 με άλλα μόρια συνάφειας, όπως η TAG-1 (Kuhn et al., 1991), σχηματίζοντας ετεροδιμερή. Ο μηχανισμός που ακολουθείται κάθε φορά εξαρτάται από τον πληθυσμό των κυττάρων που φέρουν τους συγκεκριμένους νευράξονες.

Το μόριο της L1 έχει δειχθεί επίσης ότι εμπλέκεται στη δεσμιδοποίηση των αναπτυσσόμενων νευραξόνων (Stallcup and Beasley, 1985) είτε επάγοντάς την (Stoeckli and Landmesser, 1995) είτε αναστέλλοντάς την (Fischer et al., 1986) και πάλι ανάλογα με τον κυτταρικό πληθυσμό που φέρει τους συγκεκριμένους άξονες. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται και στη μετανάστευση κυτταρικών πληθυσμών και συγκεκριμένα των κοκκωδών κυττάρων του φλοιού της παρεγκεφαλίδας (Asou et al., 1992a; Asou et al., 1992b; Lindner et al., 1983; Miura et al., 1992).

Ένα άλλο διαμεμβρανικό μόριο συνάφειας, που ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών, είναι η πρωτεΐνη **NrCAM** (N-CAM related Cell Adhesion Molecule). Το μόριο αυτό αποτελείται από 6 επαναλήψεις ομόλογες των C2 ανοσοσφαιρινικών περιοχών και 5 επαναλήψεις με ομολογία στις φιμπρονεκτινικές

τύπου ΙΙΙ περιοχές, όπως και το μόριο της L1 (εικόνα 13) (Grumet et al., 1991; Kayyem et al., 1992). Η έκφρασή του εντοπίζεται κυρίως σε συνδεσμικές δομές, αλλά και σε κυτταρικούς τύπους του φλοιού της παρεγκεφαλίδας (Lustig et al., 2001; Sakurai et al., 2001).

Έχει αποδειχθεί ότι το NrCAM εμπλέκεται στην συνάφεια των κυττάρων μεταξύ τους είτε μέσω ομοφιλικού είτε μέσω ετεροφιλικού μηχανισμού δέσμευσης (Mauro et al., 1992). Επίσης, αναστέλλει ή επάγει την επέκταση νευραξόνων, ανάλογα με το είδος των κυττάρων στο οποίο εκφράζεται και ανάλογα με τα μόρια με τα οποία αλληλεπιδρά (Grumet, 1997).

Εκτός από τα διαμεμβρανικά μόρια συνάφειας, μερικά από τα οποία ήδη περιγράψαμε, υπάρχουν και ορισμένα που δεν έχουν διαμεμβρανική περιοχή, αλλά είναι συνδεδεμένα στην επιφάνεια των κυττάρων με δεσμούς γλυκοσιλο-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (GPI δεσμός). Ένα τέτοιο μόριο συνάφειας, με το οποίο θα ασχοληθούμε εκτενώς στη συγκεκριμένη εργασία είναι η **TAG-1** (Transiently expressed Axonal Glycoprotein). Αποτελείται από 6 επαναλήψεις ομόλογες των C2 ανοσοσφαιρινικών περιοχών και 4 επαναλήψεις με ομολογία στις φιμπρονεκτινικές τύπου ΙΙΙ περιοχές (εικόνα 13) (Furley et al., 1990). Η ομόλογη πρωτεΐνη στην όρνιθα ονομάστηκε axonin-1 και εμφανίζει 74.5 % ομοιότητα στην αμινοξική αλληλουχία με αυτή των θηλαστικών (Zuellig et al., 1992). Όπως φαίνεται και από την ονομασία της, η πρωτεΐνη TAG-1 εκφράζεται παροδικά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και μάλιστα έως τώρα έχει δειχθεί η έκφρασή της μόνο σε μεταμιτωτικούς νευρώνες (Furley et al., 1990).

Στην περιοχή του νωτιαίου μυελού η TAG-1 εκφράζεται αρχικά από τους κινητικούς νευρώνες που βρίσκονται κοιλιακά (Dodd et al., 1988). Αργότερα η έκφρασή της εντοπίζεται και στους άξονες των συνδεσμικών νευρώνων που βρίσκονται στην ραχιαία περιοχή του νωτιαίου μυελού και στα νωτιαία γάγγλια (Dorsal Root Ganglia, DRG) (Dodd et al., 1988; Furley et al., 1990). Έχει δειχθεί ότι οι άξονες των συνδεσμικών νευρώνων εκφράζουν το μόριο TAG-1 καθώς εκτείνονται κοιλιακά, αλλά μόλις περάσουν τη μέση γραμμή κάτω από το εδαφιαίο πέταλο, σταματά η έκφραση της TAG-1 και αυξάνεται η έκφραση ενός άλλου μορίου συνάφειας της L1 (Dodd et al., 1988). Σε *in vivo* πειράματα που έγιναν σε έμβρυα όρνιθας, χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι της axonin-1 (TAG-1) ή έναντι της NrCAM, τα οποία χορηγήθηκαν κατευθείαν στο νωτιαίο μυελό των αναπτυσσόμενων

εμβρύων. Στα συγκεκριμένα έμβρυα παρατηρήθηκαν λάθη στην καθοδήγηση των αξόνων των συνδεσμικών νευρώνων προς το εδαφιαίο πέταλο, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα δύο παραπάνω μόρια εμπλέκονται στο μηχανισμό καθοδήγησης των συνδεσμικών νευρώνων προς το στόχο τους (Stoeckli and Landmesser, 1995). Επιπλέον βρέθηκε ότι η αναστολή της axonin-1 προκαλεί λάθη στην καθοδήγηση των αξόνων των συνδεσμικών νευρώνων, χωρίς όμως να επηρεάζει το ρυθμό και την ικανότητα επέκτασής τους (Fitzli et al., 2000).

Τα μόρια axonin-1 (TAG-1) και NrCAM, μέσω trans αλληλεπίδρασης, έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται και στην καθοδήγηση νευραξόνων των νωτιαίων γαγγλίων (DRGs) και συμπαθητικών γαγγλίων (Lustig et al., 1999). Με *in vivo* χορήγηση αντισωμάτων και πάλι σε έμβρυα όρνιθας βρέθηκε ότι η αναστολή της αλληλεπίδρασης αυτών των μορίων οδηγεί σε αναστολή της επέκτασης των παραπάνω νευραξόνων (Lustig et al., 1999). Εκτός από την trans αλληλεπίδραση με την NrCAM η TAG-1 έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με cis τρόπο και με το μόριο συνάφειας L1 και μάλιστα αυτή η αλληλεπίδραση έχει δειχθεί ότι είναι απαραίτητη για την επέκταση νευραξόνων ορισμένων κυτταρικών πληθυσμών (Felsenfeld et al., 1994).

Επιπλέον η TAG-1 έχει δειχθεί ότι επάγει τη συνάφεια των κυττάρων μεταξύ τους και μάλιστα πιθανόν μέσω ομοφιλικού τρόπου σύνδεσης στον οποίο συμμετέχουν κυρίως οι φιμπρονεκτινικές περιοχές του μορίου της (Dhar Malhotra et al., 1998; Felsenfeld et al., 1994; Rader et al., 1993; Tsiotra et al., 1996). Πολύ πρόσφατα δεδομένα έχουν αρχίσει να δείχνουν ότι η πρωτεΐνη TAG-1 εμπλέκεται και στην μετανάστευση νευρώνων κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι η TAG-1 εκφράζεται από τους άξονες πάνω στους οποίους μεταναστεύουν οι GABAεργικοί ενδονευρώνες από τη μέση περιοχή των πρόδρομων βασικών γαγγλίων (medial ganglionic eminence, MGE) ως τον αναπτυσσόμενο φλοιό (Denaxa et al., 2001). Αναστέλλοντας *in vitro* τη δράση της TAG-1 στο συγκεκριμένο σύστημα, μικρότερος αριθμός GABAεργικών ενδονευρώνων μεταναστεύει προς την τελική τους θέση (Denaxa et al., 2001). Τέλος, πρόσφατα έχει αρχίσει να αναλύεται ο φαινότυπος των μυών που εμφανίζουν απώλεια δράσης του γονιδίου της TAG-1 (knock out μύες) (Fukamauchi et al., 2001) και φαίνεται ότι υπάρχει αύξηση των adenosine A1 υποδοχέων στην περιοχή του ιπποκάμπου.

Τέλος, η πρωτεΐνη **F3** είναι άλλο ένα μόριο συνδεδεμένο με GPI-δεσμό, το οποίο ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Στη δομή του περιλαμβάνει 6 επαναλήψεις ομόλογες των C2 ανοσοσφαιρινικών περιοχών και 4 επαναλήψεις με ομολογία στις φιμπρονεκτινικές τύπου ΙΙΙ περιοχές, όπως ακριβώς και το μόριο της TAG-1 (εικόνα 13) (Gennarini et al., 1989). Σχετικά με τη δράση της F3 έχει δειχθεί ότι παίζει ρόλο στη συνάφεια των κυττάρων μεταξύ τους και εμπλέκεται και στην επέκταση νευραξόνων είτε αναστέλλοντας (Buttiglione et al., 1998; Buttiglione et al., 1996; Faivre-Sarrailh et al., 1999) είτε επάγοντάς την (Durbec et al., 1994; Durbec et al., 1992; Gennarini et al., 1991; Morales et al., 1993). Επιπλέον, σε *in vitro* συνθήκες βρέθηκε ότι επάγει τη δεσμιδοποίηση των νευραξόνων των κοκκωδών κυττάρων της παρεγκεφαλίδας (Buttiglione et al., 1998; Buttiglione et al., 1996; Faivre-Sarrailh et al., 1999).

Όλα τα μόρια συνάφειας, τα οποία περιγράψαμε έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να δρουν είτε μέσω ομοφιλικής trans σύνδεσης είτε μέσω ετεροφιλικής σύνδεσης με άλλα μόρια, που ανήκουν στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών (Buttiglione et al., 1998). Επιπλέον, τα συγκεκριμένα μόρια έχει βρεθεί ότι συνδέονται με πρωτεΐνες του εξωκυττάριου χώρου (Pesheva et al., 1993) και με μέλη της οικογένειας των ιντεγκρινών (Treubert and Brummendorf, 1998). Η ποικιλία αυτή που παρατηρείται στις αλληλεπιδράσεις εξηγεί και την ποικιλία των δράσεων που εκτελούν αυτά τα μόρια κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος.

2. Πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των καντχερινών (cadherins)

Η οικογένεια των καντχερινών περιλαμβάνει πολλά μέλη από τα οποία το πιο άφθονο στο νευρικό σύστημα είναι η N-καντχερίνη. Το συγκεκριμένο μόριο έχει δειχθεί ότι συνδέεται μέσω ομοφιλικής σύνδεσης με άλλα μόρια N-καντχερίνης, που εκφράζονται από τα γειτονικά κύτταρα ή άξονες μόνο παρουσία ιόντων Ca^{++} στον εξωκυττάριο χώρο και επάγει τη συνάφεια των κυττάρων μεταξύ τους (Takeichi, 1987). Οι καντχερίνες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, των οποίων η ενδοκυττάρια περιοχή συνδέεται με μια οικογένεια μορίων που ονομάζονται κατενίνες (catenins), οι οποίες με τη σειρά τους αλληλεπιδρούν με στοιχεία του κυτταροσκελετού (Kandel et al., 1991).

3. Πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των ιντεγκρινών (integrins)

Οι ιντεγκρίνες είναι μια ομάδα γλυκο-πρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούν τους υποδοχείς των στοιχείων του εξωκυττάριου χώρου, που αναφέρονται αναλυτικότερα στην παράγραφο 4.2.1.3. Το μόριο των ιντεγκρινών είναι ένα ετεροδιμερές, που αποτελείται από τις υπομονάδες α και β (Hynes, 1992). Η β υπομονάδα περιέχει μια περιοχή με πολλούς δισουλφιδικούς δεσμούς, ενώ η περιοχή σύνδεσης με τις πρωτεΐνες του εξωκυττάριου χώρου βρίσκεται στην αμινοτελική περιοχή των υπομονάδων. Στη συγκεκριμένη περιοχή είναι σημαντική η πρόσδεση ιόντων ασβεστίου (Ca^{++}) για τη σύνδεση των ιντεγκρινών με τα μόρια του εξωκυττάριου περιβάλλοντος (Hynes, 1992).

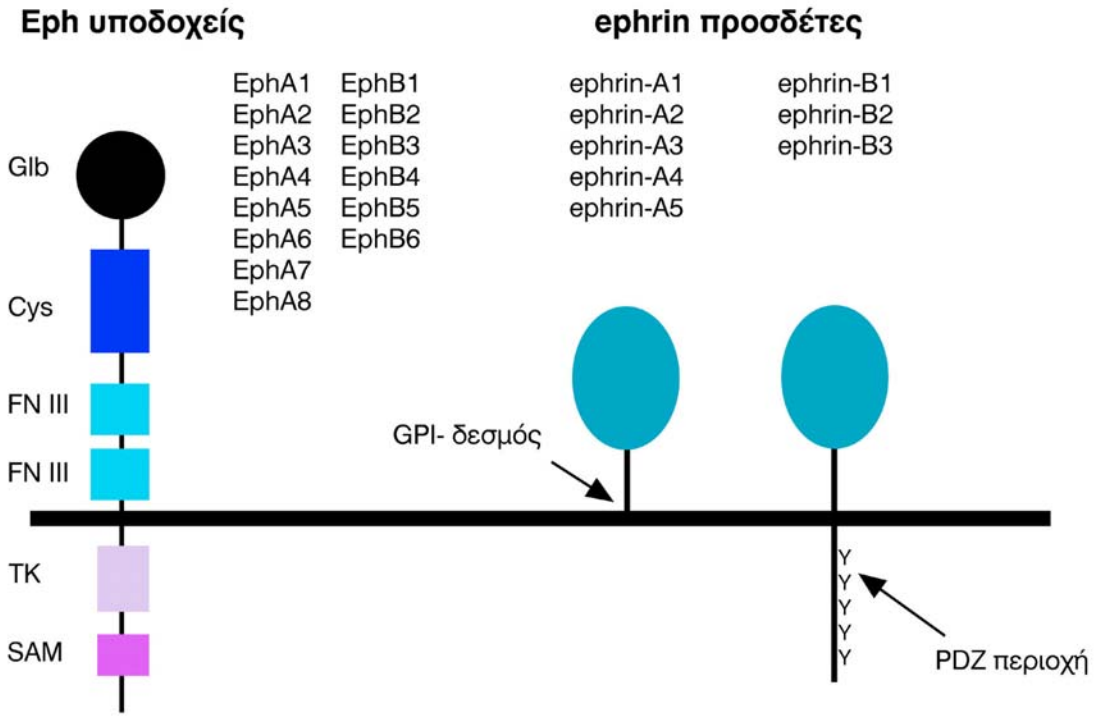
4.2.1.2 Eph/ephrins

Οι υποδοχείς κινάσες τυροσίνης (Receptor Tyrosine Kinases, RTKs) είναι μια ομάδα πρωτεϊνών που παίζουν σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση και στην εμβρυογένεση. Μια υποοικογένεια των συγκεκριμένων μορίων αποτελούν οι υποδοχείς **Eph**. Το πρώτο μόριο αυτής της υποοικογένειας κλωνοποιήθηκε στα τέλη της δεκαετίας του `80 και ήταν η EphA1 (Hirai et al., 1987), ενώ έως σήμερα έχουν αναγνωριστεί 8 EphA και 6 EphB μέλη της υποοικογένειας αυτής στα σπονδυλωτά (Flanagan and Vanderhaeghen, 1998). Αργότερα, αναγνωρίστηκαν οι προσδέτες των συγκεκριμένων υποδοχέων, οι πρωτεΐνες **ephrins** και έως σήμερα έχουν αναγνωριστεί 8 μέλη αυτής της υποοικογένειας (Flanagan and Vanderhaeghen, 1998).

Τα Eph μόρια είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες φέρουν στην εξωκυττάρια περιοχή τους μια αμινοτελική σφαιρική περιοχή (globular domain, Glb), μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες (Cys) και 2 περιοχές με ομολογία στις τύπου III επαναλήψεις της φιμπρονεκτίνης (FN III) (εικόνα 14) (Nakamoto, 2000). Η ενδοκυττάρια περιοχή του μορίου, όπως όλοι οι RTKs υποδοχείς, φέρει περιοχές που εμπλέκονται στη μετάδοση σήματος, όπως η περιοχή κινάσης τυροσίνης (TK). Στο ενδοκυττάριο τμήμα του μορίου υπάρχει επίσης η περιοχή SAM (sterile alpha motif), η οποία εμπλέκεται στο διμερισμό του υποδοχέα (Flanagan and Vanderhaeghen, 1998).

Οι ephrins ανάλογα με τον τρόπο που είναι συνδεδεμένοι στην κυτταρική μεμβράνη χωρίζονται σε διαμεμβρανικές (ephrins-B1-B3) και σε συνδεόμενες με GPI-δεσμό (ephrins-A1-A5) (εικόνα 14). Επιπλέον οι ενδοκυττάριες περιοχές των

ephrin-B μορίων είναι πολύ συντηρημένες και εμφανίζουν μια περιοχή με πέντε σημεία δυνητικής φωσφορυλίωσης τυροσίνης (PDZ περιοχή) (Flanagan and Vanderhaeghen, 1998).



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση της δομής των Eph υποδοχέων και ephrin προσδετών τους. Τα Eph μόρια είναι διαμεμβρανικά, όπως και οι ephrin-B προσδέτες τους, ενώ οι ephrin-A προσδέτες είναι συνδεδεμένοι με GPI- δεσμό στην επιφάνεια των κυττάρων.

Ως προς την αλληλεπίδραση οι EphA υποδοχείς συνδέονται με τους ephrin-A προσδέτες, ενώ οι EphB με τους ephrin-B. Ωστόσο στο συγκεκριμένο κανόνα υπάρχει η εξαίρεση του μορίου EphA4, το οποίο συνδέεται με τους ephrin-A προσδέτες, αλλά και με τους ephrin-B2 και ephrin-B3 (Gale, 1996). Πολύ σημαντικό στοιχείο στην δράση αυτών των μορίων είναι η ικανότητά τους να δρουν μεταφέροντας σήμα και στο κύτταρο που φέρει τον υποδοχέα και σε αυτό που φέρει τον προσδέτη, άρα η ενεργοποίηση του συγκεκριμένου συμπλόκου να φέρει ένα διπλής κατεύθυνσης αποτέλεσμα (Holland et al., 1998).

Η δράση των παραπάνω πρωτεϊνών εστιάζεται τόσο στην καθοδήγηση αναπτυσσόμενων νευραξόνων όσο και στη μετανάστευση κυτταρικών πληθυσμών. Αρχικά η δράση των Eph/ephrins ανιχνεύθηκε στο αναπτυσσόμενο οπτικό σύστημα. Οι άξονες των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς προβάλουν προς τους στόχους τους με πολύ συγκεκριμένο και σταθερό τρόπο. Τόσο στα πτηνά όσο και στα θηλαστικά έχει αποδειχθεί ότι τα μόρια ephrin-A2 και ephrin-A5 δημιουργούν ένα εκτενές τοπογραφικό δίκτυο έκφρασης, ώστε να απωθούν τους EphA3 θετικούς άξονες και να τους οδηγούν στη σωστή τους θέση (Cheng et al., 1995; Drescher et al., 1995).

Εκτός από το οπτικό σύστημα τα μόρια Eph/ephrins παίζουν σημαντικό ρόλο στην καθοδήγηση των αναπτυσσόμενων νευραξόνων στην περιοχή του ιπποκάμπου (Gao et al., 1996), των συνδεσμικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού στην περιοχή της μέσης γραμμής (Klein, 2001) και του πυραμιδικού δεματίου στο επίπεδο του νωτιαίου μυελού (Bergemann et al., 1998; Coonan et al., 2001; Kullander et al., 2001; Yokoyama et al., 2001). Εκτός από την καθοδήγηση αναπτυσσόμενων νευραξόνων, εμπλέκονται και σε διαδικασίες διαμερισματοποίησης του αναπτυσσόμενου ρομβειδούς εγκεφάλου (Flanagan and Vanderhaeghen, 1998; Holder and Klein, 1999), μετανάστευσης των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας (neural crest cells) (Holder and Klein, 1999; Klein, 2001; Wilkinson, 2001), αλλά και κυτταρικών πληθυσμών του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπως για παράδειγμα των ενδονευρώνων του οσφρητικού βολβού (Yokoyama et al., 2001).

4.2.1.3 Στοιχεία εξωκυττάριου χώρου (extracellular matrix components, ECM)

Οι πρωτεΐνες του εξωκυττάριου χώρου, οι οποίες αρχικά έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στην καθοδήγηση νευραξόνων είναι η λαμινίνη και η φιμπρονεκτίνη (Varela-Echavarria and Guthrie, 1997). Η **λαμινίνη** είναι μια μεγάλου μεγέθους πρωτεΐνη που αποτελείται από τρεις υπομονάδες, οι οποίες ονομάζονται A, B1 και B2. Η καθεμία από αυτές τις υπομονάδες έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται σε διαφορετικές λειτουργίες, όπως η συνάφεια κυττάρων, η επέκταση νευραξόνων καθώς και η σύνδεση με άλλα μόρια, όπως η ηπαρίνη (Gundersen, 1987; Hynes et al., 1992; Sanes, 1989; Varela-Echavarria and Guthrie, 1997).

Η **φιμπρονεκτίνη** αποτελείται από δύο υπομονάδες, διαφορετικές μεταξύ τους, οι οποίες είναι συνδεδεμένες με δισουλφιδικό δεσμό και εμφανίζουν θέσεις δέσμευσης με διάφορα άλλα μόρια. Παράγεται από ινοβλάστες και άλλα

μεσεγχυματικά κύτταρα, ενώ ανιχνεύεται και στο περιφερικό νευρικό σύστημα, όπου εμπλέκεται στη μετανάστευση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας (Kandel et al., 1991).

Τέλος, πιο πρόσφατες μελέτες έχουν αρχίσει να φανερώνουν και άλλες πρωτεΐνες του εξωκυττάριου χώρου, οι οποίες εμπλέκονται στη διαδικασία της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι το **κολλαγόνο**, η **τενασίνη-R** (tenascin-R), η **τενασίνη- C** (tenascin-C) και η **ανοσμίνη-1** (anosmin-1) εμπλέκονται σε διαδικασίες μετανάστευσης και επέκτασης νευραξόνων (Varela-Echavarria and Guthrie, 1997).

4.2.1.4 Σεμαφορίνες (Semaphorins)

Μια άλλη οικογένεια μορίων με απωθητική κυρίως δράση είναι οι σεμαφορίνες (semaphorins). Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες ταξινομούνται σε 8 τάξεις. Οι τάξεις I-II συναντώνται στα ασπόνδυλα, οι τάξεις III-VI στα σπονδυλωτά και υπάρχει και η V τάξη, η οποία εμφανίζεται σε ιούς. Στις τάξεις I, IV, V και VI ανήκουν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, στις τάξεις II, III και V εκκρινόμενες, ενώ στην τάξη VII ανήκουν πρωτεΐνες που συνδέονται με GPI δεσμό στην επιφάνεια των κυττάρων (Raper, 2000; Tamagnone and Comoglio, 2000; Yu and Bargmann, 2001). Το χαρακτηριστικό των σεμαφορινών είναι η "sema" περιοχή 500 αμινοξέων που υπάρχει στο εξωκυττάριο τμήμα τους, και περιλαμβάνει 500 αμινοξέα μεταξύ των οποίων 17 συντηρημένες κυστεΐνες και είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση των σεμαφορινών με τους υποδοχείς τους (Feiner, 1997).

Έως σήμερα έχουν αναγνωριστεί δύο είδη υποδοχέων των σεμαφορινών: οι neuropilins και οι plexins. Οι neuropilins αλληλεπιδρούν μόνο με εκκρινόμενης μορφής σεμαφορίνες, ενώ αντίθετα οι plexins αλληλεπιδρούν με μεμβρανικές σεμαφορίνες και όχι με εκκρινόμενες (Raper, 2000; Tamagnone and Comoglio, 2000; Yu and Bargmann, 2001).

Σχετικά με τις δράσεις των σεμαφορινών έχει δειχθεί ότι εμπλέκονται κυρίως σε ανασταλτικές ή απωθητικές λειτουργίες. Συγκεκριμένα, απωθούν αναπτυσσόμενους νευράξονες, προκαλούν αναστολή της επέκτασης νευραξόνων και δημιουργία δενδριτών σε κινητικούς νευρώνες και κατάρρευση (collapse) του αυξητικού κώνου αισθητικών νευρώνων (Kolodkin, 1996).

4.2.2 Πρωτεΐνες που δρουν με διάχυση εξ' αποστάσεως

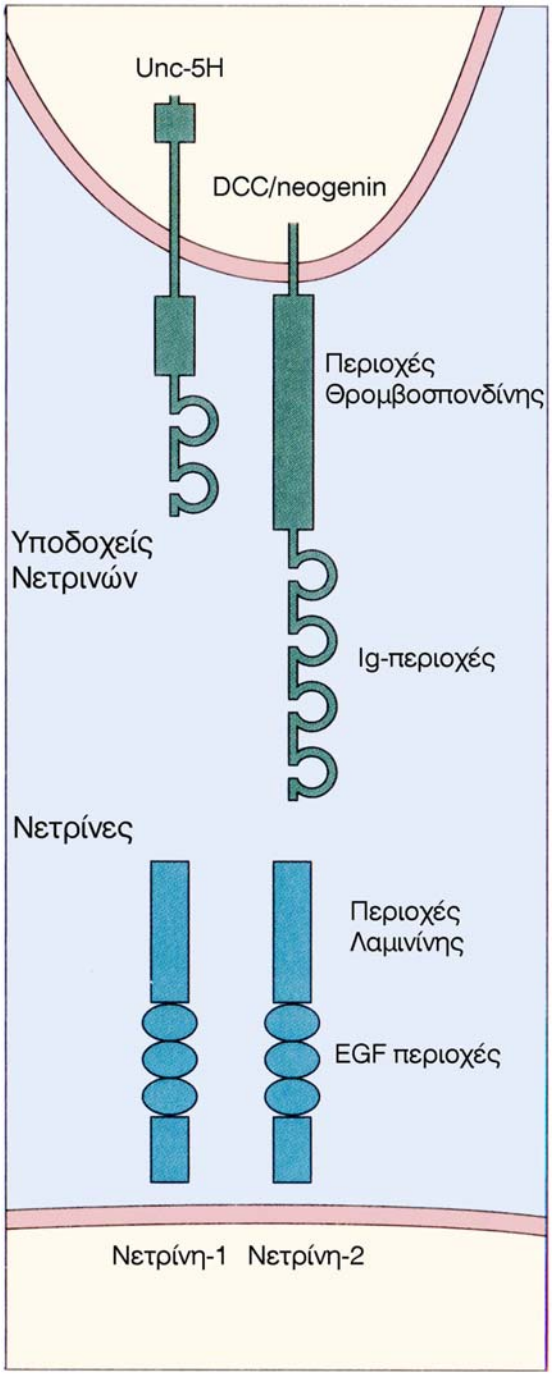
4.2.2.1 Νετρίνες και υποδοχείς

Οι πολυποίκιλες δράσεις του εδαφιαίου πετάλου οφείλονται κατά μεγάλο βαθμό στη δράση των νετρινών. Οι νετρίνες είναι εκκρινόμενες πρωτεΐνες, οι οποίες κλωνοποιήθηκαν αρχικά στην όρνιθα και βρέθηκε ότι επάγουν την επέκταση νευραξόνων και έλκουν τους αναπτυσσόμενους νευράξονες των συνδεσμικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού (Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1994). Στην όρνιθα έχουν κλωνοποιηθεί δύο νετρίνες, η **νετρίνη–1**, που εκφράζεται από τα κύτταρα του εδαφιαίου πετάλου και η **νετρίνη-2**, που εκφράζεται στην κοιλιακή πλευρά του νωτιαίου μυελού εκτός από την περιοχή του εδαφιαίου πετάλου (Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1994). Στα θηλαστικά έχει κλωνοποιηθεί η νετρίνη-1, η οποία εκφράζεται στην περιοχή του εδαφιαίου πετάλου (Livesey and Hunt, 1997), ενώ έως σήμερα δεν έχει βρεθεί η ομόλογη της νετρίνης-2 της όρνιθας στους μύες. Δομικά οι νετρίνες φέρουν περιοχές που εμφανίζουν ομοιότητα με αμινοξυτελικές περιοχές του μορίου της λαμινίνης και περιοχές με ομοιότητα στον επιδερμικό τροφικό παράγοντα (EGF) (εικόνα 15) (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996).

Πρόσφατα, έχουν κλωνοποιηθεί στους μύες άλλα τρία μέλη της οικογένειας των νετρινών, η νετρίνη-3 (Puschel, 1999), η νετρίνη-4 (Yin et al., 2000) και η συνδεδεμένη στην επιφάνεια των κυττάρων με GPI δεσμό νετρίνη G (Nakashiba et al., 2000). Από τα παραπάνω μόρια μόνο η νετρίνη-4 εκφράζεται στην περιοχή της μέσης γραμμής και φαίνεται να ασκεί ελκτική δράση σε κάποιο υποπληθυσμό συνδεσμικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού (Yin et al., 2000).

Οι υποδοχείς των νετρινών χωρίζονται σε δύο οικογένειες. Τα μόρια **DCC** (Deleted in Colorectal Cancer) (Fearon et al., 1990) και **neogenin** (Vielmetter et al., 1994) ανήκουν στην πρώτη οικογένεια και είναι ομόλογες πρωτεΐνες με την unc-40 του C. elegans (Hedgecock et al., 1990). Δομικά, οι πρωτεΐνες αυτές είναι διαμεμβρανικές και φέρουν 4 επαναλήψεις με ομολογία στις ανοσοσφαιρινικές περιοχές των μορίων συνάφειας και 6 περιοχές με ομολογία στις τύπου III περιοχές της φιμπρονεκτίνης (Varela-Echavarria and Guthrie, 1997) (εικόνα 15). Η δεύτερη οικογένεια αποτελείται από τα μόρια που ονομάζονται **UNC-5** και είναι ομόλογες πρωτεΐνες με την unc-5 του C. elegans. Τα μέλη αυτής της οικογένειας είναι και αυτά διαμεμβρανικά μόρια, τα οποία εμφανίζουν 2 επαναλήψεις με ομολογία στις ανοσοσφαιρινικές περιοχές των μορίων συνάφειας και 2 περιοχές ομόλογες της θρομβοσπονδίνης τύπου I (TSPI) (Leung-Hagesteijn et al., 1992).

Σχετικά με τη δράση των νετρινών, αρχικά είχαν χαρακτηριστεί ως τα μόρια που ευθύνονται για την ελκτική επίδραση που ασκεί το εδαφιαίο πέταλο στην επέκταση των νευραξόνων των συνδεσμικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού (Kennedy et al., 1994). Στη συνέχεια δείχθηκε ότι η δράση τους αυτή παρατηρείται



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση των νετρινών και των υποδοχέων τους.

και σε άλλες περιοχές του νευρικού συστήματος σε άλλου τύπου νευρικούς πληθυσμούς. Βρέθηκε ότι η νετρίνη-1 έλκει τους αναπτυσσόμενους άξονες που προέρχονται από την παρεγκεγαλίδα προς το θάλαμο (Shirasaki et al., 1995), τους άξονες των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς χιτώνα του οφθαλμού (de la Torre et al., 1997) και τους φλοιοθαλαμικούς άξονες του τελεγκεφάλου (Metin et al., 1997). Ακολούθως δείχθηκε ότι η νετρίνη ασκεί απωθητική δράση στους άξονες του κινητικού πυρήνα του τροχιλιακού νεύρου (Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995a).

Οι διαφορετικές δράσεις που εμφανίζει η νετρίνη οφείλονται στην αλληλεπίδρασή της με διαφορετικούς υποδοχείς στους νευρώνες που αποκρίνονται στην ύπαρξή της. Συγκεκριμένα, οι άξονες των κυττάρων που εκφράζουν τον DCC υποδοχέα έλκονται από τη νετρίνη, ενώ οι άξονες που φέρουν τους UNC-5 υποδοχείς απωθούνται (Cook et al., 1998; Guthrie, 1997; Keino-Masu et al., 1996; Leonardo et al., 1997; Shirasaki et al., 1998; Varela-Echavarria and Guthrie, 1997). Τα τελευταία χρόνια ωστόσο, έχει αρχίσει να φαίνεται ότι στην απωθητική δράση της νετρίνης εμπλέκεται και ο DCC υποδοχέας. Συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι σε πληθυσμούς κυττάρων που εκφράζουν και τους δύο υποδοχείς, υπάρχει αλληλεπίδραση των δύο αυτών μορίων για να επιτευχθεί η απωθητική δράση (Hong et al., 1999; Seeger and Beattie, 1999; Terman and Kolodkin, 1999).

Εκτός από την επίδραση που έχει η νετρίνη στη διαδικασία της επέκτασης των νευραξόνων, έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται και στον προσανατολισμό των μεταναστευόντων κυττάρων, δρώντας είτε ελκτικά είτε απωθητικά. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι έλκει τα μεταναστεύοντα κύτταρα του πρόσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού του αναπτυσσόμενου ρομβοειδούς εγκεφάλου (το μεταναστευτικό μονοπάτι φαίνεται στην εικόνα 10) (Yee et al., 1999). Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν καθόλη τη διάρκεια της μετανάστευσής τους τον υποδοχέα DCC (Yee et al., 1999). Αντίθετα, η νετρίνη ασκεί απωθητική δράση στα μεταμιτωτικά κοκκώδη κύτταρα του φλοιού της παρεγκεφαλίδας (Przyborski et al., 1998) και στα κύτταρα που δημιουργούνται στην βλαστική στοιβάδα της πλάγιας περιοχής των πρόδρομων βασικών γαγγλίων (lateral ganglionic eminence, LGE) και καταλήγουν στο αναπτυσσόμενο ραβδωτό (το μονοπάτι Β στην εικόνα 7) (Hamasaki et al., 2001).

Οι περισσότερες, αλλά όχι όλες οι δράσεις της νετρίνης και των υποδοχέων της, που περιγράψαμε ως τώρα, επιβεβαιώνονται από το φαινότυπο των μυών με απώλεια δράσης της νετρίνης (Serafini et al., 1996) ή του DCC (Fazeli et al., 1997).

Συγκεκριμένα, τα ζώα αυτά εμφανίζουν προβλήματα στην προβολή των αξόνων των συνδεσμικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού προς τη μέση γραμμή (Serafini et al., 1996). Ωστόσο, δεν επηρεάζονται οι άξονες του κινητικού πυρήνα του τροχιλιακού νεύρου, οι οποίοι όπως είπαμε απωθούνται από τη νετρίνη (Serafini et al., 1996). Σημαντικά προβλήματα παρουσιάζουν δομές που απαρτίζονται από άξονες συνδεσμικών νευρώνων, όπως το μεσολόβιο. Επιπλέον στα συγκεκριμένα ζώα δεν σχηματίζεται ο βασικός πυρήνας της γέφυρας (Serafini et al., 1996).

4.2.2.2 F-σπονδίνη (F-spondin)

Μια άλλη διαχεόμενη πρωτεΐνη, η οποία κλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε την τελευταία δεκαετία είναι η **F-σπονδίνη** (F-spondin). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εμφανίζει μια μοναδική δομή στο αμινοτελικό της άκρο, αλλά στο καρβόξυτελικό της άκρο έχει 6 επαναλήψεις περιοχής που εμφανίζει ομολογία με τμήματα της πρωτεΐνης του εξωκυττάριου χώρου θρομβοσπονδίνη (Klar et al., 1992). Η F-σπονδίνη βρέθηκε ότι εκφράζεται στην περιοχή του εδαφιαίου πετάλου και επάγει τη συνάφεια και την επέκταση νευραξόνων από τους συνδεσμικούς νευρώνες του νωτιαίου μυελού και από αισθητικούς νευρώνες (Klar et al., 1992). Η πρωτεΐνη έχει ανιχνευθεί και στην όρνιθα (Burstyn-Cohen et al., 1999), ενώ *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι εμπλέκεται στην σωστή προβολή των αξόνων των συνδεσμικών νευρώνων στην αντίθετη πλευρά του νευρικού σωλήνα καθώς αυτοί προβάλουν κάτω από το εδαφιαίο πέταλο (Burstyn-Cohen et al., 1999).

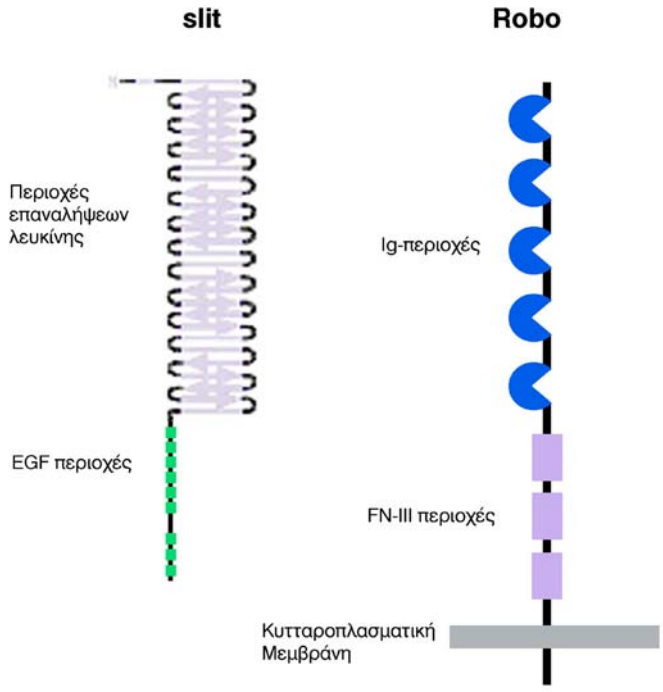
4.2.2.3 Slit-Robo

Μια άλλη οικογένεια χημειοτροπικών παραγόντων με απωθητική δράση αποτελούν οι πρωτεΐνες **slit**. Το πρώτο μέλος αυτής της οικογένειας κλωνοποιήθηκε στη Δροσόφιλα, αλλά ως σήμερα έχουν κλωνοποιηθεί 3 γονίδια και στα θηλαστικά (Brose et al., 1999; Holmes et al., 1998; Li et al., 1999). Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν μεγάλες γλυκο πρωτεΐνες του εξωκυττάριου χώρου με τη δομή που φαίνεται στην εικόνα 19. Συγκεκριμένα, φέρουν 4 επαναλήψεις περιοχών πλούσιες σε λευκίνες και 7-9 επαναλήψεις περιοχών ομόλογες με EGF (Brose and Tessier-Lavigne, 2000; Nguyen-Ba-Charvet and Chedotal, 2002).

Οι υποδοχείς των πρωτεϊνών slit είναι οι πρωτεΐνες **Robo**. Στα θηλαστικά έχουν κλωνοποιηθεί 3 γονίδια που κωδικοποιούν 3 διαφορετικές πρωτεΐνες. Πρόκειται για μόρια που ανήκουν στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών και η

δομή τους φαίνεται στην εικόνα 16. Είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που φέρουν 5 επαναλήψεις ομόλογες των ανοσοσφαιρινικών περιοχών και 3 επαναλήψεις με ομολογία στις φιμπρονεκτινικές τύπου ΙΙΙ περιοχές (Brose and Tessier-Lavigne, 2000; Kidd et al., 1998; Li et al., 1999; Nguyen-Ba-Charvet and Chedotal, 2002).

Οι δράσεις των συγκεκριμένων πρωτεϊνών είναι ποικίλες. Εμπλέκονται τόσο στην καθοδήγηση αναπτυσσόμενων νευραξόνων όσο και στη μετανάστευση κυττάρων. Έχει δειχθεί ότι οι πρωτεΐνες slit, μέσω της αλληλεπίδρασης με τους υποδοχείς robo, απωθούν τους νευράξονες του ιπποκάμπου, του οσφρητικού βολβού και των κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού (Brose et al., 1999; Li et al., 1999). Επιπλέον, στην αλληλεπίδραση slit-robo οφείλεται η απώθηση των μεταναστευόντων κυττάρων της υποκοιλιακής ζώνης του τελεγκεφάλου προς τον οσφρητικό βολβό (Brose and Tessier-Lavigne, 2000). Τέλος έχει βρεθεί ότι το slit επάγει την επέκταση και τη δημιουργία δενδριτών από τους αισθητικούς νευρώνες του νωτιαίου μυελού (Wang et al., 1999).



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση των μορίων slit και Robo.

Πολύ πρόσφατα δείχθηκε ότι τα διάφορα συστήματα μορίων που επηρεάζουν την καθοδήγηση των νευραξόνων ή των κυττάρων κατά την ανάπτυξη

δεν είναι τόσο ανεξάρτητα το ένα από το άλλο, όσο αρχικά πιστευόταν. Συγκεκριμένα αποδείχθηκε ότι το σύστημα των νετρινών/DCC και slit/Robo αλληλεπιδρούν επηρεάζοντας τις έως τότε γνωστές λειτουργίες τους (Stein and Tessier-Lavigne, 2001).

Όπως ήταν ήδη γνωστό οι συνδεσμικοί άξονες του νωτιαίου μυελού, οι οποίοι εκφράζουν το DCC έλκονται από την νετρίνη που εκφράζεται στο εδαφιαίο πέταλο. Από τη στιγμή που ο αναπτυσσόμενος νευράξονας περάσει τη μέση γραμμή παύει να αποκρίνεται στην νετρίνη, παρόλο που διατηρεί την έκφραση του DCC (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Παράλληλα, αρχίζει η έκφραση της πρωτεΐνης robo, ώστε ο αναπτυσσόμενος νευράξονας να απωθείται από το slit που εκφράζεται από το εδαφιαίο πέταλο και να μην ξαναπεράσει τη μέση γραμμή (Kidd et al., 1999; Zou et al., 2000). Όπως αποδείχθηκε, η ενεργοποίηση του υποδοχέα robo από τον προσδέτη του slit οδηγεί σε μια αλληλεπίδραση της ενδοκυττάριας περιοχής του robo, CC1, με την ενδοκυττάρια περιοχή P3 του DCC και αυτή η αλληλεπίδραση είναι που προκαλεί την παύση της ελκτικής δράσης της νετρίνης, όταν οι νευράξονες διασχίσουν τη μέση γραμμή (Stein and Tessier-Lavigne, 2001). Από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται ακόμα πιο σαφές το εύρος των δυνατοτήτων καθοδήγησης που παρέχουν τα έως τώρα γνωστά μόρια.

Είναι επίσης αρκετά σημαντικό να τονιστεί ότι τα περισσότερα από τα μόρια τα οποία αναφέραμε χαρακτηρίστηκαν αρχικά με βάση την ικανότητά τους να επηρεάζουν την επέκταση των αναπτυσσόμενων νευραξόνων. Στη συνέχεια όμως άρχισε να διαφαίνεται ότι τόσο τα μόρια συνάφειας, όσο και οι Eph/ephrins και οι νετρίνες εμπλέκονται και στην καθοδήγηση των μεταναστευόντων κυτταρικών σωμάτων, φανερώνοντας κατά αυτό τον τρόπο την ποικιλία των μηχανισμών που διέπουν την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο γενικότερος σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση των μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών που επηρεάζουν την οριζόντια μετανάστευση στο αναπτυσσόμενο κεντρικό νευρικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα εστιαστήκαμε σε δύο οριζόντια μεταναστευτικά μονοπάτια που λαμβάνουν χώρα στον οπίσθιο ρομβοειδή εγκέφαλο: το οπίσθιο επιφανειακό μεταναστευτικό μονοπάτι (OEMM) και το μεταναστευτικό μονοπάτι της κάτω ελαίας (ΜΜΚΕ) (εικόνα 10). Οι δύο αυτοί κυτταρικοί πληθυσμοί παρόλο που δημιουργούνται στο ίδιο σημείο, την ίδια περίπου χρονική στιγμή εμφανίζουν πολλές διαφορές στη μεταναστευτική τους πορεία και ειδικά στο σημείο της μέσης γραμμής.

Επιγραμματικά οι κύριοι στόχοι που τέθηκαν κατά την έναρξη της μελέτης ήταν οι εξής:

- Η διερεύνηση του ρόλου της πρωτεΐνης TAG-1, η οποία εκφράζεται κατά την διάρκεια της μετανάστευσης των κυττάρων του OEMM από τα ίδια τα μεταναστεύοντα κύτταρα, καθώς ήταν ήδη γνωστό ότι η TAG-1 εμπλέκεται τόσο στην καθοδήγηση των αναπτυσσόμενων νευραξόνων όσο και στην καθοδήγηση μεταναστευόντων κυττάρων άλλων συστημάτων.
- Η ανίχνευση της έκφρασης άλλων μορίων συνάφειας από τα κύτταρα ή από το περιβάλλον όπου συντελείται η μετανάστευση των κυττάρων του OEMM και η πιθανή δράση που ασκούν στα μεταναστεύοντα κύτταρα.
- Η μελέτη των επιδράσεων του μικροπεριβάλλοντος της μετανάστευσης σε σχέση με την εσωτερική μοίρα των κυττάρων του ΜΜΚΕ.
- Η διερεύνηση του ρόλου του εδαφιαίου πετάλου στην καθοδήγηση των κυττάρων του OEMM και του ΜΜΚΕ.
- Η μελέτη του ρόλου της πρωτεΐνης νετρίνης στην μετανάστευση των κυττάρων του OEMM και του ΜΜΚΕ.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικοί μύες των στελεχών CBAxC57Bl/10 και OF1 (Iffa Credo, Lyon, France). Η ημέρα της σύλληψης θεωρήθηκε εμβρυονική ημέρα 0.5 (E0.5). Τα έγκυα ζώα θυσιάστηκαν με μεγάλη δόση αιθέρα ή χλωροφορμίου και τα έμβρυα συλλέχθηκαν σε φωσφορικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline: 400mM Na_2HPO_4, 50mM NaH_2PO_4, 1,5M NaCl). Στη συνέχεια, ακολούθησε μονιμοποίηση του ιστού ή απομόνωση ιστοτεμαχίων για καλλιέργεια (explants).

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης μύες από τη διασταύρωση θηλυκών OF1 με αρσενικά ß-geo ROSA-26, τα οποία εκφράζουν το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης στο νευρικό τους σύστημα ((Friedrich and Soriano, 1991), Jackson Laboratories).

Μύες που εμφανίζουν απώλεια δράσης του γονιδίου TAG-1 (TAG-1 deficient mice): Χρησιμοποιήθηκαν μύες του στελέχους C57Bl/6 μεταλλαγμένοι ώστε να μην εκφράζουν την πρωτεΐνη TAG-1. Στα συγκεκριμένα ζώα έχει αφαιρεθεί η αλληλουχία του γονιδίου της TAG-1 μεταξύ των εξονίων II και V, η οποία κωδικοποιεί την αμινοξική αλληλουχία από το σημείο έναρξης της μεταγραφής ως και την πρώτη Ig- περιοχή (Fukamauchi et al., 2001). Χρησιμοποιώντας αντισώματα ειδικά για τις Ig ή για τις FNIII περιοχές του μορίου της TAG-1 σε πειράματα ανοσοϊστοχημείας, δείχθηκε ότι με αυτού του είδους την αφαίρεση αλληλουχίας δεν παράγεται καθόλου πρωτεΐνη (Fukamauchi et al., 2001). Για τον προσδιορισμό του γονότυπου των διαφόρων εμβρύων ως προς το μεταλλαγμένο και το φυσιολογικό αλλήλιο, έγινε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), σύμφωνα με τις οδηγίες που αναφέρονται από τους (Fukamauchi et al., 2001).

Μύες που εμφανίζουν απώλεια δράσης του γονιδίου L1 (L1 deficient mice): Θηλυκοί ετερόζυγοι μύες διασταυρώθηκαν με αγρίου τύπου C57Bl/10 αρσενικά. Στα έμβρυα που προέκυψαν από αυτές τις διασταυρώσεις έγινε προσδιορισμός του φύλου και του γονότυπου τους ως προς το φυσιολογικό και το μεταλλαγμένο αλλήλιο του L1, χρησιμοποιώντας αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (Dahme et al., 1997). Σε όλα τα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε αρσενικά έμβρυα που έφεραν το μεταλλαγμένο αλλήλιο στο X χρωμόσωμά τους και αγρίου τύπου ζώα.

Μύες που εμφανίζουν απώλεια δράσης του γονιδίου EphA4 (EphA4 deficient mice): Χρησιμοποιήθηκαν μύες που εμφανίζουν απώλεια δράσης του γονιδίου Eph A4, οι οποίοι δημιουργήθηκαν σύμφωνα με τους (Helmbacher et al., 2000). Ο προσδιορισμός του γονότυπου των συγκεκριμένων εμβρύων ή νεογέννητων μυών έγινε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιώντας τους ανιχνευτές που αναφέρουν οι (Helmbacher et al., 2000).

Τέλος χρησιμοποιήθηκαν γονιμοποιημένα αυγά όρνιθας (Gallus gallus domesticus) και ορτυκιού (Cotunix cotunix japonica), τα οποία επωάστηκαν στους 38°C σε υψηλή υγρασία και η ηλικία των εμβρύων προσδιορίστηκε σύμφωνα με τους (Hamburger and Hamilton, 1951).

2. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βακτηριακές καλλιέργειες

Για την καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών E.coli (DH5a και XL-1-blue) χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά υλικά LB (Luria-Bertani) και 2xYT σε υγρή και στερεά μορφή και σε σύσταση όπως περιγράφεται από τη STRATAGENE. Ανάλογα με τον πλασμιδιακό φορέα που χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό των βακτηρίων, έγινε και η προσθήκη των απαιτούμενων αντιβιοτικών, αμπικιλίνη 15μg/ml ή/και τετρακυκλίνη 10μg/ml.

2.2 Μετασχηματισμός (transformation) βακτηριακών κυττάρων

Ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων έγινε με τη μέθοδο LB-PEG. Η μέθοδος αυτή δίνει συχνότητα μετασχηματισμού κυττάρων μεγαλύτερη από 1x10^{7} και περιλαμβάνει σε συντομία τα παρακάτω στάδια:

1. Μεταφέρουμε μιας βακτηριακής αποικίας E.coli από ένα φρέσκο 2xYT-άγαρ τρυβλίο σε υγρή καλλιέργεια μικρού όγκου (2-3 ml) και επωάζουμε 14-16 ώρες στους 37°C.
2. Εμβολιάζουμε 250ml 2xYT με 2.5 ml από την παραπάνω καλλιέργεια και επωάζουμε, ώσπου η οπτική πυκνότητα των κυττάρων στα 600nm να φτάνει έως 0.7.
3. Τοποθετούμε στον πάγο για 10 λεπτά.
4. Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα στους 4°C, στις 5000 rpm για 15 λεπτά και επαναδιαλύουμε σε 2.5 ml κρύο 2xYT.
5. Προσθέτουμε 12.5 ml διάλυμα LB-PEG (36% γλυκερόλη, 12% PEG 8000, 12mM $MgSO_4$ σε LB θρεπτικό) και αναδεύουμε καλά, αλλά όχι απότομα. (Όσα από τα

κύτταρα δεν χρησιμοποιηθούν αμέσως μπορούν να μοιραστούν σε μικρές ποσότητες και να διατηρηθούν στους –80°C).

6. Αναμιγνύουμε 100 μl βακτήρια με 1 μl DNA (περίπου 500ng) και αφήνουμε στον πάγο για 15 λεπτά.

7. Μεταφέρουμε τα βακτήρια στους 42°C για 1 λεπτό και μετά ξανά στον πάγο για 5 λεπτά.

8. Προσθέτουμε 900 μl 2xYT και επωάζουμε στους 37°C για 1 ώρα αναδεύοντας.

9. Απλώνουμε τα βακτήρια σε τρυβλία επιστρωμένα με 2xYT και επωάζουμε στους 37°C για 15 περίπου ώρες.

2.3 Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων

2.3.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα

Για την παρασκευή σε μικρή κλίμακα (mini prep) υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αλκαλικής λύσης (alkaline lysis). Η μέθοδος αυτή αποδίδει υψηλής καθαρότητας και σχετικά μεγάλες ποσότητες πλασμιδιακού DNA (10-15 μg) κατάλληλου για ανάλυση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφεται από τους (Sambrook et al., 1989).

2.3.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αλκαλικής λύσης σε συνδυασμό με διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις διαβάθμισης χλωριούχου κεσίου (CsCl gradient), παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (Sambrook et al., 1989). Επίσης, απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA με το σύστημα plasmid midiprep kit της Biorad, σύμφωνα με τις οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρείας.

2.3.3 Απομόνωση γενομικού DNA από ιστούς

Για την απομόνωση γενομικού DNA από ιστούς (ουρές μυών ή αμνιακοί σάκκοι εμβρύων μυών) ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: Οι ιστοί επωάστηκαν για 14-16 ώρες στους 55°C σε διάλυμα, το οποίο περιείχε τα εξής: 0.1mg/ml πρωτεϊνάση K, 50mM Tris pH8.0, 50mM KCl, 2.5mM EDTA, 0.45% Nonidet P-40 και 0.45% Tween-20. Μετά από φυγοκέντρηση, παίρνουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε ίσο όγκο ισοπροπανόλης και αφήνουμε στον πάγο για 15 λεπτά. Στη συνέχεια με φυγοκέντρηση γίνεται η κατακρήμνιση του DNA και μετά από ένα

πλύσιμο της πελλέτας με 70% EtOH επαναδιαλύουμε στον επιθυμητό όγκο σε 10mM Tris pH8.0.

2.4 Πέψη μορίων DNA με ένζυμα περιορισμού

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από τις εταιρείες Promega, Minotech και New England Biolabs και οι πέψεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρείας και με βάση τα πρωτόκολλα που περιγράφονται από τους (Sambrook et al., 1989).

Στη συνέχεια τα προϊόντα των πέψεων καθαρίστηκαν με τη μέθοδο καθαρισμού με φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη και άλας οξικού νατρίου (Sambrook et al., 1989).

2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Για το προσδιορισμό του γονότυπου των μυών που εμφανίζουν απώλεια δράσης συγκεκριμένων γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες που ακολουθήθηκαν για κάθε αντίδραση περιγράφονται από τους (Dahme et al., 1997) (Fukamauchi et al., 2001)και (Helmbacher et al., 2000) για τους μύες που έχουν απώλεια δράσης των γονιδίων L1, TAG-1 και EphA4αντίστοιχα. Οι εκκινητές για την ανίχνευση των μυών με απώλεια δράσης της TAG-1 δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ηρακλείου Κρήτης. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από την εταιρεία FINZYMES. Οι αντιδράσεις για την ανίχνευση των μυών με απώλεια δράσης του γονιδίου της EphA4 έγιναν στο εργαστήριο του Dr P.Charnay, Ecole Normale Supérieure, Paris και για την ανίχνευση των μυών με απώλεια δράσης του γονιδίου της L1 έγιναν στο εργαστήριο της Dr M. Schachner, Institut fuer Bioynthese Neuraler Strukturen, Hamburg.

3. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Προετοιμασία ιστών

Απομονωμένοι ρομβοειδείς εγκέφαλοι εμβρύων ή ιστοτεμάχια μετά από καλλιέργεια μονιμοποιήθηκαν σε 4% παραφορλμαλδεΰδη στους 4°C για χρονικό διάστημα από 30 λεπτά έως 16 ώρες ανάλογα με το είδος της διεργασίας που ακολουθήθηκε για την κάθε περίπτωση. Ορισμένοι ιστοί, που προορίζονταν για

ανοσοϊστοχημεία για την ανίχνευση της πρωτεΐνης νεστίνης, μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα Clarke (αιθανόλη/οξικό οξύ 3/1) για 3 ώρες. Σε όσους από αυτούς προορίζονταν για πειράματα ανοσοϊστοχημείας, έγινε έγκλιση σε διάλυμα αγαρόζης 4% σε PBS και κόπηκαν σε μικροτόμο δόνησης (vibratome) σε τομές πάχους 100μm. Ορισμένοι ιστοί μετά τη μονιμοποίηση τους επωάστηκαν σε διάλυμα σουκρόζης 30% σε PBS για 14-16 ώρες για κρυοπροστασία, και έγινε έγκλιση σε διάλυμα 15% σουκρόζης/ 7.5% ζελατίνης σε PBS και κόπηκαν σε κρυοτόμο σε τομές πάχους 16μm. Οι τομές συλλέχθηκαν σε ζελατινοποιημένες αντικειμενοφόρες πλάκες, οι οποίες διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

Για τους ιστούς που προορίζονταν για πειράματα in situ υβριδοποίησης έγινε έγκλιση σε διάλυμα 30% αλβουμίνης/0.5% ζελατίνης σε PBS, το οποίο πολυμερίστηκε με την προσθήκη γλουταραλδεΰδης (1% τελική συγκέντρωση). Οι συγκεκριμένοι ιστοί κόπηκαν σε μικροτόμο δόνησης σε τομές πάχους 100-200μm.

3.2 Ιστοχημικές χρώσεις

3.2.1 Χρώση cresyl violet

Τομές κρυοτόμου βάφθηκαν με διάλυμα 1% cresyl violet (Sigma) για 10 λεπτά και ακολούθως αφυδατώθηκαν σε διαλύματα EtOH από 50% έως 100% για 5 λεπτά στο καθένα. Τέλος επωάσθηκαν σε ξυλόλη (3x5 λεπτά) και καλύφθηκαν με Entellan (MERCK).

3.2.2 Χρώση ανίχνευσης β-γαλακτοσιδάσης

Ιστοί από ß-geo ROSA-26 ζώα μονιμοποιήθηκαν για 30 λεπτά σε 4% παραφολμαλδεΰδη και στη συνέχεια επωάστηκαν σε διάλυμα X-gal 4mg/ml (Promega) σε PBS παρουσία 3mM $K_3Fe(CN)_6$, 3mM $K_4Fe(CN)_6$, 2mM $MgCl_2$ και 0.1% TritonX-100 στους 30°C για 14-16 ώρες, ώσπου να εμφανιστεί το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα.

3.2.3 DiI σήμανση και φωτο-οξείδωση (φωτομετατροπή, Photo-oxidation)

Για τη σήμανση των αποφύσεων των ακτινωτών γλοιακών κυττάρων του νευρικού σωλήνα, ένας μικρός κρύσταλλος από 1,1'-dioctodecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine (DiI) τοποθετήθηκε στην κοιλιακή περιοχή (ventricular zone) κοντά στο εδαφιαίο πέταλο σε απομονωμένους ρομβοειδείς εγκεφάλους εμβρύων. Οι ιστοί διατηρήθηκαν στους 4°C σε διάλυμα παραφορμαλδεύδης 4% για 5

ημέρες και κόπηκαν σε μικροτόμο δόνησης σε τομές πάχους 100μm. Στη συνέχεια έγινε φωτο-οξείδωση- φωτομετατροπή του σήματος που προήλθε από το DiI ως εξής: κάθε τομή αφού πλύθηκε σε 0.1M Tris pH8.2 επωάστηκε σε διάλυμα διαμινοβενζιδίνης (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 1.5mg/ml σε 0.1M Tris pH8.2, κάτω από UV φως προερχόμενο απο μικροσκόπιο με προσαρμοσμένη UV λάμπα. Κάθε περίπου 5 λεπτά γινόταν ανανέωση του διαλύματος της DAB, ώσπου σε όλες τις σημασμένες με DiI αποφύσεις να δημιουργηθούν αδιάλυτα προϊόντα της διαμινοβενζιδίνης και να μετατραπεί η φθορίζουσα σήμανση σε καφέ χρώμα (Sandell and Masland, 1988).

3.3 Ανοσοϊστοχημεία

3.3.1 Διαδικασία ανοσοϊστοχημείας

Η ανοσοϊστοχημεία πραγματοποιήθηκε σε ολόκληρους ιστούς (whole mount) ή σε τομές από μικροτόμο δόνησης ή κρυοτόμο ως εξής: Οι ιστοί ή οι τομές πλύθηκαν με PBS και καλύφθηκαν οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης του αντισώματος επωάζοντας 1 ώρα με διάλυμα PBS, 1%BSA, 0.1%Triton-X-100 ή PBS, 1%FCS, 0.1%TritonX-100. Ακολούθως, επωάσθηκαν με διάλυμα του πρωτοταγούς (primary) αντισώματος σε PBS, 0.1%BSA, 0.1%TritonX-100 ή PBS, 0.1%FCS, 0.1%TritonX-100, στους 4°C για 14-16 ώρες. Μετά από 3-4 πλυσίματα με PBT (PBS, 0.1%TritonX-100) επωάσθηκαν με το διάλυμα του δευτεροταγούς αντισώματος για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Όταν το αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με βιοτίνη ακολουθεί επώαση με διάλυμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης συνδεδεμένη με βιοτίνη (Vectastain elite ABC kit, Vector Laboratories) και στη συνέχεια χρωματική αντίδραση με DAB (3,3'-Diaminobenzidine) και H_2O_2 (FAST ^{TM} DAB tablet set, Sigma).

Για την ανίχνευση της ενσωματωμένης 5-βρώμο-2-δεόξυ-ουριδίνης επωάσαμε με 2N HCL για 45 λεπτά, ακολούθησε πλύσιμο με PBS και επωάσαμε για 5 λεπτά με 10-20mg/ml πρωτεϊνάση Κ. Μετά από εκτεταμένο πλύσιμο με PBS ακολούθησε ξανά μονιμοποίηση με 4% παραφορμαλδεύδη/0.2% γλουταραλδεύδη για 20 λεπτά. Στη συνέχεια επωάσαμε με αντίσωμα κατά της 5-βρώμο-2-δεόξυ-ουριδίνης (1/300, Becton Dickinson) σε PGT (PBS, 0.2% ζελατίνη, 1% TritonX-100) στους 4°C 14-16 ώρες και ακολουθείται η υπόλοιπη διαδικασία όπως αναφέρθηκε ανωτέρω. Σε διάλυμα PGT αραιώθηκε και το αντίσωμα QCPN για την ανίχνευση του πυρηνικού επίτοπου του ορτυκιού.

3.3.2 Πρωτοταγή αντισώματα (primary abs)

Τα κύρια αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: μονοκλωνικό αντίσωμα (ΜΑ) ενάντια στην TAG-1 (4D7 (σε μορφή ασκίτη), 1:1000, (Dodd et al., 1988)), ΜΑ ενάντια στην class III β- τουμπουλίνη (Tuj-1 (ασκίτης), 1:1000, (Roskams et al., 1998) προσφορά του Dr A Frankfurter), ΜΑ ενάντια στο PSA-NCAM (5A5 (ασκίτης), 1:1000, (Dodd et al., 1988)), ΜΑ ενάντια στη νεστίνη (Rat 401 (υπερκείμενο), (Lendahl et al., 1990) 1/20, Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB) και ΜΑ έναντια ενός επίτοπου ετεροχρωματίνης του ορτυκίου (QCPN (υπερκέιμενο), 1:50, DSHB (Lance-Jones and Langernaur, 1987)). Πολυκλωνικό αντίσωμα (ΠΑ), σε μορφή ορού, ενάντια στην L1 (ορός, 1:1000, προσφορά του Dr.Rathjen (Rathjen and Schachner, 1984)), ΠΑ από κουνέλι ενάντια στην εκφραζόμενη από βακτήρια πρωτεΐνη F3 (Gennarini et al., 1991), ΠΑ ενάντια στην πρωτεΐνη NrCAM (ορός 1/1000), που δημιουργήθηκε σε κουνέλι σύμφωνα με τους (Davis et al., 1996) και ΠΑ ενάντια στην πρωτεΐνη EphA4 (ορός 1:1000, προσφορά του Dr Charnay (Becker et al., 1995).

3.3.3 Δευτεροταγή αντισώματα (secondary abs)

Τα δευτεροταγή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: anti-mouse IgM συνδεδεμένο με βιοτίνη (1:250, Jackson) ή συνδεδεμένο με FITC (1:100, TAGO), anti-mouse IgG συνδεδεμένο με βιοτίνη (1:250, Jackson) ή συνδεδεμένο με Cy3 (1:1000, Jackson), anti-rabbit συνδεδεμένο με βιοτίνη (1:500, Jackson) ή συνδεδεμένο με Cy3 ή FITC (1:1000, Jackson 1:250, Amersham αντίστοιχα).

3.4 In situ υβριδοποίηση

3.4.1 Διαδικασία in situ υβριδοποίησης

Πειράματα in situ υβριδοποίησης έγιναν σε τομές μικροτόμου δόνησης πάχους 200μm ή σε ολόκληρα ιστοτεμάχια σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο (Bally-Cuif and Wassef, 1994).

Οι ιστοί μονιμοποιήθηκαν σε 4% παραφορμαλδεΰδη για τουλάχιστον 15 ώρες, πλύθηκαν με PBT (PBS, 0.1% Tween-20) και αφυδατώθηκαν περνώντας διαδοχικά από αυξανόμενες συγκεντρώσεις μεθανόλης σε PBT από 25% ως 100%. Στη συνέχεια, ενυδατώθηκαν και πάλι ακολουθώντας την αντίστροφη διαδικασία. Επιδράσαμε με 2% H_2O_2 για 1 ώρα για καταστροφή των ενδογενών υπεροξειδασών.

Μετά από πλύσιμο με PBT επιδράσαμε με πρωτεϊνάση K (10 μg/ml) για χρόνο ανάλογο με το μέγεθος του ιστού. Στη συνέχεια έγινε ξανά μονιμοποίηση με 4% παραφορμαλδεύδη + 0.2% γλουταραλδεΰδη για 20 λεπτά, πλύναμε με PBT και επωάσαμε για 1 ώρα στους 70°C με το διάλυμα προϋβριδοποίσης, το οποίο περιέχει: 50% φορμαμίδιο, 5X SSC, 1% SDS, 50μg/ml yeast RNA, 50μg/ml ηπαρίνη. Στη συνέχεια προσθέτουμε τον ανιχνευτή, ο οποίος ήταν σημασμένος με διοξυγενίνη (Digoxigenin, DIG) σε συγκέντρωση 2μg/ml και επωάζουμε στους 70^{oC,} 14-16 ώρες. Την επόμενη μέρα ακολουθεί πλύσιμο με διάλυμα 50% φορμαμιδίου, 5X SSC και 1% SDS (2x30 λεπτά στους 70°C), επώαση με διάλυμα 100μg/ml RNAse σε 0.5M NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% Tween20 (2x30 λεπτά στους 37°C) για την αποικοδόμηση των τμημάτων RNA που δεν έχουν δεσμευθεί με το mRNA πάνω στον ιστό και πάλι πλύσιμο με διάλυμα φορμαμιδίου 50% και 2X SSC (2x30 λεπτά στους 65°C). Ακολούθως, επωάζουμε για 14-16 ώρες στους 4°C με αντίσωμα anti-DIG συνδεδεμένο με αλκαλική φωσφατάση (Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments, Roche) 1:2000 σε TBST (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 25mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% Tween20) παρουσία 1% FSC, αφού πρώτα έχουμε επωάσει για 90 λεπτά με διάλυμα 10% FCS σε TBST για κάλυψη των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης. Την επόμενη μέρα ακολουθούν εκτεταμένα πλυσίματα με TBST (5x30 λεπτά), εξισορρόπηση του pH με διάλυμα NTMT (100mM NaCl, 100mM Tris-HCl pH9.5, 50mM $MgCl_2$, 0,1% Tween20, 2mM Levamisole) και στη συνέχεια επώαση με το χρωμογόνο διάλυμα 337.7μg/ml NBT (Nitroblue tetrazolium chloride, Roche) + 175μg/ml BciP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate,4-toluidine salt, Roche) σε NTMT στο σκοτάδι, ώσπου να εμφανιστεί η χρώση. Τέλος, οι ιστοί πλύθηκαν σε διάλυμα PBT αρκετές φορές και διατηρήθηκαν σε διάλυμα γλυκερόλης-PBS (80:20) στους 4°C ως την παρατήρησή τους.

Στις περιπτώσεις που έγινε διπλή in situ υβριδοποίηση, ο ένας ανιχνευτής ήταν σημασμένος με διοξυγενίνη και ο δεύτερος με φλουορεσκίνη. Οι ιστοί υπέστησαν την ίδια διεργασία που αναφέρθηκε παραπάνω και επωάστηκαν στους 70°C και με τους δύο ανιχνευτές ταυτόχρονα. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διεργασία όπως περιγράφεται για την ανίχνευση του σημασμένου με διοξυγενίνη ανιχνευτή και μετά την εμφάνιση του μπλε χρώματος, ακολούθησε επώαση των ιστών με αντίσωμα anti-φλουορεσκίνης συνδεδεμένο με αλκαλική φωσφατάση (Anti-fluorescein-AP, Fab fragments, Roche) 1:1000 σε TBST, 1% FCS, στους 4°C. Την επόμενη μέρα, μετά τα πλυσίματα που περιγράφονται παραπάνω, ακολούθησε

επώαση με ταμπλέτες fast red (Fast red tablets, Roche) διαλυμένες σε 0.1mM Tris-HCl pH 8.2 στο σκοτάδι, ως την εμφάνιση του κόκκινου χρώματος.

3.4.2 Ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν

Για την δημιουργία των ανιχνευτών χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια που παραθέτονται στον πίνακα 1. Η αλληλουχία του mBrn3.2 και του mTAG-1, που κλωνοποιήθηκαν στα αντίστοιχα πλασμίδια, προήλθαν από PCR που έγινε σε γενωμικό DNA μυών, βασιζόμενοι στις αντίστοιχες δημοσιευμένες αλληλουχίες (Turner et al., 1994) (Furley et al., 1990).

Η γραμμοποίηση των πλασμιδικών μορίων DNA έγινε με τα περιοριστικά ένζυμα που παραθέτονται στον ίδιο πίνακα, η διαδικασία πέψης που ακολουθήθηκε είναι αυτή που περιγράφεται στην παράγραφο 2.4 και η τελική συγκέντρωση γραμμοποιημένου DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1μg/μl.

Για τη σήμανση των ανιχνευτών έγινε *in vitro* μεταγραφή χρησιμοποιώντας το Riboprobe Gemmini System II Buffers kit (Promega), T3, T7 και SP6 RNA πολυμεράσες (Roche) και UTP σημασμένο με διοξυγενίνη (Digoxigenin-11-UTP, Roche) ή φλουορεσκίνη (Fluorescein-12-UTP, Roche).

Η διαδικασία της *in vitro* μεταγραφής έγινε ως εξής:

1. Σε σωληνάκια eppendorf αναμίχθηκαν τα ακόλουθα υλικά με τη σειρά που αναφέρονται και επωάστηκαν για 3 ώρες στους 37°C:

H_2O χωρίς νουκλεάσες	7μl
5x ρυθμιστικό διάλυμα μεταγραφής	4μl
0.1 M DTT	2μl
10mM rGTP	1μl
10mM rCTP	1μl
10mM rATP	1μl
10 mM rUTP	0.65μl
10mM 11-DIG-UTP (ή 12-Fluo-UTP)	0.35μl
καταστολέας RNAσών	1μl (40 units)
RNA πολυμεράση	1μl (20 units)
1μg/μl γραμμοποιημένο πλασμιδιακό DNA	1μl

2. Σταματάμε την αντίδραση προσθέτοντας 2μl (10u/μl units) RNAση χωρίς DNAσηI (Roche) και επωάζοντας για 15 λεπτά στους 37°C.

3. Γίνεται κατακρίμνηση του RNA προσθέτοντας 100μl TE (10mM Tris pH8.0,

1mM EDTA pH8.0), 10μl 4M LiCl και 300μl 100% EtOH στους -20^{0}C για 30 λεπτά.
4. Φυγοκεντρούμε, ξεπλένουμε το ίζημα (pellet) με 70% EtOH και επαναδιαλύουμε σε ΤΕ σε τελική συγκέντρωση 0.1μg/μl.

Μόριο	**Πλασμιδιακός φορέας**	**Μη νοηματικό RNA (Antisense RNA)**		**Νοηματικό RNA (Sense RNA)**	
		Ένζυμο	**Πολυμεράση**	**Ένζυμο**	**Πολυμεράση**
[1]mouse EphrinB1	pBS SK	XbaI	T7	HindIII	T3
[2]mouse EphrinB3	pBS KS	HindIII	T7	BamHI	T3
[3]mouse EphA4	pBS KS	XhoI	T7	XbaI	T3
[4]quail Brn-3.2	pBS KS	HindIII	T7	XbaI	T3
[5]Axonin (chick TAG-1)	pBS KS	BamHI	T7	XbaI	T3
[6]rat F-spondin	pBS KS	XhoI	T7	DraI	T3
mouse Brn-3.2	pBS KS	XhoI	T7	PstI	T3
[7]rat TAG-1	pBS KS	XbaI	T3	HincII	T7
mouse TAG-1	pBS KS	HindIII	T3	XhoI	T7
[8]rat NrCAM	pBS KS	XhoI	T7	BamHI	T3
[9]mouse F3	pBS KS	HindIII	T7	PstI	T3
[10]rat DCC	pCRII (Invitrogen)	EcoRV	SP6	BamHI	T7
[11]mouse Netrin-1	pBS SK	EcoRI	T3	SacI	T7

Πίνακας 1: Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία ανιχνευτών της in situ υβριδοποίησης.

---

[1] (Bouillet et al., 1995), [2] (Bergemann et al., 1998), (Gale, 1996), [3] (Nieto et al., 1992), [4] (Turner et al., 1994) [5] (Zuellig et al., 1992), [6] (Klar et al., 1992), [7] (Furley et al., 1990), [8] (Davis et al., 1996), [9] (Virgintino et al., 1999), [10] (Keino-Masu et al., 1996), [11] (Serafini et al., 1996)

---

4. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

4.1 Ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα των ευκαρυωτικών σειρών COS1 και COS7, προερχόμενα από νεφρικά κύτταρα πιθήκου μετασχηματισμένα από SV40, κύτταρα CHO προερχόμενα από ωοθήκη κινέζικου hamster και CHO μόνιμα διαμολυσμένα, ώστε να εκφράζουν επιφανειακά την πρωτεΐνη TAG-1 (Buttiglione et al., 1998) ή την ομόλογη στον άνθρωπο TAX-1 (TAX-CHO, (Pavlou et al., 2002)). Όλα τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία petri με θρεπτικό υλικό DMEM (Gibco BRL), 2mM γλουταμίνη (Gibco BRL), 10% ορό εμβρύου μοσχαριού (Fetal Calf Serum FCS, Gibco BRL) και πενικιλλίνη/ στρεπτομυκίνη (P/S 5u/μl και 5μg/μl αντίστοιχα, Gibco BRL) σε CO_2-κλίβανο στους 37^oC και CO_2 5%. Όταν τα κύτταρα κάλυπταν κατά περίπου 70-80% την επιφάνεια του τρυβλίου ξεκινούσαμε τη διαδικασία της διαμόλυνσης με συγκεκριμένα πλασμίδια.

4.2 Μέθοδοι διαμόλυνσης

Οι μέθοδοι διαμόλυνσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

1. Διαμόλυνση με λιποφεκταμίνη (lipofectAMINE, Gibco BRL).
2. Διαμόλυνση με FuGENE (FuGENE^{TM} 6, Roche)
3. Διαμόλυνση με τη μέθοδο της συνκατακρήμνισης νουκλεϊκών οξέων με διάλυμα $CaCl_2$ (Graham and Van der Eb, 1973).

Στις δύο πρώτες περιπτώσεις η διαμόλυνση έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες που έδιναν οι προμηθεύτριες εταιρείες, ενώ στην τρίτη περίπτωση η διαδικασία έγινε ως εξής: Αναμιγνύουμε 10μg πλασμιδικό DNA με 31μl 2M CaCl2 σε διάλυμα με τελικό όγκο 250μl. Στη συνέχεια ρίχνουμε αυτό το διάλυμα σταγόνα-σταγόνα σε 250μl διαλύματος 2xHBS (274mM NaCl, 10mM KCl, 1.5mM Na_2HPO_4, 12mM D-γλυκόζη, 42mM Hepes) και επωάζουμε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως ρίχνουμε αυτή την ποσότητα διαλύματος σταγόνα-σταγόνα και αναδεύοντας στα κύτταρα COS1 ενός 100mm^2 τρυβλίου. Επωάζουμε για 12 ώρες και στη συνέχεια ξεπλένουμε τα κύτταρα με PBS (Gibco, BRL) και προσθέτουμε το ανάλογο θρεπτικό υλικό.

4.3 Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για διαμόλυνση

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση COS7 κύτταρων, ώστε να εκφράζουν παροδικά εκκρινόμενη νετρίνη-1 και νετρίνη-2 ήταν τα pGNET1myc και pGNET2myc (Serafini et al., 1994). Χρησιμοποιήθηκε επίσης το πλασμίδιο pTLmEn2m (Joliot et al., 1998) για την διαμόλυνση COS7 κυττάρων για να εκφράζουν την εκκρινόμενη πρωτεΐνη Engrailed.

Για την παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης TAG-1 χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pIG-TAX–Fc, το οποίο δημιουργήθηκε από την κλωνοποίηση του cDNA της TAX (ομόλογη πρωτείνη της TAG-1 στον άνθρωπο) σε σύντηξη με την Fc περιοχή στον πλασμιδικό φορέα pIG (Simmons, 1993). Χρησιμοποιήθηκε επίσης το πλασμίδιο pIG-MUC18–Fc (Lehmann et al., 1989).

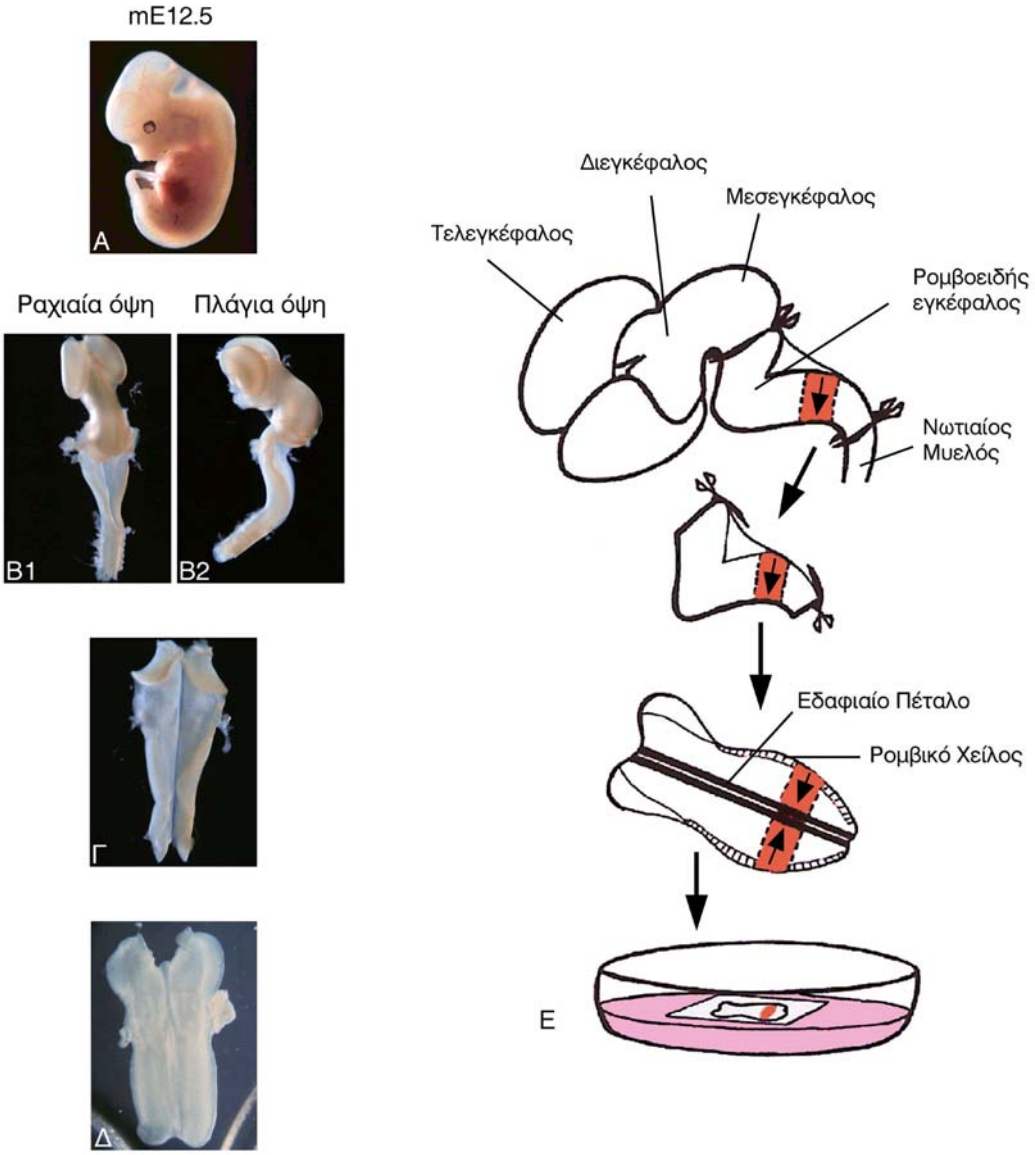
5. ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

5.1 Δημιουργία καλλιεργούμενων ιστοτεμαχίων (explants)

Τμήματα του νευρικού σωλήνα, που περιέχουν τον αναπτυσσόμενο ρομβοειδή εγκέφαλο και την παρεγκεφαλίδα απομονώνονται από έμβρυα μυών E11.5 ή E12.5 ή από έμβρυα όρνιθας και ορτυκίου σταδίου HH22-24, απαλλάσσσονται από τις μήνυγγες μέσα σε διάλυμα PBS, 0.6% γλυκόζης, P/S 5u/μl και 5μg/μl αντίστοιχα ή σε L15 (Gibco, BRL), 0.6% γλυκόζης, P/S 5u/μl και 5μg/μl αντίστοιχα. Στη συνέχεια κόβουμε στη ραχιαία μέση γραμμή, δημιουργώντας τη λεγόμενη «διάταξη ανοικτού βιβλίου» και καλλιεργούμε τον ιστό πάνω σε Biopore μεμβράνες (Millicell CM, Millipore), οι οποίες επιπλέουν σε DMEM/F12 (Gibco), που συμπληρώνεται με 0.6% γλυκόζη, 2mM γλουταμίνη, 0.0075% NαHCO3, 5mM Hepes (Gibco), πενικιλλίνη (5U/ml)/στρεπτομυκίνη (5mg/ml), 10% FCS (fetal calf serum) και 5% NHS (normal horse serum, Gibco, BRL) (εικόνα 17).

Ορισμένα καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια, πριν την έναρξη της καλλιέργειας, επωάστηκαν για 30 λεπτά σε θρεπτικό διάλυμα που περιείχε 10mM 5-βρώμο-2-δεόξυ-ουριδίνης (BrdU) στους 37°C. Στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν κανονικά για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Επιπρόσθετα σε ορισμένες περιπτώσεις έγινε ένεση στην έγκυο μητέρα στην E11.5 με διάλυμα BrdU (2mg/ml σε 0.9% NaCl, 20μg/gr) με σκοπό να σημανθούν οι νευρωνικοί πληθυσμοί που είναι μιτωτικοί στο συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο.

Οι ανατομικές παρεμβάσεις που έγιναν σε ορισμένα καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια (αφαίρεση του ρομβικού χείλους ή του εδαφιαίου πετάλου και η τοποθέτηση τους σε έκτοπη θέση) έγιναν πριν από την έναρξη της καλλιέργειας.



Εικόνα 17: **Διαδικασία απομόνωσης καλλιεργούμενων ιστοτεμαχίων**
Το νευρικό σύστημα εμβρύων ηλικίας Ε12.5 (Α) απελευθερώνεται από τις μήνιγγες (Β1, Β2) και στη συνέχεια απομονώνεται η περιοχή του ρομβοειδούς εγκεφάλου (Γ). Ο ιστός τοποθετείται σε Biopore μεμβράνες (Δ) και καλλιεργείται για ορισμένο χρονικό διάστημα.
Ε: Σχηματική αναπαράσταση της απομόνωσης του καλλιεργούμενου ιστοτεμαχίου.

5.2 Δημιουργία χιμαιρικών ιστοτεμαχίων όρνιθας-ορτυκίου

Σε καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια, που προέρχονται από έμβρυα όρνιθας και ορτυκιού γίνονται πειράματα μεταμοσχεύσεων (Le Douarin and McLaren, 1984). Τμήματα από το ρομβικό χείλος ορτυκίου μεταμοσχεύονται στην ανάλογη θέση του ρομβικού χείλους της όρνιθας (ομότυπες μεταμοσχεύσεις) ή σε διαφορετική θέση από αυτή που προήλθαν (ετερότυπες μεταμοσχεύσεις). Οι μεταμοσχεύσεις αυτές έγιναν στην αρχή της περιόδου καλλιέργειας και περιγράφονται αναλυτικά στις αντίστοιχες παραγράφους των αποτελεσμάτων.

5.3 Σήμανση με DiI

Ένας μικρός κρύσταλλος από 1,1'-dioctodecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine (DiI) τοποθετήθηκε στο ρομβικό χείλος καλλιεργούμενων ιστοτεμαχίων από E12.5 ρομβεγκέφαλο. Το DiI, ως λιπόφιλο μόριο, ενσωματώνεται στη μεμβράνη των νευρικών κυττάρων και βάφει τόσο τα ίδια τα κύτταρα που έρχονται σε επαφή με αυτό όσο και τους άξονες ή τις αποφύσεις τους (leading processes). Ορισμένα από τα ιστοτεμάχια μονιμοποιούνται στην ηλικία E12.5 και άλλα καλλιεργούνται όπως περιγράφεται παραπάνω για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

5.4 Πήκτωμα κολλαγόνου

Τμήματα ρομβικού χείλους καλλιεργούνται σε πήκτωμα κολλαγόνου, το οποίο φτιάχνεται ως εξής: αναμιγνύουμε 90μl κολλαγόνου (rat tail collagen, Roche) (3mg/ml σε διάλυμα οξικού οξέως 0.2%, pH3.0) με 10μl 10x θρεπτικού υλικού, που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια των ιστοτεμαχίων και 2μl $NaCO_3$ 1M. Το συγκεκριμένο διάλυμα όταν εκτίθεται σε θερμοκρασία δωματίου γίνεται πήκτωμα.

Αυτού του είδους τα πηκτώματα επιτρέπουν τη συνκαλλιέργεια τμημάτων ιστού σε συγκεκριμένες αποστάσεις σε ένα τρισδιάστατο περιβάλλον και με αυτόν τον τρόπο επιτρέπουν τη μελέτη των επιδράσεων διαλυτών πρωτεϊνών που εκκρίνονται από μια πηγή έκκρισης και δρουν στον προς μελέτη ιστό (Tessier-Lavigne et al., 1988). Στη συγκεκριμένη μελέτη, τμήματα του ρομβικού χείλους καλλιεργήθηκαν με τμήματα εδαφιαίου πετάλου ή με συσσωματώματα κυττάρων που εκκρίνουν ορισμένες διαλυτές πρωτεΐνες, τα οποία δημιουργήθηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.5.1. Μετά από επώαση του πηκτώματος στους 37°C

παρουσία 5% CO_2 για 24-48 ώρες ελέγχθηκε η ικανότητα προσανατολισμού των αναπτυσσόμενων νευριτών από τις εκάστοτε πηγές εκκρινόμενων πρωτεϊνών.

5.5 Πηγές εκκρινόμενων πρωτεϊνών

5.5.1 Παρασκευή συσσωματωμάτων κυττάρων COS, που εκκρίνουν διαλυτές πρωτεΐνες

Περίπου 8 ώρες μετά την διαμόλυνση COS7 κυττάρων με τη μέθοδο της λιποφεκταμίνης ή με FuGENE, ώστε να εκφράζουν νετρίνη-1, νετρίνη-2 ή En-2, αποκολλούμε τα κύτταρα από τα τρυβλία με τρυψίνη (Gibco, BRL) και τα επαναδιαλύουμε σε συγκέντρωση 2.5-3x10^5 κύτταρα/20μl. Στη συνέχεια τοποθετούμε τα κύτταρα αυτά διαλυτοποιημένα σε σταγόνες των 20μl στο καπάκι τρυβλίων, τα οποία κλείνουμε κανονικά και επωάζουμε σε κλίβανο κυτταροκαλλιεργειών (37°C και 5%CO2) για 15-20 ώρες. Κατά αυτό τον τρόπο δημιουργούνται μικρές κρεμόμενες σταγόνες θρεπτικού με κύτταρα, τα οποία δημιουργούν συσσωματώματα (Kennedy et al., 1994). Αυτά τα συσσωματώματα τα συλλέγουμε με βελόνες ή λαβίδες σε ζεστό θρεπτικό L15, ώσπου να τοποθετηθούν στο συγκεκριμένο σημείο του εκτοπλάσματος ή του πηκτώματος κολλαγόνου.

5.5.2 Αγαρόζη χαμηλού σημείου πήξεως ως πηγή εκκρινόμενων πρωτεϊνών

Αγαρόζη χαμηλού σημείου πήξεως συγκέντρωσης 4% σε διάλυμα DMEM/F12 αναμιγνύεται με καθαρισμένη νετρίνη-1 από όρνιθα σε τελική συγκέντρωση 10μg/ml. Αφού κρυώσει το μίγμα κόβονται μικρά τμήματα, τα οποία και τοποθετούνται πάνω στα καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια, ώστε να εκκρίνουν τη νετρίνη στις συγκεκριμένες περιοχές (Yee et al., 1999). Σε ορισμένες περιπτώσεις γεμίζουμε με αυτήν την αγαρόζη ρύγχοι προσρόφησης (λεπτά white tips), αφήνουμε να κρυώσει και στη συνέχεια κόβουμε μικρότερα τμήματα, τα οποία τοποθετούμε σε πηκτώματα κολλαγόνου, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.4). Χρησιμοποιήθηκε επίσης αλβουμίνη ορού βοδινού (Bovine Serum Albumin, BSA, Sigma) ως πρωτεΐνη μάρτυρας (control) με τον ίδιο τρόπο και στην ίδια συγκέντρωση με τη νετρίνη.

5.5.3 Σφαιρίδια affigel

Σφαιρίδια affigel πλένονται σε PBS και επωάζονται 14-16 ώρες με διάλυμα νετρίνης-1 (5μg/ml σε DMEM/F12). Στη συνέχεια τοποθετούνται σε συγκεκριμένες

περιοχές των καλλιεργούμενων ιστοτεμαχίων, ώστε να απελευθερώσουν την προσροφούμενη νετρίνη (Storm and Kingsley, 1999).

5.5.4. Διαλυτή νετρίνη στο θρεπτικό υλικό

Σε ορισμένες περιπτώσεις στο θρεπτικό υλικό, που καλλιεργήθηκαν τα ιστοτεμάχια προστέθηκε διαλυτή νετρίνη-1 από όρνιθα σε συγκέντρωση 500ng/ml (gift of Dr Tessier Lavigne) (Alcantara et al., 2000).

5.6 Πειράματα αναστολής δράσης πρωτεϊνών

Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας ιστοτεμαχίων σε *in vitro* συνθήκες χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι τρόποι για να επιτευχθεί αναστολή της δράσης ορισμένων πρωτεϊνών όπως η TAG-1, η L1 και η PSA-NCAM. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

5.6.1 Αναστολή της δράσης πρωτεϊνών με ενζυματικό τρόπο

Η πρωτεΐνη TAG-1 είναι συνδεδεμένη στην επιφάνεια των κυττάρων με δεσμό γλυκόσυλο-φωσφατιδύλο-ινοσιτόλης (Glycosil-Phosphatidyl-Inositol GPI) δεσμό (Furley et al., 1990). Το ένζυμο φωσφατιδύλο-ινοσιτόλη-φωσφολιπάση C (phosphatidylinositol-specific phospholipase C, PI-PLC) μπορεί να αποκόψει τον GPI δεσμό και έτσι να αφαιρέσει την πρωτείνη TAG-1, καθώς και άλλες πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες με GPI δεσμό, από την επιφάνεια των κυττάρων (Furley et al., 1990; Masuda et al., 2000).

Τα ιστοτεμάχια μετά την απομόνωσή τους επωάζονται σε θρεπτικό υλικό παρουσία φωσφολιπάσης C (100mU/ml, GLYCO) για 30 λεπτά και στη συνέχεια τοποθετούνται στις Biopore μεμβράνες και ξεκινά η καλλιέργεια σε θρεπτικό που περιέχει φωσφολιπάση C στην ίδια συγκέντρωση. Το θρεπτικό με το ένζυμο αντικαθίσταται κάθε 12 ώρες και η καλλιέργεια διαρκεί 3 μέρες. Στη συνέχεια, για να διαπιστωθεί εάν η φωσφολιπάση C απέκοψε την TAG-1 από την επιφάνεια των κυττάρων, έγιναν πειράματα ανοσοϊστοχημείας όπου δεν μπόρεσε να ανιχνευτεί καθόλου πρωτείνη TAG-1 σε ιστοτεμάχια που είχαν καλλιεργηθεί παρουσία του ενζύμου, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά ιστοτεμάχια, που επωάστηκαν απουσία ενζύμου.

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο EndoN για την αποκοπή του πολυσιαλικού οξέως από την πρωτεΐνη PSA-NCAM σε ποσότητα 1μl/ml σύμφωνα με

τις οδηγίες των (Hu et al., 1996). Τα ιστοτεμάχια επωάστηκαν σε θρεπτικό υλικό παρουσία του συγκεκριμένου ενζύμου για 3 μέρες και στη συνέχεια ελέχθηκε η πλήρης αποκοπή του πολυσιαλικού οξέως, κάνοντας ανοσοϊστοχημεία με το μονοκλωνικό αντίσωμα 5A5, το οποίο αναγνωρίζει έναν επίτοπο του πολυσιαλικού οξέως της πρωτεΐνης NCAM (Dodd et al., 1988).

5.6.2 Αναστολή της δράσης πρωτεϊνών με τη χρήση αντισωμάτων

Στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας των ιστοτεμαχίων προστέθηκαν πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της TAG-1 με σκοπό την αναστολή της δράσης της. Τα πολυκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα 2m, 4m, TG1, TG2, τα οποία δημιουργήθηκαν έναντι καθαρής πρωτείνης TAG-1, που απομονώθηκε από εμβρυονικούς εγκεφάλους (2m, 4m (Dodd et al., 1988)) ή έναντι πρωτεΐνης που παρήχθηκε από baculovirus (TG1, TG2, gift of Dr T.M.Jessell). Χρησιμοποιήθηκε επίσης και το μονοκλωνικό αντίσωμα 4D7 (mouse IgM, (Yamamoto et al., 1986)). Η συγκέντρωση όλων των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 200-400 μg/ml και προστέθηκαν στο σύνηθες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας των ιστοτεμαχίων (Denaxa et al., 2001).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, προκειμένου να ελεγχθεί εάν οι τυχόν αλλοιώσεις που προκαλούνται στα καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια οφείλονται μόνο στην αναστολή της δράσης της TAG-1 μέσω των αντισωμάτων που προστέθηκαν στο θρεπτικό υλικό, εφαρμόστηκε η μέθοδος της αντιγονο-απομάκρυνση του αντισώματος από το διάλυμα του θρεπτικού υλικού (antigen-depletion) (Zheng et al., 1996). Κύτταρα CHO μόνιμα διαμολυσμένα ώστε να εκφράζουν την πρωτείνη TAG-1 στην επιφάνεια τους (CHO-TAG-1 κύτταρα), αναπτύσσονται ώσπου να καλύψουν περίπου το 80-90% του τρυβλίου στο οποίο καλλιεργούνται. Το θρεπτικό υλικό με τα αντισώματα έναντι της TAG-1, με το οποίο επρόκειτο να καλλιεργηθούν τα ιστοτεμάχια, επωάστηκε διαδοχικά με 12 τρυβλία με CHO-TAG-1 κύτταρα για 30 λεπτά σε καθένα από αυτά. Με αυτό τον τρόπο το αντίσωμα που βρίσκεται στο θρεπτικό υλικό δεσμεύεται από τα μόρια της TAG-1 στην επιφάνεια των κυττάρων CHO. Μετά από το κάθε πέρασμα από τα τρυβλία όλο και περισσότερο αντίσωμα αφαιρείται από το θρεπτικό υλικό, αφού προσδένεται στα κύτταρα που είναι επιστρωμένα στο τρυβλίο. Μετά το 12ο τρυβλίο μια μικρή ποσότητα από το θρεπτικό ελέγχθηκε με ανοσοϊστοχημεία και διαπιστώθηκε ότι δεν περιείχε πια αντίσωμα έναντι της TAG-1 σε ικανή ποσότητα ώστε να δεσμευθεί με την TAG-1 πάνω σε τομές από ρομβοειδή

εγκέφαλο. Το συγκεκριμένο θρεπτικό προσθέθηκε στα καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια και εξετάστηκε εάν προκαλεί τις ίδιες αλλοιώσεις στη μετανάστευση των προς μελέτη κυττάρων όπως και θρεπτικό με αντίσωμα έναντι της TAG-1, το οποίο έχει επωαστεί με κύτταρα CHO, που δεν εκφράζουν TAG-1, ως πείραμα ελέγχου.

Χρησιμοποιθήκαν επίσης Fab τμήματα αντισωμάτων έναντι της TAG-1 σε συγκέντρωση 200-400μg/ml, τα οποία παρασκευάστηκαν από το πολυκλωνικό αντίσωμα TG2 σύμφωνα με τις οδηγίες του ImmunoPure Fab preparation kit (Pierce).

Ως τυφλό πείραμα (control) χρησιμοποιήσαμε αντισώματα έναντι πρωτεϊνών, οι οποίες δεν εμπλέκονται στο προς μελέτη σύστημα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα έναντι του μεταγραφικού παράγοντα HNF4 (προσφορά του Dr I. Ταλιανίδη), Fab τμήματα αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης ret (long isoform της πρωτεΐνης μετά από ανοσοποίηση κουνελιών) και μονοκλωνικό αντίσωμα IgM έναντι της ακτίνης (Amersham). Όλα τα control αντισώματα προστέθηκαν σε θρεπτικό υλικό σε ίδια συγκέντρωση με τα αντισώματα έναντι της TAG-1.

Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν Fab τμήματα αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης L1 (προσφορά της Dr M. Schachner), με σκοπό την αναστολή δράσης της στα καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 200μg/ml σύμφωνα με τους (Rathjen and Schachner, 1984).

5.6.3 Αναστολή της δράσης πρωτεϊνών με τη χρήση διαλυτών πρωτεϊνών

Ως ένας παραπάνω τρόπος αναστολής της TAG-1 χρησιμοποιήθηκε διαλυτή πρωτεΐνη TAG-1 σε συγκέντρωση 200 μg/ml (Buttiglione et al., 1998). Η διαλυτή TAG-1 πρωτεΐνη στο θρεπτικό υλικό συνδέεται τόσο με ομοφιλικό τρόπο με μόρια της TAG-1 πάνω στον ιστό, όσο και με ετεροφιλικό τρόπο με τους πιθανούς υποδοχείς της TAG-1 στο συγκεκριμένο ιστό. Ως control συνθήκη χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό με την προσθήκη ίδιας συγκέντρωσης διαλυτής πρωτεΐνη MUC18, η οποία ανήκει και αυτή στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών (Lehmann et al., 1989).

5.6.3.1 Παραγωγή διαλυτών πρωτεϊνών

Κύτταρα COS1 διαμολύνθηκαν με τη μέθοδο της συνκατακρήμνισης νουκλεϊκών οξέων με διάλυμα $CaCl_2$, ώστε να εκφράζουν παροδικά την πρωτεΐνη TAG-1 ή MUC18 σε εκκρινόμενη μορφή. Μετά τη διαδικασία της διαμόλυνσης στα

κύτταρα προστίθεται OPTIMEM (Gibco, BRL) χωρίς ορρό και αφήνονται χωρίς να αλλαχθεί το θρεπτικό για 2-3 μέρες. Στη συνέχεια συλλέγεται το θρεπτικό υλικό και συμπυκνώνεται με φίλτρα φυγοκέντρησης CentriconYM100, ως τελικό όγκο περίπου 100μl. Το 1/20 αυτής της ποσότητας χρησιμοποιείται για ποσοτικοποίηση με SDS-ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση (Western blots) και το υπόλοιπο προστίθεται στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας ιστοτεμαχίων.

5.6.3.2 SDS-ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση των διαλυτών πρωτεϊνών που παρήχθησαν μετά από τη διαμόλυνση COS1 έγινε σε σύστημα ασυνεχούς ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) σύμφωνα με τον (Laemmli, 1970). Στο κάθε δείγμα προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος, το οποίο περιείχε 62.5mM Tris-HCl pH 6.8, 2.3% SDS, 10% γλυκερόλη, 0.05% κυανό της βρωμοφαινόλη και 100mM DTT. Τα δείγματα έβρασαν στους 95-100°C για 3-5 λεπτά και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στα πηγαδάκια του πηκτώματος ακρυλαμίδης 7.5%.

Το πήκτωμα ακρυλαμίδης 7.5% αποτελείται από το stacking και το διαχωριστικό (separating) πήκτωμα, τα οποία παρασκευάζονται ως εξής:

<u>Stacking πήκτωμα (10ml)</u>

Ρυθμιστικό διάλυμα	2.5 ml
(0.5M Tris-base, 0.4% SDS με τελικό pH 6.8)	
διάλυμα ακρυλαμίδης	1.5 ml
(30% ακρυλαμίδης και 0.8% N,N μεθυλενο-δις- ακρυλαμίδης, Merck)	
υπερθεϊκό αμμώνιο 0.1%	100 μl
(APS, ammonium persulfate Merck),	
N, N, N, N-τετραμεθυλ-διαμίδιο 0.1%	10 μl
(TEMED, N, N, N, N-tetramethyle diamide Merck)	
H_20	6 ml

<u>Πήκτωμα διαχωρισμού (10ml)</u>

Ρυθμιστικό διάλυμα	2.5ml
(1.5M Tris-base, 0.4% SDS με τελικό pH 8.8)	
διάλυμα ακρυλαμίδης	2.5 ml

υπερθεϊκό αμμώνιο 0.1%	100 μl
N, N, N, N-τετραμεθυλ-διαμίδιο 0.1%	5 μl
H_20	5 ml

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Biorad με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 25mM Tris-base, 192mM γλυκίνη και 0.1% SDS σε θερμοκρασία δωματίου και με ένταση ρεύματος 40-45 mA για περίπου 1 ώρα. Ορισμένα πηκτώματα βάφονται με διάλυμα Coomasie Brilliant Blue 0.156% (σε διάλυμα 25% μεθανόλης και 12% οξικού οξέως σε H_2O) για 30 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησε αποχρωματισμός περνώντας από διαδοχικά διαλύματα 50% μεθανόλης με 10% οξικού οξέως, ώσπου να διακρίνονται καθαρά οι ζώνες που αντιστοιχούν στις διάφορες πρωτεΐνες.

5.6.3.3 Ανοσοαποτύπωση (Western blots)

Ορισμένα από τις πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν κατά την SDS ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου μεταφέρθηκαν με αποτύπωση σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (PROTRAN, Schleicher & Scuell) με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος εντάσεως 350mA για 1-2 ώρες. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάστηκε 14-16 ώρες στους 4^oC με ρυθμιστικό διάλυμα (20mM Tris-HCl pH7.4, 155mM NaCl, 0.1% Tween20) παρουσία 0.1% ζελατίνης (Fluka) για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης του αντισώματος. Στη συνέχεια προστίθεται το κατάλληλο πρωτοταγές αντίσωμα στο παραπάνω διάλυμα παρουσία 1% ζελατίνης (Teleostean gelatin, Sigma) και η μεμβράνη επωάστηκε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πρωτοταγή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της TAG-1 (TG-1 και TG-3 1:7000) και έναντι της ανθρώπινης Fc περιοχής (anti-human Fc 1:15000, Jackson).

Ακολούθως, για την ανίχνευση των πρωτοταγών αντισωμάτων οι μεμβράνες επωάστηκαν με δευτεροταγή αντισώματα συνδεδεμένα με υπεροξειδάση για τουλάχιστον 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα anti-rabbit-HRP (1:5000, Amersham) για την ανίχνευση των TG1-3 και anti-human Fc.

Τέλος, το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισωμάτων ανιχνεύεται με την προσθήκη ECL (Western blotting detection reagents, Amersham Pharmacia Biotech) και την αποτύπωση σε φιλμ Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Σε καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια από ζώα που εμφανίζουν απώλεια δράσης του γονιδίου της TAG-1 και από φυσιολογικά ζώα σημάνθηκαν τα κύτταρα του οπίσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού με BrdU ανοσοφθορισμό. Στη συνέχεια μετρήσαμε τα σημασμένα κύτταρα ως πυκνότητα των εικονοστοιχείων (pixel density) που φθορίζουν σε σχέση με την συνολική επιφάνεια του ιστού, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα NIH Image. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικά χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ANOVA.

7. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

Τα φθορίζοντα δείγματα παρατηρήθηκαν και αναλύθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS-NT Laser Scanning. Οι τομές μικροτόμου δόνησης παρατηρήθηκαν σε στερεοσκόπιο Leica MZ12 και φωτογραφήθηκαν σε κάμερα LEICA MPS60. Όλα τα άλλα δείγματα αναλύθηκαν σε μικροσκόπιο Zeiss Axioskop και φωτογραφήθηκαν χρησιμοποιώντας φιλμ Fujichrome Sensia I 100ASA film.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

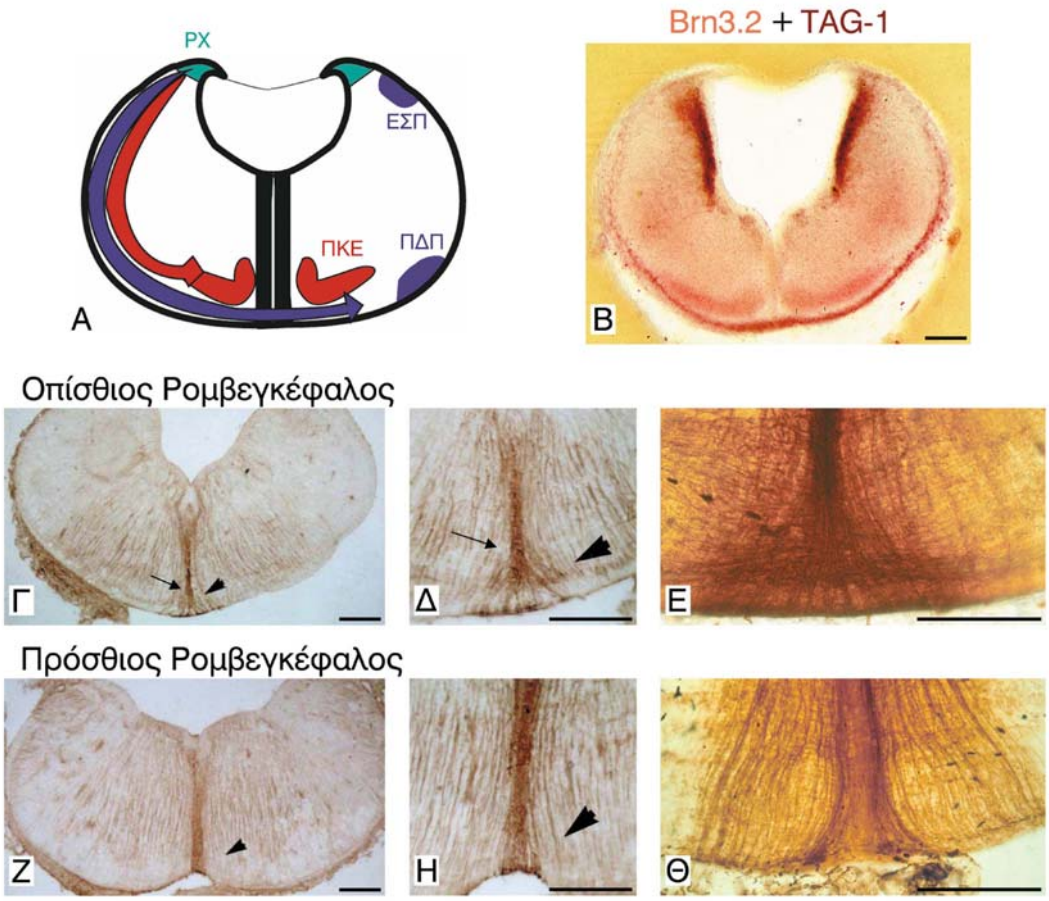
1. ΟΡΙΖΟΝΤΙΑ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΩΝ ΑΚΤΙΝΩΤΩΝ ΓΛΟΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟΝ ΟΠΙΣΘΙΟ ΡΟΜΒΟΕΙΔΗ ΕΓΚΕΦΑΛΟ

Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης στον οπίσθιο ρομβοειδή εγκέφαλο (οπίσθιο προπαρεγκεφαλιδικό σύστημα) παρατηρούνται δύο οριζόντια μεταναστευτικά μονοπάτια, τα οποία και μελετούμε στη συγκεκριμένη εργασία. Τα κύτταρα των δύο αυτών μονοπατιών εκφράζουν διαφορετικά μόρια δείκτες (markers) κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους και έτσι είναι δυνατή η παρακολούθηση του καθενός από αυτά ξεχωριστά.

Τα κύτταρα που αποτελούν το οπίσθιο επιφανειακό μεταναστευτικό μονοπάτι (ΟΕΜΜ) ξεκινούν από το ρομβικό χείλος, μεταναστεύουν κοιλιακά, περνούν το εδαφιαίο πέταλο και δημιουργούν τον πλάγιο δικτυωτό (ΠΔΠ) και έξω σφηνοειδή πυρήνα (ΕΣΠ) στην αντίθετη πλευρά από αυτήν που ξεκίνησαν (μπλε μονοπάτι στην εικόνα 10 και 18Α). Τα κύτταρα αυτά κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους εκφράζουν το μόριο συνάφειας TAG-1, όπως ήταν γνωστό και από παλαιότερες μελέτες (Wolfer et al., 1994). Τα κύτταρα του μεταναστευτικού μονοπατιού της κάτω ελαίας (ΜΜΚΕ) προέρχονται και αυτά από το ρομβικό χείλος, μεταναστεύουν κοιλιακά και δημιουργούν τους πυρήνες της κάτω ελαίας εκατέρωθεν του εδαφιαίου πετάλου, όπως φαίνεται στο κόκκινο μονοπάτι της εικόνας 10 και 18Α.

Με διπλή in situ υβριδοποίηση σε εγκάρσιες τομές ρομβοειδούς εγκεφάλου εμβρύων μυών στην ηλικία Ε13.5 φαίνεται ότι τα δύο μεταναστευτικά μονοπάτια είναι πλήρως διαχωρισμένα. Τα κύτταρα του ΟΕΜΜ εκφράζουν την πρωτεΐνη TAG-1 κατά τη διάρκεια της μετανάστευσή τους (μωβ χρώση αλκαλικής φωσφατάσης στην εικόνα 18Β), ενώ τα κύτταρα του ΜΜΚΕ εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα Brn-3.2, μια πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων που φέρουν την περιοχή POU (κόκκινη χρώση της φλουορεσκίνης στην εικόνα 18Β).

Είναι ενδιαφέρον ότι τα κύτταρα που ακολουθούν τα δύο αυτά μεταναστευτικά μονοπάτια, παρόλο που δημιουργούνται στην ίδια περιοχή και περίπου στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο, εμφανίζουν μια εντελώς διαφορετική συμπεριφορά όταν φτάνουν στην περιοχή του εδαφιαίου πετάλου. Τα κύτταρα του



Εικόνα 18: **Οριζόντια μεταναστευτικά μονοπάτια και οργάνωση των ακτινωτών γλοιακών κυττάρων στον οπίσθιο ρομβοειδής εγκέφαλο**

Α: Σχηματική απεικόνιση των οριζόντιων μεταναστευτικών μονοπατιών στον οπίσθιο ρομβοειδή εγκέφαλο. Τα κύτταρα και των δύο μονοπατιών ξεκινούν από το ρομβικό χείλος (σημασμένο με το πράσινο χρώμα). Το οπίσθιο επιφανειακό μεταναστευτικό μονοπάτι (ΟΕΜΜ) παριστάνεται με το μπλε χρώμα και τα κύτταρα του δημιουργούν τον πλάγιο δικτυωτό (ΠΔΠ) και έξω σφηνοειδή πυρήνα (ΕΣΠ). Τα κύτταρα του μεταναστευτικού μονοπατιού της κάτω ελαίας (ΜΜΚΕ), που διακρίνεται με το κόκκινο χρώμα, δημιουργούν τον πυρήνα της κάτω ελαίας (ΠΚΕ).

Β: Διπλή in situ υβριδοποίηση σε εγκάρσια τομή ρομβοειδούς εγκεφάλου εμβρύου μυός ηλικίας Ε13.5 στο ύψος του 8ου ρομβομερούς. Με μωβ χρώση εντοπίζεται το mRNA της TAG-1, που εκφράζεται από τα κύτταρα του ΟΕΜΜ, ενώ με κόκκινη το mRNA του mBrn-3.2, το οποίο εκφράζεται από τα κύτταρα του ΜΜΚΕ.

Γ-Δ: Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της πρωτεΐνης νεστίνης σε τομές οπίσθιου ρομβοειδούς εγκεφάλου μυών σε ηλικία Ε13.5. Οι κεφαλές βελών δείχνουν την διάταξη των αποφύσεων των ακτινωτών γλοιακών κυττάρων στην περιοχή του εδαφιαίου πετάλου, από όπου διέρχονται τα κύτταρα του ΟΕΜΜ. Τα βέλη δείχνουν τη διάταξη των αποφύσεων των ακτινωτών γλοιακών κυττάρων στην περιοχή που συσσωρεύονται τα κύτταρα του ΜΜΚΕ.

Ε: Εγκάρσια τομή οπίσθιου ρομβοειδούς εγκεφάλου μετά από σήμανση των αποφύσεων των ακτινωτών γλοιακών κυττάρων με DiI και φωτομετατροπή. Διακρίνεται η χαρακτηριστική δομή «γέφυρας» που δημιουργούν οι συγκεκριμένες αποφύσεις, για να διέρχονται τα κύτταρα του ΟΕΜΜ κάτω από το εδαφιαίο πέταλο.

Z-H: Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της πρωτεΐνης νεστίνης σε τομές πρόσθιου ρομβοειδούς εγκεφάλου μυών σε ηλικία E13.5. Οι κεφαλές βελών δείχνουν την διάταξη των αποφύσεων των ακτινωτών γλοιακών κυττάρων στην περιοχή του εδαφιαίου πετάλου, σε σημείο που δεν υπάρχει το ΟΕΜΜ.
Θ: Εγκάρσια τομή πρόσθιου ρομβοειδούς εγκεφάλου μετά από σήμανση των αποφύσεων των ακτινωτών γλοιακών κυττάρων με DiI και φωτομετατροπή.
ΡΧ: ρομβικό χείλος, ΠΚΕ: πυρήνας κάτω ελαίας, ΠΔΠ: πλάγιος δικτυωτός πυρήνας, ΕΣΠ: έξω σφηνοειδής πυρήνας. Κλίμακα: 200μm.

ΜΜΚΕ φτάνοντας στην κοιλιακή (ventral) περιοχή του αναπτυσσόμενου νευρικού σωλήνα συσσωρεύονται εκατέρωθεν του εδαφιαίου πετάλου και δημιουργούν τους πυρήνες της κάτω ελαίας. Αντίθετα, τα κύτταρα του ΟΕΜΜ φτάνοντας στην περιοχή του εδαφιαίου πετάλου περνούν κάτω από αυτό και συνεχίζουν τη μετανάστευσή τους, ώσπου να δημιουργήσουν τον πλάγιο δικτυωτό και τον έξω σφηνοειδή πυρήνα στην αντίθετη πλευρά του νευρικού σωλήνα από αυτήν που δημιουργήθηκαν.

Στην προσπάθειά μας να μελετήσουμε αρχικά την οργάνωση ακτινωτών αποφύσεων των γλοιακών κυττάρων στη συγκεκριμένη περιοχή χρησιμοποιήσαμε αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης νεστίνης, η οποία ανιχνεύεται στα γλοιακά κύτταρα. Με ανοσοϊστοχημεία σε εγκάρσιες τομές ρομβοειδούς εγκεφάλου, παρατηρήσαμε ότι οι αποφύσεις των γλοιακών κυττάρων στην περιοχή που συντελούνται οι προς μελέτη μεταναστεύσεις (οπίσθιος ρομβοειδής εγκέφαλος) και συγκεκριμένα στο εδαφιαίο πέταλο δημιουργούν μια δομή που μοιάζει με γέφυρα, κάτω από την οποία περνούν τα κύτταρα του ΟΕΜΜ (κεφαλή βέλους στην εικόνα 18Γ,Δ). Αντίθετα, στον εδαφιαίο πέταλο του πρόσθιου ρομβοειδούς εγκέφαλου δεν σχηματίζεται αυτή η δομή και οι γλοιακές αποφύσεις βρίσκονται σε πολύ στενή επαφή μεταξύ τους φτάνοντας ως την εξωτερική (pial) επιφάνεια του νευρικού σωλήνα (κεφαλή βέλους στην εικόνα 18Z,Η). Στα ίδια αποτελέσματα οδηγηθήκαμε, όταν σημάναμε τις γλοιακές αποφύσεις με τη λιπόφιλη χρωστική DiI και κάνοντας στη συνέχεια φωτομετατροπή με διαμινοβενζιδίνη (DAB) (εικόνα 18Ε και 18Θ). Αντίθετα, κοντά στη μέση γραμμή και στο σημείο που συντελείται η μετανάστευση των κυττάρων της ελαίας οι αποφύσεις των γλοιακών κυττάρων είναι στενά διατεταγμένες και δεν επιτρέπουν τη διέλευση των μεταναστευόντων κυττάρων στην αντίθετη πλευρά (βέλος στην εικόνα 18Γ και 18Δ).

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι στο επίπεδο που συντελούνται οι συγκεκριμένες μεταναστεύσεις οι αποφύσεις των γλοιακών κυττάρων είναι

διατεταγμένες κατά τρόπο ώστε να επιτρέπουν τη διέλευση των κυττάρων του ΟΕΜΜ κάτω από το εδαφιαίο πέταλο και τη συνέχιση της μετανάστευσή τους στην αντίθετη πλευρά από αυτήν που ξεκίνησαν, αλλά όχι και τη διέλευση των κυττάρων του ΜΜΕ, τα οποία και σταματούν τη μετανάστευσή τους πριν περάσουν τη μέση γραμμή.

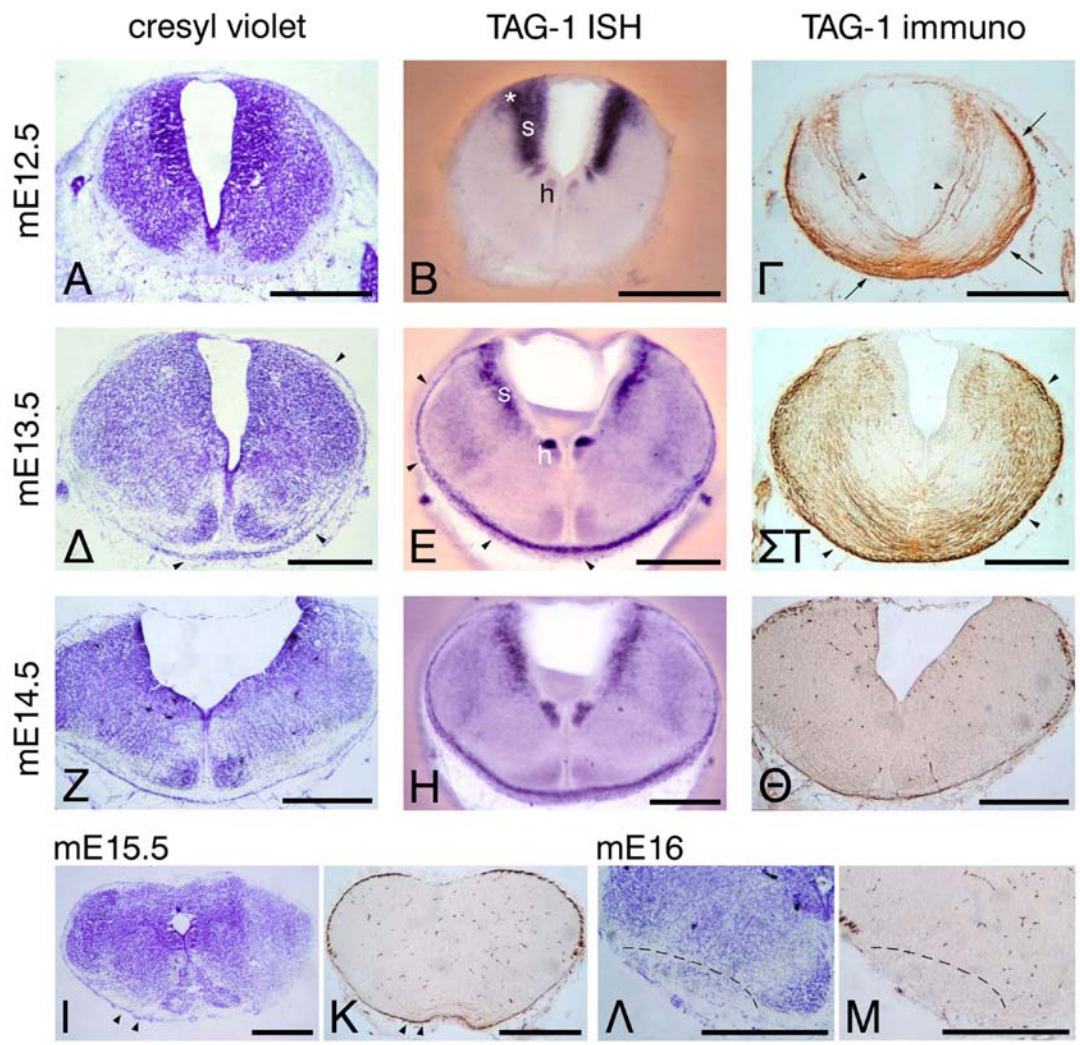
2. ΟΠΙΣΘΙΟ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΟ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ (ΟΕΜΜ)

2.1 Έκφραση της TAG-1 *από τα κύτταρα του ΟΕΜΜ in vivo*

Προκειμένου να μελετήσουμε το ΟΕΜΜ κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης χρησιμοποιήσαμε ως μάρτυρα το μόριο συνάφειας TAG-1. Κάναμε πειράματα in situ υβριδοποίησης και ανοσοϊστοχημείας, για να ανιχνεύσουμε *in vivo* το mRNA και την πρωτεΐνη αντίστοιχα σε εγκάρσιες τομές οπίσθιου ρομβοειδούς εγκεφάλου εμβρύων σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια.

Στην εμβρυϊκή ηλικία E12.5, με χρώση cresyl violet, η οποία σημαίνει τα κυτταρικά σώματα των νευρικών κυττάρων (εικόνα 19Α), φαίνεται ότι τα κύτταρα του ΟΕΜΜ δεν έχουν αρχίσει ακόμα τη μετανάστευσή τους αν και έχουν δημιουργηθεί στο ρομβικό χείλος, όπως φαίνεται από την έκφραση του mRNA της TAG-1 με in situ υβριδοποίηση (αστερίσκος στην εικόνα 19Β). Το mRNA ανιχνεύεται επίσης στην υποκοιλιακή ζώνη (subventricular zone, s στην εικόνα 19Β) και στον πυρήνα του υπογλώσσιου νεύρου (h στην εικόνα 19Β). Η πρωτεΐνη TAG-1 σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο εκφράζεται τόσο από τους επιφανειακούς άξονες όσο και από πιο εσωτερικούς κοντά στην κοιλιακή περιοχή του νευρικού σωλήνα (βέλη και κεφαλές βελών αντίστοιχα στην εικόνα 19Γ).

Μια ημέρα αργότερα, στην E13.5, τα κύτταρα του ΟΕΜΜ έχουν ξεκινήσει τη μετανάστευσή τους και ανιχνεύονται σε όλη την εξωτερική επιφάνεια του νευρικού σωλήνα στο συγκεκριμένο επίπεδο, όπως φαίνεται τόσο με τη χρώση cresyl violet όσο και με ανοσοϊστοχημεία και in situ υβριδοποίηση (κεφαλές βελών στις εικόνες 19Δ-ΣΤ). Στην E14.5 η μετανάστευση καθώς και η έκφραση της TAG-1 από τα συγκεκριμένα κύτταρα συνεχίζεται (εικόνα 19Ζ-Θ), ενώ συνεχίζεται και η έκφραση της TAG-1 στην υποκοιλιακή ζώνη και στον πυρήνα του υπογλώσσιου νεύρου. Μια ημέρα αργότερα (E15.5) ανιχνεύονται ακόμα λίγα κύτταρα του ΟΕΜΜ που εκφράζουν την πρωτεΐνη TAG-1 (κεφαλές βελών στις εικόνες 19Ι και 19Κ).



Εικόνα 19: **Χαρακτηρισμός του οπίσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού (OEMM) σε *in vivo* συνθήκες, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα την έκφραση της TAG-1**

Εγκάρσιες τομές οπίσθιου ρομβοειδούς εγκεφάλου μυών ηλικίας E12.5 (Α-Γ), E13.5 (Δ-ΣΤ), E14.5 (Ζ-Θ), E15.5 (Ι-Κ) και E16.0 (Λ-Μ). Το mRNA της TAG-1 ανιχνεύθηκε με in situ υβριδοποίηση (Β, Ε και Η) και η πρωτεΐνη TAG-1 με πειράματα ανοσοϊστοχημείας (Γ, ΣΤ, Θ, Κ και Μ).

Α-Γ: Σε ηλικία E12.5, τα κύτταρα του OEMM, εκφράζουν το mRNA της TAG-1 όταν ακόμα βρίσκονται στην περιοχή του ρομβικού χείλους (αστερίσκος στην Β), αρχίζοντας τη μεταναστευτική τους πορεία. Σε αυτή την ηλικία η πρωτεΐνη TAG-1 εκφράζεται από τους επιφανειακούς άξονες του νευρικού σωλήνα και από αυτούς που βρίσκονται κοντά στην υποκοιλιακή ζώνη (βέλη και κεφαλές βελών αντίστοιχα στην Γ). Το mRNA της TAG-1 εκφράζεται επίσης στην υποκοιλιακή ζώνη (s) και στον πυρήνα του υπογλώσσιου νεύρου (h), ενώ η έκφραση της συνεχίζεται στα συγκεκριμένα σημεία ως και στην E14.5.

Δ-ΣΤ: Σε ηλικία E13.5 τα κύτταρα του OEMM έχουν φτάσει ως την κοιλιακή πλευρά του νευρικού σωλήνα, εκφράζοντας το mRNA και την πρωτεΐνη TAG-1, όπως δείχνουν οι κεφαλές βελών.

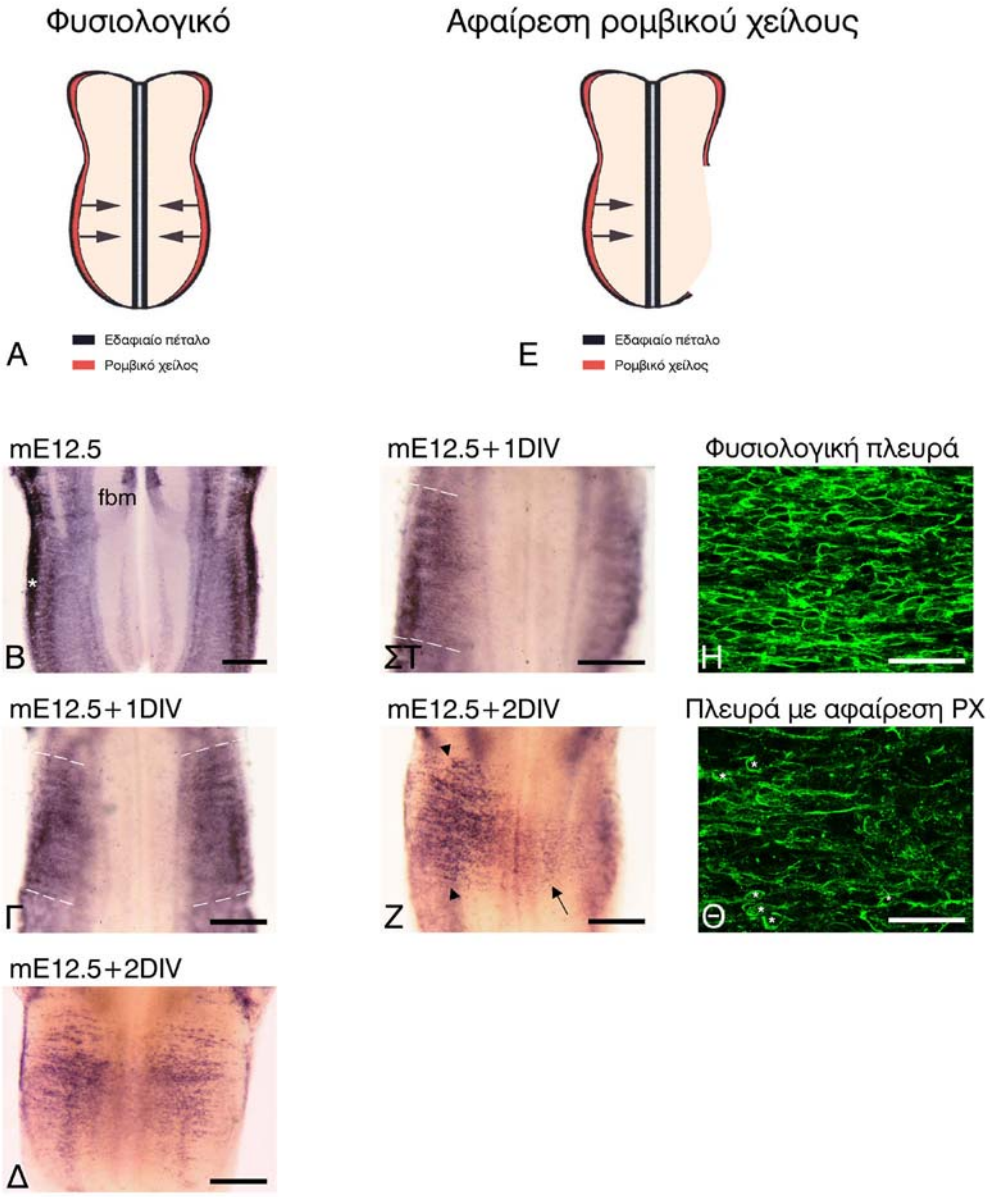
Ζ-Θ: Σε ηλικία Ε14.5, υπάρχουν ακόμα πολλά κύτταρα του ΟΕΜΜ, τα οποία εκφράζουν TAG-1.
Ι-Κ: Σε ηλικία Ε15.5, μόνο λίγα κύτταρα ανιχνεύονται στο ΟΕΜΜ (κεφαλή βέλους στην Ι), τα οποία εκφράζουν τη TAG-1 (κεφαλή βέλους στην Κ).
Λ-Μ: Σε ηλικία Ε16.0, τα κύτταρα του ΟΕΜΜ έχουν ολοκληρώσει τη μετανάστευσή τους ενώ διακρίνεται ο πλάγιος δικτυωτός πυρήνας (μέσα στη διακεκομμένη γραμμή), του οποίου τα κύτταρα δεν εκφράζουν πια την TAG-1.
s: υποκοιλιακή ζώνη, h: πυρήνας του υπογλώσσιου νεύρου. Κλίμακα: 500μm.

Στην ηλικία Ε16.0 η μετανάστευση των κυττάρων του ΟΕΜΜ έχει ολοκληρωθεί, και με χρώση cresyl violet διακρίνεται ο πλάγιος δικτυωτός πυρήνας (μέσα στη διακεκομένη γραμμή στην εικόνα 19Λ). Όπως φαίνεται με πειράματα ανοσοϊστοχημείας για την ανίχνευση της TAG-1, η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεν εκφράζεται από τα κύτταρα του πλάγιου δικτυωτού πυρήνα, όταν αυτά φτάσουν στις τελικές τους θέσεις (εικόνα 19Μ).

Από τα παραπάνω πειράματα φαίνεται ότι η πρωτεΐνη TAG-1 εκφράζεται παροδικά από τα κύτταρα του ΟΕΜΜ μόνο κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους και η έκφρασή της σταματά με τη δημιουργία των πυρήνων στις τελικές τους θέσεις.

2.2 Έκφραση της TAG-1 από τα κύτταρα του ΟΕΜΜ *in vitro*

Στην προσπάθειά μας να αναπτύξουμε ένα *in vitro* σύστημα μελέτης του συγκεκριμένου μεταναστευτικού μονοπατιού, ώστε να είναι πιο εύκολη η οποιαδήποτε παρέμβασή μας, απομονώσαμε ιστοτεμάχια από έμβρυα συγκεκριμένων ηλικιών, τα οποία και καλλιεργήσαμε για ορισμένα χρονικά διαστήματα σε *in vitro* συνθήκες. Από τα δικά μας *in vivo* πειράματα, καθώς και από προηγούμενες μελέτες ήταν γνωστό ότι τα κύτταρα του ΟΕΜΜ γεννιούνται στην περιοχή του ρομβικού χείλους την Ε11.5-Ε12.5 και στη συνέχεια ξεκινούν τη μετανάστευσή τους. Τα ιστοτεμάχια που απομονώθηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.1 των μεθόδων περιείχαν την περιοχή του ρομβοειδούς εγκεφάλου που δημιουργεί τη γέφυρα, τον προμήκη και την παρεγκεφαλίδα. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 20Α, το ρομβικό χείλος βρίσκεται στα πλάγια του καλλιεργούμενου ιστοτεμαχίου και το εδαφιαίο πέταλο στο κέντρο. Τα βέλη δείχνουν τη διαδρομή που ακολουθούν τα μεταναστεύοντα κύτταρα. Με πειράματα in situ υβριδοποίησης στην ηλικία Ε12.5,



Εικόνα 20: **Χαρακτηρισμός του οπίσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού (OEMM) σε *in vitro* συνθήκες, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα την έκφραση της TAG-1**

Α: Σχηματική απεικόνιση φυσιολογικού ιστοτεμαχίου που απομονώθηκε από έμβρυα ηλικίας E12.5.

Β-Δ: In situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA της TAG-1 σε ιστοτεμάχια εμβρύων E12.5 αμέσως μετά την απομόνωσή τους (Β), μετά από καλλιέργεια 1 ημέρας (E12.5+1DIV) (Γ) ή 2 ημερών (E12.5+2DIV) (Δ). Τα κύτταρα του OEMM, τα οποία εκφράζουν TAG-1, ανιχνεύονται αρχικά στο ρομβικό χείλος (αστερίσκος στην Β). Στην E12.5+1DIV έχουν αρχίσει να εξέρχονται από το ρομβικό χείλος, όπως φαίνονται ανάμεσα στις διακεκομμένες γραμμές στην Γ και στην E12.5+2DIV έχουν φτάσει και ξεπεράσει τη μέση γραμμή (Δ). Η TAG-1 εκφράζεται επίσης από τα κύτταρα του κινητικού πυρήνα του προσωπικού νεύρου (fbm) στην ηλικία E12.5 και από την υποκοιλιακή ζώνη σε ιστοτεμάχια E12.5 και E12.5+DIV (Β,Γ)

Ε: Σχηματική απεικόνιση ιστοτεμαχίου, που απομονώθηκε από έμβρυα ηλικίας E12.5 και υπέστη μονόπλευρη αφαίρεση του ρομβικού χείλους στην αρχή της περιόδου καλλιέργειας.
ΣΤ-Ζ: In situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA της TAG-1 σε ιστοτεμάχια E12.5+1DIV (ΣΤ) και E12.5+2DIV (Ζ). Τα κύτταρα του OEMM έχουν εξέλθει από το ακέραιο ρομβικό χείλος και μεταναστεύουν ανάμεσα στις διακεκομμένες γραμμές στο ΣΤ. Μετά από 2 ημέρες καλλιέργειας τα κύτταρα έχουν περάσει τη μέση γραμμή και συνεχίζουν να εκφράζουν το mRNA της TAG-1 (βέλος στο Ζ). Φαίνεται επίσης ότι τα κύτταρα του OEMM, όταν βρίσκονται κοντά στο ρομβικό χείλος, στις πλάγιες περιοχές του ιστοτεμαχίου, μεταναστεύουν σε στενή επαφή το ένα με το άλλο σχηματίζοντας αλυσίδες (κεφαλή βέλους στην Ζ), ενώ όταν βρίσκονται κοντά και πέρα από τη μέση γραμμή μεταναστεύουν πιο μεμονωμένα (βέλος στην Ζ).
Η-Θ: Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο ιστοτεμαχίων, στα οποία έγιναν πειράματα ανοσοϊστοχημείας για την ανίχνευση της πρωτεΐνης TAG-1. Στην φυσιολογική πλευρά του ιστοτεμαχίου ανιχνεύονται κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη TAG-1, τόσο στο κυτταρικό τους σώμα, όσο και στην καθοδηγητική τους απόφυση (Η). Στην πλευρά που έχει υποστεί αφαίρεση του ρομβικού χείλους ανιχνεύονται κύτταρα που εκφράζουν TAG-1 (αστερίσκοι στην Θ), τα οποία έχουν προέλθει από την ακέραια πλευρά του ιστοτεμαχίου.
fbm: κινητικός πυρήνας του προσωπικού νεύρου
Κλίμακα: Α-Ζ: 500μm, Η-Θ: 50μm.

ηλικία που γίνεται η απομόνωση του ιστοτεμαχίου, ανιχνεύσαμε το mRNA της TAG-1 στην περιοχή του ρομβικού χείλους (αστερίσκος στην εικόνα 20Β), στον κινητικό πυρήνα του προσωπικού νεύρου (facial branchiomotor nuclei, fbm) καθώς και στην υποκοιλιακή ζώνη. Μετά από μία ημέρα σε καλλιέργεια [E12.5 +1DIV (1 day *in vitro*)], τα κύτταρα του OEMM έχουν ξεκινήσει τη μετανάστευσή τους επιφανειακά προς την μέση γραμμή του καλλιεργούμενου ιστοτεμαχίου (ανάμεσα στις διακεκομμένες γραμμές στην εικόνα 20Γ) ενώ μετά από 2 ημέρες σε καλλιέργεια (E12.5+2DIV) τα κύτταρα φτάνουν και περνούν τη μέση γραμμή (εικόνα 20Δ).

Παρατηρώντας τα συγκεκριμένα κύτταρα σε καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια διαπιστώνουμε ότι εμφανίζουν δύο διαφορετικά πρότυπα μεταναστευτικής συμπεριφοράς. Όταν τα κύτταρα βρίσκονται στις πλάγιες περιοχές του ιστοτεμαχίου, δηλαδή κοντά στις ραχιαίες περιοχές του νευρικού σωλήνα, δημιουργούν μικρές αλυσίδες καθώς μεταναστεύουν σε πολύ στενή διάταξη το ένα με το άλλο. Αντίθετα, όταν τα κύτταρα πλησιάζουν στη μέση γραμμή, στην κοιλιακή πλευρά του νευρικού σωλήνα, μεταναστεύουν πιο απομονωμένα το ένα από το άλλο, χωρίς να δημιουργούν αυτές τις χαρακτηριστικές αλυσίδες κυττάρων.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι τα κύτταρα του OEMM μπορούν να μεταναστεύουν και στις *in vitro* συνθήκες στα καλλιεργούμενα

ιστοτεμάχια. Ωστόσο, τα κύτταρα σε αυτές τις συνθήκες δεν είναι σε θέση να ολοκληρώσουν τη μετανάστευσή τους δημιουργώντας τους πυρήνες και παραμένουν στη κατάσταση που βρίσκονται την δεύτερη ημέρα καλλιέργειάς τους ακόμα και αν συνεχίσουμε την καλλιέργεια για 5 ημέρες. Για αυτό το λόγο όλα τα παρακάτω πειράματα που περιγράφονται γίνονται τις πρώτες 3 ημέρες καλλιέργειες, ώστε να μπορούν τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα με την *in vivo* κατάσταση.

Όπως προαναφέρθηκε τα κύτταρα του OEMM δημιουργούνται στο ρομβικό χείλος και από τις δύο πλευρές του ρομβοειδούς εγκεφάλου και στη συνέχεια μεταναστεύουν ακολουθώντας δύο συμμετρικά μεταναστευτικά ρεύματα που διασταυρώνονται κάτω από το εδαφιαίο πέταλο. Προκειμένου να μελετήσουμε ολόκληρη την πορεία που ακολουθούν τα μεταναστεύοντα κύτταρα ακόμα και μετά την διέλευσή τους από τη μέση γραμμή και να ξεχωρίσουμε τα δύο συμμετρικά μεταναστευτικά ρεύματα, αφαιρέσαμε το ρομβικό χείλος από τα καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια στην αρχή της περιόδου καλλιέργειάς τους, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 20Ε. Με αυτό τον τρόπο απομακρύνουμε τα κύτταρα που προέρχονται από το δεξιό ρομβικό χείλος και έτσι μπορούμε να παρακολουθήσουμε μόνο την πορεία των κυττάρων που προέρχονται από την αριστερή πλευρά. Μία ημέρα μετά την έναρξη της καλλιέργειας φαίνονται κύτταρα που εκφράζουν το mRNA της TAG-1 να εξέρχονται μόνο από τα ακέραιο ρομβικό χείλος (ανάμεσα στις διακεκομμένες γραμμές στα αριστερά της εικόνας 20ΣΤ) και όχι από τη πλευρά που είχε υποστεί αφαίρεση τη ρομβικού χείλους (δεξιά πλευρά στην εικόνα 20ΣΤ). Η χρώση που φαίνεται στην δεξιά πλευρά του ιστοτεμαχίου στην εικόνα 20ΣΤ οφείλεται στην έκφραση της TAG-1 στην υποκοιλιακή ζώνη, που βρίσκεται σε βαθύτερη περιοχή του ιστοτεμαχίου και όχι στην επιφανειακή όπως τα κύτταρα του OEMM που φαίνονται στην αριστερή πλευρά. Δύο ημέρες μετά την έναρξη της καλλιέργειας φαίνονται κύτταρα του OEMM που έχουν φτάσει και ξεπεράσει τη μέση γραμμή (βέλος στην εικόνα 20Z). Και σε αυτήν την περίπτωση φαίνεται ξεκάθαρα ότι τα κύτταρα του OEMM στην αρχή της πορείας τους μεταναστεύουν σε στενή επαφή το ένα με το άλλο σχηματίζοντας αλυσίδες κυττάρων (κεφαλή βέλους στην εικόνα 20Z), ενώ κοντά και μετά τη μέση γραμμή ακολουθούν πιο απομονωμένες πορείες μετανάστευσης (βέλος στην 20Z).

Κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, ορισμένοι κυτταρικοί πληθυσμοί εκφράζουν συγκεκριμένα καθοδηγητικά μόρια, ώσπου να φτάσουν σε έναν ορισμένο ενδιάμεσο στόχο (Shirasaki et al., 1998; Tessier-Lavigne et al., 1988).

Περνώντας αυτόν τον ενδιάμεσο στόχο αλλάζει και το ρεπερτόριο των καθοδηγητικών μορίων που εκφράζουν. Ένα παράδειγμα τέτοιου κυτταρικού πληθυσμού είναι οι συνδεσμικοί νευρώνες του νωτιαίου μυελού. Οι αναπτυσσόμενοι άξονες των συγκεκριμένων νευρώνων εκφράζουν την πρωτεΐνη TAG-1 καθώς προβάλουν προς την κοιλιακή περιοχή του νωτιαίου μυελού. Η έκφραση της TAG-1 σταματά όταν οι άξονες αυτοί διασχίσουν τη μέση γραμμή περνώντας κάτω από το εδαφιαίο πέταλο, ενώ, καθώς προβάλουν στην αντίθετη πλευρά του νευρικού σωλήνα, ξεκινά η έκφραση της πρωτεΐνης L1 (Dodd et al., 1988).

Στο OEMM το mRNA της TAG-1 εκφράζεται από τα μεταναστεύοντα κύτταρα ακόμα και αφού έχουν διασχίσει τη μέση γραμμή, όπως φαίνεται στην εικόνα 20Z (βέλος). Ωστόσο για να ελέγξουμε εάν υπάρχει και έκφραση της πρωτεΐνης TAG-1 από τα συγκεκριμένα κύτταρα έγιναν πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια που τους είχε αφαιρεθεί το ένα ρομβικό χείλος κατά την έναρξη της καλλιέργειας και έμειναν σε *in vitro* συνθήκες για 3 ημέρες. Δείχθηκε ότι η πρωτεΐνη TAG-1 εκφράζεται τόσο από τα κύτταρα της φυσιολογικής πλευράς (εικόνα 20H) όσο και από τα κύτταρα που ήδη έχουν διασχίσει τη μέση γραμμή (εικόνα 20Θ, οι αστερίσκοι δείχνουν τα κυτταρικά σώματα των μεταναστευόντων κυττάρων που εκφράζουν TAG-1).

Συμπερασματικά, από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι τα κύτταρα του OEMM μπορούν να μεταναστεύουν και *in vitro* αν και δεν ολοκληρώνεται η δημιουργία των πυρήνα κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες. Ωστόσο η πορεία των κυττάρων τις 3 πρώτες ημέρες της περιόδου καλλιέργειας προσομοιάζει στην *in vivo* κατάσταση και έτσι διαπιστώνουμε ότι τα κύτταρα του OEMM αρχικά μεταναστεύουν σε στενή διάταξη το ένα με το άλλο, ενώ στη συνέχεια εμφανίζονται πιο μεμονωμένα. Η έκφραση της TAG-1 ωστόσο συνεχίζεται και μετά το πέρασμα από τη μέση γραμμή.

2.3. Μελέτη του OEMM με τη χρήση ενσωματούμενης 5-βρώμο-2-δεόξυ-ουριδίνης

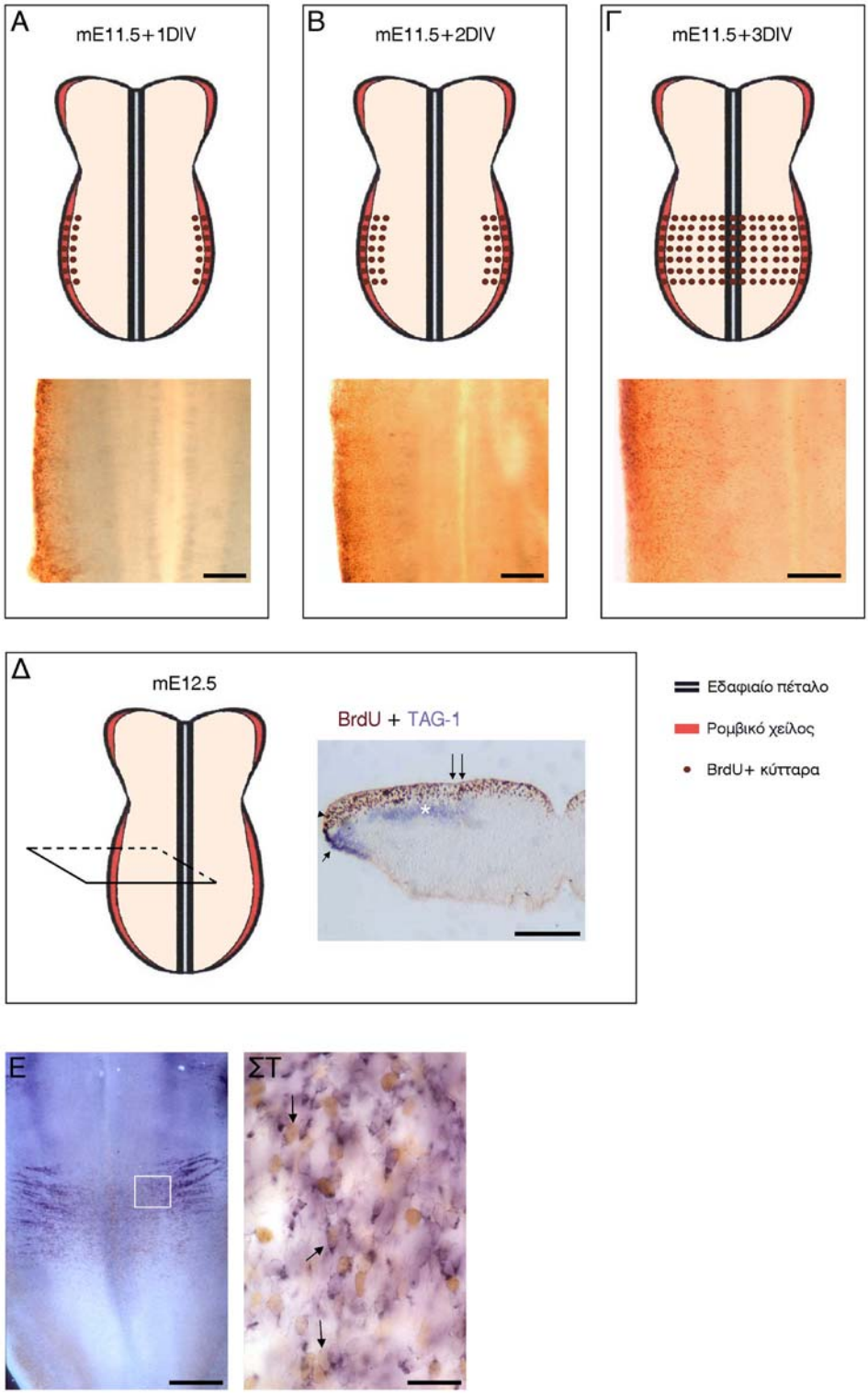
Ένας επιπλέον τρόπος μελέτης του OEMM σε *in vitro* συνθήκες είναι η σήμανση των κυττάρων με 5-βρώμο-2-δεόξυ-ουριδίνης (BrdU), η οποία ενσωματώνεται στο DNA των μιτωτικών κυττάρων και ανιχνεύεται με ανοσοϊστοχημικούς τρόπους. Όπως ήταν γνωστό από προηγούμενες μελέτες τα κύτταρα του OEMM δημιουργούνται στο ρομβικό χείλος την E11.5-E12.5 (Altman

and Bayer, 1987). Επωάζοντας ιστοτεμάχια ρομβοειδούς εγκεφάλου που απομονώθηκαν από έμβρυα των συγκεκριμένων ηλικιών για 30 λεπτά σε διάλυμα BrdU σημαίνουμε τα κύτταρα που εκείνο το χρονικό διάστημα βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού.

Ιστοτεμάχια που απομονώθηκαν σε ηλικία E11.5, καλλιεργήθηκαν για 1, 2 και 3 ημέρες και στη συνέχεια ανιχνεύθηκαν τα σημασμένα κύτταρα και η πορεία που ακολούθησαν κατά τη διάρκεια της καλλιέργειάς τους. Μία ημέρα μετά την έναρξη της καλλιέργειας τα σημασμένα κύτταρα βρίσκονται ακόμα στην περιοχή του ρομβικού χείλους (εικόνα 21Α), δύο ημέρες μετά, τα κύτταρα έχουν ξεκινήσει τη μεταναστευτική τους πορεία και πλησιάζουν προς τη μέση γραμμή (εικόνα 21Β) και τρεις ημέρες μετά, τα μεταναστεύοντα κύτταρα έχουν φτάσει στη μέση γραμμή (εικόνα 21Γ).

Κατά τον ίδιο τρόπο σημάνθηκαν κύτταρα του OEMM που δημιουργούνται στην ηλικία E12.5. Στην προσπάθειά μας να ερευνήσουμε εάν η TAG-1 εκφράζεται από τα κύτταρα του OEMM μετά την τελευταία μίτωσή τους, όπως συμβαίνει σε άλλους πληθυσμούς νευρικών κυττάρων, όπως τα κοκκώδη κύτταρα της παρεγκεφαλίδας (Furley et al., 1990) αμέσως μετά την επώασή τους με BrdU τα ιστοτεμάχια μονιμοποιήθηκαν χωρίς να ακολουθήσει καλλιέργεια σε *in vitro* συνθήκες. Στη συνέχεια έγινε in situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA της TAG-1 και ανοσοϊστοχημεία για την ανίχνευση της ενσωματωμένης BrdU. Στην εικόνα 21Δ φαίνεται μια εγκάρσια τομή του ιστοτεμαχίου στο επίπεδο που δείχνεται στο διάγραμμα στα αριστερά. Η καφέ χρώση δείχνει την ενσωματωμένη BrdU από τα κύτταρα που βρίσκονταν τη στιγμή της χορήγησή της σε μιτωτική φάση, ενώ η μπλε χρώση φανερώνει τη έκφραση του mRNA της TAG-1. Φαίνεται λοιπόν ότι τα κύτταρα που έχουν ενσωματώσει την BrdU βρίσκονται ακριβώς στο ρομβικό χείλος (κεφαλή βέλους στην εικόνα 21Δ), ενώ η TAG-1 εκφράζεται μόνο από τα κύτταρα που έχουν ξεκινήσει τη μετανάστευσή τους (βέλος στην εικόνα 21Δ). BrdU θετικά κύτταρα ανιχνεύονται επίσης και στην κοιλιακή ζώνη (ventricular zone) του ιστοτεμαχίου (διπλό βέλος στην εικόνα 21Δ), η οποία αποτελεί βλαστική στοιβάδα (κοιλιακή ζώνη) του αναπτυσσόμενου νευρικού σωλήνα, ενώ η TAG-1 εκφράζεται και από τα κύτταρα της υποκοιλιακής ζώνης (αστερίσκος στην εικόνα 21Δ).

Αφήνοντας τα ιστοτεμάχια που σημάνθηκαν με BrdU στην E12.5 τρεις ημέρες σε καλλιέργεια παρατηρούμε ότι τα κύτταρα που είχαν ενσωματώσει τη BrdU στην αρχή της καλλιέργειας στη συνέχεια έγιναν μεταμιτωτικά και άρχισαν να



Εικόνα 21: **Χαρακτηρισμός της μετανάστευσης των κυττάρων του οπίσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού (OEMM) με τη χρήση της ενσωματωμένης BrdU**

Α-Γ: Ιστοτεμάχια που απομονώθηκαν από έμβρυα ηλικίας Ε11.5, έλαβαν για 30 λεπτά BrdU και καλλιεργήθηκαν για 1, 2 και 3 ημέρες σε *in vitro* συνθήκες. Φαίνεται ότι τα κύτταρα που είχαν ενσωματώσει BrdU, βρίσκονταν στην περιοχή του

ρομβικού χείλους 1 ημέρα μετά την απομόνωσή τους (Α), ενώ είχαν αρχίσει τη μετανάστευσή τους 2 ημέρες μετά (Β). Την 3η ημέρα της καλλιέργειας (Γ) τα κύτταρα του ΟΕΜΜ, που έχουν ενσωματώσει BrdU, έχουν φτάσει ως τη μέση γραμμή.
Δ-ΣΤ: Ιστοτεμάχια που απομονώθηκαν από έμβρυα ηλικίας Ε12.5 και έλαβαν για 30 λεπτά BrdU.
Δ: Στο διάγραμμα σημειώνεται το σημείο που έγινε η εγκάρσια τομή που φαίνεται στα δεξιά. Η μπλε χρώση δείχνει την κατανομή του mRNA της TAG-1, ενώ η καφέ τα κύτταρα που έχουν ενσωματώσει τη BrdU. Τα κύτταρα του ΟΕΜΜ, που έχουν ενσωματώσει BrdU ανιχνέυονται στο ρομβικό χείλος (κεφαλή βέλους), ενώ η TAG-1 ανιχνευται μόνο στα κύτταρα που έχουν αρχίσει τη μετανάστευσή τους (βέλος). Το διπλό βέλος δείχνει τα μιτωτικά κύτταρα της κοιλιακής ζώνης και ο αστερίσκος τα μεταμιτωτικά κύτταρα της υποκοιλιακής ζώνης, που εκφράζουν TAG-1.
Ε-ΣΤ: In situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση της TAG-1 και ανοσοιστοχημεία για την ανίχνευση της BrdU σε ιστοτεμάχια που έμειναν σε καλλιέργεια για 3 ημέρες. Διακρίνονται τα κύτταρα του ΟΕΜΜ, τα οποία εκφράζουν TAG-1, ενώ ένας υποπληθυσμός αυτών έχουν ενσωματώσει την BrdU που δόθηκε στην αρχή της περιόδου καλλιέργειας. Τα βέλη δείχνουν τα διπλά σημασμένα κύτταρα.
Κλίμακα: Α-Γ, Ε: 250μm, Δ: 200μm, ΣΤ: 25μm.

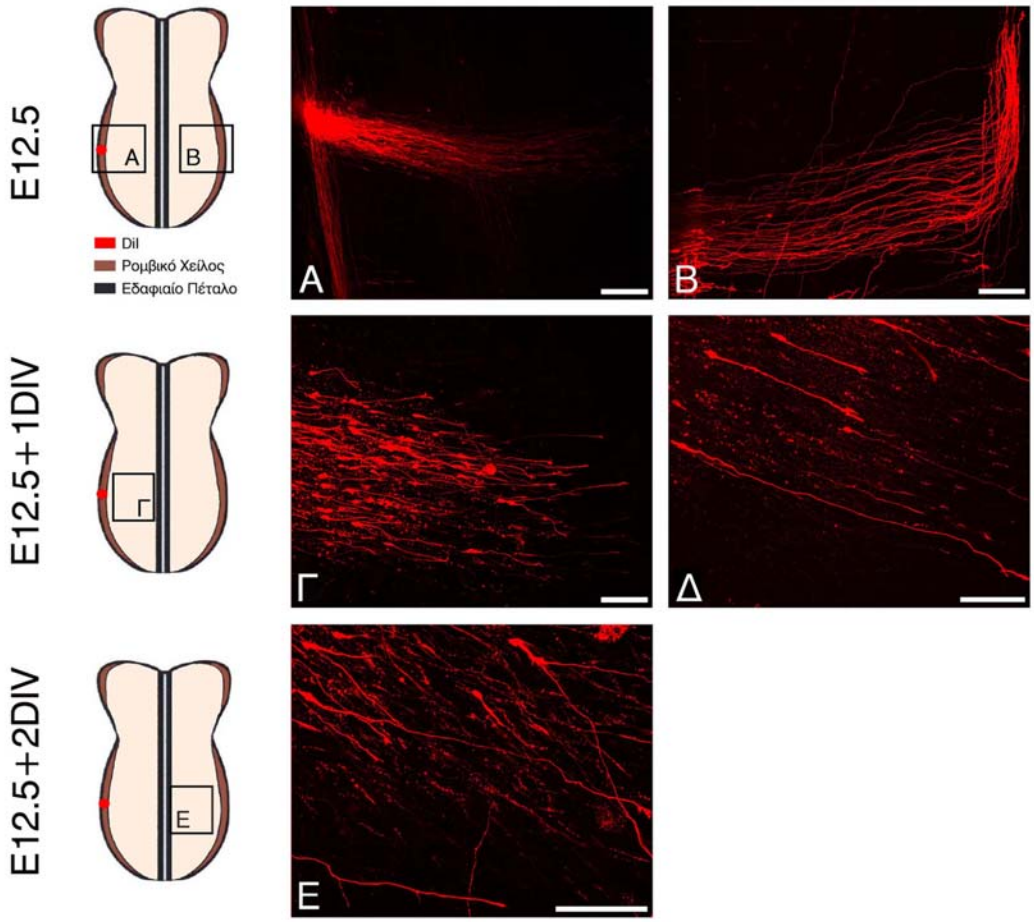
εκφράζουν TAG-1 καθώς συνεχίζουν τη μεταναστευτική τους πορεία. Έτσι στις εικόνες 21Ε και σε μεγαλύτερη μεγέθυνση στην εικόνα 21ΣΤ, ανιχνεύουμε κύτταρα που είναι θετικά και για BrdU και για TAG-1 (βέλη στην εικόνα 21ΣΤ).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η σήμανση των κυττάρων του ΟΕΜΜ με BrdU αποτελεί έναν επιπλέον τρόπο ανίχνευσής τους. Ωστόσο, με αυτόν τον τρόπο σημαίνεται μόνο ένας περιορισμένος αριθμός κυττάρων του ΟΕΜΜ, και συγκεκριμένα αυτά τα κύτταρα που βρίσκονταν σε μιτωτική φάση στο χρονικό διάστημα των 30 λεπτών που χορηγήσαμε την BrdU.

2.4 Μηχανισμοί μετανάστευσης κυττάρων στο ΟΕΜΜ

2.4.1 Μορφολογία μεταναστευόντων κυττάρων του ΟΕΜΜ

Από προηγούμενες μελέτες είχε δειχθεί ότι τα κύτταρα που δημιουργούν τον βασικό πυρήνα της γέφυρας, που και αυτά εκφράζουν την πρωτεΐνη TAG-1 κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους εκτείνουν μια μεγάλη καθοδηγητική απόφυση (leading process), την οποία και ακολουθεί το κυτταρικό σώμα μεταναστεύοντας κυκλικά ακριβώς κάτω από την pial επιφάνεια του νευρικού σωλήνα. Τα συγκεκριμένα κύτταρα μεταναστεύουν σε πολύ στενή επαφή το ένα με το άλλο σε ένα τύπο αλυσιδωτής μετανάστευσης (Yee et al., 1999).



Εικόνα 22: **Μορφολογία των κυττάρων του οπίσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού (OEMM) μετά από σήμανση με DiI**

Εικόνες συνεστιακού μικροσκοπίου, από ολόκληρα ιστοτεμάχια, στα οποία σημάναμε τα κύτταρα του OEMM τοποθετώντας έναν κόκκο DiI στο ρομβικό τους χείλος, όπως φαίνεται στα διαγράμματα στα αριστερά, όταν απομονώθηκαν σε ηλικία E12.5. Τα τετράγωνα πάνω στα διαγράμματα αναπαριστούν τις περιοχές, τις οποίες δείχνουν οι εικόνες με τα αντίστοιχα γράμματα.

A-B: Ιστοτεμάχια που μονιμοποιήθηκαν στην ηλικία E12.5. Επιφανειακά του ιστοτεμαχίου, διακρίνονται οι μακριές καθοδηγητικές αποφύσεις των κυττάρων που βρίσκονται ακόμα στην περιοχή του ρομβικού χείλους (A). Σε πιο βαθύ επίπεδο, διακρίνονται άξονες, οι οποίοι φτάνουν στην αντίθετη πλευρά του ιστοτεμαχίου και στρίβουν προς την πρόσθια πλευρά του νευρικού συστήματος (B).

Γ-Δ: Μετά από 1 ημέρα καλλιέργειας διακρίνονται κύτταρα του OEMM, που εξέρχονται από το ρομβικό χείλος (Γ). Το κύτταρα αυτά έχουν μονοπολική μορφή και φέρουν τεράστιες καθοδηγητικές αποφύσεις, οι οποίες εκτείνονται προς την κατεύθυνση της μετανάστευσης (Δ).

E: Μετά από 2 ημέρες καλλιέργειας διακρίνονται κύτταρα του OEMM να έχουν φτάσει στην αντίθετη πλευρά από αυτή που ξεκίνησαν, διατηρώντας την ίδια μονοπολική μορφή με μεγάλες καθοδηγητικές αποφύσεις. Κλίμακα: 50μm.

Λόγω των ομοιοτήτων που παρουσιάζουν τα κύτταρα τού προς μελέτη συστήματος με αυτά που δημιουργούν τον βασικό πυρήνα της γέφυρας θελήσαμε να μελετήσουμε τη διαδικασία της μετανάστευσης των κυττάρων στο ΟΕΜΜ καθώς και τη μορφολογία τους. Για το σκοπό αυτό τοποθετήσαμε έναν μικρό κρύσταλλο της λιπόφιλης ουσίας DiI στο ρομβικό χείλος της μίας πλευράς του ιστοτεμαχίου που απομονώθηκε από έμβρυα ηλικίας Ε12.5. Με αυτό τον τρόπο σημάναμε τα κύτταρα, που όπως έχει δειχθεί από τα προηγούμενα πειράματα βρίσκονται σε αυτή τη θέση στη συγκεκριμένη ηλικία.

Μονιμοποιημένα ιστοτεμάχια στην ηλικία που έγινε η τοποθέτηση του DiI (Ε12.5) διατηρήθηκαν 5 ημέρες για να γίνει η μεταφορά της λιπόφιλης ουσίας και στη συνέχεια παρατηρήθηκαν. Οι εικόνες 22Α και 22Β είναι από τις περιοχές που παρατίθονται στο διάγραμμα αριστερά και στην 22Α φαίνεται ότι τα κύτταρα που βρίσκονται στο ρομβικό χείλος και έχουν σημανθεί με το DiI, φέρουν μία μακριά καθοδηγητική απόφυση (leading process), που εκτείνεται επιφανειακά του ιστοτεμαχίου προς την κατεύθυνση που θα γίνει η μετανάστευση των κυττάρων. Αντίθετα, σε πιο βαθύ επίπεδο στον ιστό φαίνονται μακρυοί νευράξονες, οι οποίοι φτάνουν ως την αντίθετη πλευρά του νευρικού σωλήνα, όπου και στρίβουν προβάλλοντας προς την πρόσθια πλευρά του νευρικού σωλήνα (εικόνα 22Β).

Ορισμένα ιστοτεμάχια έμειναν σε καλλιέργεια για μία ημέρα μετά την απομόνωσή τους και την τοποθέτηση του DiI στο ρομβικό τους χείλος και στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν. Όπως φαίνεται στην εικόνα 22Γ το DiI έχει ενσωματωθεί στα κύτταρα του ΟΕΜΜ, που εξέρχονται από το ρομβικό χείλος. Το σχήμα των μεταναστευόντων κυττάρων είναι μονοπολικό με μία μεγάλη καθοδηγητική απόφυση, που εκτείνεται προς την κατεύθυνση της μετανάστευσης και η οποία μπορεί να φτάσει σε μήκος ακόμα και εκατοντάδες μικρόμετρα (εικόνα 22Δ).

Τέλος, μετά από καλλιέργεια δύο ημερών τα σημασμένα κύτταρα έχουν διασχίσει τη μέση γραμμή και συνεχίζουν τη μετανάστευσή τους διατηρώντας τη μονοπολική τους μορφολογία με μια μεγάλη καθοδηγητική απόφυση (εικόνα 22Ε).

2.4.2 Τρόποι μετανάστευσης των κυττάρων του ΟΕΜΜ

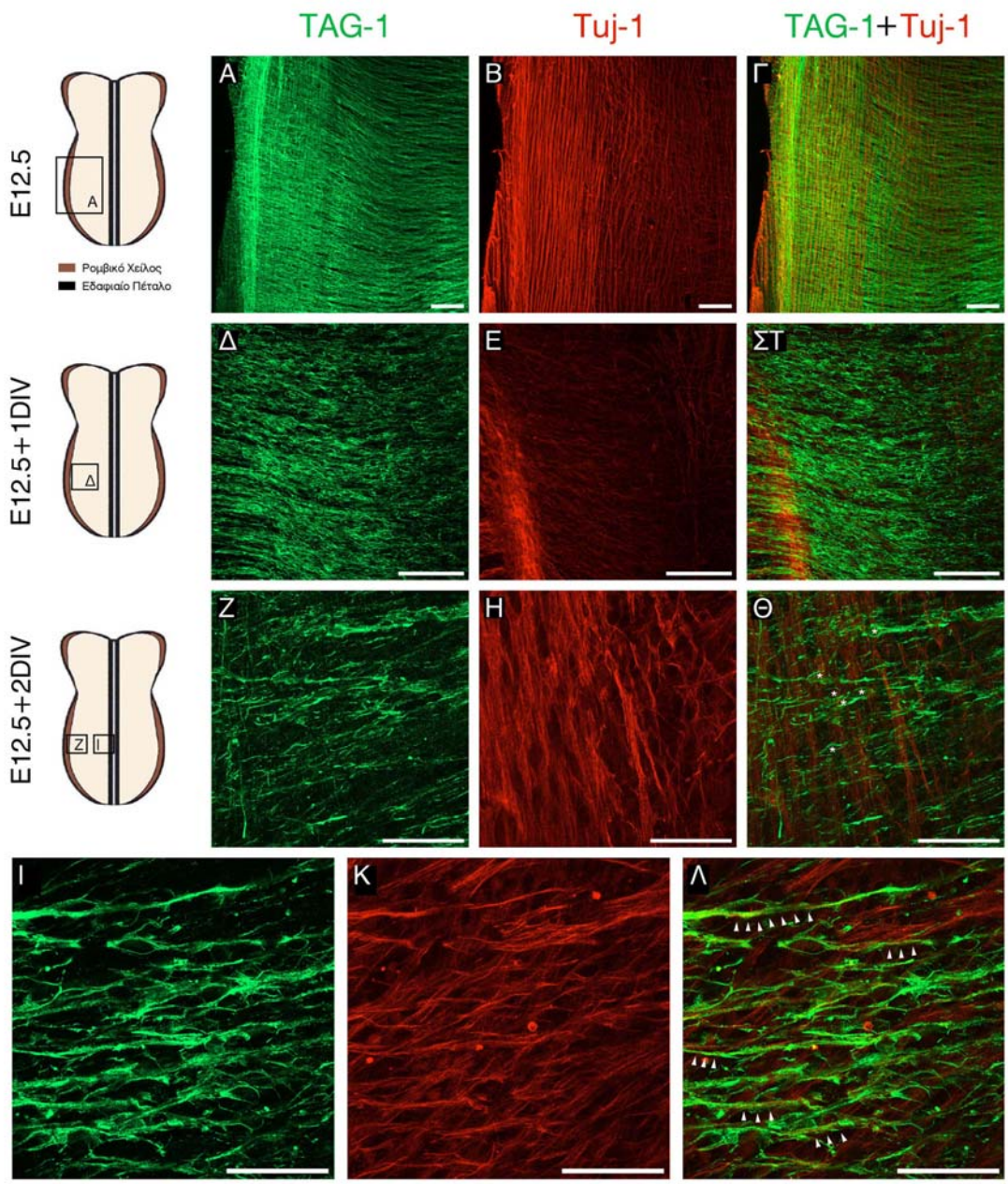
Ακολούθως θελήσαμε να διερευνήσουμε εάν τα κύτταρα του ΟΕΜΜ κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους ακολουθούν προϋπάρχοντες νευρικούς άξονες ως φορείς στήριξης (νευροφιλική μετανάστευση) ή εάν μεταναστεύουν με αλυσιδωτή μετανάστευση, όπως συμβαίνει στα κύτταρα που δημιουργούν τον βασικό πυρήνα

της γέφυρας. Για να απαντήσουμε στο ανωτέρω ερώτημα κάναμε διπλή ανοσοϊστοχημεία με αντίσωμα έναντι της TAG-1 και με αντίσωμα Tuj-1 που αναγνωρίζει την τάξης-ΙΙΙ β-τουμπουλίνη και αποτελεί ειδικό μάρτυρα για διαφοροποιημένο νευρικό ιστό. Με τη χρήση του Tuj-1 στο συγκεκριμένο σύστημα, θελήσαμε να σημάνουμε τους νευρικούς άξονες, πάνω στους οποίους πιθανόν να μεταναστεύουν τα κύτταρα του OEMM.

Σε ιστοτεμάχια που απομονώθηκαν στην ηλικία E12.5 η έκφραση της TAG-1 παρατηρήθηκε σε επιφανειακές ίνες που βρίσκονται πάνω στην πορεία που θα ακολουθήσουν τα μεταναστεύοντα κύτταρα (εικόνα 23Α). Αυτές οι TAG-1 θετικές ίνες δεν εκφράζουν τον νευροειδικό μάρτυρα Tuj-1, ο οποίος ανιχνεύθηκε μόνο σε άξονες που διατρέχουν κάθετα το νευρικό σωλήνα σε αυτό το σημείο (εικόνα 23Β). Στην εικόνα 23Γ φαίνεται ότι οι ίνες που παρατηρούνται στην επιφάνεια του ιστοτεμαχίου και δεν είναι ώριμοι νευρικοί άξονες, αφού είναι αρνητικοί για το Tuj-1, αλλά εκφράζουν την TAG-1, συμπίπτουν με τις επιφανειακά διατεταγμένες καθοδηγητικές αποφύσεις των κυττάρων του OEMM, των οποίων τα κυτταρικά σώματα βρίσκονται ακόμα στην περιοχή του ρομβικού χείλους. Οι επιφανειακές αυτές καθοδηγητικές αποφύσεις είχαν φανεί και με την σήμανση DiI, που παρουσιάστηκε στην προηγούμενη εικόνα.

Σε ιστοτεμάχια που καλλιεργήθηκαν για 1 ημέρα και τα κύτταρα του OEMM άρχισαν τη μετανάστευσή τους, η TAG-1 ανιχνεύθηκε στα μεταναστεύοντα κύτταρα και στις καθοδηγητικές αποφύσεις τους (εικόνα 23Δ). Αντίθετα Tuj-1 θετικοί άξονες βρίσκονται μόνο κάθετα στην πορεία των κυττάρων (εικόνα 23Ε). Όπως φαίνεται και στην εικόνα 23ΣΤ, στην πορεία των μεταναστευόντων κυττάρων δεν υπάρχουν ώριμοι νευρικοί άξονες. Φαίνεται επίσης ότι τα κύτταρα του OEMM βρίσκονται σε στενή διάταξη μεταξύ τους καθώς μεταναστεύουν ακολουθώντας το καθένα την καθοδηγητική απόφυση του γειτονικού του κυττάρου.

Τέλος σε ιστοτεμάχια που καλλιεργήθηκαν για 2 ημέρες και η μετανάστευση των κυττάρων είχε προχωρήσει, παρατηρήθηκαν δύο τύποι μετανάστευσης, ανάλογα με τη θέση των κυττάρων. Στην πλευρική περιοχή του ιστοτεμαχίου, φαίνονται TAG-1 θετικά κύτταρα (εικόνα 23Ζ) να μεταναστεύουν σε ένα περιβάλλον που δεν έχει Tuj-1 θετικούς άξονες, παρά μόνο ορισμένους ώριμους άξονες διατεταγμένους κάθετα στην πορεία των μεταναστευόντων κυττάρων του OEMM (εικόνα 23Η-Θ). Αντίθετα, όταν τα TAG-1 θετικά κύτταρα πλησιάζουν τη μέση γραμμή (εικόνα 23Ι) στην πορεία της μετανάστευσή τους βρίσκονται ώριμοι Tuj-1 θετικοί άξονες (εικόνα



Εικόνα 23: **Αλυσιδωτή και νευροφιλική μετανάστευση στο οπίσθιο επιφανειακό μεταναστευτικό μονοπάτι (ΟΕΜΜ)**

Εικόνες συνεστιακού μικροσκοπίου, από ολόκληρα ιστοτεμάχια, που απομονώθηκαν σε ηλικία Ε12.5 και στα οποία έγινε διπλή ανοσοϊστοχημεία για την ανίχνευση της TAG-1 (πράσινη χρώση) και του Tuj-1 (κόκκινη χρώση). Αριστερά στην εικόνα φαίνονται τα διαγράμματα, στα οποία σημειώνεται ποιο σημείο δείχνουν οι εικόνες με τα αντίστοιχα γράμματα.

Α-Γ: Σε ιστοτεμάχια ηλικία Ε12.5 διακρίνονται επιφανειακές ίνες, οι οποίες εκφράζουν TAG-1 (Α, Γ), αλλά όχι Tuj-1 (Β, Γ). Οι Tuj-1 θετικοί νευρικοί άξονες ανιχνεύονται με κατεύθυνση κάθετη από αυτή των TAG-1 θετικών ινών (Γ), οι οποίες ίνες είναι πιθανότατα οι καθοδηγητικές αποφύσεις των κυττάρων του ΟΕΜΜ, των οποίων τα σώματα βρίσκονται ακόμα στο ρομβικό χείλος.

Δ-ΣΤ: Μετά από 1 ημέρα σε καλλιέργεια κύτταρα του ΟΕΜΜ θετικά για TAG-1 εξέρχονται από το ρομβικό χείλος και μεταναστεύουν σχηματίζοντας χαρακτηριστικές αλυσίδες όπως φαίνονται στα αριστερά των εικόνων Δ και ΣΤ (αλυσιδωτή μετανάστευση). Αυτά τα κύτταρα δεν μεταναστεύουν σε επαφή με Tuj-1 θετικούς άξονες (Ε, ΣΤ).
Ζ-Λ: Μετά από 2 ημέρες σε καλλιέργεια, παρατηρούνται δύο τρόποι μετανάστευσης ανάλογα με το σημείο της πορείας που βρίσκονται τα κύτταρα του ΟΕΜΜ.
Στα πλάγια του ιστοτεμαχίου (Ζ-Θ), τα TAG-1 θετικά κύτταρα του ΟΕΜΜ (Ζ, Θ) μεταναστεύουν επιφανειακά κάθετα στους Tuj-1 θετικούς νευρικούς άξονες (Η, Θ).
Σε πιο κεντρικό σημείο του ιστοτεμαχίου, κοντά στην μέση γραμμή, τα TAG-1 θετικά κύτταρα του ΟΕΜΜ (Ι, Λ) μεταναστεύουν σε στενή επαφή με Tuj-1 θετικούς άξονες (Κ, Λ). Οι κεφαλές βελών στην Λ δείχνουν καθοδηγητικές αποφύσεις των κυττάρων του ΟΕΜΜ (πράσινη χρώση) να έχουν «αγκαλιάσει» νευρικούς άξονες (κόκκινη χρώση) σε ενός τύπου νευροφιλική μετανάστευση.
Κλίμακα: Α-ΣΤ: 50μm, Ζ-Λ: 20μm.

23Κ) με τους οποίους βρίσκονται σε στενή επαφή τα συγκεκριμένα κύτταρα (κεφαλές βελών στην εικόνα 23Λ).

Από τα ανωτέρω πειράματα φαίνεται ότι υπάρχουν δύο φάσεις μετανάστευσης στο ΟΕΜΜ. Στην αρχή της μετανάστευσης, όταν τα κύτταρα βρίσκονται κοντά στο ρομβικό χείλος, στην πλάγια πλευρά του ιστοτεμαχίου ή στην ραχιαία πλευρά του νευρικού σωλήνα, τα κύτταρα μεταναστεύουν σε στενή επαφή το ένα με το άλλο, ακολουθώντας τις καθοδηγητικές τους αποφύσεις. Αυτού του τύπου η μετανάστευση αποτελεί την αλυσιδωτή μετανάστευση. Όταν τα κύτταρα πλησιάζουν τη μέση γραμμή, στην κοιλιακή πλευρά του νευρικού σωλήνα, ακολουθούν προϋπάρχοντες νευρικούς άξονες σε μια μορφή νευροφιλικής μετανάστευσης. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με τα πειράματα της in situ υβριδοποίησης, όπου και εκεί ήταν φανερή η διαφορετική διάταξη των κυττάρων στην πλάγια και κεντρική περιοχή των καλλιεργούμενων ιστοτεμαχίων.

2.5 Επίδραση της αναστολής της δράσης της TAG-1 στην μετανάστευση των κυττάρων του ΟΕΜΜ

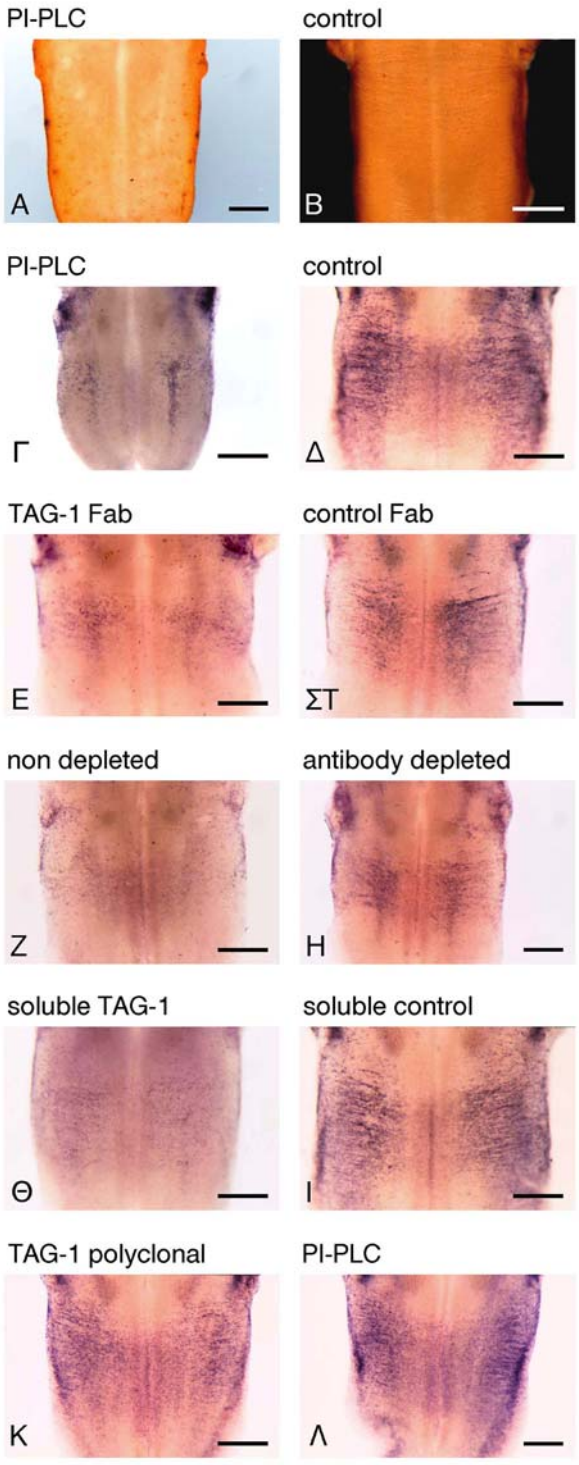
Όπως έχει δειχθεί από τα ανωτέρω πειράματα, η έκφραση του mRNA και της πρωτεΐνης TAG-1 συμπίπτει με τη χρονική περίοδο που λαμβάνει χώρα η μετανάστευση των κυττάρων του ΟΕΜΜ. Στην προσπάθειά μας να διερευνήσουμε εάν η πρωτεΐνη TAG-1 παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της μετανάστευσης των συγκεκριμένων κυττάρων, αναστείλαμε τη δράση της με διάφορους τρόπους σε καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια, σε *in vitro* συνθήκες. Στη συνέχεια με πειράματα in situ

υβριδοποίησης, παρατηρήσαμε την πορεία των μεταναστευόντων κυττάρων, ανιχνεύοντας το mRNA της TAG-1, που εκφράζεται από αυτά.

Η πρωτεΐνη TAG-1, όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι συνδεδεμένη στην επιφάνεια των κυττάρων με δεσμό γλυκοσιλ-φωσφατυδιλ-ινοσιτόλης (GPI) (Furley et al., 1990; Karagogeos et al., 1991). Το ένζυμο φωσφατιδύλ-ινοσιτόλη-φωσφολιπάση C (phosphatidylinositol-specific phospholipase C, PI-PLC) μπορεί να αποκόψει τον GPI δεσμό και έτσι να αφαιρέσει την πρωτεΐνη TAG-1, καθώς και άλλες πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες με τέτοιου τύπου δεσμό, από την επιφάνεια των κυττάρων (Furley et al., 1990; Masuda et al., 2000).

Μετά την απομόνωση των ιστοτεμαχίων ακολούθησε επώαση τους σε θρεπτικό υλικό παρουσία του ενζύμου PI-PLC και στη συνέχεια καλλιέργεια στο ίδιο θρεπτικό, αλλάζοντας το ένζυμο κάθε 12 ώρες. Μετά από 3 ημέρες σε καλλιέργεια έγινε ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της TAG-1 σε ιστοτεμάχια που είχαν επωαστεί με PI-PLC και σε φυσιολογικά ιστοτεμάχια. Όπως φαίνεται στην εικόνα 24Α η TAG-1 έχει αποκοπεί από την επιφάνεια των κυττάρων στα ιστοτεμάχια που επωάστηκαν με PI-PLC, ενώ ανιχνεύεται στα φυσιολογικά ιστοτεμάχια (εικόνα 24Β). Στη συνέχεια, έγιναν πειράματα in situ υβριδοποίηση για TAG-1 για να ανιχνευθούν τα κύτταρα του OEMM, που εκφράζουν το συγκεκριμένο mRNA ακόμα και όταν η πρωτεΐνη έχει αποκοπεί από την επιφάνειά τους. Παρατηρήθηκε ότι στα ιστοτεμάχια που είχαν επωαστεί με PI-PLC τα κύτταρα του OEMM δεν είχαν μεταναστεύσει φυσιολογικά καθώς ανιχνεύθηκαν λιγότερα κύτταρα και δεν είχαν το χαρακτηριστικό μονοπάτι μετανάστευσης που παρατηρήθηκε στα φυσιολογικά ιστοτεμάχια (σύγκριση των εικόνων 24Γ και 24Δ). Φαίνεται λοιπόν, ότι η TAG-1 ή κάποια άλλη πρωτεΐνη συνδεδεμένη με GPI δεσμό, η οποία αφαιρέθηκε από την επιφάνεια των κυττάρων μετά από την επίδραση με PI-PLC, είναι σημαντική για την σωστή πορεία των μεταναστευόντων κυττάρων του OEMM.

Προκειμένου να αναστείλουμε τη δράση της TAG-1 με πιο ειδικό τρόπο, χρησιμοποιήσαμε πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα ή Fab τμήματα αντισωμάτων ενάντια στην TAG-1, τα οποία προσθέσαμε στο θρεπτικό υλικό των καλλιεργούμενων ιστοτεμαχίων. Όπως φάνηκε μετά από in situ υβριδοποίηση και σε αυτή την περίπτωση τα κύτταρα του OEMM δεν έχουν μεταναστεύσει φυσιολογικά, καθώς ανιχνεύονται πολύ λιγότερα κύτταρα και αυτά δεν σχηματίζουν τις χαρακτηριστικές αλυσίδες κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους (εικόνα 24Ε) σε αντίθεση με ό,τι συμβαίνει στη συνθήκη ελέγχου (control πείραμα), όταν στο υλικό



Εικόνα 24: **Επίδραση της αναστολής της δράσης της TAG-1 στη μετανάστευση των κυττάρων του οπίσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού**
Εικόνες ιστοτεμαχίων, στα οποία έγινε ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της πρωτεΐνης TAG-1 (A-B) ή in situ υβριδοποίηση για τον εντοπισμό των κυττάρων που εκφράζουν το mRNA της TAG-1 (Γ-Λ).

Α-Ι: Η δράση της TAG-1 ανεστάλη με τη χρήση του ενζύμου PI-PLC (Α, Γ), με Fab τμήματα πολυκλωνικών αντισωμάτων (Ε), με πολυκλωνικά αντισώματα (Ζ) και με διαλυτή TAG-1-Fc πρωτεΐνη. Ως συνθήκη ελέγχου χρησιμοποιήσαμε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό χωρίς την προσθήκη PI-PLC (Β, Δ), Fab τμήματα πολυκλωνικών αντισώματων ενάντια της πρωτεΐνης ret που δεν εκφράζονται στην περιοχή του ΟΕΜΜ (ΣΤ), θρεπτικό υλικό μετά από αντιγονο-αποκάκρυνση του αντισώματος της TAG-1 (Η) και διαλυτή MUC-18 πρωτεΐνη (Ι).
Το ένζυμο PI-PLC έχει αποκόψει την πρωτεΐνη TAG-1 από την επιφάνεια του ιστοτεμαχίου, αφού δεν ανιχνεύεται με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους (Α) σε αντίθεση με το φυσιολογικό ιστοτεμάχιο (Β). Σε όλες τις περιπτώσεις αναστολής της δράσης της TAG-1 τα κύτταρα του ΟΕΜΜ είναι λιγότερα από όσα είναι στα φυσιολογικά ιστοτεμάχια και επίσης δε σχηματίζουν τις χαρακτηριστικές αλυσίδες κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους.
Κ-Λ: Ιστοτεμάχια που καλλιεργήθηκαν για 2 ημέρες σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό και στη συνέχεια με θρεπτικό που περιείχε πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της TAG-1 (Κ) ή ένζυμο PI-PLC (Λ). Και στις δύο περιπτώσεις το κύτταρα του ΟΕΜΜ έχουν μεταναστεύσει φυσιολογικά.
Κλίμακα: 500μm.

καλλιέργειας είχαν προστεθεί Fab τμήματα αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης ret που δεν εμπλέκεται στο συγκεκριμένο σύστημα μετανάστευσης (εικόνα 24ΣΤ).

Στην προσπάθειά μας να διερευνήσουμε εάν τα αποτελέσματα που επιφέρει η προσθήκη αντισωμάτων έναντι της TAG-1 στη μετανάστευση των κυττάρων του ΟΕΜΜ είναι ειδικά και προέρχονται μόνο από την αναστολή που προκαλούν τα συγκεκριμένα αντισώματα στη δράση της TAG-1, κάναμε πειράματα αντιγονο-απομάκρυνσης του αντίσωματος από το θρεπτικό υλικό, όπως περιγράφονται στην παράγραφο 5.5.2 της ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Με τη συγκεκριμένη μέθοδο αφαιρούμε από το θρεπτικό υλικό μόνο τα αντισώματα που αναγνωρίζουν την TAG-1 και κανένα άλλο από τα στοιχεία του, και όπως φαίνεται στην εικόνα 24Η, το συγκεκριμένο θρεπτικό δεν προκαλεί προβλήματα στη μετανάστευση των κυττάρων του ΟΕΜΜ. Αντίθετα, το θρεπτικό από το πείραμα ελέγχου, που δεν υπέστη τη διαδικασία της αντιγονο-απομάκρυνσης προκαλεί τα προβλήματα που προαναφέρθηκαν σε σχέση με τη μετανάστευση των κυττάρων του ΟΕΜΜ (εικόνα 24Ζ).

Τέλος, ένας άλλος τρόπος αναστολής της δράσης της TAG-1 είναι και η χρήση διαλυτής πρωτεΐνης TAG-1 μέσα στο υλικό καλλιέργειας των ιστοτεμαχίων. Είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη TAG-1 μπορεί να αλληλεπιδρά με ομοφιλικό τρόπο συνδεόμενη με μόρια της ίδιας πρωτεΐνης που εκφράζεται από τα μεταναστεύοντα κύτταρα, αλλά επίσης μπορεί να αλληλεπιδρά και με τους πιθανούς υποδοχείς της

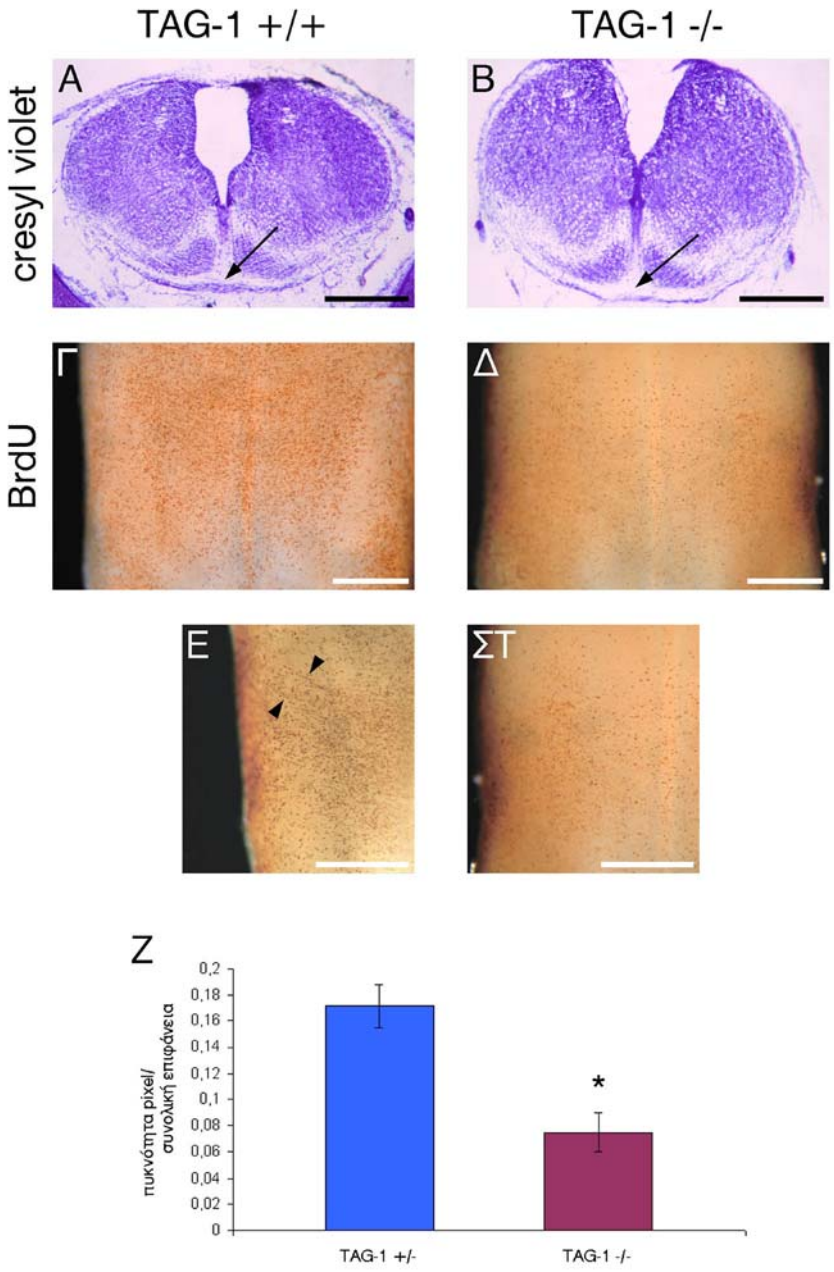
TAG-1 συνδεόμενη με ετεροφιλικό τρόπο. Όπως φαίνεται στη εικόνα 24Θ η προσθήκη της διαλυτής πρωτεΐνης TAG-1 προκαλεί προβλήματα στη μετανάστευση των κυττάρων του OEMM, καθώς τα κύτταρα που μεταναστεύουν είναι πολύ λιγότερα και δεν σχηματίζουν τις χαρακτηριστικές αλυσίδες κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους. Ωστόσο η προσθήκη σε διαλυτή μορφή της πρωτεΐνης MUC-18, η οποία δεν εμπλέκεται στο συγκεκριμένο σύστημα, ως συνθήκη ελέγχου, δεν προκαλεί κανένα πρόβλημα στη μετανάστευση των κυττάρων του OEMM (εικόνα 24Ι).

Προκειμένου να ερευνήσουμε το ενδεχόμενο η προσθήκη των αντιδραστηρίων που αναστέλλουν την TAG-1 να προκαλεί το θάνατο των TAG-1 θετικών κυττάρων, δημιουργήσαμε ιστοτεμάχια τα οποία καλλιεργήσαμε για 2 ημέρες σε φυσιολογικό θρεπτικό υλικό, ώστε να επιτευχθεί η μετανάστευση των κυττάρων και ακολούθως προσθέσαμε τα αντιδραστήρια που αναστέλλουν τη δράση της TAG-1 για χρονικό διάστημα δύο ημερών. Με το συγκεκριμένο πείραμα δείχθηκε ότι τα κύτταρα του OEMM μετανάστευσαν φυσιολογικά τις δύο πρώτες ημέρες της καλλιέργειας και η προσθήκη πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι της TAG-1 για δύο παραπάνω ημέρες δεν προκαλούν κανένα πρόβλημα στη βιωσιμότητα των εν λόγω κυττάρων (εικόνα 24Κ). Τα ίδια αποτελέσματα είχαμε όταν η TAG-1 αποκόπηκε από την επιφάνεια των κυττάρων με τη χρήση του ενζύμου PI-PLC δύο ημέρες μετά την έναρξη της καλλιέργειας (εικόνα 24Λ). Φαίνεται δηλαδή ότι αυτή καθεαυτή η προσθήκη των συγκεκριμένων αντιδραστηρίων δεν προκαλεί το θάνατο των TAG-1 θετικών κυττάρων, όταν αυτά έχουν προχωρήσει στη διαδικασία της μετανάστευσης.

Από τα παραπάνω πειράματα συμπεραίνουμε ότι αναστέλλοντας τη δράση της πρωτεΐνης TAG-1 αναστέλλεται ως ένα βαθμό και η μετανάστευση των κυττάρων του OEMM. Παρόλο που και πάλι ανιχνεύονται μεταναστεύοντα κύτταρα, ο αριθμός τους είναι μειωμένος και δε μεταναστεύουν σε στενή επαφή το ένα με το άλλο δημιουργώντας αλυσίδες, αλλά με πιο μεμονωμένο τρόπο.

2.6 Φαινότυπος των μυών με απώλεια δράσης του γονιδίου της TAG-1

Προκειμένου να ερευνήσουμε περαιτέρω τη δράση της TAG-1 στο προς μελέτη μεταναστευτικό μονοπάτι, χρησιμοποιήσαμε μύες, που εμφανίζουν απώλεια δράσης του γονιδίου της TAG-1 (Fukamauchi et al., 2001). Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα που περιγράφηκαν στην προηγούμενη παράγραφο θα περιμέναμε τα



Εικόνα 25: **Επίδραση της απώλειας δράσης του γονιδίου της TAG-1 στο οπίσθιο επιφανειακό μεταναστευτικό μονοπάτι**

Α-Β: Ιστολογική χρώση cresyl violet σε εγκάρσιες τομές οπίσθιου ρομβοειδούς εγκεφάλου από αγρίου τύπου μύες (Α) και από μύες με απώλεια δράσης του γονιδίου της TAG-1 (Β). Τα κύτταρα του ΟΕΜΜ είναι λιγότερα στα μεταλλαγμένα ζώα σε σχέση με τα αγρίου τύπου (βέλη).

Γ-ΣΤ: Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της ενσωματωμένης BrdU σε καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια που απομονώθηκαν από φυσιολογικά (Γ,Ε) και μεταλλαγμένα (Δ,ΣΤ) ζώα. Διακρίνονται περισσότερα μεταναστεύοντα κύτταρα στα φυσιολογικά ζώα, που σε ορισμένες περιπτώσεις σχηματίζουν και «αλυσίδες» (κεφαλές βελών στην Ε).

Z: Διάγραμμα στο οποίο αναπαριστάται ο λόγος της πυκνότητας φθορίζοντων εικονοτεμαχίων (pixels) ως προς την συνολική επιφάνειας του ιστού. Τα BrdU σημασμένα κύτταρα του OEMM είναι πολύ λιγότερα στα TAG-1 -/- ζώα σε σχέση με τα TAG-1 +/- (p-value <0.01). Κλίμακα: 500 μm.

μεταλλαγμένα αυτά ζώα να παρουσιάζουν ανωμαλίες στο OEMM. Με ιστολογική χρώση cresyl violet σε εγκάρσιες τομές του οπίσθιου ρομβοειδούς εγκεφάλου εμβρύων E13.5, είδαμε ότι τα φυσιολογικά ζώα έχουν μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων στο OEMM (βέλος στην εικόνα 25Α), σε σχέση με τα ζώα με απώλεια δράσης του γονιδίου της TAG-1 (βέλος στην εικόνα 25Β).

Ακολούθως, δημιουργήσαμε καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια από μεταλλαγμένα και αγρίου τύπου ζώα, στα οποία χορηγήσαμε BrdU στην ηλικία E11.5 και E12.5 για να σημάνουμε τα κύτταρα του OEMM, που γεννιούνται το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Μετά από καλλιέργεια 3 ημερών και ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της ενσωματωμένης BrdU είδαμε ότι στα ιστοτεμάχια που είχαν απομονωθεί από φυσιολογικά ζώα τα κύτταρα του OEMM ήταν πολύ περισσότερα από αυτά που ανιχνεύονταν στα ιστοτεμάχια από ζώα με απώλεια δράσης της TAG-1 (σύγκριση των εικόνων 25Γ και 25Δ). Επιπλέον, στα αγρίου τύπου ζώα παρατηρείται σε ορισμένες περιπτώσεις ο σχηματισμός των χαρακτηριστικών αλυσίδων από τα μεταναστεύοντα κύτταρα του OEMM (κεφαλές βελών στην εικόνα 25Ε), γεγονός που δεν παρατηρείται στα μεταλλαγμένα ζώα (εικόνα 25ΣΤ).

Σε ορισμένα ιστοτεμάχια η ενσωματωμένη BrdU ανιχνεύθηκε με ανοσοφθορισμό και ακολούθησε στατιστική ανάλυση των εικόνων που πήραμε από συνεστιακό μικροσκόπιο. Με αυτόν τον τρόπο υπολογίστηκε ο λόγος της πυκνότητας των φθορίζοντων εικονοτεμαχίων (pixels), τα οποία αντιστοιχούν σε σημασμένα κύτταρα, σε σχέση με την συνολική επιφάνεια της περιοχής που παρατηρείται το OEMM. Μετά από ανάλυση ANOVA φαίνεται ότι η διαφορά που παρατηρείται είναι σημαντική (p-value <0.01) (εικόνα 25Z). Από τα ανωτέρω αποτελέσματα φαίνεται ότι στα ζώα που εμφανίζουν απώλεια δράσης του γονιδίου της TAG-1 παρουσιάζουν μικρότερο αριθμό κυττάρων στο OEMM.

2.7 Έκφραση άλλων μορίων συνάφειας και επίδραση της αναστολής δράση τους στο OEMM

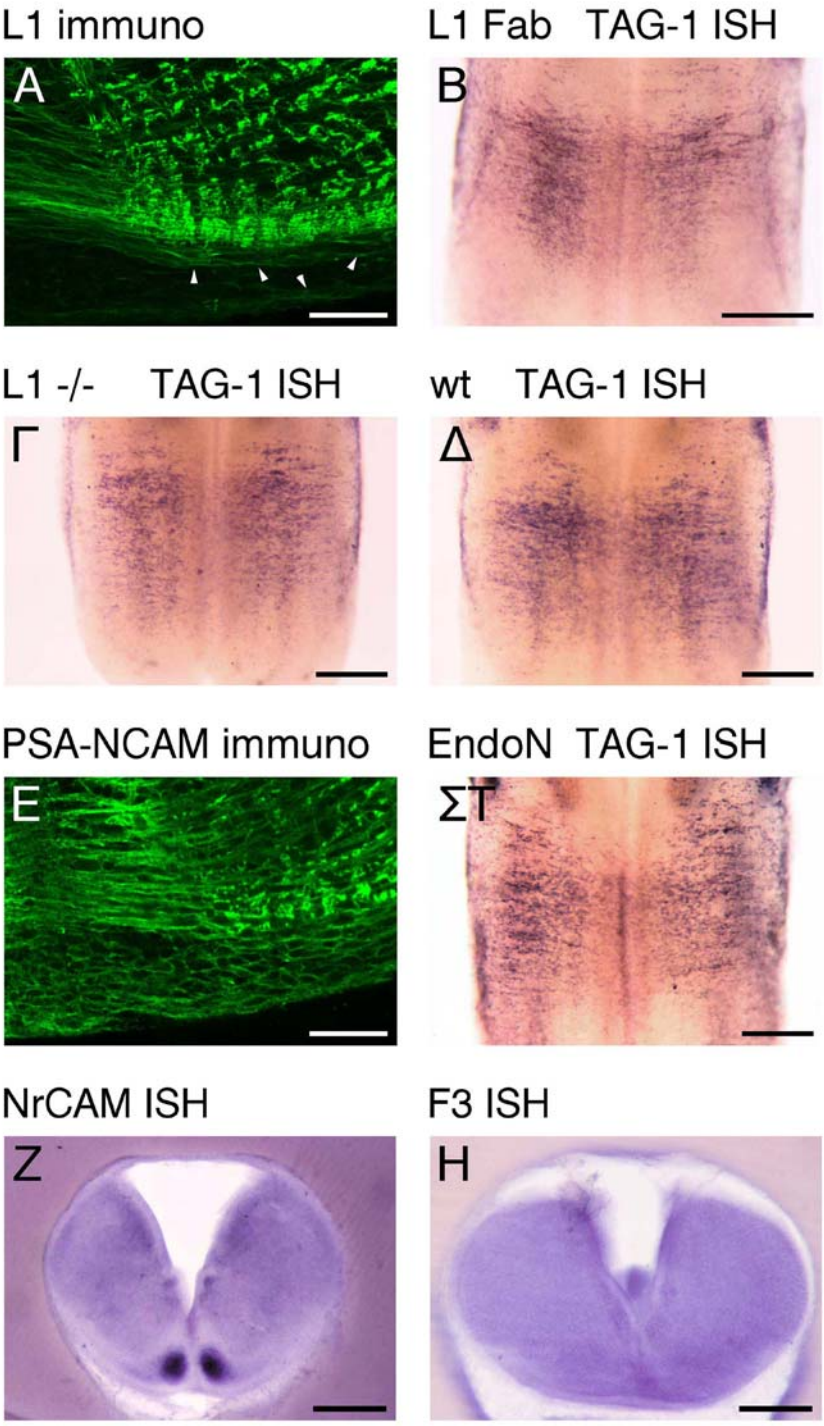
Η TAG-1 είναι μια πρωτεΐνη που είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με άλλα μόρια συνάφειας και εμπλέκεται στην καθοδήγηση και στην επέκταση των αναπτυσσόμενων νευραξόνων. Πρωτεΐνες όπως η L1, η PSA-NCAM, η NrCAM και η F3 εκτός από γνωστοί προσδέτες της TAG-1 είναι και μόρια που έχει δειχθεί ότι επηρεάζουν ορισμένες διαδικασίες κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος (Buchstaller et al., 1996; Buttiglione et al., 1998; Dhar Malhotra et al., 1998; Hu et al., 1996; Lustig et al., 1999; Stoeckli and Landmesser, 1995).

Προκειμένου να ερευνήσουμε την πιθανή εμπλοκή και αυτών των μορίων συνάφειας στο OEMM, μελετήσαμε αρχικά το πρότυπο έκφρασής τους στην περιοχή του αναπτυσσόμενου οπίσθιου ρομβοειδούς εγκεφάλου. Ακολούθως, αναστείλαμε τη δράση τους με συγκεκριμένες μεθόδους και παρατηρήσαμε τα αποτελέσματα αυτής της αναστολής στη μετανάστευση των κυττάρων του OEMM, χρησιμοποιώντας και πάλι ως μάρτυρα την έκφραση του mRNA της TAG-1.

Η πρωτεΐνη L1, η οποία είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με την TAG-1 (Buttiglione et al., 1998; Dhar Malhotra et al., 1998), εκφράζεται, όπως ανιχνεύθηκε με πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε εγκάρσιες τομές ρομβοειδούς εγκεγάλου την E13.5, από ορισμένους άξονες πράλληλους προς την πορεία που ακολουθούν τα μεταναστεύοντα κύτταρα (κεφαλές βελών στην εικόνα 26Α). Με την προσθήκη Fab τμημάτων αντισώματος έναντι στην L1 αναστείλαμε τη δράση της L1 σε καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια, αλλά όπως φάνηκε μετά από πειράματα in situ υβριδοποίησης για την TAG-1, τα κύτταρα του OEMM είχαν μεταναστεύσει κανονικά, χωρίς αυτή η αναστολή της L1 να προκαλέσει κανένα πρόβλημα στη φυσιολογική τους πορεία (εικόνα 26Β).

Ακολούθως, ερευνήσαμε το ενδεχόμενο να υπάρχουν αλλοιώσεις στο OEMM σε μύες που εμφανίζουν απώλεια δράσης του υπεύθυνο γονιδίου για την έκφραση της πρωτεΐνης L1. Όπως φαίνεται όμως τα TAG-1 θετικά κύτταρα του OEMM εμφανίζουν την ίδια μεταναστευτική πορεία σε ζώα ομόζυγα για το μεταλλαγμένο γονίδιο της L1 και σε ζώα αγρίου τύπου (εικόνα 26Γ και 26Δ αντίστοιχα).

Μια άλλη πρωτεΐνη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών και μόριο συνάφειας είναι το NCAM. Από προηγούμενες μελέτες είναι γνωστό ότι η πολυσιαλική μόρφη του NCAM (PSA-NCAM) εμπλέκεται σε οριζόντιες μεταναστεύ-



Εικόνα 26: **Έκφραση και ρόλος άλλων μορίων συνάφειας στη μετανάστευση των κυττάρων του οπίσθιου μεταναστευτικού μονοπατιού**

Α: Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της πρωτεΐνης L1 σε εγκάρσιες τομές οπίσθιου ρομβοειδούς εγκεφάλου σε έμβρυα ηλικίας E13.5. Η L1 εκφράζεται μόνο από ορισμένους άξονες (κεφαλές βελών) στο σημείο του OEMM.

Β: In situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA της TAG-1 σε ιστοτεμάχια που είχαν καλλιεργηθεί παρουσία Fab τμημάτων αντισωμάτων έναντι της L1.

Γ-Δ: In situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA της TAG-1 σε ιστοτεμάχια από ζώα που εμφανίζουν απώλεια δράσης του γονιδίου της L1 (Γ) και σε αγρίου τύπου ζώα (littermates) (Δ).
Η αναστολή της δράσης της πρωτεΐνης L1 και με τους δύο τρόπους δεν προκαλεί προβλήματα στη μετανάστευση των κυττάρων του OEMM.
Ε: Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της πολυσιαλικής μορφής της πρωτεΐνης NCAM (PSA-NCAM) σε εγκάρσιες τομές οπίσθιου ρομβοειδούς εγκεφάλου σε έμβρυα ηλικίας Ε13.5. Το PSA-NCAM εκφράζεται από τα κύτταρα του OEMM κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους.
ΣΤ: In situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA της TAG-1 σε ιστοτεμάχια που είχαν καλλιεργηθεί παρουσία ενζύμου endoN, το οποίο αποκόπτει το πολυσιαλικό οξύ, από τα μόρια του PSA-NCAM. Τα κύτταρα του OEMM έχουν μεταναστεύσει κανονικά, ακόμα και μετά την αποκοπή του πολυσιαλικού οξέος.
Ζ: In situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA του μορίου συνάφειας NrCAM σε εγκάρσιες τομές οπίσθιου ρομβοειδούς εγκεφάλου σε έμβρυα ηλικίας Ε13.5. Το NrCAM εκφράζεται από τα κύτταρα του πυρήνα της κάτω ελαίας.
Η: In situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA του μορίου συνάφειας F3, σε εγκάρσιες τομές οπίσθιου ρομβοειδούς εγκεφάλου σε έμβρυα ηλικίας Ε13.5. Η F3 δεν ανιχνεύεται σε κανένα πληθυσμό κυττάρων στο συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο. Κλίμακα: Α, Ε: 50μm, Β-Δ, ΣΤ-Η: 500μm.

σεις κυττάρων στο οσφρητικό σύστημα (Hu et al., 1996; Ono et al., 1994). Στο προς μελέτη σύστημα, το PSA-NCAM εκφράζεται από τα μεταναστεύοντα κύτταρα του OEMM, όπως φαίνεται από πειράματα ανοϊστοχημείας σε εγκάρσιες τομές ρομβοειδούς εγκεφάλου στην Ε13.5 (εικόνα 26Ε).

Προκειμένου να ελέγξουμε εάν το συγκεκριμένο μόριο εμπλέκεται στη διαδικασία της μετανάστευσης των κυττάρων του OEMM, απομονώσαμε ιστοτεμάχια, τα οποία και επωάσαμε με το ένζυμο EndoN, ώστε να αποκοπεί το πολυσιαλικό οξύ από την επιφάνεια των κυττάρων του OEMM. Μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας παρατηρήσαμε με in situ υβριδοποίηση για TAG-1, ότι τα κύτταρα του OEMM είχαν μεταναστεύσει κανονικά και η αποκοπή του πολυσιαλικού οξέως δεν προκάλεσε κανένα πρόβλημα στην πορεία που ακολουθούν (εικόνα 26ΣΤ).

Ένα άλλο μόριο συνάφειας, που αλληλεπιδρά με την TAG-1 είναι το Nr-CAM. Όπως φάνηκε από πειράματα in situ υβριδοποίησης για την ανίχνευση του mRNA σε εγκάρσιες τομές αναπτυσσόμενου ρομβοειδούς εγκεφάλου Ε13.5 στο επίπεδο που συντελείται η μετανάστευση του OEMM, το Nr-CAM ανιχνεύεται στα κύτταρα που δημιουργούν τον πυρήνα της ελαίας και όχι στο OEMM (εικόνα 26Ζ).

Τέλος, μελετήσαμε την έκφραση της πρωτεΐνης F3, η οποία είναι και αυτή μόριο συνάφειας που αλληλεπιδρά με την TAG-1. Ωστόσο, το mRNA της F3 δεν

ανιχνεύεται στη συγκεκριμένη περιοχή και στο αναπτυξιακό στάδιο που λαμβάνει χώρα η μετανάστευση των κυττάρων του OEMM (εικόνα 26Η).

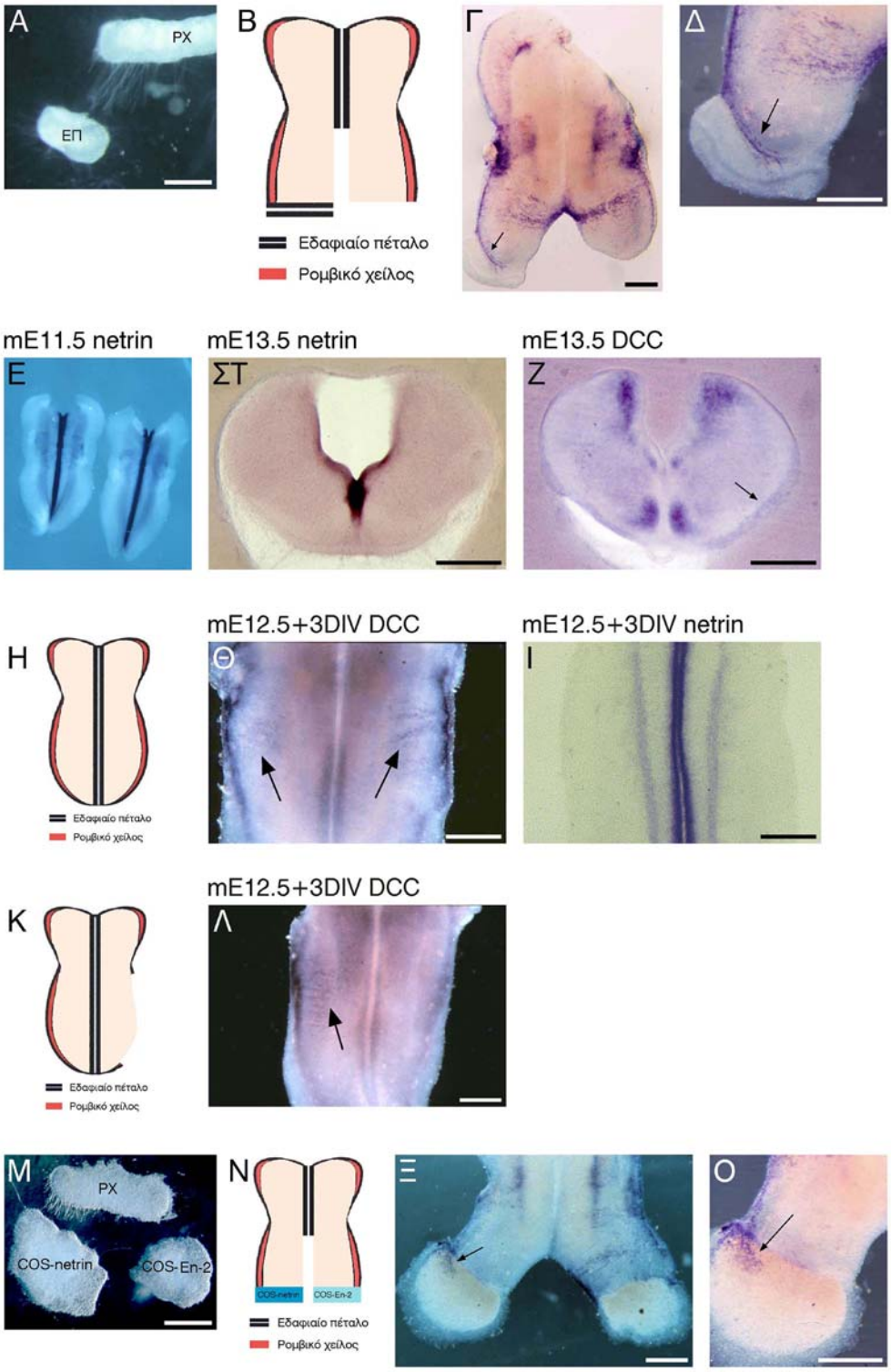
Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι τα μόρια συνάφειας L1, PSA-NCAM, Nr-CAM και F3 δεν εμπλέκονται στη διαδικασία της μετανάστευσης των κυττάρων του OEMM και άρα δεν μπορούν να αποτελούν υποδοχείς της πρωτεΐνης TAG-1 στο συγκεκριμένο σύστημα.

2.8 Επίδραση του εδαφιαίου πετάλου στο OEMM

Εκτός από τα καθοδηγητικά μόρια που δρουν εξ επαφής, όπως τα μόρια συνάφειας, υπάρχουν και πρωτεΐνες, που εκκρίνονται από μια πηγή παραγωγής και δρουν εξ αποστάσεως διαχεόμενες προς τα κύτταρα στόχους. Μια πηγή παραγωγής τέτοιων διαχεόμενων πρωτεϊνών είναι το εδαφιαίο πέταλο, το οποίο κατέχει κεντρική θέση στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα και έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στην καθοδήγηση αξόνων κατά την ανάπτυξη (Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995). Στη συγκεκριμένη μελέτη θελήσαμε να ερευνήσουμε το ρόλο που μπορεί να παίζει το εδαφιαίο πέταλο στην καθοδήγηση των μεταναστευόντων κυττάρων του OEMM.

Προκειμένου να ελέγξουμε τη βιολογική δραστικότητα τμημάτων του εδαφιαίου πετάλου, τα καλλιεργούμε σε πηκτώματα κολλαγόνου παρουσία τμημάτων του ρομβικού χείλους, για να παρατηρήσουμε την ικανότητα του εδαφιαίου πετάλου να προσανατολίζει τους αναπτυσσόμενους νευρίτες, που εξέρχονται από το καλλιεργούμενο ρομβικό χείλος. Όπως φαίνεται στην εικόνα 27Α, οι νευρίτες που εκτείνονται από το τμήμα του ρομβικού χείλους έλκονται από το εδαφιαίο πέταλο και προσανατολίζουν την πορείας τους προς αυτό.

Για να ελέγξουμε την επίδραση που μπορεί να έχει η συγκεκριμένη δομή στην καθοδήγηση των μεταναστευόντων κυττάρων του OEMM, αφαιρέσαμε το ενδογενές εδαφιαίο πέταλο από την περιοχή που συντελείται η μετανάστευση και το τοποθετήσαμε έκτοπα, κάθετα στην φυσιολογική του θέση. Στην εικόνα 27Β φαίνεται σε διάγραμμα το ιστοτεμάχιο που απομονώθηκε και οι προαναφερθείσες παρεμβάσεις που έγιναν στην αρχή της περιόδου καλλιέργειας. Μετά από 3 ημέρες το καλλιεργούμενο ιστοτεμάχιο μονιμοποιήθηκε και ακολούθησε in situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA της TAG-1, που και σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιούμε ως μάρτυρα για να παρακολουθούμε την πορεία των κυττάρων του OEMM. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 27Γ στην δεξιά πλευρά του ιστοτεμαχίου τα TAG-1 θετικά κύτταρα του OEMM έχουν μεταναστεύσει κανονικά προς τη μέση



Εικόνα 27: **Επίδραση του εδαφιαίου πετάλου και της πρωτεΐνης νετρίνης στη μετανάστευση των κυττάρων του οπίσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού (OEMM)**

Α: Καλλιέργεια τμήματος ρομβικού χείλους (ΡΧ) και εδαφιαίου πετάλου (ΕΠ) σε πήκτωμα κολλαγόνου. Οι νευρίτες που εξέρχονται από το ρομβικό χείλος έλκονται από το εδαφιαίο πέταλο.
Β-Δ: Σχηματική απεικόνιση ιστοτεμαχίου με έκτοπη τοποθέτηση εδαφιαίου πετάλου (Β) και in situ υβριδοποίηση του συγκεκριμένου ιστοτεμαχίου μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας για την ανίχνευση των TAG-1 θετικών κυττάρων του ΟΕΜΜ. Τα κύτταρα του ΟΕΜΜ έχουν παρεκκλίνει της φυσιολογικής τους πορείας και μεταναστεύουν προς το έκτοπο εδαφιαίο πέταλο (βέλος στις Γ και σε μεγαλύτερη μεγέθυνση στο Δ).
Ε-ΣΤ: In situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA της νετρίνης σε απομονωμένα ιστοτεμάχια σε ηλικία Ε11.5 (Ε) και σε εγκάρσιες τομές ρομβοειδούς εγκεφάλου ηλικίας Ε13.5 στο επίπεδο του ΟΕΜΜ (ΣΤ). Η νετρίνη εκφράζεται στην περιοχή της μέσης γραμμής από το εδαφιαίο πέταλο καθώς και στην περιοχή της κοιλιακής ζώνης.
Ζ: In situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA του υποδοχέα της νετρίνης DCC και σε εγκάρσιες τομές ρομβοειδούς εγκεφάλου ηλικία Ε13.5 στο επίπεδο του ΟΕΜΜ. Το DCC εκφράζεται από τα μεταναστεύοντα κύτταρα του ΟΕΜΜ (βέλος).
Η-Ι: Σχηματική απεικόνιση φυσιολογικού ιστοτεμαχίου, που απομονώθηκε από Ε12.5 έμβρυα (Η) και in situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA του DCC (Θ) και της νετρίνης (Ι) στα συγκεκριμένα ιστοτεμάχια μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας. Το DCC εκφράζεται από τα μεταναστεύοντα κύτταρα του ΟΕΜΜ (βέλος στην Θ) και η νετρίνη από τα κύτταρα του εδαφιαίου πετάλου (Ι).
Κ-Λ: Σχηματική απεικόνιση ιστοτεμαχίου, που απομονώθηκε από έμβρυα ηλικίας Ε12.5 και υπέστη μονόπλευρη αφαίρεση του ρομβικού χείλους στην αρχή της περιόδου καλλιέργειας (Κ). Με in situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA του DCC μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας βλέπουμε ότι τα κύτταρα του ΟΕΜΜ εκφράζουν DCC μόνο πριν να διασχίσουν τη μέση γραμμή (βέλος στην Λ).
Μ: Καλλιέργεια τμήματος ρομβικού χείλους (ΡΧ) με συσσωματώματα COS κυττάρων που εκφράζουν νετρίνη (COS-netrin) ή En-2 (COS-En-2) σε πήκτωμα κολλαγόνου. Οι νευρίτες που εξέρχονται από το ρομβικό χείλος έλκονται μόνο από το COS-netrin συσσωμάτωμα κυττάρων.
Ν-Ξ: Σχηματική απεικόνιση ιστοτεμαχίου με αφαίρεση του ενδογενούς εδαφιαίου πετάλου και έκτοπη τοποθέτηση συσσωματωμάτων COS-netrin και COS-En-2 κυττάρων (Ν). In situ υβριδοποίηση του συγκεκριμένου ιστοτεμαχίου μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας για την ανίχνευση των TAG-1 θετικών κυττάρων του ΟΕΜΜ. Τα κύτταρα του ΟΕΜΜ έχουν παρεκκλίνει της φυσιολογικής τους πορείας και έχουν εισέλθει στο συσσωμάτωμα των κυττάρων που εκφράζουν νετρίνη (βέλος στην Ξ και σε μεγαλύτερη μεγέθυνση στην Ο), αλλά όχι και σε αυτό που εκφράζει En-2 (Ξ).
Κλίμακα: Α, Μ: 200μm, Γ-Ζ, Θ-Ι, Λ, Ξ-Ο: 500μm.

γραμμή. Στην αριστερή πλευρά του ιστοτεμαχίου, όπου είχε τοποθετηθεί το έκτοπο εδαφιαίο πέταλο, ανιχνεύονται κύτταρα του ΟΕΜΜ στη φυσιολογική τους θέση, αλλά και ένας πληθυσμός κυττάρων που έχει παρεκκλίνει της φυσιολογικής τους πορείας και έχει μεταναστεύσει προς το έκτοπο εδαφιαίο πέταλο (βέλος στην εικόνα 27Γ και σε μεγαλύτερη μεγέθυνση στην εικόνα 27Δ).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύεται ότι το εδαφιαίο πέταλο ασκεί μια ελκτική επίδραση στα κύτταρα του OEMM, τόσο ισχυρή ώστε η έκτοπη τοποθέτησή του να τα καθοδηγεί σε πορείες που παρεκκλίνουν της φυσιολογικής.

2.8 Επίδραση της εκκρινόμενης από το εδαφιαίο πέταλο νετρίνης στο OEMM

Από πολυάριθμες μελέτες έχει δειχθεί ότι υπάρχουν πολλές εκκρινόμενες πρωτεΐνης από το εδαφιαίο πέταλο, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ποικίλη δράση της συγκεκριμένης δομής. Μετά από τα αποτελέσματα που είχαμε, τα οποία δείχνουν ότι το εδαφιαίο πέταλο παίζει καθοδηγητικό ρόλο στην μετανάστευση των κυττάρων του OEMM, αναζητήσαμε την πιθανή πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για αυτή τη δράση του εδαφιαίου πετάλου. Μία υποψήφια ήταν η νετρίνη, η οποία, όπως έχει αποδειχθεί από παλαιότερες μελέτες, είναι υπεύθυνη τόσο για την ελκτική όσο και για την απωθητική δράση που εμφανίζει το εδαφιαίο πέταλο στην καθοδήγηση αξόνων διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών (Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1996).

Αρχικά ελέγξαμε το πρότυπο έκφρασης της νετρίνης στην περιοχή και στο αναπτυξιακό στάδιο που συντελείται η μετανάστευση των προς μελέτη κυττάρων. Με πειράματα in situ υβριδοποίησης για την ανίχνευση του mRNA της νετρίνης δείξαμε ότι σε έμβρυα ηλικίας E11.5 η νετρίνη εκφράζεται έντονα στην περιοχή του εδαφιαίου πετάλου και σε μικρότερο ποσό στην κοιλιακή ζώνη κοντά στο εδαφιαίο πέταλο (εικόνα 27E). Στην ηλικία E13.5 το πρότυπο έκφρασης παραμένει το ίδιο, όπως φαίνεται σε εγκάρσιες τομές στο επίπεδο του οπίσθιου ρομβοειδούς εγκεφάλου (εικόνα 27ΣΤ). Επιπρόσθετα, σε αυτήν ηλικία με πειράματα in situ υβριδοποίησης δείχθηκε ότι από τα μεταναστεύοντα κύτταρα του OEMM εκφράζεται το mRNA της πρωτεΐνης DCC, η οποία είναι γνωστός ελκτικός υποδοχέας της νετρίνης (τόξο στην εικόνα 27Z) (Culotti and Merz, 1998; Keino-Masu et al., 1996). Το DCC εκφράζεται επίσης από τα κύτταρα της υποκοιλιακής ζώνης και από τα κύτταρα του πυρήνα της ελαίας (εικόνα 27Z).

Σε καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 27H, μετά από 3 ημέρες *in vitro* καλλιέργειας, το DCC εκφράζεται από τα μεταναστεύοντα κύτταρα (βέλη στην εικόνα 27Θ) και η νετρίνη από το εδαφιαίο πέταλο (εικόνα 27I). Σε ιστοτεμάχια που τους είχε αφαιρεθεί μονόπλευρα το ρομβικό χείλος στην αρχή της περιόδου καλλιέργειας (εικόνα 27K) ανιχνεύονται κύτταρα του OEMM που εκφράζουν DCC μόνο στην ακέραια πλευρά του ιστοτεμαχίου (βέλος

στην εικόνα 27Λ). Όπως είχε δειχθεί σε προηγούμενα πειράματα με in situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA της TAG-1 (εικόνα 20Z), τα κύτταρα του OEMM μετά από 2 ημέρες σε καλλιέργεια έχουν ήδη διασχίσει τη μέση γραμμή, άρα εφόσον DCC θετικά κύτταρα διακρίνονται μόνο στην ακέραια πλευρά του ιστοτεμαχίου, σημαίνει ότι το συγκεκριμένο μόριο δεν εκφράζεται από τα κύτταρα που έχουν φτάσει στην αντίθετη πλευρά που της έχει αφαιρεθεί το ρομβικό χείλος.

Από το πρότυπο έκφρασης των παραπάνω πρωτεϊνών θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι τα μεταναστεύοντα κύτταρα του OEMM μπορούν να αποκρίνονται στην νετρίνη που εκκρίνεται από το εδαφιαίο πέταλο, μέσω του DCC υποδοχέα της που εκφράζουν. Για να ελέγξουμε την πιθανότητα αυτή, δημιουργήσαμε συσσωματώματα COS κυττάρων διαμολυσμένα ώστε να εκφράζουν νετρίνη, τα οποία και χρησιμοποιήσαμε ως πηγές εκκρινόμενης νετρίνης. Για να ελέγξουμε τη δραστικότητα της εκκρινόμενης νετρίνης από τα συσσωματώματα τα τοποθετήσαμε σε πηκτώματα κολλαγόνου σε μικρή απόσταση από τμήματα ρομβικού χείλους, ώστε να ελέγξουμε την ικανότητα της εκκρινόμενης νετρίνης να προσανατολίζει τους νευρίτες που εξέρχονται από το ρομβικό χείλος. Όπως φαίνεται στην εικόνα 27Μ, οι αναπτυσσόμενοι νευρίτες έλκονται από την νετρίνη που εκκρίνεται από τα συσσωμάτωμα COS κυττάρων, ενώ αντίθετα δεν έλκονται από την πρωτεΐνη En-2, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη ελέγχου στο συγκεκριμένο πείραμα. Στη συνέχεια δημιουργήσαμε καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια, από τα οποία αφαιρέσαμε το ενδογενές εδαφιαίο πέταλο, ώστε να μην υπάρχει ο ανταγωνισμός από την ενδογενή νετρίνη και τοποθετήσαμε συσσωματώματα COS κυττάρων στις θέσεις που φαίνονται στο διάγραμμα της εικόνας 27Ν. Μετά από 3 ημέρες καλλιέργειες έγιναν πειράματα in situ υβριδοποίησης για την ανίχνευση των TAG-1 θετικών κυττάρων του OEMM. Όπως φαίνεται από την εικόνα 27Ξ, στην πλευρά του ιστοτεμαχίου που είχε τοποθετηθεί το συσσωμάτωμα που εκκρίνει En-2, τα κύτταρα του OEMM έχουν μεταναστεύσει φυσιολογικά προς τη μέση γραμμή. Αντίθετα, στην πλευρά του ιστοτεμαχίου που είχαμε τοποθετήσει το συσσωμάτωμα που εκκρίνει νετρίνη τα κύτταρα του OEMM έχουν παρεκκλίνει της φυσιολογικής τους πορείας και κατευθύνθηκαν προς την έκτοπη πηγή νετρίνης. Σε μεγαλύτερη μεγέθυνση στην εικόνα 27Ο, διακρίνονται τα TAG-1 θετικά κύτταρα να έχουν πλησιάσει και εισχωρήσει στο συσσωμάτωμα των COS κυττάρων που εκκρίνουν νετρίνη.

Από τα ανωτέρω πειράματα φαίνεται ότι η νετρίνη δρα ελκτικά για τα μεταναστεύοντα κύτταρα του OEMM, τα οποία εκφράζουν τον υποδοχέα της DCC

πριν να διασχίσουν τη μέση γραμμή. Είναι λοιπόν πιθανό η ελκτική δράση του εδαφιαίου πετάλου που είχαμε παρατηρήσει στα προηγούμενα πειράματα να οφείλεται στην εκκρινόμενη νετρίνη, αφού μια πηγή έκκρισης νετρίνης είναι ικανή να μιμηθεί τα αποτελέσματα που είχαμε με την τοποθέτηση σε έκτοπη θέση τμήματος του εδαφιαίου πετάλου.

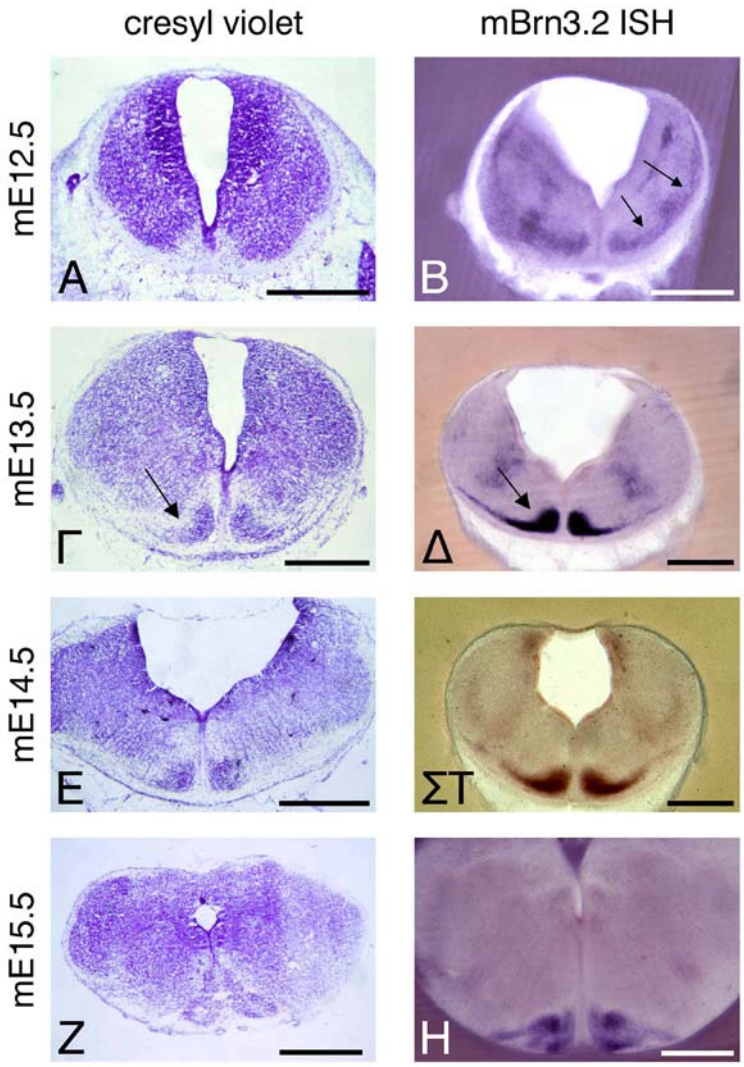
3. ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΚΑΤΩ ΕΛΑΙΑΣ (ΜΜΚΕ)

Στον αναπτυσσόμενο οπίσθιο ρομβοειδή εγκέφαλο, εκτός από το οπίσθιο επιφανειακό μεταναστευτικό μονοπάτι (ΟΕΜΜ), λαμβάνει χώρα και το μεταναστευτικό μονοπάτι της κάτω ελαίας (ΜΜΚΕ). Κύτταρα που δημιουργούνται και αυτά στην περιοχή του ρομβικού χείλους, μεταναστεύουν κοιλιακά και δημιουργούν τους πυρήνες της κάτω ελαίας εκατέρωθεν του εδαφιαίου πετάλου, χωρίς να διασχίσουν τη μέση γραμμή. Τα κύτταρα αυτά κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους, αλλά και αφού δημιουργήσουν τον πυρήνα της κάτω ελαίας εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα Brn-3.2, την έφραση του οποίου χρησιμοποιούμε ως μάρτυρα για την παρακολούθηση των συγκεκριμένων κυττάρων.

3.1 Μετανάστευση των κυττάρων του ΜΜΚΕ *in vivo*

Σε *in vivo* συνθήκες και σε εγκάρσιες τομές εμβρύων μυών διαφόρων σταδίων, μελετήσαμε τη μετανάστευση των κυττάρων του ΜΜΚΕ. Όπως έχουν δείξει παλαιότερες μελέτες τα κύτταρα του ΜΜΚΕ δημιουργούνται στο ρομβικό χείλος την εμβρυονική ημέρα 10.5-11.5 (E10.5-E11.5). Μια ημέρα αργότερα, E12.5 τα μεταναστεύοντα κύτταρα του ΜΜΚΕ βρίσκονται περιφερειακά του νευρικού σωλήνα, όπως φαίνεται από την χρώση cresyl violet (εικόνα 28Α) και από την in situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA του Brn-3.2 (βέλη στην εικόνα 28Β).

Σε ηλικία E13.5, τα κύτταρα του ΜΜΚΕ φτάνουν και συσσωρεύονται εκατέρωθεν του εδαφιαίου πετάλου, ενώ υπάρχουν ορισμένα κύτταρα που βρίσκονται ακόμα στη διαδικασία της μετανάστευσης (βέλη στις εικόνες 28Γ και 28Δ). Στην E14.5, σχεδόν όλα τα κύτταρα έχουν φτάσει κοντά στο εδαφιαίο πέταλο (εικόνα 28Ε και 28ΣΤ), ενώ στην E15.5 ο πυρήνας της κάτω ελαίας έχει δημιουργηθεί, αρχίζουν να διακρίνονται οι υποπυρήνες του (εικόνα 28Ζ) και η έκφραση του Brn-3.2 παραμένει ακόμα (εικόνα 28Η).



Εικόνα 28: **Χαρακτηρισμός του μεταναστευτικού μονοπατιού της κάτω ελαίας (ΜΜΚΕ) σε *in vivo* συνθήκες, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα την έκφραση του Brn-3.2**

Εγκάρσιες τομές οπίσθιου ρομβοειδούς εγκεφάλου μυών ηλικίας E12.5 (A-B), E13.5 (Γ-Δ), E14.5 (E-ΣΤ) και E15.5 (Z-H). Τα κυτταρικά σώματα των νευρικών κυττάρων φαίνονται με χρώση cresyl violet (A, Γ, E, Z) και το mRNA του mBrn-3.2 ανιχνεύθηκε με in situ υβριδοποίηση (B, Δ, ΣΤ και H).

A-B: Σε ηλικία E12.5, τα κύτταρα του ΜΜΚΕ έχουν αρχίσει τη μετανάστευσή τους εκφράζοντας mBrn-3.2 (βέλη στην B).

Γ-Δ: Σε ηλικία E13.5 τα κύτταρα του ΜΜΚΕ έχουν φτάσει ως την κοιλιακή πλευρά του νευρικού σωλήνα και αρχίζουν να συσσωρεύονται εκατέρωθεν του εδαφιαίου πετάλου (βέλη).

E-ΣΤ: Σε ηλικία E14.5, ο δημιουργούμενος πυρήνας της κάτω ελαίας μεγαλώνει, καθώς όλο και περισσότερα κύτταρα συσσωρεύονται δίπλα από το εδαφιαίο πέταλο.

Z-H: Σε ηλικία E15.5, η μετανάστευση των κυττάρων του ΜΜΚΕ έχει ολοκληρωθεί και αρχίζουν να δημιουργούνται οι υποπυρήνες της κάτω ελαίας (E), καθώς συνεχίζεται η έκφραση του mBrn-3.2 (H). Κλίμακα: 500μm.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, φαίνεται ότι τα κύτταρα του ΜΜΚΕ αρχίζουν τη μετανάστευσή τους την Ε12.5 και την ολοκληρώνουν την Ε15.5, οπότε και αρχίζουν να δημιουργούνται οι υποπυρήνες της κάτω ελαίας. Καθόλη τη διάρκεια της μετανάστευσή τους, αλλά και όταν φτάσουν στις τελικές τους θέσεις τα κύτταρα του ΜΜΚΕ εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα Brn-3.2, τον οποίο και χρησιμοποιήσαμε και στη συνέχεια της συγκεκριμένης μελέτης για μάρτυρα των μεταναστευόντων κυττάρων της κάτω ελαίας.

3.2 Μετανάστευση των κυττάρων του ΜΜΚΕ *in vitro*

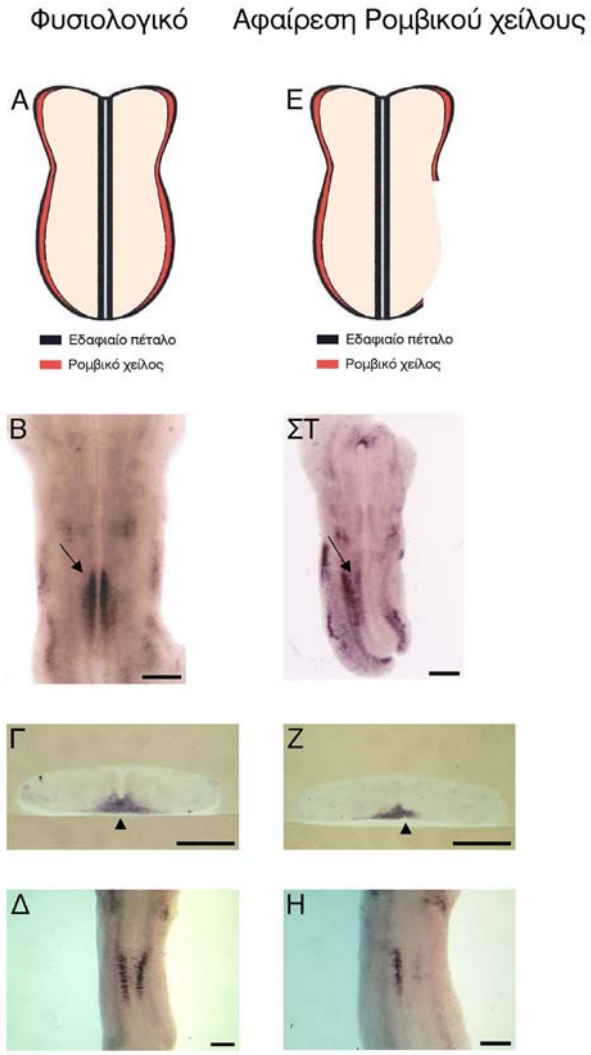
Προκειμένου να ελέγξουμε εάν ο συγκεκριμένος τύπος μετανάστευσης συντελείται και σε *in vitro* συνθήκες απομονώσαμε ιστοτεμάχια, όπως έχουμε περιγράψει παραπάνω, τα οποία και καλλιεργήσαμε *in vitro* για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

Λόγω του γεγονότος ότι τα κύτταρα του ΜΜΚΕ δημιουργούνται στην περιοχή του ρομβικού χείλους την Ε11.5, απομονώνουμε τα ιστοτεμάχια του αναπτυσσόμενου ρομβοειδούς εγκεφάλου στη συγκεκριμένη ηλικία (εικόνα 29Α) και τα αφήνουμε σε καλλιέργεια για 3-4 ημέρες προκειμένου να ολοκληρωθεί η διαδικασία της μετανάστευσης. Μετά από πειράματα in situ υβριδοποίησης όπου ανιχνεύσαμε το mRNA του Brn-3.2, φαίνεται ότι ο πυρήνας της κάτω ελαίας δημιουργείται κανονικά εκατέρωθεν του εδαφιαίου πετάλου (βέλος στην εικόνα 29Β). Σε εγκάρσιες τομές καλλιεργούμενων ιστοτεμαχίων, φαίνεται ότι τα μεταναστεύοντα κύτταρα έχουν συσσωρευθεί ακόμα και κάτω από το εδαφιαίο πέταλο (κεφαλή βέλους εικόνα 29Γ).

Τα ίδια αποτελέσματα έχουμε σε καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια από έμβρυο ορτυκιού. Τα κύτταρα του ΜΜΚΕ στα έμβρυα ορτυκιού και όρνιθας δημιουργούνται στο αναπτυξιακό στάδιο 22-24 κατά Hamburger & Hamilton (ΗΗ22-24) την εμβρυονική ημέρα 3.5-4.0 (Ε3.5-4.0). Σε αυτή την ηλικία απομονώνουμε τα ιστοτεμάχια και μετά από 4 ημέρες σε καλλιέργεια παρατηρήσαμε τη δημιουργία του πυρήνα της κάτω ελαίας στη φυσιολογική του θέση (εικόνα 29Δ).

Προκειμένου να βεβαιωθούμε ότι η συγκεκριμένη μετανάστευση συντελείται σε *in vitro* συνθήκες και να διερευνήσουμε εάν τα κύτταρα του ΜΜΚΕ δεν διασχίζουν τη μέση γραμμή, όπως και στις *in vivo* συνθήκες, δημιουργήσαμε ιστοτεμάχια που στην αρχή της περιόδου καλλιέργειας τους είχε αφαιρεθεί

μονόπλευρα το ρομβικό χείλος, δηλαδή η πηγή των κυττάρων του ΜΜΚΕ. Μετά από 4 ημέρες καλλιέργειας παρατηρήσαμε τη δημιουργία του πυρήνα της ελαίας μόνο από την ακέραια πλευρά του νευρικού σωλήνα (βέλος στην εικόνα 29ΣΤ). Σε εγκάρσιες τομές του καλλιεργούμενου ιστοτεμαχίου στο επίπεδο της δημιουργούμενης ελαίας, φαίνεται ότι τα Brn-3.2 θετικά κύτταρα έχουν σταματήσει κάτω από το εδαφιαίο



Εικόνα 29: **Χαρακτηρισμός του μεταναστευτικού μονοπατιού της κάτω ελαίας (ΜΜΚΕ) σε *in vitro* συνθήκες, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα την έκφραση του Brn-3.2**

Α: Διαγραμματική απεικόνιση φυσιολογικού ιστοτεμαχίου που απομονώθηκε από έμβρυα ηλικίας Ε11.5.

Β: In situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA του mBrn-3.2 σε ιστοτεμάχια εμβρύων μυών Ε11.5 μετά από *in vitro* καλλιέργεια 3 ημερών. Τα κύτταρα του ΜΜΚΕ, που είναι θετικά για το mBrn-3.2 συσσωρεύονται εκατέρωθεν του εδαφιαίου πετάλου και δημιουργούν τον πυρήνα της κάτω ελαίας (βέλος).

Γ: Εγκάρσια τομή ιστοτεμαχίου στο επίπεδο του πυρήνα της κάτω ελαίας. Φαίνονται mBrn-3.2 θετικά κύτταρα ακόμα και κάτω από το εδαφιαίο πέταλο (κεφαλή βέλους).

Δ: In situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA του qBrn-3.2 σε ιστοτεμάχια εμβρύων ορτυκιών σταδίου HH22-24 μετά από *in vitro* καλλιέργεια 4 ημερών. Και σε αυτήν την περίπτωση τα κύτταρα του ΜΜΚΕ έχουν μεταναστεύσει σε *in vitro* συνθήκες και έχουν δημιουργήσει τον πυρήνα της κάτω ελαίας.
Ε: Διαγραμματική απεικόνιση ιστοτεμαχίου, που απομονώθηκε από έμβρυα ηλικίας Ε11.5 και υπέστη μονόπλευρη αφαίρεση του ρομβικού χείλους στην αρχή της περιόδου καλλιέργειας.
ΣΤ: In situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA του mBrn-3.2 σε ιστοτεμάχια με μονόπλευρη αφαίρεση του ρομβικού χείλους μετά από 4 ημέρες σε καλλιέργεια. Ο πυρήνας της κάτω ελαίας έχει δημιουργηθεί μόνο από την ακέραια πλευρά του ιστοτεμαχίου (βέλος).
Ζ: Εγκάρσια τομή ιστοτεμαχίου στο επίπεδο του πυρήνα της κάτω ελαίας. Φαίνονται mBrn-3.2 θετικά κύτταρα μόνο από την ακέραια πλευρά τα οποία έχουν σταματήσει ακριβώς κάτω από το εδαφιαίο πέταλο (κεφαλή βέλους).
Η: In situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA του qBrn-3.2 σε ιστοτεμάχια εμβρύων ορτυκιών σταδίου HH22-24, τα οποία υπέστησαν μονόπλευρη αφαίρεση του ρομβικού χείλους και παρέμειναν σε καλλιέργεια 4 ημέρες. Και σε αυτήν την περίπτωση πυρήνας της κάτω ελαίας έχει δημιουργηθεί μόνο στην ακέραια πλευρά του ιστοτεμαχίου. Κλίμακα: 500μm.

πέταλο και δεν έχουν συνεχίσει την πορεία τους (κεφαλή βέλους στην εικόνα 29Ζ). Όσες ημέρες και να αφήναμε το ιστοτεμάχιο σε καλλιέργεια τα κύτταρα του ΜΜΚΕ δεν συνέχιζαν τη μετανάστευσή τους στην αντίθετη πλευρά του νευρικού σωλήνα.

Σε καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια από έμβρυα ορτυκιού παρατηρήσαμε ότι και σε αυτήν την περίπτωση, όταν γίνεται μονόπλευρη αφαίρεση του ρομβικού χείλους στην έναρξη της καλλιέργειας, ο πυρήνας της κάτω ελαίας δημιουργείται κανονικά μόνο στην ακέραια πλευρά του ιστοτεμαχίου (εικόνα 29Η).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι τα κύτταρα του ΜΜΚΕ είναι σε θέση να μεταναστεύουν κάτω από τις συγκεκριμένες *in vitro* συνθήκες και η χρονική διάρκεια της μετανάστευσής τους είναι σχεδόν όμοια με αυτή των *in vivo* συνθηκών. Σε 3-4 ημέρες από την έναρξη της καλλιέργειας, δηλαδή στην αντίστοιχη Ε14.5-15.5 στις *in vivo* συνθήκες, ο πυρήνας της κάτω ελαίας έχει δημιουργηθεί και τα κύτταρα δε συνεχίζουν τη μετανάστευσή τους όσες μέρες και να παραμείνουν σε καλλιέργεια.

3.3 Εσωτερική μοίρα των κυττάρων και παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος που εμπλέκονται στη δημιουργία του πυρήνα της κάτω ελαίας

Στην προσπάθειά μας να διερευνήσουμε το κατά πόσο η δημιουργία της ελαίας στη συγκεκριμένη θέση του αναπτυσσόμενου ρομβοειδούς εγκεφάλου είναι

αποτέλεσμα της εσωτερικής μοίρας των κυττάρων, που δημιουργούνται στο ρομβικό χείλος τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή, και το κατά πόσο το περιβάλλον, στο οποίο συντελείται η μετανάστευση, επηρεάζει τη τελική διαφοροποίηση των κυττάρων κάναμε πειράματα μεταμοσχεύσεων ρομβικού χείλους. Συγκεκριμένα, δοκιμάσαμε να μεταμοσχεύσουμε τμήματα του ρομβικού χείλους, τα κύτταρα του οποίου θα δώσουν τον πυρήνα της κάτω ελαίας, από τη φυσιολογική τους θέση στο επίπεδο του 8ου ρομβομερούς σε πιο πρόσθια θέση (ρομβομερές 2, 3) και σε πιο οπίσθια (στο νωτιαίο μυελό). Η υπόθεση μας ήταν ότι εάν τα κύτταρα έχουν την εσωτερική μοίρα να δημιουργήσουν το συγκεκριμένο πυρήνα θα τον δημιουργήσουν σε οποιοδήποτε περιβάλλον και αν βρεθούν, ενώ αν στη διαφοροποίηση των κυττάρων εμπλέκονται και παράγοντες του περιβάλλοντος που συντελείται η μετανάστευση, τότε, σε περιβάλλον που λείπουν αυτοί οι παράγοντες δε θα δημιουργηθεί ο πυρήνας της κάτω ελαίας. Για να διαλευκανθούν αυτά τα ερωτήματα κάναμε πειράματα μεταμοσχεύσεων χρησιμοποιώντας το σύστημα της χίμαιρας ορτυκιού-όρνιθας, αλλά και πειράματα μεταμοσχεύσεων ρομβικού χείλους σε μύες.

3.3.1 Μεταμοσχεύσεις τύπου Ι

Αρχικά κάναμε ομοτυπικές και ισοχρονικές μεταμοσχεύσεις, δηλαδή αφαιρέσαμε το ρομβικό χείλος του 8ου ρομβομερούς από έμβρυο ορτυκιού σε αναπτυξιακό στάδιο HH23-24 και το τοποθετήσαμε στη θέση του 8ου ρομβομερούς εμβρύου όρνιθας του ίδιου αναπτυξιακού σταδίου (εικόνα 30Α). Αφήσαμε το ιστοτεμάχιο σε καλλιέργεια για 4 ημέρες, ώστε να ολοκληρωθεί η μετανάστευση και στη συνέχεια με ανοσοϊστοχημεία ανιχνεύσαμε έναν ειδικό επίτοπο των κυττάρων του ορτυκίσιου ιστού, οπότε με αυτόν τον τρόπο μπορούμε να παρατηρήσουμε την μεταναστευτική πορεία των κυττάρων του ορτυκιού μέσα στον ιστό της όρνιθας. Είδαμε ότι κάτω από αυτές τις συνθήκες τα κύτταρα του ρομβικού χείλους του ορτυκιού μεταναστεύουν κανονικά στον ιστό της όρνιθας και συσσωρεύονται δίπλα από τη μέση γραμμή (η διακεκομμένη γραμμή στην εικόνα 30Β δείχνει τη μέση γραμμή και το βέλος τα ορτυκίσια κύτταρα, που έχουν συσσωρευθεί δίπλα της), όπως και τα κύτταρα του ενδογενούς πυρήνα της κάτω ελαίας. Με in situ υβριδοποίηση, παράλληλα με QCPN ανοσοϊστοχημεία, παρατηρήσαμε ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα ορτυκιού, που συσσωρεύτηκαν δίπλα από το εδαφιαίο πέταλο, εκφράζουν και τον ειδικό μάρτυρα για τα κύτταρα της κάτω ελαίας qBrn-3.2 (εικόνα 30Γ). Φαίνεται δηλαδή ότι κάτω από τις συγκεκριμένες *in vitro* συνθήκες τα κύτταρα του ιστού δότη

μπορούν να μεταναστεύουν και να δημιουργούν τον πυρήνα της κάτω ελαίας σε αυτού του τύπου τις ομοτυπικές και ισοχρονικές μεταμοσχεύσεις.

3.3.2 Μεταμοσχεύσεις τύπου ΙΙ

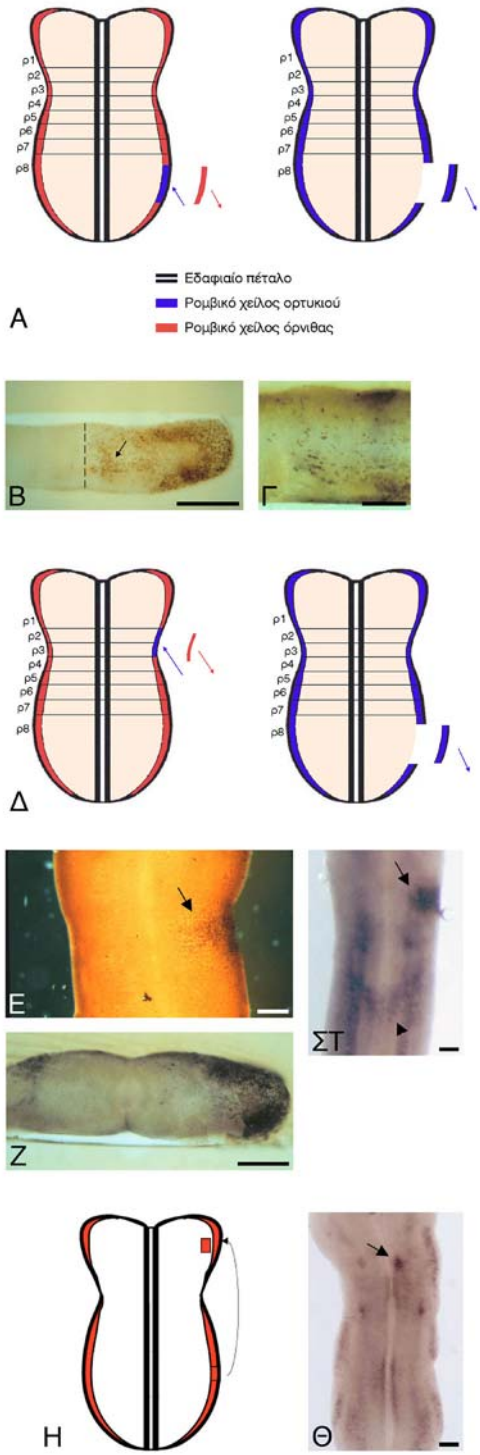
Όταν μεταμοσχέυσαμε τμήματα από το ρομβικό χείλος του 8ου ρομβομερούς ορτυκίου από την φυσιολογική τους θέση σε πιο πρόσθια περιοχή στο ρομβομερές 2/3 σε ιστό όρνιθας (εικόνα 30Δ), μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση με το αντίσωμα QCPN παρατηρήσαμε ότι τα ορτυκίσια κύτταρα δεν έχουν μεταναστεύσει σε μεγάλη απόσταση μέσα στον ιστό-δέκτη (βέλος στην εικόνα 30Ε). Κάνοντας in situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA του qBrn-3.2 παράλληλα με την ανοσοϊστοχημεία με QCPN αντίσωμα, είδαμε ότι στο σημείο του μοσχεύματος κοντά στη μέση γραμμή δεν έχουν φτάσει κύτταρα θετικά για qBrn-3.2 ή για QCPN (βέλος στην εικόνες 30ΣΤ), παρόλο που το μόσχευμα διακρίνεται στα δεξιά του ιστοτεμαχίου. Επίσης, διακρίνεται ο ενδογενής πυρήνας της ελαίας στο επίπεδο του 8ου ρομβομερούς (κεφαλή βέλους στην εικόνα 30ΣΤ). Επιπλέον, σε εγκάρσια τομή στο επίπεδο του 2/3ου ρομβομερούς του ιστού-δέκτη (εικόνα 30Ζ), διακρίνονται τα κύτταρα του ιστού-δότη στα δεξιά της τομής, βαμμένα με QCPN και qBrn-3.2, τα οποία όμως δεν έχουν μεταναστεύσει ως τη φυσιολογική θέση που θα έπρεπε να έχουν κοντά στη μέση γραμμή.

Αντίθετα, όταν κάναμε τον αντίστοιχο τύπο μεταμοσχεύσεων σε ιστό μυών (εικόνα 30Η), παρατηρήσαμε ότι τα κύτταρα μεταναστεύουν κανονικά και συσσωρεύονται δίπλα από τα εδαφιαίο πέταλο δημιουργώντας τον πυρήνα της κάτω ελαίας σε έκτοπη θέση (βέλος στην εικόνα 30Θ), όπως ανιχνεύεται από την έκφραση του ειδικού μάρτυρα mBrn-3.2.

Από τα παραπάνω πειράματα φαίνεται ότι υπάρχει διαφορά στη δημιουργία του πυρήνα της ελαίας σε ιστό όρνιθας και μυών, αφού στην πρώτη περίπτωση η κάτω ελαία δεν δημιουργείται σε πιο πρόσθια από τη φυσιολογική της θέση, ενώ στη δεύτερη περίπτωση δημιουργείται κανονικά.

3.3.3 Μεταμοσχεύσεις τύπου ΙΙΙ

Ακολούθως, έγιναν μεταμοσχεύσεις ρομβικού χείλους από το 8ο ρομβομερές ιστοτεμαχίου που απομονώθηκε από ορτύκι σε πιο οπίσθια θέση στο νωτιαίο μυελό όρνιθας (εικόνα 31Α). Με πειράματα in situ υβριδοποίησης για την ανίχνευση του mRNA του qBrn-3.2 παρατηρήσαμε ότι από την πλευρά που έγινε η μεταμόσχευση



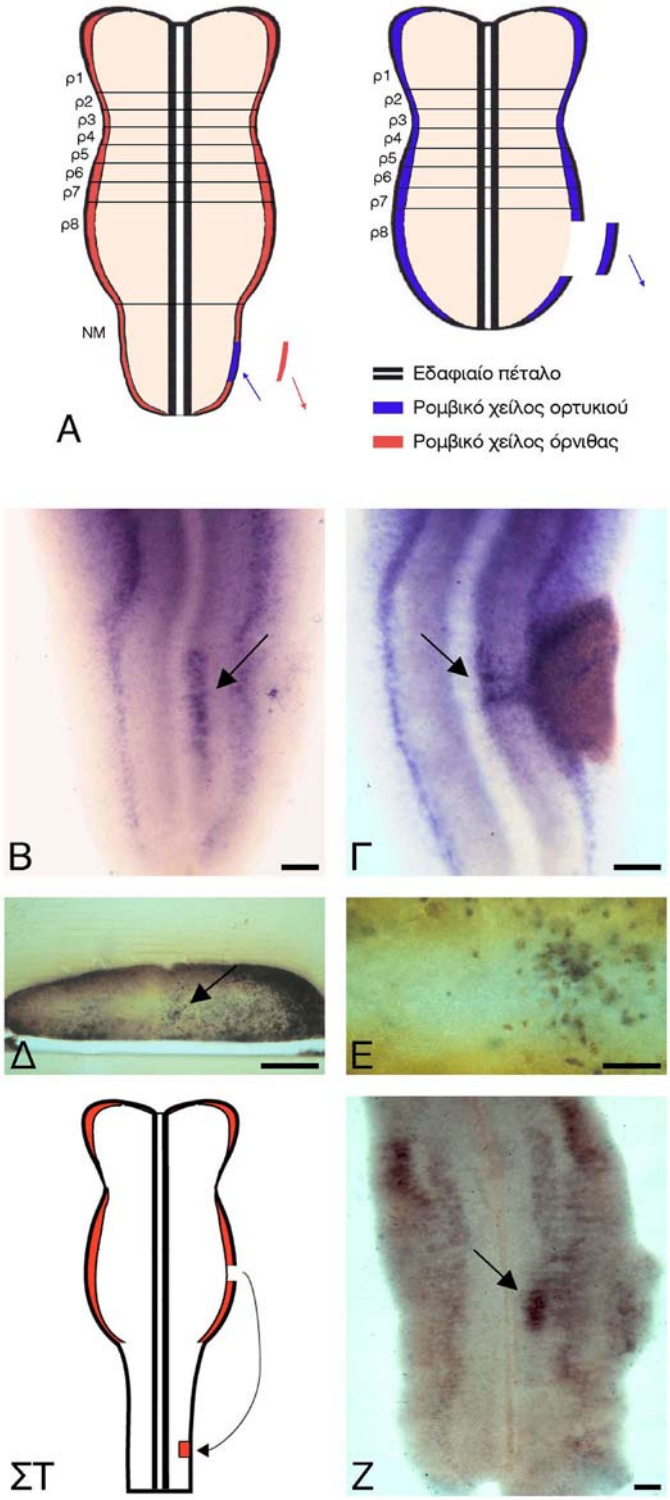
Εικόνα 30: **Μεταμοσχεύσεις τύπου Ι και ΙΙ**

Α-Γ: Μεταμοσχεύσεις τύπου Ι σε χίμαιρες όρνιθας-ορτυκιού.

Α: Σχηματική απεικόνιση της μεταμόσχευσης τύπου Ι. Τμήμα του ρομβικού χείλους από το 8ο ρομβομερές (ρ8) ορτυκιού μεταμοσχεύθηκε στο επίπεδο του ρ8 σε ιστό όρνιθας.

Β-Γ: Εγκάρσιες τομές χιμαιρικού ιστοτεμαχίου μετά από 4 ημέρες *in vitro* καλλιέργειας και ανοσοϊστοχημεία για την ανίχνευση των ορτυκίσιων κυττάρων στον ιστό δεκτή της όρνιθας. Διακρίνονται ορτυκίσια κύτταρα (βέλος στην Β), τα οποία έχουν συσσωρευθεί δίπλα από τη μέση γραμμή (διακεκομμένη γραμμή στην Β). Με in situ υβρίδοποίηση για το qBrn-3.2 διαπιστώνεται ότι τα συγκεκριμένα ορτυκίσια κύτταρα (καφέ χρώση), που συσσωρεύονται δίπλα από τη μέση γραμμή εκφράζουν και αυτόν τον ειδικό μάρτυρα για την κάτω ελαία (μπλε χρώση στην Γ).
Δ-Ζ: Μεταμοσχεύσεις τύπου ΙΙ σε χίμαιρες όρνιθας-ορτυκιού.
Δ: Σχηματική απεικόνιση της μεταμόσχευσης τύπου ΙΙ. Τμήμα του ρομβικού χείλους από το ρ8 ορτυκιού μεταμοσχεύθηκε στο επίπεδο του ρ2/3 σε ιστό όρνιθας.
Ε: Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των ορτυκίσιων κυττάρων στον ιστό της όρνιθας σε ιστοτεμάχια που έμειναν σε καλλιέργεια 4 ημέρες. Τα μεταμοσχευμένα καφέ κύτταρα στην δεξιά πλευρά του ιστοτεμαχίου έχουν μεταναστεύσει μικρή απόσταση στο ιστό-δέκτη και δεν έχουν φτάσει στη μέση γραμμή.
ΣΤ: Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των ορτυκίσιων κυττάρων στον ιστό της όρνιθας σε ιστοτεμάχια που έμειναν σε καλλιέργεια 4 ημέρες και παράλληλη in situ υβριδοποίηση για Brn-3.2. Το βέλος δείχνει το ορτυκίσιο μόσχευμα (καφέ χρώση) και η κεφαλή βέλους τον ενδογενή πυρήνα της κάτω ελαίας (μπλε χρώση). Στο επίπεδο του ρ2/3 που έγινε το μόσχευμα δεν έχει δημιουργηθεί έκτοπος πυρήνας ελαίας.
Ζ: Εγκάρσια τομή στο επίπεδο του ρ2/3 του ιστοτεμαχίου που φαίνεται στην ΣΤ. Τα ορτυκίσια κύτταρα στα δεξιά της τομής δεν έχουν φτάσει στη μέση γραμμή και δεν έχουν δημιουργήσει τον πυρήνα της κάτω ελαίας.
Η-Θ: Μεταμοσχεύσεις τύπου ΙΙ σε μύες.
Η: Σχηματική απεικόνιση μεταμοσχεύσεων τύπου ΙΙ σε μύες. Τμήμα του ρομβικού χείλους από το ρ8 μεταμοσχεύεται στο ρ2/3.
Θ: In situ υβριδοποίηση σε ιστοτεμάχια που έμειναν σε καλλιέργεια 3 ημέρες. Στο ύψος του ρ2/3 έχει δημιουργηθεί έκτοπος πυρήνας της ελαίας (βέλος) από κύτταρα του ρ8 που μετανάστευσαν από το μεταμοσχευμένο ρομβικό χείλος, που τοποθετήθηκε σε αυτό το σημείο. Κλίμακα: 250μm.

έχει δημιουργηθεί ο επιμήκης πυρήνας της ελαίας (βέλος στην εικόνα 31Β). Κάνοντας παράλληλα ανοσοϊστοχημεία για το QCPN φαίνεται ότι το σημείο που έχει δημιουργηθεί η ελαία συμπίπτει με το σημείο που έγινε η μεταμόσχευση (βέλος στην εικόνα 31Γ). Σε εγκάρσιες τομές του ιστοτεμαχίου στο σημείο που έχει φτιαχτεί η έκτοπη ελαία, διακρίνονται κύτταρα που έχουν προέλθει από ιστό ορτυκιού (καφέ χρώση της ανοσοϊστοχημείας) και παράλληλα εκφράζουν το qBrn-3.2 (μπλε χρώση της in situ υβριδοποίησης) (βέλος στην εικόνα 31Δ και σε μεγαλύτερη μεγέθυνση 31Ε).



Εικόνα 31: **Μεταμοσχεύσεις τύπου ΙΙΙ**

Α-Ε: Μεταμοσχεύσεις τύπου ΙΙΙ σε χίμαιρες όρνιθας-ορτυκιού.

Α: Σχηματική απεικόνιση της μεταμόσχευσης τύπου ΙΙΙ. Τμήμα του ρομβικού χείλους από το ρ8 ορτυκιού μεταμοσχεύθηκε στο επίπεδο του νωτιαίου μυελού σε ιστό όρνιθας.

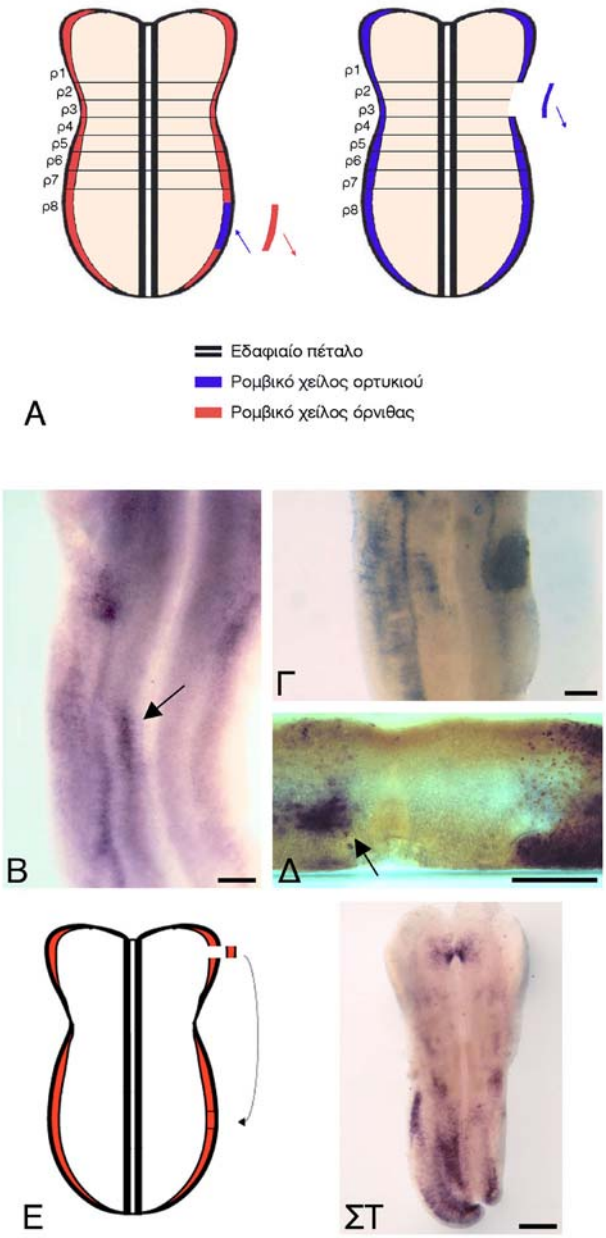
Β: In situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του qBrn-3.2 σε ιστοτεμάχια μετά από 4 ημέρες σε καλλιέργεια. Διακρίνεται ο έκτοπος πυρήνας της ελαίας που έχει δημιουργηθεί από την πλευρά που έγινε η μεταμόσχευση (βέλος).
Γ: In situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του qBrn-3.2 και ανοσοϊστοχημεία για την ανίχνευση των ορτυκίσιων κυττάρων σε ιστοτεμάχια μετά από 4 ημέρες σε καλλιέργεια. Στο σημείο του μοσχεύματος έχει δημιουργηθεί ο έκτοπος πυρήνας της ελαίας (βέλος).
Δ-Ε: Εγκάρσιες τομές χιμαιρικού ιστοτεμαχίου, στα οποία διακρίνονται τα ορτυκίσια κύτταρα, που εκφράζουν qBrn-3.2, συσσωρευμένα δίπλα στη μέση γραμμή (βέλος στην Δ).
ΣΤ-Ζ: Μεταμοσχεύσεις τύπου ΙΙΙ σε μύες.
ΣΤ: Σχηματική απεικόνιση μεταμοσχεύσεων τύπου ΙΙΙ σε μύες. Τμήμα του ρομβικού χείλους από το ρ8 μεταμοσχεύεται στο επίπεδο του νωτιαίου μυελού.
Ζ: In situ υβριδοποίηση σε ιστοτεμάχια που έμειναν σε καλλιέργεια 3 ημέρες. Στο ύψος του νωτιαίου μυελού έχει δημιουργηθεί έκτοπος πυρήνας της ελαίας (βέλος) από Brn3.2 θετικά κύτταρα. Κλίμακα: Β-Δ, Ζ: 200μm, Ε: 50μm.

Σε αντίστοιχου τύπου μεταμοσχεύσεις που έγιναν σε ιστοτεμάχια μυών (εικόνα 31ΣΤ), παρατηρήσαμε με in situ υβριδοποίηση για το mBrn-3.2 ότι και σε αυτή την περίπτωση δημιουργείται έκτοπη ελαία, η οποία προέρχεται από το ρομβικό χείλος του ιστού-δότη (βέλος στην εικόνα 31Ζ).

Από τα παραπάνω πειράματα φαίνεται ότι τόσο σε ιστοτεμάχια όρνιθας, όσο και σε ιστοτεμάχια απομονωμένα από ιστό μυών το ρομβικό χείλος από τον ιστό-δότη, που είναι από ορτύκι ή μυ αντίστοιχα, μπορεί να δημιουργήσει τον πυρήνα της κάτω ελαίας σε έκτοπη θέση στον ιστό-δέκτη.

3.3.4 Μεταμοσχεύσεις τύπου IV

Τέλος, προκειμένου να ελέγξουμε εάν το περιβάλλον του 8ου ρομβομερούς είναι σε θέση να επάγει τη δημιουργία ελαίας ακόμα και σε ιστό που στη φυσιολογική του θέση δεν θα δημιουργήσει τον συγκεκριμένο πυρήνα, δημιουργήσαμε ιστοτεμάχια με μεταμοσχεύσεις ρομβικού χείλους από το ρομβομερές 2/3 ορτυκίου στο ρομβομερές 8 της όρνιθας (εικόνα 32Α). Με in situ υβριδοποίσηση για την ανίχνευση του qBrn-3.2 σε ολόκληρο το ιστοτεμάχιο φαίνεται ότι ο πυρήνας της κάτω ελαίας έχει δημιουργηθεί μόνο από την ακέραια πλευρά του ιστοτεμαχίου και όχι από τη πλευρά που έχουμε τοποθετήσει το μόσχευμα (το βέλος στην εικόνα 32Β δείχνει τον ενδογενή πυρήνα της κάτω ελαίας). Επιπρόσθετα, με ανοσοϊστοχημικό



Εικόνα 32: **Μεταμοσχεύσεις τύπου IV**

Α-Δ: Μεταμοσχεύσεις τύπου IV σε χίμαιρες όρνιθας-ορτυκιού.

Α: Σχηματική απεικόνιση της μεταμόσχευσης τύπου IV. Τμήμα του ρομβικού χείλους από το ρ2/3 ορτυκιού μεταμοσχεύθηκε στο επίπεδο του ρ8 σε ιστό όρνιθας.

Β: In situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του qBrn-3.2 σε ιστοτεμάχια μετά από 4 ημέρες σε καλλιέργεια. Διακρίνεται ο ενδογενής πυρήνας της ελαίας (βέλος), αλλά από την πλευρά της μεταμόσχευσης δεν ανιχνεύονται Brn-3.2 θετικά κύτταρα.

Γ: In situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του qBrn-3.2 και ανοσοϊστοχημεία για την ανίχνευση των ορτυκίσιων κυττάρων σε ιστοτεμάχια μετά από 4 ημέρες σε καλλιέργεια. Το μόσχευμα διακρίνεται στην δεξιά πλευρά του ιστοτεμαχίου και ο ενδογενής πυρήνας της ελαίας στην αριστερή.

Δ: Εγκάρσια τομή χιμαιρικού ιστοτεμαχίου, στο οποίο διακρίνεται η ενδογενής κάτω ελαία (βέλος) και τα ορτυκίσια κύτταρα (καφέ χρώση στα δεξιά), τα οποία δεν έχουν μεταναστεύσει σε μεγάλη απόσταση μέσα στον ιστό δέκτη.
Ε-ΣΤ: Μεταμοσχεύσεις τύπου IV σε μύες.
Ε: Σχηματική απεικόνιση μεταμοσχεύσεων τύπου IV σε μύες. Τμήμα του ρομβικού χείλους από το ρ2/3 μεταμοσχεύεται στο επίπεδο του ρ8.
ΣΤ: In situ υβριδοποίηση σε ιστοτεμάχια που έμειναν σε καλλιέργεια 3 ημέρες. Πυρήνας της κάτω ελαίας έχει δημιουργηθεί μόνο από την αριστερή, ακέραια πλευρά του ιστοτεμαχίου. Κλίμακα: 300μm.

εντοπισμό των κυττάρων που προήλθαν από το ρομβικό χείλος ορτυκιού αποδεικνύεται ότι από το σημείο που έγινε η μεταμόσχευση τους δεν έγινε μετανάστευση των κυττάρων προς τη μέση γραμμή και άρα δεν δημιουργήθηκε και πυρήνας κάτω ελαίας (εικόνα 32Γ). Όπως φαίνεται και πιο καθαρά σε εγκάρσια τομή στο επίπεδο του μοσχεύματος από την ακέραια πλευρά έχει δημιουργηθεί ο ενδογενής πυρήνας της κάτω ελαίας (βέλος στην εικόνα 32Δ), ενώ από την πλευρά του μοσχεύματος (καφέ χρώση από την ανοσοϊστοχημεία για QCPN στην εικόνα 32Δ) δεν έχουν μεταναστεύσει κύτταρα προς τη μέση γραμμή και δεν έχουν δημιουργήσει τον πυρήνα της κάτω ελαίας.

Στη συνέχεια κάναμε το ανάλογο πείραμα σε ιστοτεμάχια από μύες (εικόνα 32Ε). Με πειράματα in situ υβριδοποίησης για την ανίχνευση του mBrn-3.2 είδαμε ότι και σε αυτήν την περίπτωση ο πυρήνας της κάτω ελαίας δεν δημιουργείται από το ρομβικό χείλος των ρομβομερών 2/3 (εικόνα 32ΣΤ). Συμπερασματικά, από τα παραπάνω πειράματα φαίνεται ότι τα κύτταρα του ρομβικού χείλους των ρομβομερών 2/3 δεν είναι σε θέση να δημιουργήσουν τον πυρήνα της κάτω ελαίας ακόμα και αν τοποθετηθούν στο περιβάλλον του 8ου ρομβομερούς, όπου είναι ο φυσικός χώρος που λαμβάνει χώρα η μετανάστευση των κυττάρων της κάτω ελαίας.

3.4 Επίδραση του εδαφιαίου πετάλου στη μετανάστευση των κυττάρων του ΜΜΚΕ

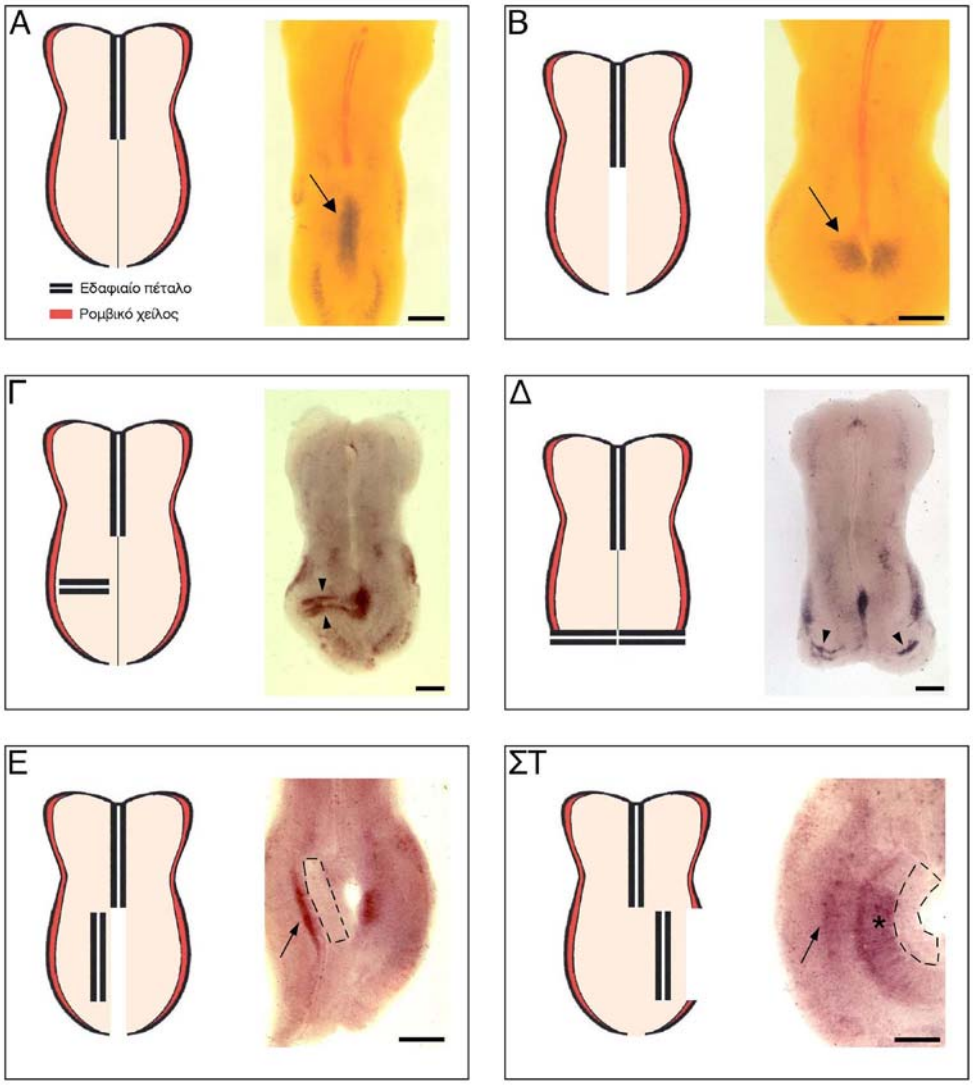
Το εδαφιαίο πέταλο έχει μια κεντρική θέση στο αναπτυσσόμενο νευρικό σωλήνα και όπως συμβαίνει στην περίπτωση της μετανάστευσης των κυττάρων του ΟΕΜΜ, θα μπορούσε να παίζει σημαντικό ρόλο και στον προσανατολισμό της μετανάστευσης των κυττάρων του ΜΜΚΕ.

Για να ελέγξουμε τον πιθανό ρόλο του εδαφιαίου πετάλου δημιουργήσαμε ιστοτεμάχια από τα οποία στην έναρξη της περιόδου καλλιέργειας αφαιρέσαμε το

ενδογενές εδαφιαίο πέταλο, όπως φαίνεται από το διάγραμμα της εικόνας 33Α. Στη συγκεκριμένη περίπτωση μετά την αφαίρεση του εδαφιαίου πετάλου φέραμε σε επαφή τα δύο τμήματα του νευρικού σωλήνα, ώστε να μην υπάρχει κενό ανάμεσά τους από την έλλειψη του εδαφιαίου πετάλου. Μετά από 4 ημέρες σε καλλιέργεια κάναμε διπλή in situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA της πρωτεΐνης F-spondin, η οποία εκφράζεται από τα κύτταρα του εδαφιαίου πετάλου, και του mRNA του Brn-3.2, που χρησιμοποιούμε ως μάρτυρα για την ταυτοποίηση των κυττάρων της κάτω ελαίας. Όπως φαίνεται στην εικόνα 33Α η αφαίρεση του εδαφιαίου πετάλου από την οπίσθια πλευρά του ιστοτεμαχίου είναι πλήρης, αφού η κόκκινη χρώση της F-spondin ανιχνεύεται μόνο στην πρόσθια πλευρά του ιστοτεμαχίου. Όσο για τον πυρήνα της κάτω ελαίας φαίνεται ότι δημιουργήθηκε με τη γνωστή επιμήκη μορφή του, που είχαμε παρατηρήσει και σε φυσιολογικά, άθικτα ιστοτεμάχια (εικόνα 29Β). Μια μικρή διαφοροποίηση παρατηρήσαμε όταν μετά την αφαίρεση του εδαφιαίου πετάλου δεν ενώναμε τις δύο πλευρές του νευρικού σωλήνα, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 33Β. Σε αυτήν την περίπτωση παρατηρήσαμε ότι ο πυρήνας της ελαίας που δημιουργήθηκε, δεν είχε την γνωστή επιμήκη διαμόρφωση, αλλά ήταν πιο σφαιρικός, είχε όμως δημιουργηθεί στη φυσιολογική του θέση δίπλα από τη μέση γραμμή.

Από τα παραπάνω πειράματα δείχθηκε ότι ακόμα και απουσία του εδαφιαίου πετάλου, τα κύτταρα του ΜΜΚΕ έχουν την δυνατότητα να μεταναστεύουν και να φτάνουν στην τελική τους θέση. Αυτό θα μπορούσε να σημαίνει είτε ότι η συγκεκριμένη δομή δεν εμπλέκεται στη διαδικασία αυτής της μετανάστευσης είτε ότι υπάρχει μία ή περισσότερες εκκρινόμενες από το εδαφιαίο πέταλο πρωτεΐνες, οι οποίες παραμένουν στην περιοχή της μέσης γραμμής, ακόμα και αφού έχει αφαιρεθεί το εδαφιαίο πέταλο.

Για να διερευνήσουμε το ποια από τις παραπάνω υποθέσεις είναι σωστή καλλιεργήσαμε ιστοτεμάχια, στα οποία είχαμε τοποθετήσει το εδαφιαίο πέταλο σε έκτοπη θέση. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 33Γ αφαιρέσαμε το ενδογενές εδαφιαίο πέταλο και το τοποθετήσαμε σε κάθετη θέση στο χώρο που γίνεται η μετανάστευση στην αρχή της περιόδου καλλιέργειας. Μετά από in situ υβριδοποίηση φαίνεται ότι κύτταρα θετικά για Brn-3.2 έχουν συσσωρευθεί εκατέρωθεν του έκτοπου εδαφιαίου πετάλου (ανάμεσα στις κεφαλές βελών στην εικόνα 33Γ). Για να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο τα συγκεκριμένα κύτταρα να



Εικόνα 33: **Επίδραση του εδαφιαίου πετάλου στη μετανάστευση των κυττάρων του μεταναστευτικού μονοπατιού της κάτω ελαίας (ΜΜΚΕ)**

Α-Β: Καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια, από τα οποία έχει αφαιρεθεί το εδαφιαίο πέταλο στην αρχή της καλλιέργειας, όπως δείχνουν τα διαγράμματα στα αριστερά. Μετά από διπλή in situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση της F-spondin (κόκκινη χρώση) και του Brn-3.2 (μπλε χρώση) φαίνεται ο πυρήνας της κάτω ελαίας σχηματισμένος στη φυσιολογική του θέση (βέλη), παρόλη την έλλειψη του εδαφιαίου πετάλου σε αυτή την περιοχή.

Γ-Δ: Καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια, στα οποία τοποθετήθηκαν τμήματα του εδαφιαίου πετάλου κάθετα στην φυσιολογική τους θέση. Μετά από in situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του Brn-3.2 φαίνεται ότι κύτταρα του ΜΜΚΕ έχουν συσσωρευτεί δίπλα από τα έκτοπα τμήματα του εδαφιαίου πετάλου (κεφαλές βελών).

Ε-ΣΤ: Καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια, στα οποία τοποθετήθηκαν τμήματα του εδαφιαίου πετάλου πιο κοντά (Ε) ή πιο μακριά (ΣΤ) από την φυσιολογική τους θέση ως προς το ρομβικό χείλος, όπως φαίνεται στα διαγράμματα αριστερά. Μετά από in situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του Brn-3.2 φαίνονται κύτταρα του ΜΜΚΕ να έχουν συσσωρευθεί δίπλα από το εδαφιαίο πέταλο όταν αυτό τοποθετήθηκε πιο κοντά

στο ρομβικό χείλος (βέλος στην Ε). Όταν το εδαφιαίο πέταλο τοποθετείται πιο μακριά από το ρομβικό χείλος, παρατηρούμε έναν μικρό πληθυσμό Brn-3.2 θετικών κυττάρων να συσσωρεύονται στην φυσιολογική τους θέση (βέλος στην ΣΤ), αλλά τα περισσότερα κύτταρα φτάνουν δίπλα από το έκτοπο εδαφιαίο πέταλο (αστερίσκος στην ΣΤ). Τα έκτοπα εδαφιαία πέταλα βρίσκονται ανάμεσα στις διακεκομμένες γραμμές. Κλίμακα: 500μm.

υπήρχαν σε αυτή τη θέση κατά την απομόνωση του εδαφιαίου πετάλου, τοποθετήσαμε τα τμήματα του εδαφιαίου πετάλου στην άκρη του ιστοτεμαχίου, αφού αφαιρέσαμε ένα μικρό τμήμα από την οπίσθια πλευρά του, ώστε το έκτοπο εδαφιαίο πέταλο να είναι κοντά την περιοχή που συμβαίνει η μετανάστευση των κυττάρων του ΜΜΚΕ (διάγραμμα της εικόνας 33Δ). Μετά από in situ υβριδοποίηση παρατηρήσαμε ότι τα Brn-3.2 κύτταρα του ΜΜΚΕ έχουν συσσωρευτεί μόνο από την επάνω πλευρά του έκτοπου εδαφιαίου πετάλου, γεγονός που αποδεικνύει ότι όντως προήλθαν από το μεταναστευτικό μονοπάτι της συγκεκριμένης περιοχής (κεφαλές βελών στην εικόνα 33Δ).

Είναι επίσης σημαντικό να παρατηρήσουμε ότι ο πυρήνας της κάτω ελαίας που έχει δημιουργηθεί στην κανονική του θέση είναι πολύ μικρότερος από τον φυσιολογικό (εικόνα 33Δ), αφού ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων που προορίζονταν για τη δημιουργία του, παρέκκλιναν της φυσιολογικής τους πορείας και συσσωρεύτηκαν δίπλα από τα έκτοπα εδαφιαία πέταλα και από τις δύο πλευρές του νευρικού σωλήνα. Από τα παραπάνω πειράματα φαίνεται ότι το εδαφιαίο πέταλο ασκεί ελκτική δράση στα κύτταρα του ΜΜΚΕ, πιθανόν μέσω ορισμένων πρωτεϊνών που εκκρίνονται από τη συγκεκριμένη δομή.

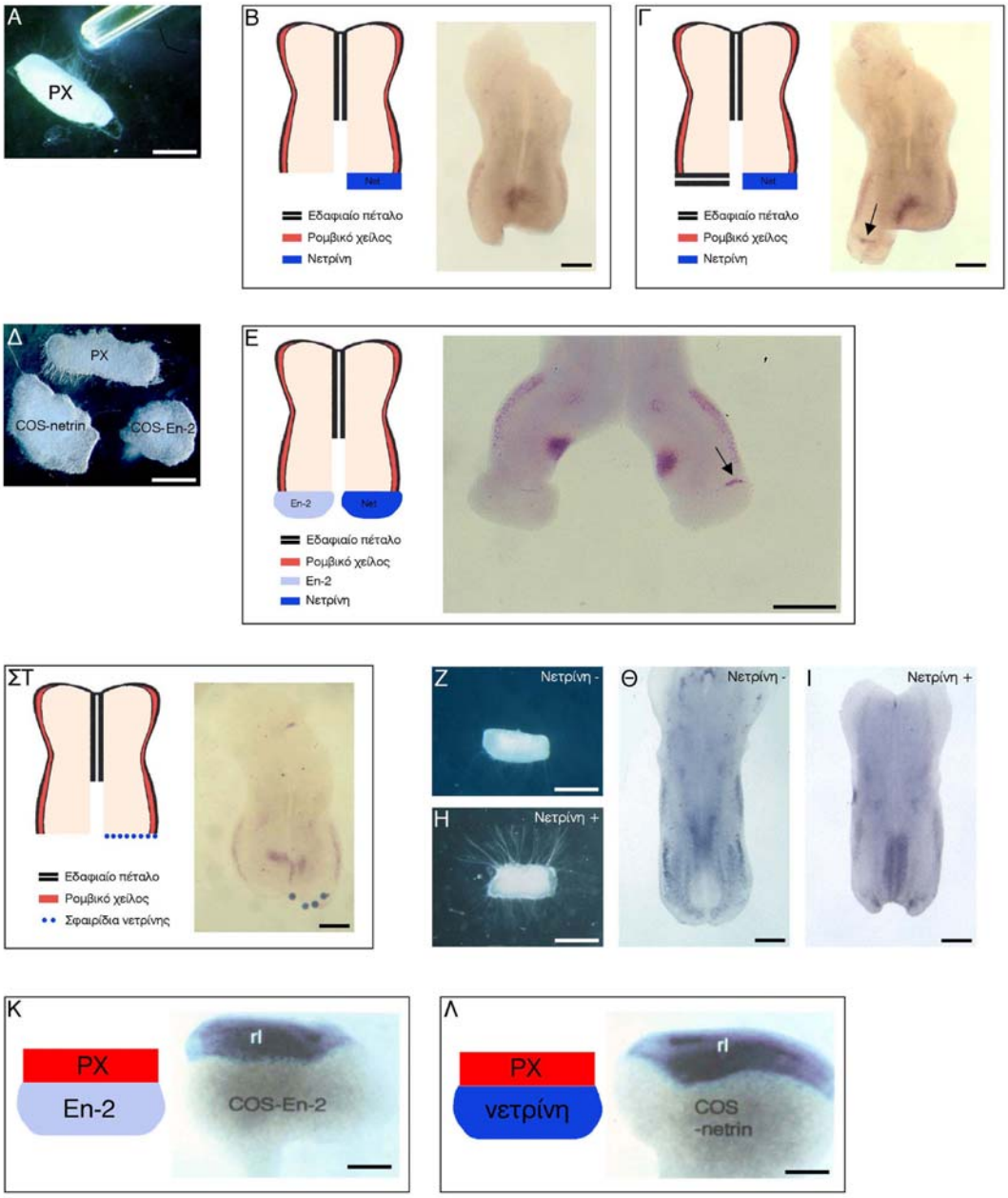
Παρατηρώντας το γεγονός ότι τα κύτταρα του ΜΜΚΕ μεταναστεύουν ως το εδαφιαίο πέταλο, αλλά δεν το διαπερνούν σκεφτήκαμε να εξετάσουμε το ενδεχόμενο αν αυτή η δομή εκτός από ελκτική δράση λειτουργεί και ως ένα σήμα σταματήματος της συγκεκριμένης μεταναστευτικής πορείας. Για να διερευνήσουμε αυτό το ερώτημα απομονώσαμε ιστοτεμάχια, στα οποία είχαμε αφαιρέσει το εδαφιαίο πέταλο από την κανονική του θέση και το είχαμε τοποθετήσει πιο κοντά στο ρομβικό χείλος, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 33Ε. Μετά από 4 ημέρες σε καλλιέργεια, με in situ υβριδοποίηση παρατηρήσαμε ότι τα Brn-3.2 θετικά κύτταρα του ΜΜΚΕ έχουν σταματήσει στη μέση της φυσιολογικής τους πορείας, έχουν συσσωρευτεί δίπλα από το έκτοπο εδαφιαίο πέταλο και δεν το έχουν διαπεράσει (βέλος στην εικόνα 33Ε). Προκειμένου να ερευνήσουμε εάν μπορούν να ακολουθήσουν μια πορεία μεγαλύτερη

από τη φυσιολογική τους, αφαιρέσαμε το ενδογενές εδαφιαίο πέταλο και το τοποθετήσαμε πιο μακρυά από τη φυσιολογική του θέση (διάγραμμα της εικόνας 33ΣΤ). Παράλληλα, αφαιρέσαμε το ρομβικό χείλος από την δεξιά πλευρά του ιστοτεμαχίου, ώστε να είμαστε βέβαιοι ότι τα κύτταρα της ελαίας που θα ανιχνεύσουμε προέρχονται μόνο από τη μία πλευρά και είναι αυτά που θα διανύσουν τη μεγαλύτερη απόσταση, ώσπου να "συναντήσουν" το έκτοπο εδαφιαίο πέταλο. Όπως διαπιστώσαμε μετά από in situ υβριδοποίηση, ένα ποσοστό Brn-3.2 θετικών κυττάρων έχουν σταματήσει στη φυσιολογική τους θέση (τόξο στην εικόνα 33ΣΤ), ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών έχει προχωρήσει και πέρα της φυσιολογικής τους πορείας και έχει σταματήσει δίπλα από το έκτοπο εδαφιαίο πέταλο (αστερίσκος στην εικόνα 33ΣΤ). Από τα παραπάνω πειράματα φαίνεται ότι το εδαφιαίο πέταλο εκτός από ελκτική δράση λειτουργεί και ως σήμα σταματήματος της πορείας των κυττάρων του ΜΜΚΕ. (Τα πειράματα της εικόνας 33Ε και 33ΣΤ έγιναν από την Dr I. de Diego)

3.5 Επίδραση της νετρίνης στη μετανάστευση των κυττάρων του ΜΜΚΕ

Όπως και στην περίπτωση των κυττάρων του ΟΕΜΜ φαίνεται ότι και τα κύτταρα του ΜΜΚΕ επηρεάζονται κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους από πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το εδαφιαίο πέταλο. Η πρώτη πρωτεΐνη που θελήσαμε να μελετήσουμε ήταν η νετρίνη, η οποία όπως έχει ήδη περιγραφεί εμπλέκεται στη καθοδήγηση της μετανάστευση των κυττάρων του ΟΕΜΜ. Δημιουργήσαμε πηγές εκκρινόμενης νετρίνης, με σκοπό να τοποθετούνται σε συγκεκριμένες θέσεις πάνω στο καλλιεργούμενο ιστοτεμάχιο και να μελετούμε εάν είναι σε θέση να έλκουν τα μεταναστεύοντα κύτταρα του ΜΜΚΕ.

Αρχικά δημιουργήσαμε διάλυμα αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως παρουσία διαλυτής νετρίνης σε συγκέντρωση 10μg/ml, το οποίο στη συνέχεια έγινε πήκτωμα και χρησιμοποιήσαμε μικρά τμήματα του για να δημιουργήσουμε πηγή εκκρινόμενης νετρίνης. Για να ελέγξουμε την βιολογική ενεργότητα της εκκρινόμενης νετρίνης από την αγαρόζη, δοκιμάζουμε την ικανότητά της να προσανατολίζει αναπτυσσόμενους άξονες από ρομβικό χείλος σε πήκτωμα κολλαγόνου. Όπως φαίνεται στην εικόνα 34Α οι άξονες που εξέρχονται από το ρομβικό χείλος προσανατολίζονται προς την πηγή έκκρισης νετρίνης από το ρύγχος που φέρει στο εσωτερικό του πήκτωμα αγαρόζης με νετρίνη. Άρα η νετρίνη που εκκρίνεται από την αγαρόζη έχει βιολογική δράση.



Εικόνα 34: **Επίδραση της πρωτεΐνης νετρίνης στη μετανάστευση των κυττάρων του μεταναστευτικού μονοπατιού της κάτω ελαίας (ΜΜΚΕ)**

Α: Καλλιέργεια τμήματος ρομβικού χείλους (PX) και τμήματος αγαρόζης που εκκρίνει νετρίνη σε πήκτωμα κολλαγόνου. Οι νευρίτες που εξέρχονται από το ρομβικό χείλος έλκονται από τη νετρίνη που εκκρίνεται από την αγαρόζη μέσα στο ρύγχος.

Β: Διαγραμματική απεικόνιση ιστοτεμαχίου με έκτοπη τοποθέτηση τμήματος αγαρόζης που εκκρίνει νετρίνη και in situ υβριδοποίηση του συγκεκριμένου ιστοτεμαχίου μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας για την ανίχνευση των Brn-3.2 θετικών κυττάρων του ΜΜΚΕ. Τα κύτταρα του ΜΜΚΕ δεν έχουν παρεκκλίνει της φυσιολογικής τους πορείας και δεν συσσωρεύθηκαν δίπλα από την έκτοπη πηγή έκκρισης νετρίνης.

Γ: Διαγραμματική απεικόνιση ιστοτεμαχίου με έκτοπη τοποθέτηση τμήματος αγαρόζης που εκκρίνει νετρίνη και έκτοπο τμήμα εδαφιαίου πετάλου. Μετά από in situ υβριδοποίηση φαίνονται κύτταρα του ΜΜΚΕ να έχουν συσσωρευθεί τόσο στη φυσιολογική τους θέση, όσο και δίπλα από το έκτοπο εδαφιαίο πέταλο (βέλος) όχι όμως και δίπλα από την πηγή εκκρινόμενης νετρίνης.
Δ: Καλλιέργεια τμήματος ρομβικού χείλους (PX) με συσσωματώματα COS κυττάρων που εκφράζουν νετρίνη (COS-netrin) ή En-2 (COS-En-2) σε πήκτωμα κολλαγόνου. Οι νευρίτες που εξέρχονται από το ρομβικό χείλος έλκονται μόνο από το COS-netrin συσσωμάτωμα κυττάρων.
Ε: Διαγραμματική απεικόνιση ιστοτεμαχίου με αφαίρεση του ενδογενούς εδαφιαίου πετάλου και έκτοπη τοποθέτηση συσσωματωμάτων COS-netrin και COS-En-2 κυττάρων και in situ υβριδοποίηση του συγκεκριμένου ιστοτεμαχίου μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας για την ανίχνευση των mBrn-3.2 θετικών κυττάρων του ΜΜΚΕ. Μόνο λίγα κύτταρα του ΜΜΚΕ έχουν παρεκκλίνει της φυσιολογικής τους πορείας και έχουν συσσωρευθεί δίπλα από το συσσωμάτωμα των κυττάρων που εκφράζουν νετρίνη (βέλος). Δεν ανιχνεύονται Brn3.2 θετικά κύτταρα δίπλα από το COS-En-2 συσσωμάτωμα.
ΣΤ: Διαγραμματική απεικόνιση ιστοτεμαχίου με αφαίρεση του ενδογενούς εδαφιαίου πετάλου και έκτοπη τοποθέτηση σφαιριδίων affigel εμποτισμένα με νετρίνη. Μετά από 3 ημέρες σε καλλιέργεια και in situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση των Brn3.2 θετικών κυττάρων του ΜΜΚΕ δεν φαίνονται κύτταρα να έχουν συσσωρευθεί δίπλα από τα σφαιρίδια που εκκρίνουν νετρίνη.
Ζ-Η: Τμήματα ρομβικού χείλους, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε πήκτωμα κολλαγόνου σε θρεπτικό υλικό απουσία (Ζ) ή παρουσία νετρίνης (Η). Φαίνεται ότι η παρουσία νετρίνης επάγει την επέκταση νευραξόνων από το ρομβικό χείλος.
Θ-Ι: Ιστοτεμάχια που καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία νετρίνης και μετά από in situ υβριδοποίηση φαίνεται ότι ο πυρήνας της ελαίας που δημιουργήθηκε παρουσία νετρίνης είναι πιο συμπυκνωμένος κοντά στη μέση γραμμή, σε σχέση με τη ελαία που δημιουργήθηκε απουσία νετρίνης.
Κ-Λ: Τμήματα του ρομβικού χείλους που καλλιεργήθηκαν σε επαφή με συσσωματώματα κυττάρων COS που εκκρίνουν En-2 (Κ) ή νετρίνη (Λ) όπως φαίνεται στα διαγράμματα στα αριστερά. Μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας και χρώση για β-γαλακτοσιδάση δεν φαίνονται κύτταρα του ρομβικού χείλους να έχουν μεταναστεύσει μέσα στα συσσωματώματα COS κυττάρων.
Κλίμακα: Α, Δ, Ζ-Η, Κ-Λ: 200μm, Β-Γ, Ε-ΣΤ, Θ-Ι: 500μm.

Ακολούθως, σε καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια, αφαιρέσαμε το εδαφιαίο πέταλο, για να μην υπάρχει ανταγωνισμός με την ενδογενή νετρίνη, και τοποθετήσαμε τμήματα αγαρόζης με νετρίνη, κάθετα στην φυσιολογική θέση του εδαφιαίου πετάλου (διάγραμμα της εικόνας 34Β). Μετά από 4 ημέρες καλλιέργειας και με πειράματα in situ υβριδοποίησης, ανιχνεύσαμε Brn-3.2 θετικά κύτταρα στη φυσιολογική θέση της ελαίας, αλλά όχι συσσωρευμένα δίπλα από την έκτοπη πηγή έκκρισης νετρίνης (εικόνα 34Β). Θα πρέπει να τονίσουμε ότι μετά από τη διαδικασία της in situ υβριδοποίησης, το τμήμα της αγαρόζης δεν είναι πια ανιχνεύσιμο, γιατί

λόγω της υψηλής θερμοκρασίας, στην οποία γίνεται η υβριδοποίηση η αγαρόζη λιώνει. Δημιουργήσαμε επίσης ιστοτεμάχια, που στη μία πλευρά τους τοποθετήσαμε έκτοπο εδαφιαίο πέταλο και στην άλλη αγαρόζη με νετρίνη (διάγραμμα της εικόνας 34Γ). Στα συγκεκριμένα ιστοτεμάχια φαίνεται ότι στην πλευρά που είχε τοποθετηθεί το εδαφιαίο πέταλο, κύττατα του ΜΜΚΕ, που εκφράζουν Brn-3.2 έχουν συσσωρευθεί δίπλα του (βέλος στην εικόνα 34Γ), ενώ στο σημείο που είχε τοποθετηθεί η αγαρόζη με τη νετρίνη δεν ανιχνεύονται Brn-3.2 θετικά κύτταρα (εικόνα 34Γ). Φαίνεται λοιπόν, ότι η νετρίνη που παράγεται με το συγκεκριμένο τρόπο δεν είναι σε θέση να προσελκύσει τα μεταναστεύοντα κύτταρα του ΜΜΚΕ.

Επιπλέον, δημιουργήσαμε συσσωματώματα κυττάρων COS διαμολυσμένα με τους ανάλογους πλασμιδιακούς φορείς, έτσι ώστε να παράγουν σε εκκρινόμενη μορφή την πρωτεΐνη νετρίνη. Ως πείραμα ελέγχου δημιουργήσαμε συσσωματώματα κυττάρων που εκκρίνουν την πρωτεΐνη En-2, η οποία δεν εμπλέκεται το συγκεκριμένο σύστημα μετανάστευσης. Σε πήκτωμα κολλαγόνου δοκιμάσαμε την βιολογική ενεργότητα της νετρίνης των COS κυττάρων (εικόνα 34Δ) και παρατηρήσαμε ότι η νετρίνη που εκκρίνεται από τα συσσωματώματα έλκει τους νευρίτες, που εξέρχονται από το τμήμα του ρομβικού χείλους, ενώ η πρωτεΐνη En-2 δεν εμφανίζει τέτοιου είδους δράση. Στη συνέχεια τοποθετήσαμε τα συσσωματώματα των COS κυττάρων σε καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 34Ε. Μετά από 4 ημέρες σε καλλιέργεια με in situ υβριδοποίηση ανιχνεύσαμε τα κύτταρα που εκφράζουν Brn-3.2 και παρατηρήσαμε ότι ένας μικρός πληθυσμός τέτοιων κυττάρων είχε συσσωρευθεί δίπλα από το συσσωμάτωμα των κυττάρων που εκφράζουν νετρίνη (τόξο στην εικόνα 34Ε) και μάλιστα κοντά στην πλάγια πλευρά του ιστοτεμαχίου, δηλαδή στην ραχιαία πλευρά του νευρικού σωλήνα. Στην πλευρά που είχαμε έκτοπη έκκριση του En-2 δεν παρατηρήθηκαν Brn-3.2 θετικά κύτταρα συσσωρευμένα δίπλα στο συσσωμάτωμα των COS κυττάρων (εικόνα 34Ε).

Στην προσπάθειά μας να δημιουργήσουμε μια άλλη πηγή εκκρινόμενης νετρίνης, χρησιμοποιήσαμε σφαιρίδια affigel. Τα συγκεκριμένα σφαιρίδια είχαν επωαστεί σε διάλυμα νετρίνης, ώστε να την προσροφήσουν και στη συνέχεια να την απελευθερώσουν στο σημείο του ιστοτεμαχίου που τοποθετήθηκαν, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 34ΣΤ, ώστε να ελεγχθεί εάν η εκκρινόμενη από αυτά νετρίνη είναι σε θέση να έλκει τα μεταναστεύοντα κύτττταρα του ΜΜΚΕ. Μετά το τέλος της περιόδου καλλιέργειας έγιναν πειράματα in situ υβριδοποίησης και δεν

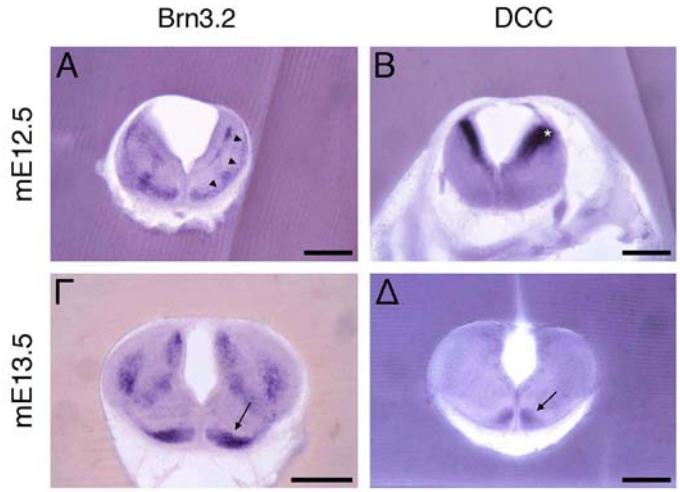
παρατηρήθηκαν Brn-3.2 θετικά κύτταρα συγκεντρωμένα δίπλα από τα σφαιρίδια που παρήγαγαν νετρίνη (εικόνα 34ΣΤ).

Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήσαμε διαλυτή νετρίνη μέσα στο θρεπτικό υλικό, στο οποίο καλλιεργήθηκαν τα ιστοτεμάχια. Αρχικά ελέγξαμε τη βιολογική δράση της διαλυτής νετρίνης σε πηκτώματα κολλαγόνου, όπου καλλιεργούνται τμήματα ρομβικού χείλους. Όταν το θρεπτικό υλικό περιείχε νετρίνη, οι νευρίτες που εξέρχονται από το καλλιεργούμενο ρομβικό χείλος είναι πολλοί και με μεγαλύτερο μήκος (εικόνα 34Η) σε σχέση με αυτούς που δημιουργούνται σε θρεπτικό υλικό απουσία νετρίνης (εικόνα 34Ζ). Την ίδια συγκέντρωση νετρίνης χρησιμοποιήσαμε και για την καλλιέργεια φυσιολογικών ιστοτεμαχίων για 4 ημέρες. Με πειράματα in situ υβριδοποίησης που έγιναν στα συγκεκριμένα ιστοτεμάχια, παρατηρήσαμε ότι ο πυρήνας της κάτω ελαίας που δημιουργήθηκε παρουσία αυξημένης διαλυτής νετρίνης στο θρεπτικό υλικό, ήταν πιο συμπυκνωμένος γύρω από το εδαφιαίο πέταλο (εικόνα 34Ι) σε σχέση με τον πυρήνα που δημιουργήθηκε στα φυσιολογικά ιστοτεμάχια (εικόνα 34Θ).

Τέλος, προκειμένου να ελέγξουμε το κατά πόσο ένα περιβάλλον με νετρίνη είναι προσπελάσιμο από τα μεταναστεύοντα κύτταρα του ΜΜΚΕ, δημιουργήσαμε συσσωματώματα κυττάρων COS που εκφράζουν νετρίνη και άλλα που εκφράζουν την πρωτεΐνη En-2, τα οποία και τοποθετήσαμε σε επαφή με τμήματα ρομβικού χείλους από το 8ο ρομβομερές μυών με μια μεταλλαγή ώστε να εκφράζουν το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης στο νευρικό τους σύστημα (ß-geo ROSA-26). Τα συγκεκριμένα ιστοτεμάχια έμειναν σε καλλιέργεια για 2-3 ημέρες και μετά ελέγξαμε με X-gal χρώση εάν τα κύτταρα του ρομβικού χείλους, τα οποία εκφράζουν το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης και είναι χρωματισμένα μπλε, έχουν εισέλθει στο συσσωμάτωμα των κυττάρων που εκφράζουν είτε νετρίνη είτε En-2. Όπως φαίνεται από τις εικόνες 34Κ και 34Λ σε καμιά περίπτωση τα κύτταρα του ρομβικού χείλους δεν έχουν αναμιχθεί με τα COS κύτταρα των συσσωματωμάτων.

Από όλα τα παραπάνω πειράματα, φαίνεται ότι μόνο ένας υποπληθυσμός των κυττάρων του ΜΜΚΕ έλκεται από την νετρίνη που εκκρίνεται από το εδαφιαίο πέταλο κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους. Επίσης φαίνεται ότι η νετρίνη επιδρά κατά τη διάρκεια της τελικής δημιουργίας του πυρήνα της κάτω ελαίας δίπλα από τη μέση γραμμή, αλλά δε φαίνεται να εμπλέκεται καθόλη τη διάρκεια της μετανάστευσης των κυττάρων του συγκεκριμένου μονοπατιού.

Παρατηρώντας το πρότυπο έκφρασης του υποδοχεά της νετρίνης DCC από τα κύτταρα του ΜΜΚΕ κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους, μπορούμε να ερμηνεύσουμε τα παραπάνω αποτελέσματα. Στην ηλικία Ε12.5 υπάρχουν αρκετά κύτταρα του συγκεκριμένου μονοπατιού που έχουν ξεκινήσει τη διαδικασία μετανάστευσής τους, όπως φαίνεται από την έκφραση του μάρτυρα Brn-3.2 στην εικόνα 35Α. Παρόλα αυτά μόνο ένας υποπληθυσμός αυτών των κυττάρων, ο οποίος βρίσκεται κοντά στο ρομβικό χείλος εκφράζει τον υποδοχέα DCC της νετρίνης (αστερίσκος στην εικόνα 35Β). Στη συγκεκριμένη ηλικία ο υποδοχέας DCC εκφράζεται και στην υποκοιλιακή ζώνη Επίσης σε ηλικία Ε13.5, ενώ αρκετά από τα κύτταρα του ΜΜΚΕ βρίσκονται ακόμα σε φάση μετανάστευσης (εικόνα 35Γ), μόνο τα κύτταρα που έχουν φτάσει κοντά στη μέση γραμμή εκφράζουν DCC (βέλος στην εικόνα 35Δ). Φαίνεται δηλαδή ότι τα κύτταρα του ΜΜΚΕ εκφράζουν τον υποδοχέα της νετρίνης και άρα εμφανίζουν απόκριση στη νετρίνη μόνο στην αρχή και στο τέλος της μεταναστευτικής τους πορείας και όχι κατά τη διάρκειά της.



Εικόνα 35: **Έκφραση του υποδοχέα της νετρίνης DCC από τα κύτταρα του μεταναστευτικού μονοπατιού της κάτω ελαίας**
In situ υβριδοποίηση σε εγκάρσιες τομές οπίσθιου ρομβοειδούς εγκαφάλου για την ανίχνευση του υποδοχέα της νετρίνης DCC σε σύγκριση με την έκφραση του mBrn-3.2 από τα κύτταρα του ΜΜΚΕ.
Α-Β: Στην ηλικία Ε12.5, ενώ τα κύτταρα του ΜΜΚΕ έχουν προχωρήσει στη μετανάστευσή τους (κεφαλές βελών στην Α), το DCC εκφράζεται μόνο από τα κύτταρα που βρίσκονται κοντά στο ρομβικό χείλος (αστερίσκος στην Β).
Γ-Δ: Στην ηλικία Ε13.5, τα κύτταρα του ΜΜΚΕ έχουν αρχίσει να συσσωρεύονται δίπλα από το εδαφιαίο πέταλο (βέλος στην Γ), αλλά μόνο όσα βρίσκονται κοντά στη μέση γραμμή, έχουν δηλαδή τελειώσει τη μεταναστευτική τους πορεία, εκφράζουν το DCC (βέλος στη Δ). Κλίμακα: 500μm.

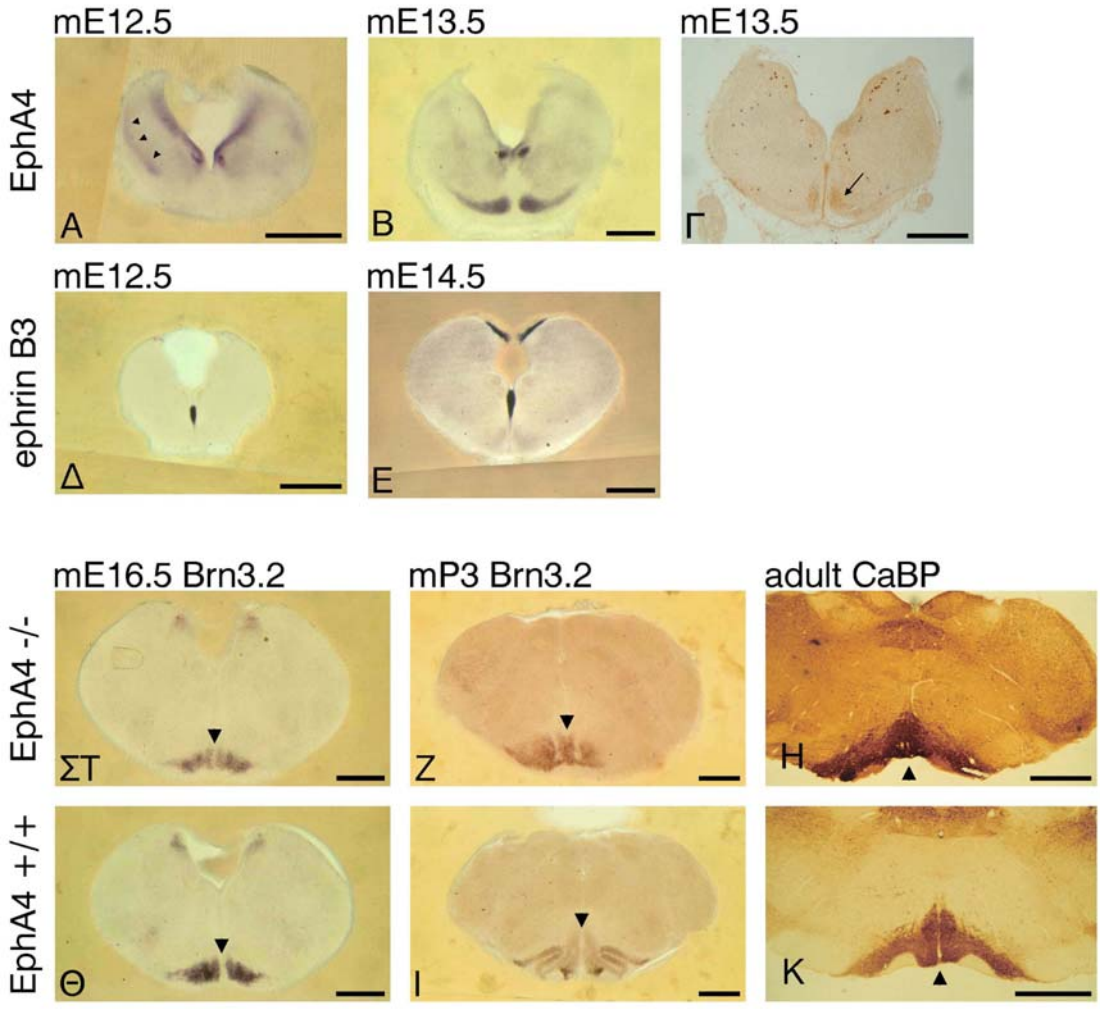
3.6 Έκφραση μορίων της οικογένειας ephrin/Eph και επίδρασή τους στη μετανάστευση των κυττάρων του ΜΜΚΕ

Στην προσπάθειά μας να βρούμε άλλα μόρια που πιθανόν να εμπλέκονται στην μετανάστευση των κυττάρων του ΜΜΚΕ, μελετήσαμε το πρότυπο έκφρασης ορισμένων μελών της οικογένειας μορίων ephrin/Eph. Τα συγκεκριμένα μόρια εμπλέκονται τόσο σε περιπτώσεις προσανατολισμού αναπτυσσόμενων νευραξόνων όσο και στη μετανάστευση ορισμένων κυτταρικών πληθυσμών.

Αρχικά, κάναμε πειράματα in situ υβριδοποίησης για την ανίχνευση του mRNA της EphA4 στην ηλικία Ε12.5, που έχει αρχίσει η μετανάστευση των κυττάρων του ΜΜΚΕ. Αυτό που παρατηρήσαμε ήταν ότι τα μεταναστεύοντα κύτταρα εκφράζουν το mRNA της συγκεκριμένης πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους (κεφαλές βελών στην εικόνα 36Α). Μία ημέρα αργότερα, σε ηλικία Ε13.5, φαίνονται και πάλι τα μεταναστεύοντα κύτταρα του ΜΜΚΕ να εκφράζουν το mRNA της EphA4 (εικόνα 36Β). Με πειράματα ανοσοϊστοχημείας ανιχνεύσαμε και την πρωτεΐνη EphA4, να εκφράζεται από τα μεταναστεύοντα κύτταρα της ελαίας (εικόνα 36Γ).

Ο υποδοχέας EphA4 έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με διάφορους προσδέτες (ligands), ανάμεσά τους είναι η ephrin B2 και ephrin B3. Μετά από πειράματα in situ υβριδοποίησης για τα συγκεκριμένα μόρια βρήκαμε ότι τόσο μόνο η ephrin B3 εκφράζονται από τα κύτταρα του εδαφιαίου πετάλου κατά τη διάρκεια της μετανάστευσης των κυττάρων του ΜΜΚΕ. Όπως φαίνεται και στις εικόνες 36Δ και 36Ε η ephrin B3 ανιχνεύεται στο εδαφιαίο πέταλο σε εγκάρσιες τομές οπίσθιου ρομβοειδούς εγκεφάλου σε ηλικίες Ε12.5 και Ε14.5. Στην ηλικία Ε14.5 μάλιστα υπάρχει έκφραση της ephrin B3 και από τα κύτταρα του οροφιαίου πετάλου. Αντίθετα, η ephrin B2 δεν εκφράζεται από κανένα κυτταρικό πληθυσμό σε αυτήν την ηλικία. Ελέγξαμε επίσης το πρότυπο έκφρασης της ephrinB1, που δεν συνδέεται βέβαια με την EphA4, αλλά αλληλεπιδρά με άλλα μόρια της ίδια οικογένειας. Η έκφρασή της εντοπίζεται στα ίδια σημεία με την ephrinB3, αλλά σε πιο χαμηλό επίπεδο έκφρασης.

Παρατηρώντας το πρότυπο έκφρασης της EphA4 και των προσδετών της, θελήσαμε να ερευνήσουμε το ενδεχόμενο να εμπλέκονται και οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες στη μετανάστευση των κυττάρων του ΜΜΚΕ. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε μύες που εμφάνιζαν απώλεια δράσης του γονιδίου της EphA4 και ελέγξαμε τη σωστή ή όχι δημιουργία του πυρήνα της κάτω ελαίας στα συγκεκριμένα



Εικόνα 36: **Έκφραση των EphA4 και ephrinB3 στο μεταναστευτικό μονοπάτι της κάτω ελαίας**

Α-Γ: Έκφραση της EphA4 σε εγκάρσιες τομές οπίσθιου ρομβοειδή εγκεφάλου. Το mRNA της EphA4 εκφράζεται από τα μεταναστεύοντα κύτταρα του ΜΜΚΕ σε ηλικία Ε12.5 (κεφαλές βελών στην Α) και σε Ε13.5 (Β). Με πειράματα ανοσοϊστοχημείας ανιχνεύεται και η πρωτεΐνη EphA4 στα κύτταρα του πυρήνα της κάτω ελαίας (βέλος στην Γ).

Δ-Ε: In situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA της ephrinB3 σε εγκάρσιες τομές οπίσθιου ρομβοειδούς εγκεφάλου. Σε ηλικία Ε12.5 η ephrinB3 εκφράζεται από το εδαφιαίο πέταλο (Δ), ενώ σε ηλικία Ε14.5 ανιχνεύτεται έκφραση τόσο στο εδαφιαίο όσο και στο οροφιαίο πέταλο (Ε).

ΣΤ-Κ: Εγκάρσιες τομές οπίσθιων ρομβοειδούς εγκεφάλων από μύες που εμφανίζουν απώλεια δράσης του γονιδίου EphA4 (ΣΤ-Η) και σε αντίστοιχα αγρίου τύπου ζώα (Θ-Κ). Με in situ υβριδοποίηση για το mBrn-3.2 και ανοσοϊστοχημεία για CaBP σημαίνουμε τα κύτταρα του πυρήνα της κάτω ελαίας σε ηλικίες mE16.5 (ΣΤ, Θ), mP3 (Z, I) και σε ενήλικα άτομα (Η, Κ). Στην περιοχή της μέσης γραμμής, όπως δείχνουν οι κεφαλές βελών, στα φυσιολογικά άτομα υπάρχει ένα κενό, ενώ στα μεταλλαγμένα ζώα τα κύτταρα του πυρήνα της ελαίας δεν έχουν σταματήσει στις φυσιολογικές τους θέσεις και βρίσκονται πάνω στη μέση γραμμή.

Κλίμακα: 500μm.

ζώα. Έγιναν πειράματα in situ υβριδοποίησης με τον ειδικό μάρτυρα Brn-3.2 για τα κύτταρα της ελαίας στην ηλικία E16.5 σε ομόζυγα για το ελαττωματικό γονίδιο ζώα και σε φυσιολογικά αδέλφια τους. Όπως φάνηκε η ελαία έχει δημιουργηθεί και στις δύο περιπτώσεις, αλλά στα μεταλλαγμένα ζώα ανιχνεύονται Brn-3.2 θετικά κύτταρα, τα οποία δεν έχουν σταματήσει πριν το εδαφιαίο πέταλο, αλλά βρίσκονται πάνω στη μέση γραμμή (κεφαλή βέλους στην εικόνα 36ΣΤ). Στα φυσιολογικά ζώα ο πυρήνας της κάτω ελαίας έχει δημιουργηθεί φυσιολογικά και υπάρχει το κανονικό κενό ανάμεσα στα δύο ημισφαίρια του νευρικού σωλήνα (κεφαλή βέλους στην εικόνα 36Θ).

Σε μεγαλύτερη ηλικία, 3 ημέρες μετά τη γέννηση των μυών (mP3), εμφανίζεται και πάλι το ίδιο πρότυπο. Στα ζώα που εμφανίζουν έλλειψη του γονιδίου της EphA4, τα κύτταρα της ελαίας έχουν μεταναστεύσει και πάνω στη μέση γραμμή (κεφαλή βέλους στην εικόνα 36Z), ενώ στα φυσιολογικά ζώα έχουν σταματήσει στη φυσιολογική τους θέση (κεφαλή βέλους στην εικόνα 36I). Τέλος με ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της ειδικής πρωτεΐνης μάρτυρα CaBP για τα κύτταρα της ελαίας σε ενήλικα άτομα, παρατηρούμε ότι και σε αυτή την ηλικία τα κύτταρα της ελαίας ανιχνεύονται και πάνω από τη μέση γραμμή στα μεταλλαγμένα ζώα (κεφαλή βέλους στην εικόνα 36H), ενώ στα φυσιολογικά άτομα παρατηρείται ένα κενό στην μέση γραμμή (κεφαλή βέλους στην εικόνα 36K).

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι τα κύτταρα του ΜΜΚΕ εκφράζουν κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους τον υποδοχέα EphA4, ο οποίος φαίνεται να είναι σημαντικός για τη δημιουργία της κάτω ελαίας, αφού η έλλειψή του προκαλεί προβλήματα στη δημιουργία του πυρήνα αυτού.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Γενικά

Η περιοχή του ρομβοειδούς εγκεφάλου αποτελεί ένα σημείο του αναπτυσσόμενου νευρικού συστήματος, το οποίο παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω του ότι σε αυτήν την περιοχή λαμβάνουν χώρα αρκετά οριζόντια μεταναστευτικά μονοπάτια (Altman and Bayer, 1987a; Altman and Bayer, 1987b; Altman and Bayer, 1987c; Altman and Bayer, 1987d). Στην παρούσα εργασία εστιάσαμε το ενδιαφέρον μας σε δύο από αυτά: στο μεταναστευτικό μονοπάτι της κάτω ελαίας (ΜΜΚΕ) και στο οπίσθιο επιφανειακό μεταναστευτικό μονοπάτι (ΟΕΜΜ). Τα οριζόντια αυτά μεταναστευτικά μονοπάτια παρατηρούνται στον οπίσθιο ρομβοειδή εγκέφαλο, στο ύψος του προμήκους μυελού, και δημιουργούν αντίστοιχα τους πυρήνες της κάτω ελαίας και τον πλάγιο δικτυωτό και έξω σφηνοειδή πυρήνα (εικόνα 10).

Τα κύτταρα του ΟΕΜΜ στους μύες δημιουργούνται ραχιαία στην περιοχή του ρομβικού χείλους την εμβρυϊκή ημέρα Ε11.5-12.5 και στη συνέχεια μεταναστεύουν κοιλιακά, εντελώς επιφανειακά στο νευρικό σωλήνα, ακριβώς κάτω από την εξωτερική (pial) επιφάνεια, περνούν κάτω από το εδαφιαίο πέταλο και δημιουργούν στην απέναντι πλευρά από αυτή που γεννήθηκαν τον πλάγιο δικτυωτό και τον έξω σφηνοειδή πυρήνα (μπλε μονοπάτι στην εικόνα 10) (Altman and Bayer, 1987c; Wolfer et al., 1994). Χρειάζεται δηλαδή να διανύσουν μια πολύ μεγάλη απόσταση περικυκλώνοντας κατά κάποιο τρόπο το νευρικό σωλήνα, ώσπου να σταματήσουν στις τελικές τους θέσεις, οι οποίες βρίσκονται πολύ κοντά στο σημείο που ξεκίνησαν, αλλά ετερόπλευρα. Όπως ήταν γνωστό από παλαιότερες μελέτες (Altman and Bayer, 1987c; Wolfer et al., 1994), αλλά και όπως φάνηκε από τη δική μας δουλειά, τα κύτταρα του ΟΕΜΜ αρχίζουν να εκφράζουν το μόριο συνάφειας TAG-1 αμέσως μετά την τελευταία τους μιτωτική διαίρεση. Στη συνέχεια, καθόλη τη διάρκεια της μετανάστευσή τους συνεχίζουν να εκφράζουν TAG-1 και η έκφραση αυτή σταματά μόνο στην Ε16.0 οπότε τα κύτταρα του ΟΕΜΜ φτάνουν στις τελικές τους θέσεις και δημιουργούν τον πλάγιο δικτυωτό και έξω σφηνοειδή πυρήνα του προμήκους μυελού. Την έκφραση του συγκεκριμένου μορίου χρησιμοποιούμε ως δείκτη (marker) στην παρούσα εργασία για την ανίχνευση των κυττάρων του ΟΕΜΜ.

Τα κύτταρα του ΜΜΚΕ δημιουργούνται και αυτά ραχιαία στην περιοχή του ρομβικού χείλους την εμβρυϊκή ημέρα E10.5-11.5 στους μύες (Altman and Bayer, 1987b; Bourrat et al., 1989) και στο αναπτυξιακό στάδιο HH22-24 σε ορτύκια και όρνιθες (Ambrosiani et al., 1996; Harkmark, 1954; Tan and Le Dourin, 1991). Στη συνέχεια μεταναστεύουν κοιλιακά, σε πιο εσωτερικό σημείο από αυτό που μεταναστεύουν τα κύτταρα του ΟΕΜΜ, και σταματούν χωρίς να διασχίσουν τη μέση γραμμή εκατέρωθεν του εδαφιαίου πετάλου, δημιουργώντας τον πυρήνα της κάτω ελαίας (κόκκινο μονοπάτι στην εικόνα 10). Καθόλη τη διάρκεια της μετανάστευσής τους, αλλά και αφού φτάσουν στις τελικές τους θέσεις, τα κύτταρα του ΜΜΚΕ εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα Brn-3.2, τον οποίο και χρησιμοποιούμε στη παρούσα εργασία ως δείκτη για να ανιχνεύουμε τα κύτταρα του συγκεκριμένου μονοπατιού.

Παρόλο που τα κύτταρα και των δύο αυτών μεταναστευτικών μονοπατιών γεννιούνται στο ίδιο σημείο, την ίδια περίπου χρονική στιγμή, ακολουθούν διαφορετικές πορείες και διαφορετική μεταναστευτική συμπεριφορά ιδιαίτερα στο επίπεδο του εδαφιαίου πετάλου. Στο συγκεκριμένο σημείο, τα κύτταρα του ΟΕΜΜ περνούν κάτω από το εδαφιαίο πέταλο μέσα από τη χαλαρή δομή που εμφανίζουν οι αποφύσεις των ακτινωτών Bergmann γλοιακών κυττάρων, όταν απολήγουν στην pial επιφάνεια. Αντίθετα, τα κύτταρα του ΜΜΚΕ συσσωρεύονται δίπλα από τη μέση γραμμή, χωρίς να τη διαπερνούν πιθανόν και λόγω του μηχανικού εμποδίου που παρέχει η πολύ σφιχτή δομή των αποφύσεων των γλοιακών κυττάρων στο συγκεκριμένο σημείο.

2. *In vitro* σύστημα καλλιέργειας για τη μελέτη των δύο μεταναστευτικών μονοπατιών

Στην παρούσα μελέτη αναπτύξαμε ένα *in vitro* σύστημα καλλιέργειας, στο οποίο διατηρείται σε μεγάλο βαθμό ακέραια η δομή της ευρύτερης περιοχής του ρομβοειδούς εγκεφάλου. Συγκεκριμένα, καλλιεργήθηκαν ολόκληρα τμήματα του ρομβοειδούς εγκεφάλου τοποθετημένα με την κοιλιακή επιφάνεια σε επαφή με ειδικές μεμβράνες καλλιέργειας, οι οποίες επέπλεαν σε θρεπτικό υλικό. Με τον τρόπο αυτό τα κύτταρα και των δύο μεταναστευτικών μονοπατιών που μελετούμε, μεταναστεύουν σε ένα περιβάλλον που προσομοιάζει κατά πολύ σε αυτό που συναντάται στις *in vivo* συνθήκες. Επίσης, σε αυτού του τύπου τα καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια μπορούμε να μελετήσουμε όχι μόνο τα μόρια που δρουν με διάχυση εξ΄

αποστάσεως, όπως γίνεται στην περίπτωση των καλλιεργειών σε πηκτώματα κολλαγόνου, αλλά και μόρια που εμπλέκονται σε καθοδήγηση αξόνων ή κυττάρων εξ' επαφής. Επιπλέον, στις συγκεκριμένες συνθήκες το καλλιεργούμενο ιστοτεμάχιο μπορεί να μείνει ζωντανό για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα, που μπορεί να φτάσει και τις 8 ημέρες, ώστε τα προς μελέτη κύτταρα να προλάβουν να ολοκληρώσουν τη μεταναστευτική τους πορεία.

Σε αυτές τις *in vitro* συνθήκες τα κύτταρα και των δύο μεταναστευτικών μονοπατιών έχουν την δυνατότητα να μεταναστεύουν. Τα κύτταρα του OEMM, ανιχνεύονται στην περιοχή του ρομβικού χείλους στην E12.5. Μία ημέρα αργότερα έχουν ξεκινήσει τη μετανάστευσή τους, χωρίς όμως να έχουν φτάσει στη μέση γραμμή, την οποία φτάνουν και ξεπερνούν μετά από καλλιέργεια 2 ημερών. Στις *in vivo* συνθήκες τα κύτταρα του OEMM έχουν φτάσει στη μέση γραμμή στην ηλικία E13.5, αρά φαίνεται ότι στις *in vitro* συνθήκες καλλιέργειας η μετανάστευση των κυττάρων γίνεται λίγο πιο αργά σε σχέση με την *in vivo* κατάσταση. Αυτό το γεγονός πιθανόν οφείλεται στο ότι η διαδικασία της απομόνωσής και της τοποθέτησης του ιστοτεμαχίου στις συνθήκες καλλιέργειας δημιουργεί ένα κενό κάποιων ωρών στη φυσιολογική του αναπτυξιακή πορεία.

Επίσης, είναι αξιοσημείωτο ότι ενώ τα κύτταρα του OEMM στις *in vivo* συνθήκες 4 ημέρες μετά τη γέννησή τους στο ρομβικό χείλος (E16.0), σταματούν να εκφράζουν TAG-1 και φτάνουν στις τελικές τους θέσεις, δημιουργώντας τους πυρήνες που πρέπει, στην *in vitro* κατάσταση τα συγκεκριμένα κύτταρα αν και μεταναστεύουν κανονικά τις πρώτες 3 ημέρες της καλλιέργειας, στη συνέχεια δεν σταματούν να εκφράζουν TAG-1 και δεν δημιουργούν τους τελικούς πυρήνες, ακόμα και αν παραμείνουν σε καλλιέργεια για 7 ημέρες. Παρόλο που τα δύο αυτά γεγονότα, η παύση της έκφρασης της TAG-1 και η δημιουργία των πυρήνων, φαίνονται αλληλένδετα δεν μπορούμε με τα συγκεκριμένα πειράματα να διακρίνουμε ποιό από τα δύο γεγονότα είναι αποτέλεσμα του άλλου.

Ωστόσο, η αδυναμία των κυττάρων του OEMM να ολοκληρώσουν τη μεταναστευτική τους πορεία *in vitro* πιθανόν να οφείλεται στην έλλειψη ορισμένων παραγόντων από το *in vitro* σύστημα καλλιέργειας. Λόγω της απομόνωσης που υφίσταται το ιστοτεμάχιο πριν μπει σε καλλιέργεια, του αφαιρούνται όλες οι μήνιγγες, οι οποίες είναι γνωστό ότι εκκρίνουν τις ουσίες του εξωκυττάριου χώρου, που περιβάλλουν το νευρικό σωλήνα (Sievers et al., 1994). Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, η έλλειψη των μηνίγγων προκαλεί προβλήματα στην σωστή δημιουργία των

απολήξεων των ακτινωτών γλοιακών κυττάρων στο φλοιό της παρεγκεφαλίδας (Graus-Porta et al., 2001). Ως αποτέλεσμα της έλλειψης των μηνίγγων και των ανωμαλιών στις γλοιακές ίνες στα ζώα εμφανίζονται προβλήματα στη μετανάστευση των κοκκωδών κυττάρων της παρεγκεφαλίδας και συγκεκριμένα δημιουργούνται έκτοπα συσσωματώματα κυττάρων που δεν ολοκληρώνουν ποτέ τη μετανάστευσή τους (Graus-Porta et al., 2001). Η έλλειψη των μηνίγγων και στο δικό μας σύστημα είναι ένας παράγοντας που θα μπορούσε να είναι περιοριστικός στην τοποθέτηση των μεταναστευόντων κυττάρων στις τελικές τους θέσεις.

Επιπλέον, πρέπει να τονιστεί ότι όλες οι επιδράσεις μας σε καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια έγιναν τις πρώτες 3-4 ημέρες της καλλιέργειάς τους, ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα με την *in vivo* κατάσταση, αφού μετά την 4η ημέρα καλλιέργειας, τα κύτταρα του OEMM μένουν στην ίδια κατάσταση και δεν συνεχίζουν ούτε ολοκληρώνουν τη μεταναστευτική τους πορεία.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήσαμε την έκφραση του μορίου συνάφειας TAG-1 ως δείκτη για τα κύτταρα του OEMM. Τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* συνθήκες, κάνοντας in situ υβριδοποίηση για την ανίχνευση του mRNA της TAG-1 σημάναμε τα σώματα των κυττάρων του OEMM, έτσι ώστε να μπορούμε να παρακολουθούμε την μεταναστευτική τους πορεία. Ένας ακόμα δείκτης, που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των κυττάρων του OEMM είναι η βρώμο-δεόξυ-ουριδίνη (BrdU). Ενύοντας διάλυμα BrdU στην έγκυο μητέρα, όταν τα έμβρυα βρίσκονταν σε ηλικία E11.5 ή επωάζοντας τα απομονωμένα ιστοτεμάχια με διάλυμα BrdU για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, πετυχαίνουμε την σήμανση των κυττάρων που εκείνη τη χρονική στιγμή βρίσκονταν σε μιτωτική φάση και ενσωμάτωσαν την BrdU. Άρα, με αυτό τον τρόπο σήμανσης ανιχνεύουμε μόνο έναν υποπληθυσμό κυττάρων του OEMM, σε αντίθεση με την in situ υβριδοποίηση για TAG-1, με την οποία σημαίνουμε όλα τα κύτταρα του OEMM.

Αντίθετα με τα κύτταρα του OEMM αυτά του MMKE φαίνεται να ολοκληρώνουν κανονικά τη μετανάστευσή τους σε *in vitro* συνθήκες. Σε ιστοτεμάχια που απομονώθηκαν από μύες σε ηλικία E11.5 ή από ορτύκια σε αναπτυξιακό στάδιο HH22-24, και έμειναν για 4 ημέρες σε καλλιέργεια τα κύτταρα του MMKE μετανάστευσαν κανονικά αν και πάλι, όπως και στην περίπτωση των κυττάρων του OEMM, υπήρχε μια καθυστέρηση στη μετανάστευση σε σχέση με την *in vivo* κατάσταση. Σε αυτή την περίπτωση όμως τα κύτταρα ολοκληρώνουν τη

μεταναστευτική τους πορεία και δημιουργούν τον πυρήνα της ελαίας δίπλα από τη μέση γραμμή στην πλευρά του νευρικού σωλήνα απ' όπου ξεκίνησαν.

Για την ανίχνευση των κυττάρων του ΜΜΚΕ χρησιμοποιούμε ως δείκτη την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Brn-3.2 (ή Brn-3b). Το συγκεκριμένο μόριο είναι μια πρωτεΐνη που ανήκει στους τάξης IV- POU μεταγραφικούς παράγοντες και εκφράζεται σε αρκετές δομές του αναπτυσσόμενου νευρικού συστήματος (Turner et al., 1994). Στους μύες που εμφανίζουν απώλεια δράσης του γονιδίου του Brn-3.2, δεν παρατηρείται κανένα πρόβλημα στον πυρήνα της κάτω ελαίας, αλλά παρατηρείται πολύ μικρότερος αριθμός γαγγλιακών κυττάρων στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα (Erkman et al., 1996). Μελέτες των τελευταίων δύο χρόνων έχουν δείξει ότι το Brn3.2 δεν εμπλέκεται ούτε στην ρύθμιση της εσωτερικής μοίρας των πρόδρομων γαγγλιακών κυττάρων στο να γίνουν γαγγλιακά, ούτε στη διαδικασία μετανάστευσής τους ως την τελική τους θέση στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων στον αμφιβληστροειδή (Gan et al., 1999; Wang et al., 2000). Φαίνεται όμως ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην επέκταση των νευραξόνων των συγκεκριμένων κυττάρων, όταν αυτά έχουν φτάσει στις τελικές τους θέσεις και στην προβολή των αξόνων αυτών προς τους τελικούς τους στόχους στο άνω διδύμιο (Erkman et al., 2000; Wang et al., 2000). Η αδυναμία των γαγγλιακών κυττάρων να δημιουργήσουν τις σωστές συνάψεις είναι και η τελική αιτία του αποπτοτικού τους θανάτου (Gan et al., 1999). Αντίθετα με την έλλειψη του Brn3.2, η οποία δεν προκαλεί κανένα πρόβλημα στη δημιουργία του πυρήνα της κάτω ελαίας, η έλλειψη του γονιδίου Brn3.0, το οποίο είναι άλλο ένα μέλος της τάξης IV POU μεταγραφικών παραγόντων, προκαλεί έλλειψη αρκετών υποπυρήνων της ελαίας (McEvilly et al., 1996).

Από τις μέχρι τώρα μελέτες δεν είναι ακόμα σαφές ποιος είναι ο ρόλος του Brn3.2 στον πυρήνα της κάτω ελαίας. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήσαμε αυτό το μόριο μόνο ως δείκτη των συγκεκριμένων κυττάρων κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους. Πρέπει να τονιστεί ωστόσο ότι η έκφραση του Brn3.2 συνεχίζεται στον πυρήνα της ελαίας ακόμα και μετά την ολοκλήρωση της δημιουργίας του, όταν δηλαδή γίνεται η επέκταση των νευραξόνων των συγκεκριμένων κυττάρων και η προβολή τους προς την παρεγκεφαλίδα. Θα μπορούσε δηλαδή να εμπλέκεται και σε αυτό το σύστημα στην καθοδήγηση νευραξόνων όπως περιγράφθηκε ότι συμβαίνει στο οπτικό σύστημα.

3. Αλυσιδωτή και νευροφιλική μετανάστευση από τα κύτταρα του οπίσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού (OEMM)

Η οριζόντια μετανάστευση που παρατηρείται σε ορισμένους πληθυσμούς πρόδρομων νευρικών κυττάρων μπορεί να είναι νευροφιλική, όταν τα κύτταρα ακολουθούν προϋπάρχοντες στην περιοχή νευρικούς άξονες ως φορείς στήριξης, ή αλυσιδωτή, όταν τα μεταναστεύοντα κύτταρα ακολουθούν το ένα το άλλο προχωρώντας ως τον τελικό τους στόχο. Ένα παράδειγμα αλυσιδωτής μετανάστευσης στην περιοχή του ρομβοειδούς εγκεφάλου συναντάμε στον βασικό πυρήνα της γέφυρας (basilar pontine nucleus) (πράσινο μονοπάτι στην εικόνα 10). Τα κύτταρα που απαρτίζουν το συγκεκριμένο πυρήνα, δημιουργούνται στην περιοχή του ρομβικού χείλους στον πρόσθιο ρομβοειδή εγκέφαλο (από την εμβρυονική μέρα E12.5 στους μύες και E15 στους επίμυες) και ακολουθούν το πρόσθιο επιφανειακό μεταναστευτικό μονοπάτι μεταναστεύοντας κοιλιακά, ώσπου να φτάσουν δίπλα από τη μέση γραμμή και να δημιουργήσουν τους βασικούς πυρήνες της γέφυρας εκατέρωθεν του εδαφιαίου πετάλου (Altman and Bayer, 1987d; Taber-Pierce, 1966). Τα συγκεκριμένα κύτταρα κατά τη διάρκεια της μετανάστευσή τους έχει δειχθεί ότι δεν χρησιμοποιούν κανένα προϋπάρχοντα νευρικό άξονα ως φορέα στήριξης (Ono and Kawamura, 1990), αλλά εκτείνουν μια πολύ μακριά καθοδηγητική απόφυση, την οποία και ακολουθούν τα κυτταρικά σώματα ως την τελική τους θέση (Yee et al., 1999). Επίσης, κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους δείχθηκε ότι εκφράζουν το μόριο συνάφειας TAG-1 (Wolfer et al., 1994; Yee et al., 1999). Οι ομοιότητες που εμφανίζουν τα παραπάνω κύτταρα με αυτά του προς μελέτη συστήματος μας οδήγησε στο να μελετήσουμε τη μορφολογία, αλλά και το πρότυπο μετανάστευσης που ακολουθούν τα κύτταρα OEMM.

Σημαίνοντας τα μεταναστεύοντα κύτταρα του OEMM με τη λιπόφιλη ουσία DiI παρατηρήσαμε τη μορφολογία τους. Φαίνεται ότι τα κύτταρα του OEMM έχουν μονοπολική μορφή με μια τεράστια καθοδηγητική απόφυση, που μπορεί να φτάσει τα αρκετά μικρόμετρα σε μήκος και η οποία εκτείνεται προς την κατεύθυνση που συντελείται η μετανάστευση. Αυτήν την καθοδηγητική απόφυση ακολουθεί και το σώμα των κυττάρων καθώς μετακινείται προς την κοιλιακή πλευρά του νευρικού συστήματος ή την κεντρική πλευρά του ιστοτεμαχίου. Επίσης δείξαμε ότι τόσο το κυτταρικό σώμα, όσο και η καθοδηγητική απόφυση των κυττάρων εκφράζουν την πρωτεΐνη TAG-1.

Ακολούθως, ελέγξαμε εάν τα κύτταρα αυτά μεταναστεύουν με αλυσιδωτό ή νευροφιλικό πρότυπο μετανάστευσης. Όπως φάνηκε από τα πειράματα που κάναμε, τα κύτταρα του ΟΕΜΜ εμφανίζουν και τα δύο αυτά μεταναστευτικά πρότυπα, ανάλογα με τη θέση που βρίσκονται. Όταν τα κύτταρα βρίσκονται στις πλάγιες περιοχές του ιστοτεμαχίου, δηλαδή στην ραχιαία πλευρά του νευρικού σωλήνα, μεταναστεύουν με αλυσιδωτό τρόπο, όπως και τα κύτταρα του πρόσθιου εξωτερικού μεταναστευτικού μονοπατιού, που δημιουργούν τους βασικούς πυρήνες της γέφυρας. Όταν όμως τα κύτταρα του ΟΕΜΜ φτάνουν στην κεντρική περιοχή του ιστοτεμαχίου ή στην κοιλιακή πλευρά του νευρικού σωλήνα, μεταναστεύουν πιο απομονωμένα το ένα από το άλλο, ακολουθώντας προϋπάρχοντες άξονες ως φορείς στήριξης (εικόνα 37), όπως συμβαίνει σε άλλες περιοχές του αναπτυσσόμενου νευρικού συστήματος, για παράδειγμα στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων (Denaxa et al., 2001).

Παλαιότερες μελέτες στην περιοχή του ΟΕΜΜ με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου είχαν δείξει ότι τα κύτταρα του συγκεκριμένου μονοπατιού μεταναστεύουν σε στενή επαφή με άξονες, οι οποίοι από τα κυτταροπλασματικά τους χαρακτηριστικά φαίνεται ότι είναι νευρικής προέλευσης (Ono and Kawamura, 1989). Η περιοχή που είχε εξεταστεί στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν κοντά στο εδαφιαίο πέταλο, σε σημείο δηλαδή που και τα δικά μας πειράματα δείχνουν ότι συμβαίνει μετανάστευση νευροφιλικού τύπου.

Τα συγκεκριμένα πρότυπα μετανάστευσης των κυττάρων του ΟΕΜΜ είχαν παρατηρηθεί και από τα πειράματα in situ υβριδοποίησης, όπου διακρίνονταν στα πλάγια του ιστοτεμαχίου κύτταρα να μεταναστεύουν σχηματίζοντας χαρακτηριστικές αλυσίδες, ενώ στο κέντρο του ιστοτεμαχίου τα TAG-1 θετικά κύτταρα μοιάζουν να μεταναστεύουν πιο μεμονωμένα το ένα από το άλλο.

4. Το μόριο συνάφεια TAG-1 εμπλέκεται στη μετανάστευση των κυττάρων του οπίσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού

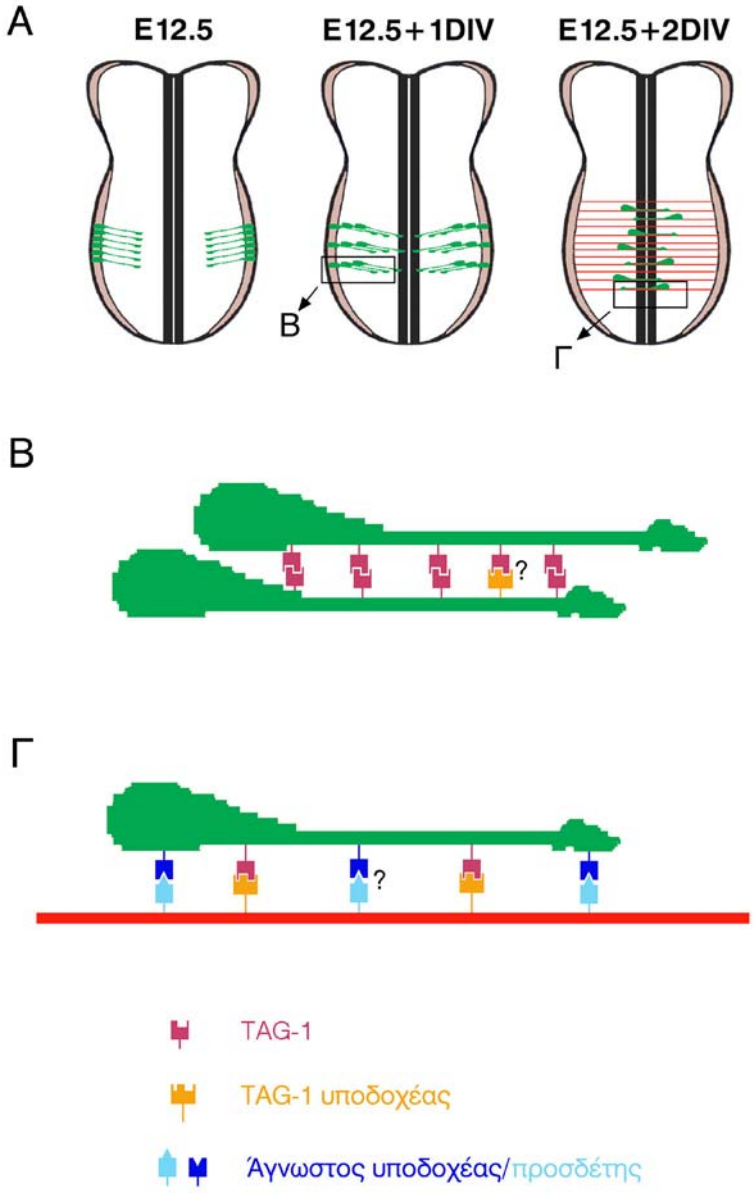
Το μόριο συνάφειας TAG-1 είναι μια πρωτεΐνη που ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών και εμφανίζει παροδική έκφραση σε πληθυσμούς μεταμιτωτικών νευρώνων (Dodd et al., 1988; Furley et al., 1990; Karagogeos et al., 1991). Από παλαιότερες έρευνες ήταν γνωστό ότι εμπλέκεται στη διαδικασία επέκτασης νευραξόνων καθώς και στην συνάφεια των κυττάρων μεταξύ τους (Furley et al., 1990). Επιπρόσθετα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος είναι γνωστό ότι η TAG-1 εκφράζεται παροδικά, από κυτταρικούς

πληθυσμούς που βρίσκονται στη διαδικασία της μετανάστευσης (Dodd et al., 1988; Wolfer et al., 1994l). Στον αναπτυσσόμενο φλοιό της παρεγκεφαλίδας, η TAG-1 εκφράζεται από τα κοκκώδη κύτταρα όταν βρίσκονται στην στοιβάδα EGLb, στη φάση δηλαδή που εκτελούν την οριζόντια μετανάστευσή τους (Bailly et al., 1996; Komuro et al., 2001; Ryder and Cepko, 1994; Stottmann and Rivas, 1998; Yamamoto et al., 1986). Στην περιοχή του ρομβοειδούς εγκεφάλου εκφράζεται από τα μεταναστεύοντα κύτταρα του πρόσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού, τα οποία δημιουργούν τον βασικό πυρήνα της γέφυρας (Yee et al., 1999) και από τα κύτταρα του κινητικού πυρήνα του προσωπικού νεύρου σε μια ορισμένη φάση της μετανάστευσή τους (Garel et al., 2000).

Βασιζόμενοι στο γεγονός ότι η TAG-1 εκφράζεται από τα κύτταρα του OEMM και μάλιστα μόνο κατά τη διάρκεια της μετανάστευσή τους, θελήσαμε να ερευνήσουμε τον πιθανό ρόλο που θα μπορούσε να παίζει αυτή η πρωτεΐνη στη μετανάστευση των συγκεκριμένων κυττάρων. Για να ερευνήσουμε το παραπάνω ερώτημα, αναστείλαμε με ποικίλους τρόπους την δράση της TAG-1 σε ιστοτεμάχια που καλλιεργήθηκαν σε *in vitro* συνθήκες.

Με όλους τους τρόπους αναστολής της δράσης της TAG-1 που χρησιμοποιήσαμε παρατηρήσαμε τα ίδια περίπου αποτελέσματα. Τα κύτταρα του OEMM δεν είχαν μεταναστεύσει κανονικά μετά την αναστολή της δράσης της TAG-1. Συγκεκριμένα, ανιχνεύονται πολύ λιγότερα μεταναστεύοντα κύτταρα σε σχέση με την φυσιολογική κατάσταση και η βασικότερή μας παρατήρηση είναι ότι τα λιγοστά αυτά κύτταρα που έχουν μεταναστεύσει, δε φαίνεται να είναι σε στενή επαφή μεταξύ τους, αλλά αρκετά απομονωμένα το ένα από το άλλο. Επίσης, δε διακρίνονται καθόλου οι χαρακτηριστικές αλυσίδες που είχαμε παρατηρήσει να δημιουργούνται στην πλάγια περιοχή των ιστοτεμαχίων. Επιπλέον, και στα ζώα που εμφανίζουν απώλεια δράσης του γονιδίου της TAG-1 παρατηρήσαμε μικρότερο αριθμό κυττάρων στο OEMM, τα οποία και πάλι δεν σχηματίζουν τις χαρακτηριστικές αλυσίδες που σχηματίζουν στα φυσιολογικά ζώα. Από αυτά τα αποτελέσματα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η πρωτεΐνη TAG-1 παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της μετανάστευσης των κυττάρων του OEMM και ιδιαιτέρως στη φάση της αλυσιδωτής μετανάστευσης, που παρατηρείται στην αρχή της πορείας των μεταναστευόντων κυττάρων (εικόνα 37).

Ένα επιπρόσθετο συμπέρασμα που μπορούμε να βγάλουμε από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι ότι η TAG-1 πιθανόν να εμπλέκεται στη διαδικασία της μετανά-



Εικόνα 37: **Σχηματική αναπαράσταση της μετανάστευσης των κυττάρων του ΟΕΜΜ**

Α. Μεταναστευτικά πρότυπα στο ΟΕΜΜ. Όταν τα κύτταρα του ΟΕΜΜ βρίσκονται στα πλάγια του ιστοτεμαχίου ακολουθούν αλυσιδωτη μετανάστευση. Όταν βρίσκονται κοντά στο εδαφιαίο πέταλο ακολουθούν νευροφιλικού τύπου μετανάστευση.

Β. Κατά τη διάρκεια της αλυσιδωτής μετανάστευσης υπάρχει trans ομοφιλική αλληλεπίδραση της TAG-1, που εκφράζεται από τα κύτταρα του ΟΕΜΜ και ενδεχομένως trans ετεροφιλική αλληλεπίδραση με υποδοχέα της TAG-1.

Γ. Κατά τη διάρκεια της νευροφιλικής μετανάστευσης υπάρχει ετεροφιλική αλληλεπίδραση της TAG-1 με άγνωστο έως τώρα υποδοχέα, που εκφράζεται από τους άξονες, πάνω στους οποίους συντελείται η μετανάστευση.

στευσης των κυττάρων του OEMM μέσω ενός ομοφιλικού μηχανισμού αλληλεπίδρασης. Είναι φανερό ότι χρησιμοποιώντας το ένζυμο PI-PLC ή τα αντισώματα ενάντια στην TAG-1, αναστέλλουμε τη δράση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, εμποδίζοντας τα μόρια της TAG-1 πάνω στα μεταναστεύοντα κύτταρα να συνδεθούν με τον οποιοδήποτε υποδοχέα της. Όταν όμως χρησιμοποιούμε τη διαλυτή πρωτεΐνη TAG-1-Fc, αυτή δεσμεύεται τόσο ομοφιλικά με τα μόρια της TAG-1 πάνω στα μεταναστεύοντα κύτταρα, όσο και ετεροφιλικά με τους υποδοχείς της TAG-1 που πιθανόν υπάρχουν στο συγκεκριμένο σύστημα μετανάστευσης, εμποδίζοντας τους να αλληλεπιδράσουν με την TAG-1 των μεταναστευόντων κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο πετυχαίνουμε τόσο την αναστολή της δράσης της TAG-1, όσο και την αναστολή δράσης των υποδοχέων της, εάν υποθέσουμε ότι η δράση της TAG-1 στο συγκεκριμένο σύστημα οφείλεται σε ετεροφιλικό τρόπο αλληλεπίδρασης με κάποιους υποδοχείς. Θα περιμέναμε δηλαδή ότι η χρήση TAG-1-Fc θα είχε πιο δραματικά αποτελέσματα στην μετανάστευση των κυττάρων του OEMM. Όπως παρατηρήσαμε όμως, τα αποτελέσματα που πήραμε με αυτού του είδους την αναστολή ήταν τα ίδια με αυτά που πήραμε όταν αναστέλλαμε μόνο το μόριο της TAG-1, γεγονός που μας οδηγεί στην υπόθεση ότι ο «υποδοχέας» της TAG-1 στο συγκεκριμένο σύστημα πιθανόν να είναι άλλα μόρια της TAG-1 στα γειτονικά κύτταρα, άρα να έχουμε ένα είδος ομοφιλικής αλληλεπίδρασης (εικόνα 37Β, Γ).

Από παλαιότερες αλλά και πιο πρόσφατες μελέτες έχει δειχθεί ότι η TAG-1 εμπλέκεται στη συγκόλληση των κυττάρων μεταξύ τους μέσω trans ομοφιλικής αλληλεπίδρασης (Felsenfeld et al., 1994) και συγκεκριμένα μέσω των φιμπρονεκτικών της περιοχών (Dhar Malhotra et al., 1998; Tsiotra et al., 1996; Rader et al., 1993). Πολύ πρόσφατα δείχθηκε ότι η συγκεκριμένη trans αλληλεπίδραση ενδεχόμενα υποβοηθείται από ενός είδους cis αλληλεπίδρασης μεταξύ των μορίων της TAG-1 που βρίσκονται στην επιφάνεια ενός κυττάρου (Kunz et al., 2002). Τα παραπάνω δεδομένα στηρίζουν και τη δική μας υπόθεση ότι η TAG-1 εμπλέκεται μέσω ομοφιλικής σύνδεσης στη συγκόλληση των κυττάρων του OEMM, ώστε να μένουν σε στενή επαφή μεταξύ τους κατά τη διάρκεια της μετανάστευσης.

Έως σήμερα, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη TAG-1 εμπλέκεται σε καταστάσεις επέκτασης και καθοδήγησης νευραξόνων συνήθως αλληλεπιδρώντας με άλλα μόρια συνάφειας (Felsenfeld et al., 1994; Furley et al., 1990; Lustig et al., 1999; Masuda et al., 2000; Stoeckli and Landmesser, 1995; Stoeckli et al., 1997). Τον τελευταίο χρόνο έχουν αρχίσει να δημοσιεύονται πειραματικά δεδομένα, τα οποία

τεκμηριώνουν την άποψη ότι η TAG-1 εμπλέκεται και σε καταστάσεις καθοδήγησης μεταναστευόντων νευρώνων. Συγκεκριμένα, δείχθηκε ότι η TAG-1, η οποία εκφράζεται από τους φλοιοθαλαμικούς άξονες (corticofugal fibers) του φλοιού των ημισφαιρίων, παίζει σημαντικό ρόλο στην καθοδήγηση GABAεργικών ενδονευρώνων που μεταναστεύουν σε στενή επαφή με τους συγκεκριμένους άξονες, χωρίς όμως τα ίδια τα μεταναστεύοντα κύτταρα να εκφράζουν TAG-1. Αναστέλλοντας τη δράση της πρωτεΐνης TAG-1 σε *in vitro* συνθήκες προκαλούνται προβλήματα σε αυτού του είδους την νευροφιλική οριζόντια μετανάστευση (Denaxa et al., 2001). Με τη δική μας μελέτη δείχθηκε για πρώτη φορά ότι η TAG-1, που εκφράζεται από τα ίδια τα μεταναστεύοντα κύτταρα, παίζει σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση τους.

5. Ρόλος άλλων μορίων συνάφειας στη μετανάστευση των νευρώνων του οπίσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού

Εκτός από το μόριο συνάφειας TAG-1 μελετήσαμε και την έκφραση άλλων πρωτεϊνών της ίδιας υπεροικογένειας στην περιοχή του OEMM. Συγκεκριμένα, αναλύσαμε το πρότυπο έκφρασης των μορίων συνάφειας L1, PSA-NCAM, NrCAM και F3. Τα παραπάνω μόρια ερευνήθηκαν γιατί είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν με την TAG-1, οπότε θα μπορούσαν να αποτελούν υποδοχείς για την TAG-1 στο συγκεκριμένο μεταναστευτικό σύστημα (Buchstaller et al., 1996; Buttiglione et al., 1998; Dhar Malhotra et al., 1998; Milev et al., 1996; Stoeckli et al., 1997).

Η πρωτεΐνη L1 βρέθηκε ότι εκφράζεται μόνο σε ορισμένους άξονες παράλληλους προς την κατεύθυνση της κίνηση των μεταναστευόντων κυττάρων. Επιπλέον, δείχθηκε ότι τόσο σε φυσιολογικά ιστοτεμάχια, στα οποία είχε γίνει αναστολή δράσης της L1 όσο και σε ιστοτεμάχια από μύες με έλλειψη του γονιδίου L1, η μετανάστευση των κυττάρων του OEMM συντελείται κανονικά. Τα αποτελέσματα αυτά μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη L1 δεν εμπλέκεται στη μετανάστευση των κυττάρων του OEMM ούτε μέσω ετεροφιλικής αλληλεπίδρασης TAG-1–L1, ούτε μέσω ομοφιλική αλληλεπίδραση των μορίων L1 μεταξύ τους.

Αντίθετα, σε άλλα συστήματα η L1 έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται σε διαδικασίες επέκτασης και δεσμιδοποίησης αξόνων καθώς και στη μετανάστευση κυττάρων. Συγκεκριμένα, σε *in vitro* συνθήκες σε μύες, επίμυες και όρνιθες έχει δειχθεί ότι η L1, μέσω ομοφιλικού τρόπου αλληλεπίδρασης, επάγει την επέκταση αναπτυσσόμενων

νευραξόνων και μάλιστα έχει βρεθεί και ποιες περιοχές του μορίου της ευθύνονται για αυτού του είδους τη δράση (Appel et al., 1993; Lemmon et al., 1989; Sugawa et al., 1997). Έχει αποδειχθεί ωστόσο, ότι η L1 αλληλεπιδρά και με ετεροφιλικό τρόπο με την TAG-1 σε *in vitro* συνθήκες και μάλιστα η αλληλεπίδραση αυτή είναι απαραίτητη για την επέκταση νευριτών από απομονωμένα κύτταρα νωτιαίων γαγγλίων (dorsal root ganglia) (Kuhn et al., 1991).

Επιπλέον έχει δειχθεί ότι σε *in vitro* συνθήκες καλλιέργειας κοκκωδών κυττάρων παρεγκεφαλίδας, αναστέλλοντας τη δράση της L1 μειώνεται η δεσμιδοποίηση των νευριτών που δημιουργούνται (Fischer et al., 1986). Ακόμα και σε *in vivo* συνθήκες, ενίοντας αντίσωμα που αναστέλλει τη δράση της L1 κατευθείαν στο νωτιαίο μυελό σε έμβρυα όρνιθας παρατηρήθηκε ότι μειώθηκε ο βαθμός δεσμιδοποίησης των συνδεσμικών νευρώνων, γεγονός που αποδεικνύει ότι η L1 επάγει την δεσμιδοποίση νευραξόνων διαφόρων κυτταρικών πληθυσμών (Stoeckli and Landmesser, 1995). Τέλος, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η L1 εμπλέκεται και στη μετανάστευση των κοκκωδών κυττάρων του φλοιού της παρεγκεφαλίδας. Σε *in vitro* συνθήκες έχει δειχθεί ότι αναστέλλοντας τη δράση της L1 σε καλλιέργειες, μειώνεται ο ρυθμός μετανάστευσή των συγκεκριμένων κυττάρων, πράγμα που αποδεικνύει ότι η L1 εμπλέκεται σε αυτή τη διαδικασία (Asou et al., 1992a; Asou et al., 1992b; Fischer et al., 1986; Lindner et al., 1983; Miura et al., 1992).

Η πολυσιαλική μορφή της πρωτεΐνης NCAM (PSA-NCAM), είναι άλλο ένα μόριο που αλληλεπιδρά με την TAG-1 (Milev et al., 1996) και του οποίου την έκφραση ελέγξαμε στο OEMM. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη, παρόλο που εκφράζεται από τα μεταναστεύοντα κύτταρα του OEMM, όπως ακριβώς και η TAG-1, δε φάνηκε να παίζει ρόλο στη μετανάστευση τους, αφού η αφαίρεση του πολυσιαλικού οξέος δεν προκάλεσε καμία μεταβολή της πορείας τους. Σε άλλα συστήματα ωστόσο, η PSA-NCAM έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται σε καταστάσεις οριζόντιας μετανάστευσης νευρώνων. Στο οσφρητικό σύστημα το PSA-NCAM εκφράζεται από τους ενδονευρώνες που δημιουργούνται στην υποκοιλιακή ζώνη της πλάγιας κοιλίας του εγκεφάλου και παίζει σημαντικό ρόλο στην μετανάστευση των κυττάρων αυτών (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996; Hu et al., 1996; Rousselot et al., 1995). Τα κύτταρα αυτά μεταναστεύουν ακολουθώντας έναν τύπο αλυσιδωτής οριζόντιας μετανάστευσης, όπως και τα κύτταρα του OEMM (Lois et al., 1996). Αφαιρώντας το πολυσιαλικό οξύ από το μόριο του NCAM ενζυματικά ή γενετικά, δημιουργώντας μεταλλαγές σε αυτή την πρωτεΐνη, αναστέλλεται σε μεγάλο βαθμό η μετανάστευση

των συγκεκριμένων κυττάρων (Hu et al., 1996; Ono et al., 1994; Tomasiewicz et al., 1993), αντίθετα δεν επηρέαζεται η ακτινωτή μετανάστευση στην ίδια περιοχή του οσφρητικού βολβού (Ono et al., 1994).

Επιπλέον, το PSA-NCAM εμπλέκεται στη μετανάστευση των LHRH (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone) νευρώνων από την περιοχή του οσφρητικού βολβού προς τον προσθεγκέφαλο, η οποία συντελείται πάνω σε έναν υποπληθυσμό αξόνων του οσφρητικού νεύρου, που εκφράζει τόσο το PSA-NCAM όσο και την TAG-1 (Yoshida et al., 1995). Στην περιοχή αυτή το PSA-NCAM, εκφράζεται τόσο από τα μεταναστεύοντα κύτταρα όσο και από τους άξονες πάνω στους οποίους μεταναστεύουν τα κύτταρα (Murakami et al., 2000). Η αφαίρεση του πολυσιαλικού οξέως από το συγκεκριμένο σύστημα, οδηγεί σε μείωση του αριθμού των μεταναστευόντων νευρώνων, πιθανόν επηρεάζοντας την κινητικότητά τους. Η παραπάνω υπόθεση στηρίζεται στο γεγονός ότι η παρουσία του πολυσιαλικού οξέως στο μόριο του NCAM μειώνει την ικανότητα συγκόλλησης του, άρα κάνει τα κύτταρα που το φέρουν στην επιφάνειά τους πιο «ευέλικτα» στην κίνηση τους. Αφαιρώντας το PSA από την επιφάνεια των αξόνων και των μεταναστευόντων κυττάρων, λιγότερα κύτταρα μεταναστεύουν χωρίς όμως στους άξονες να ανιχνεύεται οποιαδήποτε αλλαγή (Murakami et al., 2000; Yoshida et al., 1999).

Τέλος, αναλύθηκε η έκφραση των μορίων συνάφειας NrCAM και F3 στην περιοχή του OEMM. Το NrCAM βρέθηκε να εκφράζεται από τα κύτταρα του πυρήνα της κάτω ελαίας στο συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο, ενώ η F3 δεν εκφράζεται καθόλου στην περιοχή της μετανάστευσης. Το μόριο της NrCAM, είναι ένα διαμεμβρανικό μόριο συνάφειας (Grumet et al., 1991; Kayyem et al., 1992), το οποίο εκφράζεται σε πολλά σημεία του αναπτυσσόμενου νευρικού συστήματος, όπως στην παρεγκεφαλίδα και σε συνδεσμικές δομές (Lustig et al., 2001). Σχετικά με τη δράση του έχει αποδειχθεί ότι επάγει τη συγκόλληση των κυττάρων μεταξύ τους μέσω ομοφιλικής και ετεροφιλικής αλληλεπίδρασης (Mauro et al., 1992). Έχει βρεθεί επίσης ότι εμπλέκεται σε καταστάσεις επέκτασης νευραξόνων. Ανάλογα με τα μόρια με τα οποία αλληλεπιδρά, που μπορεί να είναι άλλα μόρια συνάφειας (F3, TAG-1), η neurofascin, η β-ιντεργκρίνη, και ανάλογα με το είδος των κυττάρων στα οποία γίνεται η αλληλεπίδραση, μπορεί είτε να επάγει είτε να καταστέλλει την επέκταση νευραξόνων (Faivre-Sarrailh et al., 1999; Grumet, 1997; Lustig et al., 1999; Morales et al., 1993; Suter et al., 1995; Treubert and Brummendorf, 1998). Έχει βρεθεί επίσης ότι αλληλεπιδρώντας με την TAG-1 εμπλέκεται σε καταστάσεις καθοδήγησης των

αξόνων των συνδεσμικών νευρώνων στο νωτιαίο μυελό (Grumet, 1997; Lustig et al., 1999; Stoeckli and Landmesser, 1995; Stoeckli et al., 1997).

Πρόσφατα άρχισε να αναλύεται ο φαινότυπος των μυών που εμφανίζουν απώλεια δράσης του γονιδίου της NrCAM (Sakurai et al., 2001). Η παρεγκεφαλίδα των ζώων αυτών, η μόνη δομή που ως τώρα έχει αναλυθεί, δεν φαίνεται να εμφανίζει κάποιο προβλήμα, πέρα από το ελαφρώς μικρότερο μέγεθος των λοβιδίων IV και V. Αντίθετα, όταν δημιουργούνται διπλά μεταλλαγμένα ζώα, από τα οποία λείπει τόσο η NrCAM όσο και η L1, εμφανίζονται προβλήματα στη δημιουργία των φολίων της παρεγκεφαλίδας και μειώνεται το πάχος της εσωτερικής κοκκώδους στοιβάδας (Sakurai et al., 2001).

Από όλα τα παραπάνω φαίνεται ότι το NrCAM είναι ένα μόριο-υποδοχέας για πολλές άλλες πρωτεΐνες και αναλόγως με την αλληλεπίδραση που δημιουργεί κάθε φορά έχει και πολυάριθμες λειτουργίες. Δεν έχει βρεθεί ωστόσο ακόμα, να εμπλέκεται σε καταστάσεις ρύθμισης μετανάστευσης νευρώνων και φυσικά ούτε στη μετανάστευση των κυττάρων του OEMM.

Η F3 είναι ένα μόριο συνάφειας συνδεδεμένο με GPI δεσμό στην επιφάνεια των νευρικών κυττάρων (Gennarini et al., 1989). Όπως και η NrCAM, αλληλεπιδρά με αρκετά μόρια, όπως άλλα μόρια συνάφειας, πρωτεΐνες του εξωκυττάριου χώρου και tenascin-R (Buttiglione et al., 1998; Faivre-Sarrailh et al., 1999; Morales et al., 1993; Pesheva et al., 1993; Xiao et al., 1998). Έχει βρεθεί ότι παίζει ρόλο στη συγκόλληση των κυττάρων μεταξύ τους και επάγει την επέκταση νευραξόνων σε νευρώνες των νωτιαίων γαγγλίων (Durbec et al., 1994; Durbec et al., 1992; Gennarini et al., 1991; Morales et al., 1993). Σημαντικός είναι ο ρόλος της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στην ανάπτυξη των κοκκωδών κυττάρων της παρεγκεφαλίδας. Έχει δειχθεί ότι αναστέλλει την επέκταση των νευραξόνων τους και επάγει την δεσμιδοποίησή τους, αλληλεπιδρώντας με την TAG-1 και την NrCAM (Buttiglione et al., 1998; Buttiglione et al., 1996; Faivre-Sarrailh et al., 1999). Η F3, όπως και η NrCAM αλληλεπιδρά με πολλά μόρια και έχει ποικίλες δράσεις, δεν έχει αποδειχθεί όμως να εμπλέκεται στη μετανάστευση κυτταρικών σωμάτων.

Συμπερασματικά, είναι προφανές ότι κανένα από τα μόρια που εξετάσθηκαν ως πιθανοί υποδοχείς της TAG-1 στο προς μελέτη σύστημα δεν εμπλέκεται στη μετανάστευση των κυττάρων του OEMM. Βασιζόμενοι στα συγκεκριμένα αποτελέσματα, στα αποτελέσματα που πήραμε από τα πειράματα αναστολής δράσης

καθώς και στις παρατηρήσεις μας σχετικά με τα πρότυπα μετανάστευσης των κυττάρων του ΟΕΜΜ, μπορούμε να υποστηρίξουμε ότι η TAG-1 παίζει σημαντικό ρόλο πιθανόν μέσω ομοφιλικής σύνδεσης στη 1η φάση μετανάστευσης των κυττάρων του ΟΕΜΜ, όταν δηλαδή τα κύτταρα εκτελούν αλυσιδωτή μετανάστευση. Λόγω του ότι η TAG-1 εμπλέκεται στη συγκόλληση των κυττάρων μεταξύ τους μέσω ομοφιλικής trans αλληλεπίδρασης (Dhar Malhotra et al., 1998; Felsenfeld et al., 1994; Tsiotra et al., 1996), θεωρούμε ότι επηρεάζει τη συγκεκριμένη μετανάστευση σαν ένα μόριο που δρα εξ΄ επαφής και εξασφαλίζει τη στενή επαφή των κυττάρων του ΟΕΜΜ μεταξύ τους (εικόνα 37Α, Β).

Αντίθετα, στη 2η φάση της μεταναστευτικής τους πορείας, όταν τα TAG-1 θετικά κύτταρα μεταναστεύουν πάνω σε προϋπάρχοντες νευρικούς άξονες, οι οποίοι δεν εκφράζουν TAG-1, η TAG-1 πιθανόν δρα μέσω ετεροφιλικής σύνδεσης με μόρια που ακόμα δεν είναι γνωστά. Δεν μπορούμε ωστόσο να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο η TAG-1 να μην εμπλέκεται σε αυτή τη 2η φάση της μετανάστευσης και αυτό λόγω του ότι στα πειράματα αναστολής της δράσης της, ενώ δεν σχηματίζονται αλυσίδες μεταναστευόντων κυττάρων, παρατηρούμε μεμονωμένα κύτταρα να μεταναστεύουν. Τέλος, το σχήμα της εικόνας 37 συνοψίζει τα συμπεράσματά μας σχετικά με τον ρόλο και τον τρόπο δράσης της TAG-1 στο ΟΕΜΜ.

6. Η εσωτερική μοίρα και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες καθορίζουν τη πορεία των κυττάρων του μεταναστευτικού μονοπατιού της κάτω ελαίας (ΜΜΚΕ)

Ο ρομβοειδής εγκέφαλος είναι μια περιοχή του νευρικού συστήματος, η οποία κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης εμφανίζει μεταμεριδίωση. Η δομή αυτή χωρίζεται σε 8 ρομβομερή, από τα οποία το καθένα εκφράζει συγκεκριμένα μόρια ως δείκτες και έχει ορισμένα χαρακτηριστικά, που είναι μοναδικά για το κάθε ρομβομερές. Τα κύτταρα του μεταναστευτικού μονοπατιού της κάτω ελαίας, όπως έχει προαναφερθεί, δημιουργούνται στο ρομβικό χείλος του 7ου και 8ου ρομβομερούς και μεταναστεύουν μέσα στα όρια των ρομβομερών αυτών, ώσπου να φτάσουν στις τελικές τους θέσεις.

Στη συγκεκριμένη εργασία θελήσαμε να ερευνήσουμε εάν η δημιουργία των πυρήνων της κάτω ελαίας στη συγκεκριμένη θέση είναι αποτέλεσμα της εσωτερικής μοίρας των κυττάρων, που δημιουργούνται στο ρομβικό χείλος τη συγκεκριμένη στιγμή, και το κατά πόσο το περιβάλλον, στο οποίο συντελείται η μετανάστευση, επηρεάζει την τελική διαφοροποίηση των κυττάρων του ΜΜΚΕ. Για να διερευνηθεί

το ερώτημα αυτό χρησιμοποιήσαμε χιμαιρικά ιστοτεμάχια όρνιθας/ορτυκίου, τα οποία δημιουργήσαμε με τέτοιο τρόπο ώστε ανιχνεύοντας τα ορτυκίσια κύτταρα που είχαμε μεταμοσχεύσει στον ιστό της όρνιθας, να μπορούμε να παίρνουμε πληροφορίες για τον τρόπο που επηρεάζεται η μεταναστευτική τους πορεία.

Συγκεκριμένα παρατηρήσαμε ότι κύτταρα που έχουν δημιουργηθεί στο ρομβικό χείλος του ρομβομερούς 8 και είναι «προγραμματισμένα» να δημιουργήσουν τον πυρήνα της κάτω ελαίας μεταναστεύουν και δημιουργούν τη συγκεκριμένη δομή ακόμα και αν μεταμοσχευθούν σε πιο οπίσθια θέση στο επίπεδο του νωτιαίου μυελού. Ωστόσο, αν μεταμοσχευθούν σε πιο πρόσθια θέση, στο επίπεδο του ρομβομερούς 2 και 3, δεν ολοκληρώνεται η μετανάστευσή τους και δε δημιουργείται ο πυρήνας της κάτω ελαίας. Συμπεραίνουμε δηλαδή ότι τα κύτταρα του 8ου ρομβομερούς, ενώ έχουν την εσωτερική μοίρα να δημιουργήσουν τον πυρήνα της ελαίας, αφού τον δημιουργούν σε πιο οπίσθια περιοχή, δεν είναι σε θέση να ολοκληρώσουν τη μετανάστευσή τους σε πιο πρόσθιο επίπεδο, πιθανόν λόγω της ύπαρξης κάποιου ανασταλτικού παράγοντα ή της απουσίας κάποιου απαραίτητου παράγοντα στη συγκεκριμένη περιοχή. Σε αντίθεση με αυτά που παρατηρήσαμε σε χιμαιρικά ιστοτεμάχια όρνιθας/ορτυκιού, σε ιστοτεμάχια απομονωμένα από μύες η ελαία δημιουργήθηκε κανονικά και σε πιο πρόσθιες περιοχές. Υπάρχει δηλαδή αυτή η σημαντική διαφορά στα δύο αυτά συτήματα μελέτης.

Επιπλέον, βρέθηκε ότι κύτταρα από το ρομβικό χείλος πρόσθιων ρομβομερών (2/3) δεν είναι σε θέση να μεταναστεύσουν και να δημιουργήσουν τον πυρήνα της ελαίας όταν μεταμοσχευθούν στο περιβάλλον του 8ου ρομβομερούς, στο οποίο συντελείται η μετανάστευση των κυττάρων του ΜΜΚΕ υπό φυσιολογικές συνθήκες. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα, αποτελεί μια ακόμα επιβεβαίωση ότι η εσωτερική μοίρα των κυττάρων είναι σημαντική για την δημιουργία του πυρήνα της κάτω ελαίας.

Συμπερασματικά, από τα συγκεκριμένα αποτελέσματα μπορούμε να υποστηρίξουμε ότι η εσωτερική μοίρα των κυττάρων, αλλά και περιβαλλοντικοί παράγοντες εμπλέκονται στη διαδικασία της σωστής ολοκλήρωσης της μετανάστευσης των κυττάρων της κάτω ελαίας. Ωστόσο πρέπει να τονιστεί ότι τα συμπεράσματα αυτά αφορούν μόνο το συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο που επιλέξαμε, αφού αν χρησιμοποιούσαμε ιστοτεμάχια απομονωμένα από έμβρυα πιο πρώιμων σταδίων πιθανόν το περιβάλλον να έπαιζε σημαντικότερο ρόλο, αφού τα κύτταρα του ρομβικού χείλους θα ήταν λιγότερο διαφοροποιημένα ή και μιτωτικά.

Προσπάθειες που έγιναν για να μελετήσουμε με τον ίδιο τρόπο το ΟΕΜΜ δεν απέδωσαν, γιατί παρουσιάστηκαν τεχνικές δυσκολίες. Συγκεκριμένα, η περιοχή του ρομβοειδούς εγκεφάλου, από την οποία απομονώνουμε τα καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια, είναι πολύ πιο λεπτή και πιο μικρή στον ιστό της όρνιθας και του ορτυκιού σε σχέση με τον ιστό των μυών στο ανάλογο αναπτυξιακό στάδιο. Επίσης, λόγω του ότι τα κύτταρα του ΟΕΜΜ δημιουργούνται και μεταναστεύουν σε πολύ επιφανειακό επίπεδο, δεν ήταν εφικτό να γίνουν όλοι αυτοί οι λεπτοί χειρισμοί που απαιτούνταν για τις μεταμοσχεύσεις, χωρίς να καταστραφεί μεγάλος αριθμός των κυττάρων του ΟΕΜΜ.

7. Ρόλος του εδαφιαίου πετάλου στην καθοδήγηση των κυττάρων του οπίσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού (ΟΕΜΜ) και του μεταναστευτικού μονοπατιού της κάτω ελαίας (ΜΜΚΕ)

Το εδαφιαίο πέταλο είναι μια δομή επιθηλιακών κυττάρων, που κατέχει κεντρική θέση στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα (Jessell et al., 1989). Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι εμπλέκεται στην διαφοροποίηση κυτταρικών πληθυσμών, όπως οι κινητικοί νευρώνες και στην καθοδήγηση αναπτυσσόμενων νευραξόνων, η οποία μπορεί να είναι ελκτική ή απωθητική (Bovolenta and Dodd, 1990; Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995b; Guthrie and A., 1995; Stoeckli and Landmesser, 1998; Tamada et al., 1995). Οι δράσεις του εδαφιαίου πετάλου οφείλονται σε μόρια που παράγονται από αυτό και δρουν είτε εξ' επαφής είτε με διάχυση εξ' αποστάσεως (Murakami and Shirasaki, 1997). Έχει βρεθεί επίσης ότι το εδαφιαίο πέταλο παίζει ρόλο και στην καθοδήγηση κυτταρικών σωμάτων και όχι μόνο αξόνων. Συγκεκριμένα, ασκεί έλξη στα κύτταρα του πρόσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού του ρομβοειδούς εγκεφάλου, τα οποία δημιουργούν τον βασικό πυρήνα της γέφυρας (Yee et al., 1999) και από τα μέχρι τώρα αποτελέσματά μας φαίνεται να έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα κύτταρα του ΟΕΜΜ. Στη παρούσα μελέτη θελήσαμε να μελετήσουμε τη δράση του εδαφιαίου πετάλου στην καθοδήγησης των κυττάρων των προς μελέτη μεταναστευτικών μονοπατιών.

Για να ελέγξουμε τη δράση της συγκεκριμένης δομής δημιουργήθηκαν ιστοτεμάχια από τα οποία είχε αφαιρεθεί το εδαφιαίο πέταλο από τη φυσιολογική του περιοχή και είχε τοποθετηθεί σε έκτοπη θέση. Βρέθηκε ότι ένα ποσοστό κυττάρων του ΟΕΜΜ είχε παρεκκλίνει της φυσιολογικής του πορείας και είχε συσσωρευθεί δίπλα από το έκτοπο εδαφιαίο πέταλο. Τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν τη γνωστή

εικόνα των κυττάρων του ΟΕΜΜ, που μεταναστεύουν σχηματίζοντας αλυσίδες. Το αποτέλεσμα αυτό μας επιτρέπει να συμπεράνουμε ότι το εδαφιαίο πέταλο ασκεί μια ελκτική δράση στα μεταναστεύοντα κύτταρα του ΟΕΜΜ. Ωστόσο, υπήρξε και ένας υποπληθυσμός κυττάρων, που είχε ακολουθήσει την φυσιολογική του πορεία ως τη μέση γραμμή. Αυτά τα κύτταρα θα μπορούσαν να αποτελούν έναν υποπληθυσμό, ο οποίος δεν εκφράζει τον υποδοχέα που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη, η οποία παράγεται από το εδαφιαίο πέταλο και είναι υπεύθυνη για την ελκτική του δράση. Ωστόσο, μια περισσότερο πιθανή εξήγηση, η οποία επιβεβαιώνεται και από τα επόμενα αποτελέσματά μας, είναι ότι η υπεύθυνη πρωτεΐνη για την ελκτική δράση του εδαφιαίου πετάλου είναι ένα εκκρινόμενο μόριο, το οποίο παραμένει στην περιοχή του εδαφιαίου πετάλου, ακόμα και όταν αυτό έχει αφαιρεθεί. Αυτή η πρωτεΐνη είναι ικανή να έλκει και να οδηγεί τα κύτταρα του ΟΕΜΜ στη φυσιολογική τους πορεία.

Η επίδραση που ασκεί το εδαφιαίο πέταλο στην μετανάστευση των κυττάρων του ΜΜΚΕ φαίνεται να είναι πιο πολύπλοκη. Σε ιστοτεμάχια, από τα οποία είχε αφαιρεθεί το εδαφιαίο πέταλο, ο πυρήνας της κάτω ελαίας δημιουργήθηκε κανονικά έχοντας ένα επίμηκες σχήμα, όπως και στην *in vivo* κατάσταση. Όταν όμως σε ορισμένα ιστοτεμάχια μετά την αφαίρεση του εδαφιαίου πετάλου είχαμε αφήσει τα δύο τμήματα του νευρικού σωλήνα σε κάποια απόσταση μεταξύ τους και δεν τα είχαμε φέρει σε επαφή, ο πυρήνας της ελαίας που δημιουργήθηκε δεν είχε την φυσιολογική επιμήκη μορφή, αλλά ήταν πιο στρογγυλός. Φαίνεται δηλαδή ότι πιθανόν η αλληλεπίδραση των κύτταρων του ΜΜΚΕ με την αντίθετη πλευρά του νευρικού σωλήνα είναι αυτή που εξασφαλίζει την σωστή διάταξη των κυττάρων της ελαίας.

Από το γεγονός ότι η αφαίρεση του εδαφιαίου πετάλου δεν επηρεάζει τη δημιουργία του πυρήνα της κάτω ελαίας θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι η συγκεκριμένη δομή δεν εμπλέκεται στη διαδικασία της μετανάστευσης των κυττάρων του ΜΜΚΕ. Ωστόσο, λόγω του ότι, όπως και στη περίπτωση του ΟΕΜΜ, θα μπορούσε μια διαλυτή πρωτεΐνη, να διαχέεται από το εδαφιαίο πέταλο και να παραμένει στην περιοχή έλκοντας τα μεταναστεύοντα κύτταρα του ΜΜΚΕ, ελέγξαμε αν έκτοπα τμήματα του εδαφιαίου πετάλου είναι σε θέση να ασκούν ελκτική δράση στα κύτταρα του ΜΜΚΕ. Αποδείχθηκε ότι τα μεταναστεύοντα αυτά κύτταρα παρέκκλιναν της φυσιολογικής τους πορείας και συσσωρεύθηκαν δίπλα από το έκτοπο εδαφιαίο πέταλο. Υπήρχε ωστόσο και ένας πληθυσμός κυττάρων που έφτασαν στη φυσιολογική τους θέση δίπλα από τη μέση γραμμή. Άρα, το εδαφιαίο

πέταλο πράγματι ασκεί ελκτική δράση στα μεταναστεύοντα κύτταρα του ΜΜΚΕ, πιθανόν μέσω μια διαλυτής πρωτεΐνης, η οποία είναι υπεύθυνη για την δημιουργία του πυρήνα της κάτω ελαίας στη φυσιολογικής του θέσης, ακόμα και μετά την αφαίρεση της συγκεκριμένης δομής από την περιοχή.

Λόγω του γεγονότος ότι τα κύτταρα του ΜΜΚΕ, τόσο στην *in vivo* όσο και στην *in vitro* κατάσταση, δεν διαπερνούν τη μέση γραμμή, ελέγξαμε εάν το εδαφιαίο πέταλο, εκτός από ελκτική δράση, δρα παρέχοντας επίσης ένα σήμα σταματήματος στα συγκεκριμένα κύτταρα. Χρησιμοποιώντας και πάλι έκτοπα τμήματα του εδαφιαίου πετάλου, παρατηρήσαμε ότι τα μεταναστεύοντα κύτταρα του ΜΜΚΕ συσσωρεύονται δίπλα από το εδαφιαίο πέταλο, χωρίς να το διαπερνούν είτε αυτό είχε τοποθετηθεί σε απόσταση πιο κοντινή από τη φυσιολογική κατάσταση είτε σε πιο μακρινή. Τα μεταναστεύοντα κύτταρα του ΜΜΚΕ δηλαδή διανύουν μικρότερη ή μεγαλύτερη απόσταση, αλλά πάντα σταματούν όταν φτάσουν δίπλα στο εδαφιαίο πέταλο. Το σταμάτημα της μετανάστευσης των κυττάρων φτάνοντας στη συγκεκριμένη δομή θα μπορούσε να οφείλεται σε τρεις λόγους. Στη μέση γραμμή, όπως έχει παραπάνω σχολιαστεί, η διάταξη των αποφύσεων των ακτινωτών γαγγλιακών κυττάρων είναι πολύ στενή και θα μπορούσε να αποτελεί μηχανικό εμπόδιο για τη συνέχιση της μετανάστευσης των κυττάρων του ΜΜΚΕ, όταν φτάσουν στο συγκεκριμένο σημείο. Ένας δεύτερος πιθανός μηχανισμός είναι η ύπαρξη μιας διαλυτής πρωτεΐνης, που εκφράζεται από το εδαφιαίο πέταλο, εμφανίζει μια κλίση συγκέντρωσης (gradient) με μέγιστο στην περιοχή της μέσης γραμμής και ασκεί ελκτική δράση στα κύτταρα του ΜΜΚΕ. Τα μεταναστεύοντα κύτταρα μέσω κάποιου αγνώστου ως τώρα υποδοχέα, οδηγούνται προς την περιοχή με τη μέγιστη συγκέντρωση και φτάνοντας εκεί αδυνατούν να κινηθούν αντίστροφα της κλίσης, οπότε και σταματά η μετανάστευσή τους. Τέλος, ο τρίτος πιθανός μηχανισμός είναι η ύπαρξη ενός μορίου, που εκφράζεται επιφανειακά στην περιοχή του εδαφιαίου πετάλου και απωθεί εξ' επαφής τα κύτταρα της κάτω ελαίας όταν φτάσουν εκεί, εμποδίζοντάς τα να συνεχίσουν τη μετανάστευσή τους.

Οι τρεις αυτοί πιθανοί μηχανισμοί θα μπορούσαν να υπάρχουν και σε συνεργασία ο ένας με τον άλλον στην *in vivo* κατάσταση. Ωστόσο, στις *in vitro* καλλιέργειες δεν φαίνεται να ισχύει ο μηχανισμός του μηχανικού εμποδίου. Όπως φάνηκε από τις εγκάρσιες τομές των καλλιεργούμενων ιστοτεμαχίων, τα κύτταρα του ΜΜΚΕ, μεταναστεύουν σε πιο κοιλιακή περιοχή από την *in vivo* κατάσταση και φτάνουν κάτω από το εδαφιαίο πέταλο. Ενώ φαίνεται ότι έχουν ξεπεράσει το σημείο

που υπάρχει το μηχανικό εμπόδιο των αποφύσεων των γαγγλιακών κυττάρων και άρα θα μπορούσαν να συνεχίσουν τη μεταναστευτική τους πορεία, παρόλα αυτά παραμένουν στην περιοχή κάτω από το εδαφιαίο πέταλο ακόμα και αν μείνουν σε καλλιέργεια για τέσσερις παραπάνω ημέρες.

Από όλα τα παραπάνω είναι φανερό ότι το εδαφιαίο πέταλο παίζει σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση των προς μελέτη κυτταρικών πληθυσμών. Η δράση της συγκεκριμένης δομής φαίνεται να είναι ποικίλη, καθώς έλκει τα κύτταρα και των δύο μεταναστευτικών μονοπατιών, αλλά παρέχει και σήμα σταματήματος της μετανάστευσης των κυττάρων του ΜΜΚΕ.

8. Επίδραση της νετρίνης στην καθοδήγηση των κυττάρων του οπίσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού (ΟΕΜΜ) και του μεταναστευτικού μονοπατιού της κάτω ελαίας (ΜΜΚΕ)

Εκτός από τις πρωτεΐνες που δρουν εξ' επαφής και επηρεάζουν τη μετανάστευση των κυττάρων στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα, όπως τα μόρια συνάφειας, τα οποία αναφέρθηκαν παραπάνω, υπάρχουν και μόρια που δρουν εξ' αποστάσεως και έλκουν ή απωθούν τα μεταναστεύοντα κύτταρα καθώς και τους αναπτυσσόμενους νευράξονες. Το εδαφιαίο πέταλο είναι μια περιοχή που παράγει τέτοιου είδους μόρια και έχοντας υπ' όψιν μας το ρόλο που παίζει η συγκεκριμένη δομή στα προς μελέτη μεταναστευτικά μονοπάτια, ερευνήσαμε την πιθανή εμπλοκή πρωτεϊνών που εκκρίνονται από το εδαφιαίο πέταλο στην καθοδήγηση των κυττάρων του ΟΕΜΜ και του ΜΜΚΕ.

Μια πρωτεΐνη, η οποία παράγεται από το εδαφιαίο πέταλο και έχει αποδειχθεί ότι ευθύνεται για πολλές από τις δράσεις της συγκεκριμένης δομής είναι η νετρίνη (Kennedy et al., 1994). Αρχικά η νετρίνη είχε χαρακτηριστεί ως η πρωτεΐνη, η οποία ευθύνεται για την ελκτική δράση που ασκεί το εδαφιαίο πέταλο στους αναπτυσσόμενους συνδεσμικούς άξονες που προβάλουν προς τη μέση γραμμή τόσο στο επίπεδο του νωτιαίου μυελού (Kennedy et al., 1994), όσο και σε πιο πρόσθιες περιοχές του νευρικού συστήματος (Shirasaki et al., 1995). Η ελκτική της δράση ωστόσο δεν περιορίζεται μόνο σε συνδεσμικούς νευρώνες, αλλά εμφανίζεται και σε πολλούς άλλους πληθυσμούς όπως οι αναπτυσσόμενοι άξονες των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς (de la Torre et al., 1997) και οι φλοιοθαλαμικοί άξονες στον προσεγκέφαλο (Metin et al., 1997). Στη συνέχεια βρέθηκε ότι σε

ορισμένους αναπτυσσόμενους άξονες, όπως οι κινητικοί άξονες του τροχιλιακού νεύρου, ασκεί απωθητική δράση (Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995a).

Η ποικίλη δράση της νετρίνης αποδείχθηκε ότι οφείλεται στον υποδοχέα τον οποίο εκφράζει ο νευρώνας που αποκρίνεται στην ύπαρξη νετρίνης. Αρχικά είχε δειχθεί ότι ο υποδοχέας DCC είναι υπεύθυνος για την ελκτική δράση της νετρίνης και οι υποδοχείς UNC-5H για την απωθητική (Cook et al., 1998; Guthrie, 1997; Keino-Masu et al., 1996; Leonardo et al., 1997; Varela-Echavarria and Guthrie, 1997; Shirasaki et al., 1998). Πιο λεπτομερείς μελέτες ωστόσο, έδειξαν ότι σε κύτταρα που εκφράζουν και τα δύο είδη υποδοχέων, υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ του DCC και των UNC-5H και έτσι επιτυγχάνεται η απωθητική δράση (Hong et al., 1999; Seeger and Beattie, 1999; Terman and Kolodkin, 1999).

Εκτός από την καθοδήγηση αναπτυσσόμενων νευραξόνων έχει αποδειχθεί ότι η νετρίνη εμπλέκεται και στην καθοδήγηση μεταναστευόντων νευρικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η νετρίνη, που εκφράζεται στην κοιλιακή ζώνη της πλάγιας κοιλίας των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, απωθεί έναν υποπληθυσμό πρόδρομων κυττάρων του ραβδωτού, τα οποία δημιουργούνται στην υποκοιλιακή ζώνη της συγκεκριμένης περιοχής (Hamasaki et al., 2001). Επιπλέον, η νετρίνη έχει απωθητική δράση και στα μεταμιτωτικά κοκκώδη κύτταρα του φλοιού της παρεγκεφαλίδας, που μεταναστεύουν *in vitro* σε πηκτώματα κολλαγόνου (Alcantara et al., 2000). Αντίθετα, έχει δειχθεί ότι σε *in vitro* συνθήκες έλκει τα μεταναστεύοντα κύτταρα του πρόσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού μέσω του υποδοχέα της DCC, καθώς τα συγκεκριμένα κύτταρα καθόλη τη διάρκεια της μετανάστευσής τους εκφράζουν DCC (Yee et al., 1999). Επιβεβαίωση του συμπεράσματος αυτού αποτελεί το γεγονός ότι σε ζώα που εμφανίζουν απώλεια δράσης του γονιδίου της νετρίνης-1 (Serafini et al., 1996) ή του DCC (Fazeli et al., 1997) ο βασικός πυρήνας της γέφυρας δε σχηματίζεται.

Το γεγονός ότι το πρόσθιο επιφανειακό μεταναστευτικό μονοπάτι του ρομβοειδούς εγκεφάλου παρουσιάζει τόσες ομοιότητες με το προς μελέτη οπίσθιο επιφανειακό μεταναστευτικό μονοπάτι, μας οδήγησε στο να μελετήσουμε τη δράση των συγκεκριμένων μορίων σε αυτό το σύστημα, αλλά και στο μεταναστευτικό μονοπάτι της κάτω ελαίας. Αρχικά ελέγξαμε το πρότυπο έκφρασης της νετρίνης καθώς και του υποδοχέα της DCC τόσο στην *in vivo* κατάσταση όσο και σε *in vitro* συνθήκες. Είδαμε ότι η νετρίνη-1 εκφράζεται από το εδαφιαίο πέταλο σε όλο το μήκος του ρομβοειδούς εγκεφάλου καθώς και από την κοιλιακή (ventral) περιοχή της

κοιλιακής (ventricular) ζώνης καθόλη τη διάρκεια της μεταναστευτικής πορείας των κυττάρων και των δύο μεταναστευτικών μονοπατιών. Ο υποδοχέας της νετρίνης DCC εκφράζεται από τα μεταναστεύοντα κύτταρα του OEMM πριν αυτά διασχίσουν τη μέση γραμμή. Αντίθετα, τα κύτταρα του MMKE εκφράζουν τον υποδοχέα DCC στην αρχή της μεταναστευτικής τους πορείας, όταν βρίσκονται ακόμα στο ρομβικό χείλος και όταν φτάνουν στις τελικές τους θέσεις δίπλα από τη μέση γραμμή. Κατά τη διάρκεια της μετανάστευσης τα κύτταρα του MMKE δεν εκφράζουν το συγκεκριμένο υποδοχέα. Στο ίδιο αποτέλεσμα, σχετικά με την έκφραση του DCC από τα κύτταρα του MMKE είχαν καταλήξει και παλαιότερες μελέτες (Bloch-Gallego et al., 1999).

Όταν σε καλλιεργούμενα ιστοτεμάχια τοποθετήσαμε έκτοπες πηγές έκκρισης νετρίνης-1, παρατηρήσαμε ότι τα μεταναστεύοντα κύτταρα του OEMM παρέκκλιναν της φυσιολογικής τους πορείας και οδηγήθηκαν προς την έκτοπη πηγή νετρίνης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι όλος ο πληθυσμός των κυττάρων του OEMM έχει παρεκκλίνει της φυσιολογικής του πορείας και έχει πλησιάσει τη πηγή νετρίνης. Όταν είχαμε τοποθετήσει σε ανάλογη θέση το έκτοπο εδαφιαίο πέταλο, είχαμε παρατηρήσει ότι υπήρχε ένας υποπληθυσμός των κυττάρων του OEMM, που ακολουθούσαν την φυσιολογική τους πορεία. Φαίνεται ότι η ποσότητα νετρίνης που παρήγαγε η έκτοπη πηγή έκφρασή της ήταν πιο υψηλής συγκέντρωσης σε σχέση με την εκκρινόμενη από το εδαφιαίο πέταλο. Είναι φανερό από τα ανωτέρω αποτελέσματα ότι η νετρίνη ασκεί ελκτική δράση στα μεταναστεύοντα κύτταρα του OEMM, γεγονός που ήταν αναμενόμενο καθώς τα κύτταρα του OEMM εκφράζουν τον υποδοχέα DCC, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την ελκτική δράση της νετρίνης-1 πάνω στα κύτταρα ή στους άξονες που τον εκφράζουν. Επιπλέον, τα αποτελέσματά μας αυτά συμφωνούν με παλαιότερη μελέτη, σύμφωνα με την οποία κύτταρα που προέρχονται από απομονωμένο ρομβικό χείλος του οπίσθιου ρομβοειδούς εγκεφάλου έλκονται από πηγή νετρίνη σε πηκτώματα κολλαγόνου, χωρίς όμως στη συγκεκριμένη μελέτη να καθορίζεται ποια είναι η ταυτότητα των κυττάρων αυτών (Alcantara et al., 2000).

Για να ελέγξουμε τη δράση της εκκρινόμενης νετρίνης στη μετανάστευση των κυττάρων του MMKE, δοκιμάσαμε τρεις διαφορετικούς τρόπους έκκρισης: τμήματα αγαρόζης που είναι εμποτισμένα με νετρίνη-1 και την οποία την εκκρίνουν τοπικά εκεί που τοποθετούνται, σφαιρίδια affigel εμποτισμένα και αυτά με νετρίνη και κύτταρα COS που εκφράζουν εκκρινόμενη μορφής νετρίνη. Από αυτούς τους τρόπους μόνο με τα COS κύτταρα παρατηρήσαμε κάποια αποτελέσματα.

Συγκεκριμένα, σε ιστοτεμάχια που είχαμε τοποθετήσει σε έκτοπη θέση τα κύτταρα που εξέφραζαν νετρίνη, παρατηρήσαμε ότι ένας πολύ μικρός πληθυσμός κυττάρων του ΜΜΚΕ είχε συσσωρευθεί δίπλα από το συσσωμάτωμα των κυττάρων. Ο μικρός αριθμός των κυττάρων αυτών εξηγείται από το γεγονός ότι ο υποδοχέας της νετρίνης ο οποίος είναι υπεύθυνος για την ελκτική της δράση DCC εκφράζεται μόνο από ορισμένα κύτταρα, τα οποία μάλιστα ανιχνεύονται κοντά στο ρομβικό χείλος, όπως και τα κύτταρα που συσσωρεύτηκαν δίπλα από την πηγή νετρίνης.

Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι ενώ τα κύτταρα του ΟΕΜΜ έχουν εισέλθει και μεταναστεύσει μέσα στο συσσωμάτωμα των COS κυττάρων που εκφράζουν νετρίνη, τα κύτταρα του ΜΜΚΕ έχουν συσσωρευθεί δίπλα από το συσσωμάτωμα. Το γεγονός αυτό αποτελεί άλλη μια διαφορά μεταξύ των δύο αυτών μεταναστευτικών μονοπατιών. Επιπλέον, τα γεγονός αυτό αποτελεί άλλη μια επιβεβαίωση του προτύπου μετανάστευσης που βρήκαμε ότι ακολουθούν τα κύτταρα του ΟΕΜΜ. Στην πλάγια περιοχή του ιστοτεμαχίου τα συγκεκριμένα κύτταρα ακολουθούν το πρότυπο της αλυσιδωτής μετανάστευσης, μεταναστεύουν δηλαδή το ένα σε στενή επαφή με το άλλο, χωρίς να χρησιμοποιούν ως φορέα στήριξης κανενός είδους νευρικού άξονα. Μην έχοντας ανάγκη από κανενός είδους στήριγμα μπορούν να μεταναστεύουν ακόμα και μέσα στο συσσωμάτωμα των COS κυττάρων σε αντίθεση με τα κύτταρα του ΜΜΚΕ.

Τέλος, παρατηρήθηκε ότι σε ιστοτεμάχια που είχαν καλλιεργηθεί παρουσία διαλυτής νετρίνης στο θρεπτικό τους υλικό ο πυρήνας της ελαίας που δημιουργήθηκε ήταν πιο συμπυκνωμένος δίπλα από τη μέση γραμμή σε σχέση με τα φυσιολογικά ιστοτεμάχια. Βασιζόμενοι στο συγκεκριμένο αποτέλεσμα, καθώς και στο γεγονός ότι ο υποδοχέας DCC της νετρίνης εκφράζεται από τα κύτταρα του ΜΜΚΕ και όταν έχουν φτάσει κοντά στη μέση γραμμή μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η νετρίνη παίζει ρόλο στην τελική φάση της πορείας των κυττάρων του ΜΜΚΕ.

Συμπερασματικά μπορούμε να υποστηρίξουμε ότι η δράση της νετρίνης στα δύο μεταναστευτικά μονοπάτια που μελετάμε είναι διαφορετική. Τα κύτταρα του ΟΕΜΜ μέσω του υποδοχέα της DCC, τον οποίο εκφράζουν μόνο πριν να φτάσουν στο εδαφιαίο πέταλο, έλκονται από τη νετρίνη που εκκρίνεται από τη συγκεκριμένη δομή (εικόνα 38). Αντίθετα, τα κύτταρα του ΜΜΚΕ, τα οποία εκφράζουν DCC μόνο στην αρχή και στο τέλος της μεταναστευτικής τους πορείας φαίνεται να επηρεάζονται από τη νετρίνη μόνο όταν συγκεντρώνονται δίπλα από τη μέση γραμμή και πιθανόν όταν αρχίζουν να εκτίνουν τους άξονές τους (εικόνα 39).

Θα πρέπει ωστόσο να εστιαστούμε και στο φαινότυπο που παρουσιάζουν τα ζώα που εμφανίζουν απώλεια των γονιδίων της νετρίνης-1 (Serafini et al., 1996) ή του DCC (Fazeli et al., 1997) σε σχέση με τα δύο αυτά μεταναστευτικά μονοπάτια. Όσον αφορά τα κύτταρα του ΜΜΚΕ έχει δειχθεί ότι σε ζώα που δεν εκφράζουν νετρίνη-1 εμφανίζονται ορισμένα κύτταρα με χαρακτηριστικά των κυττάρων της ελαίας σε έκτοπες θέσεις κατά μήκος του μεταναστευτικού μονοπατιού τους (Bloch-Gallego et al., 1999). Επίσης, εμφανίζουν πρόβλημα στην προβολή των αξόνων τους προς την παρεγκεφαλίδα, καθώς μετά από αντίδρομη (retrograde) σήμανση των απολήξεων των κυττάρων της ελαίας σημάνθηκε ο ομόπλευρος πυρήνας της και όχι ο ετερόπλευρος όπως συμβαίνει στα φυσιολογικά ζώα (Bloch-Gallego et al., 1999). Ωστόσο, δεν είναι σαφές από τη συγκεκριμένη έρευνα εάν το πρόβλημα οφείλεται στο ότι οι αναπτυσσόμενοι άξονες δεν κατάφεραν να διασχίσουν τη μέση γραμμή πριν προβάλουν προς την παρεγκεφαλίδα ή εάν τα ίδια τα κυτταρικά σώματα του πυρήνα έχουν διασχίσει τη μέση γραμμή πριν δημιουργήσουν τους άξονές τους. Αν συμβαίνει το πρώτο τότε η νετρίνη-1 εμπλέκεται στη διαδικασία καθοδήγησης νευραξόνων, ενώ αν συμβαίνει το δεύτερο εμπλέκεται στη διαδικασία της μετανάστευσης. Σε αντίθεση με το ΜΜΚΕ, το ΟΕΜΜ δεν έχει μελετηθεί διεξοδικά σε αυτά τα μεταλλαγμένα ζώα. Το μόνο που είναι γνωστό είναι ότι στα ζώα που δεν εκφράζουν νετρίνη-1, οι προβολές του πλάγιου δικτυωτού πυρήνα προς την παρεγκεφαλίδα είναι φυσιολογικές, αλλά δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με τη μεταναστευτική πορεία των ίδιων των κυττάρων (Bloch-Gallego et al., 1999).

Άλλο ένα γεγονός που πρέπει να τονισθεί είναι ο συνεντοπισμός του υποδοχέα της νετρίνης-1 DCC και της πρωτεΐνης TAG-1 σε άλλον ένα κυτταρικό πληθυσμό. Όπως δείχθηκε το DCC εκφράζεται από τα κύτταρα του ΟΕΜΜ, τα οποία όπως έχουμε ήδη δείξει εκφράζουν και το μόριο συνάφειας TAG-1. Έχει ήδη αναφερθεί ότι τα συγκεκριμένα μόρια εκφράζονται και από τα κύτταρα του πρόσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού, που άλλωστε εμφανίζουν και πολλές άλλες ομοιότητες με τα προς μελέτη κύτταρα. Επιπλέον οι δύο αυτές πρωτεΐνες εκφράζονται από τους άξονες ενός τμήματος του οσφρητικού νεύρου, το οποίο λειτουργεί ως φορέας στήριξης των μεταναστευόντων LHRH κυττάρων του οσφρητικού συστήματος (Schwarting et al., 2001), που εκτελούν, όπως έχουμε προαναφέρει, μια νευροφιλική οριζόντια μετανάστευση. Συνεκφράζονται επίσης στα μεταμιτωτικά κοκκώδη κύτταρα του φλοιού της παρεγκεφαλίδας (Alcantara et al., 2000; Bailly et al., 1996; Furley et al., 1990), καθώς και στον αναπτυσσόμενο αμφιβληστροειδή χιτώνα του

οφθαλμού (de la Torre et al., 1997; Gad et al., 2000; Livesey, 1999). Από το είδος των κυττάρων, αλλά και από τη χρονική περίοδο που εκφράζονται αυτά τα μόρια θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι εμπλέκονται σε καταστάσεις καθοδήγησης αξόνων ή κυτταρικών σωμάτων, ωστόσο δεν έχει βρεθεί ως τώρα ένας μηχανισμός στον οποίο να συμμετέχουν και τα δύο. Βασιζόμενοι στο γεγονός ότι η καθοδηγητική απόφυση των μεταναστευόντων κυττάρων που εκφράζει DCC προσανατολίζεται προς μια πηγή νετρίνης-1 (Yee et al., 1999), θα μπορούσαμε να πούμε ότι το DCC ευθύνεται για τον προσανατολισμό της μετανάστευσης ενός κυττάρου, ενώ η TAG-1 για την αλληλεπίδραση του συγκεκριμένου κυττάρου με στοιχεία του μικροπεριβάλλοντός του.

Θα πρέπει επίσης να τονιστεί ότι οι δράσεις της TAG-1 και της νετρίνης στη μετανάστευση των κυττάρων του OEMM φαίνεται να είναι ανεξάρτητες αλλά και ενδεχομένως συμπληρωματικές. Η TAG-1 εξασφαλίζει την στενή επαφή των κυττάρων μεταξύ τους, ή ακόμα και με στοιχεία του μικροπεριβάλλοντος τους, ενώ η νετρίνη, πιθανόν και άλλοι εκκρινόμενοι παράγοντες του εδαφιαίου πετάλου, ασκούν ελκτική δράση στην καθοδηγητική απόφυση και κατ' επέκταση στα κύτταρα προσανατολίζοντας τη μετακίνησή τους.

9. Επίδραση μορίων της οικογένειας των ephrin/Eph στη μετανάστευση των κυττάρων του μεταναστευτικού μονοπατιού της κάτω ελαίας

Εκτός από τη νετρίνη-1 που βρήκαμε ότι εμπλέκεται στη μετανάστευση των κυττάρων και των δύο μεταναστευτικών μονοπατιών που μελετάμε, υπάρχουν και άλλα μόρια τα οποία θα μπορούσαν να παίζουν ρόλο στο συγκεκριμένο σύστημα. Μια άλλη οικογένεια πρωτεϊνών που τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται τόσο σε καταστάσεις προσανατολισμού νευραξόνων όσο και μετανάστευσης κυττάρων είναι οι ephrins και οι υποδοχείς τους Eph. Η συγκεκριμένη οικογένεια μορίων κινασών τυροσίνης αποτελείται από πολλά μέλη, των οποίων η δράση εξαπλώνεται σε πολλά σημεία του αναπτυσσόμενου νευρικού συστήματος.

Αρχικά οι δράσεις τους μελετήθηκαν στο οπτικό σύστημα και ειδικά στις πολύ συγκεκριμένες προβολές που κάνουν οι άξονες των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς στο άνω διδύμιο των θηλαστικών ή στην ομόλογη δομή των πτηνών την οπτική καλύπτρα (Friedman and O'Leary, 1996; Drescher et al., 1997). Αρκετά μόρια της συγκεκριμένης οικογένειας εμπλέκονται σε αυτού του είδους την καθοδήγηση και κυρίως μέσω εξ' επαφής απώθησης (Drescher, 1997; Flanagan and

Vanderhaeghen, 1998; Klein, 2001; Orioli and Klein, 1997; Wilkinson, 2001). Εμπλέκονται επίσης στην διαμερισματοποίηση του αναπτυσσόμενου ρομβοειδούς εγκεφάλου (Flanagan and Vanderhaeghen, 1998; Holder and Klein, 1999), στην καθοδήγηση των συνδεσμικών νευρώνων στην περιοχή της μέσης γραμμής (Klein, 2001), καθώς και στη μετανάστευση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας (neural crest cells) (Holder and Klein, 1999; Klein, 2001; Wilkinson, 2001).

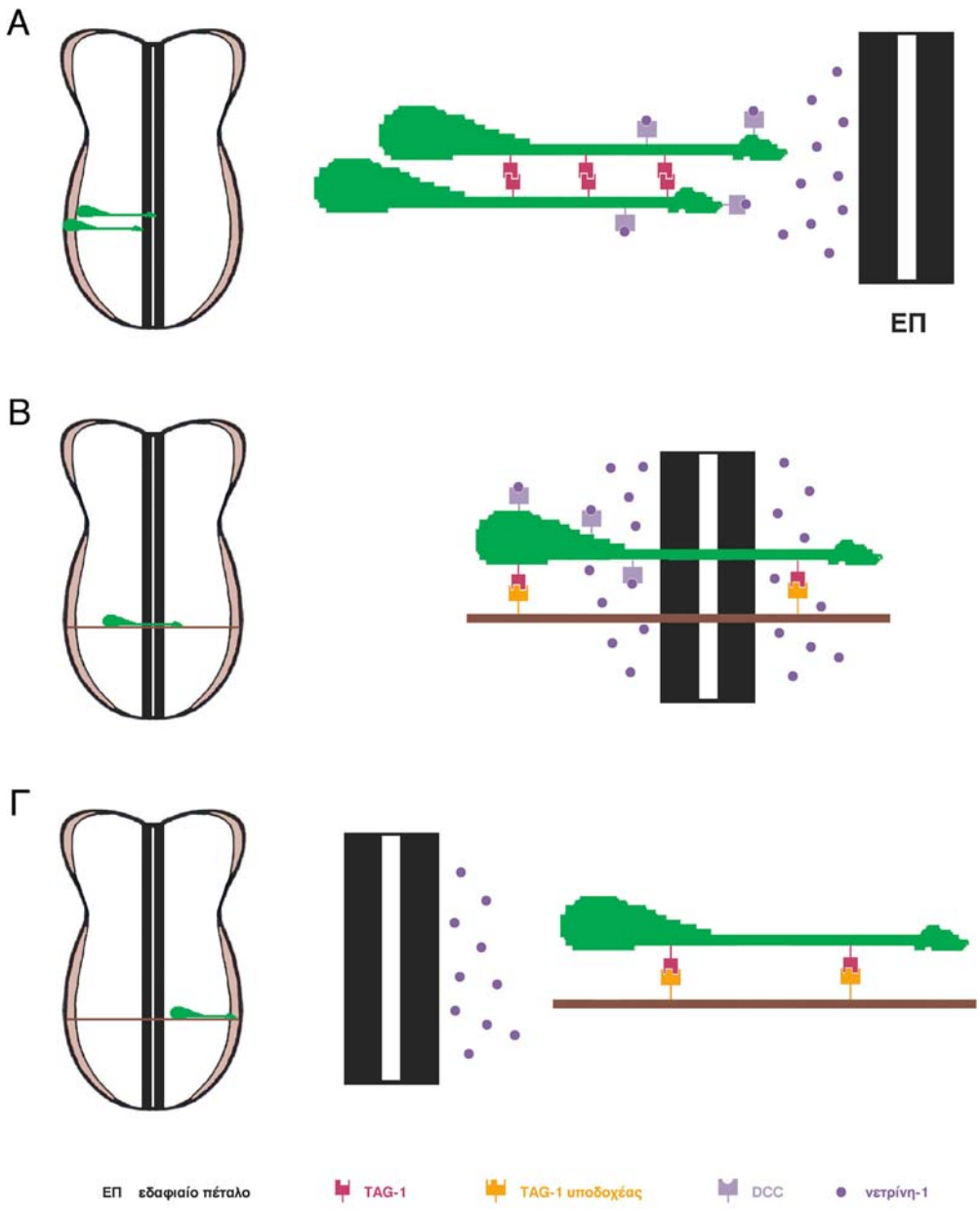
Στη παρούσα εργασία από τα μόρια της παραπάνω οικογένειας που μελετήσαμε, βρέθηκε ότι μόνο η EphA4, ο προσδέτης της ephrinB3 και η ephrinB1 εκφράζονται στην περιοχή του οπίσθιου ρομβοειδούς εγκεφάλου στα αναπτυξιακά στάδια που μας ενδιαφέρουν. Βρήκαμε ότι τα κύτταρα του ΜΜΚΕ κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους εκφράζουν τον υποδοχέα EphA4, ενώ τα μόρια ephrinB3 και λιγότερο η ephrinB1 εκφράζονται στην περιοχή του εδαφιαίου πετάλου την ίδια χρονική περίοδο. Θέλοντας να ελέγξουμε το κατά πόσο τα συγκεκριμένα μόρια εμπλέκονται στη διαδικασία της μετανάστευσης χρησιμοποιήσαμε μύες που εμφάνιζαν απώλεια δράσης του γονιδίου της EphA4. Στα ζώα αυτά βρέθηκε ότι τα κύτταρα των πυρήνων της κάτω ελαίας δεν έχουν σταματήσει στη φυσιολογική τους θέση, αλλά πολλά από αυτά ανιχνεύονται και πάνω στη μέση γραμμή.

Από τα παραπάνω μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι η αλληλεπίδραση της ephrinB3, που εκφράζεται στη μέση γραμμή, με τον υποδοχέα της EphA4, ο οποίος εκφράζεται από τα μεταναστεύοντα κύτταρα της ελαίας, θα μπορούσε να είναι ένα από τα σήματα που σταματούν τα κύτταρα του ΜΜΚΕ στη φυσιολογική τους θέση, πριν διασχίσουν τη μέση γραμμή. Στα μεταλλαγμένα ζώα, που λείπει ο υποδοχέας EphA4, δεν γίνεται αυτού του τύπου η αλληλεπίδραση και τα μεταναστεύοντα κύτταρα δεν μπορούν να σταματήσουν πριν από τη μέση γραμμή, όπως συμβαίνει στη φυσιολογική κατάσταση (εικόνα 39).

Τα δύο αυτά μόρια έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν και επηρεάζουν την καθοδήγηση αξόνων. Συγκεκριμένα, η ephrinB3, εκφράζεται από τα κύτταρα της μέσης γραμμής στο επίπεδο του νωτιαίου μυελού (Bergemann et al., 1998), ενώ η EphA4 εκφράζεται από τους άξονες των κινητικών κυττάρων της στοιβάδας V του κινητικού φλοιού, οι οποίοι δημιουργούν το φλοιονωτιαίο δεμάτιο (πυραμιδική οδός) και διασχίζουν τη μέση γραμμή μόνο μία φορά (Yokoyama et al., 2001). Από πρόσφατες έρευνες αποδείχθηκε ότι κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης η αλληλεπίδραση των δύο αυτών μορίων εμποδίζει τους άξονες του φλοιονωτιαίου δεματίου να ξαναδιασχίσουν τη μέση γραμμή. Σε μύες που εμφανίζουν απώλεια

δράσης του γονιδίου της ephrinB3 (Kullander et al., 2001; Yokoyama et al., 2001), ή του γονιδίου της EphA4 (Coonan et al., 2001) οι άξονες των συγκεκριμένων κυττάρων διασχίζουν τη μέση γραμμή περισσότερες από μία φορές. Επιπλέον, τα δύο αυτά μόρια έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται και στη μετανάστευση ενδονευρώνων του οσφρητικού συστήματος, οι οποίοι δημιουργούνται στην υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλίων του φλοιού των εγκεκφαλικών ημισφαιρίων και μεταναστεύουν προς τον οσφρητικό βολβό (Yokoyama et al., 2001).

Συμπερασματικά, αυτή η αλληλεπίδραση των μορίων της EphA4 και της ephrinB3 στο επίπεδο του εδαφιαίου πετάλου θα μπορούσε να είναι το σήμα σταματήματος της μετανάστευσης των κυττάρων του ΜΜΚΕ, το οποίο είχαμε παρατηρήσει στα αρχικά πειράματα. Ωστόσο, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε το γεγονός να υπάρχει συνδυασμός περισσότερων από ενός μηχανισμού δράσης μορίων στο παραπάνω σύστημα. Όπως είχε αναφερθεί και νωρίτερα στη συζήτηση, στο συγκεκριμένο σημείο μπορεί να υπάρχει και μηχανικό εμπόδιο στη μετανάστευση των κυττάρων του ΜΜΚΕ από τις απολήξεις των γαγγλιακών κυττάρων και μια κλίση συγκέντρωσης ελκτικού μορίου με μέγιστο στην περιοχή του εδαφιαίου πετάλου, όπου τα μεταναστεύοντα κύτταρα δεν μπορούν να κινηθούν αντίθετα σε αυτή την κλίση. Η ύπαρξη του μηχανισμού της εξ' επαφής απώθησης μέσω των μορίων EphA4 και ephrinB3 μπορεί να δρα από μόνο του ή σε συνεργασία με τους δύο παραπάνω μηχανισμούς σταματήματος της μετανάστευσης των κυττάρων της κάτω ελαίας.

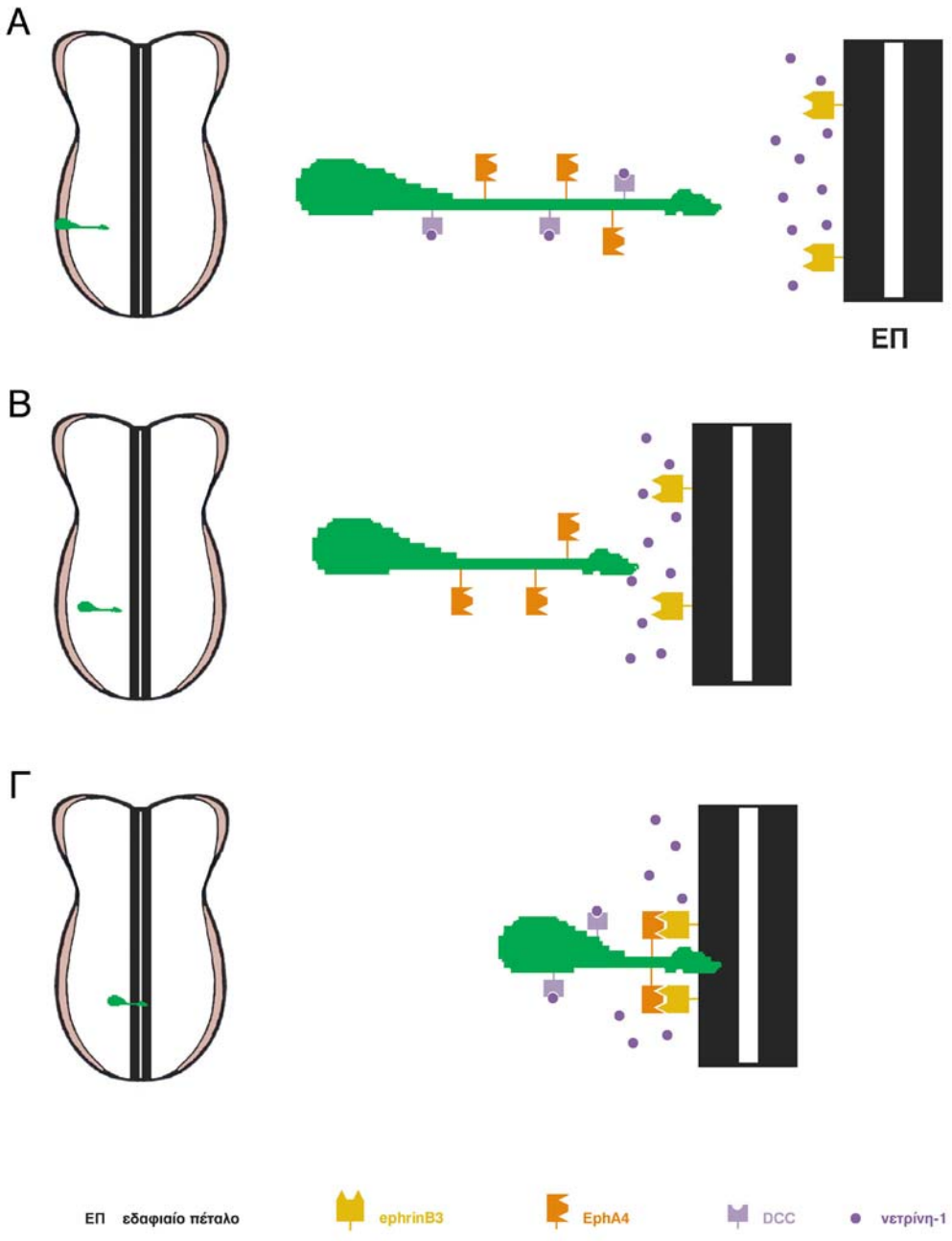


***Εικόνα 38*: Σχηματική αναπαράσταση της μετανάστευσης των κυττάρων του ΟΕΜΜ**

Α. Όταν τα κύτταρα βρίσκονται στην πλάγια πλευρά του ιστοτεμάχιου εκτελούν αλυσιδωτού τύπου μετανάστευση και έλκονται από την εκκρινόμενη από το εδαφιαίο πέταλο νετρίνη, μέσω του υποδοχέα DCC που εκφράζουν.

Β: Όταν τα κύτταρα βρίσκονται κοντά στο εδαφιαίο πέταλο, εκτελούν νευροφιλική μετανάστευση και συνεχίζουν να αποκρίνονται στην νετρίνη μέσω του DCC.

Γ. Όταν τα κύτταρα έχουν διασχίσει το εδαφιαίο πέταλο, συνεχίζουν να εκτελούν νευροφιλική μετανάστευση, αλλά δεν εκφράζουν πια τον υποδοχέα DCC.



***Εικόνα 39*: Σχηματική αναπαράσταση της μετανάστευσης των κυττάρων του ΜΜΚΕ**

Α. Όταν τα κύτταρα βρίσκονται στην πλάγια πλευρά του ιστοτεμάχιου εκφράζουν τον υποδοχέα DCC, αλλά και την EphA4.

Β: Όταν τα κύτταρα απομακρύνονται από το ρομβικό χείλος δεν εκφράζουν πια DCC, αλλά εκφράζουν την EphA4.

Γ. Όταν τα κύτταρα φτάνουν στη μέση γραμμή εκφράζουν την EphA4 η οποία αλληλεπιδρά με τον προσδέτη ephrinB3, που εκφράζεται από το εδαφιαίο πέταλο. Επιπλέον τα μεταναστεύοντα κύτταρα εκφράζουν και πάλι τον υποδοχέα DCC, ο οποίος αλληλεπιδρά με την εκκρινόμενη από το εδαφιαίο πέταλο νετρίνη.

Συνοψίζοντας……

Τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα της παρούσας μελέτης θα μπορούσαν να συνοψιστούν ως εξής:

Τα κύτταρα του οπίσθιου επιφανειακού μεταναστευτικού μονοπατιού, τα οποία εκφράζουν το μόριο συνάφειας TAG-1, κατά τη διάρκεια της μετανάστευσή τους ακολουθούν δύο διαφορετικά πρότυπα μετανάστευσης. Όταν βρίσκονται στην πλάγια πλευρά του ιστοτεμαχίου (στην ραχιαία πλευρά του νευρικού σωλήνα) ακολουθούν μια αλυσιδωτή μετανάστευση, στην οποία εμπλέκεται η TAG-1 πιθανότατα μέσω ομοφιλικής trans σύνδεσης (εικόνα 37). Όταν τα κύτταρα βρίσκονται κοντά στο εδαφιαίο πέταλο ακολουθούν νευροφιλική μετανάστευση. Σε αυτή τη φάση της μετανάστευσης, η TAG-1 συνδέεται με ετεροφιλικό τρόπο με κάποιον υποδοχέα της, που εκφράζεται από τους νευρικούς άξονες πάνω στους οποίους μεταναστεύουν τα TAG-1 θετικά κύτταρα, χωρίς ωστόσο να αποκλείεται και το γεγονός να μετέχουν και άλλα μόρια σε αυτή τη σύνδεση του TAG-1 θετικού κυττάρου με τον άξονα που δεν εκφράζει TAG-1 (εικόνα 37).

Εκτός από τον μηχανισμό της εξ' επαφής καθοδήγησης, στον οποίον εμπλέκεται η TAG-1, τα κύτταρα του OEMM έλκονται και εξ΄ αποστάσεως από την εκκρινόμενη νετρίνη από το εδαφιαίο πέταλο. Η καθοδήγηση αυτή επιτυγχάνεται μέσω του ελκτικού υποδοχέα της νετρίνης DCC, τον οποίο εκφράζουν τα μεταναστεύοντα κύτταρα μόνο πριν να φτάσουν στη μέση γραμμή (εικόνα 38).

Αντίθετα, τα κύτταρα του μεταναστευτικού μονοπατιού της κάτω ελαίας εκφράζουν τον υποδοχέα της νετρίνης DCC μόνο στην αρχή και στο τέλος της μεταναστευτικής τους πορείας και φαίνεται ότι σε αυτές τις χρονικές περιόδους περιορίζεται και η δράση της νετρίνη στα συγκεκριμένα κύτταρα (εικόνα 39). Επιπλέον, τα κύτταρα του MMKE φτάνοντας στη μέση γραμμή, σταματούν την μεταναστευτική τους πορείας και συσσωρεύονται δίπλα από το εδαφιαίο πέταλο. Το σήμα σταματήματος που καθοδηγεί τα συγκεκριμένα κύτταρα παρέχεται από το εδαφιαίο πέταλο και φαίνεται να είναι η εξ' επαφής αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης ephrinB3, η οποία εκφράζεται από το εδαφιαίο πέταλο με τον υποδοχέα της EphA4, που εκφράζεται από τα μεταναστεύοντα κύτταρα της κάτω ελαίας (εικόνα 39).

Ως γενικότερο συμπέρασμα της εργασίας αυτής θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι με τα αποτελέσματα που παραθέσαμε φαίνεται ότι η μετανάστευση πρόδρομων νευρικών κυττάρων στο νευρικό σύστημα καθοδηγείται από ποικίλους μηχανισμούς. Στα προς μελέτη συστήματα φάνηκε ότι υπάρχει και εξ΄ επαφής και εξ΄ αποστάσεως μηχανισμός καθοδήγησης κυττάρων.

Επίσης, δείχθηκε ότι μόρια τα οποία είχαν αρχικά χαρακτηριστεί με βάση την ικανότητά τους να καθοδηγούν αναπτυσσόμενους νευράξονες, φαίνεται να παίζουν τον ίδιο σημαντικό ρόλο και στην καθοδήγηση της κίνησης κυτταρικών σωμάτων. Επιπλέον, είναι η πρώτη φορά που το μόριο συνάφεια TAG-1 όταν εκφράζεται από τα μεταναστεύοντα κύτταρα δείχθηκε ότι εμπλέκεται στην διαδικασία της μετανάστευσή τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adams NC, Tomoda T, Cooper M, Dietz G, and Hatten ME. 2002. Mice that lack astrotactin have slowed neuronal migration. *Development* **129:** 965-972.

Alcantara S, Ruiz M, DeCastro F, Soriano F, and Sotelo C. 2000. Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development* **127:** 1359-1372.

Allen GL, and Tsukahara N. 1974. Cerebro-cerebellar communication systems. *Physiol. Rev.* **54:** 957-1006.

Altman J. 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J.Comp.Neurol.* **137:** 433-457.

Altman J, and Bayer S. 1978. Prenatal development of the cerebellar system in the rat: II. Cytogenesis and histogenesis of the inferior olive, pontine gray and the precerebellar reticular nuclei. *J.Comp.Neurol.* **179:** 49-76.

Altman J, and Bayer S. 1987a. Development of the precerebellar nuclei in the rat: I. The precerebellar neiroepithelium of the rhombencephalon. *J.Comp.Neurol.* **257:** 477-489.

Altman J, and Bayer S. 1987b. Development of the precerebellar nuclei in the rat: II. The intramural olivary migratory stream and the neurogenetic organization of the inferior olive. *J. Comp. Neurol.* **257:** 490-512.

Altman J, and Bayer S. 1987c. Development of the precerebellar nuclei in the rat: III. The posterior precerebellar extramural migratory stream and the lateral reticular and external cuneate nuclei. *J. Comp. Neurol.* **257:** 513-528.

Altman J, and Bayer S. 1987d. Development of the precerebellar nuclei in the rat: IV. The anterior precerebellar extramural migratory stream and the nucleus reticularis tegmenti pontis and the basal pontine gray. *J. Comp. Neurol.* **257:** 529-552.

Ambrosiani J, Armengol JA, Martinez S, and Puelles L. 1996. The avian inferior olive derives from the alar neuroepithelium of the rhombomeres 7 and 8: an analysis by using chick-quail chimeric embryos. *Neuroreport* **7:** 1285-1288.

Anderson SA, Elsenstat DD, Shi L, and Rubenstein JL. 1997a. Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science* **278:** 474-476.

Anderson SA, Qiu M, Bulfone A, Eisenstat DD, Meneses J, Pedersen R, and Rubenstein JLR. 1997b. Mutations of the homeobox genes Dlx-1 and Dlx-2 disrupt the striatal subventricular zone and differentiation of late born striatal neurons. *Neuron* **19:** 27-37.

Angevine JB, and Sidman RL. 1961. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* **192:** 766-768.

Appel F, Holm J, Conscience JF, and Schachner M. 1993. Several extracellular domains of the neural cell adhesion molecule L1 are involved in neurite outgrowth and cell body adhesion. *J. Neurosci.* **13:** 4764-4775.

Asou H, Miura M, Kobayashi M, and Uyemura K. 1992a. The cell adhesion molecule L1 has a specific role in neural cell migration. *Neuroreport* **3:** 481-484.

Asou H, Miura M, Kobayashi M, Uyemura K, and Itoh K. 1992b. Cell adhesion molecule L1 guides cell migration in primary reaggregation cultures of mouse cerebellar cells. *Neurosci. Lett.* **144:** 221-224.

Austin CP, and Cepko CL. 1990. Cellular migration patterns in the developing mouse cerebral cortex. *Development* **110:** 713-732.

Azizi SA, Michailoff GA, Burne RA, and Woodward DJ. 1981. The pontocerebellar system in the rat: An HRP study. Posterior vermis. *J.Comp.Neurol.* **197:** 543-558.

Bailly Y, Kyriakopoulou K, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J, and Karagogeos D. 1996. Cerebellar granule cell differentiation in the mutant and X-irradiated rodents revealed by the neural adhesion molecule TAG-1. *J. Comp. Neurol.* **369:** 150-161.

Bally-Cuif L, and Wassef M. 1994. Ectopic induction and reorganization of Wnt-1 expression in quail/chick chimeras. *Development* **120:** 3379-3394.

Becker N, Gilardi-Hebenstreit P, Seitanidou T, Wilkinson D, and Charnay P. 1995. Characterisation of the Sek-1 receptor tyrosine kinase. *FEBS Lett.* **368:** 353-357.

Bergemann AD, Zhang L, Chiang MK, Brambilla R, Klein R, and Flanagan JG. 1998. Ephrin-B3, a ligand for the receptor EphB3, expressed at the midline of the developing neural tube. *Oncogene* **16:** 471-480.

Bloch-Gallego E, Ezan F, Tessier-Lavigne M, and Sotelo C. 1999. Floor plate and netrin-1 are involved in the migration and survival of inferior olivary neurons. *J.Neurosci.* **19:** 4407-4420.

Boltshauser E, and Isler W. 1977. Joubert syndrome: episodic hyperpnea, abnormal eye movements, retardation and ataxia, associated with dysplasia of the cerebellar vermis. *Neuropadiatrie* **8:** 57-66.

Bouillet P, Oulad-Abdelghani M, Vicaire S, Garnier JM, Schuhbaur B, Dolle P, and Chambon P. 1995. Efficient cloning of cDNAs of retinoic acid-responsive genes in P19 embryonal carcinoma cells and characterization of a novel mouse gene, Stra1 (mouse LERK-2/Eplg2). *Dev. Biol.* **170:** 420-433.

Bourrat F, Gotow T, and Sotelo C. 1989. Development of the rat inferior olive: migratory routes, formation of afferent and efferent connections. *Exp. Brain Res.* **17:** 123-170.

Bourrat F, and Sotelo C. 1990. Migratory pathways and selective aggregation of the lateral reticular nucleus in the rat embryo: a horseradish peroxidase *in vitro* study, with special reference to migration pattern of the precerebellar nuclei. *J. Comp. Neurol.* **294:** 1-13.

Bovolenta P, and Dodd J. 1990. Guidance of commissural growth cones at the floor plate in embryonic rat spinal cord. *Development* **109:** 435-437.

Bovolenta P, and Dodd J. 1991. Perturbation of neuronal differentiation and axon guidance in the spinal cord of mouse embryos lacking a floor plate: analysis of Danforth's short-tail mutation. *Development* **113:** 625-639.

Brodal A. 1972. Cerebrocerebellar pathways. Anatomical data and some functional implications. *Acta Neurol. Scand.* **48:** 153-193.

Brodal A, and Brodal P. 1971. The organization of the nucleus reticularis tegmenti pontis in the cat in the light of experimental anatomical studies of its cerebral cortical afferents. *Exp. Brain Res.* **13:** 90-110.

Brodal P. 1980a. The cortical projection to the nucleus reticularis tegmenti pontis in the Rhesus monkey. *Exp. Brain Res.* **38:** 19-27.

Brodal P. 1980b. The projection from the nucleus reticularis tegmenti pontis to the cerebellum in the Rhesus monkey. *Exp. Brain Res.* **38:** 29-36.

Bronner-Fraser M, and Fraser SE. 1997. Differentiation of the neural tube. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9:** 885-891.

Brose K, Bland KS, Wang KH, Arnott D, Henzel W, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, and Kidd T. 1999. Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* **96:** 795-806.

Brose K, and Tessier-Lavigne M. 2000. Slit proteins: key regulators of axon guidance branching and cell migration. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10:** 95-102.

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. *J.Cell Biol.* **135:** 1593-1607.

Burstyn-Cohen T, Tzarfaty V, Frumkin A, Feinstein Y, Stoeckli ET, and Klar A. 1999. F-spondin is required for accurate pathfinding of commissural axons at the floor plate. *Neuron* **23:** 233-246.

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

Buttiglione M, Revest JM, Rougon G, and 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:** 53-69.

Cambronero F, and Puelles L. 2000. Rostrocaudal nuclear relationships in the avian medulla oblongata: a fate map with quail chick chimeras. *J. Comp. Neurol.* **427**.

Campbell NC, and Armstrong DM. 1983. Topographical localization in the olivocerebellar projection in the rat: an autoradiographic study. *Brain Res.* **275:** 235-249.

Chang S, Rathjen FG, and Raper JA. 1987. Extension of neurites on axons is impaired by antibodies against specific neural cell surface glycoprotein. *J.Cell Biol.* **104:** 355-362.

Cheng HJ, Nakamoto M, Bergemann AD, and Flanagan J. 1995. Complementary gradients in expression and binding ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell* **82:** 371-381.

Colamarino SA, and Tessier-Lavigne M. 1995a. The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell* **81:** 621-629.

Colamarino SA, and Tessier-Lavigne M. 1995b. The role of the floor plate in axon guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* **18:** 497-529.

Cook G, Tannahill D, and Keynes R. 1998. Axon guidance to and from choice points. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8:** 64-72.

Cooke JD, Larson B, Oscarsson O, and Sjolung B. 1971. Organization of afferent connections to cuneocerebellar tract. *Exp. Brain Res.* **13:** 359-377.

Coonan JR, Greferath U, Messenger J, Hartley L, M. M, Boyd AW, Dottori M, Galea MP, and Bartlett PF. 2001. Development and reorganization of corticospinal projections in EphA4 deficient mice. *J. Comp. Neurol.* **436:** 248-262.

Culotti JG, and Merz DC. 1998. DCC and netrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10:** 609-613.

Dahme M, Bartsch U, Martini R, Anliker B, Schachner M, and Mantei N. 1997. Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nat.Genet.* **17:** 346-349.

D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HM, Morgan JI, and Curran T. 1995. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* **374:** 719-723.

Davis JQ, Lambert S, and Bennett V. 1996. Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and Nr-CAM at nodal axon segments. *J. Cell Biol.* **135:** 1355-1367.

De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, and Valverde F. 1996. Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J.Neurosci.* **16:** 6146-6156.

de la Torre JR, Hopker VH, Ming GL, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Hemmati-Brivanlou A, and Holt CE. 1997. Turning of retinal growth cones in a netrin-1 gradient mediated by the netrin receptor DCC. *Neuron* **19:** 1211-1224.

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

Dhar Malhotra J, 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:** 33354-33359.

Dobyns WB, Carrozzo R, and Ledbetter DH. 1994. Frequent deletion of the LIS1 gene in classic lissencephaly. *Ann. Neurol.* **36:** 489-390.

Dobyns WB, Reiner O, Carrozzo R, and Ledbetter DH. 1993. Lissencephaly: a human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13. *JAMA* **270:** 2838-2842.

Dobyns WB, and Truwit CL. 1995. Lissencephaly and other malformations of cortical development: 1995 update. *Neuropediatics.* **26:** 132-147.

Dodd J, Morton SB, Karagogeos D, Yamamoto M, and Jessell TM. 1988. Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons. *Neuron* **1:** 105-116.

Doetsch F, and Alvarez-Buylla A. 1996. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93:** 14895-14900.

Drescher U. 1997. The Eph family in the patterning of neural development. *Curr. Biol.* **7:** 799-807.

Drescher U, Bonhoeffer F, and Muller B. 1997. The Eph family in retinal axon guidance. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7:** 75-80.

Drescher U, Kremoser C, Handwerker C, Loschinger J, Noda M, and Bonhoeffer F. 1995. In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* **82**.

Durbec P, Gennarini G, Buttiglione M, Gomez S, and Rougon G. 1994. Different domains of the F3 neuronal adhesion molecule are involved in adhesion and neurite outgrowth promotion. *Eur. J. Neurosci.* **6:** 461-472.

Durbec P, Gennarini G, Goridis C, and Rougon G. 1992. A soluble form of the F3 neuronal cell adhesion molecule promotes neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* **117:** 877-887.

Eckenhoff MF, and Rakic P. 1984. Radial organization of the hippocampal dentate gyrus: A Golgi ultrastactural and immunohistochemical analysis in the developing rhesus monkey. *J.Comp.Neurol.* **223:** 1-21.

Edelman GM. 1986. Cell adhesion molecules in the regulation of animal form and tissue pattern. *Annu. Rev. Cell Biol.* **2:** 81-116.

Edmondson JC, and Hatten ME. 1987. Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high-resolution time-lapse video microscopic study. *J.Neurosci.* **7:** 1928-1934.

Edmondson JC, Liem RK, Kuster JE, and Hatten ME. 1988. Astrotactin: a novel neuronal cell surface antigen that mediates neuron-astroglial interactions in cerebellar microcultures. *J.Cell Biol.* **106:** 505-517.

Erkman L, McEvilly RJ, Luo L, Ryan AK, Hooshmand F, O'Connell SM, Keithley EM, Rapaport DH, Ryan AF, and Rosenfeld MG. 1996. Role of transcription factors Brn-3.1 and Brn-3.2 in auditory and visual system development. *Nature* **381:** 603-606.

Erkman L, Yates PA, McLaughlin T, McEvilly RJ, Whisenhunt T, O'Connell SM, Krones A, Kirby M.A., Rapaport DH, Bermingham JR, O'Leary DD, and Rosenfeld MG. 2000. A POU domain transcription factor-dependent program regulates axon pathfinding in the vertebrate visual system. *Neuron* **28:** 779-792.

Faivre-Sarrailh C, Falk J, Pollerberg E, Schachner M, and Rougon G. 1999. NrCAM, cerebellar granule cell receptor for the neuronal adhesion molecule F3, displays an actin-dependent mobility in growth cones. *J. Cell Sci.* **112:** 3015-3027.

Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, Stoeckli ET, Keino-Masu K, Masu M, Rayburn H, Simons J, Bronson RT, Gordon JI, Tessier-Lavigne M, and Weinberg RA. 1997. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* **386:** 796-804.

Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, and Vogelstein B. 1990. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* **247:** 49-56.

Feiner L. 1997. Secreted chick semaphorins bind recombinant neuropill with similar affinities but bind different subsets of neurons in situ. *Neuron* **19:** 539-545.

Felsenfeld DP, Hynes MA, Skoler KM, Furley AJ, and Jessell TM. 1994. TAG-1 can mediate homophilic binding, but neurite outgrowth on TAG-1 requires an L1-like molecule and b1 integrins. *Neuron* **12:** 675-690.

Feng L, Hatten ME, and Heintz N. 1994. Brain lipid-binding protein BLBP: a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* **12:** 895-908.

Feng Y, and Walsh C. 2001. Protein-protein interactions, cytoskeletal regulation and neuronal migration. *Nat. Rev. Neurosci.* **2:** 408-418.

Fischer G, Kunemund V, and Schachner M. 1986. Neurite outgrowth patterns in cerebellar microexplant cultures are affected by antibodies to the cell surface glycoprotein L1. *J.Neurosci.* **6:** 605-612.

Fishell G, and Hatten ME. 1991. Astrotactin provides a neuronal receptor system for CNS migration. *Development* **113:** 755-765.

Fishman R, and Hatten ME. 1993. Multiple receptor systems promote CNS neural migration. *J.Neurosci.* **13:** 3485-3495.

Fitzli D, Stoeckli ET, Kunz S, Siribour K, Rader C, Kunz B, Kozlov SV, Buchstaller A, Lane RP, Suter DM, Dreyer WJ, and Sonderegger P. 2000.

A direct interaction of axonin-1 with NgCAM-related cell adhesion molecule (NrCAM) results in guidance, but not growth of commissural axons. *J. Cell Biol.* **149:** 951-968.

Flanagan J, and Vanderhaeghen P. 1998. The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu. Rev. Neurosci.* **21:** 309-345.

Friedrich G, and Soriano P. 1991. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev.* **5:** 1513-1523.

Fukamauchi F, Okihiko A, Wang Y-J, K. A, Takeda Y, Horie M, Kawano H, Sudo K, Asano M, Watanabe K, and Iwakura Y. 2001. TAG-1 deficient mice have marked elevation of adenosine A1 receptors in the Hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281:** 220-226.

Furley AJ, Morton SB, Manalo D, Karagogeos D, Dodd J, and Jessell TM. 1990. The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity. *Cell* **61:** 157-170.

Gad JM, Keeling SL, Shu T, Richards LJ, and Cooper HM. 2000. The spatial and temporal expression patterns of netrin receptors, DCC and neogenin, in the developing mouse retina. *Exp. Eye Res.* **70:** 711-722.

Gale NW. 1996. Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentailized during embryogenesis. *Neuron* **17:** 9-19.

Gan L, Wang SW, Huang Z, and Klein WH. 1999. POU domain factor Brn-3b is essential for retinal ganglion cell differentiation and survival but not for initial cell fate specification. *Dev. Biol.* **210:** 469-480.

Gao PP, Zhang L, Yokoyama N, Racey B, Dreyfus CF, Black IB, and Zhou R. 1996. Regulation of topographic projection in the brain: Elf-1 in the hippocamposeptal system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93:** 161-166.

Gao WQ, and Hatten ME. 1994. Neuronal differentiation rescued by implantation of weaver granule cell precursors into wild-type cerebellar cortex. *Science* **260:** 367-370.

Garel S, Garcia-Dominguez M, and Charnay P. 2000. Control of the migratory pathway of facial branciomotor neurons. *Development* **127:** 5297-5307.

Gennarini G, Cibelli G, Rougon G, Mattei MG, 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:** 775-788.

Gennarini G, Durbec P, Boned A, Rougon G, and Goridis C. 1991. Transfected F3/F11 neuronal cell surface protein mediates intercellular adhesion and promotes neurite outgrowth. *Neuron* **6:** 5950606.

Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, and Berkovic S. 1998. Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* **92:** 63-72.

Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, and Walsh C. 1999. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* **23:** 257-271.

Goffinet AM. 1979. An early development defect in the cerebral cortex of the reeler mouse. A morphological study; eading to a hypothesis concerning the action of the mutant gene. *Anat.Embryol.* **157:** 205-216.

Goldowitz D. 1989. The weaver granulepival phenotype is due to intrinsic action of the mutant locus in granule cells: evidence from homozygous weaver chimeras. *Neuron* **2:** 1565-1575.

Graham F, and Van der Eb A. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52:** 456-467.

Grant G. 1962. Projection of external cuneate nucleus onto the cerebellum in the cat: An experimental study using silver methods. *Exp. Neurol.* **5:** 179-195.

Graus-Porta D, Blaess S, Senften M, Littlewood-Evans A, Damsky C, Huang Z, Orban P, Klein R, Schittny JC, and Muller U. 2001. Beta1-class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. *Neuron* **31:** 367-379.

Grumet M. 1997. Nr-CAM: a cell adhesion molecule with ligand and receptor functions. *Cell Tissue Res.* **290:** 423-428.

Grumet M, Mauro V, Burgoon MP, Edelman GM, and Cunningham BA. 1991. Structure of a new nervous system glycoprotein, Nr-CAM, and its relationship to subgroups of neural cell adhesion molecules. *J. Cell Biol.* **113:** 1399-1412.

Gundersen RW. 1987. Response of sensory neurites and growth cones to patterned substrata of laminin and fibronectin in vitro. *Dev. Biol.* **121:** 423-431.

Guthrie S. 1997. Axon guidance: netrin receptors are revealed. *Curr. Biol.* **7:** 6-9.

Guthrie S, and A. P. 1995. Chemorepulsion of developing motor axons by the floor plate. *Neuron* **14:** 1117-1130.

Hamasaki T, Goto S, Nishikawa S, and Ushio Y. 2001. A role of netrin-1 in the formation of the subcortical structure striatum: repulsive action on the migration of late-born striatal neurons. *J. Neurosci.* **21:** 4272-4280.

Hamburger V, and Hamilton LH. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J.Morphology* **88:** 49-92.

Harkmark W. 1954. Cell migrations from the rhombic lip to the inferior olive, the nucleus raphe and the pons. A morphological and experimental investigation in chick embryos. *J.Comp.Neurol.* **100:** 115-209.

Hatten ME. 1993. The role of migration in central neurvous system neuronal development. *Curr. Opin. Neurobiol.* **3:** 38-44.

Hatten ME. 1999. Central nervous system neuronal migration. *Annu. Rev. Neurosci.* **22:** 511-39.

Hatten ME, and Mason C. 1990. Mechanisms of glial-guided neuronal migration *in vitro* and *in vivo*. *Experientia* **46:** 907-916.

Hedgecock EM, Culotti JG, and Halls DH. 1990. The *unc-5*, *unc-6*, and *unc-40* genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in C. elegans. *Neuron* **2:** 61-85.

Helmbacher F, Schneider-Maunoury S, Topilko P, Tiret L, and Charnay P. 2000. Targeting of the EphA4 tyrosine kinase receptor affects dorsal/ventral pathfinding of limb motor axons. *Development* **127:** 3313-3324.

Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, Nishida J, and Takaku F. 1987. A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science* **238:** 1717-1720.

His W. 1891. Die Entwickelung des menschlichen Rautenhirns vom Ende des ersten bis zum Beginn des dritten Monats. *Math. Phys.* **29:** 1-74.

Holder N, and Klein R. 1999. Eph receptors and ephrins: effectors of morphogenesis. *Development* **126:** 2033-2044.

Holland SJ, Peles E, Pawson T, and Schlessinger J. 1998. Cell-contact-dependent signalling in axon growth and guidance: Eph receptor tyrosine kinases and receptor protein tyrosine phosphatase β. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8:** 117-127.

Holmes GP, Negus K, Burridge L, Raman S, Algar E, Yamaha T, and Little MH. 1998. Distinct but overlapping expression patterns of two vertebrate slit homologs implies functional roles in CNS development and organogenesis. *Mech. Dev.* **79:** 57-72.

Holmqvist B, Oscarsson O, and Rosen I. 1963. Functional organization of the cuneocerebellar tract in the cat. *Acta Neurol. Scand.* **58:** 216-235.

Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier-Lavigne M, and Stein E. 1999. A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* **97:** 927-941.

Hu H, Tomasiewicz H, Magnuson T, and Rutishauser U. 1996. The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron* **16:** 735-743.

Hynes MA. 1992. Integrins: Versatility, modulation and signalling in cell adhesion. *Cell* **69:** 11-25.

Hynes MA, Miller DR, and Lander AD. 1992. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations and targeting of cells and axons. *Cell* **68:** 303-322.

Jessell TM, Bovolenta P, Placzek M, Tessier-Lavigne M, and Dodd J. 1989. Polarity and patterning in the neural tube: the origin and function of the floor plate. *Ciba Found. Symp.* **144:** 255-305.

Joliot A, Maizel A, Rosenberg D, Trembleau A, Dupas S, Volovitch M, and Prochiantz A. 1998. Identification of a signal sequence necessary for the unconventional secretion of Engrailed homeoprotein. *Curr. Biol.***:** 856-863.

Joubert MJ. 1972. Tarsal tunnel syndrome. *S. Afr. Med. J.* **46:** 507-508.

Kandel ER, Schwartz JH, and Jessell T. 1991. *Principles of neural science.* Elsevier, New York.

Karagogeos D, Morton SB, Casano F, Dodd J, and Jessell TM. 1991. Developmental expression of the axonal glycoprotein TAG-1: Differential regulation by central and peripheral neurons *in vitro*. *Development* **112:** 51-67.

Kayyem JF, Roman JM, de la Rosa EJ, Schwarz U, and Dreyer WJ. 1992. Bravo/Nr-CAM is closely related to the cell adhesion molecules L1 and Ng-CAM and has a similar heterodimer structure. *J. Cell Biol.* **118:** 1259.

Keino-Masu K, Masu K, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS, Culotti JG, and Tessier-Lavigne M. 1996. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* **87:** 175-185.

Kennedy T, Serafini T, de la Torre JR, and Tessier-Lavigne M. 1994. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* **78:** 425-435.

Kidd T, Bland KS, and Goodman CS. 1999. Slit is the midline repellent for the robo receptor in Drosophila. *Cell* **96:** 785-794.

Kidd T, Brose K, Mitchell KJ, Fetter RD, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, and Tear G. 1998. Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* **92:** 205-215.

Klar A, Baldassare M, and Jessell T. 1992. F-spondin: A gene expressed at high levels in the floor plate encodes a secreted protein that promotes neural cell adhesion and neurite extension. *Cell* **69:** 95-110.

Klein R. 2001. Excitatory Eph receptors and adhesive ephrin ligands. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13:** 196-203.

Kofuji P, Hofer M, Millen KJ, Millonig JH, and Davidson N. 1996. Functional analysis of the weaver mutant GIRK2 K+channel and rescue of weaver granule cells. *Neuron* **16:** 941-956.

Kolodkin AL. 1996. Semaphorins: Mediators of repulsive growth cone guidance. *Trends Cell Biol.* **6:** 15-22.

Komuro H, Yacubova E, Yacubova E, and Rakic P. 2001. Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J. Neurosci.* **21:** 527-540.

Kuhn TB, Stoeckli ET, Condrau MA, Rathjen FG, and Sonderegger P. 1991. Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4). *J. Cell Biol.* **115:** 1113-1126.

Kullander K, Croll SD, Zimmer M, Pan L, McClain J, Hughes V, Zabski S, DeChiara TM, Klein R, Yancopoulos GD, and Gale NW. 2001. Ephrin-B3 is the midline barrier that prevents corticospinal tract axons from recrossing, allowing for unilateral motor control. *Genes Dev.* **15:** 877-888.

Kunz B, Lierheimer R, Rader C, Spirig M, Ziegler U, and Sonderegger P. 2002. Axonin-1/TAG-1 mediates cell-cell adhesion by a cis-assisted trans-interaction. *J. Biol. Chem.* **277:** 4551-4557.

Kuzniecky R, Murro A, King D, Morawetz R, and Smith J. 1993. Magnetic resonance imaging in childhood intractable partial epilipsy: pathological correlation. *Neurology* **43:** 681-687.

Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227:** 680-685.

Lambert de Rouvoit C, and Goffinet AM. 2001. Neuronal migration. *Mech. Dev.* **105:** 47-56.

Lance-Jones C, and Langernaur CF. 1987. A new marker for identifying quail cells in the embryonic avian chimeras: a quail specific antiserum. *J. Histochem. Cytochem.* **135:** 771-780.

Lavdas A, Grigoriou M, Pachnis V, and Parnavelas JG. 1999. The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* **19:** 7881-7888.

Le Douarin NM, and McLaren A. 1984. *Chimeras in Developmental Biology*. Academic Press, New York.

Lehmann JM, Riethmuller G, and Johnson JP. 1989. MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86:** 9891-9895.

Lemmon V, Farr KL, and Lagenaur C. 1989. L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron* **2:** 1597-1603.

Lendahl U, Zimmerman LB, and McKay RD. 1990. CNS Stem Cells Express a New Class of Intermediate Filament Protein. *Cell* **60:** 585-595.

Leonardo ED, Hinck L, Masu M, Keino-Masu K, Fazeli A, Stoeckli ET, Ackerman SL, Weinberg RA, and Tessier-Lavigne M. 1997. Guidance of developing axons by netrin-1 and its receptors. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **62:** 467-476.

Leung-Hagesteijn C, Spence AM, Stern BD, Zhou Y, Su MW, Hedgecock EM, and Culotti JG. 1992. UNC-5, a transmembrane protein with immunoglobulin and thrombospondin type 1 domains, guides cell and pioneer axon migrations in C. elegans. *Cell* **71**.

Li HS, Chen JH, Wu W, Fagaly T, Zhou L, Yuan W, Dupuis S, Jiang ZH, Nash W, Gick C, Ornitz DM, Wu JY, and Rao Y. 1999. Vertebrate Slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons. *Cell* **96:** 807-818.

Lindner J, Rathjen FG, and Schachner M. 1983. L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature* **305:** 427-430.

Livesey FJ. 1999. Netrins and netrin receptors. *Cell Mol. Life Sci.* **56:** 62-68.

Livesey FJ, and Hunt SP. 1997. Netrin and netrin receptor expression in the embryonic mammaian nervous system suggests roles in retinal, striatal, nigral and cerebellar development. *Mol. Cell Neurosci.* **8:** 417-429.

Lois C, and Alvarez-Buylla A. 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* **264**.

Lois C, Garcia-Verdugo JM, and Alvarez-Buylla A. 1996. Chain migration of neuronal precursors. *Science* **271:** 978-981.

Lumsden A, and Krumlauf R. 1996. Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* **274:** 1109-1115.

Lustig M, Erskine L, Mason C, Grumet M, and Sakurai T. 2001. Nr-CAM expression in the developing mouse nervous system: ventral midline structures, specific fiber tracts, and neuropilar regions. *J. Comp. Neurol.* **434:** 13-28.

Lustig M, Sakurai T, and Grumet M. 1999. Nr-CAM promotes neurite outgrowth from peripheral ganglia by a mechanism involving axonin-1 as a neuronal receptor. *Dev. Biol.* **209:** 340-351.

Marin O, Anderson SA, and Rubenstein JLR. 2000. Origin and molecular specification of striatal interneurons. *J. Neurosci.* **20:** 6063-6076.

Marin O, and Rubenstein JL. 2001. A long remarkable journey: tangential migrations in the telencephalon. *Nature Neurosci.* **2:** 780-790.

Mason C, Edmondson JC, and Hatten ME. 1988. The extending astroglial process: development of glial cell shape, the growing tip and interactions with neurons. *J.Neurosci.* **8:** 3124-3134.

Masuda T, Okado N, and Shiga T. 2000. The involment of axonin/SC2 in mediating notochord-derived chemorepulsive activities for dorsal root gaglion cells. *Dev. Biol.* **224:** 112-121.

Mauro VP, Krushel LA, Cunningham BA, and G.M. E. 1992. Homophilic and heterophilic binding activities of Nr-CAM, a nervous system cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* **119:** 191-202.

McConnell SK. 1990. The specification of neuronal identity in the mammalian cerebral cortex. *Experientia* **46**.

McEvilly RJ, Erkman L, Luo L, Sawchenko PE, Ryan AF, and Rosenfeld MG. 1996. Requirement for Brn-3.0 in differentiation and survival of sensory and motor neurons. *Nature* **384:** 574-577.

Metin C, Deleglise D, Serafini T, Kennedy TE, and Tessier-Lavigne M. 1997. A role for netrin-1 in the guidance of cortical efferents. *Development* **124:** 5063-5074.

Michailoff GA, Burne RA, and Woodward DJ. 1978. Projection of the sensorimotor cortex to the basilar pontine nuclei in the rat: An autoradiographic study. *Brain Res.* **145:** 347-354.

Milev P, Maurel P, Haring M, Margolis RK, and Margolis RU. 1996. TAG-1/axonin-1 is a high-affinity ligand of neurocan, phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta, and N-CAM. *J. Biol. Chem.* **271:** 15716-15723.

Miura M, Asou H, Kobayashi M, and Uyemura K. 1992. Functional expression of a full-length cDNA coding for rat neural cell adhesion molecule L1 mediates homophilic intercellular adhesion and migration of cerebellar neurons. *J. Biol. Chem.* **267:** 10752-10758.

Morales G, Hubert M, Brummendorf T, Treubert U, Tarnok A, Schwarz U, and Rathjen FG. 1993. Induction of axonal growth by heterophilic interactions between the cell surface recognition proteins F11 and Nr-CAM/Bravo. *Neuron* **11:** 1113-1122.

Morris NR, Efimov VP, and Xiang X. 1998. Nuclear migration, nucleokinesis and lissencephaly. *Trends Cell Biol.* **8**.

Murakami F, and Shirasaki R. 1997. Guidance of circumferentially growing axons by the floor plate in the vertebrate central nervous system. *Cell Tissue Res.* **290:** 323-330.

Murakami S, Seki T, Rutishauser U, and Arai Y. 2000. Enzymatic removal of polysialic acid from neural cell adhesion molecule perturbs the migration route of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the developing chick forebrain. *J. Comp. Neurol.* **420:** 171-181.

Nakamoto M. 2000. Eph receptors and ephrins. *Inter. J. Biochem. Cell Biol.* **32:** 7-12.

Nakashiba T, Ikeba T, Nishimura S, Tashiro K, Honjo T, and Culotti JG. 2000. Netrin-G: a novel glycosyl phosphatidylinositol-linked mammalian netrin that is functionally divergent from classical netrins. *J. Neurosci.* **20:** 6540-6550.

Nguyen-Ba-Charvet K, and Chedotal A. 2002. Role of Slit proteins in the vertebrate brain. *J. Physiology* **96:** 91-98.

Nieto MA, Gilardi-Hebenstreit P, Charnay P, and Wilkinson DG. 1992. A receptor protein tyrosine kinase implicated in the segmental patterning of the hindbrain and mesoderm. *Development* **116:** 1137-1150.

Norman MG, McGillivary BC, Kalousek DK, Hill A, and Poskitt KJ. 1995. *Neuronal migration disorders and cortical dysplasias. Part I: migration disorders.* Oxford University Press, New York.

Nowakowski RS, and Rakic P. 1979. Mode of migration of neurons to the hippocampus: A Golgi and electron microscopic analysis in fetal rhesus monkey. *J.Neurocytol.* **8:** 697-718.

Ono K, and Kawamura K. 1989. Migration of immature neurons along tangentially oriented fibers in the subpial part of the fetal mouse medulla oblongata. *Exp.Brain Res.* **78:** 290-300.

Ono K, and Kawamura K. 1990. Mode of neuronal migration of the pontine stream in fetal mice. *Anat.Embryol.* **182:** 11-19.

Ono K, Tomasiewicz H, Magnuson T, and Rutishauser U. 1994. N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron* **13:** 595-609.

Orioli D, and Klein R. 1997. The Eph receptor family: axonal guidance by contact repulsion. *Trends in Genetics* **13:** 354-359.

O'Rourke NA, Chenn A, and McConnell SK. 1997. Postmitotic neurons migrate tangentially in the cortical ventricular zone. *Development* **124:** 997-1005.

O'Rourke NA, Dailey ME, Smith SJ, and McConnell SK. 1992. Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science* **258:** 299-302.

O'Rourke NA, Sullivan DP, Kaznowski CE, Jacobs AA, and McConnell SK. 1995. Tangential migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Development* **121:** 2165-2176.

Parnavelas JG. 2000. The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Trends Neurosci.* **23:** 126-131.

Patil N, Cox DR, Bhat D, Faham M, Myers RM, and Peterson AS. 1995. A potassium channel mutation in *weaver* mice implicates membrane excitability in granule cell differentiation. *Nat. Genet.* **11:** 126-129.

Patten BM, and Carlson BM. 1974. Foundations of embryology. *New York: McGraw-Hill***:** Third edition.

Pavlou O, Theodorakis K, Falk J, Kutsche M, Schachner M, Faivre-Sarrailh K, and Karagogeos D. 2002. Analysis of interactions of the adhesion molecule TAG-1 and its domains with other immunoglobulin superfamily members. *Mol. Cell Neurosci.* **in press**.

Pearlman AM, Faust PL, Hatten ME, and Brunstrom JE. 1998. New directions for neuronal migration. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8:** 45-54.

Pearlman AM, and Sheppard AM. 1996. Extracellular matrix in early cortical development. *Prog. Brain Res.* **108:** 117-134.

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

Price J, and Thurlow L. 1988. Cell lineage in the rat cerebral cortex: a study using retroviral-mediated gene transfer. *Development* **104:** 473-482.

Przyborski SA, Knowlew BB, and Ackerman SL. 1998. Embryonic phenotype of Unc5h3 mutant mice suggests chemorepulsion during the formation of the rostral cerebellar boundary. *Development* **125:** 41-50.

Puschel AW. 1999. Divergent properties of mouse netrins. *Mech. Dev.* **83:** 65-75.

Rader C, Stoeckli ET, Ziegler U, Osterwalder T, Kunz B, and Sonderegger P. 1993. Cell-cell adhesion by homophilic interaction of the neuronal recognition molecule axonin-1. *Eur. J. Biochem.* **215:** 133-141.

Rakic P. 1971a. Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res.* **33:** 471-476.

Rakic P. 1971b. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus rhesus. *J.Comp.Neurol.* **141:** 283-312.

Rakic P. 1972. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* **145:** 61-84.

Rakic P. 1977. Genesis of the dorsal lateral geniculate nucleus in the rhesus monkey: site and time of origin, kinetics of proliferation, routes of migration. *J. Comp. Neurol.* **176:** 23-52.

Rakic P. 1985. The Cell in Contact. In: Edelman GM and Thiery JP, eds.: Wiley. 67-91.

Rakic P. 1990. Principles of neural cell migration. *Experientia* **46:** 882-891.

Rakic P, and Sidman RL. 1973a. Sequence of developmental abnormalities leading to granule cell deficit in cerebellar cortex of *weaver* mutant mice. *J. Comp. Neurol.* **152:** 103-132.

Rakic P, and Sidman RL. 1973b. Weaver mutant mouse cerebellum: Defective neuronal migration secondary to abnormality of Bergmann glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70:** 240-244.

Raper JA. 2000. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10:** 88-94.

Rathjen FG, and Schachner M. 1984. Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *EMBO J.* **3:** 1-10.

Reid CB, Liang I, and Walsh C. 1995. Systematic widespread clonal organization in cerebral cortex. *Neuron* **15:** 299-310.

Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, Whenert M, and Faustinella F. 1993. Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein β-subunit-like repeats. *Nature* **364:** 717-721.

Rezai Z, and Yoon CH. 1972. Abnormal rate of granule cell migration in the cerebellum of "*weaver*" mutant mice. *Dev. Biol.* **29:** 17-26.

Rosen I, and Sjolung B. 1973. Organization of group I activated cells in the main external cuneate nuclei of the cat: Identification of muscle receptors. *Exp. Brain Res.* **16:** 221-237.

Roskams AJ, Cai X, and Ronnett GV. 1998. Expression of neuron-specific beta-III tubulin during olfactory neurogenesis in the embryonic and adult rat. *Neuroscience* **83:** 191-200.

Ross ME, Swanson K, and Dobyns WB. 2001. Lissencephaly with cerebellar hypoplasia (LCH): a heterogeneous group of cortical malformations. *Neuropediatics.* **32:** 256-263.

Ross ME, and Walsh C. 2001. Human brain malformation and their lessions for neuronal migration. *Annu. Rev. Neurosci.* **24:** 1041-1070.

Roste LS, Dietrichs E, and Walberg F. 1985. A projection from the periaqueductal gray to the lateral reticular nucleus in the cat. *Anat.Embryol. (Berl)* **172:** 339-343.

Rousselot P, Lois C, and Alvarez-Buylla A. 1995. Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice. *J. Comp. Neurol.* **351:** 51-61.

Rutishauser U, and Landmesser LT. 1996. Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends Neurosci.* **19:** 422-427.

Ryder E, and Cepko LC. 1994. Migration patterns of clonally related granule cells and their progenitors in the developing chick cerebellum. *Neuron* **12:** 1011-1029.

Sakurai T, Lustig M, Babiarz J, Furley A, Tait S, Brophy PJ, Brown SA, Brown LY, Mason C, and Grumet M. 2001. Overlapping functions of the cell adhesion molecules NrCAM and L1 in cerebellar granule cell development. *J Cell Biol* **154:** 1259-1273.

Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHLP, NY.

Sandell JH, and Masland RH. 1988. Photoconversion of some fluorescent markers to a diaminobenzidine product. *J. Histochem. Cytochem.* **36:** 555-559.

Sanes JP. 1989. Extracellular matrix molecules that influence neural development. *Annu. Rev. Neurosci.* **12:** 491-516.

Schwanzel-Fukuda M, and Pfaff D. 1989. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* **338:** 161-164.

Schwanzel-Fukuda M, and Pfaff D. 1990. The migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons from the medial olfactory placode into the medial basal forebrain. *Experientia* **46:** 956-962.

Schwarting GA, Kostek C, Bless EP, Ahmad N, and Tobet SA. 2001. Deleted in colorectal cancer (DCC) regulates the migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons to the basal forebrain. *J. Neurosci.* **21:** 911-919.

Seeger MA, and Beattie CE. 1999. Attraction versus repulsion: modular receptors make the difference in axon guidance. *Cell* **97**.

Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang E, Beddington R, Skarnes WC, and Tessier-Lavigne M. 1996. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* **87:** 1001-1014.

Serafini T, Kennedy T, Galko M, Mirzyan C, Jessell T, and Tessier-Lavigne M. 1994. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins with homology to C. elegans UNC-6. *Cell* **78:** 409-424.

Shirasaki R, Katsumata R, and Murakami F. 1998. Change in chemoattractant responsiveness of developing axons at an intermediate target. *Science* **279:** 105-107.

Shirasaki R, Tamada A, Katsumata R, and Murakami F. 1995. Guidance of cerebellofugal axons in the rat embryo: directed growth towards the floor plate and subsequent elongation along the longitudinal axis. *Neuron* **14:** 961-972.

Sidman RL, Green MC, and Appel F. 1965. *Catalog of the neurological mutants of the mouse.* Harvard University Press, Cambridge, MA.

Sidman RL, and Rakic P. 1973. Neuronal migration with special refence to developing human brain:a review. *Brain Res.* **62:** 1-35.

Sievers J, Pehlemann FW, Gude S, and Berry M. 1994. Meningeal cells organize the superficial glia limitans of the cerebellum and produce components of both the interstitial matrix and the basement membrane. *J. Neurocytol.* **23:** 135-149.

Simmons DL. 1993. Dissecting the modes of interactions amongst cell adhesion molecules. *Development* **1993 Suppl.:** 193-203.

Skaper SD, Moore SE, and Walsh FS. 2001. Cell signalling cascades regulating neuronal growth-promoting and inhibitory cues. *Prog. Neurol.* **65:** 593-608.

Slesinger PA, Patil N, Liao YJ, Jan Y-N, Jan LY, and Cox DR. 1996. Functional effects of the mouse weaver mutation on G protein-gated inwardly rectifying K+channels. *Neuron* **16:** 321-331.

Stallcup WB, and Beasley L. 1985. Involvment of the nerve growth factor-inducible large external glycoprotein (NILE) in neurite fasciculation in primary cultures of rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82:** 1276-1280.

Stein E, and Tessier-Lavigne M. 2001. Hierarchical organization of guidance receptors:Silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* **291:** 1928-1938.

Stoeckli ET, and Landmesser LT. 1995. Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play different roles in the *in vivo* guidance of chick commissural neurons. *Neuron* **14:** 1165-1179.

Stoeckli ET, and Landmesser LT. 1998. Axon giudance at choice point. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8:** 73-79.

Stoeckli ET, Sonderegger P, Pollerberg GE, and Landmesser LT. 1997. Interference with Axonin-1 and Nr-CAM interactions unmasks a floor-plate activity inhibitory for commissural axons. *Neuron* **18:** 209-221.

Storm EE, and Kingsley DM. 1999. GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Dev. Biol.* **209:** 11-27.

Stottmann R, W., and Rivas R, J. 1998. Distribution of TAG-1 and Synaptophysin in the developing cerebellar cortex : relationship to Purkinje cell dentritic development. *J. Comp. Neurol.* **395:** 121-135.

Sugawa M, Ono K, Yasui Y, Kishi T, and Tsumori T. 1997. Enhancement of neurite outgrowth by the soluble form of human L1 (neural cell adhesion molecule). *Neuroreport* **8:** 3157-3162.

Sussel L, Marin O, Kimura S, and Rubenstein JLR. 1999. Loss of *Nkx2.1* homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* **126:** 3359-3370.

Suter DM, Pollerberg GE, Buchstaller A, Giger RJ, Dreyer WJ, 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:** 1067-1081.

Taber-Pierce E. 1966. Histogenesis of the nuclei griseum pontis, corporis pontobulbaris and reticularis tegmenti pontis (Bechterew) in the mouse. An autoradiographic study. *J.Comp.Neurol.* **126:** 219-254.

Takeichi M. 1987. Cadherins: A molecular family essential for selective cell-cell adhesion and animal morphogenesis. *Trends Genet.* **3:** 213-217.

Tamada A, Shirasaki R, and Murakami F. 1995. Floor plate chemoattracts crossed axons and chemoreppels uncrossed axons in the vertebrate brain. *Neuron* **14:** 1083-1093.

Tamagnone L, and Comoglio PM. 2000. Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond. *Trends Cell Biol.* **10:** 377-383.

Tamamaki N, Fugimori KE, and Takauji R. 1997. Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J. Neurosci.* **17:** 8313-8323.

Tan K, and Le Dourin NM. 1991. Development of the nuclei and cell migration in the medulla oblongata. Application of the quail-chick chimera system. *Anat.Embryol.* **183:** 321-343.

Tang J, Rutishauser U, and Landmesser LT. 1994. Polysialic acid regulates growth cone behavior during sorting of motor axons in the plexus region. *Neuron* **13:** 405-414.

Terman JR, and Kolodkin AL. 1999. Attracted or repelled? Look within. *Neuron* **23:** 193-195.

Tessier-Lavigne M, and Goodman CS. 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science* **274:** 1123-1133.

Tessier-Lavigne M, Placzek M, Lumsden AGS, Dodd J, and Jessell T. 1988. Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central neurvous system. *Nature* **336:** 775-778.

Tomasiewicz H, Ono K, Yee D, Thompson C, Goridis C, Rutishauser U, and Magnuson T. 1993. Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron* **11:** 1163-1174.

Treubert U, and Brummendorf T. 1998. Functional cooperation of beta1-integrins and members of the Ig superfamily in neurite outgrowth induction. *J. Neurosci.* **18:** 1795-1905.

Tsiotra P, 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:** 29216-29222.

Turner EE, Jenne KJ, and Rosenfeld MG. 1994. Brn-3.2: A Brn-3-related transcription factor with distinctive central nervous system expression and regulation by retinoic acid. Neuron 12, 205-218. *Neuron* **12:** 205-218.

van der Kooy D, and Fishell G. 1987. Neuronal birthdate underlies the development of striatal compartments. *Brain Res.* **401:** 155-161.

Varela-Echavarria A, and Guthrie S. 1997. Molecules making waves in axon guidance. *Genes Dev.* **11:** 545-557.

Vielmetter J, Kayyem JF, Roman JM, and Dreyer WJ. 1994. Neogenin, an avian cell surface protein expressed during terminal neuronal differentiation, is closely related to the human tumor suppressor module deleted in colorectal cancer. *J. Cell Biol.* **127:** 2009-2020.

Virgintino D, Ambrosini M, D'Errico P, Bertossi M, Papadaki C, Karagogeos D, and Gennarini G. 1999. Regional distribution and cell type-specific expression of the mouse F3 axonal glycoprotein: a developmental study. *J. Comp. Neurol.* **413:** 357-372.

Walsh C, and Cepko CL. 1988. Clonally related cortical cells show several migration patterns. *Science* **241:** 1342-1345.

Walsh C, and Cepko CL. 1992. Widespread dispersion of neuronal clones accross functional regions of the cerebral cortex. *Science* **255:** 434-440.

Wang KH, Brose K, Arnott D, Kidd T, Goodman CS, Henzel W, and Tessier-Lavigne M. 1999. Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell* **96:** 771-784.

Wang SW, Gan L, Martin SE, and Klein WH. 2000. Abnormal polarization and axon outgrowth in retinal ganglion cells lacking the POU-domain transcription factor Brn-3b. *Mol.Cell Neurosci.* **16:** 141-156.

Wichterle H, Garcia-Dominguez M, and Alvarez-Buylla A. 1997. Direct evidence for homotypic, glia-indipendent neuronal migration. *Neuron* **18:** 779-791.

Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Herrera DG, and Alvarez-Buylla A. 1999. Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. *Nature Neurosci.* **2:** 461-466.

Wilkinson D. 2001. Multiple roles of Eph receptors and ephrins in neural development. *Nat. Rev. Neurosci.* **2:** 155-164.

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

Wray S, Grant P, and Gainer H. 1989. Evidence that the cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory plueode. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86:** 8132-8136.

Xiao ZC, Revest JM, Laeng P, Rougon G, Schachner M, and Montag D. 1998. Defasciculation of neurites is mediated by tenascin-R and its neuronal receptor F3/11. *J. Neurosci. Res.* **52:** 390-404.

Yachnis AT, and Rorke LB. 1999a. Cerebellar and brainstem development: an overview in relation to Joubert syndrome. *J. Child Neurol.* **14:** 570-573.

Yachnis AT, and Rorke LB. 1999b. Neuropathology of Joubert syndrome. *J. Child Neurol.* **14:** 655-659.

Yamamoto M, Boyer AM, Crandall JE, Edwards M, and Tanaka H. 1986. Distribution of stage-specific neurite-associated proteins in the developing murine nervous system recognized by a monoclonal antibody. *J.Neurosci.* **6:** 3576-3594.

Yee KT, Simon HH, Tessier-Lavigne M, and O'Leary DM. 1999. Extension of long leading processes and neuronal migration in the mammalian brain directed by the chemoattractant netrin-1. *Neuron* **24:** 607-622.

Yin Y, Sanes JP, and Miner JH. 2000. Identification and expression of mouse netrin-4. *Mech. Dev.* **96:** 115-119.

Yokoyama N, Romero MI, Cowan CA, Galvan P, Helmbacher F, Charnay P, Parada LF, and Henkemeyer M. 2001. Forward signaling mediated by ephrin-B3 prevents contralateral corticospinal axons from recrossing the spinal cord midline. *Neuron* **29:** 85-97.

Yoshida K, Rutishauser U, Crandall JE, and Schwarting GA. 1999. Polysialic acid facilitates migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons on vomeronasal axons. *J. Neurosci.* **19:** 794-801.

Yoshida K, Tobet SA, Crandall JE, Jimenez TP, and Schwarting GA. 1995. The migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the developing rat is associated with a transient, caudal projection of the vomeronasal nerve. *J. Neurosci.* **15:** 7769-7777.

Yu TW, and Bargmann CI. 2001. Dynamic regulation of axon guidance. *Nat. Neurosci.* **4:** 1169-1176.

Zheng C, Heintz N, and Hatten ME. 1996. CNS gene encoding astrotactin, which supports neuronal migration along glia fibers. *Science* **272:** 417-419.

Zou Y, Stoeckli ET, Chen JH, and Tessier-Lavigne M. 2000. Squeezing axons out of the gray matter: a role for slit and semaphorin proteins from midline and ventral spinal cord. *Cell* **102:** 363-375.

Zuellig RA, Rader C, Schroeder A, Kalousek MB, Von Bohlen und Halbach F, Osterwalder T, Inan C, Stoeckli ET, Affolter HU, Fritz A, Hafen E, and Sonderegger P. 1992. The axonally secreted cell adhesion molecule, axonin-1. *Eur. J. Biochem.* **204:** 453-463.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Development 129, 287-296 (2002)
Printed in Great Britain © The Company of Biologists Limited 2002
DEV1737

A combination of chain and neurophilic migration involving the adhesion molecule TAG-1 in the caudal medulla

Katerina Kyriakopoulou[1], Isabel de Diego[2,*], Marion Wassef[2] and Domna Karagogeos[1,†]

[1]Department of Basic Science, Medical School, University of Crete and Institute of Molecular Biology and Biotechnology, PO Box 1527, 711 10 Heraklion, Greece
[2]CNRS UMR 8542, Regionalisation Nerveuse, Ecole Normale Superieure, 46 rue d'Ulm 75230 Paris Cedex 5, France
*Present address: Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos, 29071 Málaga, Spain
†Author for correspondence (e-mail: karagoge@nefeli.imbb.forth.gr)

Accepted 17 October 2001

SUMMARY

Neuronal populations destined to form several precerebellar nuclei are generated by the rhombic lip in the caudal hindbrain. These immature neurons gather into the olivary and the superficial migratory streams and migrate tangentially around the hindbrain to reach their final position. We focus on the cells of the superficial stream that migrate ventrally, cross the midline and form the lateral reticular (LRN) and external cuneate (ECN) nuclei. The cells of the superficial steam are preceded by long leading processes; in the dorsal neural tube, they migrate in close apposition to each other and form distinct chains, whereas they disperse and follow Tuj-1 immunoreactive axons on reaching the ventral hindbrain. This suggests that, in the superficial stream, neuronal migration combines both homotypic and heterotypic mechanisms. We also show that the adhesion molecule TAG-1 is expressed by the migrating cells. Blocking TAG-1 function results in alterations in the superficial migration, indicating that TAG-1 is involved in the superficial migration. Other members of the immunoglobulin superfamily and known ligands of TAG-1 are also expressed in the region of the migration but are not involved in the migration. These findings provide evidence that the TAG-1 protein is involved as a contact-dependent signal guiding not only axonal outgrowth but also cell migration.

Key words: Tangential migration, Precerebellar nuclei, LRN, ECN, TAG-1, IgSF, Medulla, Mouse

INTRODUCTION

In the developing nervous system neurons need to migrate, often long distances, to settle into their final positions and form synaptic contacts. The migration of neurons takes place in two directions. Radial migration occurs on the processes of glial cells and has been studied extensively in the cortex and the cerebellum (Rakic, 1985). Tangential migration occurs perpendicular to the glial scaffolding; it is called 'neurophilic' when the cells migrate in close apposition to axonal fascicles and 'chain migration' when the cells migrate in close contact to each other without using a glial or neuronal scaffold (Ono and Kawamura, 1990; Rakic, 1990; Yee et al., 1999). Tangentially migrating neurons are found in the cortex, the cerebellum and in the rhombencephalon (Komuro et al., 2001; Ono and Kawamura, 1989; Ryder and Cepko, 1994; Tamamaki et al., 1997). Some of the cues guiding tangential migration have started being revealed and the picture that is emerging is that the same families of signals involved in the directional guidance of developing growth cones may also guide the translocation of cell bodies (Alcantara et al., 2000; Denaxa et al., 2001; Yee et al., 1999).

In the rhombencephalon, tangential migrations underlie the formation of precerebellar nuclei. The neurons that form these nuclei are generated at the level of the rhombic lip in the dorsal neuroepithelium of the caudal hindbrain, and then follow various paths to reach their final positions (Altman and Bayer, 1987a; Altman and Bayer, 1987b; Altman and Bayer, 1987c). The neurons of the external cuneate, lateral reticular, pontine and reticulotegmental nucleus project towards the cerebellum and supply mossy fibers to granule cells. The axons of the inferior olive cells project to the Purkinje cells of the cerebellum, forming the climbing fibers (Rodriguez and Dymecki, 2000; Wang and Zoghbi, 2001; Wingate, 2001). Recent studies indicate that the precursors of the precerebellar mossy fiber neurons appear to derive from a separate progenitor population from the progenitors of the climbing fiber neurons (Rodriguez and Dymecki, 2000).

In the present study, we have focused on the population of precerebellar neurons which are generated in the rhombic lip of rhombomeres 7/8 and are destined to form the lateral reticular nucleus (LRN) and the external cuneate nucleus (ECN). These neurons circumnavigate the medulla oblongata just under the pial surface in a direction perpendicular to the anteroposterior axis (Altman and Bayer, 1987b; Bourrat and Sotelo, 1990; Tan and Le Dourin, 1991). These cells cross the ventral midline and continue dorsally forming the nuclei on the contralateral side. The migration may occur on axon fascicles, suggesting that these

tangential fibers serve as guidance substrates for the relocation of neuronal cell bodies (Ono and Kawamura, 1989). We characterize the superficial migration of LRN and ECN neurons in vivo and in vitro. We provide evidence that the neuronal adhesion molecule TAG-1 (Cntn2 – Mouse Genome Informatics) plays a guiding role. TAG-1 is a member of the immunoglobulin superfamily (IgSF) (Furley et al., 1990) and interacts with several other proteins of the same family (Buchstaller et al., 1996; Buttiglione et al., 1998; Felsenfeld et al., 1994; Fitzli et al., 2000; Grumet, 1997; Lustig et al., 1999; Ono et al., 1994; Rathjen and Schachner, 1984). TAG-1 is transiently expressed by migrating neurons in different regions of the developing nervous system as in granule cells of the cerebellum (Bailly et al., 1996; Stottmann and Rivas, 1998; Yamamoto et al., 1986), and pontine and facial branchiomotor neurons of the hindbrain (Garel et al., 2000; Wolfer et al., 1994; Yee et al., 1999). It is also expressed by migrating neurons in the system under investigation. Blocking the function of the protein in vitro perturbs the migration of precerebellar neurons. The mechanism by which TAG-1 mediates this migration appears not to involve any of its known IgSF interacting partners. Rather, our experiments suggest that homophilic recognition of TAG-1 on the migrating cells may be the mechanism responsible for the superficial migration.

MATERIALS AND METHODS

Animals

CBA×C57Bl/10 mice were used and the day of vaginal plug detection was considered as embryonic day 0.5 (E0.5). Pregnant females were sacrificed with an overdose of ether or chloroform. Embryos were recovered in chilled phosphate-buffered saline (PBS) and were either dissected for explantation or fixed.

L1 deficient mice: female hemizygote were crossed with wild-type C57Bl/10 males. Pregnant females resulting from these crosses were sacrificed at E12.5 and each embryo was sex-genotyped and also genotyped by PCR for the normal and the L1-deficient allele (Dahme et al., 1997). In our experiments, we used males that carried the mutant allele of the X-linked L1 gene and wild-type animals.

Immunocytochemistry

Dissected hindbrains or explants were fixed overnight in 4% paraformaldehyde at 4°C. Immunocytochemistry was performed on vibratome sections (100 μm thick) of tissue embedded in agarose 4% in PBS or on cryostat sections (16 μm thick) of sucrose cryoprotected hindbrains or on whole explants. The sections or explants were processed as described previously (Denaxa et al., 2001). Primary antibodies were used as follows: monoclonal antibody (mAb) against TAG-1 (4D7, 1:1000) (Dodd et al., 1988), mAb against class III β-tubulin (Tuj-1, 1:1000, a gift from A. Frankfurter), mAb against PSA-NCAM (5A5, 1:1000) (Dodd et al., 1988), rabbit polyclonal antibody against L1 (1:1000) (Rathjen and Schachner, 1984), rabbit antisera to bacterially expressed F3 (Gennarini et al., 1991). In addition, antibodies against NrCAM were generated in rabbits according to Davis et al. (Davis et al., 1996). These antisera did not reveal any staining by immunohistochemistry in our system, while they detect NrCAM in other rat or mouse neural tissues. Secondary antibodies were used as follows: biotinylated anti-mouse IgM (1:250, Jackson), FITC-conjugated anti mouse-IgM (1:100, Jackson), FITC-conjugated anti-rabbit (1:250, Amersham) and Cy3-conjugated anti-mouse IgG (1:1000, Jackson).

Some sections were processed for histological staining with Cresyl Violet.

In situ hybridization

In situ hybridization experiments were performed on whole-mount explants or on vibratome sections (200 μm thick) according to the protocol described by Bally-Cuif and Wassef (Bally-Cuif and Wassef, 1994). The TAG-1- and F3-specific probes were produced as described by Denaxa et al. (Denaxa et al., 2001) and Virgintino et al. (Virgintino et al., 1999), respectively. The NrCAM full-length cDNA was used as a template for the antisense and sense probes (Davis et al., 1996). In all cases, no specific signal was observed with the sense probes.

Preparation of the explants

Explants of the neural tube containing the cerebellum and medulla oblongata were dissected from E12.5 brains and freed from meninges in PBS-0.6% glucose or in L15 (Gibco, BRL). They were opened on the dorsal midline in an 'open book' configuration and were cultured on Biopore membranes (Millipore) floating on DMEM/F12 (Gibco) supplemented with 0.6% glucose, 0.02 mM glutamine, 0.0075% sodium bicarbonate, 5 mM Hepes, penicillin (5 U/ml)/streptomycin (5 mg/ml), fetal calf serum (5%) and normal horse serum (5%). Ablation of the rhombic lip was performed on E12.5 hindbrain explants at the beginning of the culture period.

DiI tracing

A small crystal of 1,1′-dioctodecyl-3,3,3′,3′-tetramethyl-indocarbocyanine (DiI) was placed at the rhombic lip of E12.5 hindbrain explants. Some of the explants were fixed at E12.5 and other cultured for the appropriate time.

5-bromo-2-deoxy-uridine labeling and immunocytochemistry

Some E12.5 explants were incubated for 30 minutes in culture medium containing BrdU (10 mM) at 37°C, then washed, fixed in 4% paraformaldehyde and processed for in situ hybridization for TAG-1 and BrdU immunocytochemistry.

For the detection of incorporated BrdU, transverse cryostat sections of explants were incubated in 2N HCL for 45 minutes, rinsed in PBS and digested for 5 minutes with 10 mg/ml proteinase K. After rinses with PBS, the sections were postfixed in 4% parafolmadehyde/0.2% glutaraldehyde and incubated with anti BrdU (1/300, Becton Dickinson) in PBS, 0.2% gelatin, 0.5% Triton X-100 at 4°C overnight. After extensive washing with PBS, the sections were incubated for 2 hours at room temperature with biotinylated anti-mouse IgG (1:250, Jackson) and then treated as described above.

Function blocking experiments

Polyclonal antibodies against TAG-1 and Fab fragments were used as described previously in function blocking experiments (Denaxa et al., 2001). Antigen-depleted antibody solutions were produced as follows: CHO cells stably transfected to express TAG-1 on their surface (CHO-TAG-1 cells) (Buttiglione et al., 1998) were grown to confluency in 35 mm petri dishes. Culture medium containing 200-400 μm/ml antibody against TAG-1 was incubated for 30 minutes with CHO-TAG-1 cells. This operation was repeated 12 times changing to a new 35 mm dish each time. The complete absorption of TAG-1 antibodies from the culture medium was checked by immunocytochemistry on cryostat sections of E13.5 mouse hindbrain. As a control condition, we used non-depleted medium incubated with CHO untransfected cells. In addition, control polyclonal antibodies, Fab fragments from polyclonal antibodies against L1, soluble TAG-1-Fc protein and control MUC18-Fc were used as before (Denaxa et al., 2001; Rathjen and Schachner, 1984; Buttiglione et al., 1998; Lehmann et al., 1989).

For the cleavage of TAG-1 from the surface of the cells we used phosphatidylinositol-specific phospolipase C (PI-PLC, GLYKO) at concentration 100 mU/ml in the culture medium (Masuda et al., 2000). To remove the polysialic acid of NCAM we incubated the explants with 1 μl/ml of EndoN enzyme according to Hu et al. (Hu et al., 1996). This

amount is in a sufficient excess to remove all immunoreactive PSA from the brain for over a week (Ono et al., 1994).

The explants dissected at E12.5 were incubated in medium with blocking or control reagents for 2-4 days. Unless otherwise specified, all the reagents were added in the culture medium at the beginning of the culture but PI-PLC was added every 12 hours during the culture period.

Microscopy

Immunofluorescent explants were viewed and images were generated in a Leica TCS-NT Laser Scanning microscope using the 10×, 20×, 40× and 63× objectives. All other samples were viewed in a Zeiss Axioskop microscope and photographs were taken with a 35 mm camera using Fujichrome Sensia I 100ASA film.

RESULTS

TAG-1 is a marker of the superficial migration at the caudal hindbrain

In a screen to identify markers of the superficial migration in the caudal hindbrain, we observed that the adhesion molecule TAG-1 (Wolfer et al., 1994) was expressed in neurons of the superficial migratory stream.

At embryonic day 12.5 (E12.5) on transverse sections of caudal medulla at the level of the rhombomere 7 and 8 stained with Cresyl Violet (Fig. 1A) there were no superficially migrating cells. At that stage, TAG-1 transcripts were detected at the rhombic lip (asterisks in Fig. 1B) where the cells of the superficial stream are generated. TAG-1 was also expressed in the subventricular zone (s in Fig. 1B) and hypoglossal nucleus (h in Fig. 1B). TAG-1 protein was also widely expressed on superficially located fibers at this level (arrows in Fig. 1C). One day later, at E13.5, cell bodies were detected in the superficial region of the medulla and beneath the floor plate on sections stained with Cresyl Violet (arrowheads in Fig. 1D). This superficial row of cells expressed TAG-1 mRNA (Fig. 1E) and protein (Fig. 1F) and it corresponded to the superficial migratory stream. At E14.5 these cells were still migrating and expressed TAG-1. However, at E15.5, when the migration has been completed (Ono and Kawamura, 1989) and the cells had formed the LRN and ECN, no TAG-1 was detected (data not shown) (Wolfer et al., 1994). TAG-1 was still expressed only by the hypoglossal nucleus. Thus, in vivo, TAG-1 is expressed transiently by the cells of the superficial migratory stream at the caudal medulla and is downregulated when the cells are settled in their final positions.

The superficial migration in hindbrain explants in vitro

To investigate the mechanisms involved in the superficial migration at the caudal hindbrain we examined whether this migration can resume in vitro. We prepared explants containing this region of the medulla by dissecting the hindbrain of embryos at E12.5, cutting at the dorsal midline and placing the explants in an ‘open book’ configuration with the ventricular side down (Fig. 1G). The explants were cultured in vitro for 1 to 5 days (1DIV-5DIV).

It is known that in certain structures of the developing nervous system TAG-1 is expressed by postmitotic cells (Furley et al., 1990). It is also known that the migrating cells of the superficial stream are postmitotic (Altman, 1987b). To investigate whether TAG-1 expression starts after the last mitosis, explants dissected at E12.5 were incubated with BrdU for 30 minutes and then fixed. After TAG-1 in situ hybridization and BrdU immunocytochemistry on transverse section of these explants we observed that TAG-1 and BrdU staining were distinct (Fig. 1H). The mitotic cells at this developmental stage were detected at the most lateral side of the rhombic lip (on the left of Fig. 1H) and at the ventricular zone, but TAG-1 was expressed by postmitotic cells that have just started to migrate ventrally (arrow in Fig. 1H).

On explants dissected at E12.5, the cells of the superficial stream were generated at the rhombic lip and migrated towards the floor plate as indicated by the arrows in Fig. 1I. TAG-1 mRNA was detected in whole-mount in situ hybridization experiments on explants at E12.5, at the rhombic lip (asterisk at Fig. 1J). TAG-1 was also expressed by the facial branchiomotor neurons (fbm in Fig. 1J) and subventricular zone (Fig. 1J,K). After 1DIV, TAG-1 labeled migrating cells emerging from the rhombic lip on both sides of the explant (between the broken lines in Fig. 1K) and after 2DIV, the migrating cells have reached and crossed the midline (Fig. 1L). Two different patterns of migration were observed. At the beginning of the migration, when the cells were still located more dorsally (at the lateral parts of the explants), the TAG-1-positive cells formed characteristic stripes as they migrated. By contrast, when the cells reached the ventral part of medulla, near and beneath the floor plate (in the middle of the explant), the TAG-1-positive cells were more individually arranged. In vitro, the migrating cells do not downregulate TAG-1, even if they remain in culture for 5 days (contrary to in vivo conditions, where the migrating cells stop expressing TAG-1 at E15.5 and form the LRN and ECN).

It is well established that the expression of many guidance molecules that control the crossing of commissural axons across the midline is downregulated or upregulated upon crossing of the midline (Shirasaki et al., 1998; Stein and Tessier-Lavigne, 2001). Spinal commissural axons express TAG-1 protein on their surface as they project towards the floor plate, but after they crossed the midline TAG-1 is downregulated and another adhesion molecule, L1 is upregulated and expressed by the commissural axons (Dodd et al., 1988).

We set out to investigate whether TAG-1 is still expressed by migrating cells of LRN and ECN after they cross the midline. The symmetric streams of migrating TAG-1 positive neurons from each side of the rhombic lip meet beneath the floor plate at around day E13.5 and then cross the midline, intermingling with each other. In order to be able to follow the expression of TAG-1 in neurons originating from only one side of the rhombencephalon, we performed unilateral ablations of the rhombic lip on explants at E12.5. As illustrated in Fig. 1M, the rhombic lip from one side of the explant was ablated at the beginning of the culture, before the TAG-1 positive cells started their migration. After 1DIV, TAG-1-positive cells emerged only from the intact rhombic lip, suggesting that all the mitotic progenitors have been removed by the ablation. After 2DIV, TAG-1-positive cells were detected mostly on the non-ablated side but a few were also found on the ablated side. These cells had crossed the midline and still expressed TAG-1 mRNA (Fig. 1N).

To exclude the possibility that cells of the superficial migration express TAG-1 mRNA but not the protein after

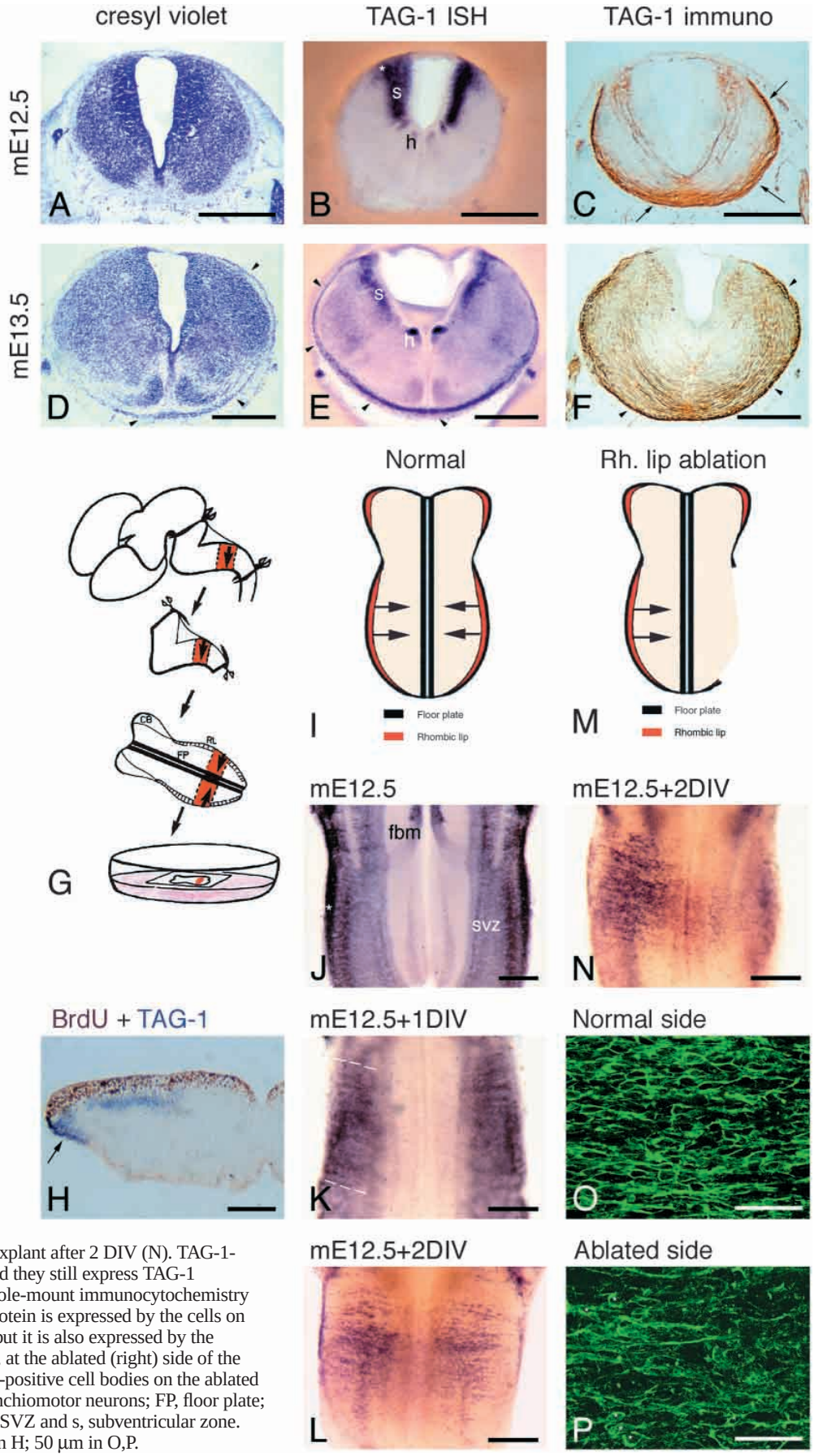


Fig. 1. Characterization of the superficial migration in vivo and in vitro. Transverse sections of E12.5 (A-C) and E13.5 (D-F) mouse hindbrain at the level of the superficial migration. Cresyl Violet staining (A,D), in situ hybridization (B,E) and immunocytochemistry (C,F) for TAG-1. At E12.5 the cells of the superficial stream have not started their migration yet (A) but they have just been generated at the rhombic lip (asterisk in B). TAG-1 protein is widely expressed at the superficially located fibers (arrows in C). At E13.5, the migrating TAG-1-positive cells have reached and crossed the midline (arrowheads in D-F). (G) Schematic representation of the dissection procedure. The hindbrains of E12.5 embryos were dissected, cut at the dorsal midline and cultured as an 'open book' configuration on Biopore membranes for the appropriate time (days in vitro, DIV). The region of the migration is marked in red and the arrows indicate the direction of the migration on the explant. (H) Transverse section of an explant taken at E12.5 at the region of the superficial migration. BrdU and TAG-1 staining is distinct. At the region of the rhombic lip mitotic (BrdU positive) cells are detected at the most lateral side and TAG-1 transcripts are expressed only by those postmitotic cells that have started to migrate ventrally (arrow). BrdU-positive cells are also detected in the ventricular zone while TAG-1 signal is found in the subventricular zone. (I) Diagram of a normal explant on E12.5 at the beginning of culture period. Arrows indicate the direction of the migration within the explant. (J-L) Whole-mount in situ hybridization for TAG-1 on explants at E12.5 (J), E12.5 + 1DIV (K) and E12.5 + 2 DIV (L). At E12.5, the cells of the superficial stream have just been generated at the rhombic lip (asterisk in J). One day later they have started to migrate (between the broken lines in K) but have not reached the midline yet, while 2 days later they have crossed the midline (L). The TAG-1-positive cells form characteristic stripes as they migrate. (M-N) Diagram of an explant with a unilateral rhombic lip ablation (M) and whole-mount in situ hybridization for TAG-1 on ablated explant after 2 DIV (N). TAG-1-positive cells have crossed the midline and they still express TAG-1 transcripts. (O,P) Confocal images of whole-mount immunocytochemistry for TAG-1 on ablated explants. TAG-1 protein is expressed by the cells on the normal (left) side of the explant (O), but it is also expressed by the migrating cells after crossing the midline, at the ablated (right) side of the explant (P). Asterisks indicate the TAG-1-positive cell bodies on the ablated side (P). CB; cerebellum; fbm, facial branchiomotor neurons; FP, floor plate; h, hypoglossal nucleus; RL, rhombic lip; SVZ and s, subventricular zone. Scale bars: 500 μm in A-F,J-N; 200 μm in H; 50 μm in O,P.

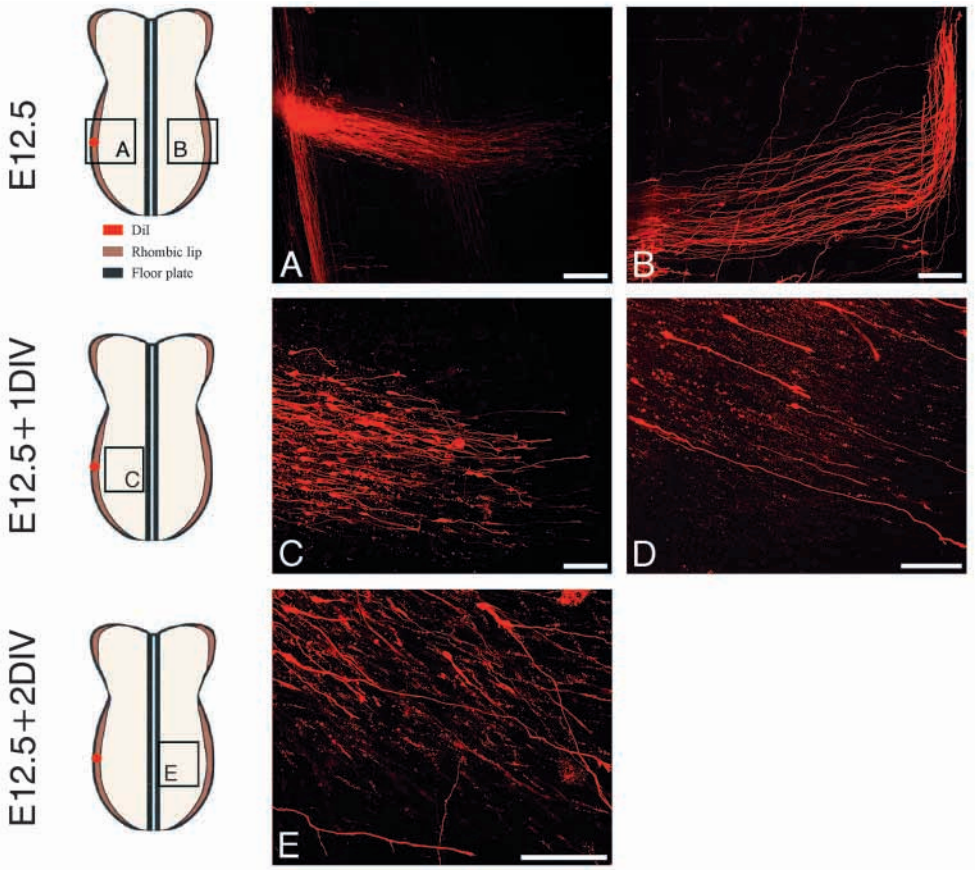


Fig. 2. Migrating cells extend long leading processes towards the direction of the migration. Confocal images of whole mount explants injected with DiI at the rhombic lip. The pictures on the right illustrate the regions boxed on the diagrams. (A,B) Explant injected at E12.5. Close to the pial surface long leading processes, labeled with DiI, extended towards the midline (A). At a deeper level, many labeled axons have crossed the midline and turned anteriorly (B). (C,D) Explant injected at E12.5 and fixed after 1DIV. DiI-labeled cells emerged from the rhombic lip. These migrating cells have a unipolar shape with a long leading process. (E) Explant injected at E12.5 and fixed after 2DIV. The migrating cells have already reached the side contralateral to the injection. Scale bars: 50 μm.

crossing the midline, we performed immunocytochemistry in toto on ablated explants after 2DIV. At the normal side of the explant many TAG-1-positive cells, arranged in close contact with each other, were observed (Fig. 1O). At the ablated side, TAG-1-positive cells were also detected (asterisks in Fig. 1P), suggesting that TAG-1 protein was still expressed on the surface of the migrating cells after they have crossed the midline. Thus, the cells of the superficial migratory stream of the caudal hindbrain migrate in vitro while expressing TAG-1 protein even after crossing the midline.

A combination of chain (homotypic) and neurophilic (heterotypic) migration occurs at the posterior superficial migratory stream

It has been reported that the cells of the basilar pontine nucleus, which also express TAG-1, extent a long leading process and migrate circumferentially beneath the pial surface in close contact with each other, without following any neuronal scaffold (Yee et al., 1999). To investigate the morphology of the cells of the posterior superficial migratory stream, we performed DiI injections in the rhombic lip of explants. At E12.5, when the cell bodies are still at the rhombic lip, DiI labeled anterogradely long leading processes of these cells at the most superficial level (Fig. 2A). At deeper levels of the same explants, many labeled axons crossed the midline, reached the contralateral rhombic lip and turned perpendicular towards the anterior part of the hindbrain (Fig. 2B). After 1DIV DiI-labeled cells emerged from the rhombic lip and were directed towards the midline. The migrating cells had a characteristic unipolar morphology, while a long single leading process extended towards the direction of the movement (Fig. 2C). These leading processes could be many hundreds micrometers in length (Fig. 2D). After 2DIV, the migrating cells reached the contralateral part of the explant and they still had the same unipolar shape with long leading processes (Fig. 2E). Thus, the cells of the LRN and ECN extend a long leading process at the superficial level of the caudal medulla, and they follow that towards their final position.

It has been reported that the cells of the superficial stream of the caudal hindbrain migrate on tangentially oriented neuronal fibers (Ono and Kawamura, 1989). We investigated whether TAG-1 was expressed not only by migrating cells but also by these axons. At E12.5 explants, TAG-1 was expressed by tangentially oriented fibers (Fig. 3A) in a direction similar to that of the leading processes. To investigate whether these fibers are axons or long leading processes of cells still located at the rhombic lip, we performed immunocytochemistry for the axonal marker class III β-tubulin (Tuj-1). As illustrated in Fig. 3B, the tangential TAG-1-positive fibers did not express Tuj-1, suggesting that these fibers could be the leading processes. In addition, these fibers are located more superficially as indicated by the overlay in Fig. 3C.

After 1DIV, many TAG-1-positive cells started to emerge from the rhombic lip and migrate in close contact to each other (Fig. 3D). No Tuj-1 staining was detected at the migratory route of these cells (Fig. 3E) and TAG-1-positive cells migrated superficially to the Tuj-1 signal located at the lateral part of the explant (Fig. 3F). After 2DIV, there is a difference in the way of migration at the lateral and medial part of the explants. At the lateral part, the cells migrate without any contact with Tuj-1 positive fibers (Fig. 3G-I), but at the medial part, closer to the midline, they migrate in close contact with axonal fibers, which did not express TAG-1 (Fig. 3J-L).

These results indicate that the cells of the superficial migratory stream follow two different patterns of migration. Laterally, there is a homotypic interaction between the TAG-1-

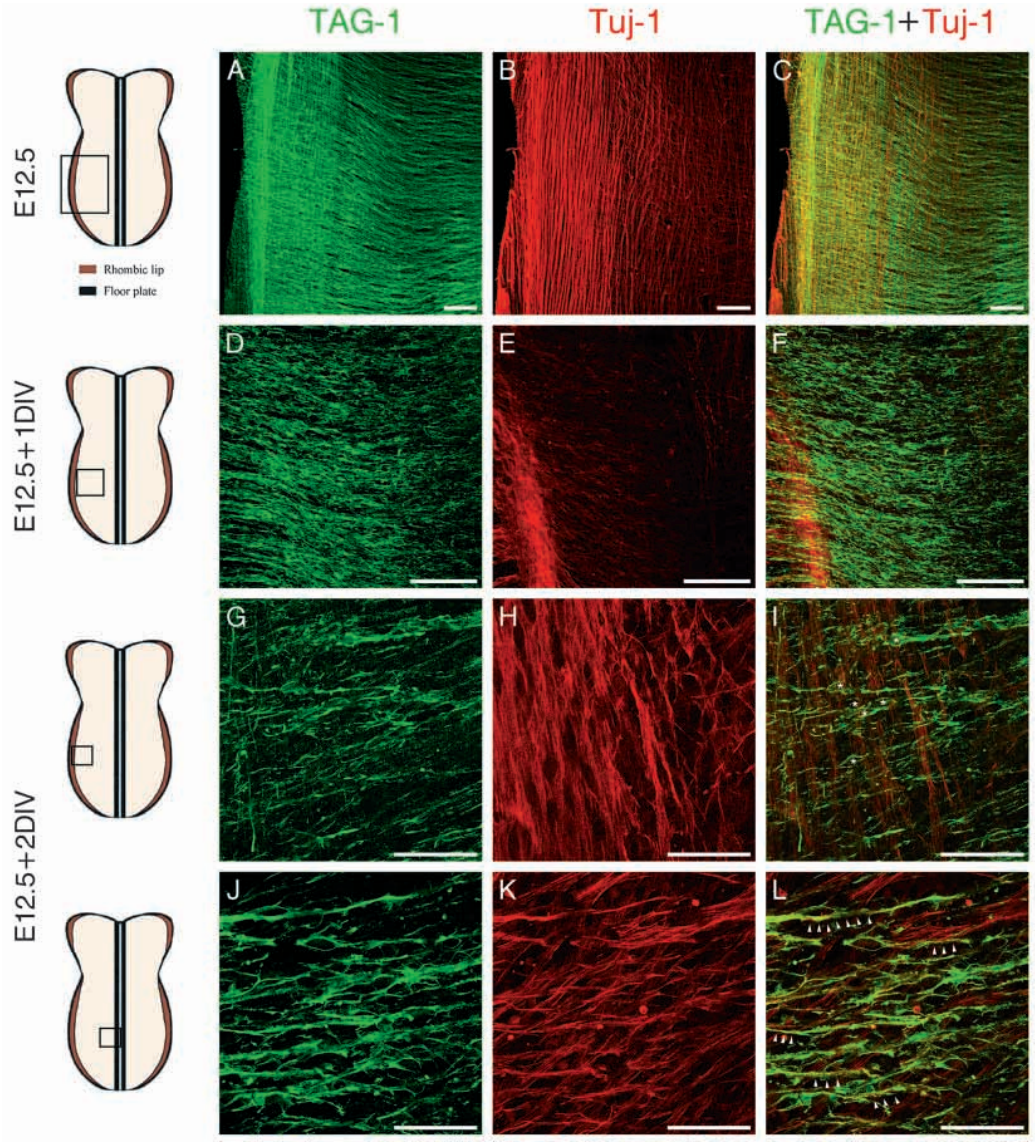


Fig. 3. Two different patterns of migration followed by LRN/ECN neurons. Confocal images of whole-mount immunocytochemistry for TAG-1 and Tuj-1 on explants. The pictures on the right illustrate the regions boxed on the diagrams. (A-C) Explants fixed on E12.5. TAG-1 is expressed by superficial transverse fibers (A,C) that are not Tuj-1 positive (B,C). These fibers could coincide with the leading processes of neurons of the superficial migration that are still located at the rhombic lip. (D-F) Explants fixed on E12.5+1DIV. TAG-1 is expressed by the migrating cells emerged by the rhombic lip (D,F). These cells migrate in close contact to each other in an environment void of Tuj-1-positive neuronal fibers (E). The Tuj-1 staining is detected only at the lateral and deeper part of the explant (E,F). (G-L) Explants fixed on E12.5+2DIV. TAG-1-positive cells (G,I) migrating perpendicular to the Tuj-1 positive axonal fibers (H, asterisks in I) are still detected at the lateral part of the explant. Closer to the midline (J-L), TAG-1-positive cells migrate in close contact with neuronal fibers which are Tuj-1 but not TAG-1 positive (arrowheads in L). Scale bars: 50 μm in A-F; 20 μm in G-L.

expressing migrating cells and medially there is a heterophilic interaction between the migrating cells and the pre-existing neuronal axons.

Effects of blocking TAG-1 function on the migrating cells of the superficial stream

TAG-1 is implicated in axon guidance and cell migration in the developing central nervous system (Denaxa et al., 2001; Stoeckli and Landmesser, 1995; Stoeckli et al., 1997). In order to investigate whether TAG-1 is involved in the migration of the cells of the superficial stream, we blocked its function in vitro.

TAG-1, a GPI-linked molecule, is removed from the surface of cells and axons by cleavage by the enzyme PI-PLC (Karagogeos et al., 1991). We treated explants with PI-PLC and after 2DIV we compared them with non-treated explants. While TAG-1 protein has been removed by PI-PLC (data not shown), TAG-1 mRNA was still present in migrating cells as detected by in situ hybridization (Fig. 4A). As shown in Fig. 4A, the superficial migration was perturbed as fewer cells were detected and most of them had stopped in the middle of their way (compare Fig. 4A,B). Additionally, the cells in untreated explants formed rows as they migrated, while in PI-PLC treated explants, cells were more individually arranged. This result indicates that TAG-1 protein and/or other GPI-linked molecules are important for the normal migration of these cells at the caudal hindbrain.

In order to block the function of TAG-1 with more specific reagents, we added polyclonal or Fab fragments of antibodies against TAG-1 in the culture medium of the explants. After 2DIV, we observed that fewer cells of the superficial stream migrated in the presence of Fab fragments (Fig. 4C). On the contrary, in the presence of Fab fragments of control antibodies, the migration of TAG-1-positive cells occurred normally (Fig. 4D).

To confirm the specificity of our blocking reagents and effect, we immunodepleted the polyclonal antiserum to TAG-1 by absorbing it against CHO cells expressing TAG-1 on their surface and control CHO cells (see also Materials and Methods). When we included the immunodepleted medium in explants, the migration occurred normally (Fig. 4F); when the explants were incubated with the medium absorbed against control CHO cells, the migration was affected in the same way as in the two conditions described above (Fig. 4E). From this result we

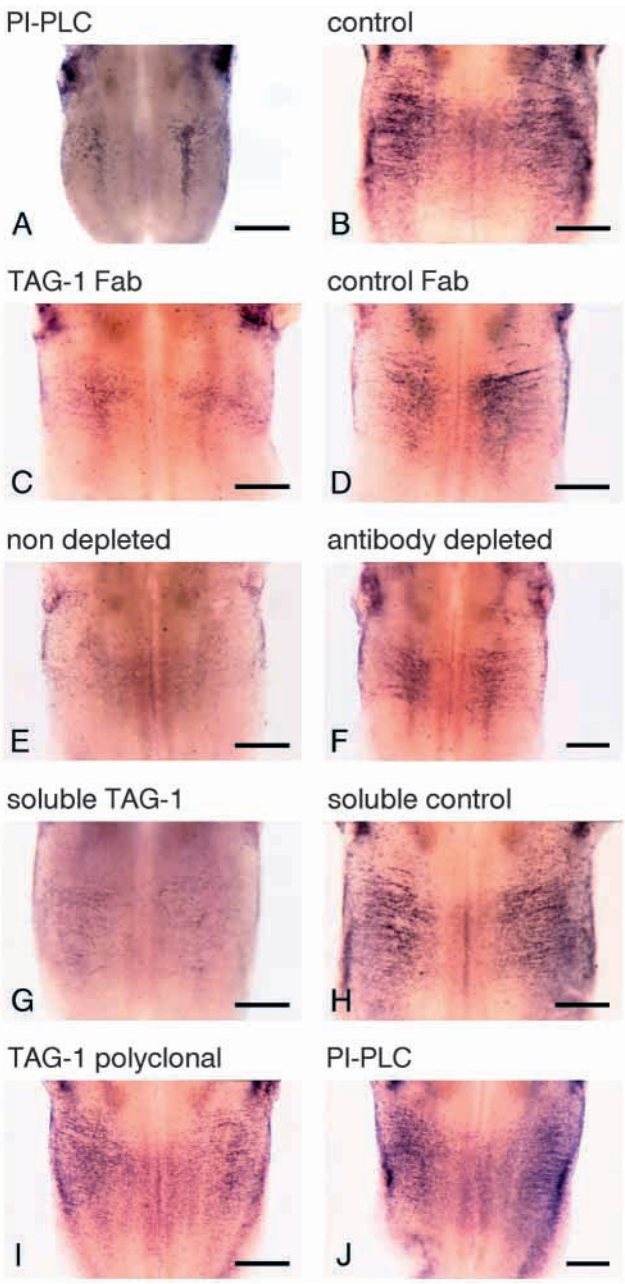


Fig. 4. Blocking TAG-1 function in vitro alters the migratory behavior of LRN and ECN cells. Whole-mount in situ hybridization for TAG-1 on E12.5 explants after 2-4 days in culture. (A,C,E,G) Blocking the function of TAG-1 by cutting the GPI link with PI-PLC (A), blocking with Fab fragments of polyclonal antibodies against TAG-1 (C), or incubating with control non-depleted medium (E) or medium with soluble TAG-1-Fc (G). (B,D,F,H) Explants incubated in control medium (B), medium with control Fab fragments (D), in antibody-depleted medium (F) and in medium with control soluble protein MUC18-Fc (H). (I,J) Explants incubated in control medium for 2 days and then for 2 more days in medium with polyclonal antibody against TAG-1 (I) or with PI-PLC (J). The migration of TAG-1-positive cells occurred normally. Scale bars: 500 μm.

conclude that the blocking effects observed were due to the presence of the polyclonal antibodies against TAG-1 in the culture medium.

Finally, we incubated explants with soluble TAG-1 protein (TAG-1-Fc) (Buttiglione et al., 1998; Denaxa et al., 2001; Stoeckli and Landmesser, 1995; Stoeckli et al., 1997). TAG-1 molecules can bind to each other homophilically (Felsenfeld et al., 1994; Tsiotra et al., 1996), therefore an excess of soluble TAG-1 in the culture medium would compete away the binding of TAG-1 expressed on the surface of migrating cells with its endogenous homophilic and heterophilic binding partners. The excess of soluble TAG-1 protein in the medium can also interact with TAG-1 receptor on the explant. After 2DIV, we observed alterations in the migration of the TAG-1 positive cells, since the migrating cells were fewer and they did not form stripes as they migrated (Fig. 4G). In control experiments where we used the MUC18-Fc protein, a related immunoglobulin superfamily member, the migration was normal (Fig. 4H).

To investigate the possibility that our blocking reagents cause the death of the TAG-1-positive cells, we prepared explants at E12.5, incubated them with control medium for 2 days and then added the blocking reagents and incubated them for another 2 days. We observed that TAG-1-positive cells migrated normally during the first 2 days of culture and the addition of TAG-1 polyclonal antibody (Fig. 4I) or PI-PLC (Fig. 4J) for the next 2 days did not affect the survival of these cells. Thus, we can conclude that the blocking reagents did not cause the death of TAG-1-positive cells when they were added for the same time period as in blocking experiments. We conclude that we observe fewer TAG-1-positive cells in the blocking experiments because these cells did not migrate properly and either consequently died or remained dorsally in the subventricular zone.

Other adhesion molecules and known ligands of TAG-1 are not implicated at the superficial migration at the caudal hindbrain

In order to identify the binding partner(s) of TAG-1 that contribute to the tangential migration of LRN and ECN neurons, we examined the expression pattern of known TAG-1 partners in the region of the medulla. These proteins are also members of the IgSF and are implicated in neurite outgrowth and/or migration during the development of the nervous system. L1 is an adhesion molecule of the IgSF and one of the partners of TAG-1 (Buchstaller et al., 1996; Dhar Malhotra et al., 1998). By immunocytochemistry on transverse sections of E13.5 caudal hindbrain, L1 protein was detected on some axons at the level of the superficial migration (arrowheads at Fig. 5A). Blocking the function of L1 with Fab fragments of polyclonal antibodies against it (Rathjen and Schachner, 1984) did not cause any alterations in the migration of TAG-1-positive cells (Fig. 5B). In addition, we prepared explants from L1-deficient animals (Dahme et al., 1997) and found that the superficial migration was normal in both null and wild-type littermates (compare Fig. 5C with Fig. 5D). Thus, L1 does not seem to be implicated in this type of migration.

The polysialic form of NCAM (PSA-NCAM) is another molecule that is involved in tangential migrations observed in the olfactory system (Hu et al., 1996; Ono et al., 1994). At the level of superficial migration, PSA-NCAM was expressed by the migrating cells (Fig. 5E). However, when the polysialic acid moiety was removed by the enzyme endoN, the migration of TAG-1-positive cells occurred normally in explants in vitro (Fig. 5F). All immunoreactive PSA moieties were removed, as shown by lack of signal in treated explants that were stained with

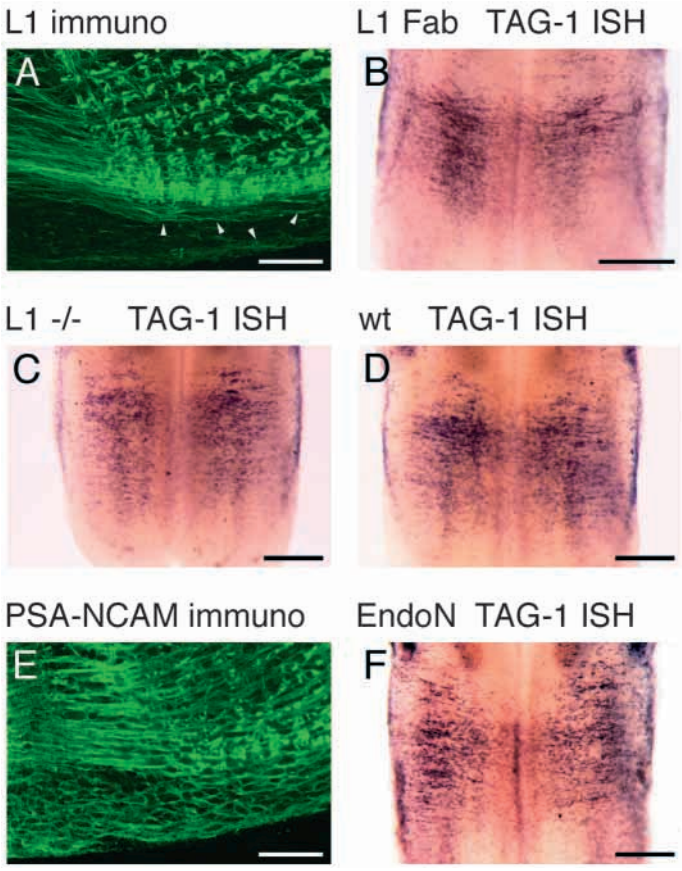


Fig. 5. The role of L1 and PSA-NCAM in the superficial migration. (A) Staining with antibody against L1. Only some axons at the region of the superficial migration are positive for L1 (arrowheads). (B) Whole-mount in situ hybridization for TAG-1 on explants incubated for 2 days in medium with Fab fragments of polyclonal antibody against L1. The trajectories of the migrating cells are normal. (C,D) Whole-mount in situ hybridization for TAG-1 on explants from L1-null (C) and wild-type (D) animals. The migration of TAG-1-positive cells is normal even in L1-deficient animals. (E) Staining with antibody against PSA-NCAM. PSA-NCAM was detected on the cell bodies of the migrating cells. (F) Whole mount is situ hybridization for TAG-1 on explants treated with EndoN during the culture. The TAG-1-positive cells migrated normally when PSA was cut. Scale bars: 50 μm in A,E; 500 μm in B-D,F.

monoclonal antibody 5A5 that recognizes PSA (data not shown) (Dodd et al., 1988). Thus, we conclude that the polysialic form of NCAM is not involved in the superficial migration at the caudal hindbrain.

Another IgSF member and partner of TAG-1 is F3 (Buttiglione et al., 1998; Gennarini et al., 1991). F3 was not expressed in the area of the superficial migration (data not shown), when investigated by in situ hybridization and immunocytochemistry, thus rendering the possibility of its involvement unlikely.

The last known partner of TAG-1 that we have tested was NrCAM (Lustig et al., 2001; Lustig et al., 1999). The antisera available did not reveal any staining in the superficial migratory stream, while in situ hybridization experiments did not reveal any signal for NrCAM in the region of the superficial migration at the appropriate stages of development (data not shown),

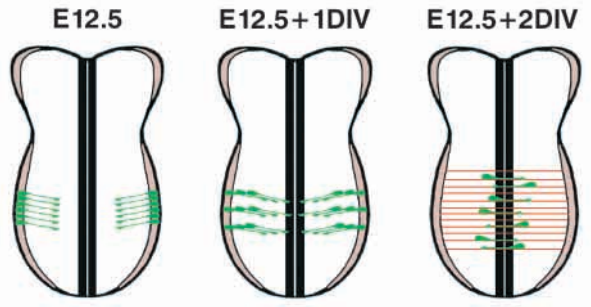


Fig. 6. Superficial migration. Laterally, the cells migrate in contact with each other, extending long leading processes. Medially, close to the floor plate (lines in black), the cells migrate by following pre-existing axonal fibers. Migrating cells and processes are shown in green, while the tangentially oriented axons are indicated in red.

suggesting that this protein is not involved in this process. In addition, sites of NrCAM expression in the developing mouse nervous system as described recently (Lustig et al., 2001) are not correlated with the superficial migration.

DISCUSSION

The developing precerebellar system provides an interesting model for the study of neuronal migration. Immature neurons that eventually will become neurons of the LRN and ECN are born dorsally, migrate ventrally, cross the midline and proceed dorsally to form these two precerebellar nuclei (Altman and Bayer, 1987b; Bourrat and Sotelo, 1990). In other words, they need to circumnavigate the entire length of the brainstem in order to finally settle in positions close to where they were born but on the contralateral side. Earlier morphological studies have suggested that axons can provide a substratum for nonradial neuronal migration in the subpial part of the medulla (Ono and Kawamura, 1989). However, the cellular and molecular components that either initiate or maintain the migration along the entire route remained unknown.

The evidence presented here indicates that the cells of the superficial migratory stream migrate in two different modes of migration. At the beginning they extent a long leading process and migrate in close contact to each other, while closer to the midline they follow pre-existing neuronal fibers as scaffold. The neural adhesion molecule TAG-1, expressed by the migrating cells, is involved in the migration of the neurons of the superficial stream. Blocking the function of TAG-1 either enzymatically or by antibodies or soluble protein, results in alterations of the migration pattern. Furthermore, our evidence suggests a homophilic type of interaction between TAG-1-positive migrating cells.

Our migration assay in vitro, owing to its open book configuration, maintains the endogenous substrate signals present in the tissue at the time of the migration. Therefore, it allows us to investigate not only the function of long-range signaling molecules, but also molecules involved in contact-mediated guidance. This is in contrast to explant co-culture assays, where the explant containing the origin of cells is faced with a source of putative long-range guidance signals.

There is a strong spatiotemporal coincidence of TAG-1

expression and the superficial migration. TAG-1 is expressed transiently by the postmitotic cells of the superficial migratory stream after their last mitosis and it is downregulated, when the cells are settled in their final positions. In the spinal cord, TAG-1 expression by commissural axons is downregulated at the level of the floor plate (Dodd et al., 1988). In our system, the neurons of the superficial stream do not downregulate their TAG-1 expression until they are close to their final position, deep in the parenchyma on the contralateral side of the ventral midline. The observation that some TAG-1-positive neurons migrate contralaterally after unilateral rhombic lip ablation indicates that it is not crossing the floor plate per se that leads to the downregulation of TAG-1 expression.

Fig. 6 presents a model of the superficial migration based on our evidence. At the beginning of their migration, at the most dorsal part of the medulla, cells extend a long leading process and migrate by following each other in a type of chain migration. This type of chain migration is also observed at the pontine migratory stream in the anterior hindbrain (Ono and Kawamura, 1990). Basilar pontine cells extend a long leading process while they migrate and they also express TAG-1 (Yee et al., 1999). Closer to the midline, the cells migrate in contact with neuronal fibers tangentially oriented in a type of neurophilic migration, as proposed also by Ono and Kawamura (Ono and Kawamura, 1989). These two different patterns of migration were also observed with in situ hybridization for TAG-1.

TAG-1 protein has been localized in many fiber systems as well as in migrating neurons in the developing CNS (Dodd et al., 1988; Wolfer et al., 1994; Yamamoto et al., 1986; Yee et al., 1999; Stottmann and Rivas, 1998). Based on its expression pattern on migrating neurons and, more specifically, in contacts between these neurons and the axons they migrate upon, it has been suggested that the protein may be involved in adhesive processes required for migration to take place (Denaxa et al., 2001; Yamamoto et al., 1990). Indeed, we have always observed migrating cells in the superficial stream to move in bundles, in contact to each other. After blocking the function of TAG-1, fewer cells migrate and do so individually. From this result we can conclude that TAG-1 is implicated in the adhesion of each cell to the other, especially at the beginning of their migration, when the cells migrate in close contact to each other. In addition, TAG-1 is expressed only by postmitotic migrating neurons; therefore blocking its function is not likely to affect the proliferation of these cells before they start to express TAG-1.

The blocking experiments also suggest that there is a homophilic type of interaction between the migrating cells. The use of TAG-1-Fc would result in blocking TAG-1 on the cells via homophilic binding as well as blocking its receptor via heterophilic binding. If the receptor is TAG-1 itself, then blocking with antibodies alone would affect migration to the same extent, which was the case in our experiments. Other partners of TAG-1, such as L1, PSA-NCAM, F3 and NrCAM are most likely not involved in this type of migration. We therefore suggest that homophilic binding between TAG-1 molecules on the migrating neurons is required for the tangential migration in our system. However, we cannot exclude that other unknown binding partners may be involved in this type of migration, especially during the second phase of migration, when the cells follow axonal fibers which do not express TAG-1.

Recently, the TAG-1-deficient mouse phenotype has been published (Fukamauchi et al., 2001). The mice appear normal except for a significant elevation in adenosine A1 receptors in the hippocampus and enhanced seizure susceptibility to convulsant stimuli. However, no analysis of precerebellar neurons and/or their development is mentioned. In light of our in vitro data, it would be interesting to study the generation and migration of these neuronal populations in developing TAG-1-null embryos.

The immature neurons of the superficial migratory stream need to cross the floor plate and proceed dorsally. It has been suggested in the past that the floor plate and in particular, netrin 1 may be the source of guidance signals for precerebellar nuclei (Alcantara et al., 2000; Bloch-Gallego et al., 1999; Bourrat and Sotelo, 1990). Our data does not exclude the action of additional cues that may function at either distinct regions of the migrating pathway or as global cues for attraction to the midline (Shirasaki et al., 1998; Shirasaki et al., 1995). Moreover, we have evidence (de Diego et al., 2002) suggesting that the floor plate exerts an attractive effect on the migrating cells of the superficial stream. This effect is possibly mediated by netrin 1, which is expressed by the floor plate, and DCC, which is expressed by the migrating cells.

In conclusion, we propose, based on the evidence presented here, that the adhesion molecule TAG-1 is involved as a contact-dependent signal guiding the LRN/ECN immature neurons to move in the subpial environment of the medulla. We propose that the protein maintains cell to cell contacts acting in a homophilic manner. Taken together, our experiments provide another example of a molecule playing either a role in axon guidance or in migration depending on the specific neuronal population.

We thank Drs V. Bennett, C. Faivre-Sarrailh, A. Frankfurter, G. Genarrini, S. B. Morton, T. Jessell, F. Rathjen, G. Rougon, D. L. Simmons and I. Talianidis for generous supply of antisera and probes. We are grateful to Dr Melitta Schachner, University of Hamburg, for the L1-deficient mice. We also thank Myrto Denaxa and Maura Strigini for critical reading of the manuscript. This work was supported by the following grants: the Greek Ministry of Education (EPEAEK 1092), IMBB intramural funds, the Greek Secretariat for Research and Technology, the EU BIOTECHNOLOGY grant 980329 (to D. K.) and ERB BIO4CT 960146 (to M. W.) as well as the Greek-French collaborative program PLATON (to D. K. and M. W.).

REFERENCES

Alcantara, S., Ruiz, M., DeCastro, F., Soriano, F. and Sotelo, C. (2000). Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development* **127**, 1359-1372.

Altman, J. and Bayer, S. (1987a). Development of the precerebellar nuclei in the rat: II. The intramural olivary migratory stream and the neurogenetic organization of the inferior olive. *J. Comp. Neurol.* **257**, 490-512.

Altman, J. and Bayer, S. (1987b). Development of the precerebellar nuclei in the rat: III. The posterior precerebellar extramural migratory stream and the lateral reticular and external cuneate nuclei. *J. Comp. Neurol.* **257**, 513-528.

Altman, J. and Bayer, S. (1987c). Development of the precerebellar nuclei in the rat: IV. The anterior precerebellar extramural migratory stream and the nucleus reticularis tegmenti pontis and the basal pontine gray. *J. Comp. Neurol.* **257**, 529-552.

Bailly, Y., Kyriakopoyloy, K., Delhaye-Bouchaud, N., Mariani, J. and Karagogeos, D. (1996). Cerebellar granule cell differentiation in the mutant and X-irradiated rodents revealed by the neural adhesion molecule TAG-1. *J. Comp. Neurol.* **369**, 150-161.

Bally-Cuif, L. and Wassef, M. (1994). Ectopic induction and reorganization of Wnt-1 expression in quail/chick chimeras. *Development* **120**, 3379-3394.

Bloch-Gallego, E., Ezan, F., Tessier-Lavigne, M. and Sotelo, C. (1999). Floor

plate and netrin-1 are involved in the migration and survival of inferior olivary neurons. *J. Neurosci.* **19**, 4407-4420.

Bourrat, F. and Sotelo, C. (1990). Migratory pathways and selective aggregation of the lateral reticular nucleus in the rat embryo: a horseradish peroxidase *in vitro* study, with special reference to migration pattern of the precerebellar nuclei. *J. Comp. Neurol.* **294**, 1-13.

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. *J. Cell Biol.* **135**, 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**, 6853-6870.

Dahme, M., Bartsch, U., Martini, R., Anliker, B., Schachner, M. and Mantei, N. (1997). Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nat. Genet.* **17**, 346-349.

Davis, J. Q., Lambert, S. and Bennett, V. (1996). Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and Nr-CAM at nodal axon segments. *J. Cell Biol.* **135**, 1355-1367.

de Diego, I., Kyriakopoulou, K., Karagogeos, D. and Wassef, M. (2002). Multiple influences on the migration of precerebellar neurons in the caudal medulla. *Development* **129**, 297-306.

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

Dhar Malhotra, J., 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**, 33354-33359.

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

Felsenfeld, D. P., Hynes, M. A., Skoler, K. M., Furley, A. J. and Jessell, T. M. (1994). TAG-1 can mediate homophilic binding, but neurite outgrowth on TAG-1 requires an L1-like molecule and b1 integrins. *Neuron* **12**, 675-690.

Fitzli, D., Stoeckli, E. T., Kunz, S., Siribour, K., Rader, C., Kunz, B., Kozlov, S. V., Buchstaller, A., Lane, R. P., Suter, D. M., Dreyer, W. J. and Sonderegger, P. (2000). A direct interaction of axonin-1 with NgCAM-related cell adhesion molecule (NrCAM) results in guidance, but not growth of commissural axons. *J. Cell Biol.* **149**, 951-968.

Fukamauchi, F., Okihiko, A., Wang, Y. J., Akasaka, K., Takeda, Y., Horie, M., Kawano, H., Sudo, K., Asano, M., Watanabe, K. and Iwakura, Y. (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., Dodd, J. and Jessell, T. M. (1990). The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity. *Cell* **61**, 157-170.

Garel, S., Garcia-Dominguez, M. and Charnay, P. (2000). Control of the migratory pathway of facial branciomotor neurons. *Development* **127**, 5297-5307.

Gennarini, G., Durbec, P., Boned, A., Rougon, G. and Goridis, C. (1991). Transfected F3/F11 neuronal cell surface protein mediates intercellular adhesion and promotes neurite outgrowth. *Neuron* **6**, 595-606.

Grumet, M. (1997). Nr-CAM: A cell adhesion molecule with ligand and receptor functions. *Cell Tissue Res.* **290**, 423-428.

Hu, H., Tomasiewicz, H., Magnuson, T. and Rutishauser, U. (1996). The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron* **16**, 735-743.

Karagogeos, D., Morton, S. B., Casano, F., Dodd, J. and Jessell, T. M. (1991). Developmental expression of the axonal glycoprotein TAG-1: Differential regulation by central and peripheral neurons *in vitro*. *Development* **112**, 51-67.

Komuro, H., Yacubova, E., Yacubova, E. and Rakic, P. (2001). Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J. Neurosci.* **21**, 527-540.

Lehmann, J. M., Riethmuller, G. and Johnson, J. P. (1989). MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **86**, 9891-9895.

Lustig, M., Erskine, L., Mason, C., Grumet, M. and Sakurai, T. (2001). Nr-CAM expression in the developing mouse nervous system: ventral midline structures, specific fiber tracts, and neuropilar regions. *J. Comp. Neurol.* **434**, 13-28.

Lustig, M., Sakurai, T. and Grumet, M. (1999). Nr-CAM promotes neurite outgrowth from peripheral ganglia by a mechanism involving axonin-1 as a neuronal receptor. *Dev. Biol.* **209**, 340-351.

Masuda, T., Okado, N. and Shiga, T. (2000). The involment of axonin/SC2 in mediating notochord-derived chemorepulsive activities for dorsal root gaglion cells. *Dev. Biol.* **224**, 112-121.

Ono, K. and Kawamura, K. (1989). Migration of immature neurons along tangentially oriented fibers in the subpial part of the fetal mouse medulla oblongata. *Exp. Brain Res.* **78**, 290-300.

Ono, K. and Kawamura, K. (1990). Mode of neuronal migration of the pontine stream in fetal mice. *Anat. Embryol.* **182**, 11-19.

Ono, K., Tomasiewicz, H., Magnuson, T. and Rutishauser, U. (1994). N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron* **13**, 595-609.

Rakic, P. (1985). In *The Cell in Contact* (ed. G. M. Edelman and J. P. Thiery), pp. 67-91. Wiley.

Rakic, P. (1990). Principles of neural cell migration. *Experientia* **46**, 882-891.

Rathjen, F. G. and Schachner, M. (1984). Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *EMBO J.* **3**, 1-10.

Rodriguez, C. I. and Dymecki, S. M. (2000). Origin of the precerebellar system. *Neuron* **27**, 475-486.

Ryder, E. and Cepko, L. C. (1994). Migration patterns of clonally related granule cells and their progenitors in the developing chick cerebellum. *Neuron* **12**, 1011-1029.

Shirasaki, R., Tamada, A., Katsumata, R. and Murakami, F. (1995). Guidance of cerebellofugal axons in the rat embryo: directed growth towards the floor plate and subsequent elongation along the longitudinal axis. *Neuron* **14**, 961-972.

Shirasaki, R., Katsumata, R. and Murakami, F. (1998). Change in chemoattractant responsiveness of developing axons at an intermediate target. *Science* **279**, 105-107.

Stein, E. and Tessier-Lavigne, M. (2001). Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by Slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* **291**, 1928-1938.

Stoeckli, E. T. and Landmesser, L. T. (1995). Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play different roles in the *in vivo* guidance of chick commissural neurons. *Neuron* **14**, 1165-1179.

Stoeckli, E. T., Sonderegger, P., Pollerberg, G. E. and Landmesser, L. T. (1997). Interference with Axonin-1 and Nr-CAM interactions unmasks a floor-plate activity inhibitory for commissural axons. *Neuron* **18**, 209-221.

Stottmann, R. W. and Rivas, R. J. (1998). Distribution of TAG-1 and synaptophysin in the developing cerebellar cortex: relationship to Purkinje cell dentritic development. *J. Comp. Neurol.* **395**, 121-135.

Tamamaki, N., Fugimori, K. E. and Takauji, R. (1997). Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J. Neurosci.* **17**, 8313-8323.

Tan, K. and Le Dourin, N. M. (1991). Development of the nuclei and cell migration in the medulla oblongata. Application of the quail-chick chimera system. *Anat. Embryol.* **183**, 321-343.

Tsiotra, P., 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**, 29216-29222.

Virgintino, D., Ambrosini, M., D'Errico, P., Bertossi, M., Papadaki, C., Karagogeos, D. and Gennarini, G. (1999). Regional distribution and cell type-specific expression of the mouse F3 axonal glycoprotein: a developmental study. *J. Comp. Neurol.* **413**, 357-372.

Wang, V. Y. and Zoghbi, H. Y. (2001). Genetic regulation of cerebellar development. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 484-491.

Wingate, R. J. (2001). The rhombic lip and early cerebellar development. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 82-88.

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

Yamamoto, M., Boyer, A. M., Crandall, J. E., Edwards, M. and Tanaka, H. (1986). Distribution of stage-specific neurite-associated proteins in the developing murine nervous system recognized by a monoclonal antibody. *J. Neurosci.* **6**, 3576-3594.

Yamamoto, M., Hassinger, L. and Crandall, J. E. (1990). Ultrastructural localization of stage-specific neurite-associated proteins in the developing rat cerebral and cerebellar cortices. *J. Neurocytol.* **19**, 619-627.

Yee, K. T., Simon, H. H., Tessier-Lavigne, M. and O'Leary, D. M. (1999). Extension of long leading processes and neuronal migration in the mammalian brain directed by the chemoattractant netrin-1. *Neuron* **24**, 607-622.

Development 129, 297-306 (2002)
Printed in Great Britain © The Company of Biologists Limited 2002
DEV2801

Multiple influences on the migration of precerebellar neurons in the caudal medulla

I. de Diego[1,*,‡], K. Kyriakopoulou[1,2,‡], D. Karagogeos[2] and M. Wassef[1,§]

[1]CNRS UMR C8542, Régionalisation Nerveuse, niveau 8, Ecole Normale Supérieure 46, rue d'Ulm 75230 Paris Cedex 05, France
[2]University of Crete Medical School and Institute of Molecular Biology and Biotechnology, PO Box 1527, Heraklion 711 10, Crete, Greece

*Present address: Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos, 29071 Málaga, España

‡These authors contributed equally to this work

§Author for correspondence (e-mail: wassef@wotan.ens.fr)

Accepted 9 October 2001

SUMMARY

Neurons destined to form several precerebellar nuclei are generated in the dorsal neuroepithelium (rhombic lip) of caudal hindbrain. They form two ventrally directed migratory streams, which behave differently. While neurons in the superficial migration migrate in a subpial position and cross the midline to settle into the contralateral hindbrain, neurons in the olivary migration travel deeper in the parenchyma and stop ipsilaterally against the floor plate. In the present study, we compared the behavior of the two neuronal populations in an organotypic culture system that preserves several aspects of their in vivo environment. Both migrations occurred in mouse hindbrain explants dissected at E11.5 even when the floor plate was ablated at the onset of the culture period, indicating that they could rely on dorsoventral cues already distributed in the neural tube. Nevertheless, the local constraints necessary for the superficial migration were more specific than for the olivary migration. Distinct chemoattractive and chemorespulsive signal were found to operate on the migrations. The floor plate exhibited a strong chemoattractive influence on both migrations, which deviated from their normal path in the direction of ectopic floor plate fragments. It was also found to produce a short-range stop signal and to induce inferior olive aggregation. The ventral neural tube was also found to inhibit or slow down the migration of olivary neurons. Interestingly, while ectopic sources of netrin were found to influence both migrations, this effect was locally modulated and affected differentially the successive phases of migration. Consistent with this observation, while neurons in the superficial migration expressed the Dcc-netrin receptor, the migrating olivary neurons did not express Dcc before they reached the midline. Our observations provide a clearer picture of the hierarchy of environmental cues that influence the morphogenesis of these precerebellar nuclei.

Key words: Precerebellar neuron, Tangential migration, Inferior olive, Floor plate, Netrin, Mouse

INTRODUCTION

Several neuronal populations are generated in the dorsal rhombencephalon, at the level of the rhombic lip. They migrate following distinct dorsoventral paths identified as the pontine, olivary and superficial migratory streams. They settle in the ventral neural tube and contribute neurons to several precerebellar nuclei. Therefore, the precebellar system permits the study of the cellular and molecular mechanisms involved in the control of cell migration. We have focused on two populations of precerebellar neurons generated in the rhombic lip of rhombomeres 7/8 (or 8) (Cambronero and Puelles, 2000) and destined to form the inferior olive (ION), the lateral reticular (LRN) and the external cuneatus (ECN) nuclei. These neurons circumnavigate at different depths around the medulla following two routes, both orthogonal to the anteroposterior axis (Harkmark, 1954; Altman and Bayer, 1987a; Altman and Bayer, 1987b; Bourrat and Sotelo, 1988; Bourrat and Sotelo, 1990; Bourrat et al., 1989; Tan and Le Douarin, 1991; Ambrosiani et al., 1996). The olivary migration follows a deep parenchymal pathway; the ION neurons stop migrating ipsilaterally and aggregate near the floor plate, whereas their axons cross the floor plate and travel towards the contralateral hemicerebellum where they project. The LRN and ECN neurons, which are generated slightly later, gather under the pial surface forming a superficial migration, which crosses the ventral midline to continue dorsalward on the contralateral side.

The floor plate is a complex ventral midline structure involved in neural tube patterning and in the guidance of both growth cone and cell body migration. The floor plate is the source of several short- and long-range chemoattractants and chemorepellents that are likely to govern both the dorsoventral orientation of the olivary and superficial migrations and their different behaviors at the ventral midline. In addition, it could provide olivary neurons with a stop signal preventing them

from crossing the midline. Several diffusible and extracellular matrix molecules have been implicated as mediators of the different activities of the floor plate (Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1994; Klar et al., 1992; Echelard et al., 1993; Brose et al., 1999). Netrin-1, which is expressed in the floor plate at all axial levels (Kennedy et al., 1994) and contributes to the attractive action of the floor plate on growing axons (Tamada et al., 1995; Shirasaki et al., 1995; Shirasaki et al., 1998), has been implicated as a major chemoattractant for ION (Bloch-Gallego et al., 1999) and LRN neurons (Alcantara et al., 2000). In netrin-1 mutant mice the ION neurons are misplaced, their number is reduced and their cerebellar projection is abnormal (Bloch-Gallego et al., 1999). Retrograde tracing experiments suggest that the LRN neurons are less affected in netrin1 mutants (Bloch-Gallego et al., 1999). The developing ION and LRN neurons express several netrin receptors of the Dcc and Unc-5 families (Ackerman et al., 1997; Bloch-Gallego et al., 1999), which is consistent with a direct role of netrin-1 on their dorsoventral migration.

In the present study we examined directly the influence of the local environment on the behavior of neurons of the olivary and superficial migrations, identified by Brn3.2 and TAG-1 expression, respectively. We compared their responses in bulbar explants when grafted in an ectopic location, to those ectopic fragments of midline structures or to sources of diffusible netrin-1 protein.

MATERIALS AND METHODS

Animals

OFI mice obtained from Iffa Credo (Lyon, France), were mated and the day of vaginal plug detection was considered as E0.5. Pregnant females were killed with an overdose of ether. Embryos, recovered in chilled PBS, were dissected for explantation or fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde in 0.12 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 (PFA4%).

Lightly ether-anaesthetized pregnant mice were injected in the tail vein with a solution of BrdU (Sigma; 2 mg/ml; 20 μg/g) in 0.9% NaCl on gestational days 10.5, 11.5 and 12.5 to identify neuronal birthdates. Embryos were fixed at E13.5, E14.5 or E18.5. DNA-incorporated BrdU was detected by immunocytochemistry.

Immunocytochemistry

Dissected hindbrains or explants were fixed overnight at 4°C in F4% for the detection of e-NCAM, L1 (gifts from Dr Schachner), vimentin (Amersham) and BrdU (Becton Dickinson). Immunocytochemistry was performed on vibratome (100 μm thick) or on cryostat (14 μm thick) sections of hindbrain or on whole explants. Sections or explants were incubated with the first antibody for 48 hours at 4°C, revealed with a biotinylated secondary antibody (1/300, Jackson) for 1 hour at room temperature followed by streptavidin-biotin peroxidase (1/400, Amersham) and visualized with diaminobenzidine and H_2O_2. For the detection of incorporated BrdU, vibratome sections or explants were treated with 2 N HCl for 45 minutes, and digested for 10 minutes with 20 μg/ml proteinase K. The sections were postfixed in PFA4% containing 0.2% glutaraldehyde and treated as above.

In situ hybridization

E11.5 to E15.5 embryos or explants at the end of the culture period were fixed overnight at 4°C in F4%. Transverse vibratome sections (200 μm thick) of albumin-gelatin embedded dissected hindbrains or fixed explants were dehydrated in methanol and stored at –20°C. In situ hybridization and double-colour in situ hybridization were performed on rehydrated tissue as described (Bally-Cuif and Wassef, 1994). The diluted anti-digoxigenin antibody was adsorbed overnight on a confluent layer of EBNA-293 cells before being used in experiments involving COS or EBNA cells, as it was found to crossreact with an epitope present in variable amounts on these cells.

Probes

The mouse Brn3.2 template was generated by PCR from mouse genomic DNA based on the published sequence (Turner et al., 1994). A 524 bp fragment between nucleotides 548 and 1071 was amplified and subcloned in pBS. The entire coding region of rat TAG-1 cDNA (Furley et al., 1990) was provided by Dr T. Jessell. pBS plasmid containing sequences from the 3′ UTR region of mouse netrin was provided by Dr T. Serafini. Plasmids containing cDNA fragments of rat F-spondin (gift from Dr Klar), mouse PACAP (gift from Dr Waschek) EphA4, ephrin A5, ephrin B1 and B3 (gift from Dr Gilardi) and SemaF (gift from Dr Chedotal) were also used.

Culture procedures

Preparation of the explants

Explants containing the whole rhombencephalon including the cerebellum were dissected from E11.5 and E12.5 brains in PBS-0.6% glucose, and opened on the dorsal midline. They were cultured for 1-4 days ventricular side down on Biopore membranes (Millipore) floating on DMEM/F12 medium (Gibco) supplemented with antibiotics and with 10% fetal bovine serum and 5-10% horse serum. In some experiments the medium was supplemented with 500 ng/ml of purified chick netrin-1 (gift from Dr Tessier Lavigne) or with BrdU (10 mM, for 30 minutes).

Ablations and transplantations

Fragments of floor plate, rhombic lip or ganglionic eminence were ablated or dissected using tungsten needles and scalpel blades. Transplants were grafted at different levels onto hindbrain explants. Alternatively, hindbrain explants were cut transversally in the region of migration and a floor plate explant or a COS or EBNA-293 cell aggregate was placed against the cut edge. Fragments of E11.5 cerebral cortex or ganglionic eminence were inserted into the region of migration. The transplantation procedure is outlined on the side of each panel.

Unless otherwise specified, the explants were cultured for 3-4 days in vitro, fixed overnight in PFA4%, and processed for whole-mount in situ hybridization or immunocytochemistry.

Sources of netrin protein

COS7 cells were transfected with pGNET1myc or pGNET2myc (using Lipofectamine, Gibco BRL) as described by Serafini et al. (Serafini et al., 1994), or using Fugene 6 (Boehringer), according to the manufacturer's instructions. pTLmEn2m (Joliot et al., 1998) was used as an unrelated control plasmid. An EBNA-293 cell line stably transfected with a netrin-1 expression plasmid and the control line transfected with the empty vector were also used. Aggregates of EBNA or transfected COS cells were prepared by the hanging drop method (Kennedy et al., 1994) and used as transplants in the same way as tissue fragments. Restricted sources of purified netrin were established in different ways. Affigel beads were rinsed in PBS and incubated overnight with a solution of netrin-1 (5 μg/ml in DMEM/F12) and used as transplants. Low-melting-point agarose in DMEM/F12 was mixed with a solution of purified chick netrin-1 (10 μg/ml final) and some was aspirated into gel-saver tips. After cooling, the blocks or tips were cut into smaller pieces, which were used as sources of netrin-1 protein. BSA was used instead of netrin in control experiments. As a biological test of netrin-like activity, the putative sources of netrin-1 were cocultured in collagen gels at a small distance from rhombic lip fragments and axonal outgrowth was examined at 24 and 48 hours.

RESULTS

The mouse superficial and olivary migrations

The relationship between the superficial and olivary migrations is best illustrated at E13.5, when both migrations have reached the ventral midline (Fig. 1A,B). TAG-1, which encodes a member of the immunoglobulin superfamily involved in axonal guidance (Dodd et al., 1988; Furley et al., 1990; Wolfer et al., 1994), is expressed in neurons of the superficial migration (Fig. 1B,E-G) whereas Brn3.2, which encodes a POU domain transcription factor (Turner et al., 1994), is expressed in the olivary migration (Fig. 1B,H-J). The superficial and olivary migrations are separated by an unlabeled gap on Brn3.2-TAG1 double-labeled sections (Fig. 1B). It should be noted that both markers also label other neuronal populations located more dorsally. Immature axons that travel in the superficial region of the caudal hindbrain could serve as substrate for both migrations (Fig. 2E). In vivo, they separate the olivary migration from the pial surface and from the superficial path described below, which is followed by the superficial migration. In the hindbrain, the floor plate consists of a sheet of specialized radial glia with tightly packed processes that abut the pial surface. In the region of migration, the floor plate seems to be built on piles: the glia fibers loosen and diverge from the midline near the pial surface, delimiting superficial galleries that cross beneath the floor plate (Fig. 1D) and are followed by the neurons of the superficial migration.

In the E11.5 caudal hindbrain, TAG-1 mRNA was detected in the subventricular zone and in the hypoglossal nucleus (data not shown). At E12.5, a row of TAG-1 expressing (TAG-1+) cells emerges from the rhombic lip (Fig. 1E). At E13.5 this band, which corresponds to the superficial migration, is continuous across the midline in the caudal hindbrain (Fig. 1F). In addition, a discontinuous layer of superficial TAG-1+ cells was observed in the dorsal neural tube on flat mounts (not shown). At E15.5, while the hypoglossal nucleus was still labeled, TAG-1 transcripts were no longer detected in the subventricular zone, the superficial migration or the ECN and LRN nuclei (Fig. 1F,G). Thus, in vivo, TAG-1 is expressed transiently in the neurons of the superficial migration and becomes downregulated as they settle into their final territory.

At E12.5, Brn3.2 transcripts were expressed in a circumferential band of cells abutting the rhombic lip and located deeper in the parenchyma than the superficial migration (Fig. 1H). The Brn3.3 and TAG-1 positive cells occupied complementary domains in the subventricular layer. At E13.5, the Brn3.2 positive cells gathered in the ventral half of the neural tube (Fig. 1I), in a domain corresponding to the olivary migration (Altman and Bayer, 1987a; Turner et al., 1994), which avoided the floor plate. At E14.5 the Brn3.2 signal was concentrated in the ION (Fig. 1J). Some dorsally located neurons also expressed Brn3.2 at this stage. Later on, Brn 3.2 expression persisted only in the ION. TAG-1 and Brn3.2 were used as markers of the two migrations in subsequent experiments.

BrdU injections were used to determine the birthdates of the neurons of the superficial and olivary migrations more precisely than was possible in earlier experiments (Taber Pierce, 1973) (data not shown). The bulk of olivary cells was generated at E10.5, with a smaller population labeled by BrdU injections at E11.5. The BrdU-labeled olivary neurons reached the ventral midline at E13.5. The peak of LRN and ECN neurons production occured 1 day later, at E11.5. BrdU injections at E12.5 also resulted in the labeling of some neurons in these nuclei. The BrdU-labeled neurons of the superficial migration reached the ventral hindbrain by E13.5.

The superficial and olivary migrations in bulbar explants

To examine whether the bulbar migrations could resume in vitro, explants containing the hindbrain including the cerebellum were dissected from E11.5 or E12.5 mouse embryos and cultured for 1-8 days, ventricular side down, in an open book configuration.

A 30-minute pulse of BrdU at the beginning of the culture period was used to label the superficial migration. The explants were fixed after 1-3 days in vitro and treated in toto for BrdU immunocytochemistry. In this way, only the most superficial cells of the ventricular and pial surfaces were accessible to the antibodies. The BrdU-labeled cells, which were confined to the vicinity of the rhombic lip after 1 day in vitro (Fig. 2A), progressed towards the midline during the two following days (Fig. 2B-E). 3 days after explantation they formed a sharply delimited band continuous across the midline (Fig. 2C,E). Detection of BrdU or TAG-1 (Fig. 2D) transcripts revealed similar migration patterns on explants dissected at E11.5 (Fig. 2C,D) or E12.5 (Fig. 2F,G). Thus, the migration of cells of the superficial stream proceeded normally in vitro even if slightly slower than in vivo. Further maturation did not proceed in vitro: the band of TAG-1+ or BrdU+ cells did not disappear even after 8 days in culture (data not shown) and the explants maintained the same appearance as at 3 days in culture.

In E11.5 explants, Brn3.2 was detected in two longitudinal dorsal stripes, unrelated to the ION, and extending along the whole hindbrain. After 2 days in vitro, the ION was detected as an isolated medial patch of Brn3.2 expressing (Brn3.2+) cells in the caudal hindbrain. 1 day later, these cells reached the ventral midline, where they accumulated (Fig. 2H). In most explants, a faint labeling for Brn3.2 was also detected in the floor plate region (Fig. 2H). In transverse sections of the explants, the Brn 3.2+ ION was located more ventrally than in vivo and was fused on the midline under the floor plate (Fig. 2H,I). In explants dissected at E12.5 instead of E11.5 and maintained for 3 days in culture, Brn3.2 transcripts were detected in the two ION on both sides of the floor plate but never across (Fig. 2K,L). More commissural axons were detected on transverse sections of E12.5 explants immunostained for L1/Ng-CAM (Fig. 2M) compared to similar explants dissected at E11.5 (Fig. 2J). In addition, no gap was detected between the floor plate and the pial surface of the explant (compare Fig. 2J,M).

Origin of the TAG-1 and Brn3.2 neurons in the rhombic lip and their behavior at the floor plate

Unilateral ablation of the rhombic lip at the beginning of the culture, at E11.5 (n=8) or E12.5 (n=12), resulted in a sharp decrease in the number of dorsal TAG-1+ or BrdU neurons on the operated side (Fig. 3A,B). After 4 days in culture, TAG-1+ neurons that have crossed the midline were detected ventrally on the operated side (Fig. 3A,B).

Because most olivary neurons were postmitotic at E11.5 they could have been already located ventrally at the time of explantation and have matured and developed Brn3.2 expression in situ. We sought to eliminate this possibility by

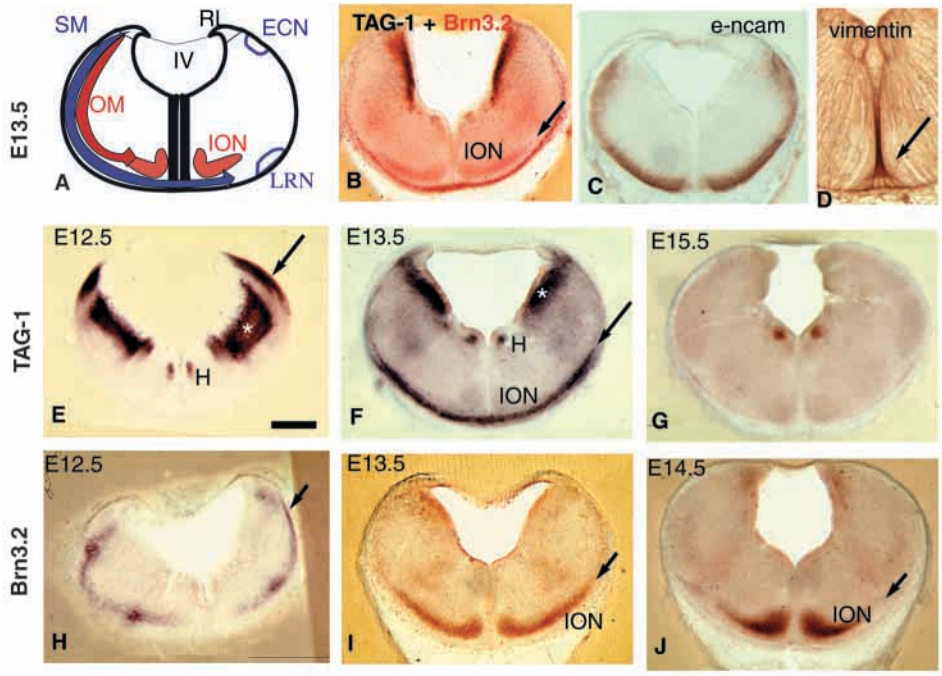


Fig. 1. The superficial and olivary migrations. (A) Schematic representation of a transverse section through the caudal hindbrain. The olivary migrations (OM) gives rise to the ipsilateral inferior olive (ION), whereas the neurons of the superficial migration (SM) form the contralateral lateral reticular (LRN) and external cuneatus (ECN) nuclei. (B-D) Transverse sections of the caudal hindbrain of E13.5 embryos. (B) A gap separates the superficial (arrow) and olivary (ION) migrations on sections double labeled for TAG-1 (brown) and Brn3.2 (red) transcripts. (C) Underlying the olivary migration is a superficial sheet of axons that express and embryonic form of NCAM (e-ncam). (D) Vimentin antibody labels the specialized radial glia that constitutes the floor plate. This tight bundle loosens when it reaches the pial surface, delimiting a superficial path (arrow). (E-J) Transverse sections of the caudal hindbrain treated for the detection of TAG-1 (E-G) or Brn3.2 (H-J). (E-G) Between E11.5 and E14.5, TAG-1 marks the superficial migration (arrows), the hypoglossal nucleus (H) and the subventricular zone (asterisks in E,F). The neurons of the superficial migration reach the midline at E13.5 (F). By E15.5 (G), TAG-1 expression is downregulated. (H-J) Brn3.2 is expressed in the neurons of the olivary migration (arrows) beginning from E12.5 (H), and more faintly in other neuronal populations of the dorsal hindbrain. Notice that the stream of Brn3.2 neurons seems to originate in a gap in the subventricular expression of TAG-1. The olivary neurons reach the midline at E13.5 (I). Brn3.2 expression in the ION persists at later stages (J). Bar, 300 μm.

extirpating the presumptive source of olivary neurons at the time of explantation. The rhombic lip was ablated unilaterally at E11.5. After 3 days in vitro, the size of the Brn3.2+ area was always decreased on the lesioned site (n=22). When the width of the ablations reached one third of the hindbrain (n=5, Fig. 2C) Brn3.2 expressing cells were no more detected ipsilaterally. Most Brn3.2+ neurons remained ipsilateral to the intact rhombic lip. Some Brn3.2+ cells migrated superficially across the floor plate and gathered beneath it. However, they did not migrate beyond its contralateral limit (Fig. 2C,D). When the rhombic lip was extirpated unilaterally at E12.5 (n=6), Brn3.2+ cells were always observed near the floor plate on both sides although the number of cells was smaller on the operated side (data not shown). This suggested that at E12.5 some olivary cells had already migrated close to the ventral midline and therefore were not eliminated by rhombic lip ablation.

Taken together, these observations indicated that the superficial and olivary neurons migrated in vitro, although some alterations could be detected after 3 days in culture. Unless otherwise specified, in the experiments described below, ablations and transplantations were performed at E11.5 and the bulbar explants were cultured for 3 or 4 days before being fixed.

The total number of transplanted or ablated explants was over 950. Slightly more than one third were discarded because of contamination, inefficient transfection, high background staining or poor histochemical reaction, which were the main causes of variability in these experiments. In two thirds of the remaining explants, the experimental design was a variant of that described here, i.e. comparison of the effects of COS-netrin and floor plate on the same explant instead of COS-netrin and COS-control, graft of rosa 26 rhombic lip instead of wild type, etc. The numbers of explants that were treated in the experiments (n) are indicated.

Influence of the floor plate on the olivary and superficial migration

The floor plate was ablated in the region of migration at the beginning of the culture period (Fig. 4A-E). In some cases both sides of the explants fused together on the midline during the culture period. The completion of the ablation was checked using a rat F-spondin probe as a floor plate marker (n=9, Fig. 4A). In most cases (8/9), the Brn3.2+ cells reached the ventral midline but failed to form a central compact structure (Fig. 4A; compare with Fig. 2H). The TAG-1+ neurons also migrated to the ventral edge of the explant in the absence of a floor plate structure (3/3, arrow in Fig. 4E). These observations indicated that, at the onset of their migration, the superficial or olivary neurons do not any longer require the presence of a floor plate to reach the ventral neural tube.

Nevertheless, floor plate-derived signals could be essential in vivo to modulate the rate or direction of migration in different neuronal subpopulations. We therefore examined whether the superficial and olivary migrations could be still responsive to floor plate-derived signals. The chemotropic activity of floor plate fragments was tested on the migrating ION and superficial migration after ablation of the endogenous floor plate from the region of migration in E11.5 hindbrain explants. Floor plate fragments dissected either from the ablated floor plate (n=8, Fig. 4B) or from different anteroposterior levels (n=7+5, Fig. 4C, spinal cord) were inserted perpendicularly to the ventral midline. Both sides of the ectopic floor plates (Fig. 4B,C) were lined with Brn3.2+ cells deviating from their normal trajectory.

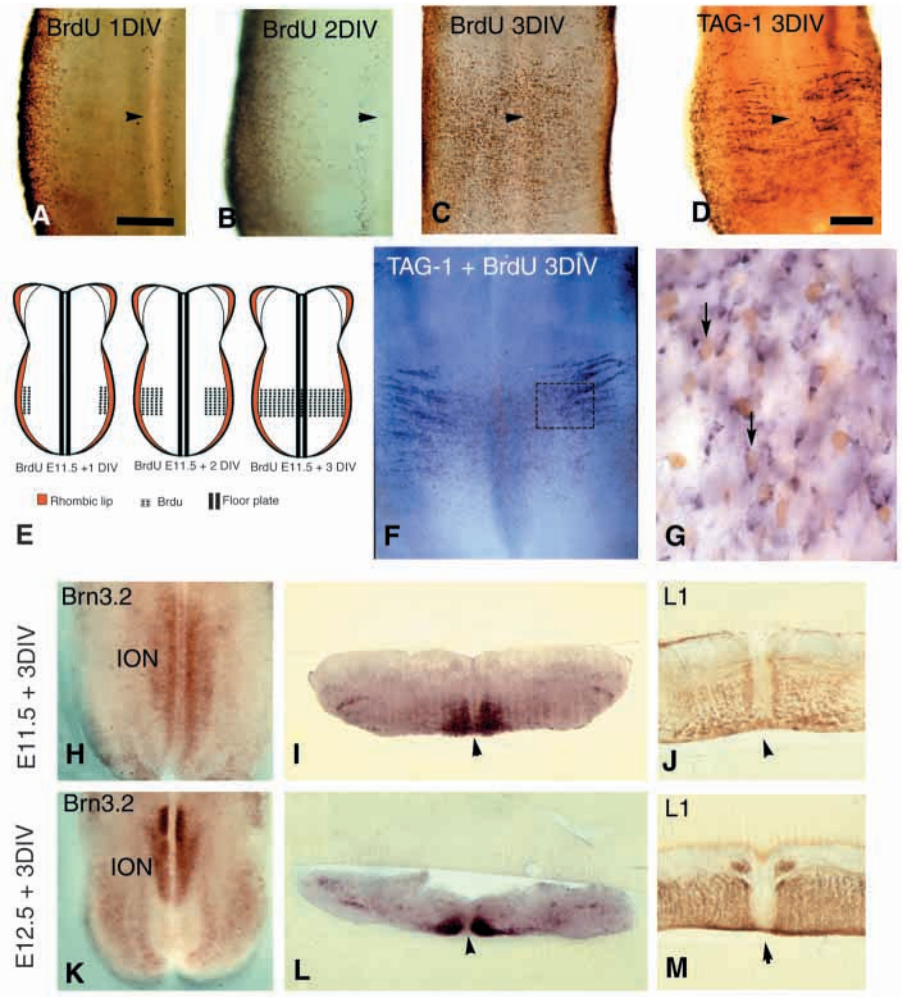


Fig. 2. The superficial and olivary migrations in vitro. (A-C) BrdU immunostained bulbar explants viewed from the pial surface. The explants incubated for 30 minutes with BrdU at E11.5 were analyzed after increasing time intervals in culture. The BrdU-labeled cells progress from their origin in the rhombic lip towards the floor plate (arrowheads) as schematized in (E). (D) The neurons of the superficial migration express TAG-1 in vitro. (F-G) E12.5 explants incubated for 30 minutes with BrdU maintained in culture for 3 days. TAG-1 transcripts are detected in blue and BrdU immunoreactivity is shown in brown. (F) The TAG-1-labeled cells form thin rows dorsally and arrange in a more diffuse pattern around the ventral midline. (G) Higher magnification of the area framed in F. The arrows point to TAG-1-labeled cells, which have incorporated BrdU at the beginning of the culture period. (H-M) Whole mounts (H,K) and transverse vibratome sections (I,J,L,M) of bulbar explants dissected at E11.5 (H-J) or E12.5 (K-M) and cultured for 3 days in vitro. Except in (J,M), where axons are labeled by immunostaining for L1, the brown label marks the olivary neurons detected by in situ hybridization of Brn3.2 transcripts. In E12.5 explants (K,L), as in vivo, the inferior olives on both sides are separated by the floor plate whereas they fuse ventrally in E11.5 explants (H,I). This behavior fits in with the presence of a ventral gap at the pial end of the floor plate in E11.5 (J) but not in E12.5 (M) explants. Arrowheads, floor plate.

At some distance from the ectopic floor plate as well as on the contralateral side, a population of Brn3.2+ cells reached the ventral midline (arrow, Fig. 4B). Brn3.2 (n=7, 7/7, Fig. 4D) and TAG-1 (n=3, 3/3, Fig. 4E) cells accumulated on one side of a floor plate fragment placed against the edge of hindbrain explants cut in the region of migration. This demonstrated that, in previous experiments, the floor plate did not act as an obstacle to the migration but that the migrating cells were indeed deflected from their normal trajectory. Brn3.2+ cells did not accumulate around unrelated neural fragments grafted in the region of migration (cerebral cortex or ganglionic eminence, data not shown). These observations indicated that ectopic floor plate grafts, dissected from hindbrain or spinal cord, attracted both the olivary and superficial neurons.

The signals necessary for olivary migration are widely distributed in the caudal brain

To examine the role of intervening structures in the migration of olivary neurons, rhombic lip fragments were dissected from the caudal hindbrain and transplanted in various ectopic sites: in the most dorsal part of the spinal cord (n=4, 4/4, Fig. 4F) or in the pontine rhombic lip (n=4, 3/4, Fig. 4G). The endogenous

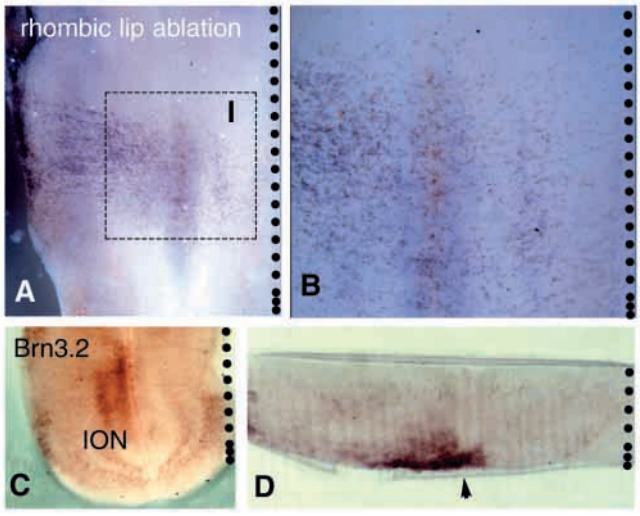


Fig. 3. Consequences of unilateral rhombic lip ablations. (A,B) Explant in which the left rhombic lip was extirpated at the time of explantation (indicated by dots on the right side of the panels). (B) Higher magnification of the area outlined in (A). Some TAG-1- and BrdU-labeled cells have crossed the floor plate. (C,D) Ablation of the left rhombic lip (dots on the right side of the panels) in E11.5 bulbar explants prevents the formation of the ipsilateral inferior olive, indicating that these neurons were located in the dorsal neural plate at the onset of the culture. (D) Vibratome section through the explant illustrated in (C). The olivary neurons cross beneath the floor plate but stop at its contralateral limit. ION, inferior olive; arrowheads, floor plate.

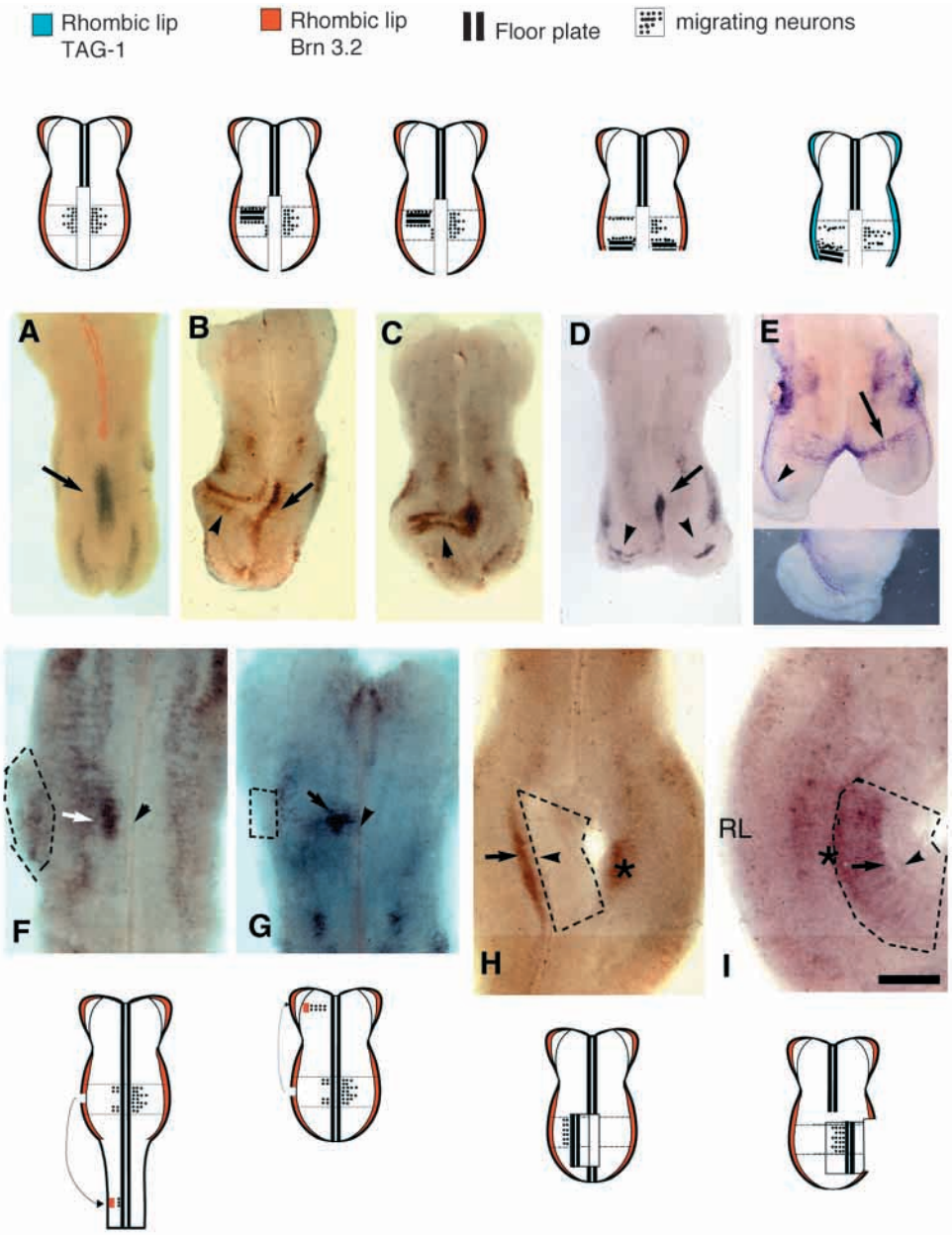


Fig. 4. Influence of the floor plate on the olivary and superficial migrations in vitro. All panels except (E) show bulbar explants dissected at E11.5, cultured for 3 or 4 days, treated for the detection of Brn3.2 transcripts, and viewed from their pial surface. (E) Similar explant dissected at E12.5, cultured for 3 days, and treated for the detection of TAG-1 transcripts. The drawings schematize additional manipulations. The caudal part of the endogenous floor plate was ablated in most cases and both sides of the explants have fused together. (A) Ablation of the floor plate marked in red (F-spondin transcripts) did not prevent the migration of olivary neurons (arrow) towards the midline. (B-D) The olivary neurons accumulate along floor plate transplants dissected from the medulla oblongata (B,D) or the spinal cord (C) of E11.5 embryos. The migration of olivary (D) and superficial (E) neurons is deflected towards a floor plate apposed to the sectioned caudal hindbrain. The inset in E illustrates a higher magnification of the ectopic TAG-1 migration. (F,G) Caudal rhombic lip fragments were transplanted posteriorly (F) or anteriorly (G). They produced Brn3.2+ neurons, which migrated in the ectopic environment (F, spinal cord and G, pons) and accumulated ipsilaterally against the endogeous floor plate. (H,I) Grafts containing floor plates (delineated with dashed lines) were placed at different distances from the rhombic lip (RL). The endogenous midline (asterisk) fused with the additional bulbar tissue. The midline was crossed by olivary neurons but they did not migrate beyond an ectopic floor plate placed closer (H) or farther (I) than the endogenous one. Arrowheads point to the grafted floor plates and arrows to the ectopic ION. Bars, 500 μm (A-E); 300 μm (F-I).

floor plate was left in place. After 3 days in culture, a group of Brn3.2+ cells was detected close to the endogenous floor plate ipsilaterally to the grafted rhombic lip. No Brn3.2 staining was detected near the floor plate on the contralateral side. Thus, although the migration domain of olivary cells is delimited in vivo as well as in control explants, these cells were capable of migrating in ectopic environments either in the rhombencephalon or in the spinal cord. In addition, the Brn3.2+ cells always remained ipsilateral to the rhombic lip grafts (Fig. 5C). In contrast, no ectopic TAG-1 positive cells were produced by similar grafts.

Signals from the ventral neural tube and floor plate impair the progression of the olivary neurons

To test the possibility that the floor plate provides a stop signal to the migrating olivary neurons, we grafted fragments of caudal rhombencephalon comprising the floor plate at various distances from the rhombic lip in bulbar explants from which the endogenous floor plate had been eliminated (Fig. 4H,I). After 3 days in culture, the Brn3.2+ cells stopped at the level of an ectopic floor plate placed at short distance from the rhombic lip (n=5, 5/5, arrowhead in Fig. 4H) without crossing it, and therefore without reaching the ventral midline. When the distance between the floor plate and the rhombic lip was increased by placing the floor plate with additional ventral tissue further away from the ventral midline (n=4, 4/4, Fig. 4I), the Brn3.2+ cells crossed the endogenous ventral midline into the adjacent tissue and reached the floor plate (arrowhead in Fig. 4I), where they stopped. In this latter type of graft, the Brn3.2+ cells did not aggregate or cluster against the floor plate as they do in all other types of floor plate grafting, indicating the presence of ventral signals that modify their behavior.

Together with the results described above, these observations indicate that the floor plate not only attracts

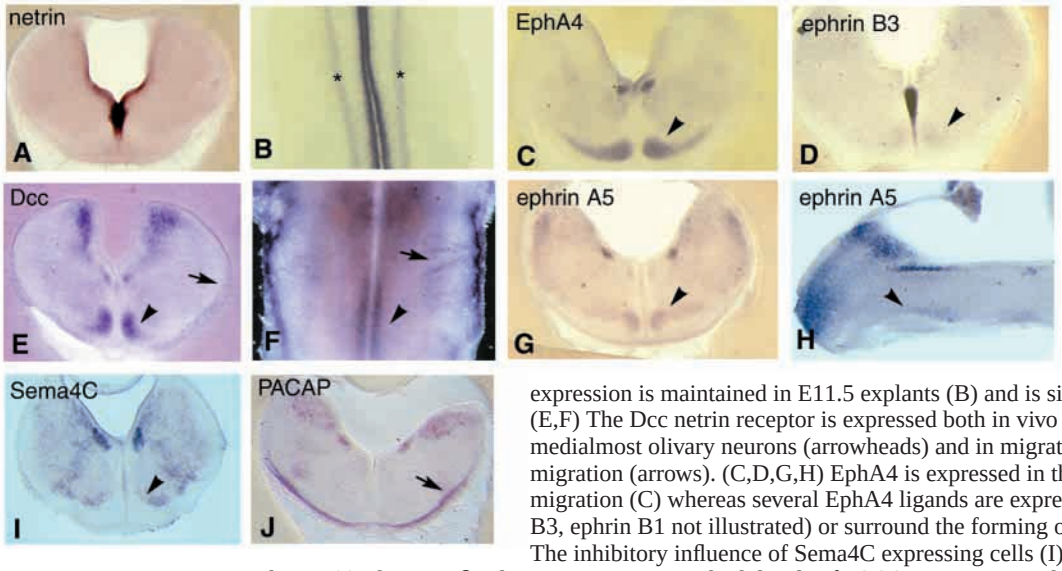


Fig. 5. Chemoattractive and repulsive signalling around the olivary and superficial migrations. Coronal (A,C,D,E,G,I,J) or sagittal (H) sections through the E13.5 caudal hindbrain. (B,F) E11.5 (B) and E12.5 (F) hindbrain explants cultured for 3 and 2 days, respectively, in vitro. (A,B) Netrin-1 midline expression is maintained in E11.5 explants (B) and is similar to its in vivo pattern (A). (E,F) The Dcc netrin receptor is expressed both in vivo (E) and in vitro (F) in the medialmost olivary neurons (arrowheads) and in migrating neurons of the superficial migration (arrows). (C,D,G,H) EphA4 is expressed in the olivary neurons at the end of migration (C) whereas several EphA4 ligands are expressed in the floor plate (D, ephrin B3, ephrin B1 not illustrated) or surround the forming olivary nucleus (G,H, ephrin A5). The inhibitory influence of Sema4C expressing cells (I) could also funnel the olivary migration into its proper pathway. (J) The superficial migration expresses high levels of PACAP transcripts. The arrowheads point to the olivary migration, the arrows to the superficial migration. Asterisks in B, lines of higher netrin expression.

olivary cells during migration but also provides them with a short-range stop signal. Signals from the ventral neural tube could also contribute to slowing down migration as the olivary neurons reach their final destination.

Chemoattractive and repulsive candidates that could mediate the ventral influences on the migrations

Netrin-1 and its Dcc and Unc-5 family receptors are expressed in the caudal hindbrain during the period of migration (Bloch Gallego et al., 1999; Alcantara et al., 2000). We examined whether the pattern of expression of netrin-1 and Dcc was maintained in hindbrain explants. In E11.5 hindbrain explants maintained for 3 days in vitro, netrin-1 was expressed in the medial region of the explants with a peak of expression at the floor plate, and another more laterally (Fig. 5B), which was consistent with their in vivo pattern (Fig. 5A). In E12.5 explants maintained for 2 days in vitro, Dcc was expressed in a thin medial stripe at the level of the ION and, more laterally, in neurons of the superficial migration (Fig. 5F). This pattern is consistent with the in vivo expression of Dcc in the medial olive and the superficial migration at E13.5 (Fig. 5E).

EphA4 was expressed in the olivary migration at E13.5 (Fig. 5C). At the same stage, EphA4 ligands were expressed both in the floor plate (ephrin B3, Fig. 5D; ephrin B1, similar pattern, not shown) and surrounding the olivary migration (ephrin A5, Fig. 5G,H). An inhibitory ensheathing could also be provided by cells expressing Sema4C (Fig. 5I). The superficial migration

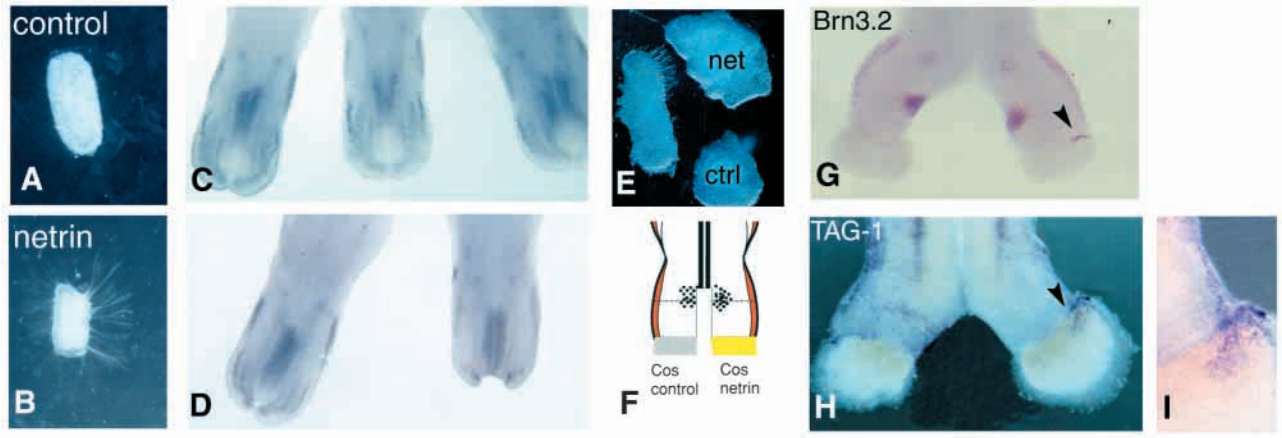


Fig. 6. Influence of netrin on the olivary and superficial migrations. (A-D) Influence of 500 ng/ml purified netrin-1 on hindbrain explants. Netrin promoted profuse axonal outgrowth from rhombic lip fragments grown in collagen (B) compared to control explants (A). The shape of the ION was more regular and more neurons reached the ventral neural tube in hindbrain explants treated with purified netrin (D) compared to untreated control explants (C). (E) E11.5 rhombic lip explant cocultured in collagen gel with netrin (net)-transfected COS cells aggregates (COS-netrin) and control (ctrl) aggregates (En-2-transfected COS cell, COS C). Axons extend from the rhombic lip in the direction of Cos-netrin. Cell migration from the rhombic lip explants is negligible and is not observed before 3 days in culture (data not shown).
(F-I) Transplantation experiments similar to those illustrated in Fig. 4D,E. Netrin-transfected (arrowheads) and control COS cells aggregates were used instead of floor plates. Netrin attracts a population of Brn3.2+ (G) and TAG-1+ (H) cells from the dorsal neural tube. I is a detail of H, illustrating the TAG-1+ cells that migrate on the surface of the COS-netrin aggregate.

neurons expressed high levels of the pituitary adenylyl cyclase activating peptide (PACAP), which could modulate various aspects of their intracellular signalling.

Influence of netrin on the olivary and superficial migrations

The influence of ubiquitous or local overexpression of netrin-1 on the migration of olivary and superficial neurons was examined. E11.5 hindbrain explants were incubated for 30 minutes in culture medium containing (or not) purified chick netrin-1 protein (500 ng/ml), a concentration that elicited a robust axonal outgrowth from rhombic lip explants (compare Fig. 6A and B). After 3 days in culture, the shape of the ION was more regular and compact near the floor plate in netrin-treated explants (n=7,5/7, Fig. 6D) compared to control explants (n=6, Fig. 6C).

Aggregates of COS cells transfected with chick netrin-1 expression plasmids (COS-netrin) or with an unrelated plasmid (ctrl) were used to establish local sources of netrin protein or as controls. COS-netrin aggregates were tested for the production of netrin-1-like activity by evaluating their attractive effect on rhombic lip axons in collagen gels (Fig. 6E). Placed against the edge of bulbar explants, COS-netrin aggregates attracted a population of Brn3.2+ neurons (n=8, 6/8 COS-netrin, 2/8 COS-ctrl). These were restricted to the dorsal neural tube and accumulated at the interface between the COS cell aggregate and neural tube (Fig. 6G). Brn3.2+ cells did not accumulate around small COS-netrin aggregates inserted more ventrally into the migration pathway (not shown). Similarly, local sources of purified netrin protein either adsorbed on affigel beads or mixed with low-melting-point agarose did not deflect the Brn3.2 migration (not shown). TAG-1^+ cells accumulated against COS-netrin aggregates and migrated diffusely over their surface (n=3, 3/3, Fig. 6H,I). It was more difficult to interprete the consequence of netrin overexpression more ventrally as insertion of COS aggregates perturbed the migration of TAG-1+ cells. Similar results were obtained with aggregates of a netrin-secreting permanent cell line (EBNA-net). Compared to that of ectopic floor plates, the attractive effect of COS-netrin cells was more restricted to the dorsal neural tube.

DISCUSSION

Previous studies of the olivary and superficial migrations (Bourrat and Sotelo, 1988; Bourrat and Sotelo, 1990; Ono and Kawamura, 1989; Bloch-Gallego et al., 1999) dealt with a later stage of development and started when these neurons had reached the ventral medulla oblongata and begun axonogenesis. The aim of the present study was to understand the factors that influence an earlier step, during which these neurons migrate from their dorsal site of generation to reach the ventral aspect of the neural tube. We found that both the superficial and olivary migrations occurred in an in vitro explant system that maintained several features of their normal environment and allowed for their manipulation.

Influence of the local environment on the olivary migration

Floor-plate ablations did not prevent the migration of olivary neurons towards the midline, showing that local cues that could guide dorsoventral migration were already distributed in the neural tube at E11.5. The presence of a repulsive activity in the rhombic lip was unlikely because many olivary neurons succeeded in reaching the ventral midline in experiments where dorsal neural tube ablations were too narrow. Olivary neurons migrated out of rhombic lip fragments transplanted at more anterior levels of the hindbrain or more posteriorly in the spinal cord, indicating that their migration is not dependent upon caudal hindbrain specific cues. At this stage of development, signals capable of maintaining the motility of olivary neurons or providing them with a permissive substrate are widely distributed along the caudal neural tube. However, these cues are not ubiquitous, as Brn3.2 neurons failed to migrate from rhombic lip explants cocultured with cerebral cortex tissue or in collagen gel or matrigel (I. dD. and M. W., unpublished observation).

Inhibitory signals to olivary migration in the ventral neural tube

Olivary neurons migrating in the spinal cord or the pons always ended as a tight cluster against the floor plate. This contrasts with the diffuse and wider distribution of olivary neurons in the caudal hindbrain. This behavior is even enhanced when supernumerary ventral tissue is inserted in the olivary migration pathway, as illustrated in Fig. 4I. This suggests that cues present in the ventral domain either inhibit olivary migration or interfere with cell-cell adhesion modifications that are necessary for their condensation into distinct nuclei. Several candidate molecules that could mediate the inhibitory behavior of the ventral neural tube on olivary migration have been described. We have observed that ephrin A4 is expressed in the inferior olive at E13.5, whereas several putative ligands are expressed around the olivary migration (ephrin A5), in the floor plate (ephrin B1 and B3) or slightly later between the olivary lamellae (ephrin A5 at E15). The ventral part of mouse rh7/8 contains a large patch of Sema3A expressing cells (Sem D) (Varela-Echavarria et al., 1997) and several small patches of neurons expressing Sema4C line the olivary migration. The olivary neurons, on the other hand, have been reported to express low levels of the neuropilin 2 semaphorin receptor (Chen et al., 1997) but not neuropilin 1, a selective receptor of Sema3 family members (Kawakami et al., 1996). This complex, though still lacunary, network of inhibitory influences is probably deployed in order to delimit a wide mediolateral outline of the mature ION where the olivary migration settles and begin the complex rearrangements that accompany the morphogenesis of the characteristic ION subdivisions (Bourrat and Sotelo, 1991; Wassef et al., 1992).

The floor plate provides a stop signal to olivary neurons

Two known properties of the floor plate could account for the behavior of olivary neurons whose cell bodies stop at the floor plate, in contrast to their axons, which cross it. On the one hand, the tightly packed radial glia of the midline could behave more like a mechanical obstacle to cell bodies than to axons. Nevertheless, in E11.5 explants, the olivary cells reach the pathway of the superficial migration and find their way beneath and across the floor plate, possibly as a result of the elimination of longitudinal axon tracts in the explants. These neurons are

not capable, however, of pursuing their migration on the other side. The floor plate has been shown to act as a switch that changes the localization of adhesion molecules and guidance receptors from internal pools to the cell surface, and vice versa, as growth cones cross the midline (Dodd et al., 1988; Stein and Tessier-Lavigne, 2001). As the olivary neurons cross beneath the floor plate they could similarly receive a short range signal from the floor plate preventing them from migrating contralaterally.

Influence of netrin on the olivary migration

The influence of netrin-1 on the olivary migration was tested in various ways. Purified netrin was diluted in the culture medium or diffused from focal sources; aggregates of netrin-transfected COS cells or a netrin-secreting EBNA-293 permanent cell line served as netrin sources. Netrin had two clear influences: it attracted a restricted subpopulation of Brn3.2-expressing neurons from the dorsal neural tube and, when provided in the culture medium, facilitated migration, resulting in a smoother and more regular outline of the ION nucleus near the floor plate. On the other hand, netrin sources did not mimick floor plate fragments that attracted and stopped Brn3.2 neurons when inserted into their pathway or placed against the edge of hindbrain explants cut in the region of migration. Compared with the phenotype of netrin mutants, the modest influence of exogenous netrin on the in vitro olivary migration is puzzling. We have observed that dorsoventral migration proceeds normally in vitro when the floor plate is ablated at the onset of migration, suggesting that, in the absence of a high ventral source of netrin, the olivary migration relies on the dorsoventral distribution of hindbrain cues. In netrin mutants, besides the lack of a ventral source of netrin, the dorsoventral organization of the neural tube is probably disturbed before the onset of olivary migration, which could explain the ectopic distribution of clusters of olivary neurons around their normal path. In addition, the direct influence of netrin on migrating olivary neurons could be restricted in time. Dcc transcripts are detected at both ends of the migration but not in migrating olivary neurons. At one end, premigratory olivary neurons in transit in the subventricular zone probably transiently express Dcc transcripts. At the other end, at E13.5, the medial subset of olivary neurons that abuts against the floor plate contains Dcc transcripts. The persistence of the DCC protein in the migrating ION neurons is unknown. COS-netrin cells were only active when placed near the dorsal neural tube, suggesting that the DCC protein is short-lived. On the other hand, we find that addition of soluble netrin to the medium globally improves the migration on ION neurons in vitro, especially in the ventral domain. In these experiments, netrin could influence both the early and late phases of olivary migration, allowing ION neurons to reach the ventral domain before the complete downregulation of DCC protein expression. At subsequent stages of development, Dcc becomes widely expressed in the ION (Bloch-Gallego et al., 1999) and could affect axonal pathfinding.

Influence of the local environment on the superficial migrations

As observed for olivary migration, floor plate ablation did not prevent the superficial migration from reaching the ventral hindbrain. Similarly, rat commissural axons still project ventrally in the absence of floor plate (Placzeck et al., 1990). In contrast to olivary migration, however, establishment of the superficial migration was constrained by the continuity of structural elements, as it did not cross the limit between grafted and host tissue in homo- or heterotopic rhombic lip transplantation experiments. We have recently observed (Kyriakopoulou et al., 2002) that TAG-1 homophilic binding is essential for the migration of superficial neurons in explants. It is likely, however, that other environmental cues are important for the superficial migration. Whereas we find that TAG-1+ cells from the explants are attracted by COS-netrin aggregates and we could confirm that netrin-1 elicited a robust outgrowth of TAG-1+ axons from E11.5 or E12.5 caudal rhombic lip explants cultured in matrigel or collagen gels (Alcantara et al., 2000), very few cells migrated on these axons during the first 3 days in culture. In several instances, glial cells were found to provide a blueprint prefiguring neuron migration pathways: astrocytic sheathing wraps the migrating olfatory neuron precursors (Lois et al., 1996) and loose glial processes prefigure the pontine migration pathway (Ono and Kawamura, 1990). Glial end-feet tunnels, similar to those observed beneath the floor plate, could be a prerequisite for the superficial migration. Meninges, which are removed at the onset of migration, could also be a source of signals, as they are for external granule cells (Ma et al., 1998). We find that TAG-1+ cells prematurely stop migration after 2 days in vitro in our explant system.

Influence of netrin on the superficial migration

We observed that netrin attracts the TAG-1 expressing cells of the superficial migration and that these neurons express Dcc. It was therefore unexpected that the LRN apparently forms and projects normally to the cerebellum in netrin-1 mutants (Bloch-Gallego et al., 1999). We observed that PACAP is expressed at high levels in the superficial migration, whereas the PAC1 receptor has been reported to be expressed ubiquitously in the hindbrain (Washek et al., 1998). A high cytoplasmic concentration of cAMP could increase the sensitivity of the neurons of the superficial migration to a residual netrin signal present in the mutants, or to signalling by another Dcc ligand or cofactor (Ming et al., 1997). Similar to the neurons of the superficial migration, the pontine neurons respond to netrin signals from the onset of their migration but are nevertheless able to reach the ventral pons in netrin mutants (Yee et al., 1999).

The present study, through the use of an organotypic system that enabled direct manipulation of the olivary and superficial migrations of the caudal hinbrain, has assessed more precisely the relative importance of structures and molecular signals that influence the migration of these population of precerebellar neurons.

The authors thank Drs Tessier-Lavigne, Serafini and Chedotal for netrin reagents, Dr Schachner for L1 and e-N-CAM antibodies, and Drs Chedotal, Gilardi, Jessell, Joliot, Klar and Waschek for the gift of cDNA plasmids. We are grateful to Angeliki Louvi, Christine Métin, Nicolas Narboux-Nème and Anibal Smith-Fernandez for critical reading of the manuscript and to Rosette Goiame for technical assistance. This study was partially supported by grants from the EC (ERB BIO 4CT960146) to M.W. and a Platon Franco-Hellenic program to M.W. and D.K. I. dD. was supported by fellowships from Fondation Recherche et Partage and FRM. The work of K.K. in

M.W.'s laboratory was supported by EMBO and *Development* fellowships. D.K. was an invited professor at the Ecole Normale Supérieure.

REFERENCES

Ackerman, S. L., Kozak, L. P., Przyborski, S. A., Rund, L. A., Boyer, B. B. and Knowles, B. B. (1997). The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein. *Nature* **386**, 838-842.

Alcantara, S., Ruiz, M., De Castro, F., Soriano, E. and Sotelo, C. (2000). Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development* **127**, 1359-1372.

Altman, J. and Bayer, S. (1987a). Development of the precerebellar nuclei in the rat: II. The intramural olivary migration stream and the neurogenetic organization of the inferior olive. *J. Comp. Neurol*. **257**, 490-512.

Altman, J. and Bayer, S. (1987b). Development of the precerebellar nuclei in the rat: III. The posterior precerebellar extramural migratory stream and the lateral reticular and external cuneate nuclei. *J. Comp. Neurol*. **257**, 513-528.

Ambrosiani, J., Armengol, J. A., Martinez, S. and Puelles, L. (1996). The avian inferior olive derives from the alar neuroepithelium of the rhombomeres 7 and 8: an analysis by using chick-quail chimeric embryos. *Neurorep.* **7**, 1285-1288.

Bally-Cuif, L. and Wassef, M. (1994). Ectopic induction and reorganization of Wnt-1 expression in quail/chick chimeras. *Development* **120**, 3379-3394.

Bloch-Gallego, E., Ezan, F., Tessier-Lavigne, M. and Sotelo, C. (1999). Floor plate and netrin-1 are involved in the migration and survival of inferior olivary neurons. *J. Neurosci.* **19**, 4407-4420.

Bourrat, F., Gotow, T. and Sotelo, C. (1989). Development of the rat inferior olive: migratory routes, formation of afferent and efferent connections. *Exp. Brain Res*. **17**, 123-170.

Bourrat, F. and Sotelo, C. (1988). Migratory pathways and neuritic differentiation of inferior olivary neurons in the rat embryo. Axonal tracing study using the in vitro slab technique. *Dev. Brain Res*. **39**, 19-37.

Bourrat, F. and Sotelo, C. (1990). Migratory pathways and selective aggregation of the lateral reticular nucleus in the rat embryo: a horseradish peroxidase in vitro study, with special reference to migration patterns of the precerebellar nuclei. *J. Comp. Neurol*. **249**, 1-13.

Bourrat, F. and Sotelo, C. (1991). Relationships between neuronal birthdates and cytoarchitecture in the rat inferior olivary complex. *J. Comp. Neurol*. **313**, 509-521.

Brose, K., Bland, K. S., Wang, K. H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M. and Kidd, T. (1999). Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* **96**, 795-806.

Cambronero, F. and Puelles, L. (2000). Rostrocaudal nuclear relationships in the avian medulla oblongata: a fate map with quail chick chimeras. *J. Comp. Neurol.* **427**, 522-545.

Chen, H., Chedotal, A., He, Z., Goodman, C. S. and Tessier-Lavigne, M. (1997). Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* **19**, 547-559.

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

Echelard, Y., Eptein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A. and McMahon, A. P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* **75**, 1417-1430.

Furley, A. J., Morton, S. B., Manalo, D., Karagogeos, D., Dodd, J. and Jessell, T. M. (1990). The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity. *Cell* **61**, 157-170.

Harkmark, W. (1954). Cell migrations from the rhombic lip to the inferior olive, the nucleus raphe and the pons. A morphological and experimental investigation in chick embryos. *J. Comp. Neurol.* **100**, 115-209.

Joliot, A., Maizel, A., Rosenberg, D., Trembleau, A., Dupas, S., Volovitch, M. and Prochiantz, A. (1998). Identification of a signal sequence necessary for the unconventional secretion of Engrailed homeoprotein. *Curr. Biol.* **8**, 856-863.

Kawakami, A., Kitsukawa, T., Takagi, S. and Fujisawa, H. (1996). Developmentally regulated expression of a cell surface protein, neuropilin, in the mouse nervous system. *J. Neurobiol.* **29**, 1-17.

Kennedy, T., Serafini, T., de la Torre, J. R. and Tessier-Lavigne, M. (1994). Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* **78**, 425-435.

Klar, A., Baldassare, M. and Jessell, T. M. (1992). F-spondin: a gene expressed at high levels in the floor plate encodes a secreted protein that promotes neural cell adhesion and neurite expression. *Cell* **69**, 95-110.

Kyriakopoulou, K., de Diego, I., Wassef, M. and Karagogeos, D. (2002). A combination of chain and neurophilic migration involving the adhesion molecule TAG-1 in the caudal medulla. *Development* **129**, 287-296.

Lois, C., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science* **271**, 978-981.

Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P. R., Segal, R. A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R. T. and Springer, T. A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9448-9453.

Ming, G. L., Song, H. J., Berninger, B., Holt, C. E., Tessier-Lavigne, M. and Poo, M. M. (1997). cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron* **19**, 1225-1235.

Ono, K. and Kawamura, K. (1989). Migration of immature neurons along tangentially oriented fibers in the subpial part of the fetal mouse medulla oblongata. *Exp. Brain Res*. **78**, 290-300.

Ono, K. and Kawamura, K. (1990). Mode of neuronal migration of the pontine stream in fetal mice. *Anat. Embryol.* **182**, 11-19.

Placzek, M., Tessier-Lavigne, M., Jessell, T. M. and Dodd, J. (1990). Orientation of commissural axons in vitro in response to a floor plate-derived chemoattractant. *Development* **110**, 19-30.

Serafini, T., Kennedy, T., Galko, M., Mirzyan, C., Jessell, T. and Tessier-Lavigne, M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins with homology to C. elegans UNC-6. *Cell* **78**, 409-424.

Shirakasi, R., Tamada, A., Katsumata, R. and Murakami, F. (1995). Guidance of cerebellofugal axons in the rat embryo: directed growth toward the floor plate and subsequent elongation along the longitudinal axis. *Neuron* **14**, 961-972.

Shirakasi, R., Katsumata, R. and Murakami, F. (1998). Change in chemoattractant responsiveness of developing axons at an intermediate target. *Science* **279**, 105-107.

Stein, E. and Tessier-Lavigne, M. (2001). Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* **291**, 1928-1938.

Taber Pierce, E. (1973). Time of origin of neurons in the brain stem of the mouse. *Prog. Brain Res*. **40**, 53-65.

Tamada, A., Shirakasi, R. and Murakami, F. (1995). Floor plate chemoattracts crossed axons in the vertebrate brain. *Neuron* **14**, 1083-1093.

Tan, K. and Le Douarin, N. M. (1991). Development of the nuclei and cell migration in the medulla oblongata. Application of the quail-chick chimera system. *Anat. Embryol*. **183**, 321-343.

Turner, E. E., Jenne, K. J. and Rosenfeld, M. G. (1994). Brn-3.2: A Brn-3-related transcription factor with distinctive central nervous system expression and regulation by retinoic acid. *Neuron* **12**, 205-218.

Varela-Echavarria, A., Tucker, A., Puschel, A. W. and Guthrie, S. (1997). Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. *Neuron*. **18**, 193-207.

Waschek, J. A., Casillas, R. A., Nguyen, T. B., DiCicco-Bloom, E. M., Carpenter, E. M. and Rodriguez, W. I. (1998). Neural tube expression of pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and receptor: potential role in patterning and neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9602-9607.

Wassef, M., Chedotal, A., Cholley, B., Thomasset, M., Heizmann, C. W. and Sotelo, C. (1992). Development of the olivocerebellar projection in the rat: I. Transient biochemical compartmentation of the inferior olive. *J. Comp. Neurol*. **323**, 519-536.

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

Yee, K. T., Simon, H. H., Tessier-Lavigne, M. and O'Leary, D. M. (1999). Extension of long leading processes and neuronal migration in the mammalian brain directed by the chemoattractant netrin-1. *Neuron* **24**, 607-622.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑ:	Κυριακοπούλου Κατερίνα-Μαρία
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ:	8 Νοεμβρίου 1970
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ:	Αθήνα
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ:	Πλαστήρα 38, 71201 Ηράκλειο Κρήτης
ΤΗΛΕΦΩΝΟ:	0810 244984
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:	Τομέας Βασικών Επιστημών, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τ.Θ. 1393, 71110 Ηράκλειο Κρήτης
ΤΗΛΕΦΩΝΟ:	0810 394543
FAX:	0810 394530
E-MAIL:	kyriakop@imbb.forth.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

1990-1994 Πτυχίο Βιολογίας (Βαθμός: Λίαν Καλώς 6.97), Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

1995-1997 Δίπλωμα Ειδίκευσης στις Βασικές Νευροεπιστήμες (Βαθμός: Άριστα), στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Βασικών Νευροεπιστημών, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

1998-2002 Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής με τίτλο «Μελέτη των μηχανισμών μετανάστευσης κυττάρων στο προπαρεγκεφαλιδικό σύστημα». Η διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Νευροεπιστημών με επιβλέπουσα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δόμνα Καραγωγέως, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Βασικών Νευροεπιστημών, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ/ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

Μάρτιος 1995 Συμμετοχή στο εκπαιδευτικό μάθημα με τίτλο «τεχνικές χρωστικής στη νευροανατομία», το οποίο πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Dr. S. Thanos, University of Tubingen, Γερμανία.

Ιούν-Αύγουσ. 1996 Επίσκεψη στο εργαστήριο Cellular Neurobiology, Center of Neurochemistry, University of Strasbourg, όπου και εκπαιδεύτηκα στην τεχνική της εμφύτευσης πολυμερών Elvax σε εγκέφαλο επίμυος από τον Dr Y. Bailly. Η επίσκεψη χρηματοδοτήθηκε από την Γαλλική πρεσβεία στην Ελλάδα.

Φεβ.-Ιούλ. 1997 Επίσκεψη στο εργαστήριο της Dr Marion Wassef στην Ecole Normale Superieure στο Παρίσι, όπου και εκπαιδεύτηκα στην τεχνική δημιουργίας χίμαιρας ορτυκιού-όρνιθας σε *in vivo* και *in vitro* συνθήκες. Η επίσκεψη χρηματοδοτήθηκε από υποτροφία της EMBO (short term fellowship).

Μαΐος-Ιούλ. 1998 Επίσκεψη στο εργαστήριο της Dr Marion Wassef στην Ecole Normale Superieure στο Παρίσι, όπου και εκπαιδεύτηκα στην μικροχειρουργική απομόνωση τμημάτων του αναπτυσσόμενου νευρικού συστήματος και στην *in vitro* καλλιέργειά τους. Η επίσκεψη χρηματοδοτήθηκε από υποτροφία του επιστημονικού περιοδικού Development.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

1993-1994 Πτυχιακή εργασία στο εργαστήριο Νευροεπιστημών της Αναπλ. Καθηγήτριας Δ. Καραγωγέως, Τομέας Βασικών Επιστημών, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Τίτλος: "Έκφραση της TAG-1 στην παρεγκεφαλίδα φυσιολογικών μυών και επίμυων, ακτινοβολημένων επίμυων και μεταλλαγμένων staggerer μυών".

Ιαν.- Ιουν. 1995 Πρακτική εξάσκηση (rotation) στο εργαστήριο Ψυχοφαρμακολογίας της Καθηγήτριας Χρ. Σπυράκη (Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης), όπου εκπαιδεύτηκα στη χρήση του μοντέλου «προτίμησης θέσης» στη μελέτη της επίδρασης της ενδοκρανιακής χορήγησης μορφίνης σε επίμυες.

Ιουλ.-Δεκ. 1995 Πρακτική εξάσκηση (rotation) στο εργαστήριο Φαρμακολογίας της Αναπλ. Καθηγήτριας Κ. Θερμού (Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης), όπου ασχολήθηκα με τον βιοχημικό και φαρμακολογικό χαρακτηρισμό των υποδοχέων σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή χιτώνα κουνελιού.

1996- σήμερα	Πρακτική εξάσκηση (rotation) και στη συνέχεια απόκτηση του τίτλου ειδίκευσης και του διδακτορικού διπλώματος από το εργαστήριο νευροεπιστημών της Αναπλ. Καθηγήτριας Δ. Καραγωγέως. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου ασχολήθηκα με την μελέτη της μετανάστευσης πρόδρομων νευρικών κυττάρων στην παρεγκεφαλίδα και στο ρομβοειδή εγκέφαλο σε μύες, επίμυες και πτηνά. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές και μοριακές μέθοδοι, κυτταροκαλλιέργειες, ιστοκαλλιέργειες και δημιουργία χιμαιρών όρνιθας-ορτυκιού (*in vivo* και *in vitro*).

ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

5-9 Οκτωβρίου 1995	2η συνάντηση του Ευρωπαϊκού Προγράμματος BARNEF, Κολυμπάρι, Κρήτη (Προφορική παρουσίαση).
3-5 Νοεμβρίου 1995	10ο συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Νευροεπιστημών, Μέτσοβο (Αναρτημένη εργασία-poster).
11-16 Νοεμβρίου 1995	25th Annual Meeting of Society of Neuroscience, San Diego, California, USA (Αναρτημένη εργασία).
25-27 Οκτωβρίου 1996	11η συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Νευροεπιστημών, Ανώγεια, Κρήτη.
27 Ιουν.-1 Ιουλ. 1998	1ο Ευρωπαϊκό συνέδριο Νευροεπιστημών (Forum of European Neuroscience), Βερολίνο (Αναρτημένη εργασία).
26-28 Οκτωβρίου 2000	15ο συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Νευροεπιστημών, Πάτρα (Αναρτημένη εργασία).
19-21 Οκτωβρίου 2001	16ο συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Νευροεπιστημών, Θεσσαλονίκη (Αναρτημένη εργασία).
10-15 Νοεμβρίου 2001	31st Annual Meeting of Society of Neuroscience, San Diego, California, USA (Αναρτημένη εργασία).
13-15 Δεκεμβρίου 2001	53ο συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας, Αθήνα (Αναρτημένη εργασία).

13-17 Ιουλίου 2002 — 5ο Ευρωπαϊκό συνέδριο Νευροεπιστημών (Forum of European Neuroscience), Παρίσι, (Αναρτημένη εργασία).

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Bailly Y.*, **Kyriakopoulou K**.*, Delhaye-Bouchaud N., Mariani J. and Karagogeos D. (1996). Cerebellar granule cell differentiation in mutant and X-irradiated rodents revealed by the neural adhesion molecule TAG-1. *J. Comp. Neurol.* 369 (1): 150-161.
2. Karagogeos D., Pouquie C., **Kyriakopoulou K**., Tavian M., Stallcup W., Peault B., Pourquie O. (1997). Expression of the cell adhesion proteins BEN/SC1/DM-GRASP and TAG-1 defines early steps of axonogenesis in the human spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 379 (3): 415-427.
3. **Kyriakopoulou K**., de Diego I., Wassef M., Karagogeos D. (2002). A combination of chain and neurophilic migration involving the adhesion molecule TAG-1 in the caudal medulla. *Development* 129(2): 287-296.
4. de Diego I.*, **Kyriakopoulou K**.*, Karagogeos D. and Wassef M. (2002). Multiple influences of the floor plate on the migration of precerebellar neurons in the caudal medulla. *Development* 129(2): 297-306.
5. Theodorakis K., **Kyriakopoulou K.,** Wassef M. and Karagogeos D. (2002). Novel sites of expression of the bHLH gene NSCL1 in the developing neurvous sytem. *Mech. Dev.* Submitted

(* equal contribution)