

ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΝΔΙΑΜΕΣΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΟΥ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΣΕ ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ: ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΕΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ
ΜΟΝΤΕΛΑ ΜΥΩΝ**

ΜΗΝΑ ΜΑΡΙΑΣ

ΒΙΟΛΟΓΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Η διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε με υποτροφία του ΙΚΥ η οποία χρηματοδοτήθηκε από την Πράξη <<Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών για μεταπτυχιακές σπουδές δεύτερου κύκλου σπουδών>> από τους πόρους του ΕΠ <<Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση>>, 2014-2020 με τη συγχρηματοδότηση του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (Ε.Κ.Τ) και του Ελληνικού Δημοσίου.

ΑΘΗΝΑ 2019

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΝΔΙΑΜΕΣΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΟΥ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΣΕ ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ: ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΕΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ
ΜΟΝΤΕΛΑ ΜΥΩΝ**

ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΝΔΙΑΜΕΣΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΟΥ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΣΕ ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ: ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΕΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ
ΜΟΝΤΕΛΑ ΜΥΩΝ**

ΜΗΝΑ ΜΑΡΙΑΣ

ΒΙΟΛΟΓΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΣΤΑΜΑΤΑΚΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ) ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΖΑΓΟΡΑΙΟΥ ΛΑΣΚΑΡΩ ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ Γ

ΣΤΥΛΙΑΝΟΠΟΥΛΟΥ ΦΩΤΕΙΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΣΤΑΜΑΤΑΚΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ) ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΖΑΓΟΡΑΙΟΥ ΛΑΣΚΑΡΩ ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ Γ

ΣΤΥΛΙΑΝΟΠΟΥΛΟΥ ΦΩΤΕΙΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΕΥΘΥΜΙΟΠΟΥΛΟΣ ΣΠΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΠΑΠΑΖΑΦΕΙΡΗ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΜΑΓΚΟΥΡΑ ΔΗΜΗΤΡΑ ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ Α

ΠΟΛΙΤΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ Γ

Copy right 2019 ΜΗΝΑ ΜΑΡΙΑ για την Ελληνική γλώσσα σε όλο τον κόσμο. Η πνευματική ιδιοκτησία αποκτάται χωρίς καμία διατύπωση και χωρίς την ανάγκη ρήτρας απαγορευτικής των προσβολών της. Επισημαίνεται πάντως ότι κατά τον Ν. 2387/20 (όπως έχει τροποποιηθεί από το Ν 100/1975 και ισχύει σήμερα) και κατά τη Διεθνή Σύμβαση της Βέρνης (όπως έχει κυρωθεί με το Ν. 100/1975) απαγορεύεται η αναδημοσίευση, η αποθήκευση σε οποιοδήποτε σύστημα διάσωσης και γενικά η αναπαραγωγή του παρόντος έργου, με οποιοδήποτε τρόπο ή μορφή τμηματικά ή περιληπτικά, στο πρωτότυπο ή σε μετάφραση ή άλλη διασκευή, χωρίς γραπτή άδεια του συγγραφέα.

«Η έγκριση Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Νοσηλευτικής Πανεπιστημίου Αθηνών δεν σημαίνει και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα»

(Σχετικές διατάξεις του άρθρου 50 του Νόμου 1268/82, σε συνδυασμό με τις διατάξεις του Πανεπιστημίου Αθηνών, Άρθρο 202 παρ 2 του Νόμου 5343/32).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΚΥΚΛΩΜΑΤΑ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ	11
ΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΔΙΑΜΕΣΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΟΥ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ	15
ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΚΑΤΑ ΜΗΚΟΣ ΤΟΥ ΡΑΧΙΑΙΟΚΟΙΛΙΑΚΟΥ ΑΞΟΝΑ ΤΟΥ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ	17
V0 ΔΙΑΜΕΣΟΙ ΝΕΥΡΩΝΕΣ.....	21
V0c, V0g ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΔΙΑΜΕΣΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ.....	22
ΚΙΝΗΤΙΚΟΙ ΝΕΥΡΩΝΕΣ ΚΑΙ C BOUTONS.....	23
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ V0C ΝΕΥΡΩΝΩΝ	25
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟΥ CART ΣΤΟΥΣ V0C ΝΕΥΡΩΝΕΣ	27
ΤΟ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟ CART (Cocaine and amphetamine regulated transcript) ..	32
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	34
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	35
ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ-ΣΕΙΡΕΣ ΠΟΝΤΙΚΩΝ	35
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗΣ	36
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	40
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ	41
-ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΑΠΟ ΕΜΒΡΥΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ	41
-ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΑΠΟ ΝΕΟΓΕΝΝΗΤΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ.....	42
-ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΗΛΙΚΙΑΣ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΗΣ ΑΠΟ P10 ΜΕ ΕΝΔΟΚΑΡΔΙΑΚΗ ΕΓΧΥΣΗ 4% ΠΑΡΑΦΟΡΜΑΛΔΕΥΔΗΣ (PERFUSION).....	43
ΚΟΠΗ ΚΡΥΟΤΟΜΩΝ	45
ΚΟΠΗ ΣΕ ΜΙΚΡΟΤΟΜΟ ΜΕ ΔΟΝΟΥΜΕΝΗ ΛΕΠΙΔΑ (VIBRATOME)	45
ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	47
ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	48
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΤΑ SOUTHERN.....	50
ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΤΑ SOUTHERN	51
ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ (BrdU) ...	53
ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ.....	55

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ	56
-ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΕΜΜΕΣΗ ΜΕΘΟΔΟ ΚΟΛΛΟΕΙΔΟΥΣ ΑΝΟΣΟΧΡΥΣΟΥ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΕΓΚΛΕΙΣΗ ΤΟΥ ΙΣΤΟΥ ΣΕ ΡΗΤΙΝΕΣ (Pre- embedding method).....	56
ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ.....	59
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	64
ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΡΙΤΧ2 ΔΙΑΜΕΣΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ	64
-ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΡΟΝΟΥ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΤΩΝ ΡΙΤΧ2 ΔΙΑΜΕΣΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ	64
-ΜΕΛΕΤΗ ΠΙΘΑΝΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ NOTCH	68
-ΜΕΛΕΤΗ ΠΙΘΑΝΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΗΟΧ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ	70
ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CART ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΣΤΟΥΣ ΡΙΤΧ2 ΝΕΥΡΩΝΕΣ.....	72
ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CART ΣΤΑ C BOUTONS	76
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ CART ΣΤΑ C BOUTONS ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΝΤΟΝΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ.....	87
ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ CART KNOCK OUT ΠΟΝΤΙΚΩΝ	88
CART ΚΑΙ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΗ: ΕΠΗΡΕΑΖΕΤΑΙ Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΕΝΟΣ ΝΕΥΡΟΔΙΑΒΙΒΑΣΤΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΠΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΑΛΛΟΥ?	92
ΤΟ CART ΔΕΝ ΕΝΤΟΠΙΖΕΤΑΙ ΣΕ ΑΛΛΕΣ ΣΥΝΑΨΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΚΙΝΗΤΙΚΟΥΣ ΝΕΥΡΩΝΕΣ.....	95
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ C BOUTON ΣΥΝΑΨΗΣ.....	97
- ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΔΥΝΑΜΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΟΧΗΣ.....	97
- ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΧΟΥΝ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΗ Ή CART ΣΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΡΕΜΑΜΕΝΟΥ ΣΥΡΜΑΤΟΣ	100
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	103
ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΡΙΤΧ2 ΔΙΑΜΕΣΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ	103
ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CART ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΣΤΟΥΣ ΡΙΤΧ2 ΝΕΥΡΩΝΕΣ.....	104
CART ΚΑΙ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΗ: ΕΠΗΡΕΑΖΕΤΑΙ Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΕΝΟΣ ΝΕΥΡΟΔΙΑΒΙΒΑΣΤΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΠΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΑΛΛΟΥ?	106
ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CART ΣΤΑ C BOUTONS	108
ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ C BOUTON ΣΥΝΑΨΗΣ.....	109
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ.....	110
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	112

ABSTRACT	114
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	116

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διδακτορική αυτή διατριβή αποτέλεσε για μένα μία πρόκληση. Στο τέλος της, είμαι πλέον σίγουρη ότι μέσα από τις δυσκολίες, μου προσέφερε πολύτιμα μαθήματα ζωής που θα με συντροφεύουν στα επόμενα βήματά μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Ζαγοραίου για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διδακτορική μου διατριβή στο εργαστήριό της, καθώς και για τη συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξη. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Σταματάκη για την πολύτιμη καθοδήγηση και κατανόησή του, καθώς και όλους τους καθηγητές της επταμελούς επιτροπής για την συμμετοχή τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Ισμήνη Ροζάνη, Παναγιώτα Αποστόλου, Ποθάκο Κωνσταντίνο, Ελένη Κονσολάκη, Ευσταθία Τετρίγγα, Βασίλη Μεσσιακάρη και Γεωργία Τσαπάρη που με συντρόφευσαν και με στήριξαν σε αυτό το ταξίδι.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους για την στήριξη, την υπομονή και την πίστη τους σε μένα.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μετακίνηση στο χώρο (locomotion), η ικανότητα δηλαδή των ζώων να μεταφέρονται από το ένα σημείο στο άλλο, είναι μια από τις πιο εξελιγμένες κινητικές συμπεριφορές των θηλαστικών. Χρειάζεται να είναι εξαιρετικά ακριβής, ώστε μέσω αυτής τα ζώα να μπορούν να εντοπίσουν τροφή, να αποδράσουν από θηρευτές και γενικότερα να επιβιώσουν. Η μετακίνηση στον χώρο, λοιπόν, είναι μία ρυθμική συμπεριφορά κατά την οποία η συχνότητα του περπατήματος, ο συγχρονισμός δεξιού-αριστερού άκρου, η εναλλαγή κάμψης και έκτασης του άκρου καθώς και η ένταση της μυϊκής σύσπασης, πρέπει να μεταβάλλονται ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες. Μια από τις μεγάλες προκλήσεις στον τομέα των νευροεπιστημών αποτελεί η μελέτη του τρόπου οργάνωσης και λειτουργίας των δικτύων που ευθύνονται για να παραχθεί η συγκεκριμένη ρυθμική συμπεριφορά. Τα υπεύθυνα δίκτυα νευρώνων για την εκτέλεση της μυϊκής σύσπασης που οδηγεί στην μετακίνηση στο χώρο εδράζονται στον νωτιαίο μυελό. Την εκτέλεσή της μετακίνησης στο χώρο επηρεάζουν και οι πληροφορίες από τα ανώτερα κέντρα και την περιφέρεια. Πιο συγκεκριμένα, τα δίκτυα αυτά εντοπίζονται στους διάμεσους νευρώνες του νωτιαίου μυελού, που δέχονται την πληροφορία από τα ανώτερα κέντρα του εγκεφάλου και τους αισθητικούς νευρώνες της περιφέρειας, την επεξεργάζονται και τη στέλνουν με τη σειρά τους στους κινητικούς νευρώνες του νωτιαίου μυελού. Οι κινητικοί νευρώνες οργανώνονται σε κινητικές μονάδες (motor pools), οι οποίες με τη σειρά τους μεταβιβάζουν το σήμα σε συγκεκριμένους μύες των άκρων (Hochman and Schmidt 1998) για την εκτέλεση της συστολής τους και κατ'επέκταση της κίνησης.

Η μεταβίβαση του σήματος από τους νευρώνες και συνεπώς η ακρίβεια της κίνησης, εξαρτάται από τη συνδυαστική επίδραση νευροδιαβίβασης και νευροτροποποίησης. Η νευροδιαβίβαση είναι πιο γρήγορη και οι νευροδιαβιβαστές συμμετέχουν άμεσα στη μεταβίβαση της πληροφορίας μέσω διεγερτικών και ανασταλτικών σημάτων, καθώς απελευθερώνονται από τον προσυναπτικό νευρώνα και προσδένονται στον μετασυναπτικό κινητικό νευρώνα πάνω σε ιονοτροπικούς υποδοχείς. Αντίθετα, οι νευροτροποποιητές

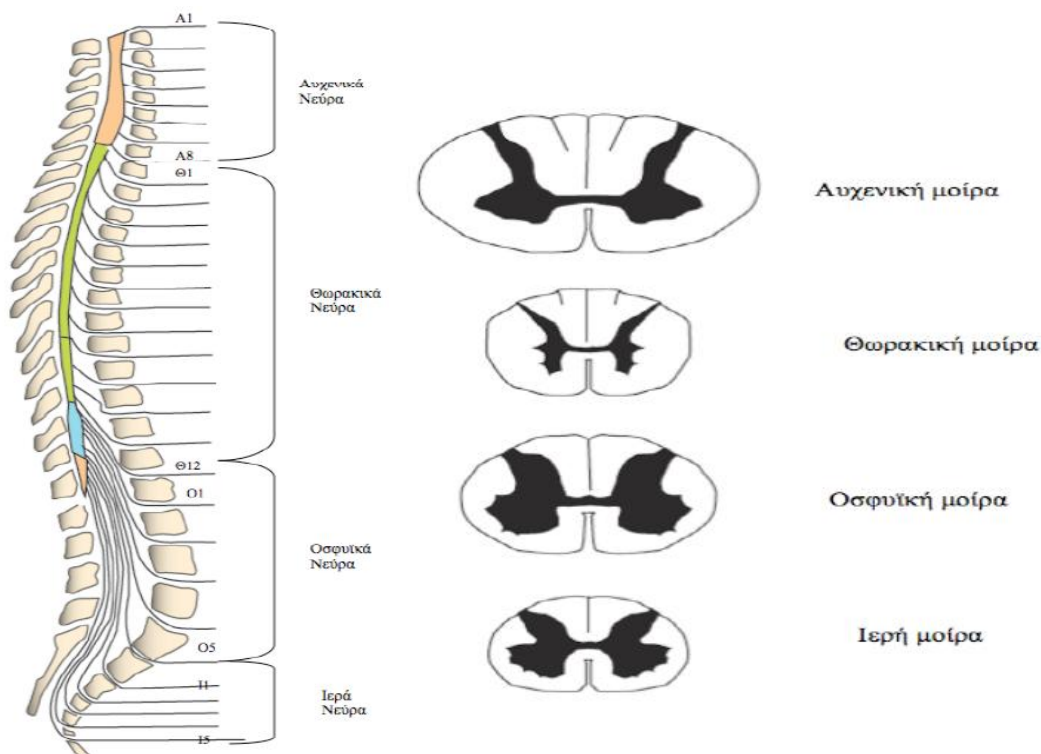
δεν συμμετέχουν άμεσα στη μεταβίβαση της πληροφορίας (Shefchyk and Jordan 1985; Orsal et al. 1986; Cazalets et al. 1996; Hochman and Schmidt 1998), αλλά επιδρούν σε αυτή μεταβάλλοντας κυτταρικές ιδιότητες, όπως η πιθανότητα απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστή, το μεμβρανικό δυναμικό και η συναπτική δραστηριότητα και πλαστικότητα (Giocomo and Hasselmo 2007). Η ακετυλοχολίνη αποτελεί ένα παράδειγμα μορίου που μπορεί να δράσει τόσο ως νευροδιαβιβαστής όσο και ως νευροτροποποιητής αναλόγως με τον μετασυναπτικό υποδοχέα που ενεργοποιεί κάθε φορά.

Ένα από τα πιο εντυπωσιακά χαρακτηριστικά του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) των σπονδυλωτών είναι η εκπληκτική ποικιλομορφία των κυτταρικών τύπων που το αποτελούν. Μια πληθώρα πληθυσμών διάμεσων νευρώνων με διαφορετικές ιδιότητες βρίσκονται στο νωτιαίο μυελό και ενεργοποιούν ή καταστέλλουν τους κινητικούς νευρώνες. Προκειμένου, να χαρτογραφηθεί το δίκτυο της μετακίνησης στον χώρο, είναι αναγκαία η εύρεση των ομοιογενών πληθυσμών νευρώνων και στη συνέχεια η σήμανση των πληθυσμών για την εύρεση της κατεύθυνσης των αξόνων τους και η απομάκρυνση πληθυσμών από το δίκτυο ώστε να προσδιοριστεί ο ρόλος του καθενός στην μετακίνηση. Η παρούσα διδακτορική διατριβή επικεντρώθηκε πρώτον στη μελέτη ενός από τους μικρούς υποπληθυσμούς διάμεσων νευρώνων του νωτιαίου μυελού. Ο υποπληθυσμός αυτός ονομάζεται V0cg, έχει εντοπιστεί στο ενδιάμεσο-κοιλιακό τμήμα του νωτιαίου μυελού και εκφράζει τον μεταγραφικό παράγοντα Pitx2 (Zagoraiou et al., 2009). Αν και μικρός, διαχωρίζεται περαιτέρω σε δύο υποπληθυσμούς: έναν χολινεργικό (V0c) και έναν γλουταματεργικό (V0g). Μάλιστα, ο V0c υποπληθυσμός αποτελεί την πηγή των C bouton συνάψεων (είδος χολινεργικής σύναψης) στους κινητικούς νευρώνες (Conradi & Skoglund, 1969). Αρχικός στόχος αυτής της εργασίας είναι η μελέτη των αναπτυξιακών γεγονότων που οδηγούν στη διαφοροποίηση των Pitx2+ διάμεσων νευρώνων από τον προγονικό πληθυσμό V0. Επιπλέον, η ανακάλυψη της ύπαρξης του Cart νευροπεπτιδίου στα σώματα των V0c νευρώνων στον νωτιαίο μυελό καθώς και στα C boutons πάνω στους κινητικούς νευρώνες, έδωσε το έναυσμα για μία λεπτομερή αναπτυξιακή και λειτουργική προσέγγιση της έκφρασης του Cart στα C boutons, που θα βοηθήσει στην αποσαφήνιση του ρόλου του στον νωτιαίο μυελό.

ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΚΥΚΛΩΜΑΤΑ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ

Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) αποτελείται από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό και είναι ο βασικός ρυθμιστής όλων των λειτουργιών του οργανισμού. Το κεντρικό νευρικό σύστημα είναι συμμετρικό και η ανάπτυξή του ξεκινά από τη δημιουργία του νευρικού σωλήνα, από το πρόσθιο τμήμα του οποίου σχηματίζεται ο εγκέφαλος, ενώ από το οπίσθιο ο νωτιαίος μυελός (Vander, Arthur, Human Physiology: the mechanisms of body function).

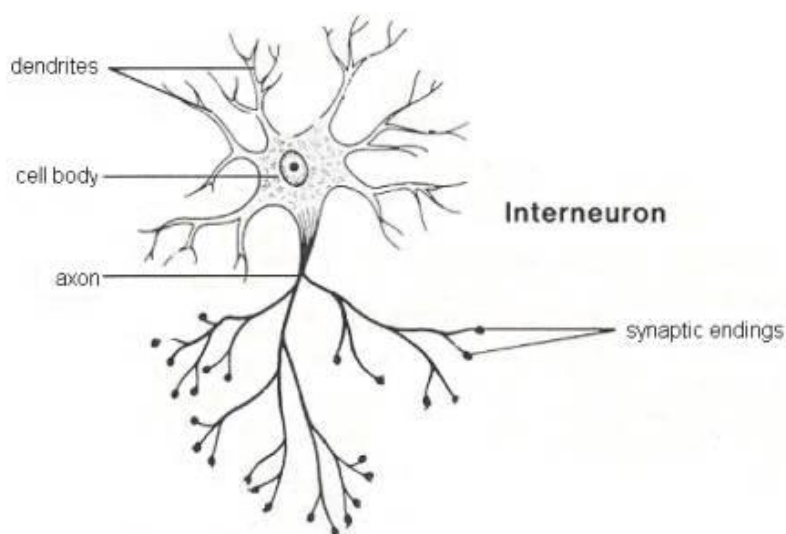
Ο νωτιαίος μυελός είναι το ουραίο τμήμα του ΚΝΣ που ξεκινά από την βάση του κρανίου και εκτείνεται ως τον πρώτο οσφυϊκό σπόνδυλο και αποτελεί έναν σημαντικό σύνδεσμο μεταξύ του εγκεφάλου και του υπολοίπου σώματος. Είναι μια κυλινδρική δομή νευρικού ιστού που προστατεύεται από τις οστικές δομές της σπονδυλικής στήλης και καλύπτεται από τις τρεις μεμβρανώδεις στιβάδες συνδετικού ιστού του ΚΝΣ, τη σκληρή (dura mater), την αραχνοειδή (arachnoid mater) και την χοριοειδή μήνιγγα (pia matter). Ο νωτιαίος μυελός χωρίζεται σε τέσσερις περιοχές/μοίρες: την αυχενική (cervical), την θωρακική (thoracic), την οσφυϊκή (lumbar) και την ιερή (sacral), από τις οποίες εκφύονται τα ομώνυμα νεύρα (**Εικόνα 1**). Εμφανίζει δύο εξογκώματα, το αυχενικό και το οσφυϊκό, από τα οποία εκφύονται τα νεύρα των άνω και κάτω άκρων αντίστοιχα. Αντίθετα, η θωρακική μοίρα είναι μικρότερης διαμέτρου και από αυτήν εκφύονται τα σχετικά λεπτά θωρακικά νεύρα. Ο νωτιαίος μυελός αποτελείται κεντρικά από φαιά ουσία (κυτταρικά σώματα), η οποία περιβάλλεται από λευκή ουσία (εμμύελες ίνες) χάρη στην οποία οι πληροφορίες φτάνουν στον εγκέφαλο αλλά και μεταφέρονται από τον εγκέφαλο στο υπόλοιπο σώμα. Ζεύγη νωτιαίων νεύρων εισέρχονται ή εξέρχονται από το νωτιαίο μυελό με τις πρόσθιες και τις οπίσθιες ρίζες. Οι πρόσθιες ρίζες εξέρχονται από το νωτιαίο μυελό και περιέχουν κινητικές ίνες, ενώ οι οπίσθιες ρίζες εισέρχονται και περιέχουν αισθητικές ίνες. Έξω ακριβώς από τα μεσοσπονδύλια τρήματα οι οπίσθιες και πρόσθιες ρίζες ενώνονται για να σχηματίσουν ένα νωτιαίο νεύρο. Κάθε νεύρο διαιρείται σε ένα πρόσθιο (πρωτεύοντα) και ένα οπίσθιο (δευτερεύοντα) κλάδο. Πριν την συνένωση, η οπίσθια ρίζα αποτελεί τους άξονες των αισθητικών νευρώνων που βρίσκονται έξω από τον νωτιαίο μυελό σε μία δομή που ονομάζεται νωτιαίο γάγγλιο (Nógrádi and Vrbová, Anatomy and Physiology of the Spinal Cord).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του νωτιαίου μυελού. Αριστερά απεικονίζεται ο νωτιαίος μυελός, τα νωτιαία νεύρα και η σπονδυλική στήλη σε κάθε επίπεδο του νωτιαίου μυελού. Δεξιά απεικονίζονται εγκάρσιες τομές του νωτιαίου μυελού σε αυχενικό, θωρακικό, οσφυϊκό και ιερό επίπεδο. Πηγή: eclass.uoa.gr.

Η βασική και λειτουργική μονάδα του νευρικού συστήματος είναι το νευρικό κύτταρο ή νευρώνας. Οι νευρώνες λειτουργούν με την γένεση ηλεκτρικών σημάτων που ταξιδεύουν από το ένα στο άλλο μέρος του ίδιου κυττάρου και με την απελευθέρωση χημικών μηνυμάτων (νευροδιαβιβαστών) προκειμένου να επικοινωνήσουν με τα άλλα κύτταρα. Κάθε νευρώνας αποτελείται από τέσσερα μέρη: το κυτταρικό σώμα, τους δένδριτες, τον άξονα και τις αξονικές απολήξεις (**Εικόνα 2**). Οι νευρώνες που έχουν κάποιο τμήμα τους (σώμα, απολήξεις κλπ) στον νωτιαίο μυελό χωρίζονται σε τρεις λειτουργικές κατηγορίες: τους προσαγωγούς (αισθητικούς) νευρώνες (μεταφέρουν πληροφορίες από τους ιστούς και τα όργανα του σώματος προς στο ΚΝΣ), τους απαγωγούς (κινητικούς) νευρώνες (μεταφέρουν ηλεκτρικά σήματα από το ΚΝΣ προς την περιφέρεια) και τους διάμεσους νευρώνες (συνδέουν νευρώνες μέσα στο ΚΝΣ). Οι διάμεσοι νευρώνες υπολογίζεται ότι

αποτελούν το 99% όλων των νευρώνων και παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών ιδιοτήτων, μορφών και λειτουργιών. Ο αριθμός των διάμεσων νευρώνων που παρεμβάλλονται μεταξύ ορισμένων προσαγωγών και απαγωγών νευρώνων ποικίλει ανάλογα με την πολυπλοκότητα της δράσης των νευρώνων του δικτύου που απαιτείται. Οι διάμεσοι νευρώνες λειτουργούν και ως μετατροπείς σημάτων, αλλάζοντας, για παράδειγμα ένα διεγερτικό εισερχόμενο σήμα σε ανασταλτικό εξερχόμενο σήμα. Είναι επίσης σημαντικοί για την γένεση ταλαντώσεων (oscillations) των δικτύων και τον συγχρονισμό της δραστηριότητας σε διάφορες συμπεριφορικές καταστάσεις του εγκεφάλου (Mann, 2007). Τέλος, οι διάμεσοι νευρώνες κατέχουν σημαντικό ρόλο σε ένα δίκτυο που υπάρχει στον νωτιαίο μυελό, το οποίο δημιουργεί και ελέγχει τη μετακίνηση στο χώρο, ρυθμίζοντας ιδιότητες όπως ο ρυθμός της κίνησης και η εναλλαγή δεξιού-αριστερού άκρου.

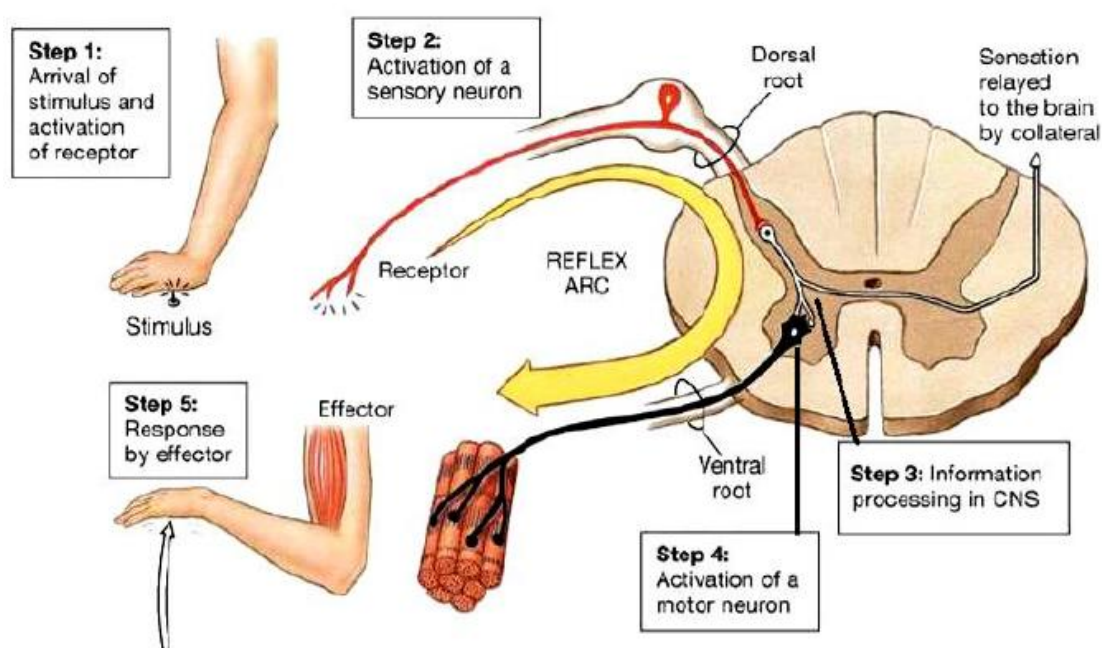


Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της δομής ενός διάμεσου νευρώνα. Πηγή: www.bilogymad.gr.

Η εσωτερική οργάνωση του νωτιαίου μυελού επιτρέπει πολλές λειτουργίες να γίνονται με αυτόματο ή αντανακλαστικό τρόπο. Παρουσιάζει εκτεταμένες συνδέσεις με τον εγκέφαλο και, συγκεκριμένα, διαμέσου των ανιόντων και των κατιόντων νευρικών οδών, μεταβιβάζει κεντρομόλες (προσαγωγές) πληροφορίες στα υψηλότερα κέντρα και φυγόκεντρες (απαγωγές) οδηγίες από τα υψηλότερα κέντρα. Ο νωτιαίος μυελός είναι αυτός

που επεξεργάζεται αρχικά τις αισθητικές πληροφορίες και τις μεταφέρει σε ανώτερα κέντρα. Δέχεται αισθητικές πληροφορίες από το δέρμα, τις αρθρώσεις και τους μύες του κορμού και των άκρων και περιέχει τους κινητικούς νευρώνες που νευρώνουν σκελετικούς και λείους μύες και είναι υπεύθυνοι για τις αντανakλαστικές και τις εκούσιες κινήσεις (Kandel, Principles of Neural Science).

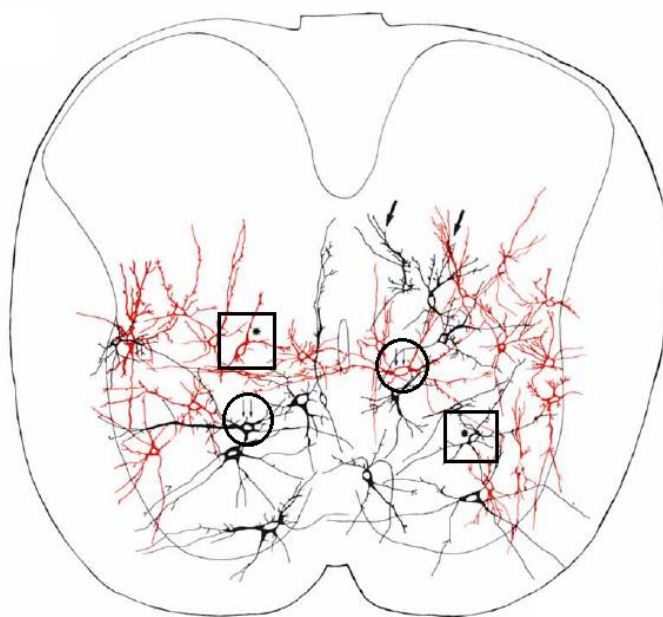
Τα νωτιαία αντανakλαστικά (μυοτατικό, αντίστροφο μυοτατικό, αντανakλαστικό κάμψης/απόσυρσης) είναι από τα πιο απλά, ολοκληρωμένα κυκλώματα κίνησης και για την πλήρη ολοκλήρωση τους χρειάζεται μόνο ο νωτιαίος μυελός. Ενεργοποιούνται από σωματοαιθητικούς υποδοχείς και με απλά νευρωνικά κυκλώματα στο επίπεδο του νωτιαίου μυελού, προκαλούν στερεότυπες κινήσεις (**Εικόνα 3**). Τα αντανakλαστικά μπορούν να επηρεαστούν από τον εγκέφαλο, κυρίως με ανασταλτικό τρόπο, αλλά δεν χρειάζεται η λειτουργία του εγκεφάλου για την εκτέλεση τους (Kandel, Principles of Neural Science).



Εικόνα 3: Περιγραφή του αντανakλαστικού απόσυρσης άκρου. Πηγή: slideshare.net.

ΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΔΙΑΜΕΣΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΟΥ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ

Σήμερα, είναι γνωστή τόσο η ανατομική όσο και η λειτουργική ποικιλομορφία των διαμέσων νευρώνων του νωτιαίου μυελού. Η ύπαρξη διαφορετικών ομάδων διαμέσων νευρώνων παρουσιάστηκε για πρώτη φορά από τον νευροεπιστήμονα Santiago Ramón y Cajal. Ακολούθησαν πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας που έδειξαν την ύπαρξη διαφορετικών διαμέσων νευρώνων με βάση τις ιδιότητές τους (Janowska, 1992), καθώς και ανατομίας που απέδειξαν την ύπαρξη είκοσι τουλάχιστον διαφορετικών πληθυσμών όσον αφορά τη μορφολογία, τη θέση τους και το πρότυπο προβολής των αξόνων τους (Silos-Santiago and Snider, 1992; Silos-Santiago and Snider, 1994). Στην **Εικόνα 4** απεικονίζεται μία διατομή νωτιαίου μυελού στην οποία φαίνεται η διαφορετική θέση και μορφολογία των διαφόρων διαμέσων νευρώνων, κάποιοι από τους οποίους στέλνουν τους άξονες τους ετερόπλευρα (μαύρο χρώμα), ενώ άλλοι ομόπλευρα (κόκκινο χρώμα).



Εικόνα 4: Η ποικιλομορφία των διαμέσων νευρώνων όσον αφορά τη μορφολογία, τη θέση και το πρότυπο προβολής του άξονα. Διατομή νωτιαίου μυελού νεογέννητου ποντικού (P0). Οι αστερίσκοι μέσα σε πλαίσιο, τα χοντρά και τα λεπτά κυκλωμένα βέλη δείχνουν τρία ζευγάρια ομόπλευρων (κόκκινο) και ετερόπλευρων (μαύρο) νευρώνων που το κάθε ένα έχει όμοια παρακλάδια δένδριτών αλλά διαφορετική προβολή άξονα. Πηγή: Silos – Santiago and Snider, 1994.

Για να καταστεί δυνατή η ομαδοποίηση πληθυσμών, ώστε να ελεγχθεί αν έχουν ομοιογένεια και για να επιτευχθεί η στοχευόμενη αποσιώπηση κάθε πληθυσμού από το δίκτυο και η μελέτη της λειτουργίας του, οι επιστήμονες άντλησαν πληροφορίες από διαφορές των νευρώνων ως προς τους μεταγραφικούς παράγοντες που εκφράζουν κατά την εμβρυική ζωή. Η μοριακή, δηλαδή, ταυτότητα των νευρώνων του νωτιαίου μυελού χρησιμοποιήθηκε ως πηγή ομαδοποίησης. Τις τελευταίες δεκαετίες, με τη χρήση της μοριακής γενετικής, νευρώνες που εκφράζουν τον ίδιο μεταγραφικό παράγοντα σημαίνονται με έκφραση φθορίζουσών πρωτεϊνών, ώστε να παρακολουθηθούν τα πρότυπα προβολής αξόνων καθώς και άλλα χαρακτηριστικά τους και εκφράζονται σε αυτούς μόρια τοξινών για να επιτευχθεί απομάκρυνσή τους από τα δίκτυα και να διερευνηθεί η δράση τους. Έτσι, πλέον είναι δυνατό να ελεγχθεί αν κύτταρα με ίδια μοριακή ταυτότητα μοιράζονται και κοινά χαρακτηριστικά όπως νευροδιαβιβαστές και συναπτικούς στόχους, προκειμένου να χαρακτηριστούν ως ενιαίος πληθυσμός ή αλλιώς λειτουργική μονάδα. Ένα παράδειγμα αποτελεί η απομάκρυνση ενός πληθυσμού νευρώνων μέσω της επαγωγής της έκφρασης ενός γονιδίου τοξίνης (π.χ. τοξίνη της διφθερίτιδας A) υπό τον υποκινητή ενός συγκεκριμένου γονιδίου, που εκφράζεται αποκλειστικά στον πληθυσμό των νευρώνων που στοχεύεται.

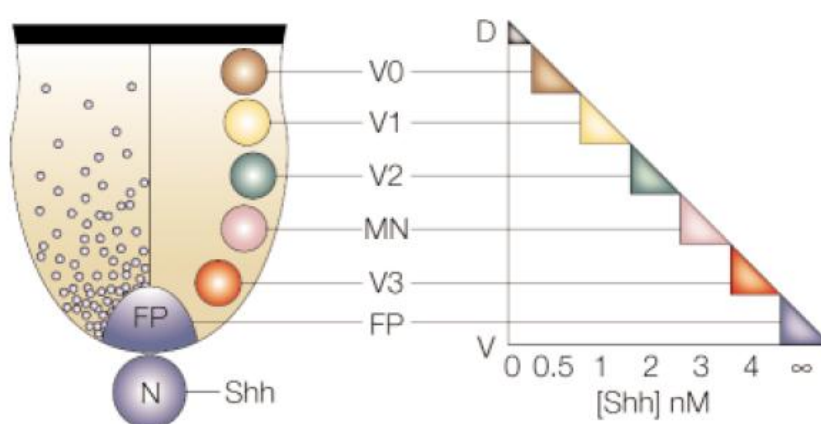
Η κύρια μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε κατά την παρούσα εργασία για τη δημιουργία ζωικών μοντέλων στα οποία σε συγκεκριμένους ιστούς είτε διαγράφονται γονίδια (knockout)- είτε εκφράζεται κάποια πρωτεΐνη για σήμανση (π.χ. GFP)- είτε αποσιωπούνται γονίδια ή θανατώνονται κύτταρα με την έκφραση ειδικών πρωτεϊνών (π.χ. τοξίνες), είναι αυτή του Cre/Lox συστήματος ιστοειδικής εκτομής.

ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΚΑΤΑ ΜΗΚΟΣ ΤΟΥ ΡΑΧΙΑΙΟΚΟΙΛΙΑΚΟΥ ΑΞΟΝΑ ΤΟΥ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ

Με τη χρήση μοριακών μεθόδων όπως αυτές που περιγράφηκαν παραπάνω, τις τελευταίες δεκαετίες αποκτήθηκαν γνώσεις σχετικές με τη μοριακή ταυτότητα των διαφορετικών πληθυσμών διάμεσων νευρώνων. Κατά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του νωτιαίου μυελού αναπτύσσονται νευρώνες τόσο στο ραχιαίο όσο και στο κοιλιακό τμήμα του νωτιαίου μυελού. Στην ραχιαία περιοχή του νωτιαίου μυελού έχουν εντοπιστεί οχτώ διαφορετικοί πληθυσμοί διάμεσων νευρώνων (dl1, dl2, dl3, dl4, dl5, dl6, dlLa, dlLb) (Helms and Johnson, 2003). Στην κοιλιακή περιοχή, προοδευτικές αλλαγές στη συγκέντρωση της πρωτεΐνης Sonic Hedgehog (Shh) παράγουν τέσσερις μοριακά ξεχωριστούς πληθυσμούς κοιλιακών διάμεσων νευρώνων (V0, V1, V2, V3) από τέσσερις αντίστοιχες περιοχές προγονικών κυττάρων (p0, p1, p2 και p3). Η δημιουργία των προγονικών και των μεταμιτωτικών πληθυσμών καθορίζεται από τη θέση στην οποία αυτοί εμφανίζονται κατά μήκος της κοιλιακής πλευράς του νωτιαίου μυελού και τη συγκέντρωση της εκκρινόμενης πρωτεΐνης Shh στην περιοχή (Jessell, 2000). Οι νευρώνες που παράγονται σε πιο κοιλιακές περιοχές του νευρικού σωλήνα απαιτούν αντίστοιχα υψηλότερες συγκεντρώσεις Shh για την επαγωγή τους συγκριτικά με αυτούς που παράγονται στις πιο ραχιαίες περιοχές (**Εικόνα 5**).

Προκειμένου η πληροφορία της διαβαθμισμένης Shh σηματοδότησης να ερμηνευθεί κατάλληλα από τα νευρικά προγονικά κύτταρα, συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες (homeodomain transcription factors) που εκφράζονται από τα κοιλιακά προγονικά κύτταρα λειτουργούν ως ενδιάμεσοι. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες σύμφωνα με το πρότυπο έκφρασής τους και τον τρόπο με τον οποίο ρυθμίζονται από την πρωτεΐνη Shh. Η έκφραση των παραγόντων της πρώτης κατηγορίας (class I - Pax7, Dbx1, Dbx2, Irx3, Pax6) καταστέλλεται όταν η συγκέντρωση του Shh φθάσει ένα συγκεκριμένο «κατώφλι», με αποτέλεσμα τα κοιλιακά όρια έκφρασής τους να οριοθετούν τους προγονικούς πληθυσμούς νευρώνων. Αντίστοιχα, η έκφραση των παραγόντων της δεύτερης κατηγορίας (class II Nkx6.1 and Nkx2.2) επάγεται από την Shh σηματοδότηση και επιτυγχάνεται σε ένα διακριτό κατώφλι συγκέντρωσης Shh. Συμπληρωματικά ζευγάρια

μεταγραφικών παραγόντων των δύο κατηγοριών που εκφράζονται στο όριο της ίδιας προγονικής περιοχής αλληλεπιδρούν κατασταλτικά μεταξύ τους με επιλεκτικό τρόπο. Έτσι, επιτυγχάνεται η δημιουργία των αρχικών ραχαιοκοιλιακών περιοχών έκφρασης των δύο πρωτεϊνικών κατηγοριών I και II και εξασφαλίζεται η ύπαρξη συγκεκριμένων ορίων μεταξύ των προγονικών περιοχών παγιώνοντας την ταυτότητά τους (Ericson et al., 1997; Jessell, 2000).

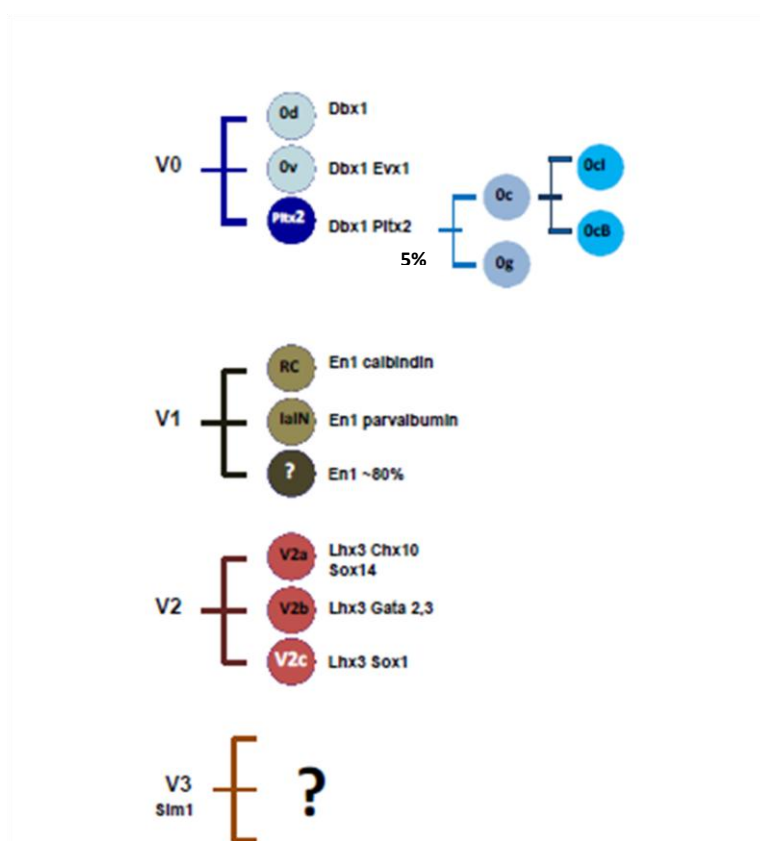


Εικόνα 5: Δημιουργία των διαφορετικών πληθυσμών των κοιλιακών διάμεσων νευρώνων. Αριστερά φαίνεται η διαβάθμιση συγκέντρωσης της πρωτεΐνης Shh στον κοιλιακό νευρικό σωλήνα και η δράση της ως μορφογόνο (σε υψηλά επίπεδα κοιλιακά και χαμηλά επίπεδα ραχιαία μέσα στο κοιλιακό νευρικό επιθήλιο). Υπάρχουν τέσσερις διαφορετικοί πληθυσμοί κοιλιακών διάμεσων νευρώνων (V0-V3), που παράγονται σε απόκριση στη διαβαθμισμένη Shh σηματοδότηση. MN: κινητικοί νευρώνες, FP: εδαφιαίο πέταλο. Δεξιά φαίνεται η παραγωγή των V0-V3 και των MN σε μοσχεύματα της ενδιάμεσης νευρικής πλάκας μεγαλωμένα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του ανασυνδυασμένου αμινοτελικού άκρου του Shh (Shh-N). Όσο πιο ραχιαία παράγεται ο νευρωνικός πληθυσμός *in vivo*, τόσο πιο χαμηλή είναι η συγκέντρωση της Shh που χρειάζεται για να δημιουργηθεί αυτός ο πληθυσμός *in vitro*. (D: dorsal neural tube, V: ventral neural tube) (Briscoe et al., 1999; Briscoe et al., 2000; Jessell, 2000).

Ωστόσο, φαίνεται πως το σηματοδοτικό μονοπάτι του Shh διαμορφώνεται και από άλλους παράγοντες με επικουρικό ρόλο. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας BMP (Bone Morphogenetic Proteins) είναι το βασικό μορφογόνο των ραχιαίων κυττάρων και εκκρίνονται από το επιδερμικό εξώδερμα και το οροφιαίο πέταλο, επάγοντας τα κύτταρα της νευρικής

πλάκας και των ραχιαίων διάμεσων νευρώνων. Η απόκριση των κοιλιακών νευρικών προγονικών κυττάρων σε συγκεκριμένα επίπεδα της Shh σηματοδοτικής δραστηριότητας ενδέχεται να εξαρτάται και από την BMP σηματοδότηση (McMahon et al., 1998; Liem et al., 2000).

Οι τέσσερις πληθυσμοί των κοιλιακών διάμεσων νευρώνων (V0, V1, V2, V3) διαφέρουν ως προς τους συναπτικούς τους στόχους, την κατεύθυνση των απολήξεών τους (ομόπλευροι ή ετερόπλευροι) και τους νευροδιαβιβαστές που εκφράζουν (διεγερτικοί ή ανασταλτικοί) (**Εικόνα 6**) (Stepien and Arber, 2008). Αποτελέσματα της τελευταίας δεκαετίας, κατά την οποία έχουν αρχίσει να αναλύονται περισσότερο οι υποπληθυσμοί στους οποίους υποδιαιρούνται οι τέσσερις πληθυσμοί, έχουν δείξει ότι αυτοί αποτελούν μεγάλες ετερογενείς κατηγορίες, με παράδειγμα τον V1 πληθυσμό που δίνει γένεση σε 19 υποπληθυσμούς (Zagoraiou et al., 2009, Bikoff et al., 2016).



Εικόνα 6: Πληθυσμοί και υποπληθυσμοί των κοιλιακών διάμεσων νευρώνων. Δίπλα από κάθε πληθυσμό/υποπληθυσμό φαίνεται ο συνδυασμός μεταγραφικών παραγόντων που εκφράζει και που τον χαρακτηρίζει. Οι διαφορετικοί V3 υποπληθυσμοί χαρακτηρίζονται από τη διαφορετική θέση και δεν έχουν βρεθεί ακόμα μεταγραφικοί παράγοντες που να τους χαρακτηρίζουν.

Ακόμη δεν έχουν βρεθεί όλοι οι λειτουργικά ομοιογενείς πληθυσμοί διάμεσων νευρώνων του νωτιαίου μυελού, όπως επίσης δεν έχουν βρεθεί και όλοι οι μηχανισμοί που οδηγούν στη διαφορετικότητά τους. Η διαφοροποίησή τους εξαρτάται από το χρονικό παράθυρο που αφήνουν τον κυτταρικό κύκλο και γίνονται μετα-μιτωτικοί, καθώς και από συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια (π.χ. Notch, Hox κλπ). Για παράδειγμα, η σηματοδότηση Notch έχει μια ευρύτατη επιρροή στον προσδιορισμό της κυτταρικής τύχης στο ΚΝΣ των σπονδυλωτών. Μελέτες έχουν προτείνει τη συμβολή της στον διαχωρισμό μεταξύ δύο κατηγοριών διάμεσων νευρώνων που προέρχονται από τον τομέα p2, προωθώντας τη διαφοροποίηση των νευρώνων GATA2+V2b εις βάρος των chx10+V2a νευρώνων (Peng et al., 2007). Τα ευρήματα αυτά εγείρουν την πιθανότητα ότι το μονοπάτι Notch κατέχει έναν γενικότερο ρόλο στη διαφοροποίηση των επιμέρους υποπληθυσμών των διάμεσων νευρώνων στον κοιλιακό νωτιαίο μυελό. Επίσης, το δίκτυο των Hox μεταγραφικών παραγόντων έχειδειχθεί ότι είναι σημαντικό για τον προσδιορισμό των διαφορετικών ταυτοτήτων των κινητικών νευρώνων στον νωτιαίο μυελό. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες έχουν δείξει ότι οι πρωτεΐνες Hox6 παίζουν κεντρικό ρόλο στον καθορισμό της ταυτότητας των κινητικών νευρώνων και στην συνδεσιμότητα κινητικών νευρώνων – μυών (Dasen et al., 2005). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την ευρεία έκφραση Hox μεταγραφικών παραγόντων στους νευρώνες κατά μήκος του νωτιαίου μυελού, υποστηρίζει την πιθανή συμμετοχή των Hox πρωτεϊνών στη διαφοροποίηση και τη λειτουργία και των διάμεσων νευρώνων. Επιπλέον, υπάρχουν αρχικά αποτελέσματα που υποστηρίζουν τη συμμετοχή των Hox πρωτεϊνών στην απόκτηση ταυτότητας και στη λειτουργία των διάμεσων νευρώνων. Ποντίκια που φέρουν μεταλλάξεις Hox σε 8-9 αλληλόμορφα διαφορετικών HoxA ή HoxD γενετικών τόπων, παρουσιάζουν σοβαρά προβλήματα στην κίνηση των πίσω άκρων και θεωρείται ότι αυτοί οι γενετικοί τόποι ελέγχουν το κινητικό κύκλωμα (Ζαγοραίου, Yoshida αδημοσίευτα αποτελέσματα).

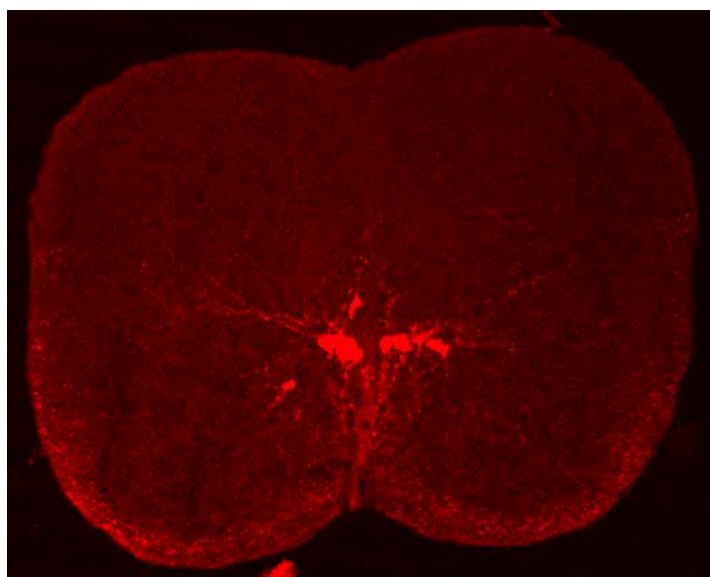
V0 ΔΙΑΜΕΣΟΙ ΝΕΥΡΩΝΕΣ

Ο V0 πληθυσμός κοιλιακών διάμεσων νευρώνων βρίσκεται σε πιο ραχιαία θέση σε σχέση με τους υπόλοιπους κοιλιακούς πληθυσμούς διάμεσων νευρώνων του νωτιαίου μυελού (Pierani et al., 1999; Pierani et al. 2001). Προέρχεται από τον ρ0 πληθυσμό νευρικών προγονικών κυττάρων, τα οποία εκφράζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες Dbx1 και Dbx2. Περίπου το 70% του V0 πληθυσμού απελευθερώνει ανασταλτικούς νευροδιαβιβαστές, ενώ το 30% απελευθερώνει διεγερτικούς. V0 πληθυσμός αποτελείται από δύο διαφορετικούς υποπληθυσμούς, τον V0v (v=ventral) και τον V0d (d=dorsal). Πιο συγκεκριμένα, ο V0v υποπληθυσμός προέρχεται από την κοιλιακή πλευρά της προγονικής περιοχής όπου εκφράζεται ο Dbx1 μεταγραφικός παράγοντας και εκφράζει παροδικά τον μεταγραφικό παράγοντα Enx1 (Moran-Rivard et al., 2001). Από την άλλη πλευρά, ο υποπληθυσμός V0d προέρχεται από τη ραχιαία πλευρά της προγονικής περιοχής όπου εκφράζεται ο Dbx1 και δεν εκφράζει τον μεταγραφικό παράγοντα Enx1 (Pierani et al., 2001). Οι δύο αυτοί υποπληθυσμοί εμφανίζουν κοινά πρότυπα μετανάστευσης και είναι κυρίως ετερόπλευροι, δηλαδή προβάλλουν τους άξονες τους στο αντίθετο ήμισυ του νωτιαίου μυελού (Moran-Rivard et al. 2001; Pierani et al. 2001). Επιπλέον, πολλοί V0 διάμεσοι νευρώνες σχηματίζουν συνάψεις με άλλους διάμεσους νευρώνες και με τους κινητικούς νευρώνες της απέναντι πλευράς του νωτιαίου μυελού, αναστέλλοντάς τους (Lanuza et al., 2004).

Σχετικά με την εμπλοκή των V0 νευρώνων στη μετακίνηση στον χώρο, όταν το Dbx1 γονίδιο απομακρύνεται από ποντίκια, οι V0 νευρώνες χάνουν την ταυτότητά τους, αποκτώντας μία καινούρια που μοιάζει στην ταυτότητα των V1 νευρώνων. Τα αποτελέσματα που έχει αυτή η αλλαγή στην μετακίνηση στο χώρο είναι η αδυναμία ακριβούς εναλλαγής δεξιού-αριστερού άκρου και η ύπαρξη κάποιων επεισοδίων ταυτόχρονης ενεργοποίησής τους. Ωστόσο, η εναλλαγή κάμψης και έκτασης των άκρων και η συχνότητα του περπατήματος παραμένουν ανέπαφες (Lanuza et al., 2004).

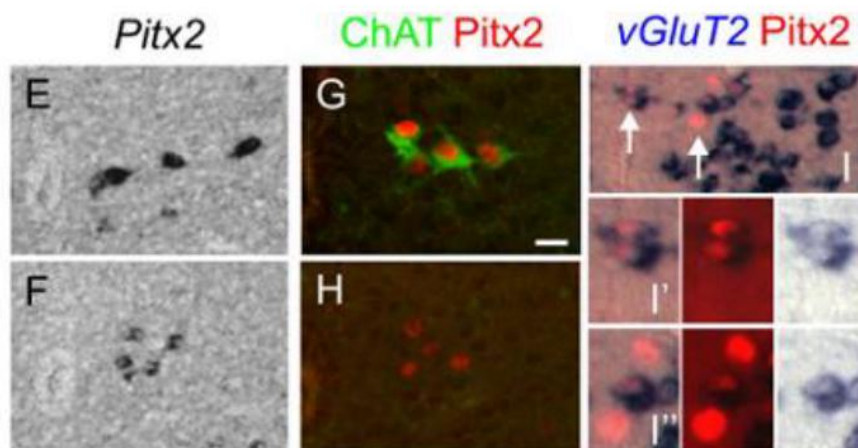
V0c, V0g ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΔΙΑΜΕΣΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ

Πριν μία δεκαετία, ανιχνεύτηκε ένας ακόμη υποπληθυσμός των V0 διαμέσων νευρώνων που χαρακτηρίζεται από την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Pitx2 και αποτελεί το 5% των V0 διαμέσων νευρώνων. Η Pitx2 πρωτεΐνη ξεκινάει να εντοπίζεται σε αυτούς τους νευρώνες πολύ νωρίς στην εμβρυική ηλικία (E11,5 με E12) (Zagoraiou et al., 2009) (**Εικόνα 7**).



Εικόνα 7: Έκφραση του γονιδίου Pitx2 στους διάμεσους νευρώνες του νωτιαίου μυελού ποντικού ηλικίας P0. Ανοσοϊστοχημεία με αντίσωμα έναντι της φθορίζουσας πρωτεΐνης td Tomato σε ζώο γονοτύπου *Pitx2cre+/-;Rosa.stop.tdTomato*. Πηγή: Εργαστήριο Δρ. Ζαγοραίου.

Ο υποπληθυσμός αυτός, αν και μικρός, διαχωρίζεται περαιτέρω σε δύο άλλους υποπληθυσμούς, με βάση τον νευροδιαβιβαστή που απελευθερώνουν: έναν χολινεργικό (V0c) και έναν γλουταματεργικό (V0g). Οι χολινεργικοί V0c νευρώνες αναγνωρίστηκαν λόγω έκφρασης του χολινεργικού δείκτη ChAT (Choline acetyltransferase), ενώ οι γλουταματεργικοί V0g αναγνωρίστηκαν λόγω έκφρασης του vGluT2 (Vesicular Glutamate Transporter) (**Εικόνα 8**). Και οι δύο τύποι νευρώνων εμφανίζονται σε όλα τα επίπεδα κατά μήκος του νωτιαίου μυελού (Zagoraiou et al. 2009).



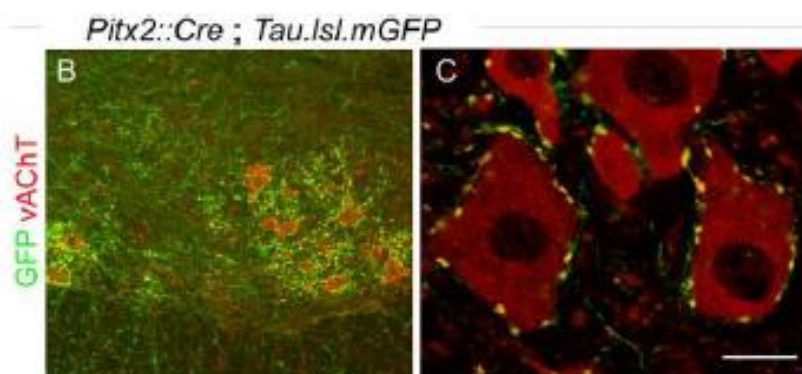
Εικόνα 8: Ο μεταγραφικός παράγοντας *Pitx2* χαρακτηρίζει έναν μικρό υποπληθυσμό (V0cg) διαμέσων νευρώνων στον νωτιαίο μυελό. Απεικονίζονται οι *Pitx2*+ διάμεσοι νευρώνες και οι νευροδιαβιβαστές τους σε νωτιαίο μυελό ποντικών ηλικίας P8. *In situ* υβριδοποίηση σε τομές νωτιαίου μυελού: Στην πρόσθια οσφυϊκή (E) και στην οπίσθια οσφυϊκή μοίρα (F). Ανοσοφθορισμός με αντισώματα *Pitx2* (κόκκινο) και ChAT (πράσινο) στην πρόσθια οσφυϊκή (G) και οπίσθια οσφυϊκή μοίρα (H). Έκφραση του vGluT2 σε έναν υποπληθυσμό των *Pitx2*+ νευρώνων στην οσφυϊκή μοίρα (I). Τα βέλη υποδεικνύουν νευρώνες που απεικονίζονται σε μεγαλύτερη μεγέθυνση στις φωτογραφίες I' και I''. Πηγή: Zagoraiou et al., 2009.

ΚΙΝΗΤΙΚΟΙ ΝΕΥΡΩΝΕΣ ΚΑΙ C BOUTONS

Οι κινητικοί νευρώνες που συμμετέχουν στα δίκτυα για την εκτέλεση της μυϊκής σύσπασης και της κίνησης εδράζονται στον νωτιαίο μυελό. Οι νευρώνες αυτοί οργανώνονται σε κινητικές μονάδες (motor pools), που με τη σειρά τους μεταβιβάζουν το σήμα σε συγκεκριμένους μύες των άκρων (Hochman and Schmidt 1998) για την εκτέλεση της χαλάρωσης ή συστολής τους και κατ'επέκταση της κίνησης. Τα σώματα και οι εγγύτατοι δενδρίτες των κινητικών νευρώνων αποτελούν στόχους για μεγάλες χολινεργικές συνάψεις που ονομάζονται C boutons (Corradi and Skoglund, 1969; Nagy et al., 1993; Li et al., 1995). Τα C boutons παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1960 με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (Corradi et al, 1969) και από τότε έχει ξεκινήσει μια προσπάθεια για την πλήρη κατανόηση της φύσεως

και των αποτελεσμάτων των νευροτροποποιητικών ερεθισμάτων στους κινητικούς νευρώνες. Ο χολινεργικός χαρακτήρας των C boutons ταυτοποιήθηκε με την τεχνική της ανοσοϊστοχημείας (Connaughton et al, 1986; Nagy et al, 1993; Li et al, 1995; Arvidsson et al, 1997).

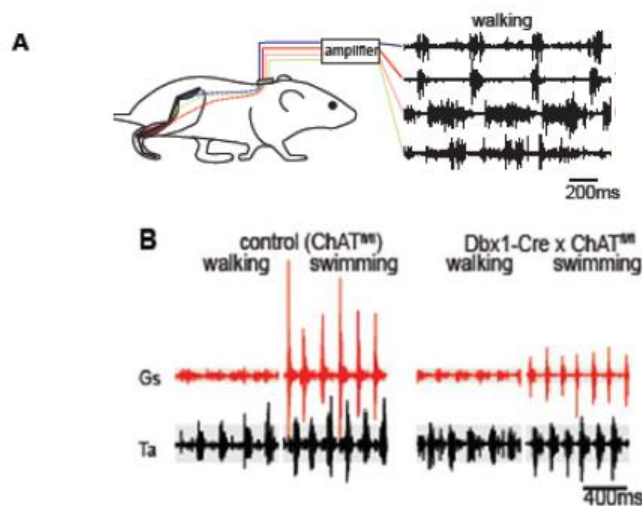
Εντούτοις, για πολλές δεκαετίες δεν είχε διευκρινιστεί η ταυτότητα των νευρικών κυττάρων που στέλνουν τους άξονές τους στους κινητικούς νευρώνες, σχηματίζοντας τα C boutons. Οι πρώτες ενδείξεις υποστήριξαν πως τα C boutons προέρχονται από κάποιον πληθυσμό διάμεσων νευρώνων του νωτιαίου μυελού (Hellstrom et al., 2003), και μεταγενέστερες υποστήριξαν ότι αυτός εντοπίζεται κοντά στο κεντρικό κανάλι του νωτιαίου μυελού (Miles et al., 2007). Το 2009 βρέθηκε ότι ο V0c υποπληθυσμός αποτελεί την πηγή των C boutons με την ακόλουθη διαδικασία. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε τομές νωτιαίου μυελού από διαγονιδιακά ζώα της σειράς Pitx2cre+/-; Tau.lsl.mGFP (Hippenmeyer et al., 2005), στα οποία η cre ρεκομπινάση εκφράζεται επιλεκτικά στους Pitx2+ νευρώνες. Η εκτομή της STOP κασέτας οδηγεί σε μόνιμη έκφραση της GFP στο κυτταρόπλασμα και στους άξονες των Pitx2+ νευρώνων. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα vAChT+ C boutons πάνω στους κινητικούς νευρώνες εκφράζουν GFP και άρα προέρχονται από τον V0c υποπληθυσμό των V0 διάμεσων νευρώνων (**Εικόνα 9**). Επομένως, αποδείχθηκε ότι η V0c υποκατηγορία αποτελεί την μοναδική πηγή των C boutons που λαμβάνουν οι κινητικοί νευρώνες του νωτιαίου μυελού (Zagoraiou et al., 2009).



Εικόνα 9: Οι V0c νευρώνες είναι η μοναδική πηγή των C-boutons στους κινητικούς νευρώνες του νωτιαίου μυελού. Συνεντοπισμός της GFP πρωτεΐνης (πράσινο) και της πρωτεΐνης vAChT (κόκκινο) σε C boutons, σε τομή νωτιαίου μυελού διαγονιδιακού ποντικού της σειράς Pitx2cre+/-;Tau.lsl.mGFP. Οι vAChT+ συνάψεις στους κινητικούς νευρώνες εκφράζουν GFP (Zagoraiou et al. 2009).

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ V0C ΝΕΥΡΩΝΩΝ

Προκειμένου να διερευνηθεί η συμβολή των V0c διαμέσων νευρώνων στη μετακίνηση στον χώρο, παρεμποδίστηκε η χολινεργική νευροδιαβίβαση αποκλειστικά στους V0c νευρώνες του ποντικού μέσω απενεργοποίησης του ενζύμου Choline Acetyltransferase (ChAT), που είναι υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση της ακετυλοχολίνης. Στα ποντίκια αυτά (*Dbx1cre+/-;ChATfl/fl*) πάνω από το 99% των V0c νευρώνων δεν παράγουν λειτουργικό ChAT, ενώ οι κινητικοί νευρώνες εξακολουθούν να εκφράζουν ChAT. Τα ποντίκια αυτά αναπτύσσονται φυσιολογικά και επιβιώνουν κανονικά (Zagoraiou et al. 2009). Ακόμη, τα ποντίκια αυτά δεν παρουσιάσαν κάποια διαφορά στον τρόπο βάδισης συγκριτικά με τα αγρίου τύπου ποντίκια (εναλλαγή καμπτήρα-εκτατήρα μυ αλλά και εναλλαγή αριστερού-δεξιού άκρου). Στη συνέχεια, ελέγχθηκαν πιο δύσκολες δοκιμασίες από τη βάδιση, όπως είναι αυτή της κολύμβησης. Η κολύμβηση απαιτεί υψηλότερο βαθμό ενεργότητας κάποιων μυών των άκρων στα τρωκτικά σε σύγκριση με το περπάτημα. Έτσι, τοποθετήθηκαν, ηλεκτρόδια σε μύες τόσο αγρίου τύπου ποντικών όσο και *Dbx1cre+/-;ChATfl/fl* ποντικών και εξετάστηκε η αλλαγή της μυϊκής τους ενεργότητας από το περπάτημα στο κολύμπι. Κατά τη διάρκεια της κολύμβησης στα αγρίου τύπου ποντίκια, ο γαστροκνήμιος μυς αυξάνει την ενεργότητά του σε σύγκριση με το περπάτημα. Η πραγματοποίηση της ίδιας δοκιμασίας στα *Dbx1cre;ChATfl/fl* ποντίκια αποκάλυψε αδυναμία του μυ να αυξήσει την ενεργότητά του στα επίπεδα που καταφέρνουν τα αγρίου τύπου ποντίκια (**Εικόνα 10**). Συμπερασματικά, στα ποντίκια που δεν παράγεται λειτουργική ChAT στους V0c νευρώνες, δεν παρατηρείται πρόβλημα στην εναλλαγή κάμψης και έκτασης του άκρου, στον συγχρονισμό δεξιού-αριστερού άκρου και στη συχνότητα του περπατήματος, ωστόσο, ο γαστροκνήμιος μυς αν και αυξάνει λίγο την ενεργότητά του, δεν καταφέρνει να φτάσει τον βαθμό ενεργότητας που επιτυγχάνεται στα αγρίου τύπου ποντίκια (Zagoraiou et al. 2009).



Εικόνα 10: Οι V0c νευρώνες ρυθμίζουν την κινητική συμπεριφορά. Το ένζυμο της ακετυλοχολινοτρανσφεράσης (ChAT) απενεργοποιήθηκε επιλεκτικά στους V0c διάμεσους νευρώνες με την απαλοιφή κωδικών εξωνίων του γονιδίου *ChAT* μέσω του συστήματος *cre-lox*, ώστε να μην παράγεται Ach στους συγκεκριμένους νευρώνες. Προκειμένου να μετρηθεί η μυϊκή ενεργότητα, τοποθετήθηκαν ηλεκτρόδια σε διαφορετικούς μύες των κάτω άκρων και τα ποντίκια δοκιμάστηκαν στο περπάτημα και στο κολύμπι (Α). Στα Dbx1cre;ChAT^{fl/fl} ποντίκια ο μυς αδυνατεί να αυξήσει την ενεργότητά του στον βαθμό που το κάνει στα αγρίου τύπου ποντίκια (ηλεκτρομυογράφημα από δύο μύες, έναν γαστροκνήμιο μυ και έναν πρόσθιο κνημιαίο) (Β) . Πηγή: Zagoraiou et al. 2009.

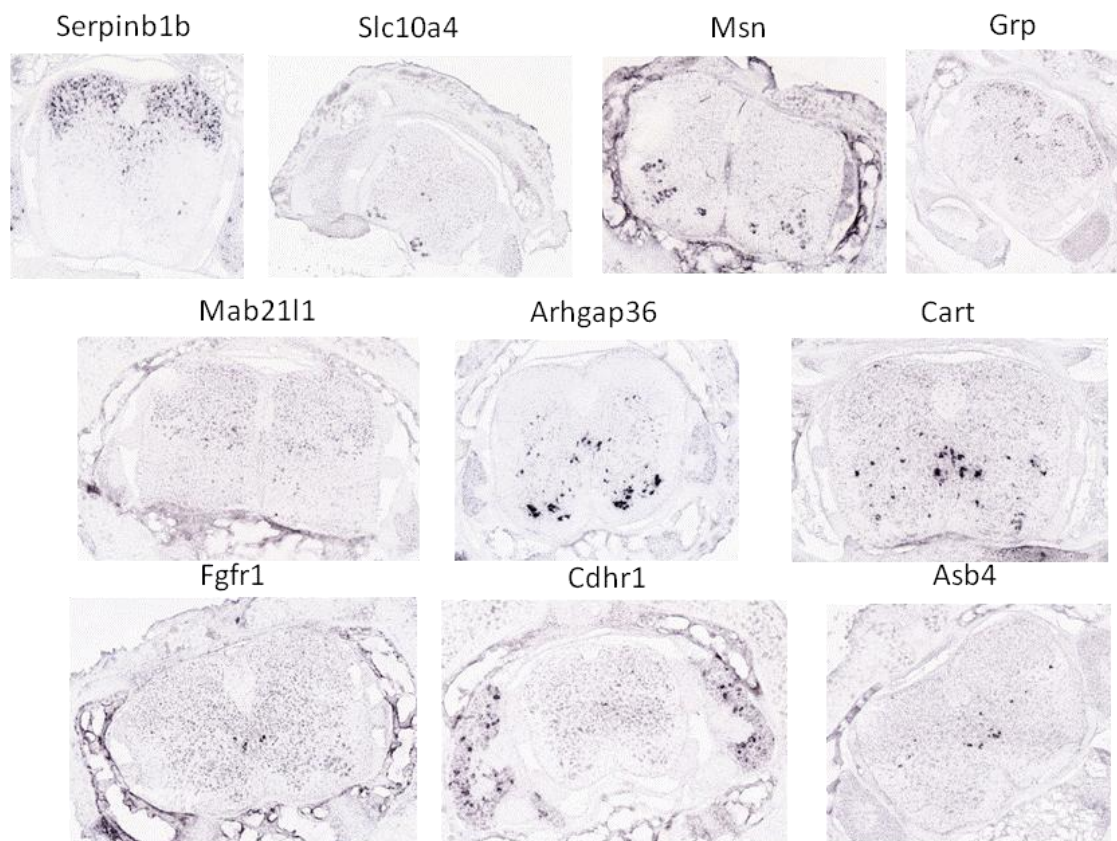
Παρά την απώλεια έκφρασης της ChAT και κατά συνέπεια την έλλειψη ακετυλοχολίνης από τους V0c νευρώνες, τα C boutons δεν χάνονται και ο αριθμός τους στο σώμα και τους δένδριτες των κινητικών νευρώνων παραμένει ίδιος με αυτόν των αγρίου τύπου ποντικών. Επιπλέον, η απώλεια έκφρασης της ChAT από τους V0c νευρώνες δεν συνοδεύεται από έκφραση γλουταματεργικών δεικτών vGluT1 ή vGluT2. Επομένως, οι V0c νευρώνες από τους οποίους λείπει το ChAT, συνεχίζουν να σχηματίζουν συνάψεις με τους κινητικούς νευρώνες παρά την έλλειψη ακετυλοχολίνης και οι συνάψεις αυτές δεν είναι γλουταματεργικές. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την πιθανότητα ύπαρξης κάποιου άλλου νευροπεπτιδίου/νευροδιαβιβαστή, που είτε συνεκφράζεται στη συγκεκριμένη σύναψη είτε άρχισε να εκφράζεται μετά την απώλεια της ακετυλοχολίνης. Επιπλέον, υπάρχει και η περίπτωση η σύναψη να μην χάνεται γιατί αποτελεί πηγή τροφικών παραγόντων για τους κινητικούς νευρώνες.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟΥ CART ΣΤΟΥΣ V0c ΝΕΥΡΩΝΕΣ

Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου, εξετάστηκε η ύπαρξη δεικτών που να διαχωρίζουν τους V0c και V0g νευρώνες μεταξύ τους ή τους Pitx2 νευρώνες (V0cg) από τον υπόλοιπο V0 πληθυσμό. Δεδομένου ότι δεν υπήρχαν τα εργαλεία για να σημανθούν και να απομονωθούν ξεχωριστά οι δύο υποπληθυσμοί V0c και V0g, συγκρίθηκε ο συνολικός πληθυσμός των νευρώνων που εκφράζουν Pitx2 με έναν άλλο πληθυσμό διάμεσων νευρώνων του νωτιαίου μυελού. Έτσι, επιλέχθηκε ο πληθυσμός των κυττάρων που χαρακτηρίζονται από την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Sox14. Ο πληθυσμός αυτός αντιστοιχεί στους V2a κοιλιακούς διάμεσους νευρώνες, που είναι διεγερτικοί και προβάλλουν τους άξονές τους ομόπλευρα στον νωτιαίο μυελό.

Απομονώθηκαν, έτσι, νευρώνες από νεογνήνητα (P0-P2) διαγονιδιακά ποντίκια γονοτύπου *Pitx2cre+/-;Rosa.stop.tdTomato* και από διαγονιδιακά ποντίκια γονοτύπου *Sox14efgr+/-*, μέσω κυτταρομετρίας ροής, με βάση τον ενδογενή φθορισμό τους. Ακολούθησε απομόνωση του RNA των νευρώνων, cDNA σύνθεση, παραγωγή σημασμένου α-RNA για υβριδοποίηση και ανάλυση σάρωσης μικροσυστοιχιών (Affimetrix), ώστε να συγκριθούν οι δύο πληθυσμοί. Με αυτόν τον τρόπο, εντοπίστηκαν 256 γονίδια που υπερεκφράζονται στους Pitx2+ νευρώνες σε σύγκριση με τους Sox14+ νευρώνες, με μεγαλύτερο score να έχει το γονίδιο *Pitx2*, γεγονός που επιβεβαιώνει την επιτυχία του πειραματικού πρωτοκόλλου.

Μετά από μελέτη των προτύπων έκφρασης αυτών των γονιδίων στη βάση δεδομένων *in situ* υβριδοποίησης allen brain atlas, επιλέχθηκαν δεκατρία γονίδια που τοπογραφικά φαίνεται να εκφράζονται στην ίδια περιοχή του νωτιαίου μυελού όπου εντοπίζονται οι Pitx2+ νευρώνες και έχουν αρκετά περιορισμένο πρότυπο έκφρασης (**Εικόνα 11**). Τα γονίδια αυτά παρατίθενται στον **Πίνακα 1**. Το γονίδιο που είχε τον μεγαλύτερο εμπλουτισμό έκφρασης αμέσως μετά γονίδιο *Pitx2*, είναι το *Cart*, του οποίου η έκφραση μελετήθηκε λεπτομερώς.

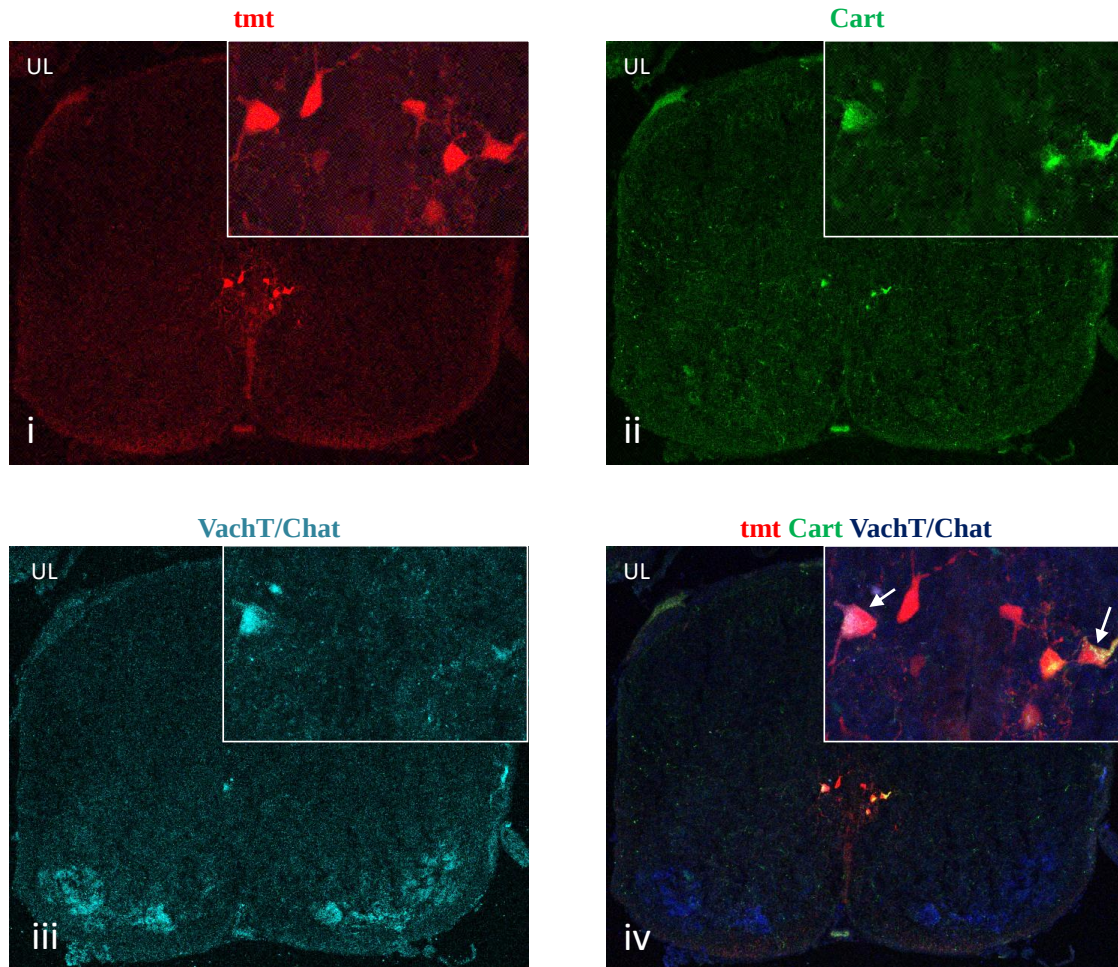


Εικόνα 11: Πρότυπο έκφρασης των γονιδίων που υπερεκφράζονται στους *Pitx2+* νευρώνες και επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση. In situ υβριδοποίηση με RNA ανιχνευτές σε τομές άνω οσφυϊκής μοίρας του νωτιαίου μυελού ποντικού ηλικίας P4. Πηγή: Allen Brain Atlas.

Πίνακας 1: Σχετική έκφραση (Pitx2 vs Sox14 πληθυσμών) των γονιδίων που επιλέχθηκαν με βάση το πρότυπο έκφρασης τους στην περιοχή όπου βρίσκονται οι Pitx2+ νευρώνες.

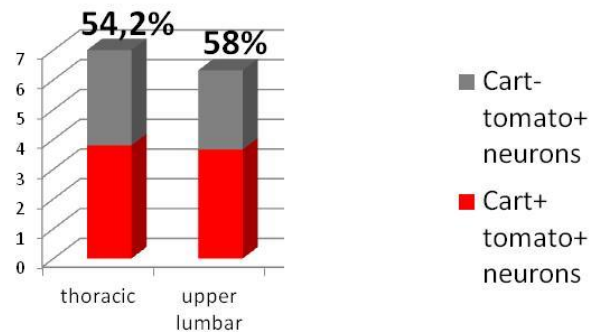
Όνομα γονιδίου	Περιγραφή	Σχετική έκφραση
<i>Cartpt</i>	Cart prepropeptide	37.487
<i>Asb4</i>	Ankyrin repeat and SOCS box containing 4	22.377
<i>Bdnf</i>	Brain-derived neurotrophic factor	12.922
<i>Grp</i>	Gastrin releasing peptide	12.041
<i>Slc10a4</i>	Solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 4	11.678
<i>Serpin1b</i>	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1b	8.201
<i>Msn</i>	Moesin	7.101
<i>Mab21l1</i>	Mab-21-like-1	6.775
<i>Arhgap36</i>	Rho GTPase activating protein 36	6.589
<i>Pmp22</i>	Peripheral myelin protein 22	5.845
<i>Cdhr1</i>	Cadherin-related family member 1	5.032
<i>Fgfr1</i>	Fibroblast growth factor receptor 1	4.710
<i>Efcab1</i>	EF-hand calcium binding domain 1	3.676

Με χρήση ανοσοφθορισμού ανιχνεύτηκε η έκφραση του νευροπεπτιδίου Cart σε μεγάλο ποσοστό των Pitx2+ νευρώνων (>56%) (**Εικόνα 12**). Στη συνέχεια, αναλύθηκε η έκφραση του Cart στους V0c και V0g νευρώνες ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σχεδόν όλοι οι V0c νευρώνες εκφράζουν το Cart, ενώ αυτό απουσιάζει από το μεγαλύτερο ποσοστό των V0g νευρώνων (περίπου 75%) (**Γράφημα 1**). Το αποτέλεσμα αυτό αποτελεί μία ένδειξη σχετικά με τον λόγο για τον οποίο η σύναψη C bouton παραμένει απουσία της ακετυλοχολίνης, καθώς δείχνει ότι οι V0c νευρώνες εκφράζουν ένα ακόμα συστατικό, το νευροπεπτίδιο Cart.

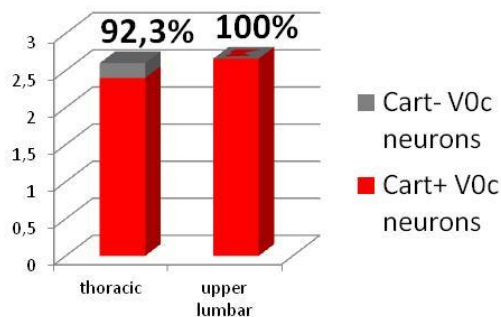


Εικόνα 12: Ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση πιθανού συνεντοπισμού του Cart στους Pitx2+ νευρώνες . Ανοσοφθορισμός σε τομές άνω οσφυϊκής μοίρας από ποντίκια γονοτύπου *Pitx2cre+/-;Rosa.stop.tdTomato+/-* και ηλικίας P0. Οι Pitx2+ νευρώνες εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη td Tomato (tmt) (i). Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για το Cart νευροπεπτίδιο (ii) και τους χολινεργικούς δείκτες VACHT/ChAT (iii). Παρατηρείται ποσοστό συνεντοπισμού των Pitx2+ νευρώνων με το Cart νευροπεπτίδιο. Όπως καταδεικνύουν τα άσπρα βέλη, σχεδόν όλοι οι V0c νευρώνες είναι και Cart+. Επίσης, ένα μικρό ποσοστό των V0g νευρώνων είναι Cart+ (iv) (άνω οσφυϊκή μοίρα- UL upper lumbar).

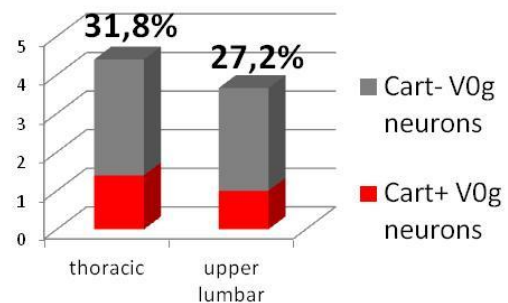
(i) Cart in Pitx2 neurons



(ii) Cart in V0c neurons



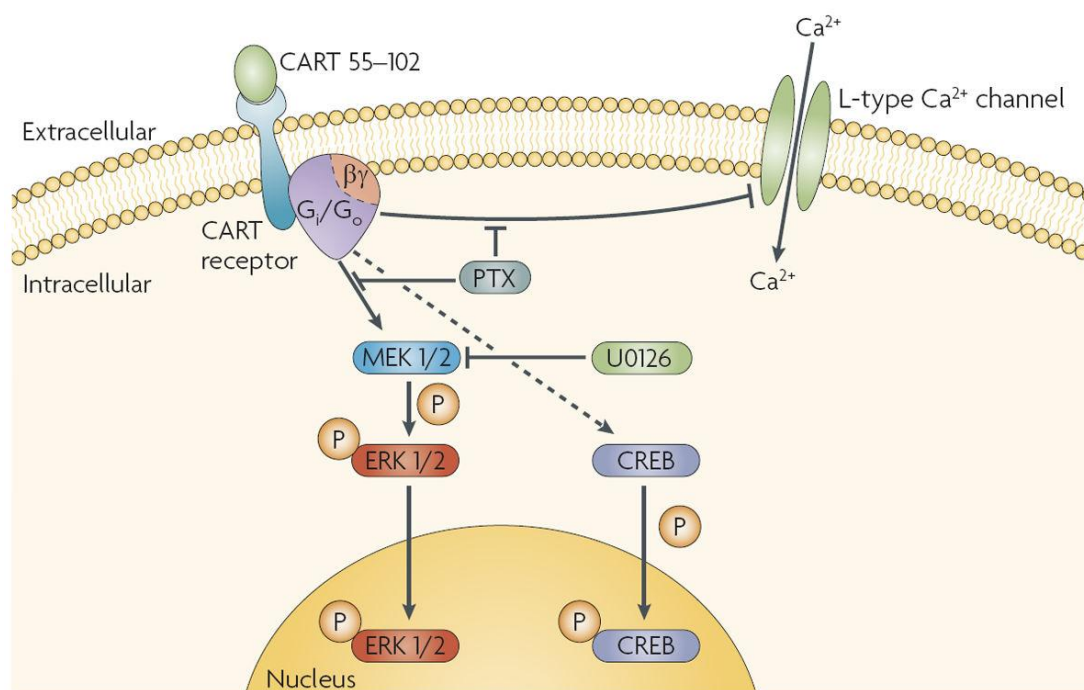
(iii) Cart in V0g neurons



Γράφημα 1: (i) Οι δύο στήλες απεικονίζουν τον αριθμό των Pitx2+ (tomato+) νευρώνων που εκφράζουν Cart (Cart+ tomato+ neurons) ή δεν εκφράζουν Cart (Cart- tomato+ neurons), μετά από κανονικοποίηση, στο σύνολο των Pitx2+ (tomato+) νευρώνων σε δύο μοίρες του νωτιαίου μυελού (θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα- upper lumbar). (ii) Οι δύο στήλες απεικονίζουν τον αριθμό των Pitx2+ (tomato+) χολινεργικών νευρώνων που εκφράζουν Cart και VACHT/ChAT (Cart+ tomato+ VACHT/ChAT+ neurons) στο σύνολο των χολινεργικών νευρώνων (tomato+ VACHT/ChAT+ neurons) σε δύο μοίρες του νωτιαίου μυελού (θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα- upper lumbar). (iii)) Οι δύο στήλες απεικονίζουν τον αριθμό των Pitx2+ (tomato+) νευρώνων που εκφράζουν Cart αλλά όχι VACHT/ChAT (Cart+ tomato+ nonVACHT/ChAT+ neurons στο σύνολο των μη χολινεργικών νευρώνων (tomato+ nonVACHT/ChAT+ neurons) σε δύο μοίρες του νωτιαίου μυελού (θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα- upper lumbar). Τομές πάχους 16 μ m.

ΤΟ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟ CART (Cocaine and amphetamine regulated transcript)

Το Cart mRNA ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά στον εγκέφαλο αρουραίων, όπου η έκφρασή του αποδείχθηκε ότι αυξάνεται ως απόκριση στη χορήγηση κοκαΐνης ή αμφεταμίνης (cocaine and amphetamine) (Douglass et al., 1995). Το γονίδιο CART του ανθρώπου, του αρουραίου και του ποντικίου έχει μέγεθος 2kb και περιέχει 3 εξόνια (Douglass and Daoud, 1996; Adams et al., 1999). Το mRNA του Cart μεταφράζεται στα Cart προπεπτίδια τα οποία, όπως και άλλα γνωστά προπεπτίδια, μέσω μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων μετατρέπονται σε πιο μικρά, βιολογικά ενεργά Cart πεπτίδια. Βρέθηκαν να σχηματίζονται τελικά δύο διαφορετικά ενεργά Cart πεπτίδια, τα CART 55-102 και CART 62-102 (Thim et al., 1999; Dey et al., 2003). Ο υποδοχέας στόχος του δεν έχει βρεθεί, μελέτες όμως προτείνουν ότι ανήκει στην κατηγορία των G-μεμβρανικών πρωτεϊνών (**Εικόνα 13**) (Lakatos et al., 2005; Sen et al., 2007).



Εικόνα 13: Προτεινόμενο μονοπάτι σηματοδότησης του Cart υποδοχέα. Διαφορετικές μελέτες προτείνουν ότι το νευροπεπτίδιο Cart ενεργοποιεί τρεις τουλάχιστον σηματοδοτικούς μηχανισμούς. Ο πρώτος αφορά την αναστολή μέσω της pertussis τοξίνης (PTX), ο δεύτερος την αυξημένη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης CREB και ο τρίτος την αυξημένη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης ERK. (Rogge et al., 2008).

Το Cart mRNA και πεπτιδίο εντοπίζονται σε πολλές περιοχές του κεντρικού και περιφερειακού νευρικού συστήματος (Yermolaieva et al., 2001). Κάποιες από αυτές τις περιοχές είναι η αμυγδαλή, ο επικλινής πυρήνας, ο υποθάλαμος, τα επινεφρίδια, οι νευρώνες του αμφιβληστροειδή και ο οσφρητικός βολβός (Koylu et al., 1998; Koylu et al., 1997; Couceyro et al., 1997; Mortensen and Camper, 2016). Στον νωτιαίο μυελό συγκεκριμένα, βρίσκεται στη ραχιαία περιοχή σε απολήξεις και στην ενδιάμεση ζώνη σε νευρώνες στην περιοχή όπου εντοπίζεται ο V0c υποπληθυσμός και παράλληλα στους προγαγγλιακούς νευρώνες («κινητικοί» νευρώνες του Αυτόνομου Νευρικού Συστήματος). Ο εντοπισμός του Cart σε ποικίλες περιοχές του νευρικού συστήματος καταδεικνύει και τη συμμετοχή του σε διαφορετικές λειτουργίες. Όντως, ρόλος του Cart έχει περιγραφεί στην ανταμοιβή και τον εθισμό, τη σίτιση και τη ρύθμιση του σωματικού βάρους καθώς και το στρες, το άγχος και την κατάθλιψη. Επίσης, το Cart έχει και νευροενδοκρινικές λειτουργίες, διαθέτει τις λειτουργικές ιδιότητες ενός ενδογενούς ψυχοδιεγερτικού και συμμετέχει στην επεξεργασία αισθητικών σημάτων (Rogge et al., 2008).

Πολλές περιπτώσεις στην πρόσφατη βιβλιογραφία υποδεικνύουν το Cart και ως έναν ισχυρό νευροπροστατευτικό παράγοντα. Τα περισσότερα αποδεικτικά στοιχεία προέρχονται από το πεδίο της ισχαιμίας: Το Cart νευροπεπτιδίο παρουσιάζει νευροπροστατευτικές ιδιότητες εναντίον της ισχαιμικής βλάβης του εγκεφάλου *in vivo* και εναντίον της oxygen-glucose-deprivation (OGD) που επάγεται από τον κυτταρικό θάνατο νευρώνων του φλοιού (Xu et al., 2006; Mao et al., 2013). Αυτή η νευροπροστατευτική δράση του Cart έχει συσχετιστεί με ενεργοποίηση του ERK μονοπατιού (Jia et al., 2008), θετική ρύθμιση του brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Qiu et al., 2013) και αυξημένη δράση του συμπλόκου I της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας (Sha et al., 2014). Το Cart φαίνεται επίσης να προωθεί την έκφυση νευριτών σε νευρώνες του φλοιού μέσω ενός PTN-εξαρτώμενου μονοπατιού (Wang et al., 2014) και θεωρείται ένας υποψήφιος θεραπευτικός παράγοντας και για την ασθένεια του Parkinson (Mao et al., 2013). Τέλος, η ενδοκοιλιακή χορήγηση Cart φαίνεται να προωθεί ανάκτηση της κίνησης και να ασκεί νευροπροστατευτική δράση ύστερα από

τραυματισμό του νωτιαίου μυελού, παρεμποδίζοντας την αστρογλοίωση που λαμβάνει χώρα (Bharne et al., 2013).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η εργασία αυτή επικεντρώνεται σε δύο βασικούς στόχους. Αρχικός σκοπός είναι η μελέτη των αναπτυξιακών γεγονότων που οδηγούν στη διαφοροποίηση των Pitx2+ διάμεσων νευρώνων από τον προγονικό πληθυσμό V0. Καθώς η διαφοροποίησή των διάμεσων νευρώνων εξαρτάται εν μέρει από το χρονικό παράθυρο που αφήνουν τον κυτταρικό κύκλο, έγινε μία προσπάθεια να προσδιοριστεί ο χρόνος που οι Pitx2+ νευρώνες γίνονται μετα-μιτωτικοί, και πιο συγκεκριμένα, να διαπιστωθεί εάν οι Pitx2+ νευρώνες γεννιούνται σε συγκεκριμένο χρονικό παράθυρο νωρίς (e9.5) ή αργά (e11.5) σε σχέση με τον συνολικό V0 υποπληθυσμό. Εφόσον η διαφοροποίησή των διάμεσων νευρώνων εξαρτάται και από συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια, έγινε μία προσπάθεια να μελετηθεί αν η σηματοδότηση Notch και οι Hox παράγοντες εμπλέκονται στη διαδικασία απόκτησης ταυτότητας των Pitx2+ διάμεσων νευρώνων.

Επίσης, η ανακάλυψη της ύπαρξης του Cart νευροπεπτιδίου στα σώματα των V0c νευρώνων στον νωτιαίο μυελό καθώς και στα C boutons πάνω στους κινητικούς νευρώνες, έδωσε το έναυσμα για τον δεύτερο και σημαντικότερο στόχο αυτής της εργασίας. Έτσι, πραγματοποιήθηκε μία λεπτομερής αναπτυξιακή και λειτουργική προσέγγιση της έκφρασης του Cart στα C boutons, που θα βοηθήσει στην αποσαφήνιση του ρόλου του ως δεύτερος νευροδιαβιβαστής των V0c νευρώνων, εκτός από την ακετυλοχολίνη, στον νωτιαίο μυελό. Ενδεχομένως να δώσει και απαντήσεις σχετικά με τον λόγο για τον οποίο η σύναψη C bouton παραμένει σε περιπτώσεις που απουσιάζει η ακετυλοχολίνη.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ-ΣΕΙΡΕΣ ΠΟΝΤΙΚΩΝ

Τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή στεγάζονται στην πρότυπη μονάδα ζωικών προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), υπό την επίβλεψη του Δρ. Νικόλαου Κωστομητσόπουλου. Στα πειράματα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τόσο αρσενικά όσο και θηλυκά ζώα. Τα ζώα είναι τοποθετημένα σε κλουβιά (έως 8 ζώα σε κάθε κλουβί) και έχουν συνεχώς ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Επίσης, τηρείται ένας δωδεκάωρος κύκλος εναλλαγής φωτός-σκοταδιού και στα δωμάτια φύλαξης των ζώων επικρατούν σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) και σχετικής υγρασίας ($55\pm 10\%$). Ο εξαερισμός των κλωβών γίνεται μέσω συστήματος εξαερισμού με τη βοήθεια του οποίου προσάγεται και απάγεται ο αέρας αφού προηγουμένως περάσει από φίλτρα καθαρισμού.

Οι πειραματικές σειρές των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή τη διδακτορική διατριβή είναι οι ακόλουθες:

- **Pitx2::cre:** Στη σειρά αυτή το γονίδιο της Cre ρεκομπινάσης έχει εισαχθεί στο πέμπτο εξώνιο του Pitx2 γονιδίου. Η έκφραση της Cre ρεκομπινάσης λαμβάνει χώρα επιλεκτικά στους ιστούς που εκφράζουν Pitx2 (ιστοειδική έκφραση) και οδηγεί σε παραγωγή μη λειτουργικού Pitx2 (Liu et al., 2003).

- **Dbx1::cre:** Στη σειρά αυτή το γονίδιο της Cre ρεκομπινάσης έχει εισαχθεί καθοδικά (downstream) της αμετάφραστης περιοχής του γονιδίου Dbx1. Η έκφραση της Cre ρεκομπινάσης λαμβάνει χώρα επιλεκτικά στους ιστούς που εκφράζουν Dbx1 (ιστοειδική έκφραση) και οδηγεί σε παραγωγή μη λειτουργικού Dbx1 (Pierani et al., 2001).

- **ChAT fl/fl**: Στη σειρά αυτή έχουν εισαχθεί δύο loxP αλληλουχίες εκατέρωθεν του τέταρτου και του πέμπτου εξωνίου του ChAT γονιδίου, με αποτέλεσμα την παραγωγή μη λειτουργικού ChAT μετά από εκτομή του.

- **vAChT-stop-DTA**: Στη σειρά αυτή έχει εισαχθεί μία floxed stop κασσέτα μέσα στο γονίδιο vAChT και στη συνέχεια το γονίδιο της τοξίνης της διφθερίτιδας A. Οδηγεί σε παραγωγή μη λειτουργικού vAChT.

- **Cart Knock Out (KO)**: Στη σειρά αυτή έχει εισαχθεί μία His/Neo κασσέτα στο γονίδιο Cart που προκαλεί στοχευμένη απενεργοποίησή του (Wierup et al., 2005).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗΣ

Χρησιμοποιούνται 150-400 μl διαλύματος γονοτύπησης (tail mix) για κάθε ουρά (ανάλογα με την ηλικία), στο οποίο προστίθεται πρωτεΐνάση K σε τελική συγκέντρωση 0,1 mg/ml. Το μίγμα ανακινείται και τοποθετείται σε θερμοαναδευτήρα στους 56°C για όλη τη νύχτα (overnight, O/N). Την επόμενη ημέρα φυγοκεντρείται στις 13.300 rpm για 5 λεπτά και το DNA που βρίσκεται στο υπερκείμενο απομονώνεται και αραιώνεται σε αναλογία 1:10 και τελικό όγκο 50 μl για PCR.

ΔΙΑΛΥΜΑ ΔΙΑΛΥΣΗΣ ΟΥΡΩΝ (tail mix)

	Τελική Συγκέντρωση	Σε συνολικό όγκο 500ml
1M Tris pH 8.5	100mM	50ml
5M NaCl	250mM	25ml
0.5M EDTA pH 8.0	5mM	5ml
20% SDS	0.2%	5ml
dH ₂ O		μέχρι 500ml

Reaction Mix

Stock Διαλύματα	Τελική Συγκέντρωση	Όγκος (25 μ l)
10X buffer	1X	2,5
dNTPS 10mM	0,2mM	0,5
25 μ M Forward Primer	1 μ M	1 μ l
25 μ M Reverse Primer	1 μ M	1 μ l
Taq DNA Polymerase 5u/ μ l	0,75 u ανά αντίδραση	0,15
dH ₂ O		μέχρι 25 μ l

DNA (diluted lysate): 1.2 μ l

Πρόγραμμα PCR 1

95 °C για 3 λεπτά

95 °C για 30 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη)

60 °C για 30 δευτερόλεπτα (υβριδοποίηση του primer στο DNA)

72 °C για 55 δευτερόλεπτα (επιμήκυνση)

Ξανά στο 2^ο βήμα για 34 επιπλέον κύκλους:

72 °C για 3 δευτερόλεπτα

10°C

Πρόγραμμα PCR 2

95 °C για 3 λεπτά

95 °C για 30 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη)

57 °C για 30 δευτερόλεπτα (υβριδοποίηση του primer στο DNA)

72 °C για 45 δευτερόλεπτα (επιμήκυνση)

Ξανά στο 2^ο βήμα για 34 επιπλέον κύκλους:

72 °C για 3 δευτερόλεπτα

10°C

- Για τις σειρές **Pitx2::cre** και **Dbx1::cre** χρησιμοποιείται το ζεύγος εκκινητών Cre83(f), Cre85(r) που πιάνει και πολλαπλασιάζει μέρος του Cre γονιδίου:

Cre83: GTCCAATTTACTGACCGTACACC

Cre85: GTTATTCGGATCATCAGCTACACC

Αναμενόμενο προϊόν: 700 ζεύγη βάσεων (bp)

Πρόγραμμα PCR 2

- Για τη σειρά **ChAT floxed/floxed** χρησιμοποιούνται τα ζεύγη εκκινητών laskCHAT_2F(f), laskCHAT_3R(r), laskCHAT_1Rdel(r).

Το ζεύγος εκκινητών laskCHAT_2F(f) και laskCHAT_3R(r) πιάνει και πολλαπλασιάζει το τμήμα εκατέρωθεν της πρώτης loxP αλληλουχίας, η οποία βρίσκεται μεταξύ του τρίτου και τέταρτου εξονίου του γονιδίου ChAT:

laskCHAT_2F: ACGTAATATATGTTTGTGGAGC

laskCHAT_3R: CCTCTTGTTTCAAATGCTTCC

Αναμενόμενο προϊόν : floxed band 269 ζεύγη βάσεων (bp), wild type band 219 ζεύγη βάσεων (bp)

Πρόγραμμα PCR 2

Το ζεύγος εκκινητών laskCHAT_2F(f) και laskCHAT_1Rdel(r) πιάνει και πολλαπλασιάζει το τμήμα μεταξύ των δύο loxP αλληλουχιών εκατέρωθεν του τέταρτου και του πέμπτου εξωνίου του ChAT γονιδίου:

laskCHAT_2F: ACGTAATATATGTTTGTGAGC

laskCHAT_1Rdel: CGCCTCAGGACTCTTCCTTT

Αναμενόμενο προϊόν: delta band 350 ζεύγη βάσεων (bp)

Πρόγραμμα PCR 2

- Για τη σειρά **vAChT-stop-DTA** χρησιμοποιείται το ζεύγος εκκινητών DTA176Sall (f), DTANotIR (r) που πιάνει και πολλαπλασιάζει μέρος του DTA γονιδίου:

DTA176Sall: AAAAGTCGACGCCATGGATCCTGATGATGTTG

DTANotIR: ATACGAGCGGCCGCTCACAAAGATCGCC

Αναμενόμενο προϊόν: 600 ζεύγη βάσεων (bp)

Πρόγραμμα PCR 1

- Για τη σειρά **CART KO** χρησιμοποιούνται τα ζεύγη εκκινητών CARTcF(f), CARTmutR(r), CARTwtR(r).

Το ζεύγος εκκινητών CARTcF(f) και CARTmutR(r) πιάνει και πολλαπλασιάζει μέρος της His/Neo κασσέτας που έχει αντικαταστήσει τα τρία εξόνια του γονιδίου Cart:

CARTcF: TATGTGTACACGAGTGCAGG

CARTmutR: GAAAATGGCCGCTTTTCTGG

Αναμενόμενο προϊόν : mutant band 658 ζεύγη βάσεων (bp)

Πρόγραμμα PCR 2

Το ζεύγος εκκινητών CARTcF(f) και CARTwtR(r) πιάνει και πολλαπλασιάζει μέρος του Cart γονιδίου:

CARTcF: TATGTGTACACGAGTGCAGG

CARTwtR: AAGGTAGCAGTAGCAGCAGG

Αναμενόμενο προϊόν: wild type band 880 ζεύγη βάσεων (bp)

Πρόγραμμα PCR 1

Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης (1% για περισσότερα από 400bp και 2% για λιγότερα από 400bp) σε διάλυμα TAE 1x, παρουσία τμημάτων γνωστού μεγέθους (DNA ladder 1kb plus).

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Σε κωνική φιάλη προστίθενται 250 ml TAE (Tris-Acetate-EDTA) 1x και 2.5 ή 5 gr αγαρόζης. Ακολουθεί ταχεία θέρμανση μερικών λεπτών σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και, αφού κρυώσει το διάλυμα, προσθήκη 7 μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/ml (EtBr) και ανάδευση. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια φθορίζουσα χρωστική που έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ βάσεων του DNA και να το κάνει να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Τοποθετούνται οι ειδικές «χτένες» στο εκμαγείο της ηλεκτροφορητικής συσκευής για τη δημιουργία «πηγαδιών» στο πήκτωμα της αγαρόζης και προστίθεται το πήκτωμα της αγαρόζης στο εκμαγείο. Το διάλυμα αφήνεται να πήξει για περίπου 20 min και στη συνέχεια αφαιρούνται οι χτένες. Τέλος, στο δοχείο της ηλεκτροφόρησης προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x μέχρι την ένδειξη της ηλεκτροφορητικής συσκευής, ώστε να καλύπτεται πλήρως το πήκτωμα.

ΔΙΑΛΥΜΑ 50x TAE

40mM Tris- Acetate

1mM EDTA

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ

Προκειμένου να καταστεί δυνατή η διενέργεια πειραμάτων και η μελέτη του νωτιαίου μυελού, αρχικά απομονώνεται και, στη συνέχεια, πραγματοποιείται μονιμοποίησή του. Η μονιμοποίηση χρησιμεύει για να εμποδίσει την αποσύνθεση των ιστών και τη διατήρηση της γενικής υφής των ιστών. Το πρωτόκολλο απομόνωσης νωτιαίου μυελού διαφέρει μεταξύ των εμβρύων και των ποντικίων που έχουν γεννηθεί (μεγαλύτερα από P0).

-ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΑΠΟ ΕΜΒΡΥΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ

Για να μελετηθεί ο νωτιαίος μυελός εμβρύων ποντικών, αρχικά θανατώνεται το έγκυο ποντίκι και απομονώνονται τα έμβρυα. Στη συνέχεια, τοποθετούνται σε κρύο PBS 1x διάλυμα και απομακρύνονται το κεφάλι, η ουρά και τα όργανα. Το PBS αλλάζεται συχνά με νέο, κρύο κάθε φορά προς συντήρηση των ιστών. Απομακρύνεται το PBS και οι ιστοί επωάζονται στους 4°C με 4% παραφορμαλδεΐδη (PFA) για 1 ώρα, ώστε να μονιμοποιηθούν. Ακολουθούν 4 φορές πλύσεις των 15 λεπτών με κρύο 1x PBS. Τέλος, επωάζονται σε σουκρόζη 30% (30% σουκρόζη in 0,1M PB) για κρυοπροστασία και παραμένουν προς ανακίνηση στους 4°C για χρόνο ανάλογο με το μέγεθός τους, ώστε να βυθιστούν.

Ακολούθως, οι ιστοί διαχωρίζονται σε τρία κομμάτια που περιέχουν τα τρία διαφορετικά επίπεδα του εμβρυικού νωτιαίου μυελού (βραχιόνια, θωρακική, οσφυϊκή μοίρα). Τα επίπεδα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για το εκάστοτε πείραμα, τοποθετούνται σε απορροφητικό χαρτί και έπειτα σε

τρυβλίο με ειδικό κρυοπροστατευτικό υλικό OCT (Optical Cutting Temperature compound) όπου ανακινούνται για λίγα δευτερόλεπτα, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια σουκρόζης. Στη συνέχεια, οι ιστοί εισάγονται σε ένα «βαρκάκι» γεμάτο OCT. Τα δείγματα τοποθετούνται στον πυθμένα του με τη σειρά (από πάνω προς τα κάτω: βραχιόνιο, θωρακικό, οσφυϊκό κομμάτι) με την οπίσθια πλευρά (caudal) πάνω, πρόσθια πλευρά (rostral) κάτω να ακουμπάει στον πάτο της «βάρκας». Κάθε βαρκάκι περιέχει ιστό από 1-3 έμβρυα. Στη συνέχεια, το βαρκάκι τοποθετείται πάνω σε θρυμματισμένο ξηρό πάγο και αφήνεται έως ότου παγώσει ολόκληρο το περιεχόμενό του. Εάν δε χρησιμοποιηθεί αμέσως προς δημιουργία κρυοτομών, αποθηκεύεται στους -80 °C μέχρι τη χρήση του. Πριν χρησιμοποιηθεί, αφήνεται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για εξισορρόπηση.

-ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΑΠΟ ΝΕΟΓΕΝΗΤΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ

Αρχικά, τα ζώα υπόκεινται σε κρυοαναισθησία σε μπανάκι νερού και πάγου για 3-5 λεπτά αν είναι ηλικίας P0-P10 ή υπόκεινται στη μέθοδο της έγχυσης (perfusion) αν είναι μεγαλύτερης ηλικίας όπως θα περιγραφεί παρακάτω. Στη συνέχεια, κόβεται κοιλιακά το στέρνο και απομακρύνονται τα όργανα μαζί με ολόκληρο το δέρμα και τα άκρα, ώστε να αποκαλυφθεί η σπονδυλική στήλη, που περιλαμβάνει και τον νωτιαίο μυελό. Ο ιστός τοποθετείται σε κρύο PBS 1x διάλυμα και καθαρίζεται απομακρύνοντας μύες, φλέβες κλπ. Ακολουθεί κοιλιακή λαμινεκτομή προκειμένου να αφαιρεθεί μέρος της σπονδυλικής στήλης αφήνοντας εκτεθειμένο το νωτιαίο μυελό, χρησιμοποιώντας μικρό ψαλίδι με κυρτή άκρη και τσιμπίδα nr5. Ξεκινώντας από την αυχενική μοίρα με δύο κοψίματα για να εκτεθεί ο νωτιαίος μυελός, κόβεται η σπονδυλική στήλη παράλληλα προς το έδαφος, δεξιά και αριστερά με εναλλαγές, ώστε να απομακρυνθεί το πάνω μισό μέρος της σπονδυλικής στήλης. Έτσι, το ραχιαίο μέρος του νωτιαίου μυελού μένει στο αυλάκι ενώ το κοιλιακό του μέρος αποκαλύπτεται. Το PBS αλλάζεται συχνά με νέο, κρύο κάθε φορά προς συντήρηση του ιστού. Απομακρύνεται το PBS και ο ιστός επωάζεται στους 4°C με 4% παραφορμαλδεΰδη (PFA) για χρόνο ανάλογο με το μέγεθός του (περίπου 2 h), ώστε να μονιμοποιηθεί. Ακολουθούν 4 φορές

πλύσεις των 15 λεπτών με κρύο 1x PBS. Τέλος, απομονώνεται ολόκληρος ο νωτιαίος μυελός, επωάζεται σε σουκρόζη 30% (30% σουκρόζη in 0,1M PB) για κρυοπροστασία και παραμένει προς ανακίνηση στους 4°C για χρόνο ανάλογο πάλι με το μέγεθός του ώστε αυτός να βυθιστεί (περίπου O/N).

Την επόμενη μέρα, ο νωτιαίος μυελός χωρίζεται στα διαφορετικά του επίπεδα (αυχενική, θωρακική, άνω και κάτω οσφυϊκή μοίρα). Τα επίπεδα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για το εκάστοτε πείραμα, τοποθετούνται σε απορροφητικό χαρτί και έπειτα σε τρυβλίο με ειδικό κρυοπροστατευτικό υλικό OCT (Optical Cutting Temperature compound) όπου ανακινούνται για λίγα δευτερόλεπτα, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια σουκρόζης. Στη συνέχεια, οι ιστοί εισάγονται σε ένα «βαρκάκι» γεμάτο OCT. Τα δείγματα τοποθετούνται στον πυθμένα του με τη σειρά (από πάνω προς τα κάτω: αυχενικό, θωρακικό, άνω οσφυϊκό, κάτω οσφυϊκό κομμάτι) με την οπίσθια πλευρά (caudal) πάνω, πρόσθια πλευρά (rostral) κάτω να ακουμπάει στον πάτο της «βάρκας». Κάθε βαρκάκι περιέχει ιστό από 1-3 ζώα. Στη συνέχεια, το βαρκάκι τοποθετείται πάνω σε θρυμματισμένο ξηρό πάγο και αφήνεται έως ότου παγώσει ολόκληρο το περιεχόμενό του. Εάν δε χρησιμοποιηθεί αμέσως προς δημιουργία κρυοτομών, αποθηκεύεται στους -80 °C μέχρι τη χρήση του. Πριν χρησιμοποιηθεί, αφήνεται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για εξισορρόπηση.

-ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΗΛΙΚΙΑΣ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΗΣ ΑΠΟ P10 ΜΕ ΕΝΔΟΚΑΡΔΙΑΚΗ ΕΓΧΥΣΗ 4% ΠΑΡΑΦΟΡΜΑΛΔΕΥΔΗΣ (PERFUSION)

Μία μέθοδος μονιμοποίησης νωτιαίου μυελού, που χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις απομόνωσής του από ενήλικα ποντίκια ή ποντίκια μεγαλύτερα των 10 ημερών (P10), είναι αυτή της έγχυσης υγρού (PBS 1x και 4% παραφορμαλδεΰδης) δια μέσου της καρδιάς (trans-cardial perfusion). Το ποντίκι αρχικά αναισθητοποιείται με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 16-30μl Avertin (2,2,2-tribromoethanol) (25 mg/ml) ανά gr βάρους ποντικού. Όταν το ποντίκι ναρκωθεί, τοποθετείται σε επιφάνεια ανατομής με την κοιλιακή πλευρά να κοιτάζει προς τα πάνω και με χρήση μικρών βελονών, ασφαρίζονται τα τέσσερα άκρα του ζώου πάνω στην επιφάνεια. Στη συνέχεια, ανοίγεται ο

θώρακας και εκτίθεται η καρδιά. Κόβεται ο δεξιός κόλπος ώστε να φεύγει το αίμα και τοποθετείται μια βελόνα-πεταλούδα στην αριστερή κοιλία, από την οποία διοχετεύεται αρχικά PBS 1x, για να αφαιρεθεί το αίμα από την κυκλοφορία, και έπειτα 4% PFA για την μονιμοποίηση των ιστών. Με αυτό τον τρόπο, αντικαθίσταται το αίμα στο κυκλοφορικό σύστημα με το μονιμοποιητικό υγρό. Έπειτα, απομονώνεται ο νωτιαίος μυελός (όπως έχει περιγραφεί παραπάνω) και μονιμοποιείται επιπλέον σε 4% PFA για 2-4 ώρες στους 4°C υπό ανακίνηση.

ΔΙΑΛΥΜΑ PB 1M, PH:7.4

1 M Na₂HPO₄

1 M NaH₂PO₄

ΔΙΑΛΥΜΑ PBS 1x (working solution PH 7.4)

2.7 mM KCl

137 mM NaCl

8 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

4% PFA ΣΕ PB ΔΙΑΛΥΜΑ

Σε συνολικό όγκο 400 ml:

dH₂O 360 ml

PFA (παραφορμαλδεΰδη) 16 gr

10N NaOH 80 μl

1M PB 1x 40ml

ΔΙΑΛΥΜΑ 30% Sucrose

Διαλύεται Sucrose σε 1M PB σε επιθυμητό τελικό όγκο

ΚΟΠΗ ΚΡΥΟΤΟΜΩΝ

Τα μονιμοποιημένα κομμάτια νωτιαίου μυελού λαμβάνονται από τους -80°C και κόβονται σε ιστολογικές τομές σε κρυοτόμο Leica σε θερμοκρασία -25°C . Οι τομές πραγματοποιούνται σε πάχος $14\mu\text{m}$ και, στη συνέχεια, τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες κατάλληλες για κρυοτομές (Superfrost slides), στις οποίες κολλάνε εύκολα λόγω της διαφοράς θερμοκρασίας (η αντικειμενοφόρος έχει θερμοκρασία δωματίου, ενώ οι τομές έχουν θερμοκρασία -25°C).

ΚΟΠΗ ΣΕ ΜΙΚΡΟΤΟΜΟ ΜΕ ΔΟΝΟΥΜΕΝΗ ΛΕΠΙΔΑ (VIBRATOME)

Για να κοπεί ο απομονωμένος νωτιαίος μυελός σε παχύτερες τομές, πρώτα τοποθετείται σε πήκτωμα αγαρόζης 4%. Το διάλυμα αυτό αποτελείται από PBS 1x και αγαρόζη και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να γίνει διαυγές. Πριν αυτό να πήξει, τοποθετείται σε ένα βαρκάκι, στο οποίο έχει προστεθεί ο νωτιαίος μυελός με συγκεκριμένη φορά. Είναι σημαντικό ο ιστός να παραμείνει στη θέση του κατά την έγχυση και την πήξη της αγαρόζης. Στη συνέχεια, τοποθετείται στους 4°C για τουλάχιστον μια ώρα ώστε η αγαρόζη να πήξει τελείως. Ο νωτιαίος μυελός τώρα είναι έτοιμος να κοπεί σε μικροτόμο με δονούμενη λεπίδα.

Ο μικροτόμος με δονούμενη λεπίδα (Vibratome-LeicaVT1000S) χρησιμοποιείται για την δημιουργία παχέων τομών, μονιμοποιημένων ή φρέσκων ιστών χωρίς να απαιτείται πάγωμα του ιστού. Πλεονέκτημα αυτού του είδους κοπής είναι η διατήρηση της μορφολογίας, της ενζυμικής ενεργότητας (όταν ο ιστός είναι μη μονιμοποιημένος) και της κυτταρικής βιωσιμότητας του ιστού δίχως να προκαλούνται παραμορφώσεις και καταστροφή κυττάρων λόγω συμπίεσης.

Ο εμβαπτισμένος στην αγαρόζη ιστός αφαιρείται από το βαρκάκι και με μια λεπίδα κόβεται το επιπλέον gel αγαρόζης από όλες τις πλευρές. Στην

μαύρη στρογγυλή βάση της τράπεζας του vibratome απλώνεται κόλλα στιγμής και τοποθετείται ο ιστός με κατάλληλη φορά ώστε να παρθούν στεφανιαίες (coronal) τομές.

Το vibratome ρυθμίζεται ώστε να έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

- Συχνότητα: 7
- Ταχύτητα: 4 (0,1 mm/s)
- Βήμα: 70 μm (πάχος τομής)
- Αρχικό και τελικό σημείο εκκίνησης: επιβεβαίωση με το κουμπί CONTINUOUS για συνεχή κίνηση της λεπίδας σύμφωνα με τις παραμέτρους που έχουν οριστεί από το σημείο που έχει καθοριστεί ως εναρκτήριο έως το σημείο λήξης. Για διακοπή της διαδικασίας χρησιμοποιείται το κουμπί PAUSE.

Κρατάμε όλες τις τομές, από την στιγμή που η λεπίδα ξεκινάει να κόβει τον νωτιαίο μυελό στην περιοχή ενδιαφέροντος, σε πηγάδια (24 well-plates) στα οποία έχει προστεθεί PBS 1x.

ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Αφού κοπούν οι τομές και τοποθετηθούν σε αντικειμενοφόρους πλάκες, αφήνονται να στεγνώσουν και χρησιμοποιούνται κατευθείαν είτε αποθηκεύονται στους -80°C και πριν χρησιμοποιηθούν, αφήνονται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για εξισορρόπηση. Στη συνέχεια, υπόκεινται σε ανοσοϊστοχημεία, μία διαδικασία επώασης αντισωμάτων και ξεπλυμάτων με διάφορα διαλύματα, που έχει σκοπό την παρατήρηση της επιθυμητού ιστού στο μικροσκόπιο φθορισμού. Πρώτα πραγματοποιείται ένα ξέπλυμα των 5 λεπτών με PBS 1x ώστε να αφαιρεθεί το OCT. Στη συνέχεια, οι τομές επωάζονται με το πρώτο αντίσωμα αραιωμένο κατάλληλα σε ορό αποφυγής δέσμευσης μη ειδικών επιτόπων (blocking solution-1% αλβουμίνη βόειου ορού- BSA, 0,1% Triton X-100 σε 1x PBS) σε τελικό όγκο 500 μl /πλακάκι, στους 4°C O/N.

Την επόμενη μέρα, πραγματοποιούνται 3 ξεπλύματα με PBS 1x, διάρκειας 10 λεπτών το καθένα, και γίνεται επώαση με το δεύτερο αντίσωμα (φθορίζον) σε κατάλληλη αραιώση σε ορό δέσμευσης μη ειδικών επιτόπων σε τελικό όγκο 500 μl /πλακάκι και αφήνουμε για 2 ώρες στο σκοτάδι (θερμοκρασία δωματίου). Όλα τα βήματα που ακολουθούν μετά από αυτό το σημείο πραγματοποιούνται στο σκοτάδι. Μετά από 3 ξεπλύματα των 15 λεπτών με PBS 1x, οι αντικειμενοφόροι καλύπτονται με Vectashield και καλυπτρίδα για μετέπειτα παρατήρησή των πλακακίων σε μικροσκόπιο φθορισμού.

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ		ΠΡΟΜΗΘΕΥΤΗΣ
ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	ΑΡΑΙΩΣΗ	
Goat anti-ChAT AB144P	1:200	Chemicon
Goat anti-VACht ABN100	1:2000	Millipore
Rabbit M2 AB9452	1:500	Alomone Labs
Guinea pig anti-Vglut1 CU538	1:16000	Jessell lab
Guinea pig anti-VACht 20R-VP002	1:400	Fitzerald
Guinea pig anti-VGluT2 AB5907	1:3000	Chemicon
Rat anti-BrdU AB6326	1:300	Abcam
Guinea pig anti- Engrailed 1	1:4000	Jessell lab
Goat anti – mCherry AB0040-200	1:500	Sicgen
Guinea pig anti-FoxP1 1492	1:8000	Jessell lab
Rabbit anti-Pitx2 CU1533 affinity purified	1:16000	Jessell lab
Rabbit anti-Cart G-003- 62	1:200	Phoenix Pharmaceuticals

ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗ		
ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	ΑΡΑΙΩΣΗ	ΠΡΟΜΗΘΕΥΤΗΣ
Donkey anti-guinea pig Cy5	1:500	Jackson ImmunoResearch laboratories
Donkey anti-goat Cy3	1:1000	Jackson ImmunoResearch laboratories
Donkey anti-guinea pig Cy3	1:1000	Jackson ImmunoResearch laboratories
Donkey anti-rabbit Alexa fluor 488	1:500	Jackson ImmunoResearch laboratories
Donkey anti-rabbit Cy5	1:500	Jackson ImmunoResearch laboratories
Donkey anti-guinea pig Alexa fluor 488	1:500	Jackson ImmunoResearch laboratories
Donkey anti-rat Alexa fluor 555	1:500	Jackson ImmunoResearch laboratories

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΤΑ SOUTHERN

Σε ουρές στις οποίες έχει προστεθεί 400μl tail buffer με πρωτεΐνάση K και έχουν επωαστεί στους 56°C, προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης-χλωροφορμίου. Η φαινόλη-χλωροφόρμιο χρησιμοποιείται για να παγιδεύσει πρωτεΐνες, λιπίδια και άχρηστα προϊόντα στη μεσόφαση, μετά από φυγοκέντρηση. Οι ουρές αναδεύονται στις 1500rpm σε θερμοκρασία δωματίου στο Thermoshaker για 5 λεπτά και ακολούθως τοποθετούνται στη φυγόκεντρο στις 1500rpm για 10 λεπτά. Απομονώνεται το υπερκείμενο και μεταφέρεται σε ένα καθαρό erpendorf, στο οποίο προστίθεται ισοπροπανόλη ίση με το 70% του όγκου του υπερκειμένου. Ακολουθεί ήπια ανάδευση μέχρι να εμφανιστεί το DNA (φαίνεται σαν σύννεφο), το οποίο μαζεύεται με μία πιπέτα Pasteur κλείστη στην άκρη της με φωτιά (λύχνος Bunchen). Το DNA ξεπλένεται με 70% αιθανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) και αφήνεται να στεγνώσει ώστε, λόγω των αλάτων, να φαίνεται με λευκό χρώμα. Η πιπέτα με το DNA μεταφέρεται σε Eppendorf που περιέχει 100μl TE 0,5x, αναδεύεται για να ξεκολλήσει το απομονωμένο DNA και αφήνεται 3 ώρες για να ενυδατωθεί. Η ανάδευση επαναλαμβάνεται και τα δείγματα μπορούν να μεταφερθούν και να διατηρηθούν στους 4°C. Τέλος, η ποιότητα του απομονωμένου DNA ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε 0,8% gel αγαρόζης ή με ποσοτικοποίηση του DNA και του βαθμού καθαρότητας του με φωτομέτρηση.

ΔΙΑΛΥΜΑ 1x TE (Tris-EDTA)

10 mM Tris-Cl, pH 7.5

1 mM EDTA

ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΤΑ SOUTHERN

Η ανάλυση κατά Southern χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας σε ένα δείγμα DNA. Η ανίχνευση αυτή πραγματοποιείται καθώς χρησιμοποιείται ένας ραδιοσημασμένος ιχνηθέτης που είναι ειδικός για την επιθυμητή αλληλουχία DNA. Αφότου απομονωθεί DNA από τα προς ανάλυση δείγματα, όπως περιγράφηκε παραπάνω, ακολουθεί πέψη με περιοριστικά ένζυμα.

Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται πέψη του DNA με ένα ένζυμο (BAMHI), με αποτέλεσμα τον κατακερματισμό αυτού σε επιμέρους τμήματα τα οποία δεν είναι δυνατό να διακριθούν μεταξύ τους όταν το DNA ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης, οπότε προκύπτει ένα smear στο πήκτωμα. Οι πέψεις πραγματοποιούνται στους 37 °C O/N. Μετά από μια διαγνωστική ηλεκτροφόρηση προκειμένου να διαπιστωθεί ότι το DNA κατακερματίστηκε, ακολουθούν τα παρακάτω βήματα:

Ηλεκτροφορούνται οι πέψεις σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% σε 40-50 V, O/N. Την επόμενη ημέρα πραγματοποιείται ένα ξέπλυμα με HCl 0,25 M για 20 λεπτά. Ακολουθεί ένα ξέπλυμα με NaOH 0,4 M για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η ημίστεγνη μεταφορά του DNA από το πήκτωμα σε μεμβράνη Hybond-N+ (θετικά φορτισμένη μεμβράνη μεταφοράς). Πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου O/N. Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς του κατακερματισμένου DNA στη μεμβράνη, σταθεροποιείται το DNA πάνω στη μεμβράνη, καθώς πραγματοποιείται έκθεση της μεμβράνης σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV cross- link), για 10 λεπτά, στους 80 °C. Ακολουθεί η προ-υβριδοποίηση, κατά την οποία τοποθετούνται οι μεμβράνες σε κυλίνδρους, καθένας από τους οποίους περιέχει 10 ml διαλύματος υβριδισμού. Οι κύλινδροι τοποθετούνται στους 65 °C, υπό ανακίνηση για 30-60 λεπτά, μετά την προσθήκη 100 μl salmon sperm DNA, το οποίο προσδένεται στις μη ειδικές θέσεις. Μάλιστα, αυτό πριν προστεθεί στην αντίδραση έχει προηγουμένως θερμανθεί στους 100 °C, για 10 λεπτά, έτσι ώστε να αποδιαταχθεί και να γίνει μονόκλωνο. Στη συνέχεια, παραμένει για 10 λεπτά στον πάγο και έπειτα προστίθεται στην αντίδραση.

Παράλληλα, πραγματοποιείται η ραδιοσήμανση του ιχνηθέτη (ChAT right probe), ο οποίος προκύπτει με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με χρήση των εκκινητών: ATATGGACAGTCGAGTTTAGCCC (Forward) και CATACGTCCAAAACCAAATCACCC (Reverse). Έπειτα, 25 ng DNA ιχνηθέτη αναμιγνύονται με 10 ng random primers και ακολουθεί επώαση στους 100 °C, για 5 λεπτά, έτσι ώστε να αποδιαταχθεί το DNA και να συνδεθούν πάνω του οι random primers, σε τυχαίες θέσεις. Αμέσως μετά, ακολουθεί μεταφορά στον πάγο και έπειτα μία πολύ γρήγορη φυγοκέντρηση.

Στη συνέχεια, προστίθενται 10 μl 5x CTP buffer και 2,5 μl ραδιοσημασμένος CTP P32* σε τελικό όγκο αντίδρασης 50 μl. Ακολουθεί προσθήκη της Klenow υπομονάδας της DNA polymerase I, ανάδευση, πολύ γρήγορη φυγοκέντρηση και επώαση στους 37 °C, για μία ώρα. Επόμενο βήμα είναι η μεταφορά στους 100 °C για 5 λεπτά και αμέσως μετά παραμονή στον πάγο για 5 λεπτά. Προστίθεται 1 μl EDTA 0.5M και η αντίδραση καθαρίζεται σε στήλη.

Πραγματοποιείται η υβριδοποίηση, δηλαδή η προσθήκη του ραδιοσημασμένου ιχνηθέτη στις μεμβράνες που περιέχονται στους κυλίνδρους που χρησιμοποιήθηκαν για την προ-υβριδοποίηση, οι οποίοι παραμένουν O/N στους 65 °C , υπό ανακίνηση. Την επόμενη ημέρα, πραγματοποιούνται δύο ξεπλύματα με 2x SSC-0,1% SDS, στους 65 °C για 20 λεπτά, καθώς και ένα ακόμα ξέπλυμα με 0,2x SSC-0,1% SDS στους 65°C για 20 λεπτά. Τα διαλύματα έκπλυσης προθερμαίνονται στους 56 °C πριν τη χρήση τους. Αφότου στεγνώσουν οι μεμβράνες μετά τις πλύσεις, τοποθετούνται στο PhosphorImager για να γίνει μια πρώτη απεικόνιση του αποτελέσματος. Έπειτα τοποθετούνται σε μια κασέτα, καλύπτονται από ένα φιλμ και ακολουθεί η εμφάνιση του φιλμ σε σκοτεινό θάλαμο.

ΔΙΑΛΥΜΑ 0,2M HCL

10N HCl 20ml

dH₂O

ΔΙΑΛΥΜΑ 0,4M NaOH

10N NaOH 40ml

dH₂O

ΔΙΑΛΥΜΑ 10N NaOH

NaOH pellets 8gr

dH₂O 20ml

ΔΙΑΛΥΜΑ 20xSSC

3M NaCl

300mM Na₃Citrate.2H₂O

ΔΙΑΛΥΜΑ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ

5x SSC

10% Poly (ethylene glycol) 8000 [Aldrich]

5% Poly (Sodium 4-Styrene-sulfonate) [Aldrich]

0,2% Hexadecylpyridinium Chloride Monohydrate 99.0% [Sigma]

ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ (BrdU)

Η Bromodeoxyuridine (5-bromo-2'-deoxyuridine, **BrdU**) είναι ένα συνθετικό νουκλεοτίδιο ανάλογο της βάσης θυμιδίνης που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των διαιρούμενων κυττάρων σε ζωντανούς ιστούς. Κατά την διάρκεια της αντιγραφής του DNA και συγκεκριμένα κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου, η BrdU ενσωματώνεται στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA και υποκαθιστά την θυμιδίνη. Αντισώματα ειδικά για την BrdU χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για την ανίχνευση της ενσωματωμένης αυτής χημικής ουσίας, υποδεικνύοντας έτσι τα κύτταρα που αναδιπλασιάζουν ενεργά το DNA τους.

Προκειμένου να προσδιοριστεί ο χρόνος που οι Pitx2⁺ νευρώνες αφήνουν τον κυτταρικό κύκλο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των κοιλιακών διάμεσων νευρώνων, η σκόνη B5002 BrdU (Sigma-Aldrich) διαλύεται πρώτα

σε αποστειρωμένο διάλυμα PBS 1x σε συγκέντρωση 10 mg/mL και χορηγείται ενδοπεριτοναϊκά σε έγκυα ποντίκια (ένεση περίπου 1.5mg ανά 30g σωματικού βάρους) κάθε 2 ώρες για 6 φορές (**Εικόνα 14**). Έα, στο κάθε έγκυο ζώο γίνονται συνολικά 6 ενέσεις σε διάστημα 12 ωρών (Panayiotou et al., 2013). Στη συνέχεια, απομονώνονται τα έμβρυα στο επιθυμητό χρονικό στάδιο και ακολουθεί μονιμοποίηση και πάγωμα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε παραπάνω.



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε για τις BrdU ενέσεις.

Για τον μετέπειτα εντοπισμό των νευρώνων που ενσωμάτωσαν BrdU, ακολουθείται ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού, που προέκυψε από πιλοτικά πειράματα για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών στις οποίες δουλεύουν ταυτόχρονα τα δύο αντισώματα σήμανσης των νευρώνων που έχουν ενσωματώσει 5'-βρωμοδεοξουριδίνη και αυτών που εκφράζουν Pitx2. Πιο συγκεκριμένα, το Pitx2 αντίσωμα δεν δουλεύει όταν γίνεται επώαση στους 37°C με υδροχλωρικό οξύ συγκέντρωσης 2N, συνθήκη που απαιτεί το BrdU αντίσωμα. Τελικά, προσδιορίστηκε ο βέλτιστος συνδυασμός της συγκέντρωσης υδροχλωρικού οξέος (1.5N) και αραίωσης του Pitx2 αντισώματος (1:3200 έναντι της συνήθους 1:32000). Έτσι, ακολουθείται το εξής τροποποιημένο πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού: Στις τομές πραγματοποιείται ένα ξέπλυμα των 5 λεπτών με PBS 1x. Στη συνέχεια, επωάζονται σε διάλυμα 1.5M HCL, 0.1%TritonX για 25 λεπτά στους 37°C. για να διεισδύσει το anti-BrdU αντίσωμα στον πυρήνα των κυττάρων. Ακολουθεί

επώαση σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης 0.1M NaBorate PH8.5 για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 3 ξεπλύματα με PBS 1x, διάρκειας 10 λεπτών το καθένα και επώαση σε ορό αποφυγής δέσμευσης μη ειδικών επιτόπων (blocking solution-5% αλβουμίνη βόειου ορού- BSA, 0,1% Triton X-100 σε 1x PBS) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, πραγματοποιείται επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα rat anti-BrdU και rabbit anti-Pitx2 1533 αραιωμένα κατάλληλα σε ορό αποφυγής δέσμευσης μη ειδικών επιτόπων (blocking solution-1% BSA, 0,1% Triton X-100 σε 1x PBS) σε τελικό όγκο 500 μl/πλακάκι, για 16 ώρες στους 4°C.

Την επόμενη μέρα, πραγματοποιούνται 3 ξεπλύματα με PBS 1x, διάρκειας 10 λεπτών το καθένα, και γίνεται επώαση με τα δεύτερα αντισώματα (φθορίζοντα) donkey anti-rat 555 και donkey anti-rabbit 488 σε κατάλληλη αραιώση σε ορό δέσμευσης μη ειδικών επιτόπων σε τελικό όγκο 500 μl/πλακάκι και αφήνουμε για 2 ώρες στο σκοτάδι (θερμοκρασία δωματίου). Μετά από 3 ξεπλύματα των 15 λεπτών με PBS 1x, οι αντικειμενοφόροι είναι έτοιμες να καλυφθούν με Vectashield και καλυπτρίδα για μετέπειτα παρατήρησή των αντισωμάτων σε μικροσκόπιο φθορισμού.

ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

Η απεικόνιση των τομών πραγματοποιήθηκε με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου (Confocal laser scanning microscopy-CLSM- LeicaTCS5 II), κατά την οποία μονοχρωματική ακτινοβολία (laser) σαρώνει τις τομές. Μετά από τα πειράματα της ανοσοϊστοχημείας, οι ιστοί φέρουν ενώσεις που έχουν την ιδιότητα να εκπέμπουν φως αμέσως μετά την απορρόφηση ακτινοβολίας συγκεκριμένου κύματος (φθοριοχρώματα). Οι ενώσεις που περιέχουν το φθοριόχρωμα γίνονται ορατές μέσω του μικροσκοπίου.

Η συνεστιακή μικροσκοπία προσφέρει διάφορα πλεονεκτήματα έναντι της απλής οπτικής μικροσκοπίας. Σε αυτά ανήκουν το ελεγχόμενο βάθος του πεδίου, η ελαχιστοποίηση του θορύβου και η σάρωση του ιστού σε βάθος, επομένως η τομή μπορεί να απεικονιστεί σε επιμέρους επίπεδα στο

εσωτερικό της (stacks), με αποτέλεσμα να βελτιστοποιείται η επεξεργασία και η ανάλυση του δείγματος. Το κλειδί στην προσέγγιση της συνεστιακής μικροσκοπίας είναι η χρήση διαστηματικού φιλτραρίσματος για την ελαχιστοποίηση του φωτός που δεν είναι εστιασμένο. Επομένως, η χρήση της συνεστιακής μικροσκοπίας δίνει την δυνατότητα απόκτησης εικόνων υψηλής ποιότητας.

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

-ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΕΜΜΕΣΗ ΜΕΘΟΔΟ ΚΟΛΛΟΕΙΔΟΥΣ ΑΝΟΣΟΧΡΥΣΟΥ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΕΓΚΛΕΙΣΗ ΤΟΥ ΙΣΤΟΥ ΣΕ ΡΗΤΙΝΕΣ (Pre-embedding method)

Ο νωτιαίος μυελός ποντικών μονιμοποιείται με τη μέθοδο της ενδοκαρδιακής έγχυσης υγρού, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Σε ποντίκια ηλικίας ενός μήνα πραγματοποιείται ενδοκαρδιακή έγχυση PBS και ακολούθως 50 ml μονιμοποιητικού διαλύματος αποτελούμενου από 4% paraformaldehyde (PFA) και 0.5% glutaraldehyde σε 0.1M φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PB), pH 7.4. Στη συνέχεια, ο νωτιαίος μυελός απομονώνεται και μονιμοποιείται επιπλέον για 16 ώρες σε 4% PFA στους 4°C υπό ανακίνηση. Το οσφυϊκό (lumbar) τμήμα του κόβεται σε στεφανιαίες τομές πάχους 70 μ m, με χρήση μικροτόμου με δονούμενη λεπίδα (Vibratome-LeicaVT1000S), όπως έχει αναλυθεί παραπάνω.

Η ανοσοεντόπιση πραγματοποιείται σε επιλεγμένες πλεύουσες (free-floating) τομές σε θερμοκρασία δωματίου (εκτός από την επώαση των πρωτογενών αντισωμάτων), υπό συνεχή ανακίνηση, σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

1. Ξέπλυμα των τομών με PBS.
2. Επώαση σε κρυοπροστατευτικό διάλυμα (0.04M PB, 20% sucrose, 8% glycerol) στους 4°C (20 λεπτά) και στους -80°C (20 λεπτά).

- 57

30%, 50% και 90% αιθανόλη, 5 λεπτά στην καθεμία, στους 4°C.

100% αιθανόλη, 1x10 λεπτά και 1x5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

15. Επώαση των τομών σε propylene oxide (PO), 2x5 λεπτά.

16. Σταδιακή εμποτίση των τομών σε μείγμα εποξικών ρητινών (Epon/Araldite) σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης ως προς τις ρητίνες:

Μίγμα εποξικών ρητινών: PO = 1:2 για 30 λεπτά.

Μίγμα εποξικών ρητινών: PO = 1:1 για 1 ώρα.

Μίγμα εποξικών ρητινών: PO = 2:1 για 1 ώρα.

Καθαρό μίγμα εποξικών ρητινών για 12 ώρες.

17. Για τη διαδικασία της σκλήνωσης (embedding procedure), οι τομές τοποθετούνται απλωμένες με μία σταγόνα εποξικών ρητινών σε ένα μικρό κομμάτι ACLAR Film (#50425, EMS), και καλύπτονται με ένα άλλο κομμάτι ACLAR.

18. Τα δείγματα πολυμερίζονται για 24 ώρες σε κλίβανο στους 60°C. Όταν ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός, το ACLAR Film αφαιρείται και απομονώνεται η εμποτισμένη σε ρητίνη τομή η οποία και επικολλάται σε ένα block ρητίνης και πολυμερίζεται ξανά για 24 ώρες στους 60°C.

Η περιοχή των κινητικών νευρώνων απομονώνεται κάτω από το στερεοσκόπιο της υπερμικροτόμου (Leica UC7) και πραγματοποιείται λήψη λεπτών (65nm) σειριακών τομών με διαμαντένιο μαχαίρι (Diatome). Οι λεπτές τομές συλλέγονται και τοποθετούνται πάνω σε χάλκινα πλέγματα διαμέτρου 3mm και άνοιγμα πλέγματος 300 mesh.

Οι τομές βάφονται με α) 7.5% αλκοολικό διάλυμα οξικού ουρανυλίου (uranyl acetate) και β) 0.4% υδατικό διάλυμα κιτρικού μολύβδου (lead citrate). Η παρατήρηση των τομών πραγματοποιείται στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης Philips TEM 420 με ανοδική τάση 60 kV. Οι ηλεκτρονιοφωτογραφίες λαμβάνονται με ψηφιακή κάμερα Megaview G2 (Olympus Soft Images Solutions).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ

Για να αναλυθεί ο ρόλος της C bouton σύναψης στην κίνηση εκπονήθηκε μια σειρά συμπεριφορικών πειραμάτων σε τρεις ομάδες ποντικών. Οι ομάδες ποντικών που υποβλήθηκαν σε συμπεριφορικές δοκιμές αποτελούνται από ποντίκια που δεν παράγουν ακετυλοχολίνη (Dbx1cre+/-;ChATfl/fl πειραματική ομάδα και ChATfl/fl ομάδα ελέγχου) ή Cart (Cart KO πειραματική ομάδα και Cart wild type ομάδα ελέγχου) στη C-bouton σύναψη και από ποντίκια που στερούνται τις C-bouton συνάψεις (vAChT-loxP-stop-loxP-DTA;Pitx2-Cre πειραματική ομάδα και vAChT-loxP-stop-loxP-DTA ομάδα ελέγχου). Δεδομένου ότι χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια διαφορετικού μεγέθους, οι αρχικές απόλυτες τιμές των αποτελεσμάτων στα οποία τα ποντίκια προσπαθούν να μετακινήσουν κάποιο εξωτερικό βάρος (είτε ισομετρικά είτε ισοτονικά) κανονικοποιήθηκαν διαιρώντας τις με το βάρος του ζώου.

Δοκιμασία κρεμάμενου σύρματος (hanging wire test)

Για τη δοκιμασία κρεμάμενου σύρματος χρησιμοποιήθηκε ένα μπρούτζινο σύρμα μήκους 55 εκ. και διαμέτρου 1,2 χλστ. Τα δύο άκρα του ήταν κρεμασμένα σε διαφανείς πλεξιγκλάς επιφάνειες, σε ύψος 55 εκ και στο μέσο του πλάτους τους. Οι πλεξιγκλάς επιφάνειες είχαν ύψος 65 εκ. και πλάτος 20 εκ. Στον πυθμένα της κατασκευής τοποθετούνταν μαλακά υλικά για να προστατεύουν τα ποντίκια στην περίπτωση πτώσης τους. Ο πειραματιστής τοποθετούσε τα μπροστινά πόδια του ποντικιού στο σύρμα και περίμενε για 45 δευτερόλεπτα να δει αν θα κατάφερνε να βάλει και τα πίσω πόδια πάνω στο σύρμα. Αν το ποντίκι δεν μπορούσε να το κάνει αυτό ο πειραματιστής το βοηθούσε να το κάνει με τέτοιο τρόπο ώστε η πλάτη του να βρίσκεται προς τον πυθμένα της κατασκευής και τα πόδια κρεμασμένα από το σύρμα. Έγινε κάθε προσπάθεια να μην επιτρέπεται στο ποντίκι ισορροπεί με το σώμα του πάνω από το σύρμα. Ο σκοπός της δοκιμασίας ήταν να κρέμεται από το σύρμα κρατώντας το βάρος του σώματός του. Ο χρόνος

λήξης της δοκιμασίας ήταν 10 λεπτά. Αν το ποντίκι έπεφτε, ο πειραματιστής σταματούσε το χρονόμετρο και το τοποθετούσε ξανά στο σύρμα. Όταν το ποντίκι είχε μια καλή λαβή του σύρματος το χρονόμετρο ξεκινούσε ξανά. Τα ποντίκια έχουν την τάση να κινούνται ενώ κρέμονται από το σύρμα προς τις πλάγιες πλεξιγκλάς επιφάνειες, μεταφέροντας το βάρος του σώματος τους. Κάθε φορά που συνέβαινε αυτό μια άφιξη (reach) καταγράφονταν και ο πειραματιστής σταματούσε το χρονόμετρο και τοποθετούσε το ποντίκι στο μέσο του σύρματος προς την αντίθετη κατεύθυνση από την προηγούμενη. Όταν το ποντίκι είχε μια καλή λαβή του σύρματος το χρονόμετρο ξανάρχιζε. Τρεις μετρήσεις καταγράφονταν: συνολικός χρόνος που το ποντίκι κρέμονταν από το σύρμα, πτώσεις, και αφίξεις στα πρώτα 3 λεπτά.

Δοκιμασία δύναμης λαβής (grip strength test)

Για την δοκιμασία δύναμης λαβής χρησιμοποιήθηκε το αντίστοιχο δυναμόμετρο (Ugo Basile). Ο πειραματιστής κρατούσε το ποντίκι από τη βάση της ουράς και επέτρεπε στο ποντίκι να πιάσει με τα μπροστινά του πόδια το συρμάτινο έλασμα του δυναμόμετρου. Το χέρι του πειραματιστή που κρατούσε το ζώο στηρίζονταν επάνω στη σχηματισμένη γροθιά του άλλου του χεριού ώστε το πιάσιμο της ουράς να είναι σταθερό και αξιόπιστο. Όταν το ποντίκι είχε μια σταθερή λαβή του σύρματος, ο πειραματιστής το τραβούσε σταθερά προς τα πίσω ώστε το ποντίκι σε αντίδραση να εφαρμόσει στο σύρμα την υψηλότερη δυνατή δύναμη. Τρεις δοκιμές ανά ποντίκι έλαβαν μέρος την πρώτη ημέρα της δοκιμασίας με διάλειμμα ανάμεσα στις δοκιμές περίπου 15 λεπτά. Μια δεύτερη μέρα δοκιμασίας με τρεις δοκιμές έλαβε μέρος 48 ώρες μετά την πρώτη. Η μέση τιμή των 3 υψηλότερων τιμών που είχαν συλλεχθεί χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση. Αυτή η μέση μη επεξεργασμένη τιμή κανονικοποιήθηκε ως προς το σωματικό βάρος των ποντικιών και αναλύθηκε ξανά στατιστικά.

Δοκιμασία αναρρίχησης σε στύλο (climbing pole test)

Στην δοκιμασία αναρρίχησης σε στύλο υπήρχε ένας ξύλινος στύλος ύψους 50 εκ. και 1 εκ. σε διάμετρο που στηρίζονταν σε ξύλινη τετράγωνη βάση (πλευρά 10 εκ., ύψος 3 εκ.). Στην κορυφή του στύλου υπήρχε μικρή πλαστική σφαίρα η οποία επέτρεπε στο ποντίκι να ισορροπήσει πρόσκαιρα πριν προσπαθήσει να κατεβεί προς τη βάση του στύλου. Ο πειραματιστής τοποθετούσε προσεκτικά το ποντίκι στην κορυφή και μετρούσε το χρόνο που έκανε το ποντίκι μέχρι να κατεβεί στη βάση του στύλου και με τα 4 πόδια. Μια ημέρα εξοικείωσης δινόταν στα ποντίκια όπου τους επιτρέπονταν να κατεβούν τον στύλο 5 φορές συνεχόμενες. Την επόμενη μέρα 3 δοκιμές δίνονταν σε κάθε ποντίκι με ένα διάλειμμα 15 λεπτών περίπου μεταξύ των δοκιμών. Μια δεύτερη μέρα δοκιμών δίνονταν 48 ώρες μετά την πρώτη. Χρόνος λήξης κάθε δοκιμής ήταν τα 60 δευτερόλεπτα. Οι μέσοι όροι των τριών τιμών της κάθε μέρας χρησιμοποιούνταν για τη στατιστική ανάλυση.

Δοκιμασία ανεστραμμένου πλέγματος

Στη δοκιμασία ανεστραμμένου πλέγματος χρησιμοποιήθηκε ένα τετράγωνο συρμάτινο πλέγμα (πλευρά 45 εκ.) το οποίο αποτελούνταν από τετράγωνα (πλευρά 1.2 εκ, διάμετρος σύρματος 1 χλστ.). Οι τοίχοι του πλέγματος ήταν φτιαγμένοι από φελιζόλ ώστε το ποντίκι να αποτρέπεται από το να σκαρφαλώνει στην επάνω πλευρά του πλέγματος. Ο πειραματιστής τοποθετούσε το ποντίκι στη μέση του πλέγματος και το περίμενε να αποκτήσει καλή λαβή του σύρματος και με τα 4 πόδια πριν αντιστρέψει το πλέγμα προσεκτικά έτσι ώστε το ποντίκι να κρέμεται με την πλάτη προς το έδαφος κρατώντας το βάρος του σώματος του. Το πλέγμα 50 εκ. πάνω από το έδαφος και μαλακά υλικά είχαν τοποθετηθεί από κάτω για να το προστατέψουν σε περίπτωση πτώσης. Τρεις χρόνοι λήξης δοκιμάστηκαν: 5, 10 και 15 λεπτά.

Δοκιμασία περιστρεφόμενης ράβδου (rotarod test)

Μια συσκευή περιστρεφόμενης ράβδου (Ugo Basile) χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμασία. Το πρωτόκολλο αποτελούνταν από 4 ημέρες δοκιμασίας με 3 δοκιμές ανά ημέρα. Μια ημέρα εξοικείωσης δινόταν στα ποντίκια πριν τη δοκιμασία όπου το ποντίκι τοποθετούνταν στην ακίνητη συσκευή για 2 λεπτά και μετά αυτή επιταχύνονταν μέχρι τις 5rpm για ένα σύνολο 5 λεπτών. Την επόμενη ημέρα άρχιζε η δοκιμασία όπου η συσκευή επιταχύνονταν από 4-40rpm σε 5 λεπτά και παρέμενε στις 40rpm για 2 επιπλέον λεπτά. Ο χρόνος που έπαιρνε σε κάθε ποντίκι να πέσει από τη συσκευή καταγράφονταν. Η μέση τιμή των 3 δοκιμών κάθε μέρας χρησιμοποιήθηκε για στατιστική διαχρονική ανάλυση.

Δοκιμασία άρσης βαρών (weights test)

Η δοκιμασία άρσης βαρών μετρούσε την ικανότητα άρσης βάρους των ποντικίων ενώ χρησιμοποιούσαν τα μπροστινά τους πόδια με 9 προοδευτικά πιο βαριά βάρη (20,2 γρ. έως 80,5 γρ.) και κρατώντας κάθε βάρος το μέγιστο για 3 δευτερόλεπτα. Τα βάρη αποτελούνταν από μεταλλικές αλυσίδες συνδεδεμένες σε μεταλλικό σύρμα καθαρισμού σκευών κουζίνας. Ο πειραματιστής κρατούσε το ποντίκι συνεχώς από τη βάση της ουράς και το χαμήλωνε προσεκτικά ώστε το ποντίκι να πιάσει το σύρμα. Όταν το ποντίκι είχε μια καλή λαβή στο σύρμα ο πειραματιστής το σήκωνε προσεκτικά έτσι ώστε το ποντίκι να σηκώσει και το βάρος και ξεκινούσε το χρονόμετρο. Κάθε ποντίκι έπαιρνε ένα σκορ που ήταν το γινόμενο του μέγιστου αριθμού κρίκων της αλυσίδας που σήκωσε επί το χρόνο που τους κράτησε στον αέρα. Οι μη επεξεργασμένες τιμές κανονικοποιήθηκαν ως προς το σωματικό βάρος των ποντικίων και αναλύθηκαν ξανά στατιστικά.

Δοκιμασία αντοχής κολύμβησης

Στην δοκιμασία αντοχής κολύμβησης χρησιμοποιήθηκε μια ορθογώνια γυάλινη δεξαμενή (45 εκ. x 30 εκ.) γεμάτη με νερό σε ύψος 25 εκ. (με τη

θερμοκρασία του να διατηρείται στους 30 ± 2 °C. Υπήρχε μια πρώτη μέρα εξοικείωσης όπου δίνονταν στα ποντίκια η ευκαιρία να κολυμπήσουν για 5 λεπτά. Την επόμενη μέρα που λάμβανε μέρος η δοκιμασία ένα βάρος από μια συρμάτινη σπείρα συνδεόταν στην ουρά του ποντικίου ίση με το 2,5% του σωματικού του βάρους έτσι ώστε να κρατηθεί ο χρόνος της κολύμβησης σε λογικά όρια. Τον ίδιο σκοπό εξυπηρετούσε και μια αντλία που ανάδευε το νερό όντας προσκολλημένη στο τοίχωμα της δεξαμενής (περί τα 10 εκ. κάτω από την επιφάνεια) και λειτουργούσε στο μέγιστο των δυνατοτήτων της (600 λίτρα/ώρα). Ο πειραματιστής μετρούσε το χρόνο που το ποντίκι κατάφερνε να κολυμπήσει στη δεξαμενή πριν βυθιστεί κάτω από την επιφάνεια για 5 δευτερόλεπτα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ PITX2 ΔΙΑΜΕΣΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ

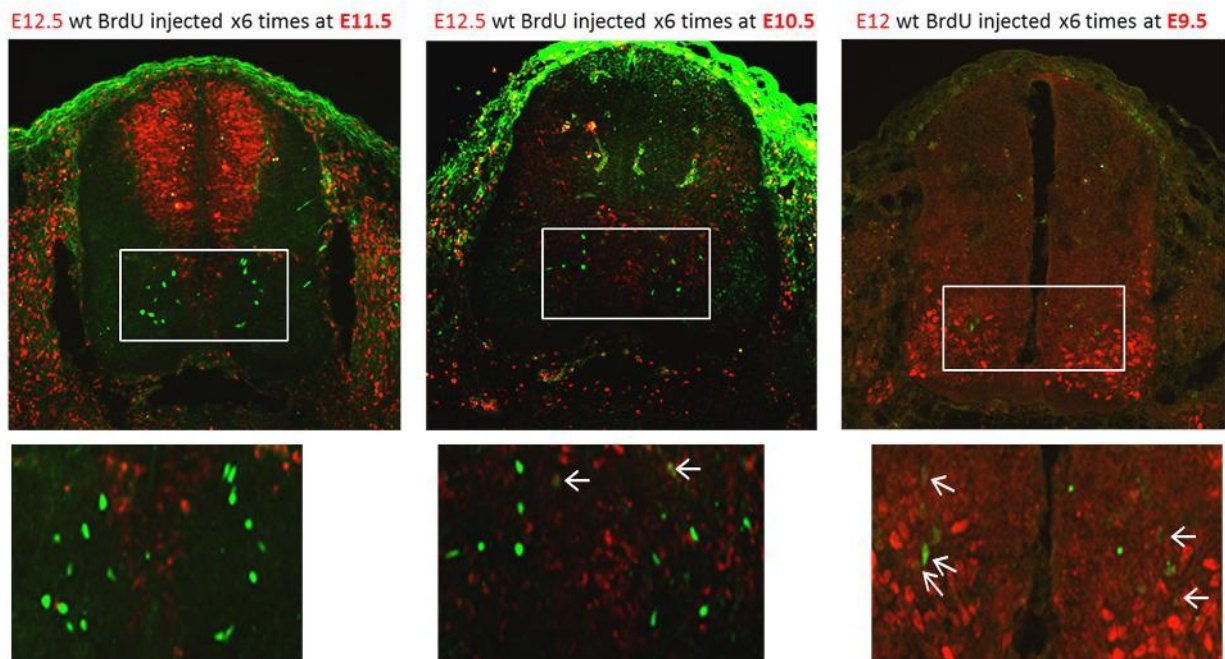
Σε αυτή την ενότητα εργασίας περιγράφεται η μελέτη των αναπτυξιακών γεγονότων που οδηγούν στη διαφοροποίηση των Pitx2+ διαμέσων νευρώνων. Στα πλαίσια αυτής της μελέτης, προσδιορίζεται πότε οι νευρώνες αυτοί γίνονται μετα-μιτωτικοί και γίνεται μία προσπάθεια κατανόησης των μηχανισμών που εμπλέκονται στη διαφοροποίησή τους.

-ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΡΟΝΟΥ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΤΩΝ PITX2 ΔΙΑΜΕΣΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ

Προκειμένου να προσδιοριστεί ο χρόνος δημιουργίας των Pitx2+ νευρώνων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των διαμέσων νευρώνων του νωτιαίου μυελού και να διαπιστωθεί εάν οι Pitx2+ νευρώνες γεννιούνται σε συγκεκριμένο χρονικό παράθυρο, για παράδειγμα νωρίς (e9.5) ή αργά (e11.5), σε σχέση με τον συνολικό V0 υποπληθυσμό, χρησιμοποιήθηκε η σήμανση με 5'-βρωμοδεοξουριδίνη (BrdU). Συγκεκριμένα, ενέθηκε διάλυμα 5'-βρωμοδεοξουριδίνης σε έγκυα ποντίκια διαφόρων εμβρυικών ημερών (e9.5, e10.5, e11.5). Συνολικά χορηγήθηκαν 6 ενέσεις σε 12 ώρες (1 ένεση κάθε 2 ώρες) ώστε να εξασφαλιστεί η διαθεσιμότητα της BrdU στην κυκλοφορία του ζώου. Τα έμβρυα απομονώθηκαν σε εμβρυικές ηλικίες μεγαλύτερες των e11.5, διότι τότε αρχίζει να εκφράζεται η πρωτεΐνη Pitx2 και μπορούμε να εντοπίσουμε τους νευρώνες που την εκφράζουν. Περίπου μέχρι την ηλικία e12.5 όλοι οι νευρώνες που εκφράζουν την πρωτεΐνη Pitx2 έχουν αρχίσει την έκφρασή της (Rozani, αδημοσίευτα αποτελέσματα του εργαστηρίου). Στη συνέχεια, μονιμοποιήθηκαν, κόπηκαν σε κρουστομές και πραγματοποιήθηκαν

πειράματα ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση Pitx2 και ενσωμάτωσης BrdU (**Εικόνα 15**). Τέλος, μετρήθηκαν, για κάθε ηλικία, οι νευρώνες που εκφράζουν μόνο Pitx2 ή εκφράζουν Pitx2 και έχουν ενσωματώσει BrdU ταυτόχρονα και υπολογίστηκε το ποσοστό των Pitx2 θετικών νευρώνων που γεννήθηκαν στο συγκεκριμένο διάστημα (**Πίνακας 2**).

Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 2Α**, οι ενέσεις σε e11.5 έμβρυα δεν έδωσαν νευρώνες που να εκφράζουν Pitx2 και ταυτόχρονα να έχουν ενσωματώσει BrdU. Επομένως, διαπιστώθηκε ότι οι Pitx2+ διάμεσοι νευρώνες γεννιούνται πριν από την εμβρυική μέρα e11.5. Όταν οι ενέσεις έγιναν σε μικρότερα έμβρυα, ημέρας e10.5, περίπου στο ένα τρίτο με ένα τέταρτο των νευρώνων που προέκυψαν ανιχνεύονται και τα δύο αντιγόνα (**Πίνακας 2Β**). Όταν οι ενέσεις έγιναν σε ακόμα μικρότερα έμβρυα (ενέσεις σε e9.5), το ποσοστό των Pitx2 νευρώνων που ενσωμάτωσαν BrdU και ανιχνεύονται την εμβρυική μέρα e12 ανέρχεται στο 70% (**Πίνακας 2C**). Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να ερμηνευτεί με δύο τρόπους. Είτε υπάρχει και ένα μικρό ποσοστό Pitx2+ νευρώνων που γεννιούνται νωρίτερα από την εμβρυική ημέρα e9.5, είτε γεννιούνται όλοι μεταξύ e9.5 και e11.5 αλλά υπάρχει μερική σήμανση με BrdU και δεν μπορούμε να τους δούμε όλους. Συμπερασματικά, με τα παραπάνω πειράματα προσδιορίστηκε ότι οι Pitx2 νευρώνες δεν γεννιούνται σε ένα στενό χρονικό παράθυρο κατά την περίοδο που οι V0 νευρώνες διαφοροποιούνται, αλλά σε ένα ευρύ χρονικό διάστημα.



Εικόνα 15: Τομές νωτιαίου μυελού από e12 και e12.5 έμβρυα ποντικών προερχόμενα από έγκυες μητέρες στις οποίες είχε ενεθεί BrdU την εμβρυική μέρα e9.5, e10.5 και e11.5 αντίστοιχα. Με βέλη καταδεικνύονται οι νευρώνες που έχουν σημανθεί με anti- Pitx2 και anti-BrdU αντισώματα ταυτόχρονα. Τομές πάχους 14μm.

A.

inje11.5-12	% Pitx2-BrdU/Pitx2 neurons
e12.25	0
E12.5	1.53%
e12.75	0

B.

inje10.5-11	% Pitx2-BrdU/Pitx2 neurons
e11.5	25%
e12	33.33%
e12.5	26.82%
e13	22.58%

C.

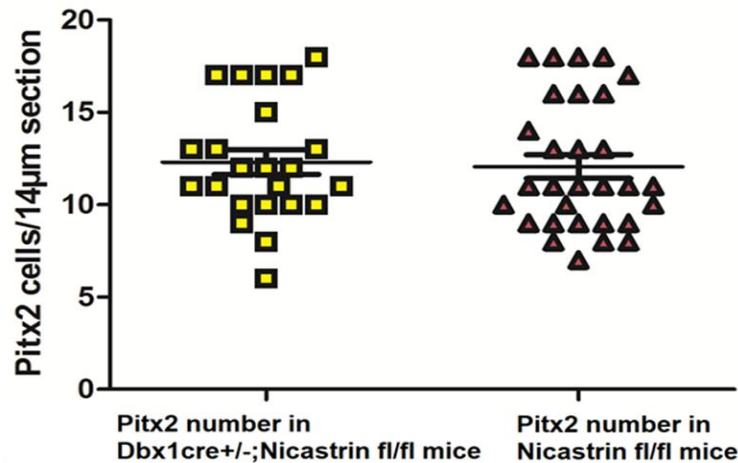
inje9.5-10	% Pitx2-BrdU/Pitx2 neurons
e11.5	48.38%
e12	70.83%

Πίνακας 2: Αριθμός των νευρώνων που εκφράζουν Pitx2 και ταυτόχρονα έχουν ενσωματώσει BrdU. Σε κάθε μία από τις εμβρυικές μέρες (e11.5, e10.5, e9.5) ενέθηκε διάλυμα BrdU σε 1-2 έγκυα ποντίκια, από τα οποία απομονώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις 6-7 έμβρυα στις εμβρυικές ηλικίες e11.5, e12, e12.25, e12.75, e13. Μετρήθηκαν νευρώνες σε τομές πάχους 14 μm που απομονώθηκαν και από τις τρεις μοίρες του εμβρυικού νωτιαίου μυελού (βραχιόνια μοίρα- brachial, θωρακική μοίρα- thoracic, οσφυϊκή μοίρα- lumbar).

- ΜΕΛΕΤΗ ΠΙΘΑΝΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ NOTCH

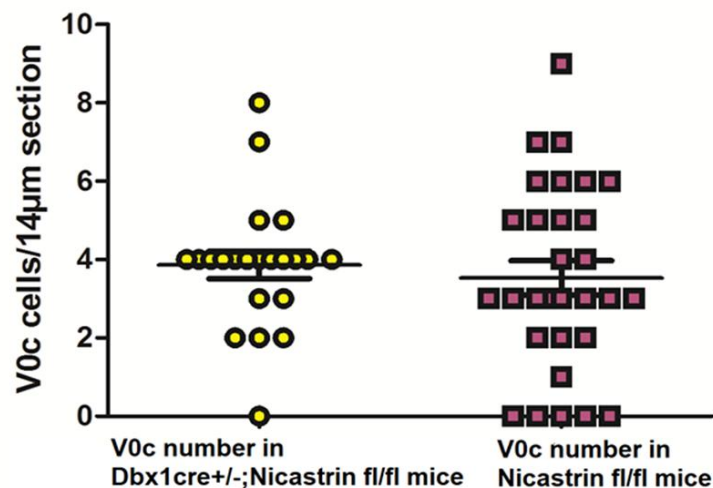
Για τη μελέτη ενός πιθανού ρόλου του μονοπατιού Notch στην ανάπτυξη των Pitx2+ διάμεσων νευρώνων, πραγματοποιήθηκαν διασταυρώσεις διαγονιδιακών σειρών στις οποίες υπάρχει βλάβη στο μονοπάτι Notch. Πιο συγκεκριμένα, διασταυρώθηκαν Dbx1::cre ποντίκια με μία σειρά ποντικών, την Nicastrin fl/fl, για ιστοειδική απενεργοποίηση της Nicastrin, (μία υπομονάδα του συμπλόκου της γ-σεκρετάσης, της πρωτεάσης που φυσιολογικά πρωτεολύει το σύμπλοκο Notch-μορίου προσδέτη και καθιστά τα τέσσερα γονίδια Notch ενεργά). Στα ποντίκια γονοτύπου Dbx1cre+/-; Nicastrin fl/fl ελέγχθηκε αν η βλάβη στο μονοπάτι Notch επηρεάζει τον αριθμό των Pitx2+ νευρώνων που έχουν διαφοροποιηθεί. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο αριθμός των Pitx2+ νευρώνων δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των πειραματικών ζώων (Dbx1cre+/-; Nicastrin fl/fl) και των ζώων που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (Nicastrin fl/fl) (P value=0,8014>0,05) (**Γράφημα 2Α**). Επιπροσθέτως, δεν βρέθηκε κάποια σημαντική διαφορά ούτε στον αριθμό των χολινεργικών Pitx2+ νευρώνων (V0c) μεταξύ των δύο ομάδων (P value=0,5791>0,05) (**Γράφημα 2Β**).

P value 0,8014



Γράφημα 2Α: Η βλάβη στο μονοπάτι Notch δεν επηρεάζει τον αριθμό των Pitx2+ νευρώνων στα πειραματικά ζώα (Dbx1cre+/-; Nicastrin fl/fl). Ο αριθμός των νευρώνων δεν διαφέρει από αυτόν των ζώων ελέγχου (Nicastrin fl/fl) (P value=0,8014>0,05). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τρία (n=3) πειραματικά και τέσσερα (n=4) ζώα ελέγχου και μετρήθηκαν νευρώνες σε τομές πάχους 14 µm που απομονώθηκαν και από τις τρεις μοίρες του νωτιαίου μυελού (άνω οσφυϊκή μοίρα- upper lumbar, θωρακική μοίρα- thoracic, κάτω οσφυϊκή μοίρα- lower lumbar).

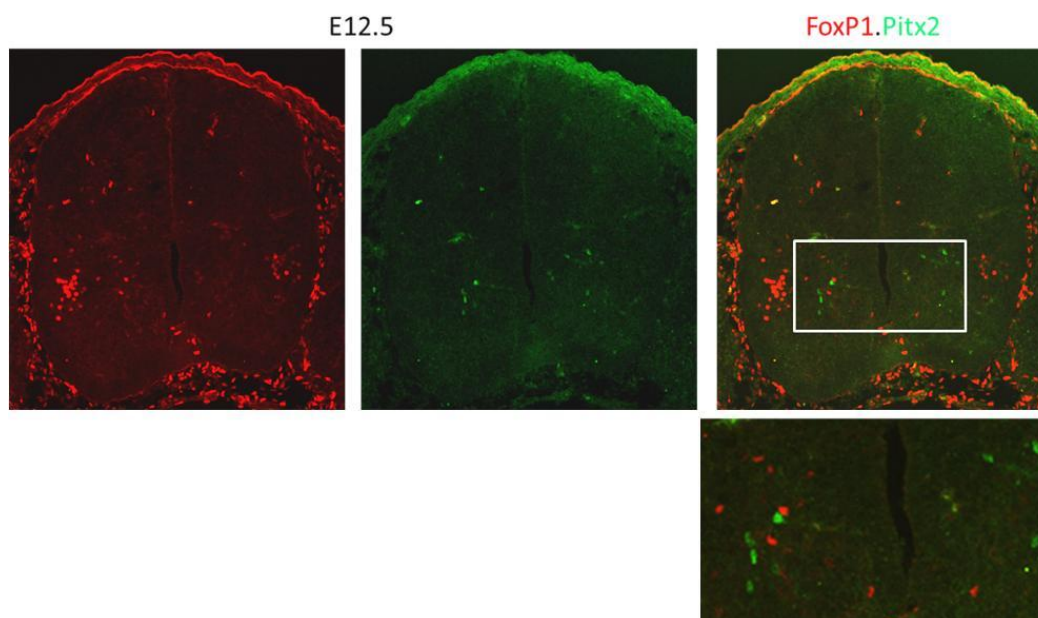
P value 0,5791



Γράφημα 2Β: Η βλάβη στο μονοπάτι Notch δεν επηρεάζει τον αριθμό των χολινεργικών Pitx2+ νευρώνων (V0c) στα πειραματικά ζώα (Dbx1cre+/-; Nicastrin fl/fl). Ο αριθμός των V0c νευρώνων δεν διαφέρει από αυτόν των ζώων ελέγχου (Nicastrin fl/fl) (P value=0,8014>0,05). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τρία (n=3) πειραματικά και τέσσερα (n=3) ζώα ελέγχου και μετρήθηκαν νευρώνες σε τομές πάχους 14 µm που απομονώθηκαν και από τις τρεις μοίρες του νωτιαίου μυελού (άνω οσφυϊκή μοίρα- upper lumbar, θωρακική μοίρα- thoracic, κάτω οσφυϊκή μοίρα- lower lumbar).

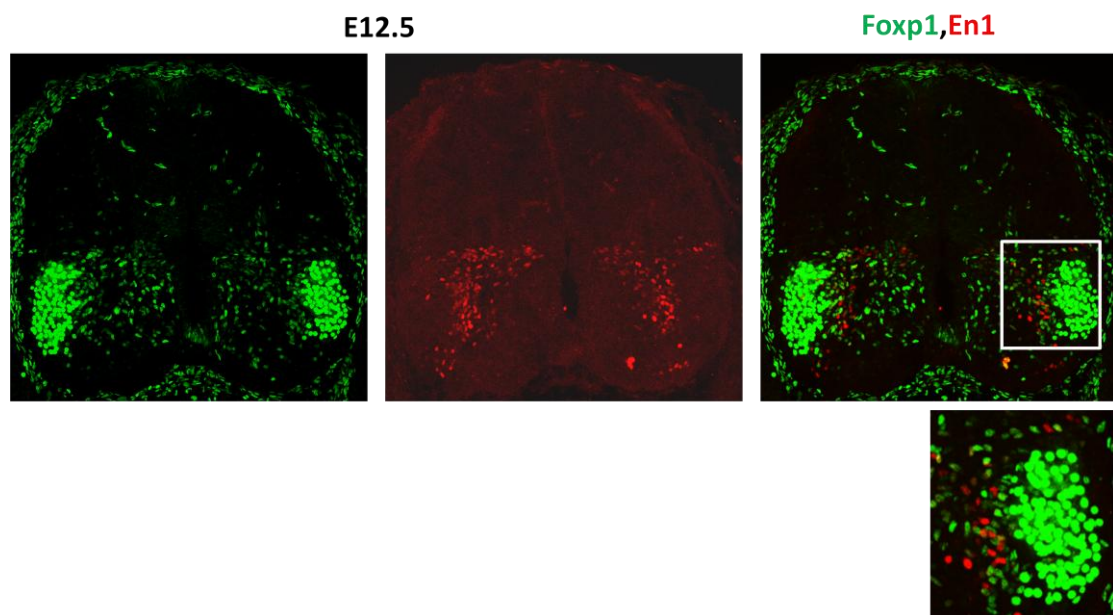
- ΜΕΛΕΤΗ ΠΙΘΑΝΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ HOX ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

Τα γονίδια Hox έχουν ήδηδειχθεί σημαντικά για τον προσδιορισμό των διαφορετικών ταυτοτήτων των κινητικών νευρώνων στον νωτιαίο μυελό. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την ευρεία έκφραση Hox μεταγραφικών παραγόντων στους νευρώνες κατά μήκος του νωτιαίου μυελού, υποστηρίζει μία πιθανή συμμετοχή των Hox πρωτεϊνών στη διαφοροποίηση και τη λειτουργία και των διάμεσων νευρώνων. Και οι 39 Hox παράγοντες που καθορίζουν την ταυτότητα των κινητικών νευρώνων χρησιμοποιούν τον Foxp1 ως βοηθητικό παράγοντα (Dasen et al., 2008) και απομάκρυνση του (Foxp1 fl/fl) σταματά το σηματοδοτικό μονοπάτι Hox, οδηγώντας το νωτιαίο κινητικό σύστημα σε μία προγονική μορφή. Επειδή ο Foxp1 έχειδειχθεί ότι εκφράζεται σε πληθυσμό διάμεσων νευρώνων στο κοιλιακό τμήμα του νωτιαίου μυελού, τους V1 διάμεσους νευρώνες (Morikawa et al., 2009), εξετάστηκε αν αυτός εκφράζεται και στους Pitx2 διάμεσους νευρώνες. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού, ώστε να ελεγχθεί αν κάποιοι Pitx2+ διάμεσοι νευρώνες εκφράζουν τον Foxp1. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δυστυχώς ο Foxp1 δεν εκφράζεται σε Pitx2 διάμεσους νευρώνες (**Εικόνα 16**).



Εικόνα 16: Τομή νωτιαίου μυελού από έμβρυο ποντικού ηλικίας e12.5 έπειτα από ανοσοφθορισμό με τα anti-FoxP1 και anti-Pitx2 αντισώματα. Δεν υπάρχουν νευρώνες που να εκφράζουν και τους δύο παράγοντες ταυτόχρονα. Τομή πάχους 14μm.

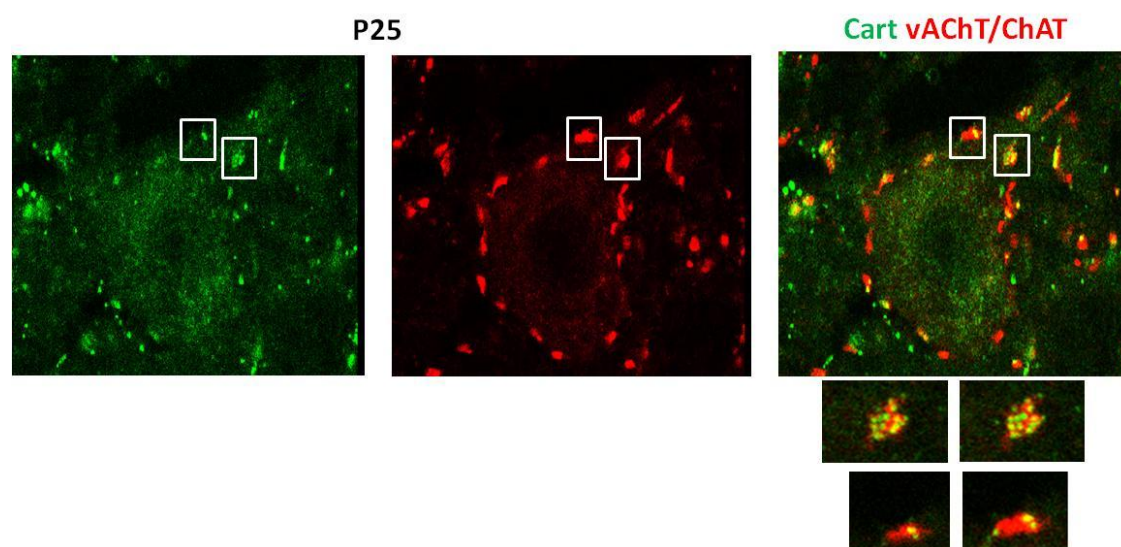
Αντίθετα, τα πειράματα ανοσοφθορισμού για τον μοριακό δείκτη *Engrailed 1* (*En1*) και τον *Foxp1* παράγοντα έδειξαν ότι ο *Foxp1* εκφράζεται στους V1 διάμεσους νευρώνες (**Εικόνα 17**), επιβεβαιώνοντας την βιβλιογραφία που υποστηρίζει ότι εκφράζεται τόσο στους κινητικούς νευρώνες όσο και στους V1 διάμεσους νευρώνες (Morikawa et al., 2009). Επομένως, στους *Pitx2* διάμεσους νευρώνες, εάν παίζουν κάποιο ρόλο οι *Hox* πρωτεΐνες, δρα κάποιος άλλος βοηθητικός παράγοντας των *Hox* (*Meis* και *Pbx*) και δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί το *Foxp1* εργαλείο για αυτή τη μελέτη.



Εικόνα 17: Τομή νωτιαίου μυελού από έμβρυο ποντικού ηλικίας e12.5 έπειτα από ανοσοφθορισμό με τα anti-FoxP1 και anti-En1 αντισώματα. Οι V1 διάμεσοι νευρώνες εκφράζουν τον *Foxp1* παράγοντα. Τομή πάχους 14μm.

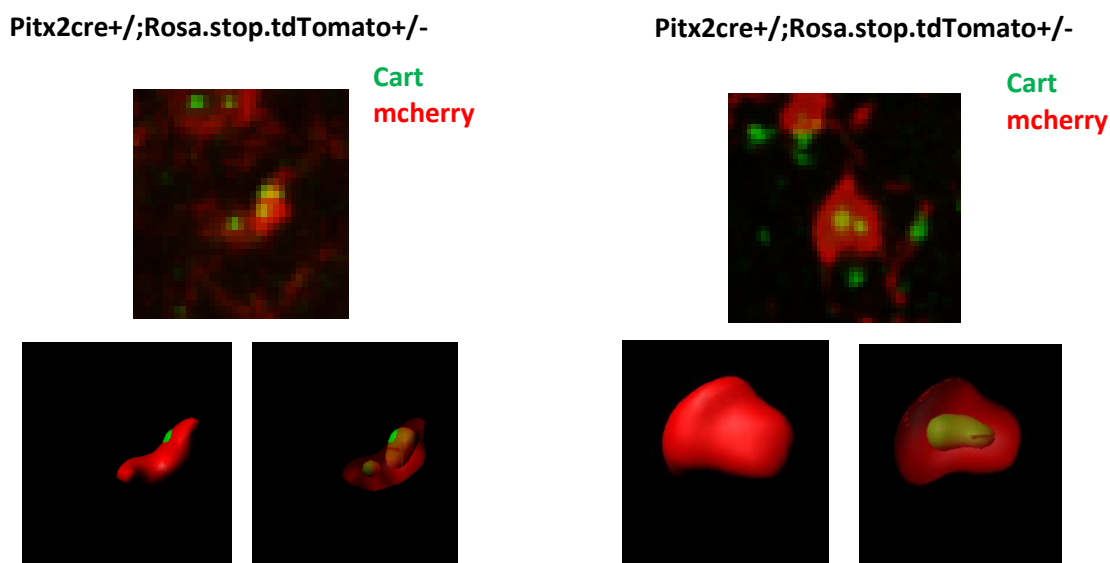
ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CART ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΣΤΟΥΣ ΡΙΤΧ2 ΝΕΥΡΩΝΕΣ

Όπως ήδη έχει περιγραφεί στην ενότητα της εισαγωγής, σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του Cart νευροπεπτιδίου στα σώματα όλων των V0c νευρώνων στον νωτιαίο μυελό. Έτσι, το επόμενο βήμα ήταν να ελεγχθεί αν το Cart εντοπίζεται και στη σύναψη C bouton των V0c νευρώνων πάνω στους κινητικούς νευρώνες. Για τον λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού για τους χολινεργικούς δείκτες (vAChT /ChAT-παράγονται στο ίδιο είδος, μαζί στο κανάλι) και για το Cart και επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του νευροπεπτιδίου και μέσα στη σύναψη C bouton, υπό τη μορφή κουκκίδων (**Εικόνα 18**). Έτσι, ο συνεντοπισμός του με τους χολινεργικούς δείκτες (vAChT /ChAT) επιβεβαίωσε ότι στη C bouton χολινεργική σύναψη, εκτός από την ακετυλοχολίνη (ACh), υπάρχει και το Cart ως δεύτερος νευροδιαβιβαστής.



Εικόνα 18: Τομή νωτιαίου μυελού από ποντίκι ηλικίας P25 έπειτα από ανοσοφθορισμό με τα anti-vAChT και anti-ChAT (μαζί στο κανάλι) και anti-Cart αντισώματα. Το Cart εκφράζεται στα C boutons. Τομή πάχους 2μm.

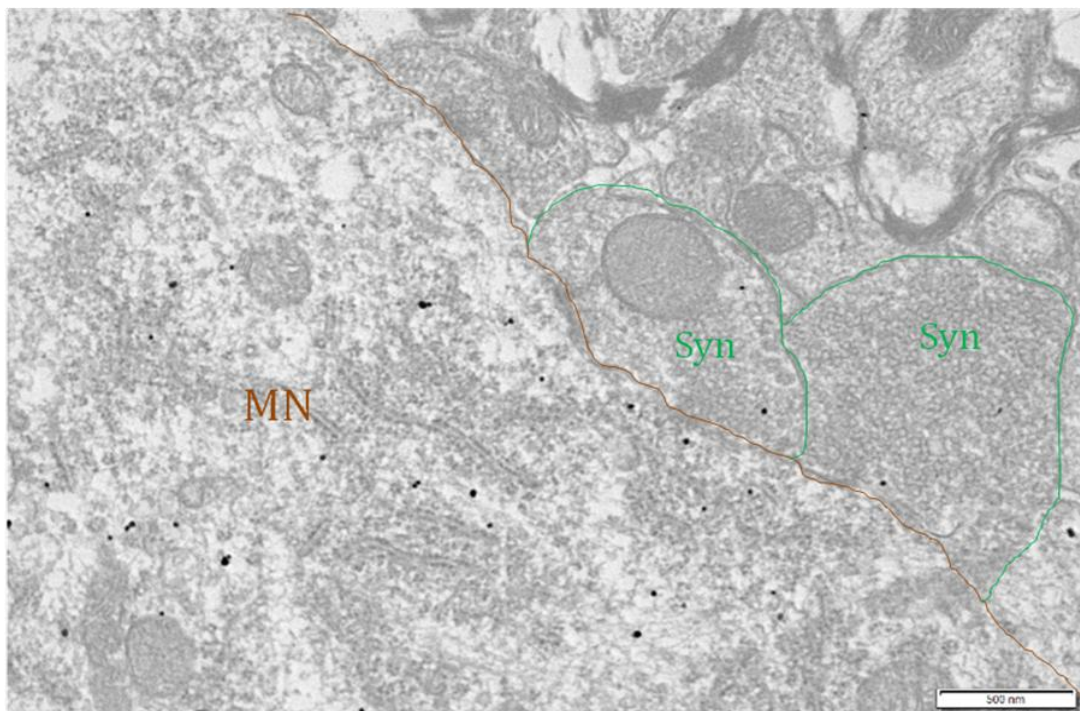
Παράλληλα, επειδή οι φωτογραφίες από το συνεστιακό μικροσκόπιο δεν έκαναν σαφές αν όλες οι κουκκίδες του Cart νευροπεπτιδίου βρίσκονται μέσα στη σύναψη ή είναι πολύ κοντά, χρησιμοποιήθηκε το IMARIS SOFTWARE προκειμένου να πραγματοποιηθεί μία 3D απεικόνιση των συνάψεων. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια γονοτύπου *Pitx2cre+/-;Rosa.stop.tdTomato+/-*, στα οποία εκφράζεται κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη στα σώματα και τις συνάψεις (C boutons) των *Pitx2+* νευρώνων, και πραγματοποιήθηκε ανασοφθορισμός για το Cart. Στην **Εικόνα 19** φαίνονται οι φωτογραφίες δύο C bouton συνάψεων όπως έχουν ληφθεί από το συνεστιακό μικροσκόπιο (πάνω), οι 3D απεικονίσεις τους (κάτω αριστερά) και οι 3D απεικονίσεις με διαφανοποίηση των κόκκινων συνάψεων (κάτω δεξιά). Όντως, μέσω αυτής της ανάλυσης, επιβεβαιώθηκε ο εντοπισμός της πλειοψηφίας των Cart κουκκίδων μέσα στη C bouton σύναψη, ενώ σε μικρό ποσοστό εντοπίζεται μέρος των κουκκίδων μέσα στη σύναψη ή εντελώς έξω από αυτή.



Εικόνα 19: 3D απεικόνιση μέσω του IMARIS SOFTWARE δύο C bouton συνάψεων από τομές νωτιαίου μυελού ποντικών ηλικίας P25, έπειτα από ανοσοφθορισμό με τα anti-Cart και anti-mcherry αντισώματα. Τομές πάχους 14μm.

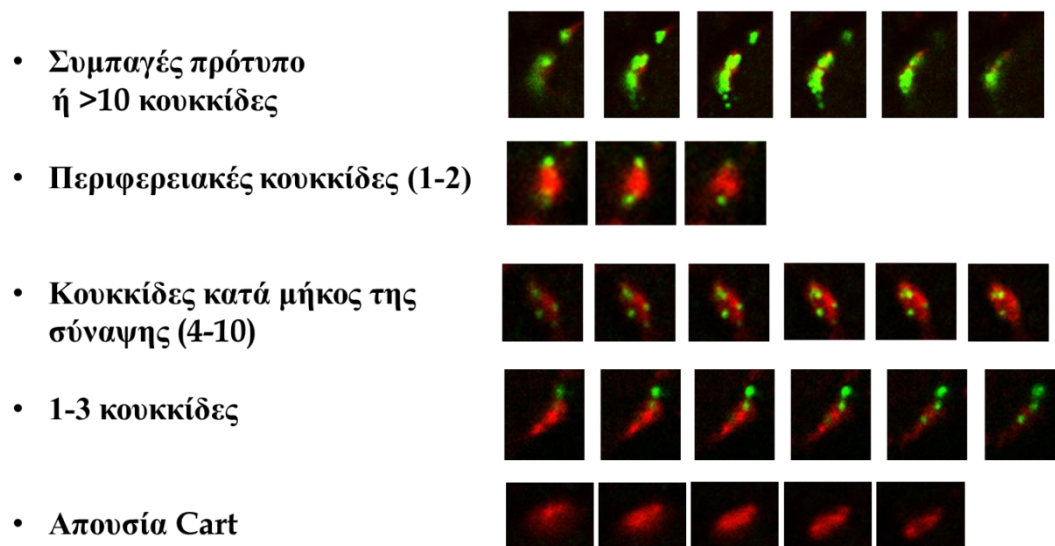
Επιπλέον, έγινε μία προσπάθεια μελέτης των C bouton συνάψεων με ηλεκτρονική μικροσκοπία για να εντοπιστεί η ακριβής θέση του Cart στη σύναψη. Τα διαθέσιμα αντισώματα έχουν παραχθεί στο ίδιο είδος και δεν ήταν

εφικτό να χρησιμοποιηθούν σε διπλό ανοσοφθορισμό. Επομένως, ο ανοσοεντοπισμός για το vAChT και το Cart πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές σειριακές τομές νωτιαίου μυελού αγρίου τύπου ποντικών ηλικίας ενός μήνα. Η παρατήρηση των τομών που επωάστηκαν με anti-vAChT αντίσωμα στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης, έδειξε εντοπισμό του vAChT στο κυτταρόπλασμα (και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο) των κινητικών νευρώνων αλλά και σε συνάψεις που αναγνωρίζουμε ότι είναι C boutons (**Εικόνα 20**). Έτσι, ήταν δυνατή η αναγνώριση των C boutons στις φωτογραφίες που λήφθηκαν. Αντίθετα, στις τομές που βάφτηκαν με anti-Cart αντίσωμα, δεν επιτεύχθηκε ειδική σήμανση. Συγκεκριμένα, όλοι οι κινητικοί νευρώνες έδωσαν σήμα Cart, ενώ η βάση δεδομένων *in situ* υβριδοποίησης allen brain atlas και πειράματα του εργαστηρίου έχουν δείξει ότι το Cart δεν εκφράζεται ποτέ σε πάνω από 10% των κινητικών νευρώνων. Στο μέλλον, θα επαναληφθεί το ίδιο πείραμα με διαφορετικό Cart αντίσωμα.



Εικόνα 20: Φωτογραφία από Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης τομής που έχει βαφτεί με anti-vAChT αντίσωμα. Το vAChT εντοπίζεται ως νανοσωματίδιο χρυσού (μαύρες κουκίδες) στο κυτταρόπλασμα (και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο) του κινητικού νευρώνα (αριστερά-κεραμιδί) και στα C boutons (δεξιά-πράσινο). Τομές πάχους 65 nm.

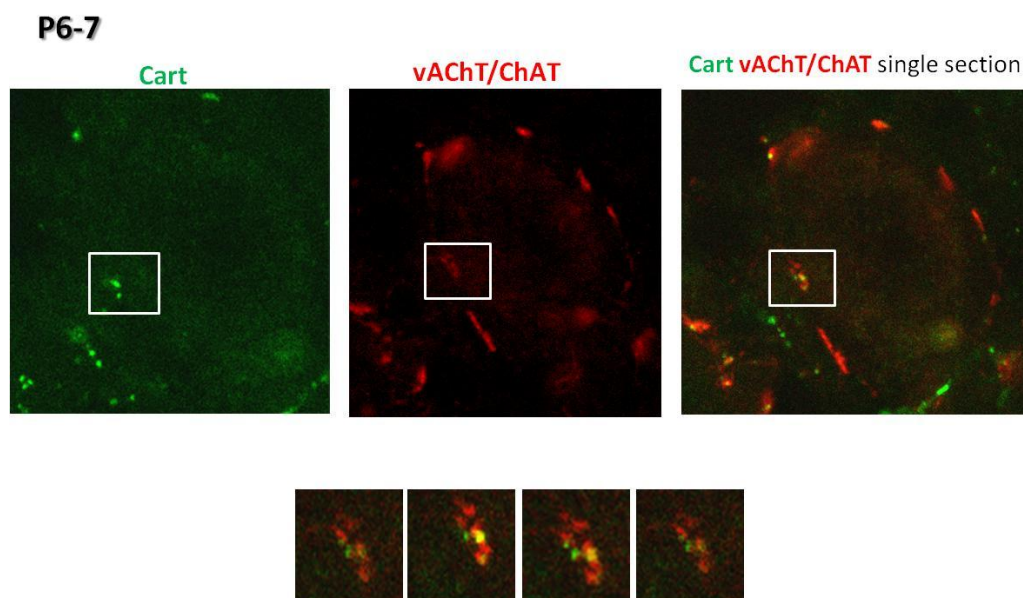
Εντύπωση προκάλεσε το γεγονός ότι οι κουκκίδες του Cart νευροπεπτιδίου εντοπίζονται μέσα στη σύναψη σε διάφορες μορφές. Οι μορφές στις οποίες εμφανίζεται το Cart μέσα σε C boutons κατηγοριοποιήθηκαν σε πέντε βασικά πρότυπα κατανομής (**Εικόνα 21**). Έτσι, ένα C bouton μπορεί να φέρει α) πολλές κουκκίδες Cart μαζί που να σχηματίζουν ένα συμπαγές πρότυπο, β) περιφερειακές κουκκίδες, συνήθως μία ή δύο, γ) παραπάνω από τρεις και έως δέκα κουκκίδες κατά μήκος της σύναψης, δ) μόνο ελάχιστες κουκκίδες, από μία μέχρι τρεις, οι οποίες όμως βρίσκονται μέσα στη σύναψη ή τέλος ε) να μην φέρει καθόλου Cart.



Εικόνα 21: Πρότυπα κατανομής του Cart στη σύναψη C bouton.

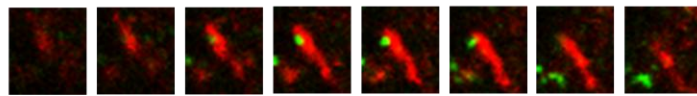
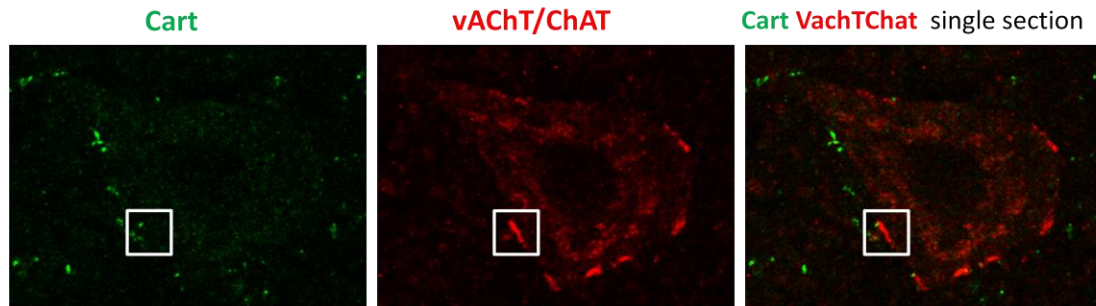
ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CART ΣΤΑ C BOUTONS

Επειδή το Cart δεν εντοπίζεται σε όλες τις C bouton συνάψεις, ακολουθήθηκε μία αναπτυξιακή, ανατομική προσέγγιση για τη μελέτη της έκφρασής του. Αρχικά, μελετήθηκε η κατανομή του στα C boutons αγρίου τύπου ποντικών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και πιο συγκεκριμένα σε έξι διαφορετικές ηλικίες αναφοράς: 1) την ημέρα P6-7 μετά τη γέννηση- στην οποία έχουν μόλις ξεκινήσει να σχηματίζονται οι χολινεργικές συνάψεις στους κινητικούς νευρώνες του νωτιαίου μυελού, 2) την ημέρα P10, 3) την ημέρα P25, 4) σε ενήλικα ζώα 8-9 εβδομάδων, 5) σε ζώα έξι μηνών και τέλος 6) σε ηλικιωμένα ζώα ενός έτους. Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η παρατήρηση του γενικού προτύπου με το οποίο το νευροπεπτίδιο Cart εμφανίζεται στη C bouton σύναψη. Στις **Εικόνες 22α-στ** φαίνονται κινητικοί νευρώνες από τον νωτιαίο μυελό ποντικών των προαναφερθεισών ηλικιών ύστερα από ανοσοφθορισμό για: 1) το νευροπεπτίδιο Cart (πράσινο) και 2) τους χολινεργικούς δείκτες vAChT / ChAT (κόκκινο).

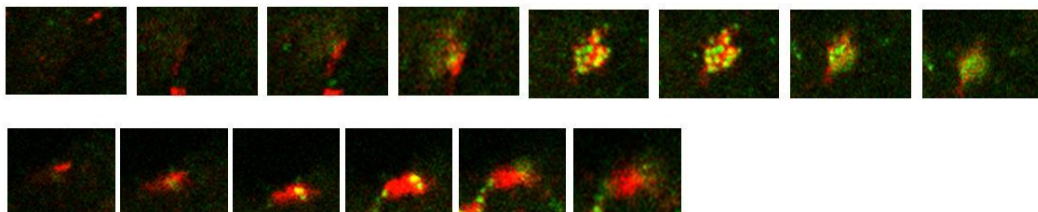
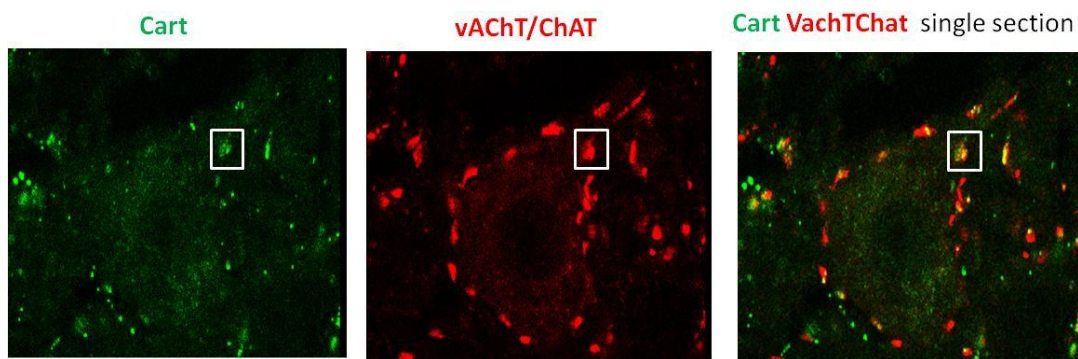


Εικόνα 22α: Εντοπισμός του Cart σε C boutons σε τομές νωτιαίου μυελού από ποντίκια αγρίου τύπου ηλικίας P6-7. Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία με αντισώματα έναντι του νευροπεπτιδίου Cart (πράσινο) και των χολινεργικών δεικτών vAChT/ChAT (κόκκινο). Οι περιοχές που επισημαίνονται είναι χολινεργικές συνάψεις (C boutons) στις οποίες εντοπίζονται και οι δύο νευροδιαβιβαστές. Τομή πάχους 2μm.

P10

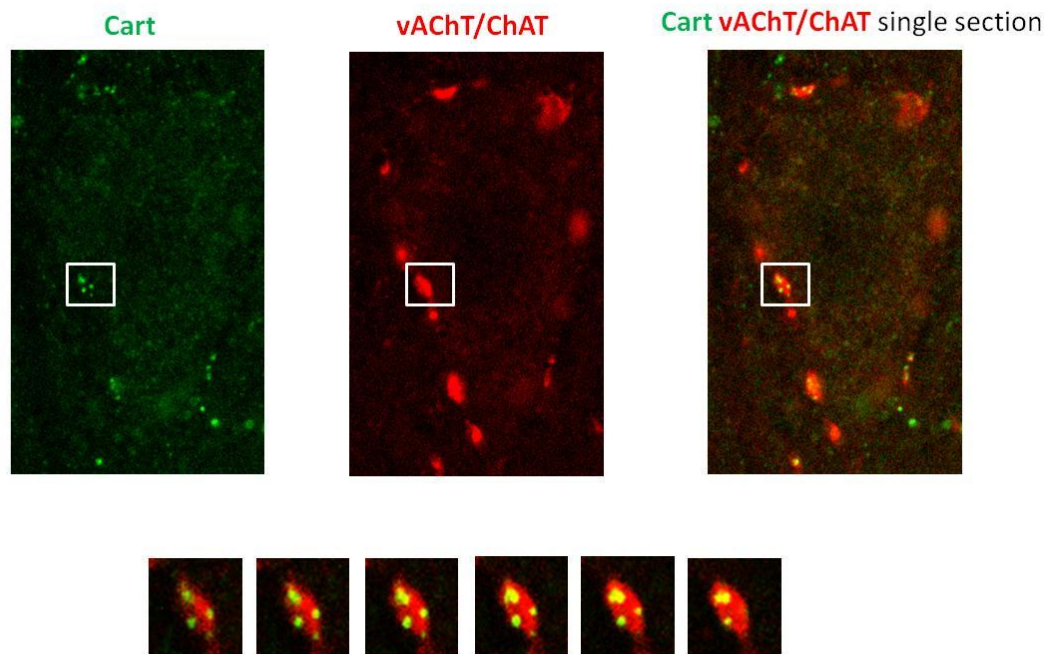


Εικόνα 22β: Εντοπισμός του Cart σε C boutons σε τομές νωτιαίου μυελού από ποντίκια αγρίου τύπου ηλικίας P10. Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία με αντισώματα έναντι του νευροπεπτιδίου Cart (πράσινο) και των χολινεργικών δεικτών vAChT/ChAT (κόκκινο). Οι περιοχές που επισημαίνονται είναι χολινεργικές συνάψεις (C boutons) στις οποίες εντοπίζονται και οι δύο νευροδιαβιβαστές. Τομή πάχους 2μm.



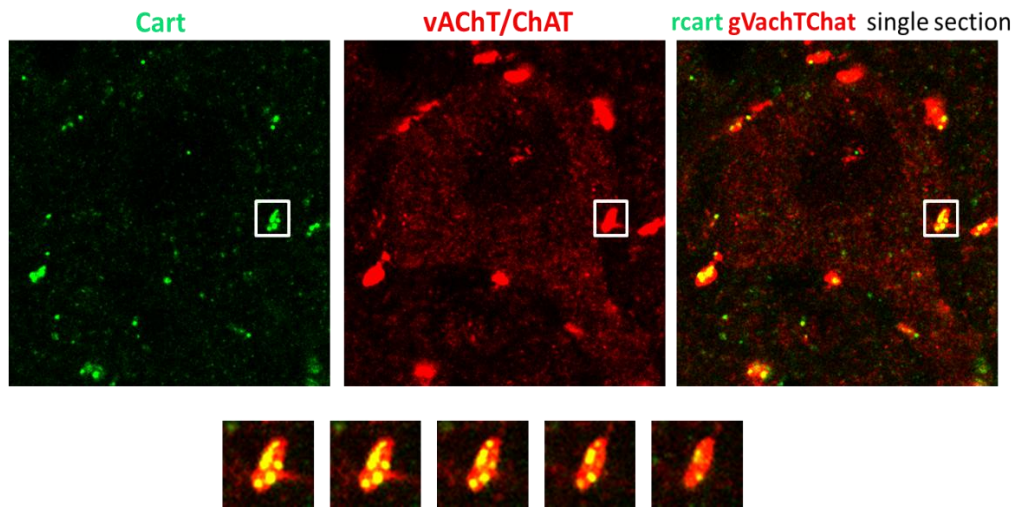
Εικόνα 22γ: Εντοπισμός του Cart σε C boutons σε τομές νωτιαίου μυελού από ποντίκια αγρίου τύπου ηλικίας P25. Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία με αντισώματα έναντι του νευροπεπτιδίου Cart (πράσινο) και των χολινεργικών δεικτών vAChT/ChAT (κόκκινο). Οι περιοχές που επισημαίνονται είναι χολινεργικές συνάψεις (C boutons) στις οποίες εντοπίζονται και οι δύο νευροδιαβιβαστές. Τομή πάχους 2μm.

8-9 weeks



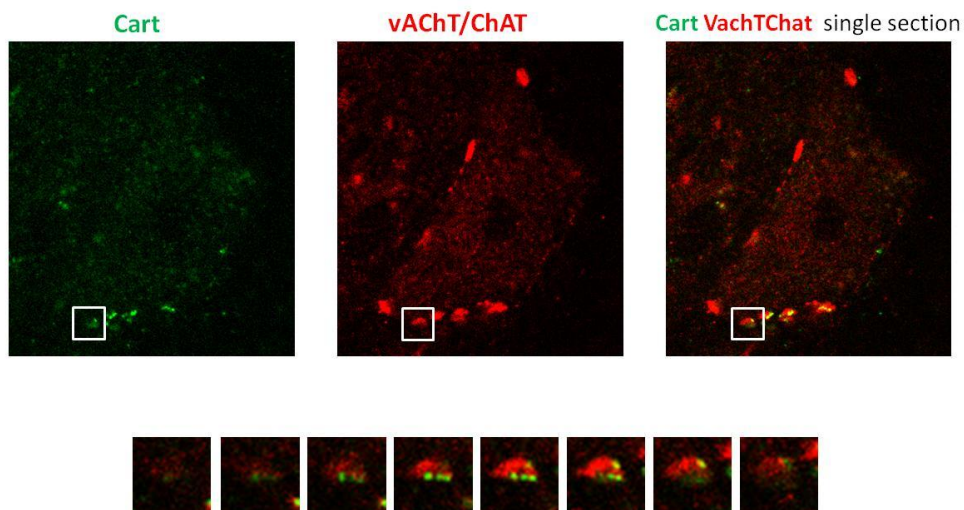
Εικόνα 22δ: Εντοπισμός του Cart σε C boutons σε τομές νωτιαίου μυελού από ποντίκια αγρίου τύπου ηλικίας 8-9 εβδομάδων. Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία με αντισώματα έναντι του νευροπεπτιδίου Cart (πράσινο) και των χολινεργικών δεικτών vAChT/ChAT (κόκκινο). Οι περιοχές που επισημαίνονται είναι χολινεργικές συνάψεις (C boutons) στις οποίες εντοπίζονται και οι δύο νευροδιαβιβαστές. Τομή πάχους 2μm.

6 months old



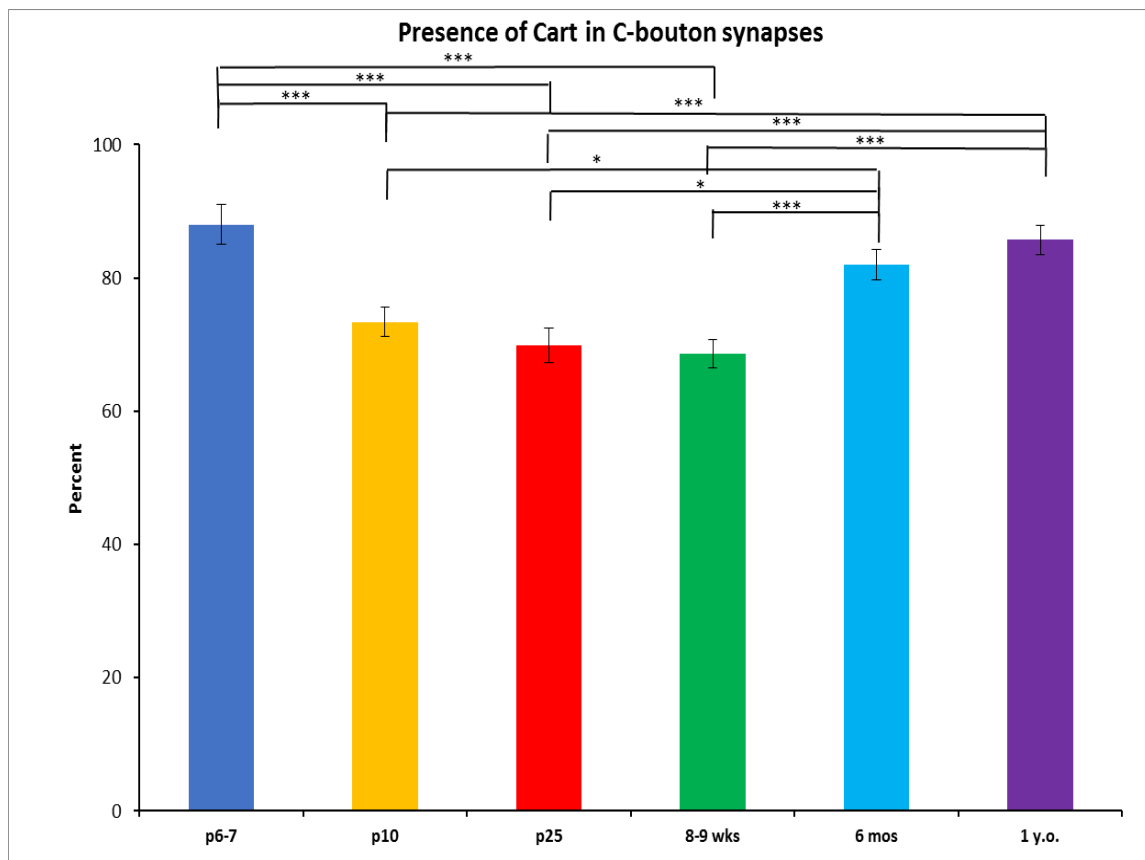
Εικόνα 22ε: Εντοπισμός του Cart σε C boutons σε τομές νωτιαίου μυελού από ποντίκια αγρίου τύπου ηλικίας 6 μηνών. Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία με αντισώματα έναντι του νευροπεπτιδίου Cart (πράσινο) και των χολινεργικών δεικτών vAChT/ChAT (κόκκινο). Οι περιοχές που επισημαίνονται είναι χολινεργικές συνάψεις (C boutons) στις οποίες εντοπίζονται και οι δύο νευροδιαβιβαστές. Τομή πάχους 2μm.

1 year old



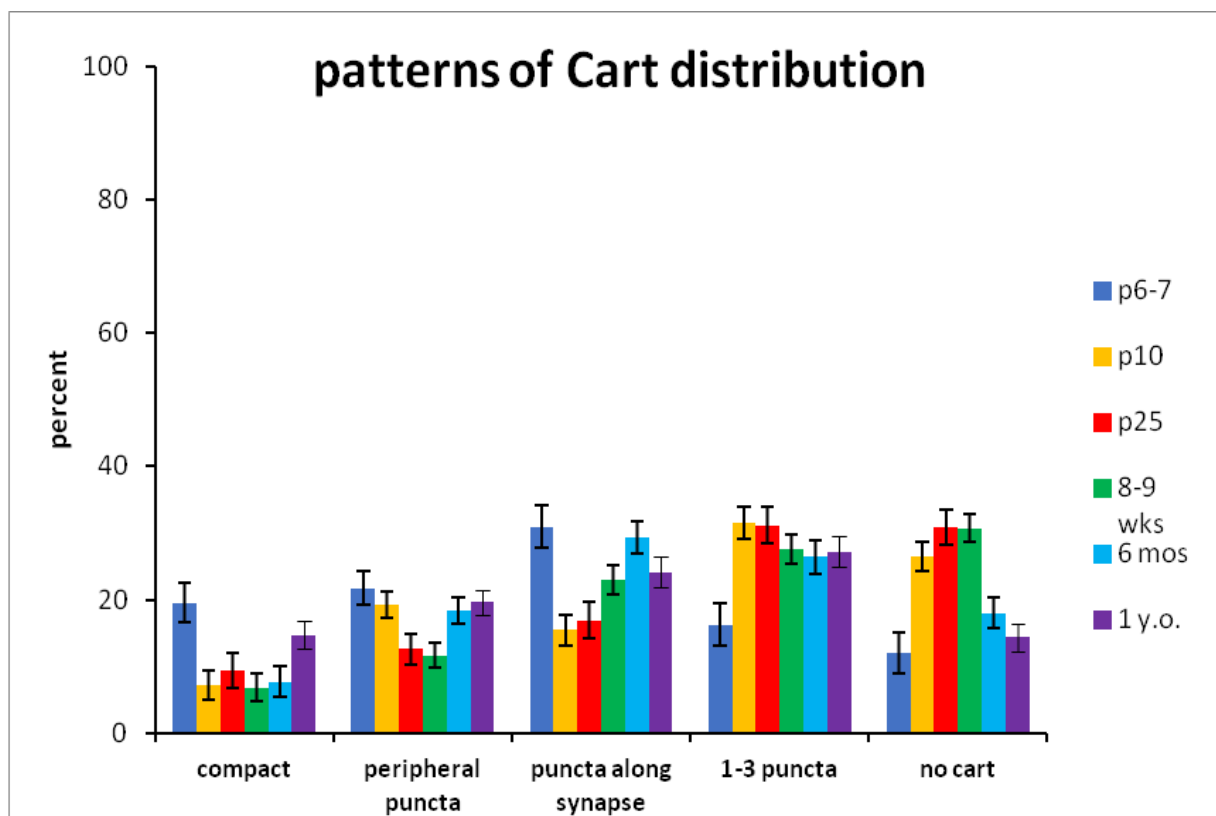
Εικόνα 22στ: Εντοπισμός του Cart σε C boutons σε τομές νωτιαίου μυελού από ποντίκια αγρίου τύπου ηλικίας ενός έτους. Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία με αντισώματα έναντι του νευροπεπτιδίου Cart (πράσινο) και των χολινεργικών δεικτών vAChT/ChAT (κόκκινο). Οι περιοχές που επισημαίνονται είναι χολινεργικές συνάψεις (C boutons) στις οποίες εντοπίζονται και οι δύο νευροδιαβιβαστές. Τομή πάχους 2μm.

Η ύπαρξη του Cart νευροπεπτιδίου στη χολινεργική σύναψη C bouton, εξετάστηκε υπολογίζοντας το ποσοστό των συνάψεων που το περιέχουν. Τα αποτελέσματα όλων των ηλικιών αναφοράς φαίνονται στο **Γράφημα 3**. Η ανάλυση έδειξε ότι στα νεαρότερα ποντίκια ηλικίας P6-7 το 88% των C bouton συνάψεων πάνω στους κινητικούς νευρώνες-που μόλις έχουν αρχίσει να σχηματίζονται και έχουν μικρό μέγεθος-περιέχουν Cart, παρουσιάζοντας το μεγαλύτερο ποσοστό ύπαρξης του νευροπεπτιδίου. Στα ζώα ηλικίας P10 -στα οποία τα C boutons είναι πλέον σχηματισμένα- μειώνεται ο αριθμός που περιέχει Cart σε ποσοστό 73,4%. Στα ζώα ηλικίας P25 η παρουσία του νευροπεπτιδίου στη C bouton σύναψη μειώνεται περαιτέρω σε ποσοστό 69,8% και φτάνει το χαμηλότερο ποσοστό (68,6%) στα ενήλικα ζώα 8-9 εβδομάδων. Αντίθετα, στα ζώα ηλικίας 6 μηνών παρουσιάζεται μία εκ νέου αύξηση του αριθμού των C boutons που περιέχουν Cart φτάνοντας το ποσοστό 82% και η ανάλυση έδειξε ότι το ποσοστό αυτό διατηρείται εξίσου υψηλό και δεν παρουσιάζει σημαντική διαφορά με την επόμενη ηλικία, που είναι τα ηλικιωμένα ζώα ενός έτους, στα οποία φτάνουν το ποσοστό 85,7%. Η στατιστική ανάλυση των παραπάνω δεδομένων (one-way ANOVA, post – hoc test, $P < 0.05$) έδειξε την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς στα επίπεδα έκφρασης του Cart στα C boutons των ηλικιών P6-7 ημερών, 6 μηνών και ενός έτους συγκριτικά με τις υπόλοιπες ηλικίες. Τα αποτελέσματα αυτά πιθανώς υποδεικνύουν μία αυξημένη ανάγκη του οργανισμού για το Cart νευροπεπτίδιο στην αρχή και στο τέλος της ανάπτυξης, άρα και έναν ενδεχόμενο συσχετισμό του με την ανάπτυξη.

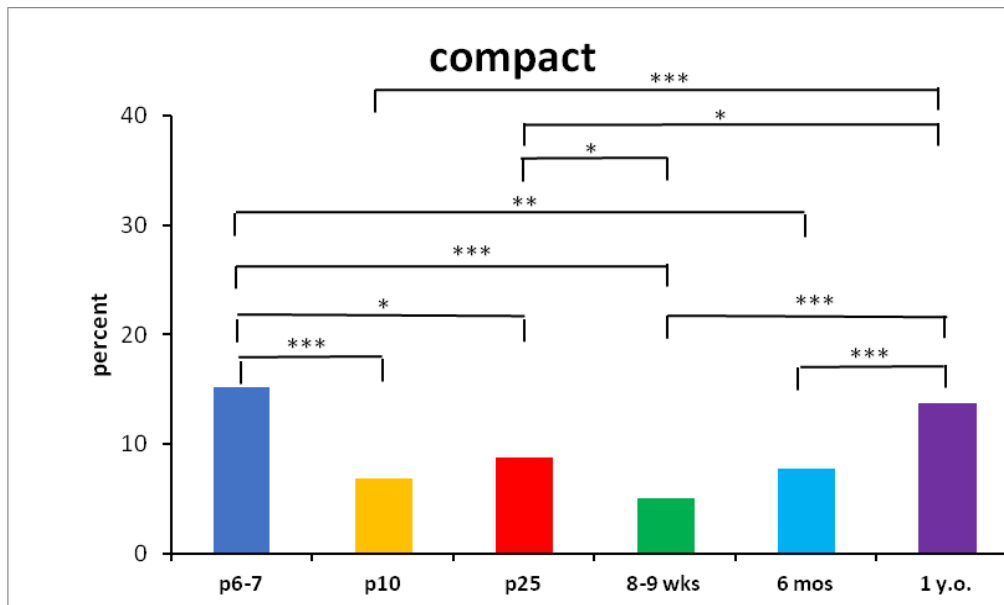


Γράφημα 3: Η ύπαρξη του νευροπεπτιδίου Cart στη σύναψη C bouton είναι σημαντικά αυξημένη κατά τα πιο πρώιμα (P6-7) και τα πιο μεταγενέστερα (6 months and 1 year old) αναπτυξιακά στάδια που αναλύθηκαν συγκριτικά με τα ενδιάμεσα στάδια. ***: $P < 0.001$, **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$.

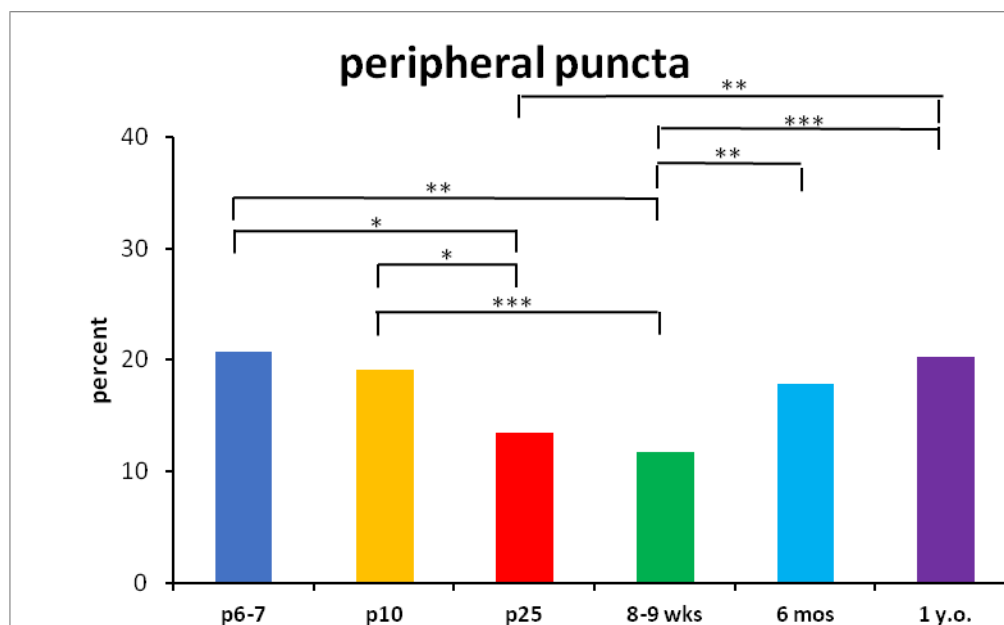
Έπειτα, αναλύθηκαν εκ νέου τα προηγούμενα ποντίκια για να διαπιστωθεί αν το πρότυπο κατανομής του Cart που επικρατεί σχετίζεται με την ηλικία του ζώου (**Γράφημα 4**). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε mANOVA η οποία εμφάνισε ότι κάπου υπάρχει σημαντικότητα ($p < 0.001$) και στην συνέχεια post-hoc test για να εντοπιστεί συγκεκριμένα η σημαντικότητα μεταξύ των ομάδων ηλικιών. Στην στατιστική ανάλυση έχει εφαρμοστεί η διόρθωση Bonferroni. Κάποιες παρατηρήσεις είναι οι εξής: Το συμπαγές πρότυπο του Cart φαίνεται να είναι σημαντικά συχνότερο στα ζώα ηλικίας P6-7 και ενός έτους σε σχέση με τις ενδιάμεσες ηλικίες (**Γράφημα 5α**). Μεγάλες διαφορές παρουσίασε το πρότυπο των κουκκίδων Cart κατά μήκος της σύναψης, το οποίο φαίνεται να είναι σημαντικά σπανιότερο στα ζώα ηλικίας P10 και P25 σε σύγκριση με τα ζώα ηλικίας P6-7 και 6 μηνών (**Γράφημα 5γ**). Το πρότυπο 1-3 κουκκίδων μέσα στη σύναψη, παρουσιάζεται σημαντικά σπανιότερο στα ζώα ηλικίας P6-7 σε σύγκριση με τα άλλα ζώα και ειδικά τα ζώα ηλικίας P10 και P25 (**Γράφημα 5δ**). Τέλος, το πρότυπο απουσίας Cart εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ηλικιών P6-7, 6 μηνών και ενός έτους σε σχέση με τις υπόλοιπες ηλικίες (**Γράφημα 5ε**), όπως έχει ήδη δειχθεί από την ανάλυση της ύπαρξης ή απουσίας του νευροπεπτιδίου στις χολινεργικές συνάψεις μεταξύ των διαφόρων ηλικιών. Συνοπτικά, όλα τα πρότυπα κατανομής υπάρχουν σε όλες τις ηλικίες αναφοράς σε διαφορετικά ποσοστά και δεν μπορεί να προσδιοριστεί κάποιος σημαντικά διαφορετικός λειτουργικός τους ρόλος.



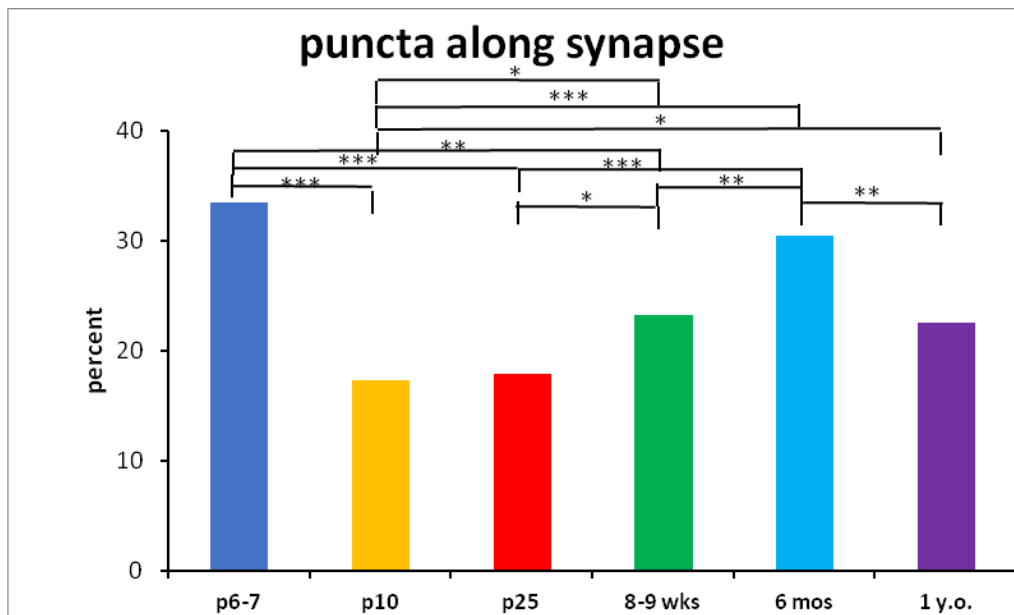
Γράφημα 4: Πρότυπα έκφρασης του Cart στη C bouton σύναψη σε σχέση με την ηλικία. Φαίνεται το ποσοστό που αντιπροσωπεύει κάθε πρότυπο έκφρασης του Cart σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των C boutons με βάση την ηλικία των ποντικών που μελετήθηκαν.



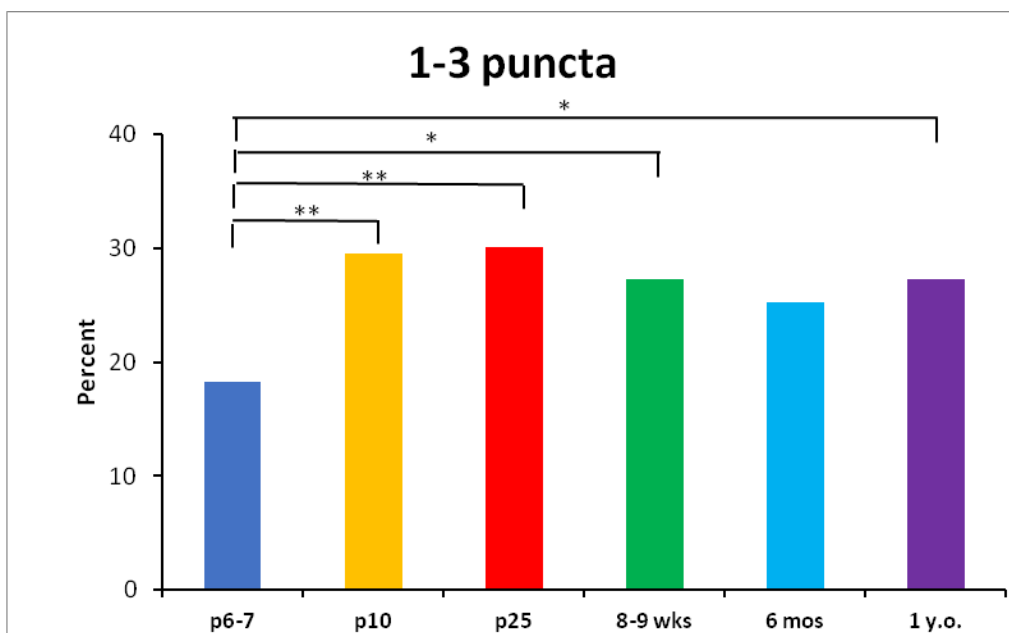
Γράφημα 5α: Ανάλυση κάθε προτύπου έκφρασης του νευροπεπτιδίου Cart στη σύναψη C bouton χωριστά σε σχέση με την ηλικία. Φαίνεται το ποσοστό που αντιπροσωπεύει το συμπαγές πρότυπο του Cart σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των C boutons, με βάση την ηλικία των ποντικών που μελετήθηκαν. Το πρότυπο αυτό φαίνεται να είναι σημαντικά συχνότερο στα ζώα ηλικίας P6-7 και ενός έτους σε σχέση με τις ενδιάμεσες ηλικίες. Με αστερίσκους επισημαίνονται οι στατιστικές διαφορές: ***:P<0.001, **:P<0.01, *:P<0.05.



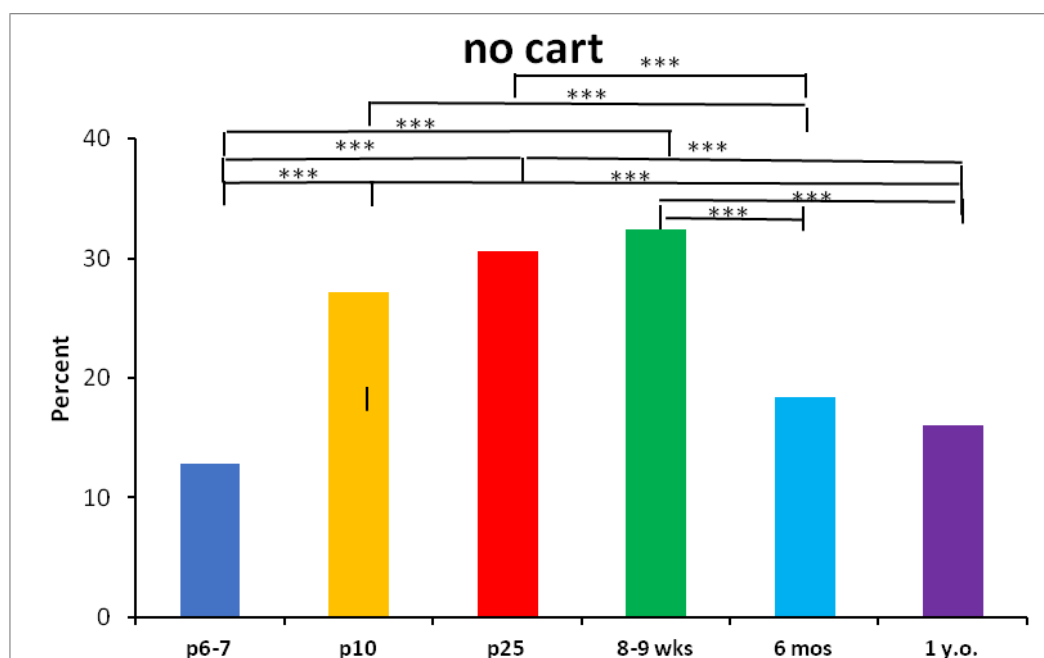
Γράφημα 5β: Ανάλυση κάθε προτύπου έκφρασης του νευροπεπτιδίου Cart στη σύναψη C bouton χωριστά σε σχέση με την ηλικία. Φαίνεται το ποσοστό που αντιπροσωπεύει το πρότυπο περιφερειακών κουκκίδων του Cart σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των C boutons, με βάση την ηλικία των ποντικών που μελετήθηκαν. Το πρότυπο αυτό φαίνεται να είναι σημαντικά σπανιότερο στα ζώα ηλικίας 8-9 εβδομάδων σε σχέση με τις υπόλοιπες ηλικίες. Με αστερίσκους επισημαίνονται οι στατιστικές διαφορές: ***:P<0.001, **:P<0.01, *:P<0.05.



Γράφημα 5γ: Ανάλυση κάθε προτύπου έκφρασης του νευροπεπτιδίου Cart στη σύναψη C bouton χωριστά σε σχέση με την ηλικία. Φαίνεται το ποσοστό που αντιπροσωπεύει το πρότυπο των κουκκίδων Cart κατά μήκος της σύναψης σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των C boutons, με βάση την ηλικία των ποντικών που μελετήθηκαν. Το πρότυπο αυτό φαίνεται να είναι σημαντικά σπανιότερο στα ζώα ηλικίας P10 και P25 σε σύγκριση με τα ζώα ηλικίας P6-7 και 6 μηνών. Με αστερίσκους επισημαίνονται οι στατιστικές διαφορές: ***: $P < 0.001$, ** : $P < 0.01$, *: $P < 0.05$.



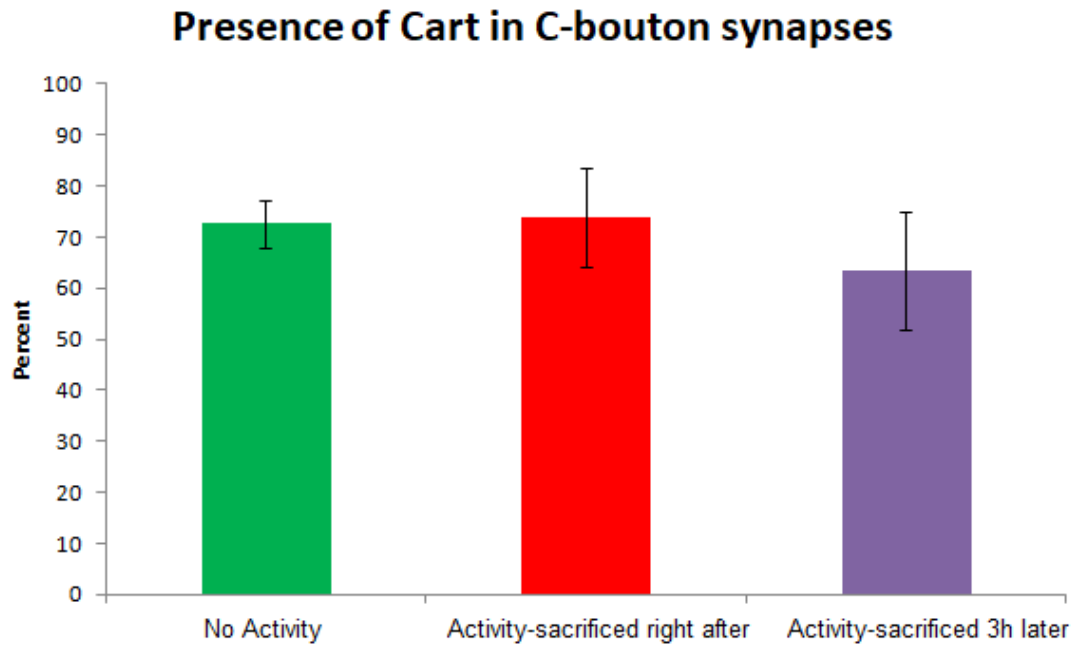
Γράφημα 5δ: Ανάλυση κάθε προτύπου έκφρασης του νευροπεπτιδίου Cart στη σύναψη C bouton χωριστά σε σχέση με την ηλικία. Φαίνεται το ποσοστό που αντιπροσωπεύει το πρότυπο 1-3 κουκκίδων Cart μέσα στη σύναψη κατά σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των C boutons, με βάση την ηλικία των ποντικών που μελετήθηκαν. Το πρότυπο αυτό φαίνεται να είναι σημαντικά σπανιότερο στα ζώα ηλικίας P6-7 σε σύγκριση με τα άλλα ζώα και ειδικά τα ζώα ηλικίας P10 και P25. Με αστερίσκους επισημαίνονται οι στατιστικές διαφορές: ***: $P < 0.001$, ** : $P < 0.01$, *: $P < 0.05$.



Γράφημα 5ε: Ανάλυση κάθε προτύπου έκφρασης του νευροπεπτιδίου Cart στη σύναψη C bouton χωριστά σε σχέση με την ηλικία. Φαίνεται το ποσοστό που αντιπροσωπεύει το πρότυπο απουσίας Cart σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των C boutons, με βάση την ηλικία των ποντικών που μελετήθηκαν. Το πρότυπο αυτό φαίνεται να είναι σημαντικά σπανιότερο στα ζώα ηλικίας P6-7 και 6 μηνών και ενός έτους σε σχέση με τις υπόλοιπες ηλικίες. Με αστερίσκους επισημαίνονται οι στατιστικές διαφορές: ***: $P < 0.001$, **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ CART ΣΤΑ C BOUTONS ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΝΤΟΝΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

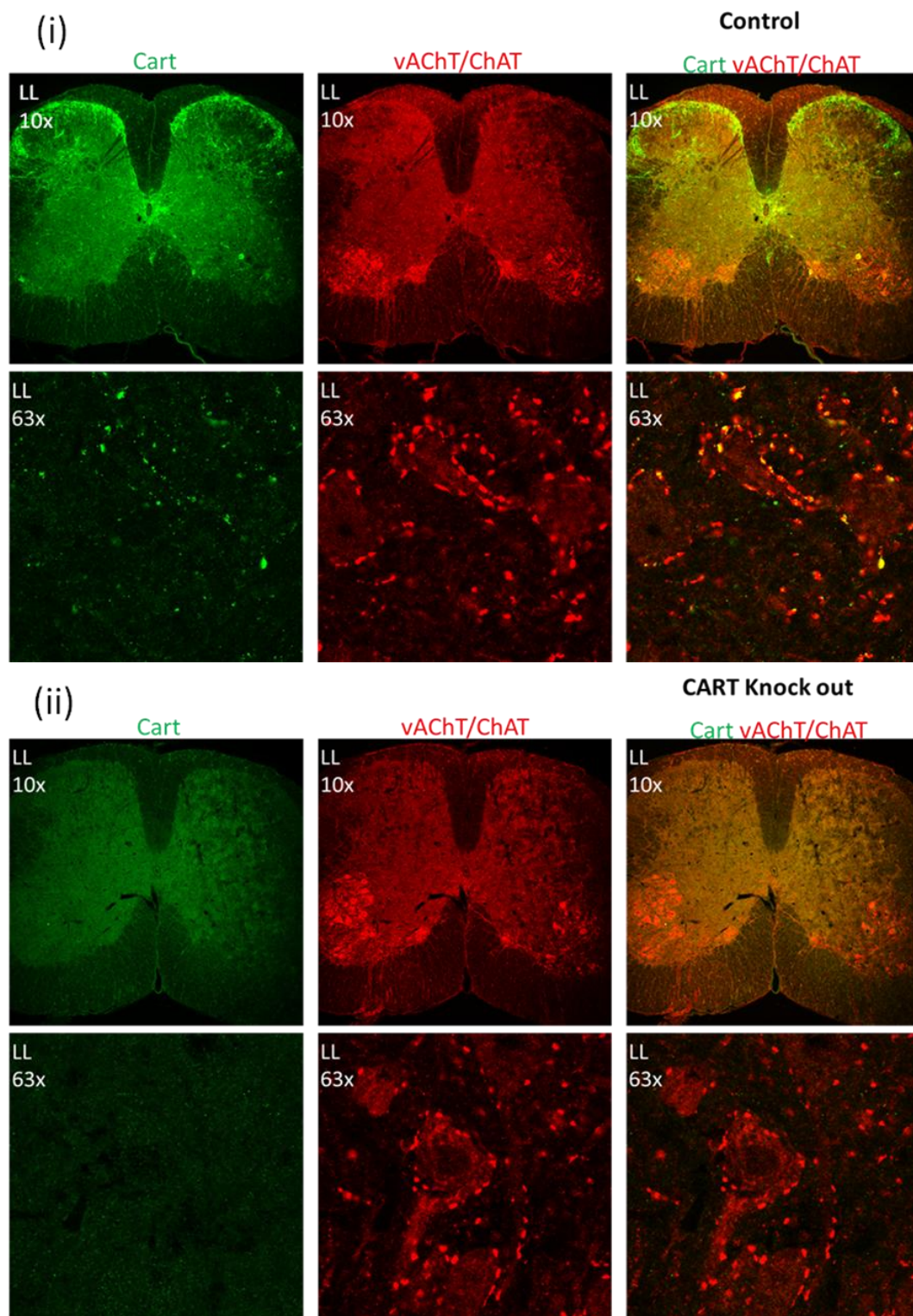
Η ανακάλυψη της αυξημένης ύπαρξης του νευροπεπτιδίου Cart στη σύναψη C bouton στα πιο πρώιμα (P6-7) και τα πιο μεταγενέστερα (6 μηνών και ενός έτους) αναπτυξιακά στάδια συγκριτικά με τα ενδιάμεσα στάδια, έδωσαν το έναυσμα για περαιτέρω μελέτη με στόχο την ερμηνεία αυτού του αποτελέσματος. Μία πιθανή ερμηνεία είναι το Cart να εκλύεται σε μεγαλύτερο βαθμό από τα C boutons στα ενδιάμεσα αναπτυξιακά στάδια που εξετάστηκαν, λόγω της πιο έντονης δραστηριότητας των ζώων συγκριτικά με τα αρχικά και τα τελευταία στάδια και για αυτόν τον λόγο να μην εντοπίζεται σε μεγάλο ποσοστό μέσα στη σύναψη. Η δεύτερη πιθανή ερμηνεία αφορά μία αυξημένη ανάγκη του οργανισμού για το Cart νευροπεπτίδιο και άρα αυξημένη παραγωγή και συσσώρευσή του στις συνάψεις, στην αρχή και στο τέλος της ανάπτυξης. Για τη διερεύνηση της πρώτης υπόθεσης, χρησιμοποιήθηκαν αγρίου τύπου ποντίκια 8-9 εβδομάδων (ενδιάμεση ηλικία στην οποία έχει ήδη δειχθεί σημαντικά μειωμένη ύπαρξη του Cart) και εξετάστηκε σε αυτά η ύπαρξη του Cart στις C bouton συνάψεις τους μετά από έντονη δραστηριότητα. Πιο συγκεκριμένα, τα ποντίκια χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες από τις οποίες η μία δεν ασκήθηκε καθόλου (ομάδα ελέγχου) και οι άλλες δύο ασκήθηκαν έντονα τρέχοντας σε ειδικό διάδρομο (treadmill). Από τις δύο ομάδες που ασκήθηκαν, τα ποντίκια της μίας θανατώθηκαν και αναλύθηκαν αμέσως μετά την άσκηση, ενώ τα ποντίκια της άλλης αφέθηκαν πρώτα να ξεκουραστούν για τρεις ώρες. Στη συνέχεια, απομονώθηκε ο νωτιαίος μυελός από τα ποντίκια και των τριών ομάδων και εξετάστηκε η ύπαρξη του Cart νευροπεπτιδίου στη σύναψη C bouton, υπολογίζοντας το ποσοστό των συνάψεων που το περιέχουν, ώστε να συγκριθούν μεταξύ τους. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε mANOVA η οποία έδειξε ότι δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στη ύπαρξη του νευροπεπτιδίου Cart στα C boutons μεταξύ των τριών ομάδων (**Γράφημα 7**). Το αποτέλεσμα αυτό, υποδεικνύει ότι μάλλον η πρώτη υπόθεση δεν ισχύει και, επομένως, είναι πιο πιθανό να ισχύει η δεύτερη ερμηνεία που αφορά μία αυξημένη ανάγκη του οργανισμού για το Cart νευροπεπτίδιο στην αρχή και στο τέλος της ανάπτυξης.



Γράφημα 7: Η ύπαρξη του νευροπεπτιδίου Cart στη σύναψη C bouton δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ποντικών που υποβλήθηκαν σε έντονη δραστηριότητα και αυτών που δεν ασκήθηκαν καθόλου. Overall $P=0.284 > 0.05$.

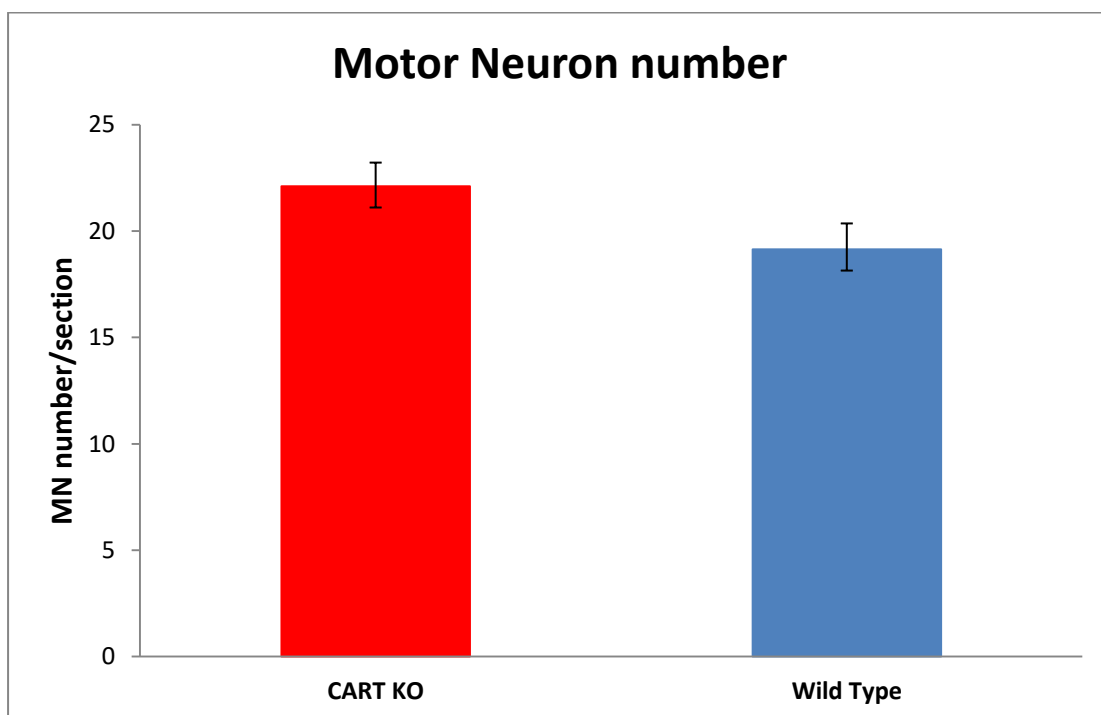
ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ CART KNOCK OUT ΠΟΝΤΙΚΩΝ

Για την περαιτέρω αποσαφήνιση του ρόλου του Cart νευροπεπτιδίου στα C boutons πάνω στους κινητικούς νευρώνες, χρησιμοποιήθηκαν τα Cart knockout (Cart KO) ποντίκια (Wierup et al., 2005), στα οποία το γονίδιο Cart έχει απομακρυνθεί. Η πρώτη παράμετρος που εξετάστηκε είναι αν η σύναψη C bouton συνεχίζει να υπάρχει όταν δεν εκφράζεται το Cart νευροπεπτίδιο. Στην **Εικόνα 23** φαίνεται ότι στα Cart KO ποντίκια, ύστερα από ανοσοφθορισμό για τους χολινεργικούς δείκτες vAChT / ChAT (κόκκινο), υπάρχουν κανονικά τα C boutons πάνω στους κινητικούς νευρώνες.

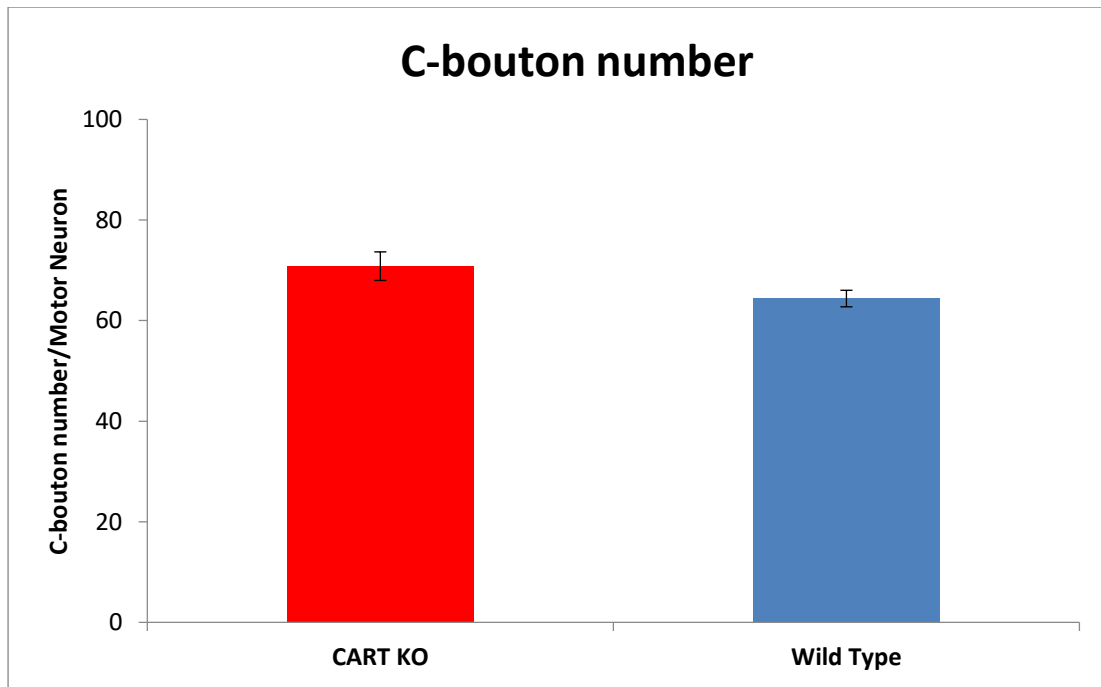


Εικόνα 23: Τομές κάτω οσφυϊκής μοίρας νωτιαίου μυελού από ποντίκια (i) αγρίου τύπου και (ii) Cart KO ηλικίας ενός μήνα, έπειτα από ανοσοφθορισμό με τα anti-vAChT, anti-ChAT και anti-Cart αντισώματα. Τα C boutons υπάρχουν κανονικά και στα αγρίου τύπου αλλά και στα Cart KO ποντίκια. Τομές πάχους 14μm (κάτω οσφυϊκή μοίρα- LL lower lumbar).

Στη συνέχεια, στα Cart KO ποντίκια μετρήθηκε ο αριθμός των κινητικών νευρώνων, καθώς και ο αριθμός των C boutons συγκρίνοντάς τα με τα αγρίου τύπου αδέρφια τους. Όπως φαίνεται στα **γραφήματα 8 και 9**, δεν υπάρχει κάποια σημαντική διαφορά στον αριθμό των κινητικών νευρώνων και των C boutons ανά κινητικό νευρώνα μεταξύ Cart KO και αγρίου τύπου ποντικών, υποδεικνύοντας ότι η έλλειψη του Cart δεν προκαλεί κάποια σημαντική αλλαγή.



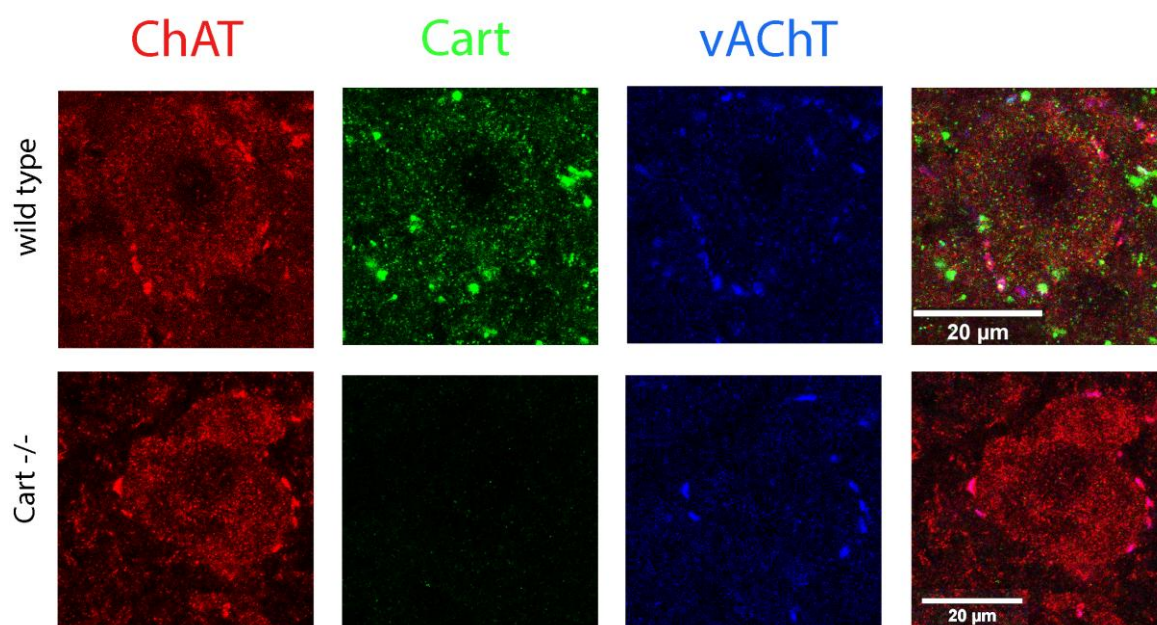
Γράφημα 8: Ο αριθμός των κινητικών νευρώνων δεν διαφέρει μεταξύ Cart KO και αγρίου τύπου ποντικών ($P=0.111>0.05$). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν 5 ($n=5$) Cart KO και 6 ($n=6$) αγρίου τύπου ποντίκια.



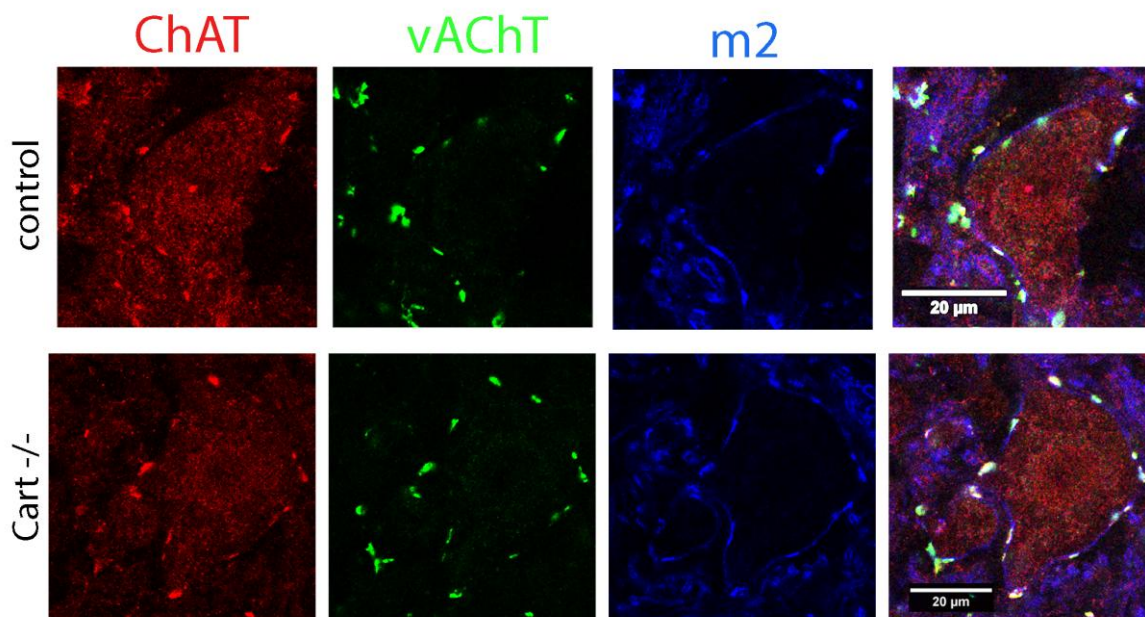
Γράφημα 9: Ο αριθμός των C boutons δεν διαφέρει μεταξύ Cart KO και αγρίου τύπου ποντικών ($P=0.097>0.05$). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν 4 ($n=4$) Cart KO και 4 ($n=4$) αγρίου τύπου ποντίκια.

CART ΚΑΙ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΗ: ΕΠΗΡΕΑΖΕΤΑΙ Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΕΝΟΣ ΝΕΥΡΟΔΙΑΒΙΒΑΣΤΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΠΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΑΛΛΟΥ?

Έχοντας δεδομένη την ταυτόχρονη παρουσία των νευροδιαβιβαστών ακετυλοχολίνη (ACh) και Cart στα C boutons, εξετάστηκε ακολούθως αν επηρεάζεται η παρουσία του μοναδικού ενζύμου της βιοσύνθεσης της ακετυλοχολίνης στον V0c υποπληθυσμό (ChAT) στα Cart KO ποντίκια (**Εικόνα 24**). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ChAT συνεχίζει να υπάρχει στις C bouton συνάψεις ακόμα και όταν το Cart λείπει. Επίσης, εντοπίστηκε και ο m2 υποδοχέας της Ach μετασυναπτικά πάνω στους κινητικούς νευρώνες (**Εικόνα 25**).



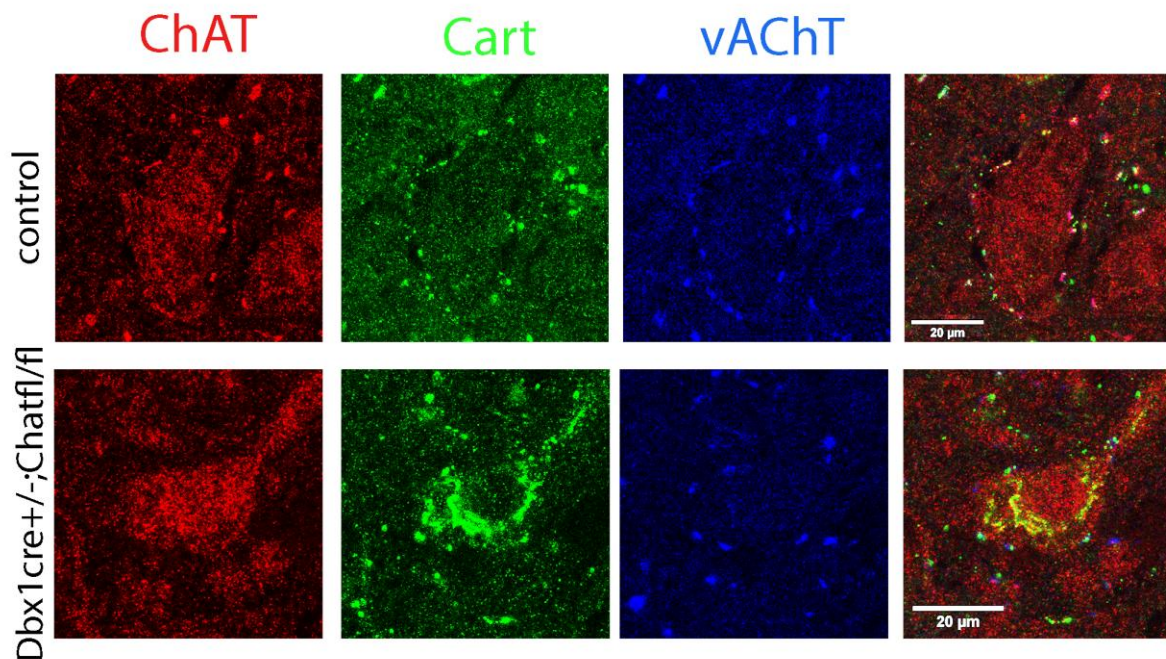
Εικόνα 24: Τομές κάτω οσφυϊκής μοίρας νωτιαίου μυελού από ποντίκια αγρίου τύπου (πάνω) και Cart KO (κάτω) ηλικίας ενάμιση μήνα, έπειτα από ανοσοφθορισμό με τα anti-vAChT, anti-ChAT και anti-Cart αντισώματα. Το ChAT συνεχίζει να υπάρχει στις C bouton συνάψεις στα Cart KO ποντίκια. Τομές πάχους 14μm.



Εικόνα 25: Τομές κάτω οσφυϊκής μοίρας νωτιαίου μυελού από ποντίκια αγρίου τύπου (πάνω) και Cart KO (κάτω) ηλικίας ενάμιση μήνα, έπειτα από ανοσοφθορισμό με τα anti-vAChT, anti-ChAT και anti-m2 αντισώματα. Ο m2 υποδοχέας της Ach συνεχίζει να υπάρχει μετασυναπτικά πάνω στους κινητικούς νευρώνες στα Cart KO ποντίκια. Τομές πάχους 14μm.

Αντίστοιχα, για να εξεταστεί αν επηρεάζεται η παρουσία του Cart στα C boutons όταν απουσιάζει η ακετυλοχολίνη, χρησιμοποιήθηκαν ζώα γονοτύπου Dbx1cre+/-;ChATfl/fl, στα οποία παρεμποδίζεται η χολινεργική νευροδιαβίβαση αποκλειστικά στους V0c νευρώνες μέσω απενεργοποίησης του ChAT, του μοναδικού ενζύμου της βιοσύνθεσης της ακετυλοχολίνης. Παρότι δεν παράγεται ακετυλοχολίνη, η σύναψη μένει ανέπαφη και εντοπίζεται με τον χολινεργικό δείκτη vAChT (Zagoraiou et al.,2009). Έτσι, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία των ιστών με τον χολινεργικό δείκτη vAChT (κόκκινο) και το νευροπεπτίδιο Cart (πράσινο) για να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή η απουσία του. Παρατηρήθηκε ότι το νευροπεπτίδιο Cart εντοπίζεται στη C bouton σύναψη παρά την απουσία της ακετυλοχολινوترansφεράσης και άρα της Ach, χωρίς να επηρεάζεται το πρότυπο κατανομής του (**Εικόνα 26**). Έτσι, η ύπαρξη της σύναψης στα ζώα με απενεργοποιημένο το χολινεργικό σήμα δικαιολογείται καθώς παρότι δεν περιέχει ακετυλοχολίνη η σύναψη, συνεχίζει να έχει Cart και ίσως και άλλους νευροτροφικούς παράγοντες. Άρα,

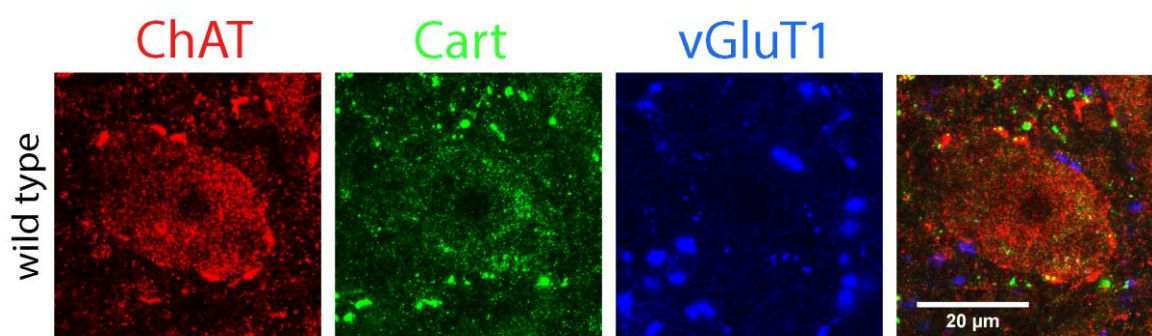
τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν είτε ότι οι δύο νευροδιαβιβαστές παράγονται ανεξάρτητα, είτε ότι η έλλειψη του ενός δεν επηρεάζει την έκφραση του άλλου.



Εικόνα 26: Τομές κάτω οσφυϊκής μοίρας νωτιαίου μυελού από ποντίκια αγρίου τύπου (πάνω) και Dbx1cre+/-;Chatfl/fl (κάτω) ηλικίας ενάμιση μήνα, έπειτα από ανοσοφθορισμό με τα anti-vAChT, anti-ChAT και anti-Cart αντισώματα. Το Cart συνεχίζει να υπάρχει στις C bouton συνάψεις στα Dbx1cre+/-;Chatfl/fl ποντίκια. Τομές πάχους 14μm.

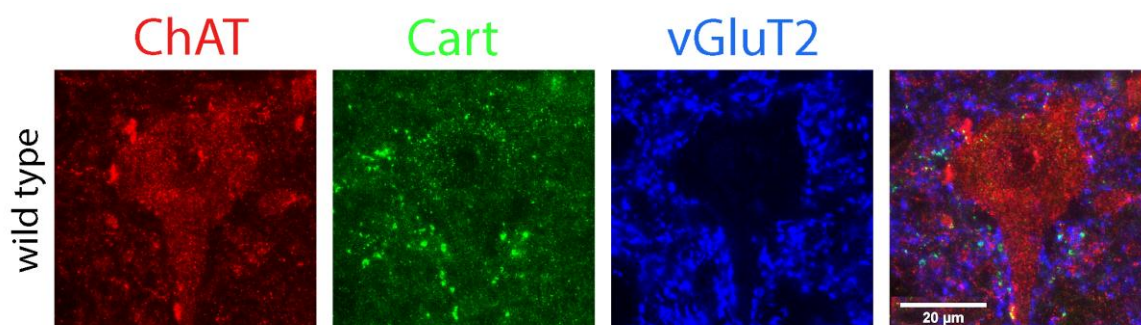
ΤΟ CART ΔΕΝ ΕΝΤΟΠΙΖΕΤΑΙ ΣΕ ΑΛΛΕΣ ΣΥΝΑΨΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΚΙΝΗΤΙΚΟΥΣ ΝΕΥΡΩΝΕΣ

Σε όλες τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν, παρατηρήθηκαν στους περισσότερους κινητικούς νευρώνες και κουκκίδες του νευροπεπτιδίου Cart που δεν βρίσκονται μέσα σε C boutons. Για το λόγο αυτό, εξετάστηκε πιθανή έκφραση του Cart και σε άλλα είδη συνάψεων πάνω στους κινητικούς νευρώνες. Επειδή το Cart εντοπίζεται σε αισθητικούς νευρώνες του νωτιαίου μυελού, εξετάστηκε αν εκφράζεται και στις συνάψεις που κάνουν οι απολήξεις τους στους κινητικούς νευρώνες. Ο vesicular glutamate transporter 1 (vGluT1) αποτελεί μοριακό δείκτη των συνάψεων στους κινητικούς νευρώνες που προέρχονται από τους προσαγωγούς Ia αισθητικούς γλουταματεργικούς νευρώνες (Alvarez et al., 2004). Στην **Εικόνα 27** φαίνεται ένας κινητικός νευρώνας από τον νωτιαίο μυελό ποντικού ηλικίας δύο μηνών ύστερα από ανοσοφθορισμό για: τον μοριακό δείκτη vGluT1 (μπλε), τον χολινεργικό δείκτη ChAT (κόκκινο) και το νευροπεπτίδιο Cart (πράσινο). Η ανάλυση έδειξε ότι το Cart δεν εκφράζεται στα vGluT1 boutons.



Εικόνα 27: Το Cart δεν εντοπίζεται σε vGluT1 boutons σε τομές άνω οσφυϊκής μοίρας νωτιαίου μυελού από ποντίκια αγρίου τύπου ηλικίας 2 μηνών. Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία με αντισώματα έναντι του χολινεργικού δείκτη ChAT (κόκκινο), του νευροπεπτιδίου Cart (πράσινο) και του μοριακού δείκτη vGluT1 (μπλε). Τομή πάχους 14μm.

Στη συνέχεια, εξετάστηκε πιθανή έκφραση του Cart στα VGLUT2 boutons. Ο vesicular glutamate transporter 2 (vGluT2) αποτελεί μοριακό δείκτη των συνάψεων στους κινητικούς νευρώνες που προέρχονται από διεγερτικούς γλουταματεργικούς διάμεσους νευρώνες του νωτιαίου μυελού (Todd et al., 2003). Στην **Εικόνα 28** φαίνεται ένας κινητικός νευρώνας από τον νωτιαίο μυελό ποντικού ηλικίας δύο μηνών ύστερα από ανοσοφθορισμό για: τον μοριακό δείκτη vGluT2 (μπλε), τον χολινεργικό δείκτη ChAT (κόκκινο) και το νευροπεπτίδιο Cart (πράσινο). Η ανάλυση έδειξε ότι το Cart δεν εκφράζεται στα vGluT2 boutons.



Εικόνα 28: Το Cart δεν εντοπίζεται σε VGLUT2 boutons σε τομές άνω οσφυϊκής μοίρας νωτιαίου μυελού από ποντίκια αγρίου τύπου ηλικίας 2 μηνών. Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία με αντισώματα έναντι του μοριακού δείκτη vGluT2 (μπλε), του χολινεργικού δείκτη ChAT (κόκκινο) και του νευροπεπτιδίου Cart (πράσινο). Τομή πάχους 14μm.

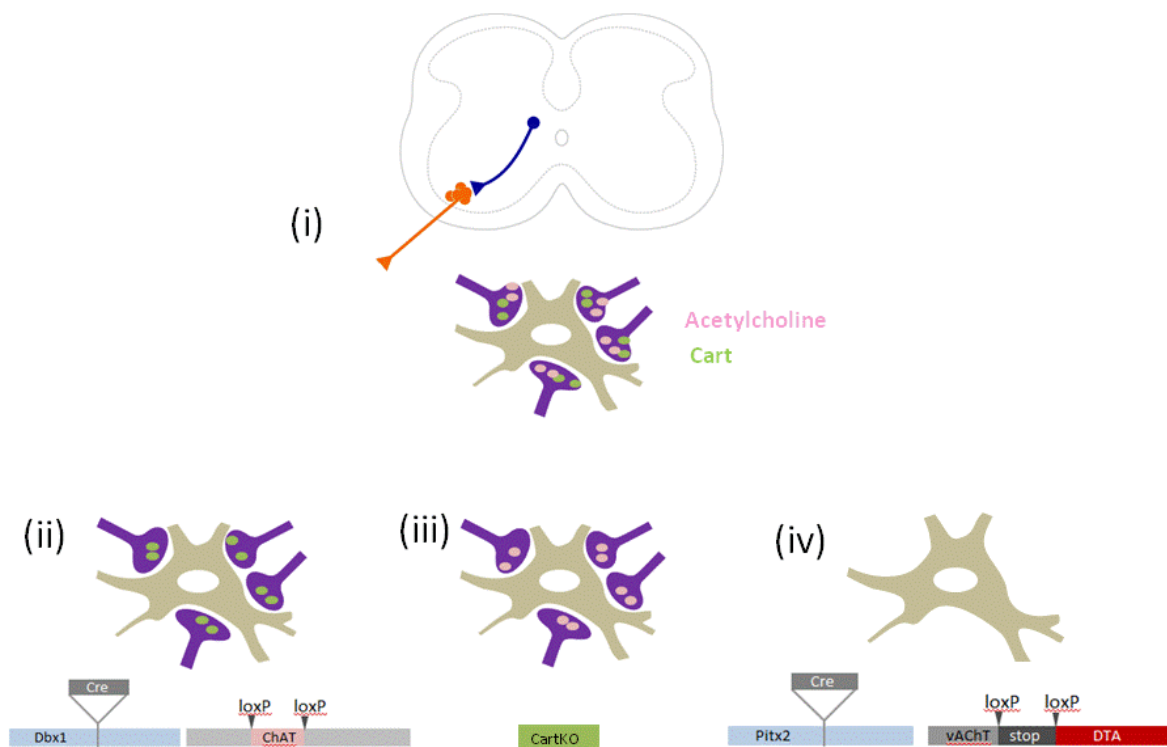
Εφόσον κάποιες από τις κουκκίδες του νευροπεπτιδίου Cart στους κινητικούς νευρώνες δεν βρίσκονται μέσα σε C boutons και δεν βρίσκονται ούτε μέσα σε vGluT1 και vGluT2 boutons, παραμένει ανοιχτό το ερώτημα της προέλευσής τους. Υπάρχει η πιθανότητα το Cart να εκφράζεται σε ανασταλτικές συνάψεις πάνω στους κινητικούς νευρώνες και οι κουκκίδες να βρίσκονται μέσα σε αυτές, καθώς και η πιθανότητα να μην βρίσκονται καν πάνω σε κινητικούς νευρώνες αλλά σε κάποια γειτονικά κύτταρα.

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ C BOUTON ΣΥΝΑΨΗΣ

- ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΔΥΝΑΜΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΟΧΗΣ

Για να αναλυθεί ο ρόλος της C-bouton σύναψης στην κίνηση, εκπονήθηκε σε συνεργασία με τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Κώστα Ποθάκο, μια σειρά συμπεριφορικών πειραμάτων σε τρεις διαφορετικές ομάδες διαγονιδιακών ποντικών και συγκρίθηκε η απόδοσή τους με τα ποντίκια των αντίστοιχων ομάδων ελέγχου. Οι δύο ομάδες αποτελούνται από ποντίκια που δεν εκφράζουν ακετυλοχολίνη (Dbx1cre+/-;ChATfl/fl πειραματική ομάδα και ChATfl/fl ομάδα ελέγχου) ή Cart (Cart KO πειραματική ομάδα και Cart wild type ομάδα ελέγχου) στη C bouton σύναψη και η τρίτη από ποντίκια που στερούνται τις C bouton συνάψεις (Pitx2cre+/-;vAChT-loxP-stop-loxP-DTA πειραματική ομάδα και vAChT-loxP-stop-loxP-DTA ομάδα ελέγχου) (**Εικόνα 29**).

Όλα τα ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν για τις συμπεριφορικές δοκιμασίες υποβλήθηκαν σε PCR τεστ και σε ιστολογική ανάλυση μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων, για να επιβεβαιωθεί ο γονοτύπος τους. Συγκεκριμένα τα ποντίκια της Dbx1cre+/-;ChATfl/fl ομάδας (ii), ελέγχθηκαν και με στύπωμα κατά Southern. Ο λόγος είναι ότι το Dbx1 εκφράζεται ενίοτε στο ζυγωτό ή στο γαμέτη και υπάρχει η περίπτωση στα ζώα να έχει συμβεί αποκοπή της loxP περιοχής στο γονίδιο ChAT σε ένα αλληλίο σε όλο το γονιδίωμα (delta). Το πρωτόκολλο γονοτύπησης (PCR) δεν είναι επαρκές για να δείξει την ύπαρξη floxed και delta, όταν τα ποντίκια είναι floxed/delta. Έτσι, σε όλα αυτά τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στις συμπεριφορικές δοκιμασίες, έγινε ανάλυση κατά Southern για να διαπιστωθεί ο γονότυπος πέραν πάσης αμφιβολίας.



Εικόνα 29: Σχηματική απεικόνιση των C boutons σε ποντίκια (i) αγρίου τύπου, (ii) που δεν εκφράζουν ακετυλοχολίνη στους V0c νευρώνες (Dbx1^{cre+/-};ChAT^{fl/fl}), (iii) που δεν εκφράζουν Cart (Cart KO) ή (iv) που στερούνται τα C-boutons (Pitx2^{cre+/-};vAChT-loxP-stop-loxP-DTA).

Πραγματοποιήθηκαν συνολικά επτά συμπεριφορικές δοκιμασίες για να εξεταστεί αν και πώς επηρεάζεται η δύναμη και η αντοχή όταν υπάρχει απενεργοποίηση ή απομάκρυνση της C bouton σύναψης. Μόνο μία από τις επτά δοκιμασίες ανέδειξε τις κινητικές ελλείψεις των παραπάνω διαγονιδιακών ποντικών και είναι η δοκιμασία κρεμάμενου σύρματος, η οποία αναλύεται στην επόμενη ενότητα. Οι υπόλοιπες δοκιμασίες ήταν:

Δοκιμασία δύναμης λαβής

Με τη συγκεκριμένη δοκιμασία εξετάστηκε η μυϊκή δύναμη των μπροστινών ποδιών. Με δεδομένο ότι η συγκεκριμένη δοκιμασία βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στη διάθεση των ποντικών να αποδώσουν, δεν έδειξε να είναι αρκετά ευαίσθητη για να αναδείξει πιθανές μικρές διαφορές μεταξύ των ομάδων.

Δοκιμασία αναρρίχησης σε στύλο

Η δοκιμασία αναρρίχησης σε στύλο απαιτεί από το ποντίκι να μεταφέρει το βάρος του και να κάνει χρήση κινητικού συγχρονισμού για να ανταπεξέλθει στις απαιτήσεις της δοκιμασίας. Οι ομάδες δεν διέφεραν σημαντικά στο χρόνο που χρειάζονταν για να κατεβούν από τον στύλο είτε την πρώτη μέρα, είτε τη δεύτερη μέρα της δοκιμασίας.

Δοκιμασία ανεστραμμένου πλέγματος

Η δοκιμασία απαιτεί από το ποντίκι να χρησιμοποιήσει τη δύναμη του για να κρατήσει το σώμα του κρεμασμένο από το πλέγμα ανάποδα. Αυτή η δοκιμασία αποδείχθηκε ιδιαίτερα εύκολη για όλες τις ομάδες και με τους τρεις χρόνους λήξης που χρησιμοποιήθηκαν (5, 10, 15 λεπτά). Είναι χαρακτηριστικό ότι μόνο ένα ποντίκι έπεσε από το πλέγμα σε όλες τις δοκιμές. Με αυτά τα δεδομένα δεν έγιναν στατιστικές αναλύσεις.

Δοκιμασία περιστρεφόμενης ράβδου

Η συγκεκριμένη δοκιμασία χρησιμοποιείται ευρέως για να μετρήσει τον κινητικό συγχρονισμό και τη δύναμη ως ένα βαθμό. Στις συγκεκριμένες ομάδες ποντικών δεν φάνηκε να είναι αρκετά ευαίσθητη για να αναδείξει πιθανές διαφορές μεταξύ τους.

Δοκιμασία άρσης βαρών

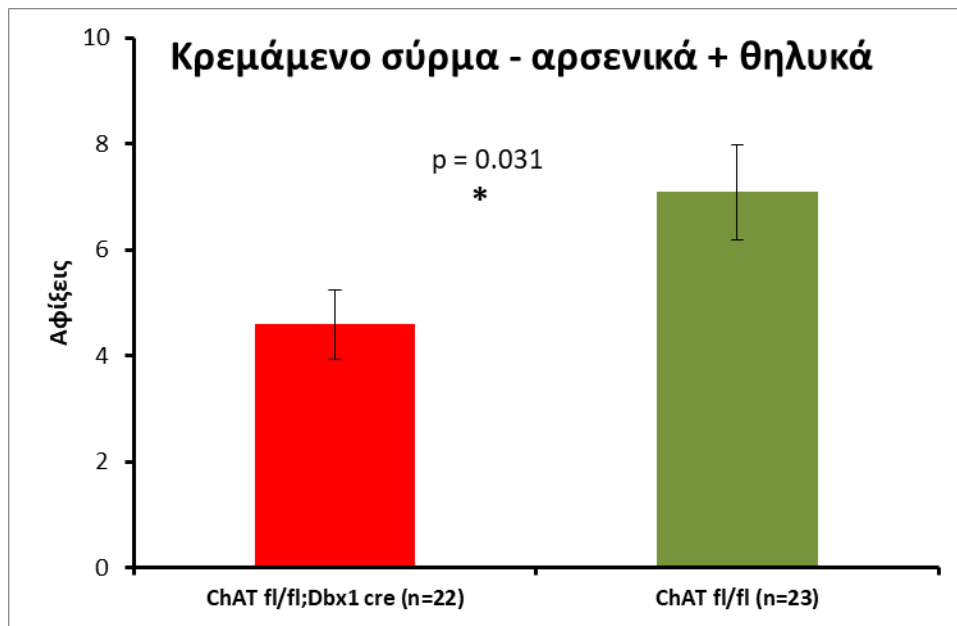
Η δοκιμασία άρσης βαρών χρησιμοποιήθηκε ως ένα εναλλακτική δοκιμασία δύναμης για να εξεταστεί η ικανότητα των ποντικών να σηκώσουν ένα βάρος με τα μπροστινά τους πόδια για περιορισμένο χρόνο. Η συγκεκριμένη δοκιμασία βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στη διάθεση συμμετοχής των ποντικών και δεν αποδείχθηκε αρκετά ευαίσθητη για τους σκοπούς αυτής της εργασίας.

Δοκιμασία αντοχής κολύμβησης

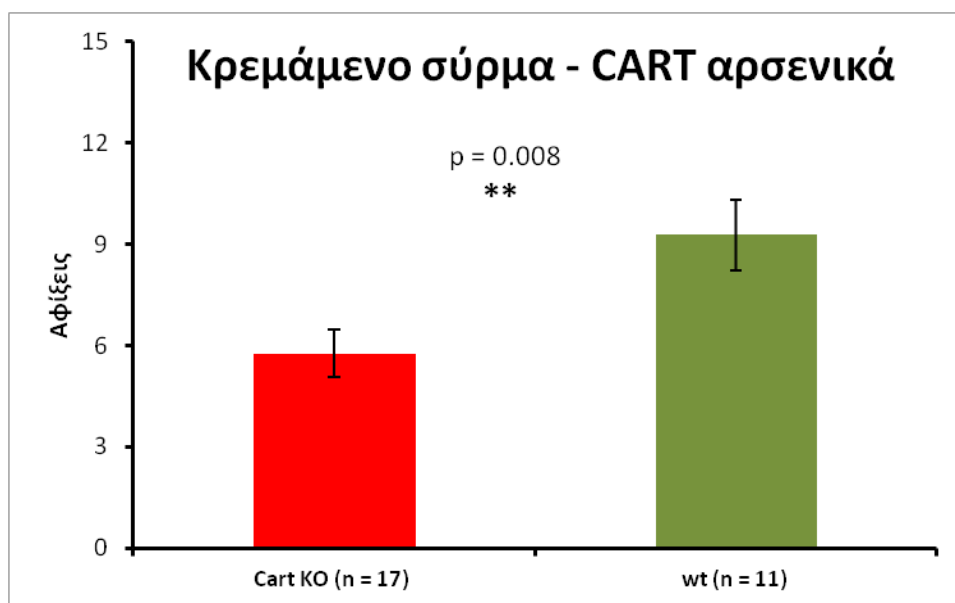
Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία αντοχής κολύμβησης ως δοκιμασία αντοχής, η οποία όμως δεν έδειξε να είναι αρκετά ευαίσθητη για να αναδείξει πιθανές μικρές διαφορές μεταξύ των ομάδων.

- ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΧΟΥΝ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΗ Ή CART ΣΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΡΕΜΑΜΕΝΟΥ ΣΥΡΜΑΤΟΣ

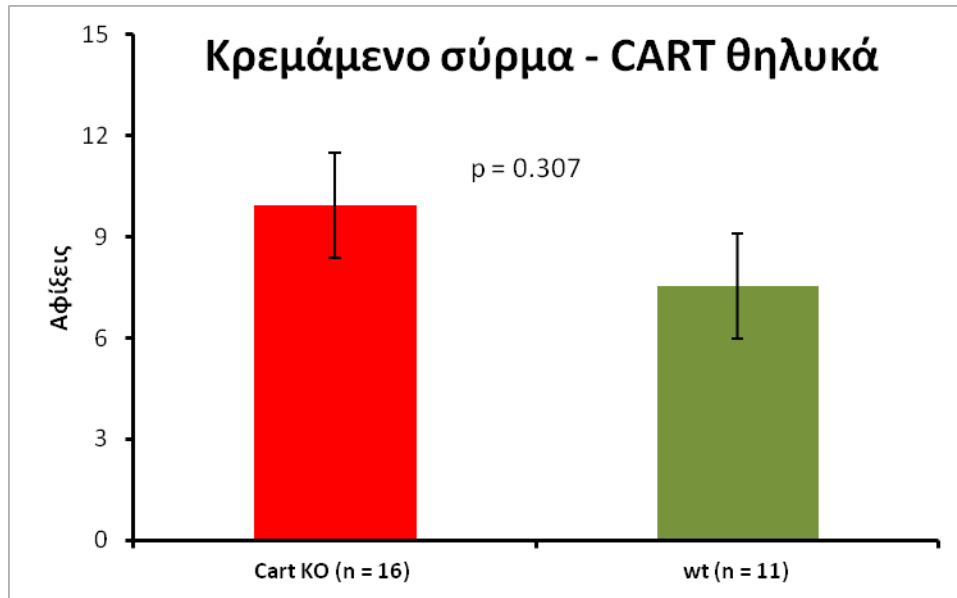
Κατά το τεστ κρεμάμενου σύρματος (hanging wire test) ελέγχθηκε πόσες φορές τα ποντίκια μπόρεσαν να μετακινηθούν (ενόσω κρεμασμένα) προς τα δύο άκρα του σύρματος στη διάρκεια 3 λεπτών και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικά με τη χρήση t-test. Η ομάδα των ποντικών που δεν παράγουν ακετυλοχολίνη (Dbx1cre+/-;ChATfl/fl) έφτασε στην άκρη του σύρματος σημαντικά λιγότερες φορές από την ομάδα ελέγχου ($P=0.031<0.05$), υποδεικνύοντας ότι σε αυτά τα ποντίκια επηρεάζεται αρνητικά η υπομέγιστη δύναμη και ο συντονισμός όπως μετράται με το συγκεκριμένο τεστ (**Γράφημα 10α**). Σχετικά με τα ποντίκια που δεν εκφράζουν Cart (Cart KO) στη C bouton σύναψη, σύγκριση των ομάδων έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ποντικών, επομένως τα δύο φύλα αναλύθηκαν ξεχωριστά. Τα αρσενικά Cart KO ποντίκια παρουσιάζουν σημαντικά λιγότερες αφίξεις στις πλάγιες επιφάνειες συγκριτικά με τα αρσενικά ποντίκια της ομάδας ελέγχου ($P=0.008<0.05$) (**Γράφημα 10β**), όπως και τα ποντίκια που δεν εκφράζουν ακετυλοχολίνη. Αντίθετα, τα θηλυκά Cart KO ποντίκια δεν διαφέρουν σημαντικά στον αριθμό των αφίξεων από τα θηλυκά ποντίκια της ομάδας ελέγχου ($P=0.307>0.05$) (**Γράφημα 10γ**). Αυτό το αποτέλεσμα δείχνει ότι ίσως υπάρχει κάποιο φυλο-εξαρτώμενο φαινόμενο που σχετίζεται με τη μέτρηση της υπομέγιστης δύναμης και του συντονισμού όταν έχει απομακρυνθεί το Cart γονίδιο. Τα ποντίκια που στερούνται εντελώς τις C bouton συνάψεις (Pitx2cre+/-;vAChT-loxP-stop-loxP-DTA), δεν παρουσιάζουν κάποια διαφορά από αυτά της ομάδας ελέγχου στον αριθμό των αφίξεων ($P=0.194>0.05$) (**Γράφημα 10δ**), γεγονός που πιθανόν οφείλεται σε αντισταθμιστικούς μηχανισμούς που χρησιμοποίησε το σύστημα, λόγω αφαίρεσης των V0c νευρώνων, και κατ' επέκταση των C boutons, πολύ νωρίς στην ανάπτυξη.



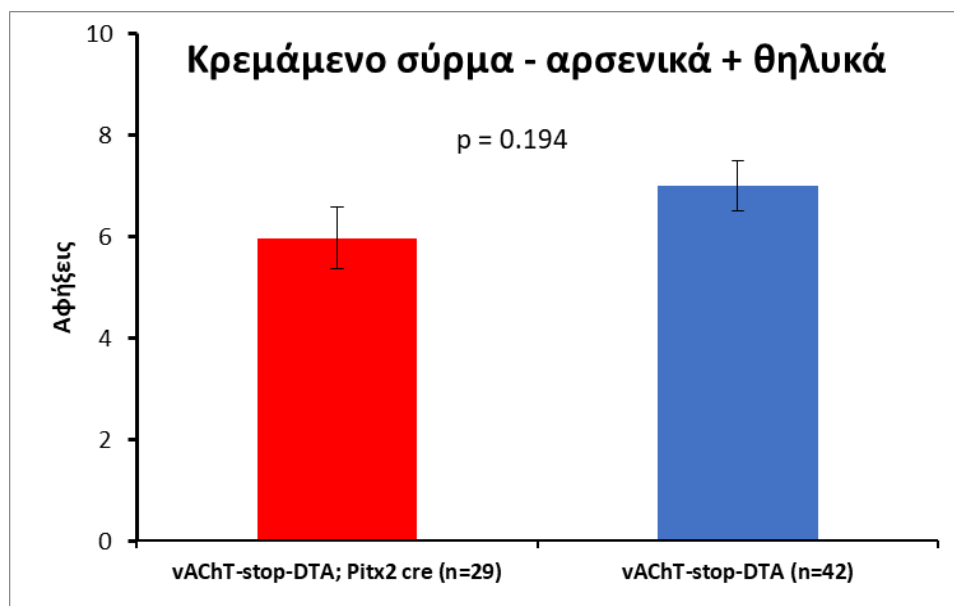
Γράφημα 10α: Τα Dbx1cre+/-;ChATfl/fl ποντίκια παρουσιάζουν σημαντικά λιγότερες αφίξεις στις πλάγιες επιφάνειες συγκριτικά με τα ποντίκια της ομάδας ελέγχου ($P=0.031<0.05$). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν εικοσιδύο ($n=22$) πειραματικά ζώα, από τα οποία 11 ήταν αρσενικά και 11 θηλυκά, και εικοσιτρία ($n=23$) ζώα ελέγχου, από τα οποία 13 ήταν αρσενικά και 10 θηλυκά.



Γράφημα 10β: Τα αρσενικά Cart KO ποντίκια παρουσιάζουν σημαντικά λιγότερες αφίξεις στις πλάγιες επιφάνειες συγκριτικά με τα ποντίκια της ομάδας ελέγχου ($P=0.008<0.05$). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν δεκαεπτά ($n=17$) πειραματικά και έντεκα ($n=11$) ζώα ελέγχου.



Γράφημα 10γ: Τα θηλυκά Cart KO ποντίκια δεν παρουσιάζουν διαφορά στον αριθμό των αφίξεων στις πλάγιες επιφάνειες συγκριτικά με τα ποντίκια της ομάδας ελέγχου ($P=0.307>0.05$). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν δεκαέξι ($n=16$) πειραματικά και έντεκα ($n=11$) ζώα ελέγχου.



Γράφημα 10δ: Τα Pitx2cre^{+/-};vAChT-loxP-stop-loxP-DTA ποντίκια δεν παρουσιάζουν διαφορά στον αριθμό των αφίξεων στις πλάγιες επιφάνειες συγκριτικά με τα ποντίκια της ομάδας ελέγχου ($P=0.194>0.05$). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν εικοσιεννέα ($n=29$) πειραματικά ζώα, από τα οποία 17 ήταν αρσενικά και 12 θηλυκά, και σαραντα δύο ($n=42$) ζώα ελέγχου, από τα οποία 19 ήταν αρσενικά και 23 θηλυκά.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ PITX2 ΔΙΑΜΕΣΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ

Η παρούσα διδακτορική εργασία επικεντρώθηκε σε δύο βασικούς στόχους. Ο πρώτος στόχος αφορά τα αναπτυξιακά γεγονότα που οδηγούν στη διαφοροποίηση των Pitx2⁺ διάμεσων νευρώνων από τον προγονικό πληθυσμό V0. Αρχικά, εξετάστηκε η ηλικία που οι Pitx2⁺ νευρώνες γίνονται μετα-μιτωτικοί. Προσδιορίστηκε ότι οι Pitx2⁺ νευρώνες δεν γεννιούνται σε ένα στενό χρονικό παράθυρο κατά την περίοδο που οι V0 νευρώνες διαφοροποιούνται, αλλά σε ένα ευρύ χρονικό διάστημα.

Επίσης, μελετήθηκε αν η σηματοδότηση Notch και οι Hox παράγοντες εμπλέκονται στη διαδικασία απόκτησης ταυτότητας των Pitx2⁺ διάμεσων νευρώνων. Η σηματοδότηση Notch έχει μια ευρύτατη επιρροή στον προσδιορισμό της κυτταρικής τύχης στο ΚΝΣ των σπονδυλωτών. Μελέτες έχουν δείξει τη συμβολή της στον διαχωρισμό μεταξύ δύο κατηγοριών διάμεσων νευρώνων που προέρχονται από τον προγονικό τομέα p2, προωθώντας τη διαφοροποίηση των νευρώνων GATA2⁺V2b εις βάρος των chx10⁺V2a νευρώνων (Peng et al., 2007). Τα ευρήματα αυτά εγείρουν την πιθανότητα το μονοπάτι Notch να κατέχει έναν γενικότερο ρόλο στη διαφοροποίηση των διαφόρων υποπληθυσμών των διάμεσων νευρώνων στον κοιλιακό νωτιαίο μυελό. Στην εργασία αυτή, εξετάστηκαν ποντίκια με βλάβη στο μονοπάτι Notch, στα οποία δεν βρέθηκε να επηρεάζεται ούτε ο αριθμός των Pitx2⁺ νευρώνων ούτε των χολινεργικών Pitx2⁺ νευρώνων (V0c) που έχουν διαφοροποιηθεί. Επομένως, το Notch σηματοδοτικό μονοπάτι δεν βρέθηκε να εμπλέκεται ενεργά στη διαδικασία διαφοροποίησης των Pitx2⁺ νευρώνων.

Σχετικά με τους Hox μεταγραφικούς παράγοντες, το δίκτυο αυτό θα μπορούσε να συμμετέχει στην διαδικασία διαφοροποίησης των διάμεσων νευρώνων, δεδομένου ότι εμπλέκεται και σε άλλες πτυχές της οργάνωσης των κινητικών συστημάτων. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι πρωτεΐνες Hox6 παίζουν

κεντρικό ρόλο στον καθορισμό της ταυτότητας των κινητικών νευρώνων και στην συνδεσιμότητα κινητικών νευρώνων – μυών (Dasen et al.,2005). Υπάρχουν επίσης προκαταρκτικά στοιχεία που υποστηρίζουν συμμετοχή των Hox πρωτεϊνών στην απόκτηση ταυτότητας και στη λειτουργία των διάμεσων νευρώνων. Ποντίκια που φέρουν μεταλλάξεις Hox σε 8-9 αλληλόμορφα διαφορετικών HoxA ή HoxD γενετικών τόπων, παρουσιάζουν σοβαρά προβλήματα στην κίνηση των πίσω άκρων και θεωρούνται ότι ελέγχουν το κινητικό κύκλωμα (Ζαγοραίου, Yoshida αδημοσίευτα αποτελέσματα). Στα πλαίσια των πειραμάτων της συγκεκριμένης εργασίας, δεν κατέστη δυνατή η μελέτη της εμπλοκής των Hox παραγόντων. Ο λόγος είναι ότι δεν βρέθηκε κάποιος βοηθητικός συμπαράγοντας των Hox στους Pitx2+ νευρώνες, ώστε αυτός να απενεργοποιηθεί και εν συνεχεία να σταματήσει το σηματοδοτικό μονοπάτι των Hox και να μελετηθεί ο ρόλος τους στη διαφοροποίηση των Pitx2+ νευρώνων.

ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CART ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΣΤΟΥΣ PITX2 ΝΕΥΡΩΝΕΣ

Η ανακάλυψη της ύπαρξης του Cart νευροπεπτιδίου στα σώματα των V0c νευρώνων στον νωτιαίο μυελό και στα C boutons πάνω στους κινητικούς νευρώνες, έδωσε το έναυσμα για τον δεύτερο και σημαντικότερο στόχο αυτής της εργασίας, τη λεπτομερή αναπτυξιακή και λειτουργική προσέγγιση της έκφρασης του Cart στα C boutons. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το νευροπεπτίδιο Cart εντοπίζεται σχεδόν σε όλους τους V0c νευρώνες (>95%), εύρημα που δείχνει ότι αναγνωρίστηκε ένα συγκεκριμένο νευροπεπτίδιο που χαρακτηρίζει όλον τον V0c υποπληθυσμό. Η επιβεβαίωση της ύπαρξής του και στις συνάψεις των V0c νευρώνων ενισχύει την υπόθεση ύπαρξης ενός δεύτερου νευροπεπτιδίου που δρα μαζί με την ακετυλοχολίνη στα C-boutons.

Πράγματι, το Cart ικανοποιεί τις γενικές απαιτήσεις που χρειάζονται για να θεωρηθεί ως ένας πεπτιδικός νευροδιαβιβαστής. Αυτές γενικά περιλαμβάνουν αποδείξεις ότι τα πεπτίδια υπάρχουν στους ιστούς, ότι είναι βιολογικά ενεργά και ότι απελευθερώνονται μέσω Ca^{2+} -εξαρτώμενων

μηχανισμών. Όντως, τα CART mRNAs και πεπτίδια εντοπίζονται τόσο στον εγκέφαλο (Douglass et al., 1995; Spiess et al., 1981; Koylu et al., 1998; Gautvik et al., 1996) όσο και στον νωτιαίο μυελό σε προγαγγλιακούς νευρώνες του αυτόνομου νευρικού συστήματος (Dun et al. 2000; Dun et al. 2002) και στους V0c νευρώνες, όπως ταυτοποιήθηκε σε αυτή την εργασία. Το Cart πεπτίδιο, μετά από έγχυσή του στον εγκέφαλο ή προσθήκη του σε καλλιέργειες κυττάρων, έχει βρεθεί ότι επιδρά με διάφορους τρόπους. Στον εγκέφαλο εντοπίζεται συγκεκριμένα σε νευρώνες, όπως στον επικλινή πυρήνα (Smith et al. 1997; Smith et al. 1999), και έχει βρεθεί να συνυπάρχει με άλλους νευροδιαβιβαστές όπως ο GABA (Smith et al. 1999) και η ουσία P (Hubert and Kuhar 2005). Επίσης, βρίσκεται μέσα σε κυστίδια πυκνού πυρήνα (Smith et al. 1997; Smith et al. 1999) και το Cart προπεπτίδιο έχει μία συγκεκριμένη αλληλουχία οδηγό που διευκολύνει την είσοδό του στα κυστίδια και την επακόλουθη επεξεργασία του (Douglass et al., 1995). Επιπλέον, η K^{+} -επαγόμενη απελευθέρωση του Cart σε νευρώνες του υποθαλάμου έχειδειχθεί ότι εξαρτάται από Ca^{2+} μηχανισμούς (Murphy et al., 2000).

Ο υποδοχέας-στόχος του Cart δεν έχει ακόμα βρεθεί, αν και μελέτες υποστηρίζουν πως πρόκειται για υποδοχέα της κατηγορίας των G-διαμεμβρανικών πρωτεϊνών (Yermolaieva et al. 2001; Lakatos et al. 2005; Sen et al. 2007). Τα αποδεικτικά στοιχεία για την ύπαρξη ενός υποδοχέα του Cart υποστηρίζουν την υπόθεση ότι το πεπτίδιο CART είναι νευροδιαβιβαστής και / ή ορμονική ουσία. Ο προσδιορισμός του υποδοχέα στο μέλλον μπορεί να διευκολύνει την αναγνώριση μορίων που δρουν ως αγωνιστές και ανταγωνιστές, τα οποία με τη σειρά τους θα είναι χρήσιμα εργαλεία για πρόσθετες μελέτες των λειτουργιών και μηχανισμών που σχετίζονται με το Cart νευροπεπτίδιο.

CART ΚΑΙ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΗ: ΕΠΗΡΕΑΖΕΤΑΙ Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΕΝΟΣ ΝΕΥΡΟΔΙΑΒΙΒΑΣΤΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΠΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΑΛΛΟΥ?

Το γεγονός ότι η σύναψη C bouton παραμένει στους κινητικούς νευρώνες στα ζώα του γονοτύπου *Dbx1cre+/-;ChATfl/fl*, στα οποία δεν παράγεται ακετυλοχολίνη, αρχικά προκάλεσε έκπληξη, διότι μία μη λειτουργική σύναψη δεν αναμένεται να επιβιώσει. Έτσι, θεωρήθηκε πιθανή η ύπαρξη κάποιου δεύτερου νευροδιαβιβαστή ή τροφικού παράγοντα στη σύναψη. Όταν ανιχνεύτηκε η εμπλουτισμένη έκφραση του *Cart* γονιδίου στους *Pitx2* νευρώνες και εντοπίστηκε το *Cart* νευροπεπτίδιο μέσα στα σώματα όλων των χολινεργικών *Pitx2+* νευρώνων (V0c) αγρίου τύπου ποντικών, θεωρήθηκε ένας υποψήφιος παράγοντας. Ο εντοπισμός του *Cart* και στη C bouton σύναψη αγρίου τύπου ποντικών τον κατέδειξε ως έναν δεύτερο νευροδιαβιβαστή στη σύναψη.

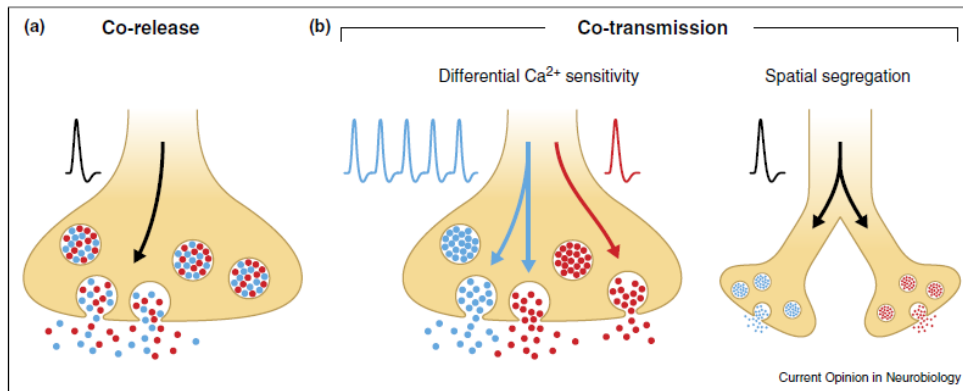
Η ανίχνευση του *Cart* νευροπεπτιδίου και στη C bouton σύναψη των *Dbx1cre+/-;ChATfl/fl* ζώων παρά την απουσία της ακετυλοχολίνης, επιβεβαίωσε τη θεωρία που υποστηρίζει πως η ύπαρξη της σύναψης δικαιολογείται, καθώς παρότι δεν περιέχει ακετυλοχολίνη, περιέχει *Cart*. Είτε το *Cart* που απελευθερώνεται σε αυτά τα ζώα έχει έναν τελείως διαφορετικό ρόλο, εφόσον έχει και διαφορετικό μετασυναπτικό υποδοχέα από την ακετυλοχολίνη, είτε έχει έναν συμπληρωματικό ρόλο και αντισταθμίζει μερικώς την απώλεια της ακετυλοχολίνης. Το *Cart* μπορεί να είναι ο λόγος που τα ζώα χωρίς ακετυλοχολίνη εξακολουθούν να μην εμφανίζουν έντονο δυσλειτουργικό κινητικό φαινότυπο (Zagoraiou et al., 2009).

Είναι πλέον γνωστό ότι το νευροπεπτίδιο *Cart* παίζει ρόλο σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις εκτός από τη συμμετοχή του στις δράσεις της κοκαΐνης και της αμφεταμίνης. Σε αυτές περιλαμβάνονται το σύστημα ανταμοιβής και εθισμού, η ρύθμιση της πρόσληψης τροφής, η απόκριση στο στρες, το άγχος και την καταθλιπτικότητα συμπεριφορά (Rogge et al. 2008). Το *Cart* πεπτίδιο έχει, επίσης, ορμονικό ρόλο (Larsen et al. 2003) (Koylu et al. 1997) και δραστηριότητα στον άξονα εγκεφάλου-εντέρου (Kuhar and Yoho 1999). Το *Cart* έχει εντοπιστεί ευρέως στον εγκέφαλο, τον νωτιαίο μυελό και την περιφέρεια, όπως και άλλες δραστικές

ουσίες που έχουν και αυτές πολλαπλές λειτουργίες. Για παράδειγμα, η ακετυλοχολίνη ή το νευροπεπτίδιο Υ (NPY) που διεγείρει τη σίτιση, συμμετέχουν σε ποικίλες λειτουργίες και είναι και αυτές ευρέως καταναεμημένες σε όλο το σώμα.

Το Cart έχει γενικά δειχθεί ότι μπορεί να λειτουργεί καλά σε συνδυασμό με άλλες δραστικές ουσίες. Εντός των κυττάρων, τα νευροπεπτίδια Cart συσσωματώνονται με πολλές άλλες δραστικές ουσίες και, επομένως, φαίνεται απίθανο να ρυθμίζουν από μόνοι τους πολλές από τις διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν. Για παράδειγμα, η πρόσληψη τροφής είναι γνωστό ότι ρυθμίζεται από δεκάδες διαφορετικούς νευροδιαβιβαστές και ορμόνες.

Σχετικά με τη συνύπαρξή του Cart με την ακετυλοχολίνη στα C boutons, όταν ένας νευρώνας φέρει παραπάνω από έναν νευροδιαβιβαστή, τότε δύο περιπτώσεις ενδέχεται να ισχύουν (**Εικόνα 30**). Η μία είναι αυτή της ταυτόχρονης απελευθέρωσης (*co-release*), κατά την οποία και οι δύο νευροδιαβιβαστές πακετάρονται σε ένα πληθυσμό συναπτικών κυστιδίων, ενώ η άλλη είναι αυτή της ταυτόχρονης μετάδοσης (*co-transmission*), που συνεπάγεται την απελευθέρωση παραπάνω από έναν νευροδιαβιβαστή από μη επικαλυπτόμενα συναπτικά κυστίδια (Vaaga et al., 2014). Ο τρόπος απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών είναι ιδιαίτερα σημαντικός, λόγω των διαφορετικών επιπτώσεων που μπορεί να έχει στη λειτουργία του κυκλώματος. Όσον αφορά στον τρόπο απελευθέρωσης της ακετυλοχολίνης και του Cart, με τις διαγονιδιακές σειρές ζώων που μελετούνται σε αυτή την εργασία δεν είναι δυνατό να εξαχθεί κάποιο ακριβές συμπέρασμα. Το σίγουρο αποτέλεσμα είναι πως η απουσία ακετυλοχολίνης δεν επηρεάζει την παρουσία του Cart στη σύναψη και αντίστοιχα, στα CART KO ποντίκια η απουσία του Cart δεν επηρεάζει την παρουσία της ακετυλοχολίνης στη σύναψη.



Εικόνα 30: Πρότυπα απελευθέρωσης πολλαπλών νευροδιαβιβαστών από έναν νευρώνα. α) με την ταυτόχρονη απελευθέρωση (co-release) και οι δύο νευροδιαβιβαστές (μπλε και κόκκινο) πακετάρονται στο ίδιο σείτ συναπτικών κυστιδίων. Με το δυναμικό ενέργειας στο προσυναπτικό άκρο, απελευθερώνονται κυστιδία που περιέχουν και τους δύο νευροδιαβιβαστές. β) Κατά την ταυτόχρονη μετάδοση (co-transmission) οι νευροδιαβιβαστές βρίσκονται σε χωριστά κυστιδία με διαφορετική απελευθέρωση που ελέγχεται από διαφορετική ευαισθησία στο Ca^{2+} . (αριστερά). Εναλλακτικά, η ταυτόχρονη μετάδοση μπορεί να βασίζεται σε διαφορετική απελευθέρωση από διαφορετικά μετασυναπτικά κομβία (δεξιά). Πηγή: Vaaga et al., 2014.

ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CART ΣΤΑ C BOUTONS

Κατά την αναπτυξιακή μελέτη της έκφρασης του νευροπεπτιδίου Cart στη σύναψη C bouton, βρέθηκε αυξημένη εντόπισή του στα C boutons στα πιο πρώιμα (P6-7) και τα πιο μεταγενέστερα (6 μηνών και ενός έτους) αναπτυξιακά στάδια συγκριτικά με τα ενδιάμεσα στάδια που μελετήθηκαν. Για την ερμηνεία αυτού του αποτελέσματος προτάθηκαν δύο πιθανές περιπτώσεις. Πρώτον, υπάρχει η περίπτωση το Cart να ανιχνεύεται σε λιγότερα C boutons στα ενδιάμεσα αναπτυξιακά στάδια που εξετάστηκαν επειδή εκλύεται σε μεγαλύτερο βαθμό από αυτά, λόγω της πιο έντονης δραστηριότητας των ζώων συγκριτικά με τα αρχικά και τα πιο ύστερα στάδια και για αυτόν τον λόγο να μην εντοπίζεται σε μεγάλο ποσοστό μέσα στη σύναψη. Η δεύτερη περίπτωση, αφορά μία αυξημένη ανάγκη του οργανισμού για το Cart νευροπεπτίδιο και άρα αυξημένη παραγωγή και συσσώρευσή του στις συνάψεις, στην αρχή και στο τέλος της ανάπτυξης. Το γεγονός ότι δεν

υπάρχει κάποια διαφορά στην ύπαρξη του Cart στις C bouton συνάψεις μεταξύ ποντικών που υποβλήθηκαν σε έντονη δραστηριότητα και ποντικών που δεν ασκήθηκαν καθόλου, υποδεικνύει ότι μάλλον το Cart δεν εκλύεται σε μεγαλύτερο βαθμό στα ενδιάμεσα στάδια λόγω πιο έντονης δραστηριότητας. Επομένως, είναι πιο πιθανό στην αρχή και στο τέλος της ανάπτυξης το Cart να παράγεται και να συσσωρεύεται σε μεγαλύτερο βαθμό στις συνάψεις.

ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ C BOUTON ΣΥΝΑΨΗΣ

Είναι πολύ σημαντικό ότι τα ποντίκια που έχουν μη λειτουργική C bouton σύναψη παρουσίασαν σημαντικά μειωμένη απόδοση στη δοκιμασία του κρεμάμενου σύρματος, μία δοκιμασία που μετρά παραμέτρους σχετικές με τη δύναμη και την αντοχή. Συγκεκριμένα, η δοκιμασία κρεμάμενου σύρματος έδειξε στατιστικά σημαντικά λιγότερες αφίξεις στις πλάγιες επιφάνειες για τα ποντίκια που δεν παράγουν ακετυλοχολίνη (Dbx1cre+/-;ChATfl/fl) και για τα αρσενικά ποντίκια που δεν εκφράζουν Cart (Cart KO) στη C-bouton σύναψη, συγκριτικά με τα αντίστοιχα ποντίκια των ομάδων ελέγχου. Για τα Dbx1cre+/-;ChATfl/fl ποντίκια, το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του ηλεκτρομυογραφήματος που περιγράφηκε στην εισαγωγή και έδειξαν ότι ο γαστροκνήμιος μυς αδυνατεί να αυξήσει την ενεργότητά του στον βαθμό που το κάνει στα αγρίου τύπου ποντίκια.

Η μειωμένη ικανότητα των δύο αυτών ομάδων στη δοκιμασία κρεμάμενου σύρματος ίσως να σημαίνει ότι η ακετυλοχολίνη και το Cart έχουν παρόμοια δράση ως συστατικά της C bouton σύναψης. Επίσης, το γεγονός ότι μόνο τα αρσενικά Cart KO ποντίκια παρουσιάζουν σημαντικά λιγότερες αφίξεις στις πλάγιες επιφάνειες συγκριτικά με τα αρσενικά ποντίκια της ομάδας ελέγχου, ενώ τα θηλυκά Cart KO ποντίκια δεν διαφέρουν σημαντικά, δείχνει ότι ίσως το Cart νευροπεπτίδιο να χρειάζεται πιο πολύ στο ένα από τα δύο φύλα. Έτσι, όταν έχει απομακρυνθεί το Cart γονίδιο, μπορεί υπάρχει κάποιο φυλο-εξαρτώμενο φαινόμενο γενικό ή ειδικά σχετιζόμενο με τη μέτρηση της υπομέγιστης δύναμης και του συντονισμού. Μελέτες σε ποντίκια

με προβλήματα στον νωτιαίο μυελό, έχουν αναδείξει διαφορές στον βαθμό ανάρρωσης μεταξύ των δύο φύλων όσον αφορά τη μετακίνηση στον χώρο (Farooque et al., 2006).

Τα ποντίκια που στερούνται εντελώς τις C bouton συνάψεις (vAChT-loxP-stop-loxP-DTA; Pitx2Cre), δεν παρουσιάζουν κάποια διαφορά από αυτά της ομάδας ελέγχου στον αριθμό των αφίξεων, γεγονός που πιθανόν οφείλεται σε αντισταθμιστικούς μηχανισμούς που χρησιμοποίησε το σύστημα, λόγω αφαίρεσης των V0c νευρώνων, και κατ' επέκταση των C boutons, πολύ νωρίς στην ανάπτυξη.

Η μέτρηση των αφίξεων στη δοκιμασία του κρεμάμενου σύρματος φαίνεται να είναι αρκετά ευαίσθητη ώστε να καταδείξει τις διαφορές στην υπομέγιστη δύναμη και τον συντονισμό. Παρατηρώντας τα ποντίκια αντιληφθήκαμε ότι το μυϊκό σύστημα που εμπλέκεται περισσότερο εντοπίζεται κυρίως στα μπροστινά άκρα και στον ανώτερο κορμό του σώματος. Πρόκειται για μια αρκετά περίπλοκη κίνηση για τα ποντίκια, αλλά προσφέρει το μεγάλο πλεονέκτημα ότι την εκτελούν με ανυπομονησία καθώς έχουν το κίνητρο να διαφύγουν προς τις επίπεδες επιφάνειες της συσκευής.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

Η εργασία αυτή συντέλεσε στην μελέτη του νευροπεπτιδίου Cart ως δεύτερο νευροδιαβιβαστή των V0c διάμεσων νευρώνων, εκτός από την ακετυλοχολίνη. Πραγματοποιήθηκε μία λεπτομερής αναπτυξιακή μελέτη της έκφρασής του στα C boutons αγρίου τύπου ποντικών καθώς και Dbx1cre^{+/-};ChAT^{fl/fl} ποντικών που δεν παράγουν ακετυλοχολίνη. Η αναγνώριση του μετασυναπτικού υποδοχέα του Cart και του σηματοδοτικού μονοπατιού που αυτός ενεργοποιεί, θα διευκολύνει την αναγνώριση του λειτουργικού του ρόλου. Είναι πολύ σημαντικό να προσδιοριστεί η δράση που έχει το Cart στους κινητικούς νευρώνες και κατ'επέκταση στον μυ και στην κινητική συμπεριφορά. Συγκεκριμένα, υπάρχουν οι εξής βασικές πιθανότητες σχετικά με τη δράση του: Μπορεί το Cart και η ακετυλοχολίνη να έχουν παρόμοια λειτουργία, επομένως το Cart να δρα ως συνεργατικό μόριο και μαζί να

συντελούν στην ενεργοποίηση των κινητικών νευρώνων και την αυξημένη ενεργότητα του μυός. Μπορεί επίσης να έχουν δύο διαφορετικές λειτουργίες και να επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο τους κινητικούς νευρώνες αλλά να οδηγούν στο ίδιο αποτέλεσμα στην ενεργότητα του μυός. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας κρεμάμενου σύρματος υποστηρίζουν μία από τις δύο αυτές κατευθύνσεις. Εναλλακτικά, υπάρχει και η περίπτωση το Cart και η ακετυλοχολίνη να έχουν δύο διαφορετικές λειτουργίες και να επηρεάζουν διαφορετικά τους κινητικούς νευρώνες. Έτσι, το ερώτημα που παραμένει ανοιχτό και πρέπει πρώτα να απαντηθεί, είναι αν όντως το Cart και η ακετυλοχολίνη έχουν παρόμοια δράση ή ο ρόλος τους είναι εντελώς διαφορετικός.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένα από τα πιο εντυπωσιακά χαρακτηριστικά του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) των σπονδυλωτών είναι η εκπληκτική ποικιλομορφία των κυτταρικών τύπων που το αποτελούν. Η κατανόηση της κυτταρικής ποικιλομορφίας, καθώς και η εξακρίβωση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στην διαφορετικότητα των νευρώνων και στον τρόπο σύνδεσης μεταξύ τους ώστε να προκύψουν ακριβείς συμπεριφορές, παραμένουν πεδία με ανοιχτά ερωτήματα. Η παρούσα διδακτορική διατριβή επικεντρώθηκε στη μελέτη ενός από τους μικρούς υποπληθυσμούς διάμεσων νευρώνων του νωτιαίου μυελού, τον V0cg, που εντοπίζεται στο ενδιάμεσο-κοιλιακό τμήμα του νωτιαίου μυελού και εκφράζει τον μεταγραφικό παράγοντα Pitx2. Αν και μικρός, διαχωρίζεται περαιτέρω σε δύο υποπληθυσμούς: έναν χολινεργικό (V0c) και έναν γλουταματεργικό (V0g). Ο V0c υποπληθυσμός αποτελεί την πηγή των C-bouton συνάψεων (είδος χολινεργικής σύναψης) στους κινητικούς νευρώνες. Αρχικός στόχος αυτής της εργασίας ήταν η μελέτη των αναπτυξιακών γεγονότων που οδηγούν στη διαφοροποίηση των Pitx2+ διάμεσων νευρώνων από τον προγονικό πληθυσμό V0. Μέσω της σήμανσης με 5'-βρωμοδεοξουριδίνη (BrdU), προσδιορίστηκε ότι οι Pitx2+ νευρώνες γίνονται μετα-μιτωτικοί σε ένα ευρύ χρονικό διάστημα και όχι σε ένα συγκεκριμένο χρονικό παράθυρο κατά την περίοδο που οι V0 νευρώνες διαφοροποιούνται. Έγινε, επίσης, μία προσπάθεια να μελετηθεί αν η σηματοδότηση Notch και οι Hox παράγοντες εμπλέκονται στη διαδικασία απόκτησης ταυτότητας των Pitx2+ διάμεσων νευρώνων. Η απενεργοποίηση του Notch σηματοδοτικού μονοπατιού δεν βρέθηκε να επηρεάζει τον αριθμό των Pitx2+ νευρώνων που διαφοροποιούνται και, επομένως, δεν βρέθηκε να εμπλέκεται ενεργά στη διαδικασία διαφοροποίησής τους. Στα πλαίσια των πειραμάτων της συγκεκριμένης εργασίας η μελέτη της εμπλοκής των Hox παραγόντων δεν κατέστη δυνατή, καθώς δεν βρέθηκε κάποιος βοηθητικός συμπάράγοντας των Hox στους Pitx2+ νευρώνες, ώστε αυτός να απενεργοποιηθεί και εν συνεχεία να σταματήσει το σηματοδοτικό μονοπάτι των Hox και να μελετηθεί ο ρόλος τους στη διαφοροποίηση των Pitx2+ νευρώνων.

Ο δεύτερος και σημαντικότερος στόχος αυτής της εργασίας ήταν να εξεταστεί αν οι Pitx2+ νευρώνες εκφράζουν κάποιον δεύτερο νευροδιαβιβαστή, εκτός από την ακετυλοχολίνη, στη σύναψη. Το νευροπεπτιδίο Cart είχε εντοπιστεί στο σώμα σχεδόν όλων των V0c νευρώνων (>95%) και τώρα εντοπίστηκε και στις C bouton συνάψεις τους πάνω στους κινητικούς νευρώνες, επομένως αναγνωρίστηκε ως ένας δεύτερος νευροδιαβιβαστής των V0c νευρώνων. Σε ζώα που παρεμποδίζεται η χολινεργική νευροδιαβίβαση αποκλειστικά στους V0c νευρώνες, η σύναψη C bouton παραμένει στους κινητικούς νευρώνες, γεγονός που αρχικά προκάλεσε έκπληξη, διότι μία μη λειτουργική σύναψη δεν αναμένεται να επιβιώσει. Η ανίχνευση του Cart νευροπεπτιδίου στη C bouton σύναψη σε αυτά τα ζώα, παρά την απουσία της ακετυλοχολίνης, ίσως εξηγεί γιατί η σύναψη επιβίωσε, καθώς παρότι δεν περιέχει ακετυλοχολίνη, περιέχει Cart. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μία λεπτομερής αναπτυξιακή και λειτουργική προσέγγιση της έκφρασης του Cart στα C boutons αγρίου τύπου ζώων. Η αναπτυξιακή ανάλυση ανέδειξε αυξημένο εντοπισμό του στα C boutons στα πιο πρώιμα και τα πιο μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια συγκριτικά με τα ενδιάμεσα στάδια που μελετήθηκαν, υποδεικνύοντας έναν ενδεχόμενο συσχετισμό του με την ανάπτυξη. Κατά τη λειτουργική προσέγγιση, τα ποντίκια που δεν εκφράζουν ακετυλοχολίνη ή Cart στη C bouton σύναψη παρουσίασαν σημαντικά μειωμένη απόδοση στη δοκιμασία του κρεμάμενου σύρματος, μία δοκιμασία που μετρά παραμέτρους σχετικές με τη δύναμη και την αντοχή. Μελλοντικά, είναι σημαντικό να προσδιοριστεί περαιτέρω η δράση που έχει το Cart στους κινητικούς νευρώνες και κατ'επέκταση στον μυ και στην κινητική συμπεριφορά, και αν αυτή η δράση είναι παρόμοια ή διαφορετική από αυτή της ακετυλοχολίνης.

ABSTRACT

One of the most striking features of the Vertebrate Central Nervous System (CNS) is the amazing diversity of its cell types. Identifying the responsible molecular mechanisms for neuronal diversity and understanding how they connect to each other, in order to produce accurate behaviors, still needs further investigation. The present study focused on one small interneuron population in the spinal cord, which is molecularly characterized by the expression of Pitx2 transcription factor. Although small, this population is further subdivided into two subsets: the cholinergic (V0c) and the glutamatergic (V0g). V0c interneurons comprise the source of C bouton synapses (a type of cholinergic synapse) on motor neurons. The primary objective of this work was to study the developmental events that lead to the differentiation of Pitx2⁺ interneurons from the parental V0 population. By using 5'-bromodeoxyuridine (BrdU) labeling, we determined that Pitx2⁺ neurons become post-mitotic over a wide period of time and not at a specific time window during the differentiation period of V0 neurons. We also attempted to study whether Notch signaling and Hox factors are involved in the acquisition process of Pitx2⁺ identity. Inactivation of the Notch signaling pathway was not found to affect the number of Pitx2⁺ differentiated neurons and probably is not actively involved in their differentiation process. In the experiments of this work, studying the involvement of Hox factors was not feasible. We couldn't detect any Hox accessory factor in Pitx2⁺ neurons in order to deactivate it and stop the Hox signaling pathway, to study their role in the differentiation of Pitx2⁺ neurons.

The second and most important objective of this work was to examine whether Pitx2⁺ neurons express a second neurotransmitter, other than acetylcholine, in the synapse. Cart neuropeptide had been previously detected in the somata of almost all V0c interneurons (> 95%) and we detected it also in their C bouton synapses on motor neurons, therefore it was recognized as a second neurotransmitter of the V0c neurons. In animals in which cholinergic neurotransmission is inhibited exclusively in V0c neurons, C bouton synapse persists on motor neurons. This was initially surprising, because a non-functional synapse is not expected to survive. The detection of

Cart neuropeptide in C boutons of these animals may explain why the synapse survived. Although it contains no acetylcholine, it still contains Cart. In addition, a detailed developmental and functional study of Cart expression was carried out in the C boutons of wild-type animals. The developmental analysis showed that Cart existence in the C bouton synapse is significantly higher during the earlier and later developmental stages analyzed compared to the intermediate ones. This finding points to a possible developmental association of Cart requirement. The functional analysis revealed significantly reduced performance of mice that do not express acetylcholine or Cart in the C bouton synapse in the hanging wire test, a test that measures strength and endurance parameters. In the future, it is important to further analyse the effect of Cart on motor neurons and thus on muscles and motor behavior. Furthermore, it is important to determine whether this effect is similar to the effect of acetylcholine or not.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adams, L.D., Gong, W., Vechia, S.D., Hunter, R.G., Kuhar, M.J. 1999. CART: from gene to function. *Brain Res* **848**:137–140.

Alvarez, F. J., Villalba, R. M., Zerda, R., Schneider, S. P. 2004. Vesicular glutamate transporters in the spinal cord, with special reference to sensory primary afferent synapses. *J Comp Neurol* **472**(3): 257-280.

Arvidsson, U. R., Riedl, M., Elde, R., Meister, B. 1997. Vesicular acetylcholine transporter (VACHT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. *Journal of Comparative Neurology* **378**: 454-467.

Bharne, A.P., Upadhya, M.A., Shelkar, G.P., Singru, P.S., Subhedar N.K., Kokare, D.M. 2013. Neuroprotective effect of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide in spinal cord injury in mice. *Neuropharmacology* **67**: 126–135.

Bikoff, J.B., Gabitto, M.I., Rivard, A.F., Drobac, E., Machado, T.A., Miri, A., Brenner-Morton, S., Famojure, E., Diaz, C., Alvarez, F.J. 2016. Spinal inhibitory interneuron diversity delineates variant motor microcircuits. *Cell* **165**: 207-219.

Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T.M., and Ericson, J. 2000. A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* **101**(4): 435-445.

Briscoe, J., Sussel, L., Serup, P., Hartigan-O'Connor, D., Jessell, T.M., Rubenstein, J.L., and Ericson, J. 1999. Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* **398**(6728): 622-627.

Cazalets, J.R., Borde, M., and Clarac, F. 1996. The synaptic drive from the spinal locomotor network to motoneurons in the newborn rat. *J Neurosci* **16**(1): 298-306.

Connaughton, M. P., Priestley, J., Sofroniew, M., Eckenstein, F., Cuello, A. 1986. Inputs to motoneurons in the hypoglossal nucleus of the rat: light and electron microscopic immunocytochemistry for choline acetyltransferase, substance P and enkephalins using monoclonal antibodies. *Neuroscience* **17**: 205-224.

Conradi, S. 1969 Ultrastructure and distribution of neuronal and glial elements on the motoneuron surface in the lumbosacral spinal cord of the adult cat. *Acta Physiol Scand Suppl* **332**: 5–48.

Conradi, S. and Skoglund, S. 1969. Observations on the ultrastructure and distribution of neuronal and glial elements on the motoneuron surface in the lumbosacral spinal cord of the cat during postnatal development. *Acta Physiol Scand Suppl* **333**: 5-52.

Couceyro, P.R., Koylu, E.O., Kuhar, M.J. 1997. Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *J Chem Neuroanat* **12**:229–241.

Dasen, J.S., De Camilli, A., Wang, B., Tucker, P.W., Jessell, T.M. 2008. Hox repertoires for motor neuron diversity and connectivity gated by a single accessory factor, FoxP1. *Cell* **134**:304-316.

Dey A, Xhu, X., Carroll, R., Turck, C.W., Stein, J., Steiner, D.F. 2003. Biological processing of the cocaine and amphetamine-regulated transcript precursors by prohormone convertases, PC2 and PC1/3. *J Biol Chem* **278**:15007–15014.

Douglass, J., McKinzie, A.A., Couceyro, P. 1995. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci* **15**:2471–2481.

Douglass, J. and Daoud, S. 1996. Characterization of the human cDNA and genomic DNA encoding CART: a cocaine and amphetamine-regulated transcript. *Gene* **169**:241–245.

Dun, S.L., Chianca, D.A., Jr., Dun, N.J., Yang, J., and Chang, J.K. 2000. Differential expression of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactivity in the rat spinal preganglionic nuclei. *Neurosci Lett* **294**(3): 143-146.

Dun, S.L., Ng, Y.K., Brailoiu, G.C., Ling, E.A., and Dun, N.J. 2002. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide-immunoreactivity in adrenergic C1 neurons projecting to the intermediolateral cell column of the rat. *J Chem Neuroanat* **23**(2): 123-132.

Ericson, J., Briscoe, J., Rashbass, P., van Heyningen, V., and Jessell, T.M. 1997. Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **62**: 451-466.

Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., and Jessell, T.M. 1996. Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* **87**(4): 661-673.

Farooque, M., Suo, Z., Arnold, P.M., Wulser, M.J., Chou, C.T., Vancura, R.W. 2006. Gender-related differences in recovery of locomotor function after spinal cord injury in mice. *Spinal Cord* **44**:182–187. [L]
[SEP]

Gautvik, K.M., de Lecea, L., Gautvik, V.T., Danielson, P.E., Tranque, P., Dopazo, A., Bloom, F.E., Sutcliffe, J.G. 1996. Overview of the most prevalent hypothalamus-specific mRNAs, as identified by directional tag PCR subtraction. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 8733–8738.

Giocomo, L.M. and Hasselmo, M.E. 2007. Neuromodulation by glutamate and acetylcholine can change circuit dynamics by regulating the relative influence of afferent input and excitatory feedback. *Mol Neurobiol* **36**(2): 184-200.

Harno E, Cottrell EC, White A. 2013. Metabolic pitfalls of CNS Cre-based technology. *Cell Metab* **18**: 21–28.

Helms, A.W., Johnson, J.E. 2003. Specification of dorsal spinal cord interneurons. *Current Opinion in Neurobiology* **13**(1): 42-49.

Hellstrom, J., Oliveira, A.L., Meister, B., Cullheim, S. 2003. Large cholinergic nerve terminals on subsets of motoneurons and their relation to muscarinic receptor type 2. *J Comp Neurol* **460**: 476–486.

Hippenmeyer, S., Vrieseling, E., Sigrist, M., Portmann, T., Laengle, C., Ladle, D.R., Arber, S. 2005. A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. *PLoS Biol* **3**(5):159.

Hochman, S. and Schmidt, B.J. 1998. Whole cell recordings of lumbar motoneurons during locomotor-like activity in the in vitro neonatal rat spinal cord. *J Neurophysiol* **79**(2): 743-752.

Hubert, G.W. and Kuhar, M.J. 2005. Colocalization of CART with substance P but not enkephalin in the rat nucleus accumbens. *Brain Res* **1050**(1-2): 8-14.

Jankowska, E. 1992. Interneuronal relay in spinal pathways from proprioceptors. *Prog Neurobiol* **38**(4): 335-378.

Jessell, T.M. 2000. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* **1**(1): 20-29.

Jia, J., Shen, H., Liu, H.S., Yu, S.J., Reiner, D.J., Harvey, B.J., Hoffer, B.J., Yang, Y., Wang, Y. 2008. CART protects brain from damage through ERK activation in ischemic stroke. *Neuropeptides* **42**: 653–661.

Kandel Eric R., S. J. *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill.

Koylu, E.O., Couceyro, P.R., Lambert, P.D., Kuhar, M.J. 1998. Cocaine- and amphet- amine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. *J Comp Neurol* **391**:115–132.

Koylu, E.O., Couceyro, P.R., Lambert, P.D., Ling, N.C., DeSouza, E.B., Kuhar, M.J. 1997. Immunohistochemical localization of novel CART peptides

in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. *J Neuroendocrinol* **9**:823–833.

Kuhar, M.J. and Yoho, L.L. 1999. CART peptide analysis by Western blotting. *Synapse* **33**(3): 163-171.

Lakatos, A., Prinster, S., Vicentic, A., Hall, R.A., Kuhar, M.J. 2005. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in AtT20 cells via putative G-protein coupled receptors. *Neurosci Lett* **384**(1-2): 198-202.

Lanuza, G.M., Gosgnach, S., Pierani, A., Jessell, T.M., and Goulding, M. 2004. Genetic identification of spinal interneurons that coordinate left-right locomotor activity necessary for walking movements. *Neuron* **42**(3): 375-386.

Larsen, P.J., Seier, V., Fink-Jensen, A., Holst, J.J., Warberg, J., and Vrang, N. 2003. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript is present in hypothalamic neuroendocrine neurones and is released to the hypothalamic-pituitary portal circuit. *J Neuroendocrinol* **15**(3): 219-226.

Li, W., Ochalski, P.A., Brimijoin, S., Jordan, L.M., and Nagy, J.I. 1995. C-terminals on motoneurons: electron microscope localization of cholinergic markers in adult rats and antibody-induced depletion in neonates. *Neuroscience* **65**(3): 879-891.

Liem, K.F., Jr., Jessell, T.M., and Briscoe, J. 2000. Regulation of the neural patterning activity of sonic hedgehog by secreted BMP inhibitors expressed by notochord and somites. *Development* **127**(22): 4855-4866.

Mann, E. 2007. Role of GABAergic inhibition in hippocampal network oscillations. *Trends Neuroscience* **30**:343-349.

Mao, P., Meshul, C. K., Thuillier, P., Reddy, P. H. 2013. Neurotransmitter CART as a New Therapeutic Candidate for Parkinson's Disease. *Pharmaceuticals (Basel)* **6**: 108–123.

Marti, E., Bumcrot, D.A., Takada, R., and McMahon, A.P. 1995. Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants. *Nature* **375**(6529): 322-325.

McMahon, J.A., Takada, S., Zimmerman, L.B., Fan, C.M., Harland, R.M., and McMahon, A.P. 1998. Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev* **12**(10): 1438-1452.

Miles, G.B., Hartley, R., Todd, A.J., and Brownstone, R.M. 2007. Spinal cholinergic interneurons regulate the excitability of motoneurons during locomotion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(7): 2448-2453.

Moran-Rivard, L., Kagawa, T., Saueressig, H., Gross, M.K., Burrill, J., and Goulding, M. 2001. Evx1 is a postmitotic determinant of v0 interneuron identity in the spinal cord. *Neuron* **29**(2): 385-399.

Morikawa, Y., Hisaoka, T., Senba, E. 2009. Characterization of Foxp2-expressing cells in the developing spinal cord. *Neuroscience* **162**: 1150–1162.

Mortensen, A.H. and Camper, S.A. 2016. Cocaine-and Amphetamine Regulated Transcript (CART) Peptide Is Expressed in Precursor Cells and Somatotropes of the Mouse Pituitary Gland. *PLoS ONE* **11**(9): e0160068.

Murphy, K.G., Abbott, C.R., Mahmoudi, M., Hunter, R., Gardiner, J.V, Rossi, M., Stanley, S.A., Ghatei, M.A., Kuhar, M.J. 2000. Quantification and synthesis of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (79–102)-like immunoreactivity and mRNA in rat tissues. *J Endocrinol.* **166**: 659–668.

Nagy, J.I., Yamamoto, T., and Jordan, L.M. 1993. Evidence for the cholinergic nature of C-terminals associated with subsurface cisterns in alpha-motoneurons of rat. *Synapse* **15**(1): 17-32.

Nógrádi, A., Vrbová, G. Anatomy and Physiology of the Spinal Cord. *Madame Curie Bioscience Database* [Internet].

Orsal, D., Perret, C., and Cabelguen, J.M. 1986. Evidence of rhythmic inhibitory synaptic influences in hindlimb motoneurons during fictive locomotion in the thalamic cat. *Exp Brain Res* **64**(1): 217-224.

Panayiotou E., Panayi E., Lapathitis G., Francius C., Clotman F., Kessaris N., Richardson W. D., Malas S. 2013. Pax6 is expressed in subsets of V0 and V2 interneurons in the ventral spinal cord in mice. *Gene Expr. Patterns* **13**: 328-334.

Pierani, A., Brenner-Morton, S., Chiang, C., and Jessell, T.M. 1999. A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell* **97**(7): 903-915.

Pierani, A., Moran-Rivard, L., Sunshine, M.J., Littman, D.R., Goulding, M., and Jessell, T.M. 2001. Control of interneuron fate in the developing spinal cord by the progenitor homeodomain protein Dbx1. *Neuron* **29**(2): 367-384.

Qiu, B., Hu, S., Liu, L., Chen, M., Wang, L., Zeng, X., Zhu, S. 2013. CART attenuates endoplasmic reticulum stress response induced by cerebral ischemia and reperfusion through upregulating BDNF synthesis and secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **436**: 655–659.

Roelink, H., Porter, J.A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D.T., Beachy, P.A., and Jessell, T.M. 1995. Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* **81**(3): 445-455.

Rogge, G., Jones, D., Hubert, G.W., Lin, Y., Kuhar, M.J. 2008. CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions. *Nat Rev Neurosci* **9**(10): 747-758.

Sen, A., Bettegowda, A., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.J., Smith, G.W. 2007. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript regulation of follicle-stimulating hormone signal transduction in bovine granulosa cells. *Endocrinology* **148**(9): 4400-4410.

Sha, D., Wang, L., Zhang, J., Qian, L., Li, Q., Li, J., Qian, J., Gu, S., Han L., Xu, P., Xu, Y. 2014. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide increases mitochondrial respiratory chain complex II activity and protects against oxygen-glucose deprivation in neurons. *Brain Res.* **1582**: 107–113.

Shefchyk, S.J. and Jordan, L.M. 1985. Motoneuron input-resistance changes during fictive locomotion produced by stimulation of the mesencephalic locomotor region. *J Neurophysiol* **54**(5): 1101-1108.

Silos-Santiago, I. and Snider, W.D. 1992. Development of commissural neurons in the embryonic rat spinal cord. *J Comp Neurol* **325**(4): 514-526.

Silos-Santiago, I. and Snider, W.D. 1994. Development of interneurons with ipsilateral projections in embryonic rat spinal cord. *J Comp Neurol* **342**(2): 221-231.

Smith, Y., Koylu, E.O., Couceyro, P., Kuhar, M.J. 1997. Ultrastructural localization of CART (cocaine- and amphetamine- regulated transcript) peptides in the nucleus accumbens of monkeys. *Synapse* **27**: 90–94.

Smith, Y., Kieval, J., Couceyro, P.R., Kuhar, M.J. 1999. CART peptide-immunoreactive neurones in the nucleus accumbens in monkeys: ultrastructural analysis, colocalization studies, and synaptic interactions with dopaminergic afferents. *J Comp Neurol.* **407**: 491–511.

Spiess, J., Villarreal, J., Vale, W. 1981. Isolation and sequence analysis of a somatostatin-like polypeptide from ovine hypothalamus. *Biochemistry* **20**:1982–1988.

Stepien, A.E. and Arber, S. 2008. Probing the locomotor conundrum: descending the 'V' interneuron ladder. *Neuron* **60**(1): 1-4.

Thim, L., Kristensen, P., Nielsen, P.F., Wulff, B.S., Clausen, J.T. 1999. Tissue-specific processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptides in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:2722–2727.

Todd, A.J., Hughes, D.I., Polgar, E., Nagy, G.G., Mackie, M., Ottersen, O.P., Maxwell, D.J. 2003. The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. *Eur. J. Neurosci.* **17**: 13–27.

Vaaga, C. E., Borisovska, M. and Westbrook, G. L. 2014. Dual-transmitter neurons: functional implications of co-release and co-transmission. *Curr. Opin. Neurobiol.* **29**: 25–32.

Vander, A. J. S. *Human Physiology: The Mechanisms of Body Function*. McGraw Hill Higher Education.

Wang, Y., Qiu, B., Liu, J., Zhu, W.-G. & Zhu, S. 2014. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript facilitates the neurite outgrowth in cortical neurons after oxygen and glucose deprivation through PTN-dependent pathway. *Neuroscience* **277**: 103–110.

Wierup, N., Richards W.G., Bannon A.W., Kuhar M.J., Åhrén B., Sundler F. 2005. CART knock out mice have impaired insulin secretion and glucose intolerance, altered beta cell morphology and increased body weight. *Regulatory Peptides* **129**: 203–211.

Xu, Y., Zhang, W., Klaus, J., Young, Y., Koerner, I., Sheldahl, L.C., Hurn, P.D., Martínez-Murillo, F., Alkayed, N.J. 2006. Role of cocaine- and amphetamine-regulated transcript in estradiol-mediated neuroprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **103**: 14489–14494.

Yermolaieva, O., Chen, J., Couceyro, P.R., Hoshi, T. 2001. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide modulation of voltage-gated Ca²⁺ signaling in hippocampal neurons. *J Neurosci* **21**(19): 7474-7480.

Zagoraiou, L., Akay, T., Martin, J.F., Brownstone, R.M., Jessell, T.M., and Miles, G.B. 2009. A cluster of cholinergic premotor interneurons modulates mouse locomotor activity. *Neuron* **64**(5): 645-662.