



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



**ΑΚΑΔΗΜΙΑ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη χολινεργικών διάμεσων νευρώνων στον νωτιαίο μυελό

**Δέσποινα Δ. Μπόσβελη**

Επιβλέπων καθηγητής:

Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ**  
**2023**

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΚΑΔΗΜΙΑ ΑΘΗΝΩΝ  
ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη χολινεργικών διάμεσων νευρώνων στο νωτιαίο μυελό

Study of cholinergic inter neurons in the spinal cord

**Δέσποινα Δ. Μπόσβελη**

Εξεταστική επιτροπή:

Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Λασκαρώ Ζαγοραίου, Ερευνήτρια Γ' ΙΙΒΕΑΑ

Πολίτης Παναγιώτης, Ερευνητής Β' ΙΙΒΕΑΑ

## **Μελέτη χολινεργικών διάμεσων νευρώνων στον νωτιαίο μυελό**

*Τμήμα Βιοτεχνολογίας*

*Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών*

### **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Ένα από τα πιο εντυπωσιακά χαρακτηριστικά του Νευρικού Συστήματος των σπονδυλωτών είναι η ποικιλομορφία των κυτταρικών τύπων που το αποτελούν. Η κατανόηση της κυτταρικής ποικιλομορφίας, καθώς και η εξακρίβωση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στη διαφορετικότητα των νευρώνων και στον τρόπο κατανομής, μετανάστευσης ίσως και σύνδεσης τους ώστε να προκύψουν ακριβείς συμπεριφορές, παραμένουν ανοιχτά ερωτήματα. Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή επικεντρώθηκε αρχικά, στη μελέτη της πρωτεΐνης Asb4. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη, έχει συνδεθεί με πληθώρα λειτουργιών, από την αγγειογένεση μέχρι και τον καρκίνο. Ωστόσο, η κατανομή της στον νωτιαίο μυελό δεν έχει μελετηθεί διεξοδικά, ούτε και η παρουσία της πρωτεΐνης Asb4 σε γνωστούς πληθυσμούς νευρώνων. Τα αποτελέσματα, έδειξαν ότι περίπου το 68% του Pitx2+πληθυσμού εκφράζει την πρωτεΐνη Asb4. Το δεύτερο μέρος της εργασίας αυτής, ήταν η διερεύνηση της προέλευσης χολινεργικών απολήξεων στο ραχιαίο κέρασ. Αποδείξαμε, ότι προέρχονται κατά μεγάλο μέρος από Pitx2+ νευρώνες.

**Επιστημονική περιοχή:** Νευροβιολογία

**Λέξεις κλειδιά:** Νωτιαίος μυελός, κινητικοί νευρώνες, διάμεσοι νευρώνες, Pitx2+, CART, Asb4

## **Study of cholinergic inter neurons in the spinal cord**

*Department of Biotechnology*

*Institute for Biomedical Research of the Academy of Athens*

### **ABSTRACT**

One of the most striking features of the Nervous System is the amazing diversity of its cell types. Understanding the cellular diversity, as well as, identifying the molecular mechanisms that lead to neuronal diversity and the way neurons connect to other neurons in order to produce precise behaviours, remain unknown fields. The present dissertation, initially focused on the study of the Asb4 protein. This protein has been linked to a variety of functions, from angiogenesis to cancer. However, its distribution in the spinal cord and the putative co-localization of the Asb4 protein with known populations of neurons have not been studied in detail. Our experiments showed that about 68% of the Pitx2+ population express the Asb4 protein. The second question was the origin of numerous cholinergic terminals in the dorsal horn. We demonstrated that the majority of the cholinergic terminals are of Pitx2+ origin.

**Scientific area:** Neuroscience

**Keywords:** Spinal cord, motor neurons, interneurons, Pitx2+, CART, Asb4

*Στους αγαπημένους μου γονείς,  
Δαμιανό και Ελένη*

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	8
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	9
1.1 ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ .....	9
1.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ .....	10
1.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	13
1.3.1 ΝΕΥΡΩΝΕΣ .....	14
1.3.2. ΝΕΥΡΟΓΛΟΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ .....	15
1.4 ΝΩΤΙΑΙΟΣ ΜΥΕΛΟΣ .....	15
1.4.1 ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ .....	17
1.4.2 ΔΙΑΜΕΣΟΙ ΚΑΙ ΚΙΝΗΤΙΚΟΙ ΝΕΥΡΩΝΕΣ .....	19
1.5 V0c ΔΙΑΜΕΣΟΙ ΝΕΥΡΩΝΕΣ .....	22
1.6 CART (Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript) .....	23
1.7 ASB4.....	24
1.7.1 ASB4 ΣΤΟΝ ΝΩΤΙΑΙΟ ΜΥΕΛΟ .....	26
1.8 ΝΕΥΡΙΚΕΣ ΑΠΟΛΗΞΕΙΣ ΚΑΙ ΟΙ ΑΞΟΝΕΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΡΑΧΙΑΙΟ ΚΕΡΑΣ ΤΟΥ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ.....	27
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	31
2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ .....	31
2.2 ΣΥΣΤΗΜΑ CRE-LOX .....	32
2.3 ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΙΣ .....	34
2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΙΣΤΟ ΓΙΑ ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ .....	35
2.5 ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΜΕ PCR.....	35
2.6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ GEL ΑΓΑΡΟΖΗΣ .....	40
2.6.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΕΣ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ .....	41
2.7 ΕΝΔΟΚΑΡΔΙΑΚΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΠΑΡΑΦΟΡΜΑΛΔΕΪΔΗΣ 4% (PERFUSION).....	44
2.7.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΕΣ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΓΙΑ PERFUSION .....	46
2.8 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ.....	47
2.9 ΕΓΚΛΕΙΣΗ ΙΣΤΟΥ .....	48
2.10 ΚΡΥΟΤΟΜΕΣ .....	50

2.11 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ .....	51
2.12 ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ .....	53
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	55
4.1 ASB4 ΣΤΟΝ ΝΩΤΙΑΙΟ ΜΥΕΛΟ .....	55
4.2 ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΣΧΗΜΑ ΓΙΑ ΕΞΑΛΕΙΨΗ ΤΩΝ V0c ΝΕΥΡΩΝΩΝ .....	83
4.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΣΧΗΜΑΤΟΣ ΓΙΑΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΑΠΟΛΗΞΕΩΝ ΤΟΥ ΡΑΧΙΑΙΟΥ ΚΕΡΑΤΟΣ .....	84
5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	92
5.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ASB4 .....	92
5.2 ΧΟΛΙΝΕΡΓΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΑΠΟΛΙΞΕΩΝ ΚΑΙ ΑΞΟΝΩΝ ΤΟΥ ΟΠΙΣΘΙΟΥ ΚΕΡΑΤΟΣ ΤΟΥ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ .....	94
6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	96

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Κέντρο Βασικών Ερευνών του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών υπό την επίβλεψη της Δρ. Λ. Ζαγοραίου, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Κύκλου Σπουδών «Βιολογία Συστημάτων» του Τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά το χρονικό διάστημα 2020-2022. Ο υπεύθυνος καθηγητής για την εργασία αυτή, ήταν ο Δρ. Π. Χατζόπουλος, Καθηγητής του Τομέα Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα πρωταρχικά, να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια της παρούσας μελέτης, τη Δρ. Λ. Ζαγοραίου για την τιμή και την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριό της καθώς και για τη συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξη. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Π. Χατζόπουλο και τον Δρ. Π. Πολίτη για το χρόνο τους και τη συμμετοχή τους στην Τριμελή Επιτροπή. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Τσάπε Ειρήνη, Ελευθεριάδη Παναγιώτη, Κόντη Γιώργο και Κοντάκου Όλγα, για τις ατέλειωτες ώρες που περάσαμε στο εργαστήριο, τη συνεργασία αλλά και τη στήριξη που μου έδιναν συνεχώς. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου του Δρ. Θ. Ράμπια, και ιδιαίτερα τις Χοτζαλαρη Λορένα και Μακρή Αντιγόνη για τη συνεχή υποστήριξη και ενθάρρυνση.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τους αγαπημένους μου ανθρώπους. Τόσο την οικογένειά μου, για την απύθμενη αγάπη και συμπαράσταση που μου δίνουν σε κάθε βήμα, όσο και τις φίλες μου Στέλα και Νάντια, το φίλο μου Βαγγέλη και το σύντροφό μου Γιώργο για την ενθάρρυνση και συντροφιά όλα αυτά τα χρόνια.

«Με την άδεια μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της».

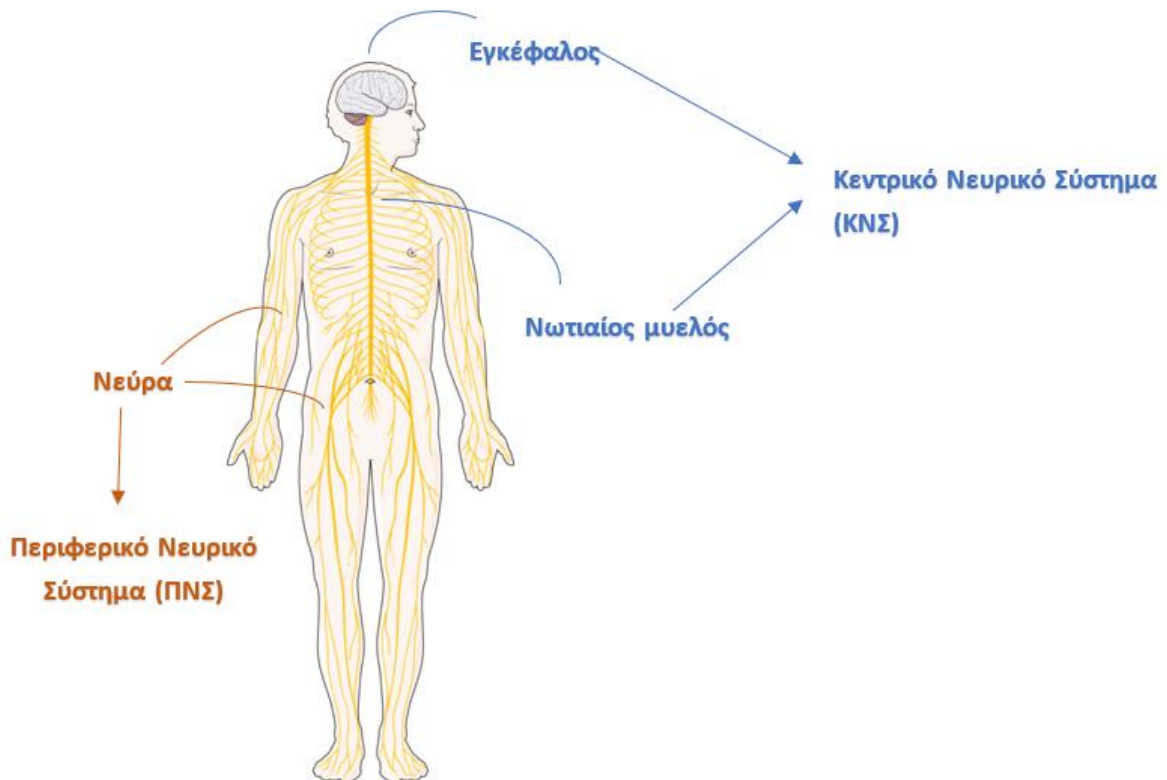


# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μεγάλη πρόκληση των επιστημόνων αποτελεί η οργάνωση των νευρώνων του νευρικού συστήματος, για να έχουμε τη δυνατότητα της κίνησης και της μετακίνησης στο χώρο (locomotion, ικανότητας των ζώων να μεταφέρονται από το ένα σημείο στο άλλο). Η ακρίβεια εκτέλεσης της κίνησης αποτελεί ιδιότητα ζωτικής σημασίας, καθώς σχετίζεται τόσο με την εύρεση τροφής όσο και με την αποφυγή θηρευτών και κατ' επέκταση την επιβίωση. Η μετακίνηση στο χώρο, αποτελεί μια ρυθμική συμπεριφορά η οποία χαρακτηρίζεται από τη συχνότητα και το πρότυπο βάδισης, την εναλλαγή δεξιού-αριστερού άκρου, καθώς και την εναλλαγή κάμψης-έκτασης των αρθρώσεων των άκρων. Το έναυσμα για την εκκίνηση του περπατήματος, έρχεται από τον εγκέφαλο, ωστόσο η εκτέλεση γίνεται από τον νωτιαίο μυελό, με τελευταίους εντολείς τους κινητικούς νευρώνες του νωτιαίου μυελού, οι οποίοι στέλνουν τους άξονές τους στους μύες και δίνουν εντολή για σύσπαση. Η έρευνα τα τελευταία χρόνια, εστιάζεται στη διερεύνηση των γεγονότων πριν από την τελευταία εντολή, δηλαδή στη μελέτη των δικτύων διάμεσων νευρώνων του νωτιαίου μυελού που ενορχηστρώνουν τη μετακίνηση στο χώρο με τόση μεγάλη ακρίβεια.

## 1.1 ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το νευρικό σύστημα, εξαπλώνεται σε ολόκληρο το σώμα, λαμβάνει μηνύματα από το σύστημα των αισθητήριων οργάνων, ανιχνεύει, αναλύει και ερμηνεύει τα ερεθίσματα και αποκρίνεται σ' αυτά. Μ' αυτό τον τρόπο, ελέγχει και συντονίζει τις λειτουργίες άλλων συστημάτων, όπως είναι το μυϊκό, συμβάλλει δηλαδή, στις κινήσεις του σώματος. Επιπλέον, ο οργανισμός αντιλαμβάνεται και αντιδρά ανάλογα με τις μεταβολές του περιβάλλοντος. Οι πληροφορίες για τις μεταβολές αυτές, συλλέγονται από τους υποδοχείς και μεταβιβάζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Μετά την επεξεργασία των πληροφοριών το κεντρικό νευρικό σύστημα δίνει τις κατάλληλες εντολές στους μύς. Μ' αυτόν τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα στον οργανισμό να προσαρμόζει τις λειτουργίες του ανάλογα με τις μεταβολές του περιβάλλοντος, απαραίτητη προϋπόθεση για την επιβίωσή του. Τα όργανα του νευρικού συστήματος είναι ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός, που αποτελούν το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), και τα νεύρα, που αποτελούν το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ) (**Εικόνα 1**).

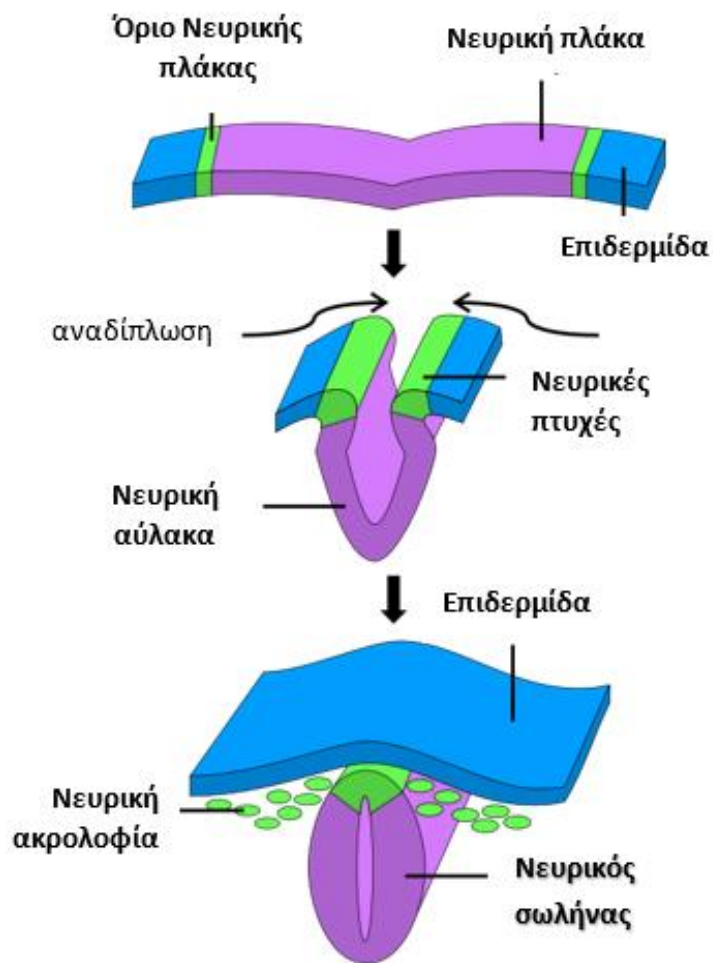


**Εικόνα 1 Νευρικό σύστημα.** Απεικόνιση του συνόλου των οργάνων του νευρικού συστήματος. Ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός αποτελούν το ΚΝΣ και τα νεύρα αποτελούν το ΠΝΣ. Τροποποιημένη εικόνα από smart servier medical art.

## 1.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Κατά την εμβρυογένεση, το νευρικό σύστημα προέρχεται καθ' ολοκληρία από το εξώδερμα. Τα νευρικά κύτταρα καθώς και τα κύτταρα της γλοίας προέρχονται από ένα στρώμα εξωδερμικών κυττάρων που εντοπίζονται κατά μήκος της ραχιαίας γραμμής του εμβρύου στο στάδιο του γαστριδίου. Καθώς αυτό το στρώμα αποκτά νευρικές ιδιότητες, αρχίζει να σχηματίζεται η νευρική πλάκα (neural plate). Στη φάση της νευριδίωσης, το ΚΝΣ αναπτύσσεται από ένα επίπεδο φύλλο κυττάρων (νευρική πλάκα) και αναδιπλώνεται με σκοπό το σχηματισμό του νευρικού σωλήνα. Το πλατύ πρόσθιο άκρο της θα σχηματίσει τον εγκέφαλο και το στενό ραχιαίο άκρο της θα σχηματίσει το νωτιαίο μυελό. Η νευρική αύλακα (neural groove) τρέχει κατά μήκος της μέσης γραμμής της νευρικής πλάκας χωρίζοντας την σε αριστερό και δεξί τμήμα. Τα δύο μισά άκρα της νευρικής πλάκας, οι νευρικές πτυχές (neural folds), ανασηκώνονται και η νευρική πλάκα παίρνει το σχήμα U. Τελικά οι άκρες των

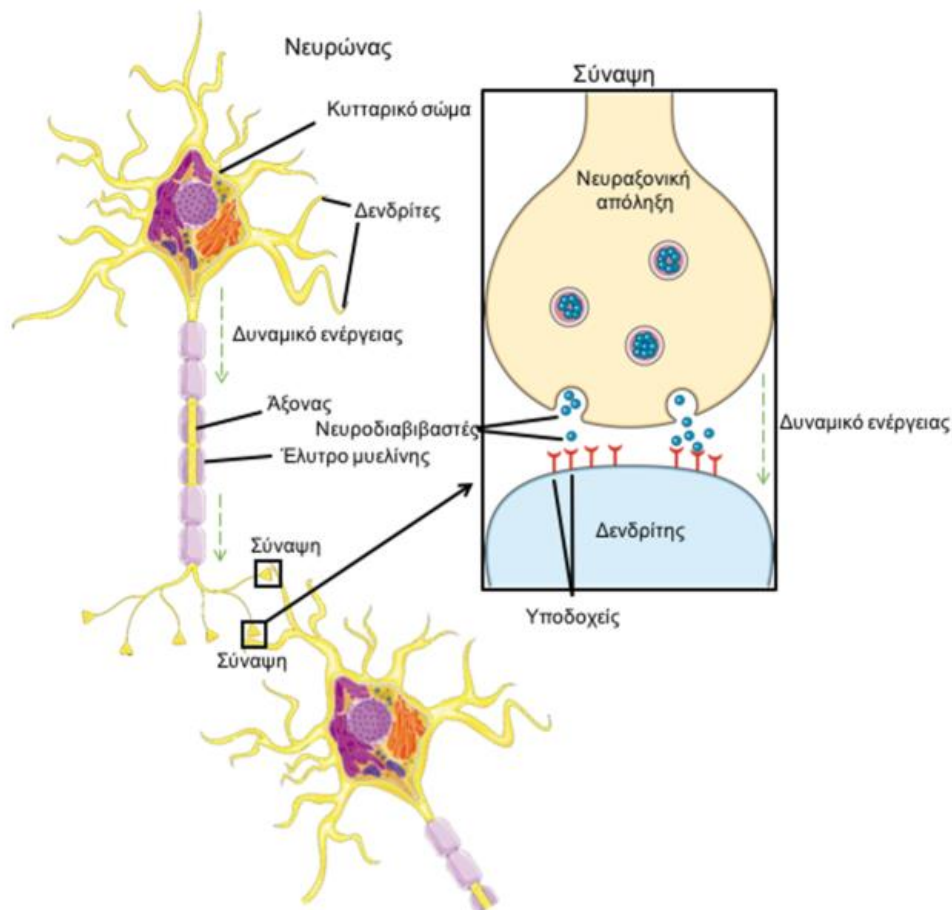
πτυχώσεων συμφύονται και σχηματίζεται ο κούφιος νευρικός σωλήνας, ο οποίος αποσυνδέεται από το επιφανειακό εξώδερμα (**Εικόνα 2**). Μεταξύ της νευρικής πλάκας και του υπόλοιπου εκτοδέρματος, που θα δώσει τελικά την επιδερμίδα, βρίσκεται μια λεπτή ζώνη ιστού, η νευρική ακρολοφία. Από αυτή τη δομή, που σχηματίζεται από τις νευρικές πτυχώσεις, προκύπτει μεγάλο μέρος των σκελετικών ιστών της κεφαλής αλλά και τα νωτιαία, συμπαθητικά και παρασυμπαθητικά γάγγλια. Η συνδυασμένη δράση των πρωτεϊνών των οικογενειών BMP (Bone morphogenetic protein), Wnt, FGF (Fibroblast growth factor), retinoic acid, Notch τα οποία παράγονται από το εξώδερμα και το υποκείμενο μεσόδερμα οδηγούν στην ανάπτυξη της νευρικής ακρολοφίας. Η BMP αποτελεί το βασικό μορφογόνο της ραχιαίας μοίρας του νωτιαίου μυελού και εκκρίνεται από επιδερμικό εξώδερμα και το οροφιαίο πέταλο, επάγοντας τα κύτταρα της νευρικής πλάκας και των ραχιαίων διάμεσων νευρώνων (Liem, Jessell, & Briscoe, 2000; McMahon et al., 1998). Η επιμήκυνση του νευρικού σωλήνα, όσο και της υποκείμενης, μεσοδερμικής προέλευσης, νωτοχορδής, δίνει τον πρόδρομο του νευρικού συστήματος, από τον οποίο θα αναπτυχθούν όλες οι δομές. Ο βαθμός, όμως του κυτταρικού πολλαπλασιασμού δεν είναι ομοιόμορφος καθ' όλο το μήκος του νευρικού σωλήνα. Διαφορετικές περιοχές του νευρικού επιθηλίου διευρύνονται με διαφορετικούς ρυθμούς και σχηματίζουν εξειδικευμένες περιοχές του ώριμου κεντρικού νευρικού συστήματος. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων στο πρόσθιο τμήμα του αναπτυσσόμενου νευρικού σωλήνα παρουσιάζει σταδιακά τρεις διογκώσεις, τον πρόσθιο (forebrain), τον διάμεσο (midbrain) και τον οπίσθιο εγκέφαλο (hindbrain), δομές που θα δώσουν όλες τις κρανιακές εγκεφαλικές δομές. Το υπόλοιπο τμήμα του νευρικού σωλήνα θα δώσει γένεση στον νωτιαίο μυελό.



**Εικόνα 2** Επαγωγή και οργάνωση του νωτιαίου μυελού. Στη φάση της νευριδίωσης, η νευρική πλάκα αναδιπλώνεται προς σχηματισμό του νευρικού σωλήνα, το ουραίο τμήμα του νευρικού σωλήνα θα δημιουργήσει το νωτιαίο μυελό, ενώ το κεφαλικό τμήμα τον εγκέφαλο. Τροποποιημένη εικόνα από Strephonsays.

### 1.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα όργανα του νευρικού συστήματος, δηλαδή ο εγκέφαλος, ο νωτιαίος μυελός και τα νεύρα αποτελούνται από νευρικό ιστό. Τα κύτταρα του νευρικού ιστού είναι δύο ειδών: τα νευρικά κύτταρα ή νευρώνες και τα νευρογλοιακά κύτταρα (**Εικόνα 3**). Οι νευρώνες, που αποτελούν τη δομική και λειτουργική μονάδα του νευρικού συστήματος, έχουν την ιδιότητα να αντιδρούν σε συγκεκριμένες μεταβολές του περιβάλλοντος (αισθητικοί), να μεταφέρουν τα μηνύματα από τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό στα εκτελεστικά όργανα (κινητικοί νευρώνες) κ.ά. Τα νευρογλοιακά κύτταρα είναι πολύ περισσότερα από τους νευρώνες, έχουν βοηθητικό ρόλο, καθώς χρησιμεύουν στη στήριξη, απομόνωση και θρέψη των νευρώνων.



**Εικόνα 3 Σχηματική απεικόνιση ενός νευρώνα (αριστερά) και της σύναψης (δεξιά).** Ο νευρώνας με τους δενδρίτες φαίνεται στο αριστερό μέρος της εικόνας και ο άξονας που είναι περιτυλιγμένος από το έλυτρο μυελίνης. Στο δεξί τμήμα αναπαρίσταται μια σύναψη, μέσω της οποίας μεταδίδεται το σήμα, επομένως και η πληροφορία από μόρια που ονομάζονται νευροδιαβιβαστές. Τροποποιημένη εικόνα από Smart Servier Medical Art.

### 1.3.1 ΝΕΥΡΩΝΕΣ

Κάθε νευρώνας αποτελείται από το κυτταρικό σώμα και από τις αποφυάδες. Το κυτταρικό σώμα περιέχει τον πυρήνα και τα οργανίδια του κυττάρου. Οι νευρικές αποφυάδες διακρίνονται στους δενδρίτες και στο νευράξονα ή νευρίτη. Ο νευράξονας, αποτελεί μια επιμήκη κυτταρική δομή, επενδυμένη εσωτερικά με κυτταροσκελετικό σύστημα και εξωτερικά με έλυτρα μυελίνης. Ο νευράξονας ευθύνεται για τη μετάδοση τόσο των ηλεκτρικών σημάτων όσο και κυτταρικών συστατικών προς τις συναπτικές απολήξεις. Εκεί που τελειώνει ο άξονας υπάρχουν σημαντικά στοιχεία τα τελικά κομβία που χρειάζονται για τη μεταφορά των πληροφοριών προς άλλους δενδρίτες άλλων νευρώνων. Κύρια χρησιμότητα των νευρώνων είναι η πρόσληψη, η αγωγή και μεταβίβαση διεγέρσεων. Οι δενδρίτες είναι συνήθως μικρές σε μήκος αποφυάδες και διακλαδίζονται σε πολλές μικρές απολήξεις. Κάθε νευρώνας διαθέτει μόνο έναν άξονα, αλλά αυτός ο άξονας μπορεί να διακλαδίζεται έντονα, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η επικοινωνία με πολλά κύτταρα-στόχους. Οι νευρώνες παρουσιάζουν μορφολογικές και λειτουργικές διαφορές και διακρίνονται, ανάλογα με τη λειτουργία που επιτελούν, σε αισθητικούς, κινητικούς και διάμεσους. Οι αισθητικοί νευρώνες μεταφέρουν μηνύματα από τις διάφορες περιοχές του σώματος στον νωτιαίο μυελό και στον εγκέφαλο. Αντίθετα, οι κινητικοί νευρώνες μεταφέρουν τα μηνύματα από τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό στα εκτελεστικά όργανα, τα οποία απαντούν είτε με σύσπαση (μύες) είτε με έκκριση ουσιών (αδένες). Τέλος, οι διάμεσοι ή συνδετικοί νευρώνες βρίσκονται αποκλειστικά στον εγκέφαλο και στον νωτιαίο μυελό και κατευθύνουν τα μηνύματα που προέρχονται από τους αισθητικούς νευρώνες στις κατάλληλες περιοχές του εγκεφάλου ή του νωτιαίου μυελού. Επιπλέον, οι διάμεσοι νευρώνες, μεταφέρουν τα μηνύματα από μία περιοχή του εγκεφάλου ή του νωτιαίου μυελού σε μία άλλη και τελικά στους κατάλληλους κινητικούς νευρώνες, ενώ ορίζουν το περπάτημα, συμμετέχουν σε αντανακλαστικά κ.ά.

Οι νευρώνες συνδέονται με άλλους νευρώνες (ή εκτελεστικά όργανα) με τη βοήθεια συνάψεων. Σύναψη, είναι η περιοχή λειτουργικής σύνδεσης των τελικών απολήξεων / κομβίων του νευράξονα ενός νευρώνα με άλλα νευρικά κύτταρα ή με ειδικά διαμορφωμένες θέσεις των εκτελεστικών οργάνων (μυών ή αδένων) (**Εικόνα 3**).

Η μεταφορά της νευρικής ώσης μέσω των συνάψεων πραγματοποιείται συνήθως με τη βοήθεια χημικών ενώσεων που παράγει το νευρικό κύτταρο, των νευροδιαβιβαστών, οι οποίες εκκρίνονται από τις απολήξεις των νευραξόνων. Ο πιο διαδεδομένος νευροδιαβιβαστής στο ΚΝΣ είναι η ακετυλοχολίνη.

### 1.3.2. ΝΕΥΡΟΓΛΟΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

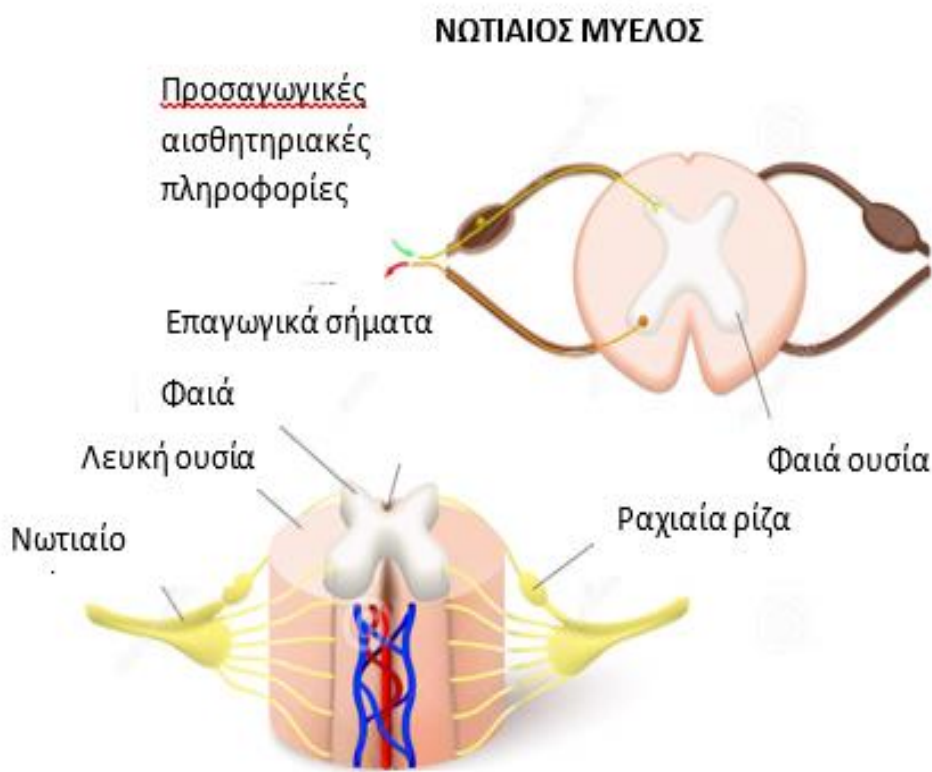
Τα νευρογλοιακά κύτταρα έχουν ποικίλα σχήματα και ειδικές λειτουργίες. Τα βοηθητικά αυτά κύτταρα προμηθεύουν με θρεπτικά συστατικά το νευρώνα και χρησιμεύουν στην απορρόφηση και απομάκρυνση των άχρηστων ουσιών από αυτούς. Τα νευρογλοιακά κύτταρα, που περιβάλλουν το νευράξονα των περισσότερων από τους νευρώνες, συμβάλλουν στη μόνωσή του και στην επιτάχυνση της μεταφοράς της νευρικής ώσης.

## 1.4 ΝΩΤΙΑΙΟΣ ΜΥΕΛΟΣ

Ο νωτιαίος μυελός είναι μία λεπτή, σχεδόν κυλινδρική στήλη νευρικού ιστού, που προστατεύεται μέσα στον σπονδυλικό σωλήνα. Ο νωτιαίος μυελός αρχίζει από το ύψος του ινιακού τρήματος και καταλήγει περίπου στο ύψος του δεύτερου οσφυϊκού σπονδύλου. Στην περιοχή του αυχένα (cervical) και στην οσφυϊκή περιοχή (lumbar) ο νωτιαίος μυελός διογκώνεται, από τις περιοχές αυτές εκφύονται τα νεύρα που νευρώνουν τα άνω και κάτω άκρα αντίστοιχα. Ο νωτιαίος μυελός, περιέχει κέντρα αντανακλαστικών λειτουργιών και συνδέει τον εγκέφαλο με τα νωτιαία νεύρα. Η κεντρική περιοχή του νωτιαίου μυελού αποτελείται από φαιά ουσία, η οποία, σε διατομή, έχει σχήμα πεταλούδας με ανοικτά φτερά (**Εικόνα 4**). Η φαιά ουσία αποτελείται κυρίως από κυτταρικά σώματα, ενώ η λευκή ουσία, που περιβάλλει τη φαιά, από μακριούς νευράξονες. Αυτοί συνδέουν τον εγκέφαλο, μέσω των νωτιαίων νεύρων, με τα διάφορα τμήματα του σώματος. Στη φαιά ουσία εντοπίζονται διάμεσοι και κινητικοί νευρώνες (motor neurons) στην κοιλιακή περιοχή, ενώ ραχιαία, βρίσκονται οι διάμεσοι νευρώνες που έχουν να κάνουν κυρίως με την επεξεργασία αισθητικών πληροφοριών. Οι κινητικοί νευρώνες στον νωτιαίο μυελό οργανώνονται σε ομάδες-πυρήνες (motor pools). Συγκεκριμένα, οι κινητικοί νευρώνες που βρίσκονται εγγύτερα της μέσης γραμμής, νευρώνουν τους μύς του κορμού, ενώ όσοι βρίσκονται στην

οπίσθια πλάγια περιοχή του κοιλιακού μισού στην αυχενική και οσφυϊκή μοίρα του νωτιαίου μυελού, νευρώνουν τους μυς των άκρων (Subhedar & Gogate, 2014).

Τόσο τα ανώτερα κέντρα του εγκεφάλου όσο και η περιφέρεια συμμετέχουν ουσιαστικά στη ρύθμιση της κίνησης. Το βασικό, όμως, λειτουργικό δίκτυο της μετακίνησης στο χώρο (locomotion) εδρεύει στον νωτιαίο μυελό. Πιο συγκεκριμένα, το δίκτυο της μετακίνησης εντοπίζεται στην κάτω θωρακική και οσφυϊκή περιοχή, αποτελούμενο από διάμεσους νευρώνες, οι οποίοι δίνουν το ρυθμό και το πρότυπο εκπόλωσης στους κινητικούς νευρώνες (όπως είναι ο συγχρονισμός δεξιού αριστερού αλλά και η εναλλαγή κάμψης-έκτασης), το οποίο μεταβιβάζεται στη συνέχεια στο μυ. Έτσι πραγματοποιείται η μετακίνηση στο χώρο.



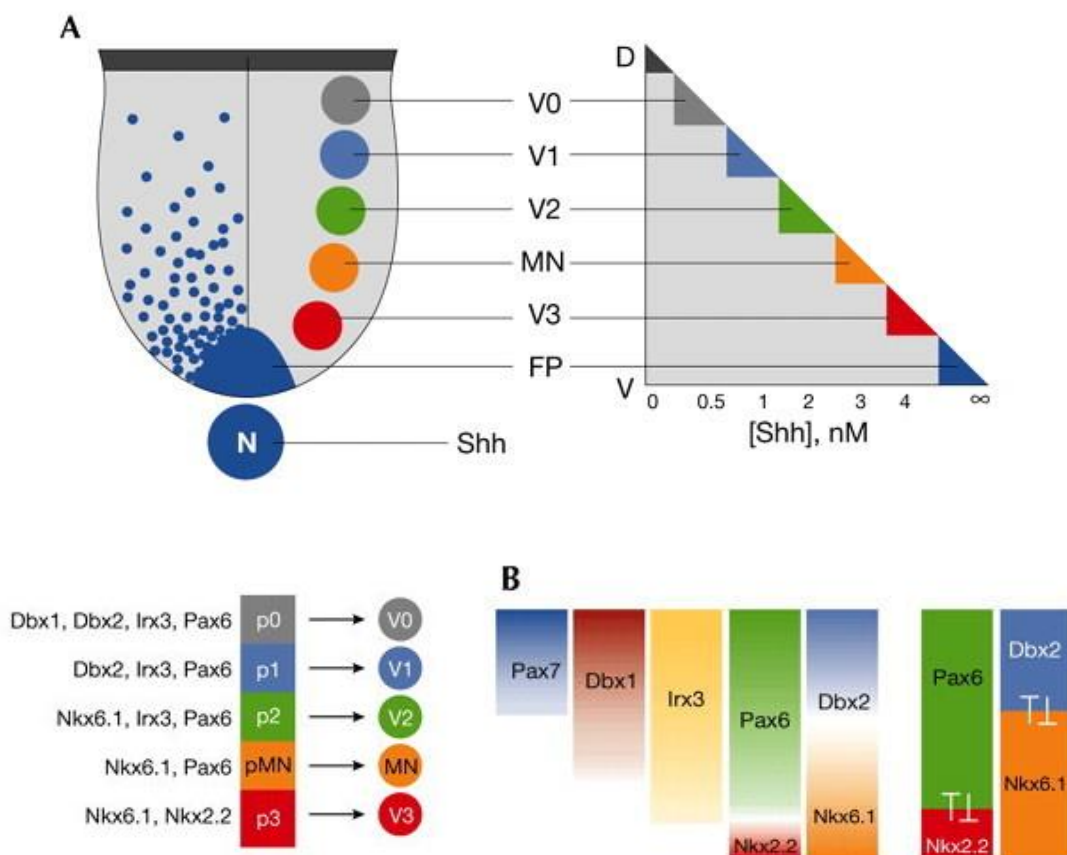
**Εικόνα 4 Νωτιαίος μυελός.** Δομικά μέρη του νωτιαίου μυελού. Τροποποιημένη εικόνα από Dreamstime.



#### 1.4.1 ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ

Στο εμβρυικό νευρικό σύστημα, από τη στιγμή που τα κύτταρα της νευρικής πλάκας γεννηθούν, αφήνουν τον κυτταρικό κύκλο και ταχύτατα αποκτούν εξειδικευμένες ιδιότητες, όπου μέσω ουσιών διαφοροποιούνται. Οι αποκτώμενες ιδιότητες, εξαρτώνται από τη θέση που κατέχουν στο νευρικό σωλήνα. Η τύχη των νευρικών κυττάρων ελέγχεται από δύο ανεξάρτητα σηματοδοτικά συστήματα. Το ένα διαμορφώνει το νευρικό σωλήνα κατά μήκος του ραχιαιοκοιλιακού άξονα (dorsoventral axis), ενώ το δεύτερο ελέγχει τη διαμόρφωση κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα (rostrocaudal axis). Στο ραχιαίο ήμισυ του νευρικού σωλήνα αρχικά, σχηματίζονται τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας που θα δώσουν τους αισθητικούς νευρώνες και εξειδικευμένα γλοιακά που σχηματίζουν το οροφιαίο πέταλο (τα κύτταρα πλαγίως του οροφιαίου πετάλου θα διαφοροποιηθούν σε αισθητήριους νευρώνες). Οι κινητικοί νευρώνες δημιουργούνται πλαγίως του εδαφιαίου πετάλου και διάφορες κατηγορίες διάμεσων νευρώνων σχηματίζονται ραχιαίως της θέσης των κινητικών νευρώνων. Η σηματοδοτική οδός που ακολουθείται κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του κοιλιακού νευρικού σωλήνα, περιλαμβάνει το μορφογόνο Sonic Hedgehog (Shh), το οποίο εκκρίνεται από τη νωτοχορδή και το εδαφιαίο πέταλο (Ericson, Morton, Kawakami, Roelink, & Jessell, 1996). Το Shh, δημιουργεί την πολικότητα ανάμεσα στο πρόσθιο και οπίσθιο τμήμα του αξονικού σκελετού κατά την ανάπτυξη των άκρων, ενώ είναι σημαντικό για τη μετανάστευση των κυττάρων της νωτιαίας ακρολοφίας κατά το σχηματισμό του νευρικού σωλήνα (Ruiz i Altaba, Palma, & Dahmane, 2002; Villavicencio, Walterhouse, & Iannaccone, 2000). Τα κύτταρα του εδαφιαίου πετάλου, εκκρίνουν το Shh επάγοντας τη διαφοροποίηση των κινητικών νευρώνων και των κοιλιακών διάμεσων νευρώνων. Από την άλλη, το ραχιαίο τμήμα του νευρικού σωλήνα διαμορφώνεται από τις BMP, οι οποίες εκκρίνονται από το επιδερμικό εξώδερμα και το οροφιαίο πέταλο. Ένας συνδυασμός της σηματοδοτικής δραστηριότητας της κλίσης συγκέντρωσης Shh (κοιλιακά προς ραχιαία) και της αντίθετης κλίσης συγκέντρωσης των BMPs και Wnt's (ραχιαία προς κοιλιακά), καθορίζει τη δημιουργία διαφορετικών περιοχών έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων. Οι επικράτειες αυτές οριοθετούν τις περιοχές προγονικών κυττάρων, από τις οποίες θα προκύψουν οι υποομάδες νευρώνων του νωτιαίου μυελού. Εστιάζοντας στην κοιλιακή περιοχή, υπάρχουν συγκεκριμένες περιοχές προγονικών κυττάρων (p0, p1, p2 και p3 αντίστοιχα) κατά μήκος του ραχιαιοκοιλιακού άξονα του κοιλιακού νευρικού σωλήνα που εκφράζουν συγκεκριμένο

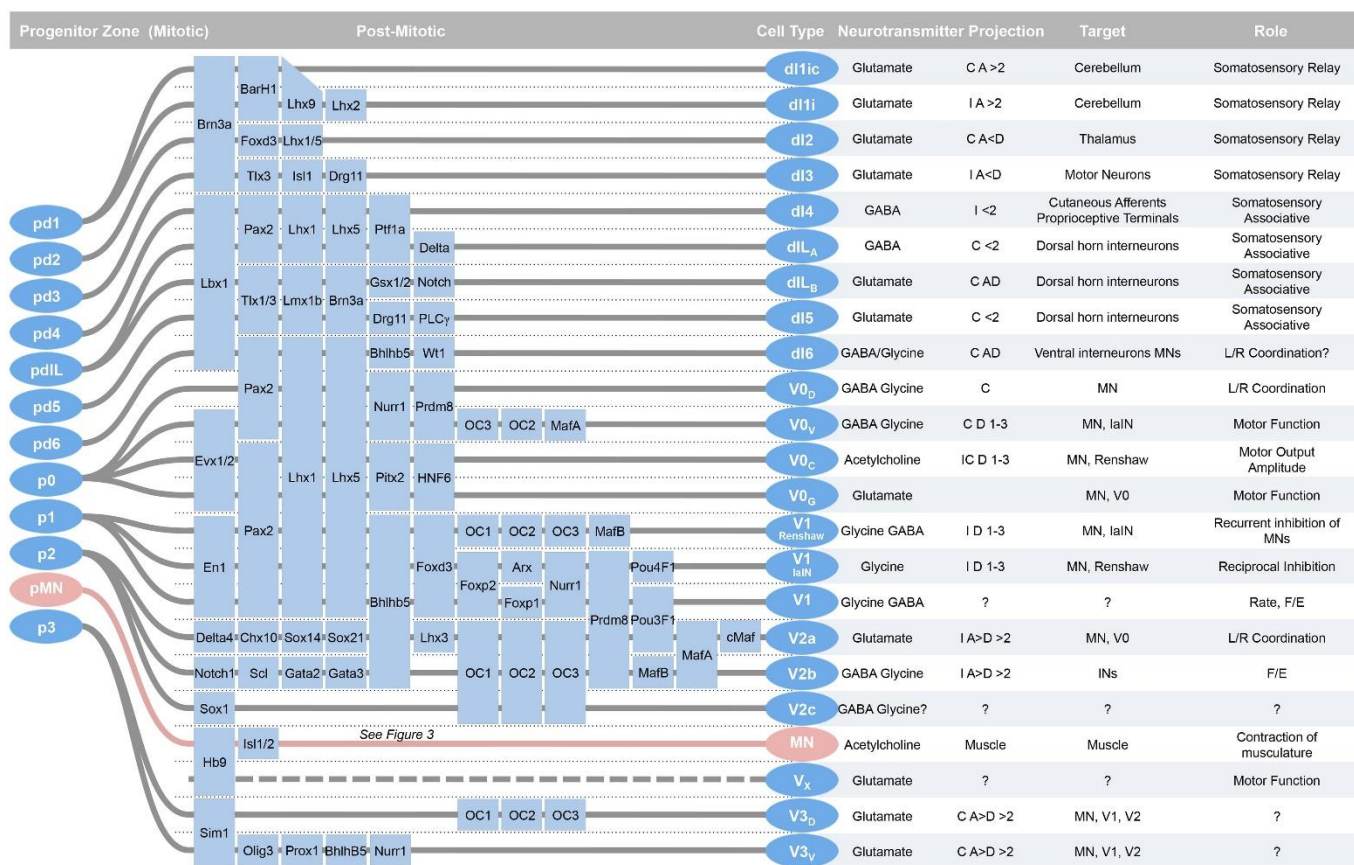
συνδυασμό μεταγραφικών παραγόντων και πρωτεϊνών (Lu, Niu, & Alaynick, 2015). Έτσι, δημιουργούνται 5 διακριτές ομάδες κοιλιακών νευρώνων από κάθε περιοχή προγονικών κυττάρων, οι V0, V1, V2, V3, ανάλογα με τη συγκέντρωση στην οποία εκτίθενται. Σε υψηλές συγκεντρώσεις επάγεται η γένεση κινητικών νευρώνων, ενώ στις υπόλοιπες διαβαθμίσεις συγκέντρωσης, η δημιουργία των κοιλιακών διάμεσων νευρώνων (Εικόνα 5). Η δημιουργία των προγονικών και των μεταμιτωτικών πληθυσμών καθορίζεται από τη θέση στην οποία βρίσκονται και τη συγκέντρωση του εκκρινόμενου μορφογόνου Shh στην περιοχή (Jessell, 2000).



**Εικόνα 5** Οι κεντρικοί νευρικοί προγονικοί τομείς του νωτιαίου μυελού ορίζονται από την Shh και από μεταγραφικούς παράγοντες. (A) Πέντε νευρωνικοί υποπληθυσμοί προέρχονται από ισοδύναμο αριθμό προγονικών περιοχών στην κοιλιακή ζώνη του κοιλιακού νωτιαίου μυελού. Σταδιακά περισσότεροι ραχιαίοι προγονικοί τομείς εκτίθενται σε μειούμενη συγκέντρωση πρωτεΐνης Shh. (B) Η κλίση συγκέντρωσης του Shh ρυθμίζει τους τομείς της κοιλιακής έκφρασης μιας σειράς παραγόντων μεταγραφής σε κοιλιακά προγονικά κύτταρα (αριστερά). Η συνδυαστική έκφραση των homodomain πρωτεϊνών σε ξεχωριστούς προγονικούς τομείς καθορίζει τον νευρωνικό υπότυπο που προκύπτει από κάθε τομέα (δεξιά). D=Dorsal (ραχιαία), DBX= developing brain homeobox transcription factor, FP=floor plate (εδαφιαίο πέταλο), MN=motor neuron (κινητικός νευρώνας), V=Ventral (κοιλιακό), Pax = Paired homeodomain protein. Τροποποιημένη εικόνα από (Jacob & Briscoe, 2003).

### 1.4.2 ΔΙΑΜΕΣΟΙ ΚΑΙ ΚΙΝΗΤΙΚΟΙ ΝΕΥΡΩΝΕΣ

Οι τέσσερις κοιλιακοί πληθυσμοί νευρώνων (V0, V1, V2, V3) (Εικόνα 6), εγκαθίστανται σε συγκεκριμένες θέσεις, έχουν διαφορετικούς συναπτικούς στόχους, κάποιοι προβάλλουν τους άξονες τους ομόπλευρα (ipsilateral), ενώ άλλοι ετερόπλευρα (bilateral). Διαφέρουν ως προς το νευροδιαβιβαστή που εκφράζουν, με κάποιους από αυτούς να είναι ανασταλτικοί και άλλοι διεγερτικοί (Stepien & Arber, 2008). Παρά την κατηγοριοποίηση των εμβρυικών πληθυσμών διάμεσων νευρώνων με βάση τη μοριακή τους ταυτότητα, δεν έχει ακόμα επιτευχθεί η πλήρης κατηγοριοποίηση των ενήλικων πληθυσμών σε ομοιογενείς ομάδες, πεδίο στο οποίο πολλά εργαστήρια στρέφονται.



**Εικόνα 6 Ραχιαίοι και κοιλιακοί νευρώνες.** Στα μέσα της κυοφορίας, τα προγονικά κύτταρα αρχίζουν να βγαίνουν από τον κυτταρικό κύκλο και να καταλαμβάνουν χαρακτηριστικές θέσεις, να εκτείνουν τους άξονές τους, να εκφράζουν μεταγραφικούς παράγοντες και ένζυμα για τη βιοσύνθεση των νευροδιαβιβαστών. Κατά την τελευταία εβδομάδα της κύησης μπορούν να χαρακτηριστούν 23 τάξεις νευρώνων ανάλογα με την έκφραση συγκριμένων μεταγραφικών παραγόντων. Τροποποίηση από Lu et al., 2015.

Κάθε πληθυσμός διάμεσων νευρώνων προέρχεται από ένα διακριτό πληθυσμό νευρωνικών προγονικών κυττάρων. Οι V0 διάμεσοι νευρώνες προκύπτουν από τον p0 προγονικό πληθυσμό νευρώνων που χαρακτηρίζεται από την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων Dbx1, Dbx2 και Nkx6.2 (Pierani et al., 2001a; Vallstedt et al., 2001). Πρόκειται για ομάδα νευρώνων (contralaterally/ipsilaterally projecting) που πραγματοποιούν συνδέσεις τόσο με άλλους διάμεσους νευρώνες όσο και με κινητικούς νευρώνες. Οι V0 διάμεσοι νευρώνες μπορούν να χωριστούν σε 3 κατηγορίες, τους V0d (dorsal), V0v (ventral), και τους V0cg Pitx2+ (Paired-Like Homeodomain Transcription Factor) νευρώνες. Από το κοιλιακό ήμισυ της προγονικής περιοχής προέρχονται οι V0v και χαρακτηρίζονται από την έκφραση του Dbx1 μεταγραφικού παράγοντα -ως προγονικοί νευρώνες- και την παροδική έκφραση του Enx1 (Even Skipped Homeobox Homologue) ως μετα-μιτωτικοί νευρώνες (Moran-Rivard et al., 2001; Pierani et al., 2001b). Οι V0d νευρώνες προέρχονται από το ραχιαίο ήμισυ της προγονικής περιοχής και χαρακτηρίζονται από την έκφραση του Dbx1 ως προγονικοί και απουσία έκφρασης του Enx1 ως μετα-μιτωτικοί (Pierani et al., 2001b). Σε μελέτες για την ανίχνευση της μοριακής ταυτότητας των μετεμβρυικών πληθυσμών, εντοπίστηκαν γονίδια με υψηλή έκφραση στην ενδιάμεση και την κοιλιακή περιοχή του νωτιαίου μυελού, στις περιοχές όπου ανιχνεύονται οι διάμεσοι νευρώνες της κίνησης. Ανάμεσα στα γονίδια αυτά ανιχνεύθηκε ο μεταγραφικός παράγοντας Pitx2 ο οποίος εντοπίζεται σε μια συγκεκριμένη ομάδα νευρώνων κοντά στο κεντρικό κανάλι του νωτιαίου μυελού. Η Pitx2 πρωτεΐνη εκφράζεται πολύ νωρίς στην εμβρυική ηλικία (εμβρυική ημέρα P11.5 με P12) και η έκφρασή της συνεχίζεται τουλάχιστον μέχρι την P30 κατά μήκος του νωτιαίου μυελού (Zagoraiou et al., 2009), ενώ πιο μετά δεν έχει μελετηθεί. Οι Pitx2+ νευρώνες αντιστοιχούν σε ένα μικρό υποπληθυσμό των V0 και συγκεκριμένα στο 5% των V0 διάμεσων νευρώνων. Οι Pitx2+ νευρώνες, δεν αποτελούν ομοιογενή υποπληθυσμό, έτσι χωρίζονται με βάση το νευροδιαβιβαστή που εκφράζουν στους: V0c χολινεργικούς διάμεσους νευρώνες οι οποίοι συνεκφράζουν τους χολινεργικούς δείκτες ChAT (Choline acetyltransferase) και vAChT (vesicular acetylcholine transporter) και στους V0g γλουταματεργικούς διάμεσοι νευρώνες που εκφράζουν vGluT2 (vesicular glutamate transporter) (Zagoraiou et al., 2009). Οι παραπάνω υποπληθυσμοί, έχουν διαφορετική κατανομή κατά μήκος της οσφυϊκής μοίρας του νωτιαίου μυελού. Συγκεκριμένα, στην άνω οσφυϊκή μοίρα υπερέχουν οι V0c / Pitx2+ νευρώνες σε αντίθεση με την κάτω οσφυϊκή μοίρα που διακρίνεται η υπεροχή των V0g / Pitx2+ νευρώνων (Zagoraiou et al., 2009). Ο V0c υποπληθυσμός αποτελεί τη μοναδική πηγή

των C-bouton συνάψεων (είδος χολινεργικής σύναψης) στους κινητικούς νευρώνες.

Αν αφαιρέσουμε το μεταγραφικό παράγοντα *Dbx1*, επηρεάζεται όλος ο V0 πληθυσμός, ο οποίος περιλαμβάνει πολλές ομάδες νευρώνων. Απώλεια του *Dbx1* οδηγεί σε αδυναμία ορθής εναλλαγής μεταξύ αριστερού-δεξιού άκρου, χωρίς όμως να επηρεάζεται η εναλλαγή καμπτήρα-εκτατήρα μυ και η συχνότητα βάδισης (Lanuza et. al, 2004).

Ως προγονικά κύτταρα, οι κοιλιακοί διάμεσοι νευρώνες του πληθυσμού V1, αποτελούν ένα πληθυσμό ανασταλτικών, ομόπλευρων νευρώνων, που προκύπτουν από την προγονική περιοχή p1 προγονική περιοχή που εκφράζει τους μεταγραφικούς παράγοντες: *Pax6*, *Nkx6.2*, *Dbx2*. Οι νευρώνες αυτοί μεταμιτωτικά εκφράζουν παροδικά τον μεταγραφικό παράγοντα *En1* (Matisse & Joyner, 1997); (Vallstedt, Klos, & Ericson, 2005) και περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, 2 σημαντικές ομοιογενείς τάξεις, τους Renshaw νευρώνες και τους Ia διάμεσους νευρώνες. Η διερεύνηση του ρόλου των V1 διαμέσων νευρώνων στην κίνηση κατέδειξε ότι απουσία αυτών, ο ρυθμός του κύκλου περπατήματος δεν πέφτει. Δεν παρατηρείται πρόβλημα στο συγχρονισμό δεξιού-αριστερού άκρου και στην εναλλαγή κάμψης και έκτασης των αρθρώσεων των άκρων (Gosgnach et al., 2006).

Η P2 προγονική περιοχή χαρακτηρίζεται από την έκφραση των *Nkx6.1* και *Irx3* μεταγραφικών παραγόντων και δίνει τον V2 (Vallstedt et al., 2005). Έχουν ανιχνευθεί τρεις διαφορετικοί υποπληθυσμοί V2 διαμέσων νευρώνων: α) οι διεγερτικοί V2a νευρώνες, β) οι ανασταλτικοί V2b, γ) οι ανασταλτικοί V2c υποπληθυσμοί και δ) οι V2d. Οι υποπληθυσμοί διατηρούν τους άξονες τους στην ίδια πλευρά του νωτιαίου μυελού στην οποία βρίσκονται. Οι V2a διεγερτικοί διάμεσοι νευρώνες χαρακτηρίζονται από την έκφραση του *Chx10* και *Sox14* μεταγραφικού παράγοντα (Crone et al., 2008), ενώ οι V2b από την έκφραση των *GATA2/3*; (Al-Mosawie, Wilson, & Brownstone, 2007; Crone et al., 2008; Panayi et al., 2010). Οι V2c χαρακτηρίζονται από την έκφραση του *Sox1* (SRV-BOX Transcription Factor 1) (Panayi et al., 2010), ενώ οι V2d από την έκφραση των *Lhx3* (LIM Homeobox 3) και *Shox2* (Dougherty et al., 2013). Συνολικά και σε συνδυασμό με άλλους υποπληθυσμούς οι διάμεσοι νευρώνες V2a-d συμμετέχουν στο συντονισμό της εναλλαγής δεξιού-αριστερού, στην εναλλαγή καμπτήρα-

εκτατήρα αλλά και στα ρυθμικά πρότυπα κίνησης (Crone et al., 2008; Dougherty et al., 2013);(J. Zhang et al., 2014).

Ο V3 πληθυσμός κοιλιακών διάμεσων νευρώνων προέρχεται από την προγονική επικράτεια p3 της οποίας οι νευρώνες εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα Nkx2.2+. Οι V3 διάμεσοι νευρώνες χαρακτηρίζονται από την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Sim1 (Single-Minded Homologue 1). Πάνω από το 85% των V3 διάμεσων νευρώνων προβάλλουν τους άξονες τους ετερόπλευρα (bilateral) του νωτιαίου μυελού και μόνο ένα μικρό ποσοστό αυτών διατηρούν τους άξονες τους ομόπλευρα (ipsilateral). Η συμμετοχή τους στην κίνηση, φαίνεται να σχετίζεται με τη διατήρηση σταθερού μοτίβου κίνησης (Jarrar et al. 2015; Y. Zhang et al., 2008).

## 1.5 V0c ΔΙΑΜΕΣΟΙ ΝΕΥΡΩΝΕΣ

Προκειμένου να βρεθούν extra markers που διαφοροποιούν τον πληθυσμό V0c από τον V0g ή χαρακτηρίζουν άγνωστους μέχρι τώρα υποπληθυσμούς τους, χρειάστηκε να συγκριθεί ο ολικός πληθυσμός των κυττάρων που εκφράζουν Pitx2 με έναν άλλο συγγενή πληθυσμό κυττάρων που εκφράζουν Sox14. Αναλυτικότερα, ο πληθυσμός αυτός αντιστοιχεί στους V2a διάμεσους νευρώνες οι οποίοι είναι διεγερτικοί και προβάλλουν τους άξονές τους ομόπλευρα. Έτσι, ελήφθησαν κύτταρα από διπλά διαγονιδιακά ποντίκια με γονότυπο *Pitx2::Cre+/-;Rosa-td-tomato+/-* και από διαγονιδιακά ποντίκια με γονότυπο *Sox14efgr+/-* που μόλις είχαν γεννηθεί (P0-P2). Η επιλογή του Sox14 έγινε με βάση το γεγονός ότι αποτελούν γειτονικό πληθυσμό, χαρακτηρίζονται από διεγερτική δράση αλλά και ότι τα κύτταρα αυτά εκφράζουν έντονα GFP πρωτεΐνης. Αρχικά, απομονώθηκε νωτιαίος μυελός από τα διπλά διαγονιδιακά ποντίκια, έγινε απομόνωση των νευρώνων και διαλογή τους μέσω κυτταρομετρίας ροής με βάση τον ενδογενή φθορισμό του εκάστοτε γενετικού σχήματος. Ακολούθησε απομόνωση RNA των κυττάρων και cDNA σύνθεση και η ανάλυση σάρωσης μικροσυστοιχιών (Affimetrix) για να συγκριθούν οι δύο πληθυσμοί. Με αυτόν τον τρόπο εντοπίστηκαν 256 γονίδια που υπερεκφράζονται στους Pitx2+ νευρώνες σε σύγκριση με τους Sox14+ νευρώνες (Zagoraiou, unpublished data). Στην ανάλυση της σάρωσης μικροσυστοιχιών εντοπίστηκαν 13 γονίδια με αρκετά περιορισμένο πρότυπο έκφρασης, στην ίδια περιοχή με τους Pitx2 (Panagiota Apostolou, unpublished data). Από αυτά, επτά ήταν τα

γονίδια που βρέθηκαν να συνεντοπίζονται με τον *Pitx2* πληθυσμό (V0c, V0g), δίνοντας, έτσι, τις πρώτες ενδείξεις μοριακών δεικτών που πιθανά εκφράζονται μόνο σε V0c, και μόνο σε V0g ή σε υποπληθυσμούς αυτών. Ανάμεσα στα γονίδια αυτά υψηλότερη σχετική έκφραση, είχαν η πρωτεΐνη **Asb4** και το νευροπεπτίδιο **CART** με το οποίο αποδείχθηκε ιδιαίτερος υποψήφιος καθώς είναι νευροπεπτίδιο και εκφράζεται σε όλους τους V0c νευρώνες. Η ύπαρξή του στα σώματα και στις συνάψεις των V0c νευρώνων ενίσχυσε την υπόθεση ύπαρξης ενός δεύτερου νευροπεπτιδίου που δρα μαζί με την ακετυλοχολίνη στα C-boutons. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, οι V0c νευρώνες αποτελούν τη μόνη πηγή των C-boutons, στους κινητικούς νευρώνες (Zagoraiou et al., 2009). Επιπλέον αξίζει να αναφερθεί, ότι ο V0c χωρίζεται σε 33% bilateral και 66% ipsilateral projections.

## 1.6 CART (Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript)

Η σάρωση μικροσυστοιχιών, με σκοπό τον εντοπισμό δεικτών/markers διαχωρισμού των V0c από τους V0g και την εύρεση δεικτών πιθανών υποπληθυσμών τους, οδήγησαν στον εντοπισμό ενός δεύτερου νευροδιαβιβαστή που εκκρίνεται από τους V0c νευρώνες, το CART (Cocaine and amphetamine-regulated transcript). Το νευροπεπτίδιο CART, σχετίζεται με πληθώρα διεργασιών στο σώμα. Ο ρόλος του έχει τεράστιο εύρος και αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι εντοπίζεται σε πολλές περιοχές του νευρικού συστήματος. Το νευροπεπτίδιο CART έχει συνδεθεί με τη ρύθμιση του σωματικού βάρους και εθιστικές συμπεριφορές μέχρι τη ρύθμιση του ύπνου και το αίσθημα φόβου (Ahmadian-Moghadam, Sadat-Shirazi, & Zarrindast, 2018; Rogge, Jones, Hubert, Lin, & Kuhar, 2008). Ακόμη σημαντική είναι η αναγνώρισή του ως νευροπροστατευτικού παράγοντα σε περιστατικά με εγκεφαλικά επεισόδια, με το νευροπεπτίδιο να εμφανίζει θετικά αποτελέσματα σε πειραματόζωα (Chang et al., 2011; Luo et al., 2013). Το νευροπεπτίδιο CART εντοπίζεται στο σώμα σχεδόν όλων των V0c νευρώνων (99%) και στις C-bouton συνάψεις τους πάνω στους κινητικούς νευρώνες, επομένως αναγνωρίστηκε ως ένας δεύτερος νευροδιαβιβαστής των V0c νευρώνων. Προηγούμενες ανατομικές μελέτες στο εργαστήριό μας, έδειξαν ότι, ελλείψει CART, ο αριθμός των κινητικών νευρώνων παραμένει αναλλοίωτος και οι C-bouton συνάψεις συνεχίζουν να εμφανίζονται επί των σωμάτων των κινητικών νευρώνων και να είναι χολινεργικές. Επιπλέον, η χρήση των *Dbx1::cre;ChAT<sup>fl/fl</sup>* διαγονιδιακών ζώων, αποκάλυψε

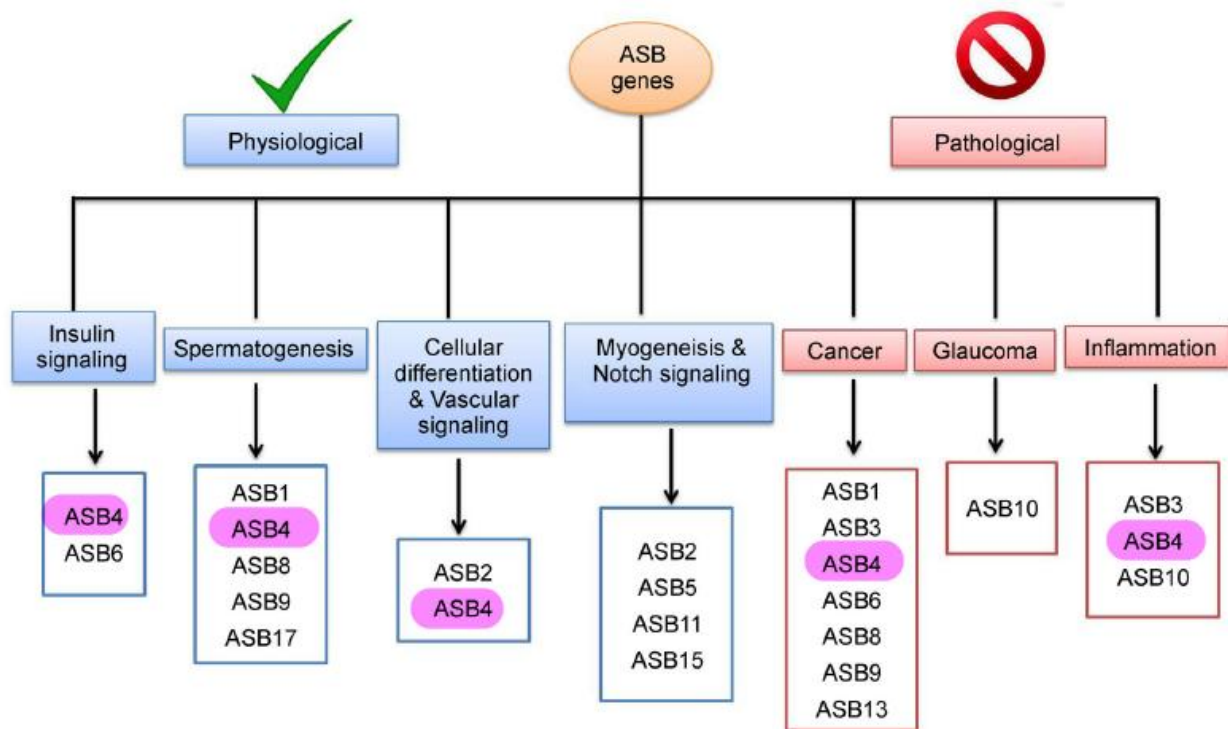
πως η έλλειψη ακετυλοχολίνης από τους V0c δεν επηρεάζει την παρουσία του νευροπεπτιδίου CART στη C-bouton σύναψη, ωστόσο τα ζώα εμφανίζουν αδυναμία αύξησης της ενεργοποίησης κάποιων μυϊκών ομάδων σε απαιτητικές δοκιμασίες. Το συμπέρασμα που εξήχθη, ήταν, ότι οι προαναφερθέντες νευροδιαβιβαστές παράγονται ανεξάρτητα και δεν είναι αλληλεξαρτώμενοι και επιπλέον, πως η σύναψη παραμένει, ελλείψει του ενός ή του άλλου νευροδιαβιβαστή (Eleutheriadis et al., paper submitted).

## 1.7 ASB4

Η πρωτεΐνη Asb4 (ankyrin repeat and SOCS box-containing 4) αποτελεί μέλος της οικογένειας των 18 πρωτεϊνών ASB που διαθέτουν επαναληπτικές αλληλουχίες ανκυρίνης και SOCS (suppressor of cytokine signaling proteins) box περιοχή (Anasa et al., 2018; Hilton et al., 1998). Συγκεκριμένα, η Asb4 αποτελείται από 6 ankyrin repeats και από 426 αμινοξέα. Αναγνωρίζει ένα υπόστρωμα του συμπλέγματος λιγάσης - ουβικουτίνης E3 (E3 ubiquitin-ligase) μέσω της SOCS box περιοχής και μαζί προκαλούν την αποικοδόμηση στοχευμένων πρωτεϊνών (Linossi & Nicholson, 2012), ενώ χαρακτηρίζονται από την παρουσία δύο συντηρημένων τομέων με N-τερματική επανάληψη ανκυρίνης και C-τερματικό πεδίο SOCS box. Η SOCS box περιοχή, εξυπηρετεί στη σύζευξη της πρωτεΐνης, η οποία αποτελεί καταστολέα του σηματοδοτικού μονοπατιού κυτοκινών, με το σύμπλοκο ελονγκίνης B και C (Okumura, Matsuzaki, Nakatsukasa, & Kamura, 2012), στοχεύοντάς το προς αποικοδόμηση (Kile et al., 2000). Η Asb4 εμπλέκεται σε πολυάριθμες κυτταρικές διαδικασίες και μονοπάτια, ωστόσο οι αλληλεπιδράσεις και οι βιολογικοί της ρόλοι παραμένουν ελάχιστα κατανοητοί. Η πρωτεΐνη Asb4 περιέχει ιδιότητες που συμβάλλουν σε ένα ευρύ φάσμα διαδικασιών και από φυσιολογικές έως παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι η ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος, η θετική ρύθμιση της αγγειογένεσης και η μεταμεταφραστική τροποποίηση πρωτεϊνών (**Εικόνα 7**) (Anasa et al., 2018). Εμπλέκεται επίσης, στην αγγειοποίηση του πλακούντα, που αποτελεί μια κρίσιμη αναπτυξιακή διαδικασία η οποία, διασφαλίζει τη βιωσιμότητα του εμβρύου (Townley-Tilson, Wu, Ferguson, & Patterson, 2014). Μεταξύ των μελών της ASB οικογένειας εκτός από τη συμμετοχή τους στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών, εμπλέκονται στην αγγειακή ανάπτυξη, με κυριότερη την Asb4 η οποία προάγει την αγγειακή διαφοροποίηση μέσω ενός εξαρτώμενου από οξυγόνο μηχανισμού (Ferguson et al., 2007).



Οι τρέχουσες μελέτες έδειξαν μια αλλαγή στην έκφραση ορισμένων γονιδίων ASB που συνδέονται με την κακοήθεια καρκίνων και την πρόγνωση. Ένα παράδειγμα μεταλλαγμένης πρωτεΐνης που βρίσκεται σε διάφορους καρκινικούς ιστούς είναι η Asb4 στο γλοίωμα. Ακόμα η Asb4, πρόσφατα βρέθηκε ότι έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη μετανάστευση και την εισβολή, αλλά όχι τον πολλαπλασιασμό σε κύτταρα HCC (ηπατοκυτταρικά καρκινώματα) (Au et al., 2014) (Lee et al., 2008).



**Εικόνα 7 ASB4 έκφραση σε φυσιολογικές συνθήκες και σε ασθένειες.** Αριστερά με μπλε χρώμα εμφανίζονται οι φυσιολογικές λειτουργίες στις οποίες εμφανίζονται οι Asb πρωτεΐνες, ενώ με κόκκινο στα δεξιά εμφανίζεται η συμμετοχή τους σε ασθένειες. Και στις 2 περιπτώσεις έχει επισημανθεί, η συμβολή της Asb4. Τροποποιημένη εικόνα από (Anasa, Ravanan, & Talwar, 2018).

### 1.7.1 ASB4 ΣΤΟΝ ΝΩΤΙΑΙΟ ΜΥΕΛΟ

Η παρουσία της πρωτεΐνης Asb4, στον νωτιαίο μυελό δεν έχει αναλυθεί, ως τώρα σε βάθος, ωστόσο γνωρίζουμε ότι εντοπίζεται στην περιοχή του νωτιαίου μυελού όπου εδρεύουν οι Pitx2+ νευρώνες. Εντοπίστηκε, σε ανάλυση μικροσυστοιχιών που πραγματοποιήθηκε, με σκοπό την εύρεση δεικτών/markers οι οποίοι συνεντοπίζονται με τον Pitx2+ πληθυσμό. Με σκοπό τη μελέτη συνεντοπισμού της πρωτεΐνης Asb4 στους Pitx2+ νευρώνες, με τις πρωτεΐνες ChAT και CART, διεξήχθησαν πειράματα ανοσοϊστοχημείας, σε τομές νωτιαίου μυελού διαγονιδιακών ποντικών γονοτύπου *Pitx2::Cre+/-;Rosa-td.tomato+/-* ηλικίας P0. Χάρη στο γενετικό σχήμα, και τον ενδογενή κόκκινο φθορισμό (td-tomato) -που σημαίνει τους Pitx2+ νευρώνες, αποφύγαμε τη χρήση αντισώματος έναντι Pitx. Επιπλέον, η αποφυγή χρήσης του αντισώματος, μας ωφέλησε, καθώς δε θα ήταν δυνατή η πραγματοποίηση τετραπλού ανοσοφθορισμού, διότι τόσο το αντίσωμα έναντι της CART, όσο και το αντίσωμα έναντι Pitx, είναι φτιαγμένα σε κουνέλι (rabbit). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός με το αντίσωμα έναντι της Asb4 το οποίο αναγνωρίζει την Asb4 πρωτεΐνη στους νευρώνες, με το αντίσωμα έναντι ChAT (choline acetyltransferase) το οποίο αναγνωρίζει το ένζυμο ακετυλοτρανσφεράση που μετατρέπει την Acetyl-CoA σε ακετυλοχολίνη προς το σχηματισμό του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη και αντίσωμα για την πρωτεΐνη CART στους νευρώνες. Έγκειται, λοιπόν, το ερώτημα, εάν στους νευρώνες που υπάρχει συνεντοπισμός CART και Chat, υπάρχει συνεντοπισμός και με την Asb4. Εξετάστηκε, έτσι, ο συνεντοπισμός των παραπάνω σε διάφορα επίπεδα του νωτιαίου μυελού (τόσο στην αυχενική και θωρακική όσο και στην άνω οσφυϊκή μοίρα). Σε πειράματα που διεξήχθησαν στο εργαστήριο, μελετώντας τα ποσοστά της Asb4 στους Pitx2+ νευρώνες βρέθηκε ότι ένα μεγάλο ποσοστό των V0c και ένα μικρό ποσοστό των V0g νευρώνων συνεκφράζουν την πρωτεΐνη Asb4. Από την ανάλυση των μετρήσεων, εξήλθε το συμπέρασμα πως η Asb4 δε χαρακτηρίζει ολόκληρο τον V0c πληθυσμό αλλά αποτελεί δείκτη για ένα μεγάλο μέρος των V0c νευρώνων. Συγκεκριμένα, οι Asb4+ Pitx2+ νευρώνες που είναι ταυτόχρονα και χολινεργικοί παρατηρείται ότι στη θωρακική μοίρα αποτελούν το 36,4% των V0c (Pitx2+ vAChT/ChAT+) νευρώνων που συνεντοπίζονται με την Asb4. Το ποσοστό αυτό φθάνει το 73,5% στην άνω οσφυϊκή μοίρα ενώ στην κάτω οσφυϊκή μοίρα παρατηρείται ότι το 57,1% είναι Asb4+. (Apostolou Panagiota, Unpublished data).



**Εικόνα 8** Σχηματική αναπαράσταση των δυο σειρών ποντικών που χρησιμοποιήθηκαν. Στη διασταύρωση αυτή, ένα ζώο που φέρει το γονίδιο Cre υπό τον υποκινητή του Pitx2+, διασταυρώνεται με ένα ζώο το οποίο φέρει υπό τον υποκινητή του Rosa (που είναι ενεργός σε όλα τα κύτταρα), μια stop αλληλουχία με δύο LoxP περιοχές εκατέρωθεν και έπειτα το γονίδιο για τη φθορίζουσα ουσία td-tomato. Έτσι τα ζώα, θα εκφράσουν ισχυρή κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη σε όλα τα σώματα και τις συνάψεις (C-boutons) των Pitx2+ νευρώνων μόνο.

## 1.8 ΝΕΥΡΙΚΕΣ ΑΠΟΛΗΞΕΙΣ ΚΑΙ ΟΙ ΑΞΟΝΕΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΡΑΧΙΑΙΟ ΚΕΡΑΣ ΤΟΥ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ

Η αποκλειστική πηγή των C-boutons, των πολυάριθμων χολινεργικών συνάψεων στο σώμα και στους εγγύς δενδρίτες κινητικών νευρώνων, είναι ο V0c (Pitx2+) πληθυσμός διάμεσων νευρώνων, τα σώματα του οποίου εντοπίζονται εκατέρωθεν του κεντρικού σωλήνα του νωτιαίου μυελού (central canal) (Zagoraiou et al., 2009). Πειράματα που αφορούσαν τη στοχευμένη ιστοειδική αδρανοποίηση του ενζύμου της συνθετάσης της ακετυλοχολίνης (ChAT) στον V0c πληθυσμό διάμεσων νευρώνων, σε ζώα *Dbx1::cre;ChATfl/fl*; απέδειξε ότι οι C-bouton συνάψεις συνεχίζουν να εντοπίζονται, παρόλο που δεν παράγουν ACh αλλά τα ζώα εμφανίζουν αδυναμία αύξησης της ενεργοποίησης κάποιων μυϊκών ομάδων, σε απαιτητικές δοκιμασίες. Σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου όπου πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός με ChAT και CART στα *Dbx1::cre;ChATfl/fl;CARTKO/KO* ζώα, παρατηρήθηκαν, πολυάριθμες νευρικές απολήξεις και άξονες στο ραχιαίο κέρασ του νωτιαίου μυελού. Σε WT ζώα, οι χολινεργικοί νευρώνες στους οποίους δεν είχε δράσει η Cre ρεκομπινάση, όπως οι κινητικοί νευρώνες ή οι προγαγγλιακοί χολινεργικοί συμπαθητικοί νευρώνες, εμφάνισαν το αναμενόμενο σήμα έπειτα από ανοσοφθορισμό έναντι της ChAT. Από την άλλη, ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός, ότι οι χολινεργικές νευρικές απολήξεις στη Lamina I και III, καθώς και τα χολινεργικά σώματα της Lamina III, δεν εμφάνισαν θετικό

σήμα στα πειραματικά *Dbx1::cre;ChAT<sup>fl/fl</sup>* ζώα, υποδεικνύοντας, έτσι, πιθανή *Dbx1* ή *Dbx1/Pitx2* ή διαφορετική προέλευση. Οι μέχρι τώρα χολινεργικοί πληθυσμοί που έχουν καταγραφεί από τους (Barber et al., 1984), είναι οι εξής 5: τα σώματα των κινητικών νευρώνων, οι προγαγγλιακοί νευρώνες του συμπαθητικού, οι ραχιαίοι χολινεργικοί νευρώνες, τα partition neurons (medial V0c και lateral partition neurons) και τα κύτταρα του κεντρικού καναλιού (Barber et al., 1984).

Οι κινητικοί νευρώνες εντοπίζονται στην κοιλιακή περιοχή και δέχονται πολυάριθμες χολινεργικές συνάψεις (ChAT και vAChT), τόσο στα σώματα, όσο και στους εγγύς δενδρίτες τους. Οι συνάψεις αυτές, προέρχονται από τον V0c πληθυσμό διάμεσων νευρώνων. Τα σώματα αυτών των *Pitx2+* (*Dbx1* προέλευσης) διάμεσων νευρώνων εμφανίζονται στην περιοχή εκατέρωθεν του κεντρικού σωλήνα και χαρακτηρίζονται από έντονο φθορίζον σήμα έπειτα από ανοσοφθορισμό έναντι της ChAT.

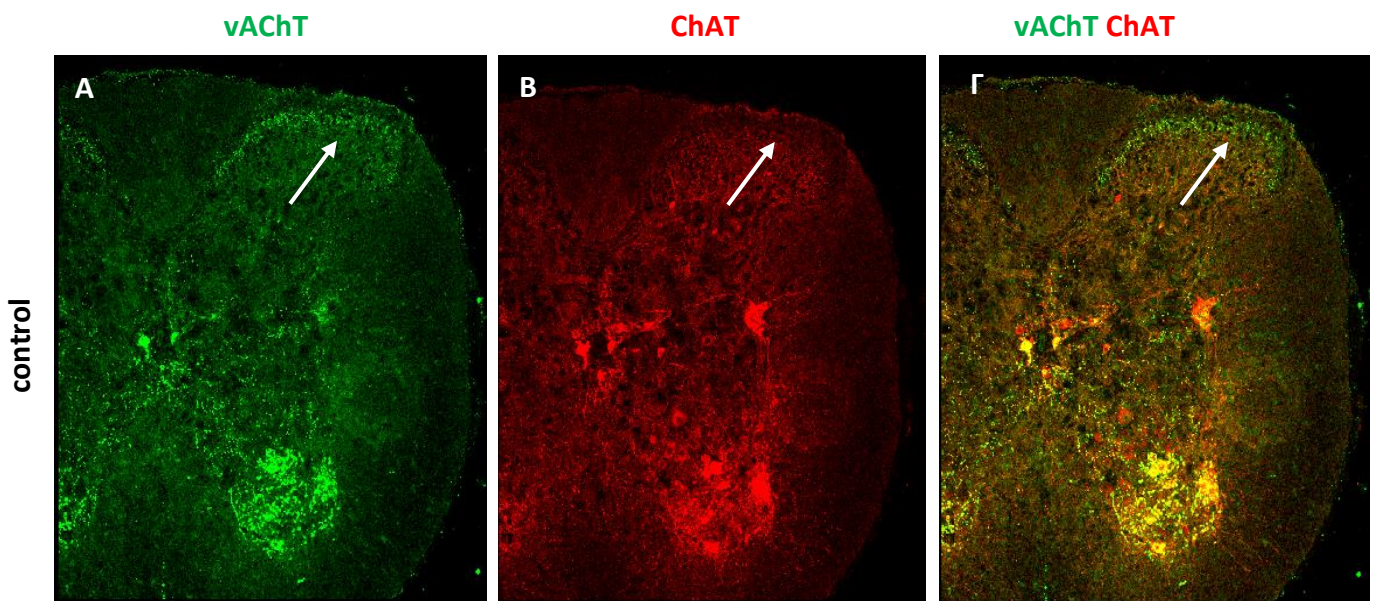
Στην περιφέρεια του κεντρικού σωλήνα εντοπίζονται τα «κύτταρα του κεντρικού καναλιού» (central canal cluster cells - ccc) (Barber et al., 1984). Οι συγκεκριμένοι νευρώνες έχουν μικρότερο μέγεθος από τους V0c και χαρακτηριστικό στρογγυλό ή οβάλ σχήμα. Διατάσσονται περικυκλώνοντας το κεντρικό κανάλι και εντοπίζονται σε όλα τα επίπεδα του νωτιαίου μυελού. Ακόμα, στην intermediate zone (medially και laterally), εντοπίζονται και προγαγγλιακοί χολινεργικοί νευρώνες του αυτόνομου συμπαθητικού νευρικού συστήματος στη θωρακική και άνω οσφυϊκή μοίρα.

Χολινεργικοί νευρώνες εντοπίζονται επίσης στην αυχενική και κάτω οσφυϊκή μοίρα, αλλά σε μικρότερο βαθμό απ' ό,τι οι αντίστοιχοι νευρώνες του συμπαθητικού. Τέλος, παρατηρούνται μεμονωμένα σώματα νευρώνων (Lamina III) αλλά και πολυάριθμες νευρικές απολήξεις στην περιοχή του ραχιαίου κέρατος (Lamina I,III), όπως περιγράφονται στην παρακάτω εργασία (Barber et al., 1984) και διερευνάται η προέλευσή τους.

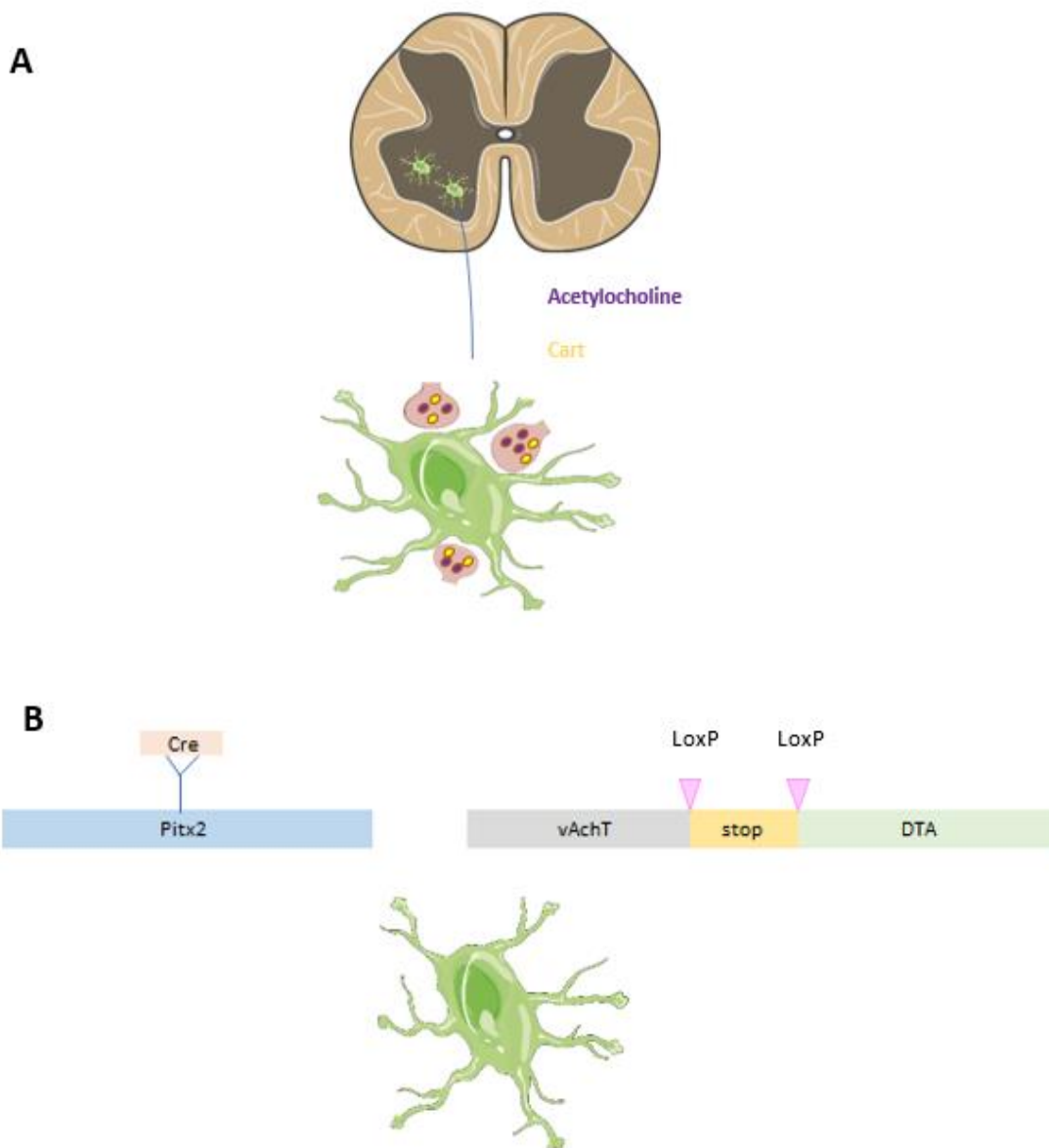
Παρατηρώντας τις πολυάριθμες νευρικές απολήξεις και τους άξονές τους στο ραχιαίο κέρα, οι οποίες μειώθηκαν ή χάθηκαν στο *Dbx1::CreChAT<sup>fl/fl</sup>* αναρωτηθήκαμε σχετικά με την προέλευσή τους. Θα μπορούσαν να προέρχονται από *Pitx2+* νευρώνες; Για να διαπιστωθεί αυτό, θα έπρεπε με κάποιο τρόπο να εξαλειφθούν οι V0c νευρώνες. Το επόμενο βήμα, λοιπόν, ήταν η χρήση ενός γενετικού σχήματος που θα οδηγήσει στην εξάλειψη των V0c χολινεργικών συνάψεων έτσι ώστε να δούμε αν οι χολινεργικές αυτές απολήξεις, αλλά και

άξονες αυτών χάνονται στην περίπτωση που είναι Pitx2+ προέλευσης ή συνεχίζουν να υπάρχουν στην περίπτωση που δεν είναι Pitx2+.

Ο τρόπος με τον οποίο κάτι τέτοιο μπορεί να επιτευχθεί είναι 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, συνήθως κάποιου μεταγραφικού παράγοντα που εκφράζεται αποκλειστικά στον πληθυσμό των νευρώνων - στόχων. Ο τελικός γονότυπος που δημιουργήθηκε ήταν ο *Pitx2::Cre;vAChT-stop-DTA*. Η ανατομική μελέτη των διαγονιδιακών αυτών ζώων, είχε ως στόχο την αποσαφήνιση της προέλευσης των απολήξεων και αξόνων. Μια σειρά τέτοιων πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Στις επόμενες σελίδες αναλύονται λεπτομερώς τα αποτελέσματα, αλλά και τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τη μελέτη αυτή.



**Εικόνα 9** Οι νευρικές απολήξεις και οι άξονές τους σε μια τομή νωτιαίου μυελού control ζώου P21 από την άνω οσφυϊκή περιοχή, υποδεικνύονται με βέλη. (A) Ανοσοφθορισμός με χρήση αντισωμάτων έναντι των ChAT (κόκκινο) και vAChT (πράσινο) σε εγκάρσιες τομές του νωτιαίου μυελού ζώων ελέγχου (UL). (B) Ανιχνεύεται ChAT στα σώματα των κινητικών νευρώνων, στους χολινεργικούς Pitx2+ νευρώνες του V0c πληθυσμού (central canal), στα προαγγλιακά κύτταρα και σε κάποιες χολινεργικές απολήξεις στο ραχιαίο κέρασ. (Γ) Ανιχνεύεται vAChT στις χολινεργικές συνάψεις γύρω από τους κινητικούς νευρώνες, αλλά και σε χολινεργικές απολήξεις. (1 section, τομές πάχους 14 μm)



**Εικόνα 10 Σχηματική απεικόνιση των C boutons και σχηματική αναπαράσταση της διασταύρωσης. (A)** Κινητικοί νευρώνες από ποντίκια αγρίου τύπου, όπου υπάρχουν οι C-boutons χολινεργικές συνάψεις. **(B)** Κινητικοί νευρώνες από *Pitx2Cre<sup>+/-</sup>;vAChT-stop-DTA* όπου ο υποπληθυσμός V0c και τα C boutons έχουν εξαφανιστεί (ablated), λόγω επιλεκτικής έκφρασης της τοξίνης DTA στους Pitx2+ χολινεργικούς νευρώνες V0c.

## 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα, ήταν ποντίκια *Mus musculus*, συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος C57BL/6J, του οποίου το γονιδίωμα ήταν το πρώτο που αλληλουχήθηκε πλήρως και αποτελεί βασικό εργαλείο σε μελέτες γενετικής. Τα ζώα, στεγάζονται στην πρότυπη Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α. Στα πειράματα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τόσο θηλυκά, όσο και αρσενικά ζώα τα οποία είχαν συνεχή και ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή. Τα ποντίκια διατηρούνται σε αυστηρά ελεγχόμενο περιβάλλον, με σταθερό 12ωρο εναλλασσόμενο κύκλο φωτός-σκοταδιού. Οι συνθήκες θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας διατηρούνται σταθερά στους  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$  και  $55\pm 10\%$ , ενώ ο εξαερισμός των κλωβών γίνεται μέσω συστήματος εξαερισμού, με τη βοήθεια του οποίου προσάγεται και απάγεται ο αέρας, αφού περάσει από φίλτρα καθαρισμού. Για τη διατήρηση της ευζωίας των ζώων ο μέγιστος αριθμός ανά κλωβό ανέρχεται στα 8 ζώα. Ο απογαλακτισμός και το ζευγάρωμα των ζώων πραγματοποιούνται μετά την 28<sup>η</sup> ημέρα P28 (postnatal) για τα θηλυκά και την P40 για τα αρσενικά. Τα ζώα, όταν καθίστανται αναπαραγωγικά ώριμα, διασταυρώνονται με σκοπό την παραγωγή απογόνων με τον επιθυμητό γονότυπο. Για τη διαπίστωση της γονιμοποίησης, ελέγχεται ο κόλπος του θηλυκού για την ύπαρξη plug. Για την εξακρίβωση του plug, πρακτικά, γίνεται έλεγχος για στερεοποιημένες εναποθέσεις εκκριμάτων του αρσενικού στον κόλπο του θηλυκού ποντικού λίγες ώρες μετά την οχεία. Η ύπαρξή του επιβεβαιώνει την επιτυχημένη γονιμοποίηση και ορίζεται σαν εμβρυική ημέρα E0.5 (embryonic). Η διάρκεια κύησης ανέρχεται στις 19 με 20 μέρες, ενώ ο αριθμός μιας τοκετοομάδας αποτελείται από 8 έως 10 μικρά. Την ημέρα, P0, διεξάχθηκε το ένα πείραμα, ενώ τα υπόλοιπα ζώα έφταναν στην P21 για να μπορούν στην πειραματική διαδικασία. Για την ατομική ταυτοποίηση, τα ζώα σημαίνονταν με δακτυλοδότηση, περίπου την P7, ακολουθώντας ένα κυκλικό μοτίβο αποκοπής δακτύλου. Την ίδια ημέρα, πραγματοποιούνταν και η αποκοπή ενός μικρού τμήματος της ουράς (0.5 cm) για την απομόνωση DNA και γονοτύπηση του ζώου, με σκοπό την αναζήτηση των επιθυμητών γονιδίων. Περιοδικά ελέγχεται η κατάσταση της υγείας τους σύμφωνα με τις οδηγίες της FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Association's).

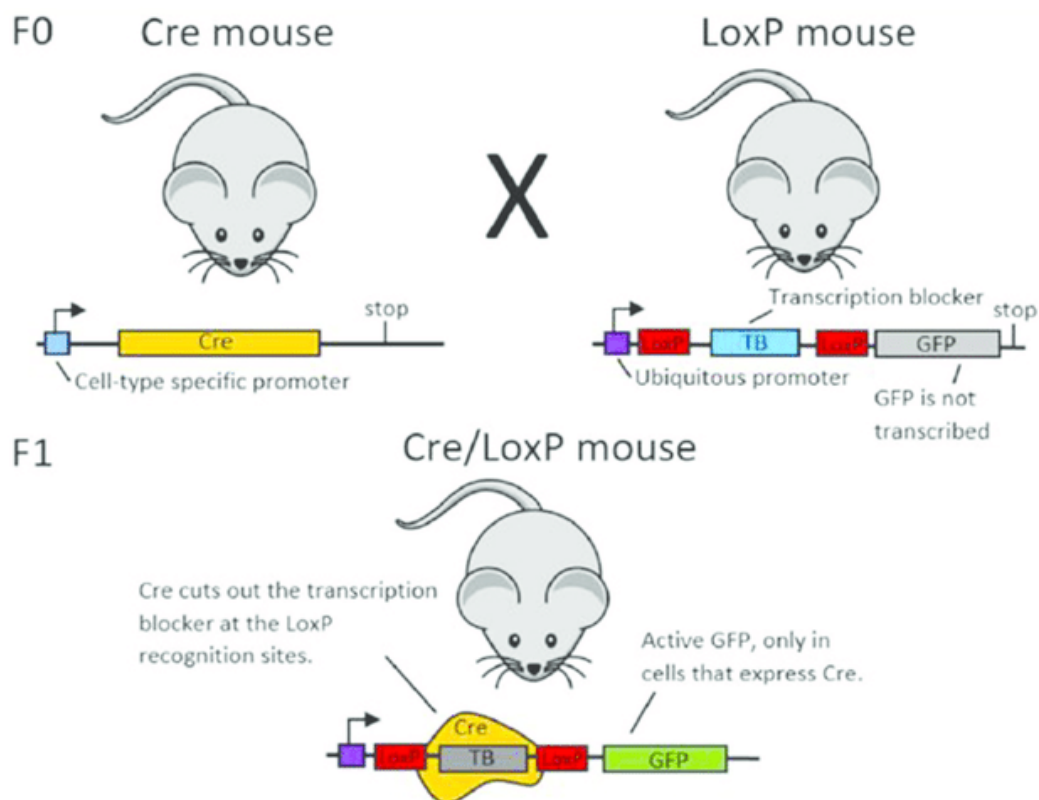
Η συγκεκριμένη μελέτη έγινε σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό ηθικό πλαίσιο για την προστασία των ζώων, που χρησιμοποιούνται για ερευνητικούς σκοπούς (European Convention 123/Council of Europe and European Directive 2010/63/EU), το Εθνικό Δίκαιο σε εναρμόνιση με την προαναφερθείσα ευρωπαϊκή οδηγία, καθώς και τις ισχύουσες κατευθυντήριες γραμμές των Διεθνών Οργανισμών, όπως ο οργανισμός Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International-AAALAC Int. Η αρμόδια Περιφερειακή Κτηνιατρική Αρχή ενέκρινε το πειραματικό πρωτόκολλο σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία (Προεδρικό Διάταγμα 56/2013, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 2010/63).

## 2.2 ΣΥΣΤΗΜΑ CRE-LOX

Το Cre/LoxP σύστημα, είναι μια συγκεκριμένη τεχνολογία γενετικής μηχανικής ανασυνδυασμού, η οποία επιτρέπει την τροποποίηση του DNA σε συγκεκριμένες θέσεις των κυττάρων (Orban, Chui, & Marth, 1992) και χρησιμοποιείται για να πραγματοποιήσει διαγραφές, εισαγωγές, μετατοπίσεις και αναστροφές. Το σύστημα αποτελείται από ένα μόνο ένζυμο, την ρεκομπινάση Cre (creates recombination), η οποία πραγματοποιεί ιστοειδικό ανασυνδιασμό μεταξύ δύο LoxP θέσεων αναγνώρισης (floxed γονίδιο) και προέρχεται από τον P1 βακτηριοφάγο (Sternberg & Hamilton, 1981). Οι πλευρικές LoxP περιοχές, (δομές με παλινδρομικές επαναλήψεις 13bp εκατέρωθεν της κεντρικής 8bp αλληλουχίας ) είναι δύο 34bp αλληλουχίες που δρουν ως μαγνήτες της Cre recombinase για να ανασυνδυάσει το τμήμα του DNA που βρίσκεται μεταξύ τους. Οι LoxP τοποθεσίες, αναγνωρίζονται από ειδικές περιοχές του ενζύμου, το ενδιάμεσο τμήμα αποκόπτεται, το γονίδιο απενεργοποιείται (Kim, Kim, Im, & Fang, 2018), ενώ δεν απαιτείται κάποιος άλλος πρωτεϊνικός παράγοντας (Sauer & Henderson, 1988). Το σύστημα, παρέχει τη δυνατότητα της ιστοειδικής έκφρασης της recombinase, αφού διαφορετικά θα προκαλούσε ανεπιθύμητα προβλήματα, καθώς το γονίδιο-στόχος θα αποκόπταν από όλα τα κύτταρα που θα είχαν ενσωματώσει τις LoxP περιοχές (Kühn & M. Torres, 2002). Με τη βοήθεια ενός driver, πραγματοποιείται αυτός ο ειδικός περιορισμός , όπου το γονίδιο Cre, ελέγχεται από έναν υποκινητή. Μ' αυτό τον τρόπο η ρεκομπινάση, μεταγράφεται και μεταφράζεται μόνο στα κύτταρα που εκφράζουν το γονίδιο-driver (Kim et al., 2018). Όταν λοιπόν, το πρώτο στέλεχος



ποντικού που περιέχει ένα γονίδιο που πλαισιώνεται από τις θέσεις LoxP, διασταυρωθεί με στέλεχος ποντικού διαγονιδιακής σειράς που εκφράζει την ρεκομπινάση Cre, τότε κάποιοι από τους απογόνους θα φέρουν τόσο το floxed γονίδιο, όσο και το γονίδιο της ειδικά εκφραζόμενης Cre. Το σύστημα ανασυνδυασμού Cre/LoxP αποτελεί ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο και έχει βοηθήσει τους νευροεπιστήμονες να μελετήσουν τον εγκέφαλο, στον οποίο υπάρχουν σύνθετοι τύποι κυττάρων και πολύπλοκα νευρωνικά δίκτυα. Έτσι και στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε το συγκεκριμένο σύστημα με αποτέλεσμα, όταν διασταυρώθηκαν ποντίκια που έφεραν τη γονιδιακή κατασκευή του driver με σειρά ποντικών που φέραν τις LoxP θέσεις, προέκυψαν κάποιοι απόγονοι που έφεραν και τις δυο τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, η *Dbx1::Cre*, ήταν η σειρά ποντικών που έφερε τον Cre driver. Μ' αυτό τον τρόπο, η περιοχή που πλαισιώνεται από τις LoxP περιοχές αποκόπτεται και το συγκεκριμένο γονίδιο δεν εκφράζεται στα κύτταρα.



**Εικόνα 9 Σχηματική απεικόνιση του συστήματος Cre/LoxP.** Στη γενιά F0, η γραμμή 1 του ποντικού (αριστερά) εκφράζει το Cre κάτω από έναν συγκεκριμένο προαγωγέα. Η γραμμή 2 του ποντικού (δεξιά) εκφράζει την πρωτεΐνη επίσημανσης (εδώ: GFP), αλλά έχει έναν blocker μεταγραφής, ο οποίος εμποδίζει τη μεταγραφή του GFP. Όταν διασταυρωθούν, ορισμένοι απόγονοι θα έχουν τόσο το Cre DNA όσο και το DNA LoxP-TB-LoxP-GFP. Σε αυτά τα ζώα, το Cre εκφράζεται μόνο στον επιθυμητό τύπο κυττάρου, όπου ο Cre κόβει τον blocker μεταγραφής στις θέσεις LoxP. Αυτό επιτρέπει τη μεταγραφή και έκφραση της GFP. Τροποποιημένη εικόνα από (Cazemier, Clascá, & Tiesinga, 2016).

## 2.3 ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΙΣ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήσαμε την κυτταροειδική έκφραση και το λειτουργικό χαρακτηρισμό του driver Cre σε διάφορους ιστούς διαγονιδιακών ποντικών με χρήση του συστήματος ανασυνδυασμού Cre/LoxP. Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της έλλειψης της τρανσφεράσης της ακετυλοχολίνης (ChAT) από συνάψεις στα σώματα των κινητικών νευρώνων, χρησιμοποιήθηκαν πειραματόζωα με γονότυπους *Pitx2::Cre/+;Rosa.stop.td-tomato* καθώς και *Pitx2::Cre;vAChT-stop-DTA*.

***Pitx2::Cre/+;Rosa.stop.td-tomato***: Η *Rosa.stop.td-tomato*, αποτελεί σειρά αναφοράς που διαθέτει LoxP θέσεις εκατέρωθεν της stop κασέτας για την έκφραση td-tomato υπό τον έλεγχο του Rosa υποκινητή μετά την εκτομή από Cre ρεκομπινάση. Ο γενετικός τύπος Rosa εκφράζεται σε όλους τους ιστούς (Madisen et al., 2010). Οι απόγονοι της διασταύρωσης αυτής, κάτω από φθορίζον στερεοσκόπιο εκπέμπουν κόκκινο χρώμα κατά μήκος όλου του σώματος, ενώ τα ζώα αναφοράς δεν εμφάνιζαν το κόκκινο χρώμα. Πρακτικά, μέσω της διασταύρωσης εκφράζεται ισχυρή κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη σε όλους τους *Pitx2+* νευρώνες (V0c, V0g).

***Pitx2::Cre;vAChT-stop-DTA***: Η *Pitx2::Cre* αποτελεί τη σειρά όπου το γονίδιο της Cre ρεκομπινάσης έχει εισαχθεί στο εξώνιο 5 του *Pitx2* γονιδίου. Επομένως, η έκφραση της Cre ρεκομπινάσης είναι ιστοειδική και λαμβάνει χώρα επιλεκτικά στους ιστούς που εκφράζουν *Pitx2* (Liu, Selever, Lu, & Martin, 2003). Στη συγκεκριμένη διασταύρωση επιλέχθηκαν αναπαραγωγικά ώριμα αρσενικά *Pitx2::Cre* ♂ ζώα και θηλυκά ♀ *vAChT-stop-DTA* ζώα στην ηλικία των P21. Η σειρά *vAChT-stop-DTA*, στην οποία μετά το γονίδιο του *vAChT* έχει εισαχθεί μια floxed stop κασέτα και στη συνέχεια το γονίδιο της διφθερίτιδας A. Οι απόγονοι που εκφράζουν τόσο την Cre, όσο και το DTA -όπου έχουμε επαγωγής της έκφρασης του γονιδίου της τοξίνης της διφθερίτιδας, το οποίο αποτελεί τοξικό παράγοντα-, σκοτώνουν τα κύτταρα που το εκφράζουν, δηλαδή όλους τους V0c νευρώνες. Ως control ζώα, θεωρήθηκαν όλα όσα δεν είχαν κανένα από τα δύο γονίδια ή ήταν no Cre.

## 2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΙΣΤΟ ΓΙΑ ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι απομόνωσης ιστού για γονοτύπηση. Στο δικό μας εργαστήριο ακολουθείται η αποκοπή μικρού ουραίου τμήματος (0.5 - 1 cm), το οποίο τοποθετείται σε αποστειρωμένο Eppendorf και έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία, απομονώνεται το DNA και πραγματοποιείται η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction). Πάνω στο tube σημειώνεται τόσο η οικογένεια, όσο και ο κωδικός του ζώου, ο οποίος έχει δοθεί μετά την ταυτοποίηση. Με τον όρο ταυτοποίηση, εννοείται η μόνιμη μέθοδος αποκοπής ενός δακτύλου, η οποία εξασφαλίζει την ατομική σήμανση των ζώων. Στη συνέχεια, προστίθεται στο Eppendorf με το τμήμα ουράς κατάλληλη ποσότητα tail buffer (100 mM Tris 8,5 pH, 5mM EDTA 8 pH, 0,2% SDS και 250 mM NaCl σε H<sub>2</sub>O). Ανάλογα με την ηλικία του ζώου, επομένως και με το μέγεθος της ουράς, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα διαλύματος tail mix (περί τα 200 μL στα νεαρά και τα 400 μL στα μεγαλύτερα ζώα). Έπειτα τοποθετείται 0.5 μL Proteinase K / 100 μL tail buffer από το αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 20 μg/mL, η οποία υδρολύει τις πρωτεΐνες (0,1 μg/mL). Στη συνέχεια το δείγμα, επωάζεται σε κλίβανο στους 56°C για 16 ώρες ο/ν (overnight).

## 2.5 ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΜΕ PCR

Μετά την overnight παραμονή των δειγμάτων στον κλίβανο, ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 13.300 rpm, στους 25°C για 5 λεπτά με σκοπό την απομάκρυνση και καθίζηση των βαρύτερων συστατικών. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται 1:10 αραίωση των δειγμάτων σε τελικό όγκο 50μL. Παρακάτω αναφέρονται όλα τα συστατικά και οι λόγοι που είναι απαραίτητοι για την πραγματοποίηση της διαδικασίας. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία *in vitro* μέθοδος που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA. Με την PCR μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Ένας πλήρης τέτοιος κύκλος περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες. Σε μια τυπική αντίδραση, το δίκλωνο DNA

αποδιατάσσεται (denaturation) με θέρμανση στους 95°C. Στη συνέχεια, οι εκκινητές προσαρμόζονται (annealing) με υβριδισμό στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου με μείωση της θερμοκρασίας του δείγματος στους 50-60°C (η θερμοκρασία προσαρμόζεται ανάλογα με τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται και το πείραμα). Ακολουθεί επώαση στους 72°C για την επιμήκυνση (extension) των εκκινητών από μία θερμοάντοχη πολυμεράση (Dream Taq buffer-Thermo Fischer Scientific), παρουσία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων. Η πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται, οι νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για την in vitro σύνθεση του DNA. Μετά από μερικούς κύκλους, το επικρατές προϊόν είναι ένα DNA θραύσμα, το μέγεθος του οποίου αντιστοιχεί στην μεταξύ των δύο αρχικών εκκινητήρων απόσταση. Στη πράξη περίπου 35 κύκλοι της αντίδρασης είναι αρκετοί για την αποτελεσματική ενίσχυση του DNA θραύσματος. Σε κάθε κύκλο που διαρκεί περίπου πέντε λεπτά η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται. Για την πραγματοποίηση μιας PCR αρχικά παρασκευάζεται ένα master mix (n+1, όπου n ο αριθμός των δειγμάτων), στο οποίο στη συνέχεια θα προστεθεί ο στόχος DNA. Αρχικά προστίθενται εκκινητές, οι οποίοι έχουν επίσης συγκεκριμένο προσανατολισμό, ώστε να υβριδοποιούνται εκατέρωθεν της περιοχής ενδιαφέροντος, οριοθετώντας έτσι το προς πολλαπλασιασμό τμήμα. Οι εκκινητές (forward / reverse) αποτελούν ολιγονουκλεοτίδια 18-30bp ειδικά σχεδιασμένα ώστε να έχουν απόλυτη συμπληρωματικότητα προς το τμήμα στόχο. Στη συνέχεια προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα (Dream Taq buffer-Thermo Fischer Scientific), ρυθμίζει το pH και το ιοντικό περιβάλλον της αντίδρασης ώστε να είναι το βέλτιστο, για τη λειτουργία της DNA πολυμεράσης καθώς και αποστειρωμένο απιονισμένο H<sub>2</sub>O, τα dNTPs και η θερμοάντοχη πολυμεράση Taq (**Πίνακας 1**).

Σε κάθε αντίδραση προστίθεται 1,2 μL από το αραιωμένο διάλυμα DNA. Επίσης, στο τέλος κάθε σειράς δειγμάτων προστίθενται 3 επιπλέον δείγματα. Συγκεκριμένα, το θετικό δείγμα αναφοράς που περιέχει την προς ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου, ίση ποσότητα από αρνητικό δείγμα αναφοράς, που δεν περιέχει την αλληλουχία στόχο, αλλά και ενός κενού, άνευ DNA δείγματος, για τον έλεγχο της ορθής διεξαγωγής του πειράματος (ανίχνευση μολύνσεων).

Συγκεκριμένα το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε είναι το εξής:

**Πίνακας 1 Πρωτόκολλο αντιδραστηρίων για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-PCR.**

Αρχικό διάλυμα	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα σε $V_{\text{τελ}}$ 25μL
10x DreamTaq Buffer	1x	2,5
dNTPs 10mM	0,2 mM	0,5
25 μM Forward primer	1 μM	1
25 μM Reverse primer	1 μM	1
DreamTaq (5u/μL)	0,75u	0,2
ddH <sub>2</sub> O		18,85

Στον **Πίνακα 2**, μπορούμε να δούμε αναλυτικά τα βήματα της PCR για το πρόγραμμα 6035:

**Πίνακας 2 Αναλυτική περιγραφή των σταδίων του προγράμματος 35 κύκλων και 65°C θερμοκρασίας.**

Βήματα	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια
1. Αρχική αποδιάταξη	96	3 min
2. Αποδιάταξη κύκλου	96	30 sec
3. Υβριδοποίηση	60	30 sec
4. Επιμήκυνση	72	30 sec
5. Επανάληψη	Βήμα 2 x34	
6. Τελική επιμήκυνση	72	3 min
7. Συντήρηση	10	∞

Ενώ στον Πίνακα 3, μπορούμε να δούμε αναλυτικά τα βήματα της PCR για το πρόγραμμα 5735:

**Πίνακας 3 Αναλυτική περιγραφή των σταδίων του προγράμματος 35 κύκλων και 57°C θερμοκρασίας.**

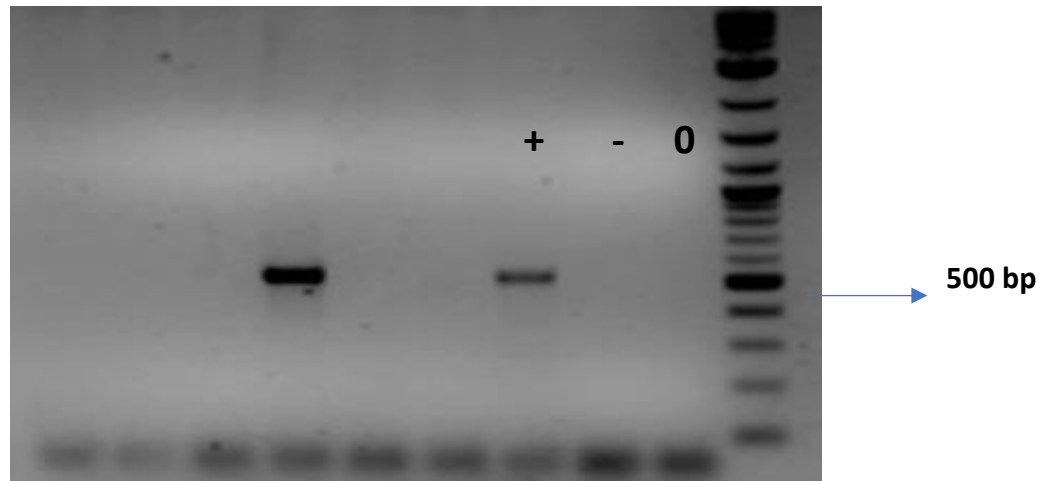
<b>Βήματα</b>	<b>Θερμοκρασία (°C)</b>	<b>Διάρκεια</b>
1. Αρχική αποδιάταξη	96	3 min
2. Αποδιάταξη κύκλου	96	30 sec
3. Υβριδοποίηση	57	30 sec
4. Επιμήκυνση	72	30 sec
5. Επανάληψη	Βήμα 2 x34	
6. Τελική επιμήκυνση	72	3 min
7. Συντήρηση	10	∞

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό της ύπαρξης των γονιδίων ενδιαφέροντος αναφέρονται παρακάτω.

Για τη σειρά Pitx2::Cre και τον εντοπισμό της ύπαρξης του γονιδίου Cre , χρησιμοποιείται το ζεύγος εκκινητών eiriniCreF και eiriniCreR με τους οποίους προκύπτει προϊόν 500bp:

eiriniCRE F: 5'-CCTGGAAAAATGCTTCTGTCC-3'

eiriniCRE R: 5'-GCTAAGTGCCTTCTCTACACC-3'

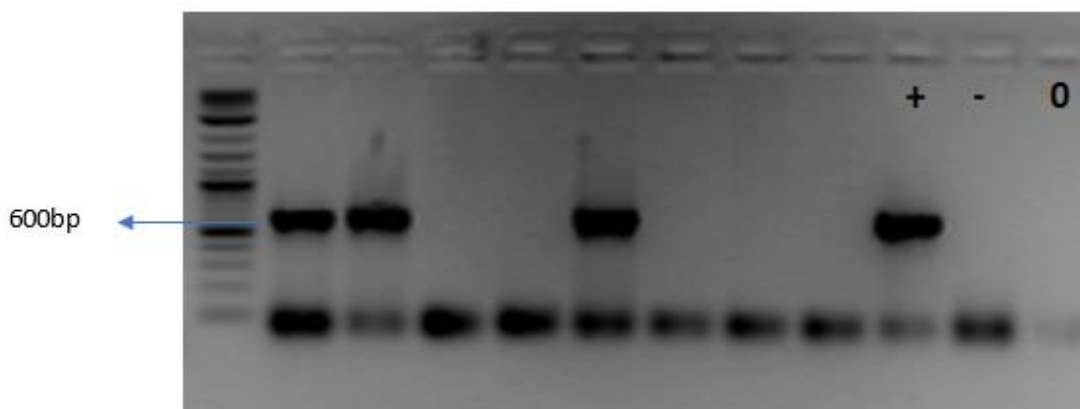


**Εικόνα 12 Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης.** Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μετά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε gel αγαρόζης, παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου με τους εκκινητές eiriniCre F/R. Το επιθυμητό προϊόν εμφανίζεται ως ζώνη μεγέθους 500 bp.

Για τη σειρά vAChT-stop-DTA χρησιμοποιείται το ζεύγος εκκινητών DTA176salFcore και DTAnotR, με τους οποίους προκύπτει προϊόν 600bp :

DTA176salFcore: 5'-AAAAGTCGACGCCATGGATCCTGATGATGTTG-3'

DTAnotR: 5'-ATACGAGCGGCCGCTCACAAGATCGCC-3'



**Εικόνα 13 Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης.** Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μετά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε gel αγαρόζης παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου με τους εκκινητές DTA176salFcore/DTAnotR. Το επιθυμητό προϊόν εμφανίζεται ως ζώνη μεγέθους 600 bp.

## 2.6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ GEL ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Το γενωμικό DNA καθώς και τα προϊόντα της τεχνικής PCR διαχωρίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης. Ηλεκτροφόρηση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο φορτισμένα μόρια και σωματίδια, μέσα σε υδάτινα διαλύματα πχ TAE (40mM Tris- Acetate–1mM EDTA) και κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Λόγω των διαφορετικών τους φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες (κινητικότητα). Η κινητικότητα αυτή εξαρτάται από την σταθερά  $\rho K$  και το μοριακό βάρος του φορτισμένου σωματιδίου, ενώ άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την κινητικότητα είναι το pH και η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer), η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, η θερμοκρασία καθώς και η φύση του υλικού μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση. Η καθιερωμένη τεχνική για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση, την απομόνωση και τον καθαρισμό κομματιών DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Χαρακτηριστικές παράμετροι της ταχύτητα μετακίνησης του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης είναι: το μοριακό μέγεθος του DNA, τα μόρια του γραμμικού δίκλωνου DNA κινούνται στο πήκτωμα με ταχύτητα που είναι αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογάριθμου ( $\log_{10}$ ) του μοριακού τους βάρους. Επιπλέον, η συγκέντρωση της αγαρόζης αποτελεί παράμετρο της κίνησης καθώς κομμάτια DNA κινούνται με διαφορετική ταχύτητα σε πήκτωμα που περιέχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις αγαρόζης. Τα μεγαλομοριακά κομμάτια διαχωρίζονται σε αραιές συγκεντρώσεις αγαρόζης ενώ τα μικρότερα κομμάτια σε πιο μεγάλες συγκεντρώσεις. Η επιλογή, λοιπόν, της συγκέντρωσης της αγαρόζης καθορίζεται από το μέγεθος των τμημάτων DNA και η συγκέντρωσή της είναι αντιστρόφως ανάλογη του μοριακού βάρους των τμημάτων DNA. Το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό ρεύμα επίσης καθορίζει την ταχύτητα κίνησης των μορίων. Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης είναι δυνατή λόγω της παρουσίας του βρωμιούχου αιθιδίου (BrEtH) στο πήκτωμα. Το DNA καθίσταται ορατό μετά από τη χρήση EtBr και έκθεση του gel σε UV ακτινοβολία.

Στα διαλύματα του DNA πριν την ηλεκτροφόρηση προστίθεται ένα πυκνότερο διάλυμα με που περιέχει χρωστικές, που κατά την ηλεκτροφόρηση σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις αγαρόζης μετακινούνται παράλληλα με κομμάτια DNA γνωστού μεγέθους (ladder). Με αυτό



τον τρόπο παρέχεται η δυνατότητα παρακολούθησης του βαθμού της μετακίνησης του DNA στο πήκτωμα με την πάροδο του χρόνου.

## 2.6.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΕΣ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

### **Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης**

Για την παρασκευή του πηκτώματος της αγαρόζης, θα πρέπει πρώτα, να αποφασιστεί η συγκέντρωση αγαρόζης, η οποία σχετίζεται με το μοριακό βάρος των προς διαχωρισμό τμημάτων του DNA. Επειδή στο συγκεκριμένο πείραμα οι μικρότερες ζώνες ήταν της τάξεως των  $\approx 300\text{bp}$  και οι μεγαλύτερες των  $\approx 600\text{bp}$ , τα πηκτώματα είχαν συγκεντρώσεις 1% για τις μεγάλου M.B ζώνες (πχ. 900 bp), 1,5% για τις μικρότερες και 2% για τον διαχωρισμό μεταξύ των χαμηλού M.B προϊόντων (200-250bp). Για την παρασκευή διαλύματος αγαρόζης 2% σε τελικό όγκο 300mL, αρχικά ζυγίζονται 6g σκόνη αγαρόζης και διαλύονται σε 300mL 1x TAE (40mM Tris-Acetate- 1mM EDTA) σε κωνική φιάλη η οποία θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων ισχύος 800W για 5min. Στη συνέχεια, το διάλυμα ψύχεται, υπό διαρκή ανάδευση, με τη βοήθεια τρεχούμενου νερού στην επιφάνεια της κωνικής φιάλης. Τέλος, στο διάλυμα προστίθενται 6  $\mu\text{L}$  EtBr διαλύματος (από αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 10 mg/mL) ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0,1mg/mL. Το ρευστό ακόμη διάλυμα αναδεύεται και τοποθετείται εντός του εκμαγείου, όπου και παραμένει έως ότου στερεοποιηθεί (1h). Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια φθορίζουσα χρωστική ουσία, που έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να το κάνει να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

### **Παρασκευή TAE**

Το διάλυμα 1x-TAE που χρησιμοποιείται κατά την ηλεκτροφόρηση, τόσο στη συσκευή όσο και στην παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης, προέρχεται από αραιώση αρχικού διαλύματος 50x-TAE που παρασκευάζεται από τα παρακάτω συστατικά:

Για Παρασκευή TAE σε  $V_{\text{τελ}}$  1L:

- 40 mM Tris-Base (242g)
- 57,1mL glacial acetic acid
- 1 mM EDTA (0,5M- pH 8) (100mL) σε τελικό όγκο 1L.

### **Παρασκευή EDTA (pH 8)**

Το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ παρασκευάζεται με βάση την παρακάτω συνταγή.

- Σε 800 mL  $H_2O$  προστίθενται:
- 0,5M disodium EDTA. $H_2O$  (186,1 g)
- NaOH, μέχρι pH 8.

Μετά το πέρας της 1h, και αφού το πήκτωμα φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου, μπορεί να ξεκινήσει η ηλεκτροφόρηση. Σε κάθε δείγμα της PCR προστίθενται περίπου 6  $\mu$ L χρωστικής Orange G 6x (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.15% orange G, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glycerol and 60 mM EDTA) και το χρωματισμένο πλέον διάλυμα του δείγματος τοποθετείται σε «πηγαδάκι» του gel. Αμέσως μετά τα δείγματα, προστίθεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους (DNA ladder), ο οποίος παρασκευάζεται με βάση την παρακάτω συνταγή.

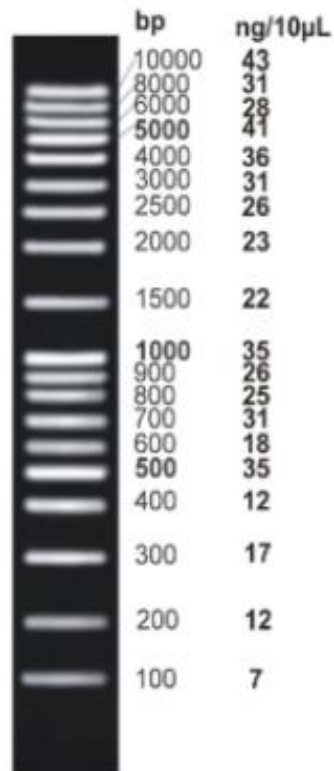
### **Παρασκευή Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder (0,025 mg/ $\mu$ L)**

Σε 85  $\mu$ L  $H_2O$ , προστίθεται:

- 10  $\mu$ L loading dye(10x)
- 5 $\mu$ L 1kb DNA ladder (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L)

Μετά την τοποθέτηση του ladder το καπάκι της συσκευής ηλεκτροφόρησης κλείνει, ώστε να δημιουργηθεί κλειστό κύκλωμα και εφαρμόζεται ρεύμα έντασης 150V mA για περίπου 40 min. Η παρατήρηση του αποτελέσματος της ηλεκτροφόρησης γίνεται στη συσκευή UV-Dolphin, η οποία διαθέτει ενσωματωμένη κάμερα για τη φωτογράφιση των δειγμάτων.

Ο μάρτυρας μοριακού βάρους (ladder), που χρησιμοποιήθηκε στην παραπάνω και σε όλες τις ηλεκτροφορήσεις του πειράματος, ήταν ο 1kb plus DNA ladder-Invitrogen που φαίνεται παρακάτω (**Εικόνα 14**).



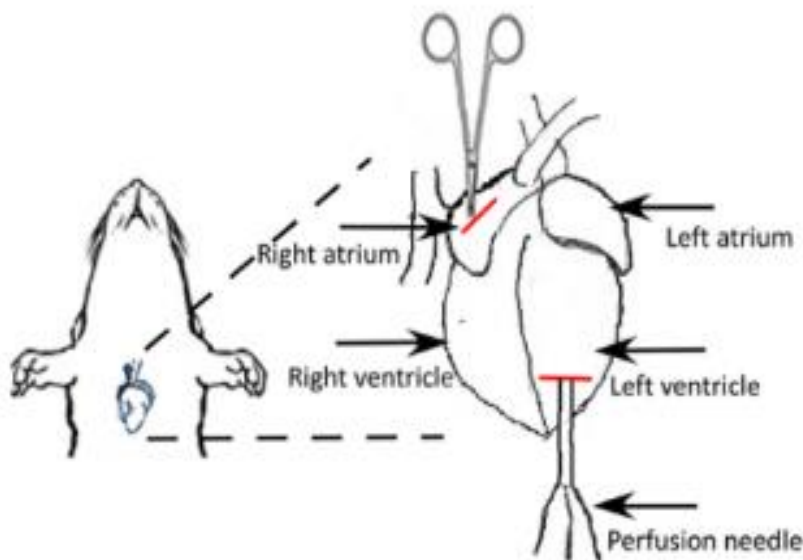
**Εικόνα 14 Μάρτυρας μοριακού βάρους - DNA ladder.** Ο συγκεκριμένος μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του μοριακού βάρους γραμμικών τμημάτων δίκλωνου DNA που προέκυψαν από την PCR. Εικόνα από Fischer scientific Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder.

## 2.7 ΕΝΔΟΚΑΡΔΙΑΚΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΠΑΡΑΦΟΡΜΑΛΔΕΪΔΗΣ 4% (PERFUSION)

Για να διατηρηθεί η αρχιτεκτονική του ιστού και η μορφολογία των κυττάρων, αλλά και να ανακτηθούν άμεσα αντιγόνα του ιστού αμέσως μετά τη θυσία των ποντικών, ο νωτιαίος μυελός πρέπει, να μονιμοποιηθεί, ακολουθώντας τη διαδικασία της ενδοκαρδιακής χορήγησης παραφορμαλδεΐδης 4% (PFA-paraformaldehyde). Το πλεονέκτημα της άμεσης μονιμοποίησης μέσω του κυκλοφορικού συστήματος είναι, ότι η χημική ουσία μπορεί να φτάσει γρήγορα σε κάθε γωνιά του οργανισμού χρησιμοποιώντας το φυσικό αγγειακό δίκτυο με σκοπό τη διατήρηση του ιστού και αποφυγή της υποξίας (Gage, Kirke, & Shain, 2012). Η διαδικασία αφορά ποντίκια μεγαλύτερα της P7. Στην παρούσα εργασία, τα ζώα θυσιάζονταν στην P0 και στην P21.

Αρχικά, το ζώο αναισθητοποιείται με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 0.015mL/gr σωματικού βάρους διαλύματος κεταμίνης (10 mg/mL) - ξυλαζίνης (2 mg/mL). Τοποθετώντας το ζώο, πάνω στη σχάρα ελέγχονται τα αντανακλαστικά πόνου. Με τη χρήση λαβίδας ελέγχουμε το δάκτυλο, την ουρά και τον οφθαλμό του ζώου για να βεβαιωθούμε ότι η διαδικασία θα πραγματοποιηθεί υπό την πλήρη καταστολή του ζώου. Στη συνέχεια μεταφέρεται το ζώο σε πιάτο ανατομίας (sylgard plate), τοποθετείται ανάσκελα και ακινητοποιείται με τη βοήθεια ειδικών καρφίτσων. Διαβρέχεται η θωρακική και κοιλιακή του κοιλότητα με διάλυμα αιθανόλης 70%, ώστε να μην εμποδίζει το τρίχωμά του οποιαδήποτε χειρουργική τομή. Με τη βοήθεια λαβίδας, το δέρμα του ζώου ανασηκώνεται στην περιοχή άνω των γεννητικών οργάνων και πραγματοποιείται η πρώτη τομή οριζοντίως. Η τομή αποσκοπεί στη διάτρηση του περιτόναιου και στην αποκάλυψη των ζωτικών οργάνων. Σταδιακά, η τομή μεγαλώνει, δημιουργώντας το λεγόμενο “χειρουργικό παράθυρο”, με σκοπό τη διεύρυνση του οπτικού πεδίου. Φτάνοντας στο διάφραγμα, γίνεται διάτρηση αυτού και αποκαλύπτεται το ήπαρ και η παλλόμενη καρδιά. Απομακρύνονται τμήματα του θωρακικού κλωβού καθώς και περίσσεια δέρματος για να ξεκινήσει η διαδικασία την ενδοκαρδιακής έγχυσης PFA. Νωρίτερα, έχει προετοιμαστεί το διάλυμα PBS 1x καθώς και της PFA 4% που βρίσκονται σε πάγο και έχει ρυθμιστεί η ένταση της αντλίας στα 60 grm. Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί το κυκλοφορικό σύστημα πιο αποτελεσματικά, πρέπει να ληφθεί μέριμνα ώστε να ταυτίζεται

με τις φυσιολογικές καρδιακές πιέσεις (Gage et al., 2012). Με τη βοήθεια της λαβίδας, η καρδιά σταθεροποιείται και γίνεται διάτρηση του δεξιού κόλπου με το χειρουργικό ψαλίδι. Μια βελόνα - πεταλούδα τοποθετείται στην αριστερή κοιλία η οποία είναι συνδεδεμένη με συνεχή παροχή κρύου PBS 1x, το οποίο παροχετεύεται ενδοκαρδιακά μέσω μηχανήματος ρυθμικών παλμών. Εγχέονται περί τα 5-10 mL κρύου PBS 1x δια μέσου της καρδιάς στην κυκλοφορία, ενώ η έξοδος τους είναι ο ανοικτός -πλέον- δεξιός κόλπος. Με τον τρόπο αυτό, γίνεται η αφαίμαξη του ζώου και η προετοιμασία για την επερχόμενη PFA. Η οπτικοποίηση - και επιτυχία- της αφαίμαξης γίνεται αντιληπτή από τον βαθμιαίο αποχρωματισμό του ήπατος. Με τη διακοπή της ροής του PBS, γίνεται αντικατάσταση αυτού με Falcon που περιέχει κρύο διάλυμα PFA 4%. Η συσκευή ρυθμικών παλμών ενεργοποιείται ξανά όπου και εγχέεται όγκος διαλύματος 25 mL από το κυκλοφορικό σύστημα του ζώου με αργό και σταθερό ρυθμό, μονιμοποιώντας τους ιστούς εκ των έσω , έως ότου παρατηρηθεί ακαμψία του ζώου καθώς και ανασήκωμα των άκρων, της ουράς και της κεφαλής, σημάδια που υποδεικνύουν την ορθή εκτέλεση της μονιμοποίησης.



**Εικόνα 15 Ενδοκαρδιακή χορήγηση PFA 4%.** Διάχυση PFA μέσω της καρδιάς του ποντικίου που δείχνει εισαγωγή της βελόνας στην αριστερή κοιλία. Μετά την εισαγωγή της βελόνας, γίνεται μια άμεση τομή στον δεξιό κόλπο για να ξεκινήσει η διαδικασία (Ghosh & Higgins, 2018).

## 2.7.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΕΣ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΓΙΑ PERFUSION

### **Παρασκευή 1X PBS (pH 7.4)**

Σε 1L dH<sub>2</sub>O προστίθενται:

- 0,137 M NaCl (8 g)
- 0.0027 M KCl (200 mg)
- 0,01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.44 g)
- 0.0018 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (245 mg)

### **Παρασκευή PB 1M (pH 7,4) (775mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-225,5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)**

Σε 500mL dH<sub>2</sub>O προστίθενται:

- 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (77,4 ml)
- 1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (22,6 ml)

Στη συνέχεια απαιτείται φιλτράρισμα του διαλύματος, με φίλτρο, διαμέτρου πόρων 0.22 μm και αποθηκεύεται.

### **Παρασκευή PFA 4% in PB (in dH<sub>2</sub>O)**

Σε 750 mL dH<sub>2</sub>O προστίθενται:

- 0.002M μL NaOH (200 μL)
- 40 g PFA 4%
- 0.1M mL PB (100 mL)

Εντός κωνικής φιάλης, σε 750 mL φιλτραρισμένου-απεσταγμένου και αποστειρωμένου H<sub>2</sub>O προστίθενται 200mL NaOH (10M) και στη συνέχεια προστίθενται 40g PFA. Η φιάλη σφραγίζεται με αλουμινόχαρτο και parafilm (για να μη διαφεύγουν οι υδρατμοί) και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 56°C. Εκεί το διάλυμα αναδεύεται τακτικά, έως ότου διαλυτοποιηθεί πλήρως η PFA. Στη συνέχεια το διάλυμα ψύχεται σε πάγο. Στο διάλυμα προστίθενται 100 mL PB (phosphate buffer) με pH 7,4. Προσαρμόζεται ο όγκος στο 1L και το διάλυμα φιλτράρεται σε φίλτρο, διαμέτρου πόρων 0.22μm και αποθηκεύεται σε αποστειρωμένα falcons των 50mL τα οποία διατηρούνται στους -20°C προς μελλοντική χρήση.

### **Παρασκευή σουκρόζης 30%**

Για την Παρασκευή σουκρόζης 30%, διαλύεται σουκρόζη σε 0.1M PB σε επιθυμητό όγκο.

## **2.8 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ**

Η μέθοδος απομόνωσης νωτιαίου μυελού σε ζώα P0-P7 δεν περιλαμβάνει τη διαδικασία της ενδοκαρδιακής έγχυσης με PFA 4% αλλά πραγματοποιείται decapitation.

Με το πέρας της διαδικασίας του perfusion (P21) ή του decapitation (P0), ξεκινά η ανατομική απομόνωση του νωτιαίου μυελού (laminectomy). Χρησιμοποιώντας ειδικό ψαλίδι και λαβίδα, κόβεται κοιλιακά το στέρνο, απομακρύνονται η κεφαλή, η ουρά ,τα άκρα του ζώου καθώς και το δέρμα, ενώ στη συνέχεια αφαιρούνται προσεκτικά οι μύες. Απομένει ο θωρακικός κλωβός με τους μεσοπλεύριους μύες, οι ραχιαίοι μύες και αποκαλύπτεται σταδιακά η σπονδυλική στήλη. Σημαντικό είναι, να μην τραυματιστεί -υπό καμία συνθήκη- η σπονδυλική στήλη, και κατά συνέπεια ο νωτιαίος μυελός. Ο ιστός μεταφέρεται σε νέο πιάτο ανατομίας και εμβαπτίζεται με κρύο 1x PBS (ώστε να αποφευχθεί η αφυδάτωση), με την κοιλιακή περιοχή εκτεθειμένη. Το ζώο, ακινητοποιείται εκ νέου, από τους εναπομείναντες ραχιαίους και μεσοπλεύριους μύες. Υπό στερεοσκόπιο Leica M80, πραγματοποιείται ενδεδειγμένος καθαρισμός από φλέβες, μύες, ιστούς και ξεκινά η λαμινεκτομή. Αρχικά εντοπίζεται η αυχενική μοίρα με τη βοήθεια λαβίδας, όπου

ανασηκώνοντας και κόβοντας τη σπονδυλική στήλη αποκαλύπτεται ο νωτιαίος μυελός. Με εφαλτήριο σημείο, την τομή της αυχενικής μοίρας, και με κατεύθυνση προς την ουραία χώρα πραγματοποιούνται διαδοχικές τομές στους σπονδύλους εκατέρωθεν της μέσης γραμμής, εισάγοντας υπό κλίση το ψαλίδι μεταξύ νωτιαίου μυελού και σπονδύλων. Το ραχιαίο μέρος του νωτιαίου μυελού μένει στο αυλάκι ενώ το κοιλιακό αποκαλύπτεται έως το ιερό τμήμα, αφού έχουμε αφαιρέσει πλήρως την κοιλιακή μοίρα των σπονδύλων.

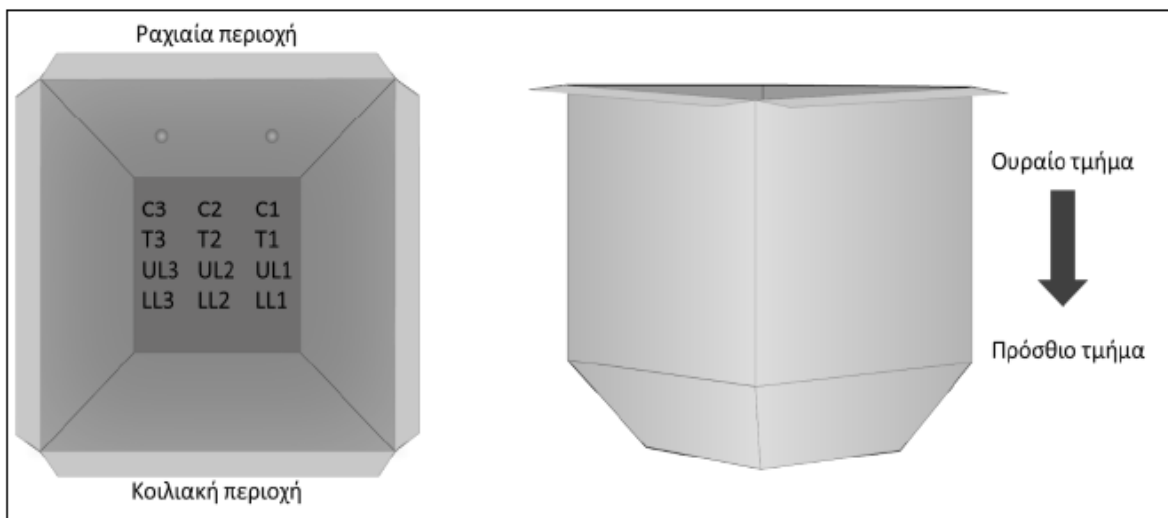
Απομακρύνεται το PBS και οι ιστοί εμβαπτίζονται με παγωμένη παραφορμαλδεΐδη (PFA) 4% καλύπτοντας όλο τον ιστό για post-fixation. Επωάζονται για 2 h, στο sylgard plate το οποίο, βρίσκεται μόνιμα πάνω σε πάγο. Με το πέρας των 2 ωρών, ακολουθούν τέσσερις 15λεπτες πλύσεις με παγωμένο PBS 1x. Τέλος ο νωτιαίος μυελός απομονώνεται πλήρως από τους υποκείμενους ιστούς, υπό στερεοσκόπιο, και εμβαπτίζεται σε διάλυμα σουκρόζης 30% υπό συνεχή ανάδευση σε rocker στους 4°C για 16 ώρες ο/ν (overnight).

## 2.9 ΕΓΚΛΕΙΣΗ ΙΣΤΟΥ

Μετά την ο/ν παραμονή των ιστών σε διάλυμα σουκρόζης 30%, ξεκινάει η διαδικασία έγκλεισης των ιστών σε ειδικά πλαστικά εκμαγεία (chocks). Η όλη διαδικασία θα πραγματοποιηθεί με τη βοήθεια στερεοσκοπίου Leica M80. Ο μονιμοποιημένος -πλέον- νωτιαίος μυελός θα τοποθετηθεί σε πιάτο ανατομίας (ο οποίος είναι εμβαπτισμένος με τη σουκρόζη) και θα σταθεροποιηθεί με τη βοήθεια ειδικών καρφίτσων. Οι καρφίτσες θα τοποθετηθούν, στα ακρινά τμήματα ή στις κοιλιακές ρίζες, τα οποία αποτελούν τμήματα που δεν θα μελετηθούν. Στη συνέχεια, ο νωτιαίος μυελός θα αποκοπεί με τη βοήθεια νυστεριού και τα τμήματα, θα εμβαπτιστούν με διάλυμα O.C.T. (Optical Cutting Temperature compound) με σκοπό την απομάκρυνση της περίσσειας σουκρόζης και θα τοποθετηθούν στον πυθμένα του chock με συγκεκριμένη κατεύθυνση. Η σειρά τοποθέτησης των τμημάτων, από πάνω προς τα κάτω (κεφαλαίο προς ουραίο τμήμα) με την ραχιαία πλευρά (caudal) προς τα πάνω και την κοιλιακή πλευρά (rostral) κάτω, να αγγίζει τον πυθμένα. Τα επίπεδα στα οποία χωρίζεται ο νωτιαίος μυελός είναι 4: το **αυχενικό** (Cervical), διακρίνεται εύκολα από την χαρακτηριστική πάχυνση και μετέπειτα στένωση στην αρχή του θωρακικού τμήματος, το **θωρακικό** (Thoracic) το οποίο βρίσκεται εντός των σπονδύλων του θώρακα, το **άνω οσφυϊκό**



(Upper Lumbar) και **κάτω οσφυϊκό** (Lower Lumbar). Η διάκριση της άνω από την κάτω οσφυϊκή περιοχή, πραγματοποιείται με την απαρίθμηση των κοιλιακών ριζών (L1-L6) και την διάκριση των παχύτερων L4 και L5. Η τομή πραγματοποιείται στο τέλος του L3 τμήματος και έτσι διαχωρίζεται το upper από το lower lumbar. Πριν την προσθήκη των αποκομμένων τμημάτων, είχε τοποθετηθεί το ειδικό διάλυμα του O.C.T. στα chocks , όπου χάρη στο υψηλό του ιξώδες έχει την ικανότητα να διατηρεί την ακριβή φορά με την οποία τοποθετούνται τα τμήματα του νωτιαίου μυελού. Στη συνέχεια, το σκεύος με τους ιστούς τοποθετείται σε ξηρό πάγο. Το O.C.T στερεοποιείται εντός 1 λεπτού και στη συνέχεια το cryoblock μεταφέρεται στους -80°C. Ο προσανατολισμός που ακολουθείται, παρουσιάζεται στην παρακάτω απεικόνιση.



**Εικόνα 16 Τμήματα ιστού σε cryoblock.** Σχηματική αναπαράσταση του προσανατολισμού των επιπέδων του νωτιαίου μυελού στο εκμαγείο. Τα γράμματα αντιστοιχούν στα αρχικά των λέξεων Cervical, Thoracic, Upper Lumbar, Lower Lumbar και οι αριθμοί, στη σειρά με την οποία τοποθετούνται τα ζώα από δεξιά προς τα αριστερά.



## 2.11 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

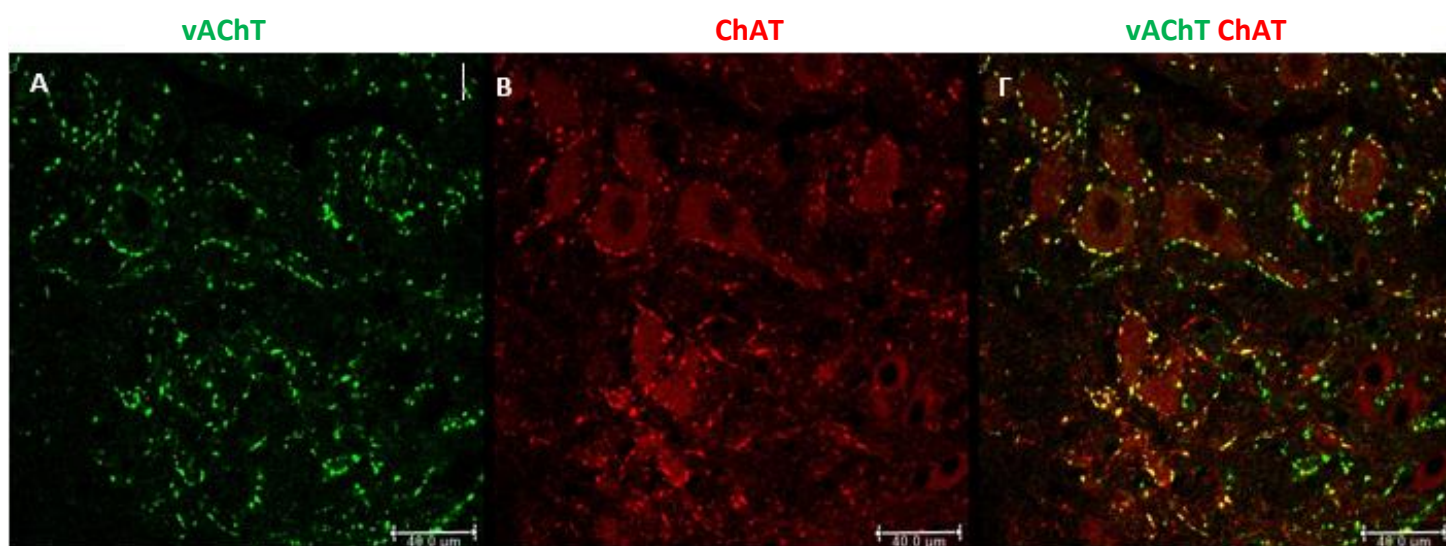
Η ανοσοϊστοχημεία είναι μια τεχνική η οποία βασίζεται στην αλληλεπίδραση αντιγόνου αντισώματος. Ο εντοπισμός των αντιγόνων γίνεται ορατή με τη χρήση ειδικών δεικτών, όπως ένα φθορίζον χρώμα, κάτω από παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Επιπλέον, μια από τις πιο σημαντικές προκλήσεις της τεχνικής είναι η ανάκτηση των αντιγονικών επιτόπων, των οποίων η τεταρτοταγής δομή αλλοιώνεται κατά την μονιμοποίηση του ιστού.

Τα slides με τους ιστούς, εξάγονται από τη βαθιά κατάψυξη και αφήνονται σε RT 25°C να ξεπαγώσουν και να στεγνώσουν για 5 min. Γίνονται x2 πλύσεις με κρύο διάλυμα PBS 1x για 5' προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια Ο.Σ.Τ. Στη συνέχεια, προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα το οποίο διαλύεται σε ορό αποφυγής δέσμησης μη ειδικών επιτόπων (blocking solution-1% αλβουμίνη βόειου ορού- BSA, 0,1% Triton X-100 σε 1x PBS) σε τελικό όγκο 500 μL/slide. Ακολουθεί επώαση σε θάλαμο υγρασίας (coldroom) στους 4 °C για 16 h ο/ν. Την επόμενη ημέρα, γίνεται απομάκρυνση του πρωτογενούς αντισώματος και ακολουθούν 3x πλύσεις με διάλυμα PBS 1x για 10 min/φορά. Προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα (αραιώνεται σε Eppendorf προστατευμένο με αλουμινόχαρτο από το φως σε 1% BSA- 0,1% Triton-X σε 1x PBS ) το οποίο έχει αραιωθεί σε ορό δέσμησης μη ειδικών επιτόπων σε τελικό όγκο 500 μL/slide και αφήνουμε 2 h σε σκοτεινό θάλαμο υγρασίας (αφού το 2γενές αντίσωμα είναι φωτοευαίσθητο). Γίνονται 4x πλύσεις των 10 min με 1x PBS για να απομακρυνθεί το δευτερογενές αντίσωμα. Τέλος, τοποθετείται το Vectashield – mounting medium το οποίο διατηρεί το φθορισμό και μειώνει το μη ειδικό σήμα και τέλος η καλυπτρίδα. Τα slides μπορούν να αποθηκευτούν στους 4 °C σε σκοτεινό θάλαμο για περίπου 3 ημέρες.

### **Παρασκευή ορού αποφυγής δέσμησης μη ειδικών επιτόπων :**

Για την παρασκευή 10 mL, σε 1x PBS, διαλύονται:

- 0,1 gr blocking solution -1% αλβουμίνη βόειου ορού BSA
- 0.1% triton X-100



Εικόνα 18 Παράδειγμα ανοσοφθορισμού. Εγκάρσια τομή νωτιαίου μυελού στο επίπεδο της άνω οσφυϊκής μοίρας. (Α) Ανοσοφθορισμός έναντι ChAT για εντοπισμό των σωμάτων των κινητικών νευρώνων. (Β) Ανοσοφθορισμός έναντι vAChT για εντοπισμό των χολινεργικών συνάψεων πάνω στα σώματα των κινητικών νευρώνων. (optical thickness 1.92  $\mu\text{m}$ )

#### Πίνακας 4 Λίστα πρωτογενών αντισωμάτων.

Πρωτογενές αντίσωμα	Αριθμός καταλόγου	Ζώο προέλευσης	Συνολική Αραίωση	Εταιρεία
<b>Anti-ChAT</b>	AB144P	Goat (gt)	1:100	Merck Millipore
<b>Anti-ChAT</b>	CU1574	Rabbit (rb)	1:8.000	Jessell lab
<b>Anti- vAChT</b>	ABN100	Goat (gt)	1:2000	Millipore
<b>anti-Asb4</b>	CU1275	guinea pig	1:4000	Jessell lab
<b>Anti-CART</b>	G-003-62	Rabbit (rb)	1:12800	Phoenix Pharmaceuticals

**Πίνακας 5 Λίστα δευτερογενών αντισωμάτων.**

Δευτερογενές αντίσωμα	Φθοριόχρωμα	Ζώο προέλευσης	Συνολική Αραίωση	Εταιρεία
Anti-gt	Alexa 488	Donkey	1:500	Jackson Immuno-research Laboratories
Anti-rb	CY3		1:1000	
Anti-gt	Alexa 488		1:500	
Anti-gp	CY5		1:500	
Anti-rb	405 Dylight		1:500	

## 2.12 ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

Το επόμενο βήμα μετά την ανοσοϊστοχημεία, είναι αρχικά, η παρατήρηση των slides σε μικροσκόπιο Mic-upright Leica DM RA2 με κάμερα Orca Flash 4.0. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας το συνεστιακό μικροσκόπιο Leica DM 6000 CFS (Confocal Fixed Stage System) laser: Argon, DPSS 561, HeNe 633, πραγματοποιείται η απεικόνιση των τομών. Οι ιστοί φέρουν ενώσεις (μετά την ανοσοϊστοχημεία) που έχουν την ιδιότητα να εκπέμπουν φως αμέσως μετά την απορρόφηση ακτινοβολίας συγκεκριμένου κύματος (φθοριοχρώματα). Χάρη στη συνεστιακή μικροσκοπία, μια τεχνική οπτικής απεικόνισης κατά την οποία έχουμε ελάττωση των μηνυμάτων από τα μη εστιασμένα σημεία του παρασκευάσματος, έχουμε σαν αποτέλεσμα την ενίσχυση της ευκρίνειας και της αντίθεσης (contrast) του παρασκευάσματος. Πρακτικά, έχοντας τοποθετήσει μικρό διάφραγμα στους οπτικούς άξονες, επιτρέπεται η σάρωση, όχι μόνο ως προς τους άξονες x και y αλλά και ως προς τον z, με αποτέλεσμα να λαμβάνουμε τρισδιάστατες εικόνες. Ακόμα στα πλεονεκτήματα της συνεστιακής μικροσκοπίας συμπεριλαμβάνονται, το ελεγχόμενο βάθος του πεδίου, αλλά και η ελαχιστοποίηση του θορύβου. Τα προαναφερθέντα μικροσκόπια βρίσκονται στην μονάδα Βιολογικών Απεικονίσεων (Biological Imaging Unit) του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α. Η ανάλυση και επεξεργασία των εικόνων έγινε με τα προγράμματα LAS AF lite και Image J.

### 3 ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία επιχειρεί να δώσει απάντηση σε δύο ερωτήματα:

**Το πρώτο ερώτημα της εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της κατανομής της *Asb4* στον νωτιαίο μυελό και η ύπαρξη πιθανού συνεντοπισμού της με τους *Pitx2+* νευρώνες, το *ChAT* και με το νευροπεπτίδιο *CART*.** Η παρουσία της πρωτεΐνης *Asb4*, έχει συνδεθεί με έναν μεγάλο αριθμό διαφορετικών λειτουργιών ενώ, είναι γνωστό ότι εντοπίζεται στην περιοχή του νωτιαίου μυελού όπου εδρεύουν οι *Pitx2+* νευρώνες. Ποια είναι όμως η κατανομή της στον νωτιαίο μυελό και ποια είναι η σχέση της με την *ChAT* και το δεύτερο νευροδιαβιβαστή *CART*; Μήπως η πρωτεΐνη *Asb4* είναι από τους παράγοντες που υποδιαιρούν τον *Pitx2+* *V0c* πληθυσμό σε *ipsilateral* και *bilateral*; Δημιουργήσαμε πειραματικά ποντίκια με γονότυπο *Pitx2::Cre+/-;Rosa-td-tomato+/-*, οι απόγονοι των οποίων, φέρουν και τα δύο γονίδια και εκφράζουν ισχυρή κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη σε όλους τους *Pitx2+* νευρώνες (*V0c*, *V0g*).

**Το δεύτερο ερώτημα, αφορά τους χολινεργικούς άξονες καθώς και τις πολυάριθμες νευρικές απολήξεις τους στο ραχιαίο κέρασ του νωτιαίου μυελού και αν προέλευσή τους είναι από *Pitx2+* νευρώνες.** Για το σκοπό αυτό διασταυρώσαμε 2 σειρές διαγονιδιακών ποντικών, όπου στους απογόνους με γονότυπο *Pitx2::Cre;vAChT-stop-DTA*, ο *V0c* πληθυσμός είχε απαλειφθεί. Συγκρίναμε εγκάρσιες τομές νωτιαίου μυελού ζώων ελέγχου (controls) με πειραματικά ζώα (experimental) για να διαπιστώσουμε αν αυτές οι χολινεργικές απολήξεις προέρχονται από *Pitx2+* νευρώνες.

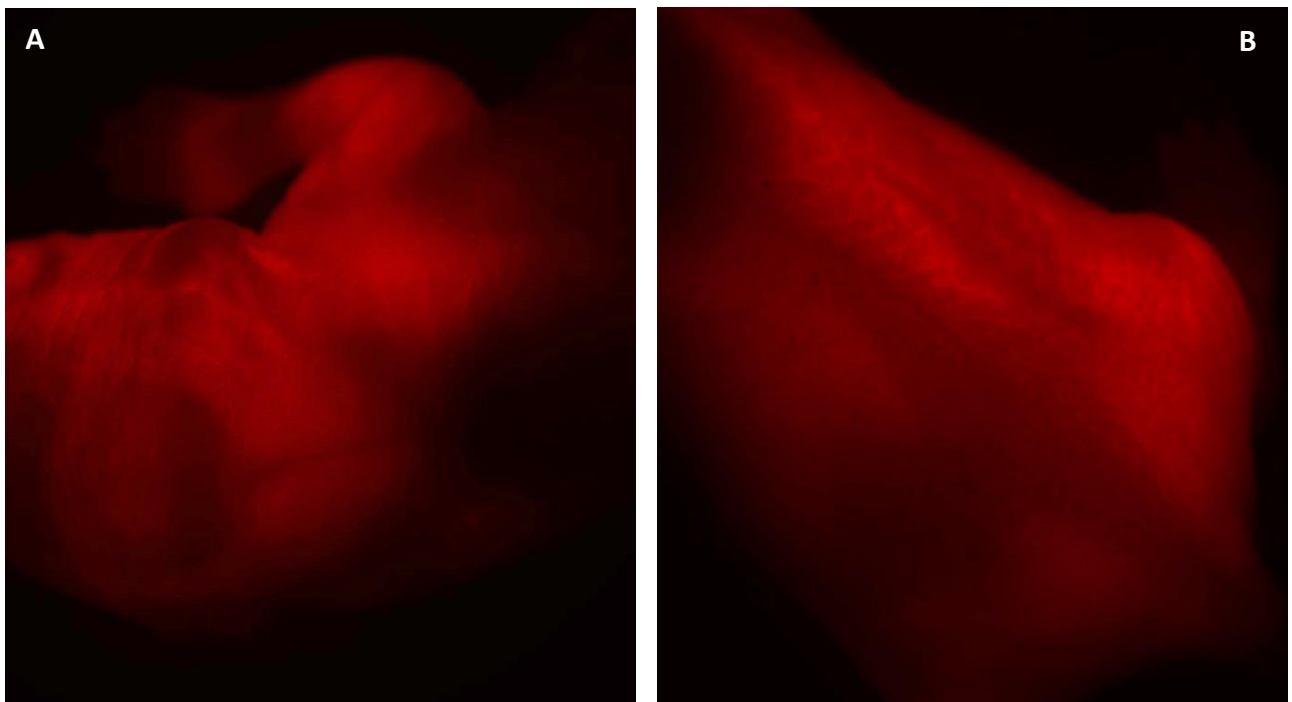
## 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 ASB4 ΣΤΟΝ ΝΩΤΙΑΙΟ ΜΥΕΛΟ

Σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου, είχε πραγματοποιηθεί screen με σκοπό την εύρεση δεικτών, που θα χαρακτήριζαν και θα ξεχώριζαν τον V0c από τον V0g πληθυσμό και ίσως μάρκαραν υποπληθυσμούς αυτών. Σ' αυτό το screen, ξεχώρισε το CART, ένα νευροπεπτίδιο το οποίο χαρακτηρίζει ολόκληρο τον V0c πληθυσμό, και εκφράζεται κι από ποσοστό των V0g. Ακόμα ξεχώρισε το γονίδιο της πρωτεΐνης *Asb4*, η οποία μαρκάρει μέρος των V0g και V0c πληθυσμών. Στη συγκεκριμένη εργασία, έγινε μια πιο ενδελεχής ανάλυση, των πληθυσμών που μαρκάρει η *Asb4*, και μελετήθηκε η σχέση της με το νευροπεπτίδιο CART, το ChAT και τους *Pitx2+*.

Για την ανάλυση, δημιουργήσαμε πειραματικά ποντίκια με γονότυπο *Pitx2::Cre+/-;Rosa-td-tomato+/-* P0, που μόλις είχαν γεννηθεί, με σκοπό τη μελέτη της έκφρασής και κατανομής της *Asb4*. Τα ποντίκια προήλθαν από τη διασταύρωση της σειράς *Pitx2::Cre*, που κατευθύνει την έκφραση της Cre ρεκομπινάσης επιλεκτικά στους *Pitx2+* νευρώνες (V0c, V0g) και της σειράς *Rosa-td-tomato* που διαθέτει *LoxP* θέσεις εκατέρωθεν της *td-tomato* κασέτας. Στους απογόνους της διασταύρωσης, που φέρουν και τα 2 γονίδια, εκφράζεται ισχυρή κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη στα σώματα και τις συνάψεις (C-boutons) των *Pitx2+* νευρώνων. Στα ποντίκια αυτού του γονοτύπου, η Cre ρεκομπινάση βρίσκεται υπό τον υποκινητή του *Pitx2+* μεταγραφικού παράγοντα και εκφράζεται, μόνο στους *Pitx2+* νευρώνες. Υπό τον υποκινητή του *Rosa* βρίσκεται μια κασέτα, η οποία περιέχει μια *LoxP* περιοχή, μια stop αλληλουχία, μια δεύτερη *LoxP* περιοχή και το γονίδιο *td-tomato* που μέσω της διασταύρωσης οι απόγονοι εκφράζουν ισχυρή κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη σε όλους τους *Pitx2+* νευρώνες (V0c, V0g). Στα ζώα που είχαν και τα δύο γονίδια, η Cre θα απομακρύνει τη stop αλληλουχία που υπάρχει μεταξύ των *LoxP* περιοχών και θα επιτρέψει την έκφραση της φθορίζουσας πρωτεΐνης *td-tomato*. Τα ποντίκια εξετάστηκαν κάτω από στερεοσκόπιο με φθορίζον φως με σκοπό τη διαπίστωση εκπομπής κόκκινου χρώματος, αν ήταν δηλαδή πειραματικά (experimental) (Εικόνα 19).

Τα πειραματόζωα *Pitx2::Cre+/-;Rosa-td-tomato+/-*, αφού ελέγχθηκαν για το γονότυπό τους, θυσιάστηκαν στην ηλικία των P0. Έγινε απομόνωση του νωτιαίου μυελού και οι ιστοί χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοϊστοχημεία. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε εγκάρσιες τομές (cross sections) νωτιαίου μυελού ποντικών ηλικίας P0. Έγινε ανοσοφθορισμός με το αντίσωμα έναντι της Asb4, με το αντίσωμα έναντι της ChAT (choline acetyltransferase) και ανοσοφθορισμός με το αντίσωμα έναντι της CART (Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript) για εντοπισμό της κατανομής του νευροπεπτιδίου CART. Πρακτικά, πρόκειται για τετραπλό ανοσοφθορισμό, διότι είχαμε και το ενδογενές κόκκινο χρώμα που σημαίνει τους *Pitx2+* νευρώνες. Εξετάστηκε, έτσι, ο συνεντοπισμός των *Pitx2+*, νAChT/ChAT, CART και Asb4, των παραπάνω ζώων τόσο στην αυχενική και θωρακική όσο και στην άνω οσφυϊκή μοίρα του νωτιαίου μυελού.



**Εικόνα 19** Απεικόνιση πειραματόζωου *Pitx2Cre+/-;Rosa-td-tomato +/-*, ηλικίας P0 κάτω από φθορίζον μικροσκόπιο. Κάποιοι ιστοί φθορίζουν κάτω από το μικροσκόπιο. Συγκεκριμένα, παρατηρείται έντονη κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη σε όλους τους απογόνους της διασταύρωσης φέρουν τα επιθυμητά γονίδια. (A) Στην εικόνα φαίνεται η κεφαλή και το δεξιό άνω άκρο του ζώου (ιστοί που εκφράζουν *Pitx2+*), ενώ στην εικόνα (B) μπορεί κανείς να παρατηρήσει το ραχιαίο και ουριαίο τμήμα του ζώου. Τα ζώα ελέγχου, δεν αποτυπώθηκαν σε εικόνα, καθώς δεν υπήρχε καθόλου φθορισμός.



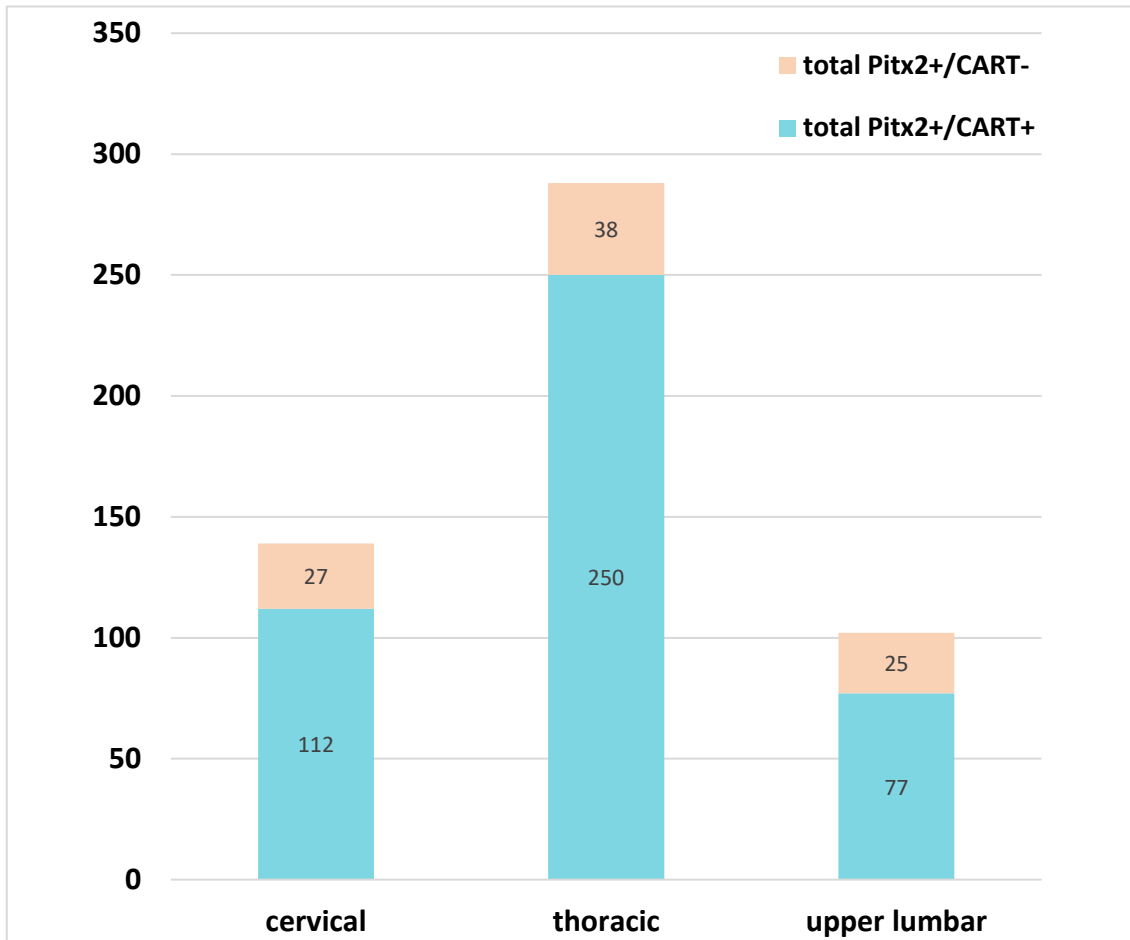
Το ChAT, εντοπίζεται στους 5 γνωστούς από τη βιβλιογραφία, χολινεργικούς πληθυσμούς νευρώνων, στα σώματα των κινητικών νευρώνων, στους προγαγγλιακούς νευρώνες του συμπαθητικού, τους ραχιαίους χολινεργικούς νευρώνες, στα partition neurons (medial V0c και lateral partition neurons) και στα κύτταρα του κεντρικού καναλιού (Barber et al., 1984).

Το νευροπεπτίδιο CART φαίνεται να εκφράζεται σε ένα ποσοστό των χολινεργικών προγαγγλιακών νευρώνων, ενώ παρατηρείται και σε πιθανές νευρικές απολήξεις στις Lamina I και II. Το CART εντοπίζεται ακόμη, σε σώματα νευρώνων πέριξ του κεντρικού καναλιού και σε ορισμένα σώματα κινητικών νευρώνων. Τέλος η παρουσία του CART παρατηρείται στη λευκή ουσία στην Anterior White Commissure, δηλαδή στην περιοχή ακριβώς κοιλιακά της Lamina X και άνω της πρόσθιας μέσης αύλακας. Πρόκειται ενδεχομένως για άξονες νευρώνων της ανιούσας νωτιαιοθλαμικής οδού που μεταφέρει αισθητικά ερεθίσματα (πόνος, θερμοκρασία, αφή) ή της κατιούσας εγκεφαλονωτιαίας οδού που μεταφέρει κινητικές εντολές.

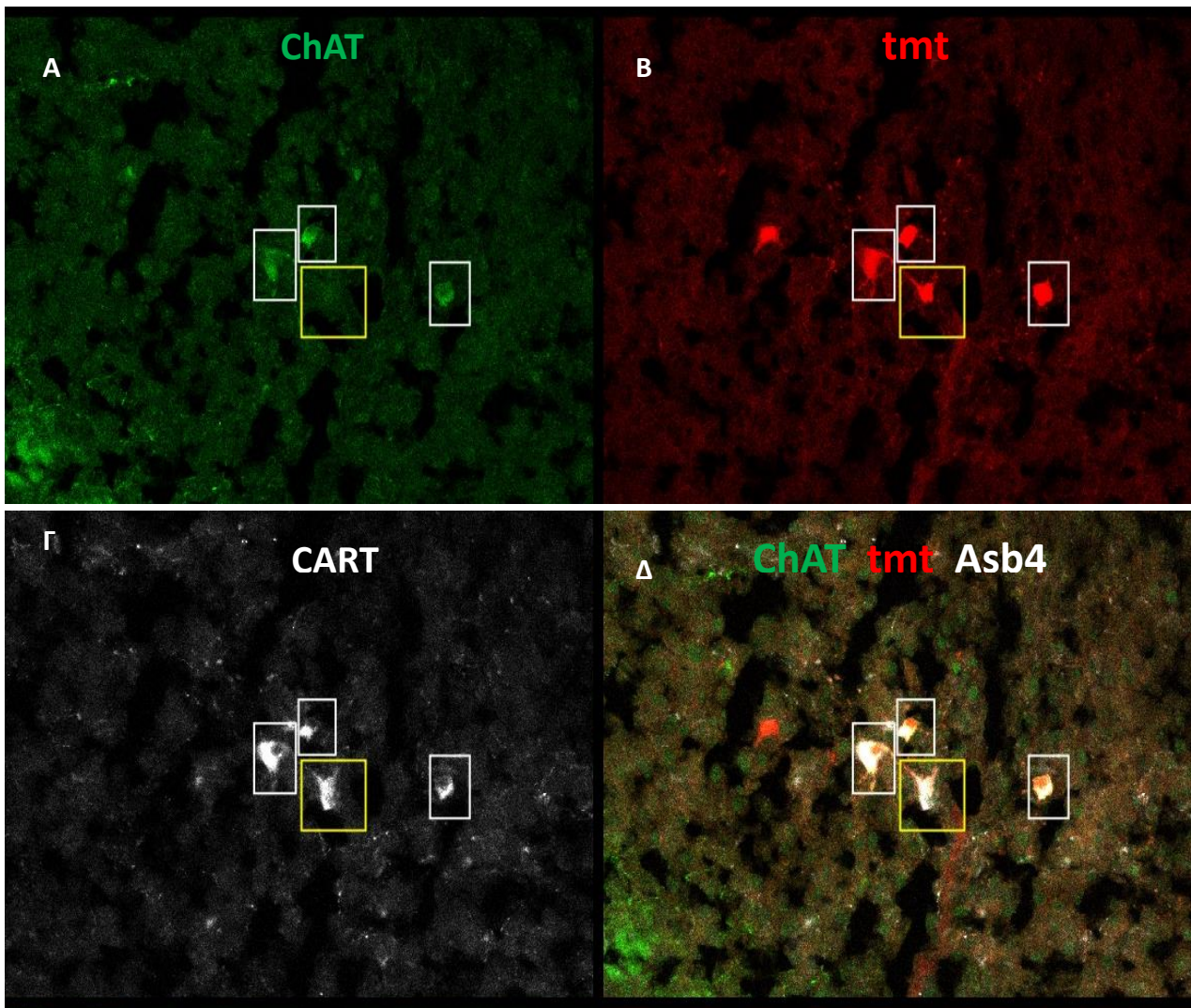
Εξετάστηκε, έτσι, ο συνεντοπισμός των td-tomato Pitx2+ νευρώνων, με το ChAT, την Asb4 και το CART. Αναλύθηκε στη συνέχεια, το ποσοστό αυτών που είναι χολινεργικοί και γλουταματεργικοί (μη χολινεργικοί) αντίστοιχα, δηλαδή vAChT+ChAT+ και vAChT-ChAT- σε διάφορα επίπεδα του νωτιαίου μυελού (αυχενική, θωρακική και άνω οσφυϊκή μοίρα). Στα εν λόγω πειραματόζωα και στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες δεν μπόρεσαν να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις στην κάτω οσφυϊκή μοίρα λόγω αδυναμίας ανίχνευσης χολινεργικών νευρώνων.

Στα διαγράμματα που ακολουθούν, οι μετρήσεις αφορούν διαφορετικό αριθμό τομών / φωτογραφιών, και διαφορετικό αριθμό νευρώνων σε αυχενικό, θωρακικό και οσφυϊκό επίπεδο. Οπότε οι 3 στήλες των διαγραμμάτων δε μπορούν να συγκριθούν μεταξύ τους. Στη συνέχεια των αποτελεσμάτων όμως, συγκρίνουμε ποσοστά θετικών και αρνητικών νευρώνων ανά επίπεδο.

Αρχικά επιβεβαιώσαμε κάποια προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου, αυξάνοντας τον αριθμό των νευρώνων στις μετρήσεις. Οι πρώτες αφορούσαν τον total αριθμό Pitx2+ νευρώνων, δηλαδή το σύνολο των V0c και V0g, οι οποίοι είναι είτε CART + είτε CART-. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι περίπου ένα 81% των Pitx2+ νευρώνων έχουν και το CART, ενώ το 19% δε το έχουν. Στο **Γράφημα 1**, μπορεί κανείς να παρατηρήσει αναλυτικά τους μετρημένους νευρώνες στην αντίστοιχη μοίρα του νωτιαίου μυελού.

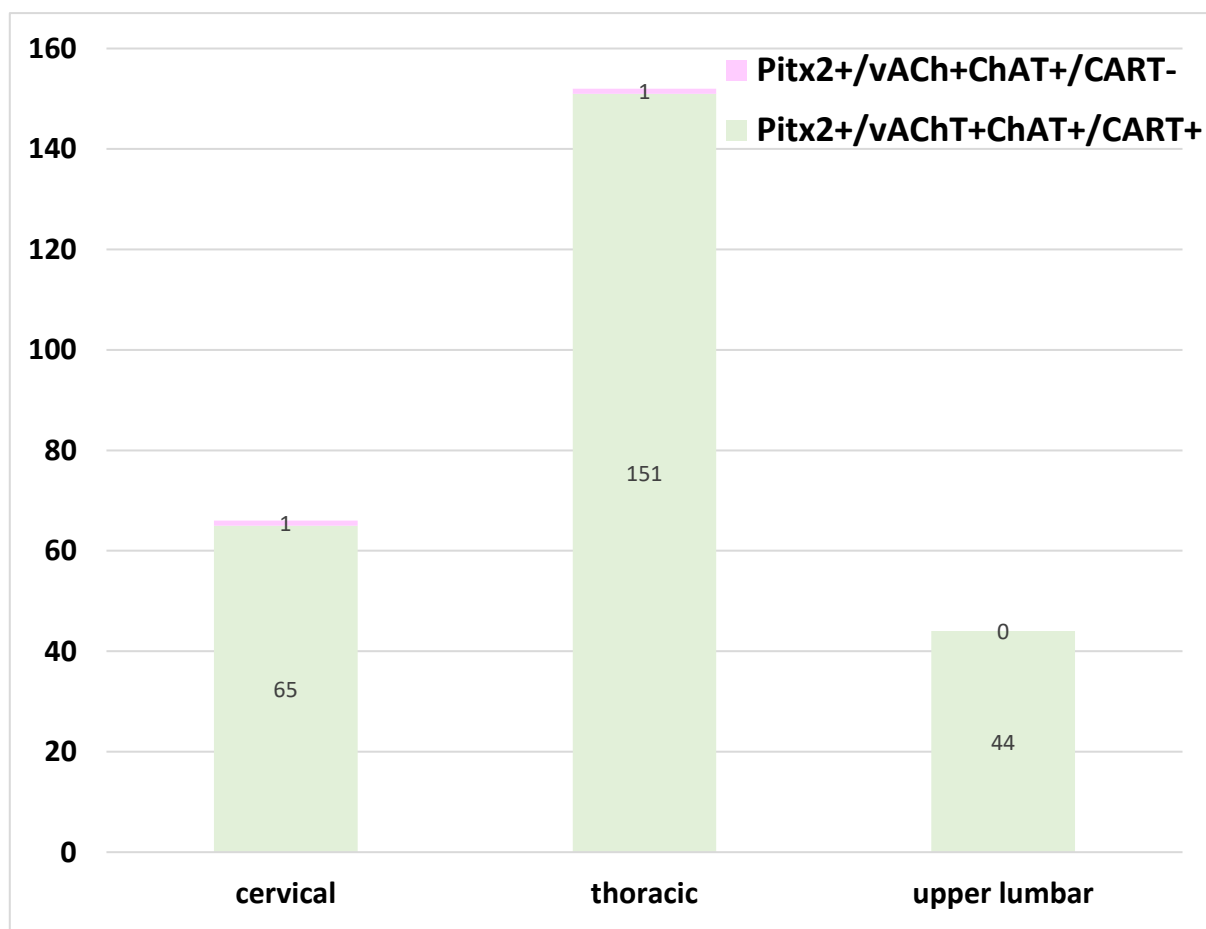


**Γράφημα 1** Οι τρεις στήλες απεικονίζουν τους total (V0c+V0g) Pitx2+ νευρώνες που είναι CART+ και CART-, στο σύνολο των Pitx2+ / td-tomato+ νευρώνων (Pitx2+ total neurons). Οι μετρήσεις στις διάφορες μοίρες έχουν γίνει σε διαφορετικό αριθμό τομών / φωτογραφιών, οπότε ο αριθμός των νευρώνων διαφέρει στις 3 στήλες, (αυχενική μοίρα- cervical, θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα- upper lumbar).



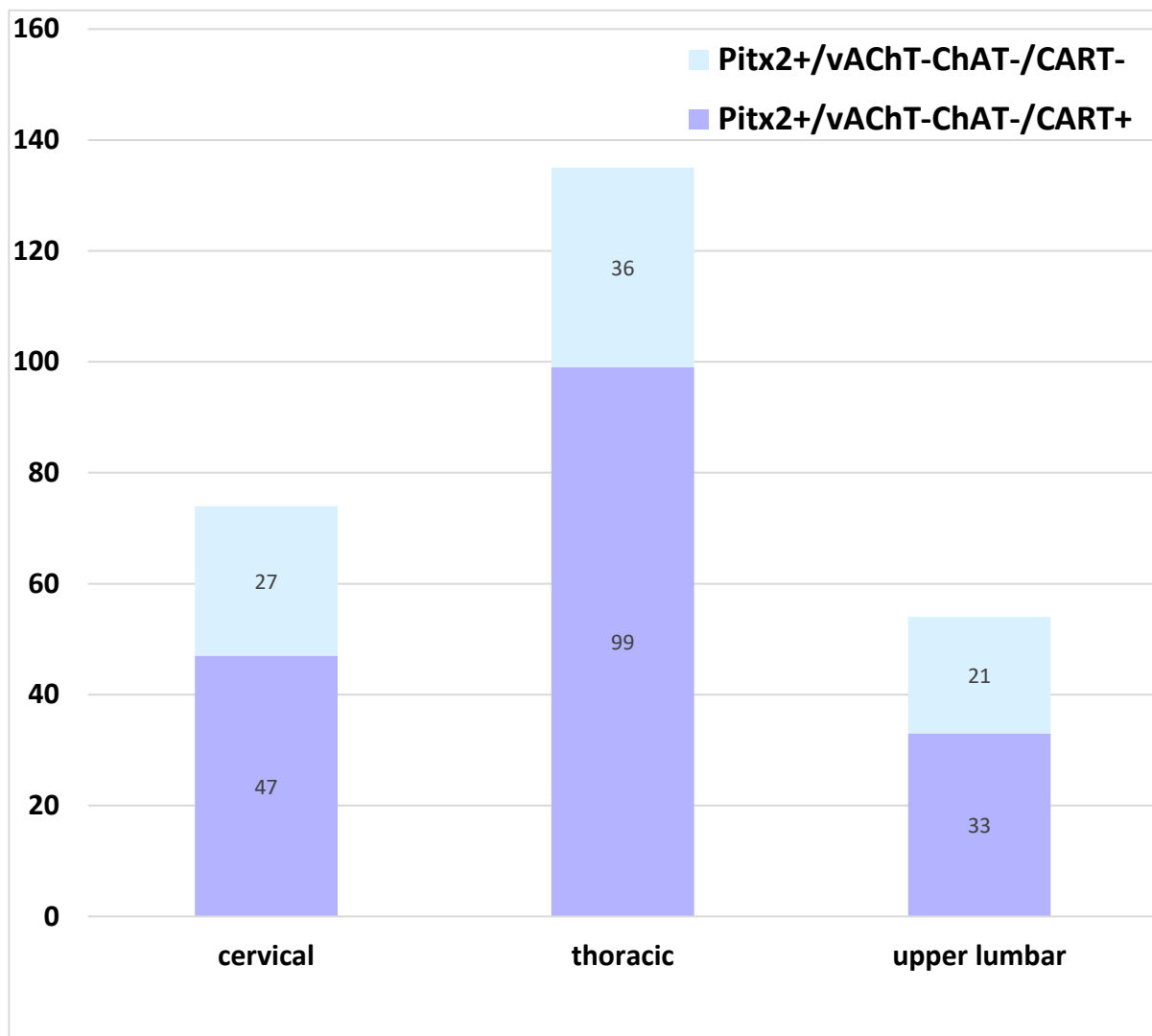
**Εικόνα 20** Ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση συνεντοπισμού των πρωτεϊνών **CART** και **vAChT/ChAT** στους **Pitx2+** νευρώνες. Ανοσοφθορισμός σε τομές της θωρακικής μοίρας από *Pitx2Cre<sup>+/-</sup>;Rosa-td-td-tomato<sup>+/-</sup>* ποντικών ηλικίας P0. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για **CART** (άσπρο) και **vAChT/ChAT** (πράσινο). Οι **Pitx2+** νευρώνες που εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη *Rosa-td-tomato* ορίζονται ως **tmt** (κόκκινο). Παρατηρείται, ότι η πλειοψηφία των *td-tomato+* νευρώνων που είναι **vAChT+ChAT+**, δηλαδή ανήκει στον **V0c** πληθυσμό, εκφράζουν την **CART** πρωτεΐνη. Ακόμα, υπάρχει και ένα κύτταρο το οποίο δεν είναι χολινεργικό, αλλά **V0g**. (θωρακική μοίρα - Thoracic). (optical thickness 1.92 μm)

Στη συνέχεια μετρήθηκαν οι χολινεργικοί Pitx2+ νευρώνες που είναι ταυτόχρονα CART+ (Pitx2+ / vAChT+ ChAT+ / CART+) και απεικονίζονται στην **Εικόνα 20**. Πιο συγκεκριμένα, στο **Γράφημα 2** παρατηρείται ότι στην αυχενική μοίρα το 98% των V0c (Pitx2+ / vAChT+ ChAT+) νευρώνων συνεντοπίζονται με την CART (Pitx2+/vAChT+ ChAT+/CART+). Το ποσοστό αυτό αγγίζει το 99% στη θωρακική μοίρα, ενώ φτάνει το 100% στην άνω οσφυϊκή μοίρα του νωτιαίου μυελού. Μελετώντας τα ποσοστά του CART στους χολινεργικούς Pitx2+ νευρώνες διαπιστώνεται πως το νευροπεπτίδιο εκφράζεται σε ποσοστό 99%, δηλαδή σχεδόν από όλους τους V0c νευρώνες, γι' αυτό το λόγο αποτελεί έναν δεύτερο νευροδιαβιβαστή.



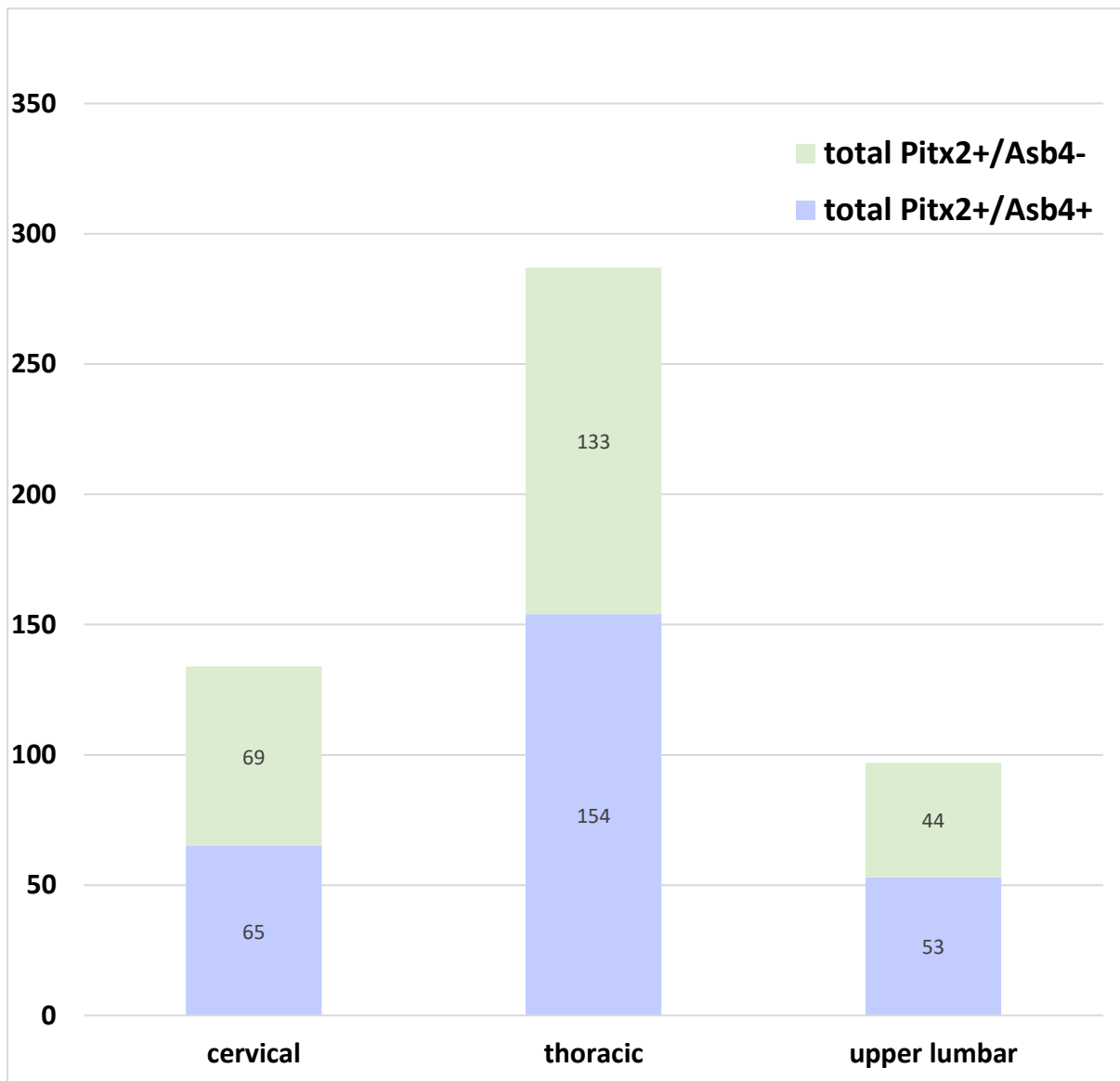
**Γράφημα 2** Οι τρεις στήλες απεικονίζουν τους td-tomato+ νευρώνες που είναι CART+ (CART+ / td-tomato+ neurons) και CART- (CART- / td-tomato+ neurons), στο σύνολο των Pitx2+ / td-tomato+ νευρώνων. Οι μετρήσεις στις διάφορες μοίρες έχουν γίνει σε διαφορετικό αριθμό τομών / φωτογραφιών, οπότε ο αριθμός των νευρώνων διαφέρει στις 3 στήλες, (αυχενική μοίρα-cervical, θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα- upper lumbar).

Στο **Γράφημα 3**, παρουσιάζεται ο αριθμός των νευρώνων που συνεντοπίζονται με την CART στο σύνολο των Pitx2+ / vAChT-ChAT- νευρώνων και είναι γλουταματεργικοί, δηλαδή V0g. Πιο αναλυτικά, το ποσοστό των Pitx2+ / vAChT-ChAT- / CART+ ανέρχεται στο 64% στην αυχενική μοίρα, στο 73% στη θωρακική μοίρα και στο 57% στην άνω οσφυϊκή μοίρα. Συνολικά ένα 65% των V0g είναι και CART.



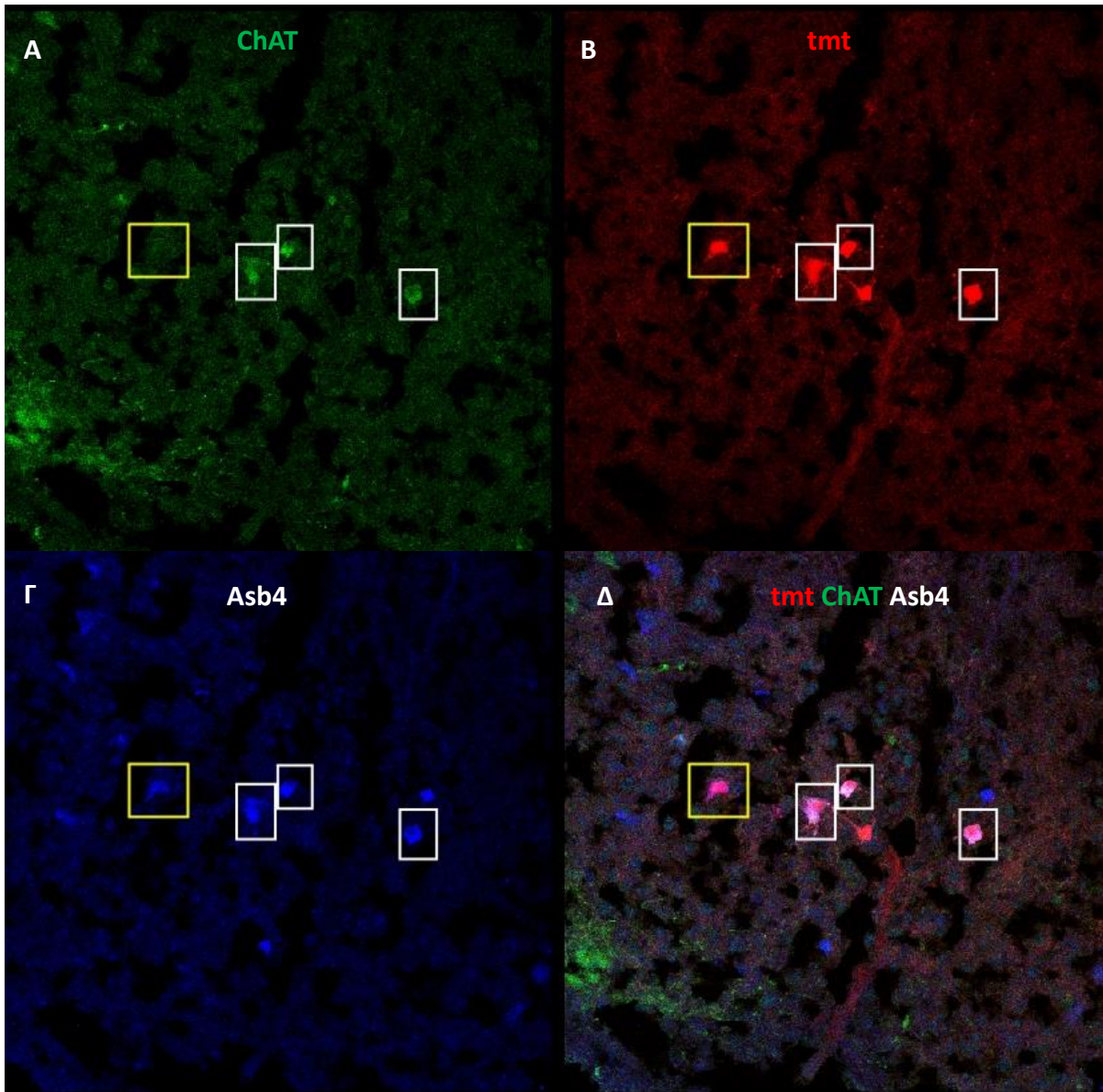
**Γράφημα 3** Οι τρεις στήλες απεικονίζουν τους td-tomato+ νευρώνες που είναι CART+/vAChT-ChAT- (td-tomato+ / vAChT-ChAT- /CART+ neurons) και CART- στο σύνολο των vAChT-ChAT- /td-tomato+ νευρώνων (td-tomato+ / vAChT-ChAT- neurons). Οι μετρήσεις στις διάφορες μοίρες έχουν γίνει σε διαφορετικό αριθμό τομών / φωτογραφιών, οπότε ο αριθμός των νευρώνων διαφέρει στις 3 στήλες, (αυχενική μοίρα-cervical, θωρακική μοίρα-thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα- upper lumbar).

Έπειτα, ακολούθησαν οι μετρήσεις που αφορούσαν την πρωτεΐνη Asb4. Αρχικά, μετρήσαμε το σύνολο των Pitx2+ νευρώνων που ήταν Asb4+ και Asb4-. Στο **Γράφημα 4** παρουσιάζονται τα ποσοστά των μετρημένων νευρώνων στην αυχενική, θωρακική και άνω οσφυϊκή μοίρα. Συνολικά ένα 52% των total Pitx2+ νευρώνων βρέθηκαν και Asb4+, ενώ ένα 48% ήταν Asb4-.



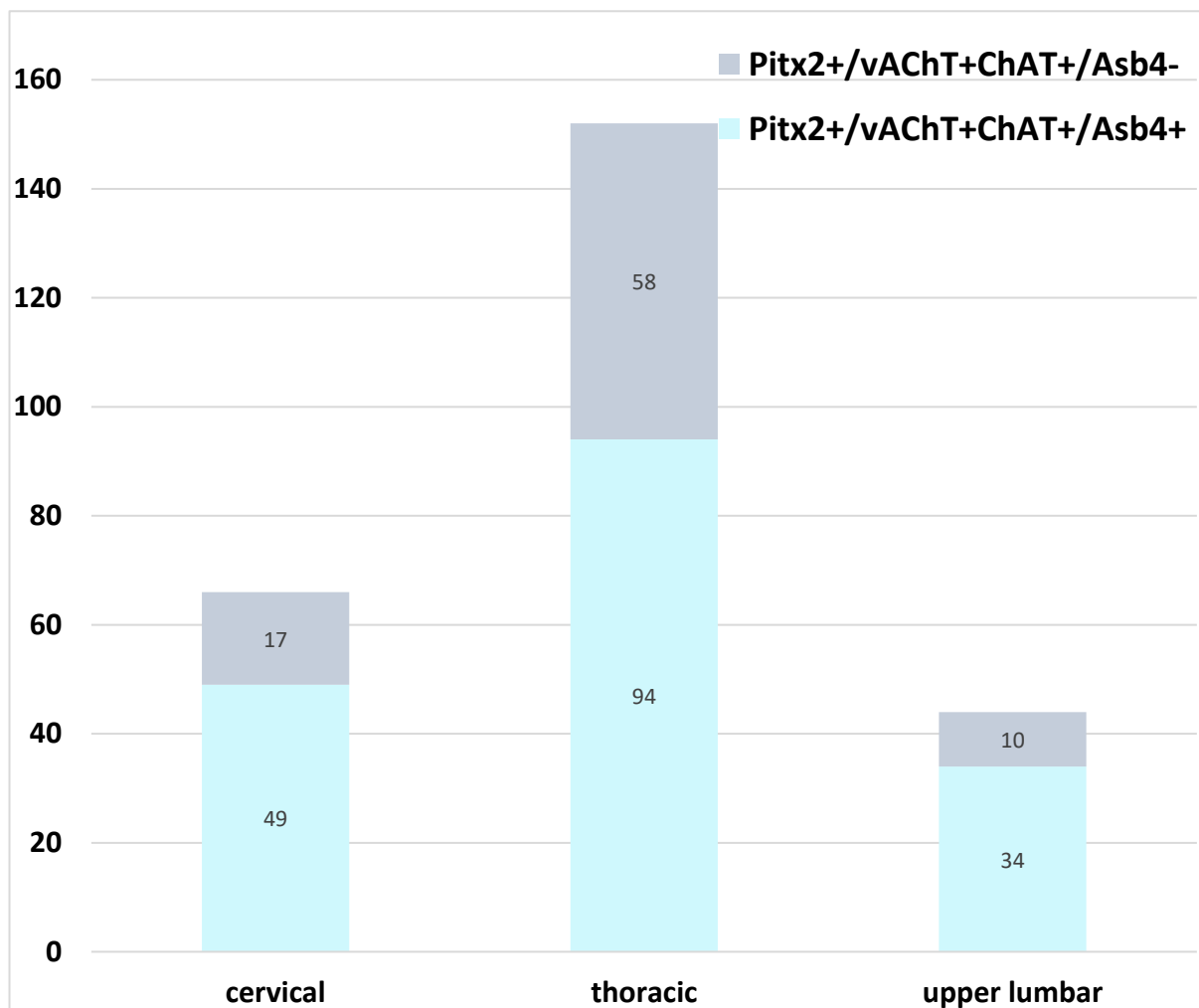
**Γράφημα 4** Οι τρεις στήλες απεικονίζουν τους total (V0c+V0g) Pitx2+ νευρώνες που είναι Asb4+ και Asb4-, στο σύνολο των Pitx2+ / td-tomato+ νευρώνων (Pitx2+ total neurons). Οι μετρήσεις στις διάφορες μοίρες έχουν γίνει σε διαφορετικό αριθμό τομών / φωτογραφιών, οπότε ο αριθμός των νευρώνων διαφέρει στις 3 στήλες, (αυχενική μοίρα- cervical, θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα- upper lumbar).

Στην **Εικόνα 21** απεικονίζεται μια θωρακική τομή του νωτιαίου μυελού όπου όλοι οι V0c νευρώνες (Pitx2+ / vAChT+ ChAT+) είναι Asb4+, πλην ενός. Οι Pitx2+ νευρώνες που δεν είναι χολινεργικοί, αλλά εκφράζουν την Asb4+ πρωτεΐνη αποτελούν ένα ποσοστό της τάξης του 35%.



**Εικόνα 21** Ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση πιθανού συνεντοπισμού των πρωτεϊνών **Asb4** και **vAChT/ChAT** στους **Pitx2+** νευρώνες. Ανοσοφθορισμός σε τομές θωρακικής μοίρας από *Pitx2Cre+/-;Rosa-td-tomato+/-* ποντικών ηλικίας P0. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για **Asb4** και **vAChT/ChAT**. Οι **Pitx2+** νευρώνες που εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη *Rosa-td-tomato* ορίζονται ως **tmt**. Παρατηρείται, ότι η πλειοψηφία των *td-tomato+* νευρώνων που είναι **vAChT+ChAT+**, δηλαδή ανήκει στον V0c πληθυσμό, εκφράζουν την **Asb4** πρωτεΐνη. Ακόμα, υπάρχει και ένα κύτταρο το οποίο δεν είναι χολινεργικό, αλλά V0g. (θωρακική μοίρα – Thoracic). (optical thickness 1.92 μm).

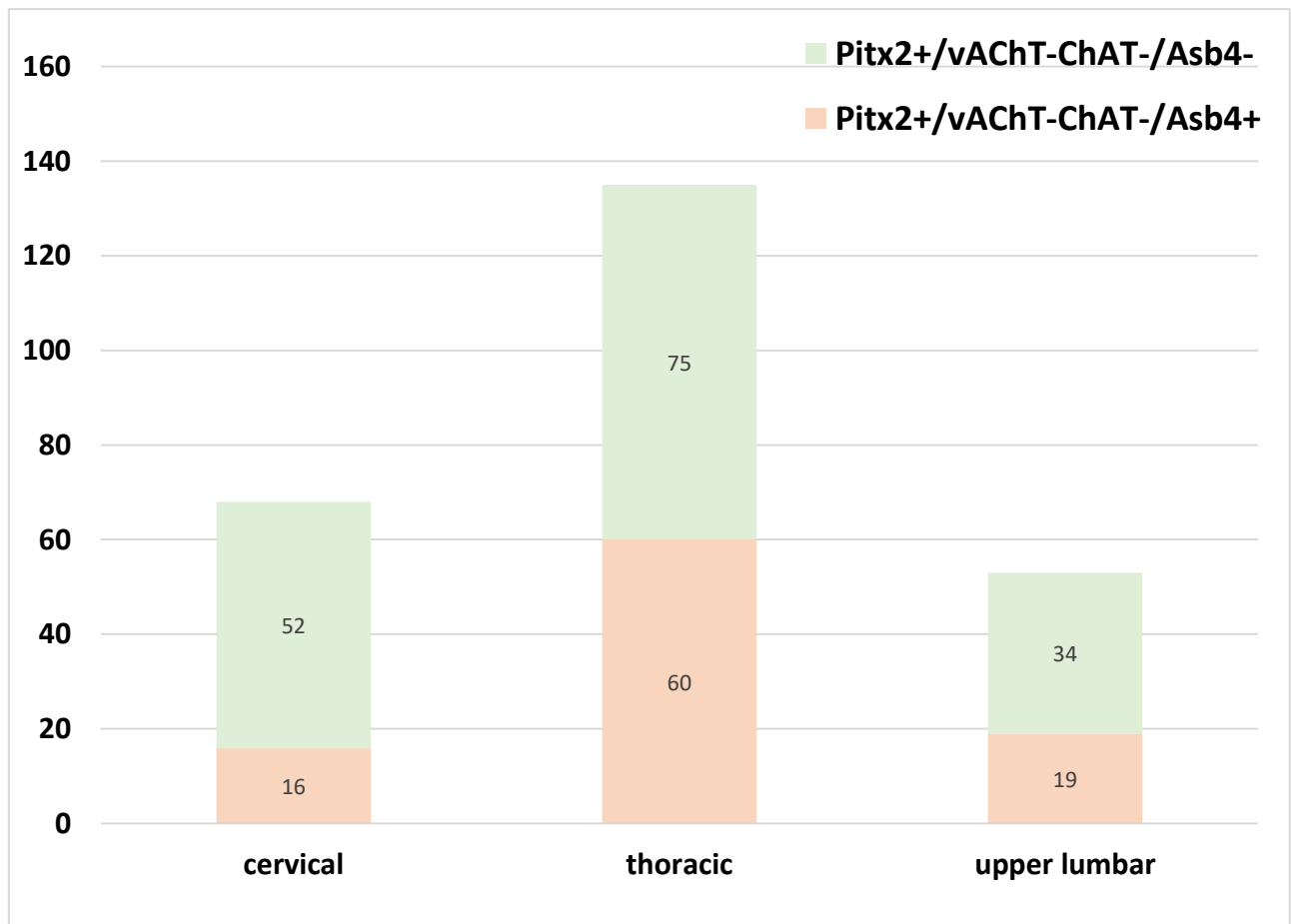
Στο **Γράφημα 5** απεικονίζεται το ποσοστό των χολινεργικών Pitx2+/ vAChT+ChAT+ νευρώνων που εκφράζουν Asb4+ και το ποσοστό των V0c νευρώνων που δεν εκφράζουν Asb4-, σε τρεις μοίρες του νωτιαίου μυελού ποντικών αγρίου τύπου. Αναλυτικότερα, στην αυχενική μοίρα 74% του πληθυσμού των Pitx2+ νευρώνων εκφράζουν την Asb4 πρωτεΐνη. Στη θωρακική μοίρα το ποσοστό αυτό μειώνεται στο 62% και στην άνω οσφυϊκή μοίρα ανέρχεται σχεδόν στο 77%. Συνολικά, κατά μήκος του νωτιαίου μυελού υπολογίστηκε, η πρωτεΐνη Asb4 εκφράζεται σε ποσοστό 69% των V0c νευρώνων.



**Γράφημα 5** Οι τρεις στήλες απεικονίζουν τους Pitx2+ νευρώνες που είναι Pitx2+/vAChT+ChAT+ / Asb4+ neurons με το γαλάζιο χρώμα, ενώ το γκρι χρώμα αναπαριστά όλους τους νευρώνες που είναι Asb4- (Asb4-/ Pitx2+ /vAChT+ChAT+ neurons) στο σύνολο των Pitx2+ td-tomato+ νευρώνων V0c. Οι μετρήσεις στις διάφορες μοίρες έχουν γίνει σε διαφορετικό αριθμό τομών / φωτογραφιών, οπότε ο αριθμός των νευρώνων διαφέρει στις 3 στήλες, (αυχενική μοίρα-cervical, θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα- upper lumbar).

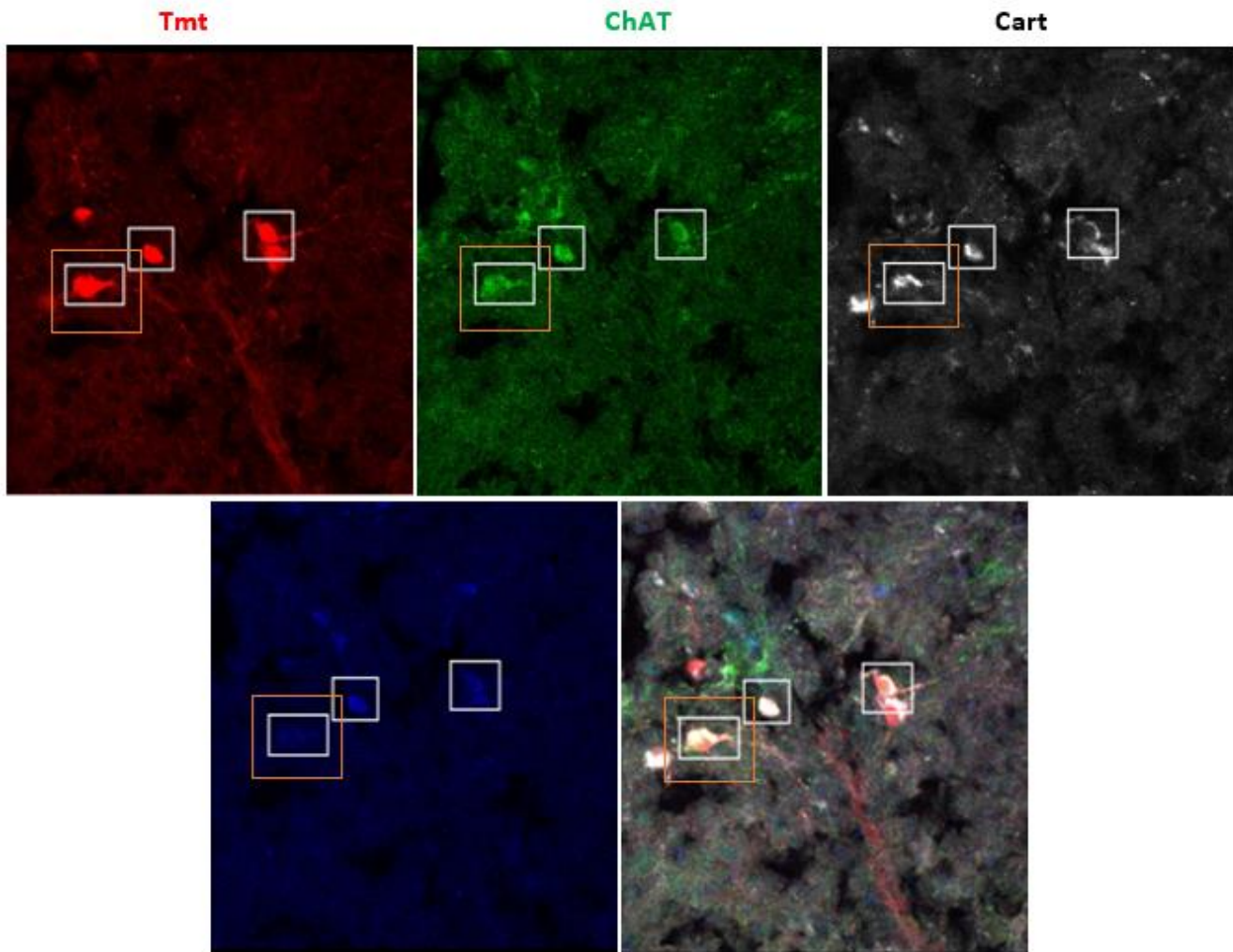


Αντίστοιχα, στο **Γράφημα 6**, παρουσιάζεται το ποσοστό των γλουταματεργικών Pitx2+/vAChT-ChAT- νευρώνων που εκφράζουν Asb4+ και το ποσοστό των V0g νευρώνων που δεν εκφράζουν Asb4-, σε τρεις μοίρες του νωτιαίου μυελού ποντικών αγρίου τύπου. Πιο αναλυτικά, το ποσοστό των Pitx2+ / vAChT-ChAT- / Asb4+ ανέρχεται στο 24% στην αυχενική μοίρα, στο 44% στη θωρακική μοίρα και σχεδόν στο 36% στην άνω οσφυϊκή μοίρα. Συνολικά, κατά μήκος του νωτιαίου μυελού υπολογίστηκε, η πρωτεΐνη Asb4 εκφράζεται σε ποσοστό 35% των V0g νευρώνων. Μελετώντας τα ποσοστά του Asb4 στους Pitx2+ νευρώνες κρίνουμε αρκετά ενδιαφέρον ότι ένα μεγάλο ποσοστό των V0c και ποσοστό των V0g νευρώνων συνεκφράζουν την ίδια πρωτεΐνη και θα ακολουθήσει ανάλυση προκειμένου να βρεθούν επιπλέον ομοιότητες των Asb4+ V0c, V0g νευρώνων.



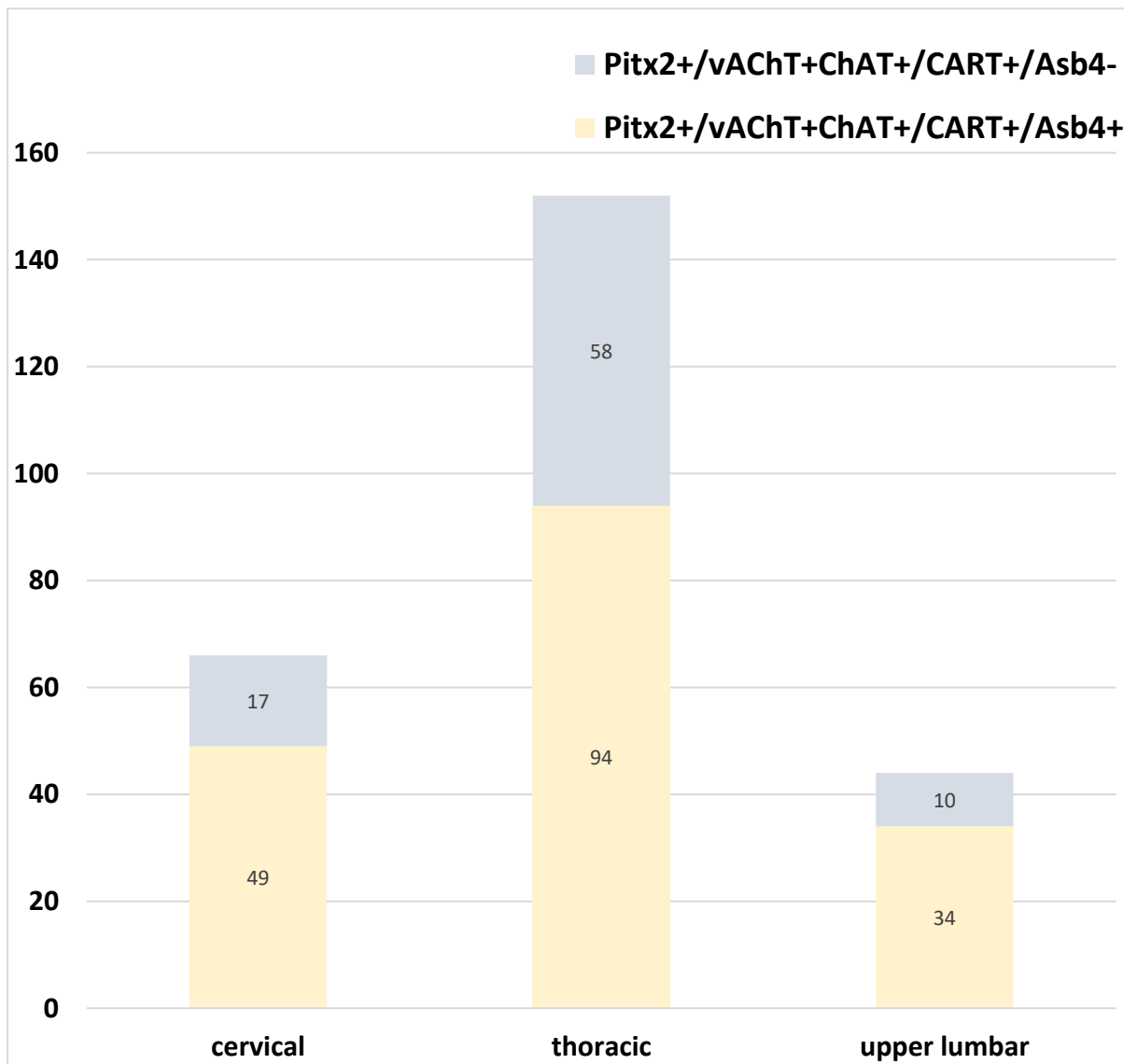
**Γράφημα 6** Οι τρεις στήλες απεικονίζουν τους Pitx2+ νευρώνες που είναι Asb4+ / vAChT-ChAT- (Asb4+ / Pitx2+ / vAChT-ChAT- neurons) και Asb4- στο σύνολο των vAChT-ChAT- /td-tomat+ νευρώνων (Pitx2+ / vAChT-ChAT- neurons) V0g. Οι μετρήσεις στις διάφορες μοίρες έχουν γίνει σε διαφορετικό αριθμό τομών / φωτογραφιών, οπότε ο αριθμός των νευρώνων διαφέρει στις 3 στήλες, (αυχενική μοίρα-cervical, θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα- upper lumbar).

Ακολούθως, προσπαθήσαμε να μελετήσουμε τη σχέση των Pitx2+ νευρώνων με το CART, την Asb4 στους V0c και V0g νευρώνες. Για το σκοπό αυτό, προχωρήσαμε σε τετραπλό ανοσοφθορισμό. Όπως μπορεί κανείς να παρατηρήσει στην **Εικόνα 22**, πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός σε τομές της άνω οσφυϊκής μοίρας του νωτιαίου μυελού σε ποντίκια *Pitx2::Cre+/-;Rosa-td-tomato+/-* ηλικίας P0. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για το CART νευροπεπτίδιο αλλά και για την πρωτεΐνη Asb4 και τους χολινεργικούς δείκτες ChAT/vAChT.



**Εικόνα 22 Συνεντοπισμός Pitx2+/ vAChT+ChAT+ / CART+ / Asb4+ σε άνω οσφυϊκή τομή.** Τομές άνω οσφυϊκής μοίρας *Pitx2Cre+/-;Rosa-td-tomato+/-* ποντικών ηλικίας P0. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για Asb4, CART και vAChT/ChAT, ενώ εκφράζεται και η ενδογενή κόκκινη φθορίζουσα td-tomato. Οι Pitx2+ νευρώνες που εκφράζουν την φθορίζουσα πρωτεΐνη Rosa-td-tomato ορίζονται ως tmt. Παρατηρείται, ένα κύτταρο των td-tomato+ νευρώνων το οποίο δεν εκφράζει την Asb4 πρωτεΐνη και έχει σημειωθεί με πορτοκαλί πλαίσιο. (άνω οσφυϊκή μοίρα- UL upper lumbar). (optical thickness 1.92 μm)

Έπειτα, ακολούθησε ανάλυση του συνεντοπισμού των Pitx2+ /vAChT+ ChAT+/CART+ με την Asb4+ πρωτεΐνη. Στο **Γράφημα 7**, παρουσιάζεται ο συνεντοπισμός αυτός, ο οποίος εν μέρη ταυτίζεται με το **Γράφημα 5**, καθώς αναφέραμε ήδη πως το ποσοστό των V0c χολινεργικών κυττάρων στα οποία εντοπίζεται το νευροπεπτίδιο CART, αγγίζει το 99%, υπάρχει δηλαδή σχεδόν πλήρης ταύτιση.

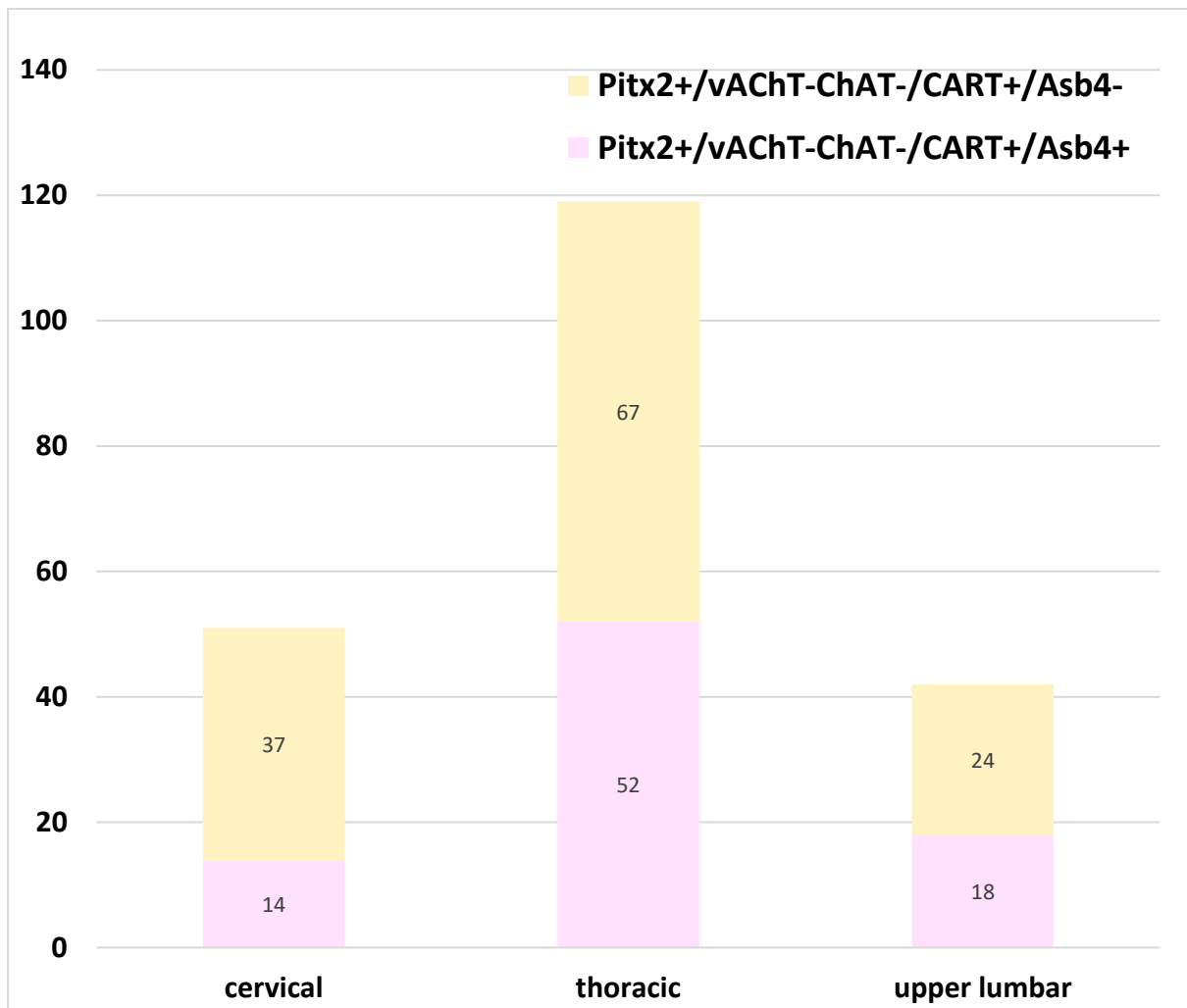


**Γράφημα 7** Οι τρεις στήλες απεικονίζουν τους tomato+ Pitx2+ /vAChT+ChAT+ /CART+ νευρώνες που είναι Asb4+ (Asb4+ tomato+ neurons) και Asb4- (Asb4- tomato+ neurons), στο σύνολο των Pitx2+ tomato+ νευρώνων. Οι μετρήσεις στις διάφορες μοίρες έχουν γίνει σε διαφορετικό αριθμό τομών / φωτογραφιών, οπότε ο αριθμός των νευρώνων διαφέρει στις 3 στήλες, (αυχενική μοίρα- cervical, θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα- upper lumbar).

Οι Asb4+ / Pitx2+ νευρώνες που είναι ταυτόχρονα και χολινεργικοί (Pitx2+ vAChT/ChAT+ / Asb4+) και CART+ στο σύνολο των Pitx2+ / vAChT+ ChAT+ / CART+ νευρώνων απεικονίζονται στο **Γράφημα 7**. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι στην αυχενική μοίρα το 74% % των V0c (Pitx2+ / vAChT+ ChAT+ / CART+) νευρώνων συνεντοπίζονται με την Asb4. Το ποσοστό αυτό φθάνει το 62% στη θωρακική μοίρα ενώ στην άνω οσφυϊκή μοίρα παρατηρείται ότι το 77% είναι Asb4+. Συνολικά, ένα 71% των Pitx2+ /vAChT+ChAT+ CART+ εκφράζει την πρωτεΐνη Asb4.

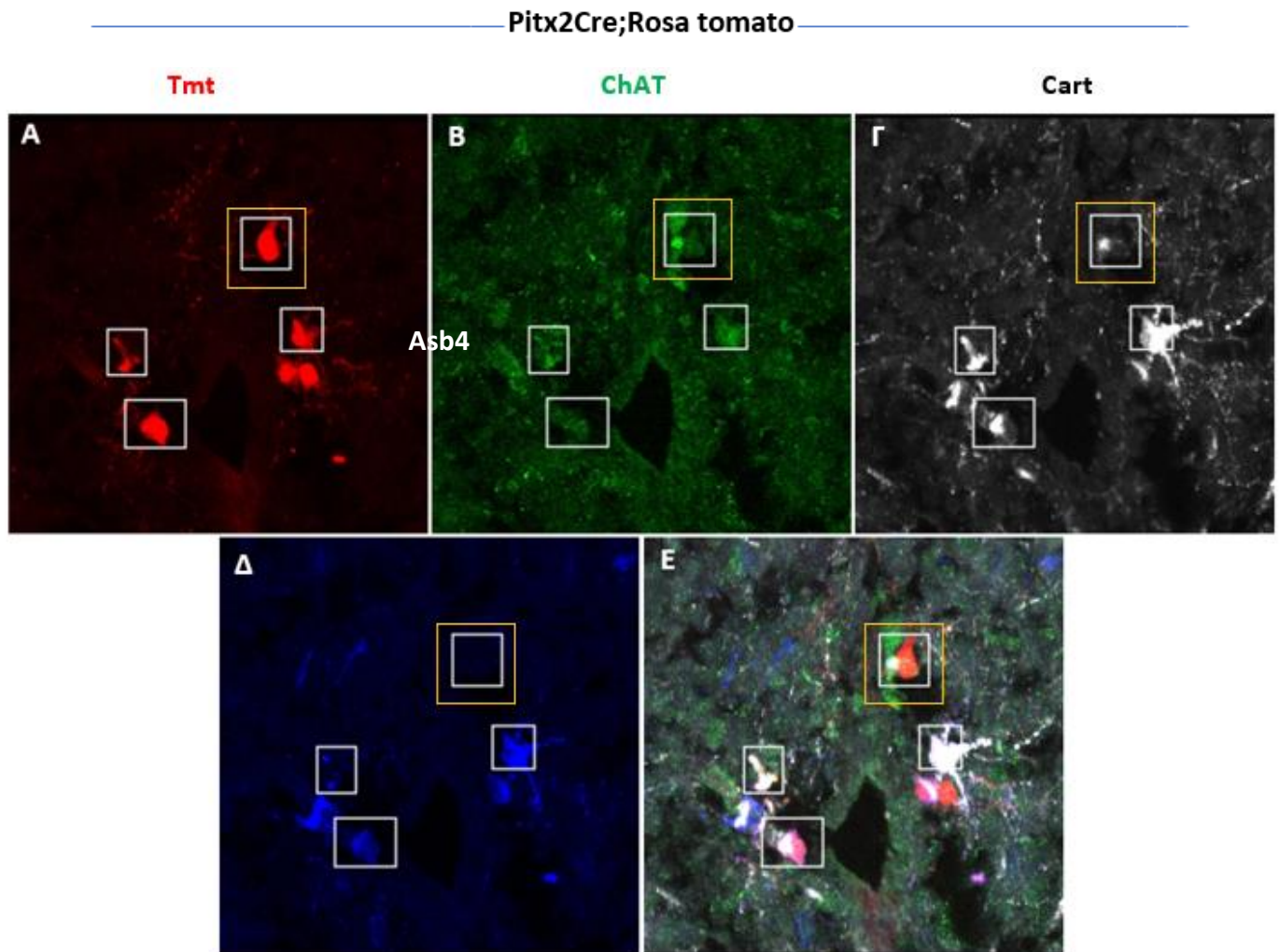
Στο **Γράφημα 8**, παρουσιάζεται ο αριθμός των νευρώνων που συνεντοπίζονται με την Asb4 στο σύνολο των Pitx2+ / vAChT-ChAT- / CART+ νευρώνων και είναι γλουταματεργικοί. Πιο αναλυτικά, το ποσοστό των Pitx2+ / vAChT-ChAT- CART+ / Asb4+ ανέρχεται στο 27% στην αυχενική μοίρα, στο 44% στη θωρακική μοίρα και σχεδόν 43% στην άνω οσφυϊκή μοίρα. Συνολικά, ένα 38% των Pitx2+ /vAChT-ChAT- CART+ εκφράζει την πρωτεΐνη Asb4. Μελετώντας τα ποσοστά της Asb4 στους Pitx2+ νευρώνες κρίνουμε αρκετά ενδιαφέρον ότι ένα μεγάλο ποσοστό των V0c και ένα μικρότερο ποσοστό των V0g νευρώνων συνεκφράζουν την ίδια πρωτεΐνη.

Διάγραμμα στο οποίο να απεικονίζονται οι Pitx2+ νευρώνες, οι οποίοι είναι V0c CART- /Asb4+/- δεν πραγματοποιήθηκε, καθώς οι νευρώνες αυτοί είναι περίπου το 1% του συνολικού V0c πληθυσμού, όπως αναφέραμε σε παραπάνω διάγραμμα, οπότε και παραλείπετε.



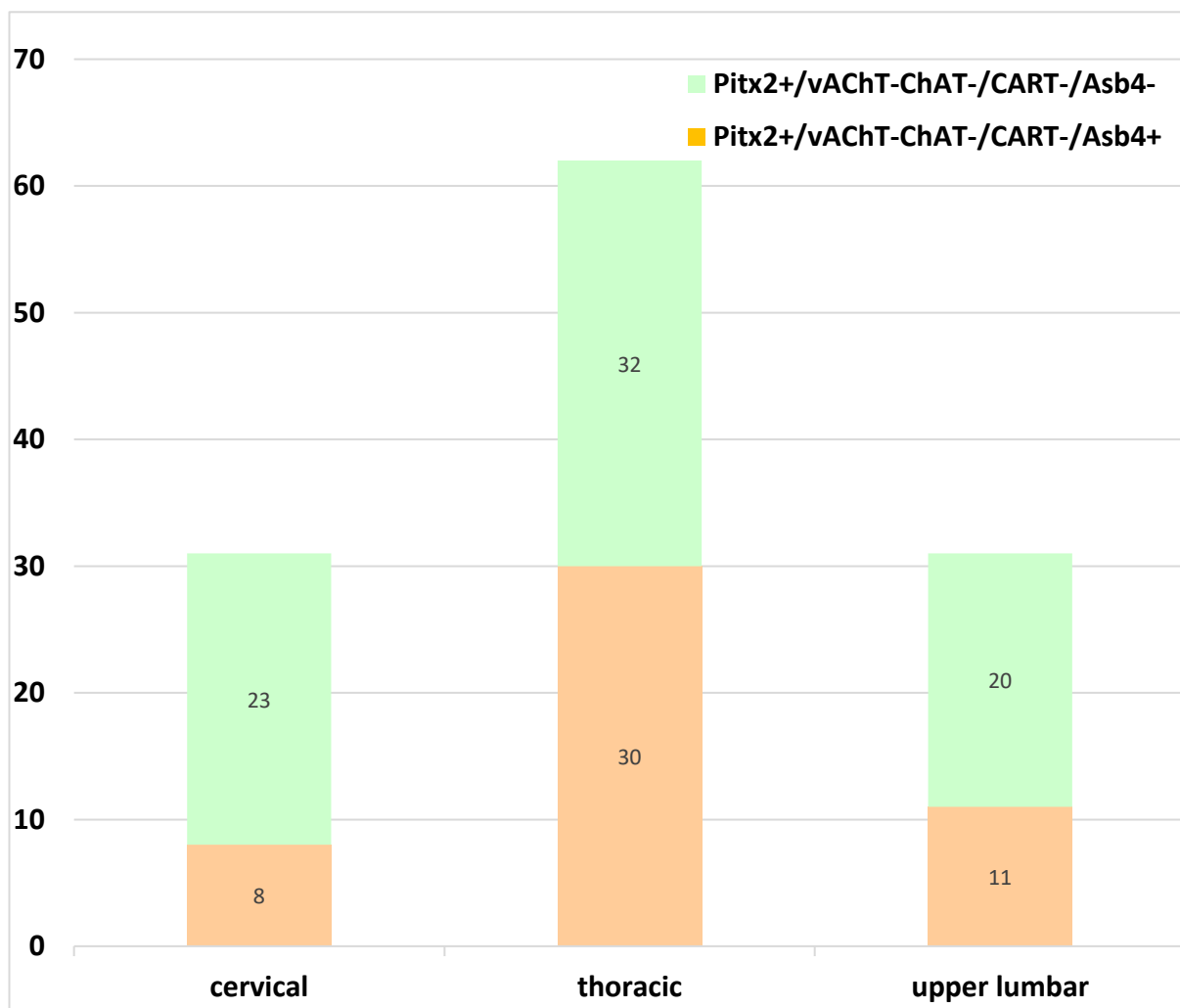
**Γράφημα 8** Οι τρεις στήλες απεικονίζουν τους **tomato+ Pitx2+ /vAChT-ChAT- /CART+** νευρώνες που είναι **Asb4+** (**Asb4+ tomato+ neurons**) και **Asb4-** (**Asb4- tomato+ neurons**), στο σύνολο των **Pitx2+ tomato+ νευρώνων**. Οι μετρήσεις στις διάφορες μοίρες έχουν γίνει σε διαφορετικό αριθμό τομών / φωτογραφιών, οπότε ο αριθμός των νευρώνων διαφέρει στις 3 στήλες, (αυχενική μοίρα- cervical, θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα- upper lumbar).

Στην **Εικόνα 23**, παρατηρούμε το αποτέλεσμα του τετραπλού ανοσοφθορισμού, όπου βλέπουμε νευρώνες να είναι V0c και CART+ και να έχουν και την Asb4+ πρωτεΐνη. Παρατηρείται ωστόσο, και ένας νευρώνας ο οποίος είναι Asb4-.



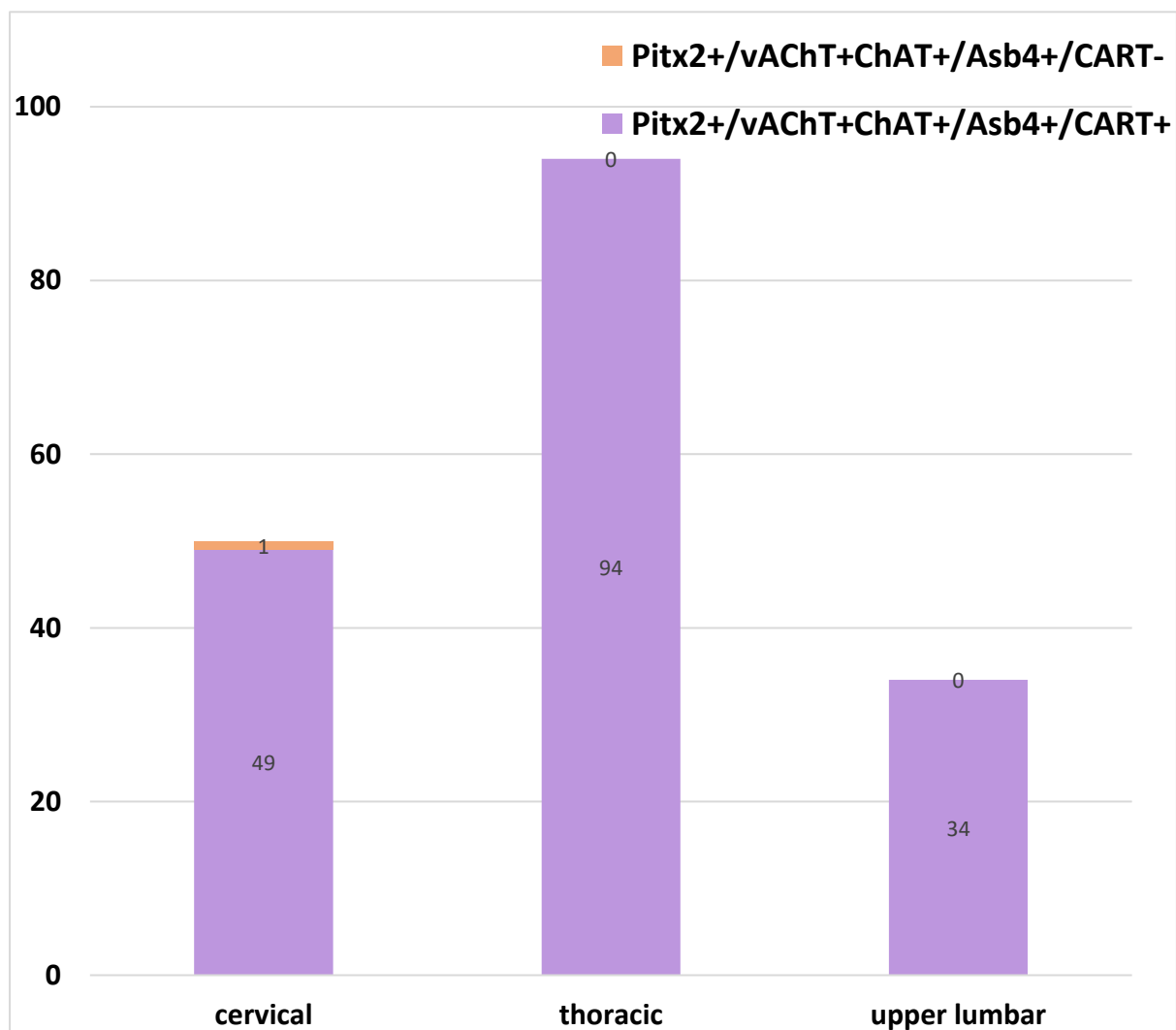
**Εικόνα 23 Συνεντοπισμός Pitx2+ / vAChT+ChAT+ / CART+ / Asb4+ σε αυχενική τομή.** Αυχενική τομή ποντικών *Pitx2Cre+/-;Rosa-td-tomato+/-* ηλικίας P0. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για ChAT, CART και Asb4. Οι Pitx2+ νευρώνες που εκφράζουν την φθορίζουσα πρωτεΐνη Rosa-td-tomato. Παρατηρείται ποσοστό συνεντοπισμού των Pitx2+ νευρώνων με την Asb4 πρωτεΐνη. Όπως επισημαίνεται από τα λευκά πλαίσια, ένα μέρος των χολινεργικών Pitx2+ νευρώνων (vAChT+ChAT+) συνεντοπίζονται με την Asb4 πρωτεΐνη, ενώ το νευροπεπτίδιο CART έχει 100% συνεντοπισμό. Απεικονίζονται Pitx2+ νευρώνες που είναι vAChT+ChAT+ /CART+ / Asb4+ καθώς και Pitx2+ νευρώνες που είναι vAChT+ChAT+ / Asb4-. (αυχενική μοίρα-C cervical). (Collapsed z stack- 14 μm)

Πραγματοποιήθηκε, επιπλέον, η μελέτη για να βρεθεί το ποσοστό των Pitx2+ V0g νευρώνων που εκφράζουν την Asb4 πρωτεΐνη και είναι είτε CART+/- . Από το **Γράφημα 9** αντλήθηκαν τα ποσοστά των νευρώνων που συνεντοπίζονται με το CART στο σύνολο των Pitx2+ / vAChT-ChAT- / Asb4+ νευρώνων και είναι γλουταματεργικοί, δηλαδή V0g. Πιο αναλυτικά, το ποσοστό των Pitx2+ / vAChT-ChAT- / CART - / Asb4+ ανέρχεται στο 26% στην αυχενική μοίρα, στο 48% στη θωρακική μοίρα και σχεδόν 35% στην άνω οσφυϊκή μοίρα. Συνολικά, ένα 37% των Pitx2+ /vAChT-ChAT- CART- εκφράζει την Asb4.



**Γράφημα 9** Οι τρεις στήλες απεικονίζουν τους tomato+ Pitx2+ /vAChT-ChAT- /CART- νευρώνες που είναι Asb4+ (Asb4+ tomato+ neurons) και Asb4-(Asb4- tomato+ neurons), στο σύνολο των Pitx2+ tomato+ νευρώνων. Οι μετρήσεις στις διάφορες μοίρες έχουν γίνει σε διαφορετικό αριθμό τομών / φωτογραφιών, οπότε ο αριθμός των νευρώνων διαφέρει στις 3 στήλες, (αυχενική μοίρα- cervical, θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα- upper lumbar).

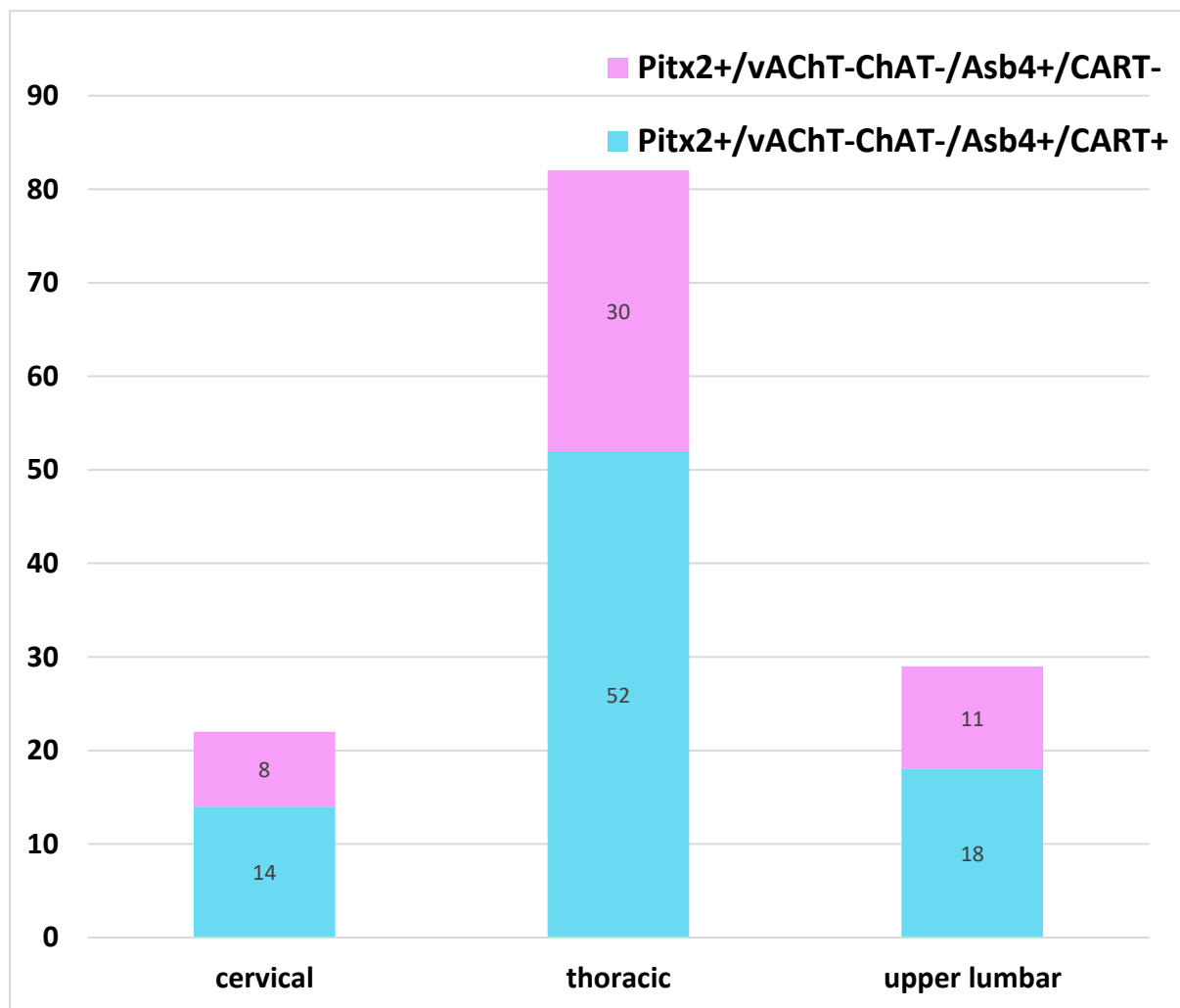
Πραγματοποιήθηκε, ακόμα, μελέτη για να βρεθεί το ποσοστό των Pitx2+ V0c νευρώνων που εκφράζουν την Asb4 πρωτεΐνη και είναι είτε CART+/- . Από το **Γράφημα 10** αντλήθηκαν τα ποσοστά των νευρώνων που συνεντοπίζονται με το CART στο σύνολο των Pitx2+ / vAChT+ ChAT+ / Asb4+ νευρώνων και είναι V0c. Πιο αναλυτικά, το ποσοστό των Pitx2+ / vAChT+ ChAT+ / Asb4+ / CART+ ανέρχεται στο 98% στην αυχενική μοίρα, στο 99% στη θωρακική μοίρα και 100% στην άνω οσφυϊκή μοίρα. Συνολικά, ένα 99% των νευρώνων εκφράζουν την CART.



**Γράφημα 10** Οι τρεις στήλες απεικονίζουν τους tomato+ Pitx2+ /vAChT+ChAT+ /Asb4+ νευρώνες που είναι CART+ (CART+ tomato+ neurons) και CART-(CART- tomato+ neurons), στο σύνολο των Pitx2+ tomato+ νευρώνων. Οι μετρήσεις στις διάφορες μοίρες έχουν γίνει σε διαφορετικό αριθμό τομών / φωτογραφιών, οπότε ο αριθμός των νευρώνων διαφέρει στις 3 στήλες, (αυχενική μοίρα- cervical, θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα- upper lumbar).

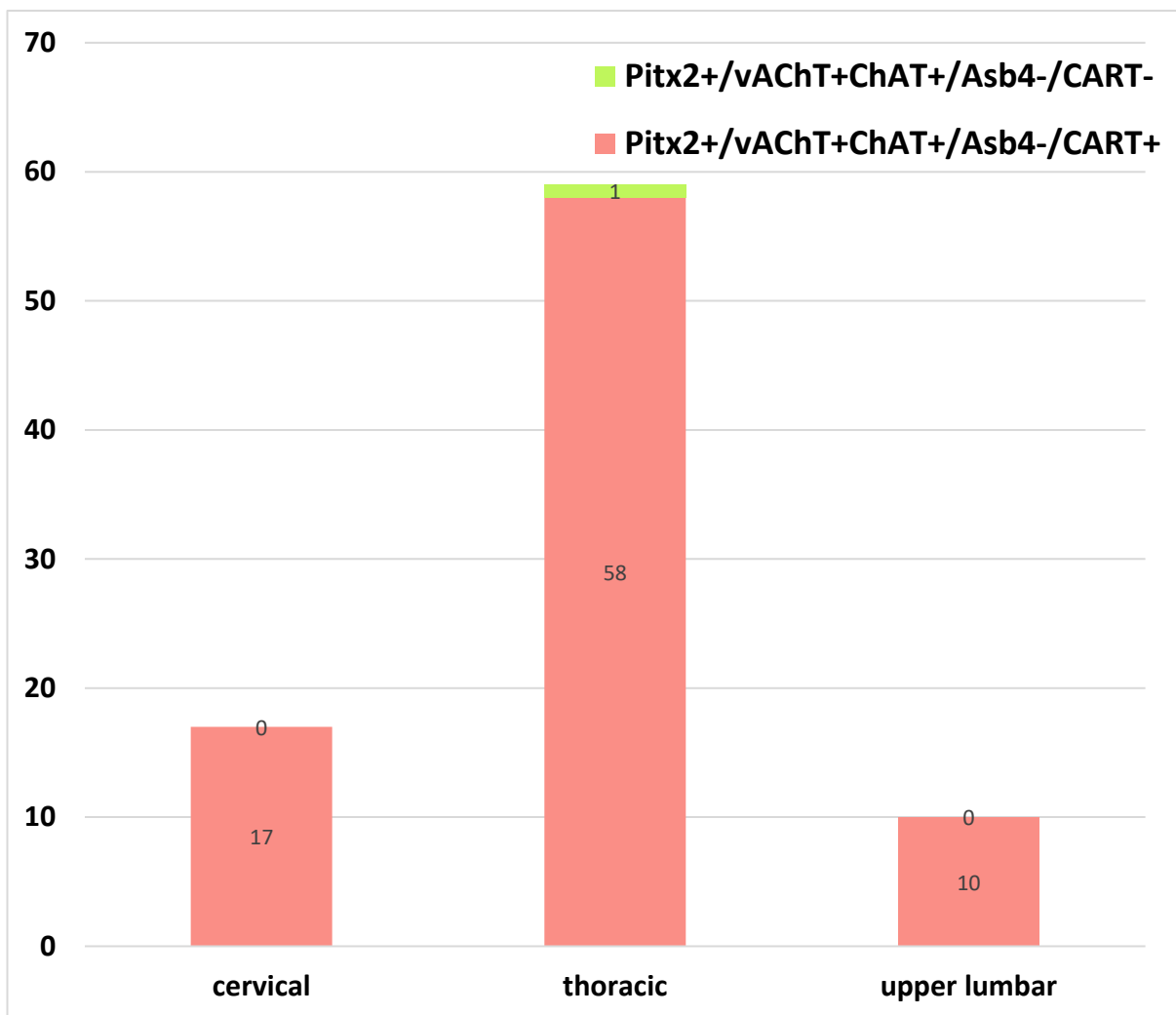


Αναλύθηκε στη συνέχεια, το ποσοστό των Pitx2+ V0g νευρώνων που εκφράζουν την Asb4 πρωτεΐνη και είναι είτε CART+/- . Από το **Γράφημα 11** αντλήθηκαν τα ποσοστά των νευρώνων που συνεντοπίζονται με το CART στο σύνολο των Pitx2+ / vAChT- ChAT- / Asb4+ νευρώνων και είναι V0g. Πιο αναλυτικά, το ποσοστό των Pitx2+ / vAChT- ChAT- / Asb4+ / CART+ ανέρχεται στο 64% στην αυχενική μοίρα, στο 63% στη θωρακική μοίρα και 62% στην άνω οσφυϊκή μοίρα. Συνολικά, ένα 63% των νευρώνων εκφράζουν την CART.



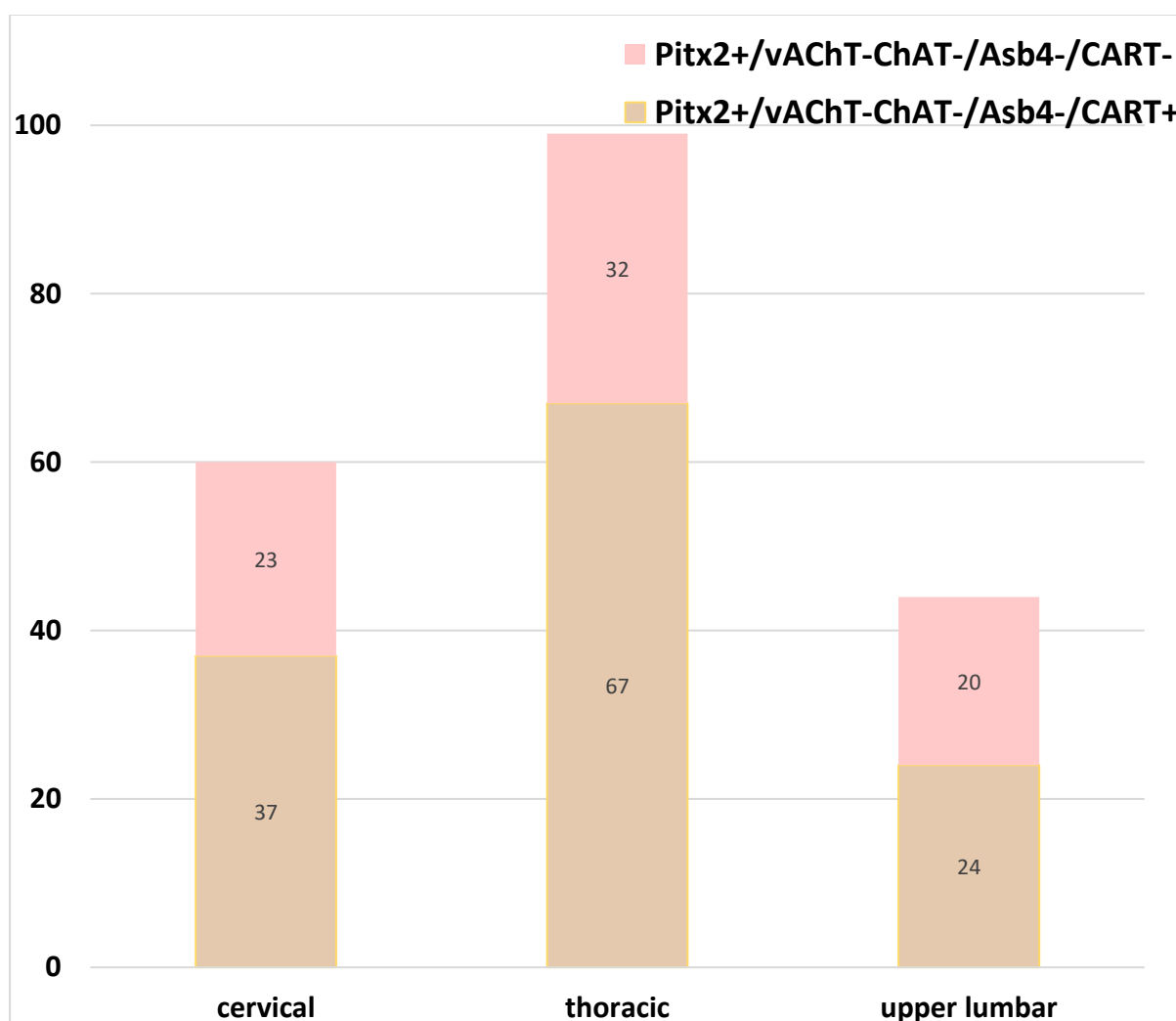
**Γράφημα 11** Οι τρεις στήλες απεικονίζουν τους tomato+ Pitx2+ /vAChT-ChAT- /Asb4+ νευρώνες που είναι CART+ (CART+ tomato+ neurons) και CART-(CART- tomato+ neurons), στο σύνολο των Pitx2+ tomato+ νευρώνων. Οι μετρήσεις στις διάφορες μοίρες έχουν γίνει σε διαφορετικό αριθμό τομών / φωτογραφιών, οπότε ο αριθμός των νευρώνων διαφέρει στις 3 στήλες, (αυχενική μοίρα-cervical, θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα- upper lumbar).

Έπειτα, αναλύθηκε το ποσοστό των Pitx2+ V0c νευρώνων που δεν εκφράζουν την Asb4 πρωτεΐνη και είναι είτε CART+/- . Από το **Γράφημα 12** αντλήθηκαν τα ποσοστά των νευρώνων που συνεντοπίζονται με το CART στο σύνολο των Pitx2+ / vAChT+ ChAT+ / Asb4- νευρώνων και είναι V0c. Πιο αναλυτικά, το ποσοστό των Pitx2+ / vAChT+ ChAT+ / Asb4- / CART+ ανέρχεται στο 100% στην αυχενική μοίρα, στο 98% στη θωρακική μοίρα και 100% στην άνω οσφυϊκή μοίρα. Συνολικά, ένα 99% των V0c/Asb4- νευρώνων εκφράζουν την CART.



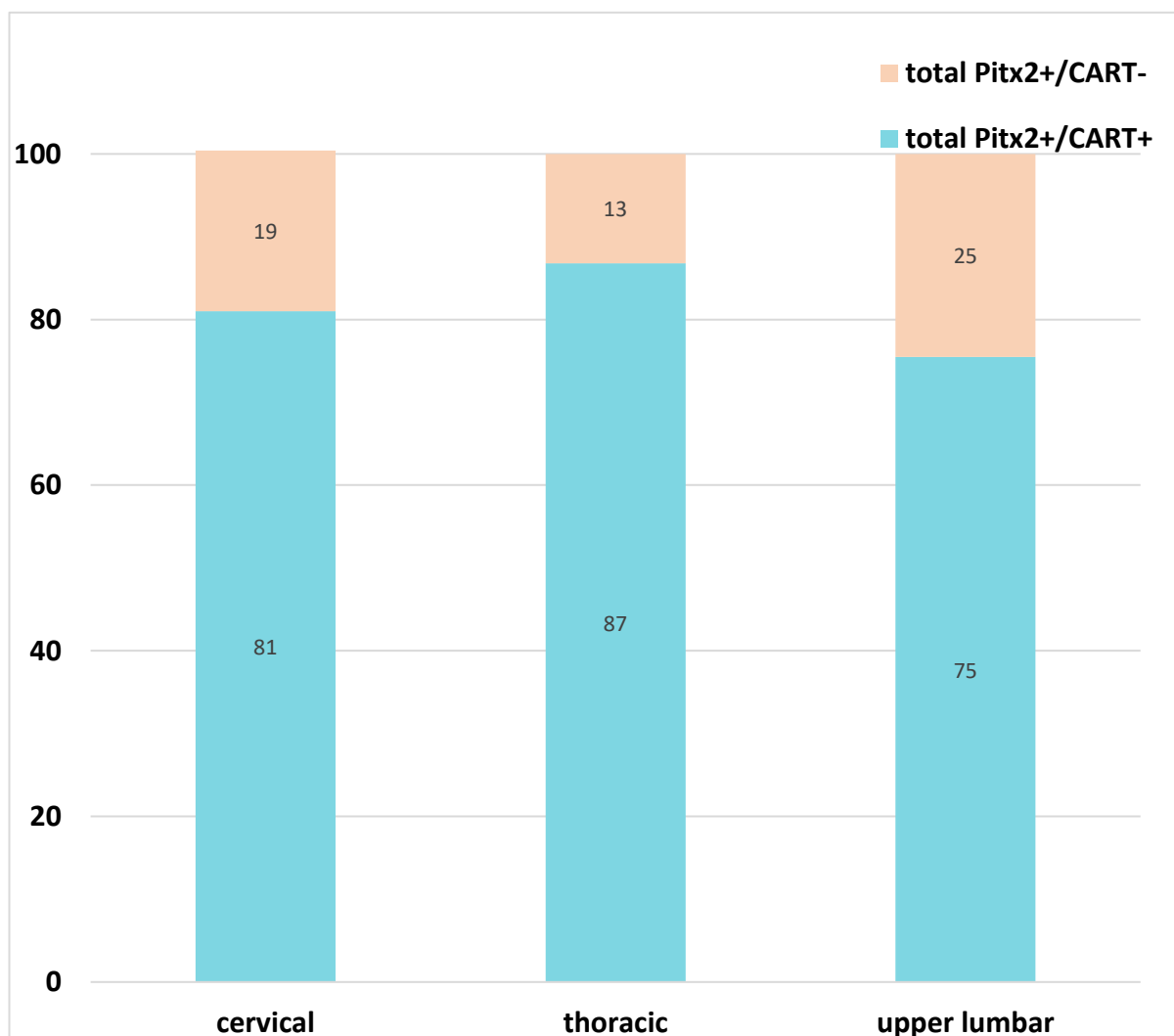
**Γράφημα 12** Οι τρεις στήλες απεικονίζουν τους tomato+ Pitx2+ /vAChT+ChAT+ /Asb4- νευρώνες που είναι CART+ (CART+ tomato+ neurons) και CART-(CART- tomato+ neurons), στο σύνολο των Pitx2+ tomato+ νευρώνων. Οι μετρήσεις στις διάφορες μοίρες έχουν γίνει σε διαφορετικό αριθμό τομών / φωτογραφιών, οπότε ο αριθμός των νευρώνων διαφέρει στις 3 στήλες, (αυχενική μοίρα-cervical, θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα- upper lumbar).

Τέλος, συγκρίναμε το ποσοστό των νευρώνων που είναι Pitx2+ γλουταματεργικοί και ταυτόχρονα Asb4- CART+ με αυτούς που είναι Asb4- CART-. Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται και στο **Γράφημα 13**, συγκρίθηκαν οι Pitx2+ /vAChT-ChAT- /Asb4-/ CART+ με τους Pitx2+ /vAChT-ChAT- / Asb4- /CART-. Βρέθηκε ότι περίπου ένα 61% των νευρώνων είναι CART+, ενώ περίπου ένα 39% είναι CART-. Πιο αναλυτικά, το ποσοστό των Pitx2+ / vAChT- ChAT- / Asb4- / CART+ ανέρχεται στο 62% στην αυχενική μοίρα, στο 68% στη θωρακική μοίρα και 55% στην άνω οσφυϊκή μοίρα.

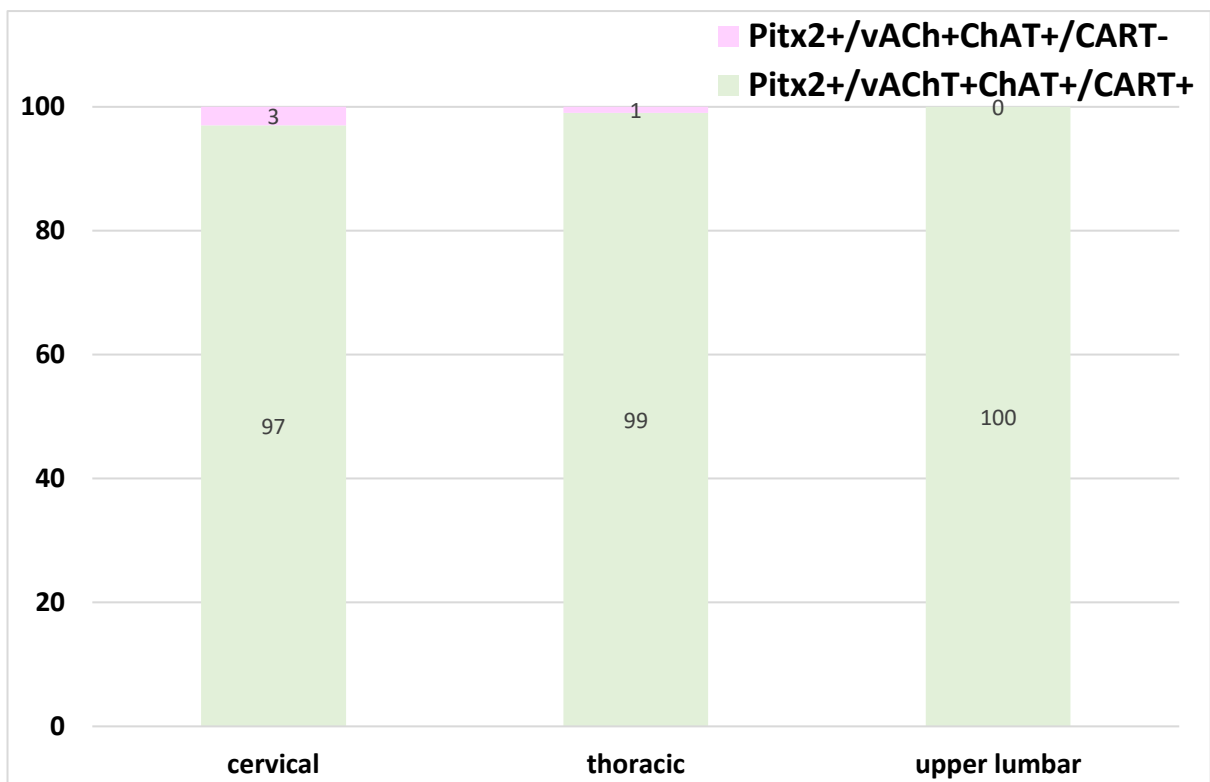


**Γράφημα 13** Οι τρεις στήλες απεικονίζουν τους tomato+ Pitx2+ /vAChT-ChAT- /Asb4- νευρώνες που είναι CART+ (CART+ tomato+ neurons) και CART-(CART- tomato+ neurons), στο σύνολο των Pitx2+ tomato+ νευρώνων (Pitx2+ total neurons). Οι μετρήσεις στις διάφορες μοίρες έχουν γίνει σε διαφορετικό αριθμό τομών / φωτογραφιών, οπότε ο αριθμός των νευρώνων διαφέρει στις 3 στήλες, (αυχενική μοίρα-cervical, θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα- upper lumbar).

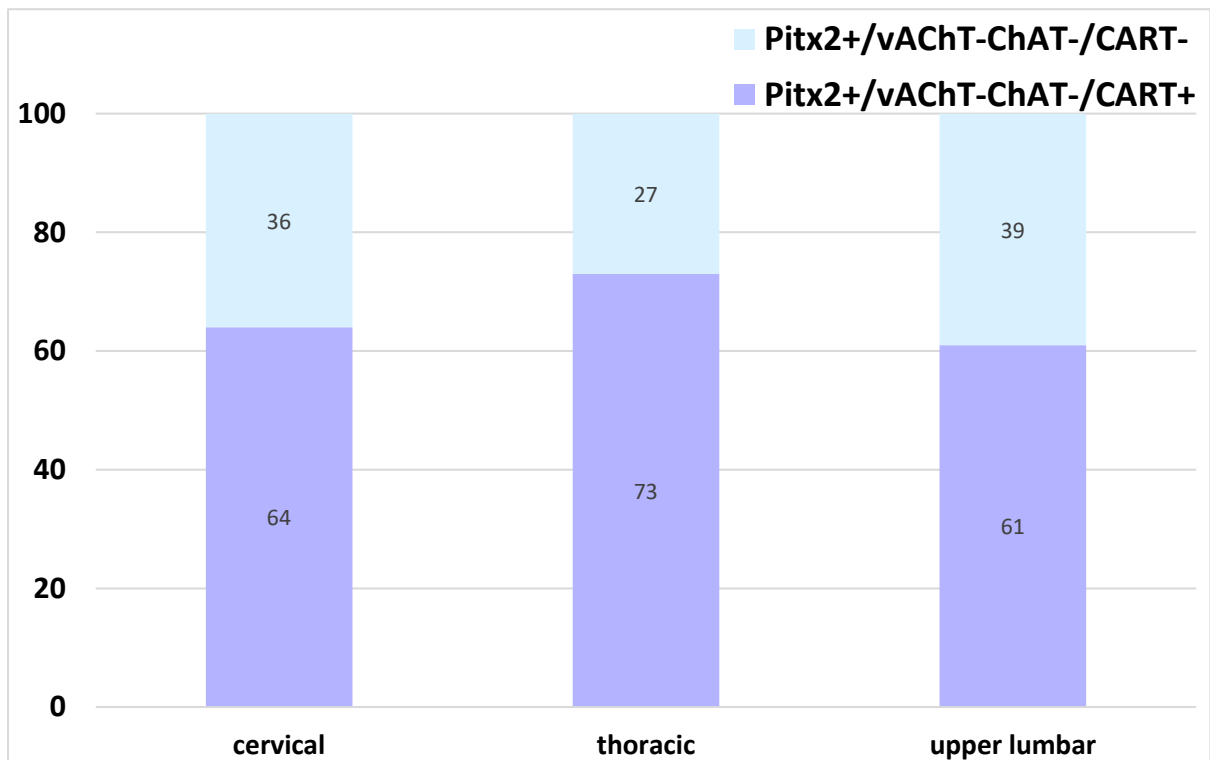
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση (normalization) των αποτελεσμάτων, καθώς οι μετρήσεις του αριθμού των τομών της αυχενικής, θωρακικής και άνω οσφυϊκής μοίρας όπως και ο αριθμός των κυττάρων είναι διαφορετικός. Τα κανονικοποιημένα διαγράμματα, παρατίθενται ακριβώς με την ίδια σειρά που βρίσκονται και παραπάνω.



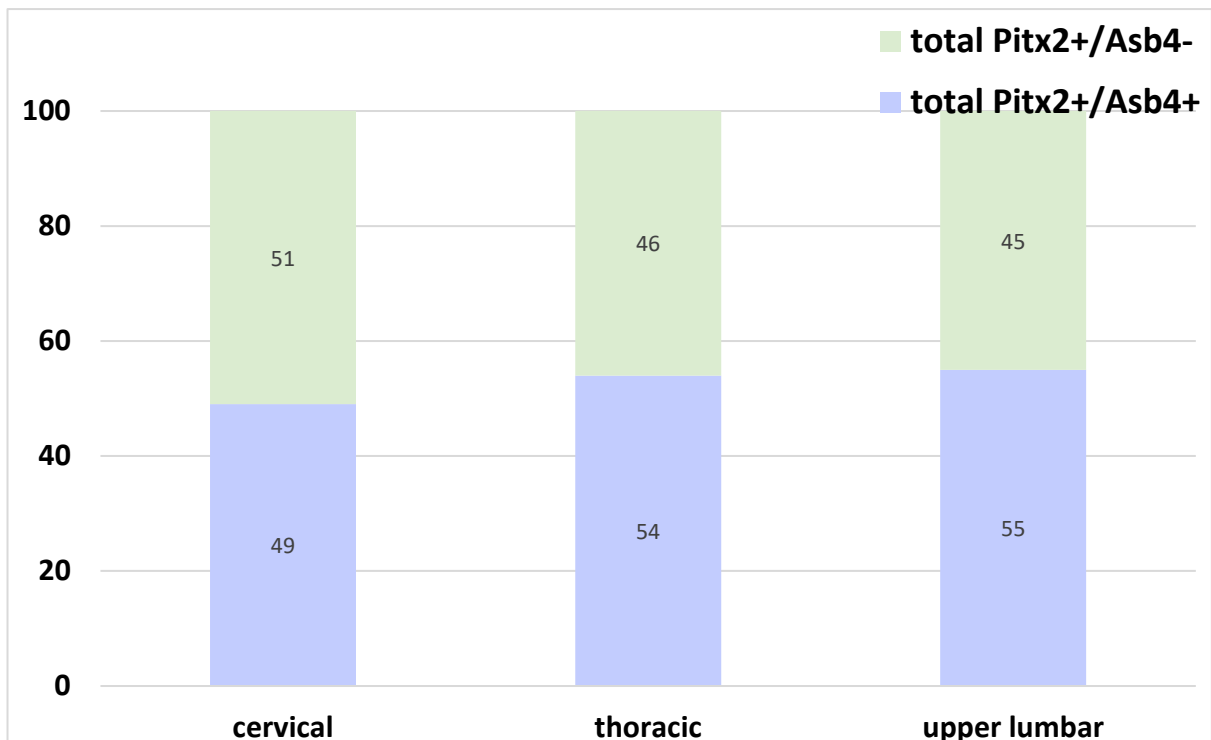
**Γράφημα 14** Κανονικοποιημένο γράφημα, όπου οι τρεις στήλες απεικονίζουν τους total (V0c + V0g) Pitx2+ νευρώνες που είναι CART+ και CART-. Οι μετρήσεις αφορούν τρεις μοίρες του νωτιαίου μυελού (αυχενική μοίρα-cervical, θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα-upper lumbar).



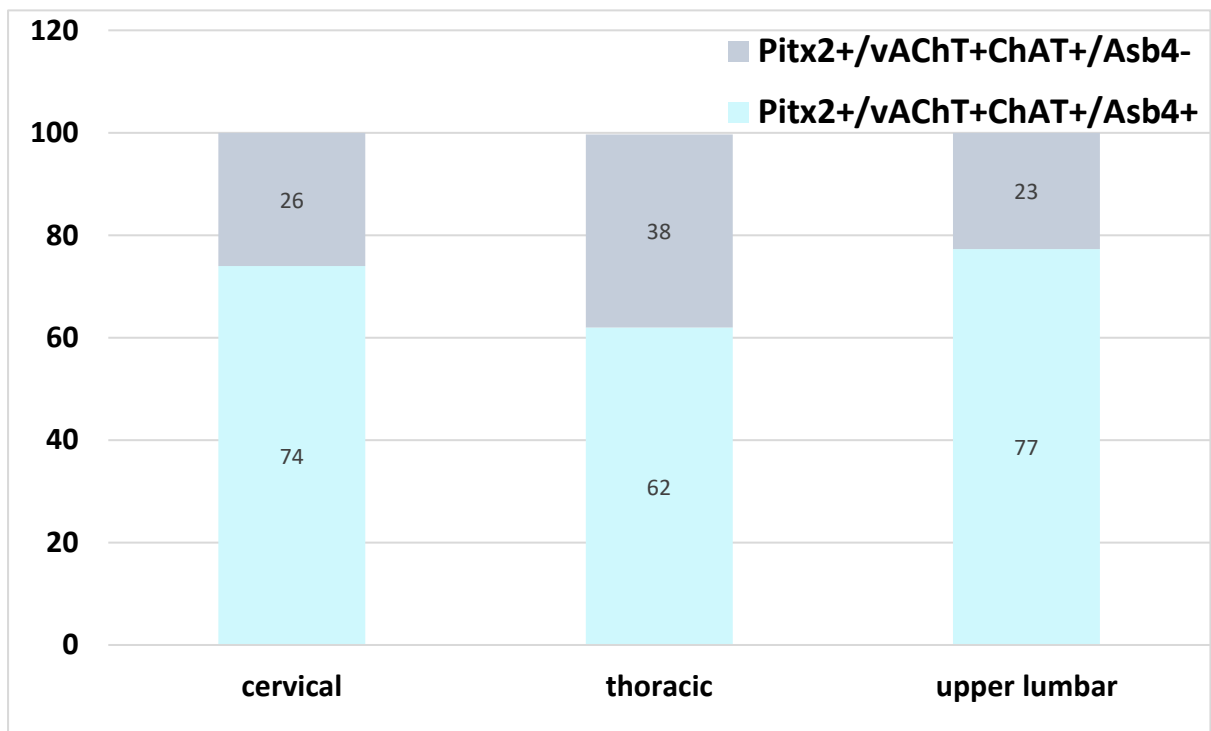
**Γράφημα 15** Κανονικοποιημένο γράφημα, όπου οι τρεις στήλες απεικονίζουν τους **tomato+** νευρώνες που είναι **CART+** (**CART+ /tomato+ neurons**) και **CART-**. Οι μετρήσεις αφορούν τρεις μοίρες του νωτιαίου μυελού (αυχενική μοίρα-cervical, θωρακική μοίρα-thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα-upper lumbar).



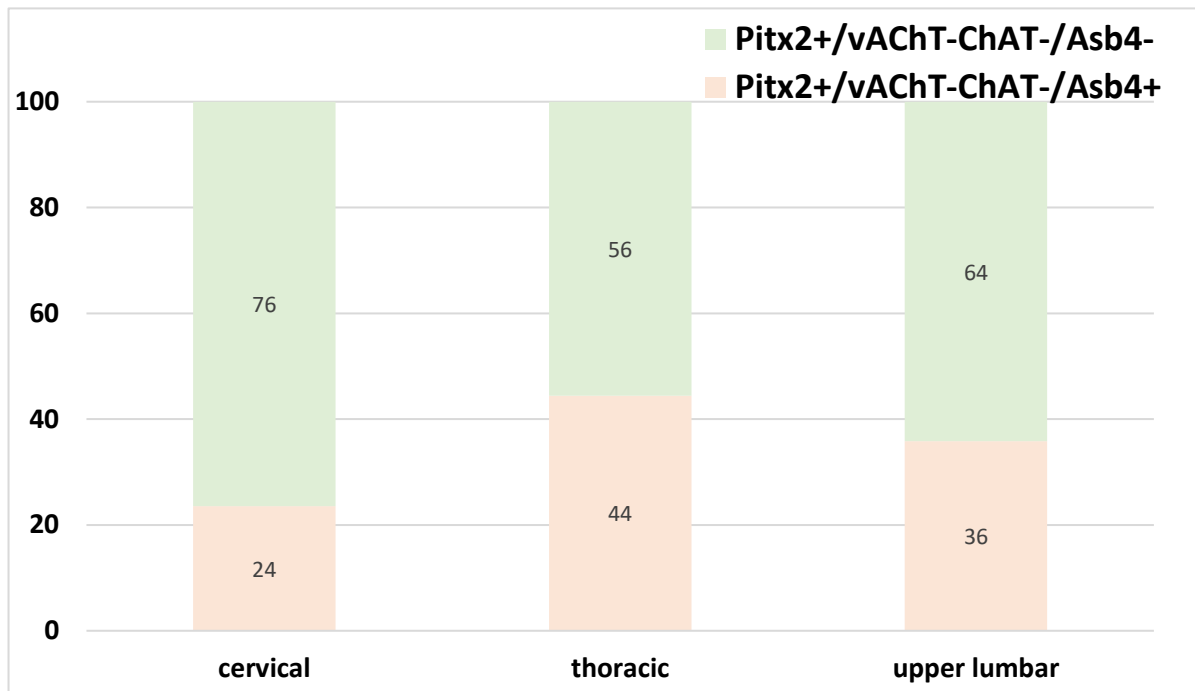
**Γράφημα 16** Κανονικοποιημένο γράφημα, όπου οι τρεις στήλες απεικονίζουν τους **tomato+** νευρώνες που είναι **CART+ / vAChT-ChAT-** (**tomato+ / vAChT-ChAT- /CART+ neurons**) και **CART-**. Οι μετρήσεις αφορούν τρεις μοίρες του νωτιαίου μυελού (αυχενική-cervical, θωρακική μοίρα-thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα-upper lumbar).



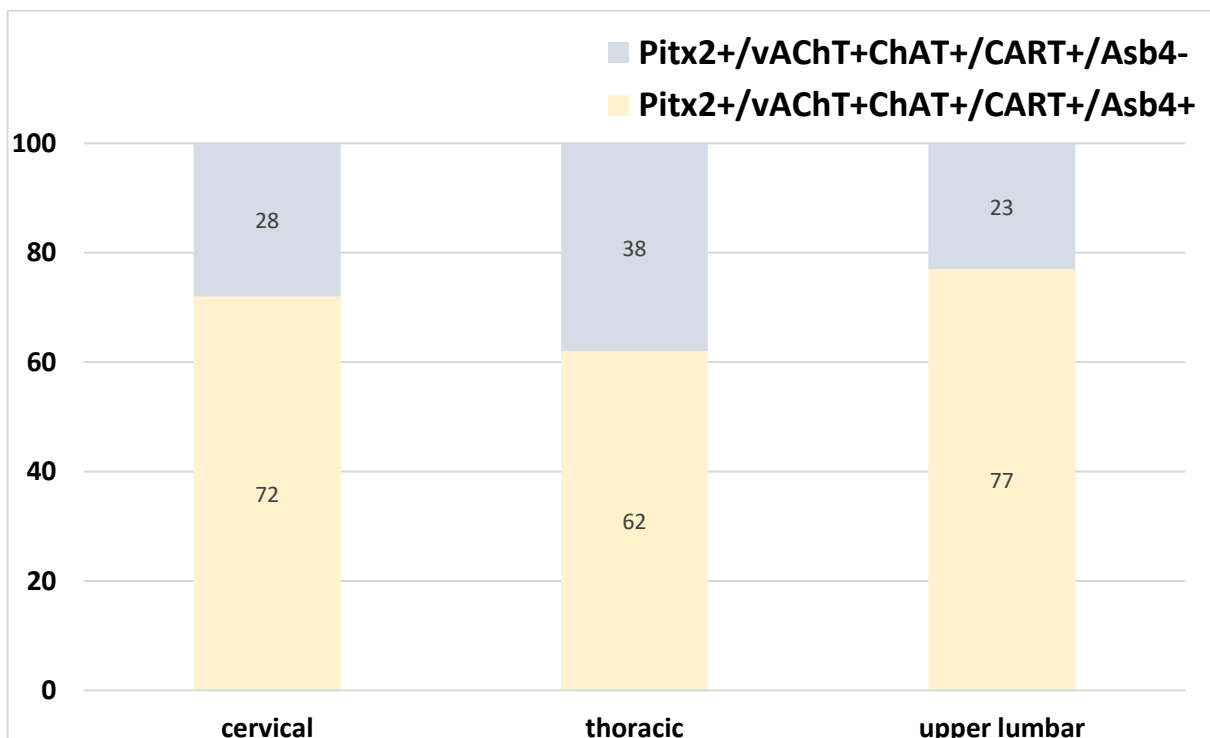
**Γράφημα 17** Κανονικοποιημένο γράφημα, όπου οι τρεις στήλες απεικονίζουν τους *tomato* (*V0c + V0g*) *Pitx2+* νευρώνες που είναι *Asb4+* και *Asb4-*, στο σύνολο των *Pitx2+ / tomato+* νευρώνων (*Pitx2+ total neurons*). Οι μετρήσεις αφορούν τρεις μοίρες του νωτιαίου μυελού (αυχενική μοίρα-*cervical*, θωρακική μοίρα- *thoracic*, άνω οσφυϊκή μοίρα- *upper lumbar*).



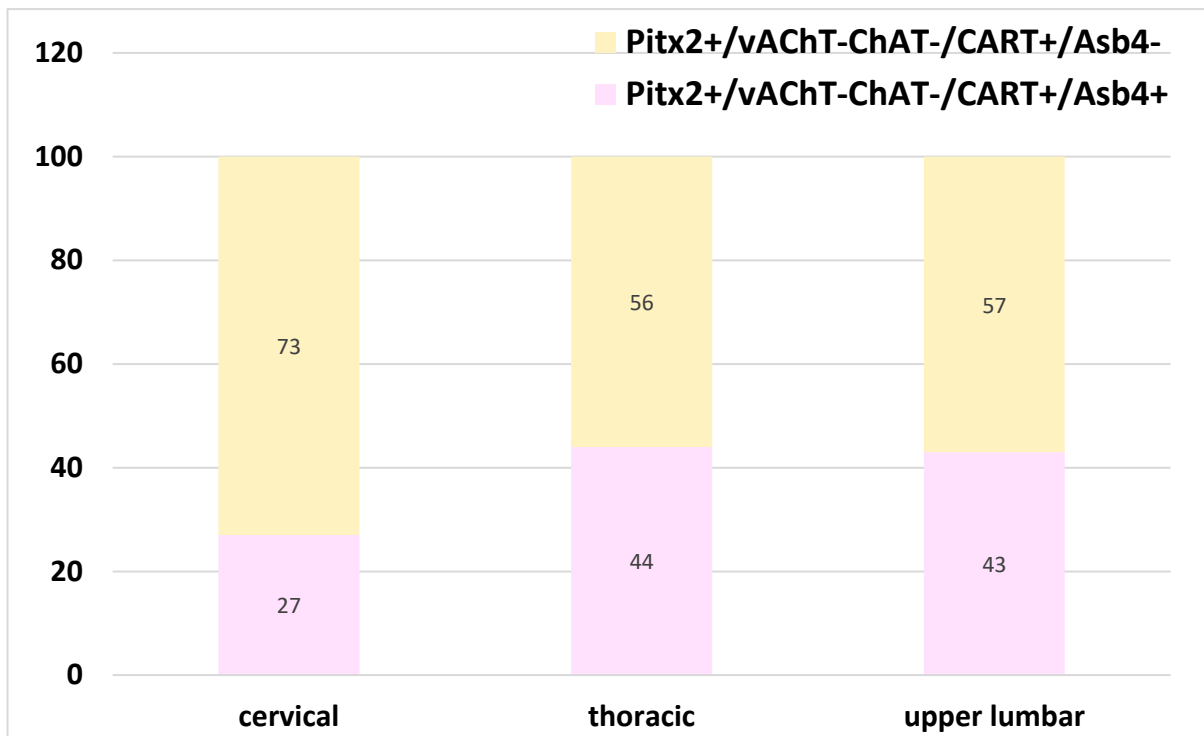
**Γράφημα 18** Κανονικοποιημένο γράφημα, όπου οι τρεις στήλες απεικονίζουν τους *Pitx2+* νευρώνες που είναι *Pitx2+/vAChT+ChAT+ / Asb4+* neurons και *Asb4-* (*Asb4-/ Pitx2+ /vAChT+ChAT+ neurons*). Οι μετρήσεις αφορούν τρεις μοίρες του νωτιαίου μυελού (αυχενική μοίρα-*cervical*, θωρακική μοίρα- *thoracic*, άνω οσφυϊκή μοίρα- *upper lumbar*).



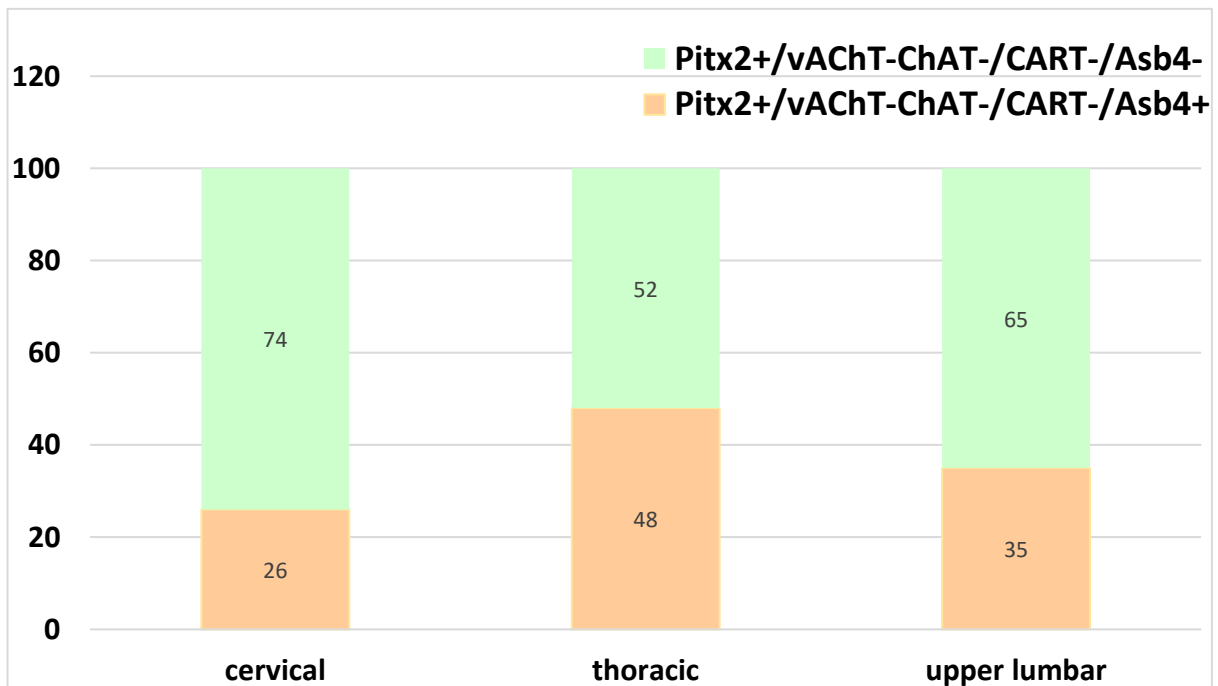
**Γράφημα 19** Κανονικοποιημένο γράφημα, όπου οι τρεις στήλες απεικονίζουν τους Pitx2+ νευρώνες που είναι vAChT-ChAT- Asb4+ και Asb4-. Οι μετρήσεις αφορούν τρεις μοίρες του νωτιαίου μυελού (αυχενική-cervical, θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα-upper lumbar).



**Γράφημα 20** Κανονικοποιημένο γράφημα, όπου οι τρεις στήλες απεικονίζουν τους tomato+ Pitx2+ /vAChT+ChAT+ /CART+ νευρώνες που είναι Asb4+ (Asb4+ tomato+ neurons) και Asb4-(Asb4- tomato+ neurons). Οι μετρήσεις αφορούν τρεις μοίρες του νωτιαίου μυελού (αυχενική μοίρα-cervical, θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα-upper lumbar).

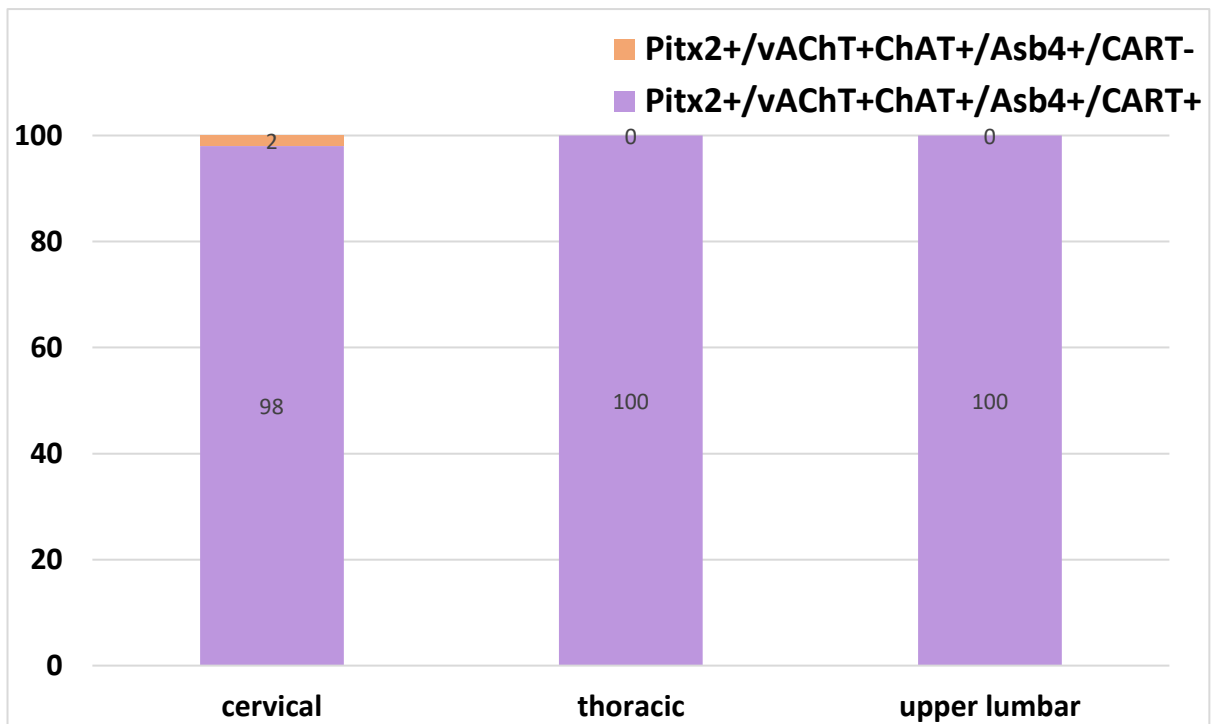


**Γράφημα 21** Κανονικοποιημένο γράφημα, όπου οι τρεις στήλες απεικονίζουν τους **tomato+ Pitx2+ /vAChT-ChAT- /CART+ νευρώνες που είναι Asb4+ (Asb4+ tomato+ neurons)** και **Asb4-(Asb4- tomato+ neurons)**. Οι μετρήσεις αφορούν τρεις μοίρες του νωτιαίου μυελού (αυχενική μοίρα-cervical, θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα-upper lumbar).

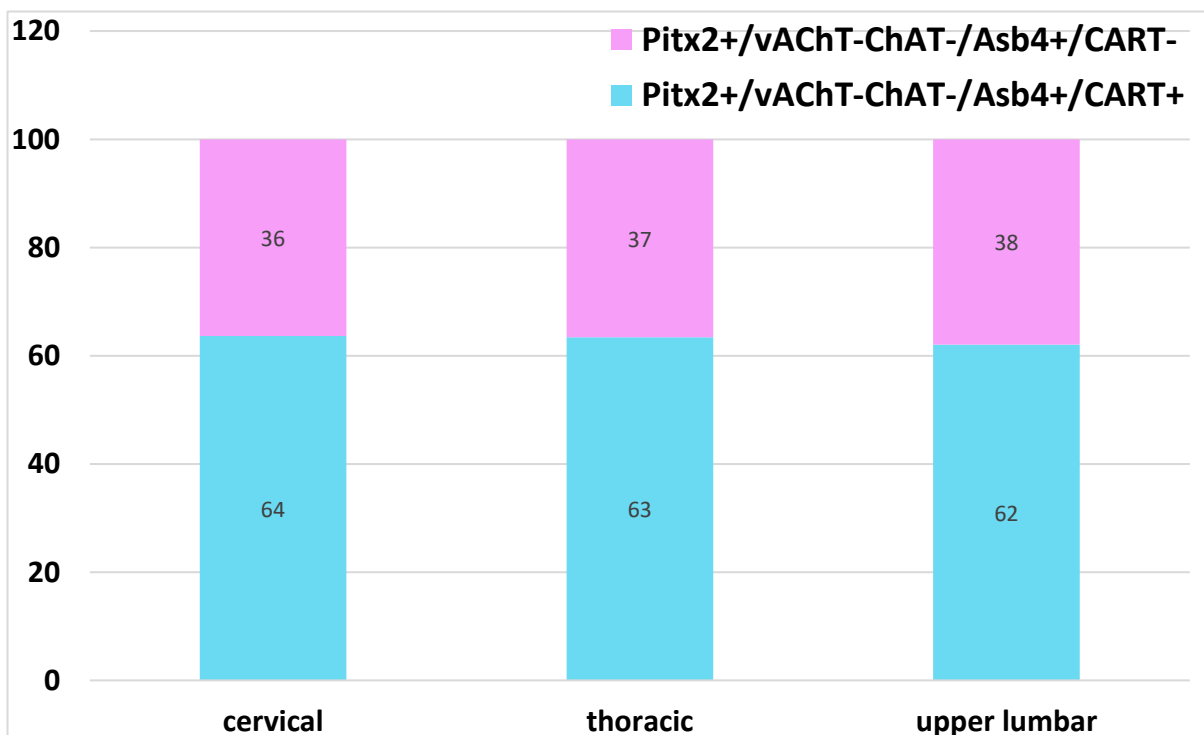


**Γράφημα 22** Κανονικοποιημένο γράφημα, όπου τρεις στήλες απεικονίζουν τους **tomato+ Pitx2+ /vAChT-ChAT- /CART- νευρώνες που είναι Asb4+ (Asb4+ tomato+ neurons)** και **Asb4-(Asb4- tomato+ neurons)**. Οι μετρήσεις αφορούν τρεις μοίρες του νωτιαίου μυελού (αυχενική μοίρα-cervical, θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα-upper lumbar).

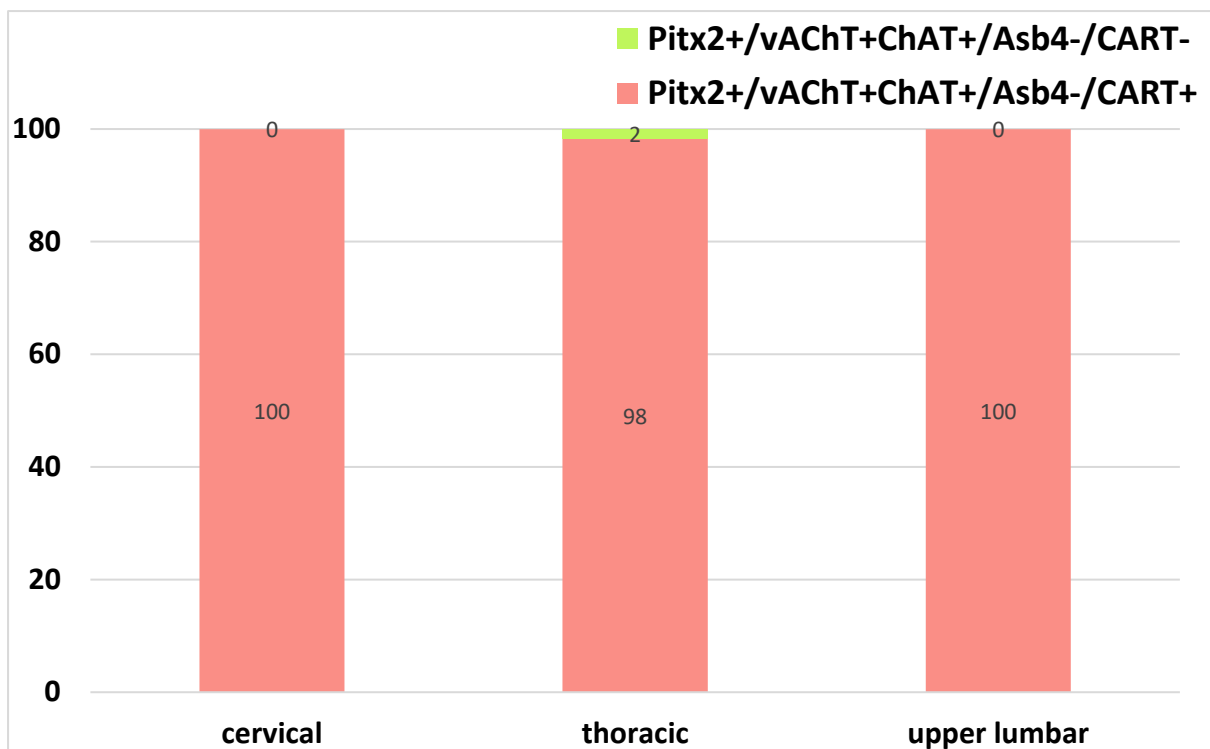




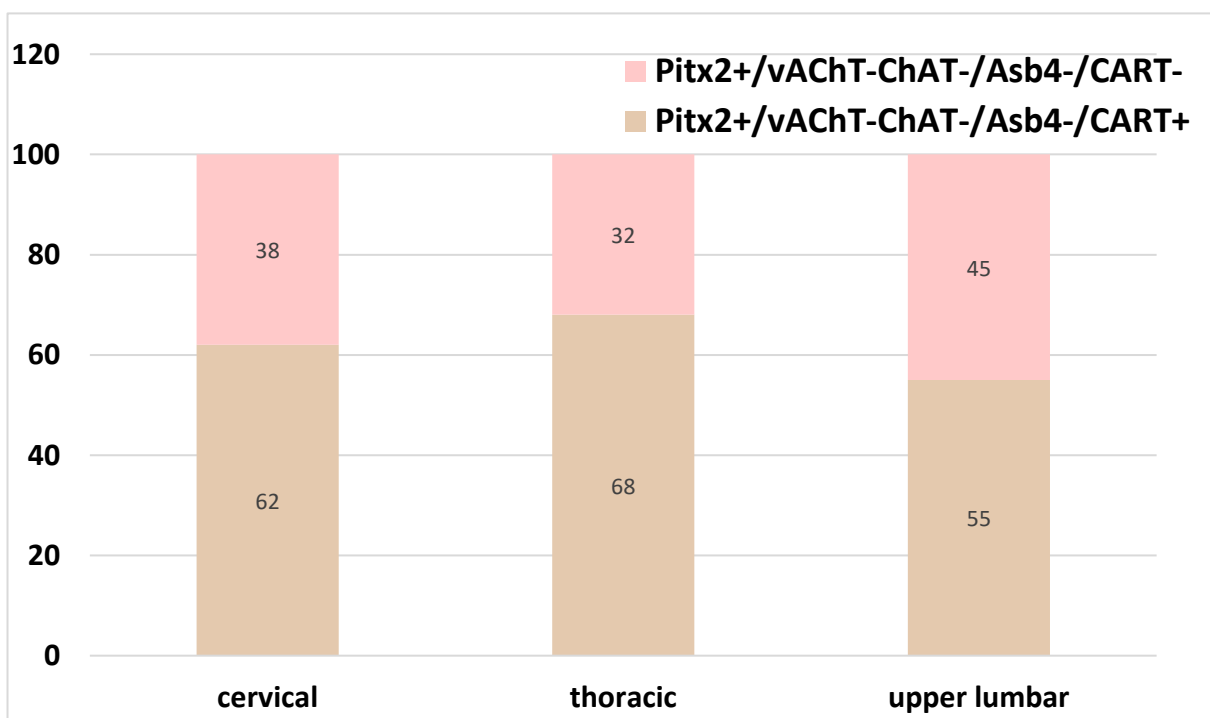
Γράφημα 23 Κανονικοποιημένο γράφημα, όπου τρεις στήλες απεικονίζουν τους **tomato+ Pitx2+ /vAChT+ChAT+ /Asb4+** νευρώνες που είναι **CART+** (**CART+ tomato+ neurons**) και **CART-** (**CART- tomato+ neurons**). Οι μετρήσεις αφορούν τρεις μοίρες του νωτιαίου μυελού (αυχενική μοίρα-cervical, θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα-upper lumbar).



Γράφημα 24 Κανονικοποιημένο γράφημα, όπου τρεις στήλες απεικονίζουν τους **tomato+ Pitx2+ /vAChT-ChAT- /Asb4+** νευρώνες που είναι **CART+** (**CART+ tomato+ neurons**) και **CART-** (**CART- tomato+ neurons**). Οι μετρήσεις αφορούν τρεις μοίρες του νωτιαίου μυελού (αυχενική μοίρα-cervical, θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα-upper lumbar).



Γράφημα 25 Κανονικοποιημένο γράφημα, όπου τρεις στήλες απεικονίζουν τους **tomato+ Pitx2+ /vAChT+ChAT+ /Asb4-** νευρώνες που είναι **CART+** (**CART + tomato+ neurons**) και **CART-** (**CART- tomato+ neurons**). Οι μετρήσεις αφορούν τρεις μοίρες του νωτιαίου μυελού (αυχενική μοίρα-cervical, θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα-upper lumbar).



Γράφημα 26 Κανονικοποιημένο γράφημα, όπου οι τρεις στήλες απεικονίζουν τους **tomato+ Pitx2+ /vAChT-ChAT- /Asb4-** νευρώνες που είναι **CART+** (**CART+ tomato+ neurons**) και **CART-** (**CART- tomato+ neurons**). Οι μετρήσεις αφορούν τρεις μοίρες του νωτιαίου μυελού (αυχενική μοίρα-cervical, θωρακική μοίρα- thoracic, άνω οσφυϊκή μοίρα-upper lumbar).

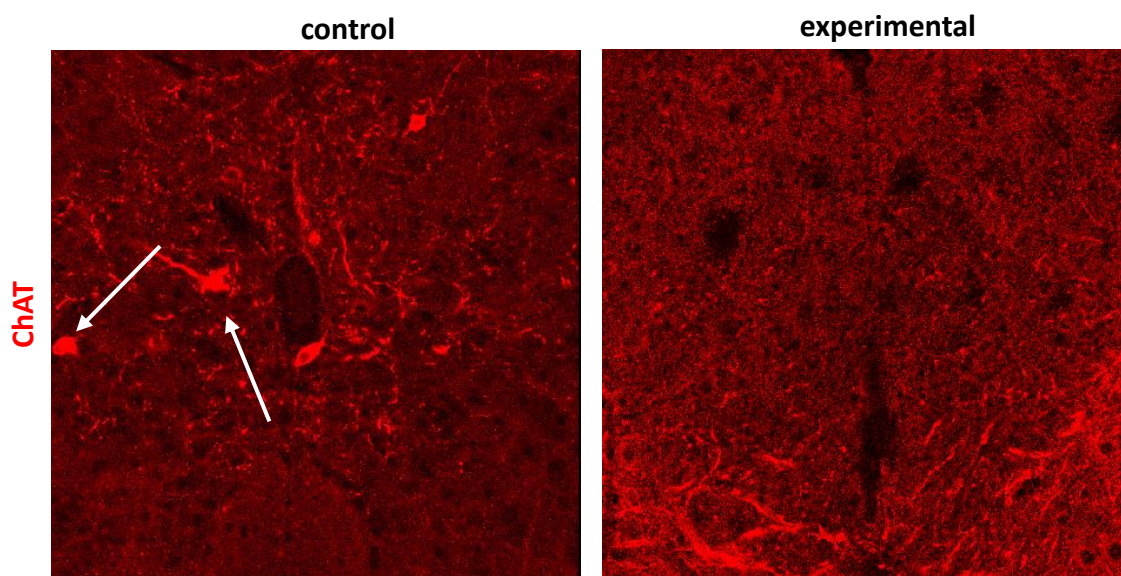
## 4.2 ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΣΧΗΜΑ ΓΙΑ ΕΞΑΛΕΙΨΗ ΤΩΝ V0c ΝΕΥΡΩΝΩΝ

Όπως ήδη αναφέραμε, είναι γνωστό, από την εργασία των Barber et al., το σύνολο των χολινεργικών πληθυσμών στον νωτιαίο μυελό ποντικού. Οι χολινεργικοί πληθυσμοί νευρώνων, αποτελούνται από τους κινητικούς νευρώνες, τους προγαγγλιακούς νευρώνες του συμπαθητικού, τους ραχιαίους χολινεργικούς νευρώνες, τα partition neurons (medial V0c και lateral partition neurons) και τα κύτταρα του κεντρικού καναλιού. Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής υπήρξε, η διερεύνηση της προέλευσης των χολινεργικών αξόνων και των νευρικών απολήξεων στο ραχιαίο κέρασ του νωτιαίου μυελού -μελετώντας τομές από όλο το μήκος του- ενώ, συγκεκριμένα αναρωτηθήκαμε αν προέρχονται από Pitx2+ νευρώνες. Για να απαντηθεί το παραπάνω ερώτημα, πραγματοποιήσαμε κατάλληλο σχήμα διασταυρώσεων, με σκοπό την εξάλειψη όλων των Pitx2+ νευρώνων. Συγκεκριμένα, διασταυρώθηκαν αρσενικά άτομα της σειράς Pitx2+Cre+, με θηλυκά άτομα *vAChT-stop-DTA*. Από τους απογόνους που προέκυψαν, όλοι όσοι είχαν τον επιθυμητό γονότυπο *Pitx2::Cre;vAChT-stop-DTA* αποτελούσαν πειραματικά ζώα. Στα ποντίκια αυτού του γονοτύπου, η Cre ρεκομπινάση, βρίσκεται υπό τον υποκινητή του Pitx2+ μεταγραφικού παράγοντα και παράγεται, μόνο στους Pitx2+ νευρώνες. Υπό τον υποκινητή του vAChT βρίσκεται μια κασέτα, η οποία περιέχει μια LoxP περιοχή, μια stop αλληλουχία, μια δεύτερη LoxP περιοχή και το γονίδιο DTA που παράγει την τοξίνη της διφθερίτιδας A. Στα ζώα που είχαν και τα δύο γονίδια, η Cre θα απομακρύνει το κομμάτι μεταξύ των LoxP περιοχών που υπάρχουν εκατέρωθεν του μεταγραφικού stop επιτρέποντας την έκφραση της DTA. Ως ζώα ελέγχου για τα πειράματα ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν είτε ζώα της ίδιας τοκετομάδας (littermates) με τα πειραματικά, είτε ζώα παράλληλων διασταυρώσεων στα οποία δεν είχαν κληροδοτηθεί τα αλληλόμορφα Cre και DTA (WT), είτε είχαν μόνο το DTA. Στους απογόνους που έφεραν και τα δύο γονίδια, επιτεύχθηκε εξάλειψη όλων των V0c.

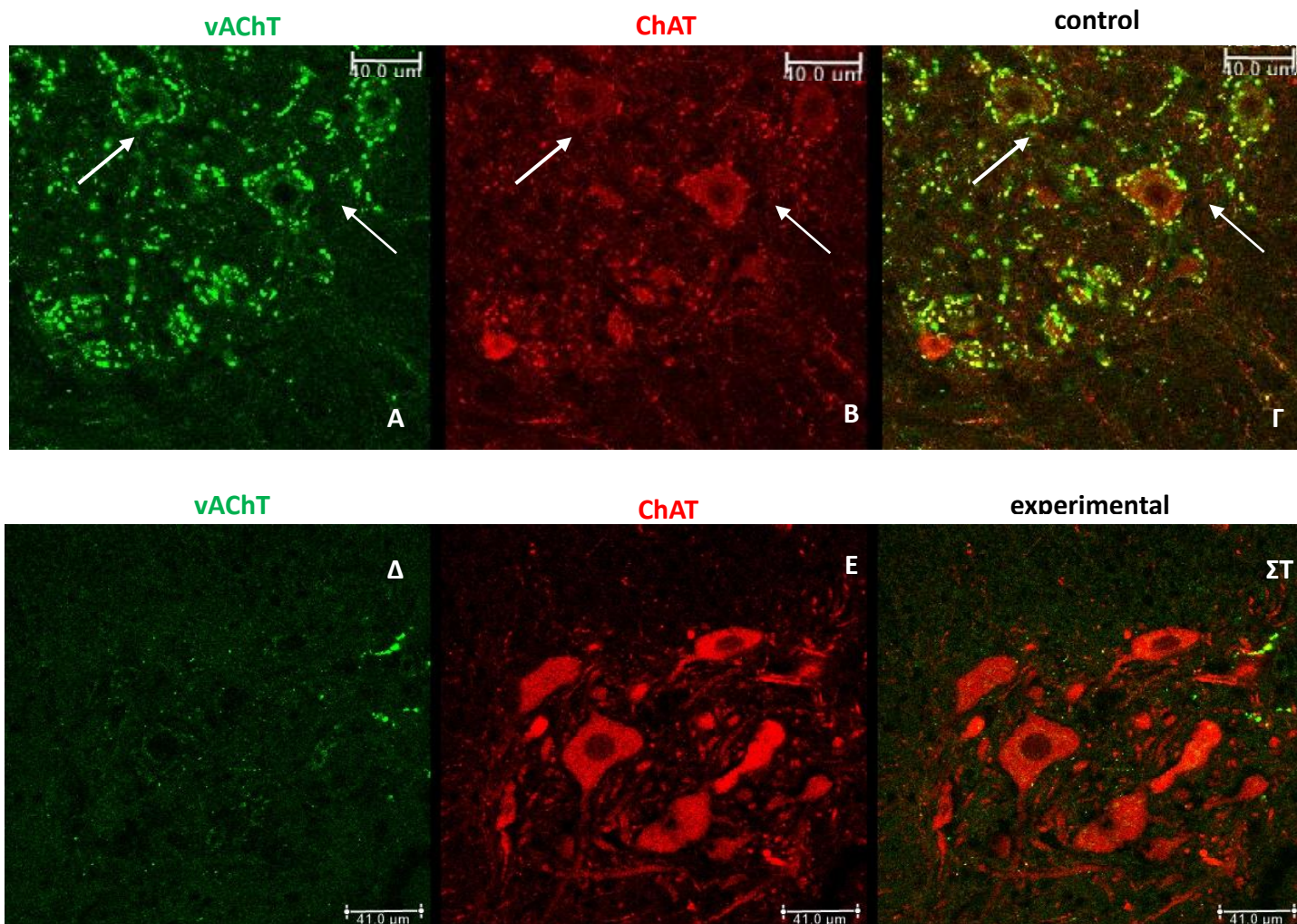
### 4.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΣΧΗΜΑΤΟΣ ΓΙΑΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΑΠΟΛΗΞΕΩΝ ΤΟΥ ΡΑΧΙΑΙΟΥ ΚΕΡΑΤΟΣ

Το παρόν γενετικό σχήμα, έχει δοκιμαστεί και στο παρελθόν για την επιλεκτική εξάλειψη του V0c υποπληθυσμού των διαμέσων νευρώνων. Από τις μετρήσεις και την ανάλυση που έγινε στον V0c υποπληθυσμό και στα C-boutons των κινητικών νευρώνων σε τομές νωτιαίου μυελού, το συμπέρασμα που προέκυψε ήταν ότι το σχήμα είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό, καθώς το ποσοστό θανάτου των V0c νευρώνων ήταν πάνω από 92%.

Αρχικά, εξετάστηκαν τομές του νωτιαίου μυελού των ζώων ελέγχου, ώστε να επιβεβαιωθεί το γεγονός ότι η παρουσία ChAT και vAChT συμφωνεί με την βιβλιογραφία. Στη συνέχεια εξετάστηκαν τομές από τα αντίστοιχα επίπεδα των πειραματικών ζώων. Στα ζώα ελέγχου, ο ανοσοφθορισμός μετά από επώαση με αντίσωμα έναντι της ChAT αποκαλύπτει όντως τους 5, γνωστούς από τη βιβλιογραφία, χολινεργικούς πληθυσμούς νευρώνων, στα σώματα των κινητικών νευρώνων, στους προγαγγλιακούς νευρώνες του συμπαθητικού, στους ραχιαίους χολινεργικούς νευρώνες, στα partition neurons (medial V0c και lateral partition neurons) και στα κύτταρα του κεντρικού καναλιού (Barber et al., 1984).



**Εικόνα 23** Ανοσοϊστοχημεία για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας του γενετικού σχήματος. Ανοσοϊστοχημεία με αντισώματα έναντι ChAT (κόκκινο). **A.** Control ζώο, όπου με βέλη μαρκάρονται οι V0c, στο κεντρικό κανάλι. **B.** Πειραματικό ζώο όπου τα κύτταρα οι V0c δεν υπάρχουν. Εγκάρσια τομή νωτιαίου μυελού στο επίπεδο της άνω οσφυϊκής μοίρας διαγονιδιακού ζώου ηλικίας P21.



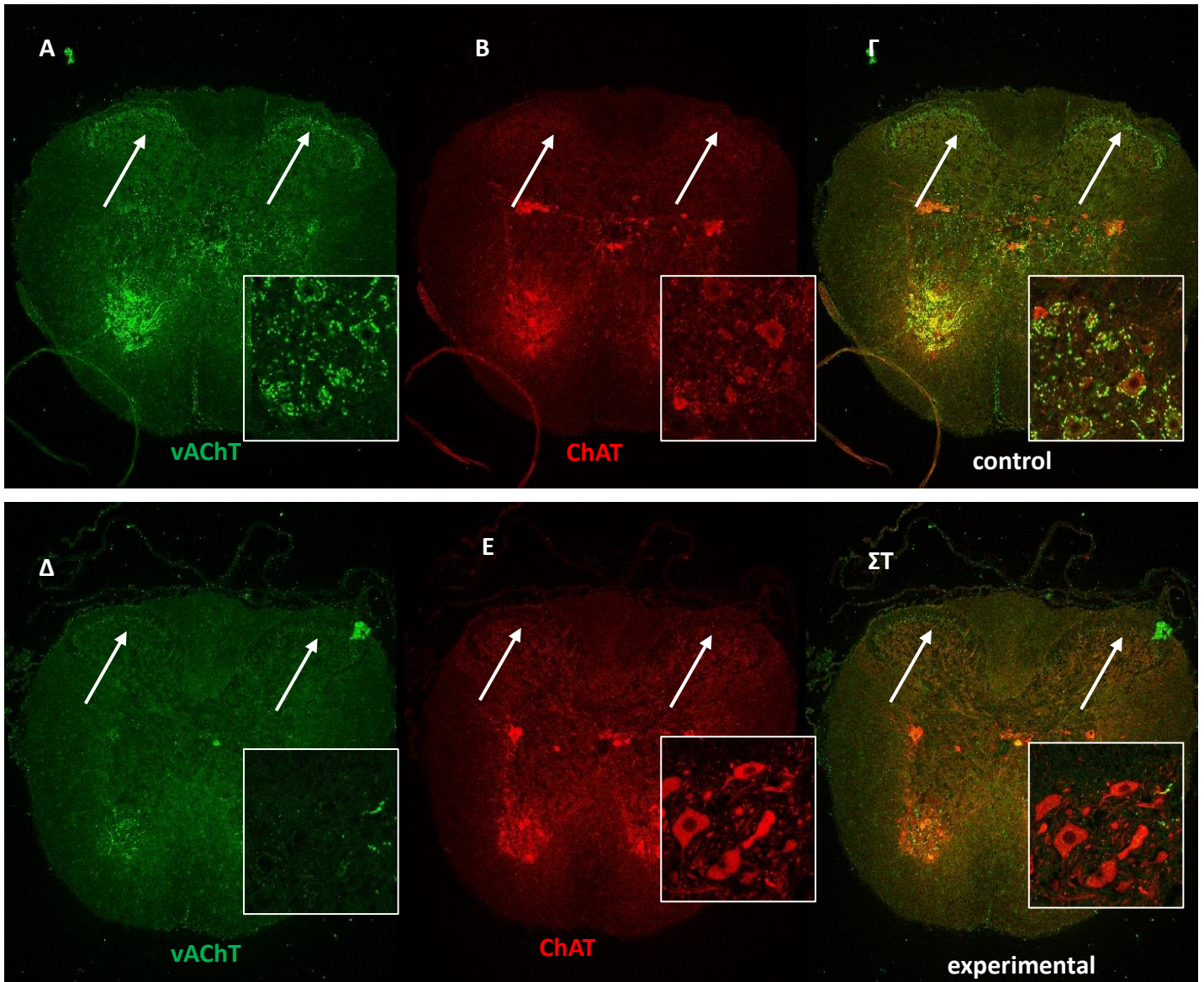
**Εικόνα 24** Ανοσοϊστοχημεία για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας του γενετικού σχήματος. Ανοσοϊστοχημεία με αντισώματα έναντι των χολινεργικών δεικτών ChAT (κόκκινο) και vAChT (πράσινο). **A-Γ** Κινητικοί νευρώνες και τα C-boutons. Φυσιολογική παρουσία των χολινεργικών δεικτών που μαρκάρουν, τόσο τα σώματα των νευρώνων όσο και των συνάψεων γύρω από αυτούς. **Δ-ΣΤ** Απουσία σήματος, σε συνάψεις πάνω στους κινητικούς νευρώνες, καθώς φαίνεται ότι όντως, οι V0c πληθυσμός έχει θανατωθεί. Εγκάρσια τομή νωτιαίου μυελού στο επίπεδο της άνω οσφυϊκής μοίρας διαγονιδιακού ζώου ηλικίας P21. (optical thickness 0.921 μm)

Τα ζώα με γονότυπο *Pitx2::Cre;vAChT-stop-DTA*, αφού ελέγχθηκαν για το γονότυπό τους με τη μέθοδο της PCR, θυσιάστηκαν στην ηλικία των P21 με perfusion. Έγινε απομόνωση του νωτιαίου μυελού και οι ιστοί χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοϊστοχημεία. Πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια ανοσοφθορισμός με τα αντισώματα έναντι του vAChT (vesicular acetylcholine transporter) και της ChAT (choline acetyltransferase).

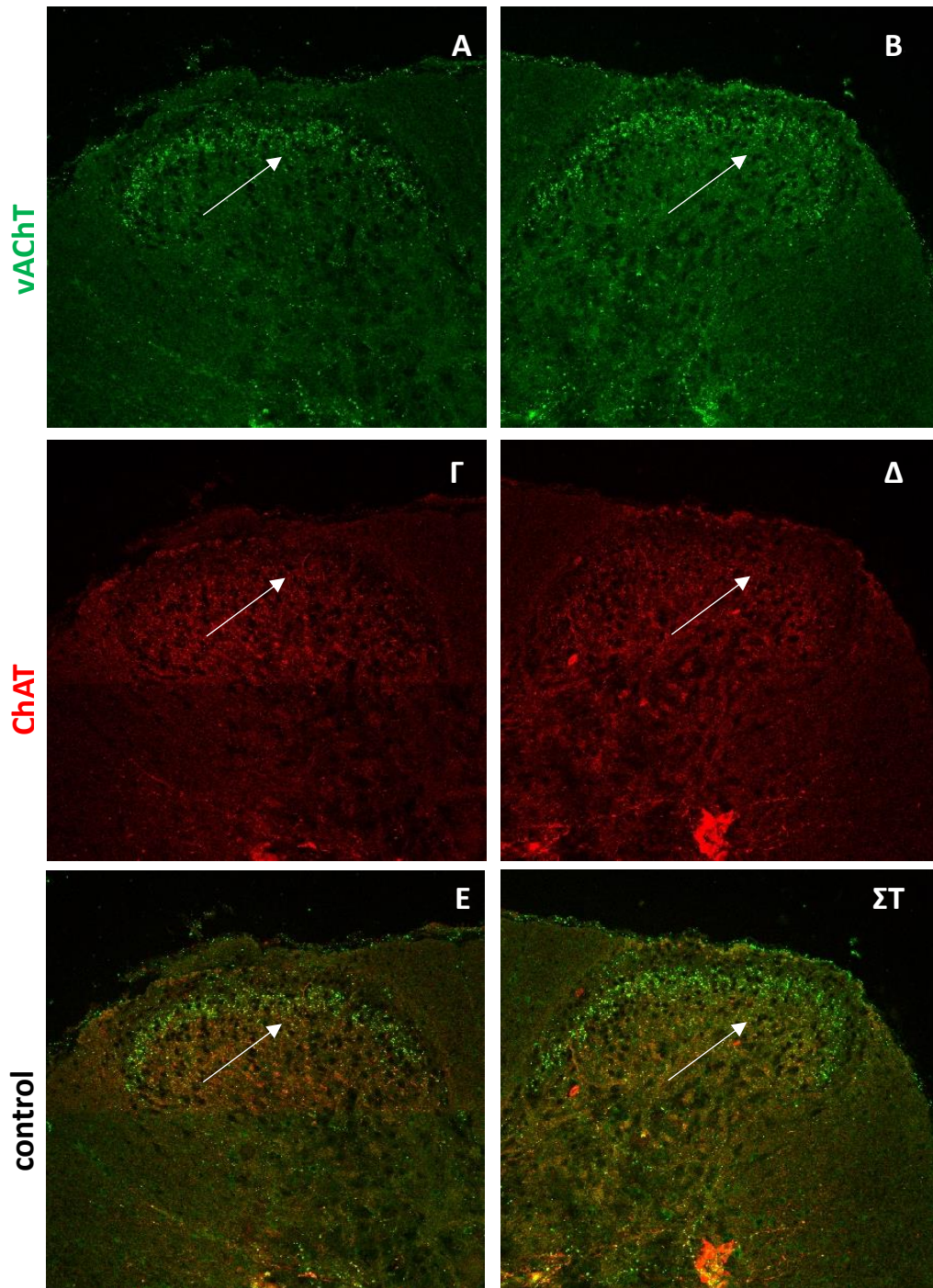
Αποδείξαμε την αποτελεσματικότητα της επιτυχία του γενετικού σχήματος, στην απαλοιφή των νευρώνων V0c. Στα ζώα της ομάδας ελέγχου (control), οι κινητικοί νευρώνες και τα C-boutons εμφάνισαν σήμα, μετά τον ανοσοφθορισμό έναντι ChAT και vAChT. Από την άλλη, στα *Pitx2::Cre+/-;vAChTstopDTA* experimental ζώα, όπως είπαμε χάνεται πάνω από το 92% των V0c νευρώνων, επομένως εξηγείται και η απουσία των C-boutons. Στην περίπτωση που οι χολινεργικοί άξονες και οι απολήξεις της ραχιαίας περιοχής εξαφανίζονται στο συγκεκριμένο γενετικό σχήμα, προέρχονται από *Pitx2+* νευρώνες, ενώ αν δεν εξαφανίζονται, προέρχονται από κάποιον άλλο πληθυσμό.

Στην **Εικόνα 25**, παρατηρούμε τα σώματα των κινητικών νευρώνων καθώς και τα C-boutons στα panels A, B και Γ, ενώ στα panels Δ,Ε και ΣΤ υπάρχει απουσία των C-boutons.

Αφού διαπιστώθηκε η επιτυχία του γενετικού σχήματος, σειρά είχε η παρατήρηση και διερεύνηση της προέλευσης της πληθώρας των χολινεργικών νευρικών απολήξεων και αξόνων που αποτέλεσε και το αντικείμενο μελέτης. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί αυτό, έπρεπε να φωτογραφηθούν στο confocal και στη συνέχεια να αναλυθούν οι εικόνες από τις τομές του νωτιαίου μυελού στα διάφορα επίπεδα.



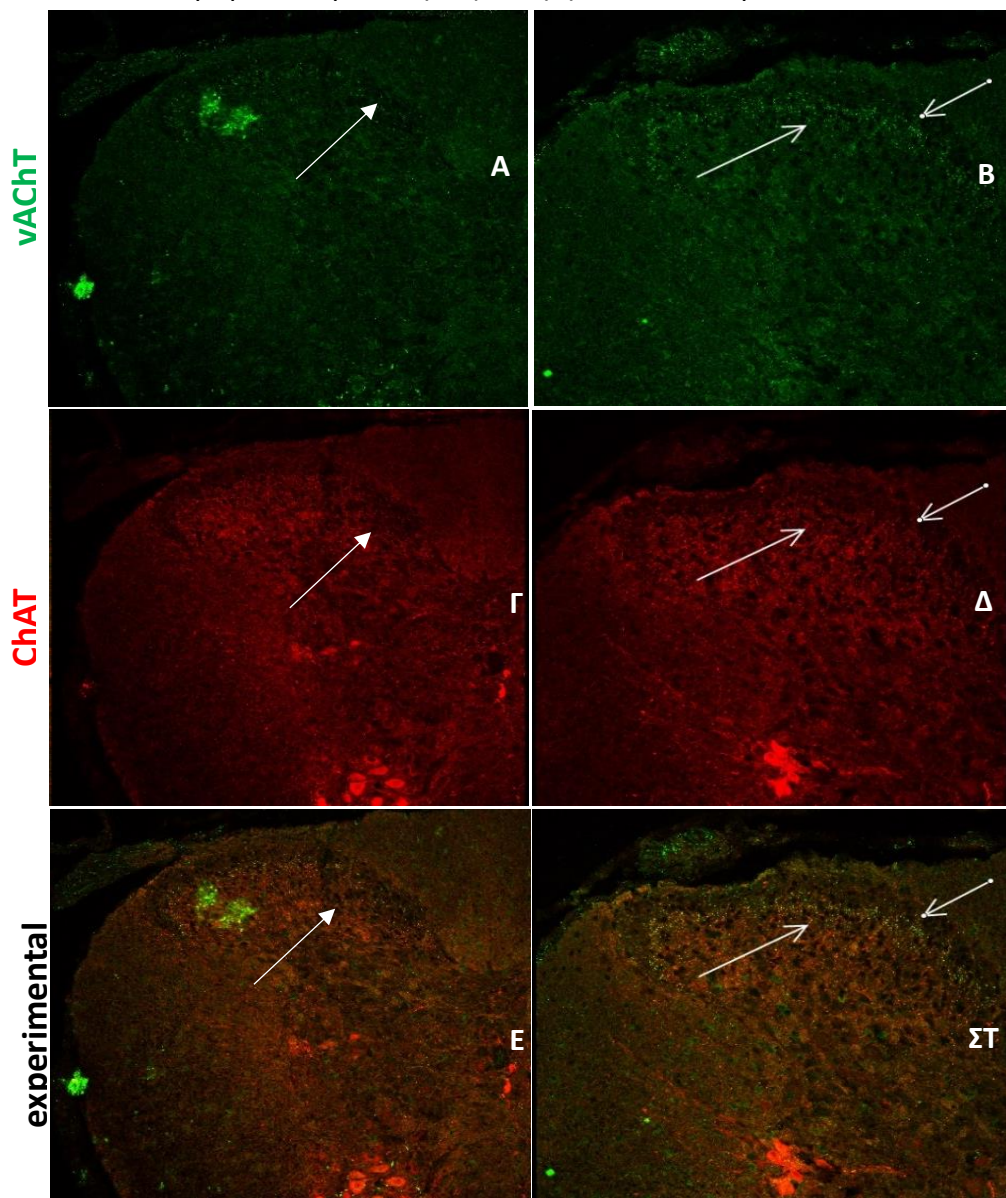
**Εικόνα 25** Ανοσοϊστοχημεία σε ζώα ελέγχου, και σε πειραματικά ζώα γενοτύπου *Pitx2Cre::vAChTstopDTA*. Α-Γ Τομές θωρακικής μοίρας από ζώα ελέγχου, όπου οι χολινεργικοί πληθυσμοί που από τη βιβλιογραφία αναμένονταν, εμφανίζονται κανονικά στα ζώα ελέγχου, καθώς και τα C-boutons. Δ-ΣΤ Πειραματικά *Pitx2Cre::vAChTstopDTA* ζώα, έπειτα από ανοσοφθορισμό με τα αντισώματα έναντι vAChT και έναντι ChAT, όπου παρατηρείται εξαφάνιση των αξόνων και των νευρικών απολήξεων στο ραχιαίο τμήμα. (optical thickness 1.92  $\mu\text{m}$ )



**Εικόνα 26** Ανοσοϊστοχημεία σε ζώα ελέγχου. Στις παραπάνω εικόνες control, απεικονίζονται νωτιαίοι μυελοί ζώων και συγκεκριμένα, το ραχιαίο κέρασ του νωτιαίου μυελού, στο οποίο φαίνονται οι πολυάριθμες νευρικές απολήξεις και οι άξονές τους. Οι εικόνες A, Γ και Δ απεικονίζουν την αριστερή πλευρά, ενώ οι εικόνες B,Δ και ΣΤ τη δεξιά πλευρά της ίδιας τομής. Εγκάρσια τομή νωτιαίου μυελού στο επίπεδο της θωρακικής μοίρας διαγονιδιακού ζώου ηλικίας P21. (optical thickness 1.92 μm)

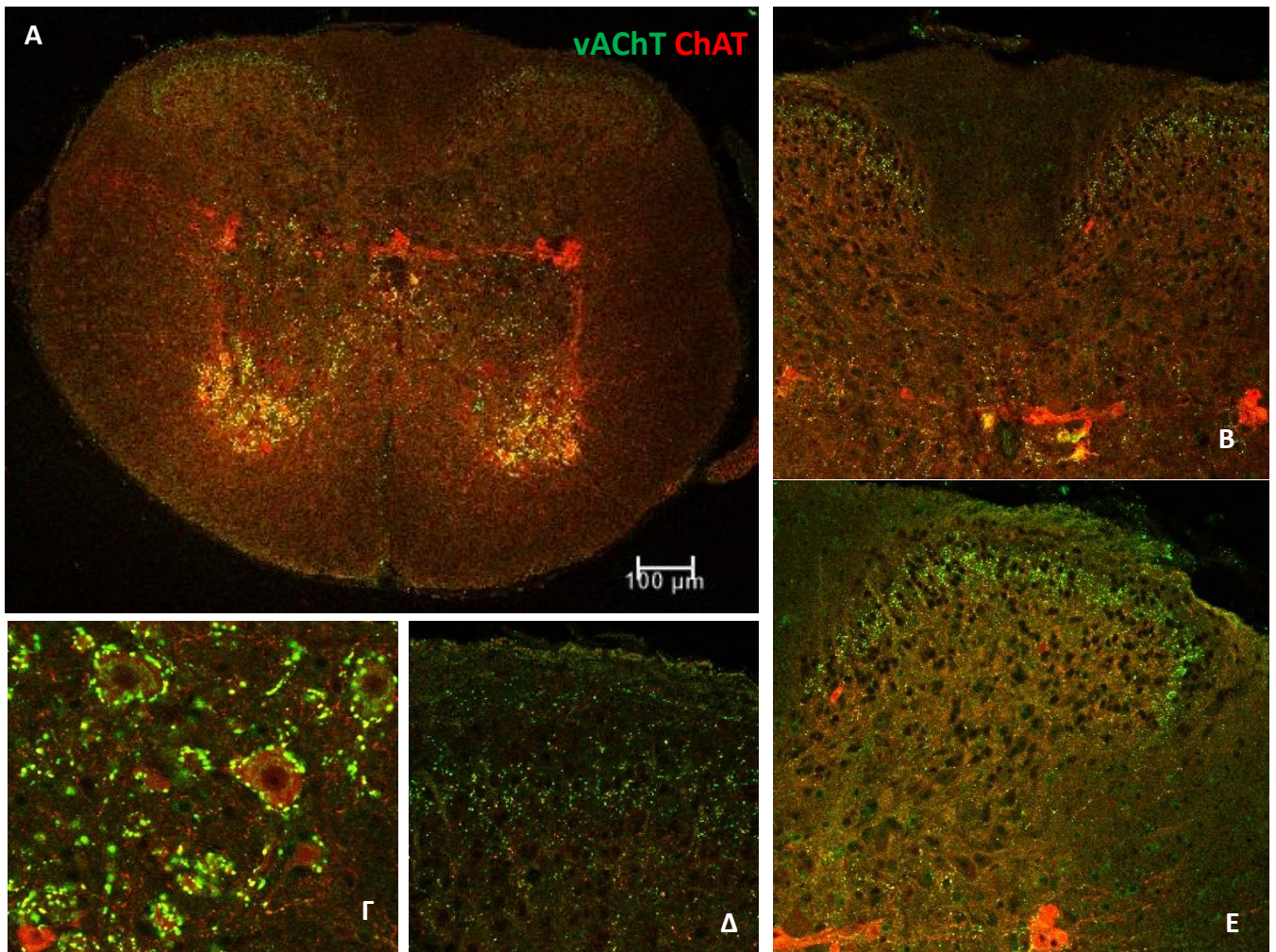


Αρχικά, παρατηρήσαμε πως στην ομάδα ελέγχου σε κάθε επίπεδο του νωτιαίου μυελού υπάρχουν οι χολινεργικοί άξονες και οι πολυάριθμες νευρικές απολήξεις στο ραχιαίο κέρασ. Αντιθέτως, τα πειραματικά ζώα *Pitx2Cre::vAChT-stop-DTA*, στο αυχενικό, άνω και κάτω οσφυϊκό επίπεδο εξαφανίζονται πλήρως. Η εξαφάνισή τους, υποδηλώνει την προέλευσή τους από *Pitx2+* νευρώνες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, ότι στη θωρακική μοίρα, φαίνεται πως ένας μικρός αριθμός αξόνων και νευρικών απολήξεων συνεχίζει να υπάρχει. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα, πως αυτά που παραμένουν δεν έχουν *Pitx2+* προέλευση. Άρα η πλειοψηφία των θωρακικών απολήξεων είναι *Pitx2+* προελεύσεως, αλλά λίγα από αυτά δεν είναι και παραμένουν μετά την εξάλειψη των *V0c* νευρώνων.



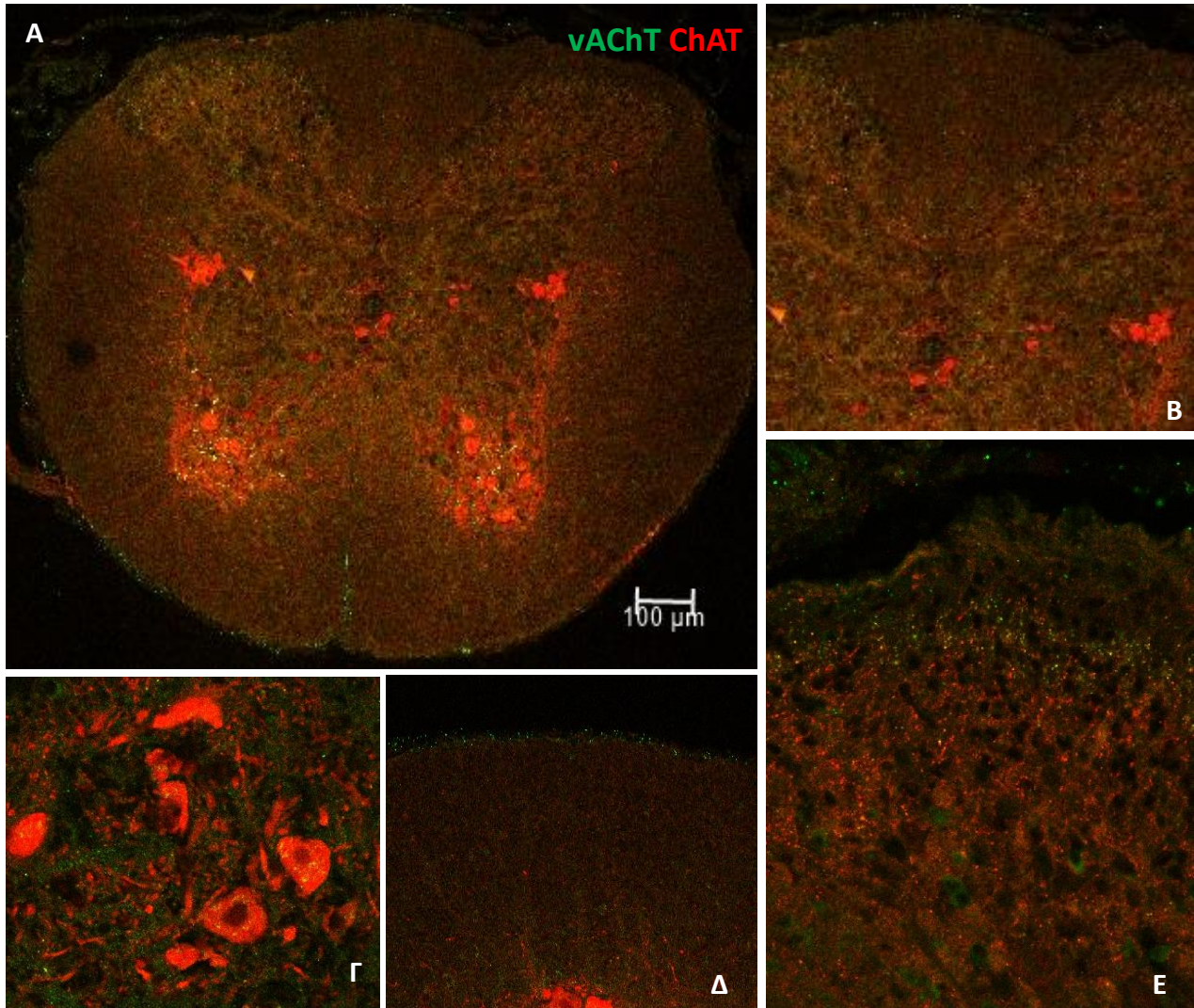
**Εικόνα 27** Ανοσοϊστοχημεία σε ζώα πειραματικά *Pitx2Cre::vAChT-stop-DTA*. Σ Στις παραπάνω εικόνες πειραματικών *Pitx2Cre::vAChTstopDTA*, απεικονίζονται νωτιαίοι μυελοί ζώων και συγκεκριμένα, το ραχιαίο κέρασ του νωτιαίου μυελού, στο οποίο έχουμε απουσία σήματος των νευρικών απολήξεων και των αξόνων τους. Οι εικόνες Α, Γ και Ε απεικονίζουν την αριστερή πλευρά, ενώ οι εικόνες Β, Δ και ΣΤ τη δεξιά πλευρά της ίδιας τομής. Εγκάρσια τομή νωτιαίου μυελού στο επίπεδο της άνω οσφυϊκής μοίρας διαγονιδιακού ζώου ηλικίας P21. (optical thickness 1.92 μm)

Ακόμα ένα παράδειγμα WT ζώου, **Εικόνα 28**, και πειραματικού ζώου *Pitx2::Cre::vAChT-stop-DTA* **Εικόνα 29** που συνοψίζει σε διάφορες μεγεθύνσεις τις εικόνες συνοψίζει τα παραπάνω.



**Εικόνα 28** Οι νευρικές απολήξεις και οι άξονές τους, καθώς και οι χολινεργικές, V0c προέλευσης, C-bouton συνάψεις εμφανίζονται κανονικά στα σώματα των κινητικών νευρώνων σε control ζώο. Ανοσοφθορισμός με αντισώματα έναντι των ChAT (κόκκινο), vAChT (πράσινο) σε εγκάρσιες τομές του νωτιαίου μυελού control ζώου ηλικίας P21, στη θωρακική μοίρα. Μπορεί κανείς να παρατηρήσει σε διάφορες μεγεθύνσεις τα κύτταρα που μας ενδιαφέρουν στο ζώο ελέγχου.

Αποδείξαμε, ότι οι χολινεργικοί άξονες και απολήξεις, προέρχονται από Pitx2+ νευρώνες. Ωστόσο, η Pitx2+ αυτή προέλευση δεν είναι αναγκαστικά από V0c, αλλά θα μπορούσε να είναι, από DRG, από spinal neurons ή και από ανώτερα κέντρα.



**Εικόνα 29** Οι νευρικές απολήξεις και οι άξονές τους, καθώς και οι χολινεργικές, V0c προέλευσης, C-bouton συνάψεις εξαφανίζονται από τα σώματα των κινητικών νευρώνων σε πειραματικό ζώο. Ανοσοφθορισμός με αντισώματα έναντι των ChAT (κόκκινο), vAChT (πράσινο) σε εγκάρσιες τομές του νωτιαίου μυελού πειραματικού ζώου ηλικίας P21, στη θωρακική μοίρα. Διάφορες μεγεθύνσεις τα κύτταρα που μας ενδιαφέρουν στο ζώο ελέγχου. Στη μεγαλύτερη μεγέθυνση, παρατηρούνται κάποιες εναπομένουσες νευρικές απολήξεις, πράγμα που υποδεικνύει ότι κάποιοι άξονες και απολήξεις είναι no Pitx2+ derived.

## 5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 5.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ASB4

Στην πρώτη φάση της πειραματικής διαδικασίας, έγινε μελέτη γύρω από την πρωτεΐνη Asb4. Η πρωτεΐνη Asb4 (ankyrin repeat and SOCS box-containing 4) αποτελεί μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών που διαθέτουν επαναληπτικές αλληλουχίες ανκυρίνης και SOCS box περιοχή. Το SOCS box εξυπηρετεί στη σύζευξη της πρωτεΐνης, η οποία αποτελεί καταστολέα του σηματοδοτικού μονοπατιού κυτοκινών, με το σύμπλοκο ελονγκίνης B και C, στοχεύοντας το προς αποικοδόμηση (Kile et al., 2000). Η πρωτεΐνη Asb4 εντοπίζεται στην περιοχή του νωτιαίου μυελού όπου εδρεύουν οι Pitx2+ νευρώνες. Ένα 69% των V0c νευρώνων και ένα 35% των V0g νευρώνων εκφράζουν Asb4. Σε ανάλυση σάρωσης μικροσυστοιχιών, σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου μας, με σκοπό την εύρεση δεικτών με τους οποίους θα ξεχωρίζουμε τον V0c από τον V0g πληθυσμό -και θα μαρκάρουμε υποπληθυσμούς τους- εντοπίστηκαν 13 γονίδια με αρκετά περιορισμένο πρότυπο έκφρασης, στην ίδια περιοχή με τα Pitx2. Από αυτά, επτά ήταν τα γονίδια που βρέθηκαν να συνεντοπίζονται ολικώς ή μερικώς με τον Pitx2 πληθυσμό, δίνοντας, έτσι, τις πρώτες

Ανάμεσα στα γονίδια στην πρώτη θέση ήταν και το CART το οποίο αποδείχθηκε ιδιαίτερος υποψήφιος καθώς είναι νευροπεπτίδιο και εκφράζεται σε όλους τους V0c νευρώνες, το οποίο τελικά αποδείχθηκε ότι αποτελεί ένα δεύτερο νευροδιαβιβαστή, που δρα μαζί με την ακετυλοχολίνη στα C-boutons.

Η πρωτεΐνη CART (cocaine and amphetamine regulated transcript) είναι ένα νευροπεπτίδιο το οποίο εκφράζεται ευρέως τόσο στο κεντρικό όσο και στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Το νευροπεπτίδιο CART παίζει ρόλο στην ανταμοιβή, τη σίτιση και το στρες ενώ παράλληλα διαθέτει τις λειτουργικές ιδιότητες ενός ενδογενούς ψυχοδιεγερτικού (Hubert, Jones, Moffett, Rogge, & Kuhar, 2008). Το CART νευροπεπτίδιο εντοπίζεται και στην intermediate zone του νωτιαίου μυελού που εδρεύουν οι Pitx2+ νευρώνες.

Σε καλή θέση, στο screen ήταν η πρωτεΐνη Asb4, η οποία σε αντίθεση με την CART, δε χαρακτηρίζει ολόκληρο τον V0c πληθυσμό αλλά ένα μεγάλο μέρος του V0c και ένα μέρος του V0g. Επομένως γεννήθηκε η ανάγκη να μάθουμε ποιο μέρος των πληθυσμών μαρκάρει.

Εξετάστηκε, έτσι, ο συνεντοπισμός των Pitx2+, vAChT/ChAT, CART με την Asb4, σε *Pitx2::Cre+/-;Rosa-td-tomato+/-* που μόλις είχαν γεννηθεί P0, στην αυχενική, θωρακική και στην άνω οσφυϊκή μοίρα του νωτιαίου μυελού.

Αρχικά επιβεβαιώσαμε τη σημαντικότητα του νευροπεπτιδίου CART, το οποίο αποτελεί ένα δεύτερο νευροδιαβιβαστή, αυξάνοντας τον αριθμό *n* των μετρήσεων του εργαστηρίου. Μελετώντας τα ποσοστά του CART στους Pitx2+ νευρώνες διαπιστώνεται πως το νευροπεπτίδιο εκφράζεται σε ποσοστό 99%, δηλαδή από σχεδόν όλους τους V0c νευρώνες. Ενώ, στο σύνολο των Pitx2+ / vAChT-ChAT- νευρώνων που είναι γλουταματεργικοί, δηλαδή V0g, ένα ποσοστό της τάξης του 64% είναι και CART. Μετά από ανάλυση των αποτελεσμάτων, συνολικά, κατά μήκος του νωτιαίου μυελού υπολογίστηκε, πως η πρωτεΐνη Asb4 εκφράζεται σε ποσοστό 69% των V0c νευρώνων. Αναλυτικότερα, στην αυχενική μοίρα 74% του πληθυσμού των Pitx2+ νευρώνων συνεντοπίζονται με την Asb4 πρωτεΐνη. Στη θωρακική μοίρα το ποσοστό αυτό μειώνεται στο 62% και στην άνω οσφυϊκή μοίρα ανέρχεται σχεδόν στο 77%. Μελετώντας τα ποσοστά του Asb4 στους Pitx2+ νευρώνες ήταν αρκετά ενδιαφέρον ότι ένα 35% των V0g νευρώνων εκφράζουν την πρωτεΐνη. Πιο αναλυτικά, το ποσοστό των Pitx2+ / vAChT-ChAT- / Asb4+ ανέρχεται στο 24% στην αυχενική μοίρα, στο 44% στη θωρακική μοίρα και σχεδόν στο 36% στην άνω οσφυϊκή μοίρα, είναι δηλαδή V0g. Μετά από τον τετραπλό ανοσοφθορισμό, διαπιστώθηκε ότι οι Asb4+ / Pitx2+ νευρώνες που είναι ταυτόχρονα και χολινεργικοί (Pitx2+ vAChT/ChAT+ / Asb4+) και CART+ στο σύνολο των Pitx2+ / vAChT+ChAT+ / CART+ νευρώνων στην αυχενική μοίρα ανέρχονται στο 74% % των V0c (Pitx2+ / vAChT+ChAT+ / CART+) νευρώνων και συνεντοπίζονται με την Asb4. Το ποσοστό αυτό φθάνει το 62% στη θωρακική μοίρα ενώ στην άνω οσφυϊκή μοίρα παρατηρείται ότι το 77% είναι Pitx2+ / vAChT+ChAT+ / CART+ / Asb4+.

Όπως μπορούμε, λοιπόν, να διαπιστώσουμε όλοι οι V0c εκφράζουν και CART, ενώ βλέπουμε ότι περαιτέρω διαχωρίζονται σε Asb4+/- . Σε τι διαφοροποιούνται όμως ως προς την έκφραση; Αφού γνωρίζουμε ότι διαχωρίζονται σε ipsilateral και bilateral projecting, μήπως η Asb4 παίζει κάποιο ρόλο; Είναι κάποια από τα ερωτήματα που θα ερευνηθούν μελλοντικά.

## 5.2 ΧΟΛΙΝΕΡΓΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΑΠΟΛΙΞΕΩΝ ΚΑΙ ΑΞΟΝΩΝ ΤΟΥ ΟΠΙΣΘΙΟΥ ΚΕΡΑΤΟΣ ΤΟΥ ΝΩΤΙΑΙΟΥ ΜΥΕΛΟΥ

Τα τελευταία χρόνια με την εξέλιξη της μοριακής και γενετικής, είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη η μέθοδος επιλεκτικής θανάτωσης νευρώνων που εκφράζουν κάποιον συγκεκριμένο δείκτη για τη διερεύνηση, είτε της λειτουργίας του είτε της προέλευσης και κατανομής τους. Στο συγκεκριμένο πείραμα, πραγματοποιήθηκε διασταύρωση δύο σειρών ποντικών, η *Pitx2::Cre+/-*; με τη *vAChT-stop-DTA+/-*. Στα ποντίκια αυτού του γονοτύπου, η Cre ρεκομπινάση, βρίσκεται υπό τον υποκινητή του *Pitx2+* μεταγραφικού παράγοντα και εκφράζεται, μόνο στους *Pitx2+* νευρώνες. Υπό τον υποκινητή του *vAChT* βρίσκεται μια κασέτα, η οποία περιέχει μια *LoxP* περιοχή, μια *stop* αλληλουχία, μια δεύτερη *LoxP* περιοχή και το γονίδιο *DTA* που παράγει την τοξίνη της διφθερίτιδας A. Στα ζώα που είχαν και τα δύο γονίδια, η Cre θα απομακρύνει το κομμάτι μεταξύ των *LoxP* περιοχών της *stop* αλληλουχίας επιτρέποντας την έκφραση της *DTA*. Στα ποντίκια αυτού του γονοτύπου *Pitx2::Cre+/-*; *vAChT-stop-DTA+/-*, μέσω της τοξίνης της διφθερίτιδας A, θανατώνονται επιλεκτικά τα κύτταρα του *V0c* πληθυσμού. Πριν μελετήσουμε το αποτέλεσμα αυτού του θανάτου, ελέγξαμε την επιτυχία του ανασυνδυασμού και κατ' επέκταση την εξάλειψη των *V0c*, όσο και των συνάψεων τους από τους κινητικούς νευρώνες και το βρήκαμε επιτυχές (92% ablation). Στη συνέχεια, συγκρίναμε control με experimental ζώα ως προς την ύπαρξη των χολινεργικών αξόνων και των νευρικών απολήξεων στο ραχιαίο κέρασ που μας ενδιαφέρουν. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν laminectomies σε ζώα ηλικίας P21, μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα 4% PFA και έπειτα απομονώθηκαν οι νωτιαίοι μυελοί. Πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια ανοσοφθορισμός με το αντίσωμα έναντι του *vAChT* και έναντι του *ChAT*. Στα ζώα ελέγχου, ο ανοσοφθορισμός μετά από επώαση με αντίσωμα έναντι της *ChAT* αποκαλύπτει τους γνωστούς από τη βιβλιογραφία χολινεργικούς πληθυσμούς νευρώνων, τα σώματα των κινητικών νευρώνων, τους προγαγγλιακούς νευρώνες του συμπαθητικού, τους ραχιαίους χολινεργικούς νευρώνες, τα partition neurons (medial *V0c* και lateral partition neurons) και τα κύτταρα του κεντρικού καναλιού (Barber et al., 1984). Οι κινητικοί νευρώνες βρίσκονται στην κοιλιακή περιοχή και δέχονται πολυάριθμες χολινεργικές συνάψεις (*ChAT* και *vAChT*), τόσο στα σώματα, όσο και στους εγγύς δενδρίτες τους.

Τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού απεικονίστηκαν με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου Leica DM 6000 CFS (Confocal Fixed Stage System). Στις εικόνες από τις τομές

τόσο της αυχενικής, όσο και της άνω και κάτω οσφυϊκής μοίρας διακρίνουμε ότι οι άξονες και οι πολυάριθμες αυτές χολινεργικές απολήξεις, αφού εξαφανίζονται, άρα έχουν χολινεργική Pitx2+ προέλευση. Το συμπέρασμα αυτό, προκύπτει, εύκολα, από την παρατήρηση και σύγκριση των εικόνων των ζώων ελέγχου με αυτές των πειραματικών. Επομένως από τη στιγμή που άξονες και οι νευρικές απολήξεις εξαφανίζονται σ' αυτό το γενετικό σχήμα, η προέλευσή τους είναι Pitx2+ derived χολινεργική. Ωστόσο, ενδιαφέρον παρουσίασε η περίπτωση της θωρακικής μοίρας, όπου παρατηρήθηκαν κάποιοι εναπομείναντες χολινεργικοί άξονες και απολήξεις, πράγμα που καταδεικνύει τη διαφορετική προέλευσή τους. Η προέλευση αυτή, μπορούμε με ασφάλεια να πούμε ότι δεν είναι Pitx2+, αλλά διαφορετική. Η Pitx2+ χολινεργική αυτή προέλευση δεν είναι αναγκαστικά από V0c. Θα μπορούσε να είναι, από Pitx χολινεργικούς sensory neurons στα DRG (dorsal root ganglia) ή και από Pitx χολινεργικούς του εγκέφαλου και του στελέχους, κάτι που θα μελετηθεί μελλοντικά.

Η εργασία αυτή, αποτελεί ένα λιθαράκι σ' αυτή την προσπάθεια να αναγνωρίσουμε υποπληθυσμούς που είναι λειτουργικά αυτόνομοι ώστε να μελετήσουμε καλύτερα το δίκτυο. Φαίνεται, ότι με όλη αυτή την πληθώρα markers που βρίσκουμε, σε κάποια χρόνια θα είμαστε σε θέση να ξεχωρίσουμε υποπληθυσμούς που είναι λειτουργικά αυτόνομοι - αυτόνομα units του δικτύου και να μελετήσουμε καλύτερα το δίκτυο.

## 6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahmadian-Moghadam, H., Sadat-Shirazi, M. S., & Zarrindast, M. R. (2018). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART): A multifaceted neuropeptide. *Peptides*, *110*, 56-77. doi:10.1016/j.peptides.2018.10.008
- Al-Mosawie, A., Wilson, J. M., & Brownstone, R. M. (2007). Heterogeneity of V2-derived interneurons in the adult mouse spinal cord. *Eur J Neurosci*, *26*(11), 3003-3015. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18028108](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18028108)
- Anasa, V. V., Ravanan, P., & Talwar, P. (2018). Multifaceted roles of ASB proteins and its pathological significance. *Frontiers in Biology*, *13*(5), 376-388. doi:10.1007/s11515-018-1506-2
- Au, V., H Tsang, F., Man, K., Tat Fan, S., Tp Poon, R., & P Lee, N. (2014). Expression of ankyrin repeat and SOCS box containing 4 (ASB4) confers migration and invasion properties of hepatocellular carcinoma cells. *BioScience Trends*, *8*(2), 101-110. doi:10.5582/bst.8.101
- Barber, R., Phelps, P., Houser, C., Crawford, G., Salvaterra, P., & Vaughn, J. (1984). The morphology and distribution of neurons containing choline acetyltransferase in the adult rat spinal cord: an immunocytochemical study. *Journal of Comparative Neurology*, *229*(3), 329-346.
- Cazemier, J., Clascá, F., & Tiesinga, P. (2016). Connectomic Analysis of Brain Networks: Novel Techniques and Future Directions. *Frontiers in Neuroanatomy*, *10*. doi:10.3389/fnana.2016.00110
- Chang, L., Chen, Y., Li, J., Liu, Z., Wang, Z., Chen, J., . . . Xu, Y. (2011). Cocaine-and amphetamine-regulated transcript modulates peripheral immunity and protects against brain injury in experimental stroke. *Brain, Behavior, and Immunity*, *25*(2), 260-269. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.09.017>
- Crone, S. A., Quinlan, K. A., Zagoraiou, L., Droho, S., Restrepo, C. E., Lundfald, L., . . . Sharma, K. (2008). Genetic ablation of V2a ipsilateral interneurons disrupts left-right locomotor coordination in mammalian spinal cord. *Neuron*, *60*(1), 70-83. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18940589](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18940589)
- Dougherty, K. J., Zagoraiou, L., Satoh, D., Rozani, I., Doobar, S., Arber, S., . . . Kiehn, O. (2013). Locomotor rhythm generation linked to the output of spinal shox2 excitatory interneurons. *Neuron*, *80*(4), 920-933. doi:10.1016/j.neuron.2013.08.015
- Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., & Jessell, T. M. (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell*, *87*(4), 661-673. doi:10.1016/s0092-8674(00)81386-0
- Ferguson, J. E., 3rd, Wu, Y., Smith, K., Charles, P., Powers, K., Wang, H., & Patterson, C. (2007). ASB4 is a hydroxylation substrate of FIH and promotes vascular differentiation via an oxygen-dependent mechanism. *Mol Cell Biol*, *27*(18), 6407-6419. doi:10.1128/mcb.00511-07
- Gage, G. J., Kipke, D. R., & Shain, W. (2012). Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp*(65). doi:10.3791/3564
- Ghosh, P., & Higgins, D. E. (2018). Listeria monocytogenes Infection of the Brain. *J Vis Exp*(140). doi:10.3791/58723
- Gosgnach, S., Lanuza, G. M., Butt, S. J., Saueressig, H., Zhang, Y., Velasquez, T., . . . Goulding, M. (2006). V1 spinal neurons regulate the speed of vertebrate locomotor outputs. *Nature*, *440*(7081), 215-219. doi:10.1038/nature04545
- Hilton, D. J., Richardson, R. T., Alexander, W. S., Viney, E. M., Willson, T. A., Sprigg, N. S., . . . Nicola, N. A. (1998). Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(1), 114-119. doi:10.1073/pnas.95.1.114
- Hubert, G. W., Jones, D. C., Moffett, M. C., Rogge, G., & Kuhar, M. J. (2008). CART peptides as modulators of dopamine and psychostimulants and interactions with the mesolimbic dopaminergic system. *Biochemical pharmacology*, *75*(1), 57-62.
- Jacob, J., & Briscoe, J. (2003). Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. *EMBO reports*, *4*(8), 761-765. doi:<https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor896>
- Jarrar, W., Dias, J. M., Ericson, J., Arnold, H.-H., & Holz, A. (2015). Nkx2.2 and Nkx2.9 Are the Key Regulators to Determine Cell Fate of Branchial and Visceral Motor Neurons in Caudal Hindbrain. *PLOS ONE*, *10*(4), e0124408. doi:10.1371/journal.pone.0124408



- Jessell, T. M. (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet*, 1(1), 20-29. doi:10.1038/35049541
- Kile, B. T., Viney, E. M., Willson, T. A., Brodnicki, T. C., Cancilla, M. R., Herlihy, A. S., . . . Alexander, W. S. (2000). Cloning and characterization of the genes encoding the ankyrin repeat and SOCS box-containing proteins Asb-1, Asb-2, Asb-3 and Asb-4. *Gene*, 258(1), 31-41. doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00402-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00402-9)
- Kim, H., Kim, M., Im, S. K., & Fang, S. (2018). Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res*, 34(4), 147-159. doi:10.5625/lar.2018.34.4.147
- Kühn, R., & M. Torres, R. (2002). Cre/loxP Recombination System and Gene Targeting. In A. R. Clarke (Ed.), *Transgenesis Techniques: Principles and Protocols* (pp. 175-204). Totowa, NJ: Springer New York.
- Lanuza, G. M., Gosgnach, S., Pierani, A., Jessell, T. M., & Goulding, M. (2004). Genetic identification of spinal interneurons that coordinate left-right locomotor activity necessary for walking movements. *Neuron*, 42(3), 375-386. doi:10.1016/s0896-6273(04)00249-1
- Lee, N. P. Y., Leung, K.-w., Cheung, N., Lam, B. Y., Xu, M. Z., Sham, P. C., . . . Luk, J. M. (2008). Comparative proteomic analysis of mouse livers from embryo to adult reveals an association with progression of hepatocellular carcinoma. *Proteomics*, 8(10), 2136-2149. Retrieved from [https://neuro.unboundmedicine.com/medline/citation/18425728/Comparative\\_proteomic\\_analysis\\_of\\_mouse\\_livers\\_from\\_embryo\\_to\\_adult\\_reveals\\_an\\_association\\_with\\_progression\\_of\\_hepatocellular\\_carcinoma](https://neuro.unboundmedicine.com/medline/citation/18425728/Comparative_proteomic_analysis_of_mouse_livers_from_embryo_to_adult_reveals_an_association_with_progression_of_hepatocellular_carcinoma)  
<https://doi.org/10.1002/pmic.200700590>
- Liem, K., Jessell, T. M., & 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.
- Linossi, E. M., & Nicholson, S. E. (2012). The SOCS box-adapting proteins for ubiquitination and proteasomal degradation. *IUBMB Life*, 64(4), 316-323. doi:10.1002/iub.1011
- Liu, W., Selever, J., Lu, M.-F., & Martin, J. F. (2003). Genetic dissection of Pitx2 in craniofacial development uncovers new functions in branchial arch morphogenesis, late aspects of tooth morphogenesis and cell migration. *Development*, 130(25), 6375-6385. doi:10.1242/dev.00849
- Lu, D. C., Niu, T., & Alaynick, W. A. (2015). Molecular and cellular development of spinal cord locomotor circuitry. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 8(25). doi:10.3389/fnmol.2015.00025
- Lundfald, L., Restrepo, C. E., Butt, S. J., Peng, C. Y., Droho, S., Endo, T., . . . Kiehn, O. (2007). Phenotype of V2-derived interneurons and their relationship to the axon guidance molecule EphA4 in the developing mouse spinal cord. *Eur J Neurosci*, 26(11), 2989-3002. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18028107](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18028107)
- Luo, Y., Shen, H., Liu, H.-S., Yu, S.-J., Reiner, D. J., Harvey, B. K., . . . Wang, Y. (2013). CART peptide induces neuroregeneration in stroke rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 33(2), 300-310. doi:10.1038/jcbfm.2012.172
- Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., . . . Zeng, H. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci*, 13(1), 133-140. doi:10.1038/nn.2467
- Matise, M. P., & Joyner, A. L. (1997). Expression Patterns of Developmental Control Genes in Normal and *Engrailed-1* Mutant Mouse Spinal Cord Reveal Early Diversity in Developing Interneurons. *The Journal of Neuroscience*, 17(20), 7805-7816. doi:10.1523/jneurosci.17-20-07805.1997
- McMahon, J. A., Takada, S., Zimmerman, L. B., Fan, C. M., Harland, R. M., & 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. doi:10.1101/gad.12.10.1438
- Moran-Rivard, L., Kagawa, T., Saueressig, H., Gross, M. K., Burrill, J., & Goulding, M. (2001). Evx1 is a postmitotic determinant of v0 interneuron identity in the spinal cord. *Neuron*, 29(2), 385-399. doi:10.1016/s0896-6273(01)00213-6
- Okumura, F., Matsuzaki, M., Nakatsukasa, K., & Kamura, T. (2012). The Role of Elongin BC-Containing Ubiquitin Ligases. *Front Oncol*, 2, 10. doi:10.3389/fonc.2012.00010
- Orban, P. C., Chui, D., & Marth, J. D. (1992). Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(15), 6861-6865. doi:10.1073/pnas.89.15.6861

- Panayi, H., Panayiotou, E., Orford, M., Genethliou, N., Mean, R., Lapathitis, G., . . . Malas, S. Sox1 is required for the specification of a novel p2-derived interneuron subtype in the mouse ventral spinal cord. *J Neurosci*, 30(37), 12274-12280. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20844123](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20844123)
- Panayi, H., Panayiotou, E., Orford, M., Genethliou, N., Mean, R., Lapathitis, G., . . . Malas, S. (2010). Sox1 Is Required for the Specification of a Novel p2-Derived Interneuron Subtype in the Mouse Ventral Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience*, 30(37), 12274-12280. doi:10.1523/jneurosci.2402-10.2010
- Pierani, A., Moran-Rivard, L., Sunshine, M. J., Littman, D. R., Goulding, M., & Jessell, T. M. (2001b). Control of Interneuron Fate in the Developing Spinal Cord by the Progenitor Homeodomain Protein Dbx1. *Neuron*, 29(2), 367-384. doi:[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00212-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00212-4)
- 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. doi:10.1038/nrn2493
- Ruiz i Altaba, A., Palma, V., & Dahmane, N. (2002). Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci*, 3(1), 24-33. doi:10.1038/nrn704
- Sauer, B., & Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(14), 5166-5170. doi:10.1073/pnas.85.14.5166
- Stepien, A. E., & Arber, S. (2008). Probing the Locomotor Conundrum: Descending the 'V' Interneuron Ladder. *Neuron*, 60(1), 1-4. doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.030>
- Sternberg, N., & Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination: I. Recombination between loxP sites. *Journal of Molecular Biology*, 150(4), 467-486. doi:[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90375-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90375-2)
- Subhedar, P. B., & Gogate, P. R. (2014). Enhancing the activity of cellulase enzyme using ultrasonic irradiations. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 101, 108-114.
- Townley-Tilson, W. H. D., Wu, Y., Ferguson, J. E., III, & Patterson, C. (2014). The Ubiquitin Ligase ASB4 Promotes Trophoblast Differentiation through the Degradation of ID2. *PLOS ONE*, 9(2), e89451. doi:10.1371/journal.pone.0089451
- Vallstedt, A., Klos, J. M., & Ericson, J. (2005). Multiple Dorsoventral Origins of Oligodendrocyte Generation in the Spinal Cord and Hindbrain. *Neuron*, 45(1), 55-67. doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.026>
- Vallstedt, A., Muhr, J., Pattyn, A., Pierani, A., Mendelsohn, M., Sander, M., . . . Ericson, J. (2001). Different Levels of Repressor Activity Assign Redundant and Specific Roles to Nkx6 Genes in Motor Neuron and Interneuron Specification. *Neuron*, 31(5), 743-755. doi:[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00412-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00412-3)
- Villavicencio, E. H., Walterhouse, D. O., & Iannaccone, P. M. (2000). The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet*, 67(5), 1047-1054. doi:10.1016/s0002-9297(07)62934-6
- Zagoraiou, L., Akay, T., Martin, J. F., Brownstone, R. M., Jessell, T. M., & Miles, G. B. (2009). A cluster of cholinergic premotor interneurons modulates mouse locomotor activity. *Neuron*, 64(5), 645-662.
- Zhang, J., Lanuza, G. M., Britz, O., Wang, Z., Siembab, V. C., Zhang, Y., . . . Goulding, M. (2014). V1 and v2b interneurons secure the alternating flexor-extensor motor activity mice require for limbed locomotion. *Neuron*, 82(1), 138-150. doi:10.1016/j.neuron.2014.02.013
- Zhang, Y., Narayan, S., Geiman, E., Lanuza, G. M., Velasquez, T., Shanks, B., . . . Goulding, M. (2008). V3 spinal neurons establish a robust and balanced locomotor rhythm during walking. *Neuron*, 60(1), 84-96. doi:10.1016/j.neuron.2008.09.027