



University of Thessaly
Faculty of Health Sciences
Department of Biochemistry and
Biotechnology



FORTH

INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY & BIOTECHNOLOGY



DEPARTMENT
**BIOCHEMISTRY &
BIOTECHNOLOGY**
UNIVERSITY OF THESSALY

DIPLOMA THESIS

«Analysis of the role of axonal protein TAG-1/CNTN2 in
neuronal populations of the mouse hippocampus»

KARATHEODOROU EMMANOUIL

A.M.: 1820114

12 February 2025

Foundation for Research and Technology-Hellas (FORTH) - University of Crete

Supervisor: Karagogeos Domna

Ηράκλειο Κρήτης 2024-2025



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας



FORTH

INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY & BIOTECHNOLOGY



ΤΜΗΜΑ
**ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ &
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ανάλυση του ρόλου της αξονικής πρωτεΐνης TAG-1/CNTN2 σε
νευρωνικούς πληθυσμούς του ιπποκάμπου μυών»

ΚΑΡΑΘΕΟΔΩΡΟΥ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ

A.M.: 1820114

12 Φεβρουαρίου 2025

Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ) - Πανεπιστήμιο Κρήτης

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Καραγωγέως Δόμνα

Ηράκλειο Κρήτης 2024-2025

Ονοματεπώνυμο: Εμμανουήλ Καραθεοδώρου του Πασχάλη

Τριμελής Επιτροπή:

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Καραγωγέως Δόμνα

Supervisor: Karagogeos Domna

Συνεπιβλέπων Καθηγητής: Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος

Co-supervisor: Mathiopoulos Konstantinos

Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής: Θεοδωράκης Κωνσταντίνος

Advising Committee Member: Theodorakis Konstantinos

Ευχαριστίες

Δεν υπάρχουν λόγια που να αρκούν για να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, την άμεση και ευρύτερη, από τα βάθη της καρδιάς μου, για την ατελείωτη και άνευ όρων υποστήριξη, τη βοήθεια και την κατανόηση τους στις αποφάσεις μου. Οφείλω τα πάντα σε εκείνους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια Δόμνα Καραγωγέως για την καθοδήγηση που μου προσέφερε όλους αυτούς τους μήνες, την πίστη της στις ικανότητές μου και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε σημαντικά πειράματα του εργαστηρίου της. Ευχαριστώ την επιβλέπουσα μου, Σοφία Πετσαγγουράκη, που με έκανε να νιώσω ευπρόσδεκτο στην ομάδα της από την πρώτη ημέρα, για την καθοδήγηση που ανιδιοτελώς εξακολουθεί να μου προσφέρει, την ανεξάντλητη κατανόηση της και τις τόσες επιστημονικές γνώσεις που μου μετέδωσε. Είμαι πολύ χαρούμενος που ήταν επιβλέπουσα μου και ελπίζω πως μελλοντικά θα υπάρξουμε συνάδελφοι. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, ειδικά τον Δρ. Δημήτριο Σπυριδάκο για τις επιστημονικές του γνώσεις και τις ευχάριστες συζητήσεις. Ευχαριστώ τον Δρ. Κωνσταντίνο Θεοδωράκη για την βοήθεια του όποτε την χρειάστηκα και τον καθηγητή Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο. Σας ευχαριστώ όλους για τη θετική ατμόσφαιρα και εύχομαι να πετύχετε όλους τους στόχους σας. Τέλος, ευχαριστώ τον στενό μου κύκλο, τους φίλους και τις φίλες μου, για τις αξέχαστες αναμνήσεις που δημιουργήσαμε μαζί εξερευνώντας την Κρήτη. Θα θυμάμαι αυτή την περίοδο ως μία από τις ομορφότερες της ζωής μου.

Περίληψη

Οι διάμεσοι νευρώνες αποτελούν ένα εκ των δύο βασικών νευρωνικών πληθυσμών του εγκεφάλου. Παρέχουν αναστολή στα νευρωνικά δίκτυα που συμμετέχουν, ενώ οποιαδήποτε διατάραξη της αναστολής οδηγεί σε υπερδιέγερση-τοξικότητα και συνεπώς στην ανάπτυξη νευρολογικών ασθενειών. Τόσο οι διεγερτικοί (ο δεύτερος νευρωνικός πληθυσμός) όσο και κάποιοι διάμεσοι νευρώνες (παρβαλβουμίνης, PV+ και σωματοστατίνης, SST+) έχουν μυελινωμένους άξονες. Μυελίνη είναι η λιποειδής προέκταση της πλασματικής μεμβράνης των ολιγοδενδροκυττάρων στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και των κυττάρων Schwann στο περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ) που περιβάλλει τους άξονες. Είναι υπεύθυνη για την αλματώδη μετάδοση των νευρικών ώσεων καθώς και για την τροφική στήριξη αυτών, ενώ επιπλέον, στους διάμεσους νευρώνες, η μυελίνη έχει ρόλο και στη ρύθμιση των εγγενών ηλεκτροφυσιολογικών τους ιδιοτήτων. Η μυελίνη πάνω στον άξονα οργανώνεται σε περιοχές: τις παρακομβικές και τις εγγύς παρακομβικές περιοχές που έχουν συντηρημένη μοριακή οργάνωση. Εκεί βρίσκονται μόρια κυτταρικής συνάφειας (CAMs) που συμβάλλουν στην αυστηρή οργάνωσή τους. Τέτοια μόρια είναι και η αξονική πρωτεΐνη TAG-1/CNTN2, που αλληλεπιδρά *in cis* την Caspr2 και *in trans* με τη γλοιακή TAG-1/CNTN2 βοηθώντας στην αγκυροβόληση των καναλιών καλίου (K⁺) στις εγγύς παρακομβικές περιοχές. Η TAG-1/CNTN2 συμμετέχει και σε άλλες διαδικασίες κατά την ανάπτυξη όπως η επέκταση του νευρίτη (neurite extension) και η ανάπτυξη του άξονα (axon outgrowth). Σήμερα, προσπαθούμε να αναλύσουμε την συμβολή της TAG-1/CNTN2 στην μυελίνωση και λειτουργία των διάμεσων νευρώνων του ιπποκάμπου. Από πρόσφατα πειράματα που πραγματοποιήσαμε, είδαμε πως σε ελλειμματικούς μύες για την TAG-1/CNTN2 έχουμε μειωμένη μυελίνωση στους άξονες SST+ σε σύγκριση με τους αντίστοιχους μύες αγρίου τύπου. Αντίθετα, οι διάμεσοι νευρώνες PV+, δεν παρουσιάζουν κάποια αλλαγή στα ποσοστά μυελίνωσής τους. Μέσα από την παρούσα μελέτη, θέλουμε να ελέγξουμε αναλυτικότερα την πηγή αυτής της μείωσης της μυελίνης, γι' αυτό καλούμαστε να αναλύσουμε το μήκος και τον αριθμό των μεσοκομβικών περιοχών (internodes, τμήμα μυελίνης ανάμεσα σε δύο διαδοχικούς κόμβους του Ranvier). Για την πειραματική μας διαδικασία χρησιμοποιήσαμε τη διαγονιδιακή σειρά που διαθέτουμε, την Tag-1 flox, την οποία διασταυρώσαμε με τη διαγονιδιακή σειρά Sst cre, για τη στοχευμένη απαλοιφή της TAG-1/CNTN2 από τους διάμεσους νευρώνες σωματοστατίνης. Στους μύες

εκείνης της διαγονιδιακής σειράς (*Sst cre;Tag-1 flox*), ανακαλύψαμε μια στατιστικά σημαντική μείωση στο μήκος των μεσοκομβικών περιοχών των διάμεσων νευρώνων σωματοστατίνης, ενώ ο αριθμός τους παρέμεινε απaráλλακτος.

Abstract

Interneurons constitute one of the two main neuronal populations in the brain. They provide inhibition within the neural networks they participate in, and any disruption of this inhibition leads to hyperexcitability, neurotoxicity, and consequently, the development of neurological disorders. Both excitatory neurons (the second neuronal population) and certain interneurons—specifically, parvalbumin-positive (PV+) and somatostatin-positive (SST+) interneurons—have myelinated axons. Myelin is the lipid-rich extension of the plasma membrane of oligodendrocytes in the central nervous system (CNS) and Schwann cells in the peripheral nervous system (PNS), which surrounds axons. It is responsible for the saltatory conduction of nerve impulses and provides metabolic support. Additionally, in interneurons, myelin plays a role in regulating their intrinsic electrophysiological properties. Myelin on the axon is organized into specific regions: the paranodal and juxtaparanodal regions, which maintain a conserved molecular organization. These regions contain cell adhesion molecules (CAMs) that contribute to their strict structural arrangement. One such molecule is the axonal protein TAG-1/CNTN2, which interacts *in cis* with Caspr2 and *in trans* with glial TAG-1/CNTN2, aiding in the anchoring of potassium channels (K⁺) in the juxtaparanodal regions. TAG-1/CNTN2 also participates in other developmental processes, such as neurite extension and axon outgrowth. Currently, we aim to analyze the role of TAG-1/CNTN2 in the myelination and function of hippocampal interneurons. Recent experiments we conducted revealed that in TAG-1/CNTN2-deficient mice, there is reduced myelination in SST+ axons compared to wild-type mice. In contrast, PV+ interneurons do not exhibit any changes in their myelination levels. Through this study, we aim to further investigate the cause of this myelin reduction by analyzing the length and number of internodes (the myelinated segments between two consecutive nodes of Ranvier). For our experimental approach, we used the transgenic line *Tag-1 flox*, which we crossed with the transgenic line *Sst cre* to achieve targeted deletion of TAG-1/CNTN2 from somatostatin-expressing

interneurons. On the mice of that transgenic line (Sst cre;Tag-1 flox), we discovered a statistically significant reduction in the length of internodes of somatostatin interneurons, while their number remained unchanged.

Περιεχόμενο

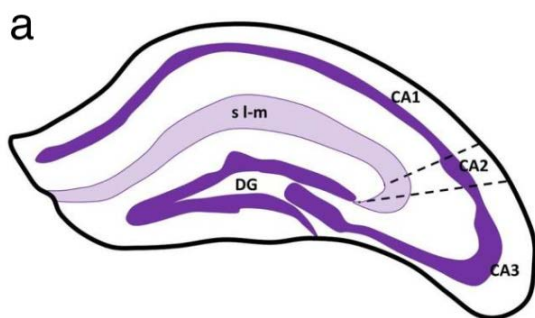
1. Εισαγωγή.....	9
1.1 Ιπποκάμπος	9
1.1.1 Δομή Ιπποκάμπου	9
1.1.2 Λειτουργία Ιπποκάμπου	10
1.2 Νευρώνες Ιπποκάμπου	11
1.2.1 Διάμεσοι Νευρώνες Σωματοστατίνης	14
1.3 Μυελίνη – Δομή και Ρόλος	16
1.3.1 Οργάνωση Μυελίνης	19
1.3.2 Μυελίνωση Διάμεσων Νευρώνων.....	22
1.4 Πρωτεΐνη TAG-1/CNTN2	24
2. Υπόθεση Μελέτης	26
3. Υλικά και Μέθοδοι	28
3.1 Μύες	28
3.1.1 Περίθαλψη Μυών	28
3.1.2 Διαγονιδιακή Σειρά Μυών	28
3.2 Γονοτύπηση Μυών	30
3.2.1 Εξαγωγή γονιδιωματικού DNA	30
3.2.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	30
3.2.3 Ηλεκτροφόρηση.....	35
3.3 Στερεοτακτική έγχυση	37
3.4 Αφαίμαξη μυών	41
3.5 Vibratome	42
3.6 Ανοσοϊστοχημεία	43
3.7 Ανάλυση.....	45
4. Αποτελέσματα	46
5. Συζήτηση.....	50
6. Βιβλιογραφία.....	52

1. Εισαγωγή

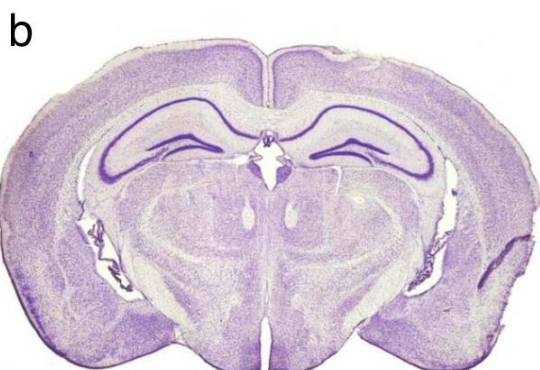
1.1 Ιππόκαμπος

1.1.1 Δομή Ιπποκάμπου

Ο ιππόκαμπος είναι μια δομή του εγκεφάλου που εντοπίζεται στον κροταφικό λοβό και απέκτησε την ονομασία του λόγω της ομοιότητας που φέρει το σχήμα του με το ομώνυμο θαλάσσιο είδος. Αποτελείται από τις εξής δύο περιοχές: το Αμμώνιο κέρασ (Cornu ammonis) και την Οδοντωτή έλικα (Dentate Gyrus, DG) οι οποίες μαζί με το Υπόθεμα (Subiculum) συνιστούν τον σχηματισμό του ιπποκάμπου (Hippocampal Formation, HPF). Το Cornu ammonis αποτελείται από τέσσερα διακριτά πεδία τα CA1, CA2, CA3 και CA4 με το CA1 να συνορεύει με το υπόθεμα και το CA4 να αποτελείται από μία ομάδα μεγάλων κυττάρων, που εντοπίζονται στην είσοδο της οδοντωτής έλικας. Κάθε ένα από τα παραπάνω πεδία οργανώνεται σε διακριτές στιβάδες: τη σκάφη (*stratum alveus*), τη στιβάδα πολυμορφικών κυττάρων (*stratum oriens*, SO), τη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων -που είναι η πιο ευδιάκριτη δομή του αμμωνίου κέρατος- *stratum pyramidale* (SP), τη διαφανή στιβάδα (*stratum lucidum*, SLu), την ακτινωτή στιβάδα *stratum radiatum* (SR), και τη βοθριώδη-μοριακή στιβάδα (*stratum lacunosum moleculare*, SLM) (Εικόνα 1) (Knierim, 2015).



Εικόνα 1: (a) Σχηματική αναπαράσταση περιοχών CA1, CA2, CA3, DG και stratum lacunosum-moleculare ιπποκάμπου μυός, (b) Απεικόνιση δομής ιπποκάμπου σε στεφανιαία τομή εγκεφάλου μυός (Πηγή: Pépin et al., 2017)



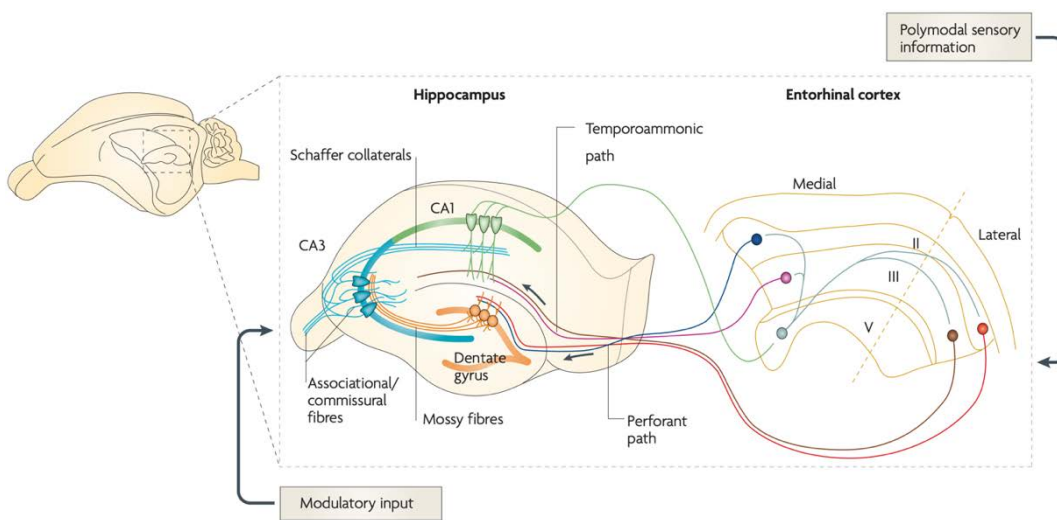
1.1.2 Λειτουργία Ιπποκάμπου

Ο ιππόκαμπος μελετήθηκε εκτενώς ύστερα από τη συσχέτισή του με τη δημιουργία μνήμης, τη μάθηση και τη χωρική πλοήγηση. Κατέχει σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση εμπειριών στη μνήμη, συμπεριλαμβάνοντας τα αισθητηριακά, συναισθηματικά και γνωστικά τμήματά τους, και επιτρέποντας τη μεταγενέστερη ανάκλησή τους συνειδητά από τον οργανισμό μέσω της έκδηλης μνήμης. (Knieirim, 2015; Squire et al., 2004). Παράλληλα, έχει διαπιστωθεί ο ρόλος του ιπποκάμπου στην επεισοδιακή μνήμη, δηλαδή την χρονική οργάνωση διαδοχικών συμβάντων μιας εμπειρίας (Kraus et al., 2013). Συγχρόνως, ο ιππόκαμπος παρουσιάζει και μια επιπλέον πλευρά, συμβάλλοντας στην ρύθμιση των συναισθημάτων και του στρες. Η διασταύρωση των παραπάνω ευρημάτων ενδέχεται να οδηγεί στο συμπέρασμα πως η δυσλειτουργία του δύναται να οδηγεί τόσο σε αμνησία όσο και σε ψυχικές διαταραχές, όπως η κατάθλιψη (Fanselow & Dong, 2010).

Τρισυναπτικό μονοπάτι

Το τρισυναπτικό μονοπάτι (Trisynaptic Pathway) είναι ο καλύτερα μελετημένος μηχανισμός επεξεργασίας πληροφοριών και δημιουργίας μνήμης του ιπποκάμπου. Περιλαμβάνει τρεις βασικούς πληθυσμούς κυττάρων του ιπποκάμπου: τα κοκκώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας (granule cells), τα πυραμιδικά κύτταρα της περιοχής 1 του αμμώνιου κέρατος και αυτά της περιοχής 3 του αμμώνιου κέρατος (CA1 και CA3). Πιο συγκεκριμένα, το τρισυναπτικό μονοπάτι αποτελείται από τη διαπιτραίνουσα οδό (perforant path) κατά την οποία σήματα μεταφέρονται από τον ενδορρινικό φλοιό (layer II), ο οποίος δέχεται αισθητηριακές και χωρικές πληροφορίες, ενώ συμβάλλει ταυτόχρονα και στην αίσθηση του χρόνου, στα κοκκώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας (DG) (1^η Σύναψη). Στη συνέχεια οι άξονες των κοκκιωδών κυττάρων προβάλλουν στους δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων της περιοχής CA3, μονοπάτι γνωστό και ως μονοπάτι βρυωδών ινών (mossy fiber pathway) (2^η Σύναψη). Έπειτα, οι άξονες των πυραμιδικών κυττάρων της CA3 περιοχής προβάλλουν στους δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων της CA1 περιοχής, συνδεσιμότητα γνωστή και ως οδός παράπλευρων ινών Schaffer (Schaffer Collateral Pathway) (3^η Σύναψη). Τέλος, άξονες από τα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 προβάλλουν πίσω στον ενδορρινικό φλοιό ολοκληρώνοντας έτσι την μετακίνηση της πληροφορίας στο τρισυναπτικό μονοπάτι.

Επομένως, το τρισυναπτικό μονοπάτι συνοψίζεται και ως εξής: EC → DG → CA3 → CA1 → EC (Εικόνα 2) (Knierim et al., 2015).



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση του τρισυναπτικού μονοπατιού (Πηγή: Neves et al., 2008)

1.2 Νευρώνες Ιπποκάμπου

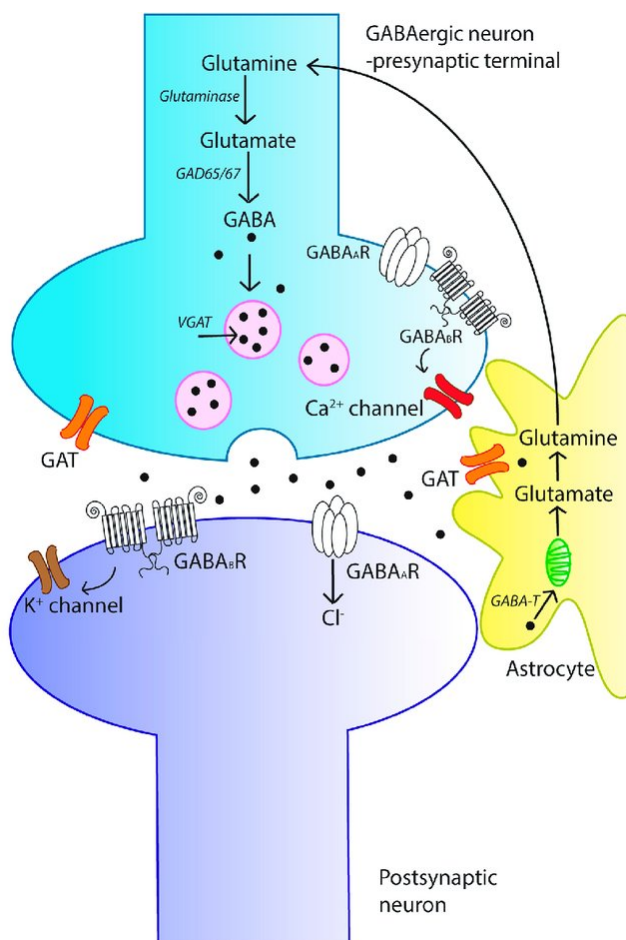
Η πολυσύνθετη επικοινωνία μεταξύ νευρώνων προσδίδουν στο νευρικό σύστημα την ικανότητα να επεξεργάζεται και να μεταδίδει πληροφορίες. Υπάρχουν δύο βασικά είδη σήματος, τα διεγερτικά που προέρχονται από τους αντίστοιχους διεγερτικούς νευρώνες και τα ανασταλτικά που πηγάζουν από τους διάμεσους νευρώνες. Η ισορροπία ανάμεσα στην διέγερση και στην αναστολή είναι υπεύθυνη για την ομαλή λειτουργία του εγκεφάλου. Οποιαδήποτε διαταραχή της οδηγεί σε υπερδιέγερση και τοξικότητα. Ένας βασικός τρόπος επικοινωνίας μεταξύ δύο γειτονικών νευρώνων είναι η δημιουργία χημικής σύναψης. Οι συνάψεις είναι δομές στις οποίες γίνεται η απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών από ένα νευρώνα σε έναν άλλον, επιτρέποντας έτσι την μεταφορά χημικών σημάτων μεταξύ τους. Κατ' αυτόν τον τρόπο, παράγονται διεγερτικά ή ανασταλτικά δυναμικά και έτσι αντίστοιχα προάγεται ή καταστέλλεται η μεταγωγή σήματος (Purves et al., 2001).

Ο ιππόκαμπος περιλαμβάνει γλουταματεργικά (glutamatergic) κύτταρα, όπως τα πυραμιδικά και τα κοκκώδη, GABAεργικούς διάμεσους νευρώνες καθώς και γλοιακά κύτταρα. Τα διεγερτικά γλουταματεργικά κύτταρα (primary cells, PCs) είναι νευρώνες που απελευθερώνουν γλουταμινικό οξύ στις συνάψεις μέσω των προσυναπτικών τους άκρων, το οποίο συνιστά το βασικό διεγερτικό νευροδιαβιβαστή του νευρικού συστήματος. Τα πυραμιδικά και κοκκώδη κύτταρα σχηματίζουν την πυραμιδική

στιβάδα στο Αμμώνιο κέρας (*stratum pyramidale*) και την κοκκώδη στην Οδοντωτή έλικα (*stratum granulare*) αντίστοιχα. Στο Αμμώνιο κέρας, οι κορυφαίοι δένδριτες των πυραμιδικών κυττάρων εκτείνονται προς τα στρώματα *stratum radiatum* (SR) και *stratum lacunosum moleculare* (SLM), ενώ οι άξονες μαζί με τους βασικούς τους δένδριτες κατευθύνονται προς τη σκάφη (*alveus*), η οποία βρίσκεται άνωθεν της στιβάδας πολυμορφικών κυττάρων (*stratum oriens*) (Schröder et al., 2020).

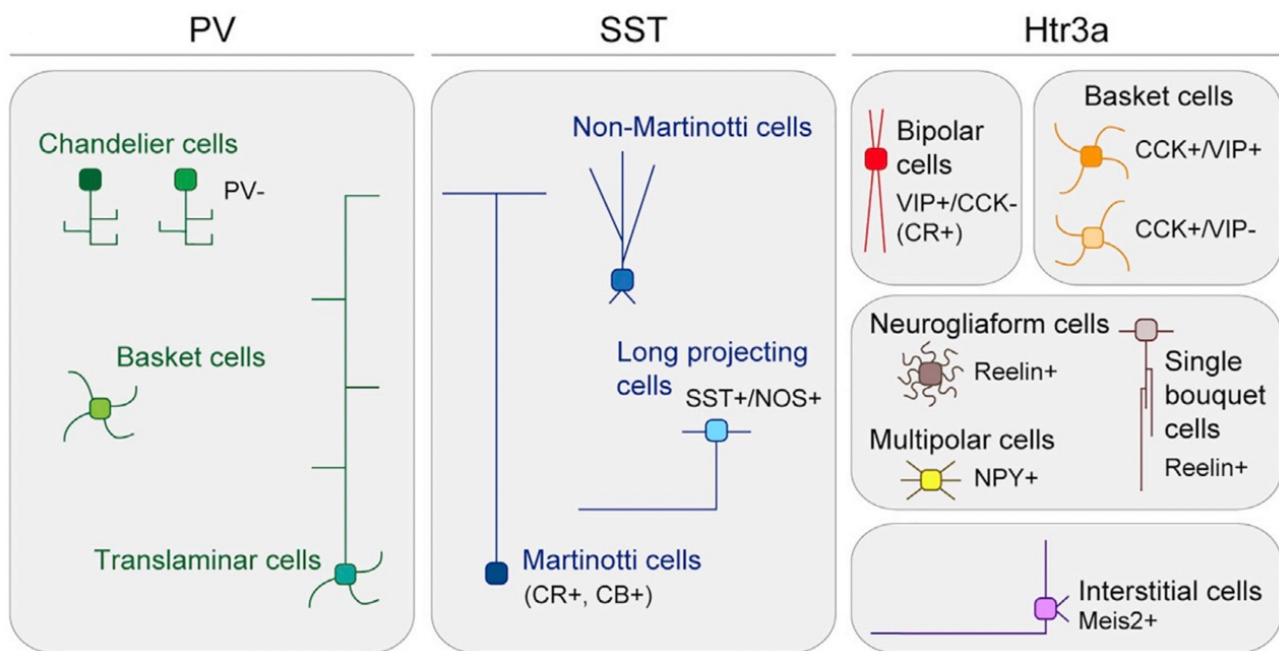
Ανασταλτικοί διάμεσοι νευρώνες

Οι ανασταλτικοί διάμεσοι νευρώνες (GABAεργικοί) συνιστούν το 10-15% του συνολικού πληθυσμού νευρικών κυττάρων, αλλά παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια και είναι καθοριστικοί στη ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ της διέγερσης και της αναστολής (Markram et al., 2004). Το γ-αμινοβουτιρικό οξύ (GABA) που απελευθερώνουν προσδένεται στους υποδοχείς GABAA και GABAB των νευρώνων στόχων, προκαλώντας την εισροή ιόντων χλωρίου (Cl^-) ή την εκροή ιόντων καλίου (K^+). Έτσι, υπερπολώνεται η κυτταρική μεμβράνη απομακρύνοντάς την από την ουδό και αποτρέποντας την παραγωγή δυναμικού ενέργειας (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση του μεταγωγικού μονοπατιού GABA (Πηγή: Govindpani et al., 2017)

Οι ανασταλτικοί διάμεσοι νευρώνες διαχωρίζονται βάσει της έκφρασης βιοχημικών δεικτών, της προέλευσής τους, της μορφολογίας τους και των μοτίβων πυροδότησης, με τον πρώτο τρόπο να είναι ο πιο ευρέως αποδεκτός. Ενδεικτικά, εντοπίζονται οι PV-διάμεσοι νευρώνες που εκφράζουν την παρβαλβουμίνη, οι SST-διάμεσοι νευρώνες που εκφράζουν τη σωματοστατίνη, οι διάμεσοι νευρώνες που εκφράζουν τον υποδοχέα σεροτονίνης 5HT3 στους οποίους ανήκουν οι CCK-διάμεσοι νευρώνες (που εκφράζουν την Χοληκυστοκινίνη), καθώς και εκείνοι που εκφράζουν το αγγειοδραστικό εντερικό πολυπεπίδιο (VIP) (Εικόνα 4). Ο διαχωρισμός τους βάσει προέλευσης περιλαμβάνει τους διάμεσους νευρώνες που προέρχονται από την έσω γαγγλιακή περιοχή (medial ganglionic eminence, MGE), την ουραία γαγγλιακή περιοχή (caudal ganglionic eminence, CGE) ή την προοπτική περιοχή (preoptic area, POA) (Pelkey et al., 2017).



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση των διάφορων τύπων ανασταλτικών διάμεσων νευρώνων (Πηγή: Lim et al., 2018)

Η σημασία της εύρυθμης λειτουργίας των διάμεσων νευρώνων αντικατοπτρίζεται και από τα αποτελέσματα που προκαλούνται στον εγκέφαλο όταν αυτοί δυσλειτουργούν. Ανεπάρκειες στην ανάπτυξη και την ικανότητα των διάμεσων νευρώνων να ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ διέγερσης και αναστολής στο νευρικό σύστημα, έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση πολυάριθμων ψυχιατρικών διαταραχών, όπως η σχιζοφρένεια και ο αυτισμός. Παράλληλα, πολλαπλά γονίδια που συσχετίζονται

με επιληψίες αποδείχθηκε πως λειτουργούν ως ρυθμιστικά στοιχεία της ανάπτυξης και της λειτουργίας των διάμεσων νευρώνων (Marín, 2012).

1.2.1 Διάμεσοι Νευρώνες Σωματοστατίνης

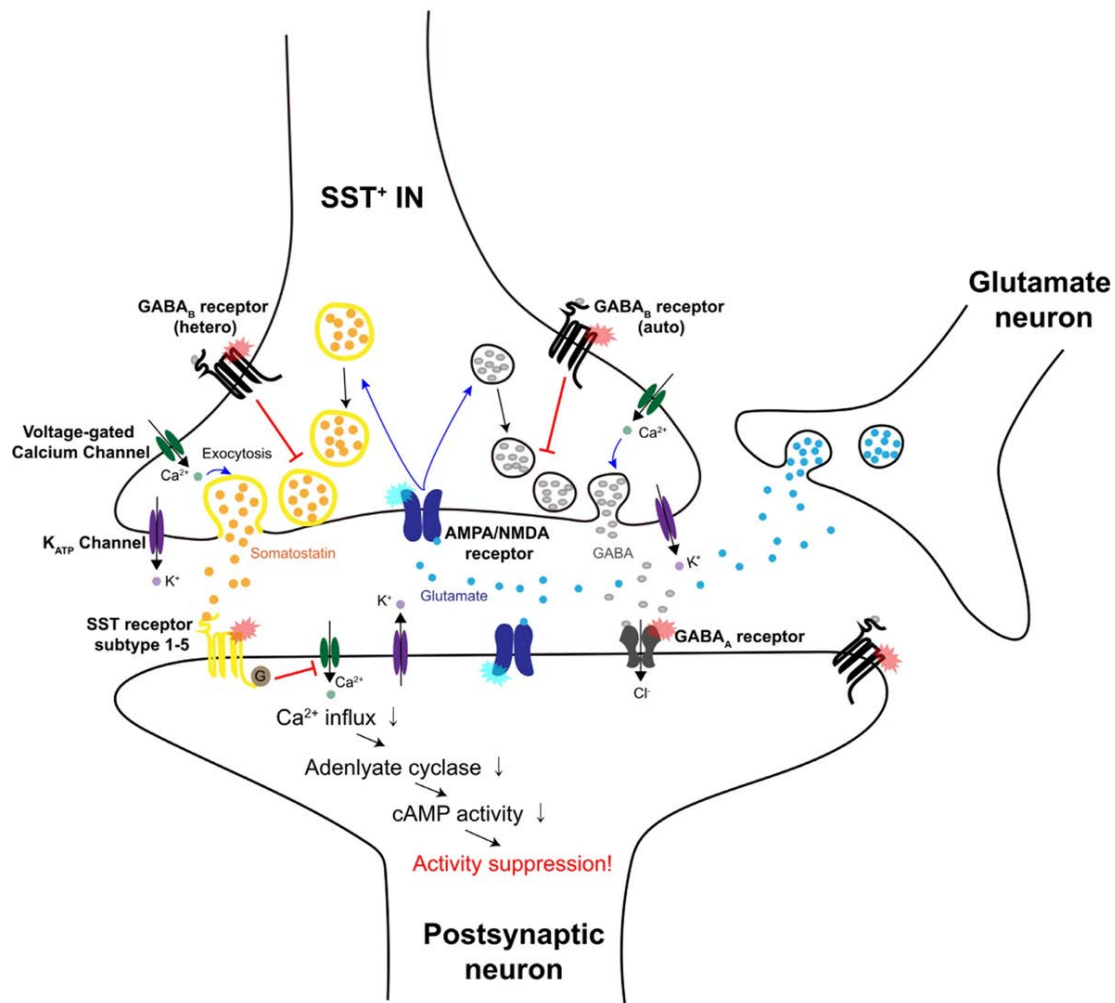
Σωματοστατίνη

Η σωματοστατίνη (SST) είναι ένα πεπτίδιο-ορμόνη με πολλαπλές λειτουργίες που παράγεται από νευρώνες αλλά και από άλλα κύτταρα του οργανισμού, όπως ενδοκρινικά κύτταρα του εγκεφάλου και κύτταρα του γαστρεντερικού συστήματος. Πρόκειται για σηματοδοτικό μόριο που λειτουργεί ως ανασταλτικός ρυθμιστής διάφορων κυτταρικών διαδικασιών συμπεριλαμβάνοντας την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και τη νευρορύθμιση. Στο νευρικό σύστημα δρα ως νευροδιαβιβαστής και συμβάλλει στην αποτελεσματικότητα της συναπτικής διαβίβασης και στη ρύθμιση των λειτουργιών νευρικών κυττάρων. Αρχικά, παράγεται μια πρόδρομη μορφή της σωματοστατίνης, μήκους 116 αμινοξέων, και υπόκειται σε επεξεργασία προς την ενεργή της μορφή. Η σωματοστατίνη εκφράζεται έντονα στον ιππόκαμπο, τον φλοιό, την αμυγδαλή και άλλες περιοχές του εγκεφάλου. Στα μέσα της δεκαετίας του 1980, διαπιστώθηκε πως είναι παρούσα σε μια υποκατηγορία των GABAεργικών νευρώνων, ενώ σήμερα είναι γνωστό πως αποτελεί δείκτη της δεύτερης μεγαλύτερης ομάδας GABAεργικών διάμεσων νευρώνων (Liguz-Leczna et al., 2022).

Διάμεσοι νευρώνες σωματοστατίνης - Λειτουργία

Οι διάμεσοι νευρώνες σωματοστατίνης (SST-διάμεσοι νευρώνες) είναι GABAεργικοί διάμεσοι νευρώνες που προέρχονται από την έσω γαγγλιακή περιοχή (MGE) και διαθέτουν κυστίδια που περιέχουν σωματοστατίνη. Η σωματοστατίνη έχει ανασταλτικό ρόλο στον ιππόκαμπο αλλά η λειτουργία της εξαρτάται από την περιοχή του εγκεφάλου, τη συγκέντρωσή της και την κατανομή των υποδοχέων της (Honoré et al., 2021; Pittman & Siggins, 1981). Οι SST-διάμεσοι νευρώνες, με το κύτταρο Martinotti να είναι η κύρια μορφή τους, αναστέλλουν τους δενδρίτες πυραμιδικών κυττάρων στο φλοιό απελευθερώνοντας GABA συνοδευόμενο συχνά από σωματοστατίνη (Honoré et al., 2021; Liguz-Leczna et al., 2022). Η λειτουργία των SST-διάμεσων νευρώνων συνοψίζεται ως εξής: αρχικά απελευθερώνεται γλουταμικό από ένα PC κύτταρο και προσδένεται σε AMPA/NMDA υποδοχέα του SST- διάμεσου νευρώνα. Η ενεργοποίηση του AMPA/NMDA υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα την

απελευθέρωση στη συναπτική σχισμή κυστιδίων που περιέχουν GABA και κυστιδίων που περιέχουν σωματοστατίνη. Η σωματοστατίνη προσδένεται σε υποδοχείς της οι οποίοι κλείνουν κανάλια ασβεστίου στο μετασυναπτικό νευρώνα, ενώ παράλληλα, το GABA προσδένεται σε υποδοχείς της οδηγώντας στην εισροή Cl^- . Μέσω αυτού του μηχανισμού επιτυγχάνουν την καταστολή του μετασυναπτικού νευρώνα (Εικόνα 5) (Song et al., 2021).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού διέγερσης και λειτουργίας ενός SST-διάμεσου νευρώνα (Πηγή: Song et al., 2021)

Τα oriens-lacunosum moleculare κύτταρα (OLM) είναι οι καλύτερα μελετημένοι SST⁺ διάμεσοι νευρώνες του ιπποκάμπτου, εντοπίζονται στις περιοχές CA1 και CA3 και κατέχουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της μνήμης στη CA1 (Mikulovic et al., 2015). Τα κυτταρικά σώματα των OLM κυττάρων βρίσκονται στη στιβάδα πολυμορφικών κυττάρων (*stratum oriens*) όπου δενδρίτες εκτείνονται παράλληλα στη σκάφη (*alveus*) και διεγείρονται κυρίως από τοπικά PCs (γλουταματεργικά κύτταρα). Ωστόσο, απαντούν στην διέγερση μέσω των αξόνων τους που εκτείνονται στην

βοθριώδη-μοριακή στιβάδα (*stratum lacunosum moleculare*) αναστέλλοντας δενδρίτες των PCs της CA1 (Honoré et al., 2021).

Διάμεσοι νευρώνες σωματοστατίνης – Σημασία

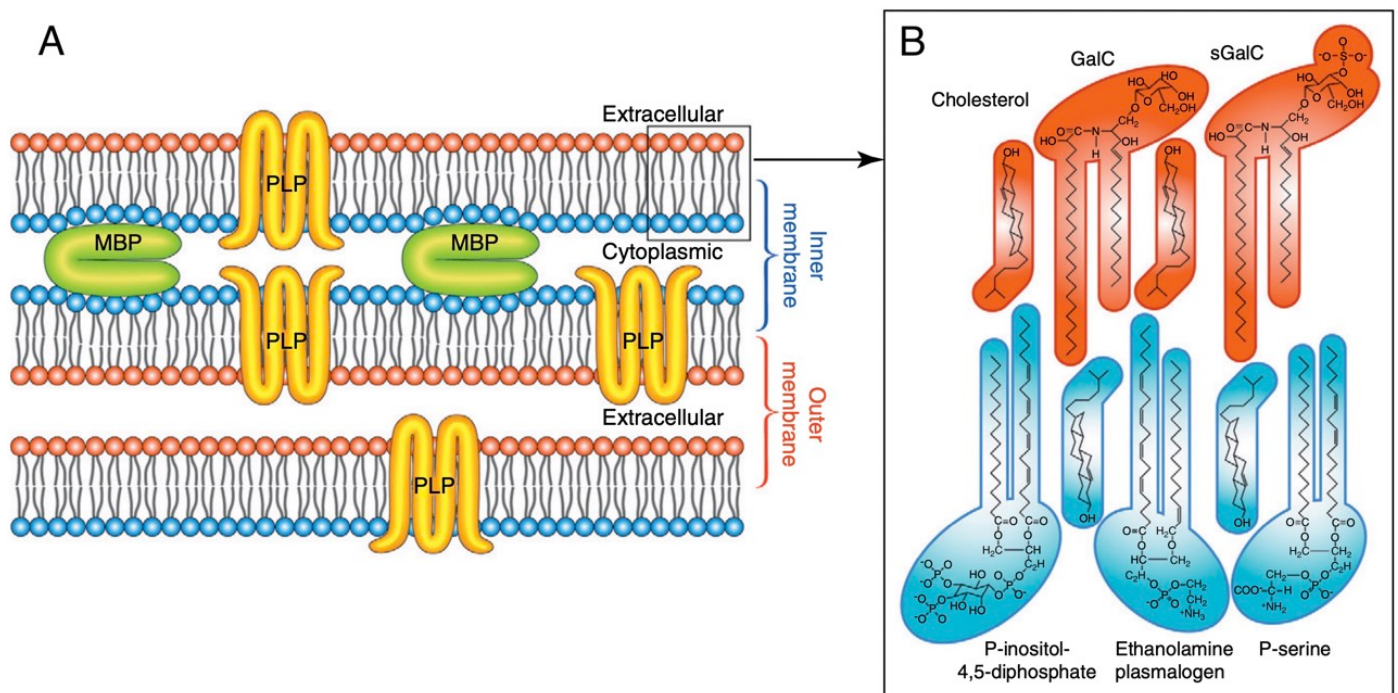
Διαπιστώθηκε πως η καταστολή δενδριτών που πραγματοποιούν οι SST-διάμεσοι νευρώνες είναι απαραίτητη για τη δημιουργία μνήμης εξαρτημένου φόβου (contextual fear). Εξαρτημένος φόβος ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο ένα μέχρι πρότινος ουδέτερο ερέθισμα, αποκτά την ικανότητα να προκαλεί κάποια αντίδραση επειδή συσχετίζεται με ένα άλλο ερέθισμα που προκαλεί την αντίδραση αυτή. Κατά την εξαρτημένη μάθηση, οι SST-διάμεσοι νευρώνες ενεργοποιούνται από το αποτρεπτικό ερέθισμα και καταστέλλουν τους δενδρίτες των PCs επιτρέποντας έτσι την μάθηση φόβου (Lovett- Barron et al., 2014).

Παράλληλα, μεταβολές στο σωματοστατινεργικό σύστημα που οδηγούν σε ανεπάρκεια της λειτουργίας τους και κατεξοχήν σε ανισορροπία μεταξύ διέγερσης και αναστολής, μπορούν να οδηγήσουν σε μειωμένη πλαστικότητα (Liguz-Leczna et al., 2022). Η μειωμένη πλαστικότητα οδηγεί σε δυσλειτουργία των συνάψεων και τελικά σε παθολογικές νευροχημικές και νευροφυσιολογικές διαδικασίες που οδηγούν σε ασθένειες. Έτσι, η μείωση της έκφρασης της σωματοστατίνης ή η μείωση του αριθμού των SST-διάμεσων νευρώνων συνδέεται στενά με ασθένειες όπως το Alzheimer's, το Parkinson's, το Huntington's, τη Σχιζοφρένεια και την κατάθλιψη (Liguz-Leczna et al., 2022).

1.3 Μυελίνη – Δομή και Ρόλος

Το 1954, ο Rudolf Virchow επινόησε τον όρο «Myelin (Μυελίνη)» από την ελληνική λέξη «μυελός» για να περιγράψει την δομή που βρίσκεται σε τόση αφθονία στον εγκέφαλο. Σήμερα, είναι γνωστό πως η μυελίνη είναι μια κρίσιμη δομή του νευρικού συστήματος αποτελούμενη από 80% λιπίδια και 20% πρωτεΐνες (στην ξηρή μορφή της). Η λιπιδιακή σύστασή της αποτελείται κυρίως από χοληστερόλη, γλυκοσφιγγολιπίδια και φωσφολιπίδια, ενώ η πρωτεϊνική της σύσταση αποτελείται κυρίως από τη βασική πρωτεΐνη μυελίνης (MBP) και τη πρωτεολιπιδική πρωτεΐνη μυελίνης (PLP). Η MBP λαμβάνει την διαμόρφωσή της μόνο όταν έρθει σε επαφή με μεμβράνη, όπου η αλληλεπίδραση στηρίζεται σε ηλεκτροστατικούς δεσμούς με τα

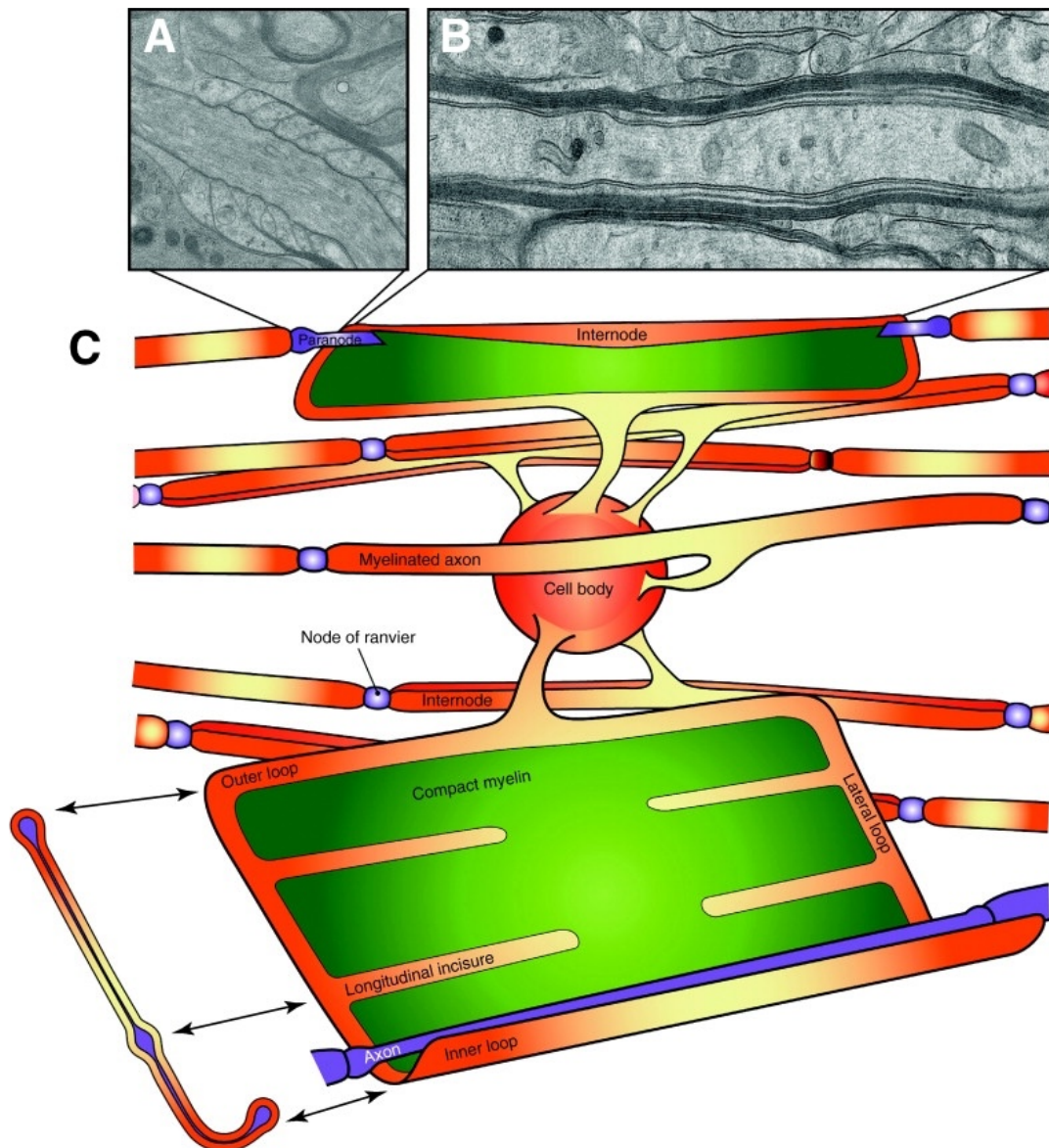
λιπίδια, ενώ η PLP αλληλεπιδρά με υδροφιλικούς δεσμούς (Εικόνα 6) (Stadelmann et al., 2019). Η εξέλιξη των πολύπλοκων νευρικών συστημάτων των σπονδυλωτών έχει αποδοθεί στην -και ίσως εξαρτάται απ' την- απόκτηση των στρωμάτων μυελίνης (Sherman & Brophy, 2005). Η μυελίνωση στον εγκέφαλο μύων πραγματοποιείται κυρίως από την postnatal day 10 (p10) έως την postnatal day 60 (p60), με το μέγιστο να είναι 2-4 εβδομάδες μετά την γέννηση (Cristobal & Lee, 2022).



Εικόνα 6: (Α) Σχηματική αναπαράσταση της δομής των στιβάδων μυελίνης και των βασικών της πρωτεϊνών. (Β) Σχηματική αναπαράσταση επιλεγμένων κύριων ομάδων λιπιδίων που συνιστούν την μυελίνη (Πηγή: Aggarwal et al., 2011)

Η μυελίνη οργανώνεται σε πολλαπλά στρώματα και προέρχεται από την επέκταση της κυτταρικής μεμβράνης των ολιγοδενδροκυττάρων στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) και των κυττάρων Schwann στο Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ). Οι μεμβρανικές αυτές προεκτάσεις τυλίγονται γύρω από άξονες νευρικών κυττάρων πολλαπλές φορές σχηματίζοντας τη μυελίνη, η οποία συμπυκνώνεται από πρωτεΐνες όπως η MBP και η PLP. Κάθε ολιγοδενδροκύτταρο δύναται να δημιουργήσει έως και 80 στρώματα μυελίνης σε πολλαπλούς άξονες (Εικόνα 7). Η μυελίνη λειτουργεί ως μονωτής προκειμένου ο μηχανισμός διάδοσης των δυναμικών ενέργειας να συγκεντρώνεται αποκλειστικά σε τακτικά, διακεκομμένα σημεία του άξονα που δεν καλύπτονται από μυελίνη. Με αυτόν τον τρόπο, η εκπόλωση κατά το δυναμικό ενέργειας μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο στα σημεία αυτά που δεν καλύπτονται

από μυελίνη, επιτυγχάνοντας ταχύτατη αγωγιμότητα (Sherman & Brophy, 2005) με ταυτόχρονη δραματική μείωση του μεταβολικού κόστους. Ένας επιπλέον ρόλος της μυελίνης είναι να λειτουργεί ως οδός για την προσφορά μεταβολικής αρωγής από τα ολιγοδενδροκύτταρα στα νευρικά κύτταρα. Τα ολιγοδενδροκύτταρα έχουν τη δυνατότητα να εισάγουν πυροσταφυλικό οξύ στους νευρώνες που μυελινώνουν, το οποίο χρησιμοποιείται μετέπειτα για την παραγωγή ενέργειας υπό τη μορφή ATP (Stadelmann et al., 2019).



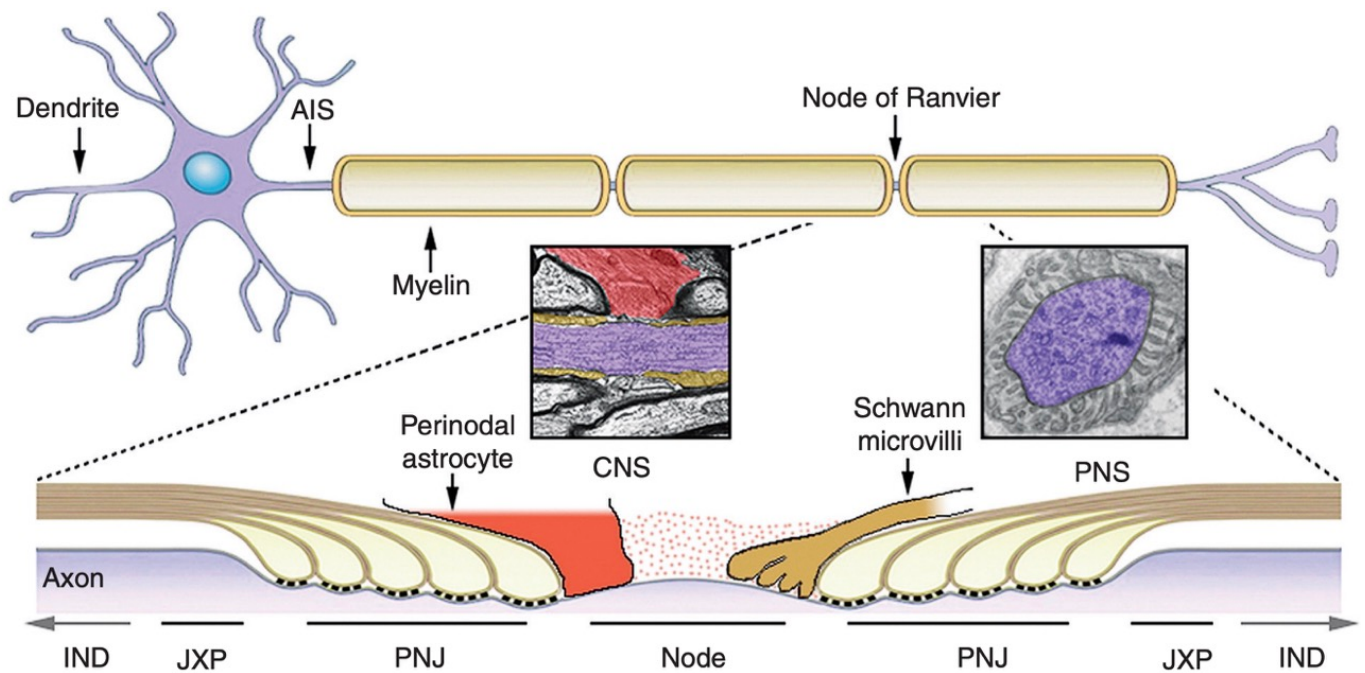
Εικόνα 7: (Α) Φωτογραφία κόμβου Ranvier από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. (Β) Φωτογραφία μεσοκομβικής περιοχής από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. (C) Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού μυελίνωσης πολλαπλών αξόνων από ένα ολιγοδενδροκύτταρο (Πηγή: Aggarwal et al., 2011)

Η ταχύτητα διάδοσης δυναμικών ενέργειας συσχετίζεται άμεσα με την διαφορά σωματικού μεγέθους που παρατηρείται μεταξύ ασπόνδυλων και σπονδυλωτών. Τα ασπόνδυλα, τα οποία δεν διαθέτουν μυελίνη, επιτυγχάνουν διάδοση δυναμικών ενέργειας με ταχύτητες έως 1 m/s. Τα κεφαλόποδα (τα μεγαλύτερα ασπόνδυλα), καταφέρνουν να υποστηρίξουν το μέγεθος τους, βελτιώνοντας την ταχύτητα διάδοσης των δυναμικών ενέργειας αυξάνοντας τη διάμετρο των αξόνων τους. Τα σπονδυλωτά, εφόσον είναι αδύνατο να ακολουθήσουν παρόμοια τακτική λόγω του χωρικού περιορισμού του κρανίου, απέκτησαν τη μυελίνη με την οποία επιτυγχάνουν διάδοση δυναμικών ενέργειας με ταχύτητες 50-100 m/s (Zalc, 2006; Kalafatakis & Karagogeos, 2021).

Η σημασία της μυελίνης αντικατοπτρίζεται και από τις δυσλειτουργίες που προκαλεί στον εγκέφαλο η έλλειψή της από τους άξονες των νευρικών κυττάρων. Παθολογίες της μυελίνης σχετίζονται με πολλαπλές νευρογενετικές ασθένειες όπως οι λευκοδυστροφίες, οι κληρονομικές από-μυελινωτικές νευροπάθειες, η σκλήρυνση κατά πλάκας (MS), η γνωστική εξασθένηση σχετιζόμενη με την ηλικία (Harayama & Riezman, 2018; Bonetto et al., 2021; Podbielska et al., 2013), ο αυτισμός, η σχιζοφρένεια και η διπολική διαταραχή (Galvez-Contreras et., 2013; Valdés-Tovar et al., 2022).

1.3.1 Οργάνωση Μυελίνης

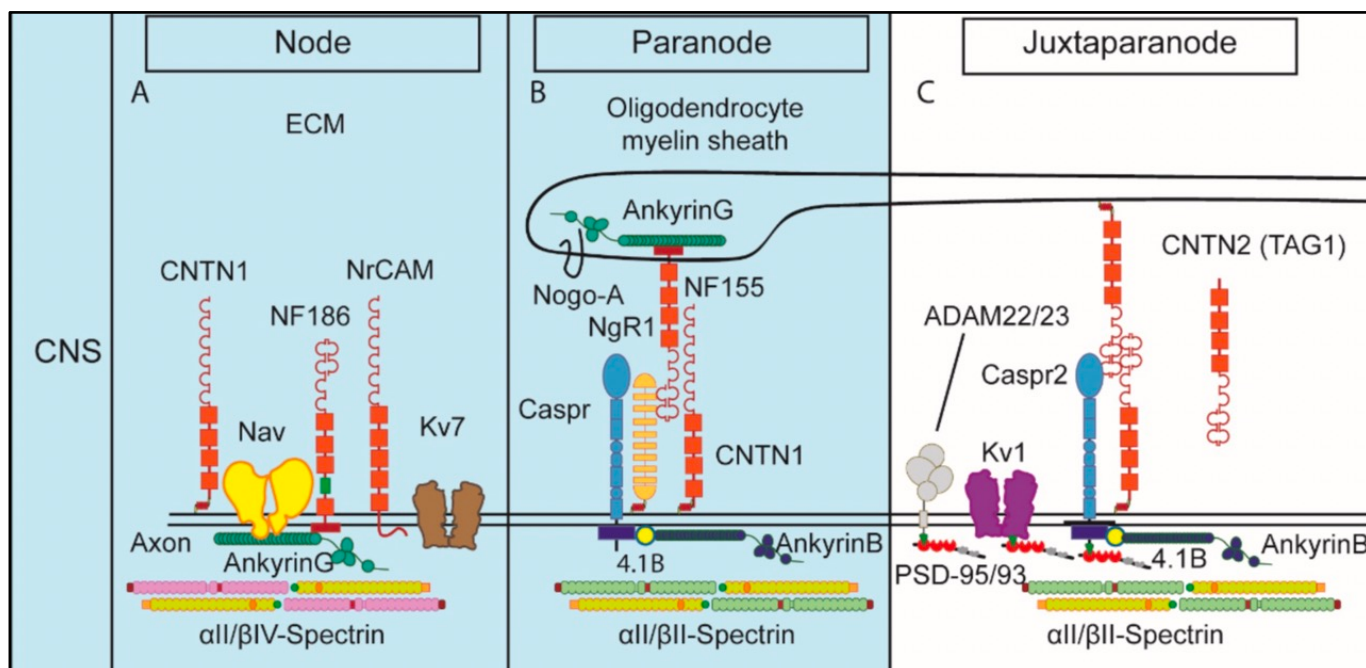
Σημαντικό χαρακτηριστικό της μυελίνης είναι η οργάνωσή της σε διακριτές περιοχές με ξεχωριστή μοριακή οργάνωση. Συγκεκριμένα, στην οργάνωση της μυελίνης παρατηρούνται οι κόμβοι του Ranvier, οι παρακομβικές περιοχές (paranodes), οι εγγύς παρακομβικές περιοχές (juxtaparanodes) καθώς και οι μεσοκομβικές περιοχές (internodes) (Εικόνα 8) (Rasband & Peles, 2016).



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση των περιοχών της μυελίνης. Παρατηρείται ο κόμβος Ranvier (Node), η παρακομβική περιοχή (PNJ), η εγγύς παρακομβική περιοχή (JXP) και η μεσοκομβική περιοχή (IND). (Πηγή: Rasband & Peles, 2016)

Κόμβοι του Ranvier

Τα στρώματα μυελίνης διακόπτονται από περιοχές όπου απουσιάζει η μυελίνη από τον άξονα, οι οποίες ονομάζονται κόμβοι του Ranvier. Οι κόμβοι του Ranvier εντοπίζονται τακτικά κατά μήκος του άξονα και είναι υπεύθυνοι για την διάδοση του δυναμικού ενέργειας. Διαθέτουν συσσωρευμένα τασο-ελεγχόμενα κανάλια Na^+ (Nav1.1/1.2/1.6/1.7/1.8) και τασο-ελεγχόμενα κανάλια K^+ (Kv7.2/7.3 και Kv3.1b). Ταυτόχρονα οι κόμβοι του Ranvier διαθέτουν την πρωτεΐνη ankyrinG (ankG) που αγκυροβολεί τα κανάλια στις πρωτεΐνες κυτταροσκελετού all-σπεκτρίνη (all-spectrin) και βIV-σπεκτρίνη (βIV-spectrin), βοηθώντας έτσι στη συγκέντρωση και σταθεροποίηση των προαναφερθέντων καναλιών στους κόμβους. Στην περιοχή του κόμβου, αξιοσημείωτα είναι τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (CAM): Nfasc186, NrCAM και Contactin-1 (CNTN1) που υποστηρίζεται πως επίσης συμβάλλουν στην σταθεροποίηση των καναλιών (Εικόνα 9) (Kalafatakis et al., 2021; Rasband & Peles, 2016).



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της μοριακής οργάνωσης ενός μυελινωμένου άξονα του ΚΝΣ (Πηγή: προσαρμοσμένη από Kalafatakis et al., 2021)

Παρακομβικές περιοχές (paranodes)

Οι παρακομβικές περιοχές πλαισιώνουν τον κόμβο του Ranvier, διαθέτουν τα μεγαλύτερα σύμπλοκα μορίων κυτταρικής προσκόλλησης των σπονδυλωτών, και εικάζεται πως είναι εκείνες που αποτρέπουν το δυναμικό ενέργειας από το να διαπεράσει στη μεσοκομβική περιοχή εμποδίζοντας τη διέλευση ιόντων από/προς τον άξονα (μόνωση). Παράλληλα, το σύμπλοκο που σχηματίζεται επιτυγχάνει τον διαχωρισμό των καναλιών Nav που βρίσκονται στον κόμβο του Ranvier, από τα κανάλια K^+ που βρίσκονται στις εγγύς παρακομβική περιοχή (Kalafatakis et al., 2021; Hivert et al., 2016). Το σύμπλοκο αποτελείται από την Contactin associated protein (Caspr) και την Contactin-1 (CNTN1) στην πλευρά του άξονα, το οποίο αλληλεπιδρά με την Nfasc155 στην μεριά της μυελίνης, προσφέροντας έτσι τον προαναφερθέντα διαχωρισμό. Το σύμπλοκο σταθεροποιείται στην περιοχή μέσω των πρωτεϊνών 4.1B και ankyrinB που το αγκυροβολούν στις πρωτεΐνες κυταροσκελετού α II-spectrin και β II-spectrin (Εικόνα 9). Η έλλειψη οποιασδήποτε από τις παραπάνω πρωτεΐνες προκαλεί έντονες διαταραχές στο νευρικό σύστημα (Kalafatakis et al., 2021). Η έλλειψη της CNTN1 παρατηρήθηκε πως οδηγεί σε μείωση της μυελίνωσης του ΚΝΣ, απομάκρυνση της Caspr και μετατόπιση της θέσης των καναλιών Kv1 που βρίσκονται στις εγγύς παρακομβικές περιοχές (Boyle et al., 2001).

Εγγύς παρακομβικές περιοχές (juxtaparanodes)

Οι εγγύς παρακομβικές περιοχές πλαισιώνουν τις παρακομβικές περιοχές και διαθέτουν συσσωρευμένα κανάλια K^+ (Kv1) που σταθεροποιούνται από τον σχηματισμό ενός συμπλόκου αποτελούμενο από την Contactin-2 (CNTN2), γνωστή και ως TAG-1, και την Caspr2. Ένα μόριο TAG-1 προσδεδεμένο στον άξονα, προσδέεται *in cis* με ένα μόριο Caspr2 και *in trans* με ένα μόριο TAG-1 προσδεδεμένο στο στρώμα μυελίνης, σχηματίζοντας έτσι το σύμπλοκο (Poliak et al., 2003; Traka et al., 2003). Εξίσου σημαντικό ρόλο στη συσσώρευση και σταθερότητα των καναλιών Kv1 έχει η παρουσία του υποδοχέα ADAM23, ο οποίος απαιτεί τους προσδέτες του (LGI2 και LGI3) προκειμένου να δράσει (Kozar-Gillan et al., 2023). Τα διάφορα μέρη της εγγύς παρακομβικής περιοχής σταθεροποιούνται στην περιοχή μέσω των πρωτεϊνών PSD93, PSD95, 4.1B και της ankyrinG που αγκυροβολούν το σύμπλοκο στις πρωτεΐνες κυτταροσκελετού α II-spectrin και β II-spectrin (Εικόνα 9) (Kalafatakis et al., 2021).

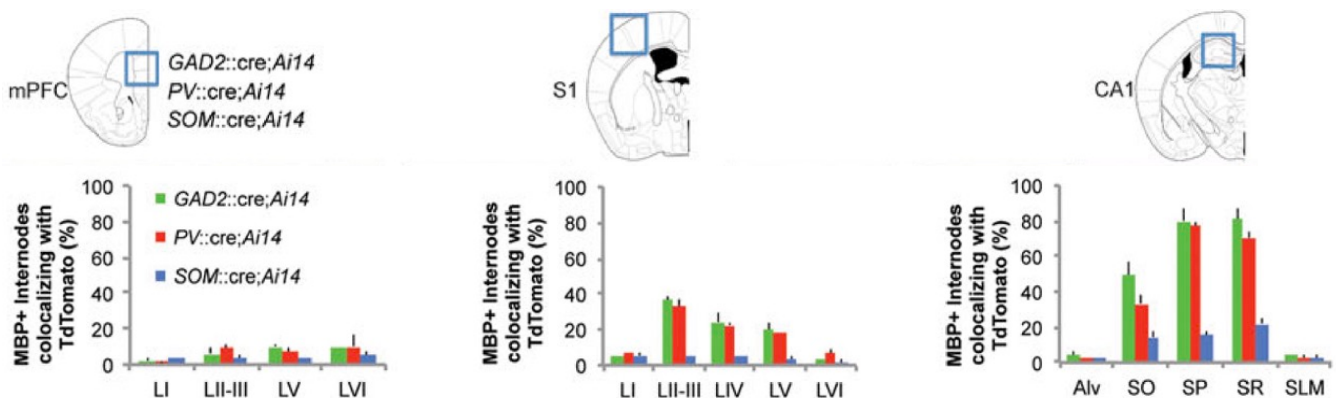
Μεσοκομβικές περιοχές (internodes)

Ως μεσοκομβικές περιοχές χαρακτηρίζονται τα τμήματα συμπαγούς μυελίνης που βρίσκονται μεταξύ δύο διαδοχικών κόμβων του Ranvier. Είναι οι μεγαλύτερες σε έκταση περιοχές μυελίνης και οργανώνονται από μόρια προσκόλλησης της οικογένειας των Nectin-like πρωτεϊνών (Nec1/SynCAM/Cadm). Οι πρωτεΐνες Nec1 διαθέτουν αλληλουχία class II PDZ που επιτρέπει την πρόσδεση τους στην πρωτεΐνη 4.1B και κατεχοχίνη τη σταθεροποίηση τους στον κυτταροσκελετό του άξονα. Στις μεσοκομβικές περιοχές εντοπίζονται επίσης και οι πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τη μυελίνη (MAG) που συμβάλλουν στην ρύθμιση της μυελίνωσης στο ΚΝΣ. (Djannatian et al., 2019; Kalafatakis et al., 2021)

1.3.2 Μυελίνωση Διάμεσων Νευρώνων

Πρόσφατα ανακαλύφθηκε πως, εκτός από τους άξονες των διεγερτικών νευρώνων, οι άξονες των GABAεργικών νευρώνων (κυρίως των PV-διάμεσων νευρώνων) είναι επίσης μυελινωμένοι σε σημαντικό βαθμό. Συγκεκριμένα, στον φλοιό, το 50% της συνολικής μυελίνης στα στρώματα 2/3 και το 25% στο στρώμα 4 περιβάλλει άξονες διάμεσων νευρώνων (Micheva et al., 2016). Παράλληλα, στον ιππόκαμπο

μύος και ανθρώπου το ποσοστό της μυελίνης που περικλείει διάμεσους νευρώνες αγγίζει το 80% της συνολικής μυελίνης στη *stratum pyramidale* και *stratum radiatum* της περιοχής CA1 (Stedehouder et al., 2017). Εξακριβώθηκε πως η συντριπτική πλειοψηφία των μυελινωμένων διαμέσων νευρώνων είναι PV-, και πως μόνο το 4,4% των SST-διαμέσων νευρώνων είναι μυελινωμένο. Ωστόσο, η οργάνωση της μυελίνης στους διάμεσους νευρώνες είναι αρκετά διαφορετική από αυτή των διεγερτικών νευρώνων: η μυελίνη των διαμέσων νευρώνων έχει 20% περισσότερη MBP αλλά παρόμοια σύσταση σε PLP, οι μεσοκομβικές περιοχές δεν παρουσιάζουν συνεχή κατανομή και είναι μικρότερες σε μήκος. Η μυελίνωση των διαμέσων νευρώνων διαφέρει από περιοχή σε περιοχή του εγκεφάλου, όπως μεταξύ του προμετωπιαίου φλοιού, του σωματοαισθητικού φλοιού και της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου (Εικόνα 10). Επίσης, οι μυελινωμένοι διάμεσοι νευρώνες διαθέτουν περισσότερα νευροϊνίδια (neurofillaments) απ' ότι μικροσωληνίσκους. Αυτές οι παρατηρήσεις ενδέχεται να παραπέμπουν σε μια διαφορετική λειτουργία της μυελίνης στους διάμεσους νευρώνες, καθώς η οργάνωση της δεν είναι ιδανική για την ταχεία μετάδοση δυναμικών ενέργειας όπως είναι στους διεγερτικούς νευρώνες. (Micheva et al., 2016; Stedehouder et al., 2017).



Εικόνα 10: Μυελίνωση διαμέσων νευρώνων σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου: mPFC (προμετωπιαίος φλοιός), S1 (σωματοαισθητικός φλοιός), CA1 (περιοχή CA1 του ιπποκάμπου (Πηγή: Stedehouder et al., 2017)

Στοχεύοντας στην κατανόηση της κατανομής των καναλιών Kv1 σε άξονες διαμέσων νευρώνων προτού μυελινωθούν, ανακαλύφθηκε πως οι PV- και οι SST- διάμεσοι νευρώνες εκφράζουν επιλεκτικά σε όλο το μήκος των μη μυελινωμένων αξόνων τους κανάλια Kv1, TAG-1, Caspr2, ADAM22 και την πρωτεΐνη 4.1B. Παράλληλα, οι διάφορες υποκατηγορίες διαμέσων νευρώνων εκφράζουν την TAG-1

σε διαφορετικές περιοχές του ιπποκάμπου, με τους SST-διάμεσους νευρώνες να την εκφράζουν στη stratum oriens της CA1, ενώ όλες οι κατηγορίες διάμεσων νευρώνων εκφράζουν TAG-1 στο αρχικό τμήμα του άξονα (axon initial segment, AIS) (Bonetto et al., 2019).

1.4 Πρωτεΐνη TAG-1/CNTN2

Η Contactin-2 ή αλλιώς TAG-1 (transient axonal glycoprotein-1) είναι μια πρωτεΐνη κυτταρικής προσκόλλησης που ανήκει στην ομάδα των Contactins, η οποία υπάγεται στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών (IgSF). Με μοριακό βάρος 135kDa, προσδένεται στην κυτταρική μεμβράνη μέσω άγκυρας γλυκοσυλοφωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (GPI) και εκφράζεται παροδικά σε υποσύνολα νευρικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος (Furley et al., 1990; Dodd et al., 1988). Η πρωτεΐνη έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη των αξόνων και τη μετανάστευση τους προς τη νευρική πλάκα του νωτιαίου μυελού κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, αλλά εντοπίζεται και μετά το πέρας της ανάπτυξης κατά τη μυελίνωση (Wolfer et al., 1994) στις εγγύς παρακομβικές περιοχές, προσδεμένη τόσο στην μεριά του άξονα όσο και στη μεριά του στρώματος της μυελίνης (Kalafatakis et al., 2021).

TAG-1 - Σημασία

Η TAG-1 κατέχει σημαντικό ρόλο στην οργάνωση της μυελίνης καθώς σταθεροποιεί τις εγγύς παρακομβικές περιοχές μέσω της αλληλεπίδρασης της με την πρωτεΐνη Caspr2 και τα τασο-ελεγχόμενα κανάλια K⁺. Η σημασία της υποδεικνύεται περαιτέρω από το γεγονός ότι είναι η μόνη πρωτεΐνη που εκφράζεται από τα ολιγοδενδροκύτταρα στο στρώμα της μυελίνης (Savvaki et al., 2010). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μια TAG-1 προσδεδεμένη στον άξονα, προσδένεται *in cis* με μια Caspr2 και *in trans* με μια TAG-1 προσδεδεμένη στο στρώμα μυελίνης, σχηματίζοντας έτσι το σύμπλοκο που σταθεροποιεί τα κανάλια Kv1 και τις εγγύς παρακομβικές περιοχές συνολικά.

Η σημασία της TAG-1 αντικατοπτρίζεται και από τις δυσλειτουργίες που προκαλεί η έλλειψη της στον εγκέφαλο. Μελετώντας τη σημασία της, σχεδιάστηκαν μύες ελλειμματικοί σε αυτήν (γονότυπος TAG-1^{-/-} / TAG-1 KO) προκειμένου να

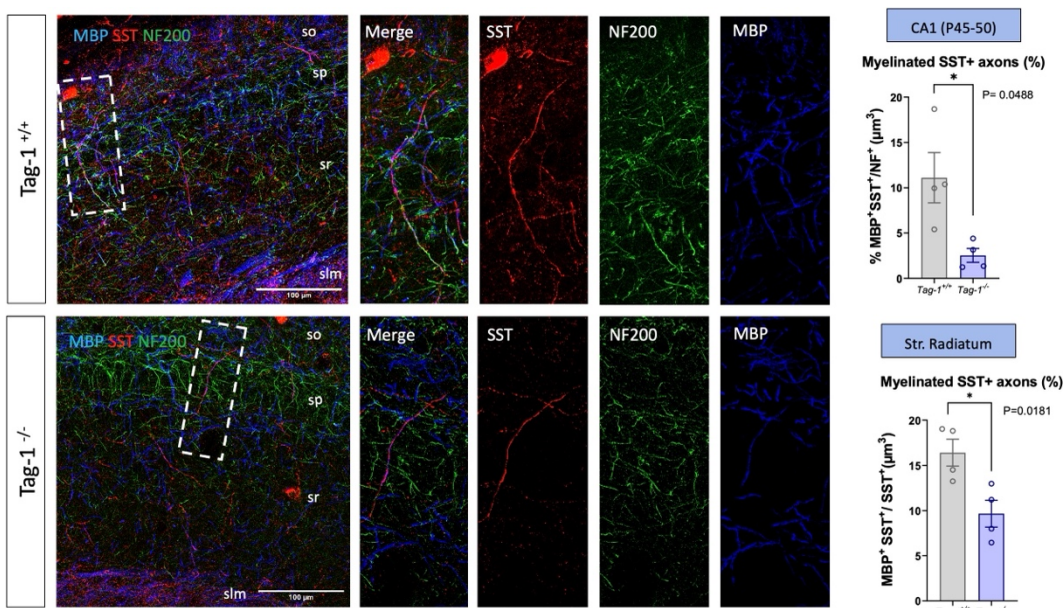
εξακριβωθεί ο ρόλος της στις εγγύς παρακομβικές περιοχές. Στους μύες TAG-1 KO παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στον εντοπισμό της Caspr2 και των τασο-ελεγχόμενων καναλιών K^+ , αναδεικνύοντας έτσι την σημασία της πρωτεΐνης στην σταθεροποίηση και τη λειτουργία των εγγύς παρακομβικών περιοχών στο ΚΝΣ και στο ΠΝΣ. Παράλληλα, εικάζεται πως τα ολιγοδενδροκύτταρα ενδέχεται να χρησιμοποιούν το σύμπλοκο αξονικής TAG-1, Caspr2 και γλοιακής TAG-1 ώστε να οργανώνουν τη συσσώρευση των καναλιών K^+ στην μεμβράνη του άξονα κάτω από το στρώμα μυελίνης στις εγγύς παρακομβικές περιοχές (Traka et al., 2003; Poliak et al., 2003). Αντιθέτως, διαπιστώθηκε πως τα τασο-ελεγχόμενα κανάλια Na^+ στους κόμβους το Ranvier έμειναν अपαράλλαχτα (Savvaki et al., 2008; Traka et al., 2003; Poliak et al., 2003) ενώ η πρωτεΐνη 4.1B με την οποία συνδέεται η Caspr2 δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την έλλειψη της TAG-1 στους TAG-1 KO μύες (Traka et al., 2003).

Η επίδραση της έλλειψης της TAG-1 μελετήθηκε και στο συμπεριφορικό επίπεδο όπου οι μύες TAG-1 KO επέδειξαν βλάβες στη μαθησιακή ικανότητα και στη μνήμη -παραπέμποντας στον ιππόκαμπο-, αυξημένο χρόνο ανταπόκρισης στον πόνο, καθώς και βλάβες στην κινητική δραστηριότητα και στον συγχρονισμό των άκρων κατά το βάδισμα (Savvaki et al., 2008).

Η TAG-1 σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα μέλη των συμπλόκων των εγγύς παρακομβικών περιοχών, έχουν εμπλακεί σε φλεγμονώδεις νευρολογικές νόσους σε μύες και στον άνθρωπο, ειδικά στη σκλήρυνση κατά πλάκας. Η σκλήρυνση κατά πλάκας (MS) είναι η συχνότερη ασθένεια αυτοάνοσης απομυελίνωσης κατά την οποία παρατηρείται απώλεια μυελίνης, παθολογία των αξόνων και νευρολογική δυσλειτουργία. Πολλαπλές μελέτες έχουν ανιχνεύσει την αποδιοργάνωση των εγγύς παρακομβικών περιοχών κατά την απομυελίνωση και την παραγωγή αυτο-αντισωμάτων που αναγνωρίζουν την TAG-1 και την Caspr2, υποδεικνύοντας πως τα T-λεμφοκύτταρα στοχοποιούν τις εγγύς παρακομβικές περιοχές (Kalafatakis et al., 2021). Αξιοσημείωτη είναι η αυξημένη ανίχνευση συστατικών φαιάς ουσίας, συμπεριλαμβανομένης της TAG-1, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF) των ασθενών με MS. Περαιτέρω δοκιμασίες οδήγησαν στην εικασία πως φλεγμονή που στοχεύει την TAG-1 των ενδοθηλιακών κυττάρων φαιάς ουσίας ενδέχεται να καθιστά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (BBB) διαπερατό σε αντισώματα που στοχεύουν τη μυελίνη. Επομένως, κατόπιν περισσότερης μελέτης, η TAG-1 θα μπορούσε να αποτελέσει δείκτη ασθένειας της φαιάς ουσίας στη σκλήρυνση κατά πλάκας (Rudick & Trapp, 2009).

2. Υπόθεση Μελέτης

Οι προηγούμενες μελέτες που αναφέρθηκαν καθιστούν σαφή τη σημασία της TAG-1 στην ανάπτυξη και την οργάνωση του ΚΝΣ και του ΠΝΣ (Furley et al., 1990; Wolfer et al., 1994; Traka et al., 2003; Poliak et al., 2003; Savvaki et al., 2010; Kalafatakis et al., 2021). Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση συμπεριφορικών και γνωστικών διαταραχών στους μύες ελλειμματικούς για την TAG-1 (Tag-1 KO) (Savvaki et al., 2008), καθώς και η πιθανή αξιοποίηση της ως βιοδείκτη για τη σκλήρυνση κατά πλάκας (MS) (Rudick & Trapp, 2009). Αφορμή για την παρούσα μελέτη είναι οι παρατηρήσεις προηγούμενης δοκιμασίας (preliminary data) στην οποία πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική χρώση σε τομές εγκεφάλου μυών Tag-1 KO και αντίστοιχων αγρίου τύπου (Tag-1 WT), όπου αποκαλύφθηκε σημαντική μείωση της μυελίνης στους άξονες των SST-διάμεσων νευρώνων, στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου με τη χρήση του λογισμικού IMARIS (Εικόνα 11), ενώ η μυελίνωση των διάμεσων νευρώνων παρβαλβουμίνης παρέμεινε σταθερή (data not shown).



Εικόνα 11: Preliminary data μυελίνωσης της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου. (Πηγή: Εργαστήριο Καραγωγέως)

Προκειμένου να εξακριβώσουμε την πηγή της μείωσης αυτής στο ποσοστό μυελίνης που καλύπτει τους SST+ άξονες, κληθήκαμε να απαντήσουμε τα κάτωθεν ερωτήματα: Οφείλεται η παρατηρούμενη μείωση,

- 1) Σε μειωμένο αριθμό μεσοκομβικών περιοχών ανά SST+ άξονα;
- 2) Σε μειωμένο μήκος των μεσοκομβικών περιοχών;
- 3) Σε μειωμένο αριθμό ελύτρων μυελίνης ανά μεσοκομβική περιοχή;

Στην εργασία αυτή αναλύουμε τα ερωτήματα 1 και 2 χρησιμοποιώντας τη διαγονιδιακή σειρά *Sst cre;Tag-1 flox* που σχεδιάσαμε (βλ.3.1.2). Χρησιμοποιήσαμε ιικό πλασμίδιο που φέρει φθορίζουσα αλληλουχία (*tdTomato*) η οποία εκφράζεται μόνο παρουσία της *cre* ρεκομπινάσης (*cre-dependent induction*) προκειμένου να πραγματοποιηθεί μια λεπτομερής χρώση των SST νευρώνων που εκφράζουν την *Cre* ρεκομπινάση. Η προσέγγιση αυτή επελέγη διότι η συμβατική χρώση με τη χρήση αντισωμάτων παρουσιάζει ένα βασικό περιορισμό ως προς τη λεπτομέρεια των δομών των νευρώνων. Στη συνέχεια, ακολούθησε ανοσοϊστοχημεία σε τομές εγκεφάλου μυών που έλαβαν το πλασμίδιο με αντισώματα *anti-SST* και *anti-MBP*, οι οποίες παρατηρήθηκαν με μικροσκόπιο συνεστιακής μικροσκοπίας (*Leica sp8 confocal microscope*). Πραγματοποιήθηκε ανάλυση του μήκους και του αριθμού των μεσοκομβικών περιοχών στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου και συγκρίθηκαν τα δεδομένα των μυών *Sst^{+/Cre};Tag-1^{fl/fl}* (*Tag-1 cKO*) με των μυών *Sst^{+/Cre};Tag-1^{+/+}* (*control*). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε μύες ηλικίας p44-p49 προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της έλλειψης της TAG-1 κατά τη διαδικασία της μυελίνωσης.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Μύες

3.1.1 Περίθαλψη Μυών

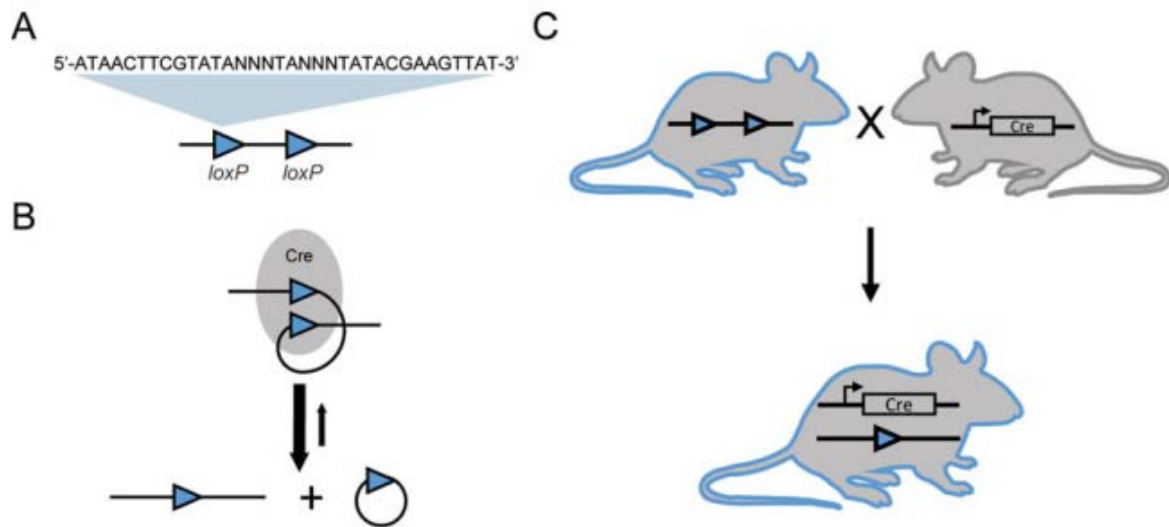
Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν μύες διαγονιδιακής σειράς εκτρεφόμενοι από το Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (IMBB-FORTH) υπό ελεγχόμενες συνθήκες και 12-ωρο κύκλο φωτός-σκοταδιού. Οι μύες ανατράφηκαν στη μονάδα SPF2 του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας το οποίο λειτουργεί σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία (Προεδρικό διάταγμα 56/30.04.2013), την Οδηγία 2010/63/EU του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και τις οδηγίες του Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA).

3.1.2 Διαγονιδιακή Σειρά Μυών

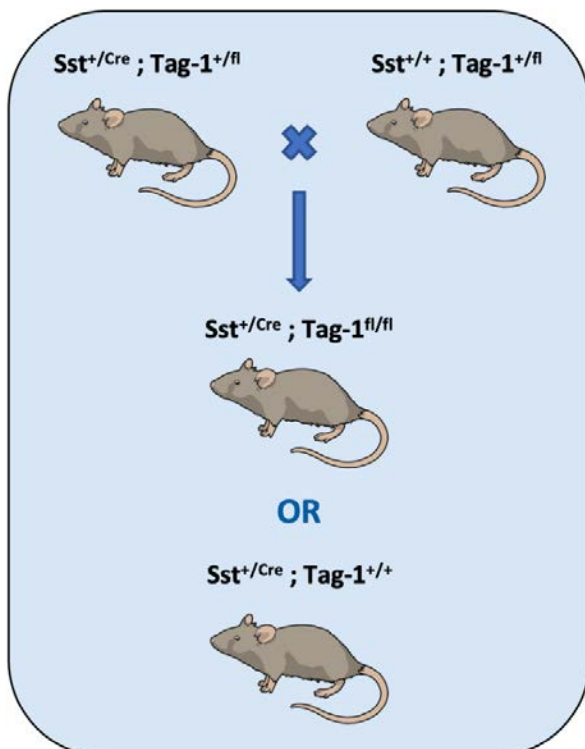
Η διαγονιδιακή σειρά που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αξιοποιεί το βακτηριακής προέλευσης σύστημα ανασυνδυασμού Cre-Lox, που ανακάλυψε ο επιστήμονας Nat L. Sternberg, διαθέτει δύο διαγονίδια, το Sst cre και το Tag-1 flox (η διαγονιδιακή σειρά αναγράφεται ως Sst cre;Tag-1 flox). Το σύστημα Cre-Lox συνιστάται από την Cre ρεκομπινάση και δύο LoxP αλληλουχίες μήκους 34 ζευγών βάσεων. Όταν η Cre ρεκομπινάση εκφράζεται σε ένα κύτταρο αποκόπτει οποιαδήποτε αλληλουχία DNA βρίσκεται ανάμεσα στις αλληλουχίες LoxP, εφόσον εκείνες έχουν τον ίδιο προσανατολισμό στο γονιδίωμα παράγοντας έτσι knock out μύες (Εικόνα 12) (McLellan et al. 2017).

Στους μύες της διαγονιδιακής σειράς Sst cre, η έκφραση της αλληλουχίας της Cre ρεκομπινάσης ρυθμίζεται από τον υποκινητή της σωματοστατίνης (SST), περιορίζοντας έτσι την έκφραση της στους νευρώνες σωματοστατίνης (SST-INs). Παράλληλα, οι μύες της διαγονιδιακής σειράς Tag-1 flox διαθέτουν δυο αλληλουχίες LoxP με όμοιο προσανατολισμό εκατέρωθεν της αλληλουχίας του γονιδίου Tag-1. Όταν μύες της σειράς Sst cre διασταυρώθηκαν με μύες της σειράς Tag-1 flox προέκυψαν οι πειραματικοί μύες Sst cre;Tag-1 flox, οι οποίοι διαθέτουν και τα δύο

διαγονίδια. Έτσι, η Cre ρεκομπινάση δρα αποκόπτοντας την αλληλουχία Tag-1, εξασφαλίζοντας, λοιπόν, την απαλοιφή του γονιδίου Tag-1 μόνο από τους νευρώνες σωματοστατίνης. Σε αυτήν τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν «Tag-1 cKO» μύες με γονότυπο $Sst^{+/Cre}; Tag-1^{fl/fl}$ και «control» μύες με γονότυπο $Sst^{+/Cre}; Tag-1^{+/+}$ οι οποίοι προέκυψαν από κατάλληλες διασταυρώσεις (Εικόνα 13).



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση λειτουργίας του συστήματος Cre-Lox. (Α) Η αλληλουχία της LoxP περιοχής. (Β) Η αφαίρεση της “floxed” αλληλουχίας DNA. (C) Γενικό πρωτόκολλο διασταύρωσης συστήματος Cre-Lox. (Πηγή: McLellan et al., 2017)



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση των βασικών διασταυρώσεων που πραγματοποιήθηκαν (Πηγή: Συγγραφέας)

3.2 Γονοτύπηση Μυών

3.2.1 Εξαγωγή γονιδιωματικού DNA

Για την γονοτύπηση κάθε γέννας διαγονιδιακών μυών επαναλήφθηκε το ίδιο πρωτόκολλο εξαγωγής DNA. Ύστερα από φυγοκέντρηση 10 δευτερολέπτων (10") όλων των tubes που περιέχουν ιστό από μύες (τμήμα ουράς), βήμα που πραγματοποιείται για την μεταφορά του δείγματος στον πάτο του tube για την αποφυγή επιμολύνσεων, προστέθηκε μείγμα αποτελούμενο από 50μl NaOH (συγκέντρωση του NaOH) και 50μl EDTA 0,4μM. Τα δείγματα αναδεύτηκαν και φυγοκεντρήθηκαν προτού τοποθετηθούν στους 95°C σε heat block για 20 λεπτά (20'). Ύστερα, απομακρύνθηκαν από το heat block, αναδεύτηκαν και φυγοκεντρήθηκαν προτού τοποθετηθούν ξανά στους 95°C σε heat block (20'). Η διαδικασία επαναλήφθηκε ακόμη μια φορά (συνολικά 3 φορές) προτού ακολουθηθεί προσθήκη ποσότητας 100μl Tris-HCl, pH 8.0, 40mM για την εξουδετέρωση του NaOH. Τέλος, τα δείγματα είτε χρησιμοποιήθηκαν άμεσα για PCR, είτε αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

3.2.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια μοριακή τεχνική που χρησιμοποιείται για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας πανομοιότυπων αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA *in vitro*. Η διαδικασία απαιτεί την παρουσία εκκινητών (primers), δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης, ρυθμιστικού διαλύματος, ιόντων Mg^{+2} και νερού (Πίνακας 1). Το μηχάνημα που χρησιμοποιείται, ονομάζεται θερμοκυκλοποιητής και εφαρμόζει διαδοχικούς εναλλασσόμενους κύκλους θέρμανσης και ψύξης ώστε να επαναλαμβάνονται τα εξής στάδια:

- a) **Αποδιάταξη:** θέρμανση του δίκλωνου μορίου DNA στους 90°C-95°C οδηγεί σε διάσπαση των δεσμών υδρογόνου ώστε το δίκλωνο μόριο να αποδιαταχθεί και να προκύψουν δύο μονόκλωνες αλυσίδες DNA.
- b) **Υβριδισμός:** πτώση της θερμοκρασίας στους 45°C-60°C επιτρέπει στους μονόκλωνους εκκινητές να προσδεθούν στις μονόκλωνες αλυσίδες DNA σε συμπληρωματικές αλληλουχίες με τη δική τους. Η ακριβής θερμοκρασία

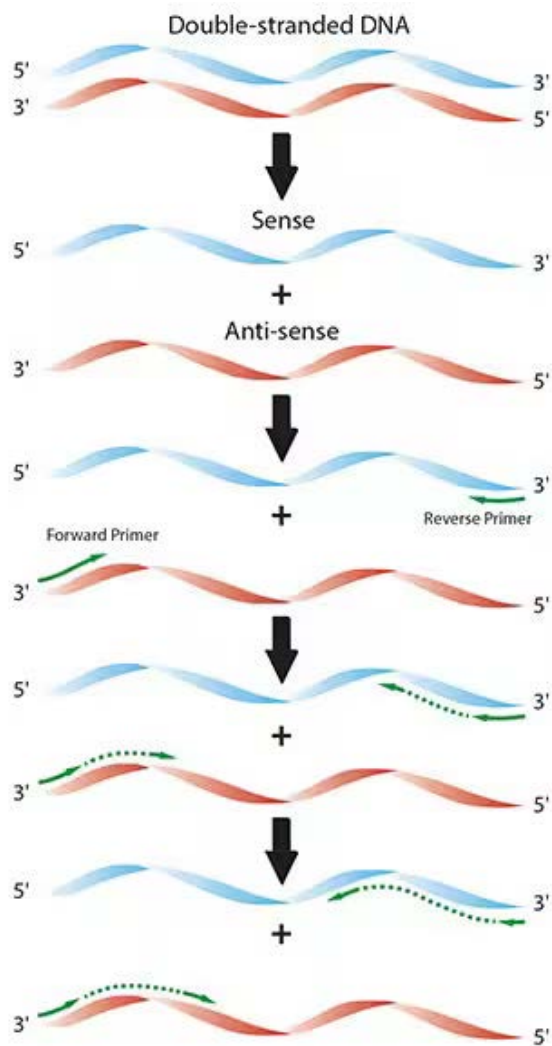
υβριδισμού καθορίζεται από τη φύση των εκκινητών (περιεκτικότητα σε G+C και συνολικό μήκος τους).

- ε) **Σύνθεση/Επέκταση:** θέρμανση στους 70°C-75°C επιτρέπει στη DNA πολυμεράση να εκκινήσει τη σύνθεση νέου κλώνου DNA συνεχίζοντας την αλληλουχία των εκκινητών. Προσδένει dNTPs συμπληρωματικά προς την αρχική αλυσίδα-καλούπι σε εκμαγείο και τελικά σχηματίζονται δύο δίκλωνα μόρια DNA, κάθε ένα από τα οποία αποτελείται από μία νέα και μία παλιά αλυσίδα DNA.

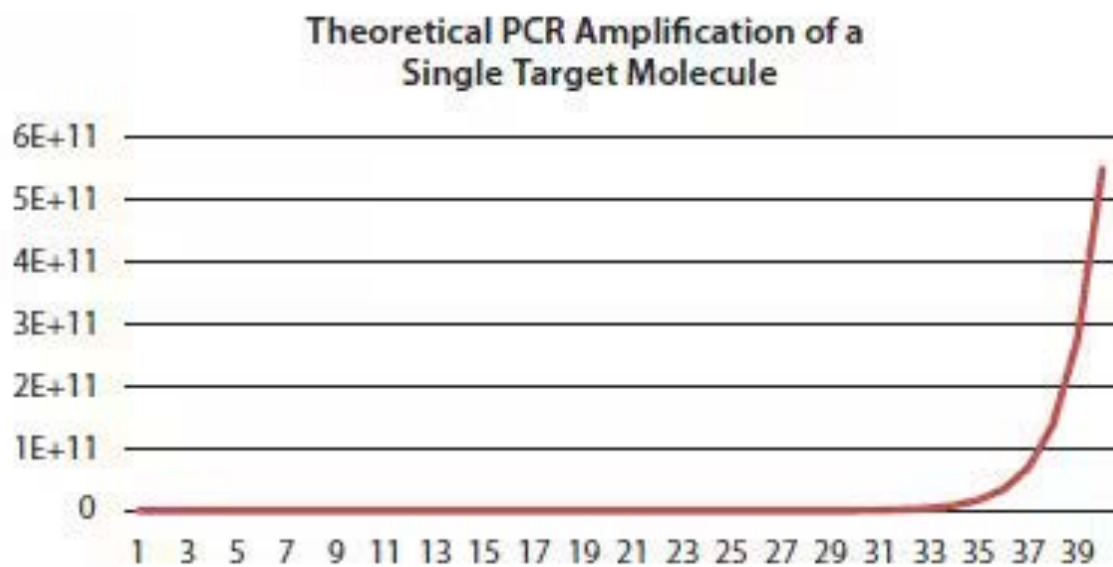
Ως ένας κύκλος ορίζεται η ολοκλήρωση των τριών σταδίων (αποδιάταξης, υβριδισμού και σύνθεσης) (Εικόνα 14) και ο αριθμός των κύκλων καθορίζεται από το μήκος (σε base pairs) του επιθυμητού μορίου DNA (συνήθως 20-40 κύκλοι). Στην θεωρία, ο πολλαπλασιασμός του DNA κατά την PCR είναι εκθετικός (Εικόνα 15).

Αντιδραστήρια	Λειτουργία
Γονιδιωματικό DNA (gDNA)	Προσδίδει πολλαπλά αντίγραφα του γονιδίου στόχου. & είναι το υπόστρωμα για να γίνει ο πολλαπλασιασμός
10x Ρυθμιστικό διάλυμα με MgCl₂ 15mM	Παρέχει σταθερό περιβάλλον (pH και ιόντα) και το Mg ⁺² λειτουργεί ως συμπαραγόντας για το ένζυμο.
Δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) 2mM	Η σύνδεση τους συνιστά τις νέες αλυσίδες DNA.
Εκκινητές (primers)	Ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων που προσδένονται σε συμπληρωματικές μονόκλωνες αλυσίδες DNA καθορίζοντας την αλληλουχία που θα αντιγραφεί.
Ταq πολυμεράση 2,5U/μl	Θερμοσταθερή πολυμεράση προερχόμενη από το βακτήριο <i>Thermus aquaticus</i> . Έχει βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας στους 75°C-80°C.
ddH₂O	Λειτουργεί ως διαλύτης

Πίνακας 1: Αντιδραστήρια της PCR και η λειτουργία τους.



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση των αντιδράσεων κατά την PCR. (Πηγή: Merck Group)



Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση της εκθετικής αύξησης παραγωγής δίκλωνων μορίων DNA κατά την PCR. (Πηγή: Merck Group)

Γονοτύπηση διαγονιδιακών μυών

Για τη γονοτύπηση κάθε γέννας μυών της διαγονιδιακής σειράς Sst cre;Tag-1 flox με PCR, χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια που αναγράφονται στον Πίνακα 2 για το διαγονίδιο Sst cre και στον Πίνακα 3 για το διαγονίδιο Tag-1 flox. Αρχικά, έχοντας όλα τα αντιδραστήρια τοποθετημένα σε πάγο, παρασκευάσαμε ένα Master Mix αποτελούμενο από: ddH₂O, 10x ρυθμιστικό διάλυμα με MgCl₂, dNTPs 2mM, forward και reverse primers και Taq polymerase 2,5U/μl προστιθέμενα με αυτή την σειρά. Έυστερα τοποθετήθηκαν 18μl του Master Mix και 2μl γονιδιωματικού DNA (gDNA) προσεγγιστικά σε κάθε PCR tube που αντιστοιχεί σε κάθε δείγμα. Σε κάθε PCR χρησιμοποιήθηκε ένα θετικό control ως απόδειξη σωστής λειτουργίας της αντίδρασης και ένα αρνητικό control ως απόδειξη έλλειψης επιμόλυνσης μεταξύ των δειγμάτων. Τέλος, τα PCR tubes τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή και έγινε έναρξη ορισμένου προγράμματος PCR (Πίνακας 4, Πίνακας 5).

PCR για το διαγονίδιο Sst cre

Υλικά	Ποσότητα
Γονιδιωματικό DNA (gDNA)	2μl
10x Ρυθμιστικό διάλυμα με MgCl ₂ 15mM	2μl
Δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) 2mM	2μl
Εκκινητής P1-Cre F 10pmol/μl	0,5μl
Εκκινητής P1-Cre R 10pmol/μl	0,5μl
Taq πολυμεράση 2,5U/μl	0,3μl
ddH ₂ O	12,7μl

Πίνακας 2: Ποσότητες αντιδραστηρίων μεθόδου PCR για το διαγονίδιο Sst cre

PCR για το διαγονίδιο Tag-1 flox

Υλικά	Ποσότητα
Γονιδιωματικό DNA (gDNA)	2μl
10x Ρυθμιστικό διάλυμα με MgCl ₂ 15mM	2μl
Δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) 2mM	2μl
Εκκινητής (primer) F5 10μM	0,5μl
Εκκινητής (primer) R5 10μM	0,5μl
Taq πολυμεράση 2,5U/μl	0,3μl
ddH ₂ O	12,7μl

Πίνακας 3: Ποσότητες αντιδραστηρίων μεθόδου PCR για το διαγονίδιο Tag-1 flox

Πρόγραμμα PCR για το διαγονίδιο Sst cre

Θερμοκρασία	Χρόνος
94°C	3 min
94°C	1 min x35
53°C	1 min x35
72°C	1 min x35
72°C	5 min
4°C	∞

Πίνακας 4: Πρόγραμμα PCR στον θερμοκυκλοποιητή για το διαγονίδιο Sst cre

Πρόγραμμα PCR για το διαγονίδιο Tag-1 flox

Θερμοκρασία	Χρόνος
94°C	3 min
94°C	45" x35
53°C	30" x35
72°C	25" x35
72°C	5'
4°C	∞

Πίνακας 5: Πρόγραμμα PCR στον θερμοκυκλοποιητή για το διαγονίδιο Tag-1 flox

3.2.3 Ηλεκτροφόρηση

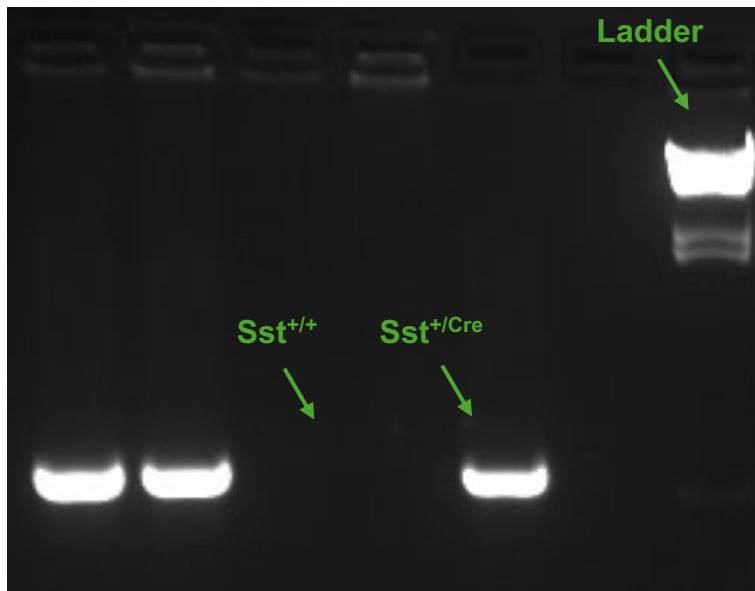
Η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και την οπτικοποίηση θραυσμάτων DNA με βάση το μέγεθος της. Το μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1,1% agarose gel και παρασκευάστηκε με ανάμειξη 110ml 1x TAE, 1,21gr αγαρόζης και 2,5μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), το οποίο προσδένεται στα νουκλεϊκά οξέα και φθορίζει στο υπεριώδες φως.

Παρασκευή 1,1% gel αγαρόζης και Ηλεκτροφόρηση

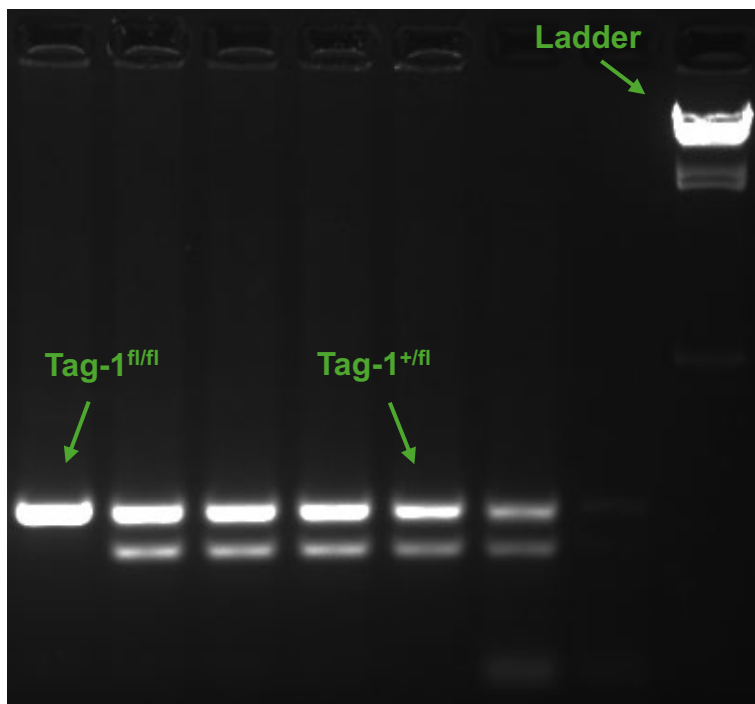
Αφού προστέθηκε η αγαρόζη στο 1x TAE, το διάλυμα ομογενοποιήθηκε με την εφαρμογή μικροκυμάτων (3'), προστέθηκαν 2,5μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και ύστερα τοποθετήθηκε σε καλούπι της 4°C (30'). Παράλληλα, σε κάθε PCR tube που περιείχε το προϊόν της PCR προστέθηκαν 5μl 1x Loading Buffer (περιέχει 1x TAE και Orange G χρωστική για καλύτερη οπτικοποίηση) και ποσότητα 25μl από το κάθε PCR tube εισήχθη σε κάποιο πηγάδι του 1,1% gel αγαρόζης. Τέλος, προστέθηκαν 5μl ladder βακτηριοφάγου λ που έχει υποστεί πέψη με το περιοριστικό ένζυμο HindIII. Το 1,1% gel αγαρόζης τοποθετήθηκε σε δοχείο γεμάτο με 1x TAE στο οποίο εφαρμόστηκαν 105V και 250mA (30-50'). Τέλος, το 1,1% gel αγαρόζης τοποθετήθηκε σε εμφανιστικό μηχάνημα UV μέσω του οποίου έγινε η λήψη φωτογραφιών.

Στην γονοτύπηση για το διαγονίδιο Sst cre η ύπαρξη ζώνης φθορισμού υποδεικνύει τον γονότυπο Sst^{+/Cre} ενώ η απουσία φθορισμού τον γονότυπο Sst^{+/+} (Εικόνα 16). Παράλληλα, στη γονοτύπηση για το διαγονίδιο Tag-1 flox, όταν υπάρχουν οι LoxP

περιοχές εκατέρωθεν του γονιδίου Tag-1, η ζώνη είναι μεγαλύτερου μήκους από τη ζώνη του αλληλόμορφου αγρίου τύπου. Συνεπώς, η ανίχνευση μόνο της ζώνης μεγαλύτερου μοριακού βάρους υποδεικνύει τον γονότυπο Tag-1^{fl/fl}. Ενώ η ανίχνευση μόνο της ζώνης μικρότερου μοριακού βάρους υποδεικνύει τον γονότυπο Tag-1^{+/+}. Τέλος, η ανίχνευση και των δύο ζωνών υποδεικνύει το γονότυπο Tag-1^{+/fl}. (Εικόνα 17)



Εικόνα 16: Φωτογραφία φθορισμού ηλεκτροφόρησης για το διαγονίδιο Sst cre (Πηγή: Συγγραφέας)

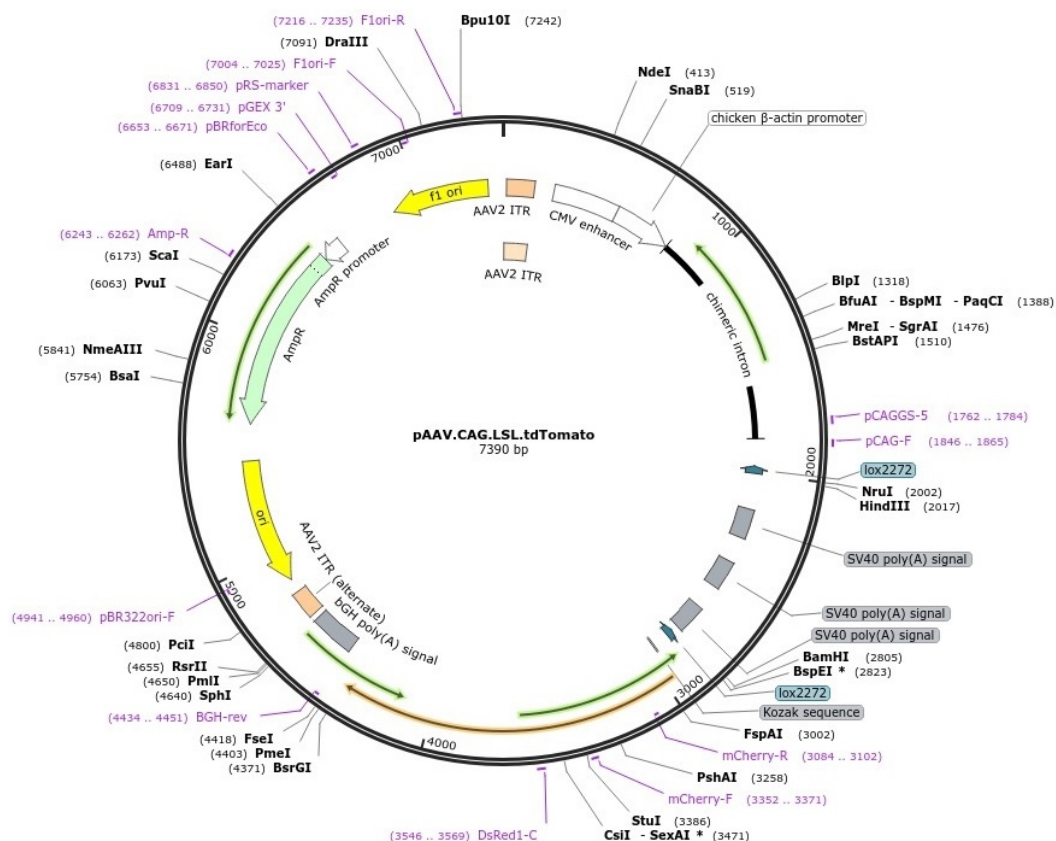


Εικόνα 17: Φωτογραφία φθορισμού ηλεκτροφόρησης για τα διαγονίδια Tag-1 flox (Πηγή: Συγγραφέας)

3.3 Στερεοτακτική έγχυση

Η στερεοτακτική έγχυση είναι μία επεμβατική μέθοδος εισαγωγής ουσιών σε συγκεκριμένη περιοχή του εγκεφάλου με ακρίβεια, χρησιμοποιώντας ένα τρισδιάστατο μοντέλο συντεταγμένων.

Για τη μελέτη επιλέχθηκαν Tag-1 cKO και control μύες ηλικίας από p24 έως p29 της οποίους έγινε στερεοτακτική έγχυση του adeno-associated ιού (AAV) (pAAV.CAG.LSL.tdTomato, Addgene 100048). Επρόκειτο για πλασμίδιο (Εικόνα 18) που περιέχει το γονίδιο του μορίου tdTomato (φθορίζουσα χρωστική που εκπέμπει στα 581nm) σε Cre-εξαρτώμενη μορφή. Εντός της αλληλουχίας tdTomato υπάρχει μία αλληλουχία λήξης μεταγραφής αποτρέποντας έτσι την έκφραση της tdTomato. Ωστόσο, η αλληλουχία λήξης διαθέτει δύο LoxP αλληλουχίες εκατέρωθεν της και έτσι, όταν η Cre ρεκομπινάση είναι παρούσα αποκόπτει την αλληλουχία λήξης και επιτρέπεται η έκφραση της tdTomato. Έτσι, η έγχυση του ιού οδηγεί στην έκφραση της tdTomato ειδικά της νευρώνες σωματοστατίνης, καθώς στην προκειμένη περίπτωση αποκλειστικά εκείνοι εκφράζουν την Cre ρεκομπινάση.



Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση του πλασμιδίου pAAV.CAG.LSL.tdTomato, Addgene 100048. (Πηγή: Addgene)

Προετοιμασία

Για την προστασία της λειτουργίας του, ο ιός χωρίστηκε σε aliquots αποθηκευμένα της -80°C και αποφεύχθηκε η επανατοποθέτηση της της -80°C εάν βρέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Η κατάλληλη αραιώση του ιού για χρήση του σε στερεοτακτική έγχυση είναι 1:100 σε 1x PBS που έχει περάσει από φίλτρο διαμέτρου $0.22\mu\text{m}$. Για την διεξαγωγή της στερεοτακτικής έγχυσης σε κάθε μυ, τα χειρουργικά εργαλεία αποστειρώθηκαν και η βελόνα έγχυσης καθαρίστηκε αρχικά με χλωρίνη και στη συνέχεια με 100% αιθανόλη, ακολουθούμενη από αέρα ώστε να απομακρυνθούν ίχνη των προηγούμενων ουσιών. Ύστερα, εμβαπτίστηκε σε mineral oil για να αποφευχθεί η απόφραξη της οπής της από πιθανή πήξη αίματος αργότερα στην διαδικασία. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε σε λεπτό σωλήνα ο οποίος συνδέθηκε σε γυάλινη σύριγγα Hamilton. Στην βελόνα έγχυσης εισήχθη ποσότητα του ιού στην κατάλληλη αραιώση και η γυάλινη Hamilton εφαρμόστηκε στο έμβολο της αντλίας μικροέγχυσης (CMA/100 Microinjection Microdialysis Syringe Pump) (Εικόνα 19) η οποία ρυθμίστηκε ώστε να απελευθερώσει 1μl του ιού σε 10' (ρυθμός $0,1\mu\text{l}/\text{min}$). Τέλος, η βελόνα έγχυσης σταθεροποιήθηκε στην στερεοτακτική συσκευή (Harvard Apparatus Compact Stereotaxic Instrument for Mouse, 75-1820) (Εικόνα 20). Παράλληλα, παρασκευάστηκε μείγμα αναισθησίας αποτελούμενο από 450μl ορού (0.9% NaCl), 150μl Κεταμίνης (21,42%) και 100μl Ξυλαζίνης (14,2%).

Χειρουργείο

Ο μυς αναισθητοποιήθηκε χορηγώντας του $5\mu\text{l}/\text{gr}$ σωματικού βάρους ενδοπεριτοναϊκά. Αφότου επιβεβαιώθηκε η αναισθητοποίηση από τη μη ανταπόκριση σε πίεση της άκρες των δακτύλων του, εφαρμόστηκε βαζελίνη της οφθαλμούς για την αποφυγή της ξήρανσης της και αφαιρέθηκε το τρίχωμα στην άνω περιοχή του κρανίου με κρέμα αποτρίχωσης. Για την ακινητοποίηση της κεφαλής του μυός, οι κοπτήρες του προσαρμόστηκαν στο προεξέχον μέταλλο της στερεοτακτικής συσκευής, η άνω βίδα προσαρμόστηκε στα ρινικά οστά, και οι πλευρικές βίδες προσαρμόστηκαν στην περιοχή της κάτω γνάθου. Στη συνέχεια, έγινε τομή του δέρματος στην άνω περιοχή του κρανίου και απομακρύνθηκε το περίοστεο ώστε να μην περιελιχθεί στο τρυπάνι αργότερα στην διαδικασία. Εντοπίστηκαν οι συντεταγμένες του βρέγματος στο κρανίο (Εικόνα 21) και χρησιμοποιήθηκαν ως σημείο αναφοράς για την εύρεση των περιοχών

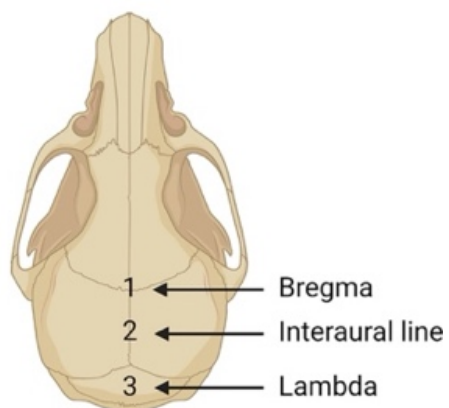
της οποίες έγινε η έγχυση. Δημιουργήθηκαν δύο οπές στο κρανίο (μία σε κάθε ημισφαίριο) της συντεταγμένες που αναγράφονται στον Πίνακα 6 με τη χρήση τρυπανιού μικρού μεγέθους προκειμένου να εισαχθεί στη συνέχεια η βελόνα έγχυσης στην περιοχή CA1 του ιππόκαμπου τόσο στο αριστερό όσο και στο δεξί εγκεφαλικό ημισφαίριο. Ακολούθως, η βελόνα έγχυσης εισήχθη διαδοχικά της δύο οπές σε ύψος - 0,18 cm από την επιφάνεια της μήνιγγας (Πίνακα 6) και η αντλία μικροέγχυσης ενεργοποιήθηκε για την διοχέτευση 1μl ιού σε κάθε οπή (10'). Μετά το πέρας του χρόνου, η συσκευή αφέθηκε ακινητοποιημένη (4') ώστε να αποφευχθεί τυχόν διάχυση του ιού κατά την έξοδο της βελόνας έγχυσης. Ο μυς αποδεσμεύτηκε από την στερεοτακτική συσκευή, εφαρμόστηκε αντισηπτικό διάλυμα Betadine στο σημείο της επέμβασης, και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε συρραφή, ακολουθούμενη από εκ νέου εφαρμογή Betadine. Τέλος, τοποθετήθηκε υπό τη θερμότητα λάμπας υπέρυθρων ώστε να υποβοηθηθεί η ομαλή ανάρρωση του. Κάθε μυς ανατράφηκε για 20 ημέρες μετά την στερεοτακτική έγχυση προκειμένου να εξασφαλιστεί επαρκής δράση του pAAV και βέλτιστη χρώση της tdTomato.



Εικόνα 19: Φωτογραφία της αντλίας μικροέγχυσης CMA/100 Microinjection Microdialysis Syringe Pump. (Πηγή: profcontrol)



Εικόνα 20: Φωτογραφία της στερεοτακτικής συσκευής Harvard Apparatus Compact Stereotaxic Instrument for Mouse, 75-1820. (Πηγή: Harvard Apparatus)



Εικόνα 21: Σχηματική αναπαράσταση της σταθεροποίησης του μυός στη στερεοτακτική συσκευή και της θέσης του βρέγματος στο κρανίο. (Πηγή: Taylor et al., 2021)

Συντεταγμένες έγχυσης CA1 περιοχής ιπποκάμπου

	Δεξί Εγκεφαλικό Ημισφαίριο	Αριστερό Εγκεφαλικό Ημισφαίριο
Anterior/Posterior (A/P)	- 0,2 cm	- 0,2 cm
Mediolateral (M)	- 0,1 cm	+ 0,1 cm
Dorsal/Ventral (D/V)	- 0,18 cm	- 0,18 cm

Πίνακας 6: Συντεταγμένες έγχυσης περιοχής CA1 ιπποκάμπου αριστερού και δεξί εγκεφαλικού ημισφαιρίου σε σχέση με της συντεταγμένες του βρέγματος. Η τιμή Dorsal/Ventral υπολογίζεται από τη μήνιγγα.

3.4 Αφαίμαξη μυών

Η αφαίμαξη μυών είναι μια χειρουργική επέμβαση που αποσκοπεί στη μονιμοποίηση και διατήρηση ιστών ή οργάνων για μετέπειτα μελέτη και ανάλυση. Απαιτεί την θανάτωση του μυός και επιτυγχάνεται μέσω χορήγησης αναισθητικού και χορήγησης παραφορμαλδεΐδης (PFA) στο μυ μέσω του αγγειακού του συστήματος.

Προετοιμασία

Στην αντλία αφαίμαξης εφαρμόστηκαν κατάλληλοι σωλήνες εισόδου και εξόδου υγρού, και στον σωλήνα εξόδου εφαρμόστηκε πεταλούδα. Παρασκευάστηκε 1x PBS και 4% PFA σε 1x PBS, τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και αφαιρέθηκε ο αέρας από την αντλία και της σωλήνες κυκλοφορώντας το 1x PBS εντός της. Παράλληλα, παρασκευάστηκε μείγμα αναισθησίας περιεκτικότητας 25μl Ξυλαζίνης (41,7%) και 35μl Κεταμίνης (58,3%) για συνολικό όγκο 60μl.

Επέμβαση

Ο μυς αναισθητοποιείται χορηγώντας 60μl του μείγματος αναισθησίας ενδοπεριτοναϊκά. Αφότου επιβεβαιώθηκε η αναισθητοποίηση από τη μη ανταπόκριση σε πίεση της άκρες των δακτύλων του, μεταφέρθηκε σε σταθερή επιφάνεια στον απορροφητήρα και σταθεροποιήθηκε ανάσκελα με μια βελόνα σε κάθε πόδι. Πραγματοποιήθηκε τομή του δέρματος, κόπηκε το διάφραγμα και ύστερα

απομακρύνθηκε ο θώρακας και τα πλευρά. Η καρδιά σταθεροποιήθηκε με λαβίδα και η πεταλούδα εισήχθη στην αριστερή κοιλία με φορά παράλληλη στο μεσοκοιλιακό διάφραγμα, διατηρώντας την ακεραιότητα του. Αμέσως ξεκίνησε η χορήγηση 30ml 1x PBS και μια μικρή τομή πραγματοποιήθηκε στον δεξί κόλπο για εξομάλυνση της πίεσης. Στη συνέχεια χορηγήθηκαν 40ml 4% PFA και τέλος 5ml 1x PBS ώστε να χορηγηθεί και η ποσότητα που βρισκόταν εντός της αντλίας και των σωλήνων. Ακολούθησε αποκεφάλιση του μυός και απομόνωση του εγκεφάλου, ο οποίος επωάστηκε σε 4% PFA της 4°C για 1 ημέρα (1 day). Τέλος, η 4% PFA αντικαταστάθηκε από 0,02% NaN₃ σε 1x PBS (αζίδιο του νατρίου) και αποθηκεύτηκε της 4°C έως ότου να πραγματοποιηθεί η τομή του.

3.5 Vibratome

Η vibratome sectioning αποτελεί μια μέθοδο λήψης τομών ιστού μεγαλύτερου πάχους από της τομές που λαμβάνονται με cryotome sectioning. Η λεπίδα που έρχεται σε επαφή με τον ιστό πάλλεται σε ρυθμιζόμενη συχνότητα επιτρέποντας την λήψη τομών υψηλής ποιότητας με μεγάλη αποτελεσματικότητα.

Προετοιμασία

Παρασκευάστηκε διάλυμα 3% gel αγαρόζης το οποίο τοποθετήθηκε σε κυλινδρικό καλούπι όπου αφέθηκε να πολυμεριστεί. Κόπηκε μία κυλινδρική φέτα του 3% gel αγαρόζης και κολλήθηκε με Bison Superglue επάνω στην βάση της Vibratome. Στη συνέχεια, κόπηκε μια επιπλέον φέτα σε ημικυλινδρικό σχήμα και κολλήθηκε επάνω στην προηγούμενη με Bison Superglue. Κάθε εγκέφαλος, από τον οποίο αποκόπηκε η παρεγκεφαλίδα, σταθεροποιήθηκε στη κατασκευή με Bison Superglue προσανατολισμένος ώστε το ραχιαίο τμήμα να έρχεται πρώτο σε επαφή με τη λεπίδα της Vibratome.

Λήψη τομών

Για τη λήψη τομών πάχους 250μm χρησιμοποιήθηκε το Leica Series VT1000 S (Εικόνα 22) όπου εφαρμόστηκε ταχύτητα λεπίδας: 3,5mm/s και συχνότητα 7,5Hz. Λήφθηκαν 12 τομές εγκεφάλου στην περιοχή του ιππόκαμπου, κάθε τομή

τοποθετήθηκε σε πηγάδι της 24-well plate που περιείχε 1x PBS και ήταν διαρκώς καλυμμένο με αλουμινόχαρτο λόγω της φωτοευαισθησίας των τομών. Στο τέλος της διαδικασίας το 24-well plate τυλίχθηκε πρώτα με parafilm προκειμένου να αποφευχθεί η διαφυγή υγρασίας και ύστερα με αλουμινόχαρτο. Για μακροχρόνια αποθήκευση οι τομές αποθηκεύτηκαν σε 0,02% NaN_3 σε 1x PBS.



Εικόνα 22: Φωτογραφία του μηχανήματος Leica Series VT1000S. (Πηγή: Συγγραφέας)

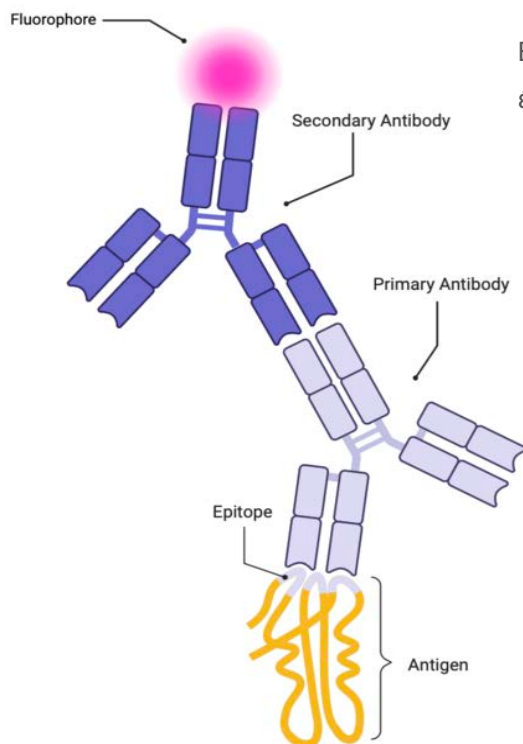
3.6 Ανοσοϊστοχημεία

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μέθοδος ανίχνευσης-απεικόνισης μόνο των επιθυμητών πρωτεϊνών σε κύτταρα ενός ιστού, χρησιμοποιώντας την ιδιότητα της ειδικής πρόσδεσης των αντισωμάτων στα αντιγόνα (Εικόνα 23).

Free Floating ανοσοϊστοχημεία

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία σε ελεύθερες φέτες (Free Floating) σε τομές ιππόκαμπου πάχους 250 μm που λήφθηκαν με τη χρήση Vibratome. Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν επιτυγχάνουν την

χρώση της βασικής πρωτεΐνης μυελίνης (MPB) και την ενίσχυση του φθορισμού της σωματοστατίνης (SST). Το πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε υπό συνθήκες σκότους λόγω της φωτοευαισθησίας του ιού και των δευτερογενών αντισωμάτων. Αρχικά, σε κάθε τομή εγκεφάλου προστέθηκε διάλυμα blocking περιεκτικότητας 2% BSA, 3% FBS, 0,3% Triton X-100 σε 1x PBS και το 24-well plate τοποθετήθηκε σε shaker σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα (1 h). Στη συνέχεια, το blocking αντικαταστάθηκε από τα πρωτογενή αντισώματα αραιωμένα σε blocking solution όπως αναγράφονται στον Πίνακα 7 σε shaker στους 4°C (2 days). Πραγματοποιήθηκε πλύση με 1x PBS-0,1% Triton X-100 σε shaker σε θερμοκρασία δωματίου (15') η οποία επαναλήφθηκε άλλες 2 φορές. Τοποθετήθηκαν τα δευτερογενή αντισώματα αραιωμένα σε blocking solution όπως αναγράφονται στον Πίνακα 7 σε shaker στους 4°C (1 day). Πραγματοποιήθηκε πλύση με 1x PBS-0,1% Triton X-100 σε shaker σε θερμοκρασία δωματίου (15') η οποία επαναλήφθηκε άλλες 2 φορές. Ύστερα, προστέθηκε DAPI σε αρραίωση 1:2000 σε 1x PBS σε shaker σε θερμοκρασία δωματίου (5'). Ακολούθησε πλύση με 1x PBS σε shaker σε θερμοκρασία δωματίου (15') η οποία επαναλήφθηκε ακόμα 2 φορές. Τέλος, οι τομές τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα με περίσσεια Mowiol (μη φθορίζουσα ουσία που προστατεύει τον φθορισμό) προκειμένου να παρατηρηθούν στο συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP8 Confocal Microscope.



Εικόνα 23: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού έμμεσης ανοσοϊστοχημείας. (Πηγή: Wikipedia)

Πρωτογενή αντισώματα	Κατασκευαστής	Αραίωση
Mouse anti-Somatostatin (G-10)	Santa Cruz Biotechnology Product code: sc-55565	1:300
Rabbit anti-mCherry		1:1000
Rat anti-Myelin Basic Protein (MBP)	Bio-rad Product code: MCA409S	1:200
Δευτερογενή αντισώματα	Κατασκευαστής	Αραίωση
Goat anti-mouse Alexa Fluor 647	Abcam Product code: ab150119	1:800
Rabbit anti-mCherry		1:800
Goat anti-Rat cfa 488	Biotium 20023	1:800

Πίνακας 7: Πρωτογενή και Δευτερογενή αντισώματα και οι αραιώσεις τους. (Πηγή: Συγγραφέας)

3.7 Ανάλυση

Συνεστιακή Μικροσκοπία και ανάλυση εικόνων

Η λήψη φωτογραφιών στην CA1 περιοχή του ιπποκάμπου των τομών εγκεφάλου από μύες Tag-1 cKO και control ηλικίας p44 έως p49 επετεύχθη με το Leica SP8 Confocal Microscope ενώ η μετέπειτα ανάλυση με το λογισμικό Fiji ImageJ. Αρχικά, παρατηρώντας την CA1 περιοχή, εντοπίστηκαν διάμεσοι νευρώνες που εκφράζουν σωματοστατίνη (SST-διάμεσοι νευρώνες) ανιχνεύοντας τον φθορισμό του mCherry και μελετήθηκαν οι άξονες που παρουσίαζαν συνεντοπισμό με την Βασική Πρωτεΐνη Μυελίνης (MBP). Ωστόσο, προτού εκκινήσει η ανάλυση κάθε άξονα έγινε επιβεβαίωση του συν-εντοπισμού mCherry με SST, ώστε να ελεγχθεί η ειδικότητα του ιού και η εγκυρότητα της πειραματικής προσέγγισης και παράλληλα, επιβεβαιώθηκε πως η κλίμακα ήταν ορθά ρυθμισμένη σε κάθε εικόνα. Η υψηλή ευκρίνεια των χρώσεων επέτρεψε την ανακατασκευή των αξόνων χρησιμοποιώντας το plugin Simple Neurite Tracer (SNT) του ImageJ, συμπεριλαμβάνοντας τα στοιχεία των αξόνων (διακλαδώσεις, μεσοκομβικές περιοχές, κόμβοι του Ranvier) ώστε να διατηρηθεί η μορφή τους. Στη συνέχεια, έγινε παρατήρηση και μέτρηση των δομών των αξόνων δίνοντας έμφαση στον αριθμό και το μήκος των μεσοκομβικών περιοχών (μm) (μέσω

της λειτουργίας «Length» του λογισμικού SNT) και στο συνολικό παρατηρήσιμο μήκος των αξόνων (μm). Ανακατασκευάστηκαν συνολικά 19 άξονες Tag-1 cKO μυών και 19 άξονες control μυών.

Στατιστική ανάλυση

Όλα τα στατιστικά test και τα γραφήματα διεξήχθησαν με τη χρήση του GraphPad Prism 9. Εφόσον διαπιστώθηκε πως οι τιμές ακολουθούσαν την κανονική κατανομή (Gaussian distribution) με τη βοήθεια του Shapiro-Wilk test, πραγματοποιήθηκε unpaired Student's t-test ώστε να εξακριβωθεί η στατιστική σημαντικότητα της εκάστοτε σύγκρισης. Στην περίπτωση που οι τιμές δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή, πραγματοποιήθηκε Mann-Whitney test. Στα στατιστικά test οι τιμές $P < 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

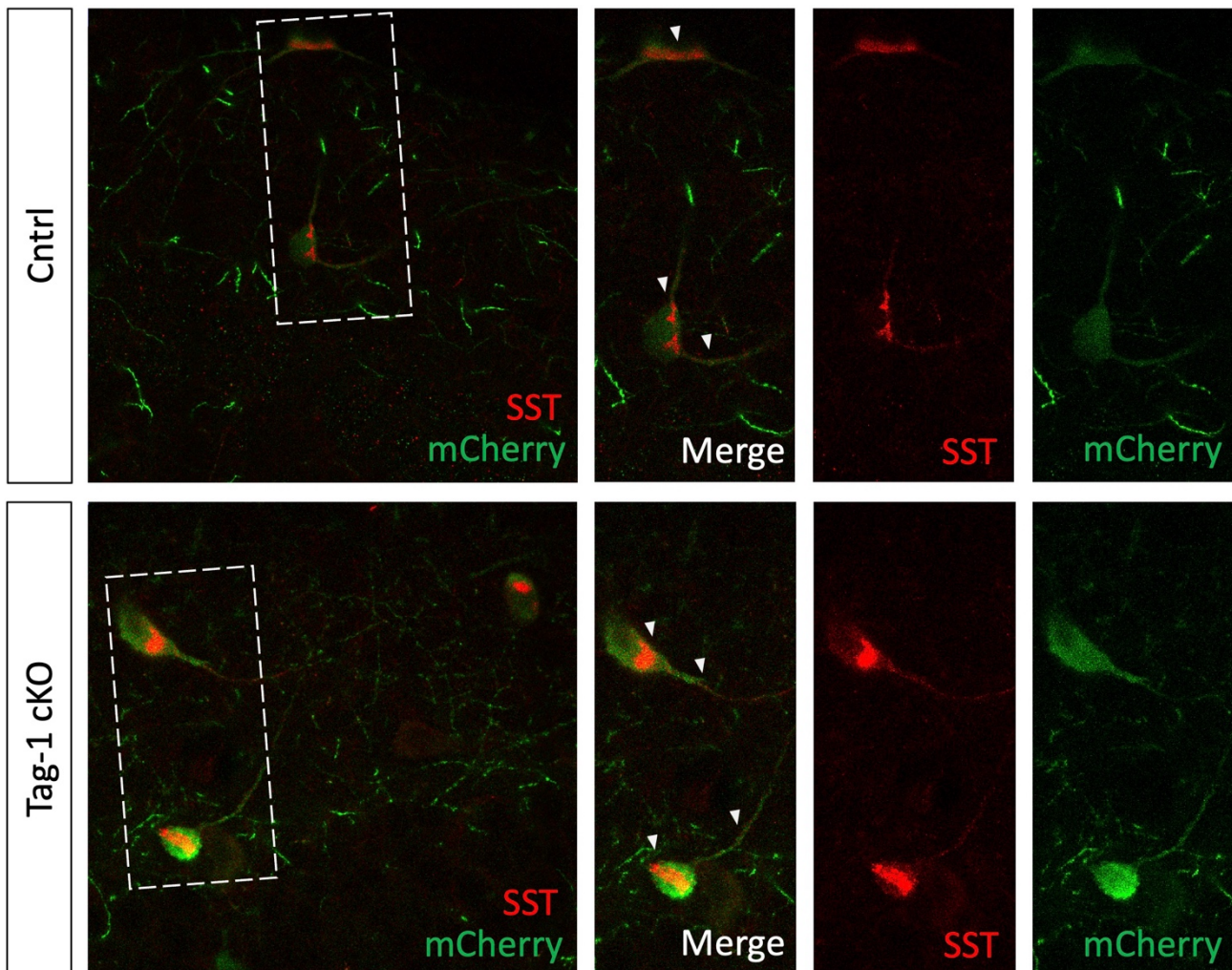
4. Αποτελέσματα

Ο ρόλος της TAG-1 στη μυελίνωση των διάμεσων νευρώνων σωματοστατίνης του ιπποκάμπου juvenile μυών (p44-p49)

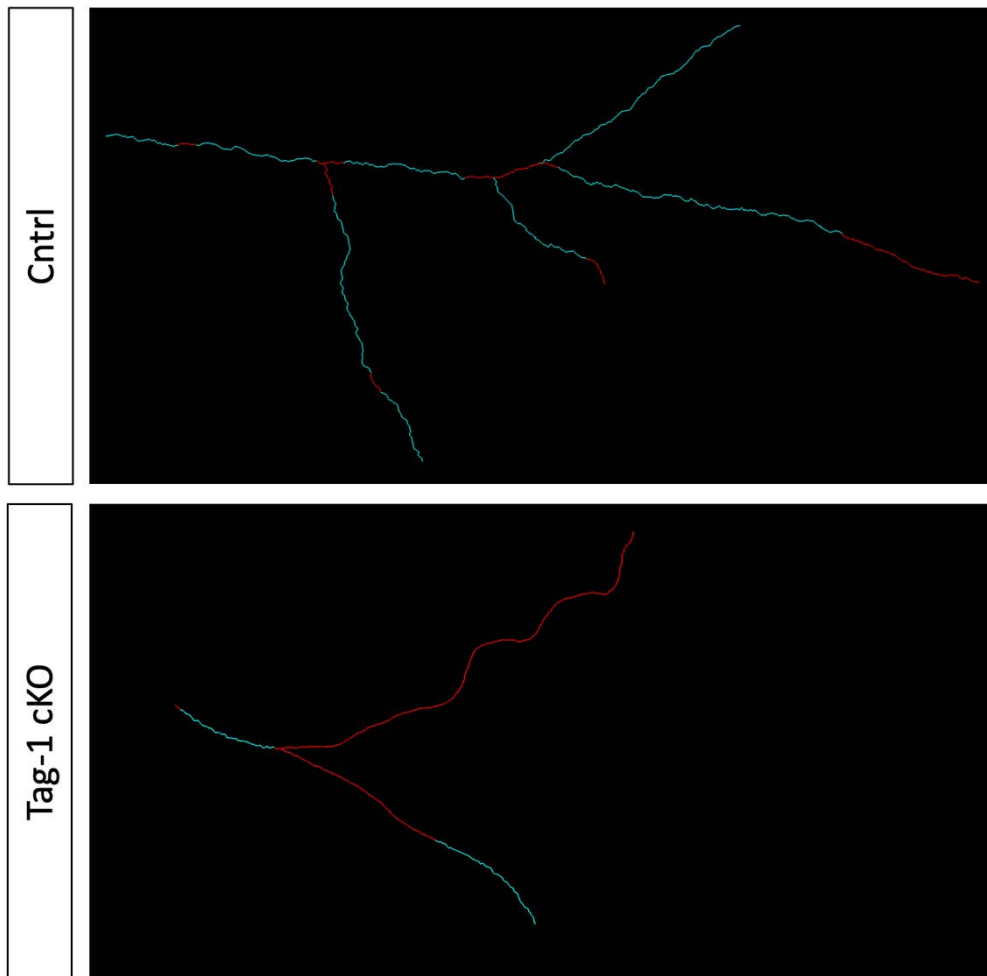
Αρχικά, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.7 «Ανάλυση» έγινε ανοσοϊστοχημική χρώση για σωματοστατίνη στον ιστό ώστε να ελεγχθεί η ειδικότητα του ιού και κατεξοχήν η εγκυρότητα της πειραματικής προσέγγισης. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 24 ανιχνεύθηκε συν-εντοπισμός του mCherry με την SST στους Tag-1 cKO και control μύες, τόσο σε κυτταρικά σώματα όσο και στους άξονές τους, επιδεικνύοντας την ειδικότητα της έκφρασης του ιού στους SST-διάμεσους νευρώνες και παρουσιάζοντας σημαντικά αυξημένη λεπτομέρεια συγκριτικά με τη χρώση του αντισώματος α -SST.

Στη συνέχεια, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2 «Υπόθεση Μελέτης», προκειμένου να μελετηθεί ο πιθανός ρόλος της TAG-1 στη μυελίνωση των SST-διάμεσων νευρώνων στον ιπποκάμπο, έγινε ανακατασκευή και μελέτη αυτών. Στην Εικόνα 25 παρατίθενται ενδεικτικά δύο τρισδιάστατες (3D) ανακατασκευές SST-διάμεσων νευρώνων Tag-1 cKO και control μυός.

Η ανίχνευση του συν-εντοπισμού των mCherry και MBP επέτρεψε την ανάλυση των μεσοκομβικών περιοχών (internodes) των SST-διάμεσων νευρώνων εστιάζοντας στο μήκος τους αλλά και στον αριθμό τους όπως αναγράφεται ακολούθως.



Εικόνα 24: Ανοσοϊστοχημεία mCherry και SST στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου control και Tag-1 cKO μυών (p44-p49). Με πράσινο απεικονίζεται ο φθορισμός του mCherry και με κόκκινο απεικονίζεται ο φθορισμός της SST.



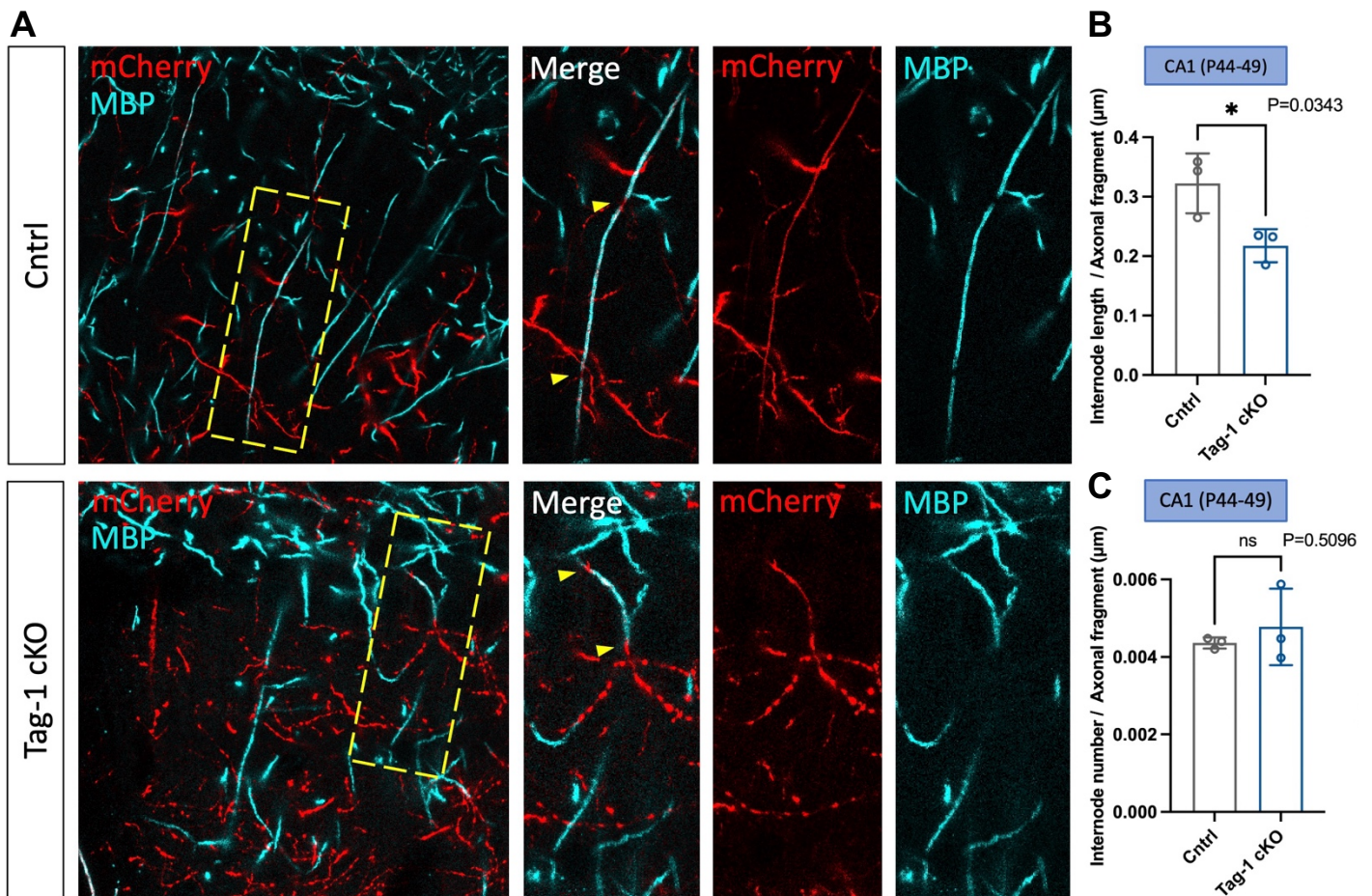
Εικόνα 25: Τρισδιάστατη (3D) ανακατασκευή SST-διάμεσων νευρώνων Tag-1 cKO και control μυών (p44-p49) μέσω του λογισμικού Simple Neurite Tracer. Με κόκκινο απεικονίζονται τα τμήματα του άξονα που δεν καλύπτονται από μυελίνη και με κυανό απεικονίζονται οι μεσοκομβικές περιοχές μυελίνης.

Μήκος Μεσοκομβικών Περιοχών

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση χρησιμοποιώντας τα δεδομένα του συνόλου των αξόνων που ανακατασκευάστηκαν από τους Tag-1 cKO και control μύες. Η κανονικοποίηση του μήκους κάθε μεσοκομβικής περιοχής έγινε μέσω του τύπου:

$$\text{Internode length} = \frac{\text{Μεσοκομβική περιοχή (}\mu\text{m)}}{\text{Ανιχνεύσιμος άξονας (}\mu\text{m)}} .$$

Υπολογίστηκε ο μέσος όρος των internode length κάθε βιολογικής επανάληψης και συγκρίθηκαν οι τιμές μεταξύ των Tag-1 cKO και control μυών. Η ανάλυση αυτή φανέρωσε μια στατιστικά σημαντική μείωση του μήκους των μεσοκομβικών περιοχών στους Tag-1 cKO μύες συγκριτικά με τους control μύες ($P=0,0343$) όπως φαίνεται στην Εικόνα 26.



Εικόνα 26: (A) Ανοσοϊστοχημεία mCherry και MBP στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπτου control και Tag-1 cKO μυών (p44-p49). Με κόκκινο απεικονίζεται ο φθορισμός του mCherry και με κυανό απεικονίζεται ο φθορισμός της MBP. (B) Ραβδόγραμμα που απεικονίζει το μήκος των μεσοκομβικών περιοχών ως προς το παρατηρήσιμο μήκος του άξονα control και Tag-1 cKO μυών (p44-p49). (C) Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τον αριθμό των μεσοκομβικών περιοχών ως προς το παρατηρήσιμο μήκος του άξονα control και Tag-1 cKO μυών (p44-p49).

Αριθμός Μεσοκομβικών Περιοχών

Παράλληλα, εξετάστηκε η πιθανή επίπτωση στον αριθμό των internode κατά μήκος των αξόνων. Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση χρησιμοποιώντας τα δεδομένα του συνόλου των αξόνων που ανακατασκευάστηκαν από τους Tag-1 cKO και control μύες. Η κανονικοποίηση του αριθμού κάθε internode έγινε μέσω του τύπου:

$$\text{internode number} = \frac{\text{Αριθμός μεσοκομβικών περιοχών}}{\text{Ανιχνεύσιμος άξονας (\mu\text{m})}}$$

Υπολογίστηκε ο μέσος όρος των internode number ανά βιολογική επανάληψη και συγκρίθηκαν οι τιμές μεταξύ των Tag-1 cKO και control μυών. Ωστόσο, η ανάλυση δεν φανέρωσε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό των μεσοκομβικών περιοχών ανά άξονα μεταξύ Tag-1 cKO και control μυών ($P=0,5096$) (Εικόνα 26)

5. Συζήτηση

Όπως προηγουμένως αναφέρθηκε, οι διάμεσοι νευρώνες έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της νευρικής δραστηριότητας και στη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ της διέγερσης και της αναστολής. Παρόλο που πολλαπλές επιστημονικές μελέτες έχουν αναδείξει τον σημαντικό ρόλο των διάμεσων νευρώνων στην εμφάνιση και την εξέλιξη διαφόρων ασθενειών του νευρικού συστήματος, η συμβολή της μυελίνωσής τους σε τέτοιες παθολογικές καταστάσεις παραμένει ασαφής. Έχουν γίνει προσπάθειες να διευκρινιστεί η σημασία της μυελίνωσης των διάμεσων νευρώνων, τόσο στο πλαίσιο των ασθενειών όσο και στη φυσιολογία τους, ωστόσο πολλά ερωτήματα εξακολουθούν να μην έχουν απαντηθεί. Παθήσεις όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας (Junker et al., 2020; Zoupi et al., 2021), η σχιζοφρένεια (Uranova et al., 2011; Chavarria-Siles et al., 2016), ο αυτισμός (Galvez-Contreras et al., 2020; Chao et al., 2010) και η επιληψία (Dubey et al., 2022) συνδέονται στενά με τους διάμεσους νευρώνες, επομένως, κρίνεται αναγκαία η διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο η απομυελίνωση πιθανόν επηρεάζει την εμφάνιση και την εξέλιξη αυτών των ασθενειών. Η πρόσφατη καταγραφή του αξιοσημείωτου ποσοστού μυελίνωσης των διάμεσων νευρώνων των περιοχών *stratum pyramidale* και *stratum radiatum* της περιοχής CA1 (80%) θέτει ερωτήματα σχετικά με την συσχέτιση που ενδέχεται να υπάρχει μεταξύ ασθένειας και ελαττωματικής μυελίνωσης των διάμεσων νευρώνων του ιπποκάμπτου.

Μια πιθανή υπόθεση που έχει προταθεί σχετίζεται με την πρωτεΐνη TAG-1 η οποία αποτελεί δομικό συστατικό των εγγύς παρακομβικών περιοχών κατά τη μυελίνωση τόσο των διεγερτικών όσο και των ανασταλτικών νευρώνων. Η TAG-1 σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα μέλη του συμπλόκου των εγγύς παρακομβικών περιοχών, έχουν εμπλακεί σε φλεγμονώδεις νευρολογικές νόσους σε μύες και στον άνθρωπο, ειδικά στη σκλήρυνση κατά πλάκας. Με αφορμή τις παραπάνω πληροφορίες, μελετήσαμε αρχικά τις δύο μεγαλύτερες ομάδες διάμεσων νευρώνων στον

ιπποκάμπο, οι PV+ και οι SST+. Ύστερα από τη διεξαγωγή μίας σειράς *in vivo* πειραμάτων σε μύες ελλειμματικούς για την TAG-1 (Tag-1 KO) μελετήσαμε τη CA1 περιοχή του ιπποκάμπου, όπου δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στη μυελίνωση των PV-διάμεσων νευρώνων. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μείωση στη μυελίνωση των SST-διάμεσων νευρώνων της περιοχής αυτής.

Σε αυτή τη μελέτη, διερευνήσαμε αναλυτικότερα την πηγή αυτής της μείωσης της μυελίνης, αναλύοντας το μήκος και τον αριθμό των μεσοκομβικών περιοχών (internodes). Για τον σκοπό αυτό, μύες της διαγονιδιακής σειράς Sst cre;Tag-1 flox, μολύνθηκαν με ιικό πλασμίδιο που φέρει cre-εξαρτώμενη φθορίζουσα αλληλουχία (tdTomato). Αξιοποιήθηκε αυτή η προσέγγιση προκειμένου να επιτευχθεί λεπτομερής χρώση των SST-διάμεσων νευρώνων που εκφράζουν την Cre ρεκομπινάση. Στη συνέχεια, ακολούθησε ανοσοϊστοχημεία σε τομές εγκεφάλου των μυών που έλαβαν το πλασμίδιο με αντισώματα anti-SST και anti-MBP, οι οποίες παρατηρήθηκαν με μικροσκόπιο συνεστιακής μικροσκοπίας (Leica sp8 confocal microscope). Από τις στατιστικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στα αποτελέσματα των μετρήσεων, διαπιστώθηκε μείωση του μήκους των μεσοκομβικών περιοχών στους Tag-1 cKO μύες συγκριτικά με τους control μύες, ενώ ο αριθμός τους παραμένει अपαράλλαχτος. Αξίζει να σημειωθεί πως όταν οι άξονες των Tag-1 cKO και control μυών διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες βάσει του παρατηρήσιμου μεγέθους τους (άξονες μικρότεροι των 500μm – άξονες μεγαλύτεροι των 500μm) και επαναλήφθηκαν οι στατιστικές αναλύσεις, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του μήκους των μεσοκομβικών περιοχών στους άξονες της κατηγορίας «μικρότεροι των 500μm». Ωστόσο, εφόσον τα συνολικά μήκη των αξόνων που μετρήθηκαν, δεν αποτελούν το πλήρες μήκος του άξονα, αλλά το τμήμα του που είναι διακριτό στην τομή του εγκεφάλου που αναλύθηκε, είναι αδύνατη η διαφοροποίησή τους στις διάφορες κατηγορίες SST-διάμεσων νευρώνων βάσει προϋπάρχουσας βιβλιογραφίας.

Ενδεχομένως, η μείωση που παρατηρήθηκε στην μυελίνωση να συνδέεται με τον ρόλο της TAG-1 ως διαμεσολαβητής της σύνδεσης του άξονα με το έλυτρο της μυελίνης στην περιοχή των εγγύς παρακομβικών περιοχών, μέσω της αλληλεπίδρασής της με την Caspr2 και της γλοιακής TAG-1. Ο λόγος που η απαλοιφή της TAG-1 φαίνεται να επηρεάζει την μυελίνωση των SST+ νευρώνων, και όχι των PV+, παραμένει να διερευνηθεί. Η αλληλεπίδραση της TAG-1 με την Caspr2 στις εγγύς παρακομβικές περιοχές, μία πρωτεΐνη που είναι γνωστό πως σχετίζεται με την επιληψία, τη σχιζοφρένεια και τον αυτισμό (Lu et al., 2016), θέτει ερωτήματα για τον

ρόλο που μπορεί να έχει η TAG-1 στη στρατολόγηση της Caspr2 στην περιοχή, και κατεξοχήν στην μοριακή οργάνωση της μυελίνης.

6. Βιβλιογραφία

- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, 25(23), R1116–R1121. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>
- Squire, L. R., Stark, C. E. L., & Clark, R. E. (2004). THE MEDIAL TEMPORAL LOBE. *Annual Review of Neuroscience*, 27(1), 279–306. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144130>
- Kraus, B. J., Robinson, R. J., White, J. A., Eichenbaum, H., & Hasselmo, M. E. (2013). Hippocampal “time cells”: Time versus path integration. *Neuron*, 78(6), 1090–1101. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.04.015>
- Fanselow, M. S., & Dong, H.-W. (2010). Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron*, 65(1), 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>
- Pépin, Jérémy & Jegou, Pierrick & Valette, Julien & Bonvento, Gilles & Flament, Julien. (2017). Imaging of neuronal compartment using gluCEST method..
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., & Williams, S. M. (2001). Excitatory and Inhibitory Postsynaptic Potentials. In *Neuroscience. 2nd edition*. Sinauer Associates. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11117/>
- Schröder, H., Moser, N., & Huggenberger, S. (2020). The Mouse Hippocampus. In H. Schröder, N. Moser, & S. Huggenberger (Eds.), *Neuroanatomy of the Mouse: An Introduction* (pp. 267–288). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19898-5_11
- Pelkey, K. A., Chittajallu, R., Craig, M. T., Tricoire, L., Wester, J. C., & McBain, C. J. (2017). Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons. *Physiological Reviews*, 97(4), 1619–1747. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2017>

- Marín, O. (2012). Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(2), 107–120. <https://doi.org/10.1038/nrn3155>
- Righes Marafiga, J., Vendramin Pasquetti, M., & Calcagnotto, M. E. (2021). GABAergic interneurons in epilepsy: More than a simple change in inhibition. *Epilepsy & Behavior*, 121, 106935. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.106935>
- Honoré, E., Khlaifia, A., Bosson, A., & Lacaille, J.-C. (2021). Hippocampal Somatostatin Interneurons, Long-Term Synaptic Plasticity and Memory. *Frontiers in Neural Circuits*, 15. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncir.2021.687558>
- Liguz-Leczna, M.; Dobrzanski, G.; Kossut, M. Somatostatin and Somatostatin-Containing Interneurons—From Plasticity to Pathology. *Biomolecules* 2022, 12, 312. <https://doi.org/10.3390/biom12020312>
- Pittman, Q. J., & Siggins, G. R. (1981). Somatostatin hyperpolarizes hippocampal pyramidal cells in vitro. *Brain Research*, 221(2), 402–408. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90791-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90791-5)
- Song, YH., Yoon, J. & Lee, SH. The role of neuropeptide somatostatin in the brain and its application in treating neurological disorders. *Exp Mol Med* 53, 328–338 (2021). <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00580-4>
- Mikulovic, S., Restrepo, C. E., Hilscher, M. M., Kullander, K., and Leao, R. (2015). Novel markers for olm interneurons in the hippocampus. *Front. Cell. Neurosci.* 9:201. doi: 10.3389/fncel.2015.00201
- Lovett-Barron, M., Kaifosh, P., Kheirbek, M. A., Danielson, N., Zaremba, J. D., Reardon, T. R., et al. (2014). Dendritic inhibition in the hippocampus supports fear learning. *Science* 343, 857–863. doi: 10.1126/science.1247485
- Stadelmann, C., Timmler, S., Barrantes-Freer, A., & Simons, M. (2019). Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. *Physiological Reviews*, 99(3), 1381–1431. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2018>
- Sherman, D., Brophy, P. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 6, 683–690 (2005). <https://doi.org/10.1038/nrn1743>

- Zalc, B. (2006). The acquisition of myelin: A success story. *Novartis Found. Symp.* 276, 15–21. doi:10.1002/9780470032244.ch3
- Bonetto, G., Belin, D., & Káradóttir, R. T. (2021). Myelin: A gatekeeper of activity-dependent circuit plasticity? *Science (New York, N.Y.)*, 374(6569), eaba6905. <https://doi.org/10.1126/science.aba6905>
- Harayama, T., Riezman, H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 281–296 (2018). <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>
- Podbielska, M., Banik, N. L., Kurowska, E., & Hogan, E. L. (2013). Myelin Recovery in Multiple Sclerosis: The Challenge of Remyelination. *Brain Sciences*, 3(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/brainsci3031282>
- Galvez-Contreras, A. Y., Zarate-Lopez, D., Torres-Chavez, A. L., & Gonzalez-Perez, O. (2020). Role of Oligodendrocytes and Myelin in the Pathophysiology of Autism Spectrum Disorder. *Brain Sciences*, 10(12), 951. <https://doi.org/10.3390/brainsci10120951>
- Kalafatakis I, Karagogeos D. Oligodendrocytes and Microglia: Key Players in Myelin Development, Damage and Repair. *Biomolecules*. 2021 Jul 20;11(7):1058. doi: 10.3390/biom11071058. PMID: 34356682; PMCID: PMC8301746.
- Valdés-Tovar, M., Rodríguez-Ramírez, A. M., Rodríguez-Cárdenas, L., Sotelo-Ramírez, C. E., Camarena, B., Sanabrais-Jiménez, M. A., Solís-Chagoyán, H., Argueta, J., & López-Riquelme, G. O. (2022). Insights into myelin dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *World Journal of Psychiatry*, 12(2), 264–285. <https://doi.org/10.5498/wjp.v12.i2.264>
- Kalafatakis I, Savvaki M, Velona T, Karagogeos D. Implication of Contactins in Demyelinating Pathologies. *Life (Basel)*. 2021 Jan 13;11(1):51. doi: 10.3390/life11010051. PMID: 33451101; PMCID: PMC7828632.
- Boyle, M. E., Berglund, E. O., Murai, K. K., Weber, L., Peles, E., & Ranscht, B. (2001). Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve. *Neuron*, 30(2), 385–397. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00296-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00296-3)

- Rasband, M. N., & Peles, E. (2016). The Nodes of Ranvier: Molecular Assembly and Maintenance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(3), a020495. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020495>
- Hivert, B., Pinatel, D., Labasque, M., Tricaud, N., Goutebroze, L., and Faivre-Sarrailh, C. (2016). Assembly of juxtaparanodes in myelinating DRG culture: Differential clustering of the Kv1/Caspr2 complex and scaffolding protein 4.1B. *Glia* 64, 840–852. <https://doi.org/10.1002/glia.22968>.
- Traka, M., Goutebroze, L., Denisenko, N., Bessa, M., Nifli, A., Havaki, S., Iwakura, Y., Fukamauchi, F., Watanabe, K., Soliven, B., Girault, J.-A., & Karagogeos, D. (2003). Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *The Journal of Cell Biology*, 162(6), 1161–1172. <https://doi.org/10.1083/jcb.200305078>
- Aggarwal, S., Yurlova, L., & Simons, M. (2011). Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends in cell biology*, 21(10), 585–593. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.06.004>
- Djannatian, M., Timmler, S., Arends, M., Luckner, M., Weil, M. T., Alexopoulos, I., Snaidero, N., Schmid, B., Misgeld, T., Möbius, W., Schifferer, M., Peles, E., & Simons, M. (2019). Two adhesive systems cooperatively regulate axon ensheathment and myelin growth in the CNS. *Nature communications*, 10(1), 4794. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12789-z>
- Furley, A. J., Morton, S. B., Manalo, D., Karagogeos, D., Dodd, J., & Jessell, T. M. (1990). The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity. *Cell*, 61(1), 157–170. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90223-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90223-2)
- Dodd, J., Morton, S. B., Karagogeos, D., Yamamoto, M., & Jessell, T. M. (1988). Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons. *Neuron*, 1(2), 105–116. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(88\)90194-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(88)90194-8)
- Wolfer, D. P., Henahan-Beatty, A., Stoeckli, E. T., Sonderegger, P., & Lipp, H. P. (1994). Distribution of TAG-1/axonin-1 in fibre tracts and migratory streams of

the developing mouse nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, 345(1), 1–32. <https://doi.org/10.1002/cne.903450102>

- Savvaki, M., Panagiotaropoulos, T., Stamatakis, A., Sargiannidou, I., Karatzioula, P., Watanabe, K., Stylianopoulou, F., Karagogeos, D., & Kleopa, K. A. (2008). Impairment of learning and memory in TAG-1 deficient mice associated with shorter CNS internodes and disrupted juxtaparanodes. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 39(3), 478–490. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.07.025>
- Savvaki, M., Theodorakis, K., Zoupi, L., Stamatakis, A., Tivodar, S., Kyriacou, K., Stylianopoulou, F., & Karagogeos, D. (2010). The Expression of TAG-1 in Glial Cells Is Sufficient for the Formation of the Juxtaparanodal Complex and the Phenotypic Rescue of Tag-1 Homozygous Mutants in the CNS. *Journal of Neuroscience*, 30(42), 13943–13954. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2574-10.2010>
- Traka, M., Goutebroze, L., Denisenko, N., Bessa, M., Nifli, A., Havaki, S., Iwakura, Y., Fukamauchi, F., Watanabe, K., Soliven, B., Girault, J.-A., & Karagogeos, D. (2003). Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *The Journal of Cell Biology*, 162(6), 1161–1172. <https://doi.org/10.1083/jcb.200305078>
- Poliak, S., Salomon, D., Elhanany, H., Sabanay, H., Kiernan, B., Pevny, L., Stewart, C. L., Xu, X., Chiu, S.-Y., Shrager, P., Furley, A. J. W., & Peles, E. (2003). Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K⁺ channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. *Journal of Cell Biology*, 162(6), 1149–1160. <https://doi.org/10.1083/jcb.200305018>
- Micheva, K. D., Wolman, D., Mensh, B. D., Pax, E., Buchanan, J., Smith, S. J., & Bock, D. D. (2016). A large fraction of neocortical myelin ensheathes axons of local inhibitory neurons. *eLife*, 5, e15784. <https://doi.org/10.7554/eLife.15784>
- Micheva, K. D., Kiraly, M., Perez, M. M., & Madison, D. V. (2021). Extensive Structural Remodeling of the Axonal Arbors of Parvalbumin Basket Cells during

Development in Mouse Neocortex. *The Journal of Neuroscience*, 41(45), 9326–9339. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0871-21.2021>

- Stedehouder, J., Couey, J. J., Brizee, D., Hosseini, B., Slotman, J. A., Dirven, C. M. F., Shpak, G., Houtsmuller, A. B., & Kushner, S. A. (2017). Fast-spiking Parvalbumin Interneurons are Frequently Myelinated in the Cerebral Cortex of Mice and Humans. *Cerebral Cortex*, 27(10), 5001–5013. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx203>
- Bonetto, G., Hivert, B., Goutebroze, L., Karagogeos, D., Crépel, V., & Faivre-Sarrailh, C. (2019). Selective Axonal Expression of the Kv1 Channel Complex in Pre-myelinated GABAergic Hippocampal Neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 222. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00222>
- Rudick, R. A., Trapp, B. D (2009). Gray-Matter Injury in Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2009, 361, 1505–1506.
- Yarmolinsky, M., Hoess, R. (2015). The Legacy of Nat Sternberg: The Genesis of Cre-lox Technology. *Annu. Rev. Virol.* 2015. 2:25–40. doi: 10.1146/annurev-virology-100114-054930
- McLellan, M. A., Rosenthal, N. A., and Pinto, A. R. (2017). Cre-loxP-mediated recombination: General principles and experimental considerations. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 7:1-12. doi: 10.1002/cpmo.22
- Πληροφορίες για την πειραματική διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR): <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/technical-documents/technical-article/genomics/pcr/polymerase-chain-reaction>
- Karunanathie, H., Kee, P. S., Ng, S. F., Kennedy M. A., Chua, E. W. (2022). PCR enhancers: Types, mechanisms, and applications in long-range PCR, *Biochimie*, Volume 197, 2022, Pages 130-143, ISSN 0300-9084. doi: 10.1016/j.biochi.2022/02/009
- Botterill, J. J., Khlaifia, A., Walters, B. J., Brimble, M. A., Scharfman, H. E., Arruda-Carvalho, M. (2021) Off-target expression of Cre-dependent adeno-associated viruses in wild-type C57BL/6J mice. *eNeuro* 8:ENEURO.0363-21.2021. doi:10.1523/ENEURO.0363-21.2021

- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E., Tsien, R. Y. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* 2004 Dec;22(12):1567-72. doi: 10.1038/nbt1037
- Taylor, Z. V., Khand, B., Porgador, A., Monsonego, A., Eremenko, E. (2021) An optimized intracerebroventricular injection of CD4⁺ T cells into mice, *STAR Protocols*, Volume 2, Issue 3, 2021, 100725, doi: 10.1016/j.xpro.2021.100725
- Wu J, Cai Y, Wu X, Ying Y, Tai Y, He M. Transcardiac Perfusion of the Mouse for Brain Tissue Dissection and Fixation. *Bio Protoc.* 2021 Mar 5;11(5):e3988. doi: 10.21769/BioProtoc.3988. PMID: 33796622; PMCID: PMC8005872.
- Hou Y, Zhang Q, Liu H, Wu J, Shi Y, Qi Y, Shao M, Yang Z, Lu J, Wu Z, Gong L, He M. Topographical organization of mammillary neurogenesis and efferent projections in the mouse brain. *Cell Rep.* 2021 Feb 9;34(6):108712. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108712. PMID: 33567285.
- Lu, Z., Reddy, M. V. V. S., Liu, J., Kalichava, A., Liu, J., Zhang, L., Chen, F., Wang, Y., Holthauzen, L. M. F., White, M. A., Seshadrinathan, S., Zhong, X., Ren, G., & Rudenko, G. (2016). Molecular Architecture of Contactin-associated Protein-like 2 (CNTNAP2) and Its Interaction with Contactin 2 (CNTN2) *. *Journal of Biological Chemistry*, 291(46), 24133–24147. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.748236>