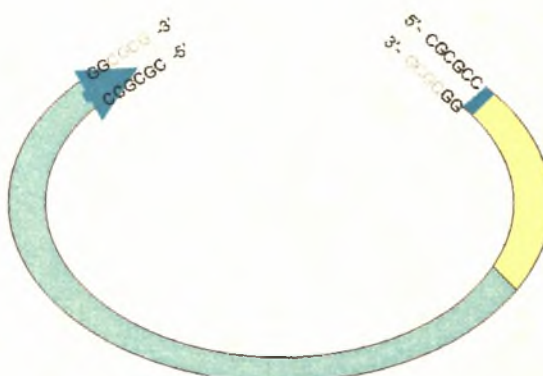




ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ ΓΙΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΥΝΑΦΕΙΑΣ TAG-1 ΣΤΑ ΟΛΙΓΟΔΕΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ, ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ SCHWANN ΚΑΙ ΣΤΟΥΣ ΝΕΥΡΩΝΕΣ

5'- GG Rat TAG-1 (~3550 bp) GAT -3'
3'- CACC CTA -5'

+



ΑΜΠΡΑΖΗ ΜΑΡΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ηράκλειο Κρήτης, 2005



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4673/1
Ημερ. Εισ.: 10-11-2005
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2005
ΑΜΠ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087858

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διπλωματική μου εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο της Dr Δόμνας Καραγωγέως, στο τμήμα Βασικών Επιστημών, στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης. Θα ήθελα να ευχαριστήσω κατ'αρχήν, τον καθηγητή μου, κ. Κωνσταντίνο Ματθιοπουλο που μου σύστησε την κ Δόμνα Καραγωγέως αλλά και την ίδια την κ. Δόμνα Καραγωγέως που με δέχτηκε στο εργαστήριό της και μου έδωσε την ευκαιρία να γνωρίσω ένα νέο περιβάλλον, να εργαστώ σε αυτό και να αποκτήσω πολύτιμες γνώσεις και εμπειρίες.

Όπως όλοι συνηθίζουν να λένε σε αυτό το εργαστήριο... «ευχαριστώ τον Κώστα Θεοδωράκη...». Πραγματικά οφείλω θερμές ευχαριστίες στον κ. Κώστα Θεοδωράκη. Ήταν ο υπεύθυνος μου αλλά και η ψυχή του εργαστηρίου. Σ'αυτά τα πρώτα μου ερευνητικά βήματα, με βοήθησε να μάθω πώς να δουλεύω μέσα σε ένα εργαστήριο και πώς να κινητοποιώ την ερευνητική μου σκέψη. Δεν θα ξεχάσω πόσες φορές πριν απαντήσει τις ερωτήσεις μου με έβαζε να ψάχνω σε όλα τα βιβλία για να βρω την απάντηση...αλλά κι αυτός είμαι σίγουρη πως δεν θα ξεχάσει πόσες απορίες είχα!

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω την πλέον καλή μου φίλη Έλενα Βοργιά. Ήμαστε μαζί από την πρώτη μέρα στο εργαστήριο καθώς και οι δύο ξεκινούσαμε τη διπλωματική μας εργασία. Με την Έλενα περάσαμε όλες τις ωραίες στιγμές στο εργαστήριο αλλά και τις λίγες κακές. Ήμαστε «οι μικρές» αλλά και «η κρυφή η δύναμη» του εργαστηρίου...στην κατανάλωση γλυκών! Την ευχαριστώ για την ηθική συμπαράσταση και για την παρέα της. Δεν μπορώ να φανταστώ πως θα ήταν αυτοί οι τέσσερις μήνες χωρίς την Έλενα. Της εύχομαι του χρόνου να είναι πιο τυχερή με τα μεταπτυχιακά και να κάνει αυτό που πραγματικά θέλει και της αρέσει.

Αυτό που δεν θα ξεχάσω σίγουρα από αυτό το εργαστήριο είναι το ευχάριστο και συναδελφικό κλίμα που επικρατούσε. Γι'αυτό θα ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου της Dr Δ.Καραγωγέως, τον Νίκο Μπαλάσκα, την Μαρκέλλα Κατίδου, τον Γιώργο Τριχά, την Μαρία Καλατζάκη, την Σέβη Γιασεμή, την Ελένη Ρενιέρη, την Μαρίνα Βιδάκη, την Μαρία Βλαβάκη και τον Αλέξανδρο Τζιμουράκα. Με βοήθησαν σε οτιδήποτε και αν χρειάστηκα. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την παλιά μου συμφοιτήτρια Μαρία Σαββάκη για την βοήθεια και τις οδηγίες της ως προς τον εγκλιματισμό μου στο νέο περιβάλλον.

Δεν θα παραλείψω να ευχαριστήσω και την καθηγήτριά μου, κ. Αιμιλία Ζίφα για τις πολύτιμες παρατηρήσεις και τις βοηθητικές της διορθώσεις κατά τη συγγραφή της εργασίας αυτής.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου. Χωρίς να υπολογίσουν τα έξοδα και την απόσταση από το σπίτι μου, με στήριξαν στην απόφασή μου να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο Πανεπιστήμιο Κρήτης. Στάθηκαν δίπλα μου όπως κάνουν σε κάθε μου απόφαση και κάθε μου βήμα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

• ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
• ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	7
1. ΓΕΝΙΚΑ.....	7
2. Ο ΝΕΥΡΩΝΑΣ.....	7
3. ΝΕΥΡΟΓΛΟΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	9
II. ΜΥΕΛΙΝΩΣΗ ΝΕΥΡΙΚΗΣ ΙΝΑΣ.....	10
1. ΓΕΝΙΚΑ.....	10
2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΥΕΛΙΝΗΣ.....	11
3. ΟΙ ΔΙΑΚΡΙΤΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ ΝΕΥΡΑΞΟΝΑ.....	12
4. ΤΑ ΜΟΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΥΝΑΦΕΙΑΣ ΣΤΗ ΜΥΕΛΙΝΩΣΗ ΝΕΥΡΙΚΗΣ ΙΝΑΣ.....	14
A. Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας.....	14
B. Ο ρόλος τους στη μυελίνωση νευρικής ίνας.....	16
III. Η ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΙΝΗ TAG-1.....	17
1. ΓΕΝΙΚΑ.....	17
2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ TAG-1 ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ.....	18
3. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ TAG-1 ΣΤΑ ΝΕΥΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΕΝΗΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΚΑΙ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.....	19
> Μοντέλο αλληλεπίδρασης TAG-1/Caspr2/κανάλια K^+	20
> Φαινότυπος των TAG-1 knock-out ποντικών.....	21
IV. ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	22
• ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ.....	23
2. ΠΕΨΗ ΜΟΡΙΩΝ DNA ΜΕ ΕΝΖΥΜΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ.....	23
3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	24
4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	24
α. Ηλεκτροέκλουση.....	25
β. Καθαρισμός DNA.....	25
5. FILLING & BLUNTING ΣΤΑ ΚΟΜΜΕΝΑ ΤΜΗΜΑΤΑ DNA.....	25
α. FILLING.....	26
β. BLUNTING.....	26
6. ΑΠΟΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ VECTOR.....	26
7. ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΩΝ DNAs ΓΙΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ (ligation).....	26
8. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ (electrocompetent) E.coli ΜΕ DNAs ΤΗΣ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΜΑΣ.....	27
9. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ.....	27
10. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA.....	28
α. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα.....	28
β. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα.....	29
γ. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα.....	29

• ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	31
1. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΓΙΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ TAG-1 ΣΤΑ ΟΛΙΓΟΔΕΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	31
2. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΓΙΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ TAG-1 ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ SCHWANN.....	37
3. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΓΙΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ TAG-1 ΣΤΟΥΣ ΝΕΥΡΩΝΕΣ.....	41
• ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
1. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΓΙΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ TAG-1 ΣΤΑ ΟΛΙΓΟΔΕΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	46
2. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΓΙΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ TAG-1 ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ SCHWANN.....	47
3. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΓΙΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ TAG-1 ΣΤΟΥΣ ΝΕΥΡΩΝΕΣ.....	47
4. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ.....	48
• ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	50

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα γλοιακά κύτταρα που σχηματίζουν το έλυτρο της μυελίνης (ολιγοδενδροκύτταρα στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και κύτταρα Schwann στο περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ)) και οι νευράξονες αλληλεπιδρούν και επηρεάζουν αμοιβαία την ανάπτυξή τους. Όπως είναι γνωστό αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι απαραίτητες για το σχηματισμό και τη διατήρηση των εξειδικευμένων περιοχών των νευραξόνων στις εμμέλες ίνες (π.χ. κόμβος Ranvier, παρακομβική και εγγύς παρακομβική περιοχή). Η διάκριση του νευράξονα στις περιοχές αυτές εξυπηρετεί τη συγχρονισμένη λειτουργία των τασεοελεγχόμενων διαύλων Na^+ και K^+ , η οποία είναι απαραίτητη για την ταχεία αγωγή του δυναμικού ενεργείας κατά μήκος των εμμέλων ινών. Όταν η φυσιολογική δομή της περιοχής του κόμβου του Ranvier διαταράσσεται οδηγεί σε περιπτώσεις νευρολογικές διαταραχές, όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας και το σύνδρομο Guillain-Barre.

Σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση νευρώνων-γλοιακών κυττάρων, κατέχουν μόρια κυτταρικής συνάφειας που ανήκουν στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών (IgSF) και μόρια της υπεροικογένειας της neurexin/NCP. Ανάμεσα σε αυτά είναι και η πρωτεΐνη TAG-1 (IgSF), η οποία δημιουργεί ένα σύμπλοκο με την Caspr2 της οικογένειας των νευρεξινών (neurexin). Αυτό το σύμπλοκο είναι απαραίτητο για τη συσσώρευση των διαύλων K^+ στις εγγύς παρακομβικές περιοχές, καθώς η εσκεμμένη αποδιοργάνωση του γονιδίου της TAG-1 έχει ως αποτέλεσμα τη δραματική μετατόπιση και διάχυση των καναλιών αυτών μακριά από τις εγγύς παρακομβικές περιοχές των νευραξόνων του ΚΝΣ και του ΠΝΣ.

Για να διερευνήσουμε τον ακριβή ρόλο που παίζει η TAG-1 στη σωστή διαμόρφωση και λειτουργία των παρακομβικών περιοχών και για να επιμερίσουμε την TAG-1 των γλοιακών κυττάρων και των νευραξόνων θα δημιουργήσουμε πειραματόζωα που θα εκφράζουν την TAG-1 μόνο στα ολιγοδενδροκύτταρα ή στα κύτταρα Schwann ή στους νευρώνες. Για να επιτευχθεί αυτό δημιουργήθηκαν τρεις DNA κατασκευές. Η πρώτη πλασμιδιακή κατασκευή (PLP-TAG-1) οδηγεί την έκφραση του cDNA της TAG-1 στα ολιγοδενδροκύτταρα λόγω του υποκινητή του γονιδίου PLP, (που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PLP και έχει χρησιμοποιηθεί για έκφραση πρωτεϊνών σε ολιγοδενδροκύτταρα σε διαγονιδιακά ζώα (Furley et al., 1990; Wight et al., 1993; Fuss et al., 2001)). Η δεύτερη οδηγεί την έκφραση του cDNA της TAG-1 στα κύτταρα Schwann (κατασκευή P_0) και η τρίτη σε νευρώνες (κατασκευή Thy1).

Η δημιουργία της πρώτης κατασκευής (PLP-TAG-1) στέφθηκε με επιτυχία. Αντιθέτως, η δεύτερη κατασκευή (P_0 -TAG-1) δεν ολοκληρώθηκε καθώς παρουσιάστηκαν προβλήματα κατά την κοπή και απομόνωση του τμήματος DNA το οποίο περιείχε τον υποκινητή P_0 (vector). Δεν υπήρχαν επίσης αρκετά στοιχεία σχετικά με τον χάρτη του τμήματος αυτού. Όσον αφορά την τρίτη κατασκευή (Thy-1-TAG-1), αρχικά έγινε προσπάθεια δημιουργίας της κατασκευής (Thy-1-TAG-1-GFP) η οποία δυστυχώς απέτυχε. Στη συνέχεια επιχειρήθηκε η δημιουργία κατασκευής (Thy-1-TAG-1) η οποία και τελείωσε επιτυχώς. Παρ'όλα αυτά επειδή υπήρχαν λάθος στοιχεία σχετικά με το τμήμα του DNA που περιείχε τον υποκινητή Thy-1 (vector) η δημιουργία της κατασκευής (Thy-1-TAG-1-GFP) θα επιχειρηθεί εκ νέου με άλλο vector για τον οποίο έχουμε περισσότερα στοιχεία.

Οι κατασκευές αυτές θα ενεθούν, στη συνέχεια σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωκυττάρων. Μετά από τρεις διασταυρώσεις θα δημιουργηθούν ποντίκια που θα εκφράζουν το γονίδιο της TAG-1 επιλεκτικά στα ολιγοδενδροκύτταρα ή στα κύτταρα Schwann ή στους νευρώνες μόνο, προς εξέταση του φαινοτύπου των ατόμων αυτών.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ι. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

1. Γενικά

Στο ανθρώπινο σώμα υπάρχουν δύο συστήματα ελέγχου για το συντονισμό της λειτουργίας των τρισεκατομμυρίων κυττάρων του. Το ένα, το ενδοκρινικό σύστημα, είναι μία συλλογή μνηματοφόρων μορίων που μεταφέρονται από το αίμα και έχει βραδεία δράση ενώ, το άλλο, το νευρικό σύστημα, είναι ένα σύστημα ελέγχου με ταχεία δράση. Τα δύο αυτά συστήματα μαζί ρυθμίζουν τις περισσότερες εσωτερικές λειτουργίες του οργανισμού και ελέγχουν τις δραστηριότητες που συνολικά γνωρίζουμε ως συμπεριφορά. Επίσης, εξασφαλίζουν την επικοινωνία του οργανισμού με το περιβάλλον.

Οι ποικίλες δομές του νευρικού συστήματος διασυνδέονται στενά μεταξύ τους αλλά διακρίνονται σε δύο μέρη: το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) που αποτελείται από τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό και το περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ), που αποτελείται από νεύρα που εκτείνονται από τον εγκέφαλο ή το νωτιαίο μυελό ως τους μύς, τους αδένες και τα αισθητήρια όργανα. Το περιφερικό νευρικό σύστημα διακρίνεται περαιτέρω σε σωματικό νευρικό σύστημα, που νευρώνει τους μύς και ελέγχει τις λειτουργίες που υπόκεινται γενικά στη βούληση και το αυτόνομο νευρικό σύστημα που νευρώνει κυρίως τους αδένες, τους λείους μύς και το μυοκάρδιο και έτσι ελέγχει λειτουργίες που δεν καθοδηγούνται από τη συνείδηση ή την επίγνωση.

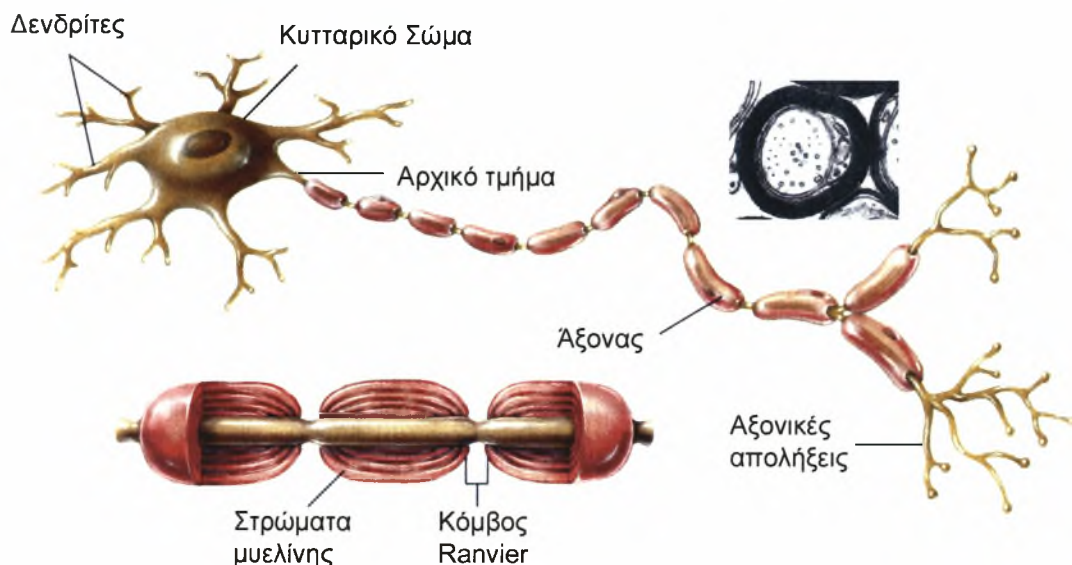
Η βασική δομική και λειτουργική μονάδα του νευρικού συστήματος είναι το νευρικό κύτταρο ή νευρώνας. Τα νευρικά κύτταρα λειτουργούν με τη γένεση ηλεκτρικών σημάτων που ταξιδεύουν από το ένα στο άλλο μέρος του ίδιου κυττάρου και με την απελευθέρωση χημικών μηνυμάτων, των επανομαζόμενων νευροδιαβιβαστών, προκειμένου να επικοινωνήσουν με άλλα κύτταρα. Το εξερχόμενο σήμα από τους νευρώνες, αντανακλά την εξισορρόπηση όλων των εισερχόμενων σημάτων που καταφτάνουν από τις χιλιάδες ή ακόμη και τις εκατοντάδες χιλιάδες άλλων νευρώνων που συγκλίνουν πάνω τους. Γι' αυτό το λόγω χαρακτηρίζονται ως ολοκληρωτές. Το νευρικό σύστημα εκτός από τους νευρώνες έχει κι ένα άλλο είδος κυττάρων, τα νευρογλοιακά κύτταρα

2. Ο νευρώνας

Ο νευρώνας, το νευρικό κύτταρο (Εικόνα 1) είναι ειδικευμένο μορφολογικά και φυσιολογικά για την αγωγή νευρικών ώσεων, δηλαδή για τη διαβίβαση κυρίως «πληροφοριών» από την περιφέρεια προς το κέντρο και «εντολών» από το κέντρο προς την περιφέρεια. Οι νευρώνες παρουσιάζονται με ποικιλία μεγεθών και μορφών, όμως οι περισσότεροι αποτελούνται από τέσσερα διακριτά μέρη: i) το κυτταρικό σώμα, ii) τους δένδριτες, iii) έναν άξονα και iv) τις αξονικές απολήξεις ή αλλιώς τα επανομαζόμενα αξονικά ή τελικά κομβία. Καθένα από αυτά τα τμήματα εκτελεί και μία διαφορετική εργασία, με κύριο πάντα στόχο την αγωγή νευρικών ώσεων.

Όπως και σε άλλους τύπους κυττάρων το κυτταρικό σώμα του νευρώνα περιέχει πυρήνα και ριβοσώματα, φέρει δηλαδή τη γενετική πληροφορία και τα απαραίτητα οργανίδια για την πρωτεϊνοσύνθεση. Έτσι, εκεί παράγονται διάφορες ουσίες όπως οι χημικοί μεταβιβαστές και άλλες ουσίες απαραίτητες για τη λειτουργία του κυττάρου. Η καταστροφή του σώματος του νευρικού κυττάρου έχει ως συνέπεια τη καταστροφή ολόκληρου του νευρικού κυττάρου.

Οι δενδρίτες σχηματίζουν μια σειρά από εκβλαστήσεις με πολλές διακλαδώσεις και ξεκινούν από το κυτταρικό σώμα. Είναι ειδικά διαμορφωμένοι για να υποδέχονται ένα μεγάλο αριθμό τελικών απολήξεων από άλλα κύτταρα κι άρα τα εισερχόμενα, από άλλους νευρώνες σήματα. Οι διακλαδώσεις τους αυξάνουν την επιφάνεια υποδοχής του κυττάρου και αυξάνουν, μ'αυτό τον τρόπο την ικανότητά του να δέχεται σήματα από χιλιάδες άλλους νευρώνες.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση ενός νευρώνα. Απεικονίζονται οι δενδρίτες, το κυτταρικό σώμα, το αρχικό τμήμα, ο άξονας, οι αξονικές απολήξεις καθώς και τα στρώματα μυελίνης και ο κόμβος Ranvier στο νευράξονα.

Ο άξονας, είναι η πιο επιμήκης αποφυάδα του νευρικού συστήματος που εκτείνεται από το κυτταρικό σώμα μέχρι τα κύτταρα-στόχους. Η κύρια λειτουργία του είναι η αγωγή νευρικών ώσεων. Το μήκος και το πάχος του ποικίλουν. Το μήκος του μπορεί να είναι από λίγα χιλιοστά μέχρι και μέτρα, ενώ το πάχος του είναι ανάμεσα στα $0,2\mu\text{m}$ και στα $20\mu\text{m}$. Το τμήμα του άξονα που βρίσκεται πιο κοντά στο κυτταρικό σώμα, μαζί με το τμήμα του κυτταρικού σώματος όπου συνδέεται ο άξονας, είναι γνωστό ως αρχικό τμήμα. Το αρχικό τμήμα είναι η «ζώνη πυροδότησης», όπου, στους περισσότερους, γεννώνται τα ηλεκτρικά σήματα που στη συνέχεια προωθούνται μακριά από το κυτταρικό σώμα κατά μήκος του άξονα ή, μερικές φορές, προς τα πίσω, κατά μήκος των δενδριτών. Ο κύριος άξονας μπορεί να έχει διακλαδώσεις κατά την πορεία του, που καλούνται παράπλευροι νευράξονες. Όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός του κύριου άξονα και των παράπλευρων νευραξόνων, τόσο μεγαλύτερη είναι και η σφαίρα επιρροής ενός κυττάρου.

Κάθε κλάδος τερματίζει σε μία αξονική απόληξη (ή τελικό κομβίο), που είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών. Το απελευθερούμενο χημικό μήνυμα διαχέεται σε ένα στενό εξωκυττάριο χώρο και φθάνει στο απέναντι κύτταρο.

Οι άξονες με διάμετρο μεγαλύτερη από 1 μm καλύπτονται από μυελίνη, η οποία αποτελείται από 20 έως 200 στρώματα κυτταρικής μεμβράνης, υψηλής διαφοροποίησης, περιτυλιγμένα γύρω από τον άξονα και τα οποία προέρχονται από ένα γειτονικό υποστηρικτικό κύτταρο. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα τα κύτταρα που σχηματίζουν τη μυελίνη ονομάζονται ολιγοδενδροκύτταρα ενώ στο περιφερικό νευρικό σύστημα αποκαλούνται κύτταρα Schwann.

3. Νευρογλοιακά κύτταρα

Τα σώματα και οι νευράξονες των νευρικών κυττάρων περιβάλλονται από νευρογλοιακά κύτταρα. Αυτά αποτελούν το δεύτερο είδος κυττάρων του νευρικού συστήματος. Υπάρχουν περίπου 10-50 φορές περισσότερα νευρογλοιακά κύτταρα από ότι νευρώνες στο ΚΝΣ των σπονδυλωτών. Τρεις είναι οι κύριοι τύποι νευρογλοιακών κυττάρων: τα ολιγοδενδροκύτταρα, τα κύτταρα Schwann και τα αστροκύτταρα.

Τα ολιγοδενδροκύτταρα και τα κύτταρα Schwann είναι μικρά κύτταρα με σχετικά λίγες αποφυάδες. Αυτά επιτελούν τη σπουδαία λειτουργία της μόνωσης των νευραξόνων, τυλίγοντας σφικτά τις μεμβρανικές αποφυάδες ομόκεντρα γύρω από το νευράξονα και σχηματίζοντας ένα έλυτρο μυελίνης. Τα ολιγοδενδροκύτταρα, τα οποία απαντούν στο ΚΝΣ, μπορεί να περιβάλλουν αρκετούς νευράξονες, 15 κατά μέσω όρο. Τα κύτταρα Schwann, τα οποία απαντούν στο ΠΝΣ, περιβάλλουν το καθένα, ένα μόνο νευράξονα. Αυτά τα δύο είδη διαφέρουν λίγο και ως προς τη χημική τους σύνθεση.

Τα αστροκύτταρα, ο τρίτος τύπος νευρογλοιακών κυττάρων, είναι τα πιο πολλά. Έχουν ανώμαλο, σχεδόν αστροειδούς σχήματος, κυτταρικό σώμα και σχετικά μακριές αποφυάδες. Μερικές από αυτές σχηματίζουν ποδίσκους στην επιφάνεια των νεύρων, του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού. Άλλα αστροκύτταρα έρχονται σε επαφή με αιμοφόρα αγγεία και αναγκάζουν τα ενδοθυλιακά κύτταρα να σχηματίσουν στενές συνδέσεις, όπως στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

Παρακάτω αναφέρονται επιγραμματικά οι λειτουργίες των νευρογλοιακών κυττάρων:

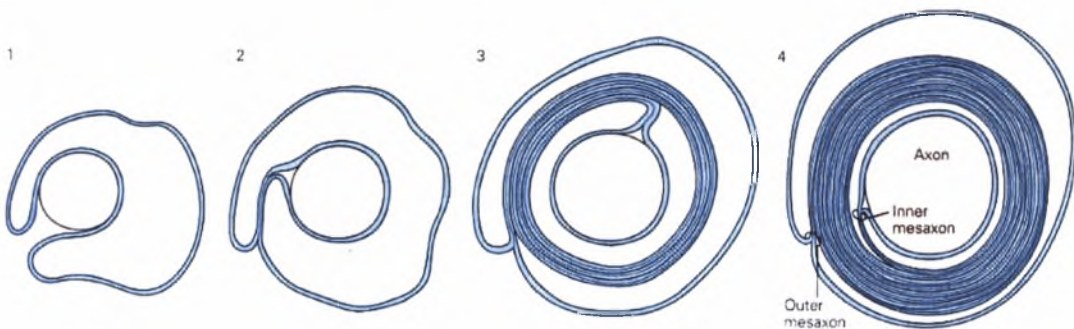
- Χρησιμεύουν ως στηρικτικά στοιχεία που προσδίδουν σταθερότητα και δομική συνοχή στον εγκέφαλο. Επίσης χωρίζουν και μερικές φορές απομονώνουν μεταξύ τους ομάδες νευρώνων.
- Όπως προαναφέρθηκε, τα ολιγοδενδροκύτταρα και τα κύτταρα Schwann, παράγουν μυελίνη, το μονωτικό έλυτρο που καλύπτει τους περισσότερους μεγάλους νευράξονες.
- Μερικά νευρογλοιακά κύτταρα λειτουργούν ως απορριμματοσυλέκτες, απομακρύνοντας συντρίμματα μετά από κάκωση ή νευρωνικό θάνατο.
- Κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου, ορισμένες ομάδες νευρογλοιακών κυττάρων καθοδηγούν τη μετανάστευση των νευρώνων και κατευθύνουν την προεκβολή των νευραξόνων.

- Ορισμένα νευρογλοιακά κύτταρα βοηθούν επίσης στον σχηματισμού ενός ειδικού, μη διαπερατού επενδύματος στα τριχοειδή αγγεία και στα φλεβίδια του εγκεφάλου, δημιουργώντας έναν αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ο οποίος εμποδίζει την είσοδο τοξικών ουσιών από το αίμα στον εγκέφαλο.
- Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι μερικά νευρογλοιακά κύτταρα παίζουν κάποιο ρόλο στη θρέψη των νευρικών κυττάρων.

II. ΜΥΕΛΙΝΩΣΗ ΝΕΥΡΙΚΗΣ ΙΝΑΣ

1. Γενικά

Η μυελίνωση της νευρικής ίνας δεν γίνεται με τον ίδιο τρόπο στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα. Κατά τη δημιουργία των εμμύελων νευρικών ινών, ο άξονας συνδέεται με τη μεμβράνη του εμμύελου γλοιακού κυττάρου που είναι το κύτταρο Schwann στο ΠΝΣ (Εικόνα 2) και το ολιγοδενδροκύτταρο στο ΚΝΣ (Εικόνα 3).

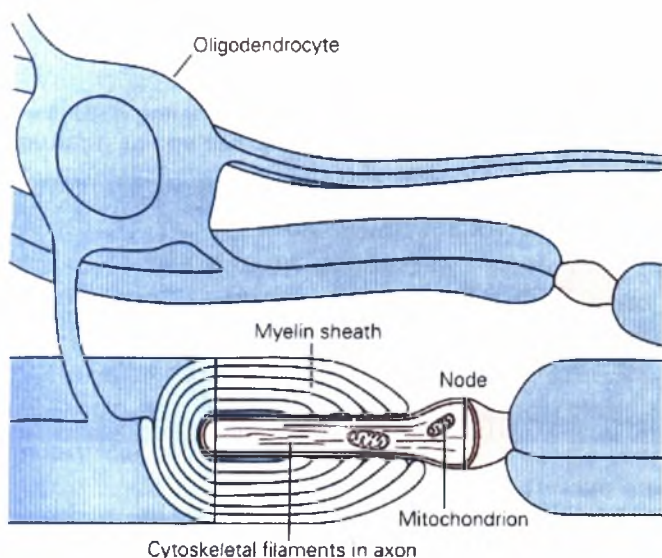


Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση μίας περιφερικής νευρικής ίνας που δέχεται το έλτρο της μυελίνης από ένα κύτταρο Schwann.

Από: «Νευροεπιστήμη και συμπεριφορά» Kandel

Στο ΠΝΣ, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, πριν από τη μυελίνωση, ο νευράξονας πορεύεται κατά μήκος ενός περιφερικού νεύρου, σε μία κοιλότητα την οποία σχηματίζουν τα νευρογλοιακά, κύτταρα Schwann. Το κύτταρο Schwann λοιπόν, έρχεται σε επαφή με ένα τμήμα του νευράξονα το οποίο σηματοδοτεί, με άγνωστο προς το παρόν μηχανισμό, το σχηματισμό του ελύτρου της μυελίνης που συντελείται σε διαφορετικά στάδια. Αρχικά, το κύτταρο αυτό ξεχωρίζει το νευράξονα που πρόκειται να καλυφθεί από μυελίνη, συνδέεται μαζί του σε μια αναλογία 1:1 περιβάλλοντάς τον με την κυτταρική του μεμβράνη, αφήνοντας όμως, μεταξύ τους διάκενα που τελικά, θα γίνουν οι κόμβοι του Ranvier. Στη συνέχεια, η κυτταρική μεμβράνη κάθε κυττάρου Schwann, περιβάλλει ένα τμήμα του νευράξονα και σχηματίζει μία διπλή μεμβρανική κατασκευή που ονομάζεται μεσάξονας, ο οποίος κατόπιν επιμηκύνεται και ελίσσεται γύρω από το νευράξονα σε ομόκεντρες στιβάδες. Στο στάδιο αυτό, το γλοιακό κύτταρο αρχίζει να παράγει σε υψηλά επίπεδα τα συστατικά της μυελίνης, ενώ το κυτταρόπλασμα εκτοπίζεται και οι αντικριστές κυτταρικές μεμβράνες έρχονται σε στενή επαφή μεταξύ τους σχηματίζοντας το

συμπαγές μυελώδες έλυτρο το πάχος του οποίου καθορίζεται από τη διάμετρο του νευράξονα.



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση ενός νευράξονα στο κεντρικό νευρικό σύστημα που δέχεται το μυελώδες έλυτρο από ένα ολιγοδενδροκύτταρο.

Από: «Νευροεπιστήμη και συμπεριφορά» Kandel

Σε αντίθεση με το κύτταρο Schwann που σχηματίζει ένα τμήμα μυελίνης γύρω από έναν άξονα το ολιγοδενδροκύτταρο, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι σε θέση να παράγει μυελίνη ταυτόχρονα σε πάνω από δέκα άξονες, διαφορετικής διαμέτρου, που μπορεί να βρίσκονται σε ποικίλες αποστάσεις από το κυτταρικό σώμα του ολιγοδενδροκυττάρου. (Εικόνα 4)

Oligodendroglia



Schwann cell



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση μυελίνωσης νευραξόνων. Τα ολιγοδενδροκύτταρα μπορούν να μυελινώσουν ταυτόχρονα πολλούς νευρώνες ενώ τα κύτταρα Schwann μόνο ένα.

2. Ο ρόλος της μυελίνης

Οι νευρικές ίνες διακρίνονται σε εμμύελλες και αμύελες με βάση την παρουσία του ελύτρου μυελίνης κατά μήκος του νευράξονα. Η μυελίνη, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί μία εξειδικευμένη μεμβράνη του εμμύελου γλοιακού κυττάρου που σχηματίζει πολλές συμπαγείς στοιβάδες που διατάσσονται σπειροειδώς γύρω από τον αξονικό κορμό. Η ώριμη μυελίνη παρουσιάζει υψηλή λιπιδική σύσταση συγκριτικά με άλλες βιολογικές μεμβράνες καθώς αποτελείται από 70% από λιπίδια και κατά 30% από πρωτεΐνες, με υψηλή συγκέντρωση χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων. Αποτελεί μία μοναδική

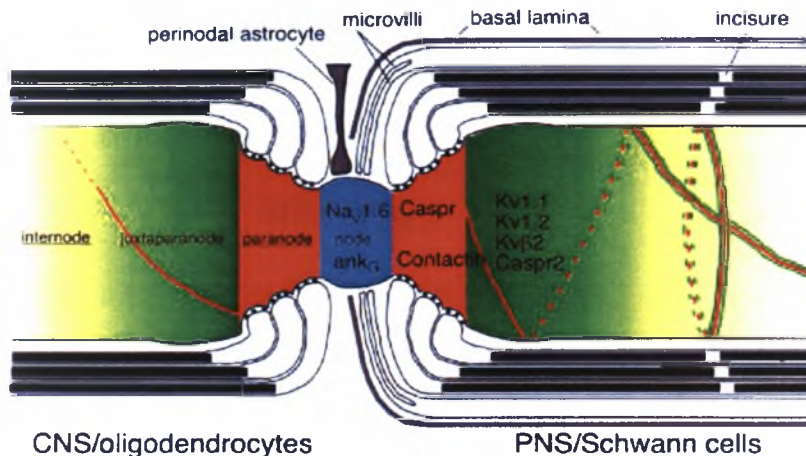
εξελικτική προσαρμογή των σπονδυλωτών που αυξάνει την αντίσταση και ελαττώνει την αγωγιμότητα της νευρικής μεμβράνης (Morell, 1990). Η συνέχεια της μυελίνης διακόπτεται στους κόμβους Ranvier.

Μ'αυτό τον τρόπο η εμμύελες νευρικές ίνες οργανώνονται σε καλά καθορισμένες και διακριτές περιοχές: τον κόμβο Ranvier, τις παρακομβικές, τις εγγύς παρακομβικές και τις μεσοκομβικές περιοχές (Poliak and Peles, 2003). Καθώς στους κόμβους ο άξονας δεν καλύπτεται από μυελίνη και παρουσιάζει υψηλή συγκέντρωση των τασεοεξαρτώμενων καναλιών νατρίου, η νευρική ώση προχωρεί με άλματα (αλματώδης αγωγή) από τον ένα κόμβο στον άλλο. Η διάδοση μέσω της αλματώδους αγωγής είναι ταχύτερη από την αγωγή στις αμύελες ίνες με την ίδια διάμετρο άξονα επειδή υπάρχουν λιγότερες διαρροές προς τα έξω λόγω της ύπαρξης περιοχών στη μεμβράνη που καλύπτονται από μυελίνη. (Να σημειωθεί ότι η ταχύτητα με την οποία διαδίδεται ένα δυναμικό ενέργειας κατά μήκος μίας μεμβράνης εξαρτάται από τη διάμετρο της ίνας και από το αν η ίνα είναι εμμύελη ή αμύελη. Όσο πιο μεγάλη είναι η διάμετρος της ίνας τόσο ταχύτερα μεταδίδεται το δυναμικό. Το ίδιο συμβαίνει και αν η ίνα είναι εμμύελη.) Επίσης, στον παρακείμενο χώρο του κόμβου φτάνει περισσότερο φορτίο και εκεί το δυναμικό ενέργειας γεννάται νωρίτερα απ'ότι αν έλειπε η μυελίνη. Τέλος, επειδή τα ιόντα μπορούν να διασχίζουν τη μεμβράνη μόνο στους κόμβους Ranvier, οι αντλίες της μεμβράνης χρειάζεται να αποκαθιστούν λιγότερα ιόντα. Ως εκ τούτου, οι εμμύελοι άξονες είναι μεταβολικώς πιο οικονομικοί από τους αμύελους. Έτσι η μυελίνη προσθέτει αποτελεσματικότητα όσον αφορά στην ταχύτητα και στο μεταβολικό κόστος και εξοικονομεί χώρο για το νευρικό σύστημα αφού οι άξονες μπορούν να είναι μικρότερης διαμέτρου.

3. Ο διακριτές περιοχές του νευράξονα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο νευράξονας λόγω της επικάλυψής του με μυελίνη διακρίνεται σε τέσσερις περιοχές: τον κόμβο του Ranvier, την παρακομβική, την εγγύς παρακομβική και την μέσοκομβική περιοχή (Poliak and Peles, 2003). Στις περιοχές αυτές παρατηρείται διαφορετική συγκέντρωση ιοντικών διαύλων και άλλων πρωτεϊνών στην πλασματική μεμβράνη (Εικόνα 5 και 6). Έτσι, η διάκριση του νευράξονα σ'αυτές τις περιοχές εξυπηρετεί τη συγχρονισμένη λειτουργία των τασεοελεγχόμενων ιοντικών διαύλων Na^+ και K^+ και άρα την ταχεία αγωγή του δυναμικού ενεργείας κατά μήκος των εμμύελων ινών.

Κόμβοι του Ranvier χαρακτηρίζονται τα μικρού μήκους (~1μm) κενά του ελύτρου μυελίνης, τα οποία είναι διατεταγμένα ανά ίσα διαστήματα στο νευράξονα. Εκεί εντοπίζονται, με μεγάλη πυκνότητα, τασεοεξαρτόμενοι διάυλοι Na^+ (Nav), οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την είσοδο ιόντων Na^+ και άρα για την εκπόλωση της μεμβράνης του κόμβου, που οδηγεί σε δημιουργία δυναμικού ενέργειας (Hille, 2001). Οι διάυλοι αυτοί αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες-μόρια κυτταρικής συνάφειας, της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών όπως η NrCAM και είναι προσδεδεμένοι σε πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τον κυτταροσκελετό (cytoskeleton-interacting), όπως η αγκυρίνη G (ankyrinG) (Pedraza, 2001).



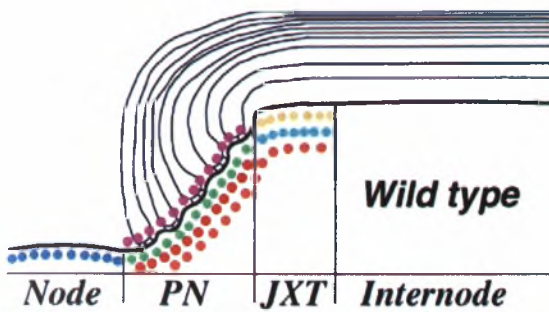
Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση των διακριτών περιοχών του νευράξονα. Φαίνονται οι πρωτεΐνες που υπάρχουν σε κάθε περιοχή αλλά και οι διαφορές στην οργάνωση των περιοχών αυτών στο CNS και στο PNS. Ankyrin G και $\text{Na}_v1.6$ εντοπίζονται στους κόμβους, Caspr και contactin στις παρακομβικές περιοχές, Kv1.1, Kv1.2, Kvβ2 και Caspr2 στις εγγύς παρακομβικές περιοχές.

Στο PNS, ένα μονό πλέγμα της Caspr και της contactin επεκτείνεται από τις παρακομβικές στις εγγύς παρακομβικές και στις μεσοκομβικές περιοχές (κόκκινη γραμμή) και αμφίπλευρα από αυτό βρίσκεται μία διπλή σειρά πρωτεϊνών των εγγύς παρακομβικών περιοχών (πράσινες γραμμές γύρω από την κόκκινη). Αντίθετα, στο CNS, μία μονή σειρά της Caspr και της contactin εκτείνεται από τις παρακομβικές περιοχές αλλά αμφίπλευρά από αυτή δεν υπάρχουν πρωτεΐνες των εγγύς παρακομβικών περιοχών στη μεσοκομβική περιοχή.

Αμφίπλευρα του κόμβου βρίσκονται οι παρακομβικές περιοχές, όπου τα συνεχή στρώματα του ελύτρου μυελίνης δημιουργούν θηλίες. Αυτές λειτουργούν ως φραγμός που εμποδίζει την ελεύθερη διάχυση μικρών μορίων και ιόντων στην γύρω αξονική περιοχή και περιορίζει την πλάγια μετακίνηση των μεμβρανικών συστατικών συμβάλλοντας στην οργάνωση του κόμβου Ranvier και στην ομαλή μετάδοση της νευρικής ώσης κατά μήκος της ίνας. Εκεί εντοπίζονται συμπλέγματα πρωτεϊνών όπως OSP/claudin-11, Caspr/paranodin, F_3 /contactin αλλά και πρωτεΐνες κυτταρικής συνάφειας όπως η E-καντερίνη και νευροφασίνη 155 (neurofascin155), που βοηθούν στις αξονο-γλοιακές συνάψεις (Rosenbluth, 1995).

Δίπλα από τις παρακομβικές περιοχές, βρίσκονται οι εγγύς παρακομβικές περιοχές, μήκους 5-15 μm . Καλύπτεται από συμπαγή μυελίνη, και χαρακτηρίζονται από τη συγκέντρωση καναλιών K^+ που αποτελούνται από τις υπομονάδες Kv1.1 και Kv1.2. (Wang, 1993). Πιστεύεται ότι τα κανάλια αυτά επιταχύνουν την επαναπόλωση της αξονικής μεμβράνης και συμβάλουν στη διατήρηση του δυναμικού ηρεμίας στο στάδιο πριν από την τελική ωρίμανση του ελύτρου της μυελίνης. Παρατηρούνται επίσης πρωτεΐνες όπως η Caspr2, της οικογένειας των νευρεξινών.

Γενικά οι στενές παρακομβικές συνδέσεις είναι σημαντικές για την φυσιολογική λειτουργία των καναλιών N^+ στην περιοχή του κόμβου εξασφαλίζοντας τον περιορισμό των καναλιών K^+ στην εγγύς-παρακομβική περιοχή.



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση των διακριτών περιοχών του νευράξονα. Φαίνεται και ο εντοπισμός διαφόρων πρωτεϊνών.

Από: Poliak et al. 2001

• **Kv1.2** • **NaCh** • **Contactin** • **Caspr** • **NF155** • **Caspr2** • **4.1B**

Node: κόμβος *Ranvier*,

JXT: εγγύς παρακομβική περιοχή,

PN: παρακομβική περιοχή,

Internode: μεσοκομβική περιοχή

4. Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας και ο ρόλος τους στην μυελίνωση νευρικής ίνας

Ο σχηματισμός του ελύτρου μυελίνης είναι ένα μεταγενετικό γεγονός που περιλαμβάνει μια σειρά δραματικών κυτταρικών αλληλεπιδράσεων που έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στη μορφολογία του εμμύλου κυττάρου αλλά και στην οργάνωση της αξονικής μεμβράνης. Κάθε στάδιο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη αξονο-γλοιακών αλληλεπιδράσεων που μεσολαβούνται από διαφορετικές ομάδες πρωτεϊνών κυτταρικής συνάφειας.

A. ΜΟΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΥΝΑΦΕΙΑΣ (CAMs: cell adhesion molecules)

Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των καθοδηγητικών μορίων που δρουν εξ'επαφής. Παίζουν κύριο ρόλο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, στη μετανάστευση και της επέκτασης των νευραξόνων των νευρώνων. Σύμφωνα όμως και με πιο πρόσφατες έρευνες παίζουν ρόλο και κατά τη μυελίνωση αλλά και τη σωστή λειτουργία των νευρώνων. Έχουν βρεθεί μεγάλες συγκεντρώσεις αυτών των πρωτεϊνών στις διακριτές περιοχές του νευράξονα και υποστηρίζεται ότι παίρνουν μέρος τόσο στην αναγνώριση του νευράξονα από τα γλοιακά κύτταρα κατά τη μυελίνωση όσο και στον σωστό εντοπισμό των ιοντικών διαύλων στις διακριτές περιοχές. Τα μόρια συνάφειας μπορούν να χωριστούν στις τρεις παρακάτω κατηγορίες ανάλογα με την οικογένεια στην οποία ανήκουν:

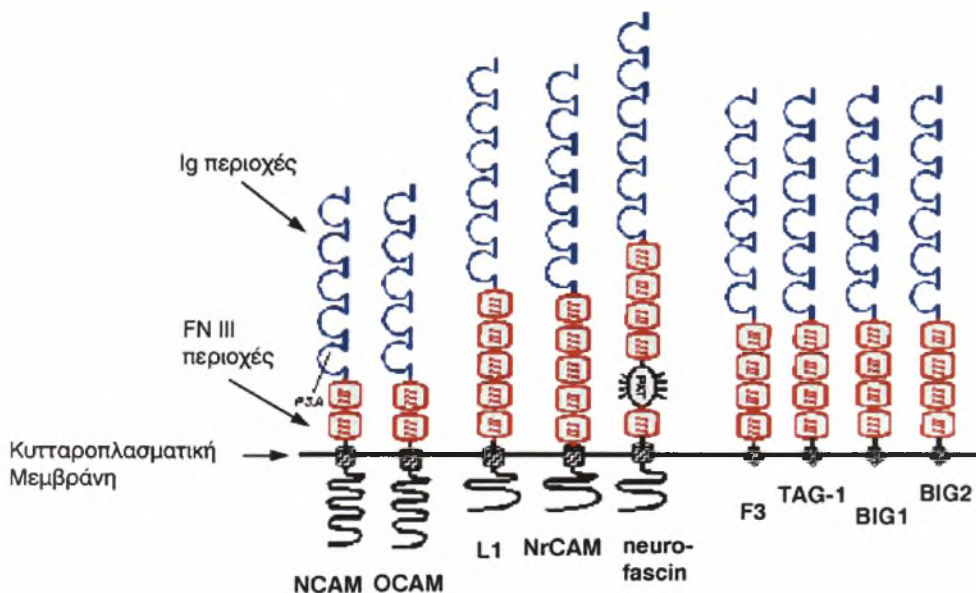
- i. Υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών,
- ii. Οικογένεια των καντερινών (cadherins),
- iii. Οικογένεια των ιντεγκρινών (integrins).

II.2.A.i Υπεροικογένεια ανοσοσφαιρινών

Οι πρωτεΐνες της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη επαναλαμβανόμενων περιοχών με ομοιότητα στην C2 περιοχή των ανοσοσφαιρινών (Ig-like domains). Κάποια μέλη εκτός από τις Ig

περιοχές έχουν και τύπου III φιμπρονεκτικές επαναλήψεις (FNIII-like domains), οι οποίες εντοπίζονται κοντά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Επίσης, πολλές από τις εν λόγω πρωτεΐνες διαθέτουν και κυτταροπλασματικό τμήμα ενώ άλλες προσδένονται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης μέσω προσδέματος γλυκοσυλφωσφατιδυλ-ινοσιτόλης (GPI). Η δομική αυτή πολυπλοκότητα που χαρακτηρίζει τα μέλη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών τους προσδίδει τη δυνατότητα σύναψης ποικίλων cis- και trans- ομοφιλικών ή ετεροφιλικών αλληλεπιδράσεων. Οι ανοσοσφαιρινικές περιοχές συμμετέχουν στη δημιουργία κυρίως, αλλά όχι αποκλειστικά, ετεροφιλικών αλληλεπιδράσεων, ενώ οι φιμπρονεκτικές σε ομοφιλικές (Tsiotra, 1996).

Σύμφωνα με τη συνολική οργάνωση των ενεργών περιοχών των μορίων τους και την πρωτοταγή τους δομή, τα μέλη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών είναι δυνατόν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις μεγάλες ομάδες (Brummendorf and Rathjen, 1996) (εικόνα 7):



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση της δομής μελών της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών στα σπονδυλωτά. Περιλαμβάνουν μία ή περισσότερες ανοσοσφαιρινικές υποομάδες (ημικύκλια) στο αμινοτελικό τους άκρο ενώ κάποιες από αυτές παρουσιάζουν και φιμπρονεκτικές επαναλήψεις τύπου III (τετράγωνα) στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Ορισμένες από αυτές όπως η TAG-1 στερούνται διαμεμβρανικής υπο-περιοχής και συνδέονται στην κυτταρική μεμβράνη με πρόσδεμα GPI.

- Πρωτεΐνες οι οποίες δομούνται μόνο από περιοχές με ομοιότητα στις ανοσοσφαιρίνες. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μυελινοποίηση νευρώνων, όπως η MAG (Myelin Associated Glycoprotein), η P₀ και η SMA (Schwann Myelin Protein) καθώς και οι πρωτεΐνες BEPN και gicerin που έχουν ιδιότητες επαγωγής νευραξόνων όταν βρίσκονται ως υπόστρωμα.
- Πρωτεΐνες οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία περιοχών με ομοιότητα στις ανοσοσφαιρίνες και στις τύπου III φιμπρονεκτικές

περιοχές. Εδώ ανήκουν πρωτεΐνες όπως η L1 που εμπλέκεται στην ρύθμιση της επέκτασης και την καθοδήγηση νευραξόνων (Chang, 1987; Stoeckli, 1997), στην δεσμίωση αυτών (Fischer, 1986; Stoeckli, 1997) και στην κυτταρική μετανάστευση (Thelen, 2002), η CHL1, η NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) και η NrCAM.

- γ) Πρωτεΐνες οι οποίες χαρακτηρίζονται από ύπαρξη περιοχών με ομοιότητα στις ανοσοσφαιρίνες σε συνδυασμό με ποικίλα μοτίβα διαφορετικά του τύπου III φιμπρονεκτικού μοτίβου.

II.2.A.ii Οικογένεια καντερινών

Οι καντερίνες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες συμβάλλουν στην κυτταρική συνάφεια με ομοφιλικό τρόπο. Η ενδοκυττάρια περιοχή συνδέεται με μία οικογένεια μορίων που ονομάζονται κατενίνες (catenins), οι οποίες με τη σειρά τους αλληλεπιδρούν με στοιχεία του κυτταροσκελετού (Kandel, 1991). Για τη δομική διαμόρφωσή τους καθώς και το λειτουργικό τους ρόλο, είναι απαραίτητη η παρουσία ιόντων ασβεστίου (Ca^{+2}), απουσία των οποίων παρατηρείται ραγδαία αποικοδόμηση λόγω πρωτεόλυσης του μορίου (Takeichi, 1987). Μέχρι σήμερα είναι γνωστά περίπου δώδεκα μόρια καντερινών από τα οποία το πιο άφθονο στο νευρικό σύστημα είναι η N-καντερίνη.

II.2.A.iii Οικογένεια ιντεγκρινών

Οι ιντεγκρίνες είναι μια ομάδα γλυκοπρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούν τους υποδοχείς των στοιχείων του εξωκυττάρου χώρου, όπως η λαμινίνη και η φιμπρονεκτίνη. Το μόριο των ιντεγκρινών είναι ένα ετεροδιμερές, που αποτελείται από τις υπομονάδες α και β (Hynes, 1992). Η β υπομονάδα περιέχει μια περιοχή με πολλούς δισουλφιδικούς δεσμούς. Η περιοχή σύνδεσης με τις πρωτεΐνες του εξωκυττάρου χώρου βρίσκεται στην αμινοτελική περιοχή των υπομονάδων. Στη συγκεκριμένη περιοχή είναι σημαντική η πρόσδεση ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) για τη σύνδεση των ιντεγκρινών με τα μόρια του εξωκυττάρου περιβάλλοντος (Hynes, 1992).

B. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΜΥΕΛΙΝΩΣΗ ΝΕΥΡΙΚΗΣ ΙΝΑΣ

Στα αρχικά στάδια της μυελίνωσης, οι πρωτεΐνες L1, NCAM και N-cadherin που εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στη μεμβράνη του άξονα και του γλοιακού κυττάρου είναι σημαντικές για τη δημιουργία στενής αξονο-γλοιακής επαφής που έχει ως αποτέλεσμα την μετέπειτα επαγωγή των πρωτεϊνών μυελίνης από το γλοιακό κύτταρο. Στις μη συμπαγείς περιοχές του ελύτρου, που διατηρούν κυτταρόπλασμα εκφράζεται η πρωτεΐνη συνάφειας E-cadherin και δημιουργούνται στενές συνδέσεις συνάφειας μεταξύ των στοιβάδων του ελύτρου της μυελίνης στο ΠΝΣ. Εκεί περιστασιακά σχηματίζονται χασμοσύνδεσμοι, όπου εκφράζεται η πρωτεΐνη connexin 32. Μία άλλη πρωτεΐνη είναι η MAG, η οποία μεσολαβεί στην αύξηση της διαμέτρου που προκαλεί το γλοιακό κύτταρο τοπικά στο τμήμα του νευράξονα που καλύπτεται από συμπαγή μυελίνη. Κρίσιμη αποδεικνύεται και η αλληλεπίδραση της merosin (κύρια ισομορφή της λαμινίνης) με την ιντεγκρίνη

β1 στα αρχικά στάδια της μυελίνωσης κατά τη σύνδεση των εμμύελων κυττάρων Schwann με τη βασική στοιβάδα.

Τέλος οι κυριότερες σε αφθονία πρωτεΐνες του ελύτρου είναι η κυτταροπλασματική MBP (myelin basic protein) και οι διαμεμβρανικές P₀ (protein zero), PLP /DM-20 (proteolipid proteins) και η PMP-22 (peripheral myelin protein 22kD). Οι πρωτεΐνες αυτές εμφανίζονται να έχουν επικαλυπτόμενη δράση και να δρουν αντισταθμιστικά σε περιπτώσεις που κάποιο συστατικό δεν εκφράζεται εξασφαλίζοντας τη δημιουργία φυσιολογικής μυελίνης. Εντούτοις, μεταβολές των επιπέδων έκφρασης αρκετών πρωτεϊνών της μυελίνης επηρεάζουν τη σταθερότητα του μυελώδους ελύτρου με αποτέλεσμα οι μεταλλάξεις τους να προκαλούν σταδιακά τον εκφυλισμό της μυελίνης (Martini and Carenini, 1998, Garbey, 2000).

III. ΤΟ ΜΟΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΥΝΑΦΕΙΑΣ TAG-1

1. Γενικά

Η TAG-1 (Transiently expressed Axonal Glycoprotein) είναι μία νευρωνική γλυκοπρωτεΐνη συνάφειας της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών με μοριακό βάρος 135 kD. Η έκφρασή της ανιχνεύθηκε πρώτη φορά σε υποπληθυσμούς νευρικών κυττάρων του νωτιαίου μυελού και συγκεκριμένα κατά τη διαφοροποίηση και αρχική επέκταση των νευραξόνων των κινητικών και συνδεσμικών νευρώνων, καθώς και στα γάγγλια της ραχιαίας ρίζας (DRG) του ΠΝΣ (Dodd, 1988) Αποτελείται από έξι ανοσοσφαιρινικές υποπεριοχές τύπου C2, στο αμινοτελικό της άκρο καθώς και από τέσσερις φιμπρονεκτινικές επαναλήψεις τύπου III στο καρβοξυτελικό της άκρο. Βρίσκεται σε δύο μορφές: συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη με πρόσδεμα GPI και εκκρινόμενη από τους νευρώνες. Έχουν βρεθεί ομόλογες πρωτεΐνες στην όρνιθα και στον άνθρωπο, axonin-1 και TAX-1 αντίστοιχα (Tsiotra, 1993), ενώ πρόσφατα βρέθηκε έκφρασή της και στο Zebrafish (Warren, 1999). Τέλος αναφέρεται ότι η TAG-1 παρουσιάζει ομοφιλικές (Rader, 1993; Felsenfeld, 1994; Tsiotra, 1996) καθώς και ποικίλες ετεροφιλικές αλληλεπιδράσεις με μόρια της ίδιας ή άλλης οικογένειας (Pavliou, 2002). Αλληλεπιδρά, για παράδειγμα, με την L1/NgCAM (Kunz, 1996), την NrCAM (Suter, 1995) και την NCAM.

Η εκκρινόμενη TAG-1 δεν είναι αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος στο mRNA αλλά ούτε φαίνεται να προκύπτει από τη δράση ενδογενούς φωσφολιπάσης στη μεμβρανική-GPI TAG-1. Πιθανότατα δημιουργείται αμέσως μετά από τη σύνθεση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Στην περίπτωση της εκκρινόμενης TAG-1, δεν πραγματοποιείται απομάκρυνση του καρβοξυτελικού υδρόφοβου άκρου της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να μην προστίθεται το πρόσδεμα GPI (Furley, 1990).

Η έκφρασή της έχει μελετηθεί εκτεταμένα κυρίως κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης οπότε και εκφράζεται σε συγκεκριμένους υποπληθυσμούς νευρώνων αμέσως μετά τη διαφοροποίησή τους. Φαίνεται να σχετίζεται με την επέκταση και την καθοδήγηση νευραξόνων καθώς και με ορισμένες μορφές νευρωνικής μετανάστευσης. Έκφραση όμως του mRNA της TAG-1 έχει εντοπιστεί και στο ΚΝΣ ενήλικων ατόμων. Ο ρόλος της εκεί δεν

είναι ξεκάθαρος αλλά φαίνεται να ευθύνεται για τον σωστό εντοπισμό των καναλιών K^+ στις εγγύς παρακομβικές περιοχές, μέσω της αλληλεπίδρασής της με την πρωτεΐνη Caspr2 (που αλληλεπιδρά με αυτά τα κανάλια).

2. Έκφραση της TAG-1 κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης

Κατά την εμβρυογένεση, η TAG-1 εκφράζεται σε συγκεκριμένους υποπληθυσμούς νευρώνων στον εγκέφαλο και στο νωτιαίο μυελό. Εκφράζεται επίσης κατά τη φάση της αρχικής επιμήκυνσης του νευράξονα, στους νωτιαίους γαγγλιακούς νευρώνες (DRG) αμέσως μετά τη διαφοροποίησή τους. Η έκφραση της προηγείται σε σχέση με άλλες ανοσοσφαιρίνες που εκφράζονται στους νευρώνες αυτούς.

Στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο, η TAG-1 εμφανίζεται παροδικά σε υποπληθυσμούς νευρώνων που εντοπίζονται στον πρόσθιο εγκέφαλο και στο στελέχος. Εκφράζεται στα κρανιακά νεύρα (οφθαλμοκινητικό, υπογλώσσιο, κινητική μοίρα τριδύμου και προσωπικού νεύρου και το άνω γναθικό νεύρο), στις φλοιοθαλαμικές προβολές καθώς και σε μακριές δεσμίδες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Επιπλέον εκφράζεται στο μεσολόβιο, στον πρόσθιο σύνδεσμο και στο σύνδεσμο του ιπποκάμπου αλλά και σε άλλες χιαζόμενες προβολές που εντοπίζονται σε διάφορα επίπεδα του στελέχους (Wolfner, 1994).

Παράλληλα ανιχνεύεται έκφραση της TAG-1 στα σώματα των νευρώνων που ακολουθούν οριζόντια μεταναστευτικά μονοπάτια προκειμένου να σχηματίσουν τους προ-παρεγκεφαλιδικούς πυρήνες καθώς και στους μετά-μιτωτικούς προ-μεταναστευτικούς νευρώνες της έσω κοκκιώδους στοιβάδας στην νεογέννητη παρεγκεφαλίδα (Yamamoto, 1990; Kyriakopoulou, 2002).

Στα νωτιαία γάγγλια, η TAG-1 ξεκινάει να εκφράζεται από την E11 και συνεχίζει μετά τη γέννηση. Παρατηρήθηκε ότι η έκφρασή της επάγεται κατά τη διάρκεια της *in vitro* αξονικής αναγέννησης μεμονωμένων νωτιαίων γαγγλιακών νευρώνων που απομονώθηκαν από διάφορα αναπτυξιακά στάδια καθώς και από το ενήλικο (Karagogeos, 1991). Αντίθετα δεν εκφράζεται κατά τη διάρκεια της *in vitro* αναγέννησης μεμονωμένων νευρώνων νωτιαίου μυελού εμβρύου ή νεογέννητου.

Στο ενήλικο άτομο, συνεχίζεται η έκφραση του μεταγράφου της TAG-1 (Furley, 1990) σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού (Wolfner, 1998). Η έκφραση όμως αυτή δεν ανιχνεύεται ανοσοϊστοχημικά. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη είναι δυνατόν να εκκρίνεται ή να εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα οπότε σε αυτές τις περιπτώσεις δεν μπορεί να εντοπιστεί. Εναλλακτικά είναι δυνατό η TAG-1 να υφίσταται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις οπότε είναι αδύνατο να αναγνωρισθεί από τα διαθέσιμα αντισώματα.

Με βάση το συνολικό πρότυπο έκφρασης της μεμβρανικής TAG-1 προκύπτει ότι η πρωτεΐνη αυτή σχετίζεται με την επέκταση και καθοδήγηση νευραξόνων ενώ είναι πιθανό να εμπλέκεται επίσης στην αναγνώριση του κυτταρικού συναπτικού στόχου (Dodd, 1988; Wolfner, 1994). Πιο συγκεκριμένα, η TAG-1 αποτελεί ένα πολύ αποτελεσματικό υπόστρωμα για την επέκταση νευριτών από νωτιαίους εμβρυϊκούς νευρώνες *in vitro* (Furley, 1990). Επιπλέον συμμετέχει στην μετανάστευση των GABAεργικών νευρώνων στον εμβρυϊκό φλοιό (Denaxa, 2001) καθώς και στην οριζόντια μετανάστευση των

κυττάρων που θα σχηματίσουν προ-παρεγκεφαλιδικούς πυρήνες (Kyriakopoulou, 2002). Η δράση της εκκρινόμενης TAG-1 δεν έχει διασαφηνιστεί αλλά είναι πιθανό να συνδέεται στην επιφάνεια των νευροεπιθηλιακών κυττάρων και να προκαλεί την αύξηση των νευραξόνων στους οποίους μπορεί να δρα ομοφιλικά ή ετεροφιλικά (Karagogeos, 1991). Επιπλέον είναι δυνατόν, η εκκρινόμενη μορφή να συνδέεται με τη μεμβρανική στην επιφάνεια του νευράξονα και με αυτό τον τρόπο να εμποδίζει τη δέσμευση άλλων μορίων στην τελευταία, γεγονός που πιθανότατα αναστέλει την δράση της μεμβρανικής μορφής στην καθοδήγηση και δεσμιτοποίηση των νευραξόνων (Liarheimer, 1997).

3. Έκφραση της TAG-1 στα νευρικά κύτταρα του ενήλικου περιφερικού και κεντρικού νευρικού συστήματος.

Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, η πρωτεΐνη κυτταρικής συνάφειας TAG-1 είναι γνωστό ότι εκφράζεται σε συγκεκριμένους υπο-πληθυσμούς νευρώνων στο ΚΝΣ, καθώς και στα νωτιαία γάγγλια όπου η έκφρασή της συνδέεται κυρίως με την επέκταση και την καθοδήγηση των αυξητικών κώνων ανάπτυξης του νευράξονα προς το κατάλληλο κυτταρικό στόχο (Karagogeos, 1991). Για το ΠΝΣ, ωστόσο δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες σχετικά με την έκφραση της TAG-1. Φαίνεται να εκφράζεται στα νωτιαία γάγγλια του ΠΝΣ που ευθύνονται για την μετάδοση της αισθητήριας πληροφορίας από την περιφέρεια προς το νωτιαίο μυελό. Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι η έκφρασή της υπόκειται σε μετα-μεταφραστική τροποποίηση στο ενήλικο άτομο όπου συνδέεται πιθανά με ένα διαφορετικό ρόλο από αυτόν που έχει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης καθώς στο στάδιο αυτό απαιτείται μεγαλύτερη σταθερότητα των διακυτταρικών συνδέσεων. Αντίστοιχα με την TAG-1 έχουν βρεθεί κι άλλες ανοσοσφαιρίνες που υπόκεινται σε μεταγραφικές ή μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ανάλογα με το κυτταρικό σύστημα και το στάδιο στο οποίο εκφράζονται. Οι διαφορετικές ισομορφές που προκύπτουν αλληλεπιδρούν με διαφορετικά εξωκυτταρικά και ενδοκυτταρικά μόρια στόχους, εξασφαλίζοντας έτσι τη δημιουργία του είδους της κυτταρικής συνάφειας που απαιτείται ανάλογα με το στάδιο ή το κυτταρικό σύστημα (Brummendorf and Lemmon, 2001).

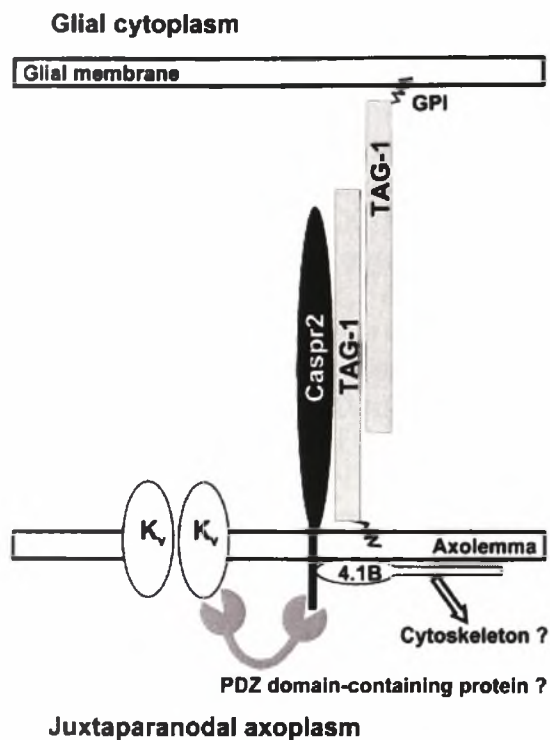
Στο επίπεδο των σωμάτων των νωτιαίων γαγγλιακών νευρώνων, η TAG-1 εντοπίζεται πιθανότατα στην κυτταρική μεμβράνη όπου θα μπορούσε να συμβάλλει στη συνάφεια/προσκόλληση των κυττάρων αυτών με τα δορυφορικά τους γλοιακά κύτταρα μέσω ετεροφιλικών αλληλεπιδράσεων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία και τη διατήρηση των διακυτταρικών συνδέσεων που εξασφαλίζουν την συμπαγή οργάνωση των νευρώνων αυτών μέσα στη κάψα του νωτιαίου γαγγλίου. Παράλληλα με την έκφραση της TAG-1 στα κυτταρικά σώματα των νωτιαίων γαγγλιακών νευρώνων, η πρωτεΐνη κατανέμεται και στις απολήξεις των νωτιαίων γαγγλίων. Διαπιστώνεται όμως χαμηλότερη έκφραση στις απολήξεις στο ΚΝΣ σε σχέση με τις απολήξεις στο ΠΝΣ. Αυτή η ανομοιογένεια στην κατανομή της TAG-1 στις απολήξεις των νωτιαίων γαγγλίων ενήλικου δεν παρατηρείται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης (Dodd, 1988). Η TAG-1 όμως που ανιχνεύεται ανασοϊστοχημικά στις προβολές των νωτιαίων γαγγλίων δεν είναι αμιγώς νευρωνικής προέλευσης καθώς υπάρχει έκφρασή της και στα γλοιακά

κύτταρα Schwann που ξεκινάει μετά τη γέννηση και διατηρείται στο ενήλικο ΠΝΣ. Η αλλαγή των επιπέδων της TAG-1 στα νωτιαία γάγγλια μπορεί να αποτελεί ένα σήμα με βάση το οποίο οι νευρώνες αυτοί επάγουν τη δημιουργία του ελύτρου μυελίνης γύρω από τον άξονά τους.

Όσον αφορά την έκφραση της TAG-1 στις εμμύελες ίνες, στο ενήλικο άτομο εντοπίζεται τόσο στα αμύελα όσο και στα εμμύελα κύτταρα Schwann (Traka, 2002) ενώ στο νεογέννητο εντοπίζεται μόνο στα αμύελα κύτταρα Schwann. Η έκφρασή της είναι πολύ ενδιαφέρουσα καθώς είναι η πρώτη ανοσοσφαιρίνη που ανιχνεύεται κοντά στον κόμβο Ranvier, στην εγγύς-παρακομβική περιοχή. Εκεί η TAG-1 συνεντοπίζεται με τα κανάλια καλίου Kv1.1 που βρίσκονται φυσιολογικά συγκεντρωμένα στην αξονική μεμβράνη (Wang, 1993). Η Neurexin πρωτεΐνη Caspr2 συνεντοπίζεται με τα κανάλια καλίου Kv1.1 στην αξονική μεμβράνη της εγγύς-παρακομβική περιοχής όπου φαίνεται να συνδέεται με αυτά (Poliak, 1999, Poliak, 2003). Η επαγωγή της συγκέντρωσης των καναλιών K^+ στην εγγύς-παρακομβική περιοχή απαιτεί την ύπαρξη συνδέσεων με τα περιβάλλοντα γλοιακά κύτταρα. Στην ίδια περιοχή, η TAG-1 συνδέεται με την Caspr2 και με αυτό τον τρόπο μεσολαβεί στον έλεγχο που ασκούν τα γλοιακά κύτταρα στην κατανομή των καναλιών καλίου στην εγγύς-παρακομβική περιοχή των εμμύελων νευρικών ινών. Αξίζει να αναφερθεί ότι η TAG-1 εκφράζεται και στην αξονική μεμβράνη της εγγύς-παρακομβικής περιοχής.

➤ Μοντέλο αλληλεπίδρασης TAG-1/Caspr2/κανάλια K^+ :

Στην εγγύς παρακομβική περιοχή των εμμύελων νευρικών ινών στο ενήλικο περιφερικό και κεντρικό νευρικό σύστημα, η γλοιακή TAG-1 αλληλεπιδρά με trans αλληλεπίδραση με την αξονική TAG-1. Η αξονική TAG-1 αλληλεπιδρά επίσης και με cis αλληλεπίδραση με την Caspr2. Η Caspr2 είναι συνδεδεμένη, πιθανότατα μέσω μίας πρωτεΐνης που περιέχει PDZ περιοχές, με τα Kv1.1 και Kv1.2 κανάλια καλίου (Εικόνα 8). Είναι επίσης συνδεδεμένη με την πρωτεΐνη 4.1B που συμβάλλει στη σύνδεση του συμπλόκου TAG-1-Caspr2 με τον κυτταροσκελετό. Όπως έχει δειχθεί και με πειράματα σε TAG-1 knock-out ποντίκια, η TAG-1 εξασφαλίζει τη σωστή κατανομή των μοριακών συστατικών της αξονικής μεμβράνης (Caspr2 και καναλιών K^+) στην εγγύς-παρακομβική περιοχή χωρίς όμως να ελέγχει τα επίπεδα έκφρασής τους, συμβάλλοντας έτσι στη γρήγορη και αποτελεσματική μετάδοση της νευρικής ώσης. Μη σωστή κατανομή πρωτεϊνών και καναλιών ιόντων οδηγεί σε ασθένειες, όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας.



Εικόνα 8. Η TAG-1 των oligο-δενδροκυττάρων αλληλεπιδρά με trans αλληλε-πίδραση με την TAG-1 των νευρώνων. Η TAG-1 όμως των νευρώνων αλληλεπιδρά και με την Caspr2, με cis αλληλεπίδραση. Η Caspr2 μέσω άλλων πρωτεϊνών αλληλεπιδρά και με κανάλια K. Οπότε και η TAG-1 αλληλεπιδρά έμμεσα με τα κανάλια K του νευρώνα.

Από: Traka, 2003

➤ Φαινότυπος των TAG-1 knock-out ποντικών

Τα TAG-1^{-/-} ζώα δεν παρουσιάζουν κάποια εμφανή ιστολογική διαταραχή των βασικών τους εγκεφαλικών δομών, ενώ εμφανίζουν μία αύξηση των υποδοχέων αδενοσίνης A1 στον ιππόκαμπο και είναι πιο ευαίσθητα σε επιληπτικά ερεθίσματα (Fukumauchi, 2001). Τόσο το πάχος όσο και η συμπίκνωση του ελύτρου δεν παρουσιάζει αλλοιώσεις στις εμμύελες ίνες των ζώων αυτών, γεγονός που υποδηλώνει ότι η TAG-1 δεν συμμετέχει δομικά στην κατασκευή της μυελίνης.

Επιπλέον η μοριακή οργάνωση της κομβικής και παρακομβικής περιοχής των εμμύελων νευρικών ινών είναι φυσιολογικές στα TAG-1^{-/-} ζώα, ενώ αντίθετα η εγγύς-παρακομβική περιοχή παρουσιάζει σημαντική αποδιοργάνωση των μοριακών συστατικών της. Συγκεκριμένα η Caspr2 δεν ανιχνεύεται καθόλου στις εμμύελες ίνες του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος των μεταλλαγμένων ζώων. Αλλοιώσεις παρουσιάζονται και στα κανάλια K⁺ αλλά σε μικρότερο βαθμό συγκριτικά με την Caspr2. Αυτό συμβαίνει είτε επειδή η συγκέντρωση κάποιων καναλιών K⁺ που εντοπίζονται σε σωστή θέση, δεν εξαρτάται από την έκφραση της TAG-1 είτε επειδή η έλλειψη της TAG-1 είναι δυνατό να υποκαθίσταται από την έκφραση κάποιου άλλου, άγνωστου προς το παρόν, μορίου που λειτουργεί αντισταθμιστικά.

Γενικά η έλλειψη της TAG-1 έχει ως αποτέλεσμα την αποδιοργάνωση της κατανομής της Caspr2 και των καναλιών K⁺ στην εγγύς-παρακομβική περιοχή (Traka, Gouterbroze et al., 2003).

IV. ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα γλοιακά κύτταρα που σχηματίζουν το έλυτρο της μυελίνης (ολιγοδενδροκύτταρα στο ΚΝΣ και κύτταρα Schwann ΠΝΣ) και νευράξονες αλληλεπιδρούν και επηρεάζουν αμοιβαία την ανάπτυξή τους. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι απαραίτητες για το σχηματισμό και τη διατήρηση των εξειδικευμένων περιοχών των νευραξόνων στις εμμύελες ίνες, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η ταχεία αγωγή του δυναμικού ενεργείας. Σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις αυτές, όπως έχει δείχθει, κατέχουν μόρια κυτταρικής συνάφειας που ανήκουν στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών και μόρια της υπεροικογένειας της *neurexin/NCP* (Arroyo and Scherer, 2000).

Αυτή η έρευνα συγκεντρώνεται στο μέλος των ανοσοσφαιρινών, TAG-1, το οποίο βρίσκεται σε αυξημένα ποσοστά στις εγγύς παρακομβικές περιοχές εμμύελων ινών στο ΚΝΣ και στο ΠΝΣ. Στα TAG-1^{-/-} ποντίκια επηρεάζεται αποκλειστικά η εγγύς-παρακομβική περιοχή καθώς επηρεάζεται ο εντοπισμός των διαύλων K⁺ και της πρωτεΐνη *Caspr2*. Για να διερευνήσουμε την ακριβή έκφραση της TAG-1 και επίσης να δούμε εάν η έκφρασή της στα ολιγοδενδροκύτταρα είναι σε θέση να αναστρέψει τον φαινότυπο των TAG-1^{-/-} στελεχών, θα δημιουργήσουμε DNA πλασμιδιακή κατασκευή (PLP-TAG-1-GFP) η οποία θα οδηγεί την έκφραση του cDNA της TAG-1 στα ολιγοδενδροκύτταρα λόγω του υποκινητή του γονιδίου PLP, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PLP και έχει χρησιμοποιηθεί για έκφραση πρωτεϊνών σε ολιγοδενδροκύτταρα σε διαγονιδιακά ζώα (Furley et al., 1990; Wight et al., 1993; Fuss et al., 2001). Αντίστοιχες DNA κατασκευές θα οδηγούν την έκφραση του cDNA της TAG-1 στα κύτταρα Schwann (κατασκευή P0) και σε νευρώνες (κατασκευή Thy1) (Gordon et al., 1987; Vidal et al., 1990; Caroni, 1997). Αυτές οι κατασκευές είναι το κυρίως θέμα αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Μετά το πέρας αυτής, οι γονιδιακές κατασκευές θα ενεθούν σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωοκυττάρων. Θα γίνει ανάλυση με υβριδοποίηση κατά Southern σε γενωμικό DNA των απογόνων τους για την ταυτοποίηση των ατόμων που φέρουν τη μεταλλαγή. Τα άτομα αυτά θα διασταυρωθούν μεταξύ τους για την παραγωγή ομόζυγων ατόμων τα οποία στη συνέχεια θα διασταυρωθούν με τα TAG-1^{-/-}. Μετά τις 3 πρώτες διασταυρώσεις θα δημιουργηθούν ποντίκια που θα εκφράζουν το γονίδιο της TAG-1 επιλεκτικά μόνο στα ολιγοδενδροκύτταρα ή στα κύτταρα Schwann ή στους νευρώνες. Ο φαινότυπος των ατόμων αυτών θα εξεταστεί με : α) ανοσοϊστοχημεία, PCR ή φθορισμό (για τον εντοπισμό των χαρακτηριστικών μορίων-μαρτύρων των κομβικών, παρακομβικών και εγγύς παρακομβικών περιοχών) και β) ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (για μελέτη της μορφολογίας).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

❖ ΥΛΙΚΑ:

- Tryptone, NaCl, Yeast extract
- NaOH 1N
- Γυάλινο ποτήρι 1000ml
- Ογκομετρικός κύλινδρος 1000ml
- Φλάσκα 1000ml, 2 γυάλινα μπουκάλια 100ml.

1α. 2ΧΥΤ

- 16gr tryptone, 10gr NaCl, 10gr yeast extract διαλυτοποιήθηκαν σε νερό.
- pH=7,2-7,4 (ρύθμιση με NaOH 1N)
- Ογκομέτρηση σε τελικό όγκο 1000ml.
- Κατόπιν τα διαλύματα αποστειρώθηκαν.

1β. LB*

- 10gr tryptone, 2gr NaCl, 5gr yeast extract διαλυτοποιήθηκαν σε νερό.
- pH =7 (ρύθμιση με NaOH 1N)
- Ογκομέτρηση σε τελικό όγκο 1000ml.
- Κατόπιν τα διαλύματα αποστειρώθηκαν.

2. ΠΕΨΗ ΜΟΡΙΩΝ DNA ΜΕ ΕΝΖΥΜΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

Η πέψη μορίων DNA με ένζυμα περιορισμού έγινε σε δυο περιπτώσεις. Πρώτον, για την απομόνωση συγκεκριμένων τμημάτων DNA και δεύτερον, για τον έλεγχο των αποικιών των μετασχηματισμένων βακτηρίων για την ύπαρξη του τμήματος του DNA που επιλέξαμε να εισάγουμε.

❖ ΥΛΙΚΑ:

- αποστειρωμένα erpendorfs και tips
- κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα
- Για την πέψη δημιουργήθηκε μίγμα με:
 - > Δείγμα DNA
 - > Ένζυμο περιορισμού
 - > Κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για το συγκεκριμένο ένζυμο
 - > BSA (Bovine Serum Albumin) το οποίο αυξάνει την ενεργότητα του ενζύμου
 - > dH₂O
- Οι πέψεις έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας των ενζύμων N.E.B. (New England Biolabs), συνήθως σε τελικό όγκο 20μl. Η θερμοκρασία της πέψης είναι συνήθως 37°C αλλά μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τις απαιτήσεις του ενζύμου. Ο χρόνος που απαιτείται για την πέψη είναι 1,2 ώρες.

3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

3α. ΑΓΑΡΟΖΗ 1%

❖ ΥΛΙΚΑ:

- Φλάσκα 500ml, ειδικό δοχείο για παρασκευή gel
 - σκόνη αγαρόζης, 50x TAE, EtBr
 - loading buffer, DNA ladder
- 1,5 gr αγαρόζης έβρασαν μέχρι πλήρη διάλυση σε 150 ml TAE 1x. Στη συνέχεια προστέθηκαν ~4 μl EtBr και το διάλυμα έπηξε σε ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης αφού προηγουμένως είχε τοποθετηθεί κατάλληλο χτενάκι για τη δημιουργία θέσεων όπου φορτώθηκαν τα δείγματα.
- Το EtBr ενσωματώνεται στις βάσεις του DNA και όταν το gel εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία τότε τα τμήματα του DNA γίνονται ορατά.
- Μετά την ολοκλήρωση των πέψεων τα δείγματα φορτώθηκαν σε gel αγαρόζης 1%, αφού τους έχει προστεθεί Loading Buffer (1x). Τα loading buffers αυξάνουν την πυκνότητα του δείγματος, ώστε το DNA να πέσει στον πάτο του πηγαδιού του gel, προσθέτουν χρώμα στο δείγμα και περιέχουν χρωστικές που σε ηλεκτρικό πεδίο κινούνται προς την άνοδο (όπως και το DNA) με προβλέψιμους ρυθμούς.
- Μαζί με τα δείγματα φορτώνεται στο gel μικρή ποσότητα DNA ladder, ο οποίος διευκολύνει στον υπολογισμό του μέγεθος ενός τμήματος DNA που φαίνεται ως μία μπάντα στο gel. Στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ο λ/HindIII.

3β. ΑΓΑΡΟΖΗ 0,8% (παρασκευαστικό gel)

- 1,2 gr αγαρόζης έβρασαν μέχρι πλήρη διάλυση σε 150 ml TAE 10x. Στη συνέχεια προστέθηκαν ~4 μl EtBr και το διάλυμα έπηξε σε ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης αφού προηγουμένως είχε τοποθετηθεί κατάλληλο χτενάκι για τη δημιουργία θέσεων όπου φορτώθηκαν τα δείγματα.
- Όταν επιθυμούμε να απομονώσουμε τμήμα DNA από gel αγαρόζης τότε κατασκευάζουμε «παρασκευαστικό gel» που είναι πιο αραιό (0,8%) και έχει πιο μεγάλα πηγαδάκια. Είναι πιο αραιό γιατί η ποσότητα του DNA που θέλουμε αν απομονώσουμε είναι πολύ μεγαλύτερη και θέλουμε να διαχωριστούν καλύτερα οι ζώνες των διαφορετικών DNAs.

4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η απομόνωση τμημάτων DNA έγινε με την μέθοδο της ηλεκτροέκλουσης σε μεμβράνες διαπίδυσης. Στη συνέχεια ο καθαρισμός του DNA έγινε με φαινόλη-χλωροφόρμιο και η κατακρήμνιση με αιθανόλη και άλας οξικού νατρίου.

4α. ΗΛΕΚΤΡΟΕΚΛΟΥΣΗ

❖ ΥΛΙΚΑ:

- Καθαρό νυστέρι
 - Μεμβράνη διαπίδυσης και ειδικά clips
 - Καθαρά πλαστικά σωληνάρια
- Έγινε πέψη του DNA (0,1-25 μg) με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού.
 - Ηλεκτροφορήθηκαν τα τμήματα του DNA σε παρασκευαστικό gel αγαρόζης 0,8% (με 2 μl EtBr).
 - Κόπηκε η μπάντα με το ενδιαφερόμενο τμήμα DNA, τοποθετήθηκε σε μεμβράνη διαπίδυσης, στην οποία προηγουμένως είχε προστεθεί νερό, και κλείστηκε με ειδικά clips.
 - Τοποθετήθηκε η μεμβράνη στο δοχείο ηλεκτροφόρησης για 1-1,5 ώρες στα 120V.
 - Αλλάχθηκε η πολικότητα στο δοχείο της ηλεκτροφόρησης για 30 sec ώστε να ξεκολλήσει το DNA από την επιφάνεια της μεμβράνης και να μεταφερθεί στο νερό, μέσα στη μεμβράνη.
 - Μεταφέρθηκε το υγρό από την μεμβράνη σε ένα καθαρό πλαστικό σωληνάριο και έγινε συμπύκνωση με εκχυλίσαις με 2-βουτανόλη.

4β. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ DNA

❖ ΥΛΙΚΑ:

- σύριγγα 1 ml
 - αποστειρωμένες πιπέτες Pasteur
 - Sephadex G50
 - Φαινόλη, χλωροφόρμιο, οξικό νάτριο, αιθανόλη 100%
- Δημιουργήθηκε μία στήλη από Sephadex G50, σε μία σύριγγα 1 ml. Το διάλυμα με το DNA πέρασε από τη στήλη ούτως ώστε να απομακρυνθούν άλατα, ολιγονουκλεοτίδια, πεπτιδίδια και αμινοξέα.
 - Το DNA καθαρίστηκε περαιτέρω με επαναλαμβανόμενες εκχυλίσαις με ίσο όγκο μίγματος φαινόλης:χλωροφορμίου. (αναλογία 1:1)
 - Έπειτα προστέθηκε 1/10 του όγκου οξικό νάτριο καθώς και δύο όγκοι αιθανόλη 100%.
 - Φυγοκεντρήθηκε το δείγμα για 10 min στις 13800 rpm στους 4°C.
 - Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υγρό, η πελλέτα επαναδιαλύθηκε σε κάποιο όγκο αποστειρωμένου νερού και το δείγμα του καθαρού DNA φυλάχθηκε στους -20°C.

5. Filling & Blunting ΣΤΑ ΚΟΜΜΕΝΑ ΤΜΗΜΑΤΑ DNA

Μετά την απομόνωση των τμημάτων του πλασμιδίου-construct (vector και insert), στα άκρα που ήταν 5' protruding έγινε filling και στα άκρα που ήταν 3' protruding έγινε blunting. Μ'αυτό τον τρόπο έγιναν όλα τα άκρα τυφλά και να διευκολυνθεί έτσι η σύνδεσή τους.

5α. filling

- Δημιουργήθηκε μίγμα με:
 - > δείγμα DNA
 - > Klenow ένζυμο της εταιρίας Roche (2u/μl)
 - > ρυθμιστικό διάλυμα της ίδιας εταιρίας
 - > dNTPs (10 mM)
 - > BSA (10mg/ml)
 - > dH₂O
- Ακολουθήθηκαν οι οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας Roche (15min, 37°C), συνήθως σε τελικό όγκο 50μl. Για απενεργοποίηση των ενζύμων τα δείγματα τοποθετούνται για 10min στους 65°C.

5β. blunting

Ομοίως με filling. Τα dNTPs όμως προστέθηκαν στο μείγμα μετά από 5 min.

6. ΑΠΟΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ VECTOR

Μετά την απομόνωση και το filling/blunting του vector ακολούθησε η αποφωσφορυλίωση των άκρων του. Αυτή η διαδικασία βοηθάει στο να αποφευχθεί η επανένωση των άκρων του.

- Δημιουργήθηκε μίγμα με:
 - > δείγμα DNA
 - > SAP ένζυμο της εταιρίας Roche (2u/μl)
 - > ρυθμιστικό διάλυμα της ίδιας εταιρίας
 - > dH₂O
- Ακολουθήθηκαν οι οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας Roche (1hr, 37°C), συνήθως σε τελικό όγκο 30μl. Για απενεργοποίηση του ενζύμου το δείγμα έμεινε για 15min στους 65°C.

7. ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΩΝ DNAs ΓΙΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ (ligation)

- Δημιουργήθηκε μίγμα με:
 - > δείγμα DNA (vector, insert)
 - > λιγάση της εταιρίας Roche (1u/μl)
 - > ρυθμιστικό διάλυμα της ίδιας εταιρίας 10x
 - > dH₂O
- Ακολουθήθηκαν οι οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας Roche (o/n, 37°C), συνήθως σε τελικό όγκο 30μl. Για απενεργοποίηση του ενζύμου το δείγμα έμεινε για 10min στους 65°C.
- Η αναλογία insert:vector είναι ανάλογη με το μέγεθος του vector. Γενικά, όσο μεγαλύτερος ο vector τόσο μεγαλύτερη πρέπει να είναι η περίσσεια του insert. Η αναλογία αυτή δεν είναι αναλογία μάζας αλλά αναλογία μορίων.

8. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ (electrompetent) ΙΚΑΝΩΝ ΝΑ ΔΕΧΟΝΤΑΙ DNA ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΩΝ

❖ ΥΛΙΚΑ:

- Φλάσκα 500ml
 - Σωληνάρια falcon 15ml και 50ml, erpendorfs
 - Θρεπτικό μέσο LB*, ddH₂O, διάλυμα γλυκερόλης 10%
- Έγινε προσθήκη 2-3ml καλλιέργειας βακτηρίων E.coli σε 50 ml θρεπτικού υλικού LB* (χωρίς αντιβιοτικό) και επωάστηκαν σε αναδευτήρα over night (o/n) στους 37°C.
 - Την επόμενη μέρα όταν η οπτική πυκνότητα έφτασε OD₆₀₀=0,6, η καλλιέργεια τοποθετήθηκε στον πάγο για 15-30 min.
 - Η καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε 4 falcons (50ml) τα οποία πριν είχαν τοποθετηθεί κι αυτά στον πάγο. Όλα τα επόμενα βήματα έγιναν στον πάγο με παγωμένα σκεύη (όπου χρειάστηκε η εκτέλεση έγινε κοντά σε φλόγα).
 - Φυγοκεντρήθηκαν τα δείγματα για 15min, στις 4.000rpm, στους 4°C.
 - Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και η πελλέτα επαναδιαλύθηκε σε ίσο όγκο ddH₂O.
 - Ξαναέγινε φυγοκέντρηση για 15min, στις 4.000rpm, στους 4°C.
 - Έγιναν άλλες 4 φυγοκεντρήσεις και επαναδιαλύσεις με όγκο ddH₂O V/2, V/10 και V/50 αντίστοιχα. Τελικά υπήρχαν 10 ml βακτηρίων (σε ddH₂O) μέσα σε falcon 15ml.
 - Προστέθηκαν 800μl γλυκερόλης 10% και τα βακτήρια μοιράστηκαν σε erpendorfs (από 60 μl).

9. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ E.coli ΜΕ DNA ΤΗΣ ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΑΣ (electroporation)

Θέλοντας να μετατρέψουμε τα βακτήρια E.coli (στέλεχος DH₁₀B) δεκτικά σε DNA της επιλογής μας (construct) τα υποβάλλαμε σε ηλεκτρικό σοκ. Με αυτή τη μέθοδο λόγω της ηλεκτρικής ώθησης το DNA εισάγεται μέσα στα βακτήρια.

❖ ΥΛΙΚΑ:

- δείγμα DNA (από ligation)
 - θρεπτικό μέσο 2XYT
 - πλαστικά σωληνάκια
 - τρυβλία με στερεό θρεπτικό 2XYT και αντιβιοτικό αμπικιλίνη
- Electrocompetent βακτήρια ξεπάγωσαν στον πάγο.
 - Προστέθηκε 1 μl από το διάλυμα της ligation και όλο μαζί τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένες, παγωμένες κυβέτες.
 - Έγινε electroshock στα 1800V για 5msec.
 - Μετά προστέθηκαν ~150μl παγωμένου θρεπτικού 2XYT(χωρίς αντιβιοτικό), ανακατεύτηκαν και μεταφέρθηκαν σε πλαστικό σωληνάκι με 700μl θρεπτικό 2XYT. Έγινε επώαση για 1hr σε αναδευτήρα στους 37°C, ώστε τα βακτήρια να εκφράσουν το γονίδιο ανθεκτικότητας.

- Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 6min στις 6.000rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απορροφήθηκε όλο το υπερκείμενο και έγινε επαναδιάλυση σε ~200μl απ'αυτό. (Όσο απέμεινε μέσα στο πλαστικό σωληνάκι)
- Τέλος έγινε επιστροφή τρυβλίων με στερεό θρεπτικό 2ΧΥΤ και αντιβιοτικό αμπικιλίνη.

10. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

10α. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΛΙΜΑΚΑ

❖ ΥΛΙΚΑ:

- γυάλινα βακτηριολογικά σωληνάκια
- αποστειρωμένα erpendorfs και tips
- πιπέτες Pasteur
- θρεπτικό υλικό 2ΧΥΤ
- κρύο solution #1 (GTE): 50 mM γλυκόζη
25 mM Tris'Cl (pH 8.0)
10 mM EDTA (pH 8.0)
- solution #2: 0,2N NaOH
1% SDS
- κρύο solution #3: 5M potassium acetate 60 ml
glacial acetic acid 11,5 ml
H₂O 28,5 ml

• Μεγάλωσαν βακτηριακές αποικίες *E.coli* στελέχους DH₁₀B σε 2ml θρεπτικού μέσου 2ΧΥΤ με αντιβιοτικό αμπικιλίνη σε γυάλινα βακτηριολογικά σωληνάκια.

Επωάστηκαν ο/η σε κινούμενο επωαστήρα στους 37⁰C.

- Μεταφέρθηκαν 1,5 ml σε erpendorf. Φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000 rpm για 30 sec. Το υπόλοιπο της καλλιέργειας φυλάχθηκε στους 4⁰C.
- Χύθηκε το υπερκείμενο υγρό αφήνοντας την πελλέτα όσο πιο στεγνή γινόταν.
- Επαναδιαλύθηκε η βακτηριακή πελλέτα σε 100 μl κρύου solution #1 (GTE).
- Προστέθηκαν 200μl φρεσκοφτιαγμένο solution #2. Τα tubes ανακινήθηκαν αμέσως και γρήγορα ένα-ένα. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στον πάγο για 5 min.
- Προστέθηκαν 150 μl κρύο solution #3. Ακολούθησε vortex για 10 sec και τα tubes τοποθετήθηκαν στον πάγο για 5 min.
- Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 12000rpm για 5 min (στους 4⁰C).
- Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε νέα tubes.
- Προστέθηκε ίσος όγκος φαινόλη:χλωροφόρμιο σε κάθε δείγμα. Έγινε φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 3 min. Η υπερκείμενη υγρή φάση μεταφέρθηκε σε νέα tubes.
- Προστέθηκαν δύο όγκοι αιθανόλη σε κάθε δείγμα και έγινε vortex. Αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
- Έγινε φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 5 min (στους 4⁰C).

- Χύθηκε το υπερκείμενο υγρό και απορροφήθηκε με μία πιπέτα Pasteur κάθε ίχνος υγρασίας από τα τοιχώματα του tube. Τα tubes αφήθηκαν να στεγνώσουν με την βοήθεια του απαγωγού.
- Κάθε πελλέτα επαναδιαλύθηκε σε 60 μl H₂O και 1 μl RNase.

10β. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΕΣΑΙΑ ΚΛΙΜΑΚΑ

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα έγινε με το kit "JETSPIN" της εταιρίας GENOMED. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, προμηθεύτηκαν από την κατασκευάστρια εταιρία.

10γ. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΕΓΑΛΗ ΚΛΙΜΑΚΑ

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης, η οποία είναι αποτελεσματική για όλα τα κοινώς χρησιμοποιούμενα στελέχη *E.coli* και είναι σχεδιασμένη για να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με ένα επακόλουθο βήμα καθαρισμού. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε καθαρισμός με διαδοχικές φυγοκentrήσεις διαβάθμισης χλωριούχου καισίου (CsCl), παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr).

❖ ΥΛΙΚΑ:

- γυάλινη φλάσκα 2 ml με 800 ml θρεπτικό υλικό 2XYT.
 - tubes των 500 ml και 250 ml.
 - καθαρά tips και πιπέτες Pasteur.
 - κρύο solution #1 (GTE): 50 mM γλυκόζη
25 mM Tris'Cl (pH 8.0)
10 mM EDTA (pH 8.0)
 - solution #2: 0,2N NaOH
1% SDS
 - κρύο solution #3: 5M potassium acetate 60 ml
glacial acetic acid 11,5 ml
H₂O 28,5 ml
 - διάλυμα λυσοζύμης: 10 mg/ml σε 10mM Tris.Cl (pH 8.0)
- Μεγάλωσαν βακτηριακές αποικίες *E.coli* στελέχους DH₁₀B σε 800ml θρεπτικού μέσου 2XYT με αντιβιοτικό αμπικιλίνη σε γυάλινη φλάσκα 2 Lt. Επώαστηκαν ο/η σε κινούμενο επωαστήρα στους 37⁰C.
 - Έγινε φυγοκέντρηση της καλλιέργειας στις 4000 rpm, στους 4⁰C για 15 min σε φυγόκεντρο Sorvall.
 - Χύθηκε το υπερκείμενο, αφήνοντας την βακτηριακή πελλέτα όσο πιο στεγνή γινόταν.
 - Επαναδιαλύθηκε η βακτηριακή πελλέτα σε 36 ml Solution #1.
 - Προστέθηκαν 2 ml φρεσκοφτιαγμένου διαλύματος λυσοζύμης.
 - Έπειτα, προστέθηκαν 40ml φρεσκοφτιαγμένου solution #2. Τα tubes φυγοκέντρησης ανακινήθηκαν αμέσως και γρήγορα ένα-ένα. Στη συνέχεια διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 min.

- Προστέθηκαν 20 ml κρύου solution #3. Ακολούθησε πολύ καλή ανακίνηση των tubes (ώστε να γίνει ομοιογενές το μίγμα) και τοποθέτησή τους στον πάγο για 10 min. Το άσπρο ίζημα που δημιουργήθηκε αποτελείται από χρωμοσωμικό DNA, υψηλού M.B. RNA καθώς και από σύμπλοκα καλίου/SDS/πρωτεΐνης/μεμβράνης.
- Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 4000rpm για 15 min (στους 4⁰C). Δημιουργήθηκε μία συμπαγής άσπρη πελλέτα που περιείχε τα υπολείμματα των βακτηρίων.
- Έγινε φιλτράρισμα του υπερκείμενου υγρού με υαλοβάμβακα και τοποθετήθηκε σε tube των 250 ml. Προστέθηκε, στη συνέχεια, 0,6 του όγκου ισοπροπανόλη σε κάθε δείγμα. Έγινε καλή ανακίνηση και τα tubes διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.
- Έγινε φυγοκέντρηση στις 5.000 rpm για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να πέσει η πελλέτα του πλασμιδιακού DNA.
- Χύθηκε το υπερκείμενο υγρό αφήνοντας την πελλέτα όσο πιο στεγνή γινόταν. Ξεπλύθηκε η πελλέτα με 1-2 ml αιθανόλης 70%. Απορροφήθηκε με μία πιπέτα Pasteur κάθε ίχνος υγρασίας από τα τοιχώματα των tubes, τα οποία στη συνέχεια αφέθηκαν να στεγνώσουν με την βοήθεια του απαγωγού.
- Κάθε πελλέτα επαναδιαλύθηκε σε 3 ml T.E. (pH 8.0).

Ακολούθησε ο καθαρισμός με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις διαβάθμισης χλωριούχου καισίου (CsCl), παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr).

❖ ΥΛΙΚΑ:

- Καθαρά πλαστικά σωληνάρια
 - Σωληνάρια COREX
 - quick seal centrifuge tubes
 - σύριγγα 1^{ος} ml
 - στερεό CsCl, διάλυμα EtBr 10mg/ml H₂O, κορεσμένο διάλυμα CsCl-H₂O-Isopropanol, διάλυμα αιθανόλης 100%.
- Υπολογίστηκε με ακρίβεια ο όγκος του διαλύματος DNA και μεταφέρθηκε σε νέο πλαστικό σωληνάριο.
 - Για κάθε ml διαλύματος προστίθεται 1,1 gr στερεού CsCl.
 - Μετά από ανάδευση προστέθηκαν 150 μl EtBr (10mg/ml H₂O).
 - Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ένα quick seal centrifuge tube και συμπληρώθηκε προσεκτικά διάλυμα CsCl (1gr/ml H₂O).
 - Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 57.500 rpm μέχρι την επόμενη μέρα.
 - Όταν τελείωσε η φυγοκέντρηση είχαν δημιουργηθεί δύο κόκκινες ζώνες στο tube. Η κάτω ζώνη είχε το πλασμιδιακό DNA ενώ η πάνω ζώνη περιείχε κομμένο κυκλικό ή γραμμικό DNA.
 - Το πλασμιδιακό DNA μεταφέρθηκε προσεκτικά με μία σύριγγα σε καθαρό πλαστικό σωληνάριο.
 - Έγιναν εκχυλίσεις με κορεσμένο διάλυμα CsCl-H₂O-Isopropanol για να απομακρυνθεί το EtBr (δεν διακρίνεται διαφορά στις δύο φάσεις, δεν υπάρχει πλέον ροζ απόχρωση στην πάνω φάση).
 - Η πάνω φάση απορροφήθηκε και η κάτω μεταφέρθηκε σε γυάλινο COREX σωληνάριο. Ο όγκος αυτός μετρήθηκε και προστέθηκαν δύο όγκοι

αποστειρωμένο, απιονισμένο H₂O και στη συνέχεια προστέθηκε δύο φορές επί τον συνολικό όγκο, αιθανόλη 100%.

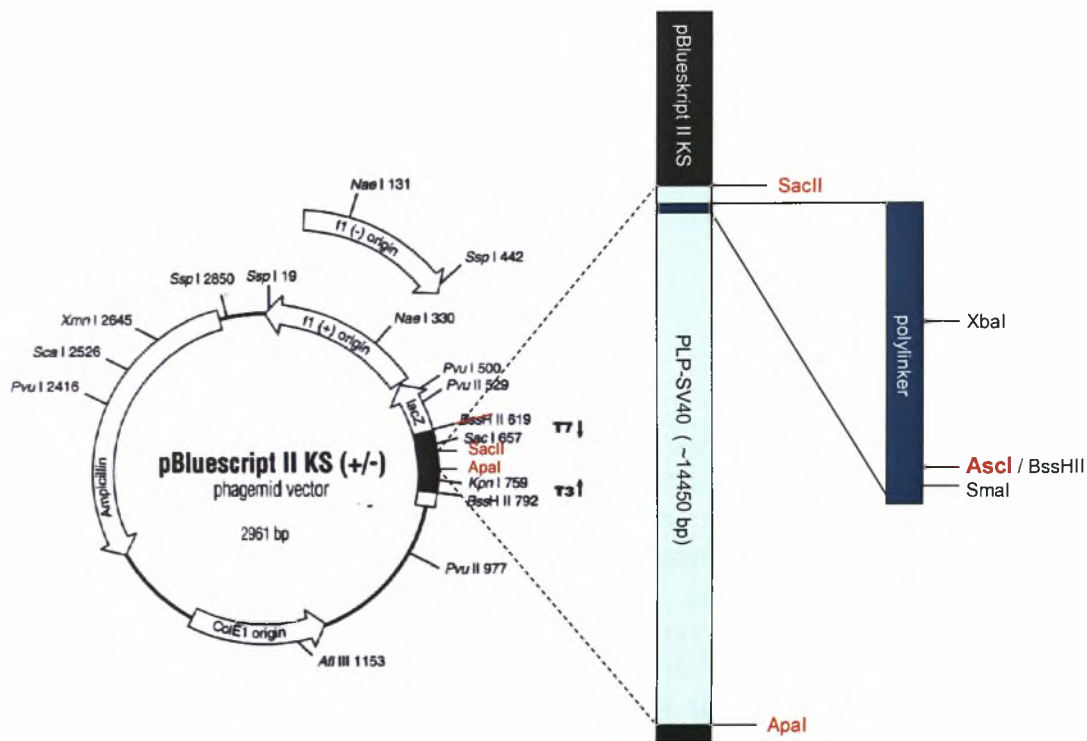
- Έγινε φυγοκέντρηση στις 1.500 rpm για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να πέσει το DNA. Η επαναδιάλυση της πελλέτας έγινε με 450 μl αποστειρωμένο, απιονισμένο H₂O.
- Τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση του δείγματος στα 260 nm και 280 nm ώστε να βρεθεί η συγκέντρωσή του και να επιβεβαιωθεί η καθαρότητά του.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΓΙΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ TAG-1 ΣΤΑ ΟΛΙΓΟΔΕΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ

Κατά τη δημιουργία πλασμιδιακής κατασκευής (construct) για υπερέκφραση του μορίου κυτταρικής συνάφειας TAG-1 στα ολιγοδενδροκύτταρα προσπαθήσαμε να εισάγουμε καθοδικά (downstream) του PLP υποκινητή το γονίδιο της TAG-1.

- Αρχικά κάναμε πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες ώστε α) να μπορέσουμε να απομονώσουμε το γονίδιο της TAG-1 (insert) από το πλασμίδιο στο οποίο υπήρχε (TAG-1 in p-Bluescript KS II) και β) να γραμμοποιήσουμε το πλασμίδιο PLP-SV40 in pBluescript KS II (vector) (εικόνα 9).

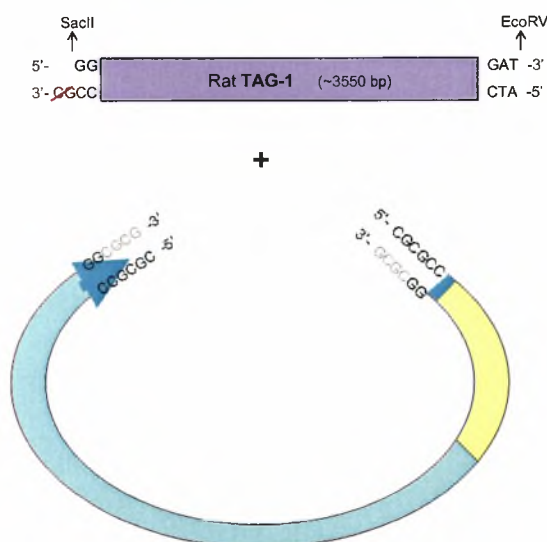


Εικόνα 9. Στον pBluescript II KS vector είχε εισαχθεί ο PLP-SV40 υποκινητής. Στον polylinker υπάρχουν θέσεις κοπής για τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες AscI και SmaI. Αυτό το πλασμίδιο αποτελεί τον vector που θα χρησιμοποιηθεί για την πρώτη πλασμιδιακή κατασκευή.

Η TAG-1 απομονώθηκε με διπλή πέψη με XbaI.EcoRV και με SacII.EcoRV (fragment TAG-1) και ο vector γραμμοποιήθηκε με AscI και SmaI. Για την απομόνωση των τμημάτων DNA από παρασκευαστικό gel 0,9%, ακολουθήθηκε η τεχνική της ηλεκτροέκλουσης και για τον καθαρισμό τους, στήλες Sephadex G50.

- Ακολούθησε filling στο τμήμα του vector που γραμμοποιήθηκε με την AscI και στο fragment TAG-1 που απομονώθηκε με XbaI.EcoRV και blunting στο fragment TAG-1 που απομονώθηκε με SacII.EcoRV, ώστε δημιουργηθούν τυφλά άκρα και να γίνει η σύνδεση των τμημάτων αυτών. Δημιουργήθηκε όμως έτσι το πρόβλημα της εισαγωγής του insert με λάθος προσανατολισμό, κάτι που μπορούσε να ελεγχθεί με πέψεις της κατασκευής, με κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Στη συνέχεια έγινε αποφωσφορυλίωση στα άκρα του vector ώστε να αποτραπεί η επανασύνδεσή τους.
- Έπειτα έγιναν τέσσερις ligations:
 1. (40ng) vector/SmaI + (60ng) fragment TAG-1 /XbaI.EcoRV
 2. (40ng) vector/SmaI + (60ng) fragment TAG-1 /SacII.EcoRV
 3. (40ng) vector/AscI + (60ng) fragment TAG-1 /XbaI.EcoRV
 4. (40ng) vector/AscI + (60ng) fragment TAG-1 /SacII.EcoRV

ligation 4



Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση της ligation 4. Φαίνεται το blunting στο ένα άκρο του insert και το filling στα άκρα του vector. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζεται το τμήμα του pBlyeskript II KS ενώ με γαλάζιο το τμήμα του PLP υποκινητή.

Έγινε επίσης μία self-ligation (μόνο με τον vector): vector/AscI για να ελέγξουμε το ποσοστό επιτυχίας της αποφωσφορυλίωσης. Αυτό γίνεται συγκρίνοντας τον αριθμό των αποικιών που υπάρχουν από τη self-ligation με το πλήθος αποικιών που υπάρχουν από τις κανονικές ligations. Οι αποικίες που βλέπουμε από τη self-ligation προέρχονται από βακτήρια στα οποία το πλασμίδιο που έχει εισαχθεί είναι ο vector (τα άκρα του έχουν επανενωθεί). Τα πλασμίδια αυτά είναι αποτέλεσμα ανεπιτυχούς αποφωσφορυλίωσης. Αν λοιπόν είναι σχεδόν ισόποσες οι αποικίες από τη self-ligation και τις κανονικές ligations, τότε σημαίνει ότι

πολλές από τις αποικίες των κανονικών ligations είναι βακτήρια που περιέχουν μόνο τον vector οπότε η αποφωσφορυλίωση ήταν ανεπιτυχής.

Η επώαση των ligations έγινε στους 20°C ο/η και η απενεργοποίηση του ενζύμου στους 65°C για 10min.

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι θέσεις κοπής της *Ascl* και της *BssHIII* είναι.

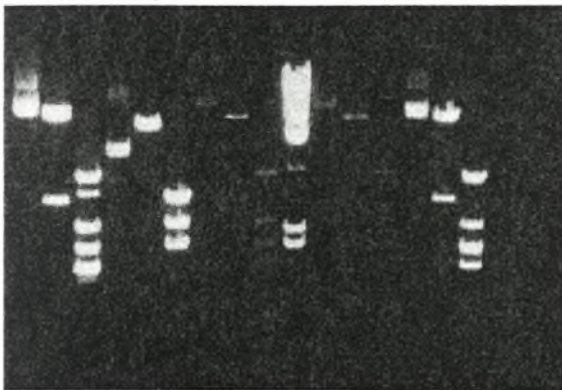
Ascl: 5'...GG|CGCGCC...3' *BssHIII*: 5'...G|CGCGC...3'
 3'...CCGCGC|GG...5' 3'...CGCGC|G...5'

Όπως φαίνεται η θέση κοπής της *BssHIII* εμπεριέχεται σ'αυτή της *Ascl*.

Κατά τη ligation 3 λοιπόν, ξαναδημιουργείται η θέση κοπής της *BssHIII* στο construct που δημιουργούμε. Οπότε όταν θελήσουμε σε μετέπειτα διαδικασία να απομονώσουμε το τμήμα PLP promoter+TAG-1 από το πλασμιδιακό construct, χρησιμοποιώντας την *BssHIII*, δεν θα μπορούσαμε γιατί αυτό το τμήμα θα κόβεται στο τέλος του PLP promoter. Θα χρειάζεται λοιπόν περαιτέρω διαδικασία για να «καταστρέψουμε» αυτή την θέση κοπής της *BssHIII* που θα έχει ξαναδημιουργηθεί. Γι αυτό το λόγω θα προτιμήσουμε την ligation 4 από την ligation 3.

- Στη συνέχεια έγινε μετασχηματισμός (electroporation) βακτηρίων *E.coli* στελέχους DH₁₀B. Κατά την επίστρωση τρυβλίων επιστρώθηκε και *ruc*-vector για να υπολογιστεί η αποδοτικότητα (efficiency) του μετασχηματισμού. Η efficiency υπολογίστηκε μετρώντας αποικίες ανά μg DNA. Εμείς βάλαμε 1pg *ruc*, οπότε 1αποικία σημαίνει ότι έχουμε efficiency=10⁶. Καλή efficiency θεωρείται όταν υπολογίζεται ~10⁹. (Για παράδειγμα στην περίπτωση μας 900 αποικίες=900x10⁶=0,9x10⁹.)
- Μετά την ανάπτυξη των αποικιών ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (minipreps) και πέψη με την *PvuII*. Ακολούθησαν πέψεις με *PvuII* και *BssHIII* σε τέσσερα minipreps που θεωρήθηκαν πιθανά. Τα αποτελέσματα δεν ήταν θετικά (εικόνα 11).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



Εικόνα 11. Φωτογραφία του gel ηλεκτροφόρησης. Στις διαδρομές:

- 1: m.p.8 άκοπο
- 2: m.p.8/*BssHIII*
- 3: m.p.8/*PvuII*
- 4: m.p.14 άκοπο
- 5: m.p.14/*BssHIII*
- 6: m.p.14/*PvuII*
- 7: m.p. 24 άκοπο
- 8: m.p. 24/*BssHIII*
- 9: m.p.24/*PvuII*
- 10: ladder λ/*HindIII*
- 11: m.p. 26 άκοπο
- 12: m.p. 26/*BssHIII*
- 13: m.p. 26/*PvuII*
- 14: vector άκοπος

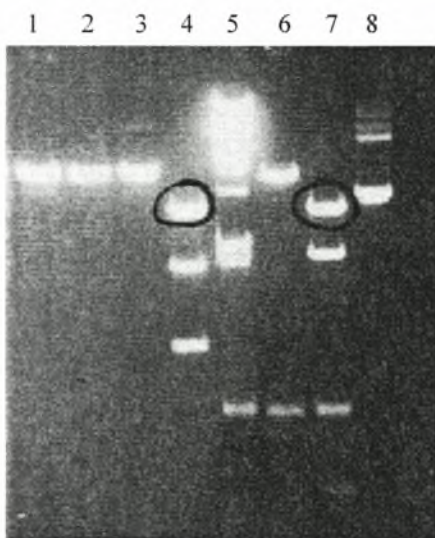
Δεν γνωρίζαμε ποιες ακριβώς μπάντες θα βλέπαμε κόβοντας με την *PvuII*. Γνωρίζαμε όμως ότι κόβοντας μόνο το insert παίρναμε σίγουρα τρεις μπάντες και κόβοντας τον vector, τέσσερις. Με την *BssHIII*

περιμέναμε δύο μπάντες 3.000 και ~18.500 ζ.β. Παρατηρούμε ότι τα δύο από τα τέσσερα minipreps έχουν μόνο τον vector (χωρίς το insert).

Θεωρήσαμε πως το γεγονός ότι δεν είχαμε θετικά minipreps οφείλεται στο ότι κατά την απομόνωση της TAG-1 δημιουργήσαμε δύο περίπου ίσα τμήματα DNA (με την διπλή πέψη XbaI.EcoRV δημιουργούνται δύο τμήματα 3552 και 2926 ζευγών βάσεων ενώ με SacII.EcoRV 3552 και 2910 ζ.β.) Γι' αυτό το λόγω το τμήμα του γονιδίου της TAG-1 έτρεχε στο παρασκευαστικό gel πολύ κοντά με το άλλο κομμάτι του πλασμιδίου και πιθανότατα υπήρξε ανάμιξη των δύο τμημάτων κατά την απομόνωση. Μειώθηκε έτσι η πιθανότητα δημιουργίας της κατασκευής.

- Ξανακάναμε πέψεις για την απομόνωση της TAG-1 αλλά τριπλές, ώστε το υπόλοιπο τμήμα του πλασμιδίου να κόβεται σε δύο μικρότερα κομμάτια και να τρέχουν πιο μακριά από το τμήμα του γονιδίου της TAG-1. Οι πέψεις ήταν: (TAG-1 in p-Blueskript KS II)/SacII.EcoRV.XmnI και (TAG-1 in p-Blueskript KS II) /SacII.EcoRV.SspI.

Περιμέναμε με την πρώτη τριπλή πέψη τρεις μπάντες, 3552 ζ.β. (γονίδιο TAG-1), 1928 ζ.β. και 982 ζ.β. Με την δεύτερη τριπλή πέψη περιμέναμε τέσσερις μπάντες 3552 ζ.β., 2135 ζ.β., 644 ζ.β. και 131 ζ.β. Ωστόσο σωστές είναι και οι μπάντες 3552 ζ.β., 2135 ζ.β., 557 ζ.β. και 218 ζ.β. Μ'αυτό τον τρόπο καταφέραμε και απομονώσαμε το γονίδιο της TAG-1.



Εικόνα 12. Φωτογραφία από το gel ηλεκτροφόρησης. Στις διαδρομές:

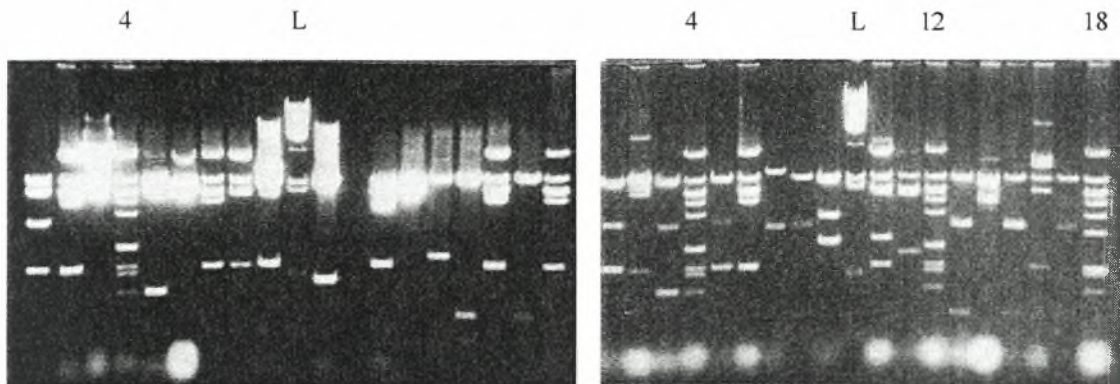
- 1: insert/EcoRV
- 2: insert/XmnI
- 3: insert/SacII
- 4: insert/SacII.EcoRV.XmnI
- 5: ladder:λ/HindIII
- 6: insert/SspI
- 7: insert/SacII.EcoRV.SspI
- 8: insert άκοπο

Στις διαδρομες 4 και 7 φαίνεται το τμήμα του DNA που αντιστοιχεί στο γονίδιο της TAG-1 (~3.500 ζ.β.). Τρέχει πιο μακριά από τα άλλα κομμάτια και άρα μπορεί να απομονωθεί πιο εύκολα.

- Για την απομόνωση του γονιδίου της TAG-1, επιλέξαμε την τριπλή πέψη με SacII.EcoRV.XmnI, καθώς οι δύο πρώτες μπάντες ήταν πιο πολύ απομακρυσμένες. Ακολούθησαν, όπως και πριν, ηλεκτροεκλουση από παρασκευαστικό gel 0,9%, blunting και ligations:

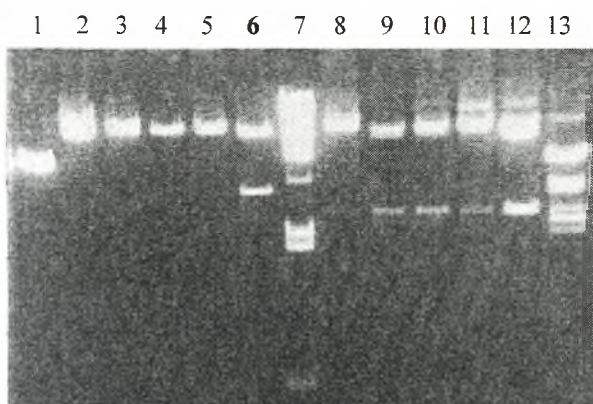
1. (80ng) vector/SmaI + (80ng) fragment TAG-1 /SacII.EcoRV.
2. (80ng) vector/SmaI + (80ng) fragment TAG-1 /SacII.EcoRV.
3. (80ng) vector/AscI + (80ng) fragment TAG-1 /SacII.EcoRV.
4. (80ng) vector/AscI + (80ng) fragment TAG-1 /SacII.EcoRV.

- Στη συνέχεια έγιναν 18 miniprep από την ligation 4 και 18 από την ligation 2 (πέψη με PvuII). Βρέθηκε ένα θετικό από την ligation 4, το #4.4 και τρία από την ligation 2, τα #4.2, #12.2 και #18.2.



Εικόνα 13. Στην αριστερή φωτογραφία φαίνονται τα minipreps (πέψη με PvuII) από τη ligation 4 και στην δεξιά φωτογραφία τα minipreps από τη ligation 2. (Έχουν αριθμηθεί μόνο οι διαδρομές με τα πιθανά, θετικά minipreps. Όπου L:ladder.)

- Ακολούθησαν πέψεις με NotI για να επιβεβαιώσουμε το αποτέλεσμα αυτών των minipreps και να μπορέσουμε να ελέγξουμε αν το insert έχει τοποθετηθεί με σωστό προσανατολισμό. Στο πλασμίδιο που δημιουργήσαμε υπάρχουν δύο θέσεις κοπής για την NotI. Μία στις τελευταίες βάσεις του PLP υποκινητή και μία στις πρώτες βάσεις του τμήματος της TAG-1 που δημιουργούν δύο κομμάτια, ένα με 3.500-4.000 ζ.β. και ένα με ~16.000 ζ.β. Σε περίπτωση που δεν υπάρχει σωστός προσανατολισμός θα είχαμε ένα πολύ μικρό τμήμα ~200 ζ.β. (που πιθανότατα δεν θα φαινόταν στο gel) κι ένα ~20.000 ζ.β. Τελικά από τα τέσσερα πιθανά θετικά miniprep μόνο το #18.2 είχε σωστό προσανατολισμό.



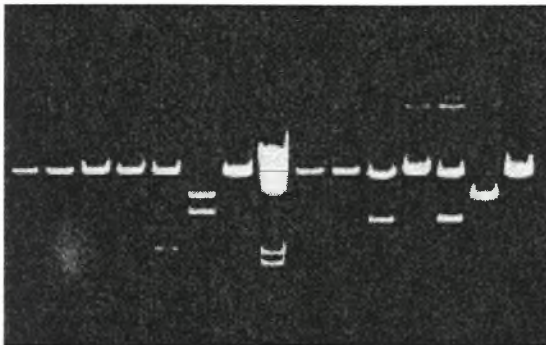
Στη διαδρομή 6 φαίνονται οι δύο μπάντες, ~4000 και ~16000ζ.β, που περιμέναμε από την πέψη με NotI. Άρα μόνο το #18.2 έχει σωστό προσανατολισμό

Εικόνα 14. Φωτογραφία από gel ηλεκτροφόρησης. Στις διαδρομές

- 1: insert/NotI
- 2: vector/NotI
- 3: mp 4.4/NotI
- 4: mp 4.2/NotI
- 5: mp 12.2/NotI
- 6: mp 18.2/NotI
- 7: ladder: λ/HindIII
- 8: mp 4.4/ApaI.SacII
- 9: mp 4.2/ApaI.SacII
- 10: mp 12.2/ApaI.SacII
- 11: mp 18.2/ApaI.SacII
- 12: vector/ApaI.SacII
- 13: insert/ApaI.SacII

- Δοκιμάσαμε άλλα 18 minipreps από το ligation 4 (το προτιμήσαμε γιατί έχει καλύτερη αναλογία vector:insert) και έγινε πέψη με PvuII. Υπήρχε ένα πιθανό miniprep, το #11 το οποίο είχε ίδιες μπάντες με το #18.2 άρα έχει και σωστό προσανατολισμό. Ακολούθησαν κι άλλες πέψεις για το #11 με NotI και SmaI ώστε να επιβεβαιωθεί ο προσανατολισμός του. Στο πλασμίδιο που δημιουργήσαμε υπάρχουν δύο θέσεις κοπής για την SmaI. Μία στις τελευταίες βάσεις του PLP υποκινητή και μία στο τμήμα της TAG-1 που δημιουργούν δύο κομμάτια ένα με 2.500-ζ.β. και ένα με ~18.500 ζ.β. Σε περίπτωση που δεν υπάρχει σωστός προσανατολισμός θα είχαμε κομμάτι με ~1.100 ζ.β. (που πιθανότατα δεν θα φαινόταν στο gel) κι ένα με ~19.000 ζ.β.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Στις διαδρομές 11 και 13 φαίνεται η ομοιότητα του mp11 με αυτό του mp18.2.

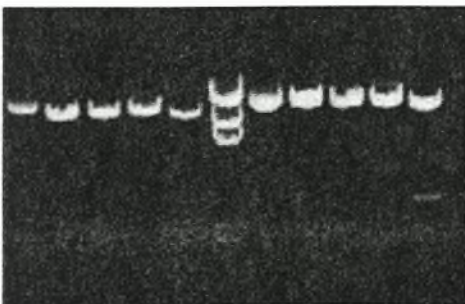
Εικόνα 15. Φωτογραφία από το gel ηλεκτροφόρησης.

Στις διαδρομές

- 1: mp 4.2/SmaI
- 2: mp 12.2/SmaI
- 3: mp 18.2/SmaI
- 4: mp 4.4/SmaI
- 5: mp 11/SmaI
- 6: insert/SmaI
- 7: vector/SmaI
- 8: ladder:λ/HindIII
- 9: mp 4.2/NotI
- 10: mp 12.2/NotI
- 11: mp 18.2/NotI
- 12: mp 4.4/NotI
- 13: mp 11/NotI
- 14: insert/NotI
- 15: vector/NotI

- Όλα τα αποτελέσματα ήταν αναμενόμενα γι'αυτό συνεχίσαμε με απομόνωση του πλασμιδίου σε μεγάλη κλίμακα (maxiprep) (από το miniprep #11) και καθαρισμό του με CsCl. Ψάρεψαμε μικρή ποσότητα DNA (ψ) και το υπόλοιπο το κατακρημνίσαμε (κ).
- Μετά την απομόνωση του πλασμιδίου ξανακάναμε πέψεις με BssHIII και SacII ώστε να σιγουρευτούμε ότι είχαμε το πλασμίδιο που θέλαμε. Και με τα δύο ένζυμα περιμέναμε να δούμε γραμμοποιημένο το πλασμίδιο. Στη διπλή πέψη περιμέναμε μία μπάντα ~3.000 ζ.β και μία ~18.000 ζ.β

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

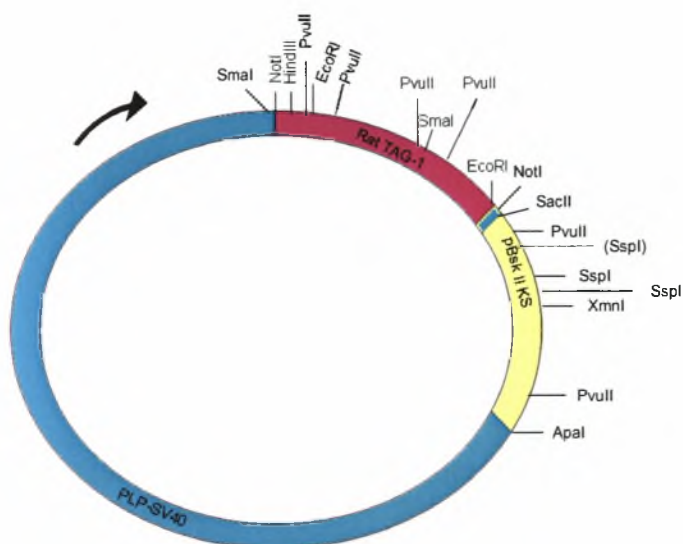


Στις διαδρομές 5 και 11 φαίνονται οι δύο μπάντες που περιμέναμε με τη διπλή πάψη BssHIII.SacII. Άρα έχουμε επιτύχει τη δημιουργία του construct.

Εικόνα 16. Φωτογραφία από gel ηλεκτροφόρησης. Στις διαδρομές

- 1: construct1(ψ) άκοπο
- 2: construct1(ψ)/BssHIII (NEB3)
- 3: construct1(ψ)/BssHIII (NEB4)
- 4: construct1(ψ)/SacII
- 5: construct1(ψ)/BssHIII.SacII
- 6: ladder:λ/HindIII
- 7: construct1(κ) άκοπο
- 8: construct1(κ)/BssHIII (NEB3)
- 9: construct1(κ)/BssHIII (NEB4)
- 10: construct1(κ)/SacII
- 11: construct1(κ)/BssHIII.SacII

- Τέλος ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο που μας δόθηκε για να είναι έτοιμο το πλασμιδιακό DNA μας για ένεση σε ποντικούς.

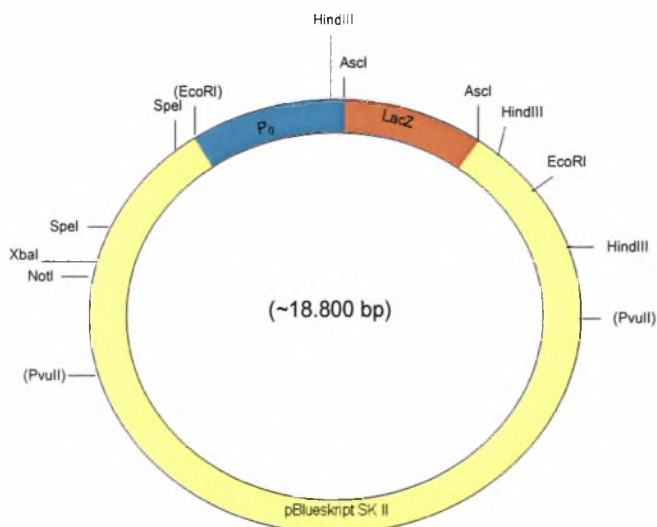


Εικόνα 17. Σχηματική απεικόνιση του πρώτου construct. Φαίνονται και οι θέσεις κοπής των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη δημιουργία του.

2. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΓΙΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ TAG-1 ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ SCHWANN

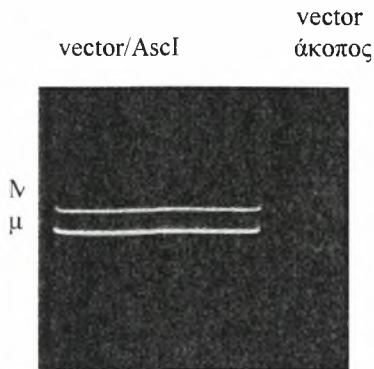
Κατά τη δημιουργία κατασκευής για υπερέκφραση του μορίου κυτταρικής συνάφειας TAG-1 στα κύτταρα Schwann προσπαθήσαμε να εισάγουμε καθοδικά του P_0 υποκινητή το γονίδιο της TAG-1.

- Αρχικά στο πλασμίδιο του υποκινητή P_0 (vector) (P_0 in p-Blueskript KS II) καθοδικά του υποκινητή υπήρχε το γονίδιο LacZ (εικόνα 18). Για να το αφαιρέσουμε και να τοποθετήσουμε στη θέση του αυτό της TAG-1, κόψαμε το αρχικό πλασμίδιο με την Ascl.



Εικόνα 18. Το αρχικό πλασμίδιο-vector όπου υπήρχε ο υποκινητής P_0 . Πρέπει στη θέση του γονιδίου της LacZ να τοποθετηθεί αυτό της TAG-1.

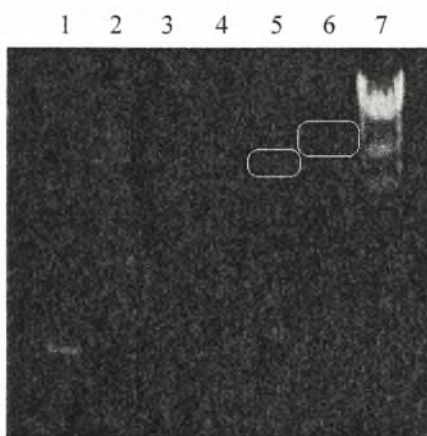
Παρατηρήσαμε όμως ότι η *AscI* δεν είχε κόψει το πλασμίδιο όπως θα έπρεπε για να δώσει δύο μπάντες (μία μεγάλη ~15.000 ζ.β. και πολύ μικρότερη). Η *AscI* είχε κόψει μερικώς.



Εικόνα 19. Φωτογραφία από το gel ηλεκτροφόρησης.

Το πλασμίδιο του vector έχει δύο θέσεις κοπής για την *AscI*. Αναμέναμε δύο μπάντες με μεγάλη διαφορά μεγέθους. Η πάνω μπάντα μάλλον δεν θα έπρεπε να υπάρχει.

- Ξαναδοκιμάσαμε την πέψη και είχαμε το ίδιο αποτέλεσμα. Αποφασίσαμε να απομονώσουμε και τα δύο κομμάτια. Ονομάσαμε Μ: το πιο μεγάλο και μ: το πιο μικρό.
- Έχοντας ένα γραμμοποιημένο τμήμα DNA (P_0 in p-Blueskript KS II) με *AscI*, απομονωμένο από παρασκευαστικό gel με ηλεκτροέκλυση από προηγούμενο πείραμα (vector frg) θελήσαμε να το συγκρίνουμε με τα δύο τμήματα DNA που απομονώσαμε αυτή τη φορά. Το κομμάτι Μ έμοιαζε να είναι αυτό που χρειαζόμασταν.

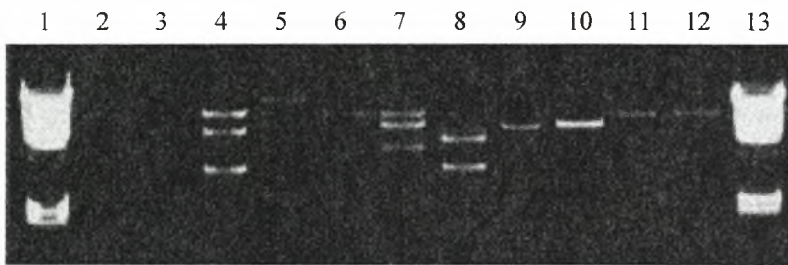


Εικόνα 20. Φωτογραφία από το gel ηλεκτροφόρησης. Στις διαδρομές

- 1: vector άκοπος
- 2: vector/*NotI*
- 3: vector/*AscI*
- 4: vector frg/*AscI*
- 5: μ
- 6: Μ
- 7: ladder: λ/*HindIII*

Η μπάντα στη διαδρομή 6 είναι ίδια με αυτή στη διαδρομή 4, όπου υπάρχει ο vector γραμμοποιημένος από προηγούμενο πείραμα. Πιθανότατα το Μ είναι το τμήμα του vector που χρειαζόμαστε.

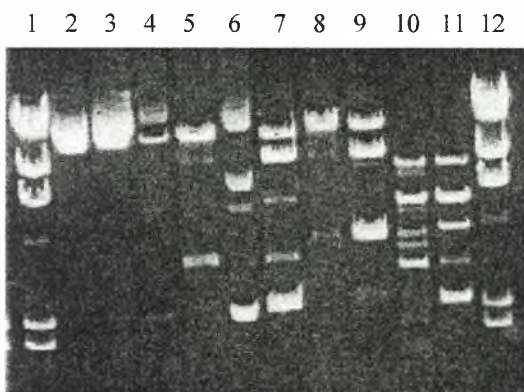
- Έγιναν κι άλλες πέψεις του (P_0 in p-Blueskript KS II), του παλιού κομματιού και των δύο καινούργιων για να αποφανθούμε κάποιο συμπέρασμα. Έγινε πέψη ξανά με *AscI* και με *SpeI* όπου περιμέναμε δύο μπάντες 600 και ~18.000 ζ.β. Το μόνο σίγουρο ήταν πως το (P_0 in p-Blueskript KS II) δεν κοβόταν πλήρως με όσες περιοριστικές ενδονουκλεάσες το προσπαθήσαμε. Καταλυτικό παράγοντα αποτέλεσε και το γεγονός ότι δεν είχαμε πολλά και ακριβή στοιχεία για το πλασμίδιο αυτό.



Εικόνα 21. Φωτογραφία από το gel ηλεκτροφόρησης. Στις διαδρομές →

- | | |
|----------------------|----------------------|
| 1: ladder:λ/HindIII | 8: vector/AscI.SacII |
| 2: vector frg άκοπος | 9: μ άκοπο |
| 3: vector frg/SpeI | 10: μ/AscI |
| 4: vector/SpeI | 11: M άκοπο |
| 5: vector άκοπος | 12: M/AscI |
| 6: vector frg/AscI | 13: ladder:λ/HindIII |
| 7: vector/AscI | |

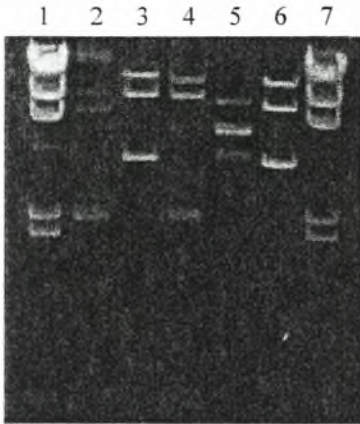
- Όσες πέψεις έγιναν, έδιναν αποτυχημένα αποτελέσματα. Παραγγείλαμε καινούριο ένζυμο AscI από την ίδια εταιρία. Κόψαμε και δύο άλλα τμήματα DNA (DNA και vectorQ) μ'αυτό για να αποφανθούμε αν έφταιγε το ένζυμο ή το DNA που δεν γινόταν η πέψη. Τελικά το (P₀ in p-Blueskript KS II) δεν κόπηκε ούτε με το καινούριο ένζυμο.



Εικόνα 22. Φωτογραφία του gel ηλεκτροφόρησης. Στις διαδρομές

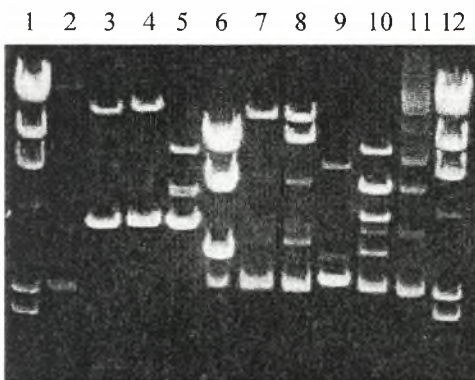
- | |
|-----------------------|
| 1: ladder: λ/HindIII |
| 2: DNA άκοπο |
| 3: DNA/AscI |
| 4: vectorQ άκοπος |
| 5: vectorQ/AscI |
| 6: vector άκοπος |
| 7: vector/AscI |
| 8: vectorQ/NotI |
| 9: vector/NotI |
| 10: vectorQ/EcoRI |
| 11: vector/EcoRI |
| 12: ladder: λ/HindIII |

- Δοκιμάσαμε να καθαρίσουμε το DNA (P₀ in p-Blueskript KS II) από άλατα με εκχυλίσεις με φαινόλη και να το ξανακόψουμε με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Το αποτέλεσμα ήταν το ίδιο. Το (P₀ in p-Blueskript KS II) δεν κοβόταν όπως θα έπρεπε.



Εικόνα 23. Φωτογραφία του gel ηλεκτροφόρησης.
 1: ladder:λ/HinDIII
 2: vector άκοπος
 3: vector/NotI
 4: vector/AscI
 5: vector/EcoRI
 6: vector/SpeI
 7: ladder:λ/HinDIII

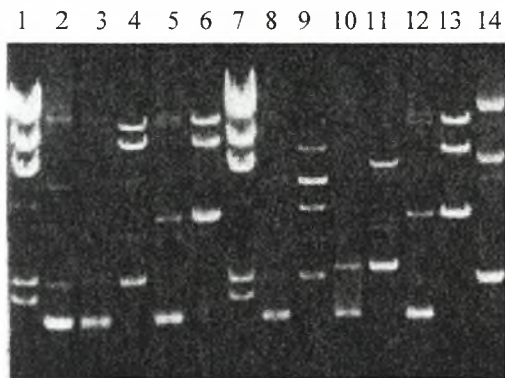
- Δοκιμάσαμε ακόμη να μετασχηματίσουμε διαφορετικό στέλεχος βακτηρίων E.coli, XL-I Blue, με το πλασμίδιο (P₀ in p-Blueskript KS II) (vectorXL) γνωρίζοντας ότι με αυτό το στέλεχος παίρνουμε πιο εύπεπτο DNA. Μετά την επώαση των βακτηρίων στα τρυβλία κάναμε miniprep (vector XL) και δοκιμάσαμε να κόψουμε με διάφορες περιοριστικές ενδονουκλεάσες.



Εικόνα 24. Φωτογραφία του gel ηλεκτροφόρησης. Στις διαδρομές
 1: ladder:λ/HindIII
 2: vectorXL άκοπος
 3: vectorXL/SpeI
 4: vectorXL/NotI
 5: vectorXL/HindIII
 6: vectorXL/EcoRI
 7: vector XL/AscI
 8: vector/AscI
 9: vectorXL/PvuII
 10: vector/EcoRI
 11: vector άκοπος
 12: ladder:λ/HindIII

Δεν πήραμε κανένα αισιόδοξο αποτέλεσμα. Το τμήμα του vector πάλι δεν κόπηκε.

- Αποφασίσαμε να κάνουμε maxiprep από αυτό το «νέο» (N) DNA (από βακτήρια XL-I Blue) και καθαρισμό με CsCl για πάρουμε καλύτερης ποιότητας DNA και να καταφέρει να κοπεί. Κάναμε πέψεις με διάφορες περιοριστικές ενδονουκλεάσες για να το συγκρίνουμε με το «παλιό» (Π) DNA που είχαμε απομονώσει αρχικά (από βακτήρια DH₁₀B). Παρατηρήσαμε ότι το (N) δεν κόπηκε με καμία από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες.



Εικόνα 25. Φωτογραφία του gel ηλεκτροφορήσης. Στις διαδρομές

- 1: ladder:λ/HindIII
- 2: N άκοπο
- 3: N/AscI
- 4: Π/AscI
- 5: N/NotI
- 6: Π/NotI
- 7: ladder:λ/HindIII
- 8: N/EcoRI
- 9: Π/EcoRI
- 10: N/PvuII
- 11: Π/PvuII
- 12: N/SpeI
- 13: Π/SpeI
- 14: Π άκοπο

- Τελικά η δημιουργία της κατασκευής δεν συνεχίστηκε γιατί δεν μπορέσαμε να γραμμοποιήσουμε και να απομονώσουμε τον vector.

3. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΓΙΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ TAG-1 ΣΤΟΥΣ ΝΕΥΡΩΝΕΣ

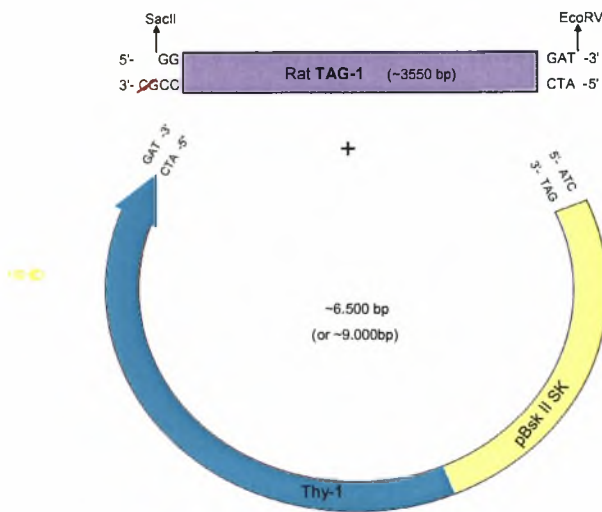
Κατά τη δημιουργία κατασκευής για υπερέκφραση του μορίου κυτταρικής συνάφειας TAG-1 στους νευρώνες προσπαθήσαμε να εισάγουμε downstream του Thy-1 υποκινητή το γονίδιο της TAG-1.

- Από προηγούμενα πειράματα είχαμε τα εξής γραμμοποιημένα πλασμίδια
- A. (vector)Thy-1 in pBlueskript/ EcoRV (SAP)(SAP)
(δύο φορές αποφωσφορυλιωμένο)
- B. [pEGFPc1/Sall.SmaI + (TAG-1 in p-Blueskript KS II)/NcoI.EcoRV]/
AfeI.XbaI

και έγιναν οι ligations:

1. 1μl A (80ng) + 2μl B (50ng)
2. 1μl A (80ng)+ 4μl B (100ng)

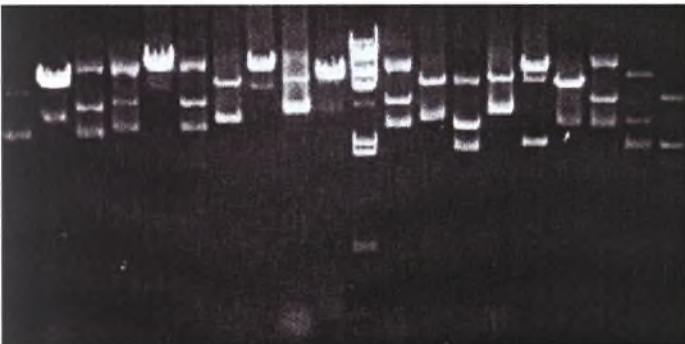
ligation 2



Εικόνα 26. Σχηματική απεικόνιση της ligation 2. Φαίνεται το blunting στο ένα άκρο του insert.

- Ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli*, στελέχους DH₁₀B, και μετά την επώαση των βακτηρίων στα τρυβλία κάναμε 18 minipreps και από τις δύο ligations. Η πέψη έγινε με HindIII. Περιμέναμε να δούμε τρεις μπάντες: 7000, 3500 και 150 ζ.β. Βρέθηκαν τέσσερα πιθανά θετικά miniprep, #2,#5, #8 και #14.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 V L 12 13 14 15 16 17 18 19 20

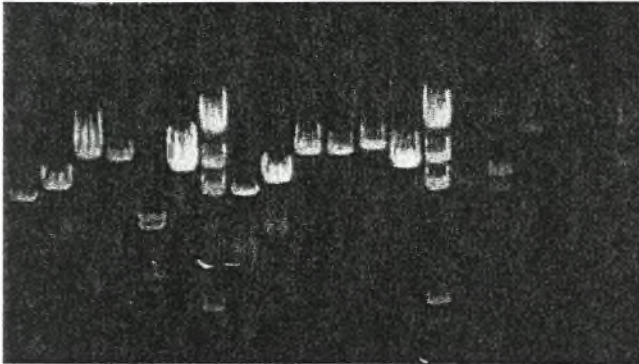


Εικόνα 27. Φωτογραφία του gel ηλεκτροφόρησης των minipreps (πέψη με HindIII). Τα #2,#5,#8 και #14 φαίνονται να έχουν κοπέι. (Όπου V:vector/HindIII και L:ladder:λ/HinIII)

Να σημειωθεί πως στο control δείγμα για την επάρκεια του μετασχηματισμού είχαμε περισσότερες από 1000 αποικίες, δηλαδή αποδοτικότητα είναι της τάξης 10^9 που θεωρείται πολύ καλή.

- Ακολούθησαν πέψεις με EcoRI και NotI για να επιβεβαιώσουμε το αποτέλεσμα. Με την EcoRI περιμέναμε να δούμε τέσσερις μπάντες: 4.500, 2x3.000 και 600 ζ.β. ενώ με τη NotI περιμέναμε μία μπάντα του γραμμοποιημένου πλασμιδίου γιατί υπάρχει μόνο μία θέση κοπής στο τμήμα του vector. Μόνο το #14 έχει τελικά πιθανότητα να είναι θετικό.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

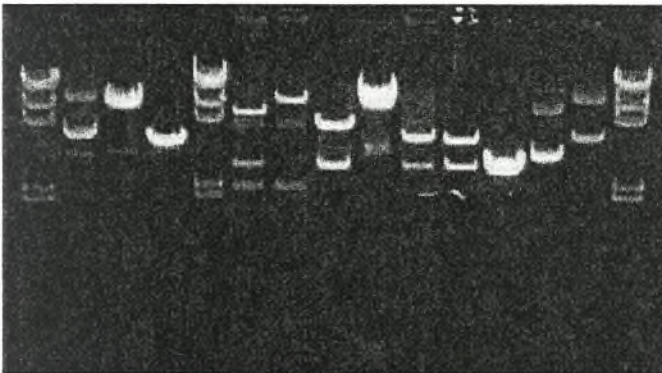


Εικόνα 28. Φωτογραφία του gel ηλεκτροφόρησης. Στις διαδρομές →

1: mp10/EcoRI
2: mp2/EcoRI
3: mp5/EcoRI
4: mp8/EcoRI
5: mp14/EcoRI
6: vector/EcoRI
7: ladder:λ/HindIII
8: mp10/NotI
9: mp2/NotI
10: mp5/NotI
11: mp8/NotI
12: mp14/NotI
13: vector/NotI
14: ladder:λ/HindIII
15: mp10 άκοπο
16: mp2 άκοπο
17: mp5 άκοπο
18: mp8 άκοπο
19: mp14 άκοπο
20: vector άκοπος

- Από το m.p. #14 παρατηρήσαμε ότι το πλασμίδιο φαίνεται (με άθροισμα των μπαντών) μεγαλύτερο από ~10.000 ζ.β. (3.500 ζ.β το τμήμα της TAG-1, 3.500ζ.β. το τμήμα του υποκινητή Thy-1 και 3.000 ζ.β το τμήμα του rBlueskript KS II) που ξέραμε ότι είναι. Κάναμε λοιπόν δοκιμαστικές πέψεις στο πλασμίδιο του vector και διαπιστώσαμε ότι ένζυμα όπως EcoRI και EcoRV κόβουν μία φορά το πλασμίδιο αυτό δίνοντας μία μπάντα περίπου 9.000 ζ.β. Κανονικά θα έπρεπε να ήταν ~6.500 ζ.β.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



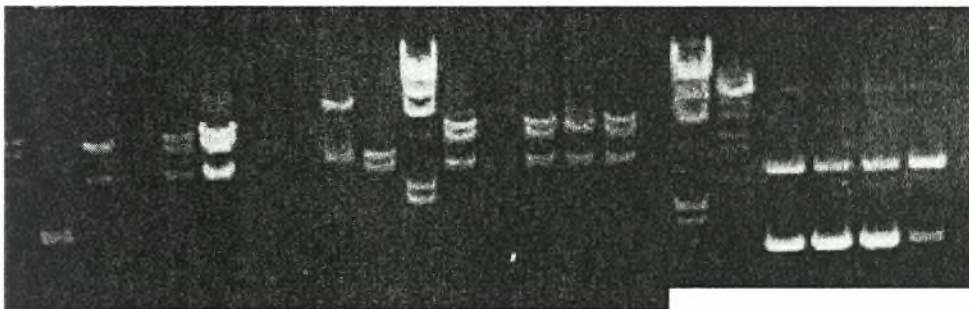
Εικόνα 29. Φωτογραφία του gel ηλεκτροφόρησης. Στις διαδρομές →
Όπου insert1: GFP-TAG
insert2: TAG

1: ladder: λ/HindIII
2: vector άκοπος
3: vector/EcoRV
4: vector/EcoRI.EcoRV
5: ladder: λ/HindIII
6: mp14/NotI.HindIII
7: mp14/HindIII
8: vector/EcoRI.HindIII
9: vector/EcoRI
10: mp14/EcoRI
11: insert1/EcoRI
12: insert2/EcoRI
13: insert2 άκοπο
14: insert1 άκοπο
15: ladder: λ/HindIII

Πιθανότατα τα στοιχεία που είχαμε για τον χάρτη του vector δεν ήταν σωστά.

- Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας για insert το (Γ) TAG-1 in p-Blueskript KS II /SacII.EcoRV αντί για το (B) [pEGFPc1/Sall.SmaI + (TAG-1 in p-Blueskript KS II)/NcoI.EcoRV] / Afel.XbaI ξανακάναμε ligations καθώς το (Γ) το είχαμε χρησιμοποιήσει στο πρώτο construct και γνωρίζαμε ότι μπορούσαμε να το κλωνοποιήσουμε. Ξανακάναμε δυο ligations:
 3. 1μl A (80ng) + 1μl Γ (40ng)
 4. 1,5μl A + 3μl B
 Αρχικά αφήσαμε 3-4μl από κάθε ligation για 3hrs στους 23°C (lig 3α, 4α). και το υπόλοιπο από κάθε δείγμα το αφήσαμε ο/η στους 20°C (lig 3β, 4β).
- Ακολούθησε όπως κάθε φορά μετασχηματισμός βακτηρίων DH₁₀B. Μετά την επώαση κάναμε miniprep μόνο από τις ligations 3α και 3β (πέψη με EcoRI) (εικόνα 30).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 L 11 12 13 14 15 16 L 20 21 22 23 24



Εικόνα 30. Φωτογραφία από το gel ηλεκτροφόρησης των minipreps (πέψη με EcoRI). (Όπου L:ladder:λ/HindIII)

Λόγω κάποιου λάθους κατά τη διαδικασία των minipreps έγινε επανάληψη των ίδιων minipreps την επόμενη μέρα (εικόνα 31). Από προηγούμενες πέψεις γνωρίζαμε ότι ο vector έχει μία θέση κοπής για την EcoRI και το insert (TAG-1) έχει δύο θέσεις κοπής για την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση. Αυτό σημαίνει ότι το construct μας (ο vector βρέθηκε ~9.000ζ.β + ~3.500ζ.β το insert = 12.000z.b.) θα έχει σίγουρα τρεις θέσεις κοπής, δηλαδή θα βλέπουμε τρεις μπάντες. Η μία θα είναι ~3.000ζ.β. και οι άλλες δύο θα έχουν άθροισμα ~9.000ζ.β. (δεν έχουμε ακριβείς πληροφορίες για τον χάρτη του vector). Οπότε τα minipreps με τρεις μπάντες θεωρήθηκαν πιθανά για να είναι το construct μας. Δηλαδή θεωρήθηκαν πιθανά 8 minipreps, #1, #5, #6, #11, #13, #15, #18 και #21 (εικόνα 30 και εικόνα 31).

1 2 3 4 5 6 6α 7 8 L 9 10 11 12 13 13α 14 14αL 15 16 18 19 20 21 22 23L 24 25 26



Εικόνα 31. Φωτογραφία από το επαναληπτικό gel ηλεκτροφόρησης των mini-preps (πέψη με EcoRI). (Όπου α:άκοπο και L:ladder:λ/HindIII).

- Ακολούθησαν πέψεις με EcoRI και HindIII για να επιβεβαιώσουμε το αποτέλεσμα. Με EcoRI περιμέναμε να δούμε μία μπάντα 3.000ζ.β και δύο με άθροισμα ~9.000, ενώ με HindIII περιμέναμε δύο μπάντες 4.000 και ~8.000 ζ.β. Τα mini-preps ήταν όντως το construct μας.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23



Εικόνα 32. Φωτογραφία του gel ηλεκτροφόρησης. Στις διαδρομές:

1: mp1/EcoRI	9: ladder:λ/HindIII	17: mp5/HindIII
2: mp5/EcoRI	10: vector/EcoRI	18: mp6/HindIII
3: mp6/EcoRI	11: vector άκοπος	19: mp11/HindIII
4: mp11/EcoRI	12: insert/EcoRI	20: mp13/HindIII
5: mp13/EcoRI	13: insert άκοπο	21: mp15/HindIII
6: mp15/EcoRI	14: insert/HindIII	22: mp18/HindIII
7: mp18/EcoRI	15: vector/HindIII	23: mp21/HindIII
8: mp21/EcoRI	16: mp1/HindIII	

Δεν συνεχίσαμε όμως με maxiprep γιατί άρχισε ξανά από την αρχή η προσπάθεια για δημιουργία του construct, με νέο vector (Thy-1 in pBlueskript KS II) που λάβαμε από μία άλλη ερευνητική ομάδα και για το οποίο είχαμε πιο πολλές πληροφορίες.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η TAG-1 είναι ένα μόριο κυτταρικής συνάφειας, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Έχει βρεθεί ότι εκφράζεται στα γλοιακά κύτταρα (ολιγοδενδροκύτταρα και κύτταρα Schwann) αλλά και στους νευρώνες. Η TAG-1 των γλοιακών κυττάρων αλληλεπιδρά με την TAG-1 των νευρώνων. Η TAG-1 των νευρώνων, με τη σειρά της, αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Caspr2, που βρίσκεται επίσης στους νευρώνες. Αυτό το σύμπλοκο αλληλεπιδρά με κανάλια K^+ . Παρατηρήθηκε επίσης ότι TAG-1 είναι υπεύθυνη για την σωστή κατανομή αυτών των πρωτεϊνών (Caspr2, κανάλια K^+) στις εγγύς παρακομβικές περιοχές.

Για να μελετηθεί καλύτερα η λειτουργία της TAG-1 κρίθηκε σκόπιμο να εκφραστεί μεμονωμένα στα ολιγοδενδροκύτταρα, στα κύτταρα Schwann και στους νευρώνες. Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να δημιουργηθούν κατασκευές όπου το γονίδιο της TAG-1 θα τοποθετηθεί καθοδικά κατάλληλων υποκινητών για την επιλεγμένη έκφραση της πρωτεΐνης.

> ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΓΙΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ TAG-1 ΣΤΑ ΟΛΙΓΟΔΕΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ

Στην πρώτη κατασκευή, το γονίδιο της TAG-1 τοποθετήθηκε downstream του PLP υποκινητή με σκοπό την υπερέκφραση της TAG-1 στα ολιγοδενδροκύτταρα. Για την γραμμοποίηση του πλασμιδίου του vector κόψαμε με δύο ένζυμα: Ascl και SmaI. Γνωρίζαμε, όμως, ότι στα πλασμίδια όπου ο vector ήταν κομμένος με SmaI, θα δημιουργούνταν μία θέση κοπής για την BssHII κατά τις ligations. Αυτή θα μας δημιουργούσε πρόβλημα στην περαιτέρω δημιουργία της πλασμιδιακής κατασκευής και θα χρειαζόταν να τη καταστρέψουμε. Θα έπρεπε δηλαδή να κόψουμε το πλασμίδιο σε δύο σημεία δεξιά και αριστερά της θέσης κοπής της BssHII, να αποκρίνουμε αυτή τη θέση και να ξανακάνουμε ligation ώστε τελικά το πλασμίδιο να μην έχει αυτή τη θέση κοπής. Γι'αυτό το λόγο προτιμήσαμε και προσπαθήσαμε περισσότερο για την δημιουργία κατασκευής με vector κομμένο με την Ascl.

Γενικά, κατά τη δημιουργία της κατασκευής δεν δημιουργήθηκαν προβλήματα παρά μόνο ότι αρχικά δεν γινόταν καλή απομόνωση του γονιδίου της TAG-1 από το πλασμίδιο του pBlueskript. Το πλασμίδιο κοβόταν σε δύο σχεδόν ισομεγέθη κομμάτια και κατά την απομόνωση υπήρχε κάποια ανάμιξή τους. Το γεγονός αυτό, μείωνε την πιθανότητα δημιουργίας της κατασκευής που θέλαμε. Για να λυθεί αυτό το πρόβλημα κόψαμε το πλασμίδιο με τρία ένζυμα, ούτως ώστε να δημιουργηθούν μικρότερα κομμάτια που δεν θα τρέχουν κοντά στο DNA της TAG-1, στο παρασκευαστικό gel αγαρόζης από το οποίο θα γινόταν η απομόνωση.

➤ **ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΓΙΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ TAG-1 ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ SCHWANN**

Η δεύτερη κατασκευή κατά την οποία το γονίδιο της TAG-1 θέλαμε να τοποθετηθεί καθοδικά του υποκινητή P₀, με σκοπό την επιλεγμένη έκφραση της TAG-1 στα κύτταρα Schwann, δεν ολοκληρώθηκε. Δημιουργήθηκαν προβλήματα από τα αρχικά ακόμη στάδια της δημιουργίας της κατασκευής. Το DNA του vector δεν κοβόταν ώστε να γραμμοποιηθεί και μετά να εισαχθεί το τμήμα DNA της TAG-1. Υποθέσαμε πως έφταιγε το ένζυμο που χρησιμοποιούσαμε. Γι'αυτό το λόγω παραγγείλαμε καινούριο ένζυμο από την ίδια εταιρία. Πάλι όμως το πλασμίδιο δεν κόπηκε. Επόμενο βήμα είναι η παραγγελία ενζύμου από άλλη εταιρία.

Η προσπάθειά μας να κόψουμε το ίδιο πλασμίδιο με άλλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες ήταν επίσης αποτυχημένη. Προσπαθήσαμε να καθαρίσουμε το DNA από άλατα (εκχυλίσεις με φαινόλη), υποθέτοντας πως αυτά δημιουργούσαν το πρόβλημα (λόγω της πιθανής υψηλής συγκέντρωσής τους) και δεν μπορούσαν να κόψουν τα ένζυμα. Ακόμη και μετά από αυτό το βήμα το πλασμίδιο δεν ήταν δυνατό να κοπεί. Τέλος προσπαθήσαμε να μετασχηματίσουμε διαφορετικό στέλεχος βακτηρίων E.coli αναμένοντας να πάρουμε πιο εύπεπτο DNA. Μετασχηματίσαμε βακτήρια XL-1 blue αντί για τα DH₁₀B όμως και πάλι το DNA δεν κόπηκε στις θέσεις που περιμέναμε. Αρνητικός παράγοντας στην όλη διαδικασία αποτέλεσε το γεγονός ότι δεν είχαμε αναλυτικά και πλήρως κατατοπιστικά στοιχεία όσον αφορά τον χάρτη του πλασμιδίου αυτού.

Οι προσπάθειες σταμάτησαν εν αναμονή του καινούριου ενζύμου από άλλη εταιρία. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου της Dr. Καραγωγέως ασχολείται με τη δημιουργία αυτού του construct πάνω από 12 μήνες χωρίς όμως να έχουν κάποιο αποτέλεσμα.

➤ **ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΓΙΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ TAG-1 ΣΤΟΥΣ ΝΕΥΡΩΝΕΣ**

Η τρίτη κατασκευή είχε σαν στόχο την τοποθέτηση της χιμαιρικής πρωτεΐνης GFP-TAG-1, καθοδικά του υποκινητή Thy-1. Η κατασκευή αυτή δεν ολοκληρώθηκε.

Κατά τις δοκιμαστικές πέψεις που έγιναν μετά την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (miniprep) διαπιστώθηκε ότι ο vector είχε μεγαλύτερο μέγεθος απ'ότι αναμέναμε σύμφωνα με τα στοιχεία που μας είχαν δοθεί γι'αυτόν. Βρέθηκε ότι ήταν ~9.000 ζ.β. ενώ περιμέναμε να είναι ~6.500 ζ.β.

Έχοντας σαν δεδομένο ότι ο vector ήταν μεγαλύτερος, συνεχίσαμε προσπαθώντας να κλωνοποιήσουμε πλέον μόνο το γονίδιο της TAG-1. Κάτι που επιτεύχθηκε χωρίς προβλήματα. Παρ'όλα αυτά, η δημιουργία αυτής της κατασκευής θα επιχειρηθεί ξανά με νέο vector

για τον οποίο έχουμε πιο πολλά και σωστά στοιχεία και με insert, την χιμαιρική πρωτεΐνη GFP-TAG-1.

> ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Μετά την επιτυχή δημιουργία των παραπάνω κατασκευών, αυτές θα ενεθούν σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωοκυττάρων. Θα γίνει ανάλυση με υβριδοποίηση κατά Southern σε γενωμικό DNA των απογόνων τους για την ταυτοποίηση των ατόμων που φέρουν την μεταλλαγή. Τα άτομα αυτά θα διασταυρωθούν μεταξύ τους για την παραγωγή ομόζυγων ατόμων τα οποία στη συνέχεια θα διασταυρωθούν με τα TAG^{-/-}. Μετά τις τρεις διασταυρώσεις θα δημιουργηθούν ποντίκια που θα εκφράζουν το γονίδιο της TAG-1 επιλεκτικά μόνο στα ολιγοδενδροκύτταρα ή στα κύτταρα Schwann ή στους νευρώνες. Ο φαινότυπος των ατόμων αυτών θα εξεταστεί α) με ανοσοϊστοχημεία, PCR (ή φθορισμό για τις πιθανές κατασκευές με την χιμαιρική πρωτεΐνη GFP-TAG-1) για τον εντοπισμό χαρακτηριστικών μορίων-μαρτύρων των κομβικών, παρακομβικών και εγγύς παρακομβικών περιοχών και β) με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο για μελέτη της μορφολογίας.

Παράλληλα γίνεται ανάλυση των αλληλεπιδράσεων της TAG-1 με άλλα μόρια στην εγγύς παρακομβική περιοχή. Γίνονται πειράματα ανοσοκατακρήμνισης με τα οποία διαπιστώνονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ TAG1 και Caspr2 και TAG1 και διαύλων καλίου. Επίσης γίνεται προσπάθεια ταυτοποίησης των δομικών περιοχών της TAG1 που αλληλεπιδρούν με Caspr2 και διαύλους καλίου με τη δημιουργία ελλειμματικών κατασκευών για τις περιοχές ανοσοσφαιρίνης (Ig) και φιμπρονεκτίνης (FN) της TAG1. Έχει ολοκληρωθεί ο κύριος κορμός των πειραμάτων που αφορούν την επίδραση της Caspr2 με τις ανοσοσφαιρινικές περιοχές της TAG-1. Οι μελέτες συνεχίζονται με εκτέλεση πειραμάτων μαρτύρων, προς επιβεβαίωση των αλληλεπιδράσεων με τις ανοσοσφαιρινικές περιοχές της TAG-1, και με την διερεύνηση του ρόλου των φιμπρονεκτινικών περιοχών της TAG-1 με την Caspr2 και προς το παρόν δεν ανιχνεύτηκε αλληλεπίδραση με τις φιμπρονεκτινικές περιοχές. Επίσης έχουν ολοκληρωθεί τα πειράματα που δείχνουν άμεση αλληλεπίδραση της TAG-1 με τους διαύλους καλίου σε κυτταρικές σειρές που έχουν διαμολυνθεί με πλασμίδια που εκφράζουν την TAG-1, την α υπομονάδα καθώς και την β υπομονάδα των διαύλων K. Η β υπομονάδα είναι απαραίτητη για την έκφραση των διαύλων στην επιφάνεια του κυττάρου. Η αλληλεπίδραση της TAG-1 με τους διαύλους K είναι ειδική δεδομένου του ότι δεν συμβαίνει στα ζώα που παρουσιάζουν απαλοϊφή του γονιδίου της TAG-1 (TAG-1^{-/-}). Άρχισαν οι μελέτες που αφορούν την επίδραση των διαύλων καλίου με τις ανοσοσφαιρινικές περιοχές της TAG-1.

Παράλληλα διερευνήθηκε η πιθανότητα αλληλεπίδρασης της TAG-1 με μία νέα πρωτεΐνη της εγγύς-παρακομβικής περιοχής, την κονεξίνη 29 (connexin 29). Δεν παρατηρήθηκε τέτοια αλληλεπίδραση

είτε σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης είτε με ανοσοϊστοχημεία (έκφραση της κονεξίνης σε φυσιολογικά και TAG-1^{-/-} ζώα).

Ταυτόχρονα για να εξεταστεί περαιτέρω ο ρόλος της γλοιακής ή νευρωνικής TAG-1 στον σχηματισμό αξονογλοιακών συνδέσμων και γενικά στην δυναμική αυτών σε ζωντανά κύτταρα, θα γίνουν πειράματα συγκαλλιέργειας αισθητικών γαγγλίων (DRG) από ζώα TAG-1^{-/-} και γλοιακών κυττάρων (Schwann cells) από ζώα αγρίου τύπου και το αντίστροφο, σε συνθήκες που επιτρέπουν *in vitro* μωελίνωση. Χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημεία θα εξετασθούν ο εντοπισμός και ο εμπλουτισμός της TAG-1, των διαύλων καλίου και της Caspr2, σε εμύελους άξονες, και συνεπώς θα διευκρινιστεί εάν ο διαφορετικός φαινότυπος που παρατηρείται στα TAG-1^{-/-} μεταλλαγμένα ποντίκια (δηλ. μη εντοπισμός των Caspr2 και διαύλων καλίου στην εγγύς παρακομβική περιοχή) μπορεί να «διασωθεί» μέσω μεμονωμένης γλοιακής ή αξονικής έκφρασης της TAG-1. Επίσης θα πραγματοποιηθούν διάφοροι συνδυασμοί συγκαλλιέργειών χρησιμοποιώντας DRG νευρώνες ή κύτταρα Schwann από TAG^{-/-} ή αγρίου τύπου ποντίκια και Schwann κύτταρα ή DRG νευρώνες που εκφράζουν φθορίζουσα TAG-1 (GFP-TAG-1 ή YFP-TAG-1), αντίστοιχα, και θα εξετασθεί ο εντοπισμός της TAG-1 με την τεχνική της *time lapse videomicroscopy*. Οι DRG νευρώνες που εκφράζουν GFP-TAG-1 θα απομονωθούν από μεταλλαγμένα ποντίκια που παράγονται στο εργαστήριο ενώ τα κύτταρα Schwann που εκφράζουν φθορίζουσα TAG-1 θα παραχθούν από επιμόλυνση με πλασμίδια (εφόσον ολοκληρωθεί η πλασμιδιακή κατασκευή). Μέσω αυτής της προσέγγισης θα έχουμε την δυνατότητα να μελετήσουμε την δυναμική των συμπλόκων της εγγύς παρακομβικής περιοχής σε ζωντανά κύτταρα, πράγμα το οποίο δεν είναι προσβάσιμο κατά την μελέτη ποντικών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Arroyo E.J. and S.S. Scherer.** (2000) On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem. Cell Biol.* **113**, 1–18.
- Brümmendorf T. and Rathjen FG.** (1996) Structure/ function relationships of axon associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr Op in Neurobiology.* **6**, 584-593.
- Brummendorf T. and Lemmon V.** (2001) Immunoglobulin superfamily receptors: cis-interactions, intracellular adapters and alternative splicing regulate adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* **13**, 611-8.
- Caroni P.** (1997) Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *J. Neurosci. Methods.* **71 (1)**, 3-9.
- Denaxa M., Chan C., Schachner M., Parnavelas J. and Karagogeos D.** (2001) The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development.* **128**, 4635-44.
- Dodd J., Morton S., Karagogeos D., Yamamoto M. and Jessall T.** (1988) Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons. *Neuron.* **1**, 105-116.
- Felsenfeld D., Hynes M., Skoler K., Furley A. and Jessell T.** (1994) TAG-1 can mediate homophilic binding, but neurite outgrowth on TAG-1 requires an L1-like molecule and beta 1 integrins. *Neuron* **12**, 675-90.
- Funamauchi F., Aihara O., Wang Y., Akasaka K., Takeda Y., Horie M., Kawano H., Sudo K., Asano M., Watanabe K. and Iwakura Y.** (2001) TAG-1 deficient mice have marked elevation of adenosine A1 receptors in the hippocampus. *Bioch and Bioph Res Com.* **281**, 220-226.
- Furley AJ., Morton SB., Manalo D., Karagogeos D., Dodd J., Jessell TM.** (1990) The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity. *Cell.* **61 (1)**, 157-70.
- Fuss B., Mallon B., Phan T., Ohlemeyer C., Kirchhoff F., Nishiyama A., Macklin WB.,** (2000) Purification and analysis of in vivo-differentiated oligodendrocytes expressing the green fluorescent protein. *Dev. Biol.* **218 (2)**, 259-74.
- Garbay B., Heape A., Sargueil F. and Cassagne C.** (2000) Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol.* **61**, 267-304.
- Gordon JW., Chesa PG., Nishimura H., Rettig WJ., Maccari JE., Endo T., Seravalli E., Seki T., Silver J.** (1987) Regulation of Thy-1 gene expression in transgenic mice. *Cell.* **50 (3)**, 445-52.

- Hille B.** (2001) Ionic channels of excitable membranes, 3rd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.
- Hynes RO.** (1992) Integrins: versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell*. **69**, 11-25.
- Kandel ER, Schwartz JH, and Jessell T.** (1991) Principles of neural science. Elsevier, New York.
- Karageorgos D., Morton S., Casano F., Dodd J. and Jessell T.** (1991) Developmental expression of the axonal glycoprotein TAG-1: differential regulation by central and peripheral neurons in vitro. *Development* **112**, 51-67.
- Kunz S., Ziegler U., Kunz B. and Sonderegger P.** (1996) Intracellular signaling is changed after clustering of the neural cell adhesion molecules axonin-1 and NgCam during neurite fasciculation. *J Cell Biol.* **135**, 253-67.
- Kyriakopoulou K., de Diego I., Wassef M. and Karageorgos D.** (2002) A combination of chain and neurophilic migration involving the adhesion molecule TAG-1 in the caudal medulla. *Development*. **129**, 287-96.
- Lierheimer R., Kunz B., Vogt L., Savoca R., Brodbeck U. and Sonderegger P.** (1997) The neuronal cell-adhesion molecule axonin-1 is specifically released by an endogenous glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase. *Eur J Biochem.* **243**, 502-10.
- Martini R. and Carenini S.** (1998) Formation and maintenance of the myelin sheath in the peripheral nerve: roles of the cell adhesion molecules and the gap junction protein connexin 32. *Micro Res Tech.* **41**, 403-415.
- Martini R.** (2001) The effect of myelinating Schwann cells on axons. *Muscle Nerve* **24**, 456-466.
- Morell P., Roberson M., Meissner G. and Toews A.** (1990) Myelin: from electrical insulator to ion channels. *Prog Clin Biol Res.* **336**, 1-23- Review.
- Pavlou O., Theodorakis K., Falk J., Kutsche M., Schachner M., Faivre-Sarrailh C. and Karageorgos D.** (2002) Analysis of interactions of the adhesion molecule TAG-1 and its domains with other immunoglobulin superfamily members. *Mol and Cel Neurosc.* **20**, 367-381.
- Pedraza L., Haung J. and Colman, D.** (2001) Organizing principles of the axoglial apparatus. *Neuron.* **30**, 335-44.
- Poliak S., Gollan L., Martinez R., Custer A., Einheber S., Salzer J., Trimmer J., Shrager P. and Peles E.** (1999) Caspr2, a new member of the neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K⁺ channels. *Neuron.* **24**, 1037-1047.

- Poliak S., Gollan L., Salomon D., Berglund E., Ohara R., Ranscht B. and Peles E.** (2001) Localization of Caspr2 in myelinated nerves depends on axon-glia interactions and the generation of barriers along the axon. *J Neurosci Res.* **21**, 7568-75.
- Poliak S. and Peles E** (2003) The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat. Rev. Neurosci.* **4(12)**, 968-80.
- Poliak S., Salomon D., Elhanany H., Sabanay H., Kiernan B., Pevny L., Stewart C., Xu X., Chiu S., Shrager P., Furley A. and Peles E.** (2003) Juxtaparanodal clustering of *shaker*-like K⁺ channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. *Jour Cell Biol.* **162**, 1148-1160.
- Rader C., Stoeckli E., Ziegler U., Osterwalder T., Kunz B. and Sonderegger P.** (1993) Cell-cell adhesion by homophilic interaction of the neuronal recognition molecule axonin-1. *Eur J Biochem.* **215**, 133-41.
- Rosenbluth J.** (1995) Glial membranes and axoglial junctions. In: Neuroglia. New York: Oxford University Press.
- Suter D., Pollerberg G., Buchstaller A., Giier R., Dreyer W. and Sonderegger P.** (1995) Binding between the neural cell adhesion molecules axonin-1 and NrCam/Bravo is involved in neuron-glia interaction. *J Cell Biol.* **131**, 1067-1081.
- Takeichi M.** (1987) Cadherins: A molecular family essential for selective cell-cell adhesion and animal morphogenesis. *Trends Genet.* **3**, 213-217.
- Traka M., Dupree J., Popko B. and Karagogeos D.** (2002) The neuronal adhesion protein TAG-1 is expressed by schwann cells and oligodendrocytes and is localized to the juxtaparanodal region of myelinated fibers. *Jurnal of Neur.* **22(8)**, 3016-1024.
- Traka M., Goutebroze L., Denisenko N., Bessa M., Nifli A., Havaki S., Iwakura Y., Fukamauchi F., Watanabe K., Soliven B., Girault J. and Karagogeos D.** (2003) Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *Journal Cell Biology.* **162(6)**, 1161-72.
- Tsiotra P., Karagogeos D., Theodorakis K., Michaelidis T., Modi W., Furley A., Jessel T. and Papametheakis J.** (1993) Isolation of the cDNA and chromosomal localization of the gene (TAX1) encoding the human axonal glycoprotein TAG-1. *Genomics.* **18**, 562-7.
- Tsiotra P., Theodorakis K., Papamatheakis J. and Karagogeos D.** (1996) The fibronectin domains of the neural adhesion molecule TAX-1 are necessary and sufficient for homophilic binding. *J Biol Chem.* **271**, 29216-22.

- Vidal M., Morris R., Grosveld F., Spanopoulou E.** (1990) Tissue specific control elements of the Thy-1 gene. *EMBO J.* **9(3)**, 833-40.
- Wang H., Kunkel D., Martin T., Schwartzkroin P. and Tempel B.** (1993) Heteromultimeric K⁺ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. *Nature.* **365**, 75-9.
- Warren JJ., Chandrasekhar A., Kanki J., Rangarajan R., Furley A. and Kuwada J.** (1999) Molecular cloning and developmental expression of a zebrafish axonal glycoprotein similar to TAG-1. *Mech Dev.* **80**, 197-201.
- Wight PA., Duchala CS., Readhead C., Macklin WB.** (1993) A myelin proteolipid protein-LacZ fusion protein is developmentally regulated and targeted to the myelin membrane in transgenic mice. *J Cell Biol.* **123**, 443-54.
- Wolfer D., Giger R., Stagliar M., Sonderegger P. and Lipp H.** (1998) Expression of the axon growth-related neural adhesion molecule TAG-1/axonin-1 in the adult mouse brain. *Anat Embryol (Berl).* **197**, 177-85.
- Wolfer D., Henehan-Beatty A., Stoeckli E., Sonderegger P. and Lipp H.** (1994) Distribution of TAG-1/axonin-1 in fibre tracts and migratory streams of the developing mouse nervous system. *J CompNeurol.* **345**, 1-32.
- Yamamoto M., Hassinger L. and Crandall J.** (1990) Ultrastructural localization of stage-specific neurite-associated proteins in the developing rat cerebral and cerebellar cortices. *J Neurocytol.* **19**, 619-27.

