

Ανάπτυξη του νευρικού συστήματος

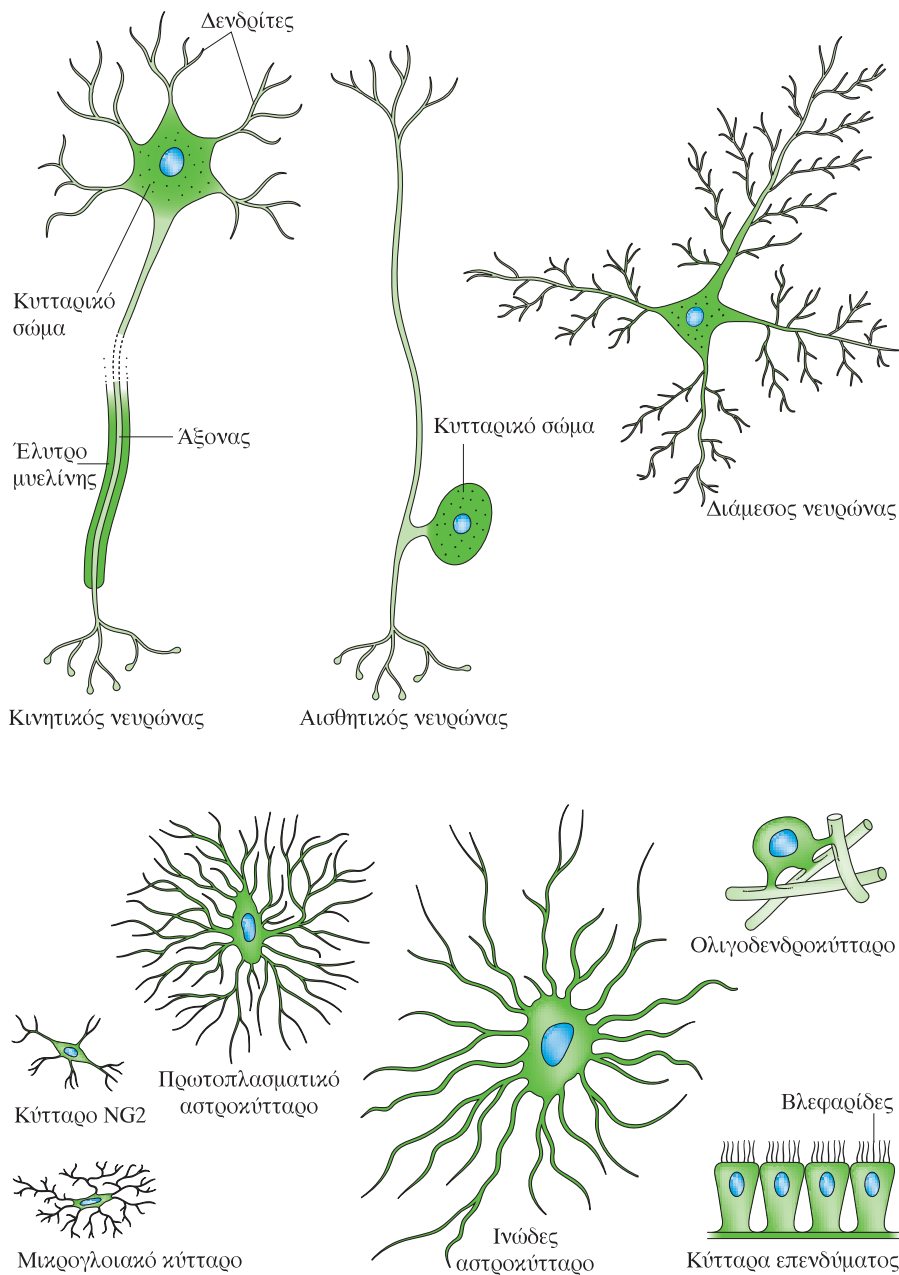
Δομή και κυτταρικοί τύποι του νευρικού συστήματος

Το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) των σπονδυλωτών, που αποτελείται από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό, αναπτύσσεται από τη **νευρική πλάκα** (neural plate) του πρώιμου εμβρύου. Το περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ) αποτελείται από τα κρανιακά, τα νωτιαία και τα αυτόνομα νεύρα, καθώς και από τα αντίστοιχα **γάγγλια** (ganglia). Το ΠΝΣ αναπτύσσεται από τη **νευρική ακρολοφία** (neural crest) και τα επιδερμικά **πλακώδια** (placodes). Τα νευρικά κύτταρα (nerve cells) ή νευρώνες (neurons) του ΚΝΣ φέρουν συνήθως δύο ειδών αποφυάδες, τους δενδρίτες και τον νευράξονα. Οι περισσότεροι νευρώνες του ΚΝΣ διαθέτουν αρκετούς δενδρίτες, οι οποίοι διακλαδίζονται σχηματίζοντας το δενδριτικό δένδρο. Το δενδριτικό δένδρο αποτελεί τη δομή που δέχεται σήματα από άλλους νευρώνες. Ο νευράξονας, από την άλλη, αποτελεί την κύρια μονάδα αγωγής σήματος από τον νευρώνα και πολλές φορές διαιρείται σε αρκετούς κλάδους, μέσω των οποίων μεταφέρονται πληροφορίες σε διαφορετικούς στόχους (Εικ. 14.1α). Στο ΚΝΣ, ο όρος «φαϊά ουσία» αποδίδεται κυρίως στα κύτταρα. Ο όρος «λευκή ουσία» αποδίδεται στους νευράξονες, λόγω του λευκού τους χρώματος, το οποίο οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα των ελύτρων μυελίνης που τους περιβάλλουν σε λιπίδια. Συχνά τα κυτταρικά σώματα των νευρώνων του ΚΝΣ οργανώνονται σε συστάδες. Οι συστάδες

αυτές καλούνται πυρήνες και δεν πρέπει να συγχέονται με τους πυρήνες των κυττάρων.

Οι συνδέσεις μεταξύ νευρώνων ή μεταξύ νευρώνων και μη νευρωνικών κυττάρων-στόχων ονομάζονται συνάψεις. Στις συνάψεις η μεταβολή του δυναμικού στο προσυναπτικό κύτταρο οδηγεί στην απελευθέρωση ενός νευροδιαβιβαστή που προσδένεται σε υποδοχείς της μετασυναπτικής μεμβράνης με επακόλουθη δημιουργία μετασυναπτικών δυναμικών, τα οποία, εφόσον αθροιζόμενα υπερβούν ένα κατώφλι, οδηγούν στη δημιουργία ενός δυναμικού ενέργειας. Η πολυπλοκότητα του νευρικού συστήματος των σπονδυλωτών είναι τεράστια: ο ανθρώπινος εγκέφαλος περιέχει περίπου 10^{11} νευρώνες και καθένας από αυτούς σχηματίζει συνάψεις με περίπου άλλους 10^3 . Οι δυνατότητες του συστήματος εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη θέση των νευρώνων και τη δημιουργία κατάλληλων συνάψεων μεταξύ τους. Τα γεγονότα αυτά λαμβάνουν χώρα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, ωστόσο η τεράστια πολυπλοκότητα του νευρικού συστήματος δημιουργείται σταδιακά, μέσω της διαδοχικής επιτέλεσης πολλών απλών διαδικασιών.

Υπάρχουν πολλοί τύποι νευρώνων (Εικ. 14.1α). Οι τύποι αυτοί μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τη μορφολογία του νευράξονα και του δενδριτικού τους δέντρου, τον νευροδιαβιβαστή που χρησιμοποιούν, για παράδειγμα ακετυλοχολίνη, νοραδρεναλίνη (= νορεπινεφρίνη) ή ντοπαμίνη, ή και με βάση το αν οι στόχοι τους είναι άλλοι νευρώνες, ένας μυς (κινητικοί νευρώνες), ένας αδένας ή ένα



Εικ. 14.1 Κυτταρικοί τύποι που συναντώνται στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ορισμένα κύτταρα με μορφολογία σαν αυτή των αστροκυττάρων της νευρογλοίας θεωρούνται πλέον ως νευρικά βλαστοκύτταρα.

αισθητήριο όργανο (αισθητικοί νευρώνες). Εκτός από τους νευρώνες, στο νευρικό σύστημα συναντώνται περίπου 10 φορές περισσότερα **νευρογλοιακά κύτταρα** (glial cells, Εικ. 14.1β). Τα **αστροκύτταρα** (astrocytes) είναι ο πολυπληθέστερος κυτταρικός τύπος νευρογλοιακών κυττάρων στο ΚΝΣ και ενέχονται σε πολλές δομικές και μεταβολικές λειτουργίες, όπως η διατήρηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, η πρόσληψη νευροδιαβιβαστών και η παραγωγή εξωκυττάριου στρώματος. Τα αστροκύτταρα τύπου 1 (ινώδη) συναντώνται

κυρίως στη λευκή ουσία, ενώ τα αστροκύτταρα τύπου 2 (πρωτοπλασματικά) στη φαιά ουσία. Τα **ολιγοδενδροκύτταρα** (oligodendrocytes) είναι τα κύτταρα του ΚΝΣ που σχηματίζουν τα έλυτρα μυελίνης γύρω από τους νευράξονες, ενώ τα **κύτταρα Schwann** (Schwann cells) επιτελούν τον ίδιο ρόλο στο ΠΝΣ. Τα κύτταρα NG2 (πολυδενδροκύτταρα – polydendrocyte, συναντοκύτταρα – synantocytes) αποτελούν έναν πληθυσμό που χαρακτηρίστηκε πρόσφατα και χρησιμεύουν ως πρόδρομα ολιγοδενδροκύτταρα, ενώ παραμένουν καθ' όλη την

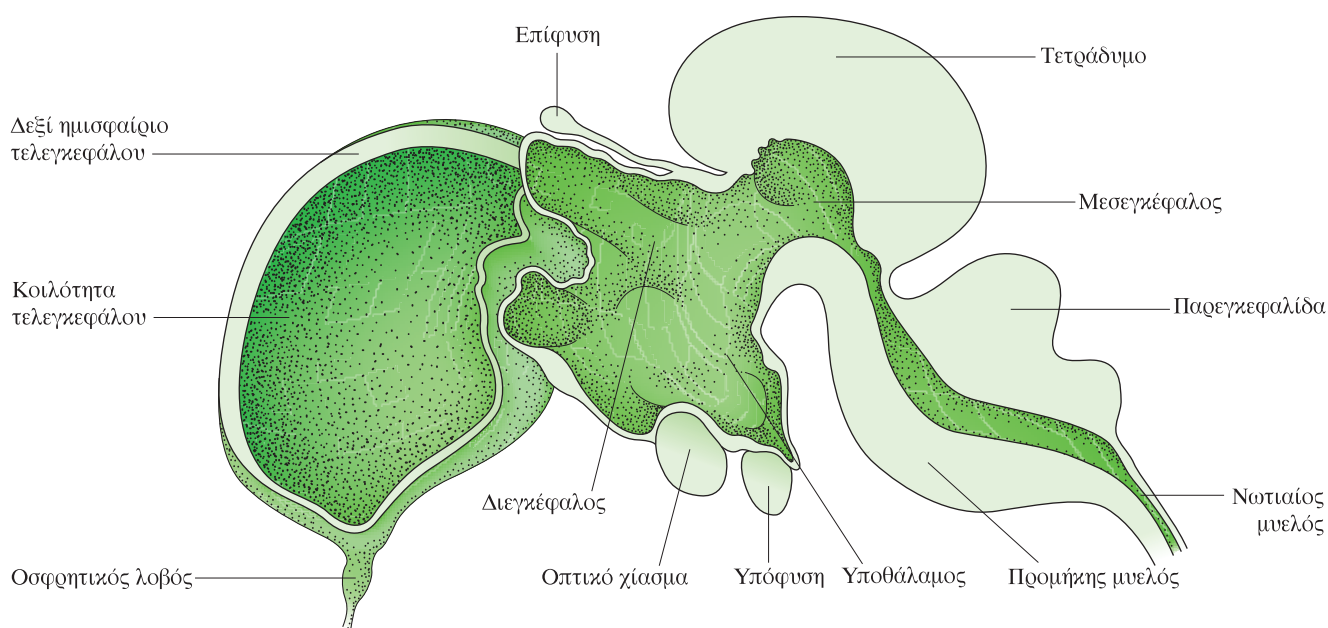
ενήλικη ζωή. Τα **ακτινωτά νευρογλοιακά κύτταρα** (radial glial cells) συναντώνται μόνο κατά την ανάπτυξη και είναι πλέον γνωστό ότι δεν είναι γλοιακά κύτταρα, αλλά αποτελούν έναν τύπο πρόδρομου νευρικού κυττάρου. Τα κυτταρικά τους σώματα εντοπίζονται κοντά στην επιφάνεια του αυλού του νευρικού σωλήνα. Από τη θέση αυτή εκτείνουν προς την εξωτερική επιφάνεια λεπτές αποφύσεις, οι οποίες καθοδηγούν την ακτινωτή μετανάστευση των νεογέννητων νευρώνων. Τα κύτταρα της **μικρογλοίας** (microglia) δεν αναπτύσσονται από τη νευρική πλάκα, αλλά είναι φαγοκύτταρα που προέρχονται από τον πρωτογενή πληθυσμό των εμβρυϊκών μακροφάγων. Τέλος, **επένδυμα** (ependyma) καλείται το απλό κυβοειδές επιθήλιο που επενδύει τις κοιλίες και τον νωτιαίο αυλό.

Η μεταβολική δραστηριότητα των νευρώνων λαμβάνει χώρα κυρίως στο κυτταρικό σώμα. Τα υλικά μεταφέρονται κατά μήκος του νευράξονα μέσω της ορθόδρομης βραδείας νευραξονικής μεταφοράς ή, στην περίπτωση των κυστιδίων νευροδιαβιβαστών, μέσω της ορθόδρομης ταχείας νευραξονικής μεταφοράς. Αυτή η ροή υλικών εξισορροπείται σε έναν

ώριμο νευράξονα από την ανάδρομη νευραξονική μεταφορά υλικών από το άκρο του νευράξονα προς το κυτταρικό σώμα. Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό των νευραξόνων είναι πολύ χρήσιμο, καθώς είναι δυνατόν να χαρτογραφηθούν τα μονοπάτια που ακολουθούν οι νευράξονες μέσα στο ΚΝΣ μετά από ένεση ενός δείκτη, όπως είναι, λόγω χάρη, το ένζυμο **υπεροξειδάση του χρένου** (HRP, Horseradish Peroxidase) στην περιφέρεια. Ο δείκτης προσλαμβάνεται από τους νευράξονες και μεταφέρεται με ανάδρομη νευραξονική μεταφορά στα κυτταρικά σώματα, τα οποία ταυτοποιούνται με ιστοχημική χρώση ή με κάποια άλλη μέθοδο ανίχνευσης. Για παράδειγμα, αν ενεθεί σε έναν μυ HRP, τότε θα μεταφερθεί ανάδρομα στους κινητικούς νευρώνες του νωτιαίου μυελού που νευρώνουν τον συγκεκριμένο μυ, επιτρέποντας έτσι την ταυτοποίησή τους.

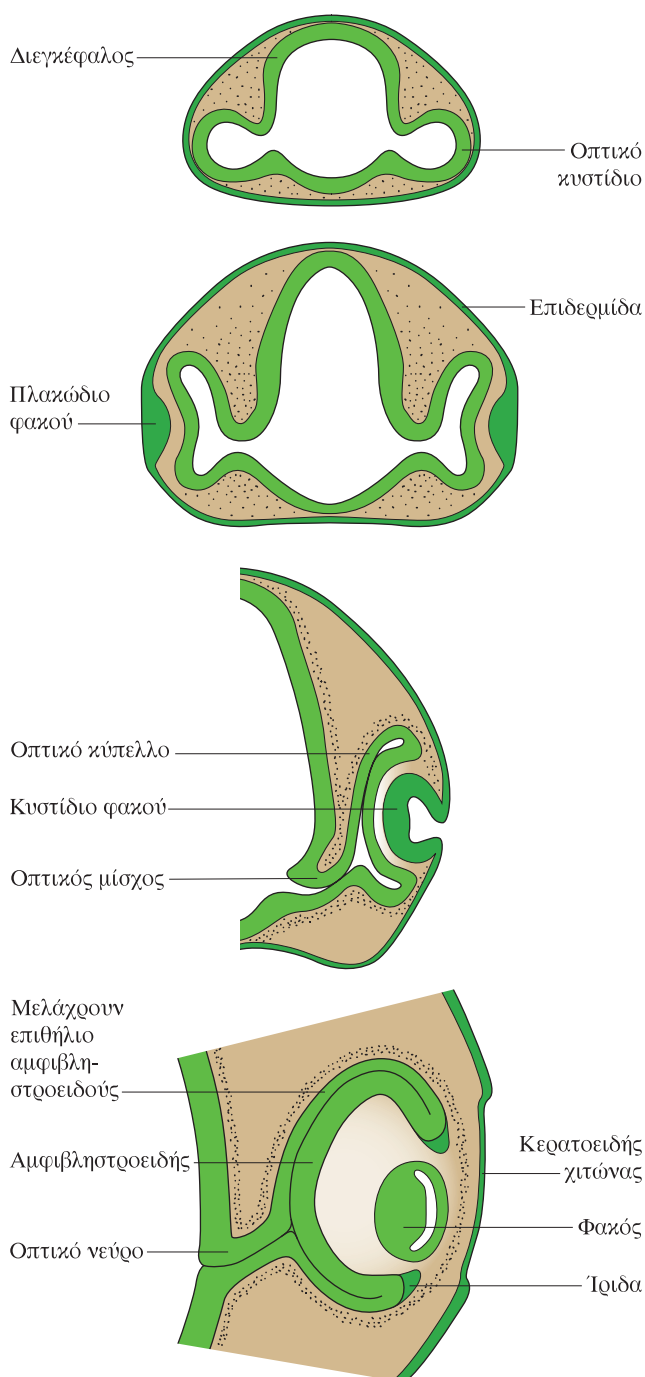
Ο εγκέφαλος

Τα κύρια τμήματα του εγκεφάλου (Εικ. 14.2) αναδύονται κατά την πρώιμη ανάπτυξη από τον



Εικ. 14.2 Η δομή του εγκεφάλου εμβρύου όρνιθας 8 ημερών. Στον διάμεσο και στον οπίσθιο εγκεφαλο η τομή έχει γίνει στη μέση γραμμή, ενώ ο δεξιός τελεγκεφαλος και η παρεγκεφαλίδα παρουσιάζονται σε παραοβελιαία τομή. Κατά Lillie F.R. (1919) *The Development of the Chick. An Introduction to Embryology*. New York: Henry Holt & Co.

νευρικό σωλήνα. Το εμπρόσθιο τμήμα του πρόσθιου εγκεφάλου αναπτύσσεται στον **τελεγκέφαλο** (telencephalon). Ο τελεγκέφαλος σχηματίζει το ζεύγος των εγκεφαλικών ημισφαιρίων και αποτελεί, ιδίως στα κατώτερα σπονδυλωτά, την περιοχή υποδοχής των οργάνων της όσφρησης. Τα οσφρητικά αισθητικά κύτταρα αναπτύσσονται από τα ρινικά πλακώδια, τα οποία αποτελούν



παχύνσεις της επιδερμίδας που εφάπτονται στον τελεγκέφαλο. Τα εγκεφαλικά ημισφαίρια έχουν πολύ μεγάλο μέγεθος στα ανώτερα σπονδυλωτά, όπου εμφανίζονται και οι πιο πολύπλοκες συμπεριφορές συνειρμού και ελέγχου. Στα θηλαστικά ο πολύστιβος εγκεφαλικός φλοιός ονομάζεται συχνά **νεοφλοιός** (neocortex). Το οπίσθιο τμήμα του πρόσθιου εγκεφάλου αναπτύσσεται στον **διεγκέφαλο** (diencephalon), από τον οποίο σχηματίζονται τα οφθαλμικά κυστίδια. Τα οφθαλμικά κυστίδια στη συνέχεια εγκολπώνονται σχηματίζοντας τα **οπτικά κύπελλα** (optic cups, Εικ. 14.3). Ο φακός του οφθαλμού αναπτύσσεται από την επιδερμίδα στα σημεία όπου αυτή εφάπτεται στο οπτικό κύπελλο. Σχηματίζεται έτσι η πάχυνση του πλακωδίου του φακού, η οποία στη συνέχεια αποκτά σφαιρικό σχήμα και εγκολπώνεται ώστε να ενσωματωθεί στον οφθαλμό. Η εσωτερική στιβάδα κάθε κυπέλλου μετατρέπεται στο αισθητήριο του αμφιβληστροειδούς, η εξωτερική στιβάδα στο μελάχρουν επιθήλιο αμφιβληστροειδούς (retinal pigment epithelium), ενώ ο σωλήνας που οδηγεί από τον εγκέφαλο στο οπτικό κύπελλο φέρει, σε μετέπειτα στάδια της ανάπτυξης, το οπτικό νεύρο. Όταν ο αμφιβληστροειδής διαφοροποιηθεί, σχηματίζει μια πολύστιβη δομή η οποία περιέχει τους αισθητικούς φωτούποδοχείς, καθώς και διάφορους άλλους τύπους νευρώνων, απ' όπου εκπορεύονται κατά μήκος των οπτικών μίσχων αποφύσεις προς το οπίσθιο τμήμα του εγκεφάλου. Οι ίνες του οπτικού νεύρου δεν απολήγουν στον διεγκέφαλο αλλά στον **μεσεγκέφαλο** (midbrain), του οποίου η ραχιαία περιοχή μεγεθύνεται και σχηματίζει ζεύγος οπτικών

Εικ. 14.3 Η ανάπτυξη του οφθαλμού. Το οφθαλμικό κυστίδιο αναπτύσσεται από τον διεγκέφαλο, ενώ ο φακός αναπτύσσεται από την επιδερμίδα. Από την εσωτερική στιβάδα του οπτικού κυπέλλου αναπτύσσεται ο αμφιβληστροειδής, ενώ από την εξωτερική στιβάδα αναπτύσσεται το μελάχρουν επιθήλιο. Κατά Hildebrand (1995) *Analysis of Vertebrate Structure*, 4th edn, John Wiley and Sons Inc., New York, μετά από άδεια του εκδοτικού οίκου.

λοβών. Στα σπονδυλόζωα, πλην των θηλαστικών, οι οπτικοί λοβοί ονομάζονται **τετράδυμα** (optic tecta, ενικός tectum) και αποτελούν τα πρωταρχικά κέντρα της υποδοχής της οπτικής πληροφορίας. Στα θηλαστικά το άνω διδύμιο (superior colliculus) αποτελεί την ομόλογη με το τετράδυμο δομή. Από τον μεσεγκέφαλο αναπτύσσονται επίσης οι ακουστικοί λοβοί.

Εκτός από τους οφθαλμούς, από τον διεγκεφαλο αναπτύσσονται ο θάλαμος (thalamus), η επίφυση (pineal body, epiphysis) στη ραχιαία πλευρά και η υπόφυση (pituitary, hypophysis) στην κοιλιακή πλευρά. Ο θάλαμος καταλαμβάνει το μεγαλύτερο τμήμα των πλευρικών τοιχωμάτων του διεγκεφάλου και αποτελεί σημαντικό κέντρο ολοκλήρωσης. Η επίφυση θεωρείται υπεύθυνη για τους ημερήσιους ρυθμούς και αποτελεί πηγή μελατονίνης. Η υπόφυση, ένας ζωτικής σημασίας ενδοκρινής αδένας που εκκρίνει πολλές διαφορετικές ορμόνες, έχει διπλή προέλευση. Το εμπρόσθιο τμήμα της σχηματίζεται από ένα πλακώδιο το οποίο αρχικά εντοπίζεται ακριβώς εμπρόσθια από τις νευρικές πτυχές και στη συνέχεια εγκολπώνεται στο στοματικό άνοιγμα και σχηματίζει τον θύλακα του Rathke στο ραχιαίο τμήμα του φάρυγγα. Το οπίσθιο τμήμα της υπόφυσης αναπτύσσεται από τον υποθάλαμο (hypothalamus), τον πυθμένα του διεγκεφάλου, με τον οποίο και παραμένει μόνιμα συνδεδεμένο.

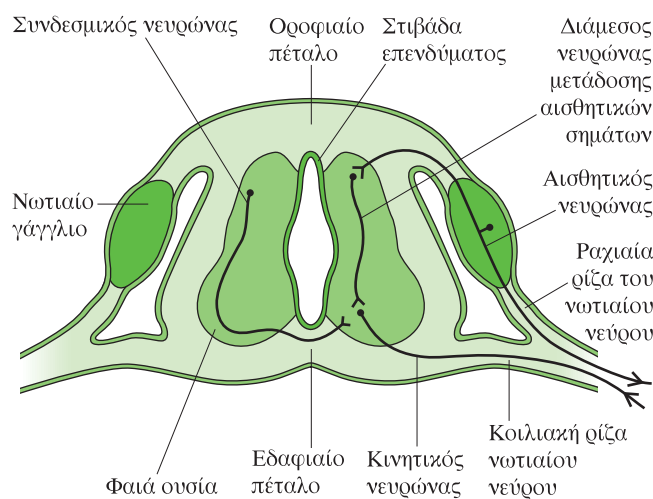
Στο εμπρόσθιο ραχιαίο τμήμα του οπίσθιου εγκεφάλου (hindbrain) εντοπίζεται η παρεγκεφαλίδα (cerebellum), ένα όργανο σημαντικό για τον έλεγχο της κίνησης. Οπίσθια από την παρεγκεφαλίδα συναντάται ο προμήκης μυελός (medulla oblongata), ο οποίος φέρει τους πυρήνες των κρανιακών νεύρων. Ο πρώτος εμβρυϊκός οπίσθιος εγκέφαλος αποτελείται από επτά **ρομβομερή** (rhombomeres). Το πρώτο από τα επτά ρομβομερή αναπτύσσεται στην παρεγκεφαλίδα. Πλευρικά από τα ρομβομερή 5 και 6 εντοπίζονται τα **ωτικά πλακώδια** (otic placodes), τα οποία εγκολπώνονται και σχηματίζουν το έσω ους, το οποίο

αποτελείται από τον κοχλία, το όργανο της ακοής και τους ημικύκλιους σωλήνες, οι οποίοι ευθύνονται για την αντίληψη της κίνησης και τον έλεγχο της ισορροπίας.

Οι κοιλίες του εγκεφάλου και ο κεντρικός αυλός του νωτιαίου μυελού αντιπροσωπεύουν τον αρχικό αυλό του νευρικού σωλήνα. Σε όλα τα σπονδυλωτά συναντώνται 10 ζεύγη **κρανιακών νεύρων** (cranial nerves): το I είναι το οσφρητικό, το II είναι το οφθαλμικό, τα νεύρα III, IV και VI ελέγχουν τους μύς του οφθαλμού, το V είναι το τρίδυμο, το VII το προσωπικό, το VIII το ακουστικό, το IX το γλωσσοφαρυγγικό και το X το πνευμονογαστρικό.

Νωτιαίος μυελός

Ο νωτιαίος μυελός (spinal cord) αποτελείται από την εσωτερική στιβάδα του επενδύματος, την κεντρική περιοχή της φαιάς ουσίας, που περιέχει τα περισσότερα κυτταρικά σώματα, και από την εξωτερική στιβάδα της λευκής ουσίας, που αποτελείται κατά κύριο λόγο από εμμύελες ίνες (Εικ. 14.4). Στη φαιά ουσία, οι κινητικοί νευρώνες εντοπίζονται στην κοιλιακή πλευρά, ενώ οι διάμεσοι νευρώνες, οι οποίοι δέχονται αισθητικά



Εικ. 14.4 Οι κύριες δομές του αναπτυσσόμενου νωτιαίου μυελού.

ερεθίσματα, καθώς και οι **συνδεδσμικοί νευρώνες** (commissural neurons), οι οποίοι συνδέουν τη μία πλευρά του νωτιαίου μυελού με την άλλη, εντοπίζονται στη ραχιαία πλευρά.

Ένα ζεύγος **νωτιαίων νεύρων** (spinal nerves) προέρχεται από κάθε τμήμα του κορμού και δημιουργείται από τη σύγκλιση νεύρων που ονομάζονται ραχιαίες και κοιλιακές ρίζες. Οι κοιλιακές ρίζες των νωτιαίων νεύρων αποτελούνται από κινητικούς νευράξονες που νευρώνουν μυς. Οι ραχιαίες ρίζες των νωτιαίων νεύρων αποτελούνται από αισθητικές ίνες, οι οποίες συνδέουν τα περιφερικά αισθητήρια όργανα με τους διάμεσους νευρώνες στον ραχιαίο νωτιαίο μυελό. Οι αισθητικοί νευρώνες εντοπίζονται στα **νωτιαία γάγγλια** (dorsal root ganglia), τα οποία αναπτύσσονται από τη νευρική ακρολοφία (Εικ. 14.4). Τα νωτιαία νεύρα που εντοπίζονται πλευρικά από τις καταβολές των εμπρόσθιων και οπίσθιων άκρων ενώνονται και σχηματίζουν δίκτυα, τα οποία ονομάζονται **βραγχιακό πλέγμα** (brachial plexus) και **οσφυϊκό πλέγμα** (lumbosacral plexus) αντίστοιχα. Από αυτά αναδύονται στη συνέχεια τα νεύρα που νευρώνουν τα άκρα.

Το αυτόνομο νευρικό σύστημα με τα πολυάριθμα μικρά του γάγγλια και τις συνδέσεις του με το ΚΝΣ σχηματίζεται επίσης από τη νευρική ακρολοφία και διακρίνεται στο συμπαθητικό και στο παρασυμπαθητικό σύστημα και επίσης παράγει ένα εκτεταμένο σύστημα εντερικών νευρώνων στο τοίχωμα του γαστρεντερικού σωλήνα.

Σχηματισμός προτύπου κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα της νευρικής πλάκας

Η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος περιλαμβάνει την αρχική τοπική εξειδίκευση της νευρικής πλάκας σε διακριτά τμήματα μέσω της δράσης μηχανισμών που είναι παρόμοιοι με αυτούς που δρουν σε άλλες διαδικασίες της οργανογένεσης. Στη συνέχεια, τα μοναδικά χαρακτηριστικά του νευρικού

συστήματος αναδεικνύονται μέσω των εξειδικευμένων κυτταρικών διαιρέσεων της νευρογένεσης και της γλοιογένεσης και ακολούθως του σχηματισμού των εξειδικευμένων νευρικών συνδέσεων που καθοδηγούνται από διάφορα εξωκυττάρια σήματα ή από παράγοντες στην κυτταρική επιφάνεια.

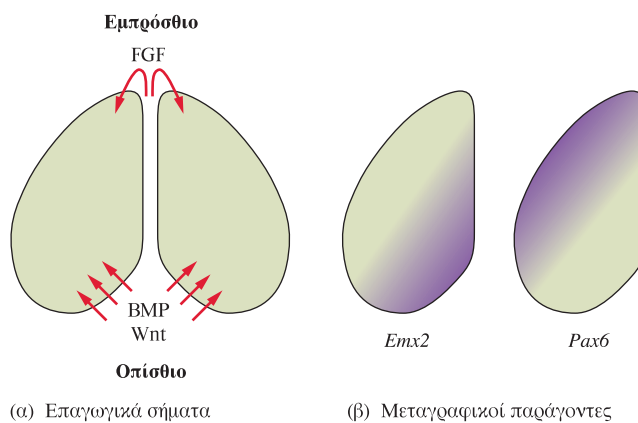
Η επαγωγή του νευρικού ιστού και η τοπική εξειδίκευση της νευρικής πλάκας έχουν ήδη αναλυθεί για τον *Xenopus* στο Κεφάλαιο 7 και για την όρνιθα στο Κεφάλαιο 9. Η νευρική επαγωγή οφείλεται εν μέρει στη δράση των παραγόντων FGF και εν μέρει στην καταστολή των παραγόντων BMP από μόρια-καταστολείς όπως η Chordin, τα οποία παράγονται από τον **οργανωτή** (organizer). Με τον τρόπο αυτό επάγεται ο σχηματισμός του **νευροεπιθηλίου** (neuroepithelium). Το νευροεπιθήλιο παρουσιάζει εμπρόσθια εξειδίκευση, έτσι ώστε, απουσία άλλων σημάτων, να εκφράζει γονίδια που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες, όπως το *Otx*, και να σχηματίζει δομές του πρόσθιου εγκεφάλου. Ο καθορισμός των οπίσθιων δομών οφείλεται στη δράση διάφορων παραγόντων που επάγουν την ανάπτυξή τους. Ιδιαίτερη σημασία έχουν οι παράγοντες FGF και Wnt, οι οποίοι επάγουν την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας Cdx. Οι μεταγραφικοί παράγοντες Cdx επάγουν με τη σειρά τους την έκφραση των γονιδίων *Hox* στον κορμό και στην ουρά. Στον οπίσθιο εγκέφαλο το ρετινοϊκό οξύ αποτελεί σημαντικό παράγοντα που προάγει τη δημιουργία οπίσθιων δομών. Οι βασικοί μηχανισμοί είναι οι ίδιοι για όλα τα σπονδυλόζωα, ωστόσο υπάρχουν διαφορές στις λεπτομέρειές τους.

Πρόσθιος εγκέφαλος

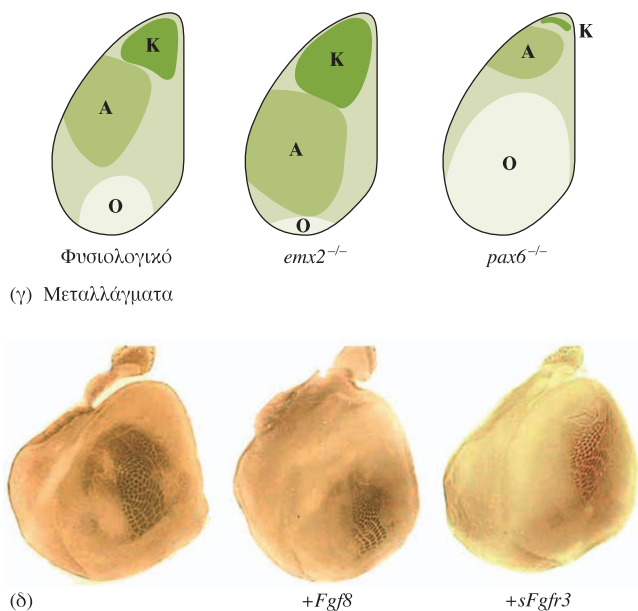
Οι επαγωγικοί παράγοντες που δρουν σε πρώιμα στάδια έχουν ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό του ΚΝΣ, το οποίο στην πρώιμη φάση της ανάπτυξης του περιλαμβάνει, κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα, λίγες διακριτές περιοχές. Σε

επόμενα στάδια της ανάπτυξης οι τοπικές αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα έχουν ως αποτέλεσμα την εγκαθίδρυση ενός πολύπλοκου προτύπου οργάνωσης κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα του νευρικού συστήματος. Ο σχηματισμός του προτύπου του πρόσθιου εγκεφάλου επιτυγχάνεται με τον ίδιο τρόπο με τον οποίο πραγματοποιούνται άλλες εμβρυολογικές αλληλεπιδράσεις: επαγωγικοί παράγοντες προκαλούν σε διαφορετικές περιοχές την ενεργοποίηση διαφορετικών συνδυασμών μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι ελέγχουν το πρότυπο διαφοροποίησης των κυττάρων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία διακριτών τμημάτων (Εικ. 14.5). Μέχρι πρότινος θεωρούνταν ότι απαραίτητη προϋπόθεση για την οργάνωση του προτύπου του νεοφλοιού αποτελούσε η νεύρωση του τμήματος αυτού από τον θάλαμο. Όμως σε μεταλλαγμένους ποντικούς στους οποίους έχει πραγματοποιηθεί στοχευμένη αδρανοποίηση γονιδίων, που έχει ως αποτέλεσμα την απουσία νεύρωσης του πρόσθιου εγκεφάλου από τον θάλαμο, το πρότυπο του νεοφλοιού οργάνωνεται φυσιολογικά. Έτσι, τώρα πλέον θεωρείται ότι η νεύρωση από τον θάλαμο τροποποιεί ένα πρότυπο που αρχικά εγκαθιδρύεται αυτόνομα. Ένα επαγωγικό σήμα που ενέχεται

στην τοπική εξειδίκευση του πρόσθιου εγκεφάλου είναι ο FGF, ο οποίος παράγεται από το πρόσθιο χείλος. Ο ρόλος του FGF στην τοπική εξειδίκευση του πρόσθιου εγκεφάλου αποκαλύφθηκε για πρώτη φορά στο ψάρι ζέβρα, όταν μετά από αφαίρεση μιας περιοχής του εμπρόσθιου άκρου της νευρικής πλάκας διαπιστώθηκε επέκταση του διεγκεφάλου. Επιπλέον, μεταμόσχευση της περιοχής αυτής στο οπίσθιο τμήμα της νευρικής πλάκας είχε ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό εκτοπικού τελεγκεφάλου. Στον ποντικό έχει ταυτοποιηθεί μια περιοχή με παρόμοια δράση, η οποία παράγει FGF8, FGF17 και FGF18. Η υπερέκφραση των παραγόντων FGF στο εμπρόσθιο τμήμα έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση των



Εικ. 14.5 Τοπική εξειδίκευση του εγκεφαλικού φλοιού στον ποντικό. (α) Οι επαγωγικοί παράγοντες συντίθενται στο πρόσθιο χείλος και στο φλοιϊκό χείλος. (β) Αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες παρουσιάζουν σε πρώιμα στάδια χαρακτηριστικά πρότυπα έκφρασης. (γ) Ο φαινότυπος των ομόζυγων μεταλλαγμάτων απώλειας λειτουργίας υποδεικνύει ότι οι εν λόγω παράγοντες ελέγχουν την ανάπτυξη των τμημάτων αυτών. M = Κινητική περιοχή, S = Αισθητική περιοχή, V = Οπτική περιοχή. (δ) Σε έμβρυα ποντικού ηλικίας E11,5 η υπερέκφραση FGF ή ενός αναστολέα του FGF στο εμπρόσθιο τμήμα έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της θέσης του αισθητικού πεδίου στη στιβάδα 4 του φλοιού. Τα διαγράμματα αντιστοιχούν στο έμβρυο ποντικού σταδίου 11,5 ημερών. Πάντως τα σηματοδοτικά μόρια δρουν και σε πιο πρώιμα στάδια. Από τη δημοσίευση O'Leary *et al.* (2007) *Neuron* 56, 252-269, μετά από άδεια του εκδοτικού οίκου Elsevier.



ορίων των εμπρόσθιων δομών προς τα πίσω (Εικ. 14.5δ). Η μεταμόσχευση μιας εκτοπικής πηγής FGF στο οπίσθιο τμήμα έχει ως αποτέλεσμα των διπλασιασμό των δομών. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν την ύπαρξη μιας διαβάθμισης συγκέντρωσης του FGF στην οποία τα κύτταρα αποκρίνονται.

Στο οπίσθιο άκρο του αναπτυσσόμενου εγκεφαλικού φλοιού, στην περιοχή του φλοιικού χείλους (cortical hem), εκφράζονται ορισμένα γονίδια που κωδικοποιούν παράγοντες Wnt και BMP. Ποντικοί στους οποίους έχει γίνει στοχευμένη αδρανοποίηση του *Wnt3A* ή του *Lef1* εμφανίζουν διάφορα ελαττώματα στον οπίσθιο τελεγκέφαλο, όπως έλλειψη του ιππόκαμπου. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι, προκειμένου να σχηματιστούν οι συγκεκριμένες δομές, απαιτείται ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt. Το πρότυπο των μεταγραφικών παραγόντων που εκφράζονται στον πρόσθιο εγκέφαλο ως απόκριση στα σήματα FGF, Wnt, και BMP (*Emx2*, *Pax6*, *Couptf1*, *Sp8*) εμφανίζει τις προβλεπόμενες μεταβολές στα μεταλλάγματα κέρδους λειτουργίας και απώλειας

λειτουργίας. Στις περιπτώσεις μεταλλαγμάτων απώλειας λειτουργίας οι δομές μετατοπίζονται προς την εξασθενημένη πηγή του σήματος. Αντίθετα, στις περιπτώσεις μεταλλαγμάτων κέρδους λειτουργίας οι δομές απομακρύνονται περισσότερο από την πηγή. Η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν αυτούς τους παράγοντες είναι επίσης διαβαθμισμένη, όπως και αυτή των επαγωγικών παραγόντων, ωστόσο στα όρια που αναπτύσσονται μεταξύ δομών η έκφραση είναι ασυνεχής.

Οργανωτής ισθμού

Ένα σημαντικό κέντρο σηματοδότησης κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα του ΚΝΣ είναι ο οργανωτής του ισθμού. Η περίσφιξη που εντοπίζεται στο όριο μεταξύ του μεσεγκεφάλου και του οπίσθιου εγκεφάλου καλείται **ισθμός** (isthmus, Εικ. 14.6). Στο στάδιο της ανοικτής νευρικής πλάκας, γονίδια που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες, όπως τα *Otx2* και *Lim1*, εκφράζονται στον μελλοντικό πρόσθιο εγκέφαλο και στον μεσεγκέφαλο. Στο οπίσθιο

Κλασικά Πειράματα

Οργάνωση του προτύπου στο ΚΝΣ

Ο «πραγματικός» επαγωγικός παράγοντας διαπιστώθηκε τελικά ότι περιλάμβανε παράγοντες που καταστέλλουν τη σηματοδότηση BMP. Η πρώτη δημοσίευση αποτελεί το αποκορύφωμα αυτής της ερευνητικής εργασίας, που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 7.

Wilson, P.A. & Hemmati-Brivanlou, A. (1995) Induction of epidermis and inhibition of neural fate by BMP-4. *Nature* **376**, 331-333.

Στις δύο παρακάτω δημοσιεύσεις περιγράφονται οι αναπτυξιακές μονάδες του οπίσθιου εγκεφάλου, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την έκφραση συγκεκριμένων συνδυασμών μεταγραφικών παραγόντων. Οι μελέτες αυτές συνέβαλαν σημαντικά στην ενοποίηση της παραδοσιακής Νευρο-

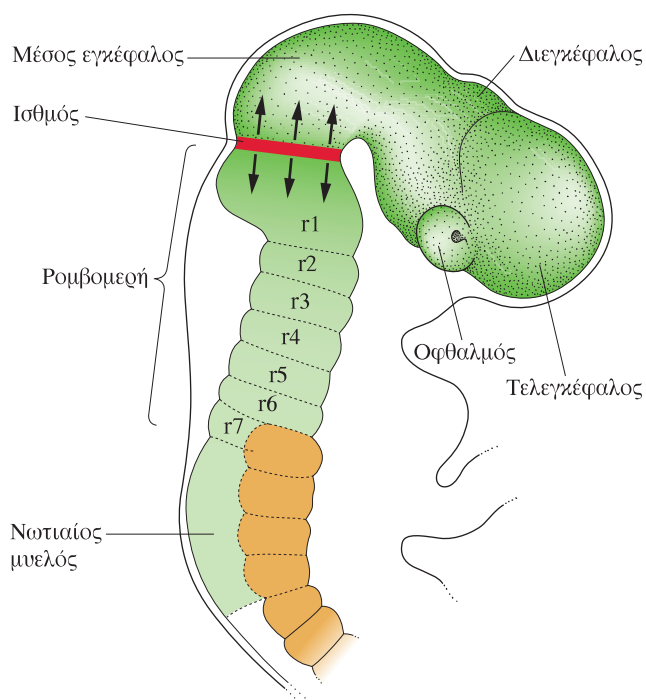
ανατομικής με τις αρχές της σύγχρονης Βιολογίας Ανάπτυξης.

Lumsden, A. & Keynes, R. (1989) Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* **337**, 424-428.

Wilkinson, D.G., Bhatt, S., Cook, M., Boncinelli, E. & Krumlauf, R. (1989) Segmental expression of Hox-2 homeobox-containing genes in the developing mouse hindbrain. *Nature* **341**, 405-409.

Η τελευταία δημοσίευση αναφέρεται στη σηματοδοτική δραστηριότητα του εδαφιαίου πετάλου, το οποίο ελέγχει το ραχιοκοιλιακό πρότυπο στον νευρικό σωλήνα.

Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J. & Jessel T.M. (1991) Control of cell pattern in the developing nervous system-polarizing activity of the floor plate and the notochord. *Cell* **64**, 635-647.



Ειχ. 14.6 Η θέση του οργανωτή ισθμού σε σχέση με τα κύρια τμήματα του εγκεφάλου του εμβρύου της όρνιθας.

όριο της έκφρασής τους, ακριβώς εμπρόσθια από τον μελλοντικό ισθμό, μία λωρίδα κυττάρων αρχίζει να παράγει τους επαγωγικούς παράγοντες FGF8 και Wnt1. Η περιοχή αυτή ονομάζεται οργανωτής ισθμού (isthmus organizer) και ελέγχει την τοπική εξειδίκευση του νευρικού ιστού στα παρακείμενα με αυτή τμήματα του εγκεφάλου. Στην περιοχή που εντοπίζεται εμπρόσθια από αυτόν, ο οργανωτής ισθμού επάγει τον σχηματισμό του **μεσεγκεφάλου** (midbrain) και εγκαθιδρύει μία διαβάθμιση έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων *Engrailed 1* και *Engrailed 2*. Στην περιοχή που εντοπίζεται οπίσθια από αυτόν, ο οργανωτής ισθμού επάγει τον σχηματισμό του ρομβομερούς 1, από το οποίο αναπτύσσεται η **παραγκεφαλίδα** (cerebellum). Ο ρόλος του οργανωτή ισθμού διαπιστώθηκε με τη βοήθεια πειραμάτων μεταμόσχευσης σε έμβρυα όρνιθας, στα οποία αποδείχθηκε ότι η περιοχή αυτή είναι σε θέση να επάγει από τον μελλοντικό διεγκέφαλο τον σχηματισμό μεσεγκεφάλου και από το εμπρόσθιο τμήμα του οπίσθιου εγκεφάλου τον σχηματισμό της παραγκεφαλίδας. Η δράση του οργανωτή

ισθμού στον μελλοντικό διεγκέφαλο ή μελλοντικό οπίσθιο εγκέφαλο είναι δυνατόν να υποκατασταθεί από την καθαρή πρωτεΐνη FGF8. Πειράματα εμφύτευσης σφαιριδίων εμποτισμένων με καθαρή πρωτεΐνη FGF8 έδειξαν ότι ο παράγοντας αυτός επάγει τον σχηματισμό μεσεγκεφάλου και οπίσθιου εγκεφάλου, όπως ακριβώς συμβαίνει με τα μοσχεύματα του οργανωτή ισθμού. Σε μοριακό επίπεδο, ο FGF8 επάγει την έκφραση των γονιδίων *Engrailed (En)* και *Wnt1*, καθώς και του δικού του γονιδίου. Μετά την αρχική της εγκαθίδρυση, η ενεργότητα του οργανωτή ισθμού διατηρείται αυτοκρινώς, αφού η ενεργοποίηση του μονοπατιού FGF επάγει μεταξύ άλλων και το γονίδιο *Fgf8*.

Ομόζυγοι ποντικοί στους οποίους έχει γίνει στοχευμένη αδρανοποίηση των γονιδίων *Wnt1* και *En1* παρουσιάζουν έλλειψη όχι μόνο της περιοχής του ισθμού, όπου φυσιολογικά εκφράζονται, αλλά και μεγάλων τμημάτων του μεσεγκεφάλου και της παραγκεφαλίδας, επιβεβαιώνοντας έτσι ότι οι παράγοντες αυτοί είναι απαραίτητοι για τη σηματοδοτική λειτουργία που διεκπεραιώνει ο οργανωτής ισθμού. Ομόζυγα έμβρυα ποντικού στα οποία έχει πραγματοποιηθεί στοχευμένη αδρανοποίηση του γονιδίου *Fgf8* πεθαίνουν σε πρώιμα στάδια της ανάπτυξης λόγω σοβαρών ελαττωμάτων στον σχηματισμό του οπίσθιου τμήματός τους. Ωστόσο, υπάρχει ένα υπομορφικό αλληλόμορφο του *Fgf8* το οποίο επιτρέπει την επιβίωση κατά την πρώιμη ανάπτυξη. Τα ζώα που είναι ομόζυγα γι' αυτό το υπομορφικό αλληλόμορφο εμφανίζουν ελαττώματα στον μεσεγκέφαλο και στην παραγκεφαλίδα. Παρόμοιος είναι και ο φαινότυπος του μεταλλάγματος *acerebellar* στο ψάρι ζέβρα. Το μετάλλαγμα *acerebellar* είναι ομόζυγο για αδρανοποιητική μεταλλαγή του γονιδίου *Fgf8*, αλλά στο ψάρι ζέβρα τα έμβρυα επιβιώνουν για μεγαλύτερη περίοδο απ' ό,τι στο αντίστοιχο μετάλλαγμα του ποντικού.

Η λειτουργία του οργανωτή ισθμού έχει ως αποτέλεσμα την εγκαθίδρυση της έκφρασης διαφορετικών συνδυασμών των μελών της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων Pax σε διακριτά

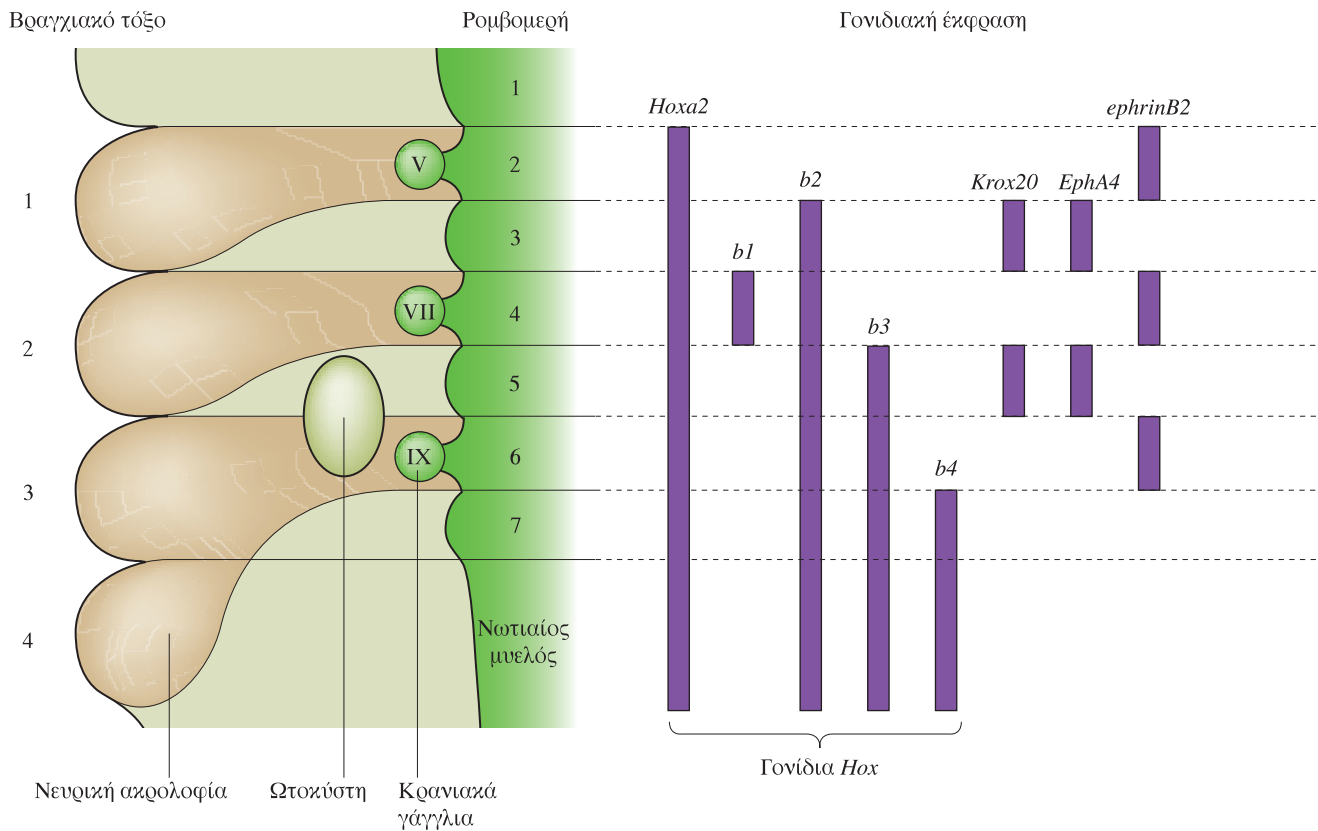
τμήματα του εγκεφάλου. Το γονίδιο *Pax6* εκφράζεται στον πρόσθιο και στον οπίσθιο εγκέφαλο, ενώ τα *Pax2* και *Pax5* εκφράζονται στον μεσεγκέφαλο και στην περιοχή του ρομβομερούς 1. Στον ποντικό το διπλό ομόζυγο μετάλλαγμα από το οποίο απουσιάζουν οι μεταγραφικοί παράγοντες *Pax2* και *Pax5* χαρακτηρίζεται από απώλεια του μεσεγκεφάλου και της παρεγκεφαλίδας, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα δύο αυτά γονίδια είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των δομών αυτών.

Μεταμερική οργάνωση του οπίσθιου εγκεφάλου

Το πρότυπο του ΚΝΣ χαρακτηρίζεται από εμφανή μεταμερική οργάνωση περισσότερο στον οπίσθιο παρά στον πρόσθιο εγκέφαλο. Μετά το κλείσιμο του νευρικού σωλήνα ο οπίσθιος εγκέφαλος διαιρείται σε επτά (ορισμένες φορές θεωρείται ότι είναι οκτώ) τμήματα, τα **ρομβομερή** (rhombomeres, Εικ. 14.6, 14.7). Από το πρώτο ρομβομερές αναπτύσσεται η παρεγκεφαλίδα. Καθένα από τα επόμενα ζεύγη ρομβομερών φέρει κινητικούς πυρήνες (nuclei) και συνεισφέρει με νευρικές ίνες στον σχηματισμό ενός **κρανιακού νεύρου** (cranial nerve). Έτσι, το τρίδυμο (V) νεύρο προέρχεται από τα ρομβομερή 2-3, το προσωπικό (VII) νεύρο από τα ρομβομερή 4-5 και το γλωσσοφαρυγγικό νεύρο (IX) από τα ρομβομερή 6-7. Επιπλέον, κυρίως από τα άρτια ρομβομερή αναδύονται τα κύτταρα της **νευρικής ακρολοφίας** (neural crest), τα οποία μεταναστεύουν στα **βραγχιακά τόξα** (branchial arches). Το ρομβομερές 2 συνεισφέρει κύτταρα στο πρώτο βραγχιακό τόξο, το ρομβομερές 4 στο δεύτερο βραγχιακό τόξο και το ρομβομερές 6 στο τρίτο βραγχιακό τόξο. Η μεταμερική οργάνωση του οπίσθιου εγκεφάλου αποκαλύπτεται από πειράματα **ανάλυσης κλώνων** (clonal analysis). Όταν σημαίνονται μεμονωμένα κύτταρα ενός ρομβομερούς σε πρώιμα στάδια, τότε οι απόγονοί τους εντοπίζονται στο ίδιο ή σε

παρακείμενα ρομβομερή. Αντίθετα, αν η σήμανση γίνει αργότερα, όλοι οι απόγονοι των σημασμένων κυττάρων περιορίζονται στο ίδιο ρομβομερές. Αυτός ο περιορισμός οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην έκφραση των εφρινών και των υποδοχέων τους, των Efh, σε εναλλασσόμενα μεταμερή. Οι εφρίνες τύπου B είναι προσδέτες που εκφράζονται στα ρομβομερή 2, 4 και 6, ενώ οι υποδοχείς τους, οι Efh, συναντώνται στα ρομβομερή 3 και 5. Όταν δύο ομάδες κυττάρων, από τις οποίες η μία εκφράζει εφρίνες και η άλλη τους υποδοχείς τους, έρθουν σε επαφή, τότε από την αλληλεπίδραση εφρινών-Efh προκαλείται αμοιβαία απώθηση των δύο κυτταρικών τύπων. Με τον τρόπο αυτό αναπτύσσονται τα όρια μεταξύ διαφορετικών ρομβομερών, ενώ παράλληλα επιτυγχάνεται ο περιορισμός των κυττάρων κάθε ρομβομερούς σε αυτό. Στα έμβρυα στα οποία εκφράζεται ένα επικρατές αρνητικό αλληλόμορφο ενός υποδοχέα Efh τα όρια μεταξύ των ρομβομερών δε σχηματίζονται. Στο στάδιο της νευρικής πλάκας η ταυτότητα των ρομβομερών δεν είναι ακόμη παγιωμένη. Επομένως, σε πειράματα μεταμόσχευσης, επιμέρους τμήματα του οπίσθιου εγκεφάλου είναι δυνατόν να ανταλλάξουν θέση με άλλα χωρίς να επηρεαστεί το τελικό πρότυπο οργάνωσής του. Όμως, όταν αρχίσουν να εμφανίζονται τα όρια των ρομβομερών, η ταυτότητα κάθε τμήματος έχει πλέον καθοριστεί και δεν είναι δυνατόν να αλλάξει ούτε μετά από μεταμόσχευση. Ο σχηματισμός κυττάρων που εντοπίζονται στα όρια των ρομβομερών εξαρτάται από το μονοπάτι Notch. Στο ψάρι ζέβρα έχει αποδειχθεί ότι κύτταρα που υπερεκφράζουν ιδιοσυστατικά τη Notch καθοδηγούνται στις περιοχές των ορίων των ρομβομερών, ενώ κύτταρα που υπερεκφράζουν ένα επικρατές αρνητικό αλληλόμορφο του γονιδίου *Su(H)* αποκλείονται από τα όρια.

Τα γονίδια *Hox* δεν εκφράζονται στον πρόσθιο εγκέφαλο και στον μεσεγκέφαλο, αλλά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην οργάνωση του εμπροσθοπίσθιου προτύπου του οπίσθιου



Εικ. 14.7 Διαγραμματική απεικόνιση των ρομβομερών. Παρουσιάζονται οι επικράτειες έκφρασης ορισμένων χαρακτηριστικών γονιδίων, καθώς και η συμβολή των ρομβομερών στα κρανιακά νεύρα και στη νευρική ακρολοφία.

εγκεφάλου. Το εμπρόσθιο όριο της έκφρασης των γονιδίων *Hox* εμπρόσθιου τύπου εντοπίζεται στον οπίσθιο εγκέφαλο. Η έκφραση των γονιδίων *Hox* στον οπίσθιο εγκέφαλο ρυθμίζεται με τέτοιον τρόπο, ώστε κάθε ρομβομερές να χαρακτηρίζεται από έναν μοναδικό συνδυασμό ενεργών γονιδίων *Hox* (Εικ. 14.7). Για παράδειγμα, το εμπρόσθιο όριο της έκφρασης του γονιδίου *Hoxa2* εντοπίζεται στο μελλοντικό όριο μεταξύ των ρομβομερών 1/2, ενώ επίσης εκφράζεται στα κύτταρα της νευρικής ακρολογίας που αναδύεται από το ρομβομερές 4 αλλά όχι από το ρομβομερές 2. Η στοχευμένη αδρανοποίηση του *Hoxa2* στον ποντικό έχει ως αποτέλεσμα τον ομοιωτικό μετασχηματισμό του βραγχιακού τόξου 2 στη μορφολογία του βραγχιακού τόξου 1. Αντίθετα, σε πειράματα υπερέκφρασης που έγιναν στην όρνιθα και στον *Xenopus*, παρατηρείται μορφολογικός μετασχηματισμός του βραγχιακού τόξου 2 σε 1.

Η έκφραση των γονιδίων *Hox* επάγεται από άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι δρουν ανοδικά από τα *Hox* και ενεργοποιούνται από τις πρώιμες διαβαθμίσεις συγκέντρωσης των παραγόντων FGF, Wnt και του ρετινοϊκού οξέος. Ένα παράδειγμα ενδιάμεσου μεταγραφικού παράγοντα αυτού του τύπου αποτελεί ο μεταγραφικός παράγοντας *Krox20*, μία πρωτεΐνη με δακτύλους ψευδαργύρου η οποία εκφράζεται στα ρομβομερή 3 και 5. Αυτό το ζεύγος των ρομβομερών εκφράζει υποδοχείς Eph και δεν παράγει κύτταρα νευρικής ακρολογίας. Στον ποντικό, στα έμβρυα που είναι ομόζυγα για μια αδρανοποιητική μεταλλαγή του γονιδίου *Krox20* δεν αναπτύσσονται τα ρομβομερή 3 και 5, ενώ τα ρομβομερή 2, 4 και 6 συντηρούνται.

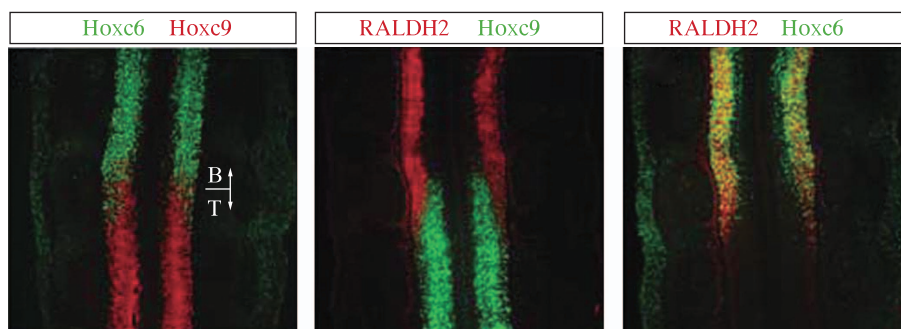
Αλλαγές στα επίπεδα του ρετινοϊκού οξέος επιφέρουν σημαντικές επιπτώσεις στην οργάνωση του οπίσθιου εγκεφάλου. Το ρετινοϊκό οξύ

παράγεται από τη βιταμίνη Α, που λαμβάνεται από τη διατροφή, και το ένζυμο που το συνθέτει (η αφυδρογονάση της ρετιναλδεϋδης, RALDH2) συναντάται στον κορμό, στους σωματίτες και στο πλευρικό πέταλο. Το ένζυμο που αποικοδομεί το ρετινοϊκό οξύ (το Cyp26, ένα κυτόχρωμα P450) συναντάται στον πρόσθιο εγκέφαλο και στον μεσεγκέφαλο. Αφού η πηγή εντοπίζεται στο οπίσθιο τμήμα και η περιοχή αποικοδόμησης στο εμπρόσθιο, θεωρείται ότι το ρετινοϊκό οξύ σχηματίζει, στην περιοχή του οπίσθιου εγκεφάλου, μία διαβάθμιση συγκέντρωσης που μειώνεται από το οπίσθιο προς το εμπρόσθιο τμήμα του. Στο ορτύκι, αν στη διατροφή της μητέρας δεν περιλαμβάνεται βιταμίνη Α, τα έμβρυα που αναπτύσσονται δεν παράγουν σχεδόν καθόλου ρετινοϊκό οξύ. Στα συγκεκριμένα έμβρυα ο οπίσθιος εγκέφαλος δεν αναπτύσσεται φυσιολογικά, καθώς απουσιάζουν τα ρομβομερή 5, 6 και 7. Ωστόσο, τα τμήματα αυτά αναπτύσσονται αν χορηγηθεί στα έμβρυα, πριν από το στάδιο των πρώιμων σωματίων, βιταμίνη Α. Εκτός από την απώλεια των ρομβομερών 5, 6 και 7 στα έμβρυα που στερούνται ρετινοϊκού οξέος, παρατηρείται επίσης απώλεια κοιλιακών νευρικών τύπων στο εμπρόσθιο τμήμα του νωτιαίου μυελού. Ομόζυγα έμβρυα ποντικού στα οποία έχει γίνει στοχευμένη αδρανοποίηση του γονιδίου *Raldh2* παρουσιάζουν έλλειψη των ρομβομερών 5, 6 και 7 και επιβιώνουν μέχρι το μέσο της κύησης. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται και στον *Xenopus* ύστερα από την υπερέκφραση μιας επικρατούς αρνητικής παραλλαγής του υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος. Στον ποντικό είναι δυνατή η χορήγηση μεγάλων δόσεων ρετινοϊκού οξέος στα θηλυκά άτομα που εγκυμονούν. Η χορήγηση ρετινοϊκού οξέος κατά την E7,5 οδηγεί σε εκτοπική έκφραση του *Hoxb1* στο ρομβομερές 2 (το εμπρόσθιο όριο έκφρασης του *Hoxb1* εντοπίζεται φυσιολογικά στο ρομβομερές 4). Η εκτοπική έκφραση του *Hoxb1* αλλάζει την ταυτότητα των κυττάρων

της νευρικής ακρολοφίας που αναδύονται από το ρομβομερές 2 και έτσι στο πρώτο βραγχιακό τόξο αναπτύσσονται οι δομές που φυσιολογικά συναντώνται στο δεύτερο. Το παραπάνω αποτέλεσμα αποτελεί ένα καλό παράδειγμα **τερατογόνου** (teratogenic) επίδρασης, που σήμερα έχει κατανοηθεί ικανοποιητικά σε μοριακό επίπεδο. Το ρετινοϊκό οξύ αποτέλεσε στο παρελθόν κίνδυνο για τερατογένεση και στον άνθρωπο, καθώς χρησιμοποιήθηκε σε πόσιμη μορφή για τη θεραπεία της ακμής. Πριν αποκαλυφθεί ο ρόλος του ρετινοϊκού οξέος κατά την πρώιμη ανάπτυξη, το μόριο αυτό χρησιμοποιούνταν και σε εγκύους, με αποτέλεσμα να πραγματοποιούνται πολλές αποβολές αλλά και γεννήσεις εμβρύων με εγκεφαλικές βλάβες.

Νωτιαίος μυελός

Στον νωτιαίο μυελό το εμπροσθοπίσθιο πρότυπο δεν είναι τόσο εμφανές όσο στον εγκέφαλο. Εντούτοις, υπάρχουν σαφή όρια έκφρασης των γονιδίων *Hox* σε διάφορα επίπεδα. Εκτός από το χαρακτηριστικό πρότυπο κατά μήκος του ραχιοκοιλιακού άξονα, οι κινητικοί νευρώνες εμφανίζουν χαρακτηριστική οργάνωση και κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα. Για παράδειγμα, οι στήλες των πλευρικών κινητικών νευρώνων που νευρώνουν τα άκρα είναι παρούσες μόνο στα επίπεδα των άκρων, ενώ στο επίπεδο του εμπρόσθιου άκρου συσχετίζονται με την έκφραση του *Hoxc6*. Η στήλη των κινητικών νευρώνων που νευρώνουν τα σπλάχνα (στήλη του Terni στην όρνιθα) εντοπίζεται στην περιοχή ανάμεσα στα άνω και κάτω άκρα και συσχετίζεται με την έκφραση του γονιδίου *Hoxc9* (Εικ. 14.8). Η υπερέκφραση του *Fgf8* μετά από ηλεκτροδιάτρηση σε αυτή την περιοχή του νευρικού σωλήνα προκαλεί εμπρόσθια μετατόπιση του ορίου *Hoxc6/Hoxc9* με ταυτόχρονη συρρίκνωση της στήλης των πλευρικών κινητικών νευρώνων.



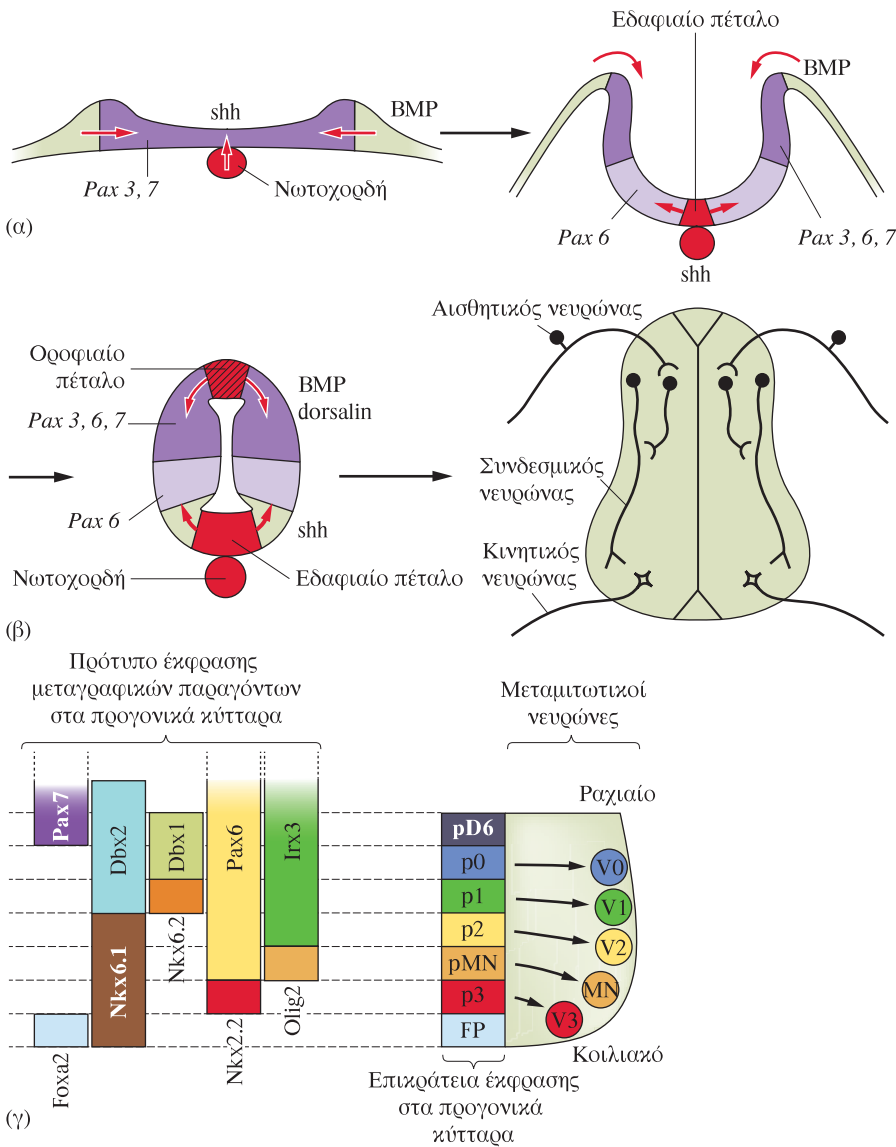
Εικ. 14.8 Ανίχνευση των μεταγραφικών παραγόντων *Hoxc6* και *Hoxc9* με ανοσοφθορισμό. Διακρίνονται τα όρια ανάμεσα στην αυχενική και στη θωρακική περιοχή (B/T) του νωτιαίου μυελού ενός εμβρύου όρνιθας την τέταρτη ημέρα της ανάπτυξης. Ένα ένζυμο που ενέχεται στην παραγωγή του ρετινοϊκού οξέος, η δεϋδρογονάση της ρετιναλδεϋδης (RALDH2, *Retinaldehyde Dehydrogenase 2*), εκφράζεται επίσης στην αυχενική περιοχή. Από τη δημοσίευση Dasen *et al.* (2003) *Nature* **425**, 926-933, μετά από άδεια του εκδοτικού οίκου Nature Publishing Group.

Οργάνωση του προτύπου κατά μήκος του ραχιοκοιλιακού άξονα του νευρικού σωλήνα

Ο νωτιαίος μυελός εμφανίζει την ίδια χαρακτηριστική οργάνωση κατά μήκος του ραχιοκοιλιακού άξονα. Επιπλέον, πολλά από τα γνωρίσματα αυτής της οργάνωσης φαίνεται ότι είναι κοινά για τον νωτιαίο μυελό, τον οπίσθιο εγκέφαλο και τον μεσεγκέφαλο. Στο μέσο του κοιλιακού τμήματος του νευρικού σωλήνα εντοπίζεται το **εδαφιαίο πέταλο** (floor plate), μια δομή η οποία αποτελείται από κυλινδρικά κύτταρα που εντοπίζονται κοντά στη νωτοχορδή. Εκατέρωθεν της δομής αυτής εντοπίζεται η περιοχή που περιέχει τους κινητικούς νευρώνες. Υπάρχουν διάφορες ομάδες κινητικών νευρώνων, οι οποίες οργάνωνονται σε στήλες. Η μέση στήλη των κινητικών νευρώνων νευρώνει τους αξονικούς μυς και τους μυς του σωματικού τοιχώματος, ενώ οι πλευρικές στήλες νευρώνουν τους μυς των άκρων. Σε κάθε στήλη οι κινητικοί νευρώνες εκφράζουν έναν συγκεκριμένο συνδυασμό μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας *Lim*, γεγονός που συσχετίζεται με τη μυϊκή ομάδα στην οποία προβάλλουν αργότερα τους νευράξονές τους. Αν μεταβληθεί πειραματικά ο συνδυασμός γονιδίων *Lim* που εκφράζεται από μια ομάδα κινητικών νευρώνων, τότε το

πρότυπο του σχηματισμού των συνάψεών τους μεταβάλλεται. Στο ραχιαίο ήμισυ του νωτιαίου μυελού εντοπίζονται οι ραχιαίοι αισθητήριοι νευρώνες αναμετάδοσης και οι **συνδεδσμικοί νευρώνες** (commissural neurons), οι οποίοι προβάλλουν στην απέναντι πλευρά του νωτιαίου μυελού. Στη ραχιαία μέση γραμμή εντοπίζεται το **οροφιαίο πέταλο** (roof plate).

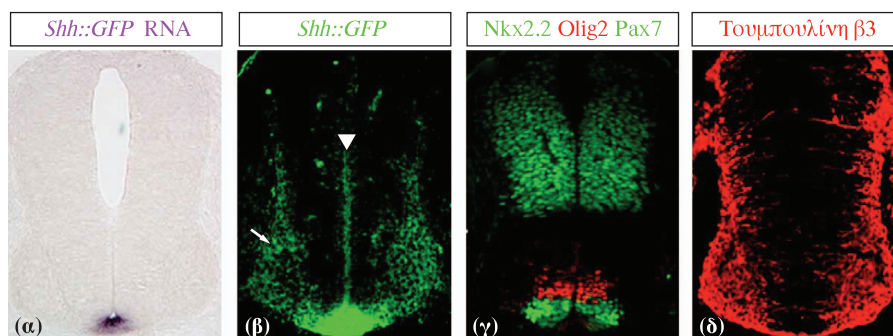
Αυτό το πρότυπο οργάνωνεται από σήματα τα οποία παράγονται αρχικά από τους ιστούς που γειτνιάζουν με τη νευρική πλάκα και αργότερα από το εδαφιαίο και το οροφιαίο πέταλο (Εικ. 14.9). Η **νωτοχορδή** (notochord) παράγει *Sonic hedgehog* (*Shh*), σήμα το οποίο επάγει σε υψηλή συγκέντρωση τον σχηματισμό του εδαφιαίου πετάλου και σε χαμηλότερη συγκέντρωση τον σχηματισμό των κινητικών νευρώνων. Αυτό έχει αποδειχθεί με πειράματα ανασυνδυασμού. Στα συγκεκριμένα πειράματα μια δεύτερη νωτοχορδή μεταμοσχεύεται δίπλα σε διαφορετικά τμήματα του νευρικού σωλήνα ενός εμβρύου όρνιθας. Η εκτοπική νωτοχορδή επάγει τον σχηματισμό ενός εκτοπικού εδαφιαίου πετάλου, καθώς και εκτοπικούς κινητικούς νευρώνες εκατέρωθεν αυτού. Υπάρχουν αποδείξεις από τρεις πειραματικές προσεγγίσεις που υποδεικνύουν ότι το επαγωγικό σήμα που παράγεται από τη νωτοχορδή είναι η *Sonic hedgehog* (*Shh*). Το γονίδιο *Shh* εκφράζεται στη νωτοχορδή



Εικ. 14.9 Οργάνωση του προτύπου κατά μήκος του ραχιοκοιλιακού άξονα του νευρικού σωλήνα. (α) Η *Sonic hedgehog*, που συντίθεται από τη νωτοχορδή, επάγει την έκφραση του γονιδίου *Sonic hedgehog* στο εδαφιαίο πέταλο. Ο παράγοντας BMP παράγεται από την επιδερμίδα και επάγει τον σχηματισμό του οροφιαίου πετάλου. (β) Οι παράγοντες *Sonic hedgehog* και BMP ρυθμίζουν την επάλληλη έκφραση γονιδίων τα οποία στη συνέχεια θα διεκπεραιώσουν τη νευρική διαφοροποίηση. (γ) Διαγραμματική απεικόνιση του προτύπου των μεταγραφικών παραγόντων που εκφράζονται σε πρώιμα στάδια της ανάπτυξης και των αντίστοιχων περιοχών όπου εντοπίζονται τα πρόδρομα κύτταρα του νωτιαίου μυελού. FP: εδαφιαίο πέταλο, MN: κινητικοί νευρώνες, V0-V3: επικράτειες διάμεσων νευρώνων. Το γράμμα p χρησιμοποιείται για να υποδείξει τις περιοχές που εντοπίζονται τα πρόδρομα κύτταρα. Από τη δημοσίευση Dessaud *et al.* (2008) *Development* **135**, 2489-2503, μετά από άδεια του εκδοτικού οίκου Company of Biologists Ltd.

και επάγει τον σχηματισμό εδαφιαίου πετάλου και κινητικών νευρώνων από τον νευρικό σωλήνα. Επίσης, έμβρυα ποντικού ομόζυγα για αδρανοποιητική μεταλλαγή του *Shh* στερούνται του εδαφιαίου πετάλου και των κινητικών νευρώνων. Διαγονιδιακοί ποντικοί που εκφράζουν την *Shh* σε σύντηξη με την GFP χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να μελετηθεί η διαβάθμιση συγκέντρωσης της *Shh*. Η υβριδική πρωτεΐνη κατανέμεται στην κορυφαία (κοιλιακή) επιφάνεια των νευροεπιθηλιακών κυττάρων σχηματίζοντας ένα σιλικό πρότυπο έκφρασης. Αυτή η ενδοκυττάρια κατανομή υποδεικνύει ως πιθανό μηχανισμό μεταφοράς τη διακυττάρωση (transcytosis, Εικ. 14.10 – βλ. επίσης Κεφάλαιο 17).

Η *Shh* παράγεται επίσης από το εδαφιαίο πέταλο και έτσι, όταν αυτό σχηματιστεί, συμμετέχει στον επαγωγικό ρόλο της νωτοχορδής. Η *Shh* ενεργοποιεί την έκφραση μιας ομάδας μεταγραφικών παραγόντων, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται οι *Foxa2*, *Nkx2.2* και *Nkx 6.1*. Επιπλέον, καταστέλλει την έκφραση ορισμένων γονιδίων που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες, όπως είναι το *Pax6* και το *Pax7*. Η σαφής οριοθέτηση των περιοχών κατά μήκος του ραχιοκοιλιακού άξονα είναι αποτέλεσμα αμοιβαίας καταστολής μεταξύ ζευγών μεταγραφικών παραγόντων. Για παράδειγμα, ο *Pax6* και ο *Nkx2.2* καταστέλλουν ο ένας την έκφραση του άλλου, οδηγώντας



Εικ. 14.10 Η διαβάθμιση συγκέντρωσης του Sonic hedgehog σε ένα διαγονιδιακό έμβρυο ποντικού ηλικίας E10,5 το οποίο εκφράζει την υβριδική πρωτεΐνη Shh-GFP. (α) Το mRNA εντοπίζεται στο εδαφιαίο πέταλο (υβριδοποίηση *in situ*). (β) Η ανάλυση της κατανομής του φθορισμού της GFP υποδεικνύει μεταφορά της πρωτεΐνης προς την κοιλιακή ζώνη (ραχιαία, υποδεικνύεται με κεφαλή βέλους), καθώς και πλευρικά, σε περιοχές που δεν αποκρίνονται και όπου εντοπίζονται διαφοροποιημένοι νευρώνες (υποδεικνύονται με βέλος). (γ) Τα πρότυπα έκφρασης τριών μεταγραφικών παραγόντων που εκφράζονται σε πρώιμα στάδια, όπως ανιχνεύονται με ανοσοφθορισμό (στην κορυφή της φωτογραφίας αναγράφονται τα ονόματα των παραγόντων με τη σειρά από την κοιλιακή πλευρά προς τη ραχιαία). (δ) Η έκφραση της τουμπουλίνης β3, όπως ανιχνεύεται μετά από ανοσοφθορισμό, ταυτοποιεί τις θέσεις των νευρώνων. Από τη δημοσίευση Dessaud *et al.* (2008) *Development* **135**, 2489-2503, μετά από άδεια του εκδοτικού οίκου Company of Biologists Ltd.

στον σχηματισμό του ορίου p3/pMN (Εικ. 14.9γ). Η αδρανοποίηση ενός από τα δύο γονίδια έχει ως αποτέλεσμα την επέκταση της επικράτειας έκφρασης του άλλου. Επίσης, παρατηρείται κατά μήκος του ραχικοκοιλιακού άξονα και σχηματισμός περιοχών που εκφράζουν συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, ο *Olig2*, που ενέχεται στην όψιμη διαφοροποίηση των κινητικών νευρώνων και των ολιγοδενδροκυττάρων, επάγεται από την *Shh*, αλλά στη συνέχεια καταστέλλεται από την *Nkx2.2*, με αποτέλεσμα να εκφράζεται και να καθορίζει την περιοχή pMN.

Η αποκάλυψη αυτού του μοριακού μηχανισμού οδήγησε στην κατανόηση της αιτιολογίας μιας συγγενούς ανωμαλίας που καλείται **ολοπροσεγκεφαλία** (holoprosencephaly). Η κατάσταση αυτή περιλαμβάνει ελαττώματα στην ανάπτυξη των δομών της μέσης γραμμής. Η σοβαρότητα της κατάστασης ποικίλλει από την απλή εμφάνιση ενός μονού κυνόδοντα μέχρι τις περιπτώσεις που παρατηρείται ένας οφθαλμός στη μέση γραμμή με μία δομή προβοσκίδας από πάνω του. Οι καταστάσεις αυτές οφείλονται σε μερική απώλεια της λειτουργίας του *Shh*, είτε λόγω μετάλλαξης στο

γονίδιο *SHH* είτε λόγω προβλημάτων στον μεταβολισμό της χοληστερόλης, με αποτέλεσμα την αδυναμία προσθήκης της χοληστερόλης στην ενεργή μορφή της *Shh*. Η ολοπροσεγκεφαλία εμφανίζεται και σε περιπτώσεις μεταλλάξεων άλλων γονιδίων. Ωστόσο, όταν οφείλεται σε απώλεια λειτουργίας, συνοδεύεται από προβλήματα στην ανάπτυξη των άκρων και των σπονδύλων, που είναι δομές στην ανάπτυξη των οποίων ενέχεται το μονοπάτι *Shh* (βλ. Κεφ. 15).

Η ραχιαία μέση γραμμή του νευρικού σωλήνα προκύπτει από το πλευρικό όριο της νευρικής πλάκας, στα σημεία όπου αυτή εφάπτεται στην επιδερμίδα. Η επιδερμίδα εκφράζει τους παράγοντες *BMP4* και *BMP7*. Οι παράγοντες *BMP* είναι σε θέση να αυξήσουν στα κύτταρα του νευρικού σωλήνα τα επίπεδα έκφρασης των *Pax6* και *Pax7*. Μετά το κλείσιμο του νευρικού σωλήνα το οροφιαίο πεταλό εκφράζει *BMP4* και *BMP7*, καθώς και την *Dorsalin*, ένα άλλο μέλος της υπερικογένειας των παραγόντων TGF-β. Όλοι αυτοί οι παράγοντες επάγουν ραχιαίους τύπους νευρώνων, όπως είναι οι αισθητήριοι νευρώνες αναμετάδοσης. Αν παρεμποδιστεί ο σχηματισμός του

οροφιαίου πετάλου, όπως συμβαίνει, για παράδειγμα, στην περίπτωση της στοχευμένης αδρανοποίησης του γονιδίου *Lim1a*, τότε δε σχηματίζονται ραχιαίοι τύποι νευρώνων. Για τους λόγους αυτούς θεωρείται ότι το συνολικό ραχιοκοιλιακό πρότυπο προκύπτει από τη συνδυασμένη επίδραση των διαβαθμίσεων συγκέντρωσης της Shh από το εδωφιαίο πέταλο και των BMP και της Dorsalin από το οροφιαίο πέταλο.

Νευρογένεση και γλοιογένεση

Drosophila

Ορισμένες από τις αρχές που διέπουν τη νευρογένεση αποκαλύφθηκαν χάρη σε μελέτες που έγιναν στην *Drosophila*. Στην *Drosophila* η κοιλιακή νευρική χορδή αναπτύσσεται από μία περιοχή η οποία αρχικά εντοπίζεται πλευρικά από το μεσόδερμα, ενώ στη συνέχεια, μετά την εγκόλπωση του μεσοδέρματος, συναντάται κοιλιακά γύρω από τη μέση γραμμή. Στη νευρογενή περιοχή εντοπίζονται επαναλαμβανόμενες μεταμερικά οργανωμένες ομάδες κυττάρων, που καλούνται **προνευρικές συστάδες** (proneural clusters) και χαρακτηρίζονται από την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων του συμπλέγματος *achaete-scute* (AS-C). Οι μεταγραφικοί παράγοντες AS-C ανήκουν στην οικογένεια bHLH. Οι θέσεις στις οποίες σχηματίζονται οι προνευρικές συστάδες εξαρτώνται από τα συστήματα που ευθύνονται για την οργάνωση του προτύπου κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου και του ραχιοκοιλιακού άξονα (βλ. Κεφάλαιο 11). Από κάθε προνευρική συστάδα αναπτύσσεται μόνο ένας νευροβλάστης (neuroblast), καθώς και ένας αριθμός επιδερμικών κυττάρων. Η ανάπτυξη των νευροβλαστών ελέγχεται από το μονοπάτι **πλευρικής αναστολής** (lateral inhibition) Notch. Οι μεταγραφικοί παράγοντες AS-C ενεργοποιούν την έκφραση του Delta, του προσδέτη του υποδοχέα Notch.

Ο προσδέτης Delta αλληλεπιδρά με τη Notch και ενεργοποιεί το ομώνυμο μονοπάτι μεταγωγής σήματος. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης των AS-C και τη μείωση της παραγωγής Delta από τα γειτονικά προς αυτό κύτταρα (Εικ. 14.11). Καθώς αρχικά όλα τα κύτταρα της προνευρικής συστάδας εκφράζουν τόσο το γονίδιο *Notch* όσο και το γονίδιο *Delta*, το παραπάνω μονοπάτι ουσιαστικά λειτουργεί ως ένα σύστημα θετικής ανατροφοδότησης το οποίο ενισχύει μικρές διαφορές, έτσι ώστε τελικά να παραμείνει από κάθε συστάδα ένα μόνο κύτταρο με υψηλά επίπεδα AS-C. Αυτό το κύτταρο αναπτύσσεται σε νευροβλάστη, ενώ τα κύτταρα που το περιβάλλουν, τα οποία εκφράζουν χαμηλά επίπεδα AS-C, γίνονται επιδερμικά κύτταρα. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός εξηγεί γιατί στα έμβρυα από τα οποία απουσιάζει η Notch παρατηρείται υπερπαραγωγή νευροβλαστών. Ο μηχανισμός της πλευρικής αναστολής αποτελεί παράδειγμα ενός συστήματος **αναίρεσης συμμετρίας** (symmetry-breaking). Η αρχική ομοιόμορφη κατάσταση των κυττάρων της προνευρικής συστάδας είναι ασταθής, διότι πάντοτε παρατηρείται ελαφρά διακύμανση στα επίπεδα AS-C ή Delta ανάμεσα στα κύτταρα. Το γεγονός αυτό ενισχύεται αυτόματα από την ανατροφοδότηση, που αποτελεί εγγενές χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου συστήματος.

Μετά τον σχηματισμό τους οι νευροβλάστες απομακρύνονται από τα γειτονικά τους κύτταρα και εισέρχονται στο εσωτερικό του εμβρύου, παραμένοντας προσωρινά συνδεδεμένοι με αυτό μέσω του κορυφαίου τους στελέχους, που εντοπίζεται στο επίπεδο του επιθηλίου. Αυτή η κορυφαία εξειδίκευση των νευροβλαστών χαρακτηρίζεται από την παρουσία του συμπλέγματος Par, το οποίο αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 12 (π.χ. το σύμπλεγμα Par3/Par6/aPKC – το ομόλογο του *par6* στην *Drosophila* ονομάζεται *bazooka*). Το σύμπλεγμα Par φωσφορυλιώνει συστατικά στοιχεία του ενδοκυττάριου συστήματος διακίνησης

Με παρόμοιο τρόπο πραγματοποιείται η νευρογένεση στα σπονδυλωτά: η πλευρική αναστολή χρησιμοποιείται για τον σχηματισμό των πρωτογενών νευρώνων, ενώ στα όψιμα στάδια παρατηρούνται ασύμμετρες διαιρέσεις. Συχνά στις παραπάνω διαδικασίες ενέχονται μοριακά στοιχεία ομόλογα με αυτά που ενέχονται στη νευρογένεση στην *Drosophila*.

Πρωτογενής νευρογένεση στα σπονδυλωτά

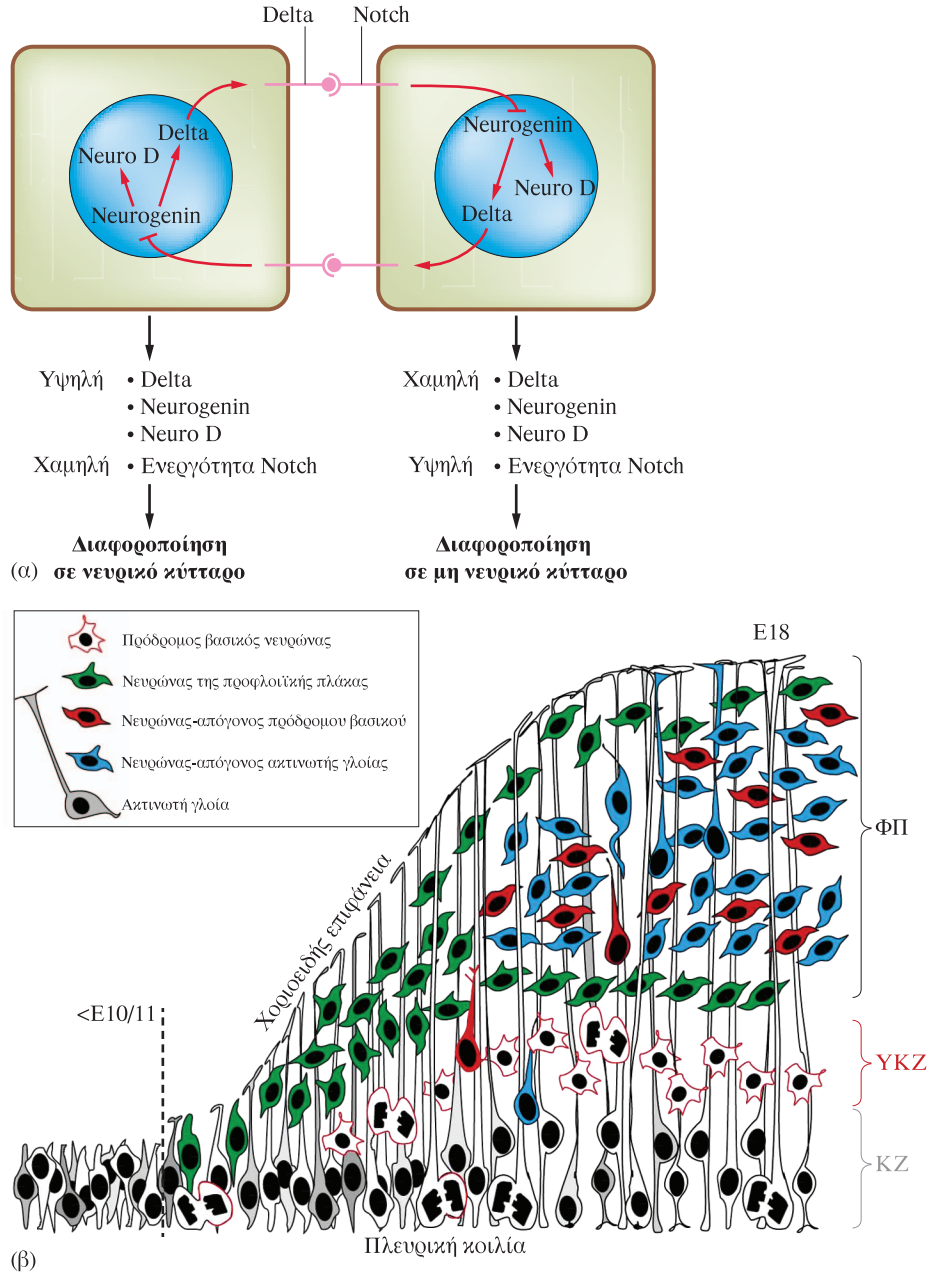
Στα κατώτερα σπονδυλωτά οι πρώτοι νευρώνες αναπτύσσονται άμεσα από το νευροεπιθήλιο της ανοικτής νευρικής πλάκας (πρωτογενείς νευρώνες). Σε αυτό το στάδιο το νευροεπιθήλιο σχηματίζει μια κυτταρική στιβάδα, αλλά μοιάζει με πολύστιβο επειδή οι πυρήνες των κυττάρων εντοπίζονται σε πολλά, διαφορετικά επίπεδα. Αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες καθοδηγούν τη νευρική διαφοροποίηση. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται η *Neurogenin* και η *NeuroD*, δύο παράγοντες οι οποίοι, όπως και οι μεταγραφικοί παράγοντες AS-C της *Drosophila*, ανήκουν στην οικογένεια bHLH. Το γονίδιο *neurogenin* εκφράζεται στα τμήματα της νευρικής πλάκας από τα οποία προκύπτουν οι πρωτογενείς νευρώνες. Επάγει την ενεργοποίηση του *NeuroD*, το οποίο ακολούθως εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στους πρωτογενείς νευρώνες. Στον *Xenopus* η υπερέκφραση ενός από τους δύο αυτούς μεταγραφικούς παράγοντες αυξάνει τον αριθμό των νευρώνων που αναπτύσσονται από το νευροεπιθήλιο. Τα διαστήματα που παρεμβάλλονται μεταξύ των πρωτογενών νευρώνων καθορίζονται από έναν μηχανισμό πλευρικής αναστολής που παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με τον μηχανισμό που περιγράφηκε στην *Drosophila* (Εικ. 14.12α). Κάθε κύτταρο που εκφράζει *Neurogenin* έχει τη δυνατότητα να διαφοροποιηθεί σε νευρώνα. Ωστόσο, η δυνατότητα αυτή αναστέλλεται από ενεργή σηματοδότηση Notch, που είναι αποτέλεσμα της

αλληλεπίδρασης του υποδοχέα Notch με τον προσδέτη του Delta στα παρακείμενα κύτταρα. Η υπερέκφραση της Delta, ή μιας ιδιοσυστατικής μορφής της Notch, στη νευρική πλάκα του *Xenopus* μειώνει τον αριθμό των πρωτογενών νευρώνων. Αντίστροφα, η υπερέκφραση μιας επικρατούς αρνητικής παραλλαγής της Delta έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των πρωτογενών νευρώνων. Η πλευρική αναστολή οδηγεί στον σχηματισμό μεμονωμένων νευρώνων που εμφανίζονται διάσπαρτοι κατά μήκος έξι επιμηκυσμένων νευρογενικών περιοχών. Μολονότι το πρώτο γεγονός αναιρέσης της συμμετρίας αρχικά αποδιδόταν στη μοριακή διακύμανση της έκφρασης συγκεκριμένων στοιχείων, είναι πλέον γνωστό ότι σε αυτό το σύστημα υπάρχει και η δυνατότητα συντηρούμενης ταλάντωσης. Επομένως, καθώς τα γειτονικά κύτταρα δεν είναι συγχρονισμένα, η έναρξη της διαδικασίας είναι δυνατόν να προκληθεί και από την αυθόρμητη ταλάντωση.

Όψιμη νευρογένεση

Στον ποντικό παρατηρείται μικρό ποσοστό πρωτογενούς νευριδίωσης, η οποία λαμβάνει χώρα κυρίως κατά το δεύτερο ήμισυ της κύησης, όταν το νευροεπιθήλιο δεν είναι μονόστιβο. Η νευρογένεση συνεχίζει καθ' όλη τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, αλλά και μετά τη γέννηση. Πειράματα σήμανσης με τη χρήση ρετροϊών σε πρῶιμα στάδια (E9-10) έχουν δείξει ότι οι περισσότεροι κλώνοι που αναπτύσσονται αποτελούνται είτε μόνο από νευρώνες είτε μόνο από κύτταρα γλοίας, ενώ ένα μικρό ποσοστό αποτελείται και από τα δύο είδη κυττάρων. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι τουλάχιστον ορισμένα από τα πρόδρομα κύτταρα είναι πολυδύναμα. Πολλές φορές θεωρείται ότι τα κύτταρα τα οποία παράγουν κλώνους που ανήκουν στον ίδιο τύπο είναι δεσμευμένα, ωστόσο, όπως αναλύθηκε στο Κεφάλαιο 4, αυτό δεν ισχύει. Το ίδιο αποτέλεσμα θα μπορούσε να

Εικ. 14.12 (α) Στα σπονδυλωτά η δράση του μονοπατιού Delta-Notch εξασφαλίζει ότι μόνο μερικά από τα κύτταρα των νευρογενικών περιοχών θα διαφοροποιηθούν τελικά σε νευρώνες. (β) Νευρογένεση και κύτταρα ακτινωτής γλοίας. Το διάγραμμα αναπαριστά την πάχυνση του φλοιού των ημισφαιρίων κατά το δεύτερο ήμισυ της κύησης στον ποντικό. Το αρχικό νευροεπιθήλιο μετατρέπεται σε πολύστιβο και περιλαμβάνει την κοιλιακή ζώνη (KZ), την υποκοιλιακή ζώνη (YKZ), και τη φλοιική πλάκα (ΦΠ). Μερικοί νευρώνες γεννιούνται από το απλό νευροεπιθήλιο, ωστόσο οι περισσότεροι είναι απόγονοι των κυττάρων της ακτινωτής γλοίας, είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω του σχηματισμού πρόδρομων βασικών νευρώνων. Σε ό,τι αφορά την επιθηλιακή μορφολογία, η εξωτερική χοριοειδής επιφάνεια είναι η βασική και η εσωτερική, κοιλιακή είναι η κορυφαία. Οι πρόδρομοι βασικοί νευρώνες ονομάστηκαν έτσι λόγω της θέσης τους σε σχέση με την κοιλιακή ζώνη. Από τη δημοσίευση Malatesta *et al.* (2007) *Cell and Tissue Research* 331, 165-178, μετά από άδεια του εκδοτικού οίκου Springer.



προκύψει λόγω των επιδράσεων του μικροπεριβάλλοντος σε ένα πολυδύναμο κύτταρο.

Με βάση τους συμβατικούς όρους που χρησιμοποιούνται για την περιγραφή των επιθηλιακών δομών, η **κορυφαία** (apical) πλευρά του νευροεπιθηλίου εντοπίζεται προς τον αυλό του νευρικού σωλήνα, ενώ η **βασική** (basal) προς το εξωτερικό του νευρικού σωλήνα (συνεπώς η κορυφαία πλευρά βρίσκεται συνήθως στο *κάτω μέρος* των σχετικών διαγραμμάτων και η βασική στο *επάνω* – σε αντίθεση με τη σύμβαση που

τηρείται για τα υπόλοιπα επιθήλια). Η κορυφαία πλευρά αναφέρεται στη νευροανατομία ως **κοιλιακή** (ventricular), επειδή στον εγκέφαλο είναι σε επαφή με τις κοιλίες, ενώ η εξωτερική πλευρά ως **χοριοειδής** (pial), κατά αναλογία με την περιβάλλουσα στιβάδα συνδετικού ιστού που ονομάζεται χοριοειδής μήνιγγα.

Στα πρώιμα στάδια όλα τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και η μετανάστευση των πυρήνων τους κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιείται με τέτοιο τρόπο, ώστε οι πυρήνες να

εντοπίζονται στη βασική πλευρά κατά τη φάση S και στην κορυφαία κατά τη μίτωση. Το φαινόμενο αυτό καλείται **ενδοκινητική μετανάστευση** (interkinetic migration). Καθώς προχωρά η νευρογένεση, το επιθήλιο γίνεται πλέον πολύστιβο και ένα ποσοστό των νευροεποθλιακών κυττάρων μετατρέπεται σε κύτταρα **ακτινωτής γλοίας** (radial glia), τα οποία εκτείνονται από την κοιλιακή έως τη χοριοειδή επιφάνεια (Εικ. 14.12β). Τα κύτταρα αυτά ονομάστηκαν έτσι επειδή εκφράζουν διάφορους δείκτες των κυττάρων γλοίας, πρόκειται όμως για πρόδρομα κύτταρα τα οποία δίνουν απογόνους τόσο νευρώνες όσο και κύτταρα γλοίας.

Τα κύτταρα της ακτινωτής γλοίας διατηρούν στην κορυφαία πλευρά την έκφραση του συμπλέγματος Par. Στην κορυφαία πλευρά εντοπίζονται επίσης μια μεμβρανική πρωτεΐνη, η Prolamin-1 (= CD133), μια πρωτεΐνη που ανήκει στα ενδιάμεσα ινίδια, η Nestin, και μια πρωτεΐνη που προσδένει λιπίδια, η Blbp (Brain lipid binding protein). Ο ρόλος των κυττάρων της ακτινωτής γλοίας ως προγονικών κυττάρων έχειδειχθεί με πειράματα σήμανσης σε διαγονιδιακούς ποντικούς. Όταν σημαίνονται τα κύτταρα της ακτινωτής γλοίας που εκφράζουν το γονίδιο *Blbp*, τότε στους απόγονους τους ταυτοποιούνται νευρώνες, πρόδρομοι βασικοί νευρώνες, αστροκύτταρα, πρόδρομα ολιγοδενδροκυττάρων και κύτταρα του επενδύματος. Οι απόγονοι των κυττάρων της ακτινωτής γλοίας που εγκαταλείπουν τον κυτταρικό κύκλο χρησιμοποιούν το γονικό κύτταρο, πάνω στο οποίο μετακινούνται έρποντας για να μεταναστεύσουν στην τελική τους θέση. Λόγω αυτής της διαδικασίας, για αρκετά χρόνια θεωρούνταν ότι τα κύτταρα της ακτινωτής γλοίας απλώς παρέχουν τα σήματα που απαιτούνται για τη μετανάστευση των νεαρών νευρώνων στην τελική τους θέση.

Σε αντίθεση με ό,τι συμβαίνει στην *Drosophila*, στα σπονδυλωτά το σύμπλοκο Par φαίνεται να παρασύρει τη Numb προς την περιοχή του κυττάρου όπου αυτό εντοπίζεται και όχι να την απωθεί προς την αντιδιαμετρική πλευρά. Μετά τη

διαίρεση, το κύτταρο που βρίσκεται στην επιφάνεια του αυλού διατηρεί την πρωτεΐνη Numb και παραμένει μιτωτικό, ενώ το άλλο στερείται πλέον της Numb. Στον ποντικό η Numb (και μια παρόμοια πρωτεΐνη, η Numblake) διατηρούν τα κύτταρα της ακτινωτής γλοίας σε κατάσταση πολλαπλασιασμού υποστηρίζοντας τις ενδοκυττάρια επαφές που ρυθμίζουν τη δομή του κυττάρου. Η κατά συνθήκη αδρανοποίηση και των δύο γονιδίων στον εμπρόσθιο ραχιαίο εγκέφαλο με το σύστημα Cre-lox είχε ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της νευρογένεσης και την εμφάνιση ποικίλων ανωμαλιών.

Στα κατώτερα σπονδυλωτά, τα οποία εμφανίζουν σημαντικά ποσοστά νευρογένεσης, και στο ενήλικο άτομο τα κύτταρα της ακτινωτής γλοίας παραμένουν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής. Στον ποντικό τα περισσότερα κύτταρα ακτινωτής γλοίας ωριμάζουν σε αστροκύτταρα κατά την πρώτη μεταγεννητική εβδομάδα. Η ωρίμανση εξαρτάται από την καρδιοτροπίνη, ένα μέλος της οικογένειας της IL6 το οποίο εκκρίνεται από τους νεαρούς νευρώνες. Ένας μικρός αριθμός κυττάρων ακτινωτής γλοίας μετατρέπεται σε **νευρικά θλαστοκύτταρα** (neural stem cells, βλ. παρακάτω). Αυτό έχειδειχθεί με πειράματα σήμανσης των κυττάρων γλοίας μετά τη γέννηση. Για τον σκοπό αυτό, ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί που εκφράζουν τη ρεκομπινάση Cre ενέθηκαν, μετά τη γέννηση, στο ραβδωτό σώμα διαγονιδιακών ποντικών στους οποίους η σύνθεση του λειτουργικού προϊόντος ενός γονιδίου αναφοράς, επιτυγχάνεται μόνον όταν η Cre απομακρύνει συγκεκριμένες αλληλουχίες οι οποίες παρεμβάλλονται ανάμεσα σε δύο θέσεις *loxP*. Η μόλυνση με τον ιό έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση της Cre, άρα και τον ανασυνδυασμό και τελικά τη μόνιμη έκφραση του γονιδίου αναφοράς τόσο στο κύτταρο που μολύνθηκε όσο και στους απογόνους του. Τα περισσότερα από τα σημασμένα κύτταρα γλοίας λίγο μετά τη γέννηση διαφοροποιούνται σε αστροκύτταρα, όμως ένα μικρό ποσοστό τους μεταναστεύει στην

υποκοιλιακή περιοχή. Τα κύτταρα αυτά διατηρούν την ικανότητα πολλαπλασιασμού και δίνουν απογόνους νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα.

Ημερομηνία γέννησης και στιβάδες

Η γέννηση ενός νευρώνα συνεπάγεται και την έξοδο του κυττάρου από τον κυτταρικό κύκλο. Επομένως, πειράματα παλμού-ώσης με BrdU ή ³HTdR (βλ. Κεφάλαιο 18) είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να προσδιοριστεί η χρονική στιγμή της γέννησης κάθε κατηγορίας νευρώνων. Αυτό συμβαίνει διότι τα μόνα κύτταρα που παραμένουν σημασμένα είναι τα κύτταρα που εγκατέλειψαν τον κυτταρικό κύκλο κατά τη φάση του παλμού. Τα υπόλοιπα κύτταρα, τα οποία συνέχισαν να διαιρούνται, έχουν χάσει τον δείκτη λόγω διαδοχικών του αραιώσεων στις επόμενες μιτώσεις. Η χρονική στιγμή κατά την οποία

το κύτταρο εγκαταλείπει τον κυτταρικό κύκλο ονομάζεται **ημερομηνία γέννησης** (birthday) του νευρώνα.

Η δομή των στιβάδων του ΚΝΣ οφείλεται στο χαρακτηριστικό πρότυπο μορφογένεσής του: αναπτύσσεται από «μέσα προς τα έξω». Κύτταρα που απομακρύνονται από την κοιλιακή στιβάδα σχηματίζουν την **επιχειλία στιβάδα** (mantle layer), γνωστή αργότερα ως φαιά ουσία, η οποία περιέχει τόσο νευρώνες όσο και γλοία. Οι νευρώνες αναπτύσσουν τους νευράξονές τους, οι οποίοι συγκεντρώνονται και σχηματίζουν την **οριακή ζώνη** (marginal zone). Η οριακή ζώνη είναι φτωχή σε κύτταρα και εντοπίζεται κάτω από τη χοριοειδή επιφάνεια. Όταν οι νευράξονες περιβληθούν από το έλυτρο μυελίνης, η περιοχή αυτή αποκτά λευκό χρώμα και έτσι είναι γνωστή ως λευκή ουσία. Καθώς αυξάνεται το πάχος του νευρικού σωλήνα, οι νεοσχηματιζόμενοι νευρώνες πρέπει

Κλασικά Πειράματα

Νευρική ακρολοφία και νευρογένεση

Le Douarin, N.M. (1986) Cell line segregation during peripheral nervous system ontogeny. *Science* **231**, 1515-1522.

Πρόκειται για ένα άρθρο ανασκόπησης, στο οποίο συνοψίζεται σειρά δημοσιεύσεων της δεκαετίας του 1970 στα γαλλικά. Στο άρθρο αναφέρονται συνοπτικά τα αποτελέσματα σειράς πειραμάτων ορθοτοπικών και ετεροτοπικών μεταμοσχεύσεων τμημάτων του νευρικού σωλήνα από έμβρυα ορνιθίου σε έμβρυα όρνιθας. Με τα πειράματα αυτά ταυτοποιήθηκε το πεπρωμένο των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας και αποκαλύφθηκε η πολυδυναμικότητά τους.

Heitzler, P. & Simpson, P. (1991) The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* **64**, 1083-1092.

Παρουσιάζεται η ανάλυση του μηχανισμού της πλευρικής αναστολής στην *Drosophila*. Ο μηχανισμός αυτός αργότερα φάνηκε ότι δρα και στη νευρογένεση στα σπονδυλόζωα.

Lee, J.E., Hollenberg, S.M., Snider, L., Turner, D.L., Lipnick, N. & Weintraub, H. (1995) Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic Helix-Loop-Helix protein. *Science* **268**, 836-844.

Η δημοσίευση αυτή παρέχει τα δεδομένα που αποδεικνύουν ότι η υπερέκφραση ενός και μόνο προνευρικού μεταγραφικού παράγοντα επαρκεί για τη διαφοροποίηση των νευρώνων στα σπονδυλόζωα.

Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A. & Gage, F.H. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine* **4**, 1313-1317.

Τα πειράματα που παρουσιάζονται στη συγκεκριμένη δημοσίευση απέδειξαν ότι, και στα θηλαστικά, πραγματοποιείται νευρογένεση στο ενήλικο άτομο.

Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Dammerman, R.S. & Kriegstein, A.R. (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* **409**, 714-720.

Στη δημοσίευση αυτή αποδείχθηκε ότι τα κύτταρα της ακτινωτής γλοίας αποτελούν την κύρια πηγή νευρώνων κατά τη νευρογένεση.

να μεταναστεύσουν ακτινωτά από τις θέσεις γέννησής τους (στην κοιλιακή ζώνη) στις τελικές τους θέσεις. Οι νευρώνες που γεννιούνται σε πρώιμα στάδια τείνουν να μεταναστεύουν σε μικρότερες αποστάσεις, ενώ αυτοί που γεννιούνται αργότερα διανύουν μεγαλύτερες αποστάσεις.

Η αρχική δομή, που περιλαμβάνει τις τρεις στιβάδες, την κοιλιακή, την επιχείλια και την οριακή, διατηρείται στον νωτιαίο μυελό, αλλά σε ορισμένα τμήματα του εγκεφάλου η τελική δομή που σχηματίζεται είναι πιο περίπλοκη. Στον φλοιό των θηλαστικών, οι πρώτοι νευρώνες που γεννιούνται μεταναστεύουν και σχηματίζουν στη χοριοειδή πλευρά την προφλοιική πλάκα, η οποία αποτελείται από μια εξωτερική στιβάδα κυττάρων που ονομάζονται νευρώνες Cajal-Retzius και από μια εσωτερική στιβάδα νευρώνων που ονομάζεται υποφλοιική. Νέοι νευρώνες της επιχείλιας ζώνης εισβάλλουν στην οριακή εγκαθιδρύοντας τις έξι στιβάδες του **νεοφλοιού** (neocortex). Οι στιβάδες αριθμούνται από τη χοριοειδή επιφάνεια (ανώτατη) προς την κοιλιακή (κατώτατη) με λατινικούς αριθμούς από I έως VI. Οι περισσότεροι νευρώνες του φλοιού στα έμβρυα των ποντικών σχηματίζονται κατά την περίοδο των E12,5-E17,5. Κάθε νέα ομάδα νευρώνων μεταναστεύει εξωτερικά από την υποφλοιική πλάκα, προκειμένου να δημιουργηθούν οι νέες στιβάδες. Έτσι, οι στιβάδες σχηματίζονται από μέσα προς τα έξω. Για παράδειγμα, οι πρώτοι νευρώνες που γεννιούνται εποίκίζουν τη στιβάδα VI, ενώ αυτοί που γεννιούνται αργότερα μεταναστεύουν μέσω των προϋπαρχουσών στιβάδων και εποίκίζουν στιβάδες που είναι πιο κοντά στη χοριοειδή επιφάνεια. Κλασικά πειράματα μεταμόσχευσης που έχουν πραγματοποιηθεί στο κουνάβι έδειξαν ότι οι πρώτοι μεταναστεύοντες νευρώνες έχουν τη δυνατότητα να εποίκισουν τις ανώτερες στιβάδες όταν μεταμοσχεύονται σε εγκέφαλο όψιμου σταδίου, ενώ οι όψιμοι μεταναστεύοντες νευρώνες δεν έχουν τη δυνατότητα να επανεξειδικευτούν και να εποίκισουν χαμηλότερες στιβάδες.

Στην παρεγκεφαλίδα, ορισμένα μιτωτικά κύτταρα μεταναστεύουν στην εξωτερική στιβάδα εγκαθιδρύοντας μια εξωτερική βλαστική στιβάδα, απ' όπου αναπτύσσονται νευρώνες οι οποίοι μεταναστεύουν προς το εσωτερικό του παρεγκεφαλιδικού φλοιού. Επιπλέον, η επιχείλια ζώνη υποδιαιρείται σε αρκετές στιβάδες, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγεται η στιβάδα των νευρώνων Purkinje. Οι νευρώνες αυτοί είναι μεγάλα κύτταρα τα οποία συναντώνται μόνο στην παρεγκεφαλίδα και σχηματίζουν συνάψεις με 10^5 άλλους νευρώνες.

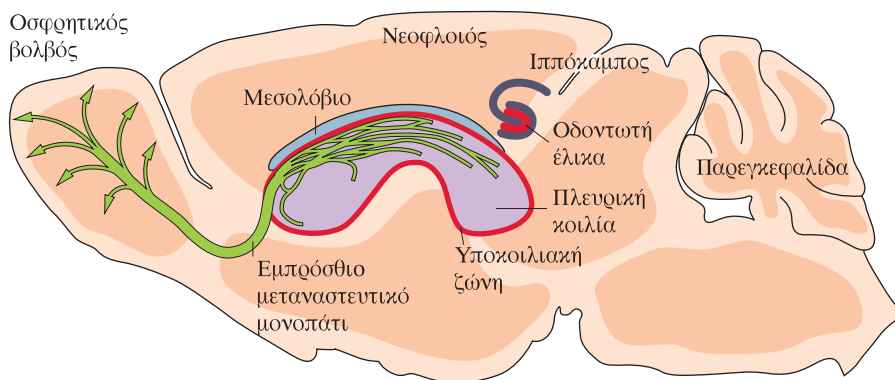
Στον οφθαλμό, η εξωτερική περιοχή του οπτικού κυπέλλου σχηματίζει το **μελάχρουν επιθήλιο** (pigment epithelium), ενώ η εσωτερική στιβάδα τον αμφιβληστροειδή (retina), ο οποίος αποτελείται από έξι στιβάδες κυττάρων με τους φωτούποδοχείς στην κοιλιακή επιφάνεια και τις ίνες που διατρέχουν το οπτικό νεύρο στη χοριοειδή επιφάνεια.

Νευρικά βλαστοκύτταρα

Στα κατώτερα σπονδυλόζωα παρατηρείται ανανέωση των κυττάρων του ΚΝΣ καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του οργανισμού. Αυτό ισχύει και για δύο περιοχές του εγκεφάλου των θηλαστικών: την υποκοιλιακή ζώνη που γειτνιάζει με τις πλευρικές κοιλίες και την υποκοκκιδώδη ζώνη του ιπποκάμπου, η οποία αποτελεί μια δομή στο εσωτερικό του κροταφικού λοβού που ενέχεται στις διαδικασίες της μάθησης και της μνήμης (Εικ. 14.13). Οι νέοι νευρώνες που γεννιούνται από την υποκοιλιακή ζώνη μεταναστεύουν εμπρόσθια και διαφοροποιούνται ως διανευρώνες στους οσφρητικούς βολβούς. Οι νευρώνες που γεννιούνται στην υποκοκκιδώδη ζώνη μεταναστεύουν εσωτερικά και διαφοροποιούνται σε νευρώνες της κοκκιδώδους ζώνης.

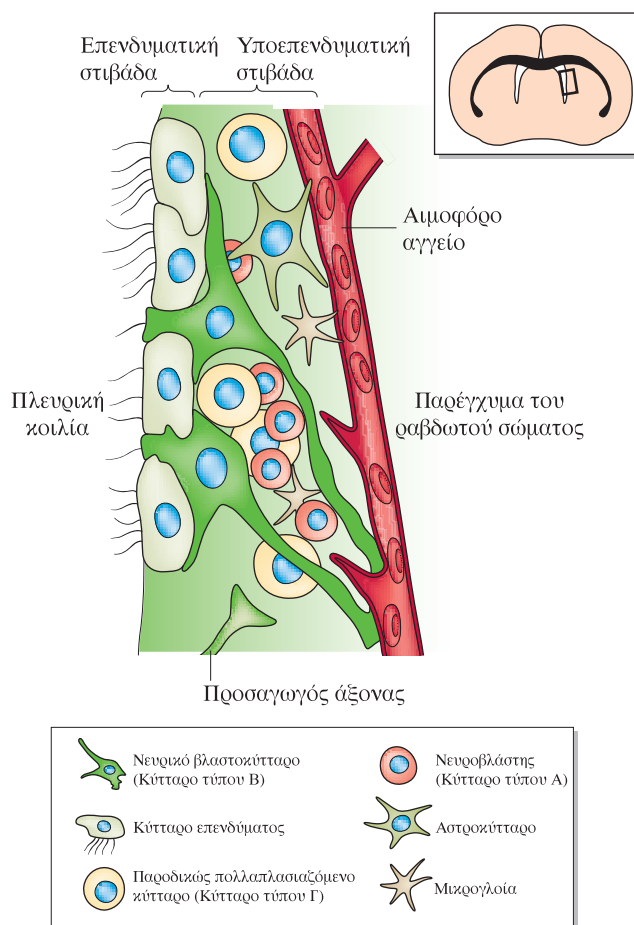
Θεωρείται σήμερα ότι τα **νευρικά βλαστοκύτταρα** (neural stem cells) οργανώνονται με παρόμοιο τρόπο με αυτόν των βλαστοκυττάρων άλλων αναγεννώμενων ιστών (βλ. Κεφάλαιο 18). Το βλαστοκύτταρο εντοπίζεται σε ένα συγκεκριμένο

Εικ. 14.13 Ο εντοπισμός των νευρικών βλαστοκυττάρων (κόκκινες περιοχές) στον εγκέφαλο ενήλικου ποντικού. Από τη δημοσίευση Zhao *et al.* (2008) *Cell* **132**, 645-660, μετά από άδεια του εκδοτικού οίκου Elsevier.



μικροπεριβάλλον (niche) και πολλαπλασιάζεται σχηματίζοντας κύτταρα παροδικά πολλαπλασιαζόμενα (transient amplifying cells), τα οποία είναι πρόδρομα κύτταρα με δυνατότητα μικρού αριθμού διαιρέσεων. Οι απόγονοι των παροδικά πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων διαφοροποιούνται σε νευρώνες. Τα βλαστοκύτταρα ταυτοποιούνται μορφολογικά ως κύτταρα «τύπου Β». Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν μια σειρά δεικτών, όπως είναι η όξινη ινώδης πρωτεΐνη (GFAP, *G*lial *F*ibrillary *A*cidic *P*rotein), η οποία μέχρι πρότινος θεωρούνταν δείκτης των ώριμων αστροκυττάρων, η Nestin, ο μεταγραφικός παράγοντας Sox2 που έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εμβρυϊκού νευροεπιθηλίου, ιντεγκρίνες, καθώς και ορισμένοι επίτοποι υδατανθρακικής φύσης, όπως η Prominin-1 (= CD133) και το SSEA1. Παρότι τα νευρικά βλαστοκύτταρα εντοπίζονται στην υποκοιλιακή ζώνη, εκτείνουν αποφυάδες μεταξύ των κυττάρων του επενδύματος και αναπτύσσουν επαφές με την κοιλιακή επιφάνεια. Το **μικροπεριβάλλον ανάπτυξης βλαστοκυττάρων** (stem cell niche, Εικ. 14.14) θεωρείται ότι προσδιορίζεται από την εγγύτητα των αιμοφόρων αγγείων με τους βασικούς υμένες τους, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την απομόνωση των παραγόντων αύξησης. Επειδή τα βλαστοκύτταρα είναι σε επαφή τόσο με το αγγειακό σύστημα όσο και με το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, έχουν ενδεχομένως τη δυνατότητα να αποκρίνονται σε σήματα που προέρχονται και από τα δύο.

Υπάρχουν αρκετές μελέτες που υποδεικνύουν ότι τα βλαστοκύτταρα είναι τα κύτταρα που μοιάζουν με αστροκύτταρα. Πρώτον, τα αστροκύτταρα



Εικ. 14.14 Ένα μοντέλο για το μικροπεριβάλλον των νευρικών βλαστοκυττάρων στην υποκοιλιακή ζώνη των πλευρικών κοιλιών των θηλαστικών. Από τη δημοσίευση Miller & Gauthier-Fisher (2009) *Cell Stem Cell* **4**, 507-510, μετά από άδεια του εκδοτικού οίκου Elsevier.

της υποκοιλιακής ζώνης είναι τα μόνα κύτταρα που παρουσιάζουν μακροπρόθεσμη σήμανση με **BrdU**. Δεύτερον, τα αστροκύτταρα της υποκοιλιακής ζώνης επιβιώνουν μετά από επώαση με το

αντιμιτωτικό φάρμακο ara-C, το οποίο καταστρέφει τα παροδικά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα που διαιρούνται γρήγορα. Δεδομένου ότι η νευρογένεση συνεχίζεται ύστερα από την απομάκρυνση της ara-C, τα νέα κύτταρα θα πρέπει να προέρχονται από κύτταρα που επιβίωσαν, όπως αστροκύτταρα. Τρίτον, αν τα νευρογλοιακά κύτταρα σημανθούν ειδικά με GFP, τότε μεταξύ των απογόνων τους περιλαμβάνονται παροδικά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα και νευρώνες που μεταναστεύουν στους οσφρητικούς λοβούς. Η σήμανση επιτυγχάνεται μετά από μόλυνση, με κατάλληλα ανασυνδυασμένο ιό της λεύκωσης των πτηνών, διαγονιδιακών ποντικών οι οποίοι εκφράζουν, στα αστροκύτταρα και στα αστροκύτταρα τύπου B, τον υποδοχέα αυτού του ιού κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *GFAP*. Ο ιός αυτός φυσιολογικά δεν είναι σε θέση να προσβάλει τον ποντικό, αλλά σε αυτό το διαγονιδιακό στέλεχος μολύνονται και σημαίνονται με την GFP ειδικά τα κύτταρα που εκφράζουν *GFAP*, δηλαδή τα φυσιολογικά αστροκύτταρα και τα αστροκύτταρα τύπου B. Τέλος, είναι δυνατόν να καλλιεργηθούν **νευροσφαίρες** (neurospheres, βλ. παρακάτω) που να περιέχουν ορισμένα από τα σημασμένα κύτταρα. Ωστόσο, δε σχηματίζονται νευροσφαίρες αν έχουν καταστραφεί όλα τα αστροκύτταρα. Αυτό είναι δυνατόν να γίνει με την επώαση των κυττάρων που προέρχονται από έναν διαγονιδιακό ποντικό ο οποίος εκφράζει το γονίδιο της κινάσης της θυμιδίνης (Thymidine kinase-TK) κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της *GFAP* σε θρεπτικό μέσο παρουσία γκανσυκλοβίρης (βλ. Κεφάλαιο 10). Τα δεδομένα που υποστηρίζουν τον ρόλο των αιμοφόρων αγγείων στη διατήρηση του μικροπεριβάλλοντος ανάπτυξης των βλαστοκυττάρων του νευρικού συστήματος έχουν προκύψει από πειράματα συγκαλλιέργειας *in vitro*. Στα πειράματα αυτά φάνηκε ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι σε θέση να διατηρήσουν την αυτοανανέωση των νευρικών βλαστοκυττάρων. Η αυτοανανέωση των νευρικών βλαστοκυττάρων διατηρείται ακόμα και αν

η κυτταρική επαφή μεταξύ των βλαστοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων παρεμποδιστεί με τη χρήση ενός **εμβόλιμου φίλτρου** (transfilter), που όμως είναι διαπερατό στις πρωτεΐνες.

Το δυναμικό μεμονωμένων βλαστοκυττάρων έχει μελετηθεί με δύο πειραματικές προσεγγίσεις. Η μία είναι η **ανάλυση κλώνων** (clonal analysis) *in vivo*, μέσω μόλυνσης των νευρικών κυττάρων με ρετροϊό ο οποίος δε διαθέτει ικανότητα αντιγραφής και εκφράζει **β-γαλακτοζιδάση** (β-galactosidase) ή **GFP**. Αν η ανάλυση κλώνων πραγματοποιηθεί σε χαμηλή πολλαπλότητα μόλυνσης, τότε τα μολυσμένα κύτταρα διαχωρίζονται ικανοποιητικά και είναι δυνατόν να θεωρηθεί ότι κάθε σημασμένη συστάδα κυττάρων αποτελεί έναν κλώνο. Τα πειράματα αυτά επιβεβαίωσαν την ακτινωτή μετανάστευση των απογόνων και έδειξαν ότι οι περισσότεροι κλώνοι περιέχουν είτε νευρώνες είτε γλοία, γεγονός που υποδεικνύει ότι η μόλυνση έγινε σε ένα παροδικά πολλαπλασιαζόμενο κύτταρο. Παρ' όλα αυτά, μικρό ποσοστό των κλώνων περιέχει τόσο νευρώνες όσο και γλοία, αποτέλεσμα που υποδεικνύει ότι το κύτταρο που σημάνθηκε αρχικά ήταν **ολιγοδύναμο** (multipotent). Μια εναλλακτική μέθοδος μελέτης περιλαμβάνει την καλλιέργεια μεμονωμένων κυττάρων *in vitro*. Σε καλλιέργειες μεμονωμένων κυττάρων από την πλευρική κοιλιική ζώνη του εγκεφαλικού φλοιού εμβρύων αρουραίου, οι περισσότεροι κλώνοι που αναπτύσσονται αποτελούνται από λίγους νευρώνες, μερικοί από λίγα νευρογλοιακά κύτταρα, ενώ το 7% περίπου σχηματίζει μεγάλους κλώνους που περιέχουν νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα. Και στους δύο τύπους πειραμάτων που μόλις περιγράφηκαν, οι μεγάλοι κλώνοι, που αποτελούνται από νευρώνες και νευρογλοιακά κύτταρα, θεωρείται ότι προκύπτουν από νευρικά βλαστοκύτταρα, ενώ οι μικροί κλώνοι ενός κυτταρικού τύπου από παροδικά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα.

Είναι γνωστό ότι διαφορετικές κατηγορίες οσφρητικών νευρώνων παράγονται από βλαστοκύτταρα που εντοπίζονται σε διακριτά τμήματα

της υποκοιλιακής ζώνης. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη τοπικής εξειδίκευσης των νευρικών βλαστοκυττάρων. Όταν ένα τμήμα της υποκοιλιακής ζώνης μεταμοσχεύεται ετεροτοπικά στον εγκέφαλο ενός νεογέννητου ζώου, οι οσφρητικοί νευρώνες που παράγονται από το μόσχευμα ανήκουν στην κατηγορία που προσδιορίζεται από τη θέση που είχε το τμήμα αυτό στον δότη και όχι από τη θέση του στον δέκτη. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η ταυτότητα των οσφρητικών νευρώνων εξαρτάται από τα αρχικά γεγονότα τοπικής εξειδίκευσης και οργάνωσης του εμπρόσθιου εγκεφάλου.

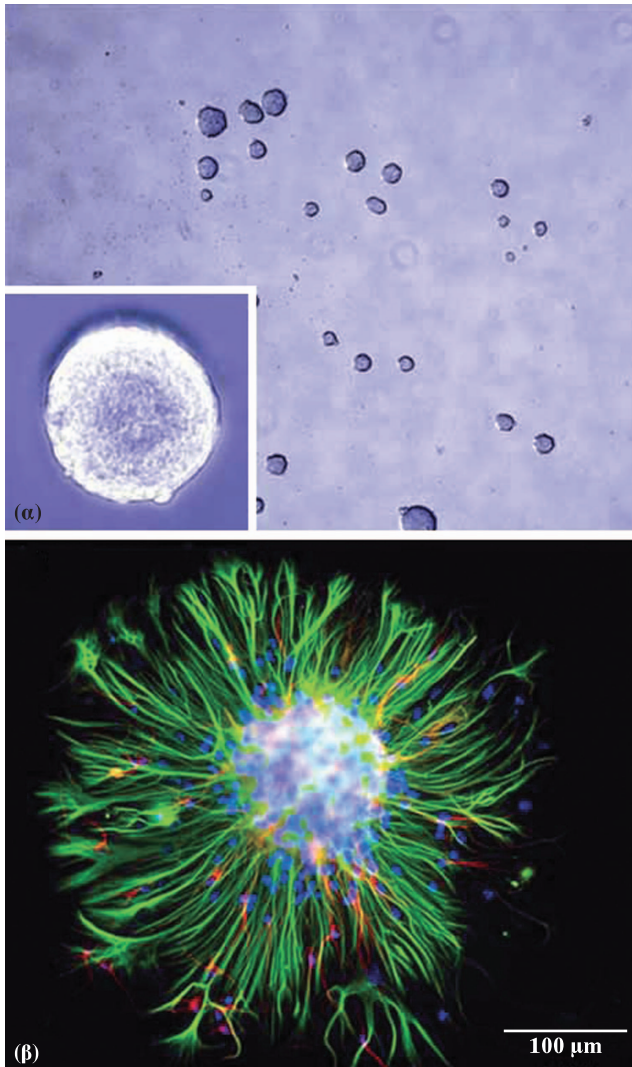
Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση που αφορά τη νευρογένεση τόσο κατά την εμβρυϊκή όσο και κατά την ενήλικη ζωή αφορά τη συχνότητα ρετρομετάθεσης, η οποία είναι πολύ υψηλότερη από αυτή που περιγράφεται για τα σωματικά κύτταρα. Φυσιολογικά το γονιδίωμα περιέχει έναν μεγάλο αριθμό στοιχείων που έχουν ομοιότητα με τους ρετροϊούς. Ένα μικρό ποσοστό αυτών αποτελεί ενεργά ρετροτρανσποζόνια. Τα στοιχεία αυτά είναι συνήθως ανενεργά λόγω μεθυλίωσης του DNA, ωστόσο περιστασιακά μεταγράφονται σε RNA και τότε, με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης του που κωδικοποιείται από το γονιδίωμά τους, συνθέτουν ένα μόριο DNA το οποίο εντίθεται σε κάποιο άλλο σημείο του γονιδιώματος. Τέτοια γεγονότα είναι δυνατόν να προκαλέσουν σωματικές μεταλλαγές ή να τροποποιήσουν τη διαφοροποίηση επηρεάζοντας την ενεργότητα των γονιδίων που εντοπίζονται κοντά στο σημείο ένθεσης. Παρότι δεν έχει αποδειχθεί, είναι πιθανό σε αυτό το φαινόμενο να οφείλονται πλευρές της προσωπικότητας και πνευματικές ικανότητες που δεν είναι κληρονομήσιμες, αλλά δεν τροποποιούνται με την εμπειρία. Με άλλα λόγια, με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν να εξηγηθούν οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ αδελφών στα αιμομικτικά στελέχη πειραματοζώων ή μεταξύ μονωικών διδύμων στον άνθρωπο.

Νευροσφαίρες

Όπως προαναφέρθηκε, «πραγματικά» βλαστοκύτταρα συναντώνται μόνο σε δύο περιοχές του ΚΝΣ, στην υποκοιλιακή ζώνη των πλευρικών κοιλιών και στην υποκοκκιδώδη ζώνη του ιπποκάμπου. Είναι όμως δυνατόν να αναπτυχθούν σε κυτταροκαλλιέργεια κύτταρα με ιδιότητες βλαστοκυττάρων προερχόμενα από πολλές άλλες περιοχές του εγκεφάλου. Αυτά τα κύτταρα σχηματίζουν δομές που καλούνται **νευροσφαίρες** (neurospheres, Εικ. 14.15). Οι νευροσφαίρες είναι συσσωματώματα κυττάρων με διάμετρο έως 0,3 mm, τα οποία μεγαλώνουν σε καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο που περιέχει επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF, Epidermal Growth Factor) και FGF ως εναιώρημα. Στις αρχικές καλλιέργειες είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε τμήμα του εμβρυϊκού ΚΝΣ και, σε πολλές περιπτώσεις, τμήματα του ΚΝΣ του ενήλικου οργανισμού στα οποία δεν παρατηρείται συνεχής πολλαπλασιασμός. Ακόμα και από τα κύτταρα του επενδύματος του νωτιαίου μυελού είναι δυνατόν να αναπτυχθούν νευροσφαίρες. Αυτό δείχθηκε με πειράματα σήμανσης με τη χρήση του συστήματος Cre στον νωτιαίο μυελό του ποντικού.

Θεωρείται ότι οι νευροσφαίρες περιέχουν έναν μικρό αριθμό νευρικών βλαστοκυττάρων, τα οποία διαθέτουν ικανότητα αυτοανανέωσης, καθώς και παροδικά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, τα οποία έχουν δυνατότητα μικρού αριθμού διαιρέσεων. Όταν οι νευροσφαίρες καλλιεργούνται σε δοχείο με επίστρωση λαμινίνης σε θρεπτικό μέσο παρουσία ορού, τότε διαφοροποιούνται σε νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα. Αν οι νευροσφαίρες αποσυγκροτηθούν σε μεμονωμένα κύτταρα, έχουν τη δυνατότητα να σχηματίσουν νέες νευροσφαίρες με ιδιότητες παρόμοιες με τις αρχικές. Έτσι, με διαδοχικούς κύκλους αποσυγκρότησης-καλλιέργειας είναι δυνατόν να παραχθούν ικανοποιητικές ποσότητες κυττάρων.

Η δυνατότητα σχηματισμού νευροσφαιρών οφείλεται στο ότι τα κύτταρα πολλές φορές συμπεριφέρονται διαφορετικά στην κυτταροκαλλιέργεια



Εικ. 14.15 Νευροσφαίρες. (α) Νευροσφαίρες σε εναιώρημα, στο ένθετο παρουσιάζεται μία νευροσφαίρα. (β) Νευροσφαίρα κατά τη διαφοροποίησή της μετά από καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο με ορό και σε δοχείο επιστρωμένο με κατάλληλο υπόστρωμα. Ανοσοφθορισμός με αντισώματα έναντι της GFAP (πράσινο) και της τουμπουλίνης β (κόκκινο). Οι πυρήνες φαίνονται με χρώμα μπλε (DAPI). Από τη δημοσίευση Marshall *et al.* (2007) *Current Pharmaceutical Biotechnology* **8**, 141-145, μετά από άδεια του εκδοτικού οίκου Bentham Science Publishers.

απ' ό,τι *in vivo*. Οι μελέτες που αναφέρονται στις νευροσφαίρες έχουν προκαλέσει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς, σε αντίθεση με τα αιμοποιητικά κύτταρα, στην περίπτωση αυτή υπάρχει δυνατότητα πολλαπλασιασμού *in vitro*, γεγονός που δημιουργεί την ελπίδα ότι κάποια στιγμή θα καταστεί δυνατό να χρησιμοποιηθούν τα συγκεκριμένα

κύτταρα σε **κυτταρικές θεραπείες** (cell therapy) για την αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών του ανθρώπου που οφείλονται σε εκτεταμένο κυτταρικό θάνατο.

Γλοιογένεση

Ο σχηματισμός των κυττάρων της γλοίας συνήθως λαμβάνει χώρα μετά τη νευρογένεση. Ορισμένα πρόδρομα κύτταρα των ολιγοδενδροκυττάρων προκύπτουν από την ακτινωτή γλοία. Επίσης, τα ίδια τα κύτταρα της ακτινωτής γλοίας διαφοροποιούνται σε αστροκύτταρα όταν ολοκληρωθεί η νευρογένεση. Η διαφοροποίηση των κυττάρων της ακτινωτής γλοίας σε αστροκύτταρα εξαρτάται από την καρδιοτροφίνη που εκκρίνεται από τους νεαρούς νευρώνες. Τα κύτταρα της γλοίας συχνά διανύουν μεγάλες αποστάσεις για να φθάσουν στις τελικές τους θέσεις.

Στον νωτιαίο μυελό τα αστροκύτταρα αναπτύσσονται από τις περιοχές p1, p2, και p3, ενώ τα ολιγοδενδροκύτταρα από το ραχιαίο τμήμα και την περιοχή pMN (Εικ. 14.9γ). Τα αστροκύτταρα από το ραχιαίο τμήμα παράγουν το καθοδηγητικό μόριο Reelin, το οποίο προσδένεται στους υποδοχείς των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών. Τα αστροκύτταρα που προκύπτουν από περιοχές που εντοπίζονται πιο κοιλιακά εκφράζουν τις πρωτεΐνες Slit, οι οποίες αναγνωρίζονται από υποδοχείς της οικογένειας Robo. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των μορίων ρυθμίζουν τη μετανάστευση των κυττάρων και την τελική τους θέση.

Η περιοχή pMN, όπως και άλλες περιοχές του νωτιαίου μυελού, αποκτούν την εξειδίκευσή τους χάρη στην έκφραση ενός συνδυασμού μεταγραφικών παραγόντων που επάγονται ως απόκριση στη διαβάθμιση συγκέντρωσης της Shh από τη νωτοχορδή και το εδαφιαίο πέταλο. Κατά τη νευρογένεση οι μεταγραφικοί παράγοντες Ngn2, Olig1 και Olig2 εκφράζονται σε αυτή την περιοχή, από την οποία αναπτύσσονται κινητικοί

νευρώνες. Κατά τα όψιμα στάδια της νευρογένεσης το γονίδιο *Ngn2* καταστέλλεται και έτσι η επικράτεια έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα *Nkx2.2* επεκτείνεται και περιλαμβάνει και την περιοχή *pMN*. Στη φάση αυτή, από την περιοχή *pMN* προκύπτουν πρόδρομα κύτταρα των ολιγοδενδροκυττάρων. Τα πρόδρομα κύτταρα των ολιγοδενδροκυττάρων είναι δίπολα κύτταρα. Το πεπρωμένο τους κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη, όπως έχει δείχθει με πειράματα σήμανσης *in vivo* με τη χρήση ρετροϊών, είναι να σχηματίσουν ολιγοδενδροκύτταρα. Ωστόσο, σε κυτταροκαλλιέργεια έχουν τη δυνατότητα να σχηματίσουν και αστροκύτταρα τύπου 2, αν καλλιεργηθούν σε θρεπτικό μέσο παρουσία του νευροτροφικού παράγοντα του ακτινωτού γαγγλίου (*CNTF*, *Ciliary Neurotrophic Factor*). Τα κύτταρα γλοίας *NG2*, τα οποία αποτελούν πρόδρομα κύτταρα των ολιγοδενδροκυττάρων και παραμένουν καθ' όλη την ενήλικη ζωή, εκφράζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες *Olig1* και *Olig2*. Πειράματα σήμανσης με τη χρήση του υποκινητή του γονιδίου *CSPG4* που κωδικοποιεί το πρωτεϊνικό τμήμα της *NG2* έδειξαν ότι στη λευκή ουσία τα κύτταρα *NG2* πολλαπλασιάζονται δίνοντας απογόνους είτε κύτταρα *NG2* είτε ολιγοδενδροκύτταρα, ενώ στη φαιά ουσία παράγουν αστροκύτταρα τύπου 2.

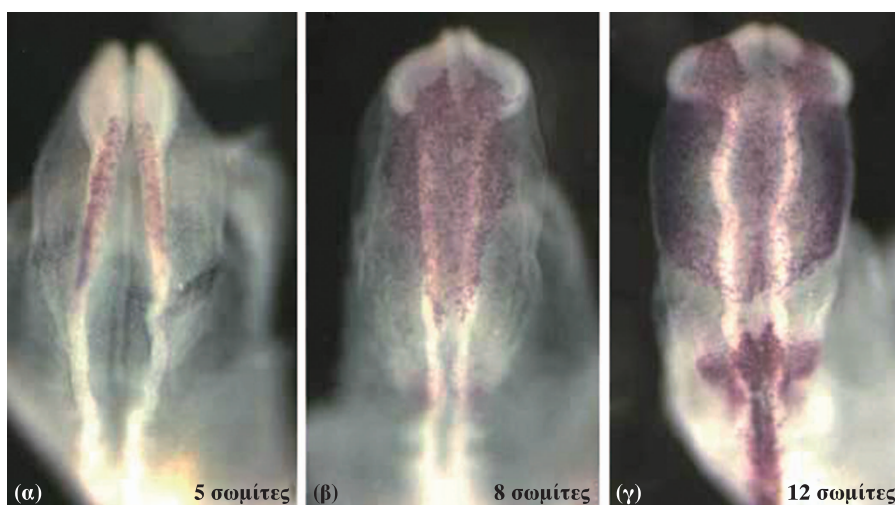
Η νευρική ακρολοφία

Η νευρική ακρολοφία (*neural crest*) αποτελεί έναν παροδικό πληθυσμό κυττάρων που αναπτύσσεται από τις νευρικές πτυχές (Εικ. 14.16). Τα κύτταρα αυτά εντοπίζονται στο ραχιαίο τμήμα του νευρικού σωλήνα τη στιγμή που αυτός κλείνει, αλλά σύντομα εγκαταλείπουν τον νευρικό σωλήνα. Από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας σχηματίζονται πολλοί διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι, οι σημαντικότεροι από τους οποίους είναι οι ακόλουθοι:

- οι νευρώνες και η γλοία των αισθητηρίων και του αυτόνομου συστήματος,
- ο μυελός των επινεφριδίων και τα κύτταρα C του θυρεοειδούς που παράγουν καλσιτονίνη,
- τα χρωμοφόρα κύτταρα (με εξαίρεση αυτά του αμφιβληστροειδούς),
- ο σκελετός του κρανίου,
- τμήμα της οδού εκροής της καρδιάς.

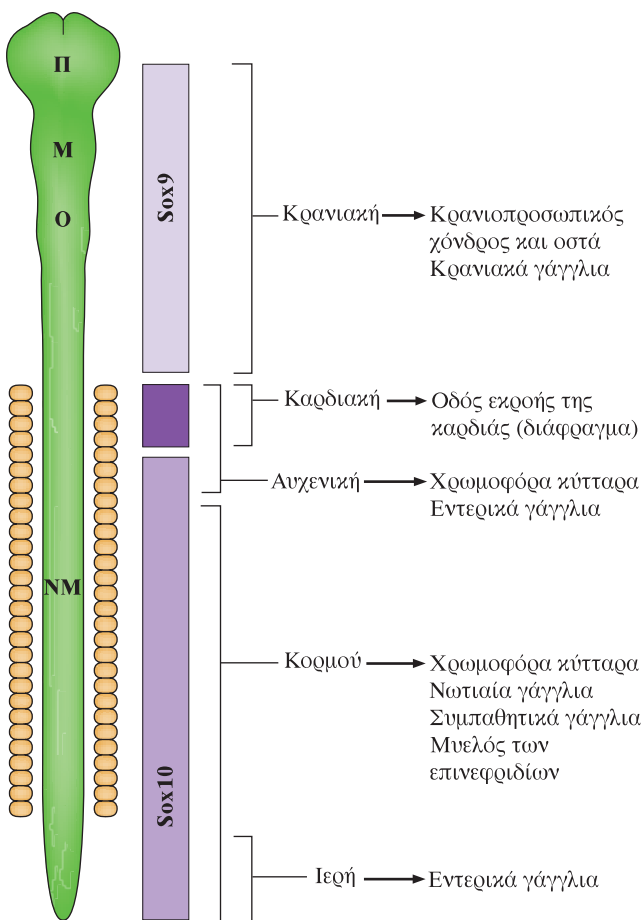
Το φυσιολογικό πεπρωμένο των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας διαπιστώθηκε με δύο τεχνικές. Η μία από αυτές συνίσταται στη μεταμόσχευση τμημάτων του νευρικού σωλήνα από έμβρυο ορτυκιού σε έμβρυο όρνιθας και στη συνέχεια στον εντοπισμό των κυττάρων του ορτυκιού σε επόμενα στάδια της ανάπτυξης. Η δεύτερη μέθοδος περιλαμβάνει τη σήμανση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας *in vivo* με εντοπισμένη

Εικ. 14.16 Η μετανάστευση της νευρικής ακρολοφίας της κεφαλής από τον νευρικό σωλήνα του εμβρύου της όρνιθας. Η ταυτοποίηση των κυττάρων έχει γίνει με υβριδοποίηση *in situ* με ιχνηθέτη τμήμα του *Sox10*. (α) Έμβρυο ηλικίας 5 σωματιτών, (β) έμβρυο ηλικίας 8 σωματιτών, (γ) έμβρυο ηλικίας 12 σωματιτών. Από τη δημοσίευση Crane & Trainor (2006) *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **22**, 267-286, μετά από άδεια του εκδοτικού οίκου Annual Reviews.



ένεση χρωστικών. Η σήμανση μπορεί να γίνει με τη χρήση εξωκυττάρων χρωστικών, όπως η **Dil**, που ενσωματώνεται στα κύτταρα μιας περιοχής, ή ενδοκυττάρων χρωστικών, όπως οι **φθορίζουσες δεξτράνες** (fluorescent dextran), οι οποίες σημαίνουν μεμονωμένα κύτταρα. Ύστερα από την ένεση το έμβρυο επωάζεται σε κατάλληλες συνθήκες και κατόπιν προσδιορίζονται η θέση και οι κυτταρικοί τύποι των σημειωμένων κυττάρων.

Σε ό,τι αφορά το πεπρωμένο των κυττάρων, τέτοιου τύπου πειράματα έχουν δείξει ότι η νευρική ακρολοφία υποδιαιρείται κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα σε διακριτά τμήματα (Εικ. 14.17). Από τη νευρική ακρολοφία της κεφαλής

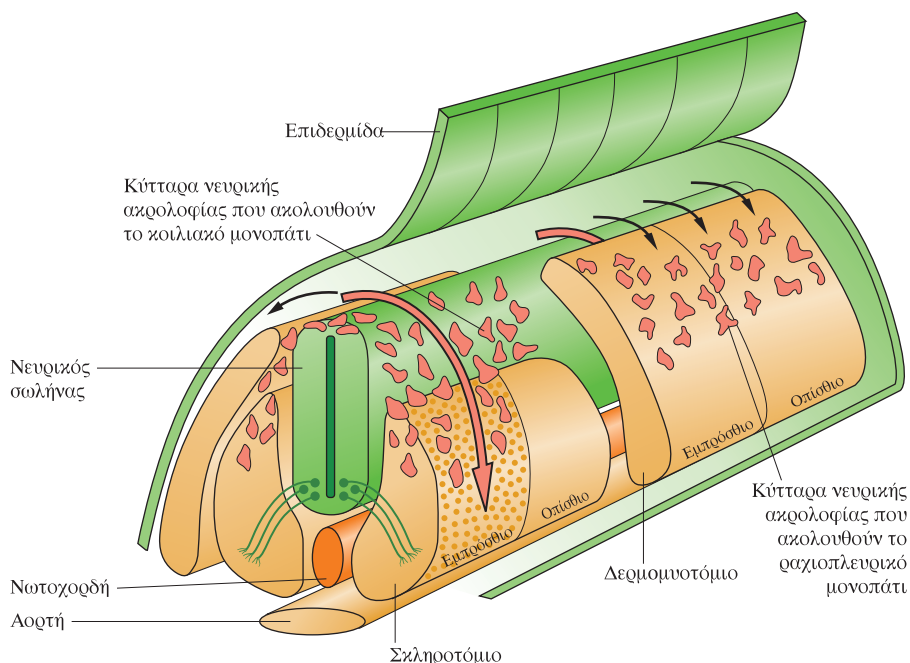


Εικ. 14.17 Χάρτης πεπρωμένου της νευρικής ακρολοφίας. Ο χάρτης έχει σχεδιαστεί βάσει των αποτελεσμάτων ορθοτοπικών μεταμοσχεύσεων ανάμεσα σε έμβρυα όρνιθας και ορτυκιού. Π: πρόσθιος εγκέφαλος, Μ: μεσεγκέφαλος, Ο: οπίσθιος εγκέφαλος, ΝΜ: νωτιαίος μυελός.

προκύπτουν πολλές διαφορετικές δομές. Αρχικά αποτελεί την πηγή του μεγαλύτερου τμήματος του μεσεγγύματος της κεφαλής. Από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας αναπτύσσεται και ένα μέρος του συνδετικού ιστού, ενώ σε μετέπειτα στάδια σχηματίζονται ο χόνδρος, ο οστίτης ιστός, τα κρανιακά γάγγλια, τα περικύτταρα, ο λείος μυϊκός ιστός των αιμοφόρων αγγείων, καθώς και οι οδοντοβλάστες (κύτταρα που σχηματίζουν οδοντίνη) των δοντιών. Η νευρική ακρολοφία του κορμού ακολουθεί δύο διακριτά μονοπάτια μετανάστευσης (Εικ. 14.18). Το ραχιαίο πλευρικό μονοπάτι περνά ανάμεσα στην επιδερμίδα και στους σωμίτες και από τα κύτταρα που το ακολουθούν προκύπτουν τα μελανοκύτταρα. Το κοιλιακό μονοπάτι διέρχεται από το σκληροτόμιο και από τα κύτταρα που το ακολουθούν προκύπτουν τα νωτιαία γάγγλια, τα συμπαθητικά γάγγλια και ο μυελός των επινεφριδίων, ενώ επίσης συνεισφέρει στην οδό εκροής της καρδιάς (καρδιακή ακρολοφία). Η μετανάστευση λαμβάνει χώρα μόνο μέσω του εμπρόσθιου ημίσεος των σκληροτομιών και σε κάθε νωτιαίο γάγγλιο συμβάλλουν κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας που έχουν μεταναστεύσει από τα σκληροτόμια που εντοπίζονται εκατέρωθέν του. Τέλος, υπάρχουν δύο περιοχές της νευρικής ακρολοφίας, η αυχενική και η ιερή, οι οποίες συνεισφέρουν κύτταρα στο εντερικό νευρικό σύστημα.

Σχηματισμός και μετανάστευση της νευρικής ακρολοφίας

Όταν σημαίνονται μεμονωμένα κύτταρα των νευρικών πτυχών, τότε στους απογόνους τους περιλαμβάνονται επιδερμικά κύτταρα, νευρικά κύτταρα ή κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας (ή συνδυασμοί αυτών των κυτταρικών τύπων). Γίνεται λοιπόν φανερό ότι δεν υπάρχει συγκεκριμένη καταβολή από την οποία αναπτύσσεται η νευρική ακρολοφία. Επομένως ο σχηματισμός της



Εικ. 14.18 Το ραχιοπλευρικό (υποδεικνύεται με μαύρα βέλη) και το κοιλιακό (υποδεικνύεται με κόκκινα βέλη) μονοπάτι της μετανάστευσης της νευρικής ακρολοφίας του κορμού.

νευρικής ακρολοφίας οφείλεται στο μικροπεριβάλλον της περιοχής στην οποία αυτή αναπτύσσεται. Αν αφαιρεθούν οι νευρικές πτυχές και το νευροεπιθήλιο ενωθεί άμεσα με την επιδερμίδα, η νευρική ακρολοφία αναπτύσσεται από τα κύτταρα που εντοπίζονται εκατέρωθεν της ένωσης, γεγονός που υποδεικνύει ότι η αλληλεπίδραση ανάμεσα στην επιδερμίδα και στο νευροεπιθήλιο οδηγεί στον σχηματισμό της νευρικής ακρολοφίας. Ο παράγοντας BMP4, που παράγεται από την επιδερμίδα, αποτελεί μέρος του επαγωγικού αυτού σήματος, αλλά ενδέχεται να μην επαρκεί για την επαγωγή της νευρικής ακρολοφίας. Πειράματα που έχουν γίνει στον *Xenopus* και στο έμβρυο της όρνιθας υποδεικνύουν ότι εκτός από τον BMP4 είναι πιθανό να απαιτούνται παράγοντες FGF και Wnt, καθώς και το ρετινοϊκό οξύ.

Στο μοριακό μονοπάτι που ενέχεται στον καθορισμό των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας παρατηρείται γενικά γραμμική αλληλουχία των γεγονότων διαφοροποίησης. Όμως, σε ορισμένες περιπτώσεις λαμβάνουν χώρα και γεγονότα ανατροφοδότησης. Η αρχική απόκριση στη σηματοδότηση BMP είναι η έκφραση δύο μεταγραφικών καταστολέων που φέρουν ομοιοεπικράτεια,

των *Msx1* και *Msx2*. Ακολουθεί η έκφραση των *Snail* και *Slug*, δύο μεταγραφικών καταστολέων που φέρουν δακτύλους ψευδαργύρου, και τέλος άλλων μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι *Sox9* και *Sox10*. Τα δεδομένα σχετικά με το μονοπάτι αυτό έχουν προκύψει από πειράματα υπερέκφρασης, καταστολής και **επίστασης** (epistasis). Στην ενότητα αυτή περιγράφονται μόνο τα αποτελέσματα των πειραμάτων στον *Xenopus*. Τα δεδομένα ωστόσο που έχουν προκύψει από πειράματα στοχευμένης αδρανοποίησης γονιδίων στον ποντικό και από πειράματα μόλυνσης με ρετροϊούς στο έμβρυο της όρνιθας συμφωνούν σε γενικές γραμμές με τα αποτελέσματα που έχουν καταγραφεί στον *Xenopus*. Στον *Xenopus* έχει παρατηρηθεί ότι η υπερέκφραση των παραγόντων *Msx1* και *Msx2* επάγει την έκφραση του γονιδίου *snail*. Η υπερέκφραση του καταστολέα *Snail* επάγει την έκφραση του γονιδίου *Sox10*, ενώ η υπερέκφραση του *Sox10* επάγει την έκφραση του γονιδίου *slug*. Όλοι αυτοί οι παράγοντες είναι σε θέση να καθοδηγήσουν τον σχηματισμό της νευρικής ακρολοφίας. Ο σχηματισμός της νευρικής ακρολοφίας παρεμποδίζεται μετά από ένεση κατάλληλα σχεδιασμένων **αντισημεινόντων ολιγονουκλεοτιδίων**

μορφολίνης (morpholinos) ή κατασκευών που έχουν δημιουργηθεί με **ανταλλαγή επικρατειών** (domain-swap) και εκφράζουν είτε επικρατείς αρνητικές μεταλλαγές οποιουδήποτε από τους προαναφερθέντες μεταγραφικούς παράγοντες, είτε καταστολείς. Η αλληλουχία γεγονότων που βασίζεται σε αυτά τα αποτελέσματα υπερέκφρασης είναι επομένως $Msx \rightarrow Snail \rightarrow Sox10 \rightarrow Slug$. Εντούτοις, υπάρχουν πολλά αποτελέσματα που δεν εξηγούνται με ένα απλό γραμμικό μονοπάτι και είναι πιθανό να υπάρχει παράλληλη λειτουργία και ανάδραση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων.

Μια επικρατής αρνητική παραλλαγή της *Slug* που επάγεται από τα γλυκοκορτικοειδή παρεμποδίζει τον σχηματισμό της νευρικής ακρολοφίας, αν η προσθήκη των γλυκοκορτικοειδών γίνει σε πρώιμα στάδια. Αν όμως η επαγωγή λάβει χώρα αργότερα, μετά τον σχηματισμό της νευρικής ακρολοφίας, τότε παρεμποδίζεται η μετανάστευση των νευρώνων. Το παραπάνω αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι η *Slug* ενέχεται σε αρκετά στάδια της ανάπτυξης της νευρικής ακρολοφίας. Ο μεταγραφικός παράγοντας *Sox10* αρχικά εκφράζεται σε ολόκληρη τη νευρική ακρολοφία, αλλά σύντομα, στην ακρολοφία της κεφαλής, αντικαθίσταται από τον μεταγραφικό παράγοντα *Sox9* (Εικ. 14.17). Ο *Sox9* διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση του χόνδρου από τα σήματα του μεσοδέρματος. Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα *Sox9* στην ανάπτυξη του χόνδρου από τη νευρική ακρολοφία αποκαλύφθηκε με ιστοειδική στοχευμένη αδρανοποίηση του γονιδίου *Sox9* στον ποντικό. Σε έμβρυα με γονότυπο *Wnt1-cre x floxed Sox9* (*Sox9* εμβόλιμο σε θέσεις *lox*) η ρεκομπινάση **Cre** εκφράζεται στον νευρικό σωλήνα (κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του *wnt1*), αλλά όχι και στο μεσόδερμα. Η Cre αναγνωρίζει τις θέσεις *loxP* και επομένως στα κύτταρα του νευρικού σωλήνα λαμβάνει χώρα ο ανασυνδυασμός που οδηγεί στη στοχευμένη αδρανοποίηση του *Sox9*. Σε έμβρυα από τα οποία απουσιάζει από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας ο

μεταγραφικός παράγοντας *Sox9* καταστέλλεται ο σχηματισμός του σκελετού του κρανίου, χωρίς όμως να επηρεάζεται ο σκελετός του κορμού. Ο παράγοντας *Snail* καταστέλλει την έκφραση της καδερίνης E, ενός μορίου κυτταρικής συνάφειας, καθώς και άλλων μορίων που αποτελούν στοιχεία των στενοσυνδέσμων, διευκολύνοντας την επιθηλιομεσεγγυματική μετάπτωση που προηγείται της μετανάστευσης.

Η μετανάστευση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας εξαρτάται από πολλά διαφορετικά στοιχεία του εξωκυττάρου στρώματος και από την έκφραση πρωτεασών, συμπεριλαμβανομένων των μεταλλοπρωτεασών και των πρωτεασών ADAM που διευκολύνουν τη διείσδυση του στρώματος από τα κύτταρα. Η μετανάστευση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας είναι δυνατόν να παρεμποδιστεί από εξουδετερωτικά αντισώματα (neutralizing antibodies) που έχουν παρασκευαστεί έναντι διάφορων μορίων που συναντώνται στο εξωκυττάριο στρώμα, όπως είναι η φιμπρονεκτίνη ή η λαμινίνη. *In vivo*, η μετανάστευση της ακρολοφίας του κορμού κατά μήκος του κοιλιακού μονοπατιού παρεμποδίζεται ειδικά από το οπίσθιο σκληροτόμιο, γεγονός που συμβάλλει στην καθοδήγηση των κυττάρων αυτών στο μονοπάτι μετανάστευσης μέσω του πρόσθιου σκληροτομίου. Τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας εκφράζουν *EphB3*, ενώ το οπίσθιο σκληροτόμιο εκφράζει εφρίνη B1 και B2. Η αλληλεπίδραση του υποδοχέα *EphB3* με την εφρίνη B1 και B2 έχει ως αποτέλεσμα την απώθηση των κυττάρων, λόγω της αποσυγκρότησης των προεκβολών τους μόλις έρθουν σε επαφή με τη μεμβράνη που φέρει τις εφρίνες B1 και B2. Η αποσυγκρότηση οφείλεται στον αποπολυμερισμό της ακτίνης, ο οποίος προκαλείται από την ενεργοποίηση του *EphB3* και διεκπεραιώνεται από το σύστημα της GTPάσης Rho (βλ. Παράρτημα). Η προσθήκη ενός καταστολέα των εφρινών σε έμβρυα όρνιθας επιτρέπει στα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας να μεταναστεύσουν

τόσο μέσω του οπίσθιου όσο και μέσω του πρόσθιου σκληροτομίου. Στα ρομβομερή 3 και 5 του οπίσθιου εγκεφάλου η μετανάστευση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας καταστέλλεται και από το σύστημα Eph-εφρινών.

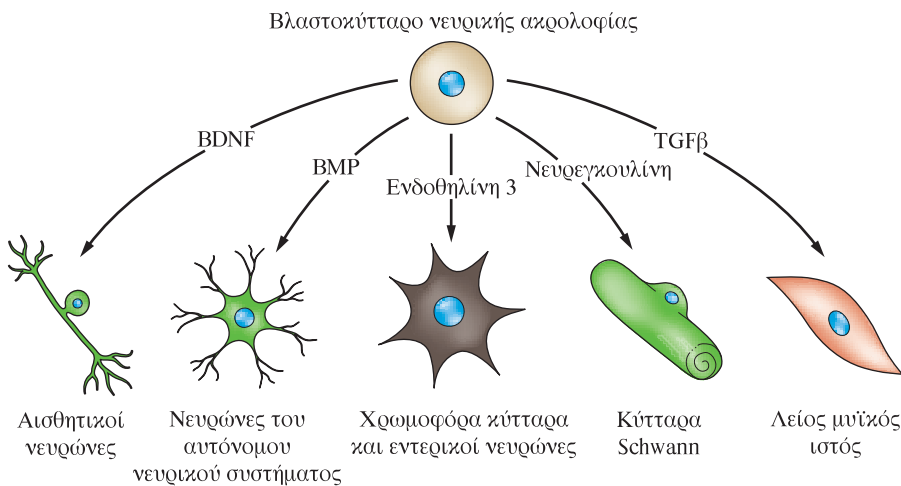
Δέσμευση και διαφοροποίηση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας

Η δέσμευση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας έχει μελετηθεί με πειράματα μεταμόσχευσης τμημάτων του νευρικού σωλήνα και επακόλουθη ανάλυση του πεπρωμένου των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας που αναπτύσσονται από το μόσχευμα. Στα ανώτερα σπονδυλωτά, τα πειράματα αυτά έχουν δείξει ότι η διάκριση ανάμεσα στην ακρολοφία της κεφαλής και στην ακρολοφία του κορμού αναπτύσσεται σε πρώιμα στάδια, καθώς ορισμένοι κυτταρικοί τύποι, όπως, για παράδειγμα, σκελετικοί ιστοί, σχηματίζονται μόνο από την ακρολοφία της κεφαλής. Από την ακρολοφία του κορμού δεν αναπτύσσεται χόνδρος ακόμη και όταν τμήματά της μεταμοσχευθούν στον νευρικό σωλήνα της κεφαλής. Αντίθετα, η ακρολοφία της κεφαλής συμβάλλει στον σχηματισμό σκελετικών δομών του σώματος μετά από μεταμόσχευσή της στον κορμό, όπου σχηματίζει διάφορους νευρικούς τύπους του κορμού. Παρ' όλα αυτά, τα κύτταρα της ακρολοφίας του κορμού είναι δυνατόν να σχηματίσουν χόνδρο, αν η μεταμόσχευσή του πραγματοποιηθεί στις καταβολές του προσώπου και όχι στον οπίσθιο εγκέφαλο. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η διάκριση είναι πιθανό να σχετίζεται περισσότερο με τη δυνατότητα μετανάστευσης των κυττάρων παρά με τη δεκτικότητά τους. Γενικά, από κάθε τμήμα της νευρικής ακρολοφίας είναι δυνατόν να αναπτυχθούν παρασυμπαθητικά, συμπαθητικά και αισθητικά γάγγλια, αν η περιοχή αυτή μεταμοσχευθεί στην κατάλληλη θέση κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα. Για παράδειγμα, η

αυχενική ακρολοφία σε φυσιολογική κατάσταση παράγει χολινεργικούς (παρασυμπαθητικούς) νευρώνες και η θωρακική ακρολοφία αδρενεργικούς (συμπαθητικούς) νευρώνες. Αν όμως γίνει ανταλλαγή ανάμεσα σε αυτές τις περιοχές, οι κυτταρικοί τύποι που σχηματίζονται είναι ανάλογοι της νέας θέσης του μοσχεύματος.

Η σήμανση μεμονωμένων κυττάρων *in vivo* με μικροένεση ή μετά από μόλυνση με ρετροϊό έδειξε ότι τα κύτταρα που εγκαταλείπουν σε πρώιμα στάδια τον νευρικό σωλήνα ενδέχεται να είναι **ολιγοδύναμα** (multipotent), καθώς ορισμένοι σημασμένοι κλώνοι περιλαμβάνουν αρκετούς κυτταρικούς τύπους, όπως αισθητικούς νευρώνες, χρωμοφόρα κύτταρα, κύτταρα μυελού επινεφριδίων και νευρογλοιακά κύτταρα. Από τα κύτταρα που εγκαταλείπουν τον νευρικό σωλήνα σε όψιμα στάδια προκύπτουν συνήθως κύτταρα τα οποία ανήκουν σε έναν κυτταρικό τύπο, για παράδειγμα τα κύτταρα που ακολουθούν το ραχιοπλευρικό μονοπάτι και τα οποία διαφοροποιούνται σε μελανοκύτταρα. Ωστόσο, η διαφοροποίηση ενός πληθυσμού σε έναν μόνο τύπο κυττάρων κατά την ανάπτυξη δεν αποδεικνύει ότι το κύτταρο που ενέθηκε δεν είχε το δυναμικό να σχηματίσει άλλους κυτταρικούς τύπους (βλ. ανάλυση κλώνων, Κεφάλαιο 4). Προκειμένου να αποδειχθεί κάτι τέτοιο, θα πρέπει ναδειχθεί ότι σε πρώιμα στάδια τα κύτταρα των κλώνων εκτέθηκαν σε μεγάλο εύρος διαφορετικών περιβαλλόντων.

Η τελική διαφοροποίηση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας εξαρτάται σε αρκετές περιπτώσεις από το περιβάλλον μέσω του οποίου μεταναστεύουν (Εικ. 14.19). Για παράδειγμα, ο σχηματισμός των νωτιαίων γαγγλίων εξαρτάται από την έκθεση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας στον προερχόμενο από τον εγκέφαλο νευροτροφικό παράγοντα BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), ο οποίος παράγεται από τον νευρικό σωλήνα. Αν παρεμποδιστεί με ένα αδιαπέραστο φίλτρο η επαφή της νευρικής



Ειγ. 14.19 Τα συνήθη μονοπάτια διαφοροποίησης των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας του κορμού μετά από έκθεση σε διάφορους επαγωγικούς παράγοντες.

ακρολοφίας με τον νευρικό σωλήνα, τότε δε σχηματίζονται νωτιαία γάγγλια. Ωστόσο, νωτιαία γάγγλια σχηματίζονται αν τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας εκτεθούν σε καθαρό παράγοντα BDNF. Σε ποντικούς από τους οποίους απουσιάζει ο νευροτροφικός παράγοντας BDNF δε σχηματίζονται νωτιαία γάγγλια. Η μεταμερική οργάνωση των νωτιαίων γαγγλίων δεν αποτελεί απλώς το αποτέλεσμα της μεταναστευτικής τους πορείας και του αποκλεισμού τους από το οπίσθιο σκληροτόμιο, αφού ακόμα και αν εξαλειφθεί η απώθηση που ασκείται στα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας το πρότυπο παραμένει. Η μεταμερική οργάνωση των νωτιαίων γαγγλίων εξαρτάται από το μονοπάτι των σεμαφορινών, καθώς απουσία των υποδοχέων τους *Neuropilin 1* και *Neuropilin 2* παρεμποδίζει τον μεταμερισμό.

Το κατά πόσον από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας θα σχηματιστούν αυτόνομοι νευρώνες, γλοία ή λείος μυϊκός ιστός επίσης εξαρτάται από περιβαλλοντικά σήματα. Κύτταρα νευρικής ακρολοφίας του κορμού σε καλλιέργεια σχηματίζουν κατά προτίμηση **κύτταρα Schwann** (Schwann cells) όταν εκτεθούν σε νευρεγκουλίνη (παράγοντας ανάπτυξης κυττάρων της γλοίας), λείο μυϊκό ιστό όταν εκτεθούν σε TGFβ και αυτόνομους νευρώνες όταν εκτεθούν σε BMP2 ή BMP4. Οι επιδράσεις αυτές είναι κυρίως **καθοδηγητικές** (instructive) επαγωγικές αλληλεπιδράσεις,

παρόλο που οι συγκεκριμένοι παράγοντες ενδέχεται να ενέχονται και στην επιβίωση των κυττάρων. Οι παράγοντες αυτοί εκφράζονται σε περιοχές του εμβρύου από τις οποίες διέρχονται τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας καθώς μεταναστεύουν: η νευρεγκουλίνη στα έλυτρα των νευραξόνων, ο TGFβ στα κύρια αγγεία εκροής της καρδιάς και οι BMP2 και BMP4 στη ραχιαία αορτή και στο έντερο. Ποντικοί στους οποίους έχει γίνει στοχευμένη αδρανοποίηση των γονιδίων αυτών παρουσιάζουν τους προβλεπόμενους φαινοτύπους. Για παράδειγμα, η στοχευμένη αδρανοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί τη νευρεγκουλίνη (*Nrg*) προκαλεί μείωση του αριθμού των κυττάρων Schwann, ενώ η στοχευμένη αδρανοποίηση γονιδίων της οικογένειας TGFβ επηρεάζει την ανάπτυξη της καρδιάς. Οι αυτόνομοι νευρώνες εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα *Mash1*, που ανήκει στις πρωτεΐνες bHLH, οι οποίες είναι ομόλογες μελών της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων AC-S στην *Drosophila*. Η στοχευμένη αδρανοποίηση του γονιδίου *Mash1* έχει ως αποτέλεσμα την έλλειψη των περισσότερων αυτόνομων νευρώνων. Η δέσμευση των κυττάρων για τον σχηματισμό των χρωμοφόρων κυττάρων και των εντερικών γαγγλίων εξαρτάται από τον επαγωγικό παράγοντα Ενδοθηλίνη 3. Ποντικοί από τους οποίους απουσιάζει η Ενδοθηλίνη 3 ή ο υποδοχέας της

στερούνται των χρωμοφόρων κυττάρων και των εντερικών γαγγλίων. Η Ενδοθελίνη 3 απαιτείται κατά το χρονικό διάστημα ανάμεσα στην E9,5 και στην E12,5, όπως έχει δειχθεί μέσω της ανάλυσης διαγονιδιακών στελεχών ποντικών στα οποία η έκφραση του υποδοχέα επάγεται σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης.

Υπάρχουν ωστόσο και άλλα πειράματα στα οποία έχει δειχθεί ότι τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας διαφοροποιούνται προς έναν μόνο κυτταρικό τύπο ακόμη και όταν εκτίθενται σε πολλές διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι υπάρχει και ένα στοιχείο αυτόνομης δέσμευσης σε συγκεκριμένα πεπρωμένα που συμβαίνει προοδευτικά σε βάθος χρόνου.

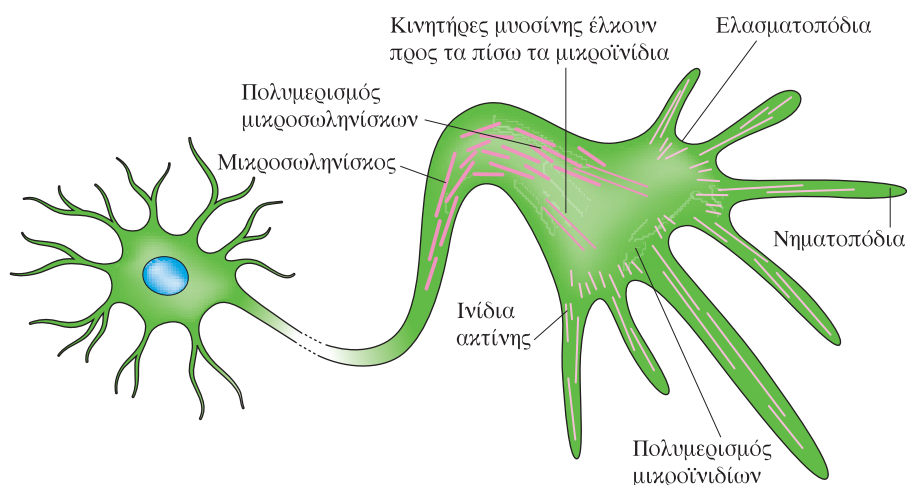
Ανάπτυξη των νευρικών δικτύων

Ο αυξητικός κώνος

Οι άξονες είναι αποφυάδες οι οποίες εκτείνονται από το κυτταρικό σώμα των νευρώνων και νευρώνουν τους στόχους τους. Οι κινητικοί νευρώνες στο κοιλιακό τμήμα του νωτιαίου μυελού νευρώνουν μυς ή αδένες, ενώ οι αισθητικοί νευρώνες στα νωτιαία γάγγλια νευρώνουν πολλούς διαφορετικούς περιφερικούς υποδοχείς και αισθητήρια

όργανα. Το τελικό πρότυπο των συνδέσεων παρουσιάζει εξαιρετικά υψηλή πολυπλοκότητα. Πώς επιτυγχάνεται η καθοδήγηση των νευραξόνων στους στόχους τους; Στην πραγματικότητα, υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί ιεραρχικά οργανωμένοι οι οποίοι ελέγχουν την ειδικότητα των συνδέσεων. Καθένας από αυτούς τους μηχανισμούς χαρακτηρίζεται από αρκετά χαμηλή ειδικότητα, ωστόσο όλοι μαζί εξασφαλίζουν τον σχηματισμό ενός δικτύου συνδέσεων το οποίο χαρακτηρίζεται από μεγάλη ακρίβεια.

Κάθε αναπτυσσόμενος νευράξονας έχει στο άκρο του τον **αυξητικό κώνο** (growth cone, Εικ. 14.20), μία δομή που μοιάζει κατά κάποιον τρόπο με έναν ινοβλάστη που μεταναστεύει. Καθώς έρπει ενεργά πάνω στο υπόστρωμα, ο αυξητικός κώνος εκτείνει και αποσύρει διαρκώς **νηματοπόδια** (filopodia). Ο κυτταροσκελετός του αυξητικού κώνου βρίσκεται σε δυναμική σταθερή κατάσταση. Τα **ελασματοπόδια** (lamellipodia) και τα νηματοπόδια οργανώνονται γύρω από μικροϊνίδια τα οποία επιμηκύνονται συνεχώς στα εξωτερικά (συν) τους άκρα, ενώ συγχρόνως τα ινίδια οπισθοδρομούν σε μία κεντρική εκπολωμένη περιοχή μέσω **κινητήριων πρωτεϊνών** (motor proteins) τύπου μυοσίνης. Στην περιοχή του αυξητικού κώνου τερματίζουν οι δέσμες μικροσωληνίσκων που διατηρούν τη δομή του νευράξονα. Ερεθίσματα που προκαλούν προέλαση του αυξητικού



Εικ. 14.20 Ένας αυξητικός κώνος στο άκρο ενός αναπτυσσόμενου νευράξονα.

κώνου αυξάνουν τον ρυθμό πολυμερισμού της ακτίνης, μειώνουν την ενεργότητα των κινητήριων πρωτεϊνών και προκαλούν επιμήκυνση των μικροσωληνίσκων. Καθώς προχωρά λοιπόν ο αυξητικός κώνος, ο νευράξονας επιμηκώνεται. Το κυτταρικό σώμα και ο κεντρικός νευράξονας δε μετακινούνται, αλλά απαιτούνται για τη διαδικασία επιμήκυνσης του νευράξονα, καθώς σε αυτές τις περιοχές του κυττάρου επιτελείται κατά κύριο λόγο η σύνθεση των νέων υλικών που χρειάζονται για την επέκταση.

Λόγω του σχετικά μεγάλου μεγέθους του αυξητικού κώνου, είναι δυνατόν διαφορετικά τμήματά του να εκτίθενται σε διαφορετικά σήματα, με αποτέλεσμα ένα μονόπλευρο ερέθισμα να προκαλεί αλλαγή στην κατεύθυνση της αύξησής του. Το αποτέλεσμα είναι είτε ένας τοπικός αποπολυμερισμός των μικροϊνιδίων και απομάκρυνση του κώνου ή τοπική σταθεροποίηση και επέκταση προς το σήμα. Οι υποδοχείς που αναγνωρίζουν τα σήματα του περιβάλλοντος προκαλούν αλλαγές στον κυτταροσκελετό μέσω της δράσης των μικρών πρωτεϊνών ανταλλαγής GTP. Η RhoA προκαλεί αποσυγκρότηση του αυξητικού κώνου στην ενεργή μορφή της, αλλά οι ενεργοί Rac και Cdc42 προάγουν την επιμήκυνση του νευράξονα.

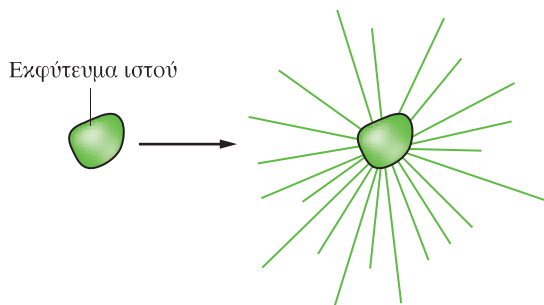
Οι νευροτροφίνες (neurotrophins) είναι εξωκυττάριοι παράγοντες που προάγουν ισχυρά την επέκταση των νευραξόνων. Στην οικογένεια των νευροτροφινών περιλαμβάνονται ο νευρικός αυξητικός παράγοντας (NGF, Nerve Growth Factor), ο νευροτροφικός παράγοντας που απομονώνεται από τον εγκέφαλο (BDNF, Brain Derived Neurotrophic Factor), η νευροτροφίνη 3 (NT3, Neurotrophin 3) και η νευροτροφίνη 4/5 (NT4/5, Neurotrophin 4/5). Οι υποδοχείς των νευροτροφινών, οι οποίοι ονομάζονται πρωτεΐνες Trk (προφέρεται «τρακ»), είναι υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης. Ο παράγοντας NGF προσδένεται κυρίως στον υποδοχέα TrkA, παρέχοντας έτσι κάποια ειδικότητα στο σύστημα. Όλες οι νευροτροφίνες προσδένονται επίσης σε έναν

υποδοχέα με τον οποίο έχουν χαμηλότερη συγγένεια απ' ό,τι με τους υποδοχείς Trk, τον υποδοχέα p75. Ο p75 χαρακτηρίζεται από τονική λειτουργία ενεργοποίησης της RhoA. Παρουσία όμως νευροτροφίνης, η ενεργοποίηση της RhoA σταματά, επιτρέποντας την επιμήκυνση του αυξητικού κώνου. Επιπλέον, πρωτεΐνες του εξωκυττάριου στρώματος, όπως η φιβρονεκτίνη και η λαμινίνη, παρέχουν συχνά ένα περιβάλλον επιτρεπτικό για την επιμήκυνση. Οι νευροτροφίνες είναι παράγοντες που υποστηρίζουν την επιβίωση των νευρώνων, αν εκτεθεί σε αυτές μόνο κυτταρικό σώμα. Για να πραγματοποιηθεί όμως η επέκταση των νευραξόνων, θα πρέπει να εκτεθεί σε αυτές ο αυξητικός κώνος. Τέλος, θεωρείται ότι σε ορισμένες περιπτώσεις ενδοκυττάρια κυστίδια τα οποία περιέχουν ενεργούς υποδοχείς μεταφέρονται στο κυτταρικό σώμα μέσω ανάδρομης νευροξονικής μεταφοράς, προκειμένου να ρυθμίσουν τη γονιδιακή έκφραση.

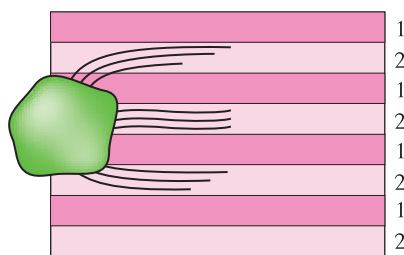
Καθοδηγητικά μόρια

Ορισμένα μόρια διευκολύνουν την καθοδήγηση των νευραξόνων, ενώ άλλα δρουν ανταγωνιστικά. Τα μόρια που ευθύνονται για την καθοδήγηση των νευραξόνων στους στόχους τους καλούνται καθοδηγητικά. Με βάση τη δράση τους (έλξη-άπωση) αλλά και τον τρόπο με τον οποίο την ασκούν (εξ αποστάσεως ή εξ επαφής), τα καθοδηγητικά μόρια διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες: μόρια που ευθύνονται για την έλξη εξ επαφής, μόρια που ευθύνονται για την άπωση εξ επαφής, μόρια που ευθύνονται για την έλξη εξ αποστάσεως και μόρια που ευθύνονται για την άπωση εξ αποστάσεως. Παλαιότερα καθεμιά από αυτές τις κατηγορίες συσχετιζόταν με μια ομάδα καθοδηγητικών μορίων, σήμερα όμως έχει γίνει αντιληπτό ότι το ίδιο μόριο μπορεί να δρα σε μερικές περιπτώσεις ως ελκτικό και σε άλλες ως απωθητικό. Η αναγνώριση παραγόντων που

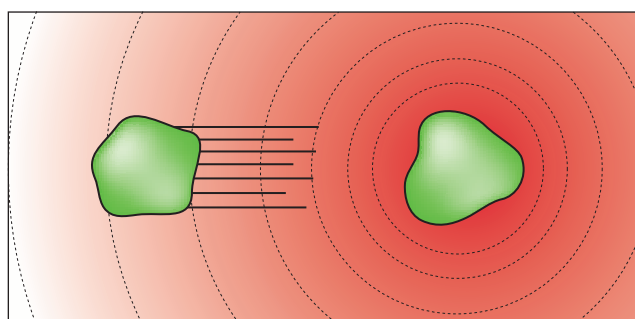
ενέχονται στην καθοδήγηση των νευραξόνων βασίζεται κυρίως στη χρήση δοκιμασιών *in vitro* (Εικ. 14.21). Μια απλή μέθοδος που ακολουθείται για τα μόρια που δρουν εξ επαφής περιλαμβάνει την επίστρωσή τους σε ένα τρυβλίο, στο οποίο στη συνέχεια καλλιεργείται ένα εκφύτευμα του νευρικού σωλήνα και μελετάται η επέκταση των



(α) Δοκιμασία ανάπτυξης νευραξόνων



(β) Δοκιμασία ανταγωνισμού



(γ) Δοκιμασία χημειοτροπισμού

Εικ. 14.21 Δοκιμές έλξης και άπωσης. (α) Απλή δοκιμή ανάπτυξης νευραξόνων μετά από επίστρωση ενός εκφυτεύματος ιστού σε μια επιφάνεια ή μετά από επεξεργασία του με επαγωγικούς παράγοντες. (β) Δοκιμή λωρίδων. Δύο υποστρώματα, τα 1 και 2, επιστρώνονται εναλλασσόμενα σε λωρίδες. Οι νευράξονες που εκτείνονται από το εκφύτευμα επιλέγουν ανάμεσα στα υποστρώματα 1 και 2. (γ) Δοκιμασία χημειοτροπισμού. Οι νευράξονες από ένα εκφύτευμα εκτείνονται προς το δεύτερο εκφύτευμα, το οποίο παράγει μια χημειοτροπική ουσία.

νευραξόνων του. Μια πιο ευαίσθητη δοκιμασία είναι η δοκιμή λωρίδων (stripe assay, Εικ. 14.21β). Η δοκιμή λωρίδων παρέχει στους νευράξονες τη δυνατότητα επιλογής ανάμεσα σε εναλλακτικά υποστρώματα, κάτι που φυσιολογικά συμβαίνει κατά την ανάπτυξή τους, μιας και οι αυξητικοί κώνοι *in vivo* εκτίθενται συνεχώς σε διαφορετικά περιβάλλοντα και επιλέγουν την κατεύθυνση επέκτασής τους. Οι εφρίνες, για παράδειγμα, είναι μόρια με ενεργότητα άπωσης εξ επαφής, τα οποία απομονώθηκαν από το τετράδυμο με χρήση της συγκεκριμένης δοκιμής. Για παράγοντες που δρουν εξ αποστάσεως είναι απαραίτητο να αποδειχθεί ότι είναι διαχυτοί και ότι οι αυξητικοί κώνοι είναι σε θέση να αποκρίθουν διαφορεικά σε διαβάθμιση συγκέντρωσής τους. Προκειμένου να διερευνηθεί κατά πόσον ένα καθοδηγητικό μόριο δρα εξ αποστάσεως, τοποθετούνται σε απόσταση, ακινητοποιημένα σε ένα πήκτωμα κολλαγόνου, δύο εκφυτεύματα: το ένα εκφύτευμα περιέχει τους νευρώνες με τους αναπτυσσόμενους νευράξονες, ενώ το άλλο παράγει το υπό μελέτη μόριο (Εικ. 14.21γ). Αν αναπτυχθούν νευράξονες προς το εκφύτευμα που παράγει το υπό μελέτη μόριο, τότε συνάγεται ότι αυτό δρα ως χημειοτροπική ουσία μακράς εμβέλειας. Μία αναμφισβήτητη απόδειξη για την ύπαρξη χημειοτροπισμού είναι η αλλαγή της κατεύθυνσης στην οποία επεκτείνονται οι νευράξονες μετά από μετακίνηση της πηγής.

Στους ελκτικούς παράγοντες εξ επαφής περιλαμβάνονται συστατικά του εξωκυττάριου στρώματος, όπως η λαμινίνη και η φιμπρονεκτίνη, καθώς και μόρια συνάφειας μεταξύ νευρώνων, όπως τα N-CAM, NgCAM και καδερίνη N. Στους παράγοντες άπωσης εξ επαφής περιλαμβάνονται οι εφρίνες (ephrins), που προσδένονται σε υποδοχείς της οικογένειας Eph, και ορισμένα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, όπως η τενασίνη (tenascin). Τα καθοδηγητικά μόρια που δρουν εξ αποστάσεως είναι οι νετρίνες (netrins), που είναι διαχυτοί εξωκυττάριοι παράγοντες οι

οποίοι σχετίζονται με τη λαμινίνη, οι σεμαφορίνες (semaphorins) και οι πρωτεΐνες Slit. Συνήθως οι νετρίνες δρουν ελκτικά, ενώ οι σεμαφορίνες και οι πρωτεΐνες Slit δρουν απωθητικά, ωστόσο αυτό εξαρτάται από τη δεκτικότητα των κυτταρικών πληθυσμών. Οι υποδοχείς των νετρινών καλούνται DCC (Deleted in Colon Carcinoma – εξαλειφθέν στον καρκίνο του εντέρου), οι υποδοχείς των σεμαφορινών ονομάζονται νευροπιλίνες (neuropilins) και πλεξίνες (plexins) και οι υποδοχείς των πρωτεΐνων Slit ονομάζονται Robo (και κωδικοποιούνται από γονίδια ομόλογα του *roundabout* της *Drosophila*). Παρόλο που ορισμένες σεμαφορίνες εκκρίνονται και δρουν εξ αποστάσεως, ορισμένες άλλες είναι διαμεμβρανικά μόρια βραχείας εμβέλειας που δρουν μέσω κυτταρικής επαφής.

Εκτός από τα προαναφερθέντα εξειδικευμένα για το νευρικό σύστημα καθοδηγητικά μόρια, άλλοι επαγωγικοί παράγοντες που συμμετέχουν σε πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες, όπως οι παράγοντες FGF, BMP, Hh, και Wnt, συμμετέχουν στην επέκταση και καθοδήγηση των νευραξόνων.

Μονοπάτια μεταγωγής σήματος στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα

Μελέτες των μονοπατιών που ακολουθούν οι αναπτυσσόμενοι νευράξονες έχουν γίνει κυρίως στις περιοχές των άκρων όπου τα νωτιαία νεύρα ενώνονται στο **βραχιόνιο** (brachial) ή στο **οσφυοϊερό πλέγμα** (lumbosacral plexus) και στη συνέχεια διακλαδίζονται εκ νέου, σχηματίζοντας τα κύρια νεύρα που νευρώνουν τα άκρα. Τα νωτιαία νεύρα που νευρώνουν τα οπίσθια άκρα εκτείνονται αρχικά στο εμπρόσθιο ραχιαίο τμήμα του σκληροτομίου, το οποίο περιβάλλει τον νευρικό σωλήνα. Τα κύτταρα του κοιλιακού οπίσθιου τμήματος του σκληροτομίου φέρουν στην επιφάνειά τους έναν παράγοντα που δρα απωθητικά, παρεμποδίζοντας την επέκταση των νευραξόνων στην περιοχή αυτή

(όπως συμβαίνει και με τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας). Το μεσέγγυμα της περιοχής του οσφυοϊερού πλέγματος αποτελεί περιβάλλον επιτρεπτικό για την επέκταση των νευραξόνων, οι οποίοι όμως υποχρεούνται να διέλθουν από δύο οπές που εντοπίζονται στην αναπτυσσόμενη πυελική ζώνη. Αν με πειραματικούς χειρισμούς δημιουργηθούν περισσότερες από δύο οπές, τότε οι νευράξονες θα διέλθουν από αυτές. Σε περίπτωση που ένα τμήμα του νευρικού σωλήνα περιστραφεί ή μετατοπιστεί λίγο, οι νευράξονες εντοπίζουν τους φυσιολογικούς στόχους τους. Αν ωστόσο η μετατόπιση είναι μεγάλη, τότε στο άκρο αυτό επεκτείνονται άξονες οι οποίοι φυσιολογικά θα καθοδηγούνταν σε άλλες περιοχές, σχηματίζοντας τελικά ένα σχεδόν φυσιολογικό πρότυπο νεύρωσης. Τα παραπάνω πειράματα υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός γενικού επιπέδου ελέγχου που συνίσταται στην παρουσία μονοπατιών στα οποία είναι δυνατόν να επεκταθούν όλοι οι νευράξονες. Τα μονοπάτια αυτά χαρακτηρίζονται από την απουσία ειδικών για τους νευράξονες μορίων, είναι περιοχές πλούσιες σε κατάλληλα υποστρώματα, όπως η λαμινίνη, ή, τέλος, αποτελούν περιοχές από τις οποίες απουσιάζουν παράγοντες που απωθούν τους νευράξονες.

Οι πιο λεπτομερείς μελέτες σε αυτό το επίπεδο έχουν γίνει σε έντομα, κυρίως στην ακρίδα και δευτερευόντως στην *Drosophila*. Όμως, ανάμεσα στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος των σπονδυλωτών και σε αυτήν των ασπόνδυλων υπάρχει μια σημαντική διαφορά. Στα σπονδυλωτά οι περισσότεροι νευρώνες αναπτύσσονται στο ΚΝΣ και χορηγούν νευράξονες προς τα περιφερικά όργανα, ενώ στα έντομα οι περισσότεροι νευρώνες εμφανίζονται στα περιφερικά όργανα, από όπου εκτείνουν νευράξονες στο ΚΝΣ. Μελέτες οι οποίες έχουν γίνει για την ανάπτυξη αυτών των μονοπατιών στα έντομα δείχνουν ότι το κάθε μονοπάτι χωρίζεται σε μικρά επιμέρους τμήματα, μήκους 100 μm περίπου. Οι νευράξονες επεκτείνονται κατά μήκος αυτών των τμημάτων και, όταν

Κλασικά Πειράματα

Εξειδίκευση των νευρικών συνδέσεων

Kennedy, T.E., Serafini, T., Delatorre, J.R. & Tessier-Lavigne, M. (1994) Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* **78**, 425-435.

Η δημοσίευση αυτή σηματοδοτεί την αποκάλυψη ενός καθοδηγητικού μορίου που ελέγχει την κατεύθυνση και την επιμήκυνση των νευραξόνων.

Drescher, U., Kremoser, C., Handwerker, C., Loschinger, J., Noda, M. & Bonhoeffer, F. (1995) In-vitro guidance of retinal ganglion-cell axons by RAGS, a 25 kda tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* **82**, 359-370.

Στη δημοσίευση αυτή περιγράφηκε για πρώτη φορά η απομόνωση ενός μορίου που ενέχεται στην εξειδίκευση των συνδέσεων αμφιβληστροειδούς και τετραδύμου. Αρχικά το μόριο ονομάστηκε RAGS, ενώ αργότερα ονομάστηκε εφρίνη 5.

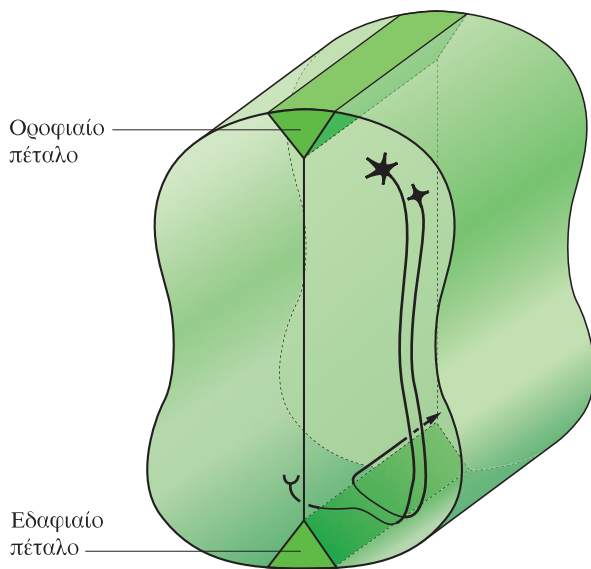
Cheng, H.J., Nakamoto, M., Bergemann, A.D. & Flanagan, J.G. (1995) Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and MEK4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell* **82**, 371-381.

Στη δημοσίευση αυτή περιγράφεται ο τοπογραφικός χάρτης που δημιουργείται μέσω των διαβαθμίσεων συγκέντρωσης των εφρινών και των υποδοχών τους στο σύστημα αμφιβληστροειδούς-τετραδύμου.

φτάνουν σε ένα σημείο –το οποίο μπορεί να είναι ένας προϋπάρχων νευρώνας ή ένα διαφορετικό υπόστρωμα– όπου πρέπει να επιλέξουν πορεία, οι αυξητικοί τους κώνοι σταματούν και εκτείνουν αποφύσεις προς όλες τις κατευθύνσεις, προκειμένου να εντοπίσουν το πιο ευνοϊκό μονοπάτι για το επόμενο τμήμα επέκτασης. Οι αρχικές συνδέσεις γίνονται από νευρώνες-σκαπανείς (pioneer neurons) όταν ολόκληρο το έμβρυο είναι αρκετά μικρό, οπότε το συνολικό μήκος κάθε μονοπατιού είναι επίσης μικρό. Σε πιο όψιμα στάδια η επέκταση των νευραξόνων βασίζεται κυρίως σε αύξηση κατά μήκος προϋπαρχόντων νευραξόνων, οι οποίοι συχνά καλούνται **δεσμίδες** (fascicles). Οι δεσμίδες παρέχουν μια «λεωφόρο» κατά μήκος της οποίας αναπτύσσονται οι επόμενοι νευράξονες. Το κατά πόσον οι νευράξονες θα παραμείνουν ενωμένοι σε δεσμίδες ή όχι εξαρτάται από την τοπική ισορροπία των ελκτικών και απωστικών αλληλεπιδράσεων. Αν οι ελκτικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των νευραξόνων είναι ισχυρότερες από αυτές που αναπτύσσουν οι νευράξονες με το υπόστρωμά τους, τότε οι άξονες παραμένουν οργανωμένοι σε δεσμίδες. Στην αντίθετη περίπτωση, η δεσμίδα αποδιοργανώνεται. Για παράδειγμα, στα σπονδυλωτά η προσθήκη

πολυσιαλικού οξέος στην N-CAM οδηγεί στην αποδιοργάνωση των δεσμίδων, επειδή μετά από την τροποποίηση αυτή το μόριο φέρει υψηλό αρνητικό επιφανειακό φορτίο και συνεπώς προκαλείται άπωση μεταξύ των νευραξόνων.

Στο ΚΝΣ των σπονδυλωτών, στο ραχιαίο τμήμα του νωτιαίου μυελού συναντώνται οι **συνδεδσμικοί νευρώνες** (commissural neurons). Οι νευράξονές τους εκτείνονται αρχικά προς τη μέση γραμμή και κατόπιν οι περισσότεροι περνούν στην απέναντι πλευρά, όπου είτε έρχονται σε άμεση επαφή με έναν νευρώνα είτε στρίβουν και επεκτείνονται παράλληλα με τη μέση γραμμή, προκειμένου να σχηματίσουν τελικές συνάψεις σε διαφορετικό επίπεδο κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα (Εικ. 14.22). Η επέκταση των συνδεδσμικών νευραξόνων προς την κοιλιακή μέση γραμμή οφείλεται στην έκκριση των νετρινών και Shh από το **εδαφιαίο πέταλο** (floor plate). Εκφυτεύματα εδαφιαίου πετάλου που καλλιεργούνται *in vitro* δρουν ελκτικά στους αναπτυσσόμενους νευράξονες συνδεδσμικών νευρώνων. Το ίδιο αποτέλεσμα επιτυγχάνεται αν αντί για εκφύτευμα εδαφιαίου πετάλου χρησιμοποιηθούν κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με κατασκευή που εκφράζει το γονίδιο *Netrin1*, το οποίο κωδικοποιεί τη νετρίνη1.



Εικ. 14.22 Το μονοπάτι που ακολουθούν οι νευράξονες των συνδεσμικών νευρώνων.

Σε ποντικούς από τους οποίους απουσιάζει η νετρίνη-1 ή ο υποδοχέας της, ο DCC, το πρότυπο επέκτασης των συνδεσμικών νευραξόνων διαταράσσεται. Αφού φτάσουν στη μέση γραμμή, όσοι από τους νευράξονες περνούν απέναντι εκφράζουν την L1 (NgCAM), ένα μόριο ικανό να αλληλεπιδράσει με ένα παρόμοιο μόριο συνάφειας που συναντάται στα κύτταρα του εδαφιαίου πετάλου. Παρουσία αδρανοποιητικών αντισωμάτων έναντι της NgCAM, οι περισσότεροι συνδεσμικοί νευράξονες επεκτείνονται παράλληλα με τη μέση γραμμή χωρίς να τη διασχίσουν. Επιπλέον, υπάρχει ένας μηχανισμός ενεργού άπωσης στην περιοχή του εδαφιαίου πετάλου ο οποίος συνίσταται στην παρουσία της Slit, μιας πρωτεΐνης που παράγεται από τα κύτταρα της μέσης γραμμής και δρα απωθητικά. Η αλληλεπίδραση της Slit με τον υποδοχέα της απωθεί τον νευράξονα από το εδαφιαίο πέταλο, ενώ ταυτόχρονα αναιρεί την καθοδηγητική λειτουργία του εδαφιαίου πετάλου, που βασίζεται στην αλληλεπίδραση νετρίνης1-DCC (αλλά δεν αναιρεί την προώθηση της επέκτασης, για την οποία επίσης απαιτείται η αλληλεπίδραση νετρίνης1-DCC). Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται ότι, από τη στιγμή που οι νευράξονες διέλθουν

από το εδαφιαίο πέταλο, η σηματοδότηση μέσω νετρίνης θα εξακολουθήσει να υποστηρίζει την αξονική επιμήκυνση, χωρίς όμως να έλκει τους νευράξονες πίσω, προς τη μέση γραμμή.

Νευροτροφίνες και κυτταρική επιβίωση

Κατά τη μεταγεννητική ανάπτυξη του νευρικού συστήματος ένα σημαντικό ποσοστό των νευρώνων που έχουν σχηματιστεί ακολουθεί απόπτωση. Οι μηχανισμοί που ευθύνονται για το φαινόμενο έχουν αναλυθεί καλύτερα στο περιφερικό νευρικό σύστημα παρά στο κεντρικό, ίσως επειδή στο ΠΝΣ παρατηρείται σε μικρότερο βαθμό λειτουργικός πλεονασμός.

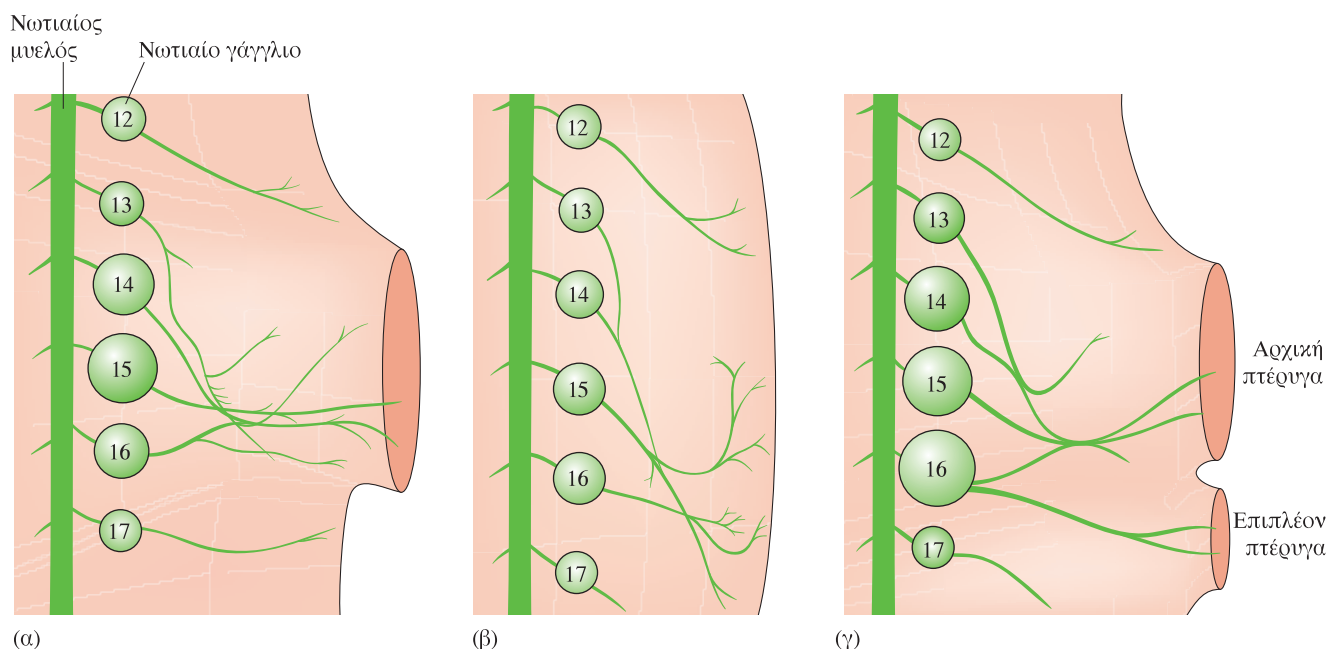
Αρκετοί παράγοντες οι οποίοι δρουν ως παράγοντες επιβίωσης για τους νευρώνες έχουν χαρακτηριστεί με πειράματα καλλιέργειας των κυττάρων αυτών *in vitro*. Μεταξύ των παραγόντων που έχουν χαρακτηριστεί συγκαταλέγεται η οικογένεια των νευροτροφινών του NGF (NGF, BDNF, NT3, NT4/5), ορισμένοι παράγοντες FGF, ο αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων (HGF, Hepatocyte Growth Factor) και ορισμένοι άλλοι παράγοντες, όπως ο αυξητικός παράγοντας που απομονώνεται από νευρογλοία (GDNF, Glial-Derived Neurotrophic Factor) και ο νευροτροφικός παράγοντας του ακτινωτού γαγγλίου (CNTF, Ciliary Neurotrophic Factor). Η επιβίωση των νευρώνων εξαρτάται από την ανάπτυξη ικανής αλληλεπίδρασης των υποδοχέων των νευροτροφικών παραγόντων, οι οποίοι εντοπίζονται στη μεμβράνη των νευρώνων, με τη νευροτροφίνη που παράγεται από το όργανο-στόχο (Εικ. 14.23). Αν το όργανο-στόχος αφαιρεθεί, τότε οι περισσότεροι από τους νευρώνες που φυσιολογικά θα σχημάτιζαν συνδέσεις με αυτό πεθαίνουν. Για παράδειγμα, αρχικά όλα τα νωτιαία γάγγλια έχουν το ίδιο μέγεθος. Όμως, στα γάγγλια που νευρώνουν τα άκρα επιβιώνουν περισσότεροι νευρώνες και έτσι αυτά έχουν μεγαλύτερο μέγεθος από τα υπόλοιπα νωτιαία γάγγλια. Αν η καταβολή

Εικ. 14.23 Η έκφραση της νευροτροφίνης 3 (NT3). Εγκάρσια τομή στη θωρακική περιοχή ενός εμβρύου ποντικού (E11) στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί στο ένα αλληλόμορφο, αντικατάσταση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου *NT3* με το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου αναφοράς της *E. coli lacZ*. Η επικράτεια έκφρασης της NT3 ανιχνεύεται μετά από χρώση για τη β-γαλακτοζιδάση (μπλε χρώμα). Τα νωτιαία νεύρα ταντοποιούνται με ανοσοϊστοχημεία με αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης β (καφέ χρώμα). Από τη δημοσίευση Fariñas *et al.* (1996) *Neuron* 17, 1065-1078, μετά από άδεια του εκδοτικού οίκου Elsevier.



του άκρου αφαιρεθεί, τότε τα γάγγλια που το νευρώνουν συρρικνώνονται λόγω του αυξημένου κυτταρικού θανάτου που λαμβάνει πλέον χώρα σε αυτά. Αν σε ένα έμβρυο γίνει μεταμόσχευση μιας

επιπλέον καταβολής άκρου, τότε στα νωτιαία γάγγλια που το νευρώνουν επιβιώνουν περισσότερα κύτταρα και επομένως τα γάγγλια αυτά αποκτούν μεγαλύτερο μέγεθος (Εικ. 14.24).



Εικ. 14.24 Οι επιδράσεις των νευροτροφινών στα νωτιαία γάγγλια. (α) Φυσιολογικό βραχιόνιο πλέγμα σε ένα έμβρυο όρνιθας. (β) Μείωση του μεγέθους του γαγγλίου μετά από αφαίρεση της καταβολής της πτέρυγας. (γ) Αύξηση του μεγέθους του γαγγλίου μετά από μεταμόσχευση μιας δεύτερης καταβολής πτέρυγας. Κατά Alberts *et al.* (1989) *Molecular Biology of the Cell*, 2nd edn, μετά από άδεια του εκδοτικού οίκου Garland Science/Taylor & Francis Group.

Νέες κατευθύνσεις στην έρευνα

Η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος αποτελεί τομέα τόσο της Βιολογίας Ανάπτυξης όσο και των Νευροεπιστημών. Έτσι, υπάρχει μία πληθώρα θεμάτων που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Όσον αφορά όμως τα ζητήματα που αφορούν συγκεκριμένα τον χώρο της Ανάπτυξης, ορισμένοι από τους πιο ενδιαφέροντες τομείς είναι εκείνοι που σχετίζονται με τη δυνατότητα ανάρρωσης μετά από τραυματισμό ή νευροεκφυλισμό:

1 Είναι δυνατόν να ενεργοποιηθούν τα κύτταρα

του ΚΝΣ κατά την ενήλικη ζωή, έτσι ώστε να συμπεριφερθούν ως βλαστοκύτταρα;

2 Είναι πράγματι σε θέση τα νευρικά βλαστοκύτταρα να αναγεννήσουν τμήματα του ΚΝΣ που έχουν υποστεί βλάβη;

3 Στο ΠΝΣ οι νευράξονες αναγεννώνται μετά από τομή, κάτι που δε συμβαίνει στο ΚΝΣ. Αυτό οφείλεται στην παρουσία ανασταλτικών μορίων στο ΚΝΣ; Ποια είναι αυτά τα μόρια και πώς είναι δυνατόν να επιτευχθεί η αναγέννηση των νευραξόνων του ΚΝΣ;

Σε αισθητικούς και συμπαθητικούς νευρώνες που αναπτύσσονται σε καλλιέργεια, ο NGF και οι άλλες νευροτροφίνες έχουν δύο διακριτές επιδράσεις: προάγουν την επέκταση των νευραξόνων τους και υποστηρίζουν την επιβίωση των κυτταρικών σωμάτων. Τα κυτταρικά σώματα επιβιώνουν ακόμα και αν εκτεθούν στη νευροτροφίνη μόνο οι αυξητικοί κώνοι και το κορυφαίο τμήμα των νευραξόνων. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι οι νευροτροφίνες δρουν στον αυξητικό κώνο και οι επιδράσεις τους μεταφέρονται προς το κυτταρικό σώμα με ανάδρομη μεταφορά. Η προστατευτική επίδραση που έχει στα νωτιαία γάγγλια η μεταμόσχευση μιας επιπλέον καταβολής άκρου είναι δυνατόν να αναπαραχθεί με απευθείας ένεση NGF στον ιστό της λαγόνας.

Ποντικοί στους οποίους έχει γίνει στοχευμένη αδρανοποίηση των νευροτροφινών ή των υποδοχέων τους χαρακτηρίζονται από μειωμένο αριθμό αισθητικών και συμπαθητικών νευρώνων. Για παράδειγμα, στους ποντικούς στους οποίους έχει πραγματοποιηθεί στοχευμένη αδρανοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα TrkA, στον οποίο προσδένεται κυρίως ο NGF, εμφανίζουν μείωση του μεγέθους του τριδύμου και των νωτιαίων γαγγλίων. Ποντικοί στους οποίους έχει γίνει στοχευμένη αδρανοποίηση του γονιδίου που

κωδικοποιεί τον υποδοχέα TrkB, στον οποίο προσδένεται κυρίως ο BDNF, εμφανίζουν μείωση του μεγέθους ορισμένων κρανιακών νεύρων (του τριδύμου, του προσωπικού, του οσφρητικού και του ακουστικού) αλλά και των νωτιαίων γαγγλίων.

Αξονικός ανταγωνισμός

Αφού δημιουργηθούν οι αρχικές συνάψεις και μειωθεί ο αριθμός των νευρώνων λόγω του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, λαμβάνει χώρα μια αναδιοργάνωση των συνδέσεων. Για τη νευρώση του μυϊκού ιστού, αυτό σημαίνει ότι η αρχική κατάσταση κατά την οποία αρκετοί νευρώνες προβάλλουν σε μια πολυπύρηνη μυϊκή ίνα αναδιοργανώνεται, έτσι ώστε κάθε μυϊκή ίνα να νευρώνεται από έναν νευρώνα μόνο, ο οποίος όμως σχηματίζει περισσότερες συνάψεις (οι εξειδικευμένες συνάψεις στον μυϊκό ιστό καλούνται νευρομυϊκές συνάψεις). Σε αντίθεση με το αρχικό, μάλλον αδρομερές και διάχυτο πρότυπο συνάψεων, η όψιμη φάση που λαμβάνει χώρα μετά τη γέννηση του οργανισμού βασίζεται στην ηλεκτρική δραστηριότητα. Στη φάση αυτή ενισχύονται μόνο οι νευρομυϊκές συνάψεις που εμφανίζουν δραστηριότητα, ενώ αποδιοργανώνονται αυτές που είναι λιγότερο ενεργές. Έτσι, ένα ερέθισμα από έναν κινητικό νευρώνα ενισχύει όλες τις νευρομυϊκές του συνάψεις, ενώ

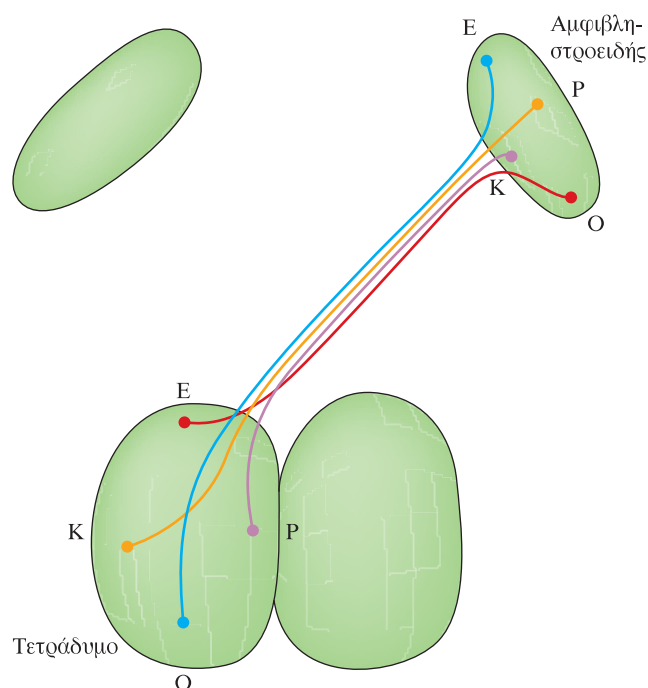
ταυτοχρόνως αποδυναμώνονται αυτές των άλλων νευρώνων. Η συγκεκριμένη διαδικασία συμβαίνει αυτόματα και συνεχίζεται έως ότου κάθε μυϊκή ίνα να νευρώνεται από έναν μόνο νευρώνα.

Μία παρόμοια αρχή ισχύει για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ νευρώνων μέσα στο ΚΝΣ, όπου οι αρχικές συνδέσεις είναι ιδιαίτερα ευρείες, αλλά στη συνέχεια εξειδικεύονται και οργανώνονται σύμφωνα με την ηλεκτρική δραστηριότητα.

Νευρικές συνάψεις στο οπτικό σύστημα

Σε ό,τι αφορά τη δημιουργία των νευρικών συνδέσεων, το οπτικό σύστημα αποτελεί ένα από τα πιο πολύπλοκα παραδείγματα νευρικής εξειδίκευσης. Οι μηχανισμοί που ενέχονται στη δημιουργία των νευρικών συνδέσεων στο οπτικό σύστημα έχουν αποκαλυφθεί τα τελευταία χρόνια, αναδεικνύοντας το θέμα αυτό σε ένα από τα πιο ενδιαφέροντα κεφάλαια της Αναπτυξιακής Νευροβιολογίας. Όπως περιγράφηκε παραπάνω, ο αμφιβληστροειδής σχηματίζεται από την εσωτερική επιφάνεια του οπτικού κυπέλλου. Λόγω της οπτικής του οφθαλμού των σπονδυλωτών, κάθε σημείο του αμφιβληστροειδούς δέχεται φως από ένα συγκεκριμένο σημείο του οπτικού πεδίου. Οι νευρώνες του αμφιβληστροειδούς εκτείνουν τους νευράξονές τους κατά μήκος του οπτικού σωλήνα, από τον οποίο σχηματίζεται αργότερα το οπτικό νεύρο (το δεύτερο κρανιακό νεύρο). Οι ίνες επεκτείνονται οπίσθια στον μεσεγκέφαλο και σχηματίζουν συνάψεις στα **τετράδυμα** (optic tecta) (ή, στα θηλαστικά, στους έξω γονατώδεις πυρήνες). Οι νευρώνες του αμφιβληστροειδούς εκτείνουν τους νευράξονές τους σε συγκεκριμένα τμήματα του τετραδύμου κατά τέτοιον τρόπο, ώστε να υπάρχει μεταξύ αμφιβληστροειδούς και τετραδύμου **τοπογραφική** (topographic) αντιστοίχιση σημείο προς σημείο και επομένως αυτή η αντιστοίχιση ισχύει και για το εξωτερικό οπτικό πεδίο. Η τοπογραφική οργάνωση αποκαλύπτεται φωτίζοντας ένα σημείο του οπτικού

πεδίου και καταγράφοντας στη συνέχεια την αντίστοιχη περιοχή στην οποία παρατηρείται ηλεκτρική δραστηριότητα στο τετράδυμο. Στα κατώτερα σπονδυλωτά και στα πτηνά λαμβάνει χώρα πλήρης διασταύρωση των οπτικών ινών στο οπτικό χίασμα και έτσι ο δεξιός αμφιβληστροειδής προβάλλει στο αριστερό τετράδυμο και το αντίθετο, ενώ στα θηλαστικά υπάρχει προβολή και από τους δύο αμφιβληστροειδείς και στους δύο γονατώδεις πυρήνες. Η προβολή πραγματοποιείται κατά τέτοιον τρόπο, ώστε οι νευρώνες του πρόσθιου αμφιβληστροειδούς να προβάλλουν στο οπίσθιο τετράδυμο και οι νευρώνες του ραχιαίου αμφιβληστροειδούς να προβάλλουν στο κοιλιακό τετράδυμο (Εικ. 14.25). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στη βιβλιογραφία των Νευροεπιστημών, ο εμπροσθοπίσθιος άξονας του αμφιβληστροειδούς αναφέρεται συνήθως ως ρινοκροταφικός άξονας, όμως στο παρόν βιβλίο ο όρος αυτός δε θα χρησιμοποιηθεί.



Εικ. 14.25 Φυσιολογική προβολή αμφιβληστροειδούς-τετραδύμου σε ένα κατώτερο σπονδυλωτό. Οι νευρώνες από το εμπροσθιο (ρινικό) τμήμα του αμφιβληστροειδούς προβάλλουν στο οπίσθιο (ουραίο) τμήμα του τετραδύμου. Οι νευρώνες από το ραχιαίο τμήμα του αμφιβληστροειδούς προβάλλουν στο κοιλιακό (πλευρικό) τμήμα του τετραδύμου.

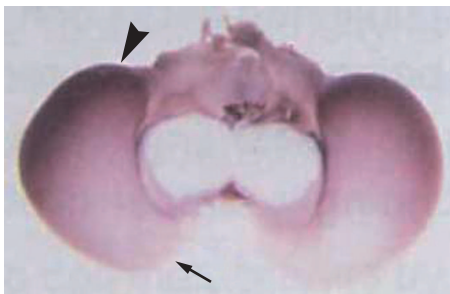
Είναι σαφές ότι, προκειμένου να δημιουργηθεί αυτός ο τοπογραφικός χάρτης, θα πρέπει να υπάρχει κάποιο σύστημα που εξασφαλίζει στους νευράξονες την αναγνώριση των κυττάρων-στόχων τους στο τετράδυμο. Η αρχή αυτή είναι γνωστή ως «υπόθεση χημειοσυγγένειας» του Sperry. Το πρότυπο των συνδέσεων αμφιβληστροειδούς-τετραδύμου διαμορφώνεται σε ένα πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο. Αν ο αναπτυσσόμενος οφθαλμός του *Xenopus* περιστραφεί πριν από το στάδιο της καταβολής ουράς, τότε η προβολή στο τετράδυμο σχηματίζεται φυσιολογικά. Ωστόσο, αν η περιστροφή γίνει αργότερα, τότε το πρότυπο που δημιουργείται είναι ανεστραμμένο. Στα κατώτερα σπονδυλωτά, μετά από τομή του οπτικού νεύρου παρατηρείται αναγέννησή του. Επομένως το σύστημα αυτό προσφέρεται για να διερευνηθούν οι μηχανισμοί που ενέχονται στη δημιουργία του τοπογραφικού χάρτη. Κατά τη φυσιολογική αναγέννηση οι συνάψεις αποκαθίστανται σύμφωνα με το πρότυπο που υπήρχε πριν από την τομή. Αν όμως εκτός από την τομή αφαιρεθεί το ήμισυ του οφθαλμού, τότε οι νευρώνες από το υπόλοιπο προβάλλουν τους νευράξονές τους σε ολόκληρο το τετράδυμο, με φυσιολογικό τοπογραφικό πρότυπο. Ομοίως, αν εκτός από την τομή αφαιρεθεί το ήμισυ του τετραδύμου, τότε όλοι οι νευρώνες του αμφιβληστροειδούς προβάλλουν τους νευράξονές τους στο εναπομείναν ήμισυ του τετραδύμου, με φυσιολογικό και πάλι τοπογραφικό πρότυπο. Πολλά πειράματα αυτού του τύπου υποδεικνύουν την ύπαρξη συστημάτων που «σημαίνουν» τα κύτταρα και μάλιστα κατά τρόπο ποσοτικό. Επιπλέον, τα πειράματα αυτά απέδειξαν ότι η προβολή είναι μια δυναμική κατάσταση με δυνατότητα συνεχούς αναδιάταξης. Αυτό συμβαίνει διότι ο αμφιβληστροειδής αυξάνεται ακτινωτά, με προσθήκη νέων κυττάρων από μια βλαστική ζώνη που εντοπίζεται στο όριό του. Αντίθετα, το τετράδυμο αυξάνει κατά μήκος της οπίσθιας μέσης επιφάνειάς του, με την προσθήκη

κυττάρων στο ένα μόνο άκρο του. Λόγω της διαφοράς στον τρόπο αύξησης των δύο αυτών δομών, οι συνάψεις θα πρέπει να αναπροσαρμόζονται διαρκώς, προκειμένου να διατηρηθεί ο συνολικός τοπογραφικός χάρτης.

Η αποκάλυψη των μηχανισμών που ενέχονται στην τοπογραφική οργάνωση των συνδέσεων στο οπτικό σύστημα είναι απόρροια μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί σε διάφορα είδη σπονδυλωτών. Στα ψάρια και στα αμφίβια στα οποία παρατηρείται αναγέννηση έχουν γίνει πολλές ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες χαρτογράφησης σήμανσης (με ^3H -proline ή με HRP) μέσω ανάδρομης μεταφοράς. Πιο πρόσφατα έχει χρησιμοποιηθεί η Dil, καθώς παρέχει καλύτερες δυνατότητες ανάλυσης κατά την οπτική παρατήρηση σε άθικτα δείγματα. Στο έμβρυο της όρνιθας έχουν χρησιμοποιηθεί ρετροϊκοί φορείς για την υπερέκφραση στοιχείων σε πειράματα κέρδους λειτουργίας. Τέλος, στον ποντικό τα πειράματα στοχευμένης αδρανοποίησης αποτελούν την κύρια προσέγγιση για τη μελέτη των αποτελεσμάτων της απώλειας λειτουργίας. Παρά τις διαφορές που παρατηρούνται από οργανισμό σε οργανισμό, οι βασικές αρχές που διέπουν τους μοριακούς μηχανισμούς είναι οι ίδιες.

Πρώτον, οι ίνες του αμφιβληστροειδούς πρέπει να επεκταθούν ως το τετράδυμο. Στα πρώτα στάδια της επέκτασης η έκφραση των μορίων Slit από το οπτικό νεύρο ασκεί ελκτική δράση. Στο οπτικό χίασμα η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Zic2 διατηρείται στους νευρώνες των οποίων οι νευράξονες δε χιάζονται, ενώ στους νευρώνες των οποίων οι νευράξονες χιάζονται καταστέλλεται από τον μεταγραφικό παράγοντα Isl1.

Η δημιουργία του τοπογραφικού χάρτη βασίζεται στην ύπαρξη μιας διαβάθμισης στη συνάφεια μεταξύ των κυττάρων που εντοπίζονται σε διαφορετικές περιοχές του αμφιβληστροειδούς και των κυττάρων διαφορετικών τμημάτων του τετραδύμου (Εικ.14.26). Μεμονωμένα κύτταρα από μία μικρή περιοχή του αμφιβληστροειδούς



Εικ. 14.26 Η διαβάθμιση συγκέντρωσης της εφρίνης A όπως φαίνεται στο τετράδυμο ενός εμβρύου όρνιθας 13 ημερών. Ανίχνευση της εφρίνης A μετά από πρόσδεσή της στον υποδοχέα EphA3 ο οποίος είναι συζευγμένος με την αλκαλική φωσφατάση, και επώαση με υπόστρωμα της αλκαλικής φωσφατάσης. Το εμπρόσθιο άκρο του τετραδύμου υποδεικνύεται με κεφαλή βέλους. Από τη δημοσίευση Chen *et al.* (1995) *Cell* **82**, 371-381, μετά από άδεια του εκδοτικού οίκου Elsevier.

προσκολλώνται σε εκφυτεύματα τετραδύμου από την περιοχή στην οποία φυσιολογικά θα πρόβαλλαν οι νευράξονές τους *in vivo* (δηλαδή κύτταρα του πρόσθιου αμφιβληστροειδούς με εκφύτευμα οπίσθιου τετραδύμου και κύτταρα ραχιαίου αμφιβληστροειδούς με εκφύτευμα κοιλιακού τετραδύμου). Με τη χρήση της δοκιμής λωρίδων (βλ. Εικ. 14.21β), έχει αποδειχθεί ότι ένα εκχύλισμα μεμβρανών του οπίσθιου τετραδύμου είναι σε θέση να καταστείλει την επέκταση των νευραξόνων που χορηγούνται από το οπίσθιο τμήμα του αμφιβληστροειδούς. Στο ίδιο πείραμα, το πρόσθιο τετράδυμο δε δρα απωθητικά, ενώ κύτταρα του πρόσθιου αμφιβληστροειδούς δεν αποκρίνονται στον παράγοντα του τετραδύμου. Οι πρωτεΐνες που ενέχονται σε αυτή την αλληλεπίδραση απομονώθηκαν και διαπιστώθηκε ότι ήταν μέλη της οικογένειας μορίων συνάφειας των εφρινών A. Οι εφρίνες είναι μια οικογένεια μορίων κυτταρικής συνάφειας που σχηματίζουν στο τετράδυμο μια διαβάθμιση έκφρασης με υψηλότερη συγκέντρωση στο οπίσθιο τμήμα του τετραδύμου. Επιπλέον, παρατηρείται διαβάθμιση συγκέντρωσης του υποδοχέα των εφρινών Eph τύπου A στα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, με υψηλά

επίπεδα έκφρασης στο οπίσθιο τμήμα και χαμηλά στο εμπρόσθιο. Έτσι, η μοριακή βάση του συγκεκριμένου συστήματος συνίσταται σε μία άπωση βραχείας εμβέλειας που καθοδηγεί τις οπίσθιες ίνες να προσκολλώνται κατά προτίμηση στο πρόσθιο τετράδυμο. Όμως και οι πρόσθιες ίνες θα μπορούσαν να προσκολληθούν στο πρόσθιο τετράδυμο. Ωστόσο, επειδή εκφράζουν χαμηλά επίπεδα υποδοχέων Eph, ο ανταγωνισμός με τις οπίσθιες ίνες, που εκφράζουν υψηλά επίπεδα των υποδοχέων Eph, έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση των πρόσθιων ινών στο οπίσθιο τετράδυμο, με αποτέλεσμα την εξειδίκευση των συνδέσεων. Τα αποτελέσματα από σειρές πειραμάτων κέρδους λειτουργίας και απώλειας λειτουργίας υποστηρίζουν το μοντέλο αυτό. Για παράδειγμα, όταν πραγματοποιείται εκτοπική έκφραση της εφρίνης A2 στο τετράδυμο εμβρύου όρνιθας ταυτόχρονα με σήμανση του αμφιβληστροειδούς με Dil, οι ίνες που εκτείνονται από τον οπίσθιο αμφιβληστροειδή αποφεύγουν τα σημεία στα οποία εκφράζεται εκτοπικά η εφρίνη A2. Στον ποντικό, οι κύριες εφρίνες που εκφράζονται στο οπτικό σύστημα είναι η εφρίνη 2 και η εφρίνη 5. Ποντικοί στους οποίους έχει γίνει στοχευμένη αδρανοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις δύο προαναφερθείσες εφρίνες διαταράσσουν τον τοπογραφικό χάρτη.

Η έκφραση των εφρινών ελέγχεται από τον μεταγραφικό παράγοντα *Engrailed*. Η ίδια η πρωτεΐνη *Engrailed* σχηματίζει μια διαβάθμιση συγκέντρωσης στο τετράδυμο από το οπίσθιο τμήμα προς το εμπρόσθιο. Η διαβάθμιση συγκέντρωσης της *Engrailed* εγκαθιδρύεται από τη δράση του οργανωτή ισθμού στον μεσεγκέφαλο (βλ. παραπάνω). Αν γίνει εκτοπική έκφραση του γονιδίου *Engrailed* σε έμβρυα όρνιθας με τη χρήση ρετροϊού, τότε οι περιοχές του τετραδύμου στις οποίες ανιχνεύεται εκτοπική έκφραση *Engrailed* παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση εφρινών και αποκλεισμό των οπίσθιων ινών του αμφιβληστροειδούς.

Οι ίδιες αρχές διέπουν και την οργάνωση του τοπογραφικού χάρτη κατά μήκος του ραχιοκοιλιακού άξονα. Οι υποδοχείς EphB εκφράζονται στον αμφιβληστροειδή με μια διαβάθμιση συγκέντρωσης από την κοιλιακή πλευρά, όπου ανιχνεύονται τα υψηλότερα επίπεδα, προς τη ραχιαία. Η εφρίνη B εκφράζεται στο τετράδυμο με μια διαβάθμιση συγκέντρωσης από τη ραχιαία πλευρά, όπου ανιχνεύονται τα υψηλότερα επίπεδα, προς την κοιλιακή (συνήθως στη βιβλιογραφία αναφέρεται ως «έσω» προς «έξω»). Επειδή αναπτύσσονται ελκτικές αλληλεπιδράσεις, οι νευράξονες των νευρώνων που εντοπίζονται στο κοιλιακό τμήμα του αμφιβληστροειδούς προβάλλουν στο ραχιαίο τμήμα του τετραδύμου.

Τελειοποίηση των δικτύων

Οι αρχικές συνδέσεις στο οπτικό σύστημα είναι δυνατόν να σχηματιστούν απουσία νευρικής δραστηριότητας. Αυτό αποδεικνύεται με πειράματα καταστολής της νευρικής δραστηριότητας, μετά από προσθήκη στο θρεπτικό μέσο ενός μορίου που αποφράσσει τους τασοελεγχόμενους διαύλους Na, όπως είναι, για παράδειγμα, η τετροδοτοξίνη. Όμως, αυτό το αρχικό πρότυπο είναι αρκετά αδρομερές και σε επόμενα στάδια τροποποιείται με τις διαδικασίες εκλέπτυνσης (refinement), οι οποίες απαιτούν νευρική δραστηριότητα.

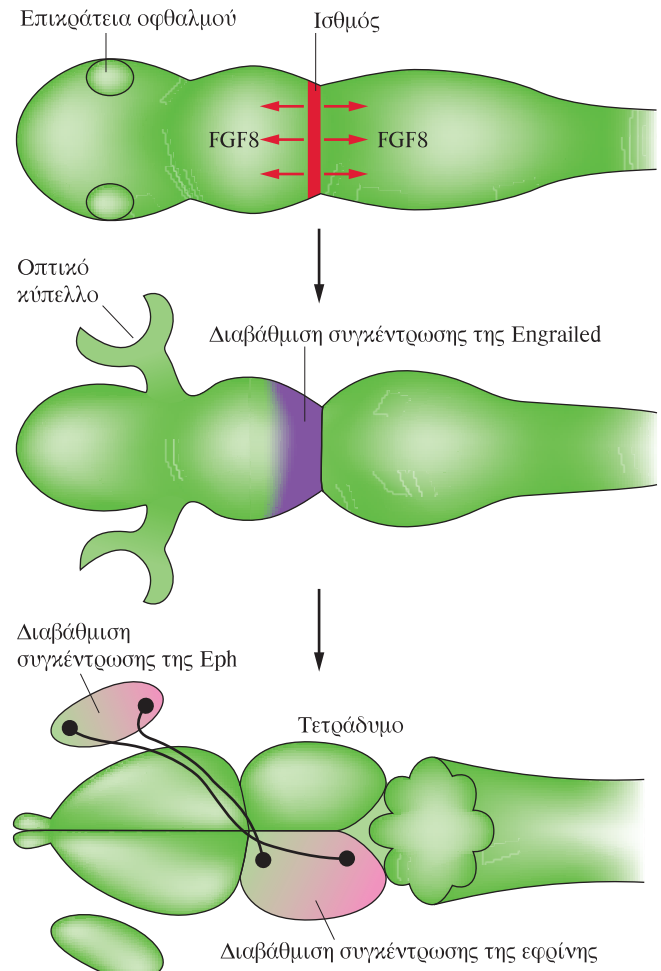
Μία παρόμοια αρχή διέπει και τον σχηματισμό συνδέσεων μεταξύ των πρωτογενών οπτικών κέντρων και του εγκεφαλικού φλοιού. Στα θηλαστικά, όπου κάθε αμφιβληστροειδής προβάλλει και στις δύο πλευρές του εγκεφάλου, διαφορετικές στιβάδες κυττάρων από τους έξω γονατώδεις πυρήνες (τις αντίστοιχες δομές των τετραδύμων) δέχονται σήματα και από τους δύο αμφιβληστροειδείς, αλλά και οι δύο προβάλλουν τελικά στην ίδια στιβάδα κυττάρων του οπτικού φλοιού. Κατά τη γέννηση τα δεκτικά πεδία για τους δύο οφθαλμούς στον οπτικό φλοιό είναι αναμειγμένα. Ύστερα από την έκθεση του νεογνού στα οπτικά ερεθίσματα, τα πεδία

διαχωρίζονται σε λωρίδες πλάτους 0,5 mm περίπου, οι οποίες ονομάζονται στήλες οφθαλμικής επικράτησης. Οι στήλες αυτές είναι δυνατόν να απεικονιστούν μετά από έγχυση ενός ιχνηθέτη, για παράδειγμα ραδιενεργής προλίνης, στον ένα οφθαλμό. Το ραδιενεργό μόριο προσλαμβάνεται από τα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς και μεταφέρεται μέχρι τον φλοιό μέσω ορθόδρομης μεταφοράς, αρχικά στα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς και κατόπιν στα κύτταρα του μεσεγκεφάλου. Γειτονικά σημεία που εντοπίζονται σε παρακείμενες λωρίδες αντιστοιχούν στο ίδιο σημείο στον οπτικό χώρο, όπως γίνεται αντιληπτό από τους δύο οφθαλμούς. Αυτές οι στήλες δε σχηματίζονται αν η νευρική δραστηριότητα παρεμποδιστεί με τετροδοτοξίνη. Επίσης, δε σχηματίζονται αν το ζώο εκτεθεί όσο βρίσκεται σε νεαρή ηλικία σε στροβοσκοπικό φως, το οποίο δίνει ένα ομοιόμορφο ταυτόχρονο ερέθισμα στους δύο οφθαλμούς. Αν παρεμποδιστεί η όραση από τον ένα οφθαλμό, το σήμα από τον άλλο θα επεκταθεί και θα καλύψει το κενό στον εγκεφαλικό φλοιό. Φαίνεται ότι και στο οπτικό σύστημα εφαρμόζεται η ίδια αρχή με αυτή που ισχύει για την εκλέπτυνση στις νευρομυϊκές συνάψεις. Σε περίπτωση που δύο κύτταρα του μεσεγκεφάλου συνδεθούν με το ίδιο κύτταρο του φλοιού, η σύνδεση θα ενισχυθεί αν τα σήματα είναι ταυτόχρονα και θα αποδυναμωθεί αν τα σήματα δεν είναι ταυτόχρονα. Αν τα κύτταρα του μεσεγκεφάλου αποκρίνονται σε παρακείμενα σημεία στον αμφιβληστροειδή του ενός οφθαλμού, είναι πιθανό στην πλειονότητα των περιστάσεων να πυροδοτούν ταυτόχρονα. Αν όμως αποκρίνονται στο ίδιο οπτικό σημείο, αλλά από τους δύο οφθαλμούς, τότε συνήθως θα πυροδοτούν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και επομένως, σύμφωνα με την αρχή του ανταγωνισμού, θα διαταχθούν σε γειτονικές περιοχές του φλοιού. Παρά τη συμβατική αυτή εξήγηση, υπάρχουν μελέτες που έχουν γίνει πρόσφατα και στις οποίες έχει δειχθεί ότι οι στήλες οφθαλμικής επικράτησης είναι δυνατόν να σχηματιστούν

απουσία σήματος από τον ένα οφθαλμό, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη ενός στοιχείου προγραμματισμένης ανάπτυξης.

Από την απλότητα στην πολυπλοκότητα

Η ανάπτυξη του οπτικού συστήματος έχει γίνει κατανοητή σε μεγάλο βαθμό από το αρχικό στάδιο της νευρικής επαγωγής μέχρι το τελικό στάδιο της φυσιολογικής λειτουργίας και αναδεικνύει όλες τις βασικές αρχές που διέπουν την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και τη δημιουργία των εξειδικευμένων συνάψεων. Σε αρχικά στάδια της ανάπτυξης οι περιοχές που θα σχηματίσουν τον αμφιβληστροειδή και το τετράδυμο εξειδικεύονται μέσω της δράσης διαβαθμίσεων συγκέντρωσης επαγωγικών παραγόντων που ενεργοποιούν συγκεκριμένους συνδυασμούς μεταγραφικών παραγόντων. Η καθοδήγηση των αναπτυσσόμενων νευραξόνων στο οπτικό μονοπάτι εξαρτάται τόσο από διάφορες ανατομικές οντότητες που παράγουν μόρια που δρουν χημειοτακτικά όσο και από σήματα που συναντώνται στο εξωκυττάριο στρώμα. Οι διαβαθμίσεις συγκέντρωσης των εφρινών καθορίζουν την τοπογραφική οργάνωση στο σύστημα αμφιβληστροειδούς-τετράδυμο. Η έκφραση των εφρινών ρυθμίζεται από μια διαβάθμιση συγκέντρωσης του μεταγραφικού παράγοντα Engrailed. Η έκφραση του παράγοντα Engrailed ελέγχεται από τον παράγοντα FGF8, ο οποίος συντίθεται από τον οργανωτή ισθμού (Εικ. 14.27). Τα πρώιμα στάδια δημιουργίας του τοπογραφικού χάρτη επιτελούνται χωρίς να είναι απαραίτητη η νευρική δραστηριότητα ή η οπτική εμπειρία, ωστόσο για την όσιμη φάση της εκλέπτυνσης απαιτείται νευρική δραστηριότητα. Συνολικά, στην οργάνωση του οπτικού συστήματος ενέχονται πολυάριθμες



Εικ. 14.27 Τα στάδια της διαδικασίας εξειδίκευσης των συνδέσεων του αμφιβληστροειδούς με το τετράδυμο. Το πρότυπο των αξονικών προβολών ελέγχεται από τις αλληλεπιδράσεις εφρινών-Eph και η αρχική πολικότητα της διαβάθμισης των εφρινών στο τετράδυμο εξαρτάται από τη διαβαθμισμένη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Engrailed, που ήταν αποτέλεσμα σημάτων του οργανωτή ισθμού.

διαδικασίες και αλληλεπιδράσεις της ανάπτυξης, καθεμία από τις οποίες είναι εγγενώς αρκετά απλή. Ωστόσο, ο συνδυασμός τους έχει ως αποτέλεσμα την οργάνωση μιας σύνθετης δομής εκπληκτικής πολυπλοκότητας.

Κύρια Σημεία

- Το πρώτο στάδιο της νευρικής επαγωγής είναι η καταστολή της ενεργότητας του BMP από παράγοντες που εκκρίνονται από τον οργανωτή και σε ορισμένες περιπτώσεις και από άλλους παράγοντες. Η δημιουργία τοπικού προτύπου κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα οφείλεται κατά κύριο λόγο σε μια διαβάθμιση συγκέντρωσης, από το οπίσθιο προς το εμπρόσθιο τμήμα, των παραγόντων FGF και Wnt. Αυτή η διαβάθμιση συγκέντρωσης ενεργοποιεί διαφορικά τα γονίδια *Hox* κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα. Η δημιουργία του προτύπου στον ραχιοκοιλιακό άξονα οφείλεται τόσο στη διαβάθμιση συγκέντρωσης της πρωτεΐνης Sonic hedgehog που παράγεται στο εδαφιαίο πέταλο όσο και στη διαβάθμιση συγκέντρωσης παραγόντων BMP που συντίθενται στο οροφιαίο πέταλο.
- Η επακόλουθη τοπική εξειδίκευση επιτελείται μέσω σηματοδοτικών μορίων που παράγονται από τοπικά κέντρα όπως το εμπρόσθιο νευρικό χείλος, το όριο του φλοιού και ο οργανωτής ισθμού. Τα σηματοδοτικά μόρια που ενέχονται στη διαδικασία αυτή αποτελούν μέλη των οικογενειών FGF, Wnt και BMP. Η μεταμερική ταυτότητα των ρομβομερών του οπίσθιου εγκεφάλου οργανώνεται από μια διαβάθμιση συγκέντρωσης ρετινοϊκού οξέος με υψηλά επίπεδα στο οπίσθιο μεσόδερμα.
- Η πρωτογενής νευρογένεση τόσο στην *Drosophila* όσο και στα σπονδυλωτά επιτελείται με τον μηχανισμό της πλευρικής αναστολής, ο οποίος αναιρεί τη συμμετρία του νευροεπιθηλίου. Οι νευρώνες που έχουν μόλις δημιουργηθεί καταστέλλουν τη νευρική διαφοροποίηση των παρακείμενων με αυτούς κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού Notch. Στα θηλαστικά το μεγαλύτερο ποσοστό της νευρογένεσης διεκπεραιώνεται

από τα κύτταρα της ακτινωτής γλοίας κατά το δεύτερο ήμισυ της κύησης. Στο ΚΝΣ των θηλαστικών δύο περιοχές φέρουν νευρικά βλαστοκύτταρα τα οποία παραμένουν και στην ενήλικη ζωή. Τα νευρικά βλαστοκύτταρα αναπτύσσονται σε καλλιέργεια ως νευροσφαίρες και διαφοροποιούνται σε νευρώνες και γλοία.

- Από τα μεταναστευτικά κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας προκύπτουν διάφοροι κυτταρικοί τύποι. Από τη νευρική ακρολοφία της κεφαλής αναπτύσσονται μεταξύ άλλων και σκελετικοί ιστοί, κάτι που δε συμβαίνει στη νευρική ακρολοφία του κορμού. Η δέσμευση σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους εξαρτάται εν μέρει από το περιβάλλον μέσω του οποίου μεταναστεύουν τα κύτταρα. Υπάρχουν ωστόσο και πειράματα που υποδεικνύουν ότι υπάρχει κάποιου βαθμού δέσμευση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας και πριν από τη μετανάστευσή τους.
- Η επέκταση των νευραξόνων επιτυγχάνεται μέσω της επιμήκυνσης του αυξητικού κώνου ως απόκριση στις νευροτροφίνες και σε άλλους εξωκυττάριους παράγοντες. Η κατεύθυνση της αύξησης των νευραξόνων εξαρτάται από την παρουσία επιτρεπτικών μορίων του περιβάλλοντος αλλά και εξειδικευμένων παραγόντων έλξης ή άπωσης. Το ιδιαίτερα πολύπλοκο πρότυπο των νευρικών συνάψεων αποτελεί αποτέλεσμα μιας σειράς διαδοχικών αποφάσεων που δημιουργούν ένα σύνθετο πρότυπο νευρικών συνδέσεων. Ορισμένα συστήματα συνδέσεων, όπως αυτό που καθοδηγεί τους νευράξονες από τον αμφιβληστροειδή στον εγκέφαλο, χαρακτηρίζονται από μια τοπογραφική οργάνωση η οποία καθορίζεται από τις αλληλεπιδράσεις συνάφειας που αναπτύσσονται μεταξύ των νευραξόνων και των κυττάρων-στόχων τους.
- Στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξής τους οι νευρικές συνδέσεις είναι αρκετά αδρομερείς.

Η εκλέπτυνσή τους επιτυγχάνεται χάρη στη διαφορική επιβίωση των νευρώνων, η οποία εξαρτάται από την παροχή νευροτροφινών από τους ιστούς-στόχους, καθώς και από τον αντα-

γωνισμό των νευραξόνων για τη νεύρωση του ίδιου κυττάρου-στόχου. Στα όψιμα στάδια, αυτό μπορεί να περιλαμβάνει και τις επιδράσεις της αισθητήριας εμπειρίας.

Περαιτέρω μελέτη

Γενικά

Brown, M., Keynes, R. & Lumsden, A. (2001) *The Developing Brain*. New York: Oxford University Press.

Sanes, D.H., Reh, T.A. & Harris, W.A. (2005) *Development of the Nervous System*, 2nd edn. New York: Academic Press.

Guillemot, F. (2007) Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development* **134**, 3771-3780.

Hochman, S. (2007) Spinal cord. *Current Biology* **17**, R950-R955.

Kiecker, C. & Lumsden, A. (2009) Recent advances in neural development. *F1000 Biology Reports* **1**.

Bellen, H.J., Tong, C. & Tsuda, H. (2010) 100 years of Drosophila research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future. *Nature Reviews Neuroscience* **11**, 514-522.

Νευρική επαγωγή και δημιουργία προτύπου κατά μήκος του εμπροσθοπίσθιου άξονα

Lumsden, A. & Krumlauf, R. (1996) Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* **274**, 1109-1115.

Marshall, H., Morrison, A., Studer, M., Pöpperl, H. & Krumlauf, R. (1996) Retinoids and Hox genes. *FASEB Journal* **10**, 969-978.

Blumberg, B. (1997) An essential role for retinoid signalling in anteroposterior neural specification and in neuronal differentiation. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **8**, 417-428.

Simeone, A. (2000) Positioning the isthmus organizer. Where *otx2* and *Gbx2* meet. *Trends in Genetics* **16**, 237-240.

Wilson, S.I. & Edlund, T. (2001) Neural induction: toward a unifying mechanism. *Nature Neuroscience* **4**, 1161-1168.

Dasen, J.S., Liu, J.-P. & Jessell, T.M. (2003) Motor neuron columnar fate imposed by sequential phases of Hox-c activity. *Nature* **425**, 926-933.

Briscoe, J. & Wilkinson, D.G. (2004) Establishing neuronal circuitry: Hox genes make the connection. *Genes and Development* **18**, 1643-1648.

Lumsden, A. (2004) Segmentation and compartmentation in the early avian hindbrain. *Mechanisms of Development* **121**, 1081-1088.

O'Leary, D.D.M., Chou, S.-J. & Sahara, S. (2007) Area patterning of the mammalian cortex. *Neuron* **56**, 252-269.

Δημιουργία προτύπου κατά μήκος του ραχιοκοιλιακού άξονα

Placzek, M. & Furley, A. (1996) Patterning cascades in the neural tube. *Current Biology* **6**, 526-529.

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

Marquardt, T. & Pfaff, S.L. (2001) Cracking the transcriptional code for cell specification in the neural tube. *Cell* **106**, 651-654.

Strähle, U., Lam, C.S., Ertzere, R. & Rastegar, S. (2004) Vertebrate floor plate specification: variations on common themes. *Trends in Genetics* **20**, 155-162.

Dessaud, E., McMahon, A.P. & Briscoe, J. (2008) Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development* **135**, 2489-2503.

Roessler, E. & Muenke, M. (2010) The molecular

genetics of holoprosencephaly. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* **154C**, 52-61.

Νευρογένεση και γλοιογένεση

Sanes, J.R. (1989) Analysing cell lineage with a recombinant retrovirus. *Trends in Neuroscience* **12**, 21-28.

McKay, R.D.G. (1997) Stem cells in the central nervous system. *Science* **276**, 66-71.

Gross, C.G. (2000) Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nature Reviews Neuroscience* **1**, 67-73.

Cayouette, M. & Raff, M. (2002) Asymmetric segregation of Numb: a mechanism for neural specification from *Drosophila* to mammals. *Nature Neuroscience* **5**, 1265-1269.

Henrique, D. & Schweisguth, F. (2003) Cell polarity: the ups and downs of the Par6/aPKC complex. *Current Opinion in Genetics and Development* **13**, 341-350.

Götz, M. & Huttner, W.B. (2005) The cell biology of neurogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 777-788.

Malatesta, P., Appolloni, I. & Calzolari, F. (2007) Radial glia and neural stem cells. *Cell and Tissue Research* **331**, 165-178.

Miller, F.D. & Gauthier-Fisher, A. (2009) Home at last: neural stem cell niches defined. *Cell Stem Cell* **4**, 507-510.

Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R. & Zhu, X. (2009) Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* **10**, 9-22.

Suh, H., Deng, W. & Gage, F.H. (2009) Signaling in adult neurogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **25**, 253-275.

Rowitch, D.H. & Kriegstein, A.R. (2010) Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* **468**, 214-222.

Νευρική ακρολοφία

Le Douarin, N.M. & Smith, J. (1988) Development of the peripheral nervous system from the neural

crest. *Annual Reviews of Cell Biology* **4**, 375-404.

Anderson, D.J. (1997) Cellular and molecular biology of neural crest cell lineage determination. *Trends in Genetics* **13**, 276-280.

LaBonne, C. & Bronner-Fraser, M. (1999) Molecular mechanisms of neural crest formation. *Annual Reviews of Cell and Developmental Biology* **15**, 81-112.

Le Douarin, N.M. & Kalcheim, C. (1999) *The Neural Crest*, 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press.

Graham, A. & Smith, A. (2001) Patterning the pharyngeal arches. *Bioessays* **23**, 54-61.

Krull, C.E. (2001) Segmental organization of neural crest migration. *Mechanisms of Development* **105**, 37-45.

Le Douarin, N.M. (2004) The avian embryo as a model to study the development of the neural crest: a long and still ongoing story. *Mechanisms of Development* **121**, 1089-1102.

Sauka-Spengler, T. & Bronner-Fraser, M. (2008) A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 557-568.

Gammill, L.S. & Roffers-Agarwal, J. (2010) Division of labor during trunk neural crest development. *Developmental Biology* **344**, 555-565.

Νευρωνική αύξηση και σχηματισμός συνάψεων

Colman, H. & Lichtman, J.W. (1993) Interactions between nerve and muscle: synapse elimination at the developing neuromuscular junction. *Developmental Biology* **156**, 1-10.

Tessier-Lavigne, M. & Goodman, C.S. (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**, 1123-1133.

Bibel, M. & Barde, Y.A. (2000) Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes and Development* **14**, 2919-2937.

Lisman, J.E. & McIntyre, C.C. (2001) Synaptic plasticity: a molecular memory switch. *Current Biology* **11**, R788-R791.

- Wilkinson, D.G. (2001) Multiple roles of Eph receptors and ephrins in neural development. *Nature Reviews Neuroscience* **2**, 155-164.
- Goldberg, J.L. (2003) How does an axon grow? *Genes and Development* **17**, 941-958.
- Schneider, V.A. & Granato, M. (2003) Motor axon migration: a long way to go. *Developmental Biology* **263**, 1-11.
- Lemke, G. & Reber, M. (2005) Retinotectal mapping: new insights from molecular genetics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**, 551-580.
- Rüdiger, S. (2006) The dual nature of neurotrophins. *BioEssays* **28**, 583-594.
- Butler, S.J. & Tear, G. (2007) Getting axons onto the right path: the role of transcription factors in axon guidance. *Development* **134**, 439-448.
- Tran, T.S., Kolodkin, A.L. & Bharadwaj, R. (2007) Semaphorin regulation of cellular morphology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **23**, 263-292.
- Ypsilanti, A.R., Zagar, Y. & Chédotal, A. (2010) Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo. *Development* **137**, 1939-1952.
- Gibson, D.A. & Ma, L. (2011) Developmental regulation of axon branching in the vertebrate nervous system. *Development* **138**, 183-195.
- Sun, K.L.W., Correia, J.P. & Kennedy, T.E. (2011) Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. *Development* **138**, 2153-2169.