



Universitatea Babeș-Bolyai Cluj-Napoca
Facultatea de Biologie și Geologie
Departamentul de Biologie experimentală



Rolul factorilor de transcriere Brn3 în dezvoltarea și diferențierea tipurilor neuronale

Rezumatul tezei de doctorat

Coordonator Științific

Acad. Prof. Dr. Octavian Popescu

Doctorand

Szilárd Sajgó

Cluj-Napoca

2014

Cuprins

Cuprins	iii
Lista figurilor	vi
Lista tabelelor	ix
1 Introducere	1
1.1 Factorii de transcriere Brn3	1
1.2 Receptorul de tirozin-kinază cRet	4
1.3 Nervii Cranieni	5
1.3.1 Nervii Cranieni	6
1.3.1.1 Nervul olfactiv I	6
1.3.1.2 Nervul optic II	6
1.3.1.3 Nervul oculomotor III	7
1.3.1.4 Nervul trohlear IV	7
1.3.1.5 Nervul trigemen V	7
1.3.1.6 Nervul abducens VI	8
1.3.1.7 Nervul facial VII	8
1.3.1.8 Nervul acustico-vestibular VIII	9
1.3.1.9 Nervul glosofaringian IX	10
1.3.1.10 Nervul vag X	11
1.3.1.11 Nervul accesoriu spinal XI	12
1.3.1.12 Nervul hipoglos XII	12
1.3.2 Reglare transcrierii în dezvoltarea nervilor cranieni	12
1.3.3 Retina	15

CUPRINS

1.3.4	Retinal ganglion cells	20
1.3.4.1	Tipuri de celule ganglionare	21
1.3.4.2	Proiecțiile axonale a celulelor ganglionare	26
2	Materiale și metode	30
2.1	Expresia genei <i>Brn3b</i> pe parcursul dezvoltării	30
2.1.1	Liniile de șoareci utilizate	30
2.1.1.1	Alela condiționată <i>Brn3b</i>	30
2.1.1.2	Alela knock-in <i>ROSA26</i> Cre	31
2.1.1.3	Alela CreER cu dublu control farmacologic	32
2.1.1.4	Phox2b:Cre	33
2.1.1.5	Alelă condițională <i>cRet</i> cu expresie CFP	33
2.1.2	Control farmacologic a recombinării rare mediate de Cre	34
2.1.3	Prepararea țesutului embrionar	35
2.1.3.1	Histochimia AP a țesutului embrionar	35
2.1.3.2	Immunohistochimia țesutului embrionar	35
2.1.3.3	Histochimie mixtă	36
2.2	Profilul de exprimare a celulelor ganglionare <i>Brn3a</i> și <i>Brn3b</i> pozitive	37
2.2.1	Disocierea și sortarea țesutului retinal	38
2.2.1.1	Disocierea țesutului	38
2.2.1.2	Purificarea imunomagnetică a celulelor retinale ganglionare AP pozitive	39
2.2.1.3	Generarea profilelor ARN	39
2.2.1.4	Analiza datelor obținute prin secvențializare ARN	40
2.2.1.5	Validarea profilelor de exprimare prin metode in silico	41
2.2.1.6	Validarea profilelor de exprimare prin in situ	41
2.3	Celule <i>cRet</i> pozitive în retină	42
2.3.1	Liniile de șoareci utilizate	42
2.3.2	Analiza morfologică a celulelor ganglionare <i>cRet</i> pozitive	42
2.4	Analiza in vivo prin intermediul vectorilor virali	43
2.4.1	Alele condiționale <i>Brn3a</i> ^{CKOCre} și <i>Brn3b</i> ^{CKOCre}	43
2.4.2	Strategii virale	45

CUPRINS

2.4.3	Testarea strategiilor virale	45
2.4.4	Immunohistochimia celulelor infectate cu virus	47
3	Rezultate	49
3.1	Expresia genei <i>Brn3b</i> pe parcursul dezvoltării	49
3.1.1	Retina și Coliculul superior	54
3.1.2	Sistemul trigeminal	55
3.1.3	Sistemul facial	58
3.1.4	Sistemul vestibulocochlear	63
3.1.5	Sistemul glossopharyngeal și vagal	65
3.2	Profilul de exprimare a celulelor ganglionare <i>Brn3a</i> și <i>Brn3b</i> pozitive	69
3.2.1	Testarea eficienței și randamentului de sortare	72
3.2.2	Analiza generală a genelor	76
3.2.2.1	Analiza markerilor specifici de celule ganglionare	76
3.2.2.2	Gene specifice pentru celulele retinale ganglionare	81
3.2.3	Validarea in silico a profilelor de exprimare E15	84
3.2.4	Validarea in situ a profilelor de exprimare P3	87
3.2.5	Familii moleculare implicate în dezvoltarea morfologiei . .	91
3.3	Celule <i>cRet</i> pozitive în retină	96
3.4	Analiza in vivo prin intermediul vectorilor virali	104
3.4.1	Vectori <i>AAV1-FLEX</i> în celule retinale ganglionare	104
4	Discuții	112
5	Direcții viitoare de cercetare	118
	Anexe A	120
	Bibliografie	124

Cuvinte cheie

Nerv cranian

Brn3

cRet

Celule retinale ganglionare

Profile de exprimare genică

Infecții virale

Introducere

Identificarea tipurilor de celule neuronale distincte din punct de vedere funcțional și morfologic poate duce la o mai bună înțelegere a circuitelor neuronale și, în final, a creierului. Lucrarea de față descrie cteva progrese metodologice care pot ajuta la descifrarea semnăturilor moleculare ale celulelor neuronale ale trunchiului cerebral și ale ganglionilor retinali în curs de dezvoltare.

Factori de transcriere Brn3

Brn3a, *Brn3b*, *Brn3c* sunt membrii restrânsei subfamiliei a factorilor de transcriere de domeniu POU. Cei trei membri distincți ai familiei, *Brn3a*, *Brn3b* și *Brn3c* sunt exprimați în subtipuri morfologice distincte ale celulelor retinale ganglionare (RGC) și ale neuronilor ganglionari rahidieni (DRG) [Badea și Nathans, 2011; Badea et al., 2012]. În urechea internă *Brn3a* și *Brn3b* sunt prezenți în neuronii ganglionari spirali și vestibulari, în timp ce *Brn3c* este singurul exprimat în celulele ciliate auditive și vestibulare [Badea et al. 2012; Erkman et al., 1996; Gan et al., 1996; Ninkina et al., 1993; Turner et al. 1994; Xiang et al., 1997, 1995, 1998] (vezi figura 1).

Mutațiile țintite ale genelor *Brn3* duc la apariția unei mari varietăți de fenotipuri. Mutanții *Brn3a* mor la naștere. Fenotipul retinal include o proporție ridicată a morfologiilor celulare bistratificate [Badea et al., 2009]. Deleția lui *Brn3b* duce la o pierdere de 70% a celulelor retinale ganglionare (RGC), [Erkman et al., 2000; Xiang et al., 1998], celulele rămase manifestând defecte de ghidare axonală la nivel intra-retinal [Badea et al., 2009; Erkman et al., 2000].

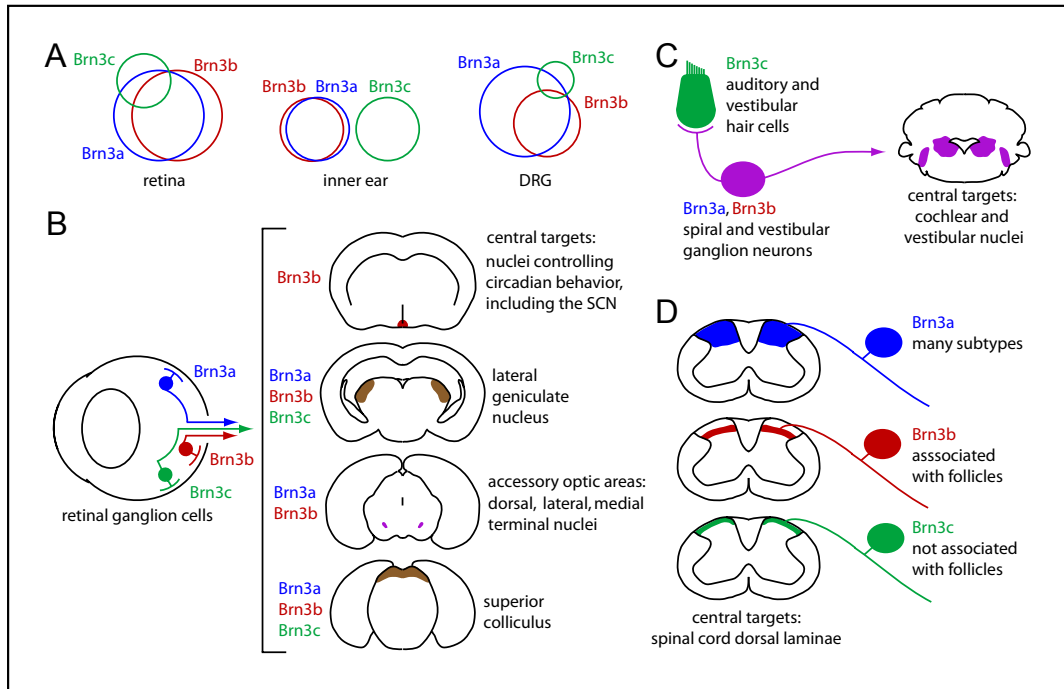


Fig 1: **Exprimări combinatorice ale factorilor de transcriere Brn3 (A)**

Diagrame reprezentând numerele aproximative de neuroni și modelele lor de exprimare ale celor trei TF Brn3 în retină, urechea internă și în ganglionul rahidian (DRG). (B) Celule ganglionare cu proiecție în diverse regiuni ale sistemului nervos central exprimă diferite combinații ale *Brn3a*, *Brn3b* și *Brn3c*. Nucleul suprachi-asmatic (SCN), care controlează ritmul circadian, primește informație doar de la RGC *Brn3b*+. Nucleul geniculat lateral primește informație de la toate cele trei celule în care exprimă *Brn3* și apoi o transferă cortexului vizual. Sistemul optic auxiliar care controlează mecanismele de stabilizare a imaginii primește informație de la celulele pozitive *Brn3a* și *Brn3b*. Coliculul superior primește informație de la celulele în care se exprimă *Brn3a*, *Brn3b* și *Brn3c*. (C) În cadrul sistemului cohleovestibular, celulele ciliate senzoriale exprimă *Brn3c*, iar majoritatea ganglionilor spirali și vestibulari exprimă atât *Brn3a* cât și *Brn3b*. (D) În cadrul sistemului somatosenzorial, *Brn3a* este exprimat de toate sau de aproape toate tipurile de neuroni senzoriali, în timp ce *Brn3b* este prezent în celulele asociate foliculilor. *Brn3c* este exprimat în fibrele non asociate foliculilor [Badea et al., 2012]

Retina

Retina este extensia sistemului nervos central, principala ei funcție fiziologică fiind transmiterea informațiilor vizuale formatoare și non-formatoare de imagini [Foster și Hankins, 2002] către creier. Vederea formatoare de imagini constă în toate informațiile vizuale care sunt esențiale pentru identificarea și urmărirea obiectelor. Vederea non-formatoare de imagini furnizează toate indiciile necesare pentru sincronizarea ceasului biologic cu ciclul întuneric-lumină (fotosincronizarea circadiană), pentru controlarea diametrului retinei și reglarea multor altor comportamente biologice [Fu et al., 2005]. Diversitatea celulară a retinei a fost analizată în detaliu pentru prima oară acum 100 de ani de către Cajal [Cajal, 1893]. De la Cajal încoace, s-a descoperit că țesutul cu o grosime de 200 μm [Gollisch and Meister, 2010] aflat în spatele ochiului este compus din cinci clase celulare diferite, celule fotoreceptoare, bipolare, orizontale, amacrine și ganglionare care sunt organizate în trei straturi nucleare și două straturi plexiforme, unde au loc conexiunile sinaptice ale acestor celule [Masland, 2001] (vezi figura 2).

Celule retinale ganglionare

Deoarece punctul central al prezentei lucrări îl constituie celula retinală ganglionară, caracteristicile sale morfologice și fiziologice vor fi discutate în detaliu. Informația vizuală colectată și procesată de retină este transmisă creierului prin intermediul a 15-20 de tipuri de celule retinale ganglionare [Badea și Nathans, 2011; Boycott și Wassle și Boycott, 1991, 1974; Cajal, 1893; Masland, 2001; Wassle, 2004]. Tipurile de celule retinale ganglionare pot fi identificate după proprietățile lor morfologice [Amthor et al., 1984; Boycott și Wassle, 1974; Rockhill et al., 2002], precum mărimea somei [Oyster et al., 1981], modelul și suprafața laminării dendritice. Bazându-ne doar pe morfologie, numărul tipurilor de celule retinale ganglionare la șoarece variază: 11 [Badea și Nathans, 2004; Kong et al., 2005], 14 [Coombs et al., 2006], 17 [Sun et al., 2002], 22 [Volgyi et al., 2009]. Prin analizarea morfologiei unei anumite celule ganglionare, este posibilă estimarea partenerilor săi sinaptici și aproximarea câmpului său receptor [Badea și Nathans, 2011; Kim et al., 2008].

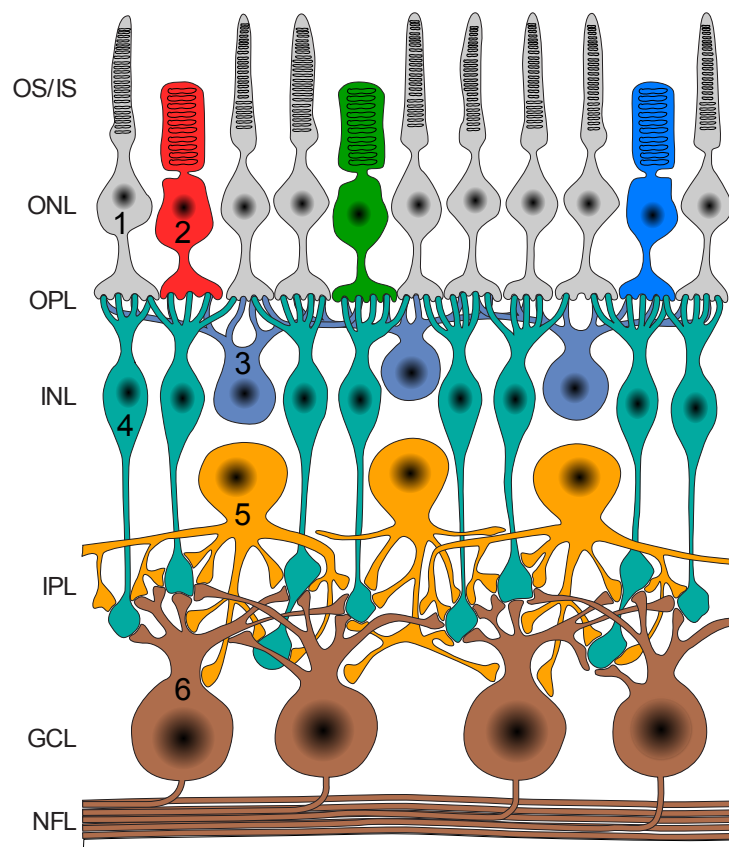


Fig 2: **Schemă a retinei la mamifere.** Cele șase clase de neuroni în retina la mamifere: bastonașe (1), conuri (2), celule orizontale (3), celule bipolare (4), celule amacrine (5) și celule retinale ganglionare (RGC) (6). Distribuția lor laminară (OS/IS, segmente externe și interne de bastonașe, conuri; ONL, stratul nuclear extern; OPL, stratul plexiform extern; INL, stratul nuclear intern; IPL, stratul plexiform intern; GCL, stratul celulelor ganglionare; NFL, stratul fibrelor nervului optic) modificată după [Wassle, 2004].

Obiective

Sistemul nervos central este compus din milioane de neuroni interconectați, diferiți din punct de vedere morfologic. Depinzând de funcția lor, neuronii se împart în trei clase principale: senzoriali, motorii și interneuroni, fiecare având multiple variante morfologice și fiziologice. Diferitele clase de neuroni posedă semnături moleculare diferite conservate la diferite specii. Principalul țel al lucrării de față a fost identificarea acelor tipuri de celule neuronale ale sistemului nervos în curs de dezvoltare care exprimă factorul de transcriere neuronal specific domeniului POU, Brn3b.

Retina la mamifere conține aproximativ 50 de neuroni diferiți din punct de vedere morfologic [Masland2001]. Singurul neuron cu proiecție din retină este celula retinală ganglionară. Scopul secundar al acestei teze a fost identificarea genelor responsabile pentru generarea diverselor celule retinale ganglionare distincte din punct de vedere morfologic și fiziologic în timpul dezvoltării. Pentru îndeplinirea acestui scop, am analizat profilele de exprimare genetică a celulelor retinale ganglionare prin secvențializarea Next-Generation a ARN-ului. În afara faptului că ne ajută să descifrăm regulatorii diversității neuronale, ar putea să faciliteze înțelegerea mecanismelor bolilor, de vreme ce multe afecțiuni neurologice sunt rezultatul unei morfologii neuronale alterate [Fiala2002].

Receptorul tirozin-kinază, cRet, este exprimat în neuronii ganglionari trigeminali și în diverse tipuri de neuroni ganglionari rahidieni. Un scop adițional al acestei teze a fost studierea exprimărilor diferențiale ale cRet în diverse tipuri de celule retinale ganglionare. Morfologiile celulelor ganglionare care exprimau cRet au fost analizate prin intermediul marcării histochimice rare.

Scopul final al acestei lucrări a fost validarea noilor instrumente genetice pentru studierea și manipularea circuitelor neuronale. Liniile de șoareci cu celule ganglionare specifice exprimării recombinazei Cre nou dezvoltate vor permite efectuarea unor analize de înaltă rezoluție la nivel celular ale RGC în curs de dezvoltare.

Modelul de exprimare a *Brn3b* în timpul dezvoltării la șoarece

Pentru a determina ce alte tipuri de celule neuronale exprimă *Brn3b* într-un model constant sau temporar, am analizat țesuturi embrionare pentru a găsi exprimări ale *Brn3b* prin utilizarea unei linii reporter condiționale *Brn3b^{CKOAP}*, dependente Cre [Badea et al., 2009]. Pentru recombinaarea rară am profitat de o linie duală farmacologică controlabilă Cre, *R26^{rtTA-CreER}* [Badea et al., 2009]. Pentru a vizualiza întregul model de exprimare a *Brn3b* am folosit CreER indus ubicuu exprimat [Badea et al., 2003]. Activarea CreER s-a efectuat prin injectarea intraperitoneală a 4HT cu două zile înainte de recoltarea embrionilor. Pentru a recombină locusul condițional *Brn3b* într-un mod dependent de *Phox2b* am folosit recombinaza Cre acționată de *Phox2b* [Scott et al., 2011].

Profile de exprimare a celulelor retinale ganglionare pozitive *Brn3a* și *Brn3b*

Pentru a determina profilele de exprimare ARN ale celulelor retinale ganglionare *Brn3a* și *Brn3b* la diferitele stadii de dezvoltare, animale heterozigote *Brn3a* sau *Brn3b* cu recombinaza Cre specifică ochiului, *Pax6α-Cre(Brn3a^{WT/KO})*; *Pax6α-Creori Brn3b^{WT/KO}*; *Pax6α-Cre*) au fost încrucișate cu animale cu alele condiționale homozigote *Brn3a^{CKOAP/CKOAP}* ori *Brn3b^{CKOAP/CKOAP}*. Se așteaptă ca generația rezultată din această încrucișare să fie *Brn3a^{AP/WT}* ori *Brn3a^{AP/KO}*, respectiv *Brn3b^{AP/WT}* ori *Brn3b^{AP/KO}* (vezi figura 3). Retina recoltată de la animalele E15.5 sau P3.5 a fost disociată cu ajutorul unui protocol pe bază de papaină adaptat de la Tabata et al. [2000]. După disocierea țesuturilor, celulele retinale ganglionare au fost separate de suspensia celulară prin purificare imunomagnetică. Protocolul utilizează sfere Dynal Pan Mouse IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, SUA) cuplate cu un anticorp monoclonal anti-AP (VIB, Gent, Belgia). Acoperirea sferelor Dynal a fost efectuată în paralel cu disocierea țesuturilor. Sferele au fost incubate împreună cu anticorpul anti-AP timp de 40 de minute la temperatura camerei (TC). Aproximativ 2×10^6 sfere Dynal acoperite au fost

incubate cu 10×10^6 celule retinale dissociate timp de 5 minute la TC. În timpul incubării, molecula AP fixată prin glicosilfosfatidilinositol (GPI) e recunoscută și legată de sferele Dynal acoperite cu anti-AP. După incubare, celulele ganglionare pozitive cu sferă Dynal asociată AP au fost separate prin izolare magnetică. După ce s-a efectuat genotipul animalelor donatoare, 3-4 mostre sortate au fost combinate corespunzător pentru a crește randamentul ARN. După ce extragerea ARN-ului a fost dusă la bun sfârșit, profilele de exprimare au fost analizate cu Illumina Genome Analyzer IIX. Pentru schematica purificării RGC vezi figura 4.

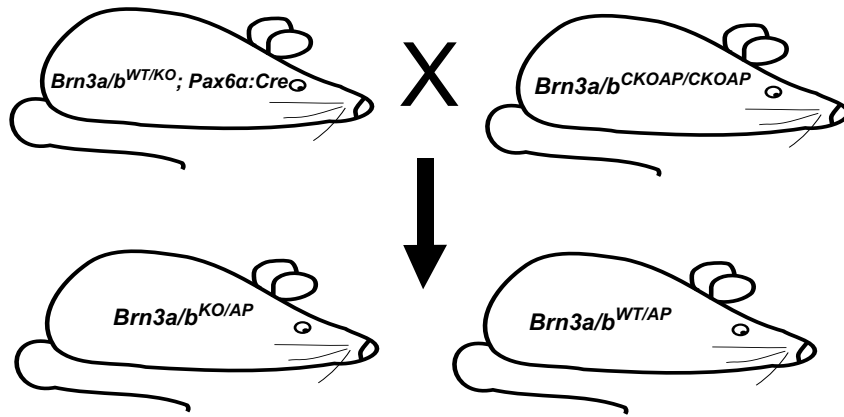


Fig 3: **Încrucișări la animale.** Diagramă arătând încrucișările efectuate care produc animale cu celule retinale ganglionare pozitive $Brn3a^{AP}$ și $Brn3b^{AP}$.

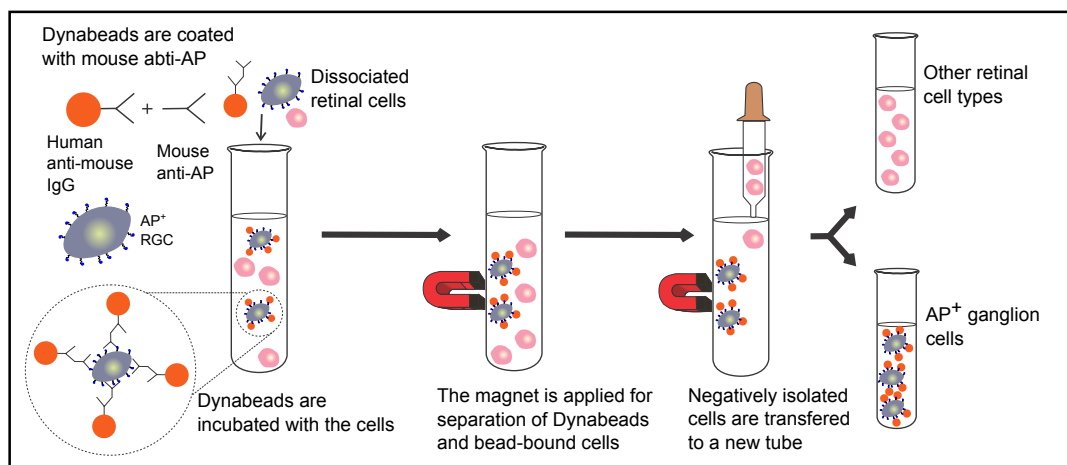


Fig 4: **Schematica protocolului de sortare.** Adaptat din Cat. no. 114.21D (Invitrogen Dynal AS Oslo)

Analiză funcțională in vivo utilizând vectori virali

Pentru a se putea efectua analiza funcțională in vivo ale genelor nou identificate, au fost folosiți șoareci dependenți Dre condiționali *Brn3a*^{CKOCre} și *Brn3b*^{CKOCre}, generați de Miruna Ghinia în colaborare cu centrul NIH-NEI Transgenic core.

Pentru a demonstra că alelele *Brn3a*^{Cre} și *Brn3b*^{Cre} se pot activa cu succes într-un mod dependent RGC, s-a folosit un virus reporter dependent Cre, AAV1 - CAG - FLEX - tdTomato - WPRE - bGH (de acum înainte AAV1.FLEX.tdT) (Perelman Philadelphia PA). Pentru procedura de injectare virală intraoculară, puii au fost aneșteziati prin hipotermie în gheață pentru 30s în ziua postnatală 0 (P0), s-a făcut o incizie în pleoapa ochiului și au fost injectați în jur de 0.2 μ L de amestec de doi vectori virali incluzând AAV1.FLEX.tdT (titru: $5.7 \cdot 10^8$), Programul de Terapie Genică de la Universitatea din Pennsylvania, Philadelphia, PA și virusul AAV1.GFP (titru: $1 \cdot 10^8$) GFP, cadou de la Dr. Peter Colosi și Zujhian Wu cu ajutorul unui femtojet (Eppendorf) prevăzut cu un capilar de sticlă. După procedură, puii au fost așezați pe un suport încălzit și după ce s-au recuperat complet, au fost înapoiți mamelor lor.

Modelul de exprimare al *Brn3b* în decursul dezvoltării la șoarece

În ultimii ani, caracterizarea moleculară a tipurilor de celule neuronale a câștigat mult în importanță. Neuronii viscerali și somatici pot fi diferențiați prin intermediul semnăturilor lor moleculare. Neuronii viscerali exprimă și necesită combinarea genelor homeobox *Phox2b* Pattyn et al. [1997], neuronii somatomotori exprimă și necesită combinarea genelor homeobox *Mnx1*, *Lhx3*, *Lhx4*, *Islet1* [Arber et al., 1999; Sharma et al., 1998; Tsuchida et al., 1994]. Marea majoritate a neuronilor somatosenzitivi exprimă combinatoric factorii de transcriere Brn3a, Brn3b și Brn3c legați de domeniul POU [Badea et al., 2012].

Pentru a determina ce alte tipuri celulare exprimă *Brn3b* am analizat țesuturi embrionale, folosind linia Cre dependent *Brn3b^{CKOAP}* [Badea et al., 2009]. (Vezi figura5)

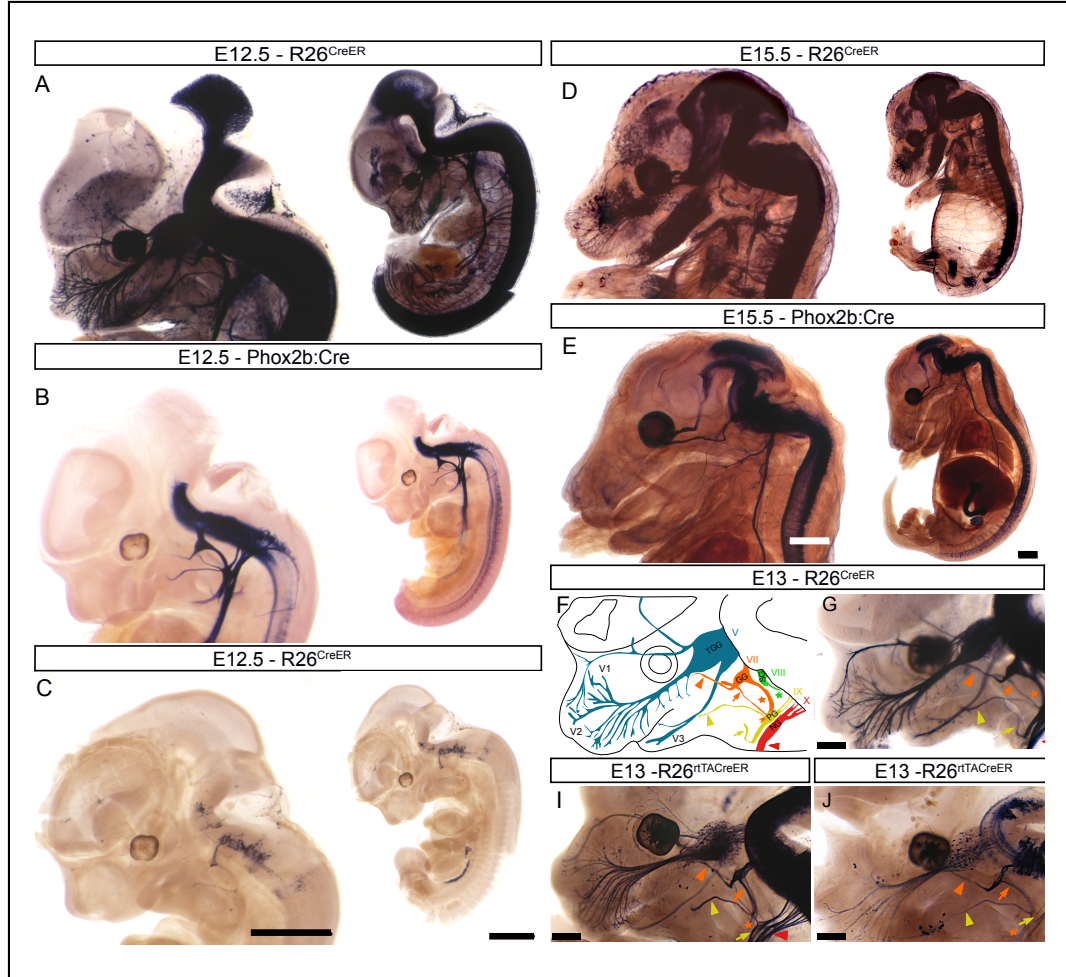


Fig 5: Modelul de exprimare Brn3b în timpul dezvoltării embrionare.

Pentru a determina modelul embrionar al exprimării *Brn3b*, animale condiționale *Brn3b^{CKOAP}* au fost încrucișate cu animale (A,D,G) *R26^{CreER}*, (B,E) *Phox2b-Cre*, sau (C,I,J) *R26^{rtTA-CreER}*. Embrionii au fost colectați în zilele (A,B,C) 12.5, (G,I,J) 13 și (D,E) 15.5. Modelul complet de exprimare al *Brn3b* a fost determinat prin recombinarea alelelor condiționale *Brn3b^{CKOAP}* utilizând CreER exprimat sub promotor-ul R26. (A,D) Pentru a satura activitatea Cre, mamele gestante au fost injectate cu 250 μ g de 4HT. Printre regiunile pozitive AP s-au numărat retina, măduva spinării, trunchiul cerebral, mezencefalul, ganglionul trigeminal (TGG), nervul trigemen (V), nervul facial (VII), nervul glosfaringian (IX) și vag (X). (B,E) Intersectarea factorilor de transcriere *Brn3b* și *Phox2b* a fost arătată prin recombinarea alelei condiționale *Brn3b* cu o *Phox2b* specifică Cre.

Regiuni care au exprimat AP au inclus măduva spinării, nervii VII, IX și X. (C,I,J) Modelul de exprimare rară al *Brn3b* a fost obținut prin utilizarea unei linii *R26^{rtTA-CreER}*. Nivelele diferite de recombinare rară ale alelelor condiționale au fost controlate prin injectarea a 0.2 mg/g de hrană cu conținut de doxiciclină și (C) 12.5 μg, (I) 50 μg, (A,D,G) 250 μg și (J) 17.5 μg 4HT. (F-J) Imagine detaliată a nervilor cranieni marcați la E13. (F) Schemă detaliată a nervilor marcați, observabilă prin exprimarea AP. Nervul trigemen cu cele trei ramuri ale sale: oftalmic (V1), maxilar (V2), mandibular (V3). Nervul pietros mare (GSPN, vârf de săgeată portocaliu), nervul coarda timpanului (CT, săgeată portocalie), și ramurile principale ale nervului facial (stea portocalie). Nervul cohleovestibular (stea verde), ramurile linguale (vârf de săgeată galben) și faringiene (săgeată galbenă) ale nervului glosfaringian și nervul vag (vârf de săgeată roșu). (G-J) O cantitate diferită de expunere la 4HT permite marcarea tuturor sau numai a câtorva fibre nervoase din nervii cranieni în curs de dezvoltare. Scară: (A-E) 1 mm, (F-J) 500 μm.

Profile de exprimare ale celulelor retinale ganglionare pozitive *Brn3a* și *Brn3b*

După validările primare, am început o analiză aprofundată a profilelor de exprimare. Toate probele au fost procesate în duplicate. Pentru o comparație de ansamblu, atât duplicatele cât și probele supernatant și RGC au fost suprapuse, în funcție de valoarea lor de exprimare, raportată în FPKM (vezi figura 6).

A fost observat un număr comparabil de transcrieri pentru ambele duplicate și genele specifice celulelor ganglionare au devenit evidente (cercurile roșii figura 6). În total am identificat aproximativ 2500 gene care sunt îmbogățite în eșantioanele RGC față de supernatant, bazându-ne pe îmbogățirea dublă RGC versus retină, mai mare sau egală ca două criterii FPKM. Deși numărul de gene specifice RGC este impresionant, din păcate numărul de gene reglate de *Brn3a/b* nu a fost evident la această rezoluție.

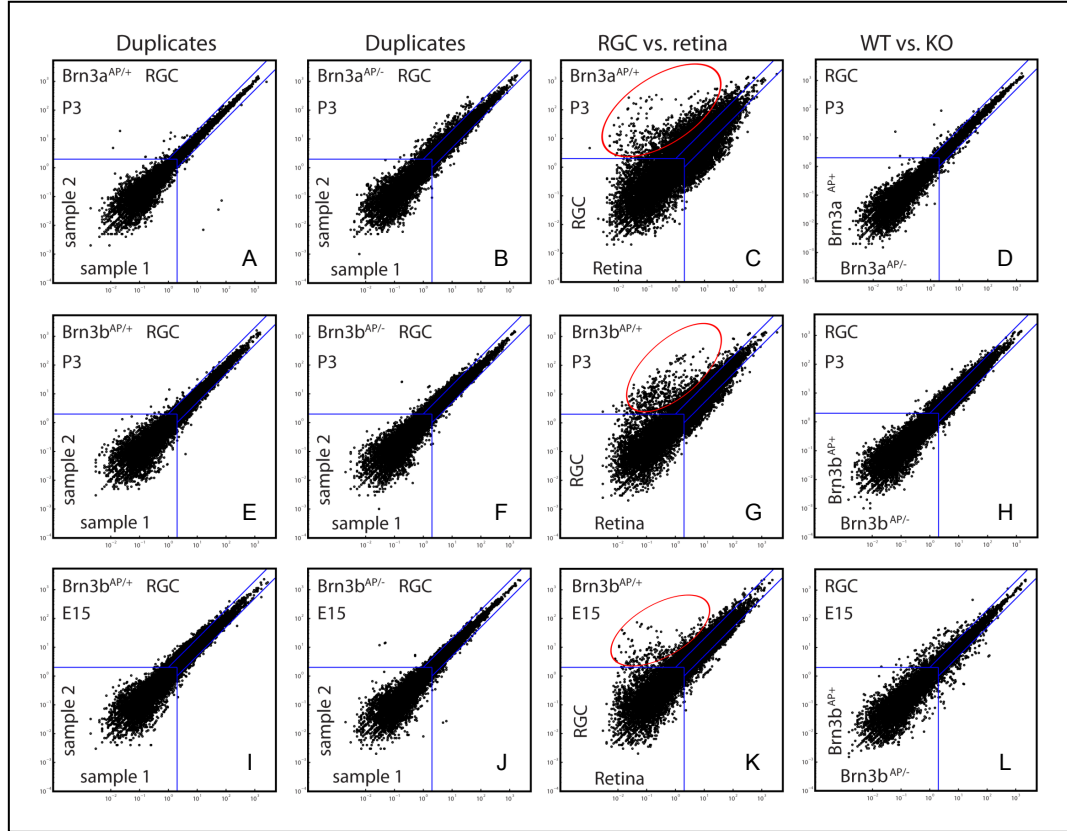


Fig 6: **Comparație de ansamblu a probelor de secvențializare ARN.**

Duplicatele secvențializate și RGC vs. probe supernatant suprapuse. (A) Proba1 *Brn3a*^{AP/+}, RGC vs. proba2 RGC, P3, (B) *Brn3a*^{AP/-}, Proba1 RGC vs. proba2 RGC, P3, (C) *Brn3a*^{AP/+}, RGC vs. retina, P3, (D) *Brn3a*^{AP/+} RGC vs. *Brn3a*^{AP/-} RGC, P3, (E) Proba1 *Brn3b*^{AP/+}, RGC vs. proba2 RGC, P3, (F) *Brn3b*^{AP/-}, proba1 vs. proba2, P3, (G) *Brn3b*^{AP/+}, RGC vs. retina, P3, (H) *Brn3b*^{AP/+} RGC vs. *Brn3b*^{AP/-} RGC, P3, (I) Proba1 *Brn3b*^{AP/+}, RGC vs. proba2 RGC, E15, (J) Proba1 *Brn3b*^{AP/-}, RGC vs. proba2 RGC, E15, (K) *Brn3b*^{AP/+}, RGC vs. retina, E15, (L) *Brn3b*^{AP/+} RGC vs. *Brn3b*^{AP/-} RGC, E15. Pragul a 2 FPKM este marcat prin liniile albastre. Cercurile roșii indică genele specifice RGC. Axele reprezintă FPKM în scară logaritmică.

Analiza funcțională in vivo utilizând vectori virali

Succesul general al injectiilor oculare P0 a fost dovedit de prezența celulelor pozitive GFP, care erau infectate cu virusul independent Cre AAV1.CAG.GFP. Astfel se poate observa cu ușurință din fluorescența canalului verde a retinelor montate plat că multe celule erau infectate în toate retinele (figura 7 C-J). În sfârșit, celulele pozitive tdTomato erau localizate în stratul celulei ganglionare (figura 7 C,D) și aveau morfologii axonale și de arbori dendritici caracteristice (figura 7 A, B, D și E), ceea ce indica faptul că aceste celule erau RGC.

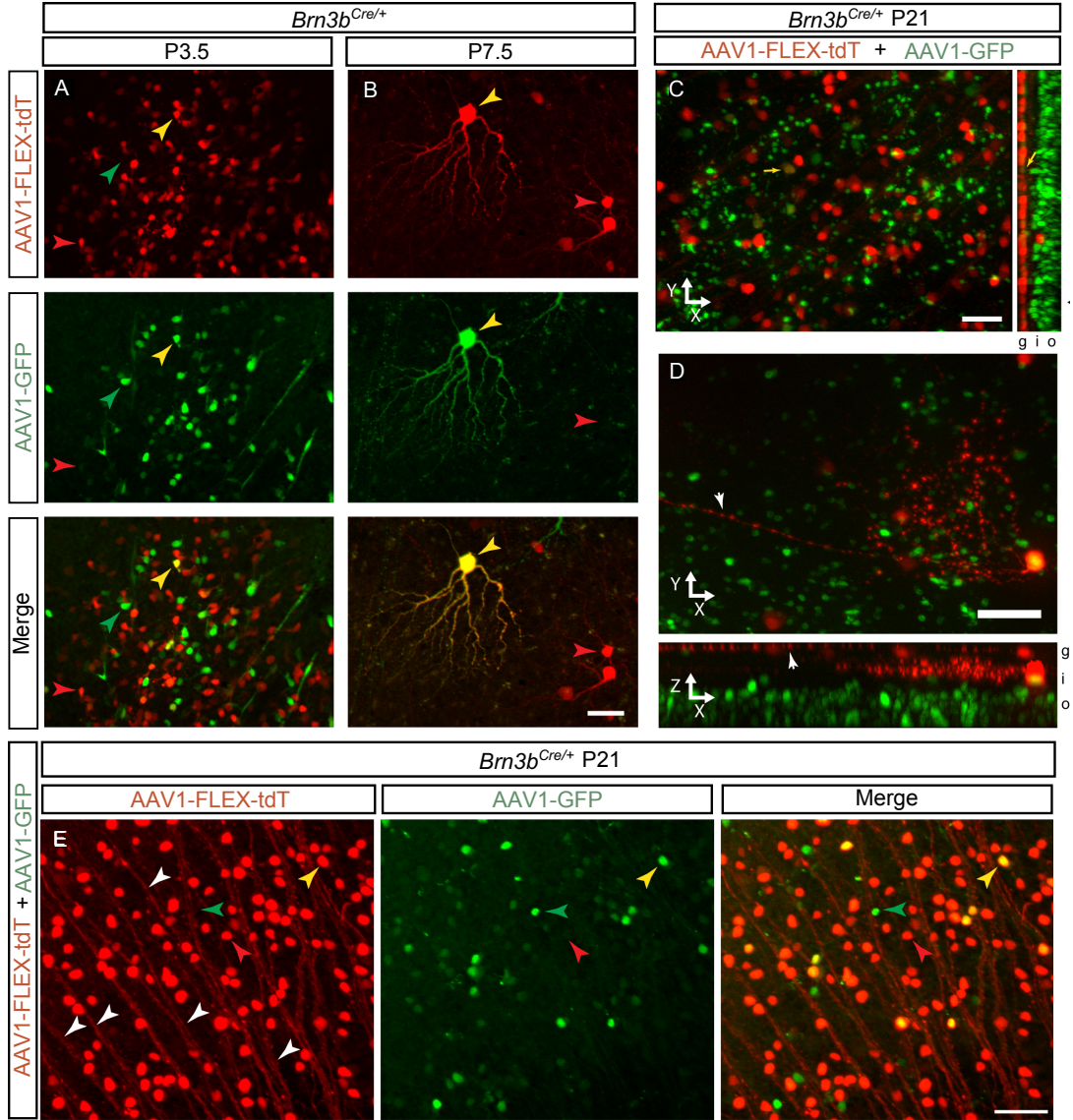


Fig 7: Infecția cu AAV1-FLEX-tdTomato la rezultate P0 în exprimarea tdTomato specifică RGC, deja detectabilă la P3.5 și P7.5. Probele de retină sunt de la (A) pui P3.5, (B) pui P7.5 sau (C-E) adulți. Panourile în A, B sunt imagini tdTomato (sus), GFP (mijloc), și combinate (jos). Panourile A-D sunt de la șoareci *Brn3b^{Cre/+}* și E de la șoareci *Brn3a^{Cre/+}*, infectați la P0 conform protocolului descris în figura anterioară. Vârfurile de săgeată roșii, verzi și galbene indică exemple de celule pozitive sau dublu pozitive roșii și verzi. Se observă că arborele dendritic al celulei dublu pozitive în B este vizibil în mod clar atât în canalul roșu cât și în cel verde. (C) Proiecții de-a lungul direcției z

(stânga) și x (dreapta) a unui teanc de la o retină *Brn3b^{Cre/+}* marcată dens, indicând o majoritate covârșitoare a corpurilor celulare fluorescente roșii stratificate în stratul GCL (g), în timp ce un număr considerabil de corpuri fluorescente verzi sunt observate de-a lungul stratului nuclear intern și extern (i și o). (D) Proiecții de-a lungul direcției z (sus) și y (jos) a unui teanc dintr-o retină *Brn3b^{Cre/+}* puțin infectată, prezentând RGC deplasat, cu axonul (vârfuri de săgeată albe) și arboarele său dendritic, văzuți atât din perspectiva plată cât și din cea transversală. (E) proiecția z a unui teanc dintr-o retină *Brn3a^{Cre/+}* dens marcată, prezentând corpuri celulare marcate singulare sau duble, și axoni RGC marcați tdTomato (vârfuri de săgeată albe). Scară: 50 μ m. Modificat după [Sajgo et al., 2014].

Discuții Generale

Am profitat de liniile de șoareci dezvoltate de Badea et al. [2009], linii care activează condițional exprimarea AP de la promotorii *Brn3a* sau *Brn3b* pentru a vizualiza neuronii individuali în curs de dezvoltare ai trunchiului cerebral și pentru a sorta celulele retinale ganglionare pentru a realiza profilele genelor. Deci, munca descrisă în teza mea va ajuta să se determine care sunt codurile genetice combinatorice care stabilesc soarta neuronilor. Noi progrese tehnice în domeniul profilării genetice au dus la identificarea unor markeri neuronali specifici. Identificarea acestor markeri va fi esențială pentru o mai bună înțelegere a comunicării neuronale și pentru a permite disecția genetică a circuitelor neurale. Câțiva markeri neuronali specifici precum *Brn3*, *Lhx*, *Phox2b*, *cRet* definesc tipuri de celule diferite din punct de vedere morfologic și fiziologic [Badea et al., 2012; Luo et al., 2009; Pattyn et al., 1997]. La adulți, modelele de exprimare ale acestor gene diferențiază neuronii somatici *Brn3*, *Lhx*, *cRet* de cei viscerali *Phox2b*+. Pentru a investiga dacă acest lucru este adevărat pentru sistemul nervos în curs de dezvoltare, am analizat modelele de exprimare ale *Brn3b*, *cRet* și *Phox2b* la diferite momente ale dezvoltării. Exprimarea *Brn3b* a fost analizată utilizându-se marcarea genetică rară. Această tehnică prezintă mai multe avantaje față de alte metode de marcarea. Marcarea anterogradă cu coloranți lipofili este adecvată pentru colorația generală a axonilor cu proiecție, în timp ce tehnicile de marcarea fluorescentă sunt insuficiente pentru identificarea detaliilor morfologice subtile, iar colorația Golgi este non-specifică. Utilizând această tehnică de marcarea, am avut posibilitatea să analizăm mai departe exprimarea *Brn3* în sistemul nervos central și periferic. Am confirmat exprimarea *Brn3b* în ganglionii trigeminali și în cei geniculați senzitivi. Acest fapt nu este surprinzător deoarece *Brn3b* este un marker cunoscut al neuronilor somatosenzitivi [Badea et al., 2012]. Cei mai importanți neuroni transmițători ai retinei, celulele ganglionare (RGC) au 20 de variante morfologice diferite. Pentru o analiză exactă a profilelor de exprimare a RGC, am profitat de linii de șoareci dezvoltate de Badea et al. [2009], linii care activează condițional exprimarea AP de la promotorii *Brn3a* sau *Brn3b*, după cum am descris anterior. Aceasta a permis purificarea RGC prin utilizarea sferelor Dynal asociate anti-AP. Scopul specific al selecției a fost identificarea genelor

responsabile cu sinteza varietății morfologice ridicate în timpul dezvoltării retinale. Prin compararea profilelor de exprimare ale celulelor retinale ganglionare *Brn3a/b*^{WT} și *Brn3a/b*^{KO}, am putut să aprofundăm înțelegerea mecanismelor moleculare responsabile pentru fenotipurile mutante observate la șoarecii knock-out. Mutanții *Brn3b* pierd 70% din celulele lor ganglionare și prezintă defecte intraretinale de ghidare axonală. Deleția lui *Brn3a* are un fenotip retinal mai scăzut, crescând numărul RGC bistratificate.