

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΝΕΥΡΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

Μεταπτυχιακή εργασία

**“Ο ρόλος των μικρών Rho GTPασών, Rac1 και Rac3
στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων του φλοιού. In vitro και in vivo
ανάλυση.”**

ZOYZANA KOYNOYPIA

Υπεύθυνη καθηγήτρια : κα. Δόμνα Καραγωγέως

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ
2012**

SUMMARY

Cortical GABAergic interneurons provide inhibitory input to the pyramidal cells and are characterized by extraordinary neurochemical and functional diversity. Their dysfunction and abnormal development have been associated with severe disorders, like autism, epilepsy and schizophrenia. Although recent studies have uncovered some of the molecular components , underlying interneuron development, including the cellular and molecular mechanisms guiding their migration to the cortex, the intracellular components involved are still unknown.

Rac1, a member of the Rac subfamily of Rho GTPases , have been implicated in various aspects of cortical development such as cell cycle dynamics , axonogenesis , and neuronal migration. Rac3 has an almost identical sequence with Rac1 but is specifically expressed in the nerve system. Recent data from our lab have adressed the specific role of Rac1 in interneuron progenitors originating in the medial ganglionic eminence (MGE), the subpallial source of GABAergic interneurons, via Cre/loxP technology. In the absence of Rac, only half of GABAergic interneurons populate the cortex. Their progenitors are delayed in exiting the cell cycle and as a consequence migrate towards the pallium later than controll cells.

The partial loss of the interneurons suggests the antistathmistic role of another molecule. By examinining double mutants for Rac1 and Rac3 it is possible to determine whether the synergistic effects of Rac1 and Rac3 mutants reflect qualitatively-distinct effects of these Rho GTPases or rather quantitative effects of their combine activities. In this sudy we examine the migration in Rac1, Rac3 and Rac1/Rac3 mutants. We observe that during early embryonic stages the Rac1/Rac3 phenotype is similar to the Rac1. Later on Rac1/Rac3 mutants interneurons have a more severe deffect in the migration. Loss of both Rac1 and Rac3 GTPases cause defects in actin and microtubule dynamics.

Finally, in this study we tried to culture cortical interneurons in 3D scaffolds that can better represent in vivo cellular behavior.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
A. Ανάπτυξη των ενδονευρώνων του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων	3
1. Ανάπτυξη του τελεγκεφάλου και σχηματισμός του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων στα θηλαστικά.....	3
2. Κατηγοριοποίηση των ενδονευρώνων του φλοιού.....	6
3. Προέλευση και καθορισμός των ενδονευρώνων του φλοιού. Η περιοχή του MGE.....	8
4. Κυτταρικός μηχανισμός της μετανάστευσης των ενδονευρώνων.....	11
B. ενδοκυττάρια σήματα στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων του φλοιού: Η οικογένεια των Rho-GTPασών και οι πρωτεΐνες Rac1 και Rac3	13
1. Ο ρόλος των Rac GTPασών στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού.....	14
2. Ο ρόλος των Rac GTPασών στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου.....	16
Γ. 3D καλλιέργειες κυττάρων: Τα 3D ικρίώματα πυριτίου.	17
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	18
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	19
I) Πειραματόζωα.....	19
II) Γονοτύπηση	19
A. Απομόνωση Γενομικού DNA από ιστούς	19
B. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	19
III) Καλλιέργειες κυττάρων.....	19
IV) Επεξεργασία ιστών για κρυτομές.....	19
V) Ανοσοφθορισμός.....	21
VI) Υβριδοποίηση <i>in situ</i> για τον εντοπισμό mRNA σε κρυτομές.....	23
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	24
1. Απενεργοποίηση της Rac-1 στην έσω γαγγλιονική προεξοχή του βασικού τελεγκεφάλου και της Rac3 κατά την εμβρυογένεση	24
2. Μελέτη του φαινοτύπου των Rac1, των Rac3 και των διπλά ελλειμματικών μυών κατά την εμβρυογένεση.....	25
3. Μελέτη των Rac1/Rac3 ελλειμματικών ενδονευρώνων <i>in vitro</i>	33
4. Μελέτη των ενδονευρώνων <i>in vitro</i> σε 3D ικρίωματα πυριτίου.....	38
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	40
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	43

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ενδονευρώνες του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων διαδραματίζουν βασικό ρόλο στα νευρικά κυκλώματα του φλοιού, δημιουργώντας ανασταλτικές συνάψεις με τους πυραμιδικούς νευρώνες. Χαρακτηρίζονται από αξιοθαύμαστη ποικιλομορφία, τόσο ως προς τα μοριακά, όσο και ως προς τα ηλεκτροφυσιολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά τους και η δυσλειτουργία τους έχει εμπλακεί σε ποικίλες παθολογικές καταστάσεις, όπως ο αυτισμός, η επιληψία και η σχιζοφρένεια. Ωστόσο, τα ενδοκυττάρια τα ενδοκυττάρια μονοπάτια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων είναι ακόμη άγνωστα.

Η πρωτεΐνη Rac1 είναι μέλος της οικογένειας των Rho-GTPασών, εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, ενώ κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, εμπλέκεται σε πολλαπλές διεργασίες, όπως στη δημιουργία νευραξόνων, στην κυτταρική μετανάστευση και στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Η Rac3 πρωτεΐνη, έχει σχεδόν ταυτόσημη αλληλουχία με την Rac1 και εκφράζεται αποκλειστικά στο νευρικό σύστημα.

Πρόσφατα δεδομένα από ομάδα του εργαστηρίου επισημαίνουν το ρόλο της Rac1 στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων. Απενεργοποίηση της Rac1 στους ενδονευρώνες που προέρχονται από την έσω γαγγλιονική προεξοχή (MGE), οι οποίοι αποτελούν την πλειοψηφία των ενδονευρώνων του φλοιού, μέσω της τεχνολογίας του Cre/loxP ανασυνδυασμού, έχει σαν αποτέλεσμα τα κύτταρα αυτά να καθυστερούν να εξέλθουν από τον κυτταρικό κύκλο, κατά συνέπεια να υπάρχει μειωμένη μετανάστευση και τελικά στον ώριμο εγκέφαλο να εντοπίζονται μόνο οι μισοί ενδονευρώνες.

Η απώλεια μέρους των ενδονευρώνων που προέρχονται από τη συγκεκριμένη περιοχή υποδεικνύει την αντισταθμιστική δράση κάποιου άλλου παράγοντα.

Μελέτη των διπλά μεταλλαγμένων ζώων, για τις Rac1 και Rac3 πρωτεΐνες, μπορεί να διασαφηνίσει το διαφορετικό ρόλο των πρωτεϊνών αυτών στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων καθώς και το βαθμό που δρουν συνεργατικά. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε συγκριτικά το πρότυπο της μετανάστευσης των προερχόμενων από το MGE ενδονευρώνων, σε ζώα ελλειμματικά μόνο για την Rac1 ή μόνο για τη Rac3 πρωτεΐνη και σε διπλά ελλειμματικά ζώα, κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Δείχθηκε ότι στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια, τα Rac1 ελλειμματικά ζώα εμφανίζουν παρόμοιο πρότυπο μετανάστευσης με τα διπλά ελλειμματικά ζώα. Σε επόμενα στάδια τα διπλά ελλειμματικά ζώα εμφανίζουν μεγαλύτερη καθυστέρηση στη μετανάστευση των ενδονευρώνων, ενώ και λιγότεροι νευρώνες φτάνουν τελικά στο φλοιό. Εξετάστηκε επίσης η μορφολογία των Rac1/Rac3 ελλειμματικών ενδονευρώνων *in vitro*. Η απώλεια των πρωτεϊνών αυτών φαίνεται να επηρεάζει τη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων και τα δυναμικά της ακτίνης, με αποτέλεσμα να μην σχηματίζεται σωστά η καθοδηγητική απόφυση, που είναι βασική στη μετανάστευση των νευρώνων.

Τέλος, έγινε μία πρώτη προσπάθεια ανάπτυξης των ενδονευρώνων σε τρισδιάστατα ικρίωματα πυριτίου. Οι ενδονευρώνες, στις συνθήκες αυτές βρέθηκε να αναπτύσσονται λιγότερο και για μικρότερο χρονικά διάστημα.

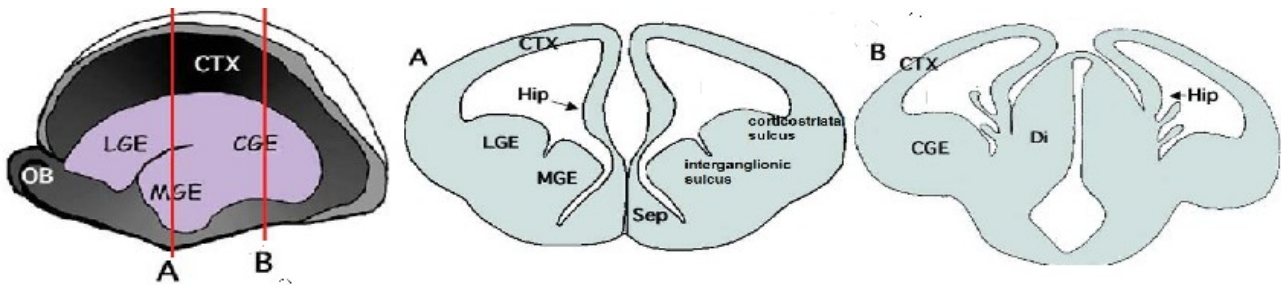
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. Ανάπτυξη των ενδονευρώνων του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων.

Ο φλοιός των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, αποτελεί την έδρα όλων των ανώτερων λειτουργιών του εγκεφάλου των θηλαστικών. Είναι η πιο πρόσφατη εξελικτικά περιοχή του κεντρικού νευρικού συστήματος και χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη δομική πολυπλοκότητα. Αποτελείται από μεγάλη ποικιλία κυτταρικών πληθυσμών, οργανωμένων σε στιβάδες. Η οργάνωση και η ποικιλομορφία των κυττάρων του φλοιού, ευθύνονται για τα μοναδικά λειτουργικά χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης δομής. Οποιαδήποτε ανωμαλία κατά την ανάπτυξη μπορεί να προκαλέσει νευρολογικές παθήσεις όπως η επιληψία, ο αυτισμός, η σχιζοφρένεια (Wonders & Anderson, 2006; Corbin & Butt, 2011). Η κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και στη σωστή λειτουργία των νευρικών κυττάρων του φλοιού αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την κατανόηση της παθολογίας του εγκεφάλου και την αντιμετώπιση τέτοιων παθήσεων.

1. Ανάπτυξη του τελεγκεφάλου και σχηματισμός του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων στα θηλαστικά.

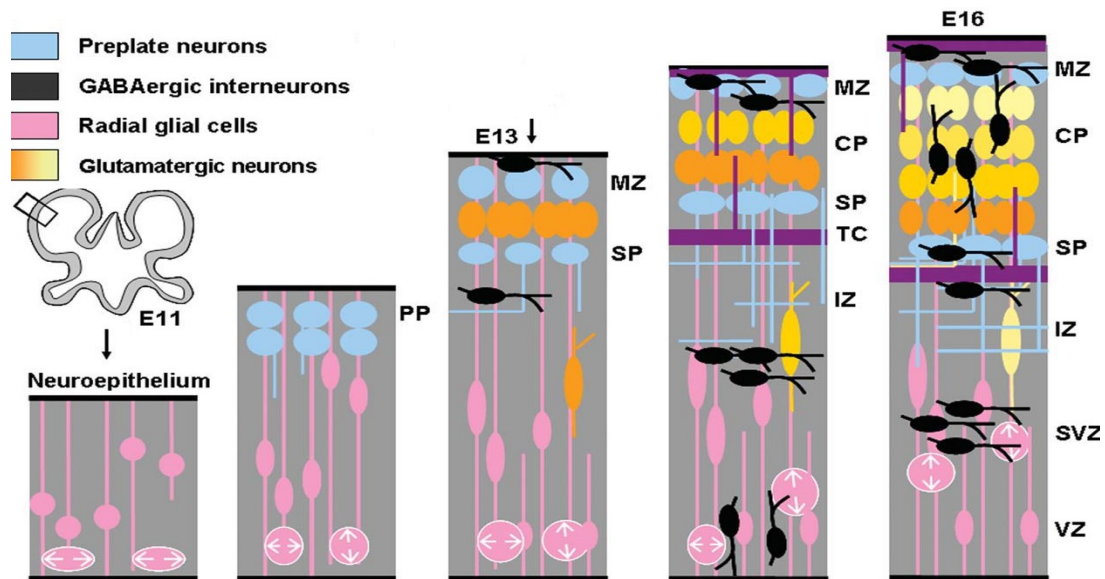
Η ανάπτυξη του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, είναι μια διεργασία μοναδική στα θηλαστικά και σημαντικά συντηρημένη ανάμεσα στα διάφορα είδη. Μετά το κλείσιμο του νευρικού σωλήνα κατά την εμβρυογένεση, το πρόσθιο τμήμα του, μορφοποιείται σε μια κοιλότητα, που ονομάζεται προσεγκέφαλος (forebrain, ή prosencephalon). Από το πρόσθιο τμήμα του προσεγκέφαλου, τον τελεγέφαλο (telencephalon), θα προέλθουν σταδιακά κατά την εμβρυογένεση ο εγκεφαλικός φλοιός, οι οσφρητικοί βολβοί, ο ιππόκαμπος, η αμυγδαλή, τα βασικά γάγγλια (Corbin & Butt, 2011). Το τοίχωμα της συγκεκριμένης δομής, αποτελείται από νευροεπιθηλιακά κύτταρα τα οποία συνεχώς πολλαπλασιάζονται, σχηματίζοντας τα εγκεφαλικά κυστίδια. (Vitalis & Rossier, 2010) Το τοίχωμα των πλευρικών κοιλιών του τελεγκεφάλου αρχίζει να διαφοροποιείται, στο ποντίκι, την εμβρυϊκή μέρα E10.5 (E: εμβρυϊκή μέρα) όταν δημιουργείται μία προεκβολή, που οδηγεί στη δημιουργία μιας αύλακας (corticostriatal sulcus). Χωρίζεται έτσι ο ραχιαίος (dorsal forebrain) από τον κοιλιακό ή βασικό τελεγέφαλο (basal forebrain). Κατά την εμβρυϊκή μέρα E11.5 ολοκληρώνεται ο σχηματισμός των γαγγλιονικών προεξοχών στον κοιλιακό τελεγέφαλο με το διαχωρισμό του κοιλιακού τοιχώματος από μια ακόμη αύλακα (interganglionic sulcus) (εικ.1). Οι δομές που προκύπτουν ονομάζονται έσω (MGE: medial ganglionic eminence) και πλευρική (LGE: lateral ganglionic eminence) γαγγλιονική προεξοχή. Σε πιο οπίσθια επίπεδα η προεκβολή του κοιλιακού τοιχώματος είναι ενιαία και ονομάζεται οπίσθια γαγγλιονική προεξοχή (CGE: caudal ganglionic eminence) (Corbin & Butt, 2011).



Εικόνα 1. Απεικόνιση του τελεγκεφάλου την E13.5 σε οβελιαίες και στεφανιαίες τομές αντίστοιχα. A,B : Στεφανιαίες τομές στο επίπεδο των κόκκινων γραμμών. Στον εμπρόσθιο τελεγκέφαλο διακρίνονται τα MGE και LGE. Πιο οπίσθια της *interganglionic sulcus* εντοπίζεται το CGE. CTX, cerebral cortex; CGE, caudal ganglionic eminence; Di, diencephalon; Hip, Hippocampal primordium; LGE, lateral ganglionic eminence; MGE, medial ganglionic eminence; (Τροποποιημένη από Corbin & Butt 2011)

Οι νευρώνες και τα γλοιακά κύτταρα του φλοιού προέρχονται από το νευροεπιθήλιο που περιβάλλει τις κοιλίες του τελεγκεφάλου και ονομάζεται κοιλιακή ζώνη (*ventricular zone, VZ*). Πριν τη νευρογένεση τα περισσότερα πρόδρομα κύτταρα της κοιλιακής ζώνης διαιρούνται συμμετρικά. Όσο εξελίσσεται η εμβρυογένεση κι η ανάπτυξη του φλοιού, η διάρκεια του κυτταρικού κύκλου αυξάνεται καθώς επεκτείνεται η φάση G1. Σε κάποιο χρονικό σημείο τα πρόδρομα κύτταρα διαιρούνται ασύμμετρα. Σταδιακά ο αριθμός των πρόδρομων κυττάρων μειώνεται ενώ αυξάνεται ο αριθμός των νευρικών κυττάρων και κατά το τέλος της ανάπτυξης του φλοιού όλα σχεδόν τα πρόδρομα κύτταρα δίνουν δυο θυγατρικά νευρικά κύτταρα. Μόλις τα νευρικά κύτταρα εξέλθουν από τον κυτταρικό κύκλο μεταναστεύουν από την κοιλιακή ζώνη προς την τελική τους θέση στον αναπτυσσόμενο φλοιό.

Στο μυ, την εμβρυϊκή μέρα E11.5 ένα πρώτο “κύμα” νευρώνων μεταναστεύουν σχηματίζοντας μία στιβάδα που ονομάζεται προφλοιϊκή πλάκα (*preplate, PP*). Ο δεύτερος πληθυσμός νευρώνων που μεταναστεύει την εμβρυϊκή μέρα E13.5 χωρίζει την προφλοιϊκή πλάκα σε δύο στιβάδες. Μια επιφανειακή, την επιχειλία ζώνη (*marginal zone, MZ*) ή στιβάδα I και μια βαθύτερη την υποφλοιϊκή πλάκα (*subplate, SP*). Η στιβάδα κυττάρων που δημιουργείται ανάμεσα ονομάζεται φλοιϊκή πλάκα (*cortical plate, CP*) (Ayala et al, 2007). Η ανάπτυξη του φλοιού συνεχίζεται με νέους πληθυσμούς νευρώνων, που μεταναστεύουν διαδοχικά και σταδιακά καταλαμβάνουν πιο επιφανειακές θέσεις. Καταλήγουν στη περιοχή της φλοιϊκής πλάκας, όπου προκύπτουν οι στιβάδες II-IV, ακολουθώντας πρότυπο κατά το οποίο, στις βαθύτερες στιβάδες εντοπίζονται οι νευρώνες που γεννιούνται νωρίτερα κατά την ανάπτυξη. (Marin et al, 2010). Ταυτόχρονα, ακριβώς κάτω από την υποφλοιϊκή πλάκα, άξονες με οριζόντια κατεύθυνση σχηματίζουν την ενδιάμεση ζώνη του φλοιού (*intermediate zone, IZ*), ενώ αρχίζει να διακρίνεται, ακριβώς πάνω από την κοιλιακή ζώνη, η υποκοιλιακή ζώνη (*subventricular zone, SVZ*), η οποία αποτελείται από μιτωτικούς και μεταμιτωτικούς νευρώνες (Ayala et al, 2007). (εικ.2)



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση της ανάπτυξης του εγκεφαλικού φλοιού. CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; MZ, marginal zone; PP, preplate; SP, subplate; SVZ, subventricular zone. (Τροποποιημένη από Vitalis & Rossier 2010)

Ο εγκεφαλικός φλοιός, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι έδρα των ανώτερων λειτουργιών των θηλαστικών κι οι λειτουργίες αυτές δεν θα μπορούσαν να επιτυγχάνονται, δίχως την ισορροπία μεταξύ διέγερσης και αναστολής των δικτύων στα οποία οργανώνονται τα νευρικά κύτταρα. Οι δύο βασικοί τύποι νευρώνων που εντοπίζονται στον ώριμο εγκέφαλο και σχηματίζουν τα νευρωνικά δίκτυα είναι οι πυραμιδικοί νευρώνες και οι ενδονευρώνες.

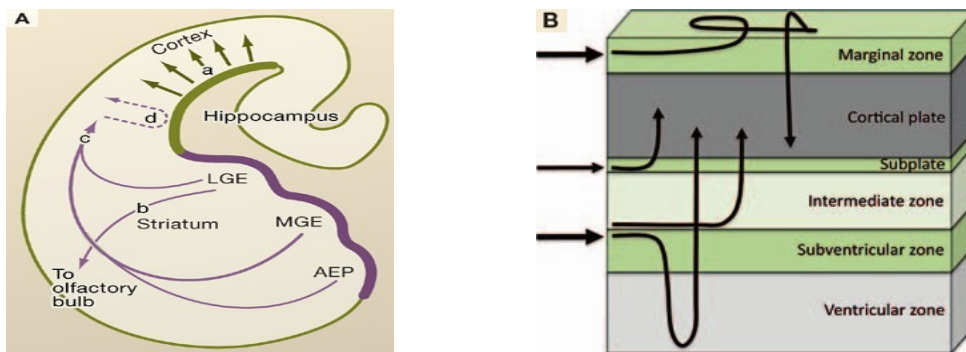
Οι πυραμιδικοί νευρώνες αποτελούν περίπου το 80% των νευρικών κυττάρων του φλοιού. Είναι διεγερτικοί νευρώνες, νευροδιαβιβαστής τους είναι το γλουταμινικό οξύ. Ενώ σχηματίζουν συνάψεις με νευρώνες σε άλλες περιοχές του φλοιού, ακόμα και σε απομακρυσμένες δομές του εγκεφάλου.

Οι ενδονευρώνες αντίθετα, δρουν κυρίως τοπικά, ενώ μικρός μόνο αριθμός τους προεκβάλλει σε απομακρυσμένες φλοιϊκές δομές. Είναι ανασταλτικοί νευρώνες, νευροδιαβιβαστής τους είναι το GABA (γ-αμινοβουτυρικό οξύ) και μέσω των συνάψεών τους με τους πυραμιδικούς νευρώνες, εξισορροπούν τη διέγερση του φλοιού και ρυθμίζουν τη μετάδοση του σήματος. Αποτελούν περίπου το 20% των συνολικών κυττάρων του φλοιού των θηλαστικών κατά μέσο όρο ενώ το ποσοστό αυτό φαίνεται να αυξάνεται κατά την εξέλιξη. (ενδεικτικά, GABAεργικοί νευρώνες στον πίθηκο 25%, σε δομές στον ανθρώπινο εγκέφαλο 34-44%) (Faux et al, 2012).

Οι πυραμιδικοί νευρώνες γεννιούνται στην κοιλιακή ζώνη του ραχιαίου τελεγκεφάλου και μεταναστεύουν προς τον φλοιό ακτινωτά, κάθετα προς την εξωτερική επιφάνεια της κοιλιακής ζώνης, ακολουθώντας τις ίνες των ακτινωτών κυττάρων της γλοίας.

Οι ενδονευρώνες γεννιούνται στην κοιλιακή ζώνη του βασικού τελεγκεφάλου, ενώ μεταναστεύουν προς τον αναπτυσσόμενο φλοιό οριζόντια, παράλληλα δηλαδή με την εξωτερική επιφάνεια της κοιλιακής ζώνης (Marin et al, 2010). (Εικ 3A) Κατά την εμβρυική μέρα E12, στο μυ, ένας πρώτος πληθυσμός ενδονευρώνων φτάνει στο φλοιό στο επίπεδο της προφλοιϊκής πλάκας (PP). Ένα δεύτερος, μεγαλύτερος πληθυσμός μεταναστεύει μέσω της επιχείλιας και της ενδιάμεσης ζώνης (IZ) λίγο αργότερα, (E13-E15) κατά την ανάπτυξη (Metin et al, 2006). Σε επόμενα στάδια, μετά το σχηματισμό της φλοιϊκής πλάκας (CP), παρατηρούνται στον αναπτυσσόμενο φλοιό τρία

μεταναστευτικά μονοπάτια, στην επιχείλια ζώνη (MZ), στην ενδιάμεση/υποκοιλιακή ζώνη (IZ/SVZ) και στην υποφλοιϊκή πλάκα. (Εικ. 3B) Μόλις οι ενδονευρώνες εισέλθουν στο φλοιό, αλλάζουν την κατεύθυνση της κίνησής τους και μεταναστεύουν ακτινωτά ώστε να πάρουν την τελική τους θέση στην κατάλληλη φλοιϊκή στιβάδα (Faux et al, 2012).



Εικόνα 3. Πρότυπα κυτταρικής μετανάστευσης στον αναπτυσσόμενο τελεγκέφαλο.

(A) Οι πυραμιδικοί νευρώνες μετακινούνται ακτινωτά από το ραχιαίο τελεγκέφαλο προς το φλοιό (πράσινα βέλη, a), ενώ οι ενδονευρώνες που γεννιούνται κοιλιακά, μετακινούνται με οριζόντια μετανάστευση προς τον τελικό προορισμό τους (μωβ βέλη, b, c). Τα κύτταρα που εισέρχονται στο φλοιό οριζόντια, συνεχίζουν με ακτινωτή μετακίνηση, προκειμένου να φθάσουν στη σωστή φλοιϊκή στιβάδα (μωβ στικτό βέλος, d). (B) Μεταναστευτική πορεία των νευρικών κυττάρων στο φλοιό. Cortex: φλοιός, Hippocampus: ιππόκαμπος, Striatum: ραβδωτό σώμα, Olfactory Bulb: οσφρητικός λοβός, MGE: έσω γαγγλιονική προεκβολή, LGE: πλευρική γαγγλιονική προεκβολή, MZ: επιχείλια ζώνη, CP: φλοιϊκή πλάκα, SP: υποφλοιϊκή πλάκα, IZ: ενδιάμεση ζώνη, SVZ: υποκοιλιακή ζώνη, VZ: κοιλιακή ζώνη. (Τροποποιημένη από Ayala et al, 2007; Faux et al, 2012)

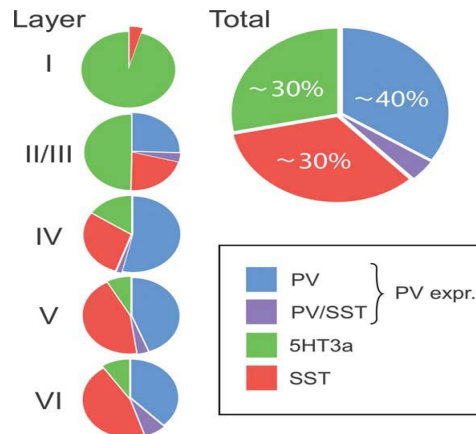
2. Κατηγοριοποίηση των ενδονευρώνων του φλοιού

Οι ενδονευρώνες αποτελούν ένα πληθυσμό κυττάρων που χαρακτηρίζονται από αξιοσημείωτη ποικιλομορφία. Αυτή ακριβώς η μεγάλη ετερογένεια που έχει προκύψει κατά την εξέλιξη υποδεικνύει τον ιδιαίτερα εξειδικευμένο ρόλο που παίζουν οι νευρώνες αυτοί στην ανάπτυξη του φλοιού και στην πλαστικότητα, ρυθμίζοντας την ενεργότητα των νευρωνικών δικτύων (Faux et al, 2012).

Ο διαχωρισμός των ενδονευρώνων σε υποκατηγορίες δεν είναι καθόλου εύκολος και η ομαδοποίησή τους βάσει συγκεκριμένων κριτηρίων, έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλαπλών μελετών και αντιπαραθέσεων μεταξύ των νευροεπιστημόνων τα τελευταία χρόνια (Petilla Interneuron Nomenclature Group, PING, 2008). Κριτήρια για τη κατηγοριοποίησή τους είναι (i) οι ηλεκτροφυσιολογικές τους ιδιότητες που αφορούν στο πρότυπο εκπόλωσής τους, στα δυναμικά ενεργείας και ηρεμίας κτλ, (ii) η μορφολογία τους, που αφορά στο μέγεθος και το σχήμα του σώματος και του άξονα, τους δενδρίτες, τον τύπο των συνάψεων που σχηματίζουν, (iii) οι μοριακοί δείκτες που εκφράζουν. Εδώ περιλαμβάνονται πρωτεΐνες που δεσμεύουν ασβέστιο, η παρβαλβουμίνη (PVA ή PV), καλβιδίνη (CB), η καλρετινίνη (CR), νευροπεπτίδια όπως το NPY (Neuropeptide Y), το νευροπεπτίδιο VIP (Vasoactive Intestinal Polypeptide), το νευροπεπτίδιο χολοκυστοκινίνη (CCK) και η σωματοστατίνη (SST), διάλυτοι, υποδοχείς και εκκρινόμενες

πρωτεΐνες (Brito & Fishell, 2009).

Από τελευταίες μελέτες προκύπτει ότι οι νευρώνες που εκφράζουν τους μοριακούς δείκτες παρβαλβουμίνη, σωματοστατίνη και τον ιοντοτρόπο υποδοχέα της σεροτονίνης 5HT3a , (στο εξής θα αναφέρονται ως PV, SST, 5HT3aR αντίστοιχα) αποτελούν προσθετικά σχεδόν το 100% των ενδονευρώνων του νεοφλοιού. Οι ενδονευρώνες που ανήκουν στις τρεις αυτές κατηγορίες έχουν διαφορετική μεταξύ τους εμβρυική προέλευση, η κάθε ομάδα βέβαια περιλαμβάνει αρκετούς τύπους νευρώνων που διαφέρουν ως προς τις μορφολογικές και ηλεκτροφυσιολογικές τους ιδιότητες. Ωστόσο, η PV και το νευροπεπτίδιο SST ορίζουν ομάδες ενδονευρώνων που δεν επικαλύπτονται. Στο σωματισταθητικό φλοιό αποτελούν το 40% και 30% αντίστοιχα των GABAεργικών νευρώνων. Ο υποδοχέας 5HT3a, στο νεοφλοιό, εκφράζεται αποκλειστικά σε GABAεργικούς νευρώνες κι οι νευρώνες αυτοί δεν εκφράζουν PV ή SST. Παρότι δεν υπάρχουν διαθέσιμα αντισώματα για τον υποδοχέα, μέσω GFP διαγονιδιακών σειρών βρέθηκε ότι οι νευρώνες που τον εκφράζουν αποτελούν το 30% των ενδονευρώνων του φλοιού. Οι άλλοι μοριακοί δείκτες (VIP, NPY, CCK, CR, CB) σημαίνουν είτε μικρότερους πληθυσμούς ενδονευρώνων είτε εκφράζονται σε μία ή περισσότερες από τις τρεις ομάδες που αναφέρθηκαν παραπάνω. (Εικ. 4)



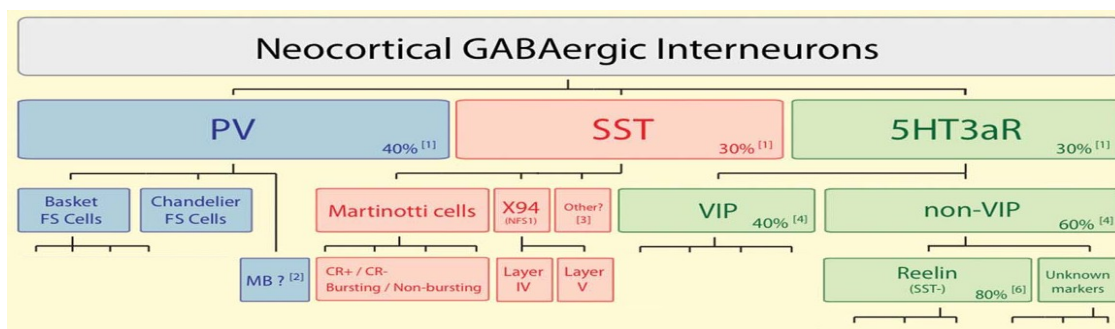
Εικόνα4. Κατανομή των τριών ομάδων GABAεργικών νευρώνων στο σωματισταθητικό φλοιό. Οι PV νευρώνες αποτελούν το 40% του συνολικού πληθυσμού των GABAεργικών νευρώνων, οι SST κι οι 5HT3aR νευρώνες το 30% ο καθένας. Εντοπίζεται σημαντική διαφοροποίηση του αριθμού τους στις στιβάδες του φλοιού. (τροποποιημένη από Rudy et al, 2010)

Οι νευρώνες που εκφράζουν PV είναι ταχέως εκπολώμενοι (fast firing). Έχουν τέτοιες ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες που εξασφαλίζουν τη γρήγορη, ακριβή και ισχυρή αναστολή του νευρώνα στόχου. Εντοπίζονται σε μεγάλα ποσοστά στη στιβάδα IV όπου δημιουργούν συνάψεις με τους θαλαμοφλοιικούς άξονες. Προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα της εσω γαγγλιονικής προεξοχής (MGE).

Οι νευρώνες που εκφράζουν SST έχουν συσχετιστεί με τα κύτταρα Martinotti που συνεκφράζουν και CR. Είναι GABAεργικοί νευρώνες με άξονες που εκτείνονται από τη στιβάδα I με οριζόντια κατεύθυνση. Εντοπίζονται στις στιβάδες II-VI και σε μεγαλύτερα ποσοστά στη στιβάδα V. Αναστέλλουν βαθμιδωτά το νευρώνα στόχο και προέρχονται από την έσω γαγγλιονική προεξοχή (MGE).

Οι νευρώνες που εκφράζουν τον υποδοχέα 5HT3a είναι μια πιο ετερογενής κατηγορία. Σε ένα υποπληθυσμό τους (περίπου 40%) συνεκφράζεται το νευροπεπτίδιο VIP ενώ στο 80% των υπόλοιπων 5HT3aR νευρώνων εκφράζεται η reelin. Στην υποομάδα αυτή ανήκει και ένας ιδιαίτερος πληθυσμός ενδονευρώνων (neurogliaform cells) οι οποίοι σχηματίζουν συνάψεις και με άλλους τύπους ενδονευρώνων, σε αντίθεση με όλους τους άλλους ενδονευρώνες που σχηματίζουν συνάψεις μόνο με ίδιου τύπου ενδονευρώνες. Στη στιβάδα I συντριπτική πλειοψηφία των ενδονευρώνων είναι 5HT3aR νευρώνες, ενώ στις στιβάδες II/III το ποσοστό τους είναι όμοιο με αυτό των PV νευρώνων. Τουλάχιστον το 90% των 5HT3aR προέρχεται από την οπίσθια γαγγλιονική προεξοχή (CGE), (Rudy et al, 2010). (Εικ 5)

Για τον πιο σαφή χαρακτηρισμό των παραπάνω διάφορων πληθυσμών ενδονευρώνων χρειάζονται περαιτέρω μελέτες.



Εικόνα 5. Μία κατηγοριοποίηση των ενδονευρώνων του φλοιού.

Σχεδόν το 100% των ενδονευρώνων του νεοφλοιού ανήκουν σε τρεις ομάδες που χαρακτηρίζονται από την έκφραση της παρβαλβουμίνη (PV), της σωματοστατίνης (SST) και του ιοντοτρόπου υποδοχέα της σεροτονίνης 5HT3a (5HT3aR). Κάθε ομάδα περιλαμβάνει υποκατηγορίες και κάθε υποκατηγορία αποτελείται από διαφορετικούς λειτουργικά πληθυσμούς νευρώνων, οι οποίοι μάλιστα, δεν είναι πλήρως καθορισμένοι. Η ομάδα των PV νευρώνων αποτελείται από δύο ανατομικά διακριτές ομάδες νευρώνων fast firing (FS), τα κύτταρα chandelier και basket που χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια. MB: (multipolar bursting) νευρώνες που δεν είναι FS. X94: υποκατηγορία νευρώνων που εκφράζουν μόνο SST, περιγράφηκε στη X94 mouse line. “other”: SST νευρώνες που δεν ανήκουν στις άλλες δύο κατηγορίες. Οι 5HT3aR νευρώνες διακρίνονται σε δύο υποκατηγορίες, τους VIP νευρώνες και σε αυτούς που δεν εκφράζουν VIP. Αυτές περιλαμβάνουν ομάδες νευρώνων που δεν είναι καθορισμένες. (τροποποιημένη από Rudy et al, 2010)

3. Προέλευση και καθορισμός των ενδονευρώνων του φλοιού.

Η περιοχή του MGE.

Η ταυτότητα των ενδονευρώνων του φλοιού καθορίζεται από τη συγκεκριμένη περιοχή του εμβρυϊκού ιστού απ' όπου προέρχονται καθώς και το χρόνο που γεννιούνται. Η πλειοψηφία τους, δημιουργείται στην κοιλιακή ζώνη του βασικού τελεγκεφάλου, η οποία κατά την εμβρυογένεση διαχωρίζεται σε διακριτές περιοχές, την έσω γαγγλιονική προεξοχή, την πλάγια

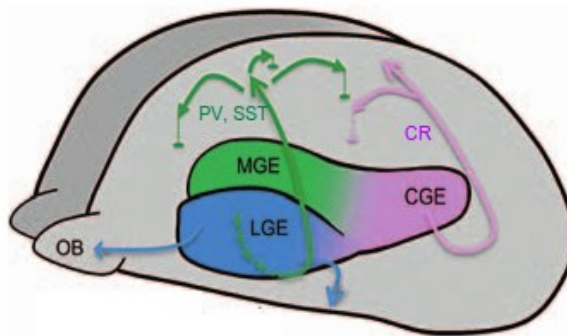
γαγγλιονική προεξοχή και την οπίσθια γαγγλιονική προεξοχή (αναφερόμενες από εδώ και στο εξής, ως MGE, LGE και CGE αντίστοιχα, από τα αρχικά της λατινικής ονομασίας τους)

Από την περιοχή MGE προέρχεται ένα μικρό ποσοστό πρόδρομων ολιγοδενδροκυττάρων και η πλειοψηφία των ενδονευρώνων του φλοιού (Fogarty et al, 2007). Είναι ενδονευρώνες που εκφράζουν PV και SST. Τα κύτταρα από το MGE μεταναστεύουν προς το φλοιό πλευρικά (Metin et al, 2006), με τους νευρώνες που γεννιούνται νωρίτερα να καταλαμβάνουν θέσεις στις βαθύτερες στιβάδες (Vitalis & Rossier, 2011).

Από την περιοχή του LGE προέρχονται ενδονευρώνες που καταλήγουν στους οσφρητικούς βολβούς, διεγερτικοί νευρώνες του ραβδώτου, ένα μικρός πληθυσμός ενδονευρώνων του φλοιού και μετά την εμβρυική μέρα E14.5 ολιγοδενδροκύτταρα που μεταναστεύουν προς το φλοιό (Wonders & Anderson, 2006).

Από την περιοχή του CGE προκύπτει το 40% των ενδονευρώνων του φλοιού. Είναι ενδονευρώνες που εκφράζουν το νευροπεπτίδιο VIP, δίπολοι νευρώνες που εκφράζουν τη CR και νευρώνες που εκφράζουν τη reelin αλλά όχι τη SST, (στην κατηγορία αυτή ανήκουν και τα neurogliaform κύτταρα), (Rudy et al, 2011). Επίσης νευρώνες που εκφράζουν το νευροπεπτίδιο NPY, αν και τέτοιοι νευρώνες προκύπτουν και από άλλη περιοχή, το MGE (Fogarty et.al, 2007). Τα κύτταρα από το CGE μεταναστεύουν οπίσθια, προς το φλοιό. Φαίνεται πως για να πάρουν την τελική τους θέση στις στιβάδες του φλοιού, δεν ακολουθούν το ίδιο πρότυπο με τους νευρώνες που προέρχονται από το MGE, αλλά μάλλον το αντίθετο (Vitalis & Rossier, 2011).

Ένας μικρός και ομοιογενής νευροχημικά, μορφολογικά και ηλεκτροφυσιολογικά πληθυσμός ενδονευρώνων γεννιέται στην preoptic area (POA) και μεταναστεύει προς το φλοιό και τον ιππόκαμπο. (Rubin et al, 2010; Faux et al, 2012). (εικ. 6)



Εικόνα 6 Τα βασικά μεταναστευτικά μονοπάτια των ενδονευρώνων από τις γαγγλιονικές προεξοχές του τελεγκεφάλου στο φλοιό. (τροποποιημένη από Faux et al, 2012)

Η μορφολογική και λειτουργική διαφοροποίηση των γαγγλιονικών περιοχών στο βασικό τελεγκέφαλο, είναι αποτέλεσμα αυστηρά ελεγχόμενης έκφρασης ενός συνδυασμού εκκρινόμενων και μεταγραφικών παραγόντων, κατά την ανάπτυξη της συγκεκριμένης δομής. Αρχικά, ένα σύνολο διαφορετικών μορφογόνων, που περιλαμβάνει μόρια όπως το Shh αλλά και πληθώρα άλλων εκκρινόμενων παραγόντων (π.χ. Wnts, FGFs, BMPs), φαίνεται ότι καθορίζει τη διαφοροποίηση των επιμέρους περιοχών του τελεγκεφάλου και των πρόδρομων κυττάρων της κάθε περιοχής. Επάγουν, στη συνέχεια, την έκφραση συγκεκριμένων συνδυασμών μεταγραφικών παραγόντων, μέσω μηχανισμών που δεν είναι ακόμα γνωστοί, συμβάλλοντας έτσι, στην επιπλέον εξειδίκευση των πρόδρομων κυττάρων κάθε επιμέρους περιοχής (Metin et al, 2006).

Το μορφογόνο sonic hedgehog (Shh) είναι απαραίτητο για τη δημιουργία σωστού προτύπου στο κοιλιακό τελεγκέφαλο καταρχήν καθώς συμβάλλει στον καθορισμό των πρώτων ορίων μεταξύ

ραχιαίου και κοιλιακού άξονα. Το Shh δρα μέσω των μεταγραφικών παραγόντων Gli που οδηγούν με έναν όχι σαφή μηχανισμό στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Nkx2.1 κατά την εμβρυική μέρα E9.5. Αυτός με τη σειρά του καταστέλλει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Pax6 (Anastasiades & Butt, 2011).

Η έκφραση του Nkx2.1 εντοπίζεται σε κύτταρα της κοιλιακής και της υποκοιλιακής ζώνης του MGE και είναι ο μοναδικός παράγοντας που καθορίζει τα ανατομικά όρια μεταξύ των γαγγλιονικών περιοχών (Metin et al, 2006). Η σημασία του Nkx2.1 στον καθορισμό του MGE και των ενδονευρώνων που προκύπτουν από την περιοχή αυτή, έχει δειχθεί σε μελέτες, όπου απώλεια του γονιδίου είχε σαν αποτέλεσμα, τα κύτταρα του MGE να αποκτήσουν το χαρακτήρα των κυττάρων LGE, ενώ στο φλοιό υπάρχει 50% μείωση των GABAεργικών νευρώνων (Wonders & Anderson, 2006). Επίσης, οι νευρώνες που εκφράζουν PV και SST εκλείπουν σε πρωτογενείς καλλιέργειες από Nkx2.1 ελλειμματικό μυ, σε αντίθεση με τους CR νευρώνες που προέρχονται από το CGE και δεν επηρεάζονται. Το MGE μπορεί να διαχωριστεί σε δύο περιοχές, το ραχιαίο και το κοιλιακό MGE, χωρίς όμως, τα όρια αυτά να είναι αυστηρά καθορισμένα. Η πλειοψηφία των ενδονευρώνων που εκφράζουν SST φαίνεται να προέρχεται από πρόδρομα κύτταρα του ραχιαίου MGE, ενώ νευρώνες που εκφράζουν PV φαίνεται να προέρχονται από το κοιλιακό MGE κυρίως (Hernandez-Miranda et al, 2010). Η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Nkx6.2 στο ραχιαίο MGE, στα όρια με το CGE, είναι στοιχείο της γενετικής βάσης που πιθανά συνεπάγεται σε αυτή τη διαφοροποίηση (Anastasiades & Butt, 2011). Από την περιοχή αυτή προέρχονται και τα κύτταρα Martinotti που συνεκφράζουν CR και SST (Fogarty et al, 2007).

Ο Nkx2. ενεργοποιεί άμεσα το μεταγραφικό παράγοντα Lhx6 (LIM homeodomain), ο οποίος εκφράζεται σε μεταμιτωτικούς νευρώνες που προέρχονται συγκεκριμένα από το MGE και παίζει σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση τους από το κοιλιακό τελεγκέφαλο στο φλοιό. (Metin et al, 2006) Στην υποκοιλιακή ζώνη του MGE εκφράζεται ο μεταγραφικός παράγοντας Lhx7(8) ο οποίος εμπλέκεται στην ανάπτυξη χολινεργικών ενδονευρώνων του ραβδώτου.

Στο LGE η ανάπτυξη επηρεάζεται από το μεταγραφικό παράγοντα Gsh2 και πιθανά από το Pax6 που δεν καταστέλλεται στην περιοχή αυτή. (εικ. 7)

Table 1. The origin of interneuron subtypes from subpallial neuroepithelial domains identified by genetic fate mapping

Subpallial germinal zone	Cre mice used for <i>in vivo</i> fate mapping (level of Cre activity)	Interneuron subtype
Central and ventral MGE	<i>Nkx2.1-Cre</i> (high)	SST ⁺ CR ⁻
	<i>Lhx6-Cre</i> (high)	PV ⁺
	<i>Gsh2-Cre</i> (low)	CB ⁺
	<i>Nkx6.2-Cre</i> (low)	
Dorsal MGE	<i>Nkx6.2-Cre</i> (high)	CR ⁺ SST ⁺ (Martinotti)
	<i>Lhx6-Cre</i> (high)	NPY ⁺
	<i>Nkx2.1-Cre</i> (low)	
	<i>Gsh2-Cre</i> (low)	
LGE/dorsal CGE	<i>Gsh2-Cre</i> (high)	CR ⁺ SST ⁻ (bipolar) NPY ⁺

Εικόνα 7 Η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων *Nkx2.1*, *Nkx6.2*, *Gsh2*, *Lhx6* στις γαγγλιονικές προεξοχές του τελεγκεφάλου κι ο τύπος των νευρώνων που προκύπτει από το συνδυασμό τους. (τροποποιημένη από Fogarty et al, 2007)

Στο CGE δεν είναι ακόμα πλήρως διασαφηνισμένοι οι παράγοντες που εκφράζονται ειδικά στην συγκεκριμένη περιοχή και εμπλέκονται στην εξειδίκευση των ενδονευρώνων που προέρχονται από τη συγκεκριμένη περιοχή. Ένας μεταγραφικός παράγοντας που εκφράζεται είναι ο Coup-TFI (Faux et al, 2012).

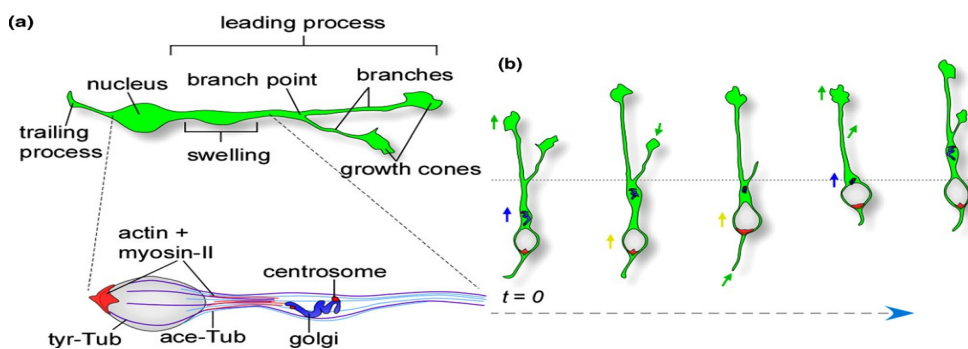
Στην περιοχή POA, εκφράζεται ο μεταγραφικός παράγοντας *Nkx5.1* κι ο ομοιογενής

πληθυσμός των ενδονευρώνων που γεννιέται εκεί εκφράζει το νευροπεπτίδιο NPY και κανέναν άλλο μοριακό δείκτη (Hernandez-Miranda et al, 2010).

Οι ενδονευρώνες του φλοιού αποκτούν τη συγκεκριμένη τους ταυτότητα με βάση όχι μόνο το χωρικό πρότυπο έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων αλλά και το χρονικό. Χαρακτηριστικά αναφέρεται, στο MGE η μέγιστη παραγωγή νευρώνων λαμβάνει χώρα μεταξύ στην E13.5 και E14.5 ενώ στο CGE μεταξύ E15-E16. Αυτό το χρονικό πρότυπο αντανακλά και στους τύπους των νευρώνων που γεννιούνται σε αυτές τις περιοχές. Έτσι οι PV νευρώνες γεννιούνται μεταξύ E9.5 και E15, οι SST μεταξύ E9.5 και E14, πριν τους VIP και NPY νευρώνες. Οι CR νευρώνες μεταξύ E12.5 και E15.5 κι οι 5-HT3aR νευρώνες μεταξύ E13 και E15.5 (Faux, et al 2012).

4. Κυτταρικός μηχανισμός της μετανάστευσης των ενδονευρώνων.

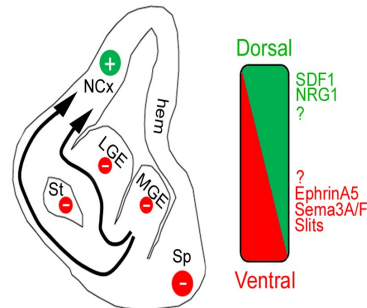
Οι νευρώνες που μεταναστεύουν είναι ιδιαίτερα πολωμένοι στην κατεύθυνση της κίνησής τους. Αυτό επιτυγχάνεται με το σχηματισμό, τη διατήρηση και την αναδιαμόρφωση της καθοδηγητικής απόφυσης. Η δομή αυτή “αισθάνεται” το μικροπεριβάλλον που το περιβάλλει συνεισφέροντας στην καθοδήγηση του νευρώνα. Η κίνηση του κυττάρου διακρίνεται σε τρεις φάσεις: Αρχικά εκτείνεται η καθοδηγητική απόφυση (leading process), εκεί ματατοπίζεται η συσκευή Golgi και το κεντροσωμάτιο, στη συνέχεια μετατοπίζεται στη καθοδηγητική απόφυση ο πυρήνας με αλματώδη τρόπο και τέλος το tailing process μαζεύεται κι ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται ωσότου ο νευρώνας φτάσει στον στόχο του (Marin et al, 2010). Οι ενδονευρώνες σε αντίθεση με τους πυραμιδικούς νευρώνες έχουν καθοδηγητική απόφυση διακλαδωμένη. (εικ 9) Οι δομές αυτές εξερευνούν το περιβάλλον, μέχρι το κύτταρο αποκρινόμενο στα σήματα του περιβάλλοντος, να “αποφασίσει” την κατεύθυνση που θα ακολουθήσει. Τότε η μία διακλάδωση επεκτείνεται περαιτέρω και η άλλη αποσύρεται (Metin et al, 2006).



Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση χαρακτηριστικών δομών στον ενδονευρώνα που μεταναστεύει. (α) tyr-Tub (tyrosinated) μικροσωληνίσκοι: δυναμικές δομές, περιβάλλουν τον πυρήνα, ace-Tub (acetylated) μικροσωληνίσκοι: πιο σταθερές δομές εμπρόσθια από τον πυρήνα, κοντά στο κεντροσωμάτιο. (β) οι τρεις φάσεις στην κίνηση του ενδονευρώνα. (τροποποιημένη από Valiente & Marin, 2010)

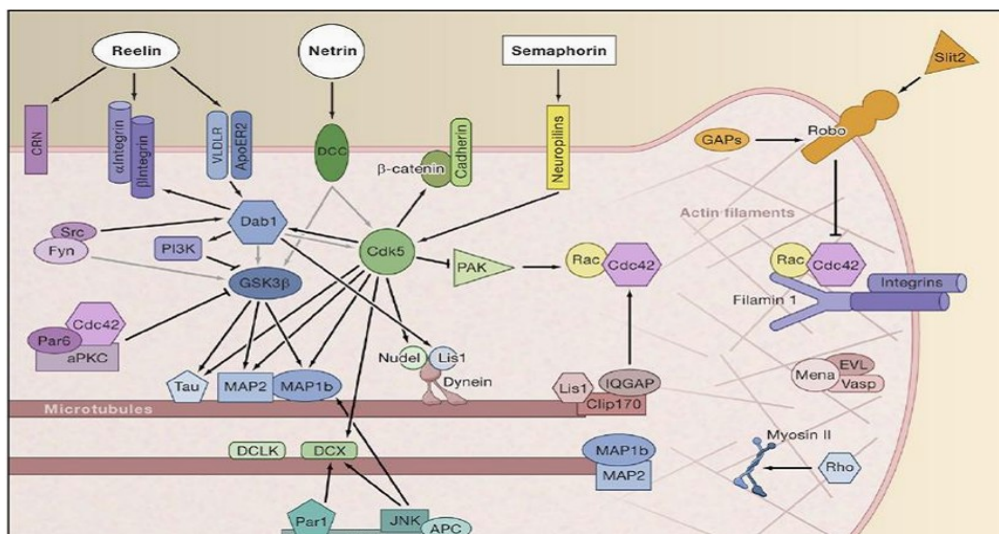
Προκειμένου οι νευρώνες να καταλήξουν στις σωστές θέσεις τους στο φλοιό, απαιτείται ο συντονισμός εξωκυττάρων καθοδηγητικών σημάτων, αυξητικών παραγόντων και μορίων κυτταρικής συνάφειας. Παράγοντες όπως ο HGF/SF (hepatocyte growth factor/ scatter factor), ο BDNF (brain-derived neurotrophic factor) και ο NT4 (neuro-trophin 4) φαίνεται να προάγουν την κίνηση και τη μετανάστευση των νευρώνων. Στην καθοδήγηση των νευρώνων εμπλέκονται χημειο-

ελκτικά (πχ NGRs Neuregulins) και χημειο-αποθητικά μόρια (πχ οι πρωτεΐνες Slit, οι εφρίνες) . Ο φλοιός παρέχει ελκτικά σήματα ενώ η ΡΟΑ αποθητικά. Οι φλοιϊκοί ενδονευρώνες αποφεύγουν το ραβδωτό μέσω ενός μηχανισμού που εμπλέκονται οι Sema3A και Sema3B. (εικ. 10)



Εικόνα 10 Σχηματική απεικόνιση αποθητικών και ελκτικών σημάτων κατά την οριζόντια μετανάστευση των ενδονευρώνων. (Τροποποιημένη από Hernandez-Miranda et al, 2012)

Ακόμη, νευροδιαβιβαστές όπως ο GABA και η σεροτονίνη, και υποδοχείς πχ του γλουταμινικού, φαίνεται να παίζουν ενεργό ρόλο στη μετανάστευση (Hernandez-Miranda et al, 2012). Τα εξωκυττάρια καθοδηγητικά σήματα επάγουν ένα εύρος ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών, με τελικό στόχο την αυστηρή ρύθμιση του κυτταροσκελετού. Ορισμένα από αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια είναι μελετημένα εκτενώς (π.χ. το μονοπάτι της Reelin, Εικ. 11) (Ayala et al, 2007).



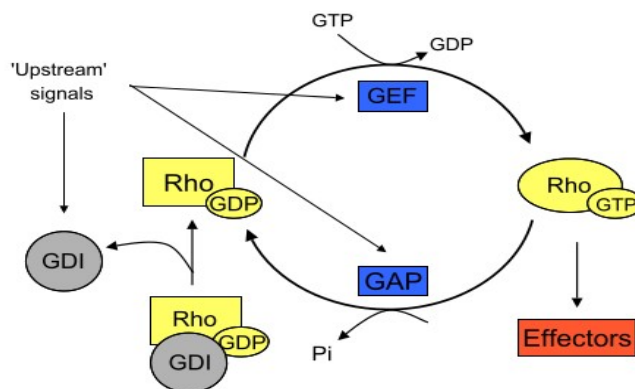
Εικόνα 10. Ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια σήματα που μετέχουν στην καθοδήγηση των νευρώνων κατά τη μετανάστευση. Για την μετανάστευση των νευρώνων και τη τοποθέτησή τους στις σωστές θέσεις τους στο φλοιό, συντονίζονται πολλαπλά μόρια που ρυθμίζουν σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου, καταλήγοντας στις ελεγχόμενες κινήσεις του κυτταροσκελετού (Τροποποιημένη από Ayala et al, 2007)

B. ενδοκυττάρια σήματα στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων του φλοιού: Η οικογένεια των Rho-GTPασών και οι πρωτεΐνες Rac1 και Rac3

Οι Rho-GTPάσες ανήκουν στην υπεροικογένεια των μικρών Ras GTPασών. Στα θηλαστικά, στην οικογένεια αυτή ανήκουν εικοσιδύο πρωτεΐνες, οι οποίες κατανέμονται σε οχτώ υποοικογένειες. Αλληλεπιδρούν με πολλές πρωτεΐνες στόχους (effectors), ρυθμίζουν έτσι πλήθος κυτταρικών διεργασιών, όπως τη μορφολογία, τη μετανάστευση, τη νευρωνική ανάπτυξη, τη κυτταρική διαίρεση και τη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, τη κυτταρική συνάφεια, τη δυναμική του κυτταροσκελετού, της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων, τη μεταφορά κυστιδίων και την έκφραση γονιδίων. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι εξελικτικά συντηρημένες από το ζυμομύκητα και τα φυτά μέχρι τα θηλαστικά. Οι πιο συντηρημένες είναι οι Rac, CDC42 και RhoA, με τις δύο πρώτες να έχουν παρόμοια δράση ενώ η τελευταία να εμφανίζει ανταγωνιστική δράση ως προς το βιολογικό αποτέλεσμα.

Στην υποοικογένεια Rac GTPασών περιλαμβάνονται οι Rac1, Rac2, Rac3 και RhoG. Αν και οι αλληλουχίες τους είναι σε μεγάλο βαθμό ταυτόσημες, έχουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης. Η Rac1 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, η Rac2 είναι ειδική για το αιμοποιητικό σύστημα, η RhoG σε διάφορους ιστούς και η Rac3 εκφράζεται στο νευρικό σύστημα (Heasman & Ridley, 2008). Το γονίδιο της εμφανίστηκε κατά την εξέλιξη, πιθανά, πρώτα στα σπονδυλωτά. Η Rac3 εμφανίζει την μεγαλύτερη ομολογία με την Rac1, διαφέρει όμως στο καρβοξυτελικό της άκρο, περιοχή σημαντική για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της και για τις αλληλεπιδράσεις της με τις πρωτεΐνες-στόχους της.

Οι Rho-GTPάσες λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες, εναλλασσόμενες διαρκώς μεταξύ δυο καταστάσεων. Στην ενεργή τους μορφή, βρίσκονται προσδεδεμένες με το GTP, ενώ στην ανενεργή τους μορφή με το GDP. Η ενεργοποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών στόχων για την εκτέλεση συγκεκριμένων λειτουργιών, ελέγχεται μέσω της αυστηρής χωροχρονικής ενεργοποίησης των GTPασών. Τον κύκλο αυτό της εναλλαγής της ενεργής και της ανενεργής κατάστασης των Rho-GTPασών, ρυθμίζουν οι GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors), οι GAPs (GTPase activating proteins) και τις GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors). (εικ.11) Οι GEFs ενεργοποιούν τις Rho-GTPάσες προάγοντας την απελευθέρωση του GDP και την πρόσδεση του GTP. Οι GAPs τις απενεργοποιούν αυξάνοντας την ενδογενή ενεργότητα GTPασης που έχουν και τέλος οι GDIs προσδένονται σε αυτές, απομακρύνοντάς τις, από τις πρωτεΐνες που τις ρυθμίζουν και τις πρωτεΐνες-στόχους τους. Στα θηλαστικά υπάρχουν 85 GEFs, 80 GAPs, και 3 GDIs (Jaffe & Hall, 2005).



Εικόνα 11. Ο κύκλος των Rho-GTPασών. Οι Rho-GTPάσες εναλλάσσονται διαρκώς μεταξύ της ενεργού (προσδεδεμένες με GTP) και της ανενεργού μορφής τους (προσδεδεμένες με GDP). Ο κύκλος ρυθμίζεται από τις GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors), τις GAPs (GTPase activating proteins) και τις GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors). (τροποποιημένη από Raftoroulou & Hall, 2003)

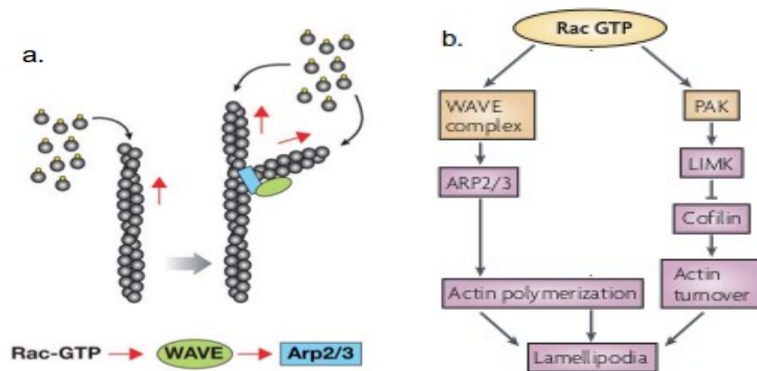
1. Ο ρόλος των Rac GTPασών στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού.

Οι Rac πρωτεΐνες ρυθμίζουν τον πολυμερισμό της ακτίνης, κατά την επέκταση των λαμελιποδίων, με διάφορους τρόπους. Οι δυναμικές αυτές δομές, στην καθοδηγητική απόφυση βοηθούν στην καθοδήγηση κατά τη μετανάστευση.

Ο παράγοντας Arp2/3 είναι βασικός για τον πολυμερισμό της ακτίνης. Προσδένεται στα νημάτια ακτίνης για να σχηματίσει διακλάδωσεις. Η Rac GTPάση τον ενεργοποιεί έμμεσα μέσω του συμπλόκου WAVE (Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) family verprolin-homologous protein) (Govek et al, 2010).

Η πρωτεΐνη cofilin συμμετέχει στην αποδιοργάνωση των ινιδίων ακτίνης, προάγοντας την απομάκρυνση μονομερών ακτίνης από τα άκρα των ινιδίων. Μεταπίπτει από την ενεργή στην ανενεργή κατάσταση κι ο κύκλος της αυτός ρυθμίζεται αυστηρά. Απενεργοποιείται με φωσφορυλίωση από τις κινάσες LIM (LIMK) οι οποίες με τη σειρά τους, ενεργοποιούνται από τη p65PAK κινάση που είναι Rac εξαρτώμενη. (εικ.11)

Η ενεργότητα της Rac, για το σχηματισμό λαμελιποδίων χρειάζεται να είναι περιορισμένη τοπικά. Σε ινοβλάστες που μεταναστεύουν, παρατηρείται κλίση συγκέντρωσης της ενεργής Rac στην καθοδηγητική απόφυση (Raftoroulou & Hall, 2004).



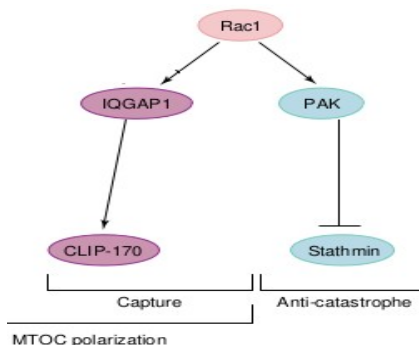
Εικόνα 12 Ρύθμιση της ακτίνης από τις Rac GTPάσες. (a). Σχηματισμός διακλαδώσεων μέσω των πρωτεϊνών WAVE, Arp2/3. (b.) Rac επαγόμενα μονοπάτια που οδηγούν στον πολυμερισμό της ακτίνης. (τροποποιημένη από Jaffe & Hall, 2005; Heasman & Ridley, 2008)

Οι Rac GTPασες ρυθμίζουν και τους μικροσωληνίσκους του κυτταροσκελετού. Οι μικροσωληνίσκοι σχηματίζονται συνήθως από δεκατρία πρωτοινίδια πολυμερισμένων ετεροδιμερών α/β τουμπουλίνης. (head to tail). Σταθεροποιούνται από διάφορες πρωτεΐνες MAP (Microtubule associated proteins), όπως η Tau. Είναι δυναμικές δομές, πολωμένες που υπόκεινται σε κύκλους επιμήκυνσης και συρρίκνωσης στα + άκρα τους τα οποία εντοπίζονται στην περιφέρεια του κυττάρου. Τα - άκρα των μικροσωληνίσκων που δεν αναπτύσσονται αγκιστρώνονται συνήθως στο MTOC (microtubule-organizing center) (Neukirchen & Bradke, 2011). Οι Rac GTPασες επηρεάζουν τα δυναμικά των μικροσωληνίσκων ρυθμίζοντας τα + άκρα.

Η πρωτεΐνη stathmin αλληλεπιδρά με τα + άκρα των μικροσωληνίσκων και προάγει την καταστροφή τους, καθώς επίσης και με τα ετεροδιμερή τουμπουλίνης εμποδίζοντας τον πολυμερισμό τους. Απενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης από την κινάση p65PAK η οποία με τη

σειρά της ενεργοποιείται από τη Rac (Watanabe et al, 2005).

Η πρωτεΐνη CLIP-170 (Cytoplasmic Linker Protein 170) σταθεροποιεί τα + άκρα των μικροσωληνίσκων και διευκολύνει τη μετάβαση από την καταστροφή στον πολυμερισμό τους, που σαν αποτέλεσμα έχει την επιμήκυνσή τους (Neukirchen & Bradke, 2011). Προσδένεται στους μικροσωληνίσκους μαζί με την πρωτεΐνη-ικρίωμα IQGAP που είναι πρωτεΐνη στόχος της Rac. Η IQGAP προσδένεται επίσης και στα νημάτια ακτίνης επιδρώντας στη σταθερότητά τους. (Noritake et al, 2005) (εικ. 13)



Εικόνα 13. Ρύθμιση των μικροσωληνίσκων από τις Rac GTPάσες.
(τροποποιημένη από Watanabe et al, 2005).

Η ρύθμιση του κυτταροσκελετού, της ακτίνης και του δικτύου των μικροσωληνίσκων σαν απόκριση σε εξωκυττάρια σήματα, είναι απαραίτητη για τη μετανάστευση, την καθοδήγηση των αξόνων και στη διαδικασία αυτή όπως περιγράφηκε παραπάνω εμπλέκονται με ποικίλους τρόπους οι Rac GTPάσες. Ο ρόλος τους όμως στη μετανάστευση είναι καλύτερα μελετημένος σε μη νευρónica κύτταρα (Govek et al, 2010).

Οι Rac GTPάσες, στο νευρικό σύστημα εμπλέκονται ακόμη, στην πολικότητα ώστε να σχηματίζεται τελικά ένας άξονας και δενδρίτες, στην ανάπτυξη των νευριτών και στη συναπτογένεση (de Curtis, 2008).

Ο ρόλος της Rac1 στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος είναι δύσκολο να μελετηθεί, καθώς απώλεια της δράσης του στο μυ οδηγεί σε θάνατο των εμβρύων κατά τη γαστριδίωση, πριν τη δημιουργία του νευρικού συστήματος. Τα τελευταία χρόνια έχουν χρησιμοποιηθεί διαγονιδιακές σειρές ζώων και προσεγγίσεις, που επιτρέπουν τη μελέτη του ρόλου της Rac1 σε επιμέρους συστήματα.

Απώλεια της Rac1 από από όλα τα πρόδρομα κύτταρα του τελεγκεφάλου κατά την ανάπτυξη, επηρεάζει την ανάπτυξη βασικών αξονικών πληθυσμών του εγκεφάλου, όπως το μεσολόβιο (corpus callosum) και ο πρόσθιος σύνδεσμος των ημισφαιρίων (anterior commissure). (Chen et al, 2007). Στα ίδια διαγονιδιακά ζώα, η απενεργοποίηση της Rac1, έχει ως αποτέλεσμα την καθυστερημένη μετανάστευση των πυραμιδικών νευρώνων (Heasman & Ridley, 2007). Παρατηρείται επίσης μικροκεφαλία, λόγω μείωσης του αριθμού των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων στις κοιλιακές ζώνες του φλοιού (Chen et al, 2009).

Απώλεια της Rac1 από πρόδρομα κύτταρα της έσω γαγγλιονική προεξοχής έχει σαν αποτέλεσμα να εντοπίζεται στον ώριμο εγκέφαλο μόνο το 50% των GABAεργικών νευρώνων (Vidaki et al, 2011).

Ολοκληρωτική απώλεια της Rac3 δεν επιφέρει μεγάλες ανατομικές αλλαγές στον εγκέφαλο ή στην οργάνωση των νευρώνων. Από μελέτες συμπεριφοράς, παρατηρείται υπερδραστηριότητα στην απόκριση σε νέα ερεθίσματα και αλλαγές στη κινητική μάθηση υποδεικνύοντας έναν πιο

επιμέρους ρόλο της Rac3, στη λειτουργία των νευρώνων. Είναι επίσης πιθανό η Rac1 έστω και εν μέρει να λειτουργεί αντισταθμιστικά στην ολοκληρωτική απώλεια της Rac3 κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος (Corbetta et al, 2008).

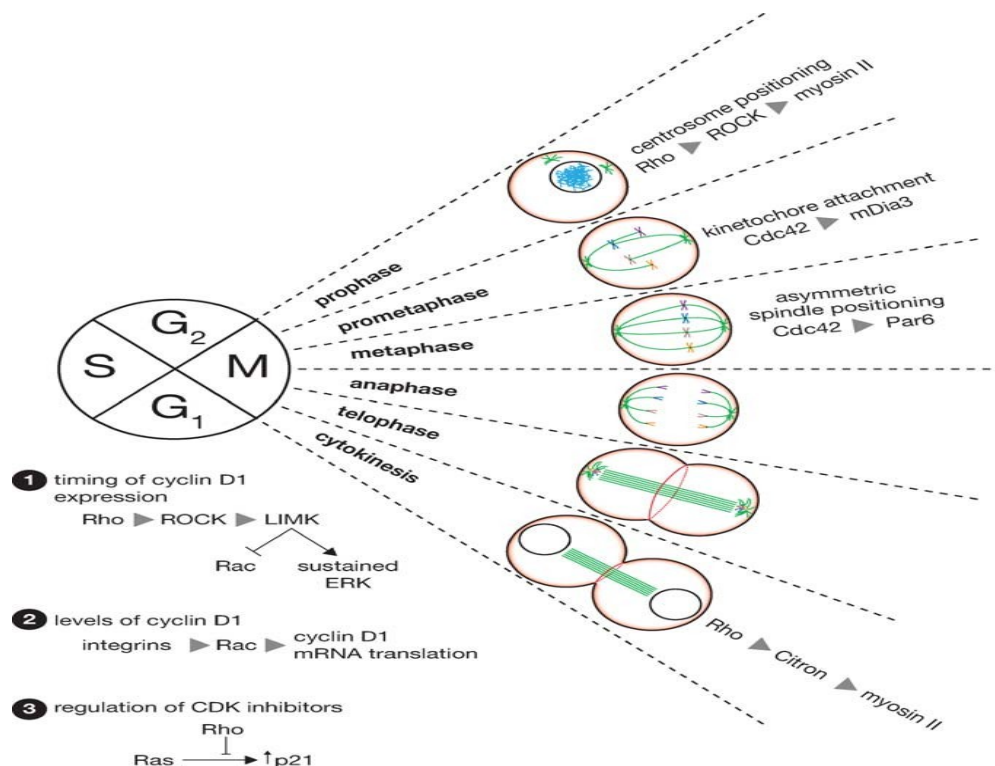
2. Ο ρόλος των Rac GTPασών στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου.

Εκτός από το ρόλο της στην αξονογένεση και τη μετανάστευση των νευρικών κυττάρων, οι Rac φαίνεται ότι επηρεάζουν την ανάπτυξη του εγκεφάλου συμμετέχοντας και σε διεργασίες, όπως ο πολλαπλασιασμός και η ομαλή εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου των πρόδρομων νευρικών κυττάρων. Επηρεάζουν τη λειτουργία των κυκλινών και των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών κατά τη διάρκεια της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου και επιπλέον μετέχουν στην οργάνωση των μικροσωληνίσκων και της ακτίνης κατά τη διάρκεια της μίτωσης (φάση M) (Jaffe & Hall, 2005).

Η Rac 1 επίσης διεγείρει την μεταγραφή της κυκλίνης D, ενώ αποκρινόμενη σε ιντεγκρίνες διεγείρει και τη μετάφραση της κυκλίνης D. (Ridley)

Επίσης η Rac1 απαιτείται για το φυσιολογικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των πρόδρομων κυττάρων της υποκοιλιακής ζώνης και την επιβίωση των πρόδρομων κυττάρων στην κοιλιακή και στην υποκοιλιακή ζώνη (Leone et al, 2010)

Απενεργοποίηση της Rac1 από πρόδρομα κύτταρα της έσω γαγγλιονική προεξοχής οδηγεί σε παρατεταμένη παραμονή των κυττάρων αυτών στον κυτταρικό κύκλο υποδεινώντας ότι η Rac1 είναι απαραίτητη για την μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S.



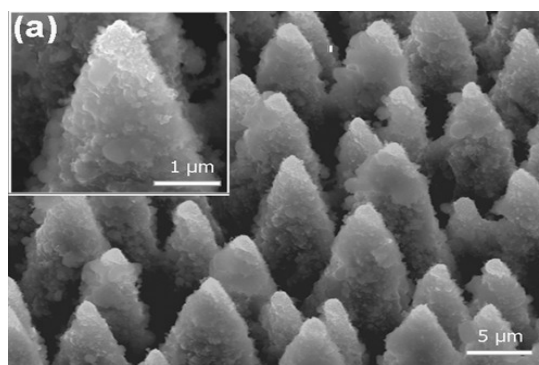
Εικόνα 14. Οι Rho GTPάσες και ο κυτταρικός κύκλος. Οι Rho-GTPάσες, ελέγχουν διαφορετικά στάδια της μίτωσης (M) και της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου. Μικροσωληνίσκοι: πράσινο, ακτίνη: κόκκινο, χρωμοσώματα: μπλε (τροποποιημένη από Jaffe & Hall, 2005)

Τέλος οι Rac GTPάσες ρυθμίζουν σηματοδοτικά μονοπάτια προκαλώντας αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων (πχ ενεργοποιούν τον παράγοντα NfκB σαν απόκριση σε φλεγμονώδεις κυτοκίνες) και τέλος επηρεάζουν ενζυμικές δραστηριότητες ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό λιπιδίων, και την παραγωγή ROS (Jaffe & Hall, 2005).

Γ. 3D καλλιέργειες κυττάρων: Τα 3D ικριώματα πυριτίου.

Οι καλλιέργειες κυττάρων σε δύο διαστάσεις (2D) ήταν για χρόνια αναντικατάστατο εργαλείο για την *in vitro* μελέτη της κυτταρικής βιολογίας. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα υποστρώματα στα οποία αναπτύσσονται τα κύτταρα είναι επίπεδες δομές από πολυστερένιο ή γυαλί. Με την ανάπτυξη όμως των κυττάρων σε ένα στρώμα, δεν αναπαράγεται η ανατομία και η φυσιολογία ενός ιστού. Η “εμφάνιση” ενός ευκαρυωτικού κυττάρου σε 2D συνθήκες δεν αναπαριστά τη μορφή που έχει στο εξωκυττάριο υλικό, ως μέρος του ιστού από όπου προέρχεται. (Haycock, 2011) Ένα μεγάλο μέρος της επιφάνειάς του έρχεται σε επαφή με το γυαλί αντί να αλληλεπιδρά με άλλα μόρια του φυσικού του περιβάλλοντος. Σαν αποτέλεσμα, πολλές βιολογικές λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση, η απόπτωση, έχειδειχθεί ότι διαφέρουν (Koutsopoulos, 2012). Ιδίως σε κύτταρα όπως είναι οι νευρώνες των οποίων η λειτουργία επηρεάζεται σημαντικά από το μικροπεριβάλλον που τα περιβάλλει. (Lai et al, 2011) Το πρότυπο έκφρασης γονιδίων έχει βρεθεί ότι διαφοροποιείται ενώ παρατηρούνται και αλλαγές στο μεταβολισμό τους. Αλλάζει ακόμη, η μορφολογία τους, καθώς περισσότερο απλώνονται στις δύο διαστάσεις παρά μεγαλώνουν στις τρεις διαστάσεις (Koutsopoulos, 2012).

Τα τελευταία χρόνια αναπτύσσονται μέθοδοι καλλιέργειας σε 3D υποστρώματα. Έχουν χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτά διάφορων ειδών υποστρώματα στερεά ή και σε μορφή πηκτώματος (gel) κι από διάφορα υλικά, πολυμερή, μέταλλα, βιολικά όπως κολλαγόνο, λαμινίνη. Βασικοί παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη είναι η χημική ή βιοχημική τους σύνθεση, η γεωμετρία τους και οι φυσικές ιδιότητες των υλικών. Οι φυσικές ιδιότητες όπως η τοπογραφία, η τραχύτητα κι ελαστικότητα επιδρούν στην κυτταρική λειτουργία (Ross et al, 2012) Για τη μελέτη της τραχύτητας στην λειτουργία των κυττάρων έχουν χρησιμοποιηθεί υποστρώματα πυριτίου. Με τεχνικές ultrafast laser παράγονται στην επιφάνεια του πυριτίου επαναλαμβανόμενες κωνικές δομές στη κλίμακα του *micro*, με κάποιες και με προεξοχές πάνω σε αυτές στη κλίμακα του *nano*. (εικ.15) Με την αύξηση του ύψους των δομών αυτών αυξάνεται και η τραχύτητα της επιφάνειας, ενώ γίνεται και υδρόφοβη. Η επίδραση της τραχύτητας της επιφάνειας στην ανάπτυξη των κυττάρων μελετήθηκε στις κυτταρικές σειρές NIH/3T3 και PC12 (Koufali et al, 2011).



Εικόνα 15. Τοπογραφία των 3D ικριωμάτων πυριτίου. Διακρίνονται κωνικές δομές στη κλίμακα του *micro* με κάποιες και με προεξοχές πάνω σε αυτές, στη κλίμακα του *nano*. (Τροποποιημένη από Koufaki et al, 2011)

Σκοπός της Εργασίας

Οι ενδονευρώνες αποτελούν μόνο το 20% των νευρώνων του εγκεφαλικού φλοιού, διαδραματίζουν όμως, βασικό ρόλο στα νευρωνικά κυκλώματα του φλοιού. Μέσω των ανασταλτικών συνάψεων με τους πυραμιδικούς νευρώνες, εξισορροπούν τη διέγερση του φλοιού, ενώ είναι πολύ σημαντικοί σε λειτουργίες όπως η μνήμη και η μάθηση. Η μη-φυσιολογική ανάπτυξη και η δυσλειτουργία τους, διαταράσσουν την ευαίσθητη ισορροπία μεταξύ διέγερσης και αναστολής στο φλοιό και έχουν συσχετιστεί με σοβαρές παθολογικές καταστάσεις, όπως η επιληψία, η σχιζοφρένεια και ο αυτισμός. Ωστόσο, τα ενδοκυττάρια μονοπάτια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων είναι ακόμη άγνωστα.

Η πρωτεΐνη Rac1, μέλος της οικογένειας των Rho-GTPασών κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, εμπλέκεται σε πολλαπλές διεργασίες, όπως στη δημιουργία νευραξόνων, στην κυτταρική μετανάστευση και στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

Πρόσφατα δεδομένα από ομάδα του εργαστηρίου επισημαίνουν το ρόλο της Rac1 στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων. Απενεργοποίηση της Rac1 στους MGE προερχόμενους ενδονευρώνες έχει σαν αποτέλεσμα την καθυστερημένη χρονικά έξοδό τους από τον κυτταρικό κύκλο και τη μειωμένη μετανάστευση τους προς το φλοιό. Κατά συνέπεια, στον ώριμο εγκέφαλο εντοπίζονται τελικά μόνο οι μισοί ενδονευρώνες. Η απώλεια μέρους των ενδονευρώνων που προέρχονται από τη συγκεκριμένη περιοχή υποδεικνύει την αντισταθμιστική δράση κάποιου άλλου παράγοντα.

Σκοπός της εργασίας είναι η συγκριτική μελέτη των διπλά μεταλλαγμένων ζώων, για τις Rac1 και Rac3 πρωτεΐνες, με ζώα ελλειμματικά μόνο για τη Rac1 ή μόνο για τη Rac3 ώστε τα δεδομένα που θα προκύψουν, να συμβάλλουν πιθανά στην κατανόηση του διαφορετικού τους ρόλου στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων, καθώς και της συνεργατικής τους δράσης.

Μία ακόμη επιδίωξη, είναι η ανάπτυξη των ενδονευρώνων σε 3D καλλιέργεια που καλύτερα θα προσομοιάζει τις *in vivo* συνθήκες.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

I) Πειραματόζωα

Για τη μελέτη των μικρών Rho-GTPασών Rac1 και Rac3 στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων του φλοιού χρησιμοποιήθηκαν:

- 1) Φυσιολογικοί μύες των στελεχών CBAxC57B1/10.
- 2) Μύες που φέρουν αλληλουχίες LoxP εκατέρωθεν του 2ου και 3ου εξονίου του γονιδίου Rac1 (Rac1flox/flox). Στα συγκεκριμένα ζώα, η δράση της Cre ρεκομπινάσης οδηγεί σε απενεργοποίηση του γονιδίου Rac1 (Walmsley et al., 2003).
- 3) Μύες που φέρουν αλληλουχίες LoxP εκατέρωθεν αλληλουχιών (transcription stop sites) που εμποδίζουν την μεταγραφή του γονιδίου της κίτρινης φθορίζουσας πρωτεΐνης YFP. Το συγκεκριμένο γονίδιο βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου ROSA26 (ROSA26-YFPstop/stop). Στα ζώα αυτά η δράση της Cre ρεκομπινάσης οδηγεί σε έκφραση της πρωτεΐνης YFP (Srinivas et al., 2001).
- 4) Μύες στους οποίους εκφράζεται η Cre ρεκομπινάση υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου Nkx2.1 (Fogarty et al., 2007; από Ν. Καίσαρη, UCL, UK).
- 5) Μύες στους οποίους τα εξόνια 2,3,4,5 και μέρος των εξονίων 1 και 6 του γονιδίου Rac3 απαλοφείται και αντικαθίσταται από το γονίδιο lacZ. Στα ζώα αυτά υπάρχει πλήρης απενεργοποίηση του γονιδίου Rac3 (Corbetta et al., 2005).

II) Γονοτύπηση

A. Απομόνωση Γενομικού DNA από ιστούς

Τμήμα της ουράς του ζώου, χρησιμοποιείται για απομόνωση γενετικού υλικού και γονοτύπηση.

- 1) Στα ενήλικα ζώα η ουρά τοποθετείται σε 400μl διαλύματος λύσης (tail digestion buffer: 100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, pH8, 25 mM EDTA, pH: 8.0, 0.5% SDS, στα έμβρυα η ουρά τοποθετείται σε 100μl δι/τος λύσεως 50mM Tris pH8, 2mM NaCl, 10mM EDTA, 0.1% SDS, ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:
- 2) Επώαση για 30' στους 37°C.
- 3) Προσθήκη 15 μl πρωτεΐνης K (10 μg/μl) και επώαση στους 55°C. για 6-18 ώρες.
- 4) Προσθήκη RNase (10 μg/μl) και επώαση στους 37°C για 10'.
- 5) Φυγοκέντρηση για 5' στις 13000rpm και απομόνωση του υπερκείμενου σε νέα σωληνάρια.
- 6) Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης και ήπια ανάδευση για την ανάμιξη των φάσεων.
- 7) Φυγοκέντρηση για 10' στις 13200rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- 8) Πλύση της πελέτας με 70% αιθανόλη.
- 9) Φυγοκέντρηση για 5' στις 13200rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου
- 10) Επαναδιάλυση της πελέτας σε 100 μl dH₂O

B. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία
----------------	------------

<i>Εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την αντίδραση Rac1</i>	
Rac1-a	5'- GTTGAAGGTGCTAGCTTGGGAAGCTG- 3'
Rac1-b	5'- GAAGGAGAAGAAGCTGACTCCCATC-3'
Rac1-c	5'- CAGCCACAGGCAATGACAGATGTTC-3'
<i>Εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την αντίδραση Nkx2.1_iCre</i>	
Nkx2.1-iCre-Fw	5'- GTCCACCATGGTGCCCAAGAAGAAG-3'
Nkx2.1-iCre-Rev	5'- GCCTGAATTCTCAGTCCCCATCTTCGAGC-3'
<i>Εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την αντίδραση Rac3</i>	
Rac3-F1	5'-CATTTCTGTGGCGTCGCCAAC-3'
Rac3-R2	5'-CACGCGGCCGAGCTGTGGTG-3'
Rac3-R3	5'-TTGCTGGTGTCCAGACCAAT-3'
<i>Εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την αντίδραση YFP-Stop</i>	
Rosa26-Lc	5'- GCTCTGAGTTGTTATCAGTAAGG-3'
Rosa26-R2	5'- GCGAAGAGTTTGTCTCAACC-3'
Rosa26-R3	5'- GGAGCGGGAGAAATGGATATG-3'

Σε κάθε περίπτωση, οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις παρακάτω συνθήκες, σε προγράμματα κατάλληλα για τους εκκινητές κάθε αντίδρασης:
 Γενομικό DNA από ουρά έως 500pg, 2.5ng από κάθε εκκινητή, 0.2μM dNTPs και 1-2units Taq polymerase (Minotech ή Finzymes) σε 1x από το αντίστοιχο PCR buffer.

Αντίδραση PCR	Πρόγραμμα αντίδρασης
<u>Nkx2.1_iCre</u>	4 λεπτά στους 94°C. Στην συνέχεια 5 κύκλοι από 30''στους 94°C, 50''στους 61°C και 2 λεπτά στους 72°C. Ακολουθούν 35 κύκλοι από 30''στους 94°C, 50''στους 56°C και 2 λεπτά στους 72°C. Στην συνέχεια 10 λεπτά στους 72°C και διατήρηση στους 4°C.
<u>Rac1</u>	2 λεπτά στους 94°C, 30 κύκλοι από 30''στους 94°C, 30''στους 54°C και 30''στους 72°C ακολουθούμενοι από 10 λεπτά στους 72°C. Συντήρηση στους 4°C.
<u>Rac3</u>	1 λεπτό στους 94°C, 30 κύκλοι από 20''στους 98°C, 1 λεπτό στους 66°C και 1 λεπτό στους 72°C ακολουθούμενοι από 10 λεπτά στους 72°C. Συντήρηση στους 4°C.
<u>YFP</u>	4 λεπτά στους 94°C, 35 κύκλοι από 30''στους 94°C, 40''στους 58°C και 1 λεπτό στους 72°C ακολουθούμενοι από 5 λεπτά στους 72°C. Διατήρηση της αντίδρασης στους 4°C.

III) Καλλιέργειες κυττάρων

- 1) Έγκυες θηλυκές θυσιάζονται την E13.5, με αποσύνδεση της σπονδυλικής τους στήλης και τα έμβρυα συλλέγονται σε θρεπτικό μέσο L15-Leibovitz (GIBCO) με 100units/ml πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη.
- 2) Ακολουθεί απομόνωση του εγκεφάλου τους μέσα στο ίδιο θρεπτικό. Κάτω από στερεοσκόπιο, απομακρύνονται οι μήνιγγες και τα 2 ημισφαίρια χωρίζονται, αποκαλύπτοντας τις κοιλίες και τις εσωτερικές δομές του εγκεφάλου. Η περιοχή του MGE απομονώνεται.
- 3) Φυγοκέντρηση για 5', στις 2000rpm στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- 4) Προσθήκη 200μl Neurobasal/B27 [Neurobasal (GIBCO), 0.6% γλυκόζη, 100units/ml πενικιλίνη και στεπτομυκίνη, 1x Glutamax (100x, GIBCO), 2% (v/v) B27 supplement (GIBCO)] και με τη βοήθεια πιπέτας Gilson και tips 200μl, πραγματοποιείται μηχανική διάσπαση των ιστοτεμαχίων (10-12 φορές), έως ότου απομονωθούν μεμονωμένα κύτταρα προερχόμενα από το MGE.
- 5) Μέτρηση των κυττάρων με Neubauer.
- 6) Προσθήκη 800μl Neurobasal/B27.
- 7) Επικάλυψη των καλυπτρίδων που θα χρησιμοποιηθούν με κολλαγόνο (Invotrogen).
- 8) Προσθήκη στις καλυπτρίδες, 900μl Neurobasal/B27 και κατάλληλη ποσότητα κυττάρων ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους.

IV) Επεξεργασία ιστών για κρυοτομές.

- 1) Απομόνωση εγκεφάλων μέσα σε 1x PBS και μονιμοποίηση σε 4% PFA, για 12-18 ώρες στους 4°C.
- 2) Πλύση με 1x PBS
- 3) Τοποθέτηση του ιστού σε δ/μα 30% σουκρόζης σε 1x PBS, για κρυοπροστασία.
- 4) Ο ιστός παραμένει στο δ/μα αυτό στους 4°C, έως ότου καταβυθιστεί.
- 5) Έγκλιση του ιστού σε πήκτωμα 15% σουκρόζης και 7,5% ζελατίνης σε 1x PBS.
- 6) Πάγωμα του ιστού σε ισοπεντάνιο, στους -45°C και φύλαξη στους -80°C, έως ότου κοπεί σε κρυοτόμο (LEICA) σε τομές πάχους 12μm. Οι τομές συλλέγονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και διατηρούνται στους -20°C.

V) Ανασοφθορισμός

A. Σε τομές κρυοτόμου

- 1) Πλύση των τομών σε PBS 1x + 0,1% Triton (1x PBT) για 5'.
- 2) Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων με 1% Fetal Bovine Serum (FBS) σε 1x PBT (blocking solution), 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- 3) Επώαση των τομών με πρωτοταγές αντίσωμα, αραιωμένο σε blocking solution, για 12-18 ώρες στους 4°C.
- 4) Πλύση των τομών με 1x PBS, 3 x 15'.
- 5) Επώαση των τομών στο σκοτάδι, με δευτεροταγές αντίσωμα αραιωμένο σε blocking solution, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- 6) Πλύση των τομών με 1x PBS, 3 x 10'.

7) Προσθήκη MOWIOL και καλυπτρίδων.

B. Σε κύτταρα

- 1) Απομάκρυνση των κυττάρων από τον επωαστήρα και πλύση με αποστειρωμένο PBS 1x + 1% Mg^{+2}/Ca^{+2} (PBS⁺⁺), 2 φορές.
- 2) Μονιμοποίηση των κυττάρων με 3,7% φορμαλδεύδη (methanol free) σε PBS⁺⁺ 1x, σε θερμοκρασία δωματίου, για 10'.
- 3) Πλύσεις με PBS⁺⁺ 1x, 2 φορές.
- 4) Προσθήκη PBS⁺⁺ 1x + 0,1% Triton, σε θερμοκρασία δωματίου, για 5'.
- 5) Πλύσεις με PBS⁺⁺ 1x, 2 φορές.
- 6) Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων με 1% Bovine Serum Albumin (BSA) σε PBS⁺⁺ 1x (blocking solution), 30' σε θερμοκρασία δωματίου.
- 7) Προσθήκη πρωτοταγούς αντισώματος αραιωμένου σε blocking solution και επώαση για 1,5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι αν πρόκειται την Phalloidin-555.
- 8) Πλύσεις με PBS⁺⁺ 1x, 3 φορές.
- 9) Επώαση στο σκοτάδι, με δευτεροταγές αντίσωμα αραιωμένο 1:200, σε blocking solution, για 30' σε θερμοκρασία δωματίου.
- 10) Πλύσεις με PBS⁺⁺ 1x, 3 φορές.
- 11) Αν πρόκειται για καλλιέργειες στα 3D ικρίωματα, επώαση με DAPI, αραιωμένο 1:1000 σε 1x PBS, για 5' σε θερμοκρασία δωματίου.
- 12) Τα κύτταρα που έχουν καλλιεργηθεί πάνω σε καλυπτρίδες, τοποθετούνται πάνω σε μια σταγόνα MOWIOL, σε αντικειμενοφόρους πλάκες, έτσι ώστε η επιφάνεια όπου βρίσκονται τα κύτταρα να είναι σε επαφή με το υγρό.

Πρωτοταγή Αντισώματα	Αραίωση		Ισότυπος
	κρυοτομές	κύτταρα	
Anti-GFP (Minotech)	1:500	1:200	Rabbit IgG
Anti-GFP (Nacalai Tesque)	1:2000	1:200	Rat IgG
Anti-Lhx6 (Lavdas et al, 1996)	1:200	-	Rabbit IgG
Anti-GABA (Sigma)	1:1000	-	Rabbit IgG
Anti-AcTub	-	1:75	Mouse IgG
Anti-TyTub	-	1:50	Rat IgG
Alexa Fluor 594 Phalloidin	-	1:200	-

Δευτεροταγή Αντισώματα	Αραίωση
Goat-anti-mouse IgG_ALEXA 488 (Molecular Probes)	1:800

Goat-anti-mouse IgG_ALEXA 555 (Molecular Probes)	1:800
Goat-anti-mouse IgG_ALEXA 633 (Molecular Probes)	1:800
Goat-anti-rabbit IgG_ALEXA 488 (Molecular Probes)	1:800
Goat-anti-rabbit IgG_ALEXA 555 (Molecular Probes)	1:800
Goat-anti-rabbit IgG_ALEXA 633 (Molecular Probes)	1:800
Donkey-anti-Rat IgG_ALEXA 488 (Molecular Probes)	1:800
Donkey-anti-Rat IgG_ALEXA 633 (Molecular Probes)	1:800
Goat-anti-Rat IgG_ALEXA 555 (Molecular Probes)	1:800

VI) Υβριδοποίηση in situ για τον εντοπισμό mRNA σε κρυτομές

- 1) Επώαση των τομών με 4% PFA, 10' σε θερμοκρασία δωματίου
- 2) Πλύσεις με 1x PBS, 3 x 5'
- 3) Ακετυλίωση των τομών με δ/μα: 4 ml τριαιθανολαμίνη, 0.525 ml HCl (37%) και 0.75 ml οξικός ανυδρίτης σε 295 ml H₂O, για 10' σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4) Πλύσεις με 1x PBS, 3 x 10'
- 5) Προϋβριδοποίηση των τομών σε δ/μα το οποίο περιέχει: 50% φορμαμίδιο, 5xSSC, 5xDenharts, 250mg/ml yeast RNA, 500mg/ml herring sperm DNA, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
- 6) Υβριδοποίηση των τομών με 400ng/ml ανιχνευτή RNA σημασμένου με διγοξυγενίνη (DIG labeled-probe), σε δ/μα προϋβριδοποίησης, για 12-18 ώρες, στους 72°C.
- 7) Μεταφορά των τομών σε δ/μα 0,2x SSC, για 1 ώρα, στους 72°C.
- 8) Μεταφορά των τομών σε δ/μα 0,2x SSC, για 5' σε θερμοκρασία δωματίου.
- 9) Πλύσεις των τομών με δ/μα B1 που περιέχει 0.1M Tris pH7.5, 0.15 M NaCl, 3 x 5'.
- 10) Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του αντισώματος με 10% Fetal Bovine Serum (FBS) σε δ/μα B1 (blocking solution), 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- 11) Επώαση των τομών με αντίσωμα anti-DIG-AP (Roche) αραιωμένο 1:5000 σε 1% FBS σε δ/μα B1, για 12-18 ώρες στο 4°C.
- 12) Πλύσεις των τομών με δ/μα B1, 3 x 10'.
- 13) Πλύσεις των τομών με δ/μα B2 που περιέχει: 0.1M Tris pH 9.5, 0.1M NaCl, 50mM MgCl₂, 3 x 10'.
- 14) Επώαση με το χρωμογόνο διάλυμα: 75mg/ml NBT (Nitroblue tetrazolium chloride, Roche) και 50mg/ml BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate,4- toluidine salt, Roche) σε διάλυμα B2. Η αντίδραση πραγματοποιείται στο σκοτάδι, μέχρι να δώσει ικανοποιητική χρώση.
- 15) Πλύσεις των τομών με 1x PBS, 3 x 10'
- 16) Προσθήκη μείγματος 50% ζελατίνης και 50% γλυκερόλης και καλυπτρίδων στις τομές.

Χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένα το Μόριο : Som, Πλασμιδιακός Φορέας: pBS II (KS),
Μη νοηματικό RNA (antisense RNA) : Ένζυμο: EcoRI, Πολυμεράση : T7

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Απενεργοποίηση της Rac-1 στην έσω γαγγλιονική προεξοχή του βασικού τελεγκεφάλου και της Rac3 κατά την εμβρυογένεση .

Για την μελέτη της πρωτεΐνης Rac-1 στην ανάπτυξη των GABAεργικών ενδονευρώνων του φλοιού, χρησιμοποιήθηκαν μύες με στοχευμένα απενεργοποιημένο το γονίδιο της, στο συγκεκριμένο πληθυσμό κυττάρων, μέσω της τεχνολογίας του Cre-loxP ανασυνδυασμού. Για το σκοπό αυτό διασταυρώθηκαν μύες που φέρουν loxP τόπους ανασυνδυασμού, εκατέρωθεν του 2ου και 3ου εξονίου του γονιδίου της Rac1 (Rac1fl/fl, Walmsley et al, 2003) με ζώα στα οποία έχει εισαχθεί διαγονίδιο που φέρει τόπους loxP εκατέρωθεν αλληλουχιών που εμποδίζουν την μεταγραφή του γονιδίου της κίτρινης φθορίζουσας πρωτεΐνης YFP (transcription stop sites). Το διαγονίδιο αυτό, βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου ROSA26 (ROSA26-YFPstop/stop). Στα ζώα αυτά δράση της Cre ρεκομπινάσης, οδηγεί σε έκφραση της πρωτεΐνης YFP (Srinivas et al., 2001).

Τα ζώα που προέκυψαν από την παραπάνω διασταύρωση, διασταυρώθηκαν με διαγονιδιακούς μύες που φέρουν το γονίδιο της Cre-ρεκομπινάσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου Nkx2.1 (Nkx2.1+/Cre, Fogarty et al, 2007).

Όπως έχει προαναφερθεί, ο μεταγραφικός παράγοντας Nkx2.1 εκφράζεται σε ολόκληρη την περιοχή της έσω γαγγλιονικής προεξοχής του βασικού τελεγκεφάλου (MGE). Για το λόγο αυτό, η διασταύρωση των Nkx2.1+/Cre διαγονιδιακών ζώων με τα Rac1fl/fl;ROSA26st/st ζώα, οδηγεί στη στοχευμένη απενεργοποίηση της Rac1 μόνο από τους ενδονευρώνες που προέρχονται από την περιοχή του MGE. Η απενεργοποίηση της Rac1 στους ενδονευρώνες του MGE, αναμένεται μετά την εμβρυϊκή ημέρα E10.5, καθώς τότε αρχίζει η έκφραση του Nkx2.1 στην περιοχή.

Από τους απογόνους των παραπάνω διασταυρώσεων, προκύπτουν ζώα ομόζυγα για το Rac1fl αλλήλιο, στα οποία υπάρχει πλήρης απενεργοποίηση της Rac1 (αναγραφόμενα ως Rac1fl/fl;Nkx2.1+/Cre), καθώς και ζώα ετερόζυγα για το ίδιο αλλήλιο, στα οποία η Rac1 εκφράζεται από το φυσιολογικό αλλήλιο (αναγραφόμενα ως Rac1+/fl;Nkx2.1+/Cre).

Όπως έχει αναφερθεί, η πρωτεΐνη Rac 3 εκφράζεται μόνο στον εγκέφαλο. Για την μελέτη του ρόλου της χρησιμοποιήθηκαν μύες με απενεργοποιημένο το γονίδιο της. Από την αλληλουχία του έχουν αφαιρεθεί τα εξόνια 2,3,4,5 και μέρος των εξονίων 1 και 6 και έχουν αντικατασταθεί με το βακτηριακό γονίδιο lacZ (Corbetta et al, 2005). Από διασταυρώσεις προκύπτουν ζώα ομόζυγα για το αλλήλιο όπου υπάρχει πλήρης έλλειψη του γονιδίου της Rac3 (-/-), ομόζυγα για το φυσιολογικό γονίδιο της Rac3 (+/+) και ετερόζυγα ζώα (+/-). Τα τελευταία χρησιμοποιούνται ως ζώα ελέγχου.

Για να μελετηθεί αν ο φαινότυπος των διπλά μεταλλαγμένων ζώων για τις Rac1 και Rac3 αντανακλά τις ποιοτικά ξεχωριστές τους επιδράσεις ή είναι αποτέλεσμα ποσοτικής επίδρασης της συνδυασμένης δράσης και των δύο, τα Rac1 ζώα διασταυρώθηκαν με τα Rac3 ζώα.

Συνοπτικά οι γονότυποι που προκύπτουν και μελετώνται στην παρούσα εργασία είναι οι:

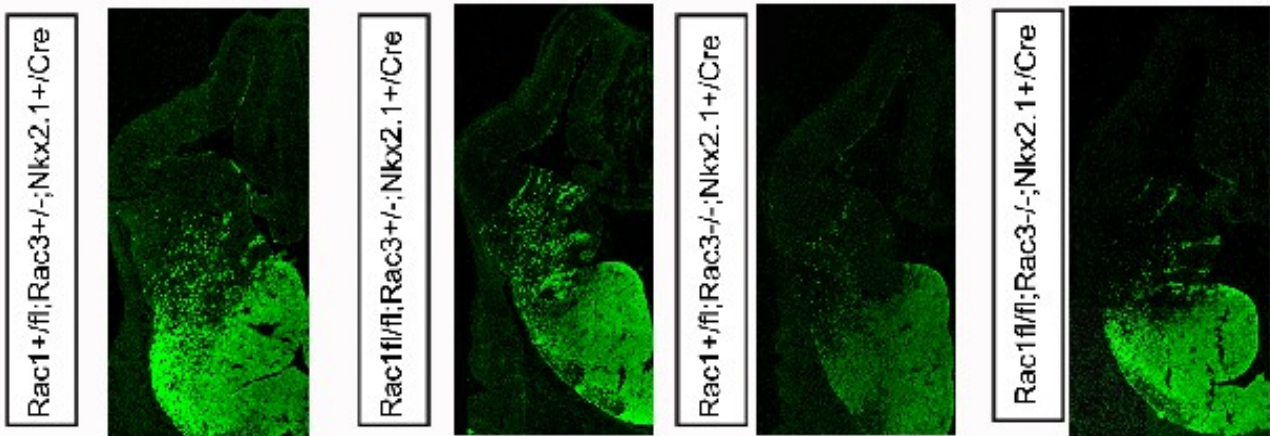
- Rac1+/fl;Rac3+/-;Nkx2.1+/Cre => ομάδα ελέγχου
- Rac1fl/fl;Rac3+/-;Nkx2.1+/Cre => Rac1 ελλειμματικά ζώα
- Rac1+/fl;Rac3-/-;Nkx2.1+/Cre => Rac3 ελλειμματικά ζώα
- Rac1fl/fl;Rac3-/-;Nkx2.1+/Cre => διπλά ελλειμματικά ζώα

Ο προσδιορισμός των γονοτύπων των ζώων γίνεται με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

2. Μελέτη του φαινοτύπου των Rac1, των Rac3 και των διπλά ελλειμματικών μυών κατά την εμβρυογένεση.

Όπως αναφέρθηκε εισαγωγικά, η πλειοψηφία των ενδονευρώνων των εγκεφαλικών ημισφαιρίων γεννιέται στην περιοχή του MGE. Η απενεργοποίηση της Rac1 στους ενδονευρώνες του MGE, και η έκφραση της YFP πρωτεΐνης αναμένεται μετά την εμβρυϊκή ημέρα E10.5, καθώς τότε αρχίζει η έκφραση του Nkx2.1 στην περιοχή. Ενώ η Rac3 απουσιάζει από τον εγκέφαλο από την αρχή της ανάπτυξης. (αφού δεν είναι conditional knockout).

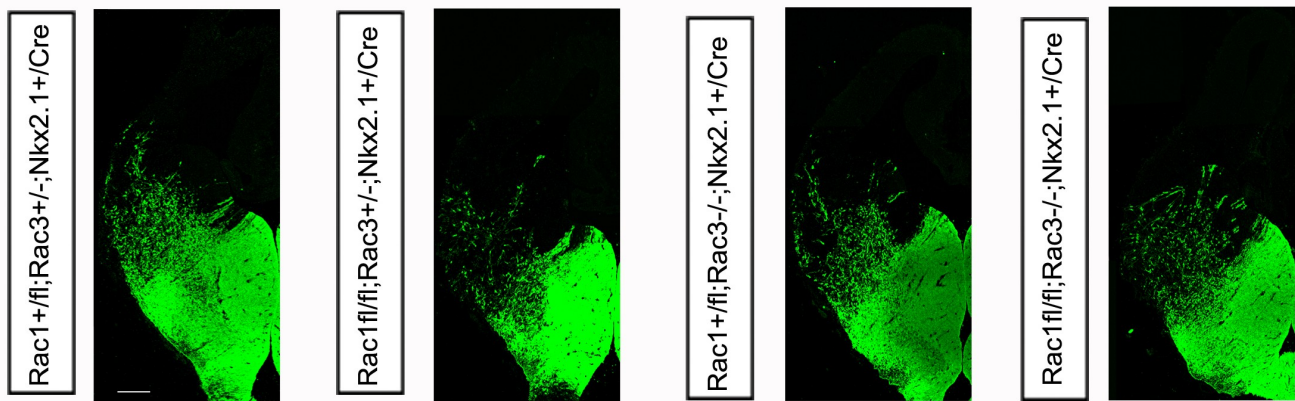
Ο χαρακτηρισμός του φαινοτύπου των Rac1 ελλειμματικών ζώων (Rac1^{fl/fl};Rac3^{+/-};Nkx2.1^{+/-}/Cre), των Rac3 ελλειμματικών ζώων (Rac1^{+/-};Rac3^{-/-};Nkx2.1^{+/-}/Cre), και των διπλά, Rac1/Rac3 ελλειμματικών ζώων (Rac1^{fl/fl};Rac3^{-/-};Nkx2.1^{+/-}/Cre) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Rac1^{+/-};Rac3^{+/-};Nkx2.1^{+/-}/Cre) αρχίζει νωρίς κατά την ανάπτυξη, την εμβρυϊκή ημέρα E12.5. Σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο, οι ενδονευρώνες από την MGE περιοχή έχουν αρχίσει να μεταναστεύουν οριζόντια προς τον αναπτυσσόμενο φλοιό και το ραβδωτό σώμα (Metin et al, 2006). Προκειμένου να μελετηθεί η διαδικασία αυτή στα Rac1, Rac3 και Rac1/Rac3 ελλειμματικά ζώα, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία για την πρωτεΐνη YFP σε στεφανιαίες τομές αδελφών μυών (εικ.1).



Εικόνα 1. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της YFP πρωτεΐνης σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλων αναπτυξιακής ηλικίας E12.5, μυών της ομάδας ελέγχου (Rac1^{+/-};Rac3^{+/-};Nkx2.1^{+/-}/Cre), Rac1 ελλειμματικών ζώων (Rac1^{fl/fl};Rac3^{+/-};Nkx2.1^{+/-}/Cre), Rac3 ελλειμματικών (Rac1^{+/-};Rac3^{-/-};Nkx2.1^{+/-}/Cre) και Rac1/Rac3 (διπλά) ελλειμματικών ζώων (Rac1^{fl/fl};Rac3^{-/-};Nkx2.1^{+/-}/Cre), κατά σειρά παρουσίασης.

Παρατηρήθηκε ότι οι ενδονευρώνες των Rac1^{+/-};Rac3^{+/-};Nkx2.1^{+/-}/Cre όπως ήταν αναμενόμενο, αρχίζουν να μεταναστεύουν από το MGE. Αντίστοιχη εικόνα παρουσιάζουν και τα Rac1^{+/-};Rac3^{-/-};Nkx2.1^{+/-}/Cre. Τα Rac1^{fl/fl};Rac3^{-/-};Nkx2.1^{+/-}/Cre φαίνεται να καθυστερούν να αρχίζουν να μεταναστεύουν.

Κατά την εμβρυική μέρα E13.5, ο φαινότυπος αυτός είναι πιο ορατός. Από την περιοχή του MGE η μέγιστη μετανάστευση των ενδονευρώνων λαμβάνει χώρα μεταξύ E13.5 και E14.5 (Hernandez-Miranda et al, 2010). (εικ.2)



Εικόνα 2. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της YFP πρωτεΐνης σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλων αναπτυξιακής ηλικίας E13.5,

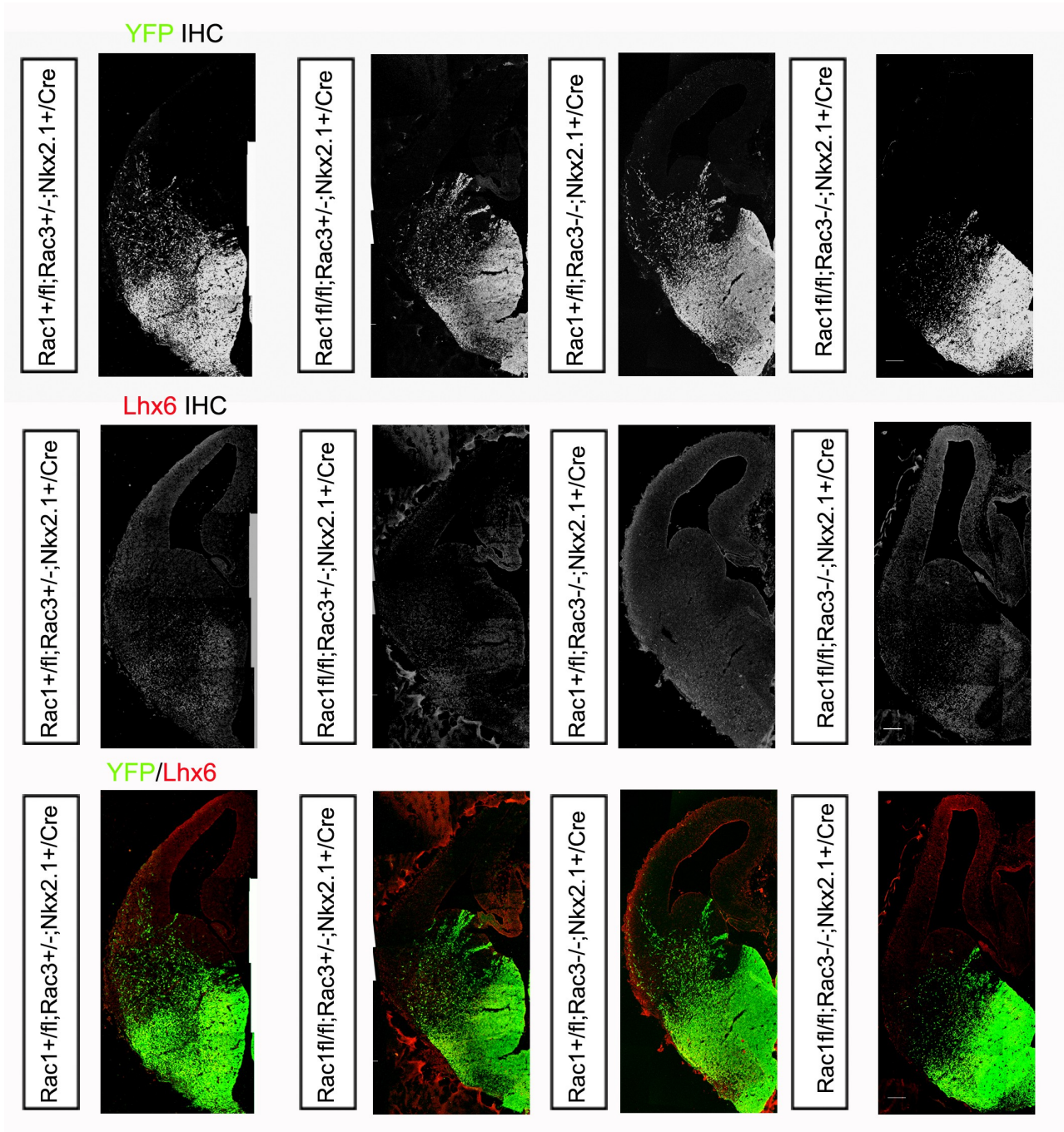
μυών της ομάδας ελέγχου (*Rac1+/fl; Rac3+/-; Nkx2.1+/Cre*), *Rac1*-ελλειμματικών ζώων (*Rac1fl/fl; Rac3+/-; Nkx2.1+/Cre*), *Rac3*-ελλειμματικών (*Rac1+/fl; Rac3-/-; Nkx2.1+/Cre*) ζώων και *Rac1/Rac3* (διπλά) ελλειμματικών ζώων (*Rac1fl/fl; Rac3-/-; Nkx2.1+/Cre*), κατά σειρά παρουσίασης.

Στην ομάδα ελέγχου καθώς και στα *Rac3*-ελλειμματικά ζώα οι ενδονευρώνες που προέρχονται από το MGE, σημασμένοι με την YFP πρωτεΐνη, μεταναστεύουν προς το φλοιό ενώ αρχίζουν να φαίνονται και τα χαρακτηριστικά μεταναστευτικά μονοπάτια που ακολουθούν, στη IZ/SVZ και στη MZ ζώνη. Αντίθετα οι ενδονευρώνες τόσο στα *Rac1*-ελλειμματικά ζώα όσο και στα *Rac1/Rac3*-ελλειμματικά ζώα φαίνεται να καθυστερούν σημαντικά να μεταναστεύσουν. Παρατηρείται να παραμένουν συγκεντρωμένα στο κοιλιακό τελεγκέφαλο.

Για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των σημασμένων με YFP κυττάρων πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία για την πρωτεΐνη YFP και τον παράγοντα *Lhx6* ο οποίος εκφράζεται ύστερα από ενεργοποίησή του από τον παράγοντα *Nkx2.1* σε μεταμιτωτικούς ενδονευρώνες και αποτελεί μάρτυρα της MGE περιοχής (Metin et al, 2006). (εικ. 3)

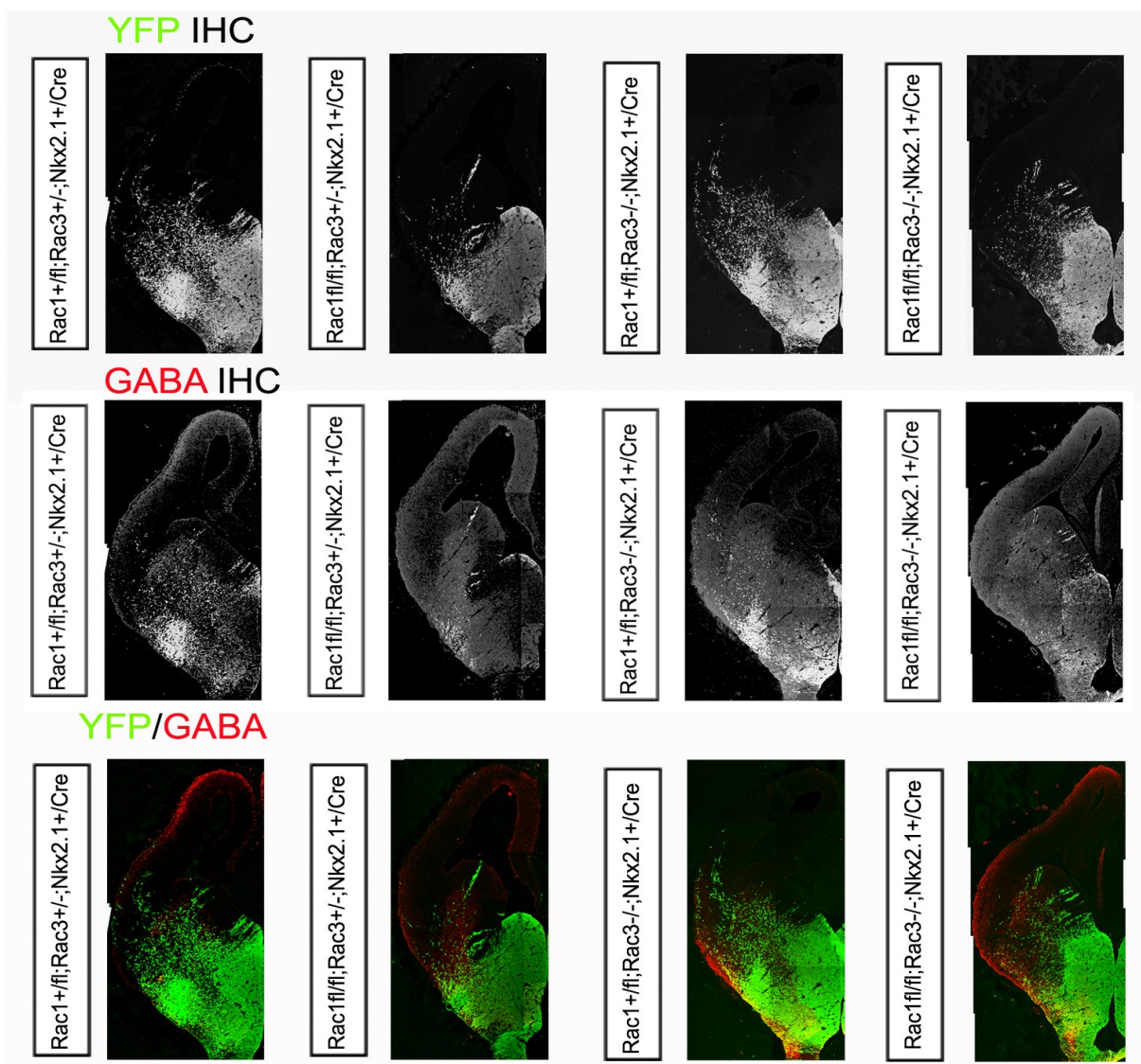
Παρατηρείται συνεντοπισμός της YFP και του *Lhx6* σε κύτταρα που μεταναστεύουν προς το φλοιό στη MZ και στη IZ/SVZ ζώνη, στα ζώα της ομάδας ελέγχου και στα *Rac3*-ελλειμματικά ζώα, καθώς και στον κοιλιακό τελεγκέφαλο όπου εντοπίζεται ένα σύνολο κυττάρων που δεν έχουν ακόμα μεταναστεύσει, αποδεικνύοντας πως πρόκειται για μεταμιτωτικούς νευρώνες που προέρχονται από το MGE. Συνέκφραση των πρωτεϊνών παρατηρείται και στα *Rac1* και *Rac1/Rac3*-ελλειμματικά ζώα στον κοιλιακό τελεγκέφαλο αποκαλύπτοντας πως τα κύτταρα που συγκεντρώνονται εκεί είναι μεταμιτωτικοί νευρώνες προερχόμενοι από το MGE που καθυστερούν να μεταναστεύσουν. Τέλος συνεντοπισμός δεν παρατηρείται, όπως αναμένονταν, στην κοιλιακή

ζώνη (VZ), αφού ο *Lhx6* εκφράζεται στα κύτταρα του MGE μετά από την έξοδό τους από τον κυτταρικό κύκλο (Metin et al, 2006).



Εικόνα 3. Διπλός ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της *YFP* πρωτεΐνης και του μεταγραφικού παράγοντα *Lhx6* σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλων αναπτυξιακής ηλικίας E13.5, μινών της ομάδας ελέγχου (*Rac1*^{+/fl};*Rac3*^{+/-};*Nkx2.1*^{+/Cre}), *Rac1*-ελλειμματικών ζώων (*Rac1*^{fl/fl};*Rac3*^{+/-};*Nkx2.1*^{+/Cre}), *Rac3*-ελλειμματικών (*Rac1*^{+/fl};*Rac3*^{-/-};*Nkx2.1*^{+/Cre}) ζώων και *Rac1/Rac3* (διπλά) ελλειμματικών ζώων (*Rac1*^{fl/fl};*Rac3*^{-/-};*Nkx2.1*^{+/Cre}), κατά σειρά παρουσίασης. (a) πρότυπο έκφρασης μόνο της *YFP*, (b) πρότυπο έκφρασης μόνο του *Lhx6*, (c) συνέκφραση *YFP*: με πράσινο, *Lhx6*: με κόκκινο)

Πραγματοποιήθηκε ακόμη ανοσοϊστοχημεία για την πρωτεΐνη YFP και το νευροδιαβιβαστή GABA που χαρακτηρίζει τους ενδονευρώνες. Παρουσιάζεται συνεντοπισμός των YFP και GABA στους τέσσερις διαφορετικούς γονοτύπους ζώων που εξετάζονται αντίστοιχα με την περίπτωση του Lhx6 που περιγράφηκε παραπάνω. Στα ζώα της ομάδας ελέγχου και στα Rac3-ελλειμματικά ζώα παρατηρείται συνεντοπισμός της YFP και του GABA σε κύτταρα που μεταναστεύουν προς το φλοιό στη MZ και στη IZ/SVZ ζώνη, καθώς και στον κοιλιακό τελεγκέφαλο, όπου εντοπίζεται ένα σύνολο κυττάρων που δεν έχουν ακόμα μεταναστεύσει. Συνέκφραση παρατηρείται και στα Rac1 και Rac1/Rac3-ελλειμματικά ζώα στον κοιλιακό τελεγκέφαλο. Συγκριτικά όμως με τους άλλους δύο γονοτύπους τα κύτταρα αυτά φαίνεται να είναι λιγότερα. Σε όλα τα ζώα εντοπίζονται κύτταρα σημασμένα με GABA που δεν συνεκφράζουν την πρωτεΐνη YFP, υποδεικνύοντας πως πρόκειται για ενδονευρώνες που προέρχονται από άλλη περιοχή, το LGE (Wonders & Anderson, 2006). (εικ.4)



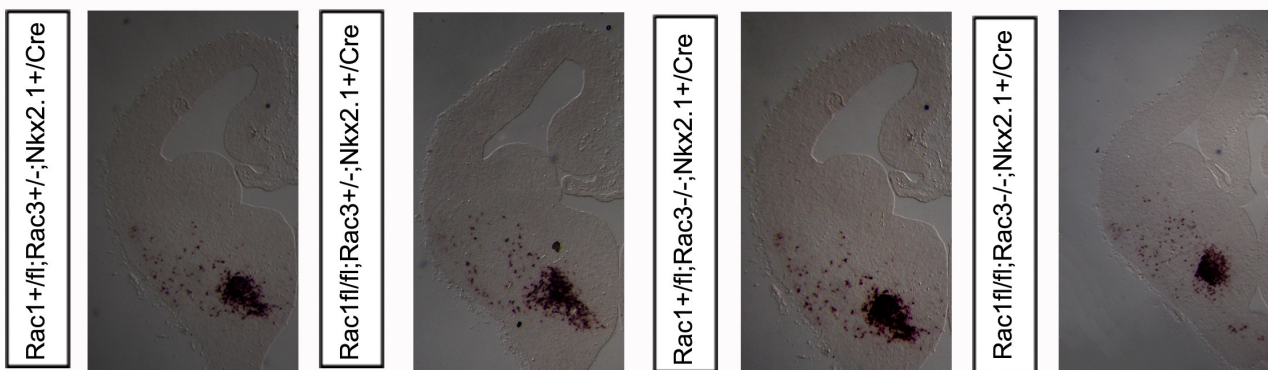
Εικόνα 4. Διπλός ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της YFP πρωτεΐνης και του νευροδιαβιβαστή GABA σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλων αναπτυξιακής ηλικίας E13.5,

μυών της ομάδας ελέγχου ($Rac1^{+/fl}; Rac3^{+/-}; Nkx2.1^{+/Cre}$), $Rac1$ -ελλειμματικών ζώων ($Rac1^{fl/fl}; Rac3^{+/-}; Nkx2.1^{+/Cre}$), $Rac3$ -ελλειμματικών ($Rac1^{+/fl}; Rac3^{-/-}; Nkx2.1^{+/Cre}$) ζώων και $Rac1/Rac3$ (διπλά) ελλειμματικών ζώων ($Rac1^{fl/fl}; Rac3^{-/-}; Nkx2.1^{+/Cre}$), κατά σειρά παρουσίασης. (a) πρότυπο έκφρασης μόνο της YFP, (b) πρότυπο έκφρασης μόνο του GABA, (c) συνέκφραση YFP: με πράσινο, GABA: με κόκκινο)

Τέλος, την εμβρυϊκή μέρα E13.5 πραγματοποιήθηκε υβριδοποίηση *in situ* για τη μελέτη του προτύπου έκφρασης του mRNA του νευροπεπτιδίου της σωματοστατίνης, στα $Rac1$, $Rac3$ και $Rac1/3$ ελλειμματικά ζώα σε σχέση με αυτό της ομάδας ελέγχου (εικ.5).

Η SST όπως αναφέρθηκε εισαγωγικά εκφράζεται σε ενδονευρώνες που προέρχονται από το MGE (Rudy et al, 2010).

Αντίστοιχα με τα παραπάνω αποτελέσματα, στην ομάδα ελέγχου καθώς και στα $Rac3$ -ελλειμματικά ζώα οι ενδονευρώνες που εκφράζουν SST εντοπίζονται στον κοιλιακό τελεγκέγαλο και φαίνονται να αρχίζουν να μεταναστεύουν προς το φλοιό. Αντίθετα τόσο στα $Rac1$ -ελλειμματικά ζώα όσο και στα $Rac1/Rac3$ -ελλειμματικά ζώα φαίνεται να καθυστερούν να μεταναστεύουν.



Εικόνα 5. Υβριδοποίηση *in situ* για τον εντοπισμό του mRNA του νευροπεπτιδίου της σωματοστατίνης (SST) σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλων αναπτυξιακής ηλικίας E13.5,

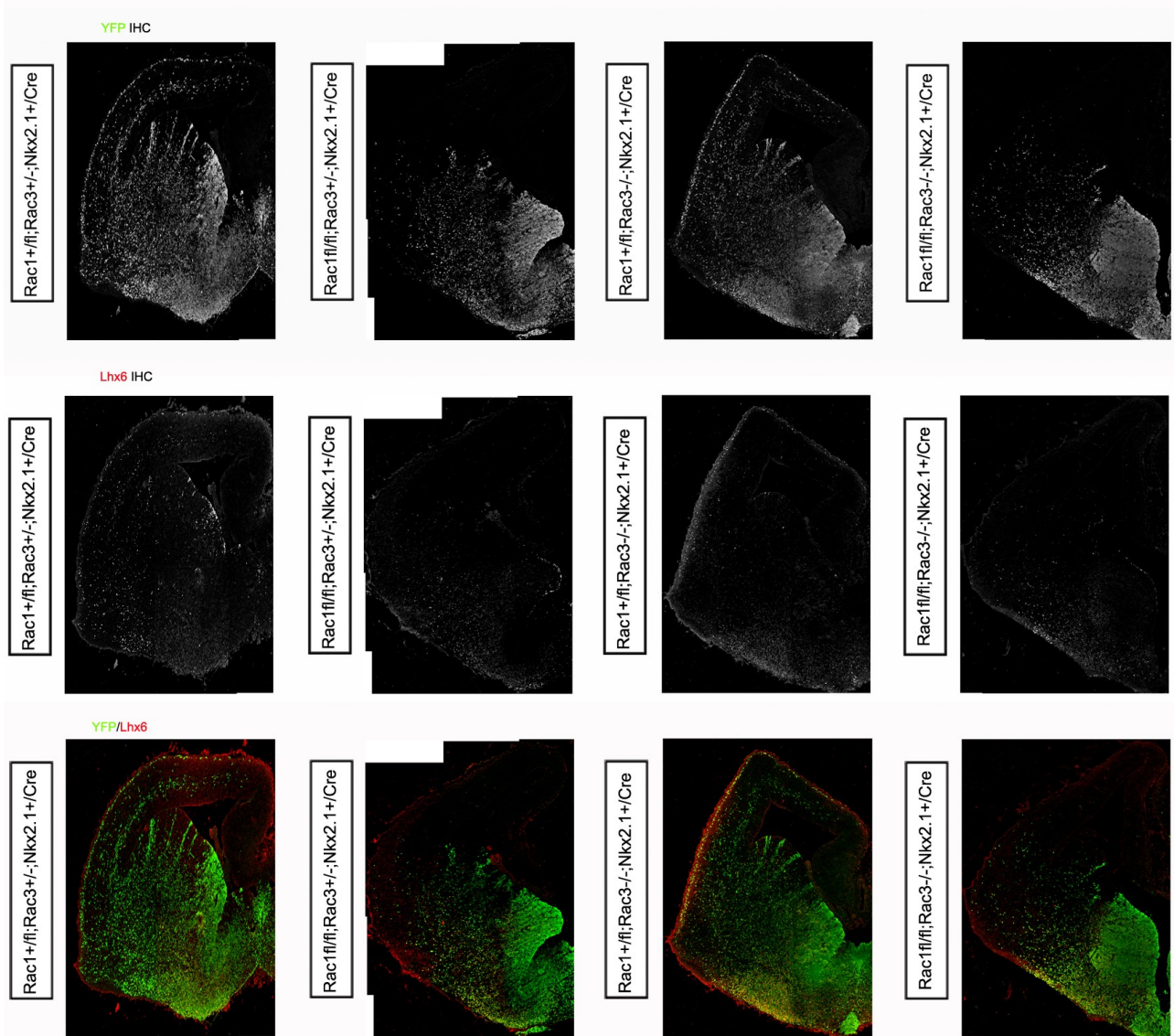
μυών της ομάδας ελέγχου ($Rac1^{+/fl}; Rac3^{+/-}; Nkx2.1^{+/Cre}$), $Rac1$ -ελλειμματικών ζώων ($Rac1^{fl/fl}; Rac3^{+/-}; Nkx2.1^{+/Cre}$), $Rac3$ -ελλειμματικών ($Rac1^{+/fl}; Rac3^{-/-}; Nkx2.1^{+/Cre}$) ζώων και $Rac1/Rac3$ (διπλά) ελλειμματικών ζώων ($Rac1^{fl/fl}; Rac3^{-/-}; Nkx2.1^{+/Cre}$), κατά σειρά παρουσίασης.

Στην εμβρυϊκή ηλικία E14.5 όπου η μετανάστευση των ενδονευρώνων από το MGE προς το φλοιό είναι στο μέγιστό της επίπεδο, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία για την πρωτεΐνη YFP και τον παράγοντα Lhx6.(εικ. 6)

Στα ζώα της ομάδας ελέγχου και στα $Rac3$ -ελλειμματικά ζώα, πλήθος ενδονευρώνων μεταναστεύουν προς το φλοιό. Ένα μεγάλο μέρος τους, στο οποίο συνεκφράζονται οι YFP και Lhx6, αποδεικνύοντας πως πρόκειται για μεταμιτωτικούς νευρώνες που προέρχονται από το MGE, έχει ήδη εισέλθει στον αναπτυσσόμενο φλοιό. Διακρίνονται χαρακτηριστικά τα μεταναστευτικά

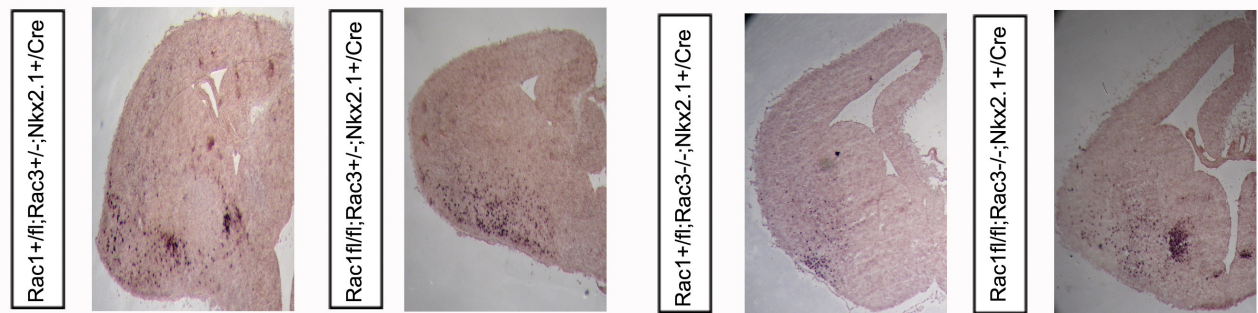
μονοπάτια στη MZ και στη IZ/SVZ ζώνη.

Σε αυτήν την εμβρυϊκή ηλικία αποτυπώνεται πιο ξεκάθαρα η καθυστέρηση των ενδονευρώνων στη μετανάστευση τους προς το φλοιό, τόσο στα *Rac1* όσο και στα *Rac1/Rac3*-ελλειμματικά ζώα. Σε σχέση με τους άλλους δύο γονοτύπους, στα ζώα αυτά, στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο, μόνο ένας πολύ μικρός αριθμός ενδονευρώνων έχει εισέλθει στο φλοιό.



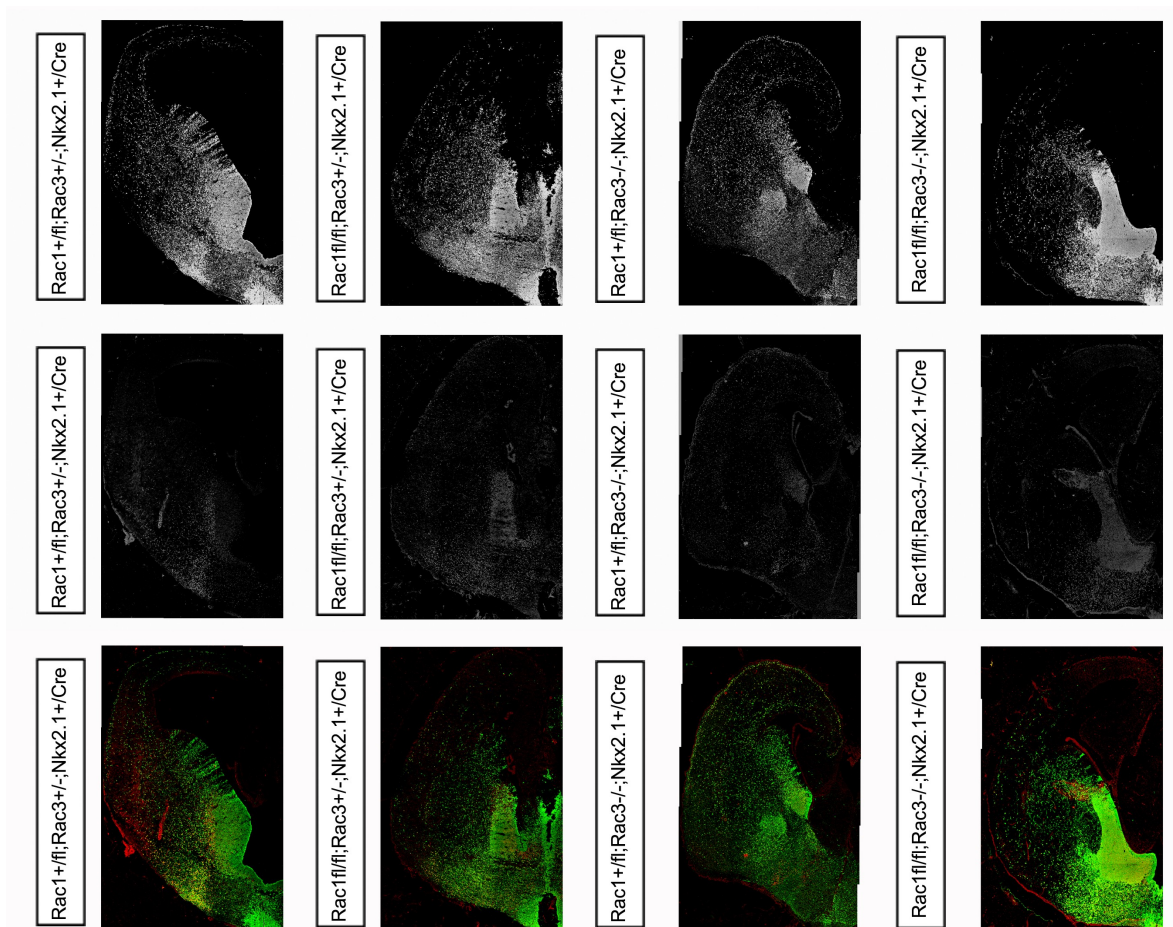
Εικόνα 6. Διπλός ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της YFP πρωτεΐνης και του μεταγραφικού παράγοντα Lhx6 σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλων αναπτυξιακής ηλικίας E14.5, μών της ομάδας ελέγχου (*Rac1+fl; Rac3+/-; Nkx2.1+/Cre*), *Rac1*-ελλειμματικών ζώων (*Rac1fl/fl; Rac3+/-; Nkx2.1+/Cre*), *Rac3*-ελλειμματικών (*Rac1+fl; Rac3-/-; Nkx2.1+/Cre*) ζώων και *Rac1/Rac3* (διπλά) ελλειμματικών ζώων (*Rac1fl/fl; Rac3-/-; Nkx2.1+/Cre*), κατά σειρά παρουσίασης. (a) πρότυπο έκφρασης μόνο της YFP, (b) πρότυπο έκφρασης μόνο του Lhx6, (c) συνέκφραση YFP: με πράσινο, Lhx6: με κόκκινο)

Για την εμβρυϊκή ηλικία E14.5 πραγματοποιήθηκε επίσης υβριδοποίηση *in situ*, ώστε να μελετηθεί το πρότυπο έκφρασης του mRNA του νευροπεπτιδίου της σωματοστατίνης, στα Rac1, Rac3 και Rac1/3 ελλειμματικά ζώα σε σχέση με αυτό της ομάδας ελέγχου (εικ.7). Στην ομάδα ελέγχου καθώς και στα Rac3-ελλειμματικά ζώα οι ενδονευρώνες που εκφράζουν SST εντοπίζονται στον κοιλιακό τελεγκέγαλο και φαίνονται να μεταναστεύουν κάποια προς το φλοιό. Στα Rac1/Rac3-ελλειμματικά ζώα φαίνονται οι ενδονευρώνες περισσότερο συγκεντρωμένοι ακόμη στον κοιλιακό τελεγκέφαλο.



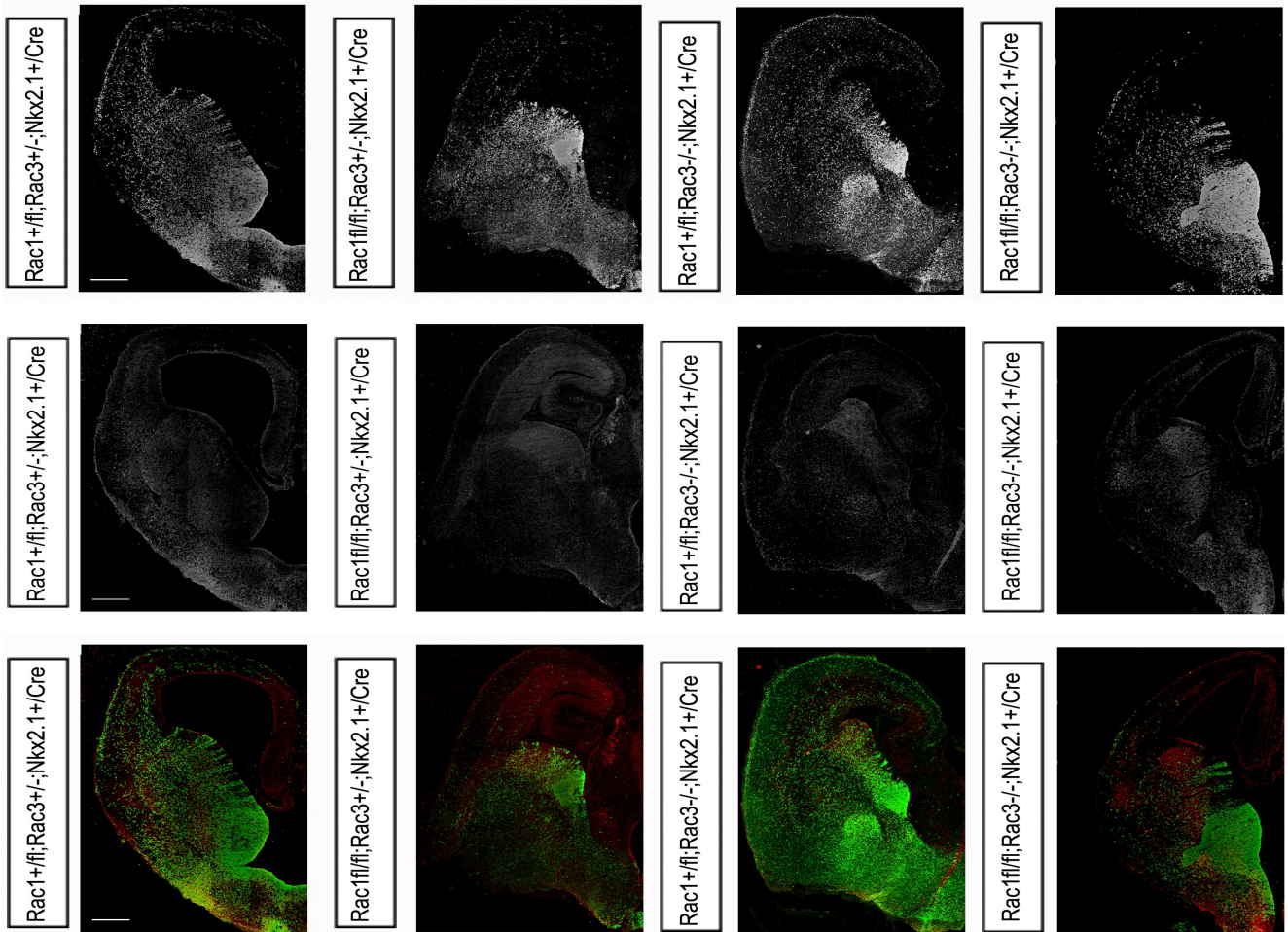
Εικόνα 7. Υβριδοποίηση *in situ* για τον εντοπισμό του mRNA του νευροπεπτιδίου της σωματοστατίνης (SST) σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλων αναπτυξιακής ηλικίας E14.5, μών της ομάδας ελέγχου ($Rac1^{+/fl}; Rac3^{+/-}; Nkx2.1^{+/Cre}$), Rac1-ελλειμματικών ζώων ($Rac1^{fl/fl}; Rac3^{+/-}; Nkx2.1^{+/Cre}$), Rac3-ελλειμματικών ($Rac1^{+/fl}; Rac3^{-/-}; Nkx2.1^{+/Cre}$) ζώων και Rac1/Rac3 (διπλά) ελλειμματικών ζώων ($Rac1^{fl/fl}; Rac3^{-/-}; Nkx2.1^{+/Cre}$), κατά σειρά παρουσίασης.

Προκειμένου να εξετασθεί περαιτέρω το πρότυπο μετανάστευσης που παρατηρήθηκε στους τέσσερις διαφορετικούς γονοτύπους ζώων, μελετήθηκαν και έμβρυα μεγαλύτερων αναπτυξιακών σταδίων. Σε έμβρυα ηλικίας E15.5 πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία για την YFP πρωτεΐνη σε συνδυασμό με το Lhx6 το GABA (εικόνες 8 και 9 αντίστοιχα).



Εικόνα 8. Διπλός ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της YFP πρωτεΐνης και του μεταγραφικού παράγοντα *Lhx6* σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλων αναπτυξιακής ηλικίας E15.5, μών της ομάδας ελέγχου (*Rac1*+/*fl*;*Rac3*+/-;*Nkx2.1*+/*Cre*), *Rac1*- ελλειμματικών ζώων (*Rac1**fl/fl*;*Rac3*+/-;*Nkx2.1*+/*Cre*), *Rac3*-ελλειμματικών (*Rac1*+/*fl*;*Rac3*-/-;*Nkx2.1*+/*Cre*) ζώων και *Rac1/Rac3* (διπλά) ελλειμματικών ζώων (*Rac1**fl/fl*;*Rac3*-/-;*Nkx2.1*+/*Cre*), κατά σειρά παρουσίας. (α) πρότυπο έκφρασης μόνο της YFP, (β) πρότυπο έκφρασης μόνο του *Lhx6*, (γ) συνέκφραση YFP: με πράσινο, *Lhx6*: με κόκκινο)

Τόσο οι ενδονευρώνες των *Rac1*+/*fl*;*Rac3*+/-;*Nkx2.1*+/*Cre* ζώων όσο και των *Rac1*+/*fl*;*Rac3*-/-;*Nkx2.1*+/*Cre* ζώων στη συντριπτική τους πλειοψηφία μεταναστεύουν προς το φλοιό οριζόντια, ενώ και μεγάλο μέρος τους έχει εισέλθει στο φλοιό. Διακρίνονται χαρακτηριστικά κατά μήκος του τα μεταναστευτικά μονοπάτια της MZ, IZ/SVZ.

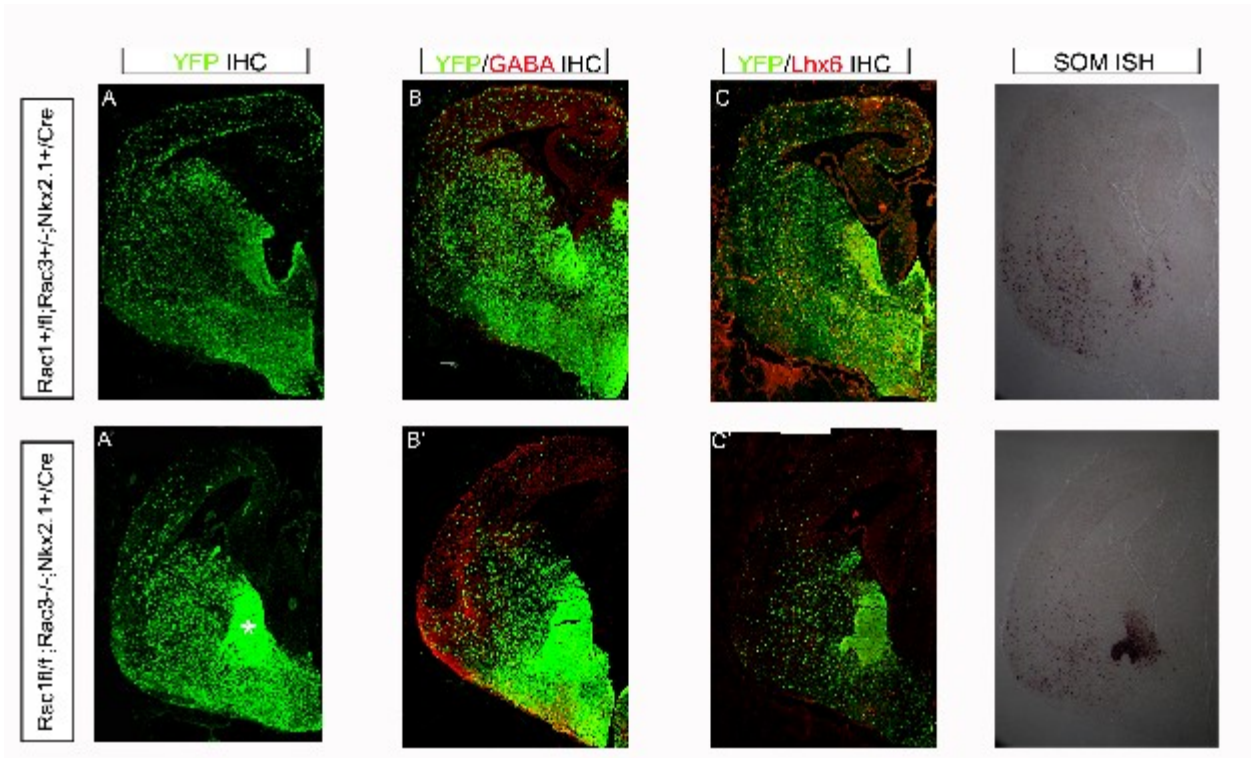


Εικόνα 10. Διπλός ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της YFP πρωτεΐνης και του μεταγραφικού παράγοντα GABA σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλων αναπτυξιακής ηλικίας E15.5, μινών της ομάδας ελέγχου ($Rac1^{+/fl}; Rac3^{+/-}; Nkx2.1^{+/Cre}$), $Rac1$ -ελλειμματικών ζώων ($Rac1^{fl/fl}; Rac3^{+/-}; Nkx2.1^{+/Cre}$), $Rac3$ -ελλειμματικών ($Rac1^{+/fl}; Rac3^{-/-}; Nkx2.1^{+/Cre}$) ζώων και $Rac1/Rac3$ (διπλά) ελλειμματικών ζώων ($Rac1^{fl/fl}; Rac3^{-/-}; Nkx2.1^{+/Cre}$), κατά σειρά παρουσίασης. (a) πρότυπο έκφρασης μόνο της YFP, (b) πρότυπο έκφρασης μόνο του Lhx6, (c) συνέκφραση YFP: με πράσινο, GABA: με κόκκινο)

Οι ενδονευρώνες των $Rac1^{fl/fl}; Rac3^{+/-}; Nkx2.1^{+/Cre}$ και των $Rac1^{fl/fl}; Rac3^{-/-}; Nkx2.1^{+/Cre}$ καθυστερούν να μεταναστεύσουν. Σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο, για πρώτη φορά τα $Rac1/Rac3$ ελλειμματικά ζώα φαίνεται να καθυστερούν περισσότερο να μεταναστεύσουν, από τα $Rac1$ -ελλειμματικά. Μεγάλος αριθμός νευρώνων φαίνεται να συγκεντρώνεται στο κοιλιακό τελεγκέφαλο.

Για την εμβρυική ηλικία E16.5 εξετάστηκαν μόνο ζώα από την ομάδα ελέγχου και $Rac1/Rac3$ ελλειμματικά ζώα. Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία για, την YFP πρωτεΐνη καθώς και για την YFP σε συνδυασμό με το νευροδιαβιβαστή GABA και το μεταγραφικό παράγοντα Lhx6

και in situ υβριδοποίηση για τον εντοπισμό του mRNA της SST.(εικ. 11)



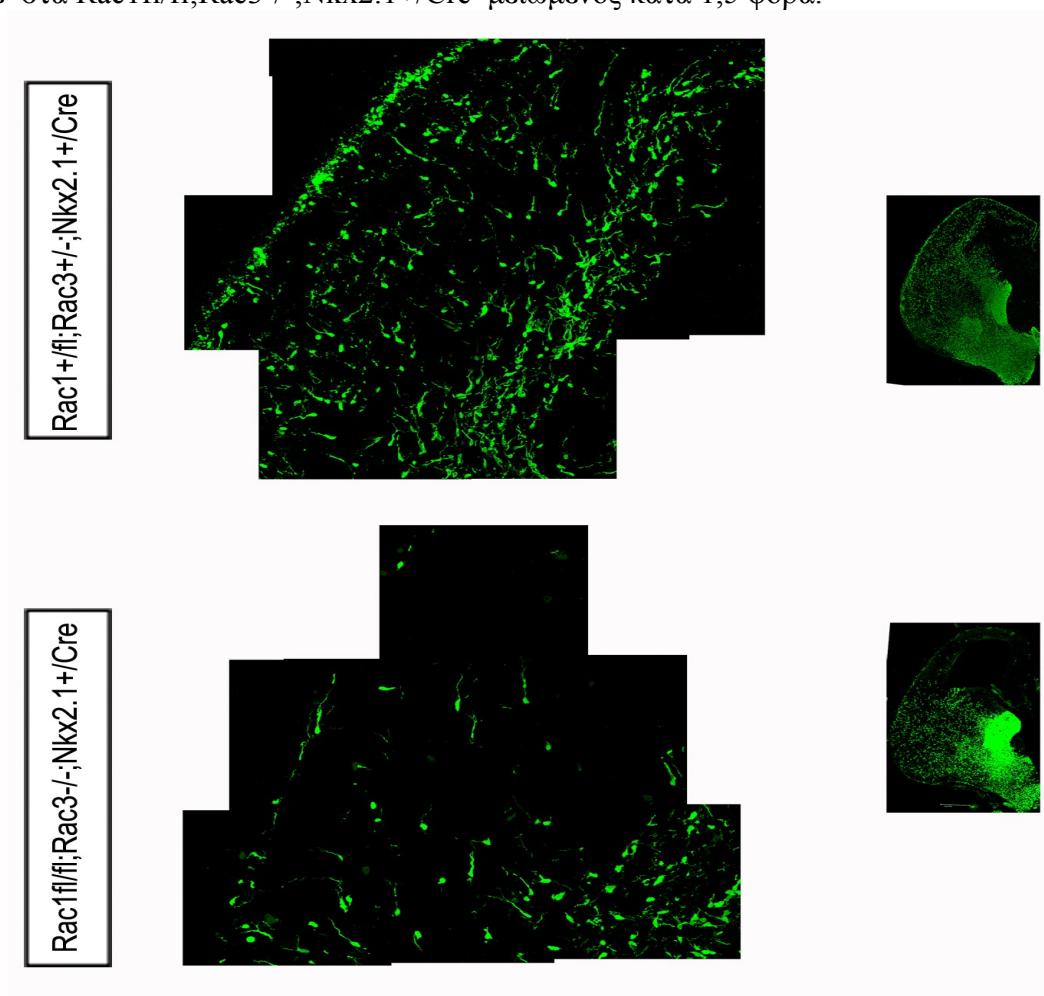
Εικόνα 11. Ανοσοϊστοχημεία και *in situ* υβριδοποίηση σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλων αναπτυξιακής ηλικίας E16.5,

μυών της ομάδας ελέγχου (*Rac1*+/*fl*;*Rac3*+/-;*Nkx2.1*+/*Cre*) και *Rac1/Rac3* (διπλά) ελλειμματικών ζώων (*Rac1**fl/fl*;*Rac3*-/-;*Nkx2.1*+/*Cre*), κατά σειρά παρουσίασης. (AA') Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της YFP πρωτεΐνης (BB') Διπλός ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της YFP πρωτεΐνης και του νευροδιαβιβαστή GABA, YFP: με πράσινο, GABA: με κόκκινο (CC') Διπλός ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της YFP πρωτεΐνης και του μεταγραφικού παράγοντα Lhx6, YFP: με πράσινο, Lhx6 : με κόκκινο (DD') *in situ* υβριδοποίηση για τον εντοπισμό του mRNA του νευροπεπτιδίου της σωματοστατίνης (SST)

Στο στάδιο αυτό αναμένεται ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων του MGE να εντοπίζονται ήδη στο φλοιό των ημισφαιρίων, ενώ πολλά κύτταρα να συνεχίζουν να μεταναστεύουν οριζόντια από τον κοιλιακό προς το ραχιαίο τελεγκέφαλο. Τέτοια εικόνα παρατηρείται στα ζώα της ομάδας ελέγχου. Μέσω της έκφρασης της YFP πρωτεΐνης σε συνδυασμό και με το GABA και το Lhx6 καθώς και του mRNA της SST προκύπτει ότι στα *Rac1/Rac3* ελλειμματικά ζώα, ένας πολύ μικρός αριθμός ενδονευρώνων, προερχόμενων από το MGE, μετακινείται από τον κοιλιακό τελεγκέφαλο προς τον αναπτυσσόμενο φλοιό. Ένα μεγάλο ποσοστό των κυττάρων όμως παραμένουν συγκεντρωμένα στο βασικό τελεγκέφαλο, στην κοιλιακή ζώνη όπου γεννιούνται. Μάλιστα συγκρίνοντας την περιοχή αυτή με την αντίστοιχη στα ζώα της ομάδας ελέγχου, φαίνεται τα περισσότερα κύτταρα να είναι συγκεντρωμένα εκεί.

3. Μελέτη των Rac1/Rac3 ελλειμματικών ενδονευρώνων in vitro.

Στο αναπτυξιακό στάδιο E15.5 εξετάζοντας τη μετανάστευση των νευρώνων με φακό μεγαλύτερης ευκρίνειας παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα που προέρχονται από το MGE και μεταναστεύουν στα διπλά ελλειμματικά ζώα παρουσιάζουν διαφορετική μορφολογία. (εικ 12). Οι άξονές τους φαίνονται μικρότεροι. Υπολογίστηκε ο μέσος όρος του μήκους των αξόνων στους Rac1fl/fl;Rac3-/-;Nkx2.1+/Cre και στους Rac1+/fl;Rac3+/-;Nkx2.1+/Cre ενδονευρώνες και βρέθηκε στα Rac1fl/fl;Rac3-/-;Nkx2.1+/Cre μειωμένος κατά 1,5 φορά.



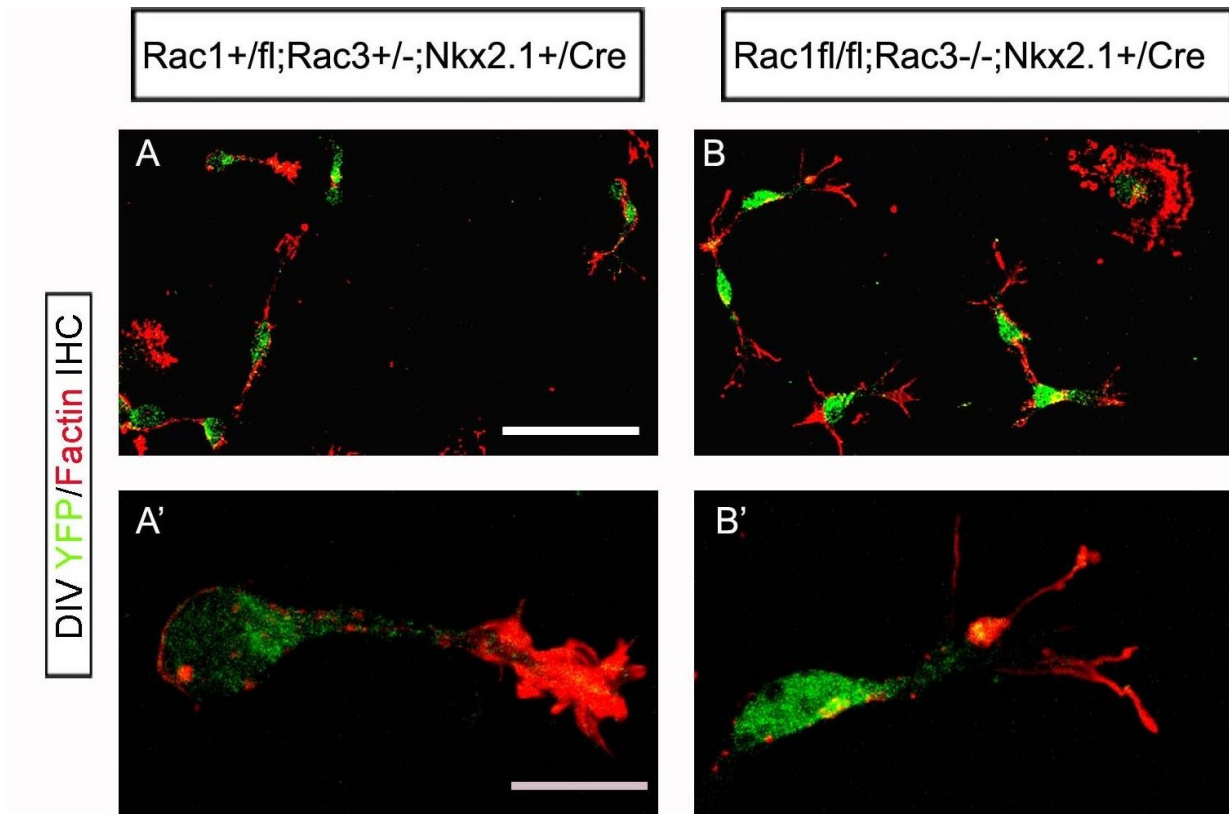
Εικόνα 12. Μορφολογία των Rac1/Rac3 ελλειμματικών ενδονευρώνων in vivo.

Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της YFP πρωτεΐνης σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλων αναπτυξιακής ηλικίας E15.5, μών της ομάδας ελέγχου (Rac1+/fl;Rac3+/-;Nkx2.1+/Cre και Rac1/Rac3 (διπλά) ελλειμματικών ζώων (Rac1fl/fl;Rac3-/-;Nkx2.1+/Cre), κατά σειρά παρουσίασης.

Για την περαιτέρω μελέτη τους, κύτταρα απομονωμένα από το MGE Rac1/Rac3 ελλειμματικών ζώων (Rac1fl/fl;Rac3-/-;Nkx2.1+/Cre) και από ζώα της ομάδας ελέγχου (Rac1+/fl;Rac3+/-;Nkx2.1+/Cre) καλλιεργήθηκαν και εξετάστηκαν με ανοσοϊστοχημεία μετά από τρεις μέρες στη καλλιέργεια.

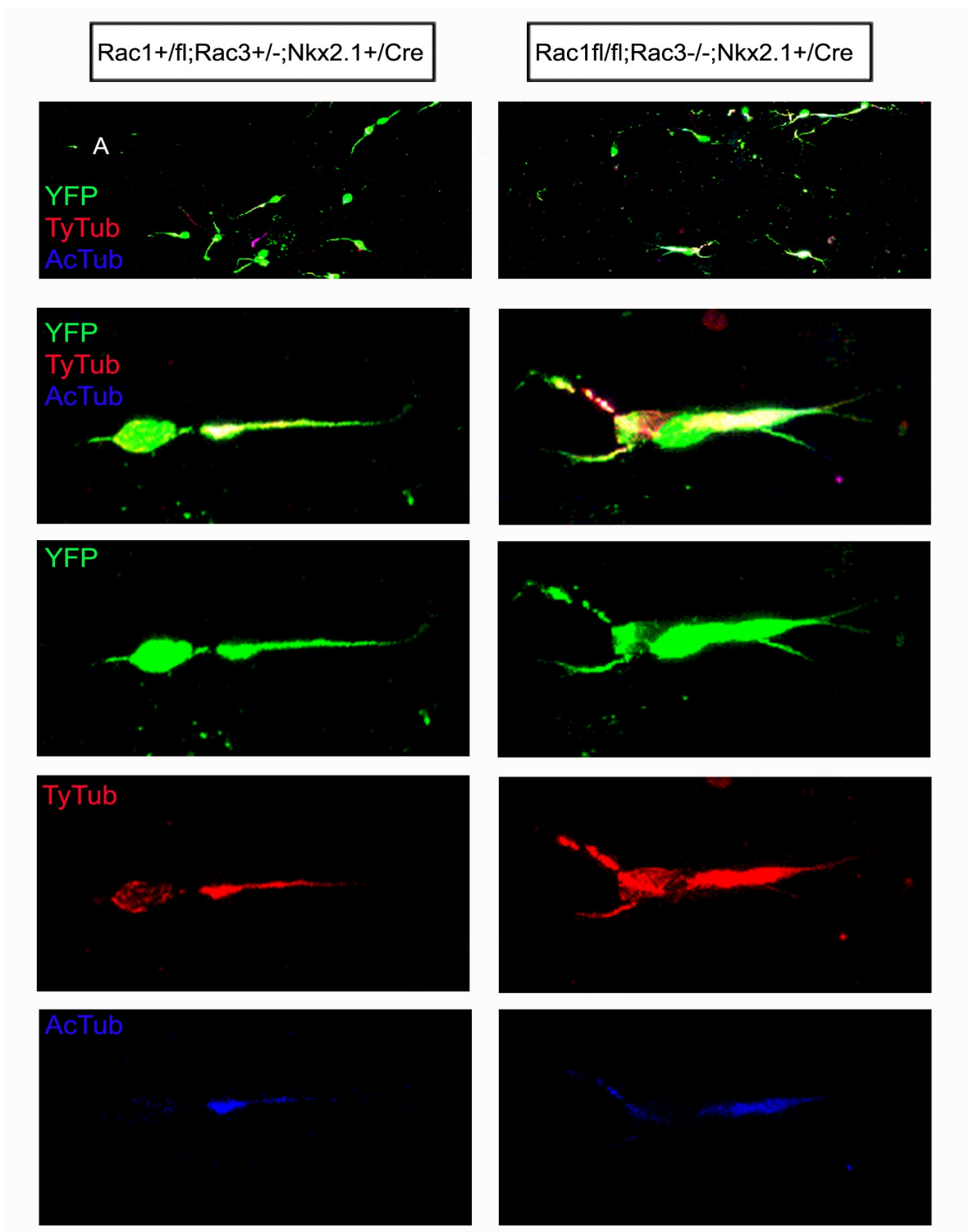
Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία με αντίσωμα για την YFP πρωτεΐνη, η οποία σημαίνει το σώμα του κυττάρου επιβεβαιώνοντας ότι πρόκειται για κύτταρα απομονωμένα από το MGE, σε

συνδυασμό με την Phalloidin 594, η οποία σημαίνει την ακτίνη που βρίσκεται πολυμερισμένη στα ινίδια. (εικ. 13) Στις τρεις ημέρες καλλιέργειας οι νευρώνες είναι σε φάση ανάπτυξης. Οι $Rac1^{+/fl}; Rac3^{+/-}; Nkx2.1^{+/Cre}$ ενδονευρώνες φαίνεται να εκτείνουν φυσιολογικά αυξητικούς κώνους και να επεκτείνουν τους νευρίτες τους. Ωστόσο οι $Rac1^{fl/fl}; Rac3^{-/-}; Nkx2.1^{+/Cre}$ ενδονευρώνες φαίνεται να εκτείνουν προεκβολές, όπου γίνεται πολυμερισμός της ακτίνης, οι οποίες όμως δεν καταλήγουν σε αυξητικό κώνο. (εικ. 13)



Εικόνα 13. Η μορφολογία των $Rac1/Rac3$ ελλειμματικών ενδονευρώνων *in vitro* επηρεάζεται. Ανοσοϊστοχημεία σε συνδυασμό για: (A,A',B,B') την YFP πρωτεΐνη (με πράσινο), και την F-actin (με κόκκινο) (με Phalloidin) σε $Rac1^{+/fl}; Rac3^{+/-}; Nkx2.1^{+/Cre}$ ενδονευρώνες (A,A',E,E') και $Rac1^{fl/fl}; Rac3^{+/-}; Nkx2.1^{+/Cre}$ (B,B',F,F') ενδονευρώνες.

Ακόμη, για να εξεταστεί αν στη διαφορετική μορφολογία των ελλειμματικών ενδονευρώνων συμβάλλει η οργάνωση των μικροσωληνίσκων πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία με αντίσωμα για την YFP πρωτεΐνη σε συνδυασμό με αντισώματα ειδικά για την Ac-Tubulin (acetylated) και Ty-Tubulin (tyrosinated).



Εικόνα 14. Η μορφολογία των *Rac1/Rac3* ελλειματικών ενδονευρώνων *in vitro* επηρεάζεται. Ανοσοϊστοχημεία σε συνδιασμό για: την *YFP* πρωτεΐνη (με πράσινο), την *Ac-Tubulin* (με μπλε) και την *Ty-Tubulin* (κοκκίνο) σε *Rac1^{+fl};Rac3^{+/-};Nkx2.1^{+Cre}* ενδονευρώνες και *Rac1^{fl/fl};Rac3^{-/-};Nkx2.1^{+Cre}* ενδονευρώνες.

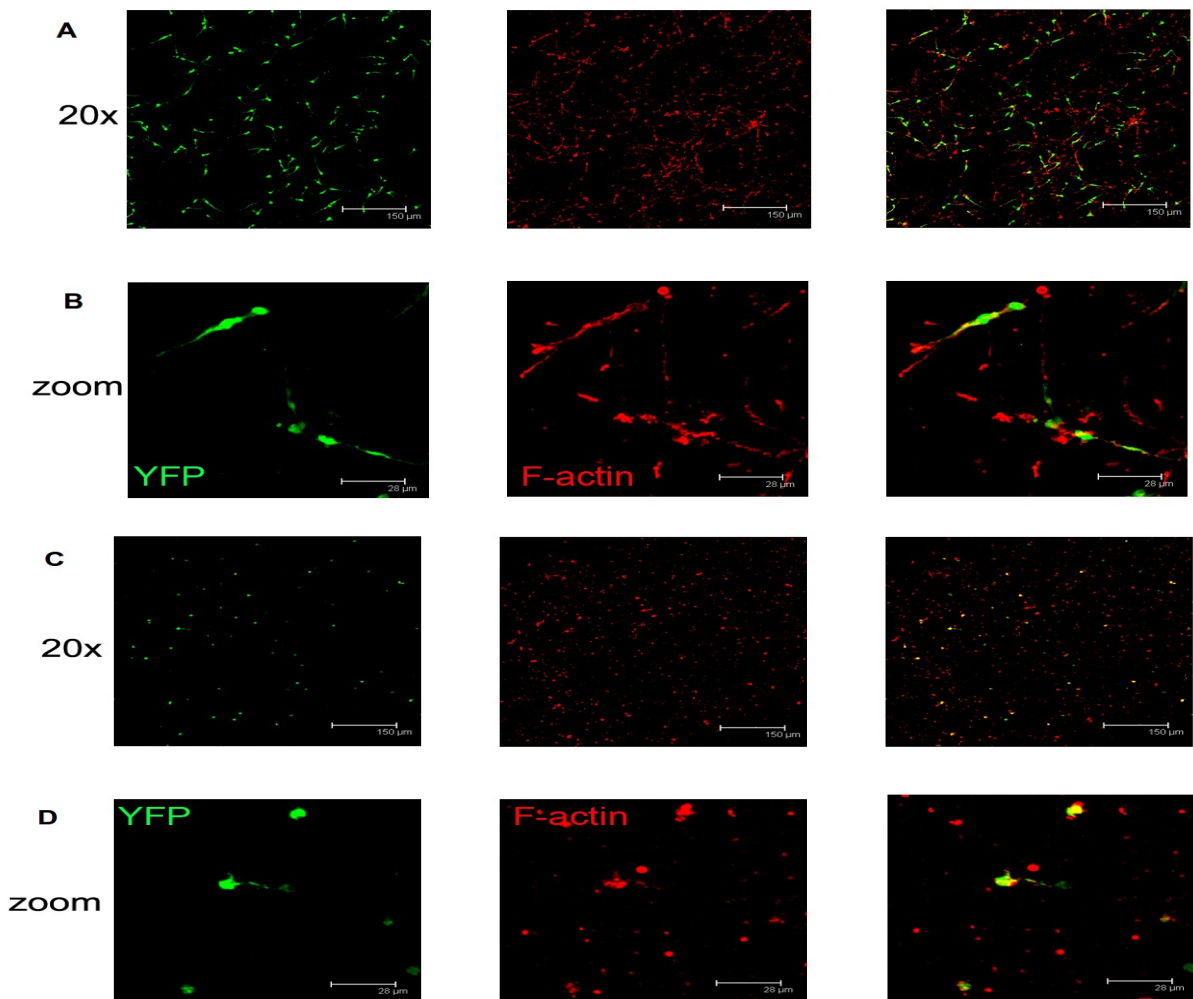
Οι τελευταίες είναι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της τουμπουλίνης. Η ακετυλίωση δε συμβάλλει αυτή καθαυτή στη σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων συμβαίνει όμως σε σταθερούς μικροσωληνίσκους. Ενώ η απομάκρυνση και η προσθήκη της τυροσίνης του καρβοξυτελικού άκρου της τουμπουλίνης είναι δυναμική διαδικασία. Σταθεροί μικροσωληνίσκοι προκύπτουν μετά από απομάκρυνση της τυροσίνης και επιπλέον τροποποίηση της τουμπουλίνης. Ο εκφυτικός κώνος (axon initial segment) είναι εμπλουτισμένος σε Ac-Tub (Janke & Kneussel, 2010). Οι Rac1fl/fl;Rac3^{-/-};Nkx2.1+/Cre ενδονευρώνες εμφανίζουν διαφορετική διασπορά της Ac-Tub συγκρινόμενοι με τους Rac1+/fl;Rac3+/-;Nkx2.1+/Cre ενδονευρώνες, παρατηρώντας την περιοχή στην αρχή του βασικού νευρίτη.(εικ.14)

4. Μελέτη των ενδονευρώνων in vitro σε 3D ικρίωματα πυριτίου.

Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκε επίσης η ανάπτυξη των ενδονευρώνων σε 3D ικρίωματα πυριτίου. Χρησιμοποιήθηκαν ενδονευρώνες προερχόμενοι από το MGE, σημασμένοι με YFP πρωτεΐνη της τεχνολογίας του Cre-loxP ανασυνδυασμού. Τα υποστρώματα αυτά όπως περιγράφηκε εισαγωγικά φέρουν κωνικές δομές και αποτελούνται από τρεις περιοχές διαφορετικής τραχύτητας. Έγινε καλλιέργεια των ενδονευρώνων στα 3D ικρίωματα, και παράλληλα σε επίπεδα υποστρώματα πυριτίου και σε γυάλινες καλυπτρίδες για τον έλεγχο των συνθηκών της πειραματικής διαδικασίας (control). Οι ενδονευρώνες αναπτύσσονται σε καλλιέργεια, στις γυάλινες καλυπτρίδες με υπόστρωμα κολλαγόνου για έξι με επτά ημέρες. Αρχικά εξετάστηκε αν μπορούν να αναπτυχθούν στα ικρίωματα πυριτίου χωρίς το υπόστρωμα κολλαγόνου, διαπιστώθηκε όμως ότι δεν αναπτύσσονται.

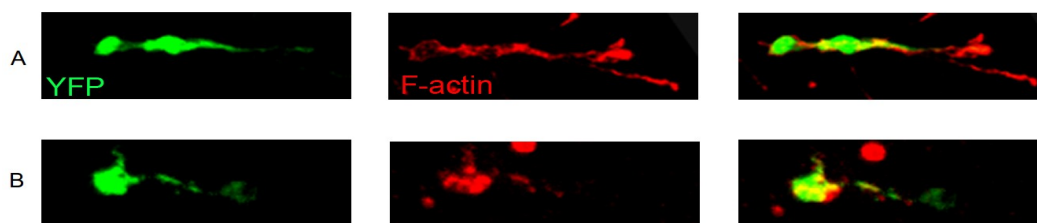
Στη συνέχεια, οι ενδονευρώνες καλλιεργήθηκαν στα ικρίωματα πυριτίου, με υπόστρωμα κολλαγόνου, για μία και δύο ημέρες με διαφορετική συγκέντρωση κυττάρων (~10³ και 10⁴ κύτταρα / ml). Η προσκόλληση των κυττάρων τόσο στις καλυπτρίδες όσο και στα 3D ικρίωματα πυριτίου μετρήθηκε περίπου στο 80%. Αυτό που παρατηρήθηκε στα 3D ικρίωματα πυριτίου, είναι ότι δεν υπήρχαν καθόλου κύτταρα μεταξύ των περιοχών με τη διαφορετική τραχύτητα. Στα σημεία αυτά η χημική σύσταση της επιφάνειας είναι ίδια όπως σε όλο το ικρίωμα, δεν υπάρχουν όμως οι κωνικές τρισδιάστατες δομές. Η συγκέντρωση των κυττάρων, τουλάχιστον οι συγκεκριμένες που δοκιμάστηκαν, δεν βρέθηκε να επηρεάζουν την ανάπτυξη των ενδονευρώνων. Οι άξονες των ενδονευρώνων που αναπτύσσονταν στα 3D ικρίωματα ήταν μικρότεροι από αυτούς που αναπτύσσονταν στις καλυπτρίδες. (εικ 16)

Ακολούθησε λοιπόν, σειρά πειραμάτων με καλλιέργειες ενδονευρώνων στα 3D ικρίωματα πυριτίου για 2, 3 και 4 ημέρες με σκοπό να διαπιστωθεί αν εκτείνουν τους νευρίτες τους περισσότερο, αργότερα από ότι τα κύτταρα που μεγαλώνουν στις συνθήκες ελέγχου. Σε κάθε περίπτωση για τη μελέτη της ανάπτυξης των ενδονευρώνων πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία με αντίσωμα για την YFP πρωτεΐνη και την Phalloidin όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. (εικ.15)



Εικόνα 15. Ανάπτυξη των ενδονευρώνων σε 3D ικρίώματα πυριτίου μετά από τρεις ημέρες καλλιέργειας. Ανοσοιστοχημεία με αντίσωμα για την YFP πρωτεΐνη (πράσινο) και Phalloidin (κόκκινο). (A,B) ενδονευρώνες σε καλυπτρίδες με υπόστρωμα κολλαγόνου (C,D) ενδονευρώνες σε 3D ικρίώματα πυριτίου με υπόστρωμα κολλαγόνου.

Και σε μεγαλύτερης διάρκειας καλλιέργεια οι ενδονευρώνες που αναπτύσσουν έστω μικρότερους νευρίτες στα 3D ικρίώματα, μετά την τρίτη ημέρα φαίνεται να μην μπορούν να τους εκτείνουν περαιτέρω.



Εικόνα 16. Ανάπτυξη ενδονευρώνα σε 3D ικρίωμα πυριτίου μετά από τρεις ημέρες καλλιέργειας. Ανοσοιστοχημεία με αντίσωμα για την YFP πρωτεΐνη (πράσινο) και Phalloidin (κόκκινο). (A) ενδονευρώνας σε καλυπτρίδα με υπόστρωμα κολλαγόνου (B) ενδονευρώνας σε 3D ικρίώματα πυριτίου με υπόστρωμα κολλαγόνου.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο φλοιός των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, αποτελεί την έδρα όλων των ανώτερων λειτουργιών του εγκεφάλου των θηλαστικών. Η οργάνωση και η ποικιλομορφία των κυττάρων του φλοιού, ευθύνονται για τα μοναδικά λειτουργικά χαρακτηριστικά της δομής αυτής.

Αποτελείται από δύο βασικούς πληθυσμούς νευρικών κυττάρων τους πυραμιδικούς νευρώνες και τους μη-πυραμιδικούς ενδονευρώνες. Οι πυραμιδικοί νευρώνες αποτελούν το 80% του συνολικού πληθυσμού νευρώνων, ενώ οι ενδονευρώνες αποτελούν μόλις το 20% του συνόλου των νευρικών κυττάρων. Οι ενδονευρώνες του φλοιού δημιουργούνται στο βασικό τελεγκέφαλο και κατά την εμβρυογένεση μεταναστεύουν οριζόντια προς τον αναπτυσσόμενο φλοιού. Χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια και κατηγοριοποιούνται σε πολλούς υποπληθυσμούς, οι οποίοι σχηματίζουν τοπικές ανασταλτικές συνάψεις, σημαντικές για τη σωστή λειτουργία των νευρικών δικτύων. Η σημασία της ομαλής ανάπτυξης και διαφοροποίησης των ενδονευρώνων αντικατοπτρίζεται σε παθολογικές καταστάσεις που προκαλούνται από την απουσία ή τη δυσλειτουργία των κυττάρων αυτών, όπως η επιληψία, ο αυτισμός, η σχιζοφρένεια και η διανοητική καθυστέρηση. Η κατανόηση λοιπόν των μηχανισμών που ρυθμίζουν την ομαλή μετανάστευση και ανάπτυξη των ενδονευρώνων του φλοιού, είναι ιδιαίτερα σημαντική.

Οι πρωτεΐνες Rac1 και Rac3 ανήκουν στην οικογένεια των Rho GTPασών. Αν και οι αλληλουχίες τους είναι σε μεγάλο βαθμό ταυτόσημες, έχουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης, με τη Rac1 να εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και τη Rac3 να εκφράζεται στο νευρικό σύστημα. Οι Rho GTPάσες ρυθμίζουν πλήθος κυτταρικών διεργασιών, όπως τη μορφογένεση, τη μετανάστευση, τη νευρωνική ανάπτυξη, τη κυτταρική διαίρεση και τη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, τη δυναμική του κυτταροσκελετού, της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων.

Μελέτες, έχουν δείξει το ρόλο της Rac1 στην επέκταση νευριτών και καθοδήγηση νευραξόνων *in vitro* ωστόσο, ο ρόλος της Rac1 στην ανάπτυξη των νευρικών κυττάρων *in vivo*, είναι ελάχιστα μελετημένος (Heasman & Ridley, 2008). Απώλεια της Rac1 από όλα τα πρόδρομα κύτταρα του τελεγκέφαλου κατά την ανάπτυξη, επηρεάζει την ανάπτυξη βασικών αξονικών πληθυσμών του εγκεφάλου, όπως το μεσολόβιο και ο πρόσθιος σύνδεσμος των ημισφαιρίων (Chen et al, 2007). Παρατηρείται επίσης μικροκεφαλία, λόγω μείωσης του αριθμού των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων στις κοιλιακές ζώνες του φλοιού (Chen et al, 2009). Ακόμη απώλεια της Rac1 από πρόδρομα κύτταρα της έσω γαγγλιονική προεξοχής έχει σαν αποτέλεσμα να εντοπίζεται στον ώριμο εγκέφαλο μόνο το 50% των GABAεργικών νευρώνων (Vidaki et al, 2011).

Όσο για την Rac3, ολοκληρωτική απώλεια της δεν επιφέρει μεγάλες ανατομικές αλλαγές στον εγκέφαλο ή στην οργάνωση των νευρώνων. Από μελέτες συμπεριφοράς, παρατηρείται υπερδραστηριότητα στην απόκριση σε νέα ερεθίσματα και αλλαγές στη κινητική μάθηση υποδεικνύοντας έναν πιο επιμέρους ρόλο της Rac3, στη λειτουργία των νευρώνων.

Είναι επίσης πιθανό η Rac1 έστω και εν μέρει να λειτουργεί αντισταθμιστικά στην ολοκληρωτική απώλεια της Rac3 κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος (de Curtis, 2008).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε *in vivo* και *in vitro* η επίδραση της απώλειας των Rac1 και Rac3 GTPασών στην ανάπτυξη των GABAεργικών ενδονευρώνων της περιοχής του MGE. Η Rac1 πρωτεΐνη απενεργοποιήθηκε στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα που εκφράζουν Nkx2.1 και δημιουργούνται στην περιοχή αυτή, και η Rac3, στο σύνολο των κυττάρων.

Από τη συγκριτική μελέτη εμβρύων των τεσσάρων γονοτύπων, των Rac1 ελλειμματικών ζώων (Rac1^{fl/fl};Rac3^{+/-};Nkx2.1^{+/-}/Cre), των Rac3 ελλειμματικών ζώων (Rac1^{+/-};Rac3^{-/-};Nkx2.1^{+/-}/Cre), και των διπλά, Rac1/Rac3, ελλειμματικών ζώων (Rac1^{fl/fl};Rac3^{-/-};Nkx2.1^{+/-}/Cre) και ζώων της ομάδας ελέγχου (Rac1^{+/-};Rac3^{+/-};Nkx2.1^{+/-}/Cre)

στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια, παρατηρείται ότι οι GABAεργικοί ενδονευρώνες που έχουν απενεργοποιημένες τις Rac1 και Rac3 πρωτεΐνες, καθυστερούν να μεταναστεύσουν από το κοιλιακό τελεγκέφαλο όπου γεννιούνται, προς τον αναπτυσσόμενο φλοιό, ενώ και η μετανάστευση των κυττάρων αυτών είναι μειωμένη.

Εκτός της YFP πρωτεΐνης, η οποία σημαίνει τα κύτταρα που εκφράζουν τη cre ρεκομπινάση υπό τον έλεγχο του υποκινητή του μεταγραφικού παράγοντα Nkx2.1 και ο οποίος όπως έχει αναφερθεί χαρακτηρίζει τα κύτταρα, νευρώνες και ολιγονδροκύτταρα, που προέρχονται από το MGE (Fogarty et al, 2007), για να χαρακτηριστούν περαιτέρω τα ελλειμματικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες το Lhx6 και το GABA. Ο μεταγραφικός παράγοντας Lhx6 είναι χαρακτηριστικός για την MGE περιοχή και εκφράζεται σε μεταμιτωτικούς ενδονευρώνες ενώ ο νευροδιαβιβαστής GABA χαρακτηρίζει συνολικά τους ενδονευρώνες, αποδεικνύοντας πως τα κύτταρα που παρουσιάζουν το έλλειμμα αυτό είναι GABAεργικοί ενδονευρώνες.

Από προηγούμενη μελέτη στο εργαστήριο έχειδειχθεί ότι στα Rac1-ελλειμματικά ζώα οι ενδονευρώνες που προέρχονται από το MGE, που αποτελούν και την πλειοψηφία των ενδονευρώνων του φλοιού, παρουσιάζουν μειωμένη μετανάστευση προς το φλοιό, και η οποία αρχίζει με σημαντική καθυστέρηση σε σχέση με τους φυσιολογικούς ενδονευρώνες. Αυτό οφείλεται, στην παρατεταμένη παραμονή τους στον κυτταρικό κύκλο. Σαν αποτέλεσμα, στον ώριμο εγκέφαλο, τελικά εντοπίζονται μόνο οι μισοί ενδονευρώνες (Vidaki et al, 2011).

Για τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια E12.5-E14.5, τα Rac1/Rac3 ελλειμματικά ζώα παρουσιάζονται να έχουν τον ίδιο φαινότυπο με τα Rac1 που περιγράφηκε παραπάνω. Την εμβρυική μέρα E15.5 όμως, αυτό αλλάζει και η απώλεια και των δύο Rac πρωτεϊνών Rac1 και Rac3 φαίνεται να έχει μεγαλύτερη επίπτωση. Οι ενδονευρώνες, μένουν συγκεντρωμένοι στον κοιλιακό τελεγκέφαλο, ενώ μόνο μικρός αριθμός τους μεταναστεύει προς το φλοιό. Αντίστοιχη εικόνα για τα διπλά ελλειμματικά ζώα παρατηρείται και την E16.5, παρότι στο αναπτυξιακό αυτό στάδιο δεν κατέστη δυνατό να εξετασθούν και οι τέσσερις γονότυποι. Και σε αυτή την περίπτωση πολύ μικρός αριθμός ενδονευρώνων, προερχόμενων από το MGE, μετακινείται από τον κοιλιακό τελεγκέφαλο προς τον αναπτυσσόμενο φλοιό ενώ ένα μεγάλο ποσοστό κυττάρων, μάλλον το μεγαλύτερο, παραμένουν συγκεντρωμένα στο βασικό τελεγκέφαλο, όπου γεννιούνται.

Τα Rac3 ελλειμματικά ζώα κατά τις διάφορες εμβρυϊκές ηλικίες που μελετήθηκαν παρουσιάζουν φαινότυπο όμοιο με αυτόν της ομάδας ελέγχου υποδεικνύοντας ότι ίσως η απώλεια της Rac3 αντισταθμίζεται από τη δράση της Rac1 GTPάσης χωρίς η τελευταία να υπερεκφράζεται (Corbetta et al, 2005). Συγκρίνοντας τους φαινότυπους των Rac1 και Rac3 ελλειμματικών ζώων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, δε φαίνεται να συμβαίνει το αντίστροφο σε επίπεδα που να αλλάζει δραματικά ο φαινότυπος των Rac1 ελλειμματικών ζώων.

Στα Rac1/Rac3 ελλειμματικά ζώα την εμβρυϊκή μέρα E15.5, με φακό μεγαλύτερης ευκρίνειας παρατηρήθηκαν αλλαγές στη μορφολογία των νευρώνων. Οι νευρίτες στα κύτταρα αυτά είχαν μικρότερο μήκος από αυτό των νευρώνων της ομάδας ελέγχου. Το μήκος τους βρέθηκε μικρότερο κατά 1,5 φορές.

Οι Rac πρωτεΐνες εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με τη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων (Rac-IQGAP-CLIP170) και με τα δυναμικά της ακτίνης (μέσω WAVE και PAK) όπως αναφέρθηκε εισαγωγικά. Με δεδομένα λοιπόν ότι συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού και τη μη φυσιολογική μορφολογία των Rac1fl/fl;Rac3-/-;Nkx2.1+/Cre που παρατηρήθηκε in vivo έγινε περαιτέρω ανάλυσή της, με μάρτυρες για στοιχεία του κυτταροσκελετού τους.

Οι Rac πρωτεΐνες ρυθμίζουν τον πολυμερισμό της ακτίνης κατά την επέκταση των λαμελλοποδίων. Είναι δυναμικές δομές στην καθοδηγητική απόφυση, που βοηθούν στην καθοδήγηση κατά τη μετανάστευση (Govek et al, 2010). Οι Rac1fl/fl;Rac3-/-;Nkx2.1+/Cre

ενδονευρώνες φαίνεται να εκτείνουν προεκβολές, όπου γίνεται πολυμερισμός της ακτίνης, οι οποίες όμως δεν καταλήγουν σε αυξητικό κώνο.

Επίσης στους νευρώνες αυτούς βρέθηκε να υπάρχει διαφορά στη διασπορά της Ac-tudulin. Η μετα-μεταφραστική αυτή τροποποίηση της τουμπουλίνης, δε συμβάλλει αυτή καθαυτή στη σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων συμβαίνει όμως, σε σταθερούς μικροσωληνίσκους (Janke & Kneussel, 2010) υποδηλώνοντας πως ο μειωμένος της εντοπισμός, κοντά στο σώμα, στην αρχή του μεγαλύτερου νευρίτη, πιθανά υποδεικνύει ότι η δομή αυτή δεν είναι αρκετά σταθερή. Οι μορφολογικές αυτές διαφορές των Rac1/Rac3 ελλειμματικών νευρώνων είναι εντονότερες από αυτές που έχουν παρατηρηθεί στους Rac1 ελλειμματικούς ενδονευρώνες (Vidaki et al,2011). Πιθανά, πέρα από την παρατεταμένη παραμονή των Rac1 ελλειμματικών ενδονευρώνων στον κυτταρικό κύκλο, που έχει σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη και καθυστερημένη χρονικά μετανάστευσή τους, ο μη φυσιολογικός σχηματισμός της καθοδηγητικής απόφυσης έχει επιπλέον αρνητική επίπτωση στη μετανάστευση των ενδονευρώνων.

Ως προς την ανάπτυξη των ενδονευρώνων στα 3D ικρίωματα πυριτίου από αυτά τα πρώτα πειράματα, φαίνεται να μην είναι αντίστοιχη της ανάπτυξής τους στις συνθήκες ελέγχου. Οι νευρίτες που εκτείνουν είναι μικρότεροι και μετά την τρίτη μέρα σταματούν να επεκτείνονται περαιτέρω. Το ότι δεν εντοπίζονται ενδονευρώνες στις περιοχές των ικρίωμάτων όπου δεν υπάρχουν οι 3D κωνικές δομές ίσως υποδεικνύει ότι πιθανά η χημική σύσταση του περιβάλλοντος δεν τους βοηθάει, προσφέρει όμως κάτι παραπάνω η τοπογραφία του ικρίωματος.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Paul G. Anastasiades and Simon J. B. Butt (2011). Decoding the transcriptional basis for GABAergic interneuron diversity in the mouse neocortex. European Journal of Neuroscience 34, 1542–1552*
- Ramsis Ayala, Tianzhi Shu, Li-Huei Tsai. (2007). Trekking across the Brain: The Journey of Neuronal Migration. Cell 128, 29 – 43*
- Hossein Baharvand, Seyed. Hashemi, Saeid Kazemi Ashtiani and Ali Farrokhi (2006). Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro . Int. J. Dev. Biol., 50, 645-652.*
- Renata Batista-Brito and Gord Fishell. (2009). The Developmental Integration of Cortical Interneurons into a Functional Network. Current Topics in Developmental Biology, 87, 81 – 118*
- Chen, L., Liao, G., Waclaw, R. R., Burns, K. A., Linguist, D., Campbell, K., Zheng, Y., and Kuan, C. Y. (2007). Rac1 controls the formation of midline commissures and the competency of tangential migration in ventral telencephalic neurons. J Neurosci 27, 3884-3893.*
- Chen, L., Melendez, J., Campbell, K., Kuan, C. Y., and Zheng, Y. (2009). Rac1 deficiency in the forebrain results in neural progenitor reduction and microcephaly. Dev Biol 325, 162-170.*
- Corbetta S., Gualdoni S., Albertinazzi C., Paris S., Croci L., Consalez G., de Curtis I.(2005). Generation and characterization of Rac3 Knockout mice. Molecular and cellular Biology Vol 28; No13, p.5763-5776.*
- Joshua G. Corbin, Simon J.B. Butt (2011). Developmental Mechanisms for the Generation of Telencephalic Interneurons. Developmental Neurobiology, DOI 10.1002/dneu.20890, 710 – 732.*
- Ivan de Curtis (2008). Functions of Rac GTPases during Neuronal Development . Dev Neurosci;30:47–58*
- Clare Faux, Sonja Rakic, William Andrews, Joanne M. Britto (2012). Neurons on the Move: Migration and Lamination of Cortical Interneurons Neurosignals 20:164–185*
- Matthew Fogarty, Matthew Grist, Diego Gelman, Oscar Mari 'n, Vassilis Pachnis, and Nicoletta Kessarar (2007). Spatial Genetic Patterning of the Embryonic Neuroepithelium Generates GABAergic Interneuron Diversity in the Adult Cortex. The Journal of Neuroscience 27(41), 10935–10946*
- Eve-Ellen Govek, Mary E. Hatten, Linda Van Aelst (2010). The Role of Rho GTPase Proteins in CNS Neuronal Migration . Develop Neurobiol 71: 528–553*
- Luis R Herna 'ndez-Miranda, John G Parnavelas and Francesca Chiara (2010). Molecules and mechanisms involved in the generation and migration of cortical interneurons. ASN Neuro 2, 75 86*

Sarah J. Heasman and Anne J. Ridley (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. Nature Reviews Molecular Cell Biology, vol9 690-701

J. Haycock, 3D cell culture Methods and protocols. Methods in Molecular Biology vol695
Aron B. Jaffe and Alan Hall (2007). Rho GTPases: Biochemistry and Biology Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 21:247–69

Gord Fishell and Bernardo Rudy (2011). Mechanisms of Inhibition within the Telencephalon: “Where the Wild Things Are”. Annu. Rev. Neurosci. 34:535–567.

N. Koufaki, A. Ranella, K. Aifantis, M. Barberoglou, S. Psycharakis, C. Fotalis, E. Stratakis (2011). Controlling cell adhesion via replication micro/nano textured surfaces on polymers. Biofabrication 3, 045004

Sotirios Koutsopoulos, Shuguang Zhang. (2012) Long-term three-dimensional neural tissue cultures in functionalized self assembling peptide hydrogels, Matrigel and Collagen I DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.09.010>

Dino P. Leone, Karpagam Srinivasan, Cord Brakebusch, Susan K. McConnell (2010). The Rho GTPase Rac1 is Required for Proliferation and Survival of Progenitors in the Developing Forebrain. Develop Neurobiol 70: 659–678

Yinzhai Lai., Amish Asthana., Ke Cheng, William S. Kisaalita (2011). Neural Cell 3D Microtissue Formation Is Marked by Cytokines' Up-Regulation. PLoS ONE, 6, 1 – 8.

Oscar Mari'n , Manuel Valiente, Xuecai Ge , and Li-Huei Tsai (2010). Guiding Neuronal Cell Migrations. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2, 1 – 20.

Christine Metin, Jean-Pierre Baudoin, Sonja Rakic and John G. Parnavelas (2006). Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. European Journal of Neuroscience, 23, 894–900.

D. Neukirchen, F. Bradke (2011). Neuronal polarization and the cytoskeleton . Seminars in Cell & Developmental Biology 22:825–833

Jun Noritake, Takashi Watanabe, Kazumasa Sato, Shujie Wang and Kozo Kaibuchi (2005). IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration Journal of Cell Science 118 (10) 2085-2092

Myrto Raftopoulou and Alan Hall (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way Developmental Biology 265, 23 – 32

Anne J. Ridley Cyclin' Round the Cell with Rac . Developmental Cell 160

Ross A, Jiang Z, Bastmeyer M, Lahann J. (2012) Physical aspects of cell culture substrates: topography, roughness, elasticity. Small 8(3);365-55

Anna N. Rubin, Fabienne Alfonsi, Michael P. Humphreys, Christina K. P. Choi, Susana F. Rocha,

and Nicoletta Kessaris (2010). *The Germinal Zones of the Basal Ganglia But Not the Septum Generate GABAergic Interneurons for the Cortex*. *The Journal of Neuroscience*, 30, 12050–12062.

Bernardo Rudy, Gordon Fishell, SooHyun Lee, Jens Hjerling-Leffler (2010). *Three Groups of Interneurons Account for Nearly 100% of Neocortical GABAergic Neurons*. *Developmental Neurobiology*, DOI 10.1002/dneu.20853, 45–61.

Manuel Valiente and Oscar Marin (2010). *Neuronal migration mechanisms in development and disease*. *Current Opinion in Neurobiology*, 20, 68–78.

Vidaki M., Tivodar S., Doulgeraki K., Tybulewicz V., Kessaris N., Pachnis V., Karagogeos D. (2012) *Rac1 Dependent Cell cycle exit of MGE precursors and GABAergic interneuron migration to the cortex*. *Cerebral Cortex* 10.1093

Tania Vitalis, Jean Rossier (2010). *New Insights Into Cortical Interneurons Development and Classification: Contribution of Developmental Studies*. *Developmental Neurobiology*, DOI 10.1002/dneu.20810, 34–44.

Takashi Watanabe, Jun Noritake and Kozo Kaibuchi (2005). *Regulation of microtubules in cell migration*. *TRENDS in Cell Biology* Vol.15 No.2

Harald Witte and Frank Bradke (2008). *The role of the cytoskeleton during neuronal polarization* *Current Opinion in Neurobiology*, 18:479–487

Carl P. Wonders and Stewart A. Anderson (2006). *The origin and specification of cortical interneurons*. *NATURE REVIEWS | NEUROSCIENCE* 7, 687–696.

Τελειώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω...

*την κα. Καραγωγέως που μου έδωσε την ευκαιρία
να εκπονήσω τη μεταπτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριό της,
τη Simona Tivodar, για την καθοδήγηση, τη βοήθειά της και την αμέριστη υπομονή της,
την Κατερίνα Καλεμάκη για την καλή συνεργασία μας και την παρέα της,
(είναι πιο ευχάριστα στο εργαστήριο, αργά τα βράδια με... Περίδη?)
τη Χαρά Σιμιρτζή για την κατασκευή των 3D ικριωμάτων,
τη Λήδα Ζούπη για τις συμβουλές και τα γέλια και τα πράσινα γυαλιά...
τη Μαρία Σαββάκη για τη βοήθεια και την υπομονή της μαζί μου,
τον κο. Κώστα Θεοδωράκη και τα υπόλοιπα παιδιά, το Γιώργο Μπαστάκη,
τη Μαριλένα Καστρίτη, το Θάνο και τη Julia
για το ευχάριστο κλίμα του εργαστηρίου!*

Ευχαριστώ πολύ!!!