

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΙΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-
ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΓΤΡΑΣΗΣ RAC1 ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ
ΓΑΒΑΕΡΓΙΚΩΝ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΟΥ ΦΛΟΙΟΥ**

Φοιτήτρια: Δουλγεράκη Κατερίνα

Υπεύθυνη Καθηγήτρια: Καραγωγέως Δομνα

Επιβλέπων καθηγητής: Δελιδάκης Χρήστος

Φεβρουάριος 2009

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

SUMMARY	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
A. Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΤΕΛΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΔΟΜΩΝ ΤΟΥ ΣΤΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ.....	5
A.1. Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΝΕΟΦΛΟΙΟΥ ΤΟΥ ΤΕΛΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΣΤΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ	6
A.2. ΟΙ GABAΕΡΓΙΚΟΙ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΕΣ ΤΟΥ ΦΛΟΙΟΥ	8
A.2.1. Χωροχρονική προέλευση των GABAεργικών ενδονευρώνων και οριζόντια μεταναστευτικά μονοπάτια προς τον νεοφλοιό.....	9
A.2.2. Καθορισμός της κυτταρικής τύχης των GABAεργικών ενδονευρώνων.....	12
A.2.3. Μηχανισμοί καθοδήγησης των ενδονευρώνων κατά την οριζόντια μετανάστευση από τον βασικό τελεγκέφαλο στο νεοφλοιό.....	14
B. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ RHO ΓΤΡΑΣΩΝ.....	15
B.1. Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ RAC1 ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	17
Γ. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ	19
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	32
A. ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ RAC1 ΑΠΟ LHX6_CRE ΠΟΝΤΙΚΙΑ.	32
A.1. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΟΥ ΦΛΟΙΟΥ ΣΤΑ RAC1 ^{FL/FL} ; ROSA26YFPSTOP; LHX6_CRE ΠΟΝΤΙΚΙΑ.	34
A.2. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΑΡΙΘΜΟΙ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΩΝ ΣΤΟ ΦΛΟΙΟ ΤΩΝ RAC1 ΕΛΛΕΙΜΑΤΙΚΩΝ ΖΩΩΝ.	35
B. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΠΛΑ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΙΚΩΝ RAC1/RAC3 ΖΩΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΟΥ ΦΛΟΙΟΥ.....	39
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	44
A. ΓΕΝΙΚΑ	44
B. Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ RAC1 ΕΙΝΑΙ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΗ ΚΑΤΑ ΤΗ ΦΑΣΗ ΠΟΛΛΑΛΠΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΩΝ	44
Γ. Η ΑΠΩΛΕΙΑ ΤΩΝ RAC1 ΚΑΙ RAC3 ΟΔΗΓΕΙ ΣΕ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΗ ΜΕΙΡΩΣΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΩΝ ΣΤΟ ΦΛΟΙΟ.	48
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51

Summary:

The forebrain comprises an intricate set of structures that are required for some of the most complex and evolved functions of the mammalian brain. As a reflection of its complexity, specification of different neuronal cell types is remarkably precise and cell migration in the forebrain is extremely elaborate.

During the formation of the cerebral cortex, cortical non pyramidal cells, the GABAergic interneurons, are generated in the medial ganglionic eminence (MGE) of the ventral telencephalon and migrate tangentially to the dorsal telencephalon. Although several genes that play a role in the specification and the migration of these cells have been identified, the underlying molecular and cellular mechanism is not fully understood.

The present study forms part of a project that intends to examine the role of Rac1 on the development of cortical inhibitory interneurons. Rac1 belongs to the family of Rho GTPases, a group of proteins that are intracellular signal transducers known to regulate multiple signalling pathways. Rho GTPases therefore mediate a variety of cellular functions, including cellular migration and specification. For the aim of our study, *Rac1* was specifically deleted, using the Cre-LoxP method, from GABAergic interneurons, at the progenitor stage as well as post-mitotically, by using different Cre lines. When *Rac1* is deleted in progenitors we observe delayed migration of interneurons as well as reduced numbers of these cells in the adult cortex. On the contrary, no similar phenotype is observed when *Rac1* is deleted in post-mitotic interneurons. These findings suggest that Rac1 plays a role in the development of these cells during the progenitor stage, whereas it seems to be dispensable for cellular motility per se during neuronal migration.

An additional aim is to explore whether Rac3 compensates for Rac1 function. In order to address this issue we specifically deleted *Rac1* from interneuron progenitors in Rac3 knockout mice, generating mice with interneurons lacking both proteins. Even greater reduction of the numbers of GABAergic interneurons is observed in these mice, suggesting that some functional compensation between the two molecules exists.

Περίληψη:

Ο προσθεγκέφαλος των θηλαστικών απαρτίζεται από ετερογενείς δομές, οι οποίες είναι απαραίτητες για την εκτέλεση ορισμένων από τις πιο πολύπλοκες και ανώτερες εξελικτικά λειτουργίες του εγκεφάλου. Ο αξιοθαύμαστος βαθμός οργάνωσής του απαιτεί τον ακριβή συντονισμό, τόσο της διαφοροποίησης των επιμέρους κυτταρικών τύπων, όσο και των ποικίλων μεταναστευτικών διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα σε κάθε επιμέρους δομή του.

Κατά την ανάπτυξη του τελεγκεφάλου, οι μη πυραμιδικοί ενδονευρώνες του φλοιού, οι οποίοι εκφράζουν το νευροδιαβιβαστή γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), γεννιούνται στην μεσσαία πρόδρομη δομή του ραβδωτού (MGE) στον βασικό τελεγκεφαλο και ακολουθούν οριζόντια μεταναστευτική πορεία προς τον φλοιό. Αν και έχει χαρακτηριστεί μια πληθώρα γονιδίων τα οποία παίζουν ρόλο στην διαφοροποίηση καθώς και στο μεταναστευτικό σύστημα των εν λόγω κυττάρων, ο μοριακός μηχανισμός της ανάπτυξής τους δεν έχει διελευκανθεί πλήρως.

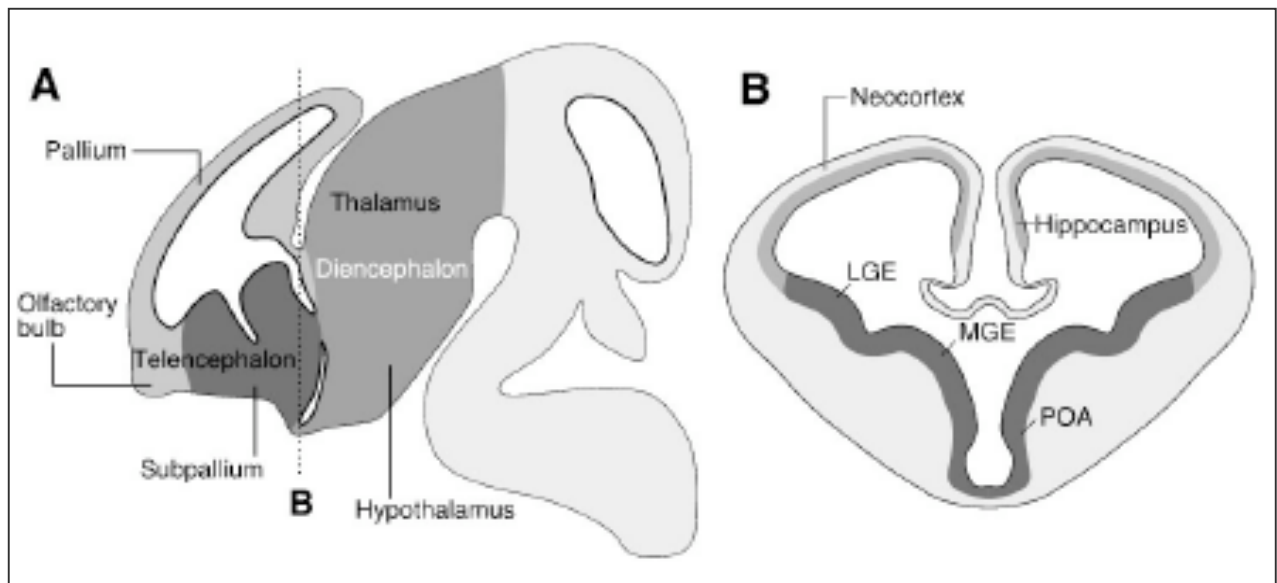
Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος μιας μελέτης, η οποία σκοπό έχει να εξετάσει τον ρόλο της GTPάσης Rac1 κατά την ανάπτυξη των ενδονευρώνων του φλοιού. Η Rac1 ανήκει στις Rho GTPάσες, ομάδα πρωτεϊνών που αποτελούν κομβικό σημείο πλήθους σηματοδοτικών μονοπατιών και εμπλέκονται σε πολλές κυτταρικές διεργασίες. Για τον σκοπό της εργασίας μας, μελετήσαμε ποντίκια στα οποία έχει γίνει στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου *Rac1* στους GABAεργικούς ενδονευρώνες, τόσο σε μιτωτικό όσο και σε μετα-μιτωτικό στάδιο. Αναστέλλοντας την έκφραση της Rac1 σε μιτωτικά κύτταρα που αποτελούν τα πρόδρομα των ενδονευρώνων, παρατηρούμε καθυστερημένη έναρξη της μετανάστευσης καθώς και μείωση του αριθμού των ενδονευρώνων στον ώριμο φλοιό. Αντίθετα, αναστέλλοντας την έκφραση της Rac1 σε μετα-μιτωτικούς ενδονευρώνες δεν παρατηρήσαμε κάποια επίδραση στην ανάπτυξη και μετανάστευση αυτών των κυττάρων. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η Rac1 εμπλέκεται στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων, και μάλιστα είναι απαραίτητη κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών (mitotic stage). Αντίθετα, φαίνεται να μην είναι απαραίτητη κατά την διαδικασία της μετανάστευσης των μετα-μιτωτικών ενδονευρώνων.

Επιπλέον, θελήσαμε να ερευνήσουμε κατά πόσο η πρωτεΐνη Rac3 αναπληρώνει την απώλεια δράσης της Rac1. Για τον σκοπό αυτό έγινε στοχευμένη απενεργοποίηση της Rac1 στους ενδονευρώνες του φλοιού σε ποντίκια που ήταν ήδη ελλειμματικά για Rac3, δημιουργώντας διπλά ελλειμματικά ζώα. Από αρχικά αποτελέσματα που προκύπτουν, φαίνεται ότι ο παρατηρούμενος φαινότυπος επιδεινώνεται στα διπλά ελλειμματικά ζώα, υποδηλώνοντας έτσι τη λειτουργική αναπλήρωση μεταξύ των δυο μορίων.

Εισαγωγή

A. Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΤΕΛΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΔΟΜΩΝ ΤΟΥ ΣΤΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ.

Κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος των θηλαστικών, ο νευρικός σωλήνας είναι μια ευθεία δομή, χωρίς κάποιο ιδιαίτερο μορφολογικό χαρακτηριστικό καθ'όλο το μήκος του. Σύντομα ωστόσο, πριν ακόμη κλείσει το οπίσθιο τμήμα του νευρικού σωλήνα, το πρόσθιο τμήμα αρχίζει να διαφοροποιείται. Τρεις περισφίξεις κατά μήκος του νευρικού σωλήνα οδηγούν στη δημιουργία τριών αρχικών κοιλιών: του προσθεγκεφάλου (forebrain), του μεσεγκεφάλου (midbrain) και του ρομβεγκεφάλου (hindbrain). Ακολούθως, ο προσθεγκεφαλος διαιρείται και πάλι κατά τον προσθιοπίσθιο άξονα στον τελεγκεφαλο και τον διεγκεφαλο. Επιπλέον, μια περισφίξη στη μέση της κοιλίας του τελεγκεφάλου κατά το μεσοπλευρικό άξονα δημιουργεί τις δυο πλευρικές κοιλίες του τελεγκεφάλου, τα μελλοντικά ημισφαίρια του εγκεφάλου (Gilbert *et al.*, 1994).



Εικόνα 1: Η ανατομία του αναπτυσσόμενου προσθεγκεφάλου: A) Σχηματική απεικόνιση μιας επιμήκουσ τομής εγκεφάλου ποντικού, ηλικίας E12.5. Δακρίνονται οι επιμέρους δομές του τελεγκεφάλου φλοιός (Pallium), οσφρητικός βολβός (olfactory bulb) και βασικός τελεγκεφαλος (subpallium) καθώς και διεγκεφαλος. B. Σχηματική απεικόνιση μιας εγκάρσιας τομής τελεγκεφάλου στην οποία διακρίνονται οι βασικές υποδιαιρέσεις του. (LGE) πλευρική και (MGE) μέση δομή του ραβδωτού σώματος, (POA-anterior preoptic area) πρόσθια προ-οπτική δομή. (Marin& Rubenstein, 2003).

Αρχικά το τοίχωμα των πλευρικών κοιλιών του τελεγκεφάλου δεν εμφανίζει κάποια δομική ειδίκευση. Η πρώτη ένδειξη διαφοροποίησης στο ποντίκι παρατηρείται την εμβρυϊκή ημέρα E10.5 (E: εμβρυϊκή ημέρα), όταν προεκβάλλει το κοιλιακό τοίχωμα σε κάθε μια από τις κοιλίες του τελεγκεφάλου. Η προεκβολή αυτή οδηγεί στην δημιουργία μιας αύλακας, η οποία χωρίζει τον

ραχιαίο από τον κοιλιακό τελεγκέφαλο (corticostriatal sulcus). Σύντομα, η προεκβολή του κοιλιακού τοιχώματος διαχωρίζεται με μια αύλακα (interganglionic sulcus) κατά τον μεσοπλευρικό άξονα και έτσι σχηματίζονται δύο προεκβολές, μια πιο κοντά στην μέση γραμμή και μια δεύτερη, πλευρική. Οι δομές αυτές καλούνται μέση (MGE: medial ganglionic eminence) και πλευρική (LGE: lateral ganglionic eminence) γανγλιονική προεξοχή αντίστοιχα. (Εικ.1) Σε πιο οπίσθια επίπεδα η προεκβολή του κοιλιακού τοιχώματος είναι ενιαία και καλείται οπίσθια γανγλιονική προεξοχή (CGE: caudal ganglionic eminence).

Ταυτόχρονα, παράλληλα με τον βασικό τελεγκέφαλο, και ο ραχιαίος τελεγκέφαλος διαφοροποιείται περαιτέρω στον υπόκαμπο και τον νεοφλοιό (neocortex).

A.1. Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΝΕΟΦΛΟΙΟΥ ΤΟΥ ΤΕΛΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΣΤΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ.

Ο νεοφλοιός των θηλαστικών είναι η έδρα όλων των ανώτερων κινητικών, αισθητικών και γνωσιακών λειτουργιών. Είναι η πιο πρόσφατη εξελικτικά περιοχή του εγκεφάλου, και συμβάλλει σημαντικά στην μεγάλη λειτουργική πολυπλοκότητα του εγκεφάλου των θηλαστικών. Για τα μοναδικά λειτουργικά χαρακτηριστικά που αποδίδονται στο νεοφλοιό, υπεύθυνη είναι εν μέρει η ιδιαιτερότητα της δομικής του οργάνωσης σε ξεχωριστές στοιβάδες, καθώς και η παρουσία πολλών τύπων νευρικών κυττάρων, που διαφέρουν τόσο σε μορφολογικό όσο και σε λειτουργικό επίπεδο.

Τα νευρικά κύτταρα του νεοφλοιού κατηγοριοποιούνται σε δυο βασικούς πληθυσμούς (Marin and Rubenstein, 2001).

Ο πρώτος πληθυσμός περιλαμβάνει τους πυραμιδικούς νευρώνες, οι οποίοι γεννιούνται στην κοιλιακή ζώνη (ventricular zone) του ραχιαίου τελεγκεφάλου και μεταναστεύουν ακτινωτά προς τον αναπτυσσόμενο νεοφλοιό (Gorski *et al.*, 2002). Οι πυραμιδικοί νευρώνες έχουν ως κύριο διαβιβαστή την γλουταμίνη, και δημιουργούν διεγερτικές συνάψεις σε πολλά σημεία τόσο στο φλοιό όσο και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου. Οι νευρώνες αυτοί αποτελούν το 80% περίπου του συνόλου των νευρώνων του φλοιού.

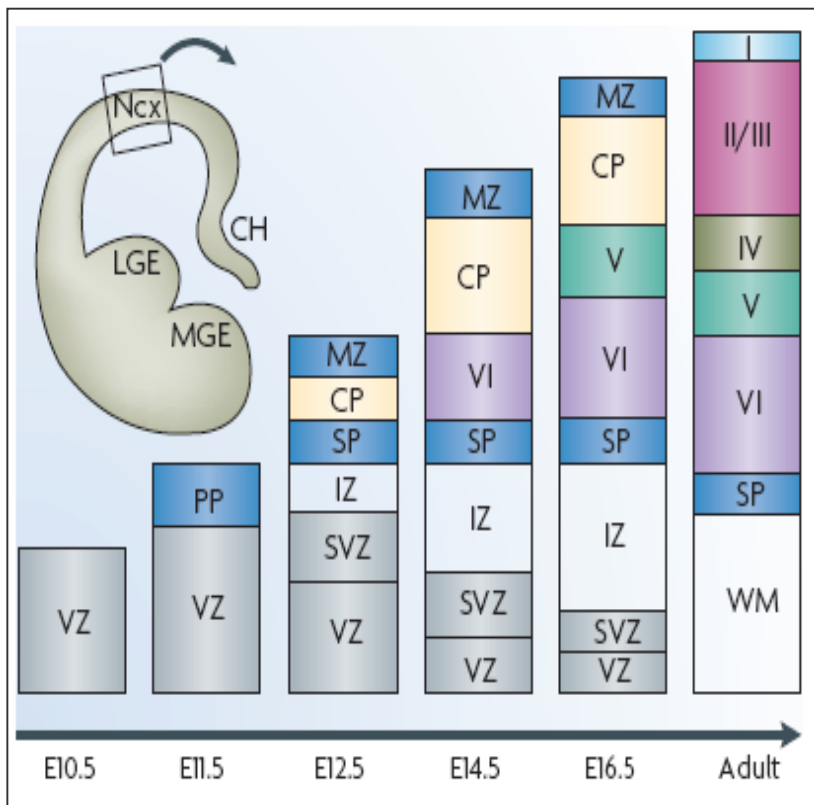
Το υπόλοιπο 20% των νευρώνων του φλοιού αποτελούν οι μη-πυραμιδικοί ενδονευρώνες, οι οποίοι γεννιούνται στην κοιλιακή ζώνη του βασικού τελεγκεφάλου και μεταναστεύουν οριζόντια προς τον ραχιαίο τελεγκέφαλο. Οι ενδονευρώνες έχουν ως διαβιβαστή το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και σχηματίζουν τοπικές ανασταλτικές συνάψεις στο φλοιό (Marin and Rubenstein, 2001; Molyneaux *et al.*, 2007).

Παρόλο που στον ώριμο φλοιό διακρίνονται αρκετές περιοχές με διαφορετικά λειτουργικά χαρακτηριστικά, η δομική του οργάνωση σε έξι στοιβάδες παραμένει η ίδια μεταξύ των επιμέρους περιοχών. Στο ποντίκι, ο σχηματισμός των στοιβάδων λαμβάνει χώρα μεταξύ των εμβρυϊκών

σταδίων ανάπτυξης E11.5 και E17.5 (Molyneaux *et al.*, 2007) και κυρίαρχο ρόλο στην διαδικασία αυτή παίζει η ακτινωτή μετανάστευση των πυραμιδικών νευρώνων (Gupta *et al.*, 2002).

Στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης ο νεοφλοιός είναι ομοιογενής και αποτελείται από μια πληθώρα μιτωτικών πρόδρομων νευρικών κυττάρων, τα οποία σχηματίζουν την κοιλιακή ζώνη. Οι πρώτοι μεταμιτωτικοί νευρώνες εμφανίζονται την E10.5, εγκαταλείπουν την κοιλιακή περιοχή μεταναστεύοντας ακτινωτά προς την εξωτερική επιφάνεια του εγκεφάλου και σχηματίζουν μια στοιβάδα που ονομάζεται προφλοιϊκή πλάκα (preplate). Την εμβρυϊκή ημέρα E13.5 ένα δεύτερο κύμα νευρώνων μεταναστεύει ακτινωτά από την κοιλιακή ζώνη χωρίζοντας τη ζώνη προφλοιϊκής πλάκας σε μια επιφανειακή, που καλείται επιχείλια ζώνη (marginal plate) και σε μια βαθιά, που καλείται υποφλοιϊκή πλάκα (subplate). Συνεπώς, αυτό το δεύτερο κύμα νευρικών κυττάρων σχηματίζει μια στοιβάδα ανάμεσα στις δυο προαναφερόμενες ζώνες, η οποία καλείται φλοιϊκή πλάκα (cortical plate). Ταυτόχρονα, ακριβώς κάτω από την υποφλοιϊκή πλάκα, άξονες με οριζόντια κατεύθυνση σχηματίζουν την ενδιάμεση ζώνη του φλοιού (intermediate zone), ενώ αρχίζει να διακρίνεται, ακριβώς πάνω από την κοιλιακή ζώνη, η υποκοιλιακή ζώνη (subventricular zone), η οποία αποτελείται από μιτωτικούς και μεταμιτωτικούς νευρώνες. Μεταξύ των εμβρυϊκών ημερών ανάπτυξης E14.5 και E18.5, μεταμιτωτικοί νευρώνες συνεχίζουν να μεταναστεύουν ακτινωτά έξω από την κοιλιακή ζώνη καταλαμβάνοντας τις τελικές τους θέσεις στην φλοιϊκή πλάκα, δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο διαφορετικές κυτταρικές στοιβάδες μέσα στην ζώνη της φλοιϊκής πλάκας. Πειράματα χρονικού καθορισμού της γέννησης των νευρώνων (birthday studies) των επιμέρους μεταναστευτικών κυμάτων έδειξαν πως τα εν λόγω κύτταρα ακολουθούν μια χωρική κατανομή στην φλοιϊκή πλάκα τύπου 'έσω προς τα έξω' (inside-out model), σε σχέση με το χρόνο γέννησής τους. Με άλλα λόγια, τα νευρικά κύτταρα που γεννιούνται νωρίς καταλαμβάνουν τις βαθύτερες ζώνες της φλοιϊκής πλάκας, ενώ αυτά που γεννιούνται αργότερα τις ανώτερες. Μετά την πλήρη διαμόρφωση της φλοιϊκής πλάκας, η ζώνη της υποφλοιϊκής πλάκας αποικοδομείται και έτσι τελικά σχηματίζονται οι έξι ζώνες του νεοφλοιού (Molyneaux *et al.*, 2007). (Εικ. 2)

Από την εμβρυϊκή ημέρα E12.5 και ως το τέλος της ανάπτυξης του νεοφλοιού, εντοπίζονται σε αυτόν σε συγκεκριμένες ζώνες σε κάθε στάδιο, GABAεργικοί ενδονευρώνες, οι οποίοι όπως αναφέραμε μεταναστεύουν με οριζόντια κατεύθυνση από τον βασικό τελεγκέφαλο. Αξίζει να σημειωθεί πως και οι ενδονευρώνες, αφού φτάσουν στην κατάλληλη θέση στον φλοιό, μεταναστεύουν ακτινωτά προς την κατάλληλη στοιβάδα (Nakajima, 2007; Tanaka *et al.*, 2003). Στις επόμενες παραγράφους θα αναφερθούμε αναλυτικά στους μηχανισμούς της οριζόντιας μετανάστευσης των GABAεργικών ενδονευρώνων και συνολικότερα στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση αυτής της ομάδας κυττάρων.



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της δημιουργίας των στοιβάδων του νεοφλοιού. Οι πρώτοι μεταμιτωτικοί νευρώνες σχηματίζουν την προφλοιϊκή πλάκα (preplate), η οποία αργότερα χωρίζεται στην επιφανειακή επιχείλιο ζώνη (marginal zone) και την εσωτερική υποφλοιϊκή πλάκα (subplate). Η φλοιϊκή πλάκα (cortical plate), η οποία θα δώσει τις στοιβάδες του φλοιού, σχηματίζεται ανάμεσα στις παραπάνω ζώνες. Διαδοχικά κύματα μεταμιτωτικών πυραμιδικών νευρώνων φτάνουν στην φλοιϊκή πλάκα και μεταναστεύουν σε πιο επιφανειακή ζώνη από νευρώνες που έχουν γεννηθεί νωρίτερα. (IZ-intermediate zone) ενδιάμεση ζώνη, (SVZ-subventricular zone)

υποκοιλιακή ζώνη, (WM-white matter) λευκή ουσία. (από Molyneaux *et al.*, 2007).

A.2. ΟΙ GABAΕΡΓΙΚΟΙ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΕΣ ΤΟΥ ΦΛΟΙΟΥ.

Οι GABAεργικοί ενδονευρώνες αποτελούν, όπως αναφέραμε, το 20% περίπου του συνολικού πληθυσμού των κυττάρων του φλοιού. Παρά το μικρό ποσοστό τους επί του συνολικού πληθυσμού, ο ρόλος τους θεωρείται σημαντικός για τις διαδικασίες της μάθησης. Επιπρόσθετα, η δυσλειτουργία τους έχει συσχετισθεί με πλήθος νευρολογικών διαταραχών, όπως είναι η επιληψία, ο αυτισμός και η σχιζοφρένεια (Cossart *et al.*, 2005; Woo and Lu, 2006). Άλλα παραδείγματα διαταραχών που έχουν αποδοθεί σε προβλήματα στη μετανάστευση των ενδονευρώνων περιλαμβάνουν το σύνδρομο Miller-Dieker (Pancoast *et al.*, 2005) και το σύνδρομο X-linked lissencephaly (Kato and Dobyns, 2005). Τα δύο προαναφερθέντα σύνδρομα αποτελούν περιπτώσεις λισεγκεφαλίας, μιας κατάστασης που στον άνθρωπο χαρακτηρίζεται από πάχυνση του φλοιού και απώλεια των πτυχώσεων (gyri), και οδηγεί σε διανοητική καθυστέρηση και επιληψία. Επιπλέον, μεταλλάξεις στο γονίδιο *Sonic hedgehog (Shh)* έχουν ως αποτέλεσμα μικροκεφαλία και συμπεριφορικές διαταραχές, και ο φαινότυπος αυτός είναι πιθανό να οφείλεται σε δυσλειτουργία των GABAεργικών ενδονευρώνων (Wonders and Anderson, 2006; Nakajima, 2007). Αυτό μπορεί να συμβαίνει καθώς η έκφραση του *Shh* επηρεάζει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα

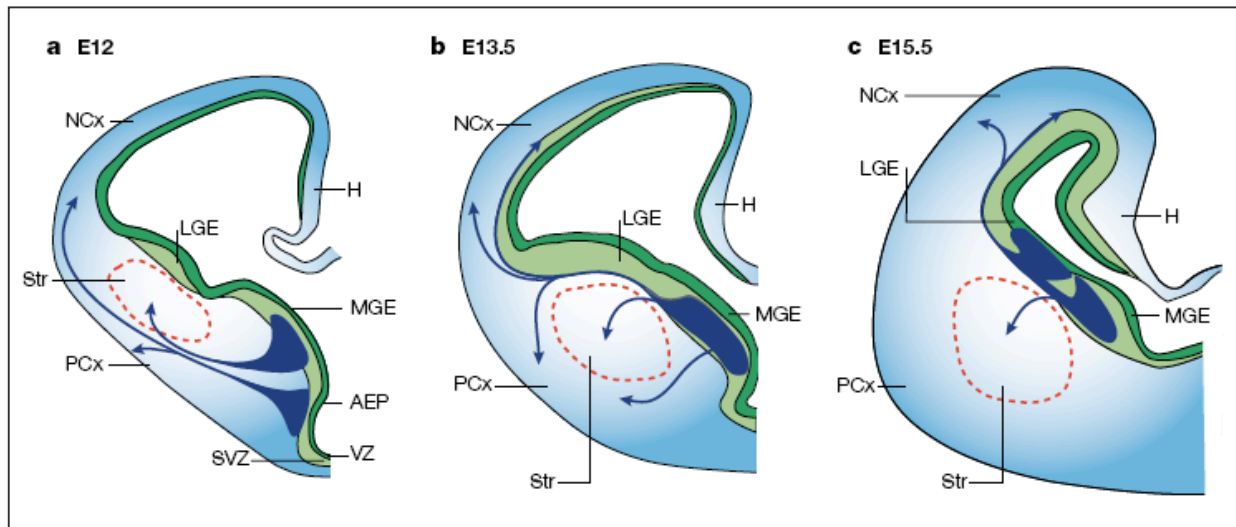
Nkx2.1, και ως εκ τούτου τον καθορισμό των ενδονευρώνων, όπως θα αναφέρουμε και παρακάτω (Xu *et al.*, 2005; Butt *et al.*, 2008).

A.2.1. Χωροχρονική προέλευση των GABAεργικών ενδονευρώνων και οριζόντια μεταναστευτικά μονοπάτια προς τον νεοφλοιό.

Η παρουσία στο νεοφλοιό κυτταρικών πληθυσμών, οι οποίοι προέρχονται από περιοχές του βασικού τελεγκεφάλου, αποδείχθηκε για πρώτη φορά μέσω πειραμάτων σήμανσης του βασικού τελεγκεφάλου σε καλλιέργειες τομών εγκεφάλου πριν από μια δεκαετία περίπου (De Carlos *et al.*, 1996; Tamamaki *et al.*, 1997). Σύντομα έγινε γνωστό ότι οι εν λόγω κυτταρικοί πληθυσμοί που ακολουθούν αυτό το πρότυπο μετανάστευσης είναι οι ενδονευρώνες του φλοιού, οι οποίοι εκφράζουν το νευροδιαβιβαστή GABA (Anderson *et al.*, 1997).

Την αρχική ανακάλυψη του μεταναστευτικού προτύπου των ενδονευρώνων ακολούθησε πλήθος μελετών οι οποίες τόσο με *in vitro* πειράματα σήμανσης του βασικού τελεγκεφάλου, (Lavidas *et al.*, 1999) όσο και μέσω ανάλυσης ποντικών ελλειμματικών για συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες του βασικού τελεγκεφάλου (Sussel *et al.*, 1999; Casarosa *et al.*, 1999) αποκάλυψαν την ύπαρξη διαφορετικών πηγών προέλευσης ενδονευρώνων καθώς και διαφορετικών μονοπατιών οριζόντιας μετανάστευσης στο φλοιό. Συνοπτικά, στα πρώιμα στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης (E11.5-E13.5), τα οριζόντια μεταναστευτικά κύτταρα προέρχονται από το MGE και ανιχνεύονται στην προφλοιϊκή πλάκα. Λίγο αργότερα κατά την ανάπτυξη (E13.5-E14.5), ένα δεύτερο κύμα οριζόντια μεταναστευτικών κυττάρων από το MGE και το CGE μεταναστεύει στην ενδιάμεση και την επιχείλια ζώνη του φλοιού. Στα μετέπειτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, οι κυτταρικοί πληθυσμοί που μεταναστεύουν οριζόντια εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στην ενδιάμεση, την υποκοιλιακή ζώνη και την επιχείλια ζώνη του φλοιού (Marin and Rubenstein, 2001). (Εικ.3)

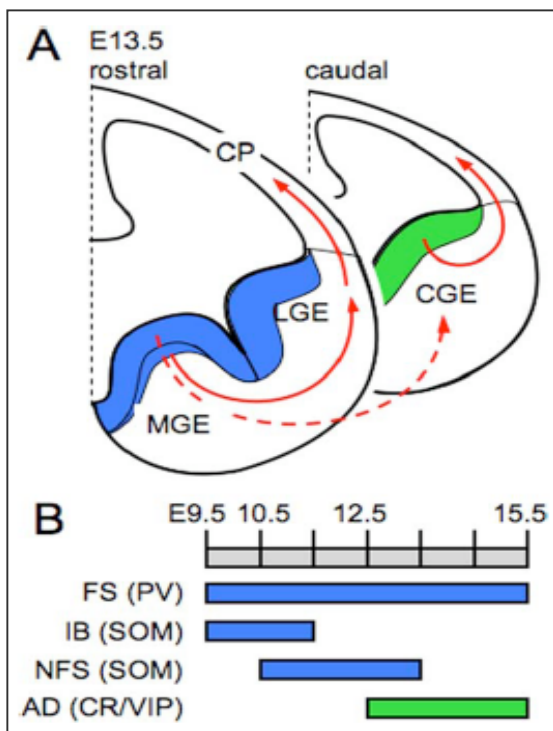
Οι GABAεργικοί ενδονευρώνες του φλοιού αποτελούν μια πολύ ετερογενή ομάδα κυττάρων, αναφορικά με την μορφολογία τους, τα ηλεκτροφυσιολογικά τους χαρακτηριστικά καθώς και με βάση το είδος του νευροπεπτιδίου και άλλων πρωτεϊνών που εκφράζουν (Flames and Marin, 2005; Markram *et al.*, 2004). Ένας τρόπος διαχωρισμού των εν λόγω κυττάρων είναι με βάση την πρωτεΐνη-δεσμευτή ασβεστίου (calcium-binding protein) στους calbindin, calretinin και parvalbumin υποπληθυσμούς. Ένας ακόμη τρόπος διαχωρισμού γίνεται με βάση το είδος του νευροπεπτιδίου που εκφράζουν π.χ. somatostatin, NPY (Kubota *et al.*, 1994; Wichterle *et al.*, 2001).



Εικόνα 3: Η πορεία της οριζόντιας μετανάστευσης των ενδονευρώνων από τον βασικό τελεγκέφαλο προς τον φλοιό. a) Στα πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης (E12) οι δομές MGE και η Anterior Entopenducular Area (AEA) αποτελούν πηγές προέλευσης των μεταναστευτικών νευρώνων, οι οποίοι εντοπίζονται στην ζώνη της προφλοιϊκής πλάκας του νεοφλοιού (NCx). b) Στα ενδιάμεσα στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης (E13.5) η κύρια πηγή οριζόντια μεταναστευτικών νευρώνων είναι το MGE. Οι εν λόγω νευρώνες ανιχνεύονται στην ενδιάμεση και υποκοιλιακή ζώνη του φλοιού. c) Προς το τέλος της μετανάστευσης τα μεταναστευτικά κύτταρα από το MGE εντοπίζονται κυρίως στην υποκοιλιακή ζώνη. Η διακεκομμένη κόκκινη γραμμή οριοθετεί τη δομή του ραβδωτού (Str-striatum) όπου μεταναστεύει ένας υποπληθυσμός των κυττάρων που γεννιούνται στον βασικό τελεγκέφαλο. (Pcx) παλαιοφλοιός, (H) ιππόκαμπος. (Marin and Rubenstein, 2001).

Η ύπαρξη διακριτών σημείων προέλευσης των ενδονευρώνων καθώς και διαφορετικών μονοπατιών μετανάστευσης έθεσε το ερώτημα αν οι διαφορετικοί υποπληθυσμοί των ενδονευρώνων γεννιούνται σε διαφορετικά σημεία και ακολουθούν διαφορετικές πορείες προς το φλοιό. Μέσω μιας σειράς μελετών είναι πλέον γνωστό ότι σχεδόν όλοι οι ενδονευρώνες του φλοιού γεννιούνται στις νευροεπιθηλιακές περιοχές (στις ζώνες πολλαπλασιασμού) των δομών MGE και CGE. Από το MGE προέρχεται το 80% περίπου των ενδονευρώνων του φλοιού και από το CGE το υπόλοιπο 20%. Αρχικά και η δομή του LGE θεωρείτο περιοχή γέννησης ενδονευρώνων. Τα πρώτα πειράματα που έγιναν περιλάμβαναν *in utero* μεταμόσχευση περιοχών MGE και LGE, και παρατήρηση της πορείας των μεταμοσχευμένων κυττάρων (fate-mapping). Από αυτά προέκυψε ότι ένα μεγάλο ποσοστό των ενδονευρώνων του φλοιού προέρχονται από το MGE, ενώ στο LGE γεννιούνται νευρώνες οι οποίοι μεταναστεύουν στους οσφρητικούς λοβούς και στο ραβδωτό σώμα (striatum) (Wichterle *et al.*, 2001). Μια ακόμη πολύ σημαντική παρατήρηση που προέκυψε από την παραπάνω μελέτη είναι ότι ο παράγοντας που καθορίζει την τύχη των μεταμοσχευμένων νευρώνων είναι το σημείο απ' όπου αυτοί προέρχονται και όχι η περιοχή στην οποία μεταμοσχεύονται. Έτσι, τμήμα ιστού από το LGE εμφανίζει το ίδιο πρότυπο μετανάστευσης είτε τοποθετηθεί στην περιοχή

του LGE είτε του MGE στον ιστό του δέκτη (Wichterle *et al.*, 2001). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε και από τους Nery *et al.*, οι οποίοι έδειξαν επιπλέον ότι η περιοχή του CGE είναι η δεύτερη περιοχή γέννησης των ενδονευρώνων του φλοιού (Nery *et al.*, 2002). Οι Nery *et al.*, παρατήρησαν ότι οι GABAεργικοί ενδονευρώνες που προέρχονται από το MGE και το CGE διέφεραν σημαντικά ως προς τη μορφολογία τους και την κατανομή τους στις στοιβάδες του φλοιού. Τις αρχικές αυτές παρατηρήσεις ακολούθησε πλήθος μελετών σχετικά με την προέλευση των διαφορετικών υποπληθυσμών των GABAεργικών ενδονευρώνων του φλοιού. Είναι πλέον γνωστό, ότι από μοριακά διακριτές περιοχές του βασικού τελεγκεφάλου προέρχονται διαφορετικοί υποπληθυσμοί GABAεργικών ενδονευρώνων (Xu *et al.*, 2004; Butt *et al.*, 2005; Fogarty *et al.*, 2007; Wonders *et al.*, 2008). Η περιοχή του MGE δίνει τους μη αλληλεπικαλυπτόμενους parvalbumin- και somatostatin-θετικούς πληθυσμούς, ενώ από την περιοχή του CGE προκύπτουν οι διπολικοί ενδονευρώνες που εκφράζουν τη πρωτεΐνη calretinin. Ο κάθε πληθυσμός χαρακτηρίζεται επιπλέον από μοναδικά μορφολογικά και ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά (Butt *et al.*, 2005; Fogarty *et al.*, 2007). (Εικ.4) Εκτός από την περιοχή προέλευσης, ο χρόνος γέννησης των εν λόγω κυττάρων σχετίζεται επίσης με την κατάταξή τους σε συγκεκριμένους υποπληθυσμούς. Οι Miyoshi *et al.*, έδειξαν ότι συγκεκριμένες υποομάδες ενδονευρώνων γεννιούνται σε συγκεκριμένα χρονικά στάδια (Miyoshi *et al.*, 2007).



Εικόνα 4: Οι περιοχές γέννησης των GABAεργικών ενδονευρώνων του φλοιού. **A.** Σχηματική απεικόνιση εγκάρσιας τομής εμπρόσθιου και οπίσθιου τελεγκεφάλου κατά την ημέρα E13.5. Το μεγαλύτερο ποσοστό των ενδονευρώνων του φλοιού γεννιέται στις ζώνες πολλαπλασιασμού των δομών MGE και CGE, και μεταναστεύουν οριζόντια (κόκκινα βέλη) προς την αναπτυσσόμενη φλοιϊκή πλάκα (CP). Ένα μέρος των MGE προερχόμενων νευρώνων μεταναστεύει πρώτα με οποισθια κατεύθυνση προτού κινηθεί προς τον νεοφλοιό (διακεκομμένα κόκκινα βέλη). **B)** Οι parvalbumin-expressing (PV) fast spiking νευρώνες καθώς και οι somatostatin-expressing (SOM) burst spiking (IB) και non-fast spiking (NFS) προέρχονται από το MGE, με διαφορετικά χρονικά προφίλ, όπως φαίνεται στο ιστόγραμμα (γκρι μπάρα). Οι calretinin-expressing adapting (AD) ενδονευρώνες προκύπτουν σε μετέπειτα χρονικά στάδια από το CGE. (Butt *et al.*, 2007).

A.2.2. Καθορισμός της κυτταρικής τύχης των GABAεργικών ενδονευρώνων.

Από τα ευρήματα που αναφέραμε παραπάνω, υποδηλώνεται ότι η έκφραση διαφορετικών συνόλων παραγόντων στις διαφορετικές περιοχές γέννησης των ενδονευρώνων έχει ως αποτέλεσμα να προκύπτουν σε κάθε περιοχή διαφορετικοί υποπληθυσμοί. Ένα εμπόδιο στον χαρακτηρισμό ενός τέτοιου γενετικού κώδικα είναι ότι μεσολαβεί αρκετά μεγάλο διάστημα ανάμεσα στον τελευταίο κυτταρικό κύκλο, κατά τον οποίο φαίνεται να καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό η τύχη τους (Xu *et al.*, 2005; Butt *et al.*, 2007), και την εμφάνιση του ώριμου φαινοτύπου των νευρώνων, η οποία ολοκληρώνεται πολύ αργότερα. Παρόλα αυτά έχουν χαρακτηριστεί ορισμένοι πολύ σημαντικοί παράγοντες που εμπλέκονται στον καθορισμό των ενδονευρώνων του φλοιού.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας Dlx είναι απαραίτητοι για την ανάπτυξη των GABAεργικών ενδονευρώνων. Τέσσερα Dlx γονίδια εκφράζονται στο νευρικό σύστημα, τα *Dlx1*, *Dlx2*, *Dlx5* και *Dlx6* και μεταγράφονται ανά ζεύγη *Dlx1/2* και *Dlx5/6*. Στα διπλά ελλειμματικά *Dlx1/2* ζώα εμποδίζεται η διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων στον βασικό τελεγέφαλο καθώς και η οριζόντια μετανάστευση των κυττάρων από την περιοχή αυτή. Στο φλοιό παρατηρείται απουσία GABA-θετικών κυττάρων (Anderson *et al.*, 1997; Cobos *et al.*, 2007). Οι παράγοντες *Dlx1/2* είναι σε θέση να επάγουν τον GABAεργικό φαινότυπο, καθώς έκτοπη έκφρασή τους οδηγεί σε έκφραση των ενζύμων που εμπλέκονται στη σύνθεση του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (Stuhmer *et al.*, 2002). Οι παράγοντες *Dlx5/6* εκφράζονται στους μεταμιτωτικούς ενδονευρώνες, και η έκφρασή τους ρυθμίζεται από τους *Dlx1/2* (Zerucha *et al.*, 2000).

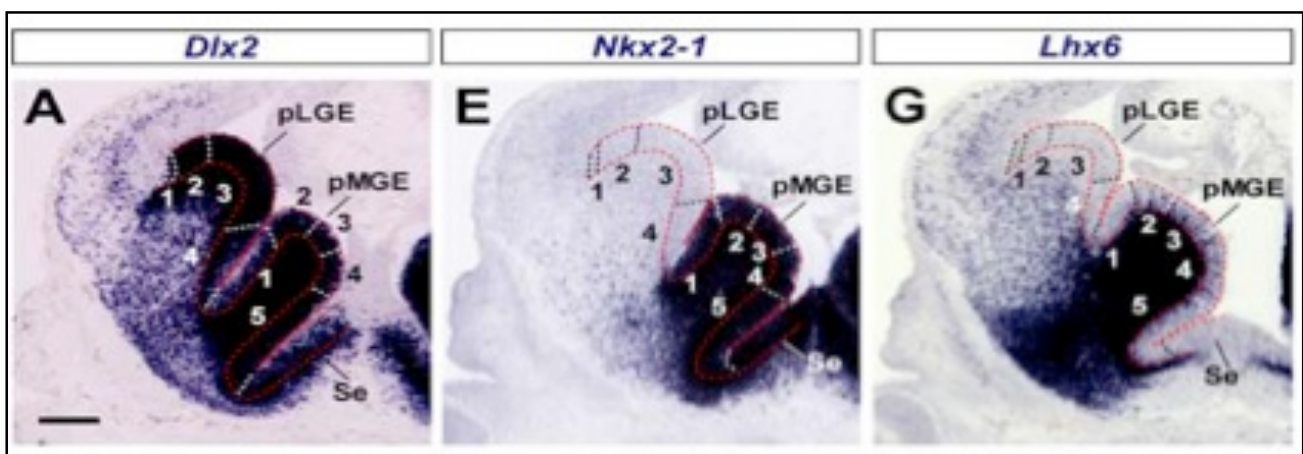
Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας για τον καθορισμό των ενδονευρώνων είναι ο *Nkx2.1*, ο οποίος εκφράζεται στην περιοχή του MGE. Ο *Nkx2.1* έχει διττό ρόλο: από τη μια επάγει συγκεκριμένες πορείες διαφοροποίησης των νευρώνων (cell fate determination) και ταυτόχρονα καταστέλλει την έκφραση γονιδίων χαρακτηριστικών για γειτονικές του MGE περιοχές (Butt *et al.*, 2008). Η έκφραση του *Nkx2.1* στο MGE είναι απαραίτητη για την δημιουργία των πληθυσμών που προκύπτουν από αυτή την περιοχή, δηλαδή των parvalbumin- και somatostatin-θετικών ενδονευρώνων, καθώς σε *Nkx2.1* ελλειμματικά ζώα οι παραπάνω πληθυσμοί δεν διαφοροποιούνται. Επιπρόσθετα δεν παρατηρείται έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *Lhx6* (Sussel *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2004). Μάλιστα, η δράση του *Nkx2.1* φαίνεται να μεσολαβείται σε μεγάλο βαθμό μέσω της επαγωγής της έκφρασης του *Lhx6*. Αυτό προκύπτει καθώς έκτοπη έκφραση του *Lhx6* είναι σε θέση να σώσει τον *Nkx2.1* ελλειμματικό φαινότυπο (Du *et al.*, 2008). Τέλος ο *Nkx2.1* φαίνεται να προσδένεται σε μια συντηρημένη περιοχή του υποκινητή του *Lhx6* γονιδίου επάγοντας τη μεταγραφή του (Du *et al.*, 2008).

Ο μεταγραφικός παράγοντας *Lhx6* εκφράζεται σε μεταμιτωτικά κύτταρα κατά την έξοδό τους από την ζώνη πολλαπλασιασμού του MGE (Grigoriou *et al.*, 1998; Lavdas *et al.*, 1999). Πιο

συγκεκριμένα, ο *Lhx6* εκφράζεται σε όλους τους MGE-προερχόμενους και *Nkx2.1*-θετικούς μεταμιτωτικούς νευρώνες (Fogarty *et al.*, 2007) ενώ δεν εκφράζεται στους *calretinin*-θετικούς, CGE-προερχόμενους ενδονευρώνες. Ανάλυση σε ποντίκια ελλειμματικά για τον παράγοντα *Lhx6* έδειξε ότι ενώ υπάρχουν στο φλοιό φυσιολογικοί αριθμοί GABA-θετικών κυττάρων, οι ενδονευρώνες του φλοιού και του ιπποκάμπου δεν εκφράζουν τους μάρτυρες των επιμέρους υποπληθυσμών *parvalbumin* και *somatostatin* (Liodis *et al.*, 2007). Στην εικόνα 5 φαίνεται το πρότυπο έκφρασης των παραγόντων που αναφέραμε παραπάνω.

Οι Fogarty *et al.*, θέλοντας να επιβεβαιώσουν και να προεκτείνουν τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την ανάλυση των ελλειμματικών ζώων, χρησιμοποίησαν το σύστημα της Cre ρεκομπινάσης με σκοπό να πραγματοποιήσουν *in vivo* παρατήρηση της πορείας ανάπτυξης των ενδονευρώνων (*in vivo* fate-mapping). Χρησιμοποιώντας διαγονιδιακές σειρές ποντικών που εκφράζουν την Cre ρεκομπινάση υπό τον έλεγχο του υποκινητή του *Nkx2.1* ή του *Lhx6* γονιδίου, παρατήρησαν ότι πράγματι το σύνολο των *somatostatin*- και *parvalbumin*-θετικών ενδονευρώνων περοέρχεται από την περιοχή έκφρασης των παραγόντων *Nkx2.1* και *Lhx6* (Fogarty *et al.*, 2007).

Τα πρότυπα έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων που αναφέραμε παραπάνω φαίνονται στην εικόνα 5.



Εικόνα 5: Πρότυπο έκφρασης των παραγόντων *Dlx2*, *Nkx2.1* και *Lhx6*. Στην εικόνα φαίνονται τομές τελεγκεφάλου ηλικίας E13.5, στις οποίες έχει γίνει *in situ* υβριδοποίηση για την ανίχνευση των παραπάνω μορίων. **A)** Ο παράγοντας *Dlx2* (όπως και ο *Dlx1*) εκφράζεται στον βασικό τελεγκεφαλο στα προγονικά κύτταρα καθώς και στους μεταμιτωτικούς νευρώνες. **E)** Ο παράγοντας *Nkx2.1* εκφράζεται στην περιοχή του MGE στα μιτωτικά κύτταρα, **G)** Η έκφραση του παράγοντα *Lhx6* ξεκινάει στους μεταμιτωτικούς ενδονευρώνες, καθώς εξέρχονται από την ζώνη πολλαπλασιασμού του MGE και συνεχίζεται και στη συνέχεια (τροποποιημένη από Flames *et al.*, 2007).

4.2.3. Μηχανισμοί καθοδήγησης των ενδονευρώνων κατά την οριζόντια μετανάστευση από τον βασικό τελεγκέφαλο στο νεοφλοιό.

Από τη στιγμή που η ταυτότητα των κυττάρων που μεταναστεύουν οριζόντια προς το φλοιό καθοριστεί, τρεις κατηγορίες μορίων συμμετέχουν στη ρύθμιση του μεταναστευτικού μηχανισμού τους (Marin and Rubenstein, 2001; Marin and Rubenstein, 2003) :

1. Παράγοντες που επάγουν την κυτταρική κίνηση (motogenic factors).
2. Πρωτεΐνες που συνιστούν το εξωκυτταρικό μικροπεριβάλλον/υπόστρωμα των μεταναστευόντων κυττάρων.
3. Μόρια που καθοδηγούν τα διαφορετικά μεταναστευτικά κύματα νευρώνων μέσω των κατάλληλων μονοπατιών στις θέσεις στόχους τους.

Στην πρώτη κατηγορία, ανήκουν οι πρωτεΐνες doublecortin (DCX) και doublecortin-like kinase (DCLK), δύο πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το σύστημα των μικροσωληνίσκων. Η αναστολή της δράσης τους μπλοκάρει την οριζόντια μετανάστευση των ενδονευρώνων. Ποντίκια ελλειμματικά για τα μόρια αυτά εμφανίζουν μειωμένους αριθμούς ενδονευρώνων στο φλοιό (Fricourt *et al.*, 2007). Η πρωτεΐνη Rac1 είναι ένα ακόμη μόριο που ανήκει στην παραπάνω κατηγορία. Πρόσφατα ευρήματα δείχνουν ότι η Rac1 είναι απαραίτητη για τη μεταναστευτική ικανότητα των ενδονευρώνων (Chen *et al.*, 2007). Στα ευρήματα σχετικά με τον ρόλο της Rac1 θα αναφερθούμε αναλυτικά στις επόμενες παραγράφους.

Στην δεύτερη κατηγορία μορίων ανήκει η πρωτεΐνη TAG-1. Η TAG-1 εκφράζεται στους φλοιοθαλαμικούς άξονες, πάνω στους οποίους μεταναστεύουν οι ενδονευρώνες ενώ αναστολή της δράσης της με χρήση αντισωμάτων οδηγεί σε μειωμένους αριθμούς ενδονευρώνων στο φλοιό (Denaxa *et al.*, 2001).

Τέλος, στην τρίτη κατηγορία έχει χαρακτηριστεί πλήθος μορίων τα οποία καθοδηγούν τους ενδονευρώνες κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους. Ορισμένα παραδείγματα καθοδηγητικών μορίων είναι οι neuropilin (Npn1) και Npn2 (Marin *et al.*, 2001), ο υποδοχέας της Neuregulin1 ErbB4 (Flames *et al.*, 2004) και ο υποδοχέας CXCR4 (Stumm *et al.*, 2003).

B. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ RHO GTPΑΣΩΝ.

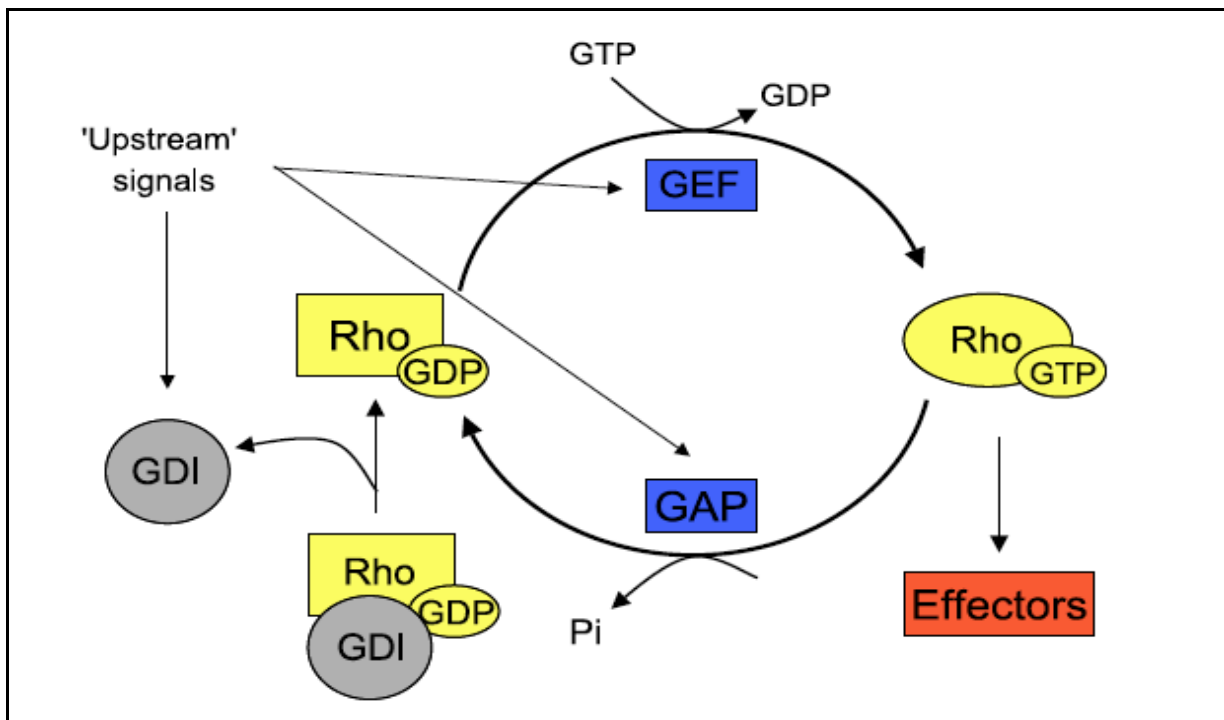
Η Rho GTPάσες ανήκουν στην υπεροικογένεια των μικρών Ras GTPασών. Ο αριθμός τους ποικίλλει από περίπου 6 στον καινοραβδίτη (*C.elegans*) και την μύγα (*D.melanogaster*) ως και

περισσότερες από 20 στα θηλαστικά (Schultz *et al.*, 1998). Τα περισσότερο μελετημένα μέλη της οικογένειας των Rho GTPασών είναι οι RhoA, Rac1 και Cdc42 (Govek *et al.*, 2005).

Οι Rho GTPάσες λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες, εναλλασσόμενες διαρκώς μεταξύ δυο καταστάσεων. Στην ενεργή τους μορφή βρίσκονται προσδεμένες με το GTP, ενώ στην ανενεργή τους μορφή είναι προσδεμένες με το GDP. Τρεις κατηγορίες μορίων ρυθμίζουν την κατάσταση ενεργοποίησης των Rho GTPασών. Οι Rho GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) επάγουν την αντικατάσταση του GDP από GTP και έτσι ενεργοποιούν τις Rho GTPάσες. Αντίθετα οι GAPs (GTPase Activating Proteins), αυξάνουν την ενδογενή ενεργότητα GTPάσης αυτών των μορίων, οδηγώντας στην υδρόλυση του GTP και την επακόλουθη απενεργοποίηση των Rho GTPασών. Μια τρίτη ομάδα πρωτεϊνών είναι οι GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors), οι οποίες προσδένουν τις ανενεργές μορφές των GTPασών και δεν επιτρέπουν την ενεργοποίησή τους (Etienne-Manneville and Hall, 2002). (Εικ.6)

Στην ενεργή τους μορφή οι Rho GTPάσες αλληλεπιδρούν με πολλές πρωτεΐνες στόχους, οι οποίες καλούνται και μόρια μεσολαβητές (effectors), μέσω των οποίων ρυθμίζουν πλήθος κυτταρικών διεργασιών. Η ενεργοποίηση των συγκεκριμένων σε κάθε περίπτωση πρωτεϊνών στόχων για την εκτέλεση συγκεκριμένων λειτουργιών, εξασφαλίζεται μέσω της αυστηρής χωροχρονικής ενεργοποίησης των GTPασών από διαφορετικές GEFs (Etienne-Manneville and Hall, 2002).

Ο πιο σημαντικός ρόλος των Rho GTPασών αφορά στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Ένα μεγάλο ποσοστό των πρωτεϊνών-στόχων των Rho GTPασών είναι μόρια που επιδρούν στον κυτταροσκελετό, και μέσω της ενεργοποίησης τους οι Rho GTPάσες ρυθμίζουν πλήθος διεργασιών, παραδείγματα των οποίων αποτελούν η ρύθμιση της μορφολογίας των κυττάρων, η δημιουργία και κίνηση κυτταρικών προεκτάσεων καθώς και η κυτταρική μετανάστευση. Πλήθος πειραματικών δεδομένων υποστηρίζει ότι οι Rho GTPάσες είναι σημαντικές σε διάφορες φάσεις κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, κάτι που είναι λογικό καθώς καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης του λαμβάνουν χώρα γεγονότα που περιλαμβάνουν μεταβολές του κυτταροσκελετού (Govek *et al.*, 2005). Οι Rho GTPάσες, μέσω άλλων πρωτεϊνών-στόχων ρυθμίζουν επιπλέον και πολλές ακόμα κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι η γονιδιακή έκφραση, ο καθορισμός της κυτταρικής τύχης, η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου και ο μεταβολισμός των λιπιδίων (Govek *et al.*, 2005).



Εικόνα 6: Ο κύκλος των Rho GTPασών. Οι Rho GTPάσες εναλλάσσονται διαρκώς μεταξύ της ενεργής GTP-προσδεμένης και της ανενεργής GDP-προσδεμένης μορφής. Ο κύκλος ρυθμίζεται αυστηρά από τις GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors), τις GAPs (GTPase activating proteins) και τις GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors). Στην ενεργή τους μορφή οι Rho GTPάσες ενεργοποιούν πλήθος από μόρια μεσολαβητές (effectors) (από Raftoroulou *et al.*, 2004).

Για την μελέτη του ρόλου των Rho GTPασών έχει κυριαρχήσει η χρήση διαρκώς ενεργών (CA: constitutively active) και dominant negative (DN) μορφών σε κυτταρικές σειρές ή διαγονιδιακά ζώα. Η μεθοδολογία αυτή, παρότι έχει δώσει ένα μεγάλο όγκο πληροφορίας εμπεριέχει ορισμένους περιορισμούς (Wang and Zhen, 2007). Ένας περιορισμός είναι ότι σε ορισμένες περιπτώσεις προκαλούνται αποκρίσεις μη ειδικές για την υπό μελέτη GTPάση, λόγω διαταραχής του συστήματος. Ο τρόπος δράσης των DN μορφών είναι να προσδέουν και να απενεργοποιούν τις GEFs, οι οποίες όμως μπορεί να ενεργοποιούν περισσότερες από μια GTPάσες. Για παράδειγμα μια DN μορφή της Rac3 έχει φανεί να αναστέλλει την δημιουργία λαμελλιποδίων, διεργασία η οποία δεν μεσολαβείται από την ίδια αλλά από την πρωτεΐνη Rac1 (Chan *et al.*, 2005). Επιπρόσθετα, εκτοπική έκφραση CA μορφών μπορεί να οδηγεί στην διαρκή δέσμευση πρωτεϊνών-στόχων, αλλάζοντας την ακριβή ρύθμισή τους. Ένας δεύτερος περιορισμός των παραπάνω μεθόδων είναι ο σημαντικός βαθμός λειτουργικής αλληλοεπικάλυψης (redundancy) που υπάρχει μεταξύ των GTPασών. Για την παράκαμψη αυτών των περιορισμών, η καλύτερη προσέγγιση είναι η μελέτη διαγονιδιακών ζώων που φέρουν έλλειμμα σε συγκεκριμένες GTPάσες ή συνδυασμούς GTPασών (Wang and Zhen, 2007).

B.1. Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ RAC1 ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.

Η Rac1 ανήκει στην υποοικογένεια των Rac GTPασών. Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις Rac GTPάσες, οι Rac1, Rac2 και Rac3. Από αυτές η Rac1 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, η Rac2 είναι ειδική για το αιμοποιητικό σύστημα και η Rac3 εκφράζεται στο νευρικό σύστημα (Haataja *et al.*, 1997).

Στο νευρικό σύστημα, η Rac1 φαίνεται να εμπλέκεται στην νευριτογένεση, την καθοδήγηση των αξόνων και των δενδριτών, τη μετανάστευση των νευρώνων και τη μυελίνωση (Luo *et al.*, 1996; Nakayama *et al.*, 2000; Kawauchi *et al.*, 2003; Nodari *et al.*, 2007; συνοψίζονται στο Govek *et al.*, 2005). Στο φλοιό η Rac1 συνεντοπίζεται και αλληλεπιδρά με την κινάση Cdk5, η οποία είναι απαραίτητη για τη μετανάστευση των πυραμιδικών νευρώνων (Nikolic *et al.*, 1998). Επιπλέον, *in utero* ηλεκτροφόρηση μιας DN μορφής της Rac1 στον αναπτυσσόμενο φλοιό αναστέλλει τη μετανάστευση των πυραμιδικών νευρώνων (Kawauchi *et al.*, 2003).

Απώλεια του γονιδίου *Rac1* οδηγεί σε θάνατο των εμβρύων κατά τη γαστριδίωση, πριν τη δημιουργία του νευρικού συστήματος (Sugihara *et al.*, 1998). Οι Kassai *et al.* χρησιμοποίησαν το σύστημα της Cre ρεκομπινάσης για να απενεργοποιήσουν το γονίδιο *Rac1* στους ιστούς που εκφράζουν τον παράγοντα Emx-1 (Kassai *et al.*, 2008). Η έκφραση του Emx-1 εντοπίζεται στον ραχιαίο τελεγκέφαλο από την ημέρα E10.5. Τα Rac1 ελλειμματικά ζώα που προκύπτουν είναι υγιή και αναπαράγονται κανονικά. Ο φλοιός τους είναι πιο λεπτός σε πάχος και παρουσιάζει μικρές διαταραχές στην οργάνωσή του, ενώ η ακτινωτή μετανάστευση των πυραμιδικών νευρώνων δεν εμποδίζεται. Επιπλέον αναστέλλεται η δημιουργία των αξονικών μονοπατιών εμπρόσθιο συνδεσμικό σύστημα (AC: anterior commissure) και συνδεσμικό σύστημα του μεσολοβίου (CC: corpus callosum) που ενώνουν τα ημισφαίρια του φλοιού. Αντίθετα, άλλα αξονικά συστήματα όπως το φλοιοθαλαμικό και το θαλαμοφλοιϊκό, δεν επηρεάζονται από την απώλεια της Rac1 στο ραχιαίο τελεγκέφαλο (Kassai *et al.*, 2008). Η σχεδόν φυσιολογική μετανάστευση των πυραμιδικών νευρώνων έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της χρήσης DN μορφών που αναφέραμε παραπάνω (Kawauchi *et al.*, 2003). Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται σε αναπλήρωση της δράσης της Rac1 από κάποια άλλη GTPάση. Ένα τέτοιο υποψήφιο μόριο είναι η Rac3, στην οποία θα αναφερθούμε αναλυτικότερα στη συνέχεια.

Σε μια δεύτερη διαγονιδιακή σειρά ποντικών, η Rac1 απενεργοποιείται στους ιστούς που εκφράζεται ο παράγοντας Foxg1 (Chen *et al.*, 2007). Η έκφραση του Foxg1 αρχίζει την ημέρα E8.5 στο πρόσθιο τμήμα της νευρικής πλάκας (anterior neural plate). Από την εμβρυϊκή ημέρα E10.5, η έκφρασή του περιορίζεται στον αναπτυσσόμενο τελεγκέφαλο και σε άλλες διακριτές δομές του εγκεφάλου, όπως τα πρόσθιο οπτικό και ακουστικό κυστίδιο (anterior optic και otic vesicle)

(Herbert and McConnell, 2000). Τα $Rac1^{fl/fl};Foxg1^{+/Cre}$ ποντίκια, στα οποία η $Rac1$ απενεργοποιείται στους ιστούς που εκφράζουν τον $Foxg1$, παρότι επιβιώνουν μέχρι την ημέρα E18.5, πεθαίνουν πριν τη γέννηση. Ο αναπτυσσόμενος τελεγκέφαλος των ζώων αυτών είναι μικρότερος σε μέγεθος ενώ ο πρόσθιος σύνδεσμος (AC) δεν δημιουργείται. Επιπλέον, τα συνδεσμικά αξονικά συστήματα του μεσολοβίου (CC) και του ιπποκάμπου (HC:hippocampal commissural) δεν περνούν τη μέση γραμμή. Στα ίδια ζώα παρατηρείται επίσης καθυστερημένη μετανάστευση των πυραμιδικών νευρώνων καθώς και αναστολή της οριζόντιας μετανάστευσης των GABAεργικών ενδονευρώνων. Οι Chen *et al.*, δημιούργησαν επίσης τα $Rac1^{fl/fl};Dlx5/6^{+/Cre}$ ζώα, στα οποία η $Rac1$ απενεργοποιείται στους μεταμιτωτικούς ενδονευρώνες του φλοιού. Στα ζώα αυτά η οριζόντια μετανάστευση των ενδονευρώνων δεν επηρεάζεται (Chen *et al.*, 2007). Η ερμηνεία που δίνουν οι ερευνητές στα ευρήματα αυτά είναι ότι η $Rac1$ είναι απαραίτητη κατά το στάδιο της διαφοροποίησης των ενδονευρώνων ώστε να αποκτήσουν μεταναστευτική ικανότητα (Chen *et al.*, 2007).

Περαιτέρω ανάλυση των $Rac1^{fl/fl};Foxg1^{+/Cre}$ ποντικών έδειξε ότι η $Rac1$ επηρεάζει την ικανότητα πολλαπλασιασμού και την επιβίωση των προγονικών κυττάρων (progenitor cells), καθώς και την τελική διαφοροποίηση των νεογέννητων νευρώνων (Chen *et al.*, 2009), γεγονός που εξηγεί εν μέρει το μικρότερο μέγεθος του εγκεφάλου αυτών των ζώων. Ένας τέτοιος ρόλος για την $Rac1$ στη ρύθμιση προγονικών κυττάρων έχει διαπιστωθεί και σε άλλα συστήματα, όπως το αιμοποιητικό και επιθηλιακό (Gu *et al.*, 2003; Benitah *et al.*, 2005).

Η πρωτεΐνη $Rac3$ ανήκει στις Rac GTPάσες και είναι ειδική για το νευρικό σύστημα (Haataja *et al.*, 1997). Η $Rac3$ εκφράζεται σε συγκεκριμένες δομές στο αναπτυσσόμενο και ενήλικο νευρικό σύστημα, και η μέγιστη εκφρασή της παρατηρείται κατά την εμβρυϊκή μέρα E13.5 και τη μετεμβρυϊκή ημέρα P7. Οι $Rac1$ και $Rac3$ εμφανίζουν 90% ομολογία σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Ποντίκια ελλειμματικά για την $Rac3$ είναι βιώσιμα και δεν εμφανίζουν κάποιο ιδιαίτερο φαινότυπο, εκτός από αυξημένη ικανότητα μάθησης, όπως προκύπτει από συμπεριφορικές μελέτες (Corbetta *et al.*, 2005).

Απώλεια των $Rac1$ και $Rac3$ οδηγεί σε απώλεια των βρυωδών κυττάρων του ιπποκάμπου (hippocampal mossy cells) και επιδρά στη δημιουργία των αξονικών μονοπατιών από και προς το hippocampal hilus. Ο φαινότυπος αυτός δεν παρατηρείται σε ποντίκια ελλειμματικά για μια από τις δυο GTPάσες, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι $Rac1$ και $Rac3$ δρουν συνεργατικά για την επιτέλεση συγκεκριμένων διαδικασιών στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα (Corbetta *et al.*, 2009).

Γ. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος μιας μελέτης που σκοπό έχει τη διερεύνηση του ρόλου της GTPάσης Rac1 στην ανάπτυξη των GABAεργικών ενδονευρώνων του φλοιού.

Για την προσέγγιση του παραπάνω ερωτήματος έγινε στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου *Rac1* στους ενδονευρώνες ως εξής: Χρησιμοποιήθηκε μια διαγονιδιακή σειρά ποντικών που φέρει αλληλουχίες LoxP εκατέρωθεν του πρώτου εξωνίου του *Rac1* γονιδίου (*Rac1^{flox/flox}*) (Walsley *et al.*, 2003). Στα ζώα αυτά, η δράση της Cre ρεκομπινάσης οδηγεί σε απενεργοποίηση του *Rac1*. Η διασταύρωση αυτών των ζώων με μια δεύτερη σειρά ποντικών στα οποία η έκφραση της Cre ρεκομπινάσης βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *Nkx2.1* (*Nkx2.1_Cre*) (Kessarlis *et al.*, 2006), οδηγεί σε απενεργοποίηση του *Rac1* στην περιοχή του MGE, από όπου προκύπτει το μεγαλύτερο μέρος των ενδονευρώνων του φλοιού. Στα *Rac1* ελλειμματικά ζώα θα μελετήσουμε την επίδραση της απώλειας της Rac1 τόσο στην μετανάστευση όσο και στη διαφοροποίηση των ενδονευρώνων στους διάφορους υποπληθυσμούς. Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιείται με την χρήση κατάλληλων μαρτύρων (markers) στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια όπως και στον ώριμο φλοιό. Επιπρόσθετα, θα διερευνήσουμε την πιθανή λειτουργική συμπλήρωση του ρόλου της Rac1 από την Rac3, διασταυρώντας τα παραπάνω ζώα με ποντίκια ελλειμματικά για την Rac3.

Από προηγούμενες μελέτες έχει προταθεί ότι έκφραση της Rac1 είναι απαραίτητη στα προγονικά κύτταρα των ενδονευρώνων, ώστε οι ώριμοι ενδονευρώνες να αποκτήσουν μεταναστευτική ικανότητα (Chen *et al.*, 2007). Για να ελέγξουμε την υπόθεση αυτή θα δημιουργήσουμε μια δεύτερη σειρά ποντικών στα οποία το γονίδιο *Rac1* θα απενεργοποιείται αποκλειστικά στους μεταμιτωτικούς ενδονευρώνες. Αυτό θα το επιτύχουμε διασταυρώνοντας τα *Rac1^{flox/flox}* ποντίκια με μια σειρά ζώων στα οποία η Cre ρεκομπινάση θα εκφράζεται υπό τον έλεγχο των ρυθμιστικών αλληλουχιών του γονιδίου *Lhx6* (*Lhx6_Cre*). Τα *Rac1^{flox/flox};Lhx6_Cre* ζώα θα αναλυθούν όπως και τα παραπάνω.

Και οι δυο διαγονιδικές σειρές, είναι σχεδιασμένες ώστε να φέρουν επιπλέον τον Cre μάρτυρα *Rosa26StopYFP*, που οδηγεί την έκφραση της φθορίζουσας πρωτεΐνης YFP στα κύτταρα στα οποία εκφράζεται η Cre ρεκομπινάση, και άρα στα κύτταρα στα οποία απενεργοποιείται η Rac1 (Srinivas *et al.*, 2001).

Από το σύνολο των παραπάνω πειραμάτων αναμένεται να σχηματίσουμε μια ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με την επίδραση της Rac1 στην ανάπτυξη των GABAεργικών ενδονευρώνων.

Στην συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των $Rac1^{flox/flox};Lhx6_Cre$ ζώων. Τα αποτελέσματα της μελέτης θα αναλυθούν στην επόμενη ενότητα, ενώ θα συζητηθούν σε συνδιασμό με τα ευρήματα που προκύπτουν από την ανάλυση των $Rac1^{flox/flox};Nkx2.1_Cre$ ποντικών. Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν κάποια αρχικά πειράματα σχετικά με τη λειτουργική συμπλήρωση του ρόλου της Rac1 από την Rac3.

*Υλικά και
Μέθοδοι*

1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν:

- 1) Φυσιολογικά ποντίκια των στελεχών CBAxC57BB1/10.
- 2) Ποντίκια που φέρουν αλληλουχίες *LoxP* εκατέρωθεν εξωνίων του γονιδίου *Rac1* (***Rac1^{fllox/flox}***). Στα συγκεκριμένα ζώα, η δράση της Cre ρεκομπινάσης οδηγεί σε απενεργοποίηση του γονιδίου *Rac1* (Walsley *et al.*, 2003).
- 3) Ποντίκια που φέρουν αλληλουχίες *LoxP* εκατέρωθεν αλληλουχιών (*transcription stop sites*) που εμποδίζουν την μεταγραφή του γονιδίου της κίτρινης φθορίζουσας πρωτεΐνης *YFP*, το οποίο βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *ROSA26* (***ROSA26_YFP^{stop/stop}***). Στα ζώα αυτά η δράση της Cre ρεκομπινάσης οδηγεί σε έκφραση της πρωτεΐνης *YFP* (Srinivas *et al.*, 2001).
- 4) Ποντίκια που εμφανίζουν απώλεια δράσης του γονιδίου *Rac3* (***Rac3^{-/-}***) (Corbetta *et al.*, 2005).
- 5) Ποντίκια στα οποία εκφράζεται η Cre ρεκομπινάση υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *Nkx2.1* (Kessaris *et al.*, 2006).
- 6) Ποντίκια στα οποία εκφράζεται η Cre ρεκομπινάση υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *Lxh6*. (εργαστήριο Βασίλη Πάχνη, NIMR-MRC, Mill Hill, London).

Ο προσδιορισμός του γονοτύπου των ζώων έγινε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Η ημέρα της σύλληψης θεωρήθηκε η εμβρυϊκή ημέρα 0.5 (E0.5). Τα έγκυα ζώα θυσιάστηκαν με αποσύνδεση της σπονδυλικής τους στήλης (cervical dislocation) ενώ τα ποντίκια σε μετεμβρυϊκή ηλικία (P0-P5) θυσιάστηκαν με αποκεφαλισμό. Τα έμβρυα και οι ιστοί συλλέχθησαν σε φωσφορικό διάλυμα PBS (*Phosphate Buffer Saline*: 400mM Na_2HPO_4 , 50mM NaH_2PO_4 , 1.5M NaCl).

2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων.

Ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων (*E.coli*, στέλεχος DH10b) έγινε με την μέθοδο της εφαρμογής ηλεκτρικού ρεύματος (electroporation). Σε κύτταρα δεκτικά να υποστούν μετασχηματισμό (electrocompetent) προστίθεται το DNA που χρησιμοποιείται για τον μετασχηματισμό και στην συνέχεια τα κύτταρα τοποθετούνται σε ειδική κρύα κυψελίδα στην οποία γίνεται το electroporation (2000V για 5msec).

Στα κύτταρα προστίθενται ~800μl 2xYT και αφήνονται να επωαστούν για 1 ώρα στους 37°C. Τα κύτταρα στην συνέχεια απλώνονται σε τριβλίο με θρεπτικό υλικό που φέρει το κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη 15μg/ml) για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.

2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini prep).

Για την παρασκευή σε μικρή κλίμακα υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης (alkaline lysis), σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους (Sambrook *et al.*, 1989). Η μέθοδος αυτή αποδίδει υψηλής καθαρότητας και σχετικά μεγάλες ποσότητες πλασμιδιακού DNA, κατάλληλο για ανάλυση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (maxi prep).

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Nucleobond Xtra Midi kit της εταιρίας Nucleobond, σύμφωνα με τις οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρίας.

2.4 Απομόνωση γενωμικού DNA από ιστούς.

Για την απομόνωση γενωμικού DNA, οι ιστοί (ουρές ποντικών) επωάζονται για 14-16 ώρες στους 55°C σε 400 ml διαλύματος tail lysis buffer (100mM NaCl, 10mM Tris pH8, 25mM EDTA, 0.5% SDS). Στην συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, συλλογή του υπερκειμένου και προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης. Στην συνέχεια το DNA κατακρημνίζεται, η πελέτα καθαρίζεται με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε dH₂O.

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από ουρές εμβρύων, οι ιστοί επωάζονται για 1 ώρα σε 22 μl quick tail lysis buffer (50mM Tris pH8, 2mM NaCl, 10mM EDTA, 0.1%SDS) και 2μl πρωτεΐνάση K. Στην συνέχεια τοποθετούνται για 5 λεπτά στους 95°C, προστίθενται 76μl dH₂O και 1 μl από το μίγμα χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την αντίδραση PCR.

2.5 Πέψη μορίων DNA με ένζυμα περιορισμού.

Για την περιοριστική πέψη μορίων χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα των εταιριών Minotech και New England Biolabs και οι πέψεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρίας.

2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).

Για τον προσδιορισμό του γονοτύπου των ποντικών χρησιμοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Στους παρακάτω πίνακες αναφέρονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση καθώς και τα προγράμματα των αντιδράσεων. Οι εκκινητές δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ηρακλείου Κρήτης.

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 Rac3</i>	
Rac3- Fw1	5'- CATTTCTGTGGCGTCGCCAAC-3'
Rac3-R2	5'- CACGCGGCCGAGCTGTGGTG-3'
Rac3-R3	5' – TTGCTGGTGTCCAGACCAAT-3'
<i>Εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την αντίδραση Lhx6_Cre</i>	
iCre-250	5'- GAGGGACTACCTCCTGTATC-3'
iCre-880	5'- TGCCCAGAGTCATCCTTGGC-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 YFP-Stop</i>	
Rosa26-Lc	5'- GCTCTGAGTTGTTATCAGTAAGG-3'
Rosa26-R2	5'- GCGAAGAGTTTGTCTCAACC-3'
Rosa26-R3	5'- GGAGCGGGAGAAATGGATATG-3'

Αντίδραση PCR	Πρόγραμμα αντίδρασης
<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. 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.
<u>Lhx6 iCre</u>	3 λεπτά στους 94°C, 32 κύκλοι από 30'' στους 94°C, 30'' στους 59°C και 1 λεπτό στους 72°C ακολουθούμενοι από 5 λεπτά στους 72°C. Διατήρηση της αντίδρασης στους 4°C.
<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.

Σε κάθε περίπτωση οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις παρακάτω συνθήκες: 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.

3. ΒΑΣΙΚΕΣ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Μονιμοποίηση και έγκλιση ιστών.

Η μονιμοποίηση απομονωμένων εγκεφάλων ποντικών έγινε σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 4%, για χρονικό διάστημα από 10 έως 18 ώρες. Στην συνέχεια οι μονιμοποιημένοι ιστοί επάζονται σε διάλυμα σουκρόζης 30% σε PBS για 14-16 ώρες για κρυοπροστασία και την διαδικασία αυτή ακολουθεί έγκλισή τους σε διάλυμα ζελατίνης 7.5%-σουκρόζης 15%. Τέλος, οι ιστοί κόβονται σε κρυοτόμο, σε θερμοκρασία -28°C, σε τομές πάχους 12μm (για τα έμβρυα) ή 14 μm (ιστοί ποντικών σε μετεμβρυϊκή ηλικία).

3.2 Ιστοχημικές χρώσεις – χρώση Cresyl Violet.

Τομές κρυοτόμου ενυδατώνονται, εμβαπτίζοντάς τις σε νερό, και στην συνέχεια βάφονται με διάλυμα 1% cresyl violet και 1% θειονίνη για 10 λεπτά. Ακολουθεί αφυδάτωση των τομών με την διαδοχική εμβάπτισή τους σε διαλύματα EtOH από 70% ως 100%, για 5 λεπτά το καθένα. Τέλος εμβαπτίζονται σε ξυλένιο (3x5 λεπτά), καλύπτονται με Entellan και παρατρώνται σε στερεοσκόπιο.

3.3 Ανοσοϊστοχημεία.

Η ανοσοϊστοχημεία σε κρυοτομές πραγματοποιήθηκε ως εξής: Οι τομές πλύθηκαν με PBS και ακολούθησε επώαση 1 ώρας σε διάλυμα 1% FBS σε PBS, ώστε να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης του αντισώματος. Στην συνέχεια επώαστηκαν με το/τα πρωτογενή αντισώματα αραιωμένα σε διάλυμα αντισώματος (0.1% FBS, 0.1% Triton X-100 σε PBS) στους 4°C ο/ν. Ύστερα από 3 δεκάλεπτα πλυσίματα με PBT (0.1% Triton X-100 σε PBS), οι τομές επώαστηκαν με το/τα δευτερογενή αντισώματα αραιωμένα σε διάλυμα αντισώματος. Σε περιπτώσεις που πραγματοποιήθηκε πυρηνική χρώση, αυτή έγινε με επώαση των τομών σε διάλυμα τορπο (αραιωμένο 1/1000 σε PBS), ακολουθούμενη από πλυσίματα των τομών (3x10 λεπτά) με PBT. Τέλος οι τομές καλύφθηκαν με διάλυμα mowiol. Τα αντισώματα καθώς και οι αραιώσεις στις οποίες αυτά χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Πρωτοταγή αντισώματα		
<i>Αντίσωμα</i>	<i>Αραίωση</i>	<i>Τύπος αντισώματος</i>
rabYFP	1:2500	Πολυκλωνικό (rabbit)
mYFP	1:500	Μονοκλωνικό (mouse IgG)
ratYFP	1:1000	Μονοκλωνικό (rat IgG2)
aLhx6	1:200	Πολυκλωνικό (rabbit)
Δευτεροταγή αντισώματα		
<i>Αντίσωμα</i>	<i>Αραίωση</i>	
Anti-mouse IgG, Alexa 488 (Molecular Probes)	1/800	
Anti-mouse IgG, Alexa 555 (Molecular Probes)	1/800	
Anti-rabbit IgG, Alexa 488 (Molecular Probes)	1/800	
Anti-rabbit IgG, Alexa 555 (Molecular Probes)	1/800	
Anti-rat IgG, Alexa 488 (Molecular Probes)	1/800	
Anti-rat IgG, Alexa 555 (Molecular Probes)	1/800	

3.4 In situ υβριδοποίηση.

3.4.1 Παρασκευή ανιχνευτών

Για την δημιουργία των ανιχνευτών (probes) χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια που παραθέτονται στον παρακάτω πίνακα. Η γραμμοποίηση των πλασμιδίων έγινε με τα κατάλληλα

περιοριστικά ένζυμα. Ακολούθησε καθαρισμός, κατακρήμνιση και τέλος επαναδιάλυση των γραμμοποιημένων πλασμιδιακών φορέων σε TE, ώστε η τελική τους συγκέντρωση να είναι 1μg/μl.

Μόριο	Πλασμιδιακός Φορέας	Μη νοηματικό RNA (antisense RNA)		Νοηματικό RNA (sense RNA)	
		Ένζυμο	Πολυμεράση	Ένζυμο	Πολυμεράση
SST		EcoRI	T7		
GAD67	pBS II (KS)	SalI	T7	NotI	T3
NPY		XhoI	T3		
Lhx6	pBluescript	NotI	T3	Xho	T7

Η σήμανση των ανιχνευτών έγινε με *in vitro* μεταγραφή, ως εξής: Σε σωληνάκια eppendorf αναμιγνύονται τα ακόλουθα υλικά με την σειρά που αναφέρονται και η αντίδραση επωάζεται για 3 ώρες στους 37°C:

H ₂ O χωρίς νουκλεάσες	7μl
5x ρυθμιστικό διάλυμα μεταγραφής	4μl
0.1M DTT	2μl
10mM rGTP	1μl
10mM rCTP	1μl
10mM rATP	1μl
10mM rUTP	0.65μl
10mM 11-DIG-UTP	0.35μl
κατατολέας RNασών	1μl
RNA πολυμεράση	1μl
1μg/μl γραμμοποιημένο πλασμιδιακό DNA	1μl

Η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη 2μl DNασηςI και επώαση για 15 λεπτά στους 37°C. Στην συνέχεια το RNA κατακρημνίζεται προσθέτοντας: 90μl EDTA, 12μl LiCl, 360μl EtOH 100%. Μετά από τουλάχιστον 30 λεπτά στους -20°C, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά και επαναδιάλυση του RNA σε TE, σε τελική συγκέντρωση 0.1μg/μl.

3.4.2. Διαδικασία *in situ* υβριδοποίησης σε κρυοτομές.

Η μεθοδος της *in situ* υβριδοποίησης εφαρμόστηκε σε κρυοτομές ως εξής: οι τομές αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί μονιμοποίηση σε διάλυμα 4% PFA σε PBS, για 10 λεπτά. Ακολούθως οι τομές πλένονται με PBS (3x3 λεπτά) και στην συνέχεια επωάζονται σε διάλυμα ακετυλίωσης (4ml τριαιθανολαμίνη, 0.525ml HCl 37%, 0.75ml οξικός ανυδρίτης σε 295ml H₂O) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια οι τομές

πλένονται με PBT (3x5λεπτά) και ακολοθεί επώαση με το διάλυμα προϋβριδοποίησης (50% φορμαμίδιο, 5xSSC, 5xDenharts, 250mg/ml yeast RNA, 500mg/ml herring sperm DNA) για 6 ώρες ή ο/η σε θερμοκρασία δωματίου. Την διαδικασία της προϋβριδοποίησης ακολουθεί η υβριδοποίηση, η οποία γίνεται με επώαση των τομών σε διάλυμα υβριδοποίησης, το οποίο περιέχει 400ng/ml από τον σημασμένο με διοξυγενίνη ανιχνευτή (DIG-RNA) σε διάλυμα προϋβριδοποίησης. Η υβριδοποίηση γίνεται στους 72°C για 14-16 ώρες, και οι τομές καλύπτονται με καλυπτρίδα ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση του διαλύματος.

Την επόμενη ημέρα, οι τομές εμβαπτίζονται σε διάλυμα 5xSSC θερμομασμένο στους 72°C και απομακρύνονται προσεκτικά οι καλυπτρίδες και στην συνέχεια μεταφέρονται σε διάλυμα 0.2xSSC στους 72°C για μια ώρα. Μετά από δυο πεντάλεπτα πλυσίματα με το διάλυμα B1 (0.1M Tris pH7.5, 0.15M NaCl), ακολουθεί επώαση των τομών για μια ώρα με διάλυμα 10% FBS σε B1, για να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης του αντισώματος. Στην συνέχεια οι τομές επωάζονται με πρωτογενές αντίσωμα έναντι της διοξυγενίνης, το οποίο είναι συνδεδεμένο με αλκαλική φωσφατάση (anti-DIG-AP), αραιωμένο 1/5000 σε διάλυμα 1% FBS σε B1, ο/η στους 4°C.

Την επόμενη μέρα οι τομές πλένονται με διάλυμα B1 (3x5 λεπτά) και ακολουθούν 3 δεκάλεπτα πλυσίματα με διάλυμα B2 (0.1M Tris pH9.5, 0.1M NaCl, 50mM MgCl₂), έτσι ώστε να εξισορροπηθεί το pH των τομών. Ακολουθεί επώαση σε χρωμογόνο διάλυμα (75mg/ml NBT, 50 mg/ml BCIP σε B2) στο σκοτάδι, έως ότου αποκτηθεί ικανοποιητική χρώση. Τέλος οι τομές πλένονται σε διάλυμα PBT και καλύπτονται με ζελατίνη/γλυκερόλη.

4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ WESTERN

4.1. Προετοιμασία δειγμάτων- παρασκευή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από τμήματα εγκεφάλου ποντικών.

Αναπτυσσόμενοι εγκέφαλοι από έμβρυα ποντικών (E14.5) απομονώθηκαν. Ακολούθως τα επιθυμητά τμήματα του εγκεφάλου (η περιοχή του MGE όσο το δυνατό απαλλαγμένη από την κοιλιακή ζώνη-ventricular zone) απομονώθηκαν και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα eppendorf. Σε αυτά προστέθηκε διάλυμα λύσης (0.5%TritonX, 150mM NaCl, 10mM Tris-Cl pH7.5, quorofinin, leupeptin, PMSF) και ακολούθησε ομογενοποίηση των ιστών στον πάγο. Στην συνέχεια η ποσότητα της συνολικής πρωτεΐνης υπολογίζεται με την μέθοδο Bradford, και τέλος στο δείγμα προστίθεται ίσος όγκος 2x loading buffer.

4.2. Παρασκευή πήκτωματος πολυακρυλαμίδης- ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (SDS-PAGE).

Για την ανίχνευση της πρωτεΐνης Rac1, η οποία έχει μέγεθος περίπου 21kD χρησιμοποιήσαμε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12%. Κάθε πήκτωμα ακρυλαμίδης για ανάλυση πρωτεϊνών αποτελείται από δύο επιμέρους πήκτώματα, το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel) και το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Αυτά παρασκευάστηκαν ως εξής:

Stacking gel (4ml)

Ρυθμιστικό διάλυμα 1.5 ml

(1M Tris-Cl pH6.8+ 0.4% SDS)

Διάλυμα ακρυλαμίδης 30% 0.9 ml

APS 60 μl

Temed 6 μl

H₂O 3.6 ml

Separating gel 12% (10ml)

Ρυθμιστικό διάλυμα 2.5 ml

(1.5M Tris-Cl pH8.8 + 0.4%SDS)

Διάλυμα ακρυλαμίδης 30% 4 ml

APS 100 μl

Temed 5 μl

H₂O 3.5 ml

Πριν φορτωθούν στο gel, τα πρωτεϊνικά δείγματα θερμαίνονται στους 100°C για 5 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Η συνολική ποσότητα πρωτεΐνης που φορτώνουμε από κάθε δείγμα είναι 90mg. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (25mM Tris base, 192mM γλυκίνη, 0.1% SDS σε H₂O) σε θερμοκρασία δωματίου και στα 60V, έως ότου οι πρωτεΐνες να διαχωριστούν με βάση το μοριακό τους βάρος. Μετά τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών, αυτές μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τάσης 310mA για 1 ώρα σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer: 25mM Tris base, 192mM γλυκίνη 0.1%SDS και 20% μεθανόλη σε H₂O).

4.3. Ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πλένεται με PBS και στην συνέχεια επωάζεται για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα blocking (διάλυμα γάλακτος 5% σε PBS-Tween 0.1%)

για τον αποκλεισμό των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων. Κατόπιν επώάζεται με το πρωτογενές αντίσωμα (aRac1 [*Rac1-CII*, *Santa Cruz*], αραιωμένο 1:100 σε διάλυμα blocking) για 16 ώρες στους 4°C. Ακολουθούν 3 δεκάλεπτες πλύσεις με PBST και επώαση με το δευτερεύον αντίσωμα, το οποίο είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση (anti-rabbit HRP, 1/1000 σε διάλυμα blocking), για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια η μεμβράνη πλένεται 3 φορές με PBST και τέλος οι ανοσοεντοπιζόμενες πρωτεϊνικές ζώνες ανιχνεύονται μέσω του συστήματος ενισχυμένης φωταύγειας ECL, σε ακτινογραφικό φιλμ και για χρόνο που εξαρτάται από την ένταση του σήματος.

5. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

Η παρατήρηση των φθορίζόντων δειγμάτων καθώς και η λήψη των εικόνων τους έγιναν σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS-NT Laser Scanning. Οι κρυτομές (ιστολογικές χρώσεις- *in situ* υβριδοποιήσεις) παρατηρήθηκαν και φωτογραφήθηκαν σε στερεοσκόπιο Leica MZ12.

Αποτελέσματα

A. ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ *Rac1* ΑΠΟ *Lhx6_Cre* ΠΟΝΤΙΚΙΑ.

Για να επιτύχουμε τη στοχευμένη απενεργοποίηση του *Rac1* στους μεταμιτωτικούς ενδονευρώνες του φλοιού, χρησιμοποιήσαμε μια διαγονιδιακή σειρά ποντικών στα οποία το γονίδιο της Cre ρεκομπινάσης βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του *Lhx6* γονιδίου (*Lhx6_Cre*). Ο παράγοντας *Lhx6* εκφράζεται από τους μεταμιτωτικούς ενδονευρώνες, καθώς αυτοί εξέρχονται από την ζώνη πολλαπλασιασμού (ventricular zone) του MGE.

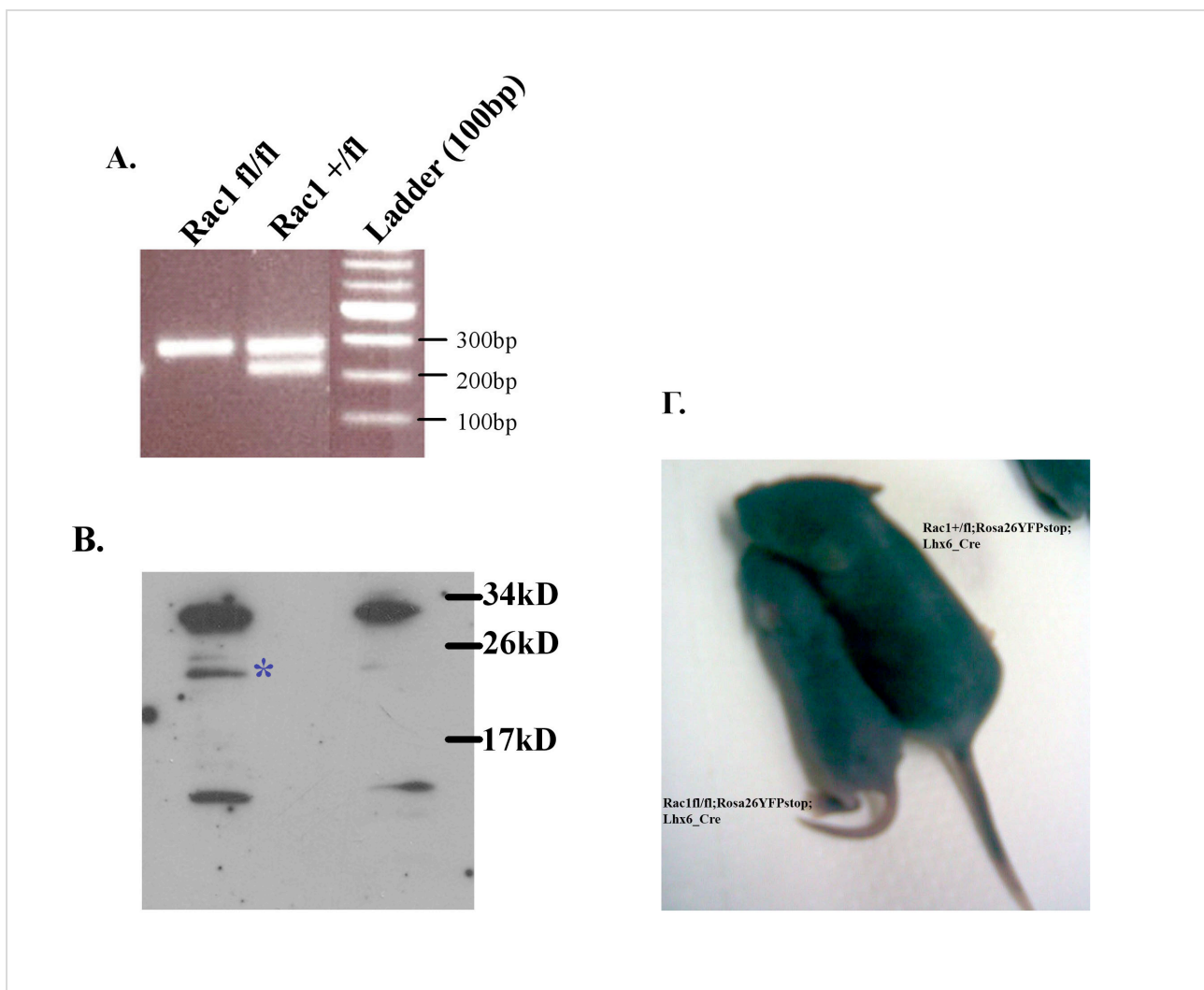
Τα *Rac1* ελλειμματικά ζώα δημιουργήθηκαν ως εξής: Αρχικά διασταυρώθηκαν ποντίκια γονοτύπου *Rac1^{fl/fl};Rosa26YFPstop* με *Rosa26YFPstop;Lhx6_Cre* ζώα. Οι απόγονοι της διασταύρωσης αυτής έχουν γονότυπο *Rac1^{+fl};Rosa26YFPstop;Lhx6_Cre*. Διασταυρώνοντας αυτά τα άτομα με *Rac1^{fl/fl};Rosa26YFPstop*, προκύπτουν *Rac1* ελλειμματικά ζώα (*Rac1^{fl/fl};Rosa26YFPstop;Lhx6_Cre*) αλλά και ετερόζυγα ζώα (*Rac1^{+fl};Rosa26YFPstop;Lhx6_Cre*), τα οποία χρησιμοποιούνται ως πειραματικό control. Η παρουσία του διαγονιδίου *Rosa26YFPstop* έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση της φθορίζουσας πρωτεΐνης YFP στα κύτταρα στα οποία εκφράζεται η Cre ρεκομπινάση.

Ο προσδιορισμός του γονοτύπου των ζώων έγινε με PCR (Εικ.1Α). Για να επιβεβαιώσουμε την απουσία της *Rac1* πρωτεΐνης στα *Rac1* ελλειμματικά ζώα απομονώσαμε από έμβρυα ηλικίας E14.5 την περιοχή του MGE αφαιρώντας από αυτήν τη ζώνη πολλαπλασιασμού (ventricular zone). Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα του ιστού χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της πρωτεΐνης *Rac1* με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικ1Β). Παρατηρούμε την παρουσία μιας ζώνης στα control άτομα, η οποία ανιχνεύεται ελάχιστα στα *Rac1^{fl/fl};Rosa26YFPstop;Lhx6_Cre*. Η ζώνη αυτή αντιστοιχεί στο κατάλληλο μοριακό βάρος (21 kD). Οι επιπλέον ζώνες που εμφανίζονται πιθανώς οφείλονται σε μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος. Η χαμηλή ζώνη (~15kD) μπορεί επίσης να οφείλεται σε αναγνώριση κάποιας αποικοδομημένης μορφής (degradation product) της *Rac1*.

Τα *Rac1^{fl/fl};Rosa26YFPstop;Lhx6_Cre* γεννιούνται σε αναμενόμενες μενδελικές αναλογίες, αλλά πεθαίνουν στα πρώτα μετεμβρυϊκά στάδια. Συγκεκριμένα, τα περισσότερα ζώα ($n=12$) πεθαίνουν μέχρι την έβδομη ημέρα μετά την γέννηση (P7) ενώ σε μια μόνο περίπτωση δυο άτομα επιβίωσαν ως και την 20 ημέρα (P20). Τέλος, τα *Rac1* ελλειμματικά ζώα είναι μικρότερα σε μέγεθος σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες (*Rac1^{+fl};Rosa26YFPstop;Lhx6_Cre*) (Εικ.1Γ). Παρά τη μεγάλη διαφορά στο μέγεθος, οι εγκέφαλοι των *Rac1* ελλειμματικών ζώων δεν είναι σημαντικά μικρότεροι σε σχέση με των *Rac1^{+fl};Rosa26YFPstop;Lhx6_Cre* ποντικών (Εικ. 3)

Όπως θα συζητήσουμε παρακάτω, η θνησιμότητα των εν λόγω ζώων φαίνεται να μην προκύπτει από την απώλεια της *Rac1* στους ενδονευρώνες του φλοιού, η ανάπτυξη των οποίων δεν

επηρεάζεται. Έτσι είναι πιθανό να οφείλεται στην απώλεια της Rac1 σε κάποιον από τους άλλους ιστούς στους οποίους εκφράζεται ο παράγοντας Lhx6, όπως τα βραγχιακά τόξα ή ο υποθάλαμος. Η απώλεια της Rac1 στον υποθάλαμο μπορεί να σχετίζεται επίσης με το μικρότερο μέγεθος των ζώων καθώς η δομή αυτή είναι υπεύθυνη για την έκφραση πολλών ορμονών ανάπτυξης (growth hormones). Τέλος δεν μπορεί να αποκλειστεί η έκτοπη έκφραση της Cre ρεκομπινάσης σε άλλους ιστούς πλην του νευρικού από τα συγκεκριμένα διαγονιδιακά ζώα (Lhx6_Cre). Ο χαρακτηρισμός αυτής της διαγονιδιακής σειράς σε σχέση με την έκφραση της Cre σε άλλους ιστούς δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμη (εργαστήριο Βασίλη Πάχνη, NIMR-MRC, Mill Hill, London).



Εικόνα 1: Στοχευμένη απενεργοποίηση του Rac1 από τα Lhx6_Cre ποντίκια. **A)** Γονοτυπική ανάλυση με αντίδραση PCR. Από τα ετερόζυγα άτομα για τον Rac1 τύπο προκύπτουν δυο ζώνες, με μεγέθη 250 και 300bp. Το ομόζυγο Rac1^{fl/fl} εμφανίζει μια μόνο ζώνη, στα 300bp. **B)** Ανάλυση κατά Western για τον εντοπισμό της Rac1 πρωτεΐνης στην περιοχή του MGE εμβρύων ηλικίας E14.5. Το πείραμα αυτό επιβεβαιώνει την απουσία της Rac1 στα Rac1^{fl/fl}; Lhx6_Cre ζώα. Η ζώνη της πρωτεΐνης Rac1 σημειώνεται με αστερίσκο (≈21 kD). **Γ)** Τα Rac1^{fl/fl}; Rosa26YFPstop; Lhx6_Cre είναι πολύ μικρότερα σε μέγεθος από τα ποντίκια-μάρτυρες, σε ηλικία P5.

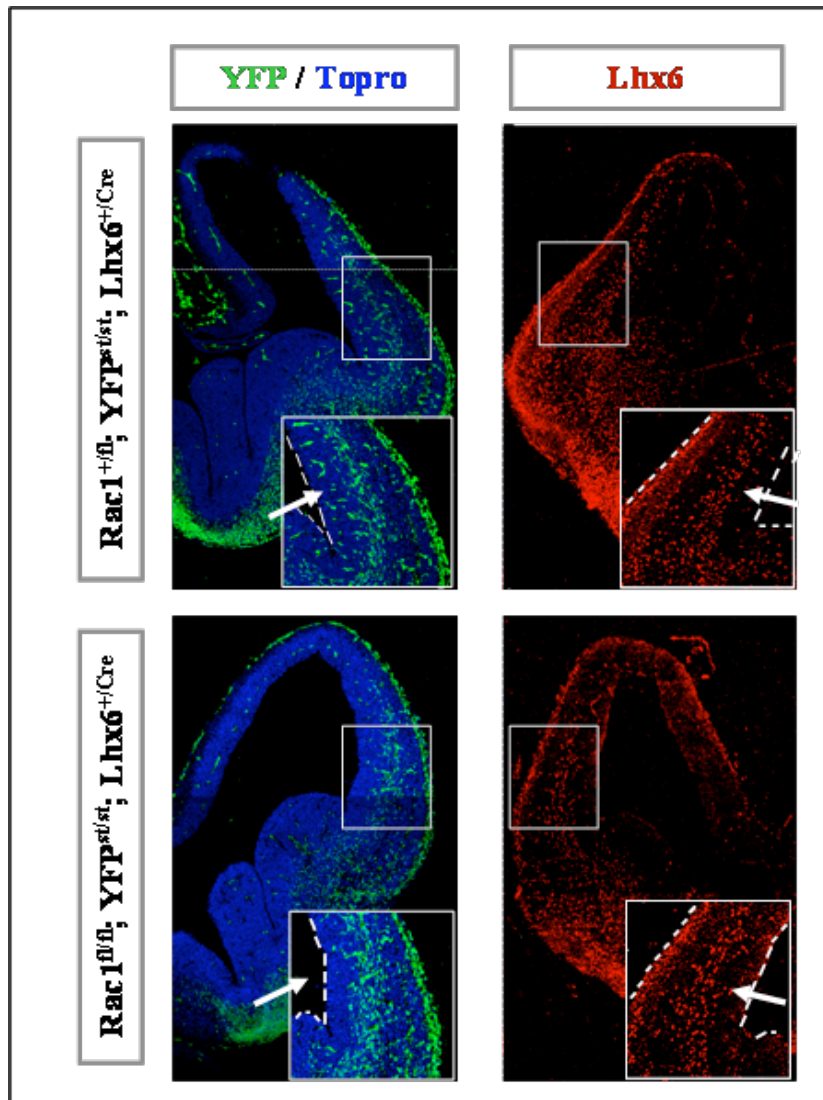
Πριν περάσουμε στην ανάλυση της ανάπτυξης των ενδονευρώνων στα παραπάνω ποντίκια, θα αναφέρουμε συνοπτικά τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει από τη μέχρι στιγμής ανάλυση των *Rac1^{fl/fl};Rosa26YFPstop;Nkx2.1_Cre* ζώων. Σε αυτά, η Rac1 απενεργοποιείται στα μιτωτικά πρόδρομα των MGE προερχόμενων ενδονευρώνων του φλοιού. Την εμβρυϊκή ημέρα E14.5 ένας σημαντικός αριθμός ενδονευρώνων έχει φύγει από τη περιοχή του MGE και ακολουθεί οριζόντια μεταναστευτική πορεία. Στα *Rac1^{fl/fl};Rosa26YFPstop;Nkx2.1_Cre* δεν εμφανίζονται μεταναστευτικοί νευρώνες στο φλοιό. Αντίθετα, τα κύτταρα αυτά παραμένουν στην περιοχή του MGE. Αργότερα, κατά την ημέρα E17.5 παρατηρείται καθυστερημένη μετανάστευση των ενδονευρώνων. Τέλος, στο φλοιό ζώων την ημέρα P0 καθώς και στα ενήλικα άτομα οι αριθμοί των ενδονευρώνων είναι σημαντικά μειωμένοι, περίπου στο 50% (Βιδάκη Μ., Καραγωγέως, Δ., μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).

A.1. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΟΥ ΦΛΟΙΟΥ ΣΤΑ *Rac1^{fl/fl};Rosa26YFPstop; Lhx6_Cre* ΠΟΝΤΙΚΙΑ.

Αρχικά θελήσαμε να ελέγξουμε αν πραγματοποιείται η οριζόντια μετανάστευση των GABAεργικών ενδονευρώνων στα *Rac1^{fl/fl};Rosa26YFPstop; Lhx6_Cre* ζώα ή αν και τα ζώα αυτά εμφανίζουν καθυστέρηση. Για τον σκοπό αυτό μελετήσαμε έμβρυα ημέρας E13.5. Η παρουσία μεταναστευτικών κυττάρων εξετάστηκε με ανοσοϊστοχημεία σε τομές τελεγκεφάλου χρησιμοποιώντας αντισώματα ενάντια στις πρωτεΐνες YFP και Lhx6. Τα μόρια αυτά χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες των ενδονευρώνων κατά τη μετανάστευση. Ο παράγοντας Lhx6 εκφράζεται, όπως έχουμε αναφέρει, από τους ενδονευρώνες μετά την έξοδό τους από τον τελευταίο κυτταρικό κύκλο και η έκφρασή του συνεχίζει και αργότερα. Η πρωτεΐνη YFP εκφράζεται από όλα τα Lhx6 θετικά κύτταρα εξαιτίας της δράσης της Cre ρεκομπινάσης. Όπως φαίνεται στην εικόνα 2, το πρότυπο μετανάστευσης των Rac1 ελλειμματικών ενδονευρώνων δεν παρουσιάζει κάποια διαφοροποίηση σε σχέση με τα control. Στον αναπτυσσόμενο φλοιό τόσο των *Rac1^{fl/fl};Rosa26YFPstop; Lhx6_Cre* όσο και των *Rac1^{+/fl};Rosa26YFPstop; Lhx6_Cre* εντοπίζεται πλήθος μεταναστευτικών κυττάρων, όπως μαρτυρά η παρουσία YFP-θετικών και Lhx6-θετικών κυττάρων (Εικ.2). Έτσι λοιπόν τα *Rac1^{fl/fl};Rosa26YFPstop; Lhx6_Cre* δεν εμφανίζουν καθυστερημένη μετανάστευση στους ενδονευρώνες του φλοιού.

Παρατηρούμε ότι η πρωτεΐνη YFP εκφράζεται και από τα αγγεία που βρίσκονται διάσπαρτα στο φλοιό. Κάτι τέτοιο έχει αναφερθεί ξανά για τη συγκεκριμένη Cre διαγονιδιακή σειρά και

πιθανώς να οφείλεται σε έκφραση είτε του Lhx6 είτε του Cre διαγονιδίου στο αναπτυσσόμενο αγγειακό σύστημα (Fogarty *et al.*, 2007).

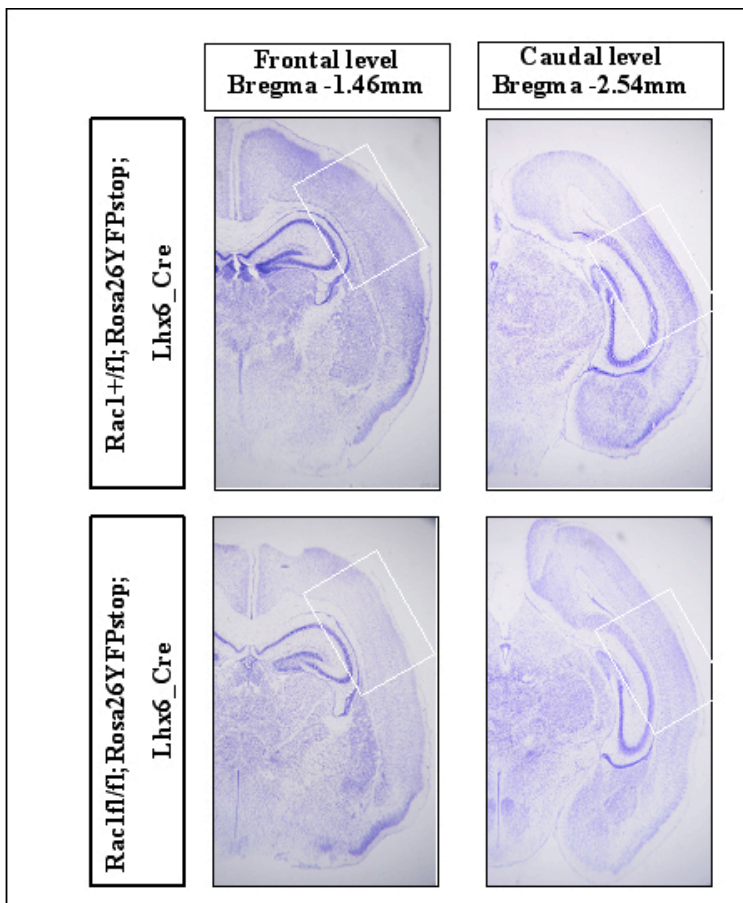


Εικόνα2: Μετανάστευση των ενδονευρώνων στα *Rac1^{fl/fl};Rosa26YFPstop;Lhx6_Cre* ποντίκια. Ανοσοϊστοχημεία για τους παράγοντες Lhx6 και YFP σε τομές εγκεφάλου εμβρύων ηλικίας E13.5. Τόσο στα *Rac1* ελλειμματικά όσο και στα control ζώα εντοπίζονται μεταναστευτικά κύτταρα στο φλοιό, όπως φαίνεται στα μεγενθυμένα τετράγωνα.

Α.2. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΑΡΙΘΜΟΙ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΩΝ ΣΤΟ ΦΛΟΙΟ ΤΩΝ RAC1 ΕΛΛΕΙΜΑΤΙΚΩΝ ΖΩΩΝ.

Στην συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε αν η απώλεια της *Rac1* έχει κάποια επίδραση στη μορφολογία του ώριμου φλοιού καθώς και στον αριθμό και τη διαφοροποίηση των ενδονευρώνων. Όπως αναφέραμε τα ζώα αυτά πεθαίνουν σύντομα μετά την γέννησή τους και η μελέτη του ώριμου φλοιού δεν είναι εφικτή. Έτσι, η μελέτη μας διεξήχθη στην ηλικία P5, κατά την οποία τα *Rac1* ελλειμματικά ποντίκια ζουν ακόμη. Στην ηλικία αυτή δεν έχουν αποκτηθεί όλα τα χαρακτηριστικά των ώριμων ενδονευρώνων, όπως η έκφραση όλων των μορίων και η ολοκλήρωση

της συνδεσμολογίας. Παρόλα αυτά η μετανάστευση έχει ολοκληρωθεί και η μορφολογία και η κατανομή των ενδονευρώνων στο φλοιό είναι όμοια με το ενήλικο άτομο. Η μορφολογία του εγκεφάλου των *Rac1* ελλειμματικών ζώων δεν παρουσιάζει διαφορά σε σχέση με τα control ζώα. Στην εικόνα 3 παρουσιάζονται ιστολογικές χρώσεις τομών εγκεφάλου (cresyl violet stainings) σε δύο επίπεδα, στα οποία έγιναν και οι μετρήσεις των κυττάρων στα πειράματα που θα αναφέρουμε στη συνέχεια.

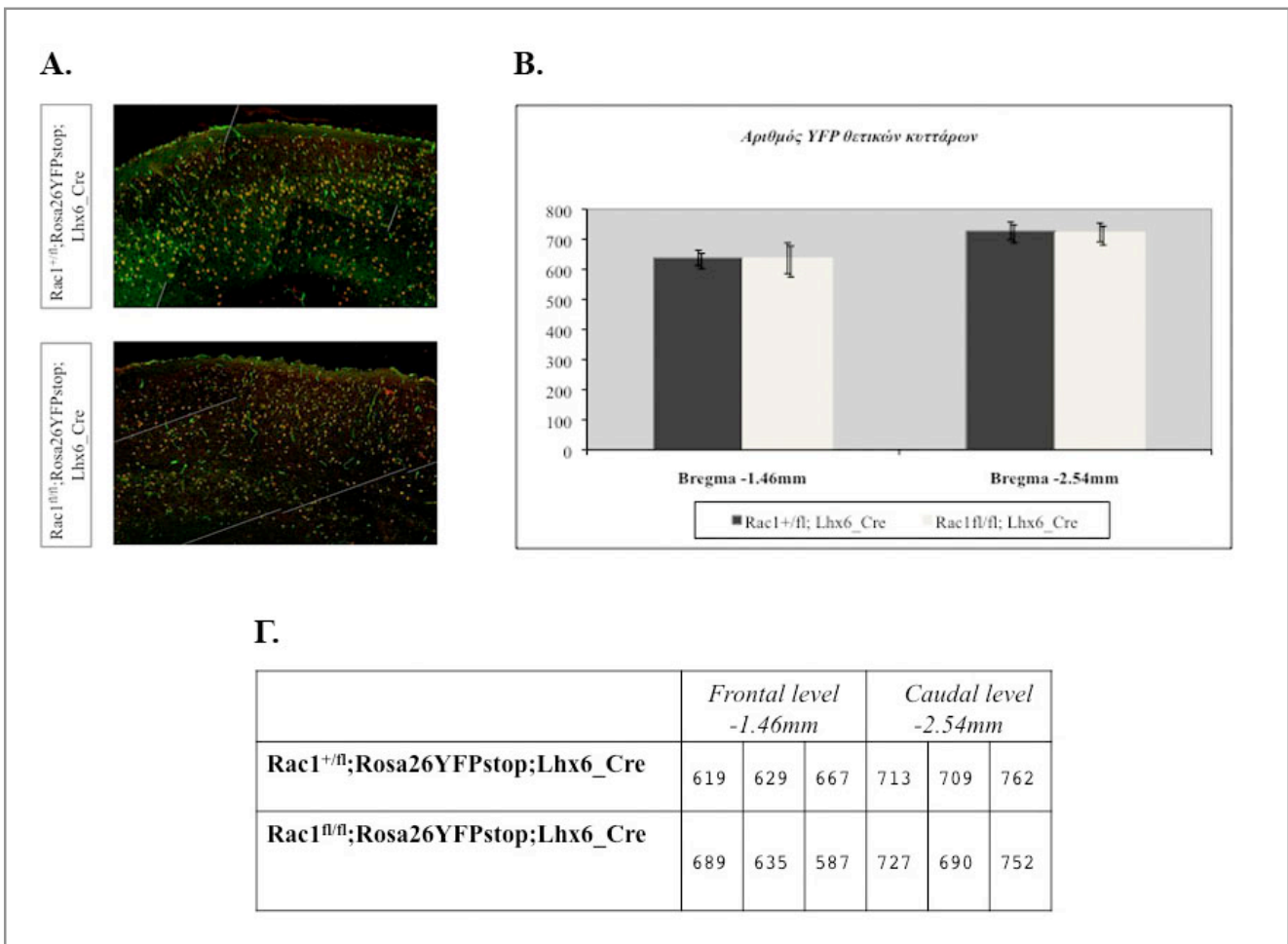


Εικόνα 3: Ιστολογική χρώση τομών εγκεφάλου ηλικίας P5.

Οι εγκεφαλοί των *Rosa^{fl/fl}; Rosa26YFPstop; Lhx6_Cre* ποντικών δεν παρουσιάζουν μορφολογικές διαφορές σε σχέση με των *Rosa^{+/fl}; Rosa26YFPstop; Lhx6_Cre*. Στην εικόνα παρουσιάζονται δυο επίπεδα. Τα επίπεδα αυτά αντιστοιχούν στα βρέγματα -1.46mm και -2.54mm του ενήλικου φλοιού. Η περιοχή στην οποία έγιναν οι μετρήσεις των κυττάρων στα πειράματα ανοσοϊστοχημείας και *in situ* υβριδοποίησης σημειώνεται με λευκό τετράγωνο.

Για τη μελέτη των ενδονευρώνων έγιναν πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε τομές εγκεφάλου και ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα ενάντια στις πρωτεΐνες YFP και Lhx6. Τα μόρια αυτά σημαίνουν όλους τους MGE προερχόμενους ενδονευρώνες. Επιπλέον έγιναν πειράματα *in situ* υβριδοποίησης για την παρουσία Lhx6-, somatostatin- (SST) και GAD67-θετικών κυττάρων. Ο μάρτυρας GAD67 σημαίνει όλα τα κύτταρα που εκφράζουν GABA, και άρα το σύνολο των ενδονευρώνων του φλοιού, ενώ τα SST-θετικά κύτταρα μας δίνουν πληροφορία για τον έναν εκ των δυο υποπληθυσμών ενδονευρώνων. Η parvalbumin (PVA), που αποτελεί μάρτυρα του δεύτερου πληθυσμού δεν μπορούσε να χρησιμοποιηθεί καθώς η έκφρασή της δεν έχει αρχίσει σε αυτήν την ηλικία.

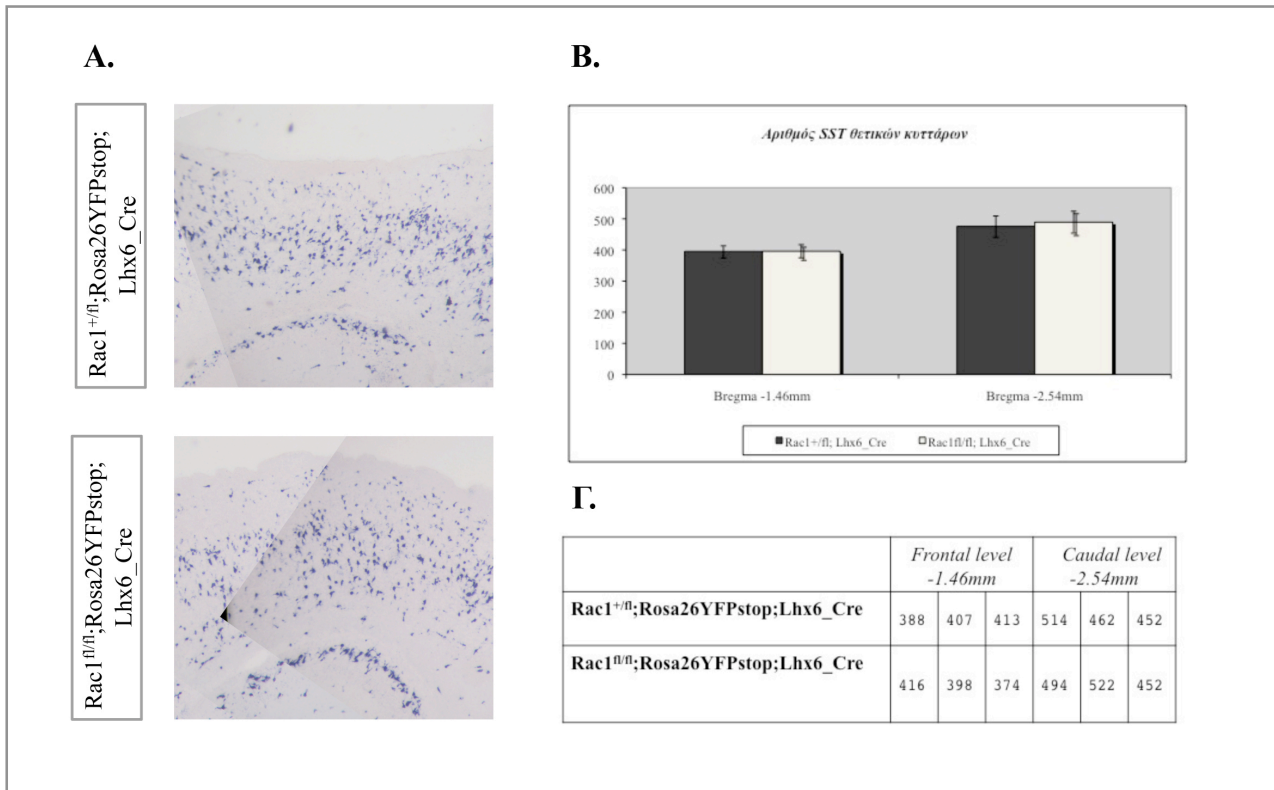
Από την πραγματοποίηση διπλής ανοσοϊστοχημείας για Lhx6 και YFP μπορούμε να υπολογίσουμε την αποτελεσματικότητα της Cre ρεκομπινάσης στα Lhx6_Cre ποντίκια, τουλάχιστον όσον αφορά στον *Rosa26YFPstop* τόπο. Συγκρίνοντας τους αριθμούς των διπλά σημασμένων, Lhx6-θετικών/YFP-θετικών κυττάρων σε σχέση με το σύνολο των Lhx6 θετικών κυττάρων προέκυψε ότι η Cre είναι λειτουργική στο μεγαλύτερο ποσοστό (97%) των Lhx6 κυττάρων. Για τη σύγκριση του αριθμού των ενδονευρώνων στα *Rac1* ελλειμματικά ζώα, έγιναν μετρήσεις του αριθμού των YFP-θετικών κυττάρων σε ισομεγέθεις περιοχές του φλοιού σε δύο επίπεδα. Από τις μετρήσεις αυτές προέκυψε ότι ο συνολικός αριθμός των ενδονευρώνων δεν εμφανίζει διαφορές μεταξύ των *Rac1^{fl/fl};Rosa26YFPstop;Lhx6_Cre* και *Rac1^{+/fl};Rosa26YFPstop;Lhx6_Cre* ποντικίων. (Εικ.4) Το ίδιο αποτέλεσμα προκύπτει και από την *in situ* υβριδοποίηση με μάρτυρα τον GAD67, που επίσης σημαίνει το σύνολο των ενδονευρώνων.



Εικόνα 4: Ο αριθμός των ενδονευρώνων δεν διαφοροποιείται στα *Rac1* ελλειμματικά ζώα σε ηλικία P5. **A)** Ανοσοϊστολογική χρώση για τις πρωτεΐνες YFP (πράσινο) και Lhx6 (κόκκινο) σε περιοχή του φλοιού. Παρατηρούμε ότι τα περισσότερα κύτταρα είναι διπλά σημασμένα Lhx6- και YFP-θετικά. Η περιοχή που παρουσιάζεται είναι η περιοχή στο βρέγμα -1.46mm στην οποία πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις των κυττάρων. **B)** Ιστόγραμμα όπου παρουσιάζεται η μέση τιμή του αριθμού των ενδονευρώνων στα *Rac1*-ελλειμματικά και στα control ζώα. Οι τιμές αυτές

προκύπτουν από μετρήσεις σε τρία ζώα από κάθε γονότυπο. **Γ)** Αριθμοί των YFP-θετικών κυττάρων. Μετρήθηκαν 3 άτομα από κάθε γονότυπο στα δυο επίπεδα.

Για να διερευνήσουμε αν η απώλεια της Rac1 επιδρά στη διαφοροποίηση των ενδονευρώνων στους αντίστοιχους υποπληθυσμούς ελέγξαμε αν υπάρχει διαφορά στον αριθμό των somatostatin-θετικών ενδονευρώνων στα Rac1 ελλειμματικά ζώα. Από τις μετρήσεις του αριθμού των κυττάρων αυτών φαίνεται ότι δεν σημειώνονται μεταβολές μεταξύ των δυο γονοτύπων (Εικ.5).



Εικόνα 5: Ο αριθμός των somatostatin-θετικών ενδονευρώνων δεν διαφοροποιείται στα Rac1 ελλειμματικά ζώα σε ηλικία P5. **A)** *In situ* υβριδοποίηση με μάρτυρα για τη somatostatin. Στην εικόνα φαίνεται τμήμα του φλοιού στο βρέγμα -1.46mm. Στην περιοχή αυτή πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις των κυττάρων. **B)** Ιστόγραμμα όπου παρουσιάζεται η μέση τιμή του αριθμού των ενδονευρώνων στα Rac1-ελλειμματικά και στα control ζώα. Οι τιμές αυτές προκύπτουν από μετρήσεις σε τρία ζώα από κάθε γονότυπο. **Γ)** Αριθμοί των SST-θετικών κυττάρων που μετρήθηκαν. Μετρήθηκαν 3 άτομα από κάθε γονότυπο στα δυο επίπεδα.

Ο πληθυσμός των somatostatin-θετικών ενδονευρώνων αποτελεί το 35%- 40% περίπου του συνόλου των MGE-προερχόμενων ενδονευρώνων, και ως εκ τούτου των Lhx6 θετικών κυττάρων (Wichterle *et al.*, 2001; Nery *et al.*, 2002; Fogarty *et al.*, 2007). Το ποσοστό αυτό επιβεβαιώνεται και από τα δικά μας πειράματα, συγκρίνοντας τους αριθμούς των Lhx6- και somatostatin-θετικών κυττάρων που προκύπτουν από τις *in situ* υβριδοποιήσεις.

Η ίδια ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε αυτή την ηλικία, έγινε και σε ζώα ηλικίας P0, απ' όπου και προέκυψαν τα ίδια αποτελέσματα. Το σύνολο των μετρήσεων για όλους τους μάρτυρες και στις δύο ηλικίες παρατίθεται στο παράρτημα 1. Από αυτές συμπεραίνουμε ότι η απώλεια της Rac1 στους μεταμιτωτικούς GABAεργικούς ενδονευρώνες, μέσω του Lhx6_Cre, δεν έχει επίδραση στη μετανάστευση ή τη διαφοροποίησή τους.

B. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΠΛΑ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΙΚΩΝ RAC1/RAC3 ΖΩΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΟΥ ΦΛΟΙΟΥ.

Από την παρούσα εργασία προέκυψαν επίσης ορισμένα αρχικά αποτελέσματα σχετικά με την λειτουργική συμπλήρωση του ρόλου της Rac1 από την Rac3. Για την προσέγγιση αυτού του ερωτήματος δημιουργήθηκαν διπλά ελλειμματικά ζώα.

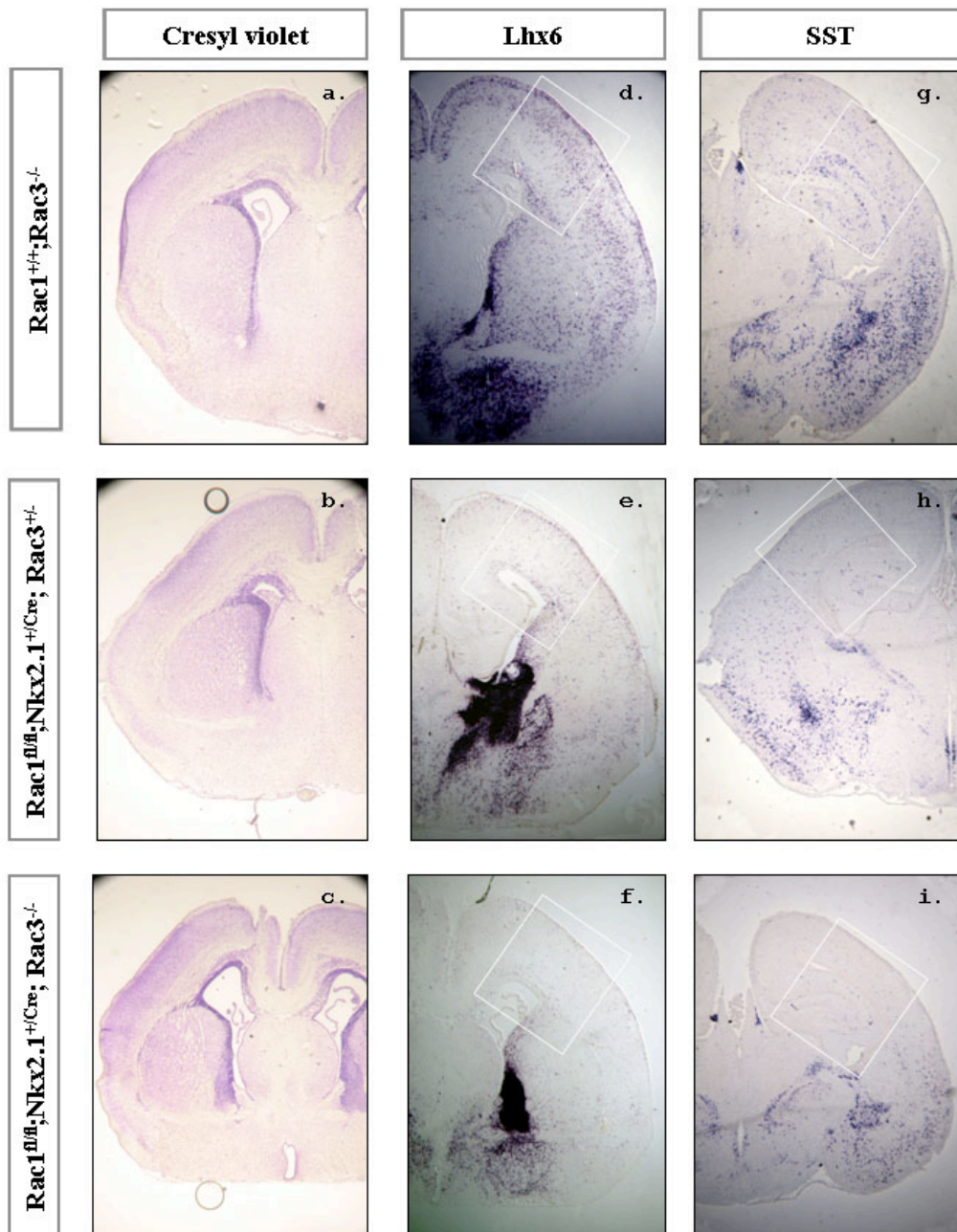
Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν ζώα στα οποία η Cre ρεκομπινάση εκφράζεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *Nkx2.1*. Η διασταύρωση που πραγματοποιήθηκε για την απόκτηση διπλά ελλειμματικών ζώων είναι *Rac1^{fl/fl}; Rosa26YFPstop; Nkx2.1_Cre; Rac3^{+/-}* με *Rac1^{fl/fl}; Rosa26YFPstop; Rac3^{-/-}* ποντίκια. Από την διασταύρωση αυτή προκύπτουν τόσο διπλά ελλειμματικά όσο και μονά ελλειμματικά ζώα για την κάθε Rac GTPάση.

Στη συνέχεια πρόκειται να αναφερθούμε σε αποτελέσματα από ένα μόνο άτομο, ηλικίας P0, το οποίο φέρει έλλειμμα και στα δύο μόρια. Παρότι το δείγμα είναι πολύ μικρό και όχι αρκετό για την εξαγωγή συμπερασμάτων, προκύπτουν ενδείξεις που συνηγορούν υπέρ της ύπαρξης λειτουργικής συμπλήρωσης ανάμεσα στις Rac1 και Rac3. Ως control χρησιμοποιήθηκαν άτομα που φέρουν έλλειμμα σε κάθε ένα από τα δύο μόρια.

Αρχικά διερευνήθηκε η μορφολογία του τελεγκεφάλου στα διπλά ελλειμματικά *Rac1^{fl/fl}; Rosa26YFPstop; Nkx2.1_Cre; Rac3^{-/-}* ζώα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 6 (Εικ.6, a-c) ο τελεγκεφάλος των *Rac1^{fl/fl}; Rosa26YFPstop; Nkx2.1_Cre; Rac3^{-/-}* ζώων είναι σημαντικά μικρότερος σε μέγεθος σε σχέση με τα control. Επιπρόσθετα, οι κοιλίες είναι μεγαλύτερες ενώ ο φλοιός είναι πιο λεπτός.

Στα ζώα αυτά πραγματοποιήθηκε *in situ* υβριδοποίηση με μάρτυρες για τα μόρια Lhx6 και SST, ενώ δεν ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί ανοσοϊστοχημεία για τη πρωτεΐνη YFP, καθώς τα άτομα δεν έφεραν το Rosa26YFPstop αλληλόμορφο. Τα *Rac1^{fl/fl}; Rac3^{-/-}* ζώα δεν διαφέρουν από τα αγρίου τύπου στην παρουσία και την κατανομή των Lhx6-θετικών κυττάρων. Αντίθετα, στα Rac1 ελλειμματικά, *Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1_Cre; Rac3^{+/-}* ζώα, παρότι οι ενδονευρώνες εκφράζουν τον παράγοντα Lhx6, δεν μεταναστεύουν και βρίσκονται συγκεντρωμένοι στον βασικό τελεγκεφαλο, στην περιοχή

όπου δημιουργούνται. Στο φλοιό των ζώων αυτών παρατηρείται σημαντική μείωση του αριθμού των Lhx6-θετικών κυττάρων (Εικ.6, d-e). Ο φαινότυπος αυτός εμφανίζεται αρκετά εντονότερος στο $Rac1^{fl/fl}; Rosa26YFPstop; Nkx2.1_{Cre}; Rac3^{-/-}$ τελεγκέφαλο. Τα Lhx6-θετικά κύτταρα που βρίσκονται στο βασικό τελεγκέφαλο είναι πολύ περισσότερο συγκεντρωμένα. Επιπλέον ο αριθμός τους στο φλοιό παρουσιάζει ακόμα μεγαλύτερη μείωση (Εικ.6, f, Εικ.7). Τα ίδια αποτελέσματα προκύπτουν και από την μελέτη των SST-θετικών κυττάρων (Εικ.6, g-i, Εικ.7).



Εικόνα 6: Ανάλυση του τελεγκεφάλου στο $Rac1^{fl/fl}; Rosa26YFPstop; Nkx2.1_{Cre}; Rac3^{-/-}$ ζώο. **a-c)** Ιστολογική χρώση τομών εγκεφάλου ηλικίας P0. Η μορφολογία του εγκεφάλου δεν εμφανίζει κάποια διαφορά τόσο στα $Rac3$ ($Rac1^{fl/fl}; Rac3^{-/-}$) όσο και στα $Rac1$ ελλειμματικά ζώα ($Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1_{Cre}; Rac3^{+/-}$) ελλειμματικά ζώα. Στα διπλά ελλειμματικά

Rac1^{fl/fl};Nkx2.1_Cre;Rac3^{-/-} ο εγκέφαλος είναι πολύ μικρότερος και οι κοιλίες πιο μεγάλες. **d-f)** *In situ* υβριδοποίηση με μάρτυρα τον Lhx6. **g-i)** *In situ* υβριδοποίηση με μάρτυρα για τη somatostatin. Τα λευκά τεράγωνα περικλείουν την περιοχή που πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις των κυττάρων.

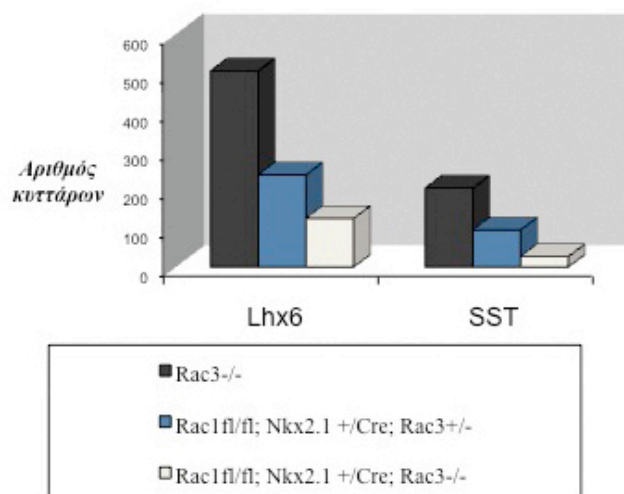
Όπως αναφέραμε στα ζώα αυτά δεν ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί ανσοϊστοχημεία για την YFP. Η σειρά αυτή τροποποιείται ώστε να συμπεριληφθεί το Rosa26YFPstop αλληλόμορφο. Η πιθανή παρουσία YFP-θετικών κυττάρων είναι κάτι που πρέπει να διερευνηθεί στα διπλά ελλειμματικά ζώα, καθώς υπάρχουν δύο πιθανότητες. Η μια είναι ορισμένα από τα κύτταρα που ανιχνεύονται στο φλοιό να είναι YFP-θετικά και άρα Rac1 ελλειμματικά. Εναλλακτικά, δεν μπορεί να αποκλειστεί τα κύτταρα που εντοπίζονται στο φλοιό να είναι YFP-αρνητικά. Η πιθανότητα αυτή δεν είναι αμελητέα καθώς η Cre ρεκομπινάση μέσω της σειράς Nkx2.1_Cre δεν εκφράζεται σε ένα μικρό σχετικά τμήμα στην ραχιαία περιοχή του MGE (Fogarty *et al.*, 2007). Έτσι είναι πιθανό ενδονευρώνες από εκείνη την περιοχή, και άρα φυσιολογικοί για Rac1 να είναι αυτοί που εντοπίζονται στο φλοιό.

Στην εικόνα 7 φαίνονται οι αριθμοί των κυττάρων που μετρήθηκαν σε κάθε περίπτωση. Όπως αναφέραμε, πρέπει να έχουμε υπ' όψιν ότι οι τιμές αυτές προέρχονται από ένα άτομο για κάθε γονότυπο και δεν μπορούμε να βασιστούμε σε αυτές για να οδηγηθούμε σε συμπεράσματα. Παρατηρώντας παρ' όλα αυτά τους αριθμούς, βλέπουμε τα εξής: Τα Rac3^{-/-} ζώα εμφανίζονται φυσιολογικά σε σχέση με τη μετανάστευση και διαφοροποίηση των ενδονευρώνων. Στα μονά, Rac1 ελλειμματικά ζώα παρατηρείται περίπου 50% μείωση στον αριθμό των κυττάρων και στους δύο μάρτυρες (239/509 για τα Lhx6, 96/205 για τα SST). (Εικ.7A). Στα παραπάνω ζώα ο αριθμός των SST-θετικών κυττάρων είναι περίπου το 40% των Lhx6-θετικών (205/509 για το Rac3^{-/-}, και 96/239 για το Rac1^{fl/fl};Nkx2.1_Cre;Rac3^{-/-}). Στα διπλά ελλειμματικά ζώα, Rac1^{fl/fl};Nkx2.1_Cre; Rac3^{-/-}, παρατηρείται ακόμα μεγαλύτερη μείωση στον αριθμό των κυττάρων στο φλοιό. Η μείωση αυτή είναι της τάξης του 75% για τα Lhx6-θετικά και 85% για τα SST-θετικά, με αποτέλεσμα ο SST-θετικός υποπληθυσμός στο ζώο αυτό να αντιστοιχεί στο 20% περίπου του συνολικού αριθμού (27/126).

A.

	<i>Αριθμός Lhx6 κυττάρων</i>	<i>Αριθμός SST κυττάρων</i>
Rac1^{fl/fl};Rac3^{-/-}	509	205
Rac1^{fl/fl};Nkx2.1_Cre;Rac3^{+/-}	239	96
Rac1^{fl/fl};Nkx2.1_Cre;Rac3^{-/-}	126	27

B.



Εικόνα 7: Μειωμένοι αριθμοί ενδονευρώνων στο φλοιό των διπλά ελλειμματικών ζώων. Α) Στον πίνακα φαίνονται οι αριθμοί των Lhx6- και SST-θετικών κυττάρων που μετρήθηκαν. **Β)** Ιστόγραμμα στο οποίο φαίνονται οι τιμές των κυττάρων σε κάθε γονότυπο.

Συζήτηση

A. ΓΕΝΙΚΑ

Ο φλοιός του τελεγκεφάλου εκτελεί ορισμένες από τις πιο πολύπλοκες και ανώτερες εξελικτικά λειτουργίες του εγκεφάλου των θηλαστικών. Για τα μοναδικά λειτουργικά χαρακτηριστικά του υπεύθυνη είναι εν μέρει η ιδιαιτερότητα της δομικής του οργάνωσης σε στοιβάδες καθώς και η μεγάλη ποικιλομορφία των νευρικών κυττάρων που τον απαρτίζουν.

Οι νευρώνες του φλοιού κατηγοριοποιούνται σε δυο βασικούς πληθυσμούς. Ο πρώτος περιλαμβάνει τους πυραμιδικούς νευρώνες και ο δεύτερος τους μη πυραμιδικούς, GABAεργικούς ενδονευρώνες. Οι τελευταίοι αποτελούν το 20% περίπου του συνολικού αριθμού και δημιουργούν τοπικές ανασταλτικές συνάψεις. Οι GABAεργικοί ενδονευρώνες γεννιούνται στο βασικό τελεγκέφαλο και μεταναστεύουν οριζόντια προς τις τελικές τους θέσεις. Η σημασία αυτών των κυττάρων αντικατοπτρίζεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις οι οποίες προκαλούνται από την απουσία ή τη δυσλειτουργία τους.

Τα μέλη της οικογένειας των Rho GTPασών είναι πολύ σημαντικά σηματοδοτικά μόρια. Λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες και ρυθμίζουν πλήθος κυτταρικών διεργασιών όπως είναι η κυτταρική διαίρεση, η γονιδιακή έκφραση και η κίνηση των κυττάρων μέσω του κυτταροσκελετού. Η μελέτη σε κυτταρικές σειρές έχει βοηθήσει σημαντικά στην αποσαφήνιση του βιοχημικού μηχανισμού μέσω του οποίου οι Rho GTPάσες μεσολαβούν τη δράση τους. Έτσι έχει χαρακτηριστεί ένας μεγάλος αριθμός μορίων (Rho GEFs και GAPs) που ρυθμίζουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια των GTPασών. Αντίθετα, ο *in vivo* ρόλος των GTPασών κατά την ανάπτυξη του νευρικού είναι σχετικά άγνωστος. Αυτό οφείλεται αφενός μεν στην ύπαρξη λειτουργικής συμπλήρωσης (functional compensation) μεταξύ των μελών της οικογένειας, γεγονός που μπορεί να επισκιάζει το ρόλο των μορίων αυτών, αφετέρου δε στην πρόωρη θνησιμότητα των εμβρύων που φέρουν έλλειμμα (germline deletion) για συγκεκριμένες GTPάσες.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνήσει τον ρόλο της GTPάσης Rac1 κατά την ανάπτυξη των GABAεργικών ενδονευρώνων του φλοιού. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήσαμε στοχευμένη απενεργοποίηση του *Rac1* στον εν λόγω κυτταρικό πληθυσμό.

B. Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ RAC1 ΕΙΝΑΙ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΗ ΚΑΤΑ ΤΗ ΦΑΣΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΩΝ.

Για τη διερεύνηση του ρόλου της Rac1 στους ενδονευρώνες του φλοιού χρησιμοποιήθηκε το σύστημα της Cre ρεκομπινάσης ώστε να πραγματοποιηθεί στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου *Rac1*. Η Rac1 απενεργοποιήθηκε τόσο στους μιτωτικούς όσο και στους μετα-μιτωτικούς

ενδονευρώνες χρησιμοποιώντας τις διαγονιδιακές σειρές *Nkx2.1_Cre* και *Lhx6_Cre*, αντίστοιχα. Και στις δυο περιπτώσεις εισάγαμε επιπλέον το διαγονίδιο *Rosa26YFPstop*, σαν ανεξάρτητο μάρτυρα κυτταρικής προέλευσης (lineage marker). Το αλληλόμορφο *Rosa26YFPstop* οδηγεί στην έκφραση της πρωτεΐνης YFP στα κύτταρα στα οποία εκφράζεται η Cre, και ως εκ τούτου σε αυτά που φέρουν έλλειμμα για τη *Rac1*.

Στο πρώτο μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των *Rac1^{fl/fl}; Rosa26YFPstop;Lhx6_Cre* ζώων. Στα ζώα αυτά πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοϊστοχημείας για τα μόρια YFP και *Lhx6*, που αποτελούν μάρτυρες των ενδονευρώνων. Παρατηρήσαμε ότι στο φλοιό εντοπίζονται μεταναστευτικά κύτταρα κατά την ημέρα E13.5. Έτσι συμπεραίνουμε ότι η οριζόντια μετανάστευση σε αυτά τα ζώα ξεκινάει κανονικά. Πραγματοποιώντας τα ίδια πειράματα στην ηλικία P5 δείξαμε ότι ο αριθμός των ενδονευρώνων στο φλοιό δεν εμφανίζει διαφορά στα *Rac1* ελλειμματικά ζώα. Τέλος η διαφοροποίηση των ενδονευρώνων σε υποπληθυσμούς φαίνεται επίσης να μην επηρεάζεται, καθώς ο αριθμός των somatostatin-θετικών κυττάρων, ενός από τους δυο βασικούς υποπληθυσμούς, δεν εμφανίζει διαφορά.

Αντίθετα, η απώλεια της *Rac1* από τα μιτωτικά προγονικά κύτταρα φάνηκε να επιδρά στη μετανάστευση και τη συνολικότερη ανάπτυξη των ενδονευρώνων. Αντίστοιχη ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στα *Rac1^{fl/fl}; Rosa26YFPstop;Nkx2.1_Cre* ποντίκια, έδειξε ότι κατά την εμβρυϊκή ημέρα E14.5 δεν εντοπίζονται YFP-θετικά κύτταρα στο φλοιό. Το σύνολο των YFP-θετικών κυττάρων βρίσκεται συγκεντρωμένο στο βασικό τελεγκέφαλο. Την ημέρα E17.5 παρατηρείται καθυστερημένη μετανάστευση κυττάρων προς το φλοιό. Στον ώριμο φλοιό των ζώων αυτών οι αριθμοί των ενδονευρώνων είναι σημαντικά μειωμένοι. Συγκεκριμένα, τα YFP-θετικά κύτταρα παρουσιάζουν μείωση της τάξης του 50%. Η ίδια μείωση παρατηρείται και στους αριθμούς των διπλά σημασμένων YFP/*Lhx6*, YFP/somatostatin και YFP/parvalbumin-θετικών κυττάρων (Βιδάκη Μ. και Καραγωγέως Δ., μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).

Ο φαινότυπος των *Rac1^{fl/fl}; Rosa26YFPstop;Nkx2.1_Cre* ποντικίων, σε συνδυασμό με αυτόν των *Rosa26YFPstop;Lhx6_Cre* μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η *Rac1* είναι απαραίτητη κατά τη φάση πολλαπλασιασμού των ενδονευρώνων, ώστε να αποκτήσουν μετέπειτα τη μεταναστευτική ικανότητα. Επιπρόσθετα φαίνεται ότι η έκφραση της *Rac1* δεν είναι απαραίτητη κατά τη διάρκεια της μετανάστευσης των κυττάρων.

Κάτι τέτοιο έχει ήδη προταθεί για τη *Rac1* στον εν λόγω κυτταρικό πληθυσμό (Chen *et al.*, 2007). Οι Chen *et al.* χρησιμοποίησαν τη διαγονιδιακή σειρά *Foxg1_Cre* ώστε να πραγματοποιήσουν στοχευμένη απενεργοποίηση του *Rac1* στον τελεγκέφαλο. Η έκφραση του *Foxg1* ξεκινάει την ημέρα E8.5 ενώ κατά την εμβρυϊκή ημέρα E10.5 εκφράζεται σε σχεδόν ολόκληρο τον τελεγκέφαλο (Herbert *et al.*, 2000). Στα ποντίκια αυτά την ημέρα E18.5 δεν

εντοπίζονται ενδονευρώνες στο φλοιό. Οι ερευνητές μελέτησαν επίσης μια δεύτερη διαγονιδιακή σειρά ζώων στην οποία το *Rac1* απενεργοποιείται στους μεταμιτωτικούς ενδονευρώνες (*Rac1^{fl/fl}; Rosa26YFPstop;Dlx5/6_IRES_Cre*). Σε αυτήν έδειξαν τη φυσιολογική μετανάστευσή τους, όμοια με τα δικά μας αποτελέσματα από την ανάλυση των *Rac1^{fl/fl}; Rosa26YFPstop;Lhx6_Cre* ποντικών. Έτσι διατύπωσαν την υπόθεση ότι η *Rac1* είναι απαραίτητη κατά το στάδιο πολλαπλασιασμού των ενδονευρώνων (Chen *et al.*, 2007).

Η απενεργοποίηση του *Rac1* μέσω της *Foxg1_Cre* στα παραπάνω ζώα έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση και άλλων φαινοτύπων, όπως είναι η καθυστερημένη μετανάστευση των πυραμιδικών νευρώνων του φλοιού καθώς και η αναστολή της δημιουργίας συγκεκριμένων αξονικών μονοπατιών του τελεγκεφάλου (Chen *et al.*, 2007). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η *Rac1* έχει διαφορετικούς ρόλους στους διαφορετικούς πληθυσμούς κυττάρων κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος.

Παρότι από την παραπάνω εργασία και από τα δικά μας αποτελέσματα οδηγούμαστε στο ίδιο συμπέρασμα σχετικά με το ρόλο της *Rac1*, υπάρχουν ορισμένες ασυμφωνίες. Στα *Foxg1_Cre* ποντίκια η *Rac1* απενεργοποιείται όχι μόνο στους ενδονευρώνες αλλά και σε ολόκληρο τον αναπτυσσόμενο τελεγκέφαλο. Έτσι η απουσία ενδονευρώνων στο φλοιό στα στελέχη αυτά θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει την ανάγκη της *Rac1* σε κάποιον άλλο κυτταρικό πληθυσμό στο περιβάλλον όπου μεταναστεύουν οι ενδονευρώνες. Από την άλλη μεριά, από τα δικά μας αποτελέσματα μπορεί να προκύψει το παραπάνω συμπέρασμα με μεγαλύτερη ασφάλεια, καθώς η *Rac1* απενεργοποιείται μόνο στους ενδονευρώνες, σε διαφορετικές χρονικές στιγμές.

Ένα δεύτερο σημείο ασυμφωνίας είναι ότι στα *Foxg1_Cre* ποντίκια δεν εντοπίζονται ενδονευρώνες στο φλοιό κατά την ηλικία E18.5. Αντίθετα, στα *Rac1^{fl/fl}; Rosa26YFPstop;Nkx2.1_Cre* ζώα στην ίδια ηλικία πραγματοποιείται καθυστερημένη μετανάστευση και ανιχνεύονται ενδονευρώνες στο φλοιό. Το γεγονός αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η έκφραση της *Rac1* είναι απαραίτητη τόσο από τους ενδονευρώνες όσο και από κάποιον δεύτερο πληθυσμό κυττάρων. Για παράδειγμα μπορεί η απουσία της στον αναπτυσσόμενο φλοιό να έχει ως αποτέλεσμα να μην εκφράζονται πιθανά καθοδηγητικά μόρια. Μια ακόμη εξήγηση για την ασυμφωνία θα μπορούσε να είναι ότι η έκφραση του *Nkx2.1* ξεκινάει την ημέρα E10.5 (Shimamura *et al.*, 1995; Sussel *et al.*, 1999), περίπου 2 ημέρες αργότερα από την έκφραση του *Foxg1*. Είναι πιθανό η παρουσία της *Rac1* μέχρι την ημέρα 10.5 να είναι υπεύθυνη για τη δυνατότητα καθυστερημένης μετανάστευσης που έχει ένα μέρος των ενδονευρώνων στα *Rac1^{fl/fl}; Rosa26YFPstop;Nkx2.1_Cre* ζώα.

Ποιός είναι όμως ο μηχανισμός δράσης της Rac1 στα μιτωτικά προγονικά κύτταρα των ενδονευρώνων;

Μια πρόσφατη μελέτη έχει δείξει ότι η Rac1 έχει σημαντική δράση στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, φαίνεται να προκαλεί την πρόωρη έξοδο των προγονικών κυττάρων (neural progenitors) από τον κυτταρικό κύκλο. Ως αποτέλεσμα αυτού παρατηρείται πρόωρη διαφοροποίηση καθώς και εξάντληση των μιτωτικών κυττάρων (progenitor pool) νωρίτερα (Chen *et al.*, 2009). Η μελέτη αυτή είναι η πρώτη που καθιερώνει το ρόλο της Rac1 στα νευρικά προγονικά κύτταρα. Προηγούμενες μελέτες αποδίδουν έναν τέτοιο ρόλο στη Rac1 σε άλλους ιστούς, όπως η επιδερμίδα, το αιμοποιητικό και το αγγειακό σύστημα (Gu *et al.*, 2003; Benitah *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2008).

Είναι πιθανό λοιπόν η απενεργοποίηση της Rac1 στα μιτωτικά πρόδρομα των ενδονευρώνων στα *Rac1^{fl/fl}; Rosa26YFPstop; Nkx2.1_Cre* ζώα να οδηγεί σε πρόωρη έξοδό τους από τον κυτταρικό κύκλο. Στην περίπτωση αυτή, μπορεί οι μεταμιτωτικοί ενδονευρώνες να μην έχουν προλάβει να λάβουν ορισμένη σηματοδότηση, απαραίτητη για την έναρξη της μετανάστευσης. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την παραμονή τους στο βασικό τελεγκέφαλο ή και το θάνατο αυτών των κυττάρων. Η καθυστερημένη μετανάστευση που παρατηρείται από μέρος των ενδονευρώνων μπορεί να αφορά κύτταρα που γεννιούνται αργότερα και ως εκ τούτου έχουν λάβει τη σηματοδότηση για μεταναστευτική δυνατότητα. Ένας παρόμοιος μηχανισμός έχει περιγραφεί για την δράση της πρωτεΐνης Notch1 στην ανάπτυξη των νευρώνων του ραβδωτού σώματος (Mason *et al.*, 2005).

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω, προκύπτει ότι θα πρέπει αρχικά να ελέγξουμε πως επιδρά η απώλεια της Rac1 στα μιτωτικά προγονικά κύτταρα. Για να το σκοπό αυτό θα πρέπει να πραγματοποιηθεί μια σειρά πειραμάτων. Χρησιμοποιώντας ως μάρτυρες μόρια που σημαίνουν τα μιτωτικά πρόδρομα, όπως το Ki67 και η φωσφορυλιωμένη ιστόνη 3 (PH3) θα ελέγξουμε αν ο πληθυσμός των μιτωτικών προδρόμων είναι μειωμένος στα *Rosa26YFPstop; Nkx2.1_Cre* ζώα. Ο έλεγχος αυτός θα πραγματοποιηθεί στις ηλικίες από E12.5 ως E18.5, ώστε να καλυφθεί ολόκληρη η περίοδος της γέννησης των ενδονευρώνων. Επιπρόσθετα θα διερευνηθεί αν στα Rac1 ελλειμματικά ζώα αλλάζει το ποσοστό των κυττάρων που εξέρχονται από τον κυτταρικό κύκλο στις παραπάνω ηλικίες.

Από τα παραπάνω πειράματα θα αποκτήσουμε μια καλύτερη εικόνα σχετικά με τον μηχανισμό δράσης της Rac1 κατά την ανάπτυξη των ενδονευρώνων του φλοιού.

Γ. Η ΑΠΩΛΕΙΑ ΤΩΝ RAC1 ΚΑΙ RAC3 ΟΔΗΓΕΙ ΣΕ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΗ ΜΕΙΩΣΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΩΝ ΣΤΟ ΦΛΟΙΟ.

Στα θηλαστικά εκφράζονται τρεις Rac GTPάσες, οι Rac1, Rac2 και Rac3. Από αυτές η Rac1 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, η Rac2 εκφράζεται στο αιμοποιητικό και η Rac3 στο νευρικό σύστημα. Ο βαθμός ομοιότητας αυτών των μορίων σε πρωτεϊνικό επίπεδο είναι πολύ μεγάλος, περίπου 90%.

Σε αρκετές περιπτώσεις έχει διαπιστωθεί η δυνατότητα πολλών μελών της οικογένειας των Rac GTPασών να επιτελούν τις ίδιες λειτουργίες (redundant functions). Για παράδειγμα έκφραση μιας διαρκώς ενεργούς (constitutively active) μορφής της Rac3 οδηγεί στη δημιουργία λαμελλιποδίων, μια διεργασία που επιτελείται από τη Rac1 (Chan *et al.*, 2005). Επιπρόσθετα, η δημιουργία ζώων διπλά ελλειμματικών για περισσότερες GTPάσες σε συγκεκριμένους ιστούς έχει αποκαλύψει την ύπαρξη τόσο κοινών όσο και ειδικών λειτουργιών για το κάθε μόριο. Για παράδειγμα, η Rac1 και Rac2 ρυθμίζουν την προσκόλληση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων (HSC: hematopoietic stem cells) στο μυελό των οστών. Ταυτόχρονη απώλεια και των δυο μορίων, και όχι ενός από αυτά, οδηγεί σε αποκόλληση των HSCs και την είσοδό τους στην περιφερειακή κυκλοφορία (Cancelas *et al.*, 2005). Από μελέτη σε αντίστοιχα διαγονιδιακά ζώα διπλά ελλειμματικά για τη Rac1 και τη Rac2 φαίνεται ότι τα μόρια αυτά είναι σημαντικοί ρυθμιστές της ανάπτυξης των T- και B- λεμφοκυττάρων (Walmsley *et al.*, 2003; Benvenuti *et al.*, 2004).

Η πρωτεΐνη Rac3 εκφράζεται μόνο στο αναπτυσσόμενο και το ώριμο νευρικό σύστημα. Η έκφραση της Rac3 ρυθμίζεται αναπτυξιακά και είναι μέγιστη κατά τη φάση της έντονης συναπτογένεσης (Bolis *et al.*, 2003). Επιπλέον η έκφραση της Rac3 δεν είναι ομοιόμορφη, αλλά εντοπίζεται σε συγκεκριμένους πληθυσμούς. Οι περιοχές που εμφανίζουν τη μέγιστη έκφραση της Rac3 είναι ο ιππόκαμπος, οι πυραμιδικοί νευρώνες της πέμπτης στοιβάδας του φλοιού και η παρεγκεφαλίδα (Corbetta *et al.*, 2005). Ποντίκια ελλειμματικά για τη Rac3 είναι υγιή και βιώσιμα, υποδηλώνοντας ότι η Rac3 δεν είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος (Corbetta *et al.*, 2005).

Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η Rac1 και Rac3 μαζί είναι απαραίτητες κατά την ανάπτυξη του νευρικού. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε μια σειρά ποντικών που φέρει στοχευμένη απενεργοποίηση της Rac1 σε συγκεκριμένους πληθυσμούς ώριμων νευρώνων του τελεγκεφάλου, μέσω της σειράς Synapsin_Cre. Η δημιουργία διπλών ελλειμματικών ζώων είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της δημιουργίας των βρυωδών κυττάρων του ιπποκάμπου και των

αξονικών μονοπατιών από και προς τον ιππόκαμπο (Corbetta *et al.*, 2009). Τα ζώα αυτά εμφανίζουν επιληπτικές κρίσεις και πρόωρο θάνατο κατά τη δεύτερη εβδομάδα της ζωής τους.

Η έκφραση της Rac3 από τους ενδονευρώνες του φλοιού μπορεί να είναι υπεύθυνη για το φαινότυπο που παρατηρούμε στα *Rac1^{fl/fl}; Rosa26YFPstop;Nkx2.1_Cre* ζώα. Είναι πιθανό η Rac3 να αναπληρώνει τη δράση της Rac1, και η αναπλήρωση αυτή να έχει ως αποτέλεσμα τη μεταναστευτική δυνατότητα ενός μέρους των ενδονευρώνων.

Για να διερευνήσουμε αν κάτι τέτοιο συμβαίνει δημιουργήσαμε διπλά ελλειμματικά ποντίκια, διασταυρώνοντας τα *Rac1^{fl/fl}; Rosa26YFPstop;Nkx2.1_Cre* με *Rac3^{-/-}* ζώα. Η ανάλυση αυτών των ποντικίων είναι σε πολύ αρχικό στάδιο. Ωστόσο αρχικά αποτελέσματα που πήραμε από την ανάλυση ενός διπλά ελλειμματικού ατόμου ηλικίας P0 στηρίζουν μια τέτοια υπόθεση. Συγκεκριμένα, ο εγκέφαλος του διπλά ελλειμματικού ζώου είναι σημαντικά μικρότερος, οι κοιλίες είναι μεγαλύτερες και ο φλοιός λεπτότερος. Στο άτομο αυτό εκτελέσαμε *in situ* υβριδοποίηση για Lhx6 και SST και δείξαμε ότι παρατηρείται σημαντικά μεγαλύτερη μείωση του αριθμού των ενδονευρώνων στο φλοιό σε σχέση με τα *Rac1* ελλειμματικά άτομα.

Η ανάλυση των διπλά ελλειμματικών ζώων τόσο κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης των ενδονευρώνων (E12.5-E14.5) όσο και αργότερα, πρέπει να πραγματοποιηθεί ώστε να διευκρινιστεί αν και σε ποιο βαθμό υπάρχει λειτουργική συμπλήρωση του ρόλου της *Rac1* από τη *Rac3*.

Βιβλιογραφία

1. Anderson, S.A., Eisenstat, D.D., Shi, L., & Rubenstein, J.L., Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278 (5337), 474-476 (1997).
2. Benitah, S.A., Frye, M., Glogauer, M., & Watt, F.M., Stem cell depletion through epidermal deletion of *Rac1*. *Science* 309 (5736), 933-935 (2005).
3. Benvenuti, F. et al., Requirement of *Rac1* and *Rac2* expression by mature dendritic cells for T cell priming. *Science* 305 (5687), 1150-1153 (2004).
4. Bishop, A.L. & Hall, A., Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2, 241-255 (2000).
5. Bolis, A., Corbetta, S., Cioce, A., & de Curtis, I., Differential distribution of *Rac1* and *Rac3* GTPases in the developing mouse brain: implications for a role of *Rac3* in Purkinje cell differentiation. *Eur J Neurosci* 18 (9), 2417-2424 (2003).
6. Butt, S.J. et al., Transcriptional regulation of cortical interneuron development. *J Neurosci* 27 (44), 11847-11850 (2007).
7. Butt, S.J. et al., The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron* 48 (4), 591-604 (2005).
8. Butt, S.J. et al., The requirement of *Nkx2-1* in the temporal specification of cortical interneuron subtypes. *Neuron* 59 (5), 722-732 (2008).
9. Cancelas, J.A. et al., *Rac* GTPases differentially integrate signals regulating hematopoietic stem cell localization. *Nat Med* 11 (8), 886-891 (2005).
10. Casarosa, S., Fode, C., & Guillemot, F., *Mash1* regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* 126 (3), 525-534 (1999).
11. Chan, A.Y. et al., Roles of the *Rac1* and *Rac3* GTPases in human tumor cell invasion. *Oncogene* 24 (53), 7821-7829 (2005).
12. Chen, L. et al., *Rac1* Controls the Formation of Midline Commissures and the Competency of Tangential Migration in Ventral Telencephalic Neurons. *Journal of Neuroscience* 27 (14), 3884-3893 (2007).
13. Chen, L., Melendez, J., Campbell, K., Kuan, C.Y., & Zheng, Y., *Rac1* deficiency in the forebrain results in neural progenitor reduction and microcephaly. *Dev Biol* 325 (1), 162-170 (2009).
14. Cobos, I., Borello, U., & Rubenstein, J.L., *Dlx* transcription factors promote migration through repression of axon and dendrite growth. *Neuron* 54 (6), 873-888 (2007).
15. Corbetta, S. et al., Generation and characterization of *Rac3* knockout mice. *Mol Cell Biol* 25 (13), 5763-5776 (2005).
16. Cossart, R., Bernard, C., & Ben-Ari, Y., Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies. *Trends Neurosci* 28 (2), 108-115 (2005).
17. de Carlos, J.A., López-Mascaraque, L., & Valverde, F., Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci* 16 (19), 6146-6156 (1996).
18. Denaxa, M., Chan, C.H., Schachner, M., Parnavelas, J.G., & Karagogeos, D., The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development* 128 (22), 4635-4644 (2001).
19. Du, T., Xu, Q., Ocbina, P.J., & Anderson, S.A., *NKX2.1* specifies cortical interneuron fate by activating *Lhx6*. *Development* 135 (8), 1559-1567 (2008).
20. Etienne-Manneville, S. & Hall, A., Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420 (6916), 629-635 (2002).
21. F. Gilbert, S.c.o.t.t., *Developmental Biology*. 817 (2006).
22. Flames, N. et al., Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* 44 (2), 251-261 (2004).

23. Flames, N. & Marín, O., Developmental mechanisms underlying the generation of cortical interneuron diversity. *Neuron* 46 (3), 377-381 (2005).
24. Flames, N. et al., Delineation of Multiple Subpallial Progenitor Domains by the Combinatorial Expression of Transcriptional Codes. *Journal of Neuroscience* 27 (36), 9682-9695 (2007).
25. Fogarty, M. et al., Spatial Genetic Patterning of the Embryonic Neuroepithelium Generates GABAergic Interneuron Diversity in the Adult Cortex. *Journal of Neuroscience* 27 (41), 10935-10946 (2007).
26. Friocourt, G. et al., Both doublecortin and doublecortin-like kinase play a role in cortical interneuron migration. *J Neurosci* 27 (14), 3875-3883 (2007).
27. Gorski, J.A. et al., Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J Neurosci* 22 (15), 6309-6314 (2002).
28. Govek, E.E., Newey, S.E., & Van Aelst, L., The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* 19 (1), 1-49 (2005).
29. Grigoriou, M., Tucker, A.S., Sharpe, P.T., & Pachnis, V., Expression and regulation of Lhx6 and Lhx7, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development. *Development* 125 (11), 2063-2074 (1998).
30. Gu, Y., Hematopoietic Cell Regulation by Rac1 and Rac2 Guanosine Triphosphatases. *Science* 302 (5644), 445-449 (2003).
31. Gupta, A., Tsai, L.H., & Wynshaw-Boris, A., Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Genet* 3 (5), 342-355 (2002).
32. Haataja, L., Groffen, J., & Heisterkamp, N., Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J Biol Chem* 272 (33), 20384-20388 (1997).
33. Hébert, J.M. & McConnell, S.K., Targeting of cre to the Foxg1 (BF-1) locus mediates loxP recombination in the telencephalon and other developing head structures. *Dev Biol* 222 (2), 296-306 (2000).
34. Kassai, H. et al., Rac1 in cortical projection neurons is selectively required for midline crossing of commissural axonal formation. *Eur J Neurosci* 28 (2), 257-267 (2008).
35. Kato, M. & Dobyns, W.B., X-linked lissencephaly with abnormal genitalia as a tangential migration disorder causing intractable epilepsy: proposal for a new term, "interneuronopathy". *J Child Neurol* 20 (4), 392-397 (2005).
36. Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y., & Hoshino, M., The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration. *EMBO J* 22 (16), 4190-4201 (2003).
37. Kessar, N. et al., Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* 9 (2), 173-179 (2006).
38. Kubota, Y., Hattori, R., & Yui, Y., Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain Res* 649 (1-2), 159-173 (1994).
39. Lavdas, A.A., Grigoriou, M., Pachnis, V., & Parnavelas, J.G., The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 19 (18), 7881-7888 (1999).
40. Liodis, P. et al., Lhx6 Activity Is Required for the Normal Migration and Specification of Cortical Interneuron Subtypes. *Journal of Neuroscience* 27 (12), 3078-3089 (2007).
41. Luo, L. et al., Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. *Nature* 379 (6568), 837-840 (1996).
42. Malosio, M.L., Gilardelli, D., Paris, S., Albertinazzi, C., & de Curtis, I., Differential expression of distinct members of Rho family GTP-binding proteins during neuronal development: identification of Rac1B, a new neural-specific member of the family. *J Neurosci* 17 (17), 6717-6728 (1997).

43. Marin, O. & Rubenstein, J., CELL MIGRATION IN THE FOREBRAIN. *Annu. Rev. Neurosci.* 26 (1), 441-483 (2003).
44. Marín, O. & Rubenstein, J.L., A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2 (11), 780-790 (2001).
45. Marín, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., & Rubenstein, J.L., Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 293 (5531), 872-875 (2001).
46. Markram, H. et al., Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5 (10), 793-807 (2004).
47. Mason, H.A. et al., Notch signaling coordinates the patterning of striatal compartments. *Development* 132 (19), 4247-4258 (2005).
48. Miyoshi, G., Butt, S.J., Takebayashi, H., & Fishell, G., Physiologically distinct temporal cohorts of cortical interneurons arise from telencephalic Olig2-expressing precursors. *J Neurosci* 27 (29), 7786-7798 (2007).
49. Molyneaux, B., Arlotta, P., Menezes, J., & Macklis, J., Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 8 (6), 427-437 (2007).
50. Nakajima, K., Control of tangential/non-radial migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Neurochem Int* 51 (2-4), 121-131 (2007).
51. Nakayama, A.Y., Harms, M.B., & Luo, L., Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 20 (14), 5329-5338 (2000).
52. Nery, S., Fishell, G., & Corbin, J.G., The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nat Neurosci* 5 (12), 1279-1287 (2002).
53. Nikolic, M., Chou, M.M., Lu, W., Mayer, B.J., & Tsai, L.H., The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature* 395 (6698), 194-198 (1998).
54. Nodari, A. et al., Beta1 integrin activates Rac1 in Schwann cells to generate radial lamellae during axonal sorting and myelination. *The Journal of Cell Biology* 177 (6), 1063-1075 (2007).
55. Pancoast, M., Dobyns, W., & Golden, J.A., Interneuron deficits in patients with the Miller-Dieker syndrome. *Acta Neuropathol* 109 (4), 400-404 (2005).
56. Raftopoulou, M. & Hall, A., Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265 (1), 23-32 (2004).
57. Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., & Ponting, C.P., SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (11), 5857-5864 (1998).
58. Shimamura, K., Hartigan, D.J., Martinez, S., Puelles, L., & Rubenstein, J.L., Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. *Development* 121 (12), 3923-3933 (1995).
59. Srinivas, S. et al., Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* 1, 4 (2001).
60. Stühmer, T., Anderson, S.A., Ekker, M., & Rubenstein, J.L., Ectopic expression of the *Dlx* genes induces glutamic acid decarboxylase and *Dlx* expression. *Development* 129 (1), 245-252 (2002).
61. Stumm, R.K. et al., CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *J Neurosci* 23 (12), 5123-5130 (2003).
62. Sugihara, K. et al., Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* 17 (26), 3427-3433 (1998).
63. Sussel, L., Marin, O., Kimura, S., & Rubenstein, J.L., Loss of *Nkx2.1* homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal

- telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* 126 (15), 3359-3370 (1999).
64. Tamamaki, N., Fujimori, K.E., & Takauji, R., Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J Neurosci* 17 (21), 8313-8323 (1997).
65. Tan, W. et al., An essential role for Rac1 in endothelial cell function and vascular development. *FASEB J* 22 (6), 1829-1838 (2008).
66. Tanaka, D., Nakaya, Y., Yanagawa, Y., Obata, K., & Murakami, F., Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins. *Development* 130 (23), 5803-5813 (2003).
67. Walmsley, M.J. et al., Critical roles for Rac1 and Rac2 GTPases in B cell development and signaling. *Science* 302 (5644), 459-462 (2003).
68. Wichterle, H., Turnbull, D.H., Nery, S., Fishell, G., & Alvarez-Buylla, A., In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128 (19), 3759-3771 (2001).
69. Wonders, C.P. & Anderson, S.A., The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci* 7 (9), 687-696 (2006).
70. Wonders, C.P. et al., A spatial bias for the origins of interneuron subgroups within the medial ganglionic eminence. *Dev Biol* 314 (1), 127-136 (2008).
71. Woo, N.H. & Lu, B., Regulation of cortical interneurons by neurotrophins: from development to cognitive disorders. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 12 (1), 43-56 (2006).
72. Xu, Q., Cobos, I., De La Cruz, E., Rubenstein, J.L., & Anderson, S.A., Origins of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci* 24 (11), 2612-2622 (2004).
73. Xu, Q., Wonders, C.P., & Anderson, S.A., Sonic hedgehog maintains the identity of cortical interneuron progenitors in the ventral telencephalon. *Development* 132 (22), 4987-4998 (2005).
74. Zerucha, T. et al., A highly conserved enhancer in the Dlx5/Dlx6 intergenic region is the site of cross-regulatory interactions between Dlx genes in the embryonic forebrain. *J Neurosci* 20 (2), 709-721 (2000).