

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗΣ ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

« ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΚΑΙ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΣΗΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΩΝ, ΣΤΟ ΦΛΟΙΟ ΤΩΝ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΩΝ
ΗΜΙΣΦΑΙΡΙΩΝ »

ΜΑΡΙΝΑ ΒΙΔΑΚΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ

ΜΑΡΤΙΟΣ 2010

Φτάνοντας στο τέλος μιας μακριάς πορείας, θέλω να ευχαριστήσω όλους όσους ήταν δίπλα μου σε αυτή την προσπάθεια, με τη βεβαιότητα ότι θα ξεχάσω κάποιον ή κάποιους. Ελπίζω να μην είναι πολλοί, ή να μη διαβάσουν τη διατριβή μου, ή να μη χρειαστώ τη βοήθειά τους στο μέλλον!!!

Το πρώτο ευχαριστώ, το οφείλω στη Δόμνα, που με βοήθησε πάρα πολύ, όλα αυτά τα χρόνια. Είχαμε μια άψογη συνεργασία και μου πρόσφερε πολλά περισσότερα, απ' όσα είχα ελπίζει όταν ξεκίνησα να δουλεύω στο εργαστήριο. Με εμπιστεύθηκε και με βοήθησε να αναπτύξω αυτόνομη σκέψη και πρωτοβουλία, που σίγουρα θα είναι πολύτιμα για μένα από εδώ και πέρα.

Κώστα Θεοδωράκη (ΚουΘού), ευχαριστώ πολύ, πολύ και πιο πολύ ακόμα, για όλα όσα μου έμαθες και για όλα όσα έκανες για μένα όλα αυτά τα χρόνια!

Μαρκέλλα Κατίδου, βλέπεις κι εσύ το φως στο τούνελ; Χαίρομαι πολύ που συμπορευτήκαμε μικρό μου! Καλή μας συνέχεια!

Μαρία Σαββάκη, το πιο μεγάλο ευχαριστώ σου το χρωστάω επειδή με έπεισες να κάνουμε μαθήματα χορού μαζί και περνάμε τόσο καλά!

Αήδα Ζούπη, γελάσαμε και γελάμε πολύ (σε καλό να μας βγει!)...Ζουπάρα!

Simona Tivodar, μου υπενθυμίζεις ότι μπορεί κάποιος να είναι όλη μέρα στο εργαστήριο χωρίς να χάνει την ηρεμία/ψυχραιμία του.

Maura Strigini, ευχαριστώ για όλες τις συμβουλές και τις συζητήσεις μας! Ήταν πολύ πολύ χρήσιμες και στο σωστό timing.

Γεωργία Τσικαλά, εύχομαι όλα να πάνε καλά και ελπίζω μέχρι να φύγω να με πας βόλτα με το νέο σου αυτοκίνητο!!!

Γιώργο Μπαστάκη, what to say??? Καλή συνέχεια και να γίνεις πολύ καλός γιατρός, γιατί όπως ξέρεις, θα έχω σίγουρα ανάγκη τη βοήθειά σου!

Ξεχωριστά ευχαριστώ τη Χαρά, την Τόνια, την Έλενα Γ. και την Έλενα Β. από τα διπλανά εργαστήρια, για την ιδιαίτερα ευχάριστη ατμόσφαιρα στην πτέρυγα 2Γ της ιατρικής σχολής!!!

Ένα μεγάλο, πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους φίλους μου Αντούλα, Ανδρέα, Άντα, Μαρία, Γιώργο και Χάρη, για τα πάντα, όλα !!! Αλλά κι ένα τεράστιο, ξεχωριστό ευχαριστώ για τον Αντώνη, που είναι πάντα εδώ, σε κάθε στιγμή, κάνοντάς την ιδιαίτερη και μοναδική.

Άφησα για το τέλος, το πιο μεγάλο μου ευχαριστώ. Αυτό, το οφείλω στην οικογένειά μου. Μαμάμπαμπάμπουμπου, είστε πάντα μαζί μου και δεν έχω λόγια για να περιγράψω πόσα σημαίνει αυτό...

Στον πατέρα μου, Φρίζο...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
SUMMARY.....	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
A. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΦΛΟΙΟΥ ΤΩΝ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΩΝ ΗΜΙΣΦΑΙΡΙΩΝ.....	6
1. <i>Ανάπτυξη του τελεγκεφάλου και σχηματισμός του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων στα θηλαστικά.....</i>	6
2. <i>Πληθυσμοί νευρικών κυττάρων στο φλοιό των ημισφαιρίων.....</i>	11
3. <i>Προέλευση και καθορισμός των ενδονευρώνων του φλοιού: η περιοχή του MGE</i>	12
4. <i>Καθορισμός και διαφοροποίηση των ενδονευρώνων του φλοιού.....</i>	15
5. <i>Οριζόντια μετανάστευση των ενδονευρώνων προς το φλοιό.....</i>	19
B. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΟΥ ΦΛΟΙΟΥ.....	22
1. ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΣΗΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΟΥ ΦΛΟΙΟΥ: Η οικογένεια των Rho-GTPασών και η πρωτεΐνη Rac1.....	23
α. <i>Ο ρόλος της Rac1 στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού.....</i>	24
β. <i>Ο ρόλος της Rac1 στην ομαλή εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου.....</i>	27
2. ΕΞΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΣΗΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΟΥ ΦΛΟΙΟΥ: Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας και η πρωτεΐνη TAG1.....	29
α. <i>Ο ρόλος της TAG1 στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων του φλοιού.....</i>	31
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	33
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ I: Ενδοκυττάρια σήματα στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων του φλοιού των ημισφαιρίων: Ο ρόλος της Rho-GTPάσης Rac1.....	35
A. <i>Απενεργοποίηση της Rac-1 στη μεσαία γαγγλιονική προεξοχή του βασικού τελεγκεφάλου κατά την εμβρυογένεση.....</i>	37
B. <i>Απενεργοποίηση της Rac1 στα κύτταρα της περιοχής του MGE: Μελέτη του φαινοτύπου κατά την εμβρυογένεση.....</i>	39
1. <i>Η απενεργοποίηση της Rac1 στα κύτταρα της περιοχής του MGE, εμποδίζει τη μετανάστευσή τους στο αναπτυξιακό στάδιο E13.5.....</i>	39

2. Η απενεργοποίηση της <i>Rac1</i> στα πρόδρομα κύτταρα της περιοχής του MGE, οδηγεί στη μειωμένη και καθυστερημένη μετανάστευσή τους προς τον αναπτυσσόμενο φλοιό.....	41
3. Την ημέρα της γέννησης, οι ενδονευρώνες του φλοιού είναι μειωμένοι κατά το ήμισυ.....	43
Γ. Απενεργοποίηση της <i>Rac1</i> στα κύτταρα της περιοχής του MGE: Μελέτη του φαινοτύπου στον ώριμο εγκέφαλο.....	45
1. Οι υποπληθυσμοί των <i>Rac1</i> -ελλειμματικών GABAεργικών ενδονευρώνων είναι μειωμένοι κατά το ήμισυ στον ώριμο φλοιό των ημισφαιρίων.....	45
2. Η απενεργοποίηση της <i>Rac1</i> στα πρόδρομα κύτταρα <i>Nkx2.1</i> ⁺ επηρεάζει την ανάπτυξη των ενδονευρώνων του ραβδωτού σώματος.....	48
3. Η απενεργοποίηση της <i>Rac1</i> στα πρόδρομα κύτταρα <i>Nkx2.1</i> ⁺ επηρεάζει την ανάπτυξη των <i>Nkx2.1</i> ⁺ ολιγοδενδροκυττάρων.....	50
4. Οι ενδονευρώνες που προέρχονται από περιοχές του τελεγκεφάλου εκτός του MGE, δεν επηρεάζονται από τη μείωση των MGE κυττάρων και την απενεργοποίηση της <i>Rac1</i>	52
Δ. Απενεργοποίηση της <i>Rac1</i> στα κύτταρα της περιοχής του MGE: Μελέτη του ρόλου της πρωτεΐνης στην ανάπτυξη των συγκεκριμένων κυττάρων.....	55
1. Η απενεργοποίηση της <i>Rac1</i> δεν οδηγεί σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο στην περιοχή του MGE κατά την ανάπτυξη.....	55
2. Η καθυστερημένη μετανάστευση των <i>Rac1</i> ^{fl/fl} ; <i>Nkx2.1</i> ^{+Cre} ενδονευρώνων οφείλεται σε ενδογενές πρόβλημα των κυττάρων.....	57
3. Οι <i>Rac1</i> ^{fl/fl} ; <i>Nkx2.1</i> ^{+Cre} ενδονευρώνες που μεταναστεύουν παρά την καθυστέρηση, έχουν φυσιολογική μορφολογία.....	59
4. Η έλλειψη της <i>Rac1</i> δεν επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό και τη μιτωτική δραστηριότητα των κυττάρων της περιοχής του MGE.....	62
5. Η απουσία της <i>Rac1</i> καθυστερεί την έξοδο των κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο.....	64
Ε. Απενεργοποίηση της <i>Rac1</i> σε μεταμιτωτικούς ενδονευρώνες του MGE δεν επηρεάζει τη μετανάστευση και την ανάπτυξή τους.....	69

ΣΥΖΗΤΗΣΗ I: Ενδοκυττάρια σήματα στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων του φλοιού των ημισφαιρίων: Ο ρόλος της Rho-GTPάσης <i>Rac1</i>.....	74
--	-----------

1. Η απενεργοποίηση της <i>Rac1</i> στα πρόδρομα κύτταρα της περιοχής του MGE, οδηγεί στην καθυστέρηση της οριζόντιας μετανάστευσής τους κατά την εμβρυογένεση.....	76
2. Η έλλειψη της <i>Rac1</i> οδηγεί στη μείωση όλων των κυτταρικών πληθυσμών που προέρχονται από την περιοχή του MGE στον ώριμο εγκέφαλο.....	77
3. Η καθυστερημένη μετανάστευση των $Rac1^{fl/fl}$; $Nkx2.1^{+/Cre}$ ενδονευρώνων οφείλεται σε ενδογενές πρόβλημα των κυττάρων.....	79
4. Η <i>Rac1</i> ρυθμίζει την έξοδο των κυττάρων της περιοχής του MGE από τον κυτταρικό κύκλο.....	81
5. Πιθανός ρόλος της <i>Rac1</i> στην ομαλή εξέλιξη της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου.....	82

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ II: Ενδοκυττάρια σήματα στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων του φλοιού των ημισφαιρίων: Ο ρόλος της πρωτεΐνης TAG1 και των φλοιοθαλαμικών αξόνων.....

A. Μελέτη του ρόλου της TAG1 στην ανάπτυξη του φλοιού των ημισφαιρίων.....	90
1. Ρόλος της TAG-1 στην ανάπτυξη των φλοιοθαλαμικών αξόνων.....	90
2. Μελέτη των ιδιοτήτων συνάφειας της TAG1.....	91
3. Συμπεριφορά των μεταναστευόντων ενδονευρώνων του φλοιού.....	93
B. Δημιουργία διαγονιδιακών μυνών ως εργαλεία στη μελέτη της ανάπτυξης του φλοιού και του νευρικού συστήματος.....	95
1. Δημιουργία γενετικά τροποποιημένων μυνών $Tag1^{(Tg) Cre}$	96
1α. Μελέτη του προτύπου έκφρασης του διαγονιδίου $Tag1^{(Tg)Cre}$ in vivo.....	97
1β. Μελλοντικές εφαρμογές των γενετικά τροποποιημένων $Tag1^{(Tg)Cre}$ μυνών.....	99
2. Δημιουργία γενετικά τροποποιημένων μυνών $Tag1^{(Tg) loxP-GFP-loxP-DTA}$	101
2α. Μελέτη του προτύπου έκφρασης του διαγονιδίου $Tag1^{(Tg)loxP-GFP-loxP-DTA}$ in vivo.....	103
2β. Μελλοντικές εφαρμογές των γενετικά τροποποιημένων $Tag1^{(Tg)loxP-GFP-loxP-DTA}$ μυνών.....	104

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....106

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....152

Περίληψη

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

Η πρωτεΐνη Rac1, μέλος της οικογένειας των Rho-GTPασών, εμπλέκεται σε πολλαπλές διεργασίες κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, όπως στη δημιουργία νευραξόνων, στην κυτταρική μετανάστευση και στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Στην παρούσα διατριβή, μελετήθηκε ο ρόλος της Rac1 στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων του φλοιού. Η πρωτεΐνη απενεργοποιήθηκε *in vivo* σε μύες, μέσω της τεχνολογίας του Cre/loxP ανασυνδυασμού, μόνο στο συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό. Από την ανάλυση των μεταλλαγμένων ζώων, προκύπτει ότι τα κύτταρα καθυστερούν να εξέλθουν του κυτταρικού κύκλου. Κατά συνέπεια, υπάρχει μειωμένη μετανάστευση ενδονευρώνων προς το φλοιό, ενώ τελικά στον ώριμο εγκέφαλο, εντοπίζονται μόνο οι μισοί ενδονευρώνες. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η Rac1 είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των ενδονευρώνων, ρυθμίζοντας την ομαλή έκβαση του κυτταρικού κύκλου τους. Σε πειράματα στα οποία η Rac1 απενεργοποιήθηκε *in vivo*, ειδικά σε μεταμιτωτικούς ενδονευρώνες, η απώλεια της πρωτεΐνης δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των κυττάρων, υπογραμμίζοντας την ανάγκη για λειτουργική Rac1 στα πρόδρομα μιτωτικά νευρικά κύτταρα.

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας, μελετήθηκαν και εξωκυττάρια καθοδηγητικά σήματα κατά την ανάπτυξη των ενδονευρώνων του φλοιού. Η πρωτεΐνη TAG1, μόριο κυτταρικής συνάφειας της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών, εκφράζεται στους φλοιοθλαμικούς άξονες κατά την εμβρυογένεση. Οι άξονες αυτοί θεωρούνται υπόστρωμα πάνω στο οποίο μετακινούνται οι οριζόντια μεταναστεύοντες ενδονευρώνες, στην πορεία τους προς το φλοιό. Χρησιμοποιώντας τον υποκινητή του γονιδίου της TAG1 ως γενετικό εργαλείο, δημιουργήθηκαν δύο σειρές γενετικά τροποποιημένων μυών, προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος των φλοιοθλαμικών αξόνων στην καθοδήγηση των ενδονευρώνων.

Summary

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

Rac1, a member of the Rac subfamily of Rho GTPases, has been implicated in various aspects of cortical development such as cell cycle dynamics, axonogenesis and neuronal migration. In this study we have addressed the specific role of Rac1 in interneuron progenitors originating in the medial ganglionic eminence, the subpallial source of GABAergic interneurons, via Cre/loxP technology. Our findings show that in the absence of Rac1, only half of GABAergic interneurons populate the cortex. Their progenitors are delayed in exiting the cell cycle and as a consequence migrate towards the pallium later than control cells. The absence of Rac1 from postmitotic interneurons does not result in obvious defects. These data indicate that a cell autonomous and stage-specific requirement of Rac1 activity within proliferating progenitors of cortical interneurons is necessary for their development.

We have also assessed the extracellular signals that facilitate interneuron migration to the cortex during development. TAG1, a cell adhesion molecule of the IgSF, is expressed by the corticofugal fibers that are thought to serve as a scaffold for interneurons to migrate on, during embryogenesis. Using the promoter of the gene encoding for TAG1 as a genetic tool, we have generated two transgenic mouse lines,

to help us address questions regarding the role of corticofugal axons in interneuronal migration.

Εισαγωγή

A. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΦΛΟΙΟΥ ΤΩΝ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΩΝ ΗΜΙΣΦΑΙΡΙΩΝ

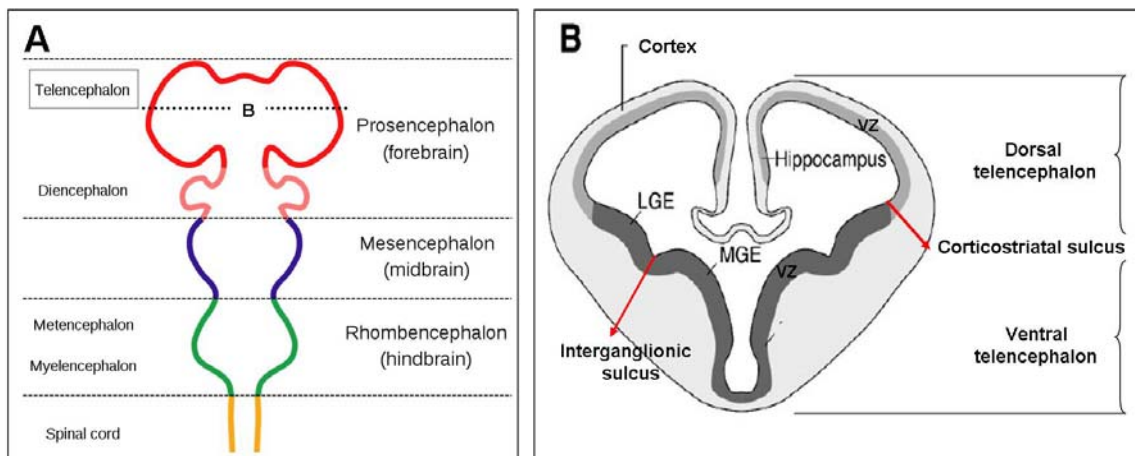
Ο φλοιός των εγκεφαλικών ημισφαιρίων των θηλαστικών, αποτελεί την έδρα όλων των ανώτερων αισθητικών, κινητικών και συνειρμικών λειτουργιών. Είναι η πιο πρόσφατη εξελικτικά δομή του νευρικού συστήματος και λόγω των πολύπλοκων δικτύων μεταξύ των νευρικών κυττάρων του, ο φλοιός είναι υπεύθυνος για τη λειτουργική πολυπλοκότητα του εγκεφάλου των θηλαστικών. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη σωστή λειτουργία του φλοιού, είναι η σωστή τοποθέτηση των νευρώνων κατά την ανάπτυξη, η διαφοροποίηση και η ενσωμάτωσή τους σε λειτουργικά νευρικά δίκτυα. Οποιαδήποτε ανωμαλία στις παραπάνω διεργασίες, συχνά αποτελεί τη βάση χρόνιων παθήσεων, όπως η επιληψία, η σχιζοφρένεια και ο αυτισμός (Gressens, 2006; Suzuki, 2007). Επομένως, η κατανόηση των μηχανισμών που καθορίζουν την ανάπτυξη και σωστή λειτουργία των νευρικών κυττάρων του φλοιού, αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την κατανόηση της παθολογίας του εγκεφάλου και την αντιμετώπιση παθήσεων με μεγάλο ψυχολογικό, κοινωνικό και οικονομικό κόστος.

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

Η ανάπτυξη του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, είναι μια διεργασία μοναδική στα θηλαστικά και σημαντικά συντηρημένη ανάμεσα στα διάφορα είδη. Μετά το κλείσιμο του νευρικού σωλήνα κατά την εμβρυογένεση, το πρόσθιο τμήμα του μορφοποιείται σε μια κοιλότητα, που ονομάζεται προσεγκέφαλος (forebrain, ή prosencephalon, Εικ. 1Α). Το τοίχωμα της συγκεκριμένης δομής, αποτελείται από νευροεπιθηλιακά κύτταρα, από τα οποία θα προέλθουν σταδιακά κατά την εμβρυογένεση, όλες οι δομές του πρόσθιου εγκεφάλου (φλοιός, ιππόκαμπος, θάλαμος). Το πιο πρόσθιο τμήμα του προσεγκέφαλου είναι ο τελεγκεφάλος, από τον οποίο δημιουργούνται τα εγκεφαλικά ημισφαίρια και ο φλοιός (cortex, Εικ. 1Β) (Marin & Rubenstein, 2003).

Αρχικά το τοίχωμα των πλευρικών κοιλιών του τελεγκεφάλου δεν εμφανίζει

κάποια δομική ειδίκευση. Η πρώτη ένδειξη διαφοροποίησης στον ποντικό παρατηρείται την εμβρυϊκή ημέρα E10.5 (E: εμβρυϊκή ημέρα), όταν το κοιλιακό τοίχωμα δημιουργεί μια προεκβολή σε κάθε μια από τις κοιλίες του τελεγκεφάλου. Η προεκβολή αυτή οδηγεί στην δημιουργία μιας αύλακας (corticostriatal sulcus), η οποία χωρίζει τον ραχιαίο (dorsal forebrain) από τον κοιλιακό ή βασικό τελεγκεφαλο (basal forebrain). Στη συνέχεια, 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, πλευρικά. Οι δομές αυτές ονομάζονται έσω (MGE: medial ganglionic eminence) και πλευρική (LGE: lateral ganglionic eminence) γαγγλιονική προεξοχή αντίστοιχα. (Εικ.1B) (Jimenez et al, 2002). Σε πιο οπίσθια επίπεδα η προεκβολή του κοιλιακού τοιχώματος είναι ενιαία και καλείται οπίσθια γαγγλιονική προεξοχή (CGE: caudal ganglionic eminence) (Anderson et al, 2001). Παράλληλα με τον βασικό τελεγκεφαλο, και ο ραχιαίος τελεγκεφαλος διαφοροποιείται περαιτέρω σε δομές από τις οποίες θα προκύψουν ο ιππόκαμπος και ο φλοιός των ημισφαιρίων (cortex) (Εικ. 1B).



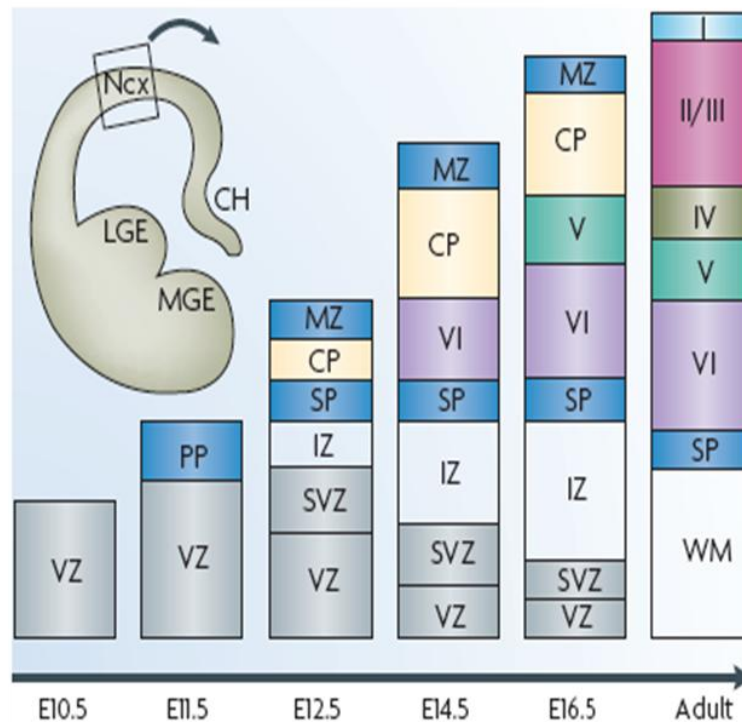
Εικόνα 1. Ανάπτυξη του τελεγκεφάλου κατά την εμβρυογένεση. (A) Σχηματική απεικόνιση του νευρικού σωλήνα κατά τα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης. Ο φλοιός των ημισφαιρίων προέρχεται από τη δομή του τελεγκεφάλου (telencephalon), στον προσεγκέφαλο (prosencephalon, ή forebrain). (B) Απεικόνιση τομής του αναπτυσσόμενου νευρικού συστήματος εμβρύου E12.5, παράλληλης στον προσθιοπίσθιο άξονα. Διακρίνεται ο ραχιαίος τελεγκεφαλος, (dorsal telencephalon) και ο βασικός τελεγκεφαλος (ventral ή basal

telencephalon) που διαχωρίζονται από την αύλακα του *corticostriatal sulcus*. Η αύλακα του *interganglionic sulcus* διαχωρίζει το βασικό τελεγκέφαλο στην έσω και πλάγια γαγγλιονική προεκβολή (*MGE, LGE*), ενώ διακρίνονται και οι πρόδρομες δομές του φλοιού (*cortex*) και του ιππόκαμπου (*hippocampus*) στο ραχιαίο τελεγκέφαλο. *VZ*: *ventricular zone*, κοιλιακή ζώνη. (Τροποποιημένη από *Marin & Rubenstein, 2003*).

Οι νευρώνες και τα γλοιακά κύτταρα του φλοιού, προέρχονται από το νευροεπιθήλιο που περιβάλλει τις κοιλίες του τελεγκεφάλου, το οποίο ονομάζεται κοιλιακή ζώνη (*ventricular zone, VZ*) (Εικ. 1B) (*Rakic, 1982*). Κατά τα αρχικά στάδια της ανάπτυξης του εγκεφάλου, στην κοιλιακή ζώνη εντοπίζονται πρόδρομα κύτταρα, τα οποία μέσω συμμετρικής μιτωτικής διαίρεσης ανανεώνουν τον πληθυσμό των πρόδρομων κυττάρων. Όσο εξελίσσεται η εμβρυογένεση και η ανάπτυξη του φλοιού, η διάρκεια του κυτταρικού κύκλου αυξάνεται, κυρίως λόγω επιμήκυνσης της φάσης G1 και κάποια από τα πρόδρομα κύτταρα πραγματοποιούν ασύμμετρη μιτωτική διαίρεση, δημιουργώντας νέα πρόδρομα κύτταρα και νευρικά ή γλοιακά κύτταρα (*Marin & Rubenstein, 2003; Ayala et al, 2007*). Σταδιακά και μέχρι το τέλος της εμβρυογένεσης, τα πρόδρομα κύτταρα μειώνονται, καθώς η πλειοψηφία αυτών διαιρείται οριστικά, δημιουργώντας μόνο νευρικά κύτταρα (*Caviness and Takahashi, 1995*).

Μόλις τα νευρικά κύτταρα εξέλθουν του κυτταρικού κύκλου, μεταναστεύουν από την κοιλιακή ζώνη προς την τελική θέση τους στον αναπτυσσόμενο φλοιό. Κατά την εμβρυϊκή μέρα E11.5 στον ποντικό, μεταναστεύουν τα πρώτα νευρικά κύτταρα και σχηματίζουν μια στιβάδα που ονομάζεται προφλοιϊκή πλάκα (*preplate, PP*) (Εικ. 2A, B). Την εμβρυϊκή ημέρα E13.5 ένας δεύτερος πληθυσμός νευρώνων μεταναστεύει από την κοιλιακή ζώνη χωρίζοντας τη ζώνη προφλοιϊκής πλάκας σε μια επιφανειακή, που ονομάζεται επιχείλια ζώνη (*marginal zone, MZ*) και σε μια βαθύτερη, που ονομάζεται υποφλοιϊκή πλάκα (*subplate, SP*). Η στιβάδα κυττάρων που δημιουργείται ανάμεσα στις δυο προαναφερόμενες ζώνες, ονομάζεται φλοιϊκή πλάκα (*cortical plate, CP*) (Εικ. 2A, B). Ταυτόχρονα, ακριβώς κάτω από την υποφλοιϊκή πλάκα, άξονες με οριζόντια κατεύθυνση σχηματίζουν την ενδιάμεση ζώνη του φλοιού (*intermediate zone, IZ*), ενώ αρχίζει να διακρίνεται, ακριβώς πάνω από την κοιλιακή ζώνη, η υποκοιλιακή ζώνη (*subventricular zone, SVZ*), η οποία αποτελείται από μιτωτικούς και μεταμιτωτικούς νευρώνες. Η ανάπτυξη του φλοιού

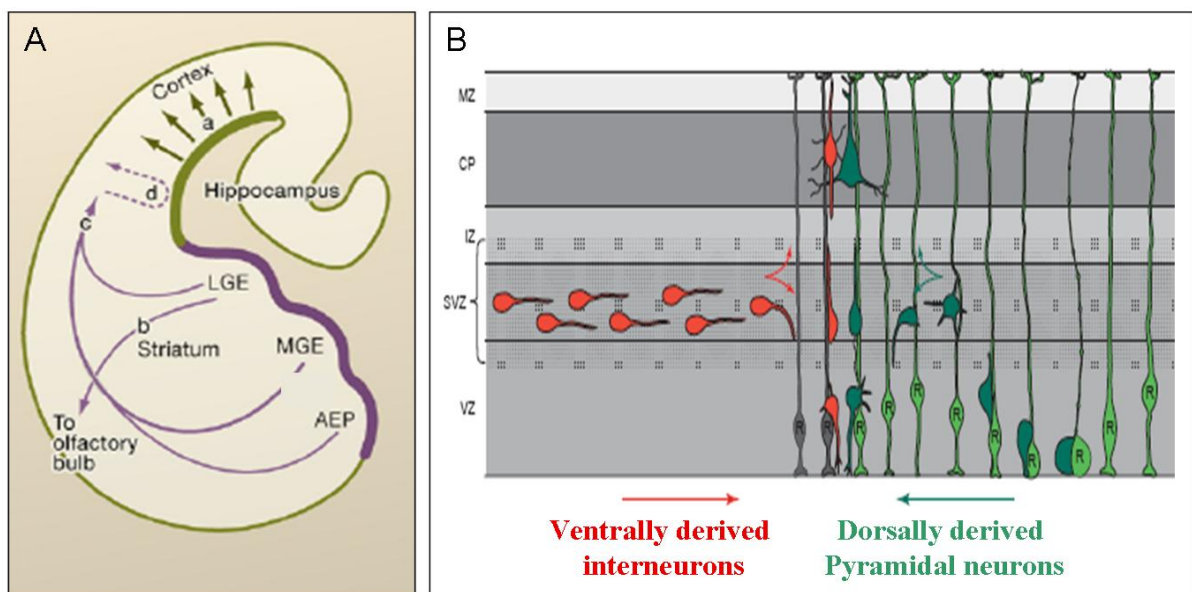
συνεχίζεται με διαδοχική μετανάστευση νευρώνων μεταξύ των εμβρυϊκών σταδίων ανάπτυξης E14.5 και E18.5, οι οποίοι καταλαμβάνουν την τελική θέση τους δημιουργώντας τη χαρακτηριστική στιβαδωτή δομή του φλοιού (Εικ. 2B) (Hatten, 1999; Marin & Rubenstein 2003; Ayala et al, 2007; Molyneaux et al, 2007).



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση της ανάπτυξης του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Τα νευρικά κύτταρα εξέρχονται από την κοιλιακή ζώνη (VZ) και μεταναστεύουν προς το φλοιό, δημιουργώντας αρχικά την προφλοιϊκή πλάκα (PP), η οποία αργότερα χωρίζεται στην επιφανειακή επιχείλια ζώνη (MZ) και την εσωτερική υποφλοιϊκή πλάκα (SP). Η φλοιϊκή πλάκα (CP), η οποία θα δώσει τις στριβάδες του φλοιού, σχηματίζεται ανάμεσα στις παραπάνω ζώνες. Διαδοχική μετανάστευση νευρώνων κατά την εμβρυογένεση, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία των στριβάδων του ώριμου φλοιού. (Molyneaux et al., 2007).

Ανάλογα με την περιοχή προέλευσής τους στον αναπτυσσόμενο τελεγκέφαλο, τα νευρικά κύτταρα μπορεί να μετακινούνται είτε κάθετα προς την εξωτερική επιφάνεια του φλοιού, είτε παράλληλα με αυτήν, προκειμένου να εγκατασταθούν στην τελική τους θέση και να δημιουργήσουν λειτουργικές συνάψεις. Οι δύο αυτοί

τύποι μετακίνησης είναι χαρακτηριστικοί κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και ονομάζονται ακτινωτή και οριζόντια κυτταρική μετανάστευση αντίστοιχα (Marin & Rubenstein, 2003; Ayala et al, 2007). Πιο συγκεκριμένα, τα νευρικά κύτταρα που γεννιούνται στην κοιλιακή ζώνη του ραχιαίου τελεγκεφάλου, μεταναστεύουν ακτινωτά (Εικ. 3Αα πράσινα βέλη), ενώ τα νευρικά κύτταρα που προέρχονται από την κοιλιακή ζώνη του βασικού τελεγκεφάλου, χρειάζεται να μετακινηθούν οριζόντια προς τις νεοαναπτυσσόμενες δομές (φλοιός, ραβδωτό σώμα, οσφρητικοί λοβοί) (Εικ. 3Αβ, γ, μωβ βέλη). Ωστόσο, τα νευρικά κύτταρα που δημιουργούνται κοιλιακά και μεταναστεύουν οριζόντια με τελικό προορισμό το φλοιό των ημισφαιρίων, μόλις εισέλθουν στο φλοιό, αλλάζουν την κατεύθυνση της κίνησής τους και μεταναστεύουν ακτινωτά, έτσι ώστε να εισέλθουν στη σωστή φλοιϊκή στιβάδα (Εικ. 3Α,δ μωβ στικτό βέλος, 3Β).



Εικόνα 3. Πρότυπα κυτταρικής μετανάστευσης στον αναπτυσσόμενο τελεγκεφαλο. (Α) Τα νευρικά κύτταρα του ραχιαίου τελεγκεφάλου μετακινούνται ακτινωτά προς το φλοιό (πράσινα βέλη, α), ενώ τα κύτταρα που γεννιούνται κοιλιακά, μετακινούνται με οριζόντια μετανάστευση προς τον τελικό προορισμό τους (μωβ βέλη, β, γ). Τα κύτταρα που εισέρχονται στο φλοιό οριζόντια, συνεχίζουν με ακτινωτή μετακίνηση, προκειμένου να φθάσουν στη σωστή φλοιϊκή στιβάδα (μωβ στικτό βέλος, δ). (Β) Μεταναστευτική πορεία των νευρικών κυττάρων στο

φλοιό. *Cortex*: φλοιός, *Hippocampus*: ιππόκαμπος, *Striatum*: ραβδωτό σώμα, *Olfactory Bulb*: οσφρητικός λοβός, *MGE*: έσω γαγγλιονική προεκβολή, *LGE*: πλευρική γαγγλιονική προεκβολή, *MZ*: επιχείλια ζώνη, *CP*: φλοιϊκή πλάκα, *SP*: υποφλοιϊκή πλάκα, *IZ*: ενδιάμεση ζώνη, *SVZ*: υποκοιλιακή ζώνη, *VZ*: κοιλιακή ζώνη. (Τροποποιημένη από Ayala et al, 2007; Kriegstein & Noctor, 2004).

2. Πληθυσμοί νευρικών κυττάρων στο φλοιό των ημισφαιρίων

Όπως έχει αναφερθεί ήδη, ο φλοιός των εγκεφαλικών ημισφαιρίων αποτελεί την έδρα όλων των ανώτερων λειτουργιών των θηλαστικών. Τα μοναδικά λειτουργικά χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης δομής του νευρικού συστήματος, οφείλονται στην ιδιαίτερη οργάνωση των κυττάρων σε στιβάδες, κάθε μια από τις οποίες αποτελείται από κύτταρα που διαφέρουν τόσο σε μορφολογικό, όσο και σε λειτουργικό επίπεδο. Τα νευρικά κύτταρα των στιβάδων, οργανώνονται σε νευρικά δίκτυα, η σωστή λειτουργία των οποίων είναι απαραίτητη για την κατανόηση και την ερμηνεία των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, καθώς και για και την απόκριση του οργανισμού σε αυτά. Δύο είναι οι βασικοί πληθυσμοί νευρικών κυττάρων που δομούν το φλοιό και συγκροτούν τα νευρικά δίκτυα (Marin & Rubenstein, 2003). Ο πρώτος και μεγαλύτερος πληθυσμός, είναι οι πυραμιδικοί διεγερτικοί νευρώνες, οι οποίοι αποτελούν το 80% των νευρικών κυττάρων του ώριμου φλοιού των ημισφαιρίων. Τα κύτταρα αυτά γεννιούνται στην κοιλιακή ζώνη του ραχιαίου τελεγκεφάλου και ακολουθούν ακτινωτή μεταναστευτική πορεία, προκειμένου να καταλήξουν στην τελική θέση τους στο φλοιό (Gorski et al, 2002). Εκεί, δημιουργούν διεγερτικές συνάψεις χρησιμοποιώντας ως νευροδιαβιβαστή το γλουταμικό οξύ (glutamate). Η ανάπτυξη και διαφοροποίηση των πυραμιδικών νευρώνων είναι εκτενώς μελετημένη. Μάλιστα, η ακτινωτή μετανάστευση που ακολουθούν φαίνεται ότι είναι καθοριστική για τη δημιουργία των στιβάδων του φλοιού κατά την ανάπτυξη, καθώς μεταλλαγές που επηρεάζουν το συγκεκριμένο τύπο μετανάστευσης, οδηγούν σε μορφολογικές ανωμαλίες των φλοιϊκών στιβάδων (Gupta et al, 2002).

Ο δεύτερος πληθυσμός νευρικών κυττάρων στο φλοιό, είναι οι μη-πυραμιδικοί, ανασταλτικοί ενδονευρώνες. Οι ενδονευρώνες, αποτελούν μόλις το 20% των συνολικών κυττάρων και εντοπίζονται διεσπαρμένοι σε όλες τις στιβάδες του φλοιού. Δημιουργούνται στον κοιλιακό τελεγκεφαλο και μετακινούνται οριζόντια

προς το φλοιό, όπου δημιουργούν κυρίως τοπικές ανασταλτικές συνάψεις με πυραμιδικούς νευρώνες, χρησιμοποιώντας ως νευροδιαβιβαστή το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA). Μέσω των ανασταλτικών συνάψεων με τους πυραμιδικούς νευρώνες, οι ενδονευρώνες εξισορροπούν τη διέγερση του φλοιού, ελέγχουν τη μετάδοση του σήματος και συντονίζουν την ηλεκτρική δραστηριότητα των κατά τόπους νευρικών δικτύων (Marin & Rubenstein, 2001; Molyneaux et al, 2007). Οι ενδονευρώνες αποτελούν περίπου το 20% των νευρώνων του φλοιού και είναι μια πολύ ετερογενής ομάδα, τόσο ως προς τη μορφολογία των κυττάρων και τις ηλεκτροφυσιολογικές τους ιδιότητες, όσο και ως προς το είδος του νευροπεπτιδίου και άλλων πρωτεϊνών που εκφράζουν (Sussel et al., 1999; Butt et al., 2008; Wonders et al., 2008).

Παρά το μικρό ποσοστό τους επί του συνόλου των νευρικών κυττάρων του φλοιού, οι ενδονευρώνες είναι πολύ σημαντικοί σε λειτουργίες όπως η μνήμη και η μάθηση (Lee et al, 2008). Η μη-φυσιολογική ανάπτυξη και η δυσλειτουργία τους, διαταράσσουν την ευαίσθητη ισορροπία μεταξύ διέγερσης και αναστολής στο φλοιό και έχουν συσχετιστεί με σοβαρές παθολογικές καταστάσεις, όπως η επιληψία, η σχιζοφρένεια και ο αυτισμός (Cossart et al., 2005; Woo and Lu, 2006).

3. Προέλευση και καθορισμός των ενδονευρώνων του φλοιού: η περιοχή του MGE

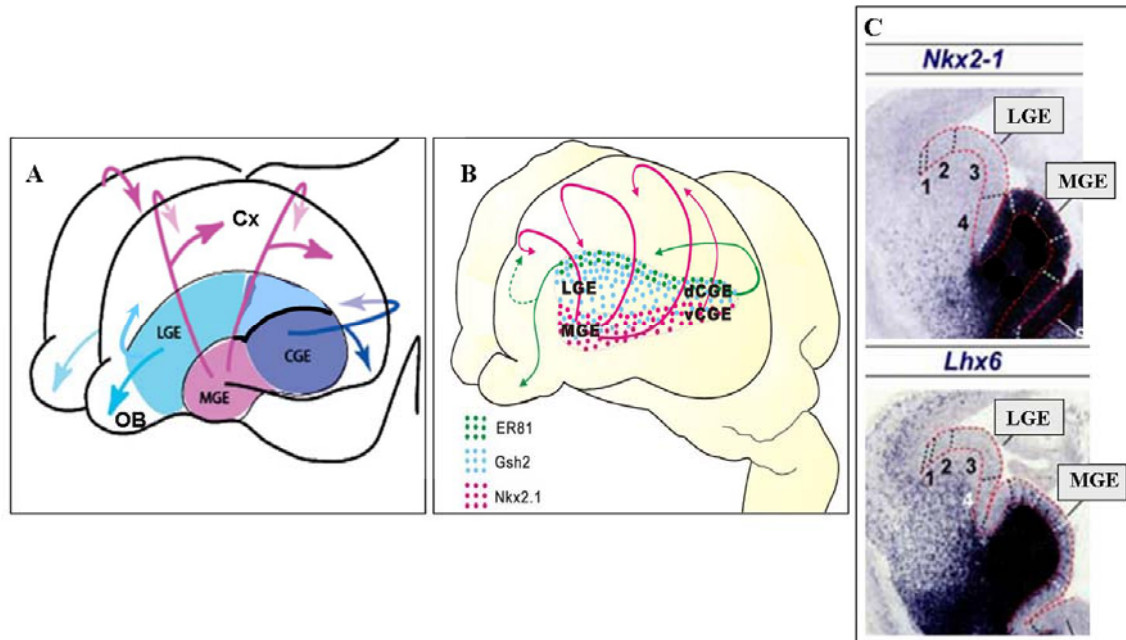
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι ενδονευρώνες του φλοιού, δημιουργούνται στην κοιλιακή ζώνη του βασικού τελεγκεφάλου, η οποία κατά την εμβρυογένεση διαχωρίζεται σε διακριτές περιοχές, την έσω γαγγλιονική προεξοχή, την πλάγια γαγγλιονική προεξοχή και την οπίσθια γαγγλιονική προεξοχή (αναφερόμενες από εδώ και στο εξής, ως MGE, LGE και CGE αντίστοιχα, από τα αρχικά της λατινικής ονομασίας τους) (Anderson et al, 2001; Jimenez et al, 2002). Εργαστηριακές μελέτες την τελευταία δεκαετία, έχουν δείξει ότι από την περιοχή του LGE προέρχονται τα νευρικά κύτταρα που καταλήγουν στους οσφρητικούς λοβούς και το ραβδωτό σώμα (Wichterle et al, 2001), και μόλις ένα πολύ μικρό ποσοστό ενδονευρώνων που καταλήγουν στο φλοιό (Anderson et al, 2001). Αντίθετα, στην περιοχή του MGE και του CGE δημιουργούνται σχεδόν όλοι οι ενδονευρώνες του φλοιού των ημισφαιρίων, όπως έχει δειχθεί από πολλαπλές μελέτες των τελευταίων χρόνων, βασισμένες κυρίως σε μεταμόσχευση κυττάρων και *in vivo* χαρτογράφηση συγκεκριμένων κυτταρικών

πληθυσμών (Wichterle et al, 2001; Nery et al, 2002; Xu et al, 2004; Butt et al, 2005; Flames et al, 2007; Miyoshi et al, 2007) (Εικ. 4A). Ωστόσο, η συμβολή των δύο περιοχών στο συνολικό πληθυσμό των ενδονευρώνων του φλοιού είναι διαφορετική, καθώς θεωρείται ότι η πλειοψηφία των συνολικών κυττάρων προέρχεται από το MGE και μόνο ένα μικρό ποσοστό δημιουργείται στο CGE (Xu et al, 2004; Butt et al, 2005).

Η μορφολογική και λειτουργική διαφοροποίηση των γαγγλιονικών περιοχών στο βασικό τελεγκέφαλο, είναι αποτέλεσμα αυστηρά ελεγχόμενης έκφρασης ενός συνδυασμού εκκρινόμενων και μεταγραφικών παραγόντων, κατά την ανάπτυξη της συγκεκριμένης δομής (Nakajima, 2007; Hebert & Fishell, 2008; Corbin et al, 2008). Πρόσφατες μελέτες έχουν εν μέρει διαφωτίσει το δίκτυο των μεταγραφικών ρυθμιστών και των μηχανισμών που ευθύνονται για την ανάπτυξη των επιμέρους περιοχών του τελεγκεφάλου και των ενδονευρώνων του φλοιού (Flames & Marin, 2005; Metin et al., 2006, Butt et al., 2007). Αρχικά, ένα σύνολο διαφορετικών μορφογόνων, που περιλαμβάνει μόρια όπως το Shh αλλά και πληθώρα άλλων εκκρινόμενων παραγόντων (π.χ. Wnts, FGFs, BMPs), φαίνεται ότι καθορίζει τη διαφοροποίηση των επιμέρους περιοχών του τελεγκεφάλου και των πρόδρομων κυττάρων κάθε περιοχής (Fuccillo et al, 2006; Aboitiz & Montiel, 2007; Hebert & Fishell, 2008). Στη συνέχεια, μέσω μηχανισμών που δεν είναι ακόμα γνωστοί, τα παραπάνω μόρια επάγουν την έκφραση συγκεκριμένων συνδυασμών μεταγραφικών παραγόντων, που συμβάλλουν στην επιπλέον εξειδίκευση των πρόδρομων κυττάρων κάθε επιμέρους περιοχής (Εικ. 4B) (Flames et al, 2007; Corbin et al, 2008).

Παρά τη σημαντική πρόοδο των τελευταίων ετών, όσον αφορά στην περιοχή του MGE, η ταυτότητα της πλειοψηφίας των μορίων που εμπλέκονται στον καθορισμό των πρόδρομων κυττάρων που δημιουργούνται εκεί, παραμένει εν πολλοίς άγνωστη. Μέχρι και σήμερα, ο μοναδικός μεταγραφικός παράγοντας που είναι γνωστό ότι καθορίζει τα όρια της περιοχής του MGE και ως εκ τούτου συμβάλλει στον καθορισμό της πλειοψηφίας των ενδονευρώνων του φλοιού, είναι το Nkx2.1. Η έκφρασή του επάγεται από το μορφογόνο Shh νωρίς κατά την εμβρυογένεση (E10.5) (Fuccillo et al, 2004; Corbin et al, 2008) και εντοπίζεται στα κύτταρα της κοιλιακής και υποκοιλιακής ζώνης του MGE (Εικ. 4C), ενώ δεν εκφράζεται σε καμιά άλλη γαγγλιονική προεκβολή (LGE, CGE) (Sussel et al, 1999; Butt et al, 2005). Η αναγκαιότητα του Nkx2.1 για τον καθορισμό της περιοχής του MGE, έχει δειχθεί σε παλαιότερες μελέτες, όπου απώλεια της δράσης του γονιδίου

είχε ως αποτέλεσμα τα κύτταρα του MGE να αποκτήσουν το χαρακτήρα των κυττάρων του LGE και να καταλήξουν στους οσφρητικούς λοβούς (Sussel et al, 1999).



Εικόνα 4. Προέλευση των ενδονευρώνων και καθορισμός της περιοχής του MGE. (A) Η πλειοψηφία των ενδονευρώνων του φλοιού (Cx), δημιουργείται στην κοιλιακή ζώνη της περιοχής του MGE και ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων προέρχεται από το CGE. Η περιοχή του LGE δίνει κύτταρα που θα μεταναστεύσουν στους οσφρητικούς λοβούς (OB), ενώ σύμφωνα με κάποιες μελέτες ένας πολύ μικρός αριθμός αυτών των κυττάρων καταλήγουν στο φλοιό (Anderson et al, 2001). (B) Συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες εκφράζονται σε κάθε μια από τις γαγγλιονικές προεκβολές κατά την ανάπτυξη, καθορίζοντας την ταυτότητα των πρόδρομων κυττάρων σε κάθε περιοχή. (C) Οι μεταγραφικοί παράγοντες *Nkx2.1* και *Lhx6*, είναι οι βασικοί καθοριστές της περιοχής του MGE και των ενδονευρώνων που προέρχονται από αυτή κατά την εμβρυογένεση. (Τροποποιημένη από Metin et al, 2006; Nakajima, 2007; Flames et al, 2007).

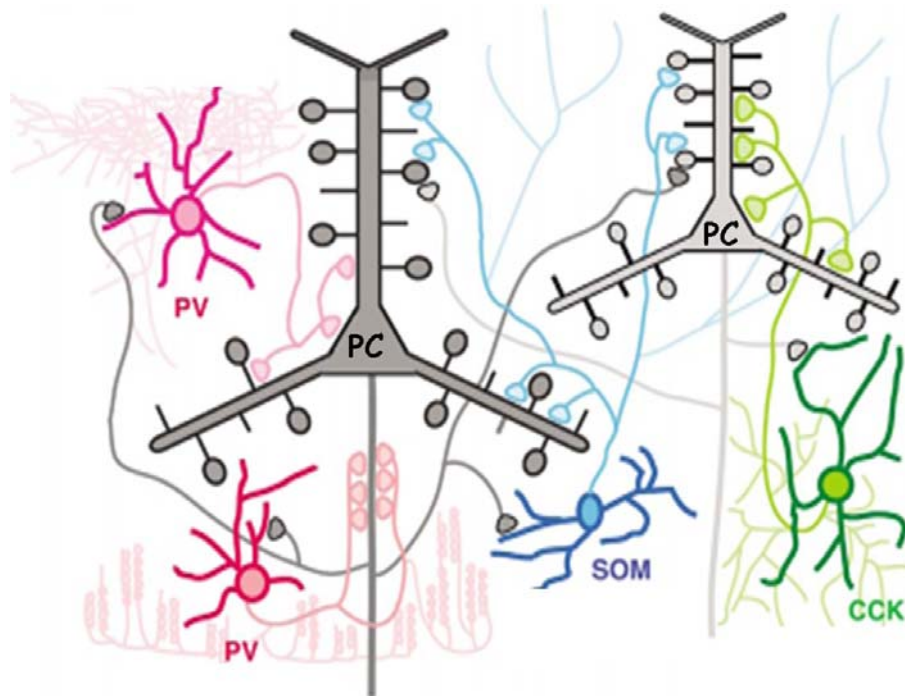
Μέχρι σήμερα, λίγα πράγματα είναι γνωστά για το μηχανισμό με τον οποίο ο μεταγραφικός παράγοντας *Nkx2.1* καθορίζει την περιοχή του MGE και την ταυτότητα των κυττάρων που δημιουργούνται εκεί. Φαίνεται ωστόσο, ότι η δράση

του συγκεκριμένου μορίου στα κύτταρα της περιοχή του MGE σχετίζεται άμεσα με την ενεργοποίηση ενός άλλου μεταγραφικού παράγοντα, του Lhx6 (Butt et al, 2007). Έχειδειχθεί ότι το Nkx2.1 προσδένεται σε μια συντηρημένη περιοχή του υποκινητή του Lhx6 γονιδίου, επάγοντας τη μεταγραφή του (Du et al., 2008). Ο μεταγραφικός παράγοντας Lhx6 εκφράζεται στα κύτταρα της περιοχής του MGE, μόλις αυτά εξέλθουν του κυτταρικού κύκλου και γίνουν μεταμιτωτικά, και κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής τους προς τον αναπτυσσόμενο φλοιό (Εικ 4C), ενώ η έκφρασή του συνεχίζεται και μετά τη γέννηση, στους ενδονευρώνες του ώριμου φλοιού των ημισφαιρίων (Grigoriou et al, 1998; Lavdas et al, 1999; Liodis et al, 2007). Πρόσφατες πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι στο φλοιό των ημισφαιρίων μυών ελλειμματικών για το Lhx6, οι ενδονευρώνες εμφανίζονται σε φυσιολογικούς αριθμούς, αλλά η κατανομή τους στις στιβάδες τους φλοιού δεν είναι φυσιολογική και παραμένουν αδιαφοροποίητοι (Liodis et al, 2007). Επιπλέον τα Lhx6-ελλειμματικά ζώα πεθαίνουν νωρίς και εμφανίζουν επιληπτική δραστηριότητα, γεγονός που υπογραμμίζει τη σημασία του συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα στη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία του φλοιού των ημισφαιρίων (Liodis et al, 2007).

4. Καθορισμός και διαφοροποίηση των ενδονευρώνων του φλοιού

Σε αντίθεση με τους πυραμιδικούς νευρώνες, οι οποίοι εμφανίζουν μορφολογική και λειτουργική ομοιογένεια, οι ενδονευρώνες του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων είναι ένας ετερογενής πληθυσμός κυττάρων. Χαρακτηρίζονται από αξιοσημείωτη ποικιλομορφία, τόσο ως προς τη μορφολογία τους, όσο και ως προς τις μοριακές και ηλεκτροφυσιολογικές τους ιδιότητες (Flames & Marin, 2005; Butt et al, 2007). Ο διαχωρισμός των ενδονευρώνων σε υποκατηγορίες, και η ομαδοποίησή τους βάσει συγκεκριμένων κριτηρίων, έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλαπλών μελετών και αντιπαραθέσεων μεταξύ των νευροεπιστημόνων τα τελευταία χρόνια (Petilla Interneuron Nomenclature Group, PING, 2008). Ένας κοινός αποδεκτός τρόπος κατηγοριοποίησης των ενδονευρώνων, είναι βάσει της έκφρασης των πρωτεϊνών για τη δέσμευση ασβεστίου, ή του νευροπεπτιδίου που εκφράζουν. 3 είναι οι βασικοί υποπληθυσμοί ενδονευρώνων που διακρίνονται με βάση τα παραπάνω κριτήρια. Ο πρώτος υποπληθυσμός περιλαμβάνει

τα κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη δέσμησης ασβεστίου παραλβουμίνη (PVA ή PV) και αποτελούν την πολυπληθέστερη υποομάδα ενδονευρώνων. Ο δεύτερος σε μέγεθος υποπληθυσμός, χαρακτηρίζεται από την έκφραση του νευροπεπτιδίου της σωματοστατίνης (Som), ενώ ο τρίτος βασικός υποπληθυσμός, περιλαμβάνει τα κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη δέσμησης ασβεστίου καλρετινίνη (CR) (Markram et al, 2004; Flames & Marin 2005). Πρόσφατες μελέτες καταγραφής της διαφοροποίησης των ενδονευρώνων, έχουν δείξει ότι υπάρχει μικρού βαθμού αλληλεπικάλυψη μεταξύ των δύο τελευταίων ομάδων κυττάρων, καθώς κάποια som⁺ κύτταρα μπορεί να εκφράζουν και CR (Flames et al, 2007; Fogarty et al, 2007; Wonders et al, 2008).



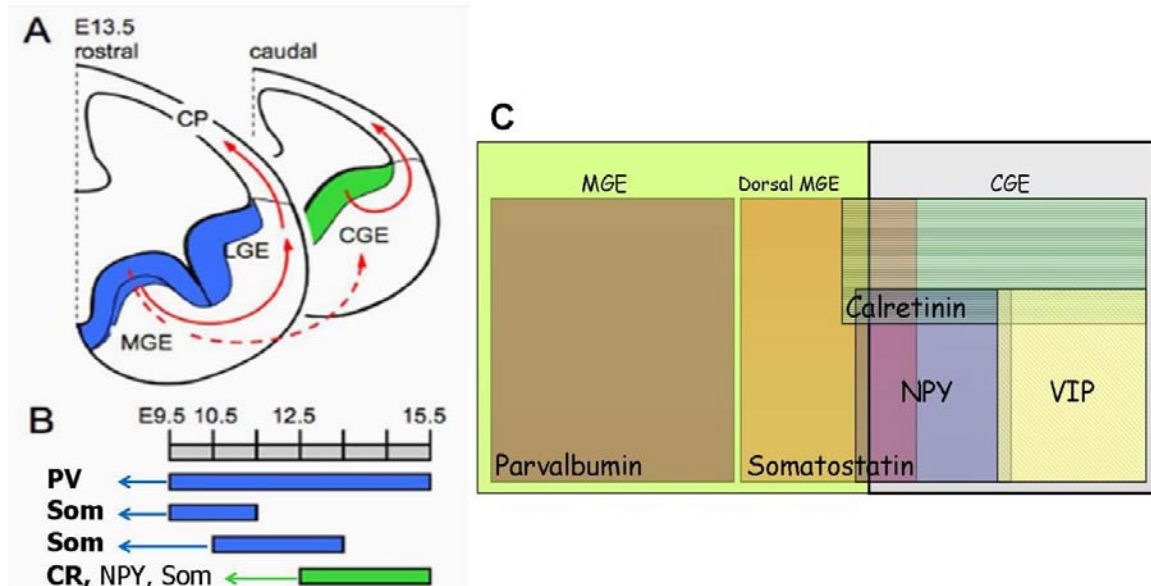
Εικόνα 5. Απεικόνιση της ποικιλομορφίας των ενδονευρώνων του φλοιού. Οι ενδονευρώνες αποτελούν μια ετερογενή ομάδα κυττάρων με ποικίλα μορφολογικά, μοριακά και ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά και συναπτικές δυνατότητες. PV: parvalbumin, Som: somatostatin, CCK: Cholecystokinin, PC: Pyramidal Cell, πυραμιδικοί νευρώνες (τροποποιημένη από Kawaguchi & Kondo, 2002).

Εκτός από τις βασικές υποομάδες ενδονευρώνων, υπάρχουν και μικρότερες υποομάδες που εκφράζουν συγκεκριμένα νευροπεπτίδια, ωστόσο η έκφρασή τους συχνά συμπίπτει με την έκφραση κάποιου από τους παραπάνω βασικούς μοριακούς δείκτες. Σε αυτές περιλαμβάνονται τα κύτταρα που εκφράζουν το νευροπεπτίδιο NPY (Neuropeptide Y), το νευροπεπτίδιο VIP (Vasoactive Intestinal Polypeptide) και το νευροπεπτίδιο χολοκυστοκινίνη (CCK) (Kubota et al, 1994; Wichterle et al 2001; Kawaguchi & Kondo, 2002; Flames & Marin, 2005). Κάθε ένας από τους ξεχωριστούς υποπληθυσμούς ενδονευρώνων, εμφανίζει διαφορετικά χαρακτηριστικά, τόσο ως προς τη μορφολογία των κυττάρων όσο και ως προς τις ηλεκτροφυσιολογικές τους ιδιότητες και τις συνάψεις που δημιουργούν στους πυραμιδικούς νευρώνες (π.χ. στο σώμα, στον άξονα, στους δενδρίτες, κτλ) (Εικ. 5) (Kawaguchi & Kondo, 2002; Fishell, 2007; Ascoli et al, 2008).

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, δεν προέρχονται όλοι οι ενδονευρώνες του φλοιού από την ίδια περιοχή του αναπτυσσόμενου εγκεφάλου. Η ύπαρξη διακριτών σημείων προέλευσης των ενδονευρώνων θα μπορούσε να ευθύνεται για την ποικιλομορφία των κυττάρων αυτών και τις διακριτές ιδιότητές τους. Πράγματι, πειραματικές μελέτες για την καταγραφή της αναπτυξιακής πορείας συγκεκριμένων κυττάρων (fate-mapping), έχουν δείξει ότι η περιοχή προέλευσης των κυττάρων είναι ο καθοριστικός παράγοντας για τη μελλοντική τους ταυτότητα και 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). Συγκεκριμένα, στην περιοχή του MGE, που όπως έχει αναφερθεί καθορίζεται από την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων Nkx2.1 και Lhx6, γεννιούνται οι ενδονευρώνες που θα σχηματίσουν τους PV⁺ και Som⁺ πληθυσμούς. Αντίθετα, από την περιοχή του CGE, όπου δεν εκφράζονται οι μεταγραφικοί παράγοντες Nkx2.1 και Lhx6, προκύπτουν οι CR⁺ ενδονευρώνες, καθώς και οι υποπληθυσμοί που εκφράζουν NPY και VIP (Εικ. 6A) (Butt et al, 2005; Fogarty et al., 2007).

Ένας επιπλέον παράγοντας που συμβάλλει στην ποικιλομορφία των ενδονευρώνων, είναι ο χρόνος γέννησης των εν λόγω κυττάρων. Φαίνεται ότι ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο δημιουργούνται οι ενδονευρώνες κάθε περιοχής, διαφοροποιούνται προς συγκεκριμένο υποπληθυσμό (Εικ. 6B) (Miyoshi et al, 2007; Butt et al, 2007). Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, συχνά υπάρχει αλληλεπικάλυψη μεταξύ των υποπληθυσμών των ενδονευρώνων, κυρίως στα

κύτταρα που προέρχονται από τα όρια των διακριτών περιοχών, η οποία ενδέχεται να οφείλεται στο συνδυασμό των μεταγραφικών παραγόντων και των μορφογόνων που δρουν στα σημεία αυτά (Εικ. 6C) (Flames et al, 2007; Fishell, 2007).



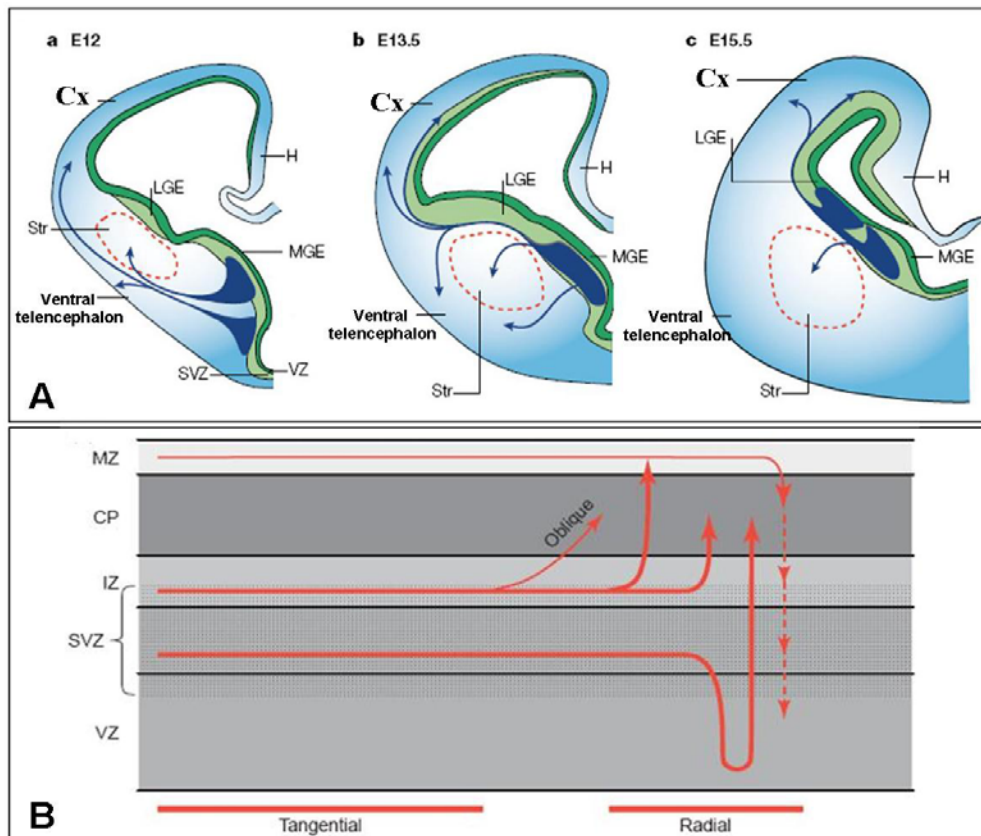
Εικόνα 6. Προέλευση και διαφοροποίηση των ενδονευρώνων του φλοιού. Σε κάθε γαγγλιονική περιοχή του αναπτυσσόμενου βασικού τελεγκεφάλου, δημιουργούνται διαφορετικοί πληθυσμοί ενδονευρώνων που μεταναστεύουν προς το φλοιό (A). Οι PV^+ και η πλειοψηφία των Som^+ ενδονευρώνων προέρχονται από το MGE σε διαφορετικά χρονικά στάδια, ενώ οι CR^+ , NPY^+ , VIP^+ και ένας μικρός πληθυσμός των Som^+ ενδονευρώνων γεννιούνται στο CGE (B). Φαίνεται ότι κάποιοι από τους υποπληθυσμούς που δημιουργούνται κυρίως στα όρια των διακριτών περιοχών του βασικού τελεγκεφάλου, εμφανίζουν αλληλεπικάλυψη στην έκφραση των νευροπεπτιδίων και των πρωτεϊνών δέσμευσης ασβεστίου τους (C). (Τροποποιημένη από Butt et al, 2007).

Πρόσφατες πειραματικές μελέτες της γενεαλογίας των πρόδρομων κυττάρων στο βασικό τελεγκέφαλο, έχουν δείξει ότι από την περιοχή του MGE και τα πρόδρομα κύτταρα που εκφράζουν Nkx2.1, προέρχονται εκτός από τους ενδονευρώνες του φλοιού και οι ενδονευρώνες που καταλήγουν στο ραβδωτό σώμα. Ωστόσο, τα εν λόγω κύτταρα δεν καθορίζονται από το μεταγραφικό παράγοντα Lhx6, αλλά από ένα άλλο μόριο της ίδιας οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων, το Lhx7

(Fragkouli et al, 2005). Λόγω αυτής της διαφοράς, οι ενδονευρώνες του ραβδωτού σώματος δεν αποκτούν τον GABAεργικό φαινότυπο, αλλά γίνονται χολινεργικοί, χρησιμοποιώντας ως νευροδιαβιβαστή την ακετυλοχολίνη (Fragkouli et al, 2005; Fragkouli et al, 2009). Περαιτέρω αναλύσεις των πρόδρομων κυττάρων που εκφράζουν Nkx2.1, έχουν δείξει ότι από τα κύτταρα αυτά προέρχεται και ένας μικρός πληθυσμός ολιγοδενδροκυττάρων που καταλήγουν στο φλοιό των ημισφαιρίων (Kessarlis et al, 2006; Fogarty et al, 2007). Και πάλι, τα συγκεκριμένα κύτταρα δεν χαρακτηρίζονται από την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Lhx6, ο οποίος θεωρείται κατ' εξοχήν μοριακός δείκτης των GABAεργικών ενδονευρώνων του φλοιού (Liodis et al, 2007).

5. Οριζόντια μετανάστευση των ενδονευρώνων προς το φλοιό

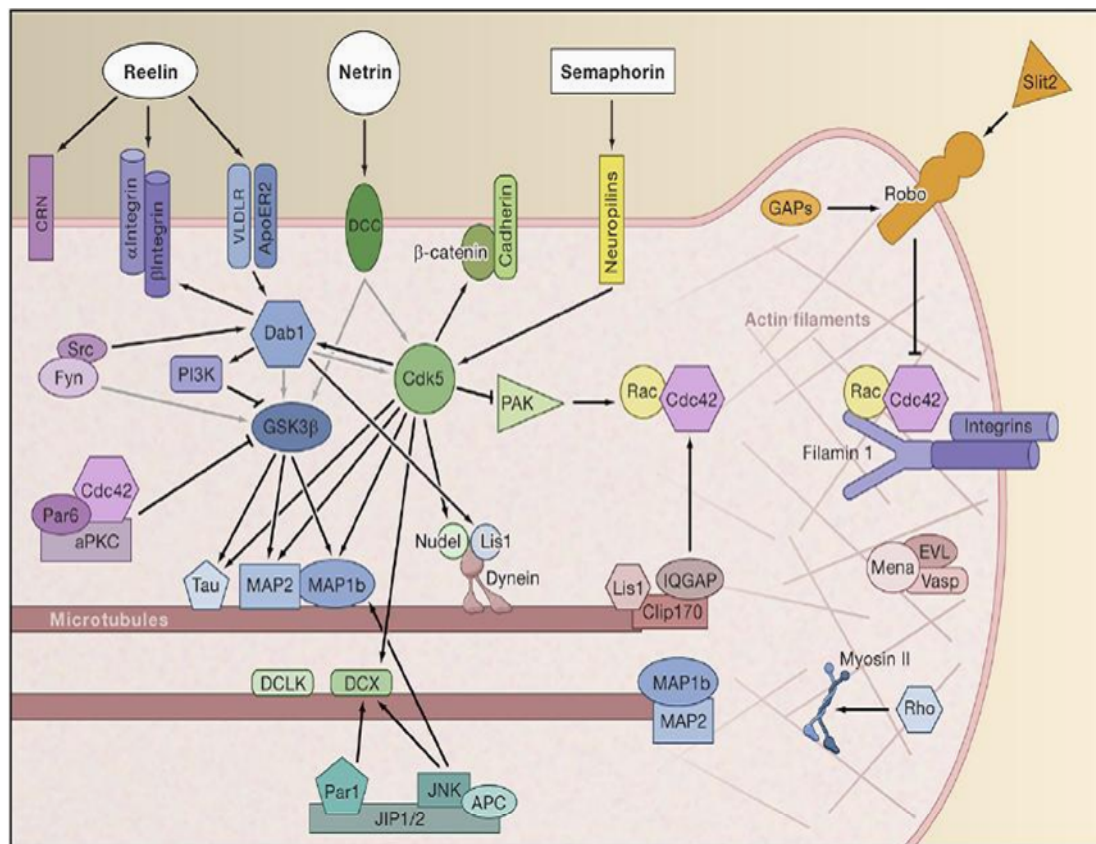
Οι ενδονευρώνες του φλοιού των ημισφαιρίων, ταυτοποιήθηκαν αρχικά ως ο πληθυσμός των νευρικών κυττάρων που δημιουργείται στο βασικό τελεγκέφαλο και μεταναστεύει προς τον αναπτυσσόμενο φλοιό ακολουθώντας οριζόντια πορεία, παράλληλη στην εξωτερική επιφάνεια του ιστού (De Carlos et al., 1996; Tamamaki et al., 1997; Anderson et al, 1997). Έκτοτε, πολλές πειραματικές μελέτες έχουν εστιαστεί στην οριζόντια μετανάστευση των κυττάρων αυτών και στην αξιοθαύμαστη ικανότητά τους να διανύουν τόσο μεγάλη απόσταση από την περιοχή της δημιουργίας τους, προκειμένου να αποκτήσουν την τελική θέση τους στο φλοιό και να ενσωματωθούν σε λειτουργικά δίκτυα. Παρά το έντονο ενδιαφέρον για τη συγκεκριμένη αναπτυξιακή διαδικασία, οι μηχανισμοί που τη διέπουν δεν είναι πλήρως κατανοητοί μέχρι σήμερα. Είναι ωστόσο αποδεδειγμένο, ότι η μη φυσιολογική μετανάστευση των ενδονευρώνων στο φλοιό, αποτελεί τη βάση για νευρολογικές παθήσεις, όπως το σύνδρομο Miller-Dieker (Pancoast et al., 2005) και το σύνδρομο X-linked lissencephaly (Kato and Dobyns, 2005). Τα συγκεκριμένα σύνδρομα αποτελούν περιπτώσεις λισεγκεφαλίας (lissencephaly), μιας κατάστασης που στον άνθρωπο χαρακτηρίζεται από πάχυνση του φλοιού και απώλεια των πτυχώσεών του, και οδηγεί σε διανοητική καθυστέρηση και επιληψία.



Εικόνα 7. Η μεταναστευτική πορεία των ενδονευρώνων από το βασικό τελεγκέφαλο προς το φλοιό. (A) a. Στα πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης (E12) το MGE αποτελεί τη βασική πηγή προέλευσης των μεταναστευτικών νευρώνων, οι οποίοι εντοπίζονται στην επιχείλια ζώνη (MZ) της προφλοιϊκής πλάκας του φλοιού (Cx). b. Στα ενδιάμεσα στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης (E13.5) οι ενδονευρώνες ανιχνεύονται στην ενδιάμεση (IZ) και υποκοιλιακή ζώνη (SVZ) του φλοιού, δημιουργώντας τη φλοιϊκή πλάκα (CP). 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 σώματος (Str-striatum) όπου μεταναστεύει ένας υποπληθυσμός των κυττάρων που γεννιούνται στον βασικό τελεγκέφαλο (B) Οι ενδονευρώνες που εισέρχονται στο φλοιό, αρχίζουν να κινούνται ακτινωτά, προκειμένου να καταλάβουν τις τελικές θέσεις τους σε στιβάδες. (Τροποποιημένη από Marin & Rubenstein, 2001; Kriegstein & Noctor, 2004).

Ανάλογα με την περιοχή στην οποία δημιουργούνται οι ενδονευρώνες και το χρονικό στάδιο της γέννησής τους, ακολουθούν συγκεκριμένα μεταναστευτικά μονοπάτια προς το φλοιό. Συνοπτικά, στα πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης (E11.5-E13.5), τα οριζόντια μεταναστευτικά κύτταρα προέρχονται από το MGE και

μετακινούνται κατά μήκος της επιχείλιας ζώνης στην προφλοιϊκή πλάκα (Εικ. 7A-a). Λίγο αργότερα κατά την ανάπτυξη (E13.5-E14.5), ένα δεύτερο κύμα οριζόντια μεταναστευτικών κυττάρων από το MGE και το CGE μεταναστεύει κατά μήκος της ενδιάμεσης και της επιχείλιας ζώνη του φλοιού (Εικ. 7A-b). Στα μετέπειτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, οι κυτταρικοί πληθυσμοί που μεταναστεύουν οριζόντια προέρχονται από το MGE/CGE (Corbin et al, 2001; Marin & Rubenstein, 2001; Metin et al, 2006; Nakajima, 2007; Ayala et al, 2007) και εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στην ενδιάμεση, την υποκοιλιακή ζώνη και την επιχείλια ζώνη του φλοιού, ενώ ένας μικρός αριθμός κυττάρων κινείται προς την περιοχή που θα αναπτυχθεί η δομή του ραβδωτού σώματος (Nadarajah et al, 2002) (Εικ 7A-c) (Marin & Rubenstein, 2001). Μόλις εισέλθουν στο φλοιό, οι ενδονευρώνες αλλάζουν κατεύθυνση μετανάστευσης και μετακινούνται πλέον ακτινωτά, καταλαμβάνουν την τελική θέση τους σε στιβάδες (Εικ. 7B) (Tanaka et al, 2003; Nakajima, 2007).



Εικόνα 8. Ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια σήματα που μετέχουν στην καθοδήγηση των νευρώνων κατά τη μετανάστευση. Η μετανάστευση των νευρώνων και η τοποθέτησή τους

στις σωστές θέσεις τους στο φλοιό, είναι υψίστης σημασίας για την οργάνωση των νευρικών δικτύων και τη σωστή λειτουργία του φλοιού. Για το λόγο αυτό, πολλαπλά μόρια συντονίζονται και ρυθμίζουν σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου, καταλήγοντας στις ελεγχόμενες κινήσεις του κυτταροσκελετού (Ayala et al, 2007).

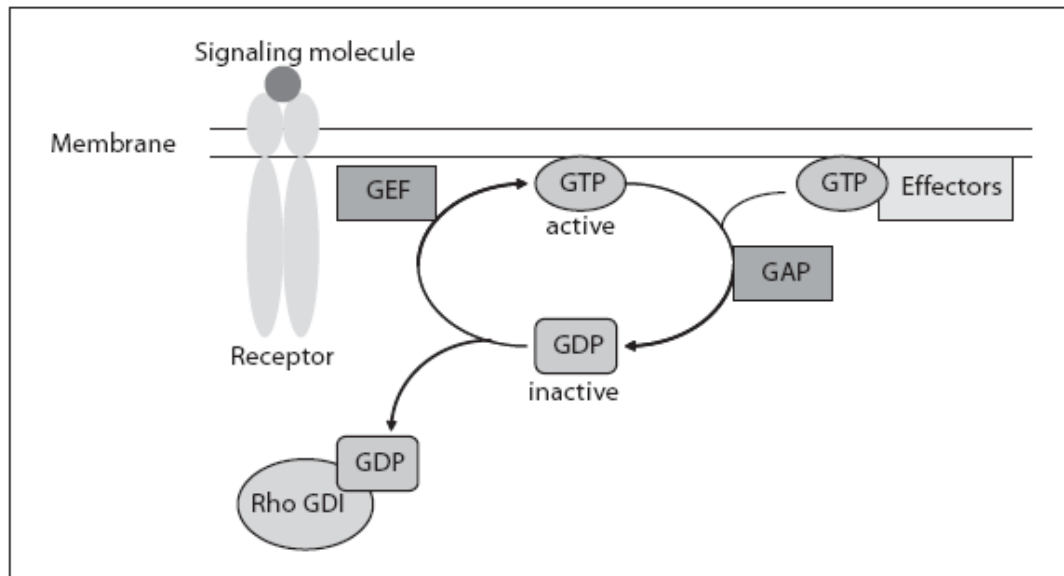
Η οριζόντια μετανάστευση αποτελεί ένα κρίσιμο σημείο κατά την ανάπτυξη των ενδονευρώνων και του φλοιού συνολικά. Για πάρα πολλά χρόνια, βασικό ερώτημα στην αναπτυξιακή νευροβιολογία αποτελούσε ο τρόπος με τον οποίο τα νευρικά κύτταρα βρίσκουν τη σωστή θέση τους μέσα στις στιβάδες του φλοιού και ενσωματώνονται σε λειτουργικά νευρικά δίκτυα, απαραίτητα για τη σωστή λειτουργία του εγκεφάλου. Τα αποτελέσματα πολλαπλών ερευνητικών ομάδων τις τελευταίες δεκαετίες έχουν δείξει ότι η μετανάστευση των νευρώνων είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία, που απαιτεί άψογο συντονισμό κυτταροσκελετικών αλλαγών, ως απόκριση σε ποικίλα εξωκυττάρια σήματα και ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια (Εικ. 8) (Ayala et al, 2007).

B. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΟΥ ΦΛΟΙΟΥ

Οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν τα στάδια ανάπτυξης των ενδονευρώνων, από τη γέννησή τους, ως την οριζόντια μετανάστευση και τη διαφοροποίησή τους, έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας την τελευταία δεκαετία. Μάλιστα έχουν χαρακτηριστεί αρκετά μόρια που μετέχουν στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων, κυρίως στο στάδιο της μετανάστευσής τους. Προκειμένου οι νεογέννητοι νευρώνες να καταλήξουν στις σωστές θέσεις τους στο φλοιό, απαιτείται ο συντονισμός εξωκυττάρων καθοδηγητικών σημάτων, αυξητικών παραγόντων και μορίων κυτταρικής συνάφειας, τα οποία με τη σειρά τους επάγουν ένα εύρος ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών, με τελικό στόχο την αυστηρή ρύθμιση του κυτταροσκελετού. Ορισμένα από αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια είναι μελετημένα εκτενώς (π.χ. το μονοπάτι της Reelin, Εικ. 8) ενώ άλλα, μόλις έχουν

αρχίσει να χαρακτηρίζονται (Marin & Rubenstein, 2001; Marin & Rubenstein, 2003; Ayala et al, 2007).

1. ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΣΗΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΟΥ ΦΛΟΙΟΥ: Η οικογένεια των Rho-GTPασών και η πρωτεΐνη Rac1



Εικόνα 9. Ο κύκλος των Rho-GTPασών. Οι Rho-GTPάσες εναλλάσσονται διαρκώς μεταξύ της ενεργού και της ανενεργού μορφής τους. Οι ενεργοποιημένες πρωτεΐνες είναι συνδεδεμένες με GTP ενώ οι ανενεργές, έχουν προσδεμένο GDP. Ο κύκλος ρυθμίζεται από συγκεκριμένα μόρια, 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). (Koh, 2006)

Οι Rho-GTPάσες ανήκουν στην υπεροικογένεια των μικρών Ras GTPασών. Οι πρωτεΐνες αυτές 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. Στην ενεργή τους μορφή οι Rho GTPάσες αλληλεπιδρούν με πολλές πρωτεΐνες στόχους (Effectors) (Εικ. 9) και ρυθμίζουν πλήθος κυτταρικών διεργασιών, όπως η μεταγραφή

γονιδίων, η δυναμική του κυτταροσκελετού της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων, η μορφολογία και η μετανάστευση των κυττάρων, οι κυτταρικές αλληλεπιδράσεις, η κυτταρική συνάφεια και η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου (Jaffe & Hall, 2005; Watabe-Uchida et al, 2006; Koh, 2006). Σε κάθε περίπτωση, η ενεργοποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών στόχων για την εκτέλεση συγκεκριμένων λειτουργιών, εξασφαλίζεται μέσω της αυστηρής χωροχρονικής ενεργοποίησης των GTPασών (Etienne-Manneville & Hall, 2002). Τα περισσότερο μελετημένα μέλη της οικογένειας των Rho GTPασών είναι η RhoA, η Rac1 και το Cdc42 και είναι γνωστό ότι ενώ οι δυο τελευταίες GTPάσες έχουν παρόμοια και αλληλεπικαλυπτόμενη δράση, η RhoA εμφανίζει ανταγωνιστική δράση με αυτές (Govek et al., 2005).

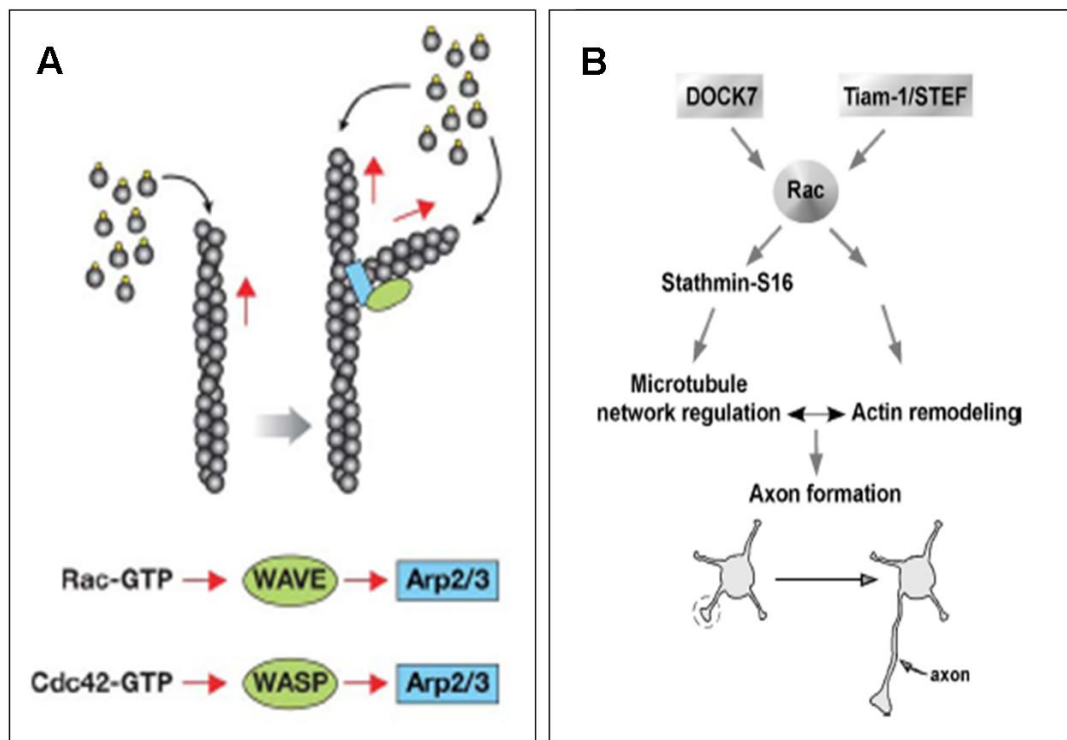
Η Rac1 ανήκει στην υποοικογένεια των Rac GTPασών. Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις Rac GTPάσες, οι Rac1, Rac2 και Rac3. Από αυτές η Rac1 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, η Rac2 είναι ειδική για το αιμοποιητικό σύστημα και η Rac3 εκφράζεται στο νευρικό σύστημα (Haataja et al, 1997; Malosio et al, 1997).

α. Ο ρόλος της Rac1 στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού

Ως μέλος της οικογένειας των Rho-GTPασών η Rac1 έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι μέσω της αλληλεπίδρασής της με το σύμπλοκο πρωτεϊνών WAVE/Arp2/3, η Rac1 προσκολλάται πάνω σε ινίδια ακτίνης και επάγει τον πολυμερισμό και τη δημιουργία διακλαδώσεων, όπως και η Rho-GTPάση Cdc42, η οποία έχει παρόμοια δράση όταν αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο WASP/Arp2/3 (Εικ. 10Α) (Jaffe & Hall, 2005). Επιπλέον, φαίνεται ότι μέσω του συμπλόκου IQGAP/CLIP170, η Rac1 είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση του δικτύου των μικροσωληνίσκων κατά την κυτταρική κίνηση (Fukata et al. 2002). Αποτέλεσμα των παραπάνω αλληλεπιδράσεων, είναι η μετακίνηση της μεμβράνης στην καθοδηγητική απόφυση των μεταναστευόντων κυττάρων (Gardiner et al. 2002; Itoh et al. 2002), διαδικασία πολύ σημαντική για τα νευρικά κύτταρα.

Λόγω της ικανότητας της να ρυθμίζει τη δυναμική του κυτταροσκελετού της ακτίνης, η Rac1 φαίνεται ότι μπορεί να επάγει τη δημιουργία λαμελιποδίων σε επιθηλιακά κύτταρα σε καλλιέργεια (Miki et al, 1998; Miki et al, 2000), ενώ έχει

δειχθεί ότι έχει τη δυνατότητα να επάγει τη δημιουργία νευριτών (Sarner et al, 2000) αλλά και τη δημιουργία, επιμήκυνση και καθοδήγηση νευραξόνων *in vitro* (Yoshizawa et al, 2005). Επιπλέον, πειράματα σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων από τον ιππόκαμπο, έχουν δείξει ότι η Rac1 οδηγεί στην επαγωγή και επέκταση νευραξόνων (Εικ. 10B) (Schwamborn et al, 2004).



Εικόνα 10. Ρόλος της Rac1 στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και στην αξονογένεση. (A) Μέσω της αλληλεπίδρασής της με το πρωτεϊνικό σύμπλοκο WAVE/Arp2/3, η Rac1 προσδένεται πάνω σε ινίδια ακτίνης και επάγει τον πολυμερισμό και τη δημιουργία διακλαδώσεων. Αντίστοιχα λειτουργεί και το Cdc42, μέσω του συμπλόκου WASP/Arp2/3. (B) Μια από τις πιθανές λειτουργίες της Rac1 στο νευρικό σύστημα, περιλαμβάνει την αλληλεπίδρασή της με μόρια effectors (π.χ. Stathmin) και τη ρύθμιση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων για τη δημιουργία των αξόνων. (Τροποποιημένη από Jaffe & Hall, 2005 και Watabe-Ushida et al, 2006).

Η δυναμική αλληλεπίδραση των στοιχείων του κυτταροσκελετού της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων, είναι υψίστης σημασίας για την απόκριση των αυξητικών

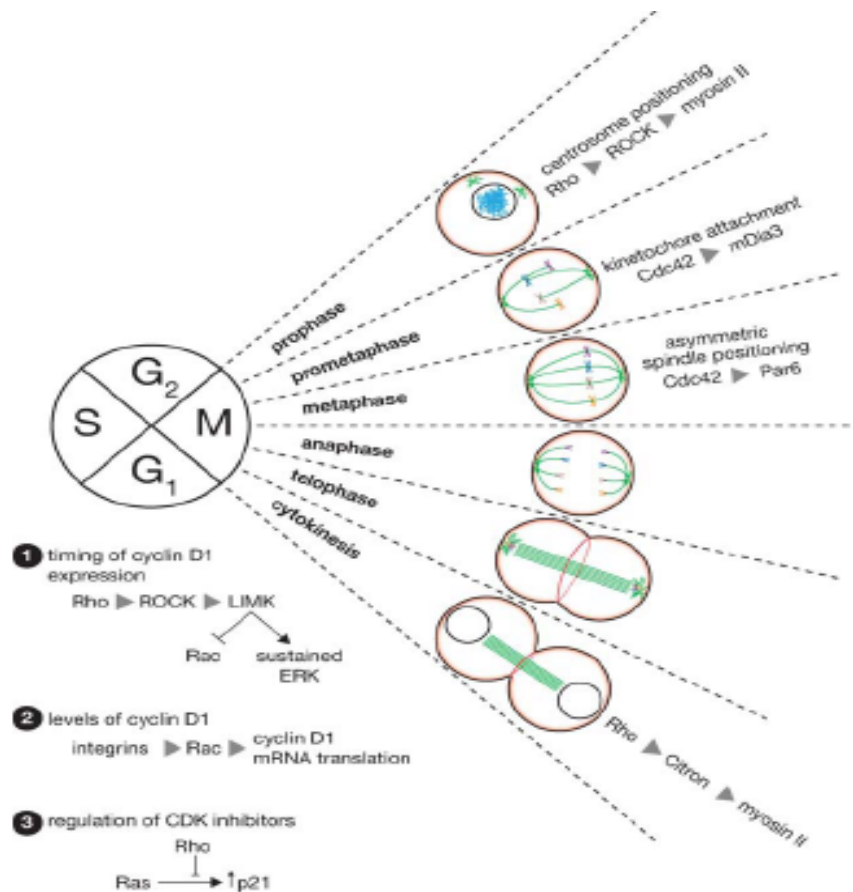
κώνων των νευρικών κυττάρων στα καθοδηγητικά σήματα του περιβάλλοντος (Dent et al., 2001; Zhou et al., 2004). Ο ρόλος της Rac1 στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού και η δυνατότητά της να επάγει τη δημιουργία νευραξόνων *in vitro*, έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών ομάδων, στον πιθανό *in vivo* ρόλο του μορίου κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, που περιλαμβάνει διεργασίες άρρηκτα συνδεδεμένες με τη δυναμική του κυτταροσκελετού. Όμως, μια τέτοια μελέτη, είναι πολύ δύσκολη, καθώς το συγκεκριμένο μόριο βρίσκεται στο μέσον μιας πληθώρας σηματοδοτικών μονοπατιών και η απώλειά της δράσης του στον ποντικό οδηγεί σε θάνατο των εμβρύων κατά τη γαστριδίωση, πριν τη δημιουργία του νευρικού συστήματος (Sugihara et al., 1998). Τα τελευταία χρόνια έχουν χρησιμοποιηθεί διαγονιδιακές σειρές ζώων και προσεγγίσεις, που επιτρέπουν τη μελέτη του ρόλου της Rac1 σε επιμέρους συστήματα. Έτσι, έχουν προκύψει δεδομένα που εμπλέκουν τη Rac1 *in vivo* σε πολλαπλές διεργασίες, αλλά έχουν επίσης δείξει ότι ο ρόλος της μπορεί να διαφέρει μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών και αυτό μπορεί να οφείλεται στα διαφορετικά μόρια που ενεργοποιούν τη Rac1, ή στα διαφορετικά καθοδικά σήματα που ενεργοποιεί η συγκεκριμένη GTPάση (Jaffe & Hall, 2005; Watabe-Ushida et al., 2006).

Στο νευρικό σύστημα *in vivo* έχει δειχθεί, ότι η Rac1 εμπλέκεται σε πολλαπλές διαδικασίες, όπως η δημιουργία των νευριτών, η καθοδήγηση των αξόνων και των δενδριτών, η μετανάστευση των νευρώνων και η μυελίνωση, αλλά ο μηχανισμός δράσης του μορίου σε κάθε επιμέρους διεργασία παραμένει ακόμα άγνωστος (Luo et al, 1996; Nakayama et al, 2000; Kawauchi et al, 2003; Govek et al, 2005; Nodari et al, 2007). Πιο συγκεκριμένα, στον αναπτυσσόμενο ραχιαίο τελεγκέφαλο φαίνεται ότι η Rac1 συνεντοπίζεται και αλληλεπιδρά με την κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση Cdk5, η οποία είναι απαραίτητη για τη μετανάστευση των πυραμιδικών νευρώνων (Nikolic et al.,1998) και η απενεργοποίησή της στην εν λόγω περιοχή αναστέλλει τη μετανάστευση των συγκεκριμένων νευρώνων (Kawauchi et al., 2003). Επιπλέον, με τη χρήση συγκεκριμένων διαγονιδιακών σειρών και την τεχνολογία τους Cre-loxP συστήματος, έχει δειχθεί ότι απώλεια της Rac1 από ολόκληρο τον τελεγκέφαλο κατά την ανάπτυξη, επηρεάζει την ανάπτυξη βασικών αξονικών πληθυσμών του εγκεφάλου, όπως το μεσολόβιο (corpus callosum) και ο πρόσθιος σύνδεσμος των ημισφαιρίων (anterior commissure) (Chen et al, 2007). Στα ίδια διαγονιδιακά ζώα, η απενεργοποίηση της Rac1 έχει ως αποτέλεσμα την

καθυστερημένη μετανάστευση των πυραμιδικών νευρώνων και την αναστολή της μετανάστευσης των ενδονευρώνων από το βασικό τελεγκέφαλο (Chen et al, 2007).

β. Ο ρόλος της Rac1 στην ομαλή εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου

Εκτός από το ρόλο της στην αξονογένεση και τη μετανάστευση των νευρικών κυττάρων, η Rac1 φαίνεται ότι επηρεάζει την ανάπτυξη του εγκεφάλου συμμετέχοντας και σε διεργασίες όπως ο πολλαπλασιασμός και η ομαλή εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου των πρόδρομων νευρικών κυττάρων. Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου δημιουργούνται στην κοιλιακή ζώνη και αφού εξέλθουν του κυτταρικού κύκλου, μεταβαίνουν στην υποκοιλιακή ζώνη και ξεκινούν τη μετανάστευση προς τις τελικές θέσεις τους στο φλοιό (Marin & Rubenstein, 2003; Ayala et al, 2007). Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι απενεργοποίηση του γονιδίου της Rac1 σε ολόκληρο τον αναπτυσσόμενο εγκεφαλο, έχει ως αποτέλεσμα την πρόωρη έξοδο των πρόδρομων κυττάρων της περιοχής του LGE και του ραχιαίου τελεγκέφαλου από τον κυτταρικό κύκλο (Chen et al, 2009). Το φαινόμενο αυτό οδηγεί σταδιακά στη μείωση του αριθμού των πρόδρομων νευρικών κυττάρων, και τελικά σε μικροκεφαλία (Chen et al, 2009). Ο ρόλος αυτός της Rac1 στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, συμφωνεί και με επιπλέον μελέτες που έχουν δείξει ότι το Cdc42 αλλά και η Rac1 ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο των πρόδρομων κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας και η απενεργοποίησή τους, οδηγεί στο μειωμένο πολλαπλασιασμό και την πρόωρη έξοδο των κυττάρων αυτών από τον κύκλο (Fuchs et al, 2009). Ωστόσο, υπάρχουν πολλές παλαιότερες μελέτες που δείχνουν ότι η απώλεια λειτουργίας της Rac1 αλλά και του Cdc42 έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, μέσω αναστολής της φάσης G1 (Olson et al, 1993; Yamamoto et al, 1995). Ο μηχανισμός αυτής της λειτουργίας δεν είναι απόλυτα γνωστός, αλλά εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον κυτταρικό τύπο και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά κάθε κυτταρικού πληθυσμού (Jaffe & Hall, 2005).



Εικόνα 11. Οι Rho-GTPάσες και ο κυτταρικός κύκλος. Οι Rho-GTPάσες, ελέγχουν διαφορετικά στάδια της μίτωσης (M) και της G₁ φάσης του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα επηρεάζουν τη δράση των κυκλινών και των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών κατά τη φάση G₁, ενώ ρυθμίζουν την οργάνωση των μικροσωληνίσκων και του κυτταροσκελετού της ακτίνης κατά τη φάση της κυτταρικής διαίρεσης. Η Rac1, επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης της cyclinD1, καθοδικά σηματοδοτικών μορίων όπως οι ιντεγκρίνες και οι καντχερίνες. (Jaffe & Hall, 2005).

Είναι γνωστό ότι οι Rho-GTPάσες επηρεάζουν τη λειτουργία των κυκλινών και των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών κατά τη διάρκεια της φάσης G₁ του κυτταρικού κύκλου και επιπλέον μετέχουν στην οργάνωση των μικροσωληνίσκων και της ακτίνης κατά τη διάρκεια της μίτωσης (φάση M) (Jaffe & Hall, 2005; Narumiya & Yasuda, 2006; Yasuda et al, 2006). Από την άλλη, η ισορροπημένη έκφραση των κυκλινών και των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cyclin-dependent kinases, Cdk), είναι ιδιαίτερης σημασίας για την ομαλή εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και βρίσκεται υπό τον αυστηρό έλεγχο πολλών μορίων, μεταξύ των οποίων

είναι η Rho και η Rac1 (Welsh et al., 2001). Μάλιστα, έχει δειχθεί ότι η Rac1 επηρεάζει άμεσα τα επίπεδα έκφρασης κυκλινών όπως π.χ. η CyclinD1, καθοδικά σηματοδοτικών μορίων, όπως οι ιντεγκρίνες και οι καντχερίνες (integrins και cadherins) (Εικ. 11) (Mettouchi et al, 2001; Fournier et al, 2008). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι απουσία συγκεκριμένων κυκλινών, όπως η cyclinD2, τα πρόδρομα κύτταρα της περιοχής του MGE εξέρχονται πρόωρα από τον κυτταρικό κύκλο και αυτό επηρεάζει τη μελλοντική διαφοροποίησή τους προς τον υποπληθυσμό PV (Glickstein et al, 2007).

Από όλα τα παραπάνω, είναι φανερό ότι η πρωτεΐνη Rac1, όπως και τα περισσότερα μέλη της οικογένειας των Rho-GTPασών, αποτελεί κομβικό μόριο που μπορεί να συνδέσει, πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια και ως εκ τούτου να επηρεάσει ποικίλες διεργασίες τόσο κατά την ανάπτυξη, όσο και στα ώριμα κύτταρα. Λόγω των ιδιοτήτων της στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού και του ρόλου της σε διεργασίες όπως η κυτταρική μετανάστευση, η μορφολογία, η κυτταρική συνάφεια, ο πολλαπλασιασμός και ο κυτταρικός κύκλος, η Rac1 αποτελεί ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον μόριο για τη μελέτη της λειτουργίας της κατά την ανάπτυξη των ενδονευρώνων του φλοιού. Ωστόσο, η μελέτη τέτοιων μορίων που διαμεσολαβούν πληθώρα σηματοδοτικών μορίων είναι δύσκολη, καθώς ο ρόλος τους μπορεί να διαφέρει σε κάθε κυτταρικό πληθυσμό (Jaffe & Hall, 2005; Fuchs et al, 2009). Για το λόγο αυτό, η στοχευμένη απενεργοποίηση των GTPασών και η χρησιμοποίηση διαγονιδιακών ζώων για την επίτευξή της, είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται και εξελίσσεται ολοένα και περισσότερο.

2. ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑ ΣΗΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΟΥ ΦΛΟΙΟΥ: Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας και η πρωτεΐνη TAG1

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα λειτουργικά νευρικά δίκτυα του φλοιού, προκύπτουν από αυστηρά συντονισμένες κυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, τα νευρικά κύτταρα χρειάζονται τη συνάφεια με το περιβάλλον τους προκειμένου να μετακινηθούν στη σωστή θέση τους, να εκτείνουν άξονες και να δημιουργήσουν συνάψεις. Τα μόρια κυτταρικής συνάφειας, εντοπίζονται στην επιφάνεια των νευρικών κυττάρων και στο μικροπεριβάλλον του νευράξονα και διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο σε όλες τις παραπάνω διεργασίες,

γεγονός που τα καθιστά πολύ σημαντικά για τη σωστή λειτουργία του φλοιού και του νευρικού συστήματος γενικότερα (Katidou, Vidaki et al, 2008). Βάσει της γενετικής συγγένειας και τη δομικής και λειτουργικής ομοιότητας, τα μόρια κυτταρικής συνάφειας κατηγοριοποιούνται σε κάποιες βασικές οικογένειες, οι σημαντικότερες από τις οποίες είναι η οικογένεια των καντχερινών (Cadherins), οι ιντεγκρίνες (Integrins) και η οικογένεια των ανοσοσφαιρινών (Immunoglobulin Superfamily, IgSF).

Η πρωτεΐνη TAG1 (Transient Axonal surface Glycoprotein 1, γνωστή και ως contactin2-cntn2), ανήκει στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών και συγκεκριμένα στην υπο-οικογένεια των contactins (Katidou, Vidaki et al, 2008; Shimoda & Watanabe, 2009). Η έκφραση της TAG1 ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στα γάγγλια της ραχιαίας ρίζας (Dorsal Root Ganglia, DRG) και κατά τη διαφοροποίηση και δημιουργία νευραξόνων στους κινητικούς και συνδεσμικούς νευρώνες του νωτιαίου μυελού (Dodd et al, 1988). Μετέπειτα μελέτες έχουν δείξει ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκφράζεται καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης σε ποικίλους νευρικούς και αξονικούς πληθυσμούς στο νευρικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, έκφραση της TAG1 εντοπίζεται στα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδή (Retinal Ganglion Cells, RGCs) (Chatzopoulou et al, 2008), σε οριζόντια μεταναστεύοντες νευρώνες στην περιοχή του προμήκη μυελού, οι οποίοι σχηματίζουν τους πυρήνες του προπαρεγκεφαλιδικού συστήματος (Kyriakopoulou et al, 2002; Denaxa, Kyriakopoulou et al, 2005) και στους φλοιοθαλαμικούς άξονες, που εκτείνονται από πυραμιδικούς νευρώνες του φλοιού (Denaxa et al, 2001).

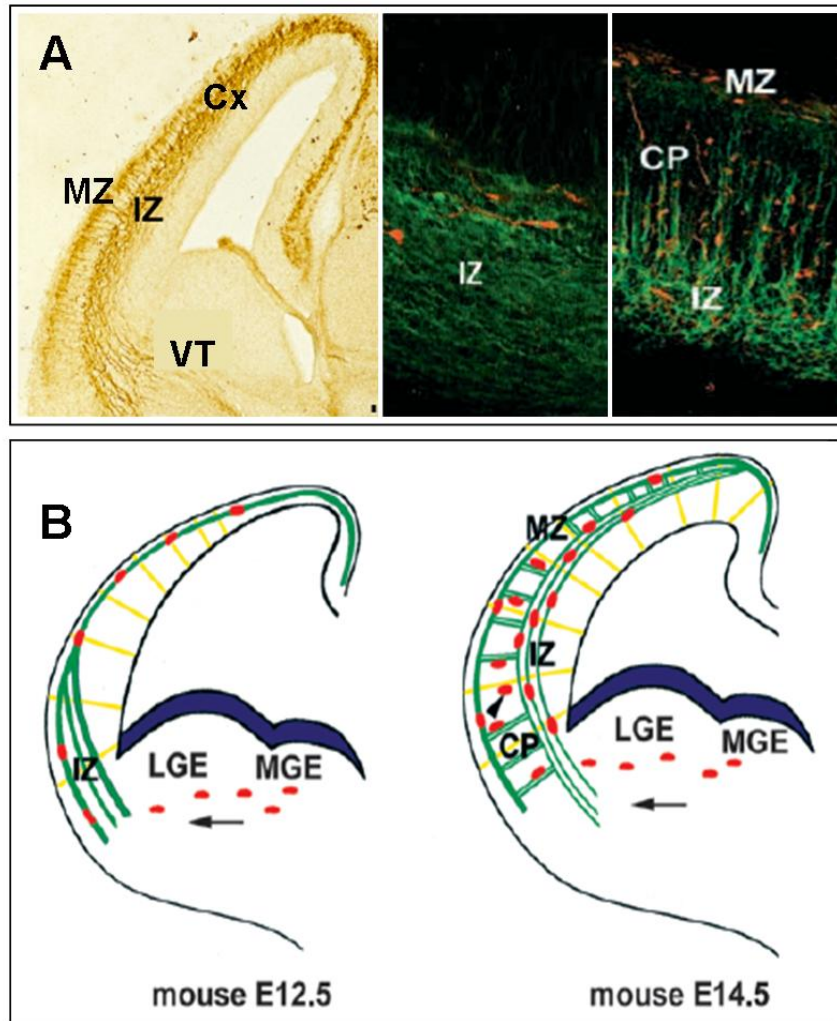
Η έκφραση της TAG1 σε πληθώρα αξονικών και κυτταρικών πληθυσμών κατά την εμβρυογένεση, αντικατοπτρίζει τον πολυσήμαντο ρόλο του μορίου στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος (Katidou, Vidaki et al, 2008; Shimoda & Watanabe, 2009). Πράγματι, έχει βρεθεί ότι η TAG1 μετέχει στην επέκταση και δεσμιδοποίηση αξόνων (Buttiglione et al, 1998), ενώ από πρόσφατες έρευνες προκύπτει ότι ρυθμίζει τη μοριακή οργάνωση των εμμέλων νευρικών ινών (Traka et al, 2002; Traka et al, 2003) και έχει κάποιο ρόλο στην οριζόντια μετανάστευση των νευρώνων τόσο στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, όσο και στον προμήκη μυελό (Denaxa et al, 2001; Kyriakopoulou et al, 2002; Denaxa, Kyriakopoulou et al, 2005). Μάλιστα, η απενεργοποίηση του μορίου στους μεταναστεύοντες νευρώνες του προμήκη μυελού, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού τους, λόγω απόπτωσης και την επακόλουθη μείωση του μεγέθους των αντίστοιχων προπαρεγκεφαλιδικών

πυρήνων (Denaxa, Kyriakopoulou et al, 2005). Τέλος, πρόσφατες μελέτες, εμπλέκουν την TAG1 στη νευρογένεση στον εγκέφαλο, μέσω της επαγωγής του σηματοδοτικού μονοπατιού του APP (β -Amyloid Precursor Protein), υπογραμμίζοντας τον πιθανό ρόλο του μορίου στην πλαστικότητα και την παθολογία του ενήλικου εγκεφάλου (Ma et al, 2008; Mattson & van Praag, 2008).

α) Ο ρόλος της TAG1 στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων του φλοιού

Είναι γνωστό, ότι οι ενδονευρώνες που γεννιούνται στο βασικό τελεγκέφαλο, καθοδηγούνται από πληθώρα σηματοδοτικών μορίων, προκειμένου να φτάσουν στις τελικές θέσεις τους στο φλοιό των ημισφαιρίων (Marin & Rubenstein, 2003). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η TAG-1 εκφράζεται στη μεμβράνη των φλοιοθλαμικών αξόνων (Εικ. 12A) (Denaxa et al, 2001), οι οποίοι κατά την ανάπτυξη εκτείνονται από πυραμιδικούς νευρώνες του φλοιού προς το θάλαμο και δομές του προμήκη και νωτιαίου μυελού. Στο ώριμο νευρικό σύστημα, οι άξονες αυτοί μεταφέρουν νευρικά σήματα από το φλοιό στις περιοχές αυτές, ρυθμίζοντας την απόκριση του οργανισμού σε ερεθίσματα του περιβάλλοντος (Worgotter et al, 2002; Chen et al, 2004; Molyneaux et al, 2007).

Κατά την ανάπτυξη, οι φλοιοθλαμικοί άξονες φαίνεται ότι δημιουργούνται αρχικά ακτινωτά, από την επιχείλια προς την ενδιάμεση ζώνη του αναπτυσσόμενου φλοιού, και στη συνέχεια διατρέχουν το φλοιό κατά μήκος της ενδιάμεσης ζώνης (IZ) σε αναπτυξιακά στάδια που συμπίπτουν με τα στάδια της οριζόντιας μετανάστευσης των ενδονευρώνων (E12.5-14.5) (Εικ, 12A) (Molyneaux et al, 2007). Οι περιοχές εντοπισμού των φλοιοθλαμικών αξόνων, ταυτίζονται με τα μονοπάτια που ακολουθούν οι ενδονευρώνες κατά την οριζόντια μετανάστευσή τους από το βασικό τελεγκέφαλο στο φλοιό (Corbin et al, 2001; Marin & Rubenstein 2001; Marin & Rubenstein, 2003). Λόγω αυτού του συνεντοπισμού των TAG1⁺ αξόνων με τους μεταναστεύοντες ενδονευρώνες, πρόσφατες μελέτες προτείνουν την TAG1 και κατ' επέκταση το σύστημα των φλοιοθλαμικών ινών, ως το υπόστρωμα που επιτρέπει τη μετανάστευση των ενδονευρώνων προς το φλοιό (Εικ. 12B) (Denaxa et al, 2001). Μάλιστα, τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι ενδονευρώνες μετακινούνται πάνω στους εν λόγω άξονες, τόσο κατά την οριζόντια μετανάστευσή τους, όσο και όταν αλλάζουν κατεύθυνση και κινούνται ακτινωτά, προκειμένου να καταλάβουν τις τελικές θέσεις τους στο φλοιό (Denaxa et al, 2001).



Εικόνα 12. Η έκφραση της TAG1 στον αναπτυσσόμενο φλοιό και ο πιθανός ρόλος της στην καθοδήγηση των ενδονευρώνων. (A) Η έκφραση της TAG1 στους φλοιοθαλαμικούς άξονες, που εντοπίζονται στην επιχείλια (MZ) και την ενδιάμεση ζώνη του φλοιού (IZ). Πάνω σε αυτούς του άξονες (με πράσινο στις δυο δεξιές φωτογραφίες) φαίνεται ότι μεταναστεύουν οι ενδονευρώνες που μετακινούνται οριζόντια από το βασικό τελεγκέφαλο (VT), προς το φλοιό (Cx), αλλά και κατά την ακτινωτή τους πορεία στις τελικές τους θέσεις στη φλοιϊκή πλάκα (CP) (κόκκινα κύτταρα στις δυο δεξιές φωτογραφίες). (B) Προτεινόμενη πορεία μετανάστευσης των ενδονευρώνων (με κόκκινο), πάνω στους άξονες που εκφράζουν TAG1 (με πράσινο) σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης του φλοιού (Denaxa et al, 2001)

Η αναστολή της δράσης της TAG1 στο φλοιό *in vitro*, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των νευρώνων που μεταναστεύουν οριζόντια προς το φλοιό, γεγονός που υποστηρίζει τον προτεινόμενο ρόλο της πρωτεΐνης ως υπόστρωμα για τη

συγκεκριμένη μετανάστευση (Denaxa et al, 2001). Ωστόσο *in vivo*, σε ποντικούς ελλειμματικούς για το γονίδιο της TAG1, δεν παρατηρείται αντίστοιχος φαινότυπος (Denaxa, Kyriakopoulou et al, 2005). Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην ύπαρξη άλλων μορίων κυτταρικής συνάφειας στην περιοχή, που αναπληρώνουν τη λειτουργία της TAG1 όταν αυτή απουσιάζει *in vivo* (Denaxa, Kyriakopoulou et al, 2005; Shimoda & Watanabe, 2009). Ως εκ τούτου, ο ρόλος της πρωτεΐνης TAG1, αλλά και των φλοιοθαλαμικών αξόνων στην οριζόντια μετανάστευση των ενδονευρώνων του φλοιού, παραμένει αδιευκρίνιστος.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Οι ενδονευρώνες του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, διαδραματίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη συγκρότηση λειτουργικών νευρικών δικτύων στον εγκέφαλο. Αποτελούν έναν εξαιρετικά ετερογενή πληθυσμό κυττάρων, με ποικίλα μορφολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά και πολλαπλές συναπτικές και ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες. Η ανάπτυξή τους, είναι μια αξιοθαύμαστη διαδικασία κατά την εμβρυογένεση, που βασίζεται στον άψογο συντονισμό πολυπαραγοντικών διεργασιών. Η σημασία της σωστής ανάπτυξης και λειτουργίας των ενδονευρώνων του φλοιού, αντικατοπτρίζεται στις παθολογικές καταστάσεις που προκαλούνται από τη διατάραξη οποιουδήποτε σταδίου κατά τη δημιουργία και ωρίμανση των συγκεκριμένων κυττάρων. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η επιληψία, η σχιζοφρένεια, η διανοητική καθυστέρηση και ο αυτισμός. Παρά τη σημαντική πρόοδο των τελευταίων χρόνων, οι μοριακοί μηχανισμοί που θεμελιώνουν την ανάπτυξη των κυττάρων αυτών, παραμένουν εν πολλοίς άγνωστοι.

Η παρούσα διατριβή είχε ως στόχο τη μελέτη των μηχανισμών που διέπουν την ανάπτυξη των ενδονευρώνων του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Οι πειραματικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιήθηκαν αφορούν στην ανάλυση του ρόλου ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μορίων, αλλά και εξωκυττάρων παραγόντων που εμπλέκονται σε ποικίλα στάδια κατά τη δημιουργία και τη μετανάστευση των ενδονευρώνων. Τα βασικά ερωτήματα που τέθηκαν, είναι τα ακόλουθα:

- Ποιος είναι ο ρόλος της Rho-GTPάσης Rac1 στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων του φλοιού. Δεδομένου του ρόλου της Rac1 σε διεργασίες,

όπως ο πολλαπλασιασμός και η κυτταρική μετανάστευση, η πρωτεΐνη απενεργοποιήθηκε στοχευμένα στους ενδονευρώνες, με σκοπό τη μελέτη των ελλειμματικών κυττάρων, ως προς τις διεργασίες αυτές.

- Ποιος είναι ο ρόλος του μορίου κυτταρικής συνάφειας TAG1, ως εξωκυττάρου καθοδηγητικού παράγοντα, στην ανάπτυξη των φλοιοθαλαμικών αξόνων και στην οριζόντια μετανάστευση των ενδονευρώνων προς το φλοιό. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη, χρησιμοποιήθηκε ως εργαλείο για τη δημιουργία δυο σειρών γενετικά τροποποιημένων μυών, με πολλαπλές μελλοντικές εφαρμογές για τη μελέτη διαφόρων αναπτυξιακών διεργασιών στο νευρικό σύστημα.

Αποτελέσματα Ι

*Ενδοκυττάρια σήματα στην ανάπτυξη των
ενδονευρώνων του φλοιού των ημισφαιρίων:*

Ο ρόλος της Rho-GTPάσης Rac1

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε ο ρόλος της GTPάσης Rac1 στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων που προέρχονται από την περιοχή της μεσαίας γαγγλιονικής προεξοχής του βασικού τελεγκεφάλου (MGE). Η πλειοψηφία των κυττάρων αυτών καταλήγει, μέσω οριζόντιας μετανάστευσης, στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, όπου ενσωματώνονται σε νευρικά δίκτυα, σημαντικά για τη σωστή λειτουργία του φλοιού. Οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν τις συγκεκριμένες αναπτυξιακές διεργασίες είναι άγνωστοι και πολύ λίγα μόρια είναι γνωστό ότι εμπλέκονται καθοριστικά στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων του εγκεφάλου.

Η πρωτεΐνη Rac1 ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνών που μετέχουν σε πολλαπλές διαδικασίες, μεταξύ των οποίων είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική μετανάστευση, και η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος της Rac1 στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων, η λειτουργία της απενεργοποιήθηκε στην περιοχή του MGE, μέσω της τεχνολογίας Cre-loxP και τη χρήση κατάλληλων διαγονιδιακών μυών. Αντίθετα με προηγούμενες μελέτες, όπου η πρωτεΐνη απενεργοποιήθηκε σε ολόκληρο τον εγκέφαλο, η στοχευμένη απενεργοποίηση της Rac1 στην περιοχή του MGE, επιτρέπει τη μελέτη του ρόλου της μόνο στους κυτταρικούς πληθυσμούς που προέρχονται από τη συγκεκριμένη περιοχή, περιορίζοντας φαινοτύπους που οφείλονται στην απαλοιφή της πρωτεΐνης σε άλλες δομές του αναπτυσσόμενου φλοιού.

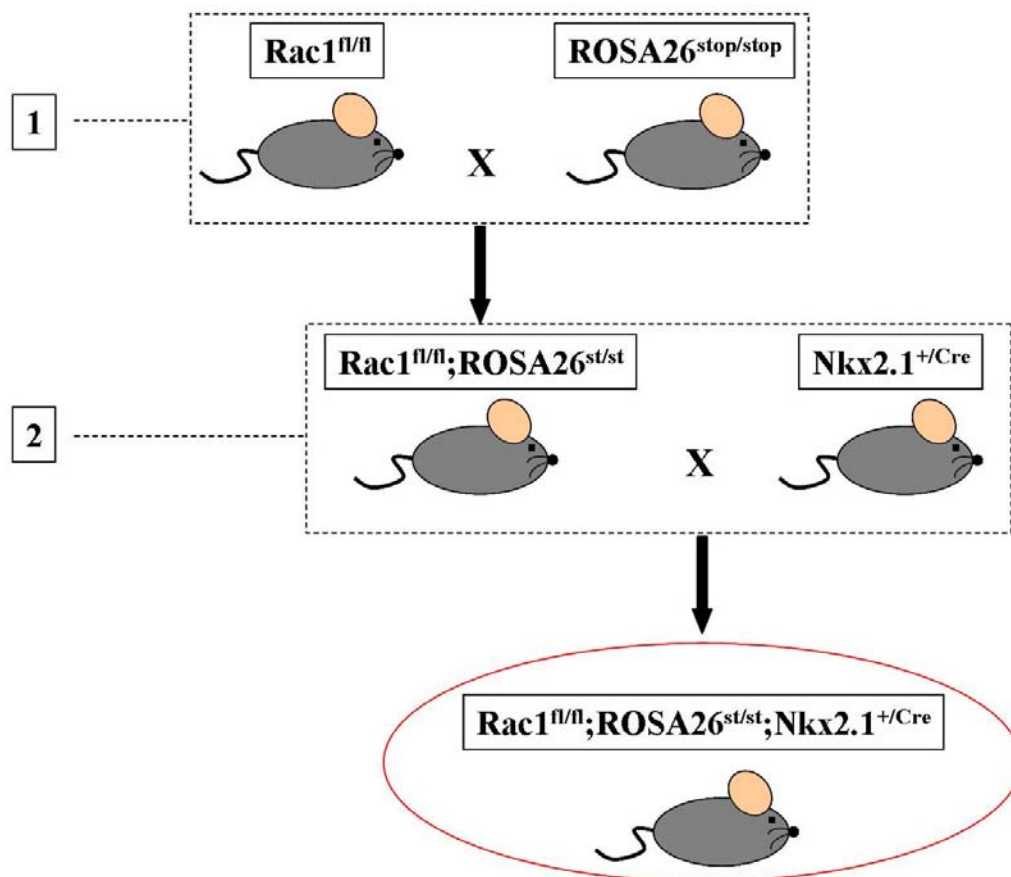
Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι λόγω απενεργοποίησης της Rac1 στα μιτωτικά πρόδρομα κύτταρα της περιοχής του MGE, οι ενδονευρώνες αλλά και τα ολιγοδενδροκύτταρα που δημιουργούνται στην περιοχή αυτή καθυστερούν να εξέλθουν του κυτταρικού κύκλου και να γίνουν μεταμιτωτικά κύτταρα. Ως αποτέλεσμα, λιγότερα κύτταρα μεταναστεύουν προς τον αναπτυσσόμενο φλοιό και το ραβδωτό σώμα, ενώ η έναρξη της μετανάστευσής τους πραγματοποιείται με καθυστέρηση. Λόγω αυτής της μειωμένης και καθυστερημένης μετανάστευσης, όλοι οι υποπληθυσμοί των ενδονευρώνων που προέρχονται από την περιοχή απενεργοποίησης της Rac1 (MGE), είναι μειωμένοι κατά το ήμισυ στον ώριμο φλοιό των ημισφαιρίων αλλά και στο ραβδωτό σώμα των μεταλλαγμένων ζώων, ενώ μειώνεται σημαντικά και ο πληθυσμός των ολιγοδενδροκυττάρων που προέρχονται από τη συγκεκριμένη περιοχή. Αντίστοιχη απενεργοποίηση της Rac1 στα ίδια κύτταρα, όταν αυτά είναι πλέον μεταμιτωτικά, δεν επηρεάζει την ανάπτυξή τους, υπογραμμίζοντας τη σημασία της λειτουργίας της πρωτεΐνης στους πρόδρομους, μιτωτικούς ενδονευρώνες του MGE.

**A. Απενεργοποίηση της Rac-1 στη μεσαία γαγγλιονική προεξοχή του βασικού
τελεγκεφάλου κατά την εμβρυογένεση**

Προκειμένου να μελετηθεί ο ακριβής ρόλος της πρωτεΐνης Rac-1 στην ανάπτυξη των GABAεργικών ενδονευρώνων του φλοιού, πραγματοποιήθηκε στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου, στο συγκεκριμένο πληθυσμό κυττάρων, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία του Cre-loxP ανασυνδυασμού. Χρησιμοποιήθηκαν μύες που φέρουν loxP τόπους ανασυνδυασμού, εκατέρωθεν του 2^{ου} και 3^{ου} εξονίου του γονιδίου της Rac1 (Rac1^{fl/fl}, Walmsley et al, 2003). Αρχικά τα ζώα αυτά διασταυρώθηκαν με ζώα, στα οποία έχει εισαχθεί διαγονίδιο που φέρει τόπους loxP εκατέρωθεν αλληλουχιών που εμποδίζουν την μεταγραφή του γονιδίου της κίτρινης φθορίζουσας πρωτεΐνης YFP (transcription stop sites). Το διαγονίδιο αυτό, βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου ROSA26 (ROSA26-YFP^{stop/stop}). Στα ζώα αυτά η δράση της Cre ρεκομπινάσης οδηγεί σε έκφραση της πρωτεΐνης YFP (Srinivas et al., 2001).

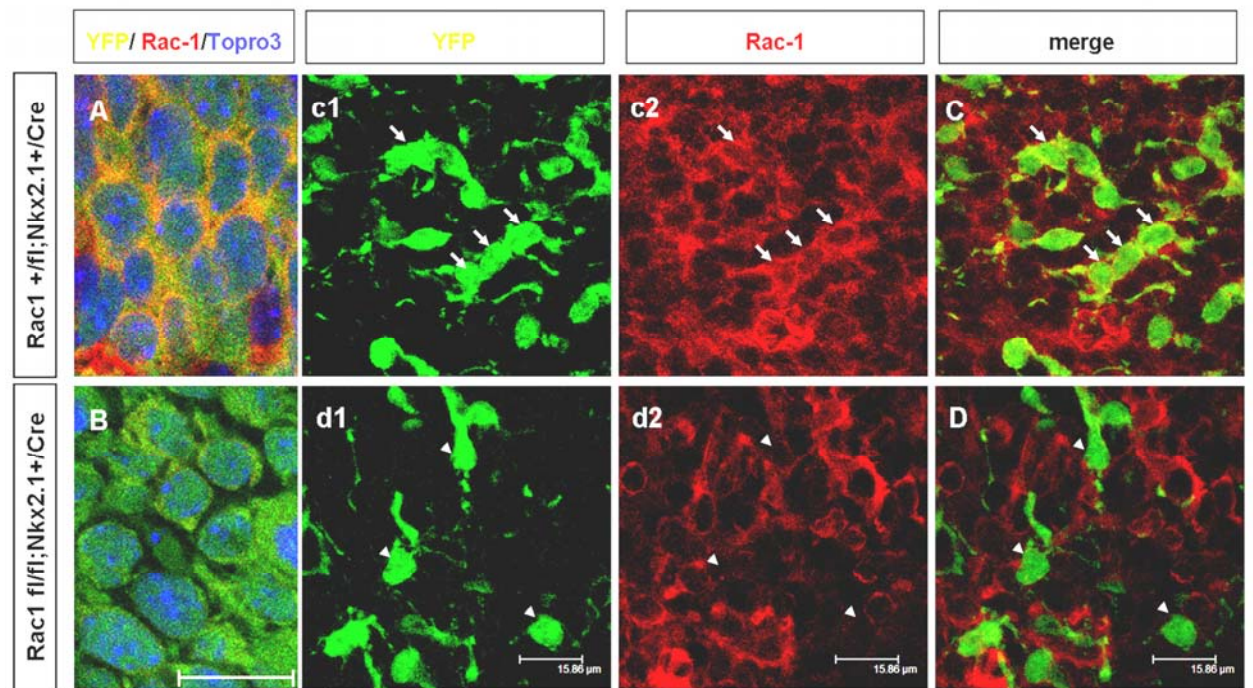
Τα ζώα που προέκυψαν από την παραπάνω διασταύρωση, διασταυρώθηκαν περαιτέρω με διαγονιδιακούς μύες που φέρουν το γονίδιο της Cre-ρεκομπινάσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου Nkx2.1 (Nkx2.1^{+Cre}, Fogarty et al, 2007). Όπως έχει προαναφερθεί, ο μεταγραφικός παράγοντας Nkx2.1 εκφράζεται σε ολόκληρη την περιοχή της μεσαίας γαγγλιονικής προεξοχής του βασικού τελεγκεφάλου (MGE). Μάλιστα, εκφράζεται από τους ενδονευρώνες που γεννιούνται στο MGE, οι οποίοι αποτελούν την πλειοψηφία των GABAεργικών ενδονευρώνων του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Για το λόγο αυτό, η διασταύρωση των Nkx2.1^{+Cre} διαγονιδιακών ζώων με τα Rac1^{fl/fl};ROSA26^{st/st} ζώα, οδηγεί στη στοχευμένη απενεργοποίηση της Rac1 μόνο από τους ενδονευρώνες που προέρχονται από την περιοχή του MGE.

Από τους απογόνους των παραπάνω διασταυρώσεων, προκύπτουν ζώα ομόζυγα για το Rac1^{fl} αλληλίο, στα οποία υπάρχει πλήρης απενεργοποίηση της Rac1 και αποτελούν τα πειραματικά ζώα της συγκεκριμένης εργασίας (αναγραφόμενα ως Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+Cre}), καθώς και ζώα ετερόζυγα για το ίδιο αλληλίο, στα οποία η Rac1 εκφράζεται από το φυσιολογικό αλληλίο και χρησιμοποιούνται ως ζώα ελέγχου (αναγραφόμενα ως Rac1^{+fl};Nkx2.1^{+Cre}). Οι διασταυρώσεις που οδήγησαν στον επιθυμητό γονότυπο για την απενεργοποίηση της Rac1, απεικονίζονται διαγραμματικά στο Σχήμα 1, ενώ ο προσδιορισμός τους γονοτύπου των ζώων που προκύπτουν, έγινε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).



Σχήμα 1. Στοχευμένη απενεργοποίηση της *Rac1* στην περιοχή του MGE. Οι απόγονοι της διασταύρωσης 1, διασταυρώνονται με ζώα $Nkx2.1^{+/Cre}$ (διασταύρωση 2), προκειμένου να προκύψουν ζώα με απενεργοποιημένη *Rac1* στους ενδονευρώνες που προέρχονται από το MGE του βασικού τελεγκεφάλου ($Rac1^{fl/fl}; ROSA26^{stop/stop}; Nkx2.1^{+/Cre}$). Το αλληλίο *Rosa26YFP* αποτελεί ένα ανεξάρτητο μάρτυρα του κυτταρικού πληθυσμού όπου έχει απενεργοποιηθεί η *Rac1*.

Η απενεργοποίηση της *Rac1* στους ενδονευρώνες του MGE, αναμένεται μετά την εμβρυϊκή ημέρα E10.5, καθώς τότε αρχίζει η έκφραση του *Nkx2.1* στην περιοχή. Για να επιβεβαιωθεί η απενεργοποίηση της πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκε διπλός ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της *Rac1* και της έκφρασης της YFP τόσο σε οβελιαίες τομές εγκεφάλων E11.5 (Εικ. 1A και B), όσο και σε εγκεφάλους εμβρύων E13.5 (Εικ. 1c1, c2, C, d1, d2, D). Όπως είναι αναμενόμενο, οι $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ ενδονευρώνες, εκφράζουν YFP αλλά δεν εκφράζουν *Rac1* (Εικ. 1B, d1, d2, D), σε αντίθεση με τα αντίστοιχα κύτταρα στα ετερόζυγα ζώα, όπου η έκφραση της YFP συνεντοπίζεται με αυτή της *Rac1* (Εικ. 1A, c1, c2, C).



Εικόνα 1. Απενεργοποίηση της *Rac1* στους GABAεργικούς ενδονευρώνες που προέρχονται από το MGE. Ανοσοϊστοχημεία σε τομές εγκεφάλων E11.5 (A-B) αποκαλύπτει την απενεργοποίηση της πρωτεΐνης νωρίς κατά την ανάπτυξη και αργότερα, σε έμβρυα E13.5 (C, D). Με πράσινο φαίνεται η έκφραση της YFP, ενώ με κόκκινο η έκφραση της *Rac1*. Οι ενδονευρώνες των ζώων *Rac1*^{+/ft}; *Nkx2.1*^{+/Cre} εκφράζουν YFP και *Rac1* (λευκά βέλη στις φωτογραφίες c1, c2 και C). Αντίθετα, στα ζώα *Rac1*^{fl/fl}; *Nkx2.1*^{+/Cre} οι ενδονευρώνες εκφράζουν μόνο τη YFP, καθώς το γονίδιο της *Rac1* έχει απενεργοποιηθεί (λευκές κεφαλές στις φωτογραφίες d1, d2, D). Κλίμακα A-D: 15.88μm.

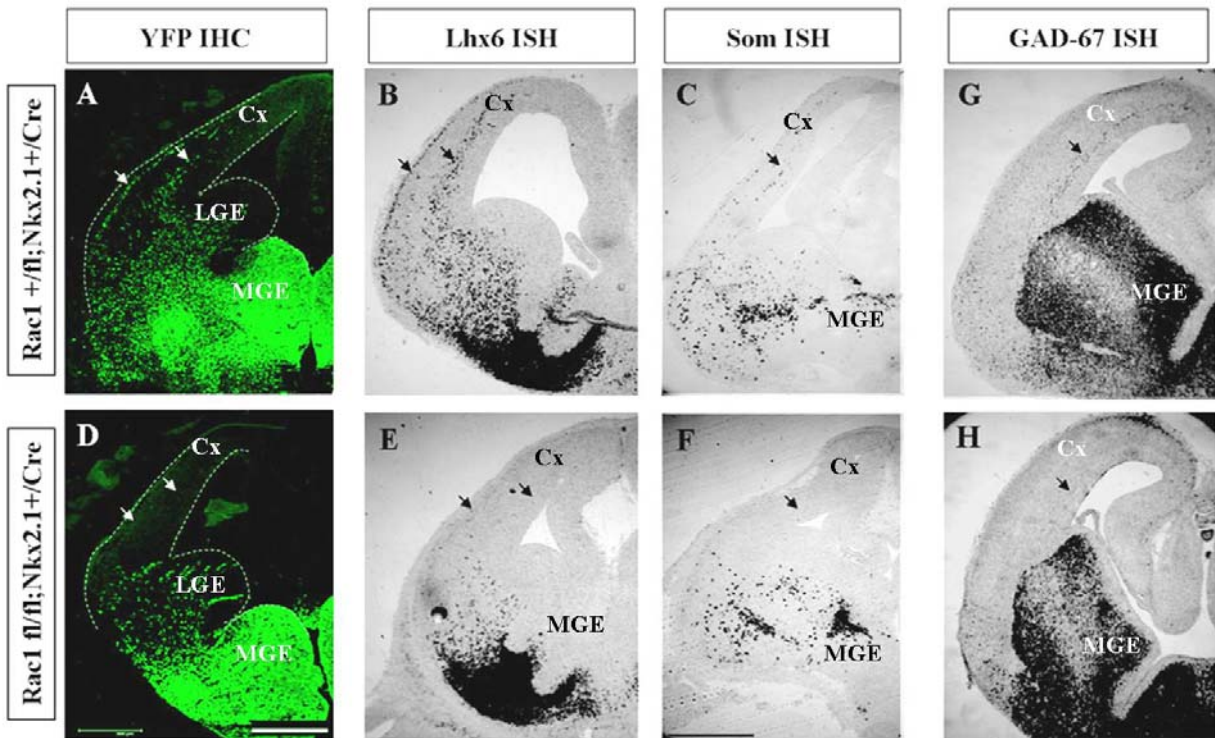
B. Απενεργοποίηση της *Rac1* στα κύτταρα της περιοχής του MGE:

Μελέτη του φαινοτύπου κατά την εμβρυογένεση

1. Η απενεργοποίηση της *Rac1* στα κύτταρα της περιοχής του MGE, εμποδίζει τη μετανάστευσή τους στο αναπτυξιακό στάδιο E13.5

Όπως αναφέρθηκε εισαγωγικά, η πλειοψηφία των ενδονευρώνων των εγκεφαλικών ημισφαιρίων γεννιέται στην περιοχή του MGE, και ήδη κατά την εμβρυϊκή ημέρα E13.5, τα κύτταρα έχουν ξεκινήσει την οριζόντια μετανάστευσή τους προς τον αναπτυσσόμενο

φλοιό και το ραβδωτό σώμα (Marin & Rubenstein, 2003; Metin et al, 2006). Προκειμένου να μελετηθεί η διαδικασία αυτή στα $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ ζώα, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία για την πρωτεΐνη YFP, η οποία εκφράζεται μόνο από τα κύτταρα όπου η $Rac1$ είναι απενεργοποιημένη. Παρατηρήθηκε ότι οι ενδονευρώνες των $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ εμβρύων δε μεταναστεύουν σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο (Εικ. 2A και D). Αντίθετα με τα φυσιολογικά κύτταρα των $Rac1^{+/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ ζώων, που έχουν ξεκινήσει τη μετανάστευση και έχουν αρχίσει να εισέρχονται στο νεοφλοιό σχηματίζοντας τα δύο χαρακτηριστικά μονοπάτια στις IZ/SVZ και MZ ζώνες, οι ενδονευρώνες των $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ εμβρύων παραμένουν στην περιοχή που αποτελεί το όριο μεταξύ ραχιαίου και βασικού τελεγκεφάλου (pallial-subpallial boundary).



Εικόνα 2. Οι ενδονευρώνες που προέρχονται από το MGE και είναι ελλειμματικοί για την πρωτεΐνη $Rac1$, δε μεταναστεύουν προς το φλοιό στο αναπτυξιακό στάδιο E13.5-14.5. Κρυστομές εγκεφάλων E13.5 (A-F) και E14.5 (G-H). Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της πρωτεΐνης YFP, αποκαλύπτει την απουσία μεταναστευόντων κυττάρων στο φλοιό των $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ εμβρύων, σε αντίθεση με τα $Rac1^{+/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ ζώα, όπου διακρίνονται τα χαρακτηριστικά μεταναστευτικά μονοπάτια των ενδονευρώνων (λευκά βέλη στο D και A αντίστοιχα). Ομοίως, με υβριδοποίηση *in situ* για μάρτυρες των κυττάρων αυτών, όπως ο μεταγραφικός παράγοντας $Lhx6$ (B,

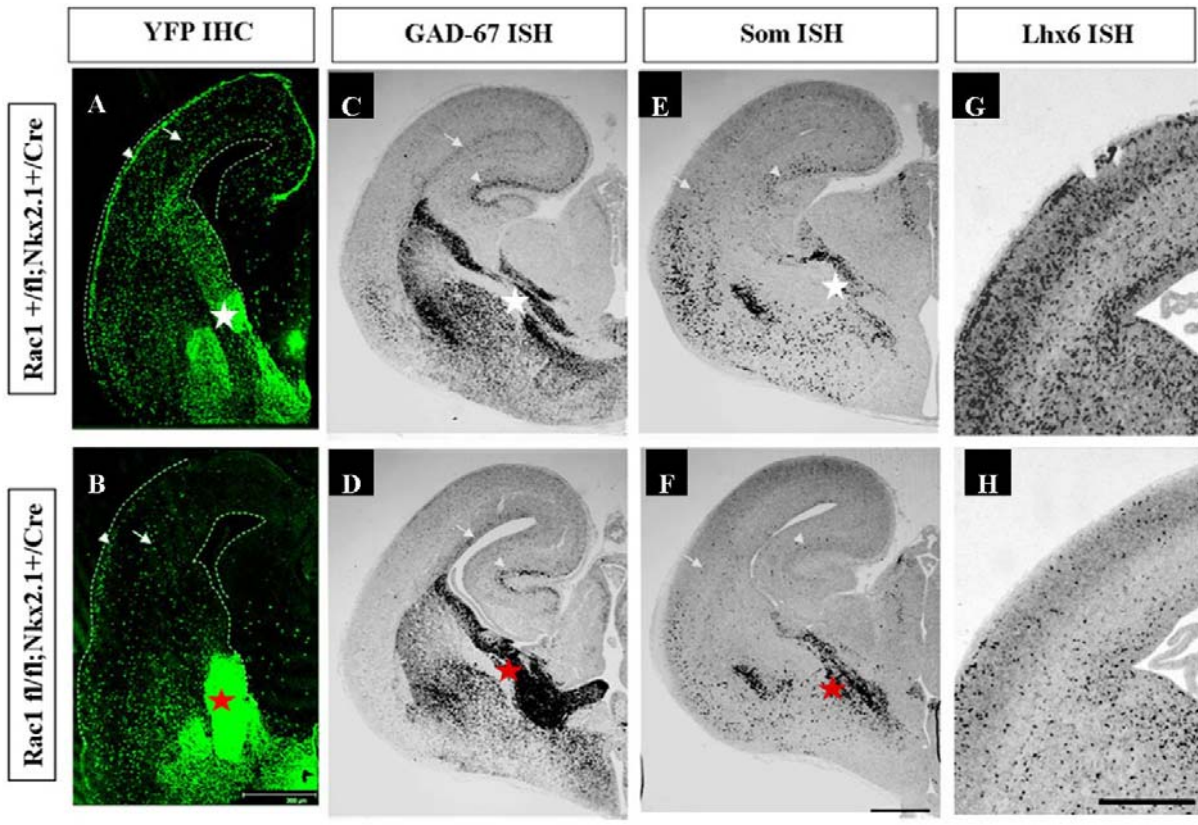
E), το νευροπεπτίδιο της *somatostatin* (C, F) και το ένζυμο *GAD67* (G, H), παρατηρείται ότι οι ενδονευρώνες που είναι ελλειμματικοί για τη *Rac1* αποτυγχάνουν να μεταναστεύουν προς το φλοιό σε αυτά τα αναπτυξιακά στάδια. Τα μαύρα βέλη στις φωτογραφίες υποδεικνύουν τη θέση των ενδονευρώνων στα *Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+Cre}* έμβρυα και την απουσία τους στα *Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+Cre}*. MGE, Medial Ganglionic Eminence; LGE, Lateral Ganglionic Eminence; Cx, Cortex. Κλίμακα A, D: 300 μ m, B, C, G, E, F: 100 μ m.

Επιπλέον ανάλυση της έκφρασης ποικίλων μορίων που χαρακτηρίζουν τους μεταναστεύοντες ενδονευρώνες, πραγματοποιήθηκε με πειράματα υβριδοποίησης *in situ*. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν mRNA ανιχνευτές για τα μετάγραφα των γονιδίων *Lhx6* (Εικ. 2B και E), *somatostatin* (Εικ. 2C και F), καθώς και *Gad67* (Εικ. 2G και H). Η συγκεκριμένη ανάλυση έδειξε ότι στον αναπτυσσόμενο φλοιό εμβρύων *Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+Cre}* δεν υπάρχουν μεταναστεύοντα κύτταρα κατά το στάδιο E13.5 και E14.5.

2. Η απενεργοποίηση της *Rac1* στα πρόδρομα κύτταρα της περιοχής του MGE, οδηγεί στη μειωμένη και καθυστερημένη μετανάστευσή τους προς τον αναπτυσσόμενο φλοιό.

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα κύτταρα που είναι ελλειμματικά για την πρωτεΐνη *Rac1* μεταναστεύουν προς το φλοιό αργότερα κατά την ανάπτυξη, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία για την πρωτεΐνη YFP, σε οβελιαίες τομές εγκεφάλων εμβρύων E16.5 (Εικ. 3). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, στο στάδιο E16.5, ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων του MGE εντοπίζονται ήδη στο φλοιό των ημισφαιρίων, ενώ πολλά κύτταρα συνεχίζουν να μεταναστεύουν οριζόντια από τον κοιλιακό προς το ραχιαίο τελεγκέφαλο. Μέσω της έκφρασης της YFP, παρατηρείται ότι σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο, κάποιοι ενδονευρώνες ελλειμματικοί για τη *Rac1* μεταναστεύουν προς το φλοιό (Εικ. 3A, B). Επιπλέον μελέτη των μεταναστευόντων κυττάρων πραγματοποιήθηκε με χρήση υβριδοποίησης *in situ* για μάρτυρες όπως το *Gad67* (Εικ. 3C, D), η *somatostatin* (Εικ. 3E, F) και το *Lhx6* (Εικ. G, H). Από τη συγκεκριμένη ανάλυση προκύπτει ότι ένας μικρός αριθμός *Rac1*-ελλειμματικών κυττάρων μετακινείται προς τον αναπτυσσόμενο φλοιό στο αναπτυξιακό στάδιο E16.5 (λευκά βέλη στις φωτογραφίες 3D, 3F). Ωστόσο, ένα μεγάλο ποσοστό των μεταλλαγμένων κυττάρων παραμένουν συγκεντρωμένα στο βασικό τελεγκέφαλο, στην κοιλιακή ζώνη όπου γεννιούνται (κόκκινοι αστερίσκοι στις

φωτογραφίες 3B, 3D, 3F). Αντίθετα, στην αντίστοιχη κοιλιακή περιοχή των φυσιολογικών ζώων, δεν υπάρχουν τόσα κύτταρα συγκεντρωμένα σε αυτό το στάδιο (λευκοί αστερίσκοι στις φωτογραφίες 3A, 3C, 3E), καθώς έχουν ήδη μεταναστεύσει προς το ραχιαίο τελεγκέφαλο.

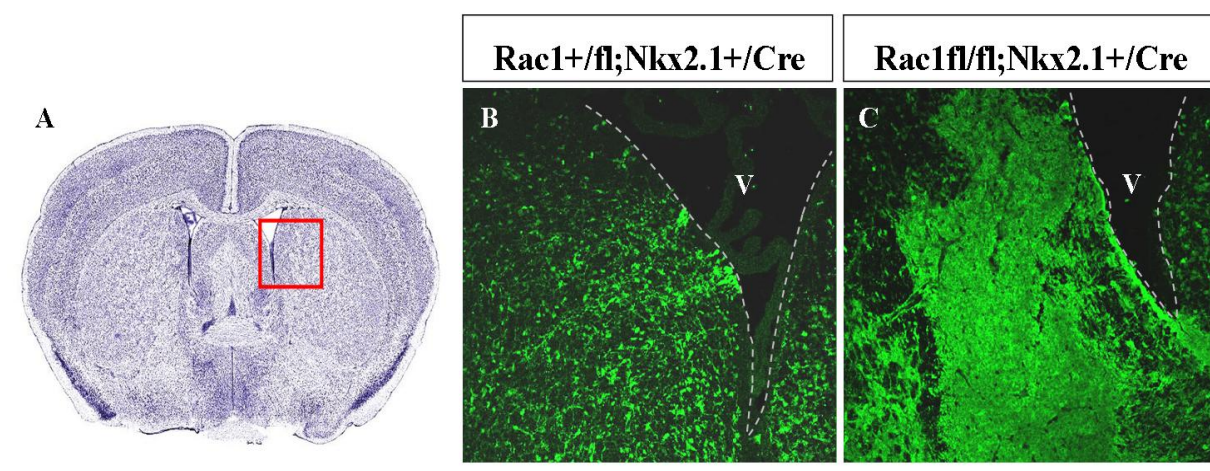


Εικόνα 3. Η απενεργοποίηση της *Rac1* στους GABAεργικούς ενδονευρώνες που προέρχονται από το MGE, οδηγεί στην καθυστέρηση της μετανάστευσής τους προς τον αναπτυσσόμενο φλοιό. Οβελιαίες τομές εγκεφάλων E16.5 (A-H). Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της πρωτεΐνης YFP, αποκαλύπτει μικρό αριθμό μεταναστευόντων κυττάρων στο φλοιό των *Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+Cre}* εμβρύων (λευκά βέλη στο B), σε σχέση με τα *Rac1^{+fl}; Nkx2.1^{+Cre}* ζώα, όπου διακρίνονται περισσότερα κύτταρα (λευκά βέλη στο A). Ομοίως, με υβριδοποίηση *in situ* για μάρτυρες των κυττάρων αυτών, όπως το ένζυμο GAD67 (C, D), το νευροπεπτίδιο της somatostatin (E, F) και ο μεταγραφικός παράγοντας *Lhx6* (G, H), παρατηρείται ότι οι ενδονευρώνες που είναι ελλειμματικοί για τη *Rac1* μεταναστεύσουν προς το φλοιό κατά την ημέρα E16.5, αλλά σε πολύ μικρότερους αριθμούς. Τα περισσότερα κύτταρα των μεταλλαγμένων ζώων φαίνεται να είναι συγκεντρωμένα κοιλιακά (κόκκινοι αστερίσκοι στα B, D, F, H) σε σχέση με τα φυσιολογικά ζώα, όπου στις αντίστοιχες περιοχές δεν

παρατηρείται τόσο μεγάλη συγκέντρωση κυττάρων σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο (λευκοί αστερίσκοι στα A, C, E, G). Κλίμακα A, B: 300 μ m, C, D, E, F, G, H: 100 μ m.

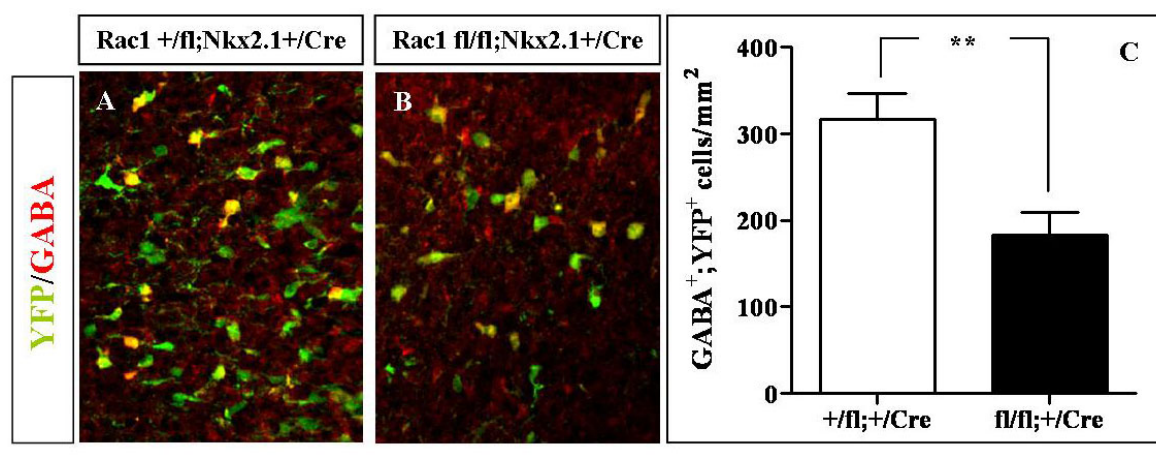
3. Την ημέρα της γέννησης, οι ενδονευρώνες του φλοιού είναι μειωμένοι κατά το ήμισυ.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, προκύπτει ότι η απενεργοποίηση της Rac1 κατά την εμβρυογένεση, οδηγεί στην καθυστέρηση της μετανάστευσης των κυττάρων, από την περιοχή του MGE όπου δημιουργούνται και σε αυξημένη συγκέντρωση των κυττάρων αυτών στην κοιλιακή περιοχή των ημισφαιρίων. Με ανοσοϊστοχημεία για την πρωτεΐνη YFP, τα μεταλλαγμένα κύτταρα εντοπίζονται συγκεντρωμένα κοιλιακά, ακόμα και την ημέρα της γέννησης (αναπτυξιακό στάδιο P0) (Εικ. 4C), αντίθετα με τα φυσιολογικά κύτταρα που βρίσκονται σε μικρότερη συγκέντρωση στην αντίστοιχη περιοχή (Εικ. 4B).



Εικόνα 4. Ένας μεγάλος αριθμός Rac1-ελλειμματικών κυττάρων εντοπίζεται στην κοιλιακή ζώνη κατά την ημέρα της γέννησης στο φλοιό των $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ ζώων. (A) Απεικόνιση της περιοχής που φαίνεται στις εικόνες B και C (κόκκινο πλαίσιο). Ο αριθμός των Rac1-ελλειμματικών κυττάρων που παραμένουν συγκεντρωμένα κοιλιακά στα μεταλλαγμένα ζώα (C), είναι αυξημένος σε σχέση με τα φυσιολογικά ζώα (B), όπως προκύπτει από ανοσοϊστοχημεία για την πρωτεΐνη YFP. V, 4^η κοιλία.

Προκειμένου να μελετηθεί η παρουσία ενδονευρώνων στο φλοιό κατά την ημέρα της γέννησης (P0), πραγματοποιήθηκε διπλός ανοσοεντοπισμός για την έκφραση της YFP και του νευροδιαβιβαστή GABA, που χαρακτηρίζει την πλειοψηφία των ενδονευρώνων του φλοιού, τόσο σε φυσιολογικά (Εικ. 5A), όσο και σε $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ ζώα (Εικ. 5B). Όπως προκύπτει, ο αριθμός GABAεργικών ενδονευρώνων στο φλοιό των μεταλλαγμένων μυών είναι μειωμένος σχεδόν κατά το ήμισυ σε σχέση με τους φυσιολογικούς ενδονευρώνες στα $Rac1^{+/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ ζώα (Εικ. 5C).



Εικόνα 5. Οι GABAεργικοί ενδονευρώνες στο φλοιό των $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ ζώων είναι μειωμένοι κατά το ήμισυ στο αναπτυξιακό στάδιο P0. Ανοσοϊστοχημεία σε τομές κρυοτόμου, εγκεφάλων P0. Οι ενδονευρώνες εντοπίζονται με την έκφραση του GABA (κόκκινο) και του YFP(πράσινο). Στο φυσιολογικό εγκέφαλο (A) τα κύτταρα είναι σχεδόν διπλάσια σε αριθμό σε σχέση με τον εγκέφαλο των $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ μυών (B). Η διαφορά είναι πολύ σημαντική στατιστικά, όπως προκύπτει έπειτα από ανάλυση με χρήση Student's T test και ANOVA για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (C).

Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα, ότι η απενεργοποίηση της πρωτεΐνης Rac1 στους ενδονευρώνες που προέρχονται από το MGE, οδηγεί στην καθυστέρηση της μετανάστευσής τους προς το φλοιό και σε συσσώρευση των κυττάρων αυτών στην κοιλιακή περιοχή του βασικού τελεγκεφάλου. Η καθυστέρηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα περισσότερα από τα μισά κύτταρα να απουσιάζουν από το φλοιό των ημισφαιρίων των $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ μυών, κατά την ημέρα της γέννησης, ενώ αντίθετα,

οι ενδονευρώνες των $Rac1^{+/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ ζώων, στο ίδιο στάδιο έχουν ολοκληρώσει τη μεταναστευτική τους πορεία, καταλαμβάνοντας τις τελικές θέσεις τους στις στιβάδες του φλοιού.

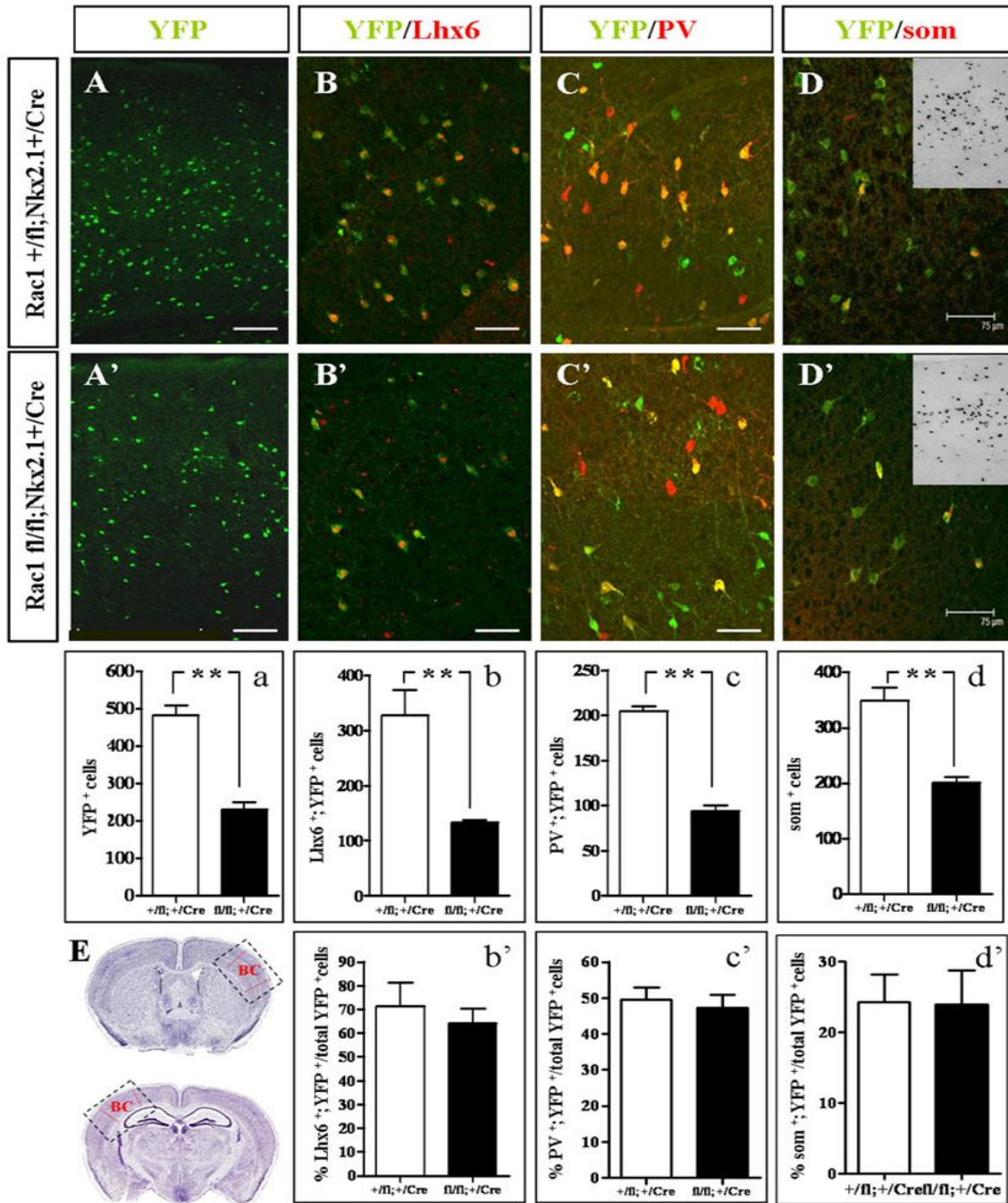
Γ. Απενεργοποίηση της $Rac1$ στα κύτταρα της περιοχής του MGE:

Μελέτη του φαινοτύπου στον ώριμο εγκέφαλο

1. Οι υποπληθυσμοί των $Rac1$ -ελλειμματικών GABAεργικών ενδονευρώνων είναι μειωμένοι κατά το ήμισυ στον ώριμο φλοιό των ημισφαιρίων.

Όπως έχει αναφερθεί και εισαγωγικά, οι ενδονευρώνες του φλοιού χαρακτηρίζονται από πολύ μεγάλη ποικιλομορφία, τόσο ως προς τη μορφολογία, αλλά και ως προς τις μοριακές και ηλεκτροφυσιολογικές τους ιδιότητες. Βάσει της έκφρασης ειδικών νευροπεπτιδίων ή πρωτεϊνών για τη δέσμευση ιόντων ασβεστίου, οι GABAεργικοί ενδονευρώνες χωρίζονται σε 3 κύριους υποπληθυσμούς: κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη δέσμευσης ασβεστίου παρβαλβουμίνη (Parvalbumin, PV), κύτταρα που εκφράζουν το νευροπεπτίδιο της σωματοστατίνης (Somatostatin, som) και κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη δέσμευσης ασβεστίου καλρετινίνη (Calretinin, CR). Κάθε ένας από τους υποπληθυσμούς αυτούς προέρχεται από διακριτές περιοχές στον αναπτυσσόμενο τελεγκέφαλο. Τα PV^+ κύτταρα προέρχονται από το MGE, όπως και η συντριπτική πλειοψηφία των som^+ κυττάρων. Από την περιοχή του CGE, προέρχονται νευρώνες που εκφράζουν κυρίως CR, καθώς και ένας μικρότερος υποπληθυσμός ενδονευρώνων που εκφράζουν το νευροπεπτίδιο NPY σε συνδυασμό με άλλους μάρτυρες, συχνά αλληλεπικαλυπτόμενους (Flames et al, 2007; Fogarty et al, 2007).

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η διαφοροποίηση των ενδονευρώνων στους σωστούς υποπληθυσμούς πραγματοποιείται φυσιολογικά στα $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ μεταλλαγμένα ζώα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοϊστοχημείας, για την ανίχνευση των μοριακών δεικτών που χαρακτηρίζουν τους υποπληθυσμούς αυτούς στον ώριμο φλοιό. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ μεταλλαγμένα ζώα, μεγαλώνουν μέχρι και 3 εβδομάδες μετά τη γέννηση τους και στη συνέχεια, μεταξύ της 24^{ης} και 26^{ης} ημέρας πεθαίνουν. Για το λόγο αυτό, όλες οι μελέτες που αφορούν στον ώριμο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων πραγματοποιήθηκαν σε μύες ηλικίας 15 ημερών (P15).



Εικόνα 6. Ο αριθμός όλων των GABAεργικών υποπληθυσμών, που προέρχονται από την περιοχή του MGE, είναι μειωμένος κατά το ήμισυ στον ώριμο φλοιό των μεταλλαγμένων ζώων. Κρυστομές από εγκεφάλους P15. (A', A, a): Ο αριθμός των YFP⁺ κυττάρων είναι μειωμένος κατά το ήμισυ στο φλοιό των μεταλλαγμένων ζώων. Ομοίως, όλα τα Lhx6⁺ κύτταρα εμφανίζουν μείωση κατά ~50% στους *Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+ / Cre}* εγκεφάλους (B, B', b), όπως και όλοι οι υποπληθυσμοί που προέρχονται από τα Lhx6⁺ πρόδρομα κύτταρα, όπως τα PV⁺ (C, C', c) και τα Som⁺ κύτταρα. (D, D', d). Ωστόσο το ποσοστό αυτών των υποπληθυσμών προς το συνολικό αριθμό των YFP⁺ παραμένει σταθερό στα μεταλλαγμένα ζώα (b', c', d'). (E): Απεικόνιση των τομών που χρησιμοποιήθηκαν για

τις μετρήσεις. Οι κόκκινες γραμμές περιέχουν το τμήμα του Barrel Cortex (BC). Οι ένθετες φωτογραφίες στο D και D' απεικονίζουν την περιοχή που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις των συνολικών κυττάρων som^+ έπειτα από υβριδοποίηση *in situ*. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με Student's T test και ANOVA για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (** P value <<0,05). Τα Error bars στα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν την τιμή Standard Error of Mean. Για λεπτομέρειες σχετικά με τη στατιστική ανάλυση, βλ. στο «Υλικά και Μέθοδοι». Κλίμακα: A, A': 300 μ m, B, B', C, C', D, D': 75 μ m.

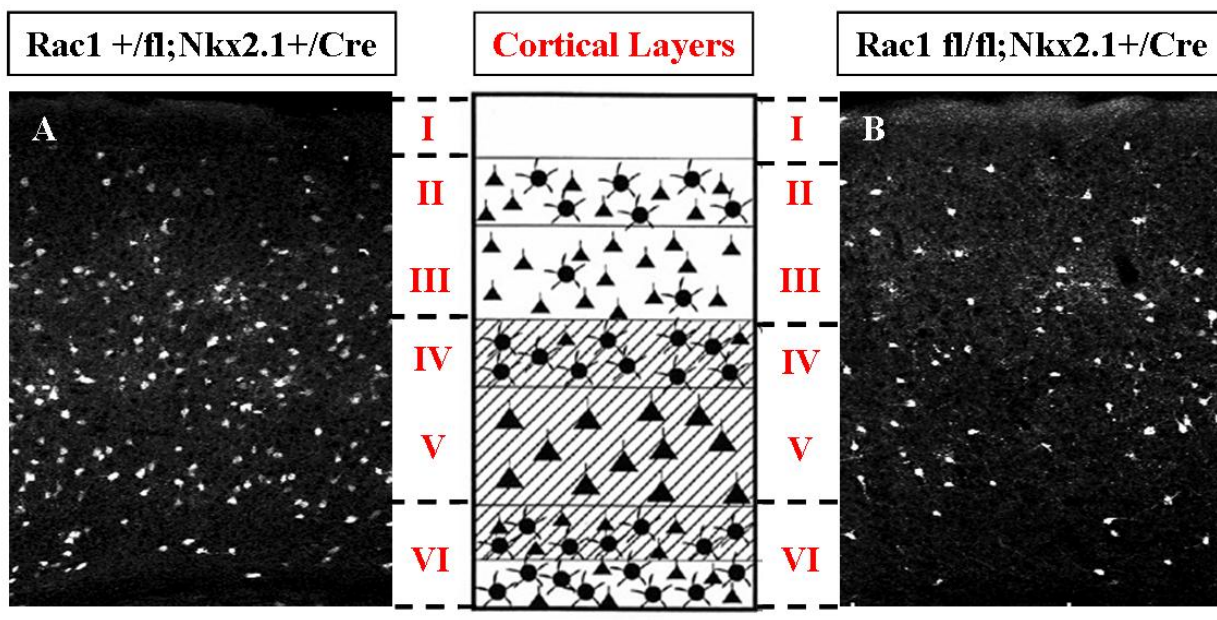
Για να εντοπιστούν οι ενδονευρώνες που προέρχονται από την περιοχή του MGE στους P15 εγκεφάλους, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία για την πρωτεΐνη YFP (Εικ. 6A, A') και ακολούθως συνεντοπισμός της YFP με Lhx6 (Εικ. 6B, B'), με PV (Εικ. 6C, C') και Som (Εικ. 6D, D'), που είναι τα μόρια που χαρακτηρίζουν τους υποπληθυσμούς του MGE. Όπως διαπιστώνεται από τα πειράματα αυτά, τα YFP κύτταρα στον ώριμο φλοιό των $Rac1^{fl/fl}$; $Nkx2.1^{+/Cre}$ μυών είναι μειωμένα κατά το ήμισυ σε σχέση με το φλοιό των φυσιολογικών $Rac1^{+/fl}$; $Nkx2.1^{+/Cre}$ ζώων (Εικ. 6a). Επιπλέον προκύπτει ότι ο αριθμός των κυττάρων που εκφράζουν το γενικό μάρτυρα Lhx6 μαζί με YFP (Εικ. 6b), ή τους μάρτυρες των υποπληθυσμών PV (Εικ. 6c) και som (Εικ. 6d) μαζί με YFP, είναι επίσης μειωμένος κατά το ήμισυ στο φλοιό των $Rac1$ μεταλλαγμένων μυών σε σχέση με τα φυσιολογικά ζώα.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται επίσης ότι ενώ σχεδόν οι μισοί $Rac1$ ελλειμματικοί ενδονευρώνες απουσιάζουν από τον ώριμο φλοιό των ημισφαιρίων, το ποσοστό των κυττάρων $Lhx6^+; YFP^+$ (Εικ. 6b'), $PV^+; YFP^+$ (Εικ. 6c') και το ποσοστό των $Som^+; YFP^+$ (Εικ. 6d') κυττάρων προς το συνολικό πληθυσμό των YFP^+ ενδονευρώνων, δε διαφέρει στα μεταλλαγμένα ζώα σε σχέση με τα φυσιολογικά.

Ωστόσο η κατανομή των $Rac1$ ελλειμματικών ενδονευρώνων (Εικ. 7B) στο φλοιό δεν παρουσιάζει σημαντικές μεταβολές, όπως φαίνεται από τον εντοπισμό των YFP^+ κυττάρων. Τα κύτταρα εντοπίζονται διάσπαρτα σε όλες τις στιβάδες του φλοιού και το πρότυπο αυτό συμφωνεί με τη φυσιολογική κατανομή των ενδονευρώνων (Εικ. 7A).

Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η έλλειψη της $Rac1$ από τους GABAεργικούς ενδονευρώνες που προέρχονται από το MGE και καταλήγουν στο φλοιό, οδηγεί στη μείωση του συνολικού αριθμού των κυττάρων αυτών, αλλά και των υποπληθυσμών τους, στον ώριμο φλοιό των ημισφαιρίων. Ωστόσο δεν επηρεάζει την κατανομή τους σε στιβάδες και τη διαφοροποίησή τους, καθώς το ποσοστό του κάθε

υποπληθυσμού ως προς το συνολικό MGE πληθυσμό παραμένει σταθερό στα μεταλλαγμένα ζώα.

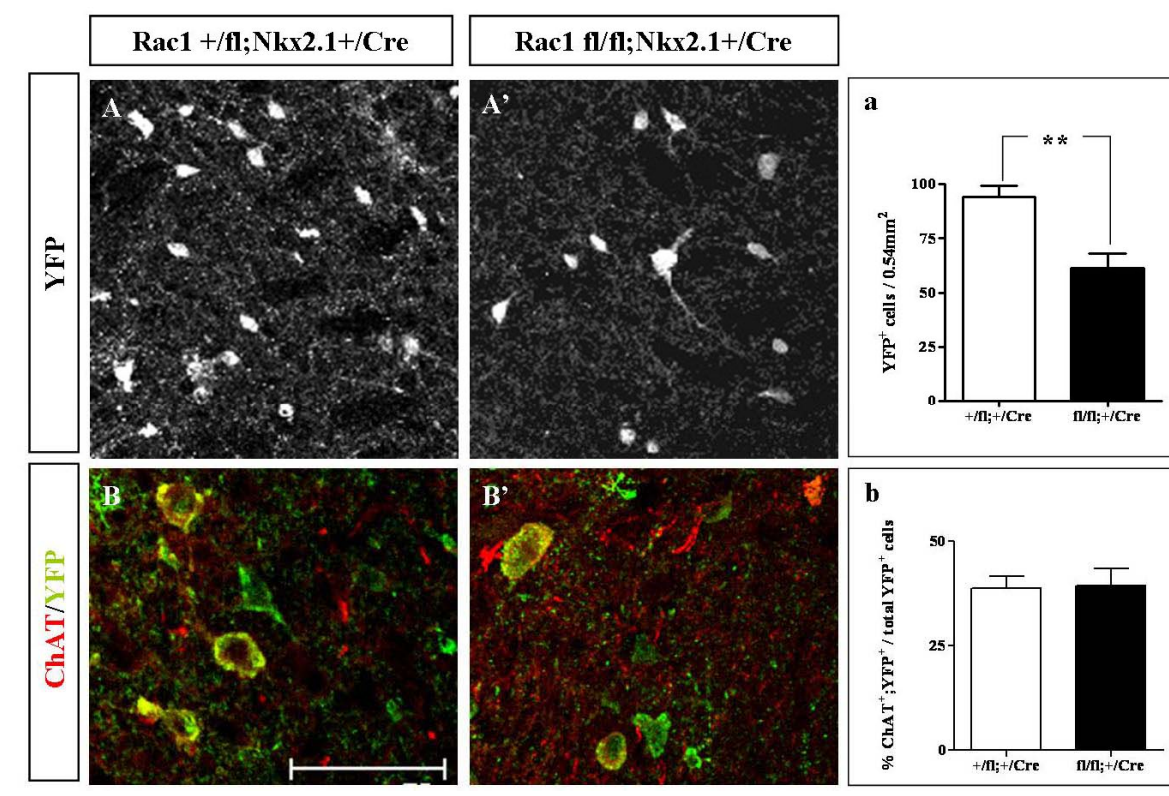


Εικόνα 7. Η απενεργοποίηση της *Rac1* δεν επηρεάζει τη φυσιολογική κατανομή των *YFP*⁺ κυττάρων στις στιβάδες του ώριμου φλοιού. Ανοσοϊστοχημεία για *YFP* σε κρυτομέες εγκεφάλων *P15*. Τα *YFP* κύτταρα εντοπίζονται σε φυσιολογική κατανομή στο φλοιό των *Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+Cre}* εγκεφάλων (B, διάσπαρτα σε όλο το πλάτος των στιβάδων, όπως και τα φυσιολογικά κύτταρα (A). Στο κέντρο απεικονίζονται σχηματικά οι στιβάδες του φλοιού των ημισφαιρίων. Τα τριγωνικά κύτταρα αντιπροσωπεύουν την παρουσία πυραμιδικών κυττάρων στις στιβάδες, ενώ τα στρογγυλά κύτταρα είναι οι ενδονευρώνες.

2. Η απενεργοποίηση της *Rac1* στα πρόδρομα κύτταρα *Nkx2.1*⁺ επηρεάζει την ανάπτυξη των ενδονευρώνων του ραβδωτού σώματος

Από τα πρόδρομα κύτταρα της περιοχής του MGE κατά την εμβρυογένεση, προέρχονται οι περισσότεροι ενδονευρώνες του φλοιού των ημισφαιρίων. Ωστόσο, ένα ποσοστό των κυττάρων αυτών καταλήγει έπειτα από οριζόντια μετανάστευση στην περιοχή του ραβδωτού σώματος (Marin & Rubenstein 2001; Ayala et al, 2007), όπου στη συνέχεια διαφοροποιείται στους υποπληθυσμούς ενδονευρώνων της συγκεκριμένης περιοχής.

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της απενεργοποίησης της Rac1 στο συγκεκριμένο πληθυσμό νευρικών κυττάρων, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία για την πρωτεΐνη YFP και μελετήθηκαν τα YFP⁺ κύτταρα στην περιοχή του ραβδωτού σώματος, ως προς τη μορφολογία, την κατανομή και τον αριθμό τους, σε κρυστομές εγκεφάλων P15 (Εικ. 8). Όπως προκύπτει, ο αριθμός των Rac1-ελλειμματικών ενδονευρώνων στο ραβδωτό σώμα των μεταλλαγμένων μυών (Εικ. 8Α), είναι σημαντικά μειωμένος, σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων αυτών στα φυσιολογικά ζώα (Εικ. 8Α') και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική (Εικ. 8a). Ωστόσο, δεν παρατηρούνται διαφορές στη μορφολογία και την κατανομή των συγκεκριμένων ενδονευρώνων, παρά την απενεργοποίηση της Rac1.



Εικόνα 8. Η απενεργοποίηση της *Rac1* στα πρόδρομα κύτταρα της περιοχής του MGE επηρεάζει τους ενδονευρώνες του ραβδωτού σώματος. Ανοσοϊστοχημεία σε κρυστομές εγκεφάλων P15 για τις πρωτεΐνες YFP (A, A') και ChAT (B, B'). Ο αριθμός των YFP⁺ κυττάρων στην περιοχή του ραβδωτού σώματος των *Rac1*^{fl/fl}; *Nkx2.1*^{+/-}; *Cre* εγκεφάλων (A') είναι σημαντικά μειωμένος (a) σε σχέση με τα φυσιολογικά ζώα (A). Ωστόσο τα κύτταρα αυτά διαφοροποιούνται προς τους αναμενόμενους υποπληθυσμούς, όπως προκύπτει από την έκφραση της πρωτεΐνης ChAT σε μεταλλαγμένα (B') και ετερόζυγα ζώα (B) και φαίνεται ότι το ποσοστό του συγκεκριμένου

υποπληθυσμού προς το συνολικό αριθμό των YFP⁺ κυττάρων παραμένει σταθερό μεταξύ των δύο γονοτύπων (b). Κλίμακα: A, A': 150μm, B, B': 75μm.

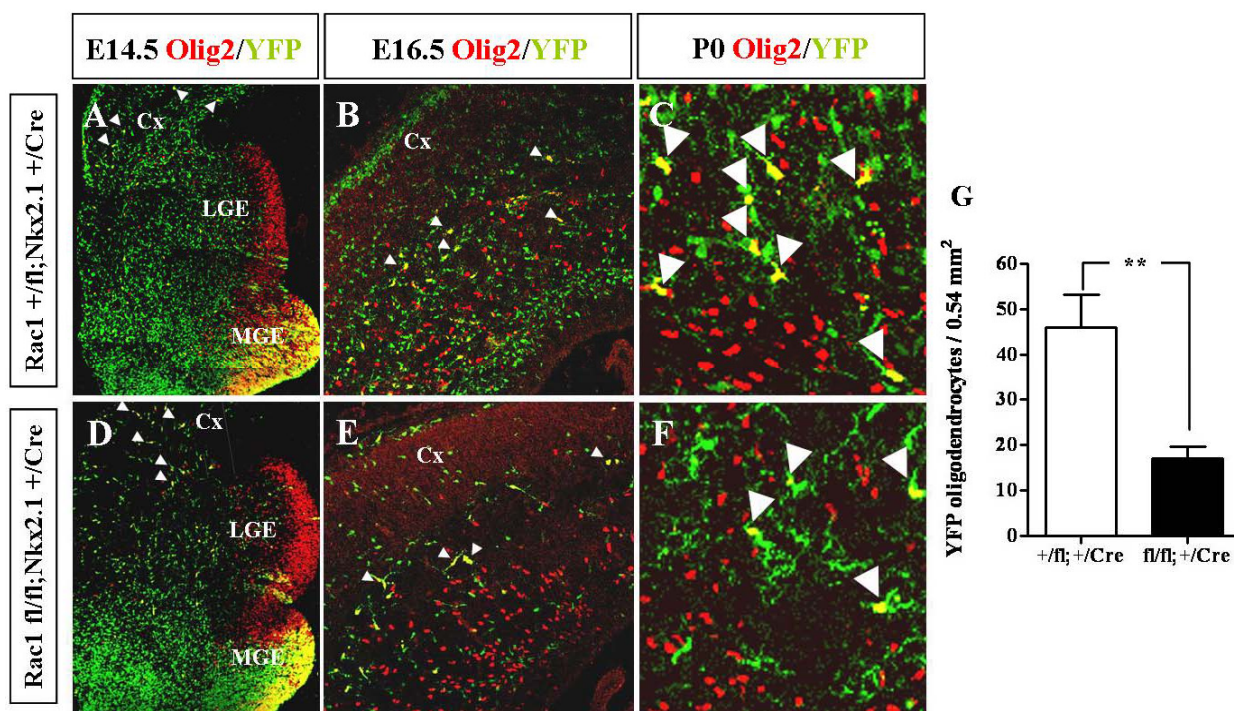
Στη συνέχεια, προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα κύτταρα που μεταναστεύουν στο ραβδωτό σώμα παρά την απενεργοποίηση της Rac1, διαφοροποιούνται φυσιολογικά, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της τρανσφεράσης της ακετυλοχολίνης (ChAT). Η έκφραση του συγκεκριμένου ενζύμου χαρακτηρίζει όλους τους χολινεργικούς νευρώνες και είναι γνωστό ότι κάποιοι ενδονευρώνες του ραβδωτού σώματος εκφράζουν ως νευροδιαβιβαστή την ακετυλοχολίνη. Το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν ChAT και YFP, και άρα προέρχονται από την περιοχή απενεργοποίησης της Rac1, στο σύνολο των YFP κυττάρων της δομής του ραβδωτού σώματος, δε μεταβάλλεται στα Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+Cre} ζώα (Εικ. 8B'), σε σχέση με τα φυσιολογικά (Εικ.8B), αλλά παραμένει σταθερό (Εικ. 8b).

Τα αποτελέσματα αυτά, συμφωνούν με τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τους ενδονευρώνες του φλοιού και υπογραμμίζουν το γεγονός ότι ο ρόλος της Rac1 στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων δεν εστιάζεται στη διαφοροποίηση, αλλά στις διεργασίες μέχρι τη διαφοροποίηση, που περιλαμβάνουν την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο και την έγκαιρη μετανάστευση των κυττάρων στις τελικές θέσεις τους.

3. Η απενεργοποίηση της Rac1 στα πρόδρομα κύτταρα Nkx2.1⁺ επηρεάζει την ανάπτυξη των Nkx2.1⁺ ολιγοδενδροκυττάρων

Όπως έχει αναφερθεί και εισαγωγικά, από την περιοχή του MGE κατά την εμβρυογένεση προέρχονται διακριτοί πληθυσμοί νευρικών και γλοιακών κυττάρων. Συγκεκριμένα, είναι γνωστό ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων που δημιουργούνται στη συγκεκριμένη δομή, είναι πρόδρομοι GABAεργικοί ενδονευρώνες και υπάρχει και ένα μικρό ποσοστό πρόδρομων ολιγοδενδροκυττάρων, που μάλιστα προέρχονται από τον πληθυσμό των Nkx2.1⁺ κυττάρων (Kessar et al, 2006; Fogarty et al, 2007). Προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα Nkx2.1⁺ ολιγοδενδροκύτταρα της περιοχής του MGE επηρεάζονται από την απενεργοποίηση της Rac1 σε όλο τον Nkx2.1⁺ κυτταρικό πληθυσμό, πραγματοποιήθηκε διπλή ανοσοϊστοχημεία για τη YFP και το μεταγραφικό παράγοντα Olig2, που αποτελεί μοριακό δείκτη των συγκεκριμένων κυττάρων. Επομένως,

ο συνεντοπισμός των συγκεκριμένων πρωτεϊνών, ιχνηθετεί μόνο ολιγοδενδροκύτταρα στα οποία υπάρχει απενεργοποίηση της Rac1, είτε πλήρης (ελλειμματικά), είτε μερική (ετερόζυγα). Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση των ολιγοδενδροκυττάρων πραγματοποιήθηκε σε τρία αναπτυξιακά στάδια, E14.5 (Εικ. 9A, C), E16.5 (Εικ. 9B, E), και P0 (ημέρα της γέννησης) (Εικ. 9C, F). Στα πρώτα 2 στάδια, είναι γνωστό ότι τα ολιγοδενδροκύτταρα της περιοχής του MGE βρίσκονται ενεργά σε μεταναστευτική πορεία, ενώ την ημέρα της γέννησης έχουν καταλάβει τις τελικές θέσεις τους στο φλοιό.



Εικόνα 9. Η απενεργοποίηση της Rac1 στα πρόδρομα κύτταρα του MGE που εκφράζουν Nkx2.1, επηρεάζει την ανάπτυξη των ολιγοδενδροκυττάρων που προέρχονται από το συγκεκριμένο πληθυσμό. Ανοσοϊστοχημεία σε κρυστομές αναπτυξιακών σταδίων E14.5 (A, D), E16.5 (B, E) και P0 (C, F). Η μετανάστευση των Rac1-ελλειμματικών ολιγοδενδροκυττάρων κατά την εμβρυογένεση, φαίνεται να πραγματοποιείται χωρίς καθυστέρηση, σύμφωνα με τη θέση εντοπισμού των μεταλλαγμένων κυττάρων (λευκά βέλη στο D και E) σε σχέση με τα φυσιολογικά αντίστοιχων αναπτυξιακών σταδίων (λευκά βέλη στο A και B). Κατά την ημέρα της γέννησης ωστόσο, στο φλοιό των μεταλλαγμένων μωρών (F) υπάρχουν πολύ λιγότερα ολιγοδενδροκύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά ζώα (C) και η διαφορά αυτή είναι πολύ σημαντική στατιστικά (G). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Student's T test και ANOVA για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (**P

value << 0.05). Τα *Error bars* στο διάγραμμα αντιπροσωπεύουν την τιμή *Standard Error of Mean*. (Βλ. «Υλικά και Μέθοδοι» για λεπτομέρειες).

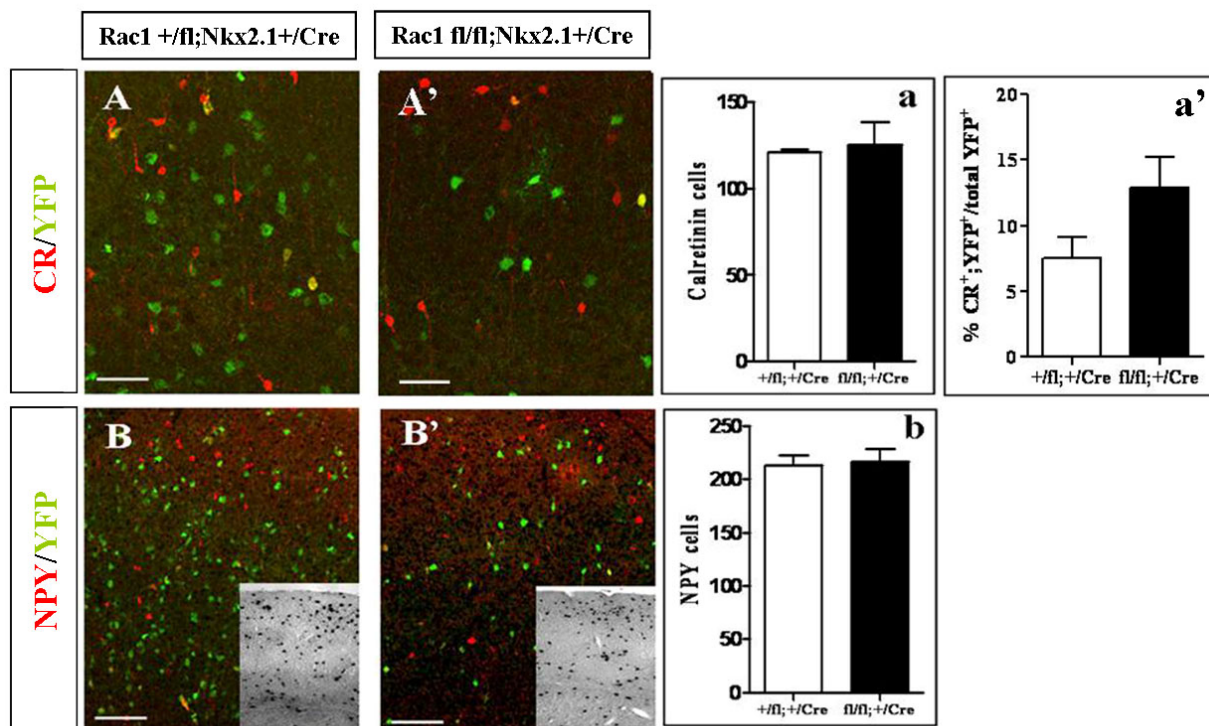
Από τη συγκεκριμένη ανάλυση προκύπτει ότι τα Rac1-ελλειμματικά ολιγοδενδροκύτταρα που προέρχονται από την περιοχή του MGE, εντοπίζονται στις ίδιες θέσεις προς το φλοιό με τα αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα, σε αντίστοιχα αναπτυξιακά στάδια (λευκά βέλη στις εικόνες 9D, E, F και 9A, B, C αντίστοιχα). Ωστόσο ο αριθμός των κυττάρων που μεταναστεύουν και τελικά καταλαμβάνουν τις τελικές θέσεις τους στο φλοιό, είναι σημαντικά μειωμένος στα μεταλλαγμένα ζώα σε σχέση με τα φυσιολογικά (Εικ. 9G).

Επομένως, η απενεργοποίηση της Rac1 στον πληθυσμό των Nkx2.1⁺ πρόδρομων κυττάρων επηρεάζει όλους τους κυτταρικούς τύπους που προκύπτουν από το συγκεκριμένο πληθυσμό στην περιοχή του MGE, τους ενδονευρώνες και τα ολιγοδενδροκύτταρα

4. Οι ενδονευρώνες που προέρχονται από περιοχές του τελεγκεφάλου εκτός του MGE, δεν επηρεάζονται από τη μείωση των MGE κυττάρων και την απενεργοποίηση της Rac1.

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι υποπληθυσμοί των ενδονευρώνων που δεν προέρχονται από το MGE, αλλά δημιουργούνται σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου, επηρεάζονται από την έλλειψη της Rac1 και τη σημαντική μείωση των MGE κυττάρων στο φλοιό, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία ενάντια σε μάρτυρες όπως η CR και το νευροπεπτίδιο NPY. Όπως είναι γνωστό, οι ενδονευρώνες που εκφράζουν CR αλλά και αυτοί που εκφράζουν NPY, προέρχονται κυρίως από την περιοχή του CGE. Από τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας φαίνεται ότι οι συγκεκριμένοι δύο πληθυσμοί ενδονευρώνων δεν επηρεάζονται από την έλλειψη της Rac1 (Εικ. 10). Ο αριθμός των CR⁺ κυττάρων παραμένει σταθερός στα Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+Cre} ζώα (Εικ. 10^A) σε σχέση με τα φυσιολογικά (Εικ. 10A), όπως και το ποσοστό των CR⁺;YFP⁺ κυττάρων στο σύνολο των ενδονευρώνων (Εικ. 10a και α' αντίστοιχα). Αντίστοιχα, ο αριθμός των ενδονευρώνων που εκφράζουν NPY δεν αλλάζει στα Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+Cre} ζώα σε σχέση με τα φυσιολογικά ετερόζυγα (Εικ 10b). Το ποσοστό των NPY⁺;YFP⁺ κυττάρων δεν έχει υπολογιστεί, διότι το αντίσωμα για το NPY δε δίνει χρώση ικανοποιητική ώστε να πραγματοποιηθούν αξιόπιστες

μετρήσεις. Οι μετρήσεις για τα κύτταρα αυτά πραγματοποιήθηκαν έπειτα από *in situ* υβριδοποίηση για τον εντοπισμό του mRNA του γονιδίου NPY (ένθετες φωτογραφίες στις Εικ. 10B και B').

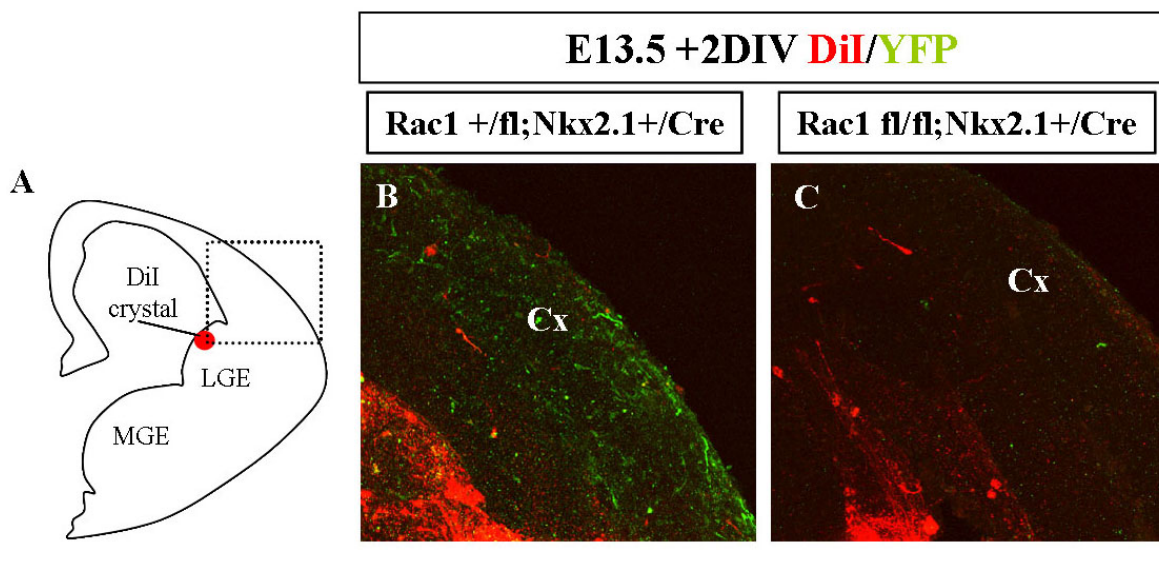


Εικόνα 10. Ο αριθμός των υποπληθυσμών των ενδονευρώνων που προέρχονται από το CGE δε μεταβάλλεται στα $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ ζώα. Κρυστομές από εγκεφάλους P15. Οι υποπληθυσμοί των $calretinin^{+}$ (CR) (A', A, a, a') και των NPY^{+} (B, B', b) κυττάρων, παραμένουν ανεπηρέαστοι από την έλλειψη της $Rac1$. Ακόμα και το μικρό ποσοστό των $CR^{+};YFP^{+}$ κυττάρων που προέρχεται από το MGE δε φαίνεται να μεταβάλλεται σημαντικά. Οι ένθετες φωτογραφίες στο B και B' απεικονίζουν την περιοχή που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις των συνολικών κυττάρων NPY^{+} έπειτα από υβριδοποίηση *in situ*. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με Student's *T test* και ANOVA για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (** *P value* <<0,05). Τα Error bars στα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν την τιμή Standard Error of Mean. Για λεπτομέρειες σχετικά με τη στατιστική ανάλυση, βλ. στο «Υλικά και Μέθοδοι». Κλίμακα: A, A': 75 μ m, B, B': 300 μ m

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι ένα πάρα πολύ μικρό ποσοστό των ενδονευρώνων του φλοιού, προέρχεται από την περιοχή του LGE (Anderson et al, 2001). Ωστόσο δεν

είναι γνωστό αν τα κύτταρα αυτά διαφοροποιούνται και σε ποιους υποπληθυσμούς ανήκουν. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι ενδονευρώνες αυτοί επηρεάζονται στα $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ ζώα, και ελλείψει μοριακών μαρτύρων για το χαρακτηρισμό τους, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σήμανσής τους με λιπόφιλους κρυστάλλους DiI σε οργανοτυπικές καλλιέργειες. Συγκεκριμένα, εγκέφαλοι από έμβρυα E13.5 απομονώθηκαν και οβελιαίες τομές καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο. Κρύσταλλοι DiI τοποθετήθηκαν στην περιοχή του LGE (Εικ. 11A) και έπειτα από 2 μέρες καλλιέργειας, παρατηρείται ότι δεν υπάρχει διαφορά στα DiI-σημασμένα κύτταρα που μεταναστεύουν προς το φλοιό στα $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ ζώα, σε σχέση με τα φυσιολογικά (Εικ. 11C και B αντίστοιχα).

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η απενεργοποίηση της $Rac1$ στο MGE επηρεάζει αποκλειστικά τα κύτταρα που προέρχονται από τη συγκεκριμένη περιοχή. Τα κύτταρα αυτά μεταναστεύουν προς το φλοιό καθυστερημένα, ενώ τα μισά από αυτά παραμένουν συγκεντρωμένα στο βασικό τελεγκέφαλο. Ως αποτέλεσμα, οι GABAεργικοί ενδονευρώνες στον ώριμο φλοιό των $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ μυών είναι μειωμένοι κατά το ήμισυ, παρ' όλο που διαφοροποιούνται φυσιολογικά στους αναμενόμενους υποπληθυσμούς, όπως φαίνεται από την έκφραση κατάλληλων μοριακών δεικτών που μελετήθηκαν.



Εικόνα 11. Η μετανάστευση των ενδονευρώνων που προέρχονται από το LGE δεν επηρεάζεται από την απενεργοποίηση της $Rac1$ στο MGE. (A): Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής

διαδικασίας. Κρύσταλλος DiI τοποθετήθηκε στην περιοχή του LGE, σε τομές εγκεφάλων E13.5 σε οργανοτυπική καλλιέργεια, προκειμένου να σημειωθούν οι νευρώνες που μεταναστεύουν στο φλοιό από την συγκεκριμένη περιοχή. Έπειτα από 48 ώρες σε καλλιέργεια, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα μεταναστεύοντα κύτταρα στις τομές των $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ εμβρύων (C), σε σχέση με τις φυσιολογικές τομές των $Rac1^{+/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ εμβρύων (B). MGE, Medial Ganglionic Eminence; LGE, Lateral Ganglionic Eminence; Cx, Cortex.

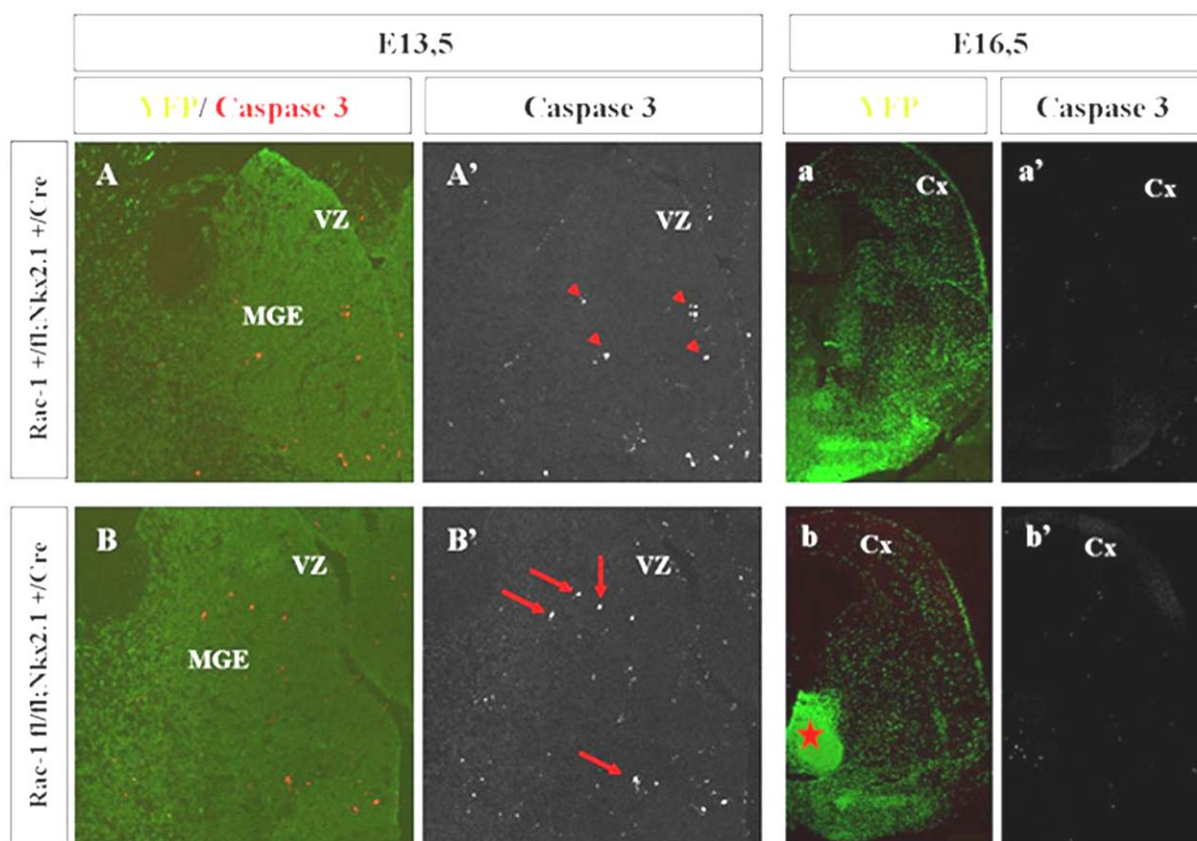
**Δ. Απενεργοποίηση της Rac1 στα κύτταρα της περιοχής του MGE:
Μελέτη του ρόλου της πρωτεΐνης στην ανάπτυξη των συγκεκριμένων κυττάρων**

1. Η απενεργοποίηση της Rac1 δεν οδηγεί σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο στην περιοχή του MGE κατά την ανάπτυξη.

Τα αποτελέσματα μέχρι τώρα δείχνουν ότι η έλλειψη της Rac1 οδηγεί σε καθυστερημένη μετανάστευση των ενδονευρώνων που προέρχονται από το MGE και σε σημαντική μείωση του πληθυσμού τους στον ώριμο φλοιό και στο ραβδωτό σώμα. Ωστόσο, προκύπτει ότι τα κύτταρα που μεταναστεύουν παρά την καθυστέρηση, καταλαμβάνουν τις σωστές θέσεις και εκφράζουν τους αναμενόμενους μοριακούς δείκτες διαφοροποίησης. Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η φύση του προβλήματος των συγκεκριμένων κυττάρων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τον εντοπισμό αυξημένου κυτταρικού θανάτου στα $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ ζώα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Αύξηση των κυττάρων που πεθαίνουν κατά την ανάπτυξη θα μπορούσε να εξηγήσει το σημαντικά μειωμένο πληθυσμό των GABAεργικών ενδονευρώνων στα $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ ζώα. Για τη διερεύνηση της υπόθεσης αυτής, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία για τον εντοπισμό έκφρασης της ενεργού μορφής της Caspase 3, που είναι γνωστός μάρτυρας αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου (Εικ. 12). Χρησιμοποιήθηκαν οβελιαίες κρουτομές από εγκεφάλους E13.5 και E16.5 και δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στα επίπεδα κυτταρικού θανάτου μεταξύ των $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ (Εικ. 12B, B', b, b') και των φυσιολογικών $Rac1^{+/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ (Εικ. 12A, A', a, a') εμβρύων, παρ' όλο που όπως αναφέρθηκε και παραπάνω ένα μεγάλο ποσοστό των Rac1 ελλειμματικών ενδονευρώνων

παραμένουν συγκεντρωμένοι στο βασικό τελεγκέφαλο χωρίς να μετακινούνται κατά την ανάπτυξη (Εικ. 12b, κόκκινος αστερίσκος).

Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αναπτυξιακή καθυστέρηση και η σημαντική μείωση του αριθμού των Rac1 ελλειμματικών ενδονευρώνων στον ώριμο φλοιό, δεν είναι αποτέλεσμα αυξημένου κυτταρικού θανάτου κατά την ανάπτυξη.



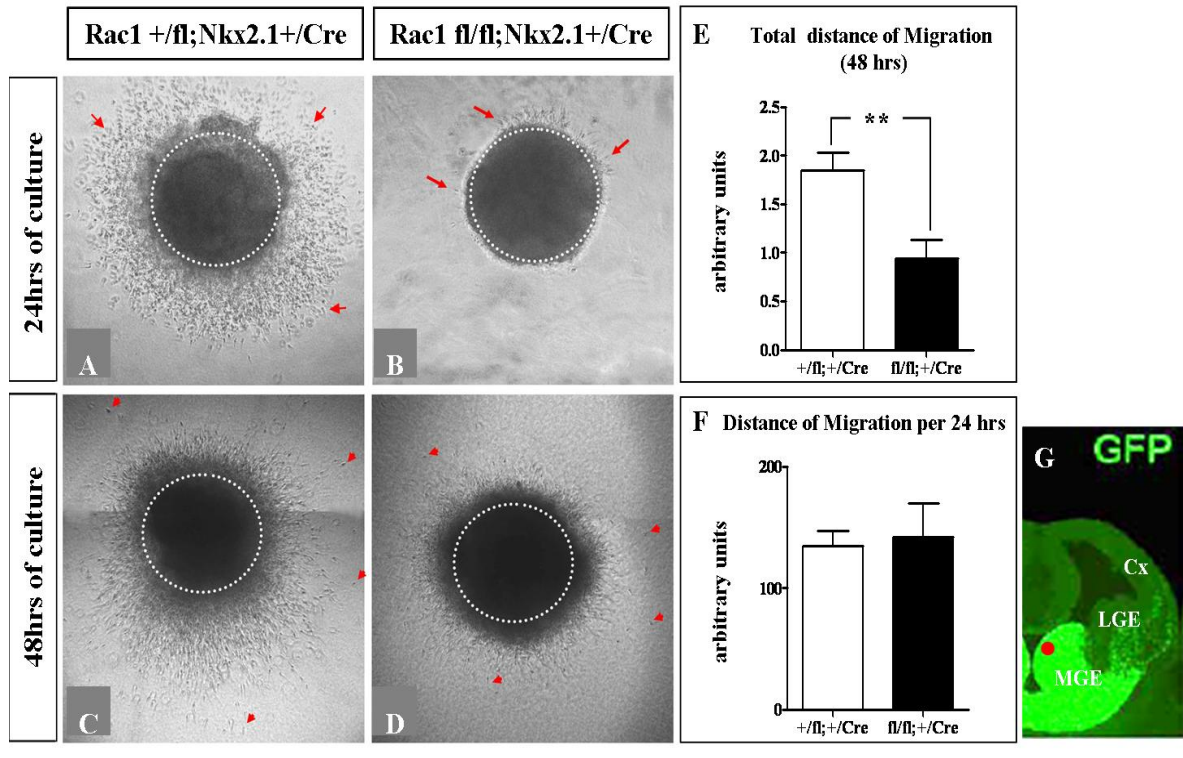
Εικόνα 12. Ο μειωμένος αριθμός των Rac1-ελλειμματικών κυττάρων που μεταναστεύουν προς το φλοιό δεν οφείλεται σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο κατά τη μετανάστευση. Ανοσοϊστοχημεία για YFP και την ενεργοποιημένη μορφή της Caspase 3 σε κρυτομές εγκεφάλων E13.5 (A, A', B, B') και E16.5 (a, a', b, b'). Σε κανένα από τα συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια δεν παρατηρείται αύξηση των αποπτωτικών κυττάρων κατά τη μετανάστευση στα μεταλλαγμένα ζώα (κόκκινα βέλη στα B, B', b, b') σε σχέση με τα φυσιολογικά (κόκκινες κεφαλές βελών στα A, A', a, a'). Ωστόσο ένας μεγάλος πληθυσμός Rac1-ελλειμματικών κυττάρων φαίνεται να παραμένουν συγκεντρωμένα στην κοιλιακή περιοχή του MGE (κόκκινος αστερίσκος στο b). MGE, Medial Ganglionic Eminence; VZ, Ventricular zone; Cx, Cortex.

2. Η καθυστερημένη μετανάστευση των $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ ενδονευρώνων οφείλεται σε ενδογενές πρόβλημα των κυττάρων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα όλων των παραπάνω πειραμάτων, η έλλειψη της $Rac1$ επηρεάζει άμεσα την ανάπτυξη των κυττάρων που προέρχονται από το MGE, καθυστερώντας την οριζόντια μετανάστευσή τους προς το φλοιό. Προκειμένου να μελετηθεί αν η καθυστέρηση αυτή οφείλεται σε ανικανότητα των ίδιων των κυττάρων να μετακινηθούν, ή στην αδυναμία τους να ανταποκριθούν σε εξωκυττάρια καθοδηγητικά σήματα, τα κύτταρα αυτά απομονώθηκαν και καλλιιεργήθηκαν *ex vivo* για μελέτη της μεταναστευτικής συμπεριφοράς τους. Συγκεκριμένα, από εγκεφάλους εμβρύων E13.5 απομονώθηκε ολόκληρη η περιοχή του MGE. Ακολούθως κάθε MGE τεμαχίστηκε σε πολύ μικρά ιστοτεμάχια (διαμέτρου $\sim 200\mu\text{m}$) και αυτά τοποθετήθηκαν μέσα σε τρισδιάστατο πήκτωμα Matrigel, όπου τα κύτταρα μετακινούνται ελεύθερα προς οποιαδήποτε κατεύθυνση. Συνολικά για κάθε έμβρυο καλλιιεργήθηκαν 5 ιστοτεμάχια.

Έπειτα από 24 ώρες σε καλλιέργεια, τα μεταλλαγμένα κύτταρα από τα $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ έμβρυα δεν έχουν αρχίσει ακόμα τη μετανάστευσή τους (Εικ. 13B) από το ιστοτεμάχιο, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα των $Rac1^{+/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ ζώων, τα οποία έχουν αρχίσει να μεταναστεύουν (Εικ. 13A). Έπειτα από 48 ώρες συνολικής καλλιέργειας, οι $Rac1$ ελλειμματικοί ενδονευρώνες έχουν αρχίσει να μεταναστεύουν μακριά από την περίμετρο του ιστοτεμαχίου (Εικ. 13D). Ωστόσο, η απόσταση που έχουν διανύσει είναι πολύ μικρότερη από την απόσταση που έχουν διανύσει οι φυσιολογικοί ενδονευρώνες (Εικ. 13C). Για να υπολογιστεί η απόσταση μετακίνησης των κυττάρων κάθε γονοτύπου, επελέγησαν σε κάθε ιστοτεμάχιο οι 10 πιο απομακρυσμένοι ενδονευρώνες και μετρήθηκε η απόσταση που έχουν διανύσει από την περίμετρο του ιστοτεμαχίου. Υπολογίστηκε έτσι για κάθε ζώο, και στη συνέχεια για κάθε γονότυπο, μια μέση απόσταση μετανάστευσης σε 48 ώρες καλλιέργειας. Η διαφορά μεταξύ των $Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ και των φυσιολογικών $Rac1^{+/fl}; Nkx2.1^{+/Cre}$ κυττάρων είναι πολύ σημαντική στατιστικά (Εικ. 13E). Εκτιμώντας ωστόσο την ταχύτητα μετακίνησης των κυττάρων, από την απόσταση που διανύουν ανά 24 ώρες, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταλλαγμένων και των φυσιολογικών ιστοτεμαχίων (Εικ. 13F). Η απόσταση που διανύουν τα κύτταρα ανά 24 ώρες, υπολογίστηκε από τη διαφορά στην απόσταση που έχουν διανύσει τα κύτταρα του ίδιου ιστοτεμαχίου στις 24 και στις 48 ώρες. Για κάθε ιστοτεμάχιο επελέγησαν τα 10 πιο απομακρυσμένα κύτταρα και υπολογίστηκε η απόστασή τους από την περίμετρο του ιστοτεμαχίου. Από τα συγκεκριμένα αποτελέσματα,

φαίνεται ότι τα κύτταρα δε μετακινούνται πιο αργά όταν απουσιάζει η πρωτεΐνη Rac1, αλλά αργούν να ξεκινήσουν τη μετανάστευσή τους.



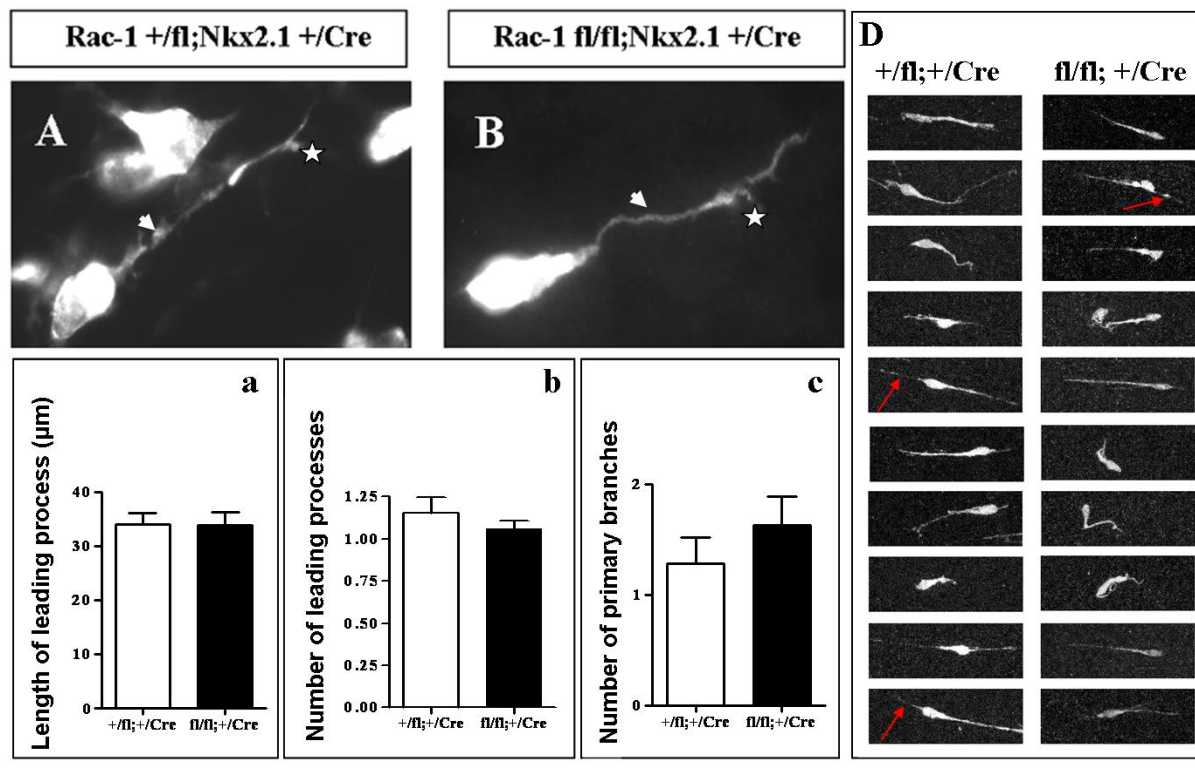
Εικόνα 13. Η μειωμένη μετανάστευση των *Rac1*-ελλειμματικών κυττάρων, οφείλεται σε ενδογενές κυτταρικό πρόβλημα έναρξης της μεταναστευτικής διαδικασίας. Ιστοτεμάχια από την περιοχή του MGE σε τρισδιάστατη καλλιέργεια σε πήκτωμα Matrigel. Έπειτα από 24 ώρες τα μεταναστεύοντα κύτταρα στα μεταλλαγμένα ιστοτεμάχια, είναι πάρα πολύ λίγα (κόκκινα βέλη στο B) σε σχέση με τα αντίστοιχα των φυσιολογικών ιστοτεμαχίων που είναι περισσότερα σε αριθμό και έχουν διανύσει μεγάλη απόσταση από την περίμετρο του ιστοτεμαχίου (κόκκινα βέλη στο A). Έπειτα από 48 ώρες καλλιέργειας, αρκετά κύτταρα από τα μεταλλαγμένα ιστοτεμάχια έχουν μεταναστεύσει (κόκκινα βέλη στο D), αλλά η απόσταση που έχουν διανύσει είναι μικρότερη από αυτή των φυσιολογικών κυττάρων (κόκκινα βέλη στο C) και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική (E). Η ταχύτητα με την οποία μετακινούνται τα μεταλλαγμένα κύτταρα δε φαίνεται να διαφέρει από την ταχύτητα των φυσιολογικών κυττάρων (F). Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση Student's T test και ANOVA για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (**P value < 0.05). Τα Error bars στα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν την τιμή Standard Error of Mean. (G) Απεικόνιση της περιοχής του MGE από όπου απομονώθηκαν τα ιστοτεμάχια (κόκκινος κύκλος). Για λεπτομέρειες σχετικά με τη στατιστική ανάλυση, βλ. στο «Υλικά & Μέθοδοι». MGE, Medial Ganglionic Eminence; LGE, Lateral Ganglionic Eminence; Cx, Cortex.

Το συγκεκριμένο πείραμα συμφωνεί με τα προηγούμενα, όπου φαίνεται ότι οι ενδονευρώνες που είναι ελλειμματικοί για την πρωτεΐνη Rac1 εμφανίζουν μια σημαντική αναπτυξιακή καθυστέρηση. Ωστόσο, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η καθυστέρηση δεν οφείλεται σε αδυναμία ανταπόκρισης των κυττάρων στα καθοδηγητικά σήματα από το περιβάλλον τους, καθώς τέτοια σήματα απουσιάζουν στην *in vitro* καλλιέργεια των ιστοτεμαχίων, αλλά είναι μάλλον αποτέλεσμα κάποιου προβληματικού ενδοκυττάρου μηχανισμού.

3. Οι $Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ ενδονευρώνες που μεταναστεύουν παρά την καθυστέρηση, έχουν φυσιολογική μορφολογία.

Προκειμένου να μελετηθεί η μορφολογία των Rac1 ελλειμματικών κυττάρων κατά τη μετανάστευση, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία για την πρωτεΐνη YFP, τόσο *in vivo* σε κρυοτομές (Εικ. 14A και B), όσο και *ex vivo* στα κύτταρα των ιστοτεμαχίων μετά από καλλιέργεια (Εικ. 14D). Η έκφραση της YFP ιχνηθετεί τα μεταλλαγμένα κύτταρα και επιτρέπει τη μελέτη της μορφολογίας των σωμάτων αλλά και των αξόνων τους, που καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το δυναμικό κυτταροσκελετό των νευρώνων. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε εγκεφάλους εμβρύων E14.5. Κατά το συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο, όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, μεταναστεύουν πολυάριθμα κύτταρα από την περιοχή του MGE, και έχουν ξεκινήσει και κάποια Rac1-ελλειμματικά κύτταρα, να περνούν το όριο του ραχιαίου και βασικού τελεγκεφάλου.

Από τη μελέτη αυτή φαίνεται ότι τα Rac1-ελλειμματικά κύτταρα (Εικ. 14B), όπως και τα φυσιολογικά κύτταρα (Εικ. 14A), έχουν τη χαρακτηριστική μορφολογία μεταναστευόντων κυττάρων, με μια βασική καθοδηγητική απόφυση προς την κατεύθυνση της μετανάστευσης (λευκά βέλη στην Εικ. 14A και 14B) και σε πολλές περιπτώσεις, μια ακολουθητική απόφυση προς την αντίθετη κατεύθυνση (κόκκινα βέλη στην Εικ. 14D). Συγκρίνοντας τους $Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ με τους φυσιολογικούς $Rac1^{+/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ ενδονευρώνες δεν παρατηρούνται διαφορές ως προς το μήκος (Εικ. 14a) και τον αριθμό των καθοδηγητικών αποφύσεων τους (Εικ. 14b), αλλά ούτε και ως προς τον αριθμό των δευτερογενών διακλαδώσεων κάθε κυττάρου (Εικ. 14c). Επομένως τα κύτταρα που μεταναστεύουν, παρά την καθυστέρηση λόγω απουσίας της Rac1 πρωτεΐνης, δε φαίνεται να επηρεάζονται μορφολογικά.

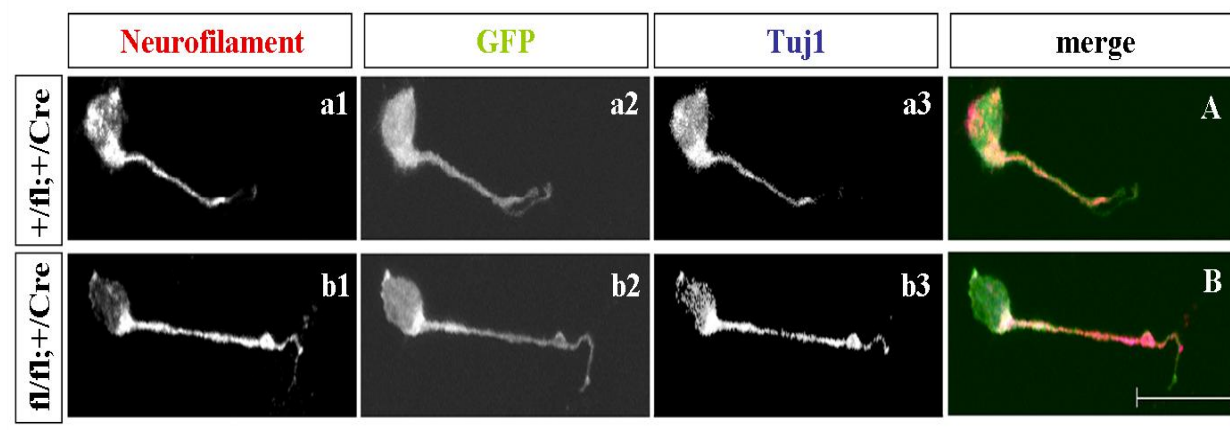


Εικόνα 14. Η μορφολογία των *Rac1*-ελλειμματικών κυττάρων κατά τη μετανάστευση, είναι φυσιολογική. Ανοσοϊστοχημεία για την πρωτεΐνη YFP αποκαλύπτει τη μορφολογία των κυττάρων και των καθοδηγητικών αποφύσεων τους *in vivo ex vivo*. Δεν παρατηρούνται μορφολογικές διαφορές στα *Rac1*-ελλειμματικά κύτταρα (B) σε σχέση με τα φυσιολογικά μεταναστεύοντα κύτταρα (A), ως προς το μήκος της καθοδηγητική απόφυσης τους (a), τον αριθμό των αποφύσεων κάθε κυττάρου (b), αλλά και τον αριθμό των διακλαδώσεων κάθε βασικού άξονα (c). Η μορφολογία των μεταναστεύοντων κυττάρων φαίνεται φυσιολογική και σε *ex vivo* καλλιέργεια (D). Τα λευκά βέλη στα A και B δείχνουν την ακθοδηγητική απόφυση του κυττάρου, ενώ οι λευκοί αστερίσκοι, υποδεικνύουν τη διακλάδωση της απόφυσης. Τα κόκκινα βέλη στο D υποδεικνύουν την ακολουθητική απόφυση των κυττάρων. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με *Student's T test* και *ANOVA* για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Τα *Error bars* στα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν την τιμή *Standard Error of Mean*. (Βλ. «Υλικά και Μέθοδοι» για λεπτομέρειες).

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από πειράματα ανοσοϊστοχημείας για πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (Εικ. 15). Χρησιμοποιήθηκαν έμβρυα αναπτυξιακού σταδίου E12.5, προκειμένου να διαπιστωθεί η οργάνωση των ινιδίων ακτίνης και της τουμπουλίνης, στη φάση που τα κύτταρα της περιοχής του MGE αρχίζουν να εμφανίζουν πόλωση του κυτταροσκελετού, στην περιοχή που αναπτύσσεται η καθοδηγητική απόφυση.

Όπως προκύπτει, μάρτυρες όπως η neurofilament, που αναγνωρίζει τα ενδιάμεσα ινίδια της ακτίνης, έχουν όμοια κατανομή στο σώμα και την απόφυση των $Rac1^{+/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ (Εικ. 15a1) και $Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ (Εικ. 15b1) εμβρύων, υποδηλώνοντας τη φυσιολογική οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Αντίστοιχη είναι η εικόνα κατανομής της τουμπουλίνης, όπως φαίνεται από τον εντοπισμό του αντισώματος *Tuj1*, συνεπώς οι μικροσωληνίσκοι των κυττάρων της περιοχής του MGE, δε διαφέρουν στα φυσιολογικά (Εικ. 15a3) και μεταλλαγμένα (Εικ. 15b3) έμβρυα. Όπως και στα προηγούμενα πειράματα, ο εντοπισμός των παραπάνω αντισωμάτων συνδυάστηκε με τον εντοπισμό της έκφρασης της YFP, προκειμένου να διακρίνονται τα κύτταρα με ενεργή Cre-ρεκομπινάση, τόσο στα φυσιολογικά (Εικ. 15a2), όσο και στα μεταλλαγμένα ζώα (Εικ. 15b2).

Από τα αποτελέσματα αυτά, προκύπτει ότι τα *Rac1*-ελλειμματικά κύτταρα, δεν παρουσιάζουν μορφολογικά προβλήματα και κυτταροσκελετικές ανωμαλίες που θα επηρέαζαν την επέκταση της καθοδηγητικής τους απόφυσης και συνεπώς τη μετανάστευση των κυττάρων. Επομένως, ο φαινότυπος των μεταλλαγμένων ζώων, οφείλεται σε διαφορετικού τύπου ενδογενές πρόβλημα των κυττάρων.



Εικόνα 15. Η μορφολογία του κυτταροσκελετού των *Rac1*-ελλειμματικών κυττάρων κατά τη μετανάστευση, είναι φυσιολογική. Ανοσοϊστοχημεία για πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και την πρωτεΐνη YFP αποκαλύπτει τη μορφολογία των κυττάρων και των καθοδηγητικών αποφύσεων τους *in vivo*. Δεν παρατηρούνται μορφολογικές διαφορές στα *Rac1*-ελλειμματικά κύτταρα (B) σε σχέση με τα φυσιολογικά μεταναστεύοντα κύτταρα (A). Φαίνεται ότι ο κυτταροσκελετός της ακτίνης έχει φυσιολογική οργάνωση, όπως προκύπτει από τον εντοπισμό της neurofilament, τόσο στα φυσιολογικά (a1), όσο και στα *Rac1*-ελλειμματικά κύτταρα (b1). Ο εντοπισμός της τουμπουλίνης (*Tuj1*), αποκαλύπτει ότι οι μικροσωληνίσκοι έχουν παρόμοια τοποθέτηση στα φυσιολογικά (a3) και στα

μεταλλαγμένα κύτταρα (b3). a2, b2: έκφραση της YFP στα φυσιολογικά και μεταλλαγμένα κύτταρα αντίστοιχα. Κλίμακα: 18.56μm.

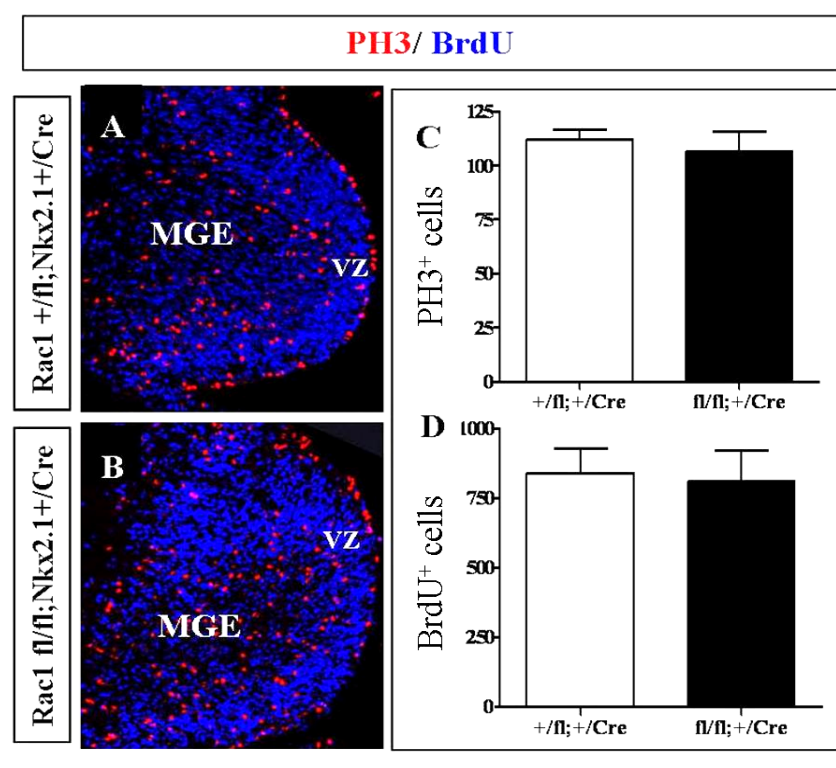
4. Η έλλειψη της Rac1 δεν επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό και τη μιτωτική δραστηριότητα των κυττάρων της περιοχής του MGE.

Ο *in vivo* φαινότυπος των Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+Cre} ζώων και τα αποτελέσματα των *ex vivo* πειραμάτων με ιστοτεμάχια MGE δείχνουν μια σαφέστατη καθυστέρηση στην έναρξη της κυτταρικής μετανάστευσης των GABAεργικών ενδονευρώνων που είναι ελλειμματικοί για τη Rac1. Ωστόσο τα κύτταρα δε φαίνεται να έχουν κάποιο κυτταροσκελετικό πρόβλημα, όπως προκύπτει από τη φυσιολογική μορφολογία τους. Επιπλέον, η υπόθεση ότι η καθυστέρηση μπορεί να οφείλεται σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο δεν επαληθεύτηκε, καθώς δεν παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση της ενεργού μορφής της Caspase 3. Μια άλλη υπόθεση που θα εξηγούσε το φαινότυπο των Rac1 ελλειμματικών κυττάρων, είναι ο μειωμένος πολλαπλασιασμός στην κοιλιακή ζώνη του MGE, όπου βρίσκονται οι πρόδρομοι ενδονευρώνες. Για να διαπιστωθεί αν γεννιούνται λιγότερα κύτταρα στα Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+Cre} έμβρυα σε σχέση με τα φυσιολογικά, πραγματοποιήθηκε εντοπισμός των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, μέσω ενσωμάτωσης αναλόγου βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU). Η συγκεκριμένη ουσία ενσωματώνεται στο γενετικό υλικό κατά το διπλασιασμό του (φάση S του κυτταρικού κύκλου) και ιχνηθετεί μόνιμα τα κύτταρα που βρίσκονται σε αυτή τη φάση. Τα κύτταρα αυτά εντοπίζονται στη συνέχεια με ανοσοϊστοχημεία με αντίσωμα που αναγνωρίζει τη BrdU.

Για τους σκοπούς της συγκεκριμένης εργασίας, πραγματοποιήθηκε ενδοπεριτοναϊκή ένεση με διάλυμα BrdU σε θηλυκά ζώα που κυοφορούσαν έμβρυα σταδίου E13.5. Η ενσωμάτωση της BrdU πραγματοποιήθηκε για μισή ώρα, έτσι ώστε ο αριθμός των κυττάρων που ιχνηθετούνται να είναι μετρήσιμος, και στη συνέχεια τα έμβρυα απομακρύνθηκαν από τις εγκύους και χρησιμοποιήθηκαν για οβελιαίες κρυστομές του εγκεφάλου τους. Ακολούθησε διπλός ανοσοεντοπισμός της BrdU και της φωσφορυλιωμένης μορφής της ιστόνης 3 (phosphohistone-3, PH3), που αποτελεί μάρτυρα των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου (Εικ. 16A, B) Έπειτα από μικροσκοπική παρατήρηση, διαπιστώνεται ότι ο αριθμός των πρόδρομων ενδονευρώνων που πολλαπλασιάζονται στην κοιλιακή ζώνη του MGE (κύτταρα που εκφράζουν BrdU), δε διαφέρει στα Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+Cre} έμβρυα, σε σχέση με τα

φυσιολογικά $Rac1^{+/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ ζώα (Εικ. 16D). Επιπλέον, ο αριθμός και η κατανομή των κυττάρων που εκφράζουν PH3 και βρίσκονται ήδη σε μιτωτική διαίρεση στα $Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ έμβρυα, δε διαφέρει από τον αντίστοιχο αριθμό κυττάρων στα φυσιολογικά $Rac1^{+/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ ζώα (Εικ. 16C).

Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο μειωμένος αριθμός των ενδονευρώνων που εντοπίζονται στον ώριμο φλοιό των $Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ μυών δεν οφείλεται στη μείωση των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων που είναι ελλειμματικά για τη $Rac1$, ούτε και στην ανικανότητά τους να εισέλθουν στη φάση της μίτωσης.



Εικόνα 16. Τα $Rac1$ -ελλειμματικά κύτταρα της περιοχής του MGE, παρουσιάζουν φυσιολογικό πολλαπλασιασμό και μιτωτική δραστηριότητα. Ανοσοϊστοχημεία για BrdU PH3 σε κρυοτομές εγκεφάλων φυσιολογικών (A) και μεταλλαγμένων εμβρύων E14.5 (B), έπειτα από ½ ώρα ενσωμάτωσης της BrdU. Ο αριθμός και η κατανομή των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων στα $Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ έμβρυα (D) δεν αλλάζει όπως φαίνεται από την ενσωμάτωση της BrdU. Επιπλέον, τα συγκεκριμένα κύτταρα φαίνεται να εισέρχονται στη μιτωτική διαίρεση με τον ίδιο ρυθμό, όπως αποκαλύπτεται από την έκφραση της PH3 (C). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Student's T test και ANOVA για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Τα Error bars στα διαγράμματα

αντιπροσωπεύουν την τιμή *Standard Error of Mean*. (Βλ. «Υλικά και Μέθοδοι» για λεπτομέρειες).
VZ, *ventricular zone*; MGE, *Medial ganglionic eminence*.

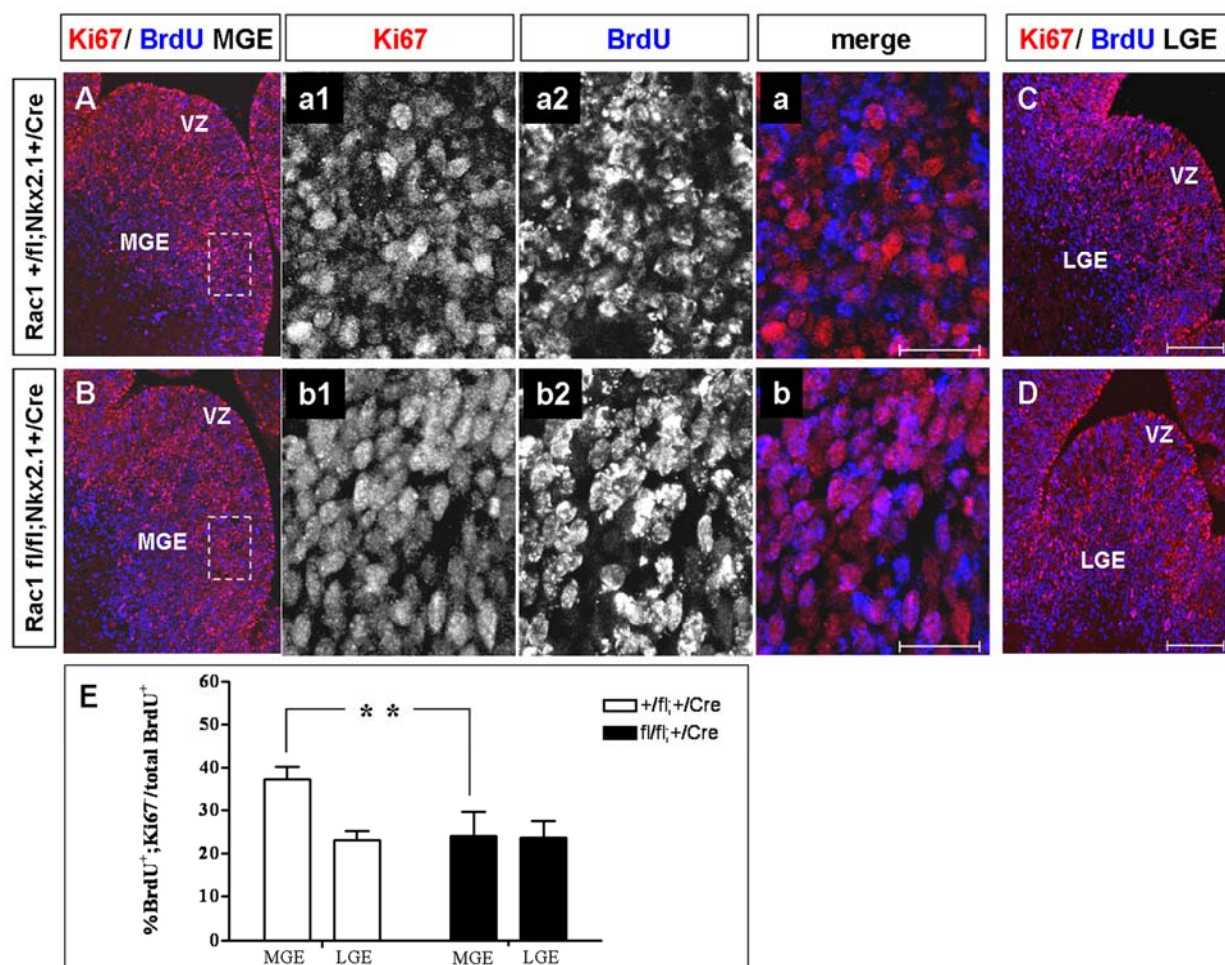
5. Η απουσία της *Rac1* καθυστερεί την έξοδο των κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο.

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι ενδονευρώνες του MGE που είναι ελλειμματικοί για τη *Rac1* έχουν κάποιο άλλο πρόβλημα, που θα μπορούσε να εξηγήσει την καθυστερημένη μετανάστευσή τους προς το φλοιό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τη μελέτη της εξόδου των κυττάρων αυτών από τον κυτταρικό κύκλο. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε και πάλι ενσωμάτωση BrdU σε έμβρυα ηλικίας E12.5, μέσω ενδοπεριτοναϊκής ένεσης σε εγκύους αυτού του αναπτυξιακού σταδίου, αλλά και σε έμβρυα E14.5 και E15.5. Η ενσωμάτωση της BrdU πραγματοποιήθηκε για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα αυτή τη φορά σε σχέση με το προηγούμενο πείραμα, προκειμένου να μπορούν να εντοπιστούν όσο το δυνατό περισσότερα νεογέννητα κύτταρα της περιοχής του MGE. Για το λόγο αυτό τα έμβρυα απομακρύνθηκαν από τις εγκύους 24 ώρες μετά από την ένεση και ακολούθως οι εγκέφαλοί τους χρησιμοποιήθηκαν για οβελιαίες κρυοτομές. Ακολούθησε ανοσοϊστοχημεία για τη BrdU, αλλά και για την πρωτεΐνη Ki67 (Εικ. 17), η έκφραση της οποίας χαρακτηρίζει τα κύτταρα που βρίσκονται ενεργά σε οποιαδήποτε φάση του κυτταρικού κύκλου (G1, G2, M). Τα κύτταρα του MGE που εκφράζουν και τους δύο μάρτυρες, θεωρείται ότι βρίσκονται ακόμα σε κυτταρικό κύκλο, ενώ τα κύτταρα στα οποία εντοπίζεται μόνο η BrdU, θεωρείται ότι έχουν εξέλθει του κυτταρικού κύκλου.

Προκειμένου να μελετηθεί η δυνατότητα εξόδου των ενδονευρώνων από τον κυτταρικό κύκλο, υπολογίστηκε ο εξής δείκτης: ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν BrdU, αλλά όχι Ki67 και άρα έχουν βγει από τον κυτταρικό κύκλο, προς το συνολικό αριθμό των BrdU⁺ κυττάρων, που αντιπροσωπεύουν τον πολλαπλασιαζόμενο πληθυσμό των πρόδρομων ενδονευρώνων. Όπως διαπιστώθηκε παραπάνω, ο πληθυσμός αυτός δε διαφέρει μεταξύ των μεταλλαγμένων $Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ και των φυσιολογικών $Rac1^{+/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$.

Ο ίδιος δείκτης υπολογίστηκε και για τον πληθυσμό των πρόδρομων κυττάρων που γεννιούνται στην περιοχή του LGE, όπου δεν έχει απενεργοποιηθεί η πρωτεΐνη *Rac1* (Εικ. 17C, D και E), προκειμένου να διαπιστωθεί η ακρίβεια του αποτελέσματος. Όπως

προκύπτει, ο δείκτης αυτός για την περιοχή του LGE παραμένει αμετάβλητος μεταξύ των μεταλλαγμένων και των φυσιολογικών ζώων. Αντίθετα, παρατηρείται μια μείωση του δείκτη αυτού την περιοχή του MGE των $Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ ζώων κατά ~ 20% (Εικ. 17 Ε). Αυτό σημαίνει ότι οι πρόδρομοι ενδονευρώνες που εξέρχονται του κυτταρικού κύκλου στα $Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ έμβρυα (Εικ. 17B, b1, b2, b) είναι σημαντικά μειωμένοι σε σχέση με τα κύτταρα που βρίσκονται στην αντίστοιχη κατάσταση στα φυσιολογικά ζώα (Εικ. 17 Α, a1, a2, a).



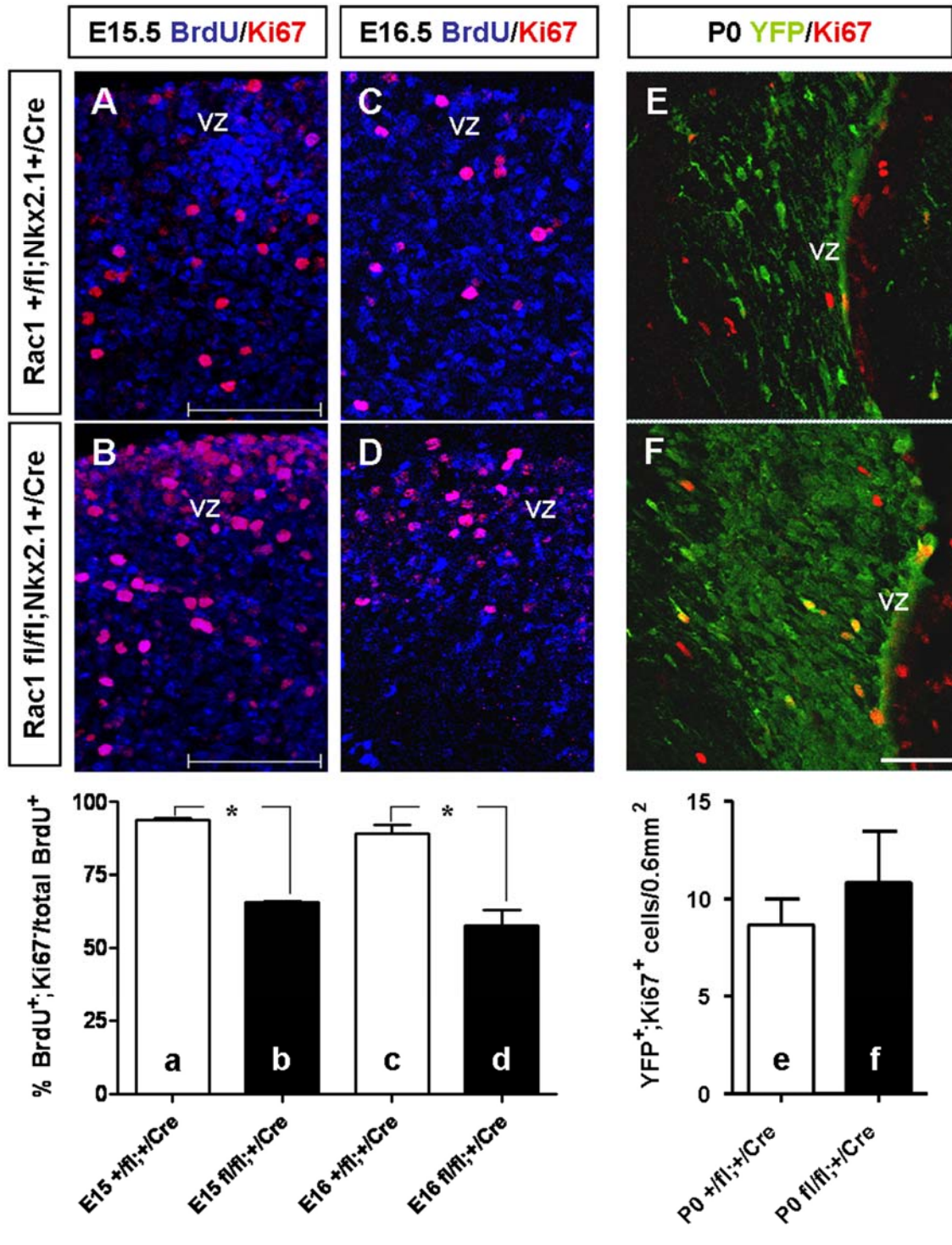
Εικόνα 17. Η απενεργοποίηση της *Rac1* στην περιοχή του MGE οδηγεί σε μειωμένη έξοδο των κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο. (A-D): Ανοσοϊστοχημεία για *BrdU* και *Ki67* σε κρυτομές εγκεφάλων E13.5, έπειτα από 24 ώρες από την ενσωμάτωση της *BrdU*. Η έξοδος των κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο, υπολογίστηκε από το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν *BrdU* ($BrdU^+$) αλλά όχι *Ki67* (*Ki67*) προς το συνολικό αριθμό των $BrdU^+$ κυττάρων στην περιοχή του MGE των φυσιολογικών και μεταλλαγμένων ζώων (A, a1, a2, a και B, b1, b2, b αντίστοιχα) και στην περιοχή

του LGE των ιδίων ζώων (C και D αντίστοιχα). Το ποσοστό αυτό μειώνεται σημαντικά στο MGE των $Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ εμβρύων, σε σχέση με τα φυσιολογικά, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για την περιοχή του LGE παραμένει αμετάβλητο (E). Η περιοχή μέσα στο στικτό πλαίσιο στις εικόνες A και B, φαίνεται σε μεγαλύτερη μεγέθυνση στις εικόνες a1, a2, a και b1, b2, b αντίστοιχα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Student's T test και ANOVA για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Τα Error bars στα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν την τιμή Standard Error of Mean. (Βλ. «Υλικά και Μέθοδοι» για λεπτομέρειες). VZ, ventricular zone; MGE, Medial ganglionic eminence; LGE, Lateral Ganglionic Eminence. Κλίμακα: A, B, C, D, 150 μ m; a1, a2, a, b1, b2, b, 25 μ m; F, G, 75 μ m.

Τα έμβρυα στα οποία πραγματοποιήθηκε ενσωμάτωση BrdU στο στάδιο E14.5 και E15.5, θυσιάστηκαν 24 ώρες μετά και χρησιμοποιήθηκαν για κρυτομές και ανοσοεντοπισμό της BrdU και του Ki67 στην περιοχή του MGE. Από την ανάλυση αυτή φαίνεται ότι τα κύτταρα των $Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ ζώων εξακολουθούν να συνεκφράζουν τους δύο μάρτυρες και εντοπίζονται συγκεντρωμένα στην κοιλιακή ζώνη τόσο στο στάδιο E15.5, όσο και στο στάδιο E16.5 (Εικ. 18B, b και D, d αντίστοιχα). Αντίθετα, τα κύτταρα των φυσιολογικών ζώων στα αντίστοιχα στάδια έχουν εξέλθει του κυτταρικού κύκλου και δεν εκφράζουν πλέον το Ki67 μαζί με την BrdU (Εικ. 18A, a και C, c). Φαίνεται λοιπόν, ότι όταν απουσιάζει η Rac1 τα κύτταρα στην περιοχή του MGE καθυστερούν να εξέλθουν του κυτταρικού κύκλου και ακόμα και σε μετέπειτα αναπτυξιακά στάδια, παραμένουν στην κοιλιακή ζώνη, εκφράζοντας μάρτυρες όπως το Ki67.

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν αργότερα, κατά την ημέρα της γέννησης, τα Rac1-ελλειμματικά κύτταρα, εξακολουθούν να παραμένουν στον κυτταρικό κύκλο, στην περιοχή όπου εντοπίζονται συσσωρευμένα, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία για την πρωτεΐνη YFP και το μάρτυρα Ki67, τόσο σε φυσιολογικά (Εικ. 18E), όσο και σε μεταλλαγμένα ζώα P0 (Εικ. 18F). Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, τα YFP κύτταρα στα οποία έχει απενεργοποιηθεί η Rac1, εντοπίζονται σε μεγάλους αριθμούς στην κοιλιακή περιοχή του εγκεφάλου κατά τη γέννηση, σε αντίθεση με τα κύτταρα των φυσιολογικών ζώων. Ωστόσο, ο αριθμός των κυττάρων που εκφράζουν το Ki67 είναι πολύ μικρός και δε διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο γονοτύπων (Εικ. 18e, f).

Από τα αποτελέσματα αυτά, φαίνεται ότι τα κύτταρα της περιοχής του MGE, καθυστερούν να εξέλθουν του κυτταρικού κύκλου κατά την εμβρυογένεση, όταν η Rac1 είναι απενεργοποιημένη. Ωστόσο την ημέρα της γέννησης, τα Rac1-ελλειμματικά κύτταρα φαίνεται ότι έχουν πάψει να βρίσκονται ενεργά στον κυτταρικό κύκλο.



Εικόνα 18. Τα *Rac1*-ελλειμματικά κύτταρα του MGE, παραμένουν στον κυτταρικό κύκλο και σε μετέπειτα αναπτυξιακά στάδια. (A-D) Ανοσοϊστοχημεία για τον εντοπισμό της *BrdU* και του *Ki67*, σε έμβρυα E15.5 (A, a, B, b) και E16.5 (C, c, D, d) 24 ώρες μετά την ενσωμάτωση της *BrdU*. Τα *Rac1*-ελλειμματικά κύτταρα της περιοχής του MGE φαίνεται ότι παραμένουν στην κοιλιακή ζώνη και διατηρούν ακόμα την έκφραση του *Ki67*, σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Ωστόσο την ημέρα της γέννησης, τα μεταλλαγμένα κύτταρα παρά τη συγκέντρωσή τους στην κοιλιακή περιοχή (F, f),

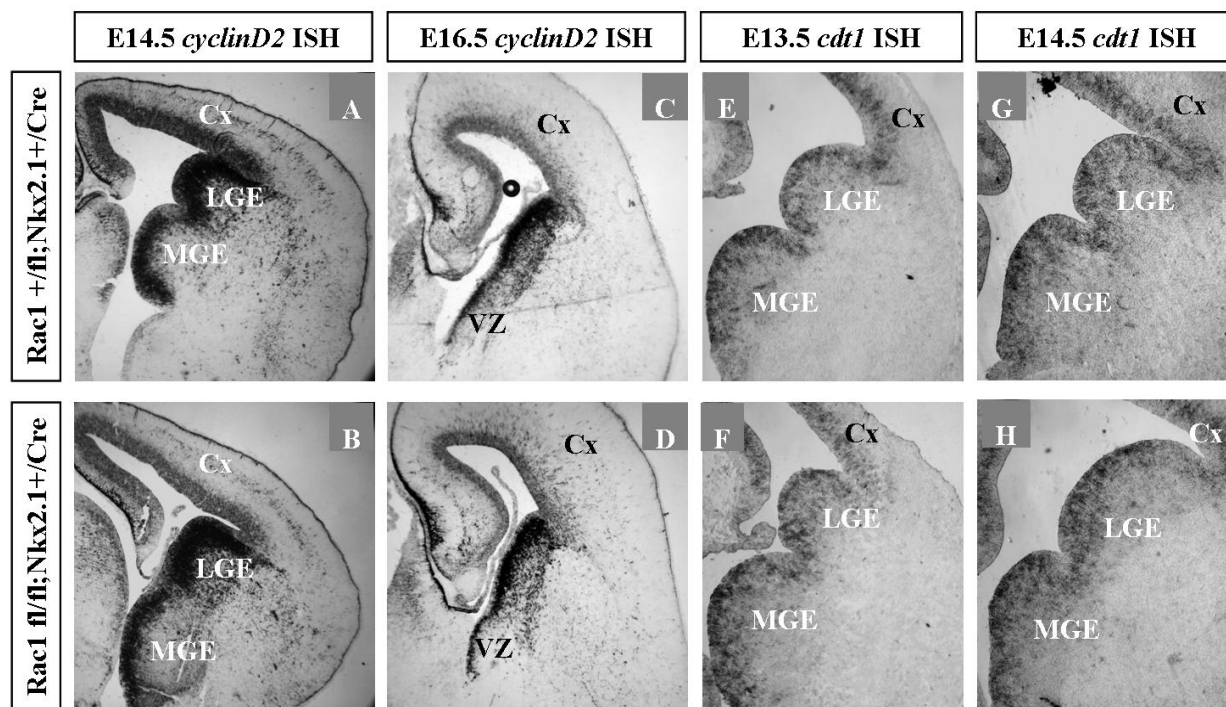
φαίνεται ότι έχουν εξέλθει του κυτταρικού κύκλου, όπως και τα φυσιολογικά κύτταρα (E, e). VZ, ventricular zone Κλίμακα: A-D: 75 μ m, 50 μ m.

Στη συνέχεια, προκειμένου να μελετηθεί η ομαλή εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στα $Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ έμβρυα, ως προς την έκφραση χαρακτηριστικών μοριακών δεικτών, πραγματοποιήθηκε *in situ* υβριδοποίηση για την ανίχνευση των μεταγράφων της κυκλίνης CyclinD2. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αποτελεί χαρακτηριστικό μάρτυρα των ενδιάμεσων πρόδρομων νευρικών κυττάρων, δηλαδή των κυττάρων που έχουν περάσει από την κοιλιακή στην υποκοιλιακή ζώνη της περιοχής προέλευσής τους. Μάλιστα όταν απουσιάζει η cyclinD2, τα κύτταρα εξέρχονται του κυτταρικού κύκλου νωρίτερα και συσσωρεύονται στην υποκοιλιακή περιοχή, με αποτέλεσμα αυτή να αυξάνει σε μέγεθος (Glickstein et al, 2007). Επιπλέον, έχει βρεθεί σε καλλιέργεια ινοβλαστών, ότι η απενεργοποίηση της $Rac1$ επηρεάζει την έκφραση συγκεκριμένων κυκλινών (CyclinD1, συνοψίζονται στο Jaffe & Hall, 2005). Βάσει των στοιχείων αυτών, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση των μεταγράφων της κυκλίνης CyclinD2 σε δύο αναπτυξιακά στάδια, E14.5 και E16.5 και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των φυσιολογικών (Εικ. 19A, C) και των $Rac1$ -ελλειμματικών εμβρύων (Εικ. 19B, D).

Με ανάλογα πειράματα υβριδοποίησης, εντοπίστηκαν και τα μετάγραφα της πρωτεΐνης Cdt1, που αποτελεί μάρτυρα της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου. Η υβριδοποίηση έγινε στα αναπτυξιακά στάδια E13.5 και E14.5, όπου δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των $Rac1^{+/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ (Εικ. 19E, G) και των $Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ εμβρύων (Εικ. 19F, H).

Ωστόσο, η ποσοτικοποίηση της έκφρασης μορίων με χρήση υβριδοποίησης *in situ*, είναι πολύ δύσκολη. Γι' αυτό θα ήταν απαραίτητα περισσότερα και διαφορετικά πειράματα για ένα πιο σαφές συμπέρασμα ως προς την έκφραση των παραπάνω μαρτύρων στα $Rac1$ -ελλειμματικά κύτταρα της περιοχής του MGE, προκειμένου να καθοριστεί το στάδιο του κυτταρικού κύκλου στο οποίο τα κύτταρα παραμένουν κατά την ανάπτυξη.

Συνοψίζοντας, από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η έλλειψη της πρωτεΐνης $Rac1$ στα πρόδρομα κύτταρα της περιοχής του MGE, οδηγεί στην καθυστέρηση της εξόδου των κυττάρων αυτών από τον κυτταρικό κύκλο. Η καθυστέρηση αυτή συνεπάγεται μειωμένη μετανάστευση προς το φλοιό και το ραβδωτό σώμα κατά την ανάπτυξη και σημαντικά μειωμένους υποληθυσμούς ενδονευρώνων και ολιγοδενδροκυττάρων στον ώριμο φλοιό.

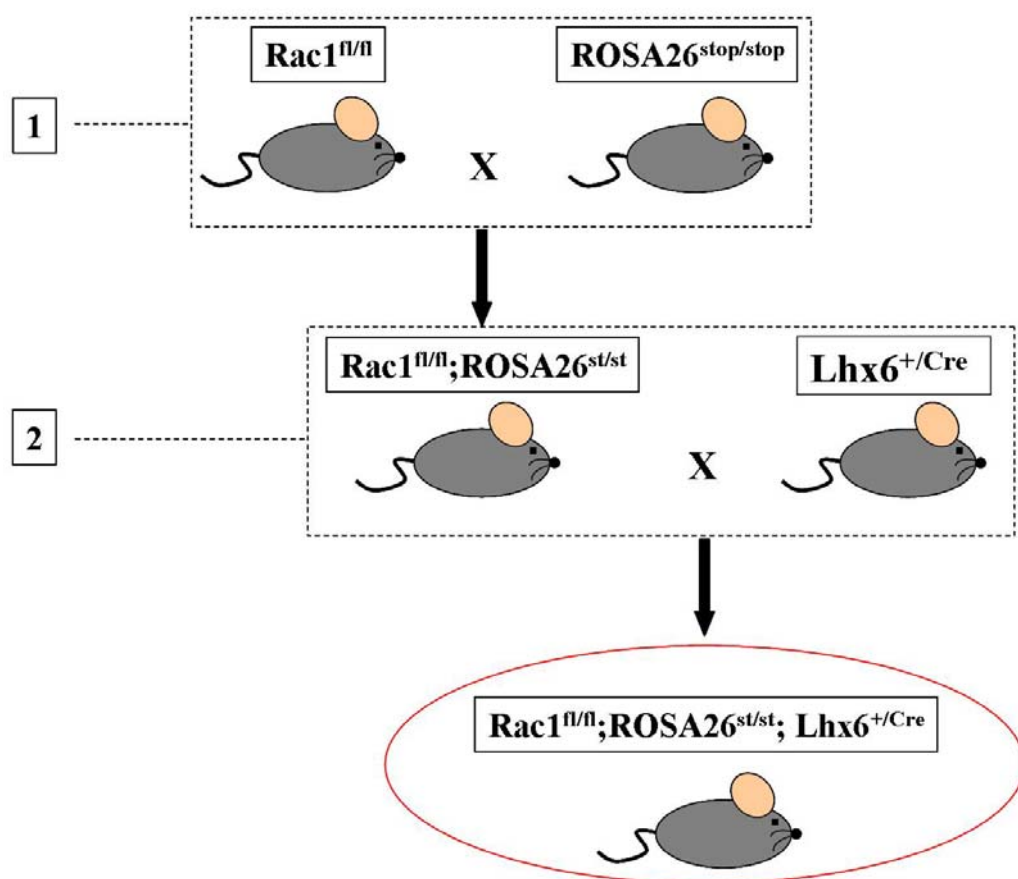


Εικόνα 19. Η έκφραση της *CyclinD2* και της *cdt1* δε φαίνεται να επηρεάζεται στα *Rac1*-ελλειμματικά ενδιάμεσα πρόδρομα κύτταρα. Υβριδοποίηση *in situ* με ανιχνευτή για τα μετάγραφα της *cyclinD2* σε κρυστομές εγκεφάλων E14.5 (A, B) και E16.5 (C, D). Σε κανένα από τα δύο αναπτυξιακά στάδια δε φαίνεται να επηρεάζεται η έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου, από την έλλειψη της *Rac1* (B, D), σε σχέση με τα φυσιολογικά επίπεδα έκφρασής του (A, C). Αντίστοιχη ανάλυση για τα μετάγραφα του γονιδίου της *cdt1*, δεν αποκαλύπτει σημαντικές διαφορές στην έκφραση του γονιδίου μεταξύ των φυσιολογικών (E, G) και των μεταλλαγμένων εμβρύων (F, H), σε κανένα αναπτυξιακό στάδιο. MGE, Medial ganglionic Eminence; LGE, Lateral Ganglionic Eminence; Cx, Cortex; VZ, Ventricular Zone.

Ε. Απενεργοποίηση της *Rac1* σε μεταμιτωτικούς ενδονευρώνες του MGE δεν επηρεάζει τη μετανάστευση και την ανάπτυξή τους.

Βάσει των προηγούμενων αποτελεσμάτων, η λειτουργία της πρωτεΐνης *Rac1* είναι πολύ σημαντική για τους GABAεργικούς ενδονευρώνες, όταν είναι ακόμα σε μιτωτικό στάδιο. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρατήρηση αυτή, πραγματοποιήθηκε απενεργοποίηση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στους μεταμιτωτικούς GABAεργικούς

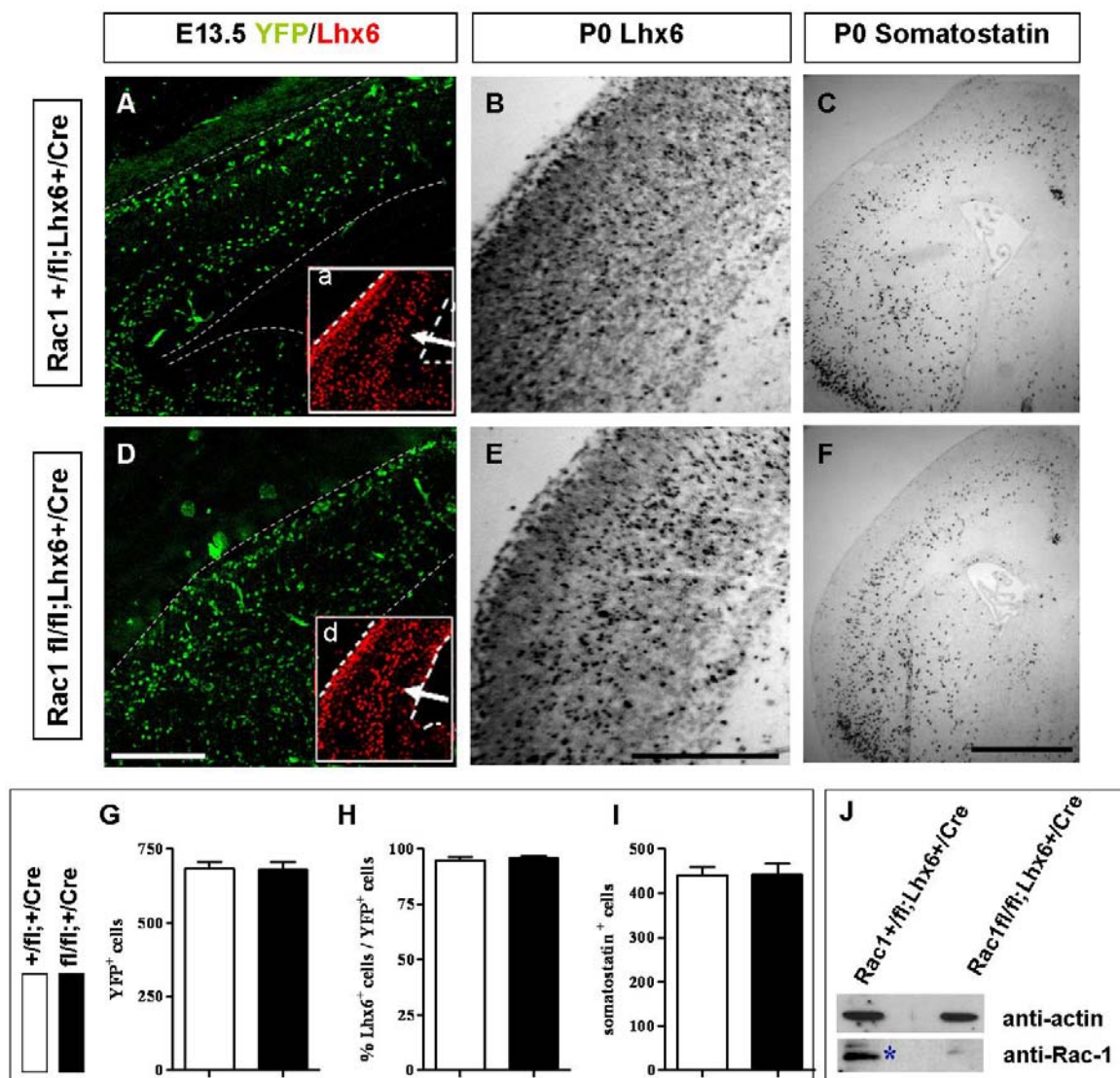
ενδονευρώνες. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία του Cre-loxP ανασυνδυασμού και συγκεκριμένα ζώα $Rac^{fl/fl}$ (Walmsley et al, 2003) που διασταυρώθηκαν αρχικά με μύες $ROSA26-YFP^{stop/stop}$ (Srinivas et al, 2001) και ακολούθως με μύες $Lhx6^{+/Cre}$ (Fogarty et al, 2007), όπως απεικονίζεται διαγραμματικά στο Σχήμα 2.



Σχήμα 2. Στοχευμένη απενεργοποίηση της *Rac1* στους μεταμιτωτικούς ενδονευρώνες της περιοχής του MGE. Οι απόγονοι της διασταύρωσης 1, διασταυρώνονται με ζώα $Lhx6^{+/Cre}$ (διασταύρωση 2), προκειμένου να προκύψουν ζώα με απενεργοποιημένη *Rac1* στους μεταμιτωτικούς ενδονευρώνες που προέρχονται από το MGE του βασικού τελεγκεφάλου ($Rac1^{fl/fl}; ROSA26^{st/st}; Lhx6^{+/Cre}$). Το αλληλίο *Rosa26YFP* αποτελεί ένα ανεξάρτητο μάρτυρα του κυτταρικού πληθυσμού όπου έχει απενεργοποιηθεί η *Rac1*.

Όπως αναφέρθηκε και εισαγωγικά, ο μεταγραφικός παράγοντας *Lhx6* εκφράζεται από όλους τους GABAεργικούς ενδονευρώνες της περιοχής του MGE, μόλις αυτοί

εξέλθουν του κυτταρικού κύκλου, γίνουν μεταμιτωτικοί και αρχίσουν να μεταναστεύουν προς το φλοιό. Μάλιστα, η έκφρασή του, χαρακτηρίζει το συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό και καθορίζει το GABAεργικό φαινότυπο (Liodis et al, 2007). Επομένως οι παραπάνω διασταυρώσεις οδηγούν στη δημιουργία ζώων, στα οποία η Rac1 είναι απενεργοποιημένη από όλους τους μεταμιτωτικούς ενδονευρώνες που προέρχονται από το MGE. Η γονοτύπηση των μεταλλαγμένων ζώων, πραγματοποιήθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), όπως και στην περίπτωση των Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+/-Cre} ζώων, ενώ η απώλεια της πρωτεΐνης Rac1 διαπιστώθηκε με ανάλυση κατά western, σε τμήματα MGE εμβρύων E13.5 (Εικ. 20J).



Εικόνα 20. Η απενεργοποίηση της Rac1 στα μεταμιτωτικά κύτταρα της περιοχής του MGE δεν επηρεάζει τη φυσιολογική ανάπτυξή τους. Ανοσοϊστοχημεία για YFP σε φυσιολογικά (A) και

μεταλλαγμένα έμβρυα E13.5 (D) και για το *Lhx6* (λευκά βέλη στα ένθετα a και b των φωτογραφιών A και B). Οι μεταλλαγμένοι ενδονευρώνες μεταναστεύουν φυσιολογικά προς το φλοιό. Από ανάλυση με υβριδοποίηση *in situ* για μάρτυρες όπως το *Lhx6* και η *Som* την ημέρα της γέννησης, προκύπτει ότι τα μεταλλαγμένα κύτταρα (E, F) εντοπίζονται στο ώριμο φλοιό σε φυσιολογική κατανομή σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα (B, C). Ποσοτική ανάλυση των *Rac1*-ελλειμματικών ενδονευρώνων δείχνει ότι τα *YFP*⁺ κύτταρα δε μεταβάλλονται σε αριθμό στα μεταλλαγμένα έμβρυα (G), σχεδόν όλα τα *YFP*⁺ κύτταρα είναι *Lhx6*⁺ (H) και ο αριθμός των *Som*⁺ κυττάρων παραμένει σταθερός απουσία της *Rac1* (I). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με *Student's T test* και *ANOVA* για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Τα *Error bars* στα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν την τιμή *Standard Error of Mean*. (Βλ. «Υλικά και Μέθοδοι» για λεπτομέρειες). (J) *Western Blot* για τον εντοπισμό της *Rac1* πρωτεΐνης στην περιοχή της μεσαίας γαγγλιονικής προεξοχής εμβρύων ηλικίας E13.5. 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). Κλίμακα: A, D: 150μm, B, C, E, F: 100μm.

Τα *Rac1*^{fl/fl}; *Lhx6*^{+Cre} ζώα που προκύπτουν από τις παραπάνω διασταυρώσεις, πεθαίνουν την πρώτη μεταγεννητική εβδομάδα (ημέρα 5^η-7^η), με αποτέλεσμα η ανάλυση του φαινοτύπου στον ενήλικο φλοιό να είναι αδύνατη. Για το λόγο αυτό, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε έμβρυα, ζώα P0 (ημέρα της γέννησης) και P5 (5^η μεταγεννητική ημέρα).

Με ανοσοϊστοχημεία για την πρωτεΐνη *YFP* αλλά και για το μάρτυρα των μεταμιτωτικών ενδονευρώνων *Lhx6*, μελετήθηκε η μετανάστευση των *GABA*εργικών κυττάρων στο αναπτυξιακό στάδιο E13.5, κατά το οποίο μεταναστεύει ο μεγαλύτερος αριθμός των κυττάρων αυτών. Από τη συγκεκριμένη ανάλυση προκύπτει ότι οι *Rac1*-ελλειμματικοί ενδονευρώνες (Εικ. 20B, b), μεταναστεύουν απόλυτα φυσιολογικά, ακολουθώντας τα μεταναστευτικά μονοπάτια που ακολουθούν και τα φυσιολογικά *Rac1*^{+/fl}; *Lhx6*^{+Cre} κύτταρα προς το φλοιό (Εικ. 20A, a). Μάλιστα, τα *YFP*⁺ μεταναστεύοντα κύτταρα, είναι ίδια σε αριθμό με τα κύτταρα των φυσιολογικών εμβρύων (Εικ. 20G). Περίπου το 97% των κυττάρων αυτών εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα *Lhx6* (Εικ. 20H). Μελετώντας περαιτέρω τα συγκεκριμένα κύτταρα την ημέρα της γέννησης, με μάρτυρες όπως το *Lhx6* (Εικ. 20B, E, H) και η *som* (Εικ. 20C, F, I), δεν παρατηρούνται διαφορές ως προς τον αριθμό και την κατανομή τους στο φλοιό των *Rac1*^{fl/fl}; *Lhx6*^{+Cre} σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα στο φλοιό των *Rac1*^{+/fl}; *Lhx6*^{+Cre} ζώων.

Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι αντίθετα με τα προηγούμενα στα *Rac1*^{fl/fl}; *Nkx2.1*^{+Cre} ζώα, όπου η *Rac1* είχε απενεργοποιηθεί από όλους τους ενδονευρώνες,

επιβεβαιώνοντας και υπογραμμίζοντας τη σημασία της πρωτεΐνης για τους ενδονευρώνες όταν αυτοί είναι ακόμα σε μιτωτικό στάδιο.

Συζήτηση Ι

*Ενδοκυττάρια σήματα στην ανάπτυξη των
ενδονευρώνων του φλοιού των ημισφαιρίων:*

Ο ρόλος της Rho-GTPάσης Rac1

Ο φλοιός των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, αποτελεί την έδρα όλων των ανώτερων λειτουργιών του εγκεφάλου των θηλαστικών. Είναι η πιο πρόσφατη εξελικτικά περιοχή του κεντρικού νευρικού συστήματος και χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη δομική πολυπλοκότητα, αποτελούμενος από μεγάλη ποικιλία κυτταρικών πληθυσμών, οργανωμένων σε στιβάδες. Η οργάνωση και η ποικιλομορφία των κυττάρων του φλοιού, ευθύνονται για τα μοναδικά λειτουργικά χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης δομής.

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

Η πρωτεΐνη Rac1 ανήκει στην οικογένεια των Rho GTPασών, οι οποίες έχουν κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και συνεπώς μετέχουν σε βασικές κυτταρικές διεργασίες, όπως η μορφογένεση, η μετανάστευση, η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, κ.α. (Jaffe & Hall, 2005). Παλαιότερες εργαστηριακές μελέτες, έχουν δείξει το ρόλο της Rac1 στην επέκταση νευριτών και καθοδήγηση νευραξόνων *in vitro* τόσο σε καρκινικά κύτταρα (Sarnier et al, 2000; Nishimura et al, 2005), όσο και σε πρωτογενή νευρικά κύτταρα σε καλλιέργεια (Schwamborn et al, 2004). Ωστόσο, ο ρόλος της Rac1 στην ανάπτυξη των νευρικών κυττάρων *in vivo*, είναι ελάχιστα μελετημένος. Πρόσφατες εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει ότι η απουσία της Rac1 κατά την ανάπτυξη των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας οδηγεί στην πρόωρη έξοδο των κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο

(Fuchs et al, 2009), ενώ απουσία της Rac1 από όλα τα πρόδρομα κύτταρα κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου, οδηγεί στην έλλειψη βασικών αξονικών πληθυσμών, όπως το μεσολόβιο (Chen et al, 2007) και σε μικροκεφαλία, λόγω μείωσης του αριθμού των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων στις κοιλιακές ζώνες του φλοιού (Chen et al, 2009).

Στη συγκεκριμένη διατριβή, μελετήθηκε ο ρόλος της Rac1 GTPάσης στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των GABAεργικών ενδονευρώνων της περιοχής του MGE, μέσω απενεργοποίησης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα που δημιουργούνται στην περιοχή αυτή. Από τη μελέτη αυτή, προκύπτει ότι η απενεργοποίηση της Rac1 από τα πρόδρομα κύτταρα που εκφράζουν Nkx2.1, οδηγεί σε παρατεταμένη παραμονή των κυττάρων αυτών στον κυτταρικό κύκλο. Ως αποτέλεσμα, παρατηρείται μειωμένη μετανάστευση των κυττάρων αυτών προς το φλοιό, η οποία αρχίζει με σημαντική καθυστέρηση σε σχέση με τη μετανάστευση των φυσιολογικών κυττάρων. Συνέπεια αυτής της μείωσης, είναι η μείωση όλων των υποπληθυσμών των GABAεργικών ενδονευρώνων που προέρχονται από το MGE, στον ώριμο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, αλλά και στη δομή του ραβδωτού σώματος.

Αντίθετα, η απενεργοποίηση της Rac1 σε κύτταρα της ίδιας περιοχής, όταν αυτά γίνουν μεταμιτωτικά και εκφράζουν Lhx6, δεν επηρεάζει την ανάπτυξή τους. Το γεγονός αυτό, υπογραμμίζει την αναγκαιότητα της Rac1 για τη σωστή ανάπτυξη των μιτωτικών πρόδρομων κυττάρων των GABAεργικών ενδονευρώνων, στην κοιλιακή περιοχή του MGE.

1. Η απενεργοποίηση της Rac1 στα πρόδρομα κύτταρα της περιοχής του MGE, οδηγεί στην καθυστέρηση της οριζόντιας μετανάστευσής τους κατά την εμβρυογένεση.

Παρ' όλο που πολλά μόρια έχουν εμπλακεί στην οριζόντια μετανάστευση των GABAεργικών ενδονευρώνων προς το φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων κατά την εμβρυογένεση, οι ενδοκυτταριοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη συγκεκριμένη διεργασία παραμένουν εν πολλοίς άγνωστοι. Είναι γνωστό ότι η GTPάση Rac1 βρίσκεται καθοδικά στα σηματοδοτικά μονοπάτια πολλών καθοδηγητικών μορίων, όπως οι εφρίνες και οι υποδοχείς τους (ephrins/Eph), η νετρίνη και ο υποδοχέας της (netrin1/DCC), και τα σύμπλοκα προσδέτη/υποδοχέα Robo/Slit και Semaphorins/Plexins (Jaffe & Hall, 2005; Lowery & Van Vactor, 2009). Επιπλέον,

έχει δειχθεί ότι η Rac1 εμπλέκεται *in vitro* στη δημιουργία λαμελιποδίων (Miki et al, 1998; Miki et al, 2000), στη νευριτογένεση (Schwamborn et al 2004), και στην επιμήκυνση και καθοδήγηση αξόνων (Nishimura et al, 2005; Watabe-Ushida et al, 2006), ενώ *in vivo* εμπλέκεται στη δημιουργία βασικών αξονικών πληθυσμών στον εγκέφαλο του ποντικού (Chen et al, 2007), στην καθοδήγηση αξόνων στη *Drosophila* (Ng et al, 2002) και στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου των πρόδρομων κυττάρων του φλοιού (Chen et al, 2009) και των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας στον ποντικό (Fuchs et al, 2009).

Λόγω των παραπάνω στοιχείων, αρχική υπόθεση στη συγκεκριμένη διατριβή, ήταν ο πιθανός ρόλος της Rac1 στη μετάδοση των σημάτων που καθοδηγούν τους GABAεργικούς ενδονευρώνες στο φλοιό, και κατά συνέπεια στη σωστή ανάπτυξη του συγκεκριμένου νευρικού πληθυσμού στον εργαστηριακό μυ. Από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας, προκύπτει ότι η λειτουργία της Rac1 είναι απαραίτητη για τους πρόδρομους ενδονευρώνες, όταν αυτοί βρίσκονται ακόμα στη μιτωτική φάση, ενώ μόλις εξέλθουν του κυτταρικού κύκλου και γίνουν μεταμιτωτικοί, η απενεργοποίηση της Rac1 δεν επηρεάζει την ανάπτυξή τους.

Συγκεκριμένα, από τη μελέτη του φαινοτύπου των μεταλλαγμένων ζώων κατά την εμβρυογένεση, προκύπτει ότι οι Rac1-ελλειμματικοί ενδονευρώνες δε μεταναστεύουν προς το φλοιό στα σωστά αναπτυξιακά στάδια. Αργότερα κατά την εμβρυογένεση, κάποια από αυτά τα κύτταρα μεταναστεύουν και καταλαμβάνουν τη θέση τους στον αναπτυσσόμενο φλοιό, ενώ ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων δε μεταναστεύουν και παραμένουν συγκεντρωμένα κοιλιακά, στην περιοχή της δημιουργίας τους. Η παρατήρηση αυτή παραπέμπει σε κάποιο πρόβλημα των ενδονευρώνων στην εκκίνηση της μεταναστευτικής διαδικασίας.

2. Η έλλειψη της Rac1 οδηγεί στη μείωση όλων των κυτταρικών πληθυσμών που προέρχονται από την περιοχή του MGE στον ώριμο εγκέφαλο.

Λόγω της καθυστερημένης μετανάστευσης και της κοιλιακής συσσώρευσης των Rac1-ελλειμματικών κυττάρων αναπτυξιακά, μόλις οι μισοί GABAεργικοί ενδονευρώνες εντοπίζονται στο φλοιό, αλλά και στην περιοχή του ραβδωτού σώματος, μετά τη γέννηση. Ωστόσο, παρά τη σημαντική μείωση, οι Rac1-ελλειμματικοί ενδονευρώνες στον ώριμο φλοιό διαφοροποιούνται φυσιολογικά προς τους αναμενόμενους υποπληθυσμούς, όπως προκύπτει από μελέτη της έκφρασης

πρωτεϊνών πρόσδεσης ασβεστίου, ενζύμων και νευροπεπτιδίων, χαρακτηριστικών για κάθε υποπληθυσμό.

Συγκεκριμένα, ~80% των Rac1-ελλειμματικών κυττάρων του φλοιού που εκφράζουν YFP, εκφράζουν και το μεταγραφικό παράγοντα Lhx6, όπως και τα φυσιολογικά κύτταρα. Ο συγκεκριμένος παράγοντας βρίσκεται καθοδικά του μεταγραφικού παράγοντα Nkx2.1 και είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες ότι τα μόρια αυτά καθορίζουν το GABAεργικό φαινότυπο των νευρώνων της περιοχής του MGE και την επακόλουθη διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών προς τους υποπληθυσμούς parvalbumin (PV) και Somatostatin (Som) στον ώριμο φλοιό (Fogarty et al., 2007; Liodis et al., 2007). Επιπλέον, τα ποσοστά των Lhx6⁺;YFP⁺, των PVA⁺;YFP⁺ και των Som⁺;YFP⁺ κυττάρων προς τα συνολικά YFP⁺ κύτταρα, δε μεταβάλλονται στα μεταλλαγμένα ζώα σε σχέση με τα φυσιολογικά. Ο φαινότυπος αυτός επιβεβαιώνεται και στην περιοχή του ραβδωτού σώματος, όπου τα κύτταρα μειώνονται σημαντικά απουσία της Rac1, αλλά εκφράζουν τους αναμενόμενου δείκτες διαφοροποίησης, όπως το ένζυμο ChAT.

Από όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, συνάγεται το συμπέρασμα ότι η απώλεια της λειτουργίας της Rac1 στους ενδονευρώνες που προέρχονται από την περιοχή του MGE, δε δημιουργεί πρόβλημα στη διαφοροποίησή τους, αλλά στην ανάπτυξη τους μέχρι τη διαφοροποίηση, που περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό, τη μιτωτική δραστηριότητα των κυττάρων αυτών και την επακόλουθη μετανάστευσή τους προς το φλοιό.

Η περιοχή του MGE, αποτελεί όπως έχει προαναφερθεί, τη βασική πηγή προέλευσης ενδονευρώνων, που καταλήγουν στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων και στο ραβδωτό σώμα του εγκεφάλου (Marin & Rubenstein, 2003; Ayala et al, 2007). Ωστόσο, από την εν λόγω περιοχή και μάλιστα από τα πρόδρομα κύτταρα που εκφράζουν Nkx2.1, προέρχεται και ένας μικρός υποπληθυσμός ολιγοδενδροκυττάρων που μεταναστεύουν στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων (Kessaris et al, 2006). Η μετανάστευση των κυττάρων αυτών είναι οριζόντια, όπως και η μετανάστευση των ενδονευρώνων και λαμβάνει χώρα στα ίδια αναπτυξιακά στάδια (Kessaris et al, 2006). Από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης, φαίνεται ότι η απενεργοποίηση της Rac1 στην περιοχή του MGE, επηρεάζει εκτός από τους ενδονευρώνες και τα ολιγοδενδροκύτταρα, με αποτέλεσμα να εντοπίζονται σημαντικά μειωμένα στον ώριμο φλοιό των μεταλλαγμένων ζώων.

Με βάση τα αποτελέσματα έως τώρα, προκύπτει ότι η απενεργοποίηση της Rac1 στα πρόδρομα κύτταρα της περιοχής του MGE, επηρεάζει όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς που προέρχονται από τη συγκεκριμένη δομή κατά την ανάπτυξη. Μάλιστα, ο φαινότυπος αυτός είναι εξειδικευμένος για τα κύτταρα της περιοχής του MGE, καθώς οι υποπληθυσμοί των ενδονευρώνων που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές του αναπτυσσόμενου τελεγκεφάλου, δεν επηρεάζονται. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι υποπληθυσμοί που εκφράζουν Calretinin (CR) και NPY, οι οποίοι προέρχονται από τα πρόδρομα κύτταρα της περιοχής του CGE, όπου δεν εκφράζεται ο μεταγραφικός παράγοντας Nkx2.1 (Fogarty et al., 2007; Flames et al., 2007; Butt et al., 2008). Όπως ήταν αναμενόμενο, οι υποπληθυσμοί αυτοί δεν επηρεάζονται στους εγκεφάλους των μεταλλαγμένων ζώων, καθώς η λειτουργία της Rac1 δεν έχει απενεργοποιηθεί. Ακόμα και ο μικρός αριθμός των CR⁺ που προέρχονται από το MGE (Flames et al., 2007) και ιχνηθετούνται με την έκφραση της YFP, δε μεταβάλλεται στα Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+Cre} ζώα.

Βάσει παλαιότερων μελετών, ένας πολύ μικρός αριθμός κυττάρων του φλοιού, προέρχεται από την περιοχή του LGE, παρ' όλο που στη συγκεκριμένη δομή γεννιούνται νευρώνες που καταλήγουν στους οσφρητικούς λοβούς (Anderson et al., 2001). Τα πρόδρομα κύτταρα της περιοχής αυτής, δεν εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα Nkx2.1 και συνεπώς έχουν φυσιολογική λειτουργία της Rac1 στα μεταλλαγμένα ζώα. Ελλείψει μοριακών μαρτύρων για τον εντοπισμό αυτών των κυττάρων στο φλοιό των μεταλλαγμένων ζώων, τα κύτταρα σημάνθηκαν με κρυστάλλους DiI σε οργανοτυπικές καλλιέργειες, προκειμένου να μελετηθεί η μετανάστευσή τους προς τον αναπτυσσόμενο φλοιό. Από την ανάλυση αυτή δε διαπιστώθηκαν διαφορές σε αυτόν τον κυτταρικό πληθυσμό στα Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+Cre} ζώα, καθώς τα κύτταρα από το LGE που μεταναστεύουν προς το φλοιό, είναι πολύ λίγα, όπως και στα φυσιολογικά ζώα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα, επιβεβαιώνουν την εξειδίκευση του φαινοτύπου που παρατηρείται στους ενδονευρώνες και τα γλοιακά κύτταρα που προέρχονται από την περιοχή του MGE στα μεταλλαγμένα Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+Cre} ζώα, τόσο κατά την ανάπτυξη όσο και στον ώριμο φλοιό.

3. Η καθυστερημένη μετανάστευση των Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1^{+Cre} ενδονευρώνων οφείλεται σε ενδογενές πρόβλημα των κυττάρων.

Προηγούμενες εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει ότι η Rac1 επηρεάζει τη διαδικασία της μετανάστευσης σε πολλούς διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς. Συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι η Rac1 μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασής της με την πρωτεΐνη WAVE και στη συνέχεια λόγω της αλληλεπίδρασης της WAVE με το Arp2/3, έχει την ικανότητα να προσδένεται πάνω στα ινίδια του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Η πρόσδεση αυτή επάγει τον πολυμερισμό και τη δημιουργία νέων διακλαδώσεων στα ινίδια της ακτίνης των μεταναστευόντων κυττάρων και η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για την προώθηση της καθοδηγητικής απόφυσης του κυττάρου, προς την κατεύθυνση της μετανάστευσης (Gardiner et al. 2002; Itoh et al., 2002). Επιπλέον είναι γνωστό ότι η Rac1 είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση της δυναμικής των μικροσωληνίσκων κατά την κυτταρική κίνηση (Grabham et al, 2003), μέσω της αλληλεπίδρασής της με το πρωτεϊνικό σύμπλοκο IQGAP1/CLIP170 (Fukata et al., 2002). Η συνεχής αλληλεπίδραση των μικροσωληνίσκων με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης είναι απαραίτητη για την απόκριση του αυξητικού κώνου των νευρώνων στα καθοδηγητικά σήματα του περιβάλλοντος (Dent et al., 2001; Zhou et al., 2004).

Σύμφωνα με τα παραπάνω στοιχεία, μια λογική υπόθεση στη συγκεκριμένη μελέτη των Rac1-ελλειμματικών ενδονευρώνων, είναι η ύπαρξη κυτταροσκελετικών προβλημάτων που δεν επιτρέπουν τη μετανάστευση των κυττάρων αυτών στο σωστό αναπτυξιακό στάδιο. Από τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής, φαίνεται ότι τα Rac1-ελλειμματικά κύτταρα έχουν κάποιο ενδογενές πρόβλημα που εμποδίζει την έναρξη της μετανάστευσής τους, το οποίο είναι ανεξάρτητο από τα περιβαλλοντικά σήματα που δέχονται κατά την ανάπτυξη. Η καλλιέργεια αυτών των κυττάρων σε απομονωμένα ιστοτεμάχια *ex vivo*, αποκαλύπτει ότι καθυστερούν να εξέλθουν του ιστοτεμαχίου. Έπειτα από τις πρώτες 24 ώρες καλλιέργειας, σχεδόν κανένα Rac1-ελλειμματικό κύτταρο δεν έχει ξεκινήσει να μεταναστεύει και μόνο έπειτα από 48 ώρες συνολικής καλλιέργειας, υπάρχουν μεταλλαγμένα κύτταρα που απομακρύνονται από τα ιστοτεμάχια. Ως αποτέλεσμα, τα κύτταρα που έχουν απενεργοποιημένη Rac1 έχουν διανύσει πολύ μικρότερη απόσταση σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα που προηγούνται τόσο χρονικά, όσο και χωρικά στη μετανάστευση. Η ταχύτητα μετκίνησης των Rac1-ελλειμματικών κυττάρων, όπως αυτή υπολογίζεται από την απόσταση που διανύουν τα κύτταρα στη διάρκεια του 2^{ου} 24ώρου που μεταναστεύουν, δε φαίνεται να διαφέρει από την αντίστοιχη ταχύτητα των φυσιολογικών κυττάρων στα ιστοτεμάχια. Ωστόσο, θα ήταν πολύ σημαντικό να

πραγματοποιηθεί ζωντανή καταγραφή της μετανάστευσης των κυττάρων σε οργανοτυπικές καλλιέργειες, ώστε να εξακριβωθεί η ταχύτητα με την οποία μετακινούνται σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα. Το συγκεκριμένο πείραμα θα δώσει σημαντικές πληροφορίες για το ρόλο της Rac1 στην κινητικότητα των κυττάρων κατά την οριζόντια μετανάστευσή τους προς το φλοιό.

Παρά την αρχική υπόθεση των κυτταροσκελετικών προβλημάτων, η μορφολογία των μεταλλαγμένων κυττάρων που μεταναστεύουν, τόσο *in vivo* κατά την εμβρυογένεση, όσο και *ex vivo* σε καλλιέργεια, είναι απόλυτα φυσιολογική σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα, όπου η Rac1 είναι λειτουργική. Τόσο η μορφολογία και ο αριθμός των καθοδηγητικών αποφύσεων κάθε κυττάρου, όσο και ο αριθμός των διακλαδώσεων κάθε απόφυσης είναι όμοια με αυτά των φυσιολογικών κυττάρων. Το γεγονός αυτό δεν παραπέμπει στην ύπαρξη κυτταροσκελετικών ανωμαλιών, καθώς κάτι τέτοιο θα παρεμπόδιζε την επέκταση καθοδηγητικών αποφύσεων, όπως έχει δειχθεί και σε παλαιότερες μελέτες (Dent & Gertler, 2003; Kwiatkowski et al, 2007). Αυτό υποστηρίζεται περαιτέρω, από την οργάνωση των ινιδίων ακτίνης αλλά και των μικροσωληνίσκων στα κύτταρα που μεταναστεύουν, η οποία δε διαφέρει μεταξύ των φυσιολογικών και μεταλλαγμένων ζώων. Ωστόσο, δε μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα ύπαρξης ενός μηχανισμού αναπλήρωσης του ρόλου της Rac1 από άλλες Rho-GTPases, όπως το Cdc42, το οποίο έχει παρόμοια και συχνά αλληλεπικαλυπτόμενη λειτουργία με τη Rac1 (Fukata et al., 2002; Jaffe & Hall, 2005). Επομένως, περισσότερα πειράματα είναι απαραίτητα, για την παρακολούθηση και καταγραφή της μετανάστευσης των Rac1-ελλειμματικών κυττάρων της περιοχής του MGE *in vivo*, προκειμένου να διαπιστωθεί ο πιθανός ρόλος της πρωτεΐνης στη δυναμική του κυτταροσκελετού των συγκεκριμένων κυττάρων κατά τη μετανάστευσή τους προς το φλοιό.

4. Η Rac1 ρυθμίζει την έξοδο των κυττάρων της περιοχής του MGE από τον κυτταρικό κύκλο.

Πρόσφατες εργαστηριακές μελέτες αναφέρουν ότι η GTPάση Rac1 επηρεάζει πολλαπλές διεργασίες κατά την ανάπτυξη των νευρικών κυττάρων. Απενεργοποίηση της λειτουργίας της από ολόκληρο τον αναπτυσσόμενο φλοιό των ημισφαιρίων στον ποντικό, οδηγεί στην απώλεια σημαντικών αξονικών πληθυσμών (Chen et al., 2007), ενώ απενεργοποίηση της πρωτεΐνης στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα του φλοιού, προκαλεί μείωση του αριθμού των κυττάρων αυτών στην περιοχή του LGE και

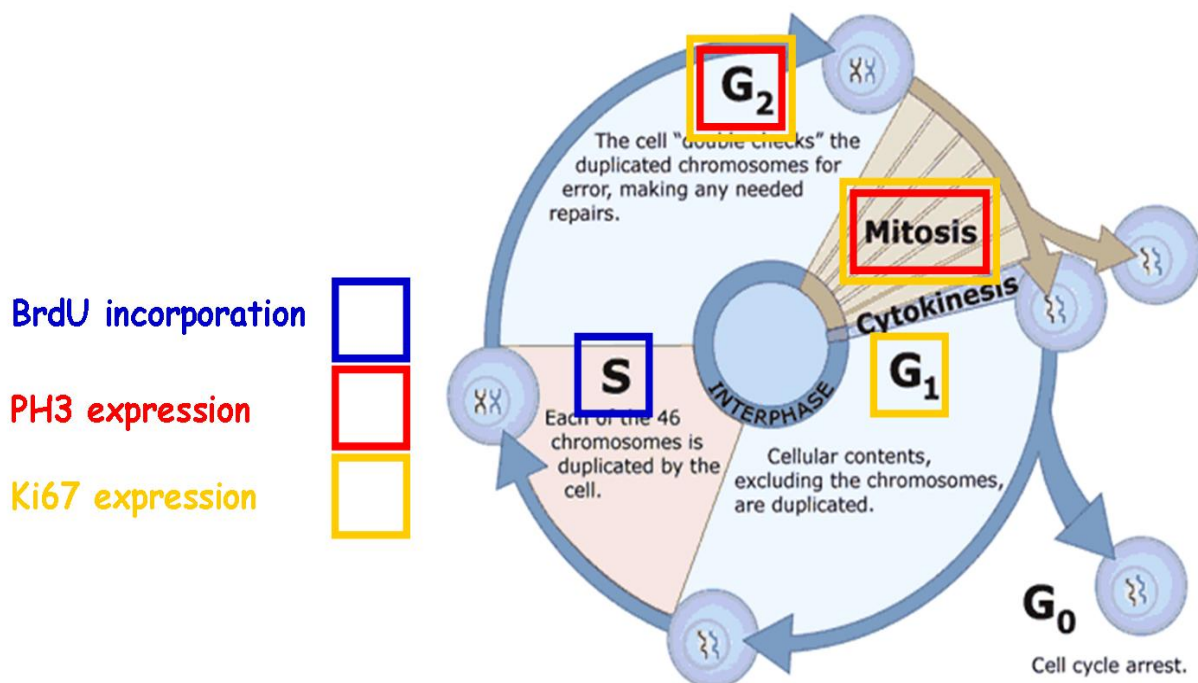
μικροκεφαλία (Chen et al., 2009). Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι η Rac1 και το Cdc42, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας, ρυθμίζοντας τον πολλαπλασιασμό και την έξοδό τους από τον κυτταρικό κύκλο (Fuchs et al., 2009).

Στη συγκεκριμένη διατριβή, προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της Rac1 στον πολλαπλασιασμό, τη μιτωτική δυναμική και τον κυτταρικό κύκλο των κυττάρων της περιοχής του MGE, απενεργοποιήθηκε η δράση της στα συγκεκριμένα κύτταρα, είτε στο μιτωτικό στάδιο αυτών, μέσω του Nkx2.1-Cre επαγόμενου ανασυνδυασμού (Fogarty et al, 2007), είτε στα μεταμιτωτικά κύτταρα μέσω του Lhx6-Cre επαγόμενου ανασυνδυασμού (Fogarty et al, 2007). Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η Rac1 είναι απαραίτητη για τα κύτταρα της περιοχής του MGE, όταν αυτά βρίσκονται ακόμα στην κοιλιακή ζώνη, ως μιτωτικά πρόδρομα κύτταρα. Παρ'ολο που δεν επηρεάζει τον αριθμό των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων και την ικανότητα των κυττάρων αυτών να διαιρούνται μιτωτικά, η απενεργοποίησή της οδηγεί στη μείωση των κυττάρων που εξέρχονται του κυτταρικού κύκλου. Τα κύτταρα φαίνεται ότι εξακολουθούν να εκφράζουν το μάρτυρα Ki67, που εκφράζεται κατά τις φάσεις G1, G2 και M του κυτταρικού κύκλου και συνεπώς χαρακτηρίζει όσα κύτταρα βρίσκονται ενεργά σε κάποιο από αυτά τα στάδια. Ωστόσο, κάποια από τα Rac1 ελλειμματικά κύτταρα ολοκληρώνουν τις μιτωτικές διαιρέσεις τους και αρχίζουν να μεταναστεύουν προς τον αναπτυσσόμενο φλοιό έπειτα από σημαντική καθυστέρηση, ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα παραμένουν συγκεντρωμένα κοιλιακά, όπου εξακολουθούν να βρίσκονται και την ημέρα της γέννησης. Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η Rac1 επηρεάζει την ομαλή εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες, που έχουν δείξει ότι η συγκεκριμένη GTPάση μαζί με το Cdc42, έχει σημαντικό ρόλο στην ομαλή μετάβαση των κυττάρων από την πρόδρομη-μιτωτική στη μεταμιτωτική φάση (Chen et al, 2007; Fuchs et al, 2009)

5. Πιθανός ρόλος της Rac1 στην ομαλή εξέλιξη της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου.

Είναι γνωστό ότι οι Rho-GTPάσες επηρεάζουν τη λειτουργία των κυκλινών και των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών κατά τη διάρκεια της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου και επιπλέον μετέχουν στην οργάνωση των μικροσωληνίσκων και της ακτίνης κατά τη διάρκεια της μίτωσης (φάση M) (Jaffe & Hall, 2005;

Narumiya & Yasuda, 2006). Βάσει των αποτελεσμάτων της συγκεκριμένης εργασίας, φαίνεται ότι τα Rac1-ελλειμματικά κύτταρα δεν παρουσιάζουν κάποιο πρόβλημα στα στάδια S , G2 ή M του κυτταρικού κύκλου. Η ενσωμάτωση της BrdU που πραγματοποιείται κατά τη φάση διπλασιασμού του γενετικού υλικού του κυττάρου (S), είναι όμοια με αυτή των φυσιολογικών κυττάρων και η έκφραση της PH3, η οποία χαρακτηρίζει τα κύτταρα που βρίσκονται στο τελευταίο στάδιο της G2 φάσης του κύκλου και όσα βρίσκονται ήδη σε διαδικασία μίτωσης (M), είναι στα ίδια επίπεδα με αυτή των φυσιολογικών εμβρύων. Επομένως, η καθυστέρηση που παρατηρείται στην έναρξη της μετανάστευσης και η μείωση των κυττάρων που μετακινούνται προ το φλοιό, θα μπορούσε να οφείλεται σε παρατεταμένη παραμονή αυτών των κυττάρων στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου (Σχήμα 1). Η υπόθεση αυτή συμφωνεί με παλαιότερες εργαστηριακές μελέτες, όπου φαίνεται ότι η έλλειψη της Rac1 ή του Cdc42, σε διάφορα είδη κυττάρων των θηλαστικών, παρεμποδίζει την ομαλή έξοδο των κυττάρων από τη φάση G1 (Olson et al., 1995). Ο μηχανισμός αυτής της λειτουργίας δεν είναι απόλυτα γνωστός, αλλά εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον κυτταρικό τύπο και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά κάθε κυτταρικού πληθυσμού (Jaffe & Hall, 2005).



Σχήμα 1. Η G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, ενδέχεται να επηρεάζεται από τη λειτουργία της Rac1. Όπως προκύπτει από την ενσωμάτωση της BrdU και την έκφραση της PH3 στα

Rac1-ελλειμματικά κύτταρα της περιοχής του MGE, η φάση S και οι φάσεις G2-M αντίστοιχα του κυτταρικού κύκλου, είναι φυσιολογικές. Η παρατεταμένη παραμονή των κυττάρων στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου, όπως φαίνεται από την έκφραση του Ki67, θα μπορούσε να εξηγήσει την καθυστερημένη/μειωμένη έξοδο των κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο, την καθυστερημένη/μειωμένη μετανάστευση και τη μείωση όλων των κυτταρικών πληθυσμών του MGE στον ώριμο φλοιό των μεταλλαγμένων ζώων.

Η ισορροπημένη έκφραση των κυκλινών και των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cyclin-dependent kinases, Cdk), είναι ιδιαίτερης σημασίας για την ομαλή εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και βρίσκεται υπό τον αυστηρό έλεγχο πολλών μορίων, μεταξύ των οποίων είναι η Rho και η Rac1 (Welsh et al., 2001). Μάλιστα, έχειδειχθεί ότι η Rac1 επηρεάζει άμεσα τα επίπεδα έκφρασης κυκλινών όπως π.χ. η CyclinD1, καθοδικά σηματοδοτικών μορίων, όπως οι integrins και οι cadherins (Mettouchi et al, 2001; Fournier et al, 2000). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι απουσία συγκεκριμένων κυκλινών, όπως η cyclinD2, τα πρόδρομα κύτταρα της περιοχής του MGE εξέρχονται πρόωρα από τον κυτταρικό κύκλο και αυτό επηρεάζει τη μελλοντική διαφοροποίησή τους προς τον υποπληθυσμό PV (Glickstein et al, 2007).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, ο φαινότυπος των Rac1-ελλειμματικών κυττάρων μπορεί να είναι αποτέλεσμα της διατάραξης της ισορροπίας στην έκφραση και ρύθμιση των κυκλινών, που στη συνέχεια οδηγεί στην παρεμπόδιση της ολοκλήρωσης της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου. Αυτή η αναπτυξιακή υστέρηση, μπορεί να οδηγεί στο μειωμένο αριθμό των κυττάρων που εξέρχονται του κυτταρικού κύκλου και μεταναστεύουν και στην καθυστερημένη έναρξη της μετανάστευσής τους προς το φλοιό, ενώ το γεγονός ότι ο *in vivo* φαινότυπος των Rac1-ελλειμματικών κυττάρων αναπαράγεται και *ex vivo*, όταν τα κύτταρα απομονωθούν και καλλιεργηθούν χωρίς εξωκυττάρια σήματα, υπογραμμίζει την ύπαρξη ενδογενούς προβλήματος στον εν λόγω κυτταρικό πληθυσμό.

Από τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης της cyclinD2 στα συγκεκριμένα κύτταρα, φαίνεται πως το πρόβλημα δεν οφείλεται σε αύξηση, ή μείωση των επιπέδων έκφρασης του μορίου. Μάλιστα, είναι μάλλον αναμενόμενο να μην παρατηρείται μείωση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, εφ' όσον ο φαινότυπος των Rac1-ελλειμματικών κυττάρων είναι αντίθετος από αυτόν των κυττάρων που είναι

ελλειμματικά για την cyclinD2. Ωστόσο, απαιτείται εκτενέστερη μελέτη της έκφρασης της συγκεκριμένης κυκλίνης στα Rac1 ελλειμματικά κύτταρα, με μεθόδους ποσοτικοποίησης (π.χ. Real Time PCR) καθώς και μελέτη των επιπέδων έκφρασης άλλων κυκλινών, και κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών, όπως π.χ. της κυκλίνης CyclinD1, η έκφραση της οποίας ρυθμίζεται άμεσα από το σηματοδοτικό μονοπάτι των πρωτεϊνών Rac (Mettouchi et al, 2001; Fournier et al, 2008). Επιπλέον, θα ήταν πολύ χρήσιμη η ανάλυση της έκφρασης μορίων με ενδεχόμενο εξισορροπητικό ρόλο στα συγκεκριμένα κύτταρα, όπως το Cdc42 και η Rac3, αλλά και μορίων με αντίθετο ρόλο από αυτόν της Rac1, όπως η RhoA, προκειμένου να διαλευκανθεί περαιτέρω ο ρόλος της Rac1 και οι αλληλεπιδράσεις της με άλλα μόρια της ίδιας οικογένειας κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος.

Με βάση όλα τα παραπάνω, ο μειωμένος αριθμός των κυττάρων της περιοχής του MGE που τελικά φτάνουν στο φλοιό και καταλαμβάνουν τις τελικές θέσεις τους, διαφοροποιούμενα προς τους αναμενόμενους GABAεργικούς υποπληθυσμούς, θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα ενός συνδυασμού αλληλένδετων γεγονότων. Πιθανότατα, τα Rac1-ελλειμματικά κύτταρα που καθυστερούν να εξέλθουν του κυτταρικού κύκλου, δεν προλαβαίνουν κάποια κρίσιμα καθοδηγητικά σήματα που δρουν την περιοχή του βασικού τελεγκεφάλου κατά την ανάπτυξη, προκειμένου να τα κατευθύνουν προς το φλοιό. Είναι επίσης πολύ πιθανό, κάποια από τα μεταλλαγμένα κύτταρα να μην εξέρχονται ποτέ του κυτταρικού κύκλου και γι' αυτό να παραμένουν συγκεντρωμένα κοιλιακά, στην περιοχή προέλευσής τους, όπου και απαντώνται ακόμα και την ημέρα της γέννησης. Ο συνδυασμός των υποθέσεων αυτών, θα μπορούσε να εξηγήσει τη σημαντική μείωση των κυττάρων της περιοχής του MGE στον ώριμο φλοιό των ημισφαιρίων, στα Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+Cre} ζώα.

Ωστόσο, όσον αφορά στα Rac1-ελλειμματικά κύτταρα, είναι αξιοσημείωτο ότι παρά την αναπτυξιακή καθυστέρηση και την παρατεταμένη παραμονή τους στην κοιλιακή ζώνη του βασικού τελεγκεφάλου, δεν παρατηρείται αύξηση του κυτταρικού θανάτου στα μεταλλαγμένα ζώα, σε κανένα από τα αναπτυξιακά στάδια που εξετάστηκαν. Θα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρον να μελετηθούν αυτά τα κύτταρα ως προς τα χαρακτηριστικά τους, προκειμένου να διαπιστωθεί αν τελικά εξέρχονται από τον κυτταρικό κύκλο και πότε, ή αν παραμένουν ενεργά στον κυτταρικό κύκλο και σε ποια συγκεκριμένη φάση του. Επιπλέον θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί το αν τελικά αυτά τα κύτταρα που δε μετακινούνται απουσία της Rac1 πεθαίνουν σταδιακά, ή παραμένουν ζωντανά σε μια αδιαφοροποίητη κατάσταση.

Η αναγκαιότητα της Rac1 στα μιτωτικά κύτταρα της περιοχής του MGE υπογραμμίζεται ακόμα περισσότερο από τη μελέτη της απενεργοποίησης της πρωτεΐνης αυτής στα μεταμιτωτικά κύτταρα της ίδιας περιοχής. Τα κύτταρα σε αυτό το στάδιο, εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα Lhx6 και έχουν ήδη ολοκληρώσει τις μιτωτικές διαιρέσεις τους στην κοιλιακή ζώνη, έχουν περάσει στην υποκοιλιακή περιοχή του MGE και ξεκινούν να μεταναστεύουν προς το φλοιό. Η απάλειψη της Rac1 σε αυτό το στάδιο, δεν επηρεάζει τη μετέπειτα αναπτυξιακή πορεία των κυττάρων αυτών. Μεταναστεύουν σε σωστό χωροχρονικό πρότυπο και καταλαμβάνουν τις τελικές θέσεις τους στο φλοιό, όπου φαίνεται να αποκτούν και τα χαρακτηριστικά των αναμενόμενων GABAεργικών υποπληθυσμών. Τα αποτελέσματα αυτά επισημαίνουν ακόμα περισσότερο τη σημασία της Rac1 στα πρόδρομα κύτταρα της περιοχής του MGE, προκειμένου αυτά να ολοκληρώσουν τον κυτταρικό κύκλο τους και να μεταναστεύσουν έγκαιρα προς τον αναπτυσσόμενο φλοιό των ημισφαιρίων.

Συνοψίζοντας, από τη συγκεκριμένη διατριβή προκύπτει ότι:

- η απουσία της GTPάσης Rac1 από τα πρόδρομα κύτταρα της περιοχής του MGE οδηγεί σε μείωση των μεταναστευόντων κυττάρων και καθυστέρηση της μετανάστευσης
- λόγω της μείωσης των μεταναστευόντων κυττάρων, τόσο οι ενδονευρώνες όσο και τα ολιγοδενδροκύτταρα που προέρχονται από την περιοχή της απενεργοποίησης της Rac1, είναι μειωμένα κατά το ήμισυ στον ώριμο εγκέφαλο, αλλά δεν επηρεάζεται η διαφοροποίησή τους
- οι ενδονευρώνες που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές του αναπτυσσόμενου εγκεφάλου, δεν επηρεάζονται από την απενεργοποίηση της Rac1 στην περιοχή του MGE
- η μείωση των μεταναστευόντων κυττάρων δεν οφείλεται σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο κατά την ανάπτυξη, λόγω της απενεργοποιημένης Rac1

- τα μεταναστεύοντα Rac1-ελλειμματικά κύτταρα αδυνατούν να αρχίσουν έγκαιρα τη μετανάστευσή τους, λόγω ενδογενούς προβλήματος, που δεν οφείλεται στον κυτταροσκελετό
- απουσία της Rac1 τα πρόδρομα κύτταρα της περιοχής του MGE πολλαπλασιάζονται φυσιολογικά και εμφανίζουν φυσιολογική μιτωτική δραστηριότητα
- η απενεργοποίηση της Rac1 οδηγεί στην καθυστερημένη έξοδο των κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο, ενδεχομένως παρεμποδίζοντας την ομαλή εξέλιξη της φάσης G1
- η απενεργοποίηση της Rac1 στα ίδια κύτταρα της περιοχής του MGE, αφού εξέλθουν του κυτταρικού κύκλου και γίνουν μεταμιτωτικά, δεν επηρεάζει περαιτέρω τη φυσιολογική ανάπτυξή τους.

Παρ' όλο που αρκετές μελέτες έχουν εστιαστεί στη διερεύνηση του ρόλου των RhoGTPασών σε διάφορα συστήματα, ο μοριακός μηχανισμός της δράσης των πρωτεϊνών αυτών και ο ρόλος τους στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, είναι ακόμα άγνωστα. Η συγκεκριμένη διατριβή, αποτελεί την πρώτη μελέτη τέτοιων μορίων στην ανάπτυξη των GABAεργικών ενδονευρώνων της περιοχής του MGE, η οποία είναι μέγιστης σημασίας για τη σωστή λειτουργία του φλοιού των ημισφαιρίων. Από τα αποτελέσματα της μελέτης, διαφαίνεται ο σημαντικός ρόλος της Rac1 στη μετάβαση των πρόδρομων νευρικών κυττάρων, από τη μιτωτική, στη μεταμιτωτική και μεταναστευτική κατάσταση. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες, προκειμένου να γίνουν κατανοητές οι βασικές αναπτυξιακές διεργασίες του φλοιού των ημισφαιρίων και οι μοριακοί μηχανισμοί που τις ρυθμίζουν.

Η κατανόηση της ανάπτυξης των ενδονευρώνων και της συγκρότησης λειτουργικών νευρικών δικτύων, είναι απαραίτητη για τη βαθύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας του εγκεφάλου. Επιπλέον θα οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών αγωγών για την αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων με μεγάλο ψυχολογικό, κοινωνικό και οικονομικό κόστος, όπως η σχιζοφρένεια, η επιληψία, η διανοητική καθυστέρηση και ο αυτισμός.



Αποτελέσματα & Συζήτηση II

*Εξωκυττάρια σήματα στην ανάπτυξη των
ενδονευρώνων του φλοιού των ημισφαιρίων:*

*Ο ρόλος της πρωτεΐνης TAG1 και των
φλοιοθαλαμικών αξόνων*

Όπως έχει αναφερθεί και εισαγωγικά, κατά την ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος των θηλαστικών, τα νευρικά κύτταρα συχνά χρειάζεται να διανύσουν μεγάλες αποστάσεις από το σημείο της γέννησής τους, μέχρι την τελική τους θέση, όπου διαφοροποιούνται και σχηματίζουν λειτουργικές συνάψεις με γειτονικά κύτταρα. Ιδιαίτερα στην περίπτωση των GABAεργικών ενδονευρώνων, τα κύτταρα μετακινούνται από την κοιλιακή περιοχή του βασικού τελεγκεφάλου, στον αναπτυσσόμενο φλοιό των ημισφαιρίων, μέσω οριζόντιας μετανάστευσης. Ωστόσο δεν είναι γνωστοί οι μοριακοί μηχανισμοί που έχουν καθοριστικό ρόλο στη μετακίνηση αυτή κατά την ανάπτυξη.

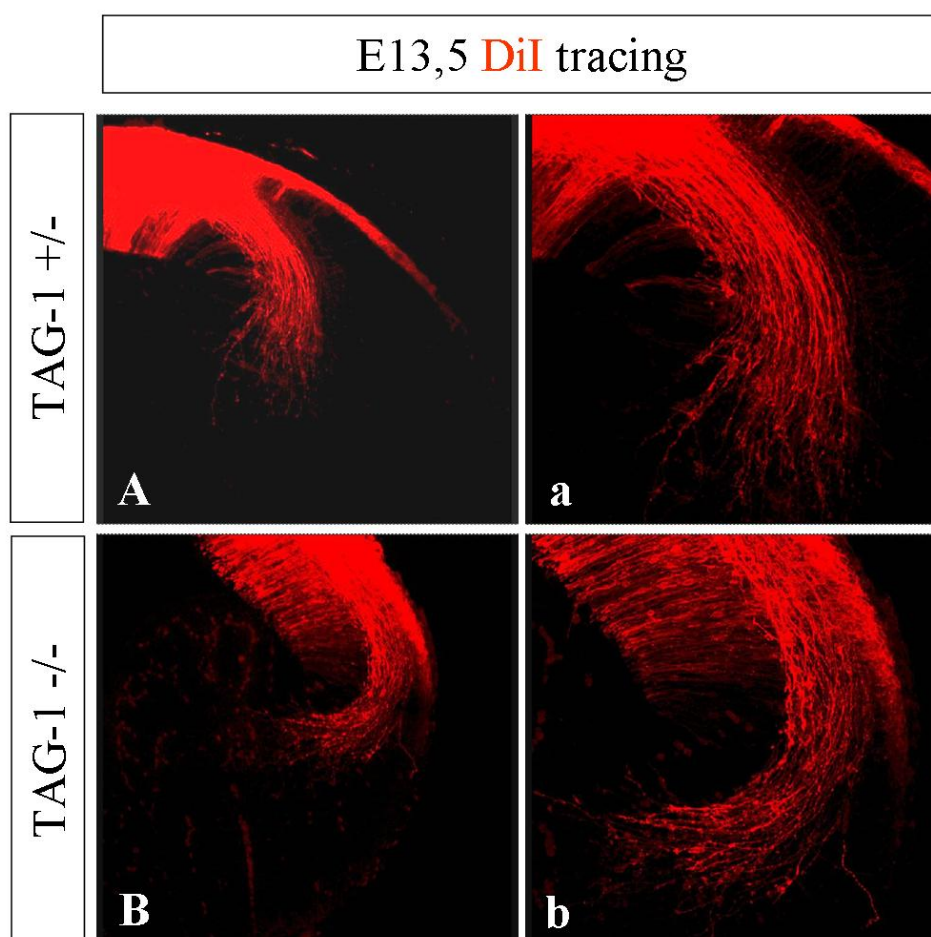
Η πρωτεΐνη TAG1 είναι ένα μόριο κυτταρικής συνάφειας που ανήκει στην υπερ-οικογένεια των ανοσοσφαιρινών (IgSF) (Dodd et al, 1988). Είναι γνωστό ότι η TAG1 μετέχει στην επέκταση και δεσμιδοποίηση αξόνων (Buttiglione et al, 1998), ενώ έχει δείχθει ότι έχει κάποιο ρόλο στην οριζόντια μετανάστευση των ενδονευρώνων του φλοιού (Denaxa et al, 2001; Denaxa, Kyriakopoulou et al, 2005). Στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, η TAG1 εκφράζεται στη μεμβράνη των φλοιοθλαμικών αξόνων, πάνω στους οποίους φαίνεται ότι μεταναστεύουν οι GABAεργικοί ενδονευρώνες που εισέρχονται στον αναπτυσσόμενο φλοιό (Denaxa et al, 2001). Εμποδίζοντας τη δράση της TAG1 στο συγκεκριμένο σύστημα *in vitro*, μειώνεται ο αριθμός των ενδονευρώνων που μεταναστεύουν (Denaxa et al, 2001). Ωστόσο *in vivo*, σε ποντικούς ελλειμματικούς για το γονίδιο της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, δεν παρατηρείται αντίστοιχος φαινότυπος, πιθανότατα λόγω άλλων μορίων συνάφειας που αναπληρώνουν τη λειτουργία της TAG1 όταν αυτή απουσιάζει (Denaxa, Kyriakopoulou et al, 2005). Ο μηχανισμός με τον οποίο η συγκεκριμένη πρωτεΐνη λειτουργεί και μετέχει στην οριζόντια μετανάστευση νευρώνων παραμένει άγνωστος.

Στόχος των πειραμάτων που περιγράφονται παρακάτω, είναι η κατανόηση του ρόλου της TAG1 και των φλοιοθλαμικών αξόνων στην οριζόντια μετανάστευση των ενδονευρώνων του φλοιού. Πραγματοποιήθηκαν *in vitro* πειράματα για τη μελέτη των ιδιοτήτων συνάφειας της TAG1 κατά την κυτταρική μετανάστευση και κατασκευάστηκαν δύο σειρές γενετικά τροποποιημένων μυών, προκειμένου να αποτελέσουν εργαλεία για την κατανόηση του ρόλου της TAG1 αλλά και των φλοιοθλαμικών αξόνων στην οριζόντια μετανάστευση.

A. Μελέτη του ρόλου της TAG1 στην ανάπτυξη του φλοιού των ημισφαιρίων

1. Ρόλος της TAG1 στην ανάπτυξη των φλοιοθαλαμικών αξόνων

Είναι γνωστό ότι κατά την ανάπτυξη του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, η TAG1 εκφράζεται στη μεμβράνη των φλοιοθαλαμικών αξόνων, οι οποίοι συνδέουν το φλοιό με τις υπόλοιπες δομές του κεντρικού νευρικού συστήματος. Μάλιστα, η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αποτελεί βασικό μοριακό δείκτη των αξόνων αυτών, καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής τους.



Εικόνα 1. Οι φλοιοθαλαμικοί άξονες των TAG1-ελλειμματικών εμβρύων, αναπτύσσονται φυσιολογικά. Οβελιαίες τομές εγκεφάλων E13.5, όπου οι φλοιοθαλαμικοί άξονες έχουν σημανθεί με κρυστάλλους DiI. Δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στη μορφολογία των αξόνων των TAG1-ελλειμματικών εμβρύων (B, b) σε σχέση με τους άξονες των ετερόζυγων (A, a).

a). Οι εικόνες a και b, αποτελούν μεγαλύτερες μεγεθύνσεις των A και B αντίστοιχα. Cx, cortex, V, 4th ventricle, IC, internal capsule.

Προκειμένου να μελετηθεί η ανάπτυξη και η μορφολογία των φλοιοθαλαμικών αξόνων, απουσία της TAG1, χρησιμοποιήθηκαν εγκέφαλοι από έμβρυα ποντικού ελλειμματικά για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη (TAG1^{-/-} ζώα) και πραγματοποιήθηκε ανίχνευση των αξόνων με κρυστάλλους DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε έμβρυα αναπτυξιακού σταδίου E13.5, κατά το οποίο οι φλοιοθαλαμικοί άξονες εκτείνονται από το φλοιό (ραχιαία) και εισέρχονται στον βασικό τελεγκέφαλο (κοιλιακά). Οι άξονες των TAG1^{-/-} (Εικ. 1B, b) εμβρύων συγκρίθηκαν με τους άξονες εμβρύων TAG1^{+/-} (Εικ. 1A, a) και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές.

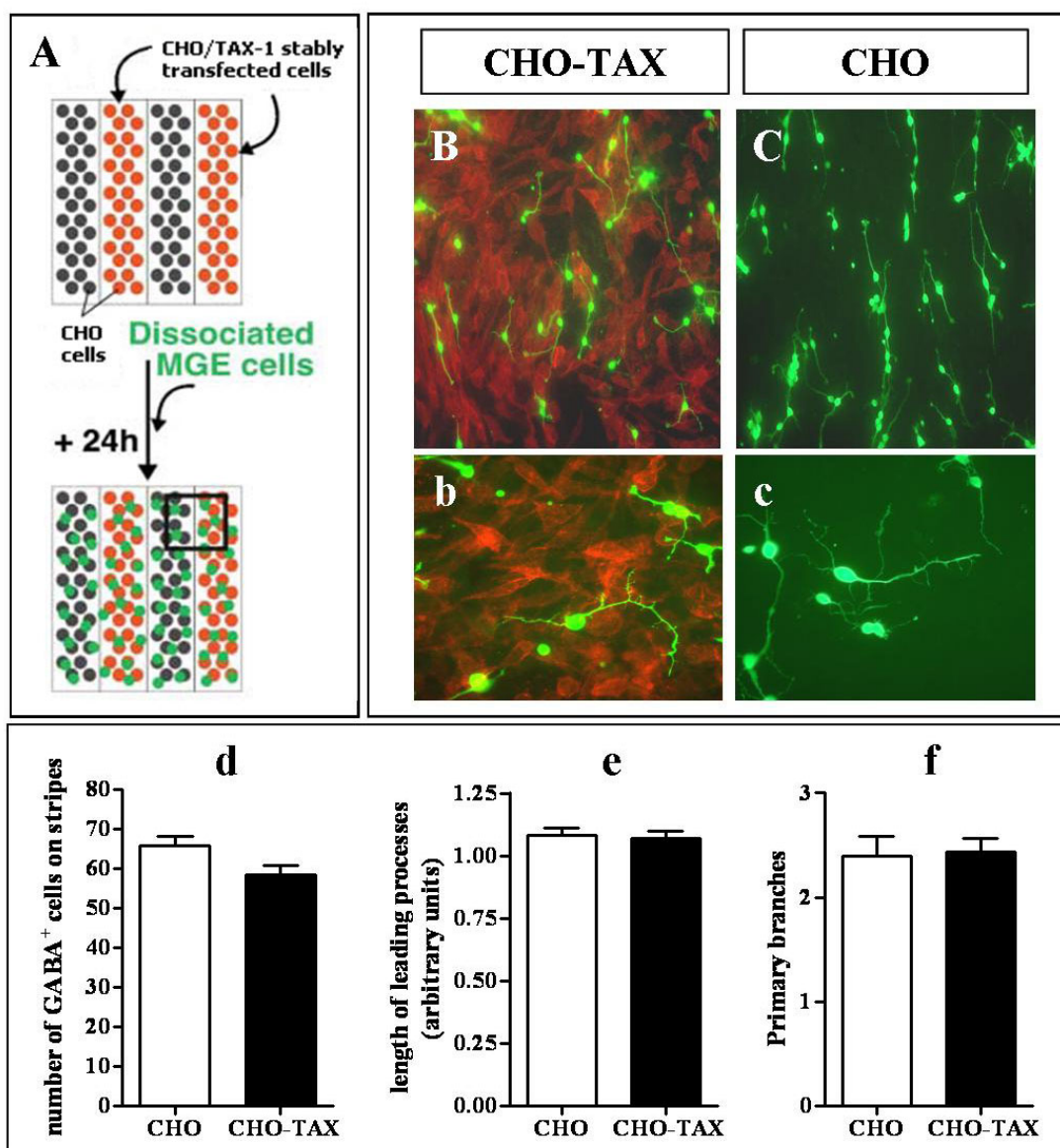
Από τα παραπάνω αποτελέσματα, φαίνεται ότι η TAG1 δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των αξόνων του φλοιού *in vivo*, καθώς στα TAG1-ελλειμματικά ζώα, η μορφολογία και η έκταση των αξόνων είναι φυσιολογικές. Ενδεχομένως να υπάρχει αναπλήρωση του ρόλου της TAG1 από άλλα μόρια κυτταρικής συνάφειας που ανήκουν στην ίδια οικογένεια, όπως η L1 που βρίσκεται στους θαλαμοφλοιικούς άξονες (Fukuda et al, 1997), ή η πρωτεΐνη neurofilament που εκφράζεται σε όλους τους αξονικούς πληθυσμούς του φλοιού (Denaxa et al, 2001).

2. Μελέτη των ιδιοτήτων συνάφειας της TAG1

Παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου έχουν δείξει ότι οι φλοιοθαλαμικοί άξονες αποτελούν το υπόστρωμα των ενδονευρώνων του φλοιού κατά την οριζόντια μετανάστευσή τους (Denaxa et al, 2001). Η TAG1 αποτελεί το βασικότερο μοριακό μάρτυρα των αξόνων αυτών και γι' αυτό μελετήθηκαν οι ιδιότητες της συγκεκριμένης πρωτεΐνης ως προς τη συνάφεια για τους μεταναστεύοντες νευρώνες.

Πιο συγκεκριμένα, προκειμένου να διαπιστωθεί αν η TAG1 αποτελεί ένα υπόστρωμα που όχι μόνο επιτρέπει αλλά και διευκολύνει την κυτταρική μετανάστευση, αναπτύχθηκε ένα *in vitro* σύστημα μελέτης της μετανάστευσης των ενδονευρώνων πάνω σε διακριτά υποστρώματα, το οποίο απεικονίζεται σχηματικά στην Εικ. 2A. Δημιουργήθηκε ένα υπόστρωμα αποτελούμενο από εναλλασσόμενες λωρίδες επιθηλιακών κυττάρων (CHO). Η πρώτη λωρίδα αποτελείται από απλά

κύτταρα, η επόμενη λωρίδα από κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί ώστε να εκφράζουν TAX1 (ανθρώπινο ομόλογο της TAG1 με 95% αμινοξική ομολογία με την TAG1, Tsiotra et al, 1993), η επόμενη από απλά κύτταρα πάλι, κοκ. Πάνω στο υπόστρωμα αυτό καλλιεργήθηκαν ενδονευρώνες του φλοιού, οι οποίοι απομονώθηκαν από έμβρυα ποντικού actin-GFP ηλικίας E13.5. Τα actin-GFP ζώα εκφράζουν την πρωτεΐνη GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή της ακτίνης, επομένως όλα τα κύτταρα ιχνηθετούνται από την GFP (Εικ. 2B, b, C, c).



Εικόνα 2. Μετανάστευση των ενδονευρώνων πάνω σε κυτταρικό υπόστρωμα που εκφράζει την TAX1 σε εναλλασσόμενες λωρίδες. (A), σχηματική απεικόνιση της

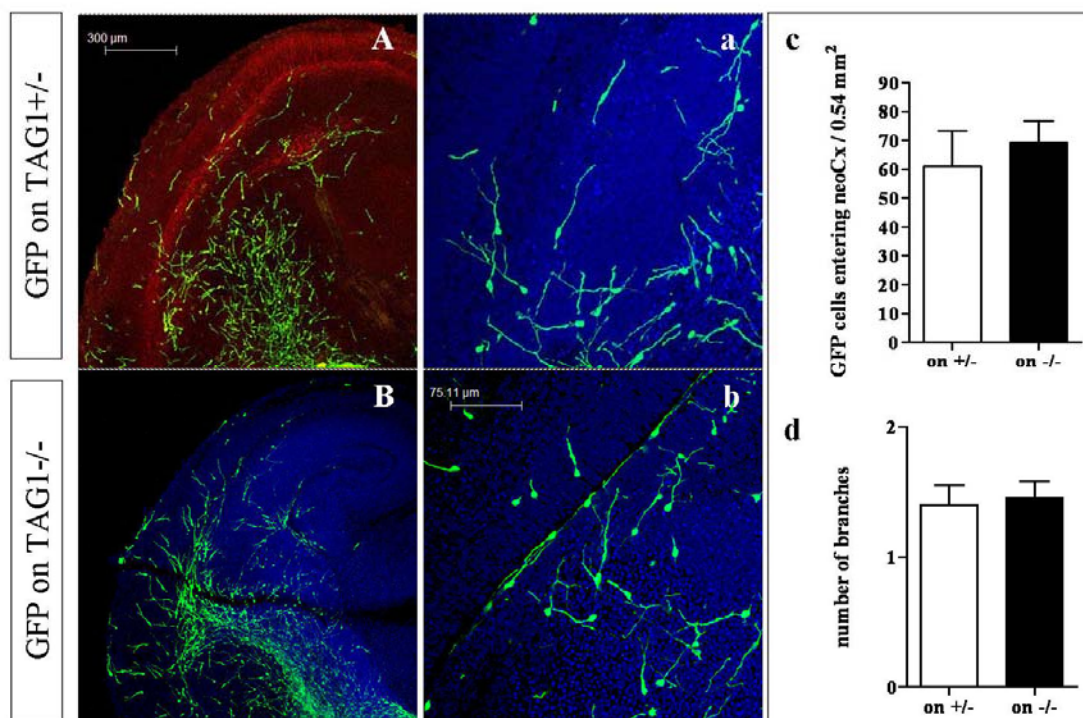
πειραματικής διεργασίας. Ενδονευρώνες από την περιοχή του MGE, εμβρύων *actin-GFP*, πάνω σε κυτταρικό υπόστρωμα CHO-TAX1 (B, b) και CHO κύτταρα (C, c), όπως φαίνονται έπειτα από ανοσοφθορισμό για την GFP (πράσινο) και την TAX1 (κόκκινο). Φαίνεται ότι η έκφραση της TAX1 δεν αυξάνει την προσκόλληση των κυττάρων πάνω στο κυτταρικό υπόστρωμα των CHO-TAX1 σε σχέση με τα αγρίου τύπου CHO κύτταρα (d), ενώ δεν επηρεάζει το μήκος των καθοδηγητικών αποφύσεων κάθε νευρώνα (e), ούτε και τις διακλαδώσεις τους (f). Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με Student's T test και ANOVA για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Τα Error bars στα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν την τιμή Standard Error of Mean. Για λεπτομέρειες σχετικά με τη στατιστική ανάλυση, βλ. στο «Υλικά και Μέθοδοι».

Έπειτα από 24 ώρες, η μεταναστευτική συμπεριφορά των ενδονευρώνων στις συγκεκριμένες καλλιέργειες μελετήθηκε ως προς τον αριθμό των νευρώνων που έχουν προσκολληθεί σε κάθε υπόστρωμα (Εικ. 2d), το μήκος της καθοδηγητικής απόφυσης (Εικ. 2e) και τον αριθμό των πρωτοταγών διακλαδώσεων που εκτείνονται από κάθε νευρώνα πάνω στα δύο διαφορετικά υποστρώματα (Εικ. 2f). Από την ανάλυση αυτή, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η TAG1/TAX1 δεν εμπλέκεται στην οριζόντια μετανάστευση των ενδονευρώνων, διευκολύνοντας τη μετακίνησή τους μέσω συνάφειας. Ενδεχομένως κάποιο άλλο μόριο (π.χ. άλλα μόρια κυτταρικής συνάφειας, της ίδιας, ή διαφορετικής υποοικογένειας) να ευθύνεται για τη μετανάστευση των κυττάρων σε στενή επαφή με τους φλοιοθαλαμικούς άξονες.

3. Συμπεριφορά των μεταναστευόντων ενδονευρώνων του φλοιού

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα, η πρωτεΐνη TAG1 δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των φλοιοθαλαμικών αξόνων, αλλά ούτε και τη μετανάστευση των ενδονευρώνων προς το φλοιό κατά την εμβρυογένεση. Με σκοπό να μελετηθεί περαιτέρω η συμπεριφορά ενδονευρώνων αγρίου τύπου σε περιβάλλον όπου απουσιάζει η TAG1, τα κύτταρα απομονώθηκαν από την περιοχή του MGE E14.5 εμβρύων *actin-GFP*, φυσιολογικών ως προς την έκφραση της TAG1. Τη συγκεκριμένη εμβρυϊκή ημέρα, υπάρχει μεγάλος αριθμός ενδονευρώνων στην περιοχή του MGE. Στη συνέχεια, το τμήμα ιστού που απομονώθηκε, τοποθετήθηκε

ως μόσχευμα σε τομές εγκεφάλων αντίστοιχης ηλικίας και στην αντίστοιχη αναπτυξιακή περιοχή. Χρησιμοποιήθηκαν τομές από εγκεφάλους TAG1^{-/-} αλλά και ετερόζυγων εμβρύων E14.5. Στη συνέχεια, οι τομές με τα μόσχευματα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της μεταναστευτικής συμπεριφοράς των GFP⁺ ενδονευρώνων, πάνω στα διαφορετικά υποστρώματα.



Εικόνα 3. Οι μεταμοσχευμένοι ενδονευρώνες μεταναστεύουν φυσιολογικά πάνω σε τομές εγκεφάλων TAG1^{-/-} εμβρύων. Ανοσοϊστοχημεία για την πρωτεΐνη GFP (πράσινο) και την TAG1 (κόκκινο) σε τομές από καλλιέργειες εγκεφάλων E13.5. Έπειτα από 24 ώρες καλλιέργειας, οι μεταμοσχευμένοι actin-GFP ενδονευρώνες μεταναστεύουν με παρόμοιο πρότυπο και έχουν όμοια μορφολογία, τόσο πάνω στις τομές εμβρύων TAG1^{-/-} (B, b), όσο και ετερόζυγων (A, a). Ο αριθμός των μεταναστευόντων κυττάρων πάνω στα διαφορετικά υποστρώματα δε διαφέρει σημαντικά (c), ούτε και οι διακλαδώσεις κάθε κυττάρου κατά την εξερεύνηση του περιβάλλοντός του (d). Κλίμακα: A, B, 300μm, a, b, 75.11μm. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Student's T test και ANOVA για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Τα Error bars στα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν την τιμή Standard Error of Mean. (Βλ. «Υλικά και Μέθοδοι» για λεπτομέρειες).

Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία για την πρωτεΐνη GFP στις τομές των TAG1-/- εμβρύων (Εικ. 3B, b) και διπλή ανοσοϊστοχημεία για την GFP και την TAG1 στις τομές των ετερόζυγων εμβρύων (Εικ. 3 A, a) και ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση των μεταναστευόντων κυττάρων. Συγκεκριμένα, οι ενδονευρώνες μελετήθηκαν τόσο ως προς τον αριθμό τους (Εικ. 3c), όσο και ως προς τον αριθμό των διακλαδώσεών τους κατά τη μετανάστευση (Εικ. 3d). Ως προς τις παραμέτρους αυτές, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των καλλιέργειών σε τομές αγρίου τύπου και σε τομές TAG1-ελλειμματικών εμβρύων.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα, το μόριο κυτταρικής συνάφειας TAG1, δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των φλοιοθαλαμικών αξόνων, καθώς όταν απενεργοποιείται, οι εν λόγω άξονες εκτείνονται και καθοδηγούνται έξω από το φλοιό φυσιολογικά. Επιπλέον, φαίνεται ότι κατά την ανάπτυξη, η TAG1 δεν εμπλέκεται στην οριζόντια μετανάστευση των ενδονευρώνων από το βασικό τελεγκέφαλο προς το φλοιό. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες, όπου η απουσία του μορίου *in vivo*, δεν επηρέασε την οριζόντια μετανάστευση και την ανάπτυξη του φλοιού (Denaxa, Kyriakopoulou et al, 2005). Εντούτοις, το γεγονός ότι η απενεργοποίηση της πρωτεΐνης *in vitro*, παρεμποδίζει τη φυσιολογική μετανάστευση των κυττάρων (Denaxa et al, 2001), υπογραμμίζει τη διαφορά μεταξύ των δύο συστημάτων και υποδηλώνει την πιθανή αναπλήρωση του ρόλου της TAG1 από άλλα μόρια που δρουν στον αναπτυσσόμενο φλοιό *in vivo*. Πράγματι, δε μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα άλλα μόρια κυτταρικής συνάφειας που έχουν παρόμοιες λειτουργίες με την TAG1, να αντικαθιστούν την πρωτεΐνη στα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται.

B. Δημιουργία διαγονιδιακών μυών ως εργαλεία στη μελέτη της ανάπτυξης του φλοιού και του νευρικού συστήματος

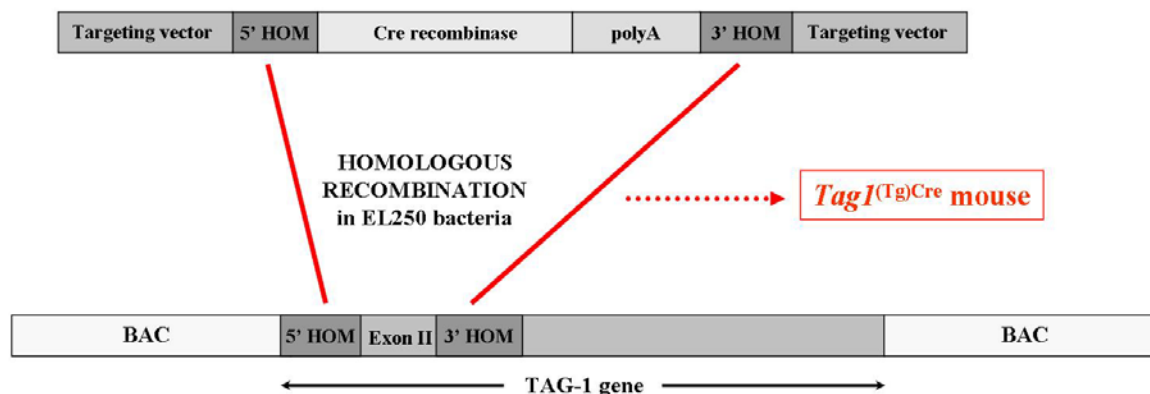
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, από τα παραπάνω πειράματα δεν προκύπτουν σημαντικές πληροφορίες για το ρόλο της TAG1 στην ανάπτυξη των ενδονευρώνων και των φλοιοθαλαμικών αξόνων του φλοιού των ημισφαιρίων. Φαίνεται ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεν έχει κάποια σημαντική λειτουργία στις εν λόγω διεργασίες, ή ο ρόλος της αναπληρώνεται από άλλα μόρια της ίδιας

οικογένειας. Ωστόσο, προκύπτουν ενδιαφέροντα ερωτήματα ως προς το ρόλο των φλοιοθαλαμικών αξόνων στην οριζόντια μετανάστευση των ενδονευρώνων και στην ανάπτυξη του φλοιού γενικότερα. Με στόχο τη μελέτη του συγκεκριμένου πληθυσμού αξόνων και χρησιμοποιώντας την TAG1 για την καθοδηγούμενη έκφραση διαγονιδίων στους άξονες αυτούς, δημιουργήθηκαν δύο σειρές γενετικά τροποποιημένων μυών, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά ως εργαλείο για περαιτέρω μελέτες πάνω στην ανάπτυξη του φλοιού των ημισφαιρίων.

1. Δημιουργία γενετικά τροποποιημένων μυών $Tag1^{(Tg)Cre}$

Τα διαγονιδιακά ζώα $Tag1^{(Tg)Cre}$, δημιουργήθηκαν προκειμένου να εκφράζουν την Cre-ρεκομπινάση, υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της TAG1. Η δημιουργία τους στηρίχθηκε στην τεχνολογία κατασκευής διαγονιδιακών ζώων με χρήση τεχνητών βακτηριακών χρωμοσωμάτων (Bacterial Artificial Chromosomes, BACs), όπως έχει περιγραφεί παλαιότερα (Fogarty et al, 2005; Kessarlis et al, 2006).

Συνοπτικά, από βιβλιοθήκη BAC, επελέγησαν κλώνοι BAC ώστε να περιέχουν το τμήμα του χρωμοσώματος που φέρει ολόκληρο το γονίδιο της TAG1 και όλες τις γενωμικές αλληλουχίες εκατέρωθέν του. Παράλληλα, δημιουργήθηκε διαγονιδιακή πλασμιδιακή κατασκευή που φέρει το γονίδιο της Cre-ρεκομπινάσης και εκατέρωθεν αυτού, αλληλουχίες ομόλογες με αλληλουχίες ανοδικά και καθοδικά του 2^{ov} εξονίου της TAG1, στο οποίο εντοπίζεται το σημείο έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου. Τόσο ο κλώνος BAC, όσο και η πλασμιδιακή κατασκευή, εισήχθησαν σε κατάλληλα βακτηριακά στελέχη και ακολούθησε επαγωγή ομόλογου ανασυνδυασμού και αντικατάσταση του 2^{ov} εξονίου του γονιδίου της TAG1 στον κλώνο, με το γονίδιο της Cre-ρεκομπινάσης (Σχήμα 1). Στη συνέχεια, από τον κλώνο BAC απομονώθηκε το ανασυνδυασμένο γονίδιο της TAG1 και ακολούθησε η εισαγωγή του σε γονιμοποιημένα ωάρια μυών, με μικροένεση. Τα γονιμοποιημένα ωάρια, τοποθετήθηκαν στη μήτρα θηλυκών ψευδοέγκυων μυών και από τους απογόνους που γεννήθηκαν, κάποιοι έφεραν το διαγονίδιο, όπως διαπιστώθηκε από γονοτύπηση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και εκκινητές για το γονίδιο της Cre-ρεκομπινάσης (βλ. «Υλικά & Μέθοδοι»). Τα ζώα αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως ιδρυτές της διαγονιδιακής σειράς $Tag1^{(Tg)Cre}$. Η διαδικασία δημιουργίας του διαγονιδίου, και όλα τα στάδια για τη δημιουργία των γενετικά τροποποιημένων μυών, περιγράφονται αναλυτικά στο «Υλικά & Μέθοδοι» της διατριβής.

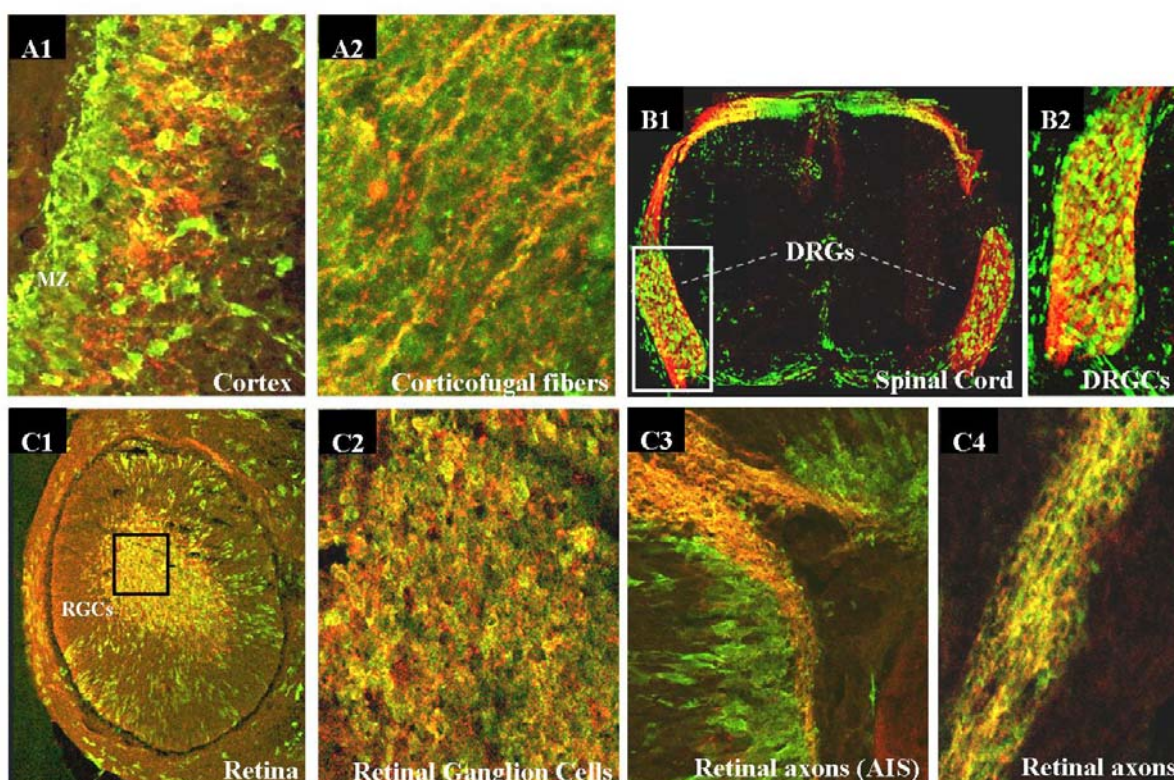


Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση του κλώνου BAC και της διαγονιδιακής κατασκευής για τους $Tag1^{(Tg)Cre}$ μύες. Μέσα σε κατάλληλα βακτηριακά κύτταρα (EL250) πραγματοποιήθηκε ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ των περιοχών ομολογίας της πλασμιδιακής κατασκευής και του γονιδίου μέσα στον κλώνο BAC (5' HOM, 3' HOM). Έτσι, το 2^ο εξόνιο του γονιδίου της TAG1 αντικαταστάθηκε από το γονίδιο της Cre-recombinase. Το ανασυνδυασμένο γονίδιο απομονώθηκε από τον κλώνο BAC και εισήχθη σε γονιμοποιημένα ωάρια μυνών και προέκυψαν γενετικά ανασυνδυασμένα ζώα, στα οποία η παρουσία του διαγονιδίου εντοπίστηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

1α. Μελέτη του προτύπου έκφρασης του διαγονιδίου $Tag1^{(Tg)Cre}$ *in vivo*

Οι γενετικά τροποποιημένοι μύες που δημιουργήθηκαν, μελετήθηκαν ως προς την *in vivo* έκφραση του διαγονιδίου $Tag1^{(Tg)Cre}$, έτσι ώστε να διαπιστωθεί αν αυτή συμφωνεί με το πρότυπο έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου της TAG1. Προκειμένου να είναι δυνατή η ανίχνευση του διαγονιδίου, τα $Tag1^{(Tg)Cre}$ ζώα διασταυρώθηκαν με ζώα, στα οποία έχει εισαχθεί διαγονίδιο που φέρει τόπους loxP εκατέρωθεν αλληλουχιών που εμποδίζουν την μεταγραφή του γονιδίου της κίτρινης φθορίζουσας πρωτεΐνης YFP (transcription stop sites). Το διαγονίδιο αυτό, βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου ROSA26 (ROSA26-YFP^{stop/stop}). Στα ζώα αυτά η δράση της Cre ρεκομπινάσης οδηγεί σε έκφραση της πρωτεΐνης YFP (Srinivas et al., 2001), καθιστώντας στη συγκεκριμένη περίπτωση δυνατό τον εντοπισμό του $Tag1^{(Tg)Cre}$ διαγονιδίου. Την παραπάνω διασταύρωση ακολούθησαν επιπλέον διασταυρώσεις, με σκοπό όλα τα $Tag1^{(Tg)Cre}$ ζώα να φέρουν το διαγονίδιο ROSA26-YFP^{stop/stop} σε ομοζυγωτία.

Για τη μελέτη του προτύπου έκφρασης της YFP και ως εκ τούτου του $Tag1^{(Tg)Cre}$ διαγονιδιακού τύπου, χρησιμοποιήθηκαν έμβρυα αναπτυξιακού σταδίου E13.5, κατά το οποίο η φυσιολογική έκφραση της TAG1 εντοπίζεται σε υψηλά επίπεδα, αντικατοπτρίζοντας την υψηλή ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου. Πραγματοποιήθηκε διπλή ανοσοϊστοχημεία για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης YFP και της ενδογενούς TAG1, σε οβελιαίες τομές από ολόκληρα έμβρυα (Εικ. 4). Όπως προκύπτει, η έκφραση της YFP εντοπίζεται σε όλες τις επιμέρους περιοχές του νευρικού συστήματος, όπου εντοπίζεται και η έκφραση της ενδογενούς TAG1.



Εικόνα 4. Πρότυπο έκφρασης της Cre-ρεκομπινάσης, υπό τον έλεγχο του υποκινητή της TAG1, στα διαγονιδιακά $Tag1^{Tg(Gre)}$ ζώα. Ανοσοϊστοχημεία σε οβελιαίες τομές εμβρύων E13.5. Η έκφραση της YFP φαίνεται με πράσινο, η έκφραση της TAG1 εντοπίζεται με κόκκινο και ο συνεντοπισμός τους, φαίνεται με κίτρινο χρώμα. Φαίνεται ότι το πρότυπο έκφρασης της YFP ακολουθεί το αντίστοιχο της ενδογενούς TAG1. Cortex: φλοιός, Corticofugal fibers: φλοιοθαλαμικοί άξονες, Spinal cord: νωτιαίος μυελός, DRGs: γάγγλια των ραχιαίων ριζών, DRGCs: κύτταρα των DRGs, Retina: αμφιβληστροειδής, RGCs: γαγγλιακά κύτταρα του

αμφιβληστροειδούς, *Retinal axons*: άξονες των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς (*AIS*, *axon initial segment*: αρχικό τμήμα των αξόνων, κοντά στα κυτταρικά σώματα).

Πιο αναλυτικά, στο φλοιό των ημισφαιρίων η έκφραση της YFP και επομένως της Cre-ρεκομπινάσης, εντοπίζεται στους φλοιοθαλαμικούς άξονες (Εικ. 4A2), αλλά και στα κυτταρικά σώματα των νευρώνων από τους οποίους εκτείνονται οι ίνες αυτές (Εικ. 4A1). Αυτό είναι σημαντικό, διότι επιτρέπει την παρατήρηση και το χαρακτηρισμό αυτών των νευρώνων, που ως τώρα δεν ήταν εύκολη, λόγω χαμηλής έκφρασης της ενδογενούς TAG1 στο κυτταρικό σώμα.

Στο νωτιαίο μυελό, η YFP εντοπίζεται στα σώματα των κυττάρων των γαγγλίων της ραχιαίας ρίζας (Εικ. 4B2), ενώ συνεντοπίζεται με την ενδογενή TAG1 στους άξονες των εν λόγω γαγγλίων κοντά στην κοιλιακή μέση γραμμή (Εικ. 4B1). Η διαφορά αυτή ενδεχομένως οφείλεται στις διαφορετικές ιδιότητες των δύο πρωτεϊνών. Η YFP, είναι κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, οπότε εντοπίζεται σε μεγάλες ποσότητες στο κυτταρικό σώμα. Αντίθετα, TAG1, απαντάται κυρίως σε μεμβρανική ή εκκρινόμενη μορφή (Furley et al, 1990; Karagogeos et al, 1991) στους άξονες και όχι στα κυτταρικά σώματα.

Υψηλά ποσοστά έκφρασης του διαγονιδίου *Tag1^{(Tg)Cre}*, παρατηρούνται και στον αναπτυσσόμενο αμφιβληστροειδή (Εικ. 4C1-C4). Συγκεκριμένα, η YFP εντοπίζεται με ανοσοϊστοχημεία, τόσο στα κυτταρικά σώματα των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς (Εικ. 4C2), όσο και στους άξονές τους (Εικ. 4C3-4) και υπάρχει πλήρης συνεντοπισμός της έκφρασής της, με την έκφραση της ενδογενούς TAG1.

1β. Μελλοντικές εφαρμογές των γενετικά τροποποιημένων *Tag1^{(Tg)Cre}* μύων

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης για τα γενετικά τροποποιημένα ζώα *Tag1^{(Tg)Cre}*, προκύπτει ότι η έκφραση του διαγονιδίου ακολουθεί το πρότυπο έκφρασης της ενδογενούς TAG1 πρωτεΐνης. Το γεγονός αυτό καθιστά τη συγκεκριμένη σειρά διαγονιδιακών μύων ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη πολλαπλών αναπτυξιακών διεργασιών στο νευρικό σύστημα. Μέσω της διασταύρωσης των ζώων αυτών με κατάλληλα διαγονιδιακά ζώα, που φέρουν loxP τόπους σε γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, είναι δυνατή η λεπτομερής μελέτη του ρόλου αυτών των γονιδίων, σε οποιαδήποτε διαδικασία συμμετέχουν. Υπάρχουν αρκετές σειρές γενετικά τροποποιημένων μύων

που θα μπορούσαν να διασταυρωθούν με τα *Tag1^{(Tg)Cre}* ζώα. Για παράδειγμα, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν τα *Rac1^{fl/fl}* ζώα που περιγράφονται στην παρούσα διατριβή, προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος της GTPάσης *Rac1* στην ανάπτυξη των φλοιοθαλαμικών αξόνων, καθώς και στην ανάπτυξη των αξόνων του αμφιβληστροειδούς και των γαγγλίων των ραχιαίων ριζών στο νωτιαίο μυελό. Η δημιουργία των εν λόγω αξονικών πληθυσμών, απαιτεί συντονισμένη και απόλυτα ελεγχόμενη αλληλεπίδραση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων, διαδικασίες στις οποίες μετέχουν ενεργά οι Rho-GTPάσες και η *Rac1* (Jaffe & Hall, 2005).

Οι *Tag1^{(Tg)Cre}* μύες, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και για τη μελέτη του ρόλου άλλων μορίων κυτταρικής συνάφειας, στην ανάπτυξη των αξόνων και των νευρικών, ή γλοιακών κυττάρων στα οποία εκφράζεται το διαγονίδιο. Συγκεκριμένα, υπάρχουν διαθέσιμες διαγονιδιακές σειρές ποντικών, που φέρουν loxP τόπους σε γονίδια καντχερινών (π.χ. *cadherin 1*, www.jax.org/jaxmice/models/cre_flp_loxp), καθώς και σε γονίδια πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μηχανισμό δράσης των παραπάνω μορίων (π.χ. *κατενίνες*, που αλληλεπιδρούν με τις *cadherins*, www.jax.org/jaxmice/models/cre_flp_loxp). Η αδρανοποίηση των μορίων αυτών μέσω Cre-loxP ανασυνδυασμού, από τη διασταύρωσή τους με τα *Tag1^{(Tg)Cre}* ζώα, θα μπορούσε να δώσει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με το ρόλο τους στα σηματοδοτικά μονοπάτια καθοδήγησης των αξόνων και της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος.

Χρήσιμη θα ήταν επίσης η διασταύρωση των *Tag1^{(Tg)Cre}* με ζώα που φέρουν loxP τόπους σε γονίδια της οικογένειας των εφρινών (π.χ. *ephrin B2*, www.jax.org/jaxmice/models/cre_flp_loxp). Παλαιότερες εργαστηριακές μελέτες, έχουν δείξει ότι τα μόρια αυτής της οικογένειας εμπλέκονται τόσο στην ανάπτυξη των αξόνων του αμφιβληστροειδούς (Drescher et al, 1997), όσο και στη γενικότερη καθοδήγηση αξόνων στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα (Nieto et al, 1996). Επομένως, η χρησιμοποίηση του συστήματος Cre-loxP για τη στοχευμένη απενεργοποίηση μορίων της οικογένειας των *ephrins* ιστοειδικά, θα διαφωτίσει το μηχανισμό δράσης αυτών των μορίων. Αντίστοιχα, θα μπορούσε να μελετηθεί ο ρόλος μορίων όπως η *neuropilin 1* (www.jax.org/jaxmice/models/cre_flp_loxp), που ως υποδοχέας σεμαφορινών εμπλέκεται ενεργά στην καθοδήγηση αξόνων στο νευρικό σύστημα (Gu et al, 2003).

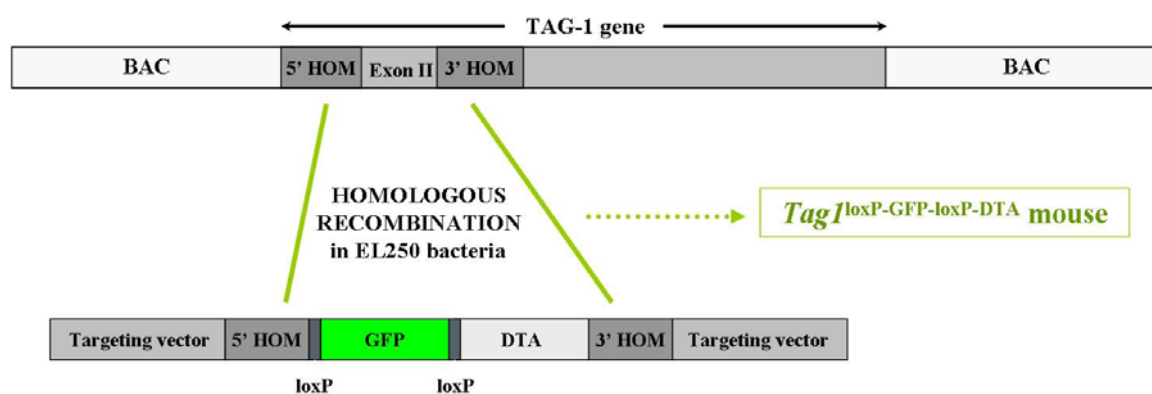
Τέλος, τα γενετικά τροποποιημένα ζώα *Tag1^{(Tg)Cre}* θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και για την απάντηση πολύ εξειδικευμένων ερωτημάτων, ως προς την ανάπτυξη συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών. Για παράδειγμα, μέσω διασταύρωσης τους με σειρές loxP-ζώων όπως τα *Grin1* (www.jax.org/jaxmice/models/cre_flp_loxp), θα μπορούσε να διαφωτιστεί ο ρόλος του υποδοχέα *Grin1* του γλουταμικού, στην ανάπτυξη του πληθυσμού των πυραμιδικών νευρώνων που εκφράζουν την TAG1 στο φλοιό.

2. Δημιουργία γενετικά τροποποιημένων μυών *Tag1^{(Tg) loxP-GFP-loxP-DTA}*

Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος των φλοιοθαλαμικών αξόνων στην οριζόντια μετανάστευση των ενδονευρώνων και στην ανάπτυξη του φλοιού, κατασκευάστηκαν διαγονιδιακοί μύες, ώστε με βάση την τεχνολογία του ανασυνδυασμού Cre-loxP να επάγεται η απαλοιφή των αξόνων αυτών (ablation). Η απαλοιφή συγκεκριμένων εμβρυϊκών περιοχών κατά την ανάπτυξη, έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα, συμβάλλοντας στην αναγνώριση οργανωτικών κέντρων του εμβρύου. Όπως ακριβώς και στην περίπτωση των *Tag1^{(Tg)Cre}* μυών, η δημιουργία των *Tag1^{(Tg)loxP-GFP-loxP-DTA}* γενετικά τροποποιημένων ζώων, στηρίχθηκε στην τεχνολογία των BACs (Bacterial Artificial Chromosomes), και χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος κλώνος BAC, που φέρει το γονίδιο της TAG1.

Συνοπτικά, δημιουργήθηκε πλασμιδιακή κατασκευή προκειμένου να ανασυνδυαστεί με το 2^ο εξόνιο του γονιδίου της TAG1 στον κλώνο BAC, και να εισαχθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί την τοξίνη DTA (diphtheria toxin A subunit) υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της TAG1. Στην κατασκευή, ανοδικά του DTA γονιδίου βρίσκεται το γονίδιο της eGFP (enhanced GFP), προκειμένου να ιχνηθετούνται τα κύτταρα που φέρουν το διαγονίδιο, και 4 SV40-polyA, τα οποία τερματίζουν τη μετάφραση και εμποδίζουν την έκφραση του DTA σε περιοχές που δεν είναι προς μελέτη. Ωστόσο, το eGFP-polyA τμήμα του διαγονιδίου, φέρει ανοδικά και καθοδικά loxP θέσεις, επομένως με την ελεγχόμενη επαγωγή Cre ανασυνδυασμού, το τμήμα αυτό απομακρύνεται και το DTA έρχεται πλησιέστερα στον υποκινητή της TAG1 και εκφράζεται. Λόγω της τοξικότητάς του, τα κύτταρα που εκφράζουν DTA πεθαίνουν. Η πλασμιδιακή κατασκευή φέρει ανοδικά και καθοδικά των παραπάνω ενθεμάτων, περιοχές ομολογίας με τμήματα εκατέρωθεν του 2^{ου} εξονίου του γονιδίου της TAG1 (Σχήμα 2).

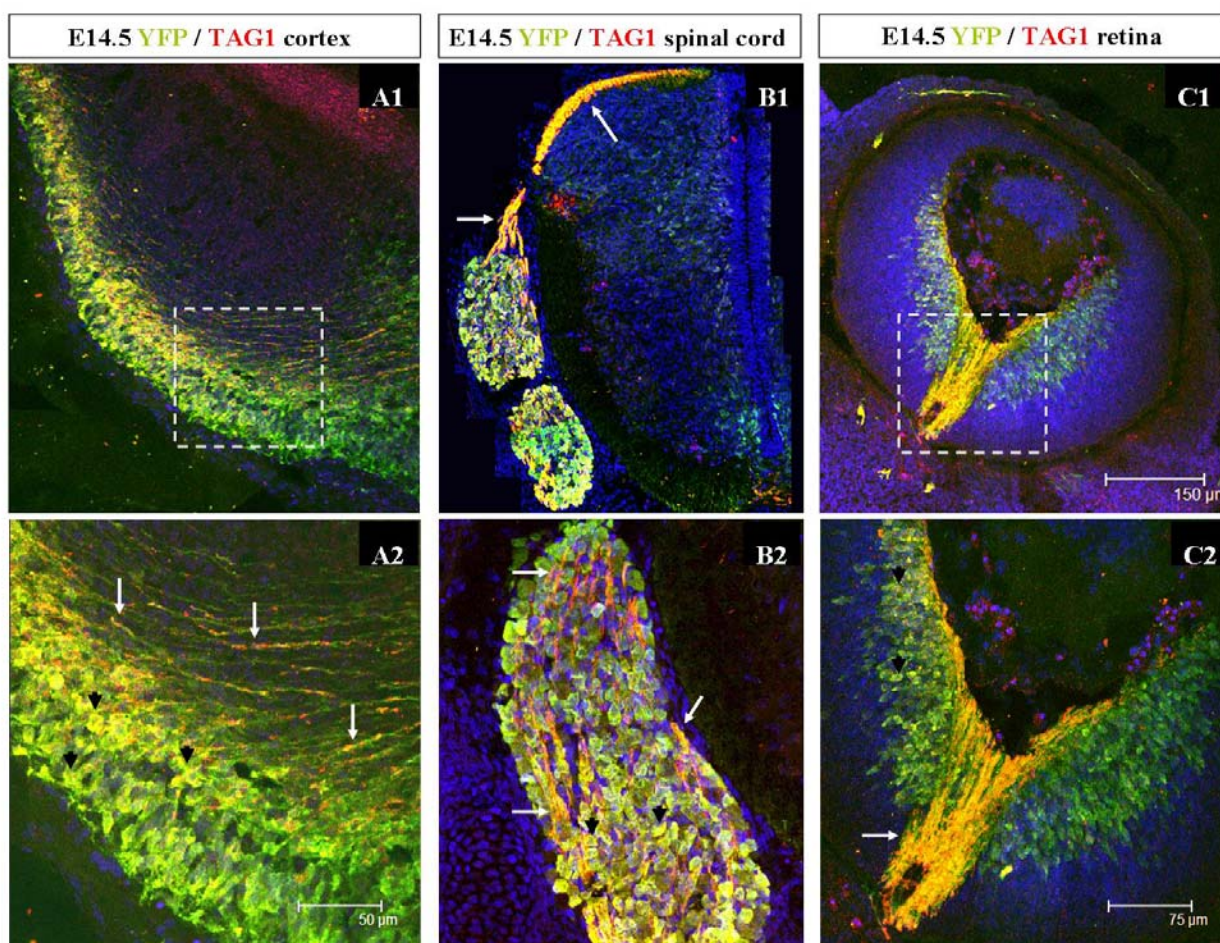
Τόσο ο κλώνος BAC, όσο και η παραπάνω πλασμιδιακή κατασκευή, εισήχθησαν σε κατάλληλα βακτηριακά στελέχη και ακολούθησε επαγωγή ομόλογου ανασυνδυασμού και αντικατάσταση του 2^{ου} εξονίου του γονιδίου της TAG1 στον κλώνο, με το γονίδιο της Cre-ρεκομπινάσης (Σχήμα 2). Στη συνέχεια, από τον κλώνο BAC απομονώθηκε το ανασυνδυασμένο γονίδιο της TAG1 και ακολούθησε η εισαγωγή του σε γονιμοποιημένα ωάρια μυών, με μικροένεση. Τα γονιμοποιημένα ωάρια, τοποθετήθηκαν στη μήτρα θηλυκών ψευδοέγκυων μυών και από τους απογόνους που γεννήθηκαν, κάποιιοι έφεραν το διαγονίδιο, όπως διαπιστώθηκε από γονοτύπηση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και εκκινητές για το γονίδιο της τοξίνης DTA (βλ. «Υλικά & Μέθοδοι»). Τα ζώα αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως ιδρυτές της διαγονιδιακής σειράς *Tag1^{(Tg)loxP-GFP-loxP-DTA}*. Η διαδικασία δημιουργίας του διαγονιδίου, και όλα τα στάδια για τη δημιουργία των γενετικά τροποποιημένων μυών, περιγράφονται αναλυτικά στο «Υλικά & Μέθοδοι» της διατριβής.



Σχήμα 2. Σχηματική απεικόνιση του κλώνου BAC και της διαγονιδιακής κατασκευής για τους *Tag1^{(Tg)loxP-GFP-loxP-DTA}* μύες. Μέσα σε κατάλληλα βακτηριακά κύτταρα (EL250) πραγματοποιήθηκε ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ των περιοχών ομολογίας της πλασμιδιακής κατασκευής και του γονιδίου μέσα στον κλώνο BAC (5' HOM, 3' HOM). Έτσι, το 2^ο εξόνιο του γονιδίου της TAG1 αντικαταστάθηκε από την απεικονιζόμενη κατασκευή. Το ανασυνδυασμένο γονίδιο απομονώθηκε από τον κλώνο BAC και εισήχθη σε γονιμοποιημένα ωάρια μυών και προέκυψαν γενετικά ανασυνδυασμένα ζώα, στα οποία η παρουσία του διαγονιδίου εντοπίστηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

2α. Μελέτη του προτύπου έκφρασης του διαγονιδίου *Tag1^{(Tg)loxP-GFP-loxP-DTA}* *in vivo*

Όπως και στην περίπτωση των *Tag1^{(Tg)Cre}* μυών, το πρότυπο της *in vivo* έκφρασης του *Tag1^{(Tg)loxP-GFP-loxP-DTA}* διαγονιδίου μελετήθηκε με την εφαρμογή ανοσοϊστοχημείας για την πρωτεΐνη GFP, προκειμένου να διαπιστωθεί αν αυτό ακολουθεί το πρότυπο έκφρασης της ενδογενούς TAG1 (Εικ. 5). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε οβελιαίες τομές από ολόκληρα έμβρυα αναπτυξιακού σταδίου E14.5, κατά το οποίο η έκφραση της TAG1 εντοπίζεται σε υψηλά επίπεδα, τόσο στο φλοιό και το νωτιαίο μυελό, όσο και στον αναπτυσσόμενο αμφιβληστροειδή.



Εικόνα 5. Πρότυπο έκφρασης του διαγονιδίου *Tag1^{(Tg)loxP-GFP-loxP-DTA}* *in vivo*. Ανοσοϊστοχημεία σε οβελιαίες τομές εμβρύων E14.5. Η έκφραση της YFP φαίνεται με πράσινο, η έκφραση της TAG1 εντοπίζεται με κόκκινο και ο συνεντοπισμός τους, φαίνεται με κίτρινο χρώμα. Το πρότυπο έκφρασης της YFP ακολουθεί το αντίστοιχο της ενδογενούς TAG1. A1: Έκφραση των πρωτεϊνών στους φλοιοθαλαμικούς άξονες του φλοιού (Cortex). Η περιοχή μέσα

στο διακεκομμένο πλαίσιο απεικονίζεται σε μεγαλύτερη μεγέθυνση στο A2, όπου φαίνεται η έκφραση στα κυτταρικά σώματα των νευρώνων (μαύρα βέλη) και στους άξονες (λευκά βέλη). B1: Έκφραση του διαγονιδίου και της ενδογενούς πρωτεΐνης στο νωτιαίο μυελό (Spinal cord). Στους άξονες των γαγγλίων των ραχιαίων ριζών, οι δύο πρωτεΐνες συνεντοπίζονται (λευκά βέλη). B2: Μεγέθυνση των γαγγλίων των ραχιαίων ριζών, όπου φαίνεται ο συνεντοπισμός της YFP και της TAG1 στα κυτταρικά σώματα (μαύρα βέλη) και στους άξονες που εκτείνονται από αυτά (λευκά βέλη). C1: Συνεντοπισμός των πρωτεϊνών στον αμφιβληστροειδή (retina). Η περιοχή μέσα στο διακεκομμένο πλαίσιο απεικονίζεται σε μεγαλύτερη μεγέθυνση στο C2, όπου φαίνεται η έκφραση τόσο στα κυτταρικά σώματα των νευρώνων (μαύρα βέλη), όσο και στους άξονες (λευκά βέλη).

Τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν ότι το διαγονίδιο $Tag1^{(Tg)loxP-GFP-loxP-DTA}$ εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στην περιοχή του φλοιού και συγκεκριμένα στους φλοιοθαλαμικούς άξονες (Εικ. 5A1) και στα κυτταρικά σώματα των πυραμιδικών νευρώνων που τους εκτείνουν (Εικ. 5A2, μαύρα βέλη). Ο συνεντοπισμός της GFP με την ενδογενή TAG1 στην εν λόγω περιοχή, επιβεβαιώνει τη σωστή έκφραση του διαγονιδίου στο φλοιό.

Στο νωτιαίο μυελό, η GFP εκφράζεται στα κυτταρικά σώματα των νευρώνων στα γάγγλια των ραχιαίων ριζών (Εικ. B2), ενώ εντοπίζεται σε υψηλά επίπεδα και στους άξονες (Εικ. B1, 2, μαύρα και λευκά βέλη αντίστοιχα). Και στις δύο περιοχές η έκφραση της πρωτεΐνης, που αποτελεί μάρτυρα της έκφρασης του διαγονιδίου $Tag1^{(Tg)loxP-GFP-loxP-DTA}$, συνεντοπίζεται απόλυτα με την ενδογενή TAG1.

Τέλος, από τη συγκεκριμένη ανοσοϊστοχημική μελέτη, προκύπτει ότι το διαγονίδιο $Tag1^{(Tg)loxP-GFP-loxP-DTA}$, εκφράζεται και στον αναπτυσσόμενο αμφιβληστροειδή (Εικ. 5C1). Όπως φαίνεται από τον εντοπισμό της GFP, έντονη έκφραση παρατηρείται τόσο στα γαγγλιακά κύτταρα, όσο και στους άξονές τους (Εικ. 5C2, μαύρα και λευκά βέλη αντίστοιχα), όπου συνεντοπίζεται απόλυτα με την ενδογενή TAG1.

2β. Μελλοντικές εφαρμογές των γενετικά τροποποιημένων $Tag1^{(Tg)loxP-GFP-loxP-DTA}$ μωών

Όπως και τα γενετικά τροποποιημένα $Tag1^{(Tg)Cre}$ ζώα, οι $Tag1^{(Tg)loxP-GFP-loxP-DTA}$ μύες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλείο για τη μελέτη ποικίλων

αναπτυξιακών διεργασιών. Ωστόσο, τα κύτταρα που εκφράζουν το διαγονίδιο, μέσω του Cre-loxP ανασυνδυασμού, πεθαίνουν, λόγω της έκφρασης του DTA. Επομένως οι $Tag1^{(Tg)loxP-GFP-loxP-DTA}$ μύες είναι κατάλληλοι για τη μελέτη συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών, ή δομών του νευρικού συστήματος, μέσω της απαλοιφής τους. Πιο αναλυτικά, τα ζώα αυτά μπορούν να διασταυρωθούν με ζώα που εκφράζουν την Cre-ρεκομπινάση ιστοειδικά στο φλοιό (π.χ. Emx1-Cre, Kessarlis et al, 2006). Οι απόγονοι της συγκεκριμένης διασταύρωσης, δε θα έχουν φλοιοθαλαμικούς άξονες και η μελέτη τους σε εμβρυϊκά στάδια, θα δώσει χρήσιμες πληροφορίες ως προς το ρόλο των αξόνων αυτών κατά την οριζόντια μετανάστευση των ενδονευρώνων και την ανάπτυξη του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων.

Επιπλέον τα $Tag1^{(Tg)loxP-GFP-loxP-DTA}$ ζώα θα μπορούσαν να διασταυρωθούν με ζώα που φέρουν την Cre-ρεκομπινάση υπό τον έλεγχο του υποκινητή του *Plp1* γονιδίου, εκφραζόμενη υπό ελεγχόμενες συνθήκες (inducible-Cre) (www.jax.org/jaxmice/models/cre_flp_loxp). Ο υποκινητής αυτός είναι ενεργός στα ολιγοδενδροκύτταρα και στα Schwann κύτταρα που παράγουν τη μυελίνη στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα αντίστοιχα, τα οποία εκφράζουν και την πρωτεΐνη TAG1 (Traka et al, 2003). Η απαλοιφή των συγκεκριμένων κυττάρων στους απογόνους της παραπάνω διασταύρωσης, θα δημιουργούσε απομυελίνωση, καθιστώντας τα ζώα αυτά ένα πιθανό ζωικό μοντέλο για τη μελέτη εκφυλιστικών παθήσεων του νευρικού συστήματος, όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας.

Όπως αναφέρθηκε και εισαγωγικά, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η TAG1 εκφράζεται σε πρόδρομα νευρικά κύτταρα (Ma et al, 2008a; Ma et al, 2008b). Επομένως η διασταύρωση των $Tag1^{(Tg)loxP-GFP-loxP-DTA}$ μυών με ζώα που εκφράζουν την Cre-ρεκομπινάση σε πρόδρομα νευρικά κύτταρα (π.χ. nestin-Cre, www.jax.org/jaxmice/models/cre_flp_loxp), θα έδινε σημαντικές πληροφορίες για τις διεργασίες της νευρογένεσης, τόσο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, όσο και στον ενήλικο εγκέφαλο.

Όπως φαίνεται από τα ενδεικτικά παραδείγματα που αναφέρθηκαν, υπάρχει μια πληθώρα γενετικά τροποποιημένων ζώων, που μπορούν να διασταυρωθούν με τα $Tag1^{(Tg)loxP-GFP-loxP-DTA}$ και τα $Tag1^{(Tg)Cre}$ ζώα, προκειμένου να απαντηθούν βασικά ερωτήματα στο πεδίο της νευροβιολογίας. Ανάλογα με το συνδυασμό των διασταυρώσεων, οι διαγονιδιακοί μύες που δημιουργήθηκαν στα πλαίσια της συγκεκριμένης διατριβής, μπορούν να αποτελέσουν σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη πολλαπλών αναπτυξιακών διεργασιών στο νευρικό σύστημα.

***Υλικά &
Μέθοδοι***

1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Για τη μελέτη των ενδοκυττάρων μορίων που μετέχουν στην καθοδήγηση των ενδονευρώνων κατά την οριζόντια μετανάστευσή τους στο φλοιό, χρησιμοποιήθηκαν:

- 1) Φυσιολογικοί μύες των στελεχών CBAxC57B1/10.
- 2) Μύες που φέρουν αλληλουχίες LoxP εκατέρωθεν του 2^{ου} και 3^{ου} εξονίου του γονιδίου *Rac1* (**Rac1^{lox/lox}**). Στα συγκεκριμένα ζώα, η δράση της Cre ρεκομπινάσης οδηγεί σε απενεργοποίηση του γονιδίου *Rac1* (Walmsley et al., 2003).
- 3) Μύες που φέρουν αλληλουχίες LoxP εκατέρωθεν αλληλουχιών (transcription stop sites) που εμποδίζουν την μεταγραφή του γονιδίου της κίτρινης φθορίζουσας πρωτεΐνης YFP. Το συγκεκριμένο γονίδιο βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου ROSA26 (**ROSA26-YFP^{stop/stop}**). Στα ζώα αυτά η δράση της Cre ρεκομπινάσης οδηγεί σε έκφραση της πρωτεΐνης YFP (Srinivas et al., 2001).
- 4) Μύες στους οποίους εκφράζεται η Cre ρεκομπινάση υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *Nkx2.1* (Fogarty et al., 2007; από N. Καίσαρη, UCL, UK).
- 5) Μύες στους οποίους εκφράζεται η Cre ρεκομπινάση υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *Lxh6* (Fogarty et al., 2007; από N. Καίσαρη, UCL, UK).

Για τη μελέτη των εξωκυτταρικών μηχανισμών καθοδήγησης των ενδονευρώνων στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, χρησιμοποιήθηκαν:

- 1) Φυσιολογικοί μύες των στελεχών CBAxC57B1/10.
- 2) Μύες που εμφανίζουν απώλεια δράσης του γονιδίου *Tag-1*, του στελέχους C57BL6. Στα συγκεκριμένα ζώα έχει αφαιρεθεί η αλληλουχία του γονιδίου της TAG-1 μεταξύ του 2^{ου} και 5^{ου} εξονίου (Fukamauchi et al, 2001).
- 3) Μύες που εκφράζουν την πρωτεΐνη GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της ακτίνης (actin-GFP)

Για τη δημιουργία των διαγονιδιακών TAG1^{Cre} και TAG1^{loxP-EGFP-loxP-DTA} μύων χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικοί μύες του στελέχους C57BL6.

Η ημέρα της σύλληψης θεωρήθηκε η εμβρυϊκή ημέρα 0.5 (E0.5). Οι έγκυες θηλυκές θυσιάστηκαν με αποσύνδεση της σπονδυλικής τους στήλης (cervical dislocation) για συλλογή των εμβρύων, ενώ οι μύες σε μετεμβρυϊκή ηλικία (P0-P5) θυσιάστηκαν με αποκεφαλισμό. Στα ζώα μεγαλύτερων μεταγεννητικών σταδίων (>P5) και στα ενήλικα, πραγματοποιήθηκε ενδοκαρδιακή έγχυση μονιμοποιητικού δ/ματος 4% PFA σε 1xPBS. Τα έμβρυα και οι ιστοί από τα ενήλικα ζώα συλλέχθηκαν σε φωσφορικό διάλυμα PBS 1x.

2. ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ

2.1 Απομόνωση Γενομικού DNA από ιστούς

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

A. Για ενήλικα ζώα, ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

1. Η ουρά τοποθετείται σε 400μl διαλύματος λύσης (tail digestion buffer: 100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, pH8, 25 mM EDTA, pH: 8.0, 0.5% SDS
2. Επώαση για 30' στους 37 °C.
3. Προσθήκη 15 μl πρωτεΐνάσης K (10 μg/μl) και επώαση στους 55 °C για 6-18 ώρες.
4. Προσθήκη RNase (10 μg/μl) και επώαση στους 37 °C για 10'.
5. Φυγοκέντρηση για 5' στις 13000rpm και απομόνωση του υπερκείμενου σε νέα σωληνάρια.
6. Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης και ήπια ανάδευση για την ανάμιξη των φάσεων.
7. Φυγοκέντρηση για 10' στις 13200rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου
8. Πλύση της πελέτας με 70% αιθανόλη
9. Φυγοκέντρηση για 5' στις 13200rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου
10. Επαναδιάλυση της πελέτας σε 100 μl T.E.

B. Για γονοτύπηση εμβρύων, ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

1. Η ουρά τοποθετείται σε 22μl δι/τος λύσεως 50mM Tris pH8, 2mM NaCl, 10mM EDTA, 0.1% SDS.

2. Προσθήκη 2μl πρωτεΐνάσης K (10 μg/μl) και επώαση στους 55 °C για 1 ώρα.
3. Επώαση στους 95°C για 5' για απενεργοποίηση του ενζύμου
4. Προσθήκη 76μl ddH₂O και χρήση 1-2μl από το DNA αυτό για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

2.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τα TAG1 +/- και -/- ζώα, περιγράφονται από τους Fukamauchi et al, 2001, ενώ οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της Rac1 παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία
<i>Εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την αντίδραση Rac1</i>	
Rac1-a	5'- GTTGAAGGTGCTAGCTTGGGAAGT- 3'
Rac1-b	5'- GAAGGAGAAGAAGCTGACTCCCATC-3'
Rac1-c	5'- CAGCCACAGGCAATGACAGATGTTC-3'
<i>Εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την αντίδραση Lhx6_Cre</i>	
iCre-250	5'- GAGGGACTACCTCCTGTATC-3'
iCre-880	5'- TGCCAGAGTCATCCTTGGC-3'
<i>Εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την αντίδραση Nkx2.1_iCre</i>	
Nkx2.1-iCre-Fw	5'- GTCCACCATGGTGCCCAAGAAGAAG-3'
Nkx2.1-iCre-Rev	5'- GCCTGAATTCTCAGTCCCATCTTCGAGC-3'
<i>Εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την αντίδραση YFP-Stop</i>	
Rosa26-Lc	5'- GCTCTGAGTTGTTATCAGTAAGG-3'
Rosa26-R2	5'- GCGAAGAGTTTGTCTCAACC-3'
Rosa26-R3	5'- GGAGCGGGAGAAATGGATATG-3'

Σε κάθε περίπτωση, οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις παρακάτω συνθήκες, σε προγράμματα κατάλληλα για τους εκκινητές κάθε αντίδρασης:

Γεωμικό DNA από ουρά έως 500pg, 2.5ng από κάθε εκκινητή, 0.2μM dNTPs και 1-2units Taq polymerase (Minotech ή Finzymes) σε 1x από το αντίστοιχο PCR buffer.

Αντίδραση PCR	Πρόγραμμα αντίδρασης
<u>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>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.

3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Για τη συγκεκριμένη διατριβή χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές:

- **CHO (Chinese Hamster Ovaries):** Επιθηλιακά κύτταρα από ωοθήκη κινέζικου Hamster
- **CHO-TAG1:** CHO κύτταρα μόνιμα διαμολυσμένα ώστε να εκφράζουν στη μεμβράνη τους την πρωτεΐνη TAG-1 (Buttiglione et al, 1998)
- **CHO-TAX1:** CHO κύτταρα μόνιμα διαμολυσμένα ώστε να εκφράζουν στη μεμβράνη τους την πρωτεΐνη TAX-1, ανθρώπινο ομόλογο της TAG-1 (Pavlou et al, 2002).

ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ:

Όλες οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία petri, ή σε φλάσκες μέσα σε θρεπτικό μέσο DMEM (SIGMA) με 10% ορρό εμβρύου μοσχαριού (Fetal Calf

Serum, FCS, GIBCO), 100units/ml πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (GIBCO), 1x Glutamax (100x GIBCO). Η καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν μέσα σε κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C και 5%CO₂.

Όταν τα κύτταρα κάλυπταν το 80% της επιφάνειας της φλάσκας ή του τρυβλίου, ακολουθούσε διαχωρισμός τους σε περισσότερες φλάσκες/τρυβλία, ως εξής:

1. απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου και πλύση των κυττάρων με αποστειρωμένο 1xPBS
2. Προσθήκη όγκου τρυψίνης-EDTA (GIBCO), αρκετού ώστε να καλύψει την επιφάνεια της καλλιέργειας (~1.5ml σε φλάσκα 25mm²) και επώαση για 3' στους 37°C.
3. Προσθήκη θρεπτικού μέσου με FCS για να απενεργοποιηθεί η τρυψίνη (~διπλάσιο όγκος από τον όγκο της τρυψίνης)
4. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωληνάρια και φυγοκεντρώνονται για 5' στις 1200rpm
5. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσεκτική επαναδιάλυση της πελέτας των κυττάρων σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού μέσου
6. Ο τελικός όγκος διαμοιράζεται σε νέες φλάσκες/τρυβλία και προστίθεται επιπλέον θρεπτικό μέσο (~5ml τελικού όγκου σε φλάσκες 25mm²).

4. ΟΡΓΑΝΟΤΥΠΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

4.1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΤΟΜΩΝ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ

Για τη συγκεκριμένη διατριβή πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες τομών από εγκεφάλους εμβρύων E13.5 και E14.5, με την ακόλουθη διαδικασία:

Οι έγκυες θηλυκές θυσιάζονται με αποσύνδεση της σπονδυλικής τους στήλης και τα έμβρυα συλλέγονται σε θρεπτικό μέσο L15-Leibovitz (GIBCO) με 100units/ml πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Ακολουθεί απομόνωση του εγκεφάλου τους μέσα στο ίδιο θρεπτικό μέσο και έγκλιση του ιστού σε 4% αγαρόζη χαμηλού σημείου ζέσεως (Low melting point agarose, SIGMA), σε L15-Leibovitz. Ακολουθούν τομές των εγκεφάλων, πάχους 250μm σε μικροτόμο δόνησης (Vibratome, Leica). Οι τομές κόβονται μέσα σε θρεπτικό μέσο L15-Leibovitz και συλλέγονται σε τρυβλία που

περιέχουν το ίδιο θρεπτικό υλικό, στον πάγο. Στη συνέχεια οι τομές τοποθετούνται πάνω σε μεμβράνες Biopore (Millicell, Millipore) μέσα σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο **DMEM/F12A** [DMEM/F12 (GIBCO), 0.6% γλυκόζη, 5% FCS, 100units/ml πενικιλίνη και στεπτομυκίνη, 1x Glutamax (100x, GIBCO), 1% (v/v) N2 supplement (GIBCO)].

Οι τομές επωάζονται μέσα σε κλίβανο με 5%CO₂ στους 37°C για 1 ώρα. Στη συνέχεια το θρεπτικό μέσο αντικαθίσταται από **Neurobasal/B27** [Neurobasal (GIBCO), 0.6% γλυκόζη, 100units/ml πενικιλίνη και στεπτομυκίνη, 1x Glutamax (100x, GIBCO), 2% (v/v) B27 supplement (GIBCO)]. Στο θρεπτικό αυτό οι τομές καλλιεργούνται για το απαραίτητο χρονικό διάστημα, ανάλογα με το πείραμα, μέσα σε κλίβανο με 5%CO₂ στους 37°C.

Έπειτα από το τέλος κάθε πειράματος, προκειμένου να πραγματοποιηθεί ανοσοϊστοχημεία στις τομές που καλλιεργήθηκαν, ακολουθεί η εξής διαδικασία:

- Οι τομές μονιμοποιούνται με 4% PFA, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στη συνέχεια τοποθετούνται σε ένα τρυβλίο petri με τη βοήθεια πινέλου
- Οι τομές καλύπτονται με δ/μα 4% αγαρόζη χαμηλού σημείου ζέσεως σε PBS 1x και κόβονται σε κύβους
- Ακολουθούν τομές σε vibratome, πάχους 50μm μέσα σε PBS 1x
- Οι τομές συλλέγονται σε PBS 1x και ακολουθεί ανοσοφθορισμός βάσει του πρωτοκόλλου 5.2. B.

4.1.1. Μεταμόσχευση τμήματος ιστού σε τομές εγκεφάλου σε καλλιέργεια

Για τη συγκεκριμένη εργασία, πραγματοποιήθηκε μεταμόσχευση της περιοχής του MGE από τον εγκέφαλο του δότη (actin-GFP έμβρυο), στον εγκέφαλο του δέκτη (TAG-1 -/- και TAG-1 +/- έμβρυα). Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε, είναι η ακόλουθη:

Ο εγκέφαλος του δότη του μοσχεύματος καλλιεργείται σε τομές, σύμφωνα με την βασική διαδικασία (3.1). Αντίστοιχη καλλιέργεια πραγματοποιείται και για τον εγκέφαλο του ζώου-δέκτη του μοσχεύματος. Μόλις οι ολοκληρωθεί η επώαση με DMEM/F12 και πριν την αλλαγή του θρεπτικού μέσου σε Neurobasal/B27, κάτω από στερεοσκόπιο κόβεται και απομονώνεται ένα μικρό τμήμα της περιοχής του MGE (διαμέτρου ~100-150μm), που θα αποτελέσει το μόσχευμα. Για την απομόνωση του

μοσχεύματος, χρησιμοποιείται πολύ λεπτό νήμα βολφραμίου Tungsten (World Precision Instruments, Inc.), ή πολύ λεπτές λαβίδες. Αντίστοιχο τμήμα ιστού κόβεται και από την ίδια περιοχή της τομής του δέκτη και απομακρύνεται. Στη συνέχεια, με τη χρήση πιπέτας Pasteur, όπου με τη θερμότητα έχει επιμηκυνθεί το στόμιο, το μόσχευμα μεταφέρεται από την τομή του δότη στην τομή του δέκτη, όπου εναποτίθεται με προσοχή, ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες αέρα. Με τη χρήση λαβίδας, το μόσχευμα τοποθετείται στη σωστή περιοχή. Ακολουθεί αλλαγή του θρεπτικού μέσου σε Neurobasal/B27 και οι τομές τοποθετούνται στον κλίβανο, όπου επωάζονται για 48 ώρες.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: έπειτα από τις πρώτες 24 ώρες καλλιέργειας, το θρεπτικό μέσο ανανεώνεται.

Μετά το τέλος της καλλιέργειας, οι τομές επεξεργάζονται για ανοσοφθορισμό, σύμφωνα με το βασικό πρωτόκολλο (4.1) και τη διαδικασία 5.2. B.

4.1.2. Τοποθέτηση κρυστάλλων DiI σε τομές εγκεφάλου σε καλλιέργεια

Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης διατριβής, πραγματοποιήθηκε σήμανση της περιοχής του LGE με 1,1'-dioctodecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine (DiI) ((NeuroTrace™ CM-DiI tissue labeling paste, Molecular Probes), σε καλλιέργειες τομών εγκεφάλου. Το συγκεκριμένο μόριο είναι λιπόφιλο και ενσωματώνεται στην κυτταρική μεμβράνη των νευρικών κυττάρων. Έτσι, μέσω διάχυσης είναι δυνατή η σήμανση τόσο των κυτταρικών σωμάτων, όσο και των καθοδηγητικών αποφύσεων και των αξόνων των νευρώνων. Στη συγκεκριμένη εργασία, ο κρύσταλλος DiI τοποθετήθηκε στην περιοχή του LGE με τη βοήθεια χειρουργικών βελόνων, πριν από την αλλαγή του θρεπτικού μέσου σε Neurobasal/B27. Στη συνέχεια οι τομές καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες σε κλίβανο με 5%CO₂ στους 37°C.

Μετά το τέλος της καλλιέργειας, οι τομές επεξεργάζονται για ανοσοφθορισμό, σύμφωνα με το βασικό πρωτόκολλο (4.1) και τη διαδικασία 5.2. B.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Λόγω του DiI, δε χρησιμοποιείται Triton-X100, ούτε και άλλο απορρυπαντικό για τον ανοσοφθορισμό, έτσι ώστε να μην καταστραφούν οι μεμβράνες που έχουν ενσωματώσει τον κρύσταλλο.

4.2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΙΣΤΟΤΕΜΑΧΙΩΝ (matrigel explants)

Για το συγκεκριμένο πείραμα, χρησιμοποιήθηκε Matrigel (BD Biosciences) το οποίο σε θερμοκρασία 4°C είναι σε υγρή μορφή, ενώ στους 37°C δημιουργεί πήκτωμα.

Την προηγούμενη ημέρα της καλλιέργειας, το Matrigel τοποθετείται σε πάγο και αφήνεται στους 4°C για να ξεπαγώσει.

Εγκέφαλοι εμβρύων E13.5 απομονώνονται μέσα σε θρεπτικό μέσο L15-Leibovitz με αντιβιοτικά (βλ.3.1). Κάτω από στερεοσκόπιο, απομακρύνονται οι μήνιγγες και τα 2 ημισφαίρια χωρίζονται, αποκαλύπτοντας τις κοιλίες και τις εσωτερικές δομές του εγκεφάλου. Η περιοχή του MGE απομονώνεται και κόβεται με τις λαβίδες σε πολύ μικρά τεμάχια (διαμέτρου ~100μm). Τα ιστοτεμάχια επωάζονται μέσα σε θρεπτικό L15-Leibovitz με αντιβιοτικά και 10% FCS για 1 ώρα σε κλίβανο με 5%CO₂ στους 37°C.

Κατά τη διάρκεια της επώασης, παρασκευάζεται το πήκτωμα του Matrigel, ως εξής:

Το Matrigel αναμιγνύεται με θρεπτικό Neurobasal/B27 σε αναλογία 1:1. ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τόσο το θρεπτικό υλικό, όσο και οι πιπέτες και τα tips που χρησιμοποιούνται για την ανάμιξη, πρέπει να είναι παγωμένα, έτσι ώστε το matrigel να παραμείνει σε υγρή μορφή. Όλες οι διεργασίες πραγματοποιούνται στον πάγο.

Με τη βοήθεια πιπέτας Gilson, δημιουργείται ένα πολύ λεπτό στρώμα matrigel (~ 150-200μl) στην επιφάνεια τρυβλίου/καλυπτρίδας (στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν 4-well plates, NUNC). Στη συνέχεια τα τρυβλία τοποθετούνται στον κλίβανο, σε θερμοκρασία 37°C για 45-60', προκειμένου να δημιουργηθεί πήκτωμα.

Μόλις δημιουργηθεί το πήκτωμα, τοποθετούνται πάνω του τα ιστοτεμάχια, με τη βοήθεια πιπέτας Gilson, ή Pasteur. Στη συνέχεια, πάνω σε κάθε ιστοτεμάχιο προστίθεται μια σταγόνα matrigel/neurobasal 1:1 και τα τρυβλία επανατοποθετούνται στον κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C για 45', προκειμένου να δημιουργηθεί και πάλι πήκτωμα. Ακολούθως, προστίθεται σε κάθε τρυβλίο θρεπτικό Neurobasal/B27 και τα ιστοτεμάχια καλλιεργούνται σε κλίβανο με 5%CO₂ στους 37°C, για 48 ώρες.

Οι καλλιέργειες μονιμοποιούνται και χρησιμοποιούνται για ανοσοφθορισμό, όπως περιγράφεται στο 5.4.B.

4.3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΦΛΟΙΟ ΤΩΝ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΩΝ ΗΜΙΣΦΑΙΡΙΩΝ (Stripe Choice Assay)

Μέρα 1^η:

1. Χρησιμοποιούνται CHO-TAG1/TAX1 κύτταρα, που έχουν καλύψει την επιφάνεια καλλιέργειας κατά 80%, για τα οποία ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στο 3 (βήματα 1-5)
2. Μετά την επαναδιάλυση της πελέτας, τα κύτταρα τοποθετούνται σε 4-well LabTek chambers (Nunc), σε πυκνότητα 4×10^5 κύτταρα/πηγάδι και αφήνονται 12-18 ώρες σε καλλιέργεια, μέσα σε κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C και 5%CO₂. Το θρεπτικό που χρησιμοποιείται, είναι αυτό που περιγράφεται στους βασικούς χειρισμούς των κυτταρικών σειρών.

Μέρα 2^η:

1. Χρησιμοποιούνται CHO κύτταρα, που έχουν καλύψει την επιφάνεια καλλιέργειας κατά 80%, για τα οποία ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στο 3 (βήματα 1-5)
2. Με τη βοήθεια ενός tip 200μl και ενός χάρακα, δημιουργούμε λωρίδες στα πηγάδια LabTek, ξύνοντας τα CHO-TAG1/TAX1 κύτταρα ανά 1mm.
3. 3 πλύσεις με αποστειρωμένο PBS 1x
4. Τα αγρίου τύπου CHO κύτταρα, τοποθετούνται με θρεπτικό μέσο, μέσα στα ίδια πηγάδια LabTek σε πυκνότητα 2×10^5 κύτταρα/πηγάδι
5. Επώση για 15', έως ότου τα νέα κύτταρα προσκολληθούν στις άδειες λωρίδες που έχουν δημιουργηθεί
6. Πολλαπλές πλύσεις με αποστειρωμένο PBS 1x, ώστε να απομακρυνθούν τα CHO κύτταρα που ενδεχομένως έχουν προσκολληθεί πάνω στα ήδη υπάρχοντα CHO-TAG1/TAX1
7. Προσθήκη θρεπτικού και επώση 12-18 ώρες σε κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C και 5%CO₂.

Μέρα 3^η:

1. E13.5-E14.5 actin-GFP έμβρυα απομακρύνονται από τις εγκύους και απομονώνεται ο εγκέφαλός τους, μέσα σε θρεπτικό μέσο L15-Leibovitz (GIBCO) με 100units/ml πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη.
2. Κάτω από στερεοσκόπιο, απομακρύνονται οι μήνιγγες και τα 2 ημισφαίρια χωρίζονται, αποκαλύπτοντας τις κοιλίες και τις εσωτερικές δομές του

εγκεφάλου. Η περιοχή του MGE απομονώνεται και κόβεται με τις λαβίδες σε πολύ μικρά τεμάχια και αυτά μεταφέρονται με πιπέτα Pasteur σε eppendorfs όγκου 1ml.

3. Στη συνέχεια με τη βοήθεια πιπέτας Gilson και tips 200μl, πραγματοποιείται μηχανική διάσπαση των ιστοτεμαχίων (10-12 φορές), έως ότου απομονωθούν μεμονωμένα κύτταρα MGE.
4. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνται για 5' στις 800rpm, προκειμένου να απομακρυνθεί το θρεπτικό μέσο.
5. Η πελέτα επαναδιαλύεται σε θρεπτικό Neurobasal/B27.
6. Μέσα στα LabTek με το εναλλασσόμενο υπόστρωμα των CHO και CHO-TAG1/TAX1 κυττάρων, τοποθετούνται $5 \cdot 10^4$ κύτταρα MGE και καλλιεργούνται για 24 ώρες σε κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C και 5%CO₂.

Μέρα 4^α:

Οι καλλιέργειες χρησιμοποιούνται για ανοσοφθορισμό όπως περιγράφεται στο 5.4 (είτε ζωντανές, είτε μετά από μονιμοποίηση)

5. ΒΑΣΙΚΕΣ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΙΣΤΩΝ ΓΙΑ ΚΡΥΟΤΟΜΕΣ ΚΑΙ ΤΟΜΕΣ ΣΕ ΜΙΚΡΟΤΟΜΟ ΔΟΝΗΣΗΣ (VIBRATOME)

1. Απομόνωση εγκεφάλων μέσα σε 1x PBS και μονιμοποίηση σε 4% PFA, για 12-18 ώρες στους 4°C. Αν οι ιστοί προέρχονται από ζώα μεταγεννητικών σταδίων, ή ενήλικα, τότε πριν την απομόνωση πραγματοποιείται ενδοκαρδιακή έγχυση 1x PBS και ακολούθως 4%PFA στο ζώο, για απομάκρυνση του αίματος από τα αγγεία και βέλτιστη μονιμοποίηση του εγκεφάλου.
2. Πλύση με 1x PBS

5.1. A. Για κρυοτομές

1. Τοποθέτηση του ιστού σε δ/μα 30% σουκρόζης σε 1x PBS, για κρυοπροστασία. Ο ιστός παραμένει στο δ/μα αυτό στους 4°C, έως ότου καταβυθιστεί.
2. Έγκλιση του ιστού σε πήκτωμα 15% σουκρόζης και 7,5% ζελατίνης σε 1x PBS.

3. Πάγωμα του ιστού σε ισοπεντάνιο, στους -45°C και φύλαξη στους -80°C , έως ότου κοπεί σε κρυοτόμο (LEICA) σε τομές πάχους $10\mu\text{m}$. Οι τομές συλλέγονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και διατηρούνται στους -20°C .

5.1. B. Για vibratome

1. Έγκλιση του ιστού σε πήκτωμα 4% αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως, σε 1x PBS.
2. Ο ιστός κόβεται σε vibratome (LEICA) μέσα σε 1x PBS, σε τομές πάχους $40\mu\text{m}$, οι οποίες συλλέγονται με πινέλο μέσα σε 1x PBS και διατηρούνται στους 4°C .

5.2. ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

5.2. A. Σε τομές κρυοτόμου

1. Πλύση των τομών σε PBS 1x + 0,1% Triton (1x PBT) για 5'.
2. Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων με 1% Fetal Bovine Serum (FBS) σε 1x PBT (blocking solution), 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Επώαση των τομών με πρωτοταγές αντίσωμα, αραιωμένο σε blocking solution, για 12-18 ώρες στους 4°C .
4. Πλύση των τομών με 1x PBT, 3 x 10'.
5. Επώαση των τομών στο σκοτάδι, με δευτεροταγές αντίσωμα αραιωμένο σε blocking solution, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Πλύση των τομών με 1x PBT, 3 x 10'.
7. Επώαση με DAPI ή TOPRO, αραιωμένα 1:1000 σε 1x PBS, για 10' σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Πλύσεις με 1x PBT 3 x 5'
9. Προσθήκη MOWIOL και καλυπτρίδων.

5.2. B. Σε τομές vibratome

1. Πλύση των τομών σε PBS 1x + 0,1% Triton (1x PBT) για 5'.
2. Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων με 1% Fetal Bovine Serum (FBS) σε 1x PBT (blocking solution), 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

3. Προσθήκη πρωτοταγούς αντισώματος, αραιωμένου σε blocking solution, για 12-18 ώρες στους 4°C.
4. Πλύσεις των τομών σε PBS 1x υπό ανάδευση, 3 x 10΄
5. Προσθήκη δευτεροταγούς αντισώματος αραιωμένου σε blocking solution και επώαση των τομών στο σκοτάδι, για 12-18 ώρες στους 4°C.
6. Πλύσεις των τομών σε PBS 1x υπό ανάδευση, 3 x 10΄
7. Επώαση με DAPI ή TOPRO, αραιωμένα 1:1000 σε 1x PBS, για 10΄ σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Οι τομές εμβαπτίζονται σε δ/μα 0.2% (m/v) ζελατίνης (porcine skin gelatin, SIGMA) σε dH₂O με 50mM Tris-HCl, pH 7.5.
9. Τοποθέτηση των τομών σε αντικειμενοφόρους πλάκες με MOWIOL και καλυπτρίδες.

5.2. Γ. Αντισώματα

Πρωτοταγή αντισώματα	Αραίωση	Ισότυπος
Anti-Rac1 (Cytoskeleton)	1:20	Mouse IgG
Anti-GFP (Invitrogen)	1:500	Mouse IgG
Anti-GFP (Minotech)	1:5000	Rabbit IgG
Anti-GFP (Nacalai Tesque)	1:1000	Rat IgG
Anti-Lhx6 (Lavdas et al, 1996)	1:200	Rabbit IgG
Anti-GABA (Sigma)	1:1000	Rabbit IgG
Anti-PV (Chemicon)	1:1000	Mouse IgG
Anti-Som (Abcam)	1:500	Rabbit IgG
Anti-CR (Swant)	1:1000	Rabbit IgG
Anti-NPY (Sigma)	1:500	Rat IgG
Anti-ChAT (Millipore)	1:200	Mouse IgG
Anti-Olig2 (Chemicon)	1:1000	Rabbit IgG
Anti-BrdU (Oxford Biotech)	1:1000	Rat IgG
Anti-Ki67 (Vector)	1:1000	Rabbit IgG
Anti-PH3 (Upstate)	1:200	Rabbit IgG
Anti-Caspase3 (Cell Signaling)	1:200	Rabbit IgG
Anti-Neurofilament (COVANCE)	1:1000	Rabbit IgG

Anti-Tuj1 (COVANCE)	1:1000	Mouse IgG
4D7 (Developmental Studies Hybridoma Bank)	1:1000	Mouse IgM

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

5.3. ΣΗΜΑΝΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΒΡΩΜΟΔΕΟΞΥΟΥΡΙΔΙΝΗΣ (BrdU)

5.3. 1. Ένεση με BrdU

1. Η BrdU διαλύεται μέσα σε H₂O σε συγκέντρωση ~10mg/ml. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C και ξεπαγώνεται πριν από τη χρήση στους 37°C.
2. Στις εγκύους πραγματοποιείται ενδοπεριτοναϊκή ένεση με διάλυμα BrdU, σε δόση 50-100μg ανά γραμμάριο βάρους του ζώου. Ο μέγιστος όγκος που ενύεται είναι 150μl και η αραίωση της BrdU γίνεται σε διάλυμα PBS 1x.
3. Η ουσία αφήνεται να ενσωματωθεί στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα για ½-24 ώρες, ανάλογα με το επιθυμητό αποτέλεσμα.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η BrdU ενσωματώνεται για ~6 ώρες πριν αποσυντεθεί. Επομένως αν χρειάζεται εκτενής σήμανση μεγάλου αριθμού κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα, η ένεση πρέπει να επαναλαμβάνεται ανά 6 ώρες.

5.3. 2. Επεξεργασία των εμβρύων

1. Τα έμβρυα συλλέγονται στο επιθυμητό αναπτυξιακό στάδιο μετά την ένεση και απομονώνεται ο εγκέφαλος.

2. Μονιμοποίηση με 4%PFA σε PBS 1x, για 12-18 ώρες στους 4°C.
3. Ακολουθεί επεξεργασία των ιστών σύμφωνα με το πρωτόκολλο για κρυτομές

5.3.3. Ανοσοφθορισμός

1. Αν η σήμανση της BrdU ακολουθεί έπειτα από άλλη ανοσοϊστοχημεία, ή υβριδοποίηση *in situ*, τότε οι τομές μονιμοποιούνται για 10' με δ/μα 4%PFA σε PBS 1x σε θερμοκρασία δωματίου και όλα τα επόμενα βήματα πραγματοποιούνται στο σκοτάδι.
2. Πλύσεις με PBS 1x, 3 x 5'
3. Αποδιάταξη του DNA
 - Αν η σήμανση της BrdU ακολουθεί έπειτα από υβριδοποίηση *in situ*, η αποδιάταξη του DNA πραγματοποιείται με επώαση των τομών σε δ/μα 2N HCl σε PBS 1x, με 0,1% Triton-X100, για 15' στους 37°C.
 - Αν η σήμανση της BrdU ακολουθεί έπειτα από άλλη ανοσοϊστοχημεία, η αποδιάταξη του DNA πραγματοποιείται με επώαση των τομών σε δ/μα 2N HCl σε PBS 1x, με 0.1% Triton-X100, για 30' στους 37°C.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: 37% HCl αντιστοιχεί σε κανονικότητα 12N.

4. Επώαση των τομών με δ/μα εξουδετέρωσης (Sodium Tetraborate 0.1M, pH 8.5), 3 x 8' σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Πλύση με PBS 1x και 0.01% Triton.
6. Επώαση με αντίσωμα για BrdU, αραιωμένο σε PBS 1x, 10% FBS, 0.1% Triton, 12-18 ώρες στους 4°C.
7. Πλύσεις με PBS 1x, 0.01% Triton, 3 x 10' σε θερμοκρασία δωματίου
8. Επώαση με το δευτεροταγές αντίσωμα αραιωμένο σε PBS 1x, 10% FBS, 0.1% Triton, 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Πλύσεις με PBS 1x, 0.01% Triton, 3 x 10' σε θερμοκρασία δωματίου
10. Προσθήκη MOWIOL και καλυπτρίδων

5.4. ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ

5.4. Α. Σε ζωντανά κύτταρα

1. Απομάκρυνση των κυττάρων από τον επωαστήρα και πλύση με αποστειρωμένο PBS 1x

2. Προσθήκη πρωτοταγούς αντισώματος αραιωμένου σε θρεπτικό μέσο.
3. Τα κύτταρα επανατοποθετούνται στους 37°C και επωάζονται με το αντίσωμα για 30'.
4. Πλύσεις με αποστειρωμένο PBS 1x, x 3
5. Μονιμοποίηση των κυττάρων με 4% PFA σε PBS 1x, σε θερμοκρασία δωματίου για 10' (ΣΗΜΕΙΩΣΗ: η PFA πρέπει να είναι σε θερμοκρασία 25-37°C ώστε να μην αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια της καλλιέργειας)
6. Προσθήκη δευτεροταγούς αντισώματος αραιωμένου σε PBS 1x με 1% FBS και επώαση για 20' σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Επώαση με DAPI ή TOPRO, αραιωμένα 1:1000 σε 1x PBS, για 5' σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Πλύσεις με PBS 1x, 3x10'.
9. Εφ' όσον τα κύτταρα έχουν καλλιεργηθεί σε τρυβλίο ή LabTek αντικειμενοφόρους, ακολουθεί προσθήκη MOWIOL και καλυπτρίδων. Αν τα κύτταρα έχουν καλλιεργηθεί πάνω σε καλυπτρίδες, αυτές τοποθετούνται πάνω σε μια σταγόνα MOWIOL, σε αντικειμενοφόρους πλάκες, ώστε η επιφάνεια όπου βρίσκονται τα κύτταρα να είναι σε επαφή με το υγρό.

5.4. Β. Σε μονιμοποιημένα κύτταρα

1. Απομάκρυνση των κυττάρων από τον επωαστήρα και πλύση με PBS 1x.
2. Μονιμοποίηση με 4% PFA σε PBS 1x, σε θερμοκρασία δωματίου για 10' (ισχύει η ΣΗΜΕΙΩΣΗ για τον ανοσοφθορισμό σε ζωντανά κύτταρα).
3. Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων με 1% Fetal Bovine Serum (FBS) σε 1x PBT (blocking solution), 20' σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Επώαση με πρωτοταγές αντίσωμα, αραιωμένο σε blocking solution, 30' σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Πλύσεις με PBS 1x, 3x10
6. Επώαση με δευτεροταγές αντίσωμα, αραιωμένο σε blocking solution, 15' σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Επώαση με DAPI ή TOPRO, αραιωμένα 1:1000 σε 1x PBS, για 5' σε θερμοκρασία δωματίου.

8. Εφ' όσον τα κύτταρα έχουν καλλιεργηθεί σε τρυβλίο ή LabTek αντικειμενοφόρους, ακολουθεί προσθήκη MOWIOL και καλυπτρίδων. Αν τα κύτταρα έχουν καλλιεργηθεί πάνω σε καλυπτρίδες, αυτές τοποθετούνται πάνω σε μια σταγόνα MOWIOL, σε αντικειμενοφόρους πλάκες, ώστε η επιφάνεια όπου βρίσκονται τα κύτταρα να είναι σε επαφή με το υγρό.

5.5. ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ *in situ* ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ mRNA σε Κρυτομές

5.5. Α. Παρασκευή του ανιχνευτή (probe) με μεταγραφή *in vitro*

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι πρόσφατα παρασκευασμένα και απαλλαγμένα από ριβονουκλεάσες (RNases)

1. Σε eppendorf tubes (1.5 ml) τα οποία έχουν επικαλυφθεί με σιλικόνη προστίθενται με την ακόλουθη σειρά:
 - nuclease free H₂O 7μl
 - 5x transcription buffer 4 μl
 - 0.1 M DTT 2μl
 - 10 mM rGTP 1μl
 - 10 mM rCTP 1μl
 - 10 mM rATP 1μl
 - 10 mM rUTP 0.65μl
 - 10 mM 11-DIGrUTP 0.35μl
 - RNAsin 1μl
 - RNA polymerase 1μl
 - 1 μg/μl linear template DNA 1μl
2. Επώση για τουλάχιστον 2 ώρες στους 37 °C
3. Ποσότητα 1 μl ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα αγαρόζης για έλεγχο/ποσοτικοποίηση του ανιχνευτή
4. Προσθήκη 2 μl DNase RNase free (15 λεπτά, 37 °C).
5. Ηλεκτροφόρηση 1μl από το παραπάνω μείγμα, σε πήκτωμα αγαρόζης για να ελεγχθεί η απουσία DNA.
6. Προσθήκη: 90 μl EDTA, 12μl LiCl 4 M, 360 μl EtOH και επώση για τουλάχιστον 30 λεπτά στους -20 °C.

7. Φυγοκέντρωση στις 12000 rpm, 15 λεπτά στους 4 °C.
8. Πλύσιμο με 70% αιθανόλη.
9. Φυγοκέντρωση στις 12000 rpm, 5 λεπτά στους 4 °C.
10. Το RNA αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλύεται σε 100 µl T.E. Μέχρι τη χρήση του, διατηρείται στους -20 °C ή -80 °C.

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν, αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

Μόριο	Πλασμιδιακός Φορέας	Μη νοηματικό RNA (antisense RNA)	
		Ενζύμο	Πολυμεράση
Som	pBS II (KS)	EcoRI	T7
GAD67	pBS II (KS)	SalI	T7
NPY	pBS II (KS)	XhoI	T3
Lhx6	pBS II (KS)	NotI	T3

5.5. Β. Πρωτόκολλο Υβριδοποίησης σε τομές κρουτόμου

1. Επώαση των τομών με 4% PFA, 10' σε θερμοκρασία δωματίου
2. Πλύσεις με 1x PBS, 3 x 5'
3. Ακετυλίωση των τομών με δ/μα: 4 ml τριαιθανολαμίνη, 0.525 ml HCl (37%) και 0.75 ml οξικός ανυδρίτης σε 295 ml H₂O, για 10' σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Πλύσεις με 1x PBS, 3 x 10'
5. Προϋβριδοποίηση των τομών σε δ/μα το οποίο περιέχει: 50% φορμαμίδιο, 5xSSC, 5xDenharts, 250mg/ml yeast RNA, 500mg/ml herring sperm DNA, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
6. Υβριδοποίηση των τομών με 400ng/ml ανιχνευτή RNA σημασμένου με διγοξυγενίνη (DIG-labeled-probe), σε δ/μα προϋβριδοποίησης, για 12-18 ώρες, στους 72°C.
7. Μεταφορά των τομών σε δ/μα 0,2x SSC, για 1 ώρα, στους 72°C
8. Μεταφορά των τομών σε δ/μα 0,2x SSC, για 5' σε θερμοκρασία δωματίου.

9. Πλύσεις των τομών με δ/μα B1 που περιέχει 0.1M Tris pH7.5, 0.15 M NaCl, 3 x 5'.
10. Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του αντισώματος με 10% Fetal Bovine Serum (FBS) σε δ/μα B1 (blocking solution), 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Επώαση των τομών με αντίσωμα anti-DIG-AP (Roche) αραιωμένο 1:5000 σε 1% FBS σε δ/μα B1, για 12-18 ώρες στου 4°C.
12. Πλύσεις των τομών με δ/μα B1, 3 x 10'.
13. Πλύσεις των τομών με δ/μα B2 που περιέχει: 0.1M Tris pH 9.5, 0.1M NaCl, 50mM MgCl₂, 3 x 10'.
14. Επώαση με το χρωμογόνο διάλυμα: 75mg/ml NBT (Nitroblue tetrazolium chloride, Roche) και 50mg/ml BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate,4-toluidine salt, Roche) σε διάλυμα B2. Η αντίδραση πραγματοποιείται στο σκοτάδι, μέχρι να δώσει ικανοποιητική χρώση.
15. Πλύσεις των τομών με 1x PBS, 3 x 10'
16. Προσθήκη μείγματος 50% ζελατίνης και 50% γλυκερόλης και καλυπτρίδων στις τομές.

5.6. ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για την ποσοτικοποίηση του φαινοτύπου σε ζώα ηλικίας P0 και για τις μετρήσεις των υποπληθυσμών των ενδονευρώνων σε ζώα P15, χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον 3 ζεύγη $Rac1^{+/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ και $Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ ζώων, από την ίδια γέννα. Για κάθε ζευγάρι ζώων επελέγησαν 4 τομές, που αντιπροσωπεύουν διαφορετικά βρέγματα κατά μήκος του προσθιοπίσθιου άξονα του εγκεφάλου(-1.94 & 2) και εμπεριέχουν ένα διακριτό τμήμα του φλοιού (στη συγκεκριμένη μελέτη, επελέγη το barrel cortex, καθώς είναι ευδιάκριτη περιοχή του φλοιού, με μεγάλο μέγεθος και όλα τα είδη ενδονευρώνων). Με κατάλληλους μάρτυρες (PV, CR, somatostatin, NPY, YFP, ή GABA) και τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας (Leica TCS SP2, Leica, Nussloch, Germany), φωτογραφήθηκε ολόκληρο το barrel cortex. Στη συνέχεια, για κάθε μοριακό μάρτυρα, μετρήθηκαν όλα τα κύτταρα της εν λόγω περιοχής του φλοιού και υπολογίστηκε μια μέση τιμή για κάθε υποπληθυσμό κυττάρων στον προσθιοπίσθιο άξονα. Σε όλες τις περιπτώσεις, για τη στατιστική

επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε Student's T test και ANOVA για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Στα γραφήματα, οι τιμές παρουσιάζονται ως Mean \pm SEM (Standard Error of Mean).

Για την ποσοτικοποίηση του φαινοτύπου στις εμβρυϊκές ηλικίες, χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον 3 ζεύγη εμβρύων από την ίδια γέννα ($Rac1^{+/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ και $Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$). Για κάθε ζευγάρι εμβρύων, επελέγησαν 4 τομές κατά μήκος του προσθιοπίσθιου άξονα, στις οποίες εντοπίζεται η περιοχή του MGE και χρησιμοποιήθηκαν για φωτογράφιση σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Τα κύτταρα σε κάθε φωτογραφία μετρήθηκαν και στη συνέχεια υπολογίστηκε μια μέση τιμή κυττάρων MGE για κάθε ζώο. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση Student's T test και ANOVA για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Στα γραφήματα, οι τιμές παρουσιάζονται ως Mean \pm SEM (Standard Error of Mean).

Προκειμένου να υπολογιστεί το μήκος των καθοδηγητικών αποφύσεων των κυττάρων *in vivo* και *in vitro*, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Image J. Για κάθε μια από τις 4 τομές που φωτογραφήθηκαν ανά έμβryo, επελέγησαν 10 τυχαία κύτταρα για τη μέτρηση. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση Student's T test και ANOVA για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Στα γραφήματα, οι τιμές παρουσιάζονται ως Mean \pm SEM (Standard Error of Mean).

Για την ποσοτικοποίηση του φαινοτύπου της απενεργοποίησης της *Rac1* στα MGE ιστοτεμάχια σε καλλιέργεια (matrigel explants), χρησιμοποιήθηκαν 4 ζεύγη εμβρύων E13.5 $Rac1^{+/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ και $Rac1^{fl/fl};Nkx2.1^{+/Cre}$ από την ίδια γέννα. Για κάθε έμβryo καλλιεργήθηκαν 5 ιστοτεμάχια MGE. Για την εκτίμηση της απόστασης που μεταναστεύουν τα κύτταρα σε 24 και 48 ώρες, επελέγησαν για κάθε ιστοτεμάχιο τα 10 πιο απομακρυσμένα κύτταρα και υπολογίστηκε η απόστασή τους από την περίμετρο του ιστοτεμαχίου, με τη χρήση του προγράμματος Image J. Από τις παραπάνω τιμές, υπολογίστηκε η μέση απόσταση των κυττάρων κάθε ιστοτεμαχίου και κάθε ζώου και η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση Student's T test και ANOVA για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, τα γραφήματα αφορούν στις τιμές Mean \pm SEM (Standard Error of Mean) για κάθε γονότυπο.

6. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ WESTERN

6.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΙΣΤΟ

Εγκέφαλοι από έμβρυα E13.5, απομονώνονται και οι μήνιγγες απομακρύνονται σε δ/μα PBS 1x και στη συνέχεια απομονώνεται η περιοχή του MGE για να χρησιμοποιηθεί για λύση. Η λύση του ιστού πραγματοποιείται με ομογενοποιητή και στη συνέχεια με τη χρήση υπερήχων, μέσα σε διάλυμα Pyranoside lysis buffer: 85mM Tris pH 7.5, 30mM NaCl, 1mM EDTA, 120mM glucose, 1% Triton X-100, 60mM octyl β-D glucopyranoside (SIGMA), 1mM PMSF (προστίθεται τελευταίο)

Μετά την ομογενοποίηση, το πρωτεϊνικό εκχύλισμα χρησιμοποιείται για ανοσοκατακρήμιση ή για ανοσοαποτύπωση ή φυλάσσεται στους -20°C έως ότου χρησιμοποιηθεί.

6.2. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ (Western Blot Analysis)

6.2.1. Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford και προετοιμασία πρωτεϊνικών δειγμάτων από ιστό

1. Σε eppendorfs όγκου 1,5 ml προστίθενται 799 μl ddH₂O και 1 μl από το πρωτεϊνικό εκχύλισμα, ώστε ο συνολικός όγκος να είναι 800 μl (σε περίπτωση μη ανιχνεύσιμης ποσότητας πρωτεΐνης, αυξάνεται ο όγκος του δείγματος και μειώνεται αναλογικά ο όγκος του ddH₂O)
2. Προσθήκη 200 μl χρωστικής Bradford (Biorad) και καλή ανάδευση (vortex)
3. Τα δείγματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για 15'
4. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του δείγματος στα 595 nm
5. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται με βάση μία πρότυπη καμπύλη η οποία προκύπτει από την αντιστοίχιση γνωστών ποσοτήτων BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma) στον άξονα x, με τις τιμές της οπτικής πυκνότητας τους στα 595 nm στον άξονα y.
6. Μετά τον υπολογισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης στο δείγμα, ο επιθυμητός όγκος μεταφέρεται σε νέο eppendorf (το υπόλοιπο φυλάσσεται στους -20°C)

7. Προσθήκη ίσου όγκου σε **2x Sample Buffer** (100mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol σε H₂O) και DTT (Dithiothreitol) σε τελική συγκέντρωση 100 mM
8. Το δείγμα βράζεται για 5' στους 95°C και ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρωση και μοριακός διαχωρισμός σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

6.2.2 Μοριακός διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Λόγω του μικρού μεγέθους της πρωτεΐνης Rac1 τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία, ήταν πυκνότητας 12%.

1. Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 12%

- **separating gel** (πήκτωμα διαχωρισμού. Η περιεκτικότητα του σε ακρυλαμίδα μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την πρωτεΐνη- στόχο)

Για 5 ml separating gel (1 μικρό πήκτωμα πάχους 0,75 mm) με σύσταση 12%:

1.75 ml dH₂O, 2 ml 30% acrylamide, 1.25 separating gel buffer (1.5 M Tris-Cl pH 8.8 + 0.4% SDS), 50 μl 10% APS (ammonium persulfate), 2.5 μl TEMED (N,N,N',N'- tetramethylethylenediamine, MERCK)

- **stacking gel** (πήκτωμα πακεταρίσματος. Η περιεκτικότητα του σε ακρυλαμίδα είναι σταθερή: 4%)

Για την προετοιμασία 3 ml (1 μικρό πήκτωμα πάχους 0,75 mm):

1.8 ml dH₂O, 450 μl 30% acrylamide, 750 μl stacking gel buffer (1 M Tris-Cl pH 6.8 + 0.4% SDS), 30 μl 10% APS, 3 μl TEMED

2. Τοποθέτησή του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας (Biorad)
3. Προσθήκη 1 Lt από το 1x running buffer [για 1 lt 10x Running-Transfer Buffer: 900 ml 10x Tris-Glycine pH8.3 (30.2g Tris-Base, 188gr Glycine σε H₂O, για 1lt δ/τος 10x), 100 ml SDS 10% σε H₂O] σε όλο το χώρο της συσκευής ανάμεσα στα πηκτώματα και περίπου το μισό από το χώρο που βρίσκεται γύρω από αυτά
4. Φόρτωση των πρωτεϊνικών δειγμάτων στα πηγάδια των πηκτωμάτων (wells)
5. Ρύθμιση της συσκευής ηλεκτροφόρησης στα 80V για όσο χρόνο τα δείγματα βρίσκονται στο πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel) (περίπου 30 min) και στη συνέχεια στα 100V μέχρι να φύγει η χρωστική από το πήκτωμα (σχεδόν 2 hrs)

6.2.3. Μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

1. Παρασκευή φρέσκου 1x transfer buffer (για 1 lt 1x Transfer Buffer: 100ml running buffer, 200ml methanol 100%, 700ml H₂O) περίπου 1 ώρα πριν τη χρήση και τοποθέτησή του στους 4°C
2. Ένα κομμάτι μεμβράνης νιτροκυτταρίνης (PROTRAN) και 6 κομμάτια χαρτιού whattman κόβονται στις διαστάσεις του πηκτώματος
3. Το πήκτωμα μετά την ηλεκτροφόρηση απομακρύνεται από τη συσκευή και στη συνέχεια απομακρύνεται το τμήμα που αντιστοιχεί στο stacking gel, ενώ απομονώνεται το τμήμα του separating gel
4. Τα χαρτιά whattman, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης καθώς και τα ειδικά σφουγγαράκια εμβαπτίζονται σε 1x transfer buffer
5. Στη συσκευή μεταφοράς, τοποθετείται πρώτα το σφουγγάρι (στη μαύρη πλευρά), ενώ ακολουθούν με τη σειρά 3 whattman χαρτιά, το πήκτωμα, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, 3 whattman χαρτιά και το δεύτερο σφουγγάρι.
6. Με χρήση γυάλινης πιπέτας pasteur που «κυλάει» πάνω στην παραπάνω διάταξη, απομακρύνεται ο αέρας που έχει εγκλωβιστεί μεταξύ των υλικών
7. Η συσκευή μεταφοράς τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, μέσα σε δ/μα transfer buffer θερμοκρασίας 4°C
8. Ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος έντασης 310mA για 1 ώρα

6.2.4. Ανοσοαποτύπωση

1. Επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα PBS 1x με 0.1% Tween-20 (PBST 1x) με 5% γάλα, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση, για την κάλυψη των μη-ειδικών θέσεων πρόσδεσης του αντισώματος
2. Επώαση της μεμβράνης με το πρωτοταγές αντίσωμα (mouse-IgG-anti-Rac1, 1:100, Cytoskeleton) αραιωμένο σε διάλυμα PBS 1x με 0.1% Tween-20 με 5% γάλα, για 12-18 ώρες στους 4°C
3. Πλύσεις με PBST 1x, 3 x 10', σε θερμοκρασία δωματίου
4. Επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα (anti-mouse-IgG-HRP, συνδεδεμένο με υπεροξειδάση, Amersham) αραιωμένο σε PBST 1x με 5% γάλα, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση
5. Πλύσεις με PBST 1x, 3 x 10', σε θερμοκρασία δωματίου

6. Η περίσσεια υγρού απομακρύνεται από τη μεμβράνη με χρήση χαρτιού whattman
7. Προσθήκη στη μεμβράνη υποστρώματος της υπεροξειδάσης για την αντίδραση χημειοφωταύγειας (PIERCE) για 1'
8. Στέγνωμα της μεμβράνης και έκθεση σε φωτογραφικό φιλμ για την εμφάνιση των ειδικών ζωνών

7. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

7.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Για την καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών *E.coli* (DH5a, DH₁₀B) χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά υλικά LB (Luria-Bertani) και 2xYT σε υγρή και στερεά μορφή και σε σύσταση όπως περιγράφεται από τη STRATAGENE. Ανάλογα με τον πλασμιδιακό φορέα που χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό των βακτηρίων, έγινε και η προσθήκη των απαιτούμενων αντιβιοτικών, αμπικιλίνη 100μg/ml ή/και τετρακυκλίνη 10μg/ml.

7.2. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΗΛΕΚΤΡΟΣΟΚ (electrocompetent)

Καλλιέργεια 3ml εμβολιάζεται με αποικία κυττάρων *E.coli* στελέχους DH₁₀B και αφήνεται να αναπτυχθεί για ~16 ώρες στους 37⁰ C σε θρεπτικό μέσο LB. Την επόμενη ημέρα εμβολιάζονται 200ml θρεπτικού LB* με 2ml καλλιέργειας DH₁₀B κυττάρων και επωάζονται στους 37⁰C έως ότου η οπτική πυκνότητα των κυττάρων να είναι 0,6. Ακολουθεί:

1. Επώαση των κυττάρων στον πάγο για 15'
2. Φυγοκέντρηση στις 4000 rpm στους 4⁰ C για 15'
3. Επαναδιάλυση πελέτας σε ίσο όγκο κρύου nanopure νερού
4. Φυγοκέντρηση στις 4000 rpm στους 4⁰ C για 15'
5. Επαναδιάλυση πελέτας σε 1/2 όγκο κρύου nanopure νερού
6. Φυγοκέντρηση στις 4000rpm στους 4⁰ C για 15'
7. Επαναδιάλυση πελέτας σε 1/4 όγκου κρύου nanopure νερού

8. Φυγοκέντρωση στις 4000 rpm στους 4⁰ C για 15'
9. Επαναδιάλυση πελέτας σε 1/10 όγκο κρύου nanopure νερού
10. Φυγοκέντρωση στις 3500 rpm στους 4⁰ C για 15'
11. Επαναδιάλυση σε ~1ml κρύου δ/τος γλυκερόλης 10% v/v
12. Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται αμέσως ή φυλάσσονται σε aliquots των 80μl στους -80 °C.

Όλες οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιούνται στον πάγο χρησιμοποιώντας πάντα κρύες πιπέτες, falcons, και tips. Για το μετασχηματισμό των κυττάρων, προστίθενται 1-2μl της αντίδρασης λιγάσης, και στη συνέχεια τα κύτταρα τοποθετούνται σε ειδική κρύα κυψελίδα για να γίνει η ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) (2000 V για 5msec). Ακολουθεί προσθήκη ~800μl θρεπτικού μέσου 2XYT στα κύτταρα και επώαση για 1 ώρα στους 37 °C. Τα κύτταρα στη συνέχεια απλώνονται σε τρυβλίο με θρεπτικό LB ή 2XYT που φέρει το κατάλληλο αντιβιοτικό.

7.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

7.3.α. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini prep), χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη μέθοδος:

1. 2-3 ml θρεπτικού μέσου με το κατάλληλο αντιβιοτικό εμβολιάζονται με μια βακτηριακή αποικία.
2. Επώαση 14-18 ώρες σε κινούμενο επωαστήρα στους 37 °C.
3. Μεταφορά 1,5 ml από την καλλιέργεια σε σωληνάρια τύπου erpendorf και φυγοκέντρωση στις 12.000 rpm για 30 sec.
4. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση της βακτηριακής πελέτας σε 100 μl κρύου διαλύματος #1 [GTE: 50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA (pH 8.0)]
5. Προσθήκη 200μl φρέσκου διαλύματος #2 (0.2N NaOH, 1% SDS)
7. Τα tubes ανακινούνται αμέσως και γρήγορα ένα-ένα. Στη συνέχεια τοποθετούνται στον πάγο για 5'.

8. Προσθήκη 150 µl κρύου διαλύματος #3 (Για 100 ml: 5M potassium acetate 60 ml, glacial acetic acid 11,5 ml, H₂O 28,5 ml), ισχυρή ανάδευση για 10 sec και τοποθέτηση στον πάγο για 5'.
9. Φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 5', στους 4 °C. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται σε νέα σωληνάρια.
10. Προσθήκη σε κάθε δείγμα ίσου όγκου δ/τος φαινόλης:χλωροφορμίου, 1:1 και φυγοκέντρωση στις 12.000 rpm για 3'. Η υπερκείμενη υγρή φάση μεταφέρεται σε νέα erppendorf σωληνάρια.
11. Προσθήκη σε κάθε δείγμα διπλάσιου όγκου αιθανόλης 100%, καλή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5'.
12. Φυγοκέντρωση στις 12.000 rpm για 5' στους 4 °C.
13. Το υπέρκείμενο απομακρύνεται και τα δείγματα αφήνονται να στεγνώσουν..
14. Κάθε δείγμα επαναδιαλύεται σε 60 µl H₂O και προστίθεται και 1µl RNase (10µg/µl).

7.3.β. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία ή μεγάλη κλίμακα

Χρησιμοποιήθηκαν τα kit της QIAGEN και της Nucleobond (Macherey Nagel) για απομόνωση νουκλεϊκών οξέων σε μεσαία, ή μεγάλη κλίμακα, σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστριών εταιριών.

7.4. ΠΕΨΗ ΜΟΡΙΩΝ DNA ΜΕ ENZYMA ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από τις εταιρείες Promega, Minotech και New England Biolabs και οι πέψεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρείας και με βάση τα πρωτόκολλα που περιγράφονται από τους Sambrook et al, 1989.

7.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η απομόνωση του DNA έγινε με τη μέθοδο της ηλεκτροέκλουσης σε μεμβράνες μικρο-διαπίδυσης και ο καθαρισμός με κολώνα QIAGEN.

Μετά την ηλεκτροφόρηση του DNA σε παρασκευαστικό gel αγαρόζης πυκνότητας 0,8% - 2% απομονώνεται η επιθυμητή ζώνη και τοποθετείται σε

μεμβράνη μικρο-διαπίδυσης με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (TAE). Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση και στη συνέχεια αλλαγή της πολικότητας του ηλεκτρικού πεδίου για 30 sec ώστε να απομακρυνθεί από τη μεμβράνη το DNA που πιθανόν έχει κολλήσει. Το υγρό μεταφέρεται από τη μεμβράνη σε στήλες της QIAGEN, ειδικές για την απομόνωση του DNA, και ακολουθούνται οι οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

7.6. ΣΥΝΔΕΣΗ ΜΟΡΙΩΝ DNA (ligation)

Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω μέθοδοι ανάλογα με το είδος των άκρων (προεξέχοντα ή τυφλά) και το είδος των μορίων που επρόκειτο να συνδεθούν :

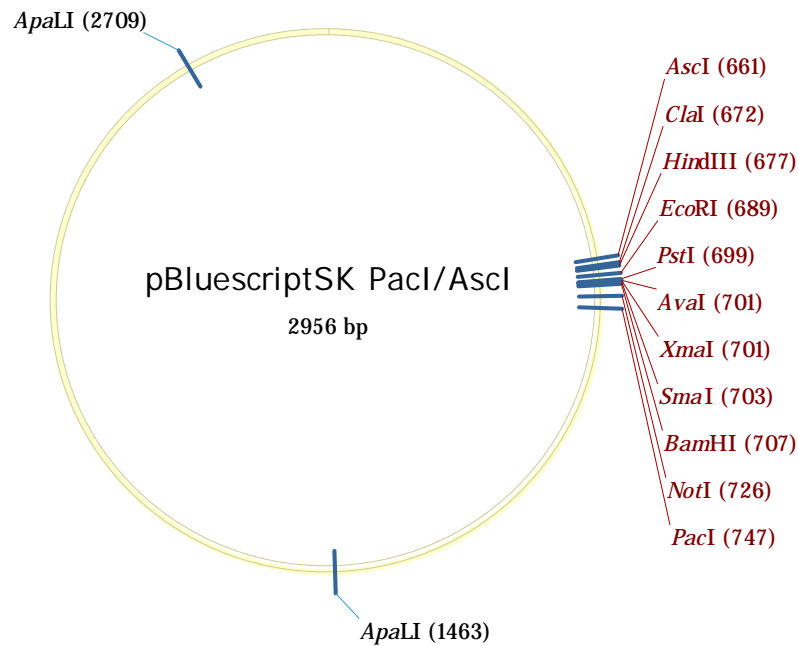
- α. Δημιουργία ανασυνδυσμένων πλασμιδίων με συμβατά άκρα. Σε αυτές τις περιπτώσεις η αναλογία μορίων φορέα (vector) : αναλογία μορίων ενθέματος (insert) ήταν 1:5 έως 1:10. Η συνολική ποσότητα του DNA δεν ξεπερνούσε τα 150-200 ng και η συγκέντρωση της λιγάσης 1u Weiss για κάθε αντίδραση.
- β. Δημιουργία ανασυνδυσμένων πλασμιδίων με τυφλά άκρα. Διατηρούνται οι μοριακές αναλογίες όπως και στην προηγούμενη περίπτωση με εξαίρεση το ποσό της λιγάσης που μπορεί να αυξηθεί 2 έως 3 φορές.

Για όλες τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε ένζυμο (T4 DNA ligase) της New England Biolabs σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας

8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΖΩΩΝ

8α. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία όλων των διαγονιδιακών κατασκευών, απεικονίζεται στο χάρτη 1. Πρόκειται για ένα φορέα pBluescriptSK, στον οποίο έχουν τροποποιηθεί οι περιοριστικές θέσεις για την κλωνοποίηση (multiple cloning site) (από N. Kessar, Wolfson Institute, UCL, UK).



8α.1 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΓΙΑ ΤΑ *Tag1*^{(Tg)Cre} ΖΩΑ

Τα τμήματα για τη δημιουργία της πλασμιδιακής κατασκευής απομονώθηκαν ξεχωριστά σε 4 στάδια, πριν ενωθούν για να προκύψει το τελικό πλασμίδιο.

Στάδιο 1. Περιοχή ομολογίας ανοδικά του 2^{ου} εξονίου του γονιδίου της TAG1 (5' HOM)

Η περιοχή αυτή απομονώθηκε από γενωμικό υλικό μυών αγρίου τύπου, με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Στα άκρα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση, σχεδιάστηκαν θέσεις περιορισμού AscI (στο 5' άκρο της περιοχής) και NcoI (στο 3' άκρο της περιοχής). Οι εκκινητές είναι οι ακόλουθοι:

- 5'HOM For AscI: 5'-ttggcgcgccaagcccctccctccc-3'
- 3'HOM Rev NcoI: 5'-atgccatggtgggtgttcaggcaa-3'

Το προϊόν της αντίδρασης έχει μέγεθος 231 bp και αντιστοιχεί στην αλληλουχία 9565-9796 bp του γονιδίου της TAG1 (Ensemble). Μετά την αντίδραση, το προϊόν απομονώθηκε και αλληλουχίστηκε για επιβεβαίωση της σωστής αλληλουχίας του, ενώ

στη συνέχεια κόπηκε με τα περιοριστικά ένζυμα AscI και NcoI, προκειμένου να έχει τα κατάλληλα άκρα για κλωνοποίηση.

Στάδιο 2. Περιοχή ομολογίας καθοδικά του 2^{ου} εξονίου του γονιδίου της TAG1 (3'HOM)

Χρησιμοποιήθηκε PCR για κλωνοποίηση της συγκεκριμένης περιοχής από γενωμικό υλικό μυών αγρίου τύπου. Στα άκρα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση, σχεδιάστηκαν θέσεις περιορισμού SpeI (στο 5' άκρο της περιοχής) και PacI (στο 3' άκρο της περιοχής). Οι εκκινητές είναι οι ακόλουθοι (οι περιοριστικές θέσεις φαίνονται υπογραμμισμένες):

- 3'HOM For SpeI: 5'-gactagtaagagcagctgattata-3'
- 3'HOM Rev PacI: 5'-ccttaattaatcacatcttagctcagg-3'

Το προϊόν της αντίδρασης έχει μήκος 309 bp και αντιστοιχεί στην αλληλουχία 9861-10159 bp του γονιδίου της TAG1 (Ensemble), ενώ μετά την απομόνωσή του ελέγχθηκε με αλληλούχιση και κόπηκε με ένζυμα SpeI και PacI.

Στάδιο 3. Γονίδιο της Cre-recombinase

Το γονίδιο της Cre-ρεκομπινάσης, απομονώθηκε με πέψεις περιορισμού, από πλασμιδιακό φορέα TOPO (Invitrogen) στον οποίο ήταν κλωνοποιημένο (από N.Kessarlis, Wolfson Institute, UCL, UK). Η απομόνωση έγινε με ένζυμα 5'-NcoI-EcoRI 3' και το μέγεθος του προϊόντος είναι 1069 bp. Η αλληλουχία ελέγχθηκε με αλληλούχιση πριν την κλωνοποίηση.

Στάδιο 4. Κασέτα ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη με αλληλουχίες τερματισμού της μετάφρασης (polyA-frt-Kanamycin-frt)

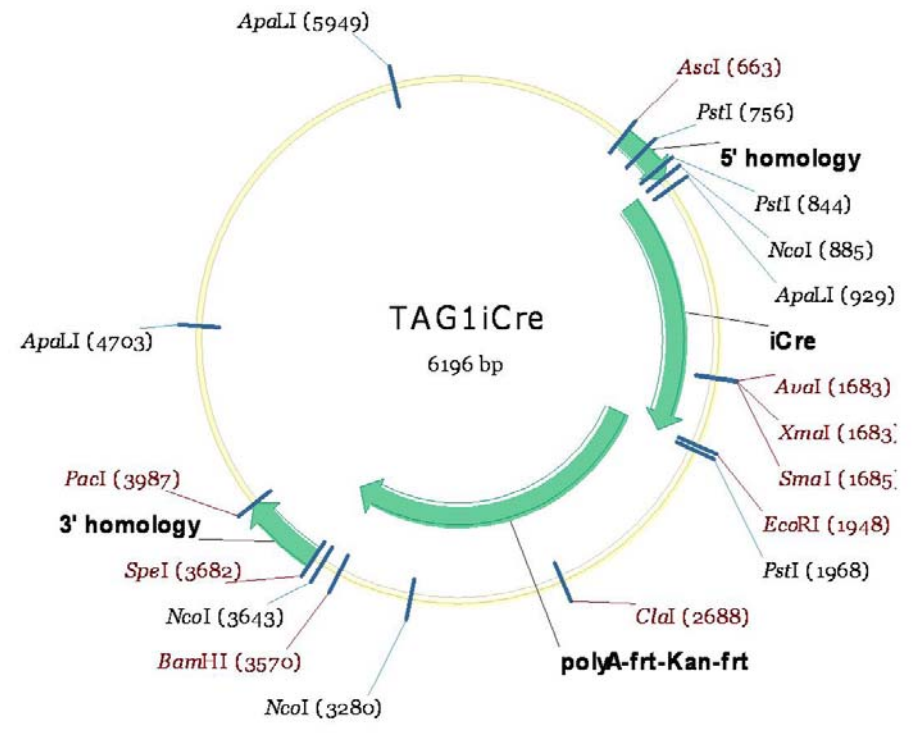
Η κασέτα απομονώθηκε από φορέα TOPO (Invitrogen) (από N.Kessarlis, Wolfson Institute, UCL, UK), με περιοριστικά ένζυμα EcoRI (5' άκρο) και SpeI (3' άκρο). Το μέγεθος του προϊόντος είναι 1740 bp και αλληλουχίστηκε αφού απομονώθηκε, προκειμένου να είναι έτοιμο για κλωνοποίηση.

Στάδιο 5. Τελική πλασμιδιακή κατασκευή για *Tag1^{(Tg)Cre}*

Όλα τα τμήματα που απομονώθηκαν στα στάδια 1, 2, 3, 4, κλωνοποιήθηκαν ταυτόχρονα στο φορέα pBluescript PacI/AscI, ο οποίος κόπηκε με ένζυμα

περιορισμού PacI και AscI. Η κατασκευή που προέκυψε, έχει μέγεθος 6196 bp και απεικονίζεται στο χάρτη 2.

Χάρτης 2



Στη συνέχεια, η τελική πλασμιδιακή κατασκευή χρησιμοποιήθηκε για ομόλογο ανασυνδυασμό μέσα σε κλώνο BAC, όπως περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

8α.2 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΚΕΥΣΗ ΓΙΑ ΤΑ *Tag1*^{loxP-GFP-loxP-DTA} ΖΩΑ

Τα τμήματα για τη δημιουργία της πλασμιδιακής κατασκευής απομονώθηκαν ξεχωριστά, πριν ενωθούν για να προκύψει το τελικό πλασμίδιο.

Στάδιο 1. Περιοχή ομολογίας ανοδικά του 2^{ου} εξονίου του γονιδίου της TAG1 με loxP θέση ανασυνδυασμού στο 3' άκρο της (5'HOM-loxPsite)

Για την απομόνωση της ομόλογης αυτής περιοχής, εφαρμόστηκε PCR σε γενωμικό DNA από μύες αγρίου τύπου. Προκειμένου το προϊόν να φέρει στο 3' άκρο θέση για loxP ανασυνδυασμό, η αλληλουχία loxP σχεδιάστηκε στον 3' εκκινήτη που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση. Μια θέση περιορισμού BglII χωρίζει την αλληλουχία loxP από την αλληλουχία ομολογίας.

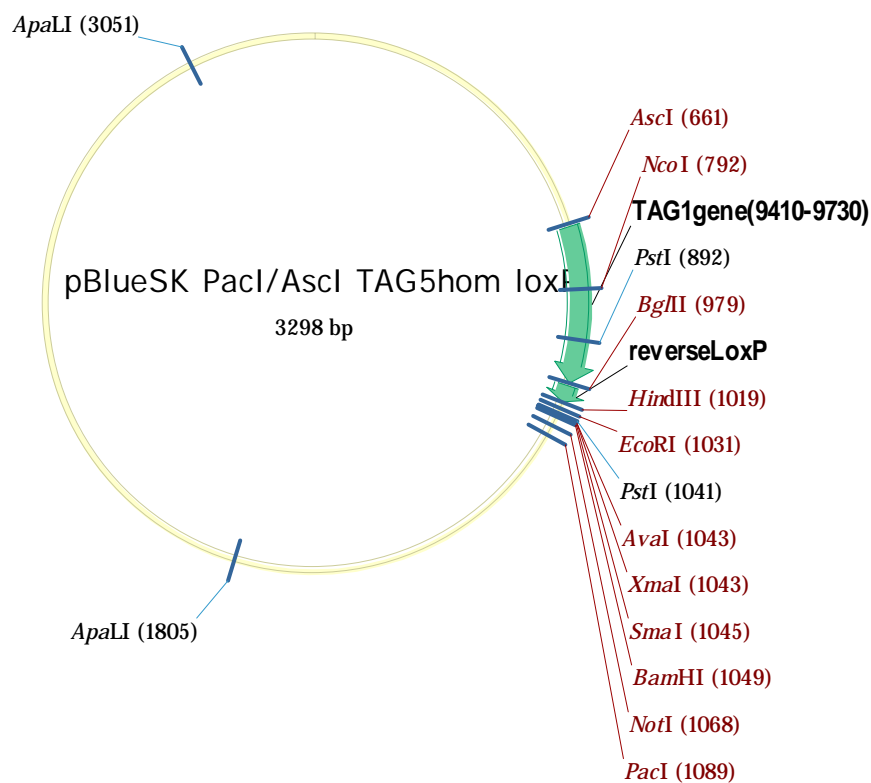
Επιπλέον, οι εκκινητές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να φέρουν στα άκρα τους θέσεις για περιοριστικές ενδονουκλεάσες, ώστε να μπορεί η περιοχή 5'ΗΟΜ να κλωνοποιηθεί. Χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες για AscI για το 5' άκρο και HindIII για το 3' άκρο του προϊόντος. Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν είναι οι ακόλουθοι (οι περιοριστικές θέσεις, φαίνονται υπογραμμισμένες και η αλληλουχία loxP με έντονους χαρακτήρες):

- TAG5'AscF1: 5'-ggcgcgcccttgctgccaattagttccgc-3'
- TAG5'BglLOXR1R1: 5'-

aagcttataacttcgtataatgtatgctatacgaagttatagatctcagcccagctccaggagagtcaactgg-3'

Το προϊόν της αντίδρασης έχει μήκος 365 bp και η ομολογία αντιστοιχεί στην αλληλουχία 9410-9730 bp του ενδογενούς γονιδίου της TAG1 (Ensemble). Αφού απομονώθηκε, το τμήμα αυτό αλληλουχίστηκε, κόπηκε με περιοριστικά ένζυμα AscI (5' άκρο) και HindIII (3' άκρο) και κλωνοποιήθηκε σε φορέα pBluescript PacI/AscI που είχε κοπεί με τα ίδια ένζυμα, στις θέσεις 661-1019 bp. Η κατασκευή, μεγέθους 3298 bp, φαίνεται στο χάρτη 3.

Χάρτης 3



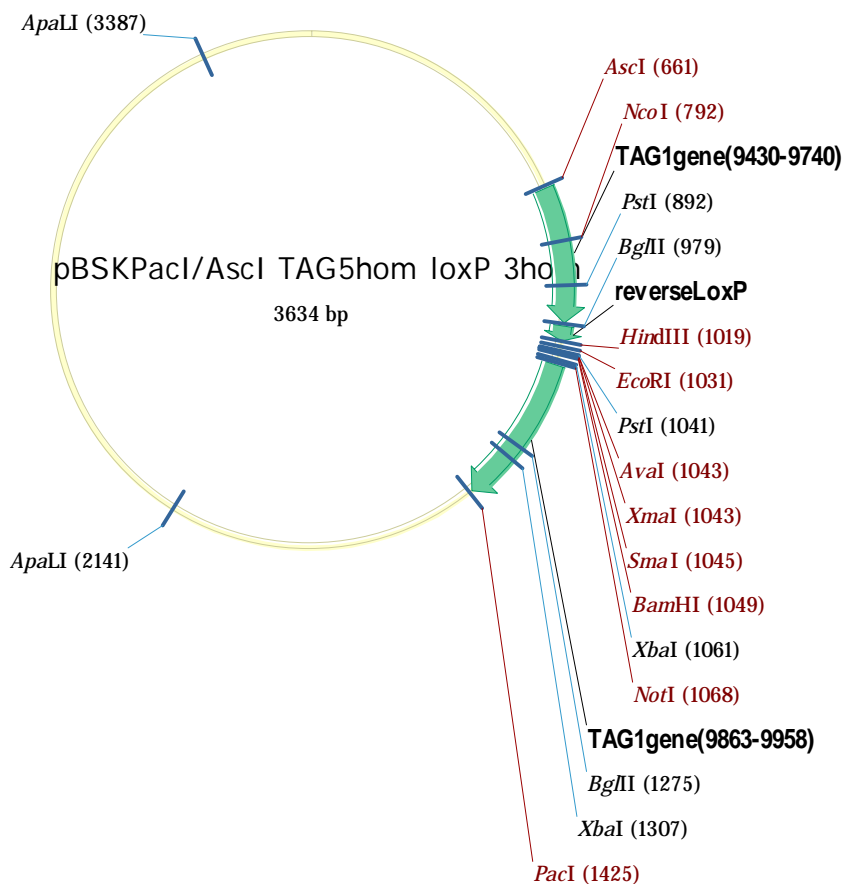
Στάδιο 2. Περιοχή ομολογίας καθοδικά του 2^ο εξονίου του γονιδίου της TAG1 (3’HOM)

Η περιοχή ομολογίας 3’HOM, απομονώθηκε με PCR σε γενωμικό DNA από μύες αγρίου τύπου. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να φέρουν περιοριστικές θέσεις στα άκρα τους, προκειμένου να μπορεί το συγκεκριμένο τμήμα DNA να κλωνοποιηθεί στην κατασκευή του σταδίου 1. Χρησιμοποιήθηκαν θέσεις NotI για το 5’ άκρο της περιοχής και PacI για το 3’ άκρο της περιοχής. Οι εκκινητές είναι οι ακόλουθοι (οι περιοριστικές θέσεις υπογραμμίζονται):

- TAG3’NotF1: 5’-gcgggccgcaagagcagctgattataggg-3’
- TAG3’PacR1: 5’-ttaaattaaagagcactgacatgtggcg-3’

Το προϊόν της αντίδρασης έχει μέγεθος 362 bp και είναι ομόλογο με την αλληλουχία 9863-9958 bp του ενδογενούς γονιδίου της TAG1 (Ensemble). Αφού απομονώθηκε, και ελέγχθηκε με αλληλούχιση, κόπηκε με περιοριστικά ένζυμα NotI και PacI και κλωνοποιήθηκε στην κατασκευή του σταδίου 1, που είχε κοπεί με τα ίδια ένζυμα, στις θέσεις 1065-1425 bp. Το πλασμίδιο που προέκυψε, μεγέθους 3634 bp, απεικονίζεται στο χάρτη 4.

Χάρτης 4



Στάδιο 3. Γονίδιο eGFP (enhanced GFP) με αλληλουχίες polyA για τερματισμό της μετάφρασης και αλληλουχία του 2^{ου} εξονίου του γονιδίου της TAG1, ανοδικά του GFP

Το συγκεκριμένο τμήμα DNA απομονώθηκε από πλασμιδιακή κατασκευή (από N. Kessar, Wolfson Institute, UCL, UK), με τη μέθοδο της PCR. Λόγω του ότι η GFP βρίσκεται καθοδικά της αλληλουχίας loxP και για να μην επηρεαστεί το γονίδιο της από τυχόν λάθη κατά τον ανασυνδυασμό, ανάμεσα στον loxP τόπο και στο ATG του γονιδίου, εισήχθη τμήμα γενωμικού DNA που αντιστοιχεί στην αλληλουχία μεταξύ του 2^{ου} εξονίου στο γονίδιο της TAG1, πριν το ATG (9741-9785 bp). Αυτό πραγματοποιήθηκε με εισαγωγή της αλληλουχίας αυτής στον 5' εκκινήτη που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση της GFP. Στους εκκινήτες επίσης προστέθηκαν περιοριστικές θέσεις κατάλληλες για την κλωνοποίηση του προϊόντος (HindIII στο 5' άκρο του προϊόντος και XbaI στο 3' άκρο του προϊόντος). Υπάρχει μια επιπλέον περιοριστική θέση NcoI που περιλαμβάνει το ATG του γονιδίου της GFP.

Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν, είναι οι ακόλουθοι (φαίνονται υπογραμμισμένες οι περιοριστικές θέσεις και με έντονους χαρακτήρες η αλληλουχία μεταξύ ιντρονίου και εξονίου 2 του ενδογενούς γονιδίου της TAG1) :

- H3TAGNcoeGFPF1: 5'-
aagcttcagctcctctctcttggactctgcctttgcctgaaacacccaccatggtgagcaagggcgaggagc-3'
- eGFPXbaR1: 5'-tctagattactgtacagctcgatcccg-3'

Το προϊόν της PCR έχει μέγεθος 776bp και αφού ελέγχθηκε με αλληλούχιση, κόπηκε με τα περιοριστικά ένζυμα HindIII και XbaI και κλωνοποιήθηκε στις θέσεις 1019-1061 της κατασκευής που απεικονίζεται στο χάρτη 4. Για την κλωνοποίηση, η κατασκευή κόπηκε με HindIII και μερικώς με XbaI (partial digest), καθώς υπήρχε άλλη μια XbaI θέση στη θέση 1307. Το τελικό πλασμίδιο έχει μέγεθος 4875 bp και απεικονίζεται στο χάρτη 5.

Στάδιο 4. Δημιουργία ενθέματος loxP με αλληλουχία του 2^{ου} εξονίου του γονιδίου της TAG1 καθοδικά του loxP

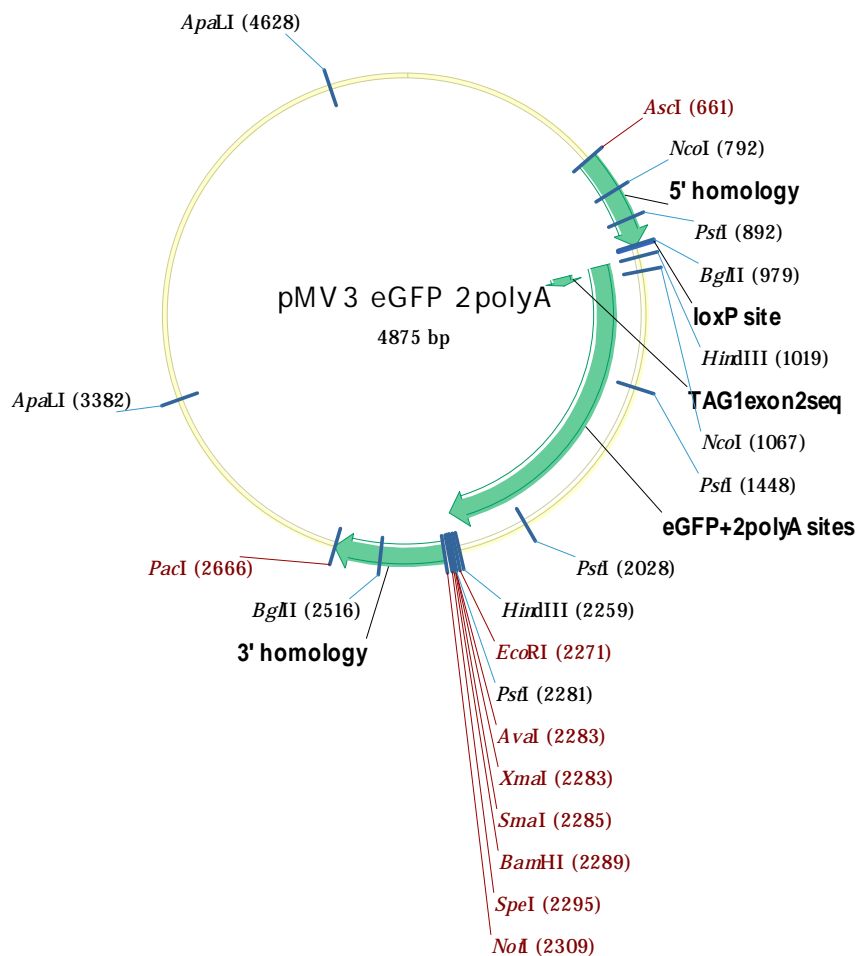
Για τη δημιουργία του συγκεκριμένου ενθέματος, σχεδιάστηκαν εκκινήτες κατάλληλοι για την κλωνοποίησή του με PCR, από την κατασκευή που απεικονίζεται στο χάρτη 5. Στο ανοδικό άκρο του εκκινήτη 5' σχεδιάστηκε θέση περιορισμού SpeI

(φαίνεται υπογραμμισμένη στην αλληλουχία), ώστε το προϊόν να μπορεί να κοπεί και να κλωνοποιηθεί αργότερα, ενώ ο εκκινητής 3' σχεδιάστηκε για να προσδεθεί μέσα στην αλληλουχία του γονιδίου της GFP. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθοι:

- SpeLOXF1: 5'-actagtataacttcgtatagcatac-3'
- GFPR1: 5'-ggccgtttacgtcgcctcc-3'

Το προϊόν της PCR έχει μέγεθος 157 bp και ελέγχθηκε με αλληλούχηση.

Χάρτης 5



Στάδιο 5. Δημιουργία ενθέματος loxP_exon2seq_DTA

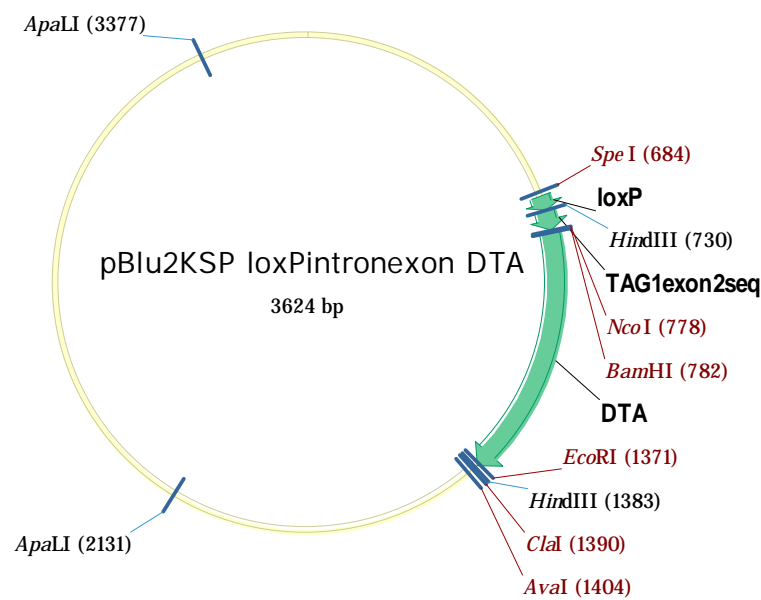
Το γονίδιο του DTA για τη δημιουργία του συγκεκριμένου ενθέματος, κλωνοποιήθηκε με PCR από πλασμιακή κατασκευή (από N. Kessar, Wolfson Institute, UCL, UK). Στον εκκινητή 5' σχεδιάστηκε θέση περιορισμού NcoI, στην οποία συμπεριλαμβάνεται το ATG του γονιδίου του DTA, ενώ στον εκκινητή 3', σχεδιάστηκε περιοριστική θέση EcoRI, προκειμένου να μπορεί να κοπεί το τμήμα

αυτό και να κλωνοποιηθεί σε παρακάτω στάδια. Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθοι (οι περιοριστικές θέσεις είναι υπογραμμισμένη):

- SpeLOXBAMTAGNcoF1: 5'-ccatggatcctgatgatgtgttg-3'
- DTARIR1: 5'-gaattctcaaaagatgcctgacacg-3'

Το προϊόν της αντίδρασης έχει μέγεθος 599 bp και αφού ελέγχθηκε με αλληλούχιση, κόπηκε με άκρα NcoI (5')-EcoRI (3'). Αντίστοιχα, το ένθεμα του σταδίου 4, κόπηκε με άκρα SpeI (5')-NcoI (3') και στη συνέχεια τα δύο ενθέματα, κλωνοποιήθηκαν ταυτόχρονα σε φορέα pBluescriptKSP, ο οποίος κόπηκε με ενδονουκλεάσες SpeI και EcoRI. Η πλασμιδιακή κατασκευή που προέκυψε, έχει μέγεθος 3624 bp και απεικονίζεται στο χάρτη 6.

Χάρτης 6



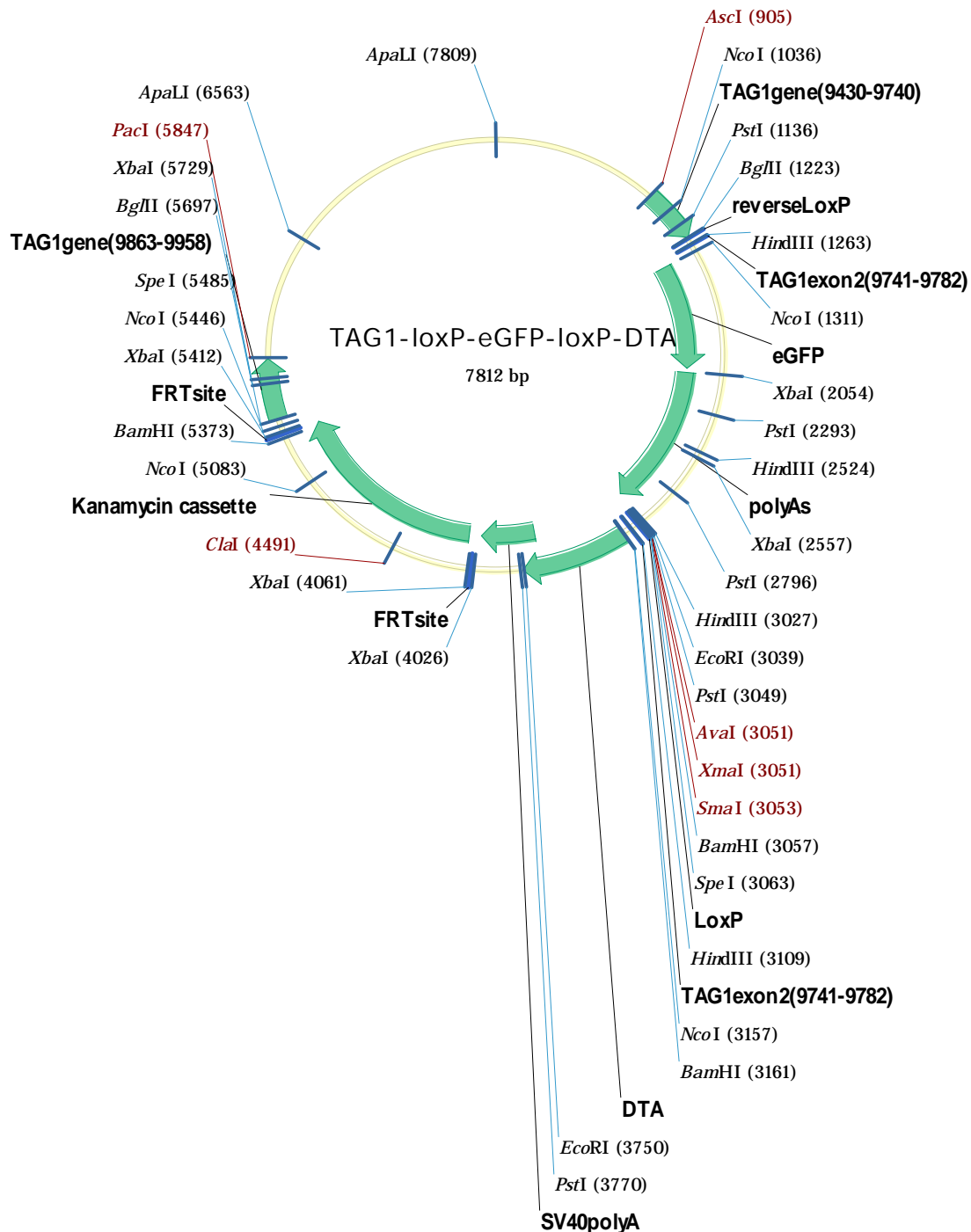
Στάδιο 6. Κασέτα ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη με αλληλουχίες τερματισμού της μετάφρασης και τόπους ανασυνδυασμού frt (polyA-frt-Kanamycin-frt)

Η κασέτα απομονώθηκε από φορέα TOPO (Invitrogen) (από N.Kessarlis, Wolfson Institute, UCL, UK), με περιοριστικά ένζυμα EcoRI (5' άκρο) και SpeI (3' άκρο). Το μέγεθος του προϊόντος είναι 1740 bp και αλληλουχίστηκε αφού απομονώθηκε, προκειμένου να είναι έτοιμο για κλωνοποίηση.

Στάδιο 7. Τελική πλασμιδιακή κατασκευή για *Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}*

Για την τελική πλασμιδιακή κατασκευή, χρησιμοποιήθηκαν το ένθεμα του σταδίου 5, κομμένο με άκρα *SpeI* (5')-*EcoRI* (3'), το ένθεμα του σταδίου 6 κομμένο με άκρα *EcoRI* (5')-*SpeI* (3') και η πλασμιδιακή κατασκευή του σταδίου 3, κομμένη με *SpeI*. Ακολούθησε η ταυτόχρονη σύνδεση των μορίων αυτών και προέκυψε πλασμιδιακή κατασκευή μεγέθους 7812 bp, όπως απεικονίζεται στο χάρτη 7.

Χάρτης 7



8β. ΕΥΡΕΣΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΚΛΩΝΩΝ BAC (Bacterial Artificial Chromosome)

1. Από την ιστοσελίδα της Ensemble CytoView, εντοπίστηκαν κλώνοι BAC που φέρουν το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TAG1 περίπου στη μέση του κλώνου. Συγκεκριμένα, 3 κλώνοι βρέθηκαν να φέρουν το γονίδιο ενδιαφέροντος στην κατάλληλη θέση: α. RP23-28B19, β. RP23-216D10 και γ. RP23-21E15
2. Στη συνέχεια οι κλώνοι παραγγέλθηκαν στην ακόλουθη ηλεκτρονική διεύθυνση: http://www.hgmp.mrc.ac.uk/geneservice/reagents/products/descriptions/mouse_pac_ordering.shtml

Γενικός χειρισμός των κλώνων BAC

Προκειμένου να ελεγχθούν οι κλώνοι και να επιλεγεί ο καταλληλότερος, ακολουθούνται τα παρακάτω στάδια:

1. Οι κλώνοι BAC καλλιεργούνται σε τρυβλία με LB-άγαρ και 12.5μg/ml χλωραμφαινικόλης, για 18 ώρες στους 37°C.
2. Μεμονωμένες αποικίες επιλέγονται και καλλιεργούνται σε μικρό όγκο με βάση το αντίστοιχο πρωτόκολλο (βλ. παρακάτω)
3. Από τις μικρές καλλιέργειες, εμβολιάζονται 500ml LB με χλωραμφαινικόλη 12.5μg/ml για απομόνωση BAC DNA σε μεγάλη κλίμακα (maxi-prep, βλ. παρακάτω).
4. Το DNA επαναδιαλύεται σε TE με χρήση πιπέτας με κομμένο tip, για 12-18 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 4°C, όπου και φυλάσσεται (λόγω του μεγάλου μεγέθους των BAC, δε συνιστάται η αποθήκευσή τους στους -20°C).
5. Για το χαρακτηρισμό των κλώνων ως προς το συνολικό μέγεθος και την ακριβή θέση του γονιδίου ενδιαφέροντος μέσα στον κάθε BAC κλώνο, πραγματοποιείται ανάλυση με ένζυμα περιορισμού (οι πέψεις πραγματοποιούνται χρησιμοποιώντας 1-2μl BAC DNA από MaxiPrep, για 6-18 ώρες και ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε 0.5x TBE, με εφαρμογή παλλόμενου πεδίου).

8β.1 Απομόνωση BAC DNA σε μικρή κλίμακα (minipreps)

Ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

1. Εμβολιάζονται 5ml θρεπτικού LB, με προσθήκη 15μg/ml χλωραμφαινικόλης, για 18 ώρες στους 32°C υπό ανάδευση.

2. Μεταφορά 1.5ml από την καλλιέργεια σε eppendorfs
3. Φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα (~14000rpm) για 1'
4. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και μεταφορά 1.5 ml καλλιέργειας στο ίδιο eppendorf
5. Φυγοκέντρηση σε μέγιστες στροφές, για 1'.
6. Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
7. Προσθήκη 100μl δ/τος I (50 mM γλυκόζης, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA (pH 8.0) και ισχυρή ανάδευση της πελέττας (vortex).
8. Προσθήκη 200μl δ/τος II (0.2N NaOH, 1% SDS) και ήπια ανάδευση του μίγματος
9. Προσθήκη 150μl δ/τος III (για 100 ml: 5M potassium acetate 60 ml, glacial acetic acid 11.5 ml, H₂O 28.5 ml) και ήπια ανάδευση.
10. Φυγοκέντρηση σε μέγιστες στροφές για 10'.
11. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα eppendorfs, με χρήση blue tip (p1000).
12. Προσθήκη 900μl κρύας αιθανόλης 100% (-20°C) και ανάδευση
13. Φυγοκέντρηση για 10' σε μέγιστη ταχύτητα και απομάκρυνση του υπερκείμενου
14. Προσθήκη 100-200μl αιθανόλης 70% στην πελέτα
15. Φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 1'
16. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναφυγοκέντρηση για 1' σε μέγιστη ταχύτητα
17. Πλήρης απομάκρυνση της αιθανόλης με yellow tip
18. Προσθήκη 40μl nanopure H₂O, ή TE στην πελέτα
19. Μεταφορά των eppendorfs στους 55°C, για 10', προκειμένου να επαναδιαλυθεί η πελέτα

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Λόγω του μεγάλου μεγέθους των BACs, υπάρχει κίνδυνος να σπάσουν αν επαναδιαλυθούν με πιπέτα. Στην περίπτωση που αυτό είναι αναγκαίο, πρέπει να χρησιμοποιούνται tips με κομμένες μύτες. Για τον ίδιο λόγο, το DNA δε φυλάσσεται στους -20, αλλά στους 4°C.

8β.2 Πέψη BAC DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Χρησιμοποιούνται tips με κομμένες μύτες, για όλες τις διεργασίες. Συνοπτικά, χρησιμοποιούνται ~10μl από το DNA που απομονώθηκε με minipreps, με 1μl περιοριστικών ενζύμων (ανεξάρτητα από την ποσότητα) στο κατάλληλο δ/μα και ~40μg/ml RNaseA και η αντίδραση πραγματοποιείται για 2 ώρες στους 37°C. Στη

συνέχεια, το DNA ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα αγαρόζης με εφαρμογή παλλόμενου πεδίου.

8β.3 Απομόνωση BAC DNA σε μεγάλη κλίμακα (maxiprep)

Ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

1. ~500μl από μια μικρή καλλιέργεια BAC, χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 400ml LB, με προσθήκη 15μg/ml χλωραμφαινικόλης. Επώαση για 16-24 ώρες στους 32°C, υπό ανάδευση.
2. Μεταφορά της καλλιέργειας σε 8 falcon tubes των 50ml
3. Φυγοκέντρηση στις 3750rpm για 10', στους 4°C
4. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση της πελέτας σε 8ml δ/τος P1 (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA (pH 8.0)) με 100μg/ml RNaseA. Η επαναδιάλυση γίνεται με πιπέτα των 10ml.
5. Προσθήκη 8ml φρέσκου δ/τος P2 (0.2N NaOH, 1% SDS) και ήπια ανάδευση. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5' (maximum)
6. Προσθήκη σε κάθε tube 8ml δ/τος P3 (100 ml: 5M potassium acetate 60 ml, glacial acetic acid 11.5 ml, H₂O 28.5 ml) και άμεση ανάδευση του περιεχομένου, μέχρις ότου το δ/μα P2 να γίνει λευκό. Επώαση στον πάγο για 20'-1 ώρα.
7. Φυγοκέντρηση στις 3750rpm για 15', στους 4°C
8. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο falcon tube, μέσα από αποστειρωμένη μουσελίνα για φιλτράρισμα. Αν το φιλτραρισμένο υγρό δεν είναι διαυγές, αλλά έχει υπολείμματα πελέτας, τότε επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση και το φιλτράρισμα.
9. Προσθήκη στο φιλτραρισμένο υπερκείμενο ίσου όγκου (~24ml) ισοπροπανόλης και ανάδευση για την ανάμιξη του περιεχομένου. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, για 5'.
10. Φυγοκέντρηση στις 3750rpm για 15', στους 4°C
11. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και πλύση της πελέτας με 70% αιθανόλη σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Φυγοκέντρηση στις 3750rpm για 15', στους 4°C
13. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση της πελέτας σε κάθε falcon, σε 250μl TE, ή nanopure H₂O, με χρήση yellow tips με κομμένες μύτες

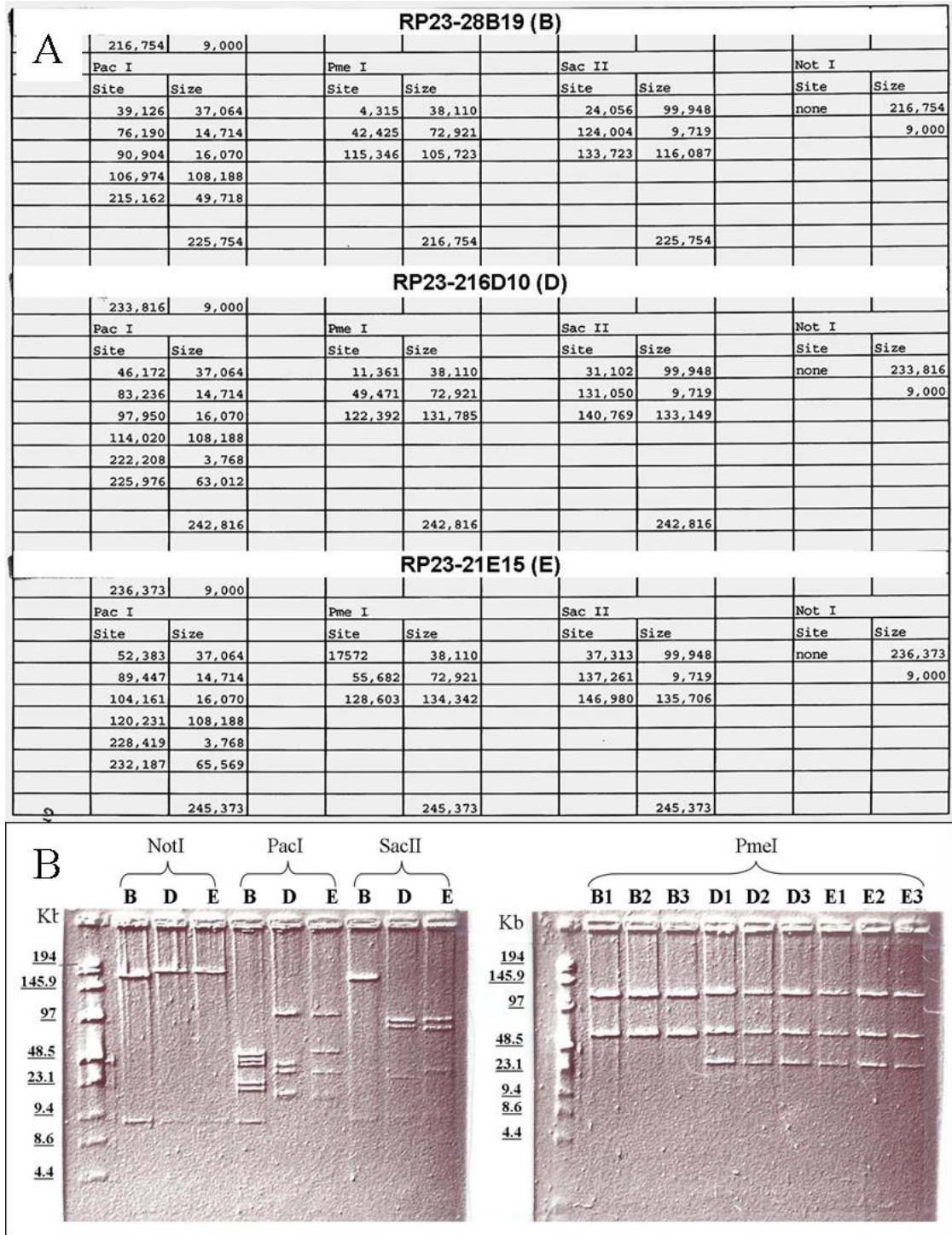
14. Οι πελέτες από όλα τα falcons μεταφέρονται σε 4 erpendorfs του 1.5ml (500μl σε κάθε ένα)
15. Ακολουθεί καθαρισμός με φαινόλη-χλωροφόρμιο, όπως στο πρωτόκολλο 7.3.α.
ΠΡΟΣΟΧΗ: Για όλα τα στάδια χρησιμοποιούνται tips με κομμένες μύτες για τη μεταφορά του BAC DNA
16. Μετά το τέλος του καθαρισμού, το DNA από τα 4 erpendorfs αναμιγνύεται σε ένα και ξαναμοιράζεται σε 4, προκειμένου όλα να έχουν όμοια ποσότητα υλικού.
17. Προσθήκη 100% κρύας αιθανόλης (-20°C) διπλάσιου όγκου (~1ml) και ανάμιξη των φάσεων. Στο στάδιο αυτό τα 2 από τα 4 erpendorfs αποθηκεύονται στους 4°C για μελλοντική χρήση
18. Φυγοκέντρηση των άλλων 2 erpendorfs στις 13200rpm για 10', στους 4°C
19. Πλύση της πελέτας με 70% αιθανόλη και φυγοκέντρηση για 5' στις 13200rpm
20. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση της πελέτας (αφού στεγνώσει) σε 200μl nanopure H₂O. Για βέλτιστη ποιότητα DNA, η πελέτα αφήνεται για 0.5-1 ώρα στους 55°C και στη συνέχεια 16-18 ώρες στους 4°C για να επαναδιαλυθεί. Μετά την επαναδιάλυση το περιεχόμενο από τα δύο erpendorfs μπορεί να μεταφερθεί σε ένα.

8β.4 Επιλογή των κατάλληλων κλώνων BAC

Οι κλώνοι BAC κόπηκαν με ενδονουκλεάση NotI, προκειμένου να διαχωριστεί ο φορέας από το ένθεμα και με ενδονουκλεάσες PacI, PmeI, SacII, που επελέγησαν βάσει υπολογιστικών προγραμμάτων για το πρότυπο τμημάτων DNA που δίνουν μετά από τις πέψεις (Εικ. 1A). Ακολούθως, τα προϊόντα των πέψεων αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης σε παλλόμενο πεδίο και επελέγη έτσι ο κλώνος που έδωσε το αναμενόμενο πρότυπο περιοριστικών τμημάτων (Εικ. 1B).

8β.5 Εισαγωγή BAC DNA σε βακτηριακά κύτταρα με ηλεκτροδιάτρηση

Η εισαγωγή του BAC DNA γίνεται σε βακτήρια EL250 με ηλεκτροδιάτρηση. Όλα τα στάδια πραγματοποιούνται στον πάγο. Συνοπτικά, χρησιμοποιούνται κυβέτες (0.1cm), μέσα στις οποίες τοποθετούνται ~40μl βακτηριακών κυττάρων (electrocompetent EL250) και 1-2μl BAC DNA από maxiprep (ή 5-10μl από miniprep). Στη συνέχεια οι κυβέτες τοποθετούνται σε συσκευή BioRad (1.8kV, 25μF, 200Ohms), όπου ακολουθεί ηλεκτροδιάτρηση για 5msec (1.8kV, 25μF, 200Ohms).



Εικόνα 1. Επιλογή των κλώνων BAC. Η επιλογή πραγματοποιήθηκε με χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων για την πρόβλεψη των περιοριστικών τμημάτων κάθε κλώνου (A). Στη συνέχεια οι κλώνοι κόπηκαν με τα αντίστοιχα περιοριστικά ένζυμα, προκειμένου να διαπιστωθεί αν το πρότυπο είναι το αναμενόμενο (B). Ο κλώνος RP23-21E15 (E), είναι αυτός που επιλέχθηκε τελικά.

Τα κύτταρα μεταφέρονται στη συνέχεια σε θρεπτικό υλικό LB και επωάζονται στους 32°C, υπό ανάδευση, για 1.5-2 ώρες πριν απλωθούν σε τρυβλία με το απαραίτητο αντιβιοτικό (χλωραμφαινικόλη, 12.5µg/ml).

Μετά από επώαση των τρυβλίων για ~ 18 ώρες στους 32°C, επιλέγονται αποικίες για minipreps (βλ. 8β.1), προκειμένου να ελεγχθεί αν τα βακτήρια φέρουν το BAC κλώνο. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται ο αρχικός κλώνος BAC, κομμένος με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα. Ακολούθως, τα προϊόντα των πέψεων αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης σε παλλόμενο πεδίο

8γ. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ *Tag1^{(Tg)Cre}* και *Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}* ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ TAG1 ΣΤΟΝ ΚΛΩΝΟ BAC

8γ.1 Προετοιμασία των EL250 βακτηρίων που φέρουν το BAC κλώνο για ηλεκτροδιάτρηση

1. Μια σωστή mini καλλιέργεια EL250 βακτηρίων που φέρουν το BAC κλώνο επιλέγεται μετά από minipreps και 1ml αυτής χρησιμοποιείται για να εμβολιαστούν 50ml LB χωρίς προσθήκη αντιβιοτικών. Τα βακτήρια επωάζονται για 2-3 ώρες στους 32°C, έως ότου η οπτική τους πυκνότητα στα 600nm να είναι μεταξύ 0.6-0.8.
2. Από τις καλλιέργειες αυτές, απομονώνονται ξεχωριστά 2 δείγματα, όγκου 10ml και τοποθετούνται σε φλάσκες. Το ένα εξακολουθεί να μεγαλώνει υπό ανάδευση στους 32°C για 15min, ενώ το άλλο επωάζεται υπό ανάδευση στους 42°C για 15min, προκειμένου τα βακτήρια να είναι έτοιμα για επαγωγή ομόλογου ανασυνδυασμού. Οι δυο καλλιέργειες θα αναφέρονται ως «ελέγχου» και «επαγόμενη» αντίστοιχα.
3. Οι 2 καλλιέργειες μεταφέρονται σε πάγο, όπου παραμένουν για 5min υπό συνεχή ανάδευση (με το χέρι) για να κρυώσουν. ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Όλα τα βήματα που ακολουθούν πραγματοποιούνται στους 4°C
4. Τα βακτήρια μεταφέρονται σε κρύα falcons (50ml) και φυγοκεντρώνται στις 2200rpm, για 8min στους 4°C.
5. Η πελέτα κάθε καλλιέργειας επαναδιαλύεται σε 1ml αποστειρωμένου H₂O, και μεταφέρεται σε erpendorf (1.5ml), όπου φυγοκεντρείται σύντομα για 20sec. Η πλύση αυτή επαναλαμβάνεται 3 φορές.

6. Επαναδιάλυση της πελέτας σε 100μl αποστειρωμένου H₂O.

8γ.2 Εισαγωγή των πλασμιδιακών κατασκευών στα βακτήρια

1. Για την εισαγωγή τους στα βακτήρια που περιγράφονται στο 8γ.1, οι πλασμιδιακές κατασκευές *TagI*^{(Tg)Cre} και *TagI*^{loxP-GFP-loxP-DTA}, κόπηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες PacI, AscI, προκειμένου να απομονωθεί το ένθεμα και να απομακρυνθεί ο φορέας.
2. 50μl από τα βακτήρια που προκύπτουν μετά το στάδιο 6 του 8γ.1, χρησιμοποιήθηκαν μαζί με 100-300ng γραμμικού DNA (τα ενθέματα των κατασκευών *TagI*^{(Tg)Cre} και *TagI*^{loxP-GFP-loxP-DTA}), σε κυβέτες (0.1cm) για ηλεκτροδιάτρηση, όπως περιγράφεται στο 8β.5. Ακολούθως τα κύτταρα μεταφέρονται σε θρεπτικό υλικό LB (500μl) και επωάζονται στους 32°C, υπό ανάδευση, για 1.5-2 ώρες.
3. Τόσο για τα βακτήρια ελέγχου, όσο και για τα επαγόμενα, χρησιμοποιούνται τρυβλία με Χλωραμφαινικόλη και Καναμυκίνη, ξεχωριστά και σε συνδυασμό. Ακολουθεί επώαση στους 32°C, για 12-18 ώρες. ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τα βακτήρια ελέγχου δεν πρέπει να αναπτυχθούν στα τρυβλία της καναμυκίνης, καθώς δε φέρουν το ένθεμα που έχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό.
4. Για έλεγχο των βακτηρίων που μεγαλώνουν στην καναμυκίνη, επιλέγονται αποικίες και πραγματοποιούνται minipreps. Το γενετικό υλικό που απομονώνεται κόβεται με κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες για να διαπιστωθεί αν έλαβε χώρα ομόλογος ανασυνδυασμός. Τα προϊόντα των πέψεων αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης σε παλλόμενο πεδίο, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα τον αρχικό κλώνο BAC, κομμένο με τα ίδια ένζυμα περιορισμού.
5. Οι σωστές αποικίες, όπου έχει πραγματοποιηθεί ανασυνδυασμός, φυλάσσονται για να ελεγχθούν με Southern blot, αφού απομακρυνθεί η κασέτα της καναμυκίνης

8γ.3 Απομάκρυνση της κασέτας ανθεκτικότητας της καναμυκίνης

Η απομάκρυνση της κασέτας της καναμυκίνης, πραγματοποιείται μέσω fit ανασυνδυασμού, έπειτα από επαγόμενη έκφραση της αντίστοιχης ρεκομπινάσης (που υπάρχει στα EL250 βακτήρια), με L-αραβινόζη. Συνοπτικά, ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

1. 300μl από τις σωστές mini καλλιέργειες από το στάδιο 4 του 8γ.2, χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 15ml θρεπτικού LB. Τα βακτήρια επωάζονται στους 32°C, υπό ανάδευση, έως ότου αποκτήσουν οπτική πυκνότητα 0.5-0.8 στα 600nm (~3 ώρες).
2. Ακολουθεί προσθήκη L-arabinose σε τελική συγκέντρωση 0.2% και επώαση για 1ώρα στους 32°C υπό ανάδευση.
3. 1ml από την παραπάνω καλλιέργεια απομακρύνεται και χρησιμοποιείται για εμβολιασμό νέας καλλιέργειας 10ml LB, η οποία επωάζεται για 2 ώρες στους 32°C υπό ανάδευση.
4. Τα βακτήρια απλώνονται σε τρυβλία με χλωραμφαινικόλη και καναμυκίνη και επωάζονται για 18 ώρες στους 32°C. ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Αν ο ανασυνδυασμός είναι επιτυχής και η κασέτα καναμυκίνης έχει απομακρυνθεί, τότε στα τρυβλία με την καναμυκίνη δε πρέπει να αναπτυχθούν αποικίες.
5. Από τα τρυβλία χλωραμφαινικόλης επιλέγονται αποικίες για έλεγχο του DNA τους με Southern blot.

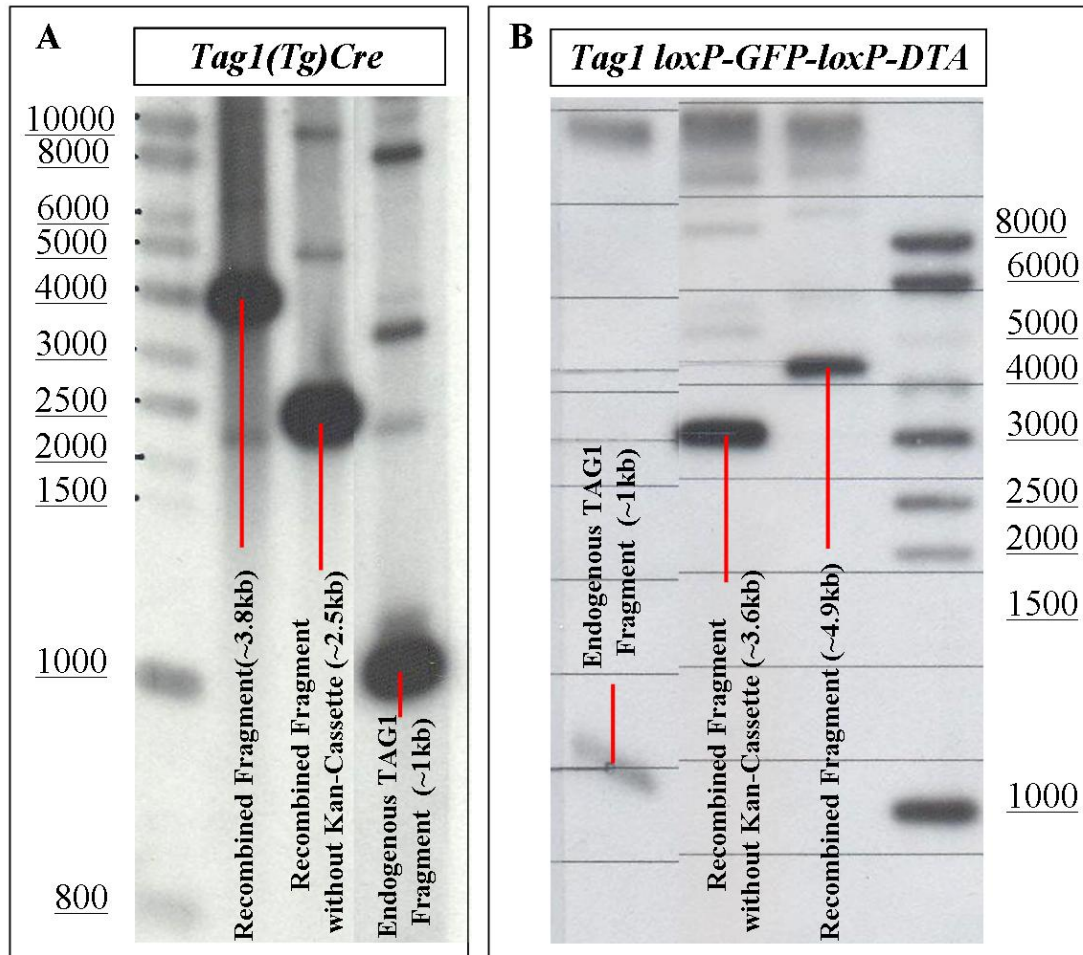
8δ. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΚΛΩΝΩΝ BAC ΚΑΤΑ SOUTHERN

Ο έλεγχος των DNA που απομονώθηκαν από τα βακτήρια πριν και μετά την απομάκρυνση της καναμυκίνης, πραγματοποιήθηκε με ανάλυση κατά Southern, όπως περιγράφεται από τους Sambrook et al., 1989. Για ανιχνευτής, χρησιμοποιήθηκε η 5' περιοχή ομολογίας με το γονίδιο της TAG1 (5'HOM, βλ. 8^α.1, στάδιο1), στην περίπτωση της κατασκευής *TagI*^{(Tg)Cre}, ενώ στην περίπτωση της κατασκευής *TagI loxP-GFP-loxP-DTA*, χρησιμοποιήθηκε η περιοχή της 3' ομολογίας με το γονίδιο της TAG1 (3'HOM, βλ. 8^α.2, στάδιο 2). Για τη ραδιοσήμανση των ανιχνευτών, χρησιμοποιήθηκε το kit της Amersham Biosciences rediprimeTMII, που στηρίζεται στη σήμανση τμημάτων DNA με την βοήθεια τυχαίων εκκινητών (random priming labelling), σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Οι πέψεις των κλώνων BAC, πραγματοποιήθηκαν με την ενδονουκλεάση SacI. (Εικ. 2).

8ε. Απομόνωση των διαγονιδίων και μικροένεση σε γονιμοποιημένα ωάρια

Η απομόνωση και ο καθαρισμός των διαγονιδίων, πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της N. Kessarlis, Wolfson Institute, UCL, UK. Οι μικροενέσεις των διαγονιδίων σε γονιμοποιημένα ωάρια για τη δημιουργία των διαγονιδιακών ζώων,

πραγματοποιήθηκαν για τα μεν $Tag1^{(Tg)Cre}$ ζώα στο Ινστιτούτο νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου, για τα δε $Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}$ στο NIMR, Mill Hill, London, UK.



Εικόνα 2. Ανάλυση των ανασυνδυασμένων γονιδίων κατά Southern. (A) Για τα διαγονιδιακά ζώα $Tag1^{(Tg)Cre}$ χρησιμοποιήθηκε η περιοχή 5' HOM, ενώ για τα ζώα $Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}$, χρησιμοποιήθηκε η 3' HOM περιοχή. Η ενδογενής περιοχή του γονιδίου της TAG1, χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας του ανιχνευτή και προήλθε από τον αρχικό BAC κλώνο.

8στ. Γονοτύπηση των γενετικά τροποποιημένων μυών

Για τη γονοτύπηση των γενετικά τροποποιημένων μυών που δημιουργήθηκαν, σχεδιάστηκαν συγκεκριμένοι εκκινητές και χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Πιο συγκεκριμένα, σχεδιάστηκαν οι ακόλουθοι εκκινητές:

Tag1^{(Tg)Cre}

- TAG-Cre for: 5'-tgagtgccttagctctacagc-3'
- TAG-Cre rev: 5'-gacacagcattggagtcaga-3'

Έπειτα από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τους παραπάνω εκκινητές, είναι δυνατή η ανίχνευση της Cre-ρεκομπινάσης, ως προϊόν μεγέθους ~550bp. Το πρόγραμμα για την αντίδραση περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

3 λεπτά στους 94°C, 31 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.

Tag1^{loxP-GFP-loxP-DTA}

- DTANcoI-F1: 5'-ccatggatcctgatgatgtgttg-3'
- DTAEcoRI-R1: 5'-gaattctcacaagatgcctgacacg-3'

Οι παραπάνω εκκινητές χρησιμοποιούνται σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και επιτρέπουν την ανίχνευση του DTA στο γονιδίωμα των ζώων, ως προϊόν μεγέθους ~599bp. Το πρόγραμμα για την αντίδραση περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

4 λεπτά στους 94°C, 32 κύκλοι από 30''στους 94°C, 45''στους 61°C και 1 λεπτό στους 72°C ακολουθούμενοι από 5 λεπτά στους 72°C. Διατήρηση της αντίδρασης στους 4°C.

Βιβλιογραφία

- Aboitiz, F., and Montiel, J. (2007). *Origin and evolution of the vertebrate telencephalon, with special reference to the mammalian neocortex. Adv Anat Embryol Cell Biol 193, 1-112.*
- Anderson, S. A., Eisenstat, D. D., Shi, L., and Rubenstein, J. L. (1997). *Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. Science 278, 474-476.*
- Anderson, S. A., Marin, O., Horn, C., Jennings, K., and Rubenstein, J. L. (2001). *Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. Development 128, 353-363.*
- Ascoli, G. A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S. A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., Buzsaki, G., Cauli, B., Defelipe, J., Fairen, A., et al. (2008). *Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. Nat Rev Neurosci 9, 557-568.*
- Ayala, R., Shu, T., and Tsai, L. H. (2007). *Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. Cell 128, 29-43.*
- Butt, S. J., Cobos, I., Golden, J., Kessar, N., Pachnis, V., and Anderson, S. (2007). *Transcriptional regulation of cortical interneuron development. J Neurosci 27, 11847-11850.*
- Butt, S. J., Fuccillo, M., Nery, S., Noctor, S., Kriegstein, A., Corbin, J. G., and Fishell, G. (2005). *The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. Neuron 48, 591-604.*
- Butt, S. J., Sousa, V. H., Fuccillo, M. V., Hjerling-Leffler, J., Miyoshi, G., Kimura, S., and Fishell, G. (2008). *The requirement of Nkx2-1 in the temporal specification of cortical interneuron subtypes. Neuron 59, 722-732.*
- Buttiglione, M., Revest, J. M., Pavlou, O., Karagogeos, D., Furley, A., Rougon, G., and Faivre-Sarrailh, C. (1998). *A functional interaction between the neuronal adhesion molecules TAG-1 and F3 modulates neurite outgrowth and fasciculation of cerebellar granule cells. J Neurosci 18, 6853-6870.*

- Caviness, V. S., Jr., and Takahashi, T. (1995). Proliferative events in the cerebral ventricular zone. *Brain Dev* 17, 159-163.
- Chatzopoulou, E., Miguez, A., Savvaki, M., Levasseur, G., Muzerelle, A., Muriel, M. P., Goureau, O., Watanabe, K., Goutebroze, L., Gaspar, P., et al. (2008). Structural requirement of TAG-1 for retinal ganglion cell axons and myelin in the mouse optic nerve. *J Neurosci* 28, 7624-7636.
- Chen, J., Magavi, S. S., and Macklis, J. D. (2004). Neurogenesis of corticospinal motor neurons extending spinal projections in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16357-16362.
- Chen, L., Liao, G., Waclaw, R. R., Burns, K. A., Linnquist, D., Campbell, K., Zheng, Y., and Kuan, C. Y. (2007). *Rac1* controls the formation of midline commissures and the competency of tangential migration in ventral telencephalic neurons. *J Neurosci* 27, 3884-3893.
- Chen, L., Melendez, J., Campbell, K., Kuan, C. Y., and Zheng, Y. (2009). *Rac1* deficiency in the forebrain results in neural progenitor reduction and microcephaly. *Dev Biol* 325, 162-170.
- Corbin, J. G., Gaiano, N., Juliano, S. L., Poluch, S., Stancik, E., and Haydar, T. F. (2008). Regulation of neural progenitor cell development in the nervous system. *J Neurochem* 106, 2272-2287.
- Corbin, J. G., Nery, S., and Fishell, G. (2001). Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain. *Nat Neurosci* 4 Suppl, 1177-1182.
- Cossart, R., Bernard, C., and Ben-Ari, Y. (2005). Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies. *Trends Neurosci* 28, 108-115.
- de Carlos, J. A., Lopez-Mascaraque, L., and Valverde, F. (1996). Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci* 16, 6146-6156.
- Denaxa, M., Chan, C. H., Schachner, M., Parnavelas, J. G., and Karagogeos, D. (2001). The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development* 128, 4635-4644.

- Denaxa, M., Kyriakopoulou, K., Theodorakis, K., Trichas, G., Vidaki, M., Takeda, Y., Watanabe, K., and Karagozeos, D. (2005). *The adhesion molecule TAG-1 is required for proper migration of the superficial migratory stream in the medulla but not of cortical interneurons. Dev Biol* 288, 87-99.
- Dent, E. W., and Gertler, F. B. (2003). *Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. Neuron* 40, 209-227.
- Dent, E. W., and Kalil, K. (2001). *Axon branching requires interactions between dynamic microtubules and actin filaments. J Neurosci* 21, 9757-9769.
- Dodd, J., and Jessell, T. M. (1988). *Axon guidance and the patterning of neuronal projections in vertebrates. Science* 242, 692-699.
- Drescher, U., Bonhoeffer, F., and Muller, B. K. (1997). *The Eph family in retinal axon guidance. Curr Opin Neurobiol* 7, 75-80.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). *Rho GTPases in cell biology. Nature* 420, 629-635.
- Fishell, G. (2007). *Perspectives on the developmental origins of cortical interneuron diversity. Novartis Found Symp* 288, 21-35; discussion 35-44, 96-28.
- Flames, N., and Marin, O. (2005). *Developmental mechanisms underlying the generation of cortical interneuron diversity. Neuron* 46, 377-381.
- Flames, N., Pla, R., Gelman, D. M., Rubenstein, J. L., Puelles, L., and Marin, O. (2007). *Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes. J Neurosci* 27, 9682-9695.
- Fogarty, M., Grist, M., Gelman, D., Marin, O., Pachnis, V., and Kessaris, N. (2007). *Spatial genetic patterning of the embryonic neuroepithelium generates GABAergic interneuron diversity in the adult cortex. J Neurosci* 27, 10935-10946.
- Fogarty, M., Richardson, W. D., and Kessaris, N. (2005). *A subset of oligodendrocytes generated from radial glia in the dorsal spinal cord. Development* 132, 1951-1959.

- Fournier, A. E., Nakamura, F., Kawamoto, S., Goshima, Y., Kalb, R. G., and Strittmatter, S. M. (2000). *Semaphorin3A enhances endocytosis at sites of receptor-F-actin colocalization during growth cone collapse. J Cell Biol 149, 411-422.*
- Fragkouli, A., Hearn, C., Errington, M., Cooke, S., Grigoriou, M., Bliss, T., Stylianopoulou, F., and Pachnis, V. (2005). *Loss of forebrain cholinergic neurons and impairment in spatial learning and memory in LHX7-deficient mice. Eur J Neurosci 21, 2923-2938.*
- Fragkouli, A., van Wijk, N. V., Lopes, R., Kessarlis, N., and Pachnis, V. (2009). *LIM homeodomain transcription factor-dependent specification of bipotential MGE progenitors into cholinergic and GABAergic striatal interneurons. Development 136, 3841-3851.*
- Fuccillo, M., Joyner, A. L., and Fishell, G. (2006). *Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. Nat Rev Neurosci 7, 772-783.*
- Fuccillo, M., Rallu, M., McMahon, A. P., and Fishell, G. (2004). *Temporal requirement for hedgehog signaling in ventral telencephalic patterning. Development 131, 5031-5040.*
- Fuchs, S., Herzog, D., Sumara, G., Buchmann-Moller, S., Civenni, G., Wu, X., Chrostek-Grashoff, A., Suter, U., Ricci, R., Relvas, J. B., et al. (2009). *Stage-specific control of neural crest stem cell proliferation by the small rho GTPases Cdc42 and Rac1. Cell Stem Cell 4, 236-247.*
- Fukamauchi, F., Aihara, O., Wang, Y. J., Akasaka, K., Takeda, Y., Horie, M., Kawano, H., Sudo, K., Asano, M., Watanabe, K., and Iwakura, Y. (2001). *TAG-1-deficient mice have marked elevation of adenosine A1 receptors in the hippocampus. Biochem Biophys Res Commun 281, 220-226.*
- Fukata, Y., Kimura, T., and Kaibuchi, K. (2002). *Axon specification in hippocampal neurons. Neurosci Res 43, 305-315.*
- Fukuda, T., Kawano, H., Ohyama, K., Li, H. P., Takeda, Y., Oohira, A., and Kawamura, K. (1997). *Immunohistochemical localization of neurocan and LI in the formation of thalamocortical pathway of developing rats. J Comp Neurol 382, 141-152.*

- Furley, A. J., Morton, S. B., Manalo, D., Karagogeos, D., Dodd, J., and Jessell, T. M. (1990). *The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity. Cell 61, 157-170.*
- Gardiner, E. M., Pestonjamas, K. N., Bohl, B. P., Chamberlain, C., Hahn, K. M., and Bokoch, G. M. (2002). *Spatial and temporal analysis of Rac activation during live neutrophil chemotaxis. Curr Biol 12, 2029-2034.*
- Glickstein, S. B., Moore, H., Slowinska, B., Racchumi, J., Suh, M., Chuhma, N., and Ross, M. E. (2007). *Selective cortical interneuron and GABA deficits in cyclin D2-null mice. Development 134, 4083-4093.*
- Gorski, J. A., Talley, T., Qiu, M., Puellas, L., Rubenstein, J. L., and Jones, K. R. (2002). *Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. J Neurosci 22, 6309-6314.*
- Govek, E. E., Newey, S. E., and Van Aelst, L. (2005). *The role of the Rho GTPases in neuronal development. Genes Dev 19, 1-49.*
- Grabham, P. W., Reznik, B., and Goldberg, D. J. (2003). *Microtubule and Rac 1-dependent F-actin in growth cones. J Cell Sci 116, 3739-3748.*
- Gressens, P. (2006). *Pathogenesis of migration disorders. Curr Opin Neurol 19, 135-140.*
- Gu, C., Rodriguez, E. R., Reimert, D. V., Shu, T., Fritsch, B., Richards, L. J., Kolodkin, A. L., and Ginty, D. D. (2003). *Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development. Dev Cell 5, 45-57.*
- Gupta, A., Tsai, L. H., and Wynshaw-Boris, A. (2002). *Life is a journey: a genetic look at neocortical development. Nat Rev Genet 3, 342-355.*
- Haataja, L., Groffen, J., and Heisterkamp, N. (1997). *Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. J Biol Chem 272, 20384-20388.*

- Hatten, M. E. (1999). *Central nervous system neuronal migration. Annu Rev Neurosci* 22, 511-539.
- Hebert, J. M., and Fishell, G. (2008). *The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required. Nat Rev Neurosci*.
- Itoh, R. E., Kurokawa, K., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Mochizuki, N., and Matsuda, M. (2002). *Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. Mol Cell Biol* 22, 6582-6591.
- Jaffe, A. B., and Hall, A. (2005). *Rho GTPases: biochemistry and biology. Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247-269.
- Jimenez, D., Lopez-Mascaraque, L. M., Valverde, F., and De Carlos, J. A. (2002). *Tangential migration in neocortical development. Dev Biol* 244, 155-169.
- Karagogeos, D., Morton, S. B., Casano, F., Dodd, J., and Jessell, T. M. (1991). *Developmental expression of the axonal glycoprotein TAG-1: differential regulation by central and peripheral neurons in vitro. Development* 112, 51-67.
- Katidou, M., Vidaki, M., Strigini, M., and Karagogeos, D. (2008). *The immunoglobulin superfamily of neuronal cell adhesion molecules: lessons from animal models and correlation with human disease. Biotechnol J* 3, 1564-1580.
- Kato, M., and Dobyns, W. B. (2005). *X-linked lissencephaly with abnormal genitalia as a tangential migration disorder causing intractable epilepsy: proposal for a new term, "interneuronopathy". J Child Neurol* 20, 392-397.
- Kawaguchi, Y., and Kondo, S. (2002). *Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. J Neurocytol* 31, 277-287.
- Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y., and Hoshino, M. (2003). *The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration. Embo J* 22, 4190-4201.

- Kessaris, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M., and Richardson, W. D. (2006). *Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. Nat Neurosci* 9, 173-179.
- Koh, C. G. (2006). *Rho GTPases and their regulators in neuronal functions and development. Neurosignals* 15, 228-237.
- Kriegstein, A. R., and Noctor, S. C. (2004). *Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. Trends Neurosci* 27, 392-399.
- Kubota, Y., Hattori, R., and Yui, Y. (1994). *Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. Brain Res* 649, 159-173.
- Kwiatkowski, A. V., Rubinson, D. A., Dent, E. W., Edward van Veen, J., Leslie, J. D., Zhang, J., Mebane, L. M., Philippar, U., Pinheiro, E. M., Burds, A. A., et al. (2007). *Ena/VASP Is Required for neuritogenesis in the developing cortex. Neuron* 56, 441-455.
- Kyriakopoulou, K., de Diego, I., Wassef, M., and Karagogeos, D. (2002). *A combination of chain and neurophilic migration involving the adhesion molecule TAG-1 in the caudal medulla. Development* 129, 287-296.
- Lee, W. C., Chen, J. L., Huang, H., Leslie, J. H., Amitai, Y., So, P. T., and Nedivi, E. (2008). *A dynamic zone defines interneuron remodeling in the adult neocortex. Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19968-19973.
- Liodis, P., Denaxa, M., Grigoriou, M., Akufo-Addo, C., Yanagawa, Y., and Pachnis, V. (2007). *Lhx6 activity is required for the normal migration and specification of cortical interneuron subtypes. J Neurosci* 27, 3078-3089.
- Lowery, L. A., and Van Vactor, D. (2009). *The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 332-343.
- Luo, L., Hensch, T. K., Ackerman, L., Barbel, S., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1996). *Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. Nature* 379, 837-840.

- Ma, Q. H., Bagnard, D., Xiao, Z. C., and Dawe, G. S. (2008a). A TAG on to the neurogenic functions of APP. *Cell Adh Migr* 2, 2-8.
- Ma, Q. H., Futagawa, T., Yang, W. L., Jiang, X. D., Zeng, L., Takeda, Y., Xu, R. X., Bagnard, D., Schachner, M., Furley, A. J., et al. (2008b). A TAG1-APP signalling pathway through Fe65 negatively modulates neurogenesis. *Nat Cell Biol* 10, 283-294.
- Malosio, M. L., Gilardelli, D., Paris, S., Albertinazzi, C., and de Curtis, I. (1997). 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, 6717-6728.
- Marin, O., and Rubenstein, J. L. (2001). A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2, 780-790.
- Marin, O., and Rubenstein, J. L. (2003). Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* 26, 441-483.
- Mattson, M. P., and van Praag, H. (2008). TAGing APP constrains neurogenesis. *Nat Cell Biol* 10, 249-250.
- Metin, C., Baudoin, J. P., Rakic, S., and Parnavelas, J. G. (2006). Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. *Eur J Neurosci* 23, 894-900.
- Mettouchi, A., Klein, S., Guo, W., Lopez-Lago, M., Lemichez, E., Westwick, J. K., and Giancotti, F. G. (2001). Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. *Mol Cell* 8, 115-127.
- Miki, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (1998). WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *Embo J* 17, 6932-6941.
- Miki, T. (2000). [Malignant transformation and regulation of cell division by a Rho exchange factor ECT2]. *Seikagaku* 72, 1249-1253.

- Miyoshi, G., Butt, S. J., Takebayashi, H., and Fishell, G. (2007). Physiologically distinct temporal cohorts of cortical interneurons arise from telencephalic Olig2-expressing precursors. *J Neurosci* 27, 7786-7798.
- Molyneaux, B. J., Arlotta, P., and Macklis, J. D. (2007a). Molecular development of corticospinal motor neuron circuitry. *Novartis Found Symp* 288, 3-15; discussion 15-20, 96-18.
- Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R., and Macklis, J. D. (2007b). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 8, 427-437.
- Nadarajah, B., Alifragis, P., Wong, R. O., and Parnavelas, J. G. (2002). Ventricle-directed migration in the developing cerebral cortex. *Nat Neurosci* 5, 218-224.
- Nakajima, K. (2007). Control of tangential/non-radial migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Neurochem Int* 51, 121-131.
- Nakayama, A. Y., Harms, M. B., and Luo, L. (2000). Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 20, 5329-5338.
- Narumiya, S., and Yasuda, S. (2006). Rho GTPases in animal cell mitosis. *Curr Opin Cell Biol* 18, 199-205.
- Nery, S., Fishell, G., and Corbin, J. G. (2002). The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nat Neurosci* 5, 1279-1287.
- Ng, J., Nardine, T., Harms, M., Tzu, J., Goldstein, A., Sun, Y., Dietzl, G., Dickson, B. J., and Luo, L. (2002). Rac GTPases control axon growth, guidance and branching. *Nature* 416, 442-447.
- Nieto, M. A. (1996). Molecular biology of axon guidance. *Neuron* 17, 1039-1048.
- Nikolic, M., Chou, M. M., Lu, W., Mayer, B. J., and Tsai, L. H. (1998). The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature* 395, 194-198.

- Nodari, A., Zambroni, D., Quattrini, A., Court, F. A., D'Urso, A., Recchia, A., Tybulewicz, V. L., Wrabetz, L., and Feltri, M. L. (2007). *Beta1 integrin activates Rac1 in Schwann cells to generate radial lamellae during axonal sorting and myelination. J Cell Biol 177, 1063-1075.*
- Olson, M. F., Ashworth, A., and Hall, A. (1995). *An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. Science 269, 1270-1272.*
- Pancoast, M., Dobyns, W., and Golden, J. A. (2005). *Interneuron deficits in patients with the Miller-Dieker syndrome. Acta Neuropathol 109, 400-404.*
- Pavlou, O., Theodorakis, K., Falk, J., Kutsche, M., Schachner, M., Faivre-Sarrailh, C., and Karagogeos, D. (2002). *Analysis of interactions of the adhesion molecule TAG-1 and its domains with other immunoglobulin superfamily members. Mol Cell Neurosci 20, 367-381.*
- Rakic, P., and Goldman-Rakic, P. S. (1982). *The development and modifiability of the cerebral cortex. Overview. Neurosci Res Program Bull 20, 433-438.*
- Sarner, S., Kozma, R., Ahmed, S., and Lim, L. (2000). *Phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42, and Rac1 act downstream of Ras in integrin-dependent neurite outgrowth in N1E-115 neuroblastoma cells. Mol Cell Biol 20, 158-172.*
- Schwamborn, J. C., Fiore, R., Bagnard, D., Kappler, J., Kaltschmidt, C., and Puschel, A. W. (2004). *Semaphorin 3A stimulates neurite extension and regulates gene expression in PC12 cells. J Biol Chem 279, 30923-30926.*
- Shimoda, Y., and Watanabe, K. (2009). *Contactins: Emerging key roles in the development and function of the nervous system. Cell Adh Migr 3, 64-70.*
- Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C. S., Williams, C. M., Tanabe, Y., Jessell, T. M., and Costantini, F. (2001). *Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. BMC Dev Biol 1, 4.*

- Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A., and Katsuki, M. (1998). *Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. Oncogene 17, 3427-3433.*
- Sussel, L., Marin, O., Kimura, S., and Rubenstein, J. L. (1999). *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, 3359-3370.*
- Suzuki, K. (2007). *Neuropathology of developmental abnormalities. Brain Dev 29, 129-141.*
- Tamamaki, N., Fujimori, K. E., and Takauji, R. (1997). *Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. J Neurosci 17, 8313-8323.*
- Tanaka, D., Nakaya, Y., Yanagawa, Y., Obata, K., and Murakami, F. (2003). *Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins. Development 130, 5803-5813.*
- Traka, M., Dupree, J. L., Popko, B., and Karagogeos, D. (2002). *The neuronal adhesion protein TAG-1 is expressed by Schwann cells and oligodendrocytes and is localized to the juxtaparanodal region of myelinated fibers. J Neurosci 22, 3016-3024.*
- Traka, M., Goutebroze, L., Denisenko, N., Bessa, M., Nifli, A., Havaki, S., Iwakura, Y., Fukamauchi, F., Watanabe, K., Soliven, B., et al. (2003). *Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. J Cell Biol 162, 1161-1172.*
- Walmsley, M. J., Ooi, S. K., Reynolds, L. F., Smith, S. H., Ruf, S., Mathiot, A., Vanes, L., Williams, D. A., Cancro, M. P., and Tybulewicz, V. L. (2003). *Critical roles for Rac1 and Rac2 GTPases in B cell development and signaling. Science 302, 459-462.*
- Watabe-Uchida, M., Govek, E. E., and Van Aelst, L. (2006). *Regulators of Rho GTPases in neuronal development. J Neurosci 26, 10633-10635.*

- Welsh, C. F., Roovers, K., Villanueva, J., Liu, Y., Schwartz, M. A., and Assoian, R. K. (2001). *Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. Nat Cell Biol 3, 950-957.*
- Wichterle, H., Turnbull, D. H., Nery, S., Fishell, G., and Alvarez-Buylla, A. (2001). *In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. Development 128, 3759-3771.*
- Wonders, C. P., Taylor, L., Welagen, J., Mbata, I. C., Xiang, J. Z., and Anderson, S. A. (2008). *A spatial bias for the origins of interneuron subgroups within the medial ganglionic eminence. Dev Biol 314, 127-136.*
- Woo, N. H., and Lu, B. (2006). *Regulation of cortical interneurons by neurotrophins: from development to cognitive disorders. Neuroscientist 12, 43-56.*
- Worgotter, F., Eyding, D., Macklis, J. D., and Funke, K. (2002). *The influence of the corticothalamic projection on responses in thalamus and cortex. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 357, 1823-1834.*
- Xu, Q., Cobos, I., De La Cruz, E., Rubenstein, J. L., and Anderson, S. A. (2004). *Origins of cortical interneuron subtypes. J Neurosci 24, 2612-2622.*
- Yamato, K., Yamamoto, M., Hirano, Y., and Tsuchida, N. (1995). *A human temperature-sensitive p53 mutant p53Val-138: modulation of the cell cycle, viability and expression of p53-responsive genes. Oncogene 11, 1-6.*
- Yasuda, S., Taniguchi, H., Ocegüera-Yanez, F., Ando, Y., Watanabe, S., Monypenny, J., and Narumiya, S. (2006). *An essential role of Cdc42-like GTPases in mitosis of HeLa cells. FEBS Lett 580, 3375-3380.*
- Yoshizawa, M., Kawauchi, T., Sone, M., Nishimura, Y. V., Terao, M., Chihama, K., Nabeshima, Y., and Hoshino, M. (2005). *Involvement of a Rac activator, P-Rex1, in neurotrophin-derived signaling and neuronal migration. J Neurosci 25, 4406-4419.*

Zhou, F. Q., and Cohan, C. S. (2004). How actin filaments and microtubules steer growth cones to their targets. J Neurobiol 58, 84-91.