



UNIVERSITY OF
THESSALY



**Δομή και λειτουργία των βασικών γαγγλίων:
Χαρακτηρισμός μονοσυναπτικών σημάτων από
την εξωτερική ωχρά σφαίρα σε D1 και D2
κυτταρικούς πληθυσμούς του ραβδωτού
σώματος.**

Χρυσήδα Μπαλτήρα

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας

Ιούνιος 2017

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση του Διπλώματος Βιοχημικού- Βιοτεχνολόγου

Η παρούσα πτυχιακή πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Καρολίνσκα, Τμήμα Νευροεπιστημών. Επιβλέποντες στο Ινστιτούτο Καρολίνσκα: Κωνσταντίνος Μελέτης, Επίκουρος Καθηγητής, Ουρανία Τζώρτζη, Διδάκτωρ.

Karolinska Institutet, Neuroscience department, SE-171 Stockholm, Sweden.
<http://ki.se/en/neuro/>.



Karolinska Institutet

Δομή και λειτουργία των βασικών γαγγλίων: Χαρακτηρισμός μονοσυναπτικών σημάτων από το εξωτερική ωχρά σφαίρα σε D1 και D2 κυτταρικούς πληθυσμούς του ραβδωτού σώματος.

Structure and Function of Basal Ganglia: Characterization of monosynaptic GPe inputs to D1 and D2 striatum cell populations.

Chrysiida Baltira

© 2017 Chrysiida Baltira

Επιβλέποντες Καθηγητές	
Πρώτος Εξεταστής	Κωσταντίνος Μελέτης Επίκουρος Καθηγητής Τμήμα Νευροεπιστημών, Ινστιτούτο Καρολίνσκα
Δεύτερος Εξεταστής	Μπαλατσός Νικόλαος Επίκουρος Καθηγητής Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τρίτος Εξεταστής	Αιμιλία Ζίφα Επίκουρος Καθηγήτρια Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Αρχικά, οφείλω ευγνωμοσύνη στους καθηγητές που με δίδαξαν και με συμβούλευσαν καθ'όλη τη διάρκεια της φοίτησης μου στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και ιδιαίτερα στον κ. Νικόλαο Μπαλατσό που με καθοδήγησε και με βοήθησε να έρθω στο Ινστιτούτο Καρολίνσκα καθώς και την κ. Αιμιλία Ζίφα που με έφερε για πρώτη φορά σε επαφή με τον τομέα των νευροεπιστημών και με ενέπνευσε να τον ακολουθήσω. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κωνσταντίνο Μελέτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και με δέχτηκε στο εργαστήριο του και φυσικά την κ. Ουρανία Τζώρτζη που ήταν η επιβλέπουσά μου όλους αυτούς τους μήνες και με δίδαξε, μου εμπιστεύτηκε την έρευνά της αλλά και με στήριξε καθ'όλη τη διάρκεια της δουλειάς μου. Οφείλω ευχαριστίες σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου και πλέον φίλους μου, οι οποίοι από την πρώτη στιγμή με έκαναν να νιώσω άνετα και με συμβούλεψαν όποτε το είχα ανάγκη. Ευχαριστώ για την στήριξη και τις υπέροχες στιγμές όλους τους φίλους που έκανα στη Σουηδία, την Ματίνα Ρ., τον Joao S. και την Elene N. Επίσης, ευχαριστώ τον Hendrik G. για την κατανόηση του, τη βοήθεια του και την ηθική στήριξη. Πάνω απ' όλα, είμαι ευγνώμων στους γονείς μου, Παναγιώτη Μπαλτήρα και Αικατερίνη Καρύδα για όλη την αγάπη που μου έχουν προσφέρει και συνεχίζουν να μου προσφέρουν καθώς και για όλη τη στήριξη τους και τις στερήσεις που έχουν υπομείνει για να πραγματοποιήσω τα όνειρα μου, αλλά και στα αδέρφια μου Ιωάννα και Άρη Μπαλτήρα. Θα ήθελα να αφιερώσω αυτή την εργασία στην οικογένεια μου.

Μπαλτήρα Χρυσήδα

Περιεχόμενα

Περίληψη	7
Synopsis	8
Συνοτομογραφίες	9
Κεφάλαιο 1	10
Εισαγωγή.....	10
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά των βασικών γαγγλίων	10
1.2 Ανατομία των βασικών γαγγλίων	10
1.3 Το ραβδωτό σώμα	14
1.3.1 Μεσαίου μεγέθους ακανθωτοί νευρώνες προβολής (MSNs)	14
1.3.2 Διάμεσοι νευρώνες (interneurons)	16
1.3.3 Δομές του ραβδωτού σώματος : Πλάκες (Patches) και Στρώμα (Matrix).....	18
1.4 Το έμμεσο και το άμεσο μονοπάτι των βασικών γαγγλίων	19
1.4.1 Ρύθμιση του έμμεσου και του άμεσου μονοπατιού	21
1.5 Η εξωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας	23
1.5.1 Προβολές της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας στο ραβδωτό σώμα : Πρωτότυποι (Prototypic) και Αρκυπαλιδικοί (Arkyrallidal) κυτταρικοί πληθυσμοί .	23
Σκοπός.....	26
Κεφάλαιο 2	26
Μεθοδολογία	26
2.1 Το σύστημα tracing του ιού της λύσσας (rabies virus)	26
2.2 Πειραματική διαδικασία	29
2.2.1 Γονοτύπιση διαγονιδιακών ζώων.....	29
2.2.3 Διαχείριση των ζώων	29
2.2.3 Ανοσοϊστοχημεία και μικροσκοπία.....	31
Κεφάλαιο 3	32
Αποτελέσματα	32
3.1 Κυτταρικοί πληθυσμοί της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας (GPe) νευρώνουν τους D1 και D2 νευρώνες του ραβδωτού σώματος.	32
3.2 Οι αρκυπαλιδικοί νευρώνες της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας φαίνεται να νευρώνουν κυρίως τους D2 νευρώνες του έμμεσου μονοπατιού.	36
3.3 Οι πρωτότυποι νευρώνες της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας φαίνεται να νευρώνουν κυρίως τους D1 νευρώνες του άμεσου μονοπατιού.	39

Συμπεράσματα-Συζήτηση	42
Βιβλιογραφία	44

Περίληψη

Το άμεσο και το έμμεσο μονοπάτι των βασικών γαγγλίων μεταφέρουν πληροφορίες στον φλοιό μέσω μηνυμάτων στον θάλαμο. Η ενεργοποίηση του άμεσου μονοπατιού έχει ως αποτέλεσμα την προώθηση της κίνησης, ενώ η ενεργοποίηση του έμμεσου μονοπατιού προκαλεί την αναστολή της. Σύμφωνα με το κλασσικό μοντέλο των βασικών γαγγλίων, GABAεργικοί νευρώνες του ραβδωτού σώματος, οι οποίοι εκφράζουν είτε τον υποδοχέα D1, είτε τον υποδοχέα D2 αποτελούν τα στοιχεία του άμεσου και του έμμεσου μονοπατιού. Ανισορροπία μεταξύ των δύο μονοπατιών έχει ως αποτέλεσμα κινητικές δυσλειτουργίες, καθώς και μια σειρά νευρολογικών ασθενειών. Ωστόσο νέα δεδομένα έχουν ενισχύσει την πολυπλοκότητα του μοντέλου. Η εξωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας (GPe) αποτελεί βασικό στοιχείο του έμμεσου μονοπατιού. Η εξωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας (GPe) επικοινωνεί με τους MSNs του ραβδωτού σώματος μέσω δύο ειδών GABAεργικών νευρώνων. Πρόσφατες μελέτες σε αρουραίους μοντέλα για την νόσο του Πάρκινσον κατηγοριοποίησαν τους GABAεργικούς νευρώνες της εξωτερικής μοίρας σε δύο βασικούς τύπους, οι οποίοι ονομάζονται πρωτότυποι (prototypic) και αρκυπαλιδικοί (arkypallidal). Οι πρωτότυποι και αρκυπαλιδικοί νευρώνες παρουσιάζουν διαφορές όσον αφορά την συνδεσιμότητα, καθώς και στο μοριακό και στο ηλεκτροφυσιολογικό τους προφίλ. Στην παρούσα μελέτη στοχεύουμε στον χαρακτηρισμό διαφορετικών μονοσυναπτικών σημάτων εισόδου από αρκυπαλιδικούς και πρωτότυπους νευρώνες της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας στο άμεσο (D1) και στο έμμεσο (D2) μονοπάτι του ραβδωτού σώματος, με τη χρήση δύο βοηθητικών αδενοσχετιζόμενων ιών και γενετικά τροποποιημένου ιού της λύσσας.

Synopsis

The direct and indirect pathways of basal ganglia convey motor information to the cortex via opposing effects to their thalamic targets. A selected motor program is facilitated by the activation of the direct pathway, whereas the indirect pathway inhibits competing motor programs. According to the classical model of basal ganglia, GABAergic D1- and D2- expressing striatal MSNs comprise the direct and indirect pathways respectively. Imbalance between the two pathways results in motor dysfunctions that characterize a series of neurological diseases. The complexity of the model has been amplified with new data. The external segment of globus pallidus (GPe) is a major component of the indirect pathway. There is a two-way communication between the striatal MSNs and GPe and both projections recruit GABAergic neurons. Recent studies on dopamine-depleted rats have categorized the GABAergic populations of GPe into two main types, the so-called “prototypic” and “arkypallidal” projecting neurons. The prototypic and arkypallidal neurons differ in their molecular and electrophysiological profiles, as well as their connectivity patterns. In the present study we aim to characterize the differential monosynaptic inputs from GPe prototypic and arkypallidal neurons to the direct (D1) and indirect (D2) striatal pathways, by using a dual viral combination of an AAV helper virus and a genetically modified rabies virus.

Συντομογραφίες

AAV	Adeno associated virus - Αδενοσχετιζόμενος ιός
ChAT	Choline acetyltransferase - Ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης
DA	Dopamine - Ντοπαμίνη
GABA	γ-Aminobutyric acid - γ-αμινοβουτυρικό οξύ
GP	Glycoprotein G - G γλυκοπρωτεΐνη
GPe	Globus pallidus externus - Εξωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας
GPI	Globus pallidus internus - Εσωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας
MSN	Medium spiny neuron - Μεσαίου μεγέθους ακανθωτός νευρώνας προβολής
PV	Parvalbumin - Παρβαλβουμίνη
Rb	Rabies Virus - Ιός της λύσσας
RG	Rabies glycoprotein G - G γλυκοπρωτεΐνη του ιού της λύσσας
SNc	Substantia nigra pars compacta - Συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας
SNr	Substantia nigra pars reticulata - Δικτυωτή μοίρα της μέλαινας ουσίας
STN	Subthalamic nucleus - Υποθαλαμικός πυρήνας
TVA	myc-tagged EnvA receptor

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά των βασικών γαγγλίων

Τα βασικά γάγγλια αποτελούν μια ομάδα πυρήνων που συνδέουν τον εγκεφαλικό φλοιό με νευρωνικά συστήματα τα οποία μετατρέπουν τη δραστηριότητα στο φλοιό σε κατευθυνόμενη συμπεριφορά. Λειτουργίες των βασικών γαγγλίων αποτελούν η μάθηση, η δημιουργία συναισθημάτων, ο κινητικός έλεγχος, καθώς και η επιλογή δράσεων που βασίζονται σε επιθυμητά αποτελέσματα [1,2,3,4].

Η σημασία των βασικών γαγγλίων στη φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου, καθώς και στη συμπεριφορά, φαίνεται από τις πολυάριθμες και ποικίλες νευρολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με τη δυσλειτουργία τους. Αυτές περιλαμβάνουν διαταραχές του ελέγχου της συμπεριφοράς, όπως ο ημιβαλλισμός, η ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή, η δυστονία, ο εθισμός, καθώς και διαταραχές στην κίνηση, όπως η νόσος Parkinson, η οποία προκαλείται από τον θάνατο κυττάρων της μέλαινας ουσίας που παράγουν ντοπαμίνη και η νόσος του Huntington, η οποία προκαλείται κατά κύριο λόγο μετά από βλάβη στο ραβδωτό σώμα (striatum) [7,8].

Οι πρώτες ενδείξεις για τη λειτουργία των βασικών γαγγλίων προέκυψαν κατά τον εικοστό αιώνα, μετά από κλινικές μελέτες οι οποίες έδειξαν ότι οι βλάβες στον φακοειδή πυρήνα (lenticular nucleus), ο οποίος αποτελείται από το κέλυφος (putamen) και την ωχρά σφαίρα (globus pallidus), και στον υποθαλαμικό πυρήνα (subthalamic nucleus) σχετίζονται με παρκινσονικά συμπτώματα, όπως η δυστονία και ο ημιβαλλισμός [5,6]. Σήμερα οι περισσότερες πληροφορίες για την νευροανατομική και τη νευροφυσιολογική οργάνωση των βασικών γαγγλίων προέρχονται από μελέτες σε τρωκτικά, αλλά οι περισσότερες από αυτές έχουν επιβεβαιωθεί και στα πρωτεύοντα. Η κύρια διαφορά μεταξύ τρωκτικών και πρωτευόντων εντοπίζεται στην ανατομία των δομών όπως αυτή φαίνεται με γυμνό μάτι.

1.2 Ανατομία των βασικών γαγγλίων

Τα βασικά γάγγλια αποτελούνται κυρίως από μία ομάδα πέντε υποφλοιωδών πυρήνων. Αυτοί είναι ο κερκοφόρος πυρήνας (caudate nucleus), το κέλυφος (putamen), η ωχρά σφαίρα (globus pallidus), ο υποθαλαμικός πυρήνας

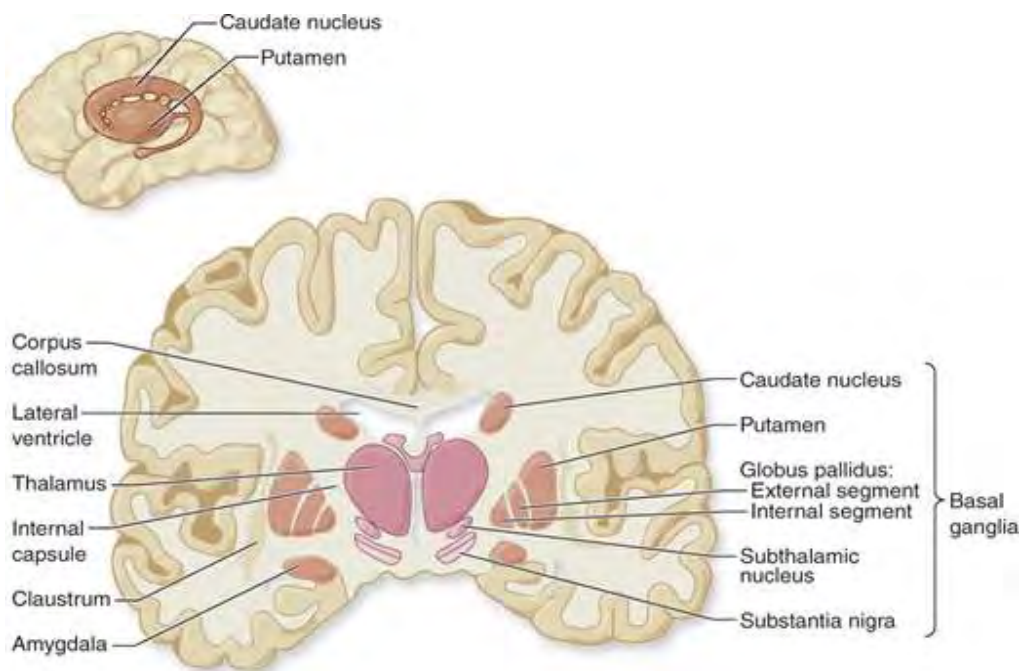
(subthalamic nucleus) και η μέλαινα ουσία (substantia nigra).

Οι πυρήνες των βασικών γαγγλίων εντοπίζονται στον τελεγκέφαλο, διεγκέφαλο και στον μεσεγκέφαλο. Σε πρωτεύοντα το κέλυφος και ο κερκοφόρος πυρήνας αποτελούν τη κύρια δομή υποδοχής σημάτων εισόδου, η οποία είναι γνωστή ως ραβδωτό σώμα (striatum). Σε εγκεφάλους κατώτερων θηλαστικών, όπως τρωκτικών, το ραβδωτό σώμα αποτελείται από ένα σύνολο πυρήνων, αντί των δύο του κελύφους και του κερκοφόρου πυρήνα. Το ραβδωτό σώμα περιέχει νευρωνικές συνδέσεις με άλλους πυρήνες των βασικών γαγγλίων. Αποτελεί GABAεργικό πυρήνα και ασκεί έλεγχο στην ωχρά σφαίρα και στη μέλαινα ουσία [9]. Αυτό παρουσιάζεται και στην παρούσα πτυχιακή.

Η ωχρά σφαίρα χωρίζεται σε δύο πυρήνες: την εξωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας (GPe) και την εσωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας (GPi). Τόσο το GPe όσο και το GPi αποτελούν GABAεργικούς πυρήνες. Η εξωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας νευρώνει κυρίως τον υποθαλαμικό πυρήνα, ενώ η εσωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας νευρώνει κυρίως τον θάλαμο. Ωστόσο πρόσφατες έρευνες σε αρουραίους με Πάρκινσον έδειξαν ότι το GPe φαίνεται να νευρώνει και το ραβδωτό σώμα [10].

Η μέλαινα ουσία χωρίζεται στην συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας (SNc) και στη δικτυωτή μοίρα της μέλαινας ουσίας (SNr). Αυτοί οι πυρήνες βρίσκονται κάτω από τον υποθαλαμικό πυρήνα. Η συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας (SNc) αποτελεί κύρια πηγή ντοπαμίνης στα βασικά γάγγλια. Η SNc νευρώνει το ραβδωτό σώμα μέσω δύο μονοπατιών, όπου το ένα είναι διεγερτικό και το άλλο ανασταλτικό (άμεσο και έμμεσο μονοπάτι D1 και D2) [11]. Η SNr νευρώνει το θάλαμο με GABAεργικούς νευρώνες.

Τέλος, ο υποθαλαμικός πυρήνας νευρώνει την εσωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας, καθώς και τη δικτυωτή μοίρα της μέλαινας ουσίας μέσω γλουταμινεργικών νευρώνων.



Εικόνα 1: Οι δομές που απαρτίζουν τα βασικά γάγγλια. Ο φλοιός (putamen) και ο επικλινής πυρήνας (caudate nucleus) που αποτελούν το ραβδωτό σώμα (striatum), η ωχρά σφαίρα (globus pallidus) με την εξωτερική μοίρα (external segment) και την εσωτερική μοίρα (internal segment), ο υποθαλαμικός πυρήνας (subthalamic nucleus) και η μέλαινα ουσία (substantia nigra). *Source: Ropper, A., Samuels, M., Klein, J. 2012. Adams and Victor's Principles of Neurology 10th Edition*

Δομή	Νευροδιαβιβαστής	Περιγραφή
Ραβδωτό σώμα (Striatum)	Γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA)	Ασκεί έλεγχο στην ωχρά σφαίρα (globus pallidus), και στη μέλαινα ουσία (substantia nigra)
Μέλαινα ουσία (Substantia Nigra)	Ντοπαμίνη	Χωρίζεται στην συμπαγή (SNc) και στη δικτυωτή μοίρα (SNr). Η SNc νευρώνει το ραβδωτό σώμα μέσω δύο μονοπατιών (άμεσο και έμμεσο μονοπάτι D1 και D2)
Ωχρά σφαίρα (Globus Pallidus)	Γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA)	Αποτελείται από ένα εσωτερικό (GPi) και ένα εξωτερικό τμήμα (GPe). Η GPe νευρώνει κυρίως τον υποθαλαμικό πυρήνα ενώ η GPi νευρώνει κυρίως τον θάλαμο
Υποθαλαμικός πυρήνας (Subthalamic nucleus)	Γλουταμινικό οξύ	Νευρώνει τη GPi καθώς και τη SNr.

Σχήμα 1: Στον πίνακα φαίνονται οι διάφορες δομές των βασικών γαγγλίων με τους νευροδιαβιβαστές τους καθώς και περιληπτικά ο ρόλος τους.

1.3 Το ραβδωτό σώμα

Το ραβδωτό σώμα αποτελεί τη βασική ζώνη εισόδου των βασικών γαγγλίων, την περιοχή δηλαδή που δέχεται τα ερεθίσματα από τον φλοιό. Όπως ήδη αναφέρθηκε, στα πρωτεύοντα συγκροτείται από δύο επιμέρους διακριτές δομές, τον κερκοφόρο πυρήνα και το κέλυφος, ενώ στα τρωκτικά αποτελεί ενιαία δομή, καθώς περιλαμβάνει και τον επικλινή πυρήνα (nucleus accubens, NAcc).

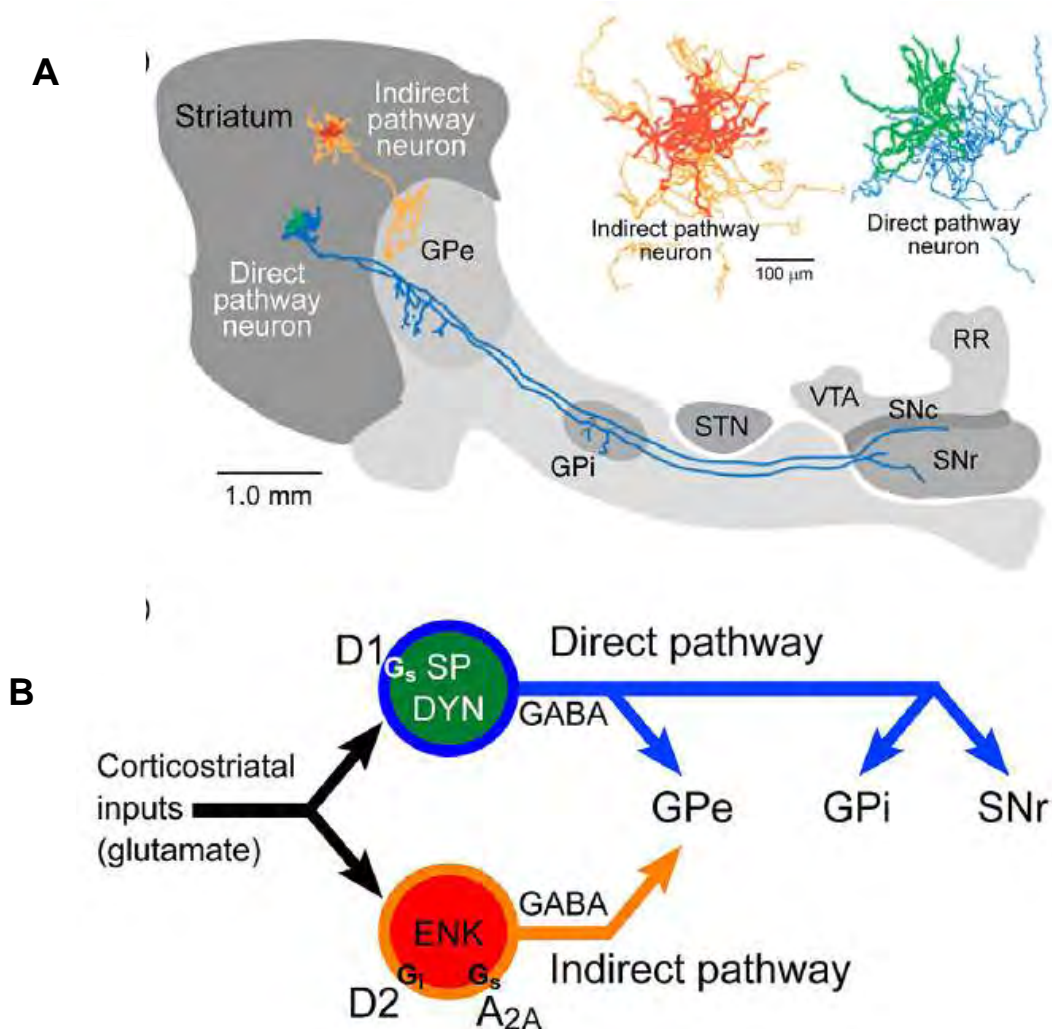
1.3.1 Μεσαίου μεγέθους ακανθωτοί νευρώνες προβολής (MSNs)

Το ραβδωτό σώμα αποτελείται κυρίως έναν τύπο νευρώνων οι οποίοι ονομάζονται μεσαίου μεγέθους ακανθωτοί νευρώνες προβολής (MSNs, medium spiny neurons) [12,13]. Αυτοί παίρνουν το όνομα τους από τη μορφολογία τους, καθώς περιέχουν μικρά έως μεσαία κυτταρικά σώματα διαμέτρου 20μm και οι κοντινοί δενδρίτες τους έχουν λεία όψη, ενώ οι πιο απομακρυσμένοι είναι ακανθωτοί [14] (Εικόνα 3). Αυτό το είδος νευρώνων αποτελεί το 85-90% του πληθυσμού των νευρώνων του ραβδωτού σώματος [14]. Μηνύματα εισόδου από το φλοιό στοχεύουν κυρίως τους MSN. Οι MSN αποτελούν τους βασικούς νευρώνες σημάτων εξόδου καθώς και εισόδου στο ραβδωτό σώμα.

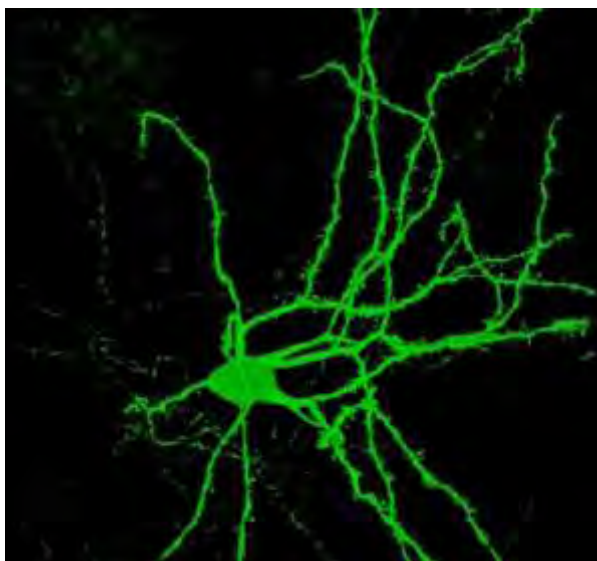
Τα μηνύματα εισόδου προέρχονται κυρίως από το φλοιό (cortex), την αμυγδαλή (amygdala) και τον θάλαμο (thalamus). Οι δομές αυτές δημιουργούν ασύμμετρες συνάψεις με τα άκανθα (spines) των δενδριτών και σε μικρότερο βαθμό με τους δενδριτικούς άξονες.

Όλοι οι μεσαίου μεγέθους ακανθωτοί νευρώνες (MSN, medium spiny neurons) του ραβδωτού σώματος είναι ανασταλτικοί και χρησιμοποιούν το GABA ως νευροδιαβιβαστή. Ωστόσο μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες [16,17,18] (Εικόνα 2). Η πρώτη κατηγορία αποτελείται από τους MSNs που απολήγουν άμεσα στην εσωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας και

στην μέλαινα ουσία. Αυτοί οι νευρώνες εκφράζουν τον υπότυπο 1 του υποδοχέα της ντοπαμίνης (D1R) ο οποίος ενεργοποιεί την ουσία P και την δυνορφίνη, καθώς και την ενδοκυτταρική αδενυλική κυκλάση πυροδοτώντας την άμεση οδό (Εικόνα 2B). Σε αντίθεση, οι MSN που νευρώνουν την εξωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας εκφράζουν τον υπότυπο 2 του υποδοχέα της ντοπαμίνης (D2R) ο οποίος αναστέλλει την ενδοκυτταρική αδενυλική κυκλάση μέσω σηματοδότησης G πρωτεϊνών και εγκεφαλίνης. Με αυτό τον τρόπο ενεργοποιούν την έμμεση οδό η οποία περιλαμβάνει το ραβδωτό σώμα, την εξωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας και τον υποθαλαμικό πυρήνα τα οποία στη συνέχεια ρυθμίζουν την εσωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας και τη μέλαινα ουσία (Εικόνα 2B).



Εικόνα 2: (Α) Οι MSNs του έμμεσου μονοπατιού προβάλλουν στη GPe, αλλά δεν συνεχίζουν πέρα από αυτόν τον πυρήνα. Οι MSNs του άμεσου μονοπατιού επίσης έχουν κάποιες προβολές στη GPe αλλά κυρίως προβάλλουν στη GPi και στη SNr. Μεγαλύτερη μεγέθυνση (πάνω δεξιά) των νευρώνων του άμεσου και του έμμεσου μονοπατιού, όπου φαίνονται οι δένδριτες (κόκκινο και πράσινο) και οι άξονες που διαπερνούν το ραβδωτό σώμα (πορτοκαλί και μπλε). VTA: Κοιλιακή καλυπτική περιοχή, RR: Οπίσθια ερυθρή περιοχή. (Β) Διάγραμμα το οποίο συνοψίζει τα κύρια χαρακτηριστικά των MSNs του άμεσου και του έμμεσου μονοπατιού. Και οι δύο τύποι είναι GABAεργικοί και λαμβάνουν γλουταμινεργικά σήματα εισόδου. Οι MSNs του άμεσου μονοπατιού, εκφράζουν τον υποδοχέα D1, καθώς και ουσία P και δυνορφίνη. Αυτοί προβάλλουν στις GPe, GPi, και SNr. Οι MSNs του άμεσου μονοπατιού εκφράζουν τον υποδοχέα D2 καθώς και τον υποδοχέα A2A και εγκεφαλίνη. Αυτοί προβάλλουν μόνο στη GPe. Πηγή: *Heinz, S., Kuei, Y.T., 2016. Handbook of Basal Ganglia Structure and Function. Volume 24, 2nd Edition, Academic Press*

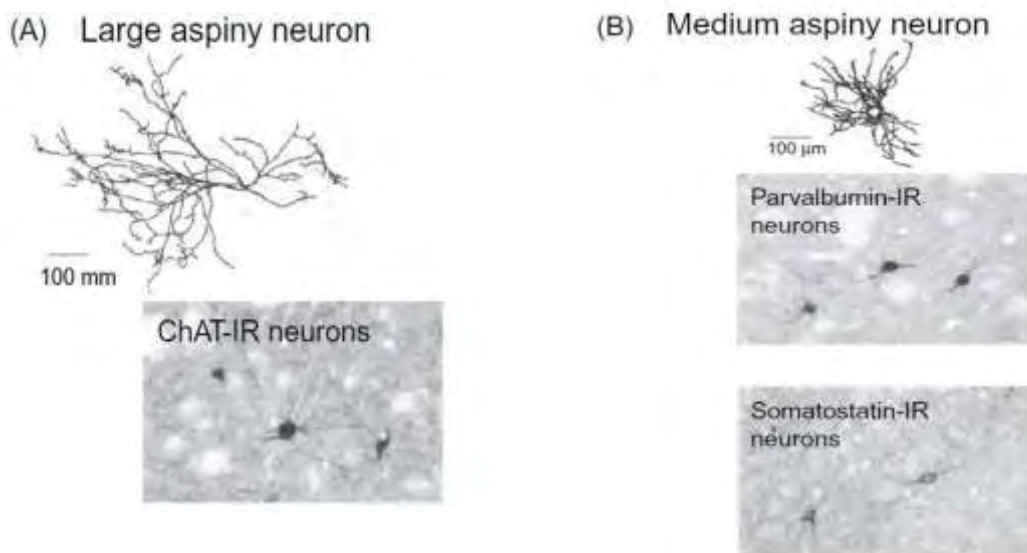


Εικόνα 3: (Α) Εικόνα MSN σημασμένου με GFP από συνεστιακό μικροσκόπιο. Πηγή: *National Institutes of Health (NIH)*,

1.3.2 Διάμεσοι νευρώνες (interneurons)

Οι υπόλοιποι νευρώνες ανήκουν στην κατηγορία των διάμεσων νευρώνων (interneurons) και δεν έχουν απολήξεις έξω από το ραβδωτό σώμα, αλλά διασκορπίζονται μέσα σε αυτό δημιουργώντας συνάψεις με τους MSNs αλλά και μεταξύ τους. Οι διάμεσοι νευρώνες του ραβδωτού σώματος χαρακτηρίζονται από την απουσία ακάνθων στους δένδριτες τους [15]. Αυτός ο τύπος αποτελεί το 10-15% του πληθυσμού νευρώνων του ραβδωτού

σώματος [12,13,14] και παρουσιάζει μια μορφολογική και νευροχημική ποικιλομορφία. Έχουν βρεθεί δύο κύριοι υπότυποι [Εικόνα 3]. Ο πρώτος υπότυπος περιλαμβάνει τους μεγάλους μη ακανθωτούς νευρώνες (large aspiny neurons) οι οποίοι χρησιμοποιούν την ακετυλοχολίνη ως νευροδιαβιβαστή [13] και ο δεύτερος υπότυπος τους μεσαίου μεγέθους μη ακανθωτούς νευρώνες που χρησιμοποιούν το GABA ως νευροδιαβιβαστή (medium-sized aspiny GABAergic interneurons) [15]. Η τελευταία κατηγορία GABAεργικών ενδονευρώνων υποδιαιρείται περαιτέρω με βάση τα διαφορετικά πεπτιδία και τις νευροχημικές ουσίες που περιέχουν [20].



Εικόνα 3: Διάμεσοι νευρώνες. (A) Μεγάλοι μη ακανθωτοί νευρώνες. Ανίχνευση δενδριτών (μαύρο) και αξόνων (γκρι) (πάνω μέρος), καθώς και φωτομικρογραφία με τη χρήση αντισώματος εναντίον της ακετυλοτρανσφεράσης της χολίνης (ChAT) (κάτω μέρος) την οποία εκφράζουν αυτοί οι νευρώνες. (B) Μεσαίου μεγέθους μη ακανθωτοί νευρώνες. Ανίχνευση δενδριτών (πάνω μέρος) και φωτομικρογραφία με τη χρήση αντισωμάτων ενάντια στην παρβαλβουμίνη και την σωματοστατίνη. Πηγές: Για την (A): Wilson, C.J., Chang, H.T., Kitai, S.T., 1990. *Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum*. *J. Neurosci.* 10, 508-519. Για την (B) Heinz, S., Kuei, Y.T., 2016. *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function. Volume 24, 2nd Edition, Academic Press.*

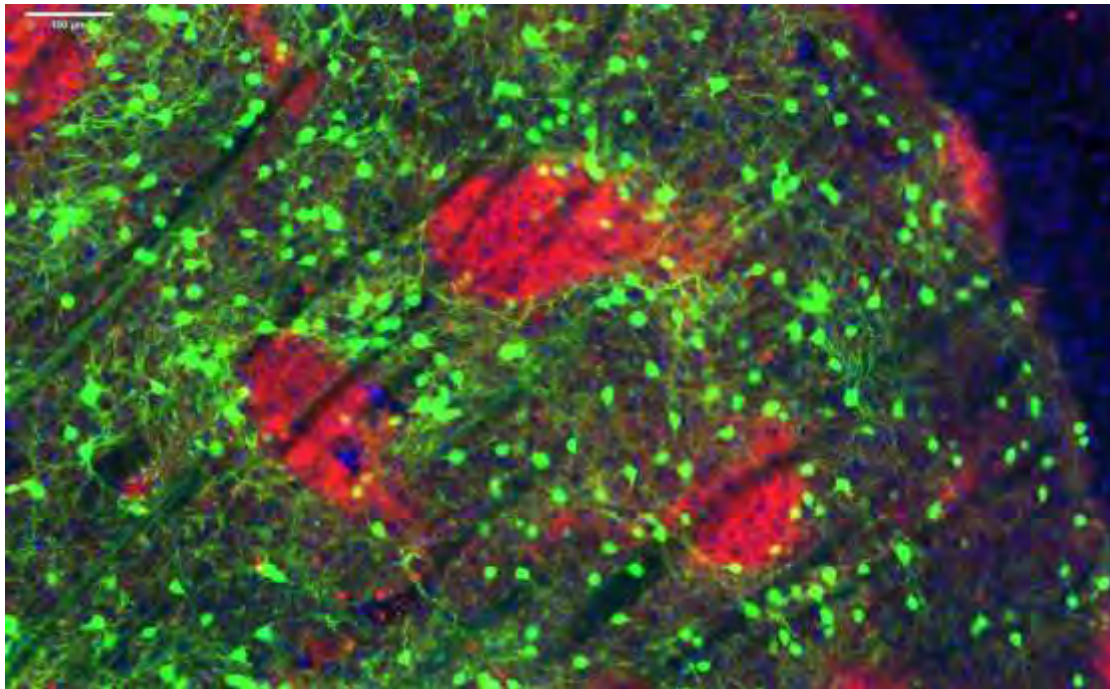
1.3.3 Δομές του ραβδωτού σώματος : Πλάκες (Patches) και Στρώμα (Matrix)

Τα σήματα από τον φλοιό μεταδίδονται μέσω της άμεσης και έμμεσης οδού με τη μεσολάβηση νευρώνων του ραβδωτού σώματος που διαπλέκονται μεταξύ τους. Το ραβδωτό σώμα περιέχει ακόμη ένα σύστημα με πιο μακροσκοπική οργάνωση των MSNs το οποίο αποτελείται από τις πλάκες και το στρώμα [19].

Τα πρώτα στοιχεία για τις συγκεκριμένες δομές του ραβδωτού σώματος εμφανίστηκαν με τη χρήση ιστοχημικής ανίχνευσης του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE) [22]. Η χρώση AChE αποκάλυψε την παρουσία πολλών περιοχών με χαμηλή ενεργότητα AChE (πλάκες) βυθισμένων σε ένα πλαίσιο έντονης ενεργότητας AChE (στρώμα). Επιπλέον, η ανοσοκυτταροχημική ανίχνευση του μ-οπιοειδούς υποδοχέα αποκάλυψε μία αυξημένη έκφρασή του εντός των πλακών και ασθενέστερη έκφραση στο στρώμα [23,24]. Από νευροχημική προοπτική, οι πλάκες χαρακτηρίζονται από ισχυρή ανοσολογική αντίδραση ενάντια στην εγκεφαλίνη, την ουσία P, το GABA και την νευροτενσίνη [25,26], ενώ το στρώμα είναι εμπλουτισμένο με πρωτεΐνες δέσμησης ασβέστιου, όπως η παρβαλβουμίνη (PV) [29] και η καλβιδίνη [28].

Δενδρίτες των MSNs οι οποίοι βρίσκονται στις πλάκες δεν εισέρχονται ποτέ στο στρώμα. Το ίδιο ισχύει και για τους MSNs του στρώματος. Αυτός ο διαχωρισμός των MSNs αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1988 [29] και το 1989 [30] και επιβεβαιώθηκε πρόσφατα [31]. Επιπλέον οι MSNs του στρώματος νευρώνουν τη GPe, την GPi, καθώς και την SNr, ενώ οι MSNs που βρίσκονται στα patches απολήγουν κυρίως στην SNc, αλλά έχουν και κάποιες απολήξεις στις GPe, GPi και SNr [26,31,32,33,34].

Κινητικές και αισθητήριες περιοχές του εγκεφαλικού φλοιού, μαζί με προβολές από τον θάλαμο και ντοπαμινεργικούς νευρώνες της SNc, νευρώνουν κυρίως το στρώμα, ενώ περιοχές του μεταιχμιακού συστήματος, του βασικού και του πλάγιου πυρήνα της αμυγδαλής (basolateral amygdala) καθώς και ραχιαία τμήματα της SNc κυρίως νευρώνουν τις πλάκες [35,36,37,38,39]. Σήμερα δεν υπάρχει μία καθαρή εξήγηση για τη λειτουργική συσχέτιση του διαχωρισμού των δομών στρώμα/πλάκες στο ραβδωτό σώμα.



Εικόνα 4: Η οργάνωση στρώμα/πλάκες του ραβδωτού σώματος. Εικόνα από τομή εγκεφάλου ποντικού στην οποία παρουσιάζεται το ραβδωτό σώμα σημασμένο με κόκκινο και πράσινο χρώμα. Οι πλάκες είναι πλούσιες σε μ-οπιοειδή υποδοχέα (MOR) (κόκκινο) και περικυκλώνονται από το στρώμα που περιέχει νευρώνες οι οποίοι εκφράζουν εγκεφαλίνη (πράσινο), η οποία είναι προσδέτης των MOR. Πηγή: *M. Banghart, S. Neufeld, and B.L. Sabatini*

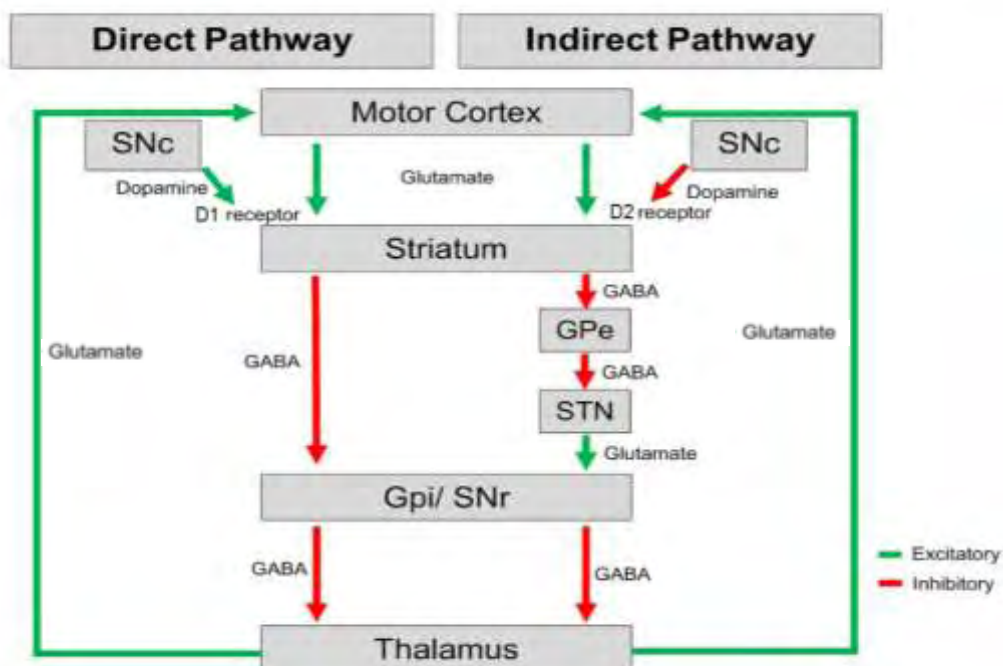
1.4 Το έμμεσο και το άμεσο μονοπάτι των βασικών γαγγλίων

Όπως προαναφέρθηκε, οι μεσαίου μεγέθους ακανθωτοί νευρώνες χωρίζονται σε δύο υποτύπους και ρυθμίζουν άμεσα (direct pathway) ή έμμεσα (indirect pathway) τους πυρήνες εξόδου οι οποίοι είναι η εσωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας και η συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας. Το βασικό μοντέλο των δύο μονοπατιών προτάθηκε το 1986 [21]. Σύμφωνα με αυτό, η ισορροπία μεταξύ των δύο μονοπατιών είναι απαραίτητη για την επίτευξη φυσιολογικής κίνησης. Τα σήματα εξόδου των βασικών γαγγλίων δρουν ανασταλτικά στον θάλαμο μέσω GABAεργικών συνάψεων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο ρυθμός της αναστολής είναι αρκετά υψηλός. Τα δύο μονοπάτια ρυθμίζουν αυτό το ρυθμό, δρώντας ανταγωνιστικά το ένα με το άλλο. Η αναστολή που πραγματοποιείται μέσω των πυρήνων εξόδου των

βασικών γαγγλίων προς τον θάλαμο αναστέλλεται από το άμεσο μονοπάτι το οποίο προωθεί την κίνηση. Σε αντίθεση, το έμμεσο μονοπάτι διεγείρει την ανασταλτική έξοδο των πυρήνων εξόδου προς τον θάλαμο και έτσι παρεμποδίζει την κίνηση.

Κατά το άμεσο μονοπάτι οι GABAεργικές προβολές των D1 MSNs στέλνουν άμεσα μηνύματα, στην GPi και στην SNr. Οι D1 MSNs είναι GABAεργικοί και αναστέλλουν την GPi και την SNr οι οποίες απολήγουν σε πυρήνες του θαλάμου. Η αναστολή των GABAεργικών νευρώνων της GPi και της SNr έχει ως αποτέλεσμα την εμπόδιση της αναστολής του θαλάμου. Έτσι ο θάλαμος είναι ελεύθερος να στείλει γλουταμινικό οξύ στον φλοιό προκαλώντας τη διέγερσή του και την έναρξη της κίνησης.

Κατά το έμμεσο μονοπάτι οι D2 MSNs αρχικά απολήγουν στην GPe και έτσι γίνεται έμμεση ρύθμιση των πυρήνων εξόδου GPi και SNr μέσω συνδέσεων που περιλαμβάνουν την GPe και τον STN. Πιο αναλυτικά, οι νευρώνες της έμμεσης οδού που είναι GABAεργικοί συνδέονται με τη GPe την οποία και αναστέλλουν. Η GPe κανονικά στέλνει ανασταλτικά μηνύματα στον STN. Κατ' αυτόν τον τρόπο ο STN δεν απενεργοποιείται και ενεργοποιεί μέσω γλουταμινεργικών συνδέσεων την GPi και την SNr. Οι πυρήνες εξόδου απολήγουν σε νευρώνες πυρήνων του θαλάμου. Με αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται αναστολή των γλουταμινεργικών νευρώνων του θαλάμου οι οποίοι νευρώνουν περιοχές του κινητικού φλοιού. Ως αποτέλεσμα, παρατηρείται καταστολή του κινητικού φλοιού και συνεπώς αναστολή της κίνησης [29].



Εικόνα 5: Απεικόνιση του άμεσου και του έμμεσου μονοπατιού, όπου το πράσινο δείχνει την διέγερση και το κόκκινο την αναστολή. SNc: συμπαγής μούρα της μέλαινας ουσίας, Motor cortex: κινητικός φλοιός, Striatum: ραβδωτό σώμα, GPe: εξωτερική μούρα της ωχράς σφαίρας, STN: υποθαλαμικός πυρήνας, Gpi: εσωτερική μούρα της ωχράς σφαίρας, SNr: δικτυωτή μούρα της μέλαινας ουσίας, Thalamus: θάλαμος.

1.4.1 Ρύθμιση του έμμεσου και του άμεσου μονοπατιού

Το κυρίαρχο μοντέλο της λειτουργίας των βασικών γαγγλίων προτείνει ότι η δραστηριότητα της άμεσης και της έμμεσης οδού καταλήγει σε αντίθετα αποτελέσματα όσον αφορά την κίνηση. Αυτό το μοντέλο βασίζεται στην ιδέα ότι οι υποκινητικές νευρολογικές διαταραχές, όπως η νόσος του Parkinson, προκύπτουν ως αποτέλεσμα της υπερδραστηριότητας της έμμεσης οδού, ενώ οι υπερκινητικές διαταραχές, όπως η δυστονία, προκύπτουν μετά από υπερδραστηριότητα της άμεσης οδού [9,40].

Το γεγονός ότι οι D1 και οι D2 υποδοχείς κατανέμονται αντίστοιχα σε MSNs του άμεσου μονοπατιού (direct-MSNs) και MSNs του έμμεσου μονοπατιού (indirect-MSNs) παρέχει μια κυτταρική και μοριακή βάση για τη διαφορετική ρύθμιση αυτών των δύο οδών [41]. Σε πειραματικά μοντέλα για την νόσο του Πάρκινσον, η μείωση της ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα που έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της μεσολαβούμενης από τους D1 υποδοχείς επαγωγή της κίνησης καθώς και η αναστολή της κίνησης με τη μεσολάβηση των D2 υποδοχέων, προάγουν αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση σε νευρώνες

της άμεσης και της έμμεσης οδού. Κατά αυτόν τον τρόπο η μείωση της ντοπαμίνης προκαλεί την έκφραση γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν υποδοχείς ντοπαμίνης και νευροπεπτιδία σε νευρώνες της έμμεσης οδού. Αυτό αναστρέφεται με τη χρήση D1 αγωνιστών [41]. Στο σύνολό τους αυτές οι μελέτες αποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση των D1 και D2 υποδοχέων έχει αντίθετα αποτελέσματα στην λειτουργία της άμεσης και της έμμεσης οδού όπως μετράται με την γονιδιακή έκφραση και συνοδεύεται με αντίθετα αποτελέσματα όσον αφορά την κίνηση. Ενώ αυτές οι μελέτες συγκλίνουν με το βασικό μοντέλο που αναφέρει ότι η δραστηριότητα στην άμεση οδό διευκολύνει τη συμπεριφορά, ενώ η δραστηριότητα στην έμμεση οδό καταστέλλει τη συμπεριφορά, περιορίζονται μόνο σε συγκεκριμένες πειραματικές προσεγγίσεις.

Τεχνικές οπτογενετικής, στις οποίες γίνεται στόχευση διαφόρων υποτύπων των καναλιών ροδοψίνης (ChR) σε συγκεκριμένους κυτταρικούς πληθυσμούς, επιτρέπουν την άμεση ενεργοποίηση συγκεκριμένων υποπληθυσμών νευρώνων και την ανάλυση της επίδρασης τους στη συμπεριφορά. Η εφαρμογή αυτών των τεχνικών σε μοντέλα της νόσου του Πάρκινσον απέδειξε ότι η επιλεκτική ενεργοποίηση του έμμεσου μονοπατιού έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή την κινητικής συμπεριφοράς, ενώ η επιλεκτική ενεργοποίηση του άμεσου μονοπατιού ενισχύει την κινητική συμπεριφορά [42], πράγμα που συμφωνεί με το κλασσικό μονοπάτι. Αυτή η μελέτη επιπλέον παρέχει μια άμεση απόδειξη ότι η δραστηριότητα του άμεσου και του έμμεσου μονοπατιού στο ραβδωτό σώμα ασκεί διαφορετικό έλεγχο στην κινητική συμπεριφορά.

Άλλες μελέτες με τη χρήση αυτής της προσέγγισης έχουν επεκτείνει τις επιπτώσεις στη συμπεριφορά που οφείλονται στα δύο μονοπάτια και την ενισχύουν ή την αναστέλλουν [42]. Τα πιο σημαντικά αποτελέσματα που υποστηρίζουν το μοντέλο που αναφέρει ότι η δραστηριότητα στο άμεσο μονοπάτι ενισχύει την κίνηση και η δραστηριότητα στο έμμεσο μονοπάτι την αναστέλλει, προέρχονται από έρευνες σε ζωικά μοντέλα για τη νόσο του Πάρκινσον. Νέες έρευνες οι οποίες εξετάζουν τη δράση των δύο μονοπατιών δείχνουν μια πιο πολύπλοκη σχέση μεταξύ τους όσον αφορά την έναρξη της κινητικής συμπεριφοράς [43]. Πλέον έχει καταστεί γνωστό ότι τα βασικά γάγγλια έχουν πολλούς βρόχους (loops), όπου φλοιικές και υποφλοιικές προεκβολές αλληλεπιδρούν με βρόχους επανεισόδου δημιουργώντας ένα πολύπλοκο δίκτυο το οποίο είναι υπεύθυνο για την επαγωγή ή την αναστολή γεγονότων και σημάτων.

1.5 Η εξωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας

Η εξωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας αποτελείται κυρίως από δύο κυτταρικούς τύπους [44]. Παρόλο που όλοι οι νευρώνες που προβάλλουν από την ωχρά σφαίρα χρησιμοποιούν το GABA ως νευροδιαβιβαστή, εμφανίζουν μορφολογικές αλλά και νευροχημικές διαφορές. Ο ένας τύπος, ο οποίος εμφανίζει μεγάλο κυτταρικό σώμα, περιέχει παραβαλβουμίνη (PV), ενώ στον άλλο τύπο που χαρακτηρίζεται γενικά από μικρότερο κυτταρικό σώμα η ουσία απουσιάζει [44]. Οι νευρώνες που περιέχουν παραβαλβουμίνη (PV) εμφανίζονται πολυπληθέστεροι.

Οι απολήξεις των δύο μορφολογικά και νευροχημικά διαφορετικών τύπων νευρώνων επίσης φαίνεται να διαφέρουν [44]. Οι θετικοί για την παραβαλβουμίνη απολήγουν στον υποθαλαμικό πυρήνα στην εσωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας και στη μέλαινα ουσία, ενώ οι αρνητικοί στην παραβαλβουμίνη νευρώνουν κυρίως τον υποθαλαμικό πυρήνα. Και οι δύο τύποι νευρώνων επίσης φαίνεται να νευρώνουν το ραβδωτό σώμα, πράγμα που ερευνάται αργότερα και θα συζητηθεί στην παρούσα εργασία.

Οι νευρώνες της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας (GPe) δέχονται σήματα εισόδου από το ραβδωτό σώμα [45,46,47], τα οποία είναι ανασταλτικά [48] και σήματα εισόδου από τον υποθαλαμικό πυρήνα (STN), τα οποία είναι διεγερτικά [49]. Τα σήματα που προέρχονται από το ραβδωτό σώμα φαίνεται να είναι τα κυρίαρχα μηνύματα εισόδου και εμφανίζουν χαρακτηριστική συναπτική οργάνωση [50].

Τα σήματα εξόδου από την εξωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας κατευθύνονται στον υποθαλαμικό πυρήνα, στην εσωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας και στην μέλαινα ουσία [44,51]. Σήματα εξόδου από την εξωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας, κατευθύνονται στο ραβδωτό σώμα δημιουργώντας έναν μηχανισμό ανατροφοδότησης [52,53,54].

1.5.1 Προβολές της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας στο ραβδωτό σώμα : Πρωτότυποι (Prototypic) και Αρκυπαλιδικοί (Arkyvallidal) κυτταρικοί πληθυσμοί

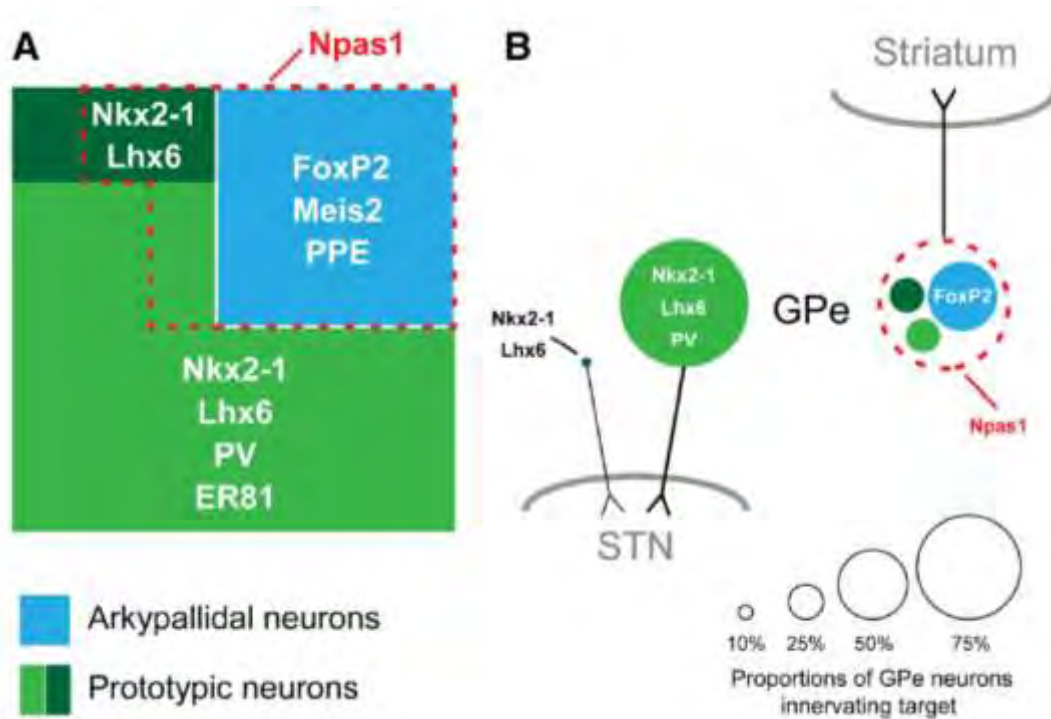
Μέχρι τώρα το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας ήταν συγκεντρωμένο στην προβολές της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας στον υποθαλαμικό πυρήνα, στην εσωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας και στην μέλαινα ουσία, τα οποία είναι μέρος του έμμεσου μονοπατιού. Ωστόσο πρόσφατες μελέτες άρχισαν να δείχνουν την σημαντικότητα του μηχανισμού ανατροφοδότησης

που δημιουργείται από τα σήματα της GPe στο ραβδωτό σώμα [10,55,56]. Πρόσφατες μελέτες παρέχουν έναν λεπτομερή χαρακτηρισμό αυτών των νευρώνων που προβάλλουν στο ραβδωτό σώμα σε φυσιολογικό, μοριακό επίπεδο αλλά και όσον αφορά τη συνδεσιμότητα τους.

Ο Mallet και οι συνεργάτες του το 2012 μετά από έρευνα σε παρκινσονικούς αρουραίους ανακάλυψαν δύο είδη νευρώνων που απελευθερώνουν GABA με ή χωρίς την παρουσία ενός νευροπεπτιδίου [10]. Τα δύο αυτά είδη ονομάστηκαν πρωτότυποι και αρκυπαλιδικοί νευρώνες [10]. Αρχικά διαχωρίστηκαν μέσω νευροχημικών και δομικών διαφορών καθώς βρέθηκε ότι οι περισσότεροι πρωτότυποι νευρώνες εκφράζουν παρβαλβουμίνη, ενώ οι αρκυπαλιδικοί όχι [10]. Επίσης οι αρκυπαλιδικοί, σε αντίθεση με τους πρωτότυπους, εκφράζουν προεπρεγκεφαλίνη (PPE) και χρησιμοποιούν την εγκεφαλίνη ως συνδιαβιβαστή (cotransmitter) [10]. Επιπλέον οι πρωτότυποι νευρώνες νευρώνουν και αναστέλλουν μέσω GABAεργικών συνδέσεων τον υποθαλαμικό πυρήνα με μικρό αριθμό προβολών στο ραβδωτό σώμα, ενώ οι αρκυπαλιδικοί παρέχουν ένα μαζικό σήμα εισόδου στο ραβδωτό σώμα [10].

Ακόμα πιο πρόσφατα μετά από έρευνα από τον Abdi, Mallet και συνεργάτες σε υγιείς αρουραίους [57], βρέθηκαν ακόμα περισσότεροι δείκτες και χαρακτηριστικά για τη διαφοροποίηση των δύο πληθυσμών. Οι πρωτότυποι νευρώνες χαρακτηρίζονται από την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων Nkx2-1 και Lhx6 (με πολλούς από αυτούς επίσης να εκφράζουν παρβαλβουμίνη και τον μεταγραφικό παράγοντα ER81) και αποτελούν περίπου τα 2/3 όλων των GPe νευρώνων [57]. Αντίθετα οι αρκυπαλιδικοί νευρώνες χαρακτηρίζονται από την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων FoxP2 και Meis2.

Όσον αφορά το προφίλ δραστηριότητας των νευρώνων, οι πρωτότυποι χαρακτηρίζονται ως νευρώνες μεγάλης συχνότητας εκφόρτισης (high-frequency discharge neurons) που περιστασιακά κάνουν παύσεις [58,59,60]. Αντίθετα, ο ρυθμός πυροδότησης (firing rate) των αρκυπαλιδικών είναι χαμηλότερος και χαρακτηρίζονται ως νευρώνες χαμηλής συχνότητας εκφόρτισης [58]. Επιπλέον, η αυτόνομη πυροδότηση των πρωτότυπων είναι πιο γρήγορη και λιγότερο ασταθής σε σχέση με τους αρκυπαλιδικούς νευρώνες [61].



Εικόνα 6: Δείκτες διαφοροποίησης και νευρικές απολήξεις των πρωτότυπων και αρκυπαλιδικών νευρώνων. **(A)** Οι δύο βασικοί GABAεργικοί κυτταρικοί τύποι της GPe στον αρουραίο. Οι χρωματικές περιοχές δείχνουν το μέγεθος του πληθυσμού των αρκυπαλιδικών νευρώνων (μπλε) και των πρωτότυπων νευρώνων (ανοιχτό και σκούρο πράσινο). Επίσης παρουσιάζονται οι χαρακτηριστικοί μοριακοί δείκτες για την αναγνώριση του κάθε τύπου. Και τα δύο είδη κυττάρων, αλλά κυρίως τα αρκυπαλιδικά, εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα Npas1 (κόκκινη διακεκομμένη γραμμή) **(B)** Σχηματική απεικόνιση των δύο κυτταρικών πληθυσμών όπου φαίνονται οι απολήξεις στο ραβδωτό σώμα (striatum) (δεξιά) και στον υποθαλαμικό πυρήνα (STN) (αριστερά). Το μεγαλύτερο ποσοστό των νευρώνων της GPe είναι πρωτότυποι. Ένα μικρό ποσοστό των νευρώνων είναι αρκυπαλιδικοί οι οποίοι δεν απολήγουν στον υποθαλαμικό πυρήνα (STN) αλλά μόνο στο ραβδωτό σώμα. Πηγή: Abdi, A., Mallet, N., Foad, Y., Sharott, A., Dodson, P.D., Nakamura, K.C., Suri, S., Avery, S.V, Larvin, J.T, Garas, F.N, Garas, S.N, Vinciati, F., Morin, S., Bezard, E., Baufreton, J., Magill, P.J., Prototypic and Arkypallidal Neurons in the Dopamine-Intact External Globus Pallidus. *J. Neurosci.* 35, 6667-6668.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής ήταν ο χαρακτηρισμός διακριτών μονοσυναπτικών σημάτων από αρκυπαλιδικούς (arkypallidal) και πρωτότυπους (prototypic) πληθυσμούς κυττάρων της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας (GPe) σε D1, D2 πληθυσμούς του ραβδωτού σώματος (striatum) με τη χρήση *cre* εξαρτώμενου διαγονιδιακού ιού της λύσσας. Ο χαρακτηρισμός συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων και των συνδέσεων τους θα βοηθήσει στην επιπλέον διερεύνηση των πολύπλοκων συστημάτων των βασικών γαγγλίων.

Κεφάλαιο 2

Μεθοδολογία

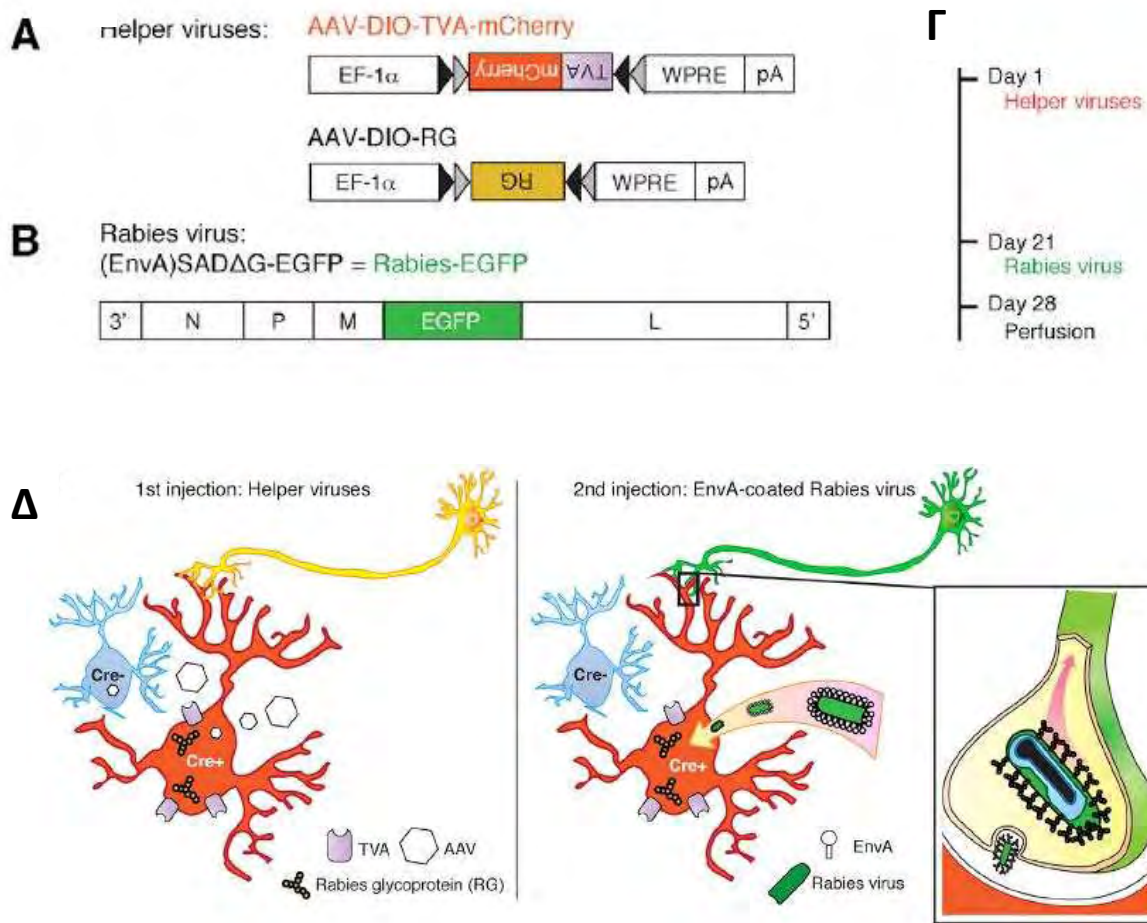
2.1 Το σύστημα tracing του ιού της λύσσας (rabies virus)

Η συνδεσιμότητα μεταξύ κυκλωμάτων στον εγκέφαλο πραγματοποιείται κυρίως με τη χρήση χημικών ιχνηλατών (tracers) οι οποίοι λειτουργούν είτε παλινδρομικά (retrograde tracing) είτε προδρομικά (anterograde tracing), παρέχοντας οπτικοποίηση των αξόνων και των στόχων τους. Στη συγκεκριμένη έρευνα για την παρατήρηση των νευρώνων που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκε γενετικά τροποποιημένος ιός της λύσσας ψευδοτυποποιημένος (pseudotyped) με *EnvA*, του οποίου η είσοδος στο DNA είναι εξαρτώμενη από το σύστημα *Cre-LoxP* [62,63]. Ο ιός λειτουργεί παλινδρομικά, δηλαδή κατευθύνεται μία σύναψη προς τα πίσω. Με αυτό τον τρόπο γίνεται παρατήρηση των κυττάρων που νευρώνουν την περιοχή της έγχυσης.

Κατά τη γενική μέθοδο (Εικόνα 7), αρχικά γίνεται έγχυση μέσω βελόνας *Cre*-εξαρτώμενων βοηθητικών ιών στον εγκέφαλο ποντικού ο οποίος παράγει την *Cre* ρεκομπινάση σε συγκεκριμένο τύπο κυττάρων. Οι βοηθητικοί ιοί συμβάλλουν ώστε η μόλυνση από τον ιό της λύσσας να επιτευχθεί σε μία συγκεκριμένη περιοχή—συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο, αλλά και να έχει παλινδρομική μονοσυναπτική εξάπλωση (monosynaptic retrograde spread). Μετά τον ανασυνδυασμό μέσω της ρεκομπινάσης, οι βοηθητικοί ιοί εκφράζουν δύο πρωτεΐνες, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη μόλυνση από τον ιό της λύσσας και για την εξάπλωσή του. Για να εισέλθει ο τροποποιημένος ιός στα κύτταρα, δηλαδή να τα μολύνει, χρειάζεται τον

υποδοχέα TVA ο οποίος είναι υποδοχέας του ιού της γρίπης. Επιπλέον από τον ιό έχει αφαιρεθεί το γονίδιο της γλυκοπρωτεΐνης G, η οποία είναι απαραίτητη για την εξάπλωση του ιού. Οι βοηθητικοί ιοί εκφράζουν τις δύο πρωτεΐνες στο σημείο την έγχυσης, επιτρέποντας την εξειδικευμένη εξάπλωση του ιού της λύσσας κατά μία σύναψη προς τα πίσω. Ο πληθυσμός των προσυναπτικών νευρώνων που μολύνει ο ιός δεν εκφράζει τη γλυκοπρωτεΐνη G και έτσι ο ιός δεν μπορεί να εξαπλωθεί περαιτέρω. Συνεπώς με τη μέθοδο αυτή η μόλυνση του ιού είναι εξειδικευμένη σε ένα μικρό αριθμό Cre εκφραζόμενων κυττάρων και στους άμεσα προσυναπτικούς νευρώνες που αυτά συνδέονται. Για την επίτευξη της μεθόδου μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ένας βοηθητικός ιός που εκφράζει και τις δύο πρωτεΐνες είτε δύο βοηθητικοί ιοί, ένας για κάθε πρωτεΐνη. Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκε διπλός συνδυασμός AAV (Adeno associated virus - Αδενοσχετιζόμενος ιός) ιού.

Στο εργαστήριο του κ. Κ. Μελέτη (Τμήμα Νευροεπιστημών, Ινστιτούτο Καρολίνσκα) χρησιμοποιείται ιός της λύσσας γενετικά τροποποιημένος ώστε να εκφράζει φθορίζοντες δείκτες, όπως mCherry και EGFP. καθώς και οψίνες που ενεργοποιούνται με το φως, όπως η ChR. Κάποιοι από αυτούς τους δείκτες χρησιμοποιούνται και στο συγκεκριμένο πείραμα.



Εικόνα 7: Πειραματική στρατηγική για μονοσυναπτικό tracing με τη χρήση του συστήματος του ιού της λύσσας. (A) AAV βοηθητικοί ιοί, οι οποίοι εκφράζουν τον υποδοχέα TVA και την RG (γλυκοπρωτεΐνη G του ιού της λύσσας). (B) Γενετικά τροποποιημένος ιός της λύσσας ψευδοτυποποιημένος με EnvA. Το γονίδιο RG έχει αντικατασταθεί με EGFP. (Γ) Η χρονική σειρά των ενέσεων. (Δ) Η πρώτη έγχυση (AAV βοηθητικοί ιοί) προκαλεί την επιλεκτική έκφραση του TVA και της RG σε νευρώνες που εκφράζουν την Cre. Η δεύτερη έγχυση (με τον EnvA-καλυμμένο ιό της λύσσας) έχει ως αποτέλεσμα την είσοδο του ιού της λύσσας σε νευρώνες που εκφράζουν TVA και την εξάπλωσή του παλινδρομικά μέσω του καλύμματος με την RG σε νευρώνες που στέλνουν μήνυμα εισόδου στους προηγούμενους νευρώνες. Πηγή: Pollak Dorocic et.al., *Neuron* 83,663-78, 2014

2.2 Πειραματική διαδικασία

2.2.1 Γονοτύπιση διαγονιδιακών ζώων

Αρχικά έγινε προσδιορισμός ποντικών θετικών για την Cre ρεκομπινάση. DNA απομονώθηκε από κομμάτια ιστού αυτιών ποντικών. Οι ιστοί αρχικά τοποθετήθηκαν σε 150 μl αντιδραστηρίου αλκαλικής λύσης (alkaline lysis reagent), το οποίο περιείχε 25mM NaOH, 0,2mM Na₂-EDTA 2H₂O, σε νερό ελεύθερο νουκλεασών, με pH:12. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στους 95°C για μία ώρα. Έπειτα τα δείγματα αναδεύτηκαν στο vortex για 15 δευτερόλεπτα και ουδετεροποιήθηκαν με 150μl αντιδραστηρίου εξουδετέρωσης (Neutralization reagent) το οποίο περιείχε 40mM Tris-HCl και pH ίσο με 5. Τα δείγματα αναλύθηκαν μετά από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), η οποία πραγματοποιήθηκε ως εξής για κάθε ζώο: 1 μl δείγματος, 10 μl 2x master mix πολυμεράσης, 0,2 μl συγκεκριμένων εκκινητών για το αλληλόμορφο της Cre ρεκομπινάσης (Cre-seq DM1, Cre-seq DM, IMR 0316, IMR 0883) και 8,2 μl νερό. Η διαδικασία της PCR:

- Αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 5 λεπτά και 30 δευτερόλεπτα
- Μείωση της θερμοκρασίας στους 58°C για 30 δευτερόλεπτα ώστε να επέλθει υβριδοποίηση των νουκλεοτιδίων στις συμπληρωματικές αλυσίδες.
- Επώαση στους 68°C για 4 δευτερόλεπτα
- Επανάληψη τις διαδικασίας 30 φορές

Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν μετά από ηλεκτροφόρηση σε τζελ αγαρόζης με περιεκτικότητα 2% με τη χρήση GelRed (Biotium) 1:10.000, το οποίο χρησιμοποιείται αντί για βρωμιούχο εθίδιο για την οπτικοποίηση του DNA. Στα ζώα που είναι θετικά για την Cre παράγονται τρεις ζώνες, με τη δεύτερη να αντιστοιχεί στο προϊόν Cre (500bp) και την υψηλότερη να είναι control.

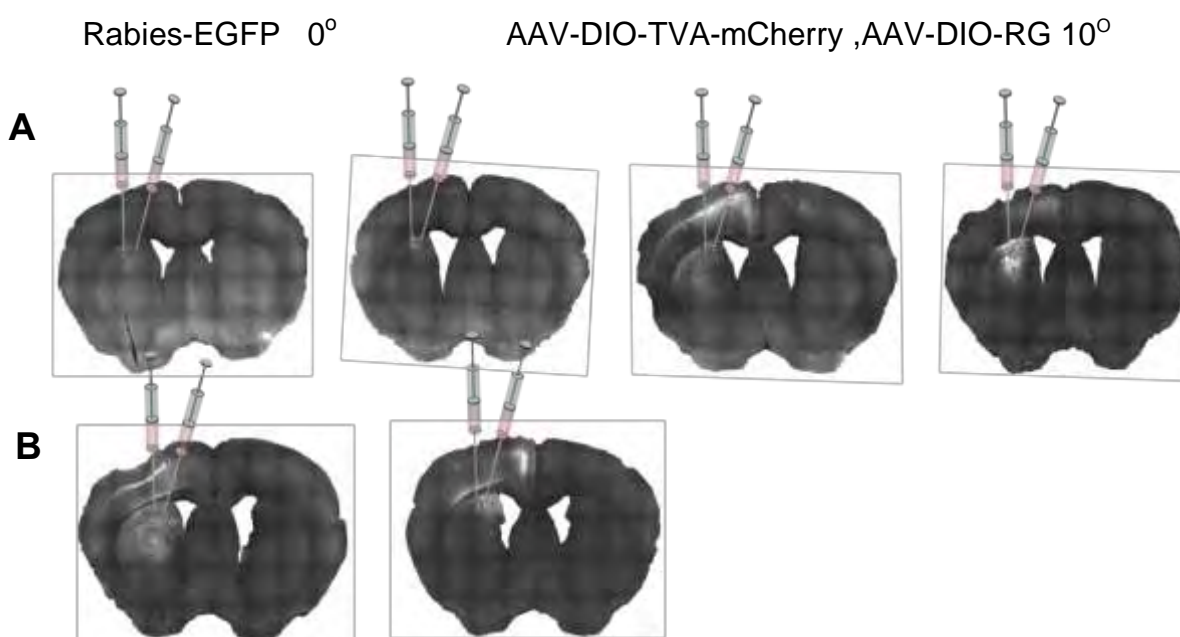
2.2.3 Διαχείριση των ζώων

Τα μοντέλα ποντικών που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη πτυχιακή ήταν τα Adora2a-Cre [64] και D1-cre [64]. Τα Adora2a-Cre παράγουν την Cre ρεκομπινάση στα κύτταρα D2 του ραβδωτού σώματος, ενώ τα D1-cre παράγουν την Cre ρεκομπινάση στα κύτταρα D1 του ραβδωτού σώματος. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα Adora2a-Cre και δύο D1-cre. Η

διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Κατάλληλα Cre θετικά ποντίκια αναισθητοποιήθηκαν με ισοφλουράνιο.
- Στη συνέχεια έγινε έγχυση με τους βοηθητικούς ιούς AAV-DIO-TVA-mCherry και AAV-DIO-RG ώστε να γίνει έκφραση του υποδοχέα TVA και της γλυκοπρωτεΐνης G του ιού της λύσσας [Εικόνα 8].
- Μετά από 21 μέρες έγινε έγχυση του ιού της λύσσας συζευγμένου με EGFP [Εικόνα 8].
- Έπειτα από 7 μέρες επήλθε perfusion όπου τα ποντίκια αναισθητοποιήθηκαν με πεντοβαρβιτάλη και έγινε έγχυση PBS μέσω της καρδιάς και κατόπιν έγχυση μονιμοποιητικού διαλύματος (fixative solution), το οποίο περιείχε 4% (w/v) παραφορμαλδεύδη, 15% (v/v) πικρικό οξύ και 0.05% (v/v) γλουταραλδεύδη σε PBS.
- Οι εγκέφαλοι αφαιρέθηκαν και παρέμειναν στο μονιμοποιητικό διάλυμα για μια νύχτα.
- Τέλος, οι εγκέφαλοι κόπηκαν με μικροτόμο δόνησης (vibratome) σε τομές των 40μm και συλλέχθηκαν σε διάλυμα PBS.

Σε κάποια ζώα χρησιμοποιήθηκε ιός της λύσσας συζευγμένος με m-cherry αντί για EGFP. Η διαδικασία παραμένει ίδια.



Εικόνα 8: Οι εκχύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο ραβδωτό σώμα καθώς και τα κύτταρα του rabies όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο φθορισμού. Αρχικά, έγινε έγχυση των δύο βοηθητικών ιών AAV-DIO-TVA-mCherry και AAV-DIO-RG με κλίση 10° και στη συνέχεια του ιού της λύσσας συζευγμένου με EGFP (Rabies-EGFP) με κλίση 0°. (A) Τα ζώα Adora2a-Cre και (B) τα ζώα D1-Cre.

2.2.3 Ανοσοϊστοχημεία και μικροσκοπία

Οι τομές βάφτηκαν με αντισώματα ώστε να γίνει στόχευση των πρωτότυπων και αρκυπαλιδικών κυττάρων που επικοινωνούν με τους συγκεκριμένους πληθυσμούς του ραβδωτού σώματος. Η ανίχνευση των αρκυπαλιδικών έγινε με τη χρήση αντισώματος έναντι του μεταγραφικού παράγοντα FoxP2, ενώ η ανίχνευση των πρωτότυπων έγινε με τη χρήση αντισώματος έναντι του μεταγραφικού παράγοντα Nkx2.1 αλλά και της παραβαλβουμίνης PV που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας. Συγκεκριμένα:

- Οι τομές τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια τα οποία περιείχαν 1 ml TBST (3% TritonX-100 και 38mM Tris-HCl, 8mM Trizma base, 120mM NaCl σε νερό).
- Στη συνέχεια επωάστηκαν με ανάδευση για μία ώρα.
- Ακολούθως τοποθετήθηκαν σε διάλυμα ανάκτησης αντιγόνου (antigen retrieval solution) το οποίο περιείχε 10mM κιτρικό νάτριο, 0,05% Tween-20 και pH:6 στους 40 °C για 1 με 2 λεπτά.
- Με σκοπό το μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων σύνδεσης, οι τομές επωάστηκαν σε 5% φυσιολογικό ορό γαϊδάρου σε TBST, για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στη συνέχεια οι τομές επωάστηκαν για ένα βράδυ με τα πρωτογενή αντισώματα και χωρίστηκαν. Οι μισές βάφτηκαν με FoxP2 κουνελιού, συγκέντρωσης 1:1000 και PV ινδικού χοιριδίου, συγκέντρωσης 1:1000 σε TBST και οι άλλες μισές με Nkx2.1 κουνελιού, συγκέντρωσης 1:1000 και PV ινδικού χοιριδίου, συγκέντρωσης 1:1000 σε TBST.
- Την επόμενη μέρα πλύθηκαν δύο φορές από 10 λεπτά σε TBST.
- Στη συνέχεια επωάστηκαν για 4 ώρες με τα δευτερογενή αντισώματα, τα οποία ήταν cy3 κουνελιού, συγκέντρωσης 1:500 και cy5 ινδικού χοιριδίου, συγκέντρωσης 1:500 σε TBST. Στην περίπτωση του ιού της λύσσας που περιείχε m-cherry, χρησιμοποιήθηκε 488 κουνελιού, επειδή το cy3 φθορίζει στο ίδιο μήκος κύματος με το m-cherry.
- Τέλος, οι τομές πλύθηκαν σε TBST, TBS και PBS. Επί 10 λεπτά για κάθε διάλυμα.

Ακολούθως οι τομές περάστηκαν σε πλακάκια στα οποία χρησιμοποιήθηκε Slow Fade antifade διάλυμα το οποίο προστατεύει τα δείγματα από φωτολεύκανση (photobleaching) και διατηρεί το σήμα από τις φθορίζουσες ουσίες. Τα δείγματα αναλύθηκαν με μικροσκόπιο φθορισμού Leica DM1000.

Τέλος, έγινε παρατήρηση στη Gpe των κυττάρων που ήταν μολυσμένα με τον ιό της λύσσας, δηλαδή στέλνουν σήματα πίσω στο ραβδωτό σώμα, αφού ο ιός λειτουργεί παλινδρομικά. Από αυτά μετρήθηκαν όσα περιείχαν και τον ιό

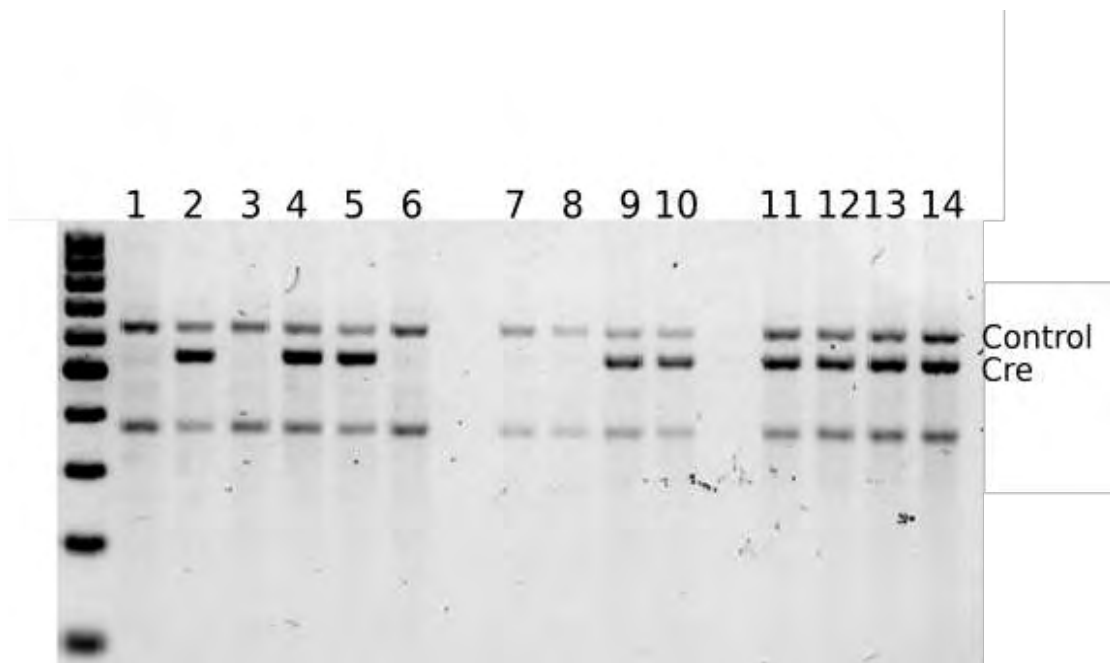
της λύσσας και τον μεταγραφικό παράγοντα FoxP2 (αρκυπαλιδικά), όσα περιείχαν τον μεταγραφικό παράγοντα Nkx2-1 και/ή παρβαλβουμίνη (πρωτότυποι νευρώνες), καθώς και συνδυασμός αυτών. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε με τη χρήση φθορίζοντων μορίων. Ο ιός της λύσσας οπτικοποιήθηκε μέσω της EGFP ή του m-cherry, ενώ τα αρκυπαλιδικά κύτταρα μέσω είτε του cy3 είτε του 488 αντισώματος (FoxP2) και τα πρωτότυπα μέσω του cy3 ή του 488 (Nkx1-2) και του cy5 (PV) αντισώματος.

Κεφάλαιο 3

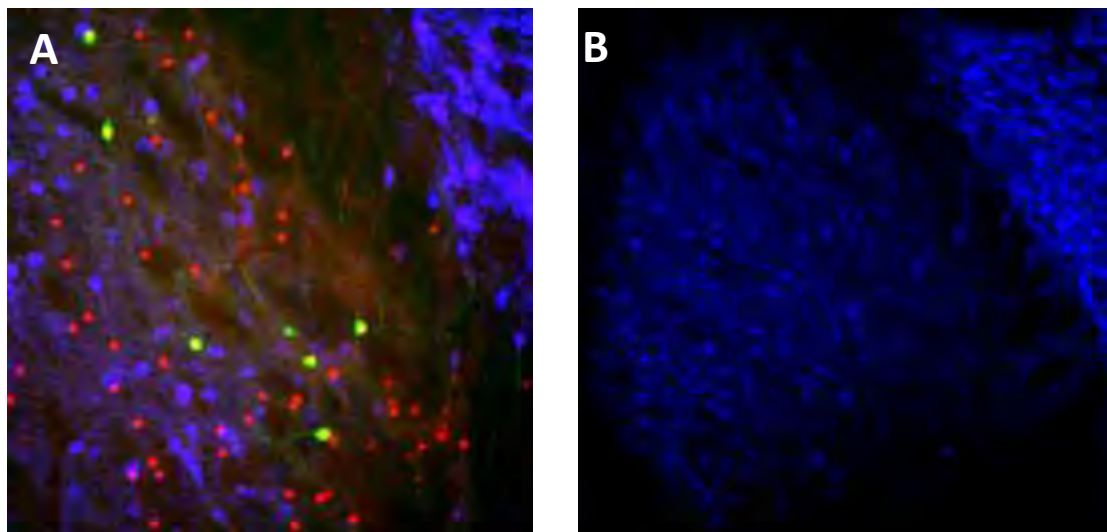
Αποτελέσματα

3.1 Κυτταρικοί πληθυσμοί της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας (GPe) νευρώνουν τους νευρώνες D1 και D2 του ραβδωτού σώματος.

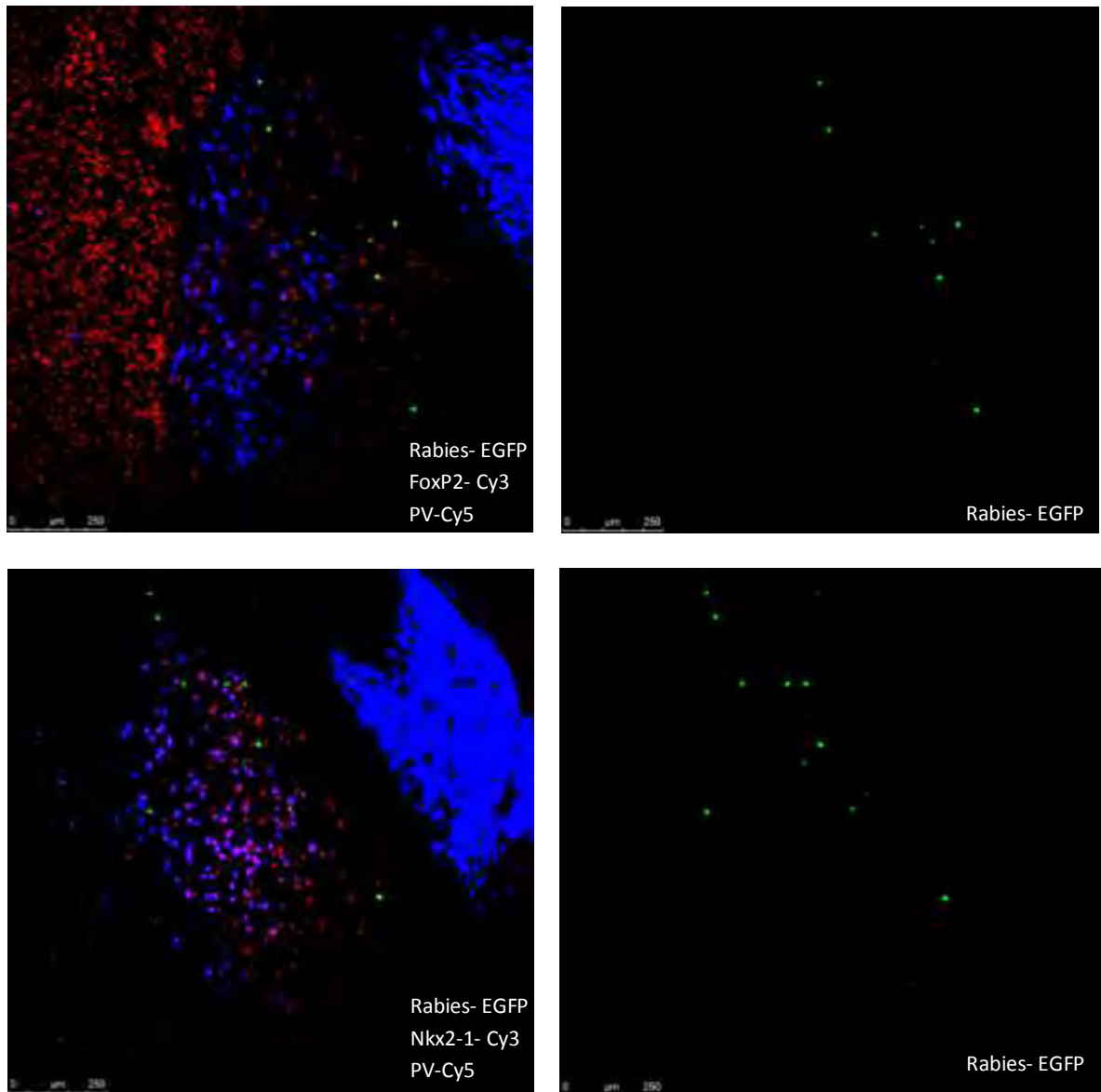
Με σκοπό την ανίχνευση σημάτων από την εξωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας σε D1 και D2 κυτταρικούς πληθυσμούς του ραβδωτού σώματος χρησιμοποιήθηκε το σύστημα παλινδρομικού tracing Cre εξαρτώμενου ιού της λύσσας. Μετά από την έγχυση με τους βοηθητικούς ιούς και τον ιό της λύσσας συζευγμένου με φθορίζοντες ουσίες στο ραβδωτό σώμα ζώων θετικών για την Cre ρεκομπινάση [Εικόνα 9], πραγματοποιήθηκε έλεγχος μέσω μικροσκοπίας φθορισμού για κύτταρα μολυσμένα από τον ιό της λύσσας στην ωχρά σφαίρα, δηλαδή κύτταρα τα οποία στέλνουν σήματα στους συγκεκριμένους κυτταρικούς πληθυσμούς του ραβδωτού σώματος. Για την διάκριση αυτών των κυτταρικών πληθυσμών της ωχράς σφαίρας έγινε χρώση τομών που περιείχαν τις δομές της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας και του ραβδωτού σώματος, με αντισώματα εναντίον του μεταγραφικού παράγοντα FoxP2 για τον χαρακτηρισμό των αρκυπαλιδικών και του Nkx2-1 για τον χαρακτηρισμό των πρωτότυπων. Επίσης πραγματοποιήθηκε χρώση της παρβαλβουμίνης, που χαρακτηρίζει τους πρωτότυπους νευρώνες, ως μάρτυρας. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι η εξωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας νευρώνει τους νευρώνες D1 και D2 του ραβδωτού σώματος, καθώς παρατηρήθηκαν κύτταρα μολυσμένα από τον ιό της λύσσας σε ζώα Adora2a-Cre τα οποία παράγουν τη Cre ρεκομπινάση στους νευρώνες D2 του ραβδωτού σώματος [Εικόνα 11] και σε ζώα D1-Cre τα οποία παράγουν την Cre ρεκομπινάση στους νευρώνες D1 του ραβδωτού σώματος [Εικόνα 12].



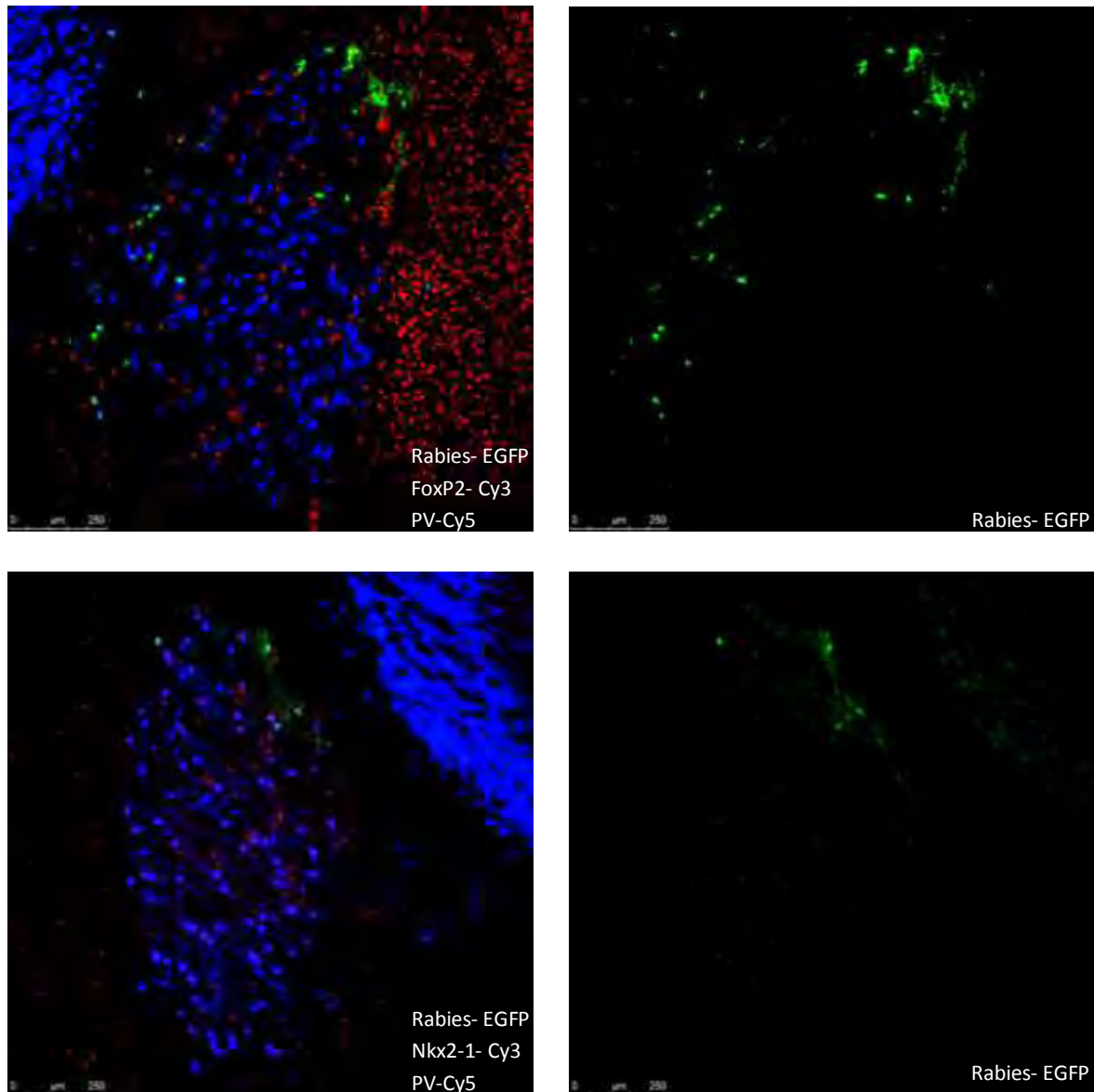
Εικόνα 9: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης, όπου φαίνονται ζώα θετικά στην Cre με το αναμενόμενο προϊόν στα 500 bp.



Εικόνα 10: Χρώσεις της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας όπως φαίνονται στο φθορίζον μικροσκόπιο. Α) Φωτογραφία με φακό 20x από τομή ζώου *Adora2a-Cre* όπου διακρίνονται τα κύτταρα που έχει μολύνει ο ιός της λύσσας μέσω της GFP (πράσινο), οι αρκυταλιδικοί νευρώνες με πρωτογενές αντίσωμα έναντι του μεταγραφικού παράγοντα FoxP2 και δευτερογενές το φθορίζον αντίσωμα Cy3 (κόκκινο), καθώς και οι πρωτότυποι νευρώνες μέσω αντισώματος έναντι της παρβαλβουμίνης και χρήση του φθορίζοντος δεύτερου αντισώματος cy5 (μπλε). Β) Φωτογραφία με φακό 5x που δείχνει πως διακρίνεται η εξωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας μετά από χρώση της παρβαλβουμίνης και χρήση δεύτερου αντισώματος Cy5.



Εικόνα 11: Χρώσεις τις εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας όπως παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού με φακό σε ζώα Adora2a-Cre. Η οπτικοποίηση έγινε μέσω της EGFP (πράσινο) για τον ιό της λύσσας και με τη χρήση πρωτογενών αντισωμάτων έναντι των μεταγραφικών παραγόντων FoxP2 (αρκυπαλιδικοί νευρώνες) και Nkx2-1 (πρωτότυποι νευρώνες), καθώς και έναντι της παρβαλβουμίνης (μάρτυρας για τους πρωτότυπους) και φθοριζόντων δεύτερων αντισωμάτων Cy3 (κόκκινο) και cy5 (μπλε). Στην αριστερή πλευρά φαίνονται όλες οι χρωστικές μαζί, ενώ στη δεξιά πλευρά φαίνονται τα κύτταρα του ιού της λύσσας. Η παρουσία των κυτάρων επιβεβαιώνει ότι η εξωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας στέλνει σήματα στα κύτταρα D2 του ραβδωτού σώματος.



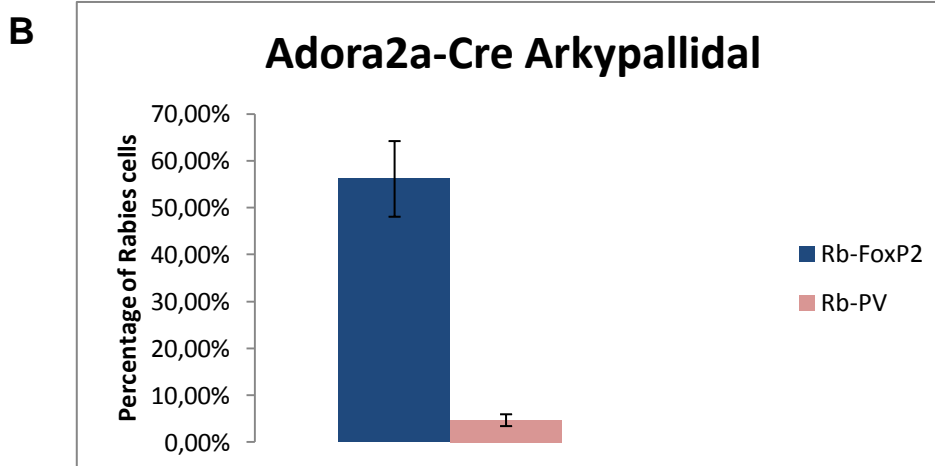
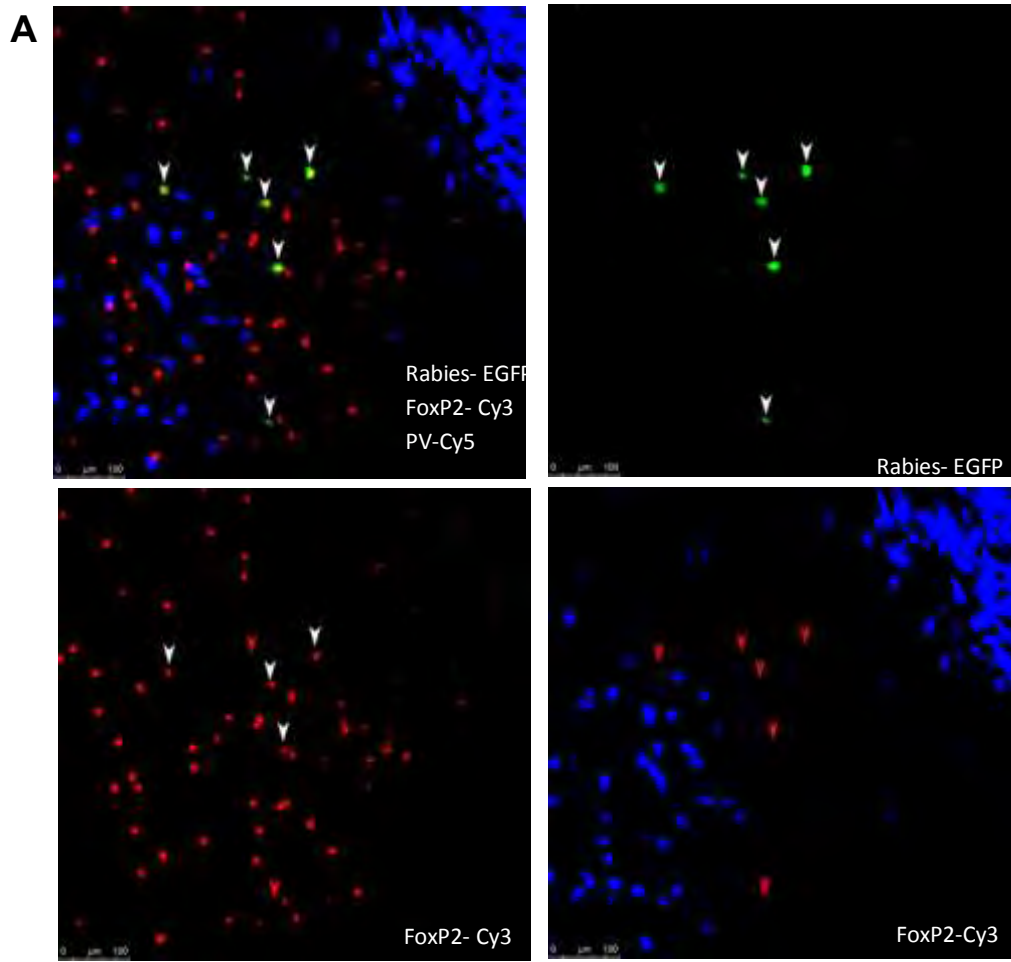
Εικόνα 12: Χρώσεις τις εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας όπως παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού με φακό σε ζώα D1-Cre. Η σπτικοποίηση έγινε μέσω της EGFP (πράσινο) για τον ιό της λύσσας και με τη χρήση πρωτογενών αντισωμάτων έναντι των μεταγραφικών παραγόντων FoxP2 (αρκυπαλιδικοί) και Nkx2-1 (πρωτότυποι), καθώς και έναντι της παρβαλβουμίνης (μάρτυρας για τους πρωτότυπους) και φθοριζόντων δεύτερων αντισωμάτων Cy3 (κόκκινο) και cy5 (μπλε). Στην αριστερή πλευρά φαίνονται όλες οι χρωστικές μαζί, ενώ στη δεξιά πλευρά φαίνονται τα κύτταρα του ιού της λύσσας . Η παρουσία των κυττάρων επιβεβαιώνει ότι η εξωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας στέλνει σήματα στα κύτταρα D1 του ραβδωτού σώματος.

3.2 Οι αρκυπαλιδικοί νευρώνες της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας φαίνεται να νευρώνουν κυρίως τους νευρώνες D2 του έμμεσου μονοπατιού.

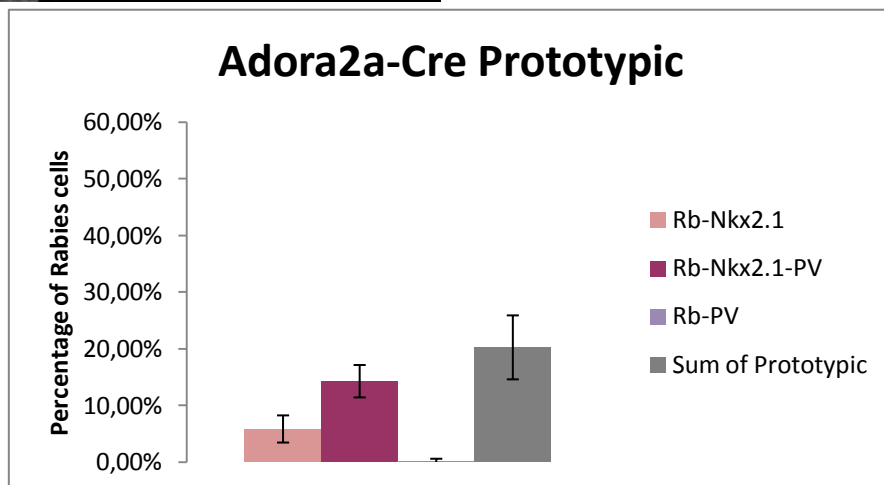
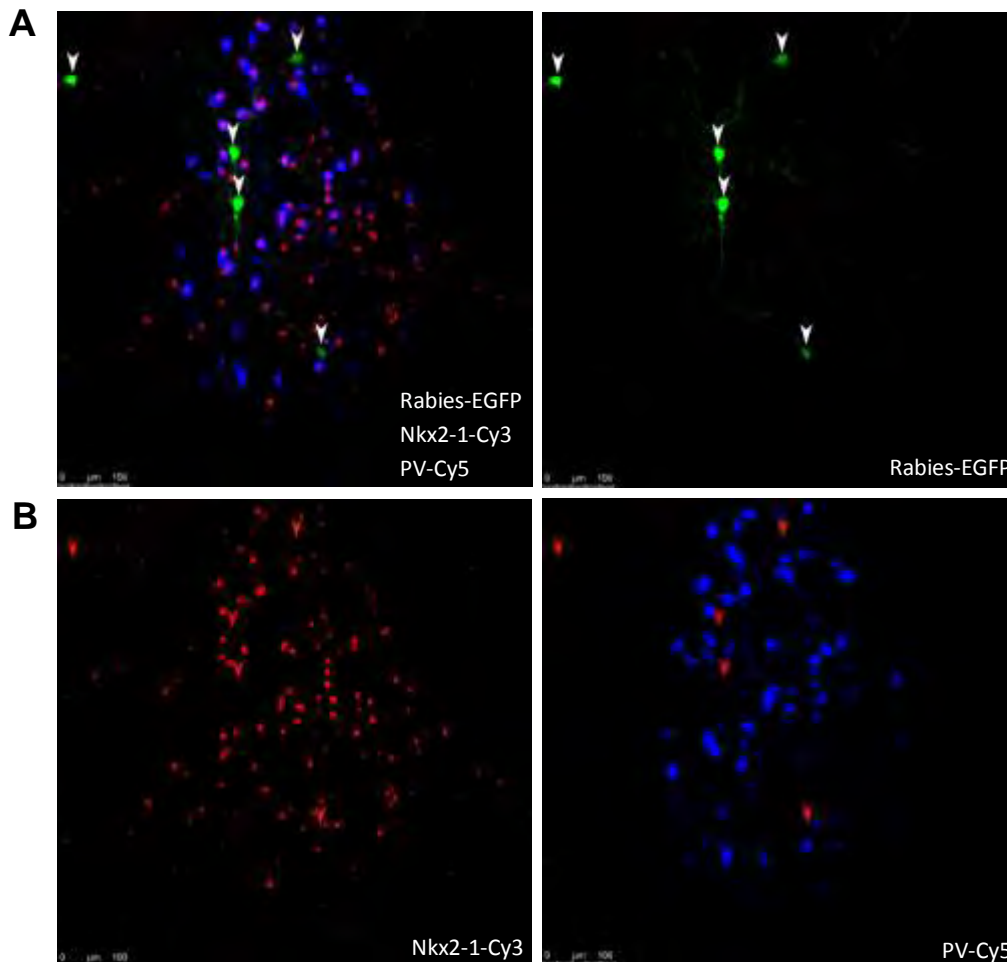
Όπως προαναφέρθηκε, πραγματοποιήθηκε χρώση της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας σε τομές εγκεφάλου από ζώα Adora2a-Cre, δηλαδή ζώα που παράγουν την Cre ρεκομπινάση σε κύτταρα D2 του ραβδωτού σώματος. Στα ζώα αυτά έγινε έκχυση του ιού της λύσσας στο ραβδωτό σώμα και παρατηρήθηκε ότι ο ιός μόλυνε κύτταρα της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας, πράγμα που σημαίνει ότι η εξωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας νευρώνει τα κύτταρα D2 του ραβδωτού σώματος.

Στη συνέχεια, για να προσδιοριστεί ο τύπος των κυττάρων της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας που μεσολαβεί στη μετάδοση σημάτων (αρκυπαλιδικά ή πρωτότυπα) στους νευρώνες D2, έγινε χρώση για τους μεταγραφικούς παράγοντες FoxP2 (αρκυπαλιδικά) και Nkx2-1 (πρωτότυπα). Έγινε επιλογή τομών από τις οποίες μισές βιάφτηκαν για FoxP2 και παρβαλβουμίνη (PV) και μισές για Nkx2-1 και PV. Μέσω του μικροσκοπίου φθορισμού παρατηρήθηκαν οι δύο τύποι κυττάρων. Αρχικά έγινε μέτρηση όλων των κυττάρων στην ωχρά σφαίρα τα οποία μολύνθηκαν από τον ιό της λύσσας και στη συνέχεια υπολογίστηκε το ποσοστό αυτών που παράγουν FoxP2, δηλαδή ανήκουν στην κατηγορία των αρκυπαλιδικών [Εικόνα 13] και το ποσοστό αυτών που εκφράζουν Nkx2-1 ή παρβαλβουμίνη ή και τα δύο, δηλαδή ανήκουν στην κατηγορία των πρωτότυπων [Εικόνα 14].

Το σύνολο των κυττάρων του ιού της λύσσας που μετρήθηκαν στα τέσσερα ζώα Adora2a-Cre, όσον αφορά τον έλεγχο του FoxP2, ήταν 368, με 60 στο πρώτο ζώο, 29 στο δεύτερο, 228 στο τρίτο και 51 στο τέταρτο. Όσον αφορά τον έλεγχο του Nkx2-1 ήταν 249 στο σύνολο, με 23 στο πρώτο ζώο, 37 στο δεύτερο, 150 στο τρίτο και 39 στο τέταρτο. Από αυτά μετρήθηκαν τα ποσοστά, στη συνέχεια οι μέσοι όροι και τέλος οι τυπικές αποκλίσεις. Οι μετρήσεις έδειξαν ότι περίπου το 56% των κυττάρων του ιού της λύσσας, με τις τιμές να κυμαίνονται μεταξύ 48%-64%, εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα FoxP2, δηλαδή ανήκουν στην κατηγορία των αρκυπαλιδικών [Εικόνα 13]. Αντίθετα, ένα μικρό ποσοστό περίπου 20% (μέσος όρος τιμών), με τις τιμές να κυμαίνονται μεταξύ 15%-25%, εκφράζουν είτε τον μεταγραφικό παράγοντα Nkx-2-1 είτε παρβαλβουμίνη είτε και τα δύο, δηλαδή ανήκουν στην κατηγορία των πρωτότυπων [Εικόνα 14]. Συμπερασματικά παρατηρούμε ότι οι αρκυπαλιδικοί νευρώνες, νευρώνουν τους D2 του ραβδωτού σώματος σε μεγαλύτερο ποσοστό από τους πρωτότυπους.



Εικόνα 13: (A) Χρώσεις της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας όπως παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού με φακό 20x σε ζώα Adora2a-Cre. Παρατηρούνται τα διαφορετικά κανάλια των χρώσεων. Στις δύο φωτογραφίες πάνω, τα λευκά βελιάκια υποδεικνύουν τα κύτταρα του ιού της λύσσας. Στις δύο κάτω τα λευκά βελιάκια υποδεικνύουν συνεντοπισμό του ιού με τον μεταγραφικό παράγοντα FoxP2 ή την παρβαλβουμίνη (PV), ενώ τα κόκκινα βελιάκια απουσία συνεντοπισμού. (B) Γράφημα στο οποίο παρουσιάζεται ο μέσος όρος των ποσοστών των κυττάρων του ιού της λύσσας στην GPe τα οποία εκφράζουν FoxP2 (56%), καθώς και η διακύμανση (48%-64%). Η PV χρησιμοποιείται ως μάρτυρας για τα πρωτότυπα.



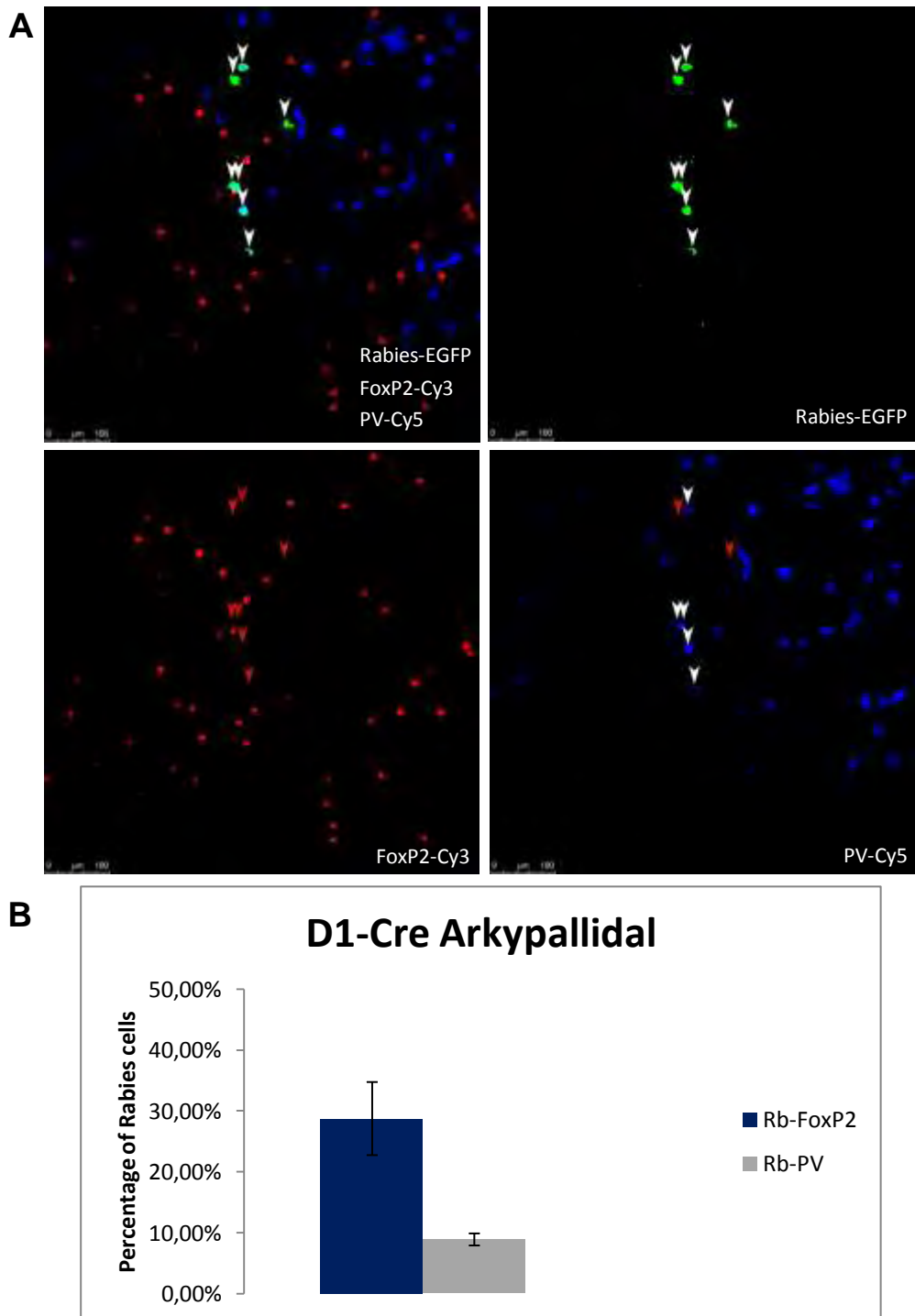
Εικόνα 14: (A) Χρώσεις της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας όπως παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού με φακό 20x σε ζώα Adora-Cre. Παρατηρούνται τα διαφορετικά κανάλια των χρώσεων. Στις δύο φωτογραφίες πάνω, τα λευκά βελιάκια υποδεικνύουν τα κύτταρα του ιού της λύσσας. Στις δύο κάτω τα λευκά βελιάκια υποδεικνύουν συνεντοπισμό του ιού με τον μεταγραφικό παράγοντα Nkx2-1 ή την παρβαλβουμίνη (PV), ενώ τα κόκκινα βελιάκια απουσία συνεντοπισμού. (B) Γράφημα στο οποίο παρουσιάζεται ο μέσος όρος των ποσοστών των κυττάρων του ιού της λύσσας στην GPe τα οποία εκφράζουν Nkx2-1 (6%), Nkx2-1-PV (14%), PV(0,1%) και το συνολικό τους άθροισμα που αποτελεί το σύνολο των πρωτότυπων (20%), καθώς και η διακύμανση των τιμών (15%-25% στο σύνολο των πρωτότυπων).

3.3 Οι πρωτότυποι νευρώνες της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας φαίνεται να νευρώνουν κυρίως τους D1 του άμεσου μονοπατιού.

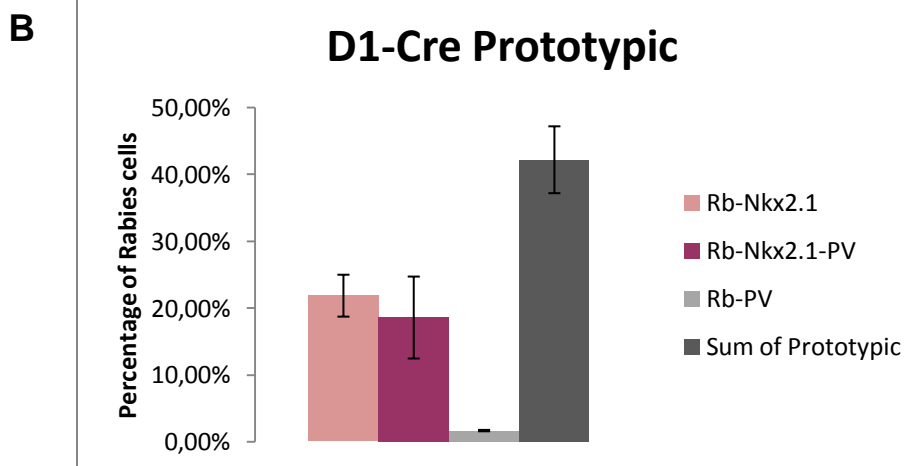
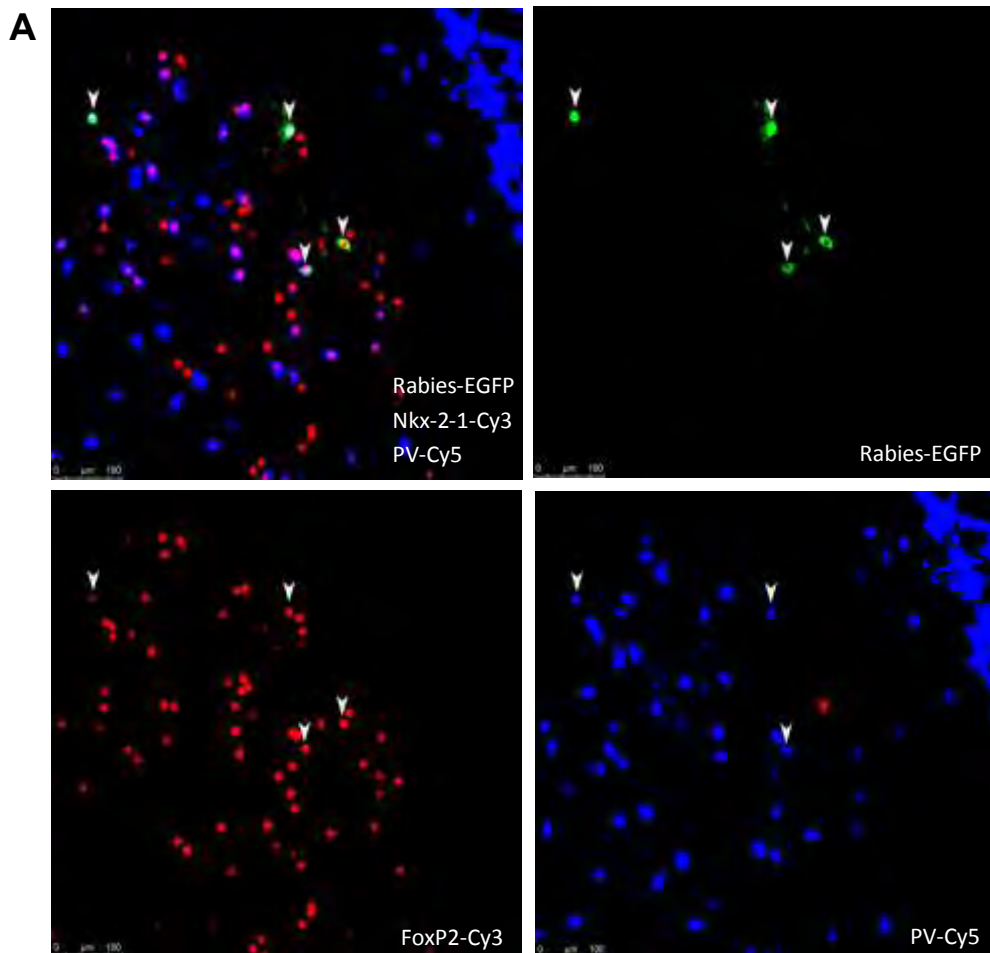
Με παρόμοιο τρόπο πραγματοποιήθηκε χρώση της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας σε τομές εγκεφάλου από ζώα D1-Cre, δηλαδή ζώα που παράγουν την Cre ρεκομπινάση σε κύτταρα D1 του ραβδωτού σώματος. Και σε αυτόν τον τύπο ζώων παρατηρήθηκε ότι ο ιός της λύσσας μόλυνε κύτταρα της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας, δηλαδή η εξωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας νευρώνει και τα κύτταρα D1 του ραβδωτού σώματος.

Για να προσδιοριστεί ο τύπος των κυττάρων της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας που νευρώνει τους D1, επίσης πραγματοποιήθηκε χρώση για τους μεταγραφικούς παράγοντες FoxP2 (αρκυπαλιδικοί) και Nkx2-1 (πρωτότυποι), με επιλογή τομών από τις οποίες οι μισές βάφτηκαν για τον πρώτο μεταγραφικό παράγοντα και την παρβαλβουμίνη (PV), ενώ οι άλλες μισές για τον δεύτερο μεταγραφικό παράγοντα και για PV. Με την χρήση των φθορίζοντων ουσιών έγινε μέτρηση όλων των κυττάρων στην ωχρά σφαίρα τα οποία μολύνθηκαν από τον ιό της λύσσας και ομοίως με τα Adora2a υπολογίστηκε το ποσοστό από αυτά που εκφράζουν FoxP2, δηλαδή είναι αρκυπαλιδικά και το ποσοστό από αυτά που εκφράζουν Nkx2-1 ή παρβαλβουμίνη ή και τα δύο, δηλαδή είναι πρωτότυπα.

Τα σύνολο των κυττάρων του ιού της λύσσας που μετρήθηκαν στα δύο ζώα D1-Cre για να ελεγχθεί ο FoxP2, ήταν 148, με 80 στο πρώτο ζώο και 68 στο δεύτερο. Για τον έλεγχο του Nkx2-1 μετρήθηκαν 173 στο σύνολο, με 61 στο πρώτο ζώο και 112 στο δεύτερο. Έπειτα πραγματοποιήθηκε μέτρηση των ποσοστών, των μέσων όρων καθώς και των τυπικών αποκλίσεων. Οι μετρήσεις έδειξαν ότι περίπου το 29% (μέσος όρος τιμών), με το ποσοστό να κυμαίνεται μεταξύ 23%-35%, των κυττάρων του ιού της λύσσας εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα FoxP2, δηλαδή ανήκουν στην κατηγορία των αρκυπαλιδικών [Εικόνα 13]. Ένα ποσοστό περίπου 43% (μέσος όρος τιμών), με τις τιμές να κυμαίνονται μεταξύ 37%-48%, εκφράζουν είτε τον μεταγραφικό παράγοντα Nkx-2-1 είτε παρβαλβουμίνη είτε και τα δύο, δηλαδή ανήκουν στην κατηγορία των πρωτότυπων [Εικόνα 14]. Άρα παρατηρείται ότι οι πρωτότυποι νευρώνες, νευρώνουν τους D1 του ραβδωτού σώματος σε μεγαλύτερο ποσοστό από τους αρκυπαλιδικούς.



Εικόνα 15: (A) Χρώσεις της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας στο μικροσκόπιο φθορισμού με φακό 20x σε ζώα D1-Cre. Παρατηρούνται τα διαφορετικά κανάλια των χρώσεων. Στις δύο φωτογραφίες πάνω, τα λευκά βελάκια υποδεικνύουν τα κύτταρα του ιού της λύσσας. Στις δύο κάτω τα λευκά βελάκια υποδεικνύουν συνεντοπισμό του ιού με τον μεταγραφικό παράγοντα FoxP2 ή την παρβαλβουμίνη (PV), ενώ τα κόκκινα βελάκια απουσία συνεντοπισμού. (B) Γράφημα στο οποίο παρουσιάζεται ο μέσος όρος των ποσοστών των κυττάρων του ιού της λύσσας στην GPe τα οποία εκφράζουν FoxP2 (29%), καθώς και η διακύμανσή τους (23%-35%). Η PV χρησιμοποιείται ως μάρτυρας για τα πρωτότυπα.



Εικόνα 16: (A) Χρώσεις της εξωτερικής μούρας της ωχράς σφαίρας από μικροσκόπιο φθορισμού με φακό 20x σε ζώα D1-Cre. Παρατηρούνται τα διαφορετικά κανάλια των χρώσεων. Στις δύο φωτογραφίες πάνω, τα λευκά βελάνια υποδεικνύουν τα κύτταρα του ιού της λύσσας. Στις δύο κάτω τα λευκά βελάνια υποδεικνύουν συνεντοπισμό του ιού με τον μεταγραφικό παράγοντα Nkx2-1 ή την παρβαλβουμίνη (PV), ενώ τα κόκκινα βελάνια απουσία συνεντοπισμού. (B) Γράφημα στο οποίο παρουσιάζεται ο μέσος όρος των ποσοστών των κυττάρων του ιού της λύσσας στην GPe τα οποία εκφράζουν Nkx2-1 (22%), Nkx2-1-PV (19%), PV(2%) και το συνολικό τους άθροισμα που αποτελεί το σύνολο των πρωτότυπων (43%) καθώς και η διακύμανση των τιμών (37%-48%).

Συμπεράσματα-Συζήτηση

Το γεγονός ότι η εξωτερική μοίρα της ωχράς σφαίρας προβάλλει πίσω στο ραβδωτό σώμα είναι ήδη γνωστό από το 1981, όταν ανακαλύφθηκε από τον Staines και τους συνεργάτες του [54]. Ωστόσο νέα δεδομένα έχουν δώσει περισσότερες πληροφορίες για το μοριακό και το φυσιολογικό προφίλ αυτών των προβαλλόντων νευρώνων καθώς και για τις διαφορές που εμφανίζουν όσον αφορά τη συνδεσιμότητα. Πρόσφατες μελέτες σε παρκινσονικούς αλλά και υγιείς αρουραίους από τον Mallet και τους συνεργάτες του [10,57], αποκάλυψαν την παρουσία δύο διαφορετικών τύπων GABAεργικών νευρώνων. Σύμφωνα με τη μελέτη αυτά τα δύο είδη νευρώνων που ονομάζονται αρκυπαλιδικοί και πρωτότυποι παρουσιάζουν διαφορές στην έκφραση μεταγραφικών παραγόντων, νευροπεπτιδίων, στη δομή τους, στο ρυθμό πυροδότησης καθώς και στο που προβάλλουν. Οι συγκεκριμένοι ερευνητές στα αποτελέσματα τους αναφέρουν ότι οι αρκυπαλιδικοί νευρώνες προβάλλουν κυρίως στο ραβδωτό σώμα, ενώ οι πρωτότυποι στον υποθαλαμικό πυρήνα, με μικρό αριθμό προβολών στο ραβδωτό σώμα. Επίσης αναφέρουν ότι ενώ οι αρκυπαλιδικοί νευρώνες εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα FoxP2, στους πρωτότυπους εκλείπει και παρατηρείται έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Nkx2-1 καθώς και της παρβαλβουμίνης, με τον Nkx2-1 να εμφανίζεται σε μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων σε σχέση με την παρβαλβουμίνη.

Χρησιμοποιώντας τους παραπάνω δείκτες πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός και ποσοτικοποίηση μονοσυναπτικών σημάτων από τους συγκεκριμένους GABAεργικούς πληθυσμούς νευρώνων της ωχράς σφαίρας σε συγκεκριμένους πληθυσμούς νευρώνων του ραβδωτού σώματος, τους D1 και D2, οι οποίοι αποτελούν μέρος του άμεσου και του έμμεσου μονοπατιού της κίνησης των βασικών γαγγλίων. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το σύστημα παλινδρομικού tracing του ιού της λύσσας συζευγμένου με φθορίζοντες ουσίες.

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι οι αρκυπαλιδικοί νευρώνες απολήγουν στους νευρώνες D2 του ραβδωτού σώματος σε μεγαλύτερο ποσοστό από τους πρωτότυπους, όπως δείχθηκε με τη χρήση ποντικών *Adora2a-Cre*, πράγμα που συμφωνεί με τον Mallet et.al, δηλαδή ότι οι αρκυπαλιδικοί είναι οι κύριοι νευρώνες προβολής στο ραβδωτό σώμα. Αντίθετα, παρατηρείται ότι οι πρωτότυποι προβάλλουν στους νευρώνες D1 του ραβδωτού σώματος σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τους αρκυπαλιδικούς, όπως δείχθηκε με τη χρήση *D1-Cre* ποντικών.

Στην συγκεκριμένη έρευνα δείξαμε για πρώτη φορά ότι τα δύο είδη GABAεργικών, άρα ανασταλτικών νευρώνων, της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας απολήγουν και με διαφορετικές αναλογίες στα δύο είδη νευρώνων (D1 και D2) των μονοπατιών της κίνησης που ξεκινούν από το ραβδωτό σώμα. Η ισορροπία μεταξύ των δύο μονοπατιών των βασικών γαγγλίων είναι απαραίτητη για την ορθή εκτέλεση της κίνησης. Μετατόπιση αυτής της ισορροπίας καταλήγει σε πλήθος νευρολογικών ασθενειών με πιο γνωστή τη νόσο του Πάρκινσον. Στη νόσο του Πάρκινσον πλήθος ερευνών έχει δείξει ένα γενικό μοτίβο υπερλειτουργίας του έμμεσου μονοπατιού (D2), το οποίο αναστέλλει την κίνηση και υπολειτουργίας του άμεσου μονοπατιού (D1) που προωθεί την κίνηση. Τα δύο είδη νευρώνων της εξωτερικής μοίρας της ωχράς σφαίρας που χαρακτηρίσαμε, φαίνεται να συμμετέχουν σε ένα μηχανισμό feedback στα μονοπάτια της κίνησης, αναστέλλοντας είτε τους νευρώνες D1 είτε τους D2. Επιπλέον έρευνα θα μπορούσε να μας δώσει τη δυνατότητα χρήσης των αρκυπαλιδικών και των προτότυπων νευρώνων ως στόχων για τη θεραπεία του Παρκινσον, αλλά και άλλων νευρολογικών ασθενειών που σχετίζονται με αυτά τα μονοπάτια, με στόχο την εύρεση πιο αποτελεσματικών μεθόδων θεραπείας.

Βιβλιογραφία

1. Cisek, P., Kalaska, J.F., 2010. Neural mechanisms for interacting with a world full of action choices. *Annu. Rev. Neurosci.* 33, 269-298.
2. Graybiel, A.M., Aosaki, T., Flaherty, A.W., Kimura, M., 1994. The basal ganglia and adaptive motor control. *Science.* 265, 1826-1831.
3. Wichmann, T., DeLong, M.R., 2003. Functional neuroanatomy of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* 91, 9-18.
4. Yin, H.H., Knowlton, B.J., 2006. The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 464-476.
5. Wilson SAK, 1925. Disorders of motility and tone. *Lancet Neurol* 1: 1–103.
6. Purdon Martin J, 1927. Hemichorea resulting from a location lesion of the brain (the syndrome of the body of Luys). *Brain* 50, 637–651.
7. Stocco, A., Lebiere, C., Anderson, John R., 2010. Conditional Routing of Information to the Cortex: A Model of the Basal Ganglia's Role in Cognitive Coordination. *Psychological Review.* 117, 541–74.
8. Fix, James D., 2008. Basal Ganglia and the Striatal Motor System. *Neuroanatomy (Board Review Series) (4th ed.)*. pp. 274–281.
9. Albin RL., Young AB., Penney JB., 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences* 12, 366-375.
10. Mallet, N., Micklem, B.R., Henny, P., Brown, M.T., Williams, C., Bolam, J.P., Nakamura, K.C., Magill, P.J., 2012. Dichotomous organization of the external globus pallidus. *Neuron.* 74, 1075-1086.
11. Albin RL., Young AB., Penney JB., 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12,366–375.
12. DiFiglia, M., Pasik, P., Pasik, T., 1976. A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res.* 114, 245-256.
13. Bishop, G.A., Chang, H.T., Kitai, S.T., 1982. Morphological and physiological properties of neostriatal neurons: an intracellular horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience.* 7, 179-191.
14. Kemp, J.M., Powell, T.P.S., 1971. The structure of the caudate nucleus of the cat: light and electron microscopy. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 262, 383-401.
15. Kawaguchi, Y., 1993. Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 13, 4908– 4923.
16. Beckstead, R.M., Cruz, C.J., 1986. Striatal axons to the globus pallidus, entopeduncular nucleus and substantia nigra come mainly from separate cell populations in cat. *Neuroscience.* 19, 147-158.
17. Gerfen, C.R., Young III, W.S., 1988. Distribution of striatonigral and

- striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res.* 460, 161-167.
18. Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Emson, P.C., 1990. Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J. Neurosci.* 10, 3421_3438.
 19. Heinz, S., Kuei, Y.T., 2016. *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function*. Volume 24, 2nd Edition, Academic Press
 20. Kita, H., 1993. GABAergic circuits of the striatum. *Prog. Brain Res.* 99, 51-72.
 21. Alexander, G.E., DeLong, M.R., Strick, P.L., 1986. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* 9, 357-381.
 22. Graybiel, A.M, Ragsdale, C.W., 1978. Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkey and cat demonstrated by acetylcholinesterase staining. *Proc Natl Acad Sci* 75, 5723–5726.
 23. Perth, C., Kuhar, M., Snyder S., 1976. Opiate receptor: Autoradiographic localization in rat brain. *Proc Natl Acad Sci* 73, 3729–3733.
 24. Desban, M., Gauchy, C., Glowinski, J., Kemel, M., 1995. Heterogeneous topographical distribution of the striatonigral and striatopallidal neurons in the matrix compartment of the cat caudate nucleus. *J Comp Neurol* 352, 117–133.
 25. Graybiel, A., Ragsdale, C., Yoneoka, E., Elde, R., 1981. An immunohistochemical study of enkephalins and other neuropeptides in the striatum of the cat with evidence that the opiate peptides are arranged to form mosaic patterns in register with the striosomal compartments visible by acetylcholinesterase staining. *Neuroscience* 6, 377–397.
 26. Gerfen, C., 1984. The neostriatal mosaic: Compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature* 311, 461–464.
 27. Gerfen, C., Baimbridge, K., Miller, J., 1985. The neostriatal mosaic: Compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. *Proc Natl Acad Sci* 82, 8780–8784.
 28. Prensa, L., Giménez-Amaya, J., Parent, A., 1999. Chemical heterogeneity of the striosomal compartment in the human striatum. *J Comp Neurol* 413, 603–618.
 29. Redgrave, P., Coizet, V., Comoli, E., McHaffie, J., Leriche, M., Vautrelle, N., Haves, L., Overton, P., 2010. Interactions between the midbrain superior colliculus and the basal ganglia. *Front Neuroanat* 4,

- 132.
30. Penny, G., Wilson, C., Kitai, S., 1988. Relationship of the axonal and dendritic geometry of spiny projection neurons to the compartmental organization of the neostriatum. *J Comp Neurol* 269, 275–289.
 31. Kawaguchi, Y., Wilson, C., Emson, P., 1989. Intracellular recording of identified neostriatal patch and matrix spiny cells in a slice preparation preserving cortical inputs. *J Neurophysiol* 62, 1052–1068.
 32. Bolam, J., Izzo, P., Graybiel, A. 1988. Cellular substrates of the histochemically defined striosome/matrix system of the caudate nucleus: A combined Golgi and immunocytochemical study in cat and ferret. *Neuroscience* 24,853– 875.
 33. Giménez-Amaya, J., Graybiel, A. 1990. Compartmental origins of the striatopallidal projections in the primate. *Neuroscience* 34,111–126.
 34. Fujiyama, F., Sohn, J., Nakano ,T., Furuta, T., Nakamura, K., Matsuda, W., Kaneko, T. 2011. Exclusive and common targets of neostriatofugal projections of rat striosome neurons: A single neuron-tracing study using a viral vector. *Eur J Neurosci* 33, 668–677.
 35. Donoghue, J., Herkenham M., 1986. Neostriatal projections from individual cortical fields conform to histochemically distinct striatal compartments in the rat. *Brain Res* 365,397–403.
 36. Ragsdale, C., Graybiel, A., 1988. Fibers from the basolateral nucleus of the amygdala selectively innervate striosomes in the caudate nucleus of the cat. *J Comp Neurol* 269, 506–522.
 37. Graybiel, A., 1984. Correspondance between the dopamine islands and striosomes of the mammalian striatum. *Neuroscience* 13, 1157–1187.
 38. Gerfen, C., 1992. The neostriatal mosaic: Multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci* 15: 133–139.
 39. Kincaid, A., Wilson, C., 1996. Corticostriatal innervation of the patch and matrix in the neostriatum. *J Comp Neurol* 374, 578–592.
 40. DeLong, M., 1990. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 13,281–285.
 41. Gerfen, C., Engber , T., Mahan, L., Susel, Z., Chase, T.,Monsma, F., Sibley, D., 1990. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250, 1429–1432.
 42. Kravitz, A., Freeze, B., Parker, P., Kay, K., Thwin, M., Deisseroth, K., Kreitzer, A. 2010. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466, 622–626.
 43. Mink, J.W., 2003. The basal Ganglia and involuntary movements: impaired inhibition of competing motor patterns. *Arch. Neurol.* 60, 1365-1368.

44. Kita, H., Kitai, S.T., 1994. The morphology of globus pallidus projection neurons in the rat: an intracellular staining study. *Brain Res.* 636, 30-319.
45. Chang, H.T., Wilson, C.J., Kitai, S.T., 1981. Single neostriatal efferent axons in the globus pallidus: a light and electron microscopic study. *Science.* 213, 915-918.
46. Hedreen, J.C., DeLong, M.R., 1991. Organization of striatopallidal, striatonigral, and nigrostriatal projections in the macaque. *J. Comp. Neurol.* 304, 569-595.
47. Wilson, C.J., Phelan, K.D., 1982. Dual topographic representation of neostriatum in the globus pallidus of rats. *Brain Res.* 243, 354-359.
48. Park, M.R., Falls, W.M., Kitai, S.T., 1982. An intracellular HRP study of the rat globus pallidus. I. Responses and light microscopic analysis. *J. Comp. Neurol.* 211, 284-294.
49. Kita, H., Kitai, S.T., 1987. Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHAL method. *J. Comp. Neurol.* 260, 435-452.
50. DiFiglia, M., Pasik, P., Pasik, T., 1982. A Golgi and ultrastructural study of the monkey globus pallidus. *J. Comp. Neurol.* 212, 53-75
51. Haber, S.N., Groenewegen, H.J., Grove, E.A., Nauta, W.J., 1985. Efferent connections of the ventral pallidum: evidence of a dual striato pallidofugal pathway. *J. Comp. Neurol.* 235, 322-335.
52. Beckstead, R.M., 1983. A pallidostriatal projection in the cat and monkey. *Brain Res. Bull.* 11, 629-632.
53. Staines, W.A., Fibiger, H.C., 1984. Collateral projections of neurons of the rat globus pallidus to the striatum and substantia nigra. *Exp. Brain Res.* 56, 217-220
54. Staines, W.A., Atmadja, S., Fibiger, H.C., 1981. Demonstration of a pallidostriatal pathway by retrograde transport of HRP-labeled lectin. *Brain Res.* 206, 446-450.
55. Gittis, A.H., Berke, J.D., Bevan, M.D., Chan, C.S., Mallet, N., Morrow, M.M., Schmidt, R., 2014. New roles for the external globus pallidus in basal ganglia circuits and behavior. *J. Neurosci.* 34, 15178-15183.
56. Gittis, A.H., Hang, G.B., LaDow, E.S., Shoenfeld, L.R., Atallah, B.V., Finkbeiner, S., Kreitzer, A.C., 2011a. Rapid target-specific remodeling of fast-spiking inhibitory circuits after loss of dopamine. *Neuron.* 71, 858-868.
57. Abdi, A., Mallet, N., Foad, Y., Sharott, A., Dodson, P.D., Nakamura, K.C., Suri, S., Avery, S.V, Larvin, J.T, Garas, F.N, Garas, S.N, Vinciati, F., Morin, S., Bezard, E., Baufreton, J., Magill, P.J., Prototypic and Arkypallidal Neurons in the Dopamine-Intact External Globus Pallidus. *J. Neurosci.* 35, 6667-6668.

58. DeLong, M., 1971. Activity of pallidal neurons during movement. *J Neurophysiol* 34,414–427.
59. Elias, S., Joshua, M., Goldberg, J.A., Heimer, G., Arkadir, D., Morris, G., Bergman, H., 2007. Statistical properties of pauses of the high-frequency discharge neurons in the external segment of the globus pallidus. *J Neurosci* 27, 2525–2538.
60. Anderson, M.E, Turner, R.S., 1991. A quantitative analysis of pallidal discharge during targeted reaching movement in the monkey. *Exp Brain Res* 86,623– 632.
61. Deister, C.A, Dodla, R., Barraza, D., Kita, H., Wilson, C.J., 2013. Firing rate and pattern heterogeneity in the globus pallidus arise from a single neuronal population. *J Neurophysiol* 109,497–506.
62. Wickersham, I. R., D. C. Lyon, R. J. Barnard, T. Mori, S. Finke, K. K. Conzelmann, J. A. Young and E. M. Callaway, 2007. Monosynaptic restriction of transsynaptic tracing from single, genetically targeted neurons. *Neuron* 53, 639-647
63. Wickersham, I. R., H. A. Sullivan and H. S. Seung , 2010. Production of glycoprotein-deleted rabies viruses for monosynaptic tracing and high-level gene expression in neurons. *Nat Protoc* 5, 595-606.
64. Gong, S., Doughty, M., Harbaugh, C.R, Cummins, A., Hatten, M.A, Heintz, N., and Gerfen, C.R, 2007. Targeting Cre Recombinase to Specific Neuron Populations with Bacterial Artificial Chromosome Constructs. , *J. Neuro.* 27, 9817-9823