

**Dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisten hermosolujen Cre-
rekombinaasivälitteinen geneettinen solulinjakartoitus hiiren sikiössä**

Aino Makkonen

Pro gradu –tutkielma

Turun yliopisto
Biologian laitos

TURUN YLIOPISTO

Biologian laitos

AINO MAKKONEN: Dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisten hermosolujen Cre-rekombinaasivälitteinen geneettinen solulinjakartoitus hiiren sikiössä

Pro gradu –tutkielma, 70 sivua, 5 liitesivua

Genetiikka

Elokuu 2019

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä

Dorsaalinen raphe-tumake on anteriorisen aivorungon tumake, jossa sijaitsee merkittävin mielialaa ja käyttäytymistä säätelevien serotonergisten hermosolujen keskittymä. Niiden aktiivisuutta säätelevät dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergiset inhibitoriset ja glutamatergiset eksitatoriset hermosolut. Hermosolujen toiminnan taustalla on niille ominaisten geenien luenta. Yksilöllisten geeniyhdistelmien ilmentyminen vaikuttaa hermosolujen erilaistumiseen ja vaeltamiseen sikiönkehityksen aikana sekä määrää solujen lopullisen identiteetin. Kehitysgenetiikan tutkimusmenetelmin on selvitetty hermosoluille ominaisia merkkigeenejä sekä seurattu solujen vaeltamista kehityksen aikana, mutta dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisten hermosolujen alkuperä tunnetaan vielä huonosti.

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää geneettisellä solulinjakartoituksella dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisten hermosolujen alkuperää hiiren sikiössä *Pax7*-geeniin kytkettyä Cre-rekombinaasia hyödyntäen. Tutkimuksessa käytettiin *Pax7^{Cre}*- ja *ROSA26^{TdTomato}*-muuntogeenisten hiirilinjojen risteytysten sikiöitä kehityksen vaiheissa E12.5 ja E18.5. Sikiöiden *Pax7*-geeniä ilmentävissä soluissa Cre-rekombinaasi poistaa *TdTomato*-geeniä edeltävän *loxP*-sekvenssien ympäröimän lopetuskodonin, jolloin *TdTomato* ilmentyy ja tuottaa RFP-merkkiproteiinia. RFP leimaa rekombinaasin toiminnan seurauksena *Pax7*-geeniä ilmentävät solut, ja RFP:n vasta-aineella voidaan kartoittaa *Pax7*-geeniä ilmentävien solujen liikkumista sikiönkehityksen aikana. *Pax7* toimi tässä tutkimuksessa merkkigeeninä dorsaalisisessa hermostoputkessa syntyneille hermosoluille. Sikiöt kerättiin eri kehityksen vaiheissa, fiksoitiin paraformaldehydissä ja säilytettiin parafiinissa. Kudoksesta leikattiin mikrotomilla leikesarjoja, jotka värjättiin immunohistokemiallisesti vasta-aineilla tai RNA *in situ* –hybridisaatiolla komplemmentaarilla RNA-koettimilla. Vasta-aineet ja koettimet valittiin aiemmissä tutkimuksissa löydettyjen GABAergisissä hermosoluissa ilmentyvien merkkigeenien perusteella, joita olivat *Pax7*:n lisäksi *Gad1*, *Ntn1*, *Pitx2* ja *Foxo1*.

Sikiön dorsaalisisessa raphe-tumakkeessa kehitysvaiheessa E18.5 esiintyi runsaasti *Gad1*-geeniä ilmentäviä GABAergisiä hermosoluja, joista osa vaikutti olevan RFP-positiivisia. GABAergisten hermosolujen joukossa esiintyi *Ntn1*-geeniä ilmentäviä *Gad1*-positiivisia hermosoluja, jotka vaikuttivat tutkimusten perusteella olevan myös RFP-positiivisia. Lisäksi kehitysvaiheen E12.5 sikiön ventraalisen rombomeeri 1:n alueella esiintyi *Ntn1*-geeniä ilmentäviä soluja, joista osa oli myös *Pitx2*-, *Pax7*- ja RFP-positiivisia. Tutkimustulokset olivat yhteneväisiä aiempien tutkimusten kanssa ja tukivat hypoteesia, että dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisillä hermosoluilla on dorsaalinen alkuperä. Tutkimus lisäsi ymmärrystä GABAergisten hermosolujen monimuotoisuuden kehittymisestä sikiönkehityksen aikana, ja voi toimia jatkossa pohjana myös uusille kehitys- ja neurogeneettisille tutkimuksille.

Asiasanat: geneettinen solulinjakartoitus, dorsaalinen raphe-tumake, GABA, serotoniini

Sisällys

1 JOHDANTO	2
1.1 Sikiönkehityksen genetiikka	2
1.2 Kehitysgeneettiset tutkimusmenetelmät	3
1.3 Keskushermoston kehitys	7
1.3.1 Alkion varhainen kehitys ja gastrulaatio	7
1.3.2 Neurulaatio ja hermosolujen erilaistuminen	8
1.3.3 GABAergiset hermosolut ja niiden erilaistuminen	10
1.3.4 Taka-aivojen kaavoittuminen ja rombomeerit	12
1.3.5 Rombomeeri 1:n GABAergiset hermosolut	14
1.4 Dorsaalinen raphe-tumake	17
1.4.1 Dorsaalisen raphe-tumakkeen neuroanatomia	17
1.4.2 Dorsaalisen raphe-tumakkeen serotonergiset hermosolut	18
1.4.3 Dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergiset hermosolut	20
1.5 Tutkimuksen tavoite ja tutkimuskysymykset	21
2 AINEISTO JA MENETELMÄT	23
2.1 Muuntogeeniset hiirilinjat	23
2.2 Histologiset menetelmät	25
2.3 Sikiöiden Cre-genotyypitys	26
2.4 Immunohistokemia	27
2.5 RNA <i>in situ</i> –hybridisaatio	30
2.5.1 RNA-koettimien valmistus	30
2.5.2 Koettimien hybridisaatio	33
2.5.3 RNA <i>in situ</i> –hybridisaatioon yhdistetty immunohistokemia	34
2.6 Fluoresenssimikroskopia ja kuvankäsittely	35
3 TULOKSET	36
3.1 Cre-rekombinaasin toiminta	36
3.1.1 Sikiöiden Cre-genotyyppi	36
3.1.2 Positiivinen ja negatiivinen tutkimuskontrolli	37
3.2 Dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisten hermosolujen geneettinen solulinjakartoitus	38
3.2.1 Dorsaalisen raphe-tumakkeen paikallistaminen kudoksetä	38
3.2.2 Dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergiset hermosolut	39
3.2.3 Dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisten hermosolujen alkuperä	41
3.3 <i>Ntn1</i> -geenin ilmentyminen dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisissä hermosoluissa	43
3.3.1 <i>Ntn1</i> -geenin ilmentyminen dorsaalissa raphe-tumakkeessa	43
3.3.2 <i>Ntn1</i> -geeniä ilmentävien solujen GABAergisyys	44
3.3.3 <i>Ntn1</i> -geeniä ilmentävien GABAergisten hermosolujen alkuperä	45
3.3.4 <i>Ntn1</i> -geeniä ilmentävien solujen 2C-typin serotoniinireseptorin ilmentyminen	46
3.4 GABAergiset prekursorit ventraalisessa rombomeeri 1:ssä	47
3.4.1 Ventraalisen rombomeeri 1:n merkkigeenit	47
3.4.2 <i>Pax7</i>	48
3.4.3 <i>Foxo1</i>	49
3.4.4 <i>Ntn1</i>	51
3.4.5 <i>Pitx2</i>	53
4 TULOSTEN TARKASTELU	55
4.1 Tulosten merkitys	55
4.2 Ventraalisen rombomeeri 1:n solujen monimuotoisuus ja alkuperä	56
4.3 Dorsaalisen raphe-tumakkeen solujen monimuotoisuus ja alkuperä	59
4.4 Tutkimuksen vahvuudet, haasteet ja jatkotutkimusmahdollisuudet	62
Kiitokset	65
Lähteet	66
Liitteet	71

1 JOHDANTO

1.1 Sikiönkehityksen genetiikka

Nisäkkään sikiönkehitys on monimutkainen geenien ohjaama tapahtuma, jossa hedelmöittyneestä munasolusta muovautuu uusi yksilö. Sikiönkehityksen aikana geenit ohjaavat solujen jakautumista ja kasvua, erilaistumista ja vaeltamista kehittyviin elimiin. Aikuiseen yksilöön verrattuna sikiönkehityksen genetiikassa on useita erityispiirteitä. Moni yksilönkehitykseen vaikuttavista geneeistä ilmenee laajasti sikiössä, mutta geenin ilmentyminen rajoittuu aikuisessa vain tietyille alueille tai se hiljennetään kokonaan. Kehityksen aikana solujen välillä esiintyy induktiivisia vuorovaikutuksia, joissa solut ohjaavat toistensa erilaistumista. Lisäksi sikiönkehityksessä monet viestimolekyylit vaikuttavat solujen erilaistumiseen tiettyinä pitoisuuksina. Signaalimolekyyliä tuottavan signaalikeskuksen läheisyydessä olevat solut vastaanottavat suuremman pitoisuuden viestimolekyyliä kuin kauempana olevat solut, jolloin solujen sijainti kehittyvässä alkiossa vaikuttaa signaalimolekyylin vasteeseen. Näitä eri pitoisuuksina vaikuttavia viestimolekyyliä kutsutaan morfogeneiksi, ja niillä on merkittävä rooli esimerkiksi alkion akseleiden ja hermostoputken kaavoittumisessa sekä keskushermoston kehityksessä. Muita erityispiirteitä sikiönkehityksen genetiikassa on pluripotenssin eli alkion sisäsolumassan kantasolujen kaikkikykkyisyyden ylläpitoon osallistuvien geenien ilmentyminen, sekä säädelty apoptoottisten geenien ilmentyminen ja apoptoosin vaikutus elinten muotoutumiseen. (Watson ym. 2014; Sariola ym. 2015).

Sikiönkehityksen ensimmäisellä kolmanneksella muodostuvat kaikki elinten aiheet, minkä vuoksi kehitys on tässä vaiheessa erityisen herkkä häiriöille (Sariola ym. 2015). Etenkin keskushermoston kehityksessä tapahtuvilla häiriöillä voi olla vakavia vaikutuksia sikiölle, sillä hermosolujen uusiutumiskyky on yleensä rajallinen. Kehitysgeneettiset tutkimukset ovat paljastaneet esimerkiksi A-vitamiinin johdannaisen retinoiinihapon morfogeneettiset ominaisuudet ja sen liiallisen saannin haitalliset vaikutukset sikiön hermoston kehitykselle, tai folaatin merkityksen hermostoputken sulkeutumiseksi. A-vitamiinin vaikutus sikiönkehitykselle pohjautuu solujen väliseen viestintään eli solusignointiin; liiallinen retinoiinihappo häiritsee alkion kaavoittumista vaikuttamalla solusisäisiin signaalintireitteihin (Durston ym. 1989). Folaattia puolestaan tarvitaan nukleiinihappojen synteesissä aktiivisesti jakautuvissa hermostoepiteelin

soluissa (Imbard ym. 2013). Genetiikan tuntemus auttaa siis ymmärtämään niin normaalia kehitystä kuin myös syitä mahdollisten häiriöiden ja sairauksien taustalla.

Fyysisten kehityshäiriöiden lisäksi kehittyvän keskushermoston geneettiset tutkimukset ovat paljastaneet useita tekijöitä, joilla voi olla vaikutusta psyykkisten sairauksien syntymiselle. Hermosolujen erilaistumista ohjaavia genejä tutkimalla on voitu selvittää hermosolujen vaeltamista kehityksen aikana eri aivoalueille. Tutkimuksissa on löydetty fysiologinen ja geneettinen tausta esimerkiksi masennukselle aivorungon serotoniinia tuottavista hermosoluista (Deneris & Wyler 2012). Aivorungon serotonergisten hermosolujen tiedetään osallistuvan laajasti mielialan, käyttäytymisen ja kognitiivisten toimintojen säätelyyn (Morton ym. 2015). Mahdollisesti jo sikiönkehityksen aikaiset tapahtumat voivat altistaa erilaisille psyykkisille sairauksille, minkä vuoksi on tärkeää ymmärtää aivojen kehityksen taustalla vaikuttavien geenien toimintaa syvällisemmin.

1.2 Kehitysgeneettiset tutkimusmenetelmät

Kehitysgeneettisissä tutkimuksissa hyödynnetään edistyksellisiä molekyyli­genetiikan tutkimusmenetelmiä, joiden avulla viimeisten vuosikymmenien aikana on saatu runsaasti tietoa sikiönkehitykseen vaikuttavista geneistä. Tutkimuksia tehdään erilaisten malliorganismien avulla. Nisäkkäistä kotihiirtä (*Mus musculus*) käytetään eniten sikiönkehityksen genetiikan tutkimuksissa malliorganismina, ja hiiren sikiönkehityksen tutkimukset antavat arvokasta tietoa myös ihmisen sikiön ja sitä kautta myös aikuisen yksilön ominaisuuksista, normaalista toiminnasta ja sairauksista. Hiiriä on suhteellisen helppo kasvattaa tutkimuksia varten, sillä ne tuottavat suuria poikueita ja niiden kantoaika on lyhyt, noin 19-21 vuorokautta (Sariola ym. 2015). Hiirialkion ikä lasketaan paritteluhetkestä lähtien, jolloin paritelleen naaraan vaginaan muodostuu tulppa. Koska parittelua seuraavana päivänä alkio on noin 12 tunnin ikäinen, tätä aikapistettä merkitään E0.5 (engl. *embryonic day*). Ajoitettujen paritusten avulla voidaan tuottaa vertailukelpoista tietoa sikiönkehityksen eri vaiheista (Frum & Ralston 2015).

Vertailevan morfologian lisäksi genomien vertailu on merkittävässä osassa kehitysgenetiikan tutkimuksessa. Verrattavuus hiiren ja ihmisen genomien välillä on suhteellisen hyvä: ihmisen DNA:n koodaavasta alueesta 85 % on yhteistä hiiren DNA:n kanssa, tosin introneista vain 35 % (Batzoglou ym. 2000). Jatkuvasti kehittyvien uuden sukupolven

sekvensointimenetelmien ansiosta genomien vertailu helpottunee tulevaisuudessa entisestään.

Geenien ilmentymistä voidaan tutkia joko yksittäisten geenien osalta tai laajempia geenien säätelyverkostoja mallintamalla. Yksittäisiä geenejä voidaan tutkia joko niiden tuottaman proteiinin avulla vasta-aineilla, tai havainnoimalla suoraan geenistä transkriptoitunutta lähetti-RNA:ta koettimien avulla. Esimerkiksi RNA *in situ* –hybridisaatio on menetelmä, jossa tutkitaan halutun geenin lähetti-RNA:ta kohdekudoksessa, esimerkiksi kehittyvässä aivokudoksessa. Lisäksi on mahdollista tuottaa mutaatioita genomiin ja sitä kautta selvittää yksittäisten geenien vaikutusta yksilön toimintaan. Kohdennetun mutageneesin avulla mutaatio tuotetaan ennalta määritettyyn kohtaan genomissa. Tutkimuksen kohteena oleva geeni voidaan inaktivoida kokonaan, mutta myös ehdollista mutageneesiä käytetään. Ehdollinen mutageneesi perustuu siihen, että mutaatio tapahtuu vain tietyssä kudoksessa tai tietyssä kehitysvaiheessa, jolloin mutaation vaikutuksia voidaan rajata. (Sariola ym. 2015).

Kun yksittäisten geenien vaikutus tunnetaan, voidaan havainnoida geenien välisiä vuorovaikutuksia laajemmin. Geenien säätelyverkostojen tutkimuksessa bioinformatiikan keinoin on mallinnettu esimerkiksi pluripotenssin ylläpitoon ja solujen erilaistumiseen vaikuttavia transkriptiotekijöitä, signaalimolekyylejä ja sääteleviä RNA-molekyylejä sekä niiden välisiä vuorovaikutuksia (Parfitt & Shen 2014). Lisäksi on mahdollista vertailla eri solupopulaatioiden välisiä eroja geenien ilmentymisessä. Solujen lähetti-RNA-sekvenssiin eli transkriptomiin perustuu esimerkiksi RNA-yksisolusekvensointi, joka on uuden sukupolven sekvensointimenetelmä. Koska kaikissa yksilön somaattisissa soluissa on sama genomi, solujen erilaistuminen perustuu geenien ilmentymisen eroihin. Solujen transkriptomien eroja tutkimalla voidaan erottaa erilaistuneita solujoukkoja, kuten hermosolupopulaatioita, toisistaan. RNA-yksisolusekvensoinnin avulla voidaan eri solupopulaatioiden geenien ilmentymistä vertailla keskenään jopa tuhansien geenien osalta (Artegiani ym. 2017). Sekvensoinnin tuloksena saadaan t-SNE (engl. *t-distributed stochastic neighbour embedding*) –kuvaaja, jossa jokainen yksittäinen solu näkyy yhtenä pisteenä. Kuvaajassa lähekkäin olevat solut muodostavat aina yhden solupopulaation. Liittämällä yksisolusekvensoinnista saadut tulokset geenien ilmentymisen ajalliseen tutkimukseen voidaan havainnoida esimerkiksi hermosolujen geenien ilmentymistä eri kehityksen vaiheissa aina hermosolun kantasolusta hermosolun esiasteeksi. Artegiani ym. (2017) havaitsivat tutkimuksessaan, että

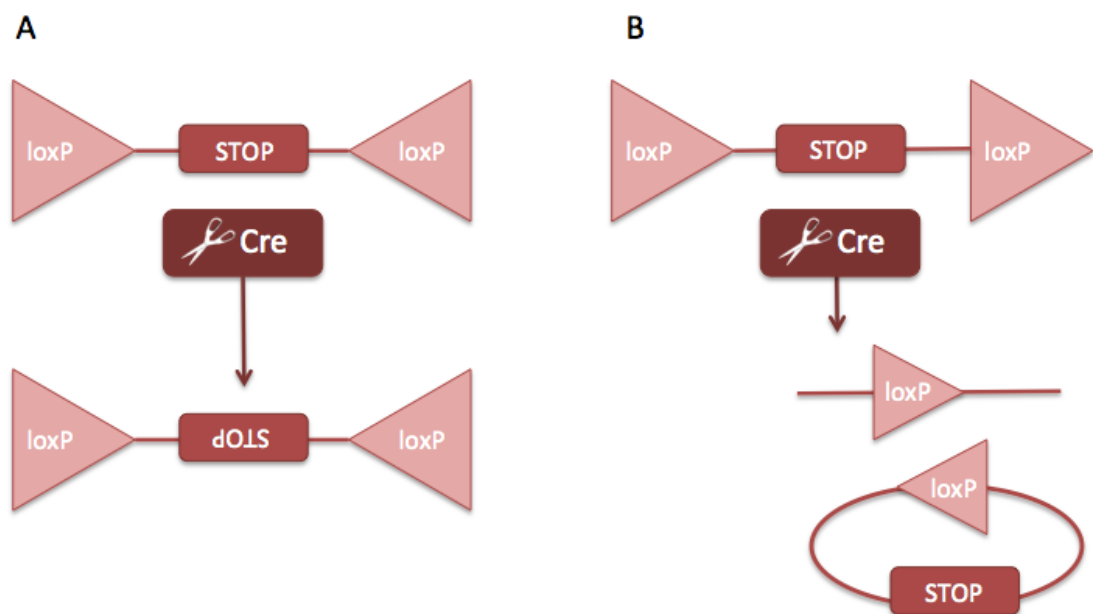
kehittyvä hermosolu ilmentää jokaisessa kehityksensä vaiheessa neurogeneesille eli hermosolujen erilaistumiselle ominaisia geeniyhdistelmiä: neurogeneesiä hiljentäviä geenejä kantasoluvaiheessa, ja aktivoivia geenejä esiastevaiheessa. Hermosolujen esiasteet erosivat merkittävästi hermosolujen kantasoluista niissä ilmentyvien geenien osalta, vaikka osaa geeneistä ilmennettiinkin läpi kehityksen. Kantasoluissa ilmentävät geenit liittyvät yleisimmin solun glukoosi- ja rasva-aineenvaihduntaan, kun taas esiastevaiheessa olevien solujen transkriptomi painottuu solusykliä sääteleviin geeneihin. Tutkimus osoitti, että yksisolusekvensoinnilla voidaan luotettavasti tutkia solupopulaatioiden transkriptomia ja siten erottaa eri populaatioita toisistaan. Myös Morello ym. (julkaisematon) ovat hyödyntäneet tutkimusryhmässään RNA-yksisolusekvensointia kartoittaessaan hiiren sikiön GABA:a tuottavien eli GABAergisten hermosolujen monimuotoisuutta kehittyvissä taka-aivoissa.

Kuten aiemmin mainitsin, inaktivoimalla tiettyjä geenejä voidaan selvittää geenin merkitys yksilön toiminnalle sikiönkehityksen aikana. Tällaisia niin kutsuttuja *knock-out* –hiiriä tutkimalla on selvitetty esimerkiksi aivorungon tumakkeiden serotonergisten hermosolujen migraatioon osallistuvia geenejä (Haugas ym. 2016; Shehabeldin ym. 2018). Monet kehitysgenetiikan tutkimusmenetelmät pohjautuvat myös muuntogeenisten *knock-in* –hiirilinjojen käyttöön tutkimuksissa. *Knock-out*- ja *knock-in* –hiirilinjojen luominen perustuu alkion sisäsolumassan pluripotentteihin kantasoluihin, joilla on kyky erilaistua miksi tahansa alkion rakenteeksi. Kun tällaisiin soluihin siirretään haluttu geeni ja soluista kasvatetaan alkioita, saadaan muuntogeenisiä *knock in* –poikasia. Risteytyksillä voidaan luoda joko hetero- tai homotsygoottisia hiiriä kyseisen geenin osalta. (Sariola ym. 2015).

Muuntogeenisiä hiirilinjoja voidaan käyttää myös geneettiseen solulinjakartoitukseen. Geneettisessä solulinjakartoituksessa selvitetään kiinnostuksen kohteena olevien solujen liikkumista sikiönkehityksen aikana. Solulinjakartoituksessa voidaan käyttää esimerkiksi kahta muuntogeenistä hiirilinjaa, joista toinen ilmentää DNA:ta muokkaavaa rekombinaasientsyymiä kiinnostuksen kohteena olevan geenin alueella. Toinen muuntogeeninen hiirilinja puolestaan ilmentää reportterigeeniä, joka voi olla esimerkiksi fluoresoivaa proteiinia tuottava geeni. Kahden muuntogeenisen hiirilinjan jälkeläisissä rekombinaasi ilmenee niissä soluissa, jotka ilmentävät kiinnostuksen kohteena olevaa geeniä. Reportterigeeniä voi edeltää lopetuskodoni, jonka rekombinaasi poistaa. Silloin kaikki solut, jotka ilmentävät kiinnostuksen kohteena olevaa geeniä, ilmentävät lopulta myös

reportterigeeniä. Geneettinen solulinjakartoitus leimaa siten pysyvästi kaikki solut, joissa rekombinaatio tapahtuu. Muutos periytyy myös tytär soluille. (Legue & Joyner 2010).

Yksi yleisimmistä käytetyistä rekombinaaseista on bakteriofagi P1:stä peräisin oleva Cre-rekombinaasi (Legue & Joyner 2010). Cre-rekombinaasin genetiikka perustuu *loxP*-tunnistusekvensseihin, joihin rekombinaasi voi sitoutua. Cre-rekombinaasi on tyrosiinirekombinaasi, jossa rekombinaasin aktiivisen keskuksen tyrosiini muodostaa DNA:han kovalenttisen sidoksen, joka säilyttää fosfodiesterisidoksen energian; tämän vuoksi ulkopuolista ATP:n energiaa ei tarvita rekombinaasin toimintaan (Watson ym. 2014). Sitouduttuaan *loxP*-sekvensseihin rekombinaasi voi aiheuttaa sekvenssien välissä olevan geenin inversion tai deleetion riippuen *loxP*-sekvenssien orientaatiosta (Kuva 1). Geneettisessä Cre-rekombinaasivälitteisessä solulinjakartoituksessa reportterigeeniä edeltää lopetuskodoni, jonka ympärillä on 34 emäsparin mittaiset *loxP*-sekvenssit samansuuntaisessa orientaatioissa (Kuva 1B). Tällöin Cre-rekombinaasin ilmentyminen kohdesolussa aiheuttaa *loxP*-sekvenssien välissä olevan sekvenssin deleetion, ja reportterigeeni pääsee ilmentymään (Legue & Joyner 2010).



Kuva 1. Cre-rekombinaasin toiminta kohdesolussa *loxP*-sekvenssin orientaation mukaan. Kohdassa A *loxP*-sekvenssit ovat vastakkaiset, jolloin Cre aiheuttaa inversion. Kohdassa B *loxP*-sekvenssit ovat samansuuntaiset, jolloin sekvenssien välissä oleva alue poistuu deleetiolla. STOP merkitsee lopetuskodonia. Tulkinta Sariola ym. (2015), s. 117 kuvasta.

Tässä luvussa olen esitellyt vain pienen osa sikiönkehityksen genetiikan tutkimusmenetelmistä, ja useat tekijät vaikuttavat sopivimman tutkimusmenetelmän valintaan. Geneettisen solulinjakartoituksen ja ehdollisen mutageneesin etuna on, että normaali sikiönkehitys ei yleensä häiriinny. Cre-rekombinaasivälitteinen geneettinen solulinjakartoitus ei vaadi invasiivista tutkimusta sikiönkehityksen aikana, koska se perustuu jo valmiiksi muokattuihin muuntogeenisiin soluihin (Legue & Joyner 2010). Lisäksi kaikissa soluissa esiintyvistä mutaatioista osa saattaa olla sikiön kuolemaan johtavia, jolloin mutaation rajaaminen vain tiettyyn kudokseen mahdollistaa sikiön normaalin kehittymisen mutaatiosta huolimatta (Sariola ym. 2015).

1.3 Keskushermoston kehitys

1.3.1 Alkion varhainen kehitys ja gastrulaatio

Kehityksen alussa hedelmöittynyt munasolu alkaa jakautua noin vuorokauden kuluttua hedelmöityksestä, ja tämän jälkeen mitoottiset solunjakautumiset tapahtuvat nisäkkäillä 12-24 tunnin välein. Jakautuvia soluja kutsutaan blastomeereiksi, ja varhaisvaiheen blastomeereistä koostuvaa alkiota morulaksi. Blastomeerit ovat totipotentteja eli täyskykyisiä, eli niistä voi muodostua sekä alkion että sikiökalvojen rakenteita. Keskeisessä osassa blastomeerien jakautumista on alkion oman genomien aktivaatio, joka tapahtuu hiirellä jo kaksisoluvaiheessa (Frum & Ralston 2015). Alkion omien geenien aktivoituminen vaatii munasolun lähetti-RNA:ta, ja samat maternaaliset transkriptiotekijät, joita vaaditaan myöhemmin solujen pluripotenssin ylläpitoon, osallistuvat myös alkion genomien aktivaatioon. Kahdeksansoluvaiheessa hiirialkion blastomeerit alkavat ilmentää adheesioproteiineja, jotka aiheuttavat kompaktion eli solujen tiivistymisen. Kompaktio aiheuttaa myös blastomeerien polarisoitumisen, ja uusien jakautumisten seurauksena blastomeerit erilaistuvat sisäsolumassaksi ja trofoblastisolukoksi. Sisäsolumassan solut ovat pluripotentteja eli kaikkikykyisiä, ja ne voivat muodostaa mitä tahansa alkion rakenteita. Sisäsolumassan solujen tuottamat signaalimolekyylit indusoivat trofoblastisoluja jakautumaan. Trofoblastisolujen erittämien natriumionien vaikutuksesta sisäsolumassan ja trofoblastin väliin muodostuu nesteen täyttämä blastoseeleontelo, ja tässä vaiheessa alkiota kutsutaan blastokystiksi. (Gilbert 2010; Sariola ym. 2015).

Hiirialkion kiinnittyminen kohdun seinämään tapahtuu noin neljän päivän kuluttua hedelmöityksestä blastokystivaiheessa (Frum & Ralston 2015). Blastokystivaiheessa tapahtuu myös alkion selkä-vatsa- eli dorso-ventraalisen akselin kaavoittuminen: selkäpuoli muodostuu sille puolelle sisäsolumassan soluja, jotka ovat yhteydessä trofoblastisoluihin. Sisäsolumassan solut erilaistuvat epiblastiksi ja hypoblastiksi, ja ainoastaan epiblastista voi muodostua alkion rakenteita. Useat eri signaalimolekyylit ja niiden väliset vuorovaikutukset ohjaavat hypoblastin ja epiblastin erilaistumista. Epiblastin soluissa tapahtuu gastrulaatio, jossa epiblastista muodostuu kolme alkio-kerrosta: endodermi, mesodermi ja ektodermi. Hiirialkion gastrulaatio tapahtuu kuusi päivää hedelmöityksen jälkeen. Ennen gastrulaatiota epiblasti ja hypoblasti taipuvat sylinterimäiseksi rakenteeksi. Gastrulaatiossa solujen liikkeitä alku-uurteen läpi säätelevät kaksi signaalikeskusta, AVE (engl. *anterior visceral endoderm*) ja solmuke (engl. *node*), jotka ovat väliaikaisia alkioon kehittyviä rakenteita. Signaalikeskuksista sekä epiblastin ulkopuolisista rakenteista tuotettavat viestimolekyylit ohjaavat gastrulaatiota ja indusoivat sen aloitusta. Gastrulaatiota ohjaavat signaalikeskukset säätelevät myös alkion etu-taka- eli antero-posteriorisen akselin kaavoittumista. Alkion kaavoittuminen mahdollistaa gastrulaatiota seuraavan hermostoputken muodostumisen, ja määrää tulevan keskushermoston rakenteiden sijainnin. (Gilbert 2010; Sariola ym. 2015).

1.3.2 Neurulaatio ja hermosolujen erilaistuminen

Osa gastrulaatiossa muodostuneen ektodermin soluista erilaistuu neuroepiteeliksi, josta alkaa hermostoputken muovautuminen. Neuroepiteeli syntyy ektodermin dorsaaliseen osaan, jossa solut muuttavat muotoaan pidemmäksi ja kapeammaksi dorsaalisen mesodermin signaloinnin vaikutuksesta. Neuroepiteelisolujen muodostama dorsaalinen hermostolevy syvenee hermostokouruksi ja lopulta sulkeutuu kokonaan hermostoputkeksi neurulaatioksi kutsutussa tapahtumassa. Hermostoputkesta muodostuu keskushermosto: anterioriseen osaan kehittyvät aivot, ja posterioriseen osaan selkäydin. (Gilbert 2010).

Kehittyvän hermostoputken ja ektodermin väliin, hermostoputken dorsaalisimpaan osaan, syntyy hermostopiena, jonka solut muodostavat kehityksen aikana ääreishermoston sekä lukuisia muita rakenteita. Hermostoputken sulkeutuessa kaudaalisen eli selkäytimen puoleisen hermostopienan solut irtautuvat hermostoputkesta

ja samalla erottavat hermostoputken ja epidermin toisistaan. Rostraalisen eli kallon puolen hermostopienan solut erilaistuvat ja lähtevät vaeltamaan jo ennen hermostoputken sulkeutumista. Ennen posteriorisen hermostoputken sulkeutumista anterioriseen osaan alkaa myös muodostua pullistumia, joista kehittyvät primaariset aivorakkulat: etuaivot, keskiaivot ja taka-aivot. Taka-aivot segmentoituvat kahdeksaksi jaokkeeksi, rombomeereiksi, joiden solut eivät sekoitu keskenään ja jotka myöhemmin kehittyvät erillisiksi aivojen rakenteiksi. (Gilbert 2010).

Sekä hermosolut että hermoston tuki- eli gliasolut erilaistuvat hermostoputken multipotenteista eli monikykyisistä neuroepiteelisoluista, ja erilaistumista säätelevät sekä ajalliset että paikalliset signaalit. Erityisesti homeodomeeni- ja bHLH-proteiinien on havaittu vaikuttavan hermosolujen varhaisen identiteetin määräytymiseen (Guillemot 2007). Hermosolujen erilaistuminen tapahtuu vaiheittain, ja erilaistumista ohjaavat kullekin vaiheelle ominaiset geenien luentaan vaikuttavat transkriptiotekijät (Achim ym. 2014). Erilaistumisen alussa yksikerroksisesta hermoepiteelisolukosta muotoutuu vähitellen monikerroksinen, kun solut jakautuvat epäsymmetrisesti ja tuottavat jakautuessaan yhden kantasolun ja yhden hermosolun esisolun. Jakautuvat hermoepiteelisolut ovat järjestäytyneet ventrikulaariselle alueelle (engl. *ventricular zone*) lähelle hermostoputken keskiosaa. Ventrikulaarisesta alueesta muodostuvat myöhemmin aivokammioiden eli ventrikkeliin seinämät (Sariola ym. 2015). Erilaistumisen ensimmäisessä vaiheessa esisolu eli progenitori saa paikasta riippuvaisia signaaleja ympäristöstään, jolloin erilaistuvassa solussa käynnistyy viestimolekyylille ominainen solunsisäinen signaalintiketju (Achim ym. 2014). Progenitorien varhaiseen erilaistumiseen osallistuu lukuisia transkriptiotekijöitä, kuten proneuraaliproteiineja, jotka säätelevät toistensa aktiivisuutta. Proneuraaliproteiinit osallistuvat myös erilaistumisen seuraavan vaiheen, solusyklistä poistumisen, säätelyyn (Guillemot 2007).

Solusyklistä poistumisen jälkeen prekursorisoluisissa eli neuroblasteissa aletaan ilmentää kullekin hermosolutyypille ominaisia geenejä, ja erilaistumista kontrolloivat niin kutsutut valitsija- eli selektorigeenit (Achim ym. 2014). Solusyklistä poistuessaan neuroblasti irtoaa ventrikulaariselta alueelta ja liikkuu lopulliselle paikalleen, jossa se muodostaa yhteyksiä muihin hermosoluihin. Hermosolujen migraatio tapahtuu esimerkiksi gliasoluja pitkin, soluväliaineen avulla tai kohdekudoksen erittämien liukoisten proteiinien, kuten *Ntn1*-geenin tuottaman Netriini-1:n, avulla (Sariola ym. 2015) (Liite 1, kaikkien tutkielmassa esitettyjen geenien koko nimet). Lisäksi hermosolujen aksonit

voivat muodostaa yhteyksiä kauas solukeskuksestaan. Hermosolujen identiteetti määräytyy lopullisesti vasta solusyklistä poistumisen jälkeen, kun kullekin solutyypille ominaisten geenien luenta käynnistyy (Achim ym. 2014). Erilaistumiseen vaadittavien geenien aktiivisuus säilyy soluissa myös erilaistumisen jälkeen.

1.3.3 GABAergiset hermosolut ja niiden erilaistuminen

Suurin osa välittäjäainetta tuottavista hermosoluista on erikoistunut tuottamaan tiettyä välittäjäainetta tai tiettyjen välittäjäaineiden yhdistelmiä, ja tätä erikoistumista ohjaavat solujen ilmentämät geenit, joiden luennan aktiivisuus määräytyy solusyklistä poistumisen jälkeen (Achim ym. 2014). GABAergiset hermosolut ovat hyvin monimuotoinen joukko keskushermoston välineuroneita, jotka syntetoivat ja käyttävät synapseissaan välittäjäaineena GABA:a eli gamma-aminobutyraattia. GABA on aminohappo glutamaatista dekarboksylaation lopputuotteena muodostunut molekyyli, jolla on keskushermoston postsynaptisissa hermosoluissa inhibitorinen vaikutus (Bu & Tobin 1994). GABA on glysiinin ohella merkittävin inhiboiva välittäjäaine keskushermostossa, kun taas glutamaatti on merkittävin eksitatorinen keskushermoston välittäjäaine (Hill ym. 2008). GABA-synteesiin osallistuvia glutamaattidekarboksylaasientsyymejä (GAD), GAD₆₅ ja GAD₆₇, koodaavat kaksi keskenään homologista geeniä, *Gad1* ja *Gad2* (Bu & Tobin 1994). Glutamaattidekarboksylaasientsyymejä koodaavat geenit ovat aktiivisena ainoastaan niissä hermosoluissa, joissa tuotetaan GABA:a, minkä vuoksi näitä geenejä voidaan luotettavasti käyttää GABAergisten hermosolujen merkkigeeneinä (Dicken ym. 2015). Myös GABA:n intra- ja ekstrasellulaariseen kuljetukseen osallistuvien proteiinien geenejä voidaan käyttää GABAergisten solujen markkereina *Gad1*- ja *Gad2*-geenien ohella.

GABA vaikuttaa kohdesolussa GABA:a ligandinaan käyttävien reseptorien välityksellä. GABA-reseptoreita on kahta tyyppiä: GABA_A ja GABA_B. GABA_A-reseptori on ionikanava, jolla on nopea, ionotrooppinen vaikutus postsynaptiseen soluun. GABA_B-reseptori on puolestaan G-proteiinikytketty transmembraaniproteiini, jolla on hitaampi, metabotrooppinen eli solusignaalintia säätelevä vaikutus kohdesolussa. Kumpikin GABA-reseptori aktivoituu GABA:n sitoutuessa reseptorin aktiiviseen kohtaan. GABA_A-reseptoriin sitoutuessaan GABA aiheuttaa ionikanavan aukeamisen ja negatiivisesti varautuneiden kloridi-ionien sisäänvirtauksen, jolloin postsynaptisen solun kalvojännite muuttuu kauemmaksi aktiopotentiaalin kynnysarvosta. GABA_B-reseptorin

aktivaatio puolestaan aiheuttaa solunsisäisen signalointireitin aktivoitumisen ja sen seurauksena muutoksen solun geenien luennasa. (Hill ym. 2008).

Keskushermoston GABAergiset hermosolut syntyvät neuroepiteelin eri osissa, erilaistuvat vaiheittain niille ominaisten selektorigeenien ohjaamina ja vaeltavat lopullisille paikoilleen erilaistumisen jälkeen. Tulevissa GABAergisten hermosolujen progenitoreissa proneuraaligeenit ovat aktiivisina, joiden lisäksi soluissa ilmennetään jakautumista edistäviä geenejä. GABAergisille hermosoluille tyypillinen proneuraaligeeni on *Ascl1*, jonka tuottama samanniminen transkriptiotekijä kuuluu bHLH-proteiinien luokkaan. (Achim ym. 2014).

Keskeisessä osassa GABAergisten solujen identiteetin määräytymistä on hermostoputken dorso-ventraalinen kaavoittuminen, jonka yksityiskohdista kerron tarkemmin seuraavassa luvussa. Kaavoittumisen seurauksena ventraalisessa osassa aletaan ilmentää *Nkx6.1*-geeniä ja dorsaaliosassa *Ptf1a*-geeniä (Achim ym. 2014). *Ptf1a* toimii myös selektorigeeninä dorsaalisten taka-aivojen GABAergisten hermosolujen esiasteille solusyklistä poistumisen jälkeen, ja sitä tarvitaan esimerkiksi pikkuaivojen GABAergisten hermosolujen kehittämisessä (Hoshino ym. 2005). *Ptf1a* aktivoi GABAergisille hermosoluille ominaisen *Gad1*-geenin luentaa ja vaikuttaa siten GABAergisen identiteetin muodostumiseen (Achim ym. 2014).

Mazurier ym. (2014) selvittivät kynsisammakon alkion verkkokalvon GABAergisten hermosolujen *Ascl1*- ja *Ptf1a*-geenien yhteyttä ja havaitsivat, että *Ascl1*:n yliekspressio ja samalla *Ptf1a*:n inaktivaatio vähensivät huomattavasti GABAergisten hermosolujen määrää. Pelkällä *Ptf1a*:n inaktivaatiolla ei ollut vaikutusta *Ascl1*-geenin toimintaan, mutta *Ascl1*:n yliekspressio lisäsi *Ptf1a*-geenin ilmentymistä. Tulosten perusteella *Ascl1* säätelee siis suoraan *Ptf1a*:n luennan aktiivisuutta. Tutkimus tukee kyseisten geenien merkitystä GABAergisten hermosolujen kehittämisessä. Myös *Gata2*- ja *Gata3*-geenien on osoitettu yhdessä *Tal1*:n kanssa toimivan postmitoottisina selektorigeeneinä solujen GABAergiselle identiteetille taka-aivojen ventraalisessa rombomeeri 1:ssä (Lahti ym. 2016). *Gata2*- ja *Gata3*-geenien yhteisinaktivaatio vähensi GABAergisten mutta lisäsi glutamatergisten hermosolujen prekursorien määrää kyseisellä alueella.

1.3.4 Taka-aivojen kaavoittuminen ja rombomeerit

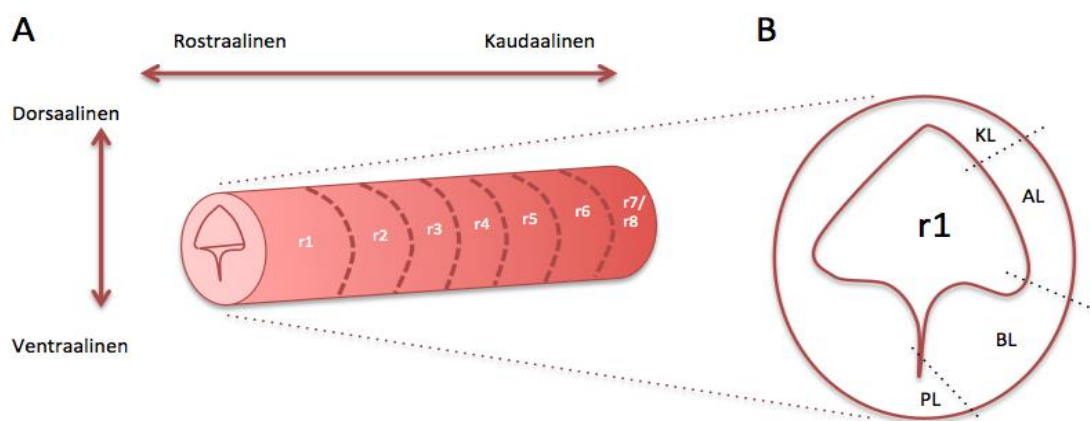
Rombomeerit ovat taka-aivojen väliaikaisia jaokkeita, jotka syntyvät heti hermostoputken sulkeutumisen ja primaaristen aivorakkuloiden muodostumisen jälkeen. Rombomeereja on kahdeksan, ja ne on numeroitu antero-posteriorisessa järjestyksessä: rombomeeri 1 sijaitsee lähimpänä keskiaivoja ja rombomeeri 8 lähimpänä selkäydintä. Taka-aivojen antero-posteriorista kaavoittumista säätelevät kullekin rombomeerille ominaiset *Hox*-geenit ja niiden tuottamien *Hox*-transkriptiotekijöiden väliset vuorovaikutukset (Gilbert 2010). Rombomeeri 1 eroaa muista rombomeereista siten, että siinä ei ilmennetä lainkaan *Hox*-geenejä, vaan sen kaavoittumiseen osallistuu viereisiltä alueilta peräisin olevia signaalimolekyylejä (Waite ym. 2012). Keskiaivojen ja rombomeeri 1:n välissä sijaitsee signaalintikeskus, istmus, jonka *Fgf8*- ja *Wnt1*-signaalointi vaikuttavat keskiaivojen ja taka-aivojen välisen rajan muodostumiseen (Liu ym. 2010).

Ang ym. (1996) havaitsivat, että myös *Otx2*-transkriptiotekijällä on keskeinen osuus anteriorisen hermostoputken kaavoittumisessa: *Otx2*^{-/-}-mutanteilla sikiöillä rombomeeri 3:a anteriorisemmat osat eivät kehity lainkaan. *Otx2* ilmenee anteriorisesti etu- ja keskiaivoissa, kun taas taka-aivoissa ilmennetään *Gbx2*-geeniä, joskin niiden ilmentyminen on kehityksen varhaisessa vaiheessa osittain päällekkäistä (Nakamura ym. 2005). Sunmonu ym. (2011) päättelivät tutkimuksessaan, että *Otx2*:n ja *Gbx2*:n välinen toisiaan inhiboiva vuorovaikutus erottelee tulevien keskiaivojen ja rombomeeri 1:n solupopulaatiot toisistaan. Tutkimuksessa *Fgf8*:n inaktivaatio aiheutti muutoksia *Gbx2*-geenin aktiivisuudessa sekä häiritsi solupopulaatioiden välisen rajan muodostumista. *Fgf8* ja sen vuorovaikutukset muiden keskeisten signaalimolekyylien kanssa ovat siis merkittävässä osassa keski- ja taka-aivojen välisen rajan muodostumisessa. Todennäköisesti *Fgf8* toimii morfogeneettisesti aiheuttaen muutoksia solujen adheesio-molekyyleissä, ja edistää siten keski- ja taka-aivojen välisen rajan muodostumista (Sunmonu ym. 2011).

Myös rombomeerien dorso-ventraalinen kaavoittuminen on signaalimolekyylien ohjaamaa. Dorsaalisen puolen kehitystä ohjaavat epidermin tuottamat *Bmp4*- ja *Tgf-β*-proteiinit (Gilbert 2010), ja ventraalisen puolen kehittymistä puolestaan indusoi suoraan selkäjänteen yläpuolella sijaitsevan pohjalevyn tuottama *Shh* (Moreno-Bravo ym. 2014). *Shh* on morfogeeni, jonka gradientti vaikuttaa geenien ilmentymiseen eri tavoin

rombomeerien dorsaaliosassa ja ventraalisessa osassa. Koska Shh:ta tuotetaan hermostoputken ventraaliosassa ja selkäjanteessa, sen vaikutus ei ulotu hermostoputken dorsaaliseen osaan. Shh:n puuttuminen dorsaaliosasta mahdollistaa *Pax7*-geenin ilmentymisen, kun taas suuret Shh-konsentraatiot ventraalisessa osassa inhiboivat *Pax7*:n ilmentymistä (Ericson ym. 1996).

Ericson ym. (1996) havaitsivat myös, että ilman Shh:ta *Pax7* ilmenee myös ventraalisessa hermostoputkessa, joten jatkuvaa Shh-signaalointia tarvitaan pitämään *Pax7*-geeni hiljennettynä kehityksen alkuvaiheessa. Kuitenkin myöhemmissä kehityksen vaiheissa ventraalisten hermostoputken *Pax7*-negatiivisten solujen havaittiin olevan riippumattomia Shh:n gradientista. Ventraalisissa soluissa Shh:n vaikutuksesta myös *Pax6*-geenin ilmentyminen estyy ja rajoittuu dorsaalisiin osiin, kun taas *Nkx2.2*-geeni aktivoituu (Ericson ym. 1997). Ventraalisessa osassa suuri Shh-konsentraatio aktivoi myös *Nkx6.1*-geenin transkriptiota, joka osallistuu GABAergisten solujen erilaistumiseen. Dorso-ventraalisen kaavoittumisen seurauksena rombomeereihin muodostuu erillisiä alueita, joista kehittyvät eri aivojen rakenteita. Näitä alueita dorsaaliosasta katsottuna ovat kattolevy, alaarilevy, basaalilevy ja pohjalevy (Moreno-Bravo ym. 2014). Kuvassa 2A on esitetty kolmiulotteinen kaavakuva rombomeereista 1-8, ja 2B:ssä poikkileikkaus rombomeeri 1:stä (Hoshino 2012 mukailen). Edellä esitetyt kaavoittumisen seurauksena syntyneet alueet on piirretty katkoviivalla kuvaan 2B (Lorente-Canovas ym. 2012 mukailen).

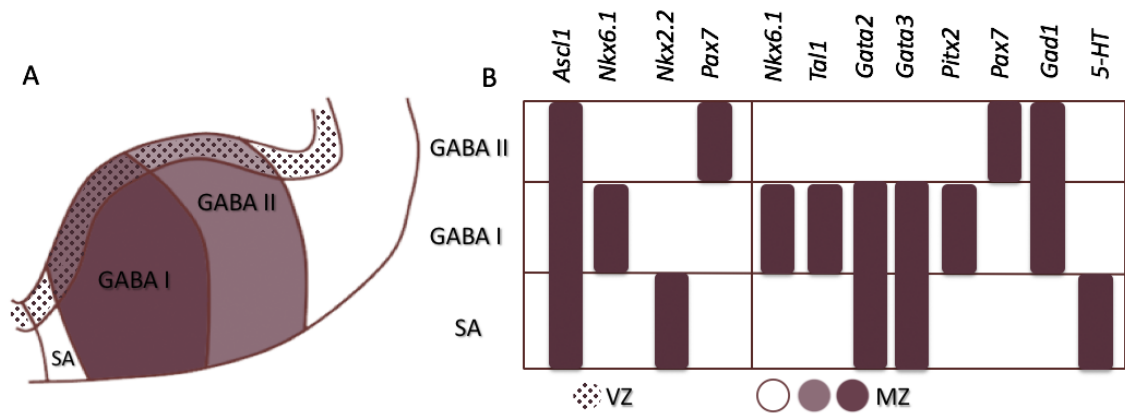


Kuva 2. Pelkistetty kaavakuva rombomeereista 1-8 (r1-r8) kolmiulotteisena kuvana. A) Taka-aivojen rombomeerit pelkistettynä putkimaiseksi rakenteeksi. Putken keski-osasta kehittyvät myöhemmin aivokammiot. B) Poikkileikkaus rombomeeri 1:stä (r1). KL = kattolevy, AL = alaarilevy, BL = basaalilevy, PL = pohjalevy. A, tulkinta Hoshino (2012), s. 323 kuvasta. B, tulkinta Lorente-Canovas ym. (2012), s. 14 kuvasta.

Pax7-geenin ilmentyminen rajoittuu siis *Shh*:n inhiboivasta vaikutuksesta katto- ja alaarilevyyn, mutta ei pääasiassa ulotu siitä pidemmälle kehityksen varhaisemmissa vaiheissa (Achim ym. 2014). Kuitenkin kehityksen vaiheessa E12.5 *Pax7* ilmenee myös osittain basaalilevyn puolella (Lahti ym. 2013). *Pax7* on yleisesti tunnettu markkeri dorsaalisesti syntyville hermosoluille, ja sitä on käytetty geneettisenä markkerina useissa hermosolujen kehittymistä käsittelevissä tutkimuksissa (Aroca ym. 2006; Lorente-Canovas ym. 2012; Plummer ym. 2017). *Pax7* ja dorsaalisesti katto- ja alaarilevyssä syntyneet GABAergiset hermosolut ovat kiinnostuksen kohteena myös tässä tutkielmassa.

1.3.5 Rombomeeri 1:n GABAergiset hermosolut

Hiirellä jo E10.5 rombomeerit ovat selkeästi havaittavissa morfologisesti (Waite ym. 2012). Rombomeeri 1:ä reunustavat rostraalisesti istmuksen alue ja *Fgf8*-signaloinnin aiheuttama *En1*- ja *En2*-geenien ilmentyminen, sekä kaudaalisesti rombomeeri 2 ja *Hoxa2*-geenin ilmentyminen (Moreno-Bravo ym. 2014). Jokaisessa taka-aivojen rombomeerissa esiintyy ainutlaatuinen ja tarkasti rajattu yhdistelmä transkriptiotekijöitä ja signaalintimolekyyliä. Rombomeeri 1:n dorsaaliosasta kehittyvät pikkuaivot ja sinitumake, ja ventraalisesta osasta kolmoishermostumakkeet sekä dorsaalinen raphe-tumake (Waite ym. 2012; Moreno-Bravo ym. 2014). Rombomeeri 1:n ventraalisella alueella sijaitsee heterogeeninen joukko GABAergisten hermosolujen esiasteita (Lahti ym. 2013). Lisäksi ventraalialueella esiintyy serotonergisten ja glutamatergisten hermosolujen prekursoreita (Haugas ym. 2016). Kuten aiemmin mainitsin, monet dorso-ventraalisella akselilla ilmennettävistä geneistä ovat *Shh*-gradientin aktivoimia; *Shh*:n konsentraatio on suurin lähellä pohjalevyä, ja kattolevyissä sitä ei esiinny lainkaan. Kaikkein dorsaalisimmassa osassa ilmennetään *Pax7*:aa ja ventraalisimmalla alueella *Nkx2.2*:a. Rombomeeri 1 on jakautunut dorso-ventraalisesti edellisissä luvussa mainittuihin alueisiin: kattolevyyn, alaarilevyyn, basaalilevyyn sekä pohjalevyyn, joista basaali- ja pohjalevy sijaitsevat ventraalisessa rombomeerissa ja katto- ja alaarilevy dorsaaliosassa rombomeerissa. Sisempänä aivokammion vieressä sijaitsee ventrikulaarinen alue, ja sen alapuolella kuorialue (engl. *mantle zone*) (Kuva 3A). GABAergiset prekursorit ovat jakautuneet useisiin alapopulaatioihin rombomeeri 1:n alueella niiden ilmentämien geenien perusteella (Kuva 3) (Lahti ym. 2013).



Kuva 3. Rombomeeri 1:n GABAergisten (GABA I, GABA II) ja serotonergisten (SA) prekursorien ilmentämät geenit. A) Koronaalinen poikkileikkauskaavakuva rombomeeri 1:n oikeanpuoleisesta ventraaliosasta, jossa ventrikulaarinen alue on merkittynä rasteroituina reunustaen rombomeerin keskellä sijaitsevaa ventrikkelia. Kuorialue sijaitsee ventrikulaarisen alueen alapuolella ruskeanpunaisilla tai valkoisella väreillä esitettynä. Huomaa yhteys kuvaan 2B, josta tässä kuvassa ovat näkyvissä basaalilevy ja pohjalevy. B) GABAergisten ja serotonergisten prekursorien ilmentämät geenit taulukoituna ventraalisessa rombomeeri 1:ssä sekä ventrikulaarisella (VZ) että kuorialueella (MZ). Tulkinta Lahti ym. (2013), s. 624 kuvasta.

Kuvassa 3 on esitettyä karkea jako rombomeeri 1:n GABAergisten ja serotonergisten prekursorien sijainnista (Lahti ym. 2013). Ventrikulaarisella alueella esiintyvät solut ovat jakautuvia progenitoreja, ja poistuttuaan solusyklistä postmitoottiset prekursorit liikkuvat kuorialueelle ja alkavat ilmentää eri hermosolutyypeille ominaisia genejä (Achim ym. 2014). Serotonergisen alueen kuorialueella esiintyy serotoniinia (5-HT, 5-hydroksitryptamiini), ja sen ventrikulaarisella alueella ilmenetään *Nkx2.2*-geeniä. Tämän alueen hermosolut saavat serotonergisen identiteetin ja vaeltavat dorsaaliseen raphe-tumakkeeseen (Haugas ym. 2016). Haugas ym. (2016) selvittivät tutkimuksessaan dorsaalisen raphe-tumakkeen serotonergisten solujen monimuotoisuutta sekä niiden syntyperää ja vaeltamista kehityksen aikana, ja havaitsivat, että selektorigenejä *Gata2* ja *Gata3* tarvitaan serotonergisten hermosolujen erilaistumiseen. *Gata2* ja *Gata3* osallistuvat myös GABAergisten prekursorien erilaistumiseen GABA I –alueella, mutta GABA II –alueella niitä ei vaadita GABAergisen identiteetin kehittymiseen (Lahti ym. 2013). Lisäksi *Gata2*:n inaktivaatiolla Kala ym. (2009) tutkimuksessa ei havaittu olevan vaikutusta *Gata3*- tai *Gad1*-geenien ilmentymiseen *Gata2*-knock-out –mutanttihiirillä rombomeeri 1:n GABAergisissä prekursoreissa, joten *Gata*-perheen transkriptiotekijät eivät ole yksinään vastuussa GABAergisen identiteetin kehittämisestä tällä alueella. Useissa GABAergisissä prekursoreissa ilmenetäänkin *Gata2*:n ja *Gata3*:n lisäksi *Tal1*-geeniä (Lahti ym. 2016).

Tutkimusryhmä (Morello ym. julkaisematon) kartoitti tutkimuksessaan RNA-yksisolusekvensoinnilla ventraalisen rombomeeri 1:n GABAergisten, glutamatergisten ja serotonergisten prekursorien sijaintia ja niiden ilmentämiä geenejä hiiren sikiön kehityksen vaiheessa E12.5. He löysivät 21 erilaista solupopulaatiota, joista seitsemän sisälsi GABAergisia prekursoreita. Näistä GABAergisistä populaatioista kolme oli syntynyt dorsaalissa rombomeerissa ja vaeltanut ventraaliselle alueelle, kun taas loput olivat syntyneet suoraan ventraalisessa rombomeeri 1:ssä. Dorsaalissyntyisissä GABAergisissä prekursoreissa ei ilmennetty *Tal1*-geeniä, mutta solut olivat *Otp*- ja *Pax7*-positiivisia. Myös Lorente-Canovas ym. (2012) havaitsivat, että *Otp* ilmenee alaari- ja basaalilevyn rajalla kuorialueella, joten tutkimusryhmän havainnot tukevat oletusta, että *Otp* on dorsaalisen rombomeeri 1:n geneettinen markkeri *Pax7*:n ohella.

Ventraalisessa rombomeeri 1:ssä *Pax7*- ja *Otp*-positiiviset solut jakautuivat kolmeen eri alapopulaatioon, joissa ilmennettiin joko *Cntn2*-, *Ntn1*- tai *Foxo1*-geeniä. Morello ym. (julkaisematon) päättelivät, että *Cntn2*-geeniä ilmentävät solut saattavat myöhemmin kuitenkin sekoittua osaksi *Ntn1*- tai *Foxo1*-positiivisia solupopulaatioita. *Foxo1*-positiivisten solujen havaittiin geneettisellä solulinjakartoituksella liikkuvan dorsaaliseen tegmentaaliseseen tumakkeeseen, jossa *Foxo1*-positiiviset solut olivat GABAergisiä. *Ntn1*-positiivisten GABAergisten prekursorien solujen vaeltamista kehityksen aikana ei seurattu, mutta todennäköisesti ne vaeltavat dorsaaliseen raphe-tumakkeeseen muiden rombomeeri 1:n ventraalisten solujoukkojen tavoin.

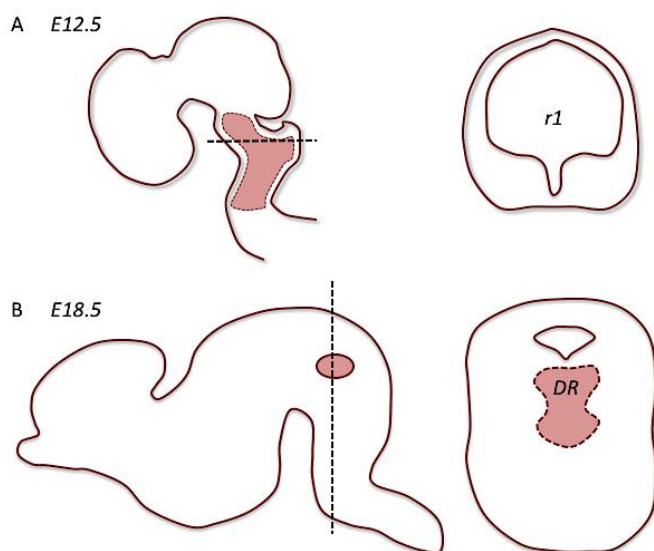
Waite ym. (2012) havaitsivat ventraalisen rombomeeri 1:n alueella myös *Pitx2*-geeniä ilmentävän postmitoottisen solupopulaation kehityksen vaiheessa E12.5. *Pitx2*-positiivisissa soluissa ei ilmennetty serotonergisille eikä glutamatergisille soluille ominaisia geenejä, vaan tutkimukset paljastivat solujen olevan GABAergisiä. Koska *Pitx2*-positiivinen solujoukko sijaitsi kuitenkin serotonergisen populaation välittömässä läheisyydessä, *Pitx2*-positiivisten solujen kommunikointi serotonergisten prekursorien kanssa on mahdollista. Ilmentymistä yhdessä *Pax7*-geenin kanssa ei ollut havaittavissa. Tarkemmat tutkimukset paljastivat *Pitx2*-positiivisten prekursorien jakautuvan kahteen erilliseen alapopulaatioon niissä ilmennettävien geenien perusteella, ja näistä populaatioista toinen oli *Dbx1*-geeniä ilmentävää, ventraalisesti syntyntä solulinjaa. Geneettinen solulinjakartoitus paljasti *Pitx2*-positiivisten solujen liikkuvan kahtena erillisenä populaationa dorsaalisen raphe-tumakkeen viereisille alueille, joissa molemmat populaatiot olivat positiivisia GABAergisille markkereille kehityksen vaiheessa E18.5.

1.4 Dorsaalinen raphe-tumake

1.4.1 Dorsaalisen raphe-tumakkeen neuroanatomia

Dorsaalinen raphe-tumake kuuluu aivorungon raphe-tumakkeisiin, joita on tunnistettu seitsemän erilaista perustuen niiden sijaintiin aivorungossa. Dorsaalinen raphe-tumake sijaitsee pääosin taka-aivojen alueella; ainoastaan pieni rostraalinen osa dorsaalisesta raphe-tumakkeesta ulottuu keskiaivojen alueelle (Alonso ym. 2013). Koronaalisesti dorsaalinen raphe-tumake reunustaa aivorungon keskiviivaa (Hornung 2003) ja sijaitsee neljännen aivokammion alapuolella (Michelsen ym. 2008). Dorsaalisessa raphe-tumakeessa esiintyy serotonergisiä, GABAergisiä, glutamatergisiä ja dopaminergisiä hermosoluja (Weissbourd ym. 2014); valtaosa dorsaalisen raphe-tumakkeen hermosoluista on kuitenkin serotonergisiä (Hornung 2003). Dorsaalinen raphe-tumake on aivorungon merkittävin serotonergisten hermosolujen solukeskusten keskittymä, sisältäen yli puolet serotonergisten välineuroneiden solukeskuksista keskushermoston alueella (Weissbourd ym. 2014). Serotonergisten hermosolujen solukeskukset sijaitsevat aivorungossa yhdeksässä eri keskittymässä, jotka on nimetty B1-B9. Suurin serotonergisten hermosolujen keskittymä, B7, sisältyy kokonaan dorsaaliseen raphe-tumakkeeseen, ja lisäksi siihen kuuluu osa B6:n serotonergisistä soluista (Frazer & Hensler 1999). Dorsaalisen raphe-tumakkeen serotonergisten, GABAergisten ja glutamatergisten hermosolujen aksoneit ulottuvat aina etuaivoihin asti ja muodostavat laajoja ja monimutkaisia hermoverkostoja koko aivoalueella (Soiza-Reilly & Commons 2014; Haugas ym. 2016). Serotonergiset solut hermottavat muun muassa manteliumaketta ja hypotalamuksen lateraalisia osia, joista puolestaan lähtee serotonergisten hermosolujen aksoneita dorsaaliseen raphe-tumakkeeseen (Luo ym. 2015). Lisäksi hypotalamuksen GABAergiset ja prefrontaalisen aivokuoren glutamatergiset solut hermottavat dorsaalista raphe-tumaketta ja säätelevät siellä tumakkeen sisäisiä hermoverkostoja (Soiza-Reilly & Commons 2014).

Aikuisen yksilön dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergiset hermosolut kehittyvät suurelta osin sikiön rombomeeri 1:n alueella esiintyvistä progenitoreista (Waite ym. 2012), ja serotonergiset solut yksinomaan rombomeeri 1:n soluista (Jensen ym. 2008). GABAergisten ja serotonergisten prekursorien erilaistumista ohjaavat aiemmissä luvuissa mainitut transkriptiotekijät ja signaalimolekyylit. Kuvassa 4 on esitettyä dorsaalisen raphe-tumakkeen kehittyminen rombomeeri 1:stä (Haugas ym. 2016).



Kuva 4. Kuvassa on esitettyä yksinkertaistettu kaavakuva rombomeeri 1:n (r1) kehitymisestä dorsaaliseksi raphe-tumakkeeksi (DR). A ja B eivät ole keskenään samassa mittakaavassa. A) Vasemmalla on sagittaalinen leikkaus kehitysvaiheen E12.5 sikiön aivoista, johon on piirretty rombomeeri 1:n karkea raja vaaleanpunaisella värillä. Oikealla puolella on poikkiviivan osoittamasta kohdasta oleva koronaalinen poikkileikkaus samasta kehitysvaiheesta. Ventrikulaarista aluetta ja

kuorialuetta ei ole erotettu toisistaan. B) Vasemmalla on kehitysvaiheen E18.5 sikiön sagittaalinen leikkaus aivoista, jossa dorsaalisen raphe-tumakkeen sijainti näkyy vaaleanpunaisella. Oikealla puolella on koronaalinen leikkaus dorsaalisen raphe-tumakkeen alueelta. Koronaalileikkauksen vaaleanpunaisella piirretty alue kuvastaa etenkin serotonergisten hermosolujen esiintymistä dorsaalisisessä raphe-tumakkeessa. Tulkinta Haugas ym. (2016), s. 4505 kuvasta.

1.4.2 Dorsaalisen raphe-tumakkeen serotonergiset hermosolut

Dorsaalisen raphe-tumakkeen serotonergiset hermosolut aksoneineen yhdessä GABAeristen, glutamaterigsten ja dopaminergisten hermosolujen kanssa säätelevät lukuisia eri toimintoja, kuten muistia ja oppimista, uni-valverytmiä, ruokahalua, motivaatiota ja seksuaalista käyttäytymistä (Michelsen ym. 2008; Soiza-Reilly & Commons 2014). Mielialan säätelyssä serotonergisillä soluilla on merkittävä vaikutus. Etenkin palkitsevaksi mielletty toiminta, kuten ruokaan tai sosiaaliseen käyttäytymiseen liittyvät palkinnot, aktivoivat dorsaalisen raphe-tumakkeen serotonergisiä hermosoluja (Li ym. 2016). Serotonergisen järjestelmän häiriöt puolestaan on yhdistetty tutkimuksissa useisiin eri psyykkisiin sairauksiin, kuten masennukseen, pakko-oireiseen häiriöön, ahdistuneisuushäiriöihin ja skitsofreniaan (Deneris & Wyler 2012). Serotoniini muodostuu aminohappo tryptofaanista tryptofaanihydroksylaasin katalysoimana (Frazer & Hensler 1999). Serotoniini vaikuttaa kohdesolussa serotoniinireseptorien välityksellä, joita tunnetaan nisäkkäillä ainakin 14 erilaista (Luo ym. 2015). Serotoniinireseptoreista (5-HTR) suurin osa vaikuttaa postsynaptiseen soluun metabotrooppisesti, mutta yhden reseptoriperheen, 5-HTR_{3:n}, proteiinit ovat ionikanavia ja vaikuttavat suoraan hermoimpulssin kulkuun postsynaptisessa solussa (Hill ym. 2008).

Serotonergiset solut dorsaalisen raphe-tumakkeen alueella ovat morfologialtaan, elektrofysiologialtaan ja geneettisiltä markkereiltaan hyvin heterogeenisiä (Luo ym. 2015). Weissbourd ym. (2014) käyttivät tutkimuksessa *Sert^{Cre}*- ja *Gad2^{Cre}*-muunto-geenisiä hiiriä erotellakseen serotonergiset ja GABAergiset hermosolut toisistaan dorsaalisisessa raphe-tumakkeessa, ja havaitsivat dorsaalisen raphe-tumakkeen serotonergisten hermosolujen sijaitsevan pääasiassa keskiviivan läheisyydessä sekä lateraalisisissa siivekkeissä. *Sert* eli *Slc6a4* on serotoniinitransportteria koodaava geeni (Haugas ym. 2016), joka kuljettaa serotoniinia synapsiraosta takaisin presynaptisiin serotonergisiin hermosoluihin ja säätelee serotoniinin pitoisuutta synapsissa (Frazer & Hensler 1999). Sitä voidaan käyttää luotettavasti serotonergisten hermosolujen markkerina (Weissbourd ym. 2014). Serotonergisten hermosolujen ominaisuuksia voidaan lisäksi tutkia *knock out*-hiirien käyttäytymiskokeilla, farmakogeneettisillä tai optogeneettisillä menetelmillä, elektrofysiologisilla hermosolujen aktiivisuuden mittauksilla tai dorsaalisen raphe-tumakkeen anatomiaa tutkimalla erilaisten värjäysmenetelmien avulla (Luo ym. 2015). Tutkimuksilla on saatu merkittävästi tietoa dorsaalisen raphe-tumakkeen serotonergisten hermosolujen toiminnasta.

Serotonergiset hermosolut esiintyvät erilaisina alapopulaatioina dorsaalisisessa raphe-tumakkeessa. Haugas ym. (2016) seurasivat geneettisellä solulinjakartoituksella *Nkx2.2*-geeniä ilmentävien serotonergisten prekursorien liikkumista hiiren sikiössä ja havaitsivat, että kaikki dorsaalisen raphe-tumakkeen serotonergiset hermosolupopulaatiot ovat peräisin ventraalisesta rombomeeri 1:stä. Tulos on yhtenevä Jensen ym. (2008) tutkimuksen kanssa, jossa selvitettiin yleisesti aivorungon serotonergisten hermosolujen alkuperää. Haugas ym. (2016) havaitsivat, että valtaosa dorsaalisen raphe-tumakkeen serotonergisistä hermosoluista syntetoi ainoastaan serotoniinia, mutta osa niistä tuottaa myös glutamaattia. Glutamatergisille hermosoluille ominainen markkeri on *Vglut3* eli glutamaattitransportterin geeni (Haugas ym. 2016). Lisäksi lähellä keskiviivaa dorsaalisisessa raphe-tumakkeessa, keskellä serotonergisiä hermosoluja, sijaitsee glutamaterginen hermosolupopulaatio, jossa ei tuoteta lainkaan serotoniinia. Haugas ym. (2016) tutkimus paljasti, että dorsaalisen raphe-tumakkeen serotonergiset ja glutamatergiset hermosolut syntyvät samoista ventraalisen rombomeeri 1:n progenitoreista. Fu ym. (2010) selvittivät myös serotonergisten ja GABAergisten hermosolujen välistä yhteyttä dorsaalisisessa raphe-tumakkeessa ja löysivät sieltä serotonergisiä soluja, jotka tuottavat serotoniinin lisäksi GABA:a. Nämä tutkimukset osoittavat, että dorsaalisen

raphe-tumakkeen serotonergiset, glutamatergiset ja GABAergiset hermosolut muodostavat monimutkaisen inhibitoristen ja eksitatoristen hermosolujen säätelyverkoston, jonka osat eivät toimi erillisinä yksikköinä vaan ovat jatkuvassa vuorovaikutuksessa keskenään.

1.4.3 Dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergiset hermosolut

Dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergiset hermosolupopulaatiot ympäröivät serotonergisiä hermosoluja, mutta niitä sijaitsee myös serotonergisten hermosolupopulaatioiden keskellä (Weissbourd ym. 2014). Osa GABAergisistä hermosoluista muodostaa synapseja dorsaalisen raphe-tumakkeen serotonergisiin hermosoluihin ja inhiboi niiden aktiivisuutta; esimerkiksi aggressiivista vuorovaikutusta seuraava sosiaalinen häviö hiirillä aktivoi GABAergisiä hermosoluja, jotka puolestaan inhiboivat serotonergisiä hermosoluja (Challis ym. 2013). Keskeisessä osassa GABAergisten ja serotonergisten solujen välisen palautejärjestelmän säätelyssä on serotoniinireseptori 5-HTR_{2C}, jonka Spoida ym. (2014) havaitsivat ilmentyvän osassa dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisistä hermosoluista aikuisessa hiiressä. Reseptorin aktivaatio GABAergisissä soluissa vähensi serotonergisten hermosolujen aktiivisuutta ja lievitti ahdistuksen oireita käyttäytymiskokeissa.

Morton ym. (2015) tutkimuksessa vastasyntyneen hiiren GABAergiset hermosolut osoittivat lisääntyntä elektrofysiologista aktiivisuutta syntymää seuraavan kahden viikon aikana. Syntymän jälkeiset kehitysvaiheet P0-P14 (engl. *postnatal*) hiirellä vastaavat ihmisen raskauden viimeistä kolmannesta. Tutkimus osoittaa, että aivojen GABAergisissä ja serotonergisissä hermosoluissa tapahtuu merkittäviä muutoksia läpi kehityksen, myös juuri ennen syntymää sekä syntymän jälkeen. Serotonergisten hermosolujen säätelyn lisäksi dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergiset hermosolut säätelevät glutamatergisten hermosolujen toimintaa samalla alueella (Soiza-Reilly & Commons 2014). Inhibitorisen luonteensa vuoksi monet GABAergisten hermosolujen ominaisuudet dorsaalisisessa raphe-tumakkeessa liittyvät muiden hermosolujen aktiivisuuden säätelyyn. Kehittyneistä tutkimusmenetelmistä huolimatta osa dorsaalisen raphe-tumakkeen hermosolujen säätelyverkoston yksityiskohdista on vielä selvittämättä. Tämän vuoksi GABAergiset hermosolut muodostavat merkittävän tutkimuskohteen tulevaisuudessa sekä kehitysgenetiikan, neurofysiologian että muiden neurotieteiden aloilla.

1.5 Tutkimuksen tavoite ja tutkimuskysymykset

Dorsaalinen raphe-tumake on merkittävin serotonerginen järjestelmä anteriorisen aivorungon alueella, jolla on merkitystä mielialan ja käyttäytymisen säätelyssä. Monet psyykkiset häiriöt, kuten masennus, ahdistuneisuushäiriöt tai pakko-oireinen häiriö, ovat seurausta serotonergisen järjestelmän epätasapainosta. Dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisillä hermosoluilla tiedetään olevan inhibitorinen vaikutus serotonergisiin hermosoluihin, mutta niiden kehitys ja alkuperä tunnetaan vielä huonosti. Kun saadaan tutkimustietoa GABAergisten hermosolujen vaeltamisesta hiiren sikiönkehityksen aikana, voidaan jatkossa tutkia monipuolisemmin GABAergisten ja serotonergisten hermosolujen välistä vuorovaikutusverkostoa. Tutkimus auttaa ymmärtämään dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisten hermosolujen alapopulaatioita sekä niiden monimuotoisuutta, joka muodostuu jo kehityksen aikana ja johon pohjautuvat myös aikuisen yksilön hermosolujen väliset vuorovaikutukset. Hermosolujen alaryhmien tuntemus on välttämätöntä aivojen toiminnan kokonaisvaltaiselle ymmärrykselle.

Tämän tutkimuksen tavoitteena on selvittää hiiren sikiön dorsaalisen raphe-tumakkeen *Gad1*-geeniä ilmentävien GABAergisten hermosolujen alkuperää geneettisellä solulinjakartoituksella *Pax7*-geeniin kytkettyä Cre-rekombinaasia ja *TdTomato*-reportterigeenin tuottamaa RFP:tä hyödyntämällä, sekä tutkia tarkemmin dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisten hermosolujen ja ventraalisen rombomeeri 1:n GABAergisten prekursorien ilmentämiä yksittäisiä merkkigenejä. Hypoteesina on, että dorsaaliossa raphe-tumakkeessa esiintyy RFP-positiivisia GABAergisiä hermosoluja, jotka ovat syntyneet dorsaaliossa hermostoputkessa ja vaeltaneet dorsaaliossa ventraaliseen rombomeeri 1:een, jossa ne muodostavat osan dorsaaliossa raphe-tumakkeen GABAergisistä hermosoluista. Dorsaaliossa raphe-tumakkeessa esiintyy hypoteesin mukaan myös suoraan ventraaliossa rombomeeri 1:ssä syntyneitä GABAergisiä hermosoluja, jotka eivät ole RFP-positiivisia.

Tutkimuksen merkkigeenit *Pax7*, *Ntn1* ja *Foxo1* (Morello ym. julkaisematon), *Pitx2* (Waite ym. 2012) sekä merkkiproteiini 5-HTR_{2C} (Spoida ym. 2014) valikoituivat tutkimukseen aikaisemmin aiheesta tehtyjen tutkimusten perusteella. Morello ym. (julkaisematon) havaitsivat tutkimuksessaan kehitysvaiheen E12.5 sikiön ventraaliossa rombomeeri 1:ssä GABAergisiä, *Pax7*-geeniä ilmentäviä dorsaaliossa syntyneitä solusyklistä poistuneita prekursoreita, joissa ilmenettiin lisäksi *Ntn1*- ja *Foxo1*-genejä.

Foxo1-geeniä ilmentävien solujen vaeltamista kehityksen aikana seurattiin tutkimuksessa, mutta *Ntn1*-positiivisten solujen liikkumista ei selvitetty tarkemmin. Tutkimuksen toisena tavoitteena onkin selvittää, liikkuvatko nämä dorsaalisesti syntyneet, kehitysvaiheen E12.5 sikiön ventraalisen rombomeeri 1:n *Ntn1*-geeniä ilmentävät GABAergiset prekursorit dorsaaliseen raphe-tumakkeeseen. Hypoteesina on, että kehitysvaiheen E18.5 sikiön dorsaaliossa raphe-tumakkeessa on havaittavissa *Ntn1*-geeniä ilmentäviä GABAergisiä hermosoluja, jotka ovat RFP-positiivisia eli syntyneet dorsaaliossa hermostoputkessa, ja jotka esiintyvät GABAergisten prekursorien alueella ventraaliossa rombomeeri 1:ssä kehityksen vaiheessa E12.5.

Waite ym. (2012) selvittivät tutkimuksessaan *Pitx2*-geenin yhteyttä hermosolujen identiteetin määrääntymiseen sikiönkehityksessä sekä tutkivat *Pitx2*-geenin ilmentymistä ventraalisen rombomeeri 1:n hermosolujen prekursoreissa. He havaitsivat *Pitx2*-geenin ilmentymisen GABAergisissä prekursoreissa, ja seurasivat näiden solujen liikkumista dorsaaliossa raphe-tumakkeen viereisille alueille geneettisellä solulinjakartoituksella. *Pitx2* valikoitui merkkigeeniksi myös omaan tutkimukseeni Waite ym. (2012) tutkimuksen perusteella. Tavoitteena on selvittää, ovatko nämä *Pitx2*-positiiviset solut yhteydessä *Ntn1*-positiivisiin soluihin ventraaliossa rombomeeri 1:ssä GABAergisten prekursorien alueella kehityksen vaiheessa E12.5.

Lisäksi olen kiinnostunut 2C-serotoniinireseptorin eli 5-HTR_{2C}-merkkiproteiinin ilmentymisestä dorsaaliossa raphe-tumakkeen GABAergisissä hermosoluissa kehitysvaiheen E18.5 sikiössä, sillä Spoida ym. (2014) havaitsivat sen esiintyvän aikuisen hiiren dorsaaliossa raphe-tumakkeen GABAergisissä hermosoluissa ja vaikuttavan serotoniiniaineenvaihdunnan säätelyyn. Tavoitteena on tutkia, ilmentyykö reseptori sikiön dorsaaliossa raphe-tumakkeen GABAergisissä hermosoluissa kehityksen vaiheessa E18.5.

Kokonaisuudessaan tämä tutkimus kytkee yhteen dorsaaliossa raphe-tumakkeen GABAergisten hermosolujen syntyperän, identiteetin sekä yhteyden serotonergisten hermosolujen säätelyyn, ja toimii pohjana aiheen perusteellisemmille tutkimuksille tulevaisuudessa.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Muuntogeeniset hiirilinjat

Tutkimuksessa käytin kahden eri muuntogeenisen hiirilinjan risteytyksestä saatuja sikiöitä kehityksen vaiheissa E12.5, E13.5, E14.5 ja E18.5. Käytetyt muuntogeeniset hiirilinjat olivat *Pax7^{Cre}* ja *ROSA26^{TdTomato}*. *Pax7^{Cre}* on muuntogeeninen *knock-in* –hiirilinja, jossa hiirten genomiin on siirretty Cre-rekombinaasin geeni *Pax7*-geenin alueelle (Keller ym. 2004). *Cre* sijaitsee *Pax7*-geenin 3' UTR –alueella 10. eli geenin viimeisen eksonin lopetuskodonin jälkeen. *Pax7*:n ja *Cre*:n välissä on *IRE5*-sekvenssi (engl. *internal ribosomal entry site*), joka on ribosomin kiinnittymiskohta lähetti-RNA:ssa (Watson ym. 2014), eli lähetti-RNA:n luenta jatkuu myös *Pax7*:n lopetuskodonin jälkeen. Tämän vuoksi *Pax7*-geeniä ilmentävä solu ilmentää aina myös *Cre*:tä ja muodostaa yhden pitkän lähetti-RNA:n, josta tuotetaan solussa sekä *Pax7*- että *Cre*-proteiinia. Tutkimuksissa on havaittu, että *Cre*:llä ei ole vaikutusta *Pax7*-geenin normaaliin ilmentymiseen (The Jackson Laboratory 2019).

Muuntogeeninen hiirilinja on saatu aikaan alun perin siirtämällä *Cre Pax7*:n geenialueelle geenikasettina (*IRE5-Cre-Frt-Neo-Frt*), jossa on *IRE5*-sekvenssin ja *Cre*:n lisäksi neomysiiniresistenssin aikaansaava geeni (*Neo*). Tämä kompleksin on siirretty alkion sisäsolumassan kantasoluihin, ja kantasoluista on valikoitu antibioottivalinnan avulla ne solut, joihin siirto on onnistunut. Näistä soluista on kasvatettu myöhemmin alkioita. Neomysiiniresistenssin geeni on myöhemmin poistettu genomista FLP-rekombinaasin avulla (The Jackson Laboratory 2019). Hiiret voivat olla *Cre*:n suhteen joko homotsygoottisia, jolloin *Cre* esiintyy kaikilla jälkeläisillä heterotsygoottisena risteytettynä villityypin kanssa, tai heterotsygoottisia, jolloin tilastollisesti puolella jälkeläisistä on *Cre* genomissaan heterotsygoottisena ja puolella ei lainkaan. Tässä tutkimuksessa *Pax7^{Cre}*-hiirilinjasta käytettiin uroksia risteytyksissä joko homotsygoottisena tai heterotsygoottisena *Cre*:n suhteen, ja varmistin sikiöiden genotyypin *Cre*:n osalta myöhemmin polymeraasiketjureaktiolla (PCR) kudoksen keräämisen jälkeen.

Toinen käytetty muuntogeeninen hiirilinja oli *ROSA26^{TdTomato}*, josta tutkimukseen käytettiin naaraspuolisia hiiriä. Naaraat risteytettiin koe-eläinkeskuksessa *Pax7^{Cre}*-hiirilinjan urosten kanssa. *ROSA26^{TdTomato}*-hiirilinjan genomiin on siirretty fluoresoivan

leiman aiheuttava reportterigeeni *TdTomato ROSA26*-lokukseen (Madisen ym. 2010). *ROSA26* on geeni, joka ilmenee kaikissa soluissa, joten se soveltuu hyvin reportterigeenin lokukseksi. *ROSA26*-geenin promoottorialue yksinään on kuitenkin heikko fluoresoivien reportterigeenien ilmentämiseen aivokudoksessa, joten muuntogeenisen hiirilinjan *ROSA26*-lokukseen on siirretty myös vahva *CAG*-promoottori. *CAG*-promoottoria seuraa *loxP-STOP-loxP* -sekvenssi, jonka Cre-rekombinaasi tunnistaa. *CAG*-promoottorin alaisena ilman lopetuskodonia *TdTomato* tuottaa punaista fluoresoivaa proteiinia eli RFP:tä (engl. *red fluorescent protein*), joka on yksi kirkkaimmista saatavilla olevista fluoresoivista proteiineista (Madisen ym. 2010). Koska promoottorialueella *TdTomato*-geeniä kuitenkin edeltää *loxP-STOP-loxP* -sekvenssi, *ROSA26^{TdTomato}*-hiirissä *TdTomato* ei pääse ilmentymään ilman Cre-rekombinaasia. Tässä tutkimuksessa kaikki käytetyt *ROSA26^{TdTomato}*-hiiret olivat *TdTomato*-geenin suhteen homotsygootteja.

Pax7^{Cre}-urosten ja *ROSA26^{TdTomato}*-naaraiden jälkeläisissä Cre-rekombinaasi tunnistaa genomien *ROSA26*-lokukseen integroidut *loxP*-sekvenssit *TdTomato*-geenin promoottori-alueelta. Cre-rekombinaasi aiheuttaa deleetion *loxP*-sekvenssien väliin, jolloin lopetuskodoni rekombinoituu pois geenialueelta. Tällöin *TdTomato* pääsee ilmentymään, mikä aiheuttaa kudokseen sytoplasmisen RFP-proteiinin kertymisen ja fluoresenssimikroskoopilla havaittavan kirkkaanpunaisen värin. *TdTomato*:n ilmentyminen solussa kertoo, että Cre:n aiheuttama rekombinaatio on onnistunut, ja että samassa solussa myös *Pax7*-geenin luenta on käynnistynyt. Cre aktivoituu solussa samaan aikaan kuin *Pax7*-geenin luenta alkaa. Koska Cre:n aiheuttama rekombinaatio periytyy tytärsoluille, niissä tuotetaan RFP:tä, vaikka *Pax7*-geeniä ei enää ilmennettäisikään. Tässä tutkimuksessa *Pax7* toimi geneettisenä markkerina rombomeeri 1:n dorsaaliosasta peräisin oleville soluille. Tämän vuoksi käytin tutkimuksessa *Pax7*-geenin alueelle integroitua Cre-rekombinaasia solujen alkuperän selvittämiseksi muuntogeenisten hiirten jälkeläisissä.

Tutkimuksessa käytettävät hiirinaaraat oli paritettu urosten kanssa koe-eläinkeskuksessa, ja sain ilmoituksen parittelutulpan muodostumisesta, jolloin hiirialkuiden ikä oli E0.5. 12-18 päivää myöhemmin tutkittavasta kehitysvaiheesta riippuen toin raskaana olevat hiiret laboratorioon, ja keräsin sikiöt heti samana päivänä. Naaras lopetettiin niskamurrolla Helsingin yliopiston koe-eläinkeskuksen sisäisen luvan mukaisesti, ja lopetuksen suoritti ammattilainen puolestani eettisen lopetuksen varmistamiseksi.

Sikiöitä yhdessä poikueessa oli 5-12, joista joko kaikilla tai noin 50 %:lla oli *Cre* genomissaan riippuen siitä, oliko parituksessa käytetty homo- vai heterotsygoottista urosta *Cre*:n osalta. Kehityksen vaiheessa E13.5 ja E14.5 keräsin yhden naaraan sikiöt tutkimusta varten, ja kehitysvaiheiden E12.5 ja E18.5 tutkimusta varten käytin kahta eri poikuetta kummassakin kehitysvaiheessa. Toisen poikueen kehitysvaiheen E12.5 sikiöt vaikuttivat leikkeiden koon perusteella olevan hiukan vanhempia kuin ensimmäisen poikueen sikiöt. Vaikka parittelun tarkka ajankohta ei ollut tiedossa, enkä määrittänyt sikiöiden kokoa keräämisen yhteydessä, eri poikueiden sikiöiden iässä oli eroa korkeintaan 12 tuntia.

2.2 Histologiset menetelmät

Lopetuksen jälkeen poistin naaraalta kohdun sikiöineen. Preparoin sikiöt yksitellen ulos kohdusta steriiliin jääkaappikylmään fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (1xPBS, laimennettiin MilliQ-veteen 10xPBS:stä), ja samalla keräsin sikiöistä kudoksenäytteet genotyyppitystä varten erillisiin numeroituihin näyteputkiin. Siirsin sikiöt numeroidulle kuoppalevyille 4% paraformaldehydiin (PFA), joka toimii fiksaatiivina estäen kudoksen hajoamisen. Pidin sikiöitä yön yli PFA:ssa ja vaihdoin PFA:n uuteen seuraavana päivänä.

Kolmantena päivänä siirsin sikiöt numeroituihin kuduskasetteihin. Siirsin näytteet Leica ASP300S –kudosprosessoriin, joka korvaa kudoksen veden parafiinilla. Seuraavana päivänä siirsin kudoksen metallimuotteihin, ja asettelin sikiön sulaan parafiiniin sopivassa orientaatioissa koronaalisia eli poikittaisleikkeitä varten. Annoin parafiinin jähmettyä hieman, jotta näyte jäi sopivaan asentoon. Tämän jälkeen asetin muotit kylmälevylle (1 °C) parafiinin kovettamiseksi. Jäähdytyksen jälkeen irrotin metallimuotit ja siirsin valmiit parafiinikappaleet 4 °C:een. Kehitysvaiheen E18.5 sikiöistä oli preparatoitu pelkästään aivot tutkimusta varten, ja sain ne valmiina parafiinikappaleissa.

Leikkasin parafinoidun kudoksen mikrotomilla 5 µm paksuisiksi koronaalileikkeiksi (Ks. kuva 4). Ohuet leikkeet parantavat vasta-aineiden ja koettimien sitoutumista kudokseen värjäysten aikana. Aloitin leikkeiden keräämisen anatomian perusteella kirjallisuutta (Kaufman 1992; Altman & Bayer 1995) ja verkkotietokantaa (Allen Institute 2019) apuna käyttäen. Keräsin 8-10 leikettä objektilaseille rinnakkaisesti kymmenen lasin sarjoiksi ja

numeroin lasit. Leikkaamisen jälkeen siirsin lasit lämpökaappiin 37 °C:een kuivumaan yli yön, ja seuraavana päivänä siirsin ne 4 °C:een värjäykseen asti.

Tässä tutkimuksessa pyrin mahdollisuuksien mukaan käyttämään vähintään kahta biologista replikaattia eli kahta eri sikiötä samasta kehitysvaiheesta. Kuitenkin ajankäytön puitteissa tutkimusaineiston saatavuus oli rajallinen, koska hiirten onnistuneet paritukset kestivät kauan, ja joissakin kehitysvaiheissa sain sikiöitä vain vähän kerrallaan. Lisäksi havaitsin, että histologisten leikkeiden laatu vaihteli. Leikkeiden laadun perusteella valitsin tutkimukseen sikiöitä kehityksen vaiheessa E12.5 ja E18.5, joista kummastakin sain leikkeitä kuudesta eri sikiöstä, sekä yhden sikiön kehityksen vaiheessa E14.5. Sikiöt kehityksen vaiheessa E13.5 jätin kokonaan pois tutkimuksista heikon leikkeiden laadun vuoksi. Suoritin kuitenkin kaikki tutkimukset aikaisemmin vahvistetuilla ja toimivaksi osoitetuilla menetelmillä, joten tutkimustulokset ovat vertailukelpoisia sekä keskenään että aikaisemmin tutkimusryhmässä saatujen tulosten kanssa.

2.3 Sikiöiden *Cre*-genotyypitys

Sikiöiden *Cre*⁺-genotyypin varmistamiseksi suoritin genotyypityksen PCR-reaktiolla, ja alukkeina käytin *Cre*-geenin sekvenssiin sitoutuvia alukkeita (Taulukko 1). Kehitysvaiheen E18.5 sikiöille reaktioon tarvittavan DNA:n sain hännistä, ja nuoremmille sikiöille jalasta. Preparoin kudoksen tyhjiin näyteputkiin jo sikiöiden keräämisen yhteydessä ja joko pakastin kudoksen -20 °C:ssa tai jatkoin suoraan sen hajotuksella. Kudoksen hajotin 100 µl tilavuudessa lyysisliuoksessa, joka sisälsi 95% ProtK-puskuria (Helsingin yliopiston laboratorio) ja 5% proteinaasi K-entsyymiä (Sigma Aldrich). Jätin kudoksen liuokseen hajoamaan yön yli 56 °C:een. Tämän jälkeen sekoitin näytteet ja siirsin ne -20 °C:een myöhempää käsittelyä varten. Pysäytin proteinaasi K:n toiminnan kymmenen minuutin lämpökäsittelyllä 90 °C:ssa, jotta proteinaasi ei hajottaisi DNA-polymeraasia PCR-reaktion aikana. Inaktivaation jälkeen pidin näytteitä jäällä 4 minuuttia ja lopuksi sentrifugoin 13200 rpm kierroksilla minuutin ajan. Supernatantista sain DNA:n PCR-reaktiota varten.

Suoritin PCR-reaktion taulukon 1 mukaisesti siten, että pipetoin puskurin, dNTP-seoksen, alukkeet, DNA-polymeraasin ja steriilin MilliQ-veden samaan liuokseen.

Liuosta valmistin sen mukaan, kuinka monta näytettä oli analysoitavana. Positiivisena kontrollina käytin aikaisemmin eristettyä *Cre*-positiivista näytettä ja negatiivisena kontrollina MilliQ-vettä. DNA-polymeraasina käytin DreamTaq-polymeraasia (Thermo Scientific) ja alukkeina *Cre3*- ja *Cre5*-alukkeita (TAG Copenhagen), joiden sekvenssit ovat esitettyinä taulukossa 1. Laimensin alukkeet 100 pmol/μl kantaliuoksesta MilliQ-veteen 10 pmol/μl laimennokseksi. Varmistin PCR-reaktion tuloksen ja sikiöiden *Cre*-genotyypin agarosigeelielektroforeesilla 1,5% geelillä, ja väriaineena käytin etidiumbromidia (Thermo Scientific). Ajoin geeliä 50-60 minuuttia 100 voltin jännitteellä tris-boraatti-EDTA -puskurissa (1xTBE, laimennettiin MilliQ-veteen 10xTBE:stä) ja kuvasin sen UV-valossa. Vertasin tuloksia positiiviseen kontrolliin ja varmistin sikiöiden *Cre*-genotyypin. PCR-tuotteen oletettu koko oli noin 500 emäsparia, joten käytin 1 kiloemäksen markkeria (Thermo Scientific).

Taulukko 1. PCR-reaktio yhdelle DNA-näytteelle.

PCR-reaktio	1 x (20 μl) reaktiutilavuus
10 x reaktiopuskuri	2 μl
dNTP	1,5 μl
<i>Cre3</i> (10 pmol/μl) CGT TTT CTG AGC ATA CCT GGA	0,5 μl
<i>Cre5</i> (10 pmol/μl) AAT CTC CCA CCG TCA GTA CG	0,5 μl
DreamTaq -DNA-polymeraasi	0,1 μl
ddH ₂ O	14,2 μl (E12.5) tai 14,7 μl (muut)
DNA (supernatantti) / kontrolli	1 μl (E12.5) tai 0,5 μl (muut)

2.4 Immunohistokemia

Tässä tutkimuksessa käytin epäsuoraa immunohistokemiallista määrittystä eli immunohistokemiallista värjäystä, joka perustuu primaariseen kohdeproteiiniin tunnistavaan immunoglobuliiniin eli vasta-aineeseen sekä sekundaariseen fluoresenssi-lemattuun vasta-aineeseen. Primaarinen vasta-aine oli tuotettu joko kanissa, hiiressä tai kanassa. Primaarinen vasta-aine tunnistaa kudoksessa kohdeproteiinin eli antigeenin, esimerkiksi RFP:n, ja sitoutuu siihen. Vasta-aineen sitovaa osaa antigeenissä kutsutaan epitoopiksi. Immunohistokemiassa ennen primaarisen vasta-aineen lisäystä kudoksen estokäsitellään seerumilla, joka vähentää vasta-aineen sitoutumista kudoksessa muualle

kuin spesifiseen antigeeniin. Sekundaarinen vasta-aine puolestaan tunnistaa spesifisesti jokaiselle lajille ominaisen vasta-aineen Fc-osan (engl. *fragment, crystallizable*). Tässä tutkimuksessa sekundaariseen vasta-aineeseen oli liitetty fluoresoiva kromofori eli fluorokromi merkkiaineeksi, jonka avulla myös primaarinen vasta-aine ja siten tunnistettu kohdeproteiini saatiin visualisoitua. Sekundaarinen vasta-aine oli tuotettu joko aasissa kanin tai hiiren vasta-aineita vastaan, tai vuoheissa kanan vasta-ainetta vastaan. Sekundaariset vasta-aineet olivat Alexa Fluor (Invitrogen) –fluorokromikonjugoituja, ja visualisoin fluorokromin emittoiman aallonpituuden fluoresenssimikroskoopilla. Immunohistokemiallisessa värjäyksessä useampia proteiineja pystytään tutkimaan samalla kertaa käyttämällä useampia eri fluorokromeilla leimattuja vasta-aineita, kuitenkin tässä tutkimuksessa enimmillään kolmea fluoresenssimikroskoopin suodattimen värien rajallisuuden vuoksi. Taulukossa 2 on esitetty käytetyt sekundaarisiin vasta-aineisiin konjugoidut Alexa Fluor -fluorokromit ja niiden fluoresenssimikroskoopilla näkyvät värit sekä absorptio- ja emissioaallonpituudet.

Taulukko 2. Sekundaaristen vasta-aineiden Alexa Fluor -fluorokromit, niiden absorptio- ja emissioaallonpituudet sekä fluoresenssimikroskoopilla havaittava väri.

Alexa Fluor - fluorokromi	Absorptio	Emissio	Fluoresenssimikroskoopilla näkyvä väri
Alexa Fluor 488	496 nm	519 nm	Vihreä
Alexa Fluor 568	578 nm	603 nm	Oranssinpunainen
Alexa Fluor 647	650 nm	665 nm	Kirkkaanpunainen

Immunohistokemiallisen värjäyksen tuloksena anti-RFP –vasta-ainetta käytettäessä näkyviin saatiin kaikki kudoksen RFP-proteiinit fiksaation hetkellä. Koska tutkittavien sikiöiden genomissa oli *Pax7*:n lisäksi *Cre* heterotsygoottisena, *TdTomato ROSA26*:n lokuksessa pääsee rekombinaasin toiminnan seurauksena ilmenemään ja tuottamaan RFP-proteiinia. *TdTomato* ilmenee aina samoissa soluissa *Pax7*-geenin kanssa. Siten kaikki *TdTomato*-geeniä ilmentävät eli RFP:tä tuottavat solut ilmentävät tai ovat ilmentäneet jossain kehityksensä vaiheessa myös *Pax7*-geeniä. Anti-RFP –vasta-ainevärjäyksen tuloksena saadaan solulinjakartta *Pax7*-geeniä ilmentävien solujen ja näiden tytärsolujen vaeltamisesta sikiönkehityksen aikana. Elävissä soluissa RFP tuottaa tarpeeksi voimakkaan fluoresenssin mikroskoopilla havaittavaksi, mutta kudoksen fiksaatio heikentää fluoresenssia niin paljon, että tarkka tulos saadaan ainoastaan

epäsuoralla immunohistokemiallisella määrityksellä. Tämän vuoksi käytin tutkimuksessa anti-RFP –vasta-ainetta (tästä eteenpäin RFP-vasta-aine) signaalin havaitsemiseen.

Värjäyksen alussa otin lasit lämpenemään huoneenlämpöön noin 15 minuuttia ennen värjäyksen alkua ylimääräisen kosteuden poistamiseksi. Poistin parafiinin kudoksesta ksyleenikäsittelyllä, jonka jälkeen suoritin kudokselle laskevan alkoholisarjan veden palauttamiseksi kudokseen (Liite 2). Pesin lasia 0,3% Triton-X –liuoksessa (Liite 3) kymmenen minuutin ajan. Vaiheen tarkoituksena on poistaa pintajännitystä ja avata kudosta, jotta vasta-aineet sitoutuvat kohdeproteiineihin paremmin. Tämän jälkeen keitin lasia 0,1 M natriumsitraattipuskurissa PFA-fiksaation purkamiseksi ensin 100% teholla 3,5 minuuttia ja sitten 40% teholla 9 minuuttia mikroaaltouunissa. Natriumsitraattikäsittelyn jälkeen jäähdytin lasia vähintään puoli tuntia, ja jäähdytyksen jälkeen pesin lasia 0,1% Triton-X:ssä (Liite 3) 15 minuuttia.

Jäähdytyksen jälkeen suoritin lasille estokäsittelyn, jonka tarkoituksena on estää epäspesifinen sekundaaristen vasta-aineiden sitoutuminen. Estokäsittelyssä inkuboin lasia 0,1% Triton-X:ään laimennetussa seerumissa, jonka valitsin sekundaarisen vasta-aineen isäntäeläimen mukaan. Estokäsittelyä varten laimensin vuohen tai aasin seerumia 10% pitoisuuteen 0,1% Triton-X:ään. Kaksoisvärjäyksissä, joissa käytin sekä aasissa että vuohessa tuotettuja sekundaarisia vasta-aineita, valmistin 5% vuohen ja 5% aasin seerumia samaan liuokseen. Pipetoin liuosta jokaisen lasin päälle 300 µl ja inkuboin lasia puolesta tunnista tuntiin huoneenlämmössä kostutetussa kammiossa. Tämän jälkeen valutin ylimääräisen liuoksen pois lasien päältä ja pipetoin 300 µl primaarista vasta-ainetta jokaiselle lasille. Primaariset vasta-aineet olin laimentanut 0,1% Triton-X:ään (Taulukko 3), jossa oli lisäksi 2% vuohen tai aasin seerumia sekundaarisesta vasta-aineesta riippuen. Inkuboin lasia +4 °C:ssa yli yön tai muutaman vuorokauden. Koska tilasin osan vasta-aineista itse (hiiren anti-RFP, BioVision; kanan anti-RFP, Rockland) ja käytin niitä uutena, testasin vasta-aineita eri pitoisuuksilla sopivan laimennoksen löytämiseksi.

Primaarivasta-ainekäsittelyn jälkeen pesin lasia 0,1% Triton-X:ssä 15 minuuttia ja valmistin sekundaariset vasta-ainelaimennokset 0,1% Triton-X:ään. Sekundaarisen vasta-aineen laimennos perustui sekundaarivasta-aineessa käytetyn fluorokromin intensiteettiin. Vihreän ja oranssinpunaisen leiman aikaansaavan fluorokromin sisältävän vasta-aineen laimensin 0,1% Triton-X:ään 1:500 ja kirkkaanpunaisen leiman 1:350.

Pipetoin sekundaarista vasta-ainelaimennosta 300 µl jokaiselle lasille ja inkuboin 5 tuntia huoneenlämmössä kosteuskammiossa tai yön yli 4 °C:ssa. Lopuksi pesin laseja 10 minuuttia 0,1 % Triton-X:ssä ja 5 minuuttia 1xPBS:ssä. Värjäsin tumat DAPI:lla (Sigma Aldrich) 1:5000 laimennettuna 1xPBS:ään. Inkuboin laseja DAPI:ssa 5 minuuttia huoneenlämmössä ravistelijassa, jonka jälkeen pesin laseja vielä 1xPBS:ssä 5 minuuttia. Tämän jälkeen peitin lasit FluorSave-petausaineella (Millipore) ja ohuella lasilla. Säilytin laseja valolta suojattuna 4 °C:ssa.

Taulukko 3. Työssä käytetyt tulosten kannalta keskeisimmät primaariset vasta-aineet ja niiden laimennokset 0,1% Triton-X –liuokseen.

Primaarinen vasta-aine	Valmistaja	Laimennos-suhde
Hiiren anti-Pax7	Hybridoma Bank	1:300
Hiiren anti-RFP	BioVision	<i>Eri pitoisuuksia</i>
Kanan anti-RFP	Rockland	<i>Eri pitoisuuksia</i>
Kanin anti-RFP	Rockland	1:500
Kanin anti-5-HT	Immunostar	1:500
Kanin anti-5-HTR _{2C}	Antibodies-online	1:200
Kanin anti-Foxo1	Cell Signaling Technology	1:500

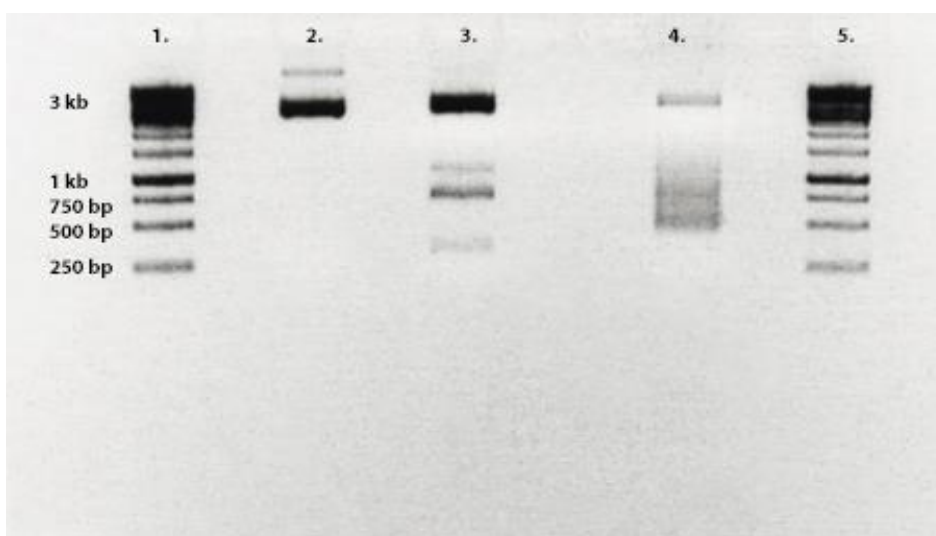
2.5 RNA *in situ* –hybridisaatio

2.5.1 RNA-koettimien valmistus

RNA *in situ* –hybridisaatioissa (tästä eteenpäin *in situ* –hybridisaatio) käytin entsyymaattisia digoksigeniinileimattuja (DIG) tai fluoresoivia fluoreseiinileimattuja (F) komplementaarisia RNA-koettimia, joiden leiman vahvistin vasta-aineilla värjäyksen aikana. RNA-koettimien avulla saadaan näkyviin kohdegeenin kudosspesifinen lähetti-RNA ja siten voidaan paikallistaa geenin ilmentyminen fiksoidussa kudoksessa. Kohdekudoksessa koetin tunnistaa emäsjärjestystä vastaavan sekvenssin lähetti-

RNA:sta ja pariutuu sen kanssa. Menetelmä vaatii äärimmäisen puhdasta työskentelyä, koska *in situ* -hybridisaatio on herkkä menetelmä RNA:n epästabiilisuuden vuoksi. Lisäksi ympäristöperäiset RNAasit hajottavat RNA-koetinta (tästä eteenpäin koetin). Käytin koettimen valmistuksessa steriilejä työvälineitä sekä RNAasi-inhibiittoreita koettimen hajottamisen estämiseksi.

Tutkimukseen valmistin *Pitx2*(DIG)-koettimen itse. Muut koettimet sain valmiina. Hiiren *Pitx2*-geeni oli kloonattu *E. coli* -bakteerin pT7T3D-PacI-plasmidiin, jota käytin templaattina koettimen valmistuksessa. Kasvatin glyserolikantaliuoksesta sulatettuja *E. coli* -bakteereita yön yli 37 °C:ssa LB-kasvatusliuoksessa, johon oli lisätty ampicilliinia (Sigma Aldrich) 100 µg/ml. Eristin plasmidi-DNA:n bakteereista GeneJET Plasmid Miniprep -kitillä (Thermo Scientific) valmistajan ohjeen mukaan. Eristin DNA:n kahteen eri putkeen ja mittasin DNA-konsentraation NanoDrop 2000 -laitteella. Konsentraatiot eristyksen jälkeen putkissa olivat 253,8 ng/µl ja 290,4 ng/µl. Pakastin putket -20 °C:ssa. Seuraavana päivänä linearisoin 20 µg plasmidi-DNA:ta EcoRI-restriktioentsyymillä (Thermo Scientific) 37 °C:ssa, jonka jälkeen puhdistin linearisoidun plasmiditemplaatin fenoli-kloroformiutolla. Varmistin linearisaation onnistumisen geelielektroforeesilla 1 % agarosigeelillä, ja kontrollina käytin linearisoimatonta plasmidia. Ajoin geeliä 100 voltin jännitteellä tunnin, ja väriaineena käytin etidiumbromidia (Thermo Scientific). Kuvasin geelin UV-valossa. Linearisoidusta plasmidista havaitsin neljä erillistä raitaa geelillä, jotka olivat kooltaan noin 400, 750, 1000 ja 3000 emäsparia (Kuva 5, kaivo 3).



Kuva 5. 1 % agarosigeeli tunnin ajon jälkeen 100 voltin jännitteellä. Kaivoissa 1 ja 5 ovat yhden kiloemäksen markkerit (Thermo Scientific). Kaivossa 2 on kitillä eristetty plasmidi-DNA, kaivossa 3 EcoRI:llä linearisoitu plasmidi ja kaivossa 4 DIG-leimattu RNA-koetin.

Seuraavana päivänä valmistin DIG-leimatun koettimen linearisoidusta templaatista RNA-polymeraasia ja DIG-leimausliuosta käyttäen. RNA-polymeraasi T3 valmistaa plasmiditemplaatin perusteella ribonukleotideista sekä DIG-leimatuista UTP-nukleotideista komplementaarisen RNA-koettimen, joka on geenistä tuotetulle lähetti-RNA:lle käänteinen sekvenssiltään. Inkuboin linearisoitua plasmiditemplaattia RNA-polymeraasin (Roche), DIG-leimausliuoksen (Roche) ja RNAasi-inhibiittorin (Promega) kanssa kaksi tuntia 37 °C:ssa, ja pysäytin reaktion 0,8 µl pH 8.0 EDTA:lla. Tarkistin vielä koettimen onnistumisen geelielektroforeesilla tunnin ajolla 100 voltin jännitteellä. DIG-leimattu koetin näkyi geelillä kahtena raitana, joista toinen oli selkeä, noin 3000 emäsparin mittainen, ja toinen epäselvempi raita, joka oli kooltaan noin 750:n ja 500:n emäsparin väliltä (Kuva 5, kaivo 4). Pakastin valmiin koettimen -80 °C:ssa. Taulukossa 4 on esitetty tutkimuksessa käytetyt tulosten kannalta keskeisimmät koettimet, niiden laimennossuhteet hybridisaatiopuskuriin sekä koettimien leiman vahvistamiseen käytetyt vasta-aineet ja niiden laimennokset.

Taulukko 4. Työssä käytetyt tulosten kannalta keskeisimmät RNA-koettimet ja niiden laimennokset, koettimien visualisointiin käytetyt vasta-aineet ja niiden laimennokset TNB:hen sekä leiman vahvistamiseen käytetyn reagenssin laimennos amplifikaatiopuskuriin.

Koetin	Laimennossuhde DIG / F hybridisaatiopuskuriin	Vasta- aine DIG / F	Vasta-aineen laimennossuhde TNB:hen DIG / F	Amplifikaatio DIG / F 1:50
<i>Gad1</i> <i>Ntn1</i> <i>Pitx2</i> <i>Sert</i>	1:400 / 1:300	Sheep anti-DIG- POD / Sheep anti-F- POD	1:1000 / 1:800	TSA-Cyanine kit (DIG) / TSA- Fluorescein kit (F)

2.5.2 Koettimien hybridisaatio

In situ –hybridisaatiossa RNA-kontaminaation välttämiseksi suoritin työvaiheet ennen hybridisaatiota mahdollisimman puhtaasti, ja käytin steriilejä liuoksia ja työvälineitä. *In situ* –hybridisaation alussa lämmitin lasia 70 °C:n lämpölevyllä noin 30 sekuntin ajan parafiinin sulattamiseksi. Kuten immunohistokemiallisen värjäyksen alussa, myös *in situ* –hybridisaatiossa poistin parafiinin kudoksesta ksyleenikäsittelyn avulla (ks. Liite 2) ja suoritin laskevan alkoholisarjan veden palauttamiseksi kudokseen. *In situ* –hybridisaatiossa kuitenkin käytin muovisten astioiden sijaan puhtaampia, autoklaavissa desinfioituja lasiastioita. Ksyleeni-alkoholisarjan jälkeen pesin lasia 0,3 % Triton-X:ssä (ks. Liite 3) kudoksen avaamiseksi. Seuraavaksi suoritin kudoksen permeabilisaation, jossa PFA-fiksaatio osittain puretaan. Tämä parantaa koettimien sitoutumista lähetti-RNA:han kohdekudoksessa. Keitin lasia 0,1 M natriumsitraattipuskurissa ensin 3,5 minuuttia 100% teholla ja sen jälkeen 9 minuuttia 40% teholla mikroaaltouunissa. Annoin lasien jäähtyä noin 30 minuuttia.

Tämän jälkeen inkuboin lasia 0,5% natriumlauryylisulfaattia (SDS) sisältävässä 1xPBS-liuoksessa 15 minuuttia sekä 10 minuuttia trietanoliamiinipuskurissa (TEA, Helsingin yliopiston laboratorio), johon olin lisännyt asetaattianhydridiä (Sigma Aldrich) 0,25% liuostilavuudesta. Asetaattianhydridi estää koettimen epäspesifisen sitoutumisen kudოსleikkeessä ja parantaa siten menetelmän tehokkuutta. Tämän jälkeen suoritin nousevan alkoholisarjan kudოსleikkeille veden palauttamiseksi kudokseen (ks. Liite 2), ja kuivatoin lasia muovikannen alla vetokaapissa vähintään tunnin. Sen jälkeen laimensin DIG- ja F-koettimet hybridisaatiopuskuriin taulukon 4 laimennosten mukaisesti. Kuumensin laimennettuja koettimia 80 °C:ssa 10 minuutin ajan, jonka jälkeen sekoitin koetinlaimennokset huolellisesti ja jäädytin jäällä 5 minuuttia. Pipetoin jokaiselle lasille 150 µl koetinlaimennosta, ja peitin lasit parafilmillä. Siirsin lasit kosteuskammioon vaakatasossa, suljin kammion teipillä ja inkuboin yön yli 65 °C:ssa.

Seuraavana päivänä poistin lasista parafilmin ja valmistin WASHI-, WASHII-, NTE- ja 1xTBST-pesuliuokset (Liite 3). Pesin lasia 65-asteisessä WASHI-liuoksessa 30 minuuttia, 65-asteisessä WASHII-liuoksessa 30 minuuttia ja huoneenlämpöisessä NTE-liuoksessa 15 minuuttia. Pesujen jälkeen käsittelin näytteitä 30 minuutin ajan 37-asteiseen NTE:hen laimennetulla RNAasi A-entsyymillä (Roche), joka hajottaa näytteistä sitoutumattomat koettimet. Tämän jälkeen pesin lasia uudelleen 65-asteisessä WASHII-

liuoksessa 30 minuuttia sekä huoneenlämpöisessä natriumsitraattia sisältävässä suolaliuoksessa (2xSSC) 15 minuuttia ja 0,1xSSC:ssä 15 minuuttia. Lopuksi pesin lasia vielä 1xTBST-liuoksessa 10 minuuttia.

Pesujen jälkeen estokäsittelin näytteet TSA-reagenssia (engl. *tyramide signal amplification*) (PerkinElmer) sisältävällä TNB-liuoksella (engl. *Tris-NaCl blocking buffer*) (PerkinElmer), jonka tarkoituksena oli estää epäspesifinen vasta-aineiden sitoutuminen. Pipetoin estokäsittelyliuosta 300 µl jokaiselle lasille ja inkuboin kosteuskammiossa 30 minuuttia huoneenlämmössä. Tämän jälkeen työvaiheet jatkuivat samoin kuten immunohistokemiallisessa värjäyksessä. Valmistin vasta-ainelaimennoksen TNB:hen joko anti-F-POD (Roche) tai anti-DIG-POD (Roche) –vasta-aineita käyttäen riippuen valituista koettimista. Pipetoin 300 µl vasta-ainelaimennosta lasille ja inkuboin lasia kostutetussa kammiossa yön yli 4 °C:ssa.

Seuraavana päivänä vahvistin anti-F –vasta-aineen leiman TSA Fluorescein kit (PerkinElmer) –reagenssilla. Laimensin reagenssin amplifikaatiopuskuriin (PerkinElmer) 1:50, ja pipetoin laimennosta 100 µl jokaiselle lasille, jossa oli F-koetinta. Inkuboin näytteitä 10 minuuttia huoneenlämmössä kostutetussa kammiossa. Tämän jälkeen pesin lasia 1xTBST-liuoksessa ja inkuboin 30 minuuttia 0,02 M HCl:ssä sekä pesin uudelleen 1xTBST:ssä. Suolahappo inaktivoi TSA-reagenssin peroksidaasientsyymien, jota käytetään koettimen leiman vahvistamisessa. Pesun jälkeen pipetoin lasille 300 µl anti-DIG-POD –vasta-ainelaimennosta 1:1000 TNB:hen laimennettuna. Neljäntenä päivänä 1xTBST-pesujen jälkeen vahvistin DIG-vasta-aineen leiman 10 minuutin inkubaatiolla TSA Plus Cyanine kit (PerkinElmer) –reagenssilla, jonka olin laimentanut amplifikaatiopuskuriin (PerkinElmer) 1:50. Suolahappokäsittelyä ei tarvittu.

2.5.3 RNA *in situ* –hybridisaatioon yhdistetty immunohistokemia

Useiden koettimien ja vasta-aineiden käyttö samoilla leikkeillä mahdollistaa useiden geenien ilmentymisen havaitsemisen samoissa soluissa. Valitsin tutkimuksissa käytetyt koettimet ja vasta-aineet sen perusteella, mitä tutkimusryhmän laboratoriossa oli aiemminkin käytetty. Näin varmistin sen, että käytin tutkimuksessa toimivaksi osoitettuja koettimia ja vasta-aineita. Tutkimuksessa oli mahdollista käyttää yhteensä kolmen koettimen tai vasta-aineen yhdistelmää yhdellä objektilasilla perustuen fluoresenssi-

mikroskoopin suodattimien väreihin, joita olivat punainen, vihreä ja kirkkaanpunainen (ks. Taulukko 2). DAPI:lle käytin aina sinistä kanavaa.

Sekundaaristen vasta-aineiden fluorokromit pystyi valitsemaan vapaasti, mutta F-leimatun koettimen havainnoin fluoresenssimikroskoopilla aina vihreän värin suodattimella ja DIG-leimatun koettimen punaisella. Pyrin suorittamaan kaikki värjäykset rinnakkaisille leikkeille tutkiakseni useiden eri geenien ilmentymistä samoissa soluissa. Koska yhden kudosleikkeen paksuus oli 5 µm, yksi ainut 15 µm paksuinen solu ulottuu kolmelle rinnakkaisleikkeelle.

Kun *in situ* –hybridisaatioon oli yhdistetty primaarivasta-aineeseen perustuva immunohistokemiallinen värjäys, pipetoin primaarisen vasta-aineen samana päivänä kuin vahvistin DIG-leiman, ja seuraavana päivänä lisäsin sekundaarisen vasta-aineen ja DAPI:n. Jos pelkkään F-koettimeen oli yhdistetty immunohistokemiallinen värjäys, pipetoin vasta-aineen samana päivänä kuin vahvistin F-koettimen leiman. Lopuksi värjäsin tumat DAPI:lla samoin kuten immunohistokemiallisessa värjäyksessä, peitin lasit FluorSave-petausaineella (Millipore) ja siirsin lasit 4 °C:een tulosten tarkasteluun asti.

2.6 Fluoresenssimikroskopia ja kuvankäsittely

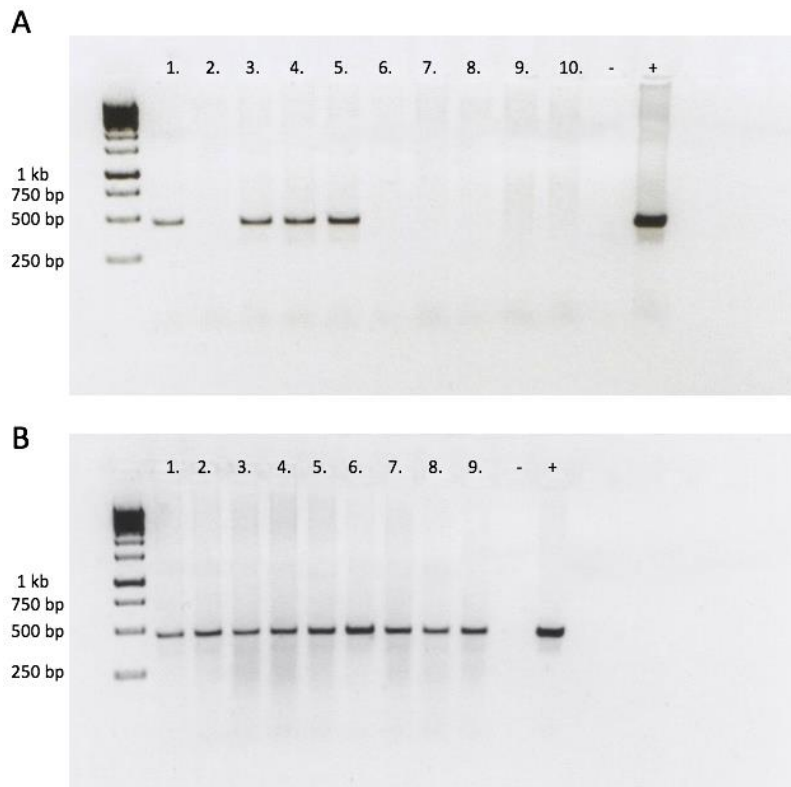
Tarkastelin tuloksia Olympus BX63-mikroskoopilla, ja otin kuvia värjäytyistä leikkeistä mikroskoopin DP72-kameralla CellSens Dimensions –ohjelmaa käyttäen 4-, 10-, 20- ja 40-kertaisilla suurennoksilla eri fluoresenssisuodattimilla (kirkkaanpunainen, oranssinpunainen ja vihreä; ks. myös taulukko 2). Kaksoisvärjäyksissä yhdistin digitaalisten kuvien RGB (engl. *red, green, blue*) –kanavat eli punaisen, vihreän ja sinisen (DAPI) kanavan toisiinsa Adobe Photoshop CC 2018 –ohjelmalla. Huomaa, että esimerkiksi violettia tai oranssia väriä ei ole mahdollista käyttää RGB-kanavia yhdistettäessä. Muokkasin mikroskooppikuvien kirkkautta ja kontrastia tarvittaessa sekä retusoin kuvista pois kudosleikkeiden mahdolliset rypyt Adobe Photoshop CC 2018 –ohjelmalla (Liite 4, retusoimattomat kuvat). Yhdistelin kuvat paneeleiksi Microsoft PowerPoint –ohjelmaa käyttäen. Myös tutkielmassa esitetyt kuvat piirsin Adobe Photoshop CC 2018- ja Microsoft PowerPoint –ohjelmilla.

3 TULOKSET

3.1 Cre-rekombinaasin toiminta

3.1.1 Sikiöiden *Cre*-genotyyppi

Varmistin jokaisen sikiön *Cre*-genotyypin geneettistä solulinjakartoitusta varten, ja käytin solulinjakartoituksessa ainoastaan genotyyppitettyjä *Cre*-positiivisia sikiöitä. Havaittiin, että kun parituksissa käytetty uros oli heterotsygoottinen *Cre*:n suhteen, neljä sikiötä kymmenestä eli 40 % oli *Cre*-positiivisia (Kuva 6A). Kun parituksissa oli käytetty *Cre*:n suhteen homotsygoottisia uroshiiriä, kaikki jälkeläiset olivat *Cre*-genotyyppiltään positiivisia (Kuva 6B). Ainoastaan toisen kehitysvaiheen E12.5 sikiöiden poikueen isänä oli käytetty parituksissa *Cre*-heterotsygoottia urosta; muissa poikueissa parituksiin käytetyt urokset olivat *Cre*-homotsygootteja.



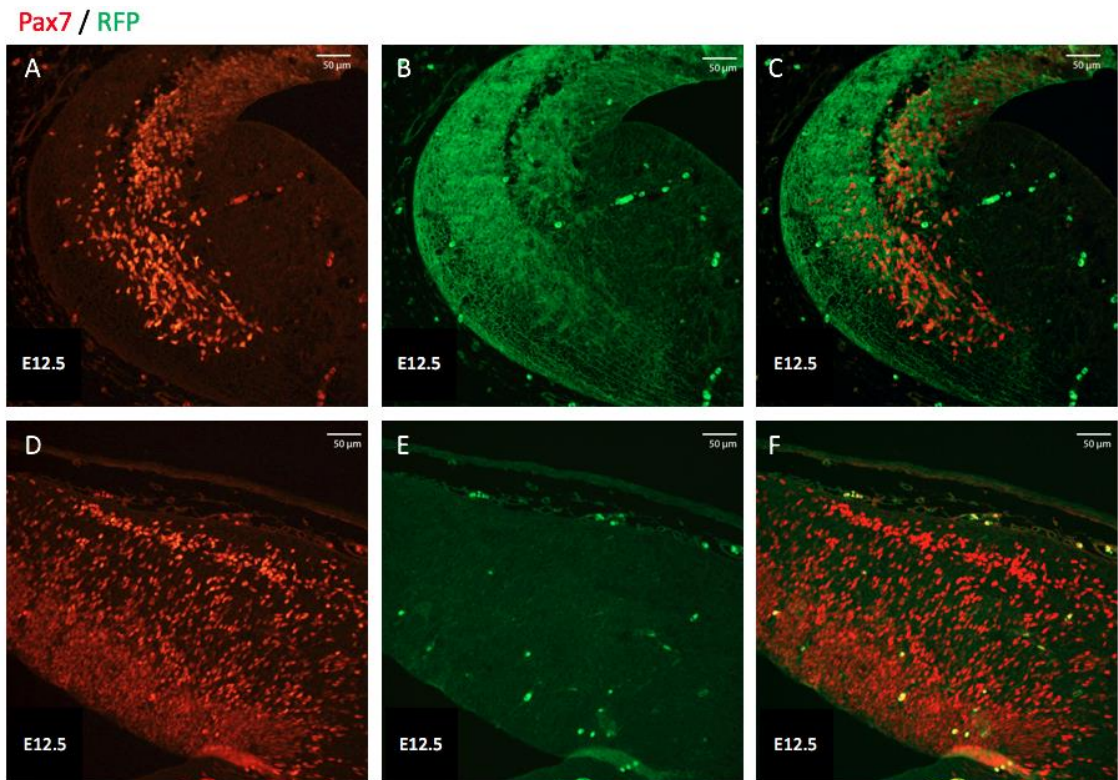
Kuva 6. 1% 1xTBE-puskuriin valmistettu agarosigeeli 50 minuutin ajon jälkeen 100 voltin jännitteellä. Positiivinen kontrolli (+) Cre^+ oli kooltaan noin 500 emäsparia (bp). Negatiivinen kontrolli (-) oli puhdas. A) Kehitysvaiheen E12.5 sikiöiden 1-10 *Cre*-genotyyppityksen tulos, kun poikueen isä oli *Cre*-heterotsygoottinen. Sikiöt 1, 3, 4 ja 5 olivat *Cre*-positiivisia. DNA-supernatanttia PCR-reaktiossa oli käytetty 1 μ l. B) Kehitysvaiheen E18.5 sikiöiden 1-9 *Cre*-genotyyppi, kun poikueen isänä oli käytetty *Cre*-homotsygoottia urosta. Kaikki sikiöt olivat *Cre*-positiivisia. PCR-reaktiossa oli käytetty 0,5 μ l DNA-supernatanttia.

Kehitysvaiheen E13.5 sikiöiden genotyypityksessä yksi genotyypitysnäyte jäi keräämättä, ja lisäksi yksi sikiö oli *Cre*-negatiivinen genotyypityksessä ja kolmas ei antanut selkeää tulosta (ei kuvaa). On kuitenkin erittäin todennäköistä, että esimerkiksi proteinaasihajotus ei toiminut kunnolla tai PCR-reaktiossa putkesta puuttui templaatti kokonaan, minkä vuoksi en saanut positiivista tulosta, vaikka parituksissa käytetyt urokset olivat *Cre*-homotsygootteja. Kaikki muut *Cre*-homotsygoottien jälkeläiset antoivat positiivisen tuloksen, ja myöskin tutkituista kehitysvaiheen E13.5 sikiöistä kuusi sikiötä kahdeksasta eli 75 % oli *Cre*-positiivisia. En kuitenkaan toistanut kyseistä PCR-reaktiota, koska en käyttänyt tämän kehitysvaiheen sikiöitä tutkimustuloksissa histologisten leikkeiden heikon laadun vuoksi.

3.1.2 Positiivinen ja negatiivinen tutkimuskontrolli

Immunohistokemiallinen Pax7- ja RFP-vasta-ainella suoritettu kaksoisvärjäys toimi tutkimuksessa positiivisena kontrollina Cre-rekombinaasin toiminnasta Pax7-geeniä ilmentävissä soluissa, koska kaikkien Pax7-geeniä ilmentävien solujen tulisi ilmentää myös Cre-rekombinaasin geeniä ja siten olla RFP-positiivisia Cre-positiivisissa sikiöissä. Havaitsin, että Cre-positiivisissa sikiöissä kehityksen vaiheessa E12.5 Pax7-geeniä ilmentävät solut (Kuva 7A) olivat myös RFP-positiivisia (Kuvat 7B, 7C). Lisäksi osa soluista, jotka eivät olleet Pax7-positiivisia, oli kuitenkin RFP-positiivisia (Kuva 7C). Havaitsin samanlaisen tuloksen kaikissa kolmessa tutkitussa kehitysvaiheessa (E12.5, E14.5 ja E18.5). Pax7:n vasta-aine sijaitsi solujen keskellä (Kuva 7A), kun taas RFP esiintyi selkeästi sytoplasmassa ja laajemmalle alueelle levinneenä kuin Pax7 (Kuva 7B). Ainoastaan yksi tutkituista genotyypityksen perusteella Cre-positiivisista kehitysvaiheen E12.5 sikiöistä ei antanut lainkaan signaalia immunohistokemiallisessa värjäyksessä RFP:n vasta-aineella, vaikka kudoksessa esiintyi Pax7-positiivisia soluja (ei kuvaa).

Negatiivisena kontrollina tutkimuksessa käytin yhtä genotyypityksen perusteella Cre-negatiivista kehitysvaiheen E12.5 sikiötä immunohistokemiallisessa Pax7/RFP-kaksoisvärjäyksessä, enkä havainnut lainkaan RFP:tä yhdessäkään solussa (Kuva 7E), vaikka Pax7 ilmentyi laajasti (Kuva 7D). Cre-negatiivisissa sikiöissä RFP:tä tuottavaa *TdTomato*-geeniä edeltää lopetuskodoni, eikä RFP:tä siten tuoteta.



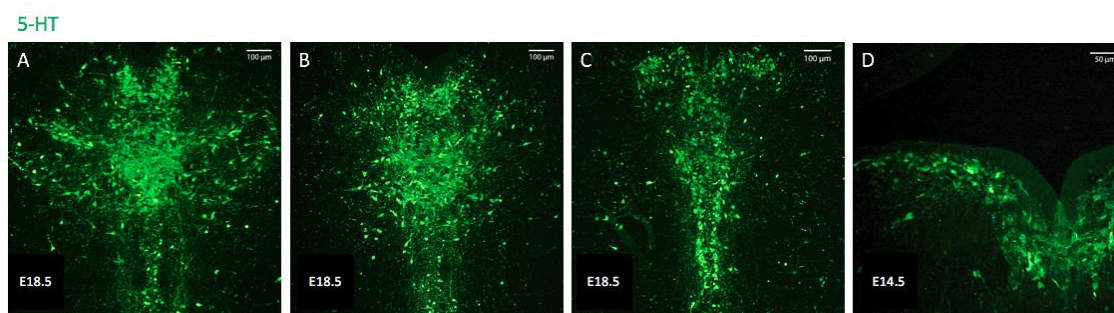
Kuva 7. Pax7- ja RFP-vasta-aineilla tehty kaksoisvärjäys genotyypityksen perusteella *Cre*-positiivisissa (A, B, C) ja *Cre*-negatiivisissa (D, E, F) sikiössä. *Pax7*-geenin ilmentyminen vasta-aineen perusteella (A, D), RFP:n esiintyminen vasta-aineen perusteella (B, E) ja yhdistelmäkuvat (C, F). Mittakaavajanojen pituudet ovat 50 µm kaikissa kuvissa.

3.2 Dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisten hermosolujen geneettinen solulinjakartoitus

3.2.1 Dorsaalisen raphe-tumakkeen paikallistaminen kudosleikkeistä

Koska dorsaalinen raphe-tumake on aivojen laajin serotonergisten hermosolujen keskittymä, käytin serotonergisten solujen esiintymistä dorsaalisen raphe-tumakkeen paikallistamiseen kudosleikkeissä anatomian ohella. Dorsaalisen raphe-tumakkeen serotonergisten hermosolujen markkereina kehityksen vaiheessa E18.5 toimivat sekä 5-HT-vasta-aine että *Sert(F)*-koetin, mutta pääasiassa tutkimuksissa käytin 5-HT-vasta-ainetta. Se antoi spesifisen, selkeän signaalin ja vähemmän epäspesifistä taustaa. Yleisesti ottaen havaitsin, että tässä tutkimuksessa runsas epäspesifinen tausta oli ongelmana kaikissa *in situ* –hybridisaatiovärjäyksissä koettimesta riippumatta. *Sert(F)*-koettimen perusteella sain kuitenkin samanlaisen tuloksen kuin 5-HT-vasta-ainetta käytettäessä serotonergisten solujen esiintymisestä dorsaalisisessa raphe-tumakkeessa runsaasta taustasta huolimatta (ei kuvaa).

5-HT-vasta-aineen perusteella havaitsin, että rostraalisessa osassa (Kuva 8A) sekä keskellä dorsaalista raphe-tumaketta (Kuva 8B) serotonergiset hermosolut esiintyvät laajana populaationa sekä keskiviivalla että dorsaalisen raphe-tumakkeen lateraalisissa siivekkeissä, kun taas kaudaalisessa osassa serotonergiset solut pääasiassa reunustivat keskiviivaa. Lisäksi kaudaalisesti aivan ventrikkelin alapuolella esiintyi laajempi serotonergisten solujen populaatio (Kuva 8C). Havaitsin vasta-aineen perusteella serotoniinia myös kehitysvaiheen E14.5 sikiössä, jossa se keskittyi ventraalisen rombomeeri 1:n ventrikulaariselle alueelle (Kuva 8D). E14.5 dorsaalinen raphe-tumake ei ole vielä kehittynyt, mutta siellä esiintyvät serotonergiset solut ovat peräisin ventraalisen rombomeeri 1:n alueelta. E14.5 nuorempia sikiöitä en tutkinut 5-HT-vasta-aineen osalta.



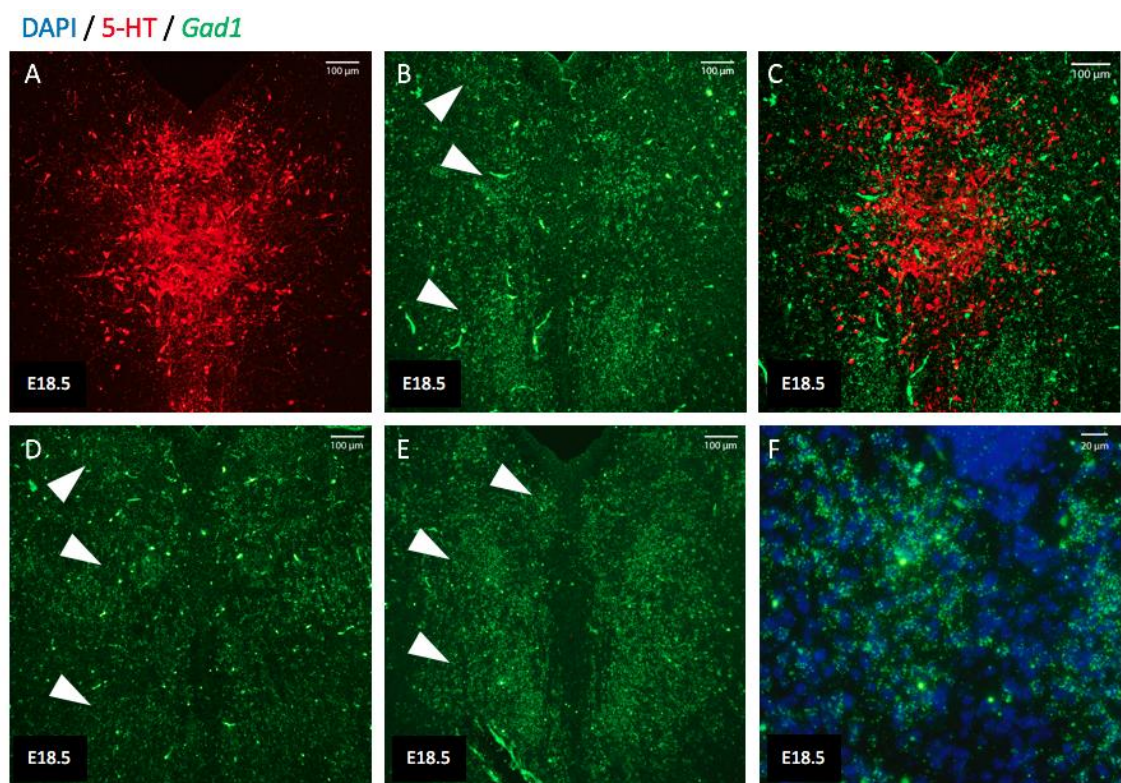
Kuva 8. Serotonergisten solujen esiintyminen immunohistokemiallisen 5-HT-vasta-ainevärjäyksen perusteella dorsaalisen raphe-tumakkeen rostraalisessa osassa (A), keskiosassa (B) ja kaudaalisessa osassa (C) kehitysvaiheessa E18.5 sekä ventraalisessa rombomeeri 1:ssä kehitysvaiheessa E14.5 (D). Mittakaavajanojen pituudet ovat 100 μm (A, B, C) ja 50 μm (D).

3.2.2 Dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergiset hermosolut

Kehitysvaiheen E18.5 sikiön dorsaaliosassa raphe-tumakkeessa esiintyi serotonergisten hermosolujen (Kuva 9A) lisäksi runsaasti GABAergisiä hermosoluja (Kuva 9B). GABAergisten hermosolujen markkerina tässä tutkimuksessa toimi *Gad1(F)*-koetin, joka sitoutuu *Gad1*-geenistä tuotettuun lähetti-RNA:han. *Gad1*-geeniä ilmennetään ainoastaan GABAergisissä hermosoluissa. Dorsaaliosassa raphe-tumakkeessa GABAergiset hermosolut sijaitsivat pääosin eri alueilla kuin serotonergiset hermosolut siten, että serotoniinia esiintyi laajimmin keskiviivan kohdalla sekä dorsaalisen raphe-tumakkeen lateraalisissa siivekkeissä, joissa *Gad1*:n lähetti-RNA:ta ei esiintynyt. Koska *Gad1(F)*-koettimen ja 5-HT-vasta-aineen kaksoisvärjäyksen seurauksena samoilla leikkeillä vasta-aine ei näkynyt lainkaan, tulkitsin tulokset rinnakkaisilta leikkeiltä, jotka yhdistin yhdeksi

kuvaksi (Kuva 9C). *Gad1*-koetin yksinään sen sijaan toimi hyvin *in situ* -hybridisaatiossa, ja geenin lähetti-RNA paikallistui selkeästi DAPI:n perusteella solujen tumaan pistemäisenä signaalina (Kuva 9F).

GABAergiset hermosolut esiintyvät läpi dorsaalisen raphe-tumakkeen kolmena laajana, mutta ei täysin erillisenä populaationa keskiviivan molemmin puolin (Kuvat 9B, 9D, 9E). Rostraalisesti dorsaaliossa raphe-tumakkeessa GABAergisiä hermosoluja esiintyi kaikista vähiten (Kuva 9D), kun taas kaudaalisimmassa osassa kolmea erillistä populaatiota ei voinut enää selkeästi erottaa toisistaan (Kuva 9E). Keskellä dorsaalista raphe-tumaketta GABAergiset hermosolut esiintyvät laajimmin serotonergisten lateraalisten siivekkeiden välissä sekä niiden alapuolella (Kuvat 9B, 9C). GABAergisiä hermosoluja ei esiintynyt lainkaan keskiviivalla (Kuvat 9B, 9D, 9E), jossa taas serotoniinia esiintyi runsaasti.



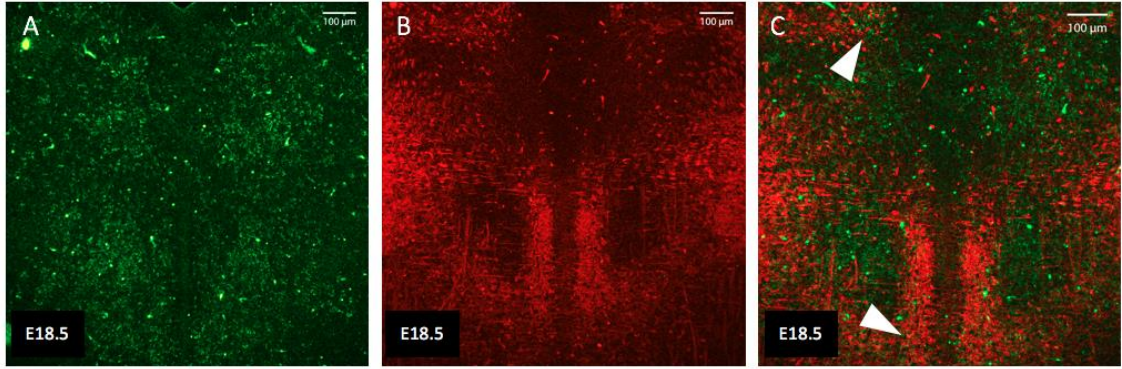
Kuva 9. Kehitysvaiheen E18.5 sikiön dorsaalisen raphe-tumakkeen serotonergiset hermosolut 5-HT-vasta-aineen perusteella (A, C) ja GABAergiset hermosolut *Gad1*(F)-koettimen perusteella (B, D, E, nuolenkärkien osoittamat alueet), sekä *Gad1*-geenin lähetti-RNA:n paikallistuminen solujen tumaan DAPI:n perusteella (F). Kuvien mittakaavajanojen pituudet ovat 100 μ m (A-E) ja 20 μ m (F).

3.2.3 Dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisten hermosolujen alkuperä

Tutkin *Gad1*(F)-koetinta yhdessä RFP-vasta-aineen kanssa kehitysvaiheen E18.5 sikiön dorsaalissa raphe-tumakkeessa tarkoitukseni selvittää GABAergisten hermosolujen alkuperä. Tämä ei onnistunut *in situ* –hybridisaatioon yhdistetyn immunohistokemian avulla, sillä *in situ* –hybridisaatioon yhdistetyt immunohistokemialliset RFP-vasta-ainevärjäykset eivät tässä tutkimuksessa toimineet odotetusti. Jokainen käytetty koetin antoi yleensä suhteellisen vahvan signaalin kaksoisvärjäyksissä, joskin epäspesifistä taustaa oli jonkin verran. Sen sijaan RFP:n vasta-aine näkyi koettimeen yhdistetyissä kaksoisvärjäyksissä hyvin heikosti tai ei lainkaan sekä punaista, kirkkaanpunaista että vihreää vasta-aineen fluorokromia käytettäessä. Kaikkien kehitysvaiheiden sikiöt mukaan lukien tein kaksoisvärjäyksen koettimen ja RFP-vasta-aineen kanssa yhteensä kahdeksassa eri sikiössä, ja sain positiivisen tuloksen ainoastaan yhdestä kehitysvaiheen E12.5 sikiöstä. Tässä sikiössä käytin koettimina värjäyksissä joko *Pitx2*(DIG)- tai *Ntn1*(DIG)-koetinta ja RFP:n sekundaarisena vasta-aineena Alexa Fluor 647 –fluorokromikonjugoitua vasta-ainetta, jonka leima oli kirkkaanpunainen. Sekin näkyi mikroskoopilla todella heikosti, mikä vaikeutti tulosten tulkittamista. Muissa seitsemässä värjäyksessä, mukaan lukien *Gad1*(F)/RFP, RFP ei antanut signaalia. Tulosten tulkintaa vaikeutti lisäksi *in situ* –hybridisaatiovärjäysten tausta. Tausta näkyi mikroskoopilla pistemäisenä epäspesifisenä signaalina kaikissa värikanavissa, vaikka käytin koettimen visualisointiin vain yhtä väriä (kuva esitettynä myöhemmin luvussa 3.4.4).

Gad1(F)-koettimen ja RFP:n kaksoisvärjäykset eivät siis toimineet samalla leikkeellä. Sen sijaan rinnakkaisten leikkeiden avulla onnistuin saamaan suuntaa-antavan tuloksen GABAergisten hermosolujen alkuperästä dorsaalissa raphe-tumakkeessa, kun yhdistin *Gad1*(F)-koettimella (Kuva 10A) tehdystä *in situ* –hybridisaatiovärjäyksestä saadun tuloksen immunohistokemiallisesta RFP-vasta-ainevärjäyksestä (Kuva 10B) saadun tuloksen kanssa. Rinnakkaisten leikkeiden perusteella vaikuttaa vahvasti siltä, että dorsaalissa raphe-tumakkeessa esiintyvistä GABAergisistä hermosoluista osa on RFP-positiivisia ja osa RFP-negatiivisia (Kuva 10C).

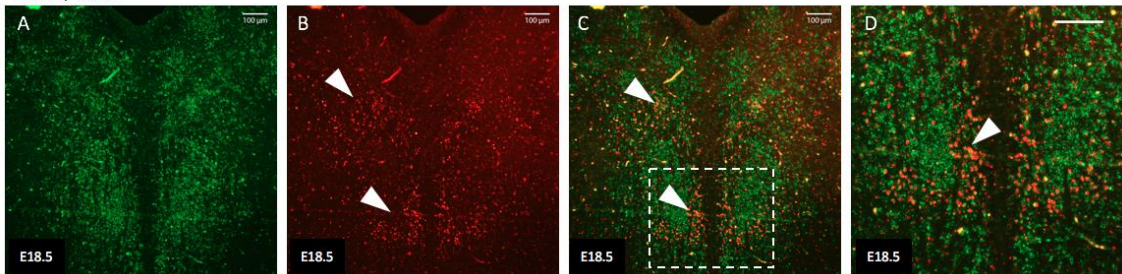
Gad1 / RFP



Kuva 10. Kehitysvaiheen E18.5 sikiön dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisten hermosolujen alkuperä. Kaikkien kuvien mittakaavajanojen pituudet ovat 100 μm . GABAergisten solujen esiintyminen *Gad1*(F)-koettimen perusteella (A), RFP:n esiintyminen vasta-aineen perusteella (B) ja yhdistelmäkuva (C) kuvista A ja B, jotka ovat rinnakkaisleikkeiltä. Kuvassa C nuolenkärjet osoittavat ne alueet, joissa *Gad1*-geeniä ilmentävät solut vaikuttavat olevan RFP-positiivisia.

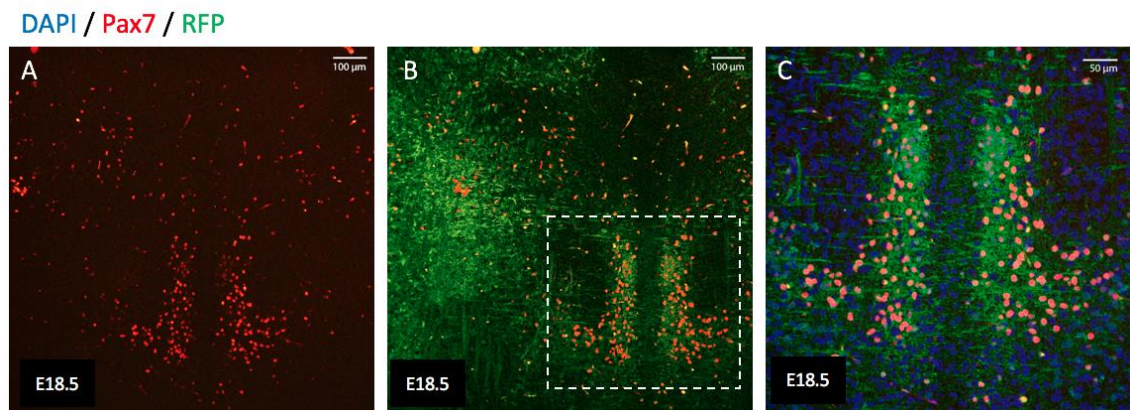
Lisäksi tutkin *Pax7*-geenin ilmentymistä dorsaalisisä raphe-tumakkeessa immunohistokemiallisella värjäyksellä. *Pax7*-vasta-aine värjää solussa *Pax7*-geenistä tuotetut *Pax7*-proteiinit, jotka ovat tumassa esiintyviä transkriptiotekijöitä. *Pax7*:n ja RFP:n vasta-aineiden erona on se, että *Pax7* kertoo, ilmentääkö solu *Pax7*-geeniä kudoksen fiksaation hetkellä. RFP puolestaan kertoo, ovatko solut jossain kehityksensä vaiheessa ilmentäneet *Pax7*-geeniä, vaikka geeni ei enää kudoksen fiksaation hetkellä ilmentyisikään. Toisin kuin *Gad1*(F)/RFP –kaksoisvärjäys, *Gad1*(F)-koettimen (Kuva 11A) ja *Pax7*-vasta-aineen (Kuva 11B) kaksoisvärjäys toimi hyvin kehitysvaiheen E18.5 sikiössä, ja havaitsin, että dorsaalisisä raphe-tumakkeessa esiintyi GABAergisiä hermosoluja, joissa ilmenettiin myös *Pax7*-geeniä (Kuvat 11C, 11D).

Gad1 / Pax7



Kuva 11. Kehitysvaiheen E18.5 sikiön dorsaalisisä raphe-tumakkeessa esiintyvä *Gad1*-geenin ilmentyminen koettimen perusteella (A) ja *Pax7*-geenin ilmentyminen vasta-aineen perusteella (B) sekä yhdistelmäkuvat (C, D). Nuolenkärjillä osoitettuna ovat ne alueet, joissa *Pax7*-geeniä ilmentävät solut ovat myös GABAergisiä (B, C, D). Kuva D on digitaalinen suurennos kuvan C katkoviivalla rajatusta alueesta. Kuvien mittakaavajanojen pituudet ovat 100 μm .

Immunohistokemiallisella värjäyksellä havaitsin, että nämä *Pax7*-geeniä ilmentävät solut (Kuva 12A) olivat myös RFP-positiivisia (Kuvat 12B, 12C), mikä tukee edellisessä kappaleessa esitettyä tulosta, että dorsaalissa raphe-tumakkeessa esiintyy GABAergisiä RFP-positiivisia hermosoluja (ks. Kuva 10C).



Kuva 12. Kehitysvaiheen E18.5 sikiön dorsaalissa raphe-tumakkeessa esiintyvä *Pax7*-geenin ilmentyminen vasta-aineen perusteella (A) sekä yhdistelmäkuvat immunohistokemiallisen Pax7/RFP-kaksoisvärjäyksen perusteella (B, C). Kuva C on suurennos kuvan B valkoisella rajatulta alueelta. Kuvien mittakaavajanojen pituudet ovat 100 μm (A, B) ja 50 μm (C).

3.3 *Ntn1*-geenin ilmentyminen dorsaalisen raphe-tumakkeen

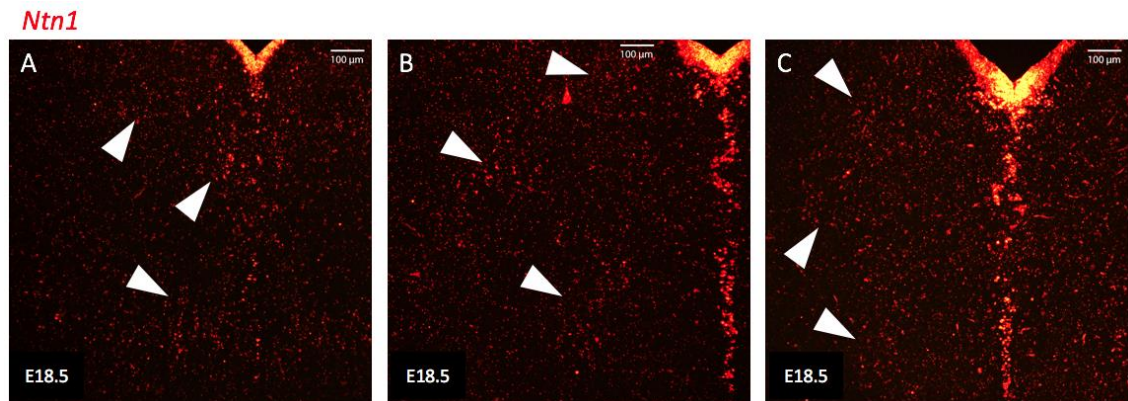
GABAergisissä hermosoluissa

3.3.1 *Ntn1*-geenin ilmentyminen dorsaalissa raphe-tumakkeessa

Tutkimuksessa selvitin *Ntn1*-geenin ilmentymistä dorsaalissa raphe-tumakkeessa, koska Morello ym. (julkaisematon) havaitsivat *Ntn1*-positiivisia GABAergisiä prekursoreita kehitysvaiheen E12.5 sikiön ventraalisessa rombomeeri 1:ssä, jotka hypoteesin mukaan vaeltavat dorsaaliseen raphe-tumakkeeseen. Käytin geenin ilmentymisen visualisointiin *Ntn1*(DIG)-koetinta, koska Netriini-1 on solusta ulos erittyvä proteiini ja voi levitä laajoillekin alueille siitä solusta, josta se tuotetaan. Sen vuoksi geenin lähetti-RNA soveltuu paremmin geenin ilmentymisen paikallistamiseen kudoksessa.

Kehitysvaiheen E18.5 sikiön dorsaalissa raphe-tumakkeessa *Ntn1*-geeniä ilmentävät hermosolupopulaatiot esiintyivät keskiviivan molemmin puolin kolmena pääpopulaationa sekä rostraalisessa- (Kuva 13A), keski- (Kuva 13B) että kaudaalissa

osassa (Kuva 13C) dorsaalista raphe-tumaketta. Lisäksi keskiviivalla ja ventrikkelin reunalla esiintyi runsaasti *Ntn1*-geeniä ilmentäviä soluja.

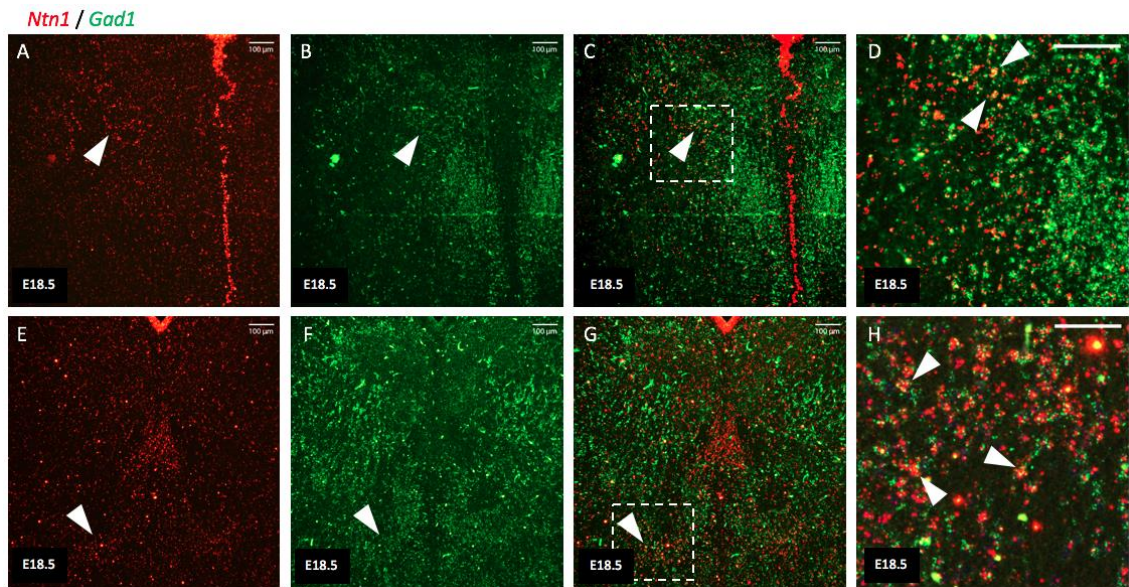


Kuva 13. *Ntn1*-geenin ilmentyminen kehitysvaiheen E18.5 sikiön dorsaalissa raphe-tumakkeessa *Ntn1*(DIG)-koettimen perusteella nuolenkärkien osoittamina populaatioina (A, B, C). Keskiviivalla ja ventrikkelin reunalla esiintyviä soluja ei ole merkitty nuolenkärjillä. Kaikkien kuvien mittakaavajanojen pituudet ovat 100 µm.

3.3.2 *Ntn1*-geeniä ilmentävien solujen GABAergisyys

Aiemmin selvitin, että kehityksen vaiheessa E18.5 dorsaalissa raphe-tumakkeessa esiintyy runsaasti GABAergisiä hermosoluja (luku 3.2.2) sekä *Ntn1*-geeniä ilmentäviä soluja (luku 3.3.1). Halusin selvittää, lukeutuvatko *Ntn1*-geeniä ilmentävät solut näihin GABAergisiin hermosoluihin dorsaalissa raphe-tumakkeessa. Selvitin *Ntn1*-positiivisten solujen GABAergisyyden *Ntn1*(DIG)/*Gad1*(F) –kaksoisvärjäyksellä, jonka toistin yhteensä neljällä eri kehitysvaiheen E18.5 sikiöllä. Yhdessä värjäyksessä lasi sekoittui toisen näytteen kanssa eikä tuloksia voinut tulkita, ja toisessa värjäyksessä dorsaalisen raphe-tumakkeen alueella en havainnut signaalia kummastakaan koettimesta. Kaksi värjäystä neljästä onnistui hyvin, mutta toisessa värjäyksistä oli ainoastaan yksi hyvä leike rostraalisesta osasta dorsaalista raphe-tumaketta.

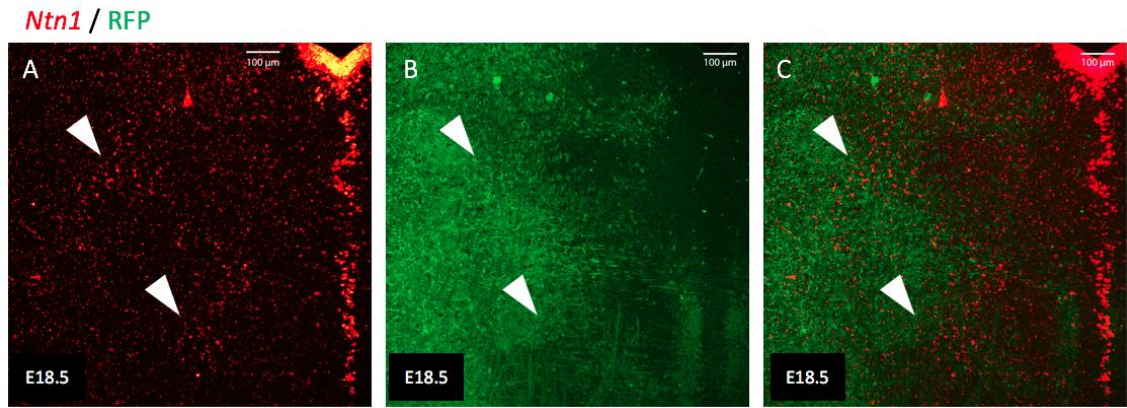
Näistä kahdesta onnistuneesta värjäyksestäkin *Ntn1*-geeniä ilmentävien hermosolujen GABAergisyys oli haasteellista selvittää, sillä kahden koettimen kaksoisvärjäyksissä epäspesifistä taustaa oli erittäin runsaasti. Kuitenkin kahden värjäyksen perusteella vaikutti siltä, että kolmesta *Ntn1*-geeniä ilmentävästä solupopulaatiosta ylin populaatio (Kuvat 14A, 14B, 14C, 14D) ja alin populaatio (Kuvat 14E, 14F, 14G, 14H) oli GABAerginen. Sen sijaan keskiviivalla sekä sen vieressä sijaitsevat *Ntn1*-positiiviset solut eivät vaikuttaneet olevan GABAergisiä (Kuvat 14C, 14G).



Kuva 14. Kehitysvaiheen E18.5 dorsaalissa raphe-tumakkeessa esiintyvä *Ntn1*-geenin ilmentyminen *Ntn1*(DIG)-koettimen perusteella (A, E, nuolenkärkien osoittamat alueet) ja *Gad1*-geenin ilmentyminen *Gad1*(F)-koettimen perusteella (B, F, nuolenkärkien osoittamat alueet). GABAergisten *Ntn1*-geeniä ilmentävien solujen esiintyminen dorsaalissa raphe-tumakkeessa yhdistelmäkuvina (C, D, G, H, nuolenkärkien osoittamat alueet). Kuva D on digitaalinen suurennos kuvan C valkoisella rajatusta alueesta, ja kuva H on digitaalinen suurennos kuvan G valkoisella rajatusta alueesta. Mittakaavajanojen pituudet ovat kaikissa kuvissa 100 μm .

3.3.3 *Ntn1*-geeniä ilmentävien GABAergisten hermosolujen alkuperä

Koska dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisten hermosolujen alkuperän selvittäminen *Gad1*(F)/RFP –kaksoisvärjäyksellä ei toiminut, yritin selvittää *Ntn1*-geeniä ilmentävien GABAergisten hermosolujen alkuperää *Ntn1*(DIG)/RFP –kaksoisvärjäyksellä ja tulokset niiltä alueilta, joissa olin edellisen värjäyksen perusteella havainnut GABAergisiä *Ntn1*-positiivisia hermosoluja. Kuten *Gad1*(F)/RFP, myöskään *Ntn1*(DIG)/RFP –kaksoisvärjäys ei toiminut yhdessä kehitysvaiheen E18.5 sikiössä useista toistoista huolimatta. Vaikka *Ntn1*(DIG)-koetin antoi selkeän signaalin, en havainnut RFP:n sekundaarisen vasta-aineen signaalia lainkaan. Sen sijaan rinnakkaisilla leikkeillä pelkkä *in situ* –hybridisaatiovärjäys *Ntn1*(DIG)-koettimella (Kuva 15A) ja pelkkä immunohistokemiallinen RFP-vasta-ainevärjäys (Kuva 15B) onnistuivat hyvin. Rinnakkaisten leikkeiden perusteella *Ntn1*-geeniä ilmentävät GABAergiset hermosolut dorsaalissa raphe-tumakkeessa vaikuttivat olevan suurelta osin RFP-positiivisia (Kuva 15C).



Kuva 15. Kehitysvaiheen E18.5 dorsaalisen raphe-tumakkeen *Ntn1*-geeniä ilmentävät solut *Ntn1*(DIG)-koettimen perusteella (A, nuolenkärkien osoittamat alueet) ja RFP:n esiintyminen vasta-aineen perusteella (B, nuolenkärkien osoittamat alueet) sekä yhdistelmäkuva (C) rinnakkaisleikkeiltä A ja B. Kuvassa C nuolenkärjet osoittavat ne alueet, joissa solut ovat sekä *Ntn1*- että RFP-positiivisia. Kaikkien kuvien mitta-kaavajanojen pituudet ovat 100 µm.

3.3.4 *Ntn1*-geeniä ilmentävien solujen 2C-tyyppin serotoniinireseptorin ilmentyminen

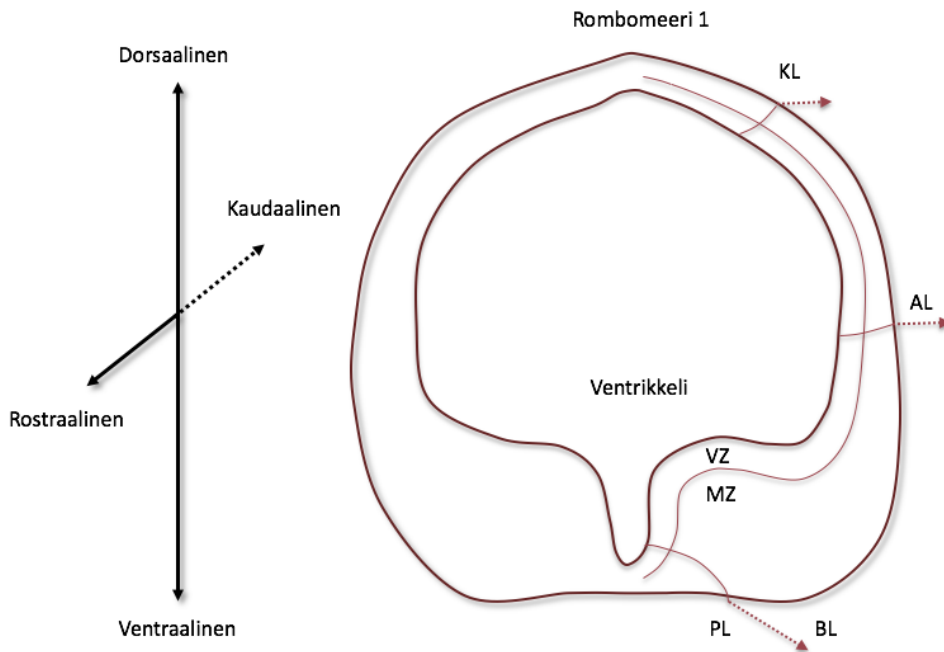
En havainnut dorsaalisisessa raphe-tumakkeen lainkaan 5-HTR_{2C}:n ilmentymistä vasta-aineen perusteella kehitysvaiheen E18.5 sikiössä (ei kuvaa). Tein kaksi toistoa pelkällä immunohistokemiallisella värjäyksellä ja muut kolme *in situ* -hybridisaatioon yhdistetyllä immunohistokemiallisella värjäyksellä yhdessä *Ntn1*(DIG)-koettimen kanssa. Dorsaalisen raphe-tumakkeen paikallistamiseen käytin serotoniinin vasta-ainetta rinnakkaisleikkeillä kaksoisvärjäyksissä, mutta immunohistokemiallisista värjäyksistä dorsaalisen raphe-tumakkeen markkeri jäi puuttumaan. Kuitenkin anatomian perusteella on todennäköistä, että vähintään osa näistäkin leikkeistä oli dorsaalisesta raphe-tumakkeesta. Lisäksi havaitsin 5-HTR_{2C}-värjäyksen rinnakkaisella leikkeellä *Pax7*-geenin ilmentymisen *Pax7*-vasta-aineen perusteella, joka vastasi kyseisen geenin ilmentymistä dorsaalisisessa raphe-tumakkeessa muissa samanikäisissä sikiöissä. *Ntn1*- ja 5HTR_{2C}-kaksoisvärjäysten tavoitteena oli selvittää dorsaalisen raphe-tumakkeen *Ntn1*-geeniä ilmentävien GABAergisten hermosolujen toiminta serotoniinin pitoisuuden säätelyssä, mutta kehitysvaiheessa E18.5 tämä ei onnistunut.

3.4 GABAergiset prekursorit ventraalisessa rombomeeri 1:ssä

3.4.1 Ventraalisen rombomeeri 1:n merkkigeenit

Halusin myös tutkia jo aiemmin kartoitettua kehitysvaiheen E12.5 sikiön ventraalisen rombomeeri 1:n GABAergisten prekursoreiden aluetta sekä siellä ilmentyviä *Pax7*-, *Ntn1*-, *Pitx2*- ja *Foxo1*-merkkigeenejä (Liite 5, Yhteenveto tutkituista GABAergisten solujen markkereista kehityksen vaiheessa E12.5). Lisäksi hyödynsin Cre-rekombinaasivälitteistä geneettistä solulinjakartoitusta ja RFP-vasta-ainetta varmistaakseni kyseisiä geenejä ilmentävien solujen jo aiemmissa tutkimuksissa selvitetyn alkuperän. Pax7/RFP –kaksoisvärjäys toimi tässä tutkimuksessa positiivisena kontrollina Cre-rekombinaasin toiminnasta, ja tämän värjäyksen tulokset esittelin jo tulosten ensimmäisessä luvussa (luku 3.1.2). *Pax7*- ja *Foxo1*-geenien tutkimiseen käytin vasta-ainetta, koska ne oli osoitettu toimiviksi tutkimusryhmän laboratoriossa. *Ntn1*- ja *Pitx2*-geeneille käytin koettimia, koska Netriini-1-proteiini erittyy ulos solusta, jolloin on helpompi tutkia geenin lähetti-RNA:ta. *Pitx2*:n vasta-aine puolestaan oli testattu laboratoriossa ja todettu *Pitx2*-koetin vasta-ainetta toimivammaksi.

Tutkin ventraalisen rombomeeri 1:n GABAergisten prekursoreiden aluetta, mutta en käyttänyt tutkimuksessani *Gad1*(F)-koetinta GABAergisten solujen merkkigeeninä. Sen sijaan tutkin aluetta anatomian perusteella ja kartoitin yleisesti tällä alueella ilmentyviä geenejä. Kuvassa 16 on kertauksen vuoksi esitettyinä rombomeeri 1, dorsaalinen ja ventraalinen jako, rostraalinen ja kaudaalinen akseli sekä rombomeerin ventrikulaarinen alue ja kuorialue sekä katto-, alaari-, basaali- ja pohjalevy.

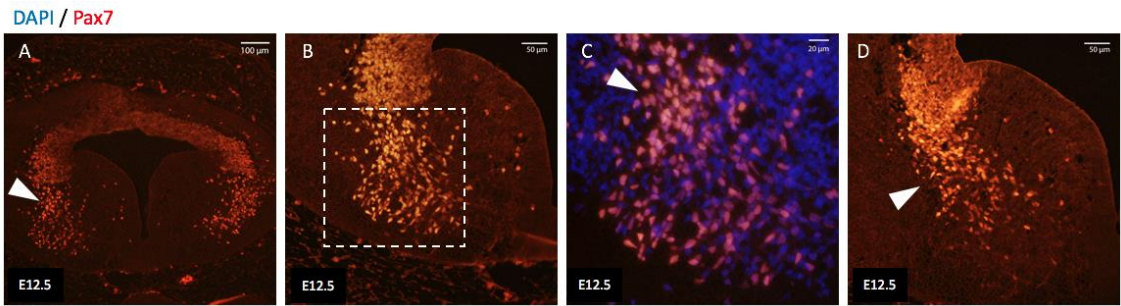


Kuva 16. Rombomeeri 1 kaavakuvana. Ventrikkeliä reunustaa ventrikulaarinen alue (VZ), jonka alapuolella kuorialue (MZ) sijaitsee. Kattolevy (KL) ja alaarilevy (AL) sijaitsevat dorsaaliosassa rombomeeri 1:ssä ja basaali- (BL) ja pohjalevy (PL) ventraalisessa rombomeeri 1:ssä. Kaudaaliosassa rombomeeri 1:stä reunustavat rombomeeri 2 ja rostraalisesti istmus ja keskiaivot.

3.4.2 Pax7

Immunohistokemiallisen Pax7-vasta-ainevärjäyksen tuloksena havaittiin Pax7-geenin ilmentymisen kehitysvaiheen E12.5 sikiön rombomeeri 1:n reunoilla rombomeerin kuorialueella (Kuva 17). Geenin ilmentyminen painottui erityisesti alaarilevyyn, ja alaarilevyssä Pax7 vaikutti ilmentyvän myös ventrikulaarisella alueella (Kuva 17A). Pohjalevyssä Pax7 ei ilmentynyt lainkaan (Kuva 17A).

Rostraalisessa rombomeeri 1:ssä (Kuvat 17A, 17B, 17C) Pax7:n ilmentyminen ulottui basaalilevyssä hiukan alemmas kuin kaudaaliosassa (Kuva 17D). Havaittiin Pax7-geenin ilmentymisen myös keskiaivojen puolella, jossa se rajoittui katto- ja alaarilevyyn, mutta ei basaalilevyn puolelle (ei kuvaa). Kaikissa värjäyksissä Pax7:n vasta-aine antoi vahvan ja yksiselitteisen signaalin, ja oli havaittavissa solujen tumissa DAPI-värjäyksen perusteella (Kuva 17C).

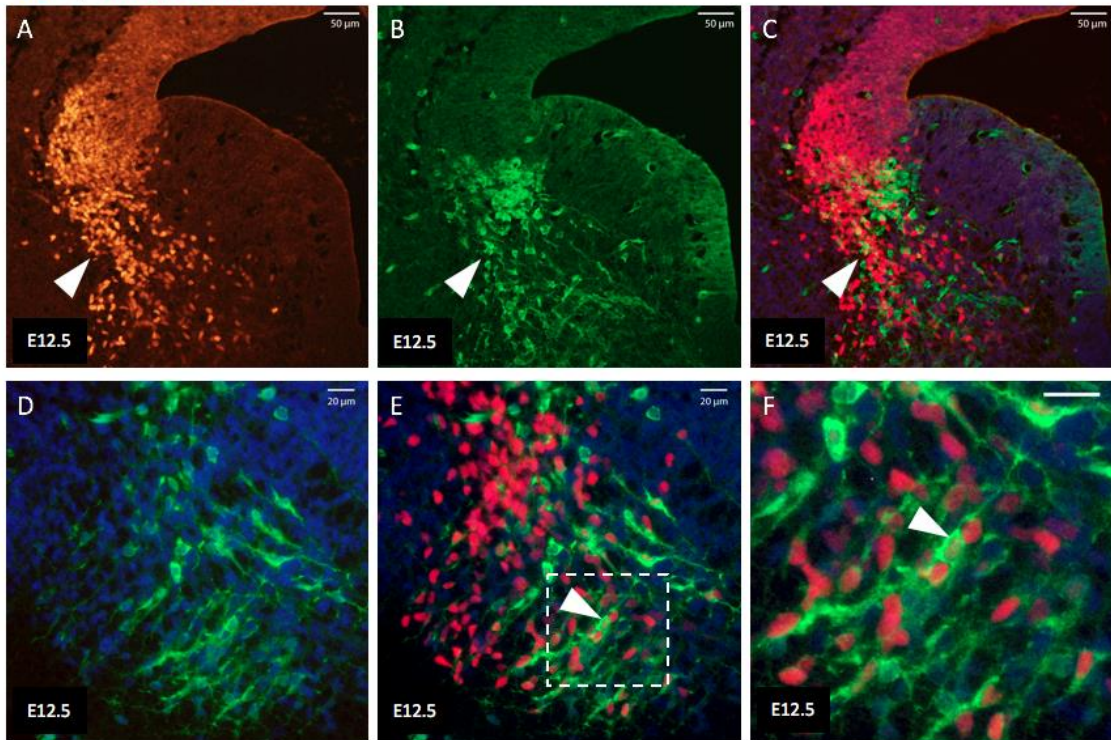


Kuva 17. *Pax7*-geenin ilmentyminen vasta-aineen perusteella kehitysvaiheen E12.5 sikiön rostraalisessa (A, B, C, nuolenkärkien osoittamat alueet) ja kaudaalisessa (D, nuolenkärjen osoittama alue) osassa rombomeeri 1:tä. Kuvassa B on valkoisella rajattuna kuvan C suurennoksen alue. Kuvien mittakaavajanojen pituudet ovat 100 μm (A), 50 μm (B, D) ja 20 μm (C). Kuvat A ja B ovat retusoituja (Liite 4).

3.4.3 *Foxo1*

Havaitsin, että *Foxo1*-geeni ilmentyi yhdessä *Pax7*-geenin kanssa ventraalisen rombomeeri 1:n basaalilevyssä (Kuvat 18C, 18E, 18F). *Foxo1* ilmentyi ventraalisen rombomeeri 1:n alueella basaalilevyssä (Kuva 18B), eikä ulottunut alaari- ja kattolevyyn kuten *Pax7*-geeni (Kuva 18A). *Foxo1*-vasta-aine värjäsi myös hermosolujen aksonit, eikä pääasiassa esiintynyt solujen tumissa (Kuva 18D).

DAPI / Pax7 / Foxo1

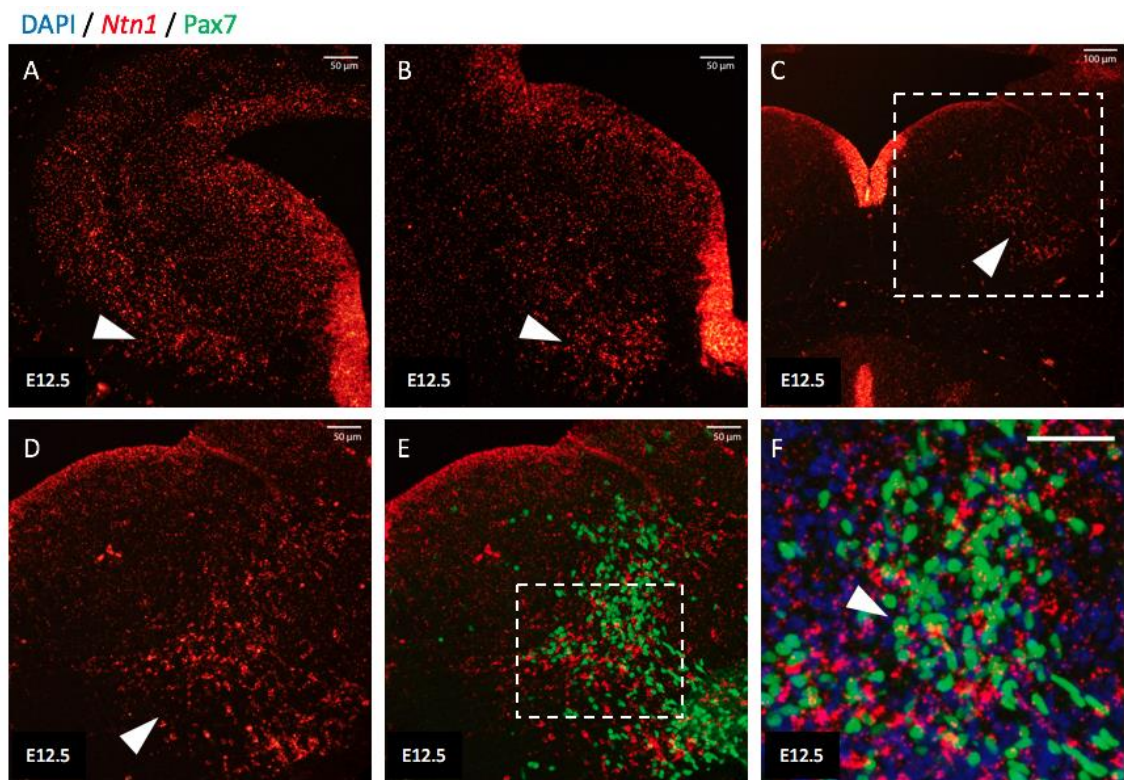


Kuva 18. *Pax7*- (A, nuolenkärjen osoittama alue) ja *Foxo1* (B, D, nuolenkärjen osoittama alue) -geenien ilmentyminen sekä yhdistelmäkuva (C, E, F, nuolenkärkien osoittamat alueet) vasta-aineiden perusteella kehitysvaiheen E12.5 sikiön rombomeeri 1:ssä. Kuva F on digitaalinen suurennos kuvan E valkoisella rajatusta alueesta. Kuvat D, E ja F ovat eri leikkeestä kuin A, B ja C, mutta samasta sikiöstä ja samalta objektilasilta. Kuvien mittakaavajanojen pituudet ovat 50 μm (A, B, C) ja 20 μm (D, E, F). Kuvat A, B ja C ovat retusoituja (Liite 4).

Olin kiinnostunut myös *Foxo1*-geeniä ilmentävien solujen alkuperästä ventraalisessa rombomeeri 1:ssä. *Foxo1*:n primaarinen vasta-aine oli tuotettu kanissa, joten RFP:n vasta-aineena en voinut käyttää kanissa tuotettua vasta-ainetta. Hiiressä tuotettu RFP:n vasta-aine toimi tutkimusryhmässä hyvin, mutta sen valmistus lopetettiin ennen tutkimukseni alkua. Sen vuoksi tilasin kanassa tuotetun RFP-vasta-aineen (Rockland), joka ei toiminut millään pitoisuuksilla immunohistokemiallisissa värjäyksissä. Lisäksi tilasin toisen valmistajan hiiressä tuotetun RFP-vasta-aineen (BioVision), joka ei myöskään toiminut. Sen vuoksi en voinut varmistaa *Foxo1*-geeniä ilmentävien solujen alkuperää geneettisellä solulinjakartoituksella tässä tutkimuksessa. Kuitenkin värjäykset yhdessä *Pax7*-vasta-aineen kanssa vahvistivat, että *Foxo1*-positiivisilla soluilla on dorsaalinen alkuperä, koska rombomeeri 1:n *Pax7*-geeniä ilmentävät solut olivat myös RFP-positiivisia aiemmissä värjäyksissä (ks. Kuva 7).

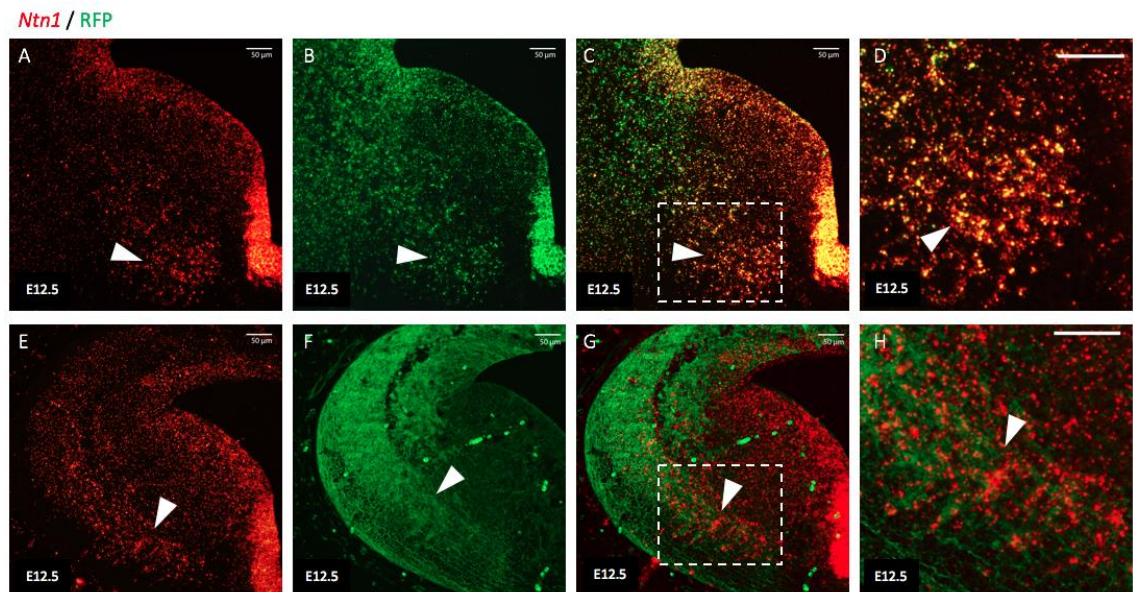
3.4.4 *Ntn1*

Ventraalisessa rombomeeri 1:ssä kehityksen vaiheessa E12.5 esiintyi runsaasti *Ntn1*-geeniä ilmentäviä soluja (Kuva 19), joiden tiedetään olevan GABAergisiä prekursoriteita (Morello ym. julkaisematon). Rostraalisessa rombomeeri 1:ssä (Kuva 19A) *Ntn1*-geenin lähetti-RNA:ta oli havaittavissa laajemmalla alueella kuin kaudaalisesti (Kuvat 19B, 19C, 19D), jossa sen esiintyminen painottui pohjalevyyn ja sen läheisyyteen. Rostraalisemmassa rombomeerissa *Ntn1*-positiiviset solut ulottuivat lähes alaarilevyyn asti. Myös ventrikulaarisella alueella *Ntn1* ilmentyi voimakkaasti. *Pax7* ilmentyi samalla alueella *Ntn1*:n kanssa ventraalisesti kuorialueella ja vaikutti ilmentyvän myös samoissa soluissa. Koska en tehnyt kaksoisvärjäyksiä samoille leikkeille yhdessä *Ntn1*-koettimen ja *Pax7*-vasta-aineen kanssa, käytin tulosten tulkintaan rinnakkaisia leikkeitä, jotka yhdistin yhdeksi kuvaksi (Kuvat 19E, 19F).



Kuva 19. *Ntn1*-geenin ilmentyminen kehitysvaiheen E12.5 sikiön rombomeeri 1:ssä *Ntn1*(DIG)-koettimen perusteella (A, B, C, D, nuolenkärkien osoittamat alueet) ja *Pax7*-geenin ilmentyminen vasta-aineen perusteella yhdistelmäkuvana *Ntn1*-geenin kanssa rinnakkaisleikkeillä (E, F, valkoisella rajattu sekä nuolenkärjen osoittama alue). Kuva D on suurennos kuvan C valkoisella rajatusta alueesta, ja kuva F on digitaalinen suurennos kuvan E valkoisella rajatusta alueesta. Mittakaavajanojen pituudet ovat 50 μm (A, B, D, E, F) ja 100 μm (C).

Selvitin *Ntn1*-geeniä ilmentävien solujen alkuperää geneettisellä solulinjakartoituksella *Ntn1*(DIG)/RFP –kaksoisvärjäyksellä. Kuten aiemmin mainitsin, kaksoisvärjäykset RFP-vasta-aineen kanssa toimivat ainoastaan yhdessä kehitysvaiheen E12.5 sikiössä kahdeksasta kaikki kehitysvaiheet mukaan lukien. Tälle kehitysvaiheen E12.5 sikiölle tein kaksoisvärjäyksen RFP:n kanssa sekä *Ntn1*(DIG)- että *Pitx2*(DIG)-koettimilla. *Ntn1*(DIG)/RFP –kaksoisvärjäyksen perusteella *Ntn1*-geeniä ilmentävät solut (Kuva 20A) saattoivat olla RFP-positiivisia (Kuva 20C). Rungas tausta kuitenkin vaikeutti tulosten tulkintaa, sillä koettimen leima näkyi myös mikroskoopin toisessa kanavassa pistemäisenä epäspesifisenä signaalina (Kuva 20B). Yhdistin myös kehitysvaiheen E12.5 sikiöiden rinnakkaisleikkeille tehdyt *Ntn1*(DIG)- ja RFP-värjäysten tulokset yhdeksi kuvaksi, jonka perusteella *Ntn1*-positiiviset solut sijaitsivat RFP-positiivisten solujen keskellä (Kuvat 20G, 20H).



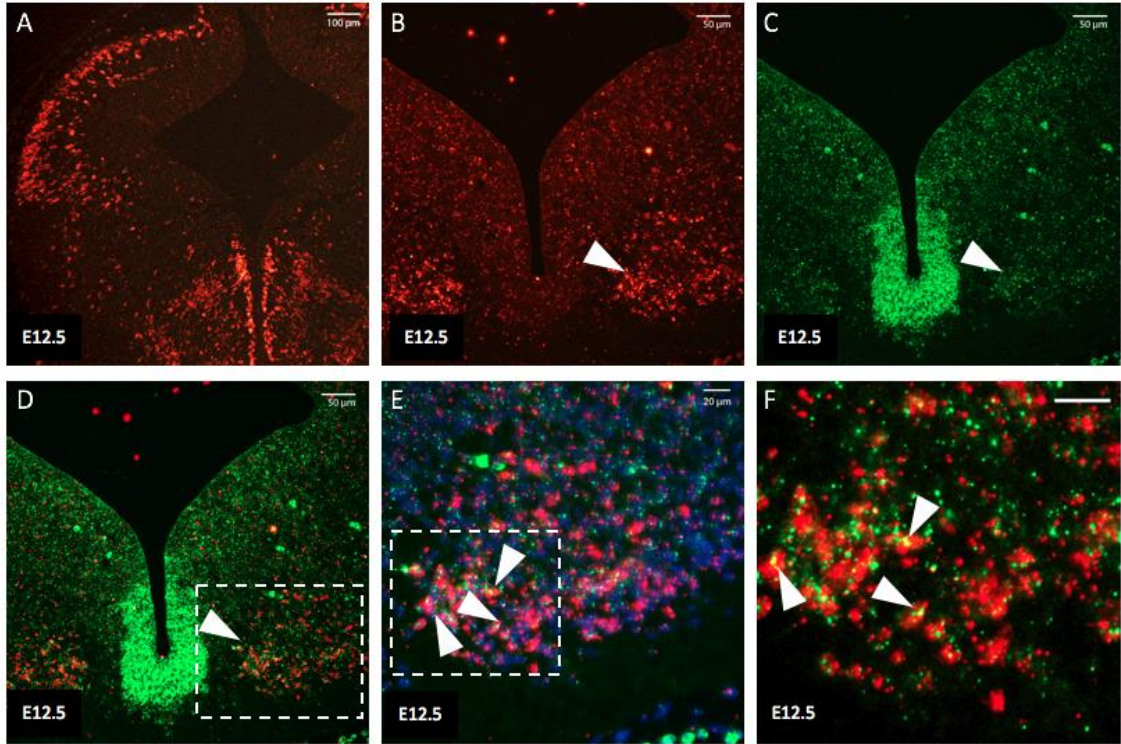
Kuva 20. *Ntn1*-geeniä ilmentävät solut koettimen perusteella (A, E, nuolenkärkien osoittamat alueet) ja RFP-positiiviset solut vasta-aineen perusteella (B, F) sekä yhdistelmäkuvat (C, D, G, H) ventraalisessa rombomeeri 1:ssä kehitysvaiheen E12.5 sikiössä. Kuvat G ja H on yhdistetty rinnakkaisilta leikkeiltä. Kuva D on digitaalinen suurennos kuvan C valkoisella rajatusta alueesta, ja kuva H on digitaalinen suurennos kuvan G valkoisella rajatusta alueesta. Kaikkien kuvien mittakaavajanojen pituudet ovat 50 μ m.

3.4.5 *Pitx2*

Pitx2:n lähetti-RNA paikallistui ventraalisen rombomeeri 1:een (Kuva 21B) samoin kuin *Ntn1* (Kuva 21C) kehitysvaiheen E12.5 sikiössä. *Pitx2*:n ilmentyminen rajoittui pienemmälle alueelle kuin *Ntn1*:n, mutta myös *Pitx2*-positiiviset solut esiintyivät ainoastaan pohja- ja basaalilevyssä rombomeerin kuorialueella *Ntn1*-positiivisten solujen tavoin. Sen sijaan keskiaivoissa *Pitx2* ilmeni hyvin laajasti (Kuva 21A).

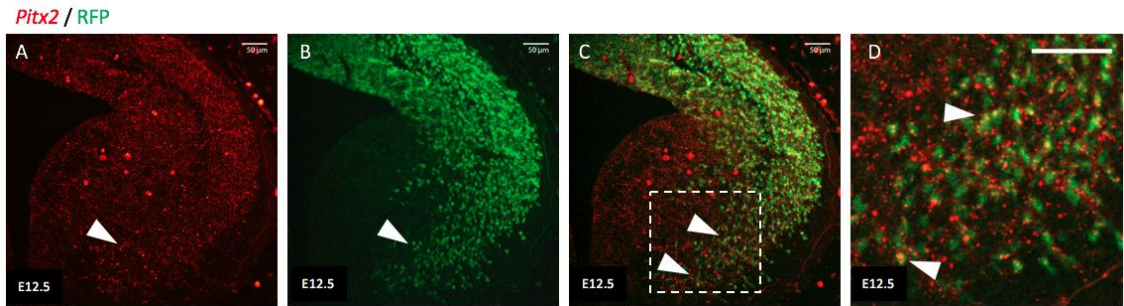
Kaksoisvärjäys *Pitx2*(F)- ja *Ntn1*(DIG) –koettimilla ei antanut lainkaan tulosta, joten tein uuden kaksoisvärjäyksen käyttäen *Pitx2*(DIG)- ja *Ntn1*(F)-koettimia. Tästä värjäyksestä sain selkeämmän tuloksen (Kuvat 21D, 21E, 21F). Taustan vuoksi en pystynyt laskemaan tarkasti, kuinka suuri osa tutkimusalueen *Ntn1*-geeniä ilmentävistä soluista ilmensi myös *Pitx2*-geeniä. Värjäyksen perusteella vaikuttaa kuitenkin siltä, että *Ntn1* ja *Pitx2* ilmentyivät osittain samoissa soluissa kehityksen vaiheessa E12.5 ventraalisessa rombomeeri 1:ssä (Kuvat 21D, 21E, 21F). En tutkinut *Pitx2*-geenin ilmentymistä kehityksen myöhemmissä vaiheissa, koska Waite ym. (2012) selvittivät jo aiemmin tutkimuksessaan *Pitx2*-positiivisten solujen vaeltamista sikiönkehityksen aikana.

DAPI / *Pitx2* / *Ntn1*



Kuva 21. *Pitx2*-geenin ilmentyminen koettimen perusteella kehitysvaiheen E12.5 sikiön keskiaivoissa (A) ja rombomeeri 1:ssä (B, nuolenkärjellä osoitettu alue) sekä *Ntn1*-geenin ilmentyminen samalla leikkeellä koettimen perusteella (C, nuolenkärjellä osoitettu alue). Yhdistelmäkuvat kuvista B ja C, joissa nuolenkärjillä on merkittynä ne solut, joissa sekä *Pitx2* että *Ntn1* ilmenevät (D, E, F). Kuva E on suurennos kuvan D valkoisella rajatusta alueesta, ja kuva F on digitaalinen suurennos kuvan E valkoisella rajatusta alueesta. Kuvien mittakaavajanojen pituudet ovat 100 μm (A), 50 μm (B, C, D) ja 20 μm (E, F).

Ventraalisessa rombomeeri 1:ssä havaitsin yhden onnistuneen kaksoisvärjäyksen (Kuva 22) sekä yhden rinnakkaisleikkeelle tehdyn värjäyksen (ei kuvaa) perusteella pienen osan *Pitx2*-geeniä ilmentävistä soluista olevan RFP-positiivisia (Kuva 22D). Onnistuneesta kaksoisvärjäyksestä DAPI jäi puuttumaan, joten en voinut suhteuttaa RFP:n leimaa solujen tumaan nähden, mutta RFP:n leima (Kuvat 22B, 22C) oli samanlainen kuin muissakin immunohistokemiallisissa RFP-värjäyksissä kehityksen vaiheessa E12.5 (ks. Kuva 20F).



Kuva 22. *Pitx2*-geenin ilmentyminen (A, nuolenkärjen osoittama alue) ja RFP:n esiintyminen vasta-aineen perusteella (B, nuolenkärjen osoittama alue) ventraalisessa rombomeeri 1:ssä kehitysvaiheen E12.5 sikiössä, sekä yhdistelmäkuvat (C, D, nuolenkärkien osoittamat alueet). Kuva D on digitaalinen suurennos kuvan C valkoisella rajatusta alueesta. Kaikkien kuvien mittakaavajanojen pituudet ovat 50 µm.

4 TULOSTEN TARKASTELU

4.1 Tulosten merkitys

Dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergiset hermosolut ovat merkittävässä osassa mielialaa ja käyttäytymistä säätelevän serotonergisen järjestelmän vuorovaikutusverkostoa. GABAergisten hermosolujen erilaistumista sikiönkehityksen aikana säätelevät niille ominaisten geenien tuottamat transkriptiotekijät, jotka vaikuttavat eri kehityksen vaiheissa solujen kypsymiseen, solusyklistä poistumiseen ja solujen vaeltamiseen. GABAergiset prekursorit eli solusyklistä poistuneet GABAergisten hermosolujen esiasteet, jotka myöhemmin vaeltavat dorsaaliseen raphe-tumakkeeseen, sijaitsevat ventraalisessa rombomeeri 1:ssä kehityksen vaiheessa E12.5. GABAergiset prekursorit sijaitsevat tällä alueella omina heterogeenisinä alapopulaatioina, joissa jokaisessa ilmennetään niille yksilöllisiä geenejä. Geneettiset tutkimukset solujen monimuotoisuuden kehittymisestä sikiönkehityksen aikana antavat merkittävää tietoa aivojen normaalista toiminnasta sekä syistä mahdollisten sairauksien taustalla.

GABAergisten prekursorien transkriptomia tutkimalla RNA-yksisolusekvensoinnilla Morello ym. (julkaisematon) kartoittivat ventraalisen rombomeeri 1:n solupopulaatioita, ja havaitsivat vielä jakautuvien mitoottisten solujen lisäksi seitsemän erillistä GABAergistä populaatiota, jotka olivat poistuneet solusyklistä ja joissa ilmennettiin GABAergisille hermosoluille ominaisia *Gad1*- ja *Gad2*-geenejä. Geenien ilmentymisen

perusteella voidaan luotettavasti erottaa eri GABAergisten prekursorien alapopulaatioita toisistaan ja siten tutkia myös eri alapopulaatioiden kehityksellistä alkuperää.

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli tutkia tarkemmin dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisiä hermosoluja kehitysvaiheen E18.5 sikiössä sekä niiden alkuperää rombomeeri 1:ssä kehitysvaiheen E12.5 sikiössä pohjautuen Morello ym. (julkaisematon) tutkimukseen sekä muihin GABAergisten hermosolujen monimuotoisuutta kartoittaviin tutkimuksiin (mm. Waite ym. 2012; Lahti ym. 2016). Kiinnostuksen kohteena olivat erityisesti *Ntn1*-geeniä ilmentävät solut, joiden Morello ym. (julkaisematon) tutkimuksessaan havaitsivat muodostavan yhden GABAergisten prekursorien populaatioista ventraalisessa rombomeeri 1:ssä. Nämä GABAergiset prekursorit olivat *Otp*- ja *Pax7*-positiivisia, mutta *Tall*-negatiivisia. *Tall* toimii ventraalisen rombomeeri 1:n alueella postmitoottisena selektorigeeninä osalle GABAergisistä hermosoluista (Lahti ym. 2016), mutta tällä alueella sijaitsee myös *Tall*:stä riippumattomia GABAergisiä prekursoreita (Lahti ym. 2013; Lahti ym. 2016). Näissä GABAergisissä prekursoreissa ilmenee myös *Pitx2*-geeni (Waite ym. 2012), jonka Morello ym. (julkaisematon) havaitsivat ilmentyvän myös *Ntn1*-geeniä ilmentävissä soluissa ventraalisessa rombomeeri 1:ssä.

4.2 Ventraalisen rombomeeri 1:n solujen monimuotoisuus ja alkuperä

Tulokseni geenien ilmentymisestä sikiön ventraalisessa rombomeeri 1:ssä kehityksen vaiheessa E12.5 tukevat hyvin aiempia tutkimustuloksia. *Pitx2*-geeni ilmentyi kaikista ventraalisimmassa rombomeeri 1:ssä, ja osassa *Pitx2*-geeniä ilmentävistä soluista ilmenettiin myös *Ntn1*-geeniä. Osa *Pitx2*-geeniä ilmentävistä soluista oli lisäksi RFP-positiivisia. Waite ym. (2012) tutkimuksessa *Pitx2*-geeniä ilmentävien GABAergisten prekursorien alkuperän selvittämiseen hyödynnettiin ehdollisesti *Dbx1*-geeniin kytkettyä Cre-rekombinaasia ilmentävien hiirien ja reportteriproteiini YFP:tä (engl. *yellow fluorescent protein*) ilmentävien hiirien risteytyksistä saatuja sikiöitä. Tutkimuksessaan Waite ym. (2012) havaitsivat, että *Pitx2*-geeniä ilmentävät solut ventraalisessa rombomeeri 1:ssä olivat todennäköisesti peräisin kahdesta erillisestä solupopulaatiosta, sillä osa *Pitx2*-positiivisista soluista oli YFP-positiivisia eli *Dbx1*-

geeniä ilmentävää solulinjaa, kun taas osa oli YFP-negatiivisia. Koska oman tutkimukseni perusteella osa *Pitx2*-positiivisista soluista oli RFP-positiivisia, on mahdollista, että nämä RFP-positiiviset solut olivat Waite ym. (2012) tutkimuksessa havaitsemia YFP-negatiivisia soluja. RFP-positiiviset solut ovat *Pax7*-geeniä ilmentävää solulinjaa, jotka ovat peräisin rombomeeri 1:n dorsaaliosasta. Mahdollisesti *Pitx2*-geeniä ilmentävät solut ventraalisessa rombomeeri 1:ssä muodostuvat siis *Pax7*-geeniä ilmentäneistä ja *Dbx1*-geeniä ilmentäneistä soluista. Poistuttuaan solusyklistä niissä aletaan ilmentää GABAergisille hermosoluille ominaisia *Gad1*- ja *Gad2*-geenejä.

Tulosteni perusteella ventraalisessa rombomeeri 1:ssä myös *Ntn1* ilmentyi samalla alueella, missä Morello ym. (julkaisematon) havaitsivat *Ntn1*:n ilmentymisen. Vaikka en tutkinut GABAergisten solujen *Gad1*- tai *Gad2*-merkkigeenejä kehitysvaiheen E12.5 sikiössä, solujen sijainnin perusteella voidaan päätellä, että nämä *Ntn1*-geeniä ilmentävät solut ovat GABAergisiä prekursoreita. Kuten Morello ym. (julkaisematon) totesivat tutkimuksessaan, myös oman tutkimukseni perusteella nämä *Ntn1*-geeniä ilmentävät solut olivat suurelta osin RFP-positiivisia. Näiden *Ntn1*-positiivisten solujen joukossa esiintyi myös *Pitx2*-positiivisia soluja, jotka Lahti ym. (2013) mukaan ovat *Tall1*- ja *Gata2*-negatiivisia GABAergisiä prekursoreita. Tämä tukee oletusta siitä, että *Ntn1*- ja *Pitx2*-geenejä ilmentävät prekursorit muodostavat yhdessä erillisen GABAergisen alapopulaation, jolla on dorsaalinen alkuperä.

Waite ym. (2012) tutkimuksessa *Pitx2*-positiiviset solut olivat *Pax7*-negatiivisia. Morello ym. (julkaisematon) mukaan puolestaan *Ntn1*-geeniä ilmentävät solut olivat *Pax7*-positiivisia, minkä havaitsin rinnakkaisleikkeiden perusteella myös omassa tutkimuksessani. *Pax7*-geenin ilmentyminen painottui dorsaalisen rombomeeri 1:n alaarilevyyn sekä basaalilevyyn; alaarilevyssä myös ventrikulaarisen alueen solut ilmensivät *Pax7*-geeniä, mutta basaalilevyssä geeni ilmentyi ainoastaan kuorialueella. Tulos on yhteneväinen Lahti ym. (2016) tutkimuksen kanssa, jossa he lisäksi havaitsivat, että *Pax7*-geeniä ilmentävissä soluissa ei esiintynyt lainkaan *Tal*- tai *Gata*-perheen transkriptiotekijöitä. Näin ollen *Pax7*-positiiviset solut ovat *Ntn1*- ja *Pitx2*-positiivisten solujen tavoin eri alapopulaatiota kuin ventraalisen rombomeeri 1:n *Tall1*-riippuvaiset GABAergiset prekursorit, mikä tukee myös Morello ym. (julkaisematon) RNA-yksisolusekvensoinnin tuloksia.

Pax7 on dorsaalisen hermostoputken ja dorsaalisen rombomeeri 1:n merkkigeeni (Ericson ym. 1996; Lorente-Canovas ym. 2012), joka ilmentyy sekä jakautuvissa hermosolujen progenitoreissa että solusyklistä poistuneissa GABAergisissä prekursoreissa (Lahti ym. 2013; Achim ym. 2014). Tätä kuvastaa omassa tutkimuksessani *Pax7*-positiivisten solujen esiintyminen dorsaalisesti sekä ventrikulaarisella alueella että kuorialueella, mutta ventraalisemmin ainoastaan kuorialueella. *Pax7*-transkriptiotekijällä on kyky sitoutua tiiviisti pakattuun kromatiiniin ja aktivoida geenien luentaa sitomalla muita transkriptiotekijöitä esimerkiksi aivolisäkkeen kehityksen aikana (Budry ym. 2012), mihin todennäköisesti perustuu myös *Pax7*:n ilmentyminen ventrikulaarisen alueen jakautuvissa progenitoreissa (Achim ym. 2014).

Hiiren sikiönkehityksen vaiheessa E12.5 hermosolut jakautuvat aktiivisesti (Waite ym. 2012), ja Achim ym. (2012) osoittivat tutkimuksessaan, että keskiaivojen GABAergisten progenitorien solusyklistä poistuminen on huipussaan kehityksen vaiheessa E10.5-E12.5. Tämän jälkeen hermosolut alkavat vaeltaa lopullisille paikoilleen ja muodostaa yhteyksiä muihin soluihin synapsien välityksellä. Omassa tutkimuksessani kehityksen vaiheessa E12.5 Foxo1-vasta-aine värjäsi myös aksonit, mikä osoittaa, että yhteydet muihin hermosoluihin alkavat muodostua jo pian prekursoreiden syntymisen jälkeen. Hermosolujen prekursoreiden muodostumisen eli neurogeneesin jälkeen gliosolujen muodostuminen eli gliogeneesi on vilkasta (Miller & Gauthier 2007). Gliosoluja on aikuisen aivokudoksessa 10-kertainen määrä hermosoluihin verrattuna (Sariola ym. 2015), joten kehityksen vaihe E12.5 soveltuu GABAergisten prekursoreiden tutkimukseen hyvin (Morello ym. julkaisematon). Tämän vuoksi myös omassa tutkimuksessani käytin aineistona kehitysvaiheen E12.5 sikiöitä. Kaikki kehitysvaiheen E13.5 sikiöt ja suurimman osan kehitysvaiheen E14.5 sikiöistä jätin pois tutkimus-aineistosta histologisten leikkeiden laadun perusteella.

Kudosleikkeiden laatu rajoitti myös kehitysvaiheen E12.5 sikiöiden käyttöä tutkimuksessani. Suurin ero eri sikiöiden välillä oli se, että oli haastavaa saada kaikki sikiöt aseteltua sulaan parafiiniin samassa orientaatioissa. Sikiön orientaatio parafiinissa vaikutti siihen, miten kudosleikkeet sai leikattua mikrotomilla: erilainen orientaatio muutti luonnollisesti myös kudosleikkeiden ulkonäköä, mikä vaikeutti anatomiaan perustuvaa tulkintaa. Vaikka parafiinikappaleen orientaatiota pystyy muuttamaan vielä mikrotomissa leikkaamisen aikana jossain määrin, vaatii se erittäin hyvää anatomian tuntemusta jokaisesta kehitysvaiheesta eri orientaatioissa. Jatkotutkimuksia ajatellen olisi hyödyllistä

käyttää sekä koronaalisia että sagittaalisia leikkeitä aivokudoksesta, jotta geenien ilmentymisestä rombomeeri 1:n alueella saisi mahdollisimman kattavan kuvan. Lisäksi useampien kehitysvaiheiden käyttö tutkimuksessa antaisi laajemman kuvan yksittäisten solujen ilmentämisestä geeneistä sekä solujen vaeltamisesta kehityksena aikana. Koska kehitysvaiheen E12.5 sikiöille tekemäni värjäykset perustuivat kuitenkin aiempiin tutkimuksiin, tuloksia voi pitää luotettavina. Tulokseni vahvistivat, että sikiön ventraalisessa rombomeeri 1:ssä GABAergisten prekursorien alueella kehityksen vaiheessa E12.5 esiintyy *Pax7*-, *Foxo1*-, *Ntn1*- ja *Pitx2*-geenejä ilmentävä solupopulaatio, jonka soluilla on dorsaalinen alkuperä. *Pitx2*-positiiviset solut vaikuttivat olevan vain osittain *Ntn1*- ja RFP-positiivisia, mikä tukee Waite ym. (2012) havaintoa kahdesta erillisestä *Pitx2*-positiivisesta populaatiosta ventraalisen rombomeeri 1:n alueella.

4.3 Dorsaalisen raphe-tumakkeen solujen monimuotoisuus ja alkuperä

Kudosleikkeiden laatu kehitysvaiheen E18.5 sikiöissä oli huomattavasti parempi kuin muissa kehitysvaiheissa, ja myös kudoksen orientaatio parafiinissa oli samanlainen kaikissa parafiinikappaleissa. Sen vuoksi näille sikiöille suoritettuja värjäyksiä pystyi vertailemaan paremmin keskenään kuin nuorempien kehitysvaiheiden osalta. Myös kehityksen vaiheessa E18.5 keräsin kudosleikkeet anatomian perusteella, mutta varmistin värjäysten yhteydessä dorsaalisen raphe-tumakkeen sijainnin joko serotoniinin vastaaineella tai *Sert*-geenin koettimella. Serotonergisten solujen esiintyminen dorsaalisisessa raphe-tumakkeessa oli tutkimuksissani yhteneväinen aiempiin tutkimuksiin (Weissbourd ym. 2014; Haugas ym. 2016). Näillä dorsaalisen raphe-tumakkeen serotonergisillä hermosoluilla on merkittävä rooli muun muassa mielialan ja käyttäytymisen säätelyssä. Dorsaalinen raphe-tumake on merkittävin serotoniinia tuottavien solujen keskittymä koko aivojen alueella, sillä serotonergisten solujen aksonit ulottuvat aina etuaivoihin asti (Weissbourd ym. 2014). Tutkimuksessani keskityin serotonergisten hermosolujen sijaan kuitenkin GABAergisiin hermosoluihin, joiden tosin tiedetään säätelevän suoraan serotonergisten solujen aktiivisuutta dorsaalisisessa raphe-tumakkeessa (Challis ym. 2013). Osa dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisistä hermosoluista säätelee serotonergisiä soluja myös välillisesti muiden GABAergisten tai esimerkiksi glutamatergisten hermosolujen välityksellä (Weissbourd ym. 2014).

Kuten Weissbourd ym. (2014) havaitsivat tutkimuksessaan, *Gad1*-geenin lähetti-RNA:n perusteella myös omassa tutkimuksessani GABAergiset solut esiintyivät dorsaalissa raphe-tumakkeessa laajoina populaatioina, jotka olivat pääosin erillään serotonergisistä soluista lukuun ottamatta joitakin yksittäisiä soluja, jotka vaikuttivat olevan sekä *Gad1*-että 5-HT-positiivisia. Nämä solut saattavat olla sekä serotoniinia että GABA:a välittäjäaineenaan käyttäviä hermosoluja, joita tiedetään esiintyvän dorsaalissa raphe-tumakkeessa (Fu ym. 2010). Koska samoille leikkeille tehdyt kaksoisvärjäykset eivät antaneet tulosta, en voinut kuitenkaan tutkia näitä soluja tarkemmin. Tulevaisuudessa jää selvitettäväksi, miten nämä sekä serotoniinia että GABA:a tuottavat hermosolut osallistuvat hermoverkoston säätelyyn dorsaalissa raphe-tumakkeessa, ja mikä on niiden kehityksellinen alkuperä.

GABAergisten hermosolujen kartoittamiseen dorsaalissa raphe-tumakkeessa Weissbourd ym. (2014) käyttivät *Gad2^{Cre}*-hiiriä ja rabiesvirusvälitteistä fluoresenssia GABAergisissä kohdesoluissa. Risteyttämällä *Gad2^{Cre}*-hiiret *Rosa26^{TdTomato}*-reportterihiirien kanssa tässä tutkimuksessa olisi ollut mahdollista tutkia GABAergisiä hermosoluja RFP-vasta-aineen avulla näiden kahden muuntogeenisen hiirilinjan sikiöissä, jolloin RFP värjää kaikki *Gad2*-geeniä ilmentävät tai ilmentäneet solut niiden alkuperästä riippumatta. Tämä hiirilinja päätettiin jättää pois tutkimuksesta ajankäytöllisistä haasteista johtuen. *Gad1*-geenin RNA-koetin toimi kuitenkin hyvin, ja sen avulla sain luotettavasti selvitettyä GABAergisten solujen sijainnin hiiren sikiön dorsaalissa raphe-tumakkeessa.

Ventraalisen rombomeeri 1:n alueella ilmentyneet GABAergisten prekursorien merkkigeenit *Ntn1* ja *Pax7* ilmentyivät myös dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisissä hermosoluissa. Etenkin *Ntn1*-geenin osalta tulokset ovat mielenkiintoisia, sillä missään aiemmassa tutkimuksessa *Ntn1*-geenin ilmentymistä dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisissä hermosoluissa ei ole kartoitettu yhtä laajasti kuin tässä tutkimuksessa. *Ntn1*-geeni koodaa Netriini-1-proteiinia, joka osallistuu muun muassa aksonien ohjaukseen (Sariola ym. 2015). Aiemmissa tutkimuksissa on havaittu, että erityisesti keskiviivan solut tuottavat runsaasti Netriini-1:ä, jossa se ohjaa aivopuoliskojen välillä informaatiota välittävien kommissuraaliaksonien kehitystä (Dominici ym. 2017).

Myös omissa tuloksissani *Ntn1*-geenin lähetti-RNA:ta esiintyi runsaasti sekä keskiviivalla että ventrikkelin reunoilla dorsaaliossa raphe-tumakkeessa kehityksen vaiheessa E18.5, ja ventrikkelin alaosassa keskiviivan kohdalla sekä rombomeerin ventrikulaarisella alueella kehityksen vaiheessa E12.5, kuten myös Dominici ym. (2017) esittelivät tuloksissaan. Tulosteni perusteella *Ntn1* ilmentyi kehitysvaiheen E12.5 sikiössä ventrikulaarisella alueella sekä dorsaaliossa että ventraalisesti, mutta kuorialueella ainoastaan ventraalisesti, joten dorsaaliossissa GABAergisissä prekursorissa geeniä aletaan ilmentää vasta solusyklistä poistumisen ja identiteetin määrääntymisen jälkeen. Sen sijaan keskiviivan soluissa *Ntn1* ilmentyy voimakkaasti läpi kehitysvaiheiden E12.5-E18.5. Geneettinen solulinjakartoitus kuitenkin paljasti, että keskiviivan solut eivät ole samaa kehityksellistä alkuperää kuin dorsaaliossa raphe-tumakkeen GABAergiset hermosolut.

Toisin kuin keskiviivan *Ntn1*-geeniä ilmentäviä soluja, dorsaaliossa raphe-tumakkeen GABAergisissä hermosoluissa ilmentyvää *Ntn1*-geeniä ei ole tutkittu tarkemmin. Vaikka tämän tutkimuksen tavoitteena ei ollut selvittää *Ntn1*-geenin roolia GABAergisissä hermosoluissa, voi silti olla mielenkiintoista selvittää tulevaisuudessa, miten esimerkiksi geenin inaktivaatio vaikuttaa GABAergisten hermosolujen kehittymiseen. Sen sijaan tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää dorsaaliossa raphe-tumakkeen GABAergisten hermosolujen alkuperää sekä sitä, ovatko *Ntn1*-geeniä ilmentävät GABAergiset hermosolut dorsaaliossa raphe-tumakkeessa peräisin ventraaliossa rombomeeri 1:n dorsaaliossista GABAergisten prekursorien populaatiosta.

Dorsaaliossa raphe-tumakkeen GABAergisten hermosolujen alkuperän selvittämisessä käytin Cre-rekombinaasivälitteistä geneettistä solulinjakartoitusta, joka perustuu Cre-rekombinaasin kykyyn aiheuttaa inversio tai deleetio genomiin *loxP*-sekvenssien väliin. Tutkimuksen aineistona käytetyissä kahden muuntogeenisen hiirilinjan, *Pax7^{Cre}*:n ja *ROSA26^{TdTomato}*:n sikiöissä, Cre aiheuttaa deleetion *TdTomato*-geeniä edeltävälle promoottorialueelle, jossa sijaitsee lopetuskodoni. Cre-välitteisen rekombinaation seurauksena *TdTomato* tuottaa fluoresoivaa RFP-proteiinia, joka värjää kaikki *Pax7*-geeniä ilmentävät solut. Vaikka tytär soluissa *Pax7* ei enää ilmentyisikään, rekombinaation aiheuttama deleetio periytyy niille ja RFP:tä tuotetaan edelleen.

Kuten esittelin tuloksissa, *Pax7*-geeni ilmentyi ventraaliossa rombomeeri 1:n ventrikulaarisella alueella, jossa esiintyy jakautuvia progenitoreja, sekä kuorialueella,

jossa tiedetään esiintyvän GABAergisiä postmitoottisia prekursoreita. Lisäksi dorsaaliossa raphe-tumakkeessa osa GABAergisistä hermosoluista oli rinnakkaisleikkeiden perusteella RFP-positiivisia, mikä tarkoittaa, että nämä solut ovat *Pax7*-geeniä ilmentänyttä solulinjaa. Koska *Pax7*:aa ilmentetään ainoastaan dorsaaliossa hermostoputkessa, näillä dorsaaliossa raphe-tumakkeen GABAergisillä RFP-positiivisilla soluilla on dorsaalinen alkuperä.

GABAergisten prekursorien alueella kehitysvaiheen E12.5 sikiön ventraalisessa rombomeeri 1:ssä sijaitsi myös *Ntn1*-positiivisia soluja, joiden osoitettiin Morello ym. (julkaisematon) tutkimuksessa olevan solusyklistä poistuneita GABAergisiä prekursoreita. Omassa tutkimuksessani lisäksi kehitysvaiheen E18.5 sikiön dorsaaliossa raphe-tumakkeessa esiintyi *Ntn1*-geeniä ilmentäviä GABAergisiä hermosoluja. Näistä *Ntn1*-geeniä ilmentävistä GABAergisistä soluista osa oli rinnakkaisleikkeiden perusteella RFP-positiivisia. Koska ventraaliossa rombomeeri 1:n postmitoottiset GABAergiset prekursorit eivät enää jakaudu, dorsaaliossa raphe-tumakkeen *Ntn1*-geeniä ilmentävät RFP-positiiviset GABAergiset hermosolut ja ventraaliossa rombomeeri 1:n *Ntn1*-geeniä ilmentävät RFP-positiiviset prekursorit ovat samaa solulinjaa.

4.4 Tutkimuksen vahvuudet, haasteet ja jatkotutkimusmahdollisuudet

Tutkimuksessa geneettinen Cre-rekombinaasivälitteinen solulinjakartoitus vahvisti hypoteesin, että dorsaaliossa raphe-tumakkeessa esiintyy dorsaaliossa hermostoputkessa syntyneitä, *Pax7*-geeniä ilmentäneitä soluja. Lisäksi osa näistä soluista ilmensi *Pax7*-geeniä edelleen. Tutkimuksessa Cre-rekombinaasin avulla pystyi luotettavasti kartoittamaan *Pax7*-geeniä ilmentänyttä solulinjaa, ja sekä positiivinen että negatiivinen tutkimuskontrolli antoivat tutkimuksessa odotetun tuloksen. Lisäksi jokaisen sikiön Cre-genotyyppitys varmisti, että jokaisen toistetun värjäyksen tulokset ovat luotettavia ja vertailukelpoisia keskenään. Kaikki käytetyt koettimet toimivat *in situ*-hybridisaatiossa, ja havaitsin, että myös itse valmistamani *Pitx2*(DIG)-koetin antoi spesifisen signaalin. Keskiaivoissa havaitsemani koettimen signaali vastasi täysin aiempia tutkimustuloksia *Pitx2*-geenin ilmentymisestä keskiaivoissa (Martin ym. 2004), vaikka koettimen templaattina käyttämäni linearisoitu plasmidi vaikuttikin agarosigeelielektroforeesin perusteella pilkkoutuneen useampaan osaan (luku 2.5.1).

Sen sijaan tutkimuksessa käytetyt koettimen ja vasta-aineen kaksoisvärjäykset eivät toimineet odotetusti, mikä hankaloitti tulosten tulkintaa GABAergisten hermosolujen solulinjakartoituksessa. Vasta-aineiden toimimattomuus kaksoisvärjäyksissä saattoi johtua *in situ*–hybridisaation protokollassa käytetyistä käsittelyistä, jotka todennäköisesti häiritsivät vasta-aineiden kiinnittymistä kudokseen. Esimerkiksi ksyleenikäsittelyt olivat *in situ*–hybridisaatioissa pidemmät kuin immunohistokemiallisessa värjäyksessä. Jatko-tutkimuksia ajatellen *Gad2^{Cre}*-hiirien käyttö tutkimuksessa yhdessä *TdTomato*-reportteri-hiirien kanssa voisi olla perusteltua, jolloin immunohistokemiallisissa värjäyksissä RFP:n vasta-aineella saataisiin näkyviin kaikki GABAergiset solut niiden alkuperästä riippumatta. Immunohistokemiallisen RFP-värjäyksen voisi toistaa useissa eri kehitys-vaiheissa yhdessä *Pax7*:n vasta-aineen kanssa, jolloin GABAergisten solujen joukosta olisi mahdollista erotella ne solut, joilla on dorsaalinen alkuperä. Tämä mahdollistaisi immunohistokemiallisten kaksoisvärjäysten käytön, jotka oman tutkimukseni perusteella toimivat erinomaisesti. Tutkimuksiin voisi sisällyttää myös aikuisia yksilöitä, jolloin tuloksia pystyy vertailemaan sikiön ja aikuisen hiiren välillä.

Neurogenetiikan tutkimuksissa Cre-rekombinaasia hyödyntäen voidaan kartoittaa monipuolisesti hermosolujen liikkumista sikiönkehityksen aikana. Tässä tutkimuksessa kiinnostuksen kohteena olivat dorsaalisesti syntyneet, dorso-ventraalisesti vaeltavat *Pax7*-geeniä ilmentävät hermosolut, mutta Cre-rekombinaasin voi yhdistää minkä tahansa geenin alueelle, jos sitä edeltää riittävän vahva promoottorialue. Cre-rekombinaasilla voidaan paikkaspesifisesti kohdentaa mutaation vaikutus ainoastaan tiettyyn kohtaan genomissa, mikä mahdollistaa esimerkiksi kiinnostuksen kohteena olevan solulinjan geneettisen solulinjakartoituksen. Cre:n avulla voidaan tuottaa myös ehdollisia, tiettyyn kudokseen tai kehitysvaiheeseen rajattuja *knock-out* –mutaatioita halutusta geenistä. Lisäksi Cre:n avulla pystyy tuomaan kaksi DNA-sekvenssiä yhteen niin, että aiemmin inaktivoitu geeni pääseekin ilmentymään, jolloin voidaan tutkia kiinnostuksen kohteena olevan geenin erilaisia vaikutuksia fenotyyppiin (Nagy 2000). Tämä tutkimus vahvisti käsitystä siitä, että kehitysgeneettisissä tutkimuksissa Cre on erinomainen ja monipuolinen työkalu, jonka sovellukset voivat ulottua myös paljon geneettistä solulinjakartoitusta pidemmälle.

Ntn1- ja *Pax7*-geenien lisäksi halusin selvittää dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisten hermosolujen 5-HTR_{2C}-serotoniinireseptorin ilmentymistä, sillä aikuisissa hiirissä sen tiedetään ilmentyvän GABAergisissä hermosoluissa dorsaalisisä

raphe-tumakkeessa ja säätelevän suoraan serotoniinin pitoisuutta synapseissa (Spoida ym. 2014). Koska reseptori ei vaikuttanut vasta-aineen perusteella ilmentyvän yhdessäkään kehitysvaiheen E18.5 sikiössä, on erittäin todennäköistä, että dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisissä hermosoluissa reseptoria aletaan ilmentää vasta hiiren syntymän jälkeen, mutta ei ennen syntymää. Reseptorin on osoitettu kuitenkin ilmentyvän muualla hermokudoksessa hiiren sikiönkehityksen aikana (Lauder ym. 2000; Allen Institute 2019). Kuten Morton ym. (2015) osoittivat tutkimuksessaan, GABAergiset hermosolut muovautuvat voimakkaasti hiiren syntymää seuraavan kahden viikon aikana, joka vastaa ihmisen sikiönkehityksen viimeistä kolmannesta. Vasta tässä vaiheessa dorsaalisen raphe-tumakkeen serotonergiset ja GABAergiset hermosolut muodostavat lopulliset yhteytensä aksonien ja dendriittien välityksellä sekä toisiinsa että muille aivoalueille, esimerkiksi etuaivoihin, hypotalamukseen ja manteliumakkeeseen (Weissbourd ym. 2014). Siksi kehitysvaiheiden P0-P14 käyttö tulevissa tutkimuksissa voisi antaa lisätietoa 5-HT_{2C}-reseptorin aktivoitumisesta GABAergisissä hermosoluissa hiiren syntymän jälkeen.

Dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisten ja serotonergisten hermosolujen vuorovaikutusverkosto muodostaa kokonaisuudessaan merkittävän tutkimuskohteen tulevaisuudessa, sillä monien psyykkisten häiriöiden tausta on serotonergisen järjestelmän epätasapainossa (Deneris & Wyler 2012). Esimerkiksi uusien masennuslääkkeiden kehitys nojaa serotonergisen järjestelmän tuntemukseen. Siten dorsaalisen raphe-tumakkeen GABAergisten hermosolujen monimuotoisuuden tutkimukset voivat paljastaa jatkossa uutta tietoa myös serotonergisten solujen toiminnasta ja kehityksestä.

Neurogenetiikka tieteenalana pyrkii kartoittamaan hermosolujen monimuotoisuuden taustalla vaikuttavia geenejä ja niiden toimintaa sekä aikuisessa yksilössä että sikiönkehityksen aikana. Neurogenetiikassa hyödynnetään kehittyneitä molekyyli-genetiikan tutkimusmenetelmiä, joihin lukeutuvat myös omassa tutkimuksessani käytetyt muuntogeeniset hiirilinjat sekä Cre-rekombinaasivälitteinen solulinjakartoitus. Jo nykyisillä muuntogeenisillä hiirilinjoilla on saatu runsaasti tietoa hermosolujen erilaistumiseen vaikuttavista geeneistä, ja yhdistämällä vielä RNA-yksisolusekvensointi-tutkimukset, käyttäytymiskokeet ja elektrofysiologiset mittaukset geneettiseen solulinjakartoitukseen eri muuntogeenisten hiirten avulla voidaan hyvin laajasti kartoittaa tiettyjen geenien vaikutusta sikiön hermoston kehitykselle. Jatkotutkimukset voivat

paljastaa uusia GABAergisten hermosolujen alatyyppejä ja molekyyli- tason ominai- suuksia sekä selvittää tarkemmin GABAergisten hermosolujen osuutta aivorungon hermoverkoston säätelyssä.

Tämän tutkimuksen tulokset valottivat aivojen merkittävimmän serotonergisen keskittymän, dorsaalisen raphe-tumakkeen, GABAergisten hermosolujen moni- muotoisuuden kehittymistä ja niiden vaeltamista sikiönkehityksen aikana, ja voivat toimia tulevaisuudessa pohjana myös muille neuro- ja kehitysgeneettisille tutkimuksille. Nähtäväksi jää, mitä jatkuvasti kehittyvät molekyyli- genetiikan tutkimusmenetelmät paljastavat hermosolujen geneettisistä säätelyverkostoista ja hermosolujen moni- muotoisuuden kehitymisestä, ja minkälaisia sovelluksia niillä voi olla neurogenetiikalle ja sikiönkehityksen tutkimuksille tulevaisuudessa.

Kiitokset

Haluan kiittää tutkimusryhmän johtajaa Juha Partasta mielenkiintoisen pro gradu – tutkielman toteuttamismahdollisuudesta neurokehitysgenetiikan tutkimusryhmässä. Suuret kiitokset ohjaajilleni Minna Vainiolle sekä Marjo Salmiselle työn ohjauksesta ja avusta tutkielman eri vaiheissa. Kiitos myös kaikille tutkimusryhmän jäsenille niin teknisestä ja teoreettisesta kuin henkisestäkin tuesta tutkimuksen aikana.

Lähteet

- Achim K, Peltopuro P, Lahti L, Li J, Salminen M, Partanen J (2012) Distinct developmental origins and regulatory mechanisms for GABAergic neurons associated with dopaminergic nuclei in the ventral mesodiencephalic region. *Development* 139, 2360–2370.
- Achim K, Salminen M, Partanen J (2014) Mechanisms regulating GABAergic neuron development. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 1395–1415.
- Allen Institute (2019) Allen Developing Mouse Brain Atlas.
< <http://developingmouse.brain-map.org/> > [Luettu 14.7.2019]
- Alonso A, Merchán P, Sandoval JE, Sánchez-Arrones L, Garcia-Cazorla A, Artuch R, Ferrán JL, Martínez-de-la-Torre M, Puelles L (2013) Development of the serotonergic cells in murine raphe nuclei and their relations with rhombomeric domains. *Brain Struct Funct* 218, 1229–1277.
- Altman & Bayer (1995) *Atlas of prenatal rat brain development, 1st edition*. CRC Press, Boca Raton.
- Ang S-L, Jin O, Rhinn M, Daigle N, Stevenson L, Rossant J (1999) A targeted mouse *Otx2* mutation leads to severe defects in gastrulation and formation of axial mesoderm and to deletion of rostral brain. *Development* 122, 243–252.
- Aroca P, Lorente-Cánovas B, Mateos FR, Puelles L (2006) Locus Coeruleus Neurons Originate in Alar Rhombomere 1 and Migrate into the Basal Plate: Studies in Chick and Mouse Embryos. *The Journal of Comparative Neurology* 496, 802–818.
- Artegiani B, Lyubimova A, Muraro M, van Es JH, van Oudenaarden A, Clevers H (2017) A Single-Cell RNA Sequencing Study Reveals Cellular and Molecular Dynamics of the Hippocampal Neurogenic Niche. *Cell Reports* 21, 3271–3284.
- Batzoglou S, Pachter L, Mesirov JP, Berger B, Lander ES (2000) Human and Mouse Gene Structure: Comparative Analysis and Application to Exon Prediction. *Genome Res.* 10(7), 950–958.
- Bu D-F & Tobin AJ (1994) The Exon-Intron Organization of the Genes (*GAD1* and *GAD2*) Encoding Two Human Glutamate Decarboxylases (*GAD₆₇* and *GAD₆₅*) Suggests That They Derive from a Common Ancestral *GAD*. *Genomics* 21, 222–228.
- Budry L, Balsalobre A, Gauthier Y, Khetchoumian K, L'Honoré A, Vallette S, Brue T, Figarella-Branger D, Meij B, Drouin J (2012) The selector gene *Pax7* dictates alternate pituitary cell fates through its pioneer action on chromatin remodeling. *Genes Dev.* 26, 2299–2310.

- Challis C, Boulden J, Veerakumar A, Espallergues J, Vassoler FM, Pierce RC, Beck SG, Berton O (2013) Raphe GABAergic Neurons Mediate the Acquisition of Avoidance after Social Defeat. *The Journal of Neuroscience* 33(35), 13978–13988.
- Deneris ES & Wyler SC (2012) Serotonergic transcriptional networks and potential importance to mental health. *Nature Neuroscience* 15, 519–527.
- Dicken MS, Hughes AR, Hentges ST (2015) Gad1 mRNA as a reliable indicator of altered GABA release from orexigenic neurons in the hypothalamus. *European Journal of Neuroscience* 42, 2644–2653.
- Dominici C, Moreno-Bravo JA, Puiggros SR, Rappeneau Q, Rama N, Vieugue P, Bernet A, Mehlen P, Chédotal A (2017) Floor plate-derived netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance. *Nature* 545, 350–354.
- Durston AJ, Timmermans JPM, Hage WJ, Hendriks HFJ, de Vries NJ, Heideveld M, Nieuwkoop PD (1989) Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature* 340, 140–144.
- Ericson J, Morton S, Kawakami A, Roelink H, Jessell TM (1996) Two Critical Periods of Sonic Hedgehog Signaling Required for the Specification of Motor Neuron Identity. *Cell* 87, 661–673.
- Ericson J, Rashbass P, Schedl A, Brenner-Morton S, Kawakami A, van Heyningen V, Jessell TM, Briscoe J (1997) Pax6 Controls Progenitor Cell Identity and Neuronal Fate in Response to Graded Shh Signaling. *Cell* 90, 169–180.
- Frazer A & Hensler JG (1999) Serotonin. Teoksessa: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition*. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Frum T & Ralston A (2015) Cell signaling and transcription factors regulating cell fate during formation of the mouse blastocyst. *Trends in Genetics* 31(7), 402–410.
- Fu W, Le Maître E, Fabre V, Bernard J-F, Xu Z-QD, Hökfelt T (2010) Chemical Neuroanatomy of the Dorsal Raphe Nucleus and Adjacent Structures of the Mouse Brain. *The Journal of Comparative Neurology* 518, 3464–3494.
- Gilbert S (2010) *Developmental biology, Ninth edition*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Guillemot F (2007) Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development* 134, 3771–3780.
- Haugas M, Tikker L, Achim K, Salminen M, Partanen J (2016) Gata2 and Gata3 regulate the differentiation of serotonergic and glutamatergic neuron subtypes of the dorsal raphe. *Development* 143, 4495–4508.

- Hill RW, Wyse GA, Anderson M (2008) *Animal Physiology, Second edition*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Hornung J-P (2003) The human raphe nuclei and the serotonergic system. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 26, 331–343.
- Hoshino M (2012) Neuronal subtype specification in the cerebellum and dorsal hindbrain. *Develop. Growth Differ.* 54, 317–326.
- Hoshino M, Nakamura S, Mori K, Kawauchi T, Terao M, Nishimura YV, Fukuda A, Fuse T, Matsuo N, Sone M, Watanabe M, Bito H, Terashima T, Wright CVE, Kawaguchi Y, Nakao K, Nabeshima Y-I (2005) Ptf1a, a bHLH Transcriptional Gene, Defines GABAergic Neuronal Fates in Cerebellum. *Neuron* 47, 201–213.
- Imbard A, Benoist JF, Blom HJ (2013) Neural Tube Defects, Folic Acid and Methylation. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 4352–4389.
- Jensen P, Farago AF, Awatramani RB, Scott MM, Deneris ES, Dymecki SM (2008) Redefining the serotonergic system by genetic lineage. *Nature Neuroscience* 11, 417–419.
- Kala K, Haugas M, Lilleväli K, Guimera J, Wurst W, Salminen M, Partanen J (2009) Gata2 is a tissue-specific post-mitotic selector gene for midbrain GABAergic neurons. *Development* 136, 253–262.
- Kaufman MH (1992) *The atlas of mouse development, 1st edition*. Academic Press, Lontoo.
- Keller C, Hansen MS, Coffin CM, Capecchi MR (2004) Pax3:Fkhr interferes with embryonic Pax3 and Pax7 function: implications for alveolar rhabdomyosarcoma cell of origin. *Genes & Development* 18, 2608–2613.
- Lahti L, Achim K, Partanen J (2013) Molecular regulation of GABAergic neuron differentiation and diversity in the developing midbrain. *Acta Physiol* 207, 616–627.
- Lahti L, Haugas M, Tikker L, Airavaara M, Voutilainen MH, Anttila J, Kumar S, Inkinen C, Salminen M, Partanen J (2016) Differentiation and molecular heterogeneity of inhibitory and excitatory neurons associated with midbrain dopaminergic nuclei. *Development* 143, 516–529.
- Lauder JM, Wilkie MB, Wu C, Singh S (2000) Expression of 5-HT(2A), 5-HT(2B) and 5-HT(2C) receptors in the mouse embryo. *Int J Dev Neurosci.* 18, 653–662.
- Legue E & Joyner AL (2010) Genetic Fate Mapping Using Site-Specific Recombinases. *Methods Enzymol.* 477, 153–181.
- Li Y, Zhong W, Wang D, Feng Q, Liu Z, Zhou J, Jia C, Hu F, Zeng J, Guo Q, Fu L, Luo M (2016) Serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus encode reward signals. *Nature Communications* 7, 10503.

- Liu Z-R, Shi M, Hu Z-L, Zheng M-H, Du F, Zhao G, Ding Y-Q (2010) A refined map of early gene expression in the dorsal rhombomere 1 of mouse embryos. *Brain Research Bulletin* 82, 74–82.
- Lorente-Cánovas B, Marín F, Corral-San-Miguel R, Hidalgo-Sánchez M, Ferrán JL, Puelles L, Aroca P (2012) Multiple origins, migratory paths and molecular profiles of cells populating the avian interpeduncular nucleus. *Dev Biol.* 361, 12–26.
- Luo M, Zhou J, Liu Z (2015) Reward processing by the dorsal raphe nucleus: 5-HT and beyond. *Learning & Memory* 22, 452–460.
- Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR, Lein ES, Zeng H (2010) A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nature Neuroscience* 13, 133–140.
- Martin DM, Skidmore JM, Philips ST, Vieira C, Gage PJ, Condie BG, Raphael Y, Martinez S, Camper SA (2004) PITX2 is required for normal development of neurons in the mouse subthalamic nucleus and midbrain. *Developmental Biology* 267, 93–108.
- Mazurier N, Parain K, Parlier D, Pretto S, Hamdache J, Vernier P, Locker M, Bellefroid E, Perron M (2014) Ascl1 as a Novel Player in the Ptf1a Transcriptional Network for GABAergic Cell Specification in the Retina. *PLoS One* 9(3), e92113.
- Michelsen KA, Prickaerts J, Steinbusch HWM (2008) The dorsal raphe nucleus and serotonin: implications for neuroplasticity linked to major depression and Alzheimer's disease. *Progress in Brain Research* 172, 233–264.
- Miller FD & Gauthier AS (2007) Timing Is Everything: Making Neurons versus Glia in the Developing Cortex. *Neuron* 54, 357–369.
- Morello F, Borshagovski D, Survila M, Tikker L, Kirjavainen A, Estartús N, Knaapi L, Lahti L, Mazutis L, Delogu A, Salminen M, Partanen J (julkaisematon) Gene expression profiling of the ventral rhombomere 1 reveals the diversity and development of GABAergic and glutamatergic neurons in the tegmental nuclei.
- Moreno-Bravo JA, Perez-Balaguer A, Martinez-Lopez JE, Aroca P, Puelles L, Martinez S, Puelles E (2014) Role of Shh in the development of molecularly characterized tegmental nuclei in mouse rhombomere 1. *Brain Struct Funct* 219, 777–792.
- Morton RA, Yanagawa Y, Valenzuela CF (2015) Electrophysiological Assessment of Serotonin and GABA Neuron Function in the Dorsal Raphe during the Third Trimester Equivalent Developmental Period in Mice. *eNeuro* 2(6), e0079-15.2015.
- Nagy A (2000) Cre Recombinase: The Universal Reagent for Genome Tailoring. *Genesis* 26, 99–109.

- Nakamura H, Katahira T, Matsunaga E, Sato T (2005) Isthmus organizer for midbrain and hindbrain development. *Brain Research Reviews* 49, 120–126.
- Parfitt DE & Shen MM (2014) From blastocyst to gastrula: gene regulatory networks of embryonic stem cells and early mouse embryogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369, 20130542.
- Plummer NW, Scappini EL, Smith KG, Tucker CJ, Jensen P (2017) Two Subpopulations of Noradrenergic Neurons in the Locus Coeruleus Complex Distinguished by Expression of the Dorsal Neural Tube Marker Pax7. *Front. Neuroanat.* 11, 60.
- Sariola H, Frilander M, Heino T, Jernvall J, Partanen J, Sainio K, Salminen M, Thesleff I, Wartiovaara K (2015) *Kehitysbiologia: Solusta yksilöksi*. 2. painos. Kustannus Oy Duodecim, Helsinki.
- Shehabeldin R, Lutz D, Karsak M, Frotscher M, Krieglstein K, Sharaf A (2018) Reelin controls the positioning of brainstem serotonergic raphe neurons. *PLoS ONE* 13(7), e0200268.
- Soiza-Reilly M, Commons KG (2014) Unraveling the architecture of the dorsal raphe synaptic neuropil using high-resolution neuroanatomy. *Frontiers in Neural Circuits* 8(105), 1–7.
- Spoida K, Masseck OA, Deneris ES, Herlitze S (2014) Gq/5-HT_{2c} receptor signals activate a local GABAergic inhibitory feedback circuit to modulate serotonergic firing and anxiety in mice. *PNAS* 111, 6479–6484.
- Sunmonu NA, Li K, Guo Q, Li JYH (2011) Gbx2 and Fgf8 are sequentially required for formation of the midbrain-hindbrain compartment boundary. *Development* 138, 725–734.
- The Jackson Laboratory (2019) Stock *Pax7^{tm1(cre)Mrc}/J* Stock 010530. <<https://www.jax.org/strain/010530>> [Luettu 14.7.2019]
- Waite MR, Skaggs K, Kaviany P, Skidmore JM, Causeret F, Martin JF, Martin DM (2012) Distinct populations of GABAergic neurons in mouse rhombomere 1 express but do not require the homeodomain transcription factor PITX2. *Mol Cell Neurosci* 49(1), 32–43.
- Watson J, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R, Harrison C (2014) *Molecular biology of the gene, Seventh edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Weissbourd B, Ren J, DeLoach KE, Guenther CJ, Miyamichi K, Luo L (2014) Presynaptic Partners of Dorsal Raphe Serotonergic and GABAergic Neurons. *Neuron* 83(3), 645–662.

Liitteet

Liite 1. Tutkielmassa esitettyjen geenien lyhenteet ja koko nimet.

Taulukko 5. Tutkielmassa esitetyt geenien lyhenteet ja täydelliset englanninkieliset nimet tutkielmassa esitettyssä järjestyksessä. Osa geneistä on esitetty tutkielmassa ainoastaan geenistä tuotetun proteiinin nimellä.

Geenin lyhenne	Geenin koko nimi
<i>Ntn1</i>	<i>Netrin 1</i>
<i>Gad1, Gad2</i>	<i>Glutamic acid decarboxylase 1, 2</i>
<i>Ascl1</i>	<i>Achaete-scute homolog 1</i>
<i>Nkx6.1, Nkx2.2</i>	<i>NK6 homeobox 1, NK2 homeobox 2</i>
<i>Ptf1a</i>	<i>Pancreas associated transcription factor 1a</i>
<i>Gata2, Gata3</i>	<i>GATA-binding factor 1, 2</i>
<i>Tal1</i>	<i>T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1</i>
<i>Fgf8</i>	<i>Fibroblast growth factor 8</i>
<i>Wnt1</i>	<i>WNT family member 1</i>
<i>Otx2</i>	<i>Orthodenticle homeobox 2</i>
<i>Gbx2</i>	<i>Gastrulation brain homeobox 2</i>
<i>Bmp4</i>	<i>Bone morphogenetic protein 4</i>
<i>Tgf-β</i>	<i>Transforming growth factor beta</i>
<i>Shh</i>	<i>Sonic hedgehog</i>
<i>Pax7, Pax6</i>	<i>Paired box 7, 6</i>
<i>En1, En2</i>	<i>Engrailed 1, 2</i>
<i>Hoxa2</i>	<i>Homeobox A2</i>
<i>Otp</i>	<i>Orthopedia homeobox</i>
<i>Cntn2</i>	<i>Contactin 2</i>
<i>Foxo1</i>	<i>Forkhead box protein 1</i>
<i>Pitx2</i>	<i>Paired-like homeodomain transcription factor 2</i>
<i>Dbx1</i>	<i>Developing brain homeobox 1</i>
<i>Sert / Slc6a4</i>	<i>Serotonin transporter / Solute carrier family 6 member 4</i>
<i>Vglut3, Vglut2</i>	<i>Vesicular glutamate transporter type 3, 2</i>

Liite 2. Ksyleenikäsittely ja laskeva alkoholisarja *in situ* –hybridisaatiossa ja immunohistokemiassa sekä nouseva alkoholisarja *in situ* –hybridisaatiossa.

Immunohistokemia:

4 x 5 minuuttia, ksyleeni
3 x 2 minuuttia, absoluuttinen etanoli
2 x 2 minuuttia, 94 % etanoli
2 minuuttia, 70 % etanoli
2 minuuttia, 50 % etanoli
2 x 1 minuutti, MilliQ-vesi

***In situ* –hybridisaatio:**

3 x 10 minuuttia, ksyleeni
2 x 5 minuuttia, absoluuttinen etanoli
2 minuuttia, 94 % etanoli
2 minuuttia, 70 % etanoli
2 minuuttia, 50 % etanoli
2 x 1 minuutti, MilliQ-vesi

5 minuuttia, 1xPBS
2 minuuttia, 50 % etanoli
2 minuuttia, 70 % etanoli
2 minuuttia, 94 % etanoli
2 x 2 minuuttia, absoluuttinen etanoli

Liite 3. Tutkimuksessa käytetyt, itse valmistetut liuokset.

WASH I:

20 X SSC 125 ml

MilliQ-vesi 500 ml asti

WASH II:

20 X SSC 50 ml

Formamidi 250 ml

MilliQ-vesi 500 ml asti

NTE:

5M NaCl 100 ml

3M Tris-HCl pH 8.0 3,33 ml

0,5M EDTA pH 8.0 10 ml

MilliQ-vesi 1000 ml asti

10 X TBST (laimennettiin 1 X TBST:ksi):

3M Tris-HCl, pH 7.5 83 ml

5M NaCl 280 ml

1M KCl 27 ml

10% Tween-20 100 ml

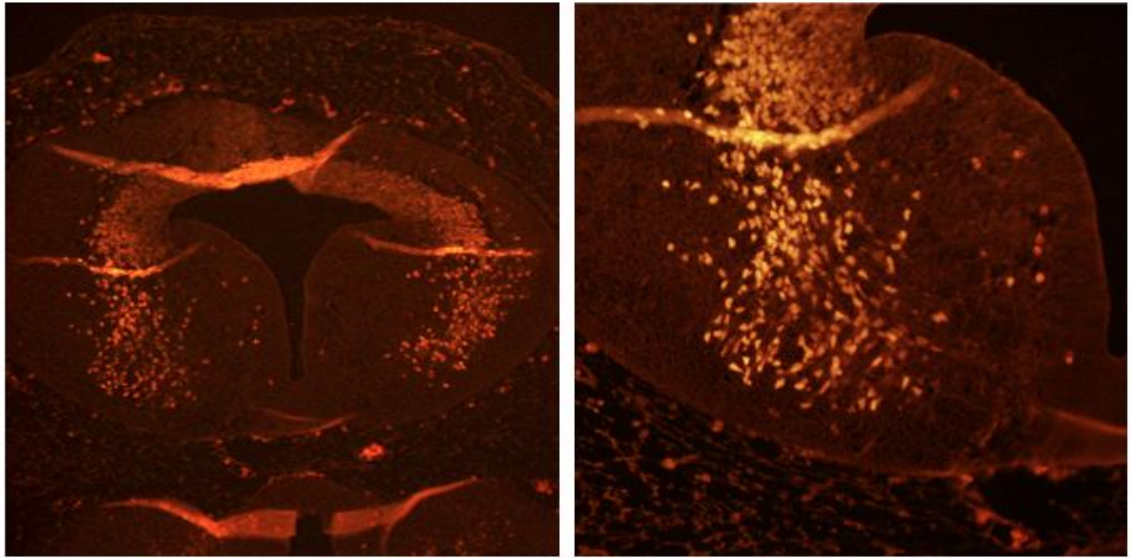
MilliQ-vesi 1000 ml asti

10% Triton-X (laimennettiin 0,1 % ja 0,3 % Triton-X:ksi)

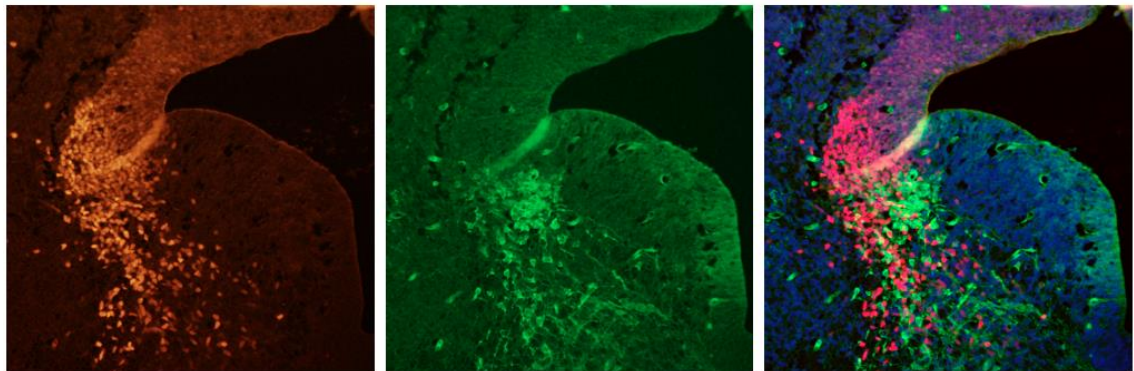
Triton X-100 (Sigma Aldrich) 100 ml

1xPBS 1000 ml asti

Liite 4. Retusoimattomat kuvat.

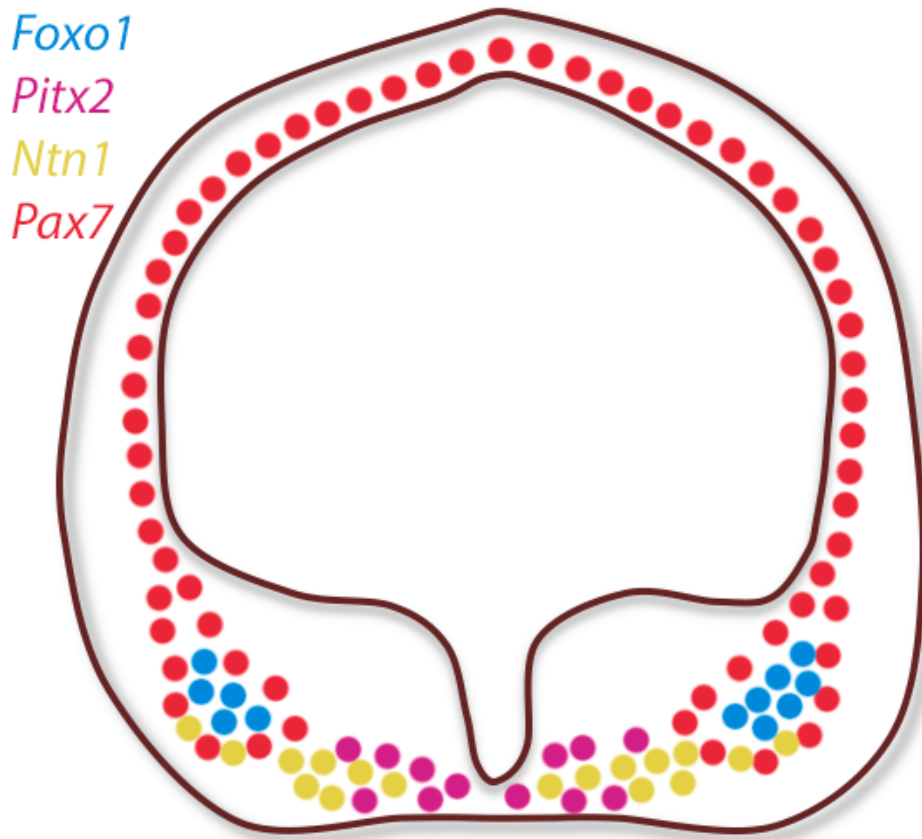


Kuva 23. Retusoimattomat kuvat 17A ja 17B.



Kuva 24. Retusoimattomat kuvat 18A, 18B ja 18C.

Liite 5. Yhteenveto tutkituista GABAergisten solujen markkereista kehityksen vaiheessa E12.5.



Kuva 25. Kehitysvaiheen E12.5 sikiön rombomeeri 1:ssä ilmentyvät GABAergisten hermosolujen merkkigeenit immunohistokemiallisten värjäysten (*Foxo1*, *Pax7*) ja *in situ*-hybridisaatiovärjäysten (*Pitx2*, *Ntn1*) perusteella.