

ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Διαφοροποίηση εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων σε νευρικά κύτταρα και έλεγχος φαρμακολογικών ουσιών»

ΣΟΦΙΑ ΣΥΝΤΑΚΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΓΡΑΒΑΝΗΣ ΑΧΙΛΛΕΑΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝ/ΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ (Επιβλέπων)

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΑΝ/ΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ (Μέλος)

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝ/ΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ (Μέλος)

ΛΑΡΙΣΑ, 2018



FOUNDATION OF RESEARCH AND TECHNOLOGY
INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY
LABORATORY OF PHARMACOLOGY AND NEURAL TISSUE ENGINEERING

POSTGRADUATE PROGRAMME
«HUMAN GENETICS»

MASTER THESIS

«Differentiation of embryonic stem cells into neurons: pharmacological treatments»

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο φαρμακολογίας και νευρικού ιστού του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας-ΙΤΕ, στα πλαίσια των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο πρόγραμμα Γενετική του Ανθρώπου του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δε θα μπορούσα να παραθέσω τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής χωρίς να χωρίς να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες και την αναγνώρισή μου στους πιο σημαντικούς ανθρώπους που συνέβαλαν στην υλοποίησή της.

Πρωτίστως, θα ήθελα να παραθέσω τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, Δρ. Αχιλλέα Γραβάνη, για την ανάθεση της παρούσας ερευνητικής μελέτης και για την πολύτιμη ευκαιρία που επέλεξε να μου προσφέρει, ώστε να αποτελέσω μέλος της επιστημονικής του ομάδας.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον καθηγητή του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, Δρ. Ιωάννη Χαραλαμπίδου για τις πολύτιμες συμβουλές του και τις γνώσεις του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον ερευνητή Δρ. Δημήτριο Τζεράνη για την εμπιστοσύνη του, την αμέριστη υποστήριξή του και για τις διεπιστημονικές γνώσεις που μου μετέδωσε. Η συνεργασία μας θα συνοδεύει πάντα την επιστημονική μου πορεία.

Ευχαριστώ τις καθηγήτριες του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Δρ. Ασπασία Τσέζου και Δρ. Βαρβάρα Τραχανά για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή της παρούσας μελέτης και την αξιολόγηση της εργασίας μου.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την ερευνήτρια Δρ. Έλενα Δεληγιάννη για τις αναλύσεις των αποτελεσμάτων μου και τις πολύτιμες συμβουλές της.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ το φοιτητή Γεώργιο Ζιάκα για την αμέριστη βοήθειά του, τις ιδέες και τις γνώσεις του αλλά και την ηθική υποστήριξή του σε όλη τη διάρκεια της παρούσας εργασίας.

Θερμά ευχαριστώ τη φοιτήτρια Δανάη Παπαδογιάννη για τις συμβουλές της, την υποστήριξή της και πάνω από όλα για τη φιλία της.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους τους ερευνητές και φοιτητές της επιστημονικής μας ομάδας για το φιλικό και συνεργατικό περιβάλλον του εργαστηρίου.

Δε θα μπορούσα να μην παραθέσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου, Αθανασία Νάκα και Κώστα Συντάκα για την ολόψυχη αγάπη τους, την κατανόησή τους και όλες τις προσπάθειες που κατέβαλαν ώστε να υλοποιήσω τα όνειρά μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Αθανάσιο Γκόγκα διότι μου έμαθε να έχω θάρρος και πίστη στον εαυτό μου. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον θείο μου, Γεώργιο Συντάκα για την αγάπη του και τη συνεχή παρότρυνσή του να ολοκληρώσω τις σπουδές μου. Θερμά και με πολύ αγάπη ευχαριστώ τον αδερφό μου, Άρη-Ελευθέριο Συντάκα για την αμέριστη ηθική συμπαράστασή του σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Σοφία Συντάκα
Ηράκλειο, Ιούνιος 2018

Περίληψη

Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες είναι χρόνιες διαταραχές του νευρικού συστήματος με κύριο χαρακτηριστικό την προοδευτική απώλεια νευρώνων και νευρογλοιακών κυττάρων. Επιφέρουν σοβαρές συμπεριφορικές και νοητικές αλλαγές που πλήττουν σημαντικά τους ασθενείς. Μέχρι σήμερα, η μελέτη τους βασίζεται κυρίως σε ζωικά μοντέλα που όμως δεν μπορούν να αναπαραστήσουν πλήρως τη παθοφυσιολογία των νόσων με αποτέλεσμα την αδυναμία εύρεσης μόνιμης ίασης. Μία σημαντική ερευνητική προσπάθεια των τελευταίων είκοσι ετών είναι η δημιουργία νευρικού ιστού από εμβρυικά βλαστοκύτταρα. Η τεχνολογία τους έχει καταστήσει δυνατή την *in vitro* καλλιέργεια ανθρώπινων νευρικών και νευρογλοιακών κυττάρων επιτρέποντας την πρόσβαση σε ανθρώπινο νευρικό ιστό. Έτσι, καθίσταται δυνατή η διερεύνηση των μηχανισμών που οδηγούν σε εγκεφαλικές διαταραχές και η προσπάθεια ανάπτυξης εξατομικευμένων θεραπειών. Η νόσος του Alzheimer είναι μια σοβαρή νευροεκφυλιστική διαταραχή με σοβαρές συνέπειες για την ακεραιότητα του εγκεφαλικού φλοιού, την υπεύθυνη περιοχή για τη μνήμη και τη μάθηση. Η νόσος ορίζεται από δύο βασικά παθολογικά χαρακτηριστικά, τις αμυλοειδείς πλάκες και τα νευροϊνιδιακά πλέγματα. Οι νευροτροφίνες είναι παράγοντες του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος με κυρίαρχους ρόλους στην επιβίωση των νευρικών και νευρογλοιακών κυττάρων. Οι νευροτροφίνες και οι υποδοχείς τους εμπλέκονται στη μοριακή παθολογία του Alzheimer και η δράση τους ελέγχεται σήμερα σε θεραπευτικές εφαρμογές. Στην παρούσα ερευνητική εργασία διερευνήθηκε η νευροπροστατευτική δράση των μικρονευροτροφινών, φαρμακολογικά μόρια με ιδιότητες ανάλογες των νευροτροφινών, σε ένα μοντέλο της νόσου του Alzheimer. Η ανάπτυξη του μοντέλου περιλάμβανε τη διαφοροποίηση εμβρυικών βλαστικών κυττάρων σε νευρικά κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού. Τα αποτελέσματα της διαδικασίας διαφοροποίησης ποσοτικοποιήθηκαν ενδελεχώς, ενώ έμφαση δόθηκε στην αξιολόγηση της νευρογένεσης και την έκφραση των υποδοχέων των νευροτροφινών. Τέλος, στο μοντέλο που αναπτύχθηκε, αξιολογήθηκαν οι νευροπροστατευτικές ιδιότητες των νευροτροφινών NGF και BDNF, καθώς και των μικρονευροτροφινών BNN27 και BNN20 ενάντια στην απόπτωση που προκλήθηκε μέσω χορήγησης ολιγομερών της β-αμυλοειδούς πρωτεΐνης. Δοκιμασίες ελέγχου της ζωτικότητας των κυττάρων και η διερεύνηση της σηματοδότησης, αποκάλυψε τη νευροπροστατευτική δράση των μικρονευροτροφινών και τον πολλά υποσχόμενο ρόλο τους ως θεραπευτικά μόρια νευροεκφυλιστικών διαταραχών όπως η νόσος του Alzheimer.

Abstract

Neurodegenerative diseases are chronic disorders of the nervous system characterized by a progressive loss of neurons and glial cells. They cause severe behavioral and cognitive changes that greatly affect patients. To date, their study is primarily based on animal models that cannot fully recapitulate the pathophysiology of these diseases, resulting in an inability to find permanent cure. In the last twenty years, the creation of neural tissue from embryonic stem cells has become a great scientific aim. This technology has made it possible to develop human neural and glial cells in vitro thus, allowing access to human neural tissue. Consequently, scientists are now able to investigate the mechanisms that lead to brain disorders and develop personalized therapies. Alzheimer's disease is a severe neurodegenerative disorder with serious consequences for cerebral cortex integrity, the fundamental area of memory and learning. The disease is defined by two major pathological hallmarks, amyloid plaques and neurofibrillary tangles. Neurotrophins are proteins of the central and peripheral nervous system with dominant roles in the survival of neurons and glial cells. Neurotrophins and their receptors are involved in the molecular pathology of Alzheimer's disease thus, are now being utilized for therapeutic applications. In this study, the neuroprotective effect of microneurotrophins was evaluated for the first time in a model of Alzheimer's disease. Microneurotrophins are novel pharmacological molecules with neurotrophin-like properties. The development of the model consists of three main parts, the differentiation of embryonic stem cells to cortical neurons, the extensive evaluation of neurogenesis and expression of neurotrophin receptors and finally, the assessment of the neuroprotective properties of neurotrophins NGF and BDNF as well as microneurotrophins BNN27 and BNN20 against apoptosis induced by the β -amyloid protein oligomers. Cell viability assays and signaling activity, revealed the neuroprotective effect of microenrotrophins and their promising role as novel therapeutic compounds for the treatment of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease.

Περιεχόμενα

Περίληψη	3
Abstract	4
Εισαγωγή	7
1. Δυναμικότητα και ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων	7
1.1 Ολοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα	8
1.1.1. Εμβρυϊκά Βλαστικά Κύτταρα στον ποντικό και τον άνθρωπο (ESCs)	8
1.1.2. Επαγόμενα Ολοδύναμα Βλαστικά κύτταρα (iPSCs)	11
1.2 Ενήλικα Βλαστικά Κύτταρα (ASCs).....	13
2. Θεραπευτικές εφαρμογές ESCs και iPSCs.....	15
2.1 Μοντελοποίηση Ασθενειών και έλεγχος Φαρμακολογικών Ουσιών.....	15
2.2 Βλαστικά κύτταρα σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες	16
3. Αναπτυξιακή νευροβιολογία του Εγκεφαλικού Φλοιού.....	18
3.1 Διαδικασία ανάπτυξης του εγκεφαλικού φλοιού.....	18
3.2 Κατηγοριοποίηση νευρώνων του Εγκεφαλικού φλοιού.....	20
3.2.1 Πρόδρομα νευρικά κύτταρα	20
3.2.2 Ώριμα νευρικά και νευρογλοιακά κύτταρα.....	23
3.3 Σύνδεση με νευροεκφυλιστικές ασθένειες	26
4. Η ασθένεια του Alzheimer (AD)	28
4.1 Παθοφυσιολογία και Ορόσημα του Alzheimer	28
4.2 Διαγονιδιακά ζωικά μοντέλα του Alzheimer	31
4.3 Μοντέλα ιστού εγκεφαλικού φλοιού	32
4.3.1 In vitro ανθρώπινα μοντέλα του Alzheimer	35
4.3.2 In vitro 3D μοντέλα του Alzheimer	37
5. Ανάπτυξη φαρμακολογικών ουσιών	40
5.1 Νευροτροφίνες και ο ρόλος τους στην επιβίωση των νευρώνων	40
5.2 Υποδοχείς των νευροτροφινών και σηματοδότηση στο Alzheimer.....	42
6. Σκοπός της διπλωματικής εργασίας	48
Μεθοδολογία	49
1. Καλλιέργεια εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων.....	49
2. Διαφοροποίηση εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων σε νευρικά κύτταρα.	50
3. Ταυτοποίηση της διαφοροποίησης με μεθόδους ανοσοφθορισμού.....	52
4. Απομόνωση RNA από ESC-διαφοροποιημένους νευρώνες.....	53
5. Σύνθεση cDNA.	55
6. Ταυτοποίηση της διαφοροποίησης με RT-PCR.	56

7. Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από ESC-διαφοροποιημένους νευρώνες.	57
8. Διερεύνηση της έκφρασης των υποδοχέων Νευροτροφινών με Ανοσοαποτύπωση κατά Western, Ανοσοφθορισμό και RT-PCR.	58
9. Δημιουργία μοντέλου του Alzheimer από ESC-διαφοροποιημένους νευρώνες.	61
9.1 Επώαση των νευρώνων με ολιγομερή της β-αμυλοειδούς πρωτεΐνης.	61
9.2 Διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης της νευροτροφίνης BDNF με RT-PCR.	62
10. Έλεγχος φαρμακολογικών ουσιών.	63
10.1 Επώαση των νευρώνων με φαρμακολογικές ουσίες.	63
10.2 Ταυτοποίηση της δραστηριότητας των φαρμάκων με Calcein-PI/live-dead δοκιμασία φθορισμού.	64
10.3 Ανάλυση της δραστηριότητας των φαρμάκων με Ανοσοαποτύπωση κατά Western.	65
11. Στατιστική ανάλυση.	66
Αποτελέσματα.	67
1. Αξιολόγηση της διαφοροποίησης εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων σε νευρικά κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού.	67
2. Διερεύνηση της έκφρασης υποδοχέων νευροτροφινών από ESC-διαφοροποιημένους νευρώνες.	73
3. Δημιουργία μοντέλου της νόσου του Alzheimer.	77
3.1 Αξιολόγηση της τοξικότητας της β-αμυλοειδούς πρωτεΐνης.	77
3.2 Διερεύνηση της έκφρασης της νευροτροφίνης BDNF.	78
4. Αξιολόγηση της νευροπροστατευτικής δράσης φαρμακολογικών ουσιών.	78
Συμπεράσματα.	82
Βιβλιογραφία.	87

1. Δυναμικότητα και ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων

Στα θηλαστικά, η ομοιόσταση, η διατήρηση και η επιδιόρθωση των ιστών είναι διαδικασίες που διενεργούνται από μία σημαντική κατηγορία αρχέγονων κυττάρων που σήμερα είναι γνωστά ως βλαστοκύτταρα (**Kuijk et al., 2010; Donovan and Gearhart, 2001**). Το 1908, ο Alexander Maximov χρησιμοποίησε πρώτη φορά τον όρο για να χαρακτηρίσει πρόδρομα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος με άγνωστες μέχρι τότε ιδιότητες (**Maximov et al., 1908; Skalova et al., 2015**). Με τα σημερινά δεδομένα, ως βλαστικά θεωρούνται τα κύτταρα που έχουν ικανότητες αυτοανανέωσης, διαφοροποίησης, δημιουργίας ιστών αλλά και υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό (**Larijani et al., 2012**). Η ιδιότητα της αυτό-ανανέωσης επιτρέπει τη συμμετρική διαίρεση σε, όμοια με το μητρικό, θυγατρικά κύτταρα (**Kuijk et al., 2010**). Η διαφοροποίηση συνήθως συμβαίνει με ασύμμετρη διαίρεση, όπου το ένα θυγατρικό κύτταρο θα είναι αντίγραφο του προγονικού, ενώ το δεύτερο θα εξειδικευτεί προς μία από τις τρεις βλαστικές στιβάδες (**Larijani et al., 2012**).

Ως «αναπτυξιακό δυναμικό» ορίζεται η ικανότητα διαφοροποίησης των βλαστοκυττάρων προς εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους (**Daley, 2015**). Ανάλογα με το αναπτυξιακό δυναμικό και την τοπολογία τους, τα βλαστοκύτταρα χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες: τα εμβρυϊκά και τα ενήλικα βλαστοκύτταρα (**Kuijk et al., 2010; Larijani et al., 2012**) (Εικόνα 1). Τα εμβρυϊκά, είναι ολοδύναμα (pluripotent) βλαστοκύτταρα που μπορούν να διαφοροποιηθούν προς όλους τους κυτταρικούς τύπους των θηλαστικών και απαντώνται μόνο στα αναπτυσσόμενα έμβρυα ενώ λείπουν από τον ενήλικο οργανισμό (**Donovan and Gearhart, 2001**). Τα ενήλικα, είναι τα βλαστοκύτταρα με περιορισμένο δυναμικό διαφοροποίησης που συναντώνται και μεταγεννητικά στους ιστούς (**Larijani et al., 2012**). Παντοδύναμα βλαστοκύτταρα θεωρούνται μόνο τα γονιμοποιημένα ωάρια και τα κύτταρα που προκύπτουν από τις πρώτες επόμενες κυτταρικές διαιρέσεις και από τα οποία προκύπτουν ο πλακούντας αλλά και οι εξωτερικές εμβρυϊκές στιβάδες. Συλλογικά, η ταξινόμηση περιλαμβάνει 5 κατηγορίες, ενδεικτικές για το αναπτυξιακό δυναμικό (**Girlovanu et al., 2015**), όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1. Δυναμικότητα και κατηγορίες των βλαστικών κυττάρων

Βλαστικά κύτταρα		Ορισμός
Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα	Παντοδύναμα	Διαφοροποίηση προς όλα τα είδη κυττάρων και εμβρυϊκών τροφικών κυττάρων
	Ολοδύναμα	Διαφοροποίηση προς τις 3 βλαστικές στιβάδες
Ενήλικα βλαστικά κύτταρα	Πολυδύναμα	Διαφοροποίηση προς είδη κυττάρων μίας βλαστικής στιβάδας
	Ολιγοδύναμα	Διαφοροποίηση σε περιορισμένα είδη κυττάρων
	Μονοδύναμα	Διαφοροποίηση προς μόνο ένα είδος κυττάρου

1.1 Ολοδύναμα Βλαστικά Κύτταρα

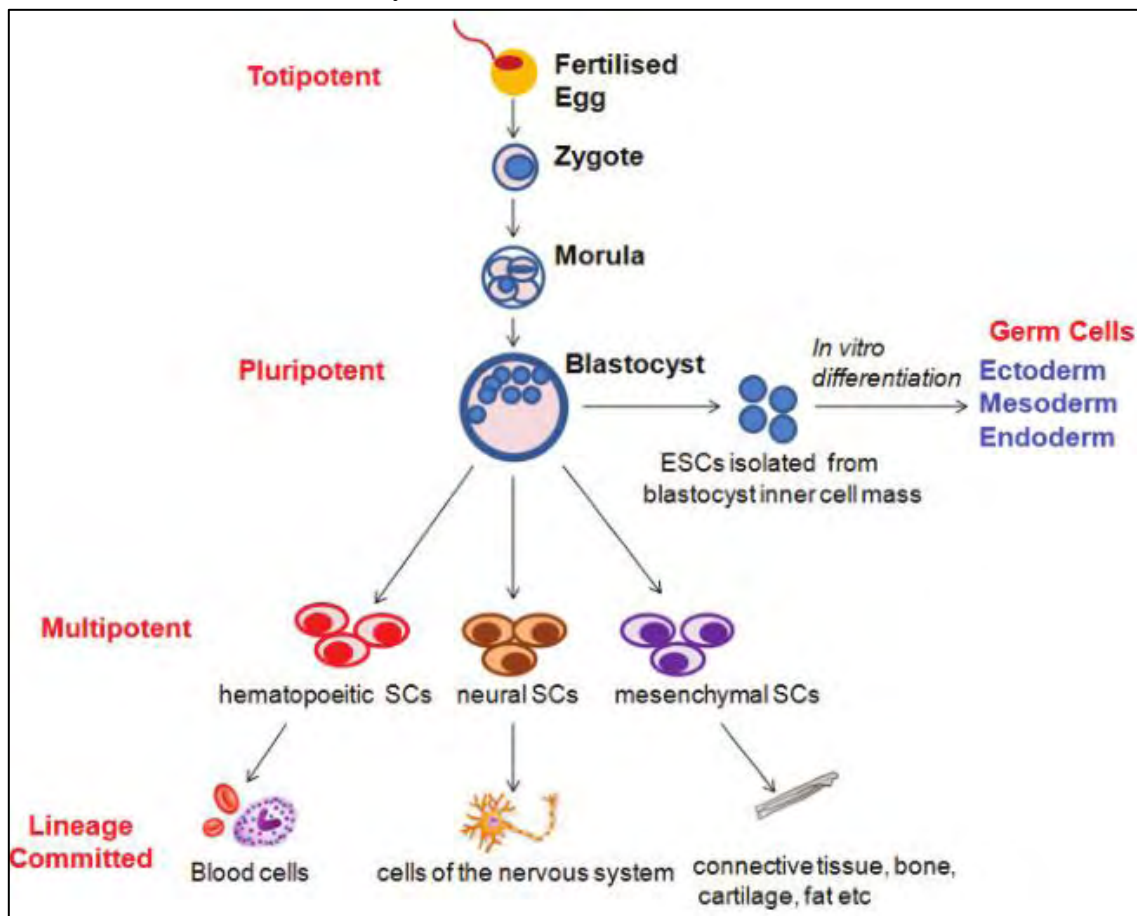
1.1.1. Εμβρυϊκά Βλαστικά Κύτταρα στον ποντικό και τον άνθρωπο (ESCs)

Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα έχουν δύο χαρακτηριστικές ιδιότητες που ορίζουν το αναπτυξιακό τους δυναμικό: την απεριόριστη αυτοανανέωση ή αθανασία και την ολοδυναμικότητα, δηλαδή την ικανότητα διαφοροποίησης προς όλους τους ιστούς του ενήλικου ατόμου (Pera and Tam, 2010; Girlovanu et al., 2015). Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα απαντώνται μόνο στο 4-5 ημερών έμβρυο όταν αυτό βρίσκεται στο αναπτυξιακό στάδιο της βλαστοκύστης. Η βλαστοκύστη αποτελείται από μία εξωτερική εμβρυϊκή στιβάδα που ονομάζεται τροφοβλάστης, μια άδεια κοιλότητα και μία εσωτερική κυτταρική μάζα από την οποία αναπτύσσεται το έμβρυο (Larijani et al., 2012). Το 1981, οι Martin Evans και Gail Martin καλλιέργησαν για πρώτη φορά την εσωτερική κυτταρική μάζα βλαστοκύστης, απομονωμένης από ποντικό και μελέτησαν τις ιδιότητες των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων (mESCs). Στην έρευνά τους έδειξαν ότι τα mESCs μπορούν να διαιρούνται απεριόριστα in vitro διατηρώντας ταυτόχρονα την ολοδυναμικότητά τους (Evans and Kaufman et al., 1981, Martin et al., 1981).

Το γονιμοποιημένο ωάριο και τα κύτταρα των πρώτων κυτταρικών διαιρέσεων, που ονομάζονται βλαστομερίδια, είναι τα μοναδικά κύτταρα με παντοδυναμικότητα (totipotency), καθώς μόνο αυτά μπορούν να σχηματίσουν όλους τους κυτταρικούς τύπους του εμβρύου ταυτόχρονα με τις εξωεμβρυϊκές στιβάδες και τον πλακούντα (De Los Angeles et al., 2015; Daley, 2015). Μετά τις πρώτες μέρες της εμβρυογένεσης, τα βλαστομερίδια διαιρούνται σε κύτταρα με πιο περιορισμένο αναπτυξιακό δυναμικό. Ορισμένα θα αποτελέσουν πρόδρομα κύτταρα των εξωεμβρυϊκών στιβάδων, ενώ άλλα θα αποτελέσουν τα ολοδύναμα κύτταρα του εσωτερικού της βλαστοκύστης. Στη συνέχεια της ανάπτυξης, τα ολοδύναμα κύτταρα

διαίρονται ασύμμετρα για να δημιουργήσουν τις τρεις εμβρυϊκές βλαστικές στιβάδες. Πρόκειται για το εκτόδερμα, το μεσόδερμα και το ενδόδερμα, κάθε ένα από τα οποία αποτελεί πρόδρομο στάδιο διαφορετικών ιστών και οργάνων (Robinton and Daley et al., 2013). Συνεπώς, καθώς η εμβρυογένεση συνεχίζεται, η ολοδυναμικότητα χάνεται και τα κύτταρα αποκτούν όλο και πιο ειδικούς φαινοτύπους που ορίζονται από επιγενετικές αλλαγές και σημαντικές τροποποιήσεις στη γονιδιακή έκφραση (Girlovanu et al., 2015).

Hayes M. et al. Critical Care, 2012



Εικόνα 1: Αναπτυξιακό δυναμικό και διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων.

Σήμερα, πραγματοποιούνται σημαντικές ερευνητικές προσπάθειες για την εύρεση του συνόλου των γονιδίων και επιγενετικών παραγόντων που καθορίζουν την ολοδυναμικότητα και τη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων. Στόχος είναι η in vitro παραγωγή καθαρών πληθυσμών από κύτταρα όλων των ιστών (Pera and Tam, 2010). Πλέον είναι γνωστό ότι οι βασικοί μεταγραφικοί παράγοντες που ορίζουν την ολοδυναμικότητα είναι οι OCT4 (εναλλακτικά POU5F1), NANOG και SOX2 (De Los Angeles et al., 2015). Οι OCT4

και SOX2 σχηματίζουν ετεροδιμερή σύμπλοκα (Avilion et al., 2003) που επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων καθορίζοντας την αυτοανανέωση και τη δυναμικότητα (Boyer et al., 2005). Αντίθετα, η ασύμμετρη διαίρεση καθορίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες SOX2, NOTCH, WNT, PTEN, p53, Myc αλλά και τις οικογένειες HOX και Musashi-1 (Girlovanu et al., 2015; Okano et al., 2005). Ένας επιπλέον παράγοντας που ρυθμίζει την ολοδυναμικότητα σε ESCs ποντικού, αλλά όχι ανθρώπου, είναι η κυτοκίνη LIF (Leukemia Inhibitory Factor). Συγκεκριμένα, η LIF δεσμεύεται και ενεργοποιεί τον ετεροδιμερή υποδοχέα LIF/Gp130, επάγοντας τη σηματοδότηση Stat3 και τελικά την αυτοανανέωση (Ying et al., 2008). Για το λόγο αυτό, σε καλλιέργειες mESCs in vitro, προκειμένου τα κύτταρα να μπορούν να διαιρούνται απεριόριστα διατηρώντας τη δυναμικότητά τους, μία τακτική είναι να συμπεριλαμβάνεται ο παράγοντας LIF στο θρεπτικό υλικό (Kuijk et al., 2011). Ωστόσο, η LIF δεν είναι επαρκής στην περίπτωση των ανθρώπινων ESCs, που συνήθως καλλιεργούνται υπό την παρουσία του αυξητικού παράγοντα (bFGF) (Yamanaka et al., 2012) που διατηρεί την ολοδυναμικότητα με αυτοκρινή και παρακρινή σηματοδότηση (Quang et al., 2014).

Τα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (hESCs) καλλιεργήθηκαν για πρώτη φορά in vitro το 1998 γεννώντας την ιδέα των μοντέλων ασθενειών από ανθρώπινα κύτταρα (Thomson et al., 1998; Tiscornia et al., 2011). Σήμερα τα hESCs έχουν συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση της ανθρώπινης αναπτυξιακής βιολογίας ενώ χρησιμοποιούνται σε θεραπευτικές εφαρμογές όπως η γονιδιακή στόχευση, η επιδιόρθωση ιστών και οργάνων αλλά και για κυτταρικές θεραπείες (Wan et al., 2015; Ohnuki and Takahashi, 2015). Παρά τα πλεονεκτήματα που προσφέρουν, οι εφαρμογές τους περιορίζονται από κλινικά προβλήματα, όπως η έλλειψη συμβατότητας με το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενή και από ηθικά ζητήματα, με κυριότερη την απομόνωση από έμβρυα (Isobe et al., 2014). Πράγματι, τα mESCs συλλέγονται από έμβρυα κατά τη διάρκεια της κύησης ενώ τα ανθρώπινα κατά κύριο λόγο προέρχονται από κρυοσυντηρημένα έμβρυα δωρητών που πρόκειται να υποβληθούν σε εξωσωματική γονιμοποίηση, οδηγώντας στην καταστροφή των εμβρύων (Kuijk et al., 2011). Ωστόσο, παρά τις ανησυχίες που εγείρονται γύρω από τη χρήση τους, υπάρχουν σημαντικές ελπίδες για την ανάπτυξη θεραπευτικών εφαρμογών που περιλαμβάνουν την άμεση διαφοροποίηση των ESCs προς εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους και ιστούς, όπως παγκρεατικές νησίδες, καρδιακά και νευρικά κύτταρα (Girlovanu et al., 2015).

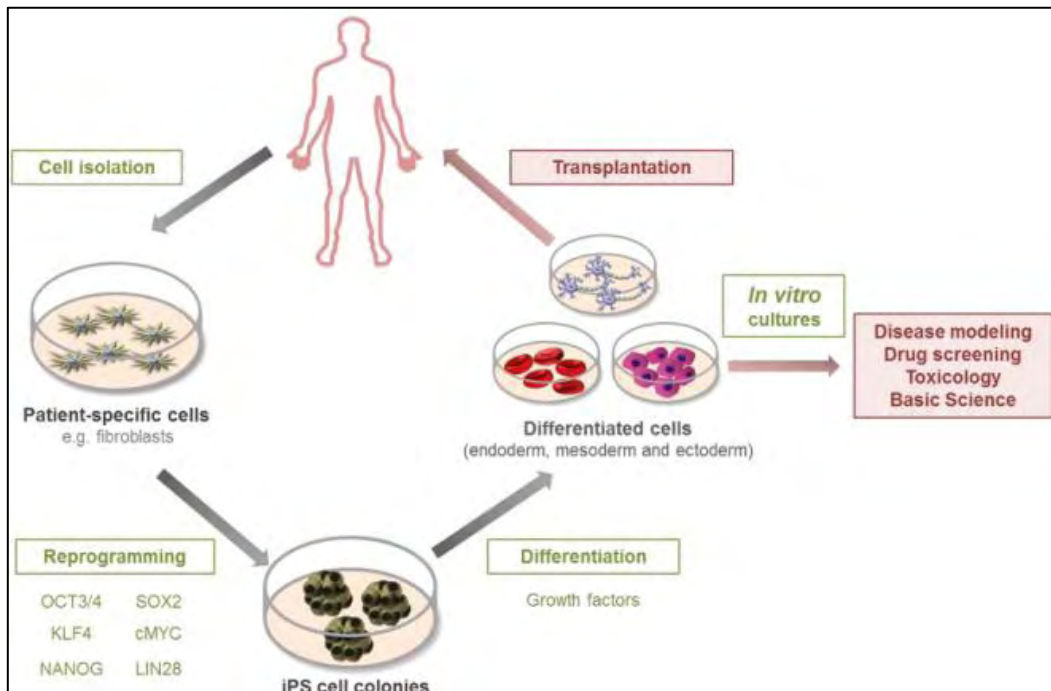
1.1.2. Επαγόμενα Ολοδύναμα Βλαστικά κύτταρα (iPSCs)

Το 2012, οι Shinya Yamanaka και Sir John Gurdon τιμήθηκαν με το Βραβείο Νομπέλ Ιατρικής για τις πρωτοποριακές τους εργασίες που αφορούν τον επαναπρογραμματισμό ώριμων σωματικών κυττάρων με τη μέθοδο της πυρηνικής μεταφοράς ή με τη χορήγηση μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν την ολοδυναμικότητα (**de Lázaro et al., 2014**). Συγκεκριμένα, οι Yamanaka et al. το 2006, κατόρθωσαν να αποδιαφοροποιήσουν ινοβλάστες ποντικού σε ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs). Το πρωτοποριακό αυτό γεγονός επιτεύχθηκε με μετασχηματισμό των ινοβλαστών με τους 4 βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες της αυτοανανέωσης και ολοδυναμικότητας, γνωστοί σήμερα ως Yamanaka's cocktail. Πρόκειται για τους Oct4, Sox2, Klf4 και cMyc (**Yamanaka et al., 2006; Takahashi et al., 2016**). Το Oct4 επάγει αυτοανανέωση, το Sox2 διατηρεί το αναπτυξιακό δυναμικό (**Avilion et al., 2003**), το Klf4 κατέχει ρόλους στην ανάπτυξη, διαφοροποίηση και ομοίωση των ιστών και τέλος, το c-Myc ως πρώτο-ογκογονίδιο ρυθμίζει μονοπάτια ανάπτυξης, πολλαπλασιασμού, απόπτωσης αλλά και μεταβολισμού (**Skalova et al., 2015**).

Το αναπτυξιακό δυναμικό των iPSCs διερευνήθηκε και επιβεβαιώθηκε οριστικά με πειράματα έγχυσης σε βλαστοκύστη ποντικού. Τα κύτταρα αυτά επιλέχθηκαν για την υψηλή έκφραση του γονιδίου Nanog και η ολοδυναμικότητα ταυτοποιήθηκε λόγω της ικανότητας να σχηματίζουν ιστούς στα ενήλικα χιμαιρικά ζώα (**Okita et al., 2007**). Επιπλέον, τα iPSCs μπορούν να ενσωματωθούν στη βλαστική σειρά (germline) με αποτέλεσμα να κληροδοτούνται εξολοκλήρου στις επόμενες γενιές (**Okita et al., 2007**). Παράλληλα, διερευνήθηκε η έκφραση γονιδίων, ειδικών για τα ESCs, όπως οι SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-8 παράγοντες κυτταρικής επιφάνειας, η αλκαλική φωσφατάση, αλλά και η καταλυτική υπομονάδα του ενζύμου τελομεράση (TERT), μία αντίστροφη τρανσκριπτάση που επιτρέπει τον απεριόριστο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα iPSCs βρέθηκαν θετικά για όλους τους παραπάνω δείκτες όπως και τα ESCs (**Takahashi et al., 2007**). Η ολοδυναμικότητά τους ταυτοποιείται περαιτέρω από μελέτες επιγενετικής, με την εντυπωσιακή παρατήρηση της ενεργοποίησης και των δύο X χρωμοσωμάτων (**Feng et al., 2013**). Τελικά, έγινε κατανοητό ότι τα iPSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν προς όλες τις βλαστικές στιβάδες, αλλά η χρήση τους δεν περιορίζεται από τα ηθικά ζητήματα που προκύπτουν λόγω καταστροφής των εμβρύων, γεγονός που διευκολύνει σημαντικά την εφαρμογή τους στην κλινική έρευνα (**Girlovanu et al., 2015**).

Η πρώτη δημιουργία ανθρώπινων iPSCs (εικόνα 2) περιλάμβανε την αποδιαφοροποίηση ινοβλαστών του δέρματος (**Takahashi et al., 2007**). Αργότερα, έγιναν προσπάθειες με κύτταρα ομφάλιου λώρου και περιφερικού αίματος. Ειδικά, τα T-λεμφοκύτταρα είναι σχετικά

εύκολο να επαναπρογραμματιστούν σε iPSCs με την παροδική έκφραση κατάλληλων παραγόντων (Giorgetti et al., 2009; Okita et al., 2013). Σήμερα, η εξέλιξη αυτής της τεχνολογίας έχει δώσει τη δυνατότητα δημιουργίας iPSCs από πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους που μπορεί να λαμβάνονται απευθείας από ασθενείς ή και από τράπεζες βλαστοκυττάρων (Tiscornia et al., 2011). Ταυτόχρονα, σημειώνεται σημαντική εξέλιξη στις μεθοδολογίες επαναπρογραμματισμού με κυριότερο στόχο τον ασφαλή μετασχηματισμό των κυττάρων, χωρίς την ενσωμάτωση ικόν φορέων στο γονιδίωμα ή/και χωρίς την υπερέκφραση γονιδίων που μπορεί να οδηγήσουν σε ογκογένεση (de Lázaro et al., 2014; Peng and Zeng, 2011). Για παράδειγμα, οι Yu et al. δημιούργησαν iPSCs από ανθρώπινους ινοβλάστες χωρίς τα πρώτο-ογκογονίδια cMyc και Klf4, αλλά με τα λιγότερο επισφαλή NANOG και LIN28 (Yu et al., 2007). Πλέον είναι γνωστό ότι η επιτυχία της δημιουργίας iPSCs εξαρτάται από την προέλευση, τον κυτταρικό τύπο αλλά και την ηλικία του ατόμου. Αυτές οι παράμετροι επηρεάζουν το χρόνο που απαιτεί η αποδιαφοροποίηση αλλά και τον αριθμό των ρυθμιστικών γονιδίων που απαιτούνται (Giorgetti et al., 2009). Ένα ενδιαφέρον παράδειγμα παρουσιάζεται από τους Kim et al., οι οποίοι κατόρθωσαν να αποδιαφοροποιήσουν νευρικά βλαστικά κύτταρα σε iPSCs χρησιμοποιώντας μόνο τον μεταγραφικό παράγοντα OCT4 (Kim et al., 2009). Σε αντίθεση με τα ανθρώπινα ESCs, τα iPSCs δε θέτουν ηθικά διλλήματα ή ζητήματα ασφάλειας καθώς μπορούν να παράγονται από σωματικά κύτταρα των ίδιων των ασθενών. Για το λόγο αυτό, αναμένεται να συμβάλλουν ουσιαστικά στη θεραπεία μονογονιδιακών αλλά και πολυπαραγοντικών νόσων όπως Alzheimer και Parkinson (Takahashi and Yamanaka, 2013). Πράγματι, το 2007 οι Yu et al. χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, απέδειξαν τη θεραπευτική ικανότητα των iPSCs για μονογονιδιακές διαταραχές (Hanna et al., 2007). Έτσι, έγινε κατανοητό ότι η τεχνολογία αυτή προσφέρει τη δυνατότητα δημιουργίας in vitro συστημάτων με εξατομικευμένα χαρακτηριστικά ασθενών για τη μελέτη τόσο της παθοφυσιολογίας όσο και για τον έλεγχο φαρμακολογικών ουσιών σε οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο συνδέεται με τη νόσο (Tiscornia et al., 2011).



Εικόνα 2: Δημιουργία ανθρώπινων iPSCs και θεραπευτικές εφαρμογές.

1.2 Ενήλικα Βλαστικά Κύτταρα (ASCs)

Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα (ASCs) χαρακτηρίζονται από περιορισμένο αναπτυξιακό δυναμικό και μπορεί να είναι πολυδύναμα (multipotent), ολιγοδύναμα (oligopotent) ή μονοδύναμα (unipotent) κύτταρα που απαντώνται σε διάφορους ιστούς (Wyles et al., 2014; Wagers and Weissman, 2004). Διαθέτουν ορισμένες από τις θεμελιώδεις ιδιότητες των βλαστοκυττάρων, όπως αυτοανανέωση, διαφοροποίηση και επιδιόρθωση των ιστών (Okano et al., 2005). Τα πολυδύναμα συναντώνται τόσο στο αναπτυσσόμενο έμβryo, όσο στον ενήλικο οργανισμό. Η διαφοροποίησή τους περιορίζεται προς κυτταρικούς τύπους που ανήκουν μόνο σε μία από τις τρεις βλαστικές στιβάδες. Τα ολιγοδύναμα έχουν πιο περιορισμένο δυναμικό από τα πολυδύναμα και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους (Wagers and Weissman, 2004). Αντίθετα, τα μονοδύναμα βλαστοκύτταρα εξειδικεύονται προς ένα ώριμο κυτταρικό τύπο και εντοπίζονται μόνο μεταγεννητικά (Girlovanu et al., 2015). Η διαφοροποίησή τους παράγει ποικίλους τύπους θυγατρικών κυττάρων που όμως ανήκουν πάντα στην ίδια αναπτυξιακή γραμμή με το μητρικό βλαστοκύτταρο (Kuijk et al., 2011).

Όλα τα βλαστικά κύτταρα που εντοπίζονται κατά τη μεταγεννητική ανάπτυξη αλλά και στους ιστούς των ενηλίκων ονομάζονται μη εμβρυϊκά ή "σωματικά βλαστικά κύτταρα". Μία σημαντική πηγή σωματικών βλαστικών κυττάρων που χρησιμοποιούνται σε θεραπευτικές

εφαρμογές, είναι ο ομφάλιος λώρος. Γενικά, τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (HSCs) και τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs). Τα HSCs έχουν πολύ περιορισμένο αναπτυξιακό δυναμικό καθώς εξειδικεύονται μόνο σε κύτταρα του αίματος ενώ τα MSCs είναι λιγότερο διαφοροποιημένα και εξειδικεύονται σε κύτταρα κυρίως μεσοδερμικής προέλευσης (**Larijani et al., 2012**). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελούν νέες έρευνες που χρησιμοποιούν MSCs για να παράγουν κύτταρα διαφορετικής προέλευσης όπως ηπατικά (**Ji et al., 2012**), παγκρεατικά (**Zanini et al., 2011**) ακόμη και νευρικά κύτταρα (**Kim et al., 2014**). Μία τρίτη κατηγορία πολυδύναμων ενήλικων βλαστοκυττάρων είναι τα νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs). Τα NSCs εντοπίζονται κυρίως στον εγκέφαλο του αναπτυσσόμενου εμβρύου αλλά και μεταγεννητικά και εξειδικεύονται σε ορισμένα νευρικά και νευρογλοιακά κύτταρα (**Grabel et al., 2012**).

Η βασική διαφορά που διακρίνει τα ολοδύναμα ESCs από τα ASCs είναι ότι τα τελευταία ως πολυδύναμα, ολιγοδύναμα ή μονοδύναμα, έχουν πιο περιορισμένο δυναμικό διαφοροποίησης (**Donovan and Gearhart, 2001; Wagers and Weissman, 2004**). Ωστόσο, τα ASCs έχουν το ισχυρό πλεονέκτημα ότι αντιμετωπίζουν λιγότερα ηθικά διλήμματα δεδομένου ότι μπορούν να συλλέγονται από ενήλικους οργανισμούς (**Girlovanu et al., 2015**). Το γεγονός αυτό έχει επιτρέψει τη χρήση τους σε κλινικές δοκιμές. Πράγματι, μέχρι σήμερα τα ASCs έχουν αξιοποιηθεί επιτυχώς σε έρευνες για τη θεραπεία ασθενειών με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα. Παρόλα αυτά η εφαρμογή τους περιορίζεται από την αδυναμία τους να παράγουν όλους τους κυτταρικούς τύπους που είναι ειδικοί για την παθογένεια συγκεκριμένων νόσων (**Donovan and Gearhart, 2001**).

2. Θεραπευτικές εφαρμογές ESCs και iPSCs

Τα ολοδύναμα βλαστοκύτταρα χρησιμοποιούνται σήμερα από πολλούς ερευνητές σε κλινικές και ερευνητικές εφαρμογές. Σε αυτές περιλαμβάνονται η αναγέννηση ιστών, η ανάπτυξη ανθρώπινων μοντέλων ασθενειών και φαρμακολογικές δοκιμές (Kuijk et al., 2010; Singh et al., 2015). Παρά τις πολλές εφαρμογές των ESCs, τα ηθικά διλλήματα που προκύπτουν από τη χρήση τους έχουν οδηγήσει σε ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών νομικών πλαισίων τόσο στις Ηνωμένες Πολιτείες όσο και στην Ευρώπη (Kurtz et al., 2014). Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, η χρήση τους είναι νόμιμη στις Ηνωμένες Πολιτείες ενώ στην Ευρώπη η παραγωγή τους, αλλά όχι η εισαγωγή τους, περιορίζεται αυστηρά σε χώρες όπως η Γερμανία και η Ιταλία ενώ άλλες χώρες δε διαθέτουν συγκεκριμένο νομικό πλαίσιο (Druml, 2009; Vakili et al., 2015). Αντίθετα, με την τεχνολογία των επαγόμενων βλαστικών κυττάρων (iPSCs), σωματικά κύτταρα αποδιαφοροποιούνται σε ολοδύναμα κύτταρα χωρίς ηθικούς προβληματισμούς. Ταυτόχρονα έχουν το πλεονέκτημα να φέρουν τη γενετική ταυτότητα ασθενών που μπορεί να πάσχουν από τραυματισμό ή εκφυλιστικές διαταραχές. Τα iPSCs χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για τη δημιουργία ιστών προκειμένου να μελετηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί της νόσου ή για μεταμόσχευση, χωρίς τον κίνδυνο απόρριψης από το ανοσοποιητικό. Είναι επίσης εξαιρετικά χρήσιμα για τον έλεγχο της δράσης νέων χημικών μορίων αλλά και για την αξιολόγηση της τοξικότητας εξατομικευμένα για κάθε ασθενή (Singh et al., 2015).

2.1 Μοντελοποίηση Ασθενειών και έλεγχος Φαρμακολογικών Ουσιών

Μέχρι σήμερα, για τη μελέτη ασθενειών και ανάπτυξη θεραπειών, αξιοποιούνται κατά κύριο λόγο συμβατικά συστήματα, όπως αθανатоποιημένες κυτταρικές σειρές ή ζωικά μοντέλα (Kim et al., 2015). Ωστόσο, οι διαφορές στη φυσιολογία μεταξύ των μοντέλων αυτών και των ανθρώπων δυσχεραίνουν την κατανόηση των ασθενειών και την εύρεση αποτελεσματικών θεραπειών καθώς δεν μπορούν να αναπαραστήσουν πλήρως τον ανθρώπινο φαινότυπο. Πράγματι, επιτυχημένες προ-κλινικές θεραπείες και φαρμακολογικές δοκιμές σε ζωικά μοντέλα δεν είχαν την ίδια επιτυχία στους ασθενείς (Xu et al., 2013). Λύση στο πρόβλημα προσφέρει σήμερα η τεχνολογία των ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων, ένας μακροχρόνιος στόχος της εξατομικευμένης ιατρικής, που προσφέρει τη δυνατότητα δημιουργίας ανθρώπινων μοντέλων νόσων με τη γενετική ταυτότητα του κάθε ασθενή (Robinton and Daley et al., 2013).

Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν αναπτύξει μεθοδολογίες που επιτρέπουν τη διαφοροποίηση ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων του ανθρώπου (hPSCs), τόσο εμβρυικά (hESCs) όσο και επαγόμενα (hiPSCs), για τη δημιουργία ώριμων κυττάρων όλων των ιστών (**Corti et al., 2015; Sterneckert et al., 2014**). Τα πρωτόκολλα αυτά προσφέρουν σημαντικές προοπτικές στη βιοϊατρική έρευνα για εφαρμογές που αφορούν: I) την ίαση μονογονιδιακών ασθενειών με κυτταρικές θεραπείες II) την ανάπτυξη αυτόλογων ιστών για μεταμόσχευση, III) τη δημιουργία *in vitro* μοντέλων ασθενειών και τον έλεγχο φαρμακολογικών ουσιών σε μεγάλη κλίμακα (**Zuba-Surma et al., 2012**). Πράγματι, πολλοί ερευνητές παρουσιάζουν iPSC μοντέλα ασθενειών που έχουν βοηθήσει στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών αλλά και στη διαλογή νέων χημικών ουσιών (**Sánchez et al., 2014**). Σήμερα οι προσπάθειες εστιάζονται στη βελτίωση αυτής της τεχνολογίας με τη δημιουργία επαναλήψιμων μοντέλων και τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης και ανάλυσης της επίδρασης των φαρμακευτικών ουσιών ανά κύτταρο αλλά και στο σύνολο των κυτταρικών πληθυσμών (**Xu et al., 2013**). Στο μέλλον, η τεχνολογία των iPSCs δίνει την προοπτική της δημιουργίας αυτόλογων κυττάρων και ιστών σε μεγάλη κλίμακα για την άμεση μεταμόσχευση και ίαση των ασθενών (**Robinton and Daley et al., 2013**).

2.2 Βλαστικά κύτταρα σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες

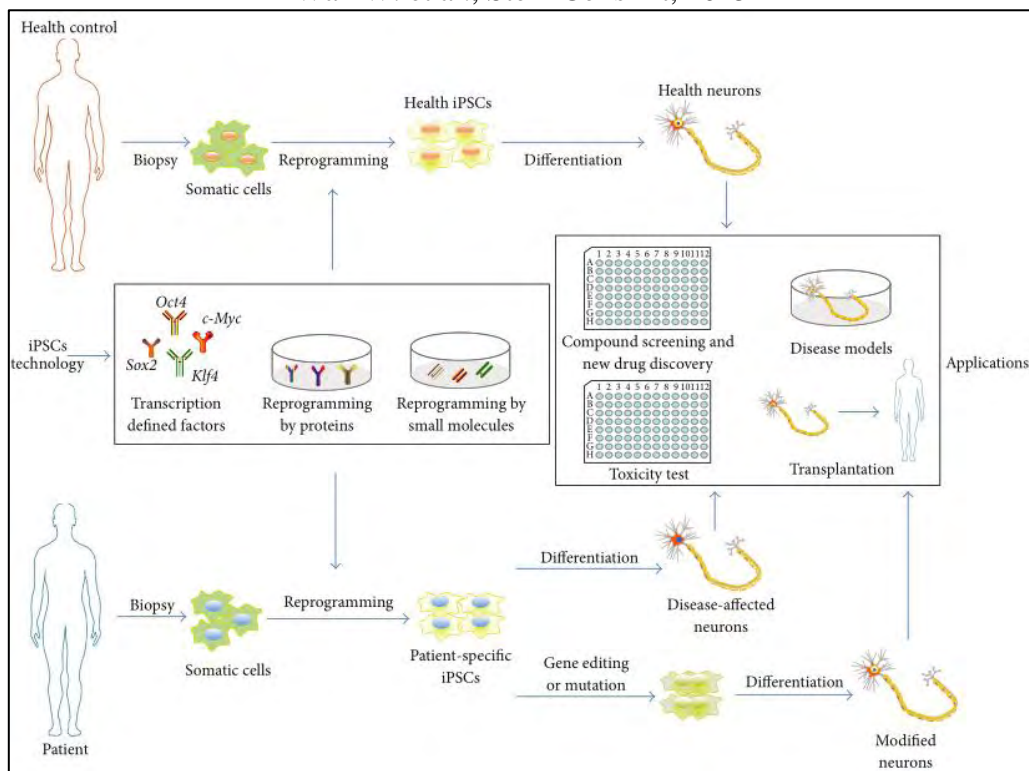
Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες είναι οξείες ή/και χρόνιες διαταραχές του νευρικού συστήματος (**Zuba-Surma et al., 2012**) με κύριο ορόσημο την προοδευτική απώλεια τόσο νευρώνων όσο και νευρογλοιακών κυττάρων. Το αποτέλεσμα είναι νοητικές, συμπεριφορικές και φυσιολογικές διαταραχές που τελικά επιφέρουν το θάνατο του ασθενούς (**Peng and Zeng et al., 2011**). Ανάλογα με τη νόσο, διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου και διακριτοί τύποι νευρώνων πλήττονται σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Έτσι, στην Αμυοτροφική Πλευρική Σκλήρυνση (ALS) εκφυλίζονται κινητικοί νευρώνες και αστροκύτταρα (**Richard et al., 2015; Rossi et al., 2008**), στη νόσο του Parkinson (PD) οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες (**Kalia et al., 2015**), ενώ στη νόσο του Alzheimer (AD) πλήττονται ποικίλοι τύποι νευρώνων με καθορισμένη χρονική σειρά και τοπολογία, ανάλογα με το στάδιο της ασθένειας (**Masters et al., 2018**).

Η τεχνολογία των iPSC έχει καταστήσει δυνατή την *in vitro* καλλιέργεια ανθρώπινων νευρικών και νευρογλοιακών κυττάρων (εικόνα 3) που δεν είναι δυνατό να απομονωθούν ως primary κύτταρα (**Russo et al., 2015**). Πράγματι, πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν αναπτύξει πρωτόκολλα διαφοροποίησης για την παραγωγή πρόδρομων και ώριμων νευρικών κυττάρων

από ESCs/iPSCs τόσο ποντικού όσο και ανθρώπου (Gaspard et al., 2008; Shi et al., 2012; Hu and Zhang, 2009; Boissart et al., 2013). Οι μεθοδολογίες αυτές δίνουν τη δυνατότητα διερεύνησης των μηχανισμών που οδηγούν σε εγκεφαλικές διαταραχές ενώ ταυτόχρονα επιτρέπουν τη σύγκριση των παθολογικών χαρακτηριστικών της νόσου ανάμεσα σε ζωικά μοντέλα και στον άνθρωπο.

Ειδικότερα, τα iPSC-μοντέλα επιτρέπουν τη μελέτη των παθήσεων όχι μόνο από ασθενείς με πρόωμη έναρξη (κληρονομικές μορφές) αλλά και από ασθενείς με σποραδικές μορφές που πλήττουν το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών, όπως συμβαίνει στη νόσο του Alzheimer (Kondo et al., 2013).

Wan W. et al., Stem Cells Int, 2015



Εικόνα 3: Η τεχνολογία των iPSCs στη μελέτη νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Δημιουργία iPSCs από σωματικά κύτταρα ασθενών. Διαφοροποίηση σε νευρικά κύτταρα και ανάπτυξη μοντέλου νευροεκφυλιστικής ασθένειας. Μελέτη της νόσου, σχεδιασμός και διαλογή φαρμακευτικών ουσιών. Δημιουργία αυτόλογων μοσχευμάτων με τη γενετική ταυτότητα του ασθενή.

3. Αναπτυξιακή νευροβιολογία του Εγκεφαλικού Φλοιού

Στα θηλαστικά ο εγκεφαλικός φλοιός είναι μία σύνθετη δομή που χαρακτηρίζεται για την ποικιλία των νευρικών κυττάρων που περιέχει αλλά και για την περίπλοκη συνδεσιμότητα και σηματοδότηση εντός των πολλαπλών στιβάδων του. Κατά την εξέλιξη των θηλαστικών, η βελτίωση της συμπεριφορικής και νοητικής ικανότητας φαίνεται να συσχετίζεται με την αύξηση των ημισφαιρίων του φλοιού. Πράγματι, στον άνθρωπο ο εγκεφαλικός φλοιός είναι η υπεύθυνη δομή για την αντίληψη, τη μνήμη και τη μάθηση (Bystron et al., 2008).

3.1 Διαδικασία ανάπτυξης του εγκεφαλικού φλοιού

Ο εγκεφαλικός φλοιός των θηλαστικών αποτελείται από έξι στιβάδες που εκτείνονται από την επιφάνεια του φλοιού έως τη λευκή ουσία. Η ιεράρχηση της δομής αυτής βασίζεται στην προγραμματισμένη μετανάστευση των ώριμων μετα-μιτωτικών (postmitotic) νευρώνων από το σημείο της γέννησής τους, έως την τελική τους θέση (Chai et al., 2014).

Ο εγκεφαλικός φλοιός είναι εκτοδερμικής προέλευσης και αρχίζει να αναπτύσσεται όταν το πρόσθιο τμήμα του νευρικού σωλήνα έχει διαφοροποιηθεί σε προσθεγέφαλο (forebrain). Από τον προσθεγέφαλο θα προκύψουν ο τελεγκέφαλος (cerebrum) και ο διεγκέφαλος (diencephalon). Ο εγκεφαλικός φλοιός προκύπτει από τον τελεγκέφαλο μαζί με το ραβδωτό σώμα (striatum). Από τον διεγκέφαλο θα προκύψουν ο θάλαμος και ο υποθάλαμος (Harris et al., 2015).

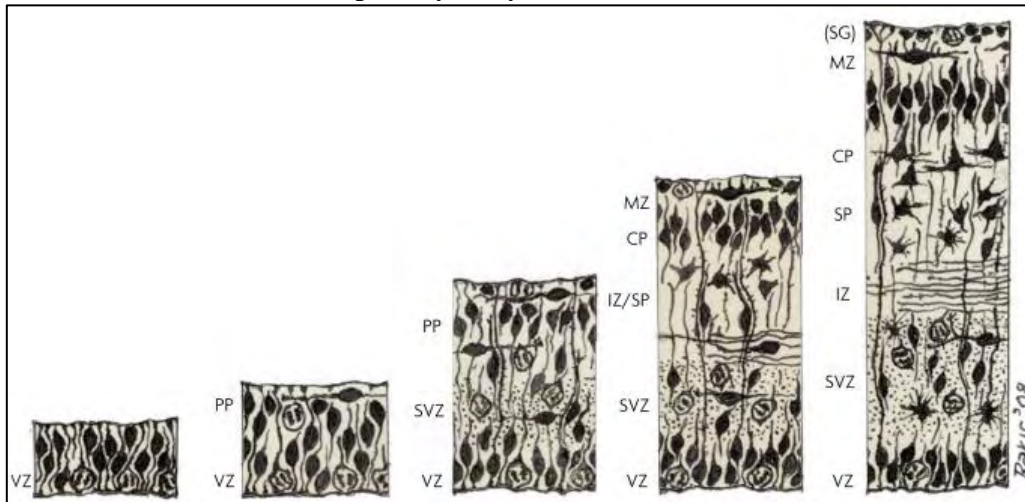
Κατά την ανάπτυξη του φλοιού είναι εντυπωσιακό ότι κανένα είδος νευρώνα δεν παράγεται εντός του ίδιου του φλοιού, αντιθέτως παράγονται στις αναπτυσσόμενες εμβρυϊκές ζώνες (ventricular/subventricular zones, VZ/SVZ), πάνω στις εγκεφαλικές πλευρικές κοιλίες. Οι νευρώνες αποκτούν τις τελικές τους θέσεις έπειτα από την τελευταία τους κυτταρική διαίρεση. Τότε, διανύουν μεγάλη απόσταση κατά μήκος της ενδιάμεσης ζώνης (IZ) πραγματοποιώντας ακτινική και εφαπτομενική μετανάστευση (Rakic et al., 2009). Συγκεκριμένα, τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα διαφοροποιούνται διαδοχικά με τέτοιο τρόπο ώστε οι στιβάδες του φλοιού να αναπτύσσονται από μέσα προς τα έξω (Εικόνα 4), όπου κατά κανόνα, οι νεότεροι νευρώνες μεταναστεύουν προς τις εξωτερικές στιβάδες του φλοιού (Laguesse et al., 2015). Οι πυραμιδοκί νευρώνες μεταναστεύουν ακτινικά μέχρι την κατάλληλη στιβάδα όπου οι άξονές τους εκτείνονται προς τις κατάλληλες θέσεις εντός ή υπό του φλοιού. Οι ενδονευρώνες, με νευροδιαβιβαστή το μόριο GABA, αρχικά αναπτύσσονται στον πρόσθιο εγκέφαλο και τελικά ενσωματώνονται σε τοπικά δίκτυα του φλοιού (Anderson et al., 1997).

Η γένεση και η μετανάστευση των νευρικών κυττάρων είναι μία αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία που ρυθμίζεται τόσο από εγγενείς όσο και εξωγενείς παράγοντες (**Chai et al., 2014**). Οι παράγοντες αυτοί είναι διάχυτα μόρια που εκκρίνονται από κέντρα σηματοδότησης στον αναπτυσσόμενο τελεγκέφαλο και δρουν ως μορφογόνα που επάγουν καταρράκτες σηματοδότησης. Το Shh επάγει τη διαφοροποίηση του τελεγκέφαλου προς τον κοιλιακό άξονα σε αντίθεση με τον καταστολέα Gli3 που επάγει διαφοροποίηση προς τον ραχιαίο άξονα. Άλλο ένα σημαντικό μονοπάτι είναι το Wnt που επάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Pax6 και της Ngn1 οικογένειας προ-νευρικών πρωτεϊνών. Με τη σειρά της, η Pax6 επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης Ngn2. Η Pax6 μαζί με τις Ngn1/2 συνιστούν τους βασικούς μεταγραφικούς ενεργοποιητές που επάγουν τη νευρογένεση στον αναπτυσσόμενο εγκεφαλικό φλοιό (**Martynoga et al., 2012**).

Επιπρόσθετα, κατά τη διάρκεια των διαφορετικών σταδίων της νευρογένεσης έχει αναγνωριστεί μία πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν την προοδευτική γένεση και τους διάφορους τύπους νευρώνων του φλοιού. Κεντρικό ρόλο για το χαρακτηρισμό και την ανάπτυξη των νευρώνων της στιβάδας V του φλοιού κατέχει το γονίδιο Ctip2 (**Arlotta et al., 2005**). Ακόλουθα, η νευρογένεση της στιβάδας VI ρυθμίζεται από το γονίδιο Tbr1. Το Tbr1 κωδικοποιεί έναν καταστολέα της δράσης του Ctip2. Αργότερα κατά την ανάπτυξη, η πρωτεΐνη Satb2 καταστέλλει το Ctip2 επάγοντας το σχηματισμό της στιβάδας II/III (**Britanova et al., 2008**). Γίνεται κατανοητό, ότι η ανάπτυξη των χρονικά αναδυόμενων στιβάδων του φλοιού ελέγχεται από την αλληλεπίδραση ενεργοποιητικών και κατασταλτικών ρυθμιστικών παραγόντων που προοδευτικά ενεργοποιούν και καταστέλλουν τα απαραίτητα σηματοδοτικά μονοπάτια της νευρογένεσης (**Martynoga et al., 2012**).

Η ολοένα και αυξανόμενη γνώση για την ανάπτυξη του εγκεφαλικού φλοιού κατά την εμβρυογένεση αποτελεί σπουδαίο εργαλείο στην προσπάθεια της διαφοροποίησης ολοδύναμων και πολυδύναμων βλαστοκυττάρων σε νευρικά κύτταρα με στόχο θεραπευτικές εφαρμογές. Ιδιαίτερα οι γνώσεις που αφορούν την κυτταρική ποικιλομορφία του φλοιού και την αναπτυξιακή σηματοδότηση ήταν καταλυτικές για την ανάπτυξη πρωτόκολλων διαφοροποίησης και την ταυτοποίηση και κατηγοριοποίηση των νευρώνων που παράγονται *in vitro* (**Harris et al., 2015**).

Adapted by I. Bystron et al., 2008



Εικόνα 4: Σύγχρονο μοντέλο της ανάπτυξης του εγκεφαλικού φλοιού στον άνθρωπο.

3.2 Κατηγοριοποίηση νευρώνων του Εγκεφαλικού φλοιού

Ο εγκεφαλικός φλοιός όλων των θηλαστικών είναι μια υψηλής οργάνωσης, σύνθετη δομή αποτελούμενη από έξι διακριτές στιβάδες που περιέχουν ποικίλους τύπους τόσο νευρώνων όσο και νευρογλοιακών κυττάρων (Molyneaux et al., 2007). Οι νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού προκύπτουν από πρόδρομα νευρικά κύτταρα και διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Πυραμιδικοί διεγερτικοί νευρώνες και ενδονευρώνες. Οι πυραμιδικοί νευρώνες είναι γλουταμινεργικοί, έχουν τυπική πυραμιδική μορφολογία και μεταδίδουν πληροφορίες μεταξύ διαφορετικών περιοχών του φλοιού αλλά και σε άλλα τμήματα του εγκεφάλου εκτείνοντας τους άξονές τους σε όλο το φάσμα του φλοιού. Οι ενδονευρώνες δημιουργούν τοπικά δίκτυα, επιτρέποντας την επικοινωνία μεταξύ διαφορετικών τύπων νευρώνων (Anderson et al., 2002).

3.2.1 Πρόδρομα νευρικά κύτταρα

Κατά την ανάπτυξη, οι νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος των θηλαστικών προκύπτουν από τη διαφοροποίηση πρόδρομων νευρικών βλαστικών κυττάρων (neural progenitors). Τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν ποικιλομορφία στη μορφολογία, το μιτωτικό τους πρόγραμμα, την έκφραση μοριακών δεικτών και τη δυνατότητα διαφοροποίησης σε νέα θυγατρικά κύτταρα (Gotz et al., 2005) (εικόνα 5). Ανάλογα με τη θέση στον αναπτυσσόμενο φλοιό στην οποία συμβαίνει η μίτωση, τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα ταξινομούνται σε δύο ομάδες: Apical Progenitors (APs) και Basal Progenitors (BPs). Η μίτωση των APs διενεργείται πάνω από την κοιλιακή επιφάνεια. Η μίτωση των BPs θα συμβεί είτε στο άνω μέρος της

κοιλιακής ζώνης (VZ) είτε στην υποκοιλιακή ζώνη (SVZ) (Laguesse et al., 2015). Με βάση τις ιδιότητές τους, οι δύο ομάδες συνίστανται από περαιτέρω είδη πρόδρομων νευρικών κυττάρων, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2: Κατηγορίες πρόδρομων κυττάρων του εγκεφαλικού φλοιού

Apical Progenitors	Basal Progenitors
Neuroepithelial cells (NEs)	Intermediate Progenitor cells (IPs)
Radial Glial cells (RGs)	Outer Radial Glial cells (oRGs)
Short Neural Precursors (SNPs)	

Τα **Neuroepithelial** κύτταρα (NEs) είναι πολυδύναμα κύτταρα με επιθηλιακά χαρακτηριστικά. Από αυτά προκύπτουν άμεσα ή έμμεσα όλα τα είδη νευρώνων και νευρογλοιακών κυττάρων που συνθέτουν τον ενήλικο εγκεφαλικό φλοιό (Gotz et al., 2005). Πριν την έναρξη της νευρογένεσης, τα NEs διαιρούνται συμμετρικά ώστε να ενισχύσουν κατάλληλα τον πληθυσμό τους, δημιουργώντας ταυτόσημα θυγατρικά κύτταρα (Laguesse et al., 2015). Αντίθετα, κατά την έναρξη της νευρογένεσης, τα NEs αρχίζουν να διαιρούνται ασύμμετρα. Με αυτόν τον τρόπο τα διαφοροποιημένα κύτταρα καταλήγουν σε νευρώνες ενώ ταυτόχρονα διατηρείται η ιδιότητα της αυτοανανέωσης (Gotz et al., 2005).

Τα **Radial glial** (RGs) παράγονται πριν από την έναρξη της νευρογένεσης και της γλοιογένεσης από νευροεπιθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού (Nulty et al., 2015). Είναι κύτταρα με αστρογλοιακά χαρακτηριστικά ωστόσο διατηρούν ιδιότητες των νευροεπιθηλιακών κυττάρων αλλά με μικρότερο δυναμικό διαφοροποίησης (Campbell et al., 2002). Έχουν ακτινική μορφολογία, είναι δίπολα και παρουσιάζουν νευρογλοιακές ιδιότητες (Pinto et al., 2007). Είναι απαραίτητα για τη δημιουργία των πολλαπλών στιβάδων του εγκεφαλικού φλοιού. Το ενδιαφέρον για τα κύτταρα αυτά αυξήθηκε όταν ταυτοποιήθηκε ο ρόλος τους ως πρόδρομα νευρικά κύτταρα και η συμμετοχή τους σε μια ποικιλία αναπτυξιακών λειτουργιών (Lu et al., 2015). Κατά την ανάπτυξη του φλοιού, τα RGs πραγματοποιούν νευρογενείς διαιρέσεις, δηλαδή διαιρούνται ασύμμετρα παράγοντας ένα περισσότερο διαφοροποιημένο κύτταρο που μπορεί να είναι είτε νευρώνας είτε ένας basal progenitor. Μπορούν ωστόσο να διαιρούνται και συμμετρικά για την αυτοανανέωση και την αύξηση του αριθμού τους (Gotz et al., 2005).

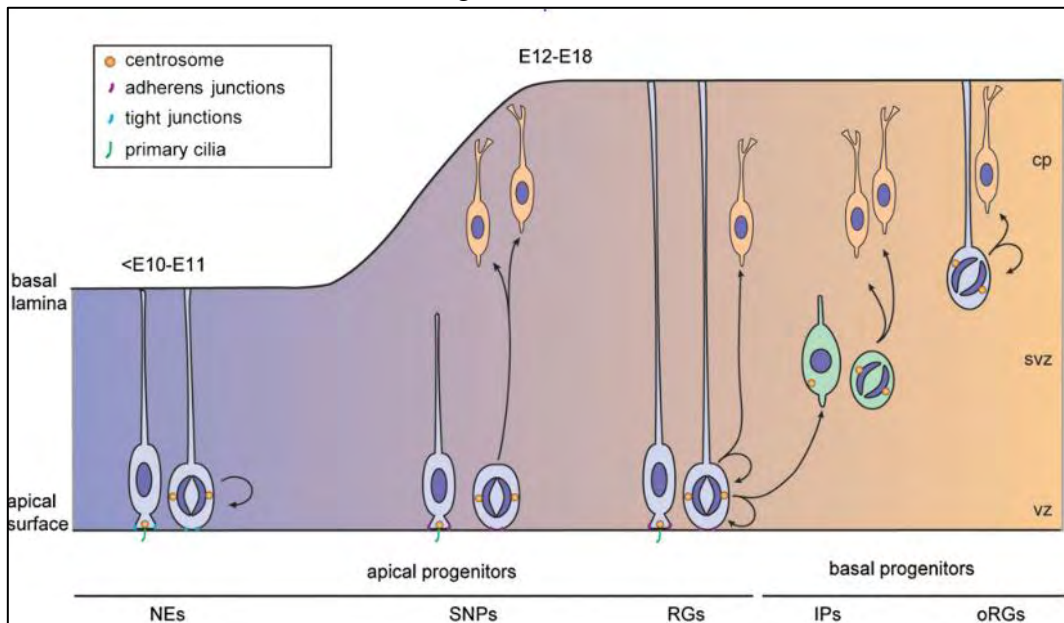
Τα **Short Neural Precursors** (SNPs) είναι κύτταρα με δίπολη πολικότητα και προσκολλητικούς συνδέσμους πάνω στη μεμβράνη τους. Σε αντίθεση με τα RGs, τα SNPs

διαιρούνται συμμετρικά και παράγουν δύο νέους νευρώνες (άμεση νευρογένεση) ενώ σπανιότερα, άλλες ομάδες πρόδρομων νευρικών κυττάρων (**Anthony et al., 2004**).

Καθώς η νευρογένεση του εγκεφαλικού φλοιού συνεχίζεται, ολοένα και περισσότερα πρόδρομα νευρικά κύτταρα διαιρούνται στη βασική πλευρά της κοιλιακής ζώνης (**Laguesse et al., 2015**).

Intermediate progenitor (IPCs) είναι ένας τύπος πρόδρομων νευρικών κυττάρων που ενισχύει τη δημιουργία νευρώνων στον αναπτυσσόμενο εγκεφαλικό φλοιό. Τα IPCs χαρακτηρίζονται από συμμετρικές διαιρέσεις που παράγουν δύο νέους νευρώνες. Μπορούν ωστόσο να παράγουν δύο νέα IPCs με σκοπό την περαιτέρω ενίσχυση και αυτοανανέωση (**Pontious et al., 2007**). Τα IPCs διακρίνονται από τα παραπάνω κύτταρα τόσο σε μορφολογία όσο και στη τοποθεσία τους στο φλοιό όταν διαιρούνται. Επιπρόσθετα, παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές και στη γονιδιακή έκφραση. Ένα αξιοσημείωτο παράδειγμα είναι η έλλειψη της έκφρασης των Pax6, nestin και BLBP, ενώ αντίθετα φαίνεται να εκφράζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες Tbr1 και Tbr2, υπεύθυνοι για τη δημιουργία στιβάδων του φλοιού (**Englund et al., 2005**). Το γεγονός αυτό τα εντάσσει στα περισσότερο διαφοροποιημένα πρόδρομα κύτταρα. Τα IPCs προκύπτουν άμεσα από τη διαφοροποίηση των Radial glial ενώ έχει προταθεί ότι από τα ίδια προκύπτουν νευρώνες όλων των στιβάδων του φλοιού (**Pontious et al., 2007**).

Τα **outer Radial glia (oRGs)** είναι κύτταρα που, κατά την ανάπτυξη, βρίσκονται κυρίως στην εξωτερική υποκοιλιακή ζώνη (oSVZ) του φλοιού. Χαρακτηρίζονται από πολύ υψηλό πολλαπλασιαστικό ρυθμό και διαιρούνται ασύμμετρα παράγοντας άλλα είδη πρόδρομων νευρικών κυττάρων (**Ostrem et al., 2017**). Εκφράζουν τα κλασσικά γονίδια που χαρακτηρίζουν τα RGs όπως Nestin, Vimentin και Pax6. Ωστόσο, νεότερες μελέτες έχουν εντοπίσει γονίδια που εκφράζονται αποκλειστικά στα oRGs όπως τα HOPX, TNC και ITGB5. Η βασική τους λειτουργία έχει προταθεί ότι είναι η παραγωγή και ενίσχυση αυξητικών παραγόντων και η ενεργοποίηση μονοπατιών αυτοανανέωσης στην υποκοιλιακή ζώνη που καταλήγουν στην ενίσχυση και την επέκτασή της. Η ύπαρξη των oRGs και ο ρόλος τους αυτός ίσως παρέχει μία εξήγηση της αναπτυξιακής εξέλιξης του ανθρώπινου φλοιού (**Pollen et al., 2015**).



Εικόνα 5: Κατηγοριοποίηση των πρόδρομων νευρικών κυττάρων.

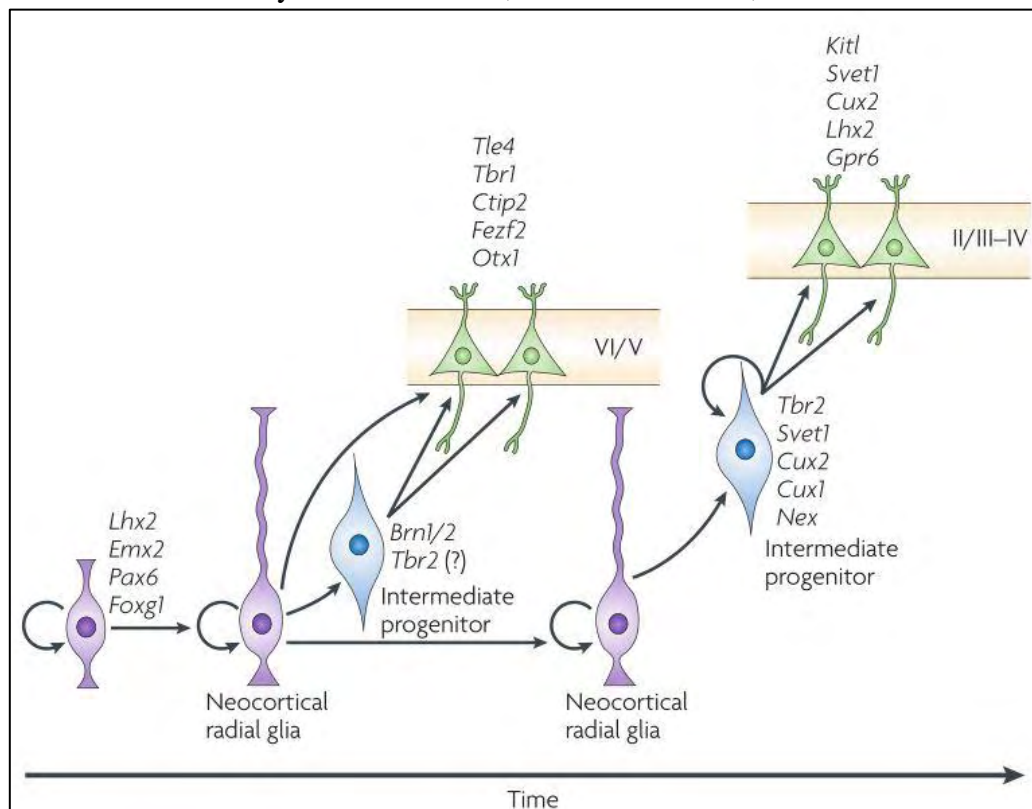
3.2.2 Ωριμα νευρικά και νευρογλοιακά κύτταρα

Ο εγκεφαλικός φλοιός των ενήλικων θηλαστικών συνίσταται από διαφορετικούς πληθυσμούς νευρώνων που παρουσιάζουν διακριτή μορφολογία και εντοπίζονται σε διαφορετικές στιβάδες του φλοιού. Παρουσιάζουν διαφορές στη γονιδιακή έκφραση και τελικά εξυπηρετούν διαφορετικές λειτουργίες (Migliore et al., 2005). Οι νευρώνες του φλοιού διακρίνονται σε δύο κύριες ομάδες: Διεγερτικοί πυραμιδικοί νευρώνες και ανασταλτικοί ενδονευρώνες. Οι **διεγερτικοί πυραμιδικοί νευρώνες** (Projection Neurons, PNs) είναι γλουταμινεργικοί, σχηματίζουν μεγάλης εμβέλειας συνδέσεις και αποτελούν περίπου το 80% των συνολικών νευρώνων. Οι **ανασταλτικοί ενδονευρώνες** (Interneurons, INs), με νευροδιαβιβαστή το μόριο GABA (γ-αμινοβουτυρικό οξύ), δημιουργούν τοπικά δίκτυα και αναστέλλουν τη σηματοδότηση των πυραμιδικών νευρώνων ενώ αποτελούν περίπου το 20% των νευρώνων του φλοιού (Harris et al., 2015). Οι περισσότεροι πυραμιδικοί νευρώνες προκύπτουν είτε άμεσα από radial glial κύτταρα είτε έμμεσα από intermediate progenitors (Anthony et al., 2004).

Όπως ειπώθηκε παραπάνω, διαφορετικοί τύποι πυραμιδικών νευρώνων εντοπίζονται σε διαφορετικές στιβάδες του εγκεφαλικού φλοιού. Στις εσωτερικές στιβάδες VI/V εδράζονται, κατά κανόνα, οι μεγαλύτεροι πυραμιδικοί νευρώνες του εγκεφάλου, που δημιουργούν τις μακρύτερες συνδέσεις (Molyneaux et al., 2007). Στις ανώτερες στιβάδες IV-II, μικρότεροι πυραμιδικοί νευρώνες και ενδονευρώνες σχηματίζουν βραχύτερα δίκτυα που επεξεργάζονται

πληροφορίες στην εκάστοτε θέση (Molnar et al., 2011). Στη στιβάδα I υπάρχει μία σημαντική κατηγορία ενδονευρώνων που ονομάζονται Cajal-Retzius (CR). Είναι οι πρώτοι νευρώνες του φλοιού που εμφανίζονται κατά την ανάπτυξη αποτελώντας εξαίρεση στον κανόνα της “από μέσα προς τα έξω ανάπτυξης του φλοιού”. Κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η έκφραση της πρωτεΐνης Reelin που ρυθμίζει την εσωτερική διαδοχική ανάπτυξη όλων των στιβάδων του αναπτυσσόμενου φλοιού (Campbell et al., 2005). Τέλος, η ωρίμανση των νευρώνων όλων των στιβάδων, απαιτεί διαφορετικά μοτίβα γονιδιακής έκφρασης που οδηγούν στη διαφοροποίηση των πρόδρομων νευρικών κυττάρων στους κατάλληλους νευρώνες της κάθε στιβάδας (Εικόνα 6) (Campbell et al., 2005).

Molyneaux B. J. et al., Nat Rev Neurosci, 2007



Εικόνα 6: Γένεση των πυραμιδικών νευρώνων από πρόδρομα νευρικά κύτταρα και η διαφορετική τους γονιδιακή έκφραση στις στιβάδες του εγκεφαλικού φλοιού.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι πυραμιδικοί νευρώνες του φλοιού μπορούν να μεταδίδουν πληροφορίες μεταξύ απομακρυσμένων περιοχών του φλοιού και του κεντρικού νευρικού συστήματος. Αντίθετα, οι ενδονευρώνες, λόγω της ανασταλτικής τους δράσης, ελέγχουν τοπικά τη σηματοδότηση των διεγερτικών νευρώνων, ρυθμίζοντας έτσι σημαντικά τη μεταφορά της πληροφορίας (Harris et al., 2015). Οι ενδονευρώνες ταξινομούνται σε διάφορες

κατηγορίες ανάλογα με τη μορφολογία, τους δενδρίτες, τη γονιδιακή έκφραση μεταγραφικών παραγόντων αλλά και ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες (Ascoli et al., 2008).

Κατά την εξέλιξη του εγκεφαλικού φλοιού, εκτός από την αύξηση στον αριθμό των νευρώνων, σημαντική αύξηση παρατηρείται και στον αριθμό των **νευρογλοιακών κυττάρων**, γεγονός το οποίο καταδεικνύει το σημαντικό τους ρόλο. Στον εγκεφαλικό φλοιό, τα νευρογλοιακά κύτταρα διακρίνονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: Αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα και μικρογλοία (Rowitch et al., 2010).

Τα **αστροκύτταρα** είναι καταλυτικά για τη λειτουργικότητα των νευρώνων. Οι κλασσικές τους λειτουργίες είναι υποστηρικτικές με κυριότερες την προστασία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, τη δομική υποστήριξη, την κατανομή ιόντων και τη ρύθμιση της ισορροπίας του νερού. Πέρα όμως από τον υποστηρικτικό και δομικό τους ρόλο, πρόσφατα αποκαλύφθηκαν κι άλλες σημαντικές ιδιότητες όπως ρύθμιση της ροής του ασβεστίου (Ca^{+}), της μετάδοσης των συνάψεων και παραγωγή νευροπεπτιδίων (Rowitch et al., 2010). Κατανέμονται σε δύο βασικές ομάδες με βάση τη μορφολογία και την τοποθεσία τους στο φλοιό: Τα ινώδη αστροκύτταρα και τα πρωτοπλασματικά αστροκύτταρα. Τα ινώδη αστροκύτταρα έχουν χαρακτηριστικό ομοιόμορφο σχήμα αστεριού και συναντώνται στη λευκή ουσία του εγκεφάλου. Κομβικό χαρακτηριστικό τους είναι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης GFAP (Glial fibrillary acidic protein). Τα πρωτοπλασματικά αστροκύτταρα έχουν ως βασική λειτουργία την εκτόνωση των συνάψεων μέσω διαφόρων μηχανισμών, μπορούν να έρθουν σε επαφή με τριχοειδή αγγεία και κατά κανόνα συναντώνται στη φαιά ουσία (Clarke et al., 2013; Rowitch et al., 2010; Harris et al., 2015). Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι όλα τα αστροκύτταρα του φλοιού προκύπτουν από τη διαφοροποίηση radial glial κυττάρων, κυρίως μετά την ολοκλήρωση της νευρογένεσης που κατά κανόνα προηγείται της γλοιογένεσης (Rowitch et al., 2010).

Τα **ολιγοδενδροκύτταρα** (OLs) διακρίνονται σε δύο βασικές ομάδες: Τα μυελικά και τα δορυφορικά ολιγοδενδροκύτταρα (Harris et al., 2015). Τα μυελικά ολιγοδενδροκύτταρα επάγουν μυελίνωση στους άξονες των νευρώνων του φλοιού και βρίσκονται κυρίως στις ανώτερες στιβάδες και στη λευκή ουσία (Tomassy et al., 2014). Αντίθετα, τα δορυφορικά ολιγοδενδροκύτταρα συναντώνται κατά κανόνα στη φαιά ουσία και σε εσωτερικές στιβάδες του φλοιού. Φαίνεται να είναι στενά συνδεδεμένα με τα σώματα των νευρώνων, παρόλα αυτά δεν παράγουν μυελίνη. Τα μέχρι τώρα δεδομένα υποστηρίζουν το ρόλο τους ως ρυθμιστές μεταβολιτών των πυραμιδικών νευρώνων (Takasaki et al., 2010).

Η τελευταία αλλά ιδιαίτερα σημαντική κατηγορία μη νευρικών κυττάρων του φλοιού είναι η **μικρογλοία**. Η μικρογλοία είναι τα ιστοειδικά μακροφάγα του εγκεφάλου και προέκυψαν

μέσω πολλών εξελικτικών προσαρμογών. Η κύρια λειτουργία της μικρογλοίας στο φλοιό είναι η επαγωγή αμυντικών μηχανισμών σε καταστάσεις λοίμωξης ή τραυματισμού. Σε αντίθεση με όλα τα άλλα κύτταρα που συνιστούν τον εγκεφαλικό φλοιό, η μικρογλοία παράγεται εκτός του νευρικού συστήματος. Συγκεκριμένα, προέρχεται από αιμοποιητικά πρόδρομα κύτταρα του εμβρυϊκού λεκιθικού σάκου. Σε πολύ πρώιμα στάδια της ανάπτυξης, τα πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα περιβάλλουν εξωτερικά το νευροεπιθήλιο, διαπερνούν το τοίχωμα του φλοιού και λαμβάνουν την τελική τους θέση (Ueno et al., 2013; Nayak et al., 2014; Kierdorf et al., 2013).

Συνοπτικά, οι πολυάριθμες ομάδες κυττάρων που αναφέρθηκαν, γεννιούνται σε συγκεκριμένη χρονική σειρά και μεταναστεύουν με ακρίβεια στην τελική τους θέση από συχνά απομακρυσμένες βλαστικές ζώνες, επάγοντας την ανάπτυξη και ωρίμανση του εγκεφάλου (Harris et al., 2015).

Οι βασικοί τύποι κυττάρων που αποτελούν τον εγκεφαλικό φλοιό παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3: Κατηγορίες ώριμων κυττάρων του εγκεφαλικού φλοιού

Νευρώνες	Νευρογλοιακά κύτταρα
Πυραμιδικοί νευρώνες (PNs) – διεγερτικοί	Αστροκύτταρα
Ενδονευρώνες (INs) – ανασταλτικοί	Ολιγοδενδροκύτταρα
	Μικρογλοία

3.3 Σύνδεση με νευροεκφυλιστικές ασθένειες

Η διερεύνηση της ανάπτυξης του ανθρώπινου φλοιού είναι καταλυτική για την κατανόηση της αναπτυξιακής και εξελικτικής βιολογίας και ίσως μπορεί να απαντήσει πολλά ερωτήματα που αφορούν διαταραχές του εγκεφαλικού φλοιού και οδηγούν σε σοβαρές νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Molnar et al., 2011).

Η απόπτωση των νευρώνων ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος συμβαίνει φυσιολογικά κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και του εγκεφαλικού φλοιού. Καθοδηγεί την οργάνωση των νευρώνων σε λειτουργικά δίκτυα και τη σωστή αύξηση των νευρωνικών πληθυσμών (Nikolic et al., 2013). Κατά κύριο λόγο, η απόπτωση συμβαίνει στην κοιλιακή ζώνη του αναπτυσσόμενου φλοιού όπου τα radial glial κύτταρα έχουν υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού (Malatesta et al., 2003).

Ωστόσο, εκτός από την φυσιολογική απόπτωση, διαταραχές στην ομοιόσταση του εγκεφαλικού φλοιού μπορούν να προκληθούν από πολλούς παράγοντες, τόσο κατά την προγεννητική όσο και κατά τη μεταγεννητική ανάπτυξη. Οι διαταραχές αυτές επιφέρουν αλλοιώσεις στη φυσιολογική ωρίμανση των νευρώνων και στη μετανάστευση οδηγώντας τελικά σε μη φυσιολογική απόπτωση. Οι αλλοιώσεις σε αυτούς τους μηχανισμούς έχουν εμπλακεί σε ποικίλες νευροεκφυλιστικές και νευροψυχιατρικές διαταραχές όπως η σχιζοφρένεια, ο αυτισμός και η επιληψία (**Luhmann et al., 2014**).

Πέρα από τις διαταραχές του εγκεφαλικού φλοιού κατά την ανάπτυξη, σημαντικές αλλαγές στη δομή του ανθρώπινου φλοιού, που συνδέονται με την εμφάνιση γνωστών ασθενειών, έχουν παρατηρηθεί με την αύξηση της ηλικίας (**Fjell et al., 2014**). Οι μεταβολές αυτές περιλαμβάνουν μείωση του μήκους των αξόνων και των δενδριτών και απώλεια των συνάψεων οδηγώντας σε διαταραχές της φυσιολογικής λειτουργίας των νευρώνων. Επιπλέον επηρεάζονται οι νευροδιαβιβαστές, η μορφολογία, η σηματοδότηση ή/και επέρχονται αλλαγές που σχετίζονται με τη νόσο Alzheimer (**Jellinger et al., 2013**). Πράγματι, ο εγκεφαλικός φλοιός πλήττεται μη αντιστρεπτά στα τελευταία, πιο βαριά στάδια αυτής της νόσου (**Braak et al., 1995; Serrano-Pozo et al., 2011**) όπως θα ειπωθεί και στη συνέχεια.

4. Η ασθένεια του Alzheimer (AD)

Η νόσος του Alzheimer (AD), αποτελεί την πιο συνηθισμένη μορφή άνοιας στον ανθρώπινο πληθυσμό, είναι μη ιάσιμη και πλήττει σημαντικά τόσο τους ασθενείς όσο και τις οικογένειες τους. Οι προσπάθειες για την ίαση της νόσου αλλά και η φροντίδα των ασθενών επιβαρύνονται ισχυρά από την έλλειψη έγκυρων μέσων διάγνωσης και πρόληψης καθώς και από την άγνοια της παθογένειας της νόσου (Selkoe et al., 2016). Σήμερα, γίνονται σημαντικές προσπάθειες για την κατανόηση της μοριακής αιτιολογίας του AD που αποτελεί τη βάση για την ανάπτυξη βελτιωμένων διαγνωστικών και θεραπευτικών προσεγγίσεων (Wang et al., 2017).

4.1 Παθοφυσιολογία και Ορόσημα του Alzheimer

Το 1907 ο Γερμανός νευρολόγος Alois Alzheimer περιέγραψε τη νόσο «Dementia Praecox» που έκτοτε είναι γνωστή ως η νόσος του Alzheimer (Alzheimer, 1907). Πρόκειται για μια προοδευτική, σοβαρή νευροεκφυλιστική διαταραχή με συνέπειες τόσο στη λειτουργικότητα του εγκεφαλικού φλοιού όσο και του ιππόκαμπου (Masters et al., 2018). Τα δύο ορόσημα που χαρακτηρίζουν την ασθένεια είναι οι αμυλοειδείς πλάκες και τα νευροϊνιδιακά πλέγματα (NFTs) (Choi et al., 2016). Οι ασθενείς διακρίνονται σε δύο κατηγορίες με βάση την έναρξη της νόσου. Έτσι, υπάρχει το κληρονομικό AD (family AD, fAD) που εκδηλώνεται σε νεαρή ηλικία και το σποραδικό AD (sporadic AD, sAD) που εμφανίζεται κυρίως σε ηλικιωμένους πληθυσμούς (Rodriguez et al., 2011).

Το κληρονομικό AD οφείλεται σε πλήρως διεισδυτικές μεταλλάξεις σε τρία γονίδια. Το APP που κωδικοποιεί την πρόδρομη μορφή της αμυλοειδούς πρωτεΐνης και τα PSEN1 και PSEN2 που κωδικοποιούν τις presenilin 1 και presenilin 2 αντίστοιχα. Η κληρονομικότητα είναι αυτοσωμική επικρατής, εκδηλώνεται σε ασθενείς κάτω των 60 ετών και αποτελεί τη μειοψηφία των περιπτώσεων της νόσου (Tong et al., 2017). Το APP εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 21q21 (Karch et al., 2014) ενώ τα PSEN1 και PSEN2 στα χρωμοσώματα 14q24 και 1q42 και οι πρωτεΐνες τους συνιστούν το σύμπλοκο της γ -secretase. Το ένζυμο αυτό είναι μία πρωτεάση που διασπά την πρόδρομη μορφή της APP (Tong et al., 2017), οδηγώντας στο σχηματισμό των τοξικών ολιγομερών A β 40 και A β 42 (Yagi et al., 2011). Επιπλέον, ένας σημαντικός γενετικός δείκτης που σχετίζεται με το κληρονομικό AD είναι το αλληλόμορφο APOE* ϵ 4 που κωδικοποιεί την απολιποπρωτεΐνη E ϵ 4. Η ύπαρξή του προδιαθέτει ισχυρά την εμφάνιση της νόσου με υψηλότερες πιθανότητες εκδήλωσης για τον ομόζυγο πληθυσμό (Villemagne et al., 2018).

Το σποραδικό AD δεν ακολουθεί μοτίβο κληρονομικότητας και οφείλεται σε συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων αλλά και στη γήρανση. Είναι η συνήθης μορφή της νόσου αποτελώντας το 95% των περιστατικών (**Tanzi et al., 2005**). Υπάρχουν πολλές θεωρίες που προσπαθούν να εξηγήσουν την παθοφυσιολογία του σποραδικού AD. Η περισσότερο αποδεκτή με τα σημερινά δεδομένα είναι η βήτα αμυλοειδής (Αβ) υπόθεση (**Karran et al., 2016**) σύμφωνα με την οποία η συσσώρευση των NFTs, η ακόλουθη απώλεια των συνάψεων και ο εκτεταμένος θάνατος των νευρικών κυττάρων ξεκινούν από την υψηλή συσσώρευση του τοξικού Αβ οδηγώντας προοδευτικά σε άνοια (**Choi et al., 2016; Duff et al., 1996**).

Η βήτα αμυλοειδής πρωτεΐνη (Αβ) είναι ένα ολιγομερές που προκύπτει από την πρωτεόλυση της πρόδρομης APP. Τα ένζυμα β- and γ-secretases καταλύουν διαδοχικά τη διάσπασή της (εικόνα 7). Η συσσώρευση των ολιγομερών οδηγεί στη δημιουργία των αμυλοειδών πλακών και στον προοδευτικό νευροεκφυλισμό που παρατηρείται σε όλους τους ασθενείς του AD (**Thinakaran et al., 2008**). Συγκεκριμένα, οι αμυλοειδείς πλάκες προκύπτουν όταν τα Αβ πεπτίδια ενώνονται σε ολιγομερή στον εξωκυττάριο χώρο εξαιτίας της πτυχωτής δομής β-φύλλου που τα χαρακτηρίζει (**Glennner et al., 1984**).

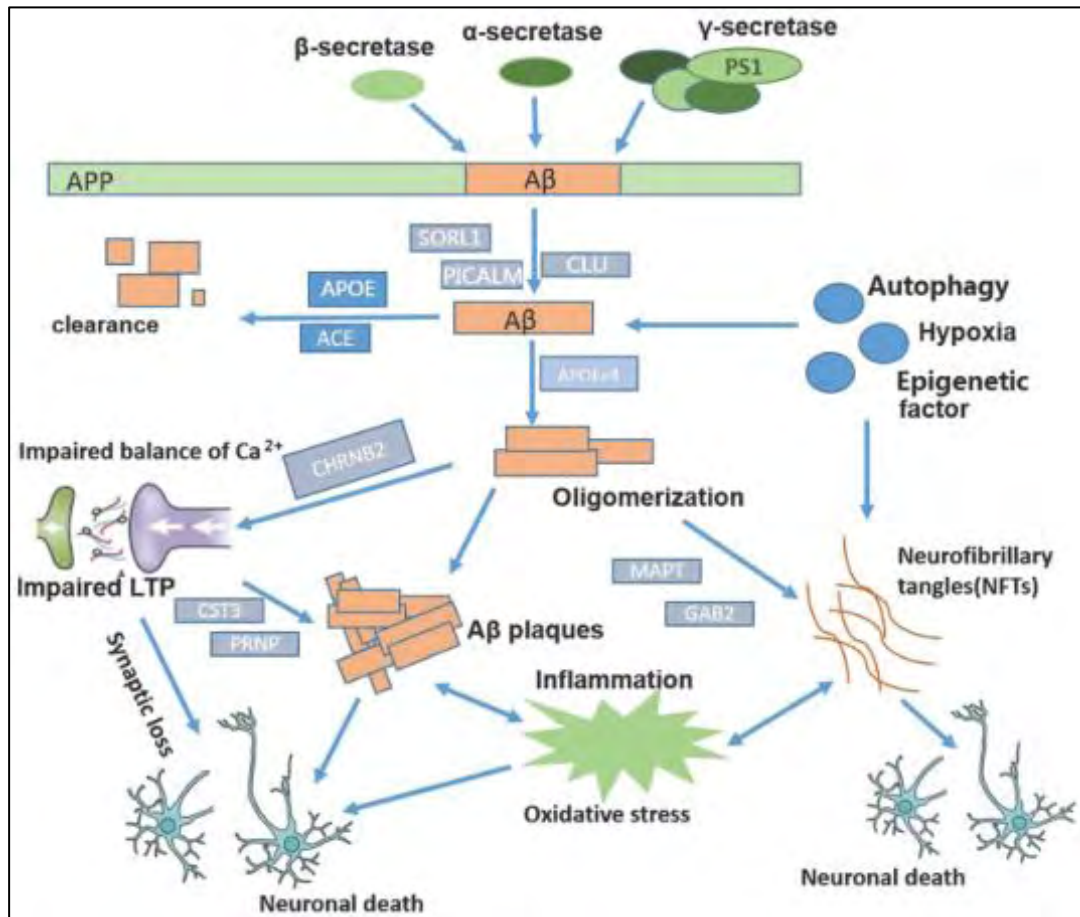
Το δεύτερο κύριο ορόσημο του AD είναι τα νευροϊνδιακά πλέγματα που προκύπτουν από την υπερφωσφορυλίωση της tau (p-tau) (**Grundke-Iqbal et al., 1986**). Μη φυσιολογικά, υψηλά επίπεδα της p-tau παρατηρούνται τόσο στο σώμα, όσο και στους δένδριτες των νευρώνων. Μία πιθανή εξήγηση της συσσώρευσης είναι η διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στις λειτουργίες κινασών και φωσφατασών που οδηγεί τελικά στην υπερφωσφορυλίωση (**Ballatore et al., 2007**). Σε αντίθεση με τις αμυλοειδείς πλάκες που συσσωρεύονται σε όλο τον εγκεφαλικό φλοιό, τα NFTs συναντώνται σε πιο επιλεκτικές περιοχές που πλήττονται από τη νόσο (**Arnold et al., 1991**).

Πολυάριθμες μελέτες τόσο in vitro όσο και in vivo έχουν ταυτοποιήσει την τοξική δράση του Αβ σε νευρικά κύτταρα. In vitro, η επώαση των νευρώνων με Αβ οδηγεί σε υψηλό οξειδωτικό στρες και σε απόπτωση (**Kim et al., 2014, Costantini et al., 2005**). Πράγματι, οξειδωτικό στρες επάγεται από τα πρώτα στάδια της νόσου γεγονός το οποίο δηλώνει μία άμεση σύνδεση με τη συσσώρευση του Αβ. Επιπλέον, in vitro, η επώαση διεγερτικών νευρώνων του εγκεφαλικού φλοιού με Αβ μεταβάλλει τη συγκέντρωση του Ca^{2+} και τη χημική σηματοδότηση του γλουταμινικού (glutamate) (**Mattson et al., 1992**).

Με τα σημερινά δεδομένα, δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία για το AD και όλες οι θεραπευτικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν την κλινική φροντίδα των ασθενών. Πολυάριθμες ιατρικές δοκιμές με αντιφλεγμονώδη, ορμονικές θεραπείες κι άλλα φάρμακα σε ασθενείς

απέτυχαν να δώσουν μόνιμη ίαση στη νόσο (Waite et al., 2015). Παρά τα πολυάριθμα υποψήφια φάρμακα, πλέον η προσοχή έχει επικεντρωθεί στη βελτίωση της διάγνωσης με την εύρεση γενετικών δεικτών και σε προ-κλινικές στρατηγικές για τη διάκριση των φαρμακολογικών ουσιών με τα μεγαλύτερα κλινικά οφέλη (Masters et al., 2018).

Yang J. et al., Mol Neurodegener. 2016



Εικόνα 7: Μοριακά μονοπάτια στην ασθένεια του Alzheimer που οδηγούν στο σχηματισμό αμυλοειδών πλακών και νευροϊνιδιακών πλεγμάτων.

4.2 Διαγονιδιακά ζωικά μοντέλα του Alzheimer

Το ποντίκι αποτελεί το πρώτο θηλαστικό στο οποίο η γονιδιακή στόχευση (knock in, knock out) έγινε εφικτή σε μεγάλη κλίμακα. Ειδικά τα διαγονιδιακά ποντίκια αποτελούν για τους ερευνητές απαραίτητο εργαλείο για τη μελέτη του ρόλου ενός γονιδίου. Ως οργανισμοί μοντέλα, τα ποντίκια είναι ιδιαίτερα χρήσιμα στην επιστημονική έρευνα καθώς είναι μικρόσωμα, αναπτύσσονται γρήγορα με σχετικά σύντομη διάρκεια ζωής και δίνουν μεγάλο αριθμό απογόνων. Παράλληλα, έχει πραγματοποιηθεί πλήρης αλληλούχιση και χαρτογράφηση του γονιδιώματός τους (Yagi et al., 2011; Hall et al., 2009).

Στη νόσο του Alzheimer, το ποντίκι χρησιμοποιείται ως μοντέλο σε πολυάριθμες ερευνητικές εργασίες και προ-κλινικές μελέτες. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: Τα Tg μοντέλα AD και τα μη-Tg μοντέλα AD. Τα Tg μοντέλα φέρουν μία ή και περισσότερες μεταλλαγές κυρίως στα γονίδια APP, PSEN1/2 και Tau. Τα μη-Tg μοντέλα είναι ποντίκια αγρίου τύπου στα οποία χορηγούνται εξωγενώς τοξικές ουσίες, συνήθως με ένεση, και στη συνέχεια μελετάται η απόκριση του ζώου (Puzzo et al., 2015).

Συγκεκριμένα, στα αγρίου τύπου ζώα, προκειμένου να μοντελοποιηθεί το Alzheimer in vivo, πραγματοποιείται άμεση έγχυση του Αβ ή/και των tau στον εγκέφαλο του ζώου με ένεση εντός του ιππόκαμπου ή ενδοεγκεφαλοκοιλιακά. Το σύστημα αυτό επιτρέπει τη μελέτη της επίδρασης του Αβ σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα σε σχέση με την κυτταροκαλλιέργεια (Balducci et al., 2014).

Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες γνώσεις σχετικά με την παθοφυσιολογία και την αιτιολογία της νόσου προέρχονται από διαγονιδιακά μοντέλα fAD (Israel et al., 2012). Η πλειοψηφία αυτών των AD μοντέλων είναι knock in για το ανθρώπινο APP ή το PSEN1 γονίδιο με αποτέλεσμα την υπερέκφραση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν. Μπορεί να φέρουν μία ή συνδυασμό μεταλλαγών fAD, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση πεπτιδίων Αβ, το σχηματισμό πλακών και άλλα ορόσημα της νόσου (Chin et al., 2011, Duff et al., 2001).

Τα αποτελέσματα των ερευνών στα διαγονιδιακά ποντίκια του AD φαίνεται να συμφωνούν με τη βήτα αμυλοειδή υπόθεση και έχουν βοηθήσει σημαντικά στην κατανόηση της νόσου. Ωστόσο, παρά τις γνώσεις που έχουν προσφέρει, τα σημερινά μοντέλα δεν μπορούν να αναπαράγουν επαρκώς την παθοφυσιολογία και τα ορόσημα που διέπουν τους ασθενείς σε κυτταρικό, βιοχημικό αλλά και συμπεριφορικό επίπεδο (Kokjohn et al., 2009).

Για παράδειγμα, το διαγονιδιακό μοντέλο 3xTg FAD προσομοιάζει σημαντικά τη νόσο καθώς φέρει μεταλλαγές στα γονίδια APP, PSEN1 και tau, οδηγώντας στη συσσώρευση αμυλοειδών πλακών αλλά και σε νευροϊνιδιακά πλέγματα (Oddo et al., 2003). Ωστόσο, η μία από αυτές

τις μεταλλαγές δε συναντάται ποτέ στο ανθρώπινο AD. Πρόκειται για το γονίδιο tau το οποίο είναι πάντα αγρίου τύπου στον άνθρωπο αλλά η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί γίνεται παθολογική κατά το AD, οδηγώντας τελικά σε νευροϊνιδιακά πλέγματα. Στο ενήλικο ποντίκι, τα NFTs δεν μπορούν να σχηματιστούν χωρίς την κατάλληλη γονιδιακή στόχευση καθώς φυσιολογικά εκφράζουν μόνο μία από τις έξι ισομορφές των πρωτεϊνών tau που υπάρχουν στον άνθρωπο (Ando et al., 2011, Choi et al., 2016).

Πράγματι, θεραπείες για το AD με θετικές ενδείξεις σε Tg και μη-Tg ποντίκια δεν είχαν το ίδιο αποτέλεσμα σε ανθρώπινες κλινικές μελέτες κυρίως εξαιτίας της αδυναμίας των ποντικών να προσομοιάσουν με μεγαλύτερη ακρίβεια τον ανθρώπινο AD φαινότυπο (De Strooper et al., 2014). Ωστόσο, παρά τους περιορισμούς τους, η έρευνα στα AD ποντίκια έχει συμβάλει καταλυτικά στην κατανόηση της μοριακής βάσης του AD. Για το λόγο αυτό θεωρούνται απαραίτητα τόσο για την έρευνα της παθοφυσιολογίας του AD όσο και για την προσπάθεια ανάπτυξης θεραπευτικών προσεγγίσεων (Puzzo et al., 2015).

4.3 Μοντέλα ιστού εγκεφαλικού φλοιού

Μία σημαντική ερευνητική προσπάθεια των τελευταίων είκοσι ετών είναι η *in vitro* δημιουργία διεγερτικών νευρώνων του εγκεφαλικού φλοιού από βλαστοκύτταρα (Hansen et al., 2011). Οι περισσότερες προσεγγίσεις περιλαμβάνουν εμβρυϊκά και επαγόμενα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (εικόνα 8). Ιδιαίτερα τα iPSCs δίνουν τη δυνατότητα εξατομικευμένης ανάπτυξης νευρικού ιστού των ασθενών (Anderson et al., 2014). Επιπλέον, χρησιμοποιούνται νευρικά βλαστοκύτταρα αλλά με τον περιορισμό ότι δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν σε όλους τους τύπους νευρώνων του φλοιού (Hansen et al., 2011).

Η τεχνολογία των iPSCs επιτρέπει τη διερεύνηση όλων των κυτταρικών τύπων από οποιονδήποτε ασθενή, όπως νευρώνες με σποραδικό ή κληρονομικό AD ή άλλες ασθένειες του νευρικού συστήματος (Yu et al., 2007). Η διαφοροποίηση ολοδύναμων βλαστοκυττάρων σε νευρικά μπορεί να πραγματοποιηθεί σε καλλιέργεια χωρίς μορφογόνα ή με την προσθήκη αναστολέων μορφογόνων. Αρχικά παράγονται πρόδρομα νευρικά κύτταρα που στη συνέχεια θα αποκτήσουν ραχιαίο ή κοιλιακό φαινότυπο (dorsal/ventral) (Ying et al., 2003, Gaspard et al., 2008, Eiraku et al., 2008). Συγκεκριμένα, η αναστολή της σηματοδότησης του μορφογόνου Sonic Hedgehog έχει δείχθει να επάγει τη διαφοροποίηση ESCs/iPSCs σε πυραμιδικούς νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού (Gaspard et al., 2008, Eiraku et al., 2008). Η πρώτη ερευνητική εργασία διαφοροποίησης εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων ποντικού σε νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού πραγματοποιήθηκε από τους Gaspard et al. με τη χρήση

μόνο ενός μικρού μορίου-αναστολέα του Sonic Hedgehog. Οι ερευνητές κατάφεραν να αναπαράγουν *in vitro* τη διαδοχική εμφάνιση των διαφόρων τύπων νευρώνων του φλοιού ενώ απέδειξαν ότι η χωρική τους οργάνωση είναι εγγενές χαρακτηριστικό και δεν εξαρτάται από τον συνολικό εγκέφαλο (**Gaspard et al., 2008**). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από άλλες ερευνητικές ομάδες διαφοροποιώντας ESCs και iPSCs ποντικού και ανθρώπου. Σε όλες τις μελέτες η διαφοροποίηση προσομοιάζει χρονικά την αναπτυξιακή διαμόρφωση των νευρώνων του φλοιού οι οποίοι ταυτοποιούνται από την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που αντιστοιχούν σε όλες τις στιβάδες του φλοιού (**Shi et al., 2012; Espuny-Camacho et al., 2013, Eiraku et al., 2008**). Μία άλλη ενδιαφέρουσα προσέγγιση διαφοροποίησης σε νευρώνες του φλοιού παρουσιάζουν οι Eiraku et al. με τη δημιουργία τρισδιάστατων embryonic bodies. Πρόκειται για μία τεχνική όπου τα βλαστοκύτταρα αυτό-οργανώνονται αυθόρμητα σε σφαίρες (καλλιέργεια SFEBq) στο αιώρημα της καλλιέργειας και διαφοροποιούνται με τη σωστή χωρική και χρονική διαδοχή που συμβαίνει κατά την ανάπτυξη. Με τον τρόπο αυτό, οι νεότεροι νευρώνες βρίσκονται στο εξωτερικό των σφαιρών όπως συμβαίνει και στις στιβάδες του φλοιού (**Eiraku et al., 2008**).

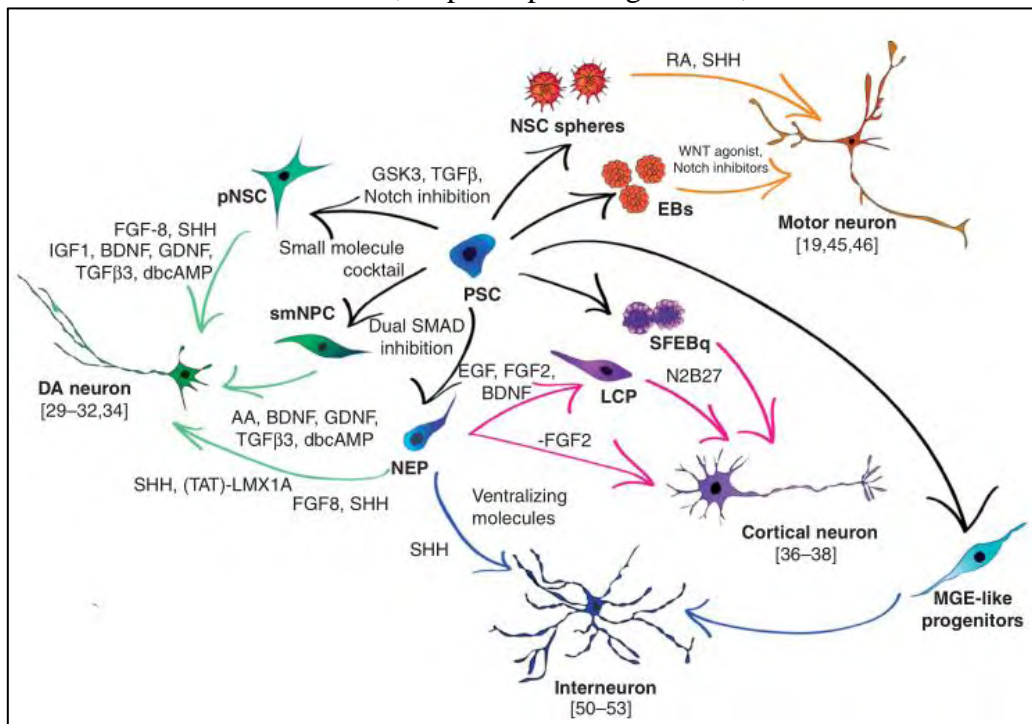
Ωστόσο, παρά την καινοτομία των παραπάνω εργασιών, η εφαρμογή τους στη βιοϊατρική έρευνα όπως το high throughput screening (HTS) αντιμετωπίζει ζητήματα όπως η ανομοιογένεια στους πληθυσμούς των νευρικών και νευρογλοιακών κυττάρων αλλά και ο υψηλός χρόνος διαφοροποίησης που απαιτείται, ιδιαίτερα στην περίπτωση των ανθρώπινων νευρώνων (**Corti et al. 2015**). Τόσο τα ESCs/iPSCs του ποντικού όσο και του ανθρώπου μπορούν να διαφοροποιηθούν σε νευρώνες με τρόπο που μιμείται την ανάπτυξη, ωστόσο διαφέρουν σημαντικά ως προς το χρονικό διάστημα που απαιτείται για τη γένεση και ωρίμανσή τους. Αρκετά μεγαλύτερο χρονικό διάστημα απαιτείται για τα ανθρώπινα κύτταρα, όπως συμβαίνει και *in vivo* (**Corti et al. 2015**). Συγκεκριμένα, οι Cao et al. Διαφοροποίησαν με επιτυχία ανθρώπινα iPSCs σε διεγερτικούς νευρώνες του φλοιού σύμφωνα με τους Gaspard et al. Ωστόσο, έδειξαν ότι ενώ η δημιουργία και ωρίμανση των νευρώνων από ESCs ποντικού απαιτεί 21-28 μέρες για να ολοκληρωθεί, χρειάζονται 60-100 μέρες στην περίπτωση των ανθρώπινων κυττάρων, περισσότερο από το διπλάσιο χρονικό διάστημα (**Cao et al., 2017**).

Οι Boissart et al. παρέχουν λύση στο πρόβλημα του χρονικού διαστήματος. Στη δημοσίευσή τους παρουσιάζουν ένα καινοτόμο πρωτόκολλο με το οποίο ανθρώπινα ESCs/iPSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν σε νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού σε διάστημα μόλις 30 ημερών. Συγκεκριμένα, η μελέτη περιλαμβάνει τη δημιουργία μίας ομάδας πρόδρομων νευρικών κυττάρων που οι ερευνητές ονόμασαν LCPs (Late Cortical Progenitors) και έχουν την ικανότητα πολλών κυτταρικών διαιρέσεων. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να διαφοροποιηθούν

περαιτέρω σε ώριμους διεγερτικούς νευρώνες του φλοιού. Εντυπωσιακή είναι η κυρίαρχη παρουσία νευρώνων των ανώτερων στιβάδων. Παράλληλα, οι ερευνητές πραγματοποίησαν έλεγχο φαρμακολογικών ουσιών σε μεγάλη κλίμακα με HTS αποδεικνύοντας το πλεονέκτημα του πρωτοκόλλου τους για φαρμακολογικές μελέτες (Boissart et al., 2013).

Οι ερευνητικές προσπάθειες που αναφέρθηκαν συμβάλλουν καταλυτικά στη μελέτη της μοριακής βάσης σοβαρών διαταραχών του εγκεφάλου, όπως η νόσος του Alzheimer. Τα νέα δεδομένα και οι εξελίξεις της νευρογενετικής και της αναπτυξιακής νευροβιολογίας αναμένεται να βελτιώσουν τις μεθόδους διαφοροποίησης οδηγώντας στη δημιουργία μοντέλων που αναπαριστούν επακριβώς την ανθρώπινη ανάπτυξη αλλά και την παθοφυσιολογία ασθενειών.

Corti S. et al., Expert Opin Drug Discov, 2015



Εικόνα 8: In vitro μηχανισμοί διαφοροποίησης ESCs/iPSCs σε νευρώνες. Οι στρατηγικές για τη γένεση διεγερτικών νευρώνων του εγκεφαλικού φλοιού περιλαμβάνουν τη διαφοροποίηση ESCs/iPSCs σε νευροεπιθηλιακά κύτταρα (NEPs), 3D σφαίρες (SFEBq) ή Late Cortical Progenitors (LCPs) και την ωρίμανση σε μεταμιτωτικούς νευρώνες του φλοιού.

4.3.1 In vitro ανθρώπινα μοντέλα του Alzheimer

Η ικανότητα διαφοροποίησης σωματικών κυττάρων σε επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iPSCs) και η διαφοροποίησή τους σε νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού έχει επιτρέψει τα τελευταία χρόνια τη δημιουργία πολλών in vitro μοντέλων ασθενειών, όπως η νόσος του Alzheimer. Τα μοντέλα ασθενειών έχουν ήδη συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας νευροεκφυλιστικών νόσων του ανθρώπου ενώ ανοίγουν προοπτικές για το σχεδιασμό εξατομικευμένων θεραπειών (Ovchinnikov et al., 2014).

Τα in vitro μοντέλα του Alzheimer περιλαμβάνουν κυρίως τη διαφοροποίηση iPSCs ασθενών σε διεγερτικούς νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού. Για τη διαφοροποίηση αξιοποιούνται η τεχνολογία των 3D σφαιρών (SFEBq) και τα πρωτόκολλα που βασίζονται σε μόρια-αναστολείς (Yagi T. et al., 2011; Israel et al., 2012, Yahata et al., 2011). Τα μοντέλα αυτά, μετά από πολλές ημέρες διαφοροποίησης, τυπικά αποτελούνται από διακριτούς νευρωνικούς και νευρογλοιακούς πληθυσμούς, πρόδρομων και ώριμων κυττάρων. Τα iPSCs συνήθως προέρχονται από fAD ασθενείς που φέρουν σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια APP, PSEN1 και PSEN2 (Tong et al., 2017).

Η πρώτη έρευνα που χρησιμοποίησε iPSCs ασθενών για τη δημιουργία μοντέλου του AD, πραγματοποιήθηκε από τους Yagi et al. Οι ασθενείς είχαν κληρονομικό AD με μεταλλάξεις στα γονίδια PSEN1 και PSEN2. Στο μοντέλο τους, οι ερευνητές κατάφεραν να αναπαράγουν υψηλά ποσοστά του ολιγομερούς Aβ42 στους διαφοροποιημένους νευρώνες (Yagi et al., 2011). Αργότερα, η διαφοροποίηση iPSCs αλλά και νευρικών βλαστοκυττάρων για τη δημιουργία in vitro μοντέλων του AD πραγματοποιήθηκε με επιτυχία από πολλούς ερευνητές (Kondo et al., 2013; Yagi T. et al., 2013; Israel et al., 2012; Liao et al., 2016; Choi et al., 2014). Συνήθως τα μοντέλα αποτελούνται από νευρώνες fAD και παρουσιάζουν υψηλότερη αναλογία των ολιγομερών Aβ42/Aβ40 σε σύγκριση με τους υγιείς νευρώνες (Muratore et al., 2014; Sproul et al., 2014). Οι fAD νευρώνες επιλέγονται περισσότερο διότι φαίνεται να συσσωρεύουν περισσότερο Aβ οδηγώντας σε μεγαλύτερη τοξικότητα σε σχέση με νευρώνες από sAD ασθενείς (Moore et al., 2015). Το ενδιαφέρον αυτό γεγονός περιπλέκει αρκετά την κατανόηση της νόσου.

Πράγματι, μοντέλα με νευρώνες από διαφοροποιημένα sAD iPSCs παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια ως προς την τοξικότητα και σε λίγες σχετικά περιπτώσεις παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα Aβ σε σχέση με δείγματα αναφοράς (control) (Yagi et al., 2011; Israel et al., 2012).

Σε μία ιδιαίτερα καινοτόμο, πρόσφατη μελέτη, οι Paquet et al. αξιοποίησαν την τεχνολογία CRISPR/Cas9 για τη δημιουργία μοντέλου του AD. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν αγρίου τύπου iPSCs στα οποία εισήγαγαν μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9 διαφορετικές fAD μεταλλάξεις στα γονίδια APP και PSEN1. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν αυξημένα ποσοστά των τοξικών ολιγομερών, συγκρίσιμα με τα επίπεδα νευρώνων από fAD ασθενείς. Επομένως, συμπέραναν ότι η πρόκληση fAD μεταλλάξεων σε αγρίου τύπου κύτταρα είναι επαρκής για τη δημιουργία AD φαινοτύπου (Paquet et al., 2016).

Η επιτυχία των AD μοντέλων από iPSCs να αναπαράγουν τα βασικά ορόσημα της νόσου αλλά και εξατομικευμένα χαρακτηριστικά ασθενών δίνει τη δυνατότητα ανάπτυξης νέων φαρμακευτικών ουσιών και τον έλεγχο της δράσης τους μέσω high throughput screening. Με την προσέγγιση αυτή, γίνεται δυνατή η άμεση διαλογή νέων χημικών μορίων με δράση ενάντια στην τοξικότητα του Αβ, στις φωσφορυλιωμένες tau ή με άλλες νευροπροστατευτικές και νευροαναγεννητικές ιδιότητες (Tong et al., 2017).

Ωστόσο, τα in vitro μοντέλα του AD έχουν σημαντικούς περιορισμούς. Παρά την υψηλή συσσώρευση των τοξικών Αβ ολιγομερών, σε κανένα μοντέλο δεν έχει παρατηρηθεί σχηματισμός αμυλοειδών πλακών αλλά ούτε και νευροϊνιδιακά πλέγματα. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι το in vitro δυσδιάστατο σύστημα καλλιέργειας και διαφοροποίησης των νευρώνων απέχει σημαντικά από τις in vivo συνθήκες στον ποντικό και τον άνθρωπο που ευνοούν την υψηλή συσσώρευση του Αβ και την εκδήλωση των επακόλουθων χαρακτηριστικών της νόσου (Yang et al., 2016). Πράγματι, σε μία τυπική κυτταροκαλλιέργεια οι τεχνικοί χειρισμοί, όπως οι συχνές αλλαγές των θρεπτικών μέσων, ενδέχεται να απομακρύνουν το συσσωρευόμενο Αβ εμποδίζοντας το σχηματισμό πλακών ενώ η τοξικότητα μπορεί να περιορίζεται εξαιτίας της χωρικής κατανομής των κυττάρων σε ένα μόνο επίπεδο (Choi et al., 2016).

Αναντίρρητα, η καινούρια τεχνολογία των iPSC μοντέλων, παρά τους προβληματισμούς και τις προκλήσεις, αναμένεται να συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση τόσο των μηχανισμών όσο και της ετερογένειας του Alzheimer και τελικά, στην προαγωγή εξατομικευμένης θεραπείας βασισμένη στη γενετική ταυτότητα και τις ιδιαιτερότητες του κάθε ασθενή.

4.3.2 In vitro 3D μοντέλα του Alzheimer

Τα τελευταία χρόνια, η δημιουργία in vitro μοντέλων ασθενειών από βλαστικά κύτταρα και η ανάπτυξη των σύνθετων και φυσικών βιοϋλικών έδωσαν τις βάσεις για τη δημιουργία 3D in vitro μοντέλων νευρικού ιστού (Jorfi et al., 2018). Η εξέλιξη αυτής της πολλά υποσχόμενης τεχνολογίας ευνοείται από το συνδυασμό εργαλείων βιολογίας και μηχανικής των υλικών όπως η γενετική τροποποίηση, οι σύγχρονες μέθοδοι απεικόνισης, τα βιοϋλικά και πρόσφατα τα microfluidics (Jackson et al., 2016). Τα 3D μοντέλα νευροεκφυλιστικών νόσων φαίνεται να αναπαριστούν με μεγαλύτερη ακρίβεια τις in vivo συνθήκες (εικόνα 9) ενώ πολλές έρευνες έχουν ήδη αποδείξει την διαφορική οργάνωση και ωρίμανση των νευρώνων αλλά και την ανάπτυξη 3D λειτουργικών νευρωνικών δικτύων (Liedmann et al., 2012; Tang Schomer et al., 2014).

Οι προσπάθειες για την ανάπτυξη 3D μοντέλων του Alzheimer ξεκίνησαν την τελευταία πενταετία και περιλαμβάνουν τη διαφοροποίηση ολοδύναμων (ESCs/iPSCs) ή και πολυδύναμων νευρικών βλαστοκυττάρων σε διάφορες συνθήκες 3D καλλιέργειας.

Σε μία εντυπωσιακή ερευνητική προσπάθεια ανάπτυξης 3D μοντέλου του AD, οι Choi S. H. et al. κατάφεραν να αναπαραστήσουν βασικά ορόσημα της νόσου καλλιεργώντας fAD ανθρώπινους νευρώνες σε Matrigel. Πράγματι, στην εργασία τους επισημαίνεται για πρώτη φορά in vitro, η συσσώρευση αμυλοειδών πλακών αλλά και η δημιουργία νευροϊνιδιακών πλεγμάτων (Choi et al., 2014). Ωστόσο, το μοντέλο αυτό προκύπτει από τη διαφοροποίηση μίας κυτταρικής σειράς fAD νευρικών βλαστικών κυττάρων και όχι από iPSCs σε νευρώνες ασθενών, όπως συμβαίνει σε άλλες μελέτες.

Παράλληλα, οι Zhang et al. δημιούργησαν μοντέλο AD σε hydrogel (PuraMatrix) διαφοροποιώντας iPSCs αγρίου τύπου και επωάζοντας τους ώριμους νευρώνες με το τοξικό ολιγομερές Aβ42. Οι ερευνητές παρατήρησαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στο 3D μοντέλο και στο 2D control, με κυριότερες τη μείωση παραγόντων που σχετίζονται με την επιβίωση και τη σηματοδότηση των νευρώνων. Η εξήγηση είναι ότι η συσσώρευση του Αβ ευνοείται στο 3D σύστημα επιφέροντας κυτταρικές αποκρίσεις πιο κοντά στο in vivo περιβάλλον (Zhang et al., 2014). Ανάλογο συμπέρασμα παρουσιάζουν οι Choi Y. J. et al. με τη διαφορά ότι στο μοντέλο τους δημιούργησαν νευρικές σφαίρες από primary νευρικά βλαστοκύτταρα ποντικών, τις οποίες επώασαν με το ολιγομερές Αβ42 (Choi et al., 2013).

Σε μία πιο πρόσφατη εργασία, οι Raja et al. διαφοροποίησαν iPSCs από fAD ασθενείς αξιοποιώντας τη μέθοδο SFEBq για τη δημιουργία νευρικών σφαιρών σε Matrigel. Έπειτα από δύο μήνες ωρίμανσης των νευρώνων στο 3D περιβάλλον, οι ερευνητές παρατήρησαν τη

δημιουργία αμυλοειδών πλακών ενώ μετά από τρεις μήνες ήταν εμφανή και αυξημένα επίπεδα της p-tau (**Raja et al., 2016**).

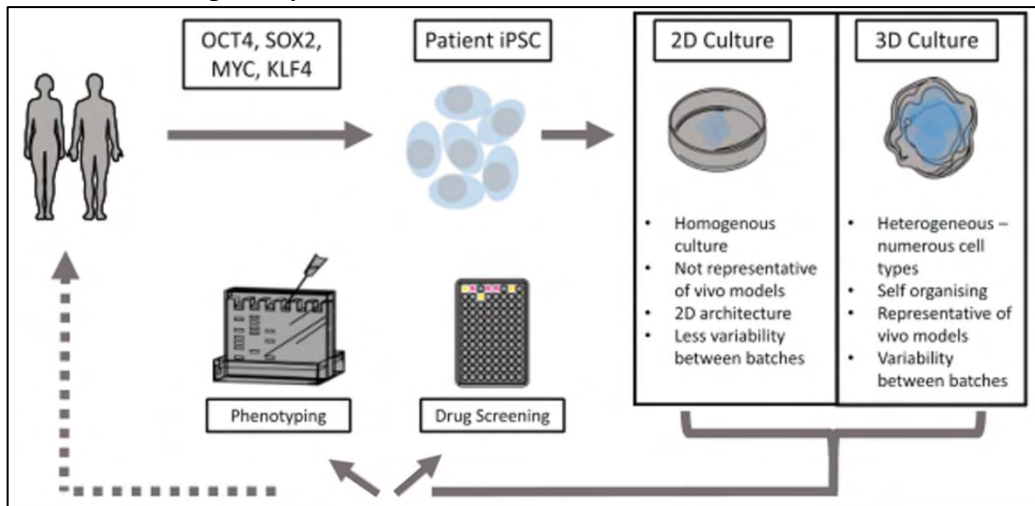
Παρόλο που τα περισσότερα μοντέλα αξιοποιούν κύτταρα από fAD ασθενείς, οι Lee et al. παρουσιάζουν ένα 3D μοντέλο διαφοροποιώντας iPSCs με σποραδικό AD, σε νευρικές σφαίρες. Έπειτα από τρεις μήνες καλλιέργειας, οι ερευνητές παρατήρησαν υψηλότερη συσσώρευση Αβ σε σχέση με το 2D control γεγονός το οποίο σπάνια παρατηρήθηκε σε 2D sAD καλλιέργειες. Επιδρώνοντας τους νευρώνες με αναστολείς των ενζύμων β και γ secretases έδειξαν σημαντικότερη μείωση της τοξικότητας στο 3D περιβάλλον με τις ίδιες συγκεντρώσεις αναστολέων, γεγονός το οποίο τονίζει το πλεονέκτημα των μοντέλων αυτών για φαρμακολογικές δοκιμές (**Lee et al., 2016**).

Γίνεται εμφανές ότι τα 3D μοντέλα αναπαριστούν πιο αποτελεσματικά τον AD φαινότυπο πιθανά διότι επιτρέπουν τη συσσώρευση του αμυλοειδούς πεπτιδίου το οποίο εγκλωβίζεται στο 3D περιβάλλον και δεν μπορεί να απομακρυνθεί εξαιτίας τεχνικών χειρισμών (**D'Avanzo et al., 2015**). Ωστόσο, παρά την επιτυχία των μοντέλων αυτών, η δημιουργία de novo νευροϊνιδιακών πλεγμάτων χωρίς τη στοχευμένη μεταλλαγή γονιδίων δεν έχει ακόμη παρατηρηθεί in vitro (**Arber et al., 2017**).

Μία πολλά υποσχόμενη εφαρμογή των παραπάνω μοντέλων είναι η ανάπτυξη και ο έλεγχος νέων φαρμακολογικών ουσιών σε ένα εξατομικευμένο 3D περιβάλλον για κάθε ασθενή που αναπαράγει όλα τα βασικά ορόσημα της νόσου (**Choi et al., 2016**). Ειδικά ο συνδυασμός των 3D ανθρώπινων μοντέλων με τις αποκρίσεις που παρατηρούνται σε ποντικούς του AD, αναμένεται να βελτιώσει σημαντικά τη διαλογή των νέων ουσιών που θα χρησιμοποιηθούν σε κλινικές μελέτες (**D'Avanzo et al., 2015**). Φυσικά, ακόμη τίθενται ζητήματα όπως η μεγάλη ετερογένεια των κυτταρικών πληθυσμών που προκύπτουν τόσο στο 2D όσο και στο 3D περιβάλλον, αλλά και ο σωστός χρόνος της ωρίμανσης των νευρώνων.

Συμπερασματικά, τα μοντέλα του AD από βλαστοκύτταρα αναμένεται να βοηθήσουν σημαντικά στη διερεύνηση της μοριακής βάσης του AD, ενώ τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα των ερευνών που αναφέρθηκαν δίνουν ελπίδες για την εύρεση ουσιαστικών, εξατομικευμένων στρατηγικών στην καταπολέμηση της νόσου του Alzheimer (**Arber et al., 2017**).

Adapted by Arber C. et al., Alzheimers Res Ther, 2017



Εικόνα 9: Τα στάδια της ανάπτυξης 2D και 3D ασθενειών *in vitro*. Δημιουργία iPSCs από ασθενείς. Διαφοροποίηση των iPSCs σε νευρικά κύτταρα. Επιλογή ανάμεσα σε 2D και 3D περιβάλλον. Αντιμετώπιση ζητημάτων. Εφαρμογές: Διερεύνηση μοριακής αιτιολογίας της νόσου, ανάπτυξη και δοκιμή καινοτόμων φαρμάκων για κλινικές μελέτες.

5. Ανάπτυξη φαρμακολογικών ουσιών

Η νόσος του Alzheimer (AD) είναι μία σοβαρή νευροεκφυλιστική διαταραχή που πλήττει σημαντικά ποσοστά του ανθρώπινου πληθυσμού. Σε ηλικίες από 65 έτη, κυμαίνεται σε ποσοστό 4,4% ενώ για ηλικίες άνω των 90 ετών, προσεγγίζει το 22% του συνολικού πληθυσμού (Bettens et al., 2010). Παρόλο που σήμερα η νόσος είναι μη ιάσιμη, οι αυξανόμενες γνώσεις σχετικά με την παθοφυσιολογία του AD έχουν επιτρέψει την ανάπτυξη χημικών ουσιών με σημαντική προοπτική για την ίαση της ασθένειας (Misra et al., 2013). Οι υπάρχουσες θεραπείες βασίζονται κυρίως στην ενεργοποίηση γλουταμινεργικών και χολινεργικών συνάψεων που επηρεάζονται σημαντικά στα διάφορα στάδια της νόσου, ωστόσο αμφισβητούνται οι νευροπροστατευτικές τους ιδιότητες και δεν αποτελούν μόνιμη λύση (Wang et al., 2009; Atri et al., 2008). Συγκεκριμένα, τα διαθέσιμα φάρμακα σήμερα περιλαμβάνουν τη μεμαντίνη (memantine), ένα μόριο-ρυθμιστή του υποδοχέα N-μεθυλο D-του ασπαρτικού οξέος (NMDA) και μόρια-αναστολείς της εστεράσης της ακετυλοχολίνης που όμως βελτιώνουν μόνο μερικώς τα συμπτώματα της νόσου (Bettens et al., 2010). Επιπλέον, πολυάριθμα φάρμακα όπως το tarenflurbil και το tramiprosate παρά την επιτυχημένη δράση τους σε ζώα-μοντέλα του AD, κλινικά έχουν αποτύχει να βελτιώσουν τη γνωστική ικανότητα των ασθενών (Rinne et al., 2010).

Ωστόσο, παρά την έλλειψη μιας συγκεκριμένης θεραπευτικής προσέγγισης, καινοτόμες φαρμακολογικές ενώσεις βρίσκονται σήμερα υπό διερεύνηση, με επίδραση σε όλο το φάσμα των συμπτωμάτων του AD. Για το λόγο αυτό, αναμένεται ότι τα επόμενα χρόνια θα ταυτοποιηθούν κλινικά και θα γίνουν διαθέσιμες αποτελεσματικές φαρμακολογικές επιλογές, συνδυασμός των οποίων θα δώσει λύση στις βαρύτερες συνέπειες του AD (Misra et al., 2013).

5.1 Νευροτροφίνες και ο ρόλος τους στην επιβίωση των νευρώνων

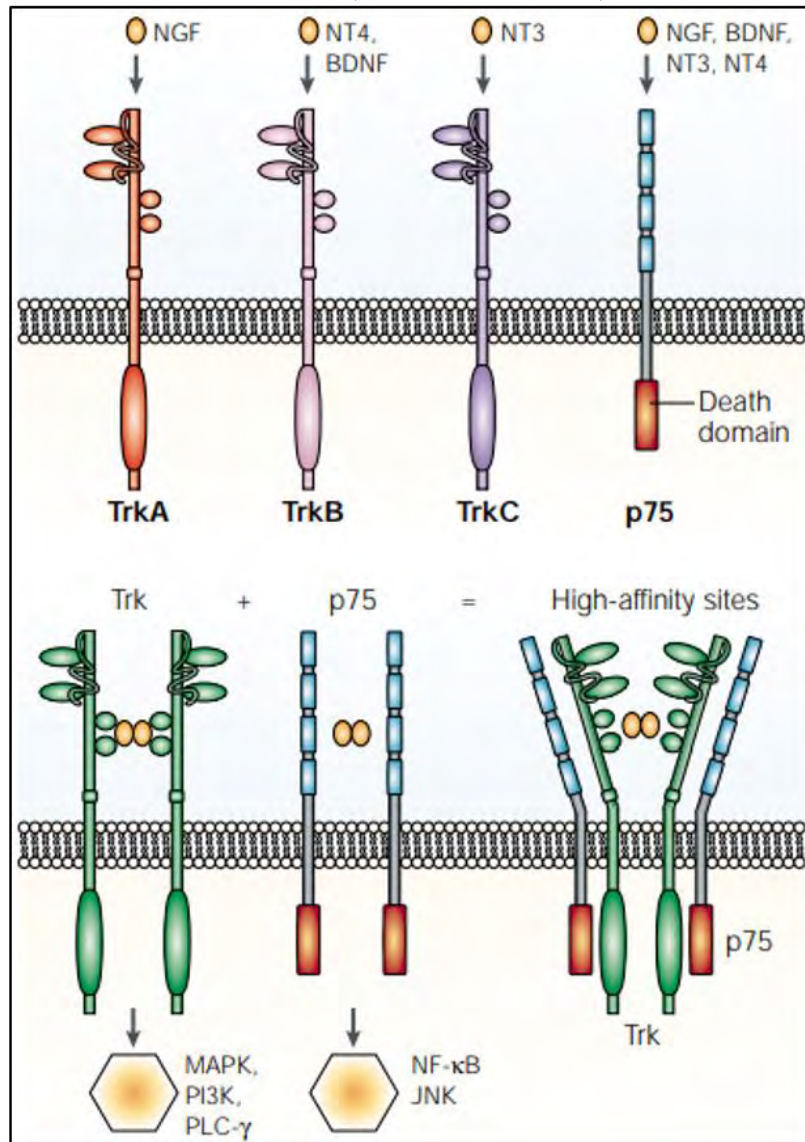
Οι νευροτροφίνες (NTs) είναι καλά χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος με σημαντικούς ρόλους στη συναπτογένεση και τη διαφοροποίηση των νευρώνων κατά την ανάπτυξη (Travaglia et al., 2012). Στα ενήλικα θηλαστικά, οι νευροτροφίνες επηρεάζουν καταλυτικά την επιβίωση των νευρώνων και τη συναπτική πλαστικότητα (Huang et al., 2001). Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί 4 διακριτές νευροτροφίνες και η δράση τους έχει διερευνηθεί διεξοδικά. Πρόκειται για τα μόρια Nerve Growth Factor (NGF), Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Νευροτροφίνη 3 (NT3) και Νευροτροφίνη 4 (NT4). Οι παράγοντες αυτοί δεσμεύουν και ενεργοποιούν δύο κατηγορίες

διαμεμβρανικών υποδοχέων που συναντώνται στα νευρικά κύτταρα. Πρόκειται για την οικογένεια των Trk υποδοχέων κινάσης-τυροσίνης και τον p75^{NTR} υποδοχέα. Η οικογένεια Trk συνίσταται από υποδοχείς που απαντώνται σε διαφορετικά είδη νευρικών κυττάρων, τους TrkA, TrkB και TrkC (Huang et al., 2003). Κάθε νευροτροφίνη έχει επιλεκτικότητα για έναν συγκεκριμένο Trk υποδοχέα. Αντιθέτως, ο p75^{NTR}, συνδέεται με όλες τις νευροτροφίνες αλλά με μικρότερη συγγένεια (Chao et al., 2006). Ο TrkA δεσμεύει επιλεκτικά τον NGF, ο TrkB τους BDNF και NT4 ενώ ο TrkC είναι ειδικός για τον NT3 (Εικόνα 10) (Barbacid et al., 1995).

Η πρόσδεση των νευροτροφινών στους Trk υποδοχείς ενεργοποιεί τρία σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγουν κυτταρική επιβίωση. Πρόκειται για το PI3K–AKT σηματοδοτικό μονοπάτι, το ρυθμιζόμενο από εξωκυτταρικά σήματα MAPK-ERK και το μονοπάτι της φωσφολιπάσης Cγ1 (PLCγ1)–PKC (Reichardt et al., 2006). Αντιθέτως, ο p75^{NTR} φαίνεται να έχει διττό ρόλο στην επιβίωση των νευρώνων που εξαρτάται από τη διαφορική παρουσία των Trk υποδοχέων αλλά και από την γλυκοπρωτεΐνη sortilin. Έτσι, ο p75^{NTR} ρυθμίζει ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια επάγοντας κυτταρική επιβίωση αλλά και κυτταρικό θάνατο (Longo et al., 2013). Συνοπτικά, ο p75^{NTR} ρυθμίζει τα μονοπάτια JUN N-terminal kinase (JNK), mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Volenté et al., 1993), τον πυρηνικό παράγοντα-κΒ (NF-κΒ) (Carter et al., 1996), την κυκλική AMP κινάση Α (PKA) (Sachs et al., 2007) αλλά και τον παράγοντα απόκρισης σε υποξία HIF (Le Moan et al., 2011).

Η σύνθεση των νευροτροφινών ξεκινάει με την παραγωγή πρόδρομων μορίων, τις προ-νευροτροφίνες. Τα μόρια αυτά μετατρέπονται στις ώριμες μορφές τους από ειδικά ένζυμα όπως η πλασμίνη και μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) (Angelucci et al., 2014). Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι οι προ-νευροτροφίνες, όπως οι προ-NGF και pro-BDNF, επάγουν σημαντικές κυτταρικές αποκρίσεις. Πράγματι, έχουν υψηλή συγγένεια για τον p75^{NTR} μέσω του οποίου ενεργοποιούν μονοπάτια κυτταρικού θανάτου σε νευρώνες με μειωμένα επίπεδα Trk υποδοχέων (Beattie et al., 2002).

Οι νευροπροστατευτικές και νευροαναγεννητικές ιδιότητες των νευροτροφινών έχουν διερευνηθεί σε πολυάριθμα μοντέλα ασθενειών τόσο in vitro όσο και in vivo. Στα συστήματα αυτά, η ικανότητά τους να αποτρέπουν το νευροεκφυλισμό και να επάγουν νευρογένεση έχει οδηγήσει στην ιδέα της ανάπτυξης πρωτογενών ή συμπληρωματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων που αξιοποιούν τις ιδιότητες των νευροτροφινών έναντι διαφόρων νευροεκφυλιστικών νοσημάτων (Chao et al., 2006).



Εικόνα 10: Πρόσδεση των νευροτροφινών στους υποδοχείς τους.

5.2 Υποδοχείς των νευροτροφινών και σηματοδότηση στο Alzheimer

Κύριο ορόσημο της νόσου του Alzheimer είναι η απώλεια νευρικών κυττάρων σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου. Συνεπώς, οι θεραπευτικοί στόχοι περιλαμβάνουν την πρόληψη της νόσου μέσω της προστασίας των νευρικών κυττάρων αλλά και την βελτίωση των συνεπειών με τη γένεση νέων νευρώνων στις εκφυλισμένες περιοχές. Όπως αναφέρθηκε, οι νευροτροφίνες, όπως οι NGF και BDNF, επάγουν μονοπάτια επιβίωσης στους νευρώνες και έχουν νευροπροστατευτική δράση. Για το λόγο αυτό, εξετάζονται σήμερα ως σημαντική θεραπευτική προσέγγιση για το AD (Akagi et al., 2015).

Παράλληλα, σε ασθενείς με AD, εντοπίζονται σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα του NGF, τόσο στον ιππόκαμπο όσο και στον εγκεφαλικό φλοιό (Hellweg et al., 1998; Hock et al., 2000), με σημαντική διακύμανση ανάλογα με την εξέλιξη της νόσου. Αντιθέτως, σε υγιείς πληθυσμούς, η έκφραση του NGF είναι σταθερή (Allen et al., 1991). Είναι ενδιαφέρον ότι ο ορός ασθενών στα πρώτα στάδια της ασθένειας, περιέχει σημαντικά μειωμένα επίπεδα NGF σε σχέση με υγιείς πληθυσμούς, τα οποία όμως φαίνεται να αυξάνονται προοδευτικά όσο ο ασθενής επιδεινώνεται (Schaub et al., 2002). Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι κατά το AD, αλλαγές σε μοριακά μονοπάτια οδηγούν σε αύξηση των επιπέδων του pro-NGF στον εγκέφαλο, πιθανώς λόγω διαταραχών στην ωρίμανση του (Fahnestock et al., 2001).

Στην αιτιοπαθολογία του AD φαίνεται να εμπλέκεται και η νευροτροφίνη BDNF. Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει μειωμένη συγκέντρωση στον εγκεφαλικό φλοιό και τον ορό διαγονιδιακών Tg και μη-Tg μοντέλων (Angelucci et al., 2011; Peng et al., 2009). Παράλληλα, οι νευροπροστατευτικές του ιδιότητες έχουν διερευνηθεί in vitro. Οι Arancibia et al., έδειξαν ότι ο BDNF προστατεύει νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού αρουραίου ενάντια στην τοξική δράση Αβ ολιγομερών, ενώ οι Kemppainen et al., έδειξαν ότι το Αβ μειώνει τα επίπεδα του λειτουργικού (full-length) TrkB υποδοχέα (Arancibia et al., 2008; Kemppainen et al., 2012).

Πέρα όμως από τα ζωικά μοντέλα, η δράση του BDNF κατά το AD έχει μελετηθεί και σε ασθενείς. Όπως και στην περίπτωση του NGF, η συγκέντρωση του μεταβάλλεται στα διάφορα στάδια της νόσου. Ωστόσο, σε αντίθεση με τον NGF, τα επίπεδα του BDNF κατά την έναρξη της νόσου είναι σχετικά υψηλά, ενώ μειώνονται σημαντικά όσο η ασθένεια εξελίσσεται (Laske et al., 2006, Angelucci et al., 2010; Forlenza et al., 2010). Επιπλέον, οι Murer et al. εξετάζοντας νευρώνες ασθενών με AD παρατήρησαν ότι τα νευροϊνδιακά πλέγματα, βασικό ορόσημο της νόσου, σχηματίζονται ισχυρότερα σε νευρώνες χωρίς BDNF σε αντίθεση με όσους φέρουν αυτόν τον νευροτροφικό παράγοντα στο σώμα και τους άξονες (Murer et al., 1999). Γίνεται αντιληπτό ότι οι νευροτροφίνες συμμετέχουν σημαντικά στην παθοφυσιολογία του AD ενώ οι νευροπροστατευτικές τους ιδιότητες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ενάντια στην πρόοδο της ασθένειας.

Πολλοί ερευνητές δημιουργούν in vitro μοντέλα AD επωάζοντας primary νευρώνες ή κυτταρικές σειρές με την αμυλοειδή πρωτεΐνη. Από τις μελέτες αυτές έχει διαπιστωθεί ότι το πεπτιδίο είναι τοξικό ανάλογα με τη δομή και τον πολυμερισμό του (Glennier et al., 1984; Kim et al., 2014). Ωστόσο, οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους επάγεται η νευροτοξικότητα είναι ακόμη υπό διερεύνηση. Οι πρώτες έρευνες έδειξαν ότι το Αβ επηρεάζει αρνητικά την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης (McLaurin et al., 1996). Αργότερα,

έγινε γνωστό ότι το πεπτίδιο προσδένεται και ενεργοποιεί διαμεμβρανικούς υποδοχείς επάγοντας μονοπάτια κυτταρικού θανάτου (Lorenzo et al., 2000; Kajkowski et al., 2001). Χαρακτηριστική είναι η ενεργοποίηση του p75^{NTR} υποδοχέα (Costantini et al., 2005; Sotthibundhu et al., 2008). Συγκεκριμένα, οι Yaar et al., έδειξαν ότι η επώαση p75^{NTR}-νευρώνων με ολιγομερή του Αβ, ενεργοποιεί τη σηματοδότηση JNK επάγοντας κυτταρικό θάνατο, σε αντίθεση με control νευρώνες χωρίς p75^{NTR}. Το εύρημα αυτό τονίζει τη σύνδεση μεταξύ του p75^{NTR} και του νευροεκφυλισμού που παρατηρείται κατά το AD (Yaar et al., 2002). Πιο συγκεκριμένα, οι Costantini et al., έδειξαν ότι η ενεργοποίηση της JNK εξαρτάται από το Death Domain-DD τμήμα του p75^{NTR}, χωρίς το οποίο δεν επάγεται κυτταρικός θάνατος (Costantini et al., 2005).

Συλλογικά, οι νευροτροφίνες και οι υποδοχείς τους φαίνεται να κατέχουν σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία και/ή στις παθολογικές συνέπειες του AD αλλά και στα πλαίσια νέων φαρμακολογικών στρατηγικών (Angelucci et al., 2014). Παρά όμως τις πολλά υποσχόμενες θεραπευτικές τους ιδιότητες, η κλινική χρήση τους αντιμετωπίζει πολλά ζητήματα. Το κυριότερο πρόβλημα είναι η αδυναμία να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (blood-brain barrier) οπότε η εισαγωγή τους είναι δυνατή μόνο με άμεση ενδοπαραεγχυματική/ενδοεγκεφαλική χορήγηση (Uwabe et al., 2006; Thorne et al., 2001). Παράλληλα, η χρήση των νευροτροφινών ως θεραπευτικά μόρια in vivo δυσχεραίνεται από το σύντομο χρόνο ημιζωής και το χαμηλό τους φαρμακοκινητικό προφίλ. Παρόλα αυτά, τα δεδομένα από κλινικές δοκιμές είναι ενθαρρυντικά δείχνοντας ότι ακόμη και η χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων NGF σε σύντομο χρονικό διάστημα δεν είναι τοξική και μετριάζει ορισμένα συμπτώματα της ασθένειας (Eriksdotter et al., 1998; Tuszynski et al., 2007). Για τους παραπάνω λόγους, αναπτύσσονται πολλές στρατηγικές για τη χορήγηση και αύξηση των νευροτροφινών στον εγκέφαλο ασθενών ή για την ενεργοποίηση των νευροπροστατευτικών τους ιδιοτήτων με εναλλακτικές μεθόδους (Angelucci et al., 2014).

Σήμερα, πραγματοποιούνται εντυπωσιακές προσπάθειες για τη σύνθεση μικρών χημικών ουσιών που μιμούνται τις φυσικές νευροτροφίνες. Οι ουσίες αυτές δρουν ως αγωνιστές για τους υποδοχείς των νευροτροφινών και το δυναμικό τους διερευνάται στη θεραπεία νευροεκφυλιστικών νόσων (Gravanis et al., 2012). Ένα φυσικό μόριο που απαντάται σε αφθονία στον ανθρώπινο οργανισμό και μιμείται τις νευροπροστατευτικές ιδιότητες των νευροτροφινών είναι η νευροστεροειδής δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA). Ο όρος νευροστεροειδές χρησιμοποιείται για την περιγραφή στεροειδών που παράγονται από νευρικά και νευρογλοιακά κύτταρα (Charalampopoulos et al., 2008). Η DHEA συντίθεται μέσα στον εγκέφαλο από το ένζυμο του κυτοχρώματος 17 (CYP17) και αποτελεί πρόδρομο μόριο της

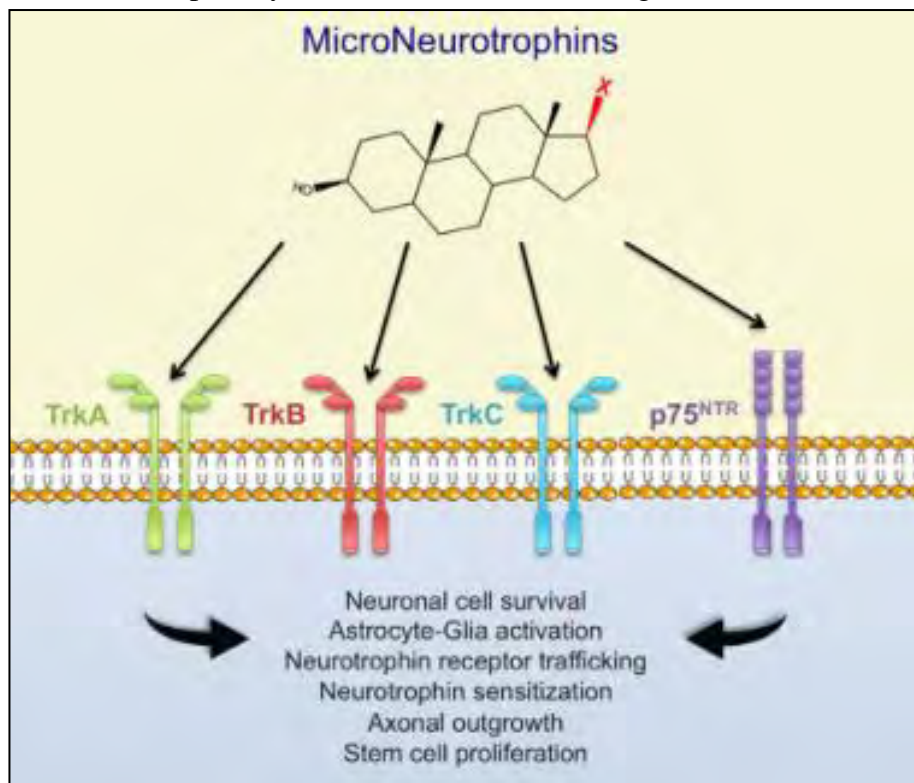
βιοσύνθεσης ορμονών όπως οιστρογόνα και ανδρογόνα. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η παρατήρηση ότι σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές, τα επίπεδα της DHEA μειώνονται σημαντικά τόσο στον εγκέφαλο όσο και στον ορό του ασθενούς, όπως συμβαίνει και με τις περισσότερες νευροτροφίνες (**Gravanis et al., 2017**). Οι Charalampopoulos et al. αποκάλυψαν στην εργασία τους το μοριακό μηχανισμό με τον οποίο το στεροειδές αυτό, ασκεί αντι-αποπτωτικές δράσεις. Οι ερευνητές δείξαν ότι η DHEA έχει υψηλή συγγένεια για όλους τους Trk υποδοχείς των νευροτροφινών αλλά και για τον p75^{NTR}. Με αυτόν τον τρόπο ενεργοποιεί μονοπάτια επιβίωσης μέσω των Trk ή καταστέλλει μονοπάτια απόπτωσης μέσω του p75^{NTR} (**Charalampopoulos et al., 2004**).

Ωστόσο, παρά τις νευροπροστατευτικές της ιδιότητες, η DHEA δεν μπορεί να αξιοποιηθεί κλινικά, κυρίως λόγω της υψηλής της συγγένειας με υποδοχείς νευροδιαβιβαστών και στεροειδών ορμονών που μπορούν να επιφέρουν ανεπιθύμητες παρενέργειες (**Charalampopoulos et al., 2008**). Εξελίσσοντας την έρευνα γύρω από τις ιδιότητες της DHEA, οι Calogeropoulou et al. συνέθεσαν μικρά παράγωγα μόρια του 17-άνθρακα του μορίου αυτού και διερεύνησαν την ικανότητά τους να ενεργοποιούν τους υποδοχείς των νευροτροφινών και να ασκούν αντι-αποπτωτικές δράσεις (**Calogeropoulou et al., 2009**).

Σημαντικά παραδείγματα των παραπάνω παραγώγων, αποτελούν οι συνθετικές μικρονευροτροφίνες (εικόνα 11) BNN27 και BNN20. Ο BNN27 μιμείται τη δράση του νευροτροφικού παράγοντα NGF με την υψηλή του συγγένεια για τον TrkA υποδοχέα. Συγκεκριμένα, η πρόσδεσή του στον TrkA επάγει φωσφορυλιώσεις κινάσης-τυροσίνης και την επακόλουθη ενεργοποίηση των καθοδικών σηματοδοτικών μονοπατιών επιβίωσης. Ταυτόχρονα, ο BNN27 διαφέρει από τον NGF λόγω της ικανότητάς του να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και παρουσιάζει μηδενική τοξικότητα γεγονός που τον καθιστά μία πλεονεκτική επιλογή για κλινικές εφαρμογές. Στην περίπτωση των TrkB και TrkC αλλά και άλλων υποδοχέων στεροειδών ορμονών, ο BNN27 δεν παρουσιάζει καμία αλληλεπίδραση, σε αντίθεση με τη DHEA που έχει υψηλή συγγένεια για όλους τους NT και άλλους υποδοχείς (**Pediaditakis et al., 2016**). Ωστόσο, οι Pediaditakis et al., έδειξαν ότι ο BNN27 εκτός από τον TrkA έχει την ικανότητα να προσδένεται στον p75^{NTR} επάγοντας την απελευθέρωση του αναστολέα RhoGDI της οικογένειας Rho πρωτεϊνών. Με τον τρόπο αυτό, αποτρέπεται η σηματοδότηση της RhoA μικρής GTPάσης και τελικά το κύτταρο οδηγείται σε επιβίωση. Οι αντι-αποπτωτικές ιδιότητες του BNN27 μέσω του p75^{NTR} ενισχύονται και από την καταστολή της ενεργοποίησης του JNK μονοπατιού που επάγει κυτταρικό θάνατο (**Pediaditakis et al., 2016**).

Η δεύτερη συνθετική μικρονευροτροφίνη που αναφέρθηκε, ο BNN20 μελετήθηκε από τους Botsakis et al. Το μόριο αυτό μιμείται τη δράση του NGF αλλά και του BDNF καθώς έχει υψηλή συγγένεια τόσο για τον TrkA όσο και για τον TrkB υποδοχέα. Όπως και ο BNN27, έτσι και ο BNN20 διαπερνάει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ενώ επίσης προσδένεται και ενεργοποιεί τον p75^{NTR}, με ανάλογο τρόπο με τους BNN27 και NGF ασκώντας αντι-αποπτωτική δράση. Τέλος, οι ερευνητές αποδείξανε τις νευροπροστατευτικές ιδιότητες του BNN20 σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες ενός διαγονιδιακού μοντέλου της ασθένειας του Parkinson in vitro και in vivo, καθιστώντας τον BNN20 ως πιθανό φαρμακευτικό μόριο για την ασθένεια αυτή (Botsakis et al., 2017).

Μέχρι σήμερα, παρά τις σημαντικές προσπάθειες για το σχεδιασμό στοχευμένων θεραπειών και την ανάπτυξη καινοτόμων φαρμάκων, η νόσος του Alzheimer παραμένει ανίατη. Πράγματι, οι υπάρχουσες κλινικές στρατηγικές δεν αποτελούν μόνιμες θεραπείες που σταματούν την εξέλιξη της νόσου. Οι νευροτροφίνες λόγω των ιδιοτήτων τους στην επιβίωση και ανάπτυξη των νευρώνων, εξετάζονται σήμερα ως πιθανά θεραπευτικά μόρια ή/και θεραπευτικοί στόχοι. Ωστόσο, η κλινική τους αξιοποίηση στη θεραπεία του AD δεν είναι εφικτή κυρίως εξαιτίας των φαρμακοκινητικών τους χαρακτηριστικών και της δυσκολίας που ενέχεται η χορήγησή τους στους ασθενείς (Angelucci et al., 2014). Για τους λόγους αυτούς, οι προσπάθειες πλέον εστιάζονται στη σύνθεση μη τοξικών, λιπόφιλων χημικών μορίων ικανά να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να ασκούν νευροπροστατευτικές δράσεις ενεργοποιώντας στοχευμένα τους υποδοχείς των νευροτροφινών. Κατά συνέπεια, αυτά τα θεραπευτικά μόρια-αγωνιστές ίσως αποτελέσουν καινοτόμες φαρμακευτικές επιλογές για ανίατες μέχρι σήμερα νευροεκφυλιστικές νόσους όπως το AD (Gravanis et al., 2017).



Εικόνα 11: Οι συνθετικές μικρονευροτροφίνες και οι νευροπροστατευτικές τους ιδιότητες. Οι μικρονευροτροφίνες, συνθετικά παράγωγα του νευροστεροειδούς DHEA, μιμούνται τις δράσεις των φυσικών νευροτροφινών με την υψηλή τους συγγένεια για τους υποδοχείς TrkA, TrkB, TrkC και p75^{NTR}. Τα συνθετικά αυτά μόρια, διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και ασκούν τη νευροπροστατευτική τους δράση είτε ενεργοποιώντας μονοπάτια επιβίωσης είτε καταστέλλοντας μονοπάτια απόπτωσης, σε ποικίλους τύπους νευρικών κυττάρων. Οι ιδιότητές τους τα καθιστούν πιθανά φαρμακευτικά μόρια για τη θεραπεία νευροεκφυλιστικών ασθενειών.

6. Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Η παρούσα ερευνητική μελέτη πραγματοποιήθηκε με σκοπό την αξιολόγηση της δράσης συνθετικών φαρμακολογικών ουσιών, των μικρονευροτροφινών, σε προερχόμενο από εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα ποντικού, μοντέλο της νόσου του Alzheimer. Οι επιμέρους στόχοι της εργασίας είναι:

Η διαφοροποίηση εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων σε νευρικά κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού.

Η διερεύνηση της έκφρασης των υποδοχέων των νευροτροφινών TrkA, TrkB και p75^{NTR}.

Η δημιουργία in vitro μοντέλου της ασθένειας του Alzheimer χρησιμοποιώντας ολιγομερή της β-αμυλοειδούς πρωτεΐνης.

Η αξιολόγηση της νευροπροστατευτικής δράσης των μικρονευροτροφινών BNN20 και BNN27 και των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούν.

Μεθοδολογία

1. Καλλιέργεια εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων.

Υλικά:

- E14 εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (ESCs)
E14: Αρσενικός γονότυπος ποντικού. Μέθοδος απομόνωσης: Απομόνωση από την εσωτερική κυτταρική μάζα βλαστοκύστης με τρυψινοποίηση (Ευγενική προσφορά από το εργαστήριο A. Kretsovali Laboratory).
- Θρεπτικό υλικό mES:
High-glucose DMEM, 15% FBS, 0.1mM non-essential amino acids, LIF (500-1000 units/ml), 2 mM L-glut, 0.1 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, αντιβιοτικό 100 µg/ml Primocin
- 1x αποστειρωμένο PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.4
- 0.1% διάλυμα gelatin τύπος B (Bovine skin)
- 0.05% τρυψίνη
- Φλάσκες T25
- Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

Μέθοδος:

Η καλλιέργεια των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Gaspard et al (**Gaspard et al., 2009**).

I. Απόψυξη των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων:

1. Προετοιμάζουμε 15ml mES θρεπτικού υλικού.
2. Μεταφέρουμε 1 vial παγωμένων ESCs από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο 37°C για 1 λεπτό.
3. Μεταφέρουμε το vial σε αποστειρωμένο θάλαμο νηματώδους ροής (hood) κυτταροκαλλιέργειας και προσθέτουμε 1ml mES θρεπτικού υλικού θερμοκρασίας 37°C. Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα και μεταφέρουμε σε conical tube με 8ml mES θρεπτικού υλικού.
4. Φυγοκέντρωση για 3 λεπτά σε 300 xg, θερμοκρασία δωματίου.
5. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων σε 5ml mES θρεπτικού στο οποίο έχουμε προσθέσει LIF πριν την καλλιέργεια.
6. Μεταφέρουμε τα ESCs σε T25 φλάσκα στην οποία έχει προηγηθεί επώαση για κάλυψη της επιφάνειας (coating) με 0.1% gelatin.
7. Τα ESCs καλλιεργούνται σε επωαστήρα (incubator) θερμοκρασίας 37°C, 5% CO₂.

II. Καλλιέργεια και ανακαλλιέργεια των ESCs:

- Αλλαγή θρεπτικού υλικού κάθε δύο μέρες:
 1. Απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό από την T25 φλάσκα.
 2. Πλύση με 1x αποστειρωμένο PBS.
 3. Προσθέτουμε 5ml mES θρεπτικού υλικού με LIF.
- Ανακαλλιέργεια (split) των ESCs κάθε τέσσερις μέρες καλλιέργειας (confluency 200.000 κύτταρα/cm²):
 1. Απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό.
 2. Προσθέτουμε 1.5ml τρυψίνη και επωάζουμε στους 37°C για 1 λεπτό.
 3. Προσθέτουμε 3ml θρεπτικού και φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά σε 300 xg, θερμοκρασία δωματίου.
 4. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων σε 1ml mES θρεπτικού υλικού με LIF.
 5. Προσδιορίζουμε τον αριθμό των κυττάρων με μέτρηση σε αιμοκυτταρόμετρο και καλλιεργούμε 20000 κύτταρα/cm² ή 500.000 κύτταρα ανά T25 φλάσκα.

2. **Διαφοροποίηση εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων σε νευρικά κύτταρα.**

Υλικά:

- E14 εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (ESCs)
- Θρεπτικό υλικό DDM:
DMEM/F12, N2 συμπλήρωμα, 0.1mM non-essential amino acids, 1mM sodium pyruvate, 500mg/ml BSA, 0.1 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, αντιβιοτικό 100 µg/ml Primocin
- Κυκλοπαμίνη (Cyclopamine)
- Θρεπτικό υλικό Neurobasal/B27:
Neurobasal, B27 χωρίς βιταμίνη A, 2mM L-glut, αντιβιοτικό 100 µg/ml Primocin
- Θρεπτικό υλικό N2B27:
DDM προς Neurobasal/B27 θρεπτικό υλικό σε αναλογία 1:1
- 1x αποστειρωμένο PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.4
- 0.1% διάλυμα gelatin τύπος B (Bovine skin)
- 33 mg Πολύ-λυσίνη/3 mg λαμινίνη διάλυμα
- 0.05% τρυψίνη
- 6-well plate

- 96-well plate

Μέθοδος:

Η διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων σε νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Gaspard et al (**Gaspard et al., 2009**).

I. Διαφοροποίηση σε πρόδρομα νευρικά κύτταρα (early differentiation):

1. Καλλιεργούμε ESCs με πυκνότητα 5,000 κύτταρα/cm² σε 6-well plate. Η διάρκεια της καλλιέργειας είναι 12 ημέρες.
2. Μέρα 0: Αφαιρούμε το mES θρεπτικό υλικό και απομακρύνουμε την περίσσεια με μία πλύση με 1x αποστειρωμένο PBS. Προσθέτουμε 2.5ml DDM θρεπτικό υλικό. Πραγματοποιούμε αλλαγή θρεπτικού κάθε 2 ημέρες μέχρι την ημέρα 12.
3. Μέρες 2-8: Κάθε 2 ημέρες αφαιρούμε το παλιό θρεπτικό υλικό, πλένουμε 2 φορές με 1x αποστειρωμένο PBS και προσθέτουμε νέο DDM στο οποίο έχουμε προσθέσει 1μM κυκλοπαμίνη. Η κυκλοπαμίνη είναι τερατογόνο, οπότε λαμβάνονται τα κατάλληλα μέτρα ασφάλειας.
4. Μέρα 10: Αφαιρούμε το παλιό θρεπτικό υλικό και προσθέτουμε 2.5ml DDM χωρίς κυκλοπαμίνη.
5. Μέρα 12: Ανακαλλιέργεια (split) των πρόδρομων νευρικών κυττάρων με 1ml 0.05% τρυψίνη και επώαση για 3 λεπτά στους 37°C. Απενεργοποιούμε την τρυψίνη με 4ml 10% FBS-1x PBS. Αναδεύουμε πολλές φορές με πιπέτα. Το διεξοδικό σπάσιμο των κυττάρων σε μονήρη (single cells) είναι απαραίτητο για την επίτευξη της διαφοροποίησης σε ώριμους νευρώνες. Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά σε 300 xg, θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρούμε το υπερκείμενο. Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα διεξοδικά σε 1ml N2B27 θρεπτικού και μετράμε την πυκνότητα σε αιμοκυτταρόμετρο. Καλλιεργούμε 5.000 κύτταρα ανά πηγάδι σε 96-well plate στην οποία έχει προηγηθεί coat με πολύ-λυσίνη/λαμινίνη.

II. Διαφοροποίηση σε ώριμα νευρικά κύτταρα (late differentiation):

Η διάρκεια της καλλιέργειας είναι 9 μέρες μέχρι την ωρίμανση των νευρώνων και προαιρετικά επιπλέον 7 ημέρες για την αύξηση του ποσοστού νευρογλοιακών κυττάρων.

1. Μέρες 12-21: Αλλάζουμε το N2B27 θρεπτικό κάθε 2 ημέρες.
2. Προαιρετικά, μέρες 21-28: Αλλάζουμε το N2B27 θρεπτικό κάθε 2 ημέρες.

3. Ταυτοποίηση της διαφοροποίησης με μεθόδους ανοσοφθορισμού.

Υλικά:

- Διαφοροποιημένοι νευρώνες σε 96-well plate
- 1x PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.4
- 4% Παραφορμαλδεΰδη PFA (Paraformaldehyde)
- 0.1% Triton X-100
- 1% Bovine Serum Albumin (BSA)
- Διάλυμα blocking - PBT (PBS-BSA-Triton):
0,1% Triton X-100, 1% BSA σε 1% PBS
- Διάλυμα 1x PBS-0,1% Triton X-100
- Πρωτογενή Αντισώματα (Πίνακας 1)
- Δευτερογενή Αντισώματα (Πίνακας 2)
- Χρωστική Hoechst 33342

Μέθοδος:

1. Διαφοροποίηση των ESCs σε νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού για 12, 19, 21 και 28 ημέρες σε 96-well plate.
2. Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από τα πηγαδάκια (wells) και απομάκρυνση της περίσσειας με 1 πλύση των 5 λεπτών με 1x PBS.
3. Μονιμοποίηση των κυττάρων σε διάλυμα 4% PFA (παραφορμαλδεΰδη) για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Αφαίρεση της PFA και απομάκρυνση της περίσσειας με 3 πλυσίματα των 5 λεπτών με 1x PBS.
5. Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης του αντισώματος (blocking) με διάλυμα PBT (1x PBS-1%BSA-0,1%Triton), για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Επώαση των κυττάρων με τα πρωτογενή αντισώματα έπειτα από κατάλληλη αραίωση σε διάλυμα 1x PBS-0,1%Triton X-100. Η επώαση πραγματοποιείται overnight στους 4°C σε κινούμενη πλατφόρμα. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και οι προτεινόμενες συγκεντρώσεις φαίνονται στον πίνακα 1.
7. Αφαίρεση του πρωτογενούς αντισώματος. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με 1x PBS-0,1%Triton.
8. Επώαση των κυττάρων με τα δευτερογενή αντισώματα anti-‘species’ IgG, ανάλογα με το είδος ανοσοποίησης των πρωτογενών αντισωμάτων. Η επώαση διαρκεί μία ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι. Τα δευτερογενή αντισώματα και οι προτεινόμενες συγκεντρώσεις τους παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

9. Αφαίρεση του δευτερογενούς αντισώματος. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα 1x PBS-0,1%Triton στο σκοτάδι.
10. Επώαση με τη χρωστική Hoechst (3μg/ml) σε 1x PBS, η οποία προσδένεται στη μικρή αύλακα του DNA σε περιοχές πλούσιες σε A-T. Η επώαση πραγματοποιείται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι. Η περίσσεια της χρωστικής απομακρύνεται με μία πλύση με 1x PBS για 5 λεπτά.
11. Οπτικοποίηση σε Operetta High Content σύστημα (HCS).
12. Η 96-well plate μπορεί να διατηρηθεί στους 4°C για μία εβδομάδα ή στους -20°C για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Πίνακας 1: Πρωτογενείς αντισώματα και συγκεντρώσεις.

Πρωτογενή Αντισώματα	Είδος	Αραίωση	Εταιρία
a-Beta Tubulin III	Mouse	1:1000	Millipore
a-GFAP	Chicken	1:2000	Millipore
a-Nestin	Chicken	1:1000	Novus Biotech
a-Sox2	Rabbit	1:1000	Millipore
a-Reelin	Mouse	1:1000	DSHB

Πίνακας 2: Δευτερογενείς αντισώματα και συγκεντρώσεις.

Δευτερογενή Αντισώματα	Φθορισμός	Αραίωση	Εταιρία
a-mouse	488	1:1000	Jackson
a-chicken	594	1:1000	Jackson
a-rabbit	647	1:1000	Jackson

4. Απομόνωση RNA από ESC-διαφοροποιημένους νευρώνες.

Υλικά:

- Διαφοροποιημένοι νευρώνες ημέρες 12, 21, 28
- ESCs
- 14.3M β-μερκαπτοαιθανόλη (β-ME)
- Αποστειρωμένα tips RNase-free
- 70% Absolut αιθανόλη
- Λεία βελόνα 21g και σύριγγα
- Από το kit:
 - RNeasy Mini Spin Columns

- Collection Tubes (1.5ml)
- Collection Tubes (2ml)
- Buffer RLT
- Buffer RW1
- Buffer RPE
- RNase-Free νερό

Μέθοδος:

Για την απομόνωση ολικού RNA χρησιμοποιείται το RNeasy mini kit της Qiagen και ακολουθείται το αντίστοιχο πρωτόκολλο.

1. Προετοιμάζουμε 1ml RLT buffer με 10μl β-ME.
2. Προσθέτουμε 350μl RLT ανά πηγάδι και αναδεύουμε ώστε να συμβεί λύση των κυττάρων. Μεταφέρουμε σε RNase free tube.
3. Ομογενοποιούμε με vortex για 1 λεπτό και με τη χρήση σύριγγας.
4. Προσθέτουμε 350μl 70% Absolut αιθανόλη και αναδεύουμε ήπια με πιπέτα.
5. Μεταφέρουμε 700μl από το δείγμα σε έναν RNeasy Mini Spin Column τοποθετημένο σε ένα collection tube των 2ml. Φυγοκέντρωση 10.000g για 30sec. Αδειάζουμε το collection tube και επανατοποθετούμε το RNeasy Column.
6. Προσθέτουμε 700μl RW1 buffer. Φυγοκέντρωση 10.000g για 30sec.
7. Μεταφέρουμε το RNeasy Column σε νέο collection tube των 2ml. Προσθέτουμε 500μl RPE buffer. Φυγοκέντρωση 10.000g για 30sec. Αδειάζουμε το collection tube και επανατοποθετούμε το RNeasy Column.
8. Προσθέτουμε 500μl RPE buffer. Φυγοκέντρωση 10.000g για 2 λεπτά. Αδειάζουμε το collection tube και επανατοποθετούμε το RNeasy Column. Φυγοκέντρωση 12.000g για 1 λεπτό.
9. Μεταφέρουμε το RNeasy Column σε νέο collection tube των 1.5ml. Προσθέτουμε 30μl RNase-free νερό. Φυγοκέντρωση 10.000g για 1 λεπτό ώστε να επαναδιαλύσουμε το RNA.
10. Προσδιορισμός της ποιότητας και ποσότητας του RNA σε μηχανήμα Nanodrop.
11. Το RNA μπορεί να αποθηκευτεί στους -80°C.

5. Σύνθεση cDNA.

Υλικά:

- RNase-free νερό
- DTT 0.1 M
- dNTP μείγμα 10 mM
- Oligo(dT)₁₈ 500μg/ml
- 5x MMLV RT Buffer
- MMLV Reverse Transcriptase 200 U/μL
- Αποστειρωμένα (RNase-free) tubes 0,5ml
- RNaseOUT αναστολέας RNase ενζύμων 40 units/μl
- Ολικό RNA

Μέθοδος:

Η κατασκευή του cDNA από το ολικό RNA των δειγμάτων, έγινε με χρήση του ενζύμου αντίστροφη τρανσκριπτάση (reverse transcriptase, RT).

1. Για την αντίδραση σύνθεσης cDNA τελικού όγκου 20μl:

Προετοιμάζουμε το ακόλουθο RNA/primer μείγμα σε 0.5ml tubes:

- 500ng-5μg από κάθε RNA δείγμα
 - 1μl Oligo(dT)₁₈
 - 1μl από το μείγμα dNTP
 - Νερό μέχρι τα 12μl
2. Θερμαίνουμε τα μείγματα στους 65°C για 5 λεπτά, ψύχουμε γρήγορα σε πάγο για 1 λεπτό και αναδεύουμε ήπια σε μικροφυγόκεντρο.
 3. Προετοιμάζουμε συνολικό μείγμα για όλα τα δείγματα (master mix) από τα ακόλουθα:

- 4μl 5x First-Strand Buffer
- 2μl DTT
- 1μl RNaseOUT

Αναδεύουμε ήπια με την πιπέτα.

Προσθέτουμε 7μl από το master mix σε κάθε RNA δείγμα που προετοιμάσαμε και αναδεύουμε ήπια με την πιπέτα.

4. Επωάζουμε για 2 λεπτά στους 37°C.
5. Προσθέτουμε στα δείγματα από 1μl M-MLV RT και αναδεύουμε ήπια σε μικροφυγόκεντρο.

6. Επωάζουμε τα δείγματα για 50 λεπτά στους 37°C και έπειτα για 15 λεπτά στους 70°C ώστε να απενεργοποιήσουμε την αντίδραση. Αυτό το βήμα μπορεί να πραγματοποιηθεί σε PCR μηχανήματα (thermocycler) ρυθμίζοντας το κατάλληλο πρόγραμμα.
7. Τοποθετούμε τα δείγματα σε πάγο για 2 λεπτά.
8. Προαιρετικά, αποθηκεύουμε τα cDNA στους -20°C.

6. Ταυτοποίηση της διαφοροποίησης με RT-PCR.

Υλικά:

- cDNA δείγματα
- Αποστειρωμένο νερό
- Αποστειρωμένα PCR tubes 0,5ml
- 10x PCR Buffer
- 50mM MgCl₂
- dNTP μείγμα 10 mM
- Forward/Reverse primers 100μM
- Platinum Taq DNA πολυμεράση

Μέθοδος:

1. Για την αντίδραση RT-PCR τελικού όγκου 50μl:
Προετοιμάζουμε το ακόλουθο συνολικό μείγμα για όλα τα cDNA δείγματα:
 - 10μl 10x PCR Buffer
 - 1.5μl MgCl₂
 - 1μl από το μείγμα dNTP
 - Αποστειρωμένο νερό μέχρι τα 45μlΑναδεύουμε ήπια σε μικροφυγόκεντρο.
2. Μοιράζουμε 1μl από τα cDNA δείγματα σε PCR tubes. Σε ένα επιπλέον tube τοποθετούμε 1μl νερό ως αρνητικό control.
3. Προσθέτουμε σε κάθε δείγμα 2μl από το κατάλληλο ζεύγος Forward/Reverse Primer. Για κάθε cDNA δείγμα πραγματοποιούμε PCR για το Hprt Housekeeping γονίδιο ως θετικό control.
4. Προσθέτουμε σε κάθε δείγμα 0.2μl Platinum Taq DNA πολυμεράση και αναδεύουμε ήπια σε μικροφυγόκεντρο.

5. Τοποθετούμε τα PCR tubes στο μηχάνημα της PCR (thermocycler) και επιλέγουμε το κατάλληλο πρόγραμμα.
6. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε 1.2% τζελ αгарόζης το οποίο έχουμε σημάνει με χρωστική Sybr safe.
7. Εμφάνιση σε μηχάνημα BIORAD chemidoc touch imaging system.
8. Η κανονικοποίηση μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων γίνεται με την ποσοτικοποίηση των μεταγράφων του γονίδιου Hprt.

Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν, τα μεγέθη των PCR προϊόντων (Base pairs, Bp) και οι θερμοκρασίες τήξης (Tm) παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: RT-PCR primers.

Γονίδιο	Forward Primer	Reverse Primer	Bp	Tm
Oct4	GCATTCAAAGTGGACACCA	AGCTTCTTTCCCATCCCA	153	57°C
Sox2	CCTCCGGGACATGATCAGCATGTA	GCAGTGTGCCGTTAATGGCCGTG	131	65°C
Nanog	AACCAAAGGATGAAGTGCAAGCGG	TCCAAGTTGGGTTGGTCCAAGTCT	190	64°C
Nestin	GTCTCAGGACAGTGCTGAGCCTTC	TCCCCTGAGGACCAGGAGTCTC	378	64°C
Tbr1	CAACAGGCCACTTTGGCTGAA	AATGAGCGGTGGGATCGAGA	122	60°C
Satb2	CTTCCTCAACCTGCCTGAAG	GTTGTCCGGTGTTCGAGGTTTT	150	55°C
Reelin	CTAATGATGTGTGTTTCTCT	CAACAATGTTAAATACTGTGCTA	200	53°C
Vglut1	CCCCCAAATCCTTGCACT	CAAATGGCCACTGAGAAACC	69	57°C
Map2	AATCGACAGCACGGTTTACTC	TGAAATCCCAGTGTGTTTCAGG	132	59°C
Hprt	GGCCAGACTTTGTTGGATTG	TGCCTCATCTTAGGCTTTGT	144	58°C

7. Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από ESC-διαφοροποιημένους νευρώνες.

Υλικά:

- Διαφοροποιημένοι νευρώνες ημέρες 12, 21, 28
- 1x PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.4
- Διάλυμα κυτταρικής λύσης (1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate,
- 0,1% SDS, 0,15M NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 7.2, Roche complete protease inhibitors cocktail-Pi PMSF)
- Laemmli χρωστική 1x

Μέθοδος:

1. Αφαίρεση θρεπτικού υλικού από τη 96-well plate και πλύση με PBS 1x.

2. Προσθέτουμε 30ml διάλυμα λύσης ανά πηγάδι και λύουμε τα κύτταρα αναδεύοντας ήπια με την πιπέτα. Μεταφέρουμε τα πρωτεϊνικά λύματα σε tubes των 1.5ml.
3. Επωάζουμε τα δείγματα σε κινούμενη πλατφόρμα στους 4°C για 20 λεπτά.
4. Φυγοκέντρωση σε 13.000rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
5. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο tube.
6. Ποσοτικοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου μέσω χρωματομετρικής μεθόδου BCA.
7. Προσθέτουμε στα δείγματα 1x Laemmli χρωστική και θερμαίνουμε για 5 λεπτά στους 95°C.
8. Μπορούμε να αποθηκεύσουμε τα δείγματα στους -20°C μέχρι την ηλεκτροφόρηση και την ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

8. Διερεύνηση της έκφρασης των υποδοχέων Νευροτροφινών με Ανοσοαποτύπωση κατά Western, Ανοσοφθορισμό και RT-PCR.

Ανοσοαποτύπωση κατά Western:

Υλικά:

- *Για την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE:*
 - πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (8%, 10% ή 12% ανάλογα με το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης)
 - διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer),
 - συσκευή ηλεκτρομεταφοράς
- *Για τη μεταφορά σε μεμβράνη (Electroblotting):*
 - ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer) με 20% μεθανόλη
 - κασέτα μεταφοράς
 - συσκευή ηλεκτρομεταφοράς
 - μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
 - χαρτάκια Whatmann
- *Για το blocking:*
 - 5% BSA
 - PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.4
 - Tween 20
 - PBS 1x - 0,1% Tween (PBS-T)

➤ *Για την Ανοσοαποτύπωση:*

- Πρωτογενή αντισώματα
- Δευτερογενή αντισώματα
- ECL kit (Enhanced Chemiluminescence)

Μέθοδος:

➤ *Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE:*

1. Αρχικά πραγματοποιείται η παρασκευή του πήκτωματος διαχωρισμού των πρωτεϊνών το οποίο φορτώνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης καλύπτοντας περίπου τα 3:4 αυτής (separating gel).
2. Ακολουθεί η παρασκευή του διαλύματος πακεταρίσματος (stacking gel). Φορτώνουμε πάνω στο separating gel το διάλυμα του stacking gel, ενώ αμέσως τοποθετείται στη συσκευή το χτενάκι για τη δημιουργία των θέσεων φόρτωσης των δειγμάτων.
3. Τα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν βράζονται στους 95°C για 5 λεπτά και έπειτα φυγοκεντρώνονται στις 13000rpm για 1 λεπτό.
4. Όταν πήξει το πήκτωμα, αφαιρείται το χτενάκι και η συσκευή τοποθετείται μέσα στο δοχείο της ηλεκτροφόρησης που περιέχει το running buffer.
5. Τα δείγματα φορτώνονται στις θέσεις που έχουν σχηματιστεί στο πήκτωμα.
6. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται αρχικά στα 80V μέχρι η χρωστική να εισέλθει στο πήκτωμα διαχωρισμού οπότε η τάση αυξάνεται στα 120V.

➤ *Μεταφορά σε μεμβράνη (Electroblotting):*

1. Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα Transfer buffer με 20% μεθανόλη, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου τάσης 300mA, για μία ώρα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ThermoFisher Scientific.
2. Προαιρετικά, η μεμβράνη βάφεται με τη χρωστική Ponceau S για 5 λεπτά. Απομακρύνουμε την Ponceau S και ακολουθεί πλύση με διάλυμα PBS-T.

➤ *Blocking:*

1. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται σε διάλυμα blocking – 5% BSA σε 1x PBS-T για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

➤ *Ανοσοαποτύπωση:*

1. Πραγματοποιούμε 3 πλύσεις των 5 λεπτών με PBS-T σε θερμοκρασία δωματίου.

2. Η μεμβράνη επώάζεται με τα πρωτογενή αντισώματα στις κατάλληλες αραιώσεις σε διάλυμα 1% BSA – 1x PBS-T. Η επώαση διαρκεί όλη τη νύχτα σε κινούμενη πλατφόρμα, στους 4°C. Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και οι προτεινόμενες συγκεντρώσεις παρουσιάζονται στον πίνακα 4.
3. Πραγματοποιούμε 3 πλύσεις των 5 λεπτών με PBS-T σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Η μεμβράνη επώάζεται με τα δευτερογενή αντισώματα α-‘species’ IgG-HRP, ανάλογα με το είδος ανοσοποίησης των πρωτογενών αντισωμάτων. Η επώαση διαρκεί για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δευτερογενή αντισώματα και οι προτεινόμενες συγκεντρώσεις τους παρουσιάζονται στον πίνακα 5.
5. Πραγματοποιούμε 3 πλύσεις των 5 λεπτών με PBS-T σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Το σήμα των πρωτεϊνικών ζωνών παράγεται με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας που αξιοποιεί το, συζευγμένο με τα δεύτερα αντισώματα, ένζυμο HRP (Horseradish peroxidase). Για την αντίδραση του HRP, επώαζουμε τη μεμβράνη με το υπόστρωμα ECL για 1 λεπτό, στο σκοτάδι.
7. Εμφάνιση σε μηχανήμα BIORAD chemidoc touch imaging system.

Πίνακας 4: Πρωτογενή αντισώματα και συγκεντρώσεις.

Πρωτογενή Αντισώματα	Είδος	Αραίωση	Εταιρία
a-TrkA	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
a-TrkB	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
a-p75^{NTR}	Rabbit	1:1000	Promega
a-GAPDH	Rabbit	1:5000	Sigma

Πίνακας 5: Δευτερογενή αντισώματα και συγκεντρώσεις.

Δευτερογενή Αντισώματα	Αραίωση	Εταιρία
a-rabbit-HRP	1:5000	Invitrogen

Ανοσοφθορισμός:

Για τον Ανοσοφθορισμό χρησιμοποιείται η μέθοδος που περιγράφεται στην παράγραφο 3.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και οι προτεινόμενες συγκεντρώσεις τους παρουσιάζονται στους πίνακες 6 και 7.

Πίνακας 6: Πρωτογενή αντισώματα και συγκεντρώσεις.

Πρωτογενή Αντισώματα	Είδος	Αραίωση	Εταιρία
a-Beta Tubulin III	Mouse	1:1000	Millipore
a-TrkB	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
a-p75^{NTR}	Rabbit	1:1000	Promega

Πίνακας 7: Δευτερογενή αντισώματα και συγκεντρώσεις.

Δευτερογενή Αντισώματα	Φθορισμός	Αραίωση	Εταιρία
a-mouse	488	1:1000	Jackson
a-rabbit	647	1:1000	Invitrogen

RT-PCR:

Για την RT-PCR χρησιμοποιείται η μέθοδος που περιγράφεται στην παράγραφο 6.

Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν, τα μεγέθη των PCR προϊόντων (Base pairs, Bp) και οι θερμοκρασίες τήξης (Tm) παρουσιάζονται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8: RT-PCR primers.

Γονίδιο	Forward Primer	Reverse Primer	Bp	Tm
TrkA	AGAGTGGCCTCCGCTTTGT	CGCATTGGAGGACAGATTCA	80	58°C
TrkB	TGGACCACGCCAACTGACATT	GAATGTCTCGCCAACTTGAG	179	58°C
p75^{NTR}	GACTAACCTAGGCCACCCAA	CAGACGTCGTTCCAGATGT	125	58°C
Hprt	GGCCAGACTTTGTTGGATTTG	TGCGCTCATCTTAGGCTTTGT	144	58°C

9. Δημιουργία μοντέλου του Alzheimer από ESC-διαφοροποιημένους νευρώνες.

- Η δημιουργία μοντέλου του Alzheimer πραγματοποιείται με επώαση των διαφοροποιημένων από ESCs νευρώνων του εγκεφαλικού φλοιού με την τοξική Βήτα Αμυλοειδή πρωτεΐνη Αβ(1-42) της νόσου.

9.1 Επώαση των νευρώνων με ολιγομερή της β-αμυλοειδούς πρωτεΐνης.

Υλικά:

- 1x αποστειρωμένο PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.4
- DMEM-F12 χωρίς phenol red
- Μονομερή της Βήτα Αμυλοειδούς πρωτεΐνης, Αβ(1-42)
- Μονομερή της Βήτα Αμυλοειδούς πρωτεΐνης, Αβ(42-1)

- Θρεπτικό υλικό N2B27 χωρίς B27
- Neurobasal θρεπτικό υλικό

Μέθοδος:

Η προετοιμασία του λυοφιλοποιημένου Αβ πραγματοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας AnaSpec.

➤ *Για τη δημιουργία των τοξικών ολιγομερών του Αβ:*

1. Διαλύουμε το μονομερές σε αποστειρωμένο PBS 1x.
2. Επώαση στους 4°C για 24 ώρες.
3. Αραίωση του Αβ στις κατάλληλες συγκεντρώσεις σε θρεπτικό υλικό N2B27 χωρίς B27.

➤ *Για την επώαση των κυττάρων:*

1. Διαφοροποίηση των ESCs σε νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού για 21 ημέρες σε 96-well plate.
2. Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και απομάκρυνση της περίσσειας με 1 πλύση με 1x αποστειρωμένο PBS.
3. Pre-starvation των κυττάρων για 2.5 ώρες σε απλό Neurobasal θρεπτικό υλικό χωρίς ορό.
4. Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και επώαση των κυττάρων με ολιγομερή των Αβ(1-42) και Αβ(42-1) σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις 2μM, 6μM και 12μM.
5. Επώαση των κυττάρων σε incubator για 16 ώρες.
6. Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού.
7. Live/dead δοκιμασία.

9.2 Διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης της νευροτροφίνης BDNF με RT-PCR.

Για τον έλεγχο της έκφρασης του BDNF έπειτα από την επίδραση με ολιγομερή της β-αμυλοειδούς πρωτεΐνης, ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 9.1.

Μετά την επώαση πραγματοποιείται απομόνωση RNA, σύνθεση cDNA και RT-PCR όπως περιγράφονται στις παραγράφους 4, 5 και 6.

Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν, τα μεγέθη των PCR προϊόντων (Base pairs, Bp) και οι θερμοκρασίες τήξης (Tm) παρουσιάζονται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9: RT-PCR primers.

Γονίδιο	Forward Primer	Reverse Primer	Bp	Tm
BDNF	CCACTGCCGGGGATCCGAGA	TTTCATGGGCGCCGCTTCA	126	65°C
Hprt	GGCCAGACTTTGTTGGATTTG	TGCGCTCATCTTAGGCTTTGT	144	58°C

10. Έλεγχος φαρμακολογικών ουσιών.

- Πραγματοποιείται έλεγχος της νευροπροστατευτικής δράσης των συνθετικών Μικρονευροτροφινών BNN20/BNN27 και των αντίστοιχων φυσικών Νευροτροφινών τους BDNF/NGF ενάντια στην τοξική δράση του ολιγομερούς Αβ(1-42).

10.1 Επώαση των νευρώνων με φαρμακολογικές ουσίες.

Υλικά:

- Θρεπτικό υλικό N2B27 χωρίς B27
- Neurobasal θρεπτικό υλικό
- 1x αποστειρωμένο PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.4
- Ολιγομερή της Βήτα Αμυλοειδούς πρωτεΐνης, Αβ(1-42) 12μΜ
- Ολιγομερή της Βήτα Αμυλοειδούς πρωτεΐνης, Αβ(42-1) 12μΜ
- NGF 100ng/ml
- BDNF 100ng/ml
- BNN27 100μΜ
- BNN20 100μΜ

Μέθοδος:

- *Προετοιμασία για τη live/dead δοκιμασία:*
1. Διαφοροποίηση των ESCs σε νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού για 21 ημέρες σε 96-well plate.
 2. Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και απομάκρυνση της περίσσειας με 1 πλύση με 1x αποστειρωμένο PBS.
 3. Pre-starvation των κυττάρων για 2.5 ώρες σε απλό Neurobasal θρεπτικό υλικό χωρίς ορό.
 4. Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και επώαση των κυττάρων με ολιγομερή των Αβ(1-42) και Αβ(42-1) και με τις φαρμακολογικές ουσίες αραιωμένες σε θρεπτικό υλικό N2B27 χωρίς B27.
 5. Επώαση των κυττάρων σε incubator για 16 ώρες.

6. Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού.
7. Live/dead δοκιμασία.

➤ *Προετοιμασία για τον έλεγχο της σηματοδότησης:*

1. Διαφοροποίηση των ESCs σε νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού για 21 ημέρες σε 96-well plate.
2. Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και απομάκρυνση της περίσσειας με 1 πλύση με 1x αποστειρωμένο PBS.
3. Pre-starvation των κυττάρων για 2.5 ώρες σε απλό Neurobasal θρεπτικό υλικό χωρίς ορό.
4. Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και επώαση των κυττάρων με ολιγομερή των Aβ(1-42) και Aβ(42-1) και με τις φαρμακολογικές ουσίες αραιωμένες σε απλό Neurobasal medium.
5. Επώαση των κυττάρων σε incubator για 20 λεπτά.
6. Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και λύση των κυττάρων για την απομόνωση του πρωτεϊνικού περιεχομένου.
7. Έλεγχος της σηματοδότησης με Ανοσοαποτύπωση κατά Western.

10.2 Ταυτοποίηση της δραστηριότητας των φαρμάκων με Calcein-PI/live-dead δοκιμασία φθορισμού.

Υλικά:

- Calcein-AM 1μM
- Propidium Iodide (PI) 1μM
- 1x αποστειρωμένο PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.4
- Θρεπτικό υλικό N2B27 χωρίς B27

Μέθοδος:

- Με την calcein προσδιορίζεται η ζωτικότητα ευκαρυωτικών κυττάρων. Σε ζωντανά κύτταρα, η μη-φθορίζουσα calcein-AM υφίσταται υδρόλυση από ενδοκυτταρικές εστεράσες στο AM άκρο με αποτέλεσμα να εκπέμπει πράσινο φθορισμό.
- Με το Propidium Iodide (PI) προσδιορίζονται τα αποπτωτικά και νεκρωτικά κύτταρα σε μία καλλιέργεια. Εκπέμπει κόκκινο φθορισμό όταν προσδένεται σε νουκλεϊκά οξέα. Δε διαπερνάει την πλασματική μεμβράνη ζωντανών κυττάρων.

1. Αφαίρεση θρεπτικού από τη 96-well plate και πλύση με 1x αποστειρωμένο PBS.
2. Επώαση των κυττάρων με 50μl διάλυμα Calcein/PI (1μM/1μM σε N2B27 χωρίς B27) για 30 λεπτά στους 37°C σε incubator.
3. Αφαίρεση του διαλύματος και προσθήκη N2B27 χωρίς B27, στο σκοτάδι.
4. Οπτικοποίηση σε Operetta High Content σύστημα (HCS).
Οι φθορισμοί των χρωστικών παρουσιάζονται στον πίνακα 10.

Πίνακας 10: Χρώσεις live/dead δοκιμασίας

Χρωστικές	Φθορισμός	Εταιρία
Calcein	488	Invitrogen
Propidium Iodide	647	Invitrogen

10.3 Ανάλυση της δραστηριότητας των φαρμάκων με Ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Για την Ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιείται η μέθοδος που περιγράφεται στην παράγραφο 8. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και οι προτεινόμενες συγκεντρώσεις τους παρουσιάζονται στους πίνακες 11 και 12.

Πίνακας 11: Πρωτογενή αντισώματα και συγκεντρώσεις.

Πρωτογενή Αντισώματα	Είδος	Αραίωση	Εταιρία
a-Phospho-Akt	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
a-Total-Akt	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
a-Phospho-Erk	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
a-Total-Erk	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
a-Phospho-Jnk	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
a-Total-Jnk	Rabbit	1:1000	Cell Signaling

Πίνακας 12: Δευτερογενή αντισώματα και συγκεντρώσεις.

Δευτερογενή Αντισώματα	Αραίωση	Εταιρία
a-rabbit-HRP	1:5000	Invitrogen

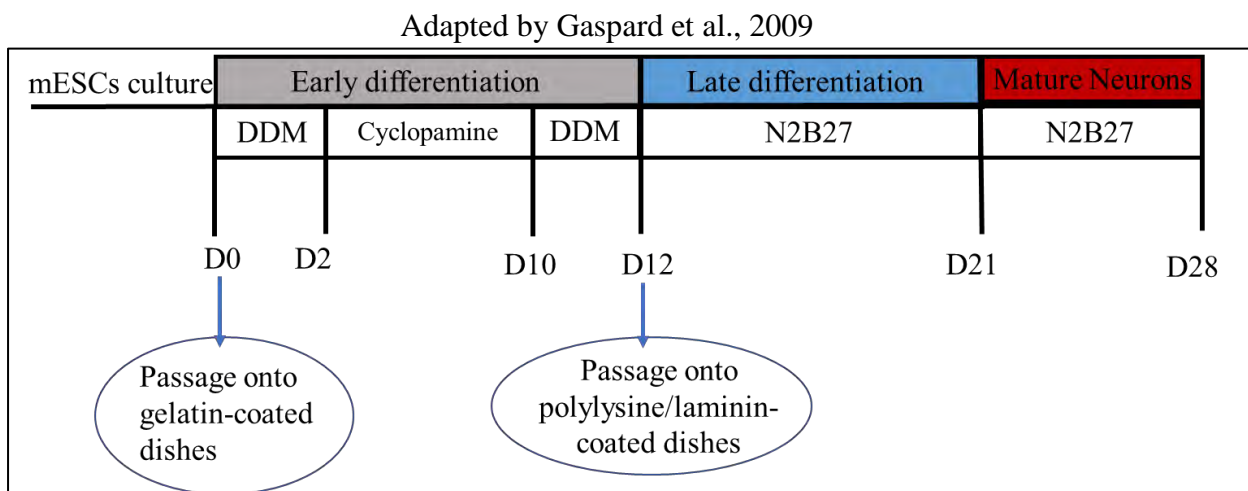
11. Στατιστική ανάλυση

Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα Excel. Η σύγκριση μεταξύ δύο ομάδων-μεταβλητών πραγματοποιήθηκε με unpaired t-test. Η στατιστική σημαντικότητα ορίζεται για τιμές p-value μικρότερες από 0.05. Τα περισσότερα αποτελέσματα εκφράζονται ως mean \pm SEM (Standard Error of the Mean).

Αποτελέσματα

1. Αξιολόγηση της διαφοροποίησης εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων σε νευρικά κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού.

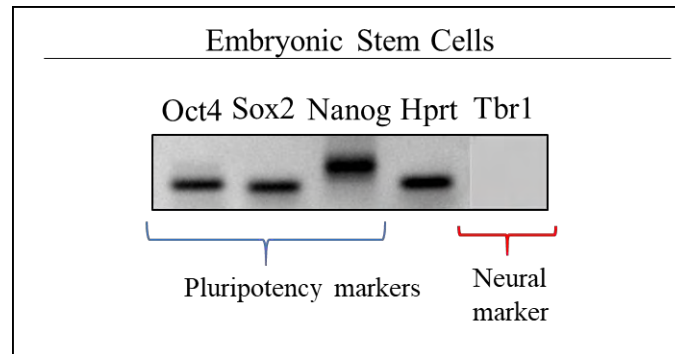
Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε διαφοροποίηση εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων ποντικού σε νευρικά κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού για την αξιολόγηση φαρμακολογικών ουσιών. Η διαφοροποίηση έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Gaspard et al (εικόνα 1) (Gaspard et al., 2009). Το πρώτο βήμα είναι η δημιουργία πρόδρομων νευρικών κυττάρων (NPs) του εγκεφαλικού φλοιού. Η επαγωγή της νευρικής διαφοροποίησης προς το ραχιαίο άξονα γίνεται με κυκλοπαμίνη, έναν αναστολέα του μορφογόνου Sonic Hedgehog. Στη συνέχεια, τα πρόδρομα κύτταρα εξειδικεύονται σε ώριμους διεγερτικούς νευρώνες και νευρογλοιακά κύτταρα.



Εικόνα 1: Χρονοδιάγραμμα δημιουργίας νευρώνων του εγκεφαλικού φλοιού.

Ημέρα 0-10: Τα mESCs καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό χωρίς μορφογόνα όπου επάγεται αυθόρμητη νευρική διαφοροποίηση. Η κυκλοπαμίνη επάγει τη διαφοροποίηση προς το ραχιαίο άξονα. Ημέρες 6-21: Νευρογένεση. Παραγωγή πρόδρομων και ώριμων νευρικών κυττάρων του εγκεφαλικού φλοιού. Ημέρες 15-28: Γλοιογένεση. Παραγωγή νευρογλοιακών κυττάρων.

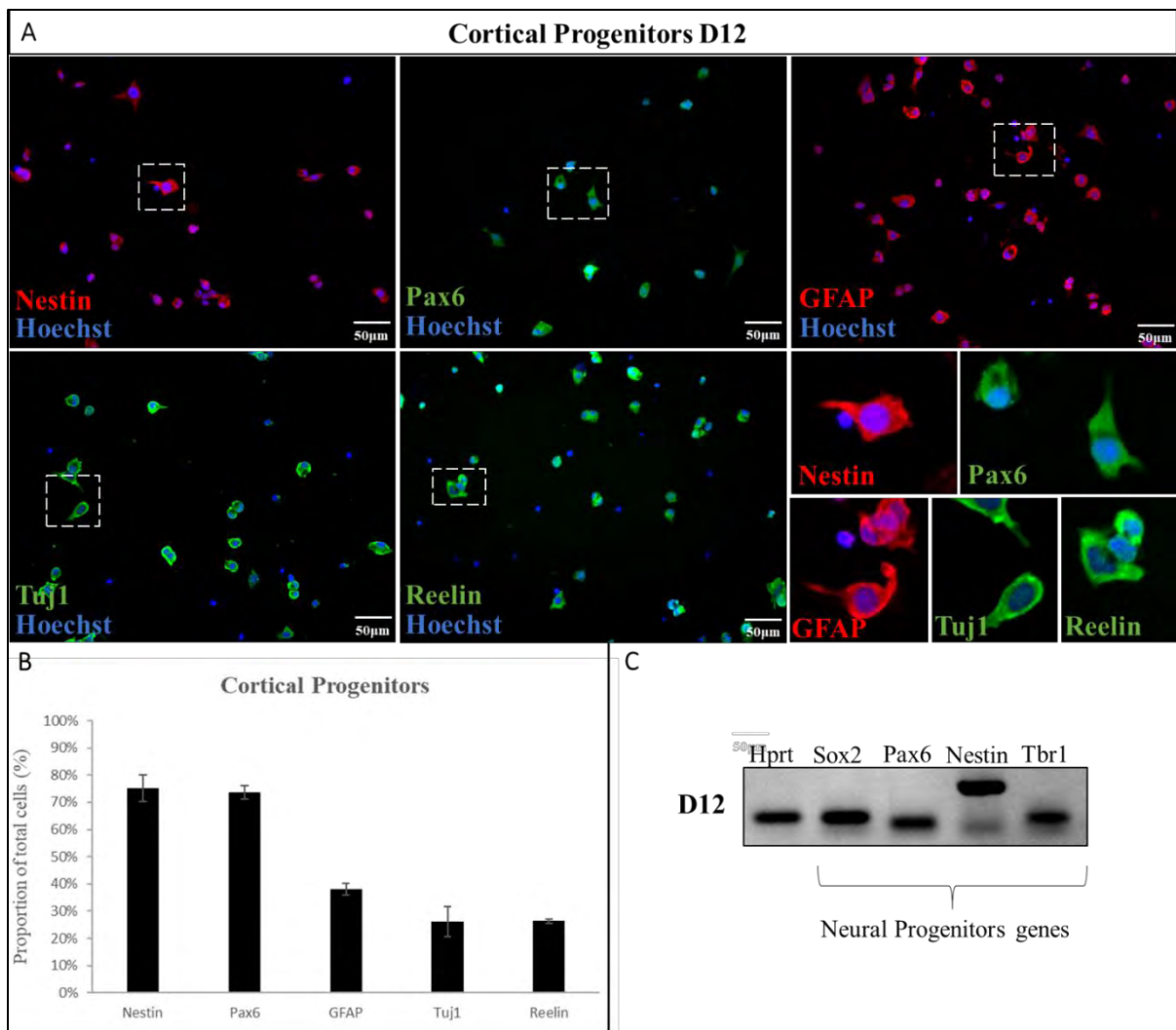
Πριν την έναρξη της διαφοροποίησης (μέρα 0), η ολοδυναμικότητα των ESCs προσδιορίστηκε από την έκφραση των γονιδίων Oct4, Sox2 και Nanog. Όπως αναμενόταν, δεν παρατηρήθηκε έκφραση του γονιδίου Tbr1 που απαντάται σε νευρικά κύτταρα. Ως θετικός δείκτης χρησιμοποιήθηκε το housekeeping γονίδιο Hprt (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Γονιδιακή έκφραση των βασικών δεικτών αυτοανανέωσης και ολοδυναμικότητας Oct4, Sox2 και Nanog (RT-PCR). Απουσία έκφρασης του νευρωνικού δείκτη Tbr1. Ως θετικός δείκτης χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο Hprt.

Μετά από 12 ημέρες διαφοροποίησης τα κύτταρα ανακαλλιεργήθηκαν σε 96-well πλάκα και η ύπαρξη πρόδρομων κυττάρων του εγκεφαλικού φλοιού ταυτοποιήθηκε από την έκφραση χαρακτηριστικών δεικτών με μεθόδους ανοσοφθορισμού και RT-PCR. Η βέλτιστη συγκέντρωση των NPs προσδιορίστηκε σε 5-7000 κύτταρα/well. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις τα κύτταρα δε διαφοροποιούνται ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρείται σχηματισμός συσσωματωμάτων και εκτεταμένος κυτταρικός θάνατος (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

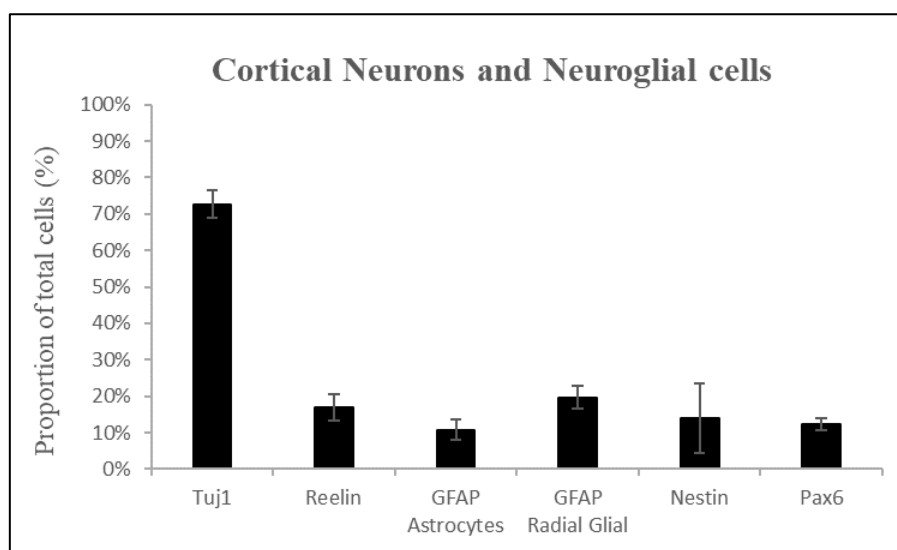
Αρχικά, η ύπαρξη νευρικών βλαστικών κυττάρων επιβεβαιώθηκε από την έκφραση του δείκτη Nestin. Τα κύτταρα ήταν θετικά για την έκφραση παραγόντων που επάγουν, μεταξύ άλλων λειτουργιών, τη διαφοροποίηση προς το ραχιαίο άξονα (Pax6, Tbr1) αλλά και για τους δείκτες GFAP και Sox2 που εκφράζονται σε Radial glial κύτταρα. Ο δείκτης Beta-III tubulin (ή Tuj1), μία πρωτεΐνη της οικογένειας των τουμπουλινών που απαντάται αποκλειστικά σε νευρικά κύτταρα, ανιχνεύθηκε σε μικρό ποσοστό. Τέλος, εντοπίστηκαν νευρώνες θετικοί για το δείκτη Reelin που αντιπροσωπεύει την ύπαρξη Cajal-Retzius κυττάρων τα οποία σηματοδοτούν την έναρξη της νευρογένεσης (οι πρώτοι νευρώνες στην ανάπτυξη του φλοιού) (Εικόνα 3).



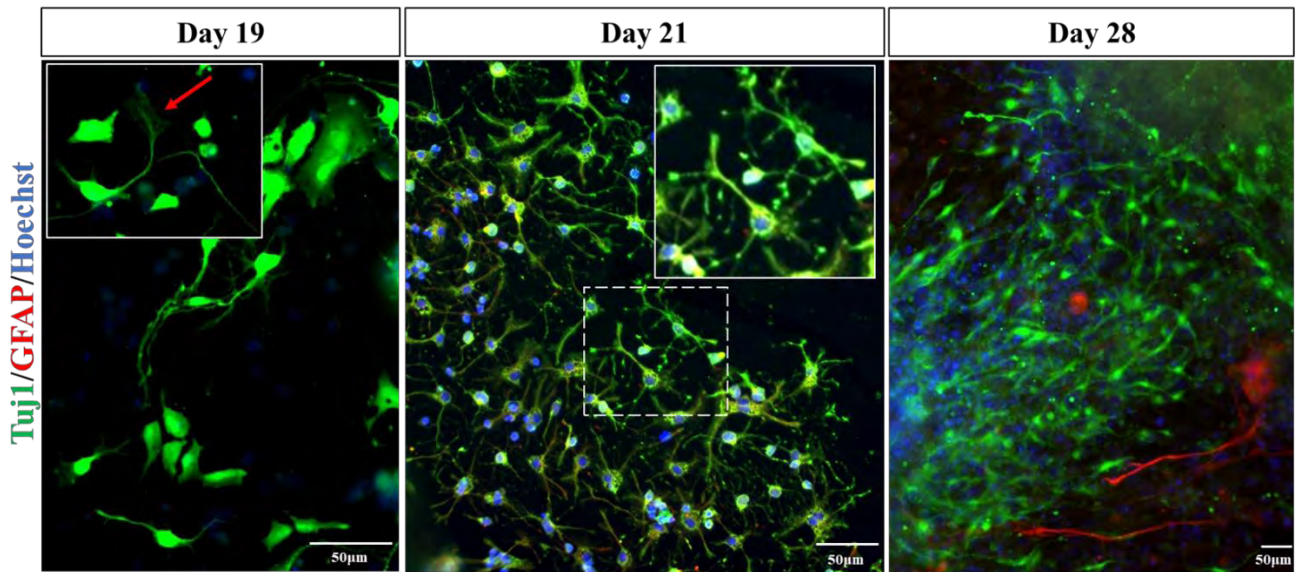
Εικόνα 3: Δημιουργία πρόδρομων νευρικών κυττάρων του εγκεφαλικού φλοιού από εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα. (A) Έκφραση Nestin+ και Pax6+ σε πρόδρομα νευρικά κύτταρα σε ποσοστό 70% την ημέρα 12 της διαφοροποίησης. Ποσοστό 35% GFAP+ Radial glial κυττάρων με δίπολη (bipolar) μορφολογία. Μικρό ποσοστό TuJ1+ και Reelin+ νευρώνων. Οι πυρήνες των κυττάρων οπτικοποιήθηκαν με τη χρώση Hoechst. **(B)** Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων του ανοσοφθορισμού. Μέτρηση κυττάρων σε 3 πεδία. Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα τριών τεχνικών επαναλήψεων και εκφράζονται ως mean ± SEM. **(C)** Έκφραση γονιδίων πρόδρομων νευρικών κυττάρων την ημέρα 12 της διαφοροποίησης (RT-PCR). Ως θετικός δείκτης χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο Hprt.

Η νευρογένεση αξιολογήθηκε μετά από 19, 21 και 28 ημέρες διαφοροποίησης, ελέγχοντας την έκφραση δεικτών που αντιστοιχούν σε ώριμους νευρώνες του φλοιού. Από την ημέρα 21, το 70% των κυττάρων προσδιορίστηκε ως θετικό για τον δείκτη TuJ1. Μειωμένο ποσοστό κυττάρων βρέθηκε θετικό για την πρωτεΐνη Reelin. Μικρό ποσοστό βρέθηκε να αντιστοιχεί σε NPs όπως ταυτοποιήθηκε από την έκφραση των Nestin και Pax6 (Διάγραμμα 1). Τα περισσότερα TuJ1+ κύτταρα έχουν χαρακτηριστική μονόπολη (unipolar) μορφολογία (Εικόνα

4). Παρατηρείται διακριτή χωρική οργάνωση από άλλα είδη κυττάρων (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Η ύπαρξη ώριμων νευρώνων ταυτοποιήθηκε από την έκφραση του γονιδίου *Map2*. Παράλληλα, εντοπίστηκαν νευρώνες που αντιστοιχούν τόσο στις εσωτερικές όσο και στις εξωτερικές στιβάδες του φλοιού. Οι νευρώνες των εσωτερικών στιβάδων ταυτοποιήθηκαν από την έκφραση του γονιδίου *Tbr1* και των ανώτερων στιβάδων από την έκφραση του *Satb2*. Όπως ήταν αναμενόμενο, η έκφραση του *Satb2* αυξάνεται μετά τη μέρα 21 καθώς στη νευρογένεση, οι νευρώνες των ανώτερων στιβάδων εμφανίζονται τελευταίοι. Αντίστοιχα, η έκφραση του *Tbr1* μειώνεται μετά την ημέρα 21. Τέλος, η ύπαρξη διεγερτικών πυραμιδικών νευρώνων ταυτοποιείται από την έκφραση του υποδοχέα *Vglut* (Διάγραμμα 2).

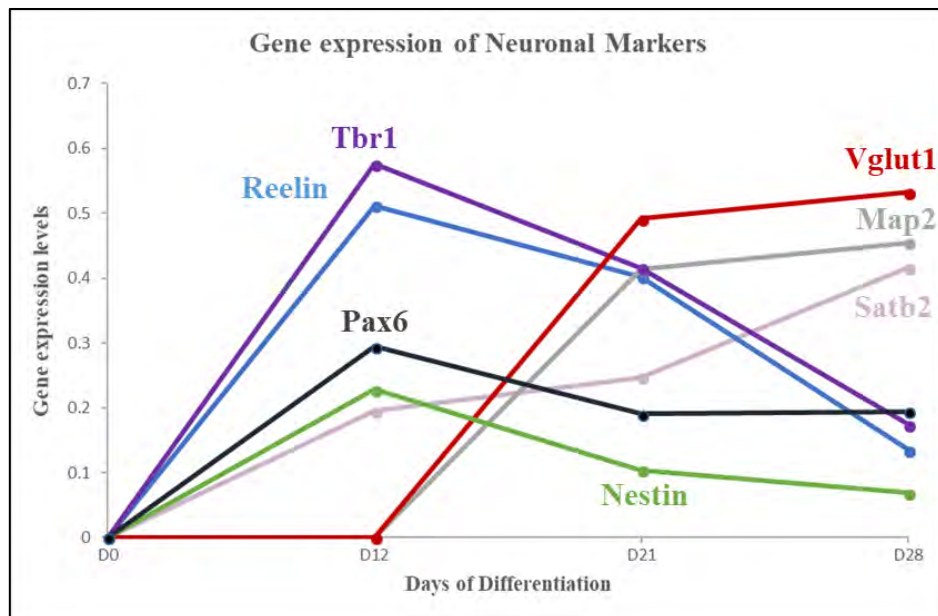


Διάγραμμα 1: Αξιολόγηση της νευρογένεσης την ημέρα 21 της διαφοροποίησης. Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων του ανοσοφθορισμού. *Tuj1*+ νευρώνες σε ποσοστό 70%. Το 15% των νευρώνων αντιστοιχεί σε *Reelin*+ Cajal Retzius κύτταρα. Ύπαρξη πρόδρομων νευρικών κυττάρων σε ποσοστό 30% όπως ταυτοποιείται από *Nestin/Pax6*+ κύτταρα και από *GFAP*+ Radial glial κύτταρα. *GFAP*+ αστροκύτταρα σε ποσοστό 10%. Μέτρηση κυττάρων σε 3 πεδία. Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα τριών τεχνικών επαναλήψεων και εκφράζονται ως mean ± SEM.



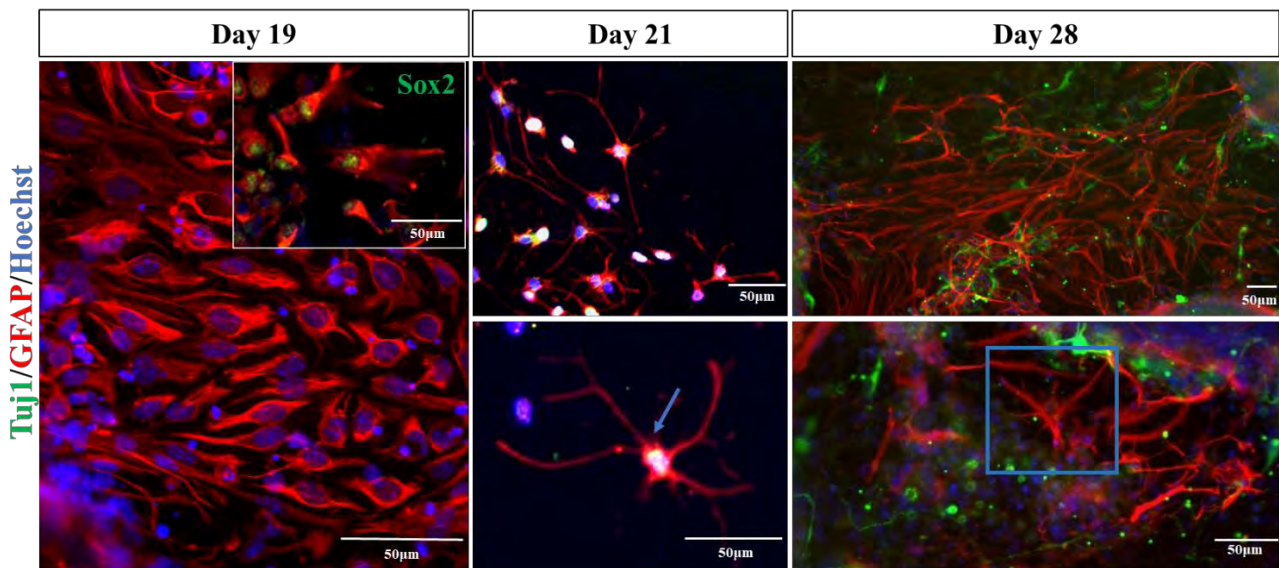
Εικόνα 4: Νευρογένεση σε διαφορετικές μέρες διαφοροποίησης.

Κυρίως Tuj1+ νευρώνες μετά την 21^η ημέρα της διαφοροποίησης. Χαρακτηριστική μορφολογία νευρώνων με ευδιάκριτο άξονα, σώμα και δενδρίτες. Κυρίως μονόπολο σχήμα διεγερτικών πυραμιδικών νευρώνων. Διακριτή χωρική οργάνωση από άλλα είδη κυττάρων όπως φαίνεται από την απουσία GFAP+ κυττάρων στους νευρωνικούς πληθυσμούς. Οι πυρήνες των κυττάρων οπτικοποιήθηκαν με τη χρώση Hoechst.



Διάγραμμα 2: Επίπεδα έκφρασης χαρακτηριστικών γονιδίων της νευρογένεσης. Μειωμένη γονιδιακή έκφραση Reelin, Nestin και Pax6 μετά την ημέρα 12. Αυξημένη έκφραση των γονιδίων Map2 και Vglut1 μετά την ημέρα 21. Υψηλή έκφραση του γονιδίου Tbr1 την ημέρα 21 και μείωση μέχρι την ημέρα 28. Αυξημένη έκφραση του γονιδίου Satb2 μετά την ημέρα 21. Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε μέσω της μέτρησης των μεταγράφων του γονιδίου Hprt. Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα ενός βιολογικού πειράματος.

Η γλοιογένεση αξιολογήθηκε τις αντίστοιχες ημέρες διαφοροποίησης. Καθώς η νευρογένεση προηγείται της γλοιογένεσης, πριν την ημέρα 21 εντοπίζονται μόνο τα πρόδρομα νευρογλοιακά κύτταρα radial glial, θετικά για GFAP και Sox2 και κυρίως δίπολη (bipolar) μορφολογία. Από την ημέρα 21, εντοπίζεται πληθυσμός αστροκυττάρων, όπως ταυτοποιήθηκε από την έκφραση του δείκτη GFAP (Διάγραμμα 1) αλλά και από τη χαρακτηριστική πολυπολική (multipolar) μορφολογία (Εικόνα 5). Παρατηρείται διακριτή χωρική οργάνωση από άλλα είδη κυττάρων (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).



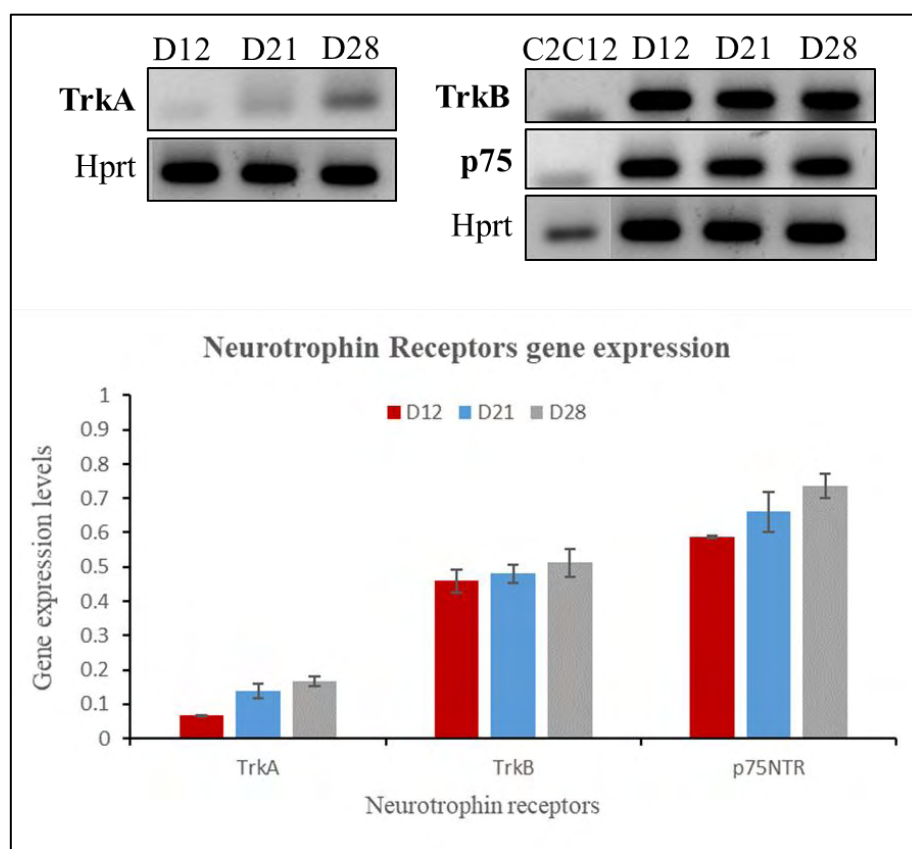
Εικόνα 5: Αξιολόγηση της γλοιογένεσης σε διαφορετικές ημέρες διαφοροποίησης.

Μόνο Radial glial GFAP/Sox2+ κύτταρα εντοπίζονται την ημέρα 19. GFAP+ αστροκύτταρα σε ποσοστό μετά την ημέρα 21 της διαφοροποίησης. Χαρακτηριστική πολυπολική μορφολογία αστροκυττάρων και δίπολη Radial glial κυττάρων. Οι πυρήνες των κυττάρων οπτικοποιήθηκαν με τη χρώση Hoechst.

2. Διερεύνηση της έκφρασης υποδοχέων νευροτροφινών από ESC-διαφοροποιημένους νευρώνες.

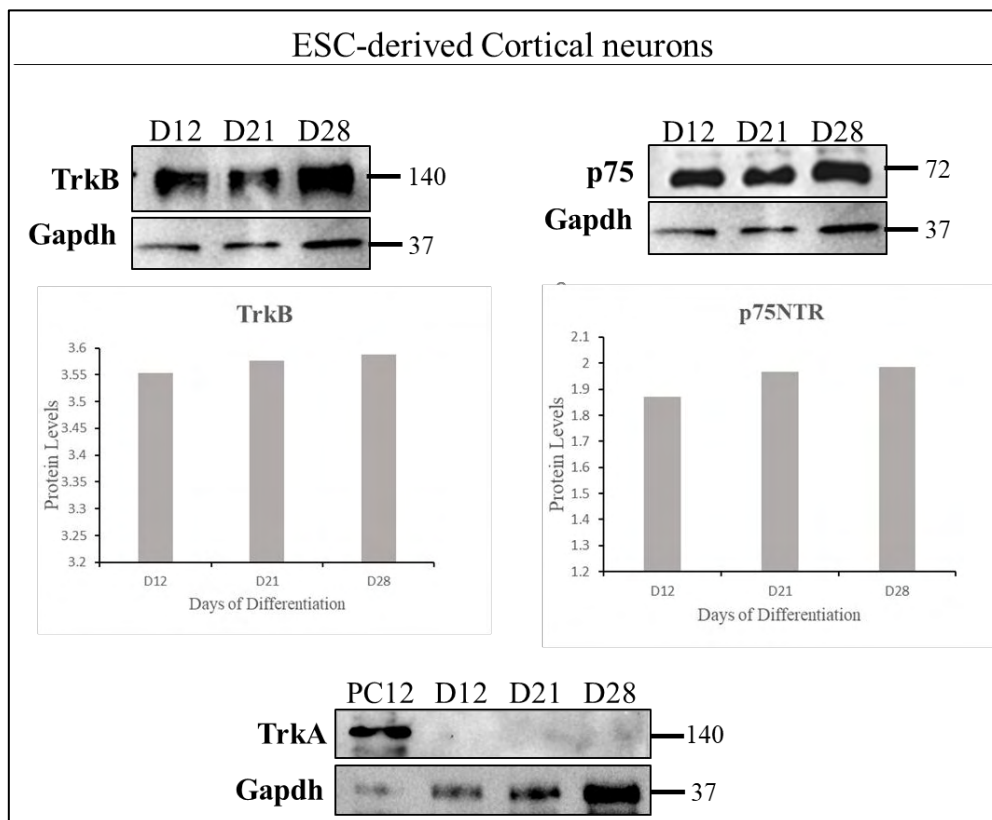
Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε η έκφραση των υποδοχέων TrkA, TrkB και p75^{NTR} στους ESC-διαφοροποιημένους νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού, καθώς στην παρούσα μελέτη οι υπό διερεύνηση φαρμακολογικές ουσίες δρουν μέσω των εν λόγω υποδοχέων.

Αρχικά, αξιολογήθηκε η γονιδιακή έκφραση των υποδοχέων. Τα χρονικά σημεία που επιλέχθηκαν είναι οι ημέρες 12, 21 και 28 μετά τη διαφοροποίηση (Εικόνα 6). Τα αποτελέσματα δύο ανεξάρτητων πειραμάτων RT-PCR δείχνουν σημαντική έκφραση των TrkB και p75^{NTR} σε όλα τα χρονικά σημεία, συγκριτικά με τη χαμηλή έκφραση του TrkA υποδοχέα. Επιπλέον, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην έκφραση των TrkB και p75^{NTR} υποδοχέων μεταξύ των διαφορετικών ημερών της διαφοροποίησης.



Εικόνα 6: Έλεγχος των μεταγραφικών επιπέδων των υποδοχέων των νευροτροφινών TrkA, TrkB και p75^{NTR}. Υψηλή έκφραση των υποδοχέων TrkB και p75^{NTR} αλλά όχι TrkA. Παρόμοια μεταγραφικά επίπεδα σε όλες τις ημέρες της διαφοροποίησης. Μυϊκά κύτταρα (C2C12) χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικό δείγμα αναφοράς για τους υποδοχείς TrkB και p75^{NTR}. Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα δύο ανεξάρτητων μεταξύ τους πειραμάτων και εκφράζονται ως mean ± SEM. Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε μέσω της μέτρησης των μεταγράφων του γονιδίου Hprt.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η ύπαρξη των λειτουργικών, γλυκοζυλιωμένων μορφών των υποδοχών με ανοσοαποτύπωση κατά Western στα αντίστοιχα χρονικά σημεία (Εικόνα 7). Όπως αναμενόταν, παρατηρήθηκε έκφραση των υποδοχών TrkB και p75^{NTR} αλλά όχι TrkA. Το Gapdh χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης (loading control) του φορτώματος ισόποσης ποσότητας ολικής πρωτεΐνης μεταξύ των δειγμάτων. Δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην έκφραση των υποδοχών μεταξύ των διαφορετικών ημερών της διαφοροποίησης.

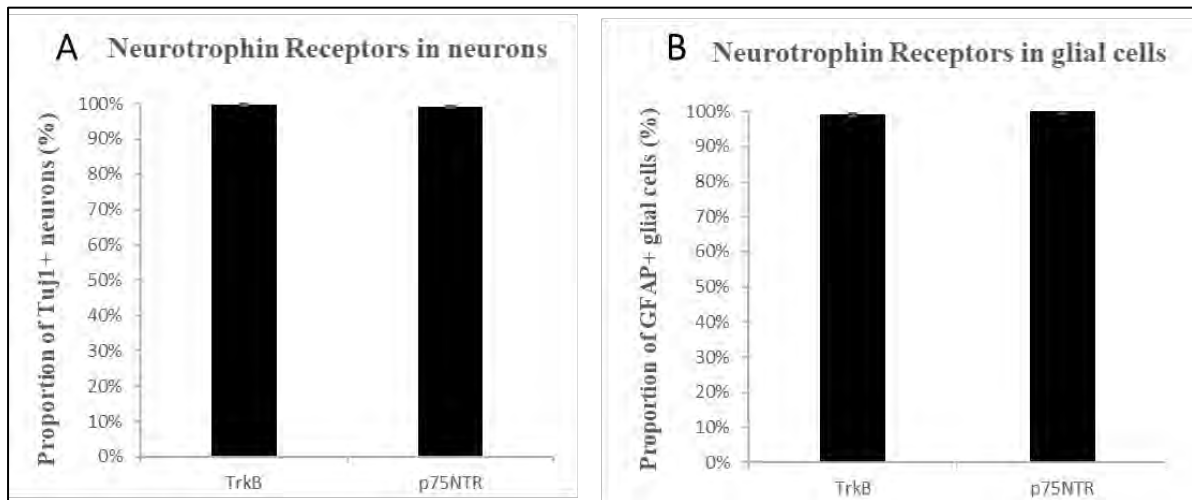


Εικόνα 7: Αξιολόγηση της έκφρασης των ώριμων υποδοχών των νευροτροφινών. Έκφραση των υποδοχών των νευροτροφινών σε διαφοροποιημένους νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού. Οι νευρώνες εκφράζουν σε όλα τα χρονικά σημεία τους υποδοχείς TrkB και p75^{NTR} αλλά όχι TrkA. Ως control της έκφρασης του TrkA χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά PC12.

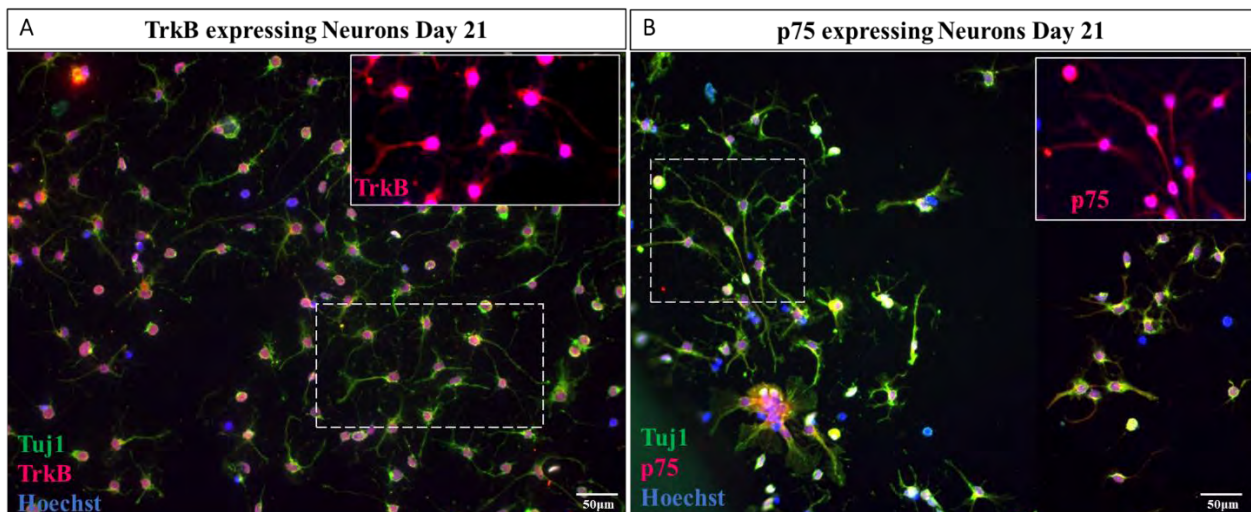
Με πειράματα ανοσοφθορισμού, επαληθεύθηκαν τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης την ημέρα 21 της διαφοροποίησης. Ταυτόχρονα, ποσοτικοποιήθηκαν οι διαφοροποιημένοι Tuj1+ νευρώνες που εκφράζουν TrkB και p75^{NTR} (Διάγραμμα 3A). Η τοπολογία των υποδοχών είναι τόσο πυρηνική όσο και μεμβρανική (Εικόνες 8A & 8B).

Στη συνέχεια εξετάστηκε αν οι υποδοχείς εκφράζονται από τον κυτταρικό πληθυσμό νευρογλοιακών κυττάρων (Εικόνες 9A & 9B). Η ύπαρξη των υποδοχών ποσοτικοποιήθηκε

σε GFAP+ κύτταρα (Διάγραμμα 3B). Τα αποτελέσματα είναι ενδεικτικά δύο ανεξαρτήτων μεταξύ τους πειραμάτων.

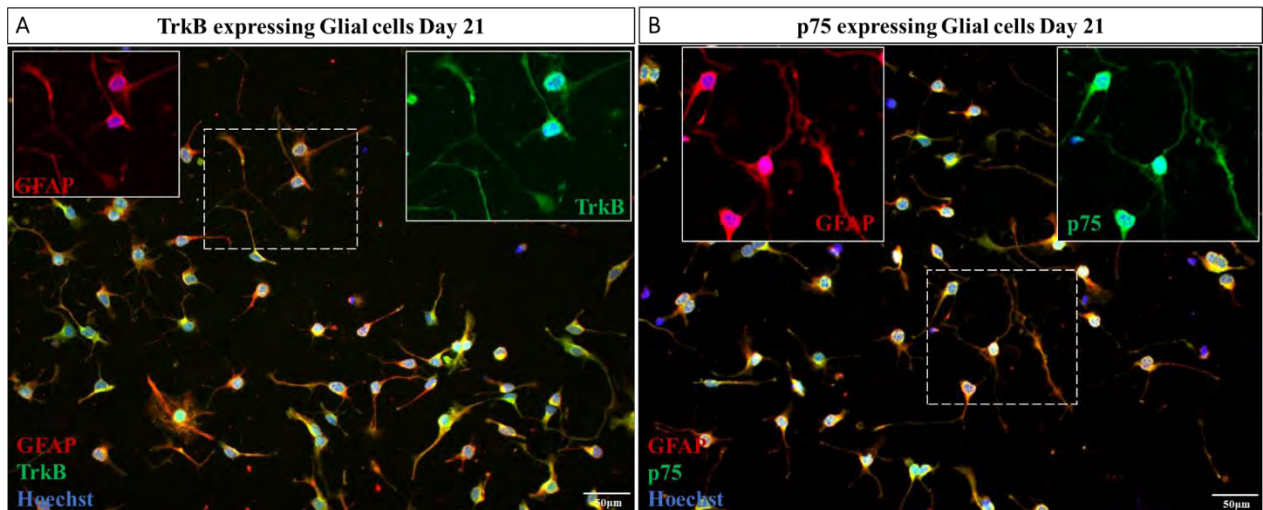


Διάγραμμα 3: Έκφραση των υποδοχέων των νευροτροφινών σε νευρώνες και νευρογλοιακά κύτταρα. (A) Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων του ανοσοφθορισμού. Όλα τα TuJ1+ κύτταρα εκφράζουν τους υποδοχείς TrkB και p75^{NTR}. (B) Όλα τα GFAP+ κύτταρα εκφράζουν τους υποδοχείς TrkB και p75^{NTR}. Η ανάλυση του πειράματος πραγματοποιήθηκε με Operetta High Content Imaging System.



Εικόνα 8: Έκφραση των υποδοχέων των νευροτροφινών σε νευρώνες.

(A) Έκφραση του TrkB υποδοχέα σε ESC-νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού. Πυρηνική και μεμβρανική κυτταρική τοποθεσία. (B) Έκφραση του p75^{NTR} υποδοχέα σε ESC-νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού. Πυρηνική και μεμβρανική κυτταρική τοποθεσία. Οι πυρήνες των κυττάρων οπτικοποιήθηκαν με τη χρώση Hoechst.



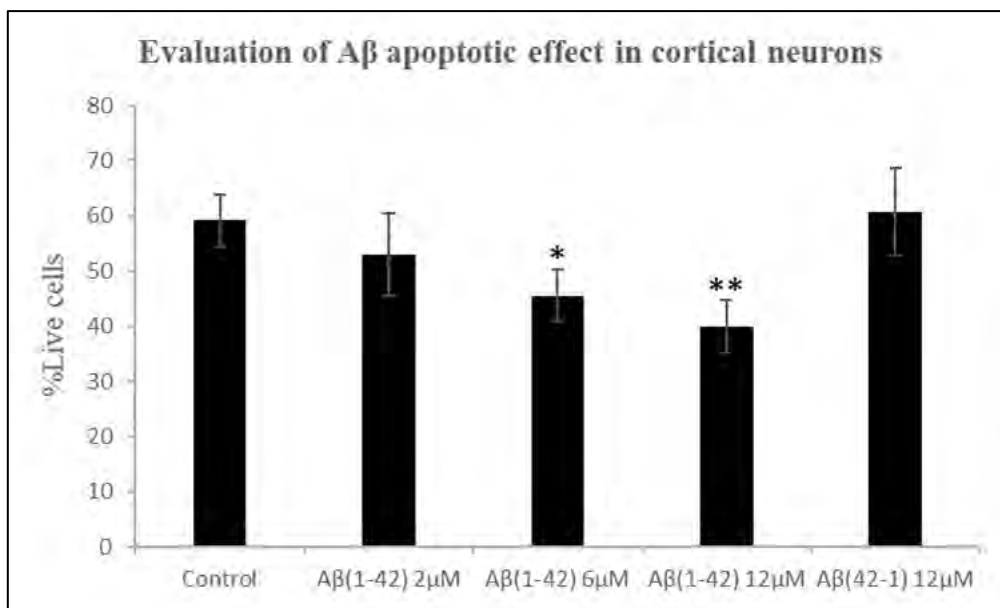
Εικόνα 9: Έκφραση των υποδοχέων των νευροτροφινών σε νευρογλοιακά κύτταρα.

(**A**) Έκφραση του TrkB υποδοχέα σε ESC-νευρογλοιακά κύτταρα. Πυρηνική και μεμβρανική κυτταρική τοποθεσία (**B**) Έκφραση του p75^{NTR} σε ESC-νευρογλοιακά κύτταρα. Πυρηνική και μεμβρανική κυτταρική τοποθεσία. Οι πυρήνες των κυττάρων οπτικοποιήθηκαν με τη χρώση Hoechst.

3. Δημιουργία μοντέλου της νόσου του Alzheimer.

3.1 Αξιολόγηση της τοξικότητας της β-αμυλοειδούς πρωτεΐνης.

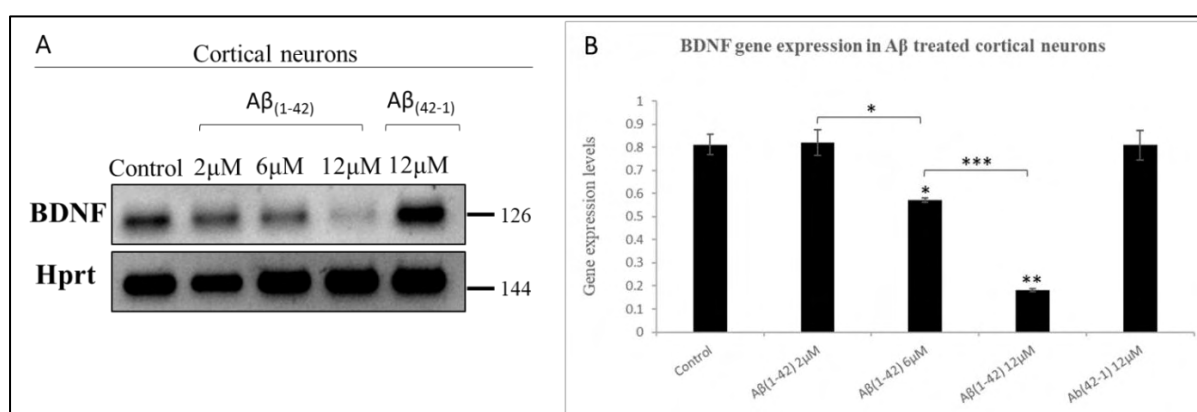
Στην παρούσα εργασία, δημιουργήσαμε μοντέλο της νόσου του Alzheimer με επώαση των ESC-διαφοροποιημένων νευρώνων με το τοξικό ολιγομερές πεπτιδίο $A\beta_{(1-42)}$. Οι νευρώνες επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις του πεπτιδίου την ημέρα 21 της διαφοροποίησης που χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό νευρικών κυττάρων αλλά και αστροκυττάρων. Διαπιστώθηκε δόσοεξαρτώμενη τοξικότητα με τα μεγαλύτερα ποσοστά νέκρωσης στην υψηλότερη συγκέντρωση. Δεν παρατηρείται αύξηση του κυτταρικού θανάτου στη συνθήκη αναφοράς του ανάστροφου πεπτιδίου $A\beta_{(42-1)}$, όπως ήταν αναμενόμενο. Τα αποτελέσματα του διαγράμματος 4 είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξαρτήτων μεταξύ τους πειραμάτων (Διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 4: Νευροτοξική δράση του $A\beta_{(1-42)}$ σε νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού. Η ζωτικότητα των κυττάρων ως απόκριση στη δράση του $A\beta_{(1-42)}$ αξιολογήθηκε σε διαφοροποιημένους νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού και προσδιορίστηκε με φθορισμό Calcein/Pi. Προσδιορισμός της ζωτικότητας μετά από 16h επώαση με το $A\beta_{(1-42)}$ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Διαπιστώθηκε δόσοεξαρτώμενη τοξικότητα του πεπτιδίου. Η ανάλυση του πειράματος πραγματοποιήθηκε με Operetta High Content Imaging System. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξαρτήτων μεταξύ τους πειραμάτων και εκφράζονται ως mean \pm SEM. *P < 0.05 και **P < 0.01 έναντι στη συνθήκη Control.

3.2 Διερεύνηση της έκφρασης της νευροτροφίνης BDNF.

Αφότου διαπιστώσαμε τη δόσοεξαρτώμενη τοξικότητα του $A\beta_{(1-42)}$ ολιγομερούς πεπτιδίου στους διαφοροποιημένους νευρώνες, αποφασίσαμε να ελέγξουμε τα mRNA επίπεδα της νευροτροφίνης BDNF στις ίδιες συγκεντρώσεις. Πράγματι, κατά αναλογία, διαπιστώθηκε δόσοεξαρτώμενη μείωση των μεταγράφων της νευροτροφίνης BDNF ενώ δεν παρατηρείται μείωση με τη χρήση του αναστροφου πεπτιδίου $A\beta_{(42-1)}$. Τα αποτελέσματα της εικόνας 10 είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξαρτήτων μεταξύ τους πειραμάτων (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Γονιδιακή έκφραση του BDNF σε $A\beta$ -treated νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού.

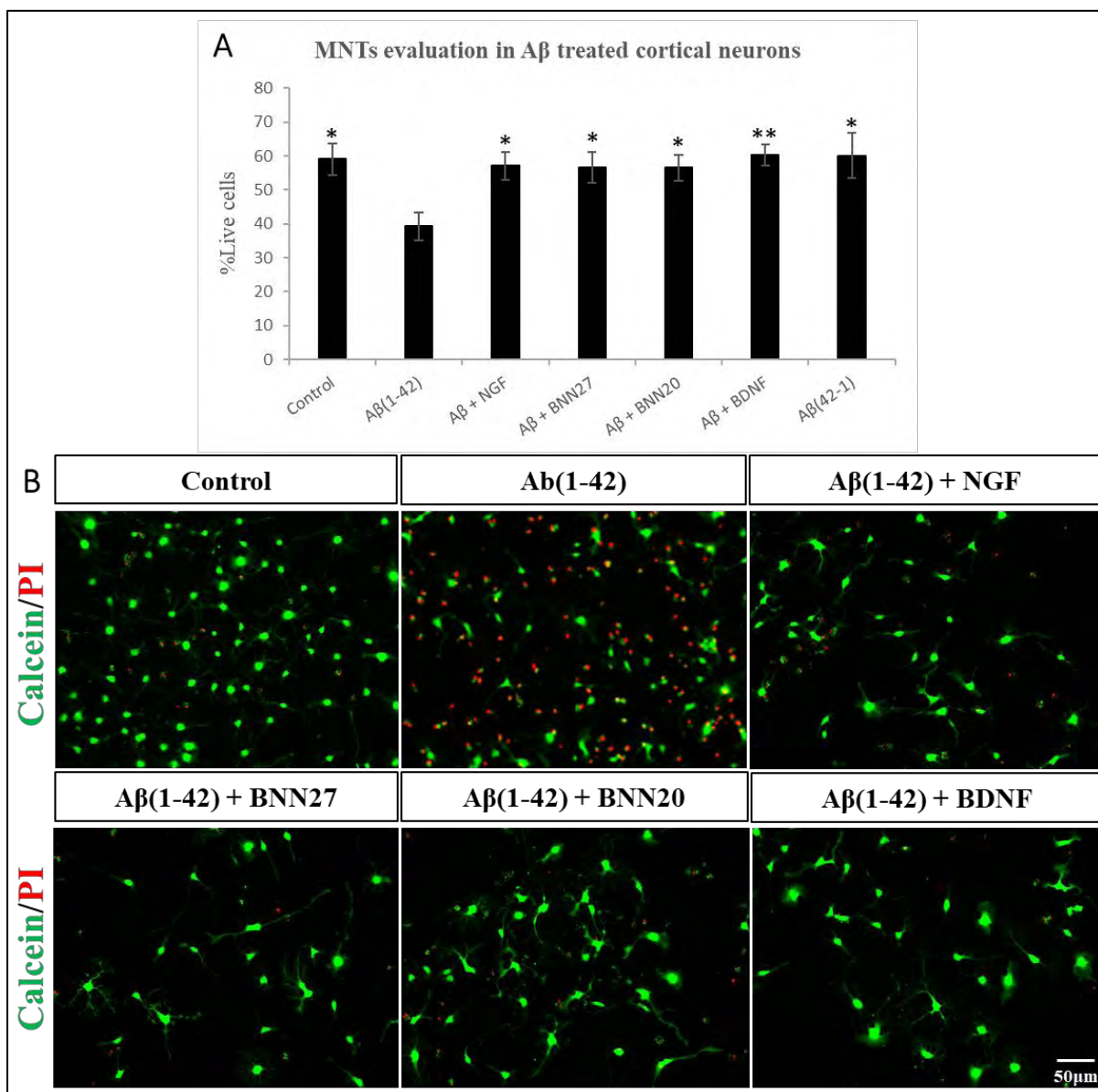
(A) Τα mRNA επίπεδα του BDNF ως απόκριση στη δράση του $A\beta_{(1-42)}$ αξιολογήθηκαν σε διαφοροποιημένους νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού και προσδιορίστηκαν με RT-PCR. Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε μέσω της μέτρησης των μεταγράφων του γονιδίου Hprt. (B) Ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης μετά από 16h επώαση με το $A\beta_{(1-42)}$ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Διαπιστώθηκε δόσοεξαρτώμενη μείωση της έκφρασης του BDNF. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξαρτήτων μεταξύ τους πειραμάτων και εκφράζονται ως mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ έναντι στη συνθήκη Control, * $P < 0.05$ μεταξύ των συγκεντρώσεων 2 μ M και 6 μ M και *** $P < 0.001$ μεταξύ των συγκεντρώσεων 6 μ M και 12 μ M.

4. Αξιολόγηση της νευροπροστατευτικής δράσης φαρμακολογικών ουσιών.

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η νευροπροστατευτική δράση δύο φαρμακολογικών ουσιών που μιμούνται τη δράση των νευροτροφινών. Πρόκειται για τις «μικρονευροτροφίνες» (MNTs) BNN27 και BNN20, με δράσεις ανάλογες των νευροτροφινών (NTs) NGF στην περίπτωση του BNN27 και των NGF και BDNF στην περίπτωση του BNN20. Ο φαρμακολογικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε ESC-διαφοροποιημένους νευρώνες την ημέρα 21 στους οποίους χορηγήθηκε το νευροτοξικό πεπτίδιο $A\beta_{(1-42)}$.

Το πεπτίδιο χορηγήθηκε στην υψηλότερη συγκέντρωση έπειτα από τη διαπίστωση της δόσοεξαρτώμενης, νευροτοξικής του δράσης. Ταυτόχρονα χορηγήθηκαν οι μικρονευροτροφίνες αλλά και οι αντίστοιχες νευροτροφίνες τους. Διαπιστώθηκε εκτεταμένος

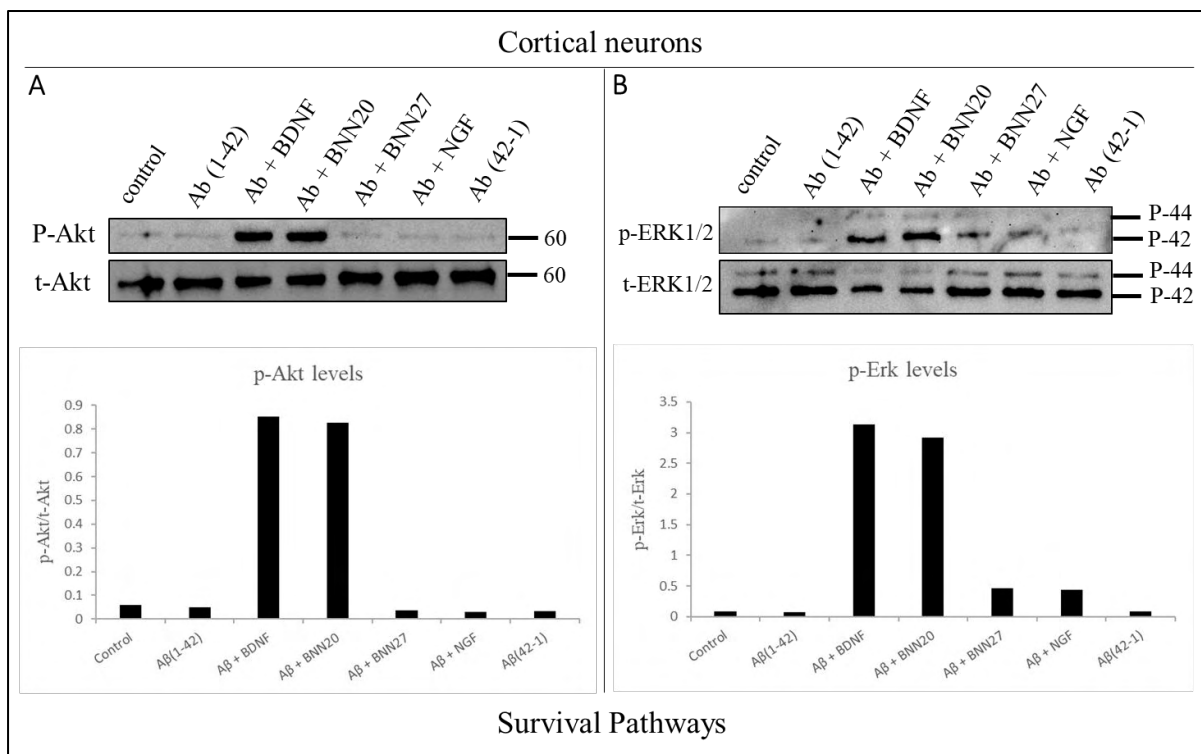
κυτταρικός θάνατος με την προσθήκη του $A\beta_{(1-42)}$ σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (untreated) αλλά όχι με την προσθήκη του ανάστροφου πεπτιδίου $A\beta_{(42-1)}$. Στις περιπτώσεις όπου το πεπτίδιο προστέθηκε με τα φάρμακα παρατηρείται σημαντική επιβίωση των κυττάρων που προσεγγίζει τα επίπεδα του δείγματος αναφοράς (control). Τα αποτελέσματα της εικόνας 11 είναι αντιπροσωπευτικά τεσσάρων ανεξαρτήτων μεταξύ τους πειραμάτων (Εικόνα 11). Η ανάλυση του πειράματος πραγματοποιήθηκε με Operetta High Content Imaging System.



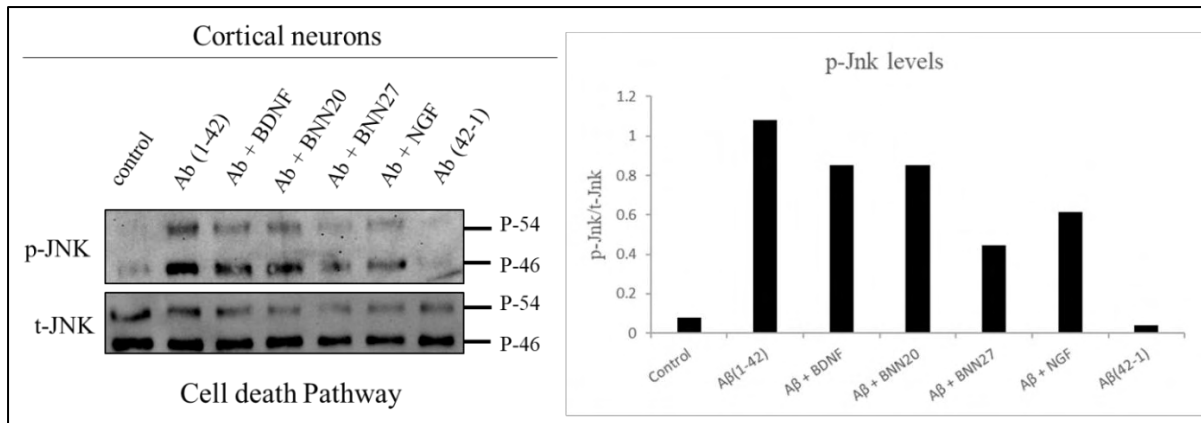
Εικόνα 11: Νευροπροστατευτική δράση των μικρονευροτροφινών BNN27 και BNN20 και των αντιστοιχων νευροτροφινών τους NGF και BDNF. (Α) Η ζωτικότητα των κυττάρων ως απόκριση στη δράση των MNT-NTs αξιολογήθηκε σε διαφοροποιημένους νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού και προσδιορίστηκε με φθορισμό Calcein/Pi. **(Β)** Ποσοτικοποίηση των θετικών για Calcein ή Pi νευρώνων μετά από 16h επώαση με το $A\beta_{(1-42)}$ και τους BNN27, BNN20, NGF ή BDNF. Η ανάλυση του

πειράματος πραγματοποιήθηκε με Operetta High Content Imaging system. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τεσσάρων ανεξαρτήτων μεταξύ τους πειραμάτων και εκφράζονται ως mean \pm SEM. *P < 0.05 και **P < 0.01 έναντι στη συνθήκη του A β ₍₁₋₄₂₎.

Βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα αποφασίσαμε να διερευνήσουμε τα σηματοδοτικά μονοπάτια επιβίωσης και θανάτου που ενεργοποιούνται ή καταστέλλονται ως απόκριση στις ιδιότητες των MNTs. Οι νευρώνες επωάστηκαν με το πεπτίδιο και τις φαρμακολογικές ουσίες και η σηματοδότηση αξιολογήθηκε με Western blot (Εικόνες 12 & 13). Παρατηρείται ενεργοποίηση των μονοπατιών επιβίωσης Akt (Εικόνα 12A) και Erk (Εικόνα 12B) και καταστολή του μονοπατιού c-jun (Jnk) (Εικόνα 13). Παρατηρείται φωσφορυλίωση της κινάσης Erk ως απόκριση σε όλες τις φαρμακολογικές ουσίες, ενώ μόνο στην περίπτωση των BNN20 και BDNF παρατηρείται φωσφορυλίωση της Akt κινάσης. Ισχυρότερη αντι-αποπτωτική δράση φαίνεται να ασκούν οι BNN27 και NGF όπως φαίνεται από την μειωμένη ενεργοποίηση της Jnk φωσφορυλιωμένης κινάσης.



Εικόνα 12: Οι μικρονευροτροφίνες επάγουν μονοπάτια επιβίωσης σε A β -treated νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού. (A) Τα επίπεδα της phospho-Akt κινάσης (p-Akt) ως απόκριση στη δράση των μικρονευροτροφινών. Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε ως προς τα επίπεδα της total-Akt (t-Akt). (B) Τα επίπεδα της phospho-Erk κινάσης (p-Erk) ως απόκριση στη δράση των μικρονευροτροφινών. Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε ως προς τα επίπεδα της total-Erk (t-Erk).



Εικόνα 13: Οι μικρονευροτροφίνες επιδρούν στην ενεργοποίηση του μονοπατιού απόπτωσης JNK σε Αβ-treated νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού. Τα επίπεδα της phosho-JNK κινάσης (p-JNK) ως απόκριση στη δράση των μικρονευροτροφινών. Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε ως προς τα επίπεδα της total-JNK (t-JNK).

Συμπεράσματα

Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες αποτελούν σοβαρές, χρόνιες διαταραχές του νευρικού συστήματος (Zuba-Surma et al., 2012) που χαρακτηρίζονται από την προοδευτική απώλεια νευρώνων και νευρογλοιακών κυττάρων, οδηγώντας στο θάνατο του ασθενούς. Μέχρι σήμερα, η μελέτη και οι προσπάθειες ίασης αξιοποιούν κατά κύριο λόγο ζωικά μοντέλα ή αθανатоποιημένες κυτταρικές σειρές (Kim et al., 2015). Ωστόσο, οι διαφορές στη φυσιολογία μεταξύ των μοντέλων αυτών και των ανθρώπων δυσχεραίνουν την κατανόηση των νόσων και την ανάπτυξη θεραπειών.

Μία σημαντική ερευνητική προσπάθεια των τελευταίων είκοσι ετών είναι η *in vitro* δημιουργία νευρικού ιστού από βλαστοκύτταρα (Hansen et al., 2011). Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν αναπτύξει πρωτόκολλα διαφοροποίησης για την παραγωγή πρόδρομων και ώριμων νευρικών κυττάρων από ESCs/iPSCs τόσο ποντικού όσο και ανθρώπου (Gaspard et al., 2008; Shi et al., 2012; Hu and Zhang, 2009; Boissart et al., 2013). Οι μεθοδολογίες αυτές δίνουν τη δυνατότητα πρόσβασης σε ανθρώπινο νευρικό ιστό επιτρέποντας τη διερεύνηση της μοριακής αιτιολογίας του νευροεκφυλισμού, ενώ ταυτόχρονα καθίσταται δυνατή η σύγκριση των παθολογικών χαρακτηριστικών ανάμεσα σε ζωικά μοντέλα και στον άνθρωπο.

Η νόσος του Alzheimer είναι μια προοδευτική νευροεκφυλιστική διαταραχή που πλήττει ισχυρά τη λειτουργικότητα του εγκεφαλικού φλοιού, την υπεύθυνη περιοχή για τη μνήμη και τη μάθηση (Masters et al., 2018). Τα δύο βασικά ορόσημα της νόσου είναι οι αμυλοειδείς πλάκες και τα νευροϊνιδιακά πλέγματα (NFTs) (Choi et al., 2016).

Οι νευροτροφίνες (NTs) είναι καλά χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος που επηρεάζουν καταλυτικά την επιβίωση και διαφοροποίηση των νευρώνων (Travaglia et al., 2012; Huang et al., 2001). Οι πρωτεΐνες αυτές και οι υποδοχείς τους, Trks και p75^{NTR}, φαίνεται να κατέχουν σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία και/ή στις παθολογικές συνέπειες της νόσου του Alzheimer, ως εκ τούτου εξετάζονται σήμερα για την ανάπτυξη θεραπευτικών στρατηγικών (Angelucci et al., 2014).

Βασιζόμενοι στις παραπάνω γνώσεις, αποφασίσαμε να διερευνήσουμε τη νευροπροστατευτική δράση δύο συνθετικών φαρμακολογικών ουσιών, που μιμούνται τις ιδιότητες των νευροτροφινών, σε ένα μοντέλο της ασθένειας του Alzheimer προερχόμενο από εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα. Αξιοποιώντας τη μεθοδολογία των Gaspard et al., 2009, τα ESCs αρχικά διαφοροποιήθηκαν σε πρόδρομα νευρικά κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού και στη συνέχεια σε ώριμα νευρικά και νευρογλοιακά κύτταρα. Η διαφοροποίηση αξιολογήθηκε σε διαφορετικά

χρονικά σημεία και διαπιστώθηκε σημαντική παραγωγή ώριμων διεγερτικών νευρώνων τις ημέρες της ώριμης διαφοροποίησης (late differentiation), όπως ταυτοποιήθηκαν από την έκφραση χαρακτηριστικών δεικτών. Αναμενόμενη ήταν η κινητική της έκφρασης χαρακτηριστικών γονιδίων μεταξύ πρόδρομων και ώριμων νευρικών κυττάρων όπως έχει αξιολογηθεί από τους Gaspard et al (**Gaspard et al., 2008**). Ταυτόχρονα, διαπιστώθηκε η ύπαρξη πληθυσμού νευρογλοιακών κυττάρων που ακολουθεί χρονικά τη νευρογένεση. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι οι πληθυσμοί των νευρικών και νευρογλοιακών κυττάρων παρουσιάζουν συγκεκριμένη τοπολογία και χωρική οργάνωση, διακριτή μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών, που δημιουργούν ένα ανομοιογενές μοτίβο καλλιέργειας. Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των χρονικών σημείων της ώριμης διαφοροποίησης με εξαίρεση τη γένεση περισσότερων νευρώνων των ανώτερων στιβάδων.

Καθώς η δράση των υπό έλεγχο φαρμακολογικών ουσιών ασκείται μέσω των υποδοχέων των νευροτροφινών (NTRs) TrkA, TrkB και p75^{NTR} (**Pediaditakis et al., 2016; Botsakis et al., 2017**), διερευνήσαμε την έκφρασή τους από τα διαφοροποιημένα κύτταρα. Παράλληλα, είναι γνωστό ότι οι NTRs εμπλέκονται σημαντικά στη νόσο του Alzheimer (**Hock et al., 2000; Peng et al., 2009**). Διαπιστώθηκε υψηλή έκφραση των TrkB και p75^{NTR} στο σύνολο των νευρικών και των νευρογλοιακών κυττάρων ενώ απουσιάζει πλήρως ο υποδοχέας TrkA. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με βιβλιογραφικές αναφορές που ανιχνεύουν τους TrkB και p75^{NTR}, αλλά όχι τον TrkA, σε primary κύτταρα εγκεφαλικού φλοιού (**Zhang et al., 2013; Park et al., 2004; Cragolini et al., 2009; Hutton et al., 1992**). Εξετάζοντας την έκφραση των TrkB και p75^{NTR} σε διαφορετικές ημέρες διαφοροποίησης, δεν παρατηρήσαμε σημαντική διακύμανση στην έκφραση τους. Το γεγονός αυτό πιθανώς οφείλεται στην έκφραση των υποδοχέων από τα πρόδρομα νευρικά και νευρογλοιακά κύτταρα που απαντώνται σε υψηλό ποσοστό νωρίς κατά τη διαφοροποίηση (early differentiation). Πράγματι, είναι γνωστός ο ρόλος των δύο υποδοχέων στην ανάπτυξη του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος (**Alcántara et al., 2006; Young et al., 2007**).

Ένα από τα κύρια ορόσημα της νόσου του Alzheimer είναι η συσσώρευση αμυλοειδών πλακών (**Masters et al., 2018**). Οι αμυλοειδείς πλάκες προκύπτουν από τοξικά ολιγομερή της β-αμυλοειδούς πρωτεΐνης. Το ολιγομερές πεπτίδιο Aβ₍₁₋₄₂₎ χρησιμοποιείται από πολλούς ερευνητές για τη δημιουργία κυτταρικών και ζωικών μοντέλων του Alzheimer και την εύρεση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων (**Yaar et al., 2002; Costantini et al., 2005; Sotthibundhu et al., 2008**).

Εφόσον αποδείξαμε τη διαφοροποίηση των ESCs σε νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού που εκφράζουν ισχυρά τους υποδοχείς των νευροτροφινών, αποφασίσαμε να αξιολογήσουμε την

τοξική επίδραση του ολιγομερούς $A\beta_{(1-42)}$ στους διαφοροποιημένους νευρώνες. Καθώς δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο ποσοστό των νευρώνων του εγκεφαλικού φλοιού αλλά και στην έκφραση των υποδοχέων νευροτροφινών μεταξύ των χρονικών σημείων που αντιστοιχούν στην ώριμη διαφοροποίηση, αποφασίσαμε για πρακτικούς λόγους να μελετήσουμε τη επίδραση σε νευρώνες την ημέρα 21. Διαπιστώθηκε δόσοεξαρτώμενη τοξικότητα όπως έχει παρατηρηθεί κι από άλλους ερευνητές (**Arancibia et al., 2008**).

Είναι γνωστό ότι στη νόσο του Alzheimer, τα επίπεδα του BDNF μειώνονται προοδευτικά με την εξέλιξη της νόσου (**Laske et al., 2006, Angelucci et al., 2010; Forlenza et al., 2010**). Βασιζόμενοι σε αυτή τη γνώση, αποφασίσαμε να ελέγξουμε τη γονιδιακή έκφραση του BDNF έπειτα από τη χορήγηση του ολιγομερούς $A\beta_{(1-42)}$ για 16 ώρες στους διαφοροποιημένους νευρώνες. Το αποτέλεσμα ήταν δόσοεξαρτώμενη μείωση των μεταγράφων γεγονός το οποίο έρχεται σε συμφωνία με το πείραμα της νευροτοξικότητας. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζουν οι Garzon et al., σε κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος (neuroblastoma) (**Garzon et al., 2007**). Εύλογα αξίζει να διερευνήσουμε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ενδοκυτταρικής αλλά και εκκρινόμενης BDNF στις αντίστοιχες συνθήκες αλλά και το μηχανισμό με τον οποίο το $A\beta$ ολιγομερές επιδρά στην έκφραση αυτής της νευροτροφίνης.

Έχοντας αποδείξει τη δημιουργία in vitro μοντέλου της νόσου του Alzheimer, πραγματοποιήσαμε τον έλεγχο δύο φαρμακολογικών ουσιών που ονομάζονται μικρονευροτροφίνες (MNTs). Πρόκειται για τα συνθετικά χημικά μόρια BNN27 και BNN20 με ιδιότητες ανάλογες των νευροτροφινών NGF και BDNF. Οι MNTs παρουσιάζουν σημαντική προοπτική ως θεραπευτικά μόρια νευροεκφυλιστικών νόσων καθώς διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και δεν παρουσιάζουν τοξικότητα για τον οργανισμό (**Gravanis et al., 2017**). Διερευνώντας τη ζωτικότητα των νευρώνων, διαπιστώθηκε σημαντική νευροπροστατευτική δράση στις συνθήκες τόσο των MNTs όσο και των αντίστοιχων νευροτροφινών τους έναντι στο τοξικό ολιγομερές $A\beta_{(1-42)}$, επιβεβαιώνοντας την ανάλογη δράση τους. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με βιβλιογραφικές αναφορές που υποστηρίζουν τη νευροπροστατευτική δράση των BDNF και NGF έναντι στο τοξικό $A\beta_{(1-42)}$ (**Arancibia et al., 2008; Yankner et al., 1990**).

Στο τελευταίο μέρος της παρούσας μελέτης, διερευνήσαμε τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται ή καταστέλλονται ως απόκριση στις ιδιότητες των νευροτροφινών. Διαπιστώθηκε ισχυρή ενεργοποίηση των μονοπατιών επιβίωσης των Akt και Erk κινασών ως απόκριση στον BNN20 και στην νευροτροφίνη BDNF. Το γεγονός αυτό πιθανώς διενεργείται μέσω του TrkB υποδοχέα που είναι γνωστό ότι ενεργοποιείται από τις δύο αυτές φαρμακολογικές ουσίες (**Botsakis et al., 2017**). Δεν παρατηρείται ανάλογη ενεργοποίηση στην

περίπτωση των BNN27 και NGF πιθανώς επειδή ασκούν τη δράση τους μέσω του TrkA υποδοχέα (**Pediaditakis et al., 2016**) που απουσιάζει από το συγκεκριμένο μοντέλο. Γνωρίζοντας ότι οι MNTs αλλά και οι NGF/BDNF παρουσιάζουν συγγένεια για τον p75^{NTR} υποδοχέα, ελέγξαμε τη σηματοδότηση του αποπτωτικού μονοπατιού c-jun (JNK). Διαπιστώθηκαν χαμηλότερα επίπεδα της JNK κινάσης σε όλες τις φαρμακολογικές ουσίες σε σχέση με τη συνθήκη του Aβ₍₁₋₄₂₎, με μικρότερα στην περίπτωση του BNN27. Αυτό το γεγονός μας οδήγησε στην υπόθεση ότι ο BNN27 και ο NGF, σε απουσία του TrkA υποδοχέα, ασκούν τη νευροπροστατευτική τους δράση εμποδίζοντας την απόπτωση που επάγεται από το Aβ₍₁₋₄₂₎ μέσω του p75^{NTR} (**Costantini et al., 2005**). Η υπόθεση αυτή συμφωνεί με βιβλιογραφικές αναφορές που υποστηρίζουν ότι παρά την έλλειψη του TrkA σε νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού (**Lee et al., 1998; Park et al., 2004**), ο NGF επάγει αντιαποπτωτικές δράσεις in vivo και in vitro μέσω του p75^{NTR}, ενώ ο BDNF επάγει επιβίωση μέσω του TrkB υποδοχέα (**Kume et al., 2000; Culmsee et al., 1999; Minichiello and Klein, 1996; Courtney et al., 1997**). Οι παραπάνω υποθέσεις μπορούν να διερευνηθούν με τη χρήση αναστολέων των NTRs επιβεβαιώνοντας το αποκλειστικό ρόλο τους στη δράση των MNTs.

Στην παρούσα εργασία, αποδείξαμε τις νευροπροστατευτικές ιδιότητες δύο καινοτόμων φαρμακολογικών ουσιών, BNN20 και BNN27, σε ένα μοντέλο της νόσου του Alzheimer προερχόμενο από τη διαφοροποίηση εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων ποντικού σε νευρικά κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού. Η ικανότητα αποδιαφοροποίησης σωματικών κυττάρων του ανθρώπου σε επαγόμενα βλαστοκύτταρα (iPSCs) και η διαφοροποίησή τους σε νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού έχει επιτρέψει τα τελευταία χρόνια τη μελέτη ανθρώπινων νευροεκφυλιστικών ασθενειών και την ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπειών. Συνεπώς, το επόμενο στάδιο της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η προκλινική μελέτη των MNTs σε ανθρώπινο νευρικό ιστό ασθενών της νόσου του Alzheimer, διαφοροποιώντας ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα. Καθώς οι ex vivo συνθήκες προσομοιάζουν ισχυρότερα τον in vivo φαινότυπο, το παραπάνω εγχείρημα αναμένεται να πραγματοποιηθεί με τη δημιουργία τρισδιάστατου (3D) μοντέλου της νόσου του Alzheimer, αξιοποιώντας καινοτόμα 3D πορώδη ικρίωματα βιοϋλικών, όπως κολλαγόνο. Το γεγονός αυτό θα επιτρέψει με μεγαλύτερη ακρίβεια τη διερεύνηση της επίδρασης των MNTs στην πρόοδο της νόσου, παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες πριν από την έναρξη κλινικών μελετών.

Αναντίρρητα, ο συνδυασμός των επιστημονικών πεδίων των βλαστοκυττάρων και των βιοϋλικών και η ανάπτυξη καινοτόμων φαρμακολογικών ουσιών δίνει ελπίδες για την εύρεση μόνιμης ίασης των νευροεκφυλιστικών νόσων, που σήμερα αποτελούν ένα παγκόσμιο

κοινωνικό πρόβλημα, επιτρέποντας το σχεδιασμό εξατομικευμένων θεραπειών σύμφωνα με τη γενετική ταυτότητα και τις ιδιαιτερότητες του κάθε ασθενή.

Βιβλιογραφία

1. Akagi, M. *et al.* Nonpeptide neurotrophic agents useful in the treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. *J Pharmacol Sci* **127**, 155-163, doi:10.1016/j.jphs.2014.12.015 (2015).
2. Allen, S. J. *et al.* Normal β -NGF content in Alzheimer's disease cerebral cortex and hippocampus. *Neuroscience Letters* **131**, 135-139, doi:10.1016/0304-3940(91)90354-v (1991).
3. Anderson, S. & Vanderhaeghen, P. Cortical neurogenesis from pluripotent stem cells: complexity emerging from simplicity. *Curr Opin Neurobiol* **27**, 151-157, doi:10.1016/j.conb.2014.03.012 (2014).
4. Anderson, S. A. Interneuron Migration from Basal Forebrain to Neocortex: Dependence on Dlx Genes. *Science* **278**, 474-476, doi:10.1126/science.278.5337.474 (1997).
5. Anderson, S. A. Distinct Origins of Neocortical Projection Neurons and Interneurons In Vivo. *Cerebral Cortex* **12**, 702-709, doi:10.1093/cercor/12.7.702 (2002).
6. Ando, K. *et al.* Accelerated human mutant tau aggregation by knocking out murine tau in a transgenic mouse model. *Am J Pathol* **178**, 803-816, doi:10.1016/j.ajpath.2010.10.034 (2011).
7. Angelucci, F. *et al.* The effect of neuropeptide Y on cell survival and neurotrophin expression in in-vitro models of Alzheimer's disease. *Can J Physiol Pharmacol* **92**, 621-630, doi:10.1139/cjpp-2014-0099 (2014).
8. Anthony, T. E., Klein, C., Fishell, G. & Heintz, N. Radial Glia Serve as Neuronal Progenitors in All Regions of the Central Nervous System. *Neuron* **41**, 881-890, doi:10.1016/s0896-6273(04)00140-0 (2004).
9. Arancibia, S. *et al.* Protective effect of BDNF against beta-amyloid induced neurotoxicity in vitro and in vivo in rats. *Neurobiol Dis* **31**, 316-326, doi:10.1016/j.nbd.2008.05.012 (2008).
10. Arber, C., Lovejoy, C. & Wray, S. Stem cell models of Alzheimer's disease: progress and challenges. *Alzheimers Res Ther* **9**, 42, doi:10.1186/s13195-017-0268-4 (2017).
11. Arlotta, P. *et al.* Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* **45**, 207-221, doi:10.1016/j.neuron.2004.12.036 (2005).
12. Atri, A., Shaughnessy, L. W., Locascio, J. J. & Growdon, J. H. Long-term course and effectiveness of combination therapy in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **22**, 209-221, doi:10.1097/WAD.0b013e31816653bc (2008).
13. Barbacid, M. Structural and Functional Properties of the TRK Family of Neurotrophin Receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences* **766**, 442-458, doi:10.1111/j.1749-6632.1995.tb26693.x (1995).

14. Beattie, M. S. *et al.* ProNGF Induces p75-Mediated Death of Oligodendrocytes following Spinal Cord Injury. *Neuron* **36**, 375-386, doi:10.1016/s0896-6273(02)01005-x (2002).
15. Bettens, K., Slegers, K. & Van Broeckhoven, C. Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Hum Mol Genet* **19**, R4-R11, doi:10.1093/hmg/ddq142 (2010).
16. Boissart, C. *et al.* Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening. *Transl Psychiatry* **3**, e294, doi:10.1038/tp.2013.71 (2013).
17. Botsakis, K. *et al.* BNN-20, a synthetic microneurotrophin, strongly protects dopaminergic neurons in the "weaver" mouse, a genetic model of dopamine-denervation, acting through the TrkB neurotrophin receptor. *Neuropharmacology* **121**, 140-157, doi:10.1016/j.neuropharm.2017.04.043 (2017).
18. Boyer, L. A. *et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**, 947-956, doi:10.1016/j.cell.2005.08.020 (2005).
19. Braak, H. & Braak, E. Staging of alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiology of Aging* **16**, 271-278, doi:10.1016/0197-4580(95)00021-6 (1995).
20. Britanova, O. *et al.* Satb2 is a postmitotic determinant for upper-layer neuron specification in the neocortex. *Neuron* **57**, 378-392, doi:10.1016/j.neuron.2007.12.028 (2008).
21. Bystron, I., Blakemore, C. & Rakic, P. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci* **9**, 110-122, doi:10.1038/nrn2252 (2008).
22. Calogeropoulou, T. *et al.* Novel dehydroepiandrosterone derivatives with antiapoptotic, neuroprotective activity. *J Med Chem* **52**, 6569-6587, doi:10.1021/jm900468p (2009).
23. Campbell, K. Cortical neuron specification: it has its time and place. *Neuron* **46**, 373-376, doi:10.1016/j.neuron.2005.04.014 (2005).
24. Campbell, K. & Götz, M. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends in Neurosciences* **25**, 235-238, doi:10.1016/s0166-2236(02)02156-2 (2002).
25. Cao, S. Y. *et al.* Enhanced derivation of human pluripotent stem cell-derived cortical glutamatergic neurons by a small molecule. *Sci Rep* **7**, 3282, doi:10.1038/s41598-017-03519-w (2017).
26. Carter, B. D. *et al.* Selective Activation of NF-kappa B by Nerve Growth Factor Through the Neurotrophin Receptor p75. *Science* **272**, 542-545, doi:10.1126/science.272.5261.542 (1996).
27. Chai, X. *et al.* Reelin Induces Branching of Neurons and Radial Glial Cells during Corticogenesis. *Cereb Cortex* **25**, 3640-3653, doi:10.1093/cercor/bhu216 (2015).

28. Chao, M. V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* **4**, 299-309, doi:10.1038/nrn1078 (2003).
29. Chao, M. V., Rajagopal, R. & Lee, F. S. Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin Sci (Lond)* **110**, 167-173, doi:10.1042/CS20050163 (2006).
30. Charalampopoulos, I., Remboutsika, E., Margioris, A. N. & Gravanis, A. Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends Endocrinol Metab* **19**, 300-307, doi:10.1016/j.tem.2008.07.004 (2008).
31. Cheng, B. & Mattson, M. P. NGF and bFGF protect rat hippocampal and human cortical neurons against hypoglycemic damage by stabilizing calcium homeostasis. *Neuron* **7**, 1031-1041, doi:10.1016/0896-6273(91)90347-3 (1991).
32. Choi, S. H. *et al.* A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature* **515**, 274-278, doi:10.1038/nature13800 (2014).
33. Choi, S. H., Kim, Y. H., Quinti, L., Tanzi, R. E. & Kim, D. Y. 3D culture models of Alzheimer's disease: a road map to a "cure-in-a-dish". *Mol Neurodegener* **11**, 75, doi:10.1186/s13024-016-0139-7 (2016).
34. Clarke, L. E. & Barres, B. A. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci* **14**, 311-321, doi:10.1038/nrn3484 (2013).
35. Corti, S., Faravelli, I., Cardano, M. & Conti, L. Human pluripotent stem cells as tools for neurodegenerative and neurodevelopmental disease modeling and drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* **10**, 615-629, doi:10.1517/17460441.2015.1037737 (2015).
36. Costantini, C. *et al.* Characterization of the Signaling Pathway Downstream p75 Neurotrophin Receptor Involved in β -Amyloid Peptide-Dependent Cell Death. *Journal of Molecular Neuroscience* **25**, 141-156, doi:10.1385/jmn:25:2:141 (2005).
37. Courtney, M. J., Åkerman, K. E. O. & Coffey, E. T. Neurotrophins Protect Cultured Cerebellar Granule Neurons against the Early Phase of Cell Death by a TwoComponent Mechanism. *The Journal of Neuroscience* **17**, 4201-4211, doi:10.1523/jneurosci.17-11-04201.1997 (1997).
38. Cragolini, A. B., Huang, Y., Gokina, P. & Friedman, W. J. Nerve growth factor attenuates proliferation of astrocytes via the p75 neurotrophin receptor. *Glia* **57**, 1386-1392, doi:10.1002/glia.20857 (2009).
39. Culmsee, C. *et al.* Neuroprotection by estrogens in a mouse model of focal cerebral ischemia and in cultured neurons: evidence for a receptor-independent antioxidative mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab* **19**, 1263-1269, doi:10.1097/00004647-199911000-00011 (1999).
40. Daley, G. Q. Stem cells and the evolving notion of cellular identity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **370**, 20140376, doi:10.1098/rstb.2014.0376 (2015).

41. D'Avanzo, C. *et al.* Alzheimer's in 3D culture: challenges and perspectives. *Bioessays* **37**, 1139-1148, doi:10.1002/bies.201500063 (2015).
42. de Lazaro, I., Yilmazer, A. & Kostarelos, K. Induced pluripotent stem (iPS) cells: a new source for cell-based therapeutics? *J Control Release* **185**, 37-44, doi:10.1016/j.jconrel.2014.04.011 (2014).
43. De Los Angeles, A. *et al.* Hallmarks of pluripotency. *Nature* **525**, 469-478, doi:10.1038/nature15515 (2015).
44. De Strooper, B. Lessons from a failed gamma-secretase Alzheimer trial. *Cell* **159**, 721-726, doi:10.1016/j.cell.2014.10.016 (2014).
45. Doerks, T., Copley, R. R., Schultz, J., Ponting, C. P. & Bork, P. Systematic identification of novel protein domain families associated with nuclear functions. *Genome Res* **12**, 47-56, doi:10.1101/ (2002).
46. Donovan, P. J. & Gearhart, J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* **414**, 92-97, doi:10.1038/35102154 (2001).
47. Druml C. Stem cell research: toward greater unity in Europe? *Cell* **139**, 649-51, doi: 10.1016/j.cell.2009.10.043 (2009).
48. Duff, K. *et al.* Increased amyloid-beta₄₂(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* **383**, 710-713, doi:10.1038/383710a0 (1996).
49. Duff, K. *et al.* Progress in the modeling of neurodegenerative diseases in transgenic mice. *Curr Opin Neurol.* **14**, 441-7, (2001).
50. Eiraku, M. *et al.* Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell* **3**, 519-532, doi:10.1016/j.stem.2008.09.002 (2008).
51. Englund, C. *et al.* Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci* **25**, 247-251, doi:10.1523/JNEUROSCI.2899-04.2005 (2005).
52. Eriksdotter Jonhagen, M. *et al.* Intracerebroventricular infusion of nerve growth factor in three patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* **9**, 246-257, doi:10.1159/000017069 (1998).
53. Fahnstock, M., Michalski, B., Xu, B. & Coughlin, M. D. The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci* **18**, 210-220, doi:10.1006/mcne.2001.1016 (2001).
54. Feng, C., Jia, Y. D. & Zhao, X. Y. Pluripotency of induced pluripotent stem cells. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **11**, 299-303, doi:10.1016/j.gpb.2013.08.003 (2013).

55. Fjell, A. M. *et al.* What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. *Prog Neurobiol* **117**, 20-40, doi:10.1016/j.pneurobio.2014.02.004 (2014).
56. Forlenza, O. V. *et al.* Effect of brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and serum levels on the progression of mild cognitive impairment. *World J Biol Psychiatry* **11**, 774-780, doi:10.3109/15622971003797241 (2010).
57. Garzon, D. J. *et al.* Oligomeric amyloid decreases basal levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA via specific downregulation of BDNF transcripts IV and V in differentiated human neuroblastoma cells. *J Neurosci.* **27** 2628-35 (2007).
58. Gaspard, N. *et al.* An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature* **455**, 351-357, doi:10.1038/nature07287 (2008).
59. Gaspard N. *et al.* Generation of cortical neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Protoc* **4** 1454-63, doi: 10.1038/nprot.2009.157 (2009).
60. Giorgetti, A. *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell* **5**, 353-357, doi:10.1016/j.stem.2009.09.008 (2009).
61. Girlovanu, M. *et al.* Stem cells - biological update and cell therapy progress. *Clujul Med* **88**, 265-271, doi:10.15386/cjmed-483 (2015).
62. Glenner, G. G. & Wong, C. W. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **120**, 885-890, doi:10.1016/s0006-291x(84)80190-4 (1984).
63. Gotz, M. & Huttner, W. B. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 777-788, doi:10.1038/nrm1739 (2005).
64. Grabel, L. Developmental origin of neural stem cells: the glial cell that could. *Stem Cell Rev* **8**, 577-585, doi:10.1007/s12015-012-9349-8 (2012).
65. Gravanis, A. *et al.* Neurosteroids and microneurotrophins signal through NGF receptors to induce prosurvival signaling in neuronal cells. *Sci Signal* **5**, pt8, doi:10.1126/scisignal.2003387 (2012).
66. Gravanis, A., Pediaditakis, I. & Charalampopoulos, I. Synthetic microneurotrophins in therapeutics of neurodegeneration. *Oncotarget* **8**, 9005-9006, doi:10.18632/oncotarget.14667 (2017).
67. Grundke-Iqbal, I. *et al.* Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**, 4913-4917, doi:10.1073/pnas.83.13.4913 (1986).

68. Hall, B., Limaye, A. & Kulkarni, A. B. Overview: generation of gene knockout mice. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 19**, Unit 19 12 19 12 11-17, doi:10.1002/0471143030.cb1912s44 (2009).
69. Hanna, J. *et al.* Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* **318**, 1920-1923, doi:10.1126/science.1152092 (2007).
70. Hansen, D. V., Rubenstein, J. L. & Kriegstein, A. R. Deriving excitatory neurons of the neocortex from pluripotent stem cells. *Neuron* **70**, 645-660, doi:10.1016/j.neuron.2011.05.006 (2011).
71. Harris, J., Tomassy, G. S. & Arlotta, P. Building blocks of the cerebral cortex: from development to the dish. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **4**, 529-544, doi:10.1002/wdev.192 (2015).
72. Hayes, M., Curley, G., Ansari, B. & Laffey, J. G. Clinical review: Stem cell therapies for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome - hope or hype? *Crit Care* **16**, 205, doi:10.1186/cc10570 (2012).
73. Hu, B. Y. & Zhang, S. C. Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nat Protoc* **4**, 1295-1304, doi:10.1038/nprot.2009.127 (2009).
74. Huang, E. J. & Reichardt, L. F. Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Annu Rev Neurosci* **24**, 677-736, doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.677 (2001).
75. Huang, E. J. & Reichardt, L. F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* **72**, 609-642, doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629 (2003).
76. Hutton, L. A., deVellis, J. & Perez-Polo, J. R. Expression of p75NGFR TrkA, and TrkB mRNA in rat C6 glioma and type I astrocyte cultures. *J Neurosci Res* **32**, 375-383, doi:10.1002/jnr.490320309 (1992).
77. Isobe, K. *et al.* iPSCs, aging and age-related diseases. *N Biotechnol* **31**, 411-421, doi:10.1016/j.nbt.2014.04.004 (2014).
78. Israel, M. A. *et al.* Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* **482**, 216-220, doi:10.1038/nature10821 (2012).
79. Jackson, E. L. & Lu, H. Three-dimensional models for studying development and disease: moving on from organisms to organs-on-a-chip and organoids. *Integr Biol (Camb)* **8**, 672-683, doi:10.1039/c6ib00039h (2016).
80. Jellinger, K. A. Neuropathological approaches to cerebral aging and neuroplasticity. *Dialogues Clin Neurosci* **15**, 29-43 (2013).

81. Ji, R. *et al.* The differentiation of MSCs into functional hepatocyte-like cells in a liver biomatrix scaffold and their transplantation into liver-fibrotic mice. *Biomaterials* **33**, 8995-9008, doi:10.1016/j.biomaterials.2012.08.058 (2012).
82. Jorfi, M., D'Avanzo, C., Kim, D. Y. & Irimia, D. Three-Dimensional Models of the Human Brain Development and Diseases. *Adv Healthc Mater* **7**, doi:10.1002/adhm.201700723 (2018).
83. K. Zuba-Surma, E., Wojakowski, W., Madeja, Z. & Z. Ratajczak, M. Stem Cells as a Novel Tool for Drug Screening and Treatment of Degenerative Diseases. *Current Pharmaceutical Design* **18**, 2644-2656, doi:10.2174/138161212800492859 (2012).
84. Kajkowski, E. M. *et al.* beta -Amyloid peptide-induced apoptosis regulated by a novel protein containing a g protein activation module. *J Biol Chem* **276**, 18748-18756, doi:10.1074/jbc.M011161200 (2001).
85. Kalia, L. V. & Lang, A. E. Parkinson's disease. *The Lancet* **386**, 896-912, doi:10.1016/s0140-6736(14)61393-3 (2015).
86. Karch, C. M., Cruchaga, C. & Goate, A. M. Alzheimer's disease genetics: from the bench to the clinic. *Neuron* **83**, 11-26, doi:10.1016/j.neuron.2014.05.041 (2014).
87. Karran, E. & De Strooper, B. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J Neurochem* **139 Suppl 2**, 237-252, doi:10.1111/jnc.13632 (2016).
88. Karus, M., Blaess, S. & Brustle, O. Self-organization of neural tissue architectures from pluripotent stem cells. *J Comp Neurol* **522**, 2831-2844, doi:10.1002/cne.23608 (2014).
89. Kempainen, S. *et al.* Impaired TrkB receptor signaling contributes to memory impairment in APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging* **33**, 1122 e1123-1139, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.11.006 (2012).
90. Kierdorf, K. *et al.* Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci* **16**, 273-280, doi:10.1038/nn.3318 (2013).
91. Kim, C. iPSC technology-Powerful hand for disease modeling and therapeutic screen. *BMB Reports* **48**, 256-265, doi:10.5483/BMBRep.2015.48.5.100 (2015).
92. Kim, E. Y. *et al.* Neuronal cell differentiation of mesenchymal stem cells originating from canine amniotic fluid. *Hum Cell* **27**, 51-58, doi:10.1007/s13577-013-0080-9 (2014).
93. Kim, J. *et al.* Beta-amyloid oligomers activate apoptotic BAK pore for cytochrome c release. *Biophys J* **107**, 1601-1608, doi:10.1016/j.bpj.2014.07.074 (2014).
94. Kim, J. B. *et al.* Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* **461**, 649-643, doi:10.1038/nature08436 (2009).

95. Kokjohn, T. A. & Roher, A. E. Amyloid precursor protein transgenic mouse models and Alzheimer's disease: understanding the paradigms, limitations, and contributions. *Alzheimers Dement* **5**, 340-347, doi:10.1016/j.jalz.2009.03.002 (2009).
96. Kondo, T. *et al.* Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular Abeta and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* **12**, 487-496, doi:10.1016/j.stem.2013.01.009 (2013).
97. Kuijk, E. W., Chuva de Sousa Lopes, S. M., Geijsen, N., Macklon, N. & Roelen, B. A. The different shades of mammalian pluripotent stem cells. *Hum Reprod Update* **17**, 254-271, doi:10.1093/humupd/dmq035 (2011).
98. Kume, T. *et al.* p75-mediated neuroprotection by NGF against glutamate cytotoxicity in cortical cultures. *Brain Research* **852**, 279-289, doi:10.1016/s0006-8993(99)02226-x (2000).
99. Kurtz A, Stacey G, Kidane L, Seriola A, Stachelscheid H, Veiga A. Regulatory insight into the European human pluripotent stem cell registry. *Stem Cells Dev* **1**, 51-5, doi: 10.1089/scd.2014.0319 (2014).
100. Laguesse, S., Peyre, E. & Nguyen, L. Progenitor genealogy in the developing cerebral cortex. *Cell Tissue Res* **359**, 17-32, doi:10.1007/s00441-014-1979-5 (2015).
101. Larijani, B. *et al.* Stem cell therapy in treatment of different diseases. *Acta Med Iran.* **50**, 79-96 (2012).
102. Laske, C. *et al.* Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)* **113**, 1217-1224, doi:10.1007/s00702-005-0397-y (2006).
103. Le Moan, N., Houslay, D. M., Christian, F., Houslay, M. D. & Akassoglou, K. Oxygen-dependent cleavage of the p75 neurotrophin receptor triggers stabilization of HIF-1alpha. *Mol Cell* **44**, 476-490, doi:10.1016/j.molcel.2011.08.033 (2011).
104. Lee, H. K. *et al.* Three Dimensional Human Neuro-Spheroid Model of Alzheimer's Disease Based on Differentiated Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS One* **11**, e0163072, doi:10.1371/journal.pone.0163072 (2016).
105. Lee, T. H. *et al.* Expression of Nerve Growth Factor and trkA After Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats Editorial Comment. *Stroke* **29**, 1687-1697, doi:10.1161/01.str.29.8.1687 (1998).
106. Liao, M. C. *et al.* Single-Cell Detection of Secreted Abeta and sAPPalpha from Human iPSC-Derived Neurons and Astrocytes. *J Neurosci* **36**, 1730-1746, doi:10.1523/JNEUROSCI.2735-15.2016 (2016).
107. Liedmann, A., Rolfs, A. & Frech, M. J. Cultivation of human neural progenitor cells in a 3-dimensional self-assembling peptide hydrogel. *J Vis Exp*, e3830, doi:10.3791/3830 (2012).

108. Longo, F. M. & Massa, S. M. Small-molecule modulation of neurotrophin receptors: a strategy for the treatment of neurological disease. *Nature Reviews Drug Discovery* **12**, 507-525, doi:10.1038/nrd4024 (2013).
109. Lorenzo, A. *et al.* Amyloid β interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* **3**, 460-464, doi:10.1038/74833 (2000).
110. Lu, X. *et al.* Morphological changes of radial glial cells during mouse embryonic development. *Brain Res* **1599**, 57-66, doi:10.1016/j.brainres.2014.12.039 (2015).
111. Luhmann, H. J., Kilb, W. & Clusmann, H. Malformations of cortical development and neocortical focus. *Int Rev Neurobiol* **114**, 35-61, doi:10.1016/B978-0-12-418693-4.00003-0 (2014).
112. Malatesta, P. *et al.* Neuronal or Glial Progeny. *Neuron* **37**, 751-764, doi:10.1016/s0896-6273(03)00116-8 (2003).
113. Martynoga, B., Drechsel, D. & Guillemot, F. Molecular control of neurogenesis: a view from the mammalian cerebral cortex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, doi:10.1101/cshperspect.a008359 (2012).
114. Masters, C. L. *et al.* Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers* **1**, 15056, doi:10.1038/nrdp.2015.56 (2015).
115. Mattson, M. P. *et al.* beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *The Journal of Neuroscience* **12**, 376-389, doi:10.1523/JNEUROSCI.12-02-00376.1992 (1992).
116. McLaurin, J. & Chakrabartty, A. Membrane Disruption by Alzheimer β -Amyloid Peptides Mediated through Specific Binding to Either Phospholipids or Gangliosides. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 26482-26489, doi:10.1074/jbc.271.43.26482 (1996).
117. Migliore, M. & Shepherd, G. M. Opinion: an integrated approach to classifying neuronal phenotypes. *Nat Rev Neurosci* **6**, 810-818, doi:10.1038/nrn1769 (2005).
118. Minichiello, L. & Klein, R. TrkB and TrkC neurotrophin receptors cooperate in promoting survival of hippocampal and cerebellar granule neurons. *Genes & Development* **10**, 2849-2858, doi:10.1101/gad.10.22.2849 (1996).
119. Misra, S. & Medhi, B. Drug development status for Alzheimer's disease: present scenario. *Neurol Sci* **34**, 831-839, doi:10.1007/s10072-013-1316-x (2013).
120. Molnar, Z. Evolution of cerebral cortical development. *Brain Behav Evol* **78**, 94-107, doi:10.1159/000327325 (2011).
121. Molnar, Z. & Clowry, G. Cerebral cortical development in rodents and primates. *Prog Brain Res* **195**, 45-70, doi:10.1016/B978-0-444-53860-4.00003-9 (2012).

122. Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R. & Macklis, J. D. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* **8**, 427-437, doi:10.1038/nrn2151 (2007).
123. Muratore, C. R. *et al.* The familial Alzheimer's disease APPV717I mutation alters APP processing and Tau expression in iPSC-derived neurons. *Hum Mol Genet* **23**, 3523-3536, doi:10.1093/hmg/ddu064 (2014).
124. Murer, M. G. *et al.* An immunohistochemical study of the distribution of brain-derived neurotrophic factor in the adult human brain, with particular reference to Alzheimer's disease. *Neuroscience* **88**, 1015-1032, doi:10.1016/s0306-4522(98)00219-x (1999).
125. Nayak, D., Roth, T. L. & McGavern, D. B. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol* **32**, 367-402, doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120240 (2014).
126. Nikolic, M., Gardner, H. A. & Tucker, K. L. Postnatal neuronal apoptosis in the cerebral cortex: physiological and pathophysiological mechanisms. *Neuroscience* **254**, 369-378, doi:10.1016/j.neuroscience.2013.09.035 (2013).
127. Nulty, J., Alsaffar, M. & Barry, D. Radial glial cells organize the central nervous system via microtubule dependant processes. *Brain Res* **1625**, 171-179, doi:10.1016/j.brainres.2015.08.027 (2015).
128. Oddo, S. *et al.* Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. *Neuron* **39**, 409-421, doi:10.1016/s0896-6273(03)00434-3 (2003).
129. Ohnuki, M. & Takahashi, K. Present and future challenges of induced pluripotent stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **370**, 20140367, doi:10.1098/rstb.2014.0367 (2015).
130. Okano, H. *et al.* Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells. *Exp Cell Res* **306**, 349-356, doi:10.1016/j.yexcr.2005.02.021 (2005).
131. Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313-317, doi:10.1038/nature05934 (2007).
132. Okita, K. *et al.* An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells* **31**, 458-466, doi:10.1002/stem.1293 (2013).
133. Ostrem, B., Di Lullo, E. & Kriegstein, A. oRGs and mitotic somal translocation - a role in development and disease. *Curr Opin Neurobiol* **42**, 61-67, doi:10.1016/j.conb.2016.11.007 (2017).
134. Paquet, D. *et al.* Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature* **533**, 125-129, doi:10.1038/nature17664 (2016).
135. Park, I. K. *et al.* Distribution of trkA in cerebral cortex and diencephalon of the mongolian gerbil after birth. *J Vet Sci* **5**, 303-7 (2004).

136. Padiaditakis, I. *et al.* Selective and differential interactions of BNN27, a novel C17-spiroepoxy steroid derivative, with TrkA receptors, regulating neuronal survival and differentiation. *Neuropharmacology* **111**, 266-282, doi:10.1016/j.neuropharm.2016.09.007 (2016).
137. Padiaditakis, I. *et al.* BNN27, a 17-Spiroepoxy Steroid Derivative, Interacts With and Activates p75 Neurotrophin Receptor, Rescuing Cerebellar Granule Neurons from Apoptosis. *Front Pharmacol* **7**, 512, doi:10.3389/fphar.2016.00512 (2016).
138. Peng, J. & Zeng, X. The role of induced pluripotent stem cells in regenerative medicine: neurodegenerative diseases. *Stem Cell Res Ther* **2**, 32, doi:10.1186/scrt73 (2011).
139. Peng, S. *et al.* Decreased brain-derived neurotrophic factor depends on amyloid aggregation state in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **29**, 9321-9329, doi:10.1523/JNEUROSCI.4736-08.2009 (2009).
140. Pera, M. F. & Tam, P. P. Extrinsic regulation of pluripotent stem cells. *Nature* **465**, 713-720, doi:10.1038/nature09228 (2010).
141. Petilla Interneuron Nomenclature, G. *et al.* Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* **9**, 557-568, doi:10.1038/nrn2402 (2008).
142. Pinto, L. & Gotz, M. Radial glial cell heterogeneity--the source of diverse progeny in the CNS. *Prog Neurobiol* **83**, 2-23, doi:10.1016/j.pneurobio.2007.02.010 (2007).
143. Pollen, A. A. *et al.* Molecular identity of human outer radial glia during cortical development. *Cell* **163**, 55-67, doi:10.1016/j.cell.2015.09.004 (2015).
144. Pontious, A., Kowalczyk, T., Englund, C. & Hevner, R. F. Role of intermediate progenitor cells in cerebral cortex development. *Dev Neurosci* **30**, 24-32, doi:10.1159/000109848 (2008).
145. Puzzo, D., Gulisano, W., Palmeri, A. & Arancio, O. Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* **10**, 703-711, doi:10.1517/17460441.2015.1041913 (2015).
146. Quang, T., Marquez, M., Blanco, G. & Zhao, Y. Dosage and cell line dependent inhibitory effect of bFGF supplement in human pluripotent stem cell culture on inactivated human mesenchymal stem cells. *PLoS One* **9**, e86031, doi:10.1371/journal.pone.0086031 (2014).
147. Raja, W. K. *et al.* Self-Organizing 3D Human Neural Tissue Derived from Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate Alzheimer's Disease Phenotypes. *PLoS One* **11**, e0161969, doi:10.1371/journal.pone.0161969 (2016).
148. Rakic, P. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci* **10**, 724-735, doi:10.1038/nrn2719 (2009).

149. Reichardt, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**, 1545-1564, doi:10.1098/rstb.2006.1894 (2006).
150. Richard, J. P. & Maragakis, N. J. Induced pluripotent stem cells from ALS patients for disease modeling. *Brain Res* **1607**, 15-25, doi:10.1016/j.brainres.2014.09.017 (2015).
151. Rinne, J. O. *et al.* 11C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid-beta load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study. *The Lancet Neurology* **9**, 363-372, doi:10.1016/S1474-4422(10)70043-0 (2010).
152. Robinton, D. A. & Daley, G. Q. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* **481**, 295-305, doi:10.1038/nature10761 (2012).
153. Rodriguez, J. J. & Verkhratsky, A. Neurogenesis in Alzheimer's disease. *J Anat* **219**, 78-89, doi:10.1111/j.1469-7580.2011.01343.x (2011).
154. Rossi, D. *et al.* Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Differ* **15**, 1691-1700, doi:10.1038/cdd.2008.99 (2008).
155. Rowitch, D. H. & Kriegstein, A. R. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* **468**, 214-222, doi:10.1038/nature09611 (2010).
156. Russo, F. B., Cugola, F. R., Fernandes, I. R., Pignatari, G. C. & Beltrao-Braga, P. C. Induced pluripotent stem cells for modeling neurological disorders. *World J Transplant* **5**, 209-221, doi:10.5500/wjt.v5.i4.209 (2015).
157. Sachs, B. D. *et al.* p75 neurotrophin receptor regulates tissue fibrosis through inhibition of plasminogen activation via a PDE4/cAMP/PKA pathway. *J Cell Biol* **177**, 1119-1132, doi:10.1083/jcb.200701040 (2007).
158. Sanchez Alvarado, A. & Yamanaka, S. Rethinking differentiation: stem cells, regeneration, and plasticity. *Cell* **157**, 110-119, doi:10.1016/j.cell.2014.02.041 (2014).
159. Saraceno, C., Musardo, S., Marcello, E., Pelucchi, S. & Di Luca, M. Modeling Alzheimer's disease: from past to future. *Front Pharmacol* **4**, 77, doi:10.3389/fphar.2013.00077 (2013).
160. Schaub, R. T., Anders, D., Golz, G., Gohringer, K. & Hellweg, R. Serum nerve growth factor concentration and its role in the preclinical stage of dementia. *Am J Psychiatry* **159**, 1227-1229, doi:10.1176/appi.ajp.159.7.1227 (2002).
161. Selkoe, D. J. & Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* **8**, 595-608, doi:10.15252/emmm.201606210 (2016).
162. Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E. & Hyman, B. T. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**, a006189, doi:10.1101/cshperspect.a006189 (2011).

163. Shi, Y., Kirwan, P. & Livesey, F. J. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. *Nat Protoc* **7**, 1836-1846, doi:10.1038/nprot.2012.116 (2012).
164. Singh, V. K., Kalsan, M., Kumar, N., Saini, A. & Chandra, R. Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front Cell Dev Biol* **3**, 2, doi:10.3389/fcell.2015.00002 (2015).
165. Skalova, S., Svadlakova, T., Shaikh Qureshi, W. M., Dev, K. & Mokry, J. Induced pluripotent stem cells and their use in cardiac and neural regenerative medicine. *Int J Mol Sci* **16**, 4043-4067, doi:10.3390/ijms16024043 (2015).
166. Sotthibundhu, A. *et al.* Beta-amyloid(1-42) induces neuronal death through the p75 neurotrophin receptor. *J Neurosci* **28**, 3941-3946, doi:10.1523/JNEUROSCI.0350-08.2008 (2008).
167. Stancik, E. K., Navarro-Quiroga, I., Sellke, R. & Haydar, T. F. Heterogeneity in ventricular zone neural precursors contributes to neuronal fate diversity in the postnatal neocortex. *J Neurosci* **30**, 7028-7036, doi:10.1523/JNEUROSCI.6131-09.2010 (2010).
168. Sternecker, J. L., Reinhardt, P. & Scholer, H. R. Investigating human disease using stem cell models. *Nat Rev Genet* **15**, 625-639, doi:10.1038/nrg3764 (2014).
169. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872, doi:10.1016/j.cell.2007.11.019 (2007).
170. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676, doi:10.1016/j.cell.2006.07.024 (2006).
171. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development* **140**, 2457-2461, doi:10.1242/dev.092551 (2013).
172. Takahashi, K. & Yamanaka, S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 183-193, doi:10.1038/nrm.2016.8 (2016).
173. Takasaki, C. *et al.* Cytochemical and cytological properties of perineuronal oligodendrocytes in the mouse cortex. *Eur J Neurosci* **32**, 1326-1336, doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07377.x (2010).
174. Tang-Schomer, M. D. *et al.* Bioengineered functional brain-like cortical tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 13811-13816, doi:10.1073/pnas.1324214111 (2014).
175. Tanzi, R. E. & Bertram, L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* **120**, 545-555, doi:10.1016/j.cell.2005.02.008 (2005).

176. Thinakaran, G. & Koo, E. H. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* **283**, 29615-29619, doi:10.1074/jbc.R800019200 (2008).
177. Thomson, J. A. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147, doi:10.1126/science.282.5391.1145 (1998).
178. Thorne, R. G. & Frey, W. H., 2nd. Delivery of neurotrophic factors to the central nervous system: pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet* **40**, 907-946, doi:10.2165/00003088-200140120-00003 (2001).
179. Tiscornia, G., Vivas, E. L. & Izpisua Belmonte, J. C. Diseases in a dish: modeling human genetic disorders using induced pluripotent cells. *Nat Med* **17**, 1570-1576, doi:10.1038/nm.2504 (2011).
180. Tomassy, G. S. *et al.* Distinct profiles of myelin distribution along single axons of pyramidal neurons in the neocortex. *Science* **344**, 319-324, doi:10.1126/science.1249766 (2014).
181. Tong, G., Izquierdo, P. & Raashid, R. A. Human Induced Pluripotent Stem Cells and the Modelling of Alzheimer's Disease: The Human Brain Outside the Dish. *Open Neurol J* **11**, 27-38, doi:10.2174/1874205X01711010027 (2017).
182. Travaglia, A., Pietropaolo, A., La Mendola, D., Nicoletti, V. G. & Rizzarelli, E. The inorganic perspectives of neurotrophins and Alzheimer's disease. *J Inorg Biochem* **111**, 130-137, doi:10.1016/j.jinorgbio.2011.10.017 (2012).
183. Tuszynski, M. H. *et al.* Nerve Growth Factor Gene Therapy: Activation of Neuronal Responses in Alzheimer Disease. *JAMA Neurol* **72**, 1139-1147, doi:10.1001/jamaneurol.2015.1807 (2015).
184. Ueno, M. *et al.* Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat Neurosci* **16**, 543-551, doi:10.1038/nn.3358 (2013).
185. Uwabe, K., Iwakawa, T., Matsumoto, M., Talkahashi, K. & Nagata, K. HU0622: a small molecule promoting GAP-43 activation and neurotrophic effects. *Neuropharmacology* **51**, 727-736, doi:10.1016/j.neuropharm.2006.05.014 (2006).
186. Vakili K, McGahan AM, Rezaie R, Mitchell W, Daar AS. Progress in human embryonic stem cell research in the United States between 2001 and 2010. *PLoS One*. **10**, e0120052. doi: 10.1371/journal.pone.0120052 (2015).
187. Villemagne, V. L., Dore, V., Burnham, S. C., Masters, C. L. & Rowe, C. C. Imaging tau and amyloid-beta proteinopathies in Alzheimer disease and other conditions. *Nat Rev Neurol* **14**, 225-236, doi:10.1038/nrneurol.2018.9 (2018).
188. Volonté, C. *et al.* Association of protein kinases ERK1 and ERK2 with p75 nerve growth factor receptors. *J Biol Chem*. **268**, 21410-5 (1993).

189. Wagers, A. J. & Weissman, I. L. Plasticity of adult stem cells. *Cell* **116**, 639-48, doi: 10.1016/S0092-8674(04)00208-9 (2004).
190. Wan, W., Cao, L., Kalionis, B., Xia, S. & Tai, X. Applications of Induced Pluripotent Stem Cells in Studying the Neurodegenerative Diseases. *Stem Cells Int* **2015**, 382530, doi:10.1155/2015/382530 (2015).
191. Wang, B. S. *et al.* Efficacy and safety of natural acetylcholinesterase inhibitor huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease: an updated meta-analysis. *J Neural Transm (Vienna)* **116**, 457-465, doi:10.1007/s00702-009-0189-x (2009).
192. Wang, J., Gu, B. J., Masters, C. L. & Wang, Y. J. A systemic view of Alzheimer disease - insights from amyloid-beta metabolism beyond the brain. *Nat Rev Neurol* **13**, 612-623, doi:10.1038/nrneurol.2017.111 (2017).
193. Wyles, S. P., Brandt, E. B. & Nelson, T. J. Stem cells: the pursuit of genomic stability. *Int J Mol Sci* **15**, 20948-20967, doi:10.3390/ijms151120948 (2014).
194. Xu, X. H. & Zhong, Z. Disease modeling and drug screening for neurological diseases using human induced pluripotent stem cells. *Acta Pharmacol Sin* **34**, 755-764, doi:10.1038/aps.2013.63 (2013).
195. Yaar, M. *et al.* Amyloid beta binds trimers as well as monomers of the 75-kDa neurotrophin receptor and activates receptor signaling. *J Biol Chem* **277**, 7720-7725, doi:10.1074/jbc.M110929200 (2002).
196. Yagi, T. *et al.* Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet* **20**, 4530-4539, doi:10.1093/hmg/ddr394 (2011).
197. Yahata, N. *et al.* Anti-Abeta drug screening platform using human iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease. *PLoS One* **6**, e25788, doi:10.1371/journal.pone.0025788 (2011).
198. Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell* **10**, 678-684, doi:10.1016/j.stem.2012.05.005 (2012).
199. Yang, J., Li, S., He, X. B., Cheng, C. & Le, W. Induced pluripotent stem cells in Alzheimer's disease: applications for disease modeling and cell-replacement therapy. *Mol Neurodegener* **11**, 39, doi:10.1186/s13024-016-0106-3 (2016).
200. Yankner, B. A. *et al.* Nerve growth factor potentiates the neurotoxicity of beta amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**, 9020-9023 (1990).

201. Ying, Q. L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M. & Smith, A. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol* **21**, 183-186, doi:10.1038/nbt780 (2003).
202. Ying, Q. L. *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519-523, doi:10.1038/nature06968 (2008).
203. Yu, J. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-1920, doi:10.1126/science.1151526 (2007).
204. Zanini, C. *et al.* Differentiation of mesenchymal stem cells derived from pancreatic islets and bone marrow into islet-like cell phenotype. *PLoS One* **6**, e28175, doi:10.1371/journal.pone.0028175 (2011).
205. Zhang, D. *et al.* A 3D Alzheimer's disease culture model and the induction of P21-activated kinase mediated sensing in iPSC derived neurons. *Biomaterials* **35**, 1420-1428, doi:10.1016/j.biomaterials.2013.11.028 (2014).
206. Zhang, Z., Fan, J., Ren, Y., Zhou, W. & Yin, G. The release of glutamate from cortical neurons regulated by BDNF via the TrkB/Src/PLC-gamma1 pathway. *J Cell Biochem* **114**, 144-151, doi:10.1002/jcb.24311 (2013).