

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

Καθηγητής: Παπαδημητρίου Αλέξανδρος

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO
DIPARTIMENTO DI SCIENZE NEUROLOGICHE

Καθηγητής: Giacomo Pietro Comi

COLUMBIA UNIVERSITY, NY
MOTOR NEURON CENTER

Καθηγητής: Serge Przedborski

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Τα αρχέγονα κύτταρα (stem cells) ως μοντέλο θεραπείας των
νευροεκφυλιστικών νοσημάτων

ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΔΗΜΗΤΡΑ
ΝΕΥΡΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	1
ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ.....	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	10
ABSTRACT.....	14
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	15
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	49
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	65
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	80
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	87
ΠΙΝΑΚΕΣ.....	97
ΔΕΝΤΡΟΓΡΑΜΜΑ.....	101
ΣΧΟΛΙΑ ΣΧΕΔΙΩΝ.....	103
ΕΙΚΟΝΕΣ.....	109

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΧΑΤΖΗΓΕΩΡΓΙΟΥ ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΣΤΑΘΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ
ΚΟΛΛΙΑ ΠΑΝΑΓΟΥΛΑ

Η ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΧΑΤΖΗΓΕΩΡΓΙΟΥ ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΣΤΑΘΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ
ΚΟΛΛΙΑ ΠΑΝΑΓΟΥΛΑ
ΑΡΒΑΝΙΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΤΡΥΠΟΣΚΙΑΔΗΣ ΦΙΛΙΠΠΟΣ
ΣΤΕΦΑΝΙΔΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ
ΚΟΥΚΟΥΛΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής υπό της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα».
(Νόμος 5343/32, αρθρ. 202 παρ. 2 και ν. 1268/92, αρθρ. 50 παρ. 8).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας το οποίο μέσα στα πλαίσια του προγράμματος “Erasmus” μου έδωσε την δυνατότητα να συνεχίσω την ερευνητική μου προσπάθεια στο Πανεπιστήμιο του Μιλάνου. Το πρόγραμμα αυτό με βοήθησε να ενταχθώ σε μια μεγάλη ερευνητική ομάδα της Νευρολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου του Μιλάνου και στον τμήμα νευροβιολογίας του Πανεπιστημίου Columbia.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζω στον Αναπληρωτή Καθηγητή κο Γ.Χατζηγεωργίου στον Καθηγητή κο Νικ.Σταθάκη και στην Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής κα Παναγούλα Κόλλια οι οποίοι με στήριξαν στην ερευνητική μου αυτή προσπάθεια.

Το μεγαλύτερο μέρος της εργασίας αυτής έγινε στο Πανεπιστήμιο του Μιλάνου και θέλω να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες στους Καθηγητές Nereo Bresolin, Giacomo Comi και Stefania Corti οι οποίοι με ενέπνευσαν κα με εισήγαγαν στα βαθιά νερά της βασικής έρευνας. Η στήριξή τους σε όλη τη διάρκεια της έρευνάς μου ήταν καθοριστική σε όλα τα επίπεδα.

Το τελευταίο μέρος της εργασίας ολοκληρώθηκε στο Πανεπιστήμιο Columbia υπό την επίβλεψη του Καθηγητού Serge Przedborski στο Motor Neuron Center, ειδικό τμήμα μελέτης των νοσημάτων κινητικού νευρώνα και θέλω να ευχαριστήσω τόσο τον ίδιο όσο και τους στενούς μου συνεργάτες Diane Re, Tetsuya Nagata και Shingo Kariya για την επιστημονική βοήθεια που μου έδωσαν.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

1. ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Δήμητρα Παπαδημητρίου

Ημερομηνία γέννησης: 24/09/1978

Τόπος γέννησης: Αθήνα

Υπηκοότητα: Ελληνική

Διεύθυνση οικίας: Μπουσίου 45, 11526, Αμπελόκηποι, Αθήνα

Τηλέφωνο: 2106998905, 6974847802

Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο: dimirap27@yahoo.gr

2. ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ – ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ – ΔΙΠΛΩΜΑΤΑ

Εγκύκλιες σπουδές: (1990- 1996, Γυμνάσιο-Λύκειο).

Απολυτήριο Λυκείου: Αμερικάνικο Κολλέγιο, Pierce College, Αγία Παρασκευή

Χρονολογία αποφοίτησης: 1996

Βαθμός Απολυτηρίου: Άριστα (19 2/11)

Προπτυχιακή εκπαίδευση: Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Μιλάνου, Ιταλίας (1996-2002).

Ημερομηνία λήψεως πτυχίου: 28/10/2002

Βαθμός πτυχίου: 104/110

Ειδικότητα Νευρολογίας: Νευρολογική Κλινική Πανεπιστημίου Μιλάνου, Ιταλίας (2003-2008).

Ημερομηνία λήψεως ειδικότητας: 12/11/2008

Βαθμός: 66/70

Ξένες Γλώσσες:

1. Αγγλικά (Certificate of Proficiency in English-University of Cambridge): Άριστα
2. Ιταλικά: Άριστα
3. Γαλλικά (Diplôme d'études francaises-Delf1): Καλώς

3. ΙΑΤΡΙΚΗ ΠΡΟΥΠΗΡΕΣΙΑ

Από 1/11/2002 έως και 1/04/2003 εξάμηνη υποχρεωτική εκπαίδευση, σύμφωνα με το εκπαιδευτικό πρόγραμμα της Ιταλίας στα τμήματα Χειρουργικής (Λαϊκό Νοσοκομείο, Αθήνα), Παθολογίας (Λαϊκό Νοσοκομείο, Αθήνα), Παιδιατρική (Νοσοκομείο Παίδων, Αγία Σοφία, Αθήνα), Βιοχημεία (Πανεπιστήμιο Αθηνών), Γυναικολογία (Πανεπιστημιακή Κλινική Νοσοκομείου Λάρισας) για την συμμετοχή στις εξετάσεις για την άδεια εξασκήσεως επαγγέλματος.

Από 1/11/2003 έως και 1/11/2008 στη Νευρολογική Κλινική Πανεπιστημίου Μιλάνου ως ειδικευόμενη ιατρός.

Στα πλαίσια της ειδικότητας μου από 1/03/2007 έως και 31/08/2008 στο Πανεπιστήμιο Columbia, New York, USA, στο Motor Neuron Center για ερευνητικό fellowship υπό την εποπτεία του Prof. S. Przedborski.

4. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 15^ο Meeting of the European Neurological Society, Vienna, 18-22 June 2005.
(παρακολούθηση teaching course: Current treatments in Neurology)
- Advances in Stem Cell Research, European Consortium for Stem Cell Research, 6-7 April, 2005, Milan, Italy.
- 20^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελλήνων Νευρολόγων, 16-19 Μαρτίου 2006, Λάρισα
- 58^ο Annual Meeting of American Academy of Neurology, San Diego, 1-7 April 2006.
- 59^ο Annual Meeting of American Academy of Neurology, Boston, April 28–May 5, 2007.
- 60^ο Annual Meeting of American Academy of Neurology, Chicago, April 12–19, 2008
(παρακολούθηση teaching course: Update in Neurology)

- Society for Neuroscience, 38th Annual Meeting, Nov 15-19, 2008. Washington, DC.
- 61^ο Annual Meeting of American Academy of Neurology, Seattle, April 25-May 2, 2009.
*awarded with 2009 AAN Resident Research Travel Scholarship
- 1st International Symposium on Personalized Medicine: Promises and Challenges in Primary Health Care, 29th May-1st June 2009, Cappadokia-Turkey
- Multiple Sclerosis-Managing the new dynamic environment 11-12 June 2009, Vienna, Austria
- Recent Advances in Neuromuscular Disorders, November 13th-14th Athens, Greece

5. ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΩΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΟΜΕΝΗ

- Teaching Evidence-Based Neurology in Europe-Cochrane Systematic Reviews in Practice
1)First Workshop: Epilepsy, London 30 June-1 July, 2005
2)Second Workshop: Multiple Sclerosis, Madrid 16-17 December, 2005
3)Third Workshop: Parkinson's Disease, Lisboa 2006
4)Fourth Workshop: Acute Stroke, Perugia 1-2 December, 2006.
Η παρακολούθηση των παραπάνω εκπαιδευτικών σεμιναρίων έγινε εφικτή με υποτροφία που μου δόθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση: Marie Curie Conferences and Training Courses.
- Παρακολούθηση εκπαιδευτικού σεμιναρίου με θέμα «Current treatments in Neurology». 15^ο Meeting of the European Neurological Society, Vienna, 18-22 giugno 2005.
- Παρακολούθηση εκπαιδευτικού σεμιναρίου με θέμα «Update in Neurology». 60^ο Annual Meeting of American Academy of Neurology, Chicago, April 12–April 19, 2008

6. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

Διεθνή συνέδρια:

1. K. Aggelakis, E. Dardiotis, **D. Papadimitriou**, A. Nikolaidou, K. Flabouriaris, P.Kolia, A. Papadimitriou, G. Hadjigeorgiou. Interleukin-1 receptor antagonist genotypes in Greek patients with Multiple sclerosis. J. Neurology 25 (suppl 2) 112, 2003.

2. K. Aggelakis, E. Dardiotis, **D. Papadimitriou**, P. Kolia, K. Kletsas, A. Papadimitriou, G. Hadjigeorgiou. Evidence for association between paraoxonase 1 (M55L) gene polymorphism and multiple sclerosis. *J. Neurology* 250 (suppl 2) 171, 2003.
3. M. Crimi, A. Papadimitriou, P. Palamidou, A. Bordoni, U. Papandreou, **D. Papadimitriou**, E. Drogari, N. Bresolin, G. Comi. A new mitochondrial mutation in ND3 gene causing Leigh syndrome. 55th Annual Meeting of American Academy of Neurology, Honolulu, March 29-April 5 2003. *J. Neurology* 25 (suppl 2) 66, 2003.
4. Corti S., Locatelli F., Guglieri M., **Papadimitriou D.**, Strazzer S., Salani S., Bendotti C. Comi G.P. BM derived stem cells contribute to CNS, heart and skeletal muscle regeneration in SOD1-G93A mice. 55th Annual Meeting of American Academy of Neurology, Honolulu, March 29-April 5 2003. *Neurology*, vol. 60, Suppl. 5, S07.004, 2003
5. Corti S., Locatelli F., Guglieri M., **Papadimitriou D.**, Salani S., Strazzer S., Del Bo R., Fortunato F., Comi G.P. A Subpopulation of Human Peripheral Blood Cells Develops Nestin-Positive Sphere Structures and Expresses Neuronal Markers. *56° Annual Meeting of American Academy of Neurology*, San Francisco, 24 aprile-1 maggio 2004. *Neurology*, vol. 58, N° 7, Suppl. 3, A31, 2004.
6. Corti S., Locatelli F., **Papadimitriou D.**, Donadoni C., Guglieri M., Salani S., Strazzer S., Del Bo R., Comi G. P. Migration and differentiation of neural stem cells into nmd mice, an animal model of Spinal Muscular Atrophy. *14° Meeting of the European Neurological Society*, Barcelona, 26-30 giugno 2004. *Journal of Neurology*, vol. 251, Suppl. 3, pp. 54-55, 2004.
7. Locatelli F., Corti S., **Papadimitriou D.**, Donadoni C., Del Bo R., Fortunato F., Strazzer S., Salani S., Bresolin N., Comi G. P. Multipotentiality, Homing Properties and Neurogenesis of CNS-Derived LeX(ssea-1)⁺/CXCR4⁺ Stem Cells. *57° Annual Meeting of American Academy of Neurology*, Miami, 9-16 aprile 2005. *Neurology*, Vol 64, Suppl 1, pp. A357-A358, 2005.
8. Corti S., Locatelli F., **Papadimitriou D.**, Donadoni C., Crimi M., Del Bo R., Bordoni A., Strazzer S., Salani S., Bresolin N., Comi G. P. Transplantation of ALDH Expressing Neural Stem Cell Subpopulation Derived from Spinal Cord into *Nmd* Mice, an Animal Model of SMARD1. *57° Annual Meeting of American Academy of Neurology*, Miami, 9-16 aprile 2005. *Neurology*, Vol 64, Suppl 1, pp. A74-A75, 2005
9. **Papadimitriou D.**, Locatelli F., Corti S., Donadoni C., Del Bo R., Fortunato F., Strazzer S., Salani S., Bresolin N., Comi G.P. Pyramidal cells generation from multipotent CNS-derived LeX(ssea-1)⁺/CXCR4⁺ stem cells. *15° Meeting of the European Neurological Society*, Vienna, 18-22 giugno 2005. *Journal of Neurology*, vol. 252, Suppl. 2, pp. 66, 2005.
10. Locatelli F., Corti S., **Papadimitriou D.**, Donadoni C., Crimi M., Del Bo R., Bordoni A., Strazzer S., Salani S., Bresolin N., Comi G.P. Aldehyde dehydrogenase positive neuronal stem cells generate motor neurons and promote functional recovery in an animal model of Spinal Muscular Atrophy with Respiratory Distress type 1. *15° Meeting of the European Neurological Society*, Vienna, 18-22 giugno 2005. *Journal of Neurology*, vol. 252, Suppl. 2, pp. 89, 2005.
11. Locatelli F., Corti S., **Papadimitriou D.**, Donadoni C., Salani S., Del Bo R., Fortunato F., Strazzer S., Nizzardo M., Sardanù G., Bresolin N., Comi G.P. siRNA Mediated Interference of Motoneuron Death Triggered by Fas in SOD1 G93A ALS Mouse Model. *58° Annual Meeting of American*

Academy of Neurology, San Diego, 1-7 aprile 2006. Neurology, Suppl 1, 2006

12. **Papadimitriou D.**, Corti S., Locatelli F., Donadoni C., Salani S., Del Bo R., Strazzer S., Nizzardo M., Sardanu G., Bresolin N., Comi G.P. SOX2-Dependent Dedifferentiation of Human Astrocytes in Multipotent Stem Cells as Possible Cell Source for Repair in CNS Diseases. 58° Annual Meeting of American Academy of Neurology, San Diego, 1-7 aprile 2006. Neurology, Suppl 1, 2006

13. Corti S., Locatelli F., **Papadimitriou D.**, Del Bo R., Donadoni C., Salani S., Strazzer S., Nizzardo M., Sardanu G., Bresolin N., Comi G.P. Transplantation of LeX+/CXCR4+ Adult Neural Stem Cells in the Spinal Cord of a Murine Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. 58° Annual Meeting of American Academy of Neurology, San Diego, 1-7 aprile 2006. Neurology, Suppl 1, 2006

14. **Papadimitriou D.**, Corti S., Locatelli F., Donadoni C., Salani S., Del Bo R., Strazzer S., Nizzardo M., Sardanu G., Bresolin N., Comi G.P. SOX2-Dependent Dedifferentiation of Human Astrocytes in Multipotent Stem Cells as Possible Cell Source for Repair in CNS Diseases. 58° Annual Meeting of American Academy of Neurology, San Diego, 1-7 aprile 2006. Neurology, Suppl 1, 2006

15. Corti S., Bordoni A., Ronchi D., Santoro A., **Papadimitriou D.**, Lamperti C., Lucchini V., Magri M., Guglieri M., Crugnola V., Moggio M., Bresolin N., Comi G.P. Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis with a novel Q23R mutation in the Copper/zinc Superoxide Dismutase gene associated with muscle mitochondrial dysfunction. 59° Annual Meeting of American Academy of Neurology, Boston, April 28–May 5, 2007. Neurology, vol 68, suppl. 1 pp: A246, 2007.

16. **Papadimitriou D.**, Corti S., Locatelli F., Nizzardo M., Cardini M., Donadoni C., Salani S., Del Bo R., Ghezzi S., Fortunato F., Strazzer S., Bresolin N., Comi G.P. Transplantation of an ALDHhiSSCio population as a potential therapy os spinal muscular atrophy. 59° Annual Meeting of American Academy of Neurology, Boston, April 28–May 5, 2007. Neurology, vol 68, suppl. 1 pp: A248, 2007.

17. **Papadimitriou D.**, Corti S., Locatelli F., Nizzardo M., Nardini M., Donadoni C., Salani S., Del Bo R., Ghezzi S., Fortunato F., Strazzer S., Bresolin N., Comi G.P. Neural stem cell intratechal transplantation ameliorates the phenotype of a spinal muscular atrophy murine model. 17° Meeting of the European Neurological Society, Rhodes, June 16-20, 2007. Journal of Neurology vol 254, suppl. 3, pp 184, 2007

18. Corti S., Locatelli F., **Papadimitriou D.**, Fortunato F., Del Bo R., Donadoni C., Nizzardo M., Nardini M., Salani S., Ghezzi S., Strazzer S., Bresolin N., Comi G.P. Fas siRNA mediated interference reduces motor neuron death in amyotrophic lateral sclerosis mouse model. 12th International Congress of the World Muscle Society, Giardini Naxos –Taormina, October 17-20, 2007. Neuromuscular Disorders vol 17, pp 824, 2007.

19. Corti S., Nizzardo M., Nardini M., Donadoni C., Salani S., Fortunato F., Del Bo R., Locatelli F., **Papadimitriou D.**, Strazzer S., Bresolin N., Comi G.P. HB9-Positive Neural Stem Cell-Derived Motor Neurons Improve Disease Phenotype after Transplantation into a SMARD1 Animal Model. 60° Annual Meeting of American Academy of Neurology, Chicago, April 12–April 19, 2008. Neurology

20. **D. Papadimitriou**, D.B. Re, T. Nagata, H. Rideout, U. Monani & S. Przedborski. Neuro-Glial Interactions Mediate Motor Neuron Death in an in Vitro Model of Spinal Muscular Atrophy. Society for Neuroscience, 38th Annual Meeting, Nov 15-19, 2008. Washington, DC.

21.S. Corti, M.Nizzardo, M. Nardini, C. Donadoni, R. Del Bo, **D. Papadimitriou**, F.Locatelli, N. Mezzina, N. Bresolin, G.P Comi. Motoneurons transplantation with pharmacological therapy to promote axonal elongation improves the phenotype of Spinal Muscular Atrophy with Respiratory Distress Type 1 (SMARD1). 61° Annual Meeting of American Academy of Neurology, Seattle, April 25-May 2, 2009. Neurology

22. **D. Papadimitriou**, D.B. Re, T. Nagata, U. Monani & S. Przedborski. Astrocytes Induce Motoneuron Death and Axonopathy in an in vitro Model of Spinal Muscular Atrophy. 61° Annual Meeting of American Academy of Neurology, Seattle, April 25-May 2, 2009. Neurology
*Presentation selected for the Highlight Session of the meeting

23. **D. Papadimitriou**. Stem Cells in Neurology. 1st International Symposium on Personalized Medicine: Promises and Challenges in Primary Health Care, 29th May-1st June 2009, Cappadokia-Turkey

24. **D. Papadimitriou**. SMA: The possible role of non neuronal cells in motoneuron degeneration. Recent Advances in Neuromuscular Disorders, November 13th-14th Athens, Greece

Πανελλήνια συνέδρια:

- Δερμιτζάκη Μ., Κονδύλη Κ., Ντίνος Κ., **Παπαδημητρίου Δ.**, Πανουσοπούλου Μ., Τσαμούρη Μ., Διβάρη Ρ. Περίπτωση Συνδρ. Με ευνοϊκή απάντηση στην θεραπευτική αγωγή. 20° Πανελλήνιο Συνέδριο Ελλήνων Νευρολόγων, 16-19 Μαρτίου 2006, Λάρισα

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- 1 Hadjigeorgiou GM, **Papadimitriou D**, Bresolin N, Papadimitriou A. Mitochondrial Encephalomyopathies. Review article *J.Q.L.R.* Vol 1, issue 3, May-June 2003.
- 2 Crimi M, Papadimitriou A., Galbiati S., Palamidou P., Fortunato F., Bordoni A., Papandreou U., **Papadimitriou D.**, Hadjigeorgiou GM., Drogari E., Bresolin N., Comi G.P. A new mitochondrial DNA mutation in ND3 gene causing severe Leigh syndrome with early lethality. *Pediatric Research*, 55(5):842-6., 2004.
- 3 Donadoni C., Corti S., Locatelli F., **Papadimitriou D.**, Guglieri M., Strazzer S., Bossolasco P., Salani S., Comi G.P. Improvement of Combined FISH and Immunofluorescence to Trace the Fate of Somatic Stem Cells after Transplantation. *J Histochem Cytochem.* 2004 Oct;52(10):1333-9.
- 4 Corti S., Locatelli F, **Papadimitriou D**, Strazzer S, Comi GP. Somatic stem cell research for neural repair: current evidence and emerging perspectives. *J. Cell Mol. Med.* 2004 Jul-Sep;8(3):329-37.
- 5 Corti S., Locatelli F, Donadoni C, Guglieri M., **Papadimitriou D**, Strazzer S, Del Bo R., Comi GP. Wild-Type Bone Marrow Cells Ameliorate Phenotype of SOD1-G93A ALS mice and Contribute to CNS, Heart and Skeletal Muscle Tissues. *Brain.* 2004 Nov;127(Pt 11):2518-32.
- 6 Corti S., Locatelli F, **Papadimitriou D**, Strazzer S, Bonato S, Comi GP. Nuclear reprogramming and adult stem cell potential. *Histol Histopathol.* 2005 Jul;20(3):977-86.
- 7 Corti S., Locatelli F, **Papadimitriou D**, Donadoni C, Del Bo R, Fortunato F, Strazzer S, Salani S, Bresolin N, Comi GP. Multipotentiality, homing properties, and pyramidal neurogenesis of CNS-derived LeX(ssea-1)+/CXCR4+ stem cells. *FASEB J.* 2005 Nov;19(13):1860-2. Epub 2005 Sep 8.
- 8 Perani D, Garibotto V, Hadjigeorgiou GM, **Papadimitriou D**, Fazio F, Papadimitriou A. Positron emission tomography changes in PARK1 mutation. *Mov Disord.* 2006 Jan;21(1):127-30.
- 9 Galbiati S., Bordoni A., **Papadimitriou D.**, Toscano A., Rodolico C., Katsarou E., Sciacco M., Garufi A., Prella A., Aguenouz M., Bonsignore M., Crimi M., Martinuzzi A., Bresolin N., Papadimitriou A., Comi G.P. New mutations in *TK2* gene associated with mitochondrial DNA depletion. *Pediatr Neurol.* 2006 Mar;34(3):177-85.
- 10 Corti S., Locatelli F, **Papadimitriou D**, Donadoni C, Salani S, Del Bo R, Strazzer S, Bresolin N, Comi GP. Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells.* 2006 Apr;24(4):975-85.
- 11 Corti S., Locatelli F., **Papadimitriou D.**, Donadoni C., Del Bo R., Crimi M., Bordoni A., Fortunato F., Strazzer S., Menozzi G., Salani S., Bresolin N., Comi G.P. Transplanted ALDH^{hi}SSC^{lo} Neural Stem Cells Generate Motor Neurons and Delay Disease Progression of

- nmd* Mice, an Animal Model of SMARD1. *Human Molecular Genetics*, 2006 Jan 15;15(2):167-87.
- 12 Corti S., Locatelli F., **Papadimitriou D**, Del Bo R., Nizzardo M., Nardini M., Donadoni C., Salani S., Fortunato F., Strazzer S., Bresolin N., Comi G.P. Neural stem cells LewisX+CXCR4+ modify disease progression in an Amyotrophic Lateral Sclerosis model. *Brain*, 2007 May;130(Pt 5):1289-305. Epub 2007 Apr 17.
 - 13 Corti S., Nizzardo M., Nardini M., Donadoni C., Locatelli F., **Papadimitriou D**, Salani S., Del Bo R., Grezzi S., Strazzer S., Bresolin N., Comi G.P. Isolation and characterization of murine neural stem/progenitor cells based on Prominin-1 expression. *Experimental Neurology*, 2007 Jun;205(2):547-62. Epub 2007 Mar 28.
 - 14 Locatelli F. *, Corti S. *, **Papadimitriou D**, Fortunato F., Del Bo R., Donadoni C., Nizzardo M., Nardini M., Salani S., Ghezzi S., Strazzer S., Bresolin N., Comi G.P. Fas small interfering RNA reduces motoneuron death in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Annals of Neurology*, 2007 Jul;62(1):81-92. * These authors contributed equally to the work.
 - 15 Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Ronchi D, Saladino F, Bordoni A, Fortunato F, Del Bo R, **Papadimitriou D**, Locatelli F, Menozzi G, Strazzer S, Bresolin N, Comi GP. Neural stem cell transplantation can ameliorate the phenotype of a mouse model of spinal muscular atrophy. *Journal of Clinical Investigation*. 2008 Oct 1;118(10):3316-3330.
 - 16 Locatelli F., Bersano A., Ballabio E., Lanfranconi S., **Papadimitriou D**, Strazzer S., Bresolin N., Comi G.P., Corti S. Stem cell therapy in stroke. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2008 Nov 8.
 - 17 Corti S, Donadoni C, Ronchi D, Bordoni A, Fortunato F, Santoro D, Del Bo R, Lucchini V, Crugnola V, **Papadimitriou D**, Salani S, Moggio M, Bresolin N, Comi GP. Amyotrophic lateral sclerosis linked to a novel SOD1 mutation with muscle mitochondrial dysfunction. *J Neurol Sci*. 2009 Jan 15;276(1-2):170-4. Epub 2008 Nov 8.
 - 18 Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Del Bo R, **Papadimitriou D**, Locatelli F, Mezzina N, Gianni F, Bresolin N, Comi GP. Motoneuron transplantation rescues the phenotype of SMARD1 (spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1). *J Neurosci*. 2009 Sep 23;29(38):11761-71.
 - 19 **Papadimitriou D**, Le Verche V, Jacquier A, Ikiz B, Przedborski S, Re DB. Inflammation in ALS and SMA: Sorting out the good from the evil. *Neurobiol Dis*. 2009 Oct 13. [Epub ahead of print]
 - 20 Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Ronchi D, Simone C, Falcone M, **Papadimitriou D**, Locatelli F, Mezzina N, Gianni F, Bresolin N, Comi GP. Embryonic stem cell-derived neural stem cells improve spinal muscular atrophy phenotype in mice. *Brain*. 2009 Dec 23. [Epub ahead of print]

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία (Spinal Muscular Atrophy, SMA), είναι μία από τις νόσους κινητικού νευρώνας και η δεύτερη σε συχνότητα αιτία, στα πλαίσια των κληρονομικών νοσημάτων, που οδηγεί σε θάνατο στην βρεφική-νεανική ηλικία. Οφείλεται σε μείωση ή έλλειψη της πρωτεΐνης SMN, η οποία αποτελεί προϊόν έκφρασης του γονιδίου *SMN* (Survival Motor Neuron Gene) και παίρνει μέρος σε σημαντικές λειτουργίες στο εσωτερικό των κυττάρων όπως στις μεταγραφικές οδούς και στη βιοσύνθεση των ριβονουκλεοπρωτεϊνών. Παρόλο που η πρωτεΐνη SMN βρίσκεται στο εσωτερικό όλων των κυττάρων του οργανισμού, στην Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία οι κινητικοί νευρώνες των προσθίων κεράτων του νωτιαίου μυελού και ορισμένες φορές και του στελέχους παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην μείωση ή έλλειψή της πρωτεΐνης αυτής είναι αποκλειστικά. Κλινικά η νόσος χαρακτηρίζεται από προοδευτική μυϊκή αδυναμία και παράλυση των αναπνευστικών μυών σε σύντομο χρονικό διάστημα ανάλογα με τη μορφή της νόσου. Διακρίνουμε τέσσερις κλινικές μορφές ανάλογα με τη βαρύτητα της κλινικής εικόνας, η οποία φαίνεται ότι συσχετίζεται με την ποσότητα της πρωτεΐνης SMN. Παρά τις έντονες ερευνητικές προσπάθειες μέχρι στιγμής δεν υπάρχει ειδική θεραπεία της νόσου και περιοριζόμαστε μόνο στη συμπτωματική θεραπεία και στην βελτίωση της ποιότητας ζωής των παιδιών με φυσικοθεραπευτικές τεχνικές και αναπνευστική υποστήριξη.

Σε αυτή τη μελέτη εξετάζουμε για πρώτη φορά την αποτελεσματικότητα της μεταμόσχευσης βλαστοκυττάρων σε πειραματικά μοντέλα της νόσου και προσπαθούμε να απαντήσουμε στο ερώτημα εάν η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην θεραπευτική στρατηγική αυτής της νόσου. Μελετήσαμε μία συγκεκριμένη κατηγορία νευρικών βλαστοκυττάρων, τα οποία και

απομονώσαμε από το νωτιαίο μυελό πειραματοζώων και χορηγήσαμε ενδορραχιαία σε πειραματικά μοντέλα SMA και σε πειραματόζωα ελέγχου. Τα πειραματόζωα δότες προγραμματίστηκαν να εκφράζουν μία φθορίζουσα πρωτεΐνη την GFP (Green Fluorescent Protein) μόνο στους κινητικούς νευρώνες και έτσι με βάση αυτή την ιδιότητα καταφέραμε να παρακολουθούμε την μεταμοσχευτική πορεία των κυττάρων μέσα στο νευρικό σύστημα του δέκτη. Τα νευρικά βλαστοκύτταρα που μεταμοσχεύσαμε κατάφεραν να μεταναστεύσουν από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό στο παρέγχυμα του νωτιαίου μυελού να εγκατασταθούν στην κατάλληλη περιοχή αυτή των προσθίων κεράτων και να διαφοροποιηθούν σε ένα ποσοστό σε κινητικούς νευρώνες. Τα μεταμοσχευμένα SMA ζώα παρουσίασαν καλύτερη νευρομυϊκή λειτουργία η οποία ελέγχθηκε με δοκιμασίες συμπεριφοράς, μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και βελτιωμένη παθολογοανατομική εικόνα σε σχέση με τα μη μεταμοσχευμένα SMA ζώα. Για να εξηγήσουμε εν μέρει αυτά τα πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα μελετήσαμε πιο στενά τους ενδογενείς κινητικούς νευρώνες των μεταμοσχευμένων ζώων. Χρησιμοποιήσαμε μία τεχνική την laser captured microdissection (LCD), με την οποία καταφέραμε να απομονώσουμε από τα πρόσθια κέρατα του νωτιαίου μυελού των μεταμοσχευμένων και μη ζώων, μεμονωμένους ενδογενείς κινητικούς νευρώνες και να τους υποβάλλουμε σε ανάλυση γονιδιακής έκφρασης (ανάλυση microarray). Στη συνέχεια αναλύσαμε τα γονίδια που παρουσίασαν την πιο ενδιαφέρουσα αλλαγή στην έκφρασή τους λόγω της μεταμόσχευσης και καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η μεταμόσχευση των αρχέγονων νευρικών κυττάρων βοήθησε τα SMA ζώα όχι μόνο προσφέροντας νέους κινητικούς νευρώνες (σε μικρό ποσοστό) αλλά και βελτιώνοντας το περιβάλλον των ενδογενών κινητικών νευρώνων οι οποίοι παρουσίασαν αλλαγή στο pattern γονιδιακής έκφρασης τόσο ώστε να

μοιάζουν περισσότερο από γονιδιακής πλευράς στους υγιείς κινητικούς νευρώνες. Συγκεκριμένα οι μεγαλύτερες αλλαγές παρατηρήθηκαν σε πρωτεΐνες εμπλεκόμενες στον μεταβολισμό του RNA, πρωτεΐνες κυτταρικού κύκλου και πρωτεΐνες οι οποίες συνδέονται με την ακτίνη.

Με την παραπάνω μελέτη αποδείξαμε ότι η μεταμόσχευση ενός συγκεκριμένου υποπληθυσμού νευρικών βλαστοκυττάρων βελτιώνει τον φαινότυπο ενός μοντέλου Νωτιαίας Μυϊκής Ατροφίας ανοίγοντας έτσι νέους ορίζοντες στην χρήση των βλαστοκυττάρων σαν πιθανή θεραπευτική προσέγγιση σε αυτή τη νόσο και στις νόσους του κινητικού νευρώνα και γενικότερα στα νευροεκφυλιστικά νοσήματα.

ABSTRACT

Spinal muscular atrophy (SMA), a motor neuron disease (MND) and one of the most common genetic causes of infant mortality, currently has no cure. Patients with SMA exhibit muscle weakness and hypotonia. Stem cell transplantation is a potential therapeutic strategy for SMA and other MNDs. In this study, we isolated spinal cord neural stem cells (NSCs) from mice expressing green fluorescent protein only in motor neurons and assessed their therapeutic effects on the phenotype of SMA mice. Intrathecally grafted NSCs migrated into the parenchyma and generated a small proportion of motor neurons. Treated SMA mice exhibited improved neuromuscular function, increased life span, and improved motor unit pathology. Global gene expression analysis of laser-capture-microdissected motor neurons from treated mice showed that the major effect of NSC transplantation was modification of the SMA phenotype toward the wild-type pattern, including changes in RNA metabolism proteins, cell cycle proteins, and actin-binding proteins. NSC transplantation positively affected the SMA disease phenotype, indicating that transplantation of NSCs may be a possible treatment for SMA.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κλινική εικόνα της Νωτιαίας Μυϊκής Ατροφίας

Οι Νωτιαίες Μυϊκές Ατροφίες (SMA) είναι μία ετερογενής ομάδα νευρομυϊκών οικογενών παθήσεων που χαρακτηρίζονται από προοδευτική εκφύλιση των κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού και του εγκεφαλικού στελέχους. Πρόκειται για παθήσεις οι οποίες αποτελούν τη δεύτερη αιτία θανάτου από κληρονομικά νοσήματα της παιδικής ηλικίας. Η πιο κοινή μορφή τους μεταβιβάζεται με αυτοσωμικό, υπολειπόμενο τρόπο (SMA5q, OMIM #253300) και η συχνότητά της είναι 1/6000 γεννήσεων, ενώ αυτή των φορέων είναι 1:40 (Pearn et al., 1978, Wirth et al., 2000).

Το γενετικό έλλειμμα χαρακτηρίζεται από μεταλλαγή στο τελομερικό ζεύγος (SMN1) του γονιδίου SMN του χρωμοσώματος 5q, το οποίο προκαλεί έλλειμμα της πρωτεΐνης SMN (Lefebvre et al., 1995).

Από γενετικής πλευράς υπάρχουν διάφορες μορφές νωτιαίας μυϊκής ατροφίας οι οποίες παρουσιάζουν παρόμοια κλινικά χαρακτηριστικά με την κλασσική SMA. Πρόκειται για μορφές που έχουν ξεχωριστή γενετική βάση προσβάλλουν διάφορες ομάδες νευρώνων και ορισμένες από αυτές είναι φυλοσύνδετες στο X (SBMA) και άλλες είναι επικρατητικές (SMA περιφερικών τμημάτων IV).

Τα κλινικά συμπτώματα της κλασσικής SMA οφείλονται κυρίως στην απώλεια των κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού και χαρακτηρίζονται από προοδευτική ατροφία και μυϊκή αδυναμία των άκρων με απώλεια της κινητικότητας των άκρων και του κορμού, και προοδευτικά της κατάποσης και της αναπνοής. Οι νοητικές λειτουργίες διατηρούνται (Munsat et al., 1992). Η αδυναμία των άκρων είναι συμμετρική, κυρίως κεντρομελική και αρχίζει από τα κάτω άκρα. Στην πορεία της νόσου προσβάλλονται οι μυς που

νευρώνονται από το εγκεφαλικό στέλεχος προκαλώντας αναπνευστική δυσχέρεια, ατροφία και δεσμιδώσεις της γλώσσας. Αρκετοί ασθενείς παρουσιάζουν τρόμο χειρών στην έκταση των άνω άκρων. Τα τενόντια αντανακλαστικά δεν παράγονται ή εμφανίζονται μειωμένα, ενώ τα πελματιαία όταν παράγονται είναι φυσιολογικά. Σε προχωρημένο στάδιο προσβάλλονται οι αναπνευστικοί μύες ενώ το μυοκάρδιο και οι λείοι μύες παρουσιάζουν φυσιολογική λειτουργία.

Η κλινική εικόνα συνοδεύεται με ηλεκτροφυσιολογία ευρήματα απονευρωτικού τύπου, όπως μειωμένη επιστράτευση μυϊκών ινών στη μέγιστη δύναμη, αύξηση της διάρκειας και του πλάτους των δυναμικών της κινητικής μονάδας, αύξηση της συχνότητας των πολυφασικών δυναμικών, αυτόματη δραστηριότητα (rhythmic firing) των κινητικών μονάδων (συνεχής ΗΜΓ δραστηριότητα στα 7-18Hz). Η κινητική και αισθητική ταχύτητα αγωγής είναι φυσιολογική ή ελάχιστα μειωμένη.

Παθολογοανατομικά παρατηρείται μείωση και εκφύλιση των κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού και του στελέχους. Οι υπάρχοντες κινητικοί νευρώνες παρουσιάζουν εκφυλιστικά στοιχεία, ενδεικτικά της εν ενεργεία διαδικασίας θανάτου, μειωμένο μέγεθος και σημεία μη φυσιολογικής ωρίμανσης.

Η ανάλυση των αξόνων στο επίπεδο των πρόσθιων ριζών παρουσιάζει πολλαξονικές δεσμίδες οι οποίες περιτυλίγονται από ένα μοναδικό κύτταρο Schwann, μειωμένη πυκνότητα αξόνων και απομυελινωτικές βλάβες. Οι μυϊκές ίνες εμφανίζουν εμβρυικά χαρακτηριστικά: μικρές διαστάσεις ένα μοναδικό κεντρικό πυρήνα, παρουσία της δεσμίνης και βιμεντίνης ουσίες οι οποίες κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής μυϊκής ανάπτυξης μειώνονται ποσοτικά ενώ στην περίπτωση της νωτιαίας μυϊκής ατροφίας αυξάνονται αναλογικά.

Λόγω του πολύμορφου κλινικού φαινότυπου, οι SMA χωρίστηκαν από το International SMA Consortium σε τέσσερις ομάδες, βασιζόμενοι στην ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων, την προσβολή ειδικών κινητικών λειτουργιών (κάθισμα, βάδιση) και την ηλικία θανάτου. (Zerres et al., 1999).

Η οξεία βρεφική μορφή (τύπου I ή Werdnig-Hoffmann) είναι η πιο βαριά. Η συχνότητά της είναι 1/20 000 γεννήσεις. Συνδέεται με το έλλειμμα του εξωνίου 7 στο γονίδιο SMN1 στο 95% των περιπτώσεων. Η νόσος εκδηλώνεται μέσα στους πρώτους έξι μήνες ζωής, αλλά πιο συχνά εμφανίζεται στους πρώτους τρεις μήνες. Ορισμένα βρέφη παρουσιάζουν στη γέννηση υποτονία, κεντρομελική αδυναμία και κατάργηση των αντανακλαστικών (“floppy baby”), ενώ σε μερικές περιπτώσεις παρατηρείται μείωση βρεφικών κινήσεων ήδη κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Η γενικευμένη παράλυση των άκρων και του κορμού επέρχεται προοδευτικά αλλά σύντομα. Η παράλυση των μεσοπλεύριων μυών προκαλεί παραμόρφωση του κορμού ο οποίος δεν μπορεί να ακολουθήσει τις αναπνευστικές κινήσεις ενώ η κοιλία διογκώνεται. Η αναπνοή γίνεται κατά κύριο λόγο διαφραγματική, καθώς το διάφραγμα προσβάλλεται μόνο στα τελικά στάδια της ασθένειας. Η προσβολή του στελέχους εμφανίζεται με ατροφία και δεσμιδώσεις γλώσσας. Τα νοσούντα παιδιά δεν καταφέρνουν ποτέ να καθίσουν. Συχνά παρουσιάζουν δυσκολία στην κατάποση και χρειάζονται γαστροστομία. Συνήθως ο θάνατος επέρχεται μέσα στα δύο πρώτα χρόνια ζωής λόγω αναπνευστικής ανεπάρκειας, η οποία συχνά συνοδεύεται από αναπνευστικές λοιμώξεις.

Η ενδιάμεση μορφή SMA (τύπου II) κληρονομείται στο 90% των ασθενών με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και οφείλεται στο έλλειμμα του εξωνίου 7 στο γονίδιο SMN1. Τα κλινικά χαρακτηριστικά είναι παρόμοια με εκείνα της SMA-1 εκτός από την ηλικία έναρξης και την παρατεταμένη επιβίωση. Η

έναρξη των συμπτωμάτων εντοπίζεται γύρω στους 6 με 18 μήνες της ζωής. Τα νοσούντα παιδιά καταφέρνουν να καθίσουν χωρίς στήριξη όμως η μετέπειτα κινητική ανάπτυξη σταματά και δεν καταφέρνουν ποτέ να διατηρήσουν την όρθια θέση χωρίς στήριξη και τελικά καθιλώνονται σε αναπηρικό αμαξίδιο. Οι δεσμιδώσεις της γλώσσας εμφανίζονται λιγότερο συχνά σε σχέση με τη SMA τύπου I όμως ο περιφερικός τρόμος είναι πιο εμφανής. Τα τενόντια αντανακλαστικά δεν παράγονται ή είναι μειωμένα. Δεν παρουσιάζουν συνήθως προβλήματα κατάποσης. Οι μεσοπλευριοί μύες προσβάλλονται στο 50% των ασθενών και σε ορισμένες περιπτώσεις μέσα στα πρώτα τρία χρόνια της ζωής. Κατά τη διάρκεια της βρεφικής ηλικίας αναπτύσσονται αγκυλώσεις των αρθρώσεων και δυσμορφίες όπως η κυφωσκολίωση, οι οποίες δυσκολεύουν τις αναπνευστικές κινήσεις. Συχνά παρατηρείται σταθεροποίηση της κλινικής εικόνας μετά από ένα ή δύο χρόνια, σπάνια όμως παρατηρείται βελτίωση. Η επιβίωση συσχετίζεται με την αναπνευστική λειτουργία και ο θάνατος επέρχεται περίπου στην δεύτερη δεκαετία.

Η πιο ελαφριά μορφή (τύπου III ή του Kugelberg-Welander) μεταβιβάζεται και αυτή με αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομικότητα και συσχετίζεται με το έλλειμμα του γονιδίου SMN1. Υποδιαιρείται με βάση την ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων σε SMA τύπου IIIa (εντός των τριών πρώτων ετών ζωής) και τύπου IIIb (μετά τα τρία πρώτα έτη ζωής). Παρουσιάζεται με προοδευτική, συμμετρική μυϊκή αδυναμία, κυρίως στα κάτω άκρα. Σε γενικές γραμμές αυτοί οι ασθενείς καταφέρνουν να καθίσουν και να περπατούν, παρότι εμφανίζουν σημαντικές παραμορφώσεις αρθρώσεων και σκολίωση. Η πάθηση επεκτείνεται αργά συνήθως κεντρομελικά, ή σπανιότερο περιφερικά ή ενίοτε και τα δύο. Ο τρόμος είναι συνήθης και μπορεί να αποτελεί το εναρκτήριο σύμπτωμα. Η αναμενόμενη διάρκεια ζωής δεν είναι μειωμένη,

αλλά το 44% των ασθενών SMA τύπου IIIa βαδίζει μέχρι την ηλικία των 20 ετών, ενώ το 90% των ασθενών SMA τύπου IIIb διατηρεί αυτή την ικανότητα και μετά την ηλικία των 20 ετών.

Η ενήλικη μορφή SMA (τύπου IV) είναι σπάνια και παρουσιάζεται μετά το τριακοστό έτος της ηλικίας με ήπια μυϊκή αδυναμία, συμμετρική ή ασύμμετρη και εντοπίζεται κυρίως στους κεντρομελικούς μυς. Τα τενόντια αντανακλαστικά είναι μειωμένα και η εξέλιξη της νόσου είναι βραδεία με φυσιολογική αναμενόμενη διάρκεια ζωής. Η εξέταση της αισθητικότητας είναι φυσιολογική. Οι γονιδιακές ελλείψεις που ανιχνεύονται στην παιδική ηλικία είναι ασυνήθεις στην SMA των ενηλίκων.

Διαγνωστικά Κριτήρια

Η διάγνωση της SMA βασίζεται σε κλινικά και εργαστηριακά κριτήρια (Zerres et al., 1999): συμμετρική μυϊκή αδυναμία, περισσότερο έκδηλη κεντρομελικά, έναρξη κυρίως από τα κάτω άκρα, παρουσία δεσμιδώσεων στη γλώσσα και/ή τρόμος χεριών, σημεία απονεύρωσης στο ΗΜΓ και στη βιοψία μυός. Τα κριτήρια αποκλεισμού είναι : διαταραχές αισθητικότητας, σημεία δυσλειτουργίας του ΚΝΣ, αρθρογρύπωση, αύξηση CPK περισσότερο από δέκα φορές πάνω από το μέγιστο όριο και μείωση της ταχύτητας αγωγής σε <70%. Στον πίνακα 2 εμφανίζονται τα συνήθη νοσήματα με τα οποία πρέπει να γίνει διαφοροδιάγνωση της νωτιαίας μυϊκής ατροφίας.

Σε περίπτωση που η κλινική εικόνα δεν αφήνει πολλές αμφιβολίες προτείνεται γενετική ανάλυση για τον καθορισμό της μετάλλαξης, ιδιαίτερα σε νεογνά, και οι πιο δύσκολες εξετάσεις για τα βρέφη όπως η βιοψία μυός

και το ηλεκτρομυογράφημα να γίνονται μόνο στις περιπτώσεις που παρουσιάζουν διαφορο-διαγνωστικό πρόβλημα.

Ειδικές μορφές Νωτιαίας Μυϊκής Ατροφίας

ΦΥΛΟΣΥΝΔΕΤΗ ΝΩΤΙΑΙΑ ΜΥΙΚΗ ΑΤΡΟΦΙΑ: (νόσος Kennedy)

Η νόσος αρχίζει στην ενήλικη ζωή (ηλικία έναρξης 20-50 έτη) είναι φυλοσύνδετη και χαρακτηρίζεται από προοδευτικά εξελισσόμενη κεντρομελική μυϊκή αδυναμία, μυϊκή ατροφία και δεσμιδώσεις. Οι ασθενείς εμφανίζουν γυναικομαστία, ατροφία όρχεων, υπογοναδισμό και διαβήτη. Η διάγνωση στηρίζεται στα κλινικά και ηλεκτρομυογραφικά ευρήματα και επιβεβαιώνεται με τον μοριακό έλεγχο όπου ανευρίσκονται επαναλήψεις τρινουκλεοτιδίων CAG στο γονίδιο των υποδοχέων των ανδρογόνων.

ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΕΞΩΣΑΜΙΝΙΔΑΣΗΣ :

Η ανεπάρκεια της εξωσαμινιδάσης οδηγεί σε λυσοσωματική εναπόθεση της GM2 γαγγλιοσιδάσης και εκδηλώνεται με παρόμοια κλινική εικόνα με την νωτιαία μυϊκή ατροφία. Σε μερικές περιπτώσεις προστίθεται συμπτώματα από την εκφύλιση της νωτιοπαρεγκεφαλιδικής οδού και του εξωπυραμιδικού συστήματος (δυστονία). Ανάλογα με την ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων διακρίνουμε την νεανική και των ενηλίκων μορφή. Η διάγνωση τίθεται με τον βιοχημικό (μέτρηση της δραστηριότητας της εξωσαμινιδάσης) και μοριακό έλεγχο.

ΜΟΝΟΜΕΛΙΚΗ ΜΥΙΚΗ ΑΤΡΟΦΙΑ :

Η μονομελική μυϊκή ατροφία είναι μία ιδιαίτερη μορφή της νωτιαίας μυϊκής ατροφίας και προσβάλλει τα άνω άκρα. Περιγράφηκαν μορφές στην βρεφική ηλικία και μέχρι της ανακάλυψης του γονιδίου SMN1 θεωρείται ιδιαίτερη νοσολογική οντότητα.

Συνήθως η συμπτωματολογία αρχίζει μεταξύ 15-25 ετών σε νέους άνδρες και χαρακτηρίζεται από αδυναμία και ατροφία των μικρών μυών της μιας χειρός που με την πάροδο του χρόνου επεκτείνεται στο αντιβράχιο. Τα τενόντια αντανακλαστικά είναι συνήθως μειωμένα και παρατηρούνται δεσμιδώσεις.

Η νόσος περιγράφηκε από τον Hirayama το 1959 ο οποίος συγκέντρωσε 150 περιπτώσεις και παρουσίασε τα παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά που επιβεβαιώνουν ότι πρόκειται για μορφή νωτιαίας μυϊκής ατροφίας.

ΝΟΣΟΣ FAZIO-LONDE:

Η νόσος προσβάλλει τους μυς που νευρώνονται από τα κατώτερα κρανιακά νεύρα. Τα συμπτώματα εμφανίζονται στη δεύτερη δεκαετία της ζωής περίπου και εξελίσσονται προοδευτικά.

ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΕΣ ΝΩΤΙΑΙΕΣ ΜΥΙΚΕΣ ΑΤΡΟΦΙΕΣ :

Η περιφερικές νωτιαίες μυϊκές ατροφίες είναι μία ομάδα νευρολογικών παθήσεων που η αδυναμία και η μυϊκή ατροφία ξεκινάει από περιφερικά τμήματα των άνω και κάτω άκρων και επεκτείνεται προοδευτικά και στους υπόλοιπους μυς.

Φαινοτυπικά η κλινική εικόνα μοιάζει με την Charcot-Marie Tooth χωρίς όμως τις αισθητικές διαταραχές και τα νευροφυσιολογικά ευρήματα είναι χαρακτηριστικά της νωτιαίας μυϊκής ατροφίας.

Αν και περιπτώσεις της νόσου περιγράφηκαν στην δεκαετία του 60 η Annita Harding το 1983 συγκέντρωσε ικανό αριθμό περιπτώσεων και ταξινόμησε τις περιφερικές νωτιαίες μυϊκές ατροφίες σε 7 ομάδες (πίνακας 1).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΗΣ ΝΩΤΙΑΙΑΣ ΜΥΙΚΗΣ ΑΤΡΟΦΙΑΣ (A.Harding 1983)				
	Κληρονομικότητα	Έναρξη	Γονίδιο	Γονιδιακή θέση
Τύπος 1	AD	2-20	Άγνωστο	Άγνωστη
Τύπος 2	AD	20-40	HSP22	12q24.3
Τύπος 3	AR	2-10	Άγνωστο	11q13
Τύπος 4	AR	1-20	Άγνωστο	Άγνωστο
Τύπος 5	AD	5-20	GARS	7q15
Τύπος 6	AR	Βρεφική (SMARD)	IGHMBP2	11q13.2
Τύπος 7	AD	10-20	DCTN1	2q13

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΝΩΤΑΙΑΣ ΜΥΙΚΗΣ ΑΤΡΟΦΙΑΣ

SMA (τύπος I)
Υποτονικό βρέφος
Χρωματοσωμιακές ανωμαλίες
Μιτοχονδριακά νοσήματα
Νόσος Pompe
Τραυματισμός νωτιαίου μυελού
Αρθρογρύπωση συγγενής
Συγγενείς μυοπάθειες
Μυοτονική δυστροφία
Συγγενής μυασθένεια

SMA (τύπος II)
Υποτονικό βρέφος
Συγγενείς μυοπάθειες
Guillain-Barre
Αδρενολευκοδυστροφία

SMA (τύπος III)
Μυϊκή δυστροφία
Συγγενείς μυοπάθειες
Μεταβολικές μυοπάθειες
Πολυνευροπάθειες
Μυοσίτις

Παθογένεια της SMA

Η γενετική διαταραχή των τεσσάρων μορφών SMA βρέθηκε στο χρωμόσωμα 5q11.2-13,2 μέσω ανάλυσης σύνδεσης (linkage) (Lefebvre et al., 1995, Monani et al., 2005 review, Wirth et al., 2006 review). Αυτή η γονιδιακή θέση περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, είναι ασταθής, με υψηλή συχνότητα ελλείψεων και αναδιατάξεων οι οποίες είτε κληρονομούνται είτε παρουσιάζονται de novo. Το γονίδιο που βρίσκεται στην περιοχή αυτή και μεταβάλλεται σε ασθενείς SMA έχει εντοπιστεί και ονομάζεται SMN (Survival Motor Neuron) (επιβίωσης κινητικού νευρώνα). Βρίσκεται σε ένα τμήμα χρωμοσώματος το οποίο είναι διπλασιασμένο και αντεστραμμένο κατά περίπου 500 kb.

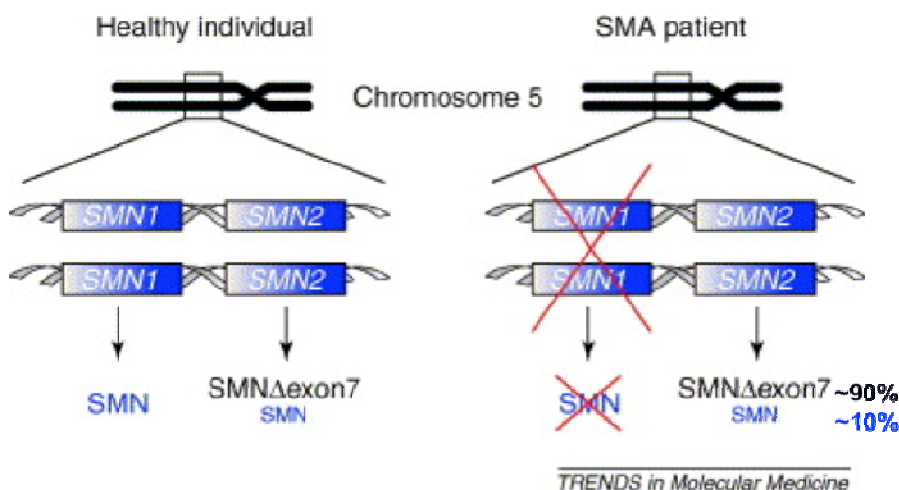
Το γονίδιο SMN και τα προϊόντα μεταγραφής του

Το γονίδιο SMN αποτελείται από εννέα εξόνια (exon 1, 2α, 2β 3-8), και το κωδικόνιο διακοπής ή κωδικόνιο λήξης βρίσκεται στο τέλος του εξονίου 7. Στον άνθρωπο υπάρχουν δύο αντίγραφα γονιδίου: το SMN1 και SMN2. Το SMN1 βρίσκεται στο τελομερίδιο, ενώ το SMN2 στο κεντρομερίδιο. Τα δύο αντίτυπα των SMN διαφέρουν μόνο σε 5 ζεύγη βάσεων, και βρίσκονται εντός της περιοχής του εξονίου 3' του γονιδίου. Μόνο η αντικατάσταση C-T στη θέση +6 του εξονίου 7 (c.840C> T) στο γονίδιο SMN2 βρίσκεται στο τμήμα κωδικοποίησης. (Bürglen L. et al., 1996).

Παρά το γεγονός ότι η αντικατάσταση c.840C> T είναι μία σιωπηλή μεταλλαγή και, επομένως, δεν μεταβάλλει την αλληλουχία αμινοξέων της

μεταφρασμένης πρωτεΐνης, η αντικατάσταση αυτή μεταβάλλει το μάτισμα (splicing) του εξονίου 7. Το πλήρους μήκους mRNA των γονιδίων SMN1 και SMN2 κωδικοποιεί πρωτεΐνες όμοιες αποτελούμενες από 294 αμινοξέα. Η αντικατάσταση C-T, που βρίσκεται στο επίπεδο του ενισχυτή ματίσματος των εξονίων καθορίζει ένα εναλλακτικό μάτισμα του προ-mRNA της SMN2, η οποία κόβει το εξόνιο 7 και έτσι το προκύπτων προϊόν μεταγραφής κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη κατατετμημένη και ασταθή.

Το γονίδιο SMN1 παράγει ένα πλήρους μήκους προϊόν μεταγραφής (FL) (βλ και α σχήμα σελ 32), το οποίο ανταποκρίνεται σε ένα σωστό μάτισμα σε σχεδόν 100% των περιπτώσεων, ενώ το γονίδιο SMN2 παράγει μόνο το 10% του προϊόντος μεταγραφής και στο 90% των περιπτώσεων παράγει ένα προϊόν που υπολείπεται του εξονίου 7 (SMN Δ 7) όπως φαίνεται στο σχήμα.



Το εξόνιο 7 του γονιδίου SMN αποτελείται από 54 ζεύγη βάσεων και χαρακτηρίζεται από ένα αδύναμο σημείο ματίσματος 3'. Η ένταξη του εξονίου 7 στο mRNA ρυθμίζεται θετικά από πολλά εξονικά στοιχεία σε cis, τα οποία ονομάζονται (Exonic Splicing Enhancer-ESEs) ενισχυτές εξονικού

ματίσματος και από τα Intronic Splicing Enhancer (ISEs) ή ενισχυτές εσονικού ματίσματος. Επίσης η ένταξη του εξονίου 7 ρυθμίζει αρνητικά εξονικά στοιχεία σε cis που ονομάζονται Exonic Splicing Silencers (ESSs) ή Σιγαστήρες εξονικού ματίσματος και Σιγαστήρες εσονικού ματίσματος (ISSs). Όλα αυτά τα στοιχεία cis αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες ματίσματος trans-acting, όπως τις πρωτεΐνες πλούσιες σε σερίνη-αργινίνη (πρωτεΐνες SR) και αρκετές πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (hnRNPs) (Cartegni L. et al., 2002).

Ένα σημαντικό ESE βρίσκεται στο άκρο 5' του εξονίου 7 του SMN1 και αναγνωρίζεται από τον παράγοντα ματίσματος SF2/ASF. Αυτή η ακολουθία ESE μεταβάλλεται από την αντικατάσταση c.840C> T στο SMN2 και, συνεπώς, δεν αναγνωρίζεται από τον παράγοντα ματίσματος SF2/ASF. Κατά συνέπεια, το εξόνιο 7 δεν αναγνωρίζεται από παράγοντες που ρυθμίζουν το μάτισμα και έτσι επιτρέπεται ένα εναλλακτικό μάτισμα με αποτέλεσμα την αποκοπή του εξονίου 7 (SMNΔ7). Πρόσφατα προτάθηκε ότι η αντικατάσταση C-T δημιουργεί ένα ESS για το hnRNP A1 το οποίο διευκολύνει την παράλειψη του εξονίου 7 (Kashima et al., 2003). Η αντικατάσταση c.840C> T καθορίζει στη συνέχεια από τη μία πλευρά την απώλεια του ενισχυτή, και από την άλλη δημιουργεί ένα σιωπηλό προϊόν. Ο διπλός αυτός μηχανισμός διευκολύνει την εναλλακτική συρραφή του SMN κατά τη διάρκεια της μεταγραφής, η οποία αποκόβει το εξόνιο 7.

Στο κεντρικό τμήμα του εξονίου 7 υπάρχει ένα πολύ ισχυρό ESE αναγνωρισμένο από το παράγοντα ματίσματος τύπου SR Htra2β1 και από πολλές άλλες πρωτεΐνες ματίσματος (SRp30c, hnRNP G e RBM) που μαζί διευκολύνουν την ένταξη του εξονίου 7. Αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ ESE, Htra2-b1 και άλλους παράγοντες ματίσματος είναι υπεύθυνη για το 10% των

FL-SMN2. Στην πραγματικότητα, η υπερέκφραση των Htra2β1 αυξάνει έως και 80% τα επίπεδα μεταγραφής του FL-SMN2. (Hofmann Y. et al., 2000)

Από όλους τους ενισχυτές και σιγαστήρες ματίσματος των εσονίων 6 και 7, οι σιγαστήρες εσονικού ματίσματος ISS-N1, φαίνεται να είναι οι πιο σημαντικοί.

Ο ISS-N1 απαρτίζεται από 15 ζεύγη βάσεων, και βρίσκεται σε απόσταση 5BP από το σημείο ένωσης με το U1 snRNP (πυρηνικό ριβονουκλεοπρωτιδικό σωματίδιο πλούσιο σε Ουριδίνη, που είναι απαραίτητο για τη διαδικασία ματίσματος) πάνω στο εσόνιο 7, και έχει μια ισχυρή επίδραση στη δραστηριότητα των άλλων θετικών παραγόντων cis του εξονίου και του εσονίου 7. Αντικωδικά ολιγονουκλεοτίδια κατά τον ISS-N1 καθορίζουν την ένταξη του εξονίου 7 σε όλες σχεδόν τις διαδικασίες μεταγραφής του SMN2, όπως αποδείχθηκε σε πειράματα in vitro σε κύτταρα (Singh NK et al., 2006).

Το προϊόν μεταγραφής SMNΔ7 κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη κατατετμημένη με 282 αμινοξέα (το FL-SMN κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με 294 αμινοξέα), που είναι ασταθής και έχει μειωμένη ικανότητα ολιγομεροποίησης. Αυτό προκαλεί περιορισμένη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης SMN και πρόωρη αποσύνθεση.

Η πρωτεΐνη SMN και οι λειτουργίες της

Το γονίδιο SMN εκφράζεται σε πολλά είδη της εξελικτικής πορείας όπως στη μαγιά, σε πολλά ασπόνδυλα και σπονδυλωτά ζώα, υποδεικνύοντας τη ζωτική σημασία της πρωτεΐνης SMN. Η πρωτεΐνη SMN βρίσκεται σε όλους τους ιστούς και εκφράζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Η έκφραση της πρωτεΐνης διαφέρει από ιστό σε ιστό και η συγκέντρωση είναι

μεγαλύτερη στον εγκέφαλο, το νωτιαίο μυελό και τους μυς. Στο εσωτερικό του πυρήνα βρίσκεται μέσα σε δομές που ονομάζονται Gemini, τα οποία συχνά βρίσκονται πολύ κοντά ή ακόμη και εφαιπόμενα στα σωμάτια Cajal. Ο κλινικός φαινότυπος συσχετίζεται με την ποσότητα των κόκκων που περιέχουν SMN.

Ο ρόλος της πρωτεΐνης SMN είναι σημαντικός αφού συμμετέχει σε πολλές διεργασίες, όπως στο μεταβολισμό RNA, στις διαδικασίες μεταγραφής και την απόπτωση. Η πρωτεΐνη SMN εμπλέκεται σημαντικά στο μεταβολισμό του RNA και την βιογένεση των snRNP, οι οποίες αποτελούν σημαντικά συστατικά των σωματιδίων ματίσματος. Η πρωτεΐνη SMN ολιγομεροποιείται και γίνεται μέρος ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλέγματος. Αυτό περιέχει πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν στοιχειομετρικά (Geminine 2-8) και άλλες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν προσωρινά μη στοιχειομετρικά, όπως οι Sm, που αποτελούν μέρος των μικρών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊκών σωματιδίων ματίσματος (snRNPs). Η βιογένεση των snRNP εκτυλίσσεται σε διάφορα στάδια. Πρώτα, το snRNA μεταγράφεται στον πυρήνα και μεταφέρεται γρήγορα στο κυτταρόπλασμα. Εδώ, το σύμπλεγμα SMN μεσολαβεί στη συναρμολόγηση ενός δακτυλίου πρωτεϊνών Sm γύρω από το κατάλληλο σημείο πάνω στο μόριο snRNA. Μετά την ορθή συναρμολόγηση με τις πρωτεΐνες Sm, το snRNA υπερμεθυλιώνεται στο 5' και δρα σαν 3'. Αυτό το σύμπλεγμα στη συνέχεια μεταφέρεται ξανά στον πυρήνα για την εκτέλεση των καθηκόντων του, για την επεξεργασία του προ mRNA σε ώριμο RNA. (Meister et al., 2002).

Το πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα στο οποίο ανήκει και η SMN αλληλεπιδρά στοιχειομετρικά με το τμήμα του πυρήνα που λέγεται geminine, όπως επίσης και προσωρινά μη στοιχειομετρικά με άλλες πρωτεΐνες, όπως τις hsp70, P53,

BCL-2 και μερικές ιογενείς πρωτεΐνες. Η σημασία αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι ακόμη εν μέρει άγνωστη.

Η πανταχού παρούσα λειτουργία της πρωτεΐνης SMN στην βιογένεση των snRNPs σε όλους τους τύπους των κυττάρων δεν εξηγεί για ποιο λόγο ένα ελάττωμα της προκαλεί ειδική εκφύλιση των άλφα κινητικών νευρώνων. Πιστεύεται ότι η μείωση της SMN οδηγεί σε δυσλειτουργία του μηχανισμού ματίσματος των μορίων mRNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ζωτικής σημασίας για τους κινητικούς νευρώνες (Pellizzoni et al, 1998).

Ο ρόλος της SMN σε αποπτωτικές διαδικασίες παραμένει ακόμη αμφιλεγόμενος. Οι μεταλλάξεις που οδηγούν στο SMNΔ7 και άλλες παρερμηνεύσιμες μεταλλαγές C-terminal προωθούν την απόπτωση των νευρώνων. Δεδομένου ότι η SMN αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη P53 έχει προταθεί η μεσολάβηση της πρωτεΐνης P53 στα αποπτωτικά φαινόμενα στην SMA. Μια άλλη θεωρία σχετικά με την παθογένεια της SMA υποστηρίζει ότι οι κινητικοί νευρώνες έχουν ανάγκη από υψηλά επίπεδα SMN για την ανάπτυξή τους και την φυσιολογική λειτουργία τους και, ως εκ τούτου, οι τελευταίοι είναι ιδιαίτερα ευάλωτοι στη μείωση αυτής της πρωτεΐνης. Η SMN μεταβάλλεται ποσοτικά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, παρουσιάζοντας τα υψηλότερα επίπεδα σε εμβρυϊκούς ιστούς *in vivo* και κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των κυττάρων *in vitro*. Επίσης, μελέτες σε πειραματόζωα SMA έχουν αποδείξει τη συμμετοχή της SMN στην ανάπτυξη των αξόνων, την καθοδήγηση και τον σχηματισμό νευρομυϊκών συνάψεων.

Μελέτες ανοσοκυτταροχημείας έχουν αποδείξει την παρουσία της SMN σε δενδρίτες και άξονες, προτείνοντας ένα πιθανό ρόλο της SMN στη αξονική μεταφορά του RNA. Το γεγονός ότι η SMN εμπεριέχεται σε κοκκία στις αποφύσεις και στους νευρικούς κώνους των αξόνων είναι υπέρ αυτής της υπόθεσης. Τα κοκκία που περιέχουν SMN παρουσιάζουν ταχείες και

αμφίδρομες κινήσεις που εξαρτώνται από την μικροσωληνίσκους και μικροϊνίδια (C Bechade et al., 1999). Η πρωτεΐνη SMN αλληλεπιδρά επίσης με την hnRNP R, μια πρωτεΐνη που δεσμεύει την μη μεταφρασμένη περιοχή 3' του mRNA της β ακτίνης. Τα διαγονιδιακά ποντίκια SMA παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα της β-ακτίνης στο mRNA των περιφερικών αξόνων και των κώνων ανάπτυξης.

Επιπλέον, σε ορισμένα διαγονιδιακά ποντίκια SMA το μήκος των δενδριτών είναι μειωμένο σημαντικά, ενώ ο αριθμός των κινητικών νευρώνων δεν αλλάζει σημαντικά σε σχέση με τα ποντίκια ελέγχου.

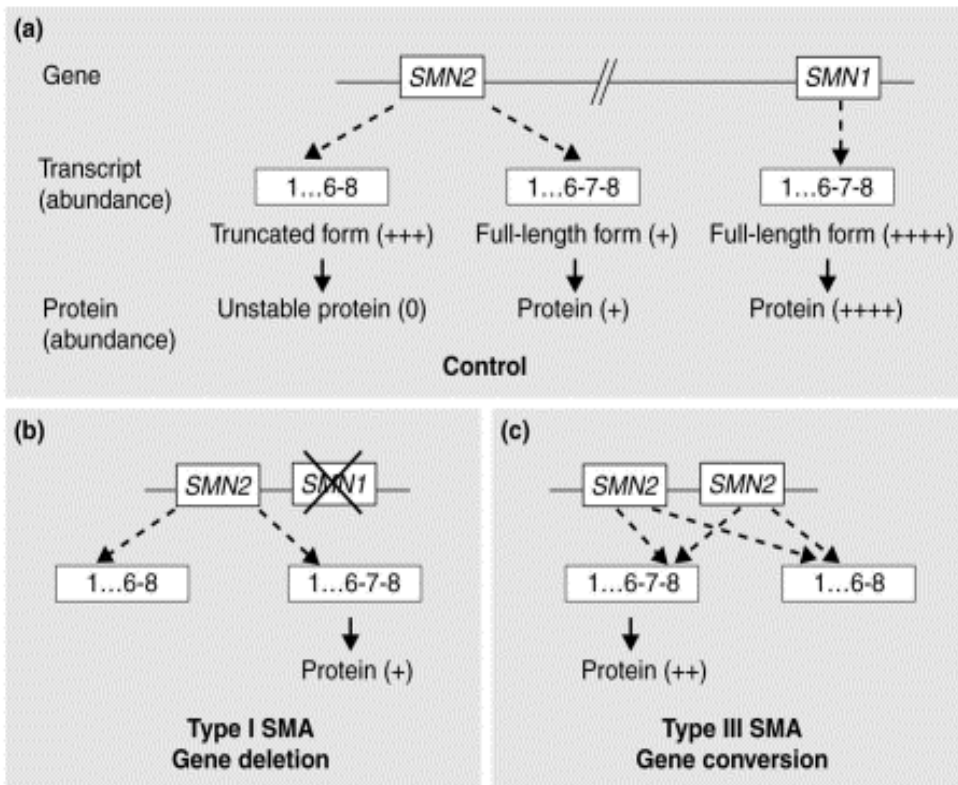
Προς υποστήριξη αυτής της υπόθεσης έχει πρόσφατα απομονωθεί μια εναλλακτική μορφή της πρωτεΐνης SMN, που παράγεται μέσω εναλλακτικού ματίσματος και ονομάζεται aSMN (Setola et al. 2006). Η aSMN προέρχεται από την μεταγραφή του γονιδίου SMN1 και διαφέρει από την SMN λόγω της παρουσίας του εσονίου 3α. Η πρωτεΐνη aSMN είναι πολύ μικρότερη από την FL-SMN, λόγω της παρουσίας του κωδικόνιου διακοπής που βρίσκεται στο σημείο επαφής μεταξύ του εξονίου 3 και του εσονίου 3α. Η aSMN υπάρχει σε διάφορα είδη κυττάρων και βρίσκεται σε καταστολή κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, γεγονός που υποδηλώνει την ενεργή συμμετοχή της κατά την εμβρυογένεση. Το χαρακτηριστικό αυτό φαίνεται να συνδέεται με την επέκταση των φιλοποδών, μια διαδικασία που συμμετέχει στην κινητικότητα και τη μετανάστευση των κυττάρων.

In vivo στοιχεία αποδεικνύουν την αύξηση της έκφρασης της aSMN στους κινητικούς νευρώνες των πρόσθιων κεράτων, στις δενδριτικές αποφύσεις και στους άξονες. Η aSMN θα μπορούσε να συμμετάσχει στις διαδικασίες αξονογένεσης. Πράγματι, αυτή η διαδικασία συνεπάγεται αλλαγές στο σχήμα, παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται στην επέκταση των φιλοπόδων. Η παρούσα υπόθεση υποστηρίζεται από μελέτες που διεξήχθησαν σε μοντέλα

zebra fish χρησιμοποιώντας αντικωδικά ολιγονουκλεοτίδια όπως το μορφολίνο το οποίο τροποποιεί την ανάπτυξη των αξόνων. Η ανακάλυψη της aSMN έκτοτε έχει αποτελέσει σημαντικό «εργαλείο» για τον προσδιορισμό της παθογένειας της SMA.

Μεταλλαγές στο γονίδιο SMN1 στους ασθενείς με SMA

Από όλους τους ασθενείς με SMA και ανωμαλίες στο χρωμόσωμα 5q-13, το 96% των ασθενών με SMA I-III, έχουν έλλειψη του γονιδίου SMN1, και συγκεκριμένα του εξονίου 7 και 8, ή μόνο του 7, ομοζυγωτικά (b, στο παρακάτω σχήμα). Αντίθετα, ασθενείς με SMA IV σπάνια εμφανίζουν ομοζυγωτική έλλειψη του SMN1. Μεταξύ των ομόζυγων ασθενών SMA για έλλειψη του SMN1, περίπου το 90% εμφανίζει το έλλειμμα στα δύο εξόνια 7 και 8, ενώ μόνο το 10% αποκλειστικά στο εξόνιο 7. Η μοριακή βάση του φαινομένου αυτού αποδίδεται σε γονιδιακή μετατροπή, ένα κοινό μηχανισμό μεταλλαγής που εμφανίζεται στην SMA, και οδηγεί στην μετατροπή του SMN1 σε SMN2, ή αντιστρόφως (c, στο παρακάτω σχήμα (Brahe C et al., 1995))



Current Opinion in Genetics & Development

Ένα μικρό ποσοστό ασθενών (4%) παρουσιάζει ενδογονιδιακές μεταλλαγές στο SMN1. Αυτοί οι ασθενείς είναι συνήθως ετεροζυγώτες με έλλειψη μόνο στο ένα χρωμόσωμα και μια ανεπαίσθητη μεταλλαγή στο άλλο χρωμόσωμα.

Μέχρι στιγμής έχουν εντοπιστεί 40 σημειακές μεταλλάξεις, από τις οποίες οι περισσότερες είναι παρερμηνεύσιμες μεταλλαγές (missense) που αλλοιώνουν τη λειτουργία της πρωτεΐνης SMN1 (B Wirth et al., 2000). Η ομοζυγωτική έλλειψη του SMN2, ένας γονότυπος που βρέθηκε στο 5% του πληθυσμού ελέγχου, δεν φαίνεται να έχει κλινικές συνέπειες.

Η παρουσία τουλάχιστον ενός λειτουργικού γονιδίου SMN1 είναι αρκετή για να αποφευχθεί η νόσος SMA. Αυτό που επηρεάζει περισσότερο τον κλινικό φαινότυπο είναι ο αριθμός των ζευγών του SMN2 (συνήθως μεταξύ 1 και 4 ζεύγη). Επειδή κάθε γονίδιο SMN2 παράγει περίπου το 10% των προϊόντων μεταγραφής FL, ο αυξημένος αριθμός γονιδίων SMN2 είναι ευεργετικός για

τους ασθενείς. Ασθενείς με SMA τύπου I είναι ομοζυγότες για την έλλειψη του SMN1 ενώ έχουν δύο αντίγραφα του SMN2, και έτσι παράγουν περίπου το 20% του προϊόντος μεταγραφής FL. Οι ασθενείς με SMA τύπου II έχουν έλλειψη ενός γονιδίου SMN1 και 3 λειτουργικά γονίδια SMN2 ενώ οι ασθενείς με SMA τύπου IIIα, έχουν τέσσερα ζεύγη SMN2 και, ως εκ τούτου, παράγουν περίπου το 40% του προϊόντος μεταγραφής FL.

	SMN-1	SMN-2
SMA τύπου I	-	~ 70% φέρουν 2 ζεύγη
SMA τύπου II	-	82% φέρουν 3 ζεύγη
SMA τύπου III	-	41% φέρουν 4 ζεύγη ~50% φέρουν πάνω από 4 ζεύγη
SMA τύπου IV	-	100% φέρουν πάνω από 4 ζεύγη

Θεραπευτικές προσεγγίσεις των Νόσων Κινητικού Νευρώνας

Μετά την ανακάλυψη της ακριβούς γενετικής βλάβης και της παθοφυσιολογίας της SMA γίνονται εκτεταμένες προσπάθειες και έρευνες για θεραπευτικές προσεγγίσεις. Βασιζόμενοι στα καινούρια στοιχεία που προέκυψαν από τα διαγονιδιακά πειραματόζωα, γνωρίζουμε τώρα ότι η αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης SMN καθυστερεί την έναρξη των συμπτωμάτων. Γίνονται επομένως έντονες ερευνητικές προσπάθειες για να εντοπισθούν τρόποι αύξησης των επιπέδων SMN FL. Αυτό μπορεί να γίνει με την ενεργοποίηση του γονιδίου SMN2, γεφυρώνοντας το γενετικό έλλειμμα (exon skipping) και σταθεροποιώντας την πρωτεΐνη SMN. Άλλες πιθανές

προσεγγίσεις στηρίζονται α) στην διερεύνηση του ρόλου ορισμένων νευροπροστατευτικών ουσιών, β) στην αντικατάσταση του γονιδίου SMN1 (γονιδιακή θεραπεία) γ) στην χρησιμοποίηση βλαστοκυττάρων (κυτταρικές θεραπείες) για την αντικατάσταση των κινητικών νευρώνων και άλλων κυττάρων. Η απευθείας όμως αντικατάσταση των κυκλωμάτων των κινητικών νευρώνων αποτελεί ένα από τα πιο δύσκολα επιτεύγματα καθώς τα μοσχευμένα κύτταρα πρέπει να διαφοροποιηθούν πρώτα σε κινητικούς νευρώνες, να αναγνωριστούν και έτσι να ενταχθούν στο δίκτυο των νευρώνων του ΚΝΣ και να είναι σε θέση να αναπτύσσουν άξονες οι οποίοι να δημιουργούν συνάψεις με τους σκελετικούς μυς.

Άλλες θεραπευτικές στρατηγικές για τη SMA αφορούν τη χρήση βλαστοκυττάρων για την παραγωγή διαφόρων παραγόντων οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν τις οδούς που οδηγούν στην κυτταρική βλάβη ή τη λειτουργία των μη νευρωνικών κυττάρων (αστροκύτταρα, μικρογλοία).

Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν κυτταρικές θεραπείες που να αποσκοπούν στην έκκριση τροφικών παραγόντων οι οποίοι να προλαμβάνουν την ενεργοποίηση των οδών κυτταρικής βλάβης στους κινητικούς νευρώνες.

Φαρμακολογική προσέγγιση

Ενεργοποίηση του γονιδίου SMN2: αναστολείς ακετυλίωσης των ιστονών

Το SMN2 γονίδιο ρυθμίζεται από ένα υποκινητή, ο οποίος έχει παρόμοια αλληλουχία βάσεων και λειτουργικότητα με αυτόν του SMN1 (Wirth et al., 2006 review). Μία περιοχή περίπου 150bp πριν την αρχή της μεταγραφικής περιοχής (translation initiation site) είναι απαραίτητη και εγγυάται την ελάχιστη δραστηριότητα του υποκινητή, αν και οι ρυθμιστικές αλληλουχίες

της έκφρασης του SMN βρίσκονται 4.6 kb πριν από το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Ο υποκινητής του SMN περιέχει σημεία σύνδεσης τα οποία δημιουργούν δεσμούς με την πρωτεΐνη cAMP, την οικογένεια πρωτεϊνών Sp, τον ρυθμιστικό παράγοντα ιντερφερόνης (interferon regulatory factor), οι οποίοι μπορούν να συντονίσουν με τη σειρά τους την δραστηριότητα του υποκινητή. Επίσης, ο υποκινητής SMN συνδέεται με τις πρωτεΐνες στόνων αποακετυλίωσης (HDAC 1 e 2) οι οποίες ρυθμίζουν την κατάσταση ακετυλίωσης των ιστονών του ίδιου υποκινητή, οδηγώντας στην έκφραση του γονιδίου SMN. Ο έλεγχος της ακετυλίωσης των ιστονών είναι ένας σημαντικός επιγενετικός μηχανισμός για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Όταν η ομάδα NH₂ των ιστονών ακετυλιώνεται εκτίθεται το DNA στις μεταγραφικές διαταραχές. Τα επίπεδα επομένως της ακετυλίωσης παίζουν σημαντικό ρόλο στην ισορροπία που αποκαθίσταται ανάμεσα στην ακετυλοτρανσφεράση και την αποακετυλίωση των ιστονών.

Μια κατηγορία φαρμάκων η οποία έχει μελετηθεί για την ικανότητά τους να ενεργοποιούν το γονίδιο SMN2 είναι αυτή των αναστολέων HDAC. Η πρώτη φαρμακευτική ουσία της κατηγορίας αυτής που χρησιμοποιήθηκε είναι το βουτυρικό νάτριο το οποίο αυξάνει τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου FL SMN2 σε λεμφοβλαστικές κυτταρικές σειρές προερχόμενες από ασθενείς με SMA τύπου 1. Η θεραπεία αυτή αυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης SMN στο νωτιαίο μυελό και στους κινητικούς νευρώνες στα πειραματικά μοντέλα της νωτιαίας μυϊκής ατροφίας. Όταν δε το βουτυρικό Na χορηγείται σε εγκυμονούντα πειραματόζωα, τότε καλυτερεύει η επιβίωση των νοσούντων εμβρύων και αυτό φαίνεται ότι οφείλεται σε μηχανισμό νευροπροστασίας. Ο μικρός όμως χρόνος υποδιπλασιασμού (6 λεπτά) δεν επέτρεψε να γίνουν μεγάλες κλινικές μελέτες για να αποδείξουν την χρησιμότητα ή μη στην καθημερινή κλινική πράξη.

Στην ίδια κατηγορία ανήκουν και γνωστά φάρμακα όπως το βαλπροϊκό και το φαινυλοβουτυρικό νάτριο που χρησιμοποιούνται εδώ και χρόνια σε διάφορα νευρολογικά νοσήματα. Η φαρμακοκινητική τους είναι γνωστή, είναι ασφαλή φάρμακα, εισέρχονται εύκολα στο ΚΝΣ, και χρησιμοποιήθηκαν πολύ νωρίς σε διάφορες κλινικές μελέτες σε ασθενείς με νωτιαία μυϊκή ατροφία πριν ακόμα αποδειχτεί η αποτελεσματικότητά τους σε πειραματόζωα.

Διάφορες ερευνητικές ομάδες απέδειξαν ότι η χορήγηση βαλπροϊκού Να αυξάνει το full-length SMN mRNA και του υποκινητή του SMN2.

Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξαν οι Andeassi και συν. 2004, οι οποίοι ανακοίνωσαν ότι και το βουτυρικό Να αυξάνει την πρωτεΐνη SMN και επομένως δυνητικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία της νωτιαίας μυϊκής ατροφίας.

Περισσότερες μελέτες για την ανακάλυψη ουσιών που προκαλούν αναστολή της ακετυλίωσης των ιστονών είναι σε εξέλιξη. Το suberoylanilide hydroxamic acid βρίσκεται στο στάδιο των μελετών για την θεραπεία του καρκίνου, είναι αναστολέας των ιστονών και σε ινοβλάστες προκαλεί αύξηση της πρωτεΐνης SMN τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε καλλιέργειες ανθρωπίνων νευρικών κυττάρων ενεργοποιώντας προφανώς το γονίδιο SMN2. Η τριχοστατίνη A (trichostatin A, TSA) που απομονώθηκε το 1976 σαν αντιμυκητιασικό φάρμακο απέδειχθη ότι σε πειραματικά μοντέλα νωτιαίας μυϊκής ατροφίας προκαλεί αύξηση της SMN πρωτεΐνης τόσο στο νευρικό όσο και στον μυϊκό ιστό. Ακόμα και μετά την έναρξη της νόσου η χορήγηση της τριχοστατίνης A αυξάνει την επιβίωση και το μέγεθος των νευρώνων του νωτιαίου μυελού. Συγκεκριμένα ενδοπεριτονιακή χορήγηση τριχοστατίνης A (TSA, 10 mg/kg) σε πειραματόζωα SMA, προκάλεσε αυξημένα επίπεδα ακετυλίωσης H3 e H4 και έκφρασης του γονιδίου SMN. Η θεραπεία αυτή αύξησε την διάρκεια επιβίωσης και καλυτέρευσε τον

φαινότυπο των πειραματοζώων. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την παρατήρηση πώς τα παράγωγα του υδροξυαμικού οξέως είναι ικανά να ενεργοποιήσουν την έκφραση του γονιδίου SMN2 in vivo προκαλώντας βελτίωση του φαινότυπου (Avila et al., 2007).

Υπό μελέτη ως προς την αποτελεσματικότητα είναι και άλλες κατηγορίες φαρμακευτικών ουσιών όπως β-λακταμάσες αναστολείς της ριβονουκλεοτιδικής ρεντουκτάσης (hydroxyl-urea) ή ριλουζόλη και αναστολείς της κύκλιοξυγενάσης (cox II) και αμινογλυκοσίδες.

Πρόσφατα ξεκίνησε μία μελέτη για να προσδιοριστούν ανάμεσα από 550.000 ουσίες, αυτές που ενεργοποιούν ένα τμήμα του υποκινητή SMN2 που βρίσκεται σε κυτταρικές σειρές παρόμοιες με κινητικούς νευρώνες (NSC34) (Jarecki J et al., 2005). Βρέθηκαν 17 παρασκευάσματα τα οποία ανήκουν σε 9 διαφορετικές κατηγορίες. Η περισσότερο ενδιαφέρουσα είναι η κατηγορία των Κιναζολινών η οποία αυξάνει το προϊόν μεταγραφής της SMN και τα επίπεδα της πρωτεΐνης σε κυτταρικές σειρές ινοβλαστών. Πρόκειται ίσως για την πιο αποτελεσματική κατηγορία φαρμάκων με ελάχιστη κυτταρική τοξικότητα.

Γονιδιακή Θεραπεία

Μία στρατηγική που θεωρητικά θα μπορούσε να συμβάλλει στη θεραπεία της SMA είναι η εισαγωγή στο reading frame του γονιδίου SMN1. Δυστυχώς η ανάπτυξη της γονιδιακής θεραπείας περιορίζεται από τις δυσκολίες που σχετίζονται με την αποτελεσματική μεταφορά του γονιδίου στους ιστούς στόχους (κύτταρα προσθίων κεράτων). Σε μία πρόσφατη μελέτη, περιγράφηκε ότι η χρησιμοποίηση ιών σαν οχήματα γονιδιακής μεταφοράς και

συγκεκριμένα ένας lenti-ιού που να εκφράζει ανθρώπινη SMN είναι ικανός να σταθεροποιεί τα επίπεδα της πρωτεΐνης SMN σε ινοβλάστες SMA τύπου I. Επιπλέον, πολλαπλές εγχύσεις lenti-ιοικών οχημάτων που να εκφράζουν την SMN σε διαφόρους μυς πειραματοζώων SMA, σταθεροποίησαν τα επίπεδα SMN στους κινητικούς νευρώνες, μείωσαν τον κυτταρικό θάνατο και αύξησαν την επιβίωση κατά μέσο όρο 3 με 5 ημερών (20% e 38%) σε σχέση με το όχημα ελέγχου LacZ και με τα πειραματόζωα που δεν δέχτηκαν θεραπεία αντίστοιχα.

Κυτταρικές Θεραπείες

Γενική Εικόνα για τα Βλαστοκύτταρα

Ο όρος βλαστοκύτταρα δηλώνει αδιαφοροποίητα κύτταρα που χαρακτηρίζονται από: α) την ικανότητα αυτοπολλαπλασιασμού και β) τη δυνατότητα διαφοροποίησης σε κύτταρα διαφόρων ιστών και οργάνων ενός οργανισμού. Βλαστοκύτταρα απαντώνται σε όλα τα στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης. Όσο πιο πρώιμο είναι το στάδιο ανάπτυξης τόσο μεγαλύτερη είναι και η δυνατότητα διαφοροποίησης των βλαστοκυττάρων προς τους διάφορους κυτταρικούς τύπους.

Στον άνθρωπο, τα βλαστοκύτταρα χαρακτηρίζονται ολοδύναμα τις πρώτες τρεις-τέσσερις ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, καθώς μπορούν να δώσουν όλους τους τύπους κυττάρων. Μετά το πέρας των πρώτων αυτών ημερών, τα κύτταρα που θα δώσουν τους υποστηρικτικούς ιστούς του εμβρύου διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα κύτταρα. Τα βλαστοκύτταρα του εμβρύου στο στάδιο αυτό και στα μετέπειτα στάδια ανάπτυξης, χαρακτηρίζονται ως

πολυδύναμα, καθώς έχουν χάσει την δυνατότητα διαφοροποίησης προς όλους τους τύπους κυττάρων που απαιτούνται για την πλήρη ανάπτυξη ενός οργανισμού, αλλά διατηρούν μέχρι την δέκατη τέταρτη ημέρα από τη γονιμοποίηση, την ικανότητα διαφοροποίησης προς μερικούς κυτταρικούς τύπους. Η πολυδυναμία των βλαστοκυττάρων μειώνεται σταδιακά, καθώς συμπληρώνεται και ολοκληρώνεται η ανάπτυξη του οργανισμού. Τελικά, στους ενήλικες, τα βλαστοκύτταρα που έχουν απομείνει και χρησιμεύουν για την ανανέωση των κατεστραμμένων κυττάρων των ιστών, υπό φυσιολογικές συνθήκες, μπορούν να διαφοροποιηθούν μόνο σε κύτταρα των ιστών στους οποίους εδρεύουν.

Τα βλαστοκύτταρα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τα αρχέγονα εμβρυϊκά κύτταρα και τα σωματικά κύτταρα. Τα αρχέγονα εμβρυϊκά κύτταρα προέρχονται από καλλιέργειες βλαστοκυστών από την ενδοκυτταρική μάζα (inner cell mass). Αυτά τα κύτταρα είναι πολυδύναμα καθώς είναι ικανά με διάφορες καλλιέργειες να διαφοροποιηθούν σε πολλούς κυτταρικούς τύπους. Τα αρχέγονα σωματικά κύτταρα έχουν πιο περιορισμένη ικανότητα αναπαραγωγής καθώς και διαφοροποίησης (συνήθως είναι μονοδύναμα, δίνοντας μόνο κύτταρα των ιστών στους οποίους εδρεύουν). Οι πηγές των βλαστοκυττάρων είναι πολλαπλές και μπορούν να ληφθούν από έμβρυα στο στάδιο της βλαστοκύστης, από εμβρυϊκούς ή ακόμα και ενήλικους ιστούς. Βλαστοκύτταρα έχουν εντοπιστεί και στο ΚΝΣ των θηλαστικών και διάφοροι ερευνητές έχουν απομονώσει βλαστοκύτταρα μέσα από συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού του ανθρώπου.

Η σκέψη για την χρήση βλαστοκυττάρων στα νευροεκφυλιστικά νοσήματα προήλθε από την ικανότητά που έχουν να διαφοροποιούνται σε ώριμους ιστούς και ενδεχομένως να αντικαθιστούν την λειτουργία των ήδη εκφυλισμένων κυττάρων (νευρώνων). Πρόσφατες μελέτες έχουν

συγκεντρώσει το ενδιαφέρον σε μεθόδους προσανατολισμού της διαδικασίας διαφοροποίησης προς μία συγκεκριμένη κυτταρική σειρά *in vitro*. Πρόκειται για ένα πολύ σημαντικό επίτευγμα διότι επιτρέπει την δημιουργία μιας ανεξάντλητης πηγής ώριμων κυτταρικών σειρών. Αυτά τα κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βασική έρευνα (*in vitro*) όπως επίσης μπορούν να εφαρμοστούν στην κυτταρική θεραπευτική διαφόρων νοσημάτων. Στον τομέα της βασικής έρευνας η εξακρίβωση των παραγόντων που καθορίζουν τη διαδικασία κυτταρικής διαφοροποίησης κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη είναι κρίσιμη τόσο για την κατανόηση ασθενειών που οφείλονται σε ανωμαλίες διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων όσο και στην μελέτη του μηχανισμού κυτταρικής ανανέωσης και αντικατάστασης των κυττάρων.

Βλαστοκύτταρα Νευρικού Συστήματος (NSC)

Νευρικά βλαστοκύτταρα (Neural Stem Cells, NSCs) βρέθηκαν σε διάφορες περιοχές του Νευρικού Συστήματος, τα οποία είναι πολυδύναμα κύτταρα και προέρχονται από διαφορετικές περιοχές τόσο του ώριμου (ενηλικιωμένου) όσο και εμβρυϊκού νευρικού ιστού (Weiss et al., 1996; Tropepe et al., 2001; Doetsch et al., 1999; Morshead et al., 1998). Τα ώριμα νευρικά βλαστοκύτταρα πολλαπλασιάζονται λιγότερο σε σχέση με τα εμβρυϊκά και για αυτό το λόγο είναι πιο δύσκολο να υπάρξει ικανός αριθμός κυττάρων διαθέσιμος για τις κλινικές θεραπευτικές απαιτήσεις. Τα κύτταρα αυτά είναι πολυδύναμα, μπορούν να κινητοποιηθούν από ορισμένους παράγοντας, να διαφοροποιηθούν σε ώριμα κύτταρα και να ενταχθούν στο νευρικό σύστημα του δέκτη.

Τα κύτταρα του οσφρητικού βολβού αποτελούν πηγή πολυδύναμων βλαστοκυττάρων μέσα στο ΚΝΣ του εμβρύου και του ενήλικα. Αυτά τα βλαστοκύτταρα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν πηγή για την θεραπεία και την αποκατάσταση, μέσω αυτόλογης μεταμόσχευσης, σε διάφορα νοσήματα του ΚΝΣ (Barnett et al., 2004).

Πρόσφατες έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην απομόνωση και την ανάπτυξη νευρικών βλαστοκυττάρων από διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού. Αυτά τα κύτταρα μπορούν να υποβληθούν σε διαδικασίες απομόνωσης και την συνέχεια σε ενεργοποίηση μέσω συγκεκριμένων υποκινητών (Green Fluorescence Protein, GFP) (Keyoung et al., 2001; Nunes et al., 2003). Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η παραγωγή μεταμοσχεύσιμων προγραμματισμένων πρόδρομων ή ώριμων κυττάρων. Η τεχνική αναστροφής της διαδικασίας θανάτου των προδρόμων κυττάρων μπορεί επίσης να αποδειχτεί ιδιαίτερα σημαντική για να επιτευχθεί η παραγωγή μεγάλου αριθμού κυττάρων, απαραίτητη για τη μετάβαση από τη βασική έρευνα στην κλινική (Roy et al., 2004).

Τα εμβρυϊκά αρχέγονα κύτταρα (ES) πολλαπλασιάζονται απεριόριστα *in vitro* διατηρώντας την ικανότητα να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε σωματικό κυτταρικό τύπο. Τα εμβρυϊκά αρχέγονα κύτταρα απομονώθηκαν για πρώτη φορά από ποντίκια το 1981 (Martin, 1981) και καλλιιεργήθηκαν παρουσία του παράγοντα LIF (leukemia inhibitory factor) και/ή πάνω σε θρεπτικό στρώμα ινοβλαστών. Εν απουσία του LIF ή του θρεπτικού στρώματος, τα εμβρυϊκά αρχέγονα κύτταρα διαφοροποιούνται αυτόματα σε πολυκυτταρικά συσσωμάτια τα οποία ονομάζονται εμβρυϊκά σωματίδια λόγω της ομοιότητας που παρουσιάζουν με τα έμβρυα.

Αφού μεταμοσχευθούν τα κύτταρα ES η συμπεριφορά τους τροποποιείται από περιβαλλοντικά ερεθίσματα και έτσι τα κύτταρα ακολουθούν τη μοίρα των

κυττάρων της περιοχής όπου εγκαθίστανται. Αυτό είναι σημαντικό δεδομένου ότι η εξάρτηση της πορείας των βλαστοκυττάρων από το περιβάλλον, αποκλείει την παραγωγή νευρώνων σε μη νευρογενείς περιοχές του ΚΝΣ. Διάφοροι παράγοντες έχουν αποδειχτεί ικανοί να ρυθμίζουν την διαφοροποίηση των κυττάρων ES σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους (Fujikura et al., 2002; Grepin et al., 1997; Kanda et al., 2003).

Η πιστοποίηση και η απομόνωση των διαφοροποιημένων κυττάρων από τα υπόλοιπα κύτταρα ES ή από άλλα ώριμα κύτταρα είναι δυνατή μέσω έκφρασης φθορίζοντων δεικτών ή γονιδίων ανθεκτικότητας σε φάρμακα υπό τον έλεγχο συγκεκριμένων υποκινητών ενός κυτταρικού τύπου (Tang et al., 2002; Billon et al., 2002).

Πιθανή χρήση των βλαστοκυττάρων στις Νευρολογικές παθήσεις

Τα βλαστοκύτταρα μπορεί να έχουν διάφορες εφαρμογές στις Νευρολογικές παθήσεις. Πρώτον μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν βιολογικά μέσα για την κατανόηση των Νευρολογικών παθήσεων, όπως για παράδειγμα η απομόνωση και ανάπτυξη κυτταρικών σειρών εμβρυϊκών αρχέγονων (Embryonic Stem Cells, ESCs) από διάφορα πειραματικά μοντέλα νευρολογικών παθήσεων, η διαφοροποίηση σε νευρώνες, και η δυνατότητα που παρέχεται να εξετάζουμε τα κυτταρικά και μοριακά προβλήματα των συγκεκριμένων κυττάρων. Δεύτερον, τα ενδογενή βλαστοκύτταρα τα οποία βρίσκονται υπό φυσιολογικές συνθήκες σε συγκεκριμένες περιοχές στο ΚΝΣ των θηλαστικών μπορούν να αναπτυχθούν με σκοπό να επανορθώσουν τις βλάβες των ιστών. Τρίτον, η μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων ή πρόδρομων

κυττάρων στις περιοχές βλάβης μπορεί να αποτελέσει μία σημαντική θεραπευτική στρατηγική.

Τα κυτταρικά μοσχεύματα μπορούν να συμβάλλουν με διάφορους τρόπους στην θεραπευτική των νευρολογικών νοσημάτων όπως: προσφορά τροφικής στήριξης στα κύτταρα του δέκτη, επιβράδυνση της εκφυλιστικής διαδικασίας, διευκόλυνση στην ανάπτυξη των αξόνων και στην λειτουργία των νευρογλοιακών κυττάρων, έκκριση νευροδιαβιβαστών, διαφοροποίηση σε ολιγοδεντροκύτταρα και μυελίνωση των αξόνων του δέκτη, διαφοροποίηση σε νευρώνες, δημιουργία νευρωνικών συνδέσεων ανάμεσα σε πληθυσμούς νευρώνων ή αντικατάσταση ελλειμματικών νευρωνικών κυκλωμάτων.

Παραγωγή κινητικών νευρώνων

Κινητικοί νευρώνες μπορούν να παραχθούν αποτελεσματικά εάν καλλιεργήσουμε τα ESCs ποντικών στο ρετινικό οξύ και στο Shh (developmental morphogen sonic hedgehog) ή τους χημικούς αγωνιστές του. Τόσο το ρετινικό οξύ όσο και το Shh ουδετεροποιεί και σταθεροποιεί τα πολυδυναμικά βλαστοκύτταρα να αποκτήσουν μία συγκεκριμένη ταυτότητα θέσης στο νωτιαίο μυελό, αυτή των κυττάρων των προσθίων κεράτων. Με αυτό τον τρόπο πολλά από τα κύτταρα ES ξεκινούν ένα ειδικό μεταγραφικό πρόγραμμα ώστε να γίνουν κινητικοί νευρώνες και αποκτούν ακόμη και τα ηλεκτροφυσιολογικά και ανοσοϊστοχημικά χαρακτηριστικά των ώριμων κινητικών νευρώνων (Wichterle et al., 2002; Miles et και το al., 2004). Οι κινητικοί νευρώνες που προέρχονται από κύτταρα ES όταν μεταμοσχευθούν στο εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό πειραματοζώου επεκτείνουν άξονες προς την περιφέρεια και παράγουν νευρομυϊκές συνδέσεις (Wichterle et al., 2002). Η

μεταμόσχευση κυττάρων ES που έχουν προγραμματιστεί να παράγουν φαινότυπο κινητικών νευρώνων σε παράλυτους ενήλικες αρουραίους οδηγεί στην παραγωγή χιλιάδων κινητικών νευρώνων, εκατοντάδες από τους οποίους επεκτείνουν άξονες από τον νωτιαίο μυελό στο περιφερικό νευρικό σύστημα (Deshpande et al., 2006). Πρόσφατα παρόμοιες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με ανθρώπινα εμβρυϊκά και νευρικά βλαστοκύτταρα και αποδείχθη ότι είναι δυνατή η παραγωγή χολινεργικών νευρώνων από ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα, όταν εμφυτευθούν σε πειραματόζωα (ενήλικα θηλαστικά) (κυτταρική σειρά K048) (Li et al., 2005, Wu et al., 2002) και αυτά τα κύτταρα μπορούν να σχηματίσουν νευρομυϊκές συνάψεις με τούς μυς του δέκτη, διευκολύνοντας τη μερική λειτουργική αποκατάσταση (Gao et al., 2005).

Αντικατάσταση μη νευρωνικών κυττάρων στις Νόσους Κινητικού Νευρώνα

Παρόλο που το μεγαλύτερο βάρος της έρευνας έχει δοθεί στην θεραπευτική αντικατάσταση του πρώτου και του δεύτερου κινητικού νευρώνα για τις Νόσους Κινητικού Νευρώνα, αφού το κύριο κύτταρο που παραβλάπεται είναι το κινητικό κύτταρο (προσθίων κεράτων), είναι όμως ολοένα και πιο εμφανές ότι η δυσλειτουργία και άλλων κυτταρικών τύπων (γλοία, μύες) συμβάλλουν επίσης στην παθογένεια της νόσου. Θα είναι λοιπόν εύλογο να γίνουν προσπάθειες αντικατάστασης ή βελτίωσης της λειτουργίας και αυτών των κυττάρων προκειμένου να υπάρξει ένα θετικό θεραπευτικό αποτέλεσμα (Barbeito et al., 2004; Sargsyan et al., 2005). Στην πλάγια Μυατροφική Σκλήρυνση (ALS) πχ. παρατηρείται έντονος πολλαπλασιασμός

αστροκυττάρων και μικρογλοίας στον φλοιό και στον νωτιαίο μυελό. Επίσης έχουν εντοπισθεί προφλεγμονώδεις παράγοντες σε ασθενείς με ALS και σε πειραματικά μοντέλα ALS οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκφυλιστική διαδικασία της νόσου (Paradimitriou D et al, 2009). Παραμένει άγνωστο λοιπόν το αν ο πολλαπλασιασμός αυτός των αστροκυττάρων και των κυττάρων της μικρογλοίας προκαλούν την βλάβη των κινητικών νευρώνων ή εάν το φαινόμενο αυτό είναι αποτέλεσμα της νευρωνικής βλάβης. Είναι όμως πλέον σίγουρο ότι τα αστροκύτταρα ρυθμίζουν την νευρογένεση στο ΚΝΣ (Song et al., 2002) και ότι τα αστροκύτταρα που προέρχονται από ανθρώπινα πρόδρομα νευρογενή κύτταρα μειώνουν την «τοξικότητα εξ υπερδιεγέρσεως» αφού ρυθμίζουν τον μεταφορέα του γλουταμικού και ασπαρτικού οξέως (Maragakis et al., 2004). Τα μικρονευρογλοιακά κύτταρα προερχόμενα από ανθρώπινα πρόδρομα νευρογενή κύτταρα (hNPC) προσφέρουν σημαντικούς νευροτροφικούς παράγοντες στο ενεργειακό πρόβλημα που αντιμετωπίζουν οι κινητικοί νευρώνες (Reinhart et al., 1990). Με τις τελευταίες έρευνες αποδείχθη ότι η μεταμόσχευση NSCs οδηγεί στην παραγωγή αστροκυττάρων (προερχόμενα από το μόσχευμα) και περιστασιακά των ολιγοδεντροκυττάρων. Αυτό μας δείχνει ότι η βελτίωση που παρατηρείται στα πειραματόζωα μετά τη μεταμόσχευση νευρικών βλαστοκυττάρων στην ALS μπορεί να οφείλεται είτε στην παραγωγή τροφικών παραγόντων εκ μέρους των αστροκυττάρων (Lu et al., 2003) ή στην μυελίνωση των αξόνων εκ μέρους των ολιγοδεντροκυττάρων (Akiyama et al., 2001). Σε ορισμένες μελέτες τα NSCs προγραμματίστηκαν κατάλληλα πριν τη μεταμόσχευση για να εκκρίνουν GDNF (glial cell-derived neurotrophic factor) και διά μέσου αυτού του μηχανισμού ερμηνεύθηκε η βελτίωση που παρατηρήθηκε σε αρουραίους SOD-1 G93A (Klein et al., 2005). Άλλοι ερευνητές (Hofstetter et al. 2005) απέδειξαν ότι τα NSCs βελτιώνουν την κινητική λειτουργική

κατάσταση σε τραυματικές βλάβες του νωτιαίου μυελού, όμως τα πειραματόζωα παρουσιάζουν αλλοδυνία στα υγιή πρόσθια άκρα και αυτό σημαίνει ότι η μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων μπορεί να βοηθήσει στην ανάπλαση των κινητικών κυττάρων αλλά μπορεί να επιδεινώσει την λειτουργία των αισθητικών κυττάρων. Κατάλληλος όμως έλεγχος της διαφοροποίησης μέσω της μεταγραφής της νευρογενίνης-2 (neurogenin-2), παράγοντας που ενισχύει την διαφοροποίηση των ολιγοδεντροκυττάρων, αυξάνει την επαναμυελίνωση της κατεστραμμένης περιοχής και επιτρέπει την αποκατάσταση τόσο της κινητικής όσο και της αισθητικής λειτουργίας στα οπίσθια άκρα (Hosfetter et al., 2005). Εκτός όμως από τα νευρογλοιακά κύτταρα, οι μύες φαίνεται ότι παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του κινητικού νευρώνα και προσφέρουν τροφική στήριξη για την διατήρηση της λειτουργίας του κινητικού νευρώνα και του άξονα (Dobrowolny et al., 2005; Kablar et al., 2005). Καθώς ο απονευρωμένος σκελετικός μυς μειώνει την έκκριση νευροτροφικών παραγόντων όπως BDNF (brain derived neurotrophic factor), NT-3 (neurotrophin-3), NGF (nerve growth factor), CT-1 (cardiotrophin-1), HGF (hepatocyte growth factor) e GDNF, είναι δυνατό η δυσλειτουργία και η εκφύλιση του άξονα να οφείλεται σε αυτή τη μείωση της τροφικής στήριξης που φυσιολογικά προσφέρει ο μυς στον κινητικό νευρώνα. Για αυτό το λόγο πολλοί ερευνητές ασχολήθηκαν με τη μεταμόσχευση μυοβλαστών σαν θεραπευτικό στόχο στις Νόσους Κινητικού Νευρώνα. Αποδείχτηκε ότι οι προγραμματισμένοι μυοβλάστες να παράγουν GDNF προλαμβάνουν την απώλεια των κινητικών νευρώνων σε μοντέλα ALS (Mohajeri et al., 1999) και έτσι οι μύς μπορούν να αποτελούν θεραπευτικό στόχο και στη νωτιαία μυϊκή ατροφία με αναπνευστική δυσλειτουργία (SMARD) (Corti et al, 2009).

Κυτταρικές θεραπείες βασισμένες στην έκκριση τροφικών παραγόντων για τη Νόσο Κινητικού Νευρώνα

Οι νευροτροφικοί και άλλοι τροφικοί παράγοντες συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των κυττάρων, στη διατήρηση διαφόρων λειτουργιών, στην πλαστικότητα των συνάψεων, στην επιβίωση και την αναγέννηση των νευρικών κυττάρων. Δρουν με υψηλή συνάφεια μέσω υποδοχέων των κινασών της τυροσίνης ενώ αλληλεπιδρούν με χαμηλή συνάφεια με τους υποδοχείς τύπου p75 NTR. Έχει αποδειχτεί ότι ο νευροτροφικός υποδοχέας *trkB* διατηρεί κάποιο βαθμό φωσφορυλίωσης στα κύτταρα του νωτιαίου μυελού ασθενών με ALS (Mutoh et al., 2000). Το γεγονός αυτό υποστηρίζει την υπόθεσή μας ότι η μεταμόσχευση προγραμματισμένων βλαστοκυττάρων για την παραγωγή τροφικών παραγόντων μπορεί να δρα εν μέρει θεραπευτικά στις Νόσους Κινητικού Νευρώνα.

Περιορισμοί στην θεραπευτική αυτή στρατηγική μέσω της έκκρισης νευροτροφικών παραγόντων αποτελούν η περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα τους, η ανικανότητά τους να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και η τοξικότητα εκτός του ΚΝΣ. Έγιναν κάποιες προσπάθειες να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα με τη χρήση οχημάτων ιών τα οποία μεταφέρουν όχι μόνο ένα αλλά πολλαπλούς τροφικούς παράγοντες απευθείας στην περιοχή βλάβης και τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά (Bilak et al., 2001). Η ενδοκρανιακή χορήγηση των τροφικών παραγόντων δεν είχε όμως επιτυχία στην κλινική πράξη. Είναι πιθανόν ότι η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα και η μικρή ημίσεια ζωή των τροφικών παραγόντων να αποτελούν τις αιτίες της ασυμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων που προέρχονται από μοντέλα *in vitro* στη βιβλιογραφία.

Η πιο ίσως αποτελεσματική υποσχόμενη στρατηγική είναι η μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων τα οποία θα παράγουν ανεξάντλητα τροφικούς παράγοντες. Αυτά τα βλαστοκύτταρα, είτε πρόκειται για ενήλικα νευρικά βλαστοκύτταρα ή εμβρυϊκά κύτταρα, θα έχουν επιπλέον το πλεονέκτημα ότι μπορούν να διαφοροποιηθούν σε πολλούς κυτταρικούς τύπους όπως νευρώνες και νευρογλοιακά κύτταρα. Επιπλέον μπορούν να προγραμματιστούν για να παράγουν τροφικούς παράγοντες που να προλαμβάνουν τον κυτταρικό θάνατο και να επιτρέπουν την δημιουργία νέων κυττάρων.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πειραματόζωα

Ως μοντέλο SMA χρησιμοποιήσαμε τους μύες FVB.Cg-Tg(SMNdelta7)4299Ahmb Tg(SMN2)89Ahmb *SmnI^{tm1Msd}/J* (Lee et al., 2005). Τα ομοζυγωτικά πειραματόζωα παρουσιάζουν τριπλή μεταλλαγή και περιέχουν δύο διαγονιδιακά αλληλία και μία μοναδική μεταλλαγή στόχος. Το αλληλίο 4299Ahmb di Tg (SMNδελτα7) αποτελείται από ένα cDNA του SMN που απολείπεται το εξόνιο 7 ενώ το αλληλίο 89Ahmb di Tg (SMN2) αποτελείται από το πλήρες ανθρώπινο γονίδιο SMN2. Οι ομοζυγώτες για το μεταλλαγμένο αλληλίο *Smn* και οι ομοζυγώτες για τα δύο διαγονιδιακά αλληλία παρουσιάζουν ανάλογα συμπτώματα και νευροπαθολογία με τους αρρώστους με SMA. Ως πειραματόζωα ελέγχου ή wild type χρησιμοποιήθηκαν μύς SMN2δέλτα7 +/+ SMN2 +/+ *Smn* +/+.

Ο γονότυπος των πειραματόζωων που χρησιμοποιήθηκαν καθορίστηκε με την μέθοδο PCR όπως περιγράφηκε από τους Lee et al. (2005).

Ως κυτταρικοί δότες χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά πειραματόζωα B6.Cg-Tg(Hlxb9-GFP)1Tmj/J, τα οποία εκφράζουν το gene reporter GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή *Hlxb9*, μόνο στους κινητικούς νευρώνες (Wichterle et al., 2002). Τα ετερόζυγα πειραματόζωα έχουν φυσιολογικό φαινότυπο και εκφράζουν την GFP στους δενδρίτες, στους άξονες και το κυτταρικό σώμα των κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού, επιτρέποντας την ταυτοποίηση τους, την απομόνωση τους μέσω FACS (Φθορίζουσα ενεργοποιημένη ταξινόμηση κυττάρων). Η έκφραση της GFP μιμείται το μοντέλο ενδογενούς έκφρασης του *HLXB9*. Η φθορίωση εκφράζεται πιο

έντονα στο επίπεδο των αξόνων, στους δενδρίτες και στις αποφύσεις των κινητικών νευρώνων από την 9.5 εμβρυϊκή μέρα έως την 10 μέρα μετά την γέννηση. Το μοντέλο αυτό είναι πολύ χρήσιμο για την απομόνωση και την *in vivo* παρακολούθηση των κινητικών νευρώνων.

Όλα τα πειραματόζωα προέρχονται από το Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σύμφωνα με τους διεθνείς κανονισμούς (EEC Council Directive 86/609, OJ L358, 1 Dec. 12, 1987; Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, U.S. National Research Council, 1996).

Απομόνωση και καλλιέργεια των NSCs

Τα νευρικά βλαστοκύτταρα (NSCs) έχουν απομονωθεί από ιστούς εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού ποντικών στην εμβρυϊκή ηλικία (εβδομάδα 13,5) και στους ενήλικες (6-8 εβδομάδες). Για τον εγκεφαλικό ιστό, χρησιμοποιήθηκε η περικοιλιακή περιοχή ($n = 10$ ποντίκια), όπως αυτή περιγράφηκε προηγουμένως (Too et al., 1999, Doetsch et al., 1999), ενώ για το νωτιαίο μυελό, χρησιμοποιήθηκε ολόκληρο το παρέγχυμα, χωρίς τις μήνιγγες, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Corti et al., 2006).

Οι ιστοί είχαν διαχωρίστηκαν μηχανικά με πιπέτα Pasteur και επώαστηκαν σε διάλυμα με 0,05% trypsin EDTA για 15 λεπτά στους 37 ° C. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν σε 190g για 5 λεπτά και αραιώθηκαν σε medium. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πυκνότητα 100.000 κύτταρα / ml σε Neurobasal (TM Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), που περιέχει B-27, N2 (Invitrogen), EGF (Epidermal Growth Factor) (20 ng / ml, Sigma Aldrich, St Louis, MO, ΗΠΑ), bFGF (Fibroblast Growth Factor) (20 ng / ml, Sigma-Aldrich), πενικιλίνη (100U) ή στρεπτομυκίνη (100 µg/ml, Invitrogen). Τα

κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε flask T75 (Nunc, Nalgene Nunc International Corp, ΗΠΑ), αιωρούμενα με τη μορφή νευροσφαιρών. Οι καλλιέργειες ανανεώθηκαν κάθε 5-7 ημέρες.

Απομόνωση των κυττάρων $ALDH^{hi} SSC^{lo}$

Τα κύτταρα $ALDH^{hi} SSC^{lo}$ απομονώθηκαν από ιστούς ή διαφοροποιήθηκαν από νευροσφαίρες. Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας ALDH τα κύτταρα επώαστηκαν με Aldefluor σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει το υπόστρωμα για ALDH, το BAAA (1 $\mu M/l$) για 60 δευτερόλεπτα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά από χρώση, κατά τη διάρκεια όλων των διαδικασιών που ακολούθησαν τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε πάγο. Για κάθε πείραμα θεωρήθηκε ως ένα δείγμα ελέγχου, ένα δείγμα κυττάρων που διατηρήθηκε στις ίδιες συνθήκες με προσθήκη 50 $\mu mol/l$ του συγκεκριμένου αναστολέα της ALDH DEAB (δυσεθυλαμίνοβενζαλδεΐδη). Πραγματοποιήθηκε επιλογή των κυττάρων με κυτταρομετρία FACS Vantage SE (Becton Dickinson Immunocytometry System, Mountain View, CA). Ο φθορισμός της Aldefluor διεγέρθηκε στα 488nm και η εκπομπή φθορισμού ανιχνεύθηκε με ένα φίλτρο Ισοθειοκυανικής φλουορεσκεΐνης (FITC) 530/30. Επελέγησαν τελικά κύτταρα με βάση το Low side scatter (SSC^{lo}) και την υψηλή δραστηριότητα ALDH ($ALDH^{hi}$). Πραγματοποιήθηκαν 20 ανεξάρτητες αναλύσεις FACS.

Είναι αναγκαίο να σημειωθεί ότι ακόμη και αν τα μήκη κύματος της GFP και της Aldefluor είναι παρόμοια, είμαστε σε θέση να διαχωρίσουν τα νευρικά βλαστοκύτταρα με τη μέθοδο αυτή, επειδή το γονίδιο Hb-9/GFP εκφράζεται μόνο στο επίπεδο των ώριμων κινητικών νευρώνων και όχι στα

βλαστοκύτταρα. Επίσης, χρησιμοποιήσαμε ως αρνητικά κύτταρα ελέγχου τα βλαστοκύτταρα Hb-9/GFP (-). Σε μια ξεχωριστή σειρά πειραμάτων, τα κύτταρα επώαστηκαν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 4 ° C με biotin-conjugated peanut agglutinin (PNA, 1:200; Vecta; Vector Labs, Burlingame, CA, <http://www.vectorlabs.com>), πλήθηκαν δύο φορές με medium χωρίς ορό με φυγοκέντρηση στους 4°C, επώαστηκαν με στρεπταβιδίνη Cy-3 για 20 λεπτά στους 4°C, πλήθηκαν δύο φορές με φυγοκέντρηση στους 4°C. Το μέγεθος των κυττάρων εξετάστηκε με την ανάλυση forward light scatter στο FACS.

Κυτταρική καλλιέργεια κυττάρων και διαφοροποίηση των επιλεγμένων πληθυσμών

Για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την καλλιέργεια κλώνων, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στο medium, όπως περιγράφεται προηγουμένως (NEP medium) με FGF με ή χωρίς EGF (Tropepe et al., 1999). Διαφοροποιήθηκαν σε κύτταρα με φαινότυπο κινητικού νευρώνα, όπως προηγουμένως περιγράφηκε με μικρές τροποποιήσεις (Wu et al., 2002). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στο Neurobasal plus N2, 0.1 mM 2-mercaptoethanol, 20 ng/ml bFGF, 1 µg/ml laminin, 5 µg/ml ηπαρίνη, 10 ng/ml neural growth factor (NGF) (Invitrogen), 10-100 ng/ml Shh (R&D Systems, Minneapolis, MN), 10 µM forskolin, RA (1 µM) per 48 h o 5 giorni (priming). Στη συνέχεια προστέθηκαν GDNF, BDNF, CNTF, IGF, NT3 (10 ng / ml, R & D Systems, Minneapolis, MN).

Το πρωτόκολλο αυτό είναι μία βελτιωμένη μέθοδος διαφοροποίησης των NSCs σε χολινεργικούς νευρώνες που περιγράφηκε προηγουμένως: Neurobasal plus N2, 20 ng/ml bFGF, 1 mg/ml laminin, 5 mg/ml ηπαρίνη, 10

ng/ml NGF (Invitrogen) και 10 ng/ml Shh (R&D Systems, Minneapolis, MN) (Corti et al., 2005, 2006). Το 2-mercaptoethanol (Grill et al., 1993; Ishii et al., 1993) επιτρέπει μεγαλύτερη επιβίωση των νευρώνων.

Η Forskolin είναι ένα μόριο που αυξάνει το ενδοκυττάριο c-AMP και ενεργοποιεί την αξονική επιμήκυνση (Roisen et al., 1972).

Το ρετινοϊκό οξύ (RA) και Sonic Hedgehog (Shh) προωθούν την διαφοροποίηση των κυττάρων ES σε κινητικούς νευρώνες (Wichterle et al., 2002, Harper et al., 2004, Li et al., 2005).

Για τη καλλιέργεια μαζί με μυοβλάστες μετά την διαδικασία priming, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν πάνω σε μυοβλάστες C2C12 (American Type Culture Collection) οι οποίοι βρίσκονταν σε Muscle differentiation medium (Promocell, Χαϊδελβέργη, Γερμανία) για 2 ημέρες.

Ανοσοκυτταροχημεία

Τα κύτταρα σταθεροποιήθηκαν σε 4% Παραφορμαλδεΰδη (PFA, 10 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Μετά το πλύσιμο με PBS και προεπώαση σε 5% ορό και 0,25% Triton X-100 σε PBS, οι καλλιέργειες επώαστηκαν με αντισώματα overnight στους 4°C. Αξιολογήθηκαν οι παρακάτω πρωτεΐνες: nestina (mouse monoclonal, 1:200, Chemicon, Temecula, CA, USA); vimentina (mouse monoclonal 1:200, Chemicon), Sox2 (coniglio, 1:200, Chemicon); Musashi (rabbit, 1: 200, Chemicon); Sox1 (rabbit polyclonal, 1 : 200, Chemicon); Pax 6 (mouse monoclonal, 1: 200, Chemicon); Pax7 (goat polyclonal, 1: 100, Santa Cruz, CA); En1 (rabbit, polyclonal, 1 :200, Chemicon); otx2 (rabbit, polyclonal 1:200, Chemicon); Irx3 (rabbit polyclonal 1 :100, Santa Cruz); Olig2 (rabbit polyclonal 1:500, Chemicon); Nkx2.2

(rabbit polyclonal 1: 200, Chemicon); Nkx6.1 (goat polyclonal 1:100 Santa Cruz); HOXC8 (mouse 1:200, Covance); HOXC6 (goat polyclonal 1:100 Santa Cruz); beta III-tubulin (TuJ-1) (mouse monoclonal, 1:200; Chemicon), NF M and H phosphorylated (mouse monoclonal, 1:200; Chemicon), NeuN (mouse monoclonal, 1:100; Chemicon), mouse monoclonal anti- MAP2 (1:100 dilution; Sigma-Aldrich, MO), rabbit anti- ChAT (1:100; Chemicon), rabbit anti-Islet-1 (1:200; Chemicon), rabbit 27 anti-HB9 (1:200; Chemicon), mouse Cy3 GFAP (1:400 dilution; Sigma-Aldrich,), oligodendrocyte marker (O4) (mouse monoclonal, 1:100; Chemicon).

Επίσης χρησιμοποιήθηκε ένα αντίσωμα έναντι της GFP συζευγμένο με Ales 488 (1:400; rabbit Molecular Probes, Eugene, OR) και την bungarotoxin συζευγμένη με τη rhodamine (1:1,000 Molecular Probes).

Μετά από επανειλημμένες πλύσεις σε PBS ορισμένα αντισώματα επώασθηκαν περαιτέρω με δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με FITC και RPE ή isotiocinata tetrametilrodamina (1:100, Dako, CARPENTERIA, CA, USA) (1 ώρα στο σκοτάδι, RT) σε PBS. Για την ποσοτική ανάλυση των φαινότυπων των διαφοροποιημένων κυττάρων *in vitro*, επιλέγησαν τυχαία 10 πεδία (πάνω από 200 κύτταρα) για κάθε δείγμα. Το ποσοστό του κάθε φαινοτύπου επιτεύχθηκε από το μέσο όρο των θετικών κυττάρων σε σύγκριση με το σύνολο των κυττάρων για κάθε πεδίο. Έγιναν τουλάχιστον 4 επαναλήψεις για κάθε δείγμα.

Real Time RT-PCR

Για την αξιολόγηση των προϊόντων μεταγραφής, το συνολικό RNA εξήχθη από τα NSCs που καλλιεργήθηκαν στο medium ανάπτυξης και αυτό της

διαφοροποίησης. Τα 3T3 κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί έλεγχοι. Το συνολικό RNA προετοιμάστηκε χρησιμοποιώντας το kit απομόνωσης EUROzol (EuroClone srl UK). Η μέθοδος RT πραγματοποιήθηκε ως εξής: 2 μικρογραμμάρια του συνολικού RNA από κάθε δείγμα μεταγράφηκαν αντίστροφα χρησιμοποιώντας για primer random Ready-To-Go™ “You-Prime First-Strand Beads” kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), σύμφωνα με συστάσεις του προμηθευτή. Ένα μl του cDNA που δημιουργήθηκε χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο για κάθε αντίδραση ποσοτικής Real-Time PCR χρησιμοποιώντας Assays-on-Demand Gene Expression Products σε ένα σύστημα ανίχνευσης ακολουθίας ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Πραγματοποιήθηκε η ακόλουθη ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης: SOX1: Mm00486299_s1, HOXC8: Mm00439369_m1, PAX6: Mm00443072_m1, nestin: Mm00450205_m1, TuJ1: Mm00727586_s1, GFAP: Mm00546086_m1. Η ευκαρυωτικό 18S ριβοσωματικό RNA (Hs99999901_s1) χρησιμοποιήθηκε ως ενδογενής έλεγχος για την ομαδοποίηση όλων αυτών των γονιδίων-στόχων. Για να προσδιοριστεί η σχετική ποσοτικοποίηση, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της συγκριτικής κύκλου ορίου (CT). Η αλλαγή του προφίλ της γονιδιακής έκφρασης αναφέρεται σε εμβρυϊκές νευροσφαίρες.

Μεταμόσχευση των κυττάρων ALDH^{hi} SSC^{lo} σε πειραματόζωα SMA

Τα κύτταρα ALDH^{hi} SSC^{lo} που προέρχονται από εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό ποντικών HB9-GFP, χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταμόσχευση, μετά την απομόνωσή τους με FACS. SMA νεογέννητα ποντίκια ηλικίας 1ης ημέρας χρησιμοποιήθηκαν ως αποδέκτες. Τα κύτταρα μεταμοσχεύθηκαν στο ΚΝΣ

των ζώων όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Elliger et al., 1999, Corti et al., 2006).

2 μl κυτταρικού αιωρήματος (20000 κύτταρα) χορηγήθηκαν. Για να μελετηθεί η τύχη των κυττάρων του δότη εκτός από την έκφραση της GPF, οι μεταμοσχεύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας κύτταρα από άρρενες δότες σε θηλυκούς λήπτες και αντιστρόφως. Για να αξιολογηθεί εύκολα η κατανομή των κυττάρων σε σύντομο χρονικό διάστημα (1-2 ημέρες και σε 5-7 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση), τα κύτταρα του δότη χρωματίστηκαν με μια φθορίζουσα χρωστική την PKH26 (Sigma), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Σαν ελέγχους χρησιμοποιήσαμε ποντίκια SMA και μη μεταλλαγμένα ζώα τα οποία και υποβάλαμε στην ίδια διαδικασία μόνο που αντί για κύτταρα χορηγήσαμε φυσιολογικό ορό.

Τα ζώα χωρίστηκαν στις εξής κατηγορίες: SMA μεταμοσχευμένα ζώα (n = 24, n = 12 αρσενικά, n = 12 θυληκά) και μη μεταμοσχευμένα SMA (n = 24, n = 12 αρσενικά και n = 12 θυληκά) και στη συνέχεια αξιολογήθηκαν για την νευρομυϊκή τους λειτουργία, την επιβίωση και τέλος ιστολογικά.

Η μελέτη σχεδιάστηκε έτσι ώστε τα ζώα που προέρχονται από την ίδια οικογένεια να διανέμονται εξίσου στις δύο ομάδες.

Επιπλέον, τρεις ομάδες που αποτελούνται από σύνολο 6 ποντίκια/συνθήκη μεταμοσχευμένων και μη ζώων και άγριου τύπου (ομάδα /συνθήκη : n = 6, 10-13 ημέρες) χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της απόπτωσης νευρώνων.

Ανάλυση της διάρκειας ζωής

Για την καταγραφή των συμπτωμάτων και της επιβίωσης, τα ζώα παρακολούθηθηκαν καθημερινά. Θυσιάστηκαν στο τελικό στάδιο της

ασθένειας, όταν δεν ήταν πλέον σε θέση να θρέφονται και παρουσίαζαν δυσκολία στην αναπνοή, όπως αναφέρεται και αλλού (Azzouz et al., 2004).

Για την στατιστική ανάλυση της επιβίωσης χρησιμοποιήθηκε ανάλυση Kaplan-Meier και log-rank test.

Λειτουργική Ανάλυση

Καμπύλες ανάπτυξης

Δημιουργήθηκε μια καμπύλη σωματικής ανάπτυξης καταγράφοντας το βάρος των ζώων κάθε μέρα. Οι καμπύλες αύξησης βάρους αναλύθηκαν με ANOVA και με τη μέθοδο Tukey-hoc η οποία επιτρέπει πολλαπλές συγκρίσεις.

Αξιολόγηση της μυϊκής ισχύος των SMA πειραματόζωων

Τα ζώα SMA αξιολογήθηκαν για τη μυϊκή τους δύναμη με τη δοκιμασία χειρολαβής, όπως αυτή περιγράφηκε προηγουμένως (Grondard et al., 2005). Όλες οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν από εξεταστές οι οποίοι δεν γνώριζαν το είδος της μεταμόσχευσης στο οποίο είχαν υποβληθεί τα ζώα. Τα ζώα ελέγχου, καθώς και τα μεταμοσχευμένα SMA ζώα αξιολογήθηκαν σε ηλικία μεταξύ 10 και 15 ημερών για την ικανότητά τους να αναρτώνται από μεταλλικές ράβδους με τα μπροστινά πόδια τους. Κάθε ζώο υποβλήθηκε σε 5 προσπάθειες με τουλάχιστον 10 λεπτά ανάπαυσης μεταξύ της μία δοκιμής και της άλλης. Τα στοιχεία αναλύθηκαν με ANOVA στατιστική ανάλυση και με Tukey post-hoc ανάλυση για πολλαπλές συγκρίσεις.

Test ανοιχτού πεδίου

Η κίνηση των ζώων αξιολογήθηκε με δοκιμή ανοιχτού πεδίου (Grondard et al., 2005). Το σύστημα αποτελείται από ένα ξύλινο κουτί διαστάσεων 28 x 28 x 5 cm. Το δάπεδο είναι χωρισμένο σε 16 τετράγωνα 7X7 εκατοστών. Τα τετράγωνα κοντά στις άκρες τα ονομάζουμε "άκρη", ενώ τα υπόλοιπα 4 τετράγωνα τα ονομάζουμε "κέντρο".

Κάθε ποντίκι τοποθετείται στο κέντρο. Τους επιτρέπεται να κυκλοφορούν ελεύθερα για 5 λεπτά και οι κινήσεις καταγράφονται από τον πειραματιστή. Κατά τη διάρκεια αυτών των 5 λεπτών καταγράφηκε ο αριθμός των περιφερειακών και κεντρικών διασταυρώσεων και το ποσοστό των περιφερειακών διασταυρώσεων. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με ANOVA και Tukey post-hoc ανάλυση για τις πολλαπλές συγκρίσεις.

Ανάλυση Ιστών

Τα ζώα θυσιάστηκαν στο τελικό στάδιο της νόσου, και οι ιστοί σταθεροποιήθηκαν με 4% PFA σε PBS (pH 7.4).

Απομονώθηκε ο νωτιαίος μυελός, τοποθετήθηκε σε PFA για 1 ώρα, και στη συνέχεια σε 20% σακχαρόζη σε PBS (pH 7.4) overnight και καταψύχθηκε με Tissue Tek OCT(Sakura) σε υγρό άζωτο. Οι ιστοί τότε κρυοτεμαχίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε πλακάκια με ζελατίνη. Ελήφθησαν δείγματα με πάχος 20 μm κάθε 10 αξονικές τομές. Όλες οι τομές επώσθησαν με 1% ορό εμβρύου μόσχου σε PBS, με 0,25% Triton X-100 και τους εξής δείκτες:

1:200 Neu-N (mouse monoclonal antibody, Chemicon), 1:200 NF (mouse monoclonal antibody, Chemicon), 1:200 TuJ1 (mouse monoclonal antibody,

Chemicon), 1:200 MAP-2 (mouse monoclonal antibody, Sigma-Aldrich), 1:200 nestin (mouse monoclonal, Chemicon), 1:200 vimentin (mouse monoclonal, Chemicon), 1:100 rabbit anti-ChAT (Chemicon); rabbit anti-Islet-1 (1:200; Chemicon), rabbit anti-HB9 (1:200; Chemicon), 1:500 rabbit anti-tyrosine hydroxylase (TH, Chemicon), 1:100 anti glutamate decarboxylase 67 (GAD 67) (mouse monoclonal, Chemicon), 1: 100 goat – Doublecortin 30 (DCX C-18, Santa Cruz), 1: 200 per O4 (mouse monoclonal, Chemicon), 1:200 per GFAP (mouse monoclonal Cy3 conjugate, Sigma).

Χρησιμοποιήθηκε επίσης ένα αντίσωμα αντι-GFP συζευγμένο με Alexa 488 (1:400).

Τα αντισώματα προστέθηκαν για επώαση overnight στους 4°C. Για τα μη ήδη συζευγμένα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν δευτερογενή αντισώματα anti mouse ή anti rabbit συζευγμένα με FITC fluorochromes, R-PE, CY3 ή βιοτίνη, 1:200 (Jackson Immuno Research and DAKO), για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Οι πυρήνες χρωματίστηκαν με DAPI. Η έκφραση των δεικτών αποκαλύφθηκε με χρήση συμβατικού μικροσκοπίου (Zeiss Axiophot, Germany) και με Confocal laser scanning (Leica TCS SP2 AOBS, Germany).

Για μια αμερόληπτη στερεολογική μέτρηση των κυττάρων GFP+, χρησιμοποιήθηκαν optical dissectors και τυχαία δειγματοληψία. Για την ποσοτικοποίηση των κυττάρων του δότη, αναλύσαμε με συστηματική τυχαία σειρά κάθε δέκατη τομή του συνόλου του νωτιαίου μυελού, (20 μm, μέσος όρος 25οριζόντιες τομές ανά ζώο). Ο αριθμός των νευρώνων αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας την μέθοδο με dissector Gundersen et al., 1988; Messina et al, 2000). Τα optical dissectors 100 x 70 x 14 χρησιμοποιήθηκαν τυχαία και μετρήθηκε ο αριθμός των θετικών κυττάρων σε κάθε ένα. Η πυκνότητα κυττάρων υπολογίστηκε διαιρώντας το συνολικό αριθμό των κυττάρων GFP

με το συνολικό όγκο των οπτικών dissectors. Ο συνολικός όγκος ιστού ανά δείγμα (V_{cord}) που περιέχει τους νευρώνες υπολογίστηκε με τη μέθοδο του Cavalieri. Ο συνολικός όγκος ιστού, πολλαπλασιαζόμενος επί τον αριθμό των νευρώνων ανά μm^3 , έδωσε τον συνολικό αριθμό των νευρώνων ανά δείγμα ($N = N_v \times V_{cord}$) (Messina και άλλοι, 2000).

Ανάλυση FISH

Για να αποκαλυφθούν πιθανά φαινόμενα σύντηξης κυττάρων και για να παρακολουθήσουμε τη μοίρα των κυττάρων του δότη, πραγματοποιήθηκε *in situ* υβριδισμός (FISH) με χρήση ανιχνευτή φθορισμού για το χρωμόσωμα Y (Cambio) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνεται από τον προμηθευτή. Το αναλυτικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε έχει περιγραφεί προηγουμένως (Donadoni C et al, 2004).

Ιστολογική ανάλυση και καταμέτρηση των κινητικών νευρώνων

Συνεχόμενα τμήματα της οσφυϊκής μοίρας του νωτιαίου μυελού (12 μm) και ποτισμένα με παραφίνη, υποβλήθηκαν σε επεξεργασία για Nissl χρώση για την καταμέτρηση των κυττάρων με οπτικό μικροσκόπιο, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Grondard et al., 2005).

Οι τομές των προσθίων κεράτων αναλύθηκαν σε 200 X μεγέθυνση για να εκτιμηθεί η παρουσία νευρώνων.

Όλα τα κύτταρα που μετρήθηκαν βρισκόντουσαν στο πρόσθιο κέρας κάτω από μια νοητή οριζόντια γραμμή από το κεντρικό σωλήνα. Μόνο τα κύτταρα των νευρώνων που εμφάνιζαν τουλάχιστον ένα πυρηνίσκο εντός του πυρήνα

καταμετρήθηκαν όπως περιγράφηκε προηγούμενα. Οι στατιστικές συγκρίσεις έγιναν με χρήση one-way ANOVA και Student's *t* test.

Laser captured microdissection (LCM) των κινητικών νευρώνων

Αναλύσαμε την οσφυϊκή μοίρα του νωτιαίου μυελού των μεταμοσχευμένων SMA ζώων (n = 3), των μη μεταμοσχευμένων SMA (n = 3) και των ζώων ελέγχου (n = 3) (όλα τα ποντίκια είναι αρσενικά). Η ομάδα ελέγχου υποβλήθηκε στη χειρουργική διαδικασία μόνο με έγχυση φυσιολογικού ορού. Η χειρουργική επέμβαση μεταμόσχευσης κυττάρων διενεργήθηκε την ημέρα P1 και τα ζώα θυσιάστηκαν σε ηλικία 10 ημερών. Ο ιστός διατηρήθηκε σε θερμοκρασία -80°C.

Ο νωτιαίος μυελός (οσφυϊκή περιοχή O1-O5) προηγουμένως ποτισμένος με PFA αφαιρέθηκε γρήγορα, τοποθετήθηκε σε Tissue-Tek OCT Compound (Zoeterwoude, the Netherlands) και καταψύχθηκε σε υγρό άζωτο. Οι ιστοί τεμαχίστηκαν σε πάχος 16 μm και τοποθετήθηκαν σε διαφάνειες επικαλυμμένες με μεμβράνη της Leica. Η τομή LCM πραγματοποιήθηκε αμέσως μετά την κοπή. Για τον προσδιορισμό των κινητικών νευρώνων χρησιμοποιήσαμε την χρώση AChAT. Οι κινητικοί νευρώνες κόπηκαν με το σύστημα Palm Robot-Microbeam (PALM AG). Για την επιλογή των κινητικών νευρώνων, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα κριτήρια: διάμετρο >25-30 μm, αναγνωρίσιμος πυρήνας και θετικότητα για Ach. Οι τετμημένοι κινητικοί νευρώνες μεταφέρθηκαν στο καπάκι microfuge το οποίο είχε υγρανθεί με μια σταγόνα ορυκτέλαιο (Sigma, St Louis, MO, USA). Συγκεντρώθηκαν περίπου 100 κύτταρα ανά καπάκι. 900-1200 κινητικοί

νευρώνες συλλέχθηκαν από τα τρία ποντίκια για επακόλουθη ανάλυση με microarray και ποσοτική real-time PCR.

Απομόνωση RNA και έλεγχος ποιότητας

Το συνολικό RNA των μικροτετμημένων κινητικών νευρώνων απομονώθηκε με ένα kit RNeasy Mini (Qiagen, Germantown, MD, USA), που περιλαμβάνει επεξεργασία (σε στήλη) με DNase για την απομάκρυνση επιμόλυνσης με genomic DNA. Δοκιμάστηκε η ποιότητα του αρχικού RNA (Agilent 2100 bioanalyser; RNA 6000 Pico LabChip, Palo Alto, CA, USA) και συνεχίσαμε μόνο όταν η ποιότητα ήταν ικανοποιητική. Τα κριτήρια επιλογής ήταν: η έλλειψη αποσύνθεσης ριβοσωματικού RNA που αντιπροσωπεύει το 90-95% του συνολικού RNA και μια αναλογία 28S/18S ίση με 1.8-2.0. Η ποιότητα του cRNA εξετάστηκε επίσης και μετά από δύο ενισχύσεις χρησιμοποιώντας το RNA 6000 Nano LabChip (Agilent 2100 bioanalyser).

Προετοιμασία του cRNA και ανάλυση microarray

Οι στόχοι του υβριδισμού επετεύχθησαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε από Affymetrix (GeneChip Eukaryotic Small Sample Target Labeling Assay Version II; Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Ένα μείγμα υβριδισμού δημιουργήθηκε που περιέχει 5.5 mg του βιοτινυλιωμένου cRNA. Για τον υβριδισμό του βιοτινυλιωμένου cRNA χρησιμοποιήθηκε το Affymetrix GeneChip MOE 430 2.0. Τρία chips χρησιμοποιήθηκαν για τον υβριδισμό, για τα μεταμοσχευμένα ζώα SMA, τα SMA ελέγχου και wild-type

αντίστοιχα, το καθένα για κάθε ποντίκι. Τα chips αποκρυπτογραφήθηκαν σε Scs 3000 gene scanner (Affymetrix). Τα προϊόντα μεταγραφής τα οποία παρουσίαζαν διαφοροποιημένη έκφραση επιλέχθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Affymetrix MAS 5.0 και έγιναν μελέτες σύγκρισης σε ζεύγη, όπου κάθε ένα από τα μεταλλαγμένα δείγματα συγκρίθηκε με το αντίστοιχο δείγμα ελέγχου. Η ανάλυση αυτή βασίζεται στο test σύγκρισης Mann-Whitney, που επιτρέπει την σύγκριση των αποτελεσμάτων με βάση το συσχετισμό και το p-value του κάθε γονιδίου. Για να θεωρηθεί «μεταφρασμένο», το γονίδιο πρέπει να έχει τουλάχιστον το 50% του *present call* σε όλα τα δείγματα και τουλάχιστον δύο *present call* στις τρεις ομάδες δειγμάτων. Οι διαφορές αυτές υπολογίστηκαν ως η αναλογία μεταξύ των μέσων τιμών στις διαφορετικές συνθήκες. Για τον εντοπισμό των προϊόντων μεταγραφής που εκφράζονται με διαφορετικό τρόπο στα μεταμοσχευμένα ζώα και στα ζώα ελέγχου, ορίσαμε σαν όριο το 2-φορές, με $p < 0.05$. Τέλος ακολουθήσαμε τις κατευθυντήριες γραμμές MIAMI (Minimum Information About a Microarray Experiment) για όλα τα πειράματα microarray.

Ποσοτική Real-time PCR

Το συνολικό RNA από 900-1200 κινητικούς νευρώνες εξήχθη όπως περιγράφεται παραπάνω για να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο σε πραγματικό χρόνο-PCR. Τρία ζώα που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε ανάλυση. Έγινε ένας κύκλος ενίσχυσης μετά τον πρώτο κύκλο (πρώτα cDNA και σύνθεση cRNA) της διαδικασίας διπλής ενίσχυσης Affymetrix πριν την με αντίστροφη μεταγραφή (Superscript II; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Η Real-time PCR πραγματοποιήθηκε με Assays-on-Demand Gene Expression Products σε

ένα σύστημα ανίχνευσης ακολουθίας ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Έγιναν οι ακόλουθες αναλύσεις της γονιδιακής έκφρασης: SOCS3, HSBP1, CDKN, EGR, DUSP, ANLN, SMN full length και Delta7. Το επίπεδο της έκφρασης του ριβοσωματικού γονιδίου του 18S RNA (Hs99999901_s1) χρησιμοποιήθηκε για την ομαλοποίηση των διαφορών στα cDNA. Όλα τα πειράματα έγιναν τέσσερις φορές μαζί με αρνητικούς ελέγχους. Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το Student's *t* test.

Αξιολόγηση της απόπτωσης

Για την ποσοτική αξιολόγηση των αποπτωτικών κυττάρων του πρόσθιου κέρατος του νωτιαίου μυελού, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση TUNEL (ApopTag® Red In Situ Apoptosis Detection Kit), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Chemicon). Τα TUNEL θετικά κύτταρα μετρήθηκαν σε μεγέθυνση 400 X των 20 τμημάτων της οσφυϊκής μοίρας του νωτιαίου μυελού για κάθε ποντίκι, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Grondard και άλλοι., 2005). Αυτές οι μετρήσεις συγκρίθηκαν με το συνολικό αριθμό των πυρήνων που εντοπίστηκαν μετά από χρώση με DAPI. Οι στατιστικές συγκρίσεις έγιναν με one-way ANOVA και στη συνέχεια με Student's *t* test.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Απομόνωση και χαρακτηρισμός in vitro των νευρικών κυττάρων $ALDH^{hi}SSC^{lo}$

Η υψηλή δραστηριότητα ALDH συσχετίζεται με τα χαρακτηριστικά αρχέγονων κυττάρων από διάφορους ενήλικους ιστούς, τόσο στο αιμοποιητικό (Hess et al., 2004) όσο και στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Corti et al., 2006). Σε αυτή τη μελέτη, αξιοποιώντας την παρατήρηση αυτή και χρησιμοποιώντας ένα φθορίζον υπόστρωμα (Bodipy-aminoacetaldehyde BAAA, Aldefluor) παρακολουθήσαμε την δραστηριότητα ALDH (μέσω ανάλυσης FACS), των κυττάρων που προέρχονται από ιστούς (τόσο εμβρυϊκής προέλευσης όσο και από ενήλικες) εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού των πειραματοζώων.

Τα κύτταρα εξετάστηκαν με την διαδικασία FACS, forward scatter (FSC) και side scatter (SSC). Ένα δείγμα κυττάρων με χαμηλή δραστηριότητα στο side scatter επώαστηκε με Aldefluor και ένα ειδικό αναστολέα της ALDH, το DEAB και με αυτό τον τρόπο οριοθετήσαμε το βασικό επίπεδο της ALDH. Η επώαση όμως των κυττάρων με τη Aldefluor και απουσία του αναστολέα ALDH προκάλεσε μια μετατόπιση του φθορισμού προς τα δεξιά πράγμα το οποίο ορίζει και χαρακτηρίζει τον πληθυσμό των κυττάρων με χαμηλό side scatter (SSC_{10}) και υψηλή δραστηριότητα ALDH ($ALDH^{hi}$). Ο πληθυσμός αυτός με τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά $ALDH^{hi}SSC^{lo}$ απομονώθηκε και στη συνέχεια αναλύθηκε και βρέθηκε ότι παρουσιάζει μία καθαρότητα πάνω από 95% του συνολικού αριθμού των κυττάρων (Σχήμα 1) και ότι επρόκειτο

για ένα ενιαίο κυτταρικό πληθυσμό μέσου μεγέθους της τάξεως περίπου των 7 μm .

ALDH^{hi}SSC^{lo} βλαστοκύτταρα που προέρχονται από εγκεφαλικό ιστό

Τα ALDH^{hi}SSC^{lo} κύτταρα με τα χαρακτηριστικά αυξημένη δραστηριότητα ALDH και χαμηλό δείκτη SSC αποτελούν το 0.2% -0.4% του δείγματος φυσιολογικού εγκεφαλικού ιστού. Η ανάλυση όμως των νευροσφαιρών (neurosphere) έδειξε αύξηση του κλάσματος των ALDH^{hi}SSC^{lo} κυττάρων σε σύγκριση με άλλους ιστούς, η οποία φτάνει στο 4.21% \pm 1.56% του συνόλου των κυττάρων προερχόμενα από εμβρυϊκές νευροσφαίρες και 2.82% \pm 1.27% του συνόλου των κυττάρων προερχόμενα από ενήλικες νευροσφαίρες. Τα ειδικά κύτταρα ALDH^{hi}SSC^{lo} διαχωρίστηκαν με FACS και καλλιεργήθηκαν παρουσία διαφόρων νευροτροφικών παραγόντων (EGF, bFGF).

Στο μικροσκόπιο, αυτά τα κύτταρα ALDH^{hi}SSC^{lo} έχουν καμπύλο σχήμα και σχετικά ομοιογενή μορφολογία. Για να χαρακτηριστεί ο φαινότυπός τους, χρησιμοποιήσαμε ανοσοϊστοχημική ανάλυση με νευροεξωδερμικούς (neuroectodermal) δείκτες. Τα περισσότερα κύτταρα εκφράζουν υψηλά επίπεδα αντιγόνων nestin, Sox2 και Musashi ($p < 0.001$ σε σύγκριση με διαφοροποιημένα κύτταρα), που αποδεικνύουν και επιβεβαιώνουν ότι πρόκειται για χαρακτηριστικά βλαστικά κύτταρα, ενώ μόνο ένα μικρό κλάσμα των κυττάρων αυτών είναι θετικό στα αντιγόνα TuJ1, GFAP και NG2, οι οποίοι και είναι δείκτες νευροεξωδερμικής διαφοροποίησης (GFAP και TuJ1, $p < 0.001$, NG2 $p < 0.005$, σε σύγκριση με διαφοροποιημένα κύτταρα).

Η ανάλυση Real-time RT-PCR, επιβεβαίωσε την έκφραση των υψηλών επιπέδων της nestin και των χαμηλών επιπέδων της GFAP και TuJ1 στατιστικά σημαντική, $p < 0.001$.

Σχετικά με την ικανότητα της αυτο-ανανέωσης των κυττάρων αυτών μέσω κλωνικής ανάλυσης απεδείχθη ότι αυτά τα κύτταρα είναι σε θέση να παράγουν νέες νευροσφαίρες και νέους κλώνους κυττάρων με επιθηλιοειδή (epithelioid) μορφολογία. Εάν τεθούν δε σε ειδικές συνθήκες καλλιέργειας που να διευκολύνουν την διαφοροποίησή τους, είναι σε θέση να διαφοροποιηθούν και στους τρεις κύριους νευροεξωδερμικούς κυτταρικούς φαινότυπους (νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα), όπως αποδείχθηκε από ανάλυση ανοσοκυτταροχημείας.

ALDH^{hi}SSC^{lo} βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από νωτιαίο μυελό

Τα ALDH^{hi}SSC^{lo} κύτταρα αντιπροσωπεύουν το 0.2-0.4% των κυττάρων του νωτιαίου μυελού των ενηλίκων και το 0.2-0.8% του εμβρυϊκού νωτιαίου μυελού, όπως ανιχνεύεται από την ανάλυση FACS. Τα ALDH^{hi}SSC^{lo} κύτταρα του νωτιαίου μυελού των ενηλίκων αποτελούν το $3.8 \pm 1.2\%$ των εμβρυϊκών νευροσφαιρών και το $1.8 \pm 0.7\%$ των ενηλίκων. Οι πληθυσμοί κυττάρων που διαχωρίστηκαν με την διαδικασία FACS (θετικό και αρνητικό κλάσμα) και τα κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν στη διαδικασία FACS μελετήθηκαν in vitro. Τα ALDH^{hi}SSC^{lo} κύτταρα παρουσιάζονται προσκολλημένα στα dish, είναι ομοιογενή, και μπορούν να επεκταθούν να πολλαπλασιαστούν και να μεγαλώσουν για τουλάχιστον πέντε φορές.

Τα ALDH^{hi}SSC^{lo} κύτταρα σε κανονικές συνθήκες εκφράζουν νεστίνη (nestin), και δεν εκφράζουν κανένα νευρωνικό ή νευρογλοιακό δείκτη, ο

οποίος θα αποτελούσε χαρακτηριστικό διαφοροποιημένων κυττάρων. Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά εκφράζουν συγκεκριμένους δείκτες αρχέγονων νευρικών κυττάρων και άλλων βλαστοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των Sox2 και Musashi-1.

Τα ALDH^{hi}SSC^{lo} κύτταρα προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ικανότητά τους για αυτο-ανανέωση, καλλιιεργήθηκαν σε πυκνότητες ανάλογες με τις καλλιέργειες κλώνων και απεδείχθη ότι τα ALDH^{hi}SSC^{lo} κύτταρα, προερχόμενα τόσο από εμβρυϊκούς όσο και από ενήλικες ιστούς, δημιούργησαν πρωτογενείς αποικίες. Η δυνατότητα των κυττάρων ALDH^{hi}SSC^{lo} που προήλθαν από εμβρυϊκές και ενήλικες νευροσφαίρες και που μπόρεσαν να παράγουν κλώνους ήταν 1:8 και 1:12 αντίστοιχα. Είναι εντυπωσιακό ότι το 1 / 17 των κυττάρων που προήλθαν από τον εμβρυϊκό ιστό και 1 / 27 των κυττάρων που προήλθαν από ενήλικα ιστό δημιούργησαν νέες νευροσφαίρες και επιπλέον, οι κλώνοι ήταν ικανοί να δημιουργήσουν δευτερεύουσες αποικίες. Η ανάλυση FACS έδειξε την παρουσία κυττάρων ALDH^{hi}SSC^{lo} στις δευτερεύουσες αποικίες ($6.6 \pm 2.4\%$ κύτταρα από τις εμβρυϊκές σφαίρες, $3.4 \pm 2.3\%$ από τις ενήλικες σφαίρες), επιβεβαιώνοντας ότι ο αρχικός υποπληθυσμός θετικός για την δραστηριότητα ALDH έχει την ικανότητα να αυτό-αναγεννηθεί.

Τα κύτταρα που με την διαδικασία FACS είχαν αρνητικό κλάσμα, μόνο ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων δημιούργησε παρόμοιους κλώνους με τη σφαίρες και ενίοτε κλώνους επιθηλιακών κυττάρων, ενώ στις δευτερογενείς αποικίες τα ALDH^{hi}SSC^{lo} κύτταρα ήταν λιγότερο από το 0.01%. Τα κύτταρα ALDH^{hi}SSC^{lo} καλλιιεργήθηκαν σε συνθήκες που διευκολύνουν την διαφοροποίηση, για να διαπιστωθεί αν είναι σε θέση να διαφοροποιηθούν σε ώριμους νευρώνες με χαρακτηριστικά παρόμοια με εκείνα των νευρώνων του νωτιαίου μυελού. Υπό αυτές τις συνθήκες απεδείχθη ότι τα κύτταρα ALDH^{hi}SSC^{lo} διαφοροποιήθηκαν στους τρεις νευροεξωδερμικούς

φαινότυπους, και αυτό επιβεβαιώθηκε τόσο μορφολογικά όσο και από την έκφραση ειδικών πρωτεϊνών. Εντοπίσαμε κύτταρα με επιμήκεις διεργασίες τα οποία εκφράζουν τουμπουλίνη III (TuJ1) (Σχήμα 2), neurofilament (NF) και πρωτεΐνη που σχετίζονται με τα μικροσωληνάρια 2 (MAP2), αποδεικνύοντας έτσι ότι τα κύτταρα αυτά έχουν αποκτήσει νευρωνικό φαινότυπο. Τα εν λόγω κύτταρα αυξάνονται με το χρόνο και αντιστοιχούν στο $42.6 \pm 4.4\%$ (εμβρυϊκά) και $35.3 \pm 5.6\%$ (ενήλικα) επί του συνολικού αριθμού των κυττάρων. Το $15.2 \pm 4.2\%$ (εμβρυϊκά) και $22.2 \pm 6.5\%$ (ενήλικα) κύτταρα είναι θετικά για Glial fibrillary Acid Protein (GFAP). Το 5.3 ± 2.2 και $3.2 \pm 1.3\%$ των κυττάρων (ενηλίκων και εμβρυϊκών αντίστοιχα) εκφράζουν το αντιγόνο O4, υποδεικνύοντας ένα ολιγοδενδρογλοιακό φαινότυπο.

Παρήχθησαν επίσης $ALDH^{hi}SSC^{lo}$ κύτταρα από HB9-GFP διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, Green Fluorescence Protein (GFP) σε όλους τους κινητικούς νευρώνες του νοτιαίου μυελού. Έτσι ώστε να διαφοροποιηθούν τα κύτταρα $ALDH^{hi}SSC^{lo}$ σε κινητικούς νευρώνες, τροποποιήθηκε ένα πρωτόκολλο το οποίο έχει ήδη δημοσιευθεί προηγουμένως, εκθέτοντας τα κύτταρα στους εξής παράγοντες, Shh, RA, Nerve Growth Factor (NGF) και στο c-AMP (Wu et al., 2002). Υπό τις συνθήκες αυτές παρατηρήθηκαν κύτταρα με ένα μεγάλο σώμα και περίτεχνες νευριτικές επεκτάσεις. Τα κύτταρα αποδείχτηκαν θετικά για την χολίνη ακετυλοτρανσφεράση (ChAT), Islet-1 και HB9, τα οποία είναι ειδικά αντιγόνα κινητικών νευρώνων (Σχήμα 2). Παρατηρήσαμε ότι το $27.6 \pm 6.6\%$ (στην περίπτωση των ενήλικων ιστών) και $7.4 \pm 2.2\%$ (αντίστοιχα για τους εμβρυϊκούς ιστούς) των νευρώνων είναι θετικοί για HB9. Για να προσδιορίσουμε αν αυτοί οι νευρώνες προερχόμενοι από τα κύτταρα $ALDH^{hi}SSC^{lo}$, είναι σε θέση να σχηματίσουν νευρομυϊκές συνάψεις, δημιουργήθηκε ένα σύστημα καλλιέργειας των παραπάνω κυττάρων με

μυοσωλήνες ποντικού προερχόμενοι από την σειρά C2C12. Οι νευρώνες που προέρχονται από τα κύτταρα $ALDH^{hi}SSC^{lo}$ επεκτείνουν άξονες που έρχονται σε επαφή με μυοσωλήνες σχηματίζοντας νευρομυϊκές συνάψεις, όπως αποδεικνύεται από την ειδική χρώση με bungarotoxin (BTX), η οποία αναγνωρίζει τον υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Η ανάλυση Confocal έδειξε την αλληλεπίδραση των αξονών οι οποίοι εκφράζουν GFP με τους υποδοχείς της ακετυλοχολίνης οι οποίοι εκφράζουν BTX.

Μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων $ALDH^{hi}SSC^{lo}$ σε πειραματικά μοντέλα SMA

20.000 εμβρυϊκά $ALDH^{hi}SSC^{lo}$ κύτταρα μεταμοσχεύθηκαν, αφού είχαν προ-διαφοροποιηθεί *in vitro*, ενδοκοιλιακά σε πειραματόζωα με SMA, για να διαπιστωθεί αν τα $ALDH^{hi}SSC^{lo}$ κύτταρα έχουν την ικανότητα να διαφοροποιηθούν καταλλήλως εντός του νωτιαίου μυελού και να μεταβάλλουν την εξέλιξη της νόσου. Για να παρακολουθήσουμε την τύχη των μεταμοσχευμένων κυττάρων και τη διαφοροποίησή τους σε κινητικούς νευρώνες χρησιμοποιήσαμε $ALDH^{hi}SSC^{lo}$ κύτταρα που προήλθαν από διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν την πρωτεΐνη HB9-GFP μόνο σε κινητικούς νευρώνες.

Ως πειραματόζωα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν SMA πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε ενδοκοιλιακά μόνο φυσιολογικός ορός.

Ανάλυση της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων

Για να εκτιμηθεί η μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων ALDH^{hi}SSC^{lo} μέσα στο παρέγχυμα άμεσα, χρησιμοποιήσαμε μία φθορίζουσα χρωστική της μεμβράνης (PKH26) με την οποία είχαμε την δυνατότητα να παρακολουθούμε την πορεία των κυττάρων του δότη. Στη συνέχεια ακολούθησε έγχυση των φθορίζόντων κυττάρων στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό των SMA πειραματικών μοντέλων.

1-2 ημέρες μετά την ένεση πολλά κύτταρα του δότη ($88.6 \pm 6.6\%$ των κυττάρων) βρέθηκαν σε όλο το μήκος του νωτιαίου μυελού. Τα κύτταρα του δότη επέζησαν και πολλαπλασιάστηκαν, δημιουργώντας ομάδες κυττάρων σε επαφή με τις μήνιγγες. Επιπλέον, το 20% των κυττάρων αυτών μετανάστευσαν στο παρέγχυμα του νωτιαίου μυελού μέσω των μηνίγγων 5-7 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση. Η εισβολή των κυττάρων παρατηρήθηκε στην έκφυση των ριζών. Οι ομάδες κυττάρων βρέθηκαν κατά κύριο λόγο κοντά σε αγγεία, πιθανότατα λόγω της πρόσβασης σε θρεπτικά συστατικά και έτσι η επαφή με το κυκλοφορικό σύστημα θα μπορούσε να επιτρέψει την περαιτέρω εξάπλωση των κυττάρων μέσα στο παρέγχυμα (Σχήμα 3). Λίγα κύτταρα εντοπίστηκαν στον εγκέφαλο των πειραματοζώων και μόνο σε περιοχές περί το σύστημα των κοιλιών. Σε υγιή πειραματοζώα παρατηρήθηκαν μόνο λίγες ομάδες κυττάρων πάνω στις μήνιγγες, καθώς και ένα ελάχιστο ποσοστό εντός του παρεγχύματος.

Τα $ALDH^{hi}SSC^{lo}$ είναι σε θέση να παράγουν κύτταρα με χαρακτηριστικά κινητικών νευρώνων μέσα στο παρέγχυμα SMA

Τα μεταμοσχευμένα ζώα θυσιάστηκαν κατά το τελικό στάδιο της νόσου (P14) και αναλύθηκαν για να προσδιοριστεί η μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων του δότη και η διαφοροποίησή τους στο εσωτερικό του νωτιαίου μυελού των πειραματοζώων SMA. Ανιχνεύσαμε (HB9-GFP θετικά) κύτταρα με φαινότυπο κινητικού νευρώνα στο εσωτερικό του παρεγχύματος του νωτιαίου μυελού, τόσο σε επίπεδο αυχενικής και οσφυϊκής μοίρας. Η εντόπιση αυτή απέδειξε την μεγάλη μεταναστευτική ικανότητα των μεταμοσχευμένων κυττάρων και την ικανότητά τους να διαφοροποιηθούν και να αποκτήσουν τον κατάλληλο φαινότυπο. Οι νευρώνες που προέρχονται από τα κύτταρα του δότη απέκτησαν μορφολογία παρόμοια με αυτή των ενδογενών κυττάρων με μειωμένο όμως μέγεθος, γεγονός το οποίο αποδίδεται στο ότι πρόκειται για *de novo* γένεση. Η θετικότητά τους για την πρωτεΐνη HB9-GFP μας επιτρέπει να τα διακρίνουμε από τα ενδογενή κύτταρα.

Τα (HB9-GFP θετικά) κύτταρα αυτά επεκτείνουν νευριτικές διεργασίες οριζοντίως στη λευκή και φαιά ουσία προς τις πρόσθιες ρίζες. Μέσω στερεολογικής ποσοτικής εκτίμησης υπολογίσαμε 323 ± 25 HB9-GFP θετικά κύτταρα για κάθε επίπεδο νωτιαίου μυελού. Δεδομένου ότι η μέθοδος εντοπισμού των κυττάρων του δότη βασίζεται στην έκφραση του γονιδίου reporter GFP το οποίο εκφράζεται μόνο σε κινητικούς νευρώνες, για να υπολογίσουμε τον συνολικό αριθμό των κυττάρων του δότη εντός του νωτιαίου μυελού χρησιμοποιήσαμε την ανάλυση FISH. Συγκεκριμένα με την ανάλυση αυτή εντοπίσαμε το χρωμόσωμα Y, σε νωτιαίους μυελούς θηλυκών ζώων τα οποία δέχτηκαν κύτταρα προερχόμενα από αρσενικά ζώα.

Η ανάλυση αυτή εντόπισε 2367 ± 205 κύτταρα του δότη στο παρέγχυμα του δέκτη. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι τα κύτταρα $ALDH^{hi}SSC^{lo}$ έχουν τη δυνατότητα να αποκτήσουν νευρωνικό φαινότυπο *in vivo*, χρησιμοποιήσαμε ανοσοϊστοχημική ανάλυση για δείκτες νευρώνων και στη συνέχεια μικροσκοπική ανάλυση με μικροσκόπιο Confocal των τμημάτων του νωτιαίου μυελού των μεταμοσχευθέντων ζώων. Τα HB9-GFP κύτταρα που εντοπίστηκαν στην φαία ουσία του νωτιαίου μυελού ήταν θετικά για αρκετούς ειδικούς δείκτες, όπως NF, TuJ1, MAP2 και NeuN (Σχήμα 4). Επίσης, ελέγχθηκε κατά πόσον τα μεταμοσχευμένα κύτταρα εξέφραζαν δείκτες κινητικών νευρώνων όπως για παράδειγμα ChAT και HB9 (Σχήμα 4).

Η μεταμόσχευση $ALDH^{hi}SSC^{lo}$ κυττάρων αυξάνει το μέγεθος και τον αριθμό των κινητικών νευρώνων

Ο μέσος αριθμός των κινητικών νευρώνων είναι μικρότερος στα ποντίκια SMA σε σύγκριση με ποντίκια ελέγχου WT ($P < 0.0001$). Ο αριθμός αυτός αυξήθηκε σημαντικά μετά τη μεταμόσχευση με νευρικά βλαστοκύτταρα ($p < 0.05$ μεταμοσχευμένων την 13^η ημέρα vs μη μεταμοσχευμένων) (Σχήμα 5 A-E). Τα στοιχεία αντιπροσωπεύουν το μέσο αριθμό των κινητικών νευρώνων \pm SD ανά ημέρα P10 και P13. Επίσης το μέσο μέγεθος των κινητικών νευρώνων των πρόσθιων ριζών φαίνεται να είναι μεγαλύτερο στα ποντίκια ελέγχου WT σε σύγκριση με ποντίκια SMA ($P < 0.0001$). Όπως παρατηρήσαμε και το μέγεθος των κινητικών νευρώνων φαίνεται να αυξήθηκε μετά τη μεταμόσχευση με νευρικά βλαστοκύτταρα ($P < 0.001$) (σχήμα 5 F-G).

Συγκριτική ανάλυση της εξέλιξης των κλινικών συμπτωμάτων και της επιβίωσης των μεταμοσχευμένων και μη πειραματοζώων

Η μεταμόσχευση των κυττάρων ALDH^{hi}SSC^{lo} προκαλεί σημαντική αύξηση στην επιβίωση των μεταμοσχευμένων πειραματοζώων σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η μέση επιβίωση αυξήθηκε από 13.04 (ομάδα ελέγχου n = 24) στις 18.16 ημέρες (ομάδα που υπεβλήθη σε κυτταρική μεταμόσχευση (n = 24)). Το log-rank τεστ έδειξε ότι η διαφορά στο προσδόκιμο ζωής μεταξύ των δύο ομάδων των πειραματοζώων SMA είναι ιδιαίτερα σημαντική ($p < 0.0001$, $\chi^2 = 47.97$). Η επιβίωση παρατάθηκε μέχρι 5.12 ημέρες, που αντιστοιχεί σε κέρδος της τάξεως του 39.26% σε διάρκεια ζωής. Η μεγαλύτερη παράταση της επιβίωσης που παρατηρήθηκε ήταν 21 ημέρες στα μεταμοσχευθέντα ζώα και 16 ημέρες στα πειραματόζωα ελέγχου. Η εικόνα 6 A δείχνει τις καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier αυτών των πειραματοζώων.

Ένα από τα πρώτα κλινικά συμπτώματα της νόσου SMA είναι η απώλεια του σωματικού βάρους. Μεταλλαγμένα SMA ποντίκια έδειξαν σημαντικές διαφορές ως προς το βάρος, από τις πρώτες κιόλας 5 ημέρες ζωής ($2.21 \pm 0.22\text{g}$ σε σχέση με $3.62 \pm 0.29\text{g}$, στην ομάδα ελέγχου $p < 0.001$). Τα SMA μεταμοσχευθέντα πειραματόζωα παρουσίασαν σταδιακή αύξηση του σωματικού βάρους σε σύγκριση με τα πειραματόζωα ελέγχου. Η καμπύλη της ανάπτυξης ήταν σημαντικά διαφορετική στις 10 και 13 ημέρες ζωής ($p < 0.005$) (Σχήμα 6 B).

Τα πειραματόζωα μοντέλα SMA παρουσιάζουν νευρομυϊκά προβλήματα μετά την 5^η ημέρα ζωής, ειδικά όσον αφορά την ανόρθωση από την ύπτια θέση. Τις επόμενες ημέρες εξελίσσεται μία προοδευτική επιδείνωση της μυϊκής αδυναμίας. Εντός 10 ημερών ζωής παρουσιάζουν σοβαρή δυσκολία στο περπάτημα με συχνές πτώσεις. Όταν καταφέρνουν να στέκονται στα τέσσερα

άκρα παρουσιάζουν τρόμο στα πίσω πόδια. Τα ζώα που έλαβαν το κυτταρικό μόσχευμα παρουσίασαν μια καθυστέρηση στην εμφάνιση των συμπτωμάτων μετά τις 10 ημέρες ζωής, με μεγαλύτερη ευκολία στο περπάτημα.

Ανάλυση της Νευρομυϊκής λειτουργίας των μεταμοσχευθέντων ζώων

Για να αξιολογήσουμε εάν η μεταμόσχευση των NSC μπορεί να παρέχει λειτουργική βελτίωση, τα πειραματόζωα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία «ανοικτού πεδίου» και δοκιμασία «hand grip» (λαβής). Οι δοκιμές αυτές έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την αξιολόγηση μυϊκής ισχύος στα ποντίκια SMA (Grondard και άλλοι., 2005). Στη δοκιμασία λαβής, μετράται ο μέσος χρόνος στον οποίο το πειραματόζωο μπορεί να στηρίξει το βάρος του κρεμάμενο από τα μπροστινά πόδια. Αυτή η παράμετρος αυξάνει αναλογικά με την ηλικία (Σχήμα 6 C, F). Σε ηλικία 12 ημερών, τα φυσιολογικά ποντίκια στηρίζονται στην μεταλλική ράβδο για 10 s, ενώ το μεταλλαγμένο ποντίκι SMA δεν είναι καν σε θέση να διεξαγάγει τη δοκιμή. Στα μεταμοσχευμένα ποντίκια παρατηρήθηκε ότι είναι σε θέση να κρατηθούν από τη ράβδο για 3 δευτερόλεπτα. Στις 13-ημέρες τα μεταμοσχευμένα ποντίκια παρουσιάζουν σταθερή απόδοση (3 s, σχήμα 6 F), ενώ τα ποντίκια ελέγχου έχουν αυξήσει το χρόνο παραμονής στα 15 δευτερόλεπτα (12-13 ημερών μεταμοσχευθέντων εναντίον ζώων ελέγχου, $p < 0.001$). Στο τελικό στάδιο της ασθένειας, και τα μεταμοσχευμένα ποντίκια SMA έδειξαν δυσκολία στην λαβή.

Η παρατήρηση της αυθόρμητης δραστηριότητας των ποντικών σε ανοιχτό χώρο ήταν η δεύτερη μέθοδος της λειτουργικής αξιολόγησης (Σχήμα 6 D). Έλεγχοι μεταξύ ζώων 10 και 13 ημερών έδειξαν μια αύξηση της

κινητικότητας, όπως αποδείχτηκε από την καταμέτρηση του συνολικού αριθμού των διελεύσεων. Σε ηλικία 10 ημερών δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική διαφορά μεταξύ ποντικών SMA και ελέγχου. Σε ηλικία 13 ημερών, τα ποντίκια SMA σπάνια φτάνουν μέχρι τα όρια του πεδίου, ενώ στα μεταμοσχευμένα ποντίκια παρατηρήθηκε βελτίωση της δοκιμασίας (μεταμοσχευμένα σε σύγκριση με μη μεταμοσχευμένα, $p < 0.001$).

Επιδράσεις της μεταμόσχευσης των NSC στην επιβίωση των κινητικών νευρώνων

Για να καθοριστεί αν η μεταμόσχευση των NSC έχει νευροπροστατευτική δράση, αναλύσαμε ποσοτικά τον αριθμό των κινητικών νευρώνων στο πρόσθιο κέρασ του νωτιαίου μυελού στα μεταμοσχευμένα και μη πειραματόζωα. Μετρήθηκαν οι κινητικοί νευρώνες του νωτιαίου μυελού της οσφυϊκής περιοχής των μεταμοσχευμένων και μη SMA ζώων. (SMN Δ 7+/+; SMN2 +/+; Snn-/-; $n=6$ για κάθε ομάδα) και υγιή ποντίκια (SMN Δ 7+/+; SMN2+/+; Snn +/+ ($n=6$)). Σε ηλικία 13 ημερών, παρατηρήσαμε μία σημαντική απώλεια των κινητικών νευρώνων σε SMA ποντίκια περίπου 39.03%, σε σύγκριση με υγιή ζώα. Στα μεταμοσχευμένα πειραματόζωα παρατηρήθηκε μικρότερη μείωση του αριθμού των κινητικών νευρώνων της τάξεως 23.92% σε ηλικία 13 ημερών ($p < 0.05$ $n = 6$ ανά ομάδα). Ο ρυθμός απώλειας κινητικών νευρώνων φαίνεται να συσχετίζεται με την επιβράδυνση της εξέλιξης της νόσου στα μεταμοσχευμένα πειραματόζωα. Για να προσδιορίσουμε εάν η μεταμόσχευση των NSC που βελτιώνει την πορεία της νόσου γίνεται μέσω της μείωσης του αποπτωτικού φαινομένου όπως υπέθεσαν οι Desjardins 1998 και Tsai 2006, έγινε ανάλυση TUNEL του

νωτιαίου μυελού των μεταμοσχευμένων και μη ποντικών σε ηλικία 10 και 13 ημερών (Σχήμα 7 A-C). Κύτταρα TUNEL-θετικά εντοπίστηκαν στο πρόσθιο κέρασ του νωτιαίου μυελού SMA σε ηλικία 10 ημερών. Το αποτέλεσμα αυτό μας έδειξε ότι η απόπτωση πιθανά αποτελεί σημαντικό παθογενετικό μηχανισμό για την απώλεια των κινητικών νευρώνων. Ειδικότερα, τα μη μεταμοσχευμένα ζώα 13 ημερών παρουσίασαν σημαντική αύξηση της απόπτωσης στο νωτιαίο μυελό, με 20 TUNEL θετικούς πυρήνες ανά πρόσθιο κέρασ, ενώ το ποσοστό της απόπτωσης που παρατηρήθηκε στα μεταμοσχευμένα ποντίκια SMA ήταν σταθερή, με μέσο όρο 5 αποπτωτικούς πυρήνες ανά πρόσθιο κέρασ (μεταμοσχευμένα εναντίον μη μεταμοσχευμένων $p < 0.01$ για $n = 6$) (Σχήμα 7 D-E).

Ανάλυση Microarray και Real Time RT PCR

Για τον εντοπισμό των μηχανισμών που ευθύνονται για τη νευρομυϊκή βελτίωση των μεταμοσχευθέντων ζώων και τον καθορισμό των μοριακών γεγονότων που σχετίζονται με την εκφύλιση των κινητικών νευρώνων στα ποντίκια SMA, συγκρίναμε το προφίλ γονιδιακής έκφρασης των κινητικών νευρώνων (απομονωμένων με laser capture microdissection) των μεταμοσχευμένων και μη-SMA ζώων και ζώων ελέγχου (13 ημέρες) μέσω ανάλυσης microarray και Real Time RT-PCR. Με τον καθορισμό ως σημαντική μεταβολή των 2.0 φορές (cut off 2), βρέθηκαν 74 γονίδια με διαφορετικά επίπεδα έκφρασης στους κινητικούς νευρώνες των 3 ομάδων πειραματοζώων. Τα ενδιαφέροντα γονίδια που παρουσιάζουν αυτές τις μεγάλες μεταβολές έκφρασης συνοψίζονται στους πίνακες στις σελίδες 97-100.

Οι κινητικοί νευρώνες που προέρχονται από τα SMA ποντίκια παρουσίασαν σημαντική αύξηση στην έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε πολύπλοκες διεργασίες ματίσματος, προ-mRNA ματίσματος, στη ριβοσωμική επεξεργασία του RNA και στην αποσύνθεση του RNA. Η αύξηση των εν λόγω γονιδίων θα μπορούσε να αποτελεί ένα προσαρμοστικό μηχανισμό για την αντιμετώπιση της έλλειψης του γονιδίου SMN.

Άλλα γονίδια που εκφράζονται με διαφορετικό τρόπο στα πειραματικά μοντέλα SMA και στα ζώα ελέγχου, αφορούν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε διαφορετικές μοριακές οδούς, όπως τον τερματισμό του κυτταρικού κύκλου cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21) pathway, την αναδίπλωση πρωτεϊνών (heat shock protein 1) και το σχηματισμό κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών.

Τα μεταμοσχευμένα ποντίκια παρουσιάζουν ενίσχυση της έκφρασης (up-regulation) των γονιδίων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό του RNA. Τα γονίδια που εκφράζονται κατά τρόπο πολύ διαφορετικό στα ποντίκια που έλαβαν μόσχευμα σε σύγκριση με αυτά που δεν έλαβαν, αφορούν λειτουργίες ρύθμισης της κυτταρικής ανάπτυξης και της αλυσιδωτής μεταφοράς ενδοκυττάριου σήματος.

Για να ελέγξουμε την εγκυρότητα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που προέκυψαν από το microarray, πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση RT-PCR για γονίδια που παρουσίασαν ενδιαφέρον χρησιμοποιώντας το σύστημα TaqMan PCR, το οποίο επιβεβαίωσε τα ευρήματα που έδειξε η ανάλυση microarray. Τα αυξημένα ή μειωμένα επίπεδα έκφρασης των ενδιαφερόντων γονιδίων εκφράστηκαν σαν κλάσμα μεταξύ των μεταμοσχευμένων ζώων και των ζώων ελέγχου. Αποδείχθηκε αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης p21 και της Hsbrp1 σε ποντίκια SMA ενώ στα μεταμοσχευμένα πειραματόζωα ($p < 0.01$) ήταν στα όρια του φυσιολογικού. Επιβεβαιώθηκε η αύξηση του

DUSP, και Egr2 στα ποντίκια SMA που έλαβαν μόσχευμα σε σχέση με τα μη μεταμοσχευμένα ($p < 0.01$) (σχήμα 8).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων αποτελεί μια πιθανή θεραπευτική στρατηγική για τις ασθένειες του κινητικού νευρώνα, συμπεριλαμβανομένων της SMA, τόσο μέσω της αντικατάστασης των εκφυλισμένων νευρώνων όσο και μέσω ενεργοποίησης μηχανισμών νευροπροστασίας.

Με αυτή τη μελέτη αποδείξαμε την ικανότητα που έχει μία ομάδα νευρικών αρχέγονων κυττάρων τα κύτταρα $ALDH^{hi}SSC^{lo}$, εφόσον μεταμοσχευθούν στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, να μεταναστεύσουν στο νωτιαίο μυελό, να παράγουν νέους κινητικούς νευρώνες, καθώς και να αλλάζουν την πορεία της νόσου, βελτιώνοντας το φαινότυπο και αυξάνοντας την επιβίωση των πειραματικών μοντέλων της SMA.

Σκοπός της μελέτης μας ήταν να απομονώσουμε υποπληθυσμούς βλαστοκυττάρων τα οποία να μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κινητικούς νευρώνες. Η έλλειψη ειδικών δεικτών που να χαρακτηρίζουν τα αρχέγονα νευρικά κύτταρα αυξάνουν τις δυσκολίες όσον αφορά την απομόνωσή τους και έτσι στην πραγματικότητα, τα νευρικά βλαστοκύτταρα εντοπίστηκαν με βάση την ικανότητά τους να δημιουργούν νευροσφαίρες. Ωστόσο οι νευροσφαίρες δεν αποτελούνται από ένα ομοιογενή πληθυσμό και περιέχουν μόνο ένα μικρό κλάσμα βλαστοκυττάρων, γεγονός το οποίο θέτει σημαντικούς περιορισμούς τόσο στη βασική έρευνα όσο και στην ανάπτυξη θεραπευτικών εφαρμογών όπως η μεταμόσχευση. Επιλέξαμε τον υποπληθυσμό $ALDH^{hi}SSC^{lo}$ κυρίως για δύο λόγους. 1) Η δραστηριότητα $ALDH$ έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την απομόνωση των αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων (Hess et al., 2004) και είχε προταθεί ως κοινός δείκτης για τον προσδιορισμό σωματικών βλαστοκυττάρων από διάφορους ιστούς (Cai et al., 2004). 2) Τα νευρικά πολυδύναμα

βλαστοκύτταρα που προέρχονται από τον νωτιαίο μυελό των πειραματοζώων εκφράζουν υψηλά επίπεδα δραστηριότητας ALDH, αλλά αυτή η ιδιότητα δεν έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την απομόνωση νευρικών βλαστοκυττάρων (Cai et al., 2004) και η ομάδα μας είναι η πρώτη ερευνητική ομάδα που προέβει στην απομόνωση και τη μελέτη αυτών των βλαστοκυττάρων.

Σε αυτήν την μελέτη, απομονώσαμε νευρικά βλαστοκύτταρα από νευρικό ιστό ποντικού, βασιζόμενοι στα επίπεδα έκφρασης της ALDH. Τα χαρακτηριστικά των κυττάρων $ALDH^{hi}SSC^{lo}$ είναι τα εξής: α) είναι πολυδύναμα και έχουν την ικανότητα του αυτοπολλαπλασιασμού β) εκφράζουν νεστίνη και άλλους ειδικούς δείκτες βλαστοκυττάρων όπως Sox2 και Musashi γ) τα κύτταρα που προέρχονται από εγκεφαλικό ιστό, μπορούν να δώσουν τόσο κλώνους νευροσφαιρών όσο και επιθηλιοειδείς κλώνους δ) τα κύτταρα $ALDH^{hi}SSC^{lo}$ που προέρχονται από το νωτιαίο μυελό χαρακτηρίζονται από μορφολογία κατεξοχήν επιθηλιοειδή και αναπτύσσονται σε ένα μόνο στρώμα *in vitro* ε) απαιτείται η παρουσία FGF για τον πολλαπλασμό τους και την διατήρηση του αδιαφοροποίητου φαινοτύπου. Όπως αποδείξαμε, σε κατάλληλες συνθήκες τα κύτταρα $ALDH^{hi}SSC^{lo}$ μπορούν να διαφοροποιηθούν στις τρεις μεγάλες νευροεξωδερμικές σειρές και είναι σε θέση να αποκτήσουν τον φαινότυπο των ώριμων νευρώνων, συμπεριλαμβανομένων των κινητικών νευρώνων που εκφράζουν HB9/ChAT. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, θελήσαμε να απαντήσουμε στο ερώτημα κατά πόσον τα κύτταρα $ALDH^{hi}SSC^{lo}$ μπορούν να δημιουργήσουν κινητικούς νευρώνες *in vivo* σε πειραματόζωα μοντέλα SMA. Δεδομένου ότι η νόσος του κινητικού νευρώνα αφορά το σύνολο του νωτιαίου μυελού, υιοθετήσαμε ως σύστημα χορήγησης την ενδορραχιαία ένεση.

Η ενδορραχιαία έγχυση αποτελεί ένα ελάχιστο επεμβατικό σύστημα χορήγησης των κυττάρων, που επιτρέπει την ευρεία εξάπλωση σε ολόκληρο τον νωτιαίο μυελό. Πράγματι, στα πειράματα μας τα μεταμοσχευμένα κύτταρα ALDH^{hi}SSC^{lo} εξαπλώθηκαν και εμφυτεύθηκαν σε όλη την έκταση του νωτιαίου μυελού. Δείξαμε επίσης ότι τα κύτταρα ALDH^{hi}SSC^{lo} μπορούν να μεταναστεύσουν μέσω των μηνίγγων στο νωτιαίο μυελό και παρατηρήσαμε ότι η μετανάστευση των νευρικών βλαστοκυττάρων ήταν αυξημένη στα SMA ποντίκια σε σύγκριση με τα μη μεταλλαγμένα. Αυτό θα μπορούσε να ερμηνευτεί από την υπόθεση ότι ο θάνατος των κυττάρων μπορεί να αποτελεί το κατάλληλο σήμα που ελκύει τα μεταμοσχευμένα κύτταρα στο εσωτερικό του νωτιαίου μυελού, προωθεί τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους, όπως έχει ήδη παρατηρηθεί σε άλλα πειραματικά μοντέλα της νόσου (Imitola et al., 2004; Pluchino et al., 2003).

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι τα κύτταρα ALDH^{hi}SSC^{lo} μπορούν να διαφοροποιούνται εντός του νωτιαίου μυελού σε νευρώνες και κινητικούς νευρώνες μετά τη μεταμόσχευση, να επιβιώνουν μέσα στην φαιά ουσία, να μεταναστεύουν, να εκτείνουν άξονες και να αποκτούν ειδικά προφίλ νευροδιαβιβαστών. Επιπλέον, φαίνεται ότι οι νέοι νευρώνες που σχηματίστηκαν μετά την μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων ενσωματώνονται χωρίς προβλήματα στο δέκτη. Θα πρέπει όμως να τονίσουμε ότι προηγήθηκε συστηματική διεργασία και καλλιέργεια με ειδικούς νευροτροφικούς παράγοντες οδηγώντας τα κύτταρα ALDH^{hi}SSC^{lo} να ακολουθήσουν φαινοτυπική μοίρα κινητικού νευρώνα πριν από τη μεταμόσχευση και πράγματι βρήκαμε νέους κινητικούς νευρώνες προερχόμενοι από τα κύτταρα ALDH^{hi}SSC^{lo} εντός του νωτιαίου μυελού των μεταμοσχευμένων ποντικών. Η αποτελεσματική παραγωγή νέων νευρώνων σε μη νευρογενείς περιοχές του ΚΝΣ και η επιβίωσή τους στο εσωτερικό του νωτιαίου μυελού των ενηλίκων

θηλαστικών οφείλεται στην προεπεξεργασία στην οποία υποβάλλαμε τα κύτταρα ex-vivo (priming).

Οι κινητικοί νευρώνες για να είναι λειτουργικοί, θα πρέπει να συνδεθούν με επιτυχία με τους μυς. Στα πειράματά μας, οι κινητικοί νευρώνες που προέρχονται από τα κύτταρα ALDH^{hi}SSC^{lo} έχουν την ικανότητα να παράγουν νευρομυϊκές συνάψεις in vitro όταν καλλιεργηθούν από κοινού με μυοσωλήνες. In vivo, παρατηρήσαμε ότι οι νέοι κινητικοί νευρώνες εκτείνουν άξονες, μέσω της λευκής ουσίας του ΚΝΣ μέσα στις πρόσθιες ρίζες. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στη διαδικασία priming που προηγήθηκε in vitro ή στο περιβάλλον που στην περίπτωση των νεογνών, είναι πιο «ανεκτικό» σε σύγκριση με τον νωτιαίο μυελό των ενηλίκων. Τα ανωτέρω επιβεβαιώνονται και από βιβλιογραφικά δεδομένα αφού πρόσφατα περιγράφηκε ότι κινητικοί νευρώνες προερχόμενοι από εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα που μεταμοσχεύθηκαν σε παράλυτους αρουραίους μπορούν να επεκτείνουν άξονες προς την περιφέρεια, να δημιουργήσουν συνάψεις, τουλάχιστον σε ορισμένα πειραματικά μοντέλα (Deshpande et al., 2006).

Η περιορισμένη όμως αναγέννηση των αξόνων κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται στην παρουσία αναστολέων ανάπτυξης που συνδέονται με τη μυελίνη, όπως η γλυκοπρωτεΐνη συνδεδεμένη με τη μυελίνη, Nogo-A και η γλυκοπρωτεΐνη της ολιγοδενδροκυτταρικής μυελίνης. Όλες αυτές οι πρωτεΐνες αντιδρούν με τον υποδοχέα nogo-66 και, ενδεχομένως, μεταδίδουν ένα μήνυμα μέσω των υποδοχέων των νευροτροφινών P75 (Filbin et al., 2003). Το σήμα που προκύπτει από την ενεργοποίηση αυτής της οδού μπορεί να μειώσει το ενδοκυτταρικό cAMP και έτσι να μειωθεί η αναγεννητική ικανότητα των αξόνων (Cai et al., 1999).

Τα μεταμοσχευμένα SMA ποντίκια έδειξαν βελτίωση του φαινότυπο, όπως αποδεικνύεται από την καμπύλη της ανάπτυξης, την ανάλυση της

νευρομυϊκής λειτουργίας και την αύξηση της επιβίωσης. Οι παρατηρήσεις αυτές συσχετίζονται και με τα στοιχεία της νευροπαθολογικής ανάλυσης η οποία δείχνει μια σημαντική μείωση της απώλειας των κινητικών νευρώνων των πειραματοζώων σε ηλικία 13 ημερών σε σύγκριση με ποντίκια που έλαβαν μόνο φυσιολογικό ορό. Σε αυτή την εργασία αποδεικνύεται για πρώτη φορά ότι τα βλαστικά κύτταρα, και συγκεκριμένα τα νευρικά βλαστοκύτταρα (NSC), μπορούν να αυξήσουν την διάρκεια ζωής του πειραματικού αυτού μοντέλου της SMA. Η μεταμόσχευση των κυττάρων ALDH^{hi}SSC^{lo} έχει σημαντικό όφελος στην διάρκεια ζωής και στα κλινικά συμπτώματα αφού η επιβίωση παρατάθηκε κατά 39.26% της συνολικής διάρκειας ζωής. Πιστεύουμε ότι το αποτέλεσμα αυτό είναι σημαντικό και πρέπει να τονιστεί να τονιστεί η σημασία αυτής της αύξησης υπό το πρίσμα των περιορισμένων αποτελεσμάτων στην επιβίωση που έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία συμπεριλαμβανομένων δύο προσπαθειών γονιδιακής θεραπείας. Η πρώτη προσπάθεια βασισμένη στην γονιδιακή μεταφορά του γονιδίου που κωδικοποιεί την cardiotrophin-1, και χρησιμοποιώντας μια ενδομυϊκή ένεση αδενοϊών, αύξησε τη διάρκεια ζωής ενός διαφορετικού μοντέλου SMA περίπου κατά 30% (Lesbordes et al., 2003). Το δεύτερο πείραμα, βασιζόμενο σε πολλαπλές ενέσεις ενός οχήματος lentiviral που εκφράζει SMN σε διάφορους μύες, αύξησε τη μέση επιβίωση μόνο κατά 3 και 5 ημέρες (20% και 38%) σε σύγκριση με lacZ και μη μεταμοσχευμένα ζώα αντίστοιχα (Azzouz et al. , 2004). Οι δυσκολίες για την επιτυχία μιας σημαντικής αύξησης στην επιβίωση χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεθόδους, δείχνουν ότι η περαιτέρω κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών που οδηγούν στον θάνατο των κινητικών νευρώνων είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη μιας θεραπείας για την SMA.

Οι πειραματικές μελέτες σε επίπεδο βασικών επιστημών είναι απαραίτητες για την επίτευξη του στόχου μιας κλινικώς αποτελεσματικής θεραπείας. Αν και η μεταμόσχευση νευρικών βλαστοκυττάρων δεν ήταν επαρκής για την πλήρη διόρθωση του φαινότυπου της SMA, η βελτίωση της επιβίωσης και της κινητικής συμπεριφοράς ήταν έκδηλη. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των κινητικών νευρώνων των μεταμοσχευμένων ζώων σε σύγκριση με τα ζώα ελέγχου, έδειξε μία σημαντική μείωση της απώλειας των νευρώνων, η οποία και μπορεί να εξηγήσει το κλινικό όφελος. Εμείς υποθέσαμε ότι τα ευεργετικά αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν οφείλονται στα πολλαπλά γεγονότα που προκλήθηκαν από την μεταμόσχευση των βλαστικών κυττάρων. Τα βλαστοκύτταρα που ενσωματώθηκαν στο παρέγχυμα ή στις μήνιγγες, μπορεί να έχουν κάποιο ρόλο στη λειτουργική βελτίωση μέσω της παραγωγής νευροπροστατευτικών ουσιών. Επιπλέον, όπως παρατηρήσαμε, η μεταμόσχευση υπήρξε ευεργετική και για τους ενδογενείς κινητικούς νευρώνες οι οποίοι παρουσίασαν προς έκπληξή μας αλλαγή στο pattern γονιδιακής έκφρασης με αποτέλεσμα να μοιάζουν περισσότερο από γονιδιακής πλευράς στους υγιείς κινητικούς νευρώνες. Συγκεκριμένα οι μεγαλύτερες αλλαγές παρατηρήθηκαν σε πρωτεΐνες εμπλεκόμενες στον μεταβολισμό του RNA, πρωτεΐνες κυτταρικού κύκλου και πρωτεΐνες οι οποίες συνδέονται με την ακτίνη. Η επίδραση των μη μεταλλαγμένων βλαστοκυττάρων στην επιβίωση των πειραματοζώων SMA θα μπορούσε επίσης να οφείλεται στο γεγονός ότι αυτά τα νέα κύτταρα παράγουν φυσιολογικά επίπεδα πρωτεΐνης SMN. Πράγματι, είναι πιθανόν να χρειαστεί να προσδιορισθεί η έκφραση της πρωτεΐνης SMN όχι μόνο στους κινητικούς νευρώνες, αλλά και σε άλλους τύπους κυττάρων.

Εν κατακλείδι, αποδείξαμε ότι η μεταμόσχευση ενός υποπληθυσμού νευρικών βλαστοκυττάρων έχει θετική επίδραση σε πειραματικό μοντέλο της SMA,

γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτή η κατηγορία των βλαστοκυττάρων μπορεί να παίζει ρόλο στην ανάπτυξη της θεραπείας για τις νόσους του κινητικού νευρώνα (είτε μέσω νευρογένεσης είτε μέσω ενεργοποίησης νευροπροστατευτικών μηχανισμών). Η μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων θα μπορούσε να γίνει εφικτή στο μέλλον, και σε συνδυασμό με άλλες μοριακές και φαρμακολογικές στρατηγικές θεραπείας για την αποτελεσματική ανάκτηση των κινητικών λειτουργιών. Αυτές οι θεραπευτικές στρατηγικές, ιδίως αν συνδυαστούν, απαιτούν προσεκτική μελέτη και δοκιμή σε μοντέλα *in vitro* και *in vivo*, πριν από το σχεδιασμό κλινικών μελετών στον άνθρωπο.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Akiyama Y, Honmou O, Kato T, Uede T, Hashi K, Kocsis JD. Transplantation of clonal neural precursor cells derived from adult human brain establishes functional peripheral myelin in the rat spinal cord. *Exp Neurol*. 2001 Jan;167(1):27-39.

Andreassi C, Angelozzi C, Tiziano FD, Vitali T, De Vincenzi E, Boninsegna A, Villanova M, Bertini E, Pini A, Neri G, Brahe C. Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet*. 2004 Jan;12(1):59-65.

Azzouz M, Le T, Ralph GS, Walmsley L, Monani UR, Lee DC, Wilkes F, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Burghes AH, Mazarakis ND. Lentivector-mediated SMN replacement in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest*. 2004 Dec;114(12):1726-31.

Avila AM, Burnett BG, Taye AA, Gabanella F, Knight MA, Hartenstein P, Cizman Z, Di Prospero NA, Pellizzoni L, Fischbeck KH, Sumner CJ. Trichostatin A increases SMN expression and survival in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest*. 2007 Mar;117(3):659-71.

Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, Viera L, Estevez AG, Beckman JS. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Brain Res Rev*. 2004 Dec;47(1-3):263-74.

Barnett SC and Chang L. Olfactory ensheathing cells and CNS repair: going solo or in need of a friend? *Trends Neurosci*. 2004 27: 54–60.

Bechade C, Rostaing P, Cisterni C, et al: Subcellular distribution of survival motor neuron (SMN) protein: Possible involvement in nucleocytoplasmic and dendritic transport. *Eur J Neurosci* 11:293-304, 1999

Bilak MM, Corse AM, Kuncel RW. Additivity and potentiation of IGF-I and GDNF in the complete rescue of postnatal motor neurons. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2001 Jun;2(2):83-91.

Billon N, Jolicoeur C, Raff M. Generation and characterization of oligodendrocytes from lineage-selectable embryonic stem cells in vitro. *Methods Mol Biol.* 2006;330:15-32.

Brahe C, Servidei S, Zappata S, et al: Genetic homogeneity between childhood-onset and adult-onset autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet* 346:741-742, 1995

Burglen L, Lefebvre S, Clermont O, et al: Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics* 32:479-482, 1996

Cai D, Shen Y, De Bellard M, Tang S, Filbin MT. Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. *Neuron.* 1999 Jan;22(1):89-101.

Cai J, Cheng A, Luo Y, Lu C, Mattson MP, Rao MS, Furukawa K. Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells. *J Neurochem.* 2004 Jan;88(1):212-26.

Carrel TL, McWhorter ML, Workman E, Zhang H, Wolstencroft EC, Lorson C, Bassell GJ, Burghes AH, Beattie CE. Survival motor neuron function in motor axons is independent of functions required for small nuclear ribonucleoprotein biogenesis. *J Neurosci.* 2006 Oct 25;26(43):11014-22.

Cartegni L, Krainer AR: Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet* 30:377-384, 2002

Chan YB, Miguel-Aliaga I, Franks C, Thomas N, Trulzsch B, Sattelle DB, Davies KE, van den Heuvel M. Neuromuscular defects in a *Drosophila* survival motor neuron gene mutant. *Hum Mol Genet.* 2003 Jun 15;12(12):1367-76.

Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Donadoni C, Del Bo R, Crimi M, Bordoni A, Fortunato F, Strazzer S, Menozzi G, Salani S, Bresolin N, Comi GP. Transplanted ALDH^{hi}SSC^{lo} neural stem cells generate motor neurons and delay disease progression of nmd mice, an animal model of SMARD1. *Hum Mol Genet.* 2006 Jan 15;15(2):167-87. Epub 2005 Dec 8.

Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Donadoni C, Del Bo R, Fortunato F, Strazzer S, Salani S, Bresolin N, Comi GP. Multipotentiality, homing properties, and pyramidal neurogenesis of CNS-derived LeX(ssea-1)+/CXCR4+ stem cells. *FASEB J*. 2005 Nov;19(13):1860-2. Epub 2005 Sep 8.

Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Donadoni C, Salani S, Del Bo R, Strazzer S, Bresolin N, Comi GP. Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells*. 2006 Apr;24(4):975-85. Epub 2005 Nov 17.

Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Del Bo R, Papadimitriou D, Locatelli F, Mezzina N, Gianni F, Bresolin N, Comi GP. Motoneuron transplantation rescues the phenotype of SMARD1 (spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1). *J Neurosci*. 2009 Sep 23;29(38):11761-71.

Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Ronchi D, Simone C, Falcone M, Papadimitriou D, Locatelli F, Mezzina N, Gianni F, Bresolin N, Comi GP. Embryonic stem cell-derived neural stem cells improve spinal muscular atrophy phenotype in mice. *Brain*. 2010 Feb;133(Pt 2):465-81. Epub 2009 Dec 23.

Deshpande DM, Kim YS, Martinez T, Carmen J, Dike S, Shats I, Rubin LL, Drummond J, Krishnan C, Hoke A, Maragakis N, Shefner J, Rothstein JD, Kerr DA. Recovery from paralysis in adult rats using embryonic stem cells. *Ann Neurol*. 2006 Jul;60(1):32-44.

Desjardins P, Ledoux S. The role of apoptosis in neurodegenerative diseases. *Metab Brain Dis*. 1998 Jun;13(2):79-96.

Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*. 1999 Jun 11;97(6):703-16.

Donadoni C, Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Guglieri M, Strazzer S, Bossolasco P, Salani S, Comi GP. Improvement of combined FISH and immunofluorescence to trace the fate of somatic stem cells after transplantation. *J Histochem Cytochem*. 2004 Oct;52(10):1333-9

Elliger SS, Elliger CA, Aguilar CP, Raju NR, Watson GL. Elimination of lysosomal storage in brains of MPS VII mice treated by intrathecal administration of an adeno-associated virus vector. *Gene Ther.* 1999 Jun;6(6):1175-8.

Frugier T, Tiziano FD, Cifuentes-Diaz C, Miniou P, Roblot N, Dierich A, Le Meur M, Melki J. Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2000 Mar 22;9(5):849-58.

Fujikura J, Yamato E, Yonemura S, Hosoda K, Masui S, Nakao K, Miyazaki Ji J, Niwa H. Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. *Genes Dev.* 2002 Apr 1;16(7):784-9.

Gao J, Coggeshall RE, Tarasenko YI, Wu P. Human neural stem cell-derived cholinergic neurons innervate muscle in motoneuron deficient adult rats. *Neuroscience.* 2005;131(2):257-62

Grepin C, Nemer G, Nemer M. Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor. *Development.* 1997 Jun;124(12):2387-95.

Grill RJ Jr, Pixley SK. 2-Mercaptoethanol is a survival factor for olfactory, cortical and hippocampal neurons in short-term dissociated cell culture. *Brain Res.* 1993 Jun 4;613(1):168-72.

Grondard C, Biondi O, Armand AS, Lecolle S, Della Gaspera B, Pariset C, Li H, Gallien CL, Vidal PP, Chanoine C, Charbonnier F. Regular exercise prolongs survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci.* 2005 Aug 17;25(33):7615-22

Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96: 857-881.

Harper JM, Krishnan C, Darman JS, Deshpande DM, Peck S, Shats I, Backovic S, Rothstein JD, Kerr DA. Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 May 4;101(18):7123-8.

Hess DA, Meyerrose TE, Wirthlin L, Craft TP, Herrbrich PE, Creer MH, Nolte JA. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood*. 2004 Sep 15;104(6):1648-55

Hofmann Y, Wirth B: hnRNP-G promotes exon 7 inclusion of survival motor neuron (SMN) via direct interaction with Htra2-beta1. *Hum Mol Genet* 11:2037-2049, 2002

Hofstetter CP, Holmstrom NA, Lilja JA, Schweinhardt P, Hao J, Spenger C, Wiesenfeld-Hallin Z, Kurpad SN, Frisen J, Olson L. Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat Neurosci*. 2005 Mar;8(3):346-53.

Imitola J, Raddassi K, Park KI, Mueller FJ, Nieto M, Teng YD, Frenkel D, Li J, Sidman RL, Walsh CA, Snyder EY, Khoury SJ. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 28;101(52):18117-22.

Ishii K, Katayama M, Hori K, Yodoi J, Nakanishi T. Effects of 2-mercaptoethanol on survival and differentiation of fetal mouse brain neurons cultured in vitro. *Neurosci Lett*. 1993 Dec 12;163(2):159-62.

Jablonka S, Schrank B, Kralewski M, Rossoll W, Sendtner M. Reduced survival motor neuron (Smn) gene dose in mice leads to motor neuron degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 341-346.

Kablar B, Belliveau AC. Presence of neurotrophic factors in skeletal muscle correlates with survival of spinal cord motor neurons. *Dev Dyn*. 2005 Nov;234(3):659-69.

Kanda S, Shiroy A, Oujy Y, Birumachi J, Ueda S, Fukui H, Tatsumi K, Ishizaka S, Takahashi Y, Yoshikawa M. In vitro differentiation of hepatocyte-like cells from embryonic stem cells promoted by gene transfer of hepatocyte nuclear factor 3 beta. *Hepatology Res*. 2003 Jul;26(3):225-231.

Keyoung HM, Roy NS, Benraiss A, Louissaint A Jr, Suzuki A, Hashimoto M, Rashbaum WK, Okano H, Goldman SA. High-yield selection and extraction

of two promoter-defined phenotypes of neural stem cells from the fetal human brain. *Nat Biotechnol.* 2001 Sep;19(9):843-50

Klein SM, Behrstock S, McHugh J, Hoffmann K, Wallace K, Suzuki M, Aebischer P, Svendsen CN. GDNF delivery using human neural progenitor cells in a rat model of ALS. *Hum Gene Ther.* 2005 Apr;16(4):509-21.

Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W, Van Broeckhoven C, Collen D, Andersen PM, Carmeliet P. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet.* 2003 Aug;34(4):383-94.

Le TT, Pham LT, Butchbach ME, Zhang HL, Monani UR, Coover DD, Gavriline TO, Xing L, Bassell GJ, Burghes AH. SMNDelta7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum Mol Genet.* 2005 Mar 15;14(6):845-57.

Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell.* 1995 Jan 13;80(1):155-65.

Lesbordes JC, Cifuentes-Diaz C, Miroglio A, Joshi V, Bordet T, Kahn A, Melki J. Therapeutic benefits of cardiotrophin-1 gene transfer in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2003 Jun 1;12(11):1233-9.

Li XJ, Du ZW, Zarnowska ED, Pankratz M, Hansen LO, Pearce RA, Zhang SC. Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2005 Feb;23(2):215-21.

Lu P, Jones LL, Snyder EY, Tuszynski MH. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2003 Jun;181(2):115-29.

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Dec;78(12):7634-8.

McWhorter ML, Monani UR, Burghes AH, Beattie CE. Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *J Cell Biol*. 2003 Sep 1;162(5):919-31.

Meister G, Fischer U: Assisted RNP assembly: SMN and PRMT5 complexes cooperate in the formation of spliceosomal UsnRNPs. *Embo J* 21:5853-5863, 2002

Messina A, Sangster CL, Morrison WA, Galea MP. Requirements for obtaining unbiased estimates of neuronal numbers in frozen sections. *J Neurosci Methods* 2000; 97: 133-137.

Miles GB, Yohn DC, Wichterle H, Jessell TM, Rafuse VF, Brownstone RM. Functional properties of motoneurons derived from mouse embryonic stem cells. *J Neurosci*. 2004 Sep 8;24(36):7848-58.

Mohajeri MH, Figlewicz DA, Bohn MC. Intramuscular grafts of myoblasts genetically modified to secrete glial cell line-derived neurotrophic factor prevent motoneuron loss and disease progression in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Gene Ther*. 1999 Jul 20;10(11):1853-66.

Monani UR, Sendtner M, Coovert DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, Jablonka S, Schrank B, Rossol W, Prior TW, Morris GE, Burghes AH. The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn*(^{-/-}) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 2000 Feb 12;9(3):333-9.

Morshead CM, Craig CG, van der Kooy D. In vivo clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain. *Development*. 1998 Jun;125(12):2251-61.

Munsat TL, Davies KE. International SMA consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul Disord*. 1992

Nayak MS, Kim YS, Goldman M, Keirstead HS, Kerr DA. Cellular therapies in motor neuron diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Jun 17;

Nunes MC, Roy NS, Keyoung HM, Goodman RR, McKhann G 2nd, Jiang L, Kang J, Nedergaard M, Goldman SA. Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat Med*. 2003 Apr;9(4):439-47.

Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, Theilmeyer G, Dewerchin M, Laudenbach V, Vermylen P, Raat H, Acker T, Vleminckx V, Van Den Bosch L, Cashman N, Fujisawa H, Drost MR, Sciot R, Bruyninckx F, Hicklin DJ, Ince C, Gressens P, Lupu F, Plate KH, Robberecht W, Herbert JM, Collen D, Carmeliet P. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet*. 2001 Jun;28(2):131-8.

Papadimitriou D, Le Verche V, Jacquier A, Ikiz B, Przedborski S, Re DB. Inflammation in ALS and SMA: Sorting out the good from the evil. *Neurobiol Dis*. 2010 Mar;37(3):493-502. Epub 2009 Oct 13.

Pearn J. Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J Med Genet*. 1978 Dec;15(6):409-13.

Pluchino S, Quattrini A, Brambilla E, Gritti A, Salani G, Dina G, Galli R, Del Carro U, Amadio S, Bergami A, Furlan R, Comi G, Vescovi AL, Martino G. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature*. 2003 Apr 17;422(6933):688-94.

Reinhart PH, Pfeiffer B, Spengler S, Hamprecht B. Purification of glycogen phosphorylase from bovine brain and immunocytochemical examination of rat glial primary cultures using monoclonal antibodies raised against this enzyme. *J Neurochem*. 1990 May;54(5):1474-83.

Rietze RL, Valcanis H, Brooker GF, Thomas T, Voss AK, Bartlett PF. Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature*. 2001 Aug 16;412(6848):736-9.

Roisen FJ, Murphy RA, Pichichero ME, Braden WG. Cyclic adenosine monophosphate stimulation of axonal elongation. *Science*. 1972 Jan 7;175(17):73-4.

Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kroning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M. Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol.* 2003 Nov 24;163(4):801-12.

Sargsyan SA, Monk PN, Shaw PJ. Microglia as potential contributors to motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia.* 2005 Sep;51(4):241-53.

Singh NK, Singh NN, Androphy EJ, et al: Splicing of a critical exon of human survival motor neuron is regulated by a unique silencer element located in the last intron. *Mol Cell Biol* 26:1333-1346, 2006

Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature.* 2002 May 2;417(6884):39-44.

Tang F, Shang K, Wang X, Gu J. Differentiation of embryonic stem cell to astrocytes visualized by green fluorescent protein. *Cell Mol Neurobiol.* 2002 Feb;22(1):95-101.

Tropepe V, Sibilica M, Ciruna BG, Rossant J, Wagner EF, van der Kooy D. Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol* 1999; 208: 166-188.

Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, Mak TW, Rossant J, van der Kooy D. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron.* 2001 Apr;30(1):65-78.

Tsai MS, Chiu YT, Wang SH, Hsieh-Li HM, Li H. Abolishing Trp53-dependent apoptosis does not benefit spinal muscular atrophy model mice. *Eur J Hum Genet.* 2006 Mar;14(3):372-5.

Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, Reynolds BA. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J. Neurosci.* 1996; 16: 7599-7609.

Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell.* 2002 Aug 9;110(3):385-97.

Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat.* 2000;15(3):228-37

Wirth B, Brichta L, Hahnen E. Spinal muscular atrophy: from gene to therapy. *Semin Pediatr Neurol.* 2006 Jun;13(2):121-31.

Wirth B: An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat* 15:228-237, 2000

Wu P, Tarasenko YI, Gu Y, Huang LY, Coggeshall RE, Yu Y. Region-specific generation of cholinergic neurons from fetal human neural stem cells grafted in adult rat. *Nat Neurosci.* 2002 Dec;5(12):1271-8.

Zerres K, Davies KE. 59th ENMC International Workshop: Spinal Muscular Atrophies: recent progress and revised diagnostic criteria 17-19 April 1998, Soestduinen, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 1999 Jun;9(4):272-8.

ΠΙΝΑΚΕΣ

ΓΟΝΙΔΙΑ ΜΕ ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΕΚΦΡΑΣΗ: SMA vs έλεγχοι

Gene name	Accession number	Gene definition	Probe Affymetrix	Biological function	Ratio
Gjb1	BC026833	gap junction membrane channel protein beta 1	1448767_s_at	nervous system development	0.21
Rsad2	BB741897	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	1421009_at	immune response	0.31
Mkrn1	BQ176661	makorin, ring finger protein, 1	1418435_at	transcription activity, cell cycle regulation	0.34
Pomt1	BC027325	protein-O-mannosyltransferase 1	1424284_at	protein amino acid O-linked glycosylation	0.35
2810453I06Rik	NM_133703	RIKEN cDNA 2810453I06 gene	1418389_at		0.36
Vps25	NM_026776	vacuolar protein sorting 25	1421050_at	regulation of transcription, DNA-dependent antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	0.39
H2-K1	BC011306	histocompatibility 2, K1, K region	1425336_x_at	cytokinesis	0.4
Anln	BI690018	anillin, actin binding protein (scraps homolog, Drosophila)	1433543_at		0.4
Trf	AF440692	transferrin	1425546_a_at	iron ion transport	0.41
Slc13a3	BB497312	solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 3	1438377_x_at	sodium ion transport	0.42
Cxcl7	NM_023785	chemokine (C-X-C motif) ligand 7	1418480_at	immune response	0.42
Arpp21	BC027107	cyclic AMP-regulated phosphoprotein, 21	1424248_at	signal transduction	0.43
Prkg1	NM_011160	protein kinase, cGMP-dependent, type I	1449876_at	dendrite development	0.43
Cyp51	NM_020010	cytochrome P450, family 51	1422534_at	electron transport	0.44

ΓΟΝΙΔΙΑ ΜΕ ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΕΚΦΡΑΣΗ: SMA vs έλεγχοι

Gene name	Accession number	Gene definition	Probe Affymetrix	Biological function	Ratio
Hspb1	U03561	heat shock protein 1	1425964_x_at	protein folding	11.1
Tmsb10	AV148480	thymosin, beta 10	1455946_x_at	actin cytoskeleton organization and biogenesis	5.55
Sult1a1	AK002700	sulfotransferase family 1A, phenol-preferring, member 1	1427345_a_at	lipid metabolism	5.2
Prodh	NM_011172	proline dehydrogenase	1417629_at	proline metabolism	4.35
Hspb1	NM_013560	heat shock protein 1	1422943_a_at	protein folding	4.35
Cdkn1a	AK007630	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	1424638_at	regulation of progression through cell cycle	4
Gdf10	L42114	growth differentiation factor 10	1424007_at	transforming growth factor beta receptor signaling pathway	3.7
Mt2	AA796766	metallothionein 2	1428942_at	nitric oxide mediated signal transduction	3.57
Tcap	AK010167	titin-cap	1423145_a_at	sarcomere organization	3.12
Mt1	NM_013602	metallothionein 1	1422557_s_at	nitric oxide mediated signal transduction	2.94
Kcna5	NM_008419	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5	1417680_at	potassium ion transport	2.94
Tsc22d3	AF201289	TSC22 domain family 3	1425281_a_at	regulation of transcription, DNA-dependent	2.77
Ccl2	AF065933	chemokine (C-C motif) ligand 2	1420380_at	inflammatory response	2.7
Ddx5	AW536527	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	1433809_at	RNA splicing	2.7
Hif3a	AF416641	hypoxia inducible factor 3, alpha subunit	1425428_at	response to hypoxia, regulation of transcription, DNA-dependent	2.27

ΓΟΝΙΔΙΑ ΜΕ ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΕΚΦΡΑΣΗ: μεταμοσχευμένα SMA vs μη μεταμοσχευμένα SMA

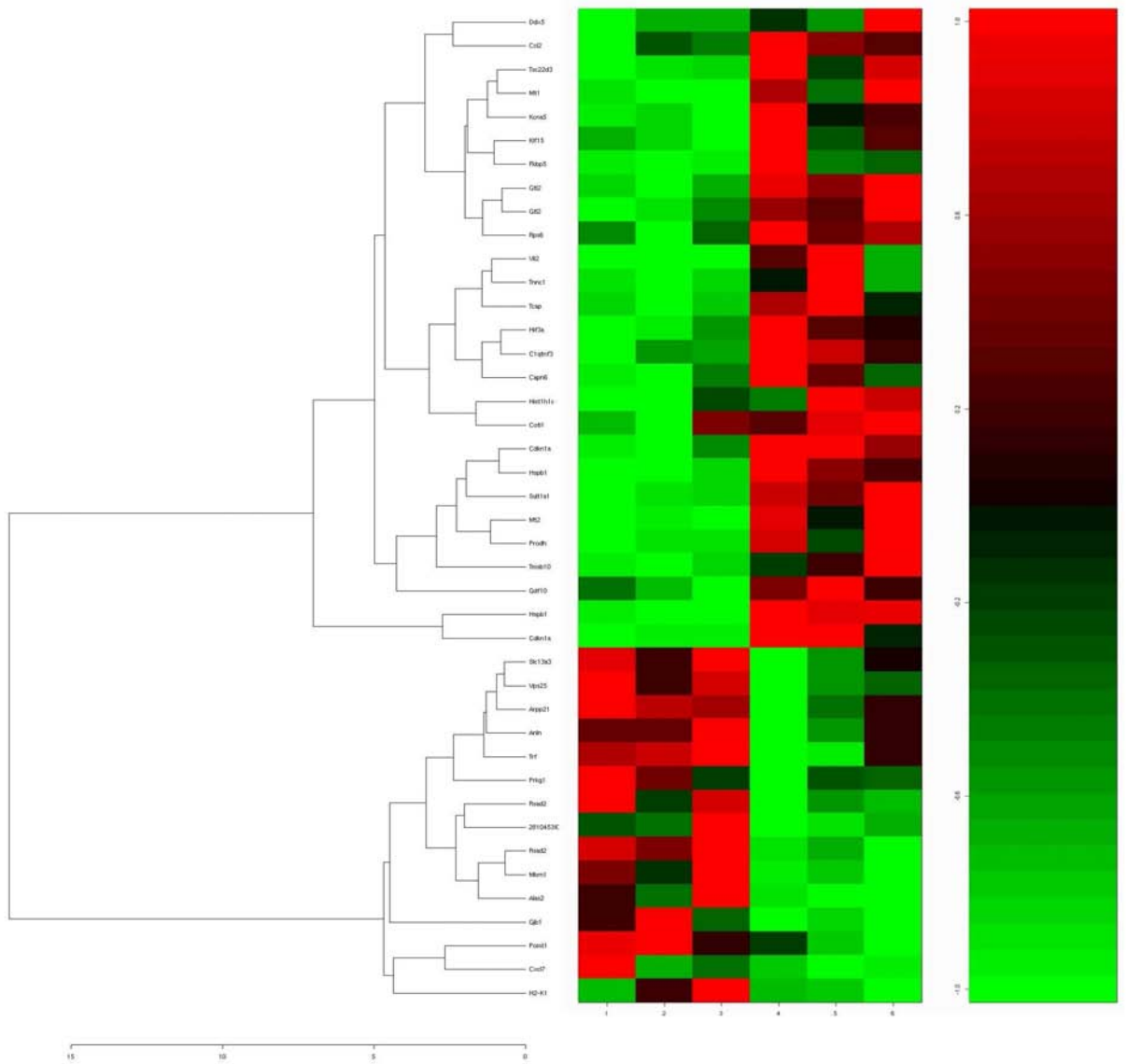
Gene name	Accession number	Gene definition	Probe Affymetrix	Biological function	Ratio
Atf3	BC019946	activating transcription factor 3	1449363_at	regulation of transcription, DNA-dependent	4.11
Socs3	BB241535	suppressor of cytokine signaling 3	1455899_x_at	regulation of cell growth	4.03
Tcrb-J	X67128	T-cell receptor beta, joining region	1452205_x_at	cellular defense response	3.97
5430435G22Rik	BB128517	RIKEN cDNA 5430435G22 gene	1424987_at	small GTPase mediated signal transduction	2.81
Phka1	AA422311	phosphorylase kinase alpha 1	1422744_at	glycogen metabolism	2.73
Ier2	NM_010499	immediate early response 2	1416442_at	immediate-early gene inducible	2.53
Itgb4	L04678	integrin beta 4	1427387_a_at	cell-matrix adhesion	2.51
Dusp1	NM_013642	dual specificity phosphatase 1	1448830_at	response to oxidative stress	2.51
Ccdc46	BG075808	coiled-coil domain containing 46	1427205_x_at		2.50
Cyr61	BM202770	cysteine rich protein 61	1438133_a_at	regulation of cell growth	2.43
Ildr1	BG084606	immunoglobulin-like domain containing receptor 1	1423276_at	receptor activity	2.41
Usp18	NM_011909	ubiquitin specific peptidase 18	1418191_at	ubiquitin-dependent protein catabolism	2.36
Ghdc	NM_031871	GH3 domain containing	1419502_at	GTPase activator activity	2.35
Egr1	NM_007913	early growth response 1	1417065_at	regulation of transcription, DNA-dependent	2.33
Zdhhc14	BB544336	zinc finger, DHHC domain containing 14	1438151_x_at	zinc ion binding	2.31

ΓΟΝΙΔΙΑ ΜΕ ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΕΚΦΡΑΣΗ: μεταμοσχευμένα SMA vs μη μεταμοσχευμένα SMA

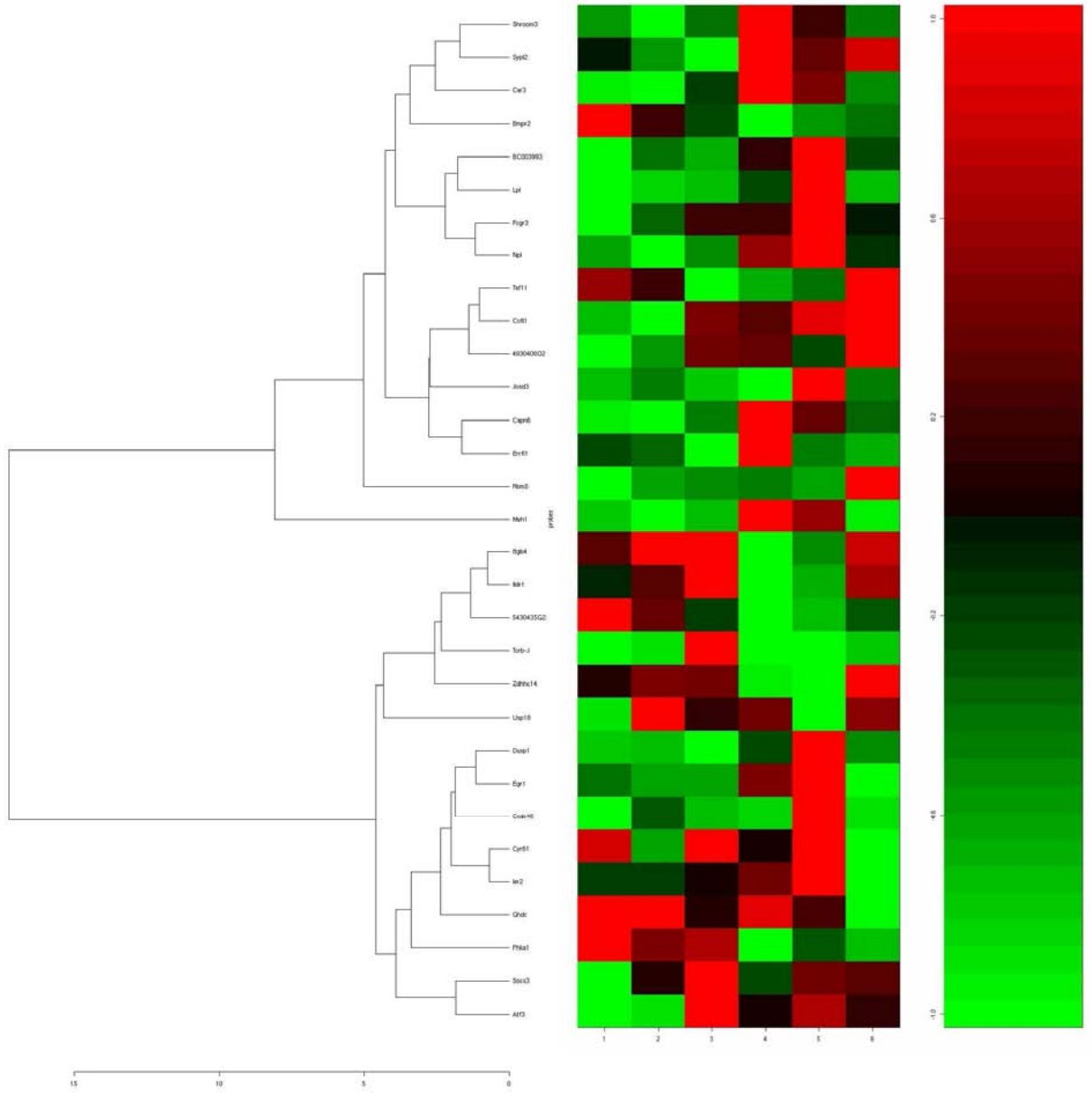
Gene name	Accession number	Gene definition	Probe Affymetrix	Biological function	Ratio
Myh1	AJ002522	myosin, heavy polypeptide 1, skeletal muscle, adult	1427868_x_at	cytoskeleton organization and biogenesis	0.08
Car3	NM_007606	carbonic anhydrase 3	1460256_at	one-carbon compound metabolism	0.30
Syp12	NM_008596	synaptophysin-like 2	1449206_at	calcium ion homeostasis	0.31
Rbm5	BE446879	RNA binding motif protein 5	1438069_a_at	negative regulation of progression through cell cycle	0.32
Shroom3	AK003320	shroom family member 3	1454211_a_at	cell morphogenesis	0.32
4930408O21Rik	AK015115	RIKEN cDNA 4930408O21 gene	1431741_a_at		0.34
Bmpr2	NM_007561	bone morphogenic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	1419616_at	transforming growth factor beta receptor signaling pathway	0.36
Errfi1	AI788755	ERBB receptor feedback inhibitor 1	1419816_s_at	stress-activated protein kinase signaling pathway	0.37
Lpl	NM_008509	lipoprotein lipase	1415904_at	lipid metabolism	0.40
Capn6	AI747133	calpain 6	1450429_at	proteolysis	0.41
Taf11	BC005603	TAF11 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor	1451995_at	regulation of transcription, DNA-dependent	0.41
Npl	BC022734	N-acetylneuraminat e pyruvate lyase	1424265_at	N-acetylneuraminat e lyase activity	0.42
Josd3	AU044383	Josephin domain containing 3	1452635_x_at		0.43
BC003993	BB532946	cDNA sequence BC003993	1438278_a_at	RNA binding	0.43

ΔΕΝΔΡΟΓΡΑΜΜΑ

controlli vs SMA



Trattati vs SMA



ΣΧΟΛΙΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Σχήμα 1. A-B: Ανάλυση FACS της ALDH δραστηριότητας των κυττάρων που προέρχονται από τον νωτιαίο μυελό.

Τα κύτταρα $ALDH^{hi}SSC^{lo}$ επελέγησαν σύμφωνα με τις ιδιότητες τους forward scatter (FSC) και side scatter (SSC) όπως περιγράφηκε στο κείμενο. Τα νευρικά βλαστοκύτταρα επώαστηκαν με Aldefluor (ALDH) και έναν ειδικό αναστολέα της Aldefluor, την διεθυλαμινοβενζαλδεΐδη (Deabate) για τον καθορισμό του βασικού επιπέδου φθορισμού των κυττάρων αυτών και της περιοχής $ALDH^{hi}$ (A). Η επώαση των κυττάρων με το υπόστρωμα Aldefluor χωρίς τον αναστολέα δημιουργεί αλλαγή του φθορισμού FL1 τη οποία ορίζει τον πληθυσμό $ALDH^{hi}$ (B).

Σχήμα 2. Διαφοροποίηση των κυττάρων $ALDH^{hi}SSC^{lo}$ σε κινητικούς νευρώνες

Μετά τη διαφοροποίηση in vitro, τα κύτταρα $ALDH^{hi}SSC^{lo}$ που προέρχονται από HB9-GFP διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν GFP (πράσινο χρώμα) μόνο στους κινητικούς νευρώνες, παράγουν νευρώνες με μια σύνθετη μορφολογία. Αυτά τα κύτταρα εκφράζουν την πρωτεΐνη GFP υπό του υποκινητή HB9, που αποδεικνύει τον ειδικό φαινότυπο κινητικού νευρώνα μαζί με άλλους ειδικούς δείκτες όπως TuJ1 (A: GFP, B: TuJ1, C: merge). Επίσης δείχνουν χολινεργικό φαινότυπο, όπως επιβεβαιώθηκε από την έκφραση της CHAT (D: GFP: E: ChAT; F: merge).

Οι πυρήνες αναδεικνύονται με DAPI.

Scale bar: 70 μ m

Σχήμα 3. Μετανάστευση των κυττάρων ALDH^{hi}SSC^{lo} στον νωτιαίο μυελό μετά από ενδορραχιαία ένεση

Για να μελετηθεί η μετανάστευση των κυττάρων ALDH^{hi}SSC^{lo} μέσα στο παρέγχυμα, τα κύτταρα χρωματίστηκαν με μια φθορίζουσα χρωστική ουσία (PKH26, κόκκινο σήμα) και μεταμοσχεύθηκαν στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Μετά από 5 ημέρες από τη μεταμόσχευση (A), τα κύτταρα του δότη βρίσκονται πλαγίως στο παρέγχυμα του νωτιαίου μυελού προσκολλημένα στις μήνιγγες και αρχίζουν να κινούνται μέσω αυτών στο παρέγχυμα. Μετά από 7 (B) και 10 ημέρες (C) τα κύτταρα του δότη βρέθηκαν τόσο στη λευκή όσο και στη φαιά ουσία του παρεγχύματος. Στο τελικό στάδιο της νόσου νευρώνες HB9-GFP+ εντοπίστηκαν στα πρόσθια κέρατα του νωτιαίου μυελού των μεταμοσχευμένων ποντικών (D). Στην εικόνα D, οι νευρώνες εκφράζουν ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει το αντιγόνο NeuN ειδικό των νευρώνων (κόκκινο σήμα).

Scale bar: A: 300 μm; B-D: 100 μm

Σχήμα 4. Τα μεταμοσχευμένα κύτταρα ALDH^{hi}SSC^{lo} σε SMA ποντίκια διαφοροποιούνται σε κινητικούς νευρώνες

Τα κύτταρα ALDH^{hi}SSC^{lo} που προέρχονται από διαγονιδιακά ποντίκια HB9-GFP που εκφράζουν GFP (πράσινο) μόνο σε κινητικούς νευρώνες μεταμοσχεύθηκαν στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό SMA ζώων. GFP + νευρώνες παρατηρήθηκαν στο πρόσθιο κέρασ του νωτιαίου μυελού, όπως φαίνεται στις εγκάρσιες τομές του νωτιαίου μυελού (A-B). Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση

επιβεβαιώνει ότι αυτά τα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν σε νευρώνες. Η Confocal μικροσκοπική ανάλυση έδειξε ότι τα κύτταρα GFP+ εκφράζουν και ειδικές πρωτεΐνες νευρώνων, όπως η NF κόκκινο (B-C) και NeuN κόκκινο E (F merge με GFP). C: μεγαλύτερη μεγέθυνση της B. G-I: GFP+ κύτταρα έχουν χαρακτηριστικά κινητικών νευρώνων όπως φαίνεται από τη διπλή θετικότητα για GFP (πράσινο) και το χολινεργικό νευροδιαβιβαστή κόκκινο (G: GFP; H: ChAT; I: merge).

Scale bar: A: 300 μm ; C-F: 70 μm ; G-I: 50 μm .

Σχήμα 5. Η μεταμόσχευση $\text{ALDH}^{\text{hi}}\text{SSC}^{\text{lo}}$ κυττάρων αυξάνει το μέγεθος και τον αριθμό των κινητικών νευρώνων

Τα ποντίκια SMA έλαβαν φυσιολογικό ορό ($n = 6$) ή νευρικά βλαστοκύτταρα ($n = 6$) και τα ποντίκια WT μόνο φυσιολογικό ορό ($n = 6$) την P1 ημέρα. (A) τμήμα του νωτιαίου μυελού ποντικών που έλαβαν φυσιολογικό ορό (οσφυϊκή μοίρα) Nissl χρώση. Scale bars: 10 μm . (B-C) Ο μέσος αριθμός των κινητικών νευρώνων είναι μικρότερος στα ποντίκια SMA (C) σε σύγκριση με ποντίκια WT (A) ($P < 0.0001$) και αυξήθηκε σημαντικά μετά τη μεταμόσχευση με νευρικά βλαστοκύτταρα SMAtr (B) ($p < 0.05$ μεταμοσχευμένων την 13^η ημέρα εναντιον μη μεταμοσχευμένων). Τα στοιχεία αντιπροσωπεύουν το μέσο αριθμό των κινητικών νευρώνων \pm SD ανά ημέρα P10 και P13 (D-E). Το μέσο μέγεθος των κινητικών νευρώνων των πρόσθιων ριζών είναι μεγαλύτερο στα ποντίκια WT σε σύγκριση με ποντίκια SMA ($P < 0.0001$) και αυξήθηκε μετά τη μεταμόσχευση με νευρικά βλαστοκύτταρα (SMAtr) ($P < 0.001$) (F-G).

Σχήμα 6. Ανάλυση της επιβίωσης και λειτουργικός χαρακτηρισμός των μεταμοσχευμένων ποντικών SMA

A: Kaplan-Meier καμπύλες επιβίωσης των μεταμοσχευμένων SMA ποντικών. Η διάρκεια ζωής έχει αυξηθεί σημαντικά σε μεταμοσχευμένα σε σύγκριση με μη μεταμοσχευμένα ποντίκια. Η μέγιστη διάρκεια ζωής των μεταμοσχευμένων ζώων ήταν 21 ημέρες, με μέση επιβίωση 18.16 ημέρες ($n = 24$). Τα μη μεταμοσχευμένα ποντίκια επέζησαν το μέγιστο 16 ημέρες με μέση επιβίωση 13.04 ημέρες ($n = 24$). Το log-rank test δείχνει ότι η διαφορά στη διάρκεια ζωής μεταξύ SMA μεταμοσχευμένα και μη μεταμοσχευμένα ποντίκια είναι στατιστικά πολύ σημαντική ($p < 0.0001$). B: καμπύλες ανάπτυξης των ποντικών SMA που έλαβαν κύτταρα και φυσιολογικό ορό σε σύγκριση με τους ελέγχους και αυτά που δεν έλαβαν κύτταρα ή ορό. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν το μέσο βάρος για κάθε ημέρα με την τυπική απόκλιση. Τα μεταμοσχευμένα SMA ποντίκια παρουσιάζουν αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης σε σύγκριση με τα μη μεταμοσχευμένα ποντίκια SMA (10-13 ημέρες $p < 0.005$). C: Διάρκεια της δοκιμασίας hand grip στους ελέγχους, τα μη μεταμοσχευμένα και τα μεταμοσχευμένα ποντίκια SMA. Η διάρκεια της δοκιμασίας hand grip σημαντικά διαφορετική στις 12-13 ημέρες μεταξύ των μεταμοσχευμένων και μη SMA ζώων ($p < 0.001$). D: Αριθμός των διασταυρώσεων στη δοκιμασία του ανοικτού πεδίου στους ελέγχους, τα μη μεταμοσχευμένα και τα μεταμοσχευμένα ποντίκια SMA. Σε 13 ημέρες ο αριθμός των διελεύσεων των ποντικών που έλαβαν κύτταρα ήταν σημαντικά διαφορετικός από τα μη μεταμοσχευμένα ποντίκια ($p < 0.001$). E: Φωτογραφία που δείχνει ένα ποντίκι έλεγχο (WT), ποντίκι μεταμοσχευμένο (TR) και μη μεταμοσχευμένο ποντίκια των ποντίκι του μοντέλου SMA (delta7). Ποντίκια SMA που έλαβαν κύτταρα είναι μεγαλύτερα από τα μη μεταμοσχευμένα. F:

Φωτογραφία κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας hand grip ενός μεταμοσχευμένου ποντικίου SMA.

Σχήμα 7. Η μεταμόσχευση των νευρικών βλαστοκυττάρων μειώνει την απόπτωση σε SMA κινητικούς νευρώνες

A-C: Ανίχνευση της απόπτωσης με την ανάλυση TUNEL στην οσφυϊκή μοίρα σε μη μεταμοσχευμένα SMA ποντίκια (A), μεταμοσχευμένα (B) και WT με φυσιολογικό ορό (C) σε ηλικία 13 ημερών. Οι πυρήνες χρωματίστηκαν με DAPI. Τα μη μεταμοσχευμένα ποντίκια έδειξαν σημαντική αύξηση του θανάτου των κινητικών νευρώνων σε σύγκριση με τα μεταμοσχευμένα. D-E: Ποσοτικός προσδιορισμός των αποπτωτικών πυρήνων στο πρόσθιο κέρασ της οσφυϊκής μοίρας του νωτιαίου μυελού σε ηλικία 10 ημερών (D) και 13 ημερών (E) (μεταμοσχευμένα εναντίον μη μεταμοσχευμένων $p < 0.01$ για $n = 6$).

Scale bar: 100 μm

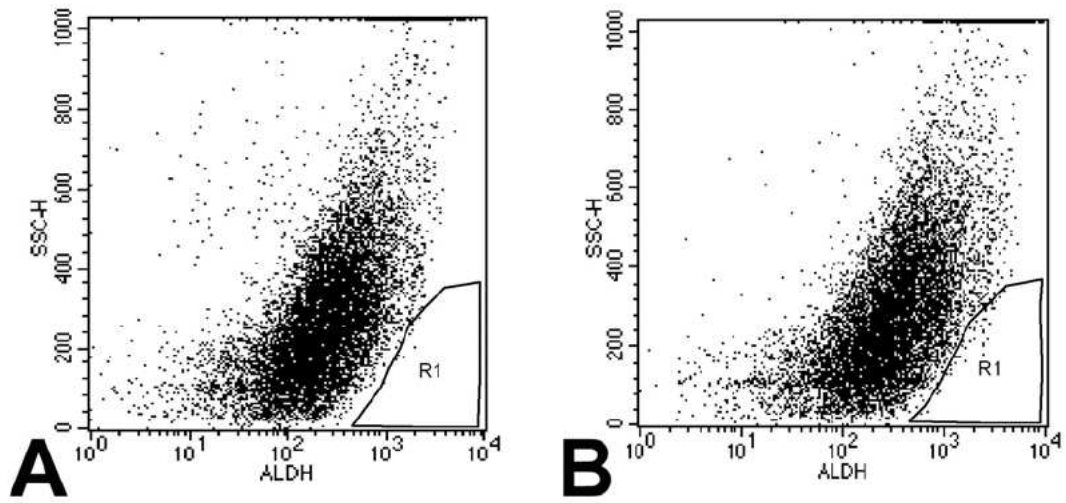
Σχήμα 8. Ανάλυση RT-PCR των ενδογενών κινητικών νευρώνων μετά τη μεταμόσχευση

Παρατηρήσαμε σημαντική αύξηση στην έκφραση του γονιδίου Cdkn1a P21(A) και Hsbp1(B) στους κινητικούς νευρώνες SMA σε σχέση με τους ελέγχους WT. Αυτά τα γονίδια μείωσαν την έκφρασή τους μετά την μεταμόσχευση (SMAttr) $*p < 0.05$, $**p < 0.01$). Τα γονίδια Dusp1 και Egr1 παρουσίαζαν αυξημένη έκφραση στα SMA ζώα σε σχέση με τα WT, ενώ η μεταμόσχευση είχε σαν αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξησή τους στα SMA ζώα (D,F $p < 0.0007$ και $p < 0.02$ αντίστοιχα). Στα C,E φαίνονται οι

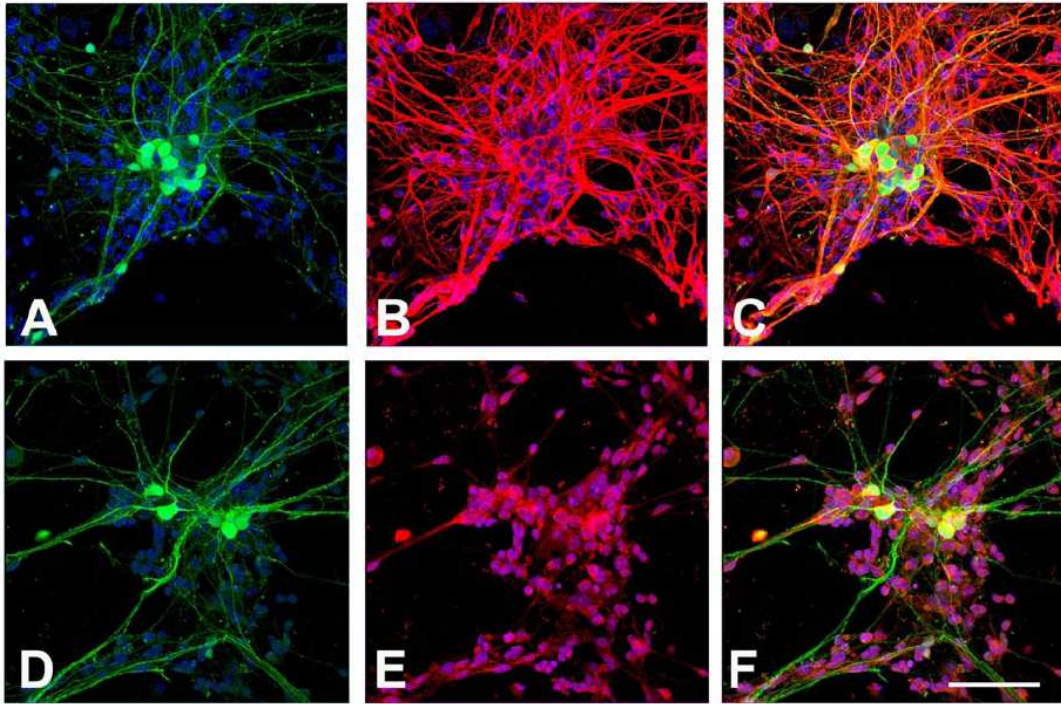
διακυμάνσεις άλλων γονιδίων (Anln, Socs3) οι οποίες όμως δεν αποδείχτηκαν στατιστικά σημαντικές ($p=0.14$, $p=0.17$).

ΕΙΚΟΝΕΣ

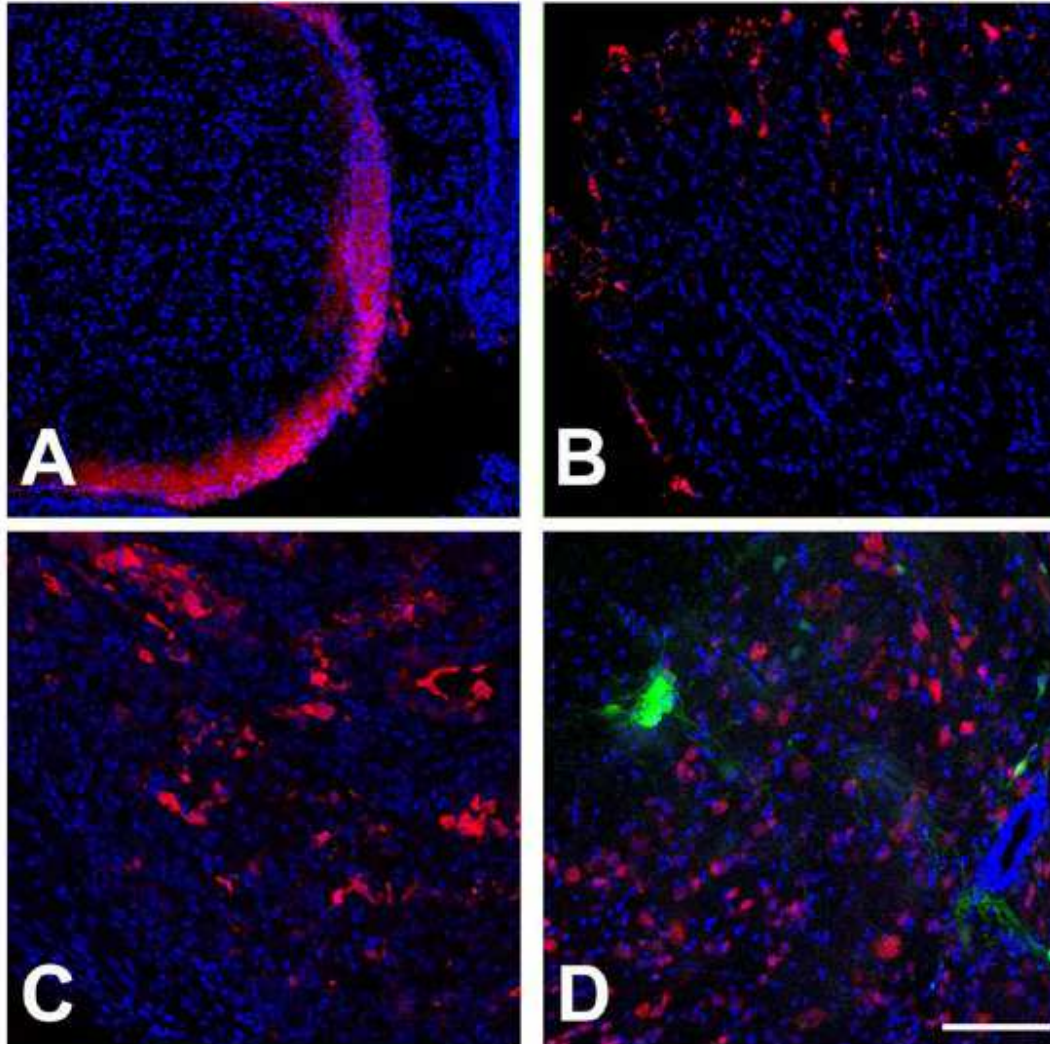
ΣΧΗΜΑ 1



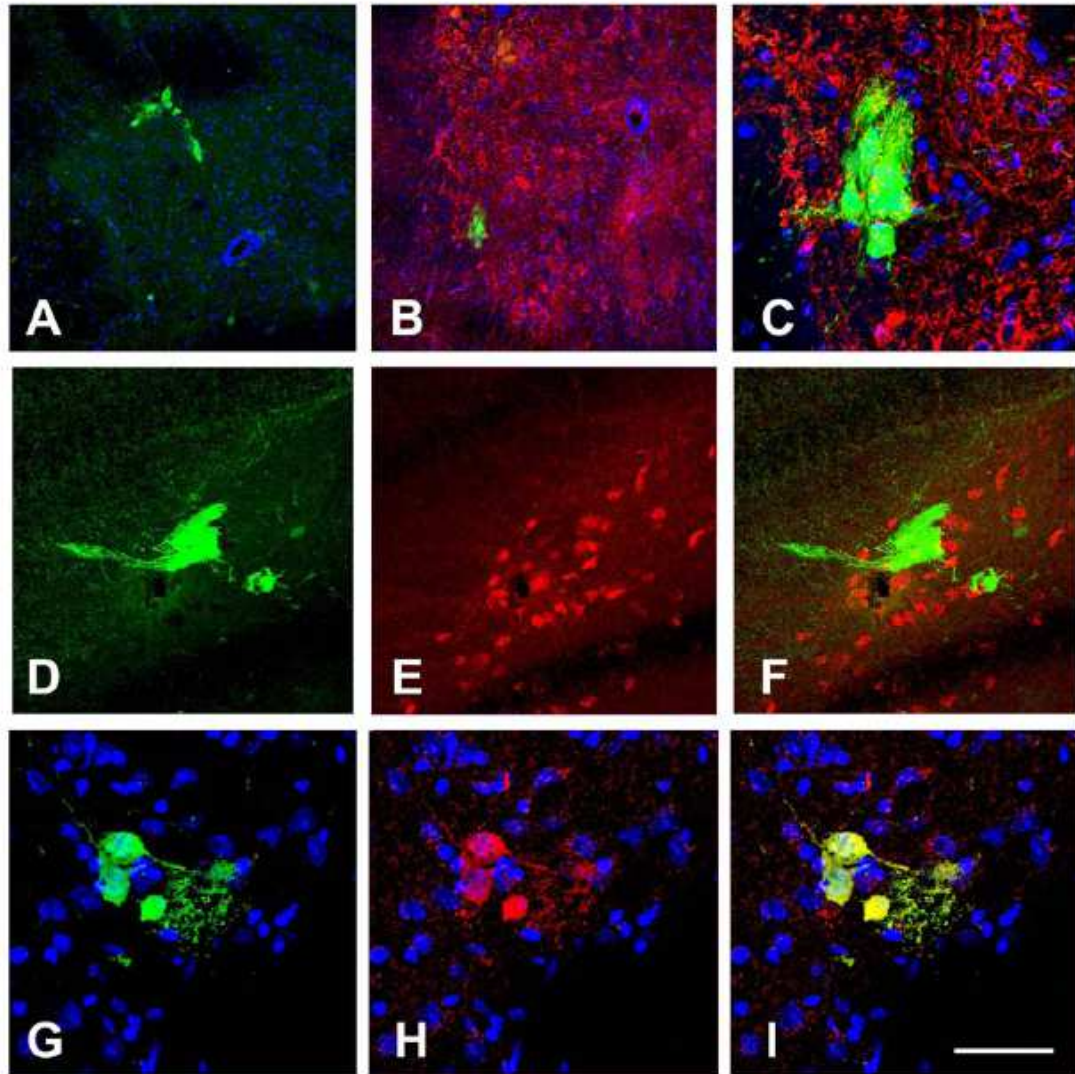
ΣΧΗΜΑ 2



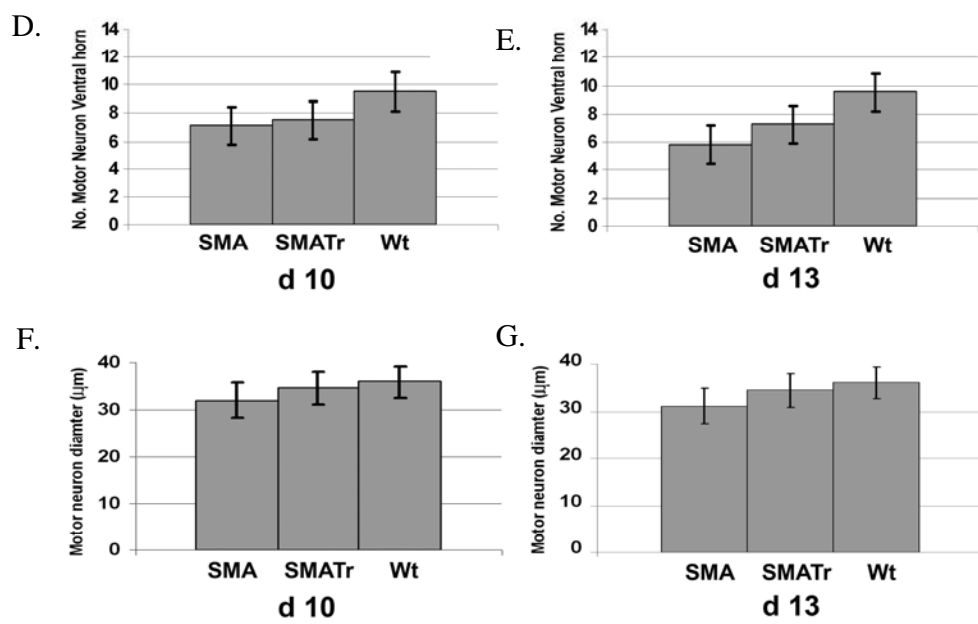
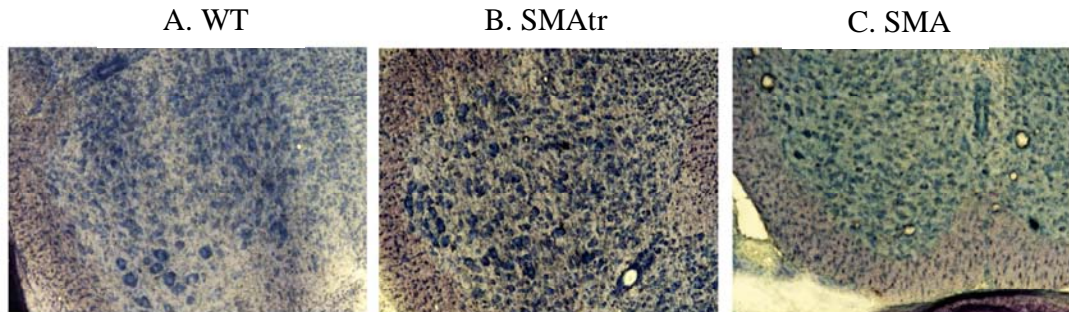
ΣΧΗΜΑ 3



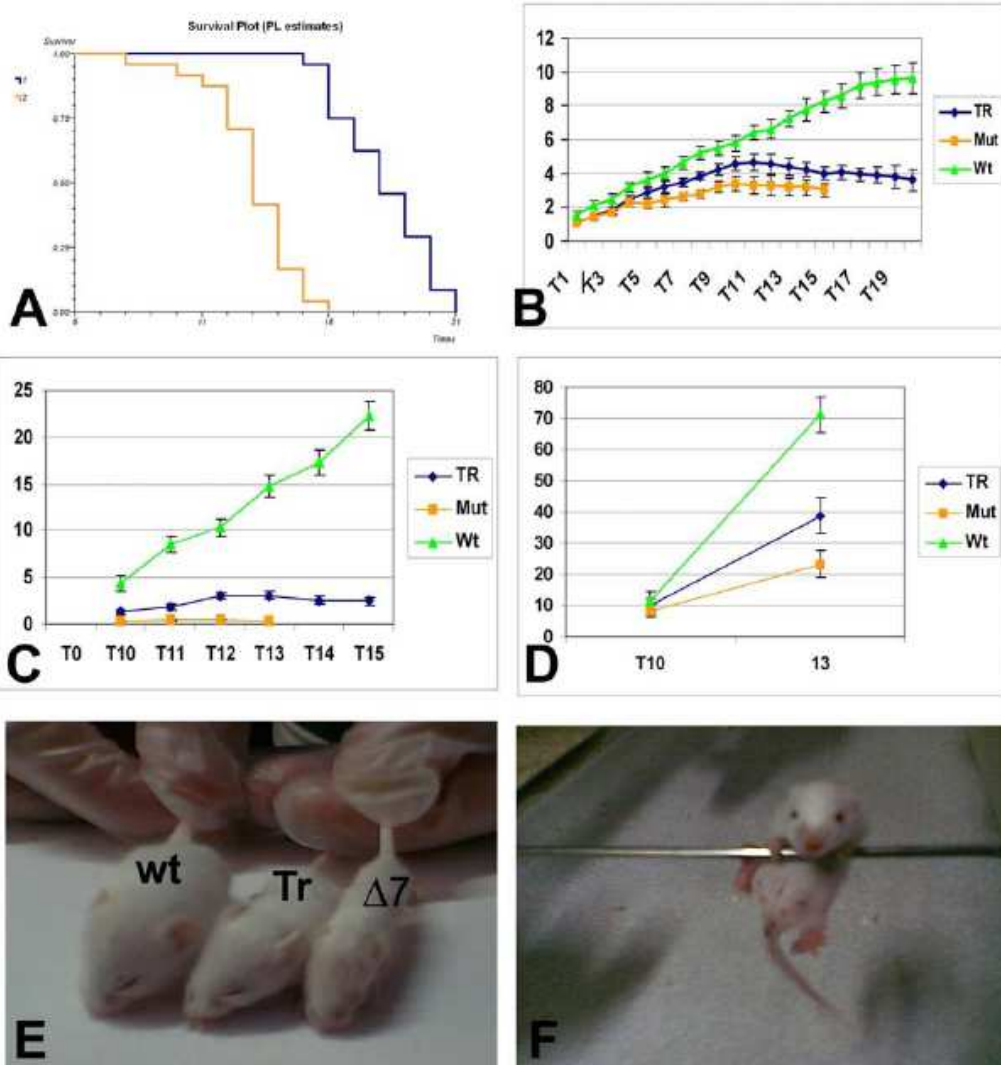
ΣΧΗΜΑ 4



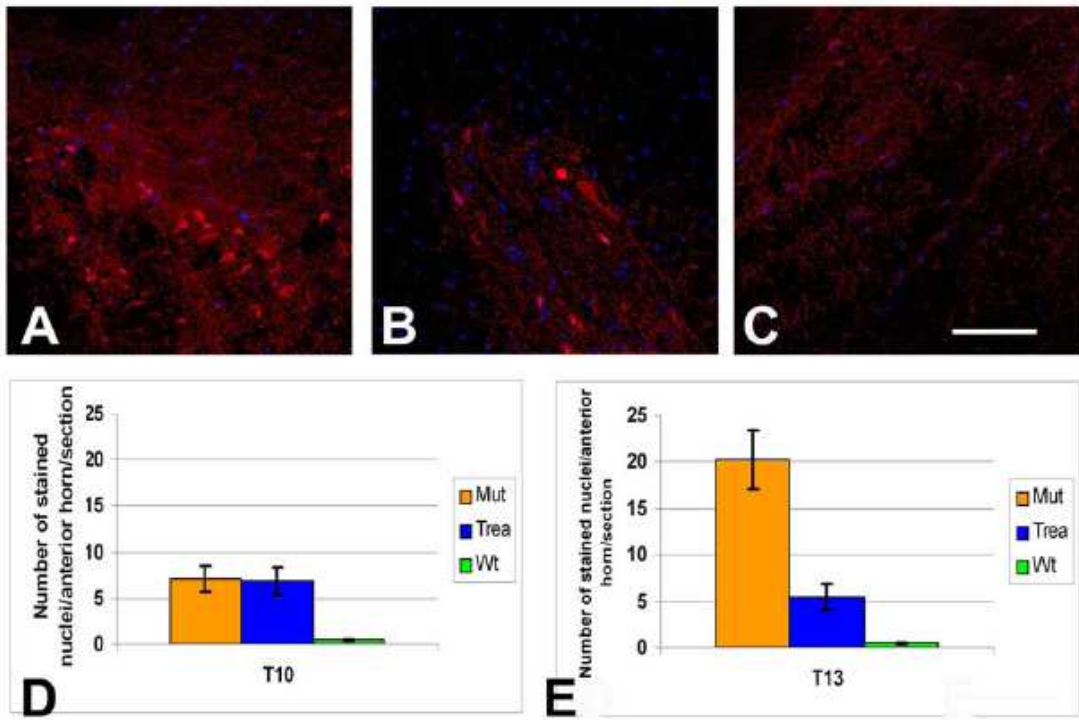
ΣXHMA 5



ΣXHMA 6



ΣXHMA 7



ΣΧΗΜΑ 8

