

## ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

## «ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ miRNAs ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΤΟ ΝΕΥΡΟΓΕΝΕΤΙΚΟ ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟ ΑΣΤΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟ ΦΛΟΙΟ ΠΟΝΤΙΚΟΥ»

Μαργαρίτη Μαρία

Βιολόγος

## ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Ευθυμιόπουλος Σπύρος

Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου – Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

## **ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ** ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «**ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ**»

#### ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ

#### ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗΣ

#### Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ miRNAs ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΤΟ ΝΕΥΡΟΓΕΝΕΤΙΚΟ ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟ ΑΣΤΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟ ΦΛΟΙΟ ΠΟΝΤΙΚΟΥ»

Μαργαρίτη Μαρία

Βιολόγος

#### ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Ευθυμιόπουλος Σπύρος

Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου – Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

#### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ευθυμιόπουλος Σπύρος

Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου – Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Τσιτσιλώνη Ουρανία

Καθηγήτρια Ανοσολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Παπαζαφείρη Παναγιώτα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιολογίας

#### ЕКПА

## Πρόλογος

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Νευρικών Βλαστικών Κυττάρων και Νευροαπεικόνισης του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, υπό την επίβλεψη της Δρ. Θωμαΐδου Δήμητρας, Ερευνήτριας Α΄ στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, κατά το χρονικό διάστημα 2018-2019. Ευχαριστώ θερμά την Δρ. Θωμαΐδου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για την επιστημονική της καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές της. Επίσης ευχαριστώ τον Καθηγητή Δρ. Ευθυμιόπουλο Σπύρο, την Καθηγήτρια Δρ. Τσιτσιλώνη Ουρανία και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δρ. Παπαζαφείρη Παναγιώτα για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή μου και για την άψογη συνεργασία.

Οφείλω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Δρ. Έλσα Παπαδημητρίου για τη στήριξή της, την πολύτιμη βοήθειά της αλλά και τις γνώσεις που απλόχερα μοιράστηκε μαζί μου. Ευχαριστώ, επίσης, της Δρ. Ξύγγη Ευαγγελία, για την πολύτιμη καθοδήγησή της στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων που αφορούσαν την ανάλυση εικόνας, καθώς και τη Δρ. Δάφνη Χρόνη για την πραγματοποίηση των πειραμάτων ηλεκτροφυσιολογίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τη διδακτορική ερευνήτρια Θάνου Ειρήνη για την βοήθεια και την ηθική υποστήριξή της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Παρή Κουτσουδάκη, τη Δρ. Κατερίνα Αραβαντινού-Φατώρου καθώς και όλη την ομάδα της Δρ. Μάτσα, για το πολύ ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο αλλά και τη μεγάλη προθυμία τους για βοήθεια ανά πάσα στιγμή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Μελίνα, την Έφη και τον Άγγελο που είναι πάντα δίπλα μου στο κοινό μας αυτό ταξίδι, το Γιώργο για τη στήριξη και την υπομονή του, τη Δήμητρα που είναι εκεί για μένα τα τελευταία δώδεκα χρόνια και τη μαμά μου, το μπαμπά μου και το αδερφάκι μου, αφού χωρίς αυτούς δε θα ήμουν αυτό που είμαι σήμερα.

Μαίρη

# Περιεχόμενα

Па	ερίληψ	η	6
Ał	ostract	t	8
K	ατάλογ	γος Συντομογραφιών	10
1.	Εισ	αγωγή	12
	1.1	Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ)	12
	1.2	Νευρογένεση κατά την εμβρυική ανάπτυξη	12
	1.2.	1 Σχηματισμός και οργάνωση των δομών του εγκεφάλου	12
	1.2.2	2 Η ανάπτυξη του εγκεφαλικού φλοιού	14
	1.2 Еука	3 Μηχανισμοί ρύθμισης της κυτταρικής ταυτότητας κατά την ανάπτυξη εφαλικού φλοιού	η του 16
	1.2.4	4 Η ανάπτυξη του εμβρυικού μεσεγκεφάλου και μηχανισμοί ρύθμισης	19
	1.3	Ενήλικη νευρογένεση	21
	1.4	Επαναπρογραμματισμός κυτταρικών πληθυσμών	26
	1.4.	1 Η δημιουργία των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων	26
	1.4.2	2 Άμεσος κυτταρικός επαναπρογραμματισμός	29
	1.4.	3 Άμεσος επαναπρογραμματισμός προς νευρώνες	30
	1.5	Σκοπός της εργασίας	39
2.	Υλι	κά – Μέθοδοι	40
	2.1	Απομόνωση εγκεφαλικού φλοιού και πρωτογενής καλλιέργεια αστροκυττά 40	ίρων
	2.2	Καθαρισμός – επέκταση πρωτογενούς καλλιέργειας αστροκυττάρων	41
	2.3	Προετοιμασία για τη διαμόλυνση	42
	2.4 mimic	Διαμόλυνση και διαφοροποίηση αστροκυττάρων με τη χρήση microRNA 242	
	2.4.	1 Βασικό Πρωτόκολλο	42
	2.4.2	2 Πρωτόκολλο με επιπλέον προσθήκες	45
	2.5	Απομόνωση RNA	45
	2.6	Σύνθεση cDNA	45
	2.7	Real Time RT-PCR	46
	2.8	Ανοσοφθορισμός	48
3.	Απο	στελέσματα	50
	3.1	RNA sequencing	50
	3.2	Ανάλυση οντολογιών γονιδίων (gene ontology analysis)	51
	3.3	Ανάλυση των μεταγραφικών παραγόντων (TFs)	54

3	.4 Επ 59	ιβεβαίωση των επιπέδων μεταγραφικών παραγόντων με real time RT-PCR		
3 π	9.5 Επαναπρογραμματισμός των miR-124+ISX9_iNs με τη χρήση των αυξητικών αραγόντων Shh και Fgf864			
	3.5.1	Μελέτη της μορφολογίας των κυττάρων64		
	3.5.2	Διερεύνηση του μοριακού προφίλ με real time RT-PCR		
	3.5.3 κύτταρο	Μελέτη των επιπέδων της πρωτεΐνης Gli1 στα επαναπρογραμματισμένα 1 73		
	3.5.4 κύτταρο	Μελέτη των επιπέδων της πρωτεΐνης Nurr1 στα επαναπρογραμματισμένα 1 76		
	3.5.5	Ηλεκτροφυσιολογική ανάλυση78		
4.	Συζήτησηε			
5.	Βιβλιογραφία			

## Περίληψη

Ως άμεσος επαναπρογραμματισμός (direct reprogramming) ορίζεται η διαδικασία επαγόμενης δια-διαφοροποίησης πλήρως διαφοροποιημένων σωματικών κυττάρων σε άλλο κυτταρικό τύπο, παρακάμπτοντας την ενδιάμεση πολυδύναμη κατάσταση. Όσον αφορά τον άμεσο επαναπρογραμματισμό προς νευρώνες, αυτοί οι επαγόμενοι νευρώνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την in vitro μελέτη νευροεκφυλιστικών ασθενειών καθώς και για την ανακάλυψη νέων προγνωστικών και διαγνωστικών δεικτών, καθώς και φαρμάκων. Επιπλέον, η αντικατάσταση χαμένων νευρώνων, μετά από τραύμα, νευροεκφυλισμό ή εγκεφαλικό επεισόδιο, μετά από άμεσο επαναπρογραμματισμό κυττάρων γλοίας προς επαγόμενους νευρώνες αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη κυτταρική θεραπευτική προσέγγιση σε in vivo επίπεδο. Για τους παραπάνω σκοπούς έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες για τον άμεσο επαναπρογραμματισμό αστροκυττάρων προς επαγόμενους νευρώνες με χρήση συνδυασμών μεταγραφικών παραγόντων, micro-RNAs και μικρών χημικών μορίων. Η επίδρασή των παραπάνω μορίων πραγματοποιείται τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε επιγενετικό επίπεδο στο κύτταρο. Στις μελέτες, οι οποίες διεξάγονται, παρατηρείται η ικανότητα των επαγόμενων κυττάρων προς το σχηματισμό συγκεκριμένων νευρωνικών υπότυπων με τους επαγόμενους νευρώνες να είναι λειτουργικοί και σε in vivo επίπεδο. Οı μηχανισμοί, οι οποίοι διέπουν τη διαδικασία του επαναπρογραμματισμού, ωστόσο, δε μας είναι ακόμη γνωστοί. Στην ομάδα μας, αρχικά εξετάσαμε το ρόλο ενός, σημαντικού κατά τη διαδικασία της νευρογένεσης, micro-RNA, του miR-124 και ενός μικρού νευρογενετικού μορίου, του ISX9, ως προς την ικανότητά τους να επαναπρογραμματίζουν άμεσα αστροκύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού ποντικού, μελετώντας παράλληλα τα μεταγραφικά δίκτυα, τα οποία διέπουν τη συγκεκριμένη διαδικασία. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των επαγόμενων νευρώνων με RNA-sequencing αποκάλυψε πως οι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι ρυθμίζονται σε αρχικό στάδιο κατά τη διαδικασία του επαναπρογραμματισμού, όπως οι Neurogenin2, NeuroD1, Tbr2 και Gsx2, συσχετίζονται άμεσα με την ανάπτυξη του πρόσθιου εγκεφάλου. Παρολ' αυτά, μετά την προσθήκη του ISX9 παρατηρήθηκε η αύξηση των επιπέδων γονιδίων, όπως τα Lmx1b, En1, Foxa1, Girk2 και DAT, τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξη του μεσεγκέφαλου και των ντοπαμινεργικών νευρώνων, κάτι το οποίο υποδεικνύει την ικανότητα επαναπρογραμματισμού προς νευρωνικούς υπότυπους άλλων περιοχών του εγκεφάλου, πέραν του πρόσθιου. Επιπλέον, στη

συγκεκριμένη ανάλυση παρατηρήθηκε επίσης, η μείωση των επιπέδων τόσο του Shh όσο και του βασικού μεταγραφικού παράγοντα-τελεστή του μονοπατιού του, Gli1, έπειτα από επαναπρογραμματισμό των κυττάρων μόνο με το miR-124 με επακόλουθη αύξηση των επιπέδων τους έπειτα από προσθήκη τους ISX9. Τα παραπάνω δεδομένα είχαν ως αποτέλεσμα τη σκέψη πως θα μπορούσε να καταστεί δυνατή η δημιουργία ενός πρωτοκόλλου, με τροποποίηση του υπάρχοντος, για τη δημιουργία νευρώνων του μεσεγκέφαλου και, συγκεκριμένα, τη δημιουργία ντοπαμινεργικών νευρώνων. Στο πλαίσιο αυτό στην παρούσα μελέτη, αρχικά, πραγματοποιήθηκε η επιβεβαίωση των επιπέδων των γονιδίων με real-time RT PCR και συνακόλουθα έγινε προσθήκη κατά τον επαναπρογραμματισμό των παραγόντων Shh και Fgf8 με στόχο την επαγωγή μονοπατιών δημιουργίας ντοπαμινεργικών νευρώνων. Οι επαγόμενοι νευρώνες με τεχνικές real-time RT PCR, ανοσοκυτταροχημείας αναλύθηκαν και ηλεκτροφυσιολογίας, ώστε να δειχθεί το κατά πόσο οι παράγοντες Shh και Fgf8 έχουν τη δυνατότητα ώθησης των κυττάρων προς τη ντοπαμινεργική μοίρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν, πως η ταυτόχρονη προσθήκη των Shh και Fgf8 ενισχύει την ωρίμανση και την πολυπλοκότητα των επαγόμενων νευρώνων ενώ σε μεταγραφικό επίπεδο παρατηρείται η μείωση των επιπέδων μεταγραφικών παραγόντων των ανώριμων ντοπαμινεργικών νευρώνων, όπως ο Lmx1b με ταυτόχρονη αύξηση δεικτών των ώριμων ντοπαμινεργικών νευρώνων, όπως ο DAT. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι κατέχουν σημαντικό ρόλο για την ανάπτυξη του πρόσθιου εγκεφάλου, όπως οι Tbr1 και Tbr2. Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν την τάση των επαγόμενων νευρώνων προς μία ντοπαμινεργική μοίρα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μία σειρά ηλεκροφυσιολογικών πειραμάτων, σύμφωνα με την οποία οι επαγόμενοι νευρώνες μετά από προσθήκη των Shh και Fgf8 είχαν καλύτερη απόκριση σε εκπολωτικά δυναμικά, ήταν λειτουργικοί, αφού παρουσίαζαν διαδοχικά δυναμικά ενέργειας μετά από διέγερση και τέλος είχαν τη δυνατότητα συμμετοχής σε δίκτυα νευρώνων, καθώς παρουσίαζαν και αυθόρμητη μετασυναπτική δραστηριότητα.

#### Abstract

Direct reprogramming involves the trans-differentiation of human somatic cells into induced neurons without the generation of induced pluripotent stem cells. These induced neurons can be used for the in vitro study of neurodegenerative diseases pathogenesis (disease-in-a-dish model) as well as for the discovery of new prognostic, diagnostic or therapeutic biomarkers for these diseases. Moreover, the replacement of lost neurons due to trauma, neurodegeneration or stroke by directly reprogramming resident glial cells into induced neurons holds great promise as an alternative therapeutic approach to brain transplantation. To this end, reprogramming of astrocytes to induced neurons has been well studied during the last years both in vitro and in vivo using combinations of transcription factors (TFs), chemical cocktails and miRNAs. These molecules can change the cell fate after inducing changes both at transcriptional or epigenetic level of the cell. There has been a great deal of studies indicating that directly reprogrammed induced neurons acquire specific neuronal subtypes, while they can be functional on an in vivo system. However, the underlying mechanisms that dictate the reprogramming process have been poorly addressed so far. In our group, se have investigated the role of the brain enriched miRNA, miR-124 and the small neurogenic molecule ISX9 in inducing neuronal reprogramming of cortical mouse astrocytes, focusing on the characterization of the transcriptional networks that instruct the process during in vitro reprogramming. Molecular characterization of early induced-neurons with RNA-seq has revealed that the major TFs upregulated early during the reprogramming process, namely Neurogenin2, NeuroD1, Tbr2 and Gsx2, are implicated in forebrain development. However, the transcriptomic analysis also revealed a set of highly upregulated genes attributed to the addition of ISX9. These genes are related to midbrain development and maturation of dopaminergic neurons (Lmx1b, En1, Foxa1, Girk2 and DAT), proposing the existence of an alternative route the induced-neuronal cells are potent to undergo following ISX9 addition in the reprogramming cocktail, other than obtaining a forebrain neuronal identity. Moreover, this analysis has also revealed that Shh as well as Gli1, which are major mediators of ventral brain identity, were downregulated after the addition of miR-124 alone, while they were upregulated after the addition of miR-124+ISX9. These findings prompted us to modify our protocol of direct reprogramming in order to create midbrain dopaminergic neurons. Firstly, we conformed with real time RT-PCR the levels of the

chosen genes and then we added Shh and Fgf8 to our previous protocol, in order to enhance dopaminergic neurons' production pathways. To this end the major aim of this study was to elucidate the role of Shh and Fgf8 in reinforcing the latent midbrain dopaminergic program of reprogrammed cells by real time RT-PCR, immunofluorescence and electrophysiological analysis. Our results indicate that addition of Shh along with Fgf8 enhances the maturation and morphological complexity of induced-neurons. Furthermore, the addition of these two factors seems to repress markers that relate with immature dopaminergic neurons' identity, such as Lmx1b while, it enhances the expression of mature dopaminergic markers, such as DAT. Importantly, it represses the cortical fate, as revealed by the downregulation of cortical markers, such as Tbr1 and Tbr2. As far as the electrophysiological analysis is concerned, our results indicate that the addition of Shh and Fgf8 in miR124/ISX9 reprogramming cocktail, boosts the formation of electrophysiologically active induced neurons-that can respond to external stimuli and participate to neuronal networks in vitro.

## Κατάλογος Συντομογραφιών

ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

**GABA**: γ – αμινοβουτυρικό οξύ

BBB: Blood Brain Barrier, αιματοεγκεφαλικός φραγμός

NSC: Neural Stem Cell, νευρικό βλαστικό κύτταρο

**IsO**: Isthmic organizer, ισθμός

Shh: Sonic hedgehog

Fgf8: Fibroblast Growth Factor 8

NPC: Neural Progenitor Cell, προγονικό νευρικό κύτταρο

VZ: Ventricular Zone, κοιλιακή ζώνη

SVZ: Subventricular Zone, υποκοιλιακή ζώνη

IPC: Intermediate Progenitor Cell, ενδιάμεσο προγονικό κύτταρο

RGC: Radial Glial Cell, κύτταρο ακτινωτής γλοίας

GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein

GLAST: Glutamate Aspartate Transporter

**BLBP**: Brain Lipid-Binding Protein

**PP**: Preplate, προφλοιϊκή πλάκα

MHB: Midbrain – hindbrain boundary, όριο μεσεγκεφάλου – οπίσθιου εγκεφάλου

FP: Floor Plate, εδαφιαίο πέταλο

VM: Ventral Midbrain, κοιλιακή μοίρα του μεσεγκέφαλου

mDA neurons: midbrain dopaminergic neurons, ντοπαμινεργικοί νευρώνες του μεσεγκέφαλου

IZ: Intermediate Zone, ενδιάμεση ζώνη

MZ: Mantle Zone, περιοχή του μανδύα

SGZ: Subgranular Zone, υποκοκκιώδης ζώνη

TAP: Transit - Amplifying Progenitor

DCX: Doublecortin

iPSCs: induced Pluripotent Stem Cells, επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα

iNs: Induced Neuronal Cells, επαγόμενα νευρωνικά κύτταρα

MEFs: Mouse Embryonic Fibroblasts, εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού

**ISX9**: Isoxazole 9, Ισοξαζόλη 9

**miR-124**: micro-RNA 124

HDAC: Histone Deacetylase, αποακετυλάση των ιστονών

**RISC**: RNA-induced silencing complex

**REST**: RE1 silencing transcription factor

iDANs: induced dopamine neurons, επαγόμενοι ντοπαμινεργικοί νευρώνες

NB: Neuroblast, νευροβλάστη

NC: Negative Control, αρνητικό δείγμα ελέγχου

**BDNF**: Brain Derived Neurotrophic Factor

GDNF: Glial cell line - Derived Neurotrophic Factor

### 1. Εισαγωγή

#### 1.1 Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ)

Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) μέρη του οποίου είναι εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός, αποτελείται από νευρώνες και νευρογλοιακά κύτταρα, με κάθε κατηγορία να κατέχει έναν ξεχωριστό ρόλο στη σύσταση και τη λειτουργία του. Οι νευρώνες λαμβάνουν και μεταφέρουν μηνύματα από κύτταρο σε κύτταρο μέσω των ενεργών συνάψεών τους με τη βοήθεια νευροδιαβιβαστών όπως η βιογενείς αμίνες (ντοπαμίνη, σεροτονίνη), το γλουταμικό οξύ, το γ – αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και η ακετυλοχολίνη. Τα νευρογλοιακά κύτταρα καταλαμβάνουν το 50% του συνολικού όγκου εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού και περιλαμβάνουν τα ολιγοδενδροκύτταρα, τα αστροκύτταρα και τα μικρογλοιακά κύτταρα. Τα πρώτα έρχονται σε άμεση επαφή με τους νευρώνες και τους μονώνουν (στρώμα μυελίνης) αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο την ταχύτητα της νευρικής ώσης. Τα αστροκύτταρα προστατεύουν τους νευρώνες, απομακρύνοντας από το περιβάλλον τους τοξικές ουσίες, ανταλλάσσουν θρεπτικές ουσίες και απομακρύνουν, επιπλέον, νευροδιαβιβαστές από το γύρω περιβάλλον. Τέλος, τα μικρογλοιακά κύτταρα, τα οποία είναι κύτταρα μη νευρωνικής προέλευσης, αποτελούν το ανοσοποιητικό σύστημα του εγκεφάλου, καθώς κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος, δεν έχουν τη δυνατότητα να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Blood Brain Barrier, BBB) ώστε να εκδηλώσουν ανοσολογική απόκριση στο ΚΝΣ. Εκτός από τις παραπάνω κατηγορίες κυττάρων υπάρχει και ένας πληθυσμός πολυδύναμων κυττάρων, τα νευρικά βλαστικά κύτταρα (Neural Stem Cells, NSCs), τα οποία, τόσο στην εμβρυική όσο και στην ενήλικη ζωή, δίνουν γένεση και ανανεώνουν τους προαναφερθέντες κυτταρικούς πληθυσμούς [1].

#### 1.2 Νευρογένεση κατά την εμβρυική ανάπτυξη

#### 1.2.1 Σχηματισμός και οργάνωση των δομών του εγκεφάλου

Στα σπονδυλωτά, ο σχηματισμός του ΚΝΣ αρχίζει όταν σε μέρος του εμβρυικού εξωδέρματος προάγεται η νευρική διαφοροποίηση, κατά την οποία το εξώδερμα αναδιπλώνεται με αποτέλεσμα το σχηματισμό του νευρικού σωλήνα, ο οποίος διαιρείται κατά τον πρόσθιο - οπίσθιο άξονα, σε τέσσερις κύριες περιοχές, τον πρόσθιο εγκέφαλο (forebrain), το μεσεγκέφαλο (midbrain), τον οπίσθιο εγκέφαλο (hindbrain) και το νωτιαίο μυελό (spinal cord). Στη συνέχεια της ανάπτυξης, οι τρεις πρώτες περιοχές διαιρούνται περαιτέρω με αποτέλεσμα το σχηματισμό πέντε περιοχών. Συγκεκριμένα, ο πρόσθιος εγκέφαλος διαφοροποιείται στον τελεγκέφαλο (telencephalon), ο οποίος θα δώσει τον εγκεφαλικό φλοιό και το διεγκέφαλο (diencephalon), ο μεσεγκέφαλος διατηρείται ως έχει και ο οπίσθιος εγκέφαλος διαφοροποιείται σε μετεγκέφαλο (metencephalon) και μυελεγκέφαλο (myelencephalon). Ακολουθεί καθορισμός των περιοχών κατά τον ραχιαίο - κοιλιακό άξονα και ολοκλήρωση της διαφοροποίησης των δομικών μερών του ενήλικου εγκεφάλου [2].

Όσον αφορά τον προσδιορισμό των περιοχών σε πρόσθιο – οπίσθιο άξονα, τα δύο κέντρα οργάνωσης είναι η πρόσθια άκρη της νευρικής πλάκας (anterior neural ridge) και ο ισθμός (isthmic organizer, IsO). Η πρόσθια νευρική πλάκα επάγει τα χαρακτηριστικά του πρόσθιου εγκεφάλου μέσω της έκκρισης των μορίων χορδίνη (chordin) και νογγίνη (noggin). Ο ισθμός, ο οποίος εντοπίζεται μεταξύ μεσεγκέφαλου και οπίσθιου εγκεφάλου, είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη των δομών του μεσεγκέφαλου και του μετεγκέφαλου. Η αρχική ρύθμιση συμβαίνει μέσω της απελευθέρωσης σηματοδοτικών μορίων (Wnt1, Fgf8), με το FGF8 να αποτελεί βασικό μόριο, το οποίο μεσολαβεί στην επαγωγή της δραστηριότητας του ισθμού [3]. Επιπλέον, υπάρχει έκφραση μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι Otx2 και Gbx2, οι οποίοι δρουν ανταγωνιστικά για τη ρύθμιση της θέσης του ισθμού αλλά δεν απαιτούνται για την επαγωγή της έκφρασης των Fgf8 και Wnt1 [4].

Αφού ολοκληρωθεί ο πρόσθιος – οπίσθιος καθορισμός ακολουθεί ο ραχιαίο κοιλιακός, ο οποίος επίσης ρυθμίζεται μέσω εκκρινόμενων σηματοδοτικών παραγόντων. Όσον αφορά τη ραχιαία μοίρα, στον καθορισμό της συμβάλλουν πρωτεΐνες της υπεροικογένειας του TGF-β (BMP4, BMP7, dorsalin, activin), οι οποίες εκκρίνονται από το εξώδερμα, ραχιαία του νευρικού σωλήνα. Αντίθετα, ο παράγοντας Sonic Hedgehog (Shh), ο οποίος παράγεται στη νωτοχορδή αποτελεί βασικό παράγοντα επαγωγής της κοιλιακής κυτταρικής μοίρας. Η κλίση συγκέντρωσης των σηματοδοτικών αυτών μορίων ελέγχει τη διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων

13

μέσω της ρύθμισης της έκφρασης πολλών μεταγραφικών παραγόντων όπως είναι οι Pax6, Pax7, Nkx6.2, Irx3 και Mafb [5-6].

#### 1.2.2 Η ανάπτυξη του εγκεφαλικού φλοιού

Στα αρχικά στάδια της γένεσης του εγκεφαλικού φλοιού υπάρχει ένας ομοιογενής πληθυσμός νευροεπιθηλιακών κυττάρων, ο οποίος διαφοροποιείται κατά την πορεία της εμβρυικής ανάπτυξης. Τα προγονικά νευρικά κύτταρα (Neural Progenitor Cells, NPCs) εντοπίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφαλικού φλοιού κατά την ανάπτυξή του. Τα ραχιαία νευρικά προγονικά κύτταρα (apical progenitor cells), τα οποία αποτελούν και τον αρχικό πληθυσμό προγονικών κυττάρων κατά την εμβρυική ανάπτυξη, βρίσκονται στην κοιλιακή ζώνη (Ventricular Zone, VZ), η οποία αποτελεί την κύρια ζώνη νευρογένεσης κατά τη δημιουργία του εγκεφαλικού φλοιού. Μέσα από σειρά διαιρέσεων των κυττάρων αυτών δημιουργούνται, εκτός από διαφοροποιημένα κύτταρα, τα βασικά νευρικά προγονικά κύτταρα (basal progenitor cells), τα οποία αποικίζουν τη δεύτερη ζώνη νευρογένεσης, την υποκοιλιακή ζώνη (Subventricular Zone, SVZ) [7].

Κατά την ανάπτυξη του εγκεφαλικού φλοιού, τα NPCs πραγματοποιούν είτε συμμετρικές είτε ασύμμετρες διαιρέσεις, μέσω των οποίων επιτυγχάνεται τόσο η αυτοανανέωση όσο και η διαφοροποίησή τους. Κατά τη συμμετρική διαίρεση, ένα NPC διαιρείται δίνοντας γένεση σε δύο θυγατρικά κύτταρα, τα οποία είναι όμοια μεταξύ τους αλλά δεν είναι κατ' ανάγκη όμοια με το κύτταρο προέλευσης. Έτσι, έχουν περιγραφεί διαιρέσεις, κατά τις οποίες τα θυγατρικά κύτταρα είναι όμοια τόσο μεταξύ τους όσο και με το μητρικό αλλά και συμμετρικές νευρογενετικές διαιρέσεις, όπου ένα νευρικό προγονικό κύτταρο, συνήθως ένα βασικό ενδιάμεσο προγονικό κύτταρο (Intermediate Progenitor Cell, IPC), δίνει γένεση σε δύο νευρώνες. Αντίθετα, στον ασύμμετρο τύπο διαίρεσης τα κύτταρα, τα οποία προκύπτουν, δεν είναι όμοια μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, κατά την ασύμμετρη διαίρεση μπορεί είτε ένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα να είναι πανομοιότυπο με το μητρικό είτε και τα δύο θυγατρικά κύτταρα να είναι διαφορετικά τόσο μεταξύ τους όσο και από το προγονικό κύτταρο. Μία τέτοια περίπτωση είναι και η διαίρεση ενός κυττάρου ακτινωτής γλοίας (Radial Glial Cell, RGC) σε ένα βασικό νευρικό πρόδρομο κύτταρο και ένα νευρώνα [8]. Η εμβρυική νευρογένεση στον εγκέφαλο ποντικού ξεκινά την 9<sup>η</sup>-10<sup>η</sup> μέρα (E9-E10) με το μετασχηματισμό τον νευροεπιθηλιακών κυττάρων της κοιλιακής και υποκοιλιακής ζώνης σε RGCs. Η μετάβαση αυτή χαρακτηρίζεται από την έκφραση αστρογλοιακών δεικτών, όπως είναι οι πρωτεΐνες GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), GLAST (Glutamate Aspartate Transporter), βιμεντίνη (vimentin) και BLBP (Brain Lipid-Binding Protein) [7,9] και συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων, ιδιαίτερα του Pax6 [10]. Τα RGCs, αρχικά λειτουργούν ως NPCs, τα οποία είτε παράγουν άμεσα νεογέννητους νευρώνες είτε παράγουν IPCs που με τη σειρά τους δημιουργούν νευρώνες μέσω συμμετρικής διαίρεσης [7]. Έτσι, τα RGCs συμβάλλουν στη νευρογένεση τόσο άμεσα όσο και έμμεσα. Το ποια θα είναι η απόκριση είναι αποτέλεσμα κυτταρο-ειδικής έκφρασης συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων. Η ίδια ετερογένεια διατηρείται και στα νευρικά βλαστικά κύτταρα, τα οποία συμβάλλουν στη μετεμβρυική/ενήλικη νευρογένεση.

Η χρονική στιγμή της γένεσης του κάθε νευρώνα, καθώς και η θέση του στο χώρο, καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τον υπότυπό του, έτσι ώστε οι νευρώνες, οι οποίοι δημιουργούνται νωρίτερα κατά την ανάπτυξη καταλαμβάνουν τα εσωτερικά στρώματα του φλοιού (deep layers), ενώ αυτοί που δημιουργούνται μετέπειτα δομούν τα ανώτερα στρώματά του (upper layers) (**Εικόνα 1.1**) με ένα μηχανισμό γνωστό ως inside-out. Έτσι, ο φλοιός δημιουργείται από μέσα προς τα έξω και τελικά, δομείται από έξι οριζόντιες στοιβάδες (layers I-VI). Η τελική ταυτότητα αλλά και η θέση του κάθε κυττάρου ρυθμίζεται από ειδικούς, για την κάθε στοιβάδα, μεταγραφικούς παράγοντες [11].



Εικόνα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση της νευρογένεσης στο φλοιό: Οι κύριοι τύποι NPCs και οι απόγονοι, οι οποίοι προκύπτουν, αναπαριστώνται με διαφορετικά χρώματα. Εδώ απεικονίζονται μόνο μερικά από τα πιθανά αποτελέσματα διαίρεσης των κυττάρων [12].

Στα τελικά στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης (E18 – E21 στο ποντίκι) λαμβάνει χώρα η γλοιογένεση, κατά την οποία τα RGCs προεκβάλλουν στο ανώτερο στρώμα του φλοιού, όπου δίνουν γένεση τόσο στα αστροκύτταρα όσο και στα ολιγοδενδροκύτταρα [12].

# 1.2.3 Μηχανισμοί ρύθμισης της κυτταρικής ταυτότητας κατά την ανάπτυξη του εγκεφαλικού φλοιού

Κατά τη νευρογένεση στο φλοιό ενεργοποιείται μια ομάδα σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία κατέχουν σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της ταυτότητας των κυττάρων με κυριότερα τα μονοπάτια Notch, Wnt και Shh.

Το μονοπάτι Notch κατέχει βασικό ρόλο τόσο κατά την εμβρυική όσο και κατά την ενήλικη νευρογένεση, συμμετέχοντας στον έλεγχο του αριθμού των NPCs. Η ενεργοποίησή του έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση των Hes γονιδίων, τα οποία με τη σειρά τους καταστέλλουν την έκφραση των προνευρωνικών γονιδίων, Neurogenin (Ngn 1/2) και Ascl1 (ή Mash1). Αυτή η καταστολή έχει ως αποτέλεσμα τα NPCs να διατηρούνται σε κατάσταση πολλαπλασιασμού και να μην υφίσταται νευρωνική διαφοροποίηση. Ωστόσο, τα επίπεδα έκφρασης του Hes1 μεταβάλλονται στον αναπτυσσόμενο φλοιό λόγω ενός βρόγχου αρνητικής ανάδρασης, με τη μεταβολή αυτή να έχει ως αποτέλεσμα την επακόλουθη μεταβολή της έκφρασης της Ngn2. Έτσι, ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αυτών ρυθμίζεται ο πολλαπλασιασμός των RGCs έναντι της διαφοροποίησης. [12].

Επιπλέον, βασικό ρόλο στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των NPCs κατέχει το μονοπάτι Wnt. Ο ρόλος του μονοπατιού Wnt είναι διττός, αφού αρχικά προωθεί τις συμμετρικές διαιρέσεις των RGCs, αλλά σε μεταγενέστερο στάδιο επάγει τη νευρωνική διαφοροποίηση [12]. Στην περίπτωση της προώθησης της κυτταρικής διαίρεσης, μετά την ενεργοποίηση του μονοπατιού η βκατενίνη (b-catenin) μετατοπίζεται στον πυρήνα και σε συνεργασία με τους μεταγραφικούς παράγοντες LEF/TCF προάγει τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλει τη διαφοροποίηση των RGCs [13]. Αντίθετα, η επαγωγή της νευρωνικής διαφοροποίησης μετά από ενεργοποίηση του Wnt μονοπατιού πραγματοποιείται μέσω της έκφρασης του N-myc, η οποία οδηγεί σε καταστολή του Notch μονοπατιού. [12].

Τέλος, άλλο ένα σημαντικό μονοπάτι είναι αυτό του Sonic Hedgehog (Shh), μέσω του οποίου προωθούνται οι συμμετρικές διαιρέσεις των RGCs. Η προώθηση αυτή γίνεται μέσω της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Hes1, ο οποίος ρυθμίζεται κυρίως από το μονοπάτι Notch [14]. Ωστόσο, σε μετέπειτα στάδια της νευρογένεσης το μονοπάτι Shh απενεργοποιείται με ταυτόχρονη αύξηση του κατασταλτικού μορίου Gli3, κάτι το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή τόσο των IPCs όσο και διαφοροποιημένων νευρώνων [15].

Τα παραπάνω μονοπάτια έχουν ως αποτέλεσμα την έκφραση ή καταστολή πολλών μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι καθορίζουν τελικά τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των διαιρούμενων NPCs στον αναπτυσσόμενο εγκεφαλικό φλοιό. Βασικό ρόλο κατά τη νευρογένεση κατέχει ο μεταγραφικός παράγοντας Pax6. Ο Ραχ6 προάγει τον πολλαπλασιασμό των RGCs (μέσω της αλληλεπίδρασης με τους μεταγραφικούς παράγοντες Sox2 και Hes1) αλλά και τη νευρωνική διαφοροποίηση μετά από επαγωγή προνευρωνικών μεταγραφικών παραγόντων (Brn1/2, Sox4, Sox11), οι οποίοι σηματοδοτούν το νευρωνικό προγραμματισμό. Αυτές οι αντιτιθέμενες επιδράσεις φαίνεται πως συμβαίνουν λόγω εναλλακτικού ματίσματος του mRNA του Pax6 [12]. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η μετάβαση από τα RGCs στα IPCs κατά τη δημιουργία του νεοφλοιού σχετίζεται με την αύξηση της δραστηριότητας του μεταγραφικού παράγοντα Tbr2 και την ταυτόχρονη μείωση του Pax6, ενώ κατά την επακόλουθη μετάβαση των IPCs σε ώριμους νευρώνες η δραστηριότητα του Tbr2 μειώνεται, ενώ παράλληλα αυξάνεται η δραστηριότητα του μεταγραφικού παράγοντα Tbr2 και την ταυτόχρονη της παραγόντων μπορεί να τροποποιηθεί στην περίπτωση των νευρώνων της προφλοιϊκής πλάκας (preplate neurons, PP), όπου υπάρχει προσωρινή συνέκφραση των Tbr2 και Tbr1 κατά την απ' ευθείας μετατροπή των RGCs σε ώριμους νευρώνες στους οποίους το Tbr2 εκφράζεται για σύντομο χρονικό διάστημα ή και καθόλου [16].

Τέλος, μία μεγάλη ομάδα μεταγραφικών παραγόντων, η οποία συμμετέχει στην ανάπτυξη του εγκεφαλικού φλοιού και τη νευρογένεση, είναι οι προνευρωνικοί (proneural) μεταγραφικοί παράγοντες του μοτίβου bHLH (basic-helix-loop-helix). Κατά τα πρώιμα στάδια της νευρογένεσης οι μεταγραφικοί παράγοντες Hes1 και Hes3 προάγουν τις συμμετρικές διαιρέσεις των νευροεπιθηλιακών κυττάρων. Στη συνέγεια, τα νευροεπιθηλιακά κύτταρα δίνουν γένεση στα RGCs, τα οποία με τη σειρά τους αυξάνονται σε αριθμό μέσω της δράσης των μεταγραφικών παραγόντων Hes1 και Hes5. Ακολούθως, με τη βοήθεια των προνευρωνικών μεταγραφικών παραγόντων Asell και Ngn2, τα RGCs αρχίζουν να πραγματοποιούν ασύμμετρες διαιρέσεις, οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό νευρώνων. Συνακόλουθα, ο μεταγραφικός παράγοντας Hes6 ενισχύει την επίδραση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων, αφού ανταγωνίζεται τον Hes1 ρυθμίζοντας τον αρνητικά. Τέλος, μετά τη διαφοροποίηση σε νευρώνες οι προνευρωνικοί παράγοντες καταστέλονται και ακολουθεί η διαφοροποίηση των RGCs/IPCs σε γλοιακά κύτταρα (αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα) κατά τη διάρκεια της γλοιογένεσης, διαδικασία η οποία προάγεται μέσω της δράσης των μεταγραφικών παραγόντων Hes1 και Hes5 [17].

#### 1.2.4 Η ανάπτυξη του εμβρυικού μεσεγκεφάλου και μηχανισμοί ρύθμισης

Κατά τη δημιουργία του νευρικού σωλήνα σχηματίζονται δύο κέντρα σηματοδότησης: ο ισθμός (IsO), ο οποίος ορίζει το όριο μεσεγκέφαλου – οπίσθιου εγκεφάλου (midbrain – hindbrain boundary, MHB) και το εδαφιαίο πέταλο (floor plate, FP), το οποίο ελέγχει το κοιλιακό τμήμα του νευρικού σωλήνα [18]. Κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης, η συνδυασμένη δράση μεταγραφικών παραγόντων και μορφογόνων των δύο αυτών κέντρων ελέγχει πολλαπλές λειτουργίες, όπως η τοπική οριοθέτηση της κοιλιακής μοίρας του μεσεγκεφάλου (ventral midbrain, VM), η εξειδίκευση και ο πολλαπλασιασμός των προγονικών ντοπαμινεργικών νευρώνων του μεσεγκεφάλου (midbrain dopaminergic, mDA, progenitors) και η νευρογένεση των mDA νευρώνων καθώς και η διαφοροποίηση και επιβίωση τους.

Ο σχηματισμός του IsO στο MHB την E7.5 ξεκινά με τη συντονισμένη έκφραση και την αμοιβαία καταστολή των μεταγραφικών παραγόντων Otx2 στον μεσεγκέφαλο και Gbx2 στον οπίσθιο εγκέφαλο [19-21]. Οι συγκεκριμένοι παράγοντες ελέγχουν τη διαμόρφωση του MHB μέσω ρύθμισης της έκφρασης δύο μορφογόνων, του Wnt1 στο μεσεγκέφαλο και του Fgf8 στον οπίσθιο εγκέφαλο [22,23].

Ένα δεύτερο σημαντικό γεγονός είναι ο καθορισμός των περιοχών στο νευρικό σωλήνα με τη βοήθεια του μορφογόνου Shh. Το Shh, το οποίο αρχικά εκκρίνεται από τη νωτοχορδή προσδιορίζει το FP, μέσω έναρξης της έκφρασης του Foxa2 την E8 στα ποντίκια [24,25]. Το Foxa2 παίζει βασικό ρόλο στο δίκτυο του Shh και απαιτείται τόσο για την ανάπτυξη του FP και της νωτοχορδής όσο και της κοιλιακής διαμόρφωσης [26,27]. Μία κλίση συγκέντρωσης του Shh στο FP ρυθμίζει τη διαμόρφωση του ραχιαιο-κοιλιακού άζονα. Η κοιλιακοί πρόγονοι στο εδαφιαίο πέταλο του μεσεγκέφαλου (midbrain floor plate mFP, progenitors) εκτίθενται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις Shh, με αποτέλεσμα την έκφραση διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων σε σχέση με τα ραχιαία κύτταρα, τα οποία εκτίθενται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (**Εικόνα 1.2**)[28].

19



Εικόνα 1.2: Αναπαράσταση γονιδίων και μονοπατιών, τα οποία συμμετέχουν στην ανάπτυξη του μεσεγκεφάλου και τη δημιουργία των ντοπαμινεργικών νευρώνων.

Οσον αφορά τους mDA νευρώνες, αυτοί προέρχονται από προγονικά κύτταρα τα οποία ρυθμίζονται μέσω της έκφρασης των μονοπατιών Shh ή Wnt1, κάτι το οποίο υποδηλώνει ότι τα συγκεκριμένα προγονικά κύτταρα αποτελούν συστατικά τόσο του mFP όσο και του IsO. Επιπλέον, σε αυτά τα κύτταρα εκφράζονται τόσο τα Foxa1/2 όσο και το Otx2, τα οποία ρυθμίζουν την έκφραση δύο μεταγραφικών παραγόντων, των Lmx1b και Lmx1a. Το Lmx1b είναι απαραίτητο για τη διαφοροποίηση των προγονικών mDA κυττάρων [29], ενώ το Lmx1a είναι απαραίτητο τόσο για τον προσδιορισμό των mDA νευρώνων στο mFP όσο και, μέσω της έκφρασης του Msx1 (muscle segment homeobox homolog 1), για την καταστολή άλλων κυτταρικών τύπων [30,31]. Έτσι, η συντονισμένη δράση των δικτύων Shh-Foxa2 και Otx2-Wnt1-Lmx1a/Msx1 είναι απαραίτητη όχι μόνο για τον προσδιορισμό του mFP αλλά και για την καταστολή εναλλακτικών κυτταρικών ταυτοτήτων.

Συνακόλουθα, τα Lmx1a/b ρυθμίζουν άμεσα τη μεταξύ τους έκφραση αλλά και οδηγούν σε έκφραση τόσο των En1, En2, Wnt1, Msx1 όσο και δύο βασικών γονιδίων, τα οποία εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των mDA νευρώνων, των Nurr1 (Nr4a2, nuclear receptor 4a2) και Pitx3 (pituitary homeobox 3, or paired-like homeodomain transcription factor 3). Η νευρογένεση των mDA νευρώνων λαμβάνει χώρα στην κοιλιακή ζώνη του mFP, όπου προγονικά mDA κύτταρα διαιρούνται ώστε να δώσουν γένεση σε μεταμιτωτικά κύτταρα, τα οποία εκφράζουν το Nurr1. Αυτά τα κύτταρα μεταναστεύουν από την ενδιάμεση ζώνη (intermediate zone, IZ) στην περιοχή του μανδύα (mantle zone, MZ), πορεία κατά την οποία διαφοροποιούνται σε TH<sup>+</sup>(tyrosine hydroxylase) ώριμους νευρώνες. Η γένεση αυτών των νευρώνων ελέγχεται από τα γονίδια Ascl1 και Ngn2, τα οποία εκφράζονται στη VZ του mFP. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η έκφραση της Ngn2 είναι απαραίτητη για τη νευρογένεση, ενώ το Ascl1 είναι ικανό να αντισταθμίσει μόνο μερικώς την απώλεια της Ngn2 [32]. Αυτά τα δύο γονίδια ρυθμίζονται άμεσα ή έμμεσα από τα δίκτυα Shh-Foxa2 και Lmx1a/b-Wnt1-Otx2.

Τέλος, στους μεταμιτωτικούς νευρώνες το Nurr1 ρυθμίζει την έκφραση αρκετών γονιδίων, τα οποία ορίζουν έναν ώριμο mDA νευρώνα, συμπεριλαμβανομένων των TH, Slc18a2/Vmat2 (solute carrier family-18 member-2/vesicular monoamine transporter-2), Slc6a3/Dat (solute carrier family-6 member-3/dopamine transporter), Ddc/Aadc, Ret (c-ret proto-oncogene), BDNF (brain-derived neurotrophic factor) και Cdkn1c (cyclin-dependent kinase inhibitor 1C) (**Εικόνα 1.3**) [33].



Εικόνα 1.3: Τα RGCs εκφράζουν μορφογόνα και μεταγραφικούς παράγοντες, ορισμένοι εκ των οποίων εκφράζονται επίσης σε νευροβλάστες (κίτρινο) και mDA νευρώνες. ±: χαμηλά επίπεδα έκφρασης, +: έκφραση, Α: έκφραση κυρίως σε πρόσθιο μεσεγκέφαλο, Ρ: έκφραση κυρίως σε οπίσθιο μεσεγκέφαλο.

#### 1.3 Ενήλικη νευρογένεση

Στον εγκέφαλο των ενήλικων θηλαστικών, υπάρχουν νευρικά βλαστικά κύτταρα (Neural Stem Cells, NSCs), τα οποία παραμένουν κατά τη μετεμβρυική και ενήλικη ζωή. Οι νέοι νευρώνες παράγονται σε δύο ανατομικές περιοχές, την υποκοιλιακή ζώνη

(subventricular zone, SVZ) και την υποκοκκιώδη ζώνη (subgranular zone, SGZ) της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου. Η νευρογένεση στην περιοχή του ιππόκαμπου συμβάλει στη μάθηση και τη μνήμη και μπορεί να εμπλέκεται σε νευροψυχιατρικές διαταραχές, ενώ νευρώνες, οι οποίοι προκύπτουν από την SVZ μεταναστεύουν στον οσφρητικό λοβό, βοηθώντας στη διάκριση και μνήμη οσμών [34]. Τέλος, σε κάποιες περιπτώσεις τα NSCs της SVZ μπορούν να λειτουργήσουν και ως πρόγονοι ολιγοδενδροκυττάρων στον ενήλικο εγκέφαλο [35].

Όσον αφορά τη νευρογένεση στην SGZ, εκεί υπάρχουν πληθυσμοί προγονικών κυττάρων, οι οποίοι ποικίλουν ως προς το χρόνο της κυτταρικής διαίρεσης. Τα αργά διαιρούμενα ή σε κατάσταση ηρεμίας (quiescent) NSCs (τύπου 1) έχουν μία μοναδική ακτινική απόληξη και εκφράζουν δείκτες όπως το GFAP και η νεστίνη (Nestin) [36,37]. Τα τελευταία χρόνια έχει χαρακτηριστεί και μία δεύτερη κατηγορία κυττάρων τύπου 1, με μικρές οριζόντιες απολήξεις [38]. Αυτά τα κύτταρα φαίνεται να διαιρούνται πιο γρήγορα. Από τη στιγμή που τα NSCs σε κατάσταση ηρεμίας ξεκινούν να διαιρούνται, δίνουν γένεση στα κύτταρα TAPs (transit-amplifying progenitors, τύποι  $2\alpha$  και  $2\beta$ ), τα οποία έχουν τη δυνατότητα διαφοροποίησης σε νευρώνες και αστροκύτταρα. Ο παράγοντας Sox2 ταυτοποιεί τα κύτταρα τύπου 2α (καθώς και τα κύτταρα τύπου 1), τα οποία μεταβαίνουν σε TAPs ώριμου σταδίου (τύπος 2β) ή σε νευροβλάστες (τύπος 3). Τα κύτταρα τύπου 2α, 2β είναι θετικά για τους δείκτες νεστίνη και DCX (doublecortin, δείκτης ανώριμων νευρώνων), ενώ τα κύτταρα τύπου 3 εκφράζουν μόνο DCX. Τέλος, παρατηρείται μείωση των επιπέδων της DCX με παράλληλη αύξηση των επιπέδων της (calretinin) και της NeuN, καθώς οι ανώριμοι νευρώνες καλρετινίνης διαφοροποιούνται σε ώριμους γλουταματεργικούς νευρώνες (Εικόνα 1.4) [34].

Τα συστατικά του μικροπεριβάλλοντος, συμπεριλαμβανομένων τόσο των κυττάρων του περιβάλλοντος (κύτταρα γλοίας), όσο και εκκρινόμενων μορίων επηρεάζουν άμεσα τα NSCs. Μέσα στη φωλεά, τόσο η παρουσία των νευρώνων στο μικροπεριβάλλον όσο και των αστροκυττάρων επηρεάζουν την αυτοανανέωση και τη διαφοροποίησή των NSCs. Σύμφωνα με έρευνες φαίνεται πως σήματα γειτονικών νευρώνων ωθούν τα NSCs στη διαφοροποίηση προς GABAεργικούς νευρώνες [39,40]. Αντίστοιχα, η παρουσία των αστροκυττάρων αλλά και ενδοθηλιακών κυττάρων και ινοβλαστών προάγει επίσης τη νευρωνική διαφοροποίηση [41,42].

Όσον αφορά την ενήλικη νευρογένεση, γνωρίζουμε λιγότερα πράγματα για το δίκτυο των μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι δρουν κατά τη διαφοροποίηση των NSCs. Για να ξεκινήσει η νευρογένεση τα κύτταρα τύπου 1 διαιρούνται ώστε να προκύψουν από αυτά τα TAPs. Σε αυτή τη μετάβαση ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος δρα είναι ο Sox2 (SRY-related HMG box 2). Έχει δειχθεί πως η διαγραφή του γονιδίου στα ενήλικα NSCs της SGZ έχει ως αποτέλεσμα την εξάντληση των κυττάρων τύπου 1 και 2 και τη μείωση των ανώριμων DCX+ νευρώνων [43]. Επιπρόσθετα, άλλος ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος εκφράζεται στα κύτταρα τύπου 1 και στα πρώιμου σταδίου τύπου 2 είναι ο Pax6. Ο συγκεκριμένος παράγοντας φαίνεται να παίζει ρόλο στον έλεγχο του αριθμού των ενήλικων NSCs ωστόσο ο ακριβής ρόλος του στην ενήλικη νευρογένεση στην SGZ παραμένει άγνωστος [34].

Άλλος ένας αξιοσημείωτος μεταγραφικός παράγοντας είναι ο Ascl1, ο οποίος εκφράζεται στα NSCs τύπου 1 και στην πλειονότητα των κυττάρων τύπου 2. Μετά από έρευνες έχει βρεθεί πως ο συγκεκριμένος παράγοντας εκφράζεται μόνο σε κύτταρα της νευρωινικής γενεαλογίας και όχι σε αστροκύτταρα ή ολιγοδενδροκύτταρα [44,45]. Ωστόσο, πολύ ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως η υπερέκφρασή του οδηγεί στη δημιουργία ολιγοδενδροκυττάρων [46], γεγονός το οποίο υποδηλώνει πως ο Ascl1 είναι σημαντικός για τον έλεγχο της κυτταρικής μοίρας, χωρίς ακόμα να γνωρίζουμε τον ακριβή του ρόλο στη νευρογένεση στην SGZ.

Άλλοι παράγοντες είναι ο FoxO3 (forkhead domain transcription factor), ο οποίος εκφράζεται σε Sox2<sup>+</sup> κύτταρα. Έχει δειχθεί πως η απουσία του οδηγεί σε αποτυχία των NSCs να επιστρέψουν σε κατάσταση ηρεμίας (quiescent state), γεγονός το οποίο οδηγεί τελικά στην εξάντλησή τους [47]. Επιπρόσθετα, άλλος ένας παράγοντας, ο REST (RE1 silencing transcription factor) εκφράζεται στα NSCs με σκοπό την αναστολή γονιδίων, τα οποία προωθούν τη νευρογένεση (όπως το Ascl1) και την επακόλουθη διατήρηση της ομάδας των ενήλικων NSCs. Τέλος, ο παράγοντας TLX είναι απαραίτητος τόσο για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων τύπου 2 [48].

Η μετάβαση από κύτταρα τύπου 1 σε TAPs και νευροβλάστες συνοδεύεται με έκφραση του παράγοντα Ngn2 και του παράγοντα Tbr2 (T-box transcription factor). Η έκφρασή τους ξεκινά σε έναν υποπληθυσμό των Sox2 /Pax6 /Ascl1 τύπου 2α κυττάρων και κορυφώνεται όταν τα TAPs ωριμάζουν προς κύτταρα τύπου 3, ενώ στη συνέχεια η έκφραση του Ngn2 αρχίζει να μειώνεται πριν τη μείωση του Tbr2. Ενώ ο ακριβής ρόλος των Ngn2/ Tbr2 στην ενήλικη νευρογένεση της SGZ δεν είναι ακόμη γνωστός, εντούτοις η απαραίτητη παρουσία τους για τη δημιουργία γλουταματεργικών νευρώνων κατά την εμβρυική ανάπτυξη υποδηλώνει πως οι συγκεκριμένοι παράγοντες είναι πιθανό και εδώ να διαδραματίζουν πολύ σημαντικούς ρόλους [34].

Καθώς τα TAPs συνεχίζουν τη διαφοροποίησή τους προς ώριμους νευρώνες υπάρχει μία διαφορετική ομάδα μεταγραφικών παραγόντων, η οποία ελέγχει τα μεταγενέστερα στάδια της νευρογένεσης. Η NeuroD1 εκφράζεται σε κύτταρα τύπου 2b και τύπου 3, οδηγώντας στη διαφοροποίηση και την επιβίωση των νευρικών πρόδρομων κυττάρων [49]. Επιπλέον, μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας Sox παίζουν βασικό ρόλο στην ωρίμανση των TAPs προς νευρώνες. Οι Sox3 και Sox11 εκφράζονται σε όψιμου σταδίου DCX<sup>+</sup> κύτταρα και η έκφρασή τους αναστέλλεται στους ώριμους NeuN νευρώνες [50,51]. Όσον αφορά το Sox11 έχει δειχθεί πως η υπερέκφρασή του στην SGZ είναι αρκετή για την προαγωγή της νευρωνικής διαφοροποίησης, η οποία σχετίζεται με αύξηση της έκφρασης της DCX και έκφραση της πρωτεΐνης MAP2AB (neuronal microtubule-associated protein) [51].

Επιπρόσθετα, ο μεταγραφικός παράγοντας FoxG1, ο οποίος αποτελεί καταστολέα της έκφρασης, εκφράζεται στα TAPs αλλά όχι στα NSCs, τα οποία βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας. Λειτουργικά, το FoxG1 φαίνεται να απαιτείται για την ενήλικη νευρογένεση στον ιππόκαμπο. Σε FoxG1 -/- ποντίκια παρατηρήθηκε τόσο μείωση του μεγέθους της οδοντωτής έλικας όσο και μειωμένοι αριθμοί των κυττάρων τύπου 3, υποδηλώνοντας πως το FoxG1 εμπλέκεται τόσο στη ρύθμιση των προγονικών κυττάρων όσο και στην ωρίμανση των νεογέννητων νευρώνων [52].

Εκτός από τη NeuroD1 και τον FoxG1, υπάρχουν και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι έχουν αποδειχτεί εξαιρετικά σημαντικοί τόσο για την επιβίωση όσο και για την ωρίμανση των νέων νευρώνων. Ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος δείκτης των ώριμων νευρώνων είναι ο μεταγραφικός παράγοντας Prox1 (prospero-related homeobox gene), του οποίου η έκφραση αυξάνεται στα κύτταρα τύπου 3 όψιμου σταδίου και συνεχίζει να εκφράζεται τόσο σε ανώριμους όσο και σε ώριμους νευρώνες [46]. Εκτός του ότι αποτελεί χρήσιμο δείκτη αυτών των νευρώνων έχει δειχθεί πως είναι απαραίτητος για την επιβίωση και ωρίμανση των ενήλικων

νευρώνων, καθώς καταστολή της έκφρασής του σε ενήλικα NSCs, τα οποία εκφράζουν νεστίνη, οδηγεί σε μειωμένο αριθμό DCX<sup>+</sup> και calretinin<sup>+</sup> νευρώνων [53].

Τέλος, ο μεταγραφικός παράγοντας CREB (cAMP response element-binding protein) είναι απαραίτητος για την ωρίμανση και επιβίωση των νευρώνων στην SGZ. Όσον αφορά το ρόλο του, έχει δειχθεί πως η υπερέκφρασή του σε προγονικά κύτταρα ενισχύει το μήκος των δενδριτών και τη διακλάδωσή τους στους ανώριμους νευρώνες, ενώ η αναστολή της έκφρασής του έχει το αντίθετο αποτέλεσμα [54]. Ενδιαφέρον είναι, επιπλέον, το γεγονός ότι μετά από καταστολή της έκφρασής του παρατηρείται μείωση των NeuroD1+ κυττάρων.



Εικόνα 1.4: Νευρογένεση στον ιππόκαμπο και μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι ρυθμίζουν το κάθε στάδιο στην ανάπτυξη νευρώνων.

Η δεύτερη περιοχή στην οποία συμβαίνει νευρογένεση κατά το ενήλικο στάδιο είναι η SVZ. Στο νεοφλοιό, τα RGCs με κυτταρικά σώματα κοντά στις κοιλίες, παράγουν ποικιλία νευρώνων και γλοιακών κυττάρων [55,56]. Μελέτες έδειξαν ότι ένα υποσύνολο των RGCs δίνει γένεση σε NSCs, τα οποία φέρουν χαρακτηριστικά αστροκυττάρων (κύτταρα τύπου B1) και αποτελούν τα βραδέως διαιρούμενα βλαστικά κύτταρα της SVZ κατά το μετεμβρυικό και ενήλικο στάδιο. Εκτός από την αστροκυτταρική μορφολογία, τα κύτταρα αυτά εκφράζουν επίσης γλοιακούς δείκτες, όπως οι GLAST, BLBP, GFAP και νεστίνη. Αντίστοιχα, προκύπτουν και κύτταρα τύπου B2, τα οποία έχουν αστροκυτταρικά χαρακτηριστικά αλλά δεν έρχονται σε επαφή με την κοιλία. Όσον αφορά την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων έχουμε αντίστοιχη με αυτή στην SGZ έκφραση των Sox2, FoxO3 και TLX.

Οι απόγονοι των κυττάρων τύπου B, τα κύτταρα τύπου C, πολλαπλασιάζονται ταχέως και βρίσκονται συχνά σε συστάδες κοντά στα αιμοφόρα αγγεία. Σε αυτά τα κύτταρα (όπως και στα TAPs της SGZ) υπάρχουν αυξημένα επίπεδα των μεταγραφικών παραγόντων Ascl1, Pax6, Tbr2 και Dlx2. Τέλος, τα κύτταρα τύπου C δίνουν γένεση σε νευροβλάστες τύπου A, στους οποίους εκφράζεται η NeuroD1. Αυτή η έκφραση έχει ως αποτέλεσμα την επιβίωση και περαιτέρω ωρίμανση των νέων νευρώνων, οι οποίοι μετά τη μετατροπή τους από νευροβλάστες σε ανώριμους νευρώνες εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα Tbr1 (Εικόνα 1.5) [34].



Εικόνα 1.5: Νευρογένεση στην SVZ και μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι ρυθμίζουν το κάθε στάδιο στην ανάπτυξη νευρώνων.

#### 1.4 Επαναπρογραμματισμός κυτταρικών πληθυσμών

#### 1.4.1 Η δημιουργία των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων

Η ανάγκη πρόσβασης σε ανθρώπινους κυτταρικούς πληθυσμούς είτε για την απ' ευθείας μεταμόσχευση τους σε ασθενείς, είτε για την χρησιμοποίηση τους ως in vitro κυτταρικά μοντέλα για τη μελέτη των γενετικών και επιγενετικών αλλαγών που συμβαίνουν σε διάφορες ασθένειες, αλλά και για την εύρεση νέων φαρμάκων ή προγνωστικών/διαγνωστικών βιοδεικτών, οδήγησε τους επιστήμονες στην αναζήτηση τρόπων δημιουργίας δύσκολα προσβάσιμων ανθρώπινων κυτταρικών τύπων, όπως είναι οι νευρώνες. Αυτό κατέστη δυνατό, αρχικά μέσω διαφοροποίησης εμβρυικών βλαστικών κυττάρων και στη συνέχεια με την τεχνική του επαναπρογραμματισμού άλλων πιο εύκολα προσβάσιμων πληθυσμών, όπως είναι οι ινοβλάστες.

Για πολλά χρόνια, η διαδικασία διαφοροποίησης των κυττάρων θεωρούνταν μία μονόδρομη διαδικασία και δεν ήταν γνωστό ότι τα κύτταρα μπορεί να έχουν τη δυνατότητα να γυρίσουν πίσω στο χρόνο και από πλήρως διαφοροποιημένα να καταλήξουν σε μία αδιαφοροποίητη κατάσταση. Αυτή η θεωρία ανατράπηκε όταν εμβρυικοί ινοβλάστες και ινοβλάστες ενήλικου ποντικού μετά από υπερέκφραση τεσσάρων διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων (Oct4, Sox2, Klf4 και c-Myc) επαναπρογραμματίστηκαν σε πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα, τα λεγόμενα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs, induced pluripotent stem cells) [57] (Εικόνα 1.6).

Τα iPSCs είναι σε θέση να διαφοροποιηθούν σχεδόν σε όλους τους τύπους κυττάρων του σώματος [58], ενώ παράλληλα μπορούν να αυτοανανεώνονται και να πολλαπλασιάζονται δίνοντας τόσο αδιαφοροποίητα όσο και διαφοροποιημένα κύτταρα in vitro και in vivo [59]. Αυτή η ικανότητα τα καθιστά ιδανικά κυτταρικά συστήματα για προσεγγίσεις κυτταρικής θεραπείας με σκοπό την επιδιόρθωση ιστών ή οργάνων, τα οποία έχουν υποστεί βλάβη λόγω κάποιου τραυματισμού, εκφυλιστικής ασθένειας, γήρανσης ή καρκίνου [60-62]. Μέχρι σήμερα, τα iPSCs έχουν διαφοροποιηθεί με επιτυχία in vitro σε πολλούς κυτταρικούς τύπους , όπως ενδοθηλιακά κύτταρα, νευρώνες (ντοπαμινεργικούς, κινητικούς), καρδιομυοκύτταρα, παγκρεατικά βκύτταρα, λιποκύτταρα και αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα. Έτσι, πλέον υπάρχει η δυνατότητα επαναπρογραμματισμού σωματικών κυττάρων του ασθενούς τόσο για μεταμόσχευση όσο και για εξατομικευμένη μελέτη των αλλαγών, οι οποίες έχουν οδηγήσει στην εκδήλωση μίας ασθένειας, όπως της νόσου Αλτσχάιμερ ή της νόσου Πάρκινσον. Με αυτό τον τρόπο ουσιαστικά δίνεται η in vitro δυνατότητα μελέτης μίας ασθένειας με κύτταρα προερχόμενα από τον ίδιο τον ασθενή (Disease-in- a- dish).



Εικόνα 1.6: Η δημιουργία και χρήση των iPSCs για κυτταρική θεραπεία, κατανόηση των μηχανισμών δράσης μιας ασθένειας και δημιουργία νέων φαρμάκων.

Παρόλο που τα iPSCs θεωρούνται σπουδαίο εργαλείο στα γέρια της επιστήμης, εντούτοις φέρουν και κάποιους περιορισμούς. Αρχικά, υπάρχει περιορισμός όσον αφορά το χρονικό διάστημα, το οποίο χρειάζεται για να επαναπρογραμματιστούν τα κύτταρα και στη συνέγεια να κατευθυνθούν στην επιθυμητή κυτταρική μοίρα, οποίος συνήθως υπερβαίνει τον 1 μήνα. Επίσης, δεδομένου ότι τα πρωτόκολλα για τη δημιουργία των iPSCs περιλαμβάνουν αρκετά στάδια, η αποτελεσματικότητα, με την οποία παράγεται ο τελικός κυτταρικός πληθυσμός μπορεί να είναι χαμηλή. Επιπλέον, πρέπει να αντιμετωπιστούν ορισμένες ανησυχίες που υπάρχουν σχετικά με την ασφάλεια αυτών των κυττάρων για κλινική χρήση, καθώς υπάρχει κίνδυνος δημιουργίας όγκων αλλά και συσσώρευσης χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Επιπρόσθετα, δεν είναι σαφές κατά πόσο τα συγκεκριμένα κύτταρα δίνουν σταθερά και επαναλήψιμα αποτελέσματα στα πλαίσια του GMP (Good Manufacturing Practise), αλλά και το κατά πόσο τα παραγόμενα διαφοροποιημένα κύτταρα διατηρούν το αρχικό ηλικιακό επιγενετικό τους προφίλ. Τέλος, η αποτελεσματικότητα της τεχνικής παραμένει γαμηλή και στο δεύτερο σκέλος, το οποίο αφορά την επιτυγή διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών στον επιθυμητό κυτταρικό πληθυσμό.

Λαμβάνοντας υπόψη όλους τους περιορισμούς, οι οποίοι σχετίζονται με την παραγωγή και τη χρήση των iPSCs, άρχισε να γίνεται προσπάθεια επαναπρογραμματισμού κυττάρων με πιο άμεση μετατροπή μεταξύ των κυτταρικών τύπων, ώστε να αποφεύγεται το στάδιο της πολυδυναμίας και τα σχετικά μειονεκτήματα.

#### 1.4.2 Άμεσος κυτταρικός επαναπρογραμματισμός

Άμεσος επαναπρογραμματισμός (direct reprogramming) ονομάζεται η διαδικασία επαγόμενης δια-διαφοροποίησης πλήρως διαφοροποιημένων σωματικών κυττάρων έτσι ώστε να μετατραπούν τους σε άλλο κυτταρικό τύπο, παρακάμπτοντας την ενδιάμεση πολυδύναμη κατάσταση (Εικόνα 1.7). Παρόλο που τα κύτταρα δεν περνάνε από το στάδιο των iPSCs, εντούτοις υπάρχει βραχυχρόνια ενεργοποίηση γονιδιακών μονοπατιών, τα οποία σχετίζονται με την πολυδυναμία (multipotency) των κυττάρων. Ο άμεσος επναπρογραμματισμός επάγεται έπειτα από υπερέκφραση συνδυασμών πρωτεϊνών / miRNAs / χημικών μορίων τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν ένα σύνθετο δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων ή/ και υποστηρίζουν την έκφραση γονιδίων του κυτταρικού τύπου ενδιαφέροντος και αντίστοιγα καταστέλλουν γονίδια τα οποία σχετίζονται με άλλες κυτταρικές μοίρες, ώστε να διατηρηθεί η επιθυμητή κυτταρική μοίρα κατά την ανάπτυξη των κυττάρων [63]. Αυτή η διαδικασία είναι το αποτέλεσμα ρύθμισης σε πολλαπλά επίπεδα, συμπεριλαμβανομένων των επιγενετικών και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, της δράσης μεταγραφικών παραγόντων και ενεργοποιητών της μεταγραφής, της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, αλλά και μη κωδικών RNAs (miRNAs, lncRNAs) [64,65].



Εικόνα 1.7: Οδοί των κυττάρων. (Α) Η πορεία ενός κυττάρου από την πολυδύναμη κατάσταση (πράσινο) σε συγκεκριμένη κυτταρική μοίρα (μπλε). (Β) Αποδιαφοροποίηση του κυττάρου: Από τη διαφοροποιημένη κατάσταση (μπλε) το κύτταρο επιστρέφει σε μία λιγότερο διαφοροποιημένη κατάσταση (πράσινο) ανακτώντας την πολυδυναμία. (C) Άμεσος επαναπρογραμματισμός: Το κύτταρο μεταβαίνει από μία διαφοροποιημένη κατάσταση (μπλε) σε μία άλλη (κίτρινο) χωρίς να περνά από την κατάσταση του πολυδύναμου βλαστικού κυττάρου [66].

Έτσι, τα τελευταία χρόνια διάφοροι κυτταρικοί τύποι έχουν υποστεί επιτυχή άμεσο επαναπρογραμματισμό, δίνοντας διαφορετικούς, από τους αρχικούς, κυτταρικούς τύπους, για παράδειγμα Β λεμφοκύτταρα έχουν μετατραπεί σε μακροφάγα [67], καρδιακοί ινοβλάστες σε καρδιομυοκύτταρα [68] και εξωκρινή παγκρεατικά κύτταρα προς β κύτταρα του παγκρέατος in vivo [69].

#### 1.4.3 Άμεσος επαναπρογραμματισμός προς νευρώνες

Όσον αφορά το νευρικό σύστημα οι κυτταρικές θεραπείες έχουν ως στόχο την αποκατάσταση των νευρωνικών κυκλωμάτων που προσβάλλονται μετά από τραύμα, εγκεφαλικό επεισόδιο ή νευροεκφυλισμό. Ο άμεσος επαναπρογραμματισμός κυττάρων γλοίας της πάσχουσας περιοχής στους επιθυμητούς υπότυπους νευρώνων είναι μία πολλά υποσχόμενη και ελπιδοφόρα επιλογή για τη δημιουργία νέων νευρώνων, με σκοπό την αντικατάσταση των νευρώνων που έχουν χαθεί και την ενσωμάτωση τους στα υπάρχοντα νευρωνικά κυκλώματα της περιοχής [70].

Έτσι, οι έρευνες στο νευρικό σύστημα γρήγορα στράφηκαν προς τους ενδογενείς πληθυσμούς κυττάρων γλοίας και ιδιαίτερα στον πληθυσμό των αστροκυττάρων, καθώς αυτός είναι ο κυτταρικός τύπος, ο οποίος μετά από τραυματισμό του εγκεφάλου ενεργοποιείται, πολλαπλασιάζεται και καταλαμβάνει την περιοχή του τραύματος. Επιπλέον, αποτελεί έναν από τους μεγαλύτερους κυτταρικούς πληθυσμούς του εγκεφάλου και, τέλος, επιδεικνύει ένα ενδογενές δυναμικό νευρογένεσης, γεγονός το οποίο τον καθιστά ιδανικό για άμεσο επαναπρογραμματισμό προς ένα νευρωνικό πληθυσμό [71]. Μέσα στα τελευταία χρόνια πλήθος ερευνών έχει δείξει πως ο άμεσος επαναπρογραμματισμός μπορεί να λάβει χώρα τόσο in vitro όσο και in vivo ύστερα από υπερέκφραση νευρο-ειδικών μεταγραφικών παραγόντων, νευρογενετικών micro-RNAs και χρήση μικρών χημικών μορίων [72,73]

#### 1.4.3.1 Η χρήση μεταγραφικών παραγόντων κατά τον άμεσο επαναπρογραμματισμό

Η πρώτη ένδειξη ότι ο άμεσος νευρωνικός επαναπρογραμματισμός είναι εφικτός, συνέβη όταν δείχθηκε πως ο Pax6, η διαγραφή του οποίου εμποδίζει τη νευρογένεση στον αναπτυσσόμενο πρόσθιο εγκέφαλο, ήταν επαρκής για τη μετατροπή μετεμβρυικών κυττάρων γλοίας, τα οποία απομονώθηκαν από εγκεφαλικό φλοιό ποντικού, σε νευρώνες, in vitro [74]. Στη συνέχεια, η Ngn2, ένας μεταγραφικός στόχος του Pax6, αποδείχτηκε ακόμη πιο αποτελεσματική στη μετατροπή μετεμβρυικών αστροκυττάρων ποντικού σε πλήρως λειτουργικούς γλουταματεργικούς νευρώνες, in vitro, με την Ngn2 να φαίνεται πως έχει κι εδώ τον ίδιο τρόπο δράσης με αυτόν κατά την εμβρυική ανάπτυξη. [74,75]. Επίσης, έχει δειχθεί πως η υπερέκφραση του Ascl1 μαζί με το Dlx2 σε αστρογλοία ποντικού, in vitro, προκαλεί τη δημιουργία GABAεργικών νευρώνων, κάτι το οποίο έρχεται σε συμφωνία με το ρόλο του Ascl1 στον αναπτυσσόμενο τελεγκέφαλο [76,77]. Οι παραπάνω παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι 01 προνευρωνικοί μεταγραφικοί παράγοντες κατευθύνουν τον επαναπρογραμματισμό των γλοιακών κυττάρων και καθορίζουν την ταυτότητα των επαγόμενων νευρώνων με μηχανισμούς που προσομοιάζουν τη φυσιολογική in vivo δράση τους κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ.

Εκτός από κύτταρα του νευρικού συστήματος έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλοι κυτταρικοί τύποι για άμεσο επαναπρογραμματισμό προς νευρώνες. Αυτοί είναι οι ινοβλάστες, τα ηπατοκύτταρα [78] και τα περικύτταρα [79]. Συγκεκριμένα ινοβλάστες ποντικού έχουν επιτυχώς επαναπρογραμματιστεί, in vitro, μετά από χρήση του συνδυασμού των μεταγραφικών παραγόντων Brn2/Mytll/Ascl1. Τα επαγόμενα νευρωνικά κύτταρα (induced neuronal cells, iNs) εξέφραζαν πολλαπλές νευρο-ειδικές πρωτεΐνες, σχημάτιζαν λειτουργικές συνάψεις και έδιναν δυναμικό ενέργειας [80]. Επίσης, σε συνέχεια της προηγούμενης έρευνας σε ανθρώπινους, αυτή τη φορά, ινοβλάστες, αποδείχθηκε πως ο συνδυασμός Brn2/Mytll/Ascl1 και NeuroD1 ήταν ικανός να οδηγήσει στη δημιουργία λειτουργικών GABAεργικών, γλουταματεργικών και ντοπαμινεργικών νευρώνων in vitro [81].

Ο απώτατος στόχος του άμεσου επαναπρογραμματισμού είναι η εφαρμογή του in vivo για την αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών και εγκεφαλικών τραυμάτων τροποποιώντας κατάλληλα ενδογενή γλοιακά κύτταρα του εγκεφάλου. Προς αυτή την κατεύθυνση, διαφορετικές μελέτες στο πεδίο αυτό έχουν δείξει επιτυχή παραγωγή νέων νευρώνων με άμεσο επαναπρογραμματισμό αστροκυττάτων και προγονικών ολιγοδενδροκυττάρων τόσο σε υγιή εγκέφαλο, όσο και σε μοντέλα τραύματος ή νευροεκφυλισμού [82]. Παρόλο που οι μεταγραφικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις μελέτες, όπως οι Sox2 [83,84], BAM παράγοντες (Brn2/Ascl1/Mytl1) [85], NeuroD1 [86] και Ascl1/ Lmx1a/ Nurr1 [87]

χρησιμοποιούνται με ανάλογο τρόπο σε in vitro μελέτες, εντούτοις στα in vivo συστήματα υπάρχουν διαφορές στο χρησιμοποιούμενο ιικό σύστημα (ρετροϊοί, λεντιιοί, αδενοϊοί), κάτι το οποίο επηρεάζει τα αποτελέσματα σε κάθε περίπτωση [82]. Ένας σημαντικός παράγοντας ο οποίος επηρεάζει το αποτέλεσμα στο in vivo σύστημα είναι οι συνθήκες στο μικροπεριβάλλον της έγχυσης. Μία βλάβη στον ιστό οδηγεί σε έλλειψη οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών, αυξημένο ρυθμό γλυκόλυσης και αυξημένα επίπεδα ROS, συνθήκες οι οποίες καθιστούν το περιβάλλον επιβλαβές για την επιβίωση των νευρώνων και τον επαναπρογραμματισμό. Επιπλέον, η υπερτροφία των κυττάρων γλοίας, ο πολλαπλασιασμός και η διήθηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού και οι αυξημένες ROS μπορεί να έχουν ευεργετική αλλά και επιζήμια δράση στον επαναπρογραμματισμό στην περιοχή του τραύματος. Τέλος, αφού ολοκληρωθεί ο επαναπρογραμματισμός, τα iNs πρέπει να ωριμάσουν, να δημιουργήσουν νέες συνδέσεις και να ενσωματωθούν στο κατεστραμμένο νευρωνικό κύκλωμα, γεγονός που παραμένει ένα μεγάλο εμπόδιο αλλά και το βασικό ζητούμενο για την επιτυχή εφαρμογή του in vivo επαναπρογραμματισμού [82]. Οι παραπάνω λόγοι είναι και αυτοί που κάνουν τον in vivo επαναπρογραμματισμό ενδογενών γλοιακών κυττάρων προς συγκεκριμένο υπότυπο νευρώνων μία προσέγγιση, που χρειάζεται περαιτέρω βελτίωση μέχρι να αποτελέσει μία ολοκληρωμένη θεραπεία.

#### 1.4.3.2 Η χρήση μικρών χημικών μορίων κατά τον άμεσο επαναπρογραμματισμό

Λόγω της ανάγκης για ύπαρξη επαναλήψιμων αποτελεσμάτων στα in vitro και in vivo πρωτόκολλα, αλλά κυρίως για την εύρεση ενός ασφαλούς φορέα στα in vivo συστήματα, τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια αντικατάστασης των πλασμιδιακών και ιικών φορέων. Έτσι, έχει ξεκινήσει η δημιουργία πρωτοκόλλων, βάσει των οποίων γίνεται χρήση μικρών χημικών μορίων για άμεσο επαναπρογραμματισμό. Τα μόρια, τα οποία έχουν επιλεγεί μέχρι σήμερα φαίνεται να είναι αρκετά αποδοτικά σε τόσο σε in vitro όσο και σε in vivo συστήματα νευροεκφυλισμού ή τραύματος, κάτι το οποίο τα καθιστά ιδανικά για μελλοντική χρήση τους ως φάρμακα ή για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων βασισμένα σε αυτά, τα οποία θα έχουν ως στόχο την ενεργοποίηση της ενδογενούς δυνατότητας του εγκεφάλου του κάθε ασθενή για επιδιόρθωση και αναγέννηση νευρώνων μετά από νευροεκφυλισμού ή τραύμα.

32

Σε αυτό το πλαίσιο το 2013 δείχτηκε ότι δύο μικρά μόρια, η Forskolin και η Dorsomorphin, οδήγησαν στην υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Ngn2 σε ανθρώπινους εμβρυικούς πνευμονικούς ινοβλάστες, κάτι το οποίο είχε ως αποτέλεσμα τον άμεσο επαναπρογραμματισμό τους σε χολινεργικούς νευρώνες με υψηλή καθαρότητα στην καλλιέργεια (>90%) και υψηλή απόδοση (περίπου το 99% των κυττάρων ήταν θετικά σε Ngn2). Επιπλέον, αυτοί οι χολινεργικοί νευρώνες παρουσίασαν ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες ώριμων νευρώνων και χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά ενός κινητικού νευρώνα, τόσο σε μορφολογία και γονιδιακή έκφραση όσο και στο σχηματισμό λειτουργικών νευρομυικών συνάψεων [88].

Στη συνέχεια άλλες ομάδες έδειξαν ότι τόσο οι εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEFs) όσο και οι ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες μπορούν να μετατραπούν σε λειτουργικούς νευρώνες, μετά από χρήση διαφορετικού συνόλου χημικών ενώσεων. Οι MEFs μετατράπηκαν επιτυχώς σε χημικώς επαγόμενους νευρώνες με τη βοήθεια τεσσάρων χημικών ενώσεων, των ISX9, Forskolin, CHIR99021 και I-BET151 [89]. Ο παράγοντας I-BET151 (BET family Bromodomain inhibitor) καταστέλλει στην έκφραση γονιδίων ειδικών για τους ινοβλάστες διευκολύνοντας με αυτό τον τρόπο τον επαναπρογραμματισμό, ενώ παράλληλα το ISX9 (Isoxazole 9) ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων ειδικών για τους νευρώνες. Οι χημικώς επαγόμενοι νευρώνες, οι οποίοι προέκυψαν, ήταν ένα μείγμα γλουταματεργικών και GABAεργικών νευρώνων.

Σε άλλη μελέτη, ανθρώπινοι ινοβλάστες ενήλικων υγιών ατόμων και ασθενών, οι οποίοι έπασχαν από οικογενή μορφή Αλτσχάιμερ μετατράπηκαν σε μίγμα γλουταματεργικών και GABAεργικών νευρώνων με τη βοήθεια επτά χημικών ενώσεων: VPA, CHIR99021, RepSox, Forskolin, SP600125, GO6983 και Y-27632 [90]. Μετά την επαγωγή του επαναπρογραμματισμού επακόλουθη προσθήκη CHIR99021, Forskolin και Dorsomorphin παρουσία των νευροτροφικών παραγόντων BDNF, GDNF και NT3 είχε ως αποτέλεσμα την περαιτέρω ωρίμανση των νευρώνων και την αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης. Επιπλέον, τα επίπεδα του β-αμυλοειδούς στους επαγόμενους νευρώνες, οι οποίοι προήλθαν από τους ασθενείς, ήταν παρόμοια με τα ενδογενή επίπεδα των ασθενών, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι ο η προσέγγιση του άμεσου επαναπρογραμματισμού μπορεί να προσφέρει μία εξατομικευμένη μοντελοποίηση της νόσου, διότι φαίνεται ότι οι επαγόμενοι νευρώνες διατηρούν την

33

ηλικιακή επιγενετική τους κατάσταση, σε αντίθεση με αυτούς που προκύπτουν από τα iPSCs [91].

Όσον αφορά τον άμεσο επαναπρογραμματισμό ειδικότερα των αστροκυττάρων με τη χρήση χημικών μορίων, την ίδια περίοδο αναφέρθηκε ο άμεσος επαναπρογραμματισμός αστροκυττάρων, τα οποία απομονώθηκαν από ανθρώπινο εμβρυικό εγκέφαλο σε νευρώνες [92]. Οι ενώσεις οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι LDN193189, SB431542, TTNPB, Thiazovivin, CHIR99021, VPA, DAPT, SAG και Purmophamine. Οι περισσότεροι νευρώνες, οι οποίοι προέκυψαν ήταν γλουταματεργικοί και αρνητικοί για δείκτες χολινεργικών, ντοπαμινεργικών και κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού.

Μετά από πλειάδα διαφορετικών ερευνών, σήμερα, είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε πως με τη χρήση συγκεκριμένων συνδυασμών χημικών μορίων είναι δυνατός ο επιτυχής επαναπρογραμματισμός ινοβλαστών ή αστροκυττάρων, ο οποίος έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία διαφορετικών τύπων νευρώνων. Στο μέλλον, λοιπόν, τέτοιες στρατηγικές επαναπρογραμματισμού μπορούν να εφαρμοστούν όχι μόνο για εξατομικευμένη μοντελοποίηση μιας νόσου όσον αφορά καθαρά τις αλλαγές σε γενετικό και πρωτεϊνικό επίπεδο αλλά και για κατανόηση των επιγενετικών αλλαγών, οι οποίες έχουν συμβεί σε κάθε ασθενή ξεχωριστά κατά την εκδήλωση μιας ηλικιο-εξαρτώμενης νευροεκφυλιστικής ασθένειας [93].

#### ISX9

Το ISX9 (Isoxazole 9) αποτελεί ένα χημικό μόριο, το οποία δρα μέσω αύξησης της εισροής Ca<sup>+2</sup> στο εσωτερικό των κυττάρων και της επακόλουθης ενεργοποίησης μονοπατιών που ρυθμίζονται από το Ca<sup>2+</sup>. Για το μηχανισμό της δράσης του έχει προταθεί η ενεργοποίηση της CaMKII, η οποία φωσφορυλιώνει και οδηγεί σε έξοδο από τον πυρήνα την HDAC5 (αποακετυλάση ιστονών 5) με αποτέλεσμα την άρση της καταστολής νευρωνικών γονιδίων και την επακόλουθη αύξηση των επιπέδων μεταγραφικών παραγόντων που κατέχουν σημαντικό ρόλο στη νευρογένεση. Μέχρι σήμερα είναι γνωστό ότι το ISX9 οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων των μεταγραφικών παραγόντων MEF2 (καθώς και των γονιδίων τα οποία αυτός ελέγχει, όπως το NR1) και NeuroD [94]. Έτσι, όσον αφορά τη διαφοροποίηση των κυττάρων, έχει δειχθεί ότι το ISX9 προάγει τη νευρωνική διαφοροποίηση κυτταρικής σειράς προγονικών νευρικών κυττάρων προερχόμενων από τον ιππόκαμπο ενήλικα αρουραίου, προγονικών κυττάρων προερχόμενων από την υποκοιλιακή ζώνη ενήλικα ποντικού, καθώς και P19 εμβρυικών καρκινικών κύτταρων [94]. Επιπλέον, έχει δειχθεί πως το ISX9 βελτιώνει τη νευρογένεση και λειτουργία του ιπποκάμπου σε ποντίκια [95]. Επιπρόσθετα δρα καταστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων και επάγοντας την έκφραση νευρωνικών γονιδίων σε κακοήθη αστροκύτταρα [96].

Τέλος, όσον αφορά τον άμεσο επαναπρογραμματισμό, το ISX9 έχει χρησιμοποιηθεί μαζί με άλλα χημικά μόρια σε μελέτη χημικού επαναπρογραμματισμού ενηλίκων ανθρώπινων αστροκυττάρων τα οποία μετατράπηκαν σε γλουταματεργικούς νευρώνες μετά από χρήση των χημικών ενώσεων VPA, CHIR99021, RepSox, Forskolin, I-BET151 και ISX-9 [97].

#### 1.4.3.3 Η χρήση των microRNAs κατά τον άμεσο επαναπρογραμματισμό

Εκτός από τον επαναπρογραμματισμό με χρήση μεταγραφικών παραγόντων και μικρών χημικών μορίων, τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει και η χρησιμοποίηση σε πρωτόκολλα άμεσου επαναπρογραμματισμού μη κωδικών RNAs, των microRNAs, τα οποία εμπλέκονται παράλληλα στη ρύθμιση πληθώρας κυτταρικών διεργασιών μέσω της αναστολής σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο της μετάφρασης των πολλαπλών mRNA στόχων τους. Το μήκος των ώριμων microRNAs ποικίλει μεταξύ 18-25 νουκλεοτίδια και αυτή η μικρή αλληλουχία είναι αρκετή ώστε να ρυθμίσει αρνητικά τη γονιδιακή έκφραση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Αργικά, τα microRNAs μεταγράφονται ως πρόδρομα pri – RNAs (primary RNAs). Στη συνέχεια τα pri – RNAs μετατρέπονται σε pre - RNAs μετά από επεξεργασία από το σύμπλοκο RNAσών, Drosha. Το μήκος τους στο στάδιο αυτό είναι περίπου 70 νουκλεοτίδια. Συνακόλουθα, υφίστανται ωρίμανση στο κυτταρόπλασμα και, μετά από επεξεργασία από το σύμπλοκο RNAσών Dicer, μετατρέπονται σε δίκλωνα μόρια, τα οποία έχουν μήκος περί τα 22 νουκλεοτίδια. Το ώριμο miRNA συνδέεται με το σύμπλοκο RISC (RNA-induced silencing complex) και η μία από τις δύο αλυσίδες στοχεύει αλληλουχίες των ώριμων mRNAs (Εικόνα 1.8). Πιο συγκεκριμένα, η αλυσίδα στόγευσης προσδένεται είτε με μερική είτε με ολική συμπληρωματικότητα στην 3'- UTR των ώριμων mRNAs, οδηγώντας είτε στην αποικοδόμηση είτε στην παρεμπόδιση της μετάφρασης τους. Εάν όλο το μήκος του microRNA είναι συμπληρωματικό στην αλληλουχία στόχευσης τότε έχουμε αποικοδόμηση του mRNA, ενώ εάν είναι μερικώς συμπληρωματικό προκύπτει παρεμπόδιση της μετάφρασης του mRNA στόχου. Η μερική συμπληρωματικότητα, η οποία μπορεί να λάβει χώρα είναι και ο λόγος που ένα microRNA μπορεί να στοχεύσει πολλά διαφορετικά γονίδια. Αντίστοιχα, ένα γονίδιο μπορεί να επηρεάζεται από διαφορετικά microRNAs [98].



Εικόνα 1.8: Δημιουργία των microRNAs και τρόπος δράσης τους.

Λόγω της δυνατότητάς τους να ελέγχουν τα επίπεδα έκφρασης των πολλών πρωτεϊνών παράλληλα, αλλά και να συμμετέχουν σε διάφορες άλλες κυτταρικές διαδικασίες, όπως σε σύμπλοκα αναδιάρθρωσης της χρωματίνης, τα microRNAs έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται για τον άμεσο επαναπρογραμματισμό κυττάρων προς νευρώνες. Ειδικότερα για το ΚΝΣ, μελέτες σε οργανισμούς όπως οι Drosophila και Mus Musculus έχουν δείξει πως υπάρχουν microRNAs τα οποία έχουν τη δυνατότητα να ρυθμίζουν πολλά διαφορετικά βήματα κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου, όπως η δημιουργία της σωστής μορφολογίας του εγκεφάλου αλλά και η διαφοροποίηση, εξειδίκευση και σωστή λειτουργία των νευρώνων [99]. Πράγματι, έχει δειχθεί πως το 70% όλων των microRNAs, τα οποία έχουν ανακαλυφθεί, εκφράζονται σε περιοχές του εγκεφάλου του ανθρώπου, ενώ το 75% αυτών είναι συντηρημένα σε όλα τα
θηλαστικά [100]. Λόγω των παραπάνω, φαίνεται ότι τα microRNAs παίζουν βασικό ρόλο στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος των θηλαστικών και παράλληλα, η ύπαρξη μοναδικών microRNAs στον άνθρωπο δείχνει το πόσο πολύπλοκος σε δομή και λειτουργία είναι ο ανθρώπινος εγκέφαλος [100].

Προς αυτή την κατεύθυνση μελέτες έγουν δείξει ότι νευρογενετικά microRNAs σε συνδυασμό με νευρογενετικούς μεταγραφικούς παράγοντες έχουν τη δυνατότητα μετασχηματισμού ανθρώπινων ινοβλαστών σε νευρώνες. Συγκεκριμένα, το 2011 δύο διαφορετικές ομάδες έκαναν επαναπρογραμματισμό ανθρώπινων ινοβλαστών με microRNAs. Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε το miR-124 μαζί με τους μεταγραφικούς παράγοντες Brn2, Mytl1 με αποτέλεσμα την παραγωγή γλουταματεργικών και GABAεργικών νευρώνων, οι οποίοι είχαν τη δυνατότητα παραγωγής συναπτικών δυναμικών [101]. Στη δεύτερη περίπτωση έγινε χρήση τριών μεταγραφικών παραγόντων, των Ascl1, NeuroD2, Myt11 με ταυτόγρονη έκφραση των miR-124 και miR-9 και το αποτέλεσμα ήταν η δημιουργία γλουταματεργικών και GABAεργικών νευρώνων με συναπτική δραστηριότητα. Ένα επιπλέον ενδιαφέρον στοιχείο σε αυτή την έρευνα ήταν πως μόνο η έκφραση των δύο microRNAs ήταν ικανή να οδηγήσει μικρό αριθμό ινοβλαστών (5%) στο να εκφράσουν νευρωνικούς δείκτες [102]. Επιπρόσθετα, μία ακόμη έρευνα με τη χρήση των παραπάνω microRNAs σε συνδυασμό με τους παράγοντες Ctip2, Dlx1/2 και Myt11 οδήγησε στον επαναπρογραμματισμό ινοβλαστών προς μέσου μεγέθους ακανθώδεις νευρώνες (medium spiny neurons) και νευρώνες του ραβδωτού σώματος [103]. Τέλος, σε in vivo επίπεδο, έχει πραγματοποιηθεί άμεσος επαναπρογραμματισμός αστροκυττάρων προς ντοπαμινεργικούς νευρώνες σε μοντέλο ποντικού για την ασθένεια Πάρκινσον με χρήση των μεταγραφικών παραγόντων NeuroD1, Ascl1, Lmx1a και του miR-218. Η μελέτη αυτή αποτελεί την πρώτη εφαρμογή του in vivo άμεσου επαναπρογραμματισμού σε ένα μοντέλο νευροεκφυλισμού, στην οποία δείχθηκε ότι οι επαγόμενοι νευρώνες iDANs (induced dopamine neurons) ήταν ικανοί να αντιδρούν σε ερεθίσματα και να επηρεάσουν θετικά το φαινότυπο του ζώου μέσω βελτίωσης της βλάβης στο βάδισμά του [104].

#### miR-124

Σε όλες τις παραπάνω έρευνες έχει χρησιμοποιηθεί μεταξύ των άλλων παραγόντων επαναπρογραμματισμού και το miR-124, το οποίο είναι πολύ καλά συντηρημένο και άφθονο στον ενήλικο εγκέφαλο, καθώς η ποσότητά του φτάνει το 25-48% των συνολικών microRNAs του εγκεφάλου [105]. Στον άνθρωπο και το ποντίκι το miR-124 κωδικοποιείται από τρία ξεχωριστά γονίδια, τα οποία βρίσκονται σε τρία διαφορετικά χρωμοσώματα. Όσον αφορά την έκφρασή του υπάρχει σε υψηλά επίπεδα στις νευροβλάστες (Neuroblasts, NBs), όπου και παραμένει οδηγώντας μέχρι και στην πλήρη ωρίμανση των νευρώνων, ενώ δε φαίνεται να εκφράζεται σε αστροκύτταρα και NSCs [106].

Ένας από τους βασικότερους λόγους για τους οποίους το miR-124 είναι απαραίτητο κατά τη διαφοροποίηση των νευρώνων είναι η ικανότητά του να στοχεύει συστατικά συμπλόκων μεταγραφικών καταστολέων, όπως το σύμπλοκο REST. Το σύμπλοκο REST εκφράζεται σε μη νευρωνικά κύτταρα, όπου και καταστέλλει νευρογενετικά γονίδια, όπως το NeuroD4 [107], θέτοντας με αυτό τον τρόπο ένα προφανές εμπόδιο στον άμεσο επαναπρογραμματισμό σε νευρώνες, αφού τέτοια γονίδια είναι απαραίτητο να ενεργοποιηθούν. Το miR-124, λοιπόν, στοχεύει σε συστατικά του REST, όπως το CoRest και η φωσφατάση SCP1, αναστέλλοντας τη δράση του και επιτρέποντας την επακόλουθη έκφραση νευρογενετικών γονιδίων. Χαρακτηριστικό είναι, επίσης, το γεγονός ότι το σύμπλοκο REST καταστέλλει τη μεταγραφή και των τριών γονιδίων του miR-124, κάτι το οποίο αποτελεί πολύ σημαντικό μηχανισμό ανάδρασης στο στάδιο των νευρικών προγονικών κυττάρων και ώριμων νευρώνων [108].

Επιπλέον, το miR-124, στα πλαίσια της διαφοροποίησης προς νευρώνες, καταστέλλει τα επίπεδα της μεθυλοτρανσφεράσης Ezh2, η οποία είναι υπεύθυνη για την καταστολή αρκετών νευροειδικών γονιδίων στο στάδιο των NSCs. Η καταστολή αυτή επιτυγχάνεται μετά από μεθυλίωση καταλοίπων λυσίνης της H3 ιστόνης (3meH3K27) [109]. Ένα από αυτά τα γονίδια είναι και το Ascl1, το οποίο κατέχει κεντρικό ρόλο στη νευρογένεση. Φαίνεται, λοιπόν, πως το miR-124 αποτελεί ιδανικό υποψήφιο microRNA όσον αφορά τον επαναπρογραμματισμό κυττάρων προς νευρώνες.

38

Παρά το βασικό ρόλο των micro-RNAs στη νευρογένεση, δεν έχει διερευνηθεί εκτενώς ο ρόλος τους στον άμεσο επαναπρογραμματισμό αστροκυττάρων προς νευρώνες. Σε μία από τις ελάχιστες μελέτες σε ανθρώπινα αστροκύτταρα παρατηρήθηκε απευθείας μετασχηματισμός σε νευροβλάστες μετά από έκφραση των miR-302/367 τόσο in vitro όσο και in vivo με χρήση VPA, το οποίο ενισχύει τη μεταγραφική ενεργότητα [110]. Ωστόσο, φαίνεται πως το ενδιαφέρον της αναγεννητικής ιατρικής έχει στραφεί σε άμεσο επαναπρογραμματισμό με microRNAs λόγω της αφθονίας τους στον εγκέφαλο και της πολύπλευρης ρυθμιστικής τους ικανότητας.

## 1.5 Σκοπός της εργασίας

0 άμεσος επαναπρογραμματισμός αστροκυττάρων προς επαγόμενους νευρώνες αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την αντικατάσταση των νευρώνων που χάνονται σε καταστάσεις τραύματος ή εκφυλισμού. Στο εργαστήριο μας μελετάται ο άμεσος επαναπρογραμματισμός αστροκυττάρων από το φλοιό ποντικού προς επαγόμενους νευρώνες, μέσω της δράσης ενός, άφθονου στον εγκέφαλο, micro-RNA, του miR-124 και ενός νευρογενετικού χημικού μορίου, του ISX9. Πρόσφατα πραγματοποιήθηκε και αναλύθηκε στο εργαστήριο μας ένα πείραμα RNA sequencing με αποτέλεσμα την βαθύτερη κατανόηση των αλλαγών που συμβαίνουν στο μεταγράφωμα των επαγόμενων νευρώνων. Ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον εύρημα αυτής της ανάλυσης αποτέλεσε το γεγονός ότι το ISX9 οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων για την ανάπτυξη νευρώνων άλλων περιοχών του εγκεφάλου, εκτός του φλοιού, όπως ο μεσεγκέφαλος. Σύμφωνα με τα παραπάνω, σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι η επιβεβαίωση των επιπέδων των γονιδίων αυτών καθώς και η διερεύνηση της ώθησης των επαγόμενων νευρώνων μετά από επαναπρογραμματισμό αστροκυττάρων του φλοιού ποντικού με το miR-124 + ISX9 προς μία ταυτότητα ντοπαμινεργικών νευρώνων του μεσεγκέφαλου.

# 2. Υλικά – Μέθοδοι

# 2.1 Απομόνωση εγκεφαλικού φλοιού και πρωτογενής καλλιέργεια αστροκυττάρων

Η απομόνωση πραγματοποιείται από νεογνά ποντίκια C57bl6J αγρίου τύπου, τρεις με πέντε ημέρες μετά τη γέννησή τους (p3-p5). Αρχικά, τα νεογνά καρατομούνται και το κεφάλι τοποθετείται σε τρυβλίο. Εκεί, γίνεται η αφαίρεση του δέρματος της κεφαλής με τη βοήθεια ψαλιδιού, ώστε να αποκαλυφθεί το κρανίο. Στη συνέχεια, το κρανίο κόβεται με κατεύθυνση από τη βάση του προς τους οσφρητικούς λοβούς και αφαιρείται με τη βοήθεια λαβίδας. Όταν αποκαλυφθεί ο εγκέφαλος αφαιρείται με προσοχή με μία λαβίδα McDonald και τοποθετείται σε τρυβλίο με PBS (Phosphate Buffer Solution) κάτω από το στερεοσκόπιο. Το PBS διατηρεί το pH και την ωσμωτικότητα του ιστού σταθερά ώστε να μην καταστραφεί το δείγμα. Κάτω από το στερεοσκόπιο αρχικά αφαιρούνται οι μήνιγγες, οι οποίες βρίσκονται επάνω στο φλοιό, οι οσφρητικοί λοβοί και οι παρεγκεφαλίδα. Στη συνέχεια, τα δύο εναπομείναντα εγκεφαλικά ημισφαίρια γυρίζουν από την ανάποδη πλευρά ώστε ο φλοιός να εφάπτεται στο τρυβλίο και γίνεται αφαίρεση του ιππόκαμπου και όλων των υπολοίπων εσωτερικών περιοχών του εγκεφάλου. Τέλος, ο φλοιός τοποθετείται σε falcon με διάλυμα HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) ώστε να διατηρηθεί μέχρι να γίνει περαιτέρω επεξεργασία.

Σε κάθε φλάσκα καλλιέργειας (75cm<sup>2</sup>), η οποία είναι επικαλυμμένη με πολυ-Dλυσίνη (PDL, βοηθά στην επίστρωση των κυττάρων) (Sigma, P6407), τοποθετούνται κύτταρα τα οποία προέρχονται από δύο με δυόμιση εγκεφάλους. Μόλις γίνει απομόνωση του επιθυμητού αριθμού εγκεφάλων και συνακόλουθα εγκεφαλικών φλοιών, γίνονται στους ιστούς αρχικά δύο πλύσεις με HBSS και στη συνέχεια εισάγονται σε κάθε falcon 900μl DMEM 1% P/S, 10μl DNάση και 4μl τρυψίνη, ένζυμα τα οποία θα προκαλέσουν πέψη των ιστών και απελευθέρωση των κυττάρων. Μόλις γίνει προσθήκη των ενζύμων οι ιστοί επωάζονται για 5 λεπτά στους 37°C. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης γίνεται προσθήκη 9ml DMEM 10% FBS, 1% P/S ώστε να τερματιστεί η ενζυμική αντίδραση και η διάσπαση συνεχίζεται μηχανικά με τη βοήθεια ανάδευσης με γυάλινη πιπέτα Παστέρ. Μετά την προσθήκη του θρεπτικού και την ανάδευση ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 850rpm, απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 10ml θρεπτικού υλικού. Τέλος, τα 10ml θρεπτικού, τα οποία περιέχουν τα κύτταρα επιστρώνονται στη φλάσκα.

#### 2.2 Καθαρισμός – επέκταση πρωτογενούς καλλιέργειας αστροκυττάρων

Μία μέρα μετά την επίστρωση αφαιρείται όλο το θρεπτικό υλικό της φλάσκας, ώστε να αφαιρεθούν όλα τα κύτταρα, τα οποία δεν προσκολλήθηκαν στο υπόστρωμα, και τοποθετούνται ξανά 10ml DMEM 10% FBS, 1% P/S. Τις επόμενες μέρες οι αλλαγές θρεπτικού γίνονται μέρα παρά μέρα, ενώ όσον αφορά τον όγκο θρεπτικού αφαιρείται ο μισός και προστίθεται όγκος ίσος με τον όγκο αφαίρεσης. Δεν αφαιρείται η ολική ποσότητα θρεπτικού καθώς τα αστροκύτταρα εκκρίνουν ουσίες, οι οποίες τα βοηθούν στην επιβίωσή τους.

Τα κύτταρα καλλιεργούνται για 7-8 ημέρες, μέχρι να φτάσουν τη μέγιστη πυκνότητα μέσα στη φλάσκα και στη συνέχεια αναδεύονται για περίπου 24 ώρες με περίσσεια θρεπτικού στα 200-250rpm. Στόχος της ανάδευσης είναι η απομάκρυνση νευρώνων, ολιγοδενδροκυττάρων και μικρογλοίας, τα οποία, λόγω της μικρότερης ικανότητας πρόσφυσης στο υπόστρωμα, αποκολλώνται και απομακρύνονται μαζί με το υπερκείμενο.

Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, γίνονται δύο πλύσεις με 10ml την κάθε φορά DMEM 1% P/S και συνακόλουθα γίνεται προσθήκη 1ml 0,25% τρυψίνης – EDTA και επώαση στους 37°C για 5 λεπτά. Με την προσθήκη της τρυψίνης τα κύτταρα αποκολλώνται από το υπόστρωμα. Η τρυψίνη απενεργοποιείται με 9ml DMEM 10% FBS, 1% P/S, το θρεπτικό με τα κύτταρα συλλέγεται σε falcon και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στα 850rpm. Στη συνέχεια το υπερκείμενο απορρίπτεται και γίνεται επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 10ml DMEM 10% FBS, 1% P/S. Τέλος, σε δύο νέες φλάσκες, επικαλυμμένες με PDL, σε κάθε μία από τις οποίες έχουν προστεθεί 5ml φρέσκου DMEM 10% FBS, 1% P/S, ισομοιράζεται το περιεχόμενο του falcon. Με αυτό τον τρόπο, η κάθε φλάσκα μέγιστης πυκνότητας δίνει δύο καινούριες, ώστε να συνεχιστεί ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων.

## 2.3 Προετοιμασία για τη διαμόλυνση

Όταν (μετά από περίπου τρεις ημέρες) τα κύτταρα έχουν πολλαπλασιαστεί επαρκώς στις φλάσκες (περίπου στο 90% πυκνότητα) πραγματοποιείται εκ νέου αποκόλληση των κυττάρων, γίνεται μέτρησή τους με αιματοκυττόμετρο (Newbauer) και στη συνέχεια επίστρωσή τους σε πιάτα 6-48 οπών, στα wells των οποίων έχουν τοποθετηθεί λαμέλες επιστρωμένες με πολυ-L-ορνιθίνη (PLO) και λαμινίνη. Η PLO προσφέρει στην επιφάνεια της λαμέλας το απαραίτητο φορτίο ώστε στη συνέχεια να προσροφηθεί η λαμινίνη, παράγοντας με τη βοήθεια του οποίου ευνοείται η νευρογένεση.

Τα πιάτα, τα οποία χρησιμοποιούνται ορίζονται βάσει του εκάστοτε πειράματος. Μπορεί να είναι 48-well, στα οποία επιστρώνονται σε κάθε θέση 40.000 κύτταρα σε τελικό όγκο 250μl, 6-well ή p35, στα οποία επιστρώνονται σε κάθε θέση περίπου 350.000 κύτταρα σε τελικό όγκο 1ml

Όσον αφορά τα 6-well και τα p35, αυτά χρησιμοποιούνται σε πρωτόκολλο απομόνωσης RNA από τα κύτταρα, δε γίνεται χρήση λαμελών και η επίστρωση είναι PDL. Το θρεπτικό, το οποίο χρησιμοποιείται είναι DMEM, 10% FBS, 1% P/S.

# 2.4 Διαμόλυνση και διαφοροποίηση αστροκυττάρων με τη χρήση microRNA mimic

#### 2.4.1 Βασικό Πρωτόκολλο

#### Υλικά Διαμόλυνσης

- Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen, 11668)
- miRIDIAN microRNA Mimic Negative Control (20µM) (Thermo Scientific-Dharmacon, CN-001000-01-05)
- miRIDIAN microRNA mmu-miR-124-3p Mimic (20µM) (Thermo Scientific-Dharmacon, C-310391-05-0010)
- Optimem (Gibco, 31985-062)

## <u>Υλικά Καλλιέργειας</u>

- DMEM (Invitrogen, 31885) 10% FBS (Gibco, 10270-106)
- Εμπλουτισμένο DMEM 10% FBS, 1% P/S (Invitrogen, 15140-122) : Neurobasal (Invitrogen, 21103-049) 1X B27 (Invitrogen, 17504-044), 1X Glutamax (Gibco, 35050-038), 1% P/S σε αναλογία 1/1
- Εμπλουτισμένο Neurobasal 1X B27, 1X Glutamax
- Εμπλουτισμένο Neurobasal 1X B27, 1X Glutamax, 1% P/S

Τα εμπλουτισμένα θρεπτικά δημιουργούνται με τη βοήθεια μίας επιπλέον φλάσκας αστροκυττάρων.

#### Πρόσθετες ενώσεις στα υλικά καλλιέργειας

- α Τοκοφερόλη (20μΜ) (Sigma, T3251)
- Ασκορβικό οξύ (200μΜ) (Sigma, A4403)
- Isoxazole 9 (ISX9, 10μM) (Tocris, 4439)
- $c AMP (500 \mu M)$
- Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF, 20ng/ml) (R&D Systems, 248-BD-025)

Μόλις τα αστροκύτταρα φτάσουν στην κατάλληλη πυκνότητα (περίπου 80%) πραγματοποιείται διαμόλυνσή τους με καθένα από τα δύο mimics, του negative control (NC) ή του miR-124. Η διαδικασία της διαμόλυνσης έχει ως εξής για τα 6 – well plates:

Αρχικά, το θρεπτικό των κυττάρων αντικαθίσταται με 800μl DMEM 10% FBS. Το συγκεκριμένο βοηθά στη διαμόλυνση των κυττάρων διότι δεν περιέχει αντιβιοτικά. Στη συνέχεια, για κάθε συνθήκη (NC, miR-124) προετοιμάζονται δύο eppendorfs.

- A. Optimem: 100µl/well NC/miR-124: 5µl/well
- B. Optimem: 100µl/wellLipofectamine 2000: 4µl/well

Μετά την προετοιμασία το μίγμα (A) εισάγεται στο μίγμα (B), το συνολικό μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για τουλάχιστον 20' και, τέλος, το μίγμα προστίθεται στην επιθυμητή θέση στο 6-well πιάτο.

Την επόμενη ημέρα το θρεπτικό μαζί με το υλικό διαμόλυνσης αφαιρούνται και το θρεπτικό αντικαθίσταται από το εμπλουτισμένο DMEM 10% FBS, 1% P/S : Neurobasal 1X B27, 1X Glutamax, 1% P/S σε αναλογία 1/1. Σε αυτό έχει γίνει προσθήκη α – τοκοφερόλης και ασκορβικού οξέος για όλες τις θέσεις διαμόλυνσης και προσθήκη ISX9 μόνο για τις επιθυμητές (βάσει πειράματος) θέσεις. Η **α** – **τοκοφερόλη** (μορφή της αντιοξειδωτικής βιταμίνης C) έχει δειχθεί ότι μειώνει τη λιπιδική υπεροξείδωση, η οποία επάγει το μηχανισμό του κυτταρικού θανάτου<sup>60</sup>, ενώ το **ασκορβικό οξύ** φαίνεται να διαθέτει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και να βελτιώνει ποσοτικά τα πρωτόκολλα επαναπρογραμματισμού<sup>59</sup>.

Η διαμόλυνση των κυττάρων με τα miRNA-mimics πραγματοποιείται συνολικά τρεις φορές, ανά δύο ημέρες. Το θρεπτικό υλικό, το οποίο προστίθεται στα κύτταρα τις ημέρες των επόμενων διαμολύνσεων είναι εμπλουτισμένο Neurobasal 1X B27, 1X Glutamax στο οποίο έχουν προστεθεί οι απαραίτητες χημικές ενώσεις, ενώ τις υπόλοιπες ενδιάμεσες ημέρες γίνεται αλλαγή θρεπτικού με εμπλουτισμένο Neurobasal 1X B27, 1X Glutamax, 1% P/S, στο οποίο έχουν προστεθεί όλες οι απαραίτητες χημικές ενώσεις (Πίνακας 2.1).

1η Μέρα	2η Μέρα	3η Μέρα	4η Μέρα	5η Μέρα	6η Μέρα	7η Μέρα
1η Διαμόλυνση		2η Διαμόλυνση		3η Διαμόλυνση		
DMEM 10% FBS -PS	DMEM 10%- Neurobasal B27/Glut 1:1	cond. Neurobasal B27/Glutamax -PS	cond. Neurobasal B27/Glutamax	cond. Neurobasal B27/Glutamax -PS	cond. Neurobasal B27/Glutamax	
	Ασκορβικό Οξύ					
	α - Τοκοφερόλη					
	ISX9					

Πίνακας 2.1: Διαγραμματική απεικόνιση της βασικής διαδικασίας επαναπρογραμματισμού

Στην περίπτωση κατά την οποία επιθυμούμε να διατηρήσουμε την καλλιέργεια για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (long term experiment, περίπου μέχρι 30 μέρες) μετά την 8<sup>η</sup> μέρα γίνεται αλλαγή θρεπτικού ανά 2-3 μέρες με εμπλουτισμένο Neurobasal/B27/Glutamax, στο οποίο γίνεται προσθήκη ασκορβικού οξέος, c – AMP και BDNF. Το ISX9 παραμένει στην καλλιέργεια μέχρι τη 10<sup>η</sup> μέρα.

## 2.4.2 Πρωτόκολλο με επιπλέον προσθήκες

Με σκοπό την ώθηση της καλλιέργειας στη δημιουργία νευρώνων ντοπαμινεργικού χαρακτήρα ακολουθείται το παραπάνω πρωτόκολλο με τις εξής επιπλέον προσθήκες: Sonic Hedgehog (Shh, 100ng/ml) και Fibroblast Growth Factor 8b (Fgf8b, 100ng/ml) προστέθηκαν από την 4<sup>η</sup> μέχρι την 7<sup>η</sup> μέρα και σε πείραμα μεγαλύτερης διάρκειας έγινε προσθήκη Glial cell line – Derived Neurotrophic Factor (GDNF, 10ng/ml) από την 7<sup>η</sup> μέρα και μετά (**Πίνακας 2.2**).

1η Μέρα	2η Μέρα	3η Μέρα	4η Μέρα	5η Μέρα	6η Μέρα	7η Μέρα
1η Διαμόλυν <del>σ</del> η		2η Διαμόλυνση		3η Διαμόλυνση		
DMEM 10% FBS -PS	DMEM 10%- Neurobasal B27/Glut 1:1	cond. Neurobasal B27/Glutamax - PS	cond. Neurobasal B27/Glutamax	cond. Neurobasal B27/Glutamax -PS	cond. Neurobasal B27/Glutamax	
	Ασκορβικό Οξύ					
	α - Τοκοφερόλη					
	ISX9					
		Shh				
			Fgf8			

Πίνακας 2.2: Διαγραμματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου με επιπλέον προσθήκες των Shh και Fgf8

## 2.5 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του ολικού RNA των κυττάρων πραγματοποιείται με τη χρήση του κιτ NucleoSpin miRNA. Μετά το πέρας της διαδικασίας, τόσο τα μικρά όσο και τα μεγαλύτερα μόρια RNA καταλήγουν προσδεμένα σε στήλη και, συνακόλουθα, γίνεται έκλουσή τους με ειδικό διάλυμα.

## 2.6 Σύνθεση cDNA

Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε κιτ της SuperScriptTM Reverse Transcriptase.

## <u>Υλικά</u>

- 5X First Strand Buffer (FSB)
- DTT (0.1M)
- Τυχαία Εξαμερή Εκκινητών (Random Primers, 120ng)
- Μίγμα dNTPs (10mM)
- SuperScript II RNase H Reverse Transcriptase
- RNA (500-700ng)
- ddH<sub>2</sub>O

Μίγμα 1: 1μl Τυχαίων Εξαμερών Εκκινητών και 1μl από το μίγμα των dNTPs για κάθε ένα από τα δείγματα RNA.

Μίγμα 2: 2μl DTT και 4μl FSB για κάθε ένα από τα δείγματα RNA.

Αρχικά, γίνεται ανάμιξη της επιθυμητής ποσότητας RNA με την κατάλληλη ποσότητα ddH<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 11,5μl. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη 2μl του μίγματος 1 σε κάθε δείγμα.

Τότε, τα δείγματα ζεσταίνονται για 5min στους 65°C με σκοπό την αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών του RNA και, συνακόλουθα, τοποθετούνται άμεσα σε πάγο ώστε να συνεχίσει να υφίσταται η αποδιάταξη. Τότε, γίνεται προσθήκη σε κάθε δείγμα 6μl από το μίγμα 2 και επώαση στους 25°C για 2min ώστε να συμβεί η υβριδοποίηση των εξαμερών στο εκμαγείο του RNA. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη 0,5μl του ενζύμου σε κάθε δείγμα και:

- Επώαση στους 25°C για 10min
- Επώαση στους 42°C για 50min (σύνθεση cDNA)
- Παραμονή στους 70°C για 10min (απενεργοποίηση της διαδικασίας)
- Παραμονή στους 4°C για άμεση χρήση ή αποθήκευση των δειγμάτων στους -20°C

# 2.7 Real Time RT-PCR

Η Real Time RT – PCR αποτελεί τεχνική ποσοτικοποίησης της γονιδιακής έκφρασης, επιτρέποντας την ανίχνευση της αντίδρασης ενίσχυσης του προϊόντος τη στιγμή που συμβαίνει. Πρόκειται για μέθοδο η οποία στηρίζεται σε σύζευξη των μορίων με φθορίζουσα χρωστική, ο φθορισμός της οποίας είναι ανάλογος του προϊόντος ενίσχυσης. Καθώς η αντίδραση ενίσχυσης προχωρά και αυξάνεται η ποσότητα προϊόντος αυξάνεται παράλληλα και η ποσότητα φθορισμού και, τελικά, δημιουργείται η γραφική παράσταση συσχέτισης της έντασης φθορισμού ως προς των αριθμό κύκλων, οι οποίοι έχουν πραγματοποιηθεί.

Η στιγμή ανίχνευσης του προϊόντος ορίζεται από κατώφλι – τιμή της έντασης φθορισμού πάνω από την οποία η ποσότητα του προϊόντος μπορεί να θεωρηθεί σημαντική. Ο αριθμός του κύκλου στον οποίο ξεκινά η ανίχνευση ορίζεται ως Ct. Το μίγμα της αντίδρασης φαίνεται στον **πίνακα 2.3**:

Mix	X1
SYBR Green Select Master Mix	10µ1
Forward Primer (10µM)	0.5µl
Reverse Primer (10µM)	0.5µl
cDNA (100ng/ml)	Εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση
MQ H2O	(20-10-0.5-0.5-cDNA)µl
Total Mix	20µl

Πίνακας 2.3: Μίγμα αντίδρασης Real Time RT PCR

## Εσωτερικοί Δείκτες

- No Template Control (NTC): Ο συγκεκριμένος έλεγχος χρησιμοποιείται σε κάθε διαδικασία για κάθε ζεύγος εκκινητών ξεχωριστά, με σκοπό την ανίχνευση επιμόλυνσης. Το μίγμα δεν περιέχει cDNA οπότε αναμένεται μηδενική ενίσχυση.
- Δομικό Γονίδιο (Housekeeping Gene): Πρόκειται για γονίδιο του οποίου η έκφραση παραμένει σταθερή εντός του κυττάρου, ανεξάρτητα των συνθηκών, οι οποίες μελετώνται. Τα δείγματα τέτοιων γονιδίων χρησιμοποιούνται για την κανονικοποίηση των δειγμάτων. Στην παρούσα εργασία το γονίδιο, το οποίο χρησιμοποιείται είναι η ακτίνη.
- Δείγμα Βαθμονόμησης (NC): Πρόκειται για δείγμα βάσει του οποίου γίνονται όλοι οι συσχετισμοί σχετικά με την επίδραση των διαφόρων συνθηκών του πειράματος. Στη συγκεκριμένη εργασία το δείγμα αυτό προέρχεται από

κύτταρα, τα οποία έχουν υποστεί διαμόλυνση με microRNA Mimic Negative Control και στα οποία έχουν συμβεί οι ίδιες αλλαγές θρεπτικών υλικών.

#### Ποσοτικοποίηση Δεδομένων

Η μέση έκφραση κάθε γονιδίου κανονικοποιείται σε σχέση με το γονίδιο ακτίνης του αντίστοιχου δείγματος. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται η παράμετρος ΔCt (Ct γονιδίου – Ct ακτίνης), η οποία χρησιμοποιείται για την εύρεση της σχετικής ποσότητας των μεταγράφων (2^-ΔCt). Τέλος, η γονιδιακή έκφραση βρίσκεται μετά από κανονικοποίηση του εκάστοτε δείγματος με το NC (2^-ΔCt δείγματος / 2^-ΔCt NC).

#### 2.8 Ανοσοφθορισμός

Η μέθοδος του ανοσοφθορισμού επιτρέπει την ανίχνευση της ύπαρξης και της θέσης στην οποία βρίσκεται ένα αντιγόνο στο κύτταρο. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη χρήση ιχνηθετημένων με φθορίζουσες χρωστικές, δευτερογενών αντισωμάτων, τα οποία προσδένονται στη σταθερή περιοχή πρωτογενών αντισωμάτων, ειδικών για τον εντοπισμό του επιθυμητού αντιγόνου. Με τη βοήθεια μεθόδων συνεστιακής μικροσκοπίας και ανάλυσης εικόνας επιτρέπεται η ταυτόχρονη ανίχνευση δύο ή περισσοτέρων αντιγόνων, καθώς και η μερική ποσοτικοποίηση των επιπέδων τους.

Όσον αφορά τη χρώση με τα πρωτογενή και δευτερογενή αντιγόνα αρχικά γίνεται μονιμοποίηση των κυττάρων, τα οποία βρίσκονται επιστρωμένα σε γυάλινες λαμέλες. Η μονιμοποίηση συμβαίνει με την προσθήκη διαλύματος παραμορμαλδεΰδης 4% (4% PFA) για 20min. Στη συνέχεια η PFA απομακρύνεται και γίνονται τρεις εκπλύσεις των 5min με PBS 1X.

Αφού τελειώσει η μονιμοποίηση ακολουθεί η προσθήκη διαλύματος blocking (NDS 5%, Triton-X 0.1%, NaN<sub>3</sub> 0.02%) και επώαση με αυτό για περίπου μία ώρα ώστε να γίνει κάλυψη των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων των κυττάρων (250μl για κάθε λαμέλα). Ακολουθεί επώαση των κυττάρων σε τα πρωτογενή αντισώματα, τα οποία βρίσκονται σε διάλυμα NDS 1%, Triton-X 0.05%, NaN<sub>3</sub> 0.02% για 24 ώρες στους 4°C (30μl διάλυμα για κάθε λαμέλα).

Την επόμενη ημέρα, οι λαμέλες ξεπλένονται σε PBS και επωάζονται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με το διάλυμα των δευτερογενών αντισωμάτων συζευγμένων με τη χρωστική (30μl διάλυμα για κάθε λαμέλα). Συνακόλουθα, γίνεται και πάλι έκπλυση σε PBS και μία επιπλέον πλύση με ddH<sub>2</sub>O. Τέλος, οι λαμέλες τοποθετούνται επάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες, με ταυτόχρονη προσθήκη Prolong Gold (χρώση πυρήνων) και είναι έτοιμες για παρατήρηση.

Γονίδιο	Ξενιστής	Είδος	Εταιρία/Νο
Nurr1	Mouse	IgG	Santa
			Cruz/447C2a
Gli1	Rabbit	IgG	Abcam/ab49314
Tuj1	Mouse	IgG	Biolegend/MMS-
			435P
Tuj1	Chicken	IgY	Merk
			Millipore/AB9354
anti-mouse	Donkey	IgG	Invitrogen/A10036
anti-mouse	Donkey	IgG	Invitrogen/A31571
anti-rabbit	Donkey	IgG	Invitrogen/A21206
anti-chicken	Goat	IgG	Invitrogen/A11040

Τα αντισώματα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν, φαίνονται στον πίνακα 2.4:

Πίνακας 2.4: Πίνακας αντισωμάτων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν.

# 3. Αποτελέσματα

### 3.1 RNA sequencing

Η παρούσα μελέτη βασίστηκε στα αποτελέσματα ενός πειράματος RNA sequencing (RNA-seq) που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο μας από την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Έλσα Παπαδημητρίου. Για το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα άμεσου επαναπρογραμματισμού αστροκυττάρων φλοιού, βάσει του πρωτοκόλλου το οποίο έχει περιγραφεί παραπάνω (βλ.σελ. 44, εικόνα 3.1). Τα δείγματα συλλέχθηκαν την 7<sup>η</sup> μέρα (day 7) μετά την αρχή της διαδικασίας του επαναπρογραμματισμού, ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA, κατασκευή βιβλιοθηκών, αλληλούχηση των δειγμάτων και βιοπληροφορική ανάλυση.



Εικόνα 3.1: Πρωτόκολλο άμεσου επαναπρογραμματισμού. Παρουσιάζεται συνοπτικά το πρωτόκολο που εφαρμόστηκε για το πείραμα του RNA-seq. Την Day1 ξεκίνησαν οι διαμολύνσεις και συλλέχθηκαν τα αστροκύτταρα, ενώ την Day7 έγινε συλλογή των miR-124\_iNs και miR-124+ISX9\_iNs.

Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα του RNAseq ήταν τα εξής: Αστροκύτταρα που απομονώθηκαν την ημέρα 1 (ημέρα έναρξης των διαμολύνσεων) (control\_astrocytes\_day1), επαγόμενοι νευρώνες (induced neurons, iNs) μετά από επαναπρογραμματισμό με το miR-124 (miR-124\_iNs\_day7) και επαγόμενοι νευρώνες (iNs) μετά από επαναπρογραμματισμό με το miR-124 παρουσία του νευρογενετικού χημικού μορίου ISX9 (miR-124+ISX9 iNs day7).

Η ανάλυση PCA (Principal Component Analysis) έδειξε ότι οι τρεις διαφορετικές συνθήκες που αναλύθηκαν (control\_astrocytes, miR-124\_iNs και miR-124+ISX9\_iNs) παρουσιάζουν σημαντική απόσταση μεταξύ τους, κάτι που υποδηλώνει ότι οι επαγόμενοι νευρώνες (miR-124\_iNs και miR-124+ISX9\_iNs) αποτελούν διακριτούς πληθυσμούς σε σχέση με τα αστροκύτταρα από τα οποία προήλθαν (**Εικόνα 3.2**). Παράλληλα, διαφαίνεται ότι η προσθήκη του ISX9 στο πρωτόκολλο του επαναπρογραμματισμού οδηγεί σε έναν εμφανώς διαφορετικό πληθυσμό επαγόμενων νευρώνων. Επίσης, η απόσταση μεταξύ των τριών επαναλήψεων της κάθε συνθήκης ήταν ιδιαίτερα μικρή, γεγονός που υποδηλώνει ότι το πείραμα είχε πολύ καλή επαναληψιμότητα..



Εικόνα 3.2: Ανάλυση PCA: παρουσιάζεται η σχετική απόσταση των τριών διαφορετικών συνθηκών μεταξύ τους, καθώς και η απόσταση των 3 επαναλήψεων της κάθε συνθήκης

## 3.2 Ανάλυση οντολογιών γονιδίων (gene ontology analysis)

Από την ανάλυση του RNA-seg πειράματος προέκυψαν 2 λίστες διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων (DEGs, differentially expressed genes), οι οποίες προέκυψαν από τη σύγκριση των εκφραζόμενων γονιδίων μεταξύ των συνθηκών miR-124 iNs vs control astrocytes και μεταξύ των συνθηκών miR-124+ISX9 iNs vs control astrocytes. Με τη χρήση αυτών των DEGs που προέκυψαν από κάθε σύγκριση έγινε GO ανάλυση (Gene Ontology analysis) με τη βοήθεια του εργαλείου Panther Classification System (http://www.pantherdb.org) και με σκοπό την κατηγοριοποίηση των DEGs ανά βιολογική διαδικασία (GO terms, biological function). Η GO ανάλυση πραγματοποιήθηκε για τα DEGs των οποίων τα επίπεδα αυξάνονται (upregulated genes) ή μειώνονται (downregulated genes) κατά τις συγκρίσεις miR-124 iNs vs control astrocytes και miR-124+ISX9 iNs vs control astrocytes. Στην εικόνα 3.3 παρουσιάζονται οι κοινές βιολογικές διαδικασίες (GO terms, biological functions) όπως προέκυψαν από την ανάλυση των upregulated DEGs και των δύο συγκρίσεων, με μπλε χρώμα (miR-124 iNs vs control astrocytes) και με πορτοκαλί χρώμα (miR-124+ISX9 iNs vs control astrocytes). Το μέγεθος της κάθε μπάρας αντιστοιχεί στον αρνητικό λογάριθμο του FDR (False Discovery Rate) και όσο μεγαλύτερη είναι τόσα περισσότερα γονίδια (DEGs) περιέχονται στο δεδομένο GO term.



Εικόνα 3.3: Ανάλυση των οντολογιών γονιδίων (GO term analysis, biological function) για τα DEGs των οποίων τα επίπεδα αυξάνονται (upregulated DEGs). Κάθε μπάρα αναπαριστά τον αρνητικό λογάριθμο του FDR (log(FDR)) για το κάθε GO term. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται ο -log(FDR) για τα GO terms που προέκυψαν από τη σύγκριση miR-124\_iNs vs control\_astrocytes και με πορτοκαλί ο -log(FDR) για τα αντίστοιχα GO terms που προέκυψαν από τη σύγκριση miR-124+ISX9\_iNs vs control\_astrocytes.

Τα παραπάνω αποτελέσματα έδειξαν ότι και στα δύο δείγματα, ένα μεγάλος αριθμός DEGs ανήκει στην κατηγορία της συναπτικής σηματοδότησης και της ρύθμισης της, καθώς επίσης και στις βιολογικές διαδικασίες που σχετίζονται με τη γένεση νευρώνων (νευρογένεση, δημιουργία νευρώνων, ρύθμιση της νευρογένεσης, διαφοροποίηση νευρώνων), αλλά και με άλλες νευροειδικές διεργασίες, όπως η εξωκυττάρωση συναπτικών κυστιδίων, η ρύθμιση του δυναμικού της μεμβράνης, η μεταφορά νευροδιαβιβαστών. Φαίνεται λοιπόν πως τόσο οι επαγόμενοι νευρώνες miR-124\_iNs όσο και οι miR-124+ISX9\_iNs έχουν αρχίσει να αποκτούν σταδιακά ένα γονιδιακό προφίλ χαρακτηριστικό της νευρωνικής ταυτότητας. Τέλος, παρατηρήθηκε επίσης, πως ο αριθμός των DEGs για τα περισσότερα GO terms είναι φανερά μεγαλύτερος στο δείγμα miR-124+ISX9 σε σχέση με το δείγμα miR-124, κάτι το οποίο υποδηλώνει πως η προσθήκη του χημικού μορίου βοηθάει αξιοσημείωτα τη νευρογενετική διαδικασία.

Από την GO ανάλυση των DEGs της σύγκρισης miR-124+ISX9\_iNs vs control\_astrocytes προέκυψαν πολύ περισσότερες βιολογικές διαδικασίες (GO terms) που είναι σχετικές με τη νευρωνική λειτουργία, σε σχέση με τους miR-124\_iNs, μεταξύ των οποίων και πολλά GO terms, τα οποία σχετίζονται με την ειδικότητα των νευρώνων. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.4** το ISX9 οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων γονιδίων που σχετίζονται κυρίως με τη δημιουργία γλουταματεργικών, καθώς και GABAεργικών νευρώνων, ενώ αποτελεί ενδιαφέρον το ότι φαίνεται να αυξάνει γονίδια που σχετίζονται και με άλλους υποτύπους, όπως οι ντοπαμινεργικοί, χολινεργικοί και κατεχολαμινεργικοί νευρώνες.



Εικόνα 3.4: Ανάλυση των οντολογιών γονιδίων (GO term analysis, biological function) για τα DEGs των miR-124+ISX9\_iNs των οποίων τα επίπεδα αυξάνονται (upregulated DEGs) και κατηγοριοποίηση βάσει νευρωνικών υποτύπων. Κάθε μπάρα αναπαριστά τον αρνητικό λογάριθμο του FDR (-log(FDR)) για το κάθε GO term.

Ενώ η τάση για τη δημιουργία γλουταματεργικών και GABAεργικών νευρώνων, όπως αυτή αποτυπώνεται στο μεταγράφωμα των miR-124+ISX9\_iNs, είναι σχετικά αναμενόμενη δεδομένου ότι οι υπότυποι αυτοί αποτελούν τους δύο τύπους νευρώνων που βρίσκονται στον εγκεφαλικό φλοιό, περιοχή από την οποία προήλθε και ο αρχικός πληθυσμός των προς επαναπρογραμματισμό αστροκυττάρων, η λιγότερο έντονη πλην όμως παρούσα τάση για άλλους τύπους νευρώνων που δεν σχετίζονται με τον φλοιό είναι ένα απροσδόκητο εύρημα.

Για παράδειγμα η εμφάνιση πλήθους γονιδίων που σχετίζονται με τη δημιουργία ντοπαμινεργικών νευρώνων, οι οποίοι δε βρίσκονται παραδοσιακά στον εγκεφαλικό φλοιό, αλλά είναι συνυφασμένοι με κατώτερες περιοχές του εγκεφάλου, όπως ο μεσεγκέφαλος, υποδηλώνει ότι το ISX9 ίσως να έχει τη δυνατότητα διεύρυνσης του φάσματος των νευρωνικών υποτύπων, οι οποίοι θα μπορούσαν να προέλθουν από τα αστροκύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού.

## 3.3 Ανάλυση των μεταγραφικών παραγόντων (TFs)

Επειδή ο επαναπρογραμματισμός από μία κυτταρική μοίρα σε μία άλλη είναι μία διαδικασία που επιφέρει δραματικές μεταγραφικές και επιγενετικές αλλαγές στα επαναπρογραμματιζόμενα κύτταρα, ένας μεγάλος στόχος του πειράματος του RNAseq ήταν να ταυτοποιηθούν οι κύριοι μεταγραφικοί και επιγενετικοί παράγοντες που κατευθύνουν τον επαναπρογραμματισμό των αστροκυττάρων λόγω της υπερέκφρασης του miR-124 από μόνο του ή παρουσία του ISX9. Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκαν αρχικά οι μεταγραφικοί παράγοντες (Transcription Factors, TFs) ανάμεσα στα DEGs τόσο των miR-124 iNs, όσο και των miR-124+ISX9 iNs χρησιμοποιώντας δύο λίστες παραγόντων, από Riken University μεταγραφικών η μία το (http://genome.gsc.riken.jp/TFdb/tf list.html) και η άλλη από τη βάση δεδομένων TF Checkpoint (http://www.tfcheckpoint.org/) του πανεπιστημίου NTNU (Norwegian University of Science and Technology).

Μετά την ανάλυση βρέθηκαν TFs τόσο με αυξημένα, όσο και με μειωμένα επίπεδα στα δείγματα των miR-124\_iNs και miR-124+ISX9\_iNs και, βάσει των επιπέδων τους, δημιουργήθηκε ένας θερμικός χάρτης (Heat Map) (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5: Θερμικός χάρτης των μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι προέκυψαν από την ανάλυση. Όσο πιο ανοιχτό είναι το χρώμα τόσο πιο χαμηλά είναι τα επίπεδα του TF, ενώ όσο πιο σκούρο είναι το χρώμα τόσο πιο αυξημένα τα επίπεδα του TF.

Η δημιουργία του θερμικού χάρτη έδωσε πολύ χρήσιμες πληροφορίες όσον αφορά την επίδραση του miR-124 και του ISX9 στα επίπεδα τόσο αστροκυτταρικών, όσο και νευροειδικών TFs. Πιο συγκεκριμένα, καθίσταται σαφές ότι το miR-124 μειώνει τα επίπεδα πολλών αστροκυτταρικών TFs (π.χ. Id1, Id2, Id3, Hes1, Hey1, Zcchc24, Rbpj, Nfic), ενώ παράλληλα αυξάνει μετρίως τα επίπεδα TFs που σχετίζονται κατά κανόνα με την ανάπτυξη του πρόσθιου εγκεφάλου κατά την εμβρυογένεση ή/και την ενήλικη νευρογένεση (π.χ. Ascl1, Gsx2, Dlx1, Fezf2, Hes6, Sox11, Sox4).Από την άλλη πλευρά φαίνεται ότι το ISX9 δεν συμβάλλει περαιτέρω στην μείωση των επιπέδων αστροκυτταρικών TFs, πλην κάποιων εξαιρέσεων, ενώ δεν αυξάνει παραπάνω ή και μειώνει τα επίπεδα των νευροειδικών TFs που ρυθμίζονται θετικά από το miR-124. Παρόλα αυτά αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα πολλών TFs που επίσης σχετίζονται με την ανάπτυξη του πρόσθιου εγκεφάλου ή/και την ενήλικη νευρογένεση (π.χ. Eomes, Neurog2, Myt11, Cux2, Lhx6, Bcl11a) (εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6: Μεταγραφικοί παράγοντες των οποίων τα επίπεδα αυξάνονται στους miR-124\_iNs και στους miR-124+ISX9\_iNs. Οι συγκεκριμένοι TFs σχετίζονται με την ανάπτυξη του πρόσθιου εγκεφάλου ή/και την ενήλικη νευρογένεση. Όσο πιο ανοιχτό μπλε είναι το χρώμα τόσο μικρότερα επίπεδα έκφρασης, ενώ όσο πιο κόκκινο είναι το χρώμα τόσο μεγαλύτερα τα επίπεδα έκφρασης.

Ενδιαφέρον αποτελεί η εμφάνιση μίας κατηγορίας TFs, των οποίων τα επίπεδα αυξάνονται σημαντικά μόνο λόγω της επίδρασης του ISX9 και δεν σχετίζονται με την ανάπτυξη του πρόσθιου εγκεφάλου. Σε αυτούς συγκαταλέγονται οι TFs Lmx1b, Hoxc4, Phox2a, En1, Foxa1, Helt, Gli1, Vax2 (εικόνα 3.7), οι οποίοι σχετίζονται με τη δημιουργία νευρώνων άλλων περιοχών του εγκεφάλου, όπως είναι ο μεσεγκέφαλος, ο οπίσθιος εγκέφαλος, ο νωτιαίος μυελός και ο αμφιβληστροειδής.



Εικόνα 3.7: Μεταγραφικοί παράγοντες των οποίων τα επίπεδα αυξάνονται μόνο στους miR-124+ISX9\_iNs και σχετίζονται με περιοχές του εγκεφάλου όπως ο μεσεγκέφαλος, οπίσθιος εγκέφαλος και ανάπτυξη του ματιού. Όσο πιο ανοιχτό μπλε είναι το χρώμα τόσο μικρότερα επίπεδα έκφρασης, ενώ όσο πιο κόκκινο είναι το χρώμα τόσο μεγαλύτερα τα επίπεδα έκφρασης.

Βάσει, λοιπόν των θερμικών χαρτών (εικόνες 3.6 και 3.7) φαίνεται πως το ISX9 αυξάνει τα επίπεδα πολλών TFs, οι οποίοι σχετίζονται τόσο με τη δημιουργία νευρώνων του πρόσθιου εγκεφάλου, όσο και άλλων περιοχών του εγκεφάλου εκτός του φλοιού. Ενδεικτικά, μεταξύ αυτών των TFs, βρέθηκαν οι Gli1, Lmx1b, En1, En2 και Foxa1, οι οποίοι κατέχουν βασικό ρόλο τόσο στην ανάπτυξη του μεσεγκέφαλου και της διάκρισης μεσεγκέφαλου – οπίσθιου εγκεφάλου, όσο και στη γένεση και ανάπτυξη των ντοπανιμεργικών νευρώνων, οι Onecut2 και Irx6, οι οποίοι σχετίζονται με την ανάπτυξη του αμφιβληστροειδούς, οι Hoxb4 και Hoxc4, οι οποίοι σχετίζονται με την ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού και ο Phox2a, ο οποίος σχετίζεται τόσο με το μεσεγκέφαλο, όσο και με τον κινητικό πυρήνα του οπίσθιου εγκεφάλου.

Στη συνέχεια, έγινε ανάλυση των GO Terms για τους μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι αυξάνονται στους miR-124\_iNs και miR-124+ISX9\_iNs, ώστε

να αποκαλυφθούν περαιτέρω πληροφορίες για τις βιολογικές διαδικασίες, στις οποίες συμμετέχουν (Εικόνα 3.8).



Εικόνα 3.8: GO term ανάλυση των μεταγραφικών παραγόντων, των οποίων τα επίπεδα αυξάνονται στους miR-124\_iNs και miR-124+ISX9\_iNs. Κάθε μπάρα αναπαριστά τον αρνητικό λογάριθμο του FDR (-log(FDR)) για το κάθε GO term. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται ο -log(FDR) για τα GO terms που προέκυψαν από τη σύγκριση miR-124\_iNs vs control astrocytes και με πορτοκαλί ο -log(FDR) για τα αντίστοιχα GO terms που προέκυψαν από τη σύγκριση miR-124+ISX9\_iNs vs control astrocytes.

Η GO term ανάλυση έδειξε πως οι περισσότεροι TFs των οποίων τα επίπεδα αυξάνονται εμπλέκονται, και στις δύο συνθήκες, στη νευρογένεση, τη διαφοροποίηση σε νευρώνες και την ανάπτυξη του πρόσθιου εγκεφάλου (forebrain and telencephalon development), ωστόσο πολλοί TFs που αυξάνονται μόνο στην περίπτωση των miR-124+ISX9\_iNs εμπλέκονται σε βιολογικές διεργασίες, όπως η ανάπτυξη του οπίσθιου εγκεφάλου, του νωτιαίου μυελού, των κρανιακών νεύρων, του ματιού, του διεγκεφάλου, αλλά και η διαφοροποίηση GABAεργικών και ντοπαμινεργικών νευρώνων.

Συμπερασματικά, όλα τα παραπάνω έδειξαν πως η προσθήκη του ISX9, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι σχετίζονται με τύπους νευρώνων από διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου. Αυτό δείχνει πως με την προσθήκη του συγκεκριμένου χημικού μορίου στο πρωτόκολλο επαναπρογραμματισμού των αστροκυττάρων, τα επαγόμενα κύτταρα αποκτούν νωρίς ένα μεταγράφωμα, το οποίο μπορεί να τους παρέχει τη δυνατότητα να μετατραπούν σε διαφορετικούς νευρωνικούς υποτύπους από διάφορες περιοχές του εγκεφάλου και όχι μόνο από το φλοιό που είναι και η περιοχή προέλευσης των αστροκυττάρων.

# 3.4 Επιβεβαίωση των επιπέδων μεταγραφικών παραγόντων με real time RT-PCR

Μετά την εύρεση των μεταγραφικών παραγόντων και τη δημιουργία των θερμικών χαρτών επόμενος στόχος ήταν η επιβεβαίωση των επιπέδων επιλεγμένων γονιδίων, τα οποία προέκυψαν από το RNA-seq με real time RT-PCR. Για τη συγκεκριμένη διπλωματική επιλέχθηκαν γονίδια, των οποίων τα επίπεδα αυξάνονταν σημαντικά μόνο μετά από προσθήκη του ISX9 και η βιολογικής τους δράση σχετίζεται με τη δημιουργία νευρώνων από άλλες περιοχές του εγκεφάλου εκτός του εγκεφαλικού φλοιού.

Πιο συγκεκριμένα, προετοιμάστηκαν 4 σειρές πειραμάτων με τις εξής συνθήκες: astrocytes (day1), scrambled miRNA (day 7), miR-124\_iNs (day 7) και miR-124+ISX9\_iNs (day7). Στα αποτελέσματα που παρουσιάζονται έχει επιλεχθεί ως control η συνθήκη όπου τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με το scrambled microRNA (Negative Control, NC), του οποίου η αλληλουχία είναι έτσι σχεδιασμένη ώστε να μην αλληλεπιδρά με κανένα mRNA μόριο. Η σύγκριση έγινε με το συγκεκριμένο δείγμα ώστε να ληφθούν υπ' όψιν οι συνθήκες καλλιέργειας και να παρουσιαστεί η καθαρή επίδραση των miR-124 και miR-124+ISX9 στο μοριακό προφίλ των επαγόμενων νευρώνων. Στα δεδομένα πραγματοποιήθηκε στατιστικό one tailed t-test ανεξάρτητων δειγμάτων ώστε να βρεθεί εάν η διαφορά στη έκφραση των γονιδίων ήταν στατιστικά σημαντική.

Τα γονίδια, τα οποία επιλέχθηκαν προς μελέτη παρουσιάζονται στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 3.1):

Γονίδιο	Περιοχή, Λειτουργία		
	Μεταγραφικός παράγοντας. Εκφράζεται στο όριο		
En1	μεσεγκέφαλου – οπίσθιου εγκεφάλου και από όλους του		
	ντοπαμινεργικούς νευρώνες από τη στιγμή της		
	διαφοροποίησης μέχρι να ωριμάσουν [33].		
	Μεταγραφικός παράγοντας. Η έκφρασή του ξεκινά κοντά		
Hoxc4	στο τέλος του αναπτυσσόμενου οπίσθιου εγκεφάλου και		
	συνεχίζεται στο νωτιαίο μυελό [111].		
Foxa1	Μεταγραφικός παράγοντας. Ρυθμίζει την ανάπτυξη των		
	ντοπαμινεργικών νευρώνων του μεσεγκέφαλου [33].		
Phox2a	Μεταγραφικός παράγοντας. Ελέγχει δομές όπως ο		
	οφθαλμοκινητικός πυρήνας στο μεσεγκέφαλο και δομές		
	του οπίσθιου εγκεφάλου [112]		
Onecut2	Μεταγραφικός παράγοντας. Εκφράζεται κατά την		
	ανάπτυξη του αμφιβληστροειδή χιτώνα [113]		
Kcnj6 (Girk2)	Δείκτης ώριμου ντοπαμινεργικού νευρώνα [33]		
Slc6a3 (DAT)	Δείκτης ώριμου ντοπαμινεργικού νευρώνα [33]		
	Μορφογόνο. Εκφράζεται στη νωτοχορδή, προσδιορίζει το		
	εδαφιαίο πέταλο και αποτελεί βασικό παράγοντα		
Shh	επαγωγής της κοιλιακής μοίρας [33].		
	Μεταγραφικός παράγοντας. Τα επίπεδά του αυξάνονται		
	από το Shh. Το μονοπάτι Shh-Gli1 ελέγχει τη δημιουργία		
Glil	νευρώνων στην κοιλιακή μοίρα του εγκεφάλου, ρυθμίζει		
	το μέγεθος του κοιλιακού μεσεγκέφαλου και την		
	ανάπτυξη των βασικών γαγγλίων [114].		
	Μεταγραφικός παράγοντας. Απαραίτητος για τη		
	διαφοροποίηση των ντοπαμινεργικών νευρώνων του		
T 11	μεσεγκέφαλου, των σετοτονεργικών νευρώνων του		
Lmx1b	οπίσθιου εγκεφάλου και νευρώνων του νωτιαίου μυελού.		
	Επιπλέον, είναι απαραίτητος για την έναρξη και τη		
	διατήρηση της δραστηριότητας του ισθμού κατά τη		
	διάρκεια της ανάπτυξης του μεσεγκέφαλου και του		
	οπίσθιου εγκεφάλου [3].		

Πίνακας 3.1: Γονίδια, τα οποία μελετήθηκαν με real RT-PCR. Παρουσίαση των περιοχών με τις οποίες σχετίζονται.

Τα αποτελέσματα των real time RT-PCR παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνες 3.9-3.12):

Αρχικά, όσον αφορά τα γονίδια Phox2a, Hoxc4, Onecut2, τα οποία ελέγχουν τμήματα του μεσεγκέφαλου, του οπίσθιου εγκεφάλου, του νωτιαίου μυελού και του αμφιβληστροειδούς, τα επίπεδά τους αυξήθηκαν στους miR-124+ISX9\_iNs. Στους miR-124\_iNs παρατηρήθηκε πολύ μικρή και μη στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων των γονιδίων Hoxc4 και Phox2a, ενώ στην περίπτωση του Onecut2

παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση, κάτι που είναι αναμενόμενο δεδομένου ότι το mRNA του Onecut2 αποτελεί έναν προβλεπόμενο στόχο του miR-124 (Εικόνα 3.9).



Εικόνα 3.9: Μελέτη των mRNA επιπέδων των γονιδίων Hoxc4 (A), Phox2a (B), Onecut2 (C) με real time RT-PCR. (\*, p<0,05, \*\*\*, p<0,001)

Επιπλέον, σε γονίδια με άμεση σύνδεση με την ανάπτυξη του μεσεγκεφάλου και των ντοπαμινεργικών νευρώνων (En1, Foxa1, Lmx1b) παρατηρήθηκε ξανά αύξηση των επιπέδων τους με στατιστική σημαντικότητα στους miR-124+ISX9\_iNs. Πολύ μικρή αύξηση παρατηρήθηκε στους miR-124\_iNs για τα γονίδια En1, Lmx1b, ενώ για το Foxa1 υπήρξε μικρή μείωση (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10: Μελέτη των mRNA επιπέδων των γονιδίων En1 (A), Foxa1 (B), Lmx1b (C) με real time RT-PCR. (\*, p<0,05, \*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.001)

Τέλος, για τα γονίδια Shh και Gli1, τα οποία κατέχουν βασικό ρόλο στην επαγωγή της κοιλιακής μοίρας και την ανάπτυξη του μεσεγκέφαλου και των ντοπαμινεργικών νευρώνων, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων τους με στατιστική σημαντικότητα στους miR-124\_iNs, ενώ αντιστρόφως υπήρξε αύξηση κυρίως του Gli1 στους miR-124+ISX9\_iNs. Παράλληλα, τα επίπεδα των γονιδίων, τα οποία εκφράζονται στους ώριμους ντοπαμινεργικούς νευρώνες (DAT, Girk2), αυξήθηκαν κατά πολύ στους miR-124+ISX9\_iNs. Οσον αφορά τους miR-124\_iNs εδώ παρατηρήθηκε πολύ μικρή αύξηση των επιπέδων του Girk2, ενώ αντίστροφα μεγάλη μείωση για το DAT. Τα δεδομένα για το γονίδιο Girk2 συλλέχθηκαν από δύο πειράματα, για το λόγο αυτό δεν πραγματοποιήθηκε στατιστική δοκιμασία (Εικόνες 3.11,3.12).



Εικόνα 3.11: Μελέτη των mRNA επιπέδων των γονιδίων Shh (A), Gli1 (B) με real time RT-PCR. (\*\*\*, p<0.001)



Εικόνα 3.12: Μελέτη των mRNA επιπέδων των γονιδίων DAT (A), Girk2 (B), Cck (C) με real time RT-PCR. (\*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.001)

Τα συνολικά αποτελέσματα έδειξαν πως σε όλες τις περιπτώσεις υπήρχε στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων των προς μελέτη γονιδίων στους miR-124+ISX9\_iNs. Με αυτό τον τρόπο επιβεβαιώθηκε πως μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι κατέχουν ρόλο στη δημιουργία νευρώνων άλλων περιοχών εκτός του εγκεφαλικού φλοιού, αυξάνουν τα επίπεδά τους παρουσία του ISX9.

Κάτι εξίσου σημαντικό, το οποίο παρατηρήθηκε, ήταν το γεγονός ότι τα επίπεδα των γονιδίων Shh, Gli1 και DAT μειώνονταν παρουσία μόνο στους miR-124\_iNs, ενώ στη συνέχεια αυξάνονταν σημαντικά στους miR-124+ISX9\_iNs. Η μείωση των επιπέδων αυτών των γονιδίων από το miR-124 θα μπορούσε να υποδηλώνει ότι το miR-124 καταστέλλει γονίδια που σχετίζονται με την ανάπτυξη του μεσεγκέφαλου και γενικότερα της κοιλιακή μοίρας.

Η επιβεβαίωση ότι το ISX9 αυξάνει τα επίπεδα γονιδίων, μεταξύ των οποίων αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες, τα οποία κατέχουν ρόλο στη δημιουργία ντοπαμινεργικών νευρώνων του μεσεγκέφαλου, μας ώθησε να διερευνήσουμε το ενδεχόμενο οι miR-124+ISX9\_iNs να μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες με τη βοήθεια κατάλληλων παραγόντων που κατευθύνουν τη δημιουργία αυτού του νευρωνικού υποτύπου.

# 3.5 Επαναπρογραμματισμός των miR-124+ISX9\_iNs με τη χρήση των αυξητικών παραγόντων Shh και Fgf8

Μετά από μελέτη άλλων πρωτοκόλλων που εφαρμόζονται για τη δημιουργία ντοπαμινεργικών νευρώνων [33], αποφασίστηκε η προσθήκη των παραγόντων Shh (100 ng/ml) και Fgf8 (100 ng/ml) στην καλλιέργεια από την 4η μέχρι την 8η μέρα του πρωτοκόλλου επαναπρογραμματισμού.

#### 3.5.1 Μελέτη της μορφολογίας των κυττάρων

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν τις μέρες 7, 15 και 20 και σημάνθηκαν με αντίσωμα έναντι της βΙΙΙ-τουμπουλίνης, anti-Tuj1, η οποία είναι δείκτης ανώριμων και διαφοροποιημένων νευρώνων (Εικόνες 3.13-3.15).

Αρχικά από άποψη μορφολογίας, την 7<sup>η</sup> μέρα παρατηρείται πως τα σώματα των miR-124+ISX9\_iNs είναι μικρότερα και οι απολήξεις τους πιο λεπτές και μακριές σε σχέση με τους miR-124\_iNs. Επιπλέον, τόσο οι miR-124+ISX9+Shh\_iNs όσο και οι miR-124+ISX9+Shh+Fgf8\_iNs παρουσιάζουν ακόμη μεγαλύτερο μήκος απολήξεων αλλά και μεγαλύτερο αριθμό διακλαδώσεων των κυττάρων, τα οποία είναι ενδεικτικά της μεγαλύτερης ωριμότητας τους.



Εικόνα 3.13: Σήμανση των κυττάρων με αντίσωμα έναντι της βΙΙΙ-τουμπουλίνης, anti-Tuj1 την 7<sup>η</sup> μέρα. (scale bar 20μm)



Εικόνα 3.14: Σήμανση των κυττάρων με αντίσωμα έναντι της βΙΙΙ-τουμπουλίνης, anti-Tuj1, την 15<sup>η</sup> μέρα. (scale bar 20μm)

Όσον αφορά τη 15<sup>η</sup> μέρα μετά την πρώτη διαμόλυνση, και σε αυτό το χρονικό σημείο, οι miR-124+ISX9\_iNs, miR-124+ISX9+Shh\_iNs και κυρίως οι miR-124+ISX9+Shh+Fgf8\_iNs έχουν μεγαλύτερη πολυπλοκότητα σε σχέση με τους miR-124\_iNs, κάτι το οποίο φαίνεται από τον αριθμό των διακλαδώσεων και το μήκος των απολήξεών τους. miR-124 miR-124+ISX9miR-124+ISX9+Shh miR-124+ISX9+Shh+Fgf8



Εικόνα 3.15: Σήμανση των κυττάρων με αντίσωμα έναντι της βΙΙΙ-τουμπουλίνης, anti-Tuj1, την 20<sup>η</sup> μέρα. (scale bar 60μm)

Την 20<sup>η</sup> ημέρα παρατηρείται πως, τα κύτταρα στο δείγμα miR-124 δεν έχουν ωριμάσει παραπάνω, κάτι το οποίο δείχνει πως το miRNA μόνο του δεν αρκεί για να οδηγήσει σε ώριμους νευρώνες. Παράλληλα, καθίσταται σαφές ότι η προσθήκη του ISX9 ωθεί σημαντικά στην ωρίμανση των επαγόμενων νευρώνων, ενώ η προσθήκη των Shh και Fgf8 βοηθά τα επαναπρογραμματισμένα κύτταρα να ωριμάσουν ακόμη περισσότερο και να αποκτήσουν νευρικές απολήξεις με μεγαλύτερο αριθμό διακλαδώσεων και μεγαλύτερο μήκος. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη του Fgf8 οδηγεί στην καλύτερη απόδοση σε επαγόμενους νευρώνες, τόσο σε επίπεδο μορφολογίας όσο και σε πυκνότητα κυττάρων.

Σε συνέχεια μετρήθηκαν τα ποσοστά των Tuj1+ κυττάρων σε όλες τις συνθήκες των παραπάνω ημερών με τη βοήθεια του προγράμματος Fiji (ImageJ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **εικόνα 3.16**.



Εικόνα 3.16: Ποσοστά των Tuj1+ κυττάρων την 7<sup>η</sup>, 15<sup>η</sup> και 20<sup>η</sup> μέρα μετά τη διαμόλυνση.

Βάσει των αποτελεσμάτων των μετρήσεων παρατηρήθηκε ότι στους miR-124+ISX9\_iNs την 7<sup>η</sup> μέρα του επαναπρογραμματισμού αυξάνεται σημαντικά το ποσοστό των Tuj1+ κυττάρων σε σχέση με τους miR-124\_iNs (43,1%±4,9) έναντι (26,3%±4,8). Επιπλέον, η προσθήκη του παράγοντα Shh αύξησε περαιτέρω το ποσοστό των Tuj1+ κυττάρων (54,8%±11,1), ενώ η συνχορήγηση των Shh και Fgf8 οδήγησε σε αξιοσημείωτη αύξηση του ποσοστού των Tuj1+ κυττάρων (72,3%±4,8).

Για τη μέτρηση των Tuj1+ κυττάρων στις άλλες δύο χρονικές στιγμές (15<sup>η</sup> και 20<sup>η</sup> ημέρα) χρησιμοποιήθηκαν πιο αυστηρά μορφολογικά κριτήρια. Συγκεκριμένα μετρήθηκαν μόνο τα Tuj1+ κύτταρα που είχαν αποκτήσει τη μορφολογία ανώριμων ή ώριμων νευρώνων με μικρό σώμα και μήκος νευρικών απολήξεων τουλάχιστον 3 φορές μεγαλύτερο από το σώμα. Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων, παρατηρήθηκε

ότι μόνο το (16,1%±1,5) των κυττάρων στο δείγμα miR-124 απέκτησε μία πιο ώριμη μορφολογία τη 15<sup>η</sup> μέρα, ένα ποσοστό που μειώθηκε ακόμη περισσότερο την 20<sup>η</sup> μέρα μετά τον επαναπρογραμματισμό (4,9%±1,9). Αυτό το αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι η υπερέκφραση του miR-124 από μόνο του δεν επαρκεί για τη δημιουργία ενός ώριμου νευρωνικού φαινότυπου.

Οσον αφορά τις υπόλοιπες συνθήκες, το ποσοστό των Tuj1+ miR-124+ISX9\_iNs μετά από 15 μέρες ήταν διπλάσιο από το αντίστοιχο για το miR-124\_iNs (32,5%±4,8), ενώ την 20<sup>η</sup> μέρα βρέθηκε ότι ήταν αρκετά μικρότερο (11,4%±1,5). Παρατηρήθηκε ότι ενώ τα ποσοστά των Tuj1+ miR-124+ISX9+Shh\_iNs και miR-124+ISX9+Shh+Fgf8\_iNs τη 15<sup>η</sup> μέρα ήταν παρόμοια με των miR-124+ISX9\_iNs (30,6%±3,9 και 34,4%±1,8 αντίστοιχα), τα αντίστοιχα ποσοστά την 20<sup>η</sup> μέρα ήταν σχεδόν διπλάσια και στις δύο συνθήκες σε σχέση με τους miR-124+ISX9\_iNs (17,4%±1,9 και 18,1%±2,6 αντίστοιχα), κάτι το οποίο μπορεί να υποδηλώνει ότι οι παράγοντες αυτοί βοηθούν στην μακρόχρονη επιβίωση των επαγόμενων κυττάρων.

#### 3.5.2 Διερεύνηση του μοριακού προφίλ με real time RT-PCR

Στην προσπάθεια διερεύνησης για το εάν μετά τον επαναπρογραμματισμό τα επαγόμενα κύτταρα είχαν χαρακτηριστικά ντοπαμινεργικών νευρώνων μετά την προσθήκη των παραγόντων Shh και Fgf8, μελετήθηκαν τα επίπεδα 2 ομάδων γονιδίων με real time RT-PCR. Η πρώτη ομάδα αφορούσε γονίδια σχετιζόμενα με το μονοπάτι του Shh και την ανάπτυξη του μεσεγκέφαλου και των ντοπανιμεργικών νευρώνων και η δεύτερη αφορούσε γονίδια χαρακτηριστικά της ανάπτυξης νευρώνων του φλοιού και ένα γονίδιο που εκφράζεται ειδικά στους GABAεργικούς νευρώνες. Η επιλογή των γονιδίων βασίστηκε στην υπόθεση ότι οι παράγοντες Shh και Fgf8 προάγουν την ντοπαμινεργική ταυτότητα (κοιλιακή μοίρα) ή/και καταστέλλουν την φλοιική ταυτότητα (ραχιαία μοίρα) ή άλλους υπότοιπους, όπως οι GABAεργικοί. Στα αποτελέσματα που παρουσιάζονται έχει επιλεχθεί ως control και πάλι η συνθήκη όπου τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με το scrambled microRNA (NC). Τα γονίδια, τα οποία μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον επόμενο πίνακα (Πίνακας **3.2**):

Γονίδιο	Περιοχή, Λειτουργία		
En1	Εκφράζεται στο όριο μεσεγκέφαλου – οπίσθιου εγκεφάλου και από		
	όλους του ντοπαμινεργικούς νευρώνες από τη στιγμή της		
	διαφοροποίησης μέχρι να ωριμάσουν [33].		
	Απαραίτητο για τη διαφοροποίηση των ντοπαμινεργικών νευρώνων		
Lmx1b	του μεσεγκέφαλου, των σετοτονεργικών νευρώνων του οπίσθιου		
LIIIXIO	εγκεφάλου και νευρώνων της σπονδυλικής στήλης. Επιπλέον, Lmx1b		
	είναι απαραίτητο για την έναρξη και τη διατήρηση της		
	δραστηριότητας του ισθμού κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του		
~ 414	μεσεγκέφαλου και του οπίσθιου εγκεφάλου [3].		
Gli1	Τα επίπεδά του αυξάνονται από το Shh. Το μονοπάτι SHH-GLΙελέγχει		
	τη δημιουργία νευρώνων στην κοιλιακή μοίρα του εγκεφάλου,		
	ρυθμίζει το μέγεθος του κοιλιακού μεσεγκέφαλου και την ανάπτυξη		
	των βασικών γαγγλίων [114].		
Kcnj6 (Girk2)	Δείκτης ώριμου ντοπαμινεργικού νευρώνα [33]		
Slc6a3 (DAT)	Δείκτης ώριμου ντοπαμινεργικού νευρώνα [33]		
Tbr1	Συμμετέχει σε πολλές διαδικασίες κατά την ανάπτυξη του		
	φλοιού. Εκφράζεται κυρίως στους πυραμιδικούς νευρώνες των		
	βαθιών στοιβάδων του φλοιού (layers V-VI) [115]		
	Κατά την ανάπτυξη του εγκεφαλικού φλοιού συνδέεται με τη		
Thr?	μετατροπή των RGCs σε IPCs. Στον ενήλικο εγκέφαλο συνδέεται		
1012	με την ενήλικη νευρογένεση στην περιοχή του ιππόκαμπου		
	(SGZ), της υποκοιλιακής ζώνης (SVZ) και του οσφρητικού		
	λοβού (olfactory bulb, OB) [16,115].		
Cux1	Εκφράζεται στο νεοφλοιό στις στιβάδες ΙΙ-ΙV [116].		
Gad1	Ελέγχει τη διαθεσιμότητα του GABA ως διαβιβαστή στους		
	GABΑεργικούς νευρώνες [117].		

Πίνακας 3.2: Γονίδια, τα οποία μελετήθηκαν με real RT-PCR. Παρουσίαση των περιοχών με τις οποίες σχετίζονται.

Τα αποτελέσματα των real time RT-PCR παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνες 3.17-3.19).

Αρχικά, σε γονίδια, τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξη του μεσεγκέφαλου καθώς και με το μονοπάτι Shh (En1, Gli1, Lmx1b), παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων στους τόσο στους miR-124+ISX9+Shh\_iNs όσο και στους miR-124+ISX9+Shh+Fgf8\_iNs σε σχέση με τους miR-124+ISX9\_iNs. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση του En1, παρατηρήθηκε ίδια μείωση στις δύο συνθήκες ενώ στα δύο

επόμενα γονίδια παρατηρήθηκε περαιτέρω μείωση στους miR-124+ISX9+Shh+Fgf8\_iNs (Εικόνα 3.17).

Συνακόλουθα, σε γονίδια – δείκτες των ώριμων ντοπανινεργικών νευρώνων (DAT, Girk2) δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στα επίπεδά τους ανάμεσα στους miR-124+ISX9\_iNs και στους miR-124+ISX9+Shh\_iNs. Στην περίπτωση του DAT παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του στους miR-124+ISX9+Shh+Fgf8\_iNs, ενώ στην περίπτωση του Girk2 τα επίπεδα και σε αυτό το δείγμα παρέμειναν σταθερά (Εικόνα 3.18).



Εικόνα 3.17: Μελέτη των mRNA επιπέδων των γονιδίων En1 (A), Gli1 (B), Lmx1b (C) με real time RT-PCR.



Εικόνα 3.18: Μελέτη των mRNA επιπέδων των γονιδίων Girk2 (A), DAT (B) με real time RT-PCR.

Ενδιαφέρον αποτελεί ότι ο μεταγραφικός παράγοντας Gli1 που είναι βασικός τελεστής του Shh μονοπατιού δεν αυξήθηκε παραπάνω σε μεταγραφικό επίπεδο μετά την προσθήκη του Shh, κάτι το οποίο μπορεί να υποδηλώνει ότι ο Shh δεν συνεισφέρει περισσότερο στην αύξηση των επιπέδων του τελεστή του από το ISX9.



Εικόνα 3.19: Μελέτη των mRNA επιπέδων των γονιδίων Tbr1 (A), Tbr2 (B), Cux1 (C), Gad1 (D) με real time RT-PCR.
Παράλληλα η προσθήκη του Fgf8 οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων ενός από τους δύο ώριμους δείκτες ντοπαμινεργικών νευρώνων που μελετήθηκαν, κάτι το οποίο υποδηλώνει ότι ο Fgf8 ενισχύει την ντοπαμινεργική ταυτότητα και συμβάλει στην ωρίμανση της.

Τέλος, στα γονίδια που σχετίζονται με την ανάπτυξη του φλοιού (Tbr1, Tbr2 και Cux1) όπως και στο Gad1 που σχετίζεται με τους GABAεργικούς νευρώνες, παρατηρήθηκε ότι ο Shh, οδηγεί σε μία πολύ μικρή μείωση των επιπέδων τους σε σχέση με το ISX9, ενώ ο Fgf8 συμβάλει σημαντικά στη μείωση των επιπέδων όλων των γονιδίων που μελετήθηκαν ενισχύοντας την υπόθεση ότι ο παράγοντας αυτός πράγματι προάγει τη ντοπαμινεργική μοίρα και παράλληλα καταστέλλει τη φλοιική ή GABAεργική ταυτότητα (Εικόνα 3.19).

# 3.5.3 Μελέτη των επιπέδων της πρωτεΐνης Gli1 στα επαναπρογραμματισμένα κύτταρα

Σε ένα επόμενο βήμα μελετήθηκε η έκφραση κάποιων μεταγραφικών παραγόντων σχετικών με τη ντοπαμινεργική ταυτότητα σε πρωτεϊνικό επίπεδο με ανοσοφθορισμό και συνεστιακή μικροσκοπία. Στόχος αυτής της ανάλυσης ήταν να αποσαφηνιστεί το ποσοστό των κυττάρων που αποκτούν αυτή την ταυτότητα και κατά πόσο αυτό το ποσοστό αυξάνεται μετά την ώθηση των κυττάρων με τη βοήθεια των Shh και Fgf8.

Λόγω των παραπάνω έγινε προσπάθεια σήμανσης των κυττάρων με αντίσωμα anti-Lmx1b, διαδικασία, η οποία δυστυχώς απέτυχε. Στη συνέχεια, αποφασίστηκε η μελέτη των επιπέδων της πρωτεΐνης Gli1 την 7<sup>η</sup> ημέρα μετά τη διαμόλυνση σε κύτταρα θετικά για Tuj1+. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη επιλέχθηκε λόγω της ανάμειξης της στο μονοπάτι του Shh αλλά και του ρόλου της στην ανάπτυξη τόσο του μεσεγκεφάλου όσο και των ντοπαμινεργικών νευρώνων.

Έτσι, για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε διπλή σήμανση των κυττάρων με anti-Tuj1 και anti-Gli1 αντίσωμα και η ποσότητα της πρωτεΐνης Gli1 ποσοτικοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος IMARIS μετά από υπολογισμό της μέσης έντασης του φθορισμού στον πυρήνα των Tuj1+ κυττάρων (**Εικόνα 3.20**). Επιλέχθηκε η ποσοτικοποίηση της έντασης του φθορισμού στον πυρήνα, διότι

θεωρήθηκε ότι με αυτό τον τρόπο θα μπορούσαμε με μεγαλύτερη σαφήνεια να διακρίνουμε διαφορετικούς υποπληθυσμούς Tuj1+ κυττάρων που να έχουν διαφορετική ποσότητα Gli1, δεδομένου ότι ουσιαστικά όλα τα κύτταρα εμφάνιζαν φθορισμό. Δεν πραγματοποιήθηκε στατιστική δοκιμασία στα αποτελέσματα, καθώς αυτά προήλθαν από δύο πειράματα.



Εικόνα 3.20: Μέση ένταση του Gli1 στον πυρήνα των Tuj1+ κυττάρων. (Α): Κατανομή των τιμών των μέσων εντάσεων φθορισμού/πυρήνα των διπλά θετικών Gli1+/Tuj1+ κυττάρων. (Β): Ποσοστά των Gli1+/Tuj1+ κυττάρων στα δείγματα miR-124+ISX9, miR-124+ISX9+Shh, miR-124+ISX9, Shh, Fgf8 με κατώφλι τις τιμές των για τους miR-124\_iNs.

Λόγω της σημαντικής μείωσης των επιπέδων του mRNA του Gli1 στους miR-124\_iNs ορίστηκε ως κατώφλι η μέγιστη τιμή φθορισμού, η οποία ανιχνεύθηκε στα κύτταρα του συγκεκριμένου δείγματος (43,5) και υπολογίστηκαν τα ποσοστά των Gli1+ κυττάρων, των οποίων οι τιμές ορίστηκαν ως θετικές (>43,5) στις υπόλοιπες συνθήκες. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης (αναλύθηκαν 100-150 κύτταρα ανά συνθήκη) έδειξαν πως το ποσοστό των διπλά θετικών Tuj1+/Gli1+ κυττάρων στους miR-+ISX9\_iNs ήταν (77,7%±9), το αντίστοιχο ποσοστό για τους miR-124+ISX9+Shh\_iNs ήταν (72,8%±11,8), ενώ για τους miR-124+ISX9+Shh+Fgf8\_iNs ήταν (89,5%±7). Παρατηρήθηκε επίσης ότι ενώ οι miR-+ISX9\_iNs και miR-124+ISX9+Shh\_iNs έχουν παρόμοια ποσοστά σε Gli1+/Tuj1+ κύτταρα και παρόμοια κατανομή τιμών έντασης φθορισμού, οι miR-124+ISX9+Shh+Fgf8\_iNs έχουν μεγαλύτερο ποσοστό Gli1+/Tuj1+ κυττάρων, αλλά το εύρος της κατανομής των τιμών έντασης φθορισμού είναι μικρότερο, γεγονός που ίσως σημαίνει ότι ο πληθυσμός αυτών των κυττάρων αρχίζει να γίνεται πιο ομοιογενής.

Η σήμανση των κυττάρων για την πρωτεΐνη Glil φαίνεται στην εικόνα 3.21.

miR-124+ISX9

miR-124



Εικόνα 3.21: Σήμανση των κυττάρων με αντίσωμα έναντι της βΙΙΙ-τουμπουλίνης, anti-Tuj1 (κόκκινο) και έναντι του μεταγραφικού παράγοντα Gli1. anti-Gli1 (πράσινο).

# 3.5.4 Μελέτη των επιπέδων της πρωτεΐνης Nurr1 στα επαναπρογραμματισμένα κύτταρα

Στη συνέχεια έγινε σήμανση των κυττάρων που συλλέχθηκαν τη 15<sup>η</sup> μέρα για άλλη μία πυρηνική πρωτεΐνη, τον πυρηνικό υποδοχέα Nurr1 (Nr4a2), η οποία αποτελεί δείκτη των ανώριμων ντοπαμινεργικών νευρώνων. Και σε αυτή την ανάλυση πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της πυρηνικής έντασης φθορισμού μόνο με βάση τα Tuj1+ τα οποία επιπροσθέτως πληρούσαν πιο αυστηρά μορφολογικά κριτήρια ανώριμων/ώριμων νευρώνων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις εικόνες 3.22, 3.23.



Εικόνα 3.22: Μέση ένταση του Nurr1 στον πυρήνα των Tuj1+ κυττάρων Κατανομή των μέσων εντάσεων φθορισμού/πυρήνα των διπλά θετικών Nurr1+/Tuj1+ κυττάρων. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται και οι μέσοι όροι των εντάσεων σε κάθε συνθήκη.

Τα αποτελέσματα δεν ήταν τα αναμενόμενα, καθώς παρατηρήθηκε θετική χρώση για το Nurr1 και στο δείγμα miR-124. Επίσης, οι miR-124\_iNs εμφανίζουν ένα γονιδιακό προφίλ, το οποίο συμφωνεί με νευρώνες του πρόσθιου εγκεφάλου. Αυτό το εύρημα, ωστόσο, συμφωνεί με πρόσφατη βιβλιογραφία στην οποία μετά από τραύμα στο φλοιό, παρατηρήθηκε επαναπρογραμματισμός αστροκυττάρων προς νευρώνες, έπειτα από χρήση των παραγόντων Ngn2/Nurr1 [118]. Φαίνεται, λοιπόν, πως το Nurr1 κατέχει κάποιο ρόλο και στη δημιουργία νευρώνων του εγκεφαλικού φλοιού.

Όσον αφορά τις τιμές των μέσων εντάσεων, ο μέσος όρος τους για τους miR-124\_iNs ήταν 31,8±12,5. Οι αντίστοιχες τιμές για τα υπόλοιπα δείγματα ήταν 50,6±19,6, 42,5±9,6 και 33,3±13,3. Παρατηρείται, λοιπόν αύξηση στους miR-124+ISX9\_iNs σε σχέση με τους miR-124\_iNs και μία ελαφρώς μικρότερη αύξηση στους miR-124+ISX9+Shh\_iNs. Από την άλλη πλευρά παρατηρείται μία μείωση στους miR-124+ISX9+Shh+Fgf8\_iNs σε σχέση με τους miR-124+ISX9\_iNs, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγηθεί από το ότι ο Fgf8 προάγει τη διαφοροποίηση και ωρίμανση της ντοπαμινεργικής ταυτότητας με αποτέλεσμα τη μείωση ανώριμων δεικτών όπως το Nurr1, αλλά αυτό χρίζει περαιτέρω διερεύνησης.



miR-124+ISX9+Shh



miR-124+ISX9

miR-124+ISX9+Shh+Fgf8



Εικόνα 3.23: Σήμανση των κυττάρων με αντίσωμα έναντι της βΙΙΙ-τουμπουλίνησ, anti-Tuj1 (κόκκινο) και έναντι του πυρηνικού υποδοχέα anti-Nurr1 (magenda).

#### 3.5.5 Ηλεκτροφυσιολογική ανάλυση

Για να ελεγχθεί κατά πόσο οι επαγόμενοι νευρώνες miR-124+ISX9\_iNs, miR-124+ISX9+Shh\_iNs και miR-124+ISX9+Shh+Fgf8\_iNs είναι λειτουργικοί πραγματοποιήθηκε μία σειρά από πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας. Τα κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε η συγκεκριμένη δοκιμασία συλλέχθηκαν ανάμεσα στην 20<sup>η</sup> και 26<sup>η</sup> μέρα.

Αρχικά, έγινε μελέτη της απόκρισης των νευρώνων (αναλύθηκαν 4-5 νευρώνες ανά συνθήκη) σε εκπολωτικά δυναμικά, όπου παρατηρήθηκε άνοιγμα των τασεοεξαρτώμενων διαύλων Na<sup>+</sup> και K<sup>+</sup> στους miR-124+ISX9\_iNs, miR-124+ISX9+Shh\_iNs και miR-124+ISX9+Shh+Fgf8\_iNs, με τους miR-124+ISX9+Shh+Fgf8 iNs να παρουσιάζουν την καλύτερη απόκριση (**Εικόνα 3.24**).

Στη συνέχεια, στους miR-124+ISX9+Shh+Fgf8\_iNs πραγματοποιήθηκε διέγερση νευρώνα με εκπολωτικό ρεύμα, το οποίο προκάλεσε διαδοχικά δυναμικά ενέργειας, κάτι το οποίο δείχνει ότι ο νευρώνας έχει τη δυνατότητα αντίδρασης σε ερεθίσματα (Εικόνα 3.25).

Τέλος, πάλι στο ίδιο δείγμα καταγράφηκε αυθόρμητη μετασυναπτική δραστηριότητα με το δυναμικό του νευρώνα να είναι στα -60mV, καταγραφή μέσω της οποίας φαίνεται ότι ο νευρώνας παίρνει σήματα από γειτονικούς νευρώνες και ανταποκρίνεται σε αυτά, γεγονός το οποίο καταδεικνύει την ωριμότητα και συνδεσιμότητα του με άλλους νευρώνες (Εικόνα 3.26).

Έτσι, σύμφωνα με τα παραπάνω, οι επαγόμενοι νευρώνες που προκύπτουν από τον επαναπρογραμματισμό σε όλες τις συνθήκες που μελετήθηκαν (miR-124+ISX9, miR-124+ISX9+Shh, miR-124+ISX9+Shh+Fgf8) αντιδρούν σε ερεθίσματα και φαίνεται να είναι λειτουργικοί, ενώ ιδιαίτερα οι miR-124+ISX9+Shh+Fgf8\_iNs από όλες τις καταγραφές φαίνεται ότι έχουν τη μεγαλύτερη ωριμότητα και συνδέονται σε δίκτυα με άλλους νευρώνες, κάτι το οποίο συμφωνεί και με τα προηγούμενα αποτελέσματα.



Εικόνα 3.24: Απόκριση αντιπροσωπευτικού νευρώνα σε εκπολωτικά δυναμικά (-80mV - +50mV). Άνοιγμα διαύλων Na<sup>+</sup> και K<sup>+</sup> (τασεοεξαρτώμενοι δίαυλοι). Κύτταρα στην 20<sup>η</sup> - 26<sup>η</sup> μέρα.



Εικόνα 3.25: Διέγερση αντιπροσωπευτικού νευρώνα miR-124+ISX9+Shh+Fgf8\_iN με εκπολωτικό ρεύμα, το οποίο προκάλεσε διαδοχικά δυναμικά ενέργειας (train action potentials). Κύτταρο την 21<sup>η</sup> μέρα.



Εικόνα 3.26: Αυθόρμητη μετασυναπτική δραστηριότητα σε αντιπροσωπευτικό νευρώνα miR-124+ISX9+Shh+Fgf8\_iN. Το δυναμικό του καταγραφόμενου νευρώνα ήταν στα -60mV. Χρονικό παράθυρο καταγραφής γεγονότων: 80sec. Κύτταρο στην 21<sup>η</sup> μέρα.

### 4. Συζήτηση

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας εκτιμάται πως το 2050 ένας στους πέντε κατοίκους του πλανήτη θα είναι πάνω από 60 ετών. Η εξέλιξη επιστημών όπως η βιολογία, η εξέλιξη στον τομέα της ιατρικής και οι καλύτερες συνθήκες ζωής, είναι αυτές, οι οποίες έχουν επιφέρει την αύξηση στο μέσο όρο επιβίωσης των ατόμων. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, μαζί με αυτή την αύξηση, παρατηρήθηκε η εμφάνιση των λεγόμενων ηλικιοεξαρτώμενων ασθενειών, με τις πιο σοβαρές από αυτές να σχετίζονται με τον εκφυλισμό του νευρικού συστήματος (νευροεκφυλιστικές ασθένειες). Λόγω των παραπάνω, η κατανόηση των μηχανισμών των νευροεκφυλιστικών ασθενειών, αλλά και η εύρεση θεραπειών κατέστη επιτακτική. Αυτό προϋπέθετε την επιτυχή δημιουργία νευρώνων από ασθενείς στο εργαστήριο και τη δημιουργία ανθρώπινων μοντέλων της ασθένειας ώστε να καταστεί δυνατή η μελέτη των νόσων αυτών και η ανάπτυξη νέων φαρμάκων ή κυτταρικών θεραπειών.

Το πρώτο βήμα προς αυτή την κατεύθυνση έγινε με τη δημιουργία των iPSCs, όπου σωματικά κύτταρα μετατράπηκαν σε πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια είχαν τη δυνατότητα να δώσουν διάφορους τύπους νευρώνων [57,58]. Παρολ' αυτά, φαίνεται πως οι συγκεκριμένοι νευρώνες υστερούν στη μελέτη ηλικιοεξαρτώμενων ασθενειών, δεδομένου ότι πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι παραγόμενοι νευρώνες μέσω διαφοροποίησης από iPSCs χάνουν το αρχικό ηλικιακό επιγενετικό τους προφίλ [91].

Από την άλλη πλευρά ο άμεσος επαναπρογραμματισμός κυττάρων (direct reprogramming), τεχνική δια-διαφοροποίησης πλήρως διαφοροποιημένων σωματικών κυττάρων, κατά την οποία τα κύτταρα μετατρέπονται σε άλλο κυτταρικό τύπο, παρακάμπτοντας την ενδιάμεση πολυδύναμη κατάσταση, έχει βρεθεί ότι δεν διαγράφει το επιγενετικό προφίλ των επαγόμενων νευρώνων [91], γεγονός που τον καθιστά καταλληλότερο για τη μοντελοποίηση νευροεκφυλιστικών ασθενειών.

Παράλληλα, ο άμεσος επαναπρογραμματισμός, εκτός από την in vitro μοντελοποίηση νευροεκφυλιστικών ασθενειών, μπορεί να εφαρμοστεί και ως in vivo κυτταρική θεραπεία στον εγκέφαλο με στόχο την αποκατάσταση των νευρωνικών κυκλωμάτων, τα οποία προσβάλλονται από νευροεκφυλισμό, αλλά και μετά από τραύμα ή εγκεφαλικό επεισόδιο. Πιο συγκεκριμένα, ο άμεσος επαναπρογραμματισμός κυττάρων γλοίας της πάσχουσας περιοχής στους επιθυμητούς υπότυπους νευρώνων είναι μία πολλά υποσχόμενη και ελπιδοφόρα επιλογή για τη δημιουργία νέων νευρώνων, με σκοπό την αντικατάσταση των νευρώνων που έχουν χαθεί και την ενσωμάτωση τους στα υπάρχοντα νευρωνικά κυκλώματα της περιοχής [70]. Προς αυτή την κατεύθυνση μέχρι σήμερα οι περισσότερες in vivo μελέτες έχουν στοχεύσει στον πληθυσμό των αστροκυττάρων, καθώς ο συγκεκριμένος κυτταρικός τύπος ενεργοποιείται μετά από τραυματισμό του εγκεφάλου, πολλαπλασιάζεται και γρήγορα καταλαμβάνει την περιοχή του τραύματος ή της πάσχουσας από νευροεκφυλισμό περιοχής. Επιπλέον, αποτελεί έναν από τους μεγαλύτερους κυτταρικούς πληθυσμούς του εγκεφάλου και, τέλος, επιδεικνύει ένα ενδογενές δυναμικό νευρογένεσης, γεγονός το οποίο τον καθιστά ιδανικό για άμεσο επαναπρογραμματισμό προς ένα νευρωνικό *π*ληθυσμό [71].

Μέχρι σήμερα, έχει πραγματοποιηθεί πλήθος διαφορετικών ερευνών τόσο in vitro όσο και in vivo προς αυτή την κατεύθυνση. Ενδιαφέρον αποτελεί μία σημαντική μελέτη των τελευταίων ετών, η οποία αποτελεί την πρώτη εφαρμογή του in vivo άμεσου επαναπρογραμματισμού σε ένα μοντέλο νευροεκφυλισμού, στην οποία δείχθηκε ότι οι επαγόμενοι νευρώνες iDANs (induced dopamine neurons) ήταν ικανοί να επηρεάσουν θετικά το φαινότυπο του ζώου μέσω βελτίωσης κινητικών του βλαβών προκαλούμενων από την νευροεκφυλιστική νόσο Parkinson's [104].

Επιπλέον, πρόσφατα δύο in vivo μελέτες, η μία σε μοντέλο τραύματος ποντικού στο φλοιό [118] και η άλλη σε μοντέλο τραύματος στο φλοιό και σε μοντέλο της νόσου Αλτσχάιμερ [86], έδειξαν ότι τα επαναπρογραμματισμένα κύτταρα ενσωματώθηκαν επιτυχώς στα τοπικά νευρικά κυκλώματα, γεγονός που καταδεικνύει πως έχει αρχίσει να πραγματοποιείται με επιτυχία η επιβίωση και ενσωμάτωση των άμεσα επαναπρογραμματισμένων νευρώνων στα κυκλώματα του εγκεφάλου.

Στα πλαίσια του άμεσου επαναπρογραμματισμού, στο εργαστήριό μας έχουμε αναπτύξει ένα πρωτόκολλο, το οποίο περιλαμβάνει τη χρήση ενός νευρογενετικού miRNA, του miR-124 και ενός χημικού μορίου που επάγει τη νευρωνική διαφοροποίηση, του ISX9. Τα in vivo δεδομένα μας δείχνουν ότι έπειτα από τραύμα στον εγκεφαλικό φλοιό ποντικού, η υπερέκφραση του miR-124 με τη χρήση λεντιιού στην περιοχή του τραύματος και η ταυτόχρονη χορήγηση του ISX9 ενδοπεριτοναϊκά είχε ως αποτέλεσμα τη δια-διαφοροποίηση γλοιακών κυττάρων της περιοχής προς νευρώνες. Ταυτόχρονα, πραγματοποιούνται και in vitro πειράματα άμεσου επαναπρογραμματισμού αστροκυττάρων του φλοιού ποντικού με το συγκεκριμένο συνδυασμό παραγόντων με απώτερο σκοπό τη διάκριση των υποπληθυσμών των νευρώνων οι οποίοι προκύπτουν, τη κατανόηση των αλλαγών οι οποίες λαμβάνουν χώρα στο γονιδιακό προφίλ των κυττάρων, αλλά και την κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων γίνεται ο επαναπρογραμματισμός.

Για τους παραπάνω λόγους πραγματοποιήσαμε ένα πείραμα RNA-seq ώστε να διερευνηθούν οι γονιδιακές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα νωρίς κατά τον επαναπρογραμματισμό. Οι συνθήκες, οι οποίες αναλύθηκαν ήταν οι ακόλουθες: control astrocytes\_day1, miR-124\_iNs\_day7 και miR-124+ISX9\_iNs\_day7. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το miR-124 είναι ικανό από μόνο του να επάγει τον επαναπρογραμματισμό των αστροκυττάρων προς ανώριμους νευρώνες, μέσω μείωσης των επίπεδων γονιδίων που σχετίζονται με την αστροκυτταρική ταυτότητα και ταυτόχρονης αύξησης των επιπέδων γονιδίων, τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξη του πρόσθιου εγκέφαλου ή/και την ενήλικη νευρογένεση. Από τα παραπάνω προκύπτει, πως υπό την επίδραση του miR-124 διατηρείται η προέλευση των αστροκυττάρων σε σχέση με την ταυτότητα που αποκτούν οι επαναπρογραμματισμένοι νευρώνες (Εικόνα 3.5).

Όσον αφορά το ISX9, έχουν ήδη υπάρξει μελέτες στις οποίες χρησιμοποιείται μαζί με μεταγραφικούς παράγοντες ή/και άλλα χημικά μόρια (όπως το I-BET151) σε πρωτόκολλα άμεσου επαναπρογραμματισμού. Συγκεκριμένα, το ISX9 χρησιμοποιήθηκε σε μελέτη στην οποία MEFs (mouse embryonic fibroblasts) μετατράπηκαν επιτυχώς σε μίγμα γλουταματεργικών και GABAεργικών νευρώνων in vitro [89], αλλά και σε μελέτη, κατά την οποία ενήλικα ανθρώπινα αστροκύτταρα μετατράπηκαν σε γλουταματεργικούς νευρώνες [97].

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν πως η προσθήκη του ISX9 στο πρωτόκολλο του επαναπρογραμματισμού συνέβαλε στην αύξηση της διαφοροποίησης και της ωρίμανσης των επαγόμενων νευρώνων καθώς βρέθηκε ότι αυξάνει τα επίπεδα πολλών γονιδίων που σχετίζονται με μεγάλη γκάμα νευρωνικών διεργασιών, όπως η συναπτική λειτουργία, η εξωκυττάρωση συναπτικών κυστιδίων, η ρύθμιση του δυναμικού της μεμβράνης και η μεταφορά νευροδιαβιβαστών. Επίσης βρέθηκε ότι το ISX9 αυξάνει τα επίπεδα γονιδίων που σχετίζονται με διάφορους νευρωνικούς υπότυπους, μεταξύ των οποίων οι γλουταματεργικοί και οι GABAεργικοί υπότυποι, κάτι που είναι αρκετά αναμενόμενο καθότι αποτελούν τους δύο πληθυσμούς νευρώνων του φλοιού, από όπου προέρχονται και τα αστροκύτταρα που επαναπρογραμματίστηκαν. Ενδιαφέρον αποτελεί όμως, ότι βρέθηκαν αρκετά γονίδια που σχετίζονται με τη δημιουργία ντοπαμινεργικών και χολινεργικών νευρώνων, υπότυποι που εντοπίζονται σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου.

Προς την ίδια κατεύθυνση η ανάλυση των μεταγραφικών παραγόντων (transcription factors, TFs) που βρέθηκαν στο RNA-seq έδειξε ότι το ISX9 αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα αρκετών TFs που σχετίζονται με την ανάπτυξη νευρώνων σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου εκτός του φλοιού και γενικότερα του πρόσθιου εγκεφάλου, όπως ο μεσεγκέφαλος, ο οπίσθιος εγκέφαλος, ο νωτιαίος μυελός και ο αμφιβληστροειδής (**Εικόνες 3.5-3.7**). Φαίνεται, λοιπόν, πως με τη χρήση του ISX9 υπάρχει η δυνατότητα να προκύψουν από τα αστροκύτταρα του φλοιού νευρώνες και άλλων περιοχών του εγκεφάλου, εκτός του φλοιού. Τα συγκεκριμένα ευρήματα θα μπορούσαν να εξηγηθούν με βάση τον τρόπο δράσης του συγκεκριμένου χημικού μορίου. Το ISX9 δρα μέσω αύξησης της εισροής Ca<sup>+2</sup>στο εσωτερικό των κυττάρων και της επακόλουθης ενεργοποίησης μονοπατιών που ρυθμίζονται από το Ca<sup>2+</sup>. Για το μηχανισμό της δράσης του έχει προταθεί η ενεργοποίηση της CaMKII, η οποία φωσφορυλιώνει και οδηγεί σε έξοδο από τον πυρήνα την HDAC5 (αποακετυλάση

ιστονών 5) με αποτέλεσμα την άρση της καταστολής νευρωνικών γονιδίων και την επακόλουθη αύξηση των επιπέδων μεταγραφικών παραγόντων που κατέχουν σημαντικό ρόλο στη νευρογένεση [94]. Έτσι, λοιπόν, η έξοδος της HDAC5 από τον πυρήνα ίσως οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων γονιδίων, που σχετίζονται με διαφορετικούς υποπληθυσμούς νευρώνων. Βέβαια δεν αποκλείεται στη δράση του ISX9 να εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες που ρυθμίζουν τη χρωματίνη, εκτός από την HDAC5. Για παράδειγμα, φαίνεται πως – όπως θα ήταν αναμενόμενο – στη διαδικασία του επαναπρογραμματισμού από το miR-124+ISX9 εμπλέκεται και το σύμπλοκο καταστολής REST, καθώς ένας πολύ μεγάλος αριθμός νευροειδικών γονιδίων των οποίων τα επίπεδα αυξάνονται κυρίως λόγω του ISX9 βρέθηκε ότι ρυθμίζονται από το REST (με τη χρήση του προγράμματος iRegulon), παράτι βέβαια δεν εντοπίστηκαν αλλαγές στα επίπεδα του ίδιου του γονιδίου. Οι παρατηρήσεις αυτές αξίζει να διερευνηθούν στο μέλλον.

Συνακόλουθα, στην παρούσα μελέτη επιλέξαμε να διερευνήσουμε και να επιβεβαιώσουμε τα επίπεδα γονιδίων και ιδιαίτερα μεταγραφικών παραγόντων, των οποίων τα επίπεδά αυξάνονται στους miR-124+ISX9 iNs και σχετίζονται με άλλες περιοχές του εγκεφάλου εκτός του φλοιού, και ιδιαίτερα με την περιοχή του μεσεγκέφαλου. Παρόλο που μετά το RNA-seq και την ανάλυση των οντολογιών (Go Term Analysis) (Εικόνα 3.8), υπήρξαν κατηγορίες, όπως αυτή της ανάπτυξης του οπίσθιου εγκεφάλου ή του νωτιαίου μυελού, οι οποίες περιλάμβαναν πολύ μεγαλύτερο αριθμό γονιδίων από αυτή της ανάπτυξης του μεσεγκέφαλου, εντούτοις διαλέξαμε τη συγκεκριμένη κατηγορία λόγω του ότι πολλά από αυτά τα γονίδια αυξάνουν σημαντικά τα επίπεδά τους, ενώ ορισμένα από αυτά, όπως το Lmx1b, είναι από τα πιο υψηλά εκφραζόμενα DEGs (Differentially Expressed Genes) που βρέθηκαν στη σύγκριση miR-124+ISX9\_iNs vs control\_astrocytes. Ένα σημαντικό ερώτημα που θέσαμε προς αυτή την κατεύθυνση είναι το κατά πόσον υπάρχει η δυνατότητα περαιτέρω ώθησης των επαναπρογραμματισμένων κυττάρων προς το συγκεκριμένο υπότυπο νευρώνων in vitro. Εάν το γεγονός αυτό επιβεβαιωθεί, τότε θα ήταν δυνατή η ανάπτυξη ενός βελτιωμένου in vitro πρωτοκόλλου άμεσου επαναπρογραμματισμού για τη δημιουργία και μελέτη ντοπαμινεργικών νευρώνων από ασθενείς με Πάρκινσον στα πλαίσια της disease-in-a-dish μοντελοποίησης, ενώ στο in vivo επίπεδο, θα μπορούσε να αναπτυχθεί μια δυνητική θεραπευτική προσέγγιση άμεσου επαναπρογραμματισμού και πάλι για την ασθένεια Πάρκινσον. Τέλος, σε ερευνητικό επίπεδο, είναι πολύ

ενδιαφέρον το να εξετάσουμε εάν επαναπρογραμματίζοντας αστροκύτταρα του φλοιού θα μπορούσαμε να καταλήξουμε σε ένα πληθυσμό νευρώνων διαφορετικής περιοχής του εγκεφάλου.

Αρχικά, έγινε προσπάθεια επιβεβαίωσης δεδομένων του RNA-seq για κάποια γονίδια, τα οποία σχετίζονται με τη συγκεκριμένη κυτταρική μοίρα. Πράγματι, γονίδια όπως τα Lmx1b, En1, Foxa1, DAT και Girk2 τα οποία σχετίζονται άμεσα με τη δημιουργία και την ωρίμανση των ντοπαμινεργικών νευρώνων (Εικόνες 3.10,3.12) [33] αύξησαν τα επίπεδα τους στους miR-124+ISX9 iNs. Αξιοσημείωτο ήταν επίσης το γεγονός ότι τα επίπεδα γονιδίων του μονοπατιού Shh, τα Shh και Gli1, το οποίο σχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη του μεσεγκέφαλου, μειώθηκαν στους miR-124 iNs, ενώ στη συνέγεια αυξήθηκαν ξανά στους miR-124+ISX9 iNs (Εικόνα 3.11), λόγω της προσθήκης του ISX9. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την υπόθεση ότι το miR-124 δρα μεταξύ άλλων μπλοκάροντας άλλες νευρωνικές μοίρες που σχετίζονται με πιο κοιλιακές περιοχές, όπως είναι ο μεσεγκέφαλος και ευνοεί την ανάπτυξη νευρώνων του πρόσθιου εγκεφάλου/φλοιού από τα φλοιικά αστροκύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τον φυσιολογικό ρόλο του miR-124, για το οποίο έχει αναφερθεί ότι παίζει ρόλο στην ανάπτυξη του φλοιού κατά την εμβρυογένεση, αλλά έχει εμπλακεί και στην ενήλικη νευρογένεση στην SVZ [119,120]. Από την άλλη πλευρά το ISX9 με ένα μηχανισμό που δεν γνωρίζουμε ακόμη αυξάνει τα επίπεδα του σημαντικότερου τελεστή του Shh μονοπατιού, του Gli1, ανοίγοντας μέσω άγνωστων μέχρι στιγμής μηγανισμών το φάσμα των νευρωνικών ταυτοτήτων προς πιο κοιλιακές περιοχές.

Για να επιτύχουμε την ώθηση του επαναπρογραμματιμού προς ένα ντοπαμινεργικό φαινότυπο ανατρέξαμε στη βιβλιογραφία και επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε τους παράγοντες Shh και Fgf8, οι οποίοι χρησιμοποιούνται σε πολλά πρωτόκολλα διαφοροποίησης νευρόσφαιρων και πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (ESCs, iPSCs) προς ντοπαμινεργικούς νευρώνες [33]. Επιλέχθηκε η προσθήκη των παραγόντων αυτών από την 4<sup>η</sup> μέχρι την 7<sup>η</sup> μέρα του πρωτόκολλου επαναπρογραμματισμού, δεδομένου ότι οι παράγοντες αυτοί προστίθενται αρκετά νωρίς στα πρωτόκολλα διαφοροποίησης.

Τα πρώτα αποτελέσματα έδειξαν πως τόσο οι miR-124+ISX9+Shh\_iNs όσο και οι miR-124+ISX9+Shh+Fgf8\_iNs την 7<sup>η</sup> ημέρα παρουσιάζουν μεγαλύτερο μήκος νευρωνικών απολήξεων και διακλαδώσεων από τους miR-124 iNs και τους miR-124+ISX9 iNs, στοιχεία ενδεικτικά της μεγαλύτερης διαφοροποίησης και ωριμότητας αυτών των επαγόμενων νευρώνων (Εικόνα 3.13). Επιπλέον, όσον αφορά το ποσοστό των Tuj1+ κυττάρων, αυτό αυξήθηκε στους miR-124+ISX9+Shh iNs σε σχέση με τους miR-124+ISX9 iNs, ενώ στην περίπτωση των miR-124+ISX9+Shh+Fgf8 iNs έφτασε σε ιδιαίτερα υψηλές τιμές (72,3%). Από τα παραπάνω φαίνεται πως η προσθήκη ιδιαίτερα Fgf8 τόσο του ωφέλησε σημαντικά την απόδοση του επαναπρογραμματισμού, όσο και την ωρίμανση των επαγόμενων νευρώνων, γεγονός που δικαιολογείται απόλυτα λαμβάνοντας υπ'όψιν ότι ο Fgf8 είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των ντοπαμινεργικών νευρώνων στο μεσεγκέφαλο [33], καθώς και το ότι η προσθήκη του Fgf8 σε πρωτόκολλο διαφοροποίησης επαγόμενων νευρικών προγονικών κυττάρων (induced Neural Precursor Cells, iNPCS) προς ντοπαμινεργικούς νευρώνες έχει δειχθεί ότι όχι μόνο βελτιώνει τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση των νευρώνων, αλλά είναι απαραίτητη και για την επιβίωση τους [121].

Συνακόλουθα, κατά την ανάλυση τόσο στη 15<sup>η</sup> μέρα όσο και στην 20<sup>η</sup> μέρα μετά τη διαμόλυνση, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση των Tuj1+ κυττάρων σε όλες τις συνθήκες που μελετήθηκαν, με το τελικό ποσοστό των Tuj1+ κυττάρων να φτάνει μέχρι το 18% για τις συνθήκες miR-124+ISX9, miR-124+ISX9+Shh και miR-124+ISX9+Shh+Fgf8 (Εικόνες 3.14, 3.15). Ένας από τους λόγους αυτής της μείωσης είναι ότι αυξάνεται η ωριμότητα των κυττάρων και έτσι η χρώση με Tuj1 δεν είναι πλέον επαρκής. Άλλη μία εξήγηση μπορεί να είναι ότι κάποια κύτταρα αποτυγχάνουν να ωριμάσουν περαιτέρω και ενδεχομένως αποπίπτουν. Σε κάθε περίπτωση θα πρέπει να γίνει περαιτέρω διερεύνηση με χρήση δεικτών πιο ώριμων νευρώνων, όπως οι MAP2 και NeuN, καθώς και χρώση των κυττάρων σε μεγαλύτερο χρόνο έπειτα από την 1<sup>η</sup> διαμόλυνση (22-25 μέρες), ώστε να δειχθεί εάν τα κύτταρα βρίσκονται σε ένα πιο ώριμο στάδιο. Επιπλέον, σε ένα στάδιο μεγαλύτερης ωριμότητας θα μπορέσει να γίνει μελέτη της χρώσης των κυττάρων με δείκτες των ώριμων ντοπαμινεργικών νευρώνων, όπως οι TH και DAT. Στην παρούσα εργασία δεν κατέστη δυνατή η εύρεση θετικών κυττάρων για τον δείκτη ώριμων ντοπαμινεργικών νευρώνων ΤΗ στην 20 μέρα, γεγονός που σημαίνει ενδεχομένως ότι απαιτείται μεγαλύτερος γρόνος ωρίμανσης ή και η βελτίωση του πρωτοκόλλου επαναπρογραμματισμού. Προς αυτή την κατεύθυνση, λόγω του ρόλου του Fgf8 στην ωρίμανση και επιβίωση των ντοπαμινεργικών νευρώνων, πιστεύουμε πως η απόδοση αλλά και η ωρίμανση μπορεί να βελτιωθεί εάν παραμείνει ο συγκεκριμένος παράγοντας στην καλλιέργεια για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Στις καινούριες συνθήκες ελέγξαμε τα επίπεδα διαφόρων γονιδίων με real time RT-PCR, ώστε να διερευνήσουμε εάν οι επαγόμενοι νευρώνες με τις συγκεκριμένες τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου αποκτούν ένα ντοπαμινεργικό φαινότυπο (Εικόνες 3.17-3.19). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως υπήρξε μείωση της έκφρασης τόσο γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη του μεσεγκέφαλου και του μονοπατιού Shh όσο και αυτών που σχετίζονται με τον εγκεφαλικό φλοιό στους miR-124+ISX9+Shh+Fgf8 iNs σε σχέση με τους miR-124+ISX9 iNs. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι στη συγκεκριμένη συνθήκη οι επαγόμενοι νευρώνες πιθανά ωριμάζουν περισσότερο ή και νωρίτερα με αποτέλεσμα τα επίπεδα δεικτών ανώριμων ντοπαμινεργικών νευρώνων να πέφτουν, ενώ ταυτόχρονα εγκαταλείπεται σταδιακά η εναλλακτική φλοιική ταυτότητα η οποία σύμφωνα με την ανάλυση μας είναι και η κύρια ταυτότητα που λαμβάνουν οι επαγόμενοι νευρώνες miR-124+ISX9 iNs απουσία των παραγόντων Shh και Fgf8. Φυσικά, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση για να καταλάβουμε εάν τα επίπεδα των γονιδίων, τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξη του μεσεγκέφαλου, μειώνονται λόγω περαιτέρω ωριμότητας των νευρώνων ή λόγω αποτυχίας τον κυττάρων να λάβουν επιτυχώς μία ντοπαμινεργική ταυτότητα. Πάντως, σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα δεδομένα (μορφολογία, ηλεκτροφυσιολογική μελέτη) τείνουμε να θεωρούμε πως τα κύτταρα ωριμάζουν, παρότι την 20<sup>η</sup> μέρα δεν βρέθηκαν θετικά κύτταρα για ΤΗ.

Στην περίπτωση των miR-124+ISX9+Shh\_iNs, η μείωση των επιπέδων των γονιδίων, τα οποία σχετίζονται με το φλοιό ήταν πολύ μικρότερη, ενώ στα γονίδια, τα οποία σχετίζονται με το μεσεγκέφαλο και τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες παρατηρήθηκε ελάχιστη ή και καθόλου μείωση σε σχέση με τους miR-124+ISX9\_iNs. Τα δεδομένα αυτά, μας έκαναν να καταλήξουμε στο συμπέρασμα πως η προσθήκη μόνο του Shh δεν είναι ικανή να ωθήσει τα κύτταρα επαρκώς προς τη ντοπαμινεργική μοίρα, καθώς επίσης πως το Shh δεν φαίνεται να συνεισφέρει περαιτέρω στα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα του βασικού τελεστή του, του Gli1, σε σχέση με το ISX9, γεγονός που μας ωθεί στο συμπέρασμα ότι το ISX9 αναπληρώνει ή υπερκαλύπτει τη δράση του Shh (τουλάχιστον όσον αφορά τα χαρακτηριστικά και τα γονίδια που μελετήθηκαν). Σε επόμενα πειράματα, θα πρέπει να ελέγξουμε με μία

ακόμα συνθήκη (miR-124+ISX9+Fgf8), εάν ο παράγοντας Fgf8 είναι από μόνος του ικανός να δώσει τα ίδια αποτελέσματα ή εάν χρειάζεται ο συνδυασμός του με το Shh.

Στη συνέχεια της μελέτης θελήσαμε να μελετήσουμε την καλλιέργεια με ανοσοκυτταροχημεία και να διερευνήσουμε αν τα μέχρι τώρα αποτελέσματα μας σχετικά με τα mRNA επίπεδα των γονιδίων έρχονται σε συμφωνία με τα επίπεδα των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Αρχικά μελετήσαμε τα πρωτεϊνικά επίπεδα του Gli1, δεδομένου ότι φαίνεται να παίζει κομβικό ρόλο στη δράση του ISX9. Παρατηρήθηκε πως τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυξήθηκαν τόσο στους miR-124+ISX9\_iNs όσο και στους miR-124+ISX9+Shh\_iNs και τους miR-124+ISX9+Shh+Fgf8\_iNs σε σχέση με τους miR-124\_iNs, όμως επειδή οι πυρήνες των περισσότερων κυττάρων είχαν θετική χρώση για το Gli1 σε όλες τις συνθήκες, αλλά με διαφορετικά επίπεδα έντασης, επιλέξαμε να ποσοτικοποιήσουμε την ένταση του φθορισμού ώστε να διακρίνουμε με μεγαλύτερη ακρίβεια πιθανούς διαφορετικούς υποπληθυσμούς μεταξύ των Tuj1+ κυττάρων.

Τα αποτελέσματα, τα οποία προέκυψαν μετά από υπολογισμό της μέσης έντασης φθορισμού στους πυρήνες των Tuj1+ κυττάρων, έδειξαν πως οι miR-124+ISX9+Shh+Fgf8\_iNs έχουν το μεγαλύτερο ποσοστό Gli1+/Tuj1+ κυττάρων αλλά και το μικρότερο εύρος κατανομής, το οποίο υποδηλώνει πως στη συγκεκριμένη συνθήκη έχουμε έναν πιο ομοιογενή πληθυσμό (Εικόνα 3.20). Το συγκεκριμένο εύρημα ενισχύει ακόμη παραπάνω την υπόθεση ότι η προσθήκη του Fgf8 προσδίδει στον πληθυσμό μία σαφή κυτταρική μοίρα.

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στη χρώση με αντισώματα έναντι των Lmx1b και Nurr1, που είναι δείκτες ανώριμων ντοπαμινεργικών νευρώνων, σε μια προσπάθεια χαρακτηρισμού των κυττάρων ως προς την ταυτότητα αυτή. Επιλέχθηκε η μελέτη του Lmx1b δεδομένου ότι είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας σημαντικός για την ανάπτυξη του μεσεγκέφαλου και τα mRNA επίπεδα του ήταν ανεβασμένα τόσο στο RNA-seq, όσο σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων του RNA-seq. Η ανάλυση εδώ πραγματοποιήθηκε την 7η μέρα, δυστυχώς όμως δε μας έδωσε αποτελέσματα λόγω μη επαρκούς λειτουργίας του αντισώματος. Όσον αφορά τη χρώση έναντι του Nurr1, τα κύτταρα συλλέχθηκαν τη 15<sup>η</sup> μέρα και πραγματοποιήθηκε χρώση με ένα αντίσωμα έναντι του Nurr1, το οποίο σημαίνει τους μετα-μιτωτικούς ανώριμους ντοπαμινεργικούς νευρώνες [33].

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν πως τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυξάνονται στους miR-124+ISX9 iNs kai stoug miR-124+ISX9+Shh iNs, evá sty suvégeia παρατηρείται μείωση στους miR-124+ISX9+Shh+Fgf8 iNs. Παρολ' αυτά, απροσδόκητο ήταν το γεγονός ότι παρατηρήθηκε έκφραση του Nurr1 και στους miR-124 iNs, γεγονός που συνάδει με τα δεδομένα του RNA-seq όπου τα επίπεδα του mRNA του συγκεκριμένου γονιδίου αυξάνονταν στους miR-124 iNs, χωρίς να παρατηρείται περαιτέρω αύξηση στους miR-124+ISX9 iNs (Εικόνες 3.22,3.23). Ανατρέχοντας στην πολύ πρόσφατη βιβλιογραφία, διαπιστώσαμε πως η πρωτεΐνη Nurr1 συμμετέχει και στη δημιουργία νευρώνων του εγκεφαλικού φλοιού [118], κάτι το οποίο δικαιολογεί την ύπαρξή της στους miR-124 iNs. Ενδιαφέρουσα ήταν, επίσης, μείωση του φθορισμού, n οποία παρατηρήθηκε στους miRη 124+ISX9+Shh+Fgf8 iNs. Το γεγονός αυτό δεν έρχεται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία, όπου αναφέρεται πως και οι ώριμοι ντοπαμινεργικοί νευρώνες διατηρούν τα επίπεδα της Nurr1 [121]. Συμπερασματικά, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί περαιτέρω διερεύνηση τόσο για τη χρώση έναντι του Gli1 όσο και για τη χρώση έναντι του Nurr1, ώστε να έχουμε τη δυνατότητα εξαγωγής ασφαλούς συμπεράσματος για τα πρωτεϊνικά επίπεδα και να υπολογιστεί με μεγαλύτερη σαφήνεια το ποσοστό των θετικών κυττάρων για τις δύο αυτές πρωτεΐνες.

Τέλος, για τη διερεύνηση της λειτουργικής ωρίμανσης των επαγόμενων νευρώνων, πραγματοποιήσαμε μία σειρά από πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας στους επαναπρογραμματισμένους miR-124+ISX9\_iNs, miR-124+ISX9+Shh\_iNs και miR-124+ISX9+Shh+Fgf8\_iNs. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας (Εικόνες 3.24, 3.25, 3.26), οι επαγόμενοι νευρώνες και στις τρεις συνθήκες έχουν απόκριση σε εκπολωτικά δυναμικά, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ρευμάτων νατρίου και καλίου, άρα είναι λειτουργικοί, με την καλύτερη απόκριση να επιτυγχάνεται στους miR-124+ISX9+Shh+Fgf8\_iNs. Επιπλέον, τα κύτταρα αυτής της συνθήκης εμφάνισαν τόσο διέγερση από εκπολωτικό ρεύμα, το οποίο προκάλεσε διαδοχικά δυναμικά ενέργειας όσο και αυθόρμητη μετασυναπτική δραστηριότητα.

Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν ακόμη παραπάνω την υπόθεση περί μεγαλύτερης ωριμότητας των miR-124+ISX9+Shh+Fhf8\_iNs, καθώς φαίνεται τόσο η λειτουργικότητα των κυττάρων όσο και η ικανότητά τους για συμμετοχή σε νευρωνικά δίκτυα, παρατηρήσεις οι οποίες συμφωνούν και με όλα τα παραπάνω αποτελέσματα.

Συμπερασματικά, μέσω της συγκεκριμένης μελέτης δεν κατέστη δυνατή η δημιουργία ενός πληθυσμού ντοπαμινεργικών νευρώνων, ωστόσο συλλέξαμε πλήθος στοιχείων τα οποία συνηγορούν ως προς το ότι τα κύτταρα, τα οποία προκύπτουν έχουν την ικανότητα ωρίμανσης αλλά και ώθησης προς τη ντοπαμινεργική κυτταρική μοίρα πιθανά μεταξύ άλλων μέσω καταστολής της μεταγραφικών παραγόντων που συνδέονται με τη φλοική κυτταρική μοίρα.

Μελλοντικά, απαραίτητη είναι η περαιτέρω μελέτη και κατανόηση των μονοπατιών του επαναπρογραμματισμού αλλά και η βελτίωση του πρωτοκόλλου επαναπρογραμματισμού προς ντοπαμινεργικούς νευρώνες, καθώς ένα βελτιωμένο πρωτόκολλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί in vitro και σε ανθρώπινα αστροκύτταρα, ώστε να μελετηθεί και εκεί η αποτελεσματικότητα του επαναπρογραμματισμού με τους συγκεκριμένους παράγοντες. Τέλος, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί περαιτέρω μελέτη και in vivo, όχι μόνο σε τραύμα στον εγκεφαλικό φλοιό αλλά και σε τραύμα κατώτερων περιοχών του εγκεφάλου ή σε μοντέλο κάποιας νευροεκφυλιστικής ασθένειας (Parkinson's, Alzheimer's), ώστε να διερευνηθεί η in vivo αποτελεσματικότητα του συνδυασμού miR-124+ISX9 ως προς τον επαναπρογραμματισμό αστροκυττάρων από άλλες περιοχές του εγκεφάλου καθώς και η ταυτότητα που αυτά αποκτούν.

### 5. Βιβλιογραφία

- 1. Vander A. Φυσιολογία του ανθρώπου, 8<sup>η</sup> έκδοση (2001).
- 2. Gilbert S. F. Developmental Biology, 7th Edition (2003).
- Chao G., Hai-Yan Q., Ying H., Haixu C., Rong-Qiang Y., Sheng-Di C., Randy L. J., Zhou-Feng C., Yu-Qiang D. Lmx1b is essential for Fgf8 and Wnt1 expression in the isthmic organizer during tectum and cerebellum development in mice. *Development* 134, 317-325 (2007).
- Li J. Y. H., Joyner A. L. Otx2 and Gbx2 are required for refinement and not induction of mid-hindbrain gene expression. *Development* 128, 4979 – 4991 (2001).
- Pierani A., Brenner-Morton S., Chiang C., Jessell T. M. A sonic hedgehogindependent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell* 97, 903-915 (1999).
- 6. Wilson L., Maden M. The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol* 282, 1-13 (2005).
- Gotz M., Huttner W. B. The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 777–788 (2005).
- Taverna E., Gotz M., Huttner W. B. The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30: 465-502 (2014).
- Malatesta P., Gotz M. Radial glia from boring cables to stem cell stars. Development 140: 483-486 (2013).
- Gotz M., Stoykova A., Gruss P. Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron* 21: 1031-1044 (1998).
- Kwan K. Y., Šestan N., Anton E. S. Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development* 139, 1535-1546 (2012).
- 12. Paridaen J. T., Huttner W. B. Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep* 15: 351-364 (2014).
- Wrobel C. N., Mutch C. A., Swaminathan S., Taketo M. M., Chenn A. Persistent expression of stabilized beta-catenin delays maturation of radial glial cells into intermediate progenitors. *Dev Biol* 309: 285-297 (2007).

- 14. Dave R. K., Ellis T., Toumpas M. C., Robson J. P., Julian E., Adolphe C., Bartlett P. F., Cooper H. M., Reynolds B. A., Wainwright B. J. Sonic hedgehog and notch signaling can cooperate to regulate neurogenic divisions of neocortical progenitors. *PLoS One* 6: e14680 (2011).
- 15. Wang H., Ge G., Uchida Y., Luu B., Ahn S. Gli3 is required for maintenance and fate specification of cortical progenitors. *J Neurosci* 31: 6440-6448 (2011).
- 16. Englund C., Fink A., Lau C., Pham D., Daza R. A., Bulfone A., Kowalczyk T., Hevner R. F. Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci.* 25: 247-51 (2005).
- 17. Kageyama R., Ohtsuka T. Kobayashi T. Roles of Hes genes in neural development. *Dev Growth Differ* 50 Suppl 1: S97-103 (2008).
- Placzek, M., Briscoe, J. The floor plate: multiple cells, multiple signals. *Nat Rev Neurosci* 6: 230-240 (2005).
- 19. Broccoli V., Boncinelli E., Wurst W. The caudal limit of Otx2 expression positions the isthmic organizer. *Nature* 401: 164-168 (1999).
- 20. Millet S., Campbell K., Epstein D. J., Losos K., Harris E., Joyner A. L. A role for Gbx2 in repression of Otx2 and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature* 401: 161-164 (1999).
- Wassarman K. M., Lewandoski M., Campbell K., Joyner A. L., Rubenstein J. L., Martinez S., Martin G. R. Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function. *Development* 124: 2923-2934 (1997).
- 22. Joyner A. L., Liu A., Millet S. Otx2, Gbx2 and Fgf8 interact to position and maintain a mid-hindbrain organizer. *Curr Opin Cell Biol.* 12: 736-741 (2000).
- 23. Rhinn M., Dierich A., Shawlot W., Behringer R. R., Le Meur M., Ang S.-L. Sequential roles for Otx2 in visceral endoderm and neuroectoderm for forebrain and midbrain induction and specification. *Development* 125: 845-856 (1998).
- Ang S.-L., Wierda A., Wong D., Stevens K. A., Cascio S., Rossant J., Zaret K. S. The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins. *Development* 119: 1301-1315 (1993).

- 25. Sasaki H., Hui C., Nakafuku M., Kondoh H. A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development* 124: 1313-1322 (1997).
- 26. Weinstein D. C., Ruiz i Altaba A., Chen W. S., Hoodless P., Prezioso V. R., Jessell T. M., Darnell J. E. Jr. The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* 78: 575-588 (1994).
- 27. Ang S.-L., Rossant J. HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* 78: 561-574 (1994).
- Hegarty S. V., Sullivan A. M., O'Keeffe G. W. Midbrain dopaminergic neurons: a review of the molecular circuitry that regulates their development. *Dev Biol* 379: 123-138 (2013).
- 29. Smidt M. P., Asbreuk C. H. J., Cox J. J., Chen H., Johnson R. L., Burbach J. P. A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires Lmx1b. *Nat. Neurosci.* 3, 337-341 (2000).
- Andersson E., Tryggvason U., Deng Q., Friling S., Alekseenko Z., Robert B., Perlmann T., Ericson J. Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell* 124: 393-405 (2006).
- 31. Andersson E., Jensen J. B., Parmar M., Guillemot F., Björklund A. Development of the mesencephalic dopaminergic neuron system is compromised in the absence of neurogenin 2. *Development* 133: 507-516 (2006).
- Kele J., Simplicio N., Ferri A. L. M., Mira H., Guillemot F., Arenas E., Ang S.-L. Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development* 133: 495-505 (2006).
- Arenas E., Denham M., Villaescusa J. C. How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Development* 142: 1918-1936 (2015).
- 34. Hsieh J. Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis. *Genes Dev.* 26: 1010-21 (2012).
- 35. Menn B., Garcia-Verdugo J. M., Yaschine C., Gonzalez-Perez O., Rowitch D., Alvarez-Buylla A. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 26: 7907–7918 (2006).

- 36. Ables J. L., Decarolis N. A., Johnson M. A., Rivera P. D., Gao Z., Cooper D. C., Radtke F., Hsieh J., Eisch A. J. Notch1 is required for maintenance of the reservoir of adult hippocampal stem cells. *J Neurosci* 30: 10484–10492 (2010).
- 37. Mira H., Andreu Z., Suh H., Lie D. C., Jessberger S., Consiglio A., San Emeterio J., Hortiguela R., Marques-Torrejon M. A., Nakashima K. Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 7: 78–89 (2010).
- 38. Lugert S., Basak O., Knuckles P., Haussler U., Fabel K., Gotz M., Haas C. A., Kempermann G., Taylor V., Giachino C. Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell* 6: 445–456 (2010).
- Deisseroth K., Singla S., Toda H., Monje M., Palmer T. D., Malenka R. C. Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron* 42: 535–552 (2004).
- 40. Tozuka Y., Fukuda S., Namba T., Seki T., Hisatsune T. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* 47: 803–815 (2005).
- 41. Song H., Stevens C. F., Gage F. H. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417: 39–44 (2002).
- 42. Goldman S. A., Chen Z. Perivascular instruction of cell genesis and fate in the adult brain. *Nat Neurosci* 14: 1382–1389 (2011).
- Favaro R., Valotta M., Ferri A. L., Latorre E., Mariani J., Giachino C., Lancini C., Tosetti V., Ottolenghi S., Taylor V. Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nat Neurosci* 12: 1248–1256 (2009).
- 44. Kim E. J., Leung C. T., Reed R. R., Johnson J. E. In vivo analysis of Ascl1 defined progenitors reveals distinct developmental dynamics during adult neurogenesis and gliogenesis. *J Neurosci* 27: 12764–12774 (2007).
- 45. Kim E. J., Ables J. L., Dickel L. K., Eisch A. J., Johnson J. E. Ascl1 (Mash1) defines cells with long-term neurogenic potential in subgranular and subventricular zones in adult mouse brain. *PLoS ONE* 6: e18472 (2011).

- 46. Jessberger S., Toni N., Clemenson G. D. Jr, Ray J., Gage F. H. Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nat Neurosci* 11: 888–893 (2008).
- Renault V. M., Rafalski V. A., Morgan A. A., Salih D. A., Brett J. O., Webb A. E., Villeda S. A., Thekkat P. U., Guillerey C., Denko N. C. FoxO3 regulates neural stem cell homeostasis. *Cell Stem Cell* 5: 527–539 (2009).
- Niu W., Zou Y., Shen C., Zhang C. L. Activation of postnatal neural stem cells requires nuclear receptor TLX. *J Neurosci* 31: 13816–13828 (2011).
- 49. Gao Z., Ure K., Ables J. L., Lagace D. C., Nave K. A., Goebbels S., Eisch A. J., Hsieh J. Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nat Neurosci* 12: 1090–1092 (2009).
- Wang T. W., Stromberg G. P., Whitney J. T., Brower N. W., Klymkowsky M. W., Parent J. M. Sox3 expression identifies neural progenitors in persistent neonatal and adult mouse forebrain germinative zones. *J Comp Neurol* 497: 88–100 (2006).
- 51. Haslinger A., Schwarz T. J., Covic M., Chichung Lie D. Expression of Sox11 in adult neurogenic niches suggests a stage-specific role in adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 29: 2103–2114 (2009).
- 52. Shen L., Nam H. S., Song P., Moore H., Anderson S. A. FoxG1 haploinsufficiency results in impaired neurogenesis in the postnatal hippocampus and contextual memory deficits. *Hippocampus* 16: 875–890 (2006).
- 53. Lavado A., Lagutin O. V., Chow L. M., Baker S. J., Oliver G. Prox1 is required for granule cell maturation and intermediate progenitor maintenance during brain neurogenesis. *PLoS Biol* 8: e1000460 (2010).
- 54. Jagasia R., Steib K., Englberger E., Herold S., Faus-Kessler T., Saxe M., Gage F. H., Song H., Lie D. C. GABA–cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 29: 7966–7977 (2009).
- 55. Fishell G., Kriegstein A. R. Neurons from radial glia: The consequences of asymmetric inheritance. *Curr Opin Neurobiol* 13: 34–41 (2003).
- Noctor S. C, Martinez-Cerdeno V., Kriegstein A. R. Neural stem and progenitor cells in cortical development. *Novartis Found Symp* 288: 59–78 (2007).

- 57. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663–676 (2006).
- 58. Boiani M., Schöler H. R. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 872–884 (2005).
- 59. Gepstein L. Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. *Circ Res* 91: 866–876 (2002).
- 60. Nakagami H., Nakagawa N., Takeya Y. Model of vasculogenesis from embryonic stem cells for vascular research and regenerative medicine. *Hypertension* 48: 112–119 (2006).
- 61. Brunt K. R., Weisel R. D., Li R. K. Stem cells and regenerative medicine future perspectives. *Can J Physiol Pharmacol* 90: 327–335 (2012).
- 62. Atala A. Regenerative medicine strategies. J Pediatr Surg 47:17-28 (2012).
- 63. Kelaini S., Cochrane A., Margariti A. Direct reprogramming of adult cells: avoiding the pluripotent state. *Stem Cells Cloning* 7: 19–29 (2014).
- 64. Graf T., Enver T. Forcing cells to change lineages. Nature 462: 587–594 (2009).
- 65. Ho L., Crabtree G. R. Chromatin remodelling during development. *Nature* 463: 474–484 (2010).
- 66. Takahashi K. Cellular reprogramming lowering gravity on Waddington's epigenetic landscape. *Journal of Cell Science* 125: 2553-2560 (2012).
- 67. Xie H., Ye M., Feng R., Stepwisw T. G. Reprogramming of B Cells into Macrophages. *Cell* 117: 663–676 (2004).
- Quian L., Huang Y., Spencer C. I., Foley A., Vedantham V., Liu L., Conway J. S., Fu J., Srivastava D. In vivo reprogramming o murine cardiac fibroblasts into induced cadriomyocytes. *Nature* 485: 593-598 (2012).
- 69. Zhou Q., Brown J., Kanarek A., Rajagopal J., Melton D. A. M. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β cells. *Nature* 455: 627-632 (2008).
- 70. Ninkovic J., Götz M. Understanding direct neuronal reprogramming-from pioneer factors to 3D chromatin. *Curr Opin Genet Dev* 52: 65-69 (2018).
- Magnusson J. P., Frisen J. Stars from the darkest night: unlocking the neurogenic potential of astrocytes in different brain regions. *Development* 143:1075-86 (2016).

- 72. Heinrich C., Götz M., Berninger B. Reprogramming of postnatal astroglia of the mouse neocortex into functional, synapse-forming neurons. *Methods Mol Biol* 814: 485-498 (2013).
- 73. Torper O., Pfisterer U., Wolf D. A., Pereira M., Lau S., Jakobsson J., Björklund A., Grealish S., Parmar M. Generation of induced neurons via direct conversion in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 7038-7043 (2013).
- 74. Heins N., Malatesta P., Cecconi, F., Nakafuku M., Tucker K. L., Hack M. A., Chapouton P., Barde Y.-A., Götz M. Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat Neurosci* 5: 308-315 (2002).
- Berninger B., Costa M. R., Koch U., Schroeder T., Sutor B., Grothe B., Gotz M. Functional properties of neurons derived from in vitro reprogrammed postnatal astroglia. *J Neurosci* 27: 8654-8664 (2007).
- 76. Casarosa S., Fode C. Guillemot F. Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* 126: 525-534 (1999).
- Heinrich C., Blum R., Gascón S., Masserdotti G., Tripathi P., Sánchez R., Tiedt S., Schroeder T., Götz M., Berninger B. Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons. *PLoS Biol* 8: e1000373 (2010).
- 78. Marro S., Pang Z. P., Yang N., Tsai M-C., Qu K., Chang H. Y., Südhof T. C., Wernig M. Direct lineage conversion of terminally differentiated hepatocytes to functional neurons. *Cell Stem Cell* 9: 374–382 (2011).
- 79. Karow M., Sánchez R., Schichor C., Masserdotti G., Ortega F., Heinrich C., Gascón S., Khan M. A., Lie D. C., Dellavalle A., Cossu G., Goldbrunner R., Götz M., Berninger B. Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells. *Cell Stem Cell* 11: 471-476 (2012).
- Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z. P., Kokubu Y., Südhof T. C., Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463: 1035–1041 (2010).
- 81. Pang Z. P., Yang N., Vierbuchen T., Ostermeier A., Fuentes D. R., Yang T. Q., Citri A., Sebastiano V., Marro S., Südhof T. C., Wernig M. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* 476: 220-223 (2011).
- 82. Gascón S., Masserdotti G., Russo G. L., Götz M. Direct Neuronal Reprogramming: Achievements, Hurdles, and New Roads to Success. *Cell Stem Cell* 21: 18-34 (2017).

- Niu W., Zang T., Zou Y., Fang S., Smith D. K., Bachoo R., Zhang C-L. In vivo reprogramming of astrocytes to neuroblasts in the adult brain. *Nat Cell Biol* 15: 1164–1175 (2013).
- 84. Heinrich C., Bergami M., Gascón S., Lepier A., Viganò F., Dimou L., Sutor B., Berninger B., Götz M. Sox2 - mediated conversion of NG2 glia into induced neurons in the injured adult cerebral cortex. *Stem Cell Rep* 3: 1000–1014 (2014).
- Torper O., Pfisterer U., Wolf D. A., Pereira M., Lau S., Jakobsson J., Björklund A., Grealish S., Parmar M. Generation of induced neurons via direct conversion in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 110: 7038–7043 (2013).
- 86. Guo Z., Zhang L., Wu Z., Chen Y., Wang F., Chen G. In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell* 14: 188–202 (2014).
- Torper O., Ottosson D. R., Pereira M., Lau S., Cardoso T., Grealish S., Parmar M. In vivo reprogramming of striatal NG2 glia into functional neurons that integrate into local host circuitry. *Cell Rep* 12: 474–481 (2015).
- Liu M. L., Zang T., Zou Y., Chang J. C., Gibson J. R., Huber K. M., Zhang C. L. Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons. *Nat Commun* 4: 2183 (2013).
- 89. Li X., Zuo X., Jing J., Ma Y., Wang J., Liu D., Zhu J., Du X., Xiong L., Du Y., Xu J., Xiao X., Wang J., Chai Z., Zhao Y., Deng H. Small-Molecule-Driven Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts into Functional Neurons. *Cell Stem Cell* 17: 195-203 (2015).
- 90. Hu W., Qiu B., Guan W., Wang Q., Wang M., Li W., Gao L., Shen L., Huang Y., Xie G., Zhao H., Jin Y., Tang B., Yu Y., Zhao J., Pei G. Direct Conversion of Normal and Alzheimer's Disease Human Fibroblasts into Neuronal Cells by Small Molecules. *Cell Stem Cell* 17: 204-12 (2015).
- 91. Mertens J., Paquola AC. M., Ku M., Hatch E., Böhnke L., Ladjevardi S., McGrath S., Campbell B., Lee H., Herdy J. R., Gonçalves J. T., Toda T., Kim Y., Winkler J., Yao J., Hetzer M. W., Gage F. H. Directly Reprogrammed Human Neurons Retain Aging-Associated Transcriptomic Signatures and Reveal Age-Related Nucleocytoplasmic Defects. *Cell Stem Cell* 17: 705-718 (2015).
- 92. Zhang L., Yin J. C., Yeh H., Ma N. X., Lee G., Chen X. A., Wang Y., Lin L., Chen L., Jin P., Wu G. Y., Chen G. Small Molecules Efficiently Reprogram

Human Astroglial Cells into Functional Neurons. *Cell Stem Cell* 17: 735-747 (2015).

- 93. Takeda Y., Harada Y., Yoshikawa T., Dai P. Chemical compound-based direct reprogramming for future clinical applications. *Biosci Rep* 38 (2018).
- 94. Schneider J. W., Gao Z., Li S., Farooqi M., Tang T. S., Bezprozvanny I., Frantz D. E., Hsieh J. Small-molecule activation of neuronal cell fate. *Nat Chem Biol* 4: 408-410 (2008).
- 95. Petrik D., Jiang Y., Birnbaum S. G., Powell C. M., Kim M. S., Hsieh J., Eisch A. J. Functional and mechanistic exploration of an adult neurogenesis-promoting small molecule. *FASEB J* 26: 3148-62 (2012).
- 96. Zhang L., Li P., Hsu T., Aguilar H. R., Frantz D. E., Schneider J. W., Bachoo R. M., Hsieh J. Small-molecule blocks malignant astrocyte proliferation and induces neuronal gene expression. *Differentiation* 81: 233-42 (2011).
- 97. Yu Y., Ping Y., Bian X., Shen L., Pei G. Direct generation of human neuronal cells from adult astrocytes by small molecules. Stem Cell Rep 8: 538–547 (2017).
- 98. Shukla C. G., Singh J., Barik S. MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. *Mol Cell Pharmacol* 3: 83–92 (2011).
- 99. Coolen M., Bally-Cuif L. MicroRNAs in brain development and physiology. *Curr Opin Neurobiol* 19: 461-70 (2009).
- 100. Chen W., Qin C. General hallmarks of microRNAs in brain evolution and development. *RNA Biol* 12: 701-708 (2015).
- Ambasudhan R., Talantova M., Coleman R., Yuan X., Zhu S., Lipton S.
  A., Ding S. Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell Stem Cell* 9: 113-8 (2011).
- 102. Yoo A. S., Sun A. X., Li L., Shcheglovitov A., Portmann T., Li Y., Lee-Messer C., Dolmetsch R. E., Tsien R. W., Crabtree G. R. MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature* 476: 228-31 (2011).
- 103. Victor M. B., Richner M., Hermanstyne T. O., Ransdell J. L., Sobieski C., Deng P. Y., Klyachko V. A., Nerbonne J. M., Yoo A. S. Generation of human striatal neurons by microRNA-dependent direct conversion of fibroblasts. *Neuron* 84: 311-23 (2014).
- 104. Rivetti di Val Cervo P., Romanov R. A., Spigolon G., Masini D., Martín-Montañez E., Toledo E. M., La Manno G., Feyder M., Pifl C., Ng Y. H.,

Sánchez S. P., Linnarsson S., Wernig M., Harkany T., Fisone G., Arenas E. Induction of functional dopamine neurons from human astrocytes in vitro and mouse astrocytes in a Parkinson's disease model. *Nat Biotechnol* 35: 444-452 (2017).

- 105. Åkerblom M., Sachdeva R., Jakobsso J. Functional Studies of microRNAs in Neural Stem Cells: Problems and Perspectives. *Front Neurosci* 6: 14 (2012).
- 106. Neurosci, N. HHS Public Access. 12, 399–408 (2009)
- Jørgensen H. F., Terry A., Beretta C., Pereira C. F., Leleu M., Chen Z.
  F., Kelly C., Merkenschlager M., Fisher A. G. REST selectively represses a subset of RE1-containing neuronal genes in mouse embryonic stem cells. *Development* 136: 715–721 (2009).
- 108. Visvanathan J., Lee S., Lee B., Lee J. W., Lee S. K. The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev* 21: 744-749 (2007).
- 109. Neo W. H., Yap K., Lee S. H., Looi L. S., Khandelia P., Neo S. X., Makeyev E. V., Su I. H. MicroRNA miR-124 controls the choice between neuronal and astrocyte differentiation by fine-tuning Ezh2 expression. *J Biol Chem* 289: 20788-20801 (2014).
- Ghasemi-Kasman M., Hajikaram M., Baharvand H., Javan M. MicroRNA-Mediated In Vitro and In Vivo Direct Conversion of Astrocytes to Neuroblasts. *PLoS One* 10:e0127878 (2015).
- 111. Nolte C., Krumlauf R. Expression of Hox Genes in the Nervous System of Vertebrates
- 112. Deng Q., Andersson E., Hedlund E., Alekseenko Z., Coppola E., Panman L., Millonig J. H., Brunet J. F., Ericson J., Perlmann T. Specific and integrated roles of Lmx1a, Lmx1b and Phox2a in ventral midbrain development. *Development* 138: 3399-3408 (2011).
- 113. Goetz J. J., Martin G. M., Chowdhury R., Trimarchi J. M. Onecut1 and Onecut2 play critical roles in the development of the mouse retina. *PLoS One* 9: e110194 (2014).
- 114. Ruiz i Altaba A., Palma V., Dahmane N. Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci* 3:24-33 (2002).

- 115. Zhang J., Jiao J. Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *Biomed Res Int.* 2015: 727542 (2015).
- 116. Nieto M., Monuki E. S., Tang H., Imitola J., Haubst N., Khoury S. J., Cunningham J., Gotz M., Walsh C. A. Expression of CUX1-1 and CUX1-2 in the subventricular zone and upper layers II–IV of the cerebral cortex. *J Comp Neurol.* 479; 168–180 (2004).
- 117. Lange M. D., Jüngling K., Paulukat L., Vieler M., Gaburro S., Sosulina L., Blaesse P., Sreepathi H. K., Ferraguti F., Pape H. C. Glutamic acid decarboxylase 65: a link between GABAergic synaptic plasticity in the lateral amygdala and conditioned fear generalization. *Neuropsychopharmacology* 39:2211-2220 (2014).
- 118. Mattugini N., Bocchi R., Scheuss V., Russo G. L., Torper O., Lao C. L., Götz M. Inducing Different Neuronal Subtypes from Astrocytes in the Injured Mouse Cerebral Cortex. *Neuron* [Epub ahead of print] (2019).
- 119. Maiorano N. A., Mallamaci A. Promotion of embryonic cortico-cerebral neuronogenesis by miR-124. *Neural Dev* 4: 40 (2009).
- Åkerblom M., Sachdeva R., Barde I., Verp S., Gentner B., Trono D., Jakobsson J. MicroRNA-124 is a subventricular zone neuronal fate determinant. *J Neurosci* 32: 8879-8889 (2012).
- Lim M. S., Lee S. Y., Park C. H. FGF8 is Essential for Functionality of Induced Neural Precursor Cell-derived Dopaminergic Neurons. *Int J Stem Cells* 8: 228-34 (2015).
- 122. Saucedo-Cardenas O., Quintana-Hau J. D., Le W. D., Smidt M. P., Cox J. J., De Mayo F., Burbach J. P., Conneely O. M. Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4013-8 (1998).

Δηλώνω ρητά ότι το κείμενο της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας δεν αποτελεί προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον.