ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΟΠΗ

Υπεύθυνος: **Ευθυμιόπουλος Σπύρος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Ε.Κ.Π.Α., Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου.**

Επιβλέπων: **Βασιλάτης Δημήτρης, Ερευνητής Γ΄, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑ), Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας.**

Μέλος: **Παπαζαφείρη Παναγιώτα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ε.Κ.Π.Α., Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου.**

ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΗ ΝΟΣΟ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝ

ΠΑΤΙΣΤΑ ΕΛΕΟΝΩΡΑ-ΙΡΙΣ
Α.Μ: 204115
ΑΘΗΝΑ 2011

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΟΠΗ

Υπεύθυνος: Ευθυμιόπουλος Σπύρος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Ε.Κ.Π.Α., Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου.

Επιβλέπων: Βασιλάτης Δημήτρης, Ερευνητής Γ΄, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑ), Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας.

Μέλος: Παπαζαφείρη Παναγιώτα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ε.Κ.Π.Α., Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου.

ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΗ ΝΟΣΟ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ (ΙΙΒΕΑ)
ΠΑΤΙΣΤΑ ΕΛΕΟΝΩΡΑ-ΙΡΙΣ
Α.Μ: 204115
ΑΘΗΝΑ 2011

UNIVERSITY OF ATHENS
FACULTY OF BIOLOGY AND MEDICAL SCHOOL
POST-GRADUATE PROGRAM
«APPLICATIONS OF BIOLOGY IN MEDICINE»

THREE-MEMBERED EXAMINATION COMMITTEE

Professor in charge:	**Spyros Efthimiopoulos, Associate Professor, University of Athens, Faculty of Biology, Department of Animal and Human Physiology**
Supervisor :	**Demetrios Vassilatis, Investigator, Biomedical Research Foundation, Academy of Athens, Laboratory of Cell Biology.**
Member:	**Panagiota Papazafeiris, Associate Professor, University of Athens, Faculty of Biology, Department of Animal and Human Physiology.**

NEYROPROTECTION IN PARKINSON DISEASE

LABORATORY OF CELL BIOLOGY (BRFAA)
ELEONORA-IRIS PATISTA
U.N: 204115
ATHENS 2011

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Λένε πως ένα τέλος σηματοδοτεί μια νέα αρχή…Τέλος, αρχή…λέξεις που τελικά ίσως δεν έχουν καμία σημασία αν τις προσεγγίσεις καθαρά και μόνο για να προσδιορίσεις τον χρόνο ή το αποτέλεσμα- Ιθάκη και όχι το ταξίδι για αυτήν.

Το δικό μου το ταξίδι ξεκίνησε στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑ) και τελειώνει τώρα…γράμμα-γράμμα, λέξη-λέξη κατά τη συγγραφή ετούτης εδώ της εργασίας. Διήρκησε 12 μήνες κατά τους οποίους γνώρισα και συνεργάστηκα με πλήθος ατόμων που ο καθένας με τον τρόπο του με κάνανε κοινωνό γνώσης και εμπειριών. Αλλά ας μην μακρηγορώ άλλο…

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή κύριο Δημήτρη Βασιλάτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα και για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στην εργαστηριακή του ομάδα, να γνωρίσω αξιόλογους ανθρώπους και να αποκομίσω νέες γνώσεις.

Θα ήθελα να πω ένα μεγάλο «ευχαριστώ» στους φίλους μου, τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Θανάση Σπαθή και την υποψήφια Διδάκτορα Δέσποινα Ζιαβρά για την καθημερινή τους υποστήριξη καθόλη την περίοδο παραμονής μου στον εργαστήριο, και στα εύκολα και στα λιγότερο εύκολα και όχι μόνο! Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την Μαρία Αργυροφθαλμίδου και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την ένθερμη υποδοχή τους και το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας εντός του εργαστηριακού χώρου.

Δεν ξεχνώ να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την Αλεξία Πολυσίδη για την βοήθεια, τις συμβουλές και τις υποδείξεις της κατά την εκτέλεση των συμπεριφορικών δοκιμασιών που έλαβαν χώρα στην εργασία αυτή, καθώς και τον φίλο μου Ευθύμη Παρώνη, ζωοκόμο στην μονάδα ζωικών προτύπων του ΙΙΒΕΑ για την βοήθειά του όποτε χρειάστηκε στους χειρισμούς των πειραματόζωων, και δεν ήταν λίγες οι φορές.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου και τους φίλους μου που στήριξαν οικονομικά και ηθικά αυτή μου την προσπάθεια και για την κατανόησή τους για τον χρόνο που δεν τους διέθεσα. Τους εγγυώμαι ότι δεν έκαναν λάθος!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1 Εισαγωγή 9

1.1 Η νόσος Πάρκινσον 9

1.1.1 Κλινική περιγραφή της ΝΠ 9

1.1.2 Παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά της ΝΠ 10

1.1.3 Τα βασικά γάγγλια-Παθολογία της Ν.Π 10

1.1.4 Ο Νευροδιαβιβαστής ντοπαμίνη 12

1.1.5 Μη ντοπαμινεργική παθολογία της ΝΠ 12

1.1.6 Οι θεωρίες παθογένεσης της ΝΠ 13

1.1.6.1 Οξειδωτικό stress 13

1.1.6.2 Ανώμαλη διαμόρφωση και συσσώρευση πρωτεϊνών 14

1.1.6.3 Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία 15

1.1.6.4 Η φλεγμονή 15

1.1.6.4.1 Νευροεκφυλιστικές ασθένειες και συστηματική φλεγμονή μέσω λιποπολυσακχαρίτη (LPS) 16

1.1.7 Η αιτιολογία της ΝΠ 17

1.1.7.1 Σποραδική ΝΠ 18

1.1.7.2 Κληρονομική ΝΠ 18

1.2 Πυρηνικοί Υποδοχείς 19

1.2.1 Η δομή του γονιδίου Nurr1 20

1.2.1.1 Υποκινητής και στοιχεία ελέγχου της μεταγραφής 20

1.2.1.2 Περιοχή πρόσδεσης DNA (DBD), περιοχή πρόσδεσης συνδέτη (LBD) και αμινοτελική περιοχή 20

1.2.2 Η έκφραση του Nurr1 στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα 21

1.2.2.1 Η ανάπτυξη των νευρώνων του ΚΝΣ 22

1.2.2.2 Ο ρόλος του Nurr1 στην ανάπτυξη των νευρώνων του ΚΝΣ 22

1.2.2.3. Τα επίπεδα έκφρασης του Nurr1 επηρεάζουν την λειτουργικότητα του ντοπαμινεργικού συστήματος στα ποντίκια 23

1.2.3 Το Nurr1 στη ΝΠ 23

1.2.3.1 Μεταλλάξεις του Nurr1 έχουν βρεθεί σε Παρκινσονικούς ασθενείς 24

1.2.3.2 Επίπεδα του Nurr1 σε Παρκινσονικούς ασθενείς 24

1.2.3.3 Το Nurr1 στην παθογένεια της ΝΠ 25

1.2.3.3.1 Το Nurr1 στο οξειδ. stress και τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία 25

1.2.3.3.2 Το Nurr1 στην πρωτεϊνική τοξικότητα 26

1.2.3.3.3 Το Nurr1 στη φλεγμονώδη αντίδραση 26

1.2.4 Το γενετικό μοντέλο υποέκφρασης του Nurr1 27

1.3 Νευροπροστασία στη ΝΠ 28

1.4 Πυρηνικοί Υποδοχείς στον C. elegans. 29

1.4.1 Δομή του γονιδίου nhr-6 30

1.4.2 Το ορθόλογο γονίδιο nhr6 στο C. elegans και η λειτουργία του 31

1.5 Σκοπός της εργασίας 32

2 Υλικά και Μέθοδοι 33

2.1 Δοκιμασίες συμπεριφοράς στα ποντίκια 33

2.1.1 Elevated plus test 33

2.1.2 Pole test 34

2.1.3 Beam test 35

2.1.4 Rearing 36

2.1.5 Τεστ μέτρησης κινητικότητας των ποντικών πριν και μετά από χορήγηση Αμφεταμίνης (OPEN FIELD ANALYSIS) 36

2.1.6 Μελέτη της δράσης της ουσίας BRF στο ποντίκι 36

2.1.6.1 Δοκιμασία Activity 36

2.1.6.2 Rotarod Performance test 37

2.2 Μελέτη κινητικότητας στο σκουλήκι C. Elegans 38

2.2.1 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος για το C. Elegans 38

2.2.2 Μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης της ουσίας XCT στο σκουλήκι 39

3 Αποτελέσματα 40

3.1 Συμπεριφορικά τέστ 41

3.1.1 Elevated plus test 41

3.1.2 Pole test 43

3.1.3 Beam test 43

3.1.4 Rearing (Αριθμός ανορθώσεων των ποντικών) 45

3.1.5 Τεστ μέτρησης κινητικότητας πριν και μετά

από χορήγηση αμφεταμίνης 46

3.2 In vivo χρήση BRF στα ποντίκια 49

3.3 Μελέτη κινητικότητας στο σκουλήκι C. elegans. 51

3.4 Χρήση XCT στον νηματώδη 51

4 Συζήτηση- Μελλοντικοί στόχοι 53

5 Βιβλιογραφία 58

1 Εισαγωγή

1.1 Η νόσος Παρκινσον

Η νόσος του Πάρκινσον (ΝΠ) είναι μια χρόνια και προοδευτική νευροεκφυλιστική νόσος του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) που περιγράφηκε για πρώτη φορά απο τον James Parkinson το 1817 (Parkinson, 1817). Η ΝΠ είναι η συνηθέστερη νευροεκφυλιστική νόσος μετά τη νόσο Altzheimer και η συχνότητα εμφάνισής της στην ηλικία των 60 ετών υπολογίζεται σε 1% του πληθυσμού.

1.1.1 Κλινική περιγραφή της ΝΠ

Στις περισσότερες περιπτώσεις, μεσολαβούν αρκετά χρόνια από την έναρξη της ΝΠ μέχρι την εμφάνιση των πρώτων κινητικών συμπτωμάτων (Hardie, 1999). Στο διάστημα αυτό, που ονομάζεται «προκλινική φάση» πραγματοποιείται το μεγαλύτερο ποσοστό νευροεκφύλισης. Στην φάση αυτή τα κλινικά συμπτώματα δεν είναι εμφανή, αν και μπορεί να ανιχνευτεί κάποια ασυμμετρία στην κίνηση καθώς και μειωμένη οσφρητική ικανότητα (Lees, 1992). Η κατάθλιψη και το άγχος μπορεί επίσης να προηγηθούν των κινητικών συμπτωμάτων κατά μερικά χρόνια (Taylor et. al., 1986; Shiba et. al. 2000).

Η διάγνωση της ΝΠ γίνεται κατά κανόνα όταν η νόσος βρίσκεται στην «κλινική φάση» αφού έχουν εμφανιστεί τα πρώτα συμπτώματα. Η νόσος Parkinson χαρακτηρίζεται από τα ακόλουθα συμπτώματα:

-Βραδυκινησία. Χαρακτηριστικό είναι το περπάτημα κατά το οποίο: στην αρχή ο ασθενής δυσκολεύεται να ξεκινήσει και το βάδισμά του γίνεται με μικρά–συρτά βήματα, σκύβοντας μπροστά.

-Τρόμο σε κατάσταση ηρεμίας που συνήθως εμφανίζεται αρχικά σε ένα χέρι. Πρόκειται για τρόμο ηρεμίας (resting tremor), ο οποίος εμφανίζεται σε κατάσταση ακινησίας. Αν και είναι το πιο χαρακτηριστικό σύμπτωμα της νόσου, δεν εμφανίζουν τρόμο όλοι οι ασθενείς με νόσο Parkinson.

-Μυϊκή δυσκαμψία που εκδηλώνεται με αντίσταση στην παθητική κίνηση των άκρων. Ο ασθενής νιώθει τα χέρια και τα πόδια του βαριά και δυσκίνητα. Το πρώτο σύμπτωμα που παρατηρεί κανείς στον ασθενή, είναι ότι όταν περπατάει δεν αιωρούνται τα χέρια του, αλλά μένουν κρεμασμένα κάτω.

-Ιδιόμορφη στάση.

Επιπλέον στα σημεία της νόσου συγκαταλέγονται:

-Το απαθές προσωπείο. Σε προχωρημένα στάδια το πρόσωπο του ασθενούς είναι «σαν μάσκα».

-Η διαταραχή του λόγου. Ο ασθενής μπορεί να τραυλίζει, να μιλάει μονότονα, να μη βρίσκει τις λέξεις κ.ο.κ.

-Η ανικανότητα για επιτέλεση καθηκόντων που απαιτούν δεξιότητα.

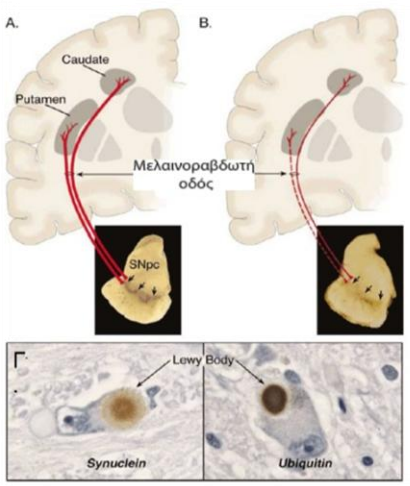
-Άνοια. Σε όψιμα στάδια, διαταράσσεται η μνήμη, η οργανωμένη σκέψη, η λήψη αποφάσεων κλπ.

Τα συμπτώματα της ΝΠ εξελίσσονται προοδευτικά με την ηλικία, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις η εξέλιξη της νόσου είναι πολύ πιο ραγδαία. Στο τελικό

στάδιο, ο ασθενής είναι ανίκανος να περπατήσει ή να σταθεί και απαιτεί συνεχή νοσηλευτική φροντίδα.

Η κλινική φάση της ΝΠ διαχωρίζεται σε 5 στάδια ανάλογα με την έκταση των συμπτωμάτων. Στο στάδιο 1 παρουσιάζονται ελαφρά συμπτώματα στη μια πλευρά του σώματος που είναι ενοχλητικά αλλά όχι ανασταλτικά για τον ασθενή και φτάνουν στο στάδιο 5 στην καχεξία και την αδυναμία για βάδιση ή όρθια στάση.

1.1.2 Παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά της ΝΠ



Εικόνα 1. Η χαρακτηριστική παθοφυσιολογία της ΝΠ στη μελαινοραβδωτή οδό.

Α. Οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες της μέλαινας ουσίας νευρώνουν το ραβδωτό σώμα (Caudate striatum και Putamen Striatum).

Β. Στην ΝΠ οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες της μέλαινας ουσίας χάνονται και καταρρέει η μελαινοραβδωτή οδός.

Γ. Τα σωμάτια Lewy (Lewy Bodies) αποτελούν κύριο παθολογικό εύρημα στη ΝΠ. Αποτελούνται κυρίως απο α-συνουκλεΐνη και ουβικιτίνη.

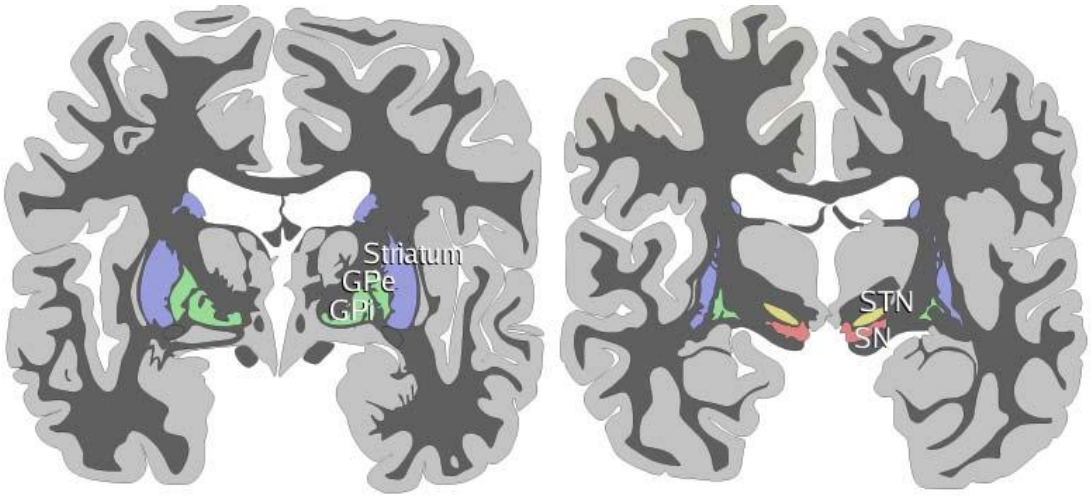
Παθοφυσιολογικά, η ΝΠ χαρακτηρίζεται από την προοδευτική εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων (περίπου 5% απώλεια νευρώνων ανά χρόνο) της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας, οι οποίοι προβάλλουν στο ραβδωτό σώμα μέσω της μελαινοραβδωτής οδού. Ιστολογικά, παρατηρείται ενδοκυττάρια συσσωμάτωση ινωδών πρωτεϊνών, που ονομάζονται σωμάτια του Lewy (Blum et al., 2001). Τα σωμάτια του Lewy συγκροτούνται από την πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη (ανώμαλα διπλωμένη) και σχηματίζονται ενδοκυτταρικά στους νευρώνες της μέλαινας ουσίας, αλλά και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου. Η μέλαινα ουσία είναι μέρος των βασικών γαγγλίων, και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κίνησης. Στη ΝΠ οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες που ξεκινούν από τη μέλαινα ουσία και νευρώνουν το ραβδωτό σώμα σχηματίζοντας τη μελαινοραβδωτή οδό εκφυλίζονται, με αποτέλεσμα τη διατάραξη της λειτουργίας των βασικών γαγγλίων και την εμφάνιση κινητικών συμπτωμάτων (Εικόνα 1).

1.1.3 Τα βασικά γάγγλια-Παθολογία της Ν.Π

Τα βασικά γάγγλια (ή βασικοί πυρήνες) είναι μια ομάδα από πυρήνες στον εγκέφαλο που διασυνδέονται με τον εγκεφαλικό φλοιό, το θάλαμο και το εγκεφαλικό στέλεχος. Τα βασικά γάγγλια των θηλαστικών συσχετίζονται με ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών όπως: κινητικός έλεγχος, γνωσιακές διεργασίες, συναισθήματα και μάθηση. Ο όρος «βασικά γάγγλια» (ή βασικοί πυρήνες) αποδίδεται σε μορφολογικώς ευκρινείς μάζες φαιάς ουσίας στο εσωτερικό κάθε εγκεφαλικού ημισφαιρίου. Αρχικά, ο όρος αυτός αναφερόταν στους πυρήνες που προέρχονται από τον τελεγκέφαλο, δηλαδή στο ραβδωτό σώμα, στον αμυγδαλοειδή πυρήνα και το προτείχισμα. Σήμερα, ο όρος αναφέρεται σε δύο επιπλέον δομές, τον υποθαλάμιο πυρήνα που βρίσκεται στον διεγκέφαλο και την μέλαινα ουσία που βρίσκεται στον μεσεγκέφαλο. Παρόλο που αυτοί οι δύο πυρήνες δεν εντοπίζονται στον τελεγκέφαλο συνδέονται ανατομικά και λειτουργικά με το ραβδωτό σώμα. Το

ραβδωτό σώμα (corpus striatum) υποδιαιρείται σε δύο πυρήνες, τον κερκοφόρο πυρήνα (caudate nucleus) και τον φακοειδή πυρήνα (lenticular nucleus). Ο φακοειδής πυρήνας, υποδιαιρείται σε ένα έξω μεγαλύτερο και σκουρότερο τμήμα, το κέλυφος (putamen), και σε ένα έσω, μικρότερο και ανοιχτότερης χροιάς τμήμα, την ωχρά σφαίρα (globus pallidus). Το κέλυφος και ο κερκοφόρος πυρήνας αναφέρονται μαζί ως νεοραβδωτό ή, απλά, ραβδωτό. Η ωχρά σφαίρα χωρίζεται σε δύο μοίρες, την έξω (globus pallidus external, GPe) και την έσω (globus pallidus internal, GPi). Η μέλαινα ουσία είναι ένας μεγάλος κινητικός πυρήνας μεταξύ της καλύπτρας και της βάσης του εγκεφαλικού σκέλους και εκτείνεται σε όλο το μήκος του μέσου εγκεφάλου. Ο πυρήνας αποτελείται από μέσου μεγέθους νευρώνες, που έχουν έγκλειστα κοκκία μελανίνης στο κυτταρόπλασμά τους. Χωρίζεται σε δύο μοίρες, την συμπαγή και την δικτυωτή μοίρα.

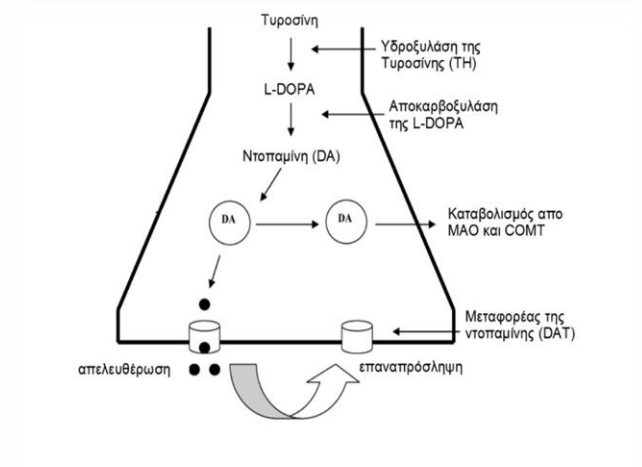
Αξίζει εδώ να σημειώσουμε ότι παθολογοανατομικές μελέτες (μετά θάνατον) δείχνουν ότι η βασική βλάβη στη ΝΠ είναι η απώλεια συγκεκριμένων νευρώνων της μέλαινας ουσίας, όπου παράγεται ο νευροδιαβιβαστής ντοπαμίνη. Η ντοπαμίνη που παράγεται από αυτούς τους νευρώνες μεταφέρεται μέσω των νευρικών απολήξεων τους, στο ραβδωτό σώμα και συνδέεται εκεί με τους υποδοχείς της. Στην ΝΠ κατά την οποία πραγματοποιείται απώλεια των νευρώνων της μέλαινας ουσίας και άρα ελλειμματική μεταβίβασης της απελευθερούμενης ντοπαμίνης, δημιουργείται έδαφος για κινητική δυσλειτουργία.



Εικόνα 2

Στεφανιαία τομή του ανθρώπινου εγκεφάλου όπου φαίνονται τα βασικά γάγγλια. Πιο συγκεκριμένα, με μπλε χρώμα απεικονίζεται το ραβδωτό, με κόκκινο απεικονίζεται η μέλαινα ουσία, με κίτρινο ο υποθαλάμιος πυρήνας και με πράσινο η ωχρά σφαίρα (έσω και έξω μοίρα).

1.1.4 Ο Νευροδιαβιβαστής ντοπαμίνη



Σχήμα 1. Η διαδικασία βιοσύνθεσης της ντοπαμίνης στον προσυναπτικό νευρώνα

Η επικοινωνία μεταξύ νευρικών κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω νευροδια-βιβαστών με μία μεταξύ τους σύνδεση που ονομάζεται νευρική σύναψη, αποτελούμενη από τον προσυναπτικό νευρώνα (απελευθερώνει τον νευροδιαβιβαστή) και τον μετασυναπτικό νευρώνα (λαμβάνει τον νευροδιαβιβαστή). Πιο συγκεκριμένα, απαιτείται μια ηλεκτρική διέγερση του προσυναπτικού κυττάρου, η οποία θα προκαλέσει την απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή που παράγεται στον προσυναπτικό νευρώνα. Η απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή γίνεται μέσω των συναπτικών κυστιδίων προς την συναπτική σχισμή η οποία αποτελεί τον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ προσυναπτικού-μετασυναπτικού νευρώνα. Από εκεί ο διαβιβαστής δεσμεύεται σε ειδικούς υποδοχείς του μετασυναπτικού κυττάρου και έτσι διαμεσολαβείται το μήνυμα.

Η ντοπαμίνη είναι ένας νευροδιαβιβαστής που ανήκει στην οικογένεια των κατεχολαμινών. Συντίθεται από το αμινοξύ Τυροσίνη και μέσω του ενζύμου υδροξυλάση της Τυροσίνης (TH) μεταβολίζεται στην L-διυδρόξυφαινυλαλανίνη (L-DOPA). Κατόπιν λαμβάνει δράση το ένζυμο αποκαρβοξυλάση της L-DOPA που την αποκαρβοξυλιώνει σε ντοπαμίνη (DA). Η απομάκρυνση της ντοπαμίνης από τη σύναψη προκειμένου να τερματιστεί η δράση της, καθώς και η επαναπρόσληψη της, επιτελούνται από το μεταφορέα της ντοπαμίνης (DAT), ενώ ο καταβολισμός της ντοπαμίνης επιτελείται από τα ένζυμα : μονοαμινο-οξειδάση (MAO) και Ο-μεθυλοτρανσφεράση των κατεχολαμινών (COMT) (Reiner, 1994), όπως διαφαίνεται στο σχήμα 1**.** Η εναπομείνασα στη συναπτική σχισμή ντοπαμίνη προσλαμβάνεται από τους μεμβρανικούς υποδοχείς των μετασυναπτικών κυττάρων. Οι υποδοχείς της ντοπαμίνης διαχωρίζονται λειτουργικά στους υποδοχείς της ομάδας D1 και D2. Οι υποδοχείς της ομάδας D1 εδράζονται μετασυναπτικά σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου (Khan et al., 1998) ενώ οι υποδοχείς της ομάδας D2 εδράζονται μετασυναπτικά ή προσυναπτικά στο ραβδωτό σώμα, τον επικλινή πυρήνα, τη μέλαινα ουσία, την κοιλιακή καλύπτρα και το φλοιό.

1.1.5 Μη ντοπαμινεργική παθολογία της ΝΠ

Η νευροεκφύλιση στη ΝΠ δεν περιορίζεται στην περιοχή της μέλαινας ουσίας. Η νευροεκφύλιση και ο σχηματισμός των σωματίων Lewy παρατηρούνται εκτός του ντοπαμινεργικού συστήματος, στο νοραδρενεργικό (locus coerulus), σεροτονινεργικό (πυρήνες της ραφής), χολινεργικό (nucleus basakis of Meynert, dorsal motor nucleus of vagus nerve) αλλά και στον εγκεφαλικό φλοιό, στον οσφρητικό βολβό και στο αυτόνομο νευρικό σύστημα (Zarow et al., 2003; Hilker et al., 2005; Rinne et al., 2008). Η εκφύλιση του ιπποκάμπου και των χολινεργικών ινών που εισέρχονται στο φλοιό είναι μια πιθανή εξήγηση για την άνοια που

παρατηρείται στη ΝΠ, ειδικά στους ασθενείς προχωρημένης ηλικίας. Επίσης, η συμπαθητική νεύρωση της καρδιάς εκφυλίζεται σε ασθενείς της νόσου, (Goldstein et al., 2000), ενώ παρατηρούνται και βιοχημικές ανωμαλίες στη λειτουργία εξουδετέρωσης τοξικών ουσιών του ήπατος (Tanner, 1991).

1.1.6 Οι θεωρίες παθογένεσης της ΝΠ

Η ΝΠ, μεταξύ πολλών άλλων νόσων, ανήκει στις πολυπαραγοντικές νόσους με βασικούς παράγοντες κινδύνου να είναι η γενετική προδιάθεση, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες-τοξίνες και κυρίως η πάροδος της ηλικίας. Από τις μέχρι σήμερα έρευνες, των πειραματικών μοντέλων της νόσου, των γονιδίων που εμπλέκονται στις κληρονομικές μορφές της και της μελέτης των μεταθανάτιων εγκεφάλων ασθενών της νόσου, τέσσερεις είναι οι επικρατέστερες θεωρίες που σχετίζονται με τη μοριακή παθογένεια της εκφύλισης της μελαινοραβδωτής οδού:

- Το οξειδωτικό stress
- Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία
- Η ελαττωματική αναδίπλωση και η συσσώρευση των πρωτεϊνών
- Η φλεγμονή

1.1.6.1 Οξειδωτικό stress

Η μέλαινα ουσία παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία στο οξειδωτικό stress. Παράγον οξειδωτικού στρες μπορεί να είναι η ίδια η ντοπαμίνη. Ο φυσιολογικός μεταβολισμός της ντοπαμίνης παράγει ρίζες υπεροξειδίου του υδρογόνου (Graham, 1978) που προκαλούν οξείδωση σε όλα τα βιολογικά μόρια (πρωτεΐνες-λιπίδια-νουκλεϊνικά οξέα). Η ντοπαμίνη έχει επίσης την τάση να αυτο-οξειδώνεται (Pezzella et. al., 1997) και να παράγει κουϊνόνες της ντοπαμίνης, μόρια δηλαδή που βλάπτουν τις πρωτεΐνες αντιδρώντας με τα κατάλοιπα κυστείνης. Μάλιστα, η αυτο-οξείδωση της ντοπαμίνης μπορεί να επιταχύνεται απο τον ελεύθερο σίδηρο καθώς τα επίπεδα σιδήρου είναι ιδιαίτερα υψηλά στη μέλαινα ουσία (Jellinger et al., 1990). Ο υπάρχον σίδηρος σε τόσο υψηλές συγκεντρώσεις ξεφεύγει από τον έλεγχο της φερριτίνης και των άλλων πρωτεϊνών που τον δεσμεύουν και έτσι, μέσω της αντίδρασης Fenton, καταλύει τη μετατροπή του H_2O_2 σε ρίζα υδροξυλίου, η οποία προσβάλλει το DNA και άλλα βιολογικά μακρομόρια. Επίσης, τα επίπεδα του σιδήρου στη μέλαινα ουσία είναι ακόμα πιο αυξημένα στα προχωρημένα στάδια της νόσου (Jellinger et al., 1990).

Υψηλά επίπεδα νευρομελανίνης απαντώνται επίσης στη περιοχή της μέλαινας ουσίας, η οποία ενώ φυσιολογικά εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες, όταν συνδυάζεται με υψηλή ποσότητα ελευθέρου σιδήρου μπορεί να επάγει την αντίδραση Fenton, με αποτέλεσμα την παραγωγή ριζών υδροξυλίου και εκ νέου οξειδωτική βλάβη (Youdim et al., 1989).

Στοιχεία απο μεταθανάτιους εγκεφάλους της ΝΠ δείχνουν αυξημένα επίπεδα δεικτών υπεροξείδωσης λιπιδίων στη μέλαινα ουσία (Andersen, 2004). Αντίθετα, τα ελαττωμένα επίπεδα γλουταθειόνης (αντιοξειδωτικός μηχανισμός) και της οξειδωμένης μορφής της προτείνεται ότι είναι απο τους πρώτους δείκτες απώλειας των ντοπαμινεργικών κυττάρων της SN στον παρκινσονικό εγκέφαλο (Sian

et al., 1994). Το οξειδωτικό stress, σαν αιτιολογικός παράγοντας για τη ΝΠ, υποστηρίζεται και απο μελέτες με νευροτοξίνες που προκαλούν παρκινσονισμό. Μια τέτοια νευροτοξίνη είναι το MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), το οποίο καταστρέφει εκλεκτικά τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες της μέλαινας ουσίας και προκαλεί παρκινσονισμό σε ανθρώπους και ζώα. Χορηγούμενο σε ποντίκια προκαλεί τη δημιουργία ριζών υδροξυλίου στο ραβδωτό, που με τη σειρά τους οδηγούν σε οξειδωτικό stress και κατόπιν απόπτωση (Chiueh et al., 1992; Beal, 2003).

1.1.6.2 Ανώμαλη διαμόρφωση και συσσώρευση πρωτεϊνών

Η συσσώρευση δομικά ανώμαλων-ελαττωματικών πρωτεϊνών αποτελεί κοινό γνώρισμα σε πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Gandhi and Wood, 2005). Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια: Αρχικά τη συσσωμάτωση των πρωτεϊνών και έπειτα την κυτταρική απόκριση στις μη φυσιολογικές πρωτεΐνες. Η κυτταρική απόκριση στις μη φυσιολογικές πρωτεΐνες συνίσταται στην επαγωγή συνοδών πρωτεϊνών (chaperons) προκειμένου να αναδιπλώσουν τις ελαττωματικές πρωτεΐνες. Αν αυτό δεν φέρει το επιθυμητό αποτέλεσμα τότε οι ελαττωματικές πρωτεΐνες ουβικουιτινιλιώνονται (λαμβάνοντας το συγκεκριμένο σήμα για αποικοδόμηση) και κατευθύνονται στο πρωτεάσωμα για να αποικοδομηθούν.

Ο προσδιορισμός της α-συνουκλεΐνης του πρώτου γονίδιου υπεύθυνο για την κληρονομική ΝΠ οδήγησε στην επακόλουθη ανακάλυψη ότι το προϊόν του αποτελεί βασικό συστατικό των σωματίων Lewy που χαρακτηρίζουν την ιδιοπαθή ΝΠ (Spillantini et. al., 1998). Η α-συνουκλεΐνη στη φυσιολογική της κατάσταση είναι μία διαλυτή και μη αναδιπλωμένη πρωτεΐνη. Εξαιτίας μίας υδρόφοβης περιοχής στο κέντρο της, έχει την τάση να συσσωματώνεται και να δημιουργεί αρχικά ένα ενδιάμεσο ολιγομερές που καλείται πρωτοϊνίδιο, ενώ στη συνέχεια δημιουργεί μη διαλυτά πολυμερή, τα οποία αποτελούν τα ινίδια που είναι το δομικό συστατικό των σωματίων Lewy.

Η ανακάλυψη του γονιδίου parkin στην κληρονομική ΝΠ αποτέλεσε την πρώτη απόδειξη εμπλοκής του συστήματος ουμπικιτίνης-πρωτεασώματος στη ντοπαμινεργική εκφύλιση. Το parkin κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη με ενεργότητα Ε3 λιγάσης της ουμπικιτίνης (Mata et. al., 2004), που καταλύει την προσθήκη αλυσίδων ουμπικιτίνης στις πρωτεΐνες που πρέπει να λάβουν το συγκεκριμένο σημα για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Ως υποστρώματα της parkin έχουν αναγνωριστεί οι πρωτεΐνες α-συνουκλεΐνη, το Pael-R, το CHIP, η συναπτοταγμίνη XI (Cookson, 2005). Η απώλεια λειτουργικότητας της parkin μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση των υποστρωμάτων της και τελικά στον κυτταρικό θάνατο των νευρώνων. Πράγματι, η ντοπαμινεργική εκφύλιση που προκαλείται από υπερέκφραση του Pael-R στη Drosophila, είναι δυνατό να ανασταλεί μέσω υπερέκφρασης του parkin (Yang et al., 2003).

Μία επιπλέον απόδειξη της εμπλοκής του συστήματος ουμπικιτίνης-πρωτεασώματος στη νευροεκφύλιση προήλθε από τον προσδιορισμό του γονιδίου UCH-L1 στην κληρονομική ΝΠ. Το UCH-L1, που είναι μία υδρολάση της ουμπικιτίνης στο καρβοξυτελικό της άκρο, βοηθά την ανακύκλωση των αλυσίδων ουμπικιτίνης στα μονομερή της και μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού μπορεί να οδηγούν στη συσσωμάτωση ανώμαλα διαμορφωμένων πρωτεϊνών (Healy et al., 2005).

Διάφορες έρευνες επιβεβαιώνουν το ρόλο του συστήματος ουμπικιτίνης-πρωτεασώματος και στη σποραδική μορφή της ΝΠ. Συγκεκριμένα, σε μεταθανάτιο εγκέφαλο ασθενών της ιδιοπαθούς ΝΠ έχει βρεθεί ότι η ενεργότητα της υπομονάδας 20S του πρωτεασώματος βρίσκεται σε μη λειτουργικά επίπεδα (Chung et al., 2001). Επιπρόσθετα, χορήγηση αναστολέων του πρωτεασώματος σε τρωκτικά οδήγησε στην εκλεκτική εκφύλιση της μελαινοραβδωτής οδού σε συνδυασμό με την εμφάνιση σωματίων Lewy, αναπαράγοντας τα κλινικά χαρακτηριστικά της ΝΠ (McNaught et al., 2002).

1.1.6.3 Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία

Η εμπλοκή της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας στην παθογένεια της ΝΠ στηρίχτηκε στη ντοπαμινεργική εκφύλιση που προκαλούν τρεις αναστολείς του συμπλόκου Ι της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων: το MPTP αρχικά και η ροτενόνη και το paraquat. Η αναστολή του συμπλόκου Ι των μιτοχονδρίων έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα και τη διαταραχή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, οδηγώντας στη μείωση της παραγωγής ATP και επακόλουθα σε ενεργειακό έλλειμμα για το κύτταρο (Adams and Odunze, 1991).

Σε ασθενείς με ΝΠ έχει αναφερθεί μείωση της ενεργότητας του συμπλόκου Ι κατά 30% στον εγκέφαλο, στους μυς και στα αιμοπετάλια (Schapira et al., 1990; Parker et al., 1989). Επιπρόσθετα, όπως έχει αναφερθεί, πολλά απο τα γονίδια της κληρονομικής ΝΠ συνδέονται έμμεσα ή άμεσα με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία.

1.1.6.4 Η φλεγμονή

Πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν ότι η φλεγμονή μπορεί επίσης να συμμετέχει στην παθογένεια της ΝΠ. Η υπόθεση αυτή στηρίχτηκε αρχικά στην παρατήρηση ότι η χρόνια χρήση αντιφλεγμονώδους αγωγής μειώνει τον κίνδυνο για ΝΠ κατά 45% (Chen et al., 2003). Η φλεγμονή στον εγκέφαλο δεν γίνεται αντιληπτή γιατί είναι ανώδυνη. Επιπλέον, η ανοσοαπόκριση στον εγκέφαλο, δεν περιλαμβάνει αντισώματα ούτε Τ κύτταρα. Αντί αυτού, η αντίδραση εξαρτάται από τα γλοία κύτταρα και τα μακροφάγα του εγκεφάλου, που ονομάζονται μικρογλοιακά κύτταρα.

Τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι μακροφάγα κύτταρα που υπάρχουν στον εγκέφαλο και φυσιολογικά βρίσκονται σε ανενεργή κατάσταση (resting state). Τα κύτταρα αυτά στην ανενεργή τους μορφή επιτελούν μια πληθώρα διεργασιών όπως το να υποστηρίζουν μεταβολικά τους νευρώνες, να προσλαμβάνουν νευροδιαβιβαστές, να συμβάλλουν στη συναπτογένεση και στη διατήρηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Επιπλέον βασικές άλλες λειτουργίες τους είναι η φαγοκυττάρωση, η αντιγονοπαρουσίαση, η νευροποροστασία και η νευροτοξικότητα (ενεργοποιούνται από διάφορα ερεθίσματα και παράγουν ουσίες που επάγουν φλεγμονή). Υπό συγκεκριμένες συνθήκες ενεργοποιούνται και παράγουν μεγάλες ποσότητες ανιόντων υπεροξειδίου και άλλων πιθανών νευροτοξινών, και παραγόντων που προκαλούν νευρωνικό θάνατο. Πειράματα σε κυτταρικές καλλιέργειες έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση των μικρογλοιακών μπορεί να λειτουργήσει βλαπτικά για τα νευρικά κύτταρα (Gao et al., 2003). Εκτός αυτού, πληθώρα ενεργοποιημένων μικρογλοιακών κυττάρων εντοπίζονται στην περιοχή

της μέλαινας ουσίας και του ραβδωτού σε εγκεφάλους ασθενών με ΝΠ (Yamada et al., 1991). Η μεγάλη ποσότητα ριζών υπεροξειδίου που παράγεται κατά την ενεργοποίησή τους μπορεί να αποτελεί το κύριο αίτιο του οξειδωτικού stress, που θεωρείται ευρέως το βασικό αίτιο για την καταστροφή των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη ΝΠ.

Η παραγωγή κυτταροκινών θεωρείται επίσης πιθανή αιτία παθογένειας για τη ΝΠ. Τα επίπεδα των κυτταροκινών όπως οι IL-1, IL-6 και κυρίως ο TNFα έχουν βρεθεί αυξημένα σε εγκεφάλους παρκινσονικών ασθενών, ενώ τα ποντίκια που στερούνται υποδοχείς TNFα είναι εντελώς ανθεκτικά στην τοξικότητα του MPTP (McGeer et al., 2001; Sriram et al., 2002).

1.1.6.4.1 Νευροεκφυλιστικές ασθένειες και συστηματική φλεγμονή μέσω λιποπολυσακχαρίτη (LPS).

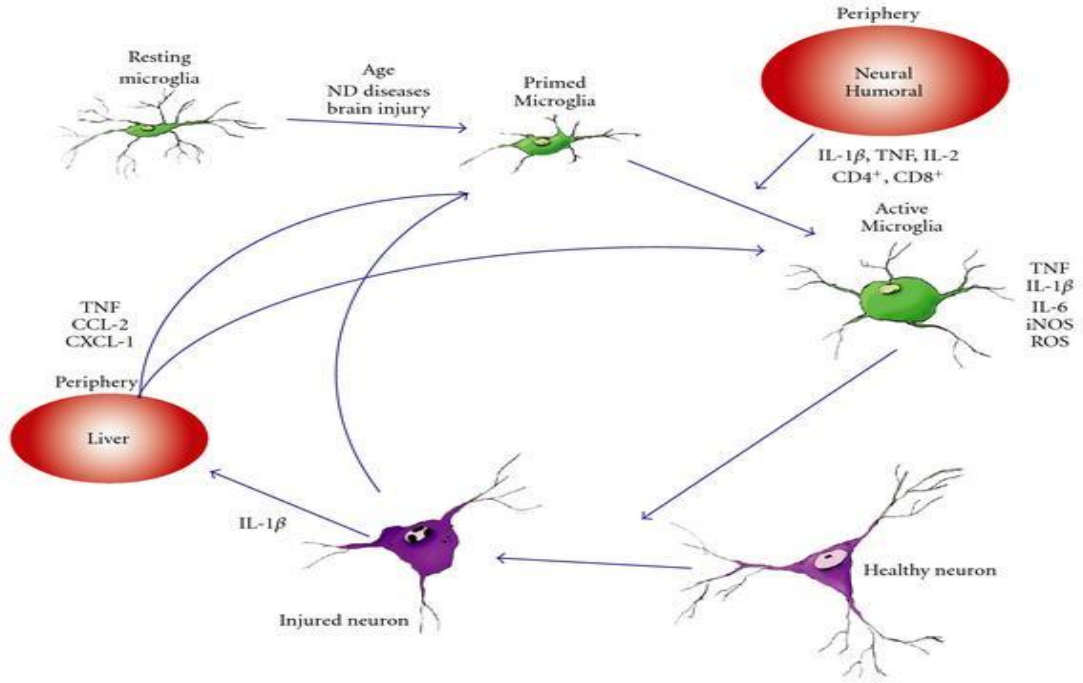
Στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες παρουσιάζεται ενεργοποίηση μικρογλοιακών κυττάρων το οποίο αποτελεί το χαρακτηριστικότερο γνώρισμά τους. Πιο συγκεκριμένα, αλλάζει η μορφολογία τους και από ανενεργά κύτταρα μετατρέπονται σε ενεργοποιημένα αμοιβαδοειδούς σχήματος κύτταρα.

Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού που διαθέτει έχει θεωρηθεί κατά καιρούς ανοσολογικά αποκλεισμένη-προστατευμένη περιοχή, δηλαδή περιοχή δύσβατη στην είσοδο παθογόνων και ανοσοκυττάρων. Ωστόσο, αυτή η αντίληψη έχει αλλάξει τα τελευταία λίγα χρόνια επειδή η επικοινωνία μεταξύ ΚΝΣ και περιφέρειας είναι πολύ πιο ρευστή απ' ό,τι θεωρούνταν. Σε πολλές νευρολογικές διαταραχές, το ανοσοποιητικό σύστημα παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην πρόοδο της νευροεκφύλισης. Όντως η ενδεχόμενη θραύση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και η φλεγμονή παίζουν καθοριστικό ρόλο στην παθολογία πολλών νευροεκφυλιστικών ασθενειών προκαλώντας λευκοκυτταρική μετανάστευση στο εγκεφαλικό παρέγχυμα.

Ερεθίσματα συστηματικής φλεγμονής, κυκλοφορούν στο αίμα και μπορούν να διαπεράσουν τον εγκέφαλο επάγοντας την σύνθεση κυτταροκινών που με τη σειρά τους μπορεί να επάγουν γενικότερη φλεγμονώδη απόκριση συμπεριλαμβάνοντας οξεία φάση απόκρισης από το συκώτι και τα συστατικά που επάγουν την συμπεριφορά αδιαθεσίας ("sickness behavior")(εικόνα 3).

Ενδοπεριτονιακή ένεση με λιποπολυσακχαρίτη (LPS) προκαλεί μια συστηματική αντίδραση φλεγμονής γνωστή ως "sickness behaviour" που χαρακτηρίζεται από πυρετό, ανορεξία, απώλεια βάρους και εν γένει υποτονικότητα. Μία αντίστοιχη απόκριση μπορεί να παρατηρηθεί με ενδοπεριτονιάκη ένεση προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως IL-1β και IL-6. Τα μικρογλοιακά κύτταρα του εγκεφάλου, αντιδρούν σε αυτά τα ερεθίσματα και δημιουργούν αυτήν την συμπεριφορά αδιαθεσίας. Η περιφερειακή φλεγμονή όπως η μόλυνση ή ο τραυματισμός μπορούν να επιδεινώσουν τα νευρωνικά σήματα θανάτου των νευρογλοιακών κυττάρων. Πειραματικά δεδομένα στηρίζουν την παραπάνω υπόθεση. Έγκυα πειραματόζωα που εκτέθηκαν σε ενδοπεριτονιακές ενέσεις LPS γέννησαν νεογνά που είχαν ελαττωμένους ντοπαμινεργικούς νευρώνες, συγκρινόμενα με τα controls που δεν είχαν εκτεθεί. Επίσης, ζώα με ντοπαμινεργική υποκινητικότητυα σχετίζονται με αυξημένη απόκριση περιφερικής φλεγμονής μετά από ενέσεις LPS.

Τέλος, περιφερικά ανοσολογικά ερεθίσματα και χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες επηρεάζουν την παθογένεια και κυρίως την πρόοδο της νόσου της Parkinson. Η επικοινωνία μεταξύ του ανοσοποιητικού και νευρικού συστήματος επιτελείται κυρίως μέσω των κύριων διαβιβαστών της φλεγμονής, τις κυτταροκίνες.



Εικόνα 3

Σχηματική αναπαράσταση που δείχνει την σχέση μεταξύ περιφερικής φλεγμονής και νευρωνικής απώλειας στην νόσο της Parkinson. Πολλές Νευροεκφυλιστικές ασθένειες παρουσιάζουν ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων το οποίο αποτελεί το κυριότερο γνώρισμά τους. Πιο συγκεκριμένα, αλλάζει η μορφολογία τους και από ανενεργά κύτταρα μετατρέπονται σε ενεργοποιημένα αμοιβαδοειδούς σχήματος. Το ενδιάμεσο στάδιο των «πρωταρχικών μικρογλοιακών» περιγράφει το στάδιο κατά το οποίο επιτυγχάνεται μικρογλοιακή νευροτοξικότητα σαν συνέπεια προ-φλεγμονωδών ερεθισμάτων. Τα ερεθίσματα αυτά μπορούν να έρθουν από την περιφέρεια ή μέσω νευρικών η χυμικών μονοπατιών. Τα ενεργοποιημένα μικρογλοιακά απελευθερώνουν προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες που μπορούν να δράσουν στην νευρωνική ακεραιότητα. Επιπλέον, οξύς τραυματισμός του εγκεφάλου επάγει ηπατική έκφραση χημειοκινών που με την σειρά τους παράγουν επαναστρατολόγηση λευκοκυττάρων στο αίμα και ακολούθως εγκεφαλική και ηπατική φλεγμονή μέσω του δικτύου χημειοκινών και κυτταροκινών.

1.1.7 Η αιτιολογία της ΝΠ

Γενικά η αιτιολογία της νόσου είναι ασαφής. Ποιοι είναι οι μηχανισμοί με τους οποίους η μείωση της ντοπαμίνης και η απώλεια των νευρικών κυττάρων οδηγούν στην ανάπτυξη των κλινικών συμπτωμάτων της νόσου του Parkinson αποτελεί ερώτημα που δε φαίνεται να μπορεί να απαντηθεί ακόμα με σαφήνεια. Επομένως τα αίτια της νόσου παραμένουν άγνωστα. Όμως υπάρχει συστηματική έρευνα για την ανακάλυψη της αιτίας όπως επίσης και για την συσχέτισή της με περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες άρχισαν να ενοχοποιούνται για τη ΝΠ απο την παρατήρηση ότι η χημική ουσία MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) που ανιχνεύτηκε σε νοθευμένα παρασκευάσματα ηρωίνης βρέθηκε να προκαλεί στους χρήστες εκφύλιση των ντοπαμινεργικών κυττάρων και παρκινσονισμό (Langston et.al., 1983).

Ωστόσο υπάρχουν και γενετικοί παράγοντες-μεταλλαγές γονιδίων, όπως έχει ήδη αναφερθεί, που φαίνεται να ευθύνονται όχι μόνο για την κληρονομική μορφή της νόσου, αλλά και για τη σποραδική. Σήμερα, η αιτιολογία της ΝΠ θεωρείται πολυπαραγοντική, με βασικότερο παράγοντα κινδύνου την πάροδο της ηλικίας.

1.1.7.1 Σποραδική ΝΠ

Η σποραδική μορφή της Parkinson αφορά τις μη κληρονομούμενες περιπτώσεις νόσου, οι οποίες αγγίζουν ένα ποσοστό που φτάνει το 85-90% . Στις περιπτώσεις αυτές η νευροεκφύλιση που λαμβάνει χώρα μπορεί να είναι αποτέλεσμα έκθεσης σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως συμβαίνει με τις ντοπαμινεργικές νευροτοξίνες. Εκτός από το MPTP, που αποτέλεσε το πρωτότυπο παράδειγμα εξωγενούς τοξίνης που προκαλεί τα κλινικά και παθολογικά χαρακτηριστικά της ΝΠ, έχουν ενοχοποιηθεί και κάποια εντομοκτόνα και παρασιτοκτόνα όπως το paraquat και η ροτενόνη ως ντοπαμινεργικές νευροτοξίνες. Άλλωστε, η διαβίωση σε αγροτικό περιβάλλον και η σχετική έκθεση σε ζιζανιοκτόνα και εντομοκτόνα έχουν συσχετιστεί με την πιθανότητα εμφάνισης της ΝΠ (Tanner, 1992).

Οι τοξίνες που ευθύνονται για τη νευροεκφύλιση της ΝΠ μπορεί να έχουν και ενδογενή προέλευση. Ο μεταβολισμός της ντοπαμίνης οδηγεί στη δημιουργία μορίων που μπορεί να δράσουν ως ενδογενείς τοξίνες προκαλώντας οξειδωτικό stress (Cohen and Werner, 1994). Η εύρεση παραγώγων ισοκουϊνολινών στον εγκέφαλο παρκινσονικών ασθενών, που είναι τοξικά για τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες, καθώς και άλλων δεικτών οξειδωτικού stress, ενισχύει αυτήν την υπόθεση (Nagatsu, 1997).

1.1.7.2 Κληρονομική ΝΠ

Η κληρονομική μορφή της ΝΠ αφορά περίπου στο 10% των περιπτώσεων. Μέχρι σήμερα, 10 γενετικοί τόποι έχουν συσχετιστεί με την κληρονομικότητα της νόσου (PARK1-PARK11), εκ των οποίων 6 γονίδια έχουν ήδη ταυτοποιηθεί και οι μεταλλάξεις τους θεωρούνται άμεσα υπεύθυνες για την παθογένεια της κληρονομικής ΝΠ. Τα γονίδια αυτά είναι η α-συνουκλεΐνη (PARK1), το parkin (PARK2), το UCH-L1 (PARK5), το PINK1 (PARK6), το DJ1 (PARK7) και το LRRK2 (PARK8). Ακολουθεί ο Πίνακας 1 με τα γονίδια που ενέχονται στην νόσο Πάρκινσον.

Locus	Position	Gene	Inheritance pattern	Pathology	Clinical features
PARK1	4q21–q23	***SNCA (α-synuclein)***	dominant, high penetrance	LB tau pathology	early onset, aggressive course, dementia, severe autonomic disturbances in some cases
PARK3	2p13	unknown	dominant, incomplete penetrance	LB β-amyloid tau pathology	late onset, classical PD, dementia in some cases
PARK5	4p14	***UCHL1***	likely dominant	unknown	classical PD
PARK8	12p11–q13	unknown	dominant, incomplete penetrance	LB negative LB tau pathology	classical PD, dementia and amyotrophy in some cases
Pending	2q22–q23	***NR4A2 (NURR1)***	likely dominant	unknown	classical PD
PARK2	6q25–q27	***parkin***	recessive	mostly LB negative LB (1 case) tau pathology	early onset slow progression good, prolonged response to l-dopa, dystonia at onset, sleep benefit
PARK6	1p36–p35	***PINK1***	recessive	unknown	early onset, slow progression
PARK7	1p36	***DJ-1***	recessive	unknown	early onset, slow progression
PARK9	1p36	unknown	recessive	unknown	juvenile onset, multisystemic involvement, l-dopa response
PARK10	1p32	unknown	non-Mendelian	unknown	classical PD (Icelandic population)
PARK11	2q36–q37	unknown	non-Mendelian	unknown	classical PD (sib pairs study)
Pending	Xq	unknown	non-Mendelian	unknown	classical PD (sib pairs study)

Πίνακας 1
Γενετικοί τόποι, παθολογία και κλινικά χαρακτηριστικά γονιδίων που ενέχονται στην Ν.Π.

1.2 Πυρηνικοί Υποδοχείς

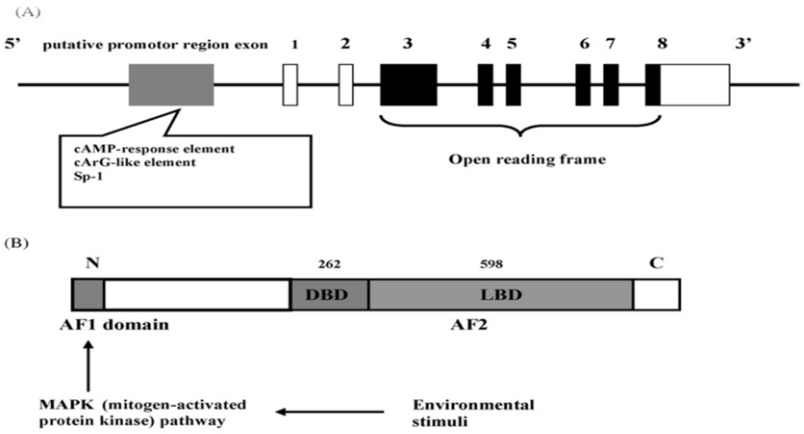
Οι πυρηνικοί υποδοχείς (NRs) είναι μια κλάση πρωτεϊνών που απαντάται μέσα στους πυρήνες των κυττάρων. Είναι υποδοχείς στεροειδών και θυρεοειδικών ορμονών καθώς και άλλων μορίων. Οι υποδοχείς αυτοί συνεργάζονται με άλλες πρωτεΐνες και έτσι ρυθμίζουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Ως εκ τούτων, ελέγχουν την εμβρυική ανάπτυξη, την ενήλικη ομοιόσταση και τον μεταβολισμό του οργανισμού.

Οι πυρηνικοί υποδοχείς έχουν την ικανότητα να δένονται απ’ ευθείας στο DNA και να ελέγχουν την έκφραση παρακείμενων γονιδίων, άρα είναι μεταγραφικοί παράγοντες. Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω πυρηνικών υποδοχέων επιτυγχάνεται όταν ένας προσδέτης -μόριο που επηρεάζει την συμπεριφορά του υποδοχέα- είναι παρόν. Πιο συγκεκριμένα, η σύνδεση του προσδέτη στον πυρηνικό υποδοχέα συντελεί σε αλλαγή της στερεοδομικής διαμόρφωσης του υποδοχέα, η οποία ενεργοποιεί τον υποδοχέα συντελώντας στην αυξημένη ή μειωμένη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Οι προσδέτες που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς αυτούς, και τους ενεργοποιούν περιλαμβάνουν ενδογενείς ορμόνες, βιταμίνες A και D και ξενοβιοτικά. Αυτά τα ρυθμιστικά μόρια (προσδέτες), συνδέονται σε ειδικές περιοχές (Ligant Binding Domains-LBDs) που εντοπίζονται στα καρβοξυτελικά άκρα των αντίστοιχων πυρηνικών υποδοχέων. Επειδή η έκφραση μεγάλου αριθμού γονιδίων ρυθμίζεται μέσω πυρηνικών υποδοχέων, οι προσδέτες που τους ενεργοποιούν μπορεί να έχουν βαθιές επιπτώσεις στους οργανισμούς. Πολλά από αυτά τα ρυθμιζόμενα γονίδια είναι ενδιαφέρον να αναφέρουμε ότι σχετίζονται με πληθώρα ασθενειών. Οι πυρηνικοί υποδοχείς, όπως ο Nurr1 μπορεί να δρουν ως μονομερή, ομοδιμερή ή ετεροδιμερή, με συνηθέστερο μόριο ετεροδιμερισμού το RXR (Retinoid X Receptor), έναν πυρηνικό υποδοχέα που ενεργοποιείται απο το ρετινοϊκό οξύ.

Οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι ειδικοί για τα μετάζωα ενώ δεν απαντώνται σε πρώτιστα, μύκητες και φυτά.

Υπάρχουν όμως πολλοί πυρηνικοί υποδοχείς, μεταξύ των οποίων και το Nurr1 (Nuclear receptor related factor 1), για τους οποίους προς το παρόν δεν έχει βρεθεί κανένα πιθανό μόριο-προσδέτης, και γι' αυτό αναφέρονται ως «ορφανοί». Οι μισοί περίπου από τους πυρηνικούς υποδοχείς των θηλαστικών και οι περισσότεροι των χορδωτών παραμένουν «ορφανοί» παρά τις εντατικές έρευνες των τελευταίων ετών. Παράλληλα, δομικές μελέτες δείχνουν ότι κάποιοι πυρηνικοί υποδοχείς αν και ικανοί να δεσμεύουν προσδέτες, ίσως ενεργοποιούνται και απουσία αυτών. (Nakae et al., 2002, Brunet et al., 1999).

1.2.1 Η δομή του γονιδίου Nurr1



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση της γονιδιακής (A) και πρωτεϊνικής (B) δομής του Nurr1

J. Jankovic et al. 2005

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα, το γονίδιο Nurr1 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2, στη θέση q22-23. Αποτελείται από 8 εξώνια και 7 εσώνια, ενώ έχει συνολικό μήκος 9822 bp (εικόνα 6). Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης περιλαμβάνει 1794 βάσεις που κωδικοποιούν 598 αμινοξέα. Το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης βρίσκεται στην αρχή του εξωνίου 3 και το κωδικόνιο λήξης στην αρχή του εξωνίου 8 (Ichinose et al., 1999, Torii et al., 1999).

1.2.1.1 Υποκινητής και στοιχεία ελέγχου της μεταγραφής

Ανοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου Nurr1 εντοπίζονται ο υποκινητής και τα στοιχεία ελέγχου της μεταγραφής (Maruyama et al., 1998, Torii et al., 1999). Η έκφραση του Nurr1 ρυθμίζεται από πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες. Ο CRF (Corticotrophin Releasing Factor) ενεργοποιεί άμεσα την έκφραση του Nurr1 σε πρόδρομα κύτταρα της υπόφυσης. Επίσης, η PTH (Parathyroid hormone) μπορεί με την σειρά της να ενεργοποιήσει την έκφραση του Nurr1 σε οστικά κύτταρα, μέσω του μονοπατιού cAMP/PKA (Tetradis et al., 2001).

1.2.1.2 Περιοχή πρόσδεσης DNA (DBD), περιοχή πρόσδεσης συνδέτη (LBD) και αμινοτελική περιοχή

Η πρωτεϊνική αλληλουχία του Nurr1 περιλαμβάνει τρία κύρια μέρη: την περιοχή πρόσδεσης DNA (DNA Binding Domain), την περιοχή πρόσδεσης προσδέτη (Ligand Binding Domain) και την αμινοτελική περιοχή (Ichinose et al., 1999, Wang et al., 2003). Η LBD (Ligand-Binding-Domain) του Nurr1 υιοθετεί μια κανονική πρωτεϊνική αναδίπλωση αλλά δεν περιλαμβάνει στην κοιλότητά του προσδέτη όπως

συμβαίνει στην πλειονότητα των NRs σαν αποτέλεσμα του στενού πακεταρίσματος υδρόφοβων αμινοξέων της πολυπεπτιδικής του αλυσίδας. Επίσης απουσιάζει η κλασική θέση πρόσδεσης για συνενεργοποιητές. Παρά αυτές τις διαφορές του Nurr1 σε σχέση με τους άλλους NRs η LBD του Nurr1 ρυθμίζεται με κάποιον τρόπο στα κύτταρα των θηλαστικών. Πιο συγκεκριμένα, η μεταγραφική δραστηριότητα του μεταγραφικού αυτού παράγοντα είναι άμεσα συσχετισμένη με την LBD η οποία και παρουσιάζει μια ιδιαίτερα σταθερή δομή. Για αυτό το Nurr1 αποτελεί μια μοναδική τάξη πυρηνικών υποδοχέων, των οποίων η δράση είναι ανεξάρτητη από την αλληλεπίδραση μορίων προσδετών (ligand-indipendent) (Wang et al., 2003).

Το Nurr1 πιθανότατα ρυθμίζει τη μεταγραφή μέσω της σύνδεσης του στο στοιχείο απόκρισης NBRE (NGFI-B Response Element) του DNA (NBRE: AAAGGTCA) ή στο στοιχείο απόκρισης στο Nurr77, που αποτελείται από δυο ανάστροφες επαναλήψεις της αλληλουχίας του NBRE μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται 6 βάσεις (AGGTCA), με τη μορφή ομοδιμερούς. Η σύνδεση του Nurr1 στο NBRE μπορεί να ενεργοποιήσει την έκφραση της TH (Tyrosine Hydroxylase/Υδροξυλάση Τυροσίνης) και του DAT (Dopamine Transporter/Μεταφορέας Ντοπαμίνης) (Sakurada et al., 1999, Saccheti et al., 2001). Επιπλέον, το Nurr1 μπορεί να σχηματίσει ετεροδιμερή με το RXR και σε αυτή τη μορφή να συνδεθεί με το DR5 (GGTTCACCGAAAGGTCA), στοιχείο απόκρισης στο RXR (RXR response element) (Renaud et al., 1995). Τέλος σημειώνεται ότι το Nurr1 μπορεί να συνδεθεί στο DNA και να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή με τη μορφή ομοδιμερών. Ιδιαίτερη σημασία για τη ρύθμιση της μεταγραφής έχει η αμινοτελική περιοχή του Nurr1 (AF1) (Nordzell et al., 2004). Αυτή η περιοχή είναι ιδιαίτερα συντηρημένη εξελικτικά μεταξύ των μελών της οικογένειας NGFI-B και ενεργοποιείται γρήγορα μέσω του μονοπατιού των MAP Κινασών (mitogen-activated protein kinase) (εικόνα 6).

Εξ' αιτίας των μηχανισμών εναλλακτικού ματίσματος του mRNA, υπάρχουν αρκετές ισομορφές του Nurr1 (Ichinose et al., 1999, Xu and Le 2004). Το 1999, βρέθηκαν 3 διαφορετικές ισομορφές, οι hcNurr1-2, hcNurr1-3 και hcNurr1-8 στους μεσεγκεφαλικούς νευρώνες. Η ικανότητα σύνδεσης με το DNA είναι μειωμένη κατά 36-50% στις ισομορφές hcNurr1-2 και hcNurr1-8, και κατά 94% στην Nurr1-3, συγκριτικά με το πλήρες Nurr1. Μια ακόμα ισομορφή του Nurr1, η Nurr1-c, που έχει ένα έλλειμμα 25 αμινοξέων από το καρβοξυτελικό άκρο, απαντάται σε μη νευρικά κύτταρα, όπως λεμφοκύτταρα, ηπατικά, μυϊκά και νεφρικά (Xu and Le 2004). Το πώς επηρεάζουν την φυσιολογία των νευρώνων οι διάφορες μορφές του Nurr1 δεν έχει ακόμη μελετηθεί.

1.2.2 Η έκφραση του Nurr1 στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

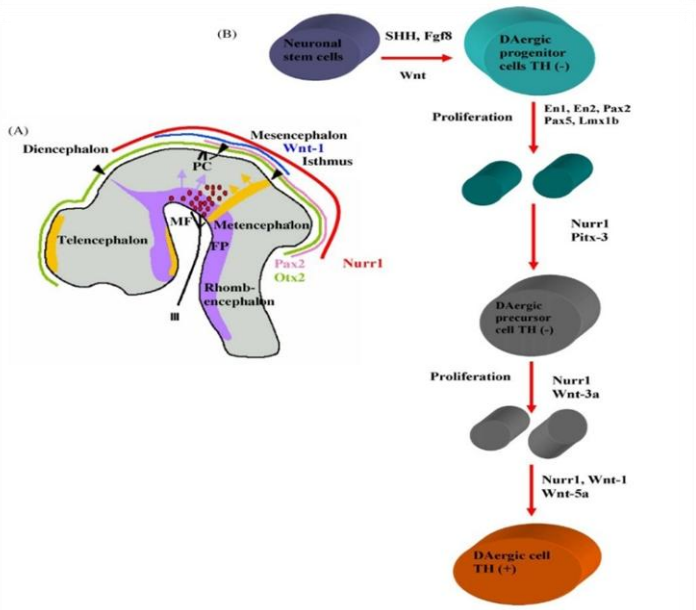
Το Nurr1 εκφράζεται στους πυρήνες των κυττάρων του ΚΝΣ, και κυρίως στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Το 95% των νευρώνων της μέλαινας ουσίας, το 85% του οσφρητικού βολβού, και το 61% του φλοιού, εκφράζουν Nurr1 (Backman et al., 1999). Τα επίπεδα έκφρασης του Nurr1 δεν είναι σταθερά και μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Ενώ είναι μέγιστα κατά το εμβρυονικό στάδιο, παραμένουν υψηλά στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες καθ΄όλη τη διάρκεια της ζωής, γεγονός που υποδεικνύει τον κομβικό ρόλο του γονιδίου όχι μόνο στην ανάπτυξη, αλλά και πιθανώς στην επιβίωση των ντοπαμινεργικών νευρώνων και όλου του οργανισμού (Zetterstrom et al., 1997; Le et al., 1999a). Επιπλέον το Nurr1

εκφράζεται στα μικρογλοιακά κύτταρα όπου έχει δειχθεί ότι επηρεάζει την μεταγραφή κυτταροκινών.

1.2.2.1 Η ανάπτυξη των νευρώνων του ΚΝΣ

Η ανάπτυξη των ντοπαμινεργικών νευρώνων του μεσεγκεφάλου είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί τη συμμετοχή πολλών γονιδίων και παραγόντων, τα οποία συμμετέχουν σε διαπλεκόμενα μονοπάτια μεταγωγής σήματος όπως οι Shh, En1, En2, Pax-2, Pax-5, Lmx1-b, Pitx-3, Wnt1, Wnt-3 και Wnt-5 (Castelo-Branco et al., 2003; Nunes et al., 2003; Smidt et al., 2003). Στην εικόνα 7 φαίνονται τα στάδια ανάπτυξης των ντοπαμινερικών νευρώνων: (α) αρχικά εκφράζονται οι Shh και FgF8 οι οποίοι συμμετέχουν στο σχηματισμό των πρόδρομων ντοπαμινεργικών κυττάρων (Roussa and Krieglstein 2004b; Yan et al., 2005), (β) ακολουθεί έκφραση των En1, En2, Pax2, Pax5, Wnt1, που απαιτούνται για τη διαφοροποίηση των ντοπαμινεργικών νευρώνων (Castelo-Branco et al., 2003, Perrier et al., 2004, Yan et al., 2005), όπως και το (γ) Lmx1-b (Smidt et al., 2000). Το Nurr1 (δ) ξεκινά να εκφράζεται την εμβρυονική μέρα 10.5 (E10.5) στο ποντίκι, ακριβώς πριν τα Pitx-3 και TH (E11,5) (Saucedo-Cardenas et al.,1998; Smits et al., 2003) και αλληλεπιδρά με το Pitx-3 και άλλους παράγοντες, επάγοντας την έκφραση της TH, και δίνοντας γένεση στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Άρα σε πρώτη φάση το Nurr1 δρα στα τελευταία στάδια της ανάπτυξης των ντοπαμινεργικών νευρώνων και σε συνεργασία με άλλους παράγοντες, συμμετέχει στη διαφοροποίηση των Nurr1(+) πρόδρομων νευρώνων σε ντοπαμινεργικούς (Le et al., 1999b; Castelo-Branco et al., 2003; Nunes et al., 2003).

1.2.2.2 Ο ρόλος του Nurr1 στην ανάπτυξη των νευρώνων του ΚΝΣ



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση της ανάπτυξης: (A) του ΚΝΣ και (B) των ντοπαμινεργικών νευρώνων στο ποντίκι, κατά την εμβρυονική μέρα 11.5. *(Jankovic et al., 2005)*

Έχει ήδη δειχθεί ότι το Nurr1 είναι απαραίτητο για τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των πρόδρομων ντοπαμινεργικών κυττάρων του μεσεγκεφάλου. Ο Zetterstrom και οι συνεργάτες του (1997) έδειξαν ότι τα ποντίκια που στερούνται Nurr1 (λόγω στοχευμένης απαλοιφής του γονιδίου), ζουν μόλις μια μέρα μετά τη γέννησή τους, με πιθανό αίτιο θανάτου την αδυναμία τους να θηλάσουν.

Τα νεογέννητα Nurr1-/- ποντίκια είναι υποκινητικά και απουσιάζουν ίχνη γάλακτος απ' το στομάχι τους. Η ιστοπαθολογική εξέταση δείχνει έλλειψη ντοπαμινεργικών νευρώνων στις περιοχές της μέλαινας ουσίας και VTA του μεσεγκεφάλου, αλλά και σε άλλες περιοχές, όπως ο διεγκέφαλος, ο υποθάλαμος και

ο οσφρητικός βολβός (Le et al., 1999a). Επίσης λείπουν οι ενεργότητες των ενζύμων TH, AADC και η ντοπαμίνη, που είναι ο κατεξοχήν νευροδιαβιβαστής των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη μελαινοραβδωτή οδό (Zetterstrom et al., 1997; Baffi et al., 1999; Le et al., 1999a). Σε άλλες κατεχολαμίνες δεν παρατηρείται αξιοσημείωτη διαφορά. Μεταγενέστερες μελέτες, δείχνουν ότι μετά από στοχευμένη απουσία του Nurr1, την εμβρυονική μέρα 11,5 οι πρόδρομοι ντοπαμινεργικοί νευρώνες έχουν μεν κανονική τοποθέτηση στη VTA (Saucedo-Cardenas 1998) αλλά αποτυγχάνουν να εκφράσουν το ντοπαμινεργικό φαινότυπο (Castillo et al., 1998). Παράλληλα, τα πρόδρομα ντοπαμινεργικά κύτταρα του μεσεγκεφάλου εκφυλίζονται, τα επίπεδα του Pitx-3 μειώνονται ειδικά στην περιοχή του μεσεγκαφάλου. και παρατηρείται αύξηση της απόπτωσης των μεσεγκεφαλικών νευρώνων (Saucedo-Cardenas 1998).

1.2.2.3 Τα επίπεδα έκφρασης του Nurr1 επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του ντοπαμινεργικού συστήματος στα ποντίκια

Ενώ τα ομόζυγα Nurr1-/- ποντίκια πεθαίνουν μια μέρα μετά τη γέννησή τους, τα ετερόζυγα Nurr1+/- επιβιώνουν και αναπτύσσονται κανονικά χωρίς εμφανή κινητικά προβλήματα. Η μειωμένη έκφραση του Nurr1 στα ετερόζυγα ποντίκια επιφέρει αυξημένη ευαισθησία στην ντοπαμινεργική νευροτοξίνη 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), σε σχέση με τα αγρίου τύπου Nurr1+/+ ποντίκια (Le et al., 1999b). Αυτό σημαίνει ότι ενδεχομένως έχει ρόλο στη διατήρηση της λειτουργικότητας των ντοπαμινεργικών νευρώνων και η απώλεια της λειτουργικότητας του να αυξάνει την ευπάθεια σε βλάβες της μέλαινας ουσίας. Αυτή η υπόθεση ενισχύεται και από πειράματα σε κυτταρικές σειρές, που δείχνουν ότι η υπερέκφραση του Nurr1 σε νευρικά βλαστικά κύτταρα ποντικού, έχει νευροπροστατευτική δράση έναντι του MPTP, που προκαλεί κυτταρικό θάνατο (Lee et al., 2002). Καθώς τα επίπεδα έκφρασης του Nurr1 μειώνονται φυσιολογικά με την ηλικία, όπως και τα επίπεδα ντοπαμίνης, το γεγονός ότι στα υπερήλικα Nurr1+/- ποντίκια η μείωση αυτή είναι σημαντικά μεγαλύτερη, ενισχύει το συσχετισμό του Nurr1 με τη διατήρηση της λειτουργικότητας του ντοπαμινεργικού συστήματος στα ποντίκια.

1.2.3 Το Nurr1 στη ΝΠ

Ο πρώτος συσχετισμός του Nurr1 με τη νόσο Πάρκινσον προέκυψε όταν βρέθηκαν δυο σημειακές μεταλλάξεις σε ασθενείς με οικογενή ΝΠ στο εξώνιο 1 του γονιδίου (Le et al., 2003). Έκτοτε, έχουν βρεθεί άλλες 5 μεταλλάξεις του Nurr1 σε οικογενείς και σποραδικές περιπτώσεις και μεγάλος όγκος επιστημονικών δεδομένων υποστηρίζει το συσχετισμό του γονιδίου με τη ΝΠ. Η μειωμένη έκφραση του Nurr1 σε ασθενείς με ΝΠ, ο αποδεδειγμένος ρόλος του στην ανάπτυξη των ντοπαμινεργικών νευρώνων, ο έλεγχος της έκφρασης άλλων γονιδίων που σχετίζονται με τη νόσο, αλλά και η συμμετοχή του στους προτεινόμενους μηχανισμούς νευροεκφύλισης, είναι οι βασικοί πυλώνες αυτού του συσχετισμού.

Επιπλέον, παρότι το Nurr1 δεν έχει ξεχωρίσει ως παράγοντας κινδύνου για τη ΝΠ σε γενετικές μελέτες, άλλα γονίδια που σχετίζονται με την ανάπτυξη των νευρώνων και την διαμόρφωση των νευρικών αξόνων έχει φανεί πως σχετίζονται με την κληρονομική προδιάθεση της νόσου. Είναι λοιπόν πιθανό, ανωμαλίες στη

διαμόρφωση του ντοπαμινεργικού συστήματος κατά την εμβρυική ανάπτυξη να οδηγούν σε παρεκκλίσεις στη διαμόρφωση της μελαινοραβδωτής οδού, που είναι μεν λειτουργικές κατά την ενήλικη ζωή, αλλά προδιαθέτουν σε μεγαλύτερο κίνδυνο για την ανάπτυξης της ΝΠ (Lesnick et al., 2007).

1.2.3.1 Μεταλλάξεις του Nurr1 έχουν βρεθεί σε Παρκινσονικούς ασθενείς

Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει ανωμαλίες στο γονίδιο Nurr1 τόσο με την οικογενή, όσο και με τη σποραδική μορφή της ΝΠ. Μέχρι στιγμής, έξι μεταλλάξεις του Nurr1 έχουν βρεθεί σε Παρκινσονικούς ασθενείς (Le et al 2003; Hering et al., 2004; Healy et al., 2006; Grimes et al., 2006). Μετά από γενετική ανάλυση 201 Καυκάσιων και Ευρωπαίων ασθενών βρέθηκαν δυο σημειακές μεταλλάξεις στο εξώνιο 1 (-291Tdel, -245T →G). Οι μεταλλάξεις αυτές εντοπίστηκαν σε ετερόζυγη κατάσταση, σε ασθενείς με αυτοσωμική επικρατή μορφή κληρονομικότητας για τη ΝΠ, και όχι σε ασθενείς με σποραδική ΝΠ (Le et al., 2003). Αυτές οι μεταλλάξεις μειώνουν τα επίπεδα mRNA του Nurr1 στα λεμφοκύτταρα και επηρεάζουν τη μεταγραφή του γονιδίου της ΤΗ. Λίγο αργότερα, εντοπίστηκαν δυο ακόμα σημειακές μεταλλάξεις του εξωνίου 1, σε ασθενείς με μη οικογενή μορφή της νόσου. Η 253C→ G και η 23C →T (Grimes et al., 2006). Πρόσφατα εντοπίστηκαν δυο νέες μεταλλάξεις. Η 309C→T, που επίσης μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του Nurr1 (Sleiman et al., 2009), και η 709C → G που εντοπίζεται στο εξώνιο 3, ακριβώς δίπλα σε μια πιθανή θέση φωσφορυλίωσης των κινασών ERK1/2 και μετατρέπει το αμυνοξύ σερίνη σε κυστεΐνη (Jacobsen et al., 2008). Η πιο πρόσφατη μετάλλαξη έχει ανακαλυφθεί σε μία οικογένεια στην Αθήνα με καταγωγή από την Στερεά Ελλάδα.

1.2.3.2 Επίπεδα του Nurr1 σε Παρκινσονικούς ασθενείς

Η πάροδος της ηλικίας, που είναι και ο καθοριστικότερος παράγοντας κινδύνου για τη ΝΠ, συνοδεύεται φυσιολογικά από μείωση της κινητικής ικανότητας, παράλληλη μείωση του αριθμού των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη μέλαινα ουσία (Fearnley and Lees, 1991) και μείωση των επιπέδων ντοπαμίνης στο ραβδωτό (Adolfsson et al., 1979). Αυτές οι μεταβολές συμβαδίζουν με τα επίπεδα έκφρασης του Nurr1, που παρουσιάζουν προοδευτική πτώση με την πάροδο της ηλικίας (Chu et al., 2002). Στη ΝΠ, η έλλειψη ντοπαμίνης στο ραβδωτό και η εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη μέλαινα ουσία είναι τα κύρια νευροχημικά χαρακτηριστικά της νόσου και εμφανίζονται νωρίς κατά την εξέλιξή της (Ross et al., 2004). Σε εγκεφάλους παρκινσονικών ασθενών έχει διαπιστωθεί σημαντικά μειωμένη έκφραση του Nurr1 ειδικά στους νευρώνες της μέλαινας ουσίας με έγκλειστα α-συνουκλεΐνης, και όχι σε νευρώνες χωρίς έγκλειστα ή νευρώνες του ιπποκάμπου, ενώ αντίστοιχη μείωση παρατηρείται και για την ΤΗ (Chu et al., 2006).

Δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα αν αυτή η μείωση αποτελεί αποτέλεσμα ή αιτιολογικό παράγοντα της εκφύλισης των ντοπαμινεργικών νευρώνων, αλλά δε φαίνεται να είναι απλώς ένα ανεξάρτητο φαινόμενο, καθώς παρατηρείται ειδικά στους νευρώνες που παρουσιάζουν παθολογία. Καθώς το Nurr1 παίζει αδιαμφισβήτητο ρόλο στην ανάπτυξη των ντοπαμινεργικών νευρώνων, προκύπτει εύλογα η υπόθεση πως η μειωμένη έκφραση του Nurr1 μπορεί να αποτελεί παράγοντα προδιάθεσης για την πρόωρη εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων που παρατηρείται στη ΝΠ.

1.2.3.3 Το Nurr1 στην παθογένεια της ΝΠ

Η πρόωρη θνησιμότητα των Nurr1-/- ποντικιών έχει λειτουργήσει ανασταλτικά στη διερεύνηση του ρόλου του Nurr1 σε ενήλικες οργανισμούς, με αποτέλεσμα να μην έχει προταθεί ως σήμερα κάποιος μηχανισμός δράσης του Nurr1 είτε στην λειτουργία, είτε στην προστασία του ντοπαμινεργικού συστήματος.

Το 2009, μια ερευνητική ομάδα, δημιούργησε ένα μοντέλο αποσιώπισης της έκφρασης του Nurr1 σε ποντίκια με χρήση αδενοϊών και παρατήρησαν προοδευτική μείωση των επιπέδων ντοπαμίνης στο ραβδωτό και των ντοπαμινεργικών δεικτών στην περιοχή της μέλαινας ουσίας, χωρίς απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων. Παράλληλα δημιούργησαν ένα γενετικό μοντέλο αποσιώπησης του Nurr1 στα τελικά στάδια της ανάπτυξης των ντοπαμινεργικών νευρώνων (E 13,5 – E 15,5) με το σύστημα Cre-LoxP, υπό τον υποκινητή του μεταφορέα της ντοπαμίνης DAT. Εκεί παρατηρήθηκε μειωμένη κινητικότητα, μειωμένο σωματικό βάρος, θνησιμότητα, και απόκριση στην L-DOPA. Η παθοφυσιολογία αυτού του φαινοτύπου προσομοιάζει έντονα με τη ΝΠ, καθώς περιλαμβάνει δραματική μείωση της TH κυρίως στη μέλαινα ουσία, και των επιπέδων ντοπαμίνης στο ραβδωτό (Kadkhodaei et al., 2009).

Η διαφορά στη σοβαρότητα του φαινοτύπου στις δυο ηλικιακές ομάδες, ίσως υποδεικνύει ότι η συμμετοχή του Nurr1 στην νευροεκφυλιστική παθογένεια έγκειται κυρίως στον μεταγενέστερο αντίκτυπο κάποιων αναπτυξιακών ανωμαλιών. Είναι όμως σημαντικό να παρατηρήσουμε ότι στην πρώτη περίπτωση η αποσιώπηση με χρήση ιών δεν είναι μόνιμη όπως σε ένα γενετικό μοντέλο, αλλά παροδική. Έτσι μένει ανοιχτό το ερώτημα μέχρι πού θα μπορούσε να φτάσει η παθολογία των ντοπαμινεργικών νευρώνων στα ενήλικα ζώα μετά απο μόνιμη διακοπή της έκφρασης του Nurr1.

Παρόλο που το Nurr1 δεν έχει χαρακτηριστεί ως γενετικός τόπος PARK, οι ενδείξεις που το συσχετίζουν με τη ΝΠ είναι ισχυρές. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το Nurr1 εμπλέκεται άμεσα ή έμμεσα με όλα τα μονοπάτια μοριακής παθογένειας που έχουν προταθεί για τη ΝΠ.

1.2.3.3.1 Το Nurr1 στο οξειδωτικό stress και τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα ετερόζυγα Nurr1 +/- ποντίκια αν και αναπτύσσονται και επιβιώνουν φυσιολογικά, παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία στο MPTP σε σύγκριση με τα φυσιολογικά Nurr1 +/+. Αυτό το εύρημα ήταν και η πρώτη ένδειξη για το ρόλο του Nurr1 στη διατήρηση των ενήλικων ντοπαμινεργικών νευρώνων (Le et al, 1999). Έκτοτε, έρευνες σε κυτταρικές σειρές νευρικών βλαστικών κυττάρων έδειξαν ότι η υπερέκφραση Nurr1 λειτουργεί προστατευτικά έναντι του MPP+, χημικού αναλόγου του MPTP, αλλά όχι έναντι της 6-υδροξυ-ντοπαμίνης (6-OHDA) (Lee et al., 2002). Πρόκειται για δυο νευροτοξίνες που προκαλούν κυτταρικό θάνατο, με τη διαφορά πως η 6-OHDA προκαλεί συρρίκνωση της κυτταρικής μεμβράνης και απόπτωση, ενώ το MPP+ προκαλεί μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (όπως και το MPTP) και νεκρωτικό θάνατο. Επιπλέον, πειράματα σε κυτταρικές σειρές έχουν δείξει πως η υπερέκφραση του Nurr1 προάγει τη βιωσιμότητα σε συνθήκες οξειδωτικού stress. Από αναλύσεις μικροσυστοιχειών

προκύπτει ότι το Nurr1 συμμετέχει στη ρύθμιση γονιδίων υπεύθυνων για την κυτταρική επιβίωση (τροφικούς παράγοντες, αναπτυξιακούς παράγοντες και γονίδια απόκρισης στο stress) αλλά και γονιδίων που αποτρέπουν τον κυτταρικό θάνατο, όπως η κασπάση-3 και η κασπάση-11 (Sousa et al., 2007).

1.2.3.3.2 Το Nurr1 στην πρωτεϊνική τοξικότητα

Το γεγονός ότι η ΝΠ χαρακτηρίζεται από την παρουσία των σωματίων Lewy (Lewy Bodies-LBs), είναι η πρώτη και βασικότερη παρατήρηση που οδήγησε στη θεωρία της πρωτεϊνικής τοξικότητας. Τα LBs είναι δυνατόν να σχηματίζονται εξαιτίας της ελαττωματικής αναδίπλωσης της α-συνουκλεΐνης, που είναι το βασικό συστατικό τους, ή και λόγω ανεπαρκούς λειτουργίας του συστήματος ουβικιτίνης-πρωτεασώματος.

Αρκετά στοιχεία υποδεικνύουν μια πιθανή αλληλεπίδραση, και πιθανώς συνεργιστική δράση του Nurr1 και της α-συνουκλεΐνης. Είναι γνωστό ότι στους ανθρώπους τα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης αυξάνουν με την πρόοδο της ηλικίας ενώ παράλληλα τα επίπεδα του Nurr1 μειώνονται. Η αντίστροφη ρύθμιση της έκφρασης των δυο αυτών γονιδίων, δε φαίνεται να είναι τυχαία. Πειράματα σε νευροβλαστικές κυτταρικές σειρές έχουν δείξει ότι υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης προκαλεί μείωση της έκφρασης του Nurr1 (Baptista et al., 2003). Αλλά και το Nurr1 επηρεάζει την έκφραση της α-συνουκλεΐνης. Μείωση της έκφρασης του Nurr1 σε νευροβλαστικές κυτταρικές σειρές με siRNA προκαλεί σημαντική αύξηση των επιπέδων ενδογενούς α-συνουκλεΐνης, ενώ η υπερέκφραση του Nurr1 ασκεί μεταγραφική καταστολή της α-συνουκλεΐνης. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο γονιδίων φαίνεται να είναι έμμεση, αφού στον υποκινητή της α-συνουκλεΐνης δεν υπάρχουν πιθανές θέσεις δέσμευσης του Nurr1 (Yang and Latchman, 2008). Υπάρχουν επίσης μη δημοσιευμένα αποτελέσματα που επιβεβαιώνουν τα παραπάνω αποτελέσματα και *in vivo*, καθώς δείχνουν πως σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν α-συνουκλεΐνη, τα επίπεδα του Nurr1 μειώνονται προοδευτικά με την ηλικία.

Το Nurr1 όμως έχει συσχετιστεί και με τη λειτουργία του πρωτεασώματος, in vitro και in vivo. Η λακτακυστίνη (lactacystin), ένας μη αντιστρέψιμος αναστολέας του πρωτεασώματος, προκαλεί μεγαλύτερη βλάβη σε νευροβλαστικά κύτταρα που υποεκφράζουν Nurr1, ενώ η υπερέκφραση του Nurr1 λειτουργεί προστατευτικά. Αλλά και η αναστολή πρωτεασώματος που προκαλείται από στερεοτακτική έγχυση λακτακυστίνης στον εγκέφαλο οδηγεί σε μεγαλύτερη απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων και εντονότερη μείωση ντοπαμίνης σε ποντίκια ετερόζυγα για το Nurr1 απ' ό,τι σε φυσιολογικά ποντίκια (Pan et al., 2008).

1.2.3.3.3 Το Nurr1 στη φλεγμονώδη αντίδραση

Μια νέα διάσταση στο ρόλο του Nurr1 προέκυψε από την πρόσφατη ανακάλυψη ότι το Nurr1 προστατεύει τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες καταστέλλοντας την έκφραση γονιδίων που επάγουν τη φλεγμονή στα αστροκύτταρα και στα μικρογλοιακά κύτταρα. Η στερεοτακτική έγχυση λιποπολυσακχαριτών (lipopolysaccharites-LPS) στη μέλαινα ουσία προκαλεί τοπική φλεγμονώδη αντίδραση και οδηγεί σε απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων (TH+). Πειράματα σε ποντίκια, έδειξαν σε ότι αυτή η φλεγμονώδης αντίδραση επάγει την

έκφραση του Nurr1, ενώ τοπική απενεργοποίηση του Nurr1 με shRNAs επιτείνει την απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων (Saijo et al., 2009).

Αυτή η νευροπροστατευτική δράση του Nurr1 φαίνεται να ξεκινά όχι απο τα ίδια τα ντοπαμινεργικά κύτταρα, αλλά απ' τα γειτονικά αστροκύτταρα και τα μικρογλοιακά κύτταρα. Πειράματα σε καλλιέργειες μικρογλοιακών και αστροκυττάρων έδειξαν ότι το Nurr1 καταστέλλει την έκφραση γονιδίων της φλεγμονής. Οι Saijo et al., προχώρησαν και στη μελέτη του μηχανισμού αυτής της καταστολής και έδειξαν οτι πρόκειται για έμμεση ρύθμιση της μεταγραφής, αφού το Nurr1 δεν συνδέεται απ' ευθείας με τους υποκινητές των γονιδίων που καταστέλλει. Η κατασταλτική δράση του Nurr1 μεσολαβείται από το κατασταλτικό σύμπλοκο CoREST. Ο προτεινόμενος μηχανισμός δράσης περιλαμβάνει τη σύνδεση του Nurr1 στην υπομονάδα p65 του NF-κB, που επάγει την έκφραση των γονιδίων της φλεγμονής. Το Nurr1 συνδέεται άμεσα και με το κατασταλτικό σύμπλοκο CoREST το οποίο στρατολογείται έτσι για την καταστολή της μεταγραφής (Bensinger and Tontonoz, 2009)

1.2.4 Το γενετικό μοντέλο υποέκφρασης του Nurr1

Η δημιουργία του γενετικού μοντέλου αποσιώπησης του Nurr1 στα ποντίκια (Nurr1 Knock Out) οδήγησε στην ανακάλυψη ότι το Nurr1 είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Τα Nurr1-/- ποντίκια δεν επιβιώνουν περισσότερο από 24 ώρες μετά τη γέννησή τους, καθώς αποτυγχάνουν να αναπτύξουν ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Αν και τα ημίζυγα Nurr1+/- επιβιώνουν και ζουν εντελώς φυσιολογικά, παρουσιάζουν πολλά ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά που τα καθιστούν ικανά μοντέλα για τη μελέτη του ρόλου του Nurr1 στην παθοφυσιολογία των ώριμων ντοπαμινεργικών νευρώνων.

Ενώ στα νεογέννητα Nurr1+/- τα επίπεδα ντοπαμίνης στο ραβδωτό είναι μειωμένα σε σχέση με τα Nurr1+/+, η διαφορά αυτή εξαλείφεται στα ενήλικα ζώα (Saucedo-Cardenas et al., 1998; Zetterstrom et al., 1997). Η εξισορρόπηση των επιπέδων ντοπαμίνης μπορεί να αποδοθεί σε ενδογενείς ρυθμιστικούς μηχανισμούς που διασφαλίζουν την ομαλή λειτουργία του ντοπαμινεργικού συστήματος παρά τις αναπτυξιακές ανισορροπίες που προκαλεί η υποέκφραση του Nurr1.

Όσον αφορά το ρόλο του Nurr1 στην επιβίωση των ντοπαμινεργικών νευρώνων, ιδιαίτερη βαρύτητα έχει η παρατήρηση ότι οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες των Nurr1+/- ποντικιών είναι πιο ευάλωτοι στη νευροτοξίνη MPTP. Σε σύγκριση με τα Nurr1+/+, τα Nurr1+/- ποντίκια παρουσίασαν μεγαλύτερες βλάβες στην περιοχή της μέλαινας ουσίας και αδυναμία επανόρθωσης της βλάβης μετά τον τερματισμό της χορήγησης MPTP, ενώ μάλιστα οι διαφορές αυτές ήταν εντονότερες σε ηλικιωμένα ποντίκια σε σχέση με τα νεαρότερα (Le et al., 1999b). Συνεπώς, το Nurr1 φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο όχι μόνο στην ανάπτυξη, αλλά και στη διατήρηση των ντοπαμινεργικών νευρώνων, ενώ μείωση στην έκφραση του Nurr1 σε συνδυασμό με την πάροδο της ηλικίας, μπορεί να οδηγεί σε μειωμένη ανθεκτικότητα σε εξωγενείς ή και ενδογενείς νευροτοξικούς παράγοντες.

Άλλωστε ακόμα και χωρίς χορήγηση νευροτοξινών, τα Nurr1+/- ποντίκια σε μεγάλες ηλικίες παρουσιάζουν προοδευτική εκφύλιση της μελαινοραβδωτής οδού. Στα κινητικά τεστ του επιταχυνόμενου ρότορα και της ελεύθερης κινητικότητας, τα

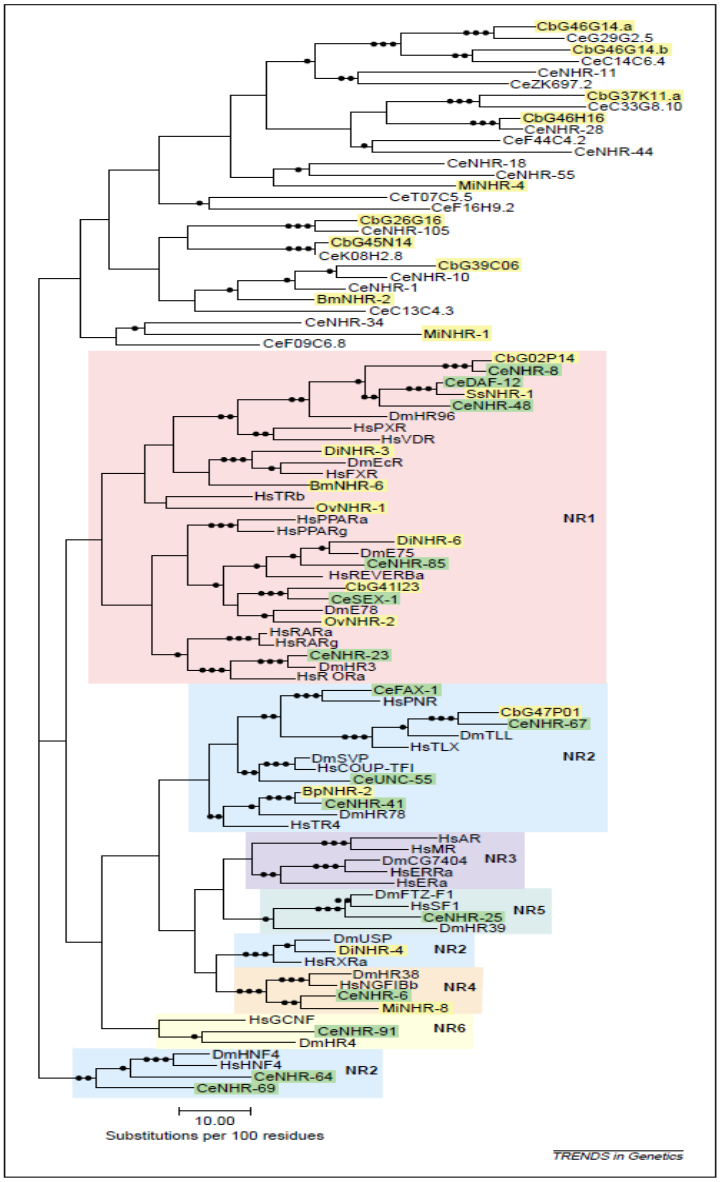
ενήλικα Nurr1+/- ηλικίας 2-10 μηνών έχουν παρόμοιες επιδόσεις με τα Nurr1+/+. Στις ηλικίες άνω των 15 μηνών όμως, οι επιδόσεις τους παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική μείωση, που συνοδεύεται από απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων στη μέλαινα ουσία και μειωμένα επίπεδα ντοπαμίνης στο ραβδωτό (Jiang et al., 2005).

Η μελέτη των Nurr1+/- ποντικιών έχει δώσει πολύ σημαντικές πληροφορίες για το ρόλο του Nurr1 στην επιβίωση των ντοπαμινεργικών νευρώνων κατά την ενήλικη ζωή και το γήρας. Καθώς όμως η έκφραση του Nurr1 είναι μειωμένη καθόλη τη διάρκεια της ανάπτυξης, είναι δυνατό η υπερευαισθησία που παρατηρείται στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες των Nurr1+/- ποντικιών να οφείλεται περισσότερο σε αναπτυξιακές ανωμαλίες παρά σε ελλειπή νευροπροστασία των ώριμων νευρώνων. Φαίνεται πως ενώ ο ρόλος του Nurr1 κατά την ανάπτυξη είναι σαφής και καλά τεκμηριωμένος, μένει ακόμα να αποσαφηνιστεί αν είναι εξίσου καθοριστικός και στη διατήρηση της βιωσιμότητας των ώριμων ντοπαμινεργικών νευρώνων.

1.3 Νευροπροστασία στη ΝΠ

Τα ανωτέρω μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το Nurr1 έχει νευροπροστατευτικό ρόλο και η μείωσή του κατά 50% δημιουργεί ευπάθεια στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Εύλογο λοιπόν είναι το ερώτημα εάν η αύξηση της δραστηριότητας του Nurr1 μπορεί να θωρακίσει τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες και να τους προστατεύσει από τους μηχανισμούς εκφύλισης. Όμως το Nurr1 όπως έχουμε αναφέρει δεν διαθέτει θέση προσδέτη όπως οι λοιποί πυρηνικοί υποδοχείς. Η δράση του Nurr1 στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες επιτελείται με τον RXR, το οποίο διαθέτει θέση προσδέτη και ενεργοποιείται από μόρια όπως το 9-cis-ρετινοικό οξύ, λιπαρά οξέα κλπ. Όντως, αποτελέσματα μελετών επιβίωσης σε κυτταροκαλλιέργειες δείχνουν ότι ο RXR ενεργοποιούμενος από τον συνθετικό προσδέτη LG268 προκαλεί επιβίωση των νευρικών κυττάρων από την επερχόμενη μέσω stress εκφύλιση. Επιπλέον μελέτες πιστοποιούν ότι η συγκεκριμένη επιβίωση αυξάνεται μετά από δημιουργία του ετεροδιμερούς συμπλόκου RXR-Nurr1. Η επιβίωση αυτή είναι εξαιρετικά ειδική για τα νευρικά κύτταρα που εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα Nurr1 στον μεσεγκέφαλο και στον φλοιό. Περαιτέρω έρευνα προς αυτή την κατεύθυνση, με χρήση ανταγωνιστών αποκαλύπτει πως το μονοπυριμιδινικό ανάλογο XCT προσδένεται στο ετεροδιμερές σύμπλοκο RXR-Nurr1 και αυξάνει σημαντικά την επιβίωση των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Από τα παραπάνω συνεπάγεται ότι το RXR που αποτελεί ένα είδος συμπαράγοντα του Nurr1 συμμετέχει σε ένα πολύπλοκο μονοπάτι μεταγωγής σήματος που ρυθμίζει εκλεκτικά την επιβίωση των ντοπαμινεργικών νεύρων του φλοιού και του μεσεγκεφάλου in vitro. (Stina Friling et al., 2009)(Esa Wallın-Mackenzie et al., 2003). Το αν ο RXR λειτουργεί μεσολαβώντας στην σηματοδότηση των πυρηνικών υποδοχέων (όπως του Nurr1) και in vivo, είναι ερώτημα το οποίο δεν έχει ακόμα διασαφηνιστεί και χρήζει περαιτέρω έρευνας.

1.4 Πυρηνικοί Υποδοχείς στον C. elegans.



Η υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων (NR) είναι η μεγαλύτερη τάξη μεταγραφικών παραγόντων που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του C. elegans, με πάνω από 250 προβλεπόμενα γονίδια. Αυτός είναι ο μεγαλύτερος αριθμός NR γονιδίων που έχει μέχρι τώρα περιγραφεί. Υπάρχουσες πληροφορίες από αναλύσεις αναδεικνύουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του 25% των ευρισκόμενων αλληλουχιών των NR γονιδίων. Το συντηρημένο μοτίβο των αλληλουχιών που παρατηρείται μετά από στατιστικές μελέτες καταδεικνύει ότι στο σύνολό τους είναι λειτουργικά. Ο αριθμός των προβλεπό-μενων NR γονιδίων είναι περίπου πέντε φορές μεγαλύτερος από τα υπάρχοντα αντίστοιχα γονίδια των άλλων ειδών.

Εικόνα 8

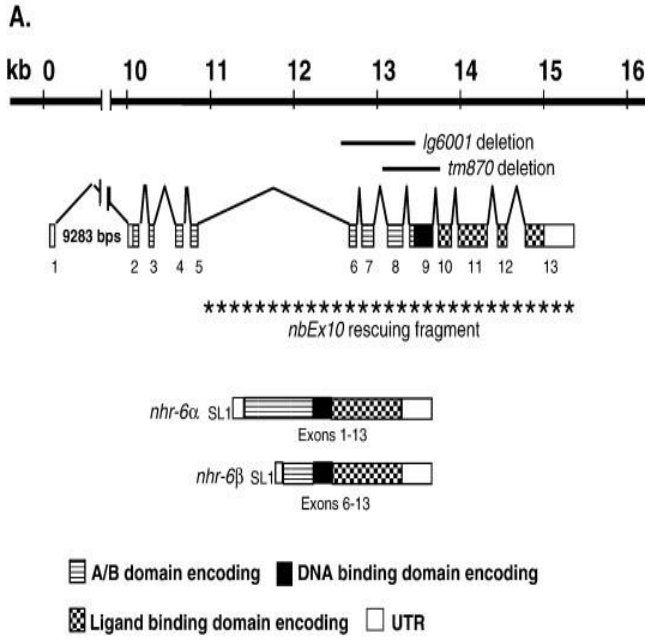
Εξελικτικό δέντρο NR γονιδίων για C. elegans, Drosophila melanogaster και άνθρωπο.

Μια πιθανή εξήγηση του φαινομένου αυτού είναι η ενδεχόμενη μη λειτουργικότητα κάποιων από αυτά, όντας ψευδογονίδια. Μελέτες βιοπληροφορικής μετά από αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων καθώς και μελέτες έκφρασης γονιδίων, δείχνουν ότι τα 54 από αυτά τα γονίδια εκφράζονται σε αρκετά ψηλά επίπεδα. Ωστόσο και τα υπόλοιπα NR γονίδια εκφράζονται σε χαμηλότερα επίπεδα και ενδεχομένως σε λίγα κύτταρα του νηματώδους.

Μεγάλης κλίμακας προσπάθειες αλληλούχισης προσφέρουν νέες προοπτικές για τον προσδιορισμό ομοιοτήτων και διαφορών του γονιδίου στο εύρος των ειδών. Η ολοκληρωμένη αλληλούχιση των οργανισμών σκουλήκι (Caenorhabditis elegans), φρουτόμυγα (Drosophila melanogaster) και του ανθρώπου αποκαλύπτουν δραματικά διαφορετικά νούμερα NR γονιδίων. Συγκεκριμένα, απαντώνται 270 γονίδια NRs για τον νηματώδη Caenorhabditis elegans, 21 για τη μύγα Drosophila melanogaster και 50 για τον άνθρωπο. Αν και κάποιες κλάσεις για

τα NR γονίδια στα έντομα και στα θηλαστικά είναι παρόντα και στο σκουλήκι, ωστόσο οι περισσότερες αλληλουχίες NR του σκουληκιού είναι ξεχωριστές και διάφορες από τις υπόλοιπες γνωστές των άλλων φύλων. Ερωτήματα που αφορούν την λειτουργική σημασία και την εξέλιξη των NR γονιδίων στο νηματώδη, πυροδοτούνται λόγω της έντονης παρουσίας και ποικιλίας των συγκεκριμένων γονιδίων στο γένωμά τους, και αποτελούν αντικείμενο ενδελεχούς έρευνας.

1.4.1 Δομή του γονιδίου nhr-6



Το γονίδιο nhr-6 χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 3 και έχει μέγεθος κάτι παραπάνω από 15 Kb. Κωδικοποιεί δύο πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική αναπαραγωγή του C. elegans. Οι δύο παραγόμενες πρωτεΐνες προκύπτουν από μηχανισμούς εναλλακτικής έναρξης μεταγραφής. Από την πιο κοντή πρωτεΐνη που παράγεται, την Nhr6β απουσιάζουν τα πρώτα πέντε εξόνια που απαντώνται στη πλήρη Nhr6α. Η Nhr6β είναι και αυτή ένας πυρηνικός υποδοχέας με μικρότερη N-τελική επικράτεια.

Εικόνα 10

Δομή του γονιδίου nhr-6

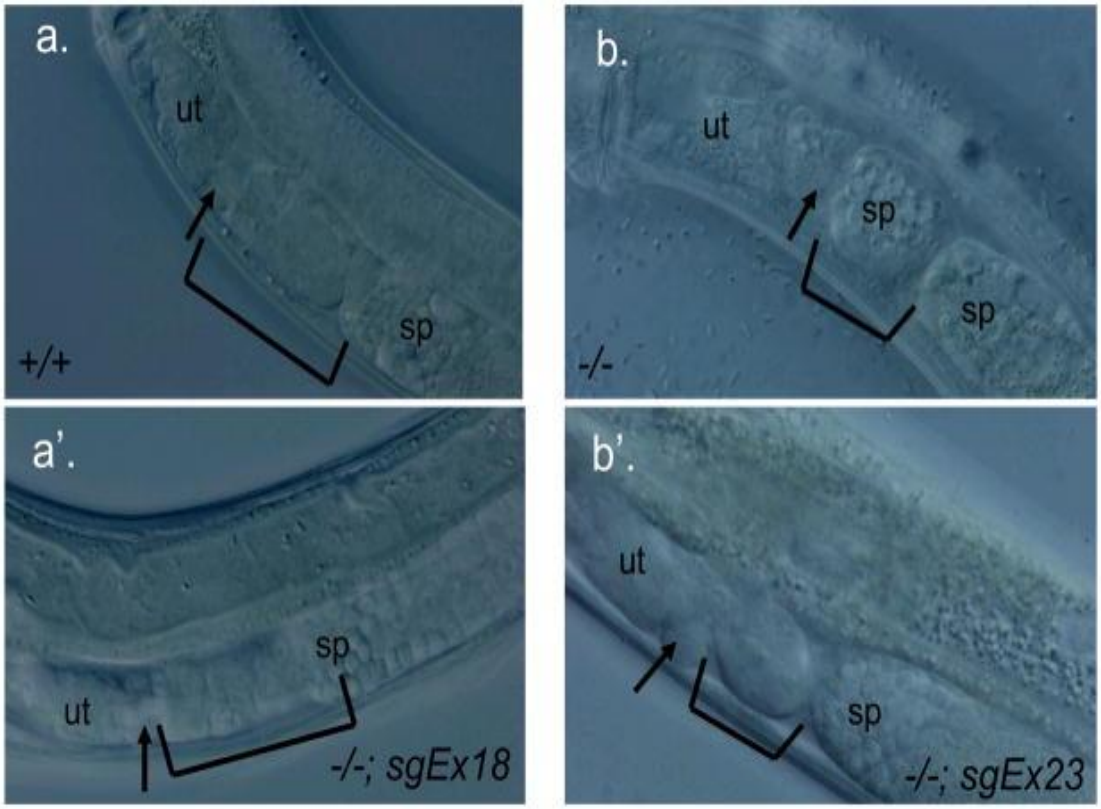
1.4.2 Το ορθόλογο γονίδιο nhr6 στο C. elegans και η λειτουργία του

Ο νηματώδης C. elegans αποτελεί ένα θαυμάσιο εργαλείο για την μελέτη της δράσης γονιδίων. Ο ενήλικος ερμαφρόδιτος οργανισμός αποτελείται από 959 σωματικά κύτταρα (Kimble and Hrish, 1979), ενώ επίσης κατέχει πολλά από τα πολύπλοκα οργανικά συστήματα και μεταξύ άλλων χρησιμοποιείται ως μοντέλο για νευρολογικές ασθένειες.

Το γονίδιο nhr-6 στον C. elegans κωδικοποιεί την ορθόλογη πρωτεΐνη του πυρηνικού υποδοχέα Nurr1. Έχει διευκρινιστεί η βιολογική λειτουργία του nhr-6, μετά από μελέτη του Knock out οργανισμού. Δείχθηκε λοιπόν ότι το γονίδιο αυτό παίζει έναν πολύ κομβικό ρόλο στην ανάπτυξη των γονάδων του C. elegans. Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο αυτό απαιτείται για την ανάπτυξη της ερμαφρόδιτης σπερμαθήκας, το αναπαραγωγικό δηλαδή όργανο που προσφέρει τη θέση για την αποθήκευση του σπέρματος και την γονιμοποίηση των ωοκυττάρων. Με χρήση μιας ποικιλίας από δείκτες ειδικούς για τη σπερμαθήκα δείχτηκε ότι η απώλεια της λειτουργίας του nhr-6 γονιδίου προκαλεί σοβαρές μορφολογικές ανεπάρκειες στη σπερμαθήκα και στις αντίστοιχες βαλβίδες αυτής. Αυτό προκύπτει από την ιδιότητα του συγκεκριμένου γονιδίου να ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την

κυτταρική διαφοροποίηση των αναπαραγωγικών οργάνων κατά την διάρκεια της ανάπτυξης. Η μη φυσιολογική ανάπτυξη αυτών των δομών στα μεταλλαγμένα στελέχη (nhr6$^-$) σκουληκιών οδηγεί σε ανεπαρκή ωογένεση και αξιοσημείωτα μειωμένη αναπαραγωγική διαδικασία. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 9 υπάρχουν μορφολογικές διαταραχές στη σπερμαθήκα μεταξύ wt (a) και Knock out (b) σκουληκιών.

Φαινομενικά, η μελέτη του γονιδίου nhr-6 στο C. elegans δεν μπορεί να μας βοηθήσει στη κατανόηση του ρόλου του Nurr1 στα θηλαστικά. Η διαφοροποίηση του μοτίβου έκφρασης των δύο γονιδίων (το nhr-6 στον C. elegans εκφράζεται στις γονάδες σε αντίθεση με το Nurr1 που εκφράζεται στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες στα θηλαστικά), ο διαφορετικός τους φαινότυπος και η απουσία του παράγοντα RXR στον νηματώδη, θα μπορούσαμε να πούμε ότι είναι παράμετροι που συνηγορούν στην παραπάνω υπόθεση. Πιο αναλυτικά, η έλλειψη του ρυθμιστικού μορίου RXR στον νηματώδη θα μπορούσε να μας οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι οι NRs στον συγκεκριμένο οργανισμό μπορεί να έχουν ιδιαίτερα διαφορετική λειτουργία. Ωστόσο, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την ύπαρξη λειτουργικών ομολόγων του RXR τα οποία δεν έχουν φανερή ομολογία αλληλουχίας



Εικόνα 9

Μορφολογικές διαταραχές των αναπαραγωγικών οργάνων στα wt (a) σκουλήκια έναντι των Knock out(a', b, b') που αφορούν το μέγεθος της σπερμαθήκας, τον αριθμό των κυττάρων που περικλείουν και την απώλεια βαλβίδας μεταξύ μήτρας-σπερμαθήκας.

αλλά μπορεί να έχουν αντίστοιχη λειτουργική δράση. Πειράματα κυτταρικών σειρών στο εργαστήριό μας έδειξαν ότι το nhr-6 μπορεί να αντικαταστήσει λειτουργικά το Nurr1 και να δημιουργήσει ετεροδιμερή με το ανθρώπινο RXR το οποίο ετεροδιμερές ενεργοποιείται από το XCT.Αυτό το γεγονός υποδηλώνει υψηλό βαθμό συντήρησης της λειτουργικότητας αλλά και πιθανότατα της δομής του nhr-6,

υποδηλώνοντας ότι η μελέτη του γονιδίου nhr-6 στο C. elegans θα μπορούσε να βοηθήσει στη κατανόηση του ρόλου του Nurr1 στα θηλαστικά.

1.5 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η κατανόηση του ρόλου του μεταγραφικού παράγοντα Nurr1 ο οποίος έχει συσχετιστεί με τη νόσο Παρκινσον, και τη νευροπροστασία. Μελετήθηκε η δράση του Nurr1 σε δύο οργανισμούς μοντέλα, στο ποντίκι και στον νηματώδη C.elegans. Η αξιολόγηση της νευροπροστατευτικής δράσης του γονιδίου αυτού γίνεται μέσω συμπεριφορικών και φαρμακολογικών τεστ.

2 Υλικά και μέθοδοι

2.1 Δοκιμασίες συμπεριφοράς στα ποντίκια

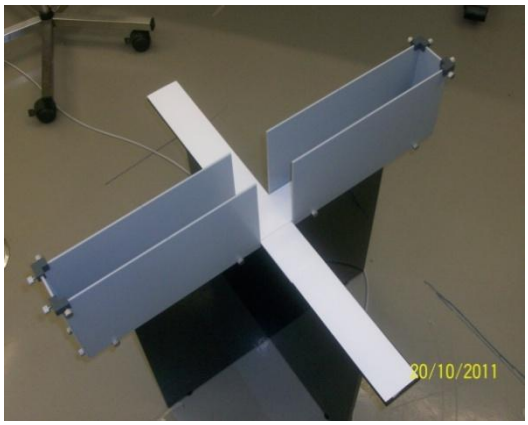
Στο **πρώτο σκέλος** της παρούσας εργασία χρησιμοποιήθηκαν ημίζυγα ποντίκια (του στελέχους 129sv) για το Nurr1 γονίδιο και ποντίκια αγρίου τύπου (ποντίκια wild type). Όλα τα ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ηλικίας 16 μηνών αρσενικά και θηλυκά και βάρους 30-35 g. Ζούσαν και τρέφονταν με ξηρά τροφή σε πολυακρυλικά κλουβιά (περίπου 4 ζώα του ίδιου φύλου ανά κλουβί), κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας 25-26 ºC, σχετικής υγρασίας 50-60% και 12h κύκλο εναλλαγής ημέρας-νύχτας. Όλα τα ποντίκια που στο σύνολό τους ήταν είκοσι (δεκατρία ημίζυγα-πειραματική ομάδα και επτά αγρίου τύπου-ομάδα ελέγχου) υποβλήθηκαν σε συμπεριφορικά τέστ σχεδιασμένα έτσι ώστε να αξιολογούν την ντοπαμινεργική τους λειτουργία και την κινητικότητά τους. Κατά την εκτέλεση τους, αγνοούνταν ο γενότυπος των ποντικών και πραγματοποιήθηκαν κατά κανόνα πρωινές ώρες (ώρα έναρξης δοκιμασιών 11.00 π.μ). Οι δοκιμασίες που έλαβαν χώρα είναι οι ακόλουθες:

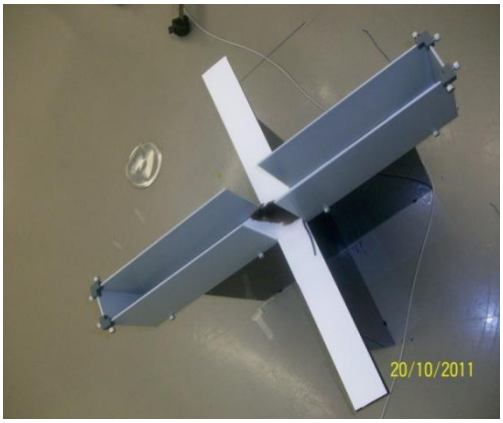
- Elevated plus
- Pole test
- Beam test
- Rearing
- Τεστ μέτρησης κινητικότητας των ποντικών πριν και μετά από ένεση Αμφεταμίνης

2.1.1 Elevated plus test

Το elevated plus test συνίσταται σε μία κατασκευή που έχει σχήμα σταυρού με δύο βραχίονες ακάλυπτους και δύο βραχίονες καλυμμένους (όπως φαίνεται στις εικόνες 12-13). Οι βραχίονες έχουν μήκος τριάντα εκατοστά και φάρδος πέντε εκατοστά.

Η κατασκευή τοποθετήθηκε σε ύψος εξήντα εκατοστών από το έδαφος και τοποθετήθηκε ένα-ένα ποντίκι στο σημείο τομής των δύο αξόνων που οριοθετούνται από τους κάθετους μεταξύ τους βραχίονες. Κατά την εκτέλεση του elevated plus test βιντεοσκοπήθηκαν όλα τα ποντίκια για χρονικό διάστημα ίσο με πέντε λεπτά και ακολούθησε ανάλυση μέσω του προγράμματος EthoVision XT Video-tracking system (Noldus). Κατά την ανάλυση, προσδιορίστηκε μια πληθώρα παραμέτρων όπως η συνολική απόσταση που διανύθηκε , η διάρκεια παραμονής τους στους καλυμμένους και ακάλυπτους βραχίονες, η μέση ταχύτητα κίνησης και αριθμός μεταβάσεων-εισόδων από τους ακάλυπτους στους καλυμμένους χώρους και αντίστροφα.





Εικόνες 12,13
Στις εικόνες αυτές παρουσιάζεται η κατασκευή του elevated plus test αποτελούμενη από καλυμμένους και ακάλυπτους βραχίονες σε σχήμα σταυρού. Τα ποντίκια κατά την έναρξη της προσπάθειας τοποθετούνται στο σημείο τομής των αξόνων που οριοθετούνται από τους βραχίονες.

2.1.2 Pole test

Το συγκεκριμένο τεστ έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για να αξιολογηθεί η κινητική δραστηριότητα των ποντικών-μοντέλων της Parkinson. Το όργανο αυτό συνίσταται σε μία τετράγωνη βάση στο κάθετο επίπεδο της οποίας είναι τοποθετημένος ένας στύλος μήκους πενήντα εκατοστών και πάχους ενός εκατοστού. Η βάση με τον στύλο τοποθετείται εντός του κλουβιού των ποντικών (όπως φαίνεται στις εικόνες 13-14) και εν συνεχεία το κάθε ποντίκι ξεκινάει την δραστηριότητα, πραγματοποιώντας πέντε προσπάθειες κάθε φορά. Το κάθε ποντίκι τοποθετείται στην κορυφή της στήλης με το κεφάλι προς τα πάνω και οι μετρήσεις που λαμβάνουν χώρα συνίστανται πρώτον στη μέτρηση της διάρκειας που απαιτείται μέχρι το ποντίκι να κάνει μια περιστροφή 180° και δεύτερον στη μέτρηση της διάρκειας που απαιτείται από την αρχή μέχρι το πέρας της προσπάθειας. Πριν την πραγματοποίηση του τεστ απαιτούνται δύο μέρες εκπαίδευσης την κάθε μέρα από τις οποίες τα ποντίκια πραγματοποιούν και πάλι από πέντε προσπάθειες. Την ημέρα του πειράματος βιντεοσκοπήθηκαν οι προσπάθειες και ακολούθησε η ανάλυση. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του συγκεκριμένου τεστ έγινε μετά από λήψη του μέσου όρου των πέντε προσπαθειών των ποντικών.

Εικόνες 14,15
Παρουσιάζεται το Pole test,κατά την οποία δοκιμασία χρονομετρείται ο χρόνος που απαιτείται για την περιστροφή 180° από την φάση τοποθέτησης του ποντικού (εικόνα 14) και ο χρόνος μέχρι το πέρας της προσπάθειας-κατάβαση του στύλου (εικόνα 15).

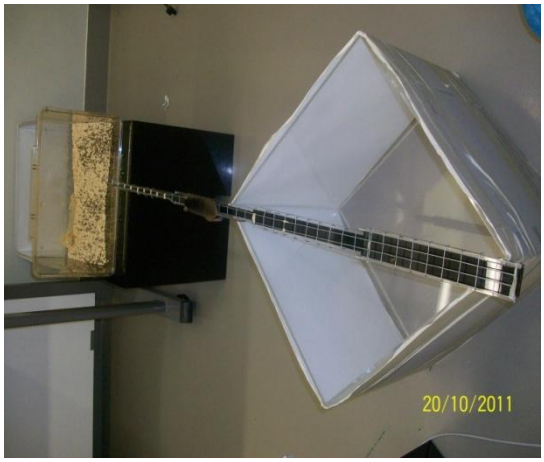
2.1.3 Beam test

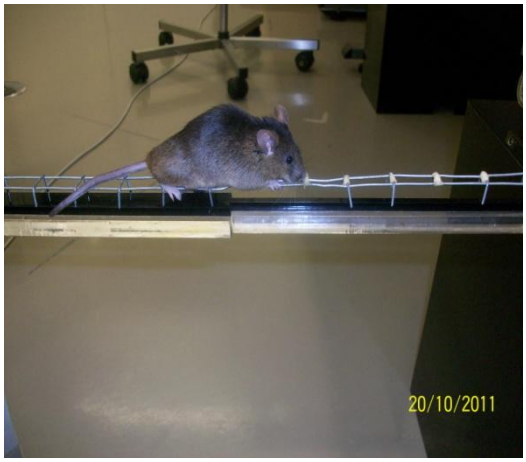
Το beam test (Challenging Beam Traversal), έχει αποδειχθεί επιτυχής προσέγγιση για την ανίχνευση κινητικών ανωμαλιών σε διαγονιδιακά ποντίκια-μοντέλα της νόσου της Parkinson. Για την πραγματοποίηση αυτού του τεστ, απαιτούνται δύο μέρες εκπαίδευσης κατά τις οποίες τα ποντίκια αφήνονται να περπατήσουν σε έναν διάδρομο μήκους ενός μέτρου στο τέλος του οποίου έχει τοποθετηθεί το κλουβί των ποντικών ενθαρρύνοντας τα να περπατήσουν τον διάδρομο και να φτάσουν στη φωλιά τους (εικόνα 16). Κατά την βάδισή τους τα ποντίκια αντιμετωπίζουν μια διαρκώς μειούμενη επιφάνεια βάδισης που ξεκινάει στην αρχή του διαδρόμου να είναι τριάμισι εκατοστά και κλιμακωτά στο τέλος του διαδρόμου φτάνει να είναι μόλις μισό εκατοστό. Εκτελούνται πέντε προσπάθειες ανά ποντίκι κάθε φορά στη φάση της εκπαίδευσης.

Την ημέρα του πειράματος τοποθετήθηκε ένα συρμάτινο πλέγμα στην επιφάνεια του διαδρόμου αφήνοντας ένα κενό μεταξύ πλέγματος-διαδρόμου ίσο με ένα εκατοστό (εικόνα 17). Τα ποντίκια αφέθηκαν σε βάδιση στο διάδρομο πάνω στον οποίο είναι τοποθετημένο το πλέγμα εκτελώντας πέντε προσπάθειες το καθένα, ενώ παράλληλα βιντεοσκοπήθηκαν. Τα βίντεο που ελήφθησαν παρατηρήθηκαν σε αργή κίνηση και σημειώθηκαν οι ακόλουθες παράμετροι:

1) ο χρόνος που απαιτείται ώστε τα ποντίκια να ολοκληρώσουν την βάδιση στη δοκό στην οποία έχει τοποθετηθεί πλέγμα
2) ο συνολικός αριθμός των βημάτων τους
3) η επίδοσή τους, η οποία προσδιορίζεται από το πηλίκο :
αριθμός λάθος βημάτων/συνολικός αριθμός βημάτων

Κατόπιν, ακολούθησε ανάλυση, με λήψη του μέσου όρου των πέντε προσπαθειών για τις παραπάνω παραμέτρους. Αξίζει δε να σημειώσουμε ότι οι κινητικές δυσλειτουργίες ταυτίζονται με αυξημένο αριθμό λάθος βημάτων κατά την βάδιση των ποντικών, δηλαδή με αυξημένο αριθμό «γλιστρημάτων» πάνω στο πλέγμα.





Εικόνες 16,17

Στην εικόνα 16 φαίνεται η πλήρης κατασκευή του Challenging Beam Traversal. Καθένα από τα ποντίκια διανύουν τον ενός μέτρου διάδρομο πάνω στον οποίο είναι το τοποθετημένο το πλέγμα και ταυτόχρονα βιντεοσκοπούνται. Στην εικόνα 17 διακρίνεται το επίπεδο βιντεοσκόπησης για την παρατήρηση των λαθών που λαμβάνουν χώρα κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας.

2.1.4 Rearing

Το rearing είναι τεστ που συνίσταται στην μέτρηση των ανορθώσεων (ανόρθωση και στάση στα δύο πίσω πόδια) που κάνει το κάθε ποντίκι, βρισκόμενο μέσα σε ένα πλαστικό διαφανές κυλινδρικό δοχείο, που έχει ύψος δεκαπέντε εκατοστά και διάμετρο δέκα εκατοστά. Πιο συγκεκριμένα, καταμετρήθηκε ο αριθμός των ανορθώσεων που πραγματοποίησε κάθε ποντίκι για χρονικό διάστημα ίσο με πέντε λεπτά. Στην συγκεκριμένη δοκιμασία δεν πραγματοποιείται η φάση της εκπαίδευσης.

2.1.5 Τεστ μέτρησης κινητικότητας των ποντικών πριν και μετά από ένεση Αμφεταμίνης (OPEN FIELD ANALYSIS)

Κάθε ποντίκι τοποθετήθηκε σε πλαστικό τετράγωνο διαφανή κλωβό (διαστάσεων 34x40x40 εκατοστών) και βιντεοσκοπήθηκε για είκοσι λεπτά πριν από ενδοπεριτονιάκη χορήγηση αμφεταμίνης και για εξήντα λεπτά ακριβώς μετά την χορήγηση. Η βιντεοσκόπηση και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγιναν μέσω του προγράμματος EthoVision XT Video-tracking system (Noldus). Κατ' αυτόν τον τρόπο κατέστη δυνατή η μέτρηση διαφόρων παραμέτρων που αφορούν την κινητική δραστηριότητα των ποντικών όπως η συνολική απόσταση που διανύθηκε, η ταχύτητα κίνησης και η διάρκεια παραμονής στο κέντρο του κλωβού ή στις γωνίες αυτού. Ως συνέπεια των παραπάνω, μπορέσαμε να συγκρίνουμε την κινητική δραστηριότητα των ζώων (αγρίου τύπου και ημίζυγων Nuurr1 +/-) πριν και μετά την χορήγηση της αμφεταμίνης.

Από το διάλυμα d-αμφεταμίνης (Sigma) που παρασκευάστηκε (0,1 mg/ml φυσιολογικού ορού) χορηγήθηκε στα ποντίκια δόση ίση με 1mg/kg, ενώ η χορήγηση έγινε ενδοπεριτοναϊκά.

2.1.6 Μελέτη της δράσης της ουσίας BRF στο ποντίκι

Πειράματα του εργαστηρίου μου, οδήγησαν στην σύνθεση της ουσίας BRF-001 της οποίας η νευροπροστατευτική δράση έχει δειχτεί σε κυτταρικές σειρές. Χρησιμοποιήθηκαν 16 ποντίκια αγρίου τύπου (C57/BL6) ηλικίας τριών μηνών τα οποία χωρίστηκαν σε δύο ισάριθμες ομάδες ποντικών: στην πειραματική ομάδα, στην οποία έγινε χορήγηση BRF διαλυμένο σε PEG WATER (συνολική δόση 10 mg BRF/kg) και στην ομάδα ελέγχου στην οποία έγινε χορήγηση PEG WATER (30% PG, 10% αιθανόλη, 60% φυσιολογικός ορός). Η κάθε δόση χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε δύο ενέσεις (όγκου 200λ) ανά 2 ώρες. Μετά την δεύτερη χορήγηση έλαβαν χώρα οι δοκιμασίες Rotarod Performance test και Activity για να δειχθεί μια ενδεχόμενη διαφορά οφειλόμενη στη χορήγηση.

2.1.6.1 Δοκιμασία Activity

Το activity είναι ένα τεστ αξιολόγησης της κινητικής δραστηριότητας των τρωκτικών. Πραγματοποιείται σε μία τετράγωνη σκεπασμένη συσκευή (activity box) στο εσωτερικό της οποίας υπάρχει στη βάση της μία σκάρα από μεταλλικές παράλληλες ρίγες (εικόνα 17). Οι ρίγες αυτές διαθέτουν αισθητήρες οι οποίοι ενεργοποιούνται με τα πατήματα των ποντικών. Έτσι, εισάγεται κάθε φορά ένα ποντίκι, αφήνεται για διάστημα ίσο με δέκα λεπτά και καταμετρώνται αυτόματα από τη συσκευή τα βήματα που έλαβαν χώρα. Πριν από την μέρα της πειραματικής διαδικασίας προηγήθηκαν δύο μέρες «εξοικείωσης» στόχος των οποίων είναι να

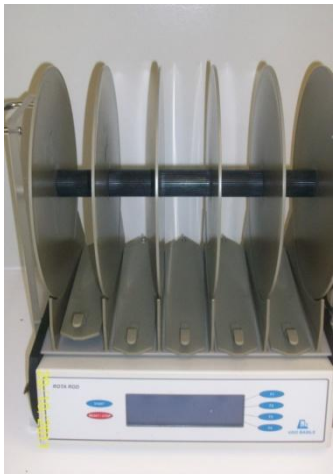
συνηθίσει το ποντίκι το περιβάλλον που προσφέρεται από το activity box, να ξεπεράσει δηλαδή την τάση για εξερεύνηση του περιβάλλοντος έτσι ώστε να είμαστε σίγουροι ότι η μέτρηση που παίρνουμε οφείλεται στην χορήγηση της εκάστοτε ουσίας (στην περίπτωσή μας BRF). Έτσι λοιπόν, μετά την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του BRF, προσμετρήθηκε ο αριθμός των βημάτων που εκτελέστηκαν.

Εικόνα 17

Στην εικόνα 17 παρουσιάζεται το activity box. Διακρίνονται οι ρίγες που διαθέτουν αισθητήρες οι οποίοι ενεργοποιούνται με τα πατήματα των ποντικών και κατ' αυτόν τον τρόπο αξιολογείται η δραστηριότητα των ποντικών.

2.1.6.2. Rotarod Performance test

Το τεστ αυτό συνίσταται στην περιστροφική κίνηση ενός οριζόντιου άξονα κυλινδρικού σχήματος (ρότορας) πάνω στον οποίο τοποθετούνται τα ποντίκια και «αναγκάζονται» να κινηθούν. Ο περιστρεφόμενος αυτός άξονας βρίσκεται αρκετά χαμηλά ώστε να μη προκαλείται ενδεχόμενο τραύμα στα ποντίκια κατά την πτώση τους αλλά αρκετά ψηλά για να επάγει την αποφυγή της πτώσης. Έτσι τα ποντίκια φυσικά, προσπαθούν να παραμείνουν πάνω στην περιστρεφόμενη ράβδο και να αποφύγουν την πτώση (εικόνες 18-19). Με τη πάροδο του χρόνου, επιταχύνεται η περιστροφή του άξονα γεγονός που αυξάνει κλιμακωτά την δυσκολία εκτέλεσης του συγκεκριμένου τεστ. Η διάρκεια παραμονής των ζώων στο συγκεκριμένο τεστ είναι ένα μέτρο αξιολόγησης της ισορροπίας, της αρμονικής λειτουργίας και κίνησης των άκρων, και της φυσικής κατάστασης. Η εκτέλεση του συγκεκριμένου τεστ έγινε δύο φορές (δύο μετρήσεις) μετά τις ενδοπεριτοναϊκές χορηγήσεις (BRF-PEG WATER) και τα αποτελέσματα που προκύπτουν αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο των δύο προσπαθειών. Πριν από τις δύο μετρήσεις πραγματοποιείται μία πρωταρχική μέτρηση που δεν λαμβάνεται υπ' όψιν γιατί θεωρείται εκπαίδευση. Οι μετρήσεις αφορούν το χρονικό διάστημα σε δευτερόλεπτα που κατάφερε το κάθε ποντίκι να παραμείνει στον επιταχυνόμενο περιστροφικό κύλινδρο.



Εικόνες 18,19
Εδώ παρουσιάζεται η συσκευή του Rotarod Performance test.

2.2 Μελέτη κινητικότητας στον νηματώδη C. Elegans

Στο **δεύτερο σκέλος** της εργασίας αυτής μελετήθηκε η κινητικότητα σε έναν δεύτερο οργανισμό-μοντέλο, τον νηματώδη C. elegans. Χρησιμοποιήθηκαν οκτώ νηματώδεις αγρίου τύπου (N2) και άλλοι οκτώ knock out νηματώδεις (DN20) για το γονίδιο του nhr6 (το ορθόλογο του Nurr1). Περίπου μισή ώρα πριν την πραγματοποίηση του πειράματος οι νηματώδεις μεταφέρθηκαν σε πιάτα στα οποία απουσίαζε τροφή. Μετρήθηκε μέσω πεντάλεπτης βιντεοσκόπησης (και μετέπειτα ανάλυσης με το πρόγραμμα EthoVision XT) η κινητικότητα των N2 και των DN20 νηματώδων. Η κινητικότητα προσδιορίζεται με βάση την συνολική απόσταση που διένυσαν εντός του πεντάλεπτου καθώς και με βάση την γωνία των μαιάνδρων που λαμβάνουν χώρα κατά τη χαρακτηριστική κίνηση των συγκεκριμένων σκουληκιών. Οι παράμετροι αυτές υπολογίζονται αυτόματα μέσω του προγράμματος EthoVision XT και υφίστανται επεξεργασία μέσω του Excel.

2.2.1 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος για το C. Elegans

Αξίζει να σημειώσουμε ότι τα σκουλήκια ζουν και κινούνται βρισκόμενα μέσα σε τρυβλία petri τα οποία περιέχουν το κατάλληλο υπόστρωμα. Το υπόστρωμα είναι ένα ζελατινώδους υφής υλικό το οποίο «στρώνεται» στα τρυβλία και προσφέρει τις κατάλληλες συνθήκες ζωής και συντήρησης των σκουληκιών. Πιο συγκεκριμένα, για την Παρασκευή 1L του υποστρώματος (που για χάριν ευκολίας το αποκαλούμε Άγαρ) απαιτείται η τήρηση της ακόλουθης αναλογίας υλικών :

- 3 gr άλατος NaCl (Aplichem)
- 17 gr Agar/πολυσακχαρίτης (Appplichem)
- 5 gr tryptone/ποικιλία αμινοξέων (Scharlau)
- 1000 ml απιονισμένο νερό

Τα υλικά αυτά τοποθετούνται σε γυάλινο δοχείο, αναδεύονται και υφίστανται αποστείρωση (διαδικασία που προκαλεί την πήξη τους) για να σιγουρευτούμε ότι θα θανατωθούν πιθανά παθογόνα που μπορεί να λάβουν χώρα κατά την παρασκευή του διαλύματος. Μετά την αποστείρωση ακολουθεί θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για να υγροποιηθεί το στερεό πλέον θρεπτικό υλικό. Όταν υγροποιηθεί προστίθενται από 500λ των διαλυμάτων ($MgSO_4$ 1M, $CaCl_2$ 0,1M.

Cholesterol/Ethanol 50mg/ml) και το διάλυμα είναι πλέον έτοιμο να διανεμηθεί σε τρυβλία petri. Σε κάθε τρυβλίο τοποθετούνται περίπου 20ml διαλύματος. Κατ αυτόν τον τρόπο παρέχονται οι απαραίτητες συνθήκες (θρεπτικά στοιχεία, ph, υγρασία) που απαιτούνται για τη ζωή, την κίνηση και την συντήρηση του C. elegans.

Πέραν του θρεπτικού υλικού που μόλις προαναφέρθηκε (Άγαρ) απαραίτητα για τη ζωή και ανάπτυξη των σκουληκιών είναι και η κατανάλωση συγκεκριμένων βακτηρίων του E. coli (του στελέχους OP50) για τα οποία απαιτούνται τα ακόλουθα:

1) Καλλιέργειά τους (overnight) σε θρεπτικό υλικό βακτηριών (LB) της ακόλουθης αναλογίας :

- 10 gr NaCl
- 5 gr yeast extract (Scharlau)
- 10 gr tryptone/ποικιλία αμινοξέων

} για παρασκευή 1L LB

2) Φυγοκέντρισή τους στα 2000 rpm και απομάκρυνση του υπερκειμένου

3) Διάλυση του ιζήματος των βακτηρίων με 12 ml από to Buffer S αποτελούμενο από:

- 5.8 gr NaCl
- 1 gr K_2HPO_4 (Biochemica)
- 6 gr KH_2PO_4 (Biochemica)

} τα οποία διαλύονται σε 1L απιονισμένου νερού

Από το διάλυμα των βακτηρίων (βακτηριακή τροφή σκουληκιών) που παρασκευάζεται τοποθετούνται από 500λ σε καθένα τρυβλίο. Κατόπιν τα τρυβλία επωάζονται overnight σε ειδικό κλίβανο στους 37°C. Έπειτα από τις παραπάνω διαδικασίες είναι έτοιμα για να δεχθούν σκουλήκια (μετά από μεταφορά τους από άλλα τρυβλία) τα οποία είναι ικανά αναπτυχτούν και να αναπαραχθούν για μερικές μέρες (7-10 μέρες) πριν την επόμενη μεταφορά τους.

2.2.2 Μελέτη της δράσης της ουσίας XCT στο σκουλήκι

Μετρήθηκε η αναπαραγωγική ικανότητα των σκουληκιών αγρίου τύπου (N2) και των knock out σκουληκιών (DN20) για το γονίδιο του nhr6 (το ορθόλογο του Nurr1) παρουσία και απουσία της ουσίας XCT. Πιο συγκεκριμένα τοποθετήθηκαν σε τέσσερα 12-well plates από 12 σκουλήκια αγρίου τύπου σε κάθε πιάτο, απουσία XCT. Μεταφέρονταν ανά ημέρα σε διαφορετικό πηγάδι και μετριόνταν ο αριθμός των αυγών που άφηναν τα μητρικά σκουλήκια. Η ίδια διαδικασία επαναλήφτηκε παράλληλα με σκουλήκια αγρίου τύπου παρουσία XCT (τόσο στο άγαρ όσο και στη βακτηριακή τροφή των νηματώδων σε συγκέντρωση 12,5 μM) και με knock out σκουλήκια για το γονίδιο του nhr6 παρουσία και απουσία XCT (ίδιας συγκέντρωσης με προηγουμένως). Έτσι μετά από περίπου τέσσερεις μέρες (όσο διαρκεί η αναπαραγωγική δυναμική των σκουληκιών) μετρήθηκε ο συνολικός αριθμός των αυγών ανά σκουλήκι (N2 ή DN20) και ανά συνθήκη (παρουσία ή απουσία XCT).

3 Αποτελέσματα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ημίζυγα ποντίκια (του στελέχους 129sv) για το γονίδιο Nurr1, δηλαδή ποντίκια που στο γένωμά τους υπάρχει ένα μόνο αντίγραφο του Nurr1 και ποντίκια αγρίου τύπου (ποντίκια wild type). Όλα τα ποντίκια υποβλήθηκαν σε συμπεριφορικά test σχεδιασμένα έτσι ώστε να αξιολογούν την ντοπαμινεργική τους λειτουργία και την κινητικότητά τους.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες ποντικών η ομάδα των ημίζυγων ποντικών για το γονίδιο Nurr 1 (πειραματική ομάδα Nurr1 +/- ποντίκια) και η ομάδα με τα ποντίκια αγρίου τύπου (ομάδα ελέγχου, Nurr1 +/+ ποντίκια). Στον πίνακα 2, ο οποίος παρατίθεται καταγράφονται στοιχεία σχετικά με την ημερομηνία γέννησης των ποντικών, τη γενιά, το φύλο, το μαρκάρισμα και τον γενότυπό τους.

Πινακας 2

Ηλικία	Γενιά	Φύλο	Μαρκάρισμα	Γενότυπος	
16 μηνών	NN9	Θυλ.	BR3	ΗΜΙΖΥΓΟ	Nurr1 +/-
16 μηνών	Nm2	Θυλ.	BR5	ΗΜΙΖΥΓΟ	Nurr1 +/-
16 μηνών	Nm4	Θυλ.	BR3	ΗΜΙΖΥΓΟ	Nurr1 +/-
16 μηνών	Nm7	Θυλ.	BL5	ΗΜΙΖΥΓΟ	Nurr 1 +/-
16 μηνών	Nm1	Αρσ..	BR5	ΗΜΙΖΥΓΟ	Nurr1 +/-
16 μηνών	Nm6	Αρσ.	BL5	ΗΜΙΖΥΓΟ	Nurr1 +/-
16 μηνών	Nm5	Αρσ..	BR4	ΗΜΙΖΥΓΟ	Nurr1 +/-
16 μηνών	Nn3	Αρσ.	BR3	ΑΓΡ. ΤΥΠΟΥ	Nurr 1 +/+
16 μηνών	Nn6	Αρσ.	BL5	ΗΜΙΖΥΓΟ	Nurr1 +/-
16 μηνών	Nn7	Αρσ.	BL2	ΑΓΡ. ΤΥΠΟΥ	Nurr 1 +/+
16 μηνών	Nn10	Αρσ.	BL3	ΑΓΡ. ΤΥΠΟΥ	Nurr 1 +/+
16 μηνών	Nn12	Αρσ.	BL4	ΑΓΡ. ΤΥΠΟΥ	Nurr 1 +/+
16 μηνών	Nn13	Αρσ.	NM	ΑΓΡ. ΤΥΠΟΥ	Nurr 1 +/+
16 μηνών	Nn5	Αρσ.	BR4	ΗΜΙΖΥΓΟ	Nurr1 +/-
16 μηνών	Nn1	Θυλ.	BR5-3	ΗΜΙΖΥΓΟ	Nurr1 +/-
16 μηνών	Nn2	Θυλ.	BR2	ΑΓΡ. ΤΥΠΟΥ	Nurr 1 +/+
16 μηνών	Nn4	Θυλ.	BR5	ΗΜΙΖΥΓΟ	Nurr1 +/-
16 μηνών	Nn8	Θυλ.	BL5	ΗΜΙΖΥΓΟ	Nurr1 +/-
16 μηνών	Nn11	Θυλ.	BL3	ΗΜΙΖΥΓΟ	Nurr1 +/-
16 μηνών	129sv	Θυλ.	NM	ΑΓΡ. ΤΥΠΟΥ	Nurr 1 +/+

3.1 Συμπεριφορικά τεστ

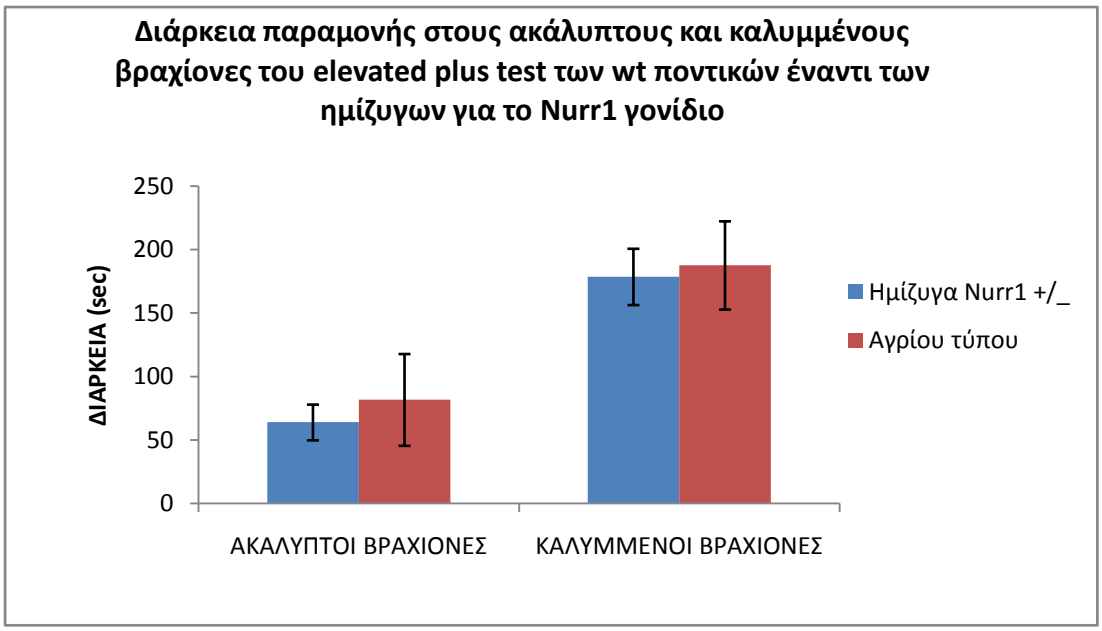
Τα συμπεριφορικά τεστ που έλαβαν χώρα στις δύο ομάδες ποντικών (στα ημίζυγα και στα αγρίου τύπου) όταν βρίσκονταν σε ηλικία 16 μηνών είναι τα ακόλουθα

- Elevated plus test
- Pole test
- Beam test
- Rearing
- Τεστ μέτρησης κινητικότητας των ποντικών πριν και μετά από χορήγηση Αμφεταμίνης

Όλα εκτός του πρώτου τεστ είναι ειδικά σχεδιασμένα τεστ για να καταδεικνύουν ντοπαμινεργική λειτουργία. Επομένως είναι πολύ ενδιαφέρον να δούμε κατά πόσον υπάρχει διαφορά στις επιδόσεις των ποντικών των δύο διαφορετικών ομάδων στα αναγραφόμενα τέστ.

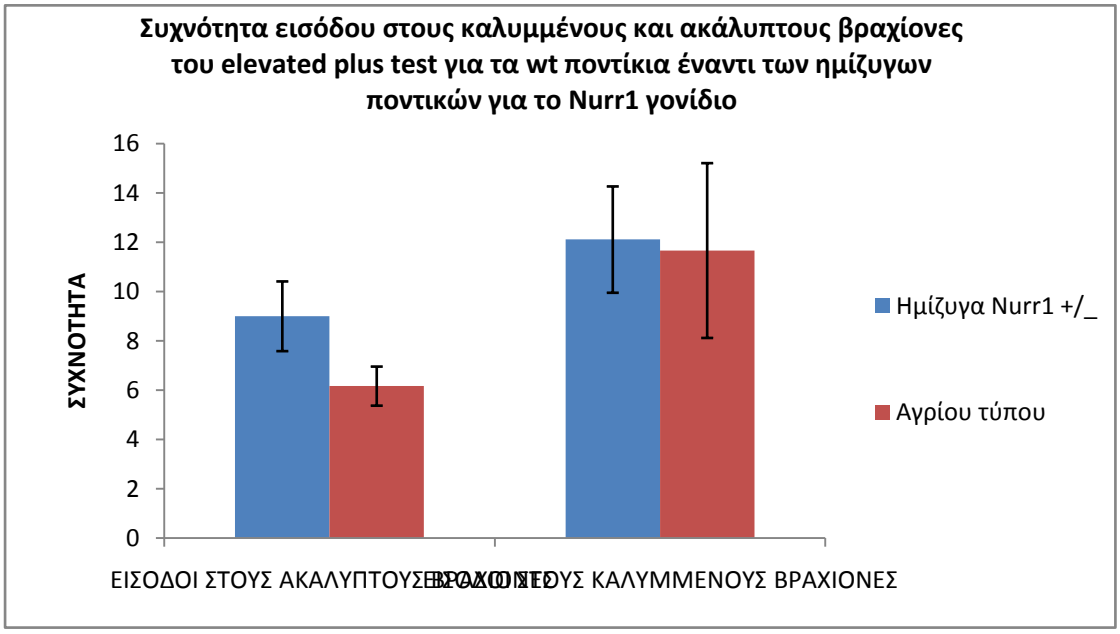
3.1.1 Elevated plus test

Αρχικά έλαβε χώρα το elevated plus test το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό του άγχους που ενδεχομένως παρουσιάζουν τα πειραματόζωα που υπόκεινται σε τεστ συμπεριφοράς (ποντίκια-αρουραίοι). Πιο συγκεκριμένα, το τεστ αυτό προσεγγίζει την αναλογία του άγχους που μπορεί να παρουσιάσουν τα τρωκτικά (όντας στους καλυμμένους- ασφαλείς βραχίονες) έναντι της διάθεσης για εξερεύνησης που προσδιορίζεται από την παρουσία τους στους ακάλυπτους χώρους. Αναλυτικότερα, όταν τα ποντίκια είναι αγχωμένα, έχουν μια φυσική τάση να προτιμούν κλειστούς σκοτεινούς χώρους που προσφέρονται από τους καλυμμένους βραχίονες, διαφορετικά έχουν αυξημένη διάθεση για εξερεύνηση που προσφέρεται από τους ακάλυπτους βραχίονες. Στην περίπτωσή μας χρησιμοποιήθηκε για να ταυτοποιηθεί αν υπάρχει ένας αγχώδης φαινότυπος στα ημίζυγα ποντίκια έναντι των ποντικών αγρίου τύπου. Ένας πιθανός αγχώδης φαινότυπος στα ημίζυγα ποντίκια έπρεπε να ταυτοποιηθεί και να συνυπολογιστεί σε όλα τα συμπεριφορικά που πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια. Ακολουθούν τα γραφήματα που αξιολογούν την ύπαρξη ή όχι άγχους στα πειραματόζωα η οποία προσδιορίζεται από την τάση τους να προτιμούν κλειστούς σκοτεινούς χώρους που προσφέρονται από τους καλυμμένους βραχίονες.



Γράφημα 1

Το γράφημα προκύπτει από τις σωστά ολοκληρωμένες προσπάθειες των 6 από τα 7 ποντίκια αγρίου τύπου (wt) και των 9 από τα 13 ημίζυγα για το γονίδιο Nurr1 ποντίκια (Nurr1+/-).



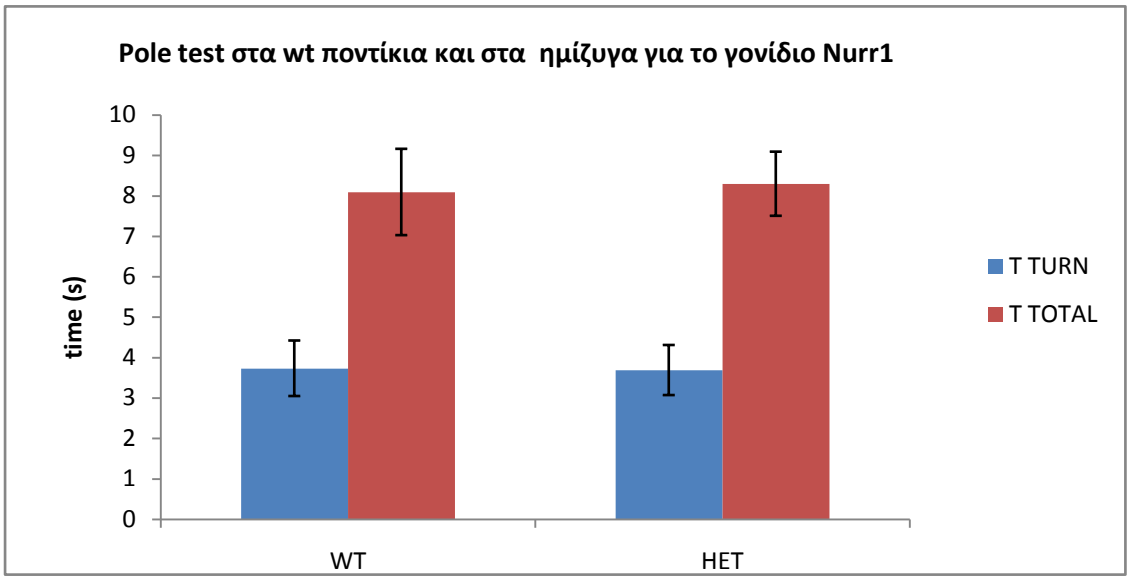
Γράφημα 2

Το γράφημα προκύπτει από τις σωστά ολοκληρωμένες προσπάθειες των 6 από τα 7 ποντίκια αγρίου τύπου (wt) και των 9 από τα 13 ημίζυγα για το γονίδιο Nurr1 ποντίκια (Nurr1+/-) και αναφέρεται στην συχνότητα εισόδου των ποντικών στους καλυμμένους και ακάλυπτους βραχίονες του elevated plus test.

Τα αποτελέσματα των παραπάνω γραφημάτων δεν συνοδεύονται από στατιστική σημαντικότητα. Ωστόσο, φαίνεται ότι δεν υπάρχει αγχώδης φαινότυπος μεταξύ πειραματικής ομάδας (Ημίζυγα ποντίκια) και ομάδας ελέγχου(Ποντίκια αγρίου τύπου).

3.1.2 Pole test

Το συγκεκριμένο τεστ έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για να αξιολογηθεί η κινητική δραστηριότητα των ποντικών-μοντέλων του Parkinson και έλαβε χώρα με σκοπό να συγκριθούν οι επιδόσεις των δύο ομάδων ποντικών.



Γράφημα 3

Το γράφημα 3 προκύπτει από τις προσπάθειες 7 ποντικών αγρίου τύπου (wt) και 13 ποντικών ημίζυγων για το γονίδιο Nurr1 (Nurr1+/-). Το καθένα απ τα ποντίκια αυτά εκτέλεσε τη δοκιμασία πέντε φορές και το γράφημα προκύπτει από τον μέσο όρο των πέντε προσπαθειών για την κάθε ομάδα ποντικών. Μετριέται ο χρόνος που απαιτείται από κάθε ποντίκι για να κάνει μια περιστροφή 180 ^{0} (T turn) και ο συνολικός χρόνος που απαιτείται από τη αρχή και ως το πέρας της προσπάθειας (T total).

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας αυτής δεν συνοδεύονται από στατιστική σημαντικότητα και δεν δείχνουν να υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ποντικών.

3.1.3 Beam test

Το beam test (Challenging Beam Traversal), έχει αποδειχθεί επιτυχής προσέγγιση για την ανίχνευση κινητικών ανωμαλιών σε διαγονιδιακά ποντίκια-μοντέλα της νόσου της Parkinson γι αυτό και χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Υποβλήθηκαν στη συγκεκριμένη διαδικασία και οι δύο ομάδες ποντικών με σκοπό να διερευνηθεί μια ενδεχόμενη κινητική δυσλειτουργία στα ημίζυγα ποντίκια για το γονίδιο Nurr1. Το beam test συνίσταται στη αξιολόγηση τριών παραμέτρων. Οι παράμετροι αυτές αφορούν:

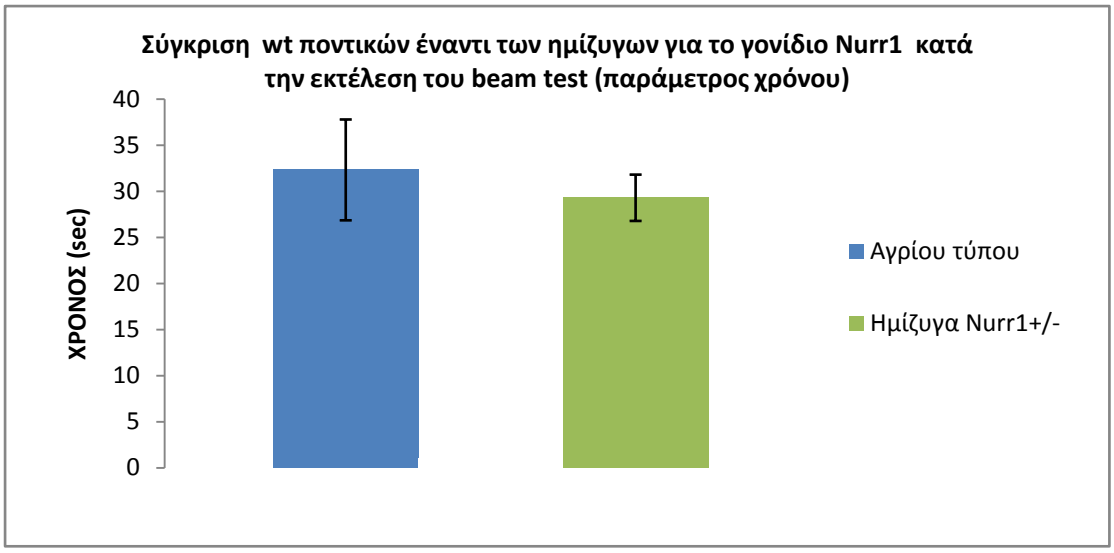
1) στον χρόνο που απαιτείται ώστε τα ποντίκια να ολοκληρώσουν την βάδιση σε μια στενή δοκό στην οποία έχει τοποθετηθεί πλέγμα

2) στον αριθμό των βημάτων τους

3) στην επίδοσή τους, η οποία προσδιορίζεται από το πηλίκο :

αριθμός λάθος βημάτων/συνολικός αριθμός βημάτων

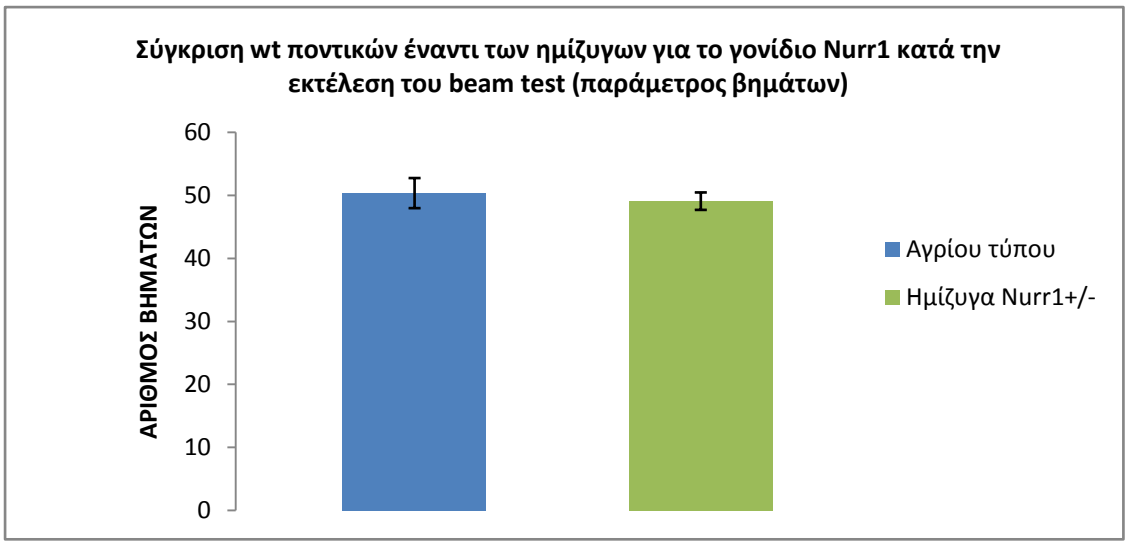
Παράμετρος χρόνου



Γράφημα 4

Το γράφημα 4 περιγράφει τον χρόνο στον οποίο τα ποντίκια ολοκλήρωσαν το beam test. Συμμετείχαν 7 ποντίκια αγρίου τύπου (wt) και 13 ποντίκια ημίζυγα για το γονίδιο Nurr1 (Nurr1+/-).Το καθένα απ τα ποντίκια αυτά εκτέλεσε τη δοκιμασία πέντε φορές και το γράφημα προκύπτει από τον μέσο όρο των πέντε προσπαθειών για την κάθε ομάδα ποντικών. Μετριέται ο χρόνος που απαιτείται από το κάθε ποντίκι ώστε να ολοκληρώσει την βάδιση σε μια στενή δοκό στην επιφάνεια της οποίας έχει τοποθετηθεί ειδικό πλέγμα.

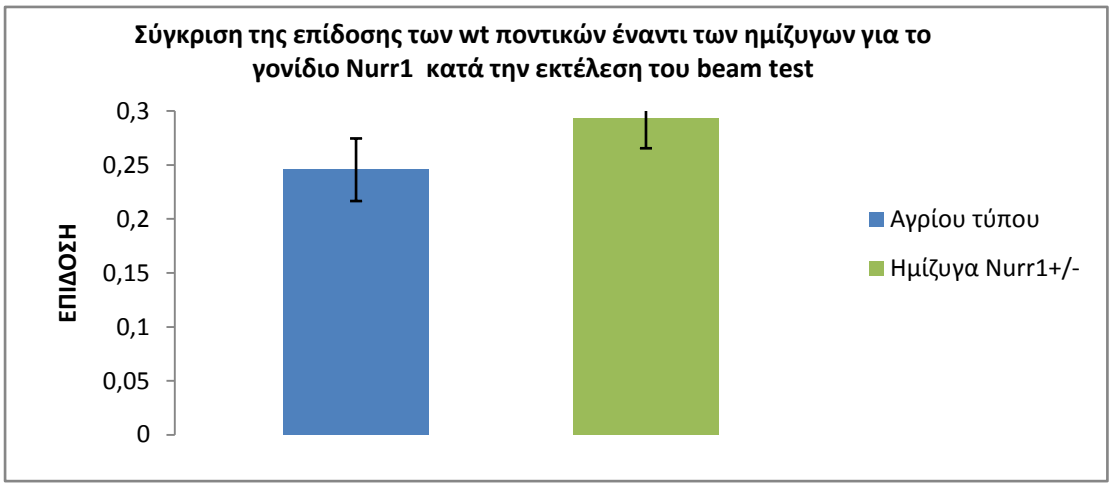
Παράμετρος βημάτων



Γράφημα 5

Το γράφημα 5 περιγράφει τον συνολικό αριθμό των βημάτων των ποντικών κατά την βάδισή τους στην στενή δοκό. Συμμετείχαν και πάλι 7 ποντίκια αγρίου τύπου (wt) και 13 ποντίκια ημίζυγα για το γονίδιο Nurr1 (Nurr1+/-).Το καθένα απ τα ποντίκια αυτά εκτέλεσε τη δοκιμασία πέντε φορές και το γράφημα προκύπτει από τον μέσο όρο των πέντε προσπαθειών για την κάθε ομάδα ποντικών.

Παράμετρος επίδοσης



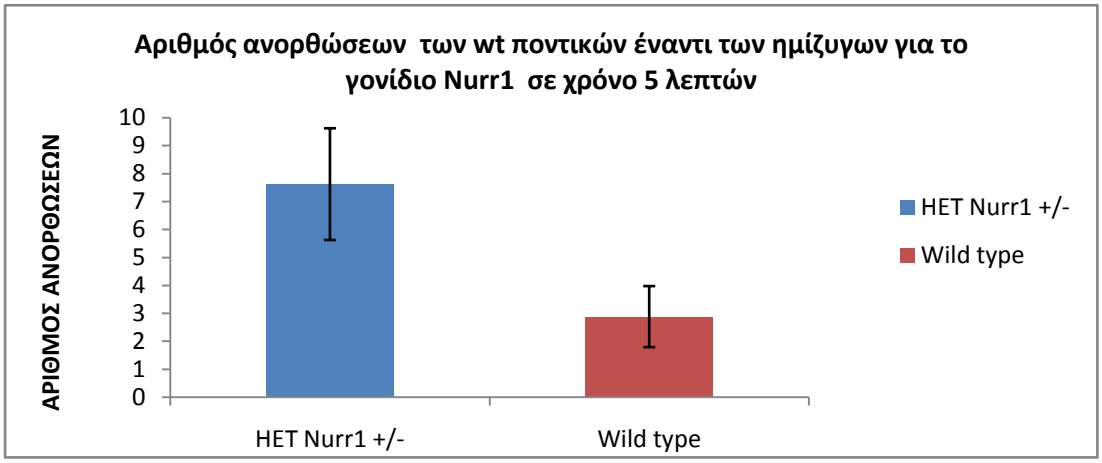
Γράφημα 6

Το γράφημα 6 περιγράφει την επίδοση των ποντικών κατά την εκτέλεση του Beam test. Η επίδοσή τους προσδιορίζεται από το πηλίκο του αριθμού των λάθος βημάτων προς τον συνολικό αριθμό των βημάτων τους. Συμμετείχαν 7 ποντίκια αγρίου τύπου (wt) και 13 ποντίκια ημίζυγα για το γονίδιο Nurr1 (Nurr1+/-) .Το καθένα απ τα ποντίκια αυτά εκτέλεσε τη δοκιμασία πέντε φορές και το γράφημα προκύπτει από τον μέσο όρο των πέντε προσπαθειών για την κάθε ομάδα ποντικών.

Από τα αποτελέσματα του Beam test στα οποία δεν σημειώθηκε στατιστική σημαντικότητα δεν φαίνεται να υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ποντικών.

3.1.4 Rearing (Αριθμός ανορθώσεων των ποντικών)

Το rearing είναι και αυτό ένα τεστ που καταδεικνύει την ντοπαμινεργική λειτουργία και συνίσταται στην μέτρηση των ανορθώσεων (ανόρθωση και στάση στα δύο πίσω πόδια) που κάνουν τα ποντίκια, βρισκόμενο μέσα σε ένα πλαστικό διαφανές κυλινδρικό δοχείο.



Γράφημα 7

Το γράφημα 7 περιγράφει τον αριθμό των ανορθώσεων 13 ποντικών αγρίου τύπου και 7 ημίζυγων για το γονίδιο Nurr 1 (Nurr1+/-). Κάθε ποντίκι αφέθηκε σε κυλινδρικό διαφανές πλαστικό δοχείο και παρατηρήθηκε ο συνολικός αριθμός ανορθώσεών του (ανόρθωση και στάση στα δύο πίσω πόδια) για χρονικό διάστημα πέντε λεπτών. Το γράφημα προκύπτει από τον μέσο όρο των ανορθώσεων των ποντικών της κάθε ομάδας.

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας rearing δεν έδειξαν στατιστική σημαντικότητα αν και φάνηκε να υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ποντικών.

3.1.5 Τεστ μέτρησης κινητικότητας πριν και μετά από χορήγηση αμφεταμίνης

Η χορήγηση αμφεταμίνης προκαλεί μια υπερδιέγερση της λειτουργίας του ντοπαμινεργικού συστήματος. Στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκε η δράση της αμφεταμίνης στις δύο ομάδες ποντικών. Τόσο τα ποντίκια αγρίου τύπου όσο και τα ημίζυγα ποντίκια για το Nurr1 γονίδιο τοποθετήθηκαν σε διαφανή πλαστικό κλωβό και βιντεοσκοπήθηκαν με σκοπό να μετρηθεί η κινητικότητα τους πριν και μετά την χορήγηση αμφεταμίνης/φυσιολογικού ορού. Πιο συγκεκριμένα στον Πίνακα 3 που ακολουθεί καταγράφονται επ' ακριβώς οι γενότυποι των ποντικών, τα βάρη τους και το είδος της χορήγησης που πραγματοποιήθηκε.

Πινακας 3

ΓΕΝΙΑ	ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ	ΒΑΡΟΣ	ΧΟΡΗΓΗΣΗ
NM6	ΥΜΙΖΥΓΟ Nurr1 +/-	41 gr	ΑΜΦΕΤΑΜΙΝΗ
NM4	ΥΜΙΖΥΓΟ Nurr1 +/-	26 gr	ΑΜΦΕΤΑΜΙΝΗ
NN1	ΥΜΙΖΥΓΟ Nurr1 +/-	30 gr	ΑΜΦΕΤΑΜΙΝΗ
NN2	ΥΜΙΖΥΓΟ Nurr1 +/-	30 gr	ΑΜΦΕΤΑΜΙΝΗ
NM5	ΥΜΙΖΥΓΟ Nurr1 +/-	28 gr	ΑΜΦΕΤΑΜΙΝΗ
NN8	ΥΜΙΖΥΓΟ Nurr1 +/-	31 gr	ΑΜΦΕΤΑΜΙΝΗ
NN7	ΥΜΙΖΥΓΟ Nurr1 +/-	29 gr	ΑΜΦΕΤΑΜΙΝΗ
NN3	ΑΓΡ. ΤΥΠΟΥ Nurr1 +/+	36 gr	ΑΜΦΕΤΑΜΙΝΗ
129SV	ΑΓΡ. ΤΥΠΟΥNurr1 +/+	33 gr	ΑΜΦΕΤΑΜΙΝΗ
NN13	ΑΓΡ. ΤΥΠΟΥ Nurr1 +/+	34 gr	ΑΜΦΕΤΑΜΙΝΗ
NN2	ΑΓΡ. ΤΥΠΟΥ Nurr1 +/+	30 gr	ΑΜΦΕΤΑΜΙΝΗ
NN6	ΥΜΙΖΥΓΟ Nurr1 +/+	31 gr	ΦΥΣΙΟΛ. ΟΡΟΣ
NN9	ΥΜΙΖΥΓΟ Nurr1 +/-	31 gr	ΦΥΣΙΟΛ. ΟΡΟΣ
NM1	ΥΜΙΖΥΓΟ Nurr1 +/-	26 gr	ΦΥΣΙΟΛ. ΟΡΟΣ
NM5	ΥΜΙΖΥΓΟ Nurr1 +/-	38 gr	ΦΥΣΙΟΛ. ΟΡΟΣ
NM2	ΥΜΙΖΥΓΟ Nurr1 +/-	25 gr	ΦΥΣΙΟΛ. ΟΡΟΣ
NM7	ΥΜΙΖΥΓΟ Nurr1 +/-	36 gr	ΦΥΣΙΟΛ. ΟΡΟΣ
NN11	ΑΓΡ. ΤΥΠΟΥ Nurr1 +/+	29 gr	ΦΥΣΙΟΛ. ΟΡΟΣ
NN10	ΑΓΡ. ΤΥΠΟΥ Nurr1 +/+	34 gr	ΦΥΣΙΟΛ. ΟΡΟΣ
NN12	ΑΓΡ. ΤΥΠΟΥ Nurr1 +/+	34 gr	ΦΥΣΙΟΛ. ΟΡΟΣ

Κατ αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται τέσσερεις ομάδες σύγκρισης της κινητικότητας οι οποίες είναι οι ακόλουθες :

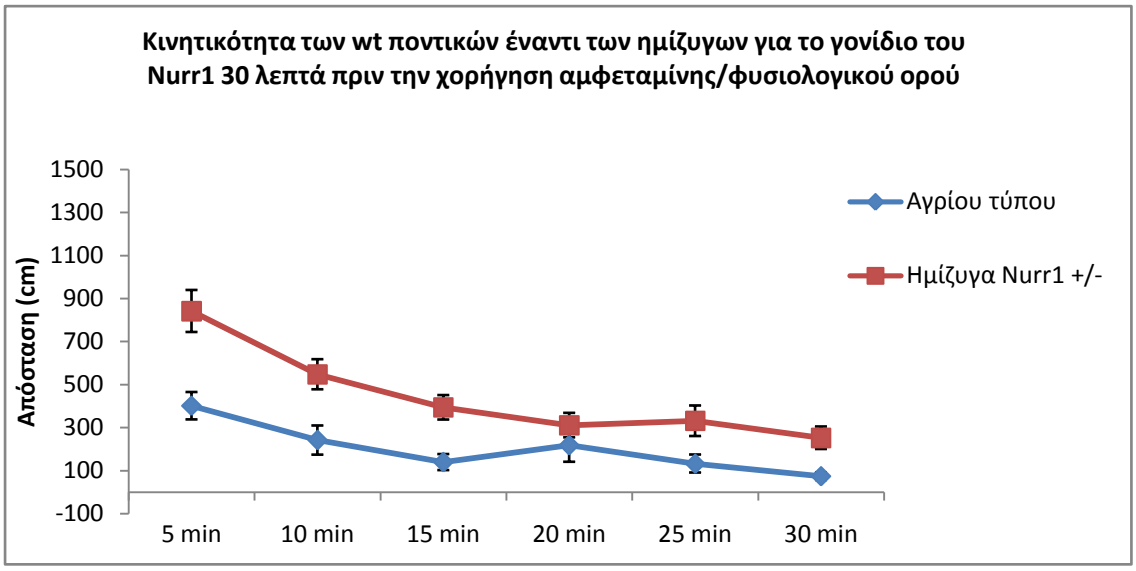
1)Ποντίκια ημίζυγα για το Nurr1 γονίδιο (Nurr1+/-) στα οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός.

2) Ποντίκια ημίζυγα για το Nurr1 γονίδιο (Nurr1+/-) στα οποία χορηγήθηκε αμφεταμίνη.

3) Ποντίκια αγρίου τύπου (wt, Nurr1+/+) στα οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός.

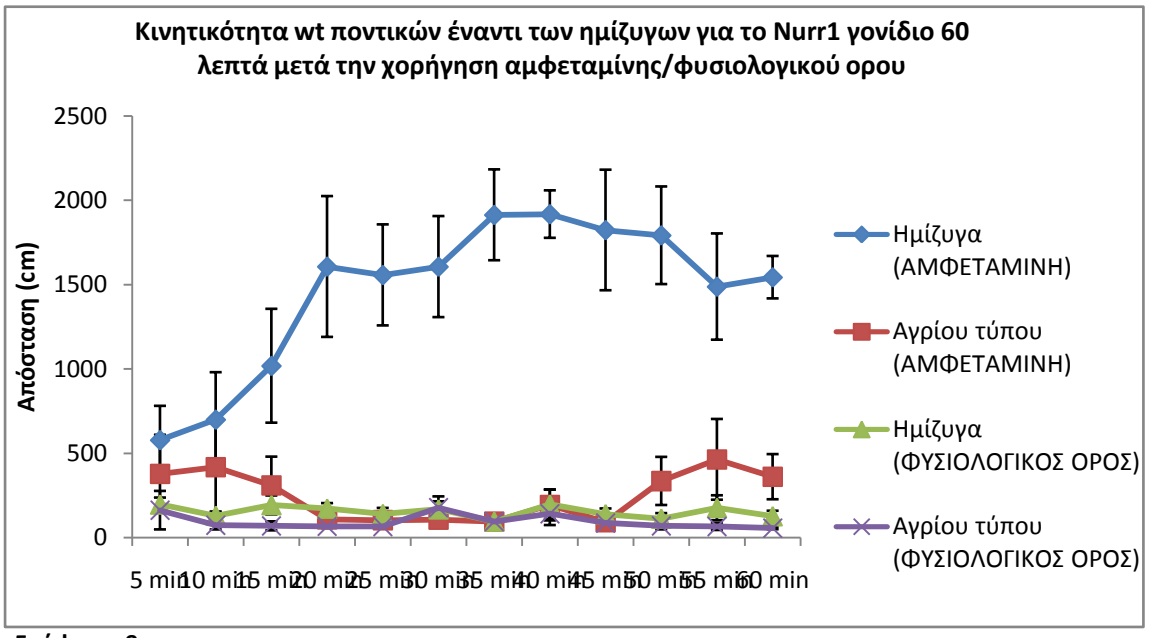
4) Ποντίκια αγρίου τύπου (wt, Nurr1+/+) στα οποία χορηγήθηκε αμφεταμίνη.

Ακολουθούν τα διαγράμματα κινητικότητας για τις παραπάνω ομάδες ποντικών πριν και μετά την χορήγηση αμφεταμίνης/φυσιολογικού ορού.



Γράφημα 8

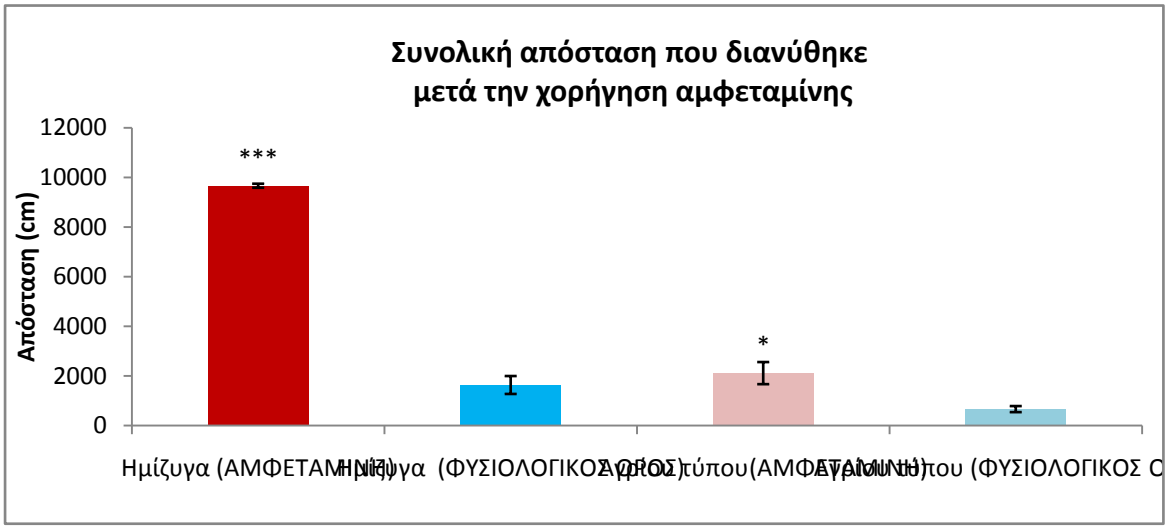
Το γράφημα 8 αναφέρεται στην κινητικότητα των ποντικών αγρίου τύπου έναντι των ημίζυγων για το γονίδιο Nurr1. Προσδιορίζεται το διάστημα που διένυσαν ανά πεντάλεπτο 30 λεπτά πριν χορηγηθεί αμφεταμίνη ή φυσιολογικός ορός .Προκύπτει από τον μέσο όρο της κινητικότητας 7 ποντικών αγρίου τύπου και 13 ημίζυγων ποντικών.



Γράφημα 9

Το γράφημα 9 αναφέρεται στην κινητικότητα των ποντικών αγρίου τύπου έναντι των ημίζυγων για το γονίδιο Nurr1, συναρτήσει της χορήγησης άλλοτε αμφεταμίνης και άλλοτε φυσιολογικού ορού. Προσδιορίζεται το διάστημα που διένυσαν τα ποντίκια ανά πεντάλεπτο 60 λεπτά ακριβώς μετά την χορήγηση αμφεταμίνης ή φυσιολογικού ορού. Το γράφημα προκύπτει από τον μέσο όρο των ποντικών που ανταποκρίθηκαν στην χορήγηση αμφεταμίνης τα οποία ήταν 4 ημίζυγα και 5 wt και από τον μέσο όρο των ποντικών που τους χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός τα οποία αριθμούσαν σε 7 ημίζυγα και 3 ποντίκια αγρίου τύπου.

Ολοκληρώνοντας το τεστ κινητικότητας, συνέκρινα την συνολική απόσταση που διανύθηκε από τις τέσσερεις ομάδες ποντικών μετά την χορήγηση αμφεταμίνης και υπολόγισα το ποσοστό αύξησης της απόστασης που διανύθηκε παρουσία αμφεταμίνης στις δύο ομάδες ποντικών (ποντίκια αγρίου τύπου/ημίζυγα ποντίκια για το γονίδιο Nurr1), τα οποία διαφαίνονται στα δύο ακόλουθα διαγράμματα.



Γράφημα 10

Το γράφημα 10 αναφέρεται στη συνολική απόσταση που διένυσαν τα ποντίκια αγρίου τύπου έναντι αυτής που διένυσαν τα ημίζυγα για το γονίδιο Nurr1, συναρτήσει της χορήγησης άλλοτε αμφεταμίνης και άλλοτε φυσιολογικού ορού, στα εξήντα λεπτά μετά την χορήγηση. Το γράφημα προκύπτει από τον μέσο όρο των ποντικών που ανταποκρίθηκαν στην χορήγηση αμφεταμίνης τα οποία ήταν 4 ημίζυγα και 5 wt και από τον μέσο όρο των ποντικών που τους χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός τα οποία αριθμούσαν σε 7 ημίζυγα και 3 ποντίκια αγρίου τύπου.

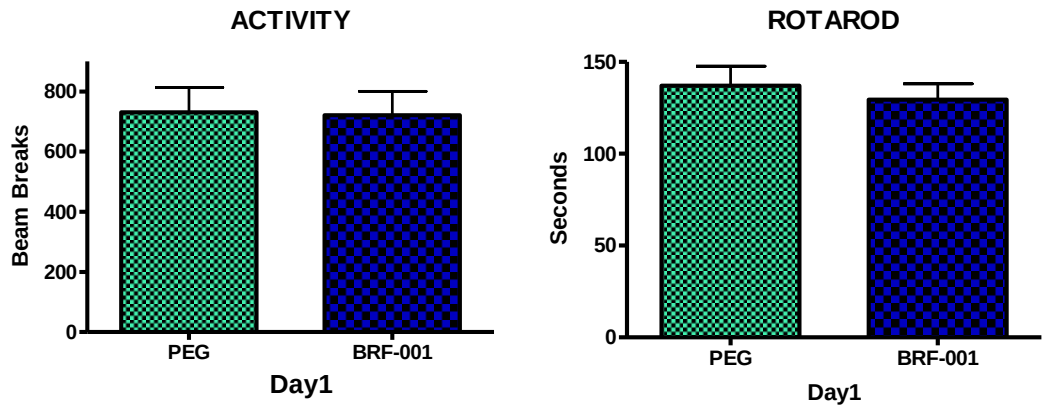
Γράφημα 11

Στο γράφημα 11 παρουσιάζεται το ποσοστό αύξησης της απόστασης που διανύθηκε από τα ημίζυγα για το γονίδιο Nurr1 ποντίκια έναντι των ποντικών αγρίου τύπου παρουσία αμφεταμίνης. Το γράφημα προκύπτει από τον μέσο όρο των ποντικών που ανταποκρίθηκαν στην χορήγηση αμφεταμίνης τα οποία ήταν 4 ημίζυγα και 5 wt.

Επομένως, κατά την δοκιμασία αυτή, δείχτηκε ότι τα ημίζυγα ποντίκια είναι περισσότερο υπερκινητικά τόσο πριν και πολύ περισσότερο μετά την χορήγηση αμφεταμίνης σε σχέση με τα ποντίκια αγρίου τύπου, αποτελέσματα που συνοδεύονται από στατιστική σημαντικότητα.

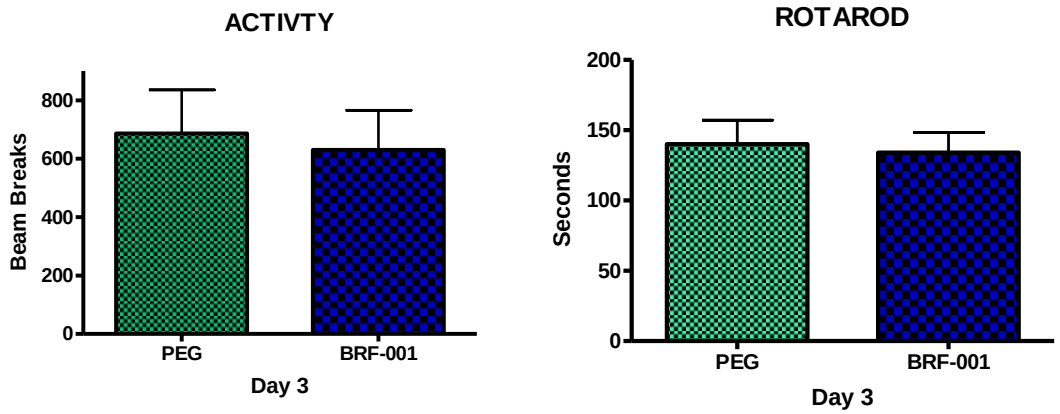
3.2 In vivo χορήγηση BRF-001 στα ποντίκια

Παράλληλα, έγινε χρήση ποντικών αγρίου τύπου στα οποία χορηγήθηκε η ουσία BRF-001. Η ουσία αυτή συντέθηκε στο εργαστήριό μας και δείχτηκε ότι ενεργοποιεί το Nurr1/RXR, διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και δεν μεταβολίζεται. Χορηγήθηκε λοιπόν BRF-001 στα ποντίκια αγρίου τύπου (πειραματική ομάδα) και PEG-WATER πάλι σε ποντίκια αγρίου τύπου(ομάδα ελέγχου) και εν συνεχεία έλαβαν χώρα τα συμπεριφορικά τεστ Activity και Rotarod. Έγιναν δύο διαδοχικές μετρήσεις των κινητικών δοκιμασιών δηλαδή το πείραμα επαναλήφθηκε για δεύτερη φορά, δύο μέρες μετά την πρώτη. Μετρήθηκε, αμέσως μετά την τελευταία ένεση, ο αριθμός των βημάτων τους σε διάστημα ενός δεκαλέπτου (avtivity) και ο χρόνος παραμονής τους στους κυλιόμενους κυλίνδρους (rotarod). Από τα παραπάνω προκύπτουν τα ακόλουθα:



Γράφημα 20

Στο γράφημα 20, αριστερά, συγκρίνεται ο αριθμός των βημάτων που εκτέλεσαν τα οκτώ ποντίκια αγρίου τύπου, συναρτήσει της χορήγησης PEG ή XCT, για διάστημα ενός δεκάλεπτου. Στη δεξιά πλευρά περιγράφεται ο χρόνος παραμονής των ίδιων ποντικών πάνω στους κυλιόμενους κυλίνδρους του Rotarod.



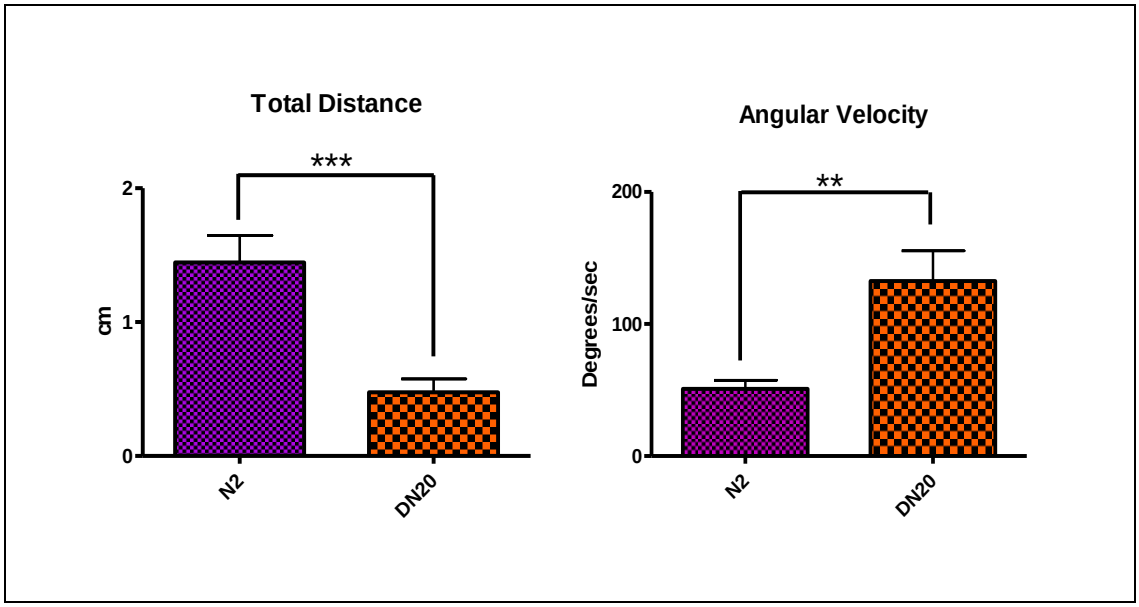
Γράφημα 21

Το γράφημα 21 παρουσιάζει ό,τι και το γράφημα 20 στο επαναληπτικό τεστ που έλαβε χώρα δυό μέρες μετά το πρώτο.

Από τα αποτελέσματα των συμπεριφορικών δοκιμασιών Activty και Rotarod φάνηκε πως δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ποντικών στα οποία χορηγήθηκε PEG και σε εκείνα που χορηγήθηκε BRF-001. Παρόλα αυτά, τα ποντίκια θυσιάστηκαν και ακολούθησε απομόνωση του ραβδωτού σώματος του μεσεγκεφάλου προκειμένου να ανιχνευτούν τα ποσά ντοπαμίνης που ανευρίσκονται εκεί. Τα αποτελέσματα αναμένονται

3.3 Μελέτη κινητικότητας στο σκουλήκι C. elegans.

Στο **δεύτερο σκέλος** της εργασίας αυτής μελετήθηκε ένας δεύτερος οργανισμός-μοντέλο, το σκουλήκι C. elegans. Μετρήθηκε μέσω πεντάλεπτης βιντεοσκόπησης (και μετέπειτα ανάλυσης με το πρόγραμμα Ethovision) η κινητικότητα των N2 (αγρίου τύπου) και των DN20 (Knock out για τι γονίδιο nhr-6) νηματώδων τα οποία βρίσκονταν στο υπότρωμά τους. Αξίζει να σημειώσουμε ότι η κινητικότητα προσδιορίζεται με βάση την συνολική απόσταση που διένυσαν εντός του πεντάλεπτου καθώς και με βάση την γωνία των μαιάνδρων που λαμβάνουν χώρα κατά τη χαρακτηριστική κίνηση των συγκεκριμένων σκουληκιών Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στο επόμενο γράφημα 26.

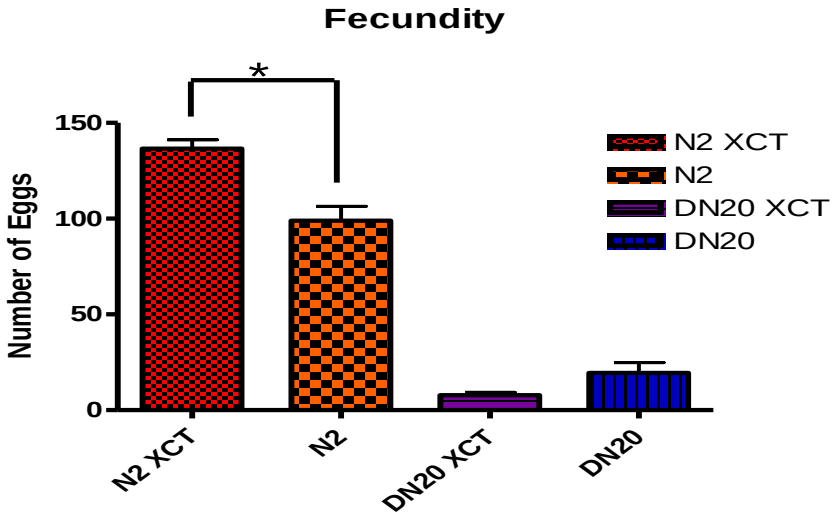


Γράφημα 26

Αριστερά, συγκρίνεται η γωνία των μαιάνδρων κατά την χαρακτηριστική κίνηση που εκτελεί το σκουλήκι C. elegans. Τα σκουλήκια αγρίου τύπου (N2) εκτελούν μικρότερη γωνία από την αντίστοιχη των Knock out για το Nurr1 γονίδιο σκουληκιών (DN20). Δεξιά βλέπουμε την συνολική απόσταση που διανύθηκε από τις δύο ομάδες σκουληκιών για διάστημα ενός πεντάλεπτου, με εμφανώς μεγαλύτερη αυτή που διάνυσαν τα σκουλήκια αγρίου τύπου. Για την μέτρηση της γωνίας των μαιάνδρων αλλά και για την μέτρηση της απόστασης που διανύθηκε χρησιμοποιήθηκαν οκτώ σκουλήκια αγρίου τύπου N2 και οκτώ σκουλήκια DN20. Τα γραφήματα προκύπτουν από τον μέσο όρο των προσπαθειών των σκουληκιών για την κάθε ομάδα.

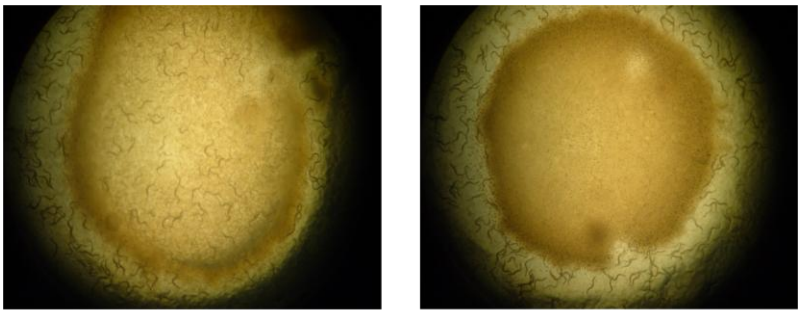
3.4 Χρήση XCT στον νηματώδη

Όπως έχει ήδη ειπωθεί το ορθόλογο γονίδιο του Nurr1 στον νηματώδη (nhr-6) σχετίζεται με ρύθμιση των γονάδων του και με την ομαλή αναπαραγωγή. Εφόσον έχει δειχθεί από πειράματα σε κυτταρικές σειρές ότι το XCT εμπλέκεται στη μεταγωγή σήματος μέσω των πυρηνικών υποδοχέων και πιο συγκεκριμένα με τον υποδοχέα Nurr1. Μελετήσαμε την επίδραση του XCT στο σκουλήκι C. elegans και πιο συγκεκριμένα στην αναπαραγωγική του ικανότητα. Το XCT διαλύθηκε τόσο στο θρεπτικό υλικό που ζει το σκουλήκι (άγαρ) όσο και στην τροφή του (βακτήρια) σε συγκέντρωση 12,5μM.



Γράφημα 29
Στο γράφημα 29 συγκρίνεται η αναπαραγωγική ικανότητα των σκουληκιών αγρίου τύπου (N2) σε σχέση με τα knock out nhr6- (DN20) συναρτήσει της παρουσίας και απουσίας του BRF.H αυξημένη αναπαραγωγική ικανότητα των N_2 λόγω XCT συνοδεύεται με στατιστική σημαντικότητα.

Αξίζει δε να σημειώσουμε ότι μακροσκοπικά παρουσιάστηκε μια ιδιαίτερη εικόνα στα τρυβλία που ζουν και μεγαλώνουν τα σκουλήκια. Πιο συγκεκριμένα, στα τρυβλία που περιείχαν το XCT διαλυμένο στη τροφή (στην εικόνα η τροφή φαίνεται με σκουρο κίτρινο χρώμα) όσο και στο άγαρ (στην εικόνα το άγαρ φαίνεται με απαλό κίτρινο χρώμα που περιβάλλει την τροφή) τα σκουλήκια αγρίου τύπου είχαν μια προτίμηση κίνησης και ανάπτυξης εκτός της τροφής.



No XCT XCT 12.5 μM

Εικόνα 21
Παρουσιάζεται η μακρο-σκοπική εικόνα wt νηματωδών παρουσία και απουσία XCT.

4 Συζήτηση

Στη Νόσο Πάρκινσον, το βασικότερο παθοφυσιολογικό χαρακτηριστικό είναι η προοδευτική εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας. Οι νευρώνες της μέλαινας ουσίας (προσυναπτικοί) προβάλλουν φυσιολογικά στο ραβδωτό σώμα (όπου απαντώνται οι μετασυναπτικοί νευρώνες) και είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή και την έκκριση της ντοπαμίνης. Επομένως στη νόσο Πάρκινσον παράλληλα με την εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νεύρων, παρατηρείται και ελλειμματική μεταβίβαση ντοπαμίνης στο ραβδωτό, γεγονός που προκαλεί κινητικές δυσλειτουργίες.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στην εργασία αυτή γίνεται μια προσπάθεια κατανόησης του ρόλου ενός γονιδίου, του Nurr1, το οποίο έχει σχετιστεί με τη νόσο Πάρκινσον. Ο πρώτος συσχετισμός που συνέδεσε το Nurr1 με την νόσο αυτή έλαβε χώρα όταν το συγκεκριμένο γονίδιο βρέθηκε να είναι μεταλλαγμένο σε ασθενείς με οικογενή νόσο Πάρκινσον.

Το γονίδιο Nurr1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας απαραίτητος για τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των πρόδρομων ντοπαμινεργικών κυττάρων του μεσεγκεφάλου. Έχει δειχθεί ότι τα ποντίκια που στερούνται πλήρως το Nurr1 ζουν μόλις μία μέρα μετά την γέννησή τους, ενώ τα ετερόζυγα ποντίκια για το ίδιο γονίδιο επιβιώνουν και αναπτύσσονται κανονικά χωρίς εμφανή κινητικά προβλήματα. Επίσης έχει δειχτεί ότι η υπερέκφρασή του σε κυτταρικές σειρές προσδίδει νευροπροστασία στους νευρώνες έναντι της τοξίνης MPP+ που προκαλεί κυτταρικό θάνατο ενώ η ελαττωμένη έκφρασή του in vivo, επιφέρει αυξημένη ευαισθησία των ντοπαμινεργικών νευρώνων έναντι της ίδιας τοξίνης. Συνεπώς, μειωμένη έκφραση του μεταγραφικού αυτού παράγοντα σχετίζεται με ευπάθεια σε βλάβες της μέλαινας ουσίας.

Υπό το πρίσμα αυτό και έχοντας ως «πρώτη ύλη» ετερόζυγα γηραιά ποντίκια για το γονίδιο του Nurr1, μελετήσαμε την λειτουργία του ντοπαμινεργικού τους συστήματος μέσω συμπεριφορικών τεστ. Οι δοκιμασίες που έλαβαν χώρα είναι ειδικά σχεδιασμένες για να καταδεικνύουν την ντοπαμινεργική λειτουργία και έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί για την μελέτη μοντέλων της νόσου Πάρκινσον.

Αξίζει να σημειώσουμε ότι η πρωταρχική δοκιμασία που έλαβε χώρα ήταν το elevated plus test που χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό του άγχους που ενδεχομένως παρουσιάζουν τα πειραματόζωα που υπόκεινται σε τεστ συμπεριφοράς (ποντίκια-αρουραίοι). Στην περίπτωσή μας χρησιμοποιήθηκε για να ταυτοποιηθεί αν τυχόν υπάρχει αγχώδης φαινότυπος στα ημίζυγα ποντίκια έναντι των ποντικών αγρίου τύπου, ο οποίος φαινότυπος έπρεπε να ταυτοποιηθεί και να συνυπολογιστεί στις μετέπειτα συμπεριφορικές δοκιμασίες. Από τα αποτελέσματα του τεστ δεν φάνηκε να υπάρχει αγχώδης φαινότυπος στα ημίζυγα ζώα.

Εν συνεχεία, έλαβαν χώρα τα συμπεριφορικά τεστ pole,beam,rearing και έτσι κατέστη δυνατή η σύγκριση των επιδόσεων των ημίζυγων ποντικών έναντι των ποντικών αγρίου τύπου. Ωστόσο, κατά την εκτέλεση αυτών των δοκιμασιών δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια ουσιαστική διαφορά μεταξύ των ημίζυγων ποντικών και των ποντικών αγρίου τύπου. Αυτό ενδεχομένως οφείλεται στις ακόλουθες δύο υποθέσεις: 1)είτε στην ύπαρξη μηχανισμών αντιστάθμισης του γονιδιακού

ελλείμματος στα ημίζυγα για το Nurr1 γονίδιο ποντίκια 2) είτε στην ανικανότητα των τεστ να καταδείξουν έναν σαφή φαινότυπο μεταξύ των δύο ομάδων ποντικών.

Κατόπιν ακολούθησε τεστ κινητικότητας στα ημίζυγα και στα αγρίου τύπου ποντίκια, πριν και μετά την χορήγηση αμφεταμίνης. Οι δύο ομάδες ποντικών βιντεοσκοπήθηκαν για μισή ώρα πριν την χορήγηση αμφεταμίνης και για μία ώρα μετά την χορήγηση αυτής και μετρήθηκε η απόσταση που διένυσαν. Από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης δοκιμασίας δείχτηκε ότι τα ημίζυγα ποντίκια ήταν εμφανώς περισσότερο υπερκινητικά από τα αγρίου τύπου πριν την χορήγηση αμφεταμίνης. Αυτό μπορεί να ερμηνευθεί ως εξής: τα ημίζυγα ποντίκια για το Nurr1 ενδεχομένως για να εξισορροπήσουν την μερική έλλειψη ντοπαμίνης, μειώνουν την επαναπρόσληψη ντοπαμίνης από τους μεταφορείς της. Δηλαδή, αν και οι νευρώνες στη μέλαινα ουσία είναι λιγότεροι, η μείωση της επαναπρόσληψης ντοπαμίνης είναι αρκετή για να διατηρήσει τα επίπεδα της ντοπαμίνης υψηλά, έτσι ώστε η διέγερση των μετασυναπτικών νευρώνων του ραβδωτού τελικά να προκαλέσει την εν λόγω υπερκινητικότητα. Επιπροσθέτως, είδαμε ότι μετά την χορήγηση αμφεταμίνης τα ημίζυγα ποντίκια διένυσαν περίπου τριπλάσια απόσταση από αυτή που διένυσαν τα αγρίου τύπου. Δηλαδή, η δράση της αμφεταμίνης ενέτεινε την ήδη υπερκινητική συμπεριφορά των ημίζυγων ποντικών. Αυτό μπορεί εύκολα να αιτιολογηθεί αν αναλογιστούμε τον μηχανισμό δράσης της αμφεταμίνης. Πιο συγκεκριμένα, η αμφεταμίνη από μόνη της δρα αναστέλλοντας την επαναπρόσληψη της ντοπαμίνης από τους μεταφορείς της στους προσυναπτικούς νευρώνες. Κατ' αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η συγκέντρωση της αμφεταμίνης στην συναπτική σχισμή και έτσι επιτελείται υπερλειτουργία του ντοπαμινεργικού συστήματος. Επιπλέον η μερική έλλειψη του Nurr1 και η συνεπαγόμενη μερική έλλειψη ντοπαμίνης, ίσως επιφέρουν και μετασυναπτικές αλλαγές οι οποίες συντελούν στην υπερδιέγερση των μετασυναπτικών νευρώνων του ραβδωτού στην αμφεταμίνη ώστε τελικά να προκληθεί η εν λόγω υπερκινητικότητα.

Παράλληλα, έγινε χρήση ποντικών αγρίου τύπου στα οποία χορηγήθηκε η ουσία BRF. Η ουσία αυτή συντέθηκε στο εργαστήριό μας και έχει δειχτεί ότι αλληλεπιδρά ειδικά με το ετεροδιμερές σύμπλεγμα του Nurr1-RXR προκαλώντας επιβίωση των νευρώνων σε κυτταρικές σειρές στις οποίες εφαρμόζονται κυτταροτοξικές τοξίνες (όπως π.χ MPP+). Επίσης είναι ικανή να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και είναι αρκετά σταθερή ώστε να μην μεταβολίζεται. Επίσης, υπενθυμίζεται ότι η ενεργοποίηση του συμπλόκου αυτού (Nurr1-RXR), αυξάνει την μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου της TH. Έτσι λοιπόν χορηγήθηκε BRF-001 στα ποντίκια αγρίου τύπου (πειραματική ομάδα) και PEG-WATER πάλι σε ποντίκια αγρίου τύπου (ομάδα ελέγχου) και εν συνεχεία έλαβαν χώρα τα συμπεριφορικά τεστ activity και rotarod. Στόχος μας ήταν να δείξουμε αν η ουσία αυτή ενεργοποιεί in vivo το σύμπλοκο Nurr1-RXR και να δείξουμε αν υπάρχει κάποιος φαινότυπος που μπορεί να «ψιλαφηθεί» μέσω συμπεριφορικών δοκιμασιών. Κατά την ανάλυση των τεστ που έλαβαν χώρα (Activity box και Rotarod performance) δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια ουσιαστική διαφορά μεταξύ των ποντικών της ομάδας ελέγχου και αυτών της πειραματικής ομάδας. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως οφείλεται είτε στην ανικανότητα των τεστ να καταδείξουν έναν σαφή φαινότυπο στα ποντίκια που τους χορηγήθηκε BRF, είτε και στην ανικανότητα της ουσίας να δράσει in vivo. Ωστόσο, τα ποντίκια θυσιάστηκαν και απομονώθηκε το ραβδωτό με σκοπό να ανιχνευτούν τα επίπεδα ντοπαμίνης και να διαλευκανθεί τελικά, αν υπάρχει η δράση της ουσίας. Τα αποτελέσματα αναμένονται.

Στο δεύτερο σκέλος της εργασίας αυτής μελετήθηκε ένας δεύτερος οργανισμός-μοντέλο ο νηματώδης C. elegans. Το πλεονέκτημα που μας δίνει το συγκεκριμένο μοντέλο είναι η δυνατότητα μελέτης σε knock out οργανισμό, δηλαδή σε οργανισμό που απουσιάζει εντελώς το γονίδιο nhr 6 (το οποίο είναι το ορθόλογο γονίδιο του Nurr1 για το σκουλήκι). Κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει στα ποντίκια (τα knock out των οποίων είναι μη βιώσιμα) γι αυτό και η συμπεριφορική μελέτη στα ποντίκια, όπως περιγράφηκε προηγουμένως περιορίζεται μόνο στους ημίζυγους για το συγκεκριμένο γονίδιο οργανισμούς. Στον νηματώδη, η λειτουργία του ορθόλογου γονιδίου nhr-6 έχει συσχετιστεί με γενική ρύθμιση της αναπαραγωγής και πιο συγκεκριμένα με δομική ακεραιότητα των γονάδων των νηματώδων. Εντούτοις, εφόσον είχαμε τη δυνατότητα, μελετήσαμε την κινητικότητα σε σκουλήκια αγρίου τύπου (N2) και στα αντίστοιχα Knock out σκουλήκια nhr6- (DN20) προκειμένου να διαπιστωθεί μια ενδεχόμενη διαφορά τους. Από τα αποτελέσματα μελέτης της κινητικότητας είδαμε ότι στα δύο αυτά στελέχη σκουληκιών υπάρχει διαφοροποίηση της κινητικότητάς τους η οποία πιστοποιείται τόσο από την γωνία των μαιάνδρων που λαμβάνουν χώρα κατά την κίνησή τους όσο και από την απόσταση που διανύθηκε σε χρόνο πέντε λεπτών. Πιο συγκεκριμένα, είδαμε ότι τα knock out σκουλήκια DN20 εκτελούν μεγαλύτερη γωνία μαιάνδρων ενώ είναι σημαντικά πιο υποκινητικά από τα σκουλήκια αγρίου τύπου N2, αποτελέσματα που συνοδεύονται με στατιστική σημαντικότητα. Κατ΄ αυτόν τον τρόπο για πρώτη φορά γίνεται συσχέτιση του γονιδίου nhr6 με κινητικό φαινότυπο στον νηματώδη C. elegans.

Εφόσον έχει δειχθεί από πειράματα σε κυτταρικές σειρές ότι το XCT εμπλέκεται στη μεταγωγή σήματος μέσω των πυρηνικών υποδοχέων και πιο συγκεκριμένα αλληλεπιδρά με το ετεροδιμερές Nurr1/RXR μελετήσαμε την επίδραση του XCT στο σκουλήκι C. elegans και πιο συγκεκριμένα στην αναπαραγωγική του ικανότητα. Έτσι λοιπόν το XCT διαλύθηκε τόσο στο θρεπτικό υλικό (Άγαρ) όσο και στην τροφή τους (βακτήρια) σε συγκέντρωση 12.5μM τόσο των νηματώδων αγρίου τύπου (N2) όσο και των Knock out για το συγκεκριμένο γονίδιο (DN20). Ακολούθησε παρακολούθηση της αναπαραγωγικής διαδικασίας των δύο ομάδων νηματώδων παρουσία και απουσία της ουσίας XCT και δείχτηκε ότι στα σκουλήκια αγρίου τύπου αυξάνεται σημαντικά η αναπαραγωγική ικανότητα παρουσία της ουσίας αυτής ενώ τα Knock out σκουλήκια δεν επηρεάζονται. Αν και με την υπάρχουσα γνώση, γνωρίζουμε ότι στο σκουλήκι απουσιάζει το RXR δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την ύπαρξη λειτουργικών ομολόγων του RXR τα οποία δεν έχουν φανερή ομολογία αλληλουχίας αλλά μπορεί να έχουν αντίστοιχη λειτουργική δράση. Άλλωστε πειράματα κυτταρικών σειρών στο εργαστήριό μας έδειξαν ότι το nhr6 μπορεί να αντικαταστήσει λειτουργικά το Nurr1 και να δημιουργήσει ετεροδιμερή με το ανθρώπινο RXR. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι το XCT αλληλεπιδρά με το nhr6 δημιουργώντας ενδεχομένως κάποιο ρυθμιστικό σύμπλοκο (κατ΄ αναλογία με την αλληλεπίδραση του XCT με το Nurr1-RXR που συμβαίνει στα θηλαστικά), και άρα εμπλέκεται στο δίκτυο μεταγωγής σήματος που πυροδοτείται από το Nurr1. Η εξήγηση αυτή δίνει ερμηνεία και στο γιατί στα Knock out σκουλήκια δεν παρατηρείται κάποια διαφορά στην αναπαραγωγική ικανότητα παρουσία XCT. Αυτό συμβαίνει γιατί τα Knock out σκουλήκια στερούνται του μεταγραφικού παράγοντα nhr-6 οπότε αδυνατεί να λάβει χώρα το δίκτυο μεταγωγής σήματος στο οποίο συμμετέχει το XCT.

Τέλος, πολύ ενδιαφέρον είναι να σχολιαστεί η μακροσκοπική εικόνα των νηματώδων που ζουν και κινούνται στο θρεπτικό υλικό (Άγαρ και τροφή βακτηρίων) εντός των τρυβλίων petri παρουσία XCT. Φάνηκε ότι μόνο τα σκουλήκια αγρίου τύπου, όταν το θρεπτικό τους υλικό περιέχει την ουσία XCT έχουν μια προτίμηση κίνησης εκτός της περιοχής που εστιάζονται η βακτηριακή τροφή τους. Αυτή ήταν μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση που χρήζει περαιτέρω μελέτης. Στην προσπάθεια να εξηγήσουμε το φαινόμενο αυτό, αξίζει να αναφέρουμε ότι όταν τα σκουλήκια βρίσκονται σε τρυβλία που περιέχουν βακτηριακή τροφή, προτιμούν να εισέρχονται μέσα στο στρώμα της τροφής και παύουν πλέον να κινούνται γρήγορα, φαινόμενο ντοπαμινεργικό. Αντίθετα, όταν οι νηματώδεις βρίσκονται σε τρυβλία που απουσιάζει το θρεπτικό τους υπόστρωμα, κινούνται διαρκώς αναζητώντας την τροφή. Σε περίπτωση απώλειας των ντοπαμινεργικών νευρώνων ή της Υδροξυλάσης Τυροσίνης, δεν υπάρχει η φυσιολογική μείωση της κινητικότητας όταν εισέρχονται στην τροφή. Μπορούμε να συσχετίσουμε αυτές τις πληροφορίες με την εικόνα των τρυβλίων που πήραμε κατά την διεξαγωγή του πειράματος με την χρήση XCT. Το αν το XCT μπορεί να αλληλεπιδρά με κάποιο τρόπο με το nhr-6 δίνοντας έναν ντοπαμινεργικό φαινότυπο κατά τον οποίο οι νηματώδεις παύουν να προτιμούν την εγκατάστασή τους εντός του βακτηριακού στρώματος τροφής χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Μελλοντικόι στόχοι

Μελλοντικός στόχος της εργασίας αυτής αποτελεί η απομόνωση των εγκεφάλων των ποντίκων στα οποία χορηγήθηκε η ουσία BRF και η ταυτοποίηση των επιπέδων ντοπαμίνης στο ραβδωτό. Αν δειχθεί ότι τα επίπεδα ντοπαμίνης στο ραβδωτό των ποντικών αυτών είναι αυξημένα συγκριτικά με τα αντίστοιχα των ποντικών στα οποία δεν χορηγήθηκε BRF, ανοίγουν ενδεχομένως νέοι ορίζοντες για την φαρμακευτική προσέγγιση της νόσου.

Άλλος μελλοντικός στόχος, είναι η μέτρηση των επιπέδων ντοπαμίνης στα δύο στελέχη νηματώδων του αγρίου τύπου (N2) και του Knock out για το γονίδιο nhr6 (DN20). Εφόσον δείξαμε ότι στον C elegans το γονίδιο nhr6 σχετίζεται με υποκινητικό φαινότυπο στους knock out για το συγκεκριμένο γονίδιο οργανισμούς, θα ήταν ενδιαφέρουσα υπόθεση η παρουσία μειωμένων επιπέδων ντοπαμίνης.

5 Βιβλιογραφια

Adams, J.D., Odunze, I.N. 1991. Biochemical mechanisms of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *Biochem Pharmacol*, 41, 1099-1105.

Andersen, J.K. 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?. *Nat Med*, 10, 18-25.

Esa Wallın-Mackenzie, Mata de Urquiza, A., Petersson, S.,Rodriguez, FJ., Friling, S., Wagner, J., Ordentlich, P.,Lengqvist,Backman, C., Perlmann, T., 2003.Nurr1–RXR heterodimers mediate RXR ligand-induced signaling in neuronal cells. GENES & DEVELOPMENT 17:3036–3047

Baffi, J.S., Palkovits, M., Castillo, S.O., Mezey, E., Nikodem, V.M. 1999. Differential expression of tyrosine hydroxylase in catecholaminergic neurons of neonatal wild-type and Nurr1-deficient mice. *Neuroscience*, 93, 631-642.

Baptista, M. J., O'Farrell, C., Daya, S., Ahmad, R., Miller, D. W., Hardy, J., Farrer, M. J., Cookson, M. R. 2003. Co-ordinate transcriptional regulation of dopamine synthesis genes by alpha-synuclein in human neuroblastoma cell lines. *J Neurochem*, 85, 957–968

Bensinger, S.J., Tontonoz, P. 2009. A Nurr1 pathway for neuroprotection. *Cell*, 137, 26-28.

Castelo-Branco,G., Wagner, J., Rodriguez, F.J., Kele, J., Sousa, K., Rawal, N., Pasolli, H.A., Fuchs, E., Kitajewski, J., Arenas, E., 2003. Differential regulation of midbrain dopaminergic neuron development by Wnt-1, Wnt-3a, and Wnt-5a. *Proc Natl Acad Sci*, 100, 12747-12752.

Castillo, S.O., Baffi, J.S., Palkovits, M., Goldstein, D.S., Kopin, I.J., Witta, J., Magnuson, M.A., Nikodem, V.M. 1998. Dopamine biosynthesis is selectively abolished in substantia nigra/ventral tegmental area but not in hypothalamic neurons in mice with targeted disruption of the Nurr1 gene. *Mol Cell Neurosci*, 11, 36-46.

Chen, H., Xzhang, SM., Herman, MA., Schwarzschild, Willett, WC., Colditz, GA., Speizer, FE., Acherio, A. 2003. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Arch Neurol*, 60, 1059-1064.

Chen, L., Feany, M.B. 2005. Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a Drosophila model of Parkinson disease. *Nat Neurosci*, 8, 657-663.

Chiueh, C.C., Krishna, G., Tulsi, P., Obata, T., Lang, K., Huang, S.J., Murphy, D.L. 1992. Intracranial microdialysis of salicylic acid to detect hydroxyl radical generation through dopamine autooxidation in the caudate nucleus: effects of MPP+. *Free Radic Biol Med*, 13, 581-583.

Chu, Y., Kompoliti, K., Cochran, E.J., Mufson, E.J., Kordower, J.H. 2002. Age-related decreases in Nurr1 immunoreactivity in the human substantia nigra. *J Comp Neurol*, 450, 203-214.

Chu, Y., Le, WD., Kompoliti, K., Jankovic, J., Mufson, E.J., Kordower, J.H. 2006. Nurr1 in Parkinson's disease and related disorders. *J Comp Neurol*, 494, 495-514.

Chung, K.K., Dawson, V.L., Dawson, T.M. 2001. The role of the ubiquitin–proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*, 24, 7-14.

Cohen, G., Werner, P. 1994. Free radicals, oxidative stress, and neurodegeneration in Neurodegenerative Diseases. Philadelphia PA, W.B. Saunders, 139-161

Fearnley, J.M., Lees, A.J. 1991. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*, 114, 2283-2301.

Friling, S, Bergsland, M., Kjellander, S., 2009. Activation of Retinoid X Receptor increases dopamine cell survival in models for Parkinson's disease. *BMC Neuroscience,* 10.1186/1471-2202-10-146

Gandhi, S., Wood, N.W. 2005. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, 14, 2749-2755.

Gao, H.M., Hong, J.S., Zhang, W., Liu, B. 2003. Synergistic dopaminergic neurotoxicity of the pesticide rotenone and inflammogen lipopoly-saccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 23, 1228-1236.

Grimes, D.A., Han, F., Panisset, M., Racacho, L., Xiao, F., Zou, R., Westaff, K., Bulman, D.E. 2006. Translated mutation in the Nurr1 gene as a cause for Parkinson's disease. *Mov Disord*, 21, 906-909.

Hardie, R.J. 1999. Measuring the rate of progression and estimating the preclinical period of Parkinson's disease with [18F] dopa PET. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 66, 256.

Healy, D.G., Abou-Sleiman, P.M., Wood, N.W. 2005. Genetic causes of Parkinson's disease: UCHL-1. *Cell Tissue Res*, 318, 189-194.

Healy, D.G., Abou-Sleiman, P.M., Quinn, N., Ahmadi, K.R., Ozawa, T., Kamm, C., Wullner, U., Oertel, W.H., Burk, K., Dupont, E., Pellecchia, M.T., Tolosa, E., Gasser, T., Holton, J.L., Revesz, T., Goldstein, D.B., Lees, AJ., Wood, N.W. 2005. UCHL-1 gene in multiple system atrophy: a haplotype tagging approach. *Mov Disord*, 20, 1338-1343.

Hering, R., Petrovic, S., Mietz, E.M., Holzmann, C., Berg, D., Bauer, P., Woitalla, D., Muller, T., Berger, K., Kruger, R., Riess, O. 2004. Extended mutation analysis and association studies with Nurr1 (NR4A2) in Parkinson disease. *Neurology*, 62, 1231-1232.

Ichinose, H., Ohye,T., Suzuki,T., Sumi-Ichinose,C., Nomura,T., Hagino,Y., Nagatsu,T. 1999. Molecular cloning of the human Nurr1 gene: characterization of the human genes and cDNAs. *Gene*, 230, 233-239.

Ishikawa, S., et al. 2009. Oxidative status of DJ-1-dependent activation of dopamine synthesis through interaction of tyrosine hydroxylase and L-DOPA decarboxylase with DJ-1. J Biol Chem, 284, 28832-28844.

Jancovic, J., Chen, S., Le, W.D. 2005. The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 77, 128-138.

Jellinger, K., Paulus, W., Grundke-Iqbal, I., Riederer, P., Youdim, M.B. 1990. Brain iron and ferritin in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*, 2, 327-340.

Jiang, C., Wan, X., He, Y., Pan, T., Jankovic, J., Le, W. 2005. Age-depented dopaminergic dysfunction in Nurr1 knock-out mice. *Exp Neurol*, 191, 154-162.

Kadkhodaei, B., Ito, T., Joodmardi, E., Mattsson, B., Rouillard, C., Carta, M., Muramatsu, S.I., Sumi-Ichinose, C., Nomura, T., Metzger, D., Chambon, P., Lindqvist, E., Larsson, N.G., Olson, L., Bjorklund, A., Ichinose, H., Perlmann, T. 2009. Nurr1 is required for maintenace of maturing and adult midbrain dopamine neurons. *J Neurosci*, 29, 15923-15932.

Kimble, J.,Hirish, D., 1979. The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in C. Elegans. Dev Biol, 70 (2): 396-417

Le, W.D., Conneely, O.M., He, Y., Jankovic, J., Appel, S.H. 1999. Reduced Nurr1 expression increased the vulnerability of mesencephalic dopaminergic neurons to MPTP-induced injury. *J Neurochem*, 73, 2218-2221.

Le, W.D., Conneely, O.M., Zou, L., He, Y., Saudedo-Cardenas, O., Jankovic, J., Mosier, D.R., Appel, S.H. 1999. Selective agenesis of mesencephalic dopaminergic neurons in Nurr1-deficient mice. *Exp Neurol*, 159, 451-458.

Le, W.D., Xu, P., Jankovic, J., Jiang, H., Appel, S.H., Smith, R.G., Vassilatis, D.K., 2003. Mutation in NR4A2 associated with familiar Parkinson's disease. *Nat Genet*, 33, 85-89.

Lee, F.J., Wang, Y.T., Liu, F. 2005. Regulation of multiple dopamine signal transduction molecules by retinoids in the developing striatum. *Neuroscience*, 134, 97-105.

Lee, M.A., Lee, H.S., Lee, H.S., Cho, K.G., Jin, B.K., Sohn, S., Lee, Y.S., Ichinose, H., Kim, S.U. 2002. Overexpression of midbrain-specific transcription factor Nurr1 modifies susceptibility of mouse neural stem cells to neurotoxins. *Neurosci Lett*, 333, 74-78.

Lees, A.J. 1992. When did Ray Kennedy's Parkinson's disease begin?. *Mov Disord*, 7, 110-116.

Lesnick, TG., Papapetropoulos, S., Mash, DC., Ffrench-Mullen, J., Sheshadeh, L., Andrade, M., Henley, JR., Rocca, WA., Ahlskog, J.E., Maraganore, D.M. 2007. A genomic Pathway Approach to a Complex Disease: Axon Guidance and Parkinson Disease. *Plos genetics*, 3, 984-995.

Maruyama, K., Tsukada, T., Ohkura, N., Bandoh, S., Hosono, T., Yamaguchi, K. 1998. The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily. *Int J Onclol*, 12, 1237-1243.

McGeer, P.L., Yasojima, K., McGeer, E.G. 2001. Inflammation in Parkinson's disease. *Adv Neurol*, 86, 83-89.

McNaught, K.S., Bjorklund, L.M., Belizaire, R., Isacson, O., Jenner, P., Olanow, C.W. 2002. Proteasome inhibition causes nigral degeneration with inclusion bodies in rats. *Neuroreport*, 13, 1437-1441.

Nagatsu, T. 1997. Isoquinoline neurotoxins in the brain and Parkinson's disease. *Neurosci Res*, 29, 99–111.

Nakae, J., et al. 2002. Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1. *Nature Genet*, 32, 245-253.

Nordzell, M., Aarnisalo, P., Benoit, G., Castro, D.S., Perlmann, T. 2004. Defining an N-terminal activation domain of the orphan nuclear receptor Nurr1. *Biochem Biophys Res Commun*, 313, 205-11.

Nunes, I., Tovmasian, L.T., Silva, R.M., Burke, R.E., Goff, S.P. 2003. Pitx-3 is required for development of subtantia nigra dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci*, 100, 4245-4250.

Ordentlich, P., Yan, Y., Zhou, S., Heyman, RA., 2003. Identification of the antineoplastic agent 6-mercaptopurine as an activator of the orphan nuclear hormone receptor Nurr1. J Biol Chem, 278(27):24791-9

Parkinson, J. 1817. An Essay on the Shaking Palsy. London, Whittingham & Rowland.

Perrier, A.L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M.E., Bruses, J., Topf, N., Harrison,N.L., Studer, L. 2004. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci*, 101, 12543-12548.

Pezzella, A., d'Ischia, M., Napolitano, A. 1997. Iron-mediated generation of the neurotoxin 6-hydroxydopamine quinine by reaction of fatty acid hydroperoxides with dopamine: a possible contributory mechanism for neuronal degeneration in Parkinson's disease. *J Med Chem*, 40, 2211-2216.

Reiner, A. 1994. The study of catecholaminergic perikara and fibers in the nervous system. In "Phylogeny and development of the catecholamine systems in the CNS of vertebrates". Cambridge University Press

Renaud, J.P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H., Moras, D. 1995. Crystal structure of the RAR-α ligand-binding domain bound to all-trans retinoid acid. *Nature*, 395, 137-143.

Ross, G.W., Petrovitch, H., Abbott, R.D., Nelson, J., Markesbery, W., Davis, D., Hardman, J., Launer, L., Masaki, K., Tanner, CM, White, L.R. 2004. Parkinsonian signs and substantia nigra neuron density in decendents elders without PD. *Ann Neurol*, 56, 532-239.

Roussa, E., Krieglstein, K. 2004. Induction and specification of midbrain dopaminergic cells: focus on SHH, FGF8 and TGF-beta. *Cell Tissue Res*, 318, 23-33.

Sacchetti, P., Mitchellm, T.R., Granneman, J.G., Bannon, M.J. 2001. Nurr1 enhances transcription of the human dopamine transporter gene through a novel mechanism. *J Neurochem* 76, 1565-1572.

Saijo, K., Winner, B., Carson, C.T., Collier, J.G., Boyer, L., Rosenfeld, M.G., Gage, F.H., Glass,C.K. 2009. A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell*, 137, 47-59.

Sakurada, K., Ohshima-Sakurada, M., Palmer, T.D., Gage, F.H., 1999. Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hyrdoxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development*, 126, 4017-4026.

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., 1998. Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of vnetral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci*, 95, 4013-4018.

Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Clark, J.B., Jenner, P., Marsden, C.D. 1990. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. J Neurochem, 54, 823-827.

Sian, J., Dexter, D.T., Lees, A.J., Daniel, S., Agid, Y., Javoy-Agid, F., Jenner, P. Marsden, C.D. 1994. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol*, 36, 348-355.

Sleiman, P.M.A., Healy, D.G., Muqit, M.M.K., Yang, Y.X., Van Der Brug,M., Holton, J.L., Revesz, T., Quinn, N.P., Bhatia, K., Diss, J.K.J., Lees, A.J., Cookson, M.R., Latchman, D.S., Wood, N.W. 2009. Characterisation of a novel *NR4A2* mutation in Parkinson's disease brain. *Neuroscience Letters*, 457, 75–79.

Smidt, M.P., Asbreuk,C.H., Cox, J.J., Chen, H., Johnson, R.L., Burbach,J.P. 2000. A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires Lmx1b. *Nat Neuroscience*, 3, 337-341.

Smidt, M.P., Smits, S.M., Burbach, J.P. 2003. Molecular mechanisms underlying midbrain DA neuron development and function. *Eur J Pharmcol*, 480, 75-88.

Song, D., Shults, C., Sisk. A., Rockenstein, E., Masliah, E. 2004. Enhanced substantia nigra mitochondrial pathology in human α-sunuclein transgenic mice after treatment with MPTP. Exp Neurol, 186, 158-172.

Sousa, K.M., Mira, H., Hall, AC., Jansson-Sjostrand, L., Kusakabe, M., Arenas, E. 2007. Microarray analyses support a role for Nurr1 in resistance to oxidative stress and neuronal differentiation in neural stem cells. *Stem Cells*, 25, 511-519.

Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M., Goedert, M. 1998. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci*, 95, 6469-6473.

Sriram, K., Matheson, J.M., Benkovic, S.A., Miller, D.B., Luster, M.I., O'Callaghan, JP. 2002. Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. *FASEB J*, 16, 1474-1476.

Tanner, C.M. 1991. Liver enzyme abnormalities in Parkinson's disease. *Geriatrics*, 46, 560-563.

Tanner, C.M. 1992. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin*, 10, 317-329.

Taylor, A.E., Saint-Cyr, J.A., Lang, A.E., Kenny, F.T. 1986. Parkinson's disease and depression. A critical re-evaluation. *Brain*, 109, 279-292.

Tetradis, S., Bezouglaia, O., Tsingotjidou, A., 2001. Parathyroid hormone induces expression of the nuclear orphan receptor Nurr1 in bone cells. *Endocrinology*, 142, 663-670.

Vidwans, SJ.,Su, T., 2001. Cycling through development in Drosophila and other metazoan. Nat Cell Biol 3(1):E35-9

Wang, Z., Benoit, G., Liu, J., Prasad, S., Aarnisalo, P., Liu, X., Xu, H., Walker, N.P., Perlmann, T., 2003. Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature*, 423, 555-560.

Xu, P.Y., Le, W.D. 2004. Novel splicing variant of the human orphan nuclear receptor Nurr1 gene. *C M J*, 117, 899-902.

Yamada, T., McGeer, PL., McGeer, EG. 1991. Relationship of complement-activated oligodentrocytes to reactive microglia and neuronal pathology in neurodegenerative disease. *Dementia*, 2, 71-77.

Yan, Y., Yang, D., Zarnowska, E.D., Du, Z., Werbel, B., Valliere, C., Pearce, R.A., Tomson, J.A., Zhang, S.C. 2005. Directed differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 23, 781-790.

Yang, Y., Nishimura, I., Imai, Y., Takahashi, R., Lu, B. 2003. Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by Pael-R in Drosophila. *Neuron*, 37, 911-924.

Yang, Y.X., Latchman, D.S. 2008. Nurr1 transcriptionally regulates the expression of α-synuclein. *Mol Neurosci*, 19, 867-871.

Youdim, M.B., Ben-Shachar, D., Riederer, P. 1989. Is Parkinson's disease a progressive siderosis of substantia nigra resulting in iron and melanin induced neurodegeneration?. *Acta Neurol Scand Suppl*, 126, 47-54.

Zarow, C., Lyness, S.A., Mortimer, J.A., Chui, H.C. 2003. Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Arch Neurol,* 60, 337–341.

Zetterstrom, R.H., Solomin, L., Jansson, L., Hoffer, B.J., Olson, L., Perlmann, T. 1997. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science*, 276, 248-250.

Zetterstrom, R.H., Solomin, L., Mitsiadis, T., Olson, L., Perlmann, T. 1996. Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. *Mol Endocrinol*, 10, 1956-1966.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εργασία αυτή γίνεται μια προσπάθεια κατανόησης του νευροπροστατευτικού ρόλου του γονιδίου Nurr1, το οποίο είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας και έχει συσχετιστεί με τη νόσο Πάρκινσον. Χρησιμοποιήθηκαν ημίζυγα ποντίκια για το γονίδιο Nurr1 (αφού τα ομόζυγα είναι μη βιώσιμα) και ο νηματώδης C. elegans, που ο Knock out οργανισμός για το ορθόλογο γονίδιο nhr6 είναι βιώσιμος. Οι οργανισμοί αυτοί μελετήθηκαν συμπεριφορικά και φαρμακολογικά. Για την φαρμακολογία, χρησιμοποιήθηκαν δύο ουσίες (BRF-001 στα ποντίκια και XCT στους νηματώδεις) οι οποίες έχουν δείξει σε κυτταρικές σειρές ότι ενεργοποιούν το Nurr1 μέσω ετεροδιμερών Nurr1/RXR και έχουν νευροπροστατευτική δράση.

Πιο συγκεκριμένα, γηραιά ποντίκια ετερόζυγα για το γονίδιο Nurr1 και ποντίκια αγρίου τύπου υποβλήθηκαν σε συμπεριφορικά τεστ ειδικά σχεδιασμένα για να καταδεικνύουν ντοπαμινεργική λειτουργία. Κατ' αυτόν τον τρόπο θέλαμε να διερευνήσουμε κατά πόσον εντοπίζεται κάποια ευαισθησία στο ντοπαμινεργικό σύστημα των ημίζυγων ποντικών έναντι των ποντικών αγρίου. Στα συμπεριφορικά τεστ pole test, beam test και rearing δεν φάνηκε να υπάρχει διαφορά κατά την εκτέλεσή τους στις δύο ομάδες ποντικών. Ωστόσο κατά την μελέτη κινητικότητας των δύο στελεχών ποντικών πριν και μετά την χορήγηση αμφεταμίνης, δείχτηκε ότι τα ημίζυγα ποντίκια είναι πιο υπερκινητικά πριν, και πολύ περισσότερο μετά την χορήγηση αμφεταμίνης, από τα ποντίκια αγρίου τύπου. Παράλληλα, μελετήθηκε in vivo η δράση της ουσίας BRF σε νεαρά ποντίκια αγρίου τύπου μέσω των συμπεριφορικών τεστ Activity box και Rotarod performance όπου δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Ταυτόχρονα, μελετήθηκε και το ορθόλογο γονίδιο του Nurr1 (nhr6) στον νηματώδη C. elegans. Στον νηματώδη, έχει ήδη ταυτοποιηθεί η λειτουργία του γονιδίου αυτού, που σχετίζεται με την δόμηση των αναπαραγωγικών οργάνων (σπερμαθήκα) και την ομαλή διεξαγωγή της αναπαραγωγής. Ωστόσο, φάνηκε ενδιαφέρον να μελετηθεί η κινητικότητά του Knock out σκουληκιού έναντι αυτής του αγρίου τύπου. Δείξαμε ότι τελικά όντως τα Knock out σκουλήκια είναι πιο υποκινητικά από τα αγρίου τύπου. Παράλληλα, μελετήθηκε η δράση της ουσίας XCT στην αναπαραγωγική ικανότητα των knock out σκουληκιών και αγρίου τύπου. Από τα αποτελέσματα του πειράματος φάνηκε ότι το XCT όντως επηρεάζει την αναπαραγωγική ικανότητα των σκουληκιών αγρίου τύπου και εμπλέκεται στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος που συμμετέχει το nhr6 ενδεχομένως μέσω δημιουργίας ετεροδιμερών με προτεϊνες ανάλογες του RXR.

Συμπερασματικά, είναι πιθανό, η αύξηση της λειτουργείας του Nurr1 μέσω ενώσεων που ενεργοποιούν το Nurr1/RXR να έχουν νευροπροστατευτικές ιδιότητες και χρήσιμες για την νόσο του Πάρκινσον.

ABSTRACT

In this thesis we are aiming to understand the neuroprotective role of Nurr1, a transcription factor that is related to Parkinson disease. We used hemizygous for Nurr1 mice (Nurr1+/-), since the homozygote deletion of Nurr1 is lethal, and Knock out (nhr-6) worms. We examined these organisms via behavioral and pharmacological tests using two compounds (BRF-001 in mice and XCT in C. elegans), which have been shown to be neuroprotective in vitro.

We investigated whether there is dopaminergic sensitivity in Nurr+/- mice using the following behavioral tests: the pole test, the beam traversal test, and the rearing test. The results did not demonstrate any significant differences between Nurr1+/- and wild type mice. Despite the above, we showed that Nurr+/- hets are hyperactive compared with wild type mice pre- and post- amphetamine injection. Moreover, we investigated examined the effect of BRF-001 administration in wild type mice, but we did not observe any significant differences between treated and untreated animals.

On the other hand, we also examined the function of the orthologous nhr6 gene in C. elegans. Nhr6 is responsible for the formation of the spermatheca (reproductive organ) in C. elegans. However, we investigated the mobility of Knock out (nhr6-) compared with wild type worms and we showed that the Knock out animals are hypoactive and have motion alterations. At the same time, we examined the effect of XCT in C.elegans' fecundity. We demonstrated that XCT affects the fecundity of wild type mice and apparently affects protein complexes that include the nhr6.

As a conclusion, our data indicated that increase of Nurr1 function via compounds that activate NURR1/RXR heterodimers have the capacity to be neuroprotective.