

GRAVANIS' LAB
Department of Pharmacology
April 18 2008
Pasparakis Emmanouil

ΚΕΙΜΕΝΟ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ

Το αντικείμενο της εργασίας μου είναι σχετικό με τις δράσεις ενδογενών και νέων συνθετικών νευροστεροειδών σε στελεχιαία νευρικά κύτταρα μυών, και πιο συγκεκριμένα (σχετικό με) τις δράσεις τους αναφορικά με τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους.

Η συγκέντρωση των ενδογενών νευροστεροειδών μειώνεται σταδιακά με την αύξηση της ηλικίας. Η μείωση αυτή σχετίζεται, πιθανότατα, με την εκδήλωση νευροεκφυλιστικών νόσων, όπως είναι η AD. Στις περιπτώσεις νευροεκφυλιστικών νόσων η χορήγηση μορίων με νευρογενετικές ιδιότητες στους πληθυσμούς των stem cells του εγκεφάλου θα αποτελούσε μια θεραπευτική προσέγγιση. Τα μόρια αυτά θα κάλυπταν τη μείωση λόγω νέκρωσης των νευρικών κυττάρων.

Η εργασία μου αφορά στην περίοδο της ανάπτυξης, κατά την οποία παρατηρούνται χωρικές και χρονικές διακυμάνσεις της συγκέντρωσης των νευροστεροειδών. Οι διακυμάνσεις αυτές επηρεάζουν την επιβίωση και την απόπτωση των στελεχιαίων νευρικών κυττάρων, καθώς και το self-renewal και τη διαφοροποίησή τους.

Γνωρίζουμε ότι τα ESC, μπορούν να δώσουν στελεχιαία νευρικά κύτταρα, τα οποία με την σειρά τους έχουν την ιδιότητα του self-renewal, την ιδιότητα να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται σε νευρικά και γλοιακά κύτταρα (αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα).

Από προηγούμενες μελέτες υπάρχουν ενδείξεις ότι νευροστεροειδή, όπως η DHEA και η Allo, οδηγούν τα στελεχιαία νευρικά κύτταρα σε διαφοροποίηση, αλλά δεν γνωρίζουμε τους μηχανισμούς.

Σκοπός της έρευνάς μας είναι να ελέγξουμε τον ρόλο των νευροστεροειδών στον πολλαπλασιασμό και/ή στην διαφοροποίηση των στελεχιαίων νευρικών κυττάρων.

Τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα μπορούν να απομονωθούν από τον υπό ανάπτυξη εγκέφαλο και να μελετηθούν άμεσα *in vitro*. Γι' αυτό ακριβώς, πήραμε ESC της 14^{ης} ημέρας, από εγκέφαλο μυών, τα οποία καλλιέργησαμε υπό την παρουσία αυξητικών παραγόντων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό νευροσφαιρών. Οι συνθήκες ήταν δύο. Στην πρώτη, η καλλιέργεια έγινε με το θρεπτικό υλικό N2, ενώ στη δεύτερη περίπτωση είχε προστεθεί το μέσον B27, η προσθήκη του οποίου επιταχύνει την διαφοροποίηση. Θα πρέπει να σημειώσουμε ότι οι νευρόσφαιρες αποτελούνται από αδιαφοροποίητα νευρικά κύτταρα τα οποία όταν διαφοροποιούνται εξέρχονται απ' τη σφαίρα. Στις νευρόσφαιρες επιδράσαμε με νευροστεροειδή είτε αμέσως μετά την απομονωσή τους, είτε κατόπιν καλλιέργειάς τους για 1 ή για 2 εβδομάδες κι ακολούθως έγιναν οι επιδράσεις. Σε όλες τις περιπτώσεις η χρονική διάρκεια των επιδράσεων με τα υπό μελέτη νευροστεροειδή ήταν 7 μέρες. Ελέγξαμε την παρουσία μεταγραφικών παραγόντων όπως οι Pax-6, Sox-2, Tuj 1, NeuN, υπεύθυνοι για την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των πρόωμων νευρικών και γλοιακών κυττάρων με μεθόδους ανοσοιστοχημείας. Ελέγξαμε, επίσης, την επίδραση των νευροστεροειδών στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την ικανότητα πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των στελεχιαίων νευρικών

κυττάρων. Αυτό ήταν ακριβώς το τμήμα της εργασίας με το οποίο ασχολήθηκα προσωπικά.

(6^η διαφάνεια) Εδώ ακριβώς βλέπουμε μία νευρόσφαιρα, στην οποία το συσσωμάτωμα των κυττάρων αντιστοιχεί στα αδιαφοροποίητα κύτταρα ενώ τα κύτταρα που αρχίζουν να διαφοροποιούνται εξέρχονται απ' αυτήν.

Στη συγκεκριμένη διαφάνεια, βλέπουμε τις επιδράσεις, κατά την πρώτη εβδομάδα, με Eth., DHEA, Allo, t-RA σε συγκέντρωση 10⁻⁷ M, υπό την προσθήκη του μέσου B27 στο θρεπτικό υλικό. Παρατηρούμε ότι η Allo επηρεάζει την δημιουργία της νευρόσφαιρας, καθώς και τη διαφοροποίηση των κυττάρων, σε μικρότερο ίσως βαθμό σε σχέση με το αποτέλεσμα του RA, σε μεγαλύτερο σε σχέση με την DHEA, η οποία με την σειρά της έχει ένα καλύτερο αποτέλεσμα σε σχέση με το control μας (7^η διαφάνεια).

Στην επόμενη διαφάνεια φαίνεται μια λεπτομέρεια αναφορικά με τη διαφοροποίηση των κυττάρων προς νευρικά κύτταρα (μέσω της έκφρασης της *Tuj1*) κάτω απ 'την επίδραση της Allo και του RA και στην οποία βλέπουμε την διαφορά.

Σ' αυτή την εικόνα (9^η διαφάνεια) μπορούμε να δούμε τις επιδράσεις με Eth., DHEA, Allo, BNN50, BNN93, RA σε συγκέντρωση 10⁻⁷M, κατά την πρώτη εβδομάδα. Παρατηρούμε τις διαφορές, όσον αφορά την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Pax-6, ο οποίος ευθύνεται για τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των RGC (radial glial cells). Ο μεταγραφικός παράγοντας NeuN, ο οποίος αποτελεί μάρτυρα για πρώιμο στάδιο διαφοροποίησης νευρικών κυττάρων δεν εμφανίζεται σε καμία απ' τις συνθήκες.

Εδώ βλέπουμε τα αποτελέσματα (10^η διαφάνεια), από τον έλεγχο μεταγραφικών παραγόντων που αφορούν στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των στελεχιαίων νευρικών κυττάρων, μέσω της μεθόδου RT-PCR. Αυτό αποτέλεσε, άλλωστε, το τμήμα της εργασίας με το οποίο ασχολήθηκα προσωπικά. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν από E14 μύες και την επόμενη μέρα καλλιεργούνταν σε θρεπτικό υλικό παρουσία του ορού B27. Η επίδραση των υπό μελέτη στεροειδών και του Ρετινοϊκού Οξέως διήρκεσε 7 μέρες (συγκέντρωση 10⁻⁷M). Κατόπιν τα κύτταρα συλλέγονται κι ακολουθεί απομόνωση ολικού mRNA και RT-PCR. Μπορούμε, με μια πρώτη εκτίμηση, να πούμε ότι τα στεροειδή DHEA και Allo διαφοροποιούνται ως προς τις δράσεις τους στα NSC ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας γονίδια που οδώνουν τον πολλαπλασιασμό ή τη διαφοροποίηση των NSC.

Ο στόχος, στο μέλλον, είναι ο πλήρης χαρακτηρισμός των δράσεων των νευροστεροειδών στα NSC, ώστε να ανιχνευθούν μόρια με πιθανώς διακριτές ιδιότητες ως προς τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των NSC.

Ευχαριστίες.