

Dopaminergisten neuronien kehitys ja sen yhteys Parkinsonin taudin kantasoluhoidoihin

Henna Kallo

Luonnontieteiden kandidaatin
tutkielma

Biologian tutkinto-ohjelma

Oulun yliopisto

3.5.2017

Sisällys

1. Johdanto.....	2
2. Neuraalinen induktio	2
3. Dopaminergiset neuronit	4
4. Dopaminergisten neuronien kehitys	5
4.1. Kehityksen tutkiminen.....	5
4.2. Gastrulaatio ja neurulaatio.....	5
4.3. Keskiaivojen alueellinen kaavoittuminen.....	7
4.4. mDA-neuronien spesifikaatio, neurogeneesi ja erilaistuminen	9
4.5. mDA-neuronien migraatio ja aksonien kohdentuminen.....	10
5. Parkinsonin tauti.....	13
6. Parkinsonin taudin solukorvaushoitojen tutkimus ja kehitys	14
6.1. Erilaiset kantasolut mDA-lähdepopulaationa.....	14
6.2. Kantasolusta mDA-neuroniksi	16
6.3. Transplantaatio ja aksonien ohjautuvuus.....	18
6.4. Soluterapian kehityksen tulevaisuus.....	19
7. Viiteluettelo	20

1. Johdanto

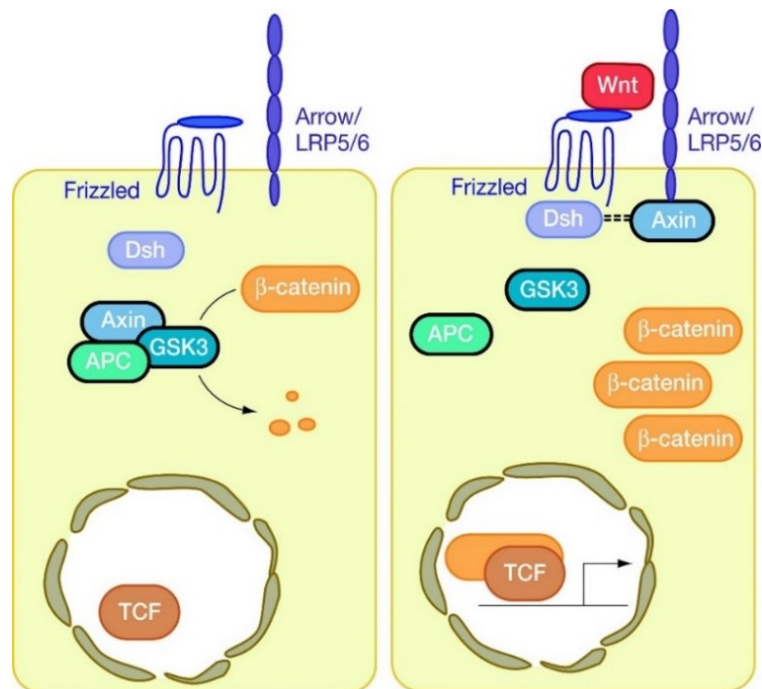
Kiinnostus regeneratiiviseen lääketieteeseen on kasvanut viime vuosina voimakkaasti. Lisääntynyt tieto siitä, mitkä tekijät ohjaavat neuronien kehittymistä, erilaistumista ja ylläpitoa *in vivo*, on kiihdyttänyt soluterapiahoitojen kehittelyä yhdeksi neurodegeneratiivisten sairauksien hoitokeinoksi. Esimerkiksi se, miten Parkinsonin taudissa tuhoutuvat keskiaivojen dopaminergiset (mDA) neuronit kehittyvät normaalissa yksilönkehityksessä, on auttanut tutkijoita muodostamaan mDA-soluja *in vitro*, mikä voi tulevaisuudessa mahdollistaa parempia tuloksia niin Parkinsonin taudin mallintamisen ja lääkekehittelyn kuin myös solukorvaushoitojen suhteen. Olennaista on ymmärtää mDA-neuronien kehityksen geneettinen säätely ja kehitystä eteenpäin ajavat molekulaariset mekanismit (Arenas *ym.* 2015). Lisäksi tutkimustiedon karttuminen kehitysprosesseista sekä neuronien lopullisista fenotyypeistä ja niitä säätelevistä tekijöistä parantavat ymmärrystämme keskiaivojen dopaminergisten neuronien funktionaalisesta diversiteetistä aikuisen nisäkkään, erityisesti ihmisen, aivoissa (Blaess & Ang 2015).

Tutkielman tarkoituksena on selvittää keskiaivojen dopaminergisten neuronien kehitystä säätelevien geneettisten ja molekulaaristen verkostojen pääpiirteet sekä tehdä katsaus Parkinsonin taudin kantasoluhoidoihin ja niiden kehitykseen. Esille nostetaan erityisesti mDA-neuronien normaalin kehityksen tuntemisen ja Parkinsonin taudin soluterapiahoitojen kehittelyn yhteys. Tutkielmassa neuronien kehityksen tarkastelu keskittyy mustatumakkeen *pars compacta* alueen dopaminergisiin soluihin eli hermosoluihin, jotka tuhoutuessaan ovat merkittävimmissä roolissa Parkinsonin taudin oireiden synnyssä. Esiteltyt säätelymekanismit ovat pääasiassa hiiri-mallieläimillä tutkittuja, mutta säätely on pitkälti samanlaista kaikilla nisäkkäillä.

2. Neuraalinen induktio

Hermosolujen kehitystä tutkittaessa on tärkeää ymmärtää kudosten välistä kommunikointia. Neuraalisessa induktiossa indusoiva kudokseksi lähettää viestin toiselle kudokselle, mikä laukaisee vastaanottajakudoksen kehityksen neuraalisessa linjassa (Price *ym.* 2011). Neuraalinen induktio on prosessi, joka määrittää solun identiteetin eli sen morfologian sekä molekulaariset ja funktionaaliset ominaisuudet, sekä saa aikaan solujen diversiteetin (Price *ym.* 2011; Purves *ym.* 2012). Solujen välinen viestintä tapahtuu signaalimolekyylien välityksellä: ligandin sitoutuminen juuri sille spesifiseen reseptoriin aktivoi biokemiallisten reaktioiden tapahtumasarjan. Tärkeitä signaalimolekyyliä neuraalisessa induktiossa ovat mm. BMP-, Wnt- ja FGF-perheisiin kuuluvat tekijät. Signaalitransduktiolla (Kuva 1) on kaksi tärkeää ominaisuutta. Pienellä määrällä ligandia voi olla suuri vaikutus, koska yhden entsyymin aktivointi voi aktivoida useita substraattimolekyyliä, mistä seuraa signaalin amplifikaatio. Toinen tärkeä ominaisuus on eri signalointireittien välillä tapahtuva vuorovaikutus. Esimerkiksi FGF- ja BMP-reitit ristivaikuttavat SMAD:n säätelyn kautta: FGF inhiboi SMAD1:n fosforyloimalla siitä tietyn kohdan, kun taas BMP aktivoi

fosforyloimalla toisen kohdan. SMAD-signaalikaskadi vaikuttaa lopulta kohdegeenin transkriptioon. FGF:llä ja BMB4:n antagonisteilla on täten samanlainen vaste eli molemmat voivat indusoida neuraaalisen kudoksen kehityksen. Solun saama informaatio ohjaa sitä kohti tiettyä solulinjaa ja erilaistumista vaikuttamalla solun geenien ilmentymiseen. Transkriptiotekijät sitoutuvat DNA:n säätelyelementteihin määrittäen sen, mitkä geenit ovat ”päällä” ja mitkä eivät. Transkriptiotekijöiden rakenteelle tyypillistä on spesifinen alue, kuten basic helix-loop-helix (bHLH)-rakenne, joka mahdollistaa niiden vuorovaikutuksen DNA:n kanssa. Tärkeitä transkriptiotekijöitä hermoston kehityksessä ovat SMAD, β -kateniini ja Sox-perheen jäsenet. Myös mikro-RNA-molekyylit säätelevät hermoston kehitystä (Price ym. 2011). Spatiaalisen säätelyn lisäksi olennaista on myös temporaalinen kontrolli eli induktion ajoitus: samalla signaalimolekyylillä voi eri kehitysvaiheissa olla erilainen vaste. Myös signaalimolekyylin pitoisuus vaikuttaa sen indusoimaan vasteeseen (Purves ym. 2012). Indusoivat tapahtumat ohjaavat solujen ja kudosten kehittymistä asteittain, mikä näkyy geenien ekspressioprofiilien muutoksina: eri kehitysvaiheissa aktivoituneina ovat eri geenit. Solujen kyky muodostaa erilaisia elimistön soluja vähenee progressiivisesti kehityksen edetessä (Sariola ym. 2015).



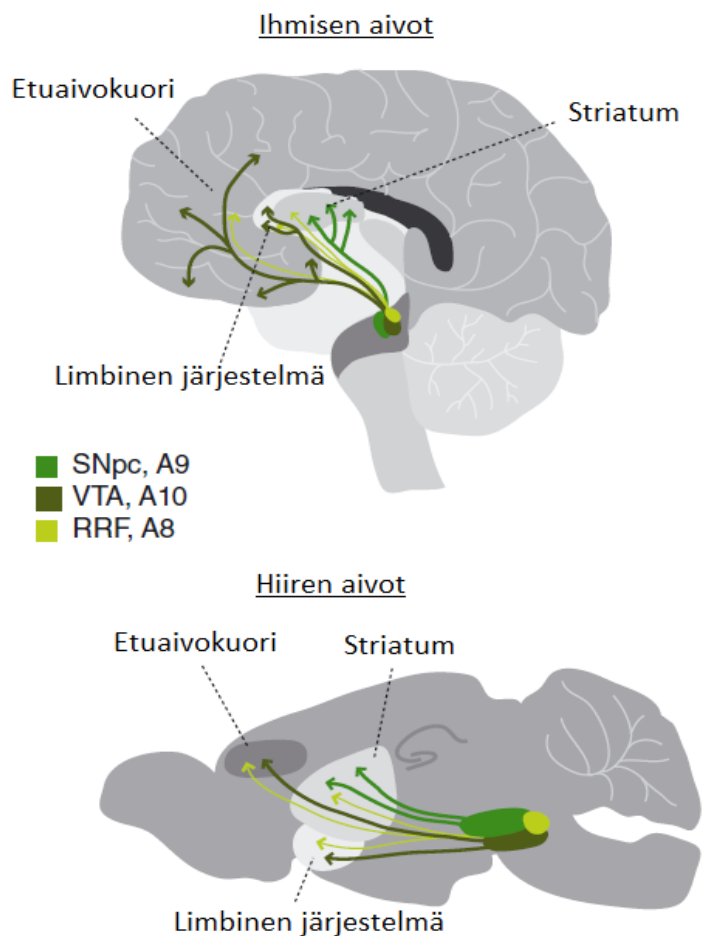
Kuva 1. Kuvassa on esitetty neuraaalisen induktion periaate esimerkkinä Wnt/ β -kateniini-signaalikaskadi. Kuvassa vasemmalla on tilanne ilman Wnt-signaalia, kun taas oikealla puolestaan on esitetty Wnt:n käynnistämä signaalitransduktio. Wnt sitoutuu spesifisesti kohdesolun solukalvolla olevaan Frizzled/LRP-reseptorikompleksiin, joka välittää signaalin solunsisäisille proteiineille: ensin Dishevelled (Dsh) -proteiinille, jonka kautta edelleen glykogeenisyntaasikinaasi-3 β (GSK-3 β), Axin- ja APC-proteiineille. β -kateniinin pitoisuus on tavallisesti solun sytoplasmassa alhainen, koska sitä hajotetaan jatkuvasti GSK-3 β /APC/Axin-kompleksin kontrolloimalla proteasomi-välitteisellä hajotusmekanismilla. Wnt-signaali inhiboi GSK-3 β /APC/Axin-välitteistä β -kateniinin hajotusta, ja täten aikaansaa sen akkumuloitumisen sytoplasmassa ja tumaan. Tumassa β -kateniini vuorovaikuttaa transkriptiotekijöiden, kuten TCF:n, kanssa vaikuttaen transkriptioon (Lähde: Logan & Nusse 2004). Wnt/ β -kateniini-reitti on konservoitunut signaalinsiirtokaskadi, joka osallistuu useisiin solun kehitystapahtumiin (Marikawa 2006). β -kateniini säätelee proliferaatiota, neurogeneesiä, spesifikaatiota, solujen polaarisuutta ja adheesiota sekä sentrosomien ja mikrotubulusten stabiiliutta ollen täten välttämätön mDA-neuronien kehitykselle (Joksimovic & Awatramani 2013).

3. Dopaminergiset neuronit

Dopamiini-välittäjäainetta vapauttavia dopaminergisia (DA) hermosoluja esiintyy nisäkkäiden keskushermostossa useina erillisinä ryhminä, joilla on toisistaan poikkeavat funktiot (Smits ym. 2006; Blaess & Ang 2015). Keskiaivojen DA-neuronit järjestäytyvät kolmeksi tumakkeeksi: *substantia nigra* (mustatumake) *pars compacta* (SNpc, A9-ryhmän neuronit), ventraalinen tegmentaali-alue (VTA, A10-ryhmän neuronit) ja A8-ryhmän muodostama tumake (retrobulbar field, RrF) (Arenas ym. 2015). Näiden tumakkeiden tutkimus on osoittanut niiden mDA-solujen välillä olevan heterogeenisyyttä niin aksoniensa kohdentumisen kuin myös hermovälittäjäaineominaisuuksien suhteen. Kehitystä ohjaavat mekanismit tämän diversiteetin taustalla ovat edelleen osittain epäselvät (Lahti ym. 2012). Kustakin tumakkeesta lähtevät aksoneit kohdentuvat etuaivoihin (Kuva 2)

muodostaen kolme pääreittoa: mesostriataalisen, mesokortikaalisen ja mesolimbisen reitin (Prestoz ym. 2012). A8-A10-ryhmien neuroneita kutsutaan myös mesodienkefaliksi dopaminergisiksi neuroneiksi, sillä osa niistä kehittyy etuaivojen dienkefalonin alueelta (Smits ym. 2006).

Eri mDA-populaatiot kontrolloivat eri toimintoja. VTA:n ja RrF:n DA-neuronit säätelevät emotionaalista ja kognitiivista käyttäytymistä sekä motivaatiota, ja niiden häiriöt ovat pääasiassa yhteydessä psykiatrisiin sairauksiin. SNpc:ssä sijaitsevat dopaminergiset A9-neuronit ulottuvat aivokuorukan (*putamen*) ja häntätumakkeen (*nucleus caudatus*) eli dorsolateraalisen striatumin alueille muodostaen nigrostriataalisen reitin (Arenas ym. 2015), joka säätelee tahdonalaisia motorisia toimintoja (Blaess & Ang 2015). Myös osa RrF-tumakkeen neuronien aksoneista osallistuvat nigrostriataalisen eli mesostriataalisen reitin muodostamiseen (Prestoz ym. 2012).



Kuva 2. Ihmisen (yläpuolella) ja hiiren (alapuolella) keskiaivojen DA-neuronien kolme tumaketta ja niiden etuaivoihin muodostamat radat. Nigrostriataalinen eli mesostriataalinen reitti mustatumakkeesta dorsolateraalisen striatumin alueelle on kuvattu vihreällä (SNpc, A9). (Lähde: Blaess & Ang 2015, muokattu).

4. Dopaminergisten neuronien kehitys

4.1. Kehityksen tutkiminen

Hiiri on hyvä mallieläin kuvaamaan ihmisellä tapahtuvaa mDA-neuronien kehitystä, koska mDA-järjestelmä ja sen muodostumisen säätely ovat nisäkkäillä, siis myös ihmisellä ja hiirellä, hyvin samankaltaiset (Kuva 2). Neuronien kehitystä tutkitaan paljon geneettisten manipulaatioiden avulla, sillä ne mahdollistavat taustalla olevien molekulaaristen reittien analysoimisen. Koe-eläimille voidaan tehdä geenin täydellinen inaktivointi (knock-out), jolloin mutatoituneen geenin ilmentyminen estyy, mistä seuraa geenituotteen välittämän toiminnon täydellinen puuttuminen (loss-of-function). Toisaalta geeniin voidaan aiheuttaa konditionaalinen inaktivointi tai aktivointi, joissa geenin luenta estetään tai sallitaan vain tietyssä kehitysvaiheessa. Tämä on erityisen tärkeä lähestymistapa, sillä monet säätelytekijät toimivat vain tietyssä vaiheessa kehitystä tai niiden aiheuttama vaste on erilainen eri kehitysasteilla. Hypomorfisilla mutanteilla geeni ilmentyy tavallista vähemmän, mutta sen toiminta ei lopu kokonaan (Blaess & Ang 2015).

Geenien toiminnasta voidaan tehdä fate mapping-tutkimusta, jossa mitataan esimerkiksi eri markkereiden pitoisuuksia eri kehitysvaiheisista soluista. Näin saadaan selville millä kehitysasteella solu on, sillä kussakin vaiheessa transkriptoidaan ja transloidaan vain kyseiselle kehitysasteelle spesifisiä genejä ja geenituotteita. Tuloksista voidaan päätellä mDA-neuronien kehitystä eteenpäin ajavia prosesseja ja mekanismeja. Dopamiinisynteesin nopeutta rajoittava tyrosiini hydroksylaasi (TH) -entsyymi on eniten käytetty markkeri erilaistuneiden mDA-neuronien tunnistuksessa. Tutkimuksissa neuronien identiteetin varmistamiseksi käytetään yleisesti myös SLC6A3 (DAT)-dopamiinitransportteria, SLC18A2-monoamiinitransportteria, dopa-dekarboksylaasia (DDC) ja PITX3-transkriptiotekijää (Blaess & Ang 2015). Näiden molekyylien merkitys mDA-neuroneille esitellään tulevissa kappaleissa. Eri geenituotteita voidaan havainnoida immunosytokemiallisten menetelmien avulla. Ne perustuvat kohdeproteiinin tunnistamiseen vasta-aineen avulla ja leimatun vasta-aineen detektioon sopivalla kuvantamismenetelmällä. Näin saadaan selville, mitkä geenit ovat aktivoituneina kussakin vaiheessa (Price ym. 2011).

4.2. Gastrulaatio ja neurulaatio

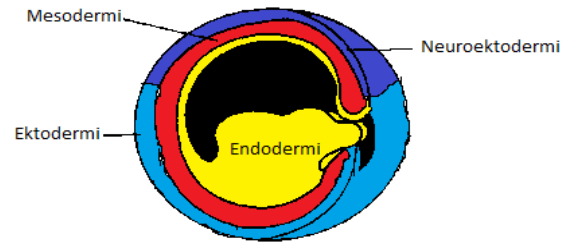
Nisäkäsyksilön kehitys alkaa munasolun hedelmöityessä tsygootiksi, joka kehittyy useiden jakautumisten kautta alkiorakkulaksi eli blastokystiksi (Sariola ym. 2015). Alkion blastokystin solut ovat pluripotentteja, mutta ne menettävät erilaistuessaan asteittain kykynsä tuottaa elimistön eri soluja. Gastrulaatioissa blastokystin epiblastista muodostuvat kolme alkiokerrosta (Kuva 3), joista yhdestä, ektodermistä, alkaa keskushermoston kehitys (Price ym. 2011; Li ym. 2013). Tutkimukset ovat paljastaneet monimutkaisen säätelyverkoston alkiokerrosten muodostumisen taustalle (Kiecker ym. 2016). Hiirikokeilla on saatu selville, että anteriorisviskeraalinen endodermi tuottaa Nodal-antagonisteja, kuten Lefty1:stä ja Cereberus 1:stä

(Cer1). Nodal-signaalien inhibitio vaimentaa kahden muun alkiokerroksen, mesodermin ja endodermin, erilaistumista ja edistää neuraalista induktiota ohjaten epiblastin soluja kohti ektodermilinjaa (Li ym. 2013).

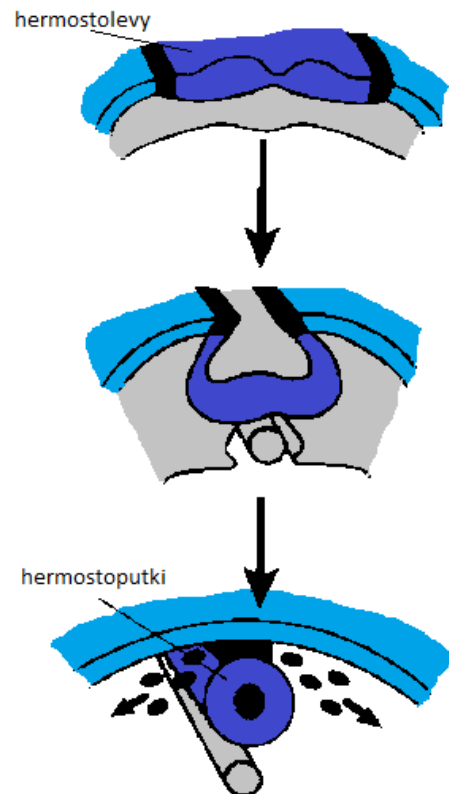
Ektodermaalisen kantapopulaation erilaistuminen riippuu sen paikasta alkiossa. Anteriorisesta ektodermista muodostuu neuraalinen ektodermi (Li ym. 2013), jonka solut muodostavat hermoston prekursori- eli esisolupopulaation (Rathjen ym. 2002). Toisesta osasta ektodermia muodostuu epidermaalinen

eli pintaektodermi (Kuva 3). Kehitysvaiheessa E7.0 (embryonic day 7) hiirialkion anteriorinen ektodermaalinen kerros ei ole enää pluripotentti, mutta se pystyy vielä erilaistumaan sekä pinta- että neuroektodermiksi, riippuen siitä onko BMP4-signaalimolekyyliä läsnä vai ei. BMP4:n poissaolo tai sen alhainen pitoisuus sekä erittyvien BMP-antagonistien, kuten NOG:n, läsnäolo ohjaavat ektodermin erilaistumaan neuraaliseen linjaan. E7.5-vaiheeseen mennessä ektodermi on rajoittunut joko neuraaliseen tai epidermaaliseen linjaan (Li ym. 2013; Arenas ym. 2015). Myös Wnt/ β -kateniini-signaalikaskadin inhibitio on välttämätöntä anteriorisen neuraalisen ektodermin muodostumiselle (Marikawa 2006).

Neurulaatio eli hermostoputken muodostuminen alkaa tapahtumalla, jossa hermostolevyn anteriorinen osa muovautuu posteriorista leveämmäksi. Kranaaliset neuraaliset laskokset tuottavat anterioriset vesikkelit, joista kehittyvät aivot. Primäärisessä neurulaatiossa (Kuva 4) muodostuvat hermostoputken ylemmät osat eli alueet, joista kehittyvät aivot ja selkäytimen ylempi osa. Siinä hermostolevyn bilateraaliset laskokset eli neuraalipoimut kohoavat, kunnes ne keskiviivan kohdalla fuusioituvat muodostaen putkimaisen keskushermoston aiheen, hermostoputken. Neurulaatiota ohjaavat useat erilaiset molekulaariset mekanismit. Solut poistuvat solusyklistä eli aloittavat neuraalisen erilaistumisen vasta, kun hermostoputken sulkeutuminen on valmis kaikilla kehon akselleilla. Liian aikaisesta erilaistumisesta aiheutuu kranaalisen neurulaation epäonnistuminen, mikä johtaa hermostoputken sulkeutumishäiriöihin (NTD) ja aivojen vialliseen kehitykseen, mikä voi johtaa moniin laajasti vammauttaviin tai hengenvaarallisiin synnynnäisiin epämuodostumiin (Copp ym. 2003).



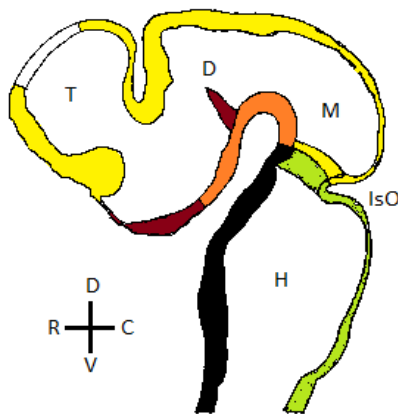
Kuva 3. Kehittyvän alkion kolme alkiokerrosta: mesodermi, endodermi ja ektodermi. Ektodermista muodostuvat sekä pintaektodermi (vaalean sininen) että neuroektodermi (tumman sininen), joista jälkimmäisestä muodostuu yksilön hermosto. (Lähde: Price ym. 2011, muokattu).



Kuva 4. Primäärinen neurulaatio: hermostolevyn kranaaliset neuraaliset laskokset muodostavat hermostoputken, josta kehittyvät aivot ja selkäytimen ylemmät osat (Lähde: Price ym. 2011, muokattu).

4.3. Keskiaivojen alueellinen kaavoittuminen

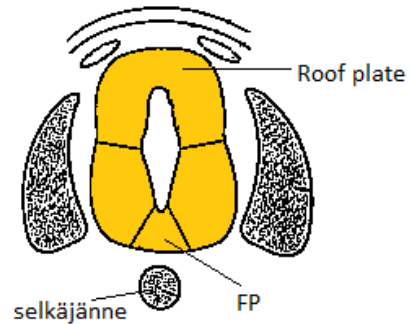
Hermostoputken alueellista kaavoittumista ohjaavat geenien ilmentymiserot eri kohdissa putkea. Sama signaalimolekyyli voi indusoida erilaisia vasteita vastaanottajasolussa riippuen siitä, kuinka suuri on indusoivan signaalin pitoisuus. Näin konsentraatiogradientin aikaansaama vaste ilmentää kohdesolun etäisyyttä indusoivasta lähteestä (Price ym. 2011). Keskushermoston varhaisen kaavoittumisen prosessit jaetaan anterioris-posteriorisen (AP) akselin ja ventraalis-dorsaalisen (VD) akselin muodostumisiin (Blaess & Ang 2015), joista ensimmäisessä hermostoputken anteriorisen pään aivorakkulat muotoutuvat etuaivoiksi eli prosenkefaloniksi, keskiaivoiksi eli mesenkefaloniksi ja taka-aivoiksi eli rombenkefaloniksi (Kuva 5) (Price ym. 2011). Etuaivot jaetaan kahteen osaan, dienkefaloniin ja telenkefaloniin (Marin & Rubenstein 2003). Signaalintikeskus, IsO (isthmic organizer), muodostuu kohtaan, jonka määrää *Otx2-Gbx2*-geenien tietynlainen ilmentyminen kehon akselilla ja niiden keskinäinen vuorovaikutus (Smits ym. 2006). IsO erittää FGF8-tekijää, jonka pitoisuus nousee taka-aivoissa suuremmaksi kuin keskiaivoissa. FGF8-gradientti yhdessä *Wnt1*:n kanssa määräävät taka- ja keskiaivojen rajalle tulevan toisen signaalintikeskuksen, MHB:n (mibrain-hindbrain boundary), paikan ja muodostumisen (Arenas ym. 2015). Hypomorfisilla *Fgf8*-mutanttihiirillä FGF8-tason voimakas lasku aiheuttaa keskiaivojen häviämisen lähes kokonaan. Keskiavot ja anteriorinen osa taka-aivoista puolestaan erottuvat muista aivojen osista *Engrailed2* (*En2*)- ja *Engrailed1* (*En1*)- sekä *Pax2*- ja *Pax5*-geenien spesifisen ilmentymisen seurauksena (Blaess & Ang 2015).



Kuva 5. Hermostoputken sagittaalileikkaus, jossa on esitettyä aivorakkuloista kehittyvät aivojen osat. Kuvassa alhaalla vasemmalla on osoitettu hermostoputken anatomiset tasot: R, rostraalinen; D, dorsaalinen; C, kaudaalinen; V, ventraalinen. T, telenkefalon; D, dienkefalon; M, keskiaivot (mesenkefalon); H, taka-aiivot (hindbrain); IsO (isthmic organizer). (Lähde: Arenas ym. 2015, muokattu).

VD-akselin kaavoituksessa hermostoputki jakautuu levyihin (Kuva 6). Keskiavojen DA-neuronit kehittyvät hermostoputken ventraalisesta keskilinjasta, lattialevystä (FP): keskiaivojen FP:n (mFP) soluissa esiintyy mDA-esisolujen markkereita, kuten ALDH1a1:ta ja LMX1A:ta. Näille soluille tyypillistä on myös CORIN:n ja SHH:n tuotanto (Blaess & Ang 2015). Ennen luultiin ventrikulaarisen vyöhykkeen (VZ) radiaalisten gliasolujen ja neuronaalisten esisolujen kuuluvan sekä anatomisesti että funktionaalisesti erillisiin populaatioihin, mutta tutkimukset ovat osoittaneet radiaalisten gliasolujen duaalisen luonteen: sen lisäksi, että ne ohjaavat neuronien migraatiota, radiaaliset gliasolut ovat myös neurogeenisia ja toimivat prekursoreina uusille DA-neuroneille (Noctor ym. 2002; Bonilla ym. 2008). Radiaalisten gliasolujen eli DA-esisolujen molekulaarisen koostumuksen alueellinen heterogeenisyys selittää osaltaan keskiaivojen DA-neuronien funktionaalista ja anatomista diversiteettiä (Kriegstein & Götz 2003; Bonilla ym. 2008).

Mesodienkefalonin hermosolut muodostavat kaksi erillistä populaatiota (Lahti ym. 2012). A9- ja A10-ryhmien dopaminergisia neuroneita muodostuu sekä ventraalisen keskiaivojen alueelta että ventraaliselta dienkefalonilta (Smits ym. 2006; Blaess & Ang 2015). Näiden DA-populaatioiden kehitystä säätelevät osittain toisistaan poikkeavat geneettiset ohjelmat. Keskiaivojen DA-neuronien induktio vaatii *Shh*:n erityksen lattialevystä (FP) ja FGF8:n erityksen Iso:sta. FGF8:n avulla ylläpidetään mDA-neuronien selviytymisessä tarvittavien *En1*- ja *En2*-transkriptiotekijöiden synteesiä. Dienkefalonin neuronien kehitys puolestaan näyttää olevan riippumaton Iso:n erittämästä FGF:stä, sillä FGFR (FGF-reseptori) -mutanteilla keskiaivojen alueella sijaitsevilla neuroneilla on dienkefalonin alueen DA-



Kuva 6. Hermostoputken poikkileikkaus. Kuvaan on merkitty lattialevy (FP), josta DA-neuronit kehittyvät. Keskiaivojen ja dienkefalonin FP-alue sijaitsee kuvassa 5 olevan hermostoputken oranssin vyöhykkeen kohdalla (ventraalinen FP). (Lähde: Price ym. 2011, muokattu).

neuronien ominaisuuksia. FGF-signaalointia esiintyy keskiaivojen proliferaatiovaiheen DA-esisoluiissa, mutta ei enää postmitoottisissa DA-prekursoreissa. Hiirellä E11.5-vaiheeseen mennessä *Aldh1a1*-, *Wnt1*-, *Wnt8b*-geenin ilmentyminen rajoittuu keskiaivojen DA-soluihin. (Lahti ym. 2012).

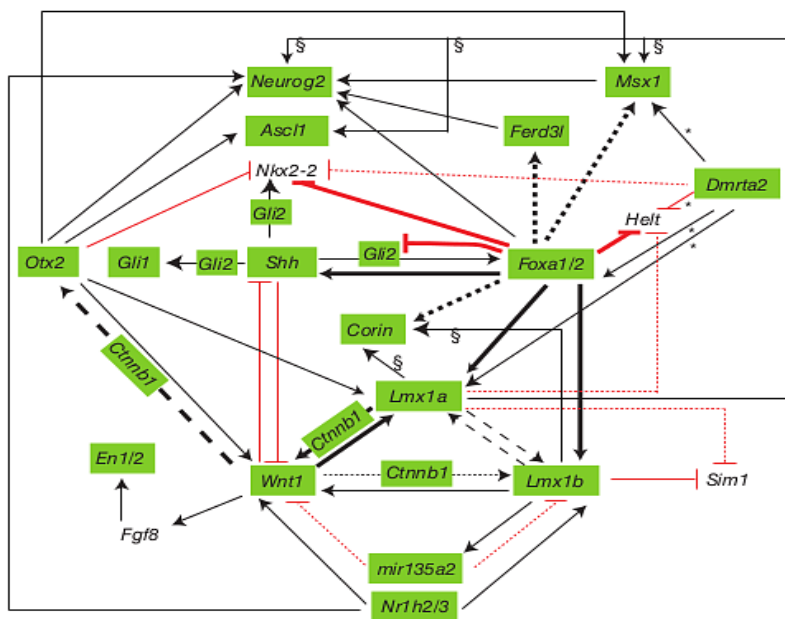
Sonic hedgehog (Shh) –signaalimolekyylillä on välttämätön ventraalisen hermostoputken kaavoittumisessa, sillä *Shh*-knock-out-mutanteilla kaikki ventraaliselta puolelta muodostuvat neuronit, kuten TH⁺-neuronit, puuttuvat täysin. Aluksi SHH:tä eritetään selkäjänteestä, ja myöhemmissä vaiheissa FP:stä itsestään, jolloin FP:stä tulee sekundäärinen ventraalinen organisoija (Blaess & Ang 2015). Ventraalisen puolen solut altistuvat suuremmille pitoisuuksille SHH:ta, minkä seurauksena ne ilmentävät erilaisia transkriptiotekijöitä verrattuna dorsaaliin soluihin. Ventraalisessa kaavoittumisessa vaikuttavat sekä temporaaliset että spatiaaliset vasteet SHH-signalointiin (Arenas ym. 2015). SHH aktivoi GLI2-transkriptiotekijän erittymistä FP:stä, mikä puolestaan indusoi GLI1-, FOXA1 ja FOXA2 (FOXA1/2) -transkriptiotekijöiden tuotannon E8.0-E8.5 -vaiheessa. FOXA1/2:sta puolestaan tarvitaan SHH:n erittymiseen FP:stä (Blaess & Ang 2015). *Msx1*-geenin kautta estetään toisen ventraalis-dorsaalisen akselin osan, pohjalevyn, muodostumista (Arenas ym. 2015).

Yhteenvetona varhaisen kaavoittumisen prosesseista voitaisiin sanoa, että AP- ja VD-akselien kaavoittumisessa merkittäviä säätelytekijät ovat ainakin FGF-, *Wnt*-, *En*- ja *Pax*-perheiden jäsenet sekä SHH, ja että A8-A10-ryhmien DA-neuronit kehittyvät keskiaivojen ja dienkefalonin lattialevyn gliasoluista.

4.4. mDA-neuronien spesifikaatio, neurogeneesi ja erilaistuminen

Ventraalisen keskiaivojen alueen induktiota seuraa erillisten mDA-esisoluluokkien spesifikaatio. Esisolut sijaitsevat hermostoputken lisääntymisvyöhykkeellä (ventrikulaarisella vyöhykkeellä, VZ) (Blaess & Ang 2015). Keskiaivojen dopaminergisten esisolujen spesifikaatiota ohjaa spesifinen geneettinen ohjelma (Kuva 7). FOXA1/2- ja OTX2-tekijät säätelevät *Lmx1b*- ja *Lmx1a*-geenien ilmentymistä. *Lmx1a* on välttämätön keskiaivojen FP:n mDA-solujen spesifikaatiolle, kun taas *Lmx1b*:tä tarvitaan erityisesti mDA-esisolujen erilaistumiseen. Lisäksi *Otx2* estää pohjalevylle tyypillisen geenin, *Nkx2-2*:n, ilmentymistä mFP:ssä. Keskiaivojen FP:ssä *Wnt1/β-kateniini* (*Ctnnb1*), *Lmx1a* ja *Lmx1b* muodostavat mDA-neuronien spesifikaatiolle välttämättömän positiivisen autoregulaatiosilmukan (Arenas ym. 2015).

Uusien hermosolujen lisääntymistä eli proliferaatiota multipotenteista esisoluista kutsutaan neurogeneesiksi. Mitoosin seurauksena muodostuu neuraalisia prekursorisoluja, joilla ei ole enää kykyä jakautua, mutta jotka voivat vielä erilaistua rajatuksi joukoksi hermoston soluja. Neurogeneesissä on kyse tasapainottelusta solujen lisääntymisen ja erilaistumisen välillä (Price ym. 2011). Keskiaivojen DA-esisolujen neurogeneesi tapahtuu keskiaivojen FP:n VZ:lla. Tapahtuman käynnistää proneuraalisen NEUROG2-tekijän induktio sekä *Ascl1*-geenin aktivaatio (Blaess & Ang 2015). *Wnt1/β-kateniini*-signalointi vähentää *Shh*:n määrää, mikä edistää mDA-proliferaatiota ja neurogeneesiä (Joksimovic & Awatramani 2013). WNT-perheen jäsenistä proliferaatiota säätelevät myös *Wnt2* ja *Wnt5a* (Blaess & Ang 2015). Neurogeneesille välttämättömiä ovat myös *Foxa1* ja *Foxa2*, jotka yhdessä säätelevät *Ferd3l*:sta ja *Lmx1a*:ta. *Ferd3l*-transkriptiotekijä repressoi *Hes1*:stä, ja *Lmx1a* puolestaan lisää *Ngn2*:n (*Neurog2*) ja *Msx1*:n ilmentymistä (Arenas ym. 2015). *Hes*-tekijät säätelevät esisolujen identiteettiä estämällä proneuraalisten geenien induktiota. Tutkimukset ovat osoittaneet myös mikroRNA-molekyyleillä olevan tärkeä rooli neuronien proliferaation säätelyssä (Blaess & Ang 2015).



Kuva 7. Dopaminergisen spesifikaation säätelyssä toimivaa geneettistä verkostoa. Tämä säätelyverkosto koskee ainoastaan esisolujen spesifikaatio- ja neurogeneesivaiheita, kun taas lopullisen erilaistumisen säätelyssä toimiva geneettinen verkosto on hyvin erilainen. Huomaa erityisesti neurogeneesin aloitusta säätelevien *Neurog2*- ja *Ascl1*-geenien tarkka säätely monen eri tekijän välityksellä, sekä *Shh*:n ja *Wnt1*:n välinen inhibitorinen vuorovaikutus toistensa kanssa. Nuolet kuvaavat aktivoivaa vaikutusta, punaiset viivat inhibitiota (Lähde: Blaess & Ang 2015, muokattu).

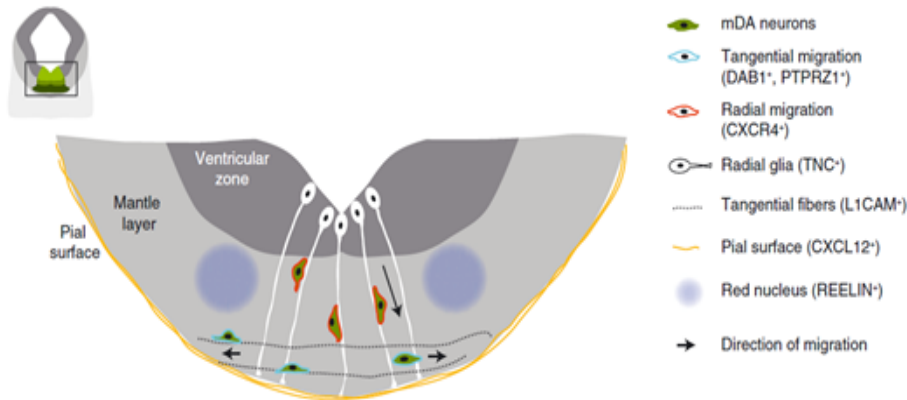
Solusyklistä poistuttuaan postmitoottiset solut siirtyvät lisääntymisvyöhykkeeltä hermostoputken sisäpinnalta ulkoreunalle päin kohti aivokuoren kerrosta erilaistumaan kypsiksi neuroneiksi (Price ym. 2011; Arenas ym. 2015). Hiirialkion mDA-neuronit siirtyvät E10.5-vaiheessa postmitoottiseen vaiheeseen ja alkavat ekspressoida *Nr4a2* (*Nurr1*) -geeniä, jonka mutanteilla mDA-neuronit tuhoutuvat apoptoottisesti. *Nr4a2*:sta tarvitaan koko erilaistumisprosessin ajan säätlemään geenejä, jotka määrittelevät mDA-neuronien lopullisen fenotyypin. NR4A2-proteiini aktivoi *Pitx3*-, *Th*-, *Slc6a3* (*Dat*)-, *Slc18a2*- ja *Dlk1*-geenejä. PITX3 säätelee positiivisen säätelyn kautta *Th*-, *Slc18a2*-, *Slc6a3*- ja *dopamiinireseptori D2* (*Drd2*)-geenejä (Blaess & Ang 2015). NURR1, PITX3 ja EN1/2 ovat välttämättömiä säätelijöitä erilaistumisen terminaalivaiheessa sekä mDA-neuroneiden ylläpidossa. WNT5A edistää keskiaivojen mDA-esisolujen erilaistumista toiminnallisiksi mDA-neuroneiksi ja *Wnt1*:stä tarvitaan mDA-neuronien selviytymiseen (Arenas ym. 2015). Kypsät mDA-neuronit siis ilmentävät sellaisia geenejä, jotka mahdollistavat niille tyypillisen fenotyypin ja toiminnan: aktiivisia ovat esimerkiksi dopamiinin biosynteesissä toimivia entsyymejä ja dopamiinin kuljetuksesta huolehtivia proteiineja koodaavat geenit (Blaess & Ang 2015). DA-neuronien kehityksen säätely on monimutkainen erilaisten tekijöiden monitasoisista vuorovaikutuksista muodostuva verkosto, josta on tuotu esille tässä kappaleessa ainoastaan pääpiirteet.

mDA-neuronit jaetaan alaryhmiin niiden anatomisen sijoittumisen, suuntautumisen ja toiminnan sekä geeniekspression mukaan. SNpc/A9-DA-neuroneille tyypillisiä markkereita ovat *Aldh1a1* ja *KCNJ6* (*Girk2*). Tutkimuksissa *Foxa1*:n ja *Foxa2*:n konditionaalinen deleetio johti *Girk2*:n ja SNc/A9 neuronien vähenemiseen, mutta ei vaikuttanut yhtä voimakkaasti VTA/A10-neuroneihin. Myös *Sox6*- ja *Pitx3*-mutaatioilla on samankaltaisia vaikutuksia (Arenas ym. 2015). *Otx2* ilmenee VTA:n alueella toimien antagonistisesti SLC6A3:lle ja KCNJ6:lle, ja toisaalta se ei ilmene SNpc:ssä, jonka mDA-soluissa näiden toimintaa ei estetä (Blaess & Ang 2015). Tiedot alatyypien välisistä molekulaarisista eroista ovat edelleen puutteelliset ja mahdollisesti myös muut geenit vaikuttavat alatyypien lopullisen identiteetin kehittymiseen (Arenas ym. 2015).

4.5. mDA-neuronien migraatio ja aksonien kohdentuminen

Erilaistuessaan neuronit aloittavat migraation pois VZ:lta kohti muodostuvaa ventraalisen keskiaivojen aivokuoren kerrosta, jossa tapahtuu lopullinen järjestäytyminen SNpc-, VTA- ja RRF-alueille (Blaess & Ang 2015). Aivokuorelle päästyään mDA-neuronit ovat muodostuneet TH⁺-neuroneiksi (Arenas ym. 2015). Tutkimukset ovat osoittaneet, että SNpc:n mDA-neuronien migraatio tapahtuu ensin radiaalisesti aivokuoren alueelle, ja sen jälkeen tangentialisesti pois keskitasosta muodostamaan SNpc:n (Kuva 8). Radiaalista migraatiota ohjaavat radiaaliset gliasolut TENASCIN-proteiinin, CXCL12-ligandin ja sen reseptorin, CXCR4:n, välityksellä. Lateraalinen migraatio tapahtuu tangentialisesti järjestäytyneiden säikeiden avulla: tangentialiset säikeet tuottavat L1CAM-soluadheesiomolekyyliä ja mDA-neuronit sen ligandia, PTPRZ1:sta, joiden vuorovaikutus ohjanee tangentialista siirtymistä. Ekstrasellulaarisen matriksin REELIN-molekyyli toimii neuronaalisessa migraatiossa ja neuronien lopullisessa sijoittamisessa tietyille

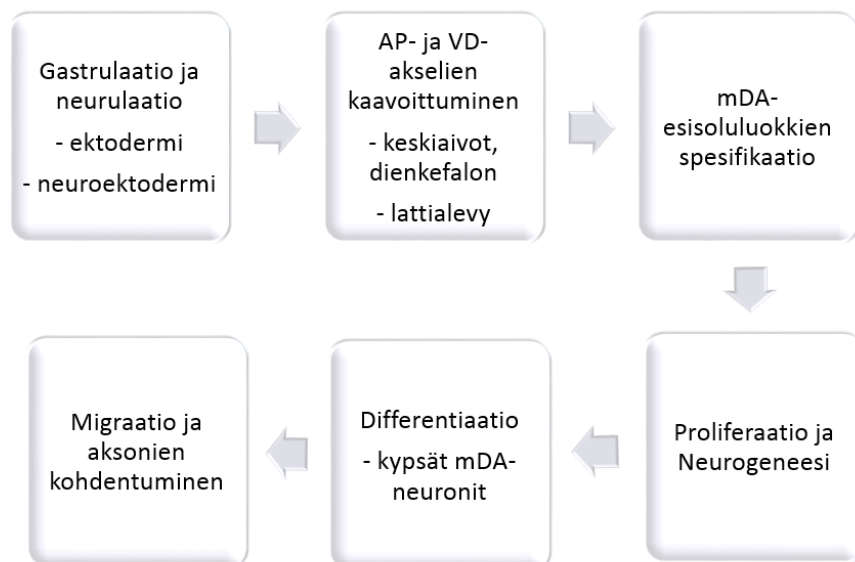
alueelle aivoissa (Blaess & Ang 2015). Myös *Ntn1* (*netrin 1*) säätelee mDA-neuronien migraatiota yhdessä *Dcc*-reseptorinsa kanssa. *Dcc*:n deleetio saa aikaan neuronien väärin sijoittumista, mDA-neuronien alentuneen määrän sekä poikkeavan nigrostriataalisen reitin hermotuksen (Arenas ym. 2015).



Kuva 8. Neuronien migraatio ventrikulaariselta vyöhykkeeltä lopullisiin kohteisiinsa. SNpc:n muodostavat hermosolut kulkevat ensin radiaalisesti gliasoluja pitkin, ja sen jälkeen lateraalisesti tangentiaalisten säikeiden avulla. Vasemmalla ylhäällä on hermostoputken poikkileikkaus, jossa vihreällä on merkitty lattialevy, josta mDA-solut kehittyvät (Lähde: Blaess & Ang 2015, muokattu).

Keskiaivojen DA-neuronit kasvattavat aksoneitaan saavuttaen lopulta etuaivojen kohteensa. Dopaminergisten solujen aksonien kasvu ohjautuu eri tavoin aivojen eri kohdissa. Aluksi aksonit pidentyvät dorsaalisesti ventrokaudaaliselle alueelle keskiaivoissa. Seuraavaksi ne suuntaavat keskiaivojen ja dienkefalonin läpi ja lopulta saavuttavat telenkefalonin ja striatumin. Signaalintikeskus MHB säätelee aksonien kasvua indusoimalla Semaforiini-3F (Sema3F)-tekijän tuotannon. Sema3F ohjaa, yhdessä reseptoreidensa ja ko-reseptoreidensa, kuten neuropiliinien (Npn-1, Npn-2) ja L1CAM:n kanssa, aksonien kasvua oikeaan suuntaan. Muita aksonien kohdentumista ohjaavia tekijöitä ovat esimerkiksi Robo-perheen reseptorit ja vastaavat Slit-perheen ligandit sekä efrini-perheen jäsenet. Eri mDA-alityypit näyttävät reagoivan eri tavoin ympäristöönsä, ja niiden aksonien kohdentumista ohjaavat eri molekyylit: esimerkiksi *Robo1* ja *Robo2* ilmenevät eri tavoin mustatumakkeessa ja VTA-alueella. Aksonien kohdentumista ohjaavien molekyylien ilmentymisen lokalisatio voi olla konservoituneena alkionkehityksestä aikuisuuteen, tai vaihdella eri kehitysvaiheiden mukaan: esimerkiksi efrinejä on läsnä myös aikuisen nigrostriataalisella reitillä alhaisilla pitoisuuksilla. Ne ylläpitävät neuronaalisia kontakteja ja synaptista plastisiteettia. Aikuisilta yksilöiltä on löytynyt mustatumakkeesta myös DCC-netrin-perheeseen kuuluvia tekijöitä sekä Slit/Robo-signaalimolekyylejä. Vaurioituneella alueella ohjautumista säätelevien molekyylien transkriptio muuttuu, mikä estää endogeenistä regeneraatiota (Prestoz ym. 2012).

Yhteenvetona voitaisiin sanoa, että keskiaivojen dopaminergisten neuronien kehitys on useita vaiheita käsittävä prosessi (Kuva 9), jota ajavat eteenpäin kullekin vaiheelle spesifiset erilaisten eritettyjen molekyylien ja niiden reseptoreiden muodostamat signaalintiverkostot sekä transkriptiotekijöiden säätelemät geenien aktivaatiot. Dopaminergisten neuronien induktioon, spesifikaatioon, neurogeneesiin ja differentiaatioon sekä solujen ylläpitoon ja vaihtoehtoisten kohtaloiden estämiseen osallistuu monia erilaisia tekijöitä (Blaess & Ang 2015). Tärkeitä säätelijöitä ovat *En-*, *Pax-*, *Lmx-* ja *Otx-*geeniperheet, jotka ohjaavat neuronaalisia prekursorisoluja saavuttamaan dopaminergisen esisolun identiteetin. Nämä solut alkavat transkriptoida *Foxa2*:sta, *Lmx1a/b*:ta ja *Msx1*:ta, jotka ohjaavat soluja kohti DA-kohtaloa, sekä *Ngn2*:sta, joka säätelee neurogeneesiä ja solusyklistä poistumista. Transkriptiotekijöiden täsmälliset funktiot sekä niiden monitasoiset yhteydet Wnt-, Shh-, TGF β - ja FGF-signaalien kanssa ovat vielä osittain epäselvät ja verkostojen selvitys vaatii vielä lisää tutkimusta. Muodostuneet postmitoottiset TH-positiiviset DA-prekursorit tunnistaa niiden maturaatiosta ja ylläpidosta huolehtivista transkriptiotekijöistä. Lopullisen fenotyypin saavuttaneet, erilaistuneet keskiaivojen DA-neuronit ilmentävät *Pitx3*:sta, dopamiinitransportteria (DAT) ja dopadekarbosyklaasia (*Ddc*) sekä dopamiinisynteesin avainensyymiä, *TH*:ta (Smits ym. 2006; Lahti ym. 2012). Erilaistuuessaan hermosolut kulkeutuvat oikeille paikoilleen aivoissa ja aksonit kohdentuvat sekä muodostavat synapsit juuri oikeisiin kohteisiinsa (Blaess & Ang 2015). DA-neuronien alatyypien kehityksen geneettisen säätelyn tuntemus on osittain edelleen puutteellista. Tärkeää olisi ymmärtää säätelymekanismit mahdollisimman tarkasti, jotta voitaisiin kehittää mahdollisimman tehokkaita menetelmiä solukorvaushoitojen toteuttamiseksi (Arenas ym. 2015).



Kuva 9. mDA-hermosolujen kehityksen päävaiheet. Hermoston kehitys alkaa ektodermin jakautuessa neuro- ja pintaektodermiin. Alkion neuroektodermin hermostolevystä muodostuu hermostoputki, joka jakautuu osiin AP- ja VD-akselien kaavoittumisessa. Näin muodostuvat keskiaivot ja etuaivojen dienkefalon, joiden lattialevyistä alkaa mDA-solujen kehitys: esisolujen spesifikaatio ja solujen lisääntyminen. Postmitoottiset solut erilaistuvat kypsiksi mDA-neuroneiksi ja siirtyvät samalla lisääntymisvyöhykkeeltä kohti lopullista sijaintia (SNpc:tä). Lopuksi A9-ryhmän mDA-solut pidentävät aksoneitaan etuaivojen kohteisiinsa muodostaen nigrostriataalisen reitin.

5. Parkinsonin tauti

Parkinsonin tauti (PD) on progressiivinen neurodegeneratiivinen sairaus (Arenas ym. 2015), jossa mDA-hermosolujen degeneraatio SNpc:ssä aiheuttaa dopamiinin vajausta striatumissa, ja johtaa laajoihin motorisiin häiriöihin (Prestoz ym. 2012; Blaess & Ang 2015). Parkinsonin taudin oireita ovat mm. liikkeiden kankeus ja hitaus, lepovapina, askelluksen häiriöt sekä asentoon liittyvä epävakaumus. Sairauden edetessä nigrostriataalinen reitti menettää asteittain toimintakykynsä neuronien tuhoutuessa ja striatumin dopaminergisen hermotuksen hävityessä. Parkinsonin taudissa tuhoutuu myös muita neuronien alatyyppejä, mikä aiheuttaa muitakin oireita kuin vain motoriikan heikentymistä, mutta suurin vaikutus tyypillisten PD-oireiden synnyssä näyttää olevan mustatumakkeen *pars compacta*-alueen mDA-neuronien tuhoutumisella. Tämän vuoksi kyseiset neuronit ovatkin solukorvaushoito tutkimuksen pääkohde PD-hoitoja kehiteltäessä. Nykyään Parkinsonin tautia hoidetaan pääasiassa farmakologisesti. Käytetyin lääke on dopamiiniprekursori levodopa (L-dopa) (Arenas ym. 2015). Toisin kuin dopamiini, se voi läpäistä veri-aivoesteen. Aivoissa DA-neuronit muuttavat L-dopan dopamiiniksi. L-dopan käyttö sairauden alkuvaiheessa on tehokas hoito, mutta DA-neuronien progressiivinen tuhoutuminen aiheuttaa sen, että sairauden edetessä pidemmälle, eivät korkeatkaan annostukset enää riitä. Joillakin potilaista L-dopa aiheuttaa sivuvaikutuksia (Morizane & Takahashi 2016). Potilaille, joille lääkkeitä ei ole riittävästi hyötyä, voidaan tehdä myös syväaivostimulaatio (DBS) (Arenas ym. 2015). Vaikka näistä hoitomenetelmistä onkin hyötyä motoristen oireiden helpottamiseksi, niillä ei ole juurikaan parantavaa vaikutusta muihin PD:n oireisiin, kuten masennukseen, hallusinaatioihin, dementiaan, autonomisiin häiriöihin tai univaikeuksiin (Westerlund ym. 2010). Farmakologisten ja kirurgisten menetelmien avulla ei pystytä hidastamaan taudin etenemistä eikä korjaamaan vaurioituneita neuroneita. Kantasoluhoidot puolestaan voisivat toimia sairauden parannuskeinona, tai ainakin hidastaa sen etenemistä (Arenas ym. 2015).

PD:n uskottiin pitkään olevan ei-perinnöllinen sairaus, mutta nykyään on löydetty jo useita geenejä, joiden mutaatiot näyttävät lisäävän riskiä sairastua Parkinsonin tautiin (Westerlund ym. 2010). Ainakin mutaatiot *LRRK2*-, *PARK7*- ja *PINK1*-geeneissä ovat yleisiä periytyvälle PD:lle altistavia tekijöitä (Genetics Home Reference: Health Conditions: Parkinson disease 2012). Sairastumisen herkkyyttä lisäävien geenien tunnistaminen on tärkeää, jotta ymmärretään, mille säätelyreiteille ne osallistuvat. Näitä geenejä voitaisiin käyttää biomarkkereina varhaisen ja luotettavan diagnoosin saamiseksi (Westerlund ym. 2010). Vaikka PD:n taustalla olevat ja sitä aiheuttavat mekanismit ovat edelleen osittain tuntemattomia, Parkinsonin taudilla on huomattu olevan vahvoja yhteyksiä ainakin proteiinien väärin laskostumisen, mitokondrioiden ja ubikitiini-proteasomin toimintahäiriöiden sekä oksidatiivisen stressin kanssa. Vaihtelevat fenotyypit potilailla viittaavat siihen, että monien erilaisten molekulaaristen reittien virheet voivat toimia laukaisevana tekijänä taudin puhkeamisessa. Monet mDA-aksonien ohjauksessa toimivien geenien polymorfismit voivat aiheuttaa dopaminergisten ratojen poikkeuksellisen muodostumisen alkionkehityksessä lisäten riskiä sairastua Parkinsonin tautiin. Esimerkiksi transkriptionaaliset muutokset *ROBO*/*Slit*-vuorovaikutuksissa voivat

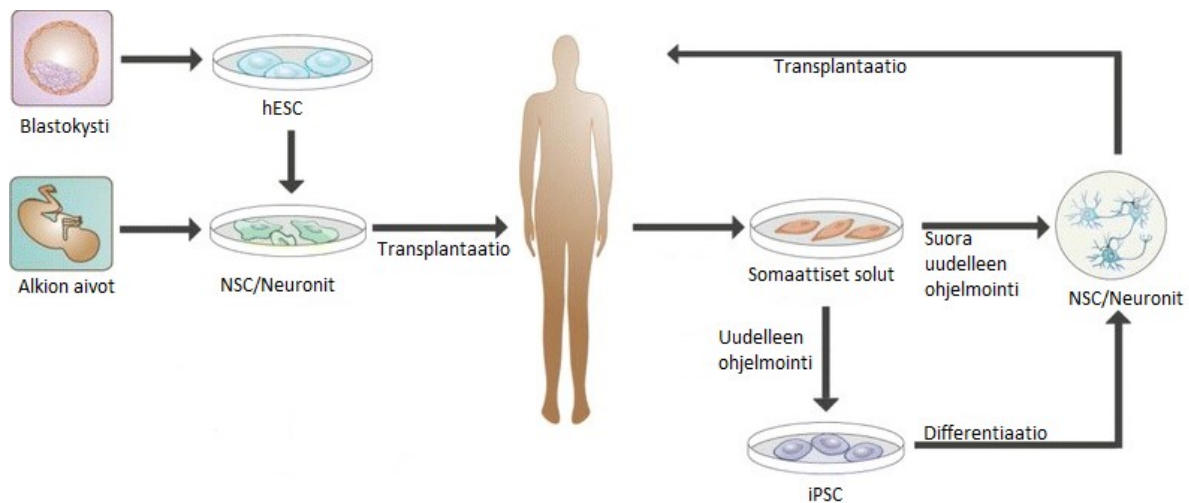
muuttaa kemoreplusiivista signaalia ja aiheuttaa synaptisten kontaktien heikentymistä ja häviämistä saaden lopulta aikaan neuronien tuhoutumisen (Prestoz ym. 2012).

6. Parkinsonin taudin solukorvaushoitojen tutkimus ja kehitys

Soluterapiatutkimuksen avulla voidaan kehittää uusia lääkkeitä ja hoitokeinoja ihmisten sairauksiin, jotka aiheutuvat solujen vaurioista tai toimintahäiriöistä. PD-DA-soluterapiahoidoissa käytettävien solujen tulisi täyttää useita eri vaatimuksia: solujen täytyy lisääntyä soluviljelmässä, sallia täsmällinen geneettinen manipulaatio ja erilaistua tehokkaasti juuri niiksi soluiksi, joita implantaatiossa tarvitaan (Rathjen ym. 2002). Solujen tulisi selvittää transplantaatiosta, liittyä vastaanottajakudokseen aiheuttamatta solujen liikakasvua, saavuttaa stabiili, kypsä ja alatyypispesifinen fenotyyppi *in vivo* sekä pystyä uudelleen hermottamaan juuri haluttua striatumia, mutta ei muita kohteita (Arenas ym. 2015). Siirrettävien solujen ei tulisi olla liian varhaisessa vaiheessa erilaistumista, koska tällöin niiden lisääntymisaktiivisuus on paljon suurempi, mikä altistaa neuraaliselle liikakasvulle ja tuumorien muodostumiselle. Toisaalta solujen ei myöskään tulisi olla liian kypsiä, sillä silloin niiden selviytyvyys transplantaatiossa laskee. Soluterapiahoiton infektioriskiä pienentää se, että missään vaiheessa protokollaa ei käytetä mitään soluja tai materiaaleja, jotka ovat peräisin muista eliöistä kuin ihmisestä (Morizane & Takahashi 2016). Lisäksi solujen täytyy vapauttaa dopamiinia ja niillä on oltava DA-neuroneille ominaiset biokemialliset ja sähköfysiologiset ominaisuudet. Niiden täytyy pystyä poistamaan PD:n oireita. Solujen *in vivo* kehityksen tunteminen ja tiedon karttaminen parantavat ihmisen mDA-neuronien tuotantoprosessin tehokkuutta *in vitro*, sekä auttavat tuottamaan laadullisesti yhä parempia soluja hoitoihin (Arenas ym. 2015). Tarkan kehitystä säätelevän geneettisen ja molekulaarisen verkoston tuntemisen avulla voidaan kantasolut saada erilaistumaan kohdennetusti juuri halutuiksi kohdesoluiksi (Kiecker ym. 2016). Parkinsonin tautia tutkitaan paljon mallieläinten avulla. Koe-eläimelle aiheutetaan PD tuhoamalla selektiivisesti neurotoksiinien avulla eläimen keskiaivojen striatum-DA-systeemi, minkä jälkeen korvaussolujen toimivuus voidaan testata PD-eläimellä (Morizane & Takahashi 2016).

6.1. Erilaiset kantasolut mDA-lähdepopulaationa

Kantasolujen perusominaisuudet ovat kyky muodostaa useita eri solutyyppejä ja monistumiskyky eli kyky tuottaa samaa solutyyppeä jakautumalla. Multipotenttien kantasolujen (ts. somaattisten kantasolujen) kyky erilaistua on rajallinen; esimerkiksi hermoston kantasolut (NSC) voivat erilaistua vain neuroneiksi, astrozyyteiksi ja oligodendrosyyteiksi. Pluripotentit kantasolut (PSC) puolestaan voivat erilaistua kaikiksi yksilössä esiintyviksi soluiksi. Somaattisten kantasolujen lisääntymisaktiivisuus on alhaisempi kuin pluripotenttien kantasolujen (Morizane & Takahashi 2016). Ihmisen mDA-neuroneita on onnistuttu kehittämään *in vitro* sikiön hermoston kanta- ja prekursorisoluista (NS/PC), alkion pluripotentteista kantasoluista (ESC) ja uudelleen ohjelmoinnin avulla somaattisista soluista, jotka indusoidaan pluripotentteiksi kantasoluiksi (iPSC) (Kuva 10) (Arenas ym. 2015).



Kuva 10. Erityyppiset kantasolut mDA-lähdepopulaationa Parkinsonin taudin hoidoissa. hESC, ihmisalkion kantasolut; NSC, neuraaliset kantasolut; iPSC, indusoidut pluripotentit kantasolut. (Lähde: Han ym. 2015, muokattu).

Valmiita DA-neuroneita voidaan saada abortoitujen alkioiden ventraalisen mesenkefalonin (VM) alueelta. Eläinkokeissa nämä neuronit selvisivät transplantaation jälkeen striatumissa. Parkinsonin tautia on hoidettu jo 1980-luvulta lähtien abortoiduista alkioista saaduilla mesenkefalonin soluilla. Potilaiden pitkäaikainen seuranta, ruumiinavaukset ja funktionaaliset kuvantamismenetelmät osoittivat, että potilaiden oireet helpottuivat, transplantoidut solut olivat pitkäikäisiä ja ne toimivat, kuten DA-neuronit. Toisaalta joillekin potilaista kehittyi siirrännäisen indusoimia pakkoliikkeitä ja muutamalla prosentilla hoitoa saaneista havaittiin aivoissa proteiiniagregaatteja, jotka ovat tyypillisiä PD-potilailla. Suuri puute on se, että luovuttajakudoksia transplantaatiota varten on vaikea saada: yhtä potilasta kohden tarvitaan useita abortoituja alkioita, jotka ovat 9-11 viikon ikäisiä, ja lisäksi ne olisi löydettävä optimaalisella aikavälillä; soluja voidaan säilyttää noin viikon ajan, minkä jälkeen niiden laatu heikkenee. Se, että yhteen transplantaatioon otetaan soluja useammalta eri yksilöltä, vaikeuttaa immuunipuolustuksessa toimivan HLA (human leucocyte antigen) -systeemin määritystä (Morizane & Takahashi 2016).

Hermoston kanta- ja prekursorisoluja (NS/PC) esiintyy ihmisen kehittyvässä aivoissa ja lisäksi aikuisella niitä löytyy hippokampuksesta ja subventrikulaariselta vyöhykkeeltä sekä mahdollisesti hajukäämistä. Soluterapiahoidoissa NS-soluja viljellään ja lisätään mitogeenisten tekijöiden avulla, mutta protokollat tarpeeksi suurten määrien tuottamiseksi klinisiin sovelluksiin ovat puutteelliset (Morizane & Takahashi 2016). Hermoston kanta- ja prekursorisoluista on vaikea saada tuotettua laadultaan ja solutyypiltään homogeenistä DA-neuroni linjaa, mikä voi johtua solujen heterogeenisyydestä jo alkutilanteesta tai puutteellisista protokollista. Ihmisalkion kudosten käyttöön tutkimuksissa liittyy runsaasti logistisia ja eettisiä ongelmia, mikä on johtanut siihen, että tutkijat pyrkivät kehittämään vastaavia soluviljelmistä muista lähteistä. Näiden soluviljelmien täytyy laadultaan ja turvallisuudeltaan vastata mahdollisimman pitkälti yksilön normaaleja soluja ennen kuin niitä voidaan käyttää kliinisissä kokeissa (Arenas ym. 2015).

Ihmisen pluripotentteja kantasoluja saadaan tutkimuksiin alkion blastokystin sisäsolumassasta tai uudelleen ohjelmoimalla jo erilaistuneita somaattisia soluja. Embryonaalisia kantasoluja koskevat samat eettiset

ongelmat kuin NS-soluja. ES-solujen käyttöön liittyvässä eettisiä ja moraalisia ongelmia läpikäyvässä keskustelussa esille nousevat erityisesti eri-ikäisten alkioiden status: missä vaiheessa kehitystä voidaan puhua ihmisyksilöstä, ja onko varhaisen kehitysvaiheen ihmisyksilön uhraaminen tutkimukselle tai hoitotarkoitukseen eettisesti ja moraalisesti oikein vai väärin. Myös ihmisen ES-solujen kloonauksen sallimisesta terapeuttisiin tarkoituksiin väitellään paljon (De Wert & Mummery 2003; Arenas ym. 2015).

Indusoituja pluripotentteja kantasoluja johdetaan somaattisista soluista, kuten fibroblasteista, pakottamalla tiettyjen geenien ilmentyminen (Morizane & Takahashi 2016): esimerkiksi Yamanaka-tekijöillä (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* ja *c-Myc*, lyhyesti OSKM) voidaan uudelleen ohjelmoida somaattisia soluja iPSC-soluiksi (Takahashi & Yamanaka 2006), mutta koska *c-Myc* on onkogeeni ja tällä tavoin muodostetut iPSC:t tarvitsevat hiirestä otettuja ruokkijasoluja viljelmissä selvittääkseen, juuri tällä menetelmällä ei voida tuottaa DA-neuroneita kliinisiin sovelluksiin. Nykyään kuitenkin pystytään tuottamaan ja ylläpitämään iPSC-soluja huomattavasti turvallisemmin ja tehokkaammin. Indusoidut PSC-johdetut DA-neuronit poistavat joitain ongelmia, mitä embryonaalisten solujen käytössä esiintyy: iPSC-solujen saamiseksi ei tarvitse uhrata ihmisygootteja vaan solut transplantaatiota varten voidaan ottaa potilaan omista somaattisista soluista: solut palautetaan niin sanottuun nollakehitystilaan ja uudelleen ohjelmoidaan eli saadaan erilaistumaan halutuiksi DA-neuroneiksi linjaspesifisten tekijöiden avulla. Potilaan omien eli autologisten solujen käyttö ainakin teoriassa vähentää hylkimisreaktioita, koska näillä soluilla pitäisi olla potilaan kanssa identtinen HLA-tyyppi (Morizane & Takahashi 2016), mutta ne saattavat kantaa geneettistä tai ympäristön aiheuttamaa vahinkoa altistaen potilaan Parkinsonin taudin kehittymiselle. Tästä syystä voisi olla parempi vastaanottaa uusia DA-soluja terveen yksilön somaattisista soluista johdetuista iPSC:sta, vaikka tässä tapauksessa immunosupressiolta ei välttyttäisikään. Somaattisia soluja voidaan uudelleen ohjelmoida myös suoraan kohdesoluiksi ilman pluripotenttia vaihetta: fibroblastien, hepatosyyttien ja astrosyyttien uudelleen ohjelmoinnissa indusoiduiksi neuroneiksi (iN) käytetään yleisesti *Brn1/2-*, *Ascl1-* ja *Myt11*-tekijöitä (BAM-tekijät) (Arenas ym. 2015; Black ym. 2016).

6.2. Kantasolusta mDA-neuroniksi

DA-neuronien induktio tapahtuu samalla tavalla sekä embryonaalisista että indusoiduista pluripotentteista kantasoluista. Induktio voidaan tehdä käyttämällä hiireltä otettuja ruokkijasoluja, tai PS-soluja voidaan kasvattaa kasvatusliuoksessa, jossa on tietynlaisia embryonaalisia soluagregaatteja (Morizane & Takahashi 2016). Ensimmäisissä protokollissa, joiden avulla onnistuttiin tuottamaan TH⁺-soluja, oli vielä monia puutteita solujen laadun ja menetelmän tehokkuuden suhteen: solut eivät olleet oikealla tavalla erilaistuneet eivätkä ne tuottaneet mDA-neuroneille spesifisiä transkriptiotekijöitä. Nämä solut eivät myöskään selvinneet transplantaatiosta (Arenas ym. 2015).

Vaikka hiiren PSC-johdetut DA-neuronit ovat toimineet hyvin PD-soluterapian mallinnuksessa, ihmisen PS-soluilla on ollut heikko selviytyvyys *in vivo*, mikä johtunee neuronien epätäydellisestä spesifikaatiosta.

Erilaisia protokollia mDA-neuronien tuottamiseksi pluripotenteista kantasoluista on paljon; tässä on esitettynä Kriksin ym. käyttämän protokollan pääperiaatteet. Ryhmä tuotti keskiaivojen FP-prekursorisoluja pluripotenteista kantasoluista altistamalla solut SHH:lle ja aktivoimalla Wnt/ β -kateniini -signaloinnin GSK3:n -inhibition avulla. Tämä indusoi LMX1A:n tuotannon FOXA2⁺-FP-prekursoreissa. Ryhmä onnistui tuottamaan oikeita geenejä ilmentäviä mDA-identiteetin omaavia soluja protokollalla, joka yhdisti duaalisen SMAD-inhibition, käsittelyn SHH-agonistilla ja FGF8:lla sekä CHIR:llä, joka on GSK3 β -inhibiittori. Tutkijat tunnistivat mDA-neuronit viljelmässä mittaamalla spesifisten markkerigeenien (*Lmx1a*, *Neurog2*, *Ddc*, *TH*, *Foxa2*, *Nurr1*, *Pitx3*, *Dat*, *KCNJ6*) ilmentymistasoja (Kriks ym. 2011). BMP-, aktiviini-, nodal- ja TGF β -signaalikaskadien duaalinen inhibitio SMAD-tekijöillä indusoi neuraalisen erilaistumisen tehokkaasti ja poisti tarpeen käyttää viljelmissä ruokkijasoluja (Arenas ym. 2015). Solujen ohjaamisessa tietylle linjalle on tärkeää huomioida myös temporaalinen säätely. Lisäksi tutkijat onnistuivat tämän protokollan avulla tuotetuista soluista tunnistamaan uusia, ennen tuntemattomia, mDA-neuronien aktiivisia geenejä. He tutkivat näiden solujen selviytymistä ja toimintaa *in vivo* kolmella eri PD-mallilajilla: ihmisen ES-soluista muodostetut mDA-solut selvisivät pitkäaikaisissa siirteissä hiirten ja rottien aivoissa sekä paransivat PD-oireita. Transplantaatiota testattiin myös PD-reesusapinoilla, joilla siirteet selviytyivät ja toimivat erinomaisesti. Transplantoidut solut eivät indusoineet neuraalista liikakasvua. Lisäksi ne saivat aikaan toiminnallista palautumista lääkeainein indusoiduista motorisista häiriöistä (Kriks ym. 2011). Tutkimusten avulla onnistutaan kehittämään asteittain yhä parempia protokollia oikeantyyppisten homogeneisten solulinjojen muodostamiseen. Yhteenvedona voitaisiin sanoa, että erilaisten signaalimolekyylien vaikutukset pitää tuntea mahdollisimman hyvin, jotta voitaisiin tuottaa turvallisia solukorvaushoidoissa käytettäviä SNpc/A9-alatyypin mDA-soluja mahdollisimman tehokkaasti (Arenas ym. 2015).

PD:n mallintamiseksi tuotetaan iPS-soluista mDA-neuroneita, jotka kantavat yhtä tai useampaa taudille tyypillistä mutaatiota. TALENS ja CRISPR/Cas9 -geenin-editointimenetelmiä käytetään mutaatioiden muodostamisessa. Indusoitujen PS-solujen käyttö tautimallia kehitettäessä on erityisen hyödyllinen, koska näin voidaan tuottaa soluja mallinnukseen suoraan PD-potilaiden soluista. Näin voidaan tutkia myös sairauden geneettistä taustaa, kuten mutaatioita tai polymorfismeja, jotka ovat assosioituneet tietyn tyyppiseen Parkinsonin tautiin. Lisäksi saadaan tautimalleja myös taudin varhaisempiin vaiheisiin, mikä tehostaa taudin ehkäisemiseen liittyvää tutkimusta (Arenas ym. 2015).

Purifikaatio vasta-aineiden avulla on osoittautunut hyväksi keinoksi valmistaa homogeeninen solulinja, jolla on sopiva erilaistumisaste ja oikea fenotyyppi. Keskiaivojen DA-esisolujen rikastamiseksi käytetään usein vasta-ainetta *Corin*:lle, joka ilmentyy alkion FP:ssä. Corin⁺-solut erotellaan fluoresenssi-aktivoitulla solulajittelulla (FACS) (Morizane & Takahashi 2016), jonka avulla voidaan heterogeenisestä soluviljelmästä poistaa ei-halutut solutyypit (Arenas ym. 2015).

6.3. Transplantaatio ja aksonien ohjautuvuus

Transplantaatiossa solut siirretään yleensä striatumiin, jossa niiden tulisi paikallisesti vapauttaa dopamiinia. Dopamiinin vapautuminen riippuu neuronien muodostamista synaptisista yhteyksistä. Dopamiini on varastoituneena siirrettyjen solujen vesikkeleihin ja sen vapautumista säätelevät synapsipäätteiden dopamiinitransportterit. Siirretyt solut voivat toimia efektoreina lääkehoidolle eli ne muuntavat L-dopan dopamiiniksi (Morizane & Takahashi 2016). Hoitojen onnistumisen kannalta on tärkeä määrittää siirrettyjen solujen aksonien kyky kasvaa ja saavuttaa niiden lopulliset kohteensa. Tutkimuksissa hiiren vaurioituneelle SN-alueelle siirretyt DA-neuronit pystyivät korjaamaan nigrostriataalisen reitin rakenteen ja toiminnan, mikä viittaa siihen, että aikuisen yksilön aivoissa on läsnä samoja spesifisiä vihjeitä, jotka ohjaavat aksonien kasvua alkiossa, ja joihin siirretyt solut pystyvät reagoimaan. Kantasoluista tuotettujen mDA-solujen aksonien ohjaamisessa voidaan käyttää Sema3A- ja Sema3C-molekyylejä, koska istutetuissa soluissa on semaforiin neuropiliini-reseptoreita. Yksi mahdollisuus parantaa transplantaation tehokkuutta voisi olla vihjemolekyylien reseptoreiden ilmenemisen muokkaus: geeniterapian keinoin voitaisiin joko vahvistaa tai heikentää solujen vastetta ulkoisiin ärsykeisiin. Tällöin täytyisi kuitenkin huomioida molekyylien monet vaikutukset: tietty tekijä ohjaa aksonien kohdentumista eri tavoin eri kohdissa reittiä. On myös harkittava tarkkaan vihjeiden moninaiset vaikutukset: esimerkiksi Sema3A inhiboi keskushermoston aksonien regeneraatiota, ja toisaalta sillä on attraktiivinen vaikutus ESC-johdettuihin DA-neuroneihin. Solujen kyky reagoida ympäristön tarjoamiin vihjeisiin on tiettyssä vaiheessa korkeampi kuin muulloin, mikä kertoo transplantaation ajoituksen olevan tärkeä muuttuja prosessin onnistumiseksi. Soluterapiahoitoja kehiteltäessä on huomioitava myös mDA-solujen aksonien kohdentumisessa toimivien signaalien heterogeenisyys eri alapopulaatioiden välillä. Karttuva tieto siitä, miten DA-aksonit ohjautuvat niiden luonnollisessa ympäristössään lopullisiin kohteisiinsa alkionkehityksen aikana, auttaa hermoston sairauksien solukorvaushoitojen kehittämisessä tehokkaammin toimiviksi (Prestoz ym. 2012).

6.4. Soluterapian kehityksen tulevaisuus

Tulevaisuuden haasteisiin kuuluu mDA-neuronien kehityksen yksityiskohtien selvitys. Vaikka pääsäätelijät tunnetaankin, selvitettävänä ovat vielä eri signaalireittien väliset monimutkaiset ja monitasoiset vuorovaikutukset (Blaess & Ang 2015). Tutkittavana on vielä se mihin kaikkiin signaalireitteihin indusointiin käytettävä molekyyli vaikuttaa: voiko molekyyli aktivoida myös sellaisia solutyyppejä, joita kantasolujen erilaistamisessa ei haluta saada aikaiseksi ja näin aiheuttaa heterogeenisen solulinjan tuotannon (Arenas ym. 2015). Lisäksi mDA-neuronien alatyypin kehityksen säätelyn tuntemus on puutteellista. Lisää tietoa tarvitaan myös siitä, miten mDA-hermosolujen neuronaalinen migraatio eri alueille (SNpc, VTA ja RRF) ohjautuu (Blaess & Ang 2015). Myös epigeneettisen säätelyn tuntemus on toistaiseksi puutteellista (Arenas ym. 2015).

Kun kehitysprosessi tunnetaan tarkasti, tiedetään myös millä tavalla kantasolujen erilaistumista voidaan ohjata tuottamaan mahdollisimman tehokkaasti korkealaatuisia ja pitkään toimivia mDA-neuroneita. Ymmärrys erilaisten molekyylien tarkoista vaikutuksista ja normaalin kehityksen vaatimuksista eri signaalimolekyyyleille on välttämätöntä parempien protokollien tuottamiseksi, jolloin solukorvaushoitojen kehitys ja SNc/A9-alatyypin mDA-hermosolujen tuotanto paranee ja tehostuu. Solukorvaushoitojen kehittäminen helpottuu, kun tuotetaan parempia menetelmiä solujen lajitteluun, uusia kehitykseen vaikuttavia tekijöitä sisällytetään protokoliin ja saavutetaan oikea signaalitaso sekä tasapaino erilaisten tekijöiden ja reittien välillä. Tehokkaampien protokollien avulla säästetään aikaa ja varoja, mikä on erittäin tärkeää osa kehitystyötä ennen kliinisten kokeiden aloittamista. Lisäksi PD-solukorvaushoitojen on oltava turvallisia – huomioon on otettava insertion aiheuttama mutageneesi, osittaisen uudelleenohjelmoinnin vaikutukset, solujen lisääntyminen ja vastaanottajan immuunivaste. Tulevaisuuden haasteena on ihmisen SNpc:ssä täysin toimivien DA-soluvalmisteiden tuottaminen ja rikastaminen *in vitro* sekä kyky selektiivisesti uudelleen hermottaa ihmisen dorsaalista striatumia ja uudelleen rakentaa nigrostriataalinen reitti iPSC-johdettujen mDA-solujen avulla (Arenas ym. 2015).

iPS-solukorvaushoitojen odotetaan tulevaisuudessa yleistyvän myös muiden keskushermoston sairauksien, kuten Alzheimerin taudin, Huntingtonin taudin ja epilepsian, hoidoissa (Morizane & Takahashi 2016).

7. Viiteluettelo

- Arenas E, Denham M & Villaescusa JC (2015) How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Development* 142(11): 1918-1936.
- Black JB, Adler AF, Wang H-, D'Ippolito AM, Hutchinson HA, Reddy TE, Pitt GS, Leong KW & Gersbach CA (2016) Targeted Epigenetic Remodeling of Endogenous Loci by CRISPR/Cas9-Based Transcriptional Activators Directly Converts Fibroblasts to Neuronal Cells. *Cell Stem Cell* 19(3): 406-414.
- Blaess S & Ang S- (2015) Genetic control of midbrain dopaminergic neuron development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4(2): 113-134.
- Bonilla S, Hall AC, Pinto L, Attardo A, Götz M, Huttner WB & Arenas E (2008) Identification of midbrain floor plate radial glia-like cells as dopaminergic progenitors. *Glia* 56(8): 809-820.
- Copp AJ, Greene NDE & Murdoch JN (2003) The genetic basis of mammalian neurulation. *Nat Rev Gen* 4(10): 784-793.
- De Wert G & Mummery C (2003) Human embryonic stem cells: Research, ethics and policy. *Hum Reprod* 18(4): 672-682.
- Han F, Baremberg D, Gao J, Duan J, Lu X, Zhang N & Chen Q (2015) Development of stem cell-based therapy for Parkinson's disease. *Transl Neurodegeneration* 4(1).
- Joksimovic M & Awatramani R (2014) Wnt/ β -catenin signaling in midbrain dopaminergic neuron specification and neurogenesis. *J Mol Cell Bio* 6(1): 27-33.
- Kiecker C, Bates T & Bell E (2016) Molecular specification of germ layers in vertebrate embryos. *Cell Mol Life Sci* 73(5): 923-947.
- Kriegstein AR & Götz M (2003) Radial glia diversity: A matter of cell fate. *Glia* 43(1): 37-43.
- Kriks S, Shim J-, Piao J, Ganat YM, Wakeman DR, Xie Z, Carrillo-Reid L, Auyeung G, Antonacci C, Buch A, Yang L, Beal MF, Surmeier DJ, Kordower JH, Tabar V & Studer L (2011) Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 480(7378): 547-551.
- Lahti L, Peltopuro P, Piepponen TP & Partanen J (2012) Cell-autonomous FGF signaling regulates anteroposterior patterning and neuronal differentiation in the mesodiencephalic dopaminergic progenitor domain. *Development (Cambridge)* 139(5): 894-905.
- Li L, Liu C, Biechele S, Zhu Q, Song L, Lanner F, Jing N & Rossant J (2013) Location of transient ectodermal progenitor potential in mouse development. *Development* 140(22): 4533-4543.
- Logan CY & Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781-810.
- Marikawa Y (2006) Wnt/ β -catenin signaling and body plan formation in mouse embryos. *Semin Cell Dev Biol* 17(2): 175-184.
- Marín O & Rubenstein JLR (2003) Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* 26: 441-483.
- Morizane A & Takahashi J (2016) Cell therapy for Parkinson's disease. *Neurol Med -Chir* 56(3): 102-109.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK & Kriegstein AR (2002) Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci* 22(8): 3161-3173.
- Prestoz L, Jaber M & Gaillard A (2012) Dopaminergic axon guidance: Which makes what? *Front Cell Neurosci* (JULY 2012).
- Price D, Jarman A, Mason J & Kind P (2011) Building Brains: An Introduction to Neural Development. In: Anonymous Building Brains: An Introduction to Neural Development.
- Purves D, Augustine G.J, Fitzpatrick D, Hall W.C, LaMantia A-S & White L.E (2012) Neuroscience. Sinauer. Sunderland. 5. painos.
- Rathjen J, Haines BP, Hudson KM, Nesci A, Dunn S & Rathjen PD (2002) Directed differentiation of pluripotent cells to neural lineages: Homogeneous formation and differentiation of a neuroectoderm population. *Development (Cambridge)* 129(11): 2649-2661.
- Sariola H, Frilander M, Heino T, Jernvall J, Partanen J, Sainio K, Salminen M, Thesleff I & Wartiovaara K (2015) Kehitysbiologia – Solusta yksilöksi. Duodecim. 2. uudistettu painos. Helsinki.
- Smits SM, Burbach JPH & Smidt MP (2006) Developmental origin and fate of meso-diencephalic dopamine neurons. *Prog Neurobiol* 78(1): 1-16.
- Takahashi K & Yamanaka S (2006) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126(4): 663-676.
- Westerlund M, Hoffer B & Olson L (2010) Parkinson's disease: Exit toxins, enter genetics. *Prog Neurobiol* 90(2): 146-156.
- Genetics Home Reference: Health Conditions: Parkinson disease (2012) <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/parkinson-disease#genes> Viitattu 18.4.2017.