



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

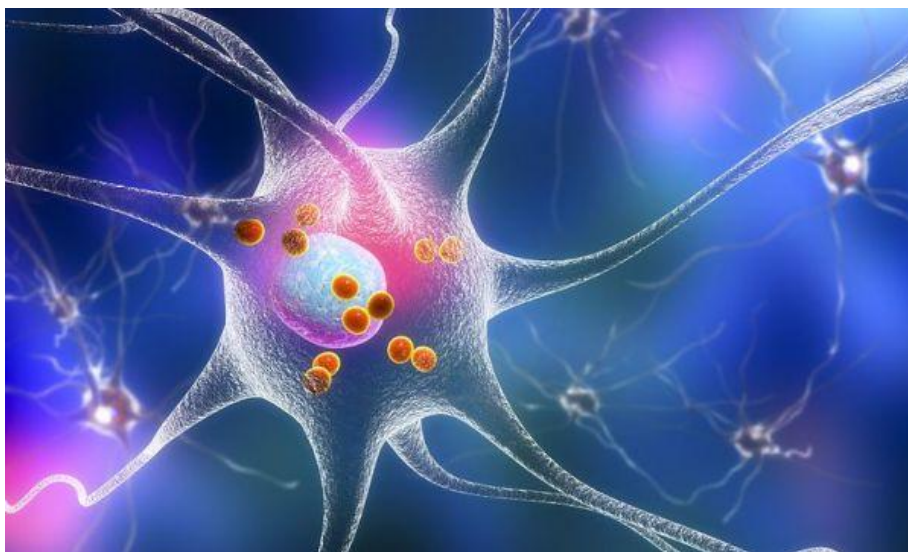


ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)»

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ): ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ –
ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ – ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ (ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ)**

**ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ, ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ
ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ PARKINSON**



ΝΤΑΛΙΠΗ ΝΑΤΑΛΙΑ

Επιβλέπων Καθηγητής:
Κούκλης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)»

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ): ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ –
ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ – ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ (ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ)**

**ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ, ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ
ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ PARKINSON**



ΝΤΑΛΙΠΗ ΝΑΤΑΛΙΑ

Επιβλέπων Καθηγητής:
Κούκλης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

Η έγκριση της εργασίας Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

Νταλίπη Ναταλία

Ο τίτλος του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης : Εφαρμογές βλαστικών κυττάρων
στη διάγνωση, πρόγνωση και θεραπεία της νόσου Parkinson

Η ημερομηνία παρουσίασης : 23 Νοεμβρίου 2022

Τα ονόματα του επιβλέποντος Καθηγητή : Κούκλης Παναγιώτης
και των 2 Καθηγητών που συμπληρώνουν την εξεταστική επιτροπή :

Λεονταρίτης Γεώργιος και Γκόγκας Χρήστος

Αφιερώσεις

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (BBE)» με κατεύθυνση «Βλαστικά κύτταρα – Γονιδιακή – Κυτταρική θεραπεία (Αναγεννητική Ιατρική)» του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, χάρη στην καθοδήγηση τους συνέβαλαν στη πραγματοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη διευθύντρια του μεταπτυχιακού κ.Πατρώνα Βεζυράκη και Επίκουρη Καθηγήτρια στο Τμήμα Ιατρικής με γνωστικό αντικείμενο 'Φυσιολογίας' για τη δυνατότητα που μου προσέφερε να συμμετάσχω στο συγκεκριμένο πρόγραμμα.

Ομοίως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής αρχίζοντας από τον Επίκουρο Καθηγητή Βιολογίας Κούκλη Παναγιώτη, για την επίβλεψη αλλά και τη βοήθεια που μου προσέφερε καθ'όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού καθώς και τον Δρ. Χρήστο Γκόγκα, Κύριος Ερευνητής του ΙΤΕ(Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών) για τη συνεισφορά και την επιστημονική του καθοδήγησή στο εργαστήριο ΙΒΕ-ΙΤΕ ώστε να ολοκληρωθεί η παρούσα εργασία. Επίσης, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας Γεώργιο Λεονταρίτη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για την άρτια ολοκλήρωση της διατριβής μου.

Πρόλογος (1 σελίδα)

Η νόσος του Parkinson είναι η δεύτερη πιο διαδεδομένη νευροεκφυλιστική διαταραχή. Τα παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου του Parkinson περιλαμβάνουν την προοδευτική απώλεια της λειτουργίας των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας (substantia nigra) του εγκεφάλου και τον επακόλουθο κυτταρικό θάνατο τους. Αν και οι εξελίξεις στον τομέα της κατανόησης της παθογένειας και της επιδημιολογίας είναι σημαντικές, η αιτία της νόσου Parkinson παραμένει αινιγματική και δεν έχει βρεθεί ακόμη αποτελεσματική ή προληπτική θεραπεία. Στην παρούσα εργασία έγινε βιβλιογραφική ανασκόπηση της έρευνας που αφορά τη χρήση βλαστικών κυττάρων για την κατανόηση (προκλινική έρευνα βιολογικών μηχανισμών) της αιτιολογίας της νόσου Parkinson και την χρησιμοποίησή τους για τη δημιουργία ντοπαμινεργικών νευρώνων που χρησιμοποιούνται για θεραπευτική μεταμόσχευση. Εν κατακλείδι, η Αναγεννητική Ιατρική μέσω των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων επιχειρεί να ανοίξει νέες κατευθύνσεις για την θεραπεία της νόσου Parkinson.

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disorder. The pathological features of Parkinson's disease include the progressive loss of function of the dopaminergic neurons of the brain's substantia nigra and their subsequent cell death. While advances in the understanding of pathogenesis and epidemiology are significant, the cause of Parkinson's disease remains enigmatic and no effective or preventive treatment has yet been found. In this diploma thesis, a bibliographic review was conducted of the research concerning the use of stem cells for the understanding (preclinical research of biological mechanisms) of the etiology of Parkinson's disease and their use for the creation of dopaminergic neurons used for therapeutic transplantation. In conclusion, Regenerative Medicine through induced pluripotent stem cells attempts to open new directions for the treatment of Parkinson's disease.

Πίνακας Περιεχομένων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1.1 Η ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ PARKINSON	12
1.1.1 Το προδρομικό στάδιο	16
1.1.2 Υπότυποι της ασθένειας	18
1.1.3 Η γενετική βάση της νόσου Parkinson	20
1.1.4 Διαγνωστικές προκλήσεις και παγίδες	26
1.1.5 Κλινικά διαγνωστικά κριτήρια	27
1.1.6 Πρόσδος προς την έγκαιρη διάγνωση	29
1.1.7 Κύριοι οδοί δράσης των φαρμάκων για τη θεραπεία της νόσου Parkinson	30
1.2 ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ (STEM CELLS)	34
1.2.1 Προέλευση των βλαστικών κυττάρων	36
1.2.2 Στάδια βλαστικότητας	37
1.2.3 Εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (ESCs)	39
1.2.4 Ενήλικα βλαστικά κύτταρα (ASC)	39
1.2.5 Επαγόμενα Πολυδύναμα Βλαστικά Κύτταρα (iPSCs)	40
1.2.6 Κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια σε hESCs	42
1.2.7 Μοντελοποίηση Ασθενειών	42
1.2.8 Θεραπεία με Βλαστοκύτταρα	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΝΟΣΟΣ PARKINSON	46
2.1 ΚΑΘΙΕΡΩΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (iPSC) ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΕ ΝΤΟΠΑΜΙΝΕΡΓΙΚΟΥΣ ΝΕΥΡΩΝΕΣ (DN)	46
2.1.1 Δημιουργία iPSC	46
2.1.2 Διαφοροποίηση σε DN	47
2.1.3 Νευρώνες που προέρχονται από iPSC για μοντελοποίηση ασθενειών	51
2.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ/ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ PARKINSON ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	51
2.2.1 Καταπόνηση του ενδοπλασματικού δικτύου	52
2.2.2 Αλλαγές στην διακίνηση και αποικοδόμηση πρωτεϊνών	58
2.2.3 Μιτοχονδριακές αλλοιώσεις και οξειδωτικό στρες	61
2.2.4 Μεταβολές στην ομοιόσταση του ασβεστίου	65
2.3 ΓΛΟΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΑ ΑΠΟ iPSC ΓΙΑ ΤΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ	66
2.4 ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΣΥΓΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ, ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΕΙΔΗ ΓΙΑ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	69
2.5 ΝΕΥΡΩΝΕΣ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΟΙ ΑΠΟ iPSC ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ	71
2.6 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΟΝΤΑΙ ΣΕ iPSC	72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ ΝΤΟΠΑΜΙΝΕΡΓΙΚΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΑΠΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	76
3.1 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ PARKINSON ΜΕ ΝΤΟΠΑΜΙΝΕΡΓΙΚΟΥΣ ΝΕΥΡΩΝΕΣ	76
3.2 Ο «ΟΔΙΚΟΣ ΧΑΡΤΗΣ» ΤΩΝ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ – ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΟΥ GFORCE-PD	78
3.2.1 Στόχοι της μελέτης GForce-PD	82
3.2.2 Ανοσοκατασταλτικές στρατηγικές	83
3.2.3 Επιλογή Ασθενών	83
3.2.4 Αξιολόγηση Ασθενών	85
3.2.5 Σχεδιασμός Κλινικής δοκιμής	86
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΕΠΙΛΟΓΟΣ	89

4.1 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ IPSC ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ PARKINSON	89
4.2 ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ DN – ΜΙΑ ΝΕΑ ΕΠΟΧΗ ΣΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ PARKINSON;	91
4.3 ΝΕΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΝΟΣΟ PARKINSON- ΥΠΟ ΔΟΚΙΜΗ ΚΑΙ ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ	92
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	96

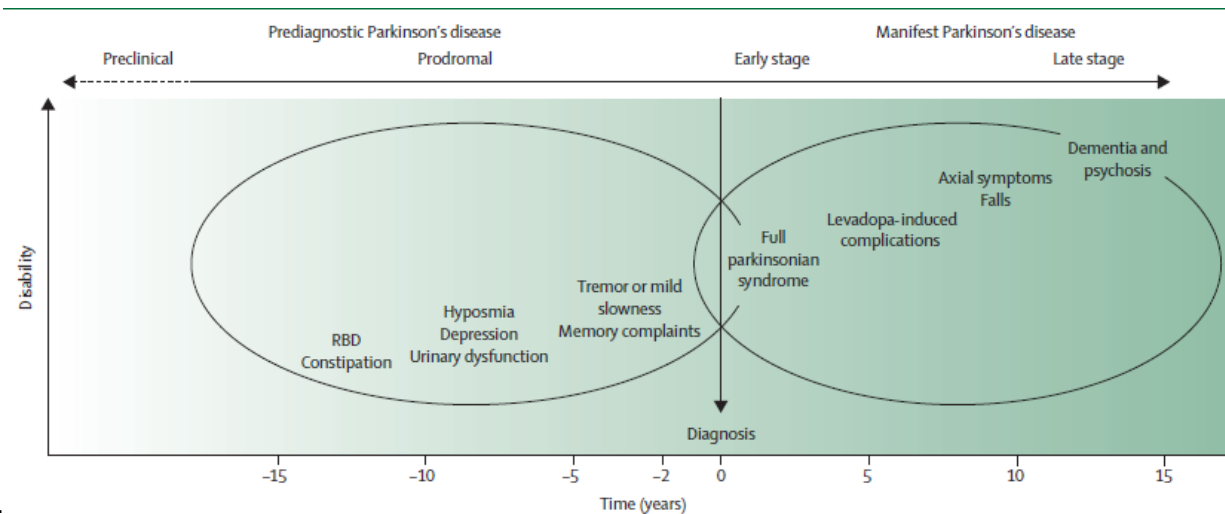
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η νόσος του Parkinson

Η νόσος του Parkinson είναι η δεύτερη πιο διαδεδομένη νευροεκφυλιστική διαταραχή, με συνολικό αριθμό ασθενών πάνω από 6 εκατομμύρια παγκοσμίως (Feigin et al., 2019). Από το 1991 παρατηρήθηκε αύξηση των ασθενών κατά 2-3 φορές, καθιστώντας τη νόσο του Parkinson μία από τις κύριες αιτίες νευρολογικών διαταραχών (Dorsey et al., 2018). Τα παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου του Parkinson περιλαμβάνουν την προοδευτική απώλεια της λειτουργίας των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας (substantia nigra) του εγκεφάλου και τον επακόλουθο κυτταρικό θάνατο τους, καθώς και τη δημιουργία νευρικών συσσωματωμάτων Lewy (σωμάτια εγκλεισμού Lewy) και νευριτών Lewy στον μεσεγκέφαλο και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου. Η νόσος Parkinson κατατάσσεται στις συνουκλειϊνοπάθειες, δεδομένης της σύστασης των σωματίων Lewy στο οποία εντοπίζονται κυρίως συσσωρευμένες ή λανθασμένα αναδιπλωμένες μορφές της πρωτεΐνης α-συνουκλειΐνης (Varma and Sen, 2015). Το 2002, ο Heiko Braak και οι συνεργάτες του (Braak et al., 2002) πρότειναν ένα μοτίβο εξάπλωσης της παθολογίας Lewy : έναρξη από το ουραίο στέλεχος του εγκεφάλου και εξέλιξη τοπικά στο άνω στέλεχος, τις μεταιχμιακές περιοχές και τέλος στο νεοφλοιό. Ωστόσο μια τέτοια εξάπλωση πιθανότατα δεν συμβαίνει σε όλες τις περιπτώσεις (Braak et al., 2002). Οι ομοιότητες των συσσωματωμάτων α-συνουκλειΐνης με τις ιδιότητες των πρωτεϊνών prion, η μετάδοση από κύτταρο σε κύτταρο αλλά και η επιτρεπτή αναδιαμόρφωση της πρωτεΐνης αποτελούν έναν δυνητικό μηχανισμό εξέλιξης της νόσου (Steiner et al., 2018).

Η νόσος Parkinson σχετίζεται με την ηλικία και υπολογίζεται πως επηρεάζει το 1% του παγκόσμιου πληθυσμού σε ηλικία 60 ετών και το 4-5% των ατόμων άνω των 85, χωρίς ωστόσο αυτό να σημαίνει ότι δεν υπάρχουν και περιπτώσεις ατόμων μικρότερης ηλικίας που νοσούν (Saiki et al., 2012). Επιπρόσθετα φαίνεται πως και το φύλο αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα εμφάνισης της νόσου αφού οι άντρες έχουν αναλογία διάγνωσης περίπου 3:2 συγκριτικά με τις γυναίκες. Υπάρχουν δύο μορφές της νόσου, η κληρονομήσιμη και η σποραδική ή ιδιοπαθής μορφή. Η κληρονομήσιμη μορφή μεταβιβάζεται στους απογόνους με αυτοσωμικό επικρατή ή υπολειπόμενο τρόπο. Η νόσος έχει μια ισχυρή γενετική συνιστώσα για τον κίνδυνο ασθένειας, με περισσότερους από 90 γενετικούς τύπους (Nalls et al., 2019) να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο νόσησης. Η ιδιοπαθής μορφή πιστεύεται ότι προκαλείται αυθόρμητα ή οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων και περιβάλλοντος (Ball et al., 2019). Συγκεκριμένα, αρκετοί περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως π.χ. τα φυτοφάρμακα, οι ρύποι νερού και άλλοι παράγοντες όπως π.χ. το κάπνισμα, ο καφές, η άσκηση ή τραύματα στο κεφάλι έχει βρεθεί ότι παίζουν ρόλο στην παθογένεση της νόσου σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Το 85-90% των περιπτώσεων της νόσου χαρακτηρίζεται ως σποραδικό (Poewe et al., 2017). Αν και αυτές οι εξελίξεις στον τομέα της κατανόησης της παθογένειας και της επιδημιολογίας ήταν σημαντικές, η αιτία της νόσου Parkinson παραμένει αινιγματική και δεν έχει βρεθεί ακόμη αποτελεσματική ή προληπτική θεραπεία..



Προ-κλινικό στάδιο	Προδρομικό στάδιο	Νόσος Parkinson
<ul style="list-style-type: none"> • Δεν υπάρχουν συμπτώματα • Δεν υπάρχουν βιοδείκτες • Γενετική ανάλυση και συμβουλευτική είναι διαθέσιμα • Πιθανότητα ταυτοποίησης και τροποποίησης περιβαλλοντικών παραγόντων κινδύνου 	<ul style="list-style-type: none"> • Μη-ειδικά συμπτώματα • Με-ειδικοί βιοδείκτες (μόνο βιοδείκτες νευροεκφύλισης υπάρχουν) • Υπάρχει επικάλυψη μεταξύ προδρομικού και πρώιμου σταδίου της νόσου • Πιθανές θεραπείες που βελτιώνουν την εξέλιξη της νόσου (π.χ. έναρξη λεβοντόπας) 	<ul style="list-style-type: none"> • Δυσκολία διάκρισης παρκινσονισμού – ψευδό-παρκινσονισμού στα πρώιμα στάδια • Κλινική επικάλυψη μεταξύ νόσου Parkinson και ατυπικού Παρκινσονισμού. • Δεν υπάρχουν ειδικοί βιοδείκτες με μεγάλη ευαισθησία πρόγνωσης της νόσου. Ωστόσο υπάρχουν κάποια επικουρικά διαγνωστικά τεστ (π.χ. απεικόνιση DaTscan – μέτρηση ντοπαμίνης στον μεσεγκέφαλο με ανεύρεση ανωμαλιών της αιμάτωσης σε συνδυασμό με ραδιοφάρμακα)

Εικόνα 1. Η φυσική εξέλιξη της νόσου του Parkinson και οι διαγνωστικές προκλήσεις ανά στάδιο της νόσου. Προσαρμοσμένη από (Tolosa et al., 2021) . Διαταραχή συμπεριφοράς ύπνου RBD-REM. Ο χρόνος διάγνωσης αντιπροσωπεύεται στον άξονα ως χρόνος «0». Τα χρονικά σημεία στην αριστερή πλευρά της διάγνωσης αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των ετών πριν από τη διάγνωση και τα χρονικά σημεία στα δεξιά αντιπροσωπεύουν τα έτη μετά τη διάγνωση. Αυτές οι χρονικές περίοδοι δίδονται προσεγγιστικά. Το διακεκομμένο βέλος υποδεικνύει ότι η διάρκεια της προ κλινικής φάσης είναι άγνωστη, σε αντίθεση με την πρόδρομη φάση, η οποία μπορεί να εκτείνεται μεταξύ 10 και 15 ετών.

Τα κλινικά διαγνωστικά κριτήρια, σχεδιασμένα για να ενισχύσουν τη διαγνωστική ακρίβεια για την νόσου Parkinson, έχουν αναθεωρηθεί τα τελευταία 5 χρόνια. Το κύριο κλινικό χαρακτηριστικό της νόσου είναι αυτό της **κινητικής διαταραχής** που περιλαμβάνει συμπτώματα όπως βραδυκινησία, τρόμο κατά την ανάπαυση, ακαμψία, καθώς και αλλαγές στη στάση του σώματος και στο βάδισμα. Οι κινητικές διαταραχές προκαλούν προοδευτική αναπηρία, επηρεάζουν τις δραστηριότητες της καθημερινότητας και οδηγούν σταδιακά σε μειωμένη ποιότητα ζωής. Τα κλασικά συμπτώματα που εμφανίζονται νωρίς και αποτελούν τους πυλώνες των διαγνωστικών κριτηρίων της νόσου Parkinson είναι η ανάπτυξη αστάθειας, οι αλλαγές στη στάση του σώματος, οι αυξανόμενες δυσκολίες στο βάδισμα, η δυσφαγία, και η δυσαρθρία, χαρακτηριστικά τα οποία επιδεινώνονται με την εξέλιξη της νόσου και οδηγούν σε κινητική αναπηρία (Jankovic, 2008). Η νόσος του Parkinson θεωρείται κινητική διαταραχή, αλλά συνδέεται και με μια ποικιλία **μη κινητικών συμπτωμάτων** συμπεριλαμβανομένης της σταδιακής απώλειας όσφρησης, της δυσκοιλιότητας, των διαταραχών ούρησης, της ορθοστατικής υπόταση, της απώλειας μνήμης, της

κατάθλιψη, του πόνου και των διαταραχών ύπνου (Gelipi et al., 2014). Τα κινητικά χαρακτηριστικά της νόσου συνδέονται με τον εκφυλισμό της μέλαινας ουσίας και την έλλειψη του νευροδιαβιβαστή ντοπαμίνη στο ραβδωτό σώμα, ενός νευροδιαβιβαστή υπεύθυνου για τον συντονισμό των κινήσεων. Τα μη κινητικά συμπτώματα πιθανόν σχετίζονται με νευροεκφυλισμό άλλων δομών του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένων του περιφερικού αυτόνομου νευρικού συστήματος (Scharira et al., 2017). Τα μη κινητικά συμπτώματα αποτελούν ένδειξη των πρώιμων σταδίων της νόσου του Parkinson (Pont-Sunyer et al., 2015). Η αναγνώριση του πρόδρομου σταδίου της νόσου Parkinson είναι απαραίτητη, δεδομένου ότι οι μελλοντικές θεραπείες θα έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι επιτυχείς αν εφαρμοστούν σε αυτό το στάδιο (Zis et al., 2015). Υπάρχει επίσης ανάγκη να οριστούν καλύτερα οι υπότυποι της νόσου Parkinson, που δεν έχουν μόνο διαφορετικές κλινικές παρουσιάσεις και πρόγνωση, αλλά διαφέρουν ως προς τους μηχανισμούς ασθένειας, απαιτώντας εξατομικευμένη θεραπεία και προσέγγιση (Barone et al., 2017). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αντιμετώπιση μονογονιδιακών μορφών της νόσου Parkinson (όπου μεταλλάξεις σε ένα μόνο γονίδιο προκαλούν τη νόσο) για την οποία οι συγκεκριμένες θεραπείες δοκιμάζονται ήδη σε κλινικές δοκιμές (Safarpour et al., 2015).

1.1.1 Το προδρομικό στάδιο

Κοινές ασθένειες όπως η απώλεια όσφρησης ή η δυσκοιλιότητα (μη κινητικά συμπτώματα) σχετίζονται με τη νόσο του Parkinson. Τα συμπτώματα αυτά αναφέρονται από ασθενείς κάποια χρόνια ή και δεκαετίες πριν από την εμφάνιση των κλασικών κινητικών συμπτωμάτων (Ross et al., 2012). Η περίοδος αυτή ορίζεται ως η

προδρομική φάση της νόσου του Parkinson, και αντιστοιχεί σε ένα στάδιο της νόσου όταν οι νευροεκφυλιστικές αλλαγές συμβαίνουν σε περιοχές εκτός της μέλαινας ουσίας, όπως το κάτω εγκεφαλικό στέλεχος, τον οσφρητικό βολβό και τις οσφρητικές οδούς, και το περιφερικό αυτόνομο νευρικό σύστημα (στάδια Braak 1-3) (Braak et al., 2002). Τα καλύτερα τεκμηριωμένα μη κινητικά συμπτώματα που σχετίζονται με την προδρομική περίοδο της νόσου του Parkinson είναι η δυσκοιλιότητα, η απώλεια όσφρησης και η διαταραχή συμπεριφοράς κατά τον ύπνο REM (RBD). Επιπλέον, φαινόμενα όπως επιτακτική ούρηση, σεξουαλική δυσλειτουργία, υπόταση, άγχος, κατάθλιψη και διαταραχές έγχρωμης όρασης έχουν περιγράψει προγενέστερα των κινητικών συμπτωμάτων της νόσου του Parkinson. Σημαντικά ζητήματα σχετικά με την πρόδρομη φάση της νόσου του Parkinson απομένουν να διευκρινιστούν, όπως η αλληλουχία με την οποία αναπτύσσονται προδρομικά συμπτώματα και η ταχύτητα της εξέλιξης της νόσου (Siderowf and Lang, 2012). Τα προδρομικά χαρακτηριστικά μπορεί επίσης να διαφέρουν ανάλογα με την αιτιολογία (π.χ. ιδιοπαθής έναντι μονογονιδιακής νόσου) (Ross et al., 2012) (A et al., 2015). Εκτός από τα μη κινητικά συμπτώματα, μπορεί να έχουμε άλλες κινητικές ενδείξεις όπως μειωμένη κινητικότητα του προσώπου, αλλαγές της φωνής, απώλεια επιδεξιότητας των δακτύλων, ήπια σκυμμένη στάση, ή μειωμένη ταλάντευση του βραχίονα κατά το βάδισμα. Ωστόσο, τέτοια ήπια «Παρκινσονικά» σημάδια μπορεί να είναι δύσκολο να διακριθούν από μη ειδικές αλλαγές κινητικότητας που σχετίζονται με τη φυσιολογική γήρανση (Pont-Sunyer et al., 2015) (Ross et al., 2012) (A et al., 2015).

1.1.2 Υπότυποι της ασθένειας

Η νόσος Parkinson εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια όσον αφορά την ηλικία έναρξης, τη κλινική παρουσίαση, τον ρυθμό προόδου και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Η ανακάλυψη γενετικά καθορισμένων μορφών της νόσου οδήγησε στην εισαγωγή βιολογικού ορισμού των υποτύπων του φάσματος της νόσου Parkinson (Fereshtehnejad et al., 2017) (Faghri et al., 2018) (Fereshtehnejad and Postuma, 2017). Τα κλινικά χαρακτηριστικά που έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατάταξη σε υποτύπους είναι: η ηλικία κατά την έναρξη (πρώιμη έναρξη έναντι όψιμης έναρξης), η πιθανή επικράτηση του κινητικού φαινοτύπου, οι δυσκινησίες ως παρενέργεια της θεραπείας με λεβοντόπα και τα μη κινητικά χαρακτηριστικά (ιδιαίτερα αυτόνομη δυσλειτουργία, γνωστική δυσλειτουργία και διαταραχή συμπεριφοράς ύπνου REM [RBD]), καθώς και ο ρυθμός εξέλιξής τους. Αντίθετα, οι εμπειρικά καθορισμένοι υπότυποι της νόσου Parkinson περιλαμβάνουν την νεανική ή πρώιμη εμφάνιση της νόσου (**πρώιμη νόσος του Parkinson**). Η πρώιμη νόσος συνήθως ορίζεται από την ηλικία έναρξης των πρώιμων συμπτωμάτων (πριν την ηλικία των 40 ή 50 ετών) και χαρακτηρίζεται από βραδύτερη πρόοδο, μειωμένη γνωστική δυσλειτουργία και αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης δυσκινησιών και κινητικών επιπλοκών ως παρενέργεια της θεραπείας με λεβοντόπα (Schrag et al., 1998) (Selikhova et al., 2009). **Καλοήθης τρεμάμενη νόσος του Parkinson** (Benign tremulous Parkinson's disease) ή τρόμο-κυρίαρχη ασθένεια του Parkinson (tremor-dominant Parkinson's disease) είναι δύο όροι που περιγράφουν την κλινική επικράτηση του τρόμου σε κατάσταση ηρεμίας και άλλα κινητικά συμπτώματα (Stebbins et al., 2013) . Αυτός ο κλινικός υπότυπος έχει συσχετιστεί με βραδύτερη εξέλιξη και μικρότερης έκτασης μείωση γνωστικών λειτουργιών σε σχέση με άλλους

υπότυπους (Selikhova et al., 2009) (Stebbins et al., 2013). Κλινικές εικόνες με εμφανή αστάθεια στη στάση και στο βάδισμα περιγράφουν διαταραχές που έχουν ταξινομηθεί ως **ορθοστατική αστάθεια** και ως **υπότυπος διαταραχών βάδισης**. Χαρακτηρίζονται από ταχεία επιδείνωση της κινητικής λειτουργίας καθώς και των γνωσιακών λειτουργιών (Simuni et al., 2016). Μέχρι πρότινος η κατηγοριοποίηση των κλινικών εικόνων σε υποτύπους γινόταν κυρίως με βάση κινητικά χαρακτηριστικά (Simuni et al., 2016) (Lee et al., 2019). Ωστόσο, σε πρόσφατες κλινικές αναλύσεις συσταδοποίησης συμπεριελήφθησαν και μη κινητικά χαρακτηριστικά στον καθορισμό των υποτύπων της νόσου (Mu et al., 2017). Σε μία από αυτές τις μελέτες, η άνοια ελαφράς μορφής, η διαταραχή RBD και η ορθοστατική υπόταση χρησιμοποιήθηκαν για την κατηγοριοποίηση υποτύπων της νόσου Parkinson με βάση την ταχύτητα εξέλιξης της νόσου (Fereshtehnejad et al., 2015): 1) ταχείας εξέλιξης υπότυπο της νόσου (*διάχυτος κακοήθης*) με μεγαλύτερη έκφραση στα κινητικά και μη κινητικά χαρακτηριστικά, 2) πιο αργή εξέλιξη (*ήπιας σοβαρότητας*) με ασθενείς που παρουσιάζουν κυρίως αλλαγές σε κινητικά χαρακτηριστικά και 3) έναν *ενδιάμεσο* υπότυπο μεταξύ των δύο (Fereshtehnejad et al., 2015). Σε μια μελέτη στην οποία συμμετείχαν 111 ασθενείς και ταξινομήθηκαν στους 3 παραπάνω υπότυπους, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του εγκεφαλικού ιστού ωστόσο, δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές ούτε στην ένταση της παθολογίας Lewy αλλά ούτε και στην παθολογία που σχετίζεται με τη νόσο Αλτσχάιμερ (Fereshtehnejad and Postuma, 2017). Συνεπώς με βάση τα παραπάνω, η κλινική έρευνα σχετικά με τη νόσο του Parkinson, οφείλει να επενδύσει στην ανακάλυψη και το χαρακτηρισμό βιοδεικτών που να συμβαδίζουν με την κλινική εξέλιξη της νόσου και να μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά για πρόγνωση ώστε να υπάρξει πιο

ολοκληρωμένος χαρακτηρισμός των υποτύπων της νόσου (De Pablo-Fernández et al., 2019).

1.1.3 Η γενετική βάση της νόσου Parkinson

Η έλευση της τεχνολογίας ανάλυσης του ανθρώπινου γονιδιώματος οδήγησε σε γρήγορη πρόοδο στην κατανόηση των γενετικών αιτιών, των παραγόντων κινδύνου και των παραλλαγών της νόσου Parkinson. Αυτές οι ανακαλύψεις προήλθαν από βελτιώσεις στις τεχνολογίες αλληλούχισης νουκλεϊκών οξέων και προσδιορισμού γονότυπου, αλλά και στην επιτυχή εφαρμογή τους σε ολοένα και μεγαλύτερες πληθυσμιακές ομάδες. Με αυτό τον τρόπο είναι πλέον γνωστό ότι η γενετική αρχιτεκτονική της νόσου Parkinson είναι εξαιρετικά περίπλοκη, με κοινές και σπάνιες γονιδιακές παραλλαγές και γονίδια κινδύνου που συμβάλλουν στην παθογένεση (Blauwendraat et al., 2020). Μεταλλάξεις σε τουλάχιστον 20 γονίδια έχουν αναγνωρισθεί ως αιτίες πρόκλησης οικογενή Παρκινσονισμού (Nalls et al., 2019). Καθένα από αυτά τα γονίδια μας παρέχει ένα κομμάτι από το πολύπλοκο παζλ της μοριακής βάσης της νευροεκφυλιστικής διαδικασίας της νόσου. Τα παραπάνω γονίδια που σχετίζονται με τη νόσο ανήκουν σε αρκετά κοινά μονοπάτια: ρύθμιση της μιτοχονδριακής ομοιόστασης, διαδικασίες κυτταρικού θανάτου, μονοπάτια φλεγμονώδους απόκρισης, ενδοκυτταρική διακίνηση και ενδοσωματική-λυσosomalική δυσλειτουργία (Bandres-Ciga et al., 2020) (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Γονίδια που σχετίζονται με τη νόσο Parkinson. Προσαρμογή από (Blauwendraat et al., 2020). Το ++ υποδηλώνει ≥4 οικογένειες που αναφέρθηκαν. + υποδηλώνει ≥2 και <4 οικογένειες που αναφέρθηκαν. – δηλώνει 1 οικογένεια που αναφέρθηκαν. – – σημαίνει ότι δεν έχουν αναφερθεί οικογένειες.

Γονίδιο	Μετάλλαξη	Φαινότυπος	Έτος ανακάλυψης	Μηχανισμός	Κληρονομικότητα	Συχνότητα	Πολλές ανεξάρτητες οικογένειες	Εμπιστοσύνη Τεκμηρίωσης ως γονίδιο σχετιζόμενο με τη Νόσο Parkinson
<i>SNCA</i>	Παρερμηνεύσιμη	Συχνά με άνοια	1997,2003	Κέρδος λειτουργίας	Επικρατής	πολύ σπάνια	++	Πολύ υψηλή
<i>PRKN</i>	Απώλειας λειτουργίας	Εμφάνιση σε νεαρή ηλικία	1998	απώλεια λειτουργίας	Υπολειπόμενη	σπάνια	++	Πολύ υψηλή
<i>UCHL1</i>	Παρερμηνεύσιμη	-	1998	απώλεια λειτουργίας;	Επικρατής	Όχι ξεκάθαρο	-	Χαμηλή

<i>PARK7</i>	Παρερμηνεύσιμη	Εμφάνιση σε νεαρή ηλικία	2003	απώλεια λειτουργίας	Υπολειπόμενη	πολύ σπάνια	++	Πολύ υψηλή
<i>LRRK2</i>	Παρερμηνεύσιμη		2004	Κέρδος λειτουργίας	Επικρατής	κοινή	++	Πολύ υψηλή
<i>PINK1</i>	Παρερμηνεύσιμη ή απώλεια λειτουργίας	Εμφάνιση σε νεαρή ηλικία	2004	απώλεια λειτουργίας	Υπολειπόμενη	σπάνια	++	Πολύ υψηλή
<i>POLG</i>	Παρερμηνεύσιμη ή απώλεια λειτουργίας	Ατυπική Νόσος Parkinson	2004	απώλεια λειτουργίας;	Επικρατής	σπάνια	++	Υψηλή
<i>HTRA2</i>	Παρερμηνεύσιμη	-	2005	αμφισβητούμενος	Επικρατής	Όχι ξεκάθαρο	-	Χαμηλή
<i>ATP13A2</i>	Παρερμηνεύσιμη ή απώλεια λειτουργίας	Ατυπική Νόσος Parkinson	2006	απώλεια λειτουργίας	Υπολειπόμενη	πολύ σπάνια	++	Πολύ υψηλή
<i>FBXO7</i>	Παρερμηνεύσιμη	Εμφάνιση σε νεαρή ηλικία	2008	απώλεια λειτουργίας	Υπολειπόμενη	πολύ σπάνια	++	Πολύ υψηλή
<i>GIGYF2</i>	Παρερμηνεύσιμη		2008	αμφισβητούμενος	Επικρατής	Όχι	+	Χαμηλή

	η			ς		ξεκάθαρο		
<i>GBA</i>	Παρερμηνεύσιμη ή απώλεια λειτουργείας	--	2009	απώλεια λειτουργείας	Επικρατής (χαμηλή διεισδυτικότητα)	κοινή	++	Πολύ υψηλή
<i>PLA2G6</i>	Παρερμηνεύσιμη ή απώλεια λειτουργείας	Εμφάνιση σε νεαρή ηλικία	2009	απώλεια λειτουργείας	Υπολειπόμενη	σπάνια	++	Πολύ υψηλή
<i>EIF4G1</i>	Παρερμηνεύσιμη	-	2011	αμφισβητούμενος	Επικρατής	Όχι ξεκάθαρο	-	Χαμηλή
<i>VPS35</i>	Παρερμηνεύσιμη	-	2011	απώλεια λειτουργείας	Επικρατής	πολύ σπάνια	++	Πολύ υψηλή
<i>DNAJC6</i>	Παρερμηνεύσιμη ή απώλεια λειτουργείας	Εμφάνιση σε νεαρή ηλικία	2012	απώλεια λειτουργείας	Υπολειπόμενη	πολύ σπάνια	++	Υψηλή
<i>SYNJ1</i>	Παρερμηνεύσιμη ή απώλεια λειτουργείας	Ατυπική Νόσος Parkinson	2013	απώλεια λειτουργείας	Υπολειπόμενη	πολύ σπάνια	++	Υψηλή
<i>DNAJC13</i>	Παρερμηνεύσιμη	Στην ίδια οικογένεια με	2014	αμφισβητούμενος	Επικρατής	Όχι ξεκάθαρο	+	Χαμηλή

		<i>TMEM230</i>						
<i>TMEM230</i>	Παρερμηνεύσιμη	Στην ίδια οικογένεια με <i>DNAJC13</i>	2016	απώλεια λειτουργίας;	Επικρατής	Όχι ξεκάθαρο	-	Χαμηλή
<i>VPS13C</i>	Παρερμηνεύσιμη ή απώλεια λειτουργίας	-	2016	απώλεια λειτουργίας	Υπολειπόμενη	σπάνια	++	Υψηλή
<i>LRP10</i>	Παρερμηνεύσιμη ή απώλεια λειτουργίας	-	2018	απώλεια λειτουργίας;	Επικρατής	Όχι ξεκάθαρο	-	Χαμηλή

Ο γενετικός έλεγχος της μεντελικής κληρονομικότητας στις διάφορες μορφές της νόσου Parkinson πραγματοποιείται όλο και περισσότερο στην κλινική πράξη, και αποτελεί έναν παράγοντα που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη σε ασθενείς με πρώιμη έναρξη της νόσου (ορίζεται ως έναρξη πριν από την ηλικία των 40 ετών), σε ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό και άτομα από πληθυσμούς υψηλού κινδύνου, με υψηλό επιπολασμό συγκεκριμένων μονογονιδιακών μορφών (π.χ. Εβραίοι Ασκενάζι, Βορειοαφρικανοί Βέρβεροι Άραβες) (Berardelli et al., 2013). Η αναγνώριση του αιτιολογικού γονιδίου που υπάρχει εντός μια οικογενείας, προσφέρει την ευκαιρία στον ασθενή να συμμετέχει σε κλινικές μελέτες και ταυτόχρονα προσφέρει τη δυνατότητα σε όλα τα μέλη της οικογενείας να εξεταστούν προληπτικά για τον εν λόγω παράγοντα.

Τα αποτελέσματα των γενετικών αναλύσεων συμβάλουν στην κατανόηση των κλινικών συμπτωμάτων που χαρακτηρίζουν την νόσο Parkinson. Από τη μελέτη ασθενών με μονογονιδιακή διαταραχή προκύπτει ότι η νόσος Parkinson ποικίλλει φαινοτυπικά. Για παράδειγμα, ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *LRRK2* (*Leucine-rich repeat kinase 2*) εμφανίζουν ποικιλόμορφη κλινική εικόνα που περιλαμβάνει αρχικά τυπική απόκριση στη λεβοντόπα, προϊούσα υπερπυρηνική παράλυση και περιστασιακά αμυοτροφία (Tolosa et al., 2020) (Blauwendraat et al., 2019) (Sanchez-Contreras et al., 2017) . Ομοίως, ασθενείς με μεταλλάξεις στα γονίδια *GBA*, *SNCA* ή *VPS13C* μπορούν να εμφανίσουν τα τυπικά χαρακτηριστικά της νόσου , αλλά πιο συχνά αναπτύσσουν προοδευτική γνωστική δυσλειτουργία που συνάδει με άνοια με σωματία Lewy (Sidransky et al., 2009) (Polymeropoulos et al., 1997) (Lesage et al., 2016). Αν και αυτές οι παρατηρήσεις αφορούν το ευρύ 5-40% των περιπτώσεων της νόσου του Parkinson (ανάλογα με το εθνικό υπόβαθρο), παρέχουν κρίσιμες πληροφορίες για

κεντρικές οδούς που σχετίζονται με τον παρκινσονισμό, και τονίζουν πιθανούς στόχους για θεραπευτικές παρεμβάσεις για τη νόσο. Επομένως, οι υπότυποι της νόσου Parkinson ορίζονται όλο και περισσότερο σε μοριακή βάση (Blauwendraat et al., 2019) (π.χ. PARK-LRRK2, PARK-SNCA).

1.1.4 Διαγνωστικές προκλήσεις και παγίδες

Η διάγνωση της ιδιοπαθούς μορφής της νόσου Parkinson μπορεί να είναι σχετικά εύκολη στον εντοπισμό. Τέτοιες περιπτώσεις είναι ασθενείς με κλασικό ιστορικό, τυπική ασυμμετρία κινητικών σημαδιών, όχι άτυπα χαρακτηριστικά και αποκλεισμό εναλλακτικών αιτιών. Ωστόσο, το σφάλμα στη διάγνωση (λανθασμένη ταξινόμηση) είναι κοινό στην καθημερινή κλινική πρακτική (15% έως 24%) (Rajput and Rajput, 2014) (Schrag et al., 2002) (Hughes et al., 1992). Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση εντόπισε συγκεντρωτική διαγνωστική ακρίβεια για την κλινική διάγνωση της νόσου μόνο στο 80,6% των κλινικο-παθολογικών μελετών (Rizzo et al., 2016). Ακόμη και με τη χρήση αυστηρών κλινικά διαγνωστικών κριτηρίων, το 10% των ανθρώπων που είχαν διαγνωστεί με τη νόσο έπασχαν από διαφορετικές παθολογίες. Κοινά χαρακτηριστικά που υπάρχουν στη νόσο Parkinson και συχνά οδηγούν σε λανθασμένες διαγνώσεις στην κλινική πρακτική εμφανίζονται και σε ασθένειες όπως οι διαταραχές τρόμου (μη νόσος του Parkinson), συμπεριλαμβανομένου του τρόμου, του ιδιοπαθή τρόμου καθώς και στους διαφορετικούς τύπους δευτεροπαθούς παρκινσονισμού (άτυπος Παρκινσονισμός).

Η μεγαλύτερη πρόκληση, ακόμη και για τους ειδικούς των κινητικών διαταραχών, είναι η πρώιμη διαγνωστική διαφοροποίηση του Parkinson από άτυπες παρκινσονικές διαταραχές. Άτυπος παρκινσονισμός είναι ένας όρος-ομπρέλα για μια ποικιλία

νευροεκφυλιστικών διαταραχών στις οποίες ένα παρκινσονικό σύνδρομο είναι ένα εξέχον κλινικό χαρακτηριστικό, αλλά το πλήρες κλινικό φάσμα, η υποκείμενη παθολογία, η εξέλιξη και η πρόγνωση διαφέρουν θεμελιωδώς από εκείνη της ασθένειας του Parkinson. Τα άτυπα σύνδρομα παρκινσονισμού περιλαμβάνουν πολλαπλή ατροφία του συστήματος, η οποία είναι παθολογικά καθορισμένη από π.χ. γλοιακά κυτταροπλασματικά εγκλείσματα λανθασμένα διπλωμένης α-συνουκλείνης σε ολιγοδενδροκύτταρα, καθώς και από tau-πάθειες, προϊούσα υπερπυρηνική παράλυση και εκφυλισμό του φλοιού, που χαρακτηρίζεται από νευρωνική εναπόθεση φωσφορυλιωμένου tau (Wenning et al., 2011) (Höglinger et al., 2017). Δεν υπάρχουν διακριτά όρια μεταξύ της νόσου Parkinson και των τριών προαναφερθέντων καταστάσεων στα αρχικά στάδια τους με αποτέλεσμα να υπάρχουν λανθασμένες διαγνώσεις. Οι κλινικές παθολογικές μελέτες αποκάλυψαν ποσοστά σφάλματος στην κλινική διάγνωση στο 7–35% των περιπτώσεων (Adler et al., 2014) (Hughes et al., 2002) (Koga et al., 2015). Τα διαφοροποιημένα χαρακτηριστικά εξελίσσονται με την πάροδο του χρόνου καθιστώντας εξαιρετικά δυσκολότερη τη διάγνωση των άτυπων συνδρόμων παρκινσονισμού από την νόσο Parkinson στα αρχικά στάδια της νόσου – συμπεριλαμβανομένης της ασυμμετρίας (η οποία είναι ιδιαίτερα εντυπωσιακή στο κορτικοβασικό εκφυλισμό) και της ανταπόκρισης στη λεβοντόπα.

1.1.5 Κλινικά διαγνωστικά κριτήρια

Η διαγνωστική ακρίβεια της νόσου του Parkinson ενισχύθηκε από τον διεθνή οργανισμό International Parkinson and Movement Disorder Society. Το International Parkinson and Movement Disorder Society προτείνει μια σειρά κριτηρίων που αποτελούν μία

αναθεωρημένη έκδοση παλαιότερων κριτηρίων από τον οργανισμό Queen's Square Brain Bank (Postuma et al., 2015) (Lees et al., 2009). Αυτά τα κριτήρια βασίζονται σε μια ειδική νευρολογική εξέταση που ορίζει την διάγνωση παρκινσονικού συνδρόμου ως: παρουσία βραδυκινησίας και τουλάχιστον ενός ακόμη βασικού κινητικού χαρακτηριστικού (ακαμψία ή κλασικό ασύμμετρο τρέμουλο ανάπαυσης, 5-Hz). Σε αντίθεση με την Queen's Square Brain Bank, το International Parkinson and Movement Disorder Society συμπεριέλαβε και επιπρόσθετα κριτήρια που αφορούν μια σειρά από αμιγώς κλινικά χαρακτηριστικά που δεν απαντούν συχνά στη νόσο του Parkinson. Αυτά τα επιπρόσθετα κριτήρια εγείρουν υποψίες για εναλλακτική διάγνωση (μη-παρκινσονικό σύνδρομο). Με βάση τα παραπάνω τα κριτήρια του Movement Disorder Society λειτουργούν σε δύο επίπεδα διαγνωστικής βεβαιότητας για τη νόσο του Parkinson: το *κλινικά διαπιστωμένο* και το *κλινικά πιθανό*. Το πρώτο επίπεδο θεσπίζει ένα σύνολο κριτηρίων με στόχο τη μέγιστη ειδικότητα (εις βάρος της ευαισθησίας), ενώ τα κριτήρια για το δεύτερο επίπεδο στοχεύουν στην αυξημένη ευαισθησία.

Μια έγκυρη μελέτη των κριτηρίων του Movement Disorder Society έχει δείξει εξαιρετική ευαισθησία (96%) και ειδικότητα (95%) για διάγνωση κλινικά πιθανόν ασθενών της νόσου του Parkinson. Η ακρίβεια διάγνωσης μίας κλινικά διαπιστωμένης νόσου του Parkinson ήταν ακόμη υψηλότερη (98 · 5%), αλλά - όπως αναμενόταν - αυτό ήταν σε βάρος της μειωμένης ευαισθησίας (59 · 3%). Για ασθενείς με διάρκεια ασθένειας μικρότερη των 5 ετών, η ακρίβειά του για κλινικά πιθανή διάγνωση της νόσου του Parkinson ήταν 87% (Postuma et al., 2018). Τα κριτήρια του International Parkinson and Movement Disorder ενσωματώνουν δύο βοηθητικά τεστ μεταξύ των τεσσάρων διαγνωστικών κριτηρίων, αλλά οι μελλοντικοί διαγνωστικοί αλγόριθμοι θα πρέπει να

ενσωματώσουν πρόσθετες δοκιμές για περαιτέρω ενίσχυση της διαγνωστικής ακρίβειας και της ευαισθησία στα πρώιμα και πρόδρομα στάδια της νόσου.

1.1.6 Πρόοδος προς την έγκαιρη διάγνωση

Υπάρχει συναίνεση ότι η διαδικασία η οποία οδηγεί σε κλινικά καθορισμένη νόσο του Parkinson ξεκινά πολύ νωρίτερα από ότι μπορεί να αναγνωρισθεί από τα τρέχοντα διαγνωστικά κριτήρια. Αυτό αποτελεί ένα μείζον ζήτημα, ειδικότερα όταν πρόκειται για την πρόγνωση ατόμων που παρουσιάζουν ένα ή περισσότερα χαρακτηριστικά τα οποία σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου. Τέτοια χαρακτηριστικά είναι η ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού ή α-συμπτωματικού φορέα για μεταλλάξεις που συνδέονται με ασθένειες με μη κινητικά χαρακτηριστικά της πρόδρομης νόσου του Parkinson όπως υποσμία ή RBD. Για την κατανόηση της εξέλιξης της νόσου, ο εντοπισμός ατόμων που διατρέχουν κίνδυνο εμφάνισης της νόσου είναι σημαντικός (Salat et al., 2016). Τα άτομα αυτά θα μπορούσαν να είναι πιθανοί συμμετέχοντες σε κλινικές δοκιμές για θεραπείες της νόσου στο μέλλον. Αρκετές δια-τομεακές και προοπτικές μελέτες περιπτώσεων ελέγχου προσπάθησαν να ορίσουν τη προγνωστική αξία των πρόδρομων κλινικών, μη γενετικών και γενετικών παραγόντων κινδύνου καθώς και των δοκιμών νευροαπεικόνισης, για τον προσδιορισμό της πιθανότητας μετατροπής τους σε κλινικά εκδηλωμένη νόσο του Parkinson (Ross et al., 2012) (Schrag et al., 2015) (Mahlknecht et al., 2020). Η RBD ξεχωρίζει μεταξύ των κλινικών δεικτών, του κινδύνου εμφάνισης της νόσου καθώς ένα ποσοστό μεγαλύτερο του 90% των ατόμων με απομονωμένη RBD θα αναπτύξει εν τέλει νευροεκφυλιστικό παρκινσονισμό—πιο συχνά νόσο του Parkinson ή άνοια της νόσου του Parkinson

(Iranzo et al., 2013) (Dauvilliers et al., 2018). Η λανθάνουσα περίοδος από την έναρξη της RBD έως την ανάπτυξη της νόσου του Parkinson είναι μεταβλητή και συνήθως διαρκεί περισσότερο από 10 έτη (Iranzo et al., 2013), αν και η παρουσία οσφρητικής δυσλειτουργίας, ανωμαλίες στο μεταφορέα ντοπαμίνης SPECT ή διακρανιακό υπερηχογράφημα, έχουν αποδειχθεί ότι εντοπίζουν τους ασθενείς κοντά στην κλινική μετατροπή (Dauvilliers et al., 2018) (Mahlknecht et al., 2015).

Το International Parkinson and Movement Disorder Society έχει προτείνει κριτήρια για μια ερευνητική διάγνωση της προδρομικής νόσου του Parkinson. Αυτές οι προσπάθειες παρέχουν ένα τεκμηριωμένο πλαίσιο για τη στατιστική εκτίμηση της πιθανότητας εμφάνισης μελλοντικής νόσου του Parkinson σε ένα άτομο, με βάση ένα μεγάλο σύνολο καλά χαρακτηρισμένων δεικτών κινδύνου (Berg et al., 2015) (Heinzel et al., 2019). Μερικές μελέτες παρέχουν αποδεικτικά στοιχεία για την εγκυρότητα αυτών των κριτηρίων στο πληθυσμό (Mahlknecht et al., 2018) (Pilotto et al., 2017). Ένας παρόμοιος αλγόριθμος έχει αναπτυχθεί με τη μορφή ενός διαδικτυακού εργαλείου για την αξιολόγηση του κινδύνου της νόσου του Parkinson και έχει δοκιμαστεί και επικυρωθεί στη μελέτη της ασθένειας του PREDICT-Parkinson, μια πληθυσμιακή μελέτη με βάση την κοινότητα που περιλάμβανε περισσότερους από 1000 συμμετέχοντες (Noyce et al., 2014) (Noyce et al., 2017).

1.1.7 Κύριοι οδοί δράσης των φαρμάκων για τη θεραπεία της νόσου Parkinson

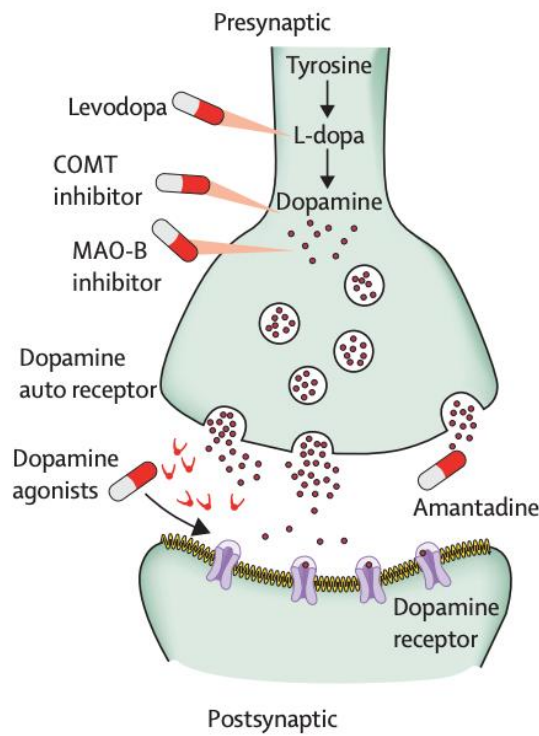
Τα κεντρικά συμπτώματα της νόσου του Parkinson είναι αντιμετωπίσιμα με φαρμακοθεραπεία. Η ντοπαμινεργική φαρμακοθεραπεία είναι μία από τις τέσσερις κύριες στρατηγικές (1. πολυπαραγοντική θεραπεία, 2. πληροφόρηση φροντιστών και

ασθενών, 3. θεραπείες με ιατρικές συσκευές π.χ. νευροδιεγέρτης και 4. φαρμακοθεραπεία). Η έναρξη φαρμακοθεραπείας είναι κομβική για την εξέλιξη της νόσου. Δυστυχώς λανθασμένα επιχειρήματα ανακυκλώνουν την άποψη που υποστηρίζει την αναβολή της θεραπείας, καθώς μακροχρόνια χρήση λεβοντόπας θα μπορούσε να είναι τοξική και να επιταχύνει την εξέλιξη της νόσου, προάγοντας το οξειδωτικό στρες. Η μεγάλη επιδημιολογική μελέτη LEAP, η οποία χρησιμοποίησε στο σχεδιασμό καθυστερημένη εκκίνηση θεραπείας με λεβοντόπα, κατέδειξε ότι σε άτομα με νόσο του Parkinson βελτιώθηκαν τα κινητικά συμπτώματα και η ποιότητα ζωής στην έναρξη θεραπείας νωρίς συγκριτικά με την ομάδα εικονικού φαρμάκου (9 μήνες μετά, η οποία δεν εμφάνισε νευροπροστασία, καταρρίπτοντας το επιχείρημα για την πιθανή τοξική δράση της λεβοντόπας). Ωστόσο είναι σημαντικό να τονιστεί ότι μόλις ληφθεί η απόφαση για την έναρξη της θεραπείας, η στρατηγική πρέπει να εξατομικεύεται.

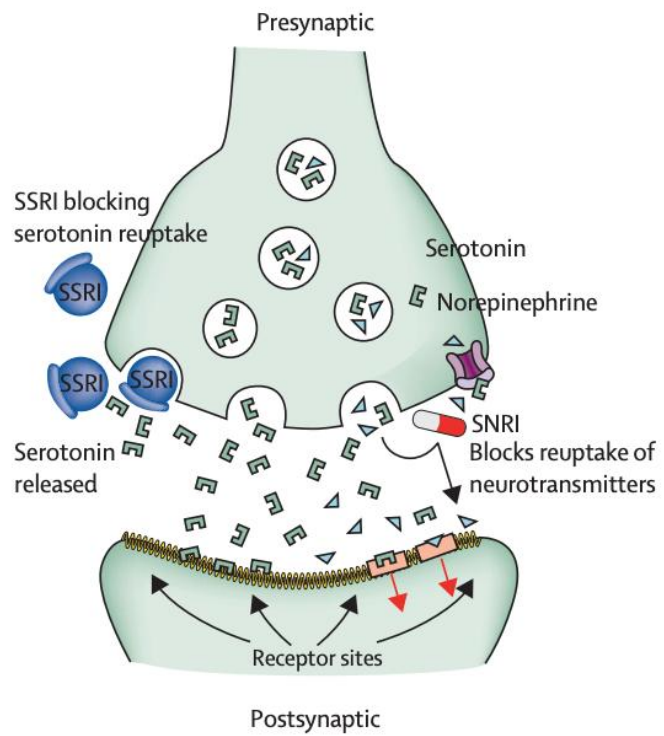
Η λεβοντόπα (αγωνιστής του υποδοχέα ντοπαμίνης, μετατρέπεται με αποκαρβοξυλίωση σε ντοπαμίνη) ή ο αναστολέας οξειδάσης τύπου Β (π.χ. σελεγιλίνη ή ρασαγιλίνη) έχουν αποδειχθεί ως ωφέλιμες ως αρχικές θεραπείες. Σε άτομα που λαμβάνουν λεβοντόπα, η θεραπεία γίνεται καλύτερα ανεκτή και οι βαθμολογίες κινητικότητας των ασθενών βελτιώνονται περισσότερο σε σύγκριση με άλλες στρατηγικές. Η λεβοντόπα σχετίζεται με μεγαλύτερη βελτίωση της κίνησης, αλλά και με περισσότερες δυσκινησίες από τους αγωνιστές ντοπαμίνης. Ωστόσο, οι άλλοι αγωνιστές σχετίζονται με περισσότερες παρενέργειες (π.χ. ναυτία, ορθοστασία και κρίσεις ύπνου) και είναι λιγότερο ανεκτοί από τη λεβοντόπα, ειδικά σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας με νόσο Parkinson. Μπορεί να εμφανιστούν διαταραχές του ελέγχου των παρορμήσεων με παρατεταμένη χρήση αγωνιστών ντοπαμίνης, κυρίως σε άνδρες και νεότερα άτομα με

νόσο του Parkinson. Υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ατόμων στην ανταπόκριση στη λεβοντόπα, και υπάρχει μια σημαντική υποομάδα των κατά τα άλλα τυπικών ατόμων με νόσο του Parkinson, οι οποίοι γίνονται προοδευτικά ανθεκτικοί στη λεβοντόπα παρά την αρχική ευεργετική ανταπόκριση.

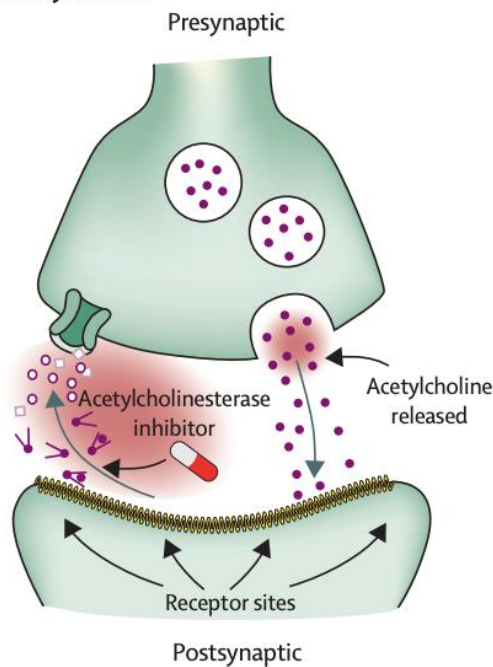
A Dopamine



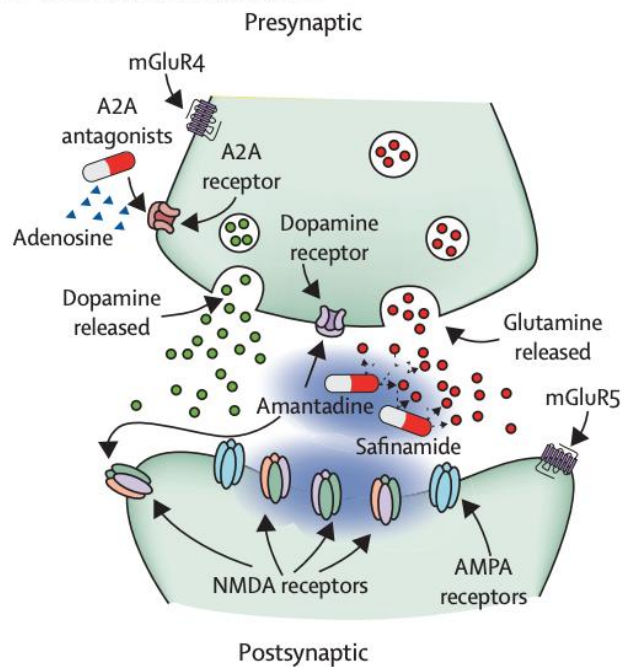
B Serotonin and norepinephrine



C Acetylcholine



D Glutamate and adenosine



Εικόνα 2. Μηχανισμοί και οδοί δράσης για τα διάφορα αντιπαρκινσονικά φάρμακα.

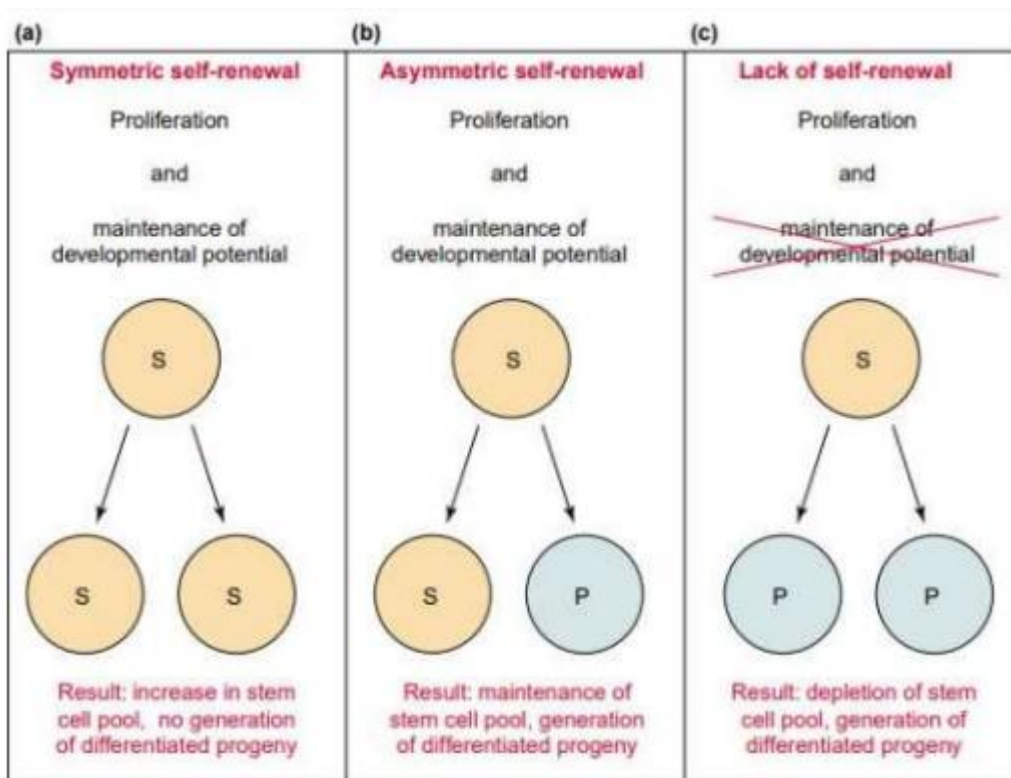
Προσαρμοσμένη από Bloem et al.. Περιγράφονται διάφοροι νευροδιαβιβαστές που εμπλέκονται με τον αντίστοιχο μηχανισμό λειτουργίας τους. AMPA=α-αμινο-3-υδροξυ-5-μεθυλ-4-

ισοξαζολοπροπιονικό οξύ. COMT=O-μεθυλοτρανσφεράση κατεχόλης. MAO-B=μονοαμινοξειδάση τύπου B. NMDA=N-μεθυλ-D-ασπαρτικό. SNRI= αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης νοραδρεναλίνης SSRI=εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης. Προσαρμοσμένη από **Bloem et al. Lancet 2021;397:2284–303. A. Ντοπαμίνη. Levodopa:** ως θεραπεία υποκατάστασης, διότι μετατρέπεται με αποκαρβοξυλίωση σε ντοπαμίνη, μόνη ή συνήθως σε συνδυασμό με περιφερικό αναστολέα της ντοπα- αποκαρβοξυλάσης όπως η βενσεραζίδη και η καρβιντόπα, **Dopamine agonists:** βρωμοκρυπτίνη, εντακαπόνη, ροπινιρόλη, πραμιπεξόλη, διυδροεργοκρυπτίνη, απομορφίνη, ροτιγοτίνη, **MAO-B inhibitors:** π.χ. η σελεγιλίνη και η ρασαγιλίνη, **COMT inhibitors:** π.χ. εντακαπόνη που χρησιμοποιείται μόνο με τον συνδυασμό λεβοντόπα/βενσεραζίδη ή λεβοντόπα/καρβιντόπα. **Amantadine:** άγνωστος μηχανισμός ντοπαμινεργικής δράσης, **B. Σεροτονίνη και νοραδρεναλίνη.** Κυρίως αναστολείς επαναπρόσληψης των νευροδιαβιβαστών σεροτονίνη και νοραδρεναλίνη, **C.Ακετυλοχολίνη.** Αναστολείς του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση και **D. Γλουταμικό Οξύ και Αδενosίνη.** Αναστολείς υποδοχέων A2A, αμανταδίνη, σαφιναμίδη (αναστολέας MAO-B).

1.2 Βλαστοκύτταρα (stem cells)

Τα βλαστοκύτταρα είναι μη εξειδικευμένα κύτταρα που χαρακτηρίζονται από τη δυνατότητα της αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησης προς πολλαπλούς τύπους κυττάρων. Η αυτοανανέωση περιλαμβάνει κυρίως την ικανότητα του βλαστοκυττάρου να υποστεί πολλαπλές διαιρέσεις. Διαθέτουν μια φαινομενικά απεριόριστη ικανότητα in vitro της τάξεως των 160 πολλαπλασιασμών (γενεών). Αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια αποδείχθηκε ότι εμπλέκονται στη διαδικασία της αυτοανανέωσης, μερικά από αυτά είναι τα Notch, Wnt, Hedgehog και οι πρωτεΐνες της οικογένειας Polycomb (Molofsky et al., 2004). Εκτός από την αυτοανανέωση, τα βλαστοκύτταρα έχουν επίσης

την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε άλλους τύπους κυττάρων, διαδραματίζοντας κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης και την επιδιόρθωση των ιστών . Τόσο η αυτοανανέωση όσο και η διαφοροποίηση εξαρτώνται από την ικανότητα του κυττάρου να διαιρείται. Τα βλαστοκύτταρα αναπαράγονται μέσω δύο τύπων διαίρεσης: α) ασύμμετρη, ένα από τα δύο κύτταρα είναι πανομοιότυπο με το μητρικό κύτταρο και το δεύτερο διαφοροποιείται σε μια πιο εξειδικευμένη κυτταρική γενεαλογία β) συμμετρική, και τα δύο θυγατρικά κύτταρα είναι πανομοιότυπα με το μητρικό κύτταρο. (εικόνα 1)



Εικόνα 3. Γραφική απεικόνιση συμμετρικής και ασύμμετρης διαίρεσης. Προσαρμοσμένη από (Molofsky, Pardal et al. 2004). Ένα βλαστοκύτταρο μπορεί να διαιρεθεί α) συμμετρικά αναπαράγοντας δύο βλαστοκύτταρα β) συμμετρικά αναπαράγοντας δύο διαφοροποιημένα κύτταρα ή γ) ασύμμετρα αναπαράγοντας ένα βλαστοκύτταρο και διαφοροποιημένο κύτταρο

1.2.1 Προέλευση των βλαστικών κυττάρων

Η εμβρυογένεση είναι η αναπτυξιακή διαδικασία του εμβρύου και περιλαμβάνει τα στάδια από τη γονιμοποίηση μέχρι και τη γέννηση. Η σύντηξη των δύο γαμετών, του ωαρίου και του σπέρματος, είναι το πρώτο στέλεχος για να σχηματιστεί ένας νέος οργανισμός. Αυτή η σύντηξη έχει ως αποτέλεσμα το γονιμοποιημένο ωάριο, γνωστό και ως ζυγωτό. Ο σχηματισμός ενός ενήλικου και γόνιμου ατόμου είναι μια μακρά διαδικασία, στην οποία συμβαίνουν αρκετές αλλαγές. Μία από τις πιο σημαντικές αλλαγές από νωρίς είναι οι πρώιμες κυτταρικές διαιρέσεις (αυλακώσεις). Οι αυλακώσεις διαφέρουν από τις συνήθεις κυτταρικές διαιρέσεις καθώς δεν συνοδεύονται από κυτταρική αύξηση, συνεπώς το κυτταρόπλασμα του γονιμοποιημένου ωαρίου διαιρείται μεταξύ των νεοσχηματισθέντων κυττάρων, διασφαλίζοντας ότι τα θυγατρικά κύτταρα θα έχουν την ίδια ποσότητα γενετικού υλικού. Το ζυγωτό διαιρείται για να δημιουργήσει πολλά νέα κύτταρα κατά τη μετακίνησή του στη μήτρα. Από κάθε διαίρεση δημιουργούνται δύο πανομοιότυπα κύτταρα. Στο στάδιο των τριάντα δύο κυττάρων έχει ξεκινήσει ο σχηματισμός του μοριδίου, το οποίο έχει το ίδιο μέγεθος με το ζυγωτό επειδή η διαφανής ζώνη (Zona Pellucida), μια προστατευτική μεμβράνη γλυκοπρωτεϊνών που περιβάλλει το γονιμοποιημένο ωάριο, παραμένει άθικτη και περιορίζει την ανάπτυξη. Σε αυτό το σημείο, τα κύτταρα συνεχίζουν να διαιρούνται αλλά αρχίζουν επίσης να διαφοροποιούνται και να αναπτύσσουν πιο εξειδικευμένες μορφές και λειτουργίες. Στη συνέχεια, το έμβρυο εξελίσσεται σε βλαστοκύστη, η οποία αποτελείται από κύτταρα που σχηματίζουν ένα εξωτερικό στρώμα, τη τροφοβλάστη και μια εσωτερική κυτταρική μάζα (Inner cell mass-ICM). Η ICM καταλαμβάνει τη μία πλευρά της σφαίρας που σχηματίζεται από τη τροφοβλάστη, ενώ το υπόλοιπο της

κοιλότητας είναι η βλαστοκήλη (κοιλότητα γεμάτη αμνιακό υγρό) (Slack, 2012). Η τροφοβλάστη συμβάλλει στη δημιουργία δομών που βοηθούν το αναπτυσσόμενο έμβρυο να εμφυτευτεί στη μήτρα, όπως ο πλακούντας και οι εμβρυϊκές μεμβράνες. Το εσωτερικό της κυτταρικής μάζας συνεχίζει να διαφοροποιείται και εξελίσσεται σε έμβρυο. Τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (Embryonic stem cells-ESCs) προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της προεμφυτευτικής βλαστοκύστης και θεωρούνται πολυδύναμα επειδή έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε όλους τους ώριμους κυτταρικούς τύπους ενός ενήλικου οργανισμού (Chagastelles and Nardi, 2011).

1.2.2 Στάδια βλαστικότητας

Με βάση τη βλαστικότητά τους και ειδικότερα την ικανότητα διαφοροποίησής τους, τα βλαστοκύτταρα μπορούν να χαρακτηριστούν ως : πολυδύναμα, πλειοδύναμα, ολιγοδύναμα ή μονοδύναμα (Kolios and Moodley, 2013). Τα ολοδύναμα ξεκινούν από το στάδιο του γονιμοποιημένου ωαρίου και την ανάπτυξη του εμβρύου μέχρι το στάδιο των οκτώ κυττάρων και έχουν την δυνατότητα να διαφοροποιηθούν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και να δημιουργήσουν έναν πλήρη και βιώσιμο οργανισμό. Το γονιμοποιημένο ωάριο διατηρεί την πλήρη ισχύ του για περίπου τέσσερις ημέρες και στη συνέχεια σχηματίζει τη βλαστοκύστη (16 κύτταρα). Τα πολυδύναμα κύτταρα προέρχονται από ολοδύναμα βλαστοκύτταρα και είναι ανίκανα να δημιουργήσουν έναν νέο οργανισμό, αλλά μπορούν να σχηματίσουν τις τρεις κύριες βλαστικές στιβάδες (εξώδερμα, ενδόδερμα, μεσόδερμα). Τα κύτταρα της ICM είναι πολυδύναμα και μπορούν διαφοροποιηθούν σε σχεδόν κάθε τύπο κυττάρου στο σώμα. Ωστόσο, δεν μπορούν να σχηματίσουν μη εμβρυϊκές δομές, όπως μέρη του πλακούντα και συνεπώς

δεν μπορούν να δημιουργήσουν έναν πλήρη οργανισμό σε αντίθεση με το ολοδύναμο στέλεχος. Υπάρχουν τουλάχιστον τρεις τύποι κυττάρων με πολυδύναμο δυναμικό, τα εμβρυϊκά γεννητικά κύτταρα, το εμβρυϊκό καρκίνωμα και τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (Dawud et al., 2012) (Howard et al., 2008). Σε μεταγενέστερα στάδια ανάπτυξης, τα κύτταρα χάνουν το πολυδύναμο δυναμικό τους και μετατοπίζονται σε χαμηλότερα στάδια του δυναμικού διαφοροποίησης καθώς διαιρούνται ασύμμετρα. Συνεπώς τα βλαστοκύτταρα που βρίσκονται σε εξειδικευμένους ιστούς του ενήλικου ατόμου ή του εμβρύου είναι γνωστά ως πλειοδύναμα, που σημαίνει ότι μπορούν να διαφοροποιηθούν σε πολλά κύτταρα/ιστούς του σώματος αλλά όχι στο πλήρες ρεπερτόριο των κυτταρικών τύπων που μπορούν να διαφοροποιηθούν τα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα. Τα πλειοδύναμα βλαστοκύτταρα σχηματίζουν μόνο κυτταρικούς τύπους σε όργανα ή ιστούς του σώματος στα οποία βρίσκονται κανονικά και τα πιο καλά μελετημένα από αυτόν τον τύπο βλαστοκυττάρων είναι τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (Mummery et al., 2014). Από την άλλη, τα ολιγοδύναμα βλαστοκύτταρα έχουν μικρότερο δυναμικό διαφοροποίησης από τα πλειοδύναμα κύτταρα και διαφοροποιούνται σε λιγότερους τύπους κυττάρων. Τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα είναι αντιπροσωπευτικά ολιγοδύναμα κύτταρα. Ωστόσο, υπάρχει μια άλλη κατηγορία κυττάρων, τα μονοδύναμα βλαστοκύτταρα, τα οποία μπορούν να σχηματίσουν μόνο ένα τύπο κυττάρου, τον δικό τους. Ορισμένα παραδείγματα μονοδύναμων κυττάρων αποτελούν τα ενήλικα μυϊκά βλαστοκύτταρα, τα κύτταρα δέρματος (επιθήλιο) και τα κύτταρα σπερματογονίας (Howard et al., 2008) (Mummery et al., 2014).

1.2.3 Εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (ESCs)

Τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα (ESCs) είναι πρωτόγονα κύτταρα που προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα (ICM) της όψιμης βλαστοκύστης. Χαρακτηρίζονται από αμείωτο πολλαπλασιασμό και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε όλα σχεδόν τα κύτταρα/ιστούς του σώματος. Μια καθοριστική στιγμή για τη βιολογία των ESC ήταν το 1981, όταν απομονώθηκε η πρώτη σειρά ESCs με επιτυχία από βλαστοκύστη ποντικού (mouse ESCs-mESCs) (Martin, 1981). Σχεδόν δύο δεκαετίες αργότερα, δημιουργήθηκε το πρώτο ανθρώπινο εμβρυικό βλαστικό κύτταρο (Thomson et al., 1998).

1.2.4 Ενήλικα βλαστικά κύτταρα (ASC)

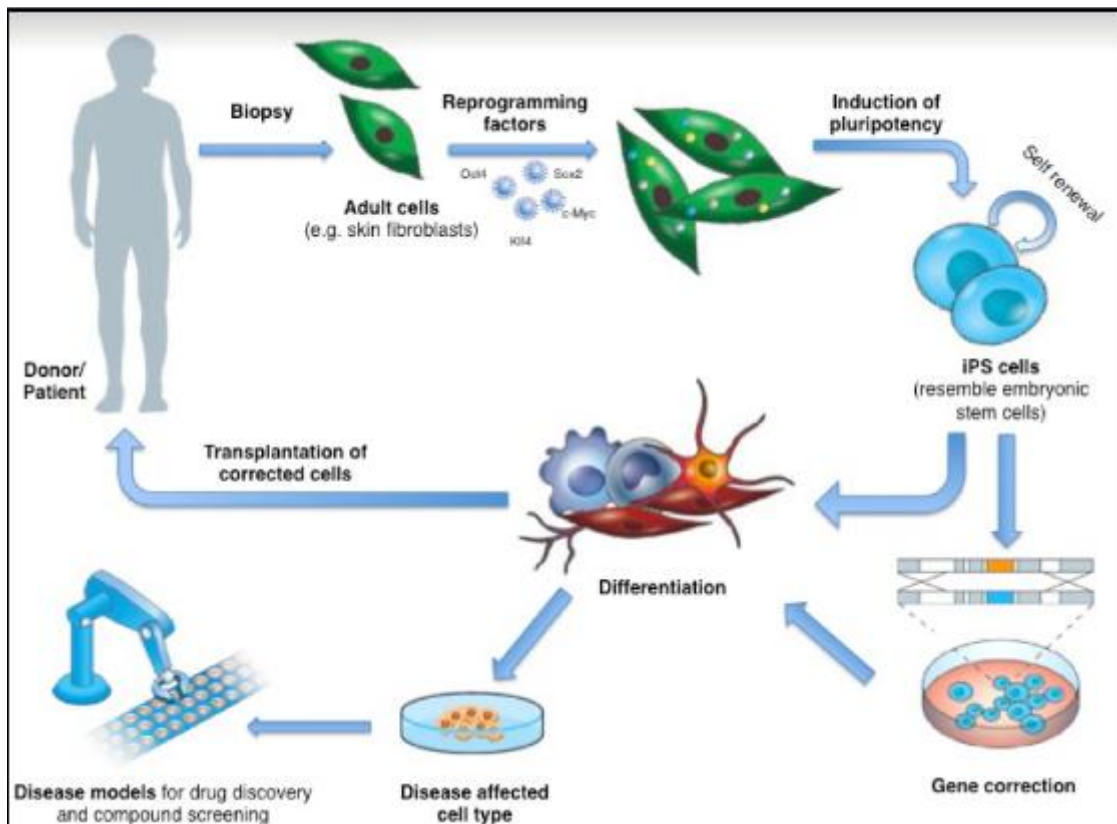
Τα ενήλικα βλαστοκύτταρα (adult Stem Cells-ASCs) είναι σπάνια και με πιο περιορισμένη ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης σε σύγκριση με τα πλειοδύναμα κύτταρα. Ο σκοπός των ASCs είναι η διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης και η αντικατάσταση όλων των νεκρών ή κατεστραμμένων κυττάρων (Xu et al., 2019). Η ισορροπία μεταξύ της αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησης ελέγχεται από το μικροπεριβάλλον ή θώκο «niche» στο οποίο κατοικούν τα ASC. Η ρυθμιστική δράση του θώκου πραγματοποιείται μέσω της φυσικής επαφής του βλαστοκυττάρου με το μικροπεριβάλλον του και μέσω εκκρινόμενων παραγόντων όπως Wnt, BMP, Sonic Hedgehog, αυξητικών παραγόντων, διαμέσου προσταγλαδίνης E2 (PGE2), αλλά και μέσω μορίων και ιόντων (όπως Ca^{+} και O^{2-}). Περιλαμβάνει μία ομάδα κυττάρων που συνδέονται με τα βλαστοκύτταρα μέσω μορίων προσκόλλησης. Τα ASCs βρίσκονται στους μεταγεννητικούς ιστούς, όχι μόνο του σώματος αλλά και του ομφάλιου λώρου κατά τη γέννηση. Οι μεταγεννητικοί ιστοί από τους οποίους απομονώνονται τα

ενήλικα βλαστοκύτταρα είναι: μυελός των οστών, αίμα, λιπώδης ιστός, ήπαρ, δέρμα και εγκέφαλος.

1.2.5 Επαγόμενα Πολυδύναμα Βλαστικά Κύτταρα (iPSCs)

Τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα είναι σωματικά κύτταρα που έχουν γενετικά επαναπρογραμματιστεί σε εμβρυικά βλαστοκύτταρα και έχουν αναγκαστεί να εκφράσουν γονίδια και παράγοντες, σημαντικούς για τη διατήρηση των ιδιοτήτων των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων. Τα iPSCs είναι παρόμοια στην αυτοανανέωση, τη μορφολογία, την αυξητική κινητική και την γονιδιακή έκφραση με τα ESCs (Xu et al., 2019). Είναι πολυδύναμα, επομένως μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα και των τριών βλαστικών στοιβάδων εκτός από τις μη εμβρυϊκές δομές. Μέχρι το 2005, ήταν γνωστό ότι τα σωματικά κύτταρα μπορούν να επαναπρογραμματιστούν μόνο με τη μεταφορά του περιεχομένου του πυρήνα τους σε ωκύτταρα (Wilmut et al., 1997) ή με σύντηξη με ESCs (Tada et al., 2001) (Cowan et al., 2005) , υποδεικνύοντας ότι το μη γονιμοποιημένο ωάριο και τα ESC περιέχουν παράγοντες που μπορούν να προσδώσουν ολοδύναμη ή πολυδύναμη ιδιότητα σε σωματικά κύτταρα (Takahashi and Yamanaka, 2006). Το 2006 οι Yamanaka και Takahashi υπέθεσαν ότι οι παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ταυτότητας των ESCs παίζουν επίσης καθοριστικό ρόλο στην επαγωγή πολυδυναμίας στα σωματικά κύτταρα (Takahashi and Yamanaka, 2006). Με βάση τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών που μελέτησαν τους παράγοντες μεταγραφής, Oct3 / 4, Sox2 και Nanog, αντίστοιχα, εξέτασαν ένα συνδυασμό τεσσάρων επιλεγμένων παραγόντων και ήταν οι πρώτοι που εντόπισαν γονίδια που είναι υπεύθυνα για την επαναφορά των σωματικών κυττάρων σε

πολυδύναμη κατάσταση (Niwa et al., 2000) (Avilion et al., 2003) (Chambers et al., 2003). Αυτοί οι τέσσερις μεταγραφικοί παράγοντες βλαστικότητας ονομάζονται "Yamanaka Factors" και είναι Oct3 / 4, Sox2, c-Myc και Klf4, γνωστοί και ως παράγοντες OSMK.



Εικόνα 4. Ο ενάρετος κύκλος της Ιατρικής Ακριβείας που βασίζεται σε εφαρμογές Αναγεννητικής Ιατρικής με βλαστικά κύτταρα. Προσαρμοσμένη από <https://www.closerlookatstemcells.org/>. Παράγοντες επαναπρογραμματισμού χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων από ινοβλάστες δέρματος. Αυτοί είναι οι παράγοντες Yamanaka, δηλαδή Oct4 / Sox2 / Klf4 και c-Myc. Τα επαναπρογραμματισμένα κύτταρα μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν για φάρμακα προσυμπτωματικού ελέγχου ή μοντελοποίησης ασθενειών.

1.2.6 Κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια σε hESCs

Υπάρχει μια πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται είτε άμεσα είτε έμμεσα στη διατήρηση της πολυδύναμης κατάστασης και στη ρύθμιση της διαφοροποίησης των βλαστοκυττάρων. Παρά την κοινή τους προέλευση, την αυτοανανέωση και τις ομοιότητες πολυδυναμίας, τα mESCs και τα hESCs διαφέρουν από πολλές απόψεις. Οι ιδιότητες ESC του ποντικιού καθορίζονται από το μονοπάτι σηματοδότησης των LIF (Leukemia inhibitory factor) και BMP (Bone Morphogenetic proteins) αλλά σε ανθρώπινα ESCs αυτά τα μονοπάτια δεν είναι αποτελεσματικά. Οι ιδιότητες πολυδυναμίας των hESCs εξαρτώνται από την ακτιβίνη και τον FGF (Fibroblast growth factor).

1.2.7 Μοντελοποίηση Ασθενειών

Στη χρήση των PSC στη μοντελοποίηση ασθενειών δόθηκε περαιτέρω ώθηση όταν ο Takahashi και ο Yamanaka ανέφεραν ότι μπορούσαν να μετατρέψουν κύτταρα από ενήλικων ποντικών και ανθρώπων σε κύτταρα που έμοιαζαν με ESCs (Takahashi and Yamanaka, 2006). Από τότε, υπάρχει ένας αξιοσημείωτος αριθμός προσπαθειών για τη χρήση ποικίλων τύπων βλαστοκυττάρων για θεραπευτικούς σκοπούς με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Η μοντελοποίηση της νόσου περιλαμβάνει ολόκληρα ζώα ή κύτταρα που εμφανίζουν όλες ή μερικές από τις παθολογικές διεργασίες που παρατηρούνται στην πραγματική ασθένεια του ανθρώπου ή των ζώων. Η μελέτη της μοντελοποίησης των ασθενειών μας βοηθά στη κατανόηση της ανάπτυξης της νόσου και επιτρέπει τη δοκιμή πιθανής θεραπευτικής προσέγγισης. Το κλειδί για τη μοντελοποίηση είναι η

αναγνώριση μιας ασθένειας όπως η νόσος του Αλτσχάιμερ (Alzheimer's Disease-AD) ή η νόσος του Parkinson (Parkinson' disease- PD), γιατί αυτό απαιτεί ταυτόχρονα την αναγνώριση κυτταρικών φαινοτύπων που σχετίζονται με γνωστές πτυχές της παθολογίας της νόσου. Αρκετοί φαινότυποι ασθενειών έχουν επιτευχθεί με επιτυχία με μοντελοποίηση ασθενειών ειδικά για μονογονιδιακές ασθένειες (όπως π.χ. το σύνδρομο εύθραυστου X (Fragile X Syndrome-FXS) και το σύνδρομο Hutchinson – Gilford (Προγηρία) κ.λπ.), Όσο για το νευρικό σύστημα, έχουν μοντελοποιηθεί : η οικογενής δυσσαυτονομία (γνωστό και ως Riley – Day σύνδρομο), το σύνδρομο Rett, η πλάγια αμυοτροφική σκλήρυνση (Amyotrophic Lateral Sclerosis-ALS), και η νωτιαία μυϊκή ατροφία (Spinal muscular atrophy-SMA) (Ebert et al., 2009).

1.2.8 Θεραπεία με Βλαστοκύτταρα

Η θεραπεία με βλαστοκύτταρα είναι ένα σημαντικό μέρος της αναγεννητικής ιατρικής. Ορίζεται ως οποιαδήποτε θεραπεία για μια ασθένεια ή μια ιατρική κατάσταση που περιλαμβάνει βασικά τη χρήση οποιουδήποτε τύπου βιώσιμων ανθρώπινων βλαστοκυττάρων συμπεριλαμβανομένων των ESCs, iPSCs και ASCs (ενηλίκων βλαστοκυττάρων). Όταν υπάρχει ανάγκη για μεταμόσχευση ιστών και οργάνων, η ικανότητα διαφοροποίησης στα συγκεκριμένα κύτταρα που απαιτούνται, καθιστούν τα βλαστοκύτταρα ιδανικούς υποψηφίους. Η θεραπεία με βάση τα βλαστοκύτταρα έχει χρησιμοποιηθεί για νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως PD, Σκλήρυνση κατά Πλάκας (Multiple sclerosis-MS) και κάκωση νωτιαίου μυελού (spinal cord injury -SCI), για οφθαλμικές παθήσεις, για θεραπεία του διαβήτη, στην οδοντιατρική και σε πολλούς άλλους τομείς . Ωστόσο, το θεραπευτικό δυναμικό των iPSC είναι ακόμα υπό έρευνα,

όπως είναι οι νέες και καινοτόμες θεραπείες που βασίζονται σε βλαστοκύτταρα είναι ακόμη στα αρχικά στάδια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα και Νόσος Parkinson

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα και Νόσος

Parkinson

2.1 Καθιέρωση της τεχνολογίας των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSC) και μέθοδοι διαφοροποίησης σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες (DN)

Υπάρχουν δύο κύριες μέθοδοι για τη λήψη DN από ασθενείς. Μια προσέγγιση περιλαμβάνει τον επαναπρογραμματισμό σωματικών κυττάρων του ασθενούς (συνήθως ινοβλάστες) σε iPSC και διαφοροποίηση αυτών των iPSC σε DN. Μια άλλη, πιο πρόσφατη, προσέγγιση είναι ο άμεσος επαναπρογραμματισμός των ινοβλαστών σε DN. Κάθε μέθοδος έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα που θα συζητηθούν σε αυτό το κεφάλαιο.

2.1.1 Δημιουργία iPSC

Η έλευση της τεχνολογίας των iPSC από την ομάδα του Yamanaka έφερε επανάσταση στον τομέα της μοντελοποίησης των ανθρώπινων ασθενειών *in vitro*. Τα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα μπορούν να δημιουργηθούν από ενήλικα σωματικά κύτταρα επάγοντας την έκφραση των παραγόντων Yamanaka: Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc (Takahashi and Yamanaka, 2006). Οι Oct3/4 και Sox2 απαιτούνται για τη πολυδυναμία, ενώ τα c-Myc και Klf4 αυξάνουν την αποτελεσματικότητα της παραγωγής iPSC, παρεμποδίζοντας την απόπτωση και τη γήρανση. Αρχικά, ο επαναπρογραμματισμός επιτυγχάνεται με την ενσωμάτωση ιών όπως οι λεντιϊοί και οι ρετροϊοί προκαλώντας την έκφραση των

παραγόντων Yamanaka (Takahashi et al., 2007) (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ωστόσο, η ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος ενέχει τον κίνδυνο εισαγωγής μεταλλαξογένεσης στο γονιδίωμα του ξενιστή. Επομένως στρατηγικές μη ενσωμάτωσης έχουν πλέον προτιμηθεί, μέσω της χρήσης μη ενσωματωμένων ιών όπως ο Sendai και αδενοϊός (Fusaki et al., 2009) (Stadtfield et al., 2008) (Zhou and Freed, 2009), επισωματικά πλασμίδια (Okita et al., 2008), piggyback transposons (τρανσποζόνια) (Kaji et al., 2009), πρωτεΐνες (Kim et al., 2018) ή μικρά μόρια (Hou et al., 2013).

2.1.2 Διαφοροποίηση σε DN

Η παλαιότερη και ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για τη δημιουργία DN από iPSCs διέρχεται από τη δημιουργία εμβρυϊκών σωμάτων (EB). Τα EB είναι τρισδιάστατες αποικίες πολυδύναμων βλαστοκυττάρων που υφίστανται διαφοροποίηση προς τα τρία βλαστικά στρώματα (ενδόδερμα, μεσόδερμα και εξώδερμα) που αποτελούν τις πρώιμες φάσεις της *in vivo* ανάπτυξης. Οι νευρώνες προέρχονται από το εξώδερμα και για να εμπλουτιστούν για τα νευροεξωδερματικά κύτταρα, τα EB καλλιεργούνται προσκολλημένα σε υποστρώματα, ώστε να επαχθεί η δημιουργία νευρικών σωληνοειδών δομών που ονομάζονται «ροζέτες» και οι οποίες μετά μπορούν να απομονωθούν. Αυτοί οι πρόδρομοι νευρωνικοί κυτταρικοί τύποι εκφράζουν τον δείκτη νευροεξωδέρματος PAX6. Μία μελέτη κλειδί έδειξε ότι η έκθεση αυτών των κυττάρων PAX6+ στον αυξητικό παράγοντα FGF8 (αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών 8) και ενεργοποιητή του μονοπατιού SHH (sonic hedgehog) εμπλουτίζει την καλλιέργεια σε DN του μέσου εγκεφάλου (Yan et al., 2005). Ειδικότερα, πρώιμη έκθεση σε FGF8 ήταν απαραίτητη για να διαμορφωθούν οι πρόδρομοι προς μια πιο οπίσθια μοίρα (ουριαία)

και η επακόλουθη έκθεση σε FGF8 και SHH επέτρεψε τη διαφοροποίηση των DANs σε μεσεγκεφαλική μοίρα (Yan et al., 2005). Αυτό το πρωτόκολλο δημιούργησε έναν μικτό πληθυσμό ηλεκτροφυσιολογικά ενεργών κυττάρων (δυναμικά δράσης και αυθόρμητη δραστηριότητα) από τα οποία το 32% ήταν θετικό στην υδροξυλάση της τυροσίνης (TH), βασικό ένζυμο για την παραγωγή ντοπαμίνης και δείκτης για DN.

Τα επόμενα χρόνια υπήρξε αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον για τη βελτίωση της προέλευσης των κυττάρων. Πρόσφατες νευροαναπτυξιακές μελέτες στον άνθρωπο έδειξαν πως οι DN που σχετίζονται με τη νόσο Parkinson προέρχονται από την εδαφική πλάκα του μεσεγκεφάλου και όχι από τους πρόδρομους των κυττάρων PAX6+ (Ono et al., 2007). Ως εκ τούτου, μια σειρά από μελέτες στόχευσαν στην παραγωγή DNs μέσω της *in vitro* δημιουργίας προγονικών κυττάρων της εδαφικής πλάκας του μεσεγκεφάλου. Η χημική μετατροπή προς νευρώνες είναι ένα προεπιλεγμένο πρόγραμμα, αλλά η αποτελεσματικότητα μπορεί να αυξηθεί με τον αποκλεισμό των μεσοδερμικών και των ενδοδερμικών μετατροπών στο πρωτόκολλο. Το 2009, το εργαστήριο Struder ανέπτυξε τη διπλή αναστολή της σηματοδότησης SMAD για να επάγει αξιόπιστα τη μετατροπή προς νευρώνες. Το σύστημα χρησιμοποιεί Noggin (ή τον αγωνιστή dorsomorphin ή LDN193189) για την αναστολή της σηματοδότησης BMP και τον παράγοντα SB431542 για αποκλεισμό της σηματοδότησης Activin και Nodal (Chambers et al., 2003). Τα νευρικά πρόδρομα κύτταρα δημιουργούνται μέσω της προεπιλογής διπλής αναστολής SMAD στην πρόσθια νευρική μοίρα. Ωστόσο, οι νευρώνες του μεσεγκεφάλου προέρχονται από την εδαφική πλάκα και ως εκ τούτου, το 2011 το εργαστήριο του Struder τροποποίησε ελαφρώς αυτό το πρωτόκολλο για να ωθήσει τα πρόδρομα κύτταρα προς μια πιο οπίσθια και κατώτερη μοίρα (ουριαίου-κοιλιακού εγκεφάλου),

επάγοντας έτσι ντοπαμινεργικούς προγονικούς νευρώνες στις πρώτες φάσεις της διαφοροποίησης (Kriks et al., 2011). Η «κοιλιοποίηση» επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού SHH χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένη SHH και πουρομορφαμίνη. Η ουριαιοποίηση και ο τελικός σχηματισμός ντοπαμινεργικών νευρικών προγόνων απαιτεί ενεργοποίηση της σηματοδότησης του FGF8a και Wnt (που επιτυγχάνεται με το CHIR99021, έναν ισχυρό αναστολέα της κινάσης GSK3B ικανός να ενεργοποιεί τη σηματοδότηση Wnt). Το αποτέλεσμα των ντοπαμινεργικών νευρικών προγόνων εκφράζει τους ντοπαμινεργικούς νευρικούς προγονικούς δείκτες του μεσεγκεφάλου : FOXA2 και LMX1A. Επιπλέον, η νευρωνική διαφοροποίηση και ωρίμανση επιτυγχάνεται με τη χρήση: DAPT (αναστολέας του συμπλόκου της γ-σεκρετάσης) για την αναστολή της σηματοδότησης Notch και την ώθηση προς τη νευρωνική διαφοροποίηση, db-cAMP (μια μορφή κυκλικού AMP που είναι κυτταρο-διαπερατή) για την ενίσχυση της επιμήκυνσης, της επιβίωσης και της περαιτέρω ωρίμανσης των νευριτών, και ενός κοκτέιλ νευροτροφικών παραγόντων (BDNF, GDNF, ασκορβικό οξύ και TGFβ3) για τροφική υποστήριξη (Kriks et al., 2011). Η προκύπτουσα νευρωνική καλλιέργεια αποδίδει 75% TH+ νευρώνες με κοιλιακή ταυτότητα μεσεγκεφάλου. Τα κύτταρα είναι ηλεκτροφυσιολογικά ενεργά και μεταμοσχεύθηκαν επιτυχώς σε μοντέλο ποντικού PD, όπου και ενσωματώθηκαν (Kriks et al., 2011).

Μια εναλλακτική λύση στη διαφοροποίηση των DN από τα iPSC ή άλλες πηγές βλαστοκυττάρων είναι ο άμεσος επαναπρογραμματισμός. Αυτή η προσέγγιση στοχεύει στη δημιουργία DNs απευθείας από άλλους τύπους σωματικών κυττάρων όπως οι ινοβλάστες και βασίζεται στην υπερέκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν

συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες προκειμένου να εξαναγκαστεί η διαφοροποίηση. Τα DN μπορεί να ληφθούν μέσω της ιικής μεταγωγής και υπερέκφρασης των γονιδίων ASCL1 με LMX1A και NURR1 με αποτελεσματικότητα 3% TH+ νευρώνες απευθείας από ανθρώπινους ενήλικες ινοβλάστες (Caiazzo et al., 2011). Το γονίδιο ASCL1 ωθεί τα κύτταρα προς νευρική ταυτότητα (Vierbuchen et al., 2010), το γονίδιο NURR1 είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των DN (Vierbuchen et al., 2010), το γονίδιο LMX1A προσδίδει στα κύτταρα ικανότητα επαναπρογραμματισμού του και επάγει την έκφραση TH. Η αποτελεσματικότητα του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου βελτιώθηκε και επιτεύχθηκαν 60% TH+ νευρώνες από εμβρυϊκούς ανθρώπινους ινοβλάστες και 8% από ενήλικους ανθρώπινους ινοβλάστες με την εισαγωγή: του mir124, ενός microRNA που καθοδηγεί τις αλλαγές στην αναδιαμόρφωση των συμπλεγμάτων χρωματίνης, μια διαδικασία απαραίτητη για τη νευρωνική διαφοροποίηση, και το p53 ανασταλτικό shRNA για να αυξηθεί η πλαστικότητα της κυτταρικής ταυτότητας. Άλλα παραδείγματα γονιδίων είναι τα Ascl1, Brn2 και Myt1l — όλα χρησιμοποιούνται για τον άμεσο επαναπρογραμματισμό των ινοβλαστών στους νευρώνες (Vierbuchen et al., 2010) —και ο συνδυασμός ASCL1 με LMX1A που δίνουν 10% TH+ νευρώνες από εμβρυϊκούς ανθρώπινους ινοβλάστες (Pfisterer et al., 2011). Ένα πλεονέκτημα του άμεσου επαναπρογραμματισμού είναι ότι, σε αντίθεση με τους νευρώνες που προέρχονται από iPSC από σωματικά κύτταρα, το πολυδύναμο στάδιο παραλείπεται. Εξάλειψη των παραγόντων Yamanaka, ορισμένοι από τους οποίους μπορεί να προκαλέσουν σχηματισμό όγκου, επομένως καθιστά ασφαλέστερο τον άμεσο επαναπρογραμματισμό των DANs για μεταμόσχευση. Μία από τις ανησυχίες σχετικά με τη χρήση των iPSC- προερχόμενα από νευρώνες στη μελέτη των

νευροεκφυλιστικών ασθενειών είναι ότι η διαδικασία του επαναπρογραμματισμού μπορεί να επαναφέρει (μηδενίσει) το κυτταρικό επιγενετικό ρολόι, κάτι το οποίο μπορεί να οδηγήσει στην έλλειψη φαινοτύπων που σχετίζονται με την ηλικία σε αυτό το *in vitro* μοντέλο. Ο άμεσος επαναπρογραμματισμός μπορεί να παρακάμψει αυτό το πρόβλημα καθώς τα κύτταρα έχουν περισσότερες πιθανότητες να διατηρήσουν την βιολογική ηλικία τους κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας (Kim et al., 2018). Ωστόσο, ο άμεσος επαναπρογραμματισμός είναι ακόμα πολύ αναποτελεσματικός αποδίδοντας μόνο 3% TH+ νευρώνες και απαιτεί σταθερή παροχή σε σπάνια πρωτογενή κύτταρα από ασθενείς, που δεν είναι πάντοτε εύκολο να απομονωθούν.

2.1.3 Νευρώνες που προέρχονται από iPSC για μοντελοποίηση ασθενειών

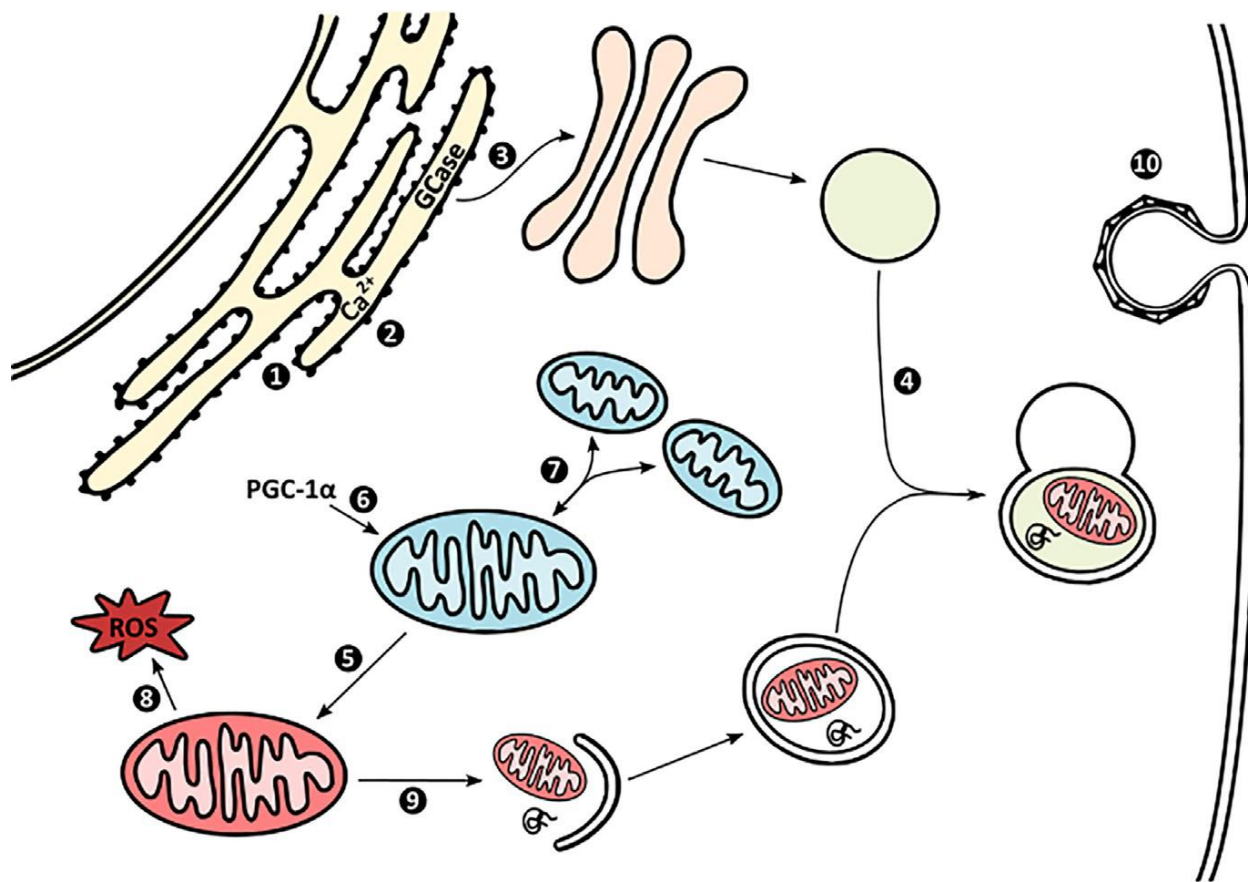
Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα των νευρώνων που προέρχονται από iPSC είναι ότι δίνουν τη δυνατότητα στους ερευνητές για τη μελέτη φαινοτύπων σε νευρώνες που προέρχονται απευθείας από ασθενείς με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο, για την ανάδειξη των κοινών παθογόνων μηχανισμών στην Νόσο Parkinson. Θα εστιάσουμε στους μελετημένους κυτταρικούς φαινοτύπους που ανακαλύφθηκαν σε νευρώνες που προέρχονται από iPSC με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο (Εικόνα 1).

2.2 Διερεύνηση των μοριακών/κυτταρικών μηχανισμών της νόσου Parkinson χρησιμοποιώντας βλαστικά κύτταρα

2.2.1 Καταπόνηση του ενδοπλασματικού δικτύου

Το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) είναι υπεύθυνο για τη σωστή αναδίπλωση και μετα-μεταφραστική τροποποίηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Πρωτεΐνες που συσσωρεύουν σφάλματα κατά την πρωτεϊνοσύνθεση (π.χ. πρώιμη λήξη ή λάθος αμινοξέα) διακινούνται στο ER για να υποβληθούν σε πρωτεολυτική αποικοδόμηση, μια διαδικασία που ονομάζεται ER-συνδεδεμένη αποικοδόμηση (ERAD) (Smith et al., 2011). Το ER εμπλέκεται επίσης στη βιοσύνθεση των λιπιδίων και είναι η κύρια αποθήκη ασβεστίου του κυττάρου. Σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, οι πρωτεΐνες με σφάλματα συγκεντρώνονται και συσσωρεύονται στο ER. Το ER ανταποκρίνεται στο αυξημένο μη αναδιπλωμένο φορτίο πρωτεΐνης με μια απόκριση στρες που ονομάζεται «απόκριση σε μη-διπλωμένες πρωτεΐνες» (UPR), η οποία προκαλεί μείωση της μετάφρασης της πρωτεΐνης και αύξηση της έκφρασης συγκεκριμένων πρωτεϊνικών συνοδών (τσαπερονίων) και πρωτεϊνών ERAD για την αποκατάσταση της ομοιόστασης του ER (Scheper and Hoozemans, 2015) (Walter and Ron, 2011). Υπάρχουν τρεις κύριες «πρωτεΐνες-αισθητήρες του στρες» στη μεμβράνη του ER: 1) η ενεργοποιημένη από RNA πρωτεϊνική κινάση (PERK), 2) ο μεταγραφικός παράγοντας 6 (ATF6) και 3) το ένζυμο 1 (IRE1). Αυτά ενεργοποιούν μεταγενέστερους μεσολαβητές της απόκρισης UPR όπως eIF2α, ATF6 και XBP1 που χρησιμοποιούνται συνήθως για τη μέτρηση των επιπέδων ενεργοποίησης του UPR (Scheper and Hoozemans, 2015). Τα επίπεδα στρες ER μπορούν επίσης να παρακολουθούνται κοιτάζοντας τα επίπεδα των υποστρωμάτων ERAD όπως η νικαστρίνη και η GCase. Το στρες ER έχει διερευνηθεί διεξοδικά σε νευρώνες που προέρχονται από iPSC ασθενών με νόσο Parkinson. DN που προέρχονται από iPSC από ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη N370S στο GBA

γονίδιο εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα δεικτών στρες ER συμπεριλαμβανομένων: BiP, PDI, IRE1, phospho-PERK, phospho-eIF2α και ματισμένης XBP1 (Fernandes et al., 2016) (Schöndorf et al., 2018). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι αυτοί οι νευρώνες εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα των τσαπερονίων που κατοικούν στο ER και των μεσολαβητών στρες ER, ERO1 και FKBP9 (Lang et al., 2019). Οι νευρώνες του φλοιού που προέρχονται από ασθενείς με τριπλασιασμό του SNCA (γονίδιο της ασνουκλείνης) συσώρευσαν τα υποστρώματα ERAD, GCase και νικαστρίνη υποδηλώνοντας την επαγωγή στρες (Chung et al., 2013). Επιπλέον, DN που προέρχονται από iPSC και έχουν μεταλλάξεις στο SNCA (A53T και τριπλασιασμός) εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα BiP και IRE1 (Zambon et al., 2019).



Εικόνα 5 Κύριοι φαινότυποι που εντοπίστηκαν σε DN που προέρχονται από iPSC από διάφορους τύπους ασθενών με Νόσο Parkinson. Προσαρμοσμένη από Blauwendraat et al.

(1) Νευροεκφύλιση - Οι ασθένειες χαρακτηρίζονται από συσσώρευση λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών σε μια ενεργοποίηση του στρες ενδοπλασματικού δικτύου που ενεργοποιεί το UPR στοχεύοντας στη μείωση της ποσότητας των «λανθασμένων» πρωτεϊνών και στην αποκατάσταση της ομοιόστασης του ER. Η απόκριση του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου μπορεί να παρακολουθηθεί με τη μέτρηση των επιπέδων των μεσολαβητών του όπως: BiP, PDI, IRE1, φωσφο-PERK, φωσφο-eIF2α, ματισμένο XBP1, ERO1 και FKBP9 ή τη συσσώρευση των ανώριμων ή μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπως η GCase. Σε DN που προέρχονται από iPSC ασθενών με Νόσο Parkinson και μεταλλάξεις SNCA ή GBA, η απόκριση στρες του ενδοπλασματικού δικτύου ενεργοποιείται χρόνια.

(2) Το ER είναι η κύρια αποθήκη ασβεστίου του κυττάρου και τα επίπεδα ασβεστίου του μεταβάλλονται στο σε μεταλλάξεις σχετιζόμενες με Νόσο Parkinson (GBA-L444P και στο LRRK2-G2019S) σε DN που προέρχονται από iPSC.

(3) Ο τριπλασιασμός του SNCA προκαλεί συσσώρευση ανώριμων λυσοσωμάτων και υδρολυτικών ενζύμων όπως η GCase στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

(4) Στα DN που προέρχονται από το GBA iPSC αυξάνεται ο λυσοσωμικός δείκτης LAMP1, υποδηλώνοντας συσσώρευση λυσοσωμάτων. Ωστόσο, αυτά τα λυσοσώματα φαίνεται να είναι δυσλειτουργικά (και στις δύο μεταλλάξεις GBA, SNCA), όπου συσσωρεύονται πρωτεΐνες με μεγάλο χρόνο ημιζωής.

(5) Αλλαγές στη μιτοχονδριακή λειτουργία παίζουν ρόλο στην Νόσο Parkinson. Συγκεκριμένα, η δραστηριότητα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) μεταβάλλεται σε DN από iPSC ασθενών με νόσο Parkinson και μεταλλάξεις: SNCA, GBA, LRRK2 και PINK.

(6) Η μιτοχονδριακή βιογένεση παρεμποδίζεται σε DN από iPSC ασθενών με νόσο Parkinson και μεταλλάξεις SNCA όπως αποδεικνύεται από τα μεταβαλλόμενα επίπεδα της πρωτεΐνης PGC-1α, ενός βασικού ρυθμιστή της μιτοχονδριακής βιογένεσης, και, **(7)** οι ίδιοι νευρώνες εμφανίζουν επίσης δυσλειτουργική μιτοχονδριακή σύντηξη και σχάση. **(8)** Αύξηση της συγκέντρωσης Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ROS) έχει περιγράψει σε SNCA,

PINK1 και *PRKN* μεταλλάξεις. (9) Η αυτοφαγία είναι η διαδικασία με την οποία το κύτταρο αποικοδομεί τις δυσλειτουργικές πρωτεΐνες και τα οργανίδια. Οι *DN GBA*, *PARK2*, *SNCA* και *LRRK2* εμφανίζουν αλλοιώσεις στις διαδικασίες αυτοφαγίας και μιτοφαγίας (αποδόμηση μιτοχονδρίων μέσω αυτοφαγίας), προκαλώντας τη συσσώρευση δυσλειτουργικών πρωτεϊνών και οργανιδίων. (10) *LRRK2 DN* εμφανίζουν μειωμένη εξαρτώμενη από την κλαθρίνη-ενδοκυττάρωση (σύνοψη μελετών στον Πίνακα 2).

Πίνακας 2 Μελέτες σε iPSC για την κατανόηση της νόσου Parkinson (γονίδια, κυτταρικοί τύποι και φαινότυποι.

Γονίδιο σχετιζόμενο με Νόσο Parkinson	Κυτταρικός τύπος	Φαινότυπος	Βιβλιογραφική αναφορά
MAPT	Ντοπαμινεργικοί νευρώνες	Μειωμένη κινητικότητα μιτοχονδρίων	<i>Beevers et al. (2017)</i>
LRRK2	Αστροκύτταρα	Αναστολή νευροπροστατευτικής δράσης αστροκυττάρων	<i>Booth et al. (2019)</i>
SNCA	Ντοπαμινεργικοί νευρώνες	Αυξημένα επίπεδα Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ROS)	<i>Byers et al. (2011)</i>
SNCA	Φλοϊικοί νευρώνες	Στρες ενδοπλασματικού δικτύου	<i>Chung et al. (2013)</i>
PINK1	Ντοπαμινεργικοί νευρώνες	Αλλοιωμένη δομή μιτοχονδρίων και αυξημένα επίπεδα ROS	<i>Chung et al. (2016)</i>
PRKN	Ντοπαμινεργικοί νευρώνες	Αλλοιωμένη δομή μιτοχονδρίων και αυξημένα επίπεδα ROS	<i>Chung et al. (2016)</i>

LRRK2	Ντοπαμινεργικοί νευρώνες	Αλλαγές στην ενδοκυττάρωση	<i>Connor-Robson et al. (2019)</i>
LRRK2	Ντοπαμινεργικοί νευρώνες	Αλλαγές στην μιτοχονδριακή αναπνοή και μειωμένη κινητικότητα μιτοχονδρίων	<i>Cooper et al. (2012)</i>
PINK1	Ντοπαμινεργικοί νευρώνες	Αλλαγές στην μιτοχονδριακή αναπνοή	<i>Cooper et al. 2012</i>
LRRK2	Αστροκύτταρα	Αναστολή νευροπροστατευτικής δράσης αστροκυττάρων	<i>Di Domenico et al. (2019)</i>
GBA	Ντοπαμινεργικοί νευρώνες	Στρες ενδοπλασματικού δικτύου, λυσοσωμική δυσλειτουργία, αυξημένη απελευθέρωση α- συνουκλεΐνης	<i>Fernandes et al. (2016)</i>
LRRK2	Ντοπαμινεργικοί νευρώνες	Αλλαγές στη μιτοφαγία	<i>Hsieh et al. (2016)</i>
Tau	Φλοιϊκοί νευρώνες	Αλλαγές στην κινητικότητα των μιτοχονδρίων	<i>Iovino et al. (2015)</i>
LRRK2	Ντοπαμινεργικοί νευρώνες	Αλλαγές στο ασβέστιο	<i>Korecka et al. (2019)</i>
GBA	Ντοπαμινεργικοί νευρώνες	Στρες ενδοπλασματικού δικτύου	<i>Lang et al. (2019)</i>

SNCA	Φλοϊικοί νευρώνες	Αλλαγές στην μιτοχονδριακή αναπνοή	<i>Ludtman et al. (2018)</i>
SNCA	Ντοπαμινεργικοί νευρώνες	Λυσοσωμική δυσλειτουργία, αλλαγές στη διακίνηση των πρωτεϊνών	<i>Mazzulli et al. (2016)</i>
LRRK2	Ντοπαμινεργικοί νευρώνες	Ευαισθησία στις οξειδωτικές βλάβες	<i>Nguyen et al. (2011)</i>
SNCA	Ντοπαμινεργικοί νευρώνες	Αλλαγές στην μιτοχονδριακή αναπνοή, τη βιογένεση των μιτοχονδρίων και αυξημένα επίπεδα ROS	<i>Ryan et al. (2013)</i>
GBA	Ντοπαμινεργικοί νευρώνες	Αλλαγές στη λειτουργία και αποθήκευση του ασβεστίου	<i>Schöndorf et al. (2014)</i>
GBA	Ντοπαμινεργικοί νευρώνες	Στρες ενδοπλασματικού δικτύου, λυσοσωμική δυσλειτουργία, αυξημένα επίπεδα ασυνουκλεΐνης, αλλαγές στα μιτοχόνδρια (αναπνοή, κινητικότητα)	<i>Schöndorf et al. (2018)</i>
SNCA	Ντοπαμινεργικοί νευρώνες	Αλλαγές στη μιτοφαγία	<i>Shaltouki et al. (2018)</i>
Tau	Φλοϊικοί νευρώνες	Αλλαγές στο μάτισμα της Tau	<i>Sposito et al. (2015)</i>

PRKN	Ντοπαμινεργικοί νευρώνες	Αλλαγές στη μιτοφαγία	<i>Suzuki et al.</i> (2017)
SNCA	Ντοπαμινεργικοί νευρώνες	Στρες ενδοπλασματικού δικτύου, αλλαγές στα μιτοχόνδρια (αναπνοή, κινητικότητα), αυξημένα επίπεδα ROS	<i>Zambon et al. 2019</i>

2.2.2 Αλλαγές στην διακίνηση και αποικοδόμηση πρωτεϊνών

Η νόσος Parkinson χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό σωματίων Lewy που αποτελούνται κυρίως από συσσωματώματα α-συνουκλεΐνης (Spillantini et al., 1997). Η α-συνουκλεΐνη, που κωδικοποιείται από το γονίδιο SNCA, είναι μια πρωτεΐνη με χαμηλό βαθμό διπλώματος στην άγρια μορφή της και η οποία δείχνει υψηλότερη τάση να συσσωματώνεται και να σχηματίζει διατεταγμένες δομές β-φύλλων (με αυξανόμενη συγκέντρωση) ακόμη κι όταν η πρωτεΐνη μεταλλάσσεται ή υφίσταται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως υπερφωσφορυλίωση (Gallegos et al., 2015). Αλλαγές στην αποικοδόμηση της α-συνουκλεΐνης και ευρύτερες αλλοιώσεις στο αυτοφαγικό/λυσosomalικό μονοπάτι, το οποίο αποικοδομεί πολλές πρωτεΐνες, μπορεί να προκαλέσουν συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης στο κύτταρο και κυτταροτοξικότητα που πιθανόν να σχετίζεται με την παθολογία της νόσου Parkinson. Αναλόγως, λυσοσωμική βλάβη μαζί με μειωμένους ρυθμούς πρωτεόλυσης παρατηρείται σε DN που προέρχονται από iPSC με τριπλασιασμό του γονιδίου SNC (Mazzulli et al., 2016). Επιπλέον, έχει ανακαλυφθεί ότι η α-συνουκλεΐνη αλληλεπιδρά με τη λυσοσωμική πρωτεΐνη GCase. Συγκεκριμένα, η α-συνουκλεΐνη αναστέλλει τη λυσοσωμική δραστηριότητα της GCase και η απώλεια της λειτουργίας της GCase συμβάλλει στη

συσσώρευση α-συνουκλείνης (Mazzulli et al., 2011). Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο GBA που κωδικοποιεί τη λυσοσωμική πρωτεΐνη GCase συνδέονται σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης νόσου Parkinson (Sidransky and Lopez, 2012). DN που προέρχονται από ασθενείς με μεταλλάξεις GBA και νόσο Parkinson εμφανίζουν διαταραχές στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών και στα μονοπάτια αυτοφαγίας. DN που προέρχονται από iPSC από ασθενείς με μεταλλάξεις GBA-L444P και GBA-N370S δείχνουν αυξημένα επίπεδα στον λυσοσωμικό δείκτη LAMP1 υποδηλώνοντας λυσοσωμική συσσώρευση καθώς και μια παρατηρούμενη αύξηση του LC3, ενός αυτοφαγοσωμικού δείκτη (Fernandes et al., 2016) (Schöndorf et al., 2014). Αυτοί οι ασθενείς εμφάνισαν επίσης μειωμένη δραστηριότητα της GCase, της λυσοσωμικής πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο GBA, και ελαττωμένη λυσοσωμική αποικοδόμηση όπως καταδεικνύεται από τα αυξημένα επίπεδα p62 (δέσμευση ουβικιτίνης, πρωτεΐνη που στοχεύει το φορτίο στα αυτοφαγοσώματα για μεταγενέστερη αποικοδόμηση). Επιπροσθέτως, ανάλυση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκάλυψε συσσώρευση υλικού υψηλής ηλεκτρονικής πυκνότητας εντός των λυσοσωμάτων (που πιθανώς αντιπροσωπεύει μη αποικοδομημένο φορτίο) και διεύρυνση του λυσοσωμικού διαμερίσματος (Fernandes et al., 2016). Αυτές οι δύο παρατηρήσεις υποδηλώνουν μείωση της λυσοσωμικής λειτουργίας σε αυτούς τους νευρώνες και συσχετίστηκαν επίσης με αυξημένα επίπεδα α-συνουκλείνης (Schöndorf et al., 2014).

Η ενδοκυτταρική διακίνηση πρωτεϊνών είναι ο μηχανισμός μέσω του οποίου ταξινομούνται οι πρωτεΐνες στο σωστό υποκυτταρικό διαμέρισμα μετά τη μετάφραση και είναι ζωτικής σημασίας για τη βέλτιστη κυτταρική λειτουργία. Οι αλλαγές στη διακίνηση πρωτεϊνών έχουν συνδεθεί στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες με τη συσσώρευση

πρωτεϊνικών εγκλεισμάτων (Hunn et al., 2015) (Wang et al., 2014). Η ενδοκυτταρική διακίνηση εμπλέκεται κυρίως στη μεταφορά πρωτεϊνών και λιπιδίων προς και από τις κυτταρικές μεμβράνες. Η διακίνηση πρωτεϊνών μπορεί να χωριστεί σε εξωκυτταρικά και σε ενδοκυτταρικά μονοπάτια. Το πρώτο εμπλέκεται στη μεταφορά πρωτεϊνών από το ER στο Golgi και μετά στις κυτταρικές μεμβράνες. Το τελευταίο ξεκινά με ενδοκυττάρωση (μια κυτταρική διαδικασία μέσω της οποίας τα μόρια προσλαμβάνονται από το κύτταρο μέσω της μεμβράνης – κρατώντας ένα κομμάτι μεμβράνης), επομένως τα μόρια περιβάλλονται από την κυτταρική μεμβράνη και εσωτερικεύονται μέσα σε ένα κυστίδιο. Στη συνέχεια, το κυστίδιο συντήκεται με το ενδοσώμα, ένα μεμβρανικο-δεσμευμένο κομμάτι του κυττάρου. Στη συνέχεια, το φορτίο ταξινομείται και μπορεί είτε να ανακυκλωθεί είτε να ακολουθήσει το μονοπάτι αποδόμησης που απαιτεί τη σύντηξη των ενδοσωμάτων με τα λυσοσώματα. Είναι επομένως σαφές ότι η ενδοκυτταρική διακίνηση πρωτεϊνών και η αποικοδόμηση πρωτεϊνών είναι στενά συνδεδεμένες. Οι αλλαγές στο εξωκυτταρικό σηματοδοτικό μονοπάτι έχουν περιγραφεί εκτενώς στα DN από ασθενείς με νόσο Parkinson. Η υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης ή ο τριπλασιασμός του γονιδίου SNCA προκαλούν αλλοιώσεις στη διακίνηση λυσοσωμικών υδρολασών από το ER στο Golgi προκαλώντας συσσώρευση ανώριμων ενζύμων στο ER. Με τη σειρά του, αυτό προκαλεί αλλοιώσεις στη λυσοσωμική δραστηριότητα που προκαλεί συσσώρευση α-συνουκλεΐνης δημιουργώντας έναν φαύλο κύκλο (Mazzulli et al., 2016). Τα DN που προέρχονται από iPSC που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο LRRK2 (G2019S και R1441C) εμφανίζουν εξασθενημένη ενδοκυττάρωση (Connor-Robson et al., 2019).

2.2.3 Μιτοχονδριακές αλλοιώσεις και οξειδωτικό στρες

Αν και η αιτιολογία της PD ήταν άγνωστη από την πρώτη περιγραφή της νόσου το 1817 (Parkinson, 2002), ένας αυξανόμενος όγκος στοιχείων εμπλέκει τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στην εξέλιξη της νόσου. Μιτοχονδριακές τοξίνες όπως το εντομοκτόνο rotenone, το μυκητοκτόνο maneb, το ζιζανιοκτόνο paraquat και MPTP (υποπροϊόν της παρασκευής του φαρμάκου MPPP) οδηγούν στη δημιουργία φαινοτύπων σε μοντέλα ποντικού που μοιάζουν με την παθολογία ασθενών με νόσο Parkinson (τρόμος, βραδυκινησία, νευροεκφύλιση, νοητικές διαταραχές) (Ryan et al., 2015) (Dauer and Przedborski, 2003). Ωστόσο, η εμπλοκή αυτών των τοξινών στην σποραδική νόσο Parkinson εξακολουθεί να αποτελεί πεδίο διαφωνίας και έρευνας. Επιπλέον, μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά γονίδια PINK1 και PRKN προκαλούν πρώιμα ερχόμενη νόσο Parkinson (Kitada et al., 1998) (Valente et al., 2004). Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και αλλαγές στη δομή των μιτοχονδρίων έχουν διαπιστωθεί σε DN που προέρχονται από iPSC με μεταλλάξεις GBA-L444P (Schöndorf et al., 2014), PINK1-Q456X, PRKN-V324A (Chung et al., 2016) και νευρώνες SNCA από ασθενείς με νόσο Parkinson (Zambon et al., 2019) .

Επίσης, έχουν βρεθεί αλλαγές στη μιτοχονδριακή αναπνοή, που αξιολογήθηκαν με μέτρηση του ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου παρουσία τοξινών που αναστέλλουν διαφορετικά στάδια της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC). DN που προέρχονται από το iPSC με μεταλλάξεις στο γονίδιο SNCA (A53T και τριπλασιασμός) εμφανίζουν μειωμένη βασική κυτταρική αναπνοή και παραγωγή ATP, μέγιστη αναπνοή και πλεονάζουσα αναπνευστική ικανότητα (Ryan et al., 2013) (Zambon et al., 2019). Έχει αποδειχθεί ότι η ολιγομερής α-συνουκλεΐνη αλληλεπιδρά με την ATP-σύνθεση σε

νευρώνες του φλοιού από ασθενείς νόσου Parkinson με SNCA-τριπλασιασμό. Τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν αυξημένο δείκτη οξειδοαναγωγής NADH, που υποδηλώνει εξασθένηση του συμπλέγματος I της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Ludtmann et al., 2018). Για αυτούς τους λόγους, οι συγγραφείς της μελέτης Ludtman et al. υπέθεσαν ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ της ολιγομερούς ασυνουκλεΐνης και της ATP-συνθάσης μπορεί να είναι επιζήμια και να είναι ένας από τους αιτιολογικούς παράγοντες για τη διαταραχή της μιτοχονδριακής αναπνοής στη νόσο Parkinson (Ludtmann et al., 2018). Η μιτοχονδριακή αναπνοή φαίνεται επίσης να διαταράσσεται σε DN από iPSC ασθενών με νόσο Parkinson και μεταλλάξεις στα γονίδια GBA (Schöndorf et al., 2018), στο LRRK2 (G2019S και R1441C), στο PINK1 (Q456X) (Cooper et al., 2012) και στο SNCA-P (Zambon et al., 2019). Εκτός από αλλοιώσεις στη μιτοχονδριακή αναπνοή, φαίνεται να υπάρχουν επίσης αλλαγές στη δυναμική των μιτοχονδρίων, τη βιογένεση και την αποδόμηση. Τα μιτοχόνδρια είναι εξαιρετικά δυναμικά οργανίδια που υφίστανται γεγονότα σύντηξης και σχάσης (διαίρεσης). Αυτές οι διαδικασίες ρυθμίζονται αυστηρά και περιλαμβάνουν μια πληθώρα συγκεκριμένων πρωτεϊνών των οποίων τα επίπεδα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την παρακολούθηση των δύο φαινομένων. Αλλαγές σε αυτές τις διαδικασίες έχουν παρατηρηθεί σε DNs που προέρχονται από ασθενείς με νόσο Parkinson που σχετίζεται με το γονίδιο GBA, όπου μειώνεται η έκφραση πρωτεϊνών μιτοχονδριακής σχάσης (DRP1 και Fis1) και μιτοχονδριακής σύντηξης (πρωτεΐνες OPA1 και Mfn1) (Schöndorf et al., 2018). Μειώσεις στα γονίδια DRP1-pS616 έχουν επίσης παρατηρηθεί σε SCNA-A53T και SCNA-τριπλασιασμό (Zambon et al., 2019).

Η ελαττωματική μιτοχονδριακή βιογένεση μπορεί επίσης να ευθύνεται για την αλλοιωμένη μιτοχονδριακή λειτουργία στη νόσο Parkinson. Σε μια μελέτη που διεξήχθη σε SNCA-A53T DN, το στρες προκλήθηκε μέσω μιτοχονδριακών τοξινών ή λόγω του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) που παρήγαγε παρεκκλίνουσες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του μεταγραφικού παράγοντα MEF2C (Ryan et al., 2013). Αυτές οι τροποποιήσεις μείωσαν τη λειτουργία του MEF2C προκαλώντας έτσι μείωση της έκφρασης γονιδίων συμπεριλαμβανομένου του PGC-1α (ένας βασικός παράγοντας στη μιτοχονδριακή βιογένεση). Στην απουσία των στρεσογόνων παραγόντων, τα κύτταρα που φέρουν την ίδια μετάλλαξη φαίνεται να έχουν αυξημένα επίπεδα PGC-1α (Zambon et al., 2019). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από τα κύτταρα που προσπαθούν να αντιμετωπίσουν την αλλοιωμένη κυτταρική αναπνοή ενισχύοντας τη βιογένεση ομοιοστατικά. Όταν το στρες αυξάνεται ο ομοιοστατικός μηχανισμός αποτυγχάνει.

Τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια συνήθως αποικοδομούνται από τη μιτοφαγία, η οποία αποτρέπει τη συσσώρευση δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι μεταλλάξεις σε ορισμένους ρυθμιστές αυτής της διαδικασίας (PINK1 και parkin) προκαλούν PD πρώιμης έναρξης. Επιπλέον, DN από ασθενείς (Suzuki et al., 2017) με μεταλλάξεις SNCA-A53T (Shaltouki et al., 2018) και LRRK2-G2019S (Hsieh et al., 2016), εμφανίζουν μειωμένη ή επιβραδυνόμενη μιτοφαγική δραστηριότητα μετά από μιτοχονδριακό stress.

Οι νευρώνες είναι πολωμένα κύτταρα (κυτταρικό σώμα-νευρίτες: δένδριτες/άξονας), οπότε η μεταφορά φορτίου κατά μήκος αυτών των κυττάρων είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη λειτουργία τους (Hunn et al., 2015). Επιπλέον, δεδομένου των υψηλών

ενεργειακών απαιτήσεων των νευρώνων, η μιτοχονδριακή μεταφορά είναι απολύτως ζωτικής σημασίας. Έχει παρατηρηθεί μείωση της μιτοχονδριακής κινητικότητας σε LRRK2-G2019S DN (Cooper et al., 2012). Αυτό θα μπορούσε να παρέχει μια μηχανιστική εξήγηση για τον ρόλο της πρωτεΐνης Ταυ που κωδικοποιείται από το γονίδιο *MAPT*, που είναι γνωστός παράγοντας κινδύνου για νόσο Parkinson (μελέτες συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος στη νόσο Parkinson) (“Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson’s disease,” 2011). Η Ταυ είναι μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με τους μικροσωληνίσκους και εμπλέκεται κυρίως στη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων. Σε γενικές γραμμές, η σωστή λειτουργία της πρωτεΐνης Ταυ έχει συσχετιστεί με την υγεία των νευρώνων και οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *MAPT* μεταβάλλουν την ωρίμανση της πρωτεΐνης Ταυ σε νευρώνες του φλοιού που προέρχονται από iPSC (Sposito et al., 2015). Σε DN που προέρχονται από iPSC παρατηρήθηκε ότι η Ταυ μπορεί επίσης να παρεμβαίνει στην αξονική μεταφορά των μιτοχονδρίων, καθώς η απαλοιφή της Ταυ είχε σαν αποτέλεσμα μια συνολική αύξηση της κινητικότητας των μιτοχονδρίων (Beevers et al., 2017). Η μιτοχονδριακή κινητικότητα μεταβάλλεται επίσης σε φλοιικούς νευρώνες που προέρχονται από iPSC με την μετάλλαξη *MAPT*-P301L (Iovino et al., 2015). Τα μιτοχόνδρια είναι η κύρια πηγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Πολλοί εκκαθαριστές ROS βρίσκονται στα μιτοχόνδρια. Ωστόσο, η αύξηση των ROS μπορεί να βλάψει τα ίδια τα μιτοχόνδρια. DN με μεταλλάξεις *SNCA*-A53T και *SNCA*-Tripllication παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα ROS καθώς και των ρυθμιζόμενων γονιδίων που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες όπως η καταλάση και η οξυγενάση της αίμης (Byers et al., 2011) (Ryan et al., 2013) (Zambon et al., 2019). DN με μεταλλάξεις *PINK1* και *PRKN* παρουσιάζουν

αυξημένη παραγωγή ROS. Ιδιαίτερα DN με μεταλλάξεις PRKN είναι πιο ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τη ροτενόνη (άοσμη, άχρωμη, κρυσταλλική ισοφλαβόνη που χρησιμοποιείται ως ευρέος φάσματος εντομοκτόνο και έχει σχετιστεί με τη νόσο Parkinson) (Chung et al., 2016) (Suzuki et al., 2017). Επιπλέον, DN με LRRK2-G2019S μετάλλαξη εμφανίζονται είναι πιο ευαίσθητοι στις οξειδωτικές προσβολές (Nguyen et al., 2011).

2.2.4. Μεταβολές στην ομοιόσταση του ασβεστίου

Το ασβέστιο είναι ένα σημαντικό σηματοδοτικό μόριο που εμπλέκεται στη ρύθμιση πολλών κυτταρικών λειτουργιών όπως η γονιδιακή έκφραση, η βιοενεργειακή λειτουργία των κυτάρων, ο καταβολισμός των πρωτεϊνών και άλλους καταρράκτες σηματοδότησης (Brini et al., 2013). Σε βιοενεργειακά ενεργά κύτταρα, όπως οι νευρώνες, το ασβέστιο παίζει ρόλο στη συναπτική απελευθέρωση και την πλαστικότητα (Zucker, 1999) (Brini et al., 2013) και ειδικότερα, τα κανάλια ασβεστίου τύπου L υποστηρίζουν την ηλεκτροφυσιολογική δραστηριότητα των DN (μοτίβο ηλεκτρικής δραστηριότητας βηματοδότη) (Guzman et al., 2009). Τα συνεχή κύματα ασβεστίου που εμφανίζονται στα DN, ωστόσο, τα τοποθετούν σε ένα περιβάλλον όπου ακόμη και μικρές μεταβολές στην ομοιόσταση του ασβεστίου μπορεί να έχουν αντίκτυπο στην κυτταρική λειτουργία τους. Αλλαγές στην ομοιόσταση του ασβεστίου έχουν συνδεθεί με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Foehring et al., 2009) (Guzman et al., 2010). Πειράματα φασματοσκοπίας μάζας αποκάλυψαν ότι DN που προέρχονται από iPSCs που φέρουν τις μεταλλάξεις GBA-L444P ρυθμίζουν την δεσμευτική πρωτεΐνη ασβεστίου NECAB2, γεγονός που υποδηλώνει μεταβολές στη λειτουργία του ασβεστίου (Schöndorf et al.,

2014). Επιπλέον, τεχνικές απεικόνισης ασβεστίου (π.χ. συνεστιακή μικροσκοπία με φθορίζοντες δείκτες που ανιχνεύουν το ασβέστιο) ανέδειξαν αλλαγές στην περιεκτικότητα σε ασβέστιο σε DN που προέρχονται από ασθενείς με GBA-L444P (Schöndorf et al., 2014) και LRRK2-G2019S μεταλλάξεις (Korecka et al., 2019). Εφαρμογή φαρμακολογικού ανταγωνιστή των διαύλων ασβεστίου αποτρέπει τον επαγόμενο από ροτενόνη θάνατο σε DN που προέρχονται από iPSC ασθενών με νόσο Parkinson που φέρουν μεταλλάξεις PRKN (Tabata et al., 2018).

2.3 Γλοιακά κύτταρα προερχόμενα από iPSC για τη μοντελοποίηση ασθενειών

Ολοένα και περισσότερα στοιχεία υποδηλώνουν έναν πιθανό ρόλο των γλοιακών κυττάρων στην παθογένεια της νόσου Parkinson. Τα αστροκύτταρα ασκούν πολλές λειτουργίες που αποσκοπούν στη διατήρηση της ακεραιότητας των νευρώνων. Διατηρούν την ομοιόσταση των υγρών στη συναπτική περιοχή, καθώς ρυθμίζουν τη συγκέντρωση ιόντων μέσω διαφόρων διαύλων ιόντων και την περιεκτικότητα σε νερό μέσω των υδατοπορινών που λαμβάνουν το νερό από τα αιμοφόρα αγγεία (Sofroniew and Vinters, 2010). Τα αστροκύτταρα εμπλέκονται στην ομοιόσταση των νευροδιαβιβαστών στη σύναψη, καθώς εκφράζουν μεταφορείς για το γλουταμικό, γ-αμινοβουτυρικό (GABA) και γλυκίνη που χρησιμοποιούνται για την επαναπρόσληψη νευροδιαβιβαστών μετά από συναπτικές μετάδοσεις (Sofroniew and Vinters, 2010). Επιπλέον, διαμορφώνουν τη συναπτική μετάδοση μέσω της απελευθέρωσης σηματοδοτικών μορίων, συμπεριλαμβανομένου του γλουταμικού, GABA και πουρινών. Αυτοί οι γλοιοδιαβιβαστές απελευθερώνονται ως απάντηση στη νευρωνική δραστηριότητα και είναι σε θέση να διαμορφώνουν την ίδια τη νευρωνική

δραστηριότητα. Πλέον έχει δειχτεί η ύπαρξη μιας "τριμερούς σύναψης" (προσυναπτικό, μετασυναπτικό άκρο και γλοιακά κύτταρα), η οποία υποδηλώνει ότι τα αστροκύτταρα εμπλέκονται άμεσα στη συναπτική λειτουργία (Sofroniew and Vinters, 2010). Επιπλέον, τα αστροκύτταρα παρέχουν τη μεταβολική υποστήριξη των νευρώνων, καθώς παρέχουν στους νευρώνες μεταβολίτες και νευροτροφικούς παράγοντες όπως ο GDNF, ο οποίος είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση των κυττάρων. Επιπλέον, τα αστροκύτταρα είναι εκείνα που εμπλέκονται στη διατήρηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (σε κοντινή επαφή με νευρώνες, ενδοθηλιακά, περικύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα και μικρογλία), ενός εξαιρετικά επιλεκτικού ημιπερατού φραγμού που χωρίζει το αίμα από τον εγκέφαλο και το υγρό του (Sofroniew and Vinters, 2010). Οι μεταβολές σε ορισμένες από αυτές τις λειτουργίες μπορεί να είναι επιζήμιες για τους νευρώνες και για τους ιστούς του εγκεφάλου. Πράγματι, οι μεταβολές στην επαναπρόσληψη των νευροδιαβιβαστών και οι μεταβολές στη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού έχουν παρατηρηθεί στην νόσο Parkinson (Booth et al., 2017). Για τους λόγους αυτούς, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη μελέτη των αστροκυττάρων που προέρχονται από ασθενείς με νόσο Parkinson. Πρόσφατα, περιγράφηκε ένα πρωτόκολλο για τη δημιουργία αστροκυττάρων (μεσεγκεφαλικής ταυτότητας) από ανθρώπινα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (Booth et al., 2019). Η πρώτη φάση του πρωτοκόλλου συνίσταται στην επαγωγή των προγονιδίων της μεσεγκεφαλικής πλάκας σύμφωνα με το πρωτόκολλο Struder (αναφορά πιο πάνω) με μικρές τροποποιήσεις (Beevers et al., 2017) (Kriks et al., 2011). Στη συνέχεια, τα νευρωνικά προγονικά κύτταρα μετατρέπονται σε προγόνους αστρογλοιακών κυττάρων με καλλιέργεια - παρουσία επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) και του

ανασταλτικού παράγοντα λευχαιμίας (LIF), για την επαγωγή του πολλαπλασιασμού. Τέλος προγονικά αστροκύτταρα επεκτείνονται και ωριμάζουν παρουσία EGF, αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (FGF2) και ηπαρίνης, ώστε να διατηρηθεί ο πολλαπλασιασμός (Tropepe et al., 1999). Μια μελέτη με χρήση τεχνικών αλληλούχισης νέας γενιάς (RNA-seq) για την μέτρηση του μεταγραφώματος σε αστροκύτταρα με μοτίβο του μεσεγκεφάλου (με μετάλλαξη LRRK2-G2019S) έδειξε ελάττωση του νευροπροστατευτικού δυναμικού των αστροκυττάρων. Συνάμα, παρατηρήθηκε ελάττωση της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τον μετατρεπτικό αυξητικό παράγοντα β (*TGFB1*), που εμπλέκεται στην αναστολή των μικρογλίων σε ένα μοντέλο νόσου Parkinson, και, την μεταλοπρωτεάση εξωκυττάριας μήτρας *MMP2*, που έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να καταβολίσει συσσωματώματα α-συνουκλεΐνης *in vitro* και *in vivo* (Booth et al., 2019). Πράγματι, η συγκαλλιέργεια DN και αστροκυττάρων που προέρχονται από iPSC ασθενών με μετάλλαξη LRRK2-G2019S, έδειξε ότι τα αστροκύτταρα μπορεί να επάγουν νευροτοξικότητα σε υγιείς DN που δεν φέρουν μετάλλαξη LRRK2-G2019S (di Domenico et al., 2019). Παρόμοια μοντέλα αστροκυττάρων που φέρουν μεταλλάξεις που απαντούν σε ασθενείς με νόσο Parkinson μπορούν να προκαλέσουν νευριτικές αλλοιώσεις και συσσώρευση α-συνουκλεΐνης σε υγιείς φλοιώδεις νευρώνες που δεν φέρουν μεταλλάξεις. Δυνητικά λοιπόν, υγιή αστροκύτταρα θα μπορούσαν να αναστρέψουν ορισμένους νευρωνικούς φαινοτύπους της νόσου Parkinson, όπως οι αλλοιώσεις των νευριτών και συσσώρευση α-συνουκλεΐνης (di Domenico et al., 2019).

2.4 Συστήματα συ καλλιέργειας, τρισδιάστατες καλλιέργειες και οργανοειδή για μοντελοποίηση ασθενειών του νευρικού συστήματος

Οι δισδιάστατες (2D) καλλιέργειες ενός μονοκυτταρικού τύπου είναι ένα απλουστευμένο μοντέλο στο οποίο μπορεί να μελετηθεί η κυτταρική δυσλειτουργία σε ασθένειες *in vitro*. Ωστόσο και εν προκειμένω για τη νόσο Parkinson, αυτό το μοντέλο μπορεί να είναι υπεραπλουστευμένο, καθώς οι διάφοροι τύποι κυττάρων του μεσεγκεφάλου αλληλεπιδρούν με πολύπλοκο τρόπο. Ως εκ τούτου, υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για πιο σύνθετα μοντέλα ασθενειών που μπορούν να εξηγήσουν την κυτταρική ποικιλομορφία στον εγκέφαλο και την αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών τύπων κυττάρων. Εκτός από τον εκφυλισμό των DN του μεσεγκεφάλου, η νόσος Parkinson χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργία του νευρωνικού κυκλώματος στο οποίο εμπλέκονται αυτά τα κύτταρα, που είναι ο κινητικός βρόγχος των βασικών γαγγλίων, που εμπλέκεται στον κινητικό έλεγχο. Το ραβδωτό σώμα λαμβάνει πληροφορίες από τον φλοιό το οποίο στη συνέχεια αναμεταδίδεται στους πυρήνες εξόδου. Τα DN διαμορφώνουν τη δραστηριότητα των νευρώνων του ραβδωτού σώματος και, επομένως, του δικτύου αυτού. Θα ήταν σημαντικό να αναπαραχθούν στο εργαστήριο (*in vitro*) τμήματα αυτού του δικτύου για την καλύτερη κατανόηση της νόσου Parkinson (Lassus et al., 2018).

Ένα άλλο πρόβλημα των 2D καλλιέργειών είναι ότι δεν ανακεφαλαιώνουν πλήρως τις αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν στο τρισδιάστατο περιβάλλον ενός ιστού. Έχουν γίνει ορισμένες προσπάθειες αναπαραγωγής αυτού του τρισδιάστατου περιβάλλοντος με τη χρήση μικρορευστομηχανικών συστημάτων ή ικριωμάτων από βιοϋλικά. Ωστόσο μια νεότερη και πολλά υποσχόμενη τεχνολογία είναι αυτή των τρισδιάστατων οργανοειδών

(3D) (Adil et al., 2017) (Moreno et al., 2015). Τα οργανοειδή είναι ένα απλουστευμένο μοντέλο ενός οργάνου που μπορεί να υπολογίσει τη μεταβλητότητα των κυττάρων συνυπολογίζοντας τις 3D αλληλεπιδράσεις. Τα οργανοειδή θα πρέπει να περιέχουν πολλαπλούς τύπους κυττάρων ειδικών για τα όργανα και να είναι σε θέση να αυτό-οργανώνονται (ξεκινώντας από iPSC ή άλλα προγονικά κύτταρα) με τέτοιο τρόπο ώστε να ανακεφαλαιώνουν την κυτταρο-αρχιτεκτονική του οργάνου που διαμορφώνουν. Επιπλέον, τα οργανοειδή θα πρέπει να ανακεφαλαιώνουν τουλάχιστον κάποιες από τις ειδικές λειτουργίες του οργάνου. Πρόσφατα, έχουν περιγραφεί δύο πρωτόκολλα για τη διαφοροποίηση των οργανοειδών μεσεγκεφάλου από ανθρώπινα iPSC (Jo et al., 2016) (Monzel et al., 2017). Το πρωτόκολλο των Jo et al. περιλαμβάνει το σχηματισμό κοιλιακού μεσεγκεφάλου από iPSC με τη χρήση SB431542 (αναστολέας του μονοπατιού TGF-β/ακτιβίνης/NODAL), Noggin (επάγει τη σχηματομόρφωση των εμβρυικών σωματιών προωθώντας την ανάπτυξη) και CHIR99021(αναστολέας της κινάσης GSK-3), ανασυνδυασμένη SHH (πρωτεΐνη sonic hedgehog-επάγει την οργανογένεση) και FGF8. Στη συνέχεια ολοκληρώνεται η επαγωγή της ανάπτυξης οργανοειδών με db-cAMP, BDNF, GDNF και ασκορβικό οξύ. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους, τα οργανοειδή διατηρούνται σε βιοαντιδραστήρες με ανάδευση για να διασφαλιστεί η καλή οξυγόνωση. Το πρωτόκολλο των Monzel et al. ξεκινά από νευρικά βλαστικά κύτταρα και συνεχίζει με χρήση CHIR99021, πουρομορφαμίνης και ασκορβικού οξέος. Έπειτα τα κύτταρα διαφοροποιούνται με db-cAMP, BDNF, GDNF και ascorbic οξύ. Και στις δύο περιπτώσεις DN, ολιγοδενδροκύτταρα και γλοιακά κύτταρα διαφοροποιήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν εντός του οργανοειδούς. Τα DN στα οργανοειδή ήταν ηλεκτροφυσιολογικά ενεργά και εμφάνιζαν δραστηριότητα που έμοιαζε

με βηματοδότη, δηλαδή συμβαδίζοντας με το *in vivo* ηλεκτροφυσιολογικό προφίλ αυτών των κυττάρων του μεσεγκεφάλου. Επιπλέον, τα οργανοειδή του μεσεγκεφάλου που περιεγράφηκαν από τους Jo et al. είχαν εναπόθεση νευρομελανίνης και απελευθέρωση ντοπαμίνης, προσφέροντας έναν ιό πιστό μοντέλο του μεσεγκεφάλου και συγκεκριμένα της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας του μεσεγκεφάλου που επηρεάζεται στη νόσο Parkinson. Οργανοειδή που προέρχονται από iPSC με μετάλλαξη LRRK2-G2019S ελήφθησαν επίσης χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο των Monzel et al (Smits et al., 2019). Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν απεικόνιση υψηλού περιεχομένου για να μελετήσουν πιθανούς φαινοτύπους στα οργανοειδή. Μετά από 35 ημέρες διαφοροποίησης, υπήρξε μια σημαντική μείωση του αριθμού των DN στα οργανοειδή που προέρχονται από ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης η πολυπλοκότητα του δενδριτικού δικτύου των DN φάνηκε να μειώνεται σημαντικά.

2.5 Νευρώνες προερχόμενοι από iPSC για κυτταρικές θεραπείες

Είναι προφανές ότι στις νευροεκφυλιστικές διαταραχές όπως η νόσος Parkinson, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την αντικατάσταση των χαμένων κυττάρων με νέα υγιή κύτταρα. Για το για το λόγο αυτό, το 1987 έγινε η πρώτη προσπάθεια μεταμόσχευσης υγιών ντοπαμινεργικών νευροβλαστών σε εγκεφάλους ασθενών με νόσο Parkinson (Lindvall et al., 1989). Έπειτα ακολούθησε μια ακόμη δεύτερη βελτιωμένη δοκιμή το 1989 (Lindvall et al., 1990). Οι εμβολιασμένοι νευρώνες που προέρχονταν από μεσεγκέφαλο ανθρώπινων εμβρύων ηλικίας 8-11 εβδομάδων έδωσε πολύ ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Η απελευθέρωση της ντοπαμίνης αποκαταστάθηκε και οι ασθενείς παρουσίασαν κλινική βελτίωση. Η παρακολούθηση των ασθενών 10 χρόνια μετά τη

μεταμόσχευση είχε ως αποτέλεσμα οι ασθενείς να εμφανίσουν μόνο ήπια Παρκινσονικά συμπτώματα (Piccini et al., 1999). Επακόλουθες δοκιμές ωστόσο, αποκάλυψαν ότι η διαδικασία παρήγαγε αρκετά μεταβλητά αποτελέσματα και ότι η προμήθεια των μεταμοσχευμένων DN ήταν μια πολύ δύσκολη διαδικασία για να τυποποιηθεί (Freed et al., 2001). Οι δυσκολίες αυτές οδήγησαν την επιστημονική κοινότητα να εξετάσει την χρησιμοποίηση DN που προέρχονται από iPSC για μεταμόσχευση. Το θέμα αυτό θα αναπτυχθεί διεξοδικά στο επόμενο κεφάλαιο.

2.6 Περιορισμοί των μοντέλων που βασίζονται σε iPSC

Η έλευση της τεχνολογίας των iPSC είναι επαναστατική για την μεταφραστική έρευνα. Τα παραδοσιακά *in vitro* μοντέλα βασίζονται σε κυτταρικές σειρές, πρωτογενείς καλλιέργειες από ζωικά μοντέλα ή πρωτογενείς καλλιέργειες από εγκεφαλικό ιστό (βιοψία ή από μεταθανάτια δωρεά) ασθενών. Οι κυτταρικές σειρές είναι αθάνατες και ως εκ τούτου φέρουν συχνά ανώμαλα χρωμοσώματα, ενώ οι πρωτογενείς καλλιέργειες από ζωικά μοντέλα προέρχονται από άλλο είδος. Πρωτογενείς καλλιέργειες σχετικών κυτταρικών τύπων από ασθενείς είναι δύσκολο να αποκτηθούν. Για τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες, επομένως, τα DN που προέρχονται από ανθρώπινα iPSC παρέχουν την ευκαιρία να δοθεί λύση σε αυτό το πρόβλημα. Ωστόσο, η τεχνολογία αυτή έχει και ορισμένα μειονεκτήματα.

Έχει αποδειχθεί ότι τα iPSC παρουσιάζουν υψηλό επίπεδο μεταβλητότητας που αντανάκλα τις γενετικές διαφορές μεταξύ των δοτών (Rouhani et al., 2014). Από τη μία πλευρά, η μεταβλητότητα λόγω του διαφορετικού γενετικού υπόβαθρου καθιστά τα κυτταρικά μοντέλα με βάση τα iPSC ιδιαίτερα καλό μοντέλο που αντανάκλα τι συμβαίνει

στην πραγματικότητα και άρα μπορεί να συμβάλλουν στην ανάδειξη των κοινών παθογενετικών μηχανισμών στην νόσο του Parkinson. Από την άλλη πλευρά, αυτή η μεταβλητότητα μπορεί να συγκαλύπτει ορισμένους συγκεκριμένους φαινότυπους στα κύτταρα. Αυτό εγείρει επίσης το ερώτημα ποια είναι η καλύτερη ομάδα ελέγχου για τα νευρικά κύτταρα που προέρχονται από iPSC μοντέλα στη νόσο Parkinson. Πολλές μελέτες χρησιμοποιούν κύτταρα που προέρχονται από άτομα ελέγχου- ωστόσο, μπορεί να είναι απαραίτητο να συμπεριληφθεί μεγάλος αριθμός ασθενών και ελέγχου ανά πείραμα προκειμένου να διαχωριστεί η κατάσταση ελέγχου και η κατάσταση νόσου για τη μελέτη της ιδιοπαθούς νόσου. Στην περίπτωση μιας γνωστής μετάλλαξης, μπορεί κανείς να χρησιμοποιήσει την στοχευμένη επεξεργασία του γονιδιώματος (π.χ. τεχνική CRISPR/Cas9) για να διορθώσει τη μετάλλαξη και να δημιουργήσει ισογενικές κυτταρικές σειρές (όπου η μόνη διαφορά είναι στο γονίδιο υπό εξέταση).

Αρκετά ανησυχητικό γεγονός είναι η ωρίμανση και η ηλικία των κυττάρων. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επαναπρογραμματισμού, τα βλαστικά κύτταρα μπορούν να αναζωογονηθούν και τα σημάδια της κυτταρικής γήρανσης, όπως η αδρανοποίηση τους και η έκφραση της τελομεράσης, διαγράφονται (Marión and Blasco, 2010). Επομένως, η διαδικασία της διαφοροποίησης ξεκινά από τους ανώριμους νευρώνες, μετακινείται στους νεαρούς νευρώνες, κ στη συνέχεια στους ώριμους νευρώνες και πιθανώς παλαιούς νευρώνες. Ωστόσο, η νευρωνική ωρίμανση είναι μια αργή διαδικασία και τα πειράματα μεταμόσχευσης έχουν δείξει ότι υπάρχει κάτι σαν ένα αυτόνομο ρολόι που φαίνεται να εξαρτάται από το είδος (Isacson et al., 1997). Αυτό θα μπορούσε να ισχύει και *in vitro*, καθιστώντας έτσι δύσκολο να αποκτήσουμε πλήρως ώριμους νευρώνες του φλοιού που προέρχονται από ανθρώπινα iPSC. Ωστόσο, αυτό δεν φαίνεται να ισχύει

στη περίπτωση σε DANs που προέρχονται από iPSC και μπορούν να καθαριστούν με τη χρήση του δείκτη TH και αποδείχθηκε ότι διαθέτουν ένα ώριμο μεταγραφικό προφίλ που δεν διαφέρει από εκείνο των απομονωμένων ανθρώπινων DANs (C et al., 2017). Χρήση νευρώνων που προέρχονται από iPSC για να το μοντέλο PD δημιουργεί πρόσθετες προκλήσεις, καθώς η PD είναι μια ασθένεια που σχετίζεται με την ηλικία. Είναι συνηθισμένο να παρατηρούνται κυτταρικοί φαινότυποι, όπως η βλάβη του DNA και του mtDNA, η συσσώρευση σιδήρου και η συσσώρευση νευρομελανίνης σε γερασμένα κύτταρα, οι οποίοι μπορεί να είναι αρκετά δύσκολο να αναπαραχθούν in vitro.

Συνολικά, τα νευρωνικά μοντέλα της νόσου του Πάρκινσον που προέρχονται από iPSC παρουσιάζουν μεγάλη αξία σε μοριακές και κυτταρικές ατέλειες που ευθύνονται για την ευπάθεια των νευρώνων της ντοπαμίνης σε πρώιμο στάδιο της διαδικασίας της νόσου και παρέχουν μια πλατφόρμα για την ανάπτυξη θεραπειών για επιβράδυνση ή πρόληψη της ασθένειας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Κλινικές δοκιμές μεταμόσχευσης ντοπαμινεργικών νευρώνων από ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Κλινικές δοκιμές μεταμόσχευσης ντοπαμινεργικών νευρώνων από ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα.

3.1 Θεραπεία της νόσου Parkinson με ντοπαμινεργικούς νευρώνες

Οι θεραπείες που βασίζονται σε βλαστοκύτταρα είναι ελκυστικές για τη νόσο Parkinson, αφού η βασική της παθολογία συνεπάγεται την απώλεια υψηλά εξειδικευμένων νευρώνων ντοπαμίνης (DN) στη μέλαινα ουσία του μεσεγκεφάλου. Η απώλεια DN ευθύνεται για πολλά από τα παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά της νόσου, όπως η ακαμψία και η βραδυκίνηση, που μπορούν να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά στα πρώιμα στάδια με ντοπαμινεργικά φάρμακα. Ωστόσο, αυτά τα φάρμακα δεν αντικαθιστούν μόνο τη ντοπαμίνη στο σημείο που λείπει (αλλά παντού) και δεν μιμούνται τον μηχανισμό της φυσιολογικής απελευθέρωσης ντοπαμίνης. Ως αποτέλεσμα, η χρήση τους να έχει παρενέργειες όπως δυσκινήσιες και συμπεριφορικά προβλήματα (Κεφάλαιο 1). Αντίθετα, στοχευμένες θεραπείες νευρωνικής αντικατάστασης (DN) μπορούν να παρακάμψουν τις ελλείψεις των θεραπευτικών προσεγγίσεων με ντοπαμινεργικά φάρμακα.

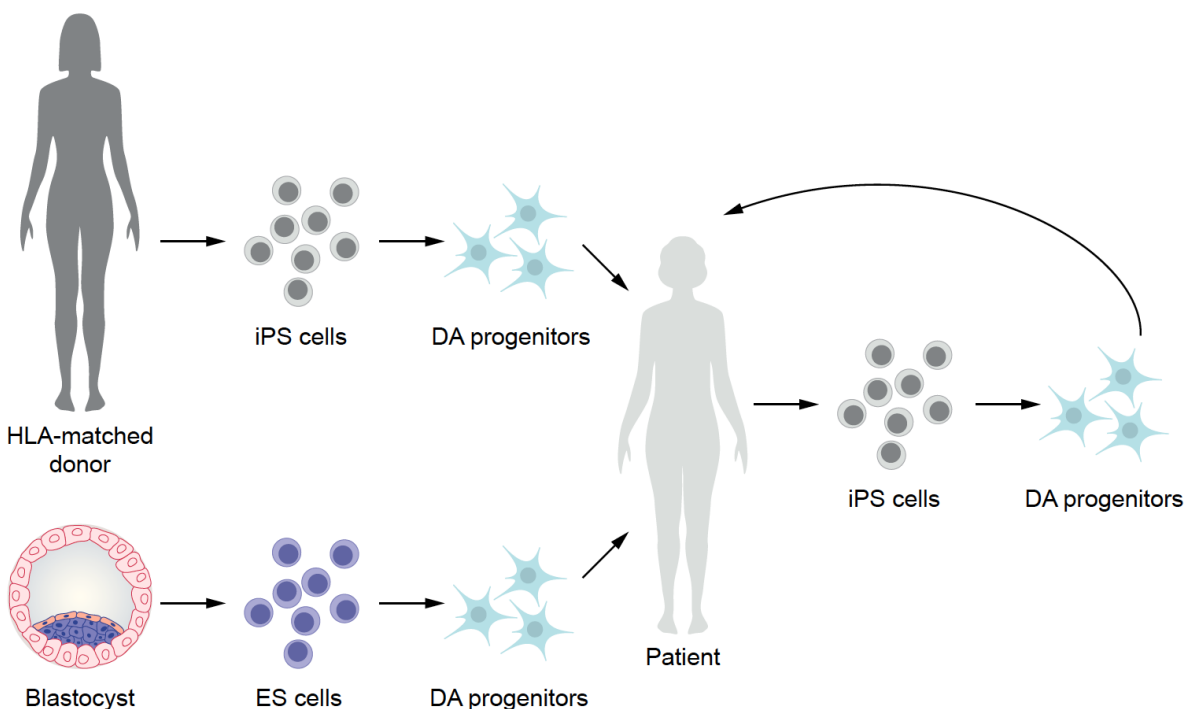
Πιλοτικές μελέτες για να αποδείξουν την εφικτότητα της μεταμόσχευσης ντοπαμινεργικών νευρώνων στη νόσο Parkinson χρησιμοποίησαν εμβρυϊκό εγκεφαλικό ιστό από πρώιμα αναπτυξιακά στάδια. Ειδικότερα, μεταμόσχευση εμβρυϊκών κοιλιακών μεσεγκεφαλικών αλλομοσχευμάτων (hfVMs) που απελευθερώνουν ντοπαμίνη, έχουν δείξει μακροπρόθεσμη αποτελεσματικότητα και επιβίωση, καθώς και βελτιώσεις στην ποιότητα ζωής των ασθενών και σε κάποια μη κινητικά χαρακτηριστικά της νόσου Parkinson (Barker et al., 2015). Ωστόσο, τέτοιες μεταμοσχεύσεις δεν δούλευαν πάντα

και έχουν ακόμη δημιουργούμενες παρενέργειες (π.χ δυσκινησίες), αλλά και παθολογία των μεταμοσχευμένων κυττάρων χρόνια μετά την εμφύτευση (Barker et al., 2015). Αυτή η μεταβλητότητα στην κλινική ανταπόκριση είναι πολυπαραγοντική και για να κατανοηθεί έχουν γίνει μελέτες όπως η μεγάλη Ευρωπαϊκή μελέτη TRANSNEURO. Επίσης, η χρήση εμβρυϊκού ιστού εγείρει ηθικά και πρακτικά ζητήματα που συνδέονται με την απόκτησή του και την ευρύτερη χρήση αλλά και την αδυναμία της τυποποίησης της διαδικασίας για κλινική εφαρμογή λόγω ετερογένειας και απρόβλεπτης διαθεσιμότητας. Για παράδειγμα, στη μελέτη TRANSNEURO, μόνο 20 από 90 προγραμματισμένες χειρουργικές επεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν λόγω έλλειψης στην παροχή ιστού. Έτσι, υπάρχει ανάγκη για εναλλακτική πηγή ιστού, ιδανικά μια που να μπορεί να κατασκευαστεί με καθορισμένες προδιαγραφές στην κλίμακα που απαιτείται για την αντιμετώπιση του μεγάλου αριθμού ασθενών με νόσο Parkinson.

Όπως είδαμε στο Κεφάλαιο 1 & 2, η χρήση των ανθρώπινων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων hPSCs που προέρχονται είτε από πρώιμα προεμφυτευτικά έμβρυα (ESC) ή επαναπρογραμματισμένα ενήλικα σωματικά κύτταρα (iPSCs) επιτρέπει τη διαφοροποίηση σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες του μεσεγκεφάλου χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα πρωτόκολλα που αναπτύχθηκαν πρόσφατα (Kirkeby et al., 2012) (Kriks et al., 2011). Το 2014, μεγάλα ακαδημαϊκά δίκτυα σε Ευρώπη, ΗΠΑ, και την Ιαπωνία σχημάτισαν μια νέα πρωτοβουλία, που ονομάστηκε GForce-PD (<http://www.gforce-pd.com>). Πολλές από τις ομάδες έχουν προχωρήσει στο σημείο παραγωγής DN με πρότυπο GMP (ορθή πρακτική παρασκευής) και προχωρούν σε δοκιμές σε ασθενείς. Κλινικές δοκιμές που χρησιμοποιούν βλαστοκύτταρα για τη θεραπεία της νόσου

Parkinson εκτός GForce-PD έχουν ήδη ξεκινήσει, με τη συμμετοχή εταιρειών (ISCO) ή άλλων ακαδημαϊκών φορέων (κινεζική δοκιμή HLA).

3.2 Ο «οδικός χάρτης» των κλινικών δοκιμών μεταμόσχευσης – το παράδειγμα του GForce-PD



Εικόνα 6: Σύνοψη τύπων κυττάρων για κλινικές δοκιμές μεταμόσχευσης στη νόσο Parkinson. Προσαρμογή από (Barker et al., 2017). Πιθανές πηγές κυττάρων για μεταμόσχευση που διερευνήθηκαν στο GForce-PD περιλαμβάνουν: επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSC) από δότες με συμβατό HLA (αντιγόνο ιστοσυμβατότητας) ή και όχι (από ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα-κύτταρα ES) (αριστερή πλευρά) ή iPSC με προέλευση από τον ίδιο τον ασθενή (δεξιά πλευρά).

Στην ενότητα αυτή χρησιμοποιώντας το παράδειγμα της πολυκεντρικής μελέτης GeForce-PD θα αναλυθούν οι προσεγγίσεις για την κλινική προσέγγιση για τη μεταμόσχευση DN για τη θεραπεία της νόσου Parkinson. Η αρχική απόφαση για τη

δημιουργία DN για τις κλινικές δοκιμές μεταμοσχεύσεων που στα πλαίσια του GForce-PD είναι αν θα έχουν ως σημείο αφετηρίας iPSC ή ESC (Εικόνα 6). Ορισμένες ομάδες επιλέγουν να χρησιμοποιήσουν κύτταρα: μη ελεγμένα για HLA-συμβατότητα, HLA-συμβατά ή αυτόλογα iPSC, ενώ άλλες ομάδες θα χρησιμοποιήσουν ESCs (Πίνακας 3). Η χρήση αυτόλογων (από τον ίδιο τον ασθενή) ή HLA-συμβατών κυττάρων θεωρείται ότι είναι η βέλτιστη επιλογή καθώς μειώνει την ανάγκη για ανοσοκαταστολή στον παραλήπτη κατά τη μεταμόσχευση και μετά. Ωστόσο, δεν είναι ξεκάθαρο εάν υπάρχει ανοσολογική απόρριψη αλλογενών ενδοεγκεφαλικών μεταμοσχευμάτων καθώς ασθενείς με νόσο Parkinson που είχαν σταματήσει να λαμβάνουν ανοσοκαταστολή για πολλά χρόνια, είχαν μακροχρόνια επιβίωση των εμβρυϊκών αλλομοσχευμάτων (Li et al., 2016).

Πίνακας 3 Σύνοψη κλινικών δοκιμών στα πλαίσια της μελέτης GForce-PD προσαρμοσμένο από (Barker et al., 2017)

	EUROPEAN STEM-PD	NYSTEM-PD	CiRA Trial	SUMMIT for PD Trial
Πηγή Κυττάρων	ESC	ESC	Αλλογενή iPSC	Αυτόλογα iPSC
Κρυοσυντηρημένα κύτταρα;	NAI	NAI	OXI	NAI
Γενετική ανάλυση	-	Καρυοτυπική ανάλυση	Αλληλούχιση για συγκεκριμένα γονίδια	Πλήρης αλληλούχιση γονιδιώματος
Μέθοδος τοποθέτησης των	Με το όργανο Rehncrona που	Σύστημα Clearpoint (βασισμένο στη	Ειδικά κατασκευασμένη	Σύστημα Clearpoint

Κυττάρων	χρησιμοποιήθηκε στις πρώτες μεταμοσχεύσεις (1980)	μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου)	βελόνα έγχυσης	(βασισμένο στη μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου)
Δοσολογία	Υψηλή ή χαμηλή δόση	Υψηλή ή χαμηλή δόση	Μία δόση	Υψηλή ή χαμηλή δόση
Ανοσοκατασταλτική αγωγή	Ναι, 12 μήνες, κυκλοσπορίνη-A, στεροειδή, Αζαθειοπρίνη	Ναι, 12 μήνες, FK506 Βασιλιξιμάμπη, Μυκοφαινόλη	Ναι, 1-2 χρόνια, FK506	ΟΧΙ
Χαρακτηριστικά Ασθενών				
Ηλικία	<70 χρόνια	40-70 χρόνια	50-70 χρόνια	45-70 χρόνια
Διάρκεια νόσου	<12 χρόνια	5-12 χρόνια	>5 χρόνια	>5 χρόνια
Δυσκινησία λόγω χρόνιας χρήσης λεβοντόπας	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
Απόκριση στη λεβοντόπα	>30%	>50%	>30%	>20%
Μελέτη ασθενών πριν την έναρξη της μελέτης	>1 χρόνο	>1 χρόνο	-	>1 χρόνο
Παρακολούθηση ασθενών μετά τη μελέτη	Επ' αόριστο	2 χρόνια	2 χρόνια	1 χρόνος
Κύριο καταληκτικό σημείο μελέτης	Ανεπιθύμητες ενέργειες - Παρενέργειες	Ανεπιθύμητες ενέργειες - Παρενέργειες	Ανεπιθύμητες ενέργειες - Παρενέργειες	Ανεπιθύμητες ενέργειες – Παρενέργειες
Δευτερογενές	UPDRS κινητική 3	UPDRS κινητική 3	UPDRS κινητική 3	UPDRS κινητική 3

καταληκτικό σημείο μελέτης (αλλαγές σε)	OFF, PDQ39; Νοητική εξέταση Addenbrooke's	OFF, PDQ39; Νοητική εξέταση Montreal	OFF, χρόνος περιόδων OFF, PDQ39; Εξέταση νοητικής κατάστασης	OFF, PDQ39; Εξέταση νοητικής κατάστασης
<i>UPDRS; Unified Parkinson's Disease Rating Scale, PDQ39; The Parkinson's Disease Questionnaire,</i>				

Κάθε ομάδα στο GForce-PD έχει αναπτύξει πρωτόκολλα GMP για εξαγωγή αυθεντικών και λειτουργικών κυττάρων DN του μεσεγκεφάλου από πηγές hPSC, μαζί με κρυοσυντήρηση και δοκιμές ελέγχου ποιότητας (QC). Τα πρωτόκολλα είναι εύχρηστα, αναπαραγώγιμα και επεκτάσιμα, αν και εξακολουθούν να υπάρχουν ζητήματα που αφορούν: καταλληλότερο/περισσότερο γενετικό έλεγχο (καρυότυπος, αποκλεισμός ογκογόνων μεταλλάξεων ή και εις βάθος ανάλυση, όπως αλληλούχιση νέας γενιάς). Οι διαφορετικές ομάδες του GeForce-PD έχουν ακολουθήσει σαφώς διαφορετικές στρατηγικές (Πίνακας 3). Είναι επίσης σημαντικό να τονιστεί ότι τα πρωτόκολλα δημιουργίας και μεταμόσχευσης DN που χρησιμοποιεί η μελέτη GForce-PD, έχουν θετικά αποτελέσματα σε πολλές *in vivo* μελέτες: μη σχηματισμός όγκων ή ανεξέλεγκτη ανάπτυξη (Grealish et al., 2014) (Kikuchi et al., 2017) (Kirkeby et al., 2012) (Kriks et al., 2011) (Steinbeck et al., 2015) και υπόκεινται σε αυστηρή τεκμηρίωση του επιπέδου ασφάλειας μαζί με σταθερή αποτελεσματικότητα και αναπαραγωγικότητα. Κάτι τέτοιο δεν συνέβη για δύο πρόσφατες δημοσιευμένες δοκιμές βλαστοκυττάρων για PD (Barker et al., 2016) (Cyranoski, 2017).

Τα πρωτόκολλα που αναπτύχθηκαν από τα μέλη του GForce-PD βρίσκονται πλέον κοντά στο να πιστοποιηθούν σε επίπεδο παραγωγής GMP, με εκτενή δεδομένα για την

προκλινική αποτελεσματικότητα. Επιπρόσθετα οι προσπάθειες αυτές στοχεύουν στην παραγωγή μεγάλων παρτίδων κρυοσυντηρημένων φιαλιδίων των προδρόμων DN. Τα τελικά κύτταρα για κλινική εφαρμογή (το προϊόν) στη συνέχεια θα ελεγχθούν για σταθερότητα, ογκογένεση, βιοκατανομή και τοξικολογία σύμφωνα με τους σχετικούς εθνικούς ρυθμιστικούς φορείς (π.χ. FDA, EMA, ΕΟΦ). Ωστόσο, όταν η θεραπεία προχωρήσει σε φάση III/αγορά φάση έγκρισης, θα είναι απαραίτητη περαιτέρω κλιμάκωση της διαδικασίας ή/και ανάπτυξη συστήματος αυτοματοποιημένης παραγωγής.

3.2.1 Στόχοι της μελέτης GForce-PD

Οι τέσσερις κύριες ομάδες που συμμετέχουν στη μελέτη GForce-PD έχουν τρεις κύριους σκοπούς:

- (1) Κριτική αξιολόγηση των προκλινικών στοιχείων από όλες τις ομάδες που υποστηρίζουν την υιοθέτηση των παραγόμενων κυττάρων (DN) ως θεραπεία υποκατάστασης
- (2) Ανοιχτή συζήτηση για τις σημαντικές και απαιτητικές πτυχές της κλινικής μετάφρασης και του σχεδιασμού της κλινικής δοκιμής και
- (3) Εναρμόνιση του έργου που γίνεται και του σχεδιασμού όλων των προγραμματισμένων εργασιών και δοκιμών ώστε να μπορεί να μεγιστοποιηθούν τα οφέλη της μελέτης και να εκμεταλλευτεί στο έπακρο η γνώση που θα παραχθεί.

Στις παραγράφους 3.2.1-3.2.5 θα εξετάσουμε επιπρόσθετους σκοπούς που αφορούν την μελέτη GForce-PD.

3.2.2 Ανοσοκατασταλτικές στρατηγικές

Η ανοσογονικότητα των ντοπαμινεργικών νευρώνων που προέρχονται από πηγές hPSC είναι άγνωστη, και επομένως είναι ασαφές ποια θα ήταν η βέλτιστη ανοσοκατασταλτική στρατηγική σε κλινικές δοκιμές μεταμόσχευσης αυτών των κυττάρων. Γενικά είναι παραδεκτό ότι μια περίοδος ανοσοκαταστολής απαιτείται και πρέπει να περιλαμβάνει τη χρήση τουλάχιστον ενός ανοσοκατασταλτικού παράγοντα, όπως ο FK506 π.χ. για 1-2 χρόνια μετά τη μεταμόσχευση όπως περιγράφεται στον Πίνακα 3. Αυτό βασίζεται στην πρότερη εμπειρία από ασθενείς με λήψη μοσχευμάτων hfVM, όπου μακροπρόθεσμα έχει παρατηρηθεί επιβίωση του μοσχεύματος χωρίς να χρειάζεται ισόβια ανοσοκαταστολή. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η τριπλή ανοσοθεραπεία για ένα χρόνο μετά το μόσχευμα έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη επιβίωση ντοπαμινεργικών κυττάρων σε σύγκριση με τη μη χρήση ανοσοκαταστολής ή μονοθεραπεία με Κυκλοσπορίνη-A μόνο για 6 μήνες μετά τον εμβολιασμό.

Η νόσος Parkinson όπως είδαμε στο κεφάλαιο 1 σχετίζεται με φλεγμονή και με τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος, επομένως χρειάζεται βαθύτερη κατανόηση των δράσεων και πιθανών παρενεργειών της ανοσοθεραπείας.

3.2.3 Επιλογή Ασθενών

Η επιλογή των ασθενών για μελέτες μεταμόσχευσης DN που προέρχονται από hPSC δεν είναι μια απλή υπόθεση. Η αρχική προϋπόθεση/κριτήριο επιλογής είναι η μειωμένη απόκριση στα λαμβανόμενα από το στόμα φάρμακα ντοπαμίνης (Πίνακας 3), ωστόσο δεν είναι ξεκάθαρο σε ποιο στάδιο της πορείας της νόσου θα πρέπει να συστηθεί

θεραπεία με μεταμόσχευση DN. Μια επικρατούσα άποψη υποστηρίζει ότι οι σχετικές κλινικές μελέτες (και κατ' επέκταση η εφαρμογή της θεραπείας στο μέλλον) θα πρέπει να στοχεύουν ασθενείς που είναι πιο πιθανό να αποκομίσουν το μέγιστο όφελος από τη μεταμόσχευση (π.χ. όπως στη μελέτη TRANSNEURO), δηλαδή νεότεροι ασθενείς σε πιο πρώιμο στάδιο της νόσου, χωρίς σημαντικές δυσκινησίες (λόγω των ντοπαμινεργικών φαρμάκων), χωρίς συμπτώματα άνοιας ή ήπιας γνωστικής διαταραχής και καλή απόκριση στα ντοπαμινεργικά φάρμακα (Barker et al., 2015).

Ωστόσο, άλλοι υποστηρίζουν ότι υποβάλλοντας τους ασθενείς σε ένα μη αποδεδειγμένο είδος κυτταροθεραπείας σε αυτό το στάδιο της ασθένειάς τους δεν είναι συμβατό με τους κανόνες της Ηθικής της Ιατρικής και της Έρευνας και ότι είναι πιο σωστό θα να δοκιμαστεί η θεραπεία μεταμόσχευσης σε όσους βρίσκονται σε πιο προχωρημένο στάδιο της ασθένειας (με κινητικές διακυμάνσεις) δεδομένου ότι γι' αυτούς παραδοσιακά εγκρίνονται πιο επεμβατικές θεραπείες (π.χ. DBS: εν τω βάθη εγκεφαλική διέγερση ή απομορφίνη/DuoDopa). Επιπλέον, αυτή η προσέγγιση θα επιτρέπει να παρακολουθείται η αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με τους ασθενείς με ηπιότερη νόσο όπου οι φαρμακευτικές θεραπείες έχουν εξαιρετικά και σταθερά αποτελέσματα σε μεγάλο ποσοστό ασθενών. Αυτό σαφώς δημιουργεί ένα περαιτέρω δίλημμα ως προς το αν οι κλινικοί γιατροί/ασθενείς θα πρέπει να επιλέξουν μια καθιερωμένη θεραπεία όπως DBS ή πιο πειραματικές, μη αποδεδειγμένες, κυτταρικές προσεγγίσεις. Στη μελέτη Gforce-PD, τα περισσότερα κέντρα αποφάσισαν να επιλέγουν ασθενείς με ελαφρά πιο προχωρημένη νόσο (σε σύγκριση με τη μελέτη TRANSNEURO), αλλά όχι σε τόσο προχωρημένο στάδιο ώστε να έχουν σημαντικές δυσκινησίες λόγω χρόνιας λήψης ντοπαμινεργικών φαρμάκων.

Η επιλογή των θεραπειών για προχωρημένα στάδια της νόσου Parkinson αποτελεί μια εξίσου σημαντική απόφαση με την έναρξη της ευεργετικής ντοπαμινεργικής θεραπείας και δυστυχώς αν και υπάρχουν μεγάλες κλινικές μελέτες, στηρίζεται σε πεπταλαιωμένα κριτήρια και όχι αντικειμενικούς βιοδείκτες με εκτενή κλινική και επιδημιολογική τεκμηρίωση.

3.2.4 Αξιολόγηση Ασθενών

Το πρωτόκολλο για την αξιολόγηση των ασθενών στη μελέτη GForce-PD περιλαμβάνει ένα ολοκληρωμένο σύνολο προτύπων (κινητικών, γνωστικών, ψυχιατρικών, μη κινητικών) και δείκτες αξιολόγησης ποιότητας ζωής όπως περιγράφονται στον Πίνακα 3. Αρκετές ομάδες των κλινικών κέντρων της GForce-PD έχουν έχει ήδη ξεκινήσει πιλοτικές μελέτες παρατήρησης, χρησιμοποιώντας αυτές τις αξιολογήσεις σε νέα γκρούπ ασθενών με νόσο Parkinson με στόχο την ένταξη κάποιων από αυτούς στις κλινικές δοκιμές. Αυτό όχι μόνο διευκολύνει την κλινική δοκιμή, αλλά πιθανόν να οδηγήσει στην ανακάλυψη πρώιμων δεικτών κλινικής αποτελεσματικότητας για τη νέα θεραπεία. Εκτός από αυτές τις κλινικές εξετάσεις, η απεικόνιση εγκεφάλου απαιτείται για δύο σκοπούς: εξασφάλιση ασφάλειας με χρήση μαγνητικής τομογραφίας (MRI) και παρακολούθηση της ντοπαμίνης που περιέχει το μόσχευμα χρησιμοποιώντας PET απεικόνιση ή ισοδύναμη τεχνική. Παρακολούθηση για την ασφάλεια των ασθενών με MRI γίνεται τουλάχιστον κάθε 3 μήνες για τον πρώτο χρόνο μετά τη μεταμόσχευση και στη συνέχεια κάθε 6 μήνες για 3 χρόνια (και ετησίως στη συνέχεια). Η απεικόνιση PET θα εξετάσει τα ντοπαμινεργικά κύτταρα στο μόσχευμα αλλά και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και το εύρος της ενεργοποίησης των μικρογλοίων.

Συμπερασματικά λοιπόν, η αξιολόγηση περνά από απλούς προ-μεταμοσχευτικούς δείκτες ποιότητας ζωής και σχετιζόμενες πληροφορίες με τη ντοπαμίνη, κίνηση και στάδιο της νόσου σε απεικονιστικές τεχνικές που μπορεί να αποκαλύψουν βιοδείκτες για την αντικειμενική αξιολόγηση των ασθενών και την πορεία του μοσχεύματος.

3.2.5 Σχεδιασμός Κλινικής δοκιμής

Στα πλαίσια του έργου GForce-PD, οι πρώτες μελέτες μεταμόσχευσης DN θα είναι ανοικτές (φανερές) θα και περιλαμβάνουν διερεύνηση της δοσολογίας σε μικρό αριθμό ασθενών. Τα περισσότερα κλινικά κέντρα θα έχουν περισσότερους από 12 ασθενείς για αυτές τις φάσεις (Μελέτες I/IIa) με δύο διαφορετικές δόσεις των κυττάρων που δίνονται σε αυτήν την ομάδα (βλέπε Πίνακας 3). Καμία από τις ομάδες δεν σχεδιάζει να έχει ομάδα placebo (π.χ. ψευδο-χειρουργική επέμβαση με χρήση μη λειτουργικού μοσχεύματος). Κεντρικά στοιχεία του σχεδιασμού είναι μελέτες σκοπιμότητας, ασφάλειας και/ή αποτελεσματικότητας. Επιπλέον, όπως με οποιαδήποτε τέτοια κυτταρική θεραπεία, οποιαδήποτε σημάδια κλινικής αποτελεσματικότητας μπορεί να χρειαστούν έως και 3-5 χρόνια για να είναι εμφανή (με βάση την πρότερη εμπειρία με μεταμοσχεύσεις hfVM). Επομένως η κλινική αποτελεσματικότητα του μοσχεύματος δεν μπορεί να είναι πρωταρχικό τελικό σημείο σε αυτές τις κλινικές μελέτες, ειδικά δεδομένης της απουσίας ομάδας ελέγχου. Επίσης ο σχεδιασμός περιλαμβάνει τη σύμφωνη απόφαση όλων των ομάδων να περιμένουν τουλάχιστον 2 χρόνια μετά τη μεταμόσχευση DN πριν δημοσιεύσουν τα αποτελέσματά τους για να αναπτυχθούν καλύτερα μέτρα (δείκτες) ανεκτικότητας του μοσχεύματος καθώς και τυχόν κλινικοί δείκτες για τη δραστηριότητα της θεραπείας. Οι ασθενείς θα πρέπει ιδανικά να

παρακολουθούνται επ' αόριστον μέχρι θανάτου δεδομένης της μη-αναστρέψιμης φύσης της ενδοεγκεφαλικής νευρικής μεταμόσχευσης.

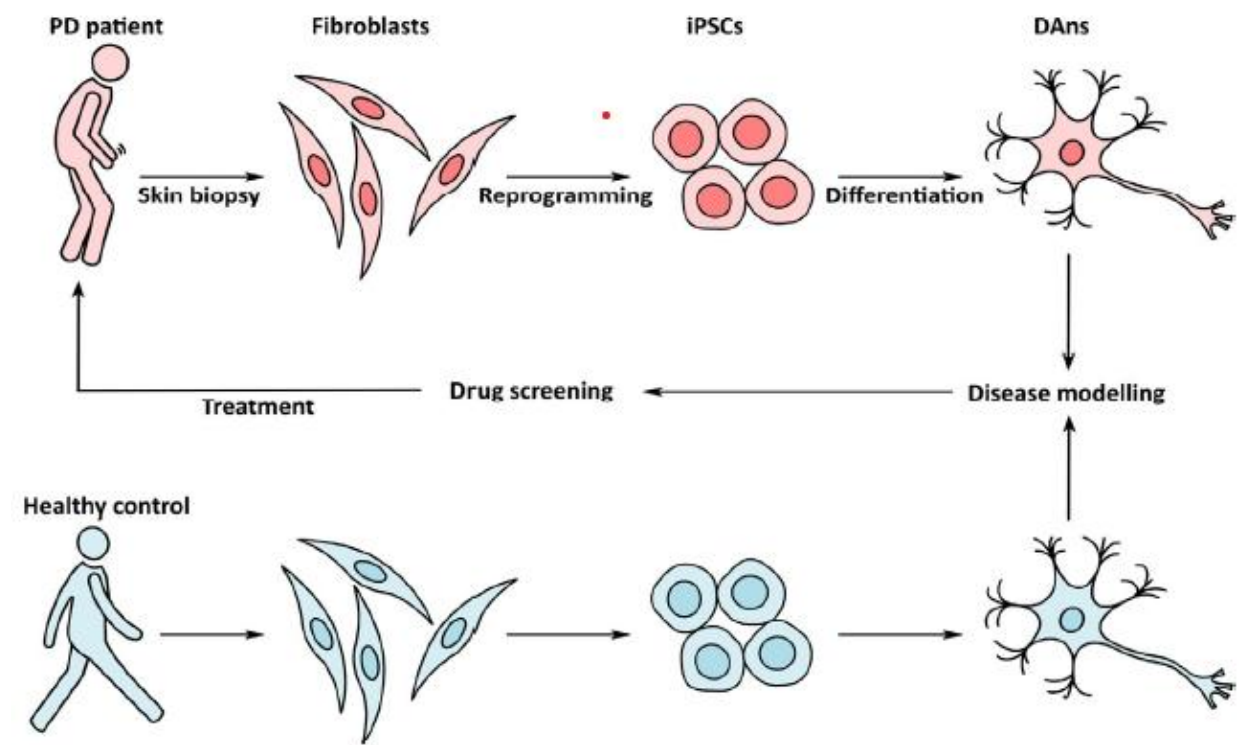
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΕΠΙΛΟΓΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΕΠΙΛΟΓΟΣ

4.1 Μελλοντικές εφαρμογές iPSC για την κατανόηση της νόσου Parkinson

Τα DN που προέρχονται από iPSC έχουν αρχίσει να παρέχουν νέες γνώσεις σχετικά με τους κυτταρικούς φαινότυπους που εμπλέκονται στην νόσο Parkinson και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανακάλυψη φαρμάκων (Κεφάλαιο 2). Η τεχνολογία iPSC-DN, σε συνδυασμό με την έλευση νέων αμερόληπτων τεχνικών υψηλής απόδοσης (ταυτόχρονη επεξεργασία πολλών δειγμάτων χωρίς να εμπλέκεται το πειραματικό σφάλμα του χρήστη με χρήση υπολογιστικών συστημάτων και ρομποτικής τεχνολογίας), αρκετοί νέοι κυτταρικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της νόσου Parkinson έχουν ανακαλυφθεί. Ειδικότερα, η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (RNA-seq) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη μελέτη των DN που προέρχονται από iPSC. Μια πρόσφατη μελέτη που διεξήχθη σε DN που προήλθαν από iPSC ασθενών με μετάλλαξη GBA-N370S και νόσο Parkinson, χρησιμοποίησε RNA-seq στο επίπεδο του ενός κυττάρου και ανακάλυψε ένα νέο κυτταροτοξικό μηχανισμό που μπορεί να στοχευθεί με φάρμακα. Επισημάνθηκε με αυτό τον τρόπο μια ομάδα γονιδίων εμπλουτισμένη σε στόχους-γονίδια που ρυθμίζονται από τον μεταγραφικό παράγοντα HDAC4 (απακετυλάση των ιστονών 4). Επιπλέον σε DN ασθενών παρατηρήθηκε πως η πρωτεΐνη αυτή είναι λανθασμένα στον πυρήνα και ότι η επανατοποθέτηση της HDAC4 πίσω στο κυτταρόπλασμα είναι σε θέση να αναστρέψει ορισμένους από τους φαινότυπους. Η μελέτη αυτή ανέδειξε την HDAC4 ως ένα νέο δυνητικό θεραπευτικό στόχο για την νόσο Parkinson. Παράλληλα σε DN από ασθενείς με νόσο Parkinson και LRRK2-G2019S μετάλλαξη, δείχθηκε ότι η κλιοκινόλη –(ένα

φάρμακο που αναστρέφει την απώλεια DN σε ένα μοντέλο ποντικού) αποκατέστησε το προφίλ γονιδιακής έκφρασης.



Εικόνα 7 : Εφαρμογές στην έρευνα για την κατανόηση των μηχανισμών της νόσου Parkinson για τους νευρώνες που προέρχονται από ανθρώπινα iPSC. Προσαρμοσμένη από Blauwendraat et al.. Τα IPSC προέρχονται από σωματικά κύτταρα ασθενών (συνήθως ινοβλάστες) με την έκφραση των παραγόντων Yamanaka (*Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc*). Τα iPSC διαφοροποιούνται στη συνέχεια σε DN ή σε άλλα κύτταρα που σχετίζονται με την ασθένεια. Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιούνται για τη μελέτη φαινοτύπων και την ανακάλυψη παθογενετικών μηχανισμών που σχετίζονται με τη νόσο Parkinson. Χρησιμοποιούνται κλασσικές κυτταρικές και μοριακές δοκιμασίες ή και νέες, αμερόληπτες τεχνικές υψηλής απόδοσης, όπως η αλληλούχιση επόμενης γενιάς. Ο προκλινικός έλεγχος φαρμάκων μπορεί να πραγματοποιηθεί σε κύτταρα ασθενών προκειμένου να ανακαλυφθούν πιθανοί θεραπευτικοί παράγοντες ικανοί να

αναστρέψουν τους φαινότυπους της νόσου αλλά και να δοκιμαστεί η ασφάλεια (π.χ. πιθανή τοξικότητα).

Επί του παρόντος δεν υπάρχουν διαθέσιμα φάρμακα που να τροποποιούν ή να αναστρέφουν την νόσο Parkinson. Η διαδικασία ανακάλυψης νέων φαρμάκων απαιτεί αξιόπιστες *in vitro* πλατφόρμες για ταχεία διαλογή των υποψήφιων σκευασμάτων πριν από την έναρξη προκλινικών και κλινικών δοκιμών. Τα ανθρώπινα iPSC που διαφοροποιούνται σε DN θα μπορούσαν να είναι η απάντηση (Εικόνα 7).

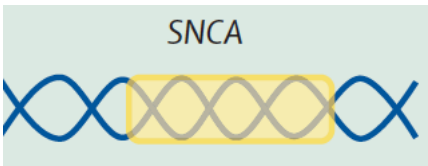
4.2 Μεταμόσχευση DN – μια νέα εποχή στην θεραπεία της νόσου Parkinson;


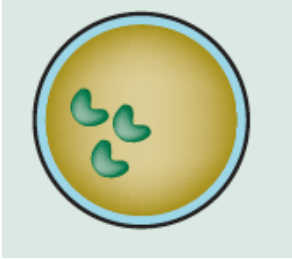



Η αντιμετώπιση της νόσου Parkinson χρησιμοποιώντας νέους, «κατασκευασμένους» από hPSC ντοπαμινεργικούς νευρώνες, ήταν ένας επιθυμητός στόχος από την πρώτη πρωτοποριακή κλινική μελέτη μεταμόσχευσης χρησιμοποιώντας εμβρυϊκά κύτταρα πριν από περισσότερα από 25 χρόνια. Οι περιορισμοί στη χρήση εμβρυϊκού ιστού αποτέλεσε το εφιαλτήριο για της εύρεση μιας επεκτάσιμης, ηθικά αποδεκτής και ασφαλούς πηγής κυττάρων. Υπάρχουν και άλλες εναλλακτικές πηγές νευρωνικών μοσχευμάτων π.χ. *ex vivo* διευρυμένοι νευροβλάστες hfVM ντοπαμίνης και ξενομοσχεύματα ιστού από χοίρους, αλλά αυτές οι πηγές έχουν περιορισμένη επιτυχία.


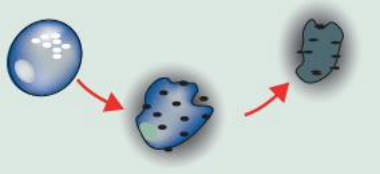
Η παραγωγή των πρώτων hESCs το 1998 έφερε μια νέα ελπίδα ότι αυτή θα μπορούσε να είναι η πηγή από την οποία αυθεντικοί ανθρώπινοι DN νευρώνες μεσεγκεφάλου θα μπορούσαν να παραχθούν. Ωστόσο, αυτό το επίτευγμα καθυστέρησε να υλοποιηθεί στην κλινική πράξη, με δύο ερευνητικές ομάδες να δημοσιεύουν πρωτόκολλα την περίοδο 2011–2012 καταδεικνύοντας μακροχρόνια επιβίωση και λειτουργική

αποτελεσματικότητα σε ζωικά μοντέλα της νόσου Parkinson (Kirkeby et al., 2012) (Kriks et al., 2011). Αυτές οι μελέτες αποτέλεσαν σημείο καμπής στον πεδίο και συνέβαλαν καταλυτικά στην ανάπτυξη νέων πρωτοκόλλων με ρεαλιστικές προσδοκίες ότι αυτή η προσέγγιση μπορεί να περάσει σε κλινικές δοκιμές. Ωστόσο, έπρεπε να φτάσουμε στο 2017 για να γίνει πραγματικότητα η βιομηχανική κατά τα πρωτόκολλα GMP παρασκευή κυττάρων για μεταμόσχευση. Το 2018 ξεκίνησε η προ-κλινική εργασία για την πραγματοποίηση κλινικών δοκιμών τα επόμενα χρόνια και ως εκ τούτου η χρήση βλαστοκυττάρων για τη θεραπεία της νόσου Parkinson έχει εισέλθει σε μια νέα εποχή.

4.3 Νέες θεραπείες για τη νόσο Parkinson- υπό δοκιμή και αναδυόμενες

Στόχος	Θεραπεία	
	Προκλινικές μελέτες	Κλινικές μελέτες
<p>α-συνουκλείνη</p> 	<p>B2 αδρενεργικοί υποδοχείς, siRNA παρέμβαση, μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη, αντιστρεπτολυσίνη-O</p>	<p>Θειαζολιδινεδιόνες (ή γλιταζόνες)</p>
<p>Μη-κανονικά διπλωμένα ινίδια α-συνουκλείνης (SNCA)</p>	<p>LAG3 αντισώματα, αναστολείς/μικρά μόρια, CLR01, KYP</p>	<p>Ενεργητική η παθητική ανοσοθεραπεία (π.χ. BIIB065), νιλοτινίμπη,</p>

		<p>δεφεριπρόνη</p>
<p>Αυτοφαγία- Λυσοσώματα</p> 	<p>LTI-291, AT3375</p>	<p>Αναστολείς της συνθετάσης του γλυκοσυλοκεραμιδίου, Αμβροξόλη</p>
<p>Ομοιόσταση Ca^{2+}</p> 	<p>Αναστολείς ασβεστίου ή ιόντων ασβεστίου</p>	<p>Αναστολείς καναλιών ιόντων ασβεστίου π.χ. ισραδιπίνη</p>
<p>Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία</p>  <p>Μονοπάτι Parkin</p>	<p>Ουρσοδεοξυχολικό οξύ αναστολείς μιτοχονδριακής διαίρεσης και θραύσης μιτοχονδρίων, αναστολείς κινάσης mTOR</p>	<p>MitoQ, αναστολείς κινάσης LRRK2</p>
<p>Νευροτροφικοί παράγοντες</p> 	<p>Εγκεφαλικός (BDNF) αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) αυξητικοί παράγοντες</p>	<p>CDNF (εγκεφαλικός νευροτροφικός παράγοντας ντοπαμίνης), GDNF (νευροτροφικός παράγοντας που</p>

		προέρχεται από τα γλοία)
<p>Φλεγμονή</p> 	Αντιφλεγμονώδη (π.χ. μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη)	AZD3241, λιραγλουτίδη, λιξισενατίδη, σαργραμοστίμη, εξενατίδη
<p>Οξειδωτικό Στρες</p> 	DJ-1 chaperones	Συνένζυμο Q10, καφεΐνη, νικοτίνη, κρεατινίνη, ινοσίνη της δεφεριπρόνης

<p>Εμβόλια, θεραπείες νευρο-φλεγμονής, διατροφή και εντερικό μικροβίωμα, καναβινοειδή, νέοι στόχοι φαρμάκων, γονιδιακή θεραπεία και εν τω βάθει εγκεφαλική διέγερση νέας γενιάς</p>
<p>Αναδυόμενες Θεραπείες για τη νόσο Parkinson</p>

Εικόνα 8 : Νέες θεραπείες για τη νόσο Parkinson. Προσαρμοσμένη από Feigin et al. Αυτές οι θεραπείες στοχεύουν στην επιβράδυνση της εξέλιξης της νόσου σε άτομα με νόσο του Parkinson ή σε καθυστέρηση της έναρξης εκδηλώσεων της νόσου σε άτομα με πρόδρομη φάση της νόσου του Parkinson. Οι προγραμματισμένες ή συνεχιζόμενες δοκιμές που στοχεύουν στην τροποποίηση της νόσου Parkinson είναι ευρείες και εις βάθος συμπεριλαμβανομένων πολλών στόχων και σε πολλές περιπτώσεις, πολλαπλών φαρμάκων για κάθε στόχο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- A, S., L, H., K, W., A, N., I, P., 2015. Prediagnostic presentations of Parkinson's disease in primary care: a case-control study. *Lancet Neurol.* 14. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70287-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70287-X)
- Adil, M.M., Rodrigues, G.M.C., Kulkarni, R.U., Rao, A.T., Chernavsky, N.E., Miller, E.W., Schaffer, D.V., 2017. Efficient generation of hPSC-derived midbrain dopaminergic neurons in a fully defined, scalable, 3D biomaterial platform. *Sci. Rep.* 7, 40573. <https://doi.org/10.1038/srep40573>
- Adler, C.H., Beach, T.G., Hentz, J.G., Shill, H.A., Caviness, J.N., Driver-Dunckley, E., Sabbagh, M.N., Sue, L.I., Jacobson, S.A., Belden, C.M., Dugger, B.N., 2014. Low clinical diagnostic accuracy of early vs advanced Parkinson disease: clinicopathologic study. *Neurology* 83, 406–412. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000641>
- Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., Lovell-Badge, R., 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17, 126–140. <https://doi.org/10.1101/gad.224503>
- Ball, N., Teo, W.-P., Chandra, S., Chapman, J., 2019. Parkinson's Disease and the Environment. *Front. Neurol.* 10, 218. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00218>
- Bandres-Ciga, S., Saez-Atienzar, S., Kim, J.J., Makarios, M.B., Faghri, F., Diez-Fairen, M., Iwaki, H., Leonard, H., Botia, J., Ryten, M., Hernandez, D., Gibbs, J.R., Ding, J., Gan-Or, Z., Noyce, A., Pihlstrom, L., Torkamani, A., Soltis, A.R., Dalgard, C.L., American Genome Center, Scholz, S.W., Traynor, B.J., Ehrlich, D., Scherzer, C.R., Bookman, M., Cookson, M., Blauwendraat, C., Nalls, M.A., Singleton, A.B., International Parkinson Disease Genomics Consortium, 2020. Large-scale pathway specific polygenic risk and transcriptomic community network analysis identifies novel functional pathways in Parkinson disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 140, 341–358. <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02181-3>
- Barker, R.A., Drouin-Ouellet, J., Parmar, M., 2015. Cell-based therapies for Parkinson disease—past insights and future potential. *Nat. Rev. Neurol.* 11, 492–503. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.123>
- Barker, R.A., Parmar, M., Kirkeby, A., Björklund, A., Thompson, L., Brundin, P., 2016. Are Stem Cell-Based Therapies for Parkinson's Disease Ready for the Clinic in 2016? *J. Park. Dis.* 6, 57–63. <https://doi.org/10.3233/JPD-160798>
- Barker, R.A., Parmar, M., Studer, L., Takahashi, J., 2017. Human Trials of Stem Cell-Derived Dopamine Neurons for Parkinson's Disease: Dawn of a New Era. *Cell Stem Cell* 21, 569–573. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.09.014>
- Barone, P., Erro, R., Picillo, M., 2017. Quality of Life and Nonmotor Symptoms in Parkinson's Disease. *Int. Rev. Neurobiol.* 133, 499–516. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2017.05.023>
- Beevers, J.E., Lai, M.C., Collins, E., Booth, H.D.E., Zambon, F., Parkkinen, L., Vowles, J., Cowley, S.A., Wade-Martins, R., Caffrey, T.M., 2017. MAPT Genetic Variation and Neuronal Maturity Alter Isoform Expression Affecting Axonal Transport in iPSC-Derived Dopamine Neurons. *Stem Cell Rep.* 9, 587–599. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.06.005>
- Berardelli, A., Wenning, G.K., Antonini, A., Berg, D., Bloem, B.R., Bonifati, V., Brooks, D., Burn, D.J., Colosimo, C., Fanciulli, A., Ferreira, J., Gasser, T., Grandas, F., Kanovsky, P., Kostic, V., Kulisevsky, J., Oertel, W., Poewe, W., Reese, J.-P., Relja, M., Ruzicka, E., Schrag, A., Seppi, K., Taba, P., Vidailhet, M., 2013. EFNS/MDS-ES/ENS [corrected]

- recommendations for the diagnosis of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurol.* 20, 16–34. <https://doi.org/10.1111/ene.12022>
- Berg, D., Postuma, R.B., Adler, C.H., Bloem, B.R., Chan, P., Dubois, B., Gasser, T., Goetz, C.G., Halliday, G., Joseph, L., Lang, A.E., Liepelt-Scarfone, I., Litvan, I., Marek, K., Obeso, J., Oertel, W., Olanow, C.W., Poewe, W., Stern, M., Deuschl, G., 2015. MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 30, 1600–1611. <https://doi.org/10.1002/mds.26431>
- Blauwendraat, C., Nalls, M.A., Singleton, A.B., 2020. The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 19, 170–178. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30287-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30287-X)
- Blauwendraat, C., Pletnikova, O., Geiger, J.T., Murphy, N.A., Abramzon, Y., Rudow, G., Mamais, A., Sabir, M.S., Crain, B., Ahmed, S., Rosenthal, L.S., Bakker, C.C., Faghri, F., Chia, R., Ding, J., Dawson, T.M., Pantelyat, A., Albert, M.S., Nalls, M.A., Resnick, S.M., Ferrucci, L., Cookson, M.R., Hillis, A.E., Troncoso, J.C., Scholz, S.W., 2019. Genetic analysis of neurodegenerative diseases in a pathology cohort. *Neurobiol. Aging* 76, 214.e1-214.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.11.007>
- Booth, H.D.E., Hirst, W.D., Wade-Martins, R., 2017. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends Neurosci.* 40, 358–370. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.04.001>
- Booth, H.D.E., Wessely, F., Connor-Robson, N., Rinaldi, F., Vowles, J., Browne, C., Evetts, S.G., Hu, M.T., Cowley, S.A., Webber, C., Wade-Martins, R., 2019. RNA sequencing reveals MMP2 and TGFB1 downregulation in LRRK2 G2019S Parkinson's iPSC-derived astrocytes. *Neurobiol. Dis.* 129, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.05.006>
- Braak, H., Del Tredici, K., Bratzke, H., Hamm-Clement, J., Sandmann-Keil, D., Rüb, U., 2002. Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J. Neurol.* 249, iii1–iii5. <https://doi.org/10.1007/s00415-002-1301-4>
- Brini, M., Ottolini, D., Cali, T., Carafoli, E., 2013. Calcium in Health and Disease, in: Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R.K.O. (Eds.), *Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases, Metal Ions in Life Sciences*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 81–137. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7500-8_4
- Byers, B., Cord, B., Nguyen, H.N., Schüle, B., Fenno, L., Lee, P.C., Deisseroth, K., Langston, J.W., Pera, R.R., Palmer, T.D., 2011. SNCA Triplication Parkinson's Patient's iPSC-derived DA Neurons Accumulate α -Synuclein and Are Susceptible to Oxidative Stress. *PLOS ONE* 6, e26159. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026159>
- C, S., P, R., C, L., A, H., H, B., J, V., L, W., R, B., M, H., Sa, C., R, W.-M., C, W., 2017. Transcriptomic profiling of purified patient-derived dopamine neurons identifies convergent perturbations and therapeutics for Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 26. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw412>
- Caiazzo, M., Dell'Anno, M.T., Dvoretzskova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., Sotnikova, T.D., Menegon, A., Roncaglia, P., Colciago, G., Russo, G., Carninci, P., Pezzoli, G., Gainetdinov, R.R., Gustincich, S., Dityatev, A., Broccoli, V., 2011. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature* 476, 224–227. <https://doi.org/10.1038/nature10284>
- Chagastelles, P.C., Nardi, N.B., 2011. Biology of stem cells: an overview. *Kidney Int. Suppl.* 1, 63–67. <https://doi.org/10.1038/kisup.2011.15>

- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., Smith, A., 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643–655. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00392-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00392-1)
- Chung, C.Y., Khurana, V., Auluck, P.K., Tardiff, D.F., Mazzulli, J.R., Soldner, F., Baru, V., Lou, Y., Freyzon, Y., Cho, S., Mungenast, A.E., Muffat, J., Mitalipova, M., Pluth, M.D., Jui, N.T., Schüle, B., Lippard, S.J., Tsai, L.-H., Krainc, D., Buchwald, S.L., Jaenisch, R., Lindquist, S., 2013. Identification and Rescue of α -Synuclein Toxicity in Parkinson Patient-Derived Neurons. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1245296>
- Chung, S.Y., Kishinevsky, S., Mazzulli, J.R., Graziotto, J., Mrejeru, A., Mosharov, E.V., Puspita, L., Valiulahi, P., Sulzer, D., Milner, T.A., Taldone, T., Krainc, D., Studer, L., Shim, J., 2016. Parkin and PINK1 Patient iPSC-Derived Midbrain Dopamine Neurons Exhibit Mitochondrial Dysfunction and α -Synuclein Accumulation. *Stem Cell Rep.* 7, 664–677. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.08.012>
- Connor-Robson, N., Booth, H., Martin, J.G., Gao, B., Li, K., Doig, N., Vowles, J., Browne, C., Klinger, L., Juhasz, P., Klein, C., Cowley, S.A., Bolam, P., Hirst, W., Wade-Martins, R., 2019. An integrated transcriptomics and proteomics analysis reveals functional endocytic dysregulation caused by mutations in LRRK2. *Neurobiol. Dis.* 127, 512–526. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.04.005>
- Cooper, O., Seo, H., Andrabi, S., Guardia-Laguarta, C., Graziotto, J., Sundberg, M., McLean, J.R., Carrillo-Reid, L., Xie, Z., Osborn, T., Hargus, G., Deleidi, M., Lawson, T., Bogetofte, H., Perez-Torres, E., Clark, L., Moskowitz, C., Mazzulli, J., Chen, L., Volpicelli-Daley, L., Romero, N., Jiang, H., Uitti, R.J., Huang, Z., Opala, G., Scarffe, L.A., Dawson, V.L., Klein, C., Feng, J., Ross, O.A., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., Marder, K., Surmeier, D.J., Wszolek, Z.K., Przedborski, S., Krainc, D., Dawson, T.M., Isacson, O., 2012. Pharmacological rescue of mitochondrial deficits in iPSC-derived neural cells from patients with familial Parkinson’s disease. *Sci. Transl. Med.* 4, 141ra90. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003985>
- Cowan, C.A., Atienza, J., Melton, D.A., Eggan, K., 2005. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 309, 1369–1373. <https://doi.org/10.1126/science.1116447>
- Cyranoski, D., 2017. Trials of embryonic stem cells to launch in China. *Nature* 546, 15–16. <https://doi.org/10.1038/546015a>
- Dauer, W., Przedborski, S., 2003. Parkinson’s Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* 39, 889–909. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00568-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00568-3)
- Dauvilliers, Y., Schenck, C.H., Postuma, R.B., Iranzo, A., Luppi, P.-H., Plazzi, G., Montplaisir, J., Boeve, B., 2018. REM sleep behaviour disorder. *Nat. Rev. Dis. Primer* 4, 19. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0016-5>
- Dawud, R.A., Schreiber, K., Schomburg, D., Adjaye, J., 2012. Human Embryonic Stem Cells and Embryonal Carcinoma Cells Have Overlapping and Distinct Metabolic Signatures. *PLOS ONE* 7, e39896. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039896>
- De Pablo-Fernández, E., Lees, A.J., Holton, J.L., Warner, T.T., 2019. Prognosis and Neuropathologic Correlation of Clinical Subtypes of Parkinson Disease. *JAMA Neurol.* 76, 470–479. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.4377>
- di Domenico, A., Carola, G., Calatayud, C., Pons-Espinal, M., Muñoz, J.P., Richaud-Patin, Y., Fernandez-Carasa, I., Gut, M., Faella, A., Parameswaran, J., Soriano, J., Ferrer, I., Tolosa, E., Zorzano, A., Cuervo, A.M., Raya, A., Consiglio, A., 2019. Patient-Specific

- iPSC-Derived Astrocytes Contribute to Non-Cell-Autonomous Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Stem Cell Rep.* 12, 213–229.
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.12.011>
- Dorsey, E.R., Sherer, T., Okun, M.S., Bloem, B.R., 2018. The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. *J. Park. Dis.* 8, S3–S8. <https://doi.org/10.3233/JPD-181474>
- Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F., Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A., Svendsen, C.N., 2009. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457, 277–280. <https://doi.org/10.1038/nature07677>
- Faghri, F., Hashemi, S.H., Leonard, H., Scholz, S.W., Campbell, R.H., Nalls, M.A., Singleton, A.B., 2018. Predicting onset, progression, and clinical subtypes of Parkinson disease using machine learning. *bioRxiv* 338913. <https://doi.org/10.1101/338913>
- Feigin, V.L., Nichols, E., Alam, T., Bannick, M.S., Beghi, E., Blake, N., Culpepper, W.J., Dorsey, E.R., Elbaz, A., Ellenbogen, R.G., Fisher, J.L., Fitzmaurice, C., Giussani, G., Glennie, L., James, S.L., Johnson, C.O., Kassebaum, N.J., Logroscino, G., Marin, B., Mountjoy-Venning, W.C., Nguyen, M., Ofori-Asenso, R., Patel, A.P., Piccininni, M., Roth, G.A., Steiner, T.J., Stovner, L.J., Szoeki, C.E.I., Theadom, A., Vollset, S.E., Wallin, M.T., Wright, C., Zunt, J.R., Abbasi, N., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Abdollahpour, I., Aboyans, V., Abraha, H.N., Acharya, D., Adamu, A.A., Adebayo, O.M., Adeoye, A.M., Adsuar, J.C., Afarideh, M., Agrawal, S., Ahmadi, A., Ahmed, M.B., Aichour, A.N., Aichour, I., Aichour, M.T.E., Akinyemi, R.O., Akseer, N., Al-Eyadhy, A., Salman, R.A.-S., Alahdab, F., Alene, K.A., Aljunid, S.M., Altirkawi, K., Alvis-Guzman, N., Anber, N.H., Antonio, C.A.T., Arabloo, J., Aremu, O., Ärnlöv, J., Asayesh, H., Asghar, R.J., Atalay, H.T., Awasthi, A., Quintanilla, B.P.A., Ayuk, T.B., Badawi, A., Banach, M., Banoub, J.A.M., Barboza, M.A., Barker-Collo, S.L., Bärnighausen, T.W., Baune, B.T., Bedi, N., Behzadifar, Masoud, Behzadifar, Meysam, Béjot, Y., Bekele, B.B., Belachew, A.B., Bennett, D.A., Bensenor, I.M., Berhane, A., Beuran, M., Bhattacharyya, K., Bhutta, Z.A., Biadgo, B., Bijani, A., Bililign, N., Sayeed, M.S.B., Blazes, C.K., Brayne, C., Butt, Z.A., Campos-Nonato, I.R., Cantu-Brito, C., Car, M., Cárdenas, R., Carrero, J.J., Carvalho, F., Castañeda-Orjuela, C.A., Castro, F., Catalá-López, F., Cerin, E., Chaiyah, Y., Chang, J.-C., Chatziralli, I., Chiang, P.P.-C., Christensen, H., Christopher, D.J., Cooper, C., Cortesi, P.A., Costa, V.M., Criqui, M.H., Crowe, C.S., Damasceno, A.A.M., Daryani, A., Cruz-Góngora, V.D. la, Hoz, F.P.D. la, Leo, D.D., Demoz, G.T., Deribe, K., Dharmaratne, S.D., Diaz, D., Dinberu, M.T., Djalalinia, S., Doku, D.T., Dubey, M., Dubljanin, E., Duken, E.E., Edvardsson, D., El-Khatib, Z., Endres, M., Endries, A.Y., Eskandarieh, S., Esteghamati, A., Esteghamati, S., Farhadi, F., Faro, A., Farzadfar, F., Farzaei, M.H., Fatima, B., Fereshtehnejad, S.-M., Fernandes, E., Feyissa, G.T., Filip, I., Fischer, F., Fukumoto, T., Ganji, M., Gankpe, F.G., Garcia-Gordillo, M.A., Gebre, A.K., Gebremichael, T.G., Gelaw, B.K., Geleijnse, J.M., Geremew, D., Gezae, K.E., Ghasemi-Kasman, M., Gidey, M.Y., Gill, P.S., Gill, T.K., Girma, E.T., Gnedovskaya, E.V., Goulart, A.C., Grada, A., Grosso, G., Guo, Y., Gupta, Rahul, Gupta, Rajeev, Haagsma, J.A., Hagos, T.B., Haj-Mirzaian, Arvin, Haj-Mirzaian, Arya, Hamadeh, R.R., Hamidi, S., Hankey, G.J., Hao, Y., Haro, J.M., Hassankhani, H., Hassen, H.Y., Havmoeller, R., Hay, S.I., Hegazy, M.I., Heidari, B., Henok, A., Heydarpour, F., Hoang, C.L., Hole, M.K., Rad, E.H., Hosseini, S.M., Hu, G., Igumbor, E.U., Ilesanmi, O.S., Irvani, S.S.N., Islam, S.M.S., Jakovljevic, M., Javanbakht, M., Jha, R.P., Jobanputra, Y.B., Jonas, J.B., Jozwiak, J.J., Jürisson, M., Kahsay, A., Kalani, R.,

Kalkonde, Y., Kamil, T.A., Kanchan, T., Karami, M., Karch, A., Karimi, N., Kasaeian, A., Kassa, T.D., Kassa, Z.Y., Kaul, A., Kefale, A.T., Keiyoro, P.N., Khader, Y.S., Khafaie, M.A., Khalil, I.A., Khan, E.A., Khang, Y.-H., Khazaie, H., Kiadaliri, A.A., Kiirithio, D.N., Kim, A.S., Kim, D., Kim, Y.-E., Kim, Y.J., Kisa, A., Kokubo, Y., Koyanagi, A., Krishnamurthi, R.V., Defo, B.K., Bicer, B.K., Kumar, M., Lacey, B., Lafranchi, A., Lansingh, V.C., Latifi, A., Leshargie, C.T., Li, S., Liao, Y., Linn, S., Lo, W.D., Lopez, J.C.F., Lorkowski, S., Lotufo, P.A., Lucas, R.M., Lunevicius, R., Mackay, M.T., Mahotra, N.B., Majdan, M., Majdzadeh, R., Majeed, A., Malekzadeh, R., Malta, D.C., Manafi, N., Mansournia, M.A., Mantovani, L.G., März, W., Mashamba-Thompson, T.P., Massenburg, B.B., Mate, K.K.V., McAlinden, C., McGrath, J.J., Mehta, V., Meier, T., Meles, H.G., Melese, A., Memiah, P.T.N., Memish, Z.A., Mendoza, W., Mengistu, D.T., Mengistu, G., Meretoja, A., Meretoja, T.J., Mestrovic, T., Miazgowski, B., Miazgowski, T., Miller, T.R., Mini, G.K., Mirrakhimov, E.M., Moazen, B., Mohajer, B., Mezerji, N.M.G., Mohammadi, M., Mohammadi-Khanaposhtani, M., Mohammadibakhsh, R., Mohammadnia-Afrouzi, M., Mohammed, S., Mohebi, F., Mokdad, A.H., Monasta, L., Mondello, S., Moodley, Y., Moosazadeh, M., Moradi, G., Moradi-Lakeh, M., Moradinazar, M., Moraga, P., Velásquez, I.M., Morrison, S.D., Mousavi, S.M., Muhammed, O.S., Muruet, W., Musa, K.I., Mustafa, G., Naderi, M., Nagel, G., Naheed, A., Naik, G., Najafi, F., Nangia, V., Negoï, I., Negoï, R.I., Newton, C.R.J., Ngunjiri, J.W., Nguyen, C.T., Nguyen, L.H., Ningrum, D.N.A., Nirayo, Y.L., Nixon, M.R., Norrving, B., Noubiap, J.J., Shiadeh, M.N., Nyasulu, P.S., Ogah, O.S., Oh, I.-H., Olagunju, A.T., Olagunju, T.O., Olivares, P.R., Onwujekwe, O.E., Oren, E., Owolabi, M.O., Pa, M., Pakpour, A.H., Pan, W.-H., Panda-Jonas, S., Pandian, J.D., Patel, S.K., Pereira, D.M., Petzold, M., Pillay, J.D., Piradov, M.A., Polanczyk, G.V., Polinder, S., Postma, M.J., Poulton, R., Poustchi, H., Prakash, S., Prakash, V., Qorbani, M., Radfar, A., Rafay, A., Rafiei, A., Rahim, F., Rahimi-Movaghar, V., Rahman, M., Rahman, M.H.U., Rahman, M.A., Rajati, F., Ram, U., Ranta, A., Rawaf, D.L., Rawaf, S., Reinig, N., Reis, C., Renzaho, A.M.N., Resnikoff, S., Rezaeian, S., Rezai, M.S., González, C.M.R., Roberts, N.L.S., Roeber, L., Ronfani, L., Roro, E.M., Roshandel, G., Rostami, A., Sabbagh, P., Sacco, R.L., Sachdev, P.S., Saddik, B., Safari, H., Safari-Faramani, R., Safi, S., Safiri, S., Sagar, R., Sahathevan, R., Sahebkar, A., Sahraian, M.A., Salamati, P., Zahabi, S.S., Salimi, Y., Samy, A.M., Sanabria, J., Santos, I.S., Milicevic, M.M.S., Sarrafzadegan, N., Sartorius, B., Sarvi, S., Sathian, B., Satpathy, M., Sawant, A.R., Sawhney, M., Schneider, I.J.C., Schöttker, B., Schwebel, D.C., Seedat, S., Sepanlou, S.G., Shabaninejad, H., Shafieesabet, A., Shaikh, M.A., Shakir, R.A., Shams-Beyranvand, M., Shamsizadeh, M., Sharif, M., Sharif-Alhoseini, M., She, J., Sheikh, A., Sheth, K.N., Shigematsu, M., Shiri, R., Shirkoohi, R., Shiue, I., Siabani, S., Siddiqi, T.J., Sigfusdottir, I.D., Sigurvinsdottir, R., Silberberg, D.H., Silva, J.P., Silveira, D.G.A., Singh, J.A., Sinha, D.N., Skiadaresi, E., Smith, M., Sobaih, B.H., Sobhani, S., Soofi, M., Soyiri, I.N., Sposato, L.A., Stein, D.J., Stein, M.B., Stokes, M.A., Sufiyan, M.B., Sykes, B.L., Sylaja, P.N., Tabarés-Seisdedos, R., Ao, B.J.T., Tehrani-Banihashemi, A., Temsah, M.-H., Temsah, O., Thakur, J.S., Thrift, A.G., Topor-Madry, R., Tortajada-Girbés, M., Tovani-Palone, M.R., Tran, B.X., Tran, K.B., Truelsen, T.C., Tsadik, A.G., Car, L.T., Ukwaja, K.N., Ullah, I., Usman, M.S., Uthman, O.A., Valdez, P.R., Vasankari, T.J., Vasanathan, R., Veisani, Y., Venketasubramanian, N., Violante, F.S., Vlassov, V., Vosoughi, K., Vu, G.T., Vujcic, I.S., Wagnew, F.S., Waheed, Y., Wang, Y.-P.,

- Weiderpass, E., Weiss, J., Whiteford, H.A., Wijeratne, T., Winkler, A.S., Wiysonge, C.S., Wolfe, C.D.A., Xu, G., Yadollahpour, A., Yamada, T., Yano, Y., Yaseri, M., Yatsuya, H., Yimer, E.M., Yip, P., Yisma, E., Yonemoto, N., Yousefifard, M., Yu, C., Zaidi, Z., Zaman, S.B., Zamani, M., Zandian, H., Zare, Z., Zhang, Y., Zodpey, S., Naghavi, M., Murray, C.J.L., Vos, T., 2019. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 18, 459–480. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30499-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30499-X)
- Fereshtehnejad, S.-M., Postuma, R.B., 2017. Subtypes of Parkinson’s Disease: What Do They Tell Us About Disease Progression? *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 17, 34. <https://doi.org/10.1007/s11910-017-0738-x>
- Fereshtehnejad, S.-M., Romenets, S.R., Anang, J.B.M., Latreille, V., Gagnon, J.-F., Postuma, R.B., 2015. New Clinical Subtypes of Parkinson Disease and Their Longitudinal Progression: A Prospective Cohort Comparison With Other Phenotypes. *JAMA Neurol.* 72, 863–873. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.0703>
- Fereshtehnejad, S.-M., Zeighami, Y., Dagher, A., Postuma, R.B., 2017. Clinical criteria for subtyping Parkinson’s disease: biomarkers and longitudinal progression. *Brain J. Neurol.* 140, 1959–1976. <https://doi.org/10.1093/brain/awx118>
- Fernandes, H.J.R., Hartfield, E.M., Christian, H.C., Emmanouilidou, E., Zheng, Y., Booth, H., Bogetofte, H., Lang, C., Ryan, B.J., Sardi, S.P., Badger, J., Vowles, J., Evetts, S., Tofaris, G.K., Vekrellis, K., Talbot, K., Hu, M.T., James, W., Cowley, S.A., Wade-Martins, R., 2016. ER Stress and Autophagic Perturbations Lead to Elevated Extracellular α -Synuclein in GBA-N370S Parkinson’s iPSC-Derived Dopamine Neurons. *Stem Cell Rep.* 6, 342–356. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.01.013>
- Foehring, R.C., Zhang, X.F., Lee, J. c. f., Callaway, J.C., 2009. Endogenous Calcium Buffering Capacity of Substantia Nigral Dopamine Neurons. *J. Neurophysiol.* 102, 2326–2333. <https://doi.org/10.1152/jn.00038.2009>
- Freed, C.R., Greene, P.E., Breeze, R.E., Tsai, W.Y., DuMouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J.Q., Eidelberg, D., Fahn, S., 2001. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson’s disease. *N. Engl. J. Med.* 344, 710–719. <https://doi.org/10.1056/NEJM200103083441002>
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., Hasegawa, M., 2009. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 85, 348–362. <https://doi.org/10.2183/pjab.85.348>
- Gallegos, S., Pacheco, C., Peters, C., Opazo, C.M., Aguayo, L.G., 2015. Features of alpha-synuclein that could explain the progression and irreversibility of Parkinson’s disease. *Front. Neurosci.* 9.
- Gelpi, E., Navarro-Otano, J., Tolosa, E., Gaig, C., Compta, Y., Rey, M.J., Martí, M.J., Hernández, I., Valldeoriola, F., Reñé, R., Ribalta, T., 2014. Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 29, 1010–1018. <https://doi.org/10.1002/mds.25776>
- Grealish, S., Diguët, E., Kirkeby, A., Mattsson, B., Heuer, A., Bramouille, Y., Van Camp, N., Perrier, A.L., Hantraye, P., Björklund, A., Parmar, M., 2014. Human ESC-Derived Dopamine Neurons Show Similar Preclinical Efficacy and Potency to Fetal Neurons

- when Grafted in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Cell Stem Cell* 15, 653–665.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.017>
- Guzman, J.N., Sánchez-Padilla, J., Chan, C.S., Surmeier, D.J., 2009. Robust pacemaking in substantia nigra dopaminergic neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 11011–11019. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2519-09.2009>
- Guzman, J.N., Sanchez-Padilla, J., Wokosin, D., Kondapalli, J., Ilijic, E., Schumacker, P.T., Surmeier, D.J., 2010. Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature* 468, 696–700. <https://doi.org/10.1038/nature09536>
- Heinzel, S., Berg, D., Gasser, T., Chen, H., Yao, C., Postuma, R.B., MDS Task Force on the Definition of Parkinson's Disease, 2019. Update of the MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 34, 1464–1470. <https://doi.org/10.1002/mds.27802>
- Höglinger, G.U., Respondek, G., Stamelou, M., Kurz, C., Josephs, K.A., Lang, A.E., Mollenhauer, B., Müller, U., Nilsson, C., Whitwell, J.L., Arzberger, T., Englund, E., Gelpi, E., Giese, A., Irwin, D.J., Meissner, W.G., Pantelyat, A., Rajput, A., van Swieten, J.C., Troakes, C., Antonini, A., Bhatia, K.P., Bordelon, Y., Compta, Y., Corvol, J.-C., Colosimo, C., Dickson, D.W., Dodel, R., Ferguson, L., Grossman, M., Kassubek, J., Krismer, F., Levin, J., Lorenzl, S., Morris, H.R., Nestor, P., Oertel, W.H., Poewe, W., Rabinovici, G., Rowe, J.B., Schellenberg, G.D., Seppi, K., van Eimeren, T., Wenning, G.K., Boxer, A.L., Golbe, L.I., Litvan, I., Movement Disorder Society-endorsed PSP Study Group, 2017. Clinical diagnosis of progressive supranuclear palsy: The movement disorder society criteria. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 32, 853–864. <https://doi.org/10.1002/mds.26987>
- Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., Ge, J., Xu, J., Zhang, Q., Zhao, Y., Deng, H., 2013. Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.1239278>
- Howard, D., Buttery, L.D., Shakesheff, K.M., Roberts, S.J., 2008. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *J. Anat.* 213, 66–72. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x>
- Hsieh, C.-H., Shaltouki, A., Gonzalez, A.E., Bettencourt da Cruz, A., Burbulla, L.F., St. Lawrence, E., Schüle, B., Krainc, D., Palmer, T.D., Wang, X., 2016. Functional Impairment in Mito Degradation and Mitophagy Is a Shared Feature in Familial and Sporadic Parkinson's Disease. *Cell Stem Cell* 19, 709–724.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.08.002>
- Hughes, A.J., Daniel, S.E., Ben-Shlomo, Y., Lees, A.J., 2002. The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain J. Neurol.* 125, 861–870. <https://doi.org/10.1093/brain/awf080>
- Hughes, A.J., Daniel, S.E., Kilford, L., Lees, A.J., 1992. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 55, 181–184. <https://doi.org/10.1136/jnnp.55.3.181>
- Hunn, B.H.M., Cragg, S.J., Bolam, J.P., Spillantini, M.-G., Wade-Martins, R., 2015. Impaired intracellular trafficking defines early Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 38, 178–188. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.12.009>

- Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies, 2011. . *The Lancet* 377, 641–649. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62345-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62345-8)
- Iovino, M., Agathou, S., González-Rueda, A., Del Castillo Velasco-Herrera, M., Borroni, B., Alberici, A., Lynch, T., O'Dowd, S., Geti, I., Gaffney, D., Vallier, L., Paulsen, O., Káradóttir, R.T., Spillantini, M.G., 2015. Early maturation and distinct tau pathology in induced pluripotent stem cell-derived neurons from patients with MAPT mutations. *Brain* 138, 3345–3359. <https://doi.org/10.1093/brain/awv222>
- Iranzo, A., Tolosa, E., Gelpi, E., Molinuevo, J.L., Valldeoriola, F., Serradell, M., Sanchez-Valle, R., Vilaseca, I., Lomeña, F., Vilas, D., Lladó, A., Gaig, C., Santamaria, J., 2013. Neurodegenerative disease status and post-mortem pathology in idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: an observational cohort study. *Lancet Neurol.* 12, 443–453. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70056-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70056-5)
- Isacson, O., Isacson, O., Deacon, T., 1997. Neural transplantation studies reveal the brain's capacity for continuous reconstruction. *Trends Neurosci.* 20, 477–482. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(97\)01081-3](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01081-3)
- Jankovic, J., 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79, 368–376. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.131045>
- Jo, J., Xiao, Y., Sun, A.X., Cukuroglu, E., Tran, H.-D., Göke, J., Tan, Z.Y., Saw, T.Y., Tan, C.-P., Lokman, H., Lee, Y., Kim, D., Ko, H.S., Kim, S.-O., Park, J.H., Cho, N.-J., Hyde, T.M., Kleinman, J.E., Shin, J.H., Weinberger, D.R., Tan, E.K., Je, H.S., Ng, H.-H., 2016. Midbrain-like Organoids from Human Pluripotent Stem Cells Contain Functional Dopaminergic and Neuromelanin-Producing Neurons. *Cell Stem Cell* 19, 248–257. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.07.005>
- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., Woltjen, K., 2009. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458, 771–775. <https://doi.org/10.1038/nature07864>
- Kikuchi, T., Morizane, A., Doi, D., Magotani, H., Onoe, H., Hayashi, T., Mizuma, H., Takara, S., Takahashi, R., Inoue, H., Morita, S., Yamamoto, M., Okita, K., Nakagawa, M., Parmar, M., Takahashi, J., 2017. Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature* 548, 592–596. <https://doi.org/10.1038/nature23664>
- Kim, Y., Zheng, X., Ansari, Z., Bunnell, M.C., Herdy, J.R., Traxler, L., Lee, H., Paquola, A.C.M., Blithikioti, C., Ku, M., Schlachetzki, J.C.M., Winkler, J., Edenhofer, F., Glass, C.K., Paucar, A.A., Jaeger, B.N., Pham, S., Boyer, L., Campbell, B.C., Hunter, T., Mertens, J., Gage, F.H., 2018. Mitochondrial Aging Defects Emerge in Directly Reprogrammed Human Neurons due to Their Metabolic Profile. *Cell Rep.* 23, 2550–2558. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.105>
- Kirkeby, A., Grealish, S., Wolf, D.A., Nelander, J., Wood, J., Lundblad, M., Lindvall, O., Parmar, M., 2012. Generation of Regionally Specified Neural Progenitors and Functional Neurons from Human Embryonic Stem Cells under Defined Conditions. *Cell Rep.* 1, 703–714. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.04.009>
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., Shimizu, N., 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392, 605–608. <https://doi.org/10.1038/33416>

- Koga, S., Aoki, N., Uitti, R.J., van Gerpen, J.A., Cheshire, W.P., Josephs, K.A., Wszolek, Z.K., Langston, J.W., Dickson, D.W., 2015. When DLB, PD, and PSP masquerade as MSA: an autopsy study of 134 patients. *Neurology* 85, 404–412. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001807>
- Kolios, G., Moodley, Y., 2013. Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration* 85, 3–10. <https://doi.org/10.1159/000345615>
- Korecka, J.A., Talbot, S., Osborn, T.M., de Leeuw, S.M., Levy, S.A., Ferrari, E.J., Moskites, A., Atkinson, E., Jodelka, F.M., Hinrich, A.J., Hastings, M.L., Woolf, C.J., Hallett, P.J., Isacson, O., 2019. Neurite Collapse and Altered ER Ca²⁺ Control in Human Parkinson Disease Patient iPSC-Derived Neurons with LRRK2 G2019S Mutation. *Stem Cell Rep.* 12, 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.11.021>
- Kriks, S., Shim, J.-W., Piao, J., Ganat, Y.M., Wakeman, D.R., Xie, Z., Carrillo-Reid, L., Auyeung, G., Antonacci, C., Buch, A., Yang, L., Beal, M.F., Surmeier, D.J., Kordower, J.H., Tabar, V., Studer, L., 2011. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson’s disease. *Nature* 480, 547–551. <https://doi.org/10.1038/nature10648>
- Lang, C., Campbell, K.R., Ryan, B.J., Carling, P., Attar, M., Vowles, J., Perestenko, O.V., Bowden, R., Baig, F., Kasten, M., Hu, M.T., Cowley, S.A., Webber, C., Wade-Martins, R., 2019. Single-Cell Sequencing of iPSC-Dopamine Neurons Reconstructs Disease Progression and Identifies HDAC4 as a Regulator of Parkinson Cell Phenotypes. *Cell Stem Cell* 24, 93-106.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.10.023>
- Lassus, B., Naudé, J., Faure, P., Guedin, D., Von Boxberg, Y., Mannoury la Cour, C., Millan, M.J., Peyrin, J.-M., 2018. Glutamatergic and dopaminergic modulation of cortico-striatal circuits probed by dynamic calcium imaging of networks reconstructed in microfluidic chips. *Sci. Rep.* 8, 17461. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35802-9>
- Lee, J.W., Song, Y.S., Kim, H., Ku, B.D., Lee, W.W., 2019. Alteration of Tremor Dominant and Postural Instability Gait Difficulty Subtypes During the Progression of Parkinson’s Disease: Analysis of the PPMI Cohort. *Front. Neurol.* 10, 471. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00471>
- Lees, A.J., Hardy, J., Revesz, T., 2009. Parkinson’s disease. *Lancet Lond. Engl.* 373, 2055–2066. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60492-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60492-X)
- Lesage, S., Drouet, V., Majounie, E., Deramecourt, V., Jacoupy, M., Nicolas, A., Cormier-Dequaire, F., Hassoun, S.M., Pujol, C., Ciura, S., Erpapazoglou, Z., Usenko, T., Maurage, C.-A., Sahbatou, M., Liebau, S., Ding, J., Bilgic, B., Emre, M., Erginel-Unaltuna, N., Guven, G., Tison, F., Tranchant, C., Vidailhet, M., Corvol, J.-C., Krack, P., Leutenegger, A.-L., Nalls, M.A., Hernandez, D.G., Heutink, P., Gibbs, J.R., Hardy, J., Wood, N.W., Gasser, T., Durr, A., Deleuze, J.-F., Tazir, M., Destée, A., Lohmann, E., Kabashi, E., Singleton, A., Corti, O., Brice, A., French Parkinson’s Disease Genetics Study (PDG), International Parkinson’s Disease Genomics Consortium (IPDGC), 2016. Loss of VPS13C Function in Autosomal-Recessive Parkinsonism Causes Mitochondrial Dysfunction and Increases PINK1/Parkin-Dependent Mitophagy. *Am. J. Hum. Genet.* 98, 500–513. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.01.014>
- Li, W., Englund, E., Widner, H., Mattsson, B., Westen, D. van, Lätt, J., Rehncrona, S., Brundin, P., Björklund, A., Lindvall, O., Li, J.-Y., 2016. Extensive graft-derived dopaminergic innervation is maintained 24 years after transplantation in the degenerating parkinsonian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 6544–6549. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605245113>

- Lindvall, O., Brundin, P., Widner, H., Rehncrona, S., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K.L., Sawle, G., Rothwell, J.C., Marsden, C.D., Björklund, M., 1990. Grafts of Fetal Dopamine Neurons Survive and Improve Motor Function in Parkinson's Disease. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.2105529>
- Lindvall, O., Rehncrona, S., Brundin, P., Gustavii, B., Åstedt, B., Widner, H., Lindholm, T., Björklund, A., Leenders, K.L., Rothwell, J.C., Frackowiak, R., Marsden, C.D., Johnels, B., Steg, G., Freedman, R., Hoffer, B.J., Seiger, Å., Bygdeman, M., Strömberg, I., Olson, L., 1989. Human Fetal Dopamine Neurons Grafted Into the Striatum in Two Patients With Severe Parkinson's Disease: A Detailed Account of Methodology and a 6-Month Follow-up. *Arch. Neurol.* 46, 615–631. <https://doi.org/10.1001/archneur.1989.00520420033021>
- Ludtmann, M.H.R., Angelova, P.R., Horrocks, M.H., Choi, M.L., Rodrigues, M., Baev, A.Y., Berezhnov, A.V., Yao, Z., Little, D., Banushi, B., Al-Menhali, A.S., Ranasinghe, R.T., Whiten, D.R., Yapom, R., Dolt, K.S., Devine, M.J., Gissen, P., Kunath, T., Jaganjac, M., Pavlov, E.V., Klenerman, D., Abramov, A.Y., Gandhi, S., 2018. α -synuclein oligomers interact with ATP synthase and open the permeability transition pore in Parkinson's disease. *Nat. Commun.* 9, 2293. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04422-2>
- Mahlknecht, P., Gasperi, A., Djamshidian, A., Kiechl, S., Stockner, H., Willeit, P., Willeit, J., Rungger, G., Poewe, W., Seppi, K., 2018. Performance of the Movement Disorders Society criteria for prodromal Parkinson's disease: A population-based 10-year study. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 33, 405–413. <https://doi.org/10.1002/mds.27281>
- Mahlknecht, P., Iranzo, A., Högl, B., Frauscher, B., Müller, C., Santamaría, J., Tolosa, E., Serradell, M., Mitterling, T., Gschliesser, V., Goebel, G., Brugger, F., Scherfler, C., Poewe, W., Seppi, K., Sleep Innsbruck Barcelona Group, 2015. Olfactory dysfunction predicts early transition to a Lewy body disease in idiopathic RBD. *Neurology* 84, 654–658. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001265>
- Mahlknecht, P., Stockner, H., Marini, K., Gasperi, A., Djamshidian, A., Willeit, P., Kiechl, S., Willeit, J., Rungger, G., Poewe, W., Seppi, K., 2020. Midbrain hyperechogenicity, hyposmia, mild parkinsonian signs and risk for incident Parkinson's disease over 10 years: A prospective population-based study. *Parkinsonism Relat. Disord.* 70, 51–54. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2019.12.008>
- Marión, R.M., Blasco, M.A., 2010. Telomere rejuvenation during nuclear reprogramming. *Curr. Opin. Genet. Dev., Chromosomes and expression mechanisms* 20, 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2010.01.005>
- Martin, G.R., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 7634–7638. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634>
- Mazzulli, J.R., Xu, Y.-H., Sun, Y., Knight, A.L., McLean, P.J., Caldwell, G.A., Sidransky, E., Grabowski, G.A., Krainc, D., 2011. Gaucher Disease Glucocerebrosidase and α -Synuclein Form a Bidirectional Pathogenic Loop in Synucleinopathies. *Cell* 146, 37–52. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.001>
- Mazzulli, J.R., Zunke, F., Isacson, O., Studer, L., Krainc, D., 2016. α -Synuclein-induced lysosomal dysfunction occurs through disruptions in protein trafficking in human midbrain synucleinopathy models. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 1931–1936. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520335113>

- Molofsky, A.V., Pardal, R., Morrison, S.J., 2004. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 700–707. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.09.004>
- Monzel, A.S., Smits, L.M., Hemmer, K., Hachi, S., Moreno, E.L., van Wuellen, T., Jarazo, J., Walter, J., Brüggemann, I., Boussaad, I., Berger, E., Fleming, R.M.T., Bolognin, S., Schwamborn, J.C., 2017. Derivation of Human Midbrain-Specific Organoids from Neuroepithelial Stem Cells. *Stem Cell Rep.* 8, 1144–1154. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.03.010>
- Moreno, E.L., Hachi, S., Hemmer, K., Trietsch, S.J., Baumuratov, A.S., Hankemeier, T., Vulto, P., Schwamborn, J.C., Fleming, R.M.T., 2015. Differentiation of neuroepithelial stem cells into functional dopaminergic neurons in 3D microfluidic cell culture. *Lab. Chip* 15, 2419–2428. <https://doi.org/10.1039/c5lc00180c>
- Mu, J., Chaudhuri, K.R., Bielza, C., de Pedro-Cuesta, J., Larrañaga, P., Martinez-Martin, P., 2017. Parkinson’s Disease Subtypes Identified from Cluster Analysis of Motor and Non-motor Symptoms. *Front. Aging Neurosci.* 9, 301. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00301>
- Mummery, C., van de Stolpe, A., Roelen, B.A.J., Clevers, H. (Eds.), 2014. Chapter 3 - What Are Stem Cells?, in: *Stem Cells (Second Edition)*. Academic Press, Boston, pp. 53–68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411551-4.00003-9>
- Nalls, M.A., Blauwendraat, C., Vallerga, C.L., Heilbron, K., Bandres-Ciga, S., Chang, D., Tan, M., Kia, D.A., Noyce, A.J., Xue, A., Bras, J., Young, E., von Coelln, R., Simón-Sánchez, J., Schulte, C., Sharma, M., Krohn, L., Pihlstrom, L., Siitonen, A., Iwaki, H., Leonard, H., Faghri, F., Gibbs, J.R., Hernandez, D.G., Scholz, S.W., Botia, J.A., Martinez, M., Corvol, J.-C., Lesage, S., Jankovic, J., Shulman, L.M., Sutherland, M., Tienari, P., Majamaa, K., Toft, M., Andreassen, O.A., Bangale, T., Brice, A., Yang, J., Gan-Or, Z., Gasser, T., Heutink, P., Shulman, J.M., Wood, N., Hinds, D.A., Hardy, J.A., Morris, H.R., Gratten, J., Visscher, P.M., Graham, R.R., Singleton, A.B., 2019. Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson’s disease: a meta-genome wide association study. *Lancet Neurol.* 18, 1091–1102. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30320-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30320-5)
- Nguyen, H.N., Byers, B., Cord, B., Shcheglovitov, A., Byrne, J., Gujar, P., Kee, K., Schüle, B., Dolmetsch, R.E., Langston, W., Palmer, T.D., Pera, R.R., 2011. LRRK2 Mutant iPSC-Derived DA Neurons Demonstrate Increased Susceptibility to Oxidative Stress. *Cell Stem Cell* 8, 267–280. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.01.013>
- Niwa, H., Miyazaki, J., Smith, A.G., 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 24, 372–376. <https://doi.org/10.1038/74199>
- Noyce, A.J., Bestwick, J.P., Silveira-Moriyama, L., Hawkes, C.H., Knowles, C.H., Hardy, J., Giovannoni, G., Nageshwaran, S., Osborne, C., Lees, A.J., Schrag, A., 2014. PREDICT-PD: identifying risk of Parkinson’s disease in the community: methods and baseline results. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 85, 31–37. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2013-305420>
- Noyce, A.J., R’Bibo, L., Peress, L., Bestwick, J.P., Adams-Carr, K.L., Mencacci, N.E., Hawkes, C.H., Masters, J.M., Wood, N., Hardy, J., Giovannoni, G., Lees, A.J., Schrag, A., 2017. PREDICT-PD: An online approach to prospectively identify risk indicators of Parkinson’s disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 32, 219–226. <https://doi.org/10.1002/mds.26898>

- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., Yamanaka, S., 2008. Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.1164270>
- Ono, Y., Nakatani, T., Sakamoto, Y., Mizuhara, E., Minaki, Y., Kumai, M., Hamaguchi, A., Nishimura, M., Inoue, Y., Hayashi, H., Takahashi, J., Imai, T., 2007. Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells. *Development* 134, 3213–3225. <https://doi.org/10.1242/dev.02879>
- Parkinson, J., 2002. An Essay on the Shaking Palsy. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 14, 223–236. <https://doi.org/10.1176/jnp.14.2.223>
- Pfisterer, U., Kirkeby, A., Torper, O., Wood, J., Nelander, J., Dufour, A., Björklund, A., Lindvall, O., Jakobsson, J., Parmar, M., 2011. Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 10343–10348.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1105135108>
- Piccini, P., Brooks, D.J., Björklund, A., Gunn, R.N., Grasby, P.M., Rimoldi, O., Brundin, P., Hagell, P., Rehncrona, S., Widner, H., Lindvall, O., 1999. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat. Neurosci.* 2, 1137–1140.
<https://doi.org/10.1038/16060>
- Pilotto, A., Heinzl, S., Suenkel, U., Lerche, S., Brockmann, K., Roeben, B., Schaeffer, E., Wurster, I., Yilmaz, R., Liepelt-Scarfone, I., von Thaler, A.-K., Metzger, F.G., Eschweiler, G.W., Postuma, R.B., Maetzler, W., Berg, D., 2017. Application of the movement disorder society prodromal Parkinson's disease research criteria in 2 independent prospective cohorts. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 32, 1025–1034.
<https://doi.org/10.1002/mds.27035>
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C.M., Halliday, G.M., Brundin, P., Volkmann, J., Schrag, A.-E., Lang, A.E., 2017. Parkinson disease. *Nat. Rev. Dis. Primer* 3, 17013.
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I., Nussbaum, R.L., 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045–2047.
<https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>
- Pont-Sunyer, C., Hotter, A., Gaig, C., Seppi, K., Compta, Y., Katzenschlager, R., Mas, N., Hofeneder, D., Brücke, T., Bayés, A., Wenzel, K., Infante, J., Zach, H., Pirker, W., Posada, I.J., Álvarez, R., Ispierto, L., De Fàbregues, O., Callén, A., Palasí, A., Aguilar, M., Martí, M.J., Valldeoriola, F., Salamero, M., Poewe, W., Tolosa, E., 2015. The onset of nonmotor symptoms in Parkinson's disease (the ONSET PD study). *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 30, 229–237. <https://doi.org/10.1002/mds.26077>
- Postuma, R.B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C.W., Oertel, W., Obeso, J., Marek, K., Litvan, I., Lang, A.E., Halliday, G., Goetz, C.G., Gasser, T., Dubois, B., Chan, P., Bloem, B.R., Adler, C.H., Deuschl, G., 2015. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 30, 1591–1601.
<https://doi.org/10.1002/mds.26424>
- Postuma, R.B., Poewe, W., Litvan, I., Lewis, S., Lang, A.E., Halliday, G., Goetz, C.G., Chan, P., Slow, E., Seppi, K., Schaffer, E., Rios-Romenets, S., Mi, T., Maetzler, C., Li, Y., Heim,

- B., Bledsoe, I.O., Berg, D., 2018. Validation of the MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 33, 1601–1608. <https://doi.org/10.1002/mds.27362>
- Rajput, A.H., Rajput, A., 2014. Accuracy of Parkinson disease diagnosis unchanged in 2 decades. *Neurology* 83, 386–387. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000653>
- Rizzo, G., Copetti, M., Arcuti, S., Martino, D., Fontana, A., Logroscino, G., 2016. Accuracy of clinical diagnosis of Parkinson disease: A systematic review and meta-analysis. *Neurology* 86, 566–576. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002350>
- Ross, G.W., Abbott, R.D., Petrovitch, H., Tanner, C.M., White, L.R., 2012. Pre-motor features of Parkinson's disease: the Honolulu-Asia Aging Study experience. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18 Suppl 1, S199-202. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(11\)70062-1](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(11)70062-1)
- Rouhani, F., Kumasaka, N., Brito, M.C. de, Bradley, A., Vallier, L., Gaffney, D., 2014. Genetic Background Drives Transcriptional Variation in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *PLOS Genet.* 10, e1004432. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004432>
- Ryan, B.J., Hoek, S., Fon, E.A., Wade-Martins, R., 2015. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. *Trends Biochem. Sci.* 40, 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.02.003>
- Ryan, S.D., Dolatabadi, N., Chan, S.F., Zhang, X., Akhtar, M.W., Parker, J., Soldner, F., Sunico, C.R., Nagar, S., Talantova, M., Lee, B., Lopez, K., Nutter, A., Shan, B., Molokanova, E., Zhang, Y., Han, X., Nakamura, T., Masliah, E., Yates, J.R., Nakanishi, N., Andreyev, A.Y., Okamoto, S., Jaenisch, R., Ambasudhan, R., Lipton, S.A., 2013. Isogenic Human iPSC Parkinson's Model Shows Nitrosative Stress-Induced Dysfunction in MEF2-PGC1 α Transcription. *Cell* 155, 1351–1364. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.009>
- Safarpour, D., Thibault, D.P., DeSanto, C.L., Boyd, C.M., Dorsey, E.R., Racette, B.A., Willis, A.W., 2015. Nursing home and end-of-life care in Parkinson disease. *Neurology* 85, 413–419. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001715>
- Saiki, S., Sato, S., Hattori, N., 2012. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease: update. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 83, 430–436. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2011-301205>
- Salat, D., Noyce, A.J., Schrag, A., Tolosa, E., 2016. Challenges of modifying disease progression in pre-diagnostic Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 15, 637–648. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00060-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00060-0)
- Sanchez-Contreras, M., Heckman, M.G., Tacik, P., Diehl, N., Brown, P.H., Soto-Ortolaza, A.I., Christopher, E.A., Walton, R.L., Ross, O.A., Golbe, L.I., Graff-Radford, N., Wszolek, Z.K., Dickson, D.W., Rademakers, R., 2017. Study of LRRK2 variation in tauopathy: Progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 32, 115–123. <https://doi.org/10.1002/mds.26815>
- Schapira, A.H.V., Chaudhuri, K.R., Jenner, P., 2017. Non-motor features of Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 509. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.91>
- Scheper, W., Hoozemans, J.J.M., 2015. The unfolded protein response in neurodegenerative diseases: a neuropathological perspective. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 130, 315–331. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1462-8>
- Schöndorf, D.C., Aureli, M., McAllister, F.E., Hindley, C.J., Mayer, F., Schmid, B., Sardi, S.P., Valsecchi, M., Hoffmann, S., Schwarz, L.K., Hedrich, U., Berg, D., Shihabuddin, L.S., Hu, J., Pruszak, J., Gygi, S.P., Sonnino, S., Gasser, T., Deleidi, M., 2014. iPSC-derived neurons from GBA1-associated Parkinson's disease patients show autophagic defects and

- impaired calcium homeostasis. *Nat. Commun.* 5, 4028.
<https://doi.org/10.1038/ncomms5028>
- Schöndorf, D.C., Ivanyuk, D., Baden, P., Sanchez-Martinez, A., De Cicco, S., Yu, C., Giunta, I., Schwarz, L.K., Di Napoli, G., Panagiotakopoulou, V., Nestel, S., Keatinge, M., Pruszk, J., Bandmann, O., Heimrich, B., Gasser, T., Whitworth, A.J., Deleidi, M., 2018. The NAD⁺ Precursor Nicotinamide Riboside Rescues Mitochondrial Defects and Neuronal Loss in iPSC and Fly Models of Parkinson's Disease. *Cell Rep.* 23, 2976–2988.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.009>
- Schrag, A., Ben-Shlomo, Y., Brown, R., Marsden, C.D., Quinn, N., 1998. Young-onset Parkinson's disease revisited—clinical features, natural history, and mortality. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 13, 885–894. <https://doi.org/10.1002/mds.870130605>
- Schrag, A., Ben-Shlomo, Y., Quinn, N., 2002. How valid is the clinical diagnosis of Parkinson's disease in the community? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 73, 529–534.
<https://doi.org/10.1136/jnnp.73.5.529>
- Schrag, A., Horsfall, L., Walters, K., Noyce, A., Petersen, I., 2015. Prediagnostic presentations of Parkinson's disease in primary care: a case-control study. *Lancet Neurol.* 14, 57–64.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70287-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70287-X)
- Selikhova, M., Williams, D.R., Kempster, P.A., Holton, J.L., Revesz, T., Lees, A.J., 2009. A clinico-pathological study of subtypes in Parkinson's disease. *Brain J. Neurol.* 132, 2947–2957. <https://doi.org/10.1093/brain/awp234>
- Shaltouki, A., Hsieh, C.-H., Kim, M.J., Wang, X., 2018. Alpha-synuclein delays mitophagy and targeting Miro rescues neuron loss in Parkinson's models. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 136, 607–620. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1873-4>
- Siderowf, A., Lang, A.E., 2012. Premotor Parkinson's disease: concepts and definitions. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 27, 608–616. <https://doi.org/10.1002/mds.24954>
- Sidransky, E., Lopez, G., 2012. The link between the GBA gene and parkinsonism. *Lancet Neurol.* 11, 986–998. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70190-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70190-4)
- Sidransky, E., Nalls, M.A., Aasly, J.O., Aharon-Peretz, J., Annesi, G., Barbosa, E.R., Bar-Shira, A., Berg, D., Bras, J., Brice, A., Chen, C.-M., Clark, L.N., Condroyer, C., De Marco, E.V., Dürr, A., Eblan, M.J., Fahn, S., Farrer, M.J., Fung, H.-C., Gan-Or, Z., Gasser, T., Gershoni-Baruch, R., Giladi, N., Griffith, A., Gurevich, T., Januario, C., Kropp, P., Lang, A.E., Lee-Chen, G.-J., Lesage, S., Marder, K., Mata, I.F., Mirelman, A., Mitsui, J., Mizuta, I., Nicoletti, G., Oliveira, C., Ottman, R., Orr-Urtreger, A., Pereira, L.V., Quattrone, A., Rogaeva, E., Rolfs, A., Rosenbaum, H., Rozenberg, R., Samii, A., Samaddar, T., Schulte, C., Sharma, M., Singleton, A., Spitz, M., Tan, E.-K., Tayebi, N., Toda, T., Troiano, A.R., Tsuji, S., Wittstock, M., Wolfsberg, T.G., Wu, Y.-R., Zabetian, C.P., Zhao, Y., Ziegler, S.G., 2009. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 361, 1651–1661.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0901281>
- Simuni, T., Caspell-Garcia, C., Coffey, C., Lasch, S., Tanner, C., Marek, K., PPMI Investigators, 2016. How stable are Parkinson's disease subtypes in de novo patients: Analysis of the PPMI cohort? *Parkinsonism Relat. Disord.* 28, 62–67.
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.04.027>
- Slack, J.M.W., 2012. *Essential developmental biology*. Wiley, Hoboken, NJ.

- Smith, M.H., Ploegh, H.L., Weissman, J.S., 2011. Road to Ruin: Targeting Proteins for Degradation in the Endoplasmic Reticulum. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.1209235>
- Smits, L.M., Reinhardt, L., Reinhardt, P., Glatza, M., Monzel, A.S., Stanslowsky, N., Rosato-Siri, M.D., Zanon, A., Antony, P.M., Bellmann, J., Nicklas, S.M., Hemmer, K., Qing, X., Berger, E., Kalmbach, N., Ehrlich, M., Bolognin, S., Hicks, A.A., Wegner, F., Sternecker, J.L., Schwamborn, J.C., 2019. Modeling Parkinson's disease in midbrain-like organoids. *NPJ Park. Dis.* 5, 5. <https://doi.org/10.1038/s41531-019-0078-4>
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V., 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., Goedert, M., 1997. α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839–840. <https://doi.org/10.1038/42166>
- Sposito, T., Preza, E., Mahoney, C.J., Setó-Salvia, N., Ryan, N.S., Morris, H.R., Arber, C., Devine, M.J., Houlden, H., Warner, T.T., Bushell, T.J., Zagnoni, M., Kunath, T., Livesey, F.J., Fox, N.C., Rossor, M.N., Hardy, J., Wray, S., 2015. Developmental regulation of tau splicing is disrupted in stem cell-derived neurons from frontotemporal dementia patients with the 10 + 16 splice-site mutation in MAPT. *Hum. Mol. Genet.* 24, 5260–5269. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv246>
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., Hochedlinger, K., 2008. Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.1162494>
- Stebbins, G.T., Goetz, C.G., Burn, D.J., Jankovic, J., Khoo, T.K., Tilley, B.C., 2013. How to identify tremor dominant and postural instability/gait difficulty groups with the movement disorder society unified Parkinson's disease rating scale: comparison with the unified Parkinson's disease rating scale. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 28, 668–670. <https://doi.org/10.1002/mds.25383>
- Steinbeck, J.A., Choi, S.J., Mrejeru, A., Ganat, Y., Deisseroth, K., Sulzer, D., Mosharov, E.V., Studer, L., 2015. Optogenetics enables functional analysis of human embryonic stem cell-derived grafts in a Parkinson's disease model. *Nat. Biotechnol.* 33, 204–209.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3124>
- Steiner, J.A., Quansah, E., Brundin, P., 2018. The concept of alpha-synuclein as a prion-like protein: ten years after. *Cell Tissue Res.* 373, 161–173. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2814-1>
- Suzuki, S., Akamatsu, W., Kisa, F., Sone, T., Ishikawa, K., Kuzumaki, N., Katayama, H., Miyawaki, A., Hattori, N., Okano, H., 2017. Efficient induction of dopaminergic neuron differentiation from induced pluripotent stem cells reveals impaired mitophagy in PARK2 neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 483, 88–93.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.188>
- Tabata, Y., Imaizumi, Y., Sugawara, M., Andoh-Noda, T., Banno, S., Chai, M., Sone, T., Yamazaki, K., Ito, M., Tsukahara, K., Saya, H., Hattori, N., Kohyama, J., Okano, H., 2018. T-type Calcium Channels Determine the Vulnerability of Dopaminergic Neurons to Mitochondrial Stress in Familial Parkinson Disease. *Stem Cell Rep.* 11, 1171–1184.
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.09.006>
- Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., Tada, T., 2001. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr. Biol. CB* 11, 1553–1558.
[https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00459-6](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00459-6)

- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Tolosa, E., Garrido, A., Scholz, S.W., Poewe, W., 2021. Challenges in the diagnosis of Parkinson’s disease. *Lancet Neurol.* 20, 385–397. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00030-2)
- Tolosa, E., Vila, M., Klein, C., Rascol, O., 2020. LRRK2 in Parkinson disease: challenges of clinical trials. *Nat. Rev. Neurol.* 16, 97–107. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0301-2>
- Tropepe, V., Sibilia, M., Ciruna, B.G., Rossant, J., Wagner, E.F., van der Kooy, D., 1999. Distinct Neural Stem Cells Proliferate in Response to EGF and FGF in the Developing Mouse Telencephalon. *Dev. Biol.* 208, 166–188. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9192>
- Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M.K., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A.R., Healy, D.G., Albanese, A., Nussbaum, R., González-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W.P., Latchman, D.S., Harvey, R.J., Dallapiccola, B., Auburger, G., Wood, N.W., 2004. Hereditary early-onset Parkinson’s disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304, 1158–1160. <https://doi.org/10.1126/science.1096284>
- Varma, D., Sen, D., 2015. Role of the unfolded protein response in the pathogenesis of Parkinson’s disease. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* 75, 1–26.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z.P., Kokubu, Y., Südhof, T.C., Wernig, M., 2010. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463, 1035–1041. <https://doi.org/10.1038/nature08797>
- Walter, P., Ron, D., 2011. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science.* <https://doi.org/10.1126/science.1209038>
- Wang, X., Cai, L., Han, P., Lin, D., Kim, H., Tong, M., 2014. Cotransport of multi-walled carbon nanotubes and titanium dioxide nanoparticles in saturated porous media. *Environ. Pollut.* 195, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.08.011>
- Wenning, G.K., Litvan, I., Tolosa, E., 2011. Milestones in atypical and secondary Parkinsonisms. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 26, 1083–1095. <https://doi.org/10.1002/mds.23713>
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H., 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810–813. <https://doi.org/10.1038/385810a0>
- Xu, Y., Chen, C., Hellwarth, P.B., Bao, X., 2019. Biomaterials for stem cell engineering and biomanufacturing. *Bioact. Mater.* 4, 366–379. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.11.002>
- Yan, Y., Yang, D., Zarnowska, E.D., Du, Z., Werbel, B., Valliere, C., Pearce, R.A., Thomson, J.A., Zhang, S.-C., 2005. Directed Differentiation of Dopaminergic Neuronal Subtypes from Human Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS* 23, 781–790. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0365>

- Zambon, F., Cherubini, M., Fernandes, H.J.R., Lang, C., Ryan, B.J., Volpato, V., Bengoa-Vergniory, N., Vingill, S., Attar, M., Booth, H.D.E., Haenseler, W., Vowles, J., Bowden, R., Webber, C., Cowley, S.A., Wade-Martins, R., 2019. Cellular α -synuclein pathology is associated with bioenergetic dysfunction in Parkinson's iPSC-derived dopamine neurons. *Hum. Mol. Genet.* 28, 2001–2013. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz038>
- Zhou, W., Freed, C.R., 2009. Adenoviral Gene Delivery Can Reprogram Human Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells* 27, 2667–2674. <https://doi.org/10.1002/stem.201>
- Zis, P., Martinez-Martin, P., Sauerbier, A., Rizos, A., Sharma, J.C., Worth, P.F., Sophia, R., Silverdale, M., Chaudhuri, K.R., 2015. Non-motor symptoms burden in treated and untreated early Parkinson's disease patients: argument for non-motor subtypes. *Eur. J. Neurol.* 22, 1145–1150. <https://doi.org/10.1111/ene.12733>
- Zucker, R.S., 1999. Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 305–313. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(99\)80045-2](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(99)80045-2)