



Δράση «Εμβληματικές δράσεις σε διαθεματικές επιστημονικές περιοχές με ειδικό ενδιαφέρον για την σύνδεση με τον παραγωγικό ιστό» ID 16618

Εθνικό δίκτυο έρευνας για την ανάδειξη της γενετικής βάσης των νευροεκφυλιστικών νόσων Alzheimer και Parkinson, την ανίχνευση αξιόπιστων βιοδεικτών και την ανάπτυξη καινοτόμων υπολογιστικών τεχνολογιών και θεραπευτικών στρατηγικών στη βάση της ιατρικής ακριβείας (BRAIN PRECISION, TAEDR-0535850)

ΤΙΤΛΟΣ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ: Ανοσοϊστοχημική ανάλυση τρωκτικών μετά από απενεργοποίηση νευρωνικών $\beta^*nAChRs$

ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 4: Ανάπτυξη κυτταρικών και ζωικών μοντέλων, καθώς και νέων βιοδεικτών για τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες Alzheimer και Parkinson.

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΖΗΣΙΜΟΠΟΥΛΟΥ (ΕΙΠ)

Ανοσοϊστοχημική ανάλυση τρωκτικών μετά από απενεργοποίηση νευρωνικών β*ηAChRs

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Μετά το πέρας των δύο μηνών τα ζώα θανατώθηκαν και απομονώθηκαν οι εγκεφαλοί τους καθώς και άλλοι ιστοί. Τομές 20 μm εκτελέστηκαν στον κρουστόμο για τους περισσότερους εγκεφάλους και χρησιμοποιούνται σε ιστοχημική και ανοσοϊστοχημική χρώση. Οι τομές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για να γίνει ανοσοανίχνευση, αρχικά, του Iba1, ώστε να ελεγχθεί πιθανή ενεργοποίηση της μικρογλοίας. Επίσης, τομές χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του βαθμού ενεργοποίησης των αστροκυττάρων με την ανοσοανίχνευση της GFAP. Επίσης, δοκιμάσαμε ανοσοϊστοχημεία για κασπάση-3, για να μελετήσουμε την πιθανότητα αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου σε τομές από ανοσοποιημένα ποντίκια με β2. Τέλος, μετρήθηκαν οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες σε διαφορετικές περιοχές εγκεφάλου των ανοσοποιημένων τρωκτικών. Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας καθώς και οι μακροσκοπικές παρατηρήσεις αποτελούν το στόχο του παραδοτέου «Ανοσοϊστοχημική ανάλυση τρωκτικών μετά από απενεργοποίηση νευρωνικών β*ηAChRs», το οποίο ολοκληρώθηκε τον Μ28.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ – ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΟΦΕΛΗ

Οι νευρικοί νικοτινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης (ηAChRs) διακρίνονται σε πολλούς υπότυπους και είναι ευρέως κατανομημένοι στο νευρικό σύστημα και σε αρκετούς μη-νευρικούς ιστούς. Ρυθμίζουν τη νευρωνική διεγερσιμότητα μέσω νευροδιαβιβαστών. Οι νευρικοί ηAChRs αποτελούν υποψήφια αυτοαντιγόνα στην αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα (AES), καθώς είναι σημαντικοί στη διανευρωνική επικοινωνία στον εγκεφαλο, ενώ γενετικές μεταλλάξεις τους έχουν συνδεθεί με τα βασικά συμπτώματα της AES. Επίσης, η δράση τους σχετίζεται με πολλές νευρολογικές ασθένειες όπως Πάρκινσον, Αλτσχάιμερ, αυτισμός κλπ.

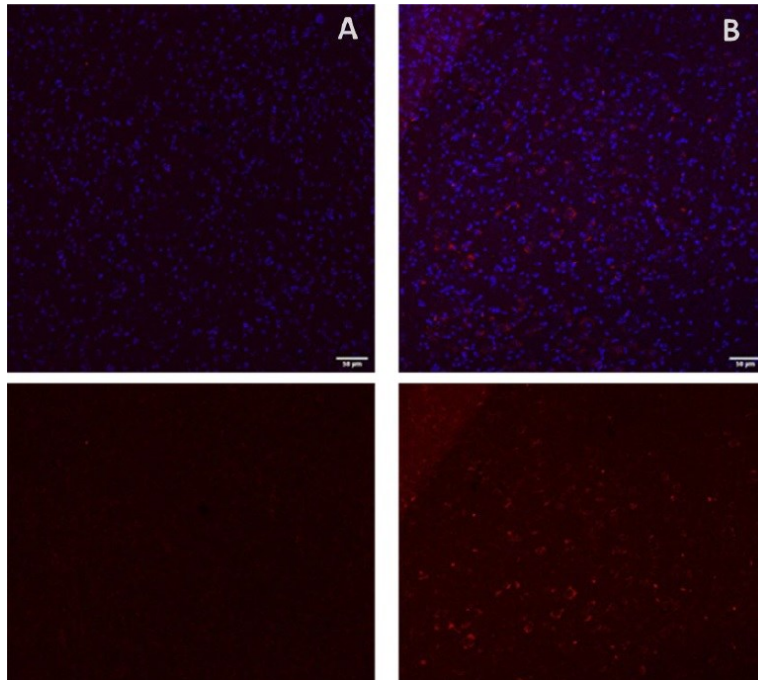
Για να μελετηθεί ο ρόλος αυτών των υπομονάδων, οι εξωκυτταρίες περιοχές (ΕΚΠ) των ανθρώπινων νευρικών υπομονάδων (α2-α7, α9 και β2-β4) εκφράστηκαν και απομονώθηκαν από *E. Coli*. Θηλυκά ποντίκια ηλικίας 6-8 εβδομάδων C57bl6 ανοσοποιήθηκαν υποδόρια με τις καθαρισμένες ανασυνδυασμένες υπομονάδες.

Μία ομάδα ποντικών (6 ζώα) ανοσοποιήθηκαν υποδόρια με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη (50 μg ανά ποντικό) και ενισχύθηκαν κάθε μήνα επί 5 μήνες. Η δεύτερη ομάδα (6 ζώα) έλαβε αποκλειστικά μόνο ανοσοενισχυτικό CFA. Η ομάδα ελέγχου περιλάμβανε 6 ποντίκια στα οποία δεν δόθηκε τίποτα. Μετά το τέλος του κύκλου ανοσοποίησης, υπήρξε μία περίοδος δύο μηνών αναμονής κατά την οποία έγινε συμπεριφορική ανάλυση των ζώων για τον εντοπισμό τυχόν νευρολογικών συμπτωμάτων, λόγω της δράσης των αντισωμάτων που αναπτύχθηκαν. Στη συνέχεια τα ποντίκια θυσιάστηκαν με εξάρθρωση του αυχένα. Τομές 20 μm ελήφθησαν σε κρουστόμο για τους περισσότερους εγκεφάλους και χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοϊστοχημική ανάλυση.

Λόγω των ευρημάτων στη συμπεριφορική ανάλυση, τα ποντίκια που είχαν ανοσοποιηθεί με τη β2 υπομονάδα, ελέγχθηκαν ως προς α) τη διατήρηση των ντοπαμινεργικών νευρώνων, β) την ενεργοποίηση μικρογλοίας, γ) των επιπέδων προφλεγμονωδών κυτταροκινών και δ) της δυσλειτουργίας αστροκυττάρων.

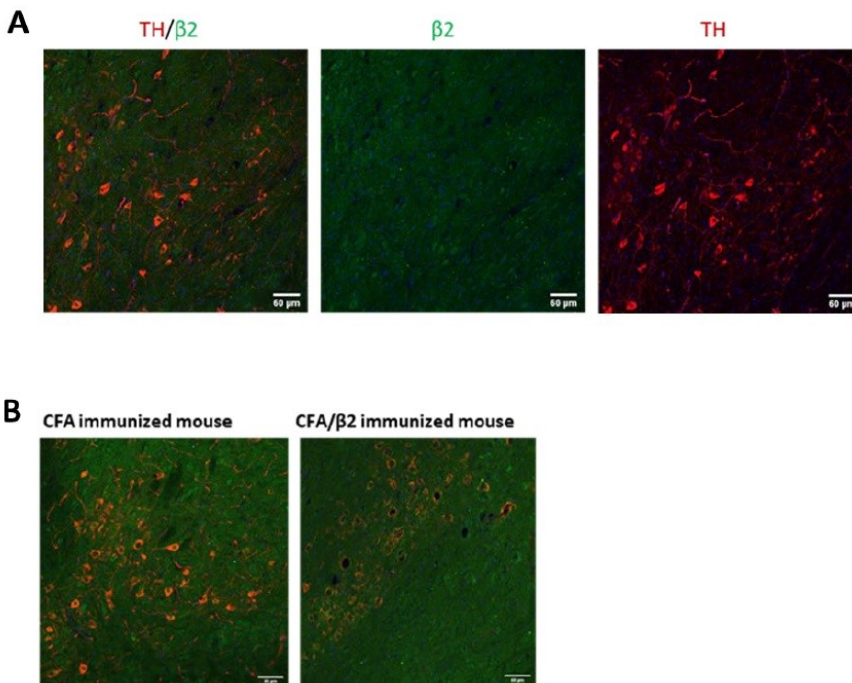
Η επίδραση της ανοσοποίησης με την υπομονάδα β2 σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες στη μέλαινα ουσία

Για να προσδιορίσουμε ποιες περιοχές του εγκεφάλου επηρεάστηκαν περισσότερο από τα β2 αντισώματα που παράγονται στα ποντίκια μετά από ανοσοποίηση, πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοϊστοχημείας. Οβελιαίες τομές εγκεφάλου επλάστηκαν, αρχικά, με ορό από τα β2 ανοσοποιημένα ποντίκια, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι τα αντισώματα που παράγονται *in vivo* στοχεύουν επιλεκτικά τους ενδογενείς β2 νικοτινικούς υποδοχείς και να προσδιοριστεί η θέση τους. Εντοπίστηκε ισχυρότερο σήμα στη μέλαινα ουσία (SN) όπως φαίνεται στην εικόνα 64. Ωστόσο, παρατηρήθηκε χαμηλό σήμα ένα στον ιππόκαμπο και στον θάλαμο.



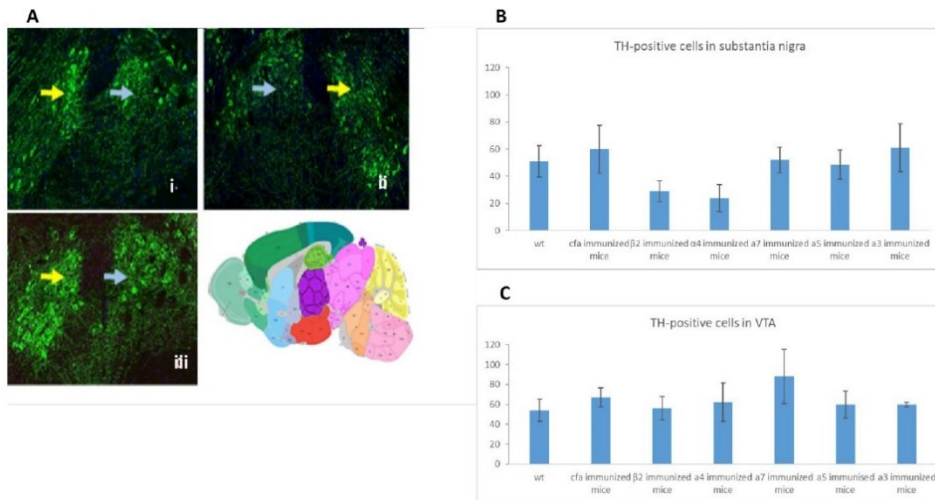
Εικόνα 64. Μικροσκοπία σάρωσης (confocal) από τομές εγκεφάλου πάχους 20μm που έχουν επωαστεί με *a.* δεύτερο αντίσωμα και *b.* ορό από ποντίκια που εμβολιάστηκαν με β2.

Στη συνέχεια έγινε χρώση σε τομές εγκεφάλων από ποντίκια όλων των ομάδων με αντίσωμα αντι-β2 και αντι-TH για να επαληθεύσουμε την ύπαρξη β2*-nAChRs σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες (Εικόνα 65). Είναι προφανές ότι οι νευρώνες στην SN συγχρωματίστηκαν και από τα δύο αντισώματα (Εικόνα 65A). Επιπλέον, το σήμα που παράγεται από τη χρώση των τμημάτων του εγκεφάλου των β2 ανοσοποιημένων ποντικών και από τα δύο αντισώματα είναι πραγματικά μειωμένο σε σύγκριση με τα ανοσοποιημένα με CFA ποντίκια (Εικόνα 65B).



Εικόνα 65. Μικροσκοπία σάρωσης (confocal) που δείχνουν την περιοχή SN ταυτόχρονα χρωματισμένη με αντίσωμα ποντικού κατά της TH και αντίσωμα κουνελιού κατά της β2 σε τομές από *A.* ποντίκια wt που αποκαλύπτουν συγχρωματισμό και *B.* ποντίκια με β2/CFA που δείχνουν μειωμένο χρωματισμό στην περιοχή SN σε σύγκριση με CFA.

Για να προσδιορίσουμε εάν η μειωμένη σωματική απόδοση των ποντικών που ανοσοποιήθηκαν με β2 συσχετίζεται με αλλοιώσεις στην ιστολογία των νευρώνων mDA, αξιολογήσαμε TH-θετικούς νευρώνες mDA στην SNpc και στην VTA. Παρατηρήθηκε μια άμεση μείωση στα TH-θετικά κύτταρα στην SNpc των β2 ανοσοποιημένων ποντικών αλλά όχι στην VTA (Εικόνα 66). Αυτό είναι σύμφωνο με τη μειωμένη σωματική τους δραστηριότητα, επειδή οι νευρώνες DA στην SN ρυθμίζουν κυρίως την κίνηση. Το γεγονός ότι υπάρχει μείωση των TH-θετικών DA νευρώνων μόνο στην SN συνεπάγεται μια πιθανή διαφορετική σύνθεση/έκφραση/εξειδίκευση της β2 υπομονάδας σε νικοτινικούς υποδοχείς ακετυλοχολίνης. Προκειμένου να διερευνηθεί εάν αυτή η μείωση είναι συνέπεια που προκαλείται από ειδικά αντισώματα έναντι ενδογενών nAChRs που περιέχουν β2 και εάν τα αντισώματα έναντι άλλων υπομονάδων έχουν το ίδιο αποτέλεσμα, προχωρήσαμε στη μέτρηση των θετικών TH νευρώνων σε τομές εγκεφάλου από ποντίκια που ανοσοποιήθηκαν με άλλες υπομονάδες ακολουθώντας το ίδιο πρωτόκολλο.



Εικόνα 66. Α. Μικροσκοπία σάρωσης (confocal) της περιοχής SN και VTA με β2/CFA (i), CFA (ii) και wt (iii) δείχνουν το μοτίβο ανοσοχρωματισμού της TH σε σαγματικές τομές. Οι μπλε βέλη υποδεικνύουν τα ντοπαμινεργικά νευρώνες στην περιοχή SN και τα κίτρινα βέλη τους στην περιοχή VTA των τομών του εγκεφάλου. **Β.** Ποσοτική ανάλυση του συνολικού

αριθμού TH+ νευρώνων στην SNpc. **Γ.** Ποσοτική ανάλυση του συνολικού αριθμού TH+ νευρώνων στην VTA.

Με βάση τα αποτελέσματα που φαίνονται στην Εικόνα 66 δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό των TH-θετικών κυττάρων εκτός από τα ποντίκια που ανοσοποιήθηκαν με β2 και α4. Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο να αναφερθεί ότι οι α4 ανοσοποιημένοι εγκεφαλοι ποντικών αποκάλυψαν αυξημένη μείωση του όγκου. Μια μικρή μείωση των HT-θετικών κυττάρων παρατηρήθηκε επίσης σε α5 ανοσοποιημένα ποντίκια.

Αυτά τα ευρήματα τεκμηριώνουν έναν νέο ρόλο για τους β2 νικοτινικούς υποδοχείς στη διατήρηση των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην SN. Οι μεσολιμβικοί ντοπαμινεργικοί νευρώνες, τα κυτταρικά σώματα των οποίων βρίσκονται δίπλα στην SNpc στην VTA, επηρεάζονται πολύ λιγότερο στην PD. Επομένως, προκειμένου να επαληθεύσουμε εάν έχουμε φαινόμενο παρόμοιο με την παθολογία Parkinson, αναζητήσαμε συσσώρευση συσσωματωμάτων α-syn σε SN ανοσοποιημένων β2 ποντικών, αλλά δεν παρατηρήσαμε τέτοια συσσωματώματα στο κυτταρόπλασμα των νευρώνων. Επιπλέον, δεν παρατηρήσαμε ειδική χρώση σωμάτων Lewy ή νευριτών Lewy με θειοφλαβίνη-S.

Αντιδραστική αστρογλοΐωση και μικρογλοΐωση σε μέλαινα ουσία β2 ανοσοποιημένων ποντικών.

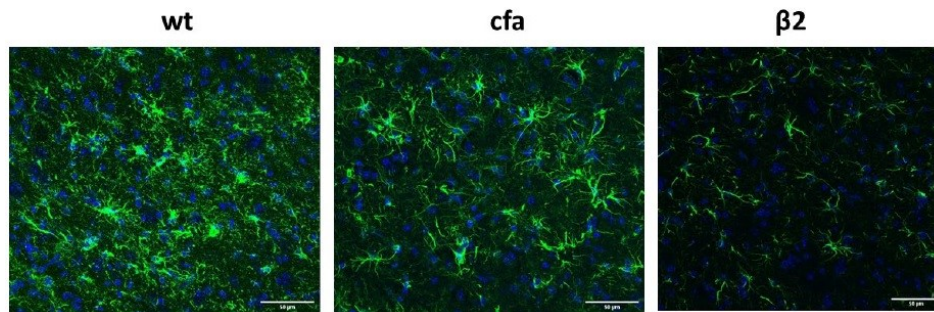
Η χρόνια νευροφλεγμονή συνδέεται σταθερά με νευρωνική βλάβη. Είναι ευρέως γνωστό ότι τα ενεργοποιημένα νευρογλοιακά κύτταρα απελευθερώνουν προφλεγμονώδεις και νευροτοξικούς παράγοντες που προκαλούν νευρωνική βλάβη και νευροεκφυλισμό. Πράγματι, η μικρογλοιακή ενεργοποίηση και τα αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως οι TNF-α, IL-1β και IL-6, παρατηρήθηκαν στην SN των ασθενών με PD, καθώς και σε ζωικά μοντέλα. Διάφορες μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι η φλεγμονή προάγει τον ντοπαμινεργικό νευροεκφυλισμό.

Γενικά, σε παθολογικές καταστάσεις, η συσσώρευση αντιδραστικών αστροκυττάρων ανιχνεύεται στον εγκεφαλο, ιδιαίτερα σε τραυματισμένες περιοχές. Αποτελέσματα από προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η φλεγμονώδης διαδικασία στην PD χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση της μόνιμης μικρογλοΐας χωρίς

αντιδραστική αστροκυττάρωση, υποδηλώνοντας ότι η προοδευτική απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων στην PD είναι μια συνεχιζόμενη νευροεκφυλιστική διαδικασία με ελάχιστη συμμετοχή του περιβάλλοντος νευρικού ιστού. Η απουσία αντιδραστικής αστροκυττάρωσης στην PD έρχεται σε αντίθεση με ό,τι ακολουθεί οποιαδήποτε άλλη νευρολογική διαταραχή και μπορεί να υποδεικνύει ότι η φλεγμονώδης διαδικασία στην PD είναι διαφορετική.

Τα ανοσοποιημένα ποντίκια με β2 εξετάστηκαν 2 μήνες μετά την ανοσοποίηση για νευροφλεγμονή στην SN με ποσοτικοποίηση θετικών κυττάρων Iba1/cd68. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά από τις ομάδες ελέγχου. Αυτό αποκαλύπτει ότι τα αντισώματα έναντι της β2 υπομονάδας των νικοτινικών υποδοχέων δεν προκάλεσαν αυξημένη αντιδραστική μικρογλοίωση.

Αναζητήσαμε τη συσσώρευση της GFAP, ενός αναγνωρισμένου δείκτη ενεργοποίησης αστροκυττάρων στα τμήματα του εγκεφάλου των ποντικών. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4, το ειδικό για την GFAP αντίσωμα χρωμάτισε μικρά ασθενή αστροκύτταρα στην SN και στο ραβδωτό σώμα. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε αύξηση των θετικών σε GFAP αστροκυττάρων στον ιππόκαμπο. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν μερικά σποραδικά μεγάλα θετικά σε GFAP αστροκύτταρα στον κινητικό/σωματοαισθητικό φλοιό.



Εικόνα 67: Αναπαραστατικές εικόνες φθορισμού της ενήλικης περιοχής SN, που έχουν ανοσοχρωματιστεί για την GFAP (πράσινη).

Συμπερασματικά, δεν ανιχνεύθηκε εμφανής αστρογλοίωση στα ανοσοποιημένα με β2/CFA ποντίκια. Μάλιστα, παρατηρήθηκε μείωση των αστροκυττάρων. Αυτό είναι σύμφωνο με ό,τι έχει βρεθεί σε εγκεφάλους PD και θα μπορούσε να αποτελεί ένδειξη δυσλειτουργίας αστροκυττάρων στα β2 ανοσοποιημένα ποντίκια.