



**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:** In vivo απεικόνιση των δυναμικών αλλαγών της μικρογλοίας σε συνθήκες νευροφλεγμονής απουσία της BIN1

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

**ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ):** ΔΗΜΗΤΡΑ ΘΩΜΑΪΔΟΥ (ΕΙΠ)

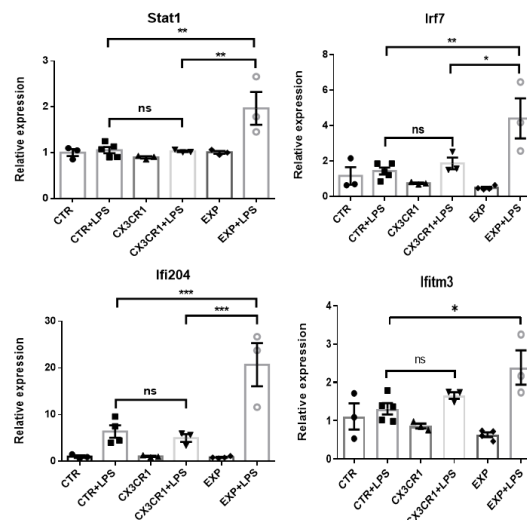
## Ιn vivo απεικόνιση των δυναμικών αλλαγών της μικρογλοίας σε συνθήκες νευροφλεγμονής απουσία της BIN1

### ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Έχει κατασκευαστεί μοντέλο διπλά διαγονιδιακών μυών που οδηγεί σε επαγόμενη απώλεια έκφρασης της πρωτεΐνης- κινδύνου εμφάνισης της σποραδικής νόσου Alzheimer BIN1 στα μικρογλοιακά κύτταρα, με στόχο τη μελέτη της συνεισφοράς της BIN1 στη μικρογλοιακή ενεργοποίηση κατά την εξέλιξη της νόσου. Στόχος της ΕΕ είναι η μελέτη της της φαινοτυπικής απόκρισης της ενεργοποιημένης μικρογλοίας απουσία της BIN1 σε συνθήκες συστημικής νευροφλεγμονής σε πραγματικό χρόνο με απεικόνιση του εγκεφάλου, έπειτα από συστημική χορήγηση της τοξίνης Lipopolysaccharide (LPS) στους διπλά διαγονιδιακού ποντικού Cx3CR1<sup>CRE-ERT</sup>//Bin1<sup>fl/fl</sup>.

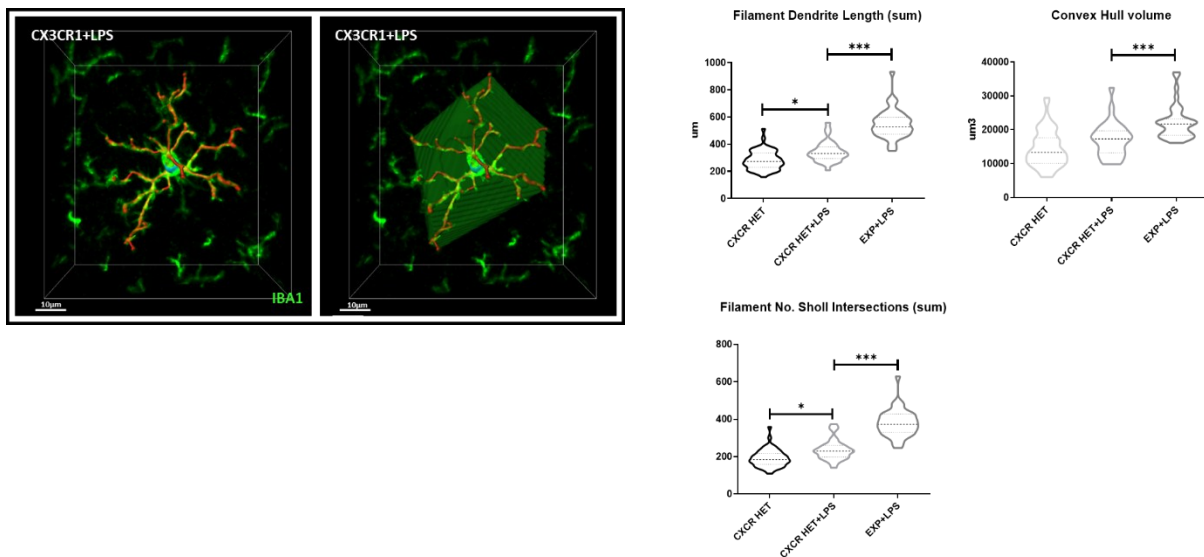
### ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ – ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΟΦΕΛΗ

Σε συνέχεια της ανάλυσης snRNA-Seq, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του μοριακού φαινοτύπου των μικρογλοιακών κυττάρων του εγκεφαλικού φλοιού και του ιπποκάμπου των διπλά διαγονιδιακών ζώων απουσία και παρουσία φλεγμονής με πειράματα real time RT-PCR, ανοσοφθορισμού και κυτταρομετρίας ροής, ώστε να εντοπισθούν αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών – δεικτών του μοριακού φαινοτύπου των μικρογλοιακών κυττάρων έπειτα από την αποσιώπηση του γονιδίου bin και την πρόκληση νευροφλεγμονής. Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήσαμε επίσης την ομάδα ελέγχου Cx3CR1 διαγονιδιακών ζώων παράλληλα με την αρχική ομάδα ελέγχου. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η αποσιώπηση του bin1 σε συνθήκες νευροφλεγμονής οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό (ki67, top2a), και την ελεγχόμενη από την IFN-1 απόκριση στη φλεγμονή (stat1, irf7, ifi204, iftm3) (**Εικόνα 35**). Επιπλέον, η αύξηση του ποσοστού των KI67<sup>+</sup> πολλαπλασιαζόμενων μικρογλοιακών κυττάρων πιστοποιήθηκε και μέσω πειραμάτων ανοσοϊστοχημείας, ενώ μελέτη του μοριακού φαινοτύπου της μικρογλοίας με κυτταρομετρία ροής και ανοσοϊστοχημεία έδειξε ότι η αποσιώπηση του bin1 σε συνθήκες φλεγμονής οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του μάρτυρα ενεργοποίησης της μικρογλοίας CD11c, καθώς και των πρωτεϊνικών επιπέδων του τελεστή του μονοπατιού IFN-1, Irf7 και της λυσωσομικής πρωτεΐνης-μάρτυρα φαγοκυτταρικής ενεργοποίησης CD68.



**Εικόνα 35.** Real time RT-PCR ανάλυση των επιπέδων έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη φλεγμονώδη απόκριση της μικρογλοίας μέσω ρύθμισης του μονοπατιού της ιντερφερόνης τύπου I (IFN type I). Η απώλεια του bin1 σε συνθήκες φλεγμονής οδηγεί σε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων Stat1, Irf7, Ifi204 και Iftm3.

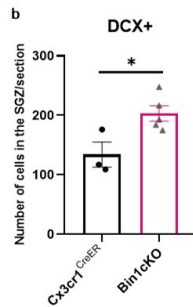
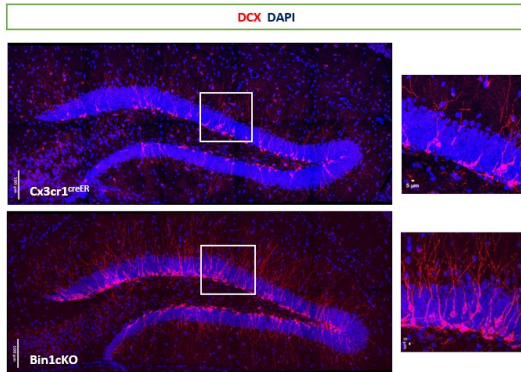
Επιπρόσθετα πραγματοποιήσαμε τρισδιάστατη απεικόνιση (3D-reconstruction) και μορφομετρική ανάλυση ενός κυττάρου (single cell morphometric analysis) της μικρογλοίας χρησιμοποιώντας το σύστημα ανάλυσης εικόνας Imaris, ώστε να ταυτοποιηθούν με ακρίβεια δυναμικές μορφολογικές αλλαγές που υφίσταται η μικρογλοία σε διαφορετικά στάδια της απόκρισής της στη φλεγμονή παρουσία ή απουσία του bin1. Η μέθοδος αυτή κρίθηκε καταλληλότερη από το 2-photon intravital imaging για την απεικόνιση της δυναμικής απόκρισης της μικρογλοίας, καθώς λόγω της μεγαλύτερης διακριτικής της ικανότητας επιτρέπει τον εντοπισμό και την μέτρηση σειράς παραμέτρων που σχετίζονται με τη μορφολογία της μικρογλοίας. Τα αποτελέσματά μορφομετρικής ανάλυσης έδειξαν ότι η αποσιώπηση του bin1 σε συνθήκες φλεγμονής οδηγεί σε μια δυναμική αλλαγή της μικρογλοίας προς έναν υπερ-διακλαδισμένο (hyper-ramnified) φαινότυπο, ο οποίος είναι ενδεικτικός των αρχικών σταδίων προ-φλεγμονώδους αντίδρασής της (**Εικόνα 36**).



**Εικόνα 36.** Μορφομετρική ανάλυση μικρογλοίας εγκεφαλικού φλοιού χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Imaris (V. 9.3.1.) Filament Tracer. A) Αντιπροσωπευτική εικόνα Iba1+ μικρογλοίας προερχόμενης από somatosensory φλοιό B) Η μορφομετρική ανάλυση της μικρογλοίας έδειξε ότι η απουσία του bin1 οδήγησε σε 65,47% αύξηση των απολήξεων, 33,54% αύξηση του συνολικού όγκου (convex hull volume) και 66,87% αύξηση στις διακλαδώσεις των απολήξεων (Filament Sholl intersections).

Συμπερασματικά τα ως τώρα δεδομένα μας φαινοτυπικής ανάλυσης της μικρογλοίας συνάδουν με τα αποτελέσματα ανάλυσης μεταγραφώματος και αποκαλύπτουν μια δυναμική κατάσταση της ενεργοποιημένης μικρογλοίας απουσία της BIN1 πρωτεΐνης, ενδεικτική προ φλεγμονώδους αντίδρασης κατά την οποία ενεργοποιείται το μονοπάτι της IFN1 καθώς και το φαγοκυτταρικό δυναμικό της. Η έντονη τοπική/χωρική ετερογένεια μεταξύ φλοιού και ιππόκαμπτου που αναδείχθηκε από τα πρωτεωμικά μας δεδομένα μας οδήγησε στη διερεύνηση, σε μεγαλύτερο βάθος, του φαινοτυπικού προφίλ των μικρογλοιακών κυττάρων του ιππόκαμπτου, καθώς και των σχετικών διακυτταρικών αλληλεπιδράσεών τους. Αρχικά, διαπιστώθηκε μειωμένο φαγοκυτταρικό δυναμικό της ιπποκαμπικής μικρογλοίας σε σύγκριση με εκείνη του φλοιού. Στη συνέχεια, εξετάστηκαν οι πιθανές επιδράσεις της μικρογλοίας στο νευρογενετικό δυναμικό της περιοχής. Απροσδόκητα, οι αναλύσεις μας αποκάλυψαν αυξημένα τα Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα (NBK) καθώς και τους νεοπαραγόμενους νευρώνες (νευροβλάστες) (**Εικόνα 37**) υποδεικνύοντας αυξημένη ενήλικη νευρογένεση στα πειραματόζωα με έλλειψη της μικρογλοιακής πρωτεΐνης Bin1, αναδεικνύοντας τον ρόλο της σε μη κυτταρικά αυτόνομες ρυθμιστικές διεργασίες.

Περαιτέρω, προκειμένου να διερευνηθούν οι υποκείμενοι μηχανισμοί της μικρογλοιακής αυτής ρύθμισης στα ενήλικα νευρικά βλαστικά κύτταρα (NBK), αναπτύχθηκε ένα *in vitro* σύστημα απάλειψης της Bin1 μέσω siRNA σε κύτταρα BV2. Το υπερκείμενο των καλλιιεργειών συλλέχθηκε και εφαρμόστηκε σε καλλιέργειες NBK, με τα προκαταρκτικά μας αποτελέσματα να αναπαράγουν πιστά τα αντίστοιχα *in vivo* ευρήματα. Τα μελλοντικά πειράματά μας προσανατολίζονται στην περαιτέρω εμβάθυνση στη διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων των μικρογλοιακών κυττάρων με άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς του εγκεφάλου, μέσω της συνδυαστικής ανάλυσης τόσο των δυναμικών κυτταρικών διεπαφών τους με χρήση *intravital imaging*, όσο και του εκκριτόματός τους, με στόχο την αποσαφήνιση των μοριακών και λειτουργικών μηχανισμών που διέπουν τη μικρογλοιακή ρύθμιση της εγκεφαλικής ομοιόστασης.



**Εικόνα 37:** Ανοσοϊστοχημική ανάλυση που δείχνει αυξημένο αριθμό νευροβλαστών του ιπποκάμπτου, βαμμένων με τον δείκτη *doublecortin* (DCX).