



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ

ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΓΛΟΙΑΣ
ΣΕ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ ΜΕ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ
ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΗΣ
ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ, ΑΡΟΕ, LDLR ΚΑΙ SR-BI**

ΠΑΓΩΝΑ ΚΑΡΒΟΥΝΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2018



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΓΛΟΙΑΣ
ΣΕ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ ΜΕ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ
ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΗΣ
ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ, ΑΡΟΕ, LDLR ΚΑΙ SR-BI**

ΠΑΓΩΝΑ ΚΑΡΒΟΥΝΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2018



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΕΝΤΡΟ ΒΑΣΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΓΛΟΙΑΣ
ΣΕ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ ΜΕ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ
ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΗΣ
ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ, ΑΡΟΕ, LDLR ΚΑΙ SR-BI**

ΠΑΓΩΝΑ ΚΑΡΒΟΥΝΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Αντώνης Σταματάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής
Βιολογίας-Βιολογίας Συμπεριφοράς, Τμήμα Νοσηλευτικής, ΕΚΠΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ: Σπύρος Γεωργόπουλος, Ερευνητής Β',
Κέντρο Βασικής Έρευνας, ΙΒΕΑΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Αντώνης Σταματάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας-Βιολογίας Συμπεριφοράς, Τμήμα Νοσηλευτικής, ΕΚΠΑ
- Σπύρος Γεωργόπουλος, Ερευνητής Β', Κέντρο Βασικής Έρευνας, ΙΒΕΑΑ
- Ουρανία Τσιτσιλώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανοσολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η μικρογλοία αποτελεί έναν ιδιαίτερο πληθυσμό κυττάρων με πληθώρα λειτουργιών στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Συγκεκριμένα έχουν κυρίαρχο ρόλο στην άμυνα του εγκεφάλου και αλληλεπιδρούν με νευρώνες, συνάψεις αλλά και με άλλα κύτταρα. Ως σημαντικοί ρυθμιστές της ομοιόστασης του εγκεφάλου εμπλέκονται και στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος του Alzheimer's.

Με δεδομένη την συμμετοχή της του μεταβολισμού της χοληστερόλης στη συγκεκριμένη νευροεκφυλιστική νόσο και την άμεση συσχέτιση της μορφολογίας των μικρογλοιακών κυττάρων με την λειτουργία τους, εξετάστηκε η επίδραση τριών παραγόντων του μεταβολισμού αυτού στην μορφολογία της μικρογλοίας. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν τα μόρια της απολιπορωτεΐνης E, του Scavenger Receptor- class B type 1 Low Density Lipoprotein Receptor. Για την μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακοί μύες με πλήρη ή μερική απουσία των μορίων αυτών και συγκρίθηκαν με αντίστοιχες ομάδες ελέγχου. Παρακάτω ακολουθεί η παρουσίαση των αποτελεσμάτων της εν λόγω μελέτης καθώς και των μεθόδων που ακολουθήθηκαν.

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης «Κλινική Βιοχημεία και Μοριακή Διαγνωστική» στο εργαστήριο Κυτταρικής Νευροβιολογίας του κέντρου Βασικής Έρευνας Ι του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών το Ακαδημαϊκό έτος 2017-2018 υπό την επίβλεψη του κ. Σπύρου Γεωργόπουλου, PhD, Ερευνητή Β' τον οποίο ευχαριστώ για την ευκαιρία να εκπονήσω τη διπλωματική μου στο εργαστήριό του και για τη συνεργασία μας. Ομοίως ευχαριστώ και τα έτερα δύο μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Αντώνη Σταματάκη και την αναπληρώτρια καθηγήτρια κα. Ουρανία Τσιτσιλώνη για την συνεργασία τους.

Ευχαριστώ θερμά όλους τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο για την συνεργασία μας και ιδιαίτερα τον Σπύρο Βασιλάτο- Λευτεράτο και την Νικολέτα Καλοβυρνά για την βοήθειά τους στην εκπόνηση της διπλωματικής μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους φίλους μου από το Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών για την βοήθεια και τη στήριξή τους όλο αυτό το διάστημα. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Θανάση Παπαγεωργίου, την Ματίνα Παπαγεωργίου, την Μαρίζα Διαμάντη και πάνω από όλα την οικογένειά μου για την απεριόριστη στήριξη και πίστη τους σε εμένα.

Περιεχόμενα

ΚΕΦ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	4
1.2 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	6
1.3 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΜΙΚΡΟΓΛΟΙΑΣ	9
1.3.1 ΡΟΛΟΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ	9
1.3.2 ΡΟΛΟΣ ΣΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	12
1.4 ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΙΚΡΟΓΛΟΙΑΣ ΣΕ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ.....	19
1.4.1 Διαφορές μεταξύ ανθρώπων και τρωκτικών	19
1.4.2 Διαφορές μεταξύ φύλων	20
1.5 ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΓΛΟΙΑΣ	20
1.6 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	23
1.7 ΜΙΚΡΟΓΛΟΙΑ ΣΤΟ ALZHEIMER'S.....	25
1.8 ΤΟ PRIMING ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΓΛΟΙΑΣ.....	27
1.9 ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	28
1.9.1 Η απολιποπρωτεΐνη E.....	29
1.9.2 Απολιποπρωτεΐνες στη νόσο Alzheimer's.....	30
1.10 SCAVENGER RECEPTOR CLASS B- TYPE I.....	31
1.10.1 Ο SR-BI στη νόσο Alzheimer's	34
1.11 LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR.....	34
1.11.1 Ο LDLR στη νόσο Alzheimer's	36
1.12 ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ	37
1.12.1 Ορισμός	37
1.12.2 Κατασκευή διαγονιδιακών μυών με μικροένεση	38
1.12.3 Γονιδιακά στοχευμένοι μύες.....	39
1.12.4 Στοχευμένη αδρανοποίηση γονιδίων.....	40

1.13 ΜΟΝΤΕΛΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΜΥΩΝ	41
1.13.1 APOE knockout.....	41
1.13.2 SR-BI knockout	42
1.13.3 LDLR knockout.....	43
1.13.4 CX3CR1 GFP.....	44
1.14 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	45
ΚΕΦ. 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	47
2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ	47
2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΒΙΟΨΙΕΣ ΟΥΡΑΣ	47
2.4 ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΥΩΝ ΜΕ PCR.....	50
2.4.3 Εφαρμογή της τεχνικής PCR στο εργαστήριο.....	51
2.4.4 Συνθήκες εκτέλεσης της αντίδρασης.....	52
2.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR	59
2.9 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΟ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ IMARIS.....	68
2.10 ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΙΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ	70
ΚΕΦ. 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	71
3.1 Η απαλοιφή του LDLR γονιδίου επηρεάζει τον φαινότυπο των μικρογλοιακών κυττάρων στον ιππόκαμπο	71
3.2 Η απαλοιφή του SR-BI γονιδίου επηρεάζει τον φαινότυπο των μικρογλοιακών κυττάρων στον ιππόκαμπο	72
3.3 Η απαλοιφή του ApoE γονιδίου δεν επηρεάζει τον φαινότυπο των μικρογλοιακών κυττάρων στον ιππόκαμπο	73
3.4 Η απαλοιφή ενός αντιγράφου του SR-BI γονιδίου δεν επηρεάζει τον φαινότυπο των μικρογλοιακών κυττάρων στον ιππόκαμπο	74
3.5 Η απαλοιφή του LDLR γονιδίου δεν επηρεάζει τον φαινότυπο των μικρογλοιακών κυττάρων στον φλοιό.....	75
3.6 Η απαλοιφή του SR-BI γονιδίου επηρεάζει τον φαινότυπο των μικρογλοιακών κυττάρων στον φλοιό.....	76

3.7 Η απαλοιφή του ApoE γονιδίου δεν επηρεάζει τον φαινότυπο των μικρογλοιακών κυττάρων στον φλοιό.....	77
3.8 Η απαλοιφή ενός αντιγράφου του SR-BI γονιδίου δεν επηρεάζει τον φαινότυπο των μικρογλοιακών κυττάρων στον φλοιό.....	78
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	80
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	99
ABSTRACT	100

ΚΕΦ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Ο εγκέφαλος και η σπονδυλική στήλη αποτελούν ένα απομονωμένο σύστημα του οργανισμού και ως τέτοιο, έχουν στην διάθεση τους έναν πληθυσμό ειδικών κυττάρων για την λειτουργία τους. Τα κύτταρα αυτά χωρίζονται σε νευρωνικά και μη-νευρωνικά, με αναλογία σχεδόν 1:1 στον εγκέφαλο και συνολικό πληθυσμό περίπου 250 δις. Τα μη-νευρωνικά κύτταρα ονομάζονται γλοιακά κύτταρα ή νευρογλοία και περιλαμβάνουν τα ολιγοδενδροκύτταρα, τα αστροκύτταρα, τα επενδυματικά κύτταρα και τη μικρογλοία στο κεντρικό νευρικό σύστημα, και τα δορυφορικά και Schwann κύτταρα στο περιφερικό νευρικό σύστημα.[1]

Το ταξίδι της ανακάλυψης των μικρογλοιακών κυττάρων ξεκίνησε στα μέσα του 19^{ου} αιώνα με την εισαγωγή του όρου ‘νευρογλοία’ (‘Nervenkitt’, που σημαίνει κόλλα των νευρών) από τον Rudolph Virchow το 1856. Η νευρογλοία αποτελούταν από μεσοδερμικό συνδετικό ιστό, τη διάμεση ουσία, πιθανότατα ακυτταρικής προέλευσης, της οποίας η βασική λειτουργία ήταν να γεμίσει τα κενά ανάμεσα στους νευρώνες και να τους συγκρατεί μαζί. [2] Στις αρχές του 1870 έγινε μια μεγάλη ανακάλυψη στο πεδίο της νευρογλοίας, από τον Camillo Golgi και την διάσημη ‘Μαύρη Αντίδραση’ του, με τη χρήση νιτρικού αργύρου. Με τις βαμμένες τομές παραφίνης που δημιούργησε και την παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο, κατάφερε να δει για πρώτη φορά ολόκληρο τον νευρωνικό και νευρογλοιακό ιστό βαμμένο μαύρο, σε αντίθεση με ένα ανοιχτό κίτρινο υπόβαθρο. Παρόλο που η χρώση δεν επέτρεπε τη διαφοροποίηση μεταξύ νευρώνων και νευρογλοίας, του επέτρεψε να αποκτήσει τις καλύτερες εικόνες των ιστών μέχρι εκείνη την εποχή. Το πείραμα αυτό έκανε τον Golgi τον πρώτο ερευνητή που έδειξε ότι τα γλοιακά κύτταρα είναι διαφορετικός πληθυσμός από τους νευρώνες.

Το 1913, ο Cajal παρουσίασε μια βελτιωμένη τεχνική, με χρώση χλωριούχου χρυσού, η οποία ενίσχυσε σημαντικά την μικροσκοπική απεικόνιση ειδικά των νευρογλοιακών κυττάρων, στο οπτικό μικροσκόπιο. Με τη χρήση της χρώσης χλωριούχου χρυσού και αποκλειστικά με βάση την μικροσκοπική απεικόνιση, ο Cajal παρατήρησε έναν καινούργιο τύπο κυττάρων τα οποία περιέγραψε ως ‘σωματίδια χωρίς αποφυάδες’ και έτσι διαχώρισε ακόμα πιο ξεκάθαρα τον καινούργιο πληθυσμό κυττάρων από τους

νευρώνες και την αστρογλοία. [2]–[4] Οι Camillo Golgi και Santiago Ramon y Cajal ήταν εξαιρετικοί παθολόγοι και η συμβολή τους στην επιστήμη ήταν τόσο σημαντική, που τους χάρισε το Νόμπελ Ιατρικής και Φυσιολογίας το 1906.[5] Ο Rio Hortega, μαθητής του Ramon y Cajal, είχε μάθει τις τεχνικές χρώσης των Golgi, Cajal και άλλων, και δημιούργησε και μια δική του μέθοδο, εξέλιξη της χρώσης αμμωνιακού αργύρου που υπήρχε ήδη.[4] Η προσέγγιση αυτή του επέτρεψε να βάψει επιλεκτικά τα μικρογλοιακά κύτταρα και να απεικονίσει εξαιρετικά τα γλοιακά κύτταρα στο οπτικό μικροσκόπιο. Χρησιμοποιώντας τη διάσημη χρώση του με άργυρο-ανθρακικά άλατα, κατάφερε να χαρακτηρίσει σε βάθος την μορφολογία δύο διακριτών κυτταρικών πληθυσμών, τα οποία ονόμασε μικρογλοιακά και διάμεσα κύτταρα. Αργότερα, ο ίδιος μετονόμασε τα διάμεσα κύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα.[2] Ο Rio Hortega αποτελεί μια από τις σημαντικότερες φιγούρες στη μελέτη της μικρογλοίας, καθώς οι διορατικές μελέτες και οι τεχνικές του έστρωσαν το δρόμο για πολλές μεταγενέστερες ανακαλύψεις, ενώ ταυτόχρονα οι παρατηρήσεις του παραμένουν καίριες.

Μια καινούργια εποχή στη μελέτη της μικρογλοίας ξεκίνησε τη δεκαετία του '60, όταν ο George Kreutzberg το 1968 ανακάλυψε ότι η ενεργοποιημένη μικρογλοία αλληλεπιδρά φυσικώς με τους νευρώνες απομακρύνοντας **συναπτικές εισόδους**. Αυτή η ιδιότητα, γνωστή ως 'συναπτική απογύμνωση' (Synaptic stripping), περιγράφηκε περισσότερο αργότερα, με τη βοήθεια της 3D μικροσκοπίας.[5], [6] Τα ευρήματα αυτά αποκάλυψαν για πρώτη φορά έναν πιθανό νευροπροστατευτικό ρόλο της μικρογλοίας στη νευρωνική αναγέννηση. [7], [8]

Ειδικά για τη μελέτη των μικρογλοιακών κυττάρων ήταν απαραίτητο να μπορούν οι ερευνητές να διαχωρίσουν τα μικρογλοιακά κύτταρα από τα μονοκυτταρικής προέλευσης μακροφάγα του εγκεφάλου, καθότι οι δείκτες αυτών των δυο πληθυσμών είναι κοινοί. Το 1991, ο Jonathon Sedgwick πρότεινε έναν ανοσοφαινοτυπικό διαχωρισμό μέσω ενεργοποιούμενης με φθορισμό κυτταρικής διαλογής (Fluorescence activated cell sorting- FACS) για τη διάκριση μεταξύ της μικρογλοίας του παρεγχύματος ($CD11b^+CD45^{low}$) και άλλων μακροφάγων του ΚΝΣ ($CD11b^+CD45^{high}$). Η σημασία αυτής της μεθόδου ήταν μεγάλη γιατί επέτρεψε για πρώτη φορά τη στόχευση της μικρογλοίας στο βιολογικό της περιβάλλον.[9] Λίγο αργότερα, ανακαλύπτεται το μόριο Iba1 (Ionized binding calcium adaptor molecule 1) το οποίο εκφράζεται από μονοπύρηνα φαγοκύτταρα, και μέσα στο ΚΝΣ από τα μικρογλοιακά κύτταρα. Το μόριο Iba1 έχει ανιχνευθεί σε όλες τις μορφολογικές και λειτουργικές καταστάσεις της μικρογλοίας, σε ανθρώπους και τρωκτικά, και από τότε χρησιμοποιείται ευρέως ως

μικρογλοιακός δείκτης σε *in vitro* και *in vivo* τεχνικές. [10], [11] Παρόλα αυτά, πρόσφατες μελέτες προφίλ έκφρασης έδειξαν ότι το Iba1 εκφράζεται στο ΚΝΣ και από τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα, καθιστώντας έτσι δύσκολο τον διαχωρισμό μεταξύ διηθητικών μακροφάγων και μικρογλοίας του ΚΝΣ.[5], [12]

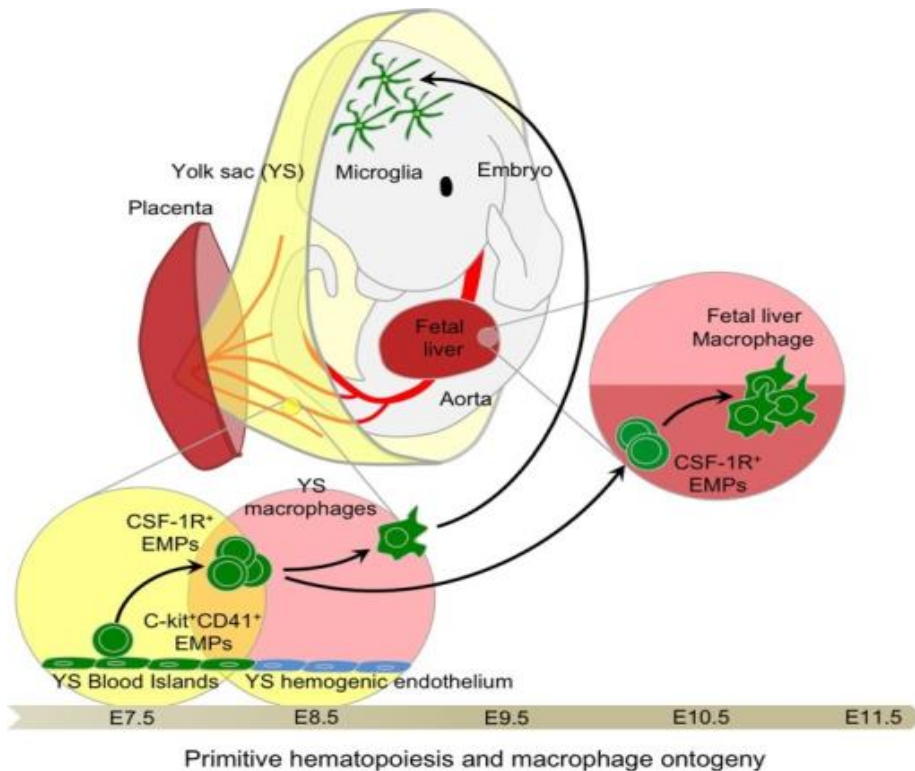
1.2 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ

Ο καθορισμός της προέλευσης της μικρογλοίας απασχόλησε γενιές ερευνητών και αποτέλεσε θέμα συζήτησης για πολλά χρόνια. Αν και κάποιοι επιστήμονες υποστήριζαν την μεσοδερμική προέλευση της μικρογλοίας, η κυρίαρχη πεποίθηση εκείνο τον καιρό ήταν πως όλα τα γλοιακά κύτταρα προέρχονται από το εξώδερμα.[2] Αργότερα, τα αποτελέσματα δύο σημαντικών εργασιών το 1996 και το 2006 καθιέρωσαν πέρα από κάθε αμφιβολία την μυελοειδή φύση της μικρογλοίας και παράλληλα υπέδειξαν και την οντογενετική συγγένεια της μικρογλοίας με τα μακροφάγα. [13], [14] Συνολικά, οι μελέτες έδειξαν ότι η μικρογλοία προέρχεται από εμβρυϊκά πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα τα οποία αποικίζουν το ΚΝΣ πριν τη γέννηση και κυριότερα πριν την αρχή της αιμοποίησης του μυελού των οστών. Ακόμα και με αυτά τα αποτελέσματα, παρέμενε άγνωστο από ποιόν ιστό και ποια κυτταρική σειρά προέρχονται τα κύτταρα που αποικίζουν το ΚΝΣ και δίνουν τελικά τη μικρογλοία.[15]

Αρκετές μελέτες οι οποίες χρησιμοποίησαν τεχνικές ώστε να παρακολουθήσουν την εξέλιξη των κυττάρων, κατέληξαν στο ότι η κύρια πηγή της μικρογλοίας είναι τα αρχέγονα μακροφάγα του λεκιθικού ασκού, ενώ το ήπαρ που είναι υπεύθυνο για την δημιουργία των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων δεν συμβάλλει στη δημιουργία της μικρογλοίας.

Η αποίκηση του ΚΝΣ από τα μακροφάγα του λεκιθικού ασκού απαιτεί την ύπαρξη κανονικής κυκλοφορίας του αίματος. Ο *de novo* σχηματισμός και αναδιαμόρφωση των αιμοφόρων αγγείων στα έμβρυα μυών συμβαίνει μεταξύ της E8 και E10. [16] Περί την E7, πρόδρομοι αιμοποιητικών και ενδοθηλιακών κυττάρων που εκφράζουν υποδοχείς για αγγειακούς ενδοθηλιακούς αυξητικούς παράγοντες μεταναστεύουν από την πρωτόγονη αύλακα στον εγγύτατο λεκιθικό ασκό και σχηματίζουν τις αιμοποιητικές νησίδες. (Εικόνα 1) Εκεί εδρεύουν τα *c-kit*⁺ ερυθρομυελοειδικά κύτταρα που αποτελούν μικρογλοιακούς προγόνους.[17] Τα πρόδρομα κύτταρα του λεκιθικού ασκού ωριμάζουν

από A1 ($CD45^+c\text{-kit}^{lo}CX3CR1^{\text{F4/80}^-}$) σε A2 ($CD45^+c\text{-kit}^{\text{CX3CR1}^{\text{F4/80}^{hi}}$) αμοιβαδοειδή μακροφάγα στις αιμοποιητικές νησίδες και το κεφαλικό μεσέγγυμα, πριν αποκτήσουν φαινότυπο ώριμων μακροφάγων στο νευροεπιθήλιο την E10.5.[18], [19] Χαρτογράφηση της πορείας των αιμοποιητικών προδρόμων που φέρουν τον μεταγραφικό παράγοντα Runx1 μεταξύ των ημερών E6.5 και E10.5, έδειξε ότι η μικρογλοία του λεκιθικού ασκού εντοπίζεται συγκεκριμένα τις ημέρες E7 με E7.5.[20]



Εικόνα 1 Προέλευση μικρογλοίας και μακροφάγων από τον λεκιθικό ασκό

Τα μικρογλοιακά κύτταρα εισέρχονται στον εγκέφαλο μέσω των λεπτομηνίγγων και των πλευρικών κοιλιών μέχρι την E9.5 και κατανέμονται σε όλο το φλοιώδες τοίχωμα και προς τις δύο κατευθύνσεις με διαφορετικές ταχύτητες και κυμαινόμενες αναλογίες πολλαπλασιασμού και ωρίμανσης, ανάλογα με την περιοχή και το στάδιο της ανάπτυξης.[20] Η αυξανόμενη κάλυψη του ΚΝΣ από αμοιβαδοειδή μακροφάγα που εξελίσσονται σε διακλαδισμένη μικρογλοία είναι δυνατή χάρις τον γρήγορο πολλαπλασιασμό του 40-80% του πληθυσμού τους μεταξύ της E10.5 και της ημέρας γέννησης.[17]

Στον άνθρωπο η αμοιβαδοειδής μικρογλοία εισβάλλει στον αναπτυσσόμενο

εγκεφαλικό φλοιό στις 4.5 εβδομάδες της κύησης μέσω της χοριοειδούς επιφάνειας, των κοιλιοτήτων και του χοριοειδούς πλέγματος.[21], [22] Παράλληλα παρατηρήθηκε ακτινωτή και εφαπτόμενη μετανάστευση της μικρογλοίας προς την λευκή ουσία, τα υποστρώματα και τα στρώματα του φλοιού. Ένα δεύτερο κύμα εισβολής της μικρογλοίας μέσω του αγγειακού συστήματος, τη 12-13 εβδομάδα της κύησης, περιορίζεται στη λευκή ουσία. Η διακλαδισμένη μορφή της μικρογλοίας μπορεί να χρειαστεί ακόμα και 22 εβδομάδες για να κατανεμηθεί ευρέως στην ενδιάμεση ζώνη του εγκεφάλου.[23], [24] Μόνο κοντά στο τέλος της κύησης, στις 35 εβδομάδες, μπορεί να ανιχνευθεί πλήρως διαφοροποιημένη μικρογλοία. [25]

Στους μύες, τις δύο πρώτες εβδομάδες μετά τη γέννηση ο αριθμός των μικρογλοιακών κυττάρων αυξάνεται και ύστερα ακολουθεί μια βαθμιδωτή μείωση της τάξης του 50% από την 3^η ως την 6^η εβδομάδα, μετά την οποία η πυκνότητα της μικρογλοίας σταθεροποιείται.[26]

Αρκετές δημοσιεύσεις έχουν αποκλείσει την συνεισφορά της οριστικής αιμοποίησης στη μικρογλοία του εγκεφάλου χρησιμοποιώντας ειδική στόχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων, ενώ βρήκαν πως παρόλο που τα μονοκύτταρα μπορούν να στρατολογηθούν στον νεογνικό και ενήλικο εγκέφαλο και να διαφοροποιηθούν σε μικρογλοία, αυτό συμβαίνει μόνο σε περιπτώσεις φλεγμονής και τα κύτταρα αυτά έχουν διαφορετικό φαινότυπο από την ενδογενή μικρογλοία. [16]

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η καταγωγή της μικρογλοίας από τον λεκιθικό ασκό διατηρείται στα διάφορα είδη όπως φαίνεται από μελέτες σε zebrafish και πτηνά. [27], [28] Αυτό που διαφέρει στους μύες είναι η απαραίτητη ύπαρξη λειτουργικού κυκλοφορικού συστήματος για τον σωστό διασκορπισμό των κυττάρων του λεκιθικού ασκού στο έμβρυο. Το συνολικό συμπέρασμα αυτών των μελετών σε τρωκτικά, ανθρώπους και άλλα είδη, είναι ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα προέρχονται από μακροφάγα του λεκιθικού ασκού τα οποία αποικίζουν τον εγκέφαλο από τα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Βέβαια οι μελέτες αυτές δεν αποκλείουν την ύπαρξη ακόμα πιο πρώιμων κυτταρικών προγόνων της μικρογλοίας οι οποίοι μπορεί να ανακαλυφθούν στο μέλλον.[16]

1.3 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΜΙΚΡΟΓΛΟΙΑΣ

1.3.1 ΡΟΛΟΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Καθώς τα πρώτα πρόδρομα μικρογλοιακά κύτταρα εισέρχονται στο νευροεξώδερμα, γεννιούνται οι πρώτοι νευρώνες στο ΚΝΣ του μυ.[29] Υπάρχουν επίσης αποδείξεις ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα εμφανίζονται σε ορισμένες περιοχές του ΚΝΣ με την έναρξη λειτουργικών νευρωνικών δικτύων.[30] Η συσχέτιση αυτή μπορεί να υποδεικνύει ότι κατά την ανάπτυξη των νευρώνων και τον σχηματισμό νευρωνικών δικτύων απαιτείται η ύπαρξη μικρογλοίας στο αναπτυσσόμενο νευροεξώδερμα. Φαίνεται πως η μικρογλοία έχει αρκετές λειτουργίες στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο και χρησιμεύει ιδιαίτερα ως ‘αρχιτέκτονας’, ενορχηστρώνοντας και συντονίζοντας την σχεδίαση και την «καλωδίωση» του ΚΝΣ. Τέσσερις κύριες λειτουργίες των κυττάρων αυτών είναι η φαγοκυττάρωση νεκρών κυττάρων, η στήριξη αναπτυσσόμενων νευρώνων, η καθοδήγηση για την ανάπτυξη αγγείων και η υποστήριξη και βελτίωση της ανάπτυξης νευρωνικών δικτύων, μέσω του «συναπτικού κλαδέματος».[31]

Φαγοκυττάρωση: Η μικρογλοία παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση αποπτωτικών νευρώνων από το αναπτυσσόμενο ΚΝΣ. Σε μερικές περιοχές του εγκεφάλου μέχρι και οι μισοί νευρώνες που γεννιούνται κατά την ανάπτυξη υπάγονται σε απόπτωση πριν από την ενηλικίωση.[32], [33] Τα μικρογλοιακά κύτταρα βρίσκονται σε κοντινή απόσταση από τους αποπτωτικούς νευρώνες στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο, όπου απομακρύνουν τα θραύσματα της απόπτωσης αλλά επίσης υπάγουν και προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Τα μικρογλοιακά κύτταρα επάγουν την απόπτωση στα Purkinje κύτταρα της παρεγκεφαλίδας, αλλά και σε άλλες περιοχές όπως ο ιππόκαμπος, μέσω της απελευθέρωσης ιόντων υπεροξειδίου, παρόμοια με τις αναπνευστικές εκρήξεις που παρατηρούνται στα ουδετερόφιλα.[31] Η απελευθέρωση των ιόντων υπεροξειδίου επάγεται από την ιντεγκρίνη CD11b και την πρωτεΐνη DAP12 μετά την αλληλεπίδραση της μικρογλοίας με τον νευρώνα-στόχο.[34] Η DAP12 και ο υποδοχέας της TREM2, έχειδειχθεί ότι υπάγουν την απομάκρυνση αποπτωτικών νευρώνων in vitro, το οποίο υποδεικνύει ότι η μικρογλοία έχει σημαντικό ρόλο στην εξαφάνιση των νευρώνων αυτών κατά την ανάπτυξη, χωρίς όμως να προκαλεί

φλεγμονή.[35], [36] Αξίζει να σημειωθεί ότι σε μυς χωρίς μικρογλοία λόγω αφαίρεσης του παράγοντα Csf1r, δεν έχει βρεθεί σοβαρή έλλειψη στην απομάκρυνση αποπτωτικών νευρώνων κατά την ανάπτυξη, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η συγκεκριμένη λειτουργία επιτελείται και από άλλα κύτταρα εκτός από τα μικρογλοιακά. [31]

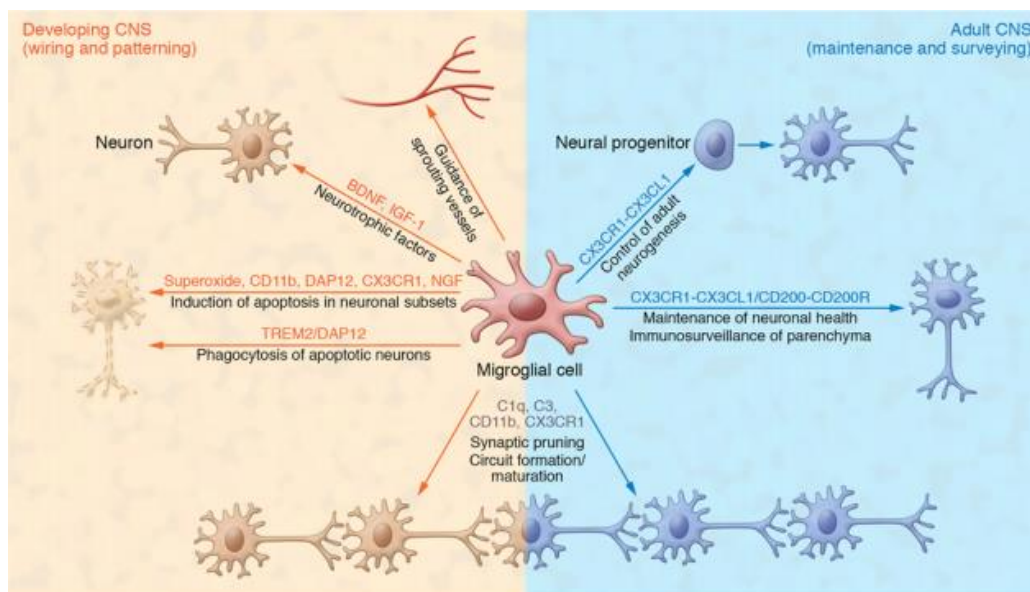
Στήριξη των αναπτυσσόμενων νευρώνων: Εκτός από την απομάκρυνση αδρανών νευρώνων, η μικρογλοία επίσης υποστηρίζει και προωθεί την επιβίωση των νευρώνων στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ μέσω της έκκρισης διάφορων νευροτροφικών παραγόντων. Η μικρογλοία είναι κρίσιμης σημασίας για την επιβίωση των νευρώνων του φλοιώδους στρώματος V κατά την μεταγεννητική ανάπτυξη, καθώς έχει φανεί ότι η διαγραφή της μειώνει σημαντικά την βιωσιμότητα των νευρώνων αυτής της περιοχής. Επίσης, έκκριση του παράγοντα IGF-1 (insulin-like growth factor 1) από τα μικρογλοιακά κύτταρα λειτουργεί ως μεσολαβητής στήριξης για τους νευρώνες του στρώματος V κατά την ανάπτυξη.[31] Φαίνεται πως η μικρογλοία εμπλέκεται στην επαγωγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου μέσω της απελευθέρωσης νευροτροφινών. [37] Μερικές in vitro μελέτες για την επίδραση των εκκρινόμενων παραγόντων από τη μικρογλοία στην επιβίωση των νευρώνων, έδειξαν ότι μπορεί να υπάρχει μια ποικιλία παραγόντων που μπορεί να προωθεί ή να μειώνει τη νευρωνική επιβίωση κατά την ανάπτυξη. Επιπλέον, τα μικρογλοιακά κύτταρα εμπλέκονται και στον έλεγχο του μεγέθους που θα έχει η δεξαμενή των νευρικών προδρόμων στην υποκοιλιακή ζώνη, εξαλείφοντας τα TBR2⁺ (T-box brain protein 2-positive) και Pax6⁺ (paired box protein 6-positive) πρόδρομα νευρικά κύτταρα.[38] Ακόμη ένας παράγοντας που επηρεάζει τον αριθμό των νευρικών προγονικών κυττάρων είναι η ενεργοποίηση της μικρογλοίας από LPS (Lipopolysaccharide) ή η απενεργοποίησή της από δοξυκυκλίνη ή προγεστερόνη.[38], [39] Η υπερενεργοποίηση της μικρογλοίας οδηγεί σε μειωμένο αριθμό προγονικών κυττάρων και λέπτυνση της υποκοιλιακής ζώνης, ενώ μείωση της μικρογλοιακής δραστηριότητας οδηγεί σε αυξημένο αριθμό των προγονικών κυττάρων.[40] Φαίνεται λοιπόν ότι η μικρογλοία συμβάλλει σημαντικά στον καθορισμό του σωστού αριθμού νευρώνων ρυθμίζοντας τον κυτταρικό θάνατο και την επιβίωση με τρόπο τοποειδικό, μέσω σημάτων απόπτωσης και επιβίωσης.

Καθοδήγηση του αναπτυσσόμενου αγγειακού συστήματος: Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ΚΝΣ από λίγα στρώματα νευρώνων σε δισεκατομμύρια νευρώνες οργανωμένους σε δίκτυα σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, συμβαίνει άλλο ένα πολύ σημαντικό γεγονός. Αυτό δεν είναι άλλο από την δημιουργία αγγειακού συστήματος στον εγκέφαλο, το οποίο θα παρέχει οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για την διαδικασία αυτή. Η ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων στο νευροεξώδερμα ξεκινάει περίπου την E10, λίγο μετά την είσοδο των μικρογλοιακών προγόνων στο ΚΝΣ.[41] Τα μικρογλοιακά κύτταρα στο εμβρυικό νευροεξώδερμα έχουν σημαντική θέση, καθώς εξυπηρετούν στην δικτύωση των αγγείων συνδέοντας τα αναπτυσσόμενα αγγεία. Στα ποντίκια και τα zebrafish η μικρογλοία προωθεί τη διακλάδωση των αιμοφόρων αγγείων που αναπτύσσονται και μείωσή της οδηγεί σε μείωση των αγγειακών σημείων διακλάδωσης.[42] Σε άλλη μελέτη, η ανάπτυξη και η πυκνότητα των αγγείων μειώθηκαν μετά την απαλοιφή της μικρογλοίας, γεγονός που διορθώθηκε μετά από ενδοϋαλώδη ένεση μικρογλοίας.[43] Τέλος, τα μικρογλοιακά κύτταρα οδηγούν την άκρη του αναπτυσσόμενου αγγείου όχι με άμεση επαφή, αλλά με έκκριση διαλυτών παραγόντων καθοδήγησης που επιτυγχάνεται με δικατευθυνόμενη επικοινωνία μεταξύ του αγγείου και της μικρογλοίας.[44]

Ωρίμανση και βελτίωση νευρωνικών δικτύων: Πρόσφατα φάνηκε ότι η μικρογλοία έχει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση και τον σχηματισμό νευρωνικών δικτύων, ειδικά κατά την μεταγεννητική ανάπτυξη. Δεδομένα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας αποκάλυψαν ότι η μικρογλοία στο υγιές ΚΝΣ είναι σε συνεχή επαφή με νευρωνικά και αστροκυτταρικά στοιχεία και έτσι υποτέθηκε ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα βρίσκονται κοντά στις συνάψεις στον υγιή εγκέφαλο.[45], [46] Επίσης δείχθηκε ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα έχουν άμεση επαφή με προ- και μετασυναπτικές δομές και επικοινωνούν για 4-5 συνεχή λεπτά στην υγιή κατάσταση.[7] Παρόλα αυτά, η επαφή αυτή παρατείνεται κατά την επιληπτική κατάσταση στο ισχαιμικό ΚΝΣ [7] και η νευρωνική υπερδραστηριότητα οδηγεί σε αύξηση των αποφυάδων που συγκεντρώνονται στην ενεργή σύναψη.[47] Το συμπέρασμα αυτών και άλλων μελετών είναι ότι τα μικρογλοιακά μπορούν να ανιχνεύσουν τη συναπτική δραστηριότητα, να επιμηκύνουν την επαφή τους με ενεργά σηματοδοτικές συνάψεις και επίσης να ρυθμίσουν τη νευρωνική δραστηριότητα στη σύναψη.[7], [47], [48] Η δημιουργία της συναπτικής αρχιτεκτονικής στα νευρωνικά δίκτυα είναι κρίσιμη πτυχή της ωρίμανσης

του ΚΝΣ στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο.[49] Ακόμη, η μικρογλοία εγκολπώνει και απομακρύνει συναπτικά στοιχεία κατά την αισθητηριακή εμπειρία και εμπλέκεται στην πλαστικότητα της σύναψης. Επίσης, υπάρχει δυναμικός ρόλος της μικρογλοίας στο συναπτικό «κλάδεμα» μέσω της απομάκρυνσης αχρησιμοποίητων δενδριτικών ακάνθων κατά τις μεταγεννητικές φάσεις. Επιπλέον, το συναπτικό «κλάδεμα» εξαρτάται από τον αριθμό των μικρογλοιακών κυττάρων κατά τη μεταγεννητική περίοδο και από τη νευρωνική δραστηριότητα των δενδριτικών ακάνθων, καθώς και από τη σήμανση των αναπτυσσόμενων συνάψεων με το C3 στοιχείο του συμπληρώματος, το οποίο οδηγεί σε φαγοκυττάρωση μέσω του υποδοχέα του συμπληρώματος CD11b της μικρογλοίας. Για να κατανοηθούν πλήρως οι μηχανισμοί αυτής της διαδικασίας, υπάρχουν και άλλες μελέτες σε εξέλιξη. [31]

Οι λειτουργίες της μικρογλοίας που περιγράφηκαν παραπάνω, φαίνονται συνοπτικά στην Εικόνα 2.



Εικόνα 2 Συνοπτική αναπαράσταση των λειτουργιών της μικρογλοίας

1.3.2 ΡΟΛΟΣ ΣΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Επιτήρηση: Τα μικρογλοιακά κύτταρα του υγιούς ΚΝΣ θεωρούνταν «στάσιμα» για δεκαετίες, με σκοπό να διαχωρίζονται από την ενεργοποιημένη κατάσταση τους η οποία

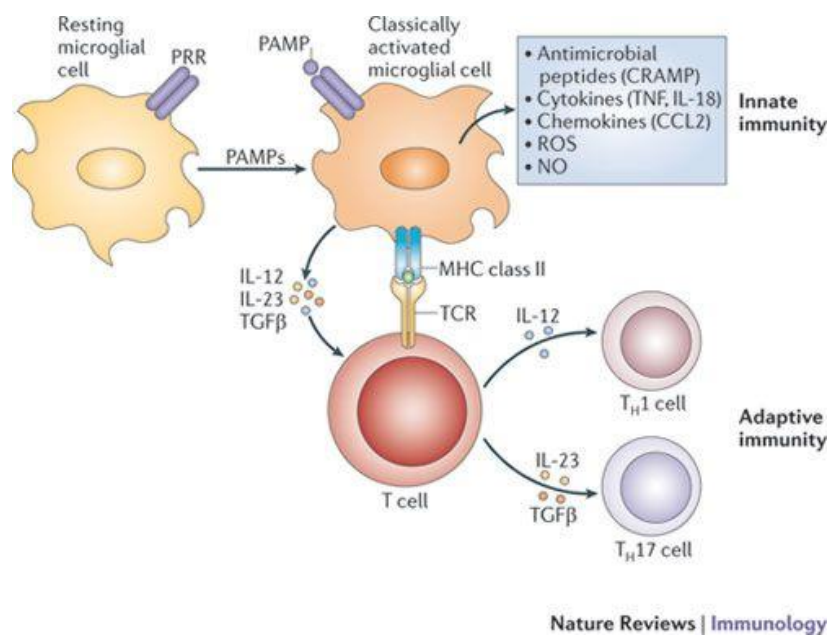
προκύπτει σε περίπτωση βλάβης ή ασθένειας του ΚΝΣ. Πρόσφατα, οι βελτιωμένες τεχνικές επέτρεψαν στους επιστήμονες να δείξουν ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα επιτηρούν το περιβάλλον τους συνεχώς και οι αποφυάδες τους είναι ιδιαίτερα κινητικές. Επιπλέον, με τη χρήση απεικόνισης σε τακτά χρονικά διαστήματα φάνηκε ότι ενώ τα σώματα των μικρογλοιακών κυττάρων παραμένουν στην ίδια θέση, οι αποφυάδες υπόκεινται σε κύκλους de novo σχηματισμού και απόσυρσης και έρχονται σε άμεση επαφή με αστροκύτταρα, νευρώνες και αιμοφόρα αγγεία για να παρατηρούν την παραμικρή αλλαγή στο μικροπεριβάλλον τους. Η δυναμική αναδιοργάνωση των μικρογλοιακών αποφυάδων μπορεί να θεωρηθεί μια βασική λειτουργία της μικρογλοίας, με την οποία τα κύτταρα αυτά επιτηρούν το περιβάλλον, απομακρύνουν μεταβολικά προϊόντα και αλλοιωμένα στοιχεία του ιστού, αναγνωρίζουν νευρωνική δραστηριότητα και δομικές αλλοιώσεις ώστε να διατηρήσουν και να οργανώσουν τα νευρωνικά δίκτυα.[46] Για τον λόγο αυτό έχει προταθεί ο όρος ‘επόπτες’ για να περιγράψει πως τα κύτταρα της μικρογλοίας παρακολουθούν ενεργά και συνεχώς το υγιές ΚΝΣ.[50] Τα μικρογλοιακά κύτταρα-επόπτες εκφράζουν συνεχώς χαμηλά επίπεδα HLA-DR (Human Leukocyte Antigen-D Related) στο ανθρώπινο ΚΝΣ και MHC-II στο ΚΝΣ των τρωκτικών, το οποίο δείχνει την ικανότητα αντιγονοπαρουσίασης των κυττάρων αυτών και τον κεντρικό τους ρόλο στην εποπτεία του ανοσοποιητικού συστήματος. Στον υγιή οργανισμό τα μικρογλοιακά κύτταρα παραμένουν στην κατάσταση εποπτείας μέσω της αλληλεπίδρασης μεταξύ των CD200-CD200 υποδοχέα (CD200R), CD22-CD45 (γνωστό και ως PTPRC), CD172A (γνωστό και ως SIRP-α)-CD47 και CX3CL1-CX3CR1. Τα σήματα μέσω CD22-CD45 και CD200-CD200R απαιτούν επαφή μεταξύ των κυττάρων, ενώ το σήμα μεταξύ CX3CL1-CX3CR1 μπορεί να δοθεί μέσω επαφής ή εξ αποστάσεως με έκκριση του διαλυτού παράγοντα CX3CL1.[50], [51]

Μεσολαβητές της φλεγμονής: Μια σημαντική ομοιότητα της μικρογλοίας με τα περιφερικά μακροφάγα είναι η ικανότητα τους να συνεισφέρουν σημαντικά στη φυσική και την επίκτητη ανοσολογική απόκριση. Τα ήρεμα μικρογλοιακά κύτταρα ενεργοποιούνται λόγω διάφορων διεγέρσεων όπως το LPS (Lipopolysaccharide), το β-αμυλοειδές, η IFN-γ (Interferon-γ), η θρομβίνη και μερικές φλεγμονώδεις κυτταροκίνες που εμπλέκονται στην φλεγμονή, τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες και την βλάβη του ΚΝΣ.[52] Κατόπιν διέγερσης, η ήρεμη διακλαδισμένη μικρογλοία υφίσταται μια σειρά

μορφολογικών και λειτουργικών αλλαγών ώστε να κινητοποιήσει την κυτταρική και μοριακή άμυνα του ΚΝΣ. Έχει φανεί ότι η μικρογλοία εκφράζει TLR (Toll-like Receptors) οι οποίοι αλληλεπιδρούν με στοιχεία του βακτηριακού κυτταρικού τείχους ώστε να εκκινήσει η έμφυτη ανοσολογική απόκριση, όπως η παραγωγή κυτταροκινών, χημειοκινών και νιτρικού οξέος.[53], [54] Τα μόρια που απελευθερώνονται από τη μικρογλοία ως απάντηση στη διέγερση αποτελούνται από φλεγμονώδεις παράγοντες όπως οι IL-1, IL-6 (Interleukins -1, -6)[55], [56] και ο TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α)[57], οι MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)[58], MIP-1 (macrophage inflammatory protein-1)[59], [60] και RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted)[61] και χημειοκίνες που εμπλέκονται στη προσέλκυση λεμφοκυττάρων. Η απόκριση αυτή καθιστά τη μικρογλοία την κρίσιμη πρώτη γραμμή άμυνας καθώς τα κύτταρα της επίκτητης ανοσίας χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να απαντήσουν στα παθογόνα που βρίσκονται στο ΚΝΣ. Μόλις το μικροπεριβάλλον του ΚΝΣ ενεργοποιηθεί, τα τοπικά κύτταρα παράγουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και χημειοκίνες και αυξάνουν τους ανοσορρυθμιστικούς επιφανειακούς τους δείκτες για να συμβάλλουν στην τοπική φλεγμονώδη απόκριση. Επιπλέον φροντίζουν ώστε να αυξηθεί η διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, γεγονός που επιτρέπει σε διαλυτούς παράγοντες και κύτταρα της ανοσίας από την περιφέρεια, όπως τα μακροφάγα, τα κύτταρα φυσικούς φονείς και τα λεμφοκύτταρα να εισέλθουν στο σημείο της φλεγμονής.[62], [63] Τα μικρογλοιακά κύτταρα παρουσιάζουν επίσης κυτταροτοξικές και φαγοκυτταρικές ιδιότητες κατά τη μόλυνση ή τη βλάβη του ΚΝΣ. Με την ενεργοποίηση της μικρογλοίας υπάρχει αύξηση στην έκφραση υποδοχέων που σχετίζονται με την οψωνοποίηση, όπως οι υποδοχείς του συμπληρώματος CR1, CR2, CR3 (Complement Receptors) και ο Fc γ R (I,II,III) που αυξάνουν τη φαγοκυττάρωση με το να προσδένονται σε μόρια του συμπληρώματος και των ανοσογλοβουλινών αντίστοιχα.[64], [65] Επιπρόσθετα, τα μικρογλοιακά κύτταρα εκκρίνουν ρίζες υπεροξειδίου και νιτρικό οξύ στο μικροπεριβάλλον τους ως απόκριση σε διέγερση από παθογόνα ή κυτταροκίνες.[66]

Ένα κρίσιμο βήμα που εμπλέκεται στην εκκίνηση της απόκρισης των T κυττάρων ενάντια στα παθογόνα και της γενικότερης απόκρισης της ειδικής ανοσίας, είναι η αντιγονοπαρουσίαση. Η αντιγονοπαρουσίαση απαιτεί αλληλεπίδραση μεταξύ του υποδοχέα του T κυττάρου και του επεξεργασμένου πεπτιδίου που παρουσιάζεται από τα MHC (Major Histocompatibility Complex) μόρια στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών (APC) κυττάρων. Τα μόρια MHCI και MHCII διεγείρουν τα

CD8 κυτταροτοξικά κύτταρα και τα CD4 T-βοηθητικά κύτταρα αντίστοιχα. Ακόμα, αλληλεπιδράσεις-κλειδιά μεταξύ συνδιεγερτικών μορίων όπως τα B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD40 τα οποία εκφράζονται στην επιφάνεια αντιγеноπαρουσιαστικών κυττάρων και υποδοχέων στα T κύτταρα απαιτούνται για την βέλτιστη προσκόλληση T-APC κυττάρων και την ενεργοποίησή τους.[67], [68] Σε κατάσταση ηρεμίας, μέσα στο παρέγχυμα του ΚΝΣ η έκφραση των MHC I και MHC II είναι ελάχιστη ή μηδενική και όταν υπάρχει βρίσκεται μόνο στη μικρογλοία σε πολύ χαμηλά επίπεδα.[69]



Εικόνα 3 Ανοσολογική απόκριση μικρογλοιακών κυττάρων

Σύμφωνα με μελέτες από τον Ford και την ομάδα του, σε φυσιολογικούς εγκεφάλους τρωκτικών τα μικρογλοιακά κύτταρα σε ήρεμη κατάσταση συμπεριφέρονται ως κακοί αντιγеноπαρουσιαστές.[70] Παρόλα αυτά, σε φλεγμονώδεις και νευροεκφυλιστικές καταστάσεις η μικρογλοία αμέσως αυξάνει την έκφραση των MHC και συνδιεγερτικών μορίων.[71] Ειδικότερα, η αλληλεπίδραση μεταξύ των CD80 και CD86 στη μικρογλοία με το CD28 που εκφράζεται στα T κύτταρα είναι απαραίτητη για να προκληθεί έκκριση κυτταροκινών από τα κύτταρα αυτά και να ενισχυθεί η ανάπτυξη και η επιβίωσή τους.[67] Επιπλέον, η αλληλεπίδραση του CD40 της μικρογλοίας με το CD40L των T κυττάρων ενισχύει την έκφραση του MHC II, της νιτρικής συνθετάσης και των μορίων CD80/CD86 στη μικρογλοία τα οποία με τη σειρά τους προωθούν την περαιτέρω ενεργοποίηση των T κυττάρων.[68] Επιπλέον, σε in vivo και in vitro μελέτες έχει φανεί

ότι η INF- γ , η οποία εκκρίνεται από CD4 T και NK (Natural Killer) κύτταρα προκαλεί και διατηρεί την έκφραση MHCII και μορίων προσκόλλησης και συνδιέγερσης στα μικρογλοιακά κύτταρα ώστε να διατηρηθεί η διέγερση των T κυττάρων.[72]

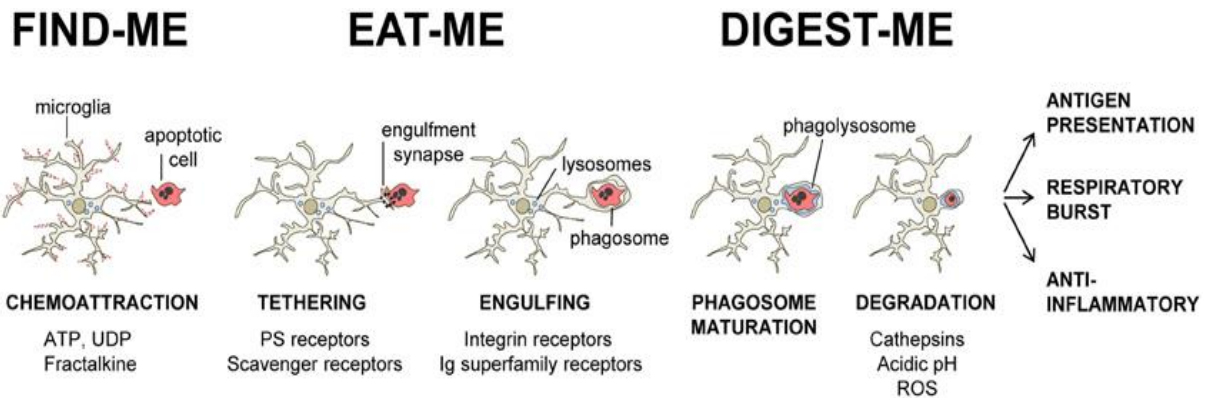
Εκτός από την εκκίνηση της έμφυτης και ειδικής απόκρισης, τα μικρογλοιακά κύτταρα λειτουργούν και για να σταματήσουν τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Εν τη απουσία επαρκών συνδιεγερτικών μορίων, η αλληλεπίδραση του Fas προσδέτη στα APC με τον Fas υποδοχέα στα T κύτταρα θα οδηγήσει σε απόπτωση μέσω ενεργοποίησης.[73] Μελέτες Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλίτιδας στα τρωκτικά in vivo και in vitro έδειξαν ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα εκφράζουν τον Fas προσδέτη και επομένως μπορούν να επιτελέσουν αυτή τη λειτουργία.[74] Επίσης, κυτταροτοξικά μόρια όπως το νιτρικό οξύ που εκκρίνεται από τα μικρογλοιακά κύτταρα μπορεί να συμβάλλει στην παύση της ανοσολογικής απόκρισης, μέσω του θανάτου των κυττάρων.[66] Τέλος, τα μικρογλοιακά κύτταρα μπορούν να εκφράσουν τον Fas προσδέτη στην επιφάνειά τους και αλληλεπιδρώντας με κύτταρα που εκφράζουν τον αντίστοιχο υποδοχέα, να οδηγηθούν στον ίδιο τους τον θάνατο.[75] Φαίνεται λοιπόν ότι η λειτουργία της μικρογλοίας μπορεί να είναι και αυτοπεριοριστική, εκτός από προωθητική της ανοσολογικής απόκρισης.[66]

Φαγοκυττάρωση: Τα μικρογλοιακά κύτταρα, ως η έμφυτη ανοσία του εγκεφάλου, έχουν και φαγοκυτταρικές ιδιότητες. Η φαγοκυττάρωση χρησιμοποιείται για να περιγράψει την εγκόλπωση και αποσύνθεση νεκρών κυττάρων και μικροβίων με τη διαμεσολάβηση υποδοχέων. Τα μικρογλοιακά κύτταρα φαγοκυτταρώνουν και ειδικά μόρια του εγκεφάλου όπως μυελινικά και αξονικά θραύσματα σε βλάβη της σπονδυλικής στήλης ή στην πολλαπλή σκλήρυνση, εναποθέσεις β -αμυλοειδούς στο Alzheimer και υπεράριθμες συνάψεις στην μεταγεννητική περίοδο.[76] Η φαγοκυττάρωση, μαζί με τη φλεγμονή, συνθέτουν την πρώτη γραμμή άμυνας του ανοσοποιητικού συστήματος ενάντια σε πολυκύτταρους οργανισμούς. Επίσης, στα θηλαστικά η φαγοκυττάρωση βοηθά να εκκινήσει η πιο ειδική απάντηση της επίκτητης ανοσίας, μέσω της αντιγονοπαρουσίασης στα T λεμφοκύτταρα. [77]

Η μέχρι τώρα γνώση για τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης συνοψίζεται στο μοντέλο των τριών βημάτων: 'Βρες', 'Φάε' και 'Χώνεψε', το οποίο αναφέρεται στην εγκόλπωση και την αποσύνθεση αποπτωτικών κυττάρων από τα φαγοκύτταρα. [78] (Εικόνα 3) Η διαδικασία ξεκινά όταν οι αποφυάδες των μικρογλοιακών κυττάρων συναντήσουν

κάποιο στόχο, είτε τυχαία είτε από κάποιο σήμα. Για παράδειγμα, το UDP, παράγωγο της αποσύνθεσης του UTP από εξωνουκλεοτιδάσες, δρα στους υποδοχείς P2Y₆ της μικρογλοίας για να διευκολύνει τη φαγοκυττάρωση. [79] Ένα επίσης σημαντικό χημειοτακτικό σήμα των αποπτωτικών κυττάρων αποτελεί το CX3CL1 (Fraktalkine). [70] Τα μικρογλοιακά κύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα CX3CR1, στον οποίο προσδένεται το CX3CL1 και έτσι προωθείται η φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών κυττάρων.[80]

Έπειτα από αυτό το πρώτο σήμα, έρχεται το πιο σημαντικό βήμα της φαγοκυττάρωσης, η αναγνώριση και η εγκόλπωση του στόχου. Τα φαγοκύτταρα είναι εξοπλισμένα με μια σειρά από υποδοχείς που τα καθιστούν ικανά να αναγνωρίζουν τους στόχους τους (σήμα 'φάε') και να τους ξεχωρίζουν από το υπόλοιπο παρέγχυμα, ειδικά από τα ζωντανά κύτταρα (τα οποία εκφράζουν σήματα 'μην-φας'). [81][78] Οι υποδοχείς αυτοί και οι στόχοι τους αλληλεπιδρούν πολύ στενά μέσω των 'συνάψεων εγκόλπωσης' ή 'φαγοκυτταρικών συνάψεων', όπως έχουν ονομαστεί. Με διάμετρο 0,5 μμ και σκοπό την στενή επαφή των κυττάρων, οι φαγοκυτταρικές συνάψεις είναι ειδικά σημεία της μεμβράνης όπου τα αποπτωτικά κύτταρα αλληλεπιδρούν μέσω μικροσυστάδων υποδοχέων και διαρκούν για μερικά λεπτά. [82] Δυστυχώς, η περίπλοκη σηματοδότηση που συμβαίνει στο βήμα αυτό είναι στο μεγαλύτερο μέρος ανεξερεύνητη όσον αφορά τη μικρογλοία. [76] Το ίδιο συμβαίνει και με το βήμα της αποσύνθεσης του στόχου. Το τελευταίο αυτό βήμα έχει μελετηθεί επαρκώς για τα φαγοκύτταρα της περιφέρειας, όμως η μικρογλοία δεν είναι αυτονόητο πως ακολουθεί τα ίδια βήματα. Επιπλέον, επειδή η φαγοκυττάρωση συμβαίνει όχι μόνο από ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα αλλά και από την ήρεμη, διακλαδισμένη μικρογλοία, χρειάζονται μελέτες για να καθοριστεί ο χώρος που γίνεται αυτή η αποσύνθεση των στόχων.[83], [84]



Εικόνα 4 Τα στάδια της φαγοκυττάρωσης

Οξειδωτική Έκρηξη: Μια σημαντική λειτουργία της μικρογλοίας είναι η οξειδωτική έκρηξη μέσω του NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate). Πρόκειται για έναν μεταβολικό καταρράκτη, από τον οποίο παράγονται αντιμικροβιακά υπεροξειδία άλλα δραστικά ενδιάμεσα οξυγόνου. [85] Αρχικά, η οξειδάση του NADPH συντίθεται στο φαγόςωμα, το κυστίδιο που δημιουργείται γύρω από το αποσυντιθέμενο μόριο στην φαγοκυττάρωση. Η οξειδάση του NADPH καταλύει την αντίδραση του NADPH με οξυγόνο προς σχηματισμό NADP^+ , πρωτονίων και ανιόντος υπεροξειδίου, αντίδραση γνωστή ως οξειδωτική έκρηξη. Στο όξινο pH του φαγώματος, το ανιόν υπεροξειδίου οδηγείται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και τέλος μετατρέπεται σε άλλες δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS). [86] Τα προϊόντα αυτά μπορούν να βλάψουν παρακείμενα κύτταρα μέσω υπεροξείδωσης των λιπιδίων, διαταραχής της μεμβράνης, νέκρωσης των κυττάρων και οξείδωσης του DNA.

Πρόσφατα φάνηκε ότι η οξειδάση του NADPH μπορεί να συντεθεί σε διαφορετικές τοποθεσίες, προκαλώντας αναπνευστική έκρηξη ανεξάρτητα της φαγοκυττάρωσης. [87] Στα μικρογλοιακά κύτταρα η οξειδωτική έκρηξη προκαλείται από υποξία/επανοξυγόνωση και LPS [88][89] και οδηγεί στην εξωκυττάρια έκκριση ROS. Με τη σειρά της, η αναπνευστική έκρηξη που προκαλείται από τη φλεγμονή οδηγεί στην έκκριση γλουταμικού από τα μικρογλοιακά κύτταρα, συμβάλλοντας στην περαιτέρω νευρωνική βλάβη. [90] Παρόλο που η αναπνευστική οξέωση είναι κομμάτι της φαγοκυττάρωσης και επομένως της ανοσολογικής απάντησης, τα καταστροφικά γεγονότα που προκαλεί έχουν καταγραφεί στα τραύματα σπονδυλικής στήλης, στην πολλαπλή σκλήρυνση, στο Alzheimer και στο εγκεφαλικό.

1.4 ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΙΚΡΟΓΛΟΙΑΣ ΣΕ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

1.4.1 Διαφορές μεταξύ ανθρώπων και τρωκτικών

Η πλειοψηφία των μελετών που αφορούν τα μικρογλοιακά κύτταρα σε υγιείς και παθολογικές καταστάσεις διεξάγονται σε πειραματικά μοντέλα ποντικών. Ορισμένες παρατηρήσεις όμως υποδεικνύουν ότι η μικρογλοία ανθρώπων και τρωκτικών είναι διαφορετικές.[91], [92] Για παράδειγμα, σε *in vitro* πειράματα φαίνεται ότι η μικρογλοία των τρωκτικών πολλαπλασιάζεται πολύ περισσότερο σε σχέση με την ανθρώπινη. Η διαφορά αυτή παρατηρήθηκε και στη νόσο του Alzheimer, στην οποία τα μικρογλοιακά κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται στους ανθρώπους, το κάνουν όμως σε μοντέλα της ασθένειας σε μύες. Υπάρχουν όμως και διαφορές στους μεσολαβητές της φλεγμονής του νευρικού συστήματος, όπως ο TGF-β1, ο οποίος έχει σημαντικό ρόλο στα ποντίκια αλλά δεν ισχύει το ίδιο και για τους ανθρώπους. Επίσης, ο TLR4 υποδοχέας του LPS αποτελεί ένα σημαντικό μονοπάτι για την ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων στα ποντίκια, στα οποία έχει υψηλά επίπεδα έκφρασης, φαίνεται όμως να είναι λιγότερο σημαντικός στους ανθρώπους. Ακόμα ένα παράδειγμα, αφορά την οικογένεια πρωτεϊνών που ονομάζεται Siglec (Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins) και εμπλέκεται στις ανοσολογικές αποκρίσεις. Παρότι υπάρχει παρόμοια γενετική υπογραφή στη μικρογλοία σε μύες και ανθρώπους[93], υπάρχουν τα διπλάσια Siglec γονίδια στους ανθρώπους απ' ό,τι στους μύες. Αυτό υποδεικνύει ότι υπάρχει μεγαλύτερη ποικιλία των πρωτεϊνών αυτών στους ανθρώπους, το οποίο μπορεί να έχει αντίκτυπο σε αρκετές ασθένειες, όπως η νόσος του Alzheimer.[94] Επιπλέον, ένα σημαντικό κομμάτι της ενεργοποίησης της μικρογλοίας είναι η παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO), μέσω της επαγόμενης συνθάσης του NO. Ενώ λοιπόν στους μύες υπάρχει μεγάλη παραγωγή NO μετά από φλεγμονώδη διέγερση, στους ανθρώπους η παραγωγή αυτή δεν είναι το ίδιο υψηλή. Η παρατήρηση αυτή προκαλεί επιπλοκές στην ανάπτυξη φαρμάκων, καθώς η παραγωγή NO χρησιμοποιείται σε πολλά μοντέλα ως μέτρο παρακολούθησης της μικρογλοιακής ενεργοποίησης. Συμπερασματικά, υπάρχει επιτακτική ανάγκη να επιβεβαιωθεί πως τα δεδομένα που έχουν συλλεχθεί από τη μικρογλοία των μύων ισχύουν και για την ανθρώπινη μικρογλοία.[95]

1.4.2 Διαφορές μεταξύ φύλων

Πρόσφατα δεδομένα από τρωκτικά υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές στη μικρογλοία ανάμεσα σε αρσενικά και θηλυκά.[96], [97] Στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης, η τεστοστερόνη που παράγεται από τους όρχεις αποκτά πρόσβαση στον εγκέφαλο και μέσω αρωματοποίησης μετατρέπεται σε οιστραδιόλη, η οποία είναι η κυρίαρχη ορμόνη αρρενοποίησης στον εγκέφαλο των τρωκτικών. Η προοπτική περιοχή είναι μια σημαντική περιοχή του εγκεφάλου στην οποία φαίνονται νευροανατομικές διαφορές μεταξύ των δυο φύλων. Στην προοπτική περιοχή τα αρσενικά έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα μικρογλοιακών κυττάρων τα οποία παρουσιάζουν ενεργοποιημένο φαινότυπο, ο οποίος χαρακτηρίζεται από αυξημένο μέγεθος σώματος και μειωμένες διακλαδώσεις και μέγεθος αποφυάδων. Η χορήγηση οιστραδιόλης στα θηλυκά ποντίκια μετά τη γέννηση, οδήγησε σε ανάπτυξη μικρογλοιακών κυττάρων με φαινότυπο που συναντάται στα αρσενικά. Επίσης, η μινοκυκλίνη, η οποία εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων, φαίνεται ότι μειώνει τον αρσενικό φαινότυπό τους. Όταν χορηγείται στην αρχή της ανάπτυξης, η μινοκυκλίνη έχει μακροχρόνια επίδραση στην παρεμπόδιση της αρρενοποίησης και τελικά οδηγεί σε αλλαγές στην ενήλικη σεξουαλική συμπεριφορά, επίδραση που μιμείται αυτή της οιστραδιόλης. Τελικά, μπορεί αυτές οι μακροχρόνιες αλλαγές στον φαινότυπο των μικρογλοιακών κυττάρων να εξηγούν τις φυλετικές διαφορές σε διαταραχές όπως ο αυτισμός.[95]

1.5 ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΓΛΟΙΑΣ

Τα μικρογλοιακά κύτταρα παράγουν και εκκρίνουν πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους, τις κυτταροκίνες, οι οποίες περιλαμβάνουν τις IL (interleukins), INF (interferons), TNF (tumor necrosis factor), CFS (colony stimulation factor), TGF (transforming growth factor). Οι κυτταροκίνες εμπλέκονται στην κυτταρική επικοινωνία, ρυθμίζουν τη φλεγμονή και την ανοσιακή απάντηση, την κυτταρική ανάπτυξη, επιβίωση και διαφοροποίηση. (Εικόνα 4) Στα μικρογλοιακά κύτταρα, η έκφραση και έκκριση των κυτταροκινών έχουν καταγραφεί επαρκώς. Τα γεγονότα που

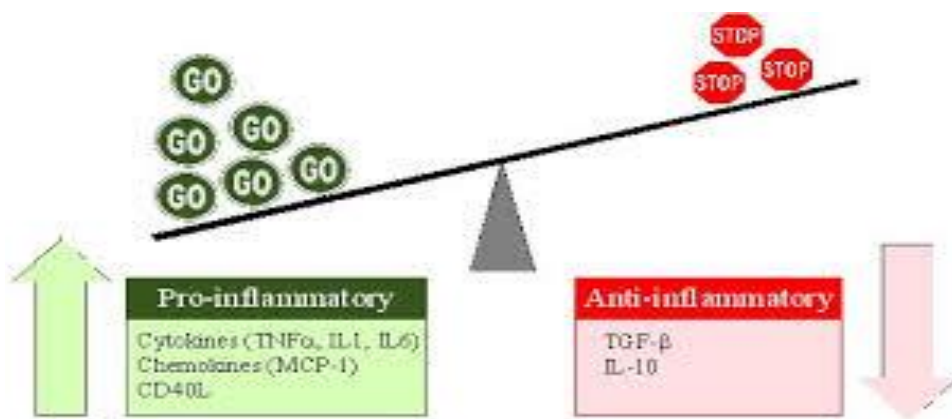
οδηγούν στην παραγωγή τους είναι πολυάριθμα και συμπεριλαμβάνουν συστατικά του βακτηριακού κυτταρικού τείχους, ικούς φακέλους, πρωτεΐνες p18, πρωτεογλυκάνες και (λιπο)τειχοϊκό οξύ, αυξητικούς παράγοντες ή κυτταροκίνες όπως το M-CSF (macrophage-colony stimulation factor) και το GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulation factor), μεσολαβητές της φλεγμονής όπως ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων και στοιχεία του συμπληρώματος, υψηλά επίπεδα ATP και υψηλές συγκεντρώσεις εξωκυττάριου καλίου, πρωτεΐνες του ορού, το Αβ και τα DAMP (damage associated molecular patterns). [98], [99]

Υπό συνθήκες ηρεμίας η ανθρώπινη μικρογλοία εκφράζει πολυάριθμες κυτταροκίνες όπως οι IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, TNF-α, MIP-1α (macrophage inflammatory protein). Επιπλέον εκφράζουν υποδοχείς κυτταροκινών όπως οι IL1-RI, IL1-RII, IL-5R, IL-6R, IL-8R, IOL-9R, IL-10R, IL-12R, IL-13R, IL-15R, TNFR1, TNFR2 και gp130, ενώ δεν έχει καταγραφεί έκφραση των IL-11R, IL-4R, IL-2R, IL-3R, IL-7R. [100]

Μετά από διέγερση με LPS η έκφραση των κυτταροκινών αυξάνεται δραματικά, εκτός από την IL-15. Η IL-1β είναι μια κρίσιμη κυτταροκίνη για τη σηματοδότηση της φλεγμονής και της διέγερσης του ανοσοποιητικού και έχει σημαντικό ρόλο στην άμυνα της φυσικής ανοσίας και την ανοσολογική απάντηση εν γένει. Οι στόχοι της συγκεκριμένης κυτταροκίνης είναι τα T και B κύτταρα, τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα και η ίδια η μικρογλοία. Στο ΚΝΣ τα ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα αποτελούν την κύρια πηγή IL-1 κατά τη φλεγμονή, την ισχαιμία, το εγκεφαλικό και τον μηχανικό τραυματισμό. Επιπλέον, εκτός από τον ρόλο της στη φλεγμονή, η IL-1 επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ και μπορεί να ρυθμίσει την αποτελεσματικότητα των συνάψεων σε νευρωνικούς πληθυσμούς, ειδικά στον υπόκαμπο. [101], [102]

Αντίθετα, οι IL-10, IL-4 και TGF-β λειτουργούν ως αντιφλεγμονώδεις, ανοσοκατασταλτικές και νευροπροστατευτικές κυτταροκίνες, μεσολαβώντας την μείωση της έκφρασης της IL-1β και του TNF-α ή μετριάζοντας τα αποτελέσματά τους. Επιπλέον, οι κυτταροκίνες αυτές τροποποιούν την έκφραση των μορίων της κυτταρικής επιφάνειας της μικρογλοίας. [103] Εκτός από την μείωση της παραγωγής φλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών, ο TGF-β παίζει ρόλο στην ανάπτυξη του ιστού και την επούλωση πληγών, ενώ έχει φανεί ότι ο TGF-β1 μειώνει τον σχηματισμό πλακών σε ζωικά πρότυπα της νόσου Ατσχάμερ. [104]

Η IL-6 είναι μια φλεγμονώδης κυτταροκίνη η οποία ξεκινά και συντονίζει την ανοσολογική απόκριση, αποφεύγοντας έτσι την εξάπλωση μολυσματικών παραγόντων. Επιπλέον, στο ΚΝΣ εκτός από την επαγωγή πυρετού, η IL-6 έχει ρόλο και στη νευροενδοκρινική κινητοποίηση των πηγών ενέργειας, την μείωση της πρόσληψης τροφής, την αύξηση της αντίληψης του πόνου και την αύξηση του ύπνου. Πρέπει να τονιστεί ότι η IL-6 έχει και φλεγμονώδη και αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα, ανάλογα με την παράλληλη παρουσία και άλλων κυτταροκινών. Στην πραγματικότητα, τα μικρογλοιακά κύτταρα εκκρίνουν IL-6 στην αρχή της βλάβης του ΚΝΣ και στη συνέχεια η IL-6 δρα στα αστροκύτταρα ώστε να τα ενεργοποιήσει για να επιδιορθώσουν τον κατεστραμμένο ιστό.[105]



Εικόνα 5 Σχηματική αναπαράσταση της δράσης κυτταροκινών

Ο παράγοντας TNF-α είναι ακόμα μια φλεγμονώδης κυτταροκίνη η οποία εκκρίνεται από νευρώνες, αστροκύτταρα και μικρογλοιακά κύτταρα. Η ισχαιμία, ο τραυματισμός, οι βακτηριακές και ιικές μολύνσεις, η πολλαπλή σκλήρυνση και η νόσος του Alzheimer αυξάνουν την έκφραση του TNF-α στον εγκέφαλο και στις περιπτώσεις αυτές, τα μικρογλοιακά κύτταρα αποτελούν την κύρια πηγή του παράγοντα αυτού. Ο TNF-α προωθεί τη φλεγμονή και το οίδημα και μπορεί να προκαλέσει την έκκριση γλουταμικού από τα αστροκύτταρα.[106] Επιπλέον, σε υψηλές συγκεντρώσεις ο TNF-α είναι τοξικός για τους νευρώνες και τη μυελίνη, όμως σε χαμηλές δόσεις προωθεί τη νευρωνική επιβίωση.[107]

Οι ιντερφερόνες τύπου I (IFN α , IFN β , IFN ω και IFN τ) εκφράζονται στο ΚΝΣ μετά από μόλυνση, ενώ υψηλά επίπεδα της IFN γ ανιχνεύονται και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις. Η IFN γ αυξάνει την έκφραση του υποδοχέα του LPS, του ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), των MHC I και II, του LFA-1 (leukocyte function-associated molecule 1), των ανοσο-συμπληρωματικών μορίων B7 (CD80/CD86), (CD14), Fc και των υποδοχέων του συμπληρώματος. Επιπλέον, η IFN γ δρα για να αλλάξει την σύνθεση του πρωτεασώματος και την έκκριση κυτταροκινών (TNF- α , IL-1 β , IL-6), πρωτεϊνών του συμπληρώματος (C1q, C2, C3, C4) και NO ενώ παράλληλα προκαλεί απόπτωση μέσω αύξησης της έκφρασης Fas και FasL.[99]

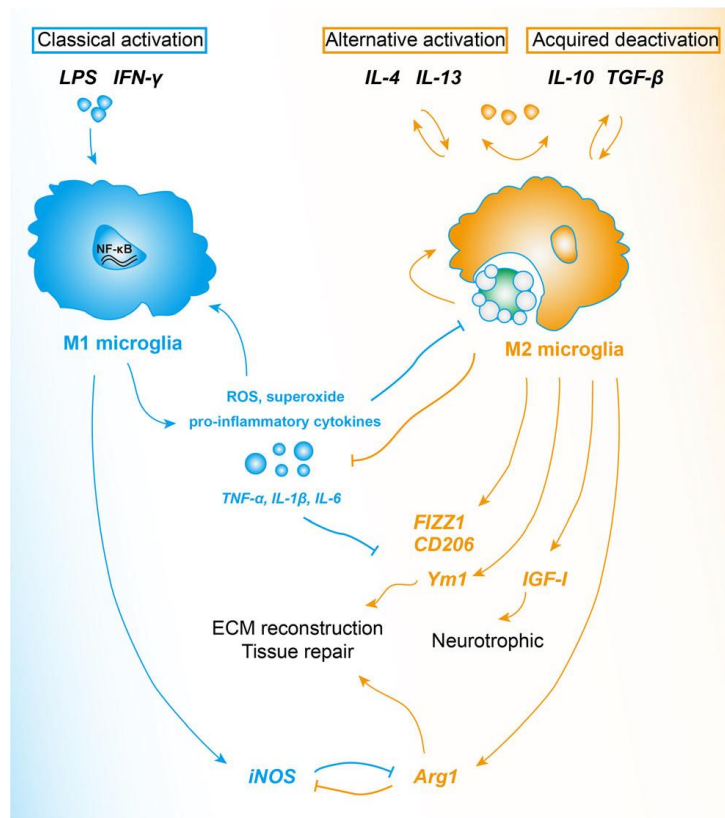
1.6 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

Ύστερα από την αναγνώριση λοίμωξης ή τραυματισμού, τα μικρογλοιακά κύτταρα μεταβαίνουν γρήγορα σε μια ενεργοποιημένη κατάσταση, γνωστή ως φαινότυπος M1, η οποία χαρακτηρίζεται από την έκφραση MHCII και την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών. Η ταυτοποίηση μοριακών προτύπων που σχετίζονται με παθογόνους οργανισμούς (PAMP), προκύπτει επειδή τα μικρογλοιακά κύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους υποδοχείς αναγνώρισης τέτοιων μοριακών μοτίβων, όπως οι TLR (Toll-like Receptors), οι RLR (RIG-I like Receptors), NLR (NOD-like Receptors), CLR (C-type lectin Receptors), RAGE (Receptor for advanced glycation-end productions). Μεταξύ των TLR, ο TLR4 είναι υπεύθυνος για την αναγνώριση του LPS (Lipopolysaccharide) το οποίο είναι κυτταρικό δομικό στοιχείο των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Οι TLR υποδοχείς μπορούν επίσης να αναγνωρίσουν ενδογενή μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με τη βλάβη (DAMP) τα οποία προκαλούνται από μεταβολικά προϊόντα όπως οι οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας και μπορεί να απελευθερώνονται από κατεστραμμένα ή νεκρά κύτταρα. Επιπλέον, τα DAMP αναγνωρίζονται από τη μικρογλοία μέσω καναλιών ιόντων και υποδοχέων νευροδιαβιβαστών, οι οποίοι συμβάλλουν στην εκκαθάριση του εγκεφαλικού παρεγχύματος από κυτταρικά θραύσματα και βοηθούν να εκκινήσει η επιδιόρθωση του ιστού μετά τη βλάβη. [51]

Τα τραυματισμένα κύτταρα εκκρίνουν επίσης NTP (Nucleoside Triphosphate), το οποίο προσδένεται στους υποδοχείς P2X ή P2Y που υπάρχουν στα μικρογλοιακά κύτταρα και προκαλεί τη σηματοδότηση μέσω του ERK (Extracellular signal Regulated Kinase) μονοπατιού, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί τον παράγοντα NF-κB (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) και την πρωτεΐνη AP-1 (Activator Protein 1), προκαλώντας έτσι την μεταγραφή φλεγμονωδών μεσολαβητών. Επιπλέον, οι RAGE υποδοχείς μπορούν να ενεργοποιηθούν από DAMP όπως το HMGB1 (High Mobility Group Box 1) το οποίο απελευθερώνεται από νεκρωτικά κύτταρα με επακόλουθη επαγωγή της μεταγραφής φλεγμονωδών γονιδίων και της πρωτεΐνης πρόσδεσης ασβεστίου S100B, η οποία απελευθερώνεται σε υψηλά επίπεδα από τα αστροκύτταρα, μετά από βλάβη και νέκρωση αυτών. Σε υψηλά εξωκυτταρικά επίπεδα, η πρωτεΐνη S100B αυξάνει την έκφραση του φλεγμονώδους ενζύμου COX-2 (cyclooxygenase 2) το οποίο εκκρίνεται και από τη μικρογλοία. [108], [109]

Παρόλα αυτά, η φλεγμονώδης απόκριση χρειάζεται να είναι αυστηρά ελεγχόμενη έτσι ώστε να περιορίσει τη νευρωνική καταστροφή. Για τον λόγο αυτό, μετά από την επαγωγή της ανοσολογικής απάντησης, τα μικρογλοιακά κύτταρα μεταβαίνουν σε μια εναλλακτική κατάσταση ενεργοποίησης, γνωστή ως M2.[110] Πέρα από τον περιορισμό της δυνητικά καταστροφικής απόκρισης του ανοσοποιητικού συστήματος, ο M2 φαινότυπος προωθεί και την επούλωση του τραύματος μέσω των υψηλών επιπέδων Arg-1 (Arginase-1). Η Arg-1 μετατρέπει την αργινίνη σε ορνιθίνη, η οποία βοηθά στην επούλωση, και παράλληλα χρησιμοποιώντας την αργινίνη η οποία είναι υπόστρωμα για την συνθετάση iNOS, η Arg-1 ανταγωνίζεται την iNOS μειώνοντας έτσι την παραγωγή του NO.[111] Στο πλαίσιο της προστασίας των νευρώνων, ο M2 φαινότυπος προκαλεί την παραγωγή της Chil3 (Chitinase-like 3, γνωστή και ως Ym1), μιας λεκτίνης που προσδένει την ηπαρίνη που εμποδίζει την αποσύνθεση της εξωκυττάριας μήτρας, και της FIZZ1 (Found in Inflammatory Zone 1) η οποία προωθεί την εναπόθεση της εξωκυττάριας μήτρας.[112] Επίσης, ο φαινότυπος αυτός προκαλεί και την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων όπως οι IL-10, TGF-β και IGF-1.

Αν και οι όροι M1 και M2 (Εικόνα 5) είναι ευρέως χρησιμοποιούμενοι για να περιγράψουν κλασικά και εναλλακτικά ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα, υπάρχει πλέον μια τάση να μην θεωρούνται ως δυο διακριτές καταστάσεις, αλλά ως ένα φάσμα φαινοτύπων οι οποίοι αλληλεπικαλύπτονται σε σημεία.[113]



Εικόνα 6 Οι καταστάσεις ενεργοποίησης της μικρογλοίας

1.7 ΜΙΚΡΟΓΛΟΙΑ ΣΤΟ ALZHEIMER'S

Τα μικρογλοιακά κύτταρα, ως ιστικά μακροφάγα του ΚΝΣ, μαζί με τα μονοκύτταρα είναι οι δυο πληθυσμοί που ενεργοποιούνται σε ένα περιβάλλον νευροεκφυλισμού. Όταν ενεργοποιηθούν, τα μικρογλοιακά κύτταρα δρουν ως εκκαθαριστικά κύτταρα, παράγοντας ένα ευρύ φάσμα μορίων τα οποία είναι απαραίτητα για την εξολόθρευση της απειλής και την εκκαθάριση τοξικών παραγόντων, όπως τα συσσωματώματα του Αβ στη νόσο του Alzheimer και τα κυτταρικά θραύσματα. Για να λειτουργήσουν επιτυχώς οι ανοσολογικές αποκρίσεις, δεν χρειάζεται μόνο σωστή ενεργοποίηση, αλλά και μια ενεργή διαδικασία τερματισμού της απόκρισης. Φαίνεται πως αν τα σήματα που ενεργοποιούν τη μικρογλοία περάσουν ένα όριο όσον αφορά την ένταση ή τον χρόνο της ενεργοποίησης, τότε τα κύτταρα της μικρογλοίας αρχίζουν να επιδεικνύουν τοξικές ιδιότητες. Η ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων σε νευροεκφυλιστικές

ασθένειες, μέσω της υπερπαραγωγής φλεγμονωδών κυτταροκινών και ελεύθερων ριζών, τελικά προκαλεί έναν κύκλο αυτοσυντήρησης και αυτοενίσχυσης της νευροτοξικότητας. Για τους παραπάνω λόγους, τα μικρογλοιακά κύτταρα θεωρούνται το «δίκικοπο μαχαίρι» της φλεγμονής.

Αρχικά, τα μικρογλοιακά κύτταρα ενεργοποιούνται όταν το Αβ αναγνωριστεί από τους υποδοχείς των κυττάρων κατά την ανοσοεπιτήρηση. Οι υποδοχείς που φαίνεται να παίζουν ρόλο στην αναγνώριση του Αβ είναι οι TLR-2, TLR-4 χωρίς να αποκλείεται η εμπλοκή και άλλων υποδοχέων. [114] Με την ενεργοποίηση των κυττάρων, αρχίζει η έκκριση πληθώρας φλεγμονωδών κυτταροκινών και παραγόντων όπως η IL-1, η IL-6 και ο TNF-α, με σκοπό την φαγοκυττάρωση θραυσμάτων και συσσωματωμάτων πρωτεϊνών. Στην φαγοκυττάρωση σημαντικό ρόλο παίζει ο υποδοχέας TREM-2 της μικρογλοίας, ο οποίος μέσω της πρωτεΐνης DAP12[115], ξεκινά την διαδικασία όταν αλληλεπιδράσει με αποπτωτικούς νευρώνες και κύτταρα ή με Αβ. Ο ίδιος υποδοχέας φροντίζει για την εκκαθάριση των κυτταρικών θραυσμάτων ώστε να προκύψει ένα υγιές περιβάλλον στον εγκέφαλο.

Κατά την εναπόθεση αμυλοειδούς, μερικές αποφυάδες των μικρογλοιακών κυττάρων γίνονται στατικές, εμφανίζοντας σταθερή σύνδεση με πλάκες, σε διάστημα ημερών ή εβδομάδων, και έχοντας αυξημένη παρουσία TREM-2, DAP12 και φωσφοτυροσίνης στις αποφυάδες αυτές. Φαίνεται ότι ο ρόλος αυτών των μικρογλοιακών κυττάρων είναι να δημιουργήσουν ένα προστατευτικό φράγμα γύρω από τις εναποθέσεις αμυλοειδούς, συμπερίζοντας τα ινίδια αμυλοειδούς ώστε να αποκτήσουν μια πιο συμπαγή και πιθανόν λιγότερο τοξική μορφή. Με τον τρόπο αυτό θα παρεμποδιστεί η συσσώρευση επιπλέον ινιδίων Αβ στις υπάρχουσες πλάκες και θα μειωθεί η δυστροφία των αξόνων. Αυτές οι προστατευτικές λειτουργίες εγκλεισμού των πλακών παρατηρήθηκαν πιο εύκολα σε μικρές πλάκες στα αρχικά στάδια της νόσου και θεωρείται πως έχουν προστατευτικό χαρακτήρα.[115]

Όταν η ανοσολογική απόκριση φτάσει σε μια δυναμική ισορροπία, είναι απαραίτητη η συνδρομή του περιφερικού ανοσοποιητικού συστήματος για να ελεγχθεί η τοπική φλεγμονή. Με σήματα από τα μικρογλοιακά κύτταρα, όπως οι χημειοκίνες IL-8 και MIP-1α, επιστρατεύονται στο παρέγχυμα μονοκύτταρα του αίματος και διαφοροποιούνται τοπικά σε μακροφάγα. Τα κύτταρα αυτά έχουν φαγοκυτταρικές ιδιότητες και εγκοιλώνουν τα θραύσματα, εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες και αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες με σκοπό να καταστείλουν την ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων. Τα Τ βοηθητικά κύτταρα (κυρίως CD4⁺ Τ κύτταρα) τα οποία

επίσης έχουν επιστρατευθεί μετά από σήματα των μικρογλοιακών κυττάρων, αυξάνουν την προσέλευση των μονοκυττάρων και έτσι ρυθμίζουν εμμέσως τα μικρογλοιακά κύτταρα.[116]

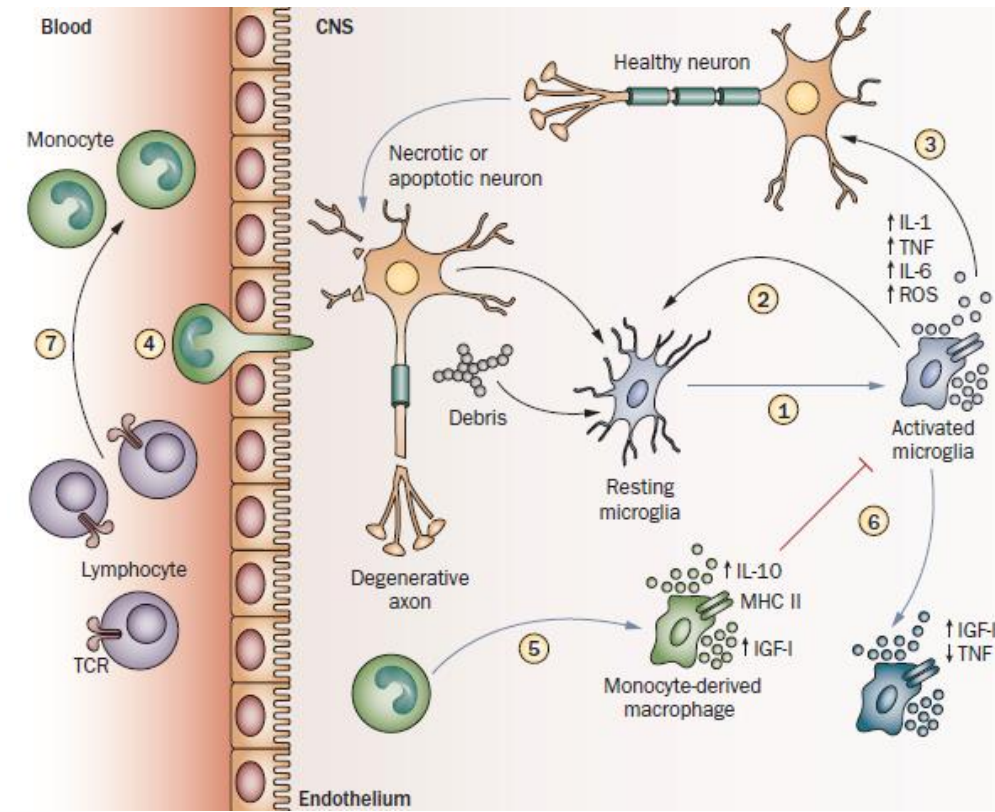
Τελικά φαίνεται πως στη χρόνια φλεγμονή των νευροεκφυλιστικών ασθενειών, τα μικρογλοιακά κύτταρα βρίσκονται σε συνδυασμό των φαινοτύπων M1 και M2, με τους φλεγμονώδεις παράγοντες που εκκρίνονται να προκαλούν καταστροφή του περιβάλλοντος λόγω της παρατεταμένης έκκρισής τους. (Εικόνα 6) Επίσης, φαίνεται πως τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι αποτελεσματικά στην εκκαθάριση του Αβ στα αρχικά στάδια της νόσου, όμως στην χρόνια φλεγμονή τα γονίδια που σχετίζονται με την εκκαθάριση μειορρυθμίζονται και έτσι προωθούν την συσσώρευση του Αβ.

1.8 TO PRIMING THΣ ΜΙΚΡΟΓΛΟΙΑΣ

Στο ΚΝΣ ηλικιωμένων μυών, αρουραίων και πρωτευόντων, τα μικρογλοιακά κύτταρα εμφανίζουν αυξημένη ευαισθησία στη φλεγμονώδη διέγερση [117], παρόμοια με αυτή που εμφανίζεται σε εγκεφάλους με εξελισσόμενο νευροεκφυλισμό. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται **priming**. Το priming μπορεί να προκαλείται από τον γηρασμό της μικρογλοίας και να σχετίζεται με την ηλικία. Στο μεταγραφικό επίπεδο, οι ενδογενείς προσδέτες μειορρυθμίζονται κατά τη γήρανση, ενώ παράγοντες για την άμυνα του οργανισμού και τη νευροπροστασία αυξορρυθμίζονται.[118] Ακόμα δεν είναι ξεκάθαρο σε ποιο βαθμό το ηλικιοεξαρτώμενο μικρογλοιακό priming προκύπτει από το αυτόνομο, κυτταρικό γήρας και όχι από την παρατεταμένη έκθεση στο γηρασμένο περιβάλλον των νευρώνων. Σε φυσιολογικά γηρασμένους μύες και σε μύες με τεχνητά επιταχυνόμενη γήρανση φάνηκε ότι το μικρογλοιακό priming χαρακτηρίζεται από αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών και δραστικών ριζών οξυγόνου και αυξημένη φαγοκυτταρική ικανότητα. Το μοντέλο αυτό έδειξε ότι οι συνθήκες του περιβάλλοντος, όπως η γήρανση των νευρώνων, μπορεί να προκαλέσει το priming της μικρογλοίας.

Γονιδιακές αναλύσεις αποκάλυψαν ένα χαρακτηριστικό μοτίβο γονιδιακής έκφρασης των πραιμινγ μικρογλοιακών κυττάρων, με αυξημένα τα γονίδια για την αναγνώριση μοτίβων και αυξημένη την έκφραση που σχετίζεται με τη σηματοδότηση μέσω ιντερφερονών. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από μοντέλα μυών με ηλικιοεξαρτώμενο νευροεκφυλισμό, όπως το APP/PS1. Η μικρογλοία μπορεί επίσης να

οδηγείται σε priming και από την συστηματική φλεγμονή, ως απόκριση στην αντίδραση του περιφερικού ανοσοποιητικού συστήματος. Συμπερασματικά, το priming της μικρογλοίας μπορεί να αποτελεί παράγοντα των παθολογικών επιπτώσεων των κυττάρων αυτών στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος του Alzheimer.[119]



Εικόνα 7 Δράση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στον νευροεκφυλισμό

1.9 ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

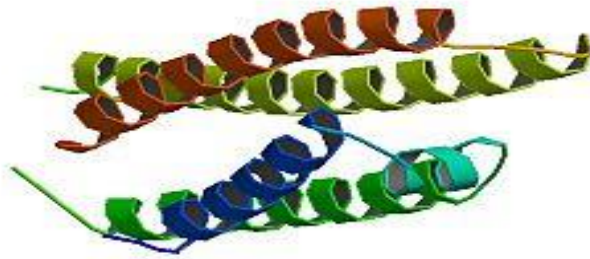
Οι απολιποπρωτεΐνες είναι πρωτεΐνες οι οποίες σχετίζονται κυρίως με την μεταφορά λιπιδίων μέσω του σχηματισμού λιποπρωτεϊνών. Άλλες λειτουργίες τους περιλαμβάνουν την δομική στήριξη, τη δράση τους ως προσδέτες υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας και τη δράση τους ως αναστολείς ή προμότερες ενζύμων που ρυθμίζουν τις λιποπρωτεΐνες. Οι απολιποπρωτεΐνες στον άνθρωπο χωρίζονται σε 7

κατηγορίες (A, B, C, D, E, H, L) και κάθε μια από αυτές έχει τις δικές της υποκατηγορίες. Οι πρωτεΐνες αυτές επιτελούν κρίσιμες λειτουργίες για τον οργανισμό, όμως φαίνεται ότι εμπλέκονται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως η στεφανιαία νόσος, η αθηροσκλήρωση, η παγκρεατίτιδα και η νόσος του Alzheimer. [120]

1.9.1 Η απολιποπρωτεΐνη E

Η ανθρώπινη απολιποπρωτεΐνη E (APOE) είναι μια λιποπρωτεΐνη με 299 αμινοξέα και μέγεθος περίπου 36kDa. Έχει δυο δομικές περιοχές, το αμινοτελικό άκρο που περιέχει την περιοχή πρόσδεσης σε υποδοχείς και το καρβοξυτελικό άκρο που περιέχει την περιοχή πρόσδεσης των λιπιδίων, ενώ αποτελείται από πολλαπλές αμφιπαθείς α-έλικες. (Εικόνα 7) Το γονίδιο της APOE στον άνθρωπο βρίσκεται στον γενετικό τόπο 19q13.2, έχει τέσσερα εξόνια και κωδικοποιεί τρεις κύριες ισομορφές της πρωτεΐνης: την APOE2, την APOE3 και την APOE4. Οι διαφορές μεταξύ των τριών ισομορφών της APOE περιορίζονται στα αμινοξέα 112 και 158, τα οποία έχουν μεγάλο αντίκτυπο στο μοριακό και κυτταρικό επίπεδο της APOE και σχετίζονται επίσης με νευροπαθολογικές καταστάσεις. Στους μύες η αντίστοιχη πρωτεΐνη έχει 311 αμινοξέα, ενώ το γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7 και έχει 6 εξόνια.[121]

Η APOE εκφράζεται σε πολλούς ιστούς, με την υψηλότερη έκφραση να βρίσκεται στο ήπαρ, ακολουθούμενη από τον εγκέφαλο. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί κομμάτι των χυλομικρών και της λιποπρωτεΐνης ενδιάμεσης πυκνότητας (IDL). Τα συστατικά αυτά είναι απαραίτητα για την επεξεργασία των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιπιδίων. Στον εγκέφαλο, τα αστροκύτταρα έχουν ταυτοποιηθεί ως η κύρια πηγή APOE, όμως η πρωτεΐνη συντίθεται επίσης από τα μικρογλοιακά κύτταρα και τους νευρώνες. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα, η APOE συλλέγει τα λιπίδια που παράγονται από τον νευρωνικό εκφυλισμό και τα αναδιανέμει στα κύτταρα που τα χρειάζονται για πολλαπλασιασμό, επιδιόρθωση της μεμβράνης ή αναμυελίνωση νέων αξόνων. Επιπλέον, η APOE ρυθμίζει την λειτουργία του υποδοχέα γλουταμινικού και την συναπτική πλαστικότητα, ρυθμίζοντας την ανακύκλωση των υποδοχέων APOE στους νευρώνες. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι η APOE ελέγχει την εγκεφαλοαγγειακή ακεραιότητα μέσω της κυκλοφιλίνης A.[122]



Εικόνα 8 Η ανθρώπινη ApoE

1.9.2 Απολιποπρωτεΐνες στη νόσο Alzheimer's

Το 1993, γενετικές αναλύσεις έδειξαν ότι η APOE4 αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τη νόσο του Alzheimer [123], ενώ η APOE2 έχει προστατευτικό ρόλο απέναντι στην ίδια νόσο.[124] Φαίνεται ότι ένα αλληλόμορφο της APOE4 μετατοπίζει την καμπύλη κινδύνου της νόσου 5 χρόνια νωρίτερα, ενώ δυο αλληλόμορφα του γονιδίου την μετατοπίζουν 10 χρόνια. Τα αποτελέσματα αυτά ισχύουν και για άτομα με μεταλλάξεις στα γονίδια APP και PS1.[122], [125] Νευροπαθολογικές εξετάσεις σε άτομα που έπασχαν από όψιμης έναρξης νόσο του Alzheimer, φάνηκε ότι τα αλληλόμορφα της APOE4 που είχαν οι ασθενείς αύξαναν την ποσότητα του Aβ, των ολιγομερών Aβ και των νευριτικών πλακών στον εγκέφαλο. Οι μέχρι τώρα μελέτες που αφορούν την σχέση της APOE με τη νόσο του Alzheimer υποδεικνύουν την εμπλοκή των συγκεκριμένων πρωτεϊνών στη φάση της παραγωγής, της συσσωμάτωσης και της εκκαθάρισης του Aβ.[104]

Στο αμυλοειδογενές μονοπάτι της επεξεργασίας του APP, το πεπτίδιο εσωτερικεύεται και παραδίδεται στα ενδοσώματα. Το APP διασπάται πρώτα από τη β-σεκρετάση και μετά από τη γ-σεκρετάση και με αυτόν τον τρόπο προκύπτει το τοξικό Aβ πεπτίδιο. Ενώ τα περισσότερα Aβ πεπτίδια εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο, μερικά μπορεί να συσσωρευτούν στα λυσοσώματα και να συνεισφέρουν στην ενδονευρωνική συσσωμάτωση του Aβ.[126] Σε αυτό βοηθά η APOE που παράγεται από τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα αστροκύτταρα, δημιουργεί λιποπρωτεΐνες με τη βοήθεια του ABCA1 μεταφορέα, και στη συνέχεια προσδένεται στο διαλυτό Aβ, βοηθώντας έτσι

την πρόσληψή του από υποδοχείς. Η γρήγορη ενδοκύττωση μέσω του υποδοχέα LRP1, προσδέτης του οποίου αποτελεί η λιποπρωτεΐνη E, αυξάνει την ενδοκύττωση του APP και την επεξεργασία του. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι η APOE4 προωθεί την αμυλοειδογενή επεξεργασία του APP, με τρόπο που εξαρτάται από τον υποδοχέα LRP1.

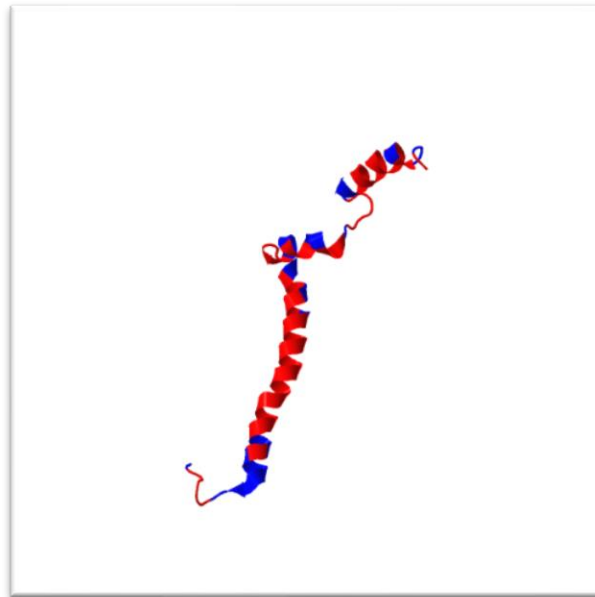
Για την εκκαθάριση του Αβ από τον εγκέφαλο υπάρχουν δυο βασικά μονοπάτια. Το ένα είναι η διαμεσολαβούμενη από υποδοχείς εκκαθάριση από τα κύτταρα του παρεγχύματος και το άλλο η πρωτεολυτική αποσύνθεση από ενδοπεπτιδάσες. Η μέσω υποδοχέων εκκαθάριση του Αβ στον εγκέφαλο πιθανότατα διενεργείται από τους υποδοχείς της APOE, LRP1, LDLR και VLDLR οι οποίοι εκφράζονται στα μικρογλοιακά κύτταρα, τα αστροκύτταρα και τους νευρώνες.[127] Οι υποδοχείς αυτοί μπορούν να προσδέσουν το Αβ απευθείας ή μέσω συνοδών πρωτεϊνών. Μια από τις πιο καλά χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες συνοδούς είναι η APOE, η οποία από την παρατηρούμενη ανοσοδραστικότητα φαίνεται πως βρίσκεται και μέσα στις πλάκες.[127] Η περιοχή της APOE που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του Αβ βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο και είναι η ίδια με αυτή στην οποία γίνεται η πρόσδεση των λιπιδίων. Αυτό σημαίνει ότι η πρόσδεση του Αβ στην APOE επηρεάζει την ικανότητα της πρωτεΐνης να δεσμεύει λιπίδια και έτσι επηρεάζεται η ομαλή διεκπεραίωση της φυσιολογικής λειτουργίας της APOE.

Η APOE δεν έχει σχέση μόνο με το αμυλοειδές στη νόσο του Alzheimer, αλλά και με άλλες πλευρές της νόσου. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι συγκεκριμένες απολιποπρωτεΐνες παίζουν ρόλο στην υπερφοσφορυλίωση της tau πρωτεΐνης και την αποσταθεροποίηση του κυτταροσκελετού στη νόσο αυτή. Επιπλέον, η APOE έχει σημαντικό ρόλο στην προώθηση του σχηματισμού συνάψεων και στην συναπτική πλαστικότητα, ενώ έχει φανεί πως έχει και κάποιο ρόλο στην φλεγμονή των νευρώνων. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις, το αποτέλεσμα εξαρτάται από την ισομορφή της απολιποπρωτεΐνης στον κάθε οργανισμό, με την APOE4 να έχει τις πιο δυσμενείς επιπτώσεις.[122]

1.10 SCAVENGER RECEPTOR CLASS B- TYPE I

Ο Scavenger Receptor Class B-Type I (SR-BI) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με 551 αμινοξέα και μοριακή μάζα 82 kDa. Ο SR-BI ανήκει στις πρωτεΐνες με άλφα έλικα και δομή φουρκέτας αλλά και στην οικογένεια CD36 (SRB-3). Το αμινοτελικό άκρο

της πρωτεΐνης βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, στη συνέχεια υπάρχει άλφα έλικα που διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, ακόμα ένα εξωκυττάριο τμήμα, μια ακόμα άλφα έλικα που διαπερνά τη μεμβράνη και τελικά το καρβοξυτελικό άκρο στον ενδοκυττάριο χώρο. (Εικόνα 8) Το ενδοκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης είναι το μικρότερο με 88 αμινοξέα, ενώ 441 αμινοξέα βρίσκονται στον εξωκυττάριο χώρο. Το γονίδιο του SR-BI συμβολίζεται ως SCARBI και στον άνθρωπο βρίσκεται στη θέση q24.31 στο χρωμόσωμα 12. Στους μύες το αντίστοιχο γονίδιο συμβολίζεται ως ScarbI και βρίσκεται στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 5. Στους ανθρώπους το γονίδιο έχει 12 εξώνια και μέγεθος 86,3kb, ενώ στους μύες έχει τον ίδιο αριθμό εξωνίων και μέγεθος περίπου 64kb. [121]



Εικόνα 9 Δομή του SR-BI

Ο SR-BI ανήκει στην κατηγορία των υποδοχέων ανιχνευτών, οι οποίοι είναι μόρια με ικανότητα αναγνώρισης των LDL απολιποπρωτεϊνών στη φυσιολογική αλλά και στην τροποποιημένη μορφή τους και για αυτό λέγονται και ακετυλο-LDL υποδοχείς.

Η έκφραση του SR-BI εντοπίζεται κυρίως στο ήπαρ, τους στερεοειδογόνους αδένες, τα επιθηλιακά κύτταρα, τον εγκέφαλο, τα αστροκύτταρα, τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα διαφοροποιημένα μονοκύτταρα.

Ο SR-BI στο ήπαρ φροντίζει για την σωστή πορεία της χοληστερόλης στο ήπαρ από τους ιστούς. Είναι υποδοχέας της HDL χοληστερόλης και εκτελεί την πρόσληψη των

εστέρων από το εσωτερικό των απολιποπρωτεϊνικών σωματιδίων, χωρίς να ενδοκυττώνει ολόκληρο το σωματίδιο.[128]

Στους στερεοειδογόνους αδένες λαμβάνει χώρα η στερεοειδογένεση, μια αναβολική διαδικασία η οποία βασίζεται στη χοληστερόλη που της παρέχεται και παράγει πολλά μεταβολικά προϊόντα και παραπροϊόντα. Ο ρόλος του SR-BI φαίνεται να είναι η ρύθμιση αυτής της διαδικασίας και η ταυτόχρονη ρύθμιση της φαγοκυττάρωσης των αποπτωτικών σπερματογόνων κυττάρων, αλληλεπιδρώντας με την φωσφατιδυλοσερίνη που υπάρχει στη μεμβράνη των κυττάρων αυτών. Επιπλέον, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο υποδοχέας συμμετέχει στην ανάπτυξη αλλά και την πρόγνωση ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων, όπως ο καρκίνος στο μαστό, ρυθμίζοντας τη διαθεσιμότητα μεταβολιτών που είναι αναγκαίοι για την παραγωγή των οιστρογόνων.[129]

Ο SR-BI συνδέεται και με λιποπολυσακχαρίτες, έχοντας έτσι ρόλο και στη μεσολάβηση της φλεγμονής. Ο SR-BI του ήπατος έχει φλεγμονώδη δράση και δεδομένου ότι ο CD36 ασκεί τη φλεγμονώδη του δράση μέσω του TLR-4 και οι δυο αυτές πρωτεΐνες ανήκουν στην ίδια ομάδα, μπορεί τα σηματοδοτικά μονοπάτια να είναι παρόμοια. [130]

Εκτός από τη φλεγμονώδη δράση του, φαίνεται πως ο υποδοχέας βοηθά και στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης. Υπάρχουν αποτελέσματα που δείχνουν την επίδραση του στην έκφραση της πρωτεΐνης LAG3 που σχετίζεται με την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων και η οποία ανταγωνίζεται την CD4 και αναστέλλει την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, φαίνεται ότι η έκφραση του υποδοχέα είναι αυξημένη σε λιποκύτταρα που υπάρχουν οξειδωμένες απολιποπρωτεΐνες, γεγονός που υποδεικνύει την προστατευτική δράση του υποδοχέα έναντι της φλεγμονής των λιποκυττάρων.[131]

Τέλος, φαίνεται πως ο υποδοχέας βοηθά τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV) να εισέλθει στον οργανισμό, μέσω της σύνδεσής του με τη γλυκοπρωτεΐνη E₂ που υπάρχει στο έλυτρο του ιού.

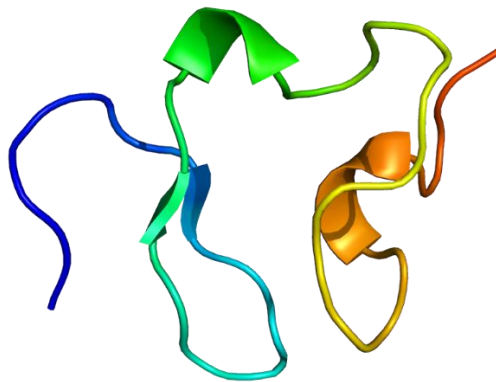
1.10.1 Ο SR-BI στη νόσο Alzheimer's

Ο SR-BI είναι υποδοχέας για το Αβ στα μικρογλοιακά κύτταρα. Σε ένα μοντέλο της ασθένειας σε μύες, η μείωση της έκφρασης του SR-BI αύξησε την εναπόθεση πλακών αμυλοειδούς, δεν είχε καμία επίδραση στην συσσώρευση μικρογλοιακών κυττάρων και φαίνεται να προκάλεσε επιδείνωση των ελλειμάτων μάθησης και μνήμης. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι ο SR-BI συμμετέχει και στην προσκόλληση της μικρογλοίας σε περιοχές που υπάρχει Αβ μέσω της παραγωγής οξειδωτικών ριζών. [132]

Μια εργασία που έχει γίνει στο εργαστήριό μας φανέρωσε την αύξηση της έκφρασης του SR-BI στους εγκεφάλους διαγονιδιακών μυών με νόσο Alzheimer's. Στη μελέτη αυτή, η μείωση της έκφρασης του υποδοχέα στους ίδιους μύες έδειξε αύξηση των περιαγγειακών μακροφάγων που βρίσκονται στα αγγεία και στο εγκεφαλικό παρέγχυμα. Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με τον συνεντοπισμό τους με τις αμυλοειδείς πλάκες, μπορεί να υποδεικνύει την εμπλοκή των περιαγγειακών μακροφάγων στην εκκαθάριση του Αβ από τα αγγεία και το παρέγχυμα του εγκεφάλου.[133]

1.11 LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR

Ο Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με 839 αμινοξέα και μέγεθος περίπου 95kDa. Ο υποδοχέας αποτελείται από έναν αριθμό διακριτά λειτουργικών περιοχών, ενώ διαπερνά μόνο μια φορά την μεμβράνη με μια αλληλουχία η οποία έχει δομή άλφα έλικας. (Εικόνα 11) [121] Η μια περιοχή αποτελείται από επτά επαναλήψεις 40 αμινοξέων οι οποίες είναι πλούσιες σε κυστεΐνη και ονομάζονται LA επαναλήψεις (LDL receptor type A repeats). Οι επαναλήψεις αυτές θεωρείται ότι είναι υπεύθυνες για την σύνδεση με τους προσδέτες. Η επόμενη περιοχή έχει υψηλή ομολογία με την πρόδρομη πρωτεΐνη EGF (epidermal growth factor) και θεωρείται υπεύθυνη για την αλλαγή της διαμόρφωσης του υποδοχέα ανάλογα με το pH, η οποία οδηγεί στην απελευθέρωση της δεσμευμένης LDL στο ενδόσωμα. Η επόμενη περιοχή είναι πλούσια σε σερίνη και θρεονίνη και υπόκειται γλυκοζυλίωση (O-linked glycosylation). Στη συνέχεια υπάρχει η διαμεμβρανική περιοχή και η περιοχή που περιέχει το καρβοξυτελικό άκρο και βρίσκεται στο κυτοσόλιο. Το γονίδιο του υποδοχέα στους ανθρώπους βρίσκεται στον γενετικό τόπο 19p13.2 και έχει 18 εξώνια. Στους μύες το γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9 και έχει επίσης 18 εξώνια. [134]



Εικόνα 10 Δομή LDL Receptor

Ο υποδοχέας LDLR διατηρεί τα επίπεδα της χοληστερόλης σταθερά στο πλάσμα, μεσολαβώντας την ενδοκυττάρωση των σωματιδίων LDL (Low-density lipoprotein), τα οποία περιέχουν εστεροποιημένη χοληστερόλη. Μετά την πρόσδεση της LDL στον υποδοχέα, το σύμπλοκο που δημιουργείται υπόκειται σε ενδοκυττάρωση μέσω κλαθρίνης. Ο προσδέτης απελευθερώνεται στα ενδοσώματα λόγω του χαμηλού pH που επικρατεί τοπικά και ο υποδοχέας ανακυκλώνεται και βγαίνει πάλι στην επιφάνεια. Παράλληλα, η LDL οδηγείται στα λυσοσώματα όπου γίνεται υδρόλυση των χοληστερουλεστέρων και έτσι η χοληστερόλη καθίσταται διαθέσιμη για χρήση από τα κύτταρα. Η έκφραση του LDL υποδοχέα ρυθμίζεται μεταγραφικά ως απόκριση στα ενδοκυτταρικά επίπεδα της χοληστερόλης, μέσω της μεταγραφής ή της αναστολής ρυθμιστικών γονιδίων. [135]

Ο πιο σημαντικός φυσιολογικός προσδέτης του υποδοχέα είναι τα σωματίδια της LDL, τα οποία περιέχουν ένα μόνο αντίγραφο της απολιποπρωτεΐνης B-100 (ApoB-100) και φέρει το 65-70% της χοληστερόλης του πλάσματος στους ανθρώπους. Ο υποδοχέας προσδέεται ισχυρά και με λιποπρωτεΐνες που φέρουν πολλαπλά αντίγραφα της απολιπρωτεΐνης E (ApoE), όπως η β -VLDL (beta-migrating very-low density lipoprotein) και λιποπρωτεΐνες ενδιάμεσης ή υψηλής πυκνότητας.[136]

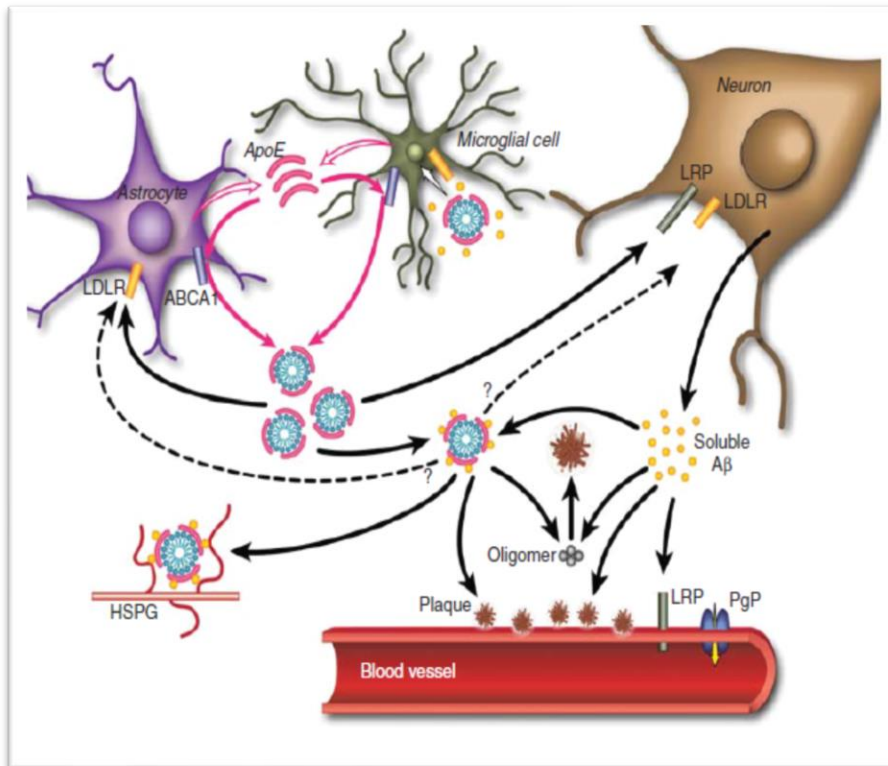
Ο υποδοχέας βρίσκεται σε αφθονία στο ήπαρ, το οποίο είναι υπεύθυνο για την απομάκρυνση της περίσσειας χοληστερόλης από τον οργανισμό. Εκφράζεται όμως και σε άλλους ιστούς, όπως ο εγκέφαλος και συγκεκριμένα τα αστροκύτταρα, τα μικρογλοιακά κύτταρα και οι νευρώνες. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα

LDLR μπορεί να φέρει μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν την έλλειψη της λειτουργίας του και τελικά οδηγούν σε οικογενή υπερχοληστερολαιμία. Η οικογενής υπερχοληστερολαιμία είναι μια ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένες συγκεντρώσεις LDL και χοληστερόλης στο πλάσμα των πασχόντων. Για την ασθένεια αυτή έχουν βρεθεί περίπου 1000 μεταλλαγμένα αλληλόμορφα τα οποία κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο. [136]

1.11.1 Ο LDLR στη νόσο Alzheimer's

Οι δυσλειτουργίες του μεταβολισμού των λιπιδίων έχουν σχετιστεί με τη νόσο του Alzheimer. (Εικόνα 12) Η αποτελεσματική μεταφορά της χοληστερόλης είναι ένα σημαντικό κομμάτι της κυτταρικής αναδόμησης, η οποία σχετίζεται με την συναπτική πλαστικότητα και επιπλοκές της διαδικασίας αυτής φαίνεται πως συνεισφέρουν στην εκδήλωση άνοιας. Δυο βασικοί ρυθμιστές του μεταβολισμού της χοληστερόλης είναι η ApoE και ο LDLR. Η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου σχετίζεται και με τους διαφορετικούς πολυμορφισμούς του υποδοχέα LDLR. Επιπλέον, η πιθανότητα αυτή σχετίζεται και με τον τύπο της ApoE που φέρει το άτομο. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου του Alzheimer μπορεί να καθορίζεται από μια λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ της ApoE και του LDLR. Ακόμη, φαίνεται πως ο υποδοχέας έχει υψηλότερη συγγένεια με την ApoE4, η οποία αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τη νόσο του Alzheimer, επομένως υπάρχει περίπτωση να εμπλέκεται και ο LDLR στην παθογένεια της νόσου.[137]

Αποτελέσματα μελετών δείχνουν πως η έλλειψη του LDLR και η αλληλεπίδραση μεταξύ του υποδοχέα και της ApoE σχετίζονται με σημαντική μείωση στη διατήρηση της μακροχρόνιας μνήμης. Επιπλέον, σε άλλη μελέτη η απαλοιφή του LDLR προκάλεσε μείωση στην πρόσληψη του Αβ, ενώ η αύξηση της έκφρασης του LDLR προκάλεσε αύξηση της πρόσληψης και της εκκαθάρισης του Αβ. [138]



Εικόνα 11 Ενδεικτικός μηχανισμός συμμετοχής της χοληστερόλης στην εκκαθάριση του Aβ

1.12 ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

1.12.1 Ορισμός

Η τεχνολογία κατά την οποία: α) μη ενδογενές DNA (ίδιου είδους, τελείως διαφορετικού είδους ή τεχνητό γενετικό υλικό) εισάγεται με τη βοήθεια ειδικών φορέων (πλασμιδίων ή ιών) στο γονιδίωμα ενός οργανισμού, ή β) το ενδογενές DNA ενός οργανισμού τροποποιείται με κατάλληλες τεχνικές, ονομάζεται **διαγονιδιακή**. Στην έρευνα για βιολογικούς σκοπούς, η τεχνολογία αυτή χρησιμοποιείται σε πολλούς οργανισμούς-μοντέλα, όπως η *Drosophila*, το *C. elegans*, τα zebrafish και κυρίως οι μύες. Οι μύες παρουσιάζουν κάποια πλεονεκτήματα σε σχέση με τα άλλα μοντέλα και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ευρέως στην έρευνα. Αρχικά, ανήκουν στα ανώτερα θηλαστικά και επομένως παρουσιάζουν περισσότερες ομοιότητες με τους ανθρώπους, άρα είναι προτιμότερα ως μοντέλα ανθρώπινων ασθενειών. Επιπλέον, έχουν μικρό μέγεθος, είναι εύκολα στον χειρισμό, έχουν χαμηλό κόστος συντήρησης και δίνουν γρήγορα μεγάλο αριθμό απογόνων.[139], [140]

1.12.2 Κατασκευή διαγονιδιακών μυών με μικροένεση

Η πιο αποτελεσματική τεχνική για την παραγωγή διαγονιδιακών μυών είναι η εισαγωγή εξωγενών, κλωνοποιημένων γονιδίων (διαγονιδίων) σε γονιμοποιημένα ωάρια με μικροένεση. Από τους ωαγωγούς θηλυκών ατόμων που έχουν ζευγαρώσει λαμβάνονται τα γονιμοποιημένα ωάρια, τα οποία αποτελούνται από δυο προπυρήνες, έναν αρσενικό (από το σπερματοζωάριο) και έναν θηλυκό (από το ωάριο). Από τους προπυρήνες αυτούς σχηματίζεται τελικά ο πυρήνας του πρώτου κυττάρου του εμβρύου. Στην τεχνική αυτή, τα γονιμοποιημένα ωάρια κρατούνται στην άκρη μιας γυάλινης πιπέτας υπό αναρρόφηση και το διαγονίδιο εισάγεται με μικροέγχυση στον αρσενικό προπυρήνα συνήθως (λόγω μεγαλύτερου μεγέθους) με μια λεπτή βελόνα. Μετά τη μικροέγχυση, γίνεται ενσωμάτωση του διαγονιδίου στο χρωμοσωμικό DNA του προπυρήνα και έτσι τα θυγατρικά κύτταρα που επιβιώνουν της διαδικασίας φέρουν το επιθυμητό διαγονίδιο. Έπειτα, τα έμβρυα εισάγονται στον ωαγωγό «ψευδοέγκυων» θηλυκών, δηλαδή θηλυκών στα οποία έχει προηγηθεί ζευγάρωμα με στειρωμένα αρσενικά και έτσι έχουν αποκτήσει τις ορμόνες που απαιτούνται για να δεχθούν τα έμβρυα. Έτσι γίνεται εμφύτευση των εμβρύων στη μήτρα των θηλυκών, αυτά αναπτύσσονται φυσιολογικά και τελικά γεννιούνται μετά από 19-21 μέρες. Τα ωάρια που επιβιώνουν από αυτή την απαιτητική τεχνική αποτελούν περίπου το 10%-30% των συνολικών ωαρίων που συλλέχθηκαν, ενώ το 40% των εμβρύων που επιζούν φέρουν το εξωγενές DNA στο γονιδιώμα τους. Μετά τη γέννηση των εμβρύων, πρέπει να γίνει έλεγχος για να διαπιστωθεί ποια από αυτά φέρουν το διαγονίδιο. Ο έλεγχος αυτός γίνεται με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ή του στυπώματος κατά Southern (Southern blot). Στις τεχνικές αυτές χρησιμοποιείται γονιδιωματικό DNA το οποίο έχει απομονωθεί από ένα κομμάτι ουράς του ζώου. Η ενσωμάτωση του διαγονιδίου γίνεται τόσο στα σωματικά όσο και στα γαμετικά κύτταρα, επομένως το χαρακτηριστικό αυτό ακολουθεί τη Μενδελιανή κληρονομικότητα και τα διαγονιδιακά ζώα μπορούν να μεταβιβάσουν το χαρακτηριστικό στους απογόνους τους. Οι διαγονιδιακοί μύες που γεννιούνται από την διαδικασία αυτή, πρέπει στη συνέχεια να διασταυρωθούν με μύες άγριου τύπου ώστε να εδραιωθεί το διαγονιδιακό στέλεχος. Το διαγονίδιο σε αυτές τις διασταυρώσεις συμπεριφέρεται ως επικρατές γονίδιο και οι απόγονοι που προκύπτουν από τα αρχικά διαγονιδιακά ζώα φέρουν το γονίδιο στην ίδια ακριβώς θέση του γονιδιώματός τους. Οι απόγονοι των ιδρυτών, δηλαδή των αρχικών διαγονιδιακών μυών αποτελούν μια διαγονική σειρά (transgenic line). Οι διαγονικοί μύες είναι συνήθως ετερόζυγοι ως προς

το διαγονίδιο, όμως μπορεί αν χρειαστεί, να γίνουν διασταυρώσεις μεταξύ των ετερόζυγων μυών ώστε να προκύψουν ομόζυγοι μύες για το διαγονίδιο.

Το εξωγενές DNA που μικροεγχύεται ενσωματώνεται σε μια μοναδική θέση ενός χρωμοσώματος, ως συστοιχία επαναλαμβανόμενων αντιγράφων (tandem arrays), με μηχανισμό που δεν είναι ακόμα απόλυτα γνωστός. Παρόλο που τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης ποικίλλουν, φαίνεται ότι είναι αυξημένα όταν ενύεται γραμμικό DNA χωρίς πλασμιδιακές αλληλουχίες, οι οποίες έχειδειχθεί ότι μπορεί να εμποδίσουν την έκφραση του διαγονιδίου. Εάν στο διαγονίδιο έχουν περιληφθεί οι κατάλληλες ρυθμιστικές αλληλουχίες, τότε το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου είναι φυσιολογικό. Στην περίπτωση που απαιτείται η έκφραση του γονιδίου να είναι ομοιόμορφη σε όλο το έμβρυο, χρησιμοποιούνται υποκινητές γονιδίων κυτταρικής οικονομίας (housekeeping genes), όπως το γονίδιο της ακτίνης β. Εάν απαιτείται το γονίδιο να εκφραστεί σε συγκεκριμένο ιστό ή σε συγκεκριμένο στάδιο της ανάπτυξης, τότε χρησιμοποιούνται υποκινητές ειδικοί για το στάδιο της ανάπτυξης ή την περιοχή αντίστοιχα. Τέλος, υπάρχουν και υποκινητές οι οποίοι επάγουν την έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις, όπως για παράδειγμα ο υποκινητής της μεταλλοθειονίνης ο οποίος ενεργοποιείται από τον ψευδάργυρο. [139], [140]

1.12.3 Γονιδιακά στοχευμένοι μύες

Παρόλο που η μέθοδος που περιγράφηκε είναι αποδοτική, δεν παρέχει κανέναν τρόπο να γνωρίζουμε τον αριθμό αντιγράφων που εισάγονται, δεν δίνει την δυνατότητα να τροποποιηθούν ενδογενή γονίδια με τρόπο ελεγχόμενο, ενώ η θέση ενσωμάτωσης του διαγονιδίου είναι τυχαία, δηλαδή μπορεί να εισαχθεί ακόμα και σε αλληλουχία του DNA που δεν είναι μεταγραφικά ενεργή. Τα προβλήματα αυτά μπορούν να υπερνικηθούν με τη χρήση της μεθόδου γονιδιακής στόχευσης με ομόλογο ανασυνδυασμό. Στην τεχνική αυτή, το επιθυμητό γονίδιο εισάγεται σε συγκεκριμένες θέσεις μέσα στη βλαστική σειρά του μυός. Η μέθοδος βασίζεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό μεταξύ του εξωγενούς DNA και του γονιδιακού DNA στα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (Embryonic stem cells, ES cells), τα οποία αναπτύσσονται σε μεγάλους αριθμούς σε *in vitro* καλλιέργειες, γεγονός που βοηθά να γίνει ο ομόλογος ανασυνδυασμός. Αυτή η τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για την στοχευμένη αδρανοποίηση ενδογενών γονιδίων (gene knockout), τα οποία αντικαθίστανται από μη λειτουργικά αντίγραφα τους. Άλλες δυνατότητες περιλαμβάνουν την αντικατάσταση

γονιδίου από κάποιο άλλο, ή πιο γενικά η εισαγωγή μιας επιθυμητής τροποποίησης σε περιοχή του γονιδιακού DNA με γνωστή αλληλουχία (knock-in), αλλά και τη δημιουργία υπό συνθήκη συστήματος έκφρασης ή αδρανοποίησης του γονιδίου (conditional). [139], [140]

1.12.4 Στοχευμένη αδρανοποίηση γονιδίων

Η στοχευμένη αδρανοποίηση γονιδίων έχει σκοπό να βοηθήσει την ανακάλυψη της λειτουργίας του γονιδίου αυτού μέσω της εξάλειψής του και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην μελέτη γενετικών ασθενειών. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται ένα μεγάλο μήκος τμήμα του γονιδιακού DNA το οποίο περιέχει την επιθυμητή περιοχή και σε αυτήν γίνεται αντικατάσταση ενός εξωνίου ή μιας άλλης σημαντικής αλληλουχίας του γονιδίου, με ένα γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά (π.χ. στη νεομυκίνη). Στις περιοχές ανοδικά ή καθοδικά της αλληλουχίας που πρόκειται να αδρανοποιηθεί, στο γονίδιο που πλέον έχει χωριστεί σε δυο τμήματα, εισάγεται το μικρό γονίδιο της κινάσης της θυμιδίνης, στο ένα άκρο και εκτός της αλληλουχίας-στόχου. Το δημιούργημα αυτό χρησιμοποιείται για να διαμολυνθούν κύτταρα ES, τα οποία έχουν προέλθει από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης του μυός και έχει ακολουθήσει καλλιέργεια σε τροφική στοιβάδα ινοβλαστών ή με χρήση του ανασταλτικού παράγοντα της λευχαιμίας, ώστε να διατηρηθεί η πολυδυναμία των κυττάρων και ικανότητα διαφοροποίησής τους προς πολλούς κυτταρικούς τύπους. Εάν το δημιούργημα εισαχθεί σε μια τυχαία θέση, τότε σε αυτήν θα βρεθούν τα γονίδια της νεομυκίνης και της κινάσης της θυμιδίνης. Στην περίπτωση όμως που σε ένα κύτταρο γίνει ομόλογος ανασυνδυασμός, τότε επειδή το γονίδιο της κινάσης της θυμιδίνης βρίσκεται εκτός της περιοχής ομολογίας, η ένθεση θα περιορίζεται μόνο στο γονίδιο της νεομυκίνης. Τα κύτταρα στα οποία πραγματοποιείται ο ομόλογος ανασυνδυασμός, με συχνότητα 1%, επιλέγονται με θρεπτικό μέσο που περιέχει νεομυκίνη και γανσικλοβίρη. Τα κύτταρα ES στα οποία δεν έχει γίνει ένθεση του δημιουργήματος, υπό αυτές τις συνθήκες καλλιέργειας πεθαίνουν καθώς είναι ευαίσθητα στη νεομυκίνη. Επίσης, τα κύτταρα στα οποία δεν έχει ομόλογος ανασυνδυασμός, ακόμα και αν περιέχουν το δημιούργημα πεθαίνουν, καθώς η κινάση της θυμιδίνης μετατρέπει την γανσικλοβίρη σε τοξικό προϊόν. Επομένως, υπό αυτές τις καλλιεργητικές συνθήκες τα περισσότερα κύτταρα που επιβιώνουν στα οποία έχει γίνει ο ομόλογος ανασυνδυασμός και έχει γίνει σωστά η αντικατάσταση του γονιδίου-στόχου με το δημιούργημα. Αυτή η διαδικασία

επιλογής ονομάζεται αρνητική-θετική επιλογή (positive-negative selection), γιατί τα κύτταρα που επιλέγονται από αυτή είναι αρνητικά για την γανσικλοβίρη και ταυτόχρονα θετικά για τη νεομυκίνη.

Στην συνέχεια, τα επιλεγμένα κύτταρα αναπτύσσονται ως μεμονωμένοι κλώνοι και ακολουθεί έλεγχός τους με PCR ή Southern blot, για να επιβεβαιωθεί η θέση της ένθεσής τους. Έπειτα, οι κλώνοι που θα επιλεγθούν εγχύονται σε βλαστοκύστες και τα έμβρυα εισάγονται σε «ψευδοέγκυες» μητέρες. Οι μύες που προκύπτουν αποτελούν χίμαιρες και συνδυάζουν κύτταρα τα οποία έχουν προέλθει από γενετικά τροποποιημένα ES κύτταρα και κύτταρα που προήλθαν από τις φυσιολογικές βλαστοκύστες του ξενιστή. Τα έμβρυα επιλέγονται με βάση το χρώμα του τριχώματός τους, το οποίο πρέπει να είναι διαφορετικό από των ζώων από τα οποία προήλθαν τα ES κύτταρα. Τις περισσότερες φορές τα ES κύτταρα προέρχονται από στελέχη μυών 129 με χρώμα agouti (συνδυασμός μαύρο/κίτρινο) και για τις βλαστοκύστες χρησιμοποιούνται μύες χρώματος μαύρου ή λευκού (αλφικό στέλεχος). Με τον τρόπο αυτό μπορεί να φανεί και από το τρίχωμα των μυών το κατά πόσο είναι χίμαιρες. Για την επιβεβαίωση χρησιμοποιείται γονιδιακό DNA απομονωμένο από ακραίο κομμάτι ουράς του μυός, στο οποίο γίνεται ανάλυση. Επόμενο βήμα είναι ο έλεγχος της γαμετικής σειράς των πρώτων μυών, μέσω κατάλληλων διασταυρώσεων, για να εξακριβωθεί αν είναι και αυτή χιμαιρική. Οι απόγονοι των διασταυρώσεων αυτών (σειρά F1), ελέγχονται με τη χρήση τμήματος της ουράς για την παρουσία του γονιδίου που έχει αδρανοποιηθεί. Όσοι από τους απογόνους αυτούς φέρουν το επιθυμητό αλληλόμορφο, διασταυρώνονται μεταξύ τους με σκοπό να προέλθουν ομόζυγοι απόγονοι.[139], [140]

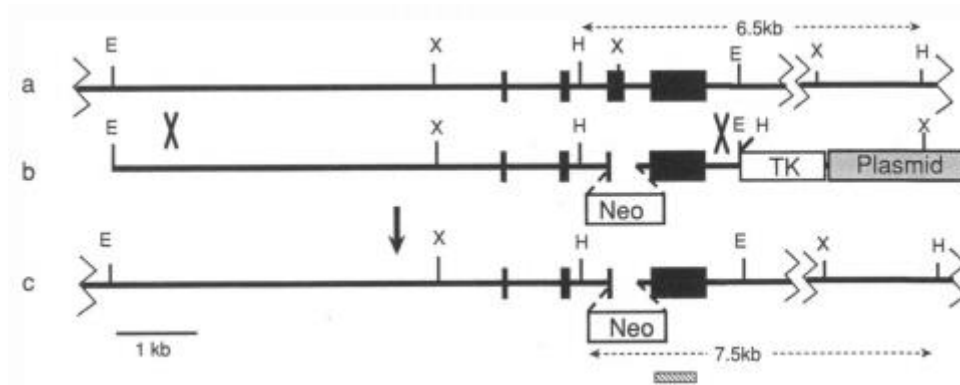
1.13 ΜΟΝΤΕΛΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΜΥΩΝ

1.13.1 APOE knockout

Οι ApoE knockout (ApoE KO) διαγονιδιακοί μύες δημιουργήθηκαν στο 1991 από την ομάδα της Nobuyo Maeda στο Πανεπιστήμιο της Βόρειας Καρολίνα. Ο τύπος της μετάλλαξης αυτής συμβολίζεται ως ApoE^{tm1UNC} (ApoE transgenic mutation 1 University of North Carolina). Οι ApoE^{tm1UNC} μύες φέρουν μια μετάλλαξη που προκαλεί διαγραφή και η οποία δημιουργήθηκε με τη χρήση εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, με τη βοήθεια πλασμιδίου έχει γίνει ένθεση μιας κασέτας η οποία

προκαλεί αντίσταση στη νεομυκίνη και παράλληλα διαγράφει το εξώνιο 3 και τμήμα του εσωνίου 3 στο γονίδιο apoE. Η μετάλλαξη αυτή έχει μεταφερθεί σε πολλές σειρές μυών όπως C57BL/6, 129P2/OlaHsd και άλλες.

Η έλλειψη της ApoE είναι αρκετή για να προκαλέσει σοβαρή υπερλιπιδαιμία στους μύες. Στους οργανισμούς αυτούς φαίνεται αύξηση στην ολική χοληστερόλη του πλάσματος η οποία οφείλεται στη συσσώρευση υπολειμμάτων χυλομικρών εμπλουτισμένων με χοληστερόλη και λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας. Στους τρεις μήνες εμφανίζονται λιπαρές ραβδώσεις στην εγγύς αορτή, οι οποίες είναι πρόδρομη της αθηροσκλήρωσης. Οι ApoE KO μύες εμφανίζουν ηλικιοεξαρτώμενη απώλεια συνάψεων και μαθησιακά ελλείματα. Επιπλέον, παρουσιάζουν χολινεργική δυσλειτουργία, υπερφοσφορύλιωση της tau και ελλείματα μνήμης, τα οποία αποτελούν χαρακτηριστικά ευρήματα της νόσου Alzheimer's.[141]



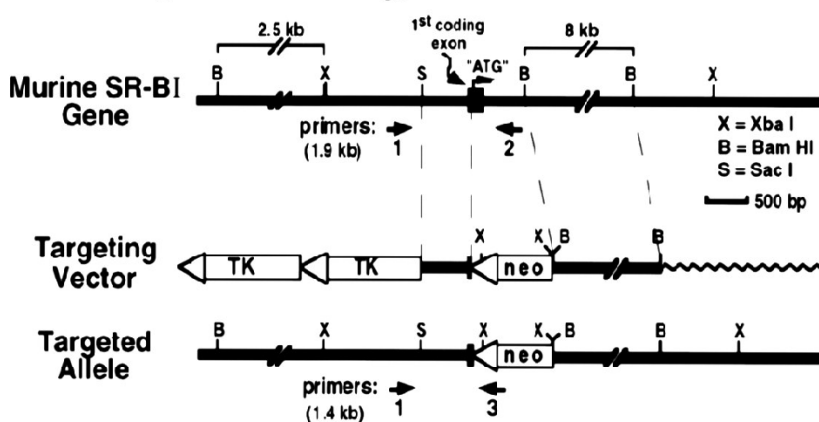
Εικόνα 12 Δημιουργία ApoE Knockout

1.13.2 SR-BI knockout

Οι SR-BI knockout (SR-BI KO) διαγονιδιακοί μύες δημιουργήθηκαν το 1996 από την ομάδα του Monty Krieger στο Massachusetts Institute of Technology. Ο τύπος της μετάλλαξης αυτής συμβολίζεται ως Scarb1^{tm1Kri} (Scavenger Receptor class B- type I transgenic mutation 1 Krieger). Οι Scarb1^{tm1Kri} μύες φέρουν μια μετάλλαξη η οποία απενεργοποιεί το γονίδιο. Συγκεκριμένα, γίνεται αντικατάσταση ολόκληρης της κωδικής περιοχής του πρώτου εξωνίου και επιπλέον 554 βάσεων του πρώτου εσωνίου.

Η αντικατάσταση αυτή γίνεται με τη χρήση περιοριστικού ενζύμου και ένθεση ενός φορέα που φέρει εκφραστικές κασέτες σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα.

Οι διαγονιδιακοί αυτοί μύες εμφανίζουν συγκεντρώσεις της χοληστερόλης του πλάσματος αυξημένες κατά 125% και 31% σε ομοζυγώτες και ετεροζυγώτες αντίστοιχα, σε σχέση με τους μύες αγρίου τύπου. Επιπλέον, τα επίπεδα της χοληστερόλης στα επινεφρίδια είναι μειωμένα κατά 72% και 42% σε ομοζυγώτες και ετεροζυγώτες αντίστοιχα. Το μοντέλο αυτό χρησιμοποιείται ευρέως για μελέτες του μεταβολισμού και του καρδιαγγειακού συστήματος.[142]

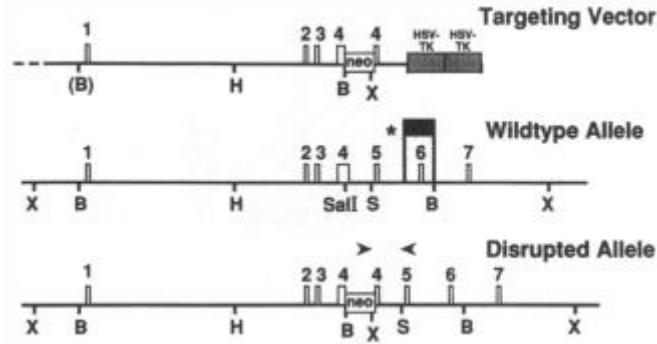


Εικόνα 13 Δημιουργία SR-BI knockout

1.13.3 LDLR knockout

Οι LDLR knockout (LDLR KO) διαγονιδιακοί μύες δημιουργήθηκαν το 1992 από την ομάδα του Herz στο Πανεπιστήμιο του Τέξας. Η μετάλλαξη συμβολίζεται ως $Ldlr^{tm1Her}$ (Low density lipoprotein receptor transgenic receptor 1 Herz). Οι $Ldlr^{tm1Her}$ μύες κατασκευάστηκαν με την εισαγωγή κασέτας νεομυκίνης σε βλαστικά κύτταρα μέσω ενός φάγου-φορέα. Η κασέτα νεομυκίνης ενσωματώνεται στο εξώνιο 4 και έτσι οδηγεί την παραγωγή μιας κομμένης πρωτεΐνης η οποία δεν μπορεί να δεσμεύσει την LDL.

Οι LDLR KO μύες που είναι ομόζυγοι για το μεταλλαγμένο γονίδιο έχουν συγκέντρωση χοληστερόλης στο πλάσμα 200-400 mg/dl ενώ οι αγρίου τύπου μύες έχουν συνήθως 80-100 mg/dl. Αυτό συμβαίνει λόγω της επταπλάσιας αύξησης στις λιποπρωτεΐνες ενδιάμεσης και χαμηλής πυκνότητας, χωρίς να επηρεάζονται οι λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας.[143]



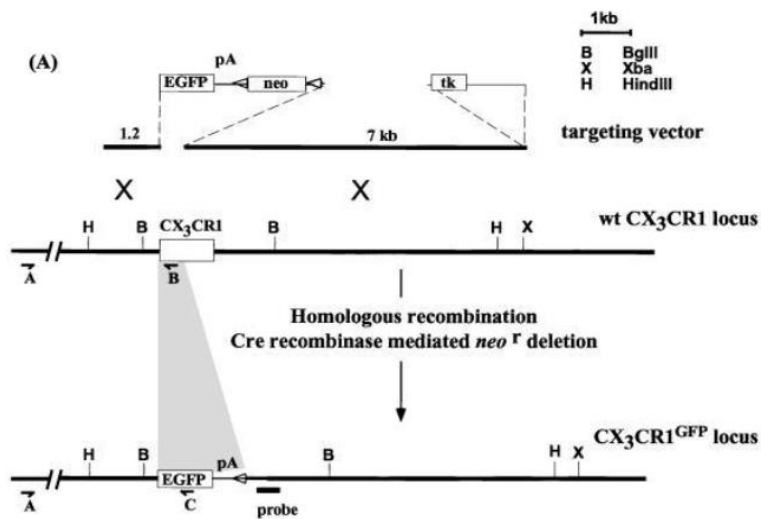
Εικόνα 14 Δημιουργία LDLR knockout

1.13.4 CX3CR1 GFP

Τα μικρογλοιακά κύτταρα χαρακτηρίζονται από την έκφραση ενός υποδοχέα χημειοκίνης που ονομάζεται CX3CR1. Προσδέτης του υποδοχέα αυτού είναι η CX3CL1/Fraktalkine (FKN) η οποία εκφράζεται από τους νευρώνες. Η σύνδεση του υποδοχέα αυτού με τον προσδέτη του μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία μικρογλοίας-νευρώνων.

Ο υποδοχέας CX3CR1 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με μέγεθος 40 kDa και 7 διαμεμβρανικά τμήματα. Εκφράζεται από τα μονοκύτταρα και από διάφορους υποπληθυσμούς των T και NK κυττάρων. Στον εγκέφαλο εκφράζεται μόνο από τα μικρογλοιακά κύτταρα και για το λόγο αυτό αποτελεί ένα πολύ καλό εργαλείο για την μελέτη τους. Για να γίνει μελέτη των μικρογλοιακών κυττάρων αλλά και του υποδοχέα μεμονωμένα, έχει δημιουργηθεί ένα διαγονιδιακό μοντέλο μύς στο οποίο έχει γίνει αντικατάσταση του υποδοχέα CX3CR1 με το γονίδιο που κωδικοποιεί την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Enhanced Green Fluorescence Protein, EGFP).

Οι CX3CR1 GFP μύες δημιουργήθηκαν το 1999 στη Νέα Υόρκη από την ομάδα του Dan Littman και η μετάλλαξη συμβολίζεται ως $Cx3cr1^{tm1Litt}$. Για την κατασκευή του διαγονιδίου, αρχικά γίνεται αντικατάσταση των 390 πρώτων ζευγών βάσεων του εξωνίου 2 με μια αλληλουχία που κωδικοποιεί το GFP και περιέχει γονίδιο αντίστασης στη νεομυκίνη. Ο φορέας εισάγεται σε βλαστοκύστες, οι οποίες αργότερα διαχωρίζονται με βάση την αντίσταση στη νεομυκίνη. Το τμήμα του υποδοχέα που χάνεται είναι σημαντικό για την πρόσδεση της φρακταλκίνης. Επομένως, οι ομόζυγοι μύες για το διαγονίδιο έχουν χάσει πλήρως τη λειτουργία του υποδοχέα. Αυτό όμως δεν φαίνεται να προκαλεί στους μύες σοβαρά προβλήματα στην ανάπτυξη.



Εικόνα 15 Δημιουργία *CX3CR1* GFP

1.14 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης των μορίων που συμμετέχουν στον μεταβολισμό της χοληστερόλης στη μορφολογία των μικρογλοιακών κυττάρων. Για τη μελέτη αυτή επιλέχθηκαν τρία μόρια τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό της χοληστερόλης: ο υποδοχέας scavenger receptor-class B type 1 (SCARB1 ή SR-BI), ο υποδοχέας low density lipoprotein receptor (LDLR) και η apolipoprotein E (ApoE). Για να εξετάσουμε την επίδραση των εν λόγω μορίων, χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακοί μύες στους οποίους είχε γίνει μερική ή ολική απαλοιφή των γονιδίων *scarb1*, *ldlr* και *apoe*. Οι μύες αυτοί εξετάστηκαν στους 4 ή 11 μήνες με τη χρήση ιστοχημικών μεθόδων.

ΜΕΡΟΣ Β

ΚΕΦ. 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Οι διαγονιδιακοί μύες SR-BI^{-/-}, LDLR^{-/-} και ApoE^{-/-} αποκτήθηκαν από το The Jackson Laboratory (JAX), ενώ οι CX3CR1 μύες προέρχονται από την Δρ. Θωμαΐδου στο Ινστιτούτο Παστέρ. Όλοι οι μύες διατηρήθηκαν υπό στείρες συνθήκες στη Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Οι συνθήκες διαβίωσης των μύων είναι οι εξής: θερμοκρασία 22±1°C, υγρασία 55±10%, 12ωρο κύκλο φωτός-σκότους, νερό και τροφή ad libitum. Το σύνολο των πρωτοκόλλων που εφαρμόστηκαν είναι εγκεκριμένα από την Επιτροπή Βιοηθικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών και όλοι οι πειραματικοί χειρισμοί των ζώων πραγματοποιήθηκαν βάσει των ηθικών συστάσεων της κατευθυντήριας οδηγίας 86/609/ΕΟΚ του συμβουλίου της 24^{ης} Νοεμβρίου 1986.

2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΒΙΟΨΙΕΣ ΟΥΡΑΣ

Από μύες 15-20 ημερών κόβεται 0.5cm από το άκρο της ουράς και τοποθετείται σε σωληνάκι erpendorf. Στη συνέχεια εισάγονται 500μl διαλύματος TENS με σύσταση 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA (αιθυλοδιαμινο-τετραοξικό οξύ, ethylene diamine tetra acetic acid, SIGMA), 100 mM NaCl (χλωριούχο νάτριο, sodium chloride, AppliChem), 1% SDS (δωδεκακυκλοθειικό νάτριο, sodium dodecyl sulfate, SIGMA), διαλυμένα σε ddH₂O και 4μl πρωτεϊνάσης K (proteinase K, AppliChem) με συγκέντρωση 10 mg/ml και στη συνέχεια γίνεται επώαση overnight στους 55°C. Καθώς το DNA είναι ιοντισμένο μόριο, είναι σταθερότερο και διαλυτό σε διαλύματα αλάτων και για το λόγο αυτό αντί για απεσταγμένο νερό, χρησιμοποιούνται μέσα που περιέχουν NaCl για τη διαλυτοποίησή του. Το EDTA, μέσω της δημιουργίας χηλικών συμπλόκων δεσμεύει δισθενή ιόντα, όπως το μαγνήσιο, τα οποία μπορούν να σχηματίσουν άλατα με τις ανιονικές φωσφορικές ομάδες του DNA. Ακόμα, το EDTA προκαλεί την έμμεση αναστολή των δεοξυριβονουκλεασών του κυττάρου, οι οποίες χρειάζονται τα ιόντα αυτά για τη δράση τους. Το SDS είναι απορρυπαντικό και λειτουργεί λύοντας την κυτταρική και πυρηνική μεμβράνη του κυττάρου με σκοπό να απελευθερωθεί το DNA.

Επιπλέον βοηθά στην αποδιάταξη, δέσμευση και απομάκρυνση των πρωτεϊνών που συνδέονται με το DNA, όπως οι ιστόνες, αλλά και στην απενεργοποίηση των νουκλεασών. Στην διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται και ένα πρωτεολυτικό ένζυμο, η πρωτεϊνάση K, η οποία προκαλεί διάσπαση των αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών και οδηγεί στην παραγωγή μικρότερων πεπτιδίων τα οποία είναι ευκολότερο να απομακρυνθούν. Το διάλυμα αυτό έχει μέτρια αλκαλικό pH και έτσι μειώνονται οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ DNA και βασικών ιστονών, ελαττώνεται η δράση των νουκλεασών και μετουσιώνονται άλλες πρωτεΐνες.

Την επόμενη μέρα το δείγμα ανακινείται σύντομα σε vortex mixer (VX100, Labnet) έτσι ώστε να διαλυθούν δομές του ιστού που μπορεί να έχουν παραμείνει. Έπειτα προστίθεται 1μl ριβονουκλεάσης A (RNase A, AppliChem) με συγκέντρωση 10 mg/ml και γίνεται επώαση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C ώστε να γίνει απομάκρυνση του RNA. Στη συνέχεια ακολουθεί καθαρισμός του DNA και απομάκρυνση πρωτεϊνών με τη μέθοδο της εκχύλισης με τη χρήση οργανικών διαλυτών. Στην αρχή προστίθενται 500μl διαλύματος φαινόλης: χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη (phenol, AppliChem: chloroform, AppliChem: isoamyl alcohol, AppliChem) με αναλογία 25:24:1 και γίνεται έντονη ανακίνηση των δειγμάτων με τη χρήση του vortex mixer για 3-5 λεπτά. Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρηση (Biofuge fresco, Heraeus) για 15 λεπτά στις 13.000rpm (rounds per minute) και στους 22°C, ώστε το μίγμα να διαχωριστεί σε δυο φάσεις. Από τις φάσεις αυτές, η πάνω είναι η υδατική και περιέχει διαλυμένο το DNA, η κάτω είναι η οργανική και η ενδιάμεση περιέχει τις πρωτεΐνες. Το χλωροφόρμιο και η φαινόλη αποδιατάσσουν τις πρωτεΐνες, ενώ η αμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί την ενδιάμεση ζώνη. Με προσοχή αφαιρείται η πάνω φάση και εισάγεται σε καινούργιο σωληνάκι Eppendorf, ενώ η κάτω φάση απορρίπτεται με προσοχή σε ειδικά σημασμένα απόβλητα, λόγω της φαινόλης. Στο σωληνάκι που εισήχθη η υδατική φάση προστίθενται άλλα 500μl διαλύματος φαινόλης: χλωροφορμίου: ισοαμυλικής αλκοόλης, γίνεται έντονη ανακίνηση στο vortex mixer για 3-5 λεπτά και επαλαμβάνεται η διαδικασία της φυγοκέντρησης υπό τις ίδιες συνθήκες. Το βήμα αυτό αποσκοπεί στον καλύτερο καθαρισμό του DNA. Λαμβάνεται και πάλι η πάνω φάση, εισάγεται σε καινούργιο σωληνάκι και προστίθενται 500μl χλωροφορμίου, το οποίο χρησιμοποιείται για να απομακρυνθεί η φαινόλη που έχει απομείνει στο δείγμα. Για τρίτη φορά επαναλαμβάνεται η διαδικασία του vortex και της φυγοκέντρησης υπό τις ίδιες συνθήκες και για τον ίδιο χρόνο και τελικά συλλέγεται η πάνω φάση σε αποστειρωμένο σωληνάκι (περίπου 400-450 μl).

Στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη ισοπροπανόλης (isopropanol, CARLO ERBA) σε ποσότητα 0,7 του όγκου του (300-330μl περίπου) και ελαφριά ανακίνηση. Στο διάλυμα TENS το DNA είναι διαλυτό και με την προσθήκη του οργανικού διαλύτη καθίσταται αδιάλυτο και επομένως κατακρημνίζεται. Οι ίνες του DNA που εμφανίζονται μετά από την προσθήκη του οργανικού διαλύτη παραλαμβάνονται με γυάλινη πιπέτα παστέρ (BRAND) η οποία επεξεργάζεται με φλόγα ώστε να κλείσει η άκρη της. Στη συνέχεια η άκρη της πιπέτας εμβαπτίζεται διαδοχικά σε αιθανόλη 70% και 100% (ethanol absolute, AppliChem) με σκοπό τον καθαρισμό του DNA, αφήνεται να στεγνώσει για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και τότε το DNA φαίνεται ως μια λευκή μάζα. Το επόμενο βήμα είναι να κοπεί η άκρη της πιπέτας και να τοποθετηθεί σε σωληνάκι Eppendorf που περιέχει 30μl διαλύματος TE (Tris-EDTA) pH 8.0, με σύσταση 100μl Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, διαλυμένα σε ddH₂O. Το TE ως ρυθμιστικό διάλυμα φροντίζει για τη διατήρηση του pH του διαλύματος κοντά στο 8.0, ενώ παράλληλα το EDTA φροντίζει για την αναστολή της δράσης των νουκλεασών. Τέλος, τα σωληνάκια που περιέχουν τα DNA που απομονώθηκαν από τα δείγματα, τοποθετούνται σε περιστροφικό ανακινητήρα για μια ώρα, στους 37°C για την πλήρη διάλυση του DNA και μετά φυλάσσονται στους 4°C.

2.3 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ DNA

Η ποσοτικοποίηση του DNA μπορεί να γίνει ακριβέστερη με τη χρήση ενός φασματοφωτομέτρου. Για να ποσοτικοποιηθεί το δίκλωνο DNA, πρέπει να μετρηθεί η απορρόφησή του στα 260nm με τη χρήση κυβετών από χαλαζία. Για να θεωρηθούν οι μετρήσεις αξιόπιστες, τα αποτελέσματα θα πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ 0,1 και 1,0. Η μια μονάδα απορρόφησης στα 260nm αντιστοιχεί σε 50μg DNA/ml, όταν οι κυβέτες είναι 1cm. Αυτή η αναλογία ισχύει όταν το DNA βρίσκεται σε ουδέτερο περιβάλλον (πχ Tris-HCl, pH=7,0).

Η συγκέντρωση του DNA δίνεται από τον τύπο:

$$\text{Συγκέντρωση DNA (mg/ml)} = (A_{260} - A_{320}) \times \text{αραιώση} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

Επειδή μπορεί να υπάρχουν στο διάλυμα και άλλα μόρια, όπως κατάλοιπα από την απομόνωση του DNA, τα οποία να απορροφούν στα 260nm, είναι απαραίτητο να καθοριστεί η καθαρότητα του DNA. Το RNA απορροφά και αυτό στα 260nm, ενώ η φαινόλη και άλλοι αρωματικοί διαλύτες απορροφούν στα 280nm. Για να υπολογιστεί η καθαρότητα του δείγματος υπολογίζεται ο λόγος των απορροφήσεων στα 260nm και

280nm, με διορθώσεις έτσι ώστε γίνει αφαίρεση της θολερότητας (320nm). Η καθαρότητα του DNA δίνεται από τον τύπο:

$$\text{Καθαρότητα DNA (A260/A280)} = (A260-A320) \div (A280-A320)$$

Τιμές καθαρότητας 1,7-2 είναι ικανοποιητικές.

Αφού προσδιοριστούν η συγκέντρωση και η καθαρότητα του DNA, το κάθε δείγμα αραιώνεται με διάλυμα TE 1x ώστε η συγκέντρωσή του να γίνει 100 mg/ml. Αυτό εξυπηρετεί στο να έχουν όλα τα δείγματα που θα χρησιμοποιηθούν στην PCR, την ίδια συγκέντρωση.

2.4 ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΥΩΝ ΜΕ PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) αποτελεί μια πολύ χρήσιμη τεχνική, η οποία επιτρέπει τον *in vitro* εκθετικό πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA, ακόμα και όταν αυτές οι αλληλουχίες βρίσκονται σε εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα μέσα σε κάποιο μίγμα.[144] Η τεχνική αυτή αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο στα χέρια των ιατρών και των βιολόγων

2.4.1 Συστατικά της αντίδρασης

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης είναι απαραίτητα τα εξής: γενωμικό DNA το οποίο έχει απομονωθεί από την ουρά μυός και αποτελεί τη μήτρα, ένζυμο DNA πολυμεράση, εκκινητές (primers), ορθόδρομος (forward) και ανάδρομος (reverse), ειδικά σχεδιασμένοι για την αλληλουχία που επιθυμούμε να πολλαπλασιαστεί, τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (deoxyribonucleotides triphosphates, dNTPs) αδενίνη (A), θυμίνη (T), κυτοσίνη (C), γουανίνη (G), ένα ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, DMSO, ιόντα μαγνησίου και ddH₂O στο οποίο διαλύονται όλα τα παραπάνω.

2.4.2 Αρχή της μεθόδου

Για τη διαδικασία της PCR είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε τις αλληλουχίες που περικλείουν την επιθυμητή αλληλουχία του DNA, ώστε να είναι δυνατή η σύνθεση μικρών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών με μήκος 15-30bp (ολιγονουκλεοτίδια με μήκος 18-24 νουκλεοτίδια εμφανίζουν συνήθως μεγάλη εξειδίκευση[144]) [139]. Ένας από τους εκκινητές είναι συμπληρωματικός προς το 3' άκρο της αλληλουχίας-στόχου στον ένα κλώνο, ενώ ο άλλος προς το 3' άκρο της αλληλουχίας-στόχου στον

συμπληρωματικό κλώνο.[144] Αρχικά χρησιμοποιείται θέρμανση για να αποδιαταχθεί το DNA και η ύπαρξη περίσσειας ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών οδηγεί σε υβριδοποίησή τους με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες που βρίσκονται εκατέρωθεν της περιοχής που επιθυμούμε να πολλαπλασιαστεί.[139], [145] Οι εκκινητές που έχουν υβριδοποιηθεί αποτελούν το υπόστρωμα που θα χρησιμοποιήσει η θερμοσταθερή DNA πολυμεράση, καθώς παρέχουν στο ένζυμο τα δίκλινα τμήματα DNA (πρωταρχικά τμήματα) τα οποία είναι απαραίτητα για την εκκίνηση της αντιγραφής του αρχικού DNA-μήτρα.[144], [145] Οι συμπληρωματικοί κλώνοι εκτείνονται πέρα από τη θέση πρόσδεσης του εκκινητή στον άλλο κλώνο και έχουν ποικίλα μήκη. Μόλις γίνει η σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων μέσω της διαδοχικής τοποθέτησης δεοξυριβονουκλεοτιδίων από την DNA πολυμεράση, χρησιμοποιείται θέρμανση ώστε να αποσυντεθούν ξανά οι αρχικοί και οι νεοσυντιθέμενοι κλώνοι. Τότε, οι εκκινητές υβριδοποιούνται με τους καινούργιους και τους αρχικούς κλώνους και αρχίζει ο επόμενος κύκλος αντιγραφής, στον οποίο περιορίζεται η επιμήκυνση των νέων αλυσίδων ακριβώς στα όρια της αλληλουχίας-στόχου. Η συγκεκριμένη διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές και μετά το πέρας των πρώτων κύκλων τα προϊόντα αποτελούνται κυρίως από την επιθυμητή αλληλουχία (η οποία ορίζεται από τους εκκινητές), ενώ υπάρχουν και επεκτάσεις του αρχικού DNA πέρα από αυτές τις θέσεις, οι οποίες είναι όμως αμελητέες. Τα δίκλινα προϊόντα που έχουν παραχθεί σε κάθε κύκλο χρησιμοποιούνται ως καλούπια για τον επόμενο και με αυτόν τον τρόπο μετά από n κύκλους, το διάλυμα της αντίδρασης περιέχει 2^n δίκλινα μόρια (εκθετικός πολλαπλασιασμός) της αλληλουχίας-στόχου.[144] Η συγκεκριμένη αντίδραση PCR τελικού σημείου, είναι μια αντίδραση με αρνητικό ή θετικό αποτέλεσμα. Ύστερα από έναν αριθμό κύκλων η παραγωγή του προϊόντος DNA φτάνει σε ένα πλατώ, κυρίως λόγω της εξάντλησης του ενζύμου και των άλλων αντιδραστηρίων. Επομένως αυτή η μέθοδος μπορεί να δώσει ποιοτικές πληροφορίες που αφορούν της παρουσία ή την απουσία ενός γονιδίου που μας ενδιαφέρει.[145]

2.4.3 Εφαρμογή της τεχνικής PCR στο εργαστήριο

Για την τεχνική χρησιμοποιείται το kit της One Taq DNA polymerase (NEW ENGLAND Biolabs). Στην αρχή προστίθενται 0,2μl DNA του κάθε δείγματος σε σωληνάκια ειδικά για την τεχνική αυτή (PCR-CUP, RAINBOW, 0,2ML, FLAT CAP, Greiner bio-one), ένα για κάθε δείγμα. Σε ένα από τα σωληνάκια προστίθεται ddH₂O

αντί για DNA, στην ίδια ποσότητα, ώστε το δείγμα αυτό να χρησιμοποιηθεί ως «τυφλό» (blank). Στην περίπτωση που δεν υπάρχει επιμόλυνση από εξωγενές DNA, στο δείγμα αυτό δεν γίνεται καμία αντίδραση. Επιπλέον, σε άλλο σωληνάκι προσθέτουμε δείγμα DNA το οποίο γνωρίζουμε ότι περιέχει την αλληλουχία που εξετάζουμε, δηλαδή θα δώσει θετικό αποτέλεσμα, και το δείγμα αυτό χρησιμοποιείται ως θετικό control. Αντίστοιχα, προετοιμάζουμε και ένα δείγμα που γνωρίζουμε ότι θα δώσει αρνητικό αποτέλεσμα και το χρησιμοποιούμε ως αρνητικό control. Συνέχεια έχει η προετοιμασία ενός διαλύματος που θα περιέχει όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια (master mix). Οι υπολογισμοί γίνονται για το σύνολο των δειγμάτων και στη συνέχεια το master mix διαμοιράζεται στα σωληνάκια των δειγμάτων σε ίσους όγκους. Οι ποσότητες του κάθε αντιδραστήριου για την κάθε PCR φαίνονται στον πίνακα. Η προετοιμασία του master mix γίνεται σε αποστειρωμένο σωληνάκι Eppendorf και προστίθενται με τη σειρά το ddH₂O, το ρυθμιστικό διάλυμα, τα dNTPs, τους εκκινητές και τελευταίο το ένζυμο. Το ένζυμο είναι το τελευταίο αντιδραστήριο που προστίθεται στο διάλυμα, καθώς η δράση 3'→5' εξωνουκλεάσης που έχει το ένζυμο μπορεί να αποικοδομήσει τους εκκινητές εν τη απουσία νουκλεοτιδίων. Τέλος, το διάλυμα μοιράζεται στα σωληνάκια των δειγμάτων.

2.4.4 Συνθήκες εκτέλεσης της αντίδρασης

Για την εκτέλεση της αντίδρασης χρησιμοποιείται ειδικό μηχάνημα που ονομάζεται θερμικός κυκλοποιητής (PTC-200, Peltier Thermal Cycler, MJ Research). Για κάθε αλληλουχία που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε γίνεται χρήση διαφορετικού προγράμματος. Οι θερμοκρασίες και η χρονική διάρκεια των σταδίων της αντίδρασης εξαρτώνται από το είδος του DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα (γενωμικό, πλασμιδιακό, cDNA κ.α.), το μήκος και την πολυπλοκότητα της αλληλουχίας-στόχου αλλά και την αλληλουχία των εκκινητών. Τα στάδια είναι τα εξής:

- I. **Αρχική Αποδιάταξη:** Η αρχική αποδιάταξη (initial denaturation) γίνεται συνήθως σε θερμοκρασία 94-98°C. Η πολυμεράση είναι ένα ένζυμο με μεγάλη θερμοανθεκτικότητα, επομένως αν χρειάζεται μπορεί να χρησιμοποιηθεί και υψηλότερη θερμοκρασία. Για την πλεοψηφία των DNA που χρησιμοποιούνται ως μήτρα για την αντίδραση, ο χρόνος

της αρχικής αποδιάταξης είναι 30 δευτερόλεπτα, όμως υπάρχουν και περιπτώσεις που ο χρόνος μπορεί να φτάσει τα 3 λεπτά αν η περιεκτικότητα σε κυτοσίνη και γουανίνη είναι υψηλή. [145]

- II. Αποδιάταξη:** Ο χρόνος της αποδιάταξης (denaturation) σε κάθε κύκλο πρέπει να είναι όσο συντομότερος γίνεται. Ο συνήθης χρόνος είναι 5-10 δευτερόλεπτα στους 96°C για τα περισσότερα δείγματα DNA.[145]
- III. Υβριδοποίηση των εκκινητών:** Για να βρεθεί η κατάλληλη θερμοκρασία υβριδοποίησης (annealing) των εκκινητών με το DNA, γίνεται αρχικά ο υπολογισμός της θερμοκρασίας τήξης (melting temperature, T_m) των εκκινητών, με βάση την αλληλουχία τους. Για τον υπολογισμό αυτό εφαρμόζεται το ειδικό πρόγραμμα (NEB T_m calculator, www.neb.com/TmCalculator) που προτείνεται από το kit που χρησιμοποιείται. Για τον υπολογισμό της θερμοκρασίας υβριδοποίησης που θα χρησιμοποιηθεί στο πρόγραμμα του κυκλοποιητή εφαρμόζεται ένας εμπειρικός κανόνας. Οι εκκινητές που έχουν πάνω από 20 νουκλεοτίδια χρειάζονται 10-30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία 3°C υψηλότερη από την T_m του εκκινητή με την πιο χαμηλή τιμή. Για εκκινητές με 20 ή λιγότερα νουκλεοτίδια η θερμοκρασία της υβριδοποίησης χρειάζεται να είναι ίση με την T_m του εκκινητή που έχει την χαμηλότερη τιμή. Εάν η T_m εκκινητή είναι 72°C για εκκινητές που αποτελούνται από 20 ή λιγότερα νουκλεοτίδια, ή τουλάχιστον 69°C για εκκινητές με πάνω από 20 νουκλεοτίδια, τότε χρησιμοποιείται ένα πρωτόκολλο δυο βημάτων, κατά το οποίο το ενιαίο βήμα υβριδοποίησης/επέκτασης πραγματοποιείται στους 72°C ακόμα και αν η T_m του εκκινητή είναι μικρότερη από αυτή τη θερμοκρασία. Σε μερικές περιπτώσεις, στις οποίες είναι επιθυμητή η αύξηση της ειδικότητας του εκκινητή, μπορούν να χρησιμοποιηθούν υψηλότερες θερμοκρασίες. [145]
- IV. Επέκταση:** Το μήκος και η πολυπλοκότητα της αλληλουχίας που πολλαπλασιάζεται καθορίζει και τον χρόνο της επέκτασης της (extension), η οποία επιτελείται στους 72°C. Ο συνολικός χρόνος που απαιτείται για την επέκταση DNA υψηλής πολυπλοκότητας όπως το γενωμικό, είναι 30 δευτερόλεπτα για κάθε Kb, ενώ για DNA χαμηλότερης πολυπλοκότητας όπως το πλασμιδιακό, ο χρόνος μειώνεται σε 15 δευτερόλεπτα ανά Kb. [145]
- V. Αριθμός Κύκλων:** Ο αριθμός των κύκλων από τους οποίους θα αποτελείται η αντίδραση, εξαρτάται κυρίως από την αρχική συγκέντρωση του DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα. Η εφαρμογή πολλών κύκλων μπορεί να αυξήσει την ποσότητα μη ειδικών προϊόντων, ενώ η εφαρμογή λίγων μπορεί να μειώσει την

παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος. Γενικά 25-35 κύκλοι θεωρούνται καλή ισορροπία και οδηγούν σε επαρκείς ποσότητες προϊόντος. [145]

VI. Τελική Επέκταση: Το επόμενο στάδιο είναι αυτό της τελικής επέκτασης (final extension), το οποίο επιτελείται στους 72°C για 5-10 λεπτά. Τέλος, η θερμοκρασία πέφτει στους 4 °C ώστε να γίνει αδρανοποίηση του ενζύμου και να σταματήσει η αντίδραση, αλλά και να διατηρηθούν τα προϊόντα

1.4.5 Προγράμματα PCR του πειράματος

Για να εξεταστεί αν οι μύες φέρουν τα απαραίτητα γονίδια για τις ανάγκες του πειράματος, σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές και προγράμματα στον κυκλοποιητή ώστε να ανιχνευθούν τα γονίδια LDLR (φυσιολογικά και μεταλλαγμένα), ApoE (φυσιολογικά και μεταλλαγμένα), SR-BI (φυσιολογικά και μεταλλαγμένα) και CX3CRI. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, οι συνθήκες της αντίδρασης και η αλληλουχία των εκκινητών φαίνεται στους παρακάτω πίνακες.

Οι εκκινητές είναι σε stock με συγκέντρωση 50pmol/μL, ενώ τα dNTPs έχουν συγκέντρωση 2,5mM.

5X Standard Buffer	1X
dNTPs	200μM
Primers	0,2μM
Q5 OneTaq Polymerase	0,02 U/μl 1,25 units/50μl PCR
DNA	≤ 1000ng

Πίνακας i. Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων PCR

2.4.5.1 PCR για τα γονίδια LDLR, SR-BI, ApoE, CX3CR1

Για να αποκλειστεί η πιθανότητα οι μύες που χρησιμοποιούνται για το πείραμα να έχουν λανθασμένο γονότυπο, εκτελούνται PCR για τα φυσιολογικά γονίδια και τα διαγονίδια. Οι εκκινητές, τα αντιδραστήρια και οι συνθήκες φαίνονται στους παρακάτω πίνακες:

- **CX3CR1**

Αντιδραστήρια:

5X Standard Buffer	5,0μl
ddH ₂ O	16,275μl
dNTPs	1,8μl
Forward Primer	0,4μl
Reverse Primer	0,4μl
DNA	1,0μl
Taq One Polymerase	0,125μl
Total Volume	25μl

Συνθήκες:

30 κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	94°C	30 sec
Αποδιάταξη νέων αλυσίδων	94 °C	20 sec
Πρόσδεση εκκινητών	51 °C	20 sec
Επιμήκυνση αλυσίδων	68 °C	15 sec
Τελική επιμήκυνση αλυσίδων	68 °C	5 mins

Εκκινητές:

Forward	5'- CGTAAACGGCCACAAGTTCA -3'
Reverse	5'- CTTGAAGTTCACCTTGATGC -3'

Μήκος προϊόντος: 245 bp

- **SR-BI**

Αντιδραστήρια:

5X Standard Buffer	4,0μl
GC Enhancer	4,0μl
ddH ₂ O	8,9μl
dNTPs	1,6μl
Primer 1	0,4μl
Primer 2	0,4μl
Primer 3	0μl
DNA	0,5μl
Q5 Polymerase	0,2μl
Total Volume	20μl

Συνθήκες:

30 κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	98°C	5 mins
Αποδιάταξη νέων αλυσίδων	98°C	10 sec
Πρόσδεση εκκινητών	62 °C	30 sec
Επιμήκυνση αλυσίδων	72 °C	30 sec
Τελική επιμήκυνση αλυσίδων	72 °C	2 mins

Εκκινητές:

1	5'-CATGAGGATCATGACAACGC-3'
2	5'-TGAAGGTGGTCCTTCAAGAGCAGTCCT-3'
3	5'-GATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGC-3'

Μήκος προϊόντος: 1000bp (wild type, 1+2), 1100bp (mutant, 2+3)

- **LDL Receptor**

Αντιδραστήρια:

5X High GC Buffer	5,0μl
ddH ₂ O	15,875μl
dNTPs	1,8μl
Primer 122	0,4μl
Primer 123	0,4μl
Primer 124	0,4μl
DNA	1,0μl
Taq One Polymerase	0,125μl
Total Volume	25μl

Συνθήκες:

31 κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	94°C	30 sec
Αποδιάταξη νέων αλυσίδων	94°C	15 sec
Πρόσδεση εκκινητών	60°C	30 sec
Επιμήκυνση αλυσίδων	78°C	30 sec
Τελική επιμήκυνση αλυσίδων	68°C	3 mins

Εκκινητές:

122	5'- AATCCATCTTGTTC AATGGCCGATC -3'
123	5'-CCATATGCATCCCCAGTCTT-3'
124	5'-GCGATGGATACACTCACTGC-3'

Μήκος προϊόντος: 167bp (Wild type, 122+124), Περίπου 350bp (Mutant, 122+123)

- **ΑροΕ**

Αντιδραστήρια:

5X Standard Buffer	5,0μl
ddH ₂ O	16,8μl
dNTPs	1,0μl
Primer 179	0,5μl
Primer 181	0,25μl
Primer 182	0,25μl
DNA	1,0μl
Taq One Polymerase	0,2μl
Total Volume	25μl

Συνθήκες:

30 κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	94°C	30 sec
Αποδιάταξη νέων αλυσίδων	94°C	20 sec
Πρόσδεση εκκινητών	60 °C	30 sec
Επιμήκυνση αλυσίδων	68 °C	20 sec
Τελική επιμήκυνση αλυσίδων	68 °C	3 mins

Εκκινητές:

179	5'-AGACTGTAGGTCCTGACCCAG-3'
181	5'-TGTGACTTGGGAGCTCTGCAG-3'
182	5'-GCCGCCCCGACTGCATCT-3'

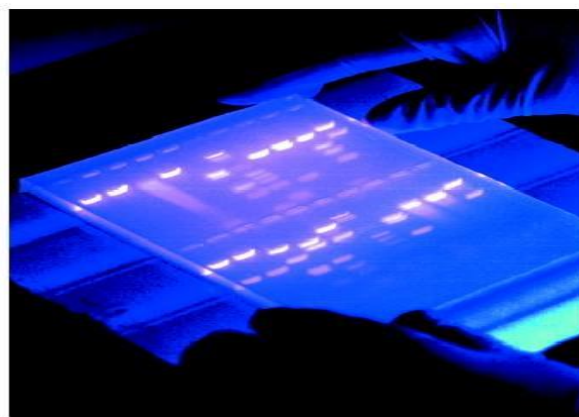
Μήκος προϊόντος: 200bp (Wild type, 179+181), 300bp (Mutant, 179+182)

2.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

2.5.1 Γενικά

Μια τεχνική για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA ή RNA διαφορετικού μεγέθους είναι η ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Στην τεχνική αυτή υπάρχει ένα πήκτωμα (gel) αγαρόζης που καλύπτεται από ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα και στο οποίο εισάγονται τα προϊόντα της PCR ώστε να διαχωριστούν ηλεκτροφορητικά, δηλαδή υπό την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος. Η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων DNA στο πήκτωμα εξαρτάται από το μήκος, το φορτίο και το σχήμα τους. Σε γενικές γραμμές, τα μεγάλα τμήματα κινούνται βραδύτερα από τα μικρά. Η αγαρόζη στο πήκτωμα δημιουργεί ένα δίκτυο πόρων, των οποίων το μέγεθος είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης της. Όσο πιο μεγάλη είναι η συγκέντρωση της αγαρόζης, τόσο πιο μικροί είναι οι πόροι που δημιουργούνται, συνεπώς ο διαχωρισμός των μικρότερων τμημάτων DNA είναι καλύτερος.[144]

Το DNA για να είναι ορατό στο πήκτωμα αγαρόζης πρέπει να σημανθεί ή να χρωσθεί. Παλαιότερα εφαρμοζόταν η μέθοδος ανίχνευσης μέσω ραδιοϊσοτόπων τα οποία ενσωματώνονταν στα μόρια του DNA (ενσωμάτωση ^{32}P στις φωσφορικές ομάδες του DNA), πριν αυτά ηλεκτροφορηθούν, και στη συνέχεια ακολουθούσε αυτοραδιογραφία. Αργότερα βρέθηκε ότι φθορίζουσες χρωστικές που προδένονται στο DNA, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο, μπορούν να καταστήσουν ορατές τις ζώνες του DNA ενώ βρίσκονται στο πήκτωμα. Στη συνέχεια, η έκθεση του πηκτώματος σε UV προκαλεί την εμφάνιση των τμημάτων DNA ως φωτεινές ζώνες, οι οποίες αντιστοιχούν στα διάφορα μεγέθη των τμημάτων. (Εικόνα 13) Για την σύγκριση των μεγεθών των τμημάτων αυτών, γίνεται χρήση τμημάτων DNA με γνωστό μέγεθος (DNA ladder).[144]



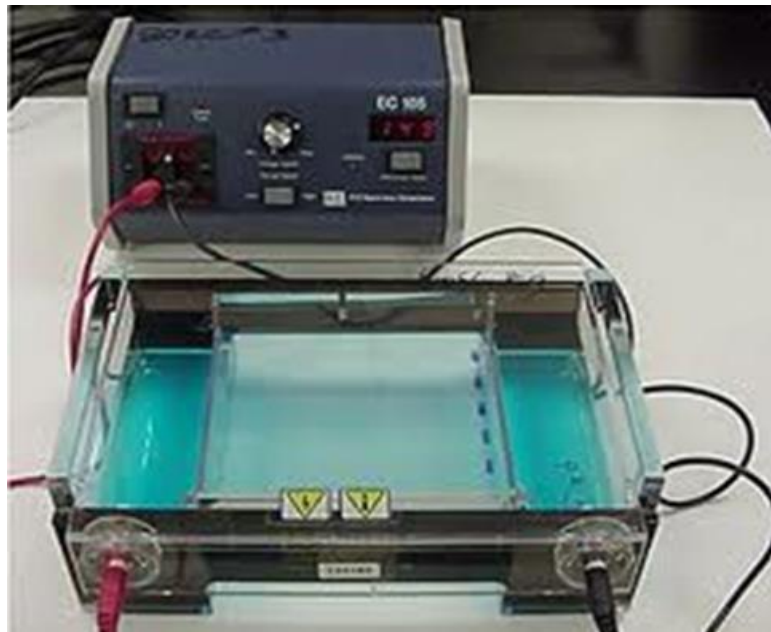
Εικόνα 13 Πήκτωμα αγαρόζης σε λάμπα UV

2.5.2 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR στο εργαστήριο

Το πήκτωμα παρασκευάζεται με τη χρήση αγαρόζης (agarose low EEO/agarose standard, AppliChem) 2% w/v η οποία διαλύεται σε TAE (ρυθμιστικό διάλυμα, Tris-acetate EDTA) 1x με σύσταση 40mM Tris-acetate, 1mM EDTA (ethylene diamine tetra acetic acid, SIGMA) σε ddH₂O. Επιπλέον προστίθεται το βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide, AppliChem) με συγκέντρωση 10mg/ml σε ποσότητα τέτοια ώστε τελικά η συγκέντρωση του στο πήκτωμα να είναι 5μg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι το μόριο που ενσωματώνεται στο DNA και με τον φθορισμό που εκπέμπει υπό ακτινοβολία UV το καθιστά ορατό. Για τη διάλυση της αγαρόζης στο ρυθμιστικό διάλυμα TAE ακολουθεί θέρμανση στο φούρνο μικροκυμάτων για λίγα λεπτά και όταν το διάλυμα κρυώσει προστίθεται το βρωμιούχο αιθίδιο. Παράλληλα ετοιμάζεται το καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης στο οποίο τοποθετούνται χτενάκια τα οποία θα αποτελέσουν τις θέσεις του πηκτώματος («πηγαδάκια»). Ενώ το διάλυμα είναι ακόμα θερμό, αποχύνεται στο καλούπι και αφήνεται να στεγνώσει για 40-60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ή εναλλακτικά αφήνεται 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ψύχεται για άλλα 10 λεπτά στους 4°C. Όταν το πήκτωμα στεγνώσει αφαιρούνται τα χτενάκια και η συσκευή γεμίζει με TAE ώστε το πήκτωμα να καλύπτεται τελείως.

Η φόρτωση των δειγμάτων γίνεται στον αρνητικό πόλο και με την επίδραση του ηλεκτρικού ρεύματος κινούνται προς τον θετικό πόλο. (Εικόνα 14) Η εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος γίνεται στους πόλους της συσκευής από ένα τροφοδοτικό, ενώ η τάση του ρεύματος που θα εφαρμοστεί εξαρτάται από το μήκος του πηκτώματος. Επιπλέον, στο κάθε δείγμα προστίθεται ειδική μπλε χρωστική με σύσταση 0,25% κυανό

της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue), 0,25% κυανόλη του ξυλενίου (xylene cyanol) και 5% γλυκερόλη (glycerin, CARL ROTH) σε ddH₂O. Η προσθήκη της χρωστικής αυτής έχει σκοπό την παρακολούθηση της πορείας των δειγμάτων στο πήκτωμα. Η χρωστική αποθηκεύεται ως stock διάλυμα 6x και προστίθεται σε τέτοια ποσότητα ώστε η τελική περιεκτικότητα στο διάλυμα της PCR να είναι 1x. Στην πρώτη θέση του πηκτώματος εισάγονται 5μl DNA ladder (NEW ENGLAND, Biolabs) των 100bp (base pairs) ο οποίος περιέχει ποικιλία DNA τμημάτων με μεγέθη 1517bp, 1200bp, 1000bp, 900bp, 800bp, 700bp, 600bp, 500/517bp, 400bp, 300bp, 200bp και 100bp για να μπορεί να γίνει ποιοτική σύγκριση του μεγέθους των προϊόντων που βρίσκονται στο πήκτωμα. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης φαίνεται όταν το πήκτωμα μεταφερθεί στη συσκευή DOLPHIN-DOC (WEALTEC) η οποία λειτουργεί με λάμπα UV. Η εικόνα μεταφέρεται στην οθόνη ηλεκτρονικού υπολογιστή μέσω CCD κάμερας η οποία είναι ενσωματωμένη στη συσκευή ενώ μέσω του προγράμματος Dolphin-1D που υπάρχει στη συσκευή, ο χρήστης λαμβάνει μια ασπρόμαυρη φωτογραφία του πηκτώματος.



Εικόνα 14 Η διάταξη της συσκευής ηλεκτροφόρησης του πηκτώματος

2.6 ΛΗΨΗ ΙΣΤΩΝ ΜΥΩΝ

Τα πειραματόζωα θανατώνονται με τη χρήση ατμών CO₂, οι οποίοι προέρχονται από την εξάχνωση CO₂ σε στερεή μορφή (πελέτες ξηρού πάγου) και προκαλούν ασφυξία. Μόλις ο μυς αναισθητοποιηθεί, απομακρύνεται από το δοχείο και αρχίζει η διαδικασία για τη λήψη των ιστών του. Αρχικά, γίνεται διάνοιξη των κοιλιακών τοιχωμάτων και της θωρακικής κοιλότητας του μυός με τη βοήθεια λαβίδας και ψαλιδιού και στη συνέχεια κόβεται ο δεξιός κόλπος της καρδιάς. Το αίμα που απελευθερώνεται μπορεί να συλλεχθεί με τη βοήθεια σύριγγας, σταδιακά και με προσοχή ώστε να μην αιμολυθεί, και να μεταφερθεί σε σωληνάκι Eppendorf. Για να ληφθεί ο ορός του αίματος, γίνονται δυο φυγοκεντρήσεις στα 6000rpm για 10 λεπτά και φυλάσσεται στους -80°C για μελλοντική χρήση. Το επόμενο βήμα είναι η απομάκρυνση του υπόλοιπου αίματος από το σώμα του μυός και η εκτέλεση του καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα των ιστών που θα λάβουμε. Το αίμα του μυός πρέπει να απομακρυνθεί ώστε να μην επηρεάσει τις μελέτες που θα γίνουν στους ιστούς. Η διαδικασία που ακολουθείται στο βήμα αυτό ονομάζεται perfusion. Στη διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται μια βελόνα η οποία θα τρυπήσει την αριστερή κοιλία του ποντικού ώστε μέσω σύριγγας που ενώνεται με αυτή, να εισαχθεί διάλυμα 1x PBS (Phosphate Buffered Saline) με σύσταση 13,7mM NaCl (sodium chloride, AppliChem), 2,7mM KCl (potassium chloride, CARLO ERBA), 10mM Na₂HPO₄ (sodium phosphate dibasic, SIGMA) και 2mM K₂HPO₄ (potassium dihydrogen phosphate, CARLO ERBA) σε ddH₂O. Το αίμα εξαναγκάζεται να κινηθεί από το PBS και εξέρχεται από τη δεξιά κοιλία η οποία έχει ήδη κοπεί. Είναι απαραίτητο για τη διαδικασία αυτή, η καρδιά του ζώου να πάλλεται ακόμα ώστε να μπορεί η αριστερή κοιλία να προωθήσει το PBS σε όλους τους ιστούς μέσω αρτηριών και αρτηριδίων, όπως συμβαίνει και με το αίμα. Και όπως στην φυσιολογική κατάσταση το αίμα γυρνά μέσα από τις φλέβες και τα φλεβίδια στο δεξιό κόλπο της καρδιάς, το ίδιο συμβαίνει και με το PBS το οποίο εξέρχεται από αυτόν καθώς είναι κομμένος. Το PBS περνώντας μέσα από την περιφερική κυκλοφορία του μυός παρασύρει και το αίμα, διώχνοντάς το από το σώμα μέσω του δεξιού κόλπου. Η διαδικασία τελειώνει όταν παρατηρηθεί αλλαγή του χρώματος του ήπατος από κόκκινο σε σχεδόν άσπρο, γεγονός που δείχνει πως το αίμα έχει απομακρυνθεί σχεδόν ολικά. Συνήθως για να συμβεί πλήρης αφαιμάξη χρειάζονται περίπου 30-50ml PBS. Στην συνέχεια γίνεται απομόνωση του εγκεφάλου, αφαιρώντας πρώτα το δέρμα του μυός και μετά ολόκληρο το κρανίο με τη χρήση ψαλιδιού. Ο εγκέφαλος αφαιρείται με μεγάλη προσοχή για να μην

τραυματιστεί και τα δυο ημισφαίρια χωρίζονται με χρήση ξυραφιού (ASTOR, BiC, stainless, double edge blades).

Το αριστερό ημισφαίριο τοποθετείται σε σωληνάκι Eppendorf και φυλάσσεται στους -80°C . Η συντήρηση μπορεί να γίνει για μεγάλο χρονικό διάστημα και μπορεί να γίνει χρήση του δείγματος για απομόνωση πρωτεϊνών (Western blot) και ανοσολογικές τεχνικές (ELISA).

Όσον αφορά το δεξί ημισφαίριο, αυτό χρησιμοποιείται για ιστολογικές τεχνικές. Αρχικά εισάγεται σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης (paraformaldehyde, SIGMA ALDRICH) 4% w/v σε PBS (Phosphate Buffered Saline) για 48 ώρες τους 4°C . Μετά το στάδιο αυτό, κατά το οποίο γίνεται η μονιμοποίηση του ιστού, το ημισφαίριο μεταφέρεται σε διάλυμα σουκρόζης (D-sucrose, AppliChem) 20% w/v στους 4°C . Η μονιμοποίηση του ιστού γίνεται ώστε ο ιστός να προστατευθεί από την αυτόλυση και από βακτηριακές μολύνσεις, αλλά και σταθεροποιηθεί ώστε η κυτταρική του δομή να διατηρηθεί και στα επόμενα στάδια της ανάλυσης. Για το λόγο αυτό η μονιμοποίηση πρέπει να γίνεται αμέσως μετά την απομόνωση του ιστού ώστε να μην προκύψουν αλλοιώσεις. Η παραφορμαλδεΐδη χρησιμοποιείται ως μονιμοποιητικό μέσο καθώς ως αλδεΐδη μπορεί να σχηματίζει ομοιοπολικούς δεσμούς με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών που είναι ελεύθερες και έτσι μπορούν μέσω της διασύνδεσης των πρωτεϊνών να τις σταθεροποιούν. Το υψηλό πρωτεϊνικό περιεχόμενο του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος καθιστά εύκολη την μονιμοποίησή τους με τη χρήση αλδεΐδων.

Τέλος, αν είναι απαραίτητο μπορεί να γίνει απομόνωση του θύμου και του σπλήνα και να φυλαχθούν στους -80°C για να γίνει αργότερα απομόνωση πρωτεϊνών από τους ιστούς αυτούς.

2.7 ΛΗΨΗ ΤΟΜΩΝ ΑΠΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟ ΜΥΟΣ

Για τη λήψη τομών χρησιμοποιείται μικροτόμος δονούμενης λεπίδας (vibratome, vibrating blade microtome, VT 1000S, Leica). (Εικόνα 15) Με τη χρήση της συσκευής αυτής λαμβάνουμε σειριακές, οβελιαίες τομές (serial, sagittal sections), με πάχος 40μm, από το δεξί ημισφαίριο με τη χρήση ξυραφιών μιας χρήσεως (ASTOR, BiC, stainless, double edge blades). Το ημισφαίριο στερεώνεται στην τράπεζα της συσκευής με τη χρήση κόλλας στιγμής (LOGO) και στη συνέχεια η τράπεζα γεμίζει ώσπου να καλυφθεί ο εγκέφαλος με ρυθμιστικό διάλυμα TBS (Tris-Buffered Saline) pH 8.0 με σύσταση 10mM Tris-HCl pH 8.0, 15mM NaCl (Sodium chloride, AppliChem) σε

ddH₂O. Η ταχύτητα και η συχνότητα κίνησης της λεπίδας της μικροτόμου ρυθμίζονται στο 7. Αρχικά, ορίζουμε το πάχος των τομών που λαμβάνονται να είναι 200μm και οι τομές αυτές απορρίπτονται μέχρι να εμφανιστεί ο ιπόκαμπος. Από αυτό το σημείο και μετά, ρυθμίζεται η συσκευή ώστε να λαμβάνουμε τομές πάχους 40μm, τις οποίες τοποθετούμε πιάτα κυτταροκάλλιεργειας 24 πηγαδιών (24-well tissue culture test plates, TPP) που έχουμε γεμίσει με TBS pH 8.0 με 0.05% w/v νατραζίδιο (sodium azide, NaN₃, AppliChem). Η κάθε τομή τοποθετείται σε ένα πηγαδάκι αρχίζοντας από το 1A μέχρι το 1D και όταν γεμίσει το πιάτο, ξεκινά να γεμίζεται ξανά από την αρχή με την ίδια σειρά. Όταν τελειώσει η λήψη τομών, το πιάτο κλείνεται γύρω γύρω με ταινία parafilm ώστε να αποκλειστεί η υγρασία και φυλάσσεται στους 4°C.



Εικόνα 15 Η μικροτόμος δονούμενης λεπίδας

2.8 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

2.8.1 Γενικές Αρχές

Η ανοσοϊστοχημεία (immunohistochemistry) αποτελεί μια μέθοδο η οποία χρησιμοποιεί τα ειδικά αντισώματα και εφαρμόζεται για να εξεταστεί το πως κατανέμεται ένα μακρομόριο σε κάποιο κύτταρο ή ιστό.[140] Η παραγωγή των αντισωμάτων εναντίον υδατανθράκων ή πρωτεϊνών (αντιγόνων) βασίζεται στην ένεση των αντιγόνων αυτών σε κάποιο ζώο με την παρουσία κατάλληλου ανοσοενισχυτικού. Τα αντισώματα χωρίζονται σε δυο είδη:

- Πολυκλωνικά: Για τα αντισώματα αυτά χρησιμοποιούνται κυρίως κουνέλια. Είναι τα προϊόντα πολλών κλώνων Β λεμφοκυττάρων και επομένως έχουν παραχθεί πολλές

ανοσοσφαιρίνες από τις οποίες η καθεμία αναγνωρίζει έναν διαφορετικό επίτοπο του αντιγόνου.[140]

- Μονοκλωνικά: Τα αντισώματα αυτά παράγονται μέσω της ανοσοποίησης μυών με το επιθυμητό αντιγόνο και την μετέπειτα σύντηξη των κυττάρων του σπλήνα τους με κάποια ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά (μυέλωμα). Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται υβριδώματα από τα οποία γίνεται επιλογή των επιθυμητών κλώνων υβριδικών κυττάρων και στη συνέχεια τα κύτταρα αυτά καλλιεργούνται και αναπτύσσονται απεριόριστα, αποτελώντας έτσι πηγή των επιθυμητών μονοκλωνικών αντισωμάτων. [140]

Τα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν το πλεονέκτημα ότι δεν χρειάζεται αντιγόνο υψηλής καθαρότητας για την δημιουργία τους. Όμως, η συγγένειά τους για το αντιγόνο δεν είναι τόσο υψηλή όσο των πολυκλωνικών τα οποία απαιτούν και λιγότερη εργασία για την κατασκευή τους.

Για την ανοσοϊστοχημεία, τα αντισώματα θα πρέπει να έχουν συνδεθεί με ειδικές χρωστικές οι οποίες θα καταστήσουν ορατές τις θέσεις στις οποίες εντοπίζεται το αντιγόνο που ανιχνεύεται. Η φλουορεσκεΐνη, η φυκοερυθρίνη και η ροδαμίνη είναι φθορίζουσες χρωστικές οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως για το σκοπό αυτό. Ο ανοσοφθορισμός άρχισε να αναπτύσσεται μετά από την ανακάλυψη της δυνατότητας σήμανσης των αντισωμάτων με φθορίζοντα μόρια το 1944 από τον Alfred Coons.[139] Παράλληλα αναπτύχθηκαν και ανοσοενζυμικές τεχνικές που χρησιμοποιούν αντιγόνα συζευγμένα με ένζυμα, όπως οι τεχνικές στρεπταβιδίνης, βιοτίνης-αβιδίνης και ανοσοϋπεροξειδάσης. [140]

2.8.2 Η μέθοδος

Η ανοσοϊστοχημεία μπορεί να εφαρμοστεί είτε σε δείγματα όπως ένας ολόκληρος εγκέφαλος, προσφέροντας έτσι μια τρισδιάστατη εικόνα της κατανομής του αντιγόνου, είτε σε τομές οι οποίες δίνουν αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα και προσφέρουν υψηλότερη διακριτική ανάλυση.[140] Η διαδικασία που ακολουθείται για την τεχνική είναι η ίδια και στις δυο αυτές περιπτώσεις. Αρχικά πρέπει να γίνει κάλυψη των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική αντίδραση (background staining) και μετά γίνεται επώαση με το ειδικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που μελετάται. Αν το αντίσωμα αυτό έχει σημανθεί με κάποιο φθοριόχρωμα ή ένζυμο, τότε υπάρχει άμεση σήμανση. Στην περίπτωση που το πρωτογενές αντίσωμα δεν έχει

σημανθεί, τότε στο δείγμα πρέπει γίνουν εκπλύσεις μετά την επώαση ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος και στη συνέχεια θα ακολουθήσει η επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα. Το δευτερογενές αντίσωμα παράγεται ενάντια της σταθερής περιοχής του πρωτογενούς αντισώματος, η οποία είναι χαρακτηριστική του είδους. Επιπλέον, το δευτερογενές αντίσωμα έχει συζευχθεί είτε με μια φθορίζουσα χρωστική είτε με ένα ένζυμο (αλκαλική φωσφατάση, υπεροξειδάση του ραπανακίου). Στην πρώτη περίπτωση, η παρατήρηση του δείγματος γίνεται σε μικροσκόπιο φθορισμού το οποίο έχει μια πηγή φωτός η οποία διεγείρει την φθορίζουσα ένωση και κατά την αποδιέγερση αυτής εκπέμπεται φως στην περιοχή του ορατού. Στη δεύτερη περίπτωση το δείγμα εξετάζεται σε οπτικό μικροσκόπιο, καθώς αφού προστεθεί το υπόστρωμα του ενζύμου (π.χ. 3,3'-diaminobenzidine, DAB) υπάρχει σχηματισμός έγχρωμου, αδιάλυτου ιζήματος. Η περίπτωση αυτή αφορά την έμμεση σήμανση.[139] Επιπλέον, υπάρχει η μέθοδος της αβιδίνης-βιοτίνης (avidin-biotin complex, ABC) η οποία εκμεταλλεύεται την ισχυρή δεσμευτική ικανότητα της αβιδίνης με τη βιοτίνη ώστε να αυξήσει την ευαισθησία της τεχνικής. Η αβιδίνη διαθέτει 4 θέσεις πρόσδεσης της βιοτίνης ανά μόριο και με τον τρόπο αυτό μπορεί να σημειωθεί με φθορίζοντα μόρια, ραδιενεργά ισότοπα η ακόμα και ένζυμα που είναι συζευγμένα με βιοτίνη. Σε αυτή την περίπτωση το πρωτογενές αντίσωμα έχει βιοτινυλωθεί και αφού ο ιστός έχει επωασθεί με αυτό, γίνεται πρόσθεση συμπλέγματος αβιδίνης και ενζύμου που έχει συνδεθεί με βιοτίνη. Έτσι γίνεται σύνδεση της αβιδίνης με το ένζυμο μέσω της βιοτίνης και υπάρχουν και θέσεις ελεύθερες για να συνδεθεί με τη βιοτίνη του αντισώματος. Ο δεσμός μεταξύ αυτών των δυο μορίων υπό τις συνήθεις πειραματικές συνθήκες είναι μη αντιστρεπτός, λόγω της ισχυρής συγγένειας τους και της υψηλής ειδικότητας.

Η χρήση ενός δεύτερου αντισώματος στο οποίο έχει συνδεθεί κάποιο ένζυμο αυξάνει την ευαισθησία λόγω της αντίδρασης μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος.[140] Ακόμη, το δείγμα δεν είναι δυνατόν να αφυδατωθεί μετά τον σχηματισμό ιζήματος και να καλυφθεί κατά το στάδιο της παρατήρησης με ένα μη υδατικό διάλυμα κάλυψης (mounting medium), το οποίο έχει μεγαλύτερο δείκτη διάθλασης και κάνει το δείγμα διαφανές σε σχέση με κάποιο υδατικό. Αντίθετα, στον ανοσοφθορισμό είναι απαραίτητο το ανοσολογικό σύμπλοκο να παραμείνει ακέραιο ώστε να μπορεί να ανιχνευθεί, επομένως είναι αδύνατη η αφυδάτωσή του. Επιπλέον, η φθορίζουσα χρώση χάνεται σχετικά γρήγορα επομένως δημιουργεί προβλήματα στην περίπτωση που τα δείγματα πρέπει να επανεξεταστούν αργότερα. Οι μέθοδοι φθορισμού όμως είναι πιο απλές γιατί και έχουν λιγότερα βήματα αλλά και δίνουν τη δυνατότητα να ανιχνευθούν πάνω από

ένα αντιγόνα σε κάποιο δείγμα, επειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές φθορίζουσες ομάδες στα δευτερογενή αντισώματα.[140]

2.8.3 Ανίχνευση Iba1 (Ionized calcium binding adaptor molecule 1) με ανοσοφθορισμό

Το Iba1 (Ionized calcium binding adaptor molecule 1) αποτελεί έναν κυτταρικό δείκτη ο οποίος εκφράζεται από τα μακροφάγα και τα μικρογλοιακά κύτταρα και έχει μοριακό βάρος 17kDa. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται για την χρώση των τομών είναι σχετικά απλό και δίνει μια αρκετά καλή εικόνα της μικρογλοίας στον εγκέφαλο.

Στην αρχή οι τομές πλένονται τρεις φορές από 5 λεπτά με ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1x (Phosphate Buffered Saline), σε θερμοκρασία δωματίου και υπό έντονη ανακίνηση σε αναδευτήρα (platform shaker, POLYMAX 1040, Heidolph) ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα στο οποίο φυλάσσονταν οι τομές. Η προσθήκη και απομάκρυνση των αντιδραστηρίων από τα πηγαδάκια στα οποία τοποθετούνται οι τομές για τη χρώση, γίνεται με τη χρήση πουάρ και γυάλινης πιπέτας παστέρ. Σειρά έχει η διαπερατοποίηση (permeabilization) του ιστού με τη χρήση διαλύματος PBS, 0,1% Triton X-100 (AppliChem) και παραμονή για 45 λεπτά στην πλατφόρμα ανακίνησης, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, για να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις, γίνεται επώαση των τομών με διάλυμα PBS, 0,01% Triton X-100, 1% αλβουμίνη ορού βοός (bovine serum albumin, BSA, SIGMA), 10% ορό εμβρύου βοός για 3 ώρες, υπό ανακίνηση και σε θερμοκρασία δωματίου. Το πρωτογενές αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Iba1 του ποντικού (rabbit polyclonal anti-Iba1, 0,19-19741, Wako) αραιώνεται 1:250 σε διάλυμα PBS, 0,01% Triton X-100, 0,1% BSA, 1% FBS. Σε αυτό το αραιωμένο αντίσωμα επώάζονται οι τομές overnight στους 4°C, υπό ήπια ανακίνηση. Την επόμενη ημέρα απομακρύνεται η περίσσεια του αντισώματος που δεν έχει προσδεθεί με την εφαρμογή 5 πλυσιμάτων με PBS, από 10 λεπτά η κάθε μια, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό έντονη ανακίνηση. Ύστερα γίνεται η επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα, έναντι του πρωτογενούς, το οποίο είναι συζευγμένο με φθορίζουσα ένωση (goat anti-rabbit IgG CyTM3-conjugated, 111-165-144, Jackson Immunoresearch). Το αντίσωμα αυτό έχει αραιωθεί 1:300 σε διάλυμα PBS, 0,01% Triton X-100, 0,1% BSA, 1% FBS και με το αραιωμένο αντίσωμα γίνεται η επώαση των τομών για 90 λεπτά, υπό ήπια ανακίνηση, σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι. Η συνθήκη σκότους διασφαλίζεται με την κάλυψη όλων των πηγαδιών με αλουμινόχαρτο. Το δευτερογενές αντίσωμα που δεν έχει

προσδεθεί απομακρύνεται με την εφαρμογή τριών πλυσιμάτων με TBS pH 8.0, για 15 λεπτά το καθένα, σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ παράλληλα γίνεται έντονη ανακίνηση και επικρατούν συνθήκες σκότους. Τέλος, γίνεται το στρώσιμο των τομών σε αντικειμενοφόρους πλάκες με διαστάσεις 25x75x1mm (microscope slides, SUPERFROST PLUS, Thermo Scientific), κάλυψή τους με υδατικό μέσο στερέωσης για φθορισμό (Vectashield, Vector, mounting medium for fluorescence, H-1000), κλείσιμο με καλυπτρίδες με διαστάσεις 24x50mm (CARL ROTH) και φύλαξη στους 4°C σε κουτί ώστε να προστατεύονται από το φως.

Η εξέταση των δειγμάτων γίνεται σε μικροσκόπιο φθορισμού (fluorescence microscope, DMRA2, Leica), το οποίο διαθέτει το κατάλληλο φίλτρο και είναι εφοδιασμένο με κάμερα (DFC350FX, Leica) και το κατάλληλο πρόγραμμα (LASV3.6) για τη λήψη φωτογραφιών.

Blocking Solution	Πρωτογενές αντίσωμα	Δευτερογενές αντίσωμα
10% FBS & 1% BSA in PBS-Tx 0,3%	Rabbit polyclonal 1:500 in 1%FBS & 1% BSA, PBS-Tx 0,3%	Goat anti-rabbit CY3 1:500 in 1%FBS & 1% BSA, PBS-Tx 0,3%

Πίνακας ii. Τα βασικά διαλύματα της χρώσης Iba-1

2.9 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΟ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ IMARIS

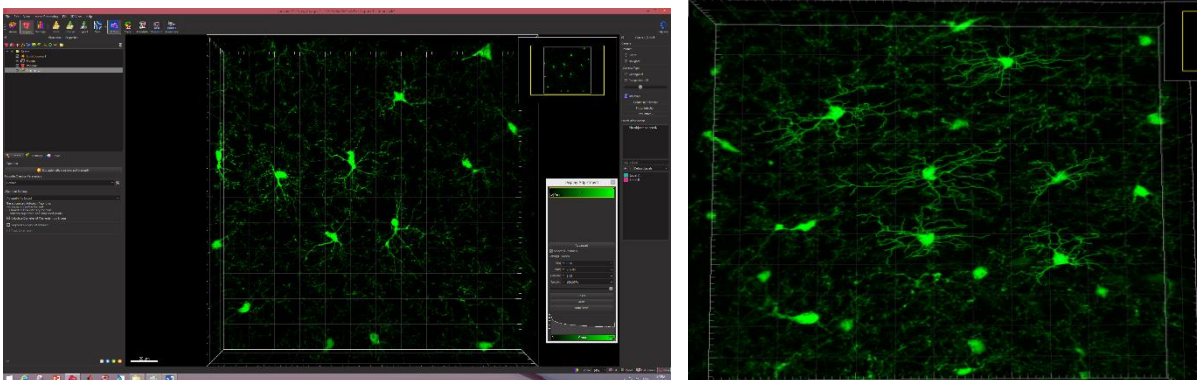
Ο καθορισμός της μορφολογίας της μικρογλοίας έγινε με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Imaris 8.0. Το Imaris είναι ένα λογισμικό το οποίο χρησιμεύει στο να οπτικοποιηθούν και να αναλυθούν τα δεδομένα που λαμβάνονται από τα συνεστιακά μικροσκόπια. Το πρόγραμμα βοηθά την 3D και 4D ανάλυση των εικόνων στις βιολογικές επιστήμες. Είναι πολύ φιλικό προς τον χρήστη και επιτρέπει τη μέτρηση πολλών παραμέτρων ταυτόχρονα. Το μειονέκτημα του προγράμματος αυτού είναι ότι βασίζεται στην διακριτική ικανότητα του χρήστη. Για παράδειγμα, το πρόγραμμα ενδέχεται να αναγνωρίσει ως αποφυάδα του μικρογλοιακού κυττάρου κάποιο σήμα το

οποίο στην πραγματικότητα είναι θόρυβος. Επομένως, απαιτείται από τον χρήστη να διαλέξει και να ξεχωρίσει το πραγματικό σήμα. Όπως είναι φυσικό, με τον τρόπο αυτό μπορεί να προκύψουν αποκλίσεις στις μετρήσεις μεταξύ διαφορετικών χρηστών ή και μεταξύ δειγμάτων του ίδιου χρήστη και για τον λόγο αυτό απαιτείται τυποποίηση του προγράμματος και πολύ καθαρές εικόνες από το συνεστιακό μικροσκόπιο.

Για το πείραμα αυτό, έγινε χρήση του λογισμικού Imaris μετά τη λήψη φωτογραφιών στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Σε κάθε φωτογραφία επιλέχθηκαν 5 κύτταρα τα οποία δεν ήταν στα άκρα της φωτογραφίας και έτσι θα έδιναν πλήρη εικόνα για το κύτταρο. Μετά τον καθαρισμό των αποφυάδων (Εικόνα) παραλήφθηκαν οι μέσοι όροι για τις παρακάτω παραμέτρους:

- Μήκος αποφυάδων: το συνολικό μήκος της κάθε αποφυάδας (συμπεριλαμβανόμενων των διακλαδώσεων)
- Τελικά σημεία: Το πλήθος των τελικών σημείων σε κάθε κύτταρο
- Τμήματα: Ως τμήμα καθορίζεται κάθε κομμάτι της αποφυάδας που βρίσκεται ανάμεσα σε δυο σημαντικά σημεία (σώμα-σημείο διακλάδωσης, σημείο διακλάδωσης-τελικό σημείο)
- Σημεία διακλάδωσης: Το πλήθος των σημείων στα οποία διακλαδώνεται η κάθε αποφυάδα.

Μετά τη λήψη των μετρήσεων, έγινε στατιστική επεξεργασία με τη χρήση t-test.



Εικόνα 16 Αριστερά: Το πρόγραμμα Imaris, Δεξιά: Τα επιλεγμένα κύτταρα μετά την επεξεργασία

2.10 ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΙΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ

Οι CX3CR1 μύες διασταυρώθηκαν με SR-BI knockout μύες, με στόχο να ληφθούν απόγονοι που θα φέρουν τον συνδυασμό CX3CR1 SR-BI^{+/-} στο γονότυπό τους. Στους μύες αυτούς υπάρχει η απενεργοποίηση του γονιδίου του SR-BI (SR-BI knockout) και παράλληλα έχει αντικατασταθεί ο υποδοχέας CX3CR1 από την φθορίζουσα πρωτεΐνη EGFP. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι μύες αναμένεται να έχουν αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα αλλά καμία σημαντική αλλαγή στον φαινότυπο λόγω της απουσίας του υποδοχέα CX3CR1.

Σκοπός των διασταυρώσεων που πραγματοποιήθηκαν ήταν να προκύψουν οι CX3CR1 SR-BI^{+/-} μύες. Για τον λόγο αυτό έγινε η παρακάτω διασταύρωση:

- ♂ SR-BI^{-/-} (x) ♀ CX3CR1

και προέκυψαν οι απόγονοι με τους εξής γονότυπους:

- CX3CR1 SR-BI^{+/-}
- CX3CR1 SR-BI^{+/+}
- SR-BI^{+/-}

Για τις διασταυρώσεις αυτές χρησιμοποιούνται συνήθως ένα αρσενικό και τρία θηλυκά ζώα με ηλικία άνω των 6 εβδομάδων, καθώς τότε βρίσκονται σε αναπαραγωγική ωριμότητα. Στην συγκεκριμένη περίπτωση επιλέχθηκε το ζώο που θα έχει τον SR-BI^{-/-} να είναι το αρσενικό, επειδή τα θηλυκά με τον αντίστοιχο γονότυπο είναι στείρα.

Η περίοδος της κύησης στους μύες διαρκεί 19-21 μέρες και έπειτα η μητέρα φροντίζει τα μικρά για περίπου 3 εβδομάδες. Ύστερα από την 28^η ημέρα, τα μικρά χωρίζονται από τη μητέρα, απομακρύνονται τα αρσενικά από τα θηλυκά και τοποθετούνται σε διαφορετικούς κλωβούς. Περίπου την 15^η ημέρα, στο κάθε ζώο γίνονται μικρές τρύπες στα αυτιά ως αναγνωριστικό και κόβεται ένα μικρό κομάτι από την ουρά που θα χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση DNA, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενο υποκεφάλαιο. Με το DNA που απομονώνεται προσδιορίζεται ο γονότυπος του μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για να ανιχνευθούν όλα τα διαγονίδια που χρησιμοποιούνται στο πείραμα αυτό.

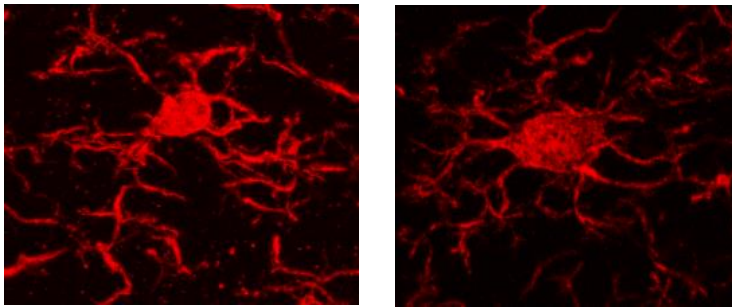
Οι διαγονιδιακοί μύες SR-BI^{-/-}, LDLR^{-/-} και ApoE^{-/-} χρησιμοποιήθηκαν όπως παραλήφθηκαν από τα Jackson Labs.

Οι μύες που μελετήθηκαν ήταν οι CX3CR1 SR-BI^{+/-}, SR-BI^{-/-}, LDLR^{-/-} και ApoE^{-/-}. Αντίστοιχα, συγκρίθηκαν με μύες CX3CR1 SR-BI^{+/+} και wild type (SR-BI^{+/+}, LDLR^{+/+} και ApoE^{+/+}) οι οποίοι αποτελούν τις ομάδες ελέγχου (control groups).

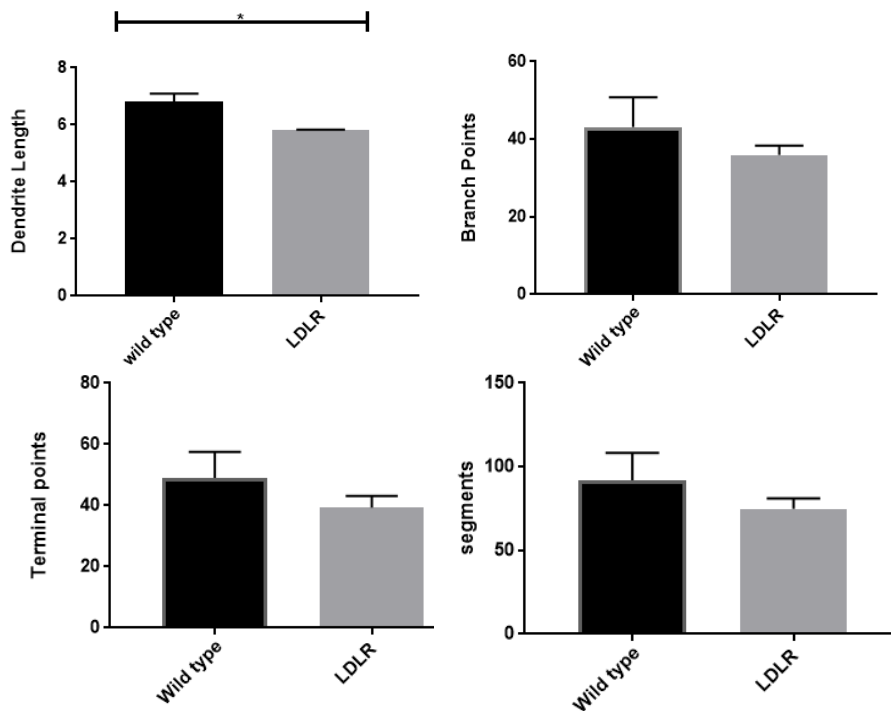
Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιούνται για την ομάδα μελέτης και την ομάδα ελέγχου είναι θηλυκά και θυσιάζονται στους 4 μήνες για τα CX3CR1 SR-BI^{-/-} και τις ομάδες ελέγχου, ενώ για τα SR-BI^{-/-}, LDLR^{-/-} και ApoE^{-/-} θυσιάζονται στους 11 μήνες.

ΚΕΦ. 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Η απαλοιφή του LDLR γονιδίου επηρεάζει τον φαινότυπο των μικρογλοιακών κυττάρων στον ιππόκαμπο



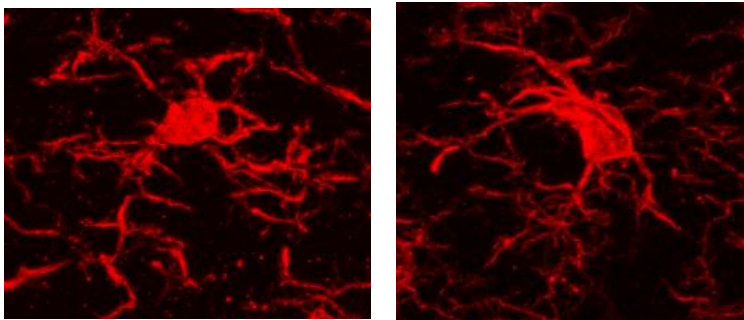
Εικόνα 17 Αριστερα: Κύτταρο από μω αγρίου τύπου, Δεξιά: Κύτταρο από μω LDLR knockout



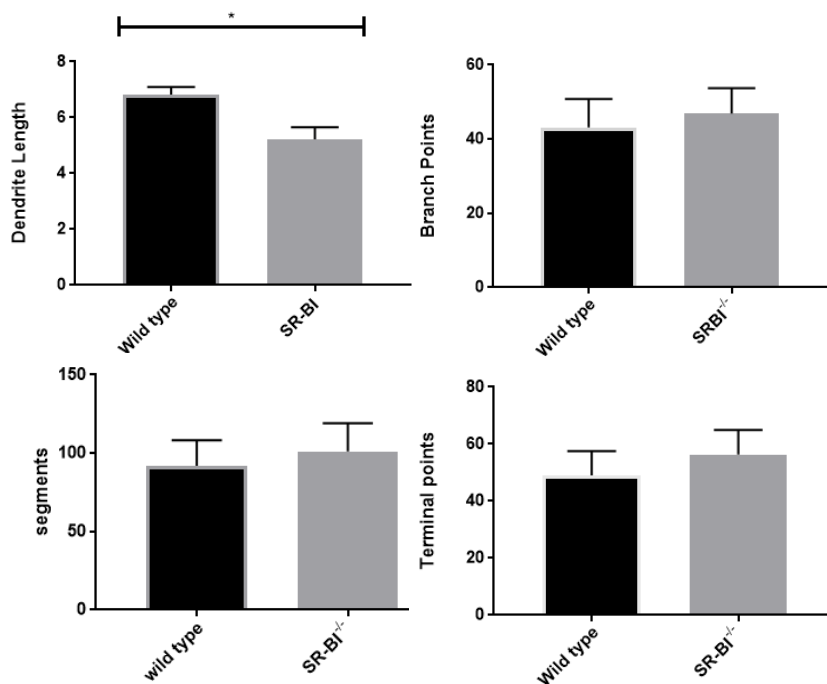
Εικόνα 18 Διαγραμματική απεικόνιση των μετρούμενων παραμέτρων για τους LDLR μύες στον ιππόκαμπο

Η χρώση των τομών εγκεφάλου με Iba-1 επέτρεψε την παρατήρηση των αποφυάδων των μικρογλοιακών κυττάρων και την ποσοτικοποίηση ορισμένων χαρακτηριστικών τους. Η σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων, wild type και LDLR^{-/-} έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά (P = 0,0343) όσον αφορά το μήκος των αποφυάδων. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως οι μύες στους οποίους έχει γίνει απαλοιφή του γονιδίου του υποδοχέα της LDL, εμφανίζουν κοντύτερες αποφυάδες. Οι υπόλοιπες παράμετροι που εξετάστηκαν, δηλαδή τα τμήματα, τα σημεία διακλάδωσης και τα τελικά σημεία δεν παρουσίασαν στατιστική διαφορά, παρόλο που οι μετρήσεις των LDLR^{-/-} μυών ήταν χαμηλότερες από αυτές των φυσιολογικών.

2.2 Η απαλοιφή του SR-BI γονιδίου επηρεάζει τον φαινότυπο των μικρογλοιακών κυττάρων στον ιππόκαμπο



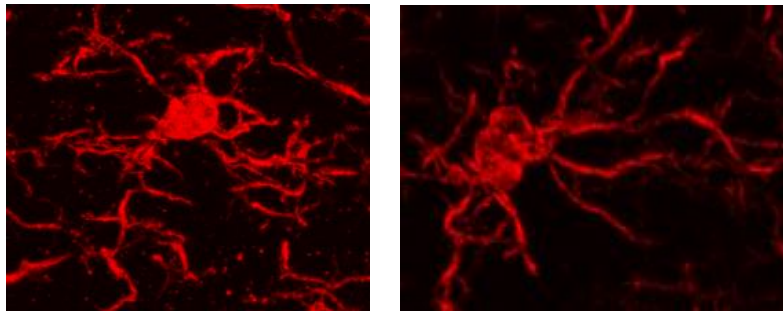
Εικόνα 19 Αριστερά: Κύτταρο από μω αγρίου τύπου, Δεξιά: Κύτταρο από μω SR-BI knockout



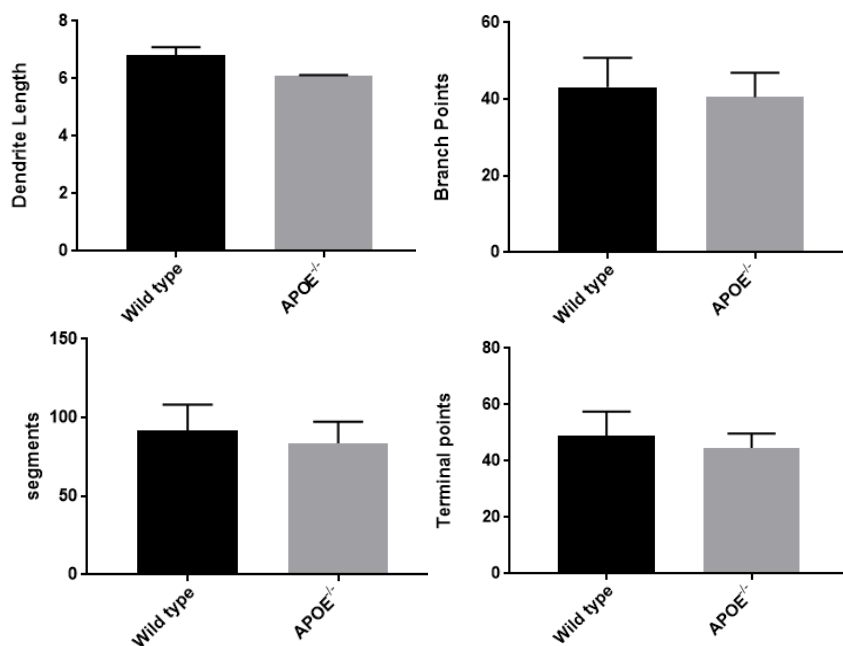
Εικόνα 20 Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων για τους SR-BI knockout μύες στον ιππόκαμπο

Με τη χρήση της χρώσης Iba-1 παρατηρήθηκε η μορφολογία των αποφυάδων των μικρογλοιακών κυττάρων στον ιππόκαμπο των wild type και SR-BI^{-/-} μυών. Από τα χαρακτηριστικά που μετρήθηκαν, το μήκος των αποφυάδων εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά (P = 0,0472) μεταξύ των δύο ομάδων. Συγκεκριμένα, η ομάδα των SR-BI^{-/-} μυών παρουσιάζει μειωμένο μήκος αποφυάδων στην περιοχή του ιπποκάμπου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Όσον αφορά τις υπόλοιπες παραμέτρους που εξετάστηκαν (τμήματα, σημεία διακλάδωσης και τελικά σημεία) οι μετρήσεις αυτή τη φορά ήταν ελαφρώς αυξημένες, χωρίς όμως να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

3.3 Η απαλοιφή του ApoE γονιδίου δεν επηρεάζει τον φαινότυπο των μικρογλοιακών κυττάρων στον ιππόκαμπο



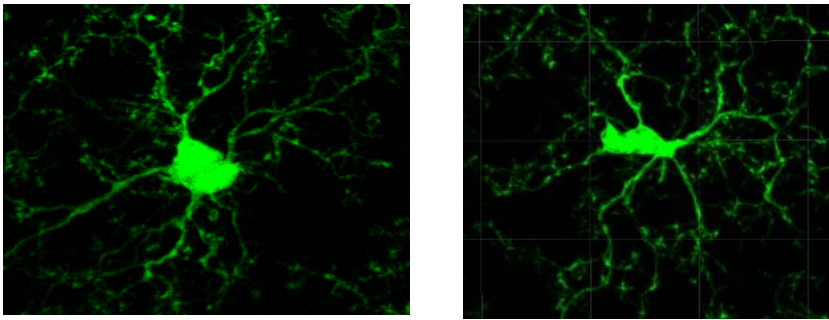
Εικόνα 21 Αριστερά: Κύτταρο από μω αγρίου τύπου, Δεξιά: Κύτταρο από μω APOE knockout



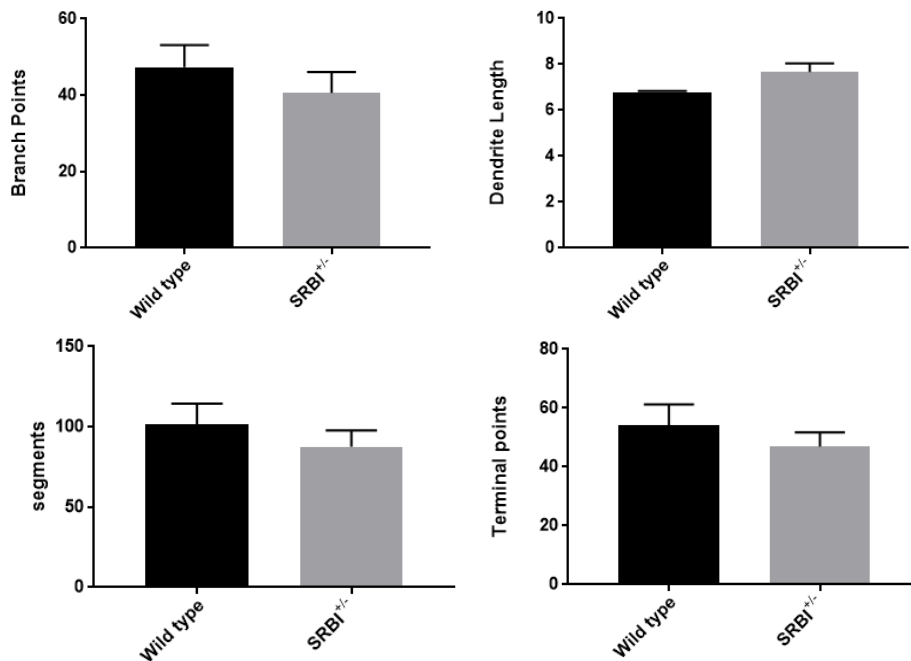
Εικόνα 22 Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων για τους APOE knockout μύες στον ιππόκαμπο

Η χρώση των τομών από τον εγκέφαλο $ApoE^{-/-}$ μυών με Iba-1 επέτρεψε την συλλογή πληροφοριών για τις αποφυάδες των μικρογλοιακών κυττάρων. Στον ιππόκαμπο των μυών που έχει απαλειφθεί το γονίδιο της $ApoE$, οι μετρήσεις δείχνουν χαμηλότερες σε σχέση με τις μετρήσεις που έγιναν στην ομάδα ελέγχου. Αυτό ισχύει για το μήκος των αποφυάδων, τον αριθμό των τμημάτων, τον αριθμό των σημείων διακλάδωσης αλλά και για τα τελικά σημεία. Οι διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, φαίνεται όμως και από τις μετρήσεις αλλά και από την παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο, πως υπάρχουν.

3.4 Η απαλοιφή ενός αντιγράφου του SR-BI γονιδίου δεν επηρεάζει τον φαινότυπο των μικρογλοιακών κυττάρων στον ιππόκαμπο



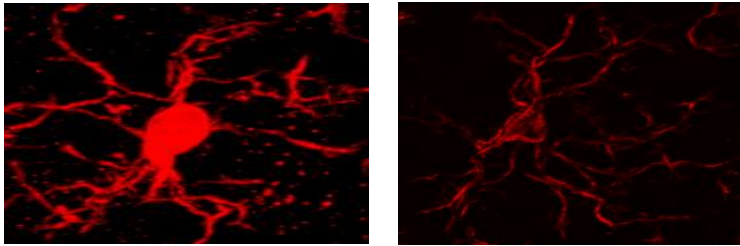
Εικόνα 23 Κύτταρα με ενδογενή χρώση GFP. Αριστερά: Κύτταρο από μω αγρίου τύπου, Δεξιά: Κύτταρο με ένα αντίγραφο SR-BI



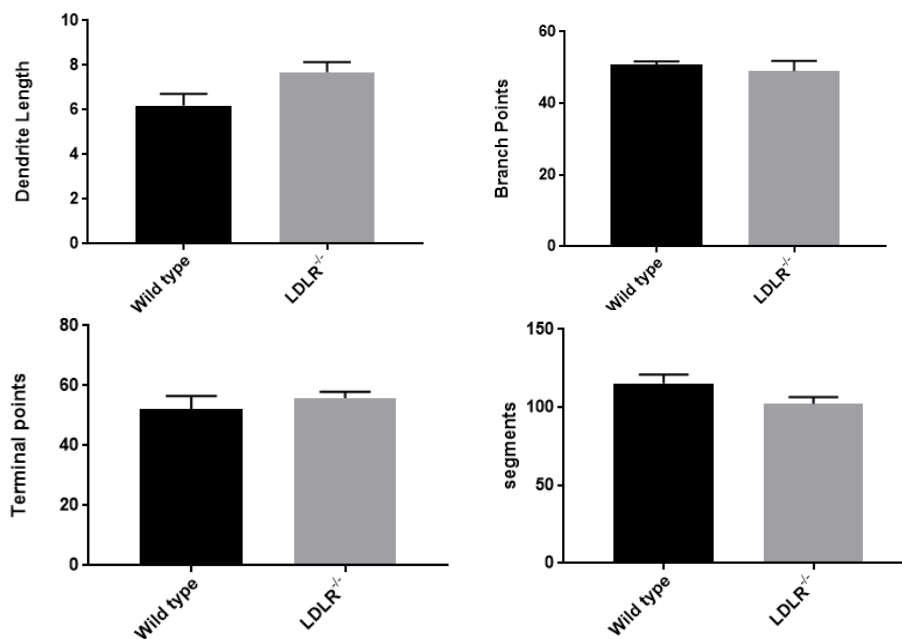
Εικόνα 24 Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων για τους $CX3CR1$ μύες στον ιππόκαμπο

Στην περίπτωση αυτή, η παρατήρηση των μικρογλοιακών κυττάρων έγινε μέσω της ενδογενούς σήμανσής τους με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP). Οι μύες της ομάδας μελέτης έχουν υποστεί απαλοιφή του ενός αντιγράφου του γονιδίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα SR-BI. Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων που έγιναν, προκύπτει πως δεν υπάρχει κάποια αξιοσημείωτη διαφοροποίηση των αποφυάδων των μικρογλοιακών κυττάρων μεταξύ των δυο ομάδων. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως οι διαφορές μεταξύ των ομάδων δεν σημαντικές για καμία από τις παραμέτρους που εξετάζονται (μήκος αποφυάδων, τμήματα, τελικά σημεία και σημεία διακλάδωσης).

3.5 Η απαλοιφή του LDLR γονιδίου δεν επηρεάζει τον φαινότυπο των μικρογλοιακών κυττάρων στον φλοιό



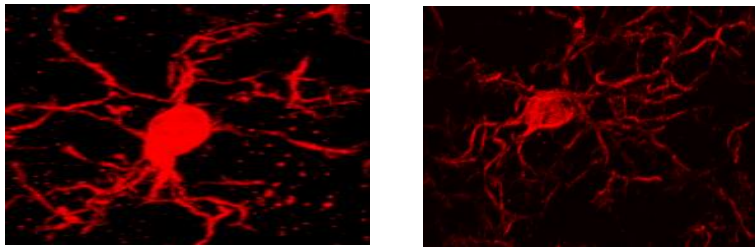
Εικόνα 25 Αριστερά: Κύτταρο από μω αγρίου τύπου, Δεξιά: Κύτταρο από μω LDLR knockout



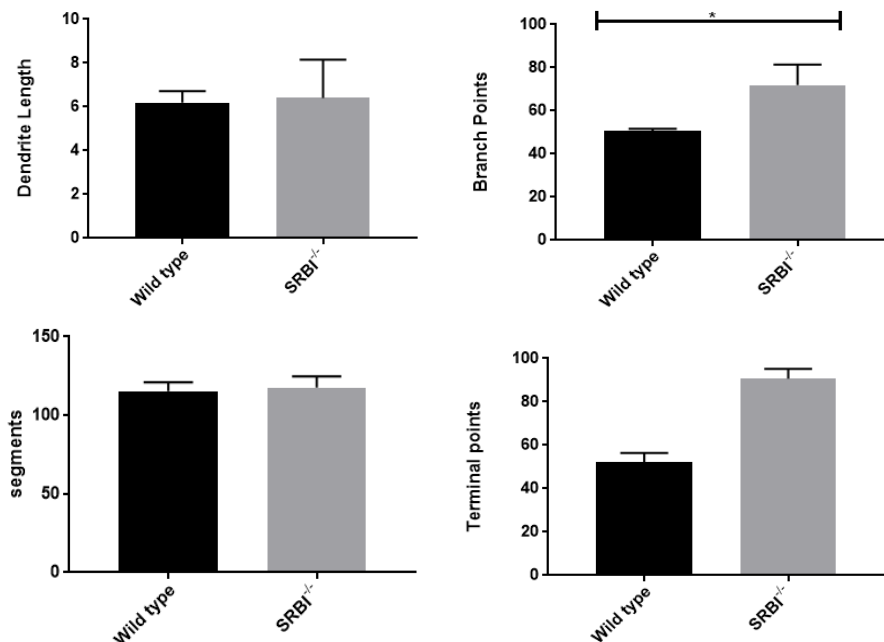
Εικόνα 26 Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων για τους LDLR knockout μύες

Μετά τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στον ιππόκαμπο, έγιναν αναλύσεις και στον φλοιό των ίδιων τομών. Στην περίπτωση της απαλοιφής του γονιδίου του LDLR τα αποτελέσματα δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ του διαγονιδιακού και του φυσιολογικού μυός. Το μήκος των αποφυάδων φαίνεται να είναι ελαφρώς μεγαλύτερο. Τα σημεία διακλάδωσης δεν παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων. Αντίστοιχα είναι και τα αποτελέσματα για τα τμήματα και τα τελικά σημεία. Συνολικά, φαίνεται πως εκτός από το μήκος των αποφυάδων οι υπόλοιπες παράμετροι δεν διαφέρουν μεταξύ της ομάδας μελέτης και της ομάδας ελέγχου.

3.6 Η απαλοιφή του SR-BI γονιδίου επηρεάζει τον φαινότυπο των μικρογλοιακών κυττάρων στον φλοιό



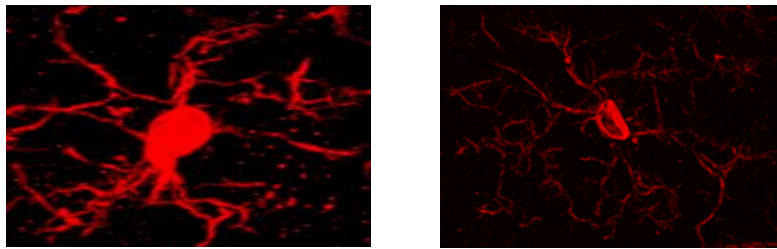
Εικόνα 27 Αριστερά: Κύτταρο από μω αγρίου τύπου, Δεξιά: Κύτταρο από μω SR-BI knockout



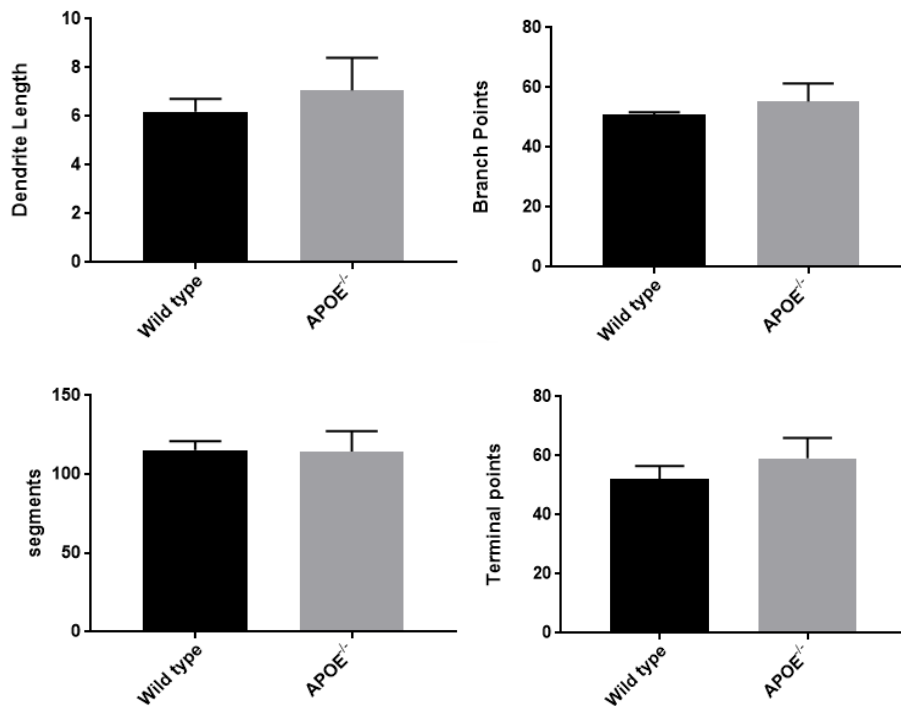
Εικόνα 29 Διαγραμματική απεικόνιση για τα αποτελέσματα των SR-BI knockout μυών

Στην περίπτωση των $SR-BI^{-/-}$ μυών τα αποτελέσματα παρουσιάζουν ενδιαφέρον. Φαίνεται πως το μέγεθος των αποφυάδων και τα τμήματα των μικρογλοιακών κυττάρων αν και παρουσιάζουν μικρή αύξηση στους διαγονιδιακούς μύες, η αύξηση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική. Αντίθετα, τα σημεία διακλάδωσης παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αύξηση στην περίπτωση των διαγονιδιακών μυών. Το ίδιο συμβαίνει και με τα τελικά σημεία αν και η αύξηση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην διασπορά των τιμών.

3.7 Η απαλοιφή του ApoE γονιδίου δεν επηρεάζει τον φαινότυπο των μικρογλοιακών κυττάρων στον φλοιό



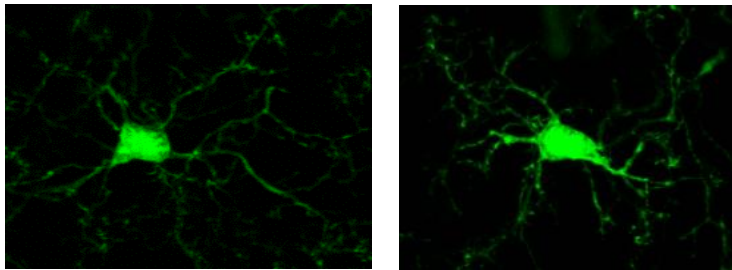
Εικόνα 30 Αριστερά: Κύτταρο από μύ αγρίου τύπου, Δεξιά: Κύτταρο από μύ $APOE$ knockout



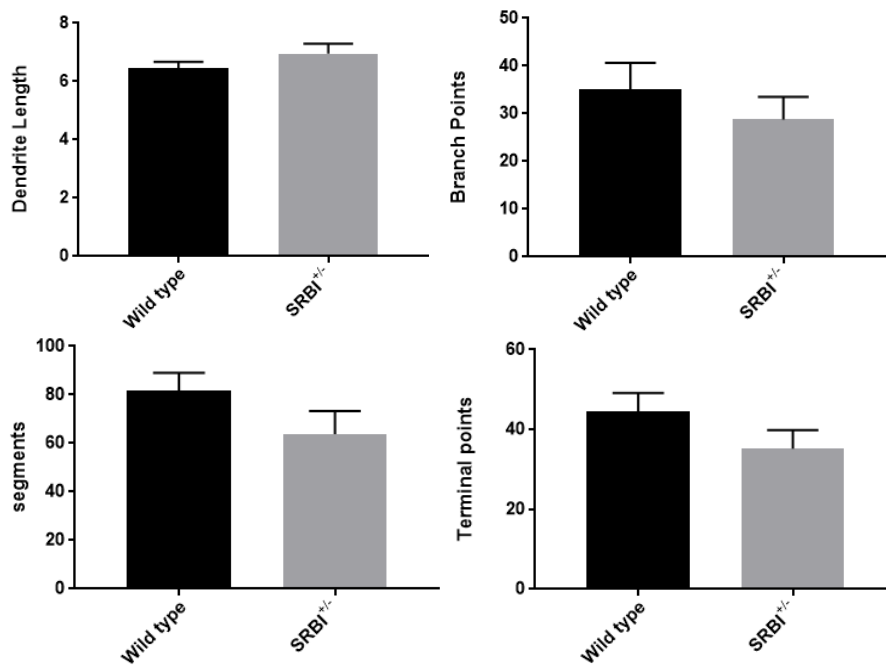
Εικόνα 31 Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων για $APOE$ knockout μύες

Η απαλοιφή του γονιδίου της APOE στους μύες έδωσε τα αποτελέσματα που φαίνονται παραπάνω. Το μήκος των αποφυάδων φαίνεται να είναι μεγαλύτερο στους διαγονιδιακούς μύες, χωρίς να υπάρχει στατιστική σημαντικότητα όμως. Τα σημεία διακλάδωσης και τα τελικά σημεία επίσης φαίνεται πως δίνουν μεγαλύτερες τιμές στα δείγματα των διαγονιδιακών μυών, σε σχέση με αυτά των φυσιολογικών. Και σε αυτή την περίπτωση δεν υπάρχει στατιστική σημαντικότητα όμως. Τέλος, τα τμήματα των κυττάρων φαίνεται πως δεν παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των δύο εξεταζόμενων ομάδων.

3.8 Η απαλοιφή ενός αντιγράφου του SR-BI γονιδίου δεν επηρεάζει τον φαινότυπο των μικρογλοιακών κυττάρων στον φλοιό



Εικόνα 32 Αριστερά: Κύτταρο από μυ αγρίου τύπου, Δεξιά: Κύτταρο με ένα αντίγραφο SR-BI γονιδίου



Εικόνα 33 Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων για τους CX3CR1 GFP μύες

Στους μύες που έγινε σήμανση με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) τα αποτελέσματα στον φλοιό δεν έδειξαν κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο εξεταζόμενων ομάδων. Σε όλες τις παραμέτρους που εξετάστηκαν (μήκος αποφυάδων, σημεία διακλάδωσης, τελικά σημεία και τμήματα κυττάρων) οι διαφορές μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων και των δειγμάτων ελέγχου δεν ήταν σημαντικές και οι αποκλίσεις ήταν μέσα στα πλαίσια της υποκειμενικότητας της μεθόδου καθορισμού της μορφολογίας των κυττάρων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι νευροεκφυλιστικές νόσοι αποτελούν μια κατηγορία παθήσεων η οποία παρουσιάζει αύξηση τα τελευταία χρόνια, λόγω του αυξημένου προσδόκιμου ζωής, και είναι υπεύθυνη για το 12% των θανάτων παγκοσμίως. Η νόσος του Alzheimer είναι η πιο κοινή νευροεκφυλιστική ασθένεια με σοβαρές επιπτώσεις για τον ασθενή, το περιβάλλον του και το κοινωνικό σύνολο.[146] Η κατανόηση των παραγόντων που συμβάλλουν στην εμφάνιση και την πρόοδο των ασθενειών αυτών κρίνεται πλέον απαραίτητη.

Από πληθυσμιακές μελέτες έχει καταδειχθεί η εμπλοκή του μεταβολισμού της χοληστερόλης στη νόσο Alzheimer's. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της νόσου και του αλληλόμορφου E4 της απολιποπρωτεΐνης E. [124] Από τότε έχουν ελεγχθεί και άλλα μόρια τα οποία συμβάλλουν στη διαδικασία του μεταβολισμού της χοληστερόλης, όπως οι υποδοχείς SR-BI και LDLR. Ο SR-BI είναι υποδοχέας της HDL και πιο συγκεκριμένα των εστέρων χοληστερόλης που βρίσκονται στο εσωτερικό των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων.[147] Οι μύες με νόσο Alzheimer's φαίνεται πως έχουν αυξημένη έκφραση του υποδοχέα SR-BI, σύμφωνα με παλαιότερη έρευνα του εργαστηρίου μας.[133] Αντίστοιχα, ο LDLR είναι ο υποδοχέας της LDL μέσω των ApoB και ApoE. Ο απλότυπος 211 του LDLR έχει σχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου Alzheimer's.[148]

Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν μύες οι οποίοι είτε παραλήφθηκαν από τα Jackson Laboratories, είτε δημιουργήθηκαν από διασταυρώσεις μεταξύ μοντέλων μυών που υπήρχαν στο εργαστήριο. Οι μύες που δημιουργήθηκαν από διασταύρωση των CX3CR1 GFP με τους SR-BI^{-/-} και η αντίστοιχη ομάδα ελέγχου (CX3CR1 GFP) μελετήθηκαν στην ηλικία των 4 μηνών. Αντίθετα, οι μύες ApoE^{-/-}, LDLR^{-/-} και SR-BI^{-/-} μελετήθηκαν στην ηλικία των 11 μηνών. Στην ηλικία αυτή, η επίδραση του γήρατος του ζώου δεν μας επιτρέπει να εξετάσουμε αμιγώς τη διαφορά μεταξύ των διαγονιδιακών και αγρίου τύπου μυών. Παρόλα αυτά μπορεί να δώσει μια σαφή εικόνα για την κατάσταση των μικρογλοιακών κυττάρων στην ηλικία άνω των 6 μηνών, που τα ζώα αυτά μπορεί να εμφανίσουν φυσιολογική φθορά του νευρικού συστήματος και άνοια.[149]

Για την μελέτη της μορφολογίας των μικρογλοιακών κυττάρων, απομονώθηκαν οι εγκεφαλοι των μυών και παραλήφθηκαν τομές πάχους 40μm, στις οποίες έγινε χρώση

με Iba-1. Οι μετρήσεις που έγιναν αφορούν δύο περιοχές του εγκεφάλου, τον ιππόκαμπο και τον φλοιό. Συγκεκριμένα, οι μετρήσεις που αφορούν τον ιππόκαμπο έγιναν στην περιοχή CA2, ενώ οι μετρήσεις που αφορούν τον φλοιό έγιναν στο τμήμα του εγκεφαλικού φλοιού που είναι παρακείμενος στον ιππόκαμπο.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων στον ιππόκαμπο για δύο από τις τρεις ομάδες με απαλοιφή γονιδίων (LDL^{-/-}, APOE^{-/-}) εμφάνισαν μείωση των παραμέτρων που εξετάστηκαν, σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα. Η μείωση αυτή αφορά το μήκος των αποφυάδων, τον αριθμό σημείων διακλάδωσης και των τελικών σημείων και τον αριθμό των τμημάτων των μικρογλοιακών κυττάρων.

Η απολιποπρωτεΐνη E φαίνεται πως παίζει σημαντικό ρόλο σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως οι νόσοι Parkinson's και Alzheimer's, χωρίς όμως να είναι γνωστός ο μηχανισμός της δράσης της. Διαγονιδιακά μοντέλα μυών με απαλοιφή για το συγκεκριμένο γονίδιο εμφανίζουν σοβαρή φλεγμονή, με παράλληλη μείωση των αντιφλεγμονώδων κυτταροκινών IL-10 και TGF-β από τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα αστροκύτταρα.[150] Η παρατήρηση αυτή ενδέχεται να δίνει και κάποιες πληροφορίες για την μορφολογία της μικρογλοίας στο αντίστοιχο μοντέλο. Η φλεγμονή, σε συνδυασμό με τις μειωμένες αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες παραπέμπει στην κατάσταση ενεργοποίησης M1 των μικρογλοιακών κυττάρων.[110] Τα χαρακτηριστικά αυτής της κατάστασης συνάδουν με τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού, από τα οποία διαφαίνεται μια πιο αμοιβαδοειδής μορφή των κυττάρων σε σχέση με τους φυσιολογικούς μύες.

Στην περίπτωση των μυών με έλλειψη του LDLR, τα αποτελέσματα έδειξαν και πάλι μειωμένες τιμές των παραμέτρων σε σχέση με τους φυσιολογικούς μύες. Από τη βιβλιογραφία έχει φανεί ότι η απαλοιφή του LDLR δεν επηρεάζει την συγκέντρωση της χοληστερόλης στον εγκέφαλο.[151] Για την επίδραση στην μορφολογία όμως δεν υπάρχουν δεδομένα. Επομένως, θα μπορούσαν οι διαφορές που παρατηρούνται σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα να οφείλονται στην απαλοιφή του εν λόγω γονιδίου.

Όσον αφορά τους μύες με απαλοιφή του γονιδίου του SR-BI, το μήκος των αποφυάδων των μικρογλοιακών κυττάρων είναι σημαντικά μικρότερο, ενώ οι υπόλοιπες παράμετροι όντας αυξημένες, υποδεικνύουν ένα κύτταρο με αυξημένη διακλάδωση. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η έκφραση του SR-BI μειορρυθμίζεται κατά την μετανεογνική ανάπτυξη και φτάνει να μην εκφράζεται στον εγκέφαλο των ενήλικων μυών.[132] Επομένως, εάν ο υποδοχέας αυτός δεν εκφράζεται στην ενήλικη μικρογλοία υπό φυσιολογικές συνθήκες, η απαλοιφή του δεν προκαλεί σημαντικές αλλαγές στα κύτταρα αυτά.

Πού θα μπορούσαν να οφείλονται οι παρατηρούμενες αλλαγές στα κύτταρα των διαγονιδιακών μυών σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα; Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η μικρογλοία στον γερασμένο εγκέφαλο παρουσιάζει αλλαγές στον φαινότυπο. Συγκεκριμένα παρατηρείται πάχυνση των αποφυάδων και μειωμένη διακλάδωση τους, ενώ παράλληλα το σώμα παρουσιάζεται υπερτροφικό. Επιπλέον, οι αποφυάδες είναι πιο κοντές.[152] Τα συμπεράσματα αυτά συνάδουν με τις παρατηρήσεις που έγιναν στα κύτταρα αυτού του πειράματος. Όλες οι εξεταζόμενες ομάδες παρουσίασαν κοντύτερες αποφυάδες σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα και το ίδιο συνέβη και με τις παραμέτρους που αφορούν τη διακλάδωση. Επίσης, τα σώματα των κυττάρων φαίνονται πιο παχιά και πεπλατυσμένα, αν και οι παρατηρήσεις αυτές δεν ποσοτικοποιήθηκαν. Παρόλα αυτά, η ομάδα ελέγχου αντιστοιχεί σε μύες 4 μηνών, επομένως η σύγκριση δεν είναι απόλυτα σωστή.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τον φλοιό δεν δείχνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων του υπόκαμπου και του φλοιού. Και πάλι οι μεγαλύτερες διαφορές μεταξύ εξεταζόμενων δειγμάτων και δειγμάτων ελέγχου εντοπίζονται στην περίπτωση των SR-BI^{-/-} μυών, με τα αποτελέσματα να δείχνουν ένα πιο αμοιβαδοειδές κύτταρο με μεγαλύτερη διακλάδωση.

Η δομή των κυττάρων που διαφαίνεται από τα αποτελέσματα είναι σύμφωνη με την δομή που περιγράφεται από τη βιβλιογραφία. Ο φλοιός και το μεγαλύτερο μέρος του υπόκαμπου αποτελούνται από φαιά ουσία. Στη φαιά ουσία τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι ακτινωτά διακλαδισμένα, σε αντίθεση με τα μικρογλοιακά κύτταρα στη λευκή ουσία, τα οποία είναι διακλαδισμένα κατά μήκος των νευρικών αξόνων.[152]

Παρόλο που δεν μπορούμε να γνωρίζουμε αν η απαλοιφή των γονιδίων αυτών προκαλεί φλεγμονή (εκτός από την περίπτωση APOE^{-/-}), στους 11 μήνες υπάρχει φλεγμονή η οποία σχετίζεται με την ηλικία και επηρεάζει τα μικρογλοιακά κύτταρα και τον φαινότυπό τους. Επιπλέον, το priming των μικρογλοιακών κυττάρων που συμβαίνει στον ηλικιωμένο εγκέφαλο, θέτει τα κύτταρα σε μια κατάσταση που μορφολογικά προσομοιάζει την ενεργοποιημένη κατάσταση, χωρίς να την φτάνει πλήρως.[149] Επομένως, τα μικρογλοιακά κύτταρα των μυών 11 μηνών αναμένεται να είναι πιο αμοιβαδοειδή και με μικρότερες αποφυάδες.

Όσον αφορά τη σύγκριση μεταξύ των CX3CR1 GFP αγρίου τύπου και CX3CR1 GFP SR-BI^{+/-}, τα αποτελέσματα στον φλοιό και στον υπόκαμπο δεν έδειξαν κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην απαλοιφή μόνο ενός αλληλόμορφου του SR-BI, το οποίο ενδέχεται να μην έχει επίδραση στα

μικρογλοιακά κύτταρα. Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο SR-BI υποδοχέας δεν εκφράζεται στα μικρογλοιακά κύτταρα των ενήλικων μυών, επομένως η μη διαφοροποίηση της μορφολογίας της μικρογλοίας ενδέχεται να οφείλεται σε αυτό.[132]

Για την περαιτέρω μελέτη της επίδρασης των LDLR, APOE και SR-BI στην μορφολογία της μικρογλοίας απαιτούνται κάποια επιπλέον πειράματα. Αρχικά θα πρέπει οι μύες 11 μηνών που μελετήθηκαν, να συγκριθούν με αντίστοιχους μύες αγρίου τύπου 11 μηνών. Επιπλέον, θα πρέπει να γίνει μελέτη σε μύες 4 μηνών ώστε να μην έχει επέλθει γήρανση του εγκεφάλου και να αποκλειστεί η συμβολή του γήρατος στην μορφολογία των κυττάρων.

Ακόμη, για να καθοριστεί πλήρως η μορφολογία των κυττάρων, θα πρέπει να εξεταστούν και παράμετροι που να αφορούν το κυτταρικό σώμα της μικρογλοίας, το οποίο εμφάνισε μεγαλύτερες διαφορές στο πείραμα αυτό στις ομάδες που εξετάστηκαν.

Τέλος, πρωτογενείς καλλιέργειες από μύες 4 και 11 μηνών θα μπορούσαν να βοηθήσουν την παρατήρηση των κυττάρων και να δώσουν πιο ξεκάθαρες εικόνες για τη μορφολογία τους.

- [1] C. S. von Bartheld, J. Bahney, and S. Herculano-Houzel, “The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 524, no. 18, pp. 3865–3895, 2016.
- [2] P. Rezaie and D. Male, “MESOGLIA & MICROGLIA – A Historical Review of the Concept of Mononuclear Phagocytes Within the Central Nervous System,” *J. Hist. Neurosci.*, vol. 11, no. 4, pp. 325–374, 2002.
- [3] J. A. De Carlos and J. Borrell, “A historical reflection of the contributions of Cajal and Golgi to the foundations of neuroscience,” *Brain Res. Rev.*, vol. 55, no. 1, pp. 8–16, 2007.
- [4] M.-È. Tremblay, C. Lecours, L. Samson, V. Sánchez-Zafra, and A. Sierra, “From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia,” *Front. Neuroanat.*, vol. 9, no. April, pp. 1–10, 2015.
- [5] C. Sousa, K. Biber, and A. Michelucci, “Cellular and molecular characterization of microglia: A unique immune cell population,” *Front. Immunol.*, vol. 8, no. MAR, 2017.
- [6] Z. Chen *et al.*, “Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain,” *Nat. Commun.*, vol. 5, no. July, pp. 1–12, 2014.
- [7] A. Miyamoto, H. Wake, A. J. Moorhouse, and J. Nabekura, “Microglia and synapse interactions: fine tuning neural circuits and candidate molecules,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 7, no. May, pp. 1–6, 2013.
- [8] K. Blinzinger and G. Kreutzberg, “Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells,” *Zeitschrift f??r Zellforsch. und Mikroskopische Anat.*, vol. 85, no. 2, pp. 145–157, 1968.
- [9] J. D. Sedgwick, S. Schwender, H. Imrich, R. Dorries, G. W. Butcher, and V. ter Meulen, “Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system.,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 88, no. 16, pp. 7438–7442, 1991.
- [10] Y. Imai, I. Ibata, D. Ito, K. Ohsawa, and S. Kohsaka, “A novel gene *iba1* in the

- major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 224, no. 3, pp. 855–862, 1996.
- [11] D. Ito, Y. Imai, K. Ohsawa, K. Nakajima, Y. Fukuuchi, and S. Kohsaka, “Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1,” *Mol. Brain Res.*, vol. 57, no. 1, pp. 1–9, 1998.
- [12] I. M. Chiu *et al.*, “A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model,” *Cell Rep.*, vol. 4, no. 2, pp. 385–401, 2013.
- [13] S. R. McKercher *et al.*, “Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities,” *EMBO J.*, vol. 15, no. 20, pp. 5647–5658, 1996.
- [14] D. R. Beers *et al.*, “Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, no. 43, pp. 16021–16026, 2006.
- [15] F. Ginhoux, S. Lim, G. Hoeffel, D. Low, and T. Huber, “Origin and differentiation of microglia,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 7, no. April, pp. 1–14, 2013.
- [16] T. L. Tay, J. C. Savage, C. W. Hui, K. Bisht, and M.-` E. Tremblay, “Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition,” *J. Physiol.*, vol. 595, pp. 1929–1945, 2017.
- [17] K. Kierdorf *et al.*, “Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways,” *Nat. Neurosci.*, vol. 16, no. 3, pp. 273–280, 2013.
- [18] M. Mizutani, P. A. Pino, N. Saederup, I. F. Charo, R. M. Ransohoff, and A. E. Cardona, “The fractalkine receptor but not CCR2 is present on microglia from embryonic development throughout adulthood,” *J. Immunol.*, vol. 188, no. 1, pp. 29–36, Jan. 2012.
- [19] A. Roumier *et al.*, “Prenatal activation of microglia induces delayed impairment of glutamatergic synaptic function,” *PLoS One*, vol. 3, no. 7, p. e2595, Jul. 2008.
- [20] F. Ginhoux *et al.*, “Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from

- primitive macrophages.,” *Science*, vol. 330, no. 6005, pp. 841–5, Nov. 2010.
- [21] A. Monier, H. Adle-Biassette, A.-L. Delezoide, P. Evrard, P. Gressens, and C. Verney, “Entry and Distribution of Microglial Cells in Human Embryonic and Fetal Cerebral Cortex,” *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 66, no. 5, pp. 372–382, 2007.
- [22] C. Verney, A. Monier, C. Fallet-Bianco, and P. Gressens, “Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants.,” *J. Anat.*, vol. 217, no. 4, pp. 436–48, Oct. 2010.
- [23] P. Rezaie and D. Male, “Colonisation of the developing human brain and spinal cord by microglia: a review,” *Microsc Res Tech*, vol. 45, no. 6, pp. 359–382, 1999.
- [24] P. Rezaie, A. Dean, D. Male, and N. Ulfig, “Microglia in the cerebral wall of the human telencephalon at second trimester,” *Cereb. Cortex*, vol. 15, no. 7, pp. 938–949, 2005.
- [25] M. M. Esiri, A. M. S. Izzi, and C. Reading, “AMacrophages, microglial,” *J. Clinical Pathol.*, vol. 44, pp. 102–106, 1991.
- [26] M. Nikodemova, R. S. Kimyon, I. De, A. L. Small, L. S. Collier, and J. J. Watters, “Microglial numbers attain adult levels after undergoing a rapid decrease in cell number in the third postnatal week.,” *J. Neuroimmunol.*, vol. 278, pp. 280–8, Jan. 2015.
- [27] M. A. Cuadros and J. Navascués, “The origin and differentiation of microglial cells during development,” *Prog. Neurobiol.*, vol. 56, no. 2, pp. 173–189, 1998.
- [28] P. Herbomel, B. Thisse, and C. Thisse, “Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process,” *Dev. Biol.*, vol. 238, no. 2, pp. 274–288, 2001.
- [29] B. Martynoga, D. Drechsel, and F. Guillemot, “Molecular control of neurogenesis: a view from the mammalian cerebral cortex.,” *Cold Spring Harb.*

Perspect. Biol., vol. 4, no. 10, Oct. 2012.

- [30] C. Rigato, R. Buckinx, H. Le-Corronc, J. M. Rigo, and P. Legendre, “Pattern of invasion of the embryonic mouse spinal cord by microglial cells at the time of the onset of functional neuronal networks,” *Glia*, vol. 59, no. 4, pp. 675–695, 2011.
- [31] K. Kierdorf and M. Prinz, “Microglia in steady state,” *J. Clin. Invest.*, vol. 127, no. 9, pp. 3201–3209, 2017.
- [32] M. P. J. Dekkers and Y.-A. Barde, “Programmed Cell Death in Neuronal Development,” *Science (80-.)*, vol. 340, no. 6128, pp. 39–41, 2013.
- [33] M. P. J. Dekkers, V. Nikolettou, and Y.-A. Barde, “Cell biology in neuroscience: Death of developing neurons: new insights and implications for connectivity,” *J. Cell Biol.*, vol. 203, no. 3, pp. 385–93, Nov. 2013.
- [34] S. Wakselman, C. Béchade, A. Roumier, D. Bernard, A. Triller, and A. Bessis, “Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor,” *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 32, pp. 8138–43, Aug. 2008.
- [35] K. Takahashi, C. D. P. Rochford, and H. Neumann, “Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2,” *J. Exp. Med.*, vol. 201, no. 4, pp. 647–57, Feb. 2005.
- [36] K. Takahashi, M. Prinz, M. Stagi, O. Chechneva, and H. Neumann, “TREM2-Transduced Myeloid Precursors Mediate Nervous Tissue Debris Clearance and Facilitate Recovery in an Animal Model of Multiple Sclerosis,” *PLoS Med.*, vol. 4, no. 4, p. e124, Apr. 2007.
- [37] J. M. Frade and Y. A. Barde, “Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina,” *Neuron*, vol. 20, no. 1, pp. 35–41, Jan. 1998.
- [38] C. L. Cunningham, V. Martínez-Cerdeño, and S. C. Noctor, “Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex,” *J. Neurosci.*, vol. 33, no. 10, pp. 4216–33, Mar. 2013.
- [39] A. A. Tronnes, J. Koschnitzky, R. Daza, J. Hitti, J. M. Ramirez, and R. Hevner, “Effects of Lipopolysaccharide and Progesterone Exposures on Embryonic

- Cerebral Cortex Development in Mice.,” *Reprod. Sci.*, vol. 23, no. 6, pp. 771–8, 2016.
- [40] J. M. Antony, A. Paquin, S. L. Nutt, D. R. Kaplan, and F. D. Miller, “Endogenous microglia regulate development of embryonic cortical precursor cells,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 89, no. 3, pp. 286–298, 2011.
- [41] W. Risau, “CHARACTERISTICS OF THE RENAL VASCULATURE Development and differentiation of endothelium,” 1998.
- [42] A. Fantin *et al.*, “Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction.,” *Blood*, vol. 116, no. 5, pp. 829–40, Aug. 2010.
- [43] D. Checchin, F. Sennlaub, E. Levavasseur, M. Leduc, and S. Chemtob, “Potential Role of Microglia in Retinal Blood Vessel Formation,” *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 47, no. 8, p. 3595, Aug. 2006.
- [44] S. F. Rymo, H. Gerhardt, F. Wolfhagen Sand, R. Lang, A. Uv, and C. Betsholtz, “A Two-Way Communication between Microglial Cells and Angiogenic Sprouts Regulates Angiogenesis in Aortic Ring Cultures,” *PLoS One*, vol. 6, no. 1, p. e15846, Jan. 2011.
- [45] D. Davalos *et al.*, “ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo,” *Nat. Neurosci.*, vol. 8, no. 6, pp. 752–758, 2005.
- [46] A. Nimmerjahn, F. Kirchhoff, and F. Helmchen, “Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo.,” *Science*, vol. 308, no. 5726, pp. 1314–8, May 2005.
- [47] U. B. Eyo, J. Peng, P. Swiatkowski, A. Mukherjee, A. Bispo, and L.-J. Wu, “Neuronal hyperactivity recruits microglial processes via neuronal NMDA receptors and microglial P2Y12 receptors after status epilepticus.,” *J. Neurosci.*, vol. 34, no. 32, pp. 10528–40, Aug. 2014.
- [48] Y. Li, X.-F. Du, C.-S. Liu, Z.-L. Wen, and J.-L. Du, “Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo.,” *Dev. Cell*, vol. 23, no. 6, pp. 1189–202, Dec. 2012.

- [49] L. C. Katz and C. J. Shatz, "Synaptic activity and the construction of cortical circuits.," *Science*, vol. 274, no. 5290, pp. 1133–8, Nov. 1996.
- [50] R. M. Ransohoff and A. E. Cardona, "The myeloid cells of the central nervous system parenchyma," *Nature*, vol. 468, no. 7321, pp. 253–262, Nov. 2010.
- [51] C. Arcuri, C. Mecca, R. Bianchi, I. Giambanco, and R. Donato, "The Pathophysiological Role of Microglia in Dynamic Surveillance, Phagocytosis and Structural Remodeling of the Developing CNS," *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 10, no. June, pp. 1–22, 2017.
- [52] S. T. Dheen, C. Kaur, and E.-A. Ling, "Microglial activation and its implications in the brain diseases.," *Curr. Med. Chem.*, vol. 14, no. 11, pp. 1189–97, 2007.
- [53] R. B. Banati, J. Gehrmann, P. Schubert, and G. W. Kreutzberg, "Cytotoxicity of microglia," *Glia*, vol. 7, no. 1, pp. 111–118, Jan. 1993.
- [54] K. Nakamichi, M. Saiki, M. Sawada, Y. Yamamuro, K. Morimoto, and I. Kurane, "Double-stranded RNA stimulates chemokine expression in microglia through vacuolar pH-dependent activation of intracellular signaling pathways," *J. Neurochem.*, vol. 95, no. 1, pp. 273–283, Aug. 2005.
- [55] M. Hartlage-Rübsamen, R. Lemke, and R. Schliebs, "Interleukin-1beta, inducible nitric oxide synthase, and nuclear factor-kappaB are induced in morphologically distinct microglia after rat hippocampal lipopolysaccharide/interferon-gamma injection.," *J. Neurosci. Res.*, vol. 57, no. 3, pp. 388–98, Aug. 1999.
- [56] A. Suzumura, M. Sawada, and T. Marunouchi, "Selective induction of interleukin-6 in mouse microglia by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor," *Brain Res.*, vol. 713, no. 1–2, pp. 192–198, Mar. 1996.
- [57] A. M. Floden, S. Li, and C. K. Combs, "-Amyloid-Stimulated Microglia Induce Neuron Death via Synergistic Stimulation of Tumor Necrosis Factor and NMDA Receptors," *J. Neurosci.*, vol. 25, no. 10, pp. 2566–2575, Mar. 2005.
- [58] A. A. Babcock, W. A. Kuziel, S. Rivest, and T. Owens, "Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS.," *J. Neurosci.*, vol. 23, no. 21, pp. 7922–30, Aug. 2003.

- [59] Q. Si, M. Cosenza, M.-L. Zhao, H. Goldstein, and S. C. Lee, "GM-CSF and M-CSF modulate γ -chemokine and HIV-1 expression in microglia," *Glia*, vol. 39, no. 2, pp. 174–183, Aug. 2002.
- [60] S. Takami *et al.*, "Induction of macrophage inflammatory protein MIP-1 α mRNA on glial cells after focal cerebral ischemia in the rat.," *Neurosci. Lett.*, vol. 227, no. 3, pp. 173–6, May 1997.
- [61] C.-J. Chen, J.-H. Chen, S.-Y. Chen, S.-L. Liao, and S.-L. Raung, "Upregulation of RANTES Gene Expression in Neuroglia by Japanese Encephalitis Virus Infection," *J. Virol.*, vol. 78, no. 22, pp. 12107–12119, Nov. 2004.
- [62] J. R. Tonra *et al.*, "Comparison of the timing of acute blood-brain barrier breakdown to rabbit immunoglobulin G in the cerebellum and spinal cord of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis.," *J. Comp. Neurol.*, vol. 430, no. 1, pp. 131–44, Jan. 2001.
- [63] A. C. Baldwin and T. Kielian, "Persistent immune activation associated with a mouse model of Staphylococcus aureus-induced experimental brain abscess," *J. Neuroimmunol.*, vol. 151, no. 1–2, pp. 24–32, Jun. 2004.
- [64] N. S. Peress, H. B. Fleit, E. Perillo, R. Kuljis, and C. Pezzullo, "Identification of Fc gamma RI, II and III on normal human brain ramified microglia and on microglia in senile plaques in Alzheimer's disease.," *J. Neuroimmunol.*, vol. 48, no. 1, pp. 71–9, Oct. 1993.
- [65] S. R. Barnum, "Inhibition of complement as a therapeutic approach in inflammatory central nervous system (CNS) disease.," *Mol. Med.*, vol. 5, no. 9, pp. 569–82, Sep. 1999.
- [66] I. Yang, S. J. Han, G. Kaur, C. Crane, and A. T. Parsa, "The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology," *J. Clin. Neurosci.*, vol. 17, no. 1, pp. 6–10, Jan. 2010.
- [67] J. M. Slavik, J. E. Hutchcroft, and B. E. Bierer, "CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families," *Immunol. Res.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–24, Feb. 1999.
- [68] C. van Kooten and J. Banchereau, "CD40-CD40 ligand.," *J. Leukoc. Biol.*, vol.

- 67, no. 1, pp. 2–17, Jan. 2000.
- [69] M. Stoll *et al.*, “Differential microglial regulation in the human spinal cord under normal and pathological conditions,” *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, vol. 32, no. 6, pp. 650–661, Dec. 2006.
- [70] L. Truman, C. Ford, M. Pasikowska, and Jd, “CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis,” *Blood*, vol. 112, no. 13, pp. 5026–5036, 2008.
- [71] G. W. Kreutzberg, “Microglia: a sensor for pathological events in the CNS.,” *Trends Neurosci.*, vol. 19, no. 8, pp. 312–8, Aug. 1996.
- [72] P. Shrikant and E. N. Benveniste, “The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation.,” *J. Immunol.*, vol. 157, no. 5, pp. 1819–22, Sep. 1996.
- [73] M. P. Pender and M. J. Rist, “Apoptosis of inflammatory cells in immune control of the nervous system: Role of glia,” *Glia*, vol. 36, no. 2, pp. 137–144, Nov. 2001.
- [74] K. S. Spanaus, R. Schlapbach, and A. Fontana, “TNF- α and IFN- γ render microglia sensitive to Fas ligand-induced apoptosis by induction of Fas expression and down-regulation of Bcl-2 and Bcl-xL,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 28, no. 12, pp. 4398–4408, Dec. 1998.
- [75] T. Kohji and Y. Matsumoto, “Coexpression of Fas/FasL and Bax on brain and infiltrating T cells in the central nervous system is closely associated with apoptotic cell death during autoimmune encephalomyelitis.,” *J. Neuroimmunol.*, vol. 106, no. 1–2, pp. 165–71, Jul. 2000.
- [76] A. Sierra, O. Abiega, A. Shahraz, and H. Neumann, “Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 7, no. January, pp. 1–22, 2013.
- [77] G. W. Litman, J. P. Cannon, and L. J. Dishaw, “Reconstructing immune phylogeny: new perspectives,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 5, no. 11, pp. 866–879, 2005.
- [78] J. Savill, I. Dransfield, C. Gregory, and C. Haslett, “A blast from the past:

- Clearance of apoptotic cells regulates immune responses,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, no. 12, pp. 965–975, 2002.
- [79] S. Koizumi *et al.*, “UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis,” *Nature*, vol. 446, no. 7139, pp. 1091–1095, 2007.
- [80] M. Noda *et al.*, “Fractalkine attenuates excitotoxicity via microglial clearance of damaged neurons and antioxidant enzyme heme oxygenase-1 expression,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 3, pp. 2308–2319, 2011.
- [81] K. S. Ravichandran, “Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums,” *J. Exp. Med.*, vol. 207, no. 9, pp. 1807–1817, 2010.
- [82] M. L. Dustin, “Review series Signaling at neuro / immune synapses,” *J. Clin. Invest.*, vol. 122, no. 4, pp. 1149–1155, 2012.
- [83] A. Sierra *et al.*, “Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis,” *Cell Stem Cell*, vol. 7, no. 4, pp. 483–495, 2010.
- [84] F. Peri and C. Nüsslein-Volhard, “Live Imaging of Neuronal Degradation by Microglia Reveals a Role for v0-ATPase a1 in Phagosomal Fusion In Vivo,” *Cell*, vol. 133, no. 5, pp. 916–927, 2008.
- [85] R. Khanna, L. Roy, X. Zhu, and L. C. Schlichter, “K⁺ channels and the microglial respiratory burst,” *Am. J. Physiol. Physiol.*, vol. 280, no. 4, pp. C796–C806, 2001.
- [86] R. Minakami and H. Sumimotoa, “Phagocytosis-Coupled Activation of the Superoxide-Producing Phagocyte Oxidase, a Member of the NADPH Oxidase (Nox) Family,” *Int. J. Hematol.*, vol. 84, no. 3, pp. 193–198, 2006.
- [87] J. Bylund, K. L. Brown, C. Movitz, C. Dahlgren, and A. Karlsson, “Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: How, where, and what for?,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 49, no. 12, pp. 1834–1845, 2010.
- [88] M. Spranger, I. Kiprianova, S. Krempien, and S. Schwab, “Reoxygenation increases the release of reactive oxygen intermediates in murine microglia,” *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 18, no. 6, pp. 670–674, 1998.
- [89] L. Qin *et al.*, “NADPH Oxidase Mediates Lipopolysaccharide-induced

- Neurotoxicity and Proinflammatory Gene Expression in Activated Microglia,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 2, pp. 1415–1421, 2004.
- [90] S. W. Barger, M. E. Goodwin, M. M. Porter, and M. L. Beggs, “Glutamate release from activated microglia requires the oxidative burst and lipid peroxidation,” *J. Neurochem.*, vol. 101, no. 5, pp. 1205–1213, 2007.
- [91] A. M. Smith and M. Dragunow, “The human side of microglia,” *Trends Neurosci.*, vol. 37, no. 3, pp. 125–135, Mar. 2014.
- [92] W. J. Streit, Q.-S. Xue, J. Tischer, and I. Bechmann, “Microglial pathology,” *Acta Neuropathol. Commun.*, vol. 2, no. 1, p. 142, Dec. 2014.
- [93] O. Butovsky *et al.*, “Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia,” *Nat. Neurosci.*, vol. 17, no. 1, pp. 131–143, Jan. 2014.
- [94] B. Linnartz-Gerlach, M. Mathews, and H. Neumann, “Sensing the neuronal glycocalyx by glial sialic acid binding immunoglobulin-like lectins,” *Neuroscience*, vol. 275, pp. 113–124, Sep. 2014.
- [95] S. A. Wolf, H. W. G. M. Boddeke, and H. Kettenmann, “Microglia in Physiology and Disease,” *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 79, no. 1, pp. 619–643, 2017.
- [96] P. Habib and C. Beyer, “Regulation of brain microglia by female gonadal steroids,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 146, pp. 3–14, Feb. 2015.
- [97] K. M. Lenz and M. M. McCarthy, “A Starring Role for Microglia in Brain Sex Differences,” *Neurosci.*, vol. 21, no. 3, pp. 306–321, Jun. 2015.
- [98] S. Kohsaka and R. April, “JB Review Microglia : System Activation and Their Significance in the Central Nervous Microglial activation flammation,” *Micro*, vol. 130, no. 2, 2001.
- [99] U. K. Hanisch, “Microglia as a source and target of cytokines,” *Glia*, vol. 40, no. 2, pp. 140–155, 2002.
- [100] S. U. Kim and J. de Vellis, “Microglia in health and disease,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 81, no. 3, pp. 302–313, Aug. 2005.

- [101] L. Vitkovic, J. Bockaert, and C. Jacque, “‘Inflammatory’ cytokines’ neuromodulators in normal brain?,” *J. Neurochem.*, vol. 74, no. 2, pp. 457–471, 2000.
- [102] D. Giulian, D. G. Young, J. Woodward, D. C. Brown, and L. B. Lachman, “Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain.,” *J. Neurosci.*, vol. 8, no. 2, pp. 709–714, 1988.
- [103] M. Sawada, A. Suzumura, H. Hosoya, T. Marunouchi, and T. Nagatsu, “Interleukin-10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia,” *J. Neurochem.*, vol. 72, no. 4, pp. 1466–1471, 1999.
- [104] T. Wyss-Coray *et al.*, “TGF-beta1 promotes microglial amyloid-beta clearance and reduces plaque burden in transgenic mice.,” *Nat. Med.*, vol. 7, no. 5, pp. 612–8, 2001.
- [105] G. Raivich, M. Bohatschek, C. U. A. Kloss, A. Werner, L. L. Jones, and G. W. Kreutzberg, “Neuroglial activation repertoire in the injured brain: Graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function,” *Brain Res. Rev.*, vol. 30, no. 1, pp. 77–105, 1999.
- [106] P. Bezzi *et al.*, “CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity,” *Nat. Neurosci.*, vol. 4, no. 7, pp. 702–710, Jul. 2001.
- [107] N. G. Carlson, W. A. Wieggl, J. Chen, A. Bacchi, S. W. Rogers, and L. C. Gahring, “Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways.,” *J. Immunol.*, vol. 163, no. 7, pp. 3963–8, Oct. 1999.
- [108] R. Donato *et al.*, “S100B protein, a damage-associated molecular pattern protein in the brain and heart, and beyond,” *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.*, vol. 2010, 2010.
- [109] K. Saijo and C. K. Glass, “Microglial cell origin and phenotypes in health and disease,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 11, pp. 775–787, 2011.
- [110] D. Boche, V. H. Perry, and J. A. R. Nicoll, “Review: Activation patterns of

- microglia and their identification in the human brain,” *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, vol. 39, no. 1, pp. 3–18, Feb. 2013.
- [111] L. Campbell, C. R. Saville, P. J. Murray, S. M. Cruickshank, and M. J. Hardman, “Local Arginase 1 Activity Is Required for Cutaneous Wound Healing,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 133, no. 10, pp. 2461–2470, Oct. 2013.
- [112] G. Pepe, G. Calderazzi, M. De Maglie, A. M. Villa, and E. Vegeto, “Heterogeneous induction of microglia M2a phenotype by central administration of interleukin-4,” *J. Neuroinflammation*, vol. 11, no. 1, p. 211, Dec. 2014.
- [113] R. M. Ransohoff, “A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist?,” *Nat. Neurosci.*, vol. 19, no. 8, pp. 987–991, Aug. 2016.
- [114] F. Aloisi, “Immune function of microglia,” *Glia*, vol. 36, no. 2, pp. 165–179, 2001.
- [115] J. D. Ulrich, T. K. Ulland, M. Colonna, and D. M. Holtzman, “Elucidating the Role of TREM2 in Alzheimer’s Disease,” *Neuron*, vol. 94, no. 2, pp. 237–248, 2017.
- [116] M. Schwartz and R. Shechter, “Systemic inflammatory cells fight off neurodegenerative disease,” *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 6, no. 7, pp. 405–410, 2010.
- [117] V. H. Perry and S. Gordon, “Macrophages and microglia in the nervous system,” *Trends Neurosci.*, vol. 11, no. 6, pp. 273–277, 1988.
- [118] S. E. Hickman *et al.*, “The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing,” *Nat. Neurosci.*, vol. 16, no. 12, pp. 1896–1905, Dec. 2013.
- [119] M. T. Heneka *et al.*, “Neuroinflammation in Alzheimer’s disease,” *Lancet Neurol.*, vol. 14, no. 4, pp. 388–405, 2015.
- [120] M. H. Dominiczak and M. J. Caslake, “Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications,” *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 48, no. 6, pp. 498–515, Nov. 2011.
- [121] “<https://www.uniprot.org/>.” .
- [122] J.-T. Yu, L. Tan, and J. Hardy, “Apolipoprotein E in Alzheimer’s Disease: An

- Update,” *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 37, no. 1, pp. 79–100, 2014.
- [123] E. H. Corder *et al.*, “Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer’s disease in late onset families.,” *Science*, vol. 261, no. 5123, pp. 921–3, Aug. 1993.
- [124] M. C. Chartier-Harlin *et al.*, “Apolipoprotein E, epsilon 4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer’s disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region.,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 3, no. 4, pp. 569–74, Apr. 1994.
- [125] P. Pastor *et al.*, “Apolipoprotein E ϵ 4 Modifies Alzheimer’s Disease Onset in an E280A PS1 Kindred,” 2003.
- [126] D. J. Selkoe, “Alzheimer’s Disease: Genes, Proteins, and Therapy,” vol. 81, no. 2, pp. 741–766, 2001.
- [127] G. Bu, “Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer’s disease: pathways, pathogenesis and therapy,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 10, no. 5, pp. 333–344, May 2009.
- [128] S. L. Acton, P. E. Scherer, H. F. Lodish, and M. Krieger, “Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 33, pp. 21003–9, Aug. 1994.
- [129] M. Hoekstra and M. Sorci-Thomas, “Rediscovering scavenger receptor type BI: surprising new roles for the HDL receptor.,” *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 28, no. 3, pp. 255–260, Jun. 2017.
- [130] C. R. Stewart *et al.*, “CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer,” *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 2, pp. 155–161, Feb. 2010.
- [131] G. Song *et al.*, “High-density lipoprotein inhibits ox-LDL-induced adipokine secretion by upregulating SR-BI expression and suppressing ER Stress pathway,” *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 30889, 2016.
- [132] J. Husemann and S. C. Silverstein, “Expression of scavenger receptor class B, type I, by astrocytes and vascular smooth muscle cells in normal adult mouse and

- human brain and in Alzheimer's disease brain.," *Am. J. Pathol.*, vol. 158, no. 3, pp. 825–32, Mar. 2001.
- [133] K. Thanopoulou, A. Fragkouli, F. Stylianopoulou, and S. Georgopoulos, "Scavenger receptor class B type I (SR-BI) regulates perivascular macrophages and modifies amyloid pathology in an Alzheimer mouse model.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 48, pp. 20816–21, Nov. 2010.
- [134] J. Defesche, "Low-Density Lipoprotein Receptor-Its Structure, Function, and Mutations," *Semin. Vasc. Med.*, vol. 4, no. 01, pp. 5–11, Mar. 2004.
- [135] J. Gent and I. Braakman, "Low-density lipoprotein receptor structure and folding," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 61, no. 19–20, pp. 2461–2470, Oct. 2004.
- [136] H. Jeon and S. C. Blacklow, "Structure and Physiologic Function of the Low-Density Lipoprotein Receptor," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 74, no. 1, pp. 535–562, 2005.
- [137] L. A. Johnson *et al.*, "Apolipoprotein E-low density lipoprotein receptor interaction affects spatial memory retention and brain ApoE levels in an isoform-dependent manner.," *Neurobiol. Dis.*, vol. 64, pp. 150–62, Apr. 2014.
- [138] J. M. Basak, P. B. Verghese, H. Yoon, J. Kim, and D. M. Holtzman, "Low-density Lipoprotein Receptor Represents an Apolipoprotein E-independent Pathway of A β Uptake and Degradation by Astrocytes," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 17, pp. 13959–13971, Apr. 2012.
- [139] T. K.-R. G.-B. O.-J. Kuby, *Immunology*. .
- [140] Slack J.M.W., *Essential Developmental Biology*. .
- [141] J. A. Piedrahita, S. H. Zhang, J. R. Hagaman, P. M. Oliver, and N. Maeda, "Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 89, no. 10, pp. 4471–5, May 1992.
- [142] A. Rigotti, B. L. Trigatti, M. Penman, H. Rayburn, J. Herz, and M. Krieger, "A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL

- metabolism.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 23, pp. 12610–5, Nov. 1997.
- [143] S. Ishibashi, M. S. Brown, J. L. Goldstein, R. D. Gerard, R. E. Hammer, and J. Herz, "Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery.," *J. Clin. Invest.*, vol. 92, no. 2, pp. 883–893, Aug. 1993.
- [144] J. A. W. James D. Watson, Amy A. Caudy, Richard M. Myers, *Recombinant DNA*. .
- [145] G. P. Patrinos, *Molecular Diagnostics*. .
- [146] World Health Organization, "Neurological disorders: a public health approach," *Neurol. Disord. public Heal. challenges.*, pp. 41–176, 2006.
- [147] E. Scarselli *et al.*, "The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus.," *EMBO J.*, vol. 21, no. 19, pp. 5017–25, Oct. 2002.
- [148] R. K. Gopalraj *et al.*, "Genetic association of low density lipoprotein receptor and Alzheimer's disease," *Neurobiol. Aging*, vol. 26, no. 1, pp. 1–7, Jan. 2005.
- [149] G. J. Harry and A. D. Kraft, "Neuroinflammation and Microglia: Considerations and approaches for neurotoxicity assessment."
- [150] Y. Liu, X. Xu, H. Dou, Y. Hua, J. Xu, and X. Hui, "Apolipoprotein E knockout induced inflammatory responses related to microglia in neonatal mice brain via astrocytes.," *Int. J. Clin. Exp. Med.*, vol. 8, no. 1, pp. 737–43, 2015.
- [151] C. T. Chen, D. W. L. Ma, J. H. Kim, H. T. J. Mount, and R. P. Bazinet, "The low density lipoprotein receptor is not necessary for maintaining mouse brain polyunsaturated fatty acid concentrations.," *J. Lipid Res.*, vol. 49, no. 1, pp. 147–52, Jan. 2008.
- [152] A. D. Hart, A. Wytenbach, V. H. Perry, and J. L. Teeling, "Age related changes in microglial phenotype vary between CNS regions: grey versus white matter differences.," *Brain. Behav. Immun.*, vol. 26, no. 5, pp. 754–65, Jul. 2012.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι τα ιστικά μακροφάγα του κεντρικού νευρικού συστήματος. Έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του συστήματος αυτού και την ομοιόστασή του κατά την ενήλικη ζωή. Επιπλέον, έχουν σημαντική συνεισφορά στη νευρογένεση και τη φλεγμονή του νευρικού συστήματος. Αυτές οι λειτουργίες των μικρογλοιακών κυττάρων τα καθιστούν συμμετέχοντες και στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος Alzheimer's.

Ο μεταβολισμός της χοληστερόλης έχει ενοχοποιηθεί ως παράγοντας στη νόσο Alzheimer's. Η απολιποπρωτεΐνη E είναι ένα από τα μόρια του μεταβολισμού του οποίου το αλληλόμορφο E4 αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τη νόσο Alzheimer's. Δύο ακόμα μόρια τα οποία σχετίζονται με τον μεταβολισμό της χοληστερόλης είναι ο Scavenger receptor- class B type 1 και ο Low Density Lipoprotein Receptor. Καθώς τα μόρια αυτά εκφράζονται στα μικρογλοιακά κύτταρα και η μορφολογία των κυττάρων αυτών σχετίζεται άμεσα με τη λειτουργία τους, εξετάστηκε η επίδραση των μορίων αυτών στη μορφολογία της μικρογλοίας.

Για την εργασία αυτή εξετάστηκαν ομάδες διαγονιδιακών μυών με απαλοιφή των γονιδίων των APOE, SR-BI, LDLR (11 μηνών), απαλοιφή ενός αλληλόμορφου του SR-BI (4 μηνών) καθώς και δύο ομάδες ελέγχου (Wild type και CX3CR1 GFP, 4 μηνών). Κάθε ομάδα αποτελούταν από 2 πειραματόζωα. Τελικά παρατηρήθηκαν μερικές σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαγονιδιακών μυών με απαλοιφή γονιδίων και της ομάδας ελέγχου, όσον αφορά την μορφολογία των αποφυάδων των μικρογλοιακών κυττάρων αλλά και το σώμα τους. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στις αποφυάδες των κυττάρων ποσοτικοποιήθηκαν με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων.

ABSTRACT

Microglia cells are the resident macrophage population of the central nervous system (CNS). They play an important part during CNS development and homeostasis during adulthood. Furthermore, their contribution during neurogenesis and neuroinflammation is significant. These functions render microglia a key player in neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease.

It has been proved that cholesterol metabolism is involved in Alzheimer's disease (AD). Apolipoprotein E is one of the molecules in cholesterol metabolism whose allele E4 constitutes a risk factor for AD. Other molecules that are implicated in cholesterol's metabolism are the scavenger receptor- class B type 1 (SR-BI) and the Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR). As these molecules are expressed in microglia cells and the cells' function is in direct correlation to their morphology, we examined the effect these molecules have on the microglia morphology.

For this project we examined transgenic mice groups lacking the genes encoding APOE, LDLR and SR-BI (11 months old), lacking one allele for SR-BI (4 months old) and two control groups (Wild type and CX3CR1 GFP, 4 months old). Each group consisted of two mice. Finally, we observed some significant differences between the transgenic mice lacking both alleles and the control group, both in the cell processes and the soma. The aforementioned differences were quantified using computer softwares.

