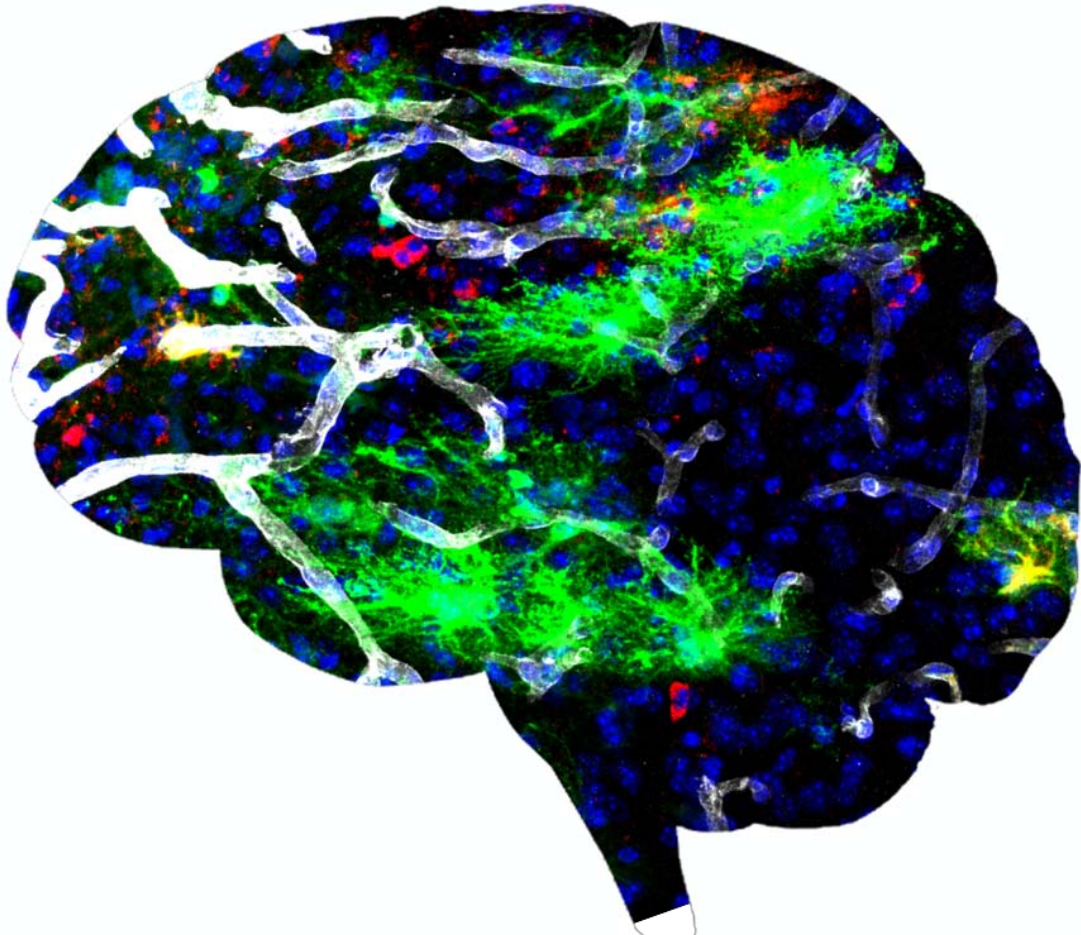




Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών
Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Βιολογίας
Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου

Διδακτορική Διατριβή

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΗΣ
ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΟΥ TGFβ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΚΑΙ
ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**



Γεώργιος Διβόλης

Βιολόγος, MSc

Αθήνα 2020



Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών
Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Βιολογίας
Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου

Διδακτορική Διατριβή

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΗΣ
ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΟΥ TGFβ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΚΑΙ
ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**

Γεώργιος Διβόλης

Βιολόγος, MSc

Αθήνα 2020

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του ΕΚΠΑ δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (ν. 5343/1932, άρθρο 202).

Το κείμενο της Διδακτορικής Διατριβής δεν αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Επιβλέπων Καθηγητής

Ευθυμίουπουλος Σπυρίδων

Καθηγητής, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Ευθυμίουπουλος Σπυρίδων
(Επιβλέπων Καθηγητής)

Καθηγητής, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Παπαζαφείρη Παναγιώτα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Σιδεράς Πασχάλης

Ερευνητής Α', Κέντρο Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής & Μεταφραστικής Έρευνας, ΙΙΒΕΑΑ

Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Ευθυμίουπουλος Σπυρίδων
(Επιβλέπων Καθηγητής)

Καθηγητής, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Θωμαΐδου Δήμητρα

Ερευνήτρια Α', Τομέας Νευροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Μουστάκας Αριστείδης

Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής Βιοχημείας και Μικροβιολογίας, Πανεπιστήμιο της Ουψάλα, Σουηδία

Παπαζαφείρη Παναγιώτα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Πολίτης Παναγιώτης

Ερευνητής Γ', Κέντρο Βασικής Έρευνας, ΙΙΒΕΑΑ

Σιδεράς Πασχάλης

Ερευνητής Α', Κέντρο Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής & Μεταφραστικής Έρευνας, ΙΙΒΕΑΑ

Τσιτσιλώνη Ουρανία

Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υπερικογένεια του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού β (TGFβ) συνίσταται από περισσότερα από 30 μέλη, που σχετίζονται δομικά μεταξύ τους, και περιλαμβάνει τους TGFβs, τις μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών (BMPs), τις Ακτιβίνες και άλλα. Η σηματοδότηση από μέλη της συγκεκριμένης υπερικογένειας έχει συνδεθεί με θεμελιώδεις διαδικασίες που διέπουν την ομοιόσταση του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), συμπεριλαμβανομένων της νευρογένεσης, της διαφοροποίησης των κυττάρων της γλοίας, της συγκρότησης και διατήρησης της ακεραιότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και άλλων. Επιπλέον, πολυάριθμες μελέτες συσχετίζουν την υπερικογένεια του TGFβ με παθολογικές καταστάσεις του ΚΝΣ που αφορούν μεγάλο ποσοστό του παγκόσμιου πληθυσμού, όπως η νευροφλεγμονή, οι βλάβες μετά από μηχανικές τραυματικές κακώσεις και οι νευροεκφυλιστικές νόσοι. Μάλιστα, αρκετοί παράγοντες του συγκεκριμένου σηματοδοτικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων προσδετών, υποδοχέων και ενδοκυττάρων τελεστών, υπερεκφράζονται σε επίπεδο mRNA ή/και πρωτεΐνης σε πειραματικά μοντέλα μηχανικού ή/και βιοχημικού τραυματισμού του νευρικού ιστού, μέσω χορήγησης νευροτοξινών. Επιπλέον, έχουν βρεθεί αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα των ίδιων παραγόντων σε κακώσεις του ανθρώπινου νωτιαίου μυελού, καθώς και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ή το ραβδωτό σώμα ασθενών με νόσο Πάρκινσον.

Παρά την εκτενή μελέτη μεμονωμένων παραγόντων της υπερικογένειας του TGFβ κατά την ομοιόσταση και παθοφυσιολογία του ΚΝΣ, τα δεδομένα που αφορούν στην ταυτότητα των κυτταρικών αποδεκτών της δράσης αυτής, καθώς και στον τρόπο με τον οποίο τα κύτταρα αυτά αποκωδικοποιούν τα περίπλοκα σήματα που δέχονται από κυτταροκίνες της υπερικογένειας ώστε να εκδηλώσουν την κατάλληλη φυσιολογική απόκριση σε μια δεδομένη χρονική στιγμή, παραμένουν ελλιπή και αρκετά ασαφή. Αδιευκρίνιστος παραμένει επίσης ο ακριβής ρόλος της ενεργοποίησης των δύο βασικών κλάδων του συστήματος, της TGFβ- και της BMP-επαγόμενης σηματοδότησης, σε παθολογικές καταστάσεις του ΚΝΣ. Υπάρχει αλληλεπίδραση των δύο σηματοδοτικών κλάδων σε αποκλίνουσες από την ομοιόσταση συνθήκες;

Αντικείμενο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η αποσαφήνιση των παραπάνω ερωτημάτων χρησιμοποιώντας ένα σύστημα διπλά διαγονιδιακών μυών αναφοράς που

αναπτύχθηκε στο IIBEAA μέσω διασταύρωσης δύο διαγονιδιακών σειρών που φέρουν στο γονιδίωμά τους τα γονίδια της κόκκινης (RFP) και της ενισχυμένης πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (eGFP) υπό τον έλεγχο καλά χαρακτηρισμένων αλληλουχιών ειδικής απόκρισης σε TGFβs/Ακτιβίνες (TGFβ Responsive Elements, TRE-RFP) ή σε BMPs (BMP Responsive Elements, BRE-eGFP), αντίστοιχα. Οι δυνητικοί κυτταρικοί αποδέκτες της κανονικής TGFβ ή BMP σηματοδότησης εκφράζουν την πρωτεΐνη RFP ή eGFP, αντίστοιχα. Χρησιμοποιώντας το συγκεκριμένο ζωικό μοντέλο διαπιστώθηκε ότι η σηματοδότηση από μέλη της υπερικογένειας του TGFβ είναι ενεργή και οριοθετημένη σε διάφορες περιοχές του νεογνικού και του ενήλικου εγκεφάλου υπό ομοιοστατικές συνθήκες, όπως στους οσφρητικούς βολβούς, στο φλοιό, στα τοιχώματα των κοιλιών, στο χοριοειδές πλέγμα και στο αγγειακό δίκτυο. Μάλιστα, στους κυτταρικούς αποδέκτες της TGFβ ή/και της BMP σηματοδότησης περιλαμβάνονταν νευρώνες, αστροκύτταρα και δομικά κύτταρα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, όπως ενδοθηλιακά κύτταρα και περικύτταρα.

Προκειμένου να μελετηθεί η συμμετοχή των TGFβ και BMP κλάδων στην παθοφυσιολογία του ΚΝΣ, εφαρμόστηκε ένα μοντέλο εστιακού διεισδυτικού εγκεφαλικού τραυματισμού. Συγκεκριμένα, ενήλικοι μύες αγρίου τύπου υποβλήθηκαν σε μονόπλευρη οξεία κρανιοεγκεφαλική κάκωση και συλλέχθηκαν δείγματα εγκεφαλικού φλοιού που εμπεριείχαν τις τραυματισμένες και τις αντίστοιχες «υγιείς» περιοχές, σε διαφορετικά χρονικά σημεία μετά τον τραυματισμό. Χαρακτηριστικοί δείκτες ενεργοποίησης της υπερικογένειας του TGFβ, όπως η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Smad και η mRNA έκφραση προσδετών και γονιδίων-στόχων, τόσο της TGFβ όσο και της BMP σηματοδότησης, αυξήθηκαν στην περιοχή του τραύματος τις πρώτες ημέρες μετά την κάκωση. Με τη βοήθεια διπλά διαγονιδιακών μυών αναφοράς δείχθηκε ότι η ενεργοποίηση και των δύο σηματοδοτικών κλάδων αφορούσε κυρίως στα δραστικά αστροκύτταρα που οριοθετούσαν την περιοχή μεταξύ υγιούς και τραυματισμένου ιστού.

Για την έμμεση διαλεύκανση του ρόλου της ενεργοποίησης της TGFβ- ή/και BMP-επαγόμενης σηματοδότησης στα κύτταρα της γλοίας που συναθροίζονται στο τραύμα, αναπτύχθηκαν συστήματα απομόνωσης και καλλιέργειας πρωτογενούς γλοίας, καθώς και πρωτόκολλα διαχωρισμού αυτών μέσω κυτταρομετρίας ροής για τη λήψη αμιγών αστροκυτταρικών και μικρογλοιακών πληθυσμών. Τα αμιγή κύτταρα διεγέρθηκαν

παρουσία ανασυνδυασμένων TGFβ1 και BMP4 και το μεταγράφημά τους αναλύθηκε με τη μέθοδο της αλληλούχισης επόμενης γενιάς (RNA-Seq). Τα αστροκύτταρα αποκρίθηκαν σημαντικά και στους δύο προσδέτες και μάλιστα παρουσίασαν ιδιαίτερα επικαλυπτόμενα μεταγραφικά προφίλ. Εντούτοις, η μικρογλοία ενώ αντέδρασε εξαιρετικά καλά στον TGFβ1, αποκρίθηκε πολύ ασθενώς παρουσία BMP4, γεγονός που πιθανότατα σχετίζεται με τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης BMP-σχετιζόμενων υποδοχέων και Smads συγκριτικά με τα αστροκύτταρα.

Η βιοπληροφορική ανάλυση του μεταγραφώματος των διεγερμένων με TGFβ1 και BMP4 αστροκυττάρων ανέδειξε ένα σύνολο κυτταρικών διεργασιών που διέπουν την ιστική επιδιόρθωση και την αποκατάσταση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού έπειτα από τραυματισμό, όπως η βιοσύνθεση και μεταφορά χοληστερόλης, η έκφραση παραγόντων καθοδήγησης νευραξόνων, η παραγωγή συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας και η ρύθμιση της ομοιόστασης του γλουταμινικού οξέος. Επιπλέον, υπό την επίδραση και των δύο προσδετών στα αστροκύτταρα και παρουσία του TGFβ1 στη μικρογλοία, ο φαινότυπος της δραστηρικής γλοίας μετατοπίστηκε προς τους αντιφλεγμονώδεις και σχετιζόμενους με την ιστική επιδιόρθωση αστροκυτταρικό τύπου A2 και μικρογλοιακούς τύπου M0/M2 φαινοτύπους, αντίστοιχα. Η αυξημένη έκφραση αφ' ενός χαρακτηριστικών παραγόντων που συμμετέχουν στις παραπάνω *in vitro* ρυθμιζόμενες βιολογικές διεργασίες, και αφ' ετέρου ειδικών μεταγράφων για τα αστροκύτταρα τύπου A2, επιβεβαιώθηκε *in vivo* στην περιοχή του τραύματος, έπειτα από εστιακή κρανιοεγκεφαλική κάκωση, υποδεικνύοντας ότι οι διαδικασίες αυτές ρυθμίζονται πιθανότατα *in situ* από τη συνεργιστική δράση της TGFβ ή/και της BMP-επαγόμενης σηματοδότησης.

Εκτός του μηχανικού διεισδυτικού τραυματισμού, εφαρμόστηκε κι ένα μοντέλο βιοχημικού τραυματισμού του εγκεφάλου, μέσω χορήγησης της μιτοχονδριακής νευροτοξίνης MPTP για την προσομοίωση παρκινσονικών συμπτωμάτων σε ενήλικους μύες. Παρατηρήθηκε σημαντική ενεργοποίηση του συστήματος της υπεροικογένειας του TGFβ κατά μήκος της μελαινοραβδωτής οδού στα πειραματόζωα όπου χορηγήθηκε MPTP. Και σε αυτό το μοντέλο εγκεφαλικού τραυματισμού, οι κυτταρικοί αποδέκτες της TGFβ και της BMP σηματοδότησης στο ραβδωτό σώμα και τη μέλαινα ουσία ήταν στην πλειοψηφία τους αστροκύτταρα. Στη συνέχεια, διεξήχθη στερεοτακτική υπερέκφραση ενεργοποιητών ή αναστολέων της BMP σηματοδότησης στη μέλαινα ουσία των

πειραματοζώνων, πριν από τη χορήγηση MPTP, και μελετήθηκε η κινητική τους δραστηριότητα. Παρατηρήθηκε σχετική βελτίωση ορισμένων συμπεριφορικών παραμέτρων στα ζώα όπου υπερεκφράστηκε η Noggin, υποδεικνύοντας ότι αναστολή της BMP-επαγόμενης σηματοδότησης στη μέλαινα ουσία παρέχει πιθανότατα νευροπροστατευτική δράση στην ομόπλευρη μελαινораβδωτή οδό.

Συνοψίζοντας, χρησιμοποιώντας ως πρότυπο σύστημα μελέτης τον εγκέφαλο του μυός, αποκωδικοποιήθηκαν σημαντικές πτυχές της αλληλεπίδρασης μεταξύ των TGFβ και BMP κλάδων του συστήματος σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ και τονίστηκε η σημασία του σχετικού ισοζυγίου των κυτταροκινών της υπεροικογένειας για τη ρύθμιση της ομοιόστασης και την εξέλιξη της παθολογίας στο ΚΝΣ. Ακόμη, αναδείχθηκαν βασικές νευροπροστατευτικές ή/και νευροτοξικές διεργασίες υπό παθοφυσιολογικές συνθήκες, καθώς και συγκεκριμένα μοριακά γεγονότα/μηχανισμοί, που αφορούν στα κύτταρα της γλοίας και μπορούν να αξιοποιηθούν μελλοντικά στην ανάπτυξη αποτελεσματικότερων θεραπευτικών προσεγγίσεων στο πλαίσιο νευροφλεγμονωδών διαταραχών ή/και τραυματικών κακώσεων του ΚΝΣ.

ABSTRACT

The Transforming Growth Factor beta (TGF β) superfamily comprises more than 30 structurally related members including, among others, TGF β s, Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) and Activins. Signaling by members of this superfamily has been implicated in fundamental processes regulating the homeostasis of the Central Nervous System (CNS), including neurogenesis, differentiation of glia cells, formation of blood-brain barrier and maintenance of its integrity and others. In addition, numerous studies have linked TGF β superfamily to CNS pathologies affecting a large proportion of the world's population, such as neuroinflammation, tissue damage following mechanical traumatic injuries and neurodegenerative diseases. In fact, several components of this signaling system, including ligands, receptors and intracellular mediators, are upregulated at mRNA and/or protein levels in experimental models of mechanical and/or biochemical – through neurotoxin administration – CNS injuries. Furthermore, increased protein levels of these components have been found in human spinal cord injuries, as well as in the cerebrospinal fluid or the *striatum* of patients with Parkinson's disease.

Despite the extensive characterization of individual components of the TGF β superfamily system during CNS homeostasis and pathophysiology, data concerning the identity of recipient cells of this action, as well as the way by which these cells decode the complex TGF β -superfamily system generated signaling-input to produce the desired physiological response at any given time, are still lacking. The precise role of the two branches of this signaling system, the TGF β /Activin- and the BMP-induced pathways, under CNS pathological conditions is still not fully understood. Is there a functional interplay between these two signaling branches in physiology and pathophysiology?

The aim of this thesis was to clarify the above questions using a double transgenic reporter mice system, developed in BRFAA by crossing two transgenic animal lines carrying the genes of Red (RFP) and Green Fluorescent Proteins (eGFP) in their genome, under the control of well-characterized sequences responding selectively to TGF β s/Activins (TGF β Responsive Elements, TRE-RFP) or BMPs (BMP Responsive Elements, BRE-eGFP), respectively. The potential cellular targets of canonical TGF β or BMP signaling express the RFP or eGFP protein, respectively. Using this animal model in previous experiments, we found that signaling by members of the TGF β superfamily is

active and confined to various regions of neonatal and adult brain, such as the olfactory bulbs, the cortex, the ventricle walls, the choroid plexus and the vasculature, under homeostatic conditions. Actually, neurons, astrocytes and structural cells of the blood-brain barrier, such as endothelial cells and pericytes, were included among the cellular targets of TGF β and/or BMP signaling.

To investigate the contribution of both TGF β and BMP signaling branches in CNS pathophysiology, we used a mouse model of penetrating focal brain injury. More specifically, adult wild-type mice were subjected to unilateral acute stab wound injury and brain tissues encompassing injured (ipsilateral) and corresponding intact (contralateral) areas were collected, at different time-points post-injury. Hallmarks of TGF β -superfamily system activation, such as levels of phosphorylated Smads, ligands and target genes for both TGF β and BMP pathways, were found upregulated within injured tissues, the first days post-injury. Next, using double transgenic reporter mice we showed that activation of both TGF β and BMP signaling branches involved primarily reactive astrocytes that demarcated the wound area.

In order to gain indirectly insights regarding the role of TGF β and/or BMP signaling activation in glia cells within the injured tissues, we developed primary glia culture systems, as well as fluorescence-activated cell-sorting protocols for the establishment of purified astrocytic and microglial cultures. The latter were treated with recombinant TGF β 1 and BMP4 and their transcriptomes were analyzed by next-generation sequencing (RNA-Seq). Astrocytes responded substantially to both ligands with considerably overlapping transcriptional profiles. Although microglia responded remarkably well to TGF β 1, they failed to respond robustly to BMP4, a finding that is probably related to the relatively lower mRNA expression levels for BMP-related receptors and Smads, compared to the astrocytic ones.

Bioinformatics analysis of the transcriptomic profiles of TGF β 1- or BMP4-treated astrocytes revealed novel pathways crucial for tissue-injury repair and blood-brain barrier restoration, such as activation of cholesterol biosynthesis and transport, production of axonal guidance and extracellular matrix components and regulation of glutamate homeostasis. Moreover, both ligands in astrocytes and TGF β 1 in microglia shifted the phenotype of reactive glia cells towards the anti-inflammatory and tissue-reparatory A2-like and M0/M2-like phenotypes, respectively. Increased expression of

selected key components of the *in vitro* modulated pathways and markers of A2-like astrocytes was confirmed *in vivo* within the wound area, suggesting that these processes could also be modulated *in situ* by the integrated action of TGF β - and/or BMP-mediated signaling.

Besides the mechanical penetrating injury, a biochemical brain injury model was also applied, through administration of the mitochondrial neurotoxin MPTP that simulates a parkinsonian phenotype in adult mice. Substantial activation of the TGF β superfamily signaling system was observed across the nigrostriatal pathway in MPTP-treated animals. Also in this brain injury model, the majority of TRE-RFP and BRE-eGFP positive cells in the *striatum* and the *substantia nigra* were identified as astrocytes. Then, stereotactic overexpression of activators or inhibitors of BMP signaling was performed in the *substantia nigra* of animals, prior to MPTP administration, followed by assessment of their locomotor activity. We observed a relative improvement in some behavioral parameters of animals subjected to Noggin overexpression, suggesting that focal inhibition of BMP signaling in the *substantia nigra* is probably exerting a neuroprotective action in the ipsilateral nigrostriatal pathway.

To sum up, using the murine brain as model system, we uncovered important aspects of the interaction between TGF β and BMP branches of the TGF β superfamily signaling system and highlighted the importance of the relative equilibrium of cytokines/members of this system for the establishment of homeostasis and progression of pathology in the CNS. In addition, we identified not only key neuroprotective and/or neurotoxic processes under pathophysiological conditions, but also specific molecular events/mechanisms, which involve glia cells and could be potentially used towards the development of more effective therapeutic approaches in the context of neuroinflammatory disorders and/or traumatic CNS injuries.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή με τίτλο «Επίδραση του συστήματος σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ κατά την ομοίωση και παθοφυσιολογία του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος» εκπονήθηκε στο Κέντρο Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής & Μεταφραστικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) σε συνεργασία με τον Τομέα Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ). Στο κείμενο που ακολουθεί θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που συνέβαλαν ποικιλοτρόπως στην εκπόνηση της διατριβής και με στήριξαν καθ' όλη τη διάρκεια αυτής.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στον επιστημονικό μου υπεύθυνο Δρ. **Πασχάλη Σιδερά**, Ερευνητή Α' και Διευθυντή του Κέντρου Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής & Μεταφραστικής Έρευνας (ΙΙΒΕΑΑ). Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή, όταν με καλωσόρισε στο εργαστήριό του ως μεταπτυχιακό φοιτητή του ΠΜΣ «Μοριακή Ιατρική», τον Απρίλιο του 2012. Τον ευχαριστώ για την ανεξάντλητη υπομονή του να μου μεταφέρει τις γνώσεις και την εμπειρία του και κυρίως να με πείσει να ακολουθήσω τις συμβουλές του όταν διατηρούσα ανησυχίες για την πρόοδο των πειραματικών διαδικασιών. Επίσης, τον ευχαριστώ για την ευχάριστη συνεργασία μας κατά τη συγγραφή της πρωτότυπης δημοσίευσης που παρατίθεται στο Παράρτημα Ι και τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις του κατά τη συγγραφή της διατριβής. Η συνεργασία μας με όπλισε με όλα τα απαραίτητα εφόδια που χρειάζεται ένας νέος για να πετύχει πρώτα απ' όλα ως άνθρωπος και στη συνέχεια ως επιστήμονας.

Ακόμη, ευχαριστώ από καρδιάς τον Επιβλέποντα Καθηγητή της διατριβής Δρ. **Σπυρίδωνα Ευθυμιόπουλο** και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας (ΕΚΠΑ) Δρ. **Παναγιώτα Παπαζαφείρη**, για την προθυμία τους να με καθοδηγήσουν και να μου παράσχουν πολύτιμες συμβουλές κατά την πρόοδο της διατριβής. Μάλιστα, στο εργαστήριο της Δρ. Παπαζαφείρη είχα την πρώτη μου επαφή με τον «εργαστηριακό πάγκο», κατά τη διάρκεια της προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας και την ευχαριστώ πολύ για τη στήριξή της όλα αυτά τα χρόνια.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το Δρ. **Αριστεΐδη Μουστάκα**, Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής Βιοχημείας και Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου της Ουψάλα (Σουηδία), ο οποίος με φιλοξένησε με ιδιαίτερη χαρά στο εργαστήριο του για επτά μήνες και με αντίστοιχη χαρά δέχτηκε να συμμετέχει στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή της διδακτορικής διατριβής. Τον ευχαριστώ για την άψογη συνεργασία και την επικοινωνία που έχουμε διατηρήσει τα τελευταία χρόνια. Επιπλέον, ευχαριστώ ιδιαίτερα τη Δρ. **Δήμητρα Θωμαΐδου**, Ερευνήτρια Α΄ του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, τη Δρ. **Ουρανία Τσιτσιλώνη**, Καθηγήτρια Ανοσολογίας του Τμήματος Βιολογίας (ΕΚΠΑ) και το Δρ. **Παναγιώτη Πολίτη**, Ερευνητή Γ΄ του Κέντρου Βασικής Έρευνας (ΙΙΒΕΑΑ) για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Δρ. **Θανάση Σταυρόπουλο**, ο οποίος συνέδραμε καταλυτικά σε επίπεδο τεχνικό, πειραματικό και συμβουλευτικό, από την πρώτη στιγμή που ήρθα στο εργαστήριο του Δρ. Σιδερά, και τη Δρ. **Μαρία Ξυλούρη**, Ερευνήτρια Γ΄ του Κέντρου Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής & Μεταφραστικής Έρευνας (ΙΙΒΕΑΑ), η οποία παρακολούθησε από κοντά την εξέλιξη της διατριβής, συμβάλλοντας εμπράκτως στη διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών και την προετοιμασία της πρωτότυπης δημοσίευσης, και παρείχε απλόχερα την υλική και ηθική της υποστήριξη. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. **Μαρία Μανιουδάκη**, η οποία ανέλαβε την αρχική επεξεργασία των βιοπληροφορικών δεδομένων και συμμετείχε με χρήσιμες υποδείξεις στη μετέπειτα ανάλυσή τους και τη Δρ. **Αριάνα Γαβριήλ** για τη δημιουργία ενός άρτια οργανωμένου εργαστηρίου, την καθοδήγηση και συνεισφορά της σε θέματα ιστολογίας, καθώς και για την πολύτιμη ηθική της υποστήριξη. Ευχαριστώ πολύ την **Αναστασία Αποστολίδου** για τη συμβολή της στην απομόνωση αμιγών κυτταρικών πληθυσμών γλοίας με τη χρήση κυτταροδιαχωριστή και για τις όμορφες συζητήσεις που είχαμε.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Ερευνήτρια Α΄ Δρ. **Αγγελική Χρόνη** και το μεταδιδακτορικό ερευνητή Δρ. **Γιάννη Δάφνη** από το Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος» για την άρτια συνεργασία μας στο πλαίσιο του μεταβολισμού της χοληστερόλης. Επίσης, ευχαριστώ τους Δρ. **Stefan Wölfl** και Δρ. **Rolf Sprengel** από το Πανεπιστήμιο της Χαϊδελβέργης και το Ινστιτούτο Max Planck στη

Γερμανία, αντίστοιχα, για την ευγενική χορηγία των αδено-σχετιζόμενων ιικών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα αναφερθώ ιδιαιτέρως στο εργαστηριακό μου “alter ego”, τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. **Κατερίνα Μελαχροινού**, με την οποία μοιραστήκαμε πολλές δύσκολες, αλλά κυρίως ευχάριστες στιγμές, εντός και εκτός εργαστηρίου, κατά τη συνεργασία μας στο πλαίσιο της νόσου Πάρκινσον. Την ευχαριστώ για όλα όσα μου έχει προσφέρει ως συνεργάτης και κυρίως ως αληθινή φίλη! Ευχαριστώ επίσης την υποψήφια διδάκτορα και φίλη **Τζένη Συνολάκη**, με την οποία συνεργαστήκαμε άψογα σε διάφορα projects του εργαστηρίου και μοιραζόμασταν τους καθημερινούς προβληματισμούς ενός υποψήφιου διδάκτορα. Ευχαριστώ τη συνάδελφο και φίλη **Νάνσυ Δούλου** για την άψογη συνεργασία που είχαμε σε θέματα χειρισμού των πειραματοζώων και τις «αγχολυτικές» βόλτες-ξενύχτια εκτός εργαστηρίου. Ευχαριστώ επίσης τη Δρ. **Αλεξία Πολυσίδη** για την πολύτιμη βοήθειά της στη διεξαγωγή και την ανάλυση των συμπεριφορικών δοκιμασιών και τα μέλη της μονάδας Μικροσκοπίας του ΙΙΒΕΑΑ Δρ. **Ελένη Ρηγανά** και Δρ. **Σταμάτη Παγκάκη** για την υποστήριξή τους στη λήψη και την επεξεργασία φωτογραφιών συνεστιακής μικροσκοπίας.

Ακόμη, ευχαριστώ θερμά το Δρ. **Ευάγγελο Ανδρεάκο**, Ερευνητή Α΄ του Κέντρου Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής & Μεταφραστικής Έρευνας (ΙΙΒΕΑΑ), και τους μεταδιδακτορικούς ερευνητές Δρ. **Ιωάννα Γαλάνη**, **Καλλιόπη Θανοπούλου**, **Μαρία Σαλαγιάννη** και **Αβραάμ Ελ Χαμιντιέ** για το γόνιμο επιστημονικό διάλογο και τη συμβολή τους σε εργαστηριακά ζητήματα που προέκυπταν. Επίσης, ευχαριστώ τις υποψήφιες διδάκτορες και φίλες **Σοφία Ταγκαρέλη**, **Βάσω Τριανταφυλλιά** και **Λένα Σιούτη**, την **Εύα Ελεμνιάδου** και τις μεταδιδακτορικές ερευνήτριες Δρ. **Μαρία Παπαδάκη**, **Κατερίνα Χαιρακάκη**, **Κατερίνα Πύριλλου** και **Μαράννια Σαριδάκη** για τις επικοινωνιακές συζητήσεις μας και κυρίως για τη δημιουργία ενός ευχάριστου κλίματος εντός του εργαστηρίου.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στον αγαπημένο μου φίλο **Γιάννη Μάνο** και την αγαπημένη μου συμφοιτήτρια-φίλη-κουμπάρα **Παναγιώτα Μαυροειδή**, οι οποίοι όλο αυτό το διάστημα υπέμειναν τις ψυχολογικές διακυμάνσεις και τις ανησυχίες μου, με στήριξαν σε κάθε επίπεδο και με τους οποίους μοιράστηκα όλες τις όμορφες και δύσκολες στιγμές αυτού του πενταετούς ταξιδιού. Έχω διαρκώς στη σκέψη μου τη

θετική αύρα της αγαπημένης μου φίλης **Κατερίνας Σαλαμάνου**, η οποία έφυγε νωρίς, αλλά μου δίδαξε πολύτιμα μαθήματα συμπεριφοράς και στάσης ζωής! Ευχαριστώ πολύ τους υπέροχους ανθρώπους που γνώρισα στη Σουηδία και ιδιαίτερα τους **Κάλλια Τζαβλάκη**, Δρ. **Πάνο Παπουτσόγλου**, **Κώστα Κολλιόπουλο**, Δρ. **Ραφαέλλο Παπαδάκη**, Δρ. **Μαρία Τσιουμπέκου**, Δρ. **Claudia Bellomo** και **Roxana Talebi**, οι οποίοι αποτέλεσαν τη σουηδική μου «οικογένεια»! Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην **οικογένειά** μου για την ηθική και υλική συμπαράσταση που μου έχει προσφέρει απλόχερα καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Σας ευχαριστώ πάρα πολύ όλους!

Γεώργιος Διβόλης

Οκτώβριος 2020

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1. Το σύστημα σηματοδότησης της υπεροικογένειας του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού β	9
1.1.1. Τα μέλη της υπεροικογένειας του TGFβ.....	10
1.1.2. Οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς των μελών της υπεροικογένειας του TGFβ	12
1.1.3. Οι πρωτεΐνες Smad και η ρύθμιση της ενδοκυττάριας μεταγωγής σήματος.....	15
1.1.4. Αλληλεπίδραση μεταξύ της TGFβ και της BMP σηματοδότησης	19
1.2. Το νευρικό σύστημα	23
1.2.1. Δομή του νευρικού συστήματος	23
1.2.2. Κυτταρική σύσταση του νευρικού συστήματος	25
1.2.2.1. Οι νευρώνες.....	25
1.2.2.2. Τα κύτταρα της γλοίας και η συμβολή τους στην ομαλή λειτουργία του νευρικού συστήματος	27
1.2.2.2.1. Αστροκύτταρα	28
1.2.2.2.2. Μικρογλοία.....	31
1.2.2.2.3. Ολιγοδενδροκύτταρα	33
1.2.2.2.4. Επενδυματικά κύτταρα.....	34
1.2.3. Παθοφυσιολογία του κεντρικού νευρικού συστήματος	34
1.2.3.1. Η κρανιοεγκεφαλική κάκωση	34
1.2.3.1.1. Παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά της κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης.....	35
1.2.3.1.2. Ζωικά μοντέλα προσομοίωσης κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης.....	38
1.2.3.2. Η νόσος Πάρκινσον.....	41
1.2.3.2.1. Παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά της νόσου	42
1.2.3.2.2. Ζωικά μοντέλα της νόσου.....	45
1.3. Ο ρόλος της υπεροικογένειας του TGFβ στην ανάπτυξη και τη διατήρηση της ομοιόστασης του ΚΝΣ	47
1.3.1. Διαφοροποίηση και φυσιολογία των νευρώνων	47
1.3.2. Διαφοροποίηση και φυσιολογία των αστροκυττάρων	49
1.3.3. Αγγειογένεση και σταθεροποίηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού	50
1.4. Η σύνδεση της υπεροικογένειας του TGFβ με παθολογικές καταστάσεις του ΚΝΣ .	51
1.4.1. Τραυματικές κακώσεις του νευρικού ιστού	52
1.4.2. Νευροεκφυλισμός σχετιζόμενος με τη νόσο Πάρκινσον	55
2. ΣΚΟΠΟΣ	57
3. ΥΛΙΚΑ	61
3.1. Αντιδραστήρια και αναλώσιμα υλικά.....	61
3.2. Αντισώματα.....	64

3.3. Αλληλουχίες εκκινητών.....	67
3.4. Ρυθμιστικά διαλύματα.....	69
4. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	71
4.1. Πειραματικά ζωικά μοντέλα	71
4.1.1. Χρήση πειραματοζώων.....	71
4.1.2. Μοντέλο εστιακής κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης	71
4.1.3. Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση της νευροτοξίνης MPTP	73
4.1.4. Στερεοτακτική έγχυση αδeno-σχετιζόμενων ιικών φορέων έκφρασης στη μέλαινα ουσία	74
4.2. Συμπεριφορική ανάλυση	75
4.2.1. Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου	75
4.2.2. Δοκιμασία κυλίνδρου	75
4.2.3. Δοκιμασία πελματογραφήματος.....	77
4.3. Ιστολογική ανάλυση.....	78
4.3.1. Απομόνωση και προετοιμασία εγκεφάλων για ιστολογική ανάλυση.....	78
4.3.2. Ανοσοϊστοχημεία.....	79
4.4. Ανάπτυξη και μελέτη πρωτογενών καλλιιεργειών γλοίας μυός	80
4.4.1. Προετοιμασία και διατήρηση καλλιιεργειών ολικής γλοίας.....	80
4.4.2. Κυτταρικός διαχωρισμός και ανάπτυξη αμιγών καλλιιεργειών αστροκυττάρων και μικρογλοίας	82
4.4.3. <i>In vitro</i> διέγερση κυττάρων γλοίας.....	85
4.4.4. Ανοσοκυτταροχημεία	86
4.5. Ανάλυση πρωτεϊνών	87
4.5.1. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών.....	87
4.5.2. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	88
4.5.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και υγρή ηλεκτροφορητική μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	89
4.5.4. Ανοσοσύπωμα κατά Western	92
4.6. Μοριακή ανάλυση	94
4.6.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρές μυών	94
4.6.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	95
4.6.3. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	98
4.6.4. Απομόνωση ολικού RNA και σύνθεση cDNA.....	99
4.6.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου	101
4.6.6. Ανάλυση μεταγραφώματος μέσω αλληλούχισης επόμενης γενιάς.....	103
4.7. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.....	111
4.8. Στατιστική ανάλυση	112
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	113
5.1. Ενεργοποίηση της TGFβ- και της BMP-επαγόμενης σηματοδότησης στην περιοχή του τραύματος έπειτα από εστιακή κρανιοεγκεφαλική κάκωση	113

5.2. Τα αστροκύτταρα και η μικρογλοία χαρακτηρίζονται από διαφορική απόκριση στη χορήγηση TGFβ1 και BMP4 <i>in vitro</i>	122
5.3. Η συμβολή της TGFβ- και BMP-επαγόμενης σηματοδότησης στο μεταβολισμό και τη διακίνηση λιπιδίων στον εγκέφαλο	135
5.4. Το σύστημα της υπεροικογένειας του TGFβ ρυθμίζει διαδικασίες σχετιζόμενες με την καθοδήγηση νευραξόνων και την ομοιοστάση του γλουταμινικού οξέος.....	139
5.5. Η σηματοδότηση από μέλη της υπεροικογένειας του TGFβ ρυθμίζει την ιστική αναδιαμόρφωση έπειτα από εστιακή κρανιοεγκεφαλική κάκωση	142
5.6. Ενεργοποίηση του συστήματος σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ έπειτα από βιοχημικό εκφυλισμό του ντοπαμινεργικού συστήματος	145
5.7. Διερεύνηση πιθανού νευροπροστατευτικού ρόλου του BMP σηματοδοτικού κλάδου στο βιοχημικό εκφυλισμό του ντοπαμινεργικού συστήματος	150
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	161
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	175
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	191
Βιογραφικό σημείωμα	191
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....	197
Πρωτότυπη δημοσίευση στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής	197

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΚΕΚ: Κρανιοεγκεφαλική Κάκωση

ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

ΝΠ: Νόσος του Πάρκινσον

ΠΝΣ: Περιφερικό Νευρικό Σύστημα

3-MT: 3-Methoxytyramine (3-μεθοξυτυραμίνη)

6-OHDA: 6-hydroxydopamine (6-υδροξυτοπαμίνη ή οξυτοπαμίνη)

ABCA1: ATP-Binding Cassette transporter **A1** (ATP-εξαρτώμενος μεταφορέας A1)

ACVR1/1B/1C/2A/2B: Activin Receptor type **1/1B/1C/2A/2B** (υποδοχείς Ακτιβινών)

ACVRL1: Activin Receptor-Like Kinase **1** (κινάση τύπου υποδοχέα της Ακτιβίνης 1)

AIF1/IBA1: Allograft Inflammatory Factor **1** / Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule **1**
(φλεγμονώδης παράγοντας αλλομοσχεύματος 1)

ALDH1L1: Aldehyde Dehydrogenase **1** Family Member **L1** (αλδεϋδική αφυδρογονάση 1L1)

ALK: Activin receptor-Like Kinase (κινάση τύπου υποδοχέα της Ακτιβίνης)

AMH: anti-Müllerian hormone (αντιμυλλέριος ορμόνη)

ANOVA: Analysis Of Variance (ανάλυση μεταβλητότητας)

APC: Allophycocyanin (αλλοφυκοκυανίνη)

APC-Cy7: Allophycocyanin-Cyanidin **7** (αλλοφυκοκυανίνη-κυανιδίνη 7)

APOE: Apolipoprotein **E** (απολιποπρωτεΐνη E)

APS: Ammonium Persulfate (υπερθειικό αμμώνιο)

ATP: Adenosine Triphosphate (τριφωσφορική αδενοσίνη)

BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor (εγκεφαλικός νευροτροφικός παράγοντας)

BMP: Bone Morphogenetic Protein (μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών)

BMPRI1A/1B/2: BMP Receptor type **1A/1B/2** (υποδοχείς των BMPs)

bp: base pairs (ζεύγη βάσεων)

BRE: BMP-Responsive Elements (αλληλουχίες απόκρισης στις BMPs)

BSA: Bovine Serum Albumin (αλβουμίνη ορού βοός)

C: Contralateral (ετερόπλευρο εγκεφαλικό ημισφαίριο)

Ca²⁺: ιόντα ασβεστίου

CAG: Cytomegalovirus enhancer/chicken beta-actin promoter

cDNA: complementary DNA (συμπληρωματικό DNA)

Co-Smad: Common-mediator Smad (κοινός μεσολαβητής Smad)

COL1: Collagen Type **I** (κολλαγόνο τύπου I)

CSPG: Chondroitin Sulfate Proteoglycan (πρωτεογλυκάνη θειικής χονδροϊτίνης)

Ct: Cycle threshold (κατώφλι κύκλου)

CTGF: Connective Tissue Growth Factor (αυξητικός παράγοντας του συνδετικού ιστού)

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole (4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη)

df: degrees of freedom (βαθμοί ελευθερίας)

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (τροποποιημένο θρεπτικό μέσο Eagle)

DMSO: Dimethyl sulfoxide (διμεθυλοσουλφοξείδιο)

dNTP: Deoxynucleotide triphosphate (τριφωσφορικό δεοξυνουκλεοτίδιο)

DOPAC: 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ)

DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων)

dpi: days post-injury (ημέρες μετά τον τραυματισμό)

ECL: Enhanced Chemiluminescence (ενισχυμένη χημειοφωταύγεια)

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ)

EGF: Epidermal Growth Factor (επιδερμικός αυξητικός παράγοντας)

eGFP: enhanced Green Fluorescent Protein (ενισχυμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη)

EGTA: Ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid [αιθυλενο-γλυκόλη-δισ (β-αμινοαιθυλ αιθέρας)-N, N, N', N'-τετραοξικό οξύ]

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase (ρυθμιζόμενη από εξωκυττάρια σήματα κινάση)

F: F value (τιμή F)

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting (κυτταρικός διαχωρισμός βασιζόμενος σε φθορισμό)

FBS: Fetal Bovine Serum (ορός εμβρύου βοός)

FDR: False Discovery Rate (πιθανότητα λάθους)

FGF: Fibroblast Growth Factor (αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών)

FPKM: Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads (θραύσματα ανά χίλιες βάσεις μεταγράφου, ανά εκατομμύριο χαρτογραφημένων αναγνώσεων)

GABA: Gamma-Aminobutyric Acid (γ-αμινοβουτυρικό οξύ)

GAPDH: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης)

GDF: Growth Differentiation Factor (παράγοντας αύξησης και διαφοροποίησης)

GDNF: Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (προερχόμενος από νευρογλοιακά κύτταρα νευροτροφικός παράγοντας)

GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein (όξινη ινώδης γλοιακή πρωτεΐνη)

GLAST/SLC1A3: Glutamate-Aspartate Transporter / Solute Carrier Family 1 Member 3 (μεταφορέας γλουταμινικού-ασπαραγινικού)

GLT-1/SLC1A2: Glutamate Transporter 1 / Solute Carrier Family 1 Member 2 (μεταφορέας γλουταμινικού 1)

GLUL/GS: Glutamate-ammonia Ligase / Glutamine Synthetase (συνθετάση της γλουταμίνης)

GO: Gene Ontology (οντολογία γονιδίων)

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution (ισορροπημένο διάλυμα αλάτων Hank's)

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης)

HRP: Horseradish Peroxidase (υπεροξειδάση του χρένου)

HVA: Homovanillic acid (ομοβανιλλικό οξύ)

I: Ipsilateral (ομόπλευρο εγκεφαλικό ημισφαίριο)

I-Smad: Inhibitory-Smad (ανασταλτική πρωτεΐνη Smad)

ID1: Inhibitor of Differentiation 1 (αναστολέας της διαφοροποίησης 1)

IF: Immunofluorescence (ανοσοφθορισμός)

IFN: Interferon (ιντερφερόνη)

IGF-1: Insulin-like Growth Factor 1 (ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας 1)

Ig(G): Immunoglobulin (G) [ανοσοσφαιρίνη (Γ)]

IL: Interleukin (ιντερλευκίνη)

IPA: Ingenuity Pathway Analysis (λογισμικό βιοπληροφορικής ανάλυσης)

JNK: c-Jun N-terminal Kinase (κινάση του αμινοτελικού άκρου του c-Jun)

kDa: kiloDalton (μονάδα μέτρησης μοριακής μάζας των πρωτεϊνών)

LAP: Latency-Associated Peptide (πεπτίδιο σχετιζόμενο με τη λανθάνουσα κατάσταση)

LLC: Large Latency Complex (μεγάλο λανθάνον σύμπλεγμα)

LPS: Lipopolysaccharide (λιποπολυσακχαρίτης)

LTBP: Latent TGFβ Binding Protein (λανθάνουσα συνδετική πρωτεΐνη του TGFβ)

MAP2: Microtubule-Associated Protein 2 (συνδεόμενη με μικροσωληνίσκους πρωτεΐνη 2)

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase (επαγόμενη από μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση)

MH1/2: Mad Homology domain 1/2 (επικράτεια ομολογίας των Mad 1/2)

MMP: Matrix Metalloproteinase/Metalloproteinase (μεταλλοπρωτεάση/μεταλλοπεπτιδάση της εξωκυττάριας ουσίας)

MPP⁺: 1-methyl-4-phenylpyridinium (1-μέθυλ-4 φαίνυλ-πυριδίνιο)

MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (1-μέθυλ-4-φαίνυλ-1,2,3,6-τετραϋδροπυριδίνη)

mRNA: messenger RNA (αγγελιαφόρο RNA)

n: μέγεθος δείγματος

NCAN: Neurocan (νευροκάνη)

NDS: Normal Donkey Serum (φυσιολογικός ορός όνου)

NES: Nuclear Export Signal (αλληλουχία πυρηνικής εξόδου)

NeuN: Neuron-specific Nuclear protein (νευρωνική πυρηνική πρωτεΐνη)

NGF: Nerve Growth Factor (νευρικός αυξητικός παράγοντας)

NGS: Normal Goat Serum (φυσιολογικός ορός αίγας)

NLS: Nuclear Localization Signal (αλληλουχία πυρηνικής εντόπισης)

NO: Nitric Oxide (μονοξείδιο του αζώτου)

NRF2: Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2 (παράγοντας 2 σχετιζόμενος με τον πυρηνικό παράγοντα ερυθροειδών κυττάρων 2)

ns: non significant (στατιστικά μη σημαντικό)

O-2A: Oligodendrocyte/type-2 Astrocyte progenitor cell (προγονικό κύτταρο των ολιγοδενδροκυττάρων/τύπου 2 αστροκυττάρων)

OLIG2: Oligodendrocyte transcription factor 2 (ολιγοδενδρογλοιακός μεταγραφικός παράγοντας)

OPC: Oligodendrocyte Precursor Cell (πρόδρομο ολιγοδενδροκύτταρο)

P/S: Penicillin/Streptomycin (Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη)

PBS: Phosphate Buffered Saline (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων)

PCR: Polymerase Chain Reaction (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor (αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας)

PDL: poly-D-lysine (πολυ-D-λυσίνη)

PFA: Paraformaldehyde (παραφορμαλδεΰδη)

PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase (κινάση της 3-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης)

psi: pound-force per square inch (λίβρες ανά τετραγωνική ίντσα - μονάδα μέτρησης πίεσης)

qRT-PCR: quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου)

R-Smad: Receptor-activated/regulated Smad (πρωτεΐνη Smad που ενεργοποιείται/ρυθμίζεται από τον υποδοχέα)

rAAV: recombinant **Adeno-Associated Virus** (ανα συνδυασμένος αδενο-σχετιζόμενος ιός)

RFP: **Red Fluorescent Protein** (κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη)

RGM: **Repulsive Guidance Molecule** (μόριο απωθητικής/ανασταλτικής καθοδήγησης)

ROS: **Reactive Oxygen Species** (δραστικές μορφές οξυγόνου)

S100β: **S100 Calcium-Binding Protein B** (ασβεστιο-εξαρτώμενη πρωτεΐνη S100β)

SDS: **Sodium Dodecyl-Sulphate** (δωδεκυλο-θειικό νάτριο)

SEM: **Standard Error of the Mean** (τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής)

Ser: **Serine** (σερίνη)

Smad: ακρωνύμιο που προκύπτει από τη σύντηξη των γονιδίων **Sma** ("small" body size) του *Caenorhabditis elegans* και **Mad** (Mothers against decapentaplegic) της *Drosophila melanogaster*

Smurf: **Smad ubiquitination regulatory factor** (ρυθμιστικός παράγοντας ουβικιτινυλίωσης των πρωτεϊνών Smad)

SnoN: **Ski-related novel gene N**

SNpc: **Substantia Nigra pars compacta** (συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας)

STAT: **Signal Transducer and Activator of Transcription** (μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής)

TAE: **Tris-Acetate-EDTA buffer** (διάλυμα Tris-οξικού οξέος-EDTA)

TBI: **Traumatic Brain Injury** (τραυματική κάκωση εγκεφάλου ή κρανιοεγκεφαλική κάκωση)

TBS: **Tris Buffered Saline** (ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων με Tris)

TEMED: **N',N',N',N' Tetramethyl-ethylene1,2-diamine** (τετραμεθυλαιθυλενδιαμίνη)

TGFβ: **Transforming Growth Factor β** (αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β)

TGFBR1 ή **TβRI:** **TGFβ Receptor type I** (υποδοχέας του TGFβ τύπου I)

TGFBR2 ή **TβRII:** **TGFβ Receptor type II** (υποδοχέας του TGFβ τύπου II)

TH: **Tyrosine Hydroxylase** (υδροξυλάση της τυροσίνης)

Thr: **Threonine** (θρεονίνη)

TIMPs: **Tissue Inhibitor of Metalloproteinases** (ιστικός αναστολέας των μεταλλοπρωτεασών)

TLR: **Toll-Like Receptor** (υποδοχέας τύπου Toll)

Tm: **Temperature melting** (θερμοκρασία τήξης)

TNF-α: **Tumor Necrosis Factor α** (παράγοντας νέκρωσης όγκων α)

TRE: **TGFβ/Activin-Responsive Elements** (αλληλουχίες απόκρισης στους TGFβs/Ακτιβίνες)

Tris: **Tris(hydroxymethyl)aminomethane** [τρις(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθάνιο ή τρομεθαμίνη]

Tyr: **Tyrosine** (τυροσίνη)

v/v: **volume per volume** (συγκέντρωση κατ' όγκο / ml διαλυμένης ουσίας ανά 100 ml διαλύματος)

VEGF: **Vascular Endothelial Growth Factor** (αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας)

w/v: **weight per volume** (συγκέντρωση κατά βάρος / gr διαλυμένης ουσίας ανά 100 ml διαλύματος)

WB: **Western Blot** (ανοσοσύπωμα κατά Western)

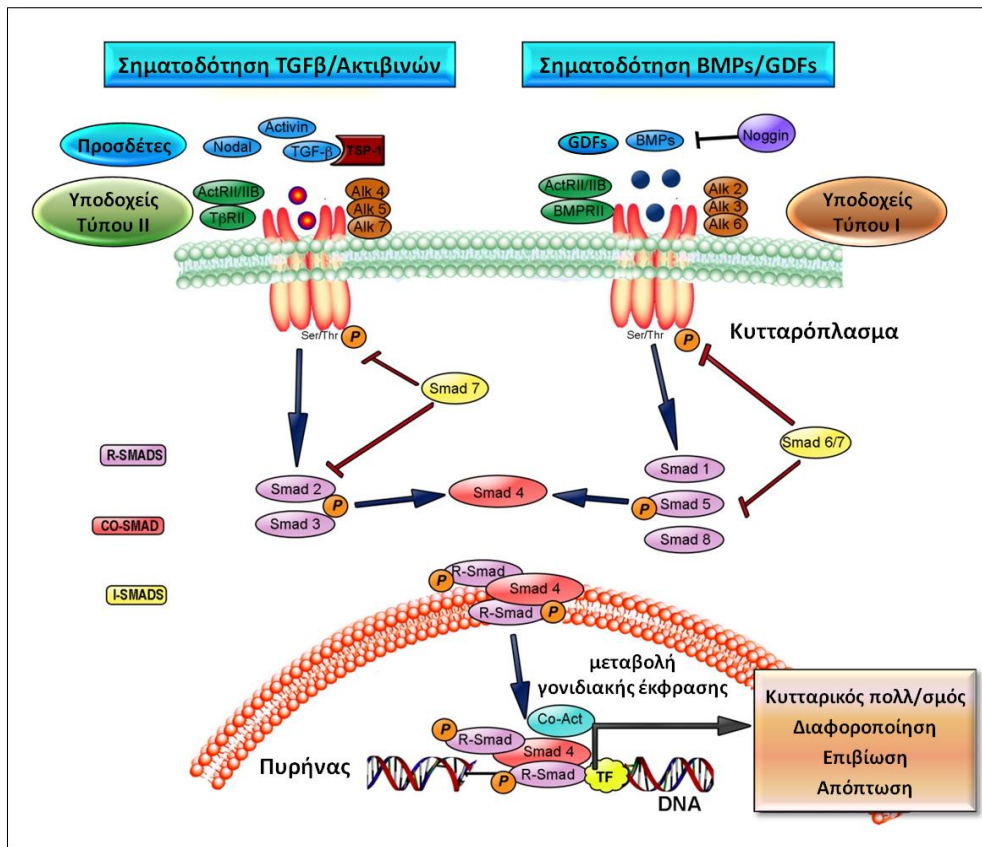
Wnt: **Wingless/integrated signaling pathway** (σηματοδοτικό μονοπάτι Wingless)

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Το σύστημα σηματοδότησης της υπεροικογένειας του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού β

Η υπεροικογένεια του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού β (Transforming Growth Factor beta, TGFβ) συνίσταται από περισσότερα από 30 μέλη, που σχετίζονται δομικά μεταξύ τους, και περιλαμβάνει τους TGFβs, τις μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs), τις Ακτιβίνες (Activins), τις Ανασταλτίνες (Inhibins), τους παράγοντες αύξησης και διαφοροποίησης (Growth and Differentiation Factors, GDFs), τη Nodal, την αντιμυλλέριο ορμόνη (anti-Müllerian hormone, AMH) και άλλα (Moustakas and Heldin, 2009; Weiss and Attisano, 2013). Οι πρωτεΐνες αυτές διακρίνονται σε επιμέρους ομάδες με βάση τις ομοιότητες στη δομή και την αμινοξική τους αλληλουχία, αλλά και την εξειδίκευση που παρουσιάζουν ως προς τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν (Shi and Massague, 2003). Οι ώριμες ενεργές μορφές των μελών της υπεροικογένειας είναι διμερή μόρια αποτελούμενα από υπομονάδες μοριακού βάρους 12-15 kDa, οι οποίες συνδέονται με ένα δισουλφιδικό δεσμό, και παρουσιάζουν πολλαπλή βιολογική δράση σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Μεταξύ άλλων ρυθμίζουν την ανάπτυξη, την ομοιόσταση και την αναγέννηση των ιστών, από το νηματώδη *Caenorhabditis elegans* μέχρι και τον άνθρωπο (Moustakas and Heldin, 2009).

Οι κυτταροκίνες της υπεροικογένειας του TGFβ επάγουν τη δράση τους μετά την πρόσδεσή τους σε ετεροτετραμερή σύμπλοκα υποδοχέων τύπου I και τύπου II, οι οποίοι διαθέτουν δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Μετά τη δέσμευση του διμερούς της κυτταροκίνης στον υποδοχέα τύπου II ακολουθεί αλληλεπίδραση του συμπλέγματος «κυτταροκίνη-υποδοχέα τύπου II» με τον υποδοχέα τύπου I, με αποτέλεσμα την επακόλουθη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του τελευταίου. Στη συνέχεια, η ενδοκυττάρια μεταγωγή του σήματος διεξάγεται μέσω των υποδοχέων τύπου I, οι οποίοι φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν καταρροϊκούς τελεστές (effectors), τις πρωτεΐνες Smad (Shi and Massague, 2003) (**Εικόνα 1**).



Εικόνα 1: Σύστημα ενδοκυττάριας σηματοδότησης κυτταροκινών της υπερικογένειας του TGFβ. Μετά τη δέσμευση του διμερούς της κυτταροκίνης στον υποδοχέα τύπου II ακολουθεί αλληλεπίδραση του συμπλέγματος «κυτταροκίνη-υποδοχέα τύπου II» με τον υποδοχέα τύπου I, με αποτέλεσμα την επακόλουθη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του τελευταίου. Στη συνέχεια, ο υποδοχέας τύπου I φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις Smad2/3 (στην περίπτωση των TGFβs και των Ακτιβινών) ή τις Smad1/5/8 (στην περίπτωση των BMPs και των περισσότερων GDFs). Οι φωσφορυλιωμένες Smad2/3 ή Smad1/5/8 σχηματίζουν σύμπλοκο με την κοινή πρωτεΐνη Smad4, το οποίο μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου αλληλεπιδρά και με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, οδηγώντας έτσι στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Προσαρμογή από S. Villarol et al., 2012, IntechOpen.

1.1.1. Τα μέλη της υπερικογένειας του TGFβ

Η υπερικογένεια του TGFβ αποτελείται από διμερείς πρωτεΐνες με κοινά δομικά χαρακτηριστικά (Moustakas and Heldin, 2009), οι οποίες ανάλογα με τη δομή και τη βιολογική δράση τους διακρίνονται στις παρακάτω οικογένειες:

- ❖ την οικογένεια των TGFβs, που περιλαμβάνει τον TGFβ1, το πρώτο και καλύτερα χαρακτηρισμένο μέλος της υπερικογένειας, που απομονώθηκε το 1983 στο εργαστήριο της Anita Roberts (Assoian et al., 1983), καθώς επίσης και τους TGFβ2 και TGFβ3.
- ❖ την οικογένεια των μορφογενετικών πρωτεϊνών των οστών που αποτελείται από τις BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8A, BMP8B, BMP9 (ή GDF2) και BMP10.

- ❖ την οικογένεια των Ακτιβινών/Ανασταλτινών που αποτελείται από τις Ακτιβίνες A, B, C, D, E, AB και τις Ανασταλτίνες A και B.
- ❖ την οικογένεια των παραγόντων ανάπτυξης και διαφοροποίησης που αποτελείται από τους GDF1, GDF3, GDF5, GDF6, GDF7 (ή BMP12), GDF8 (ή μυσστατίνη), GDF9a, GDF9b (ή BMP15), GDF10, GDF11 (ή BMP11) και GDF15 (ή MIC1).
- ❖ την οικογένεια του προερχόμενου από νευρογλοιακά κύτταρα νευροτροφικού παράγοντα (Glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) που αποτελείται από τον GDNF και τις neurturin (NTN), artemin (ART) και persephin (PSP).
- ❖ ένα σύνολο πρωτεϊνών με διπλή ή ανασταλτική δράση έναντι των άλλων μελών της υπεροικογένειας, όπως οι Nodal, AMH, Lefty A και Lefty B.

Όλα τα μέλη της υπεροικογένειας του TGFβ παράγονται σε μια πρόδρομη μορφή, αποτελούμενη από ένα προπεπτίδιο στο αμινοτελικό άκρο και από την ώριμη πρωτεΐνη στο καρβοξυτελικό άκρο. Η ώριμη πρωτεΐνη διαθέτει χαρακτηριστική τρισδιάστατη αναδίπλωση στο χώρο και χαρακτηρίζεται από την παρουσία καταλοίπων κυστεΐνης στο καρβοξυτελικό της άκρο, τα οποία συμμετέχουν στο σχηματισμό διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών (Arthurs et al., 2007). Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μέλη της υπεροικογένειας, οι BMPs διαθέτουν επτά αντί για εννιά συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης.

Οι Ακτιβίνες αποτελούν διμερή μόρια β πολυπεπτιδικών υπομονάδων των Ανασταλτινών (Ling N et al. 1986, Vale W et al. 1986). Στα θηλαστικά έχουν περιγραφεί τέσσερα διαφορετικά β πολυπεπτίδια (βA, βB, βΓ και βE), τα οποία δημιουργούν τουλάχιστον πέντε διαφορετικές Ακτιβίνες, τα ομοδιμερή Ακτιβίνης A (βA-βA), B (βB-βB), C (βC-βC), E (βE-βE) και το ετεροδιμερές AB (βA-βB), ενώ στο βάτραχο *Xenopus laevis* έχει περιγραφεί μία επιπλέον β πολυπεπτιδική υπομονάδα (βD), η οποία σχηματίζει το ομοδιμερές Ακτιβίνης D (βD-βD). Παράλληλα, οι υπομονάδες βA και βB μπορούν να ετεροδιμεριστούν με την πολυπεπτιδική υπομονάδα α των Ανασταλτινών, παράγοντας έτσι τους ανταγωνιστές της Ακτιβίνης A, τις Ανασταλτίνες A (α-βA) και B (α-βB) (Petraglia et al., 1989).

Ο TGFβ συντίθεται ως ένα ομοδιμερές πρόδρομο μόριο (προ-TGFβ), μοριακού μεγέθους ~75 kDa, και στη συνέχεια, στο σύμπλεγμα Golgi μετατρέπεται σε ώριμο ομοδιμερές, μεγέθους ~25 kDa (Annes et al., 2003). Ακολούθως, εκκρίνεται από τα

κύτταρα με τη μορφή του «μεγάλου λανθάνοντος συμπλέγματος» (Large Latency Complex, LLC), το οποίο δεν έχει βιολογική δράση, αλλά διατηρείται στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (extracellular matrix) μέχρι να ενεργοποιηθεί και αποτελείται από τρία στοιχεία: το ώριμο ομοδιμερές του TGFβ και τη «λανθάνουσα συνδετική πρωτεΐνη του TGFβ» (Latent TGFβ Binding Protein, LTBP, μεγέθους ~125-240 kDa) (Saharinen et al., 1999), που συνδέονται μη ομοιοπολικά (LSKL και RKPK αμινοξέα) και ομοιοπολικά, αντίστοιχα, με το τρίτο συστατικό του συμπλέγματος, το προπεπτιδίο των TGFβs που ονομάζεται «πεπτιδίο σχετιζόμενο με τη λανθάνουσα κατάσταση» (Latency-Associated Peptide, LAP, μεγέθους ~75 kDa) (Kanzaki et al., 1990). Η LTBP εμπλέκεται στην έκκριση των TGFβs, στην εναπόθεσή τους στην εξωκυττάρια ουσία και στην επακόλουθη ενεργοποίησή τους. Η απελευθέρωση του ώριμου διμερούς TGFβ από το σύμπλεγμα LLC διενεργείται με δύο κύριους μηχανισμούς: είτε ενζυμικά μέσω πρωτεασών, όπως εκείνων της οικογένειας Tolloid-like/BMP1, που διασπούν την LTBP, και των μεταλλοπρωτεασών της εξωκυττάριας ουσίας (matrix metalloproteases, MMPs) που καταλύουν την πρωτεόλυση του πεπτιδίου LAP, είτε μηχανικά, μέσω αλληλεπίδρασης του μοτίβου Arg-Gly-Asp που βρίσκεται στο άκρο του LAP με συγκεκριμένους υποδοχείς ιντεγκρινών ($\alpha_v\beta_6$ ή $\alpha_v\beta_8$) της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων που αποκρίνονται στον TGFβ (Tzavlaki and Moustakas, 2020). Στο δεύτερο μηχανισμό, οι ιντεγκρίνες λόγω ενδοκυττάριας σύνδεσης με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης ασκούν δυνάμεις που αλλοιώνουν τη στερεοδιάταξη του LAP και οδηγούν σε μηχανική απελευθέρωση του ώριμου βιοενεργού TGFβ.

Η ικανότητα των προπεπτιδίων να διατηρούν σε ανενεργή μορφή την ώριμη πρωτεΐνη απαντάται και σε άλλα μέλη της υπεροικογένειας του TGFβ, όπως στους GDF8 και GDF11. Ωστόσο, πολλά προπεπτιδία, όπως αυτά των Ακτιβινών, της BMP4, της BMP7 και του Nodal, δεν ασκούν αδρανοποιητική δράση στην ώριμη πρωτεΐνη, αλλά ελέγχουν τη σταθερότητα και την αποικοδόμησή τους, ρυθμίζοντας έτσι τη διαθεσιμότητά τους (Degnin et al., 2004; Dick et al., 2000).

1.1.2. Οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς των μελών της υπεροικογένειας του TGFβ

Η μεταγωγή σήματος από τα μέλη της υπεροικογένειας του TGFβ πραγματοποιείται μέσω των διαμεμβρανικών υποδοχέων τύπου I και II (Heldin and

Moustakas, 2016). Στα σπονδυλωτά έχουν βρεθεί επτά υποδοχείς τύπου I, που ιστορικά έχει επικρατήσει να ονομάζονται ALKs (Activin receptor-Like Kinases), και πέντε υποδοχείς τύπου II, μοριακού μεγέθους ~50-60 kDa και ~70-85 kDa, αντίστοιχα. Τόσο οι υποδοχείς τύπου I όσο και οι τύπου II αποτελούνται από μια μικρή εξωκυττάρια αμινοτελική περιοχή, που περιέχει περισσότερα από 10 κατάλοιπα κυστεΐνης και είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση του προσδέτη και το διμερισμό του υποδοχέα, μια απλή διαμεμβρανική περιοχή και μια καρβοξυτελική περιοχή στην οποία οφείλεται η ενεργότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Χαρακτηριστικό όλων των υποδοχέων τύπου I είναι η παρουσία ενός τμήματος περίπου 30 αμινοξικών καταλοίπων, πλούσιο σε σερίνη, θρεονίνη και γλυκίνη, το οποίο βρίσκεται μεταξύ της διαμεμβρανικής περιοχής και της επικράτειας κινάσης. Το τμήμα αυτό αναφέρεται ως επικράτεια GS, λόγω της χαρακτηριστικής ακολουθίας SGSGSG, και αποτελεί τη θέση φωσφορυλίωσης του υποδοχέα τύπου I από τους υποδοχείς τύπου II. Η φωσφορυλίωση της επικράτειας GS οδηγεί στην απελευθέρωση του ενεργού κέντρου πρόσδεσης ATP, ενεργοποιώντας έτσι την ενεργότητα κινάσης του υποδοχέα τύπου I, ο οποίος στη συνέχεια μπορεί να φωσφορυλιώσει και να ενεργοποιήσει τις πρωτεΐνες Smad που εμπλέκονται στην καταρροϊκή μεταγωγή του σήματος (**Εικόνα 1**). Οι υποδοχείς τύπου I και II, καθώς και οι κυτταροκίνες της υπεροικογένειας του TGFβ με τις οποίες αλληλεπιδρούν, συνοψίζονται στον **Πίνακα 1**.

Κάθε μέλος της υπεροικογένειας του TGFβ δεσμεύεται σε συγκεκριμένο συνδυασμό υποδοχέων. Για παράδειγμα, για τις Ακτιβίνες υπάρχουν δύο επιμέρους υποδοχείς τύπου II, οι ACVR2A και ACVR2B. Ο επικρατέστερος υποδοχέας τύπου I για τις Ακτιβίνες θεωρείται ο ACVR1B/ALK4, ενώ ο ACVR1/ALK2, αν και αρχικά χαρακτηρίστηκε ως υποδοχέας τύπου I των Ακτιβινών, μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι δρα ως υποδοχέας των BMPs. Από την άλλη, στα περισσότερα κύτταρα, οι TGFβs σηματοδοτούν μέσω ενός συμπλέγματος που αποτελείται από δύο TGFBR1/ALK5 και δύο TGFBR2 υποδοχείς. Σε γενικές γραμμές, οι ACVRL1/ALK1, ACVR1/ALK2, BMPR1A/ALK3 και BMPR1B/ALK6 σηματοδοτούν μέσω των Smad1/5/8, ενώ οι ACVR1B/ALK4, TGFBR1/ALK5 και ACVR1C/ALK7 σηματοδοτούν μέσω των Smad2/3 (Heldin and Moustakas, 2016).

Η σηματοδότηση του συστήματος της υπεροικογένειας του TGFβ ρυθμίζεται μέσω ενδοκυττάρωσης του συμπλέγματος των ενεργοποιημένων υποδοχέων τύπου I και II, είτε μέσω κυστιδίων κλαθρίνης, είτε μέσω κυστιδίων θετικών στην καβεολίνη. Η

ύπαρξη δύο μονοπατιών ενδοκυττάρωσης δημιουργεί μια δυναμική ισορροπία ανάμεσα στην ενδοκυττάρια κυκλοφορία και την κατανομή των υποδοχέων στα κυτταρικά διαμερίσματα, ενισχύει την ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος και ρυθμίζει τη βιοδιαθεσιμότητα των υποδοχέων μέσω αποικοδόμησή τους στα λυσοσώματα (Derynck and Budi, 2019; Tzavlaki and Moustakas, 2020). Η παρεμπόδιση ενός εκ των δύο μονοπατιών οδηγεί τους υποδοχείς προς το άλλο μονοπάτι.

Υποδοχείς Τύπου I	Κυτταροκίνες
ACVRL1 (ALK1)	TGFβ1/2/3, BMP9/10
ACVR1 (ALK2)	AMH, BMP5/6/7/8A/8B
BMPR1A (ALK3)	AMH, BMP2/4/5/6/7/8A/8B, GDF5/6/7/15
ACVR1B (ALK4)	Nodal, Ακτιβίνες A/B, GDF1/3/8/9a/10/11
TGFBR1 (ALK5 ή TβRI)	TGFβ1/2/3, GDF8/9a/11
BMPR1B (ALK6)	BMP2/4/5/6/7/8A/8B, GDF5/6/7/9b
ACVR1C (ALK7)	Nodal, Ακτιβίνη B, GDF1/3/9a
Υποδοχείς Τύπου II	Κυτταροκίνες
TGFBR2 (TβRII)	TGFβ1/2/3
ACVR2A (ActRIIA)	Nodal, Ακτιβίνες A/B, BMP2/4/5/6/7/8A/8B/9/10, GDF1/3/5/6/7/10/11
ACVR2B (ActRIIB)	Nodal, Ακτιβίνες A/B, BMP2/4/5/6/7/8A/8B/9/10, GDF1/3/5/6/7/8/9a/11/15
BMPR2 (BMPRII)	BMP2/4/5/6/7/8A/8B/9/10, GDF5/6/7/9b
AMHR2 (MISRII)	AMH

Πίνακας 1. Οι υποδοχείς τύπου I και τύπου II και οι αντίστοιχες κυτταροκίνες της υπερικογένειας του TGFβ που δεσμεύουν. Η επίσημη ονοματολογία κάθε υποδοχέα αναγράφεται πρώτη και οι εναλλακτικές ονομασίες σημειώνονται εντός παρενθέσεως. Ο πίνακας κατασκευάστηκε με βάση τα δεδομένα που παρατίθενται στο άρθρο ανασκόπησης (Heldin and Moustakas, 2016).

Ακόμη, έχουν περιγραφεί και διαμεμβρανικοί υποδοχείς τύπου III, όπως η β-γλυκάνη (betaglycan), η ενδογλίνη (endoglin), οι RGMs (Repulsive Guidance Molecules) και ο cripto, οι οποίοι δεν έχουν κάποια ουσιαστική δραστικότητα κινάσης. Πρόκειται για βοηθητικούς υποδοχείς (co-receptors) που διαθέτουν μια μικρή ενδοκυτταρική επικράτεια και διαδραματίζουν έμμεσο ρόλο στη σηματοδότηση, συνήθως ρυθμίζοντας την πρόσβαση και διευκολύνοντας τη σύνδεση των προσδετών της υπερικογένειας στα σύμπλοκα των υποδοχέων τύπου I και II (Nickel et al., 2018). Για παράδειγμα, σε αντίθεση με την ισχυρή πρόσδεση των TGFβ1 και TGFβ3 στον υποδοχέα TGFBR2, η πρόσδεση του TGFβ2 είναι ασθενέστερη και ενισχύεται με τη βοήθεια της β-γλυκάνης,

προκειμένου να εκκινήσει η σηματοδότηση (Esparza-Lopez et al., 2001). Η β-γλυκάνη μπορεί επίσης να προσδεθεί και να τροποποιήσει τη δράση των BMP2, BMP4, BMP7, GDF5 και Ακτιβίνη Α (Gatza et al., 2010). Επιπλέον, η ενδογλίνη εκφράζεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπου εκφράζεται ελάχιστα ή καθόλου η β-γλυκάνη, και ενισχύει την ενεργοποίηση των Smad1/5/8, καταστέλλοντας παράλληλα το μονοπάτι των Smad2/3 (Santibanez et al., 2007). Κατ' αντιστοιχία, η BMP-επαγόμενη σηματοδότηση μπορεί να τροποποιηθεί μέσω των βοηθητικών υποδοχέων RGMa, RGMb (Dragon) και RGMc (Hemojuvelin). Τέλος, ο βοηθητικός υποδοχέας cripto επάγει τη σηματοδότηση του Nodal, ενώ αναστέλλει τη σηματοδότηση των Ακτιβινών, παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή τους με τους υποδοχείς ACVR2A και ACVR2B και την επακόλουθη αλληλεπίδραση με τους αντίστοιχους υποδοχείς τύπου I (Nickel et al., 2018).

1.1.3. Οι πρωτεΐνες Smad και η ρύθμιση της ενδοκυττάριας μεταγωγής σήματος

Οι πρωτεΐνες Smad ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά στο νηματώδη *Caenorhabditis elegans* και στη *Drosophila melanogaster*, ως προϊόντα των γονιδίων *Sma* και *Mad* (mother against decapentaplegic), αντίστοιχα. Στη συνέχεια, ταυτοποιήθηκαν ομόλογες πρωτεΐνες σε διάφορα σπονδυλωτά και ονομάστηκαν Smad από τη σύντηξη των "Sma" και "Mad". Στο γονιδίωμα του ανθρώπου και του μύος κωδικοποιούνται οκτώ πρωτεΐνες της οικογένειας των Smad ενώ στο γονιδίωμα της *D. melanogaster* και του *C. elegans* κωδικοποιούνται τέσσερα και τρία μέλη, αντίστοιχα.

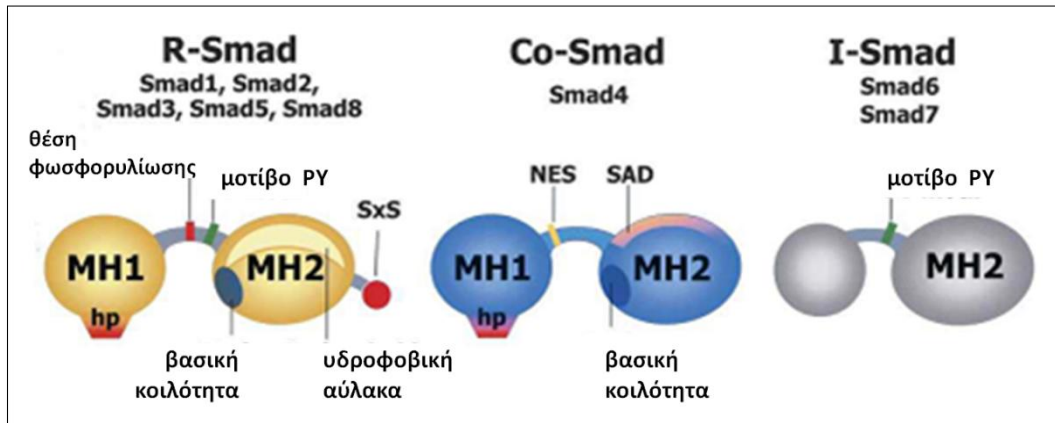
Οι πρωτεΐνες Smad διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: (α) εκείνες που ρυθμίζονται/ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς (Receptor-regulated/activated Smads, R-Smads), (β) την κοινή πρωτεΐνη Smad4 (Common-mediator Smad, Co-Smad) και (γ) τις ανασταλτικές Smads (Inhibitory Smads, I-Smads). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι Smad2 και Smad3 για τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από TGFβs, Ακτιβίνες και Nodal, και οι Smad1, Smad5 και Smad8 (ή Smad9) για τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από BMPs και GDFs. Η Smad4 δρα ως κοινός μεσολαβητής για όλα τα μέλη της υπεροικογένειας του TGFβ και δημιουργεί ολιγομερή με τις ενεργοποιημένες R-Smads. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι R-Smads βρίσκονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ενώ η Smad4 κατανέμεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Οι πρωτεΐνες Smad6 και Smad7 ανήκουν στις

I-Smads και παρεμποδίζουν την αλληλεπίδραση των R-Smads με τον υποδοχέα, αναστέλλοντας έτσι τη δράση τους (Tzavilaki and Moustakas, 2020). Οι R-Smads, Co-Smad και I-Smads παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες μεταξύ τους. Ειδικότερα, οι R-Smads αποτελούνται από την αμινοτελική επικράτεια MH1 (Mad Homology domain 1) και την καρβοξυτελική επικράτεια MH2 (Mad Homology domain 2). Οι δύο αυτές επικράτειες συνδέονται μεταξύ τους με την «επικράτεια σύνδεσης» ή συνδετική περιοχή (linker domain) που είναι πλούσια σε προλίνη και διαφέρει αρκετά ως προς την αμινοξική της αλληλουχία μεταξύ των διαφόρων πρωτεϊνών Smad (**Εικόνα 2**).

Αρχικά, αναγνωρίστηκε η ικανότητα της επικράτειας MH1 να αναστέλλει τη δράση των R-Smads, μέσω αλληλεπίδρασής της με την επικράτεια MH2 (Hata et al., 1997). Η MH1 είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση των R-Smads στο DNA, καθώς και για την αλληλεπίδρασή τους με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, και είναι ιδιαίτερα συντηρημένη σε όλες τις R-Smads και τη Smad4, αλλά απουσιάζει από τις I-Smads (Kim et al., 1997). Να σημειωθεί ότι η επικράτεια MH1 των Smad3 και Smad4 μπορεί να προσδένεται άμεσα στο DNA, σε αντίθεση με εκείνη της Smad2. Αυτό οφείλεται σε μια ένθεση 30 αμινοξέων στην αντίστοιχη επικράτεια της Smad2, ως αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος, η οποία αλλάζει τη στερεοδιάταξη της επικράτειας και εμποδίζει την απευθείας πρόσδεση της Smad2 στο DNA. Επιπλέον, η επικράτεια MH1 περιέχει θέσεις φωσφορυλίωσης, καθώς και την αλληλουχία πυρηνικής εντόπισης (Nuclear Localization Signal, NLS), που είναι υπεύθυνη για τη μετακίνηση των πρωτεϊνών στον πυρήνα (Lutz and Knaus, 2002). Για παράδειγμα, η συνεχής μετακίνηση της Smad4 από και προς τον πυρήνα του κυττάρου οφείλεται στην αλληλουχία NLS της επικράτειας MH1 καθώς και σε μία μόνιμα ενεργή σηματοδοτική αλληλουχία πυρηνικής εξόδου (Nuclear Export Signal, NES), πλούσια σε λευκίνη, που εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο της συνδετικής περιοχής.

Από την άλλη, η επικράτεια MH2 είναι συντηρημένη μεταξύ όλων των Smads και είναι υπεύθυνη για ποικίλες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Ειδικότερα, μια περιοχή με πολλαπλές υδροφοβικές υποπεριοχές που βρίσκεται στην επιφάνεια της MH2, γνωστή ως υδροφοβική αύλακα, μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα και με πρωτεϊνικούς παράγοντες συγκράτησης στο κυτταρόπλασμα, ενώ συμβάλλει στη δημιουργία ομοδιμερών ή ετεροτριμερών μεταξύ των R-Smad-Smad4. Επιπλέον, περιέχει το συντηρημένο καρβοξυτελικό μοτίβο Ser-X-Ser στο οποίο φωσφορυλιώνονται

οι R-Smads από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα τύπου I. Τέλος, στην επικράτεια MH2 των πρωτεϊνών Smad εμπεριέχεται και μια αλληλουχία που δρα ως σήμα πυρηνικής εξόδου, ρυθμίζοντας έτσι τον κυτταροπλασματικό-πυρηνικό εντοπισμό τους (Tzavlaki and Moustakas, 2020).



Εικόνα 2. Δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών Smad. Οι πρωτεΐνες Smad αποτελούνται από δύο καλά συντηρημένες σφαιρικές περιοχές, τις επικράτειες MH1 και MH2 και μία μεταβλητή συνδετική περιοχή. Η επικράτεια MH1 των R-Smads και της Smad4 περιέχει δομή φουρκέτας (β-hairpin) για τη σύνδεση του μορίου στο DNA. Οι I-Smads δε διαθέτουν επικράτεια MH1. Η συνδετική περιοχή των R-Smads περιέχει πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης για τις MAPKs και άλλες κινάσες. Στις R-Smads και I-Smads η συνδετική περιοχή διαθέτει ένα μοτίβο PY, το οποίο αναγνωρίζεται από τους τομείς WW των λιγασών ουβικιτίνης Smurf. Η συνδετική περιοχή της Smad4 περιέχει την αλληλουχία σηματοδότησης πυρηνικής εξόδου (NES) και την αλληλουχία SAD (Smad4 Activation Domain), υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με ενεργοποιητές και καταστολείς της μεταγραφής. Η επικράτεια MH2 περιέχει μία βασική κοιλότητα στην περίπτωση των R-Smads για αλληλεπίδραση με τον ενεργοποιημένο υποδοχέα τύπου I και στην περίπτωση της Smad4 για αλληλεπίδραση με το μοτίβο pS-x-pS (κόκκινη σφαίρα) των R-Smads. Στην επιφάνεια της επικράτειας MH2 των R-Smads υπάρχει ένα σύνολο υδροφοβικών περιοχών που αποτελεί κατάλληλο σημείο για πολλαπλές αλληλεπιδράσεις. Προσαρμογή από (Massague et al., 2005).

Η συνδετική περιοχή που ενώνει τις επικράτειες MH1 και MH2, εμπεριέχει πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης από κινάσες άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών που αλληλεπιδρούν με την TGFβ/BMP σηματοδότηση, συμπεριλαμβανομένων των ενεργοποιούμενων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών (Mitogen Activated Protein Kinases, MAPKs), των εξαρτώμενων από κυκλίνες πρωτεϊνικών κινασών (cyclin-dependent protein kinases) και της εξαρτώμενης από Ca²⁺/καλμοδουλίνη κινάσης τύπου II (Matsuura et al., 2004; Wicks et al., 2000). Όταν οι Smads φωσφορυλιωθούν στην περιοχή αυτή παρεμποδίζεται η είσοδός τους στον πυρήνα. Παρόλο που η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Smad αντιπροσωπεύει τον κύριο μηχανισμό για τη μεταγωγή σήματος από τα μέλη της υπεροικογένειας του TGFβ και συνιστά τη λεγόμενη «κανονική» TGFβ/BMP σηματοδότηση, υπάρχουν και εναλλακτικά μονοπάτια που

ενεργοποιούνται παράλληλα και συνολικά αναφέρονται με τον όρο «μη κανονικά» μονοπάτια σηματοδότησης. Η «μη κανονική» σηματοδότηση περιλαμβάνει τα μονοπάτια των MAPKs [ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2), JNK (c-Jun N-terminal Kinase) και P38], των Rho-like GTPασών, της κινάσης της 3-φωσφατιδυλινοσιτόλης (Phosphatidylinositol 3-Kinase, PI3K)/AKT/mTOR, JAK/STAT (Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription) και άλλα (Derynck and Budi, 2019; Tzavlaki and Moustakas, 2020). Ακόμη, στην επικράτεια σύνδεσης των R- και I-Smads υπάρχει μια αλληλουχία πλούσια σε προλίνη και τυροσίνη (μοτίβο PY), η οποία διευκολύνει την αναγνώρισή τους από τις λιγάσες ουβικιτίνης Smurf.

Παρά την ικανότητα των R-Smads να μετακινούνται συνεχώς μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος, ανοσοϊστοχημικές χρώσεις έχουν δείξει ότι εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα κατά την ομοιόσταση, όπου αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη SARA (Smad Anchor for Receptor Activation), τη φιλαμίνη ή τους μικροσωληνίσκους (Dong et al., 2000; Qin et al., 2002; Sasaki et al., 2001). Μετά τη διέγερση από μέλη της υπερικογένειας του TGFβ, η φωσφορυλίωση του καρβοξυτελικού άκρου των R-Smads από τους υποδοχείς τύπου I έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της αλληλεπίδρασης μεταξύ των επικρατειών MH1 και MH2 και το σχηματισμό ετερο-ολιγομερών συμπλόκων με τη Smad4 [R-Smads/Smad4]. Τα ενεργοποιημένα σύμπλοκα εισέρχονται στον πυρήνα και προσδένονται σε ειδικές αλληλουχίες των υποκινητών, ρυθμίζοντας έτσι τη μεταγραφή πληθώρας γονιδίων-στόχων (Treichel et al., 1998; Tsukazaki et al., 1998; Wu et al., 2000). Βέβαια, η συγγένεια/ειδικότητα σύνδεσης του συμπλόκου [R-Smads/Smad4] με το DNA είναι χαμηλή, γι' αυτό καθίσταται απαραίτητη η παρουσία και άλλων πρωτεϊνικών μορίων που δρουν ως μεταγραφικοί συμπαράγοντες, όπως οι πρωτο-ογκοπρωτεΐνες C-JUN και C-FOS (μεταγραφικός παράγοντας AP-1) (Zhang et al., 1998), οι πρωτεΐνες RUNX/AML (Runt-related transcription factor / Acute Myeloid Leukemia) (Pardali et al., 2000; Xie et al., 1999), ο υποδοχέας της βιταμίνης D (Subramaniam et al., 2001), ο παράγοντας FAST-2 (Forkhead Activin Signal Transducer-2) (Nagarajan and Chen, 2000) και άλλοι.

Επιπλέον, οι πρωτεΐνες Smad μπορούν να αλληλεπιδράσουν και με άλλους μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές ή/και συν-καταστολείς, επάγοντας θετική ή αρνητική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, στο καρβοξυτελικό άκρο τους μπορεί να συνδεθεί ο μεταγραφικός συν-ενεργοποιητής CBP (CREB-binding protein

ή p300), ο οποίος προάγει την ακετυλίωση των ιστονών με αποτέλεσμα τη χαλάρωση της οργάνωσης των νουκλεοσωμάτων και τη διευκόλυνση της προσβασιμότητας της βασικής μεταγραφικής μηχανής για τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Αντίθετα, η αλληλεπίδραση των R-Smads με συν-καταστολείς της μεταγραφής, όπως οι TGIF1 (TG-interacting factor 1), C-Ski και SnoN (Ski-related novel gene N), οδηγεί στη συμπύκνωση της δομικής οργάνωσης και κατανομής των νουκλεοσωμάτων και καταστολή συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων, μέσω ενεργοποίησης των αποακετυλασών των ιστονών (Histone deacetylases, HDACs)(Luo et al., 1999; Wotton et al., 1999).

Η προσθήκη μορίων ουβικιτίνης και η επακόλουθη αποικοδόμηση των ενεργοποιημένων R-Smads οδηγούν στον τερματισμό της κανονικής μεταγωγής σήματος. Οι πρωτεΐνες Smurf1 και Smurf2, που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη, καταλύουν την προσθήκη μορίων ουβικιτίνης στους ενεργοποιημένους υποδοχείς της υπεροικογένειας του TGFβ, με αποτέλεσμα την αποικοδόμησή τους στο πρωτεάσωμα. Σε κατάσταση ηρεμίας οι ανασταλτικές Smad6 και Smad7 βρίσκονται στον πυρήνα, ενώ μετά την ενεργοποίηση της σηματοδότησης δημιουργούν σταθερά σύμπλοκα με τις Smurf1/2 και μετατοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη, όπου συνδέονται άμεσα στους ενεργοποιημένους υποδοχείς τύπου I, παρεμποδίζοντας έτσι τη φωσφορλίωση των R-Smads. Αξίζει να σημειωθεί ότι η σύνθεση των I-Smads επάγεται και από άλλους εξωκυττάριους προσδέτες που ανταγωνίζονται τα σήματα των κυτταροκινών της υπεροικογένειας του TGFβ, όπως για παράδειγμα η ιντερφερόνη γ που ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι JAK/STAT. Συνοψίζοντας, διάφοροι αντισταθμιστικοί μηχανισμοί ενεργοποιούνται για τον τερματισμό της TGFβ- ή/και BMP-εξαρτώμενης σηματοδότησης, ενώ ως απάντηση στην επίδραση των κυτταροκινών της υπεροικογένειας εκκρίνονται από τα εκάστοτε κύτταρα και άλλοι παράγοντες, οι οποίοι μεσολαβούν και τροποποιούν την τελική κυτταρική απόκριση.

1.1.4. Αλληλεπίδραση μεταξύ της TGFβ και της BMP σηματοδότησης

Πληθώρα μηχανισμών που επηρεάζουν και διαμορφώνουν το τελικό αποτέλεσμα της δράσης του συστήματος σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ έχουν περιγραφεί σε εξωκυττάριο, κυτταροπλασματικό και πυρηνικό επίπεδο (Zi et al., 2012). Στους μηχανισμούς αυτούς περιλαμβάνονται η διαφορική ή ταυτόχρονη έκφραση

πολυάριθμων προσδετών των TGFβ και BMP κλάδων και η έκφραση διάφορων ρυθμιστών της βιοδιαθεσιμότητάς τους σε έναν ιστό κατά την ομοίωση ή την παθολογία, η διαφορική ή ταυτόχρονη έκφραση υποδοχέων και πρωτεϊνών Smad στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους που απαρτίζουν έναν ιστό, καθώς και η ρύθμιση της δραστηριότητας και της έκφρασης των υποδοχέων, μέσω φωσφορυλίωσης, ουβικιτινυλίωσης, σουμοϋλίωσης, NEDDυλίωσης και microRNAs. Επιπλέον, οι αλληλεπιδράσεις των υποδοχέων τύπου I και II με άλλους βοηθητικούς υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας ή ρυθμιστικές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και η ανακύκλωσή τους μέσω ενδοκυττάρωσης, η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Smad με πολυάριθμους κυτταροπλασματικούς ή πυρηνικούς τροποποιητές, καθώς και η ενεργοποίηση διάφορων αντισταθμιστικών μηχανισμών συνθέτουν από κοινού ένα εξαιρετικά πολύπλοκο και ταυτόχρονα ευέλικτο σύστημα που ρυθμίζει ποικίλες πτυχές της ομοίωσης και της παθοφυσιολογίας (Chang, 2016; Derynck and Budi, 2019; Miller et al., 2019).

Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι έχουν περιγραφεί κυτταρο-ειδικές διαφορές στα πρότυπα προσβασιμότητας της χρωματίνης και έχουν χαρακτηριστεί προκαθορισμένες ρυθμιστικές αλληλουχίες πρόσδεσης των R-Smads, οι οποίες αλληλεπιδρούν με διακριτούς κυτταρο-ειδικούς μεταγραφικούς συμπαραγόντες και ρυθμίζουν την έκφραση συγκεκριμένων συνόλων γονιδίων (Morikawa et al., 2016; Morikawa et al., 2011). Βέβαια, παρά την αξιοσημείωτη πρόοδο στο χαρακτηρισμό μεμονωμένων παραγόντων του συστήματος της υπεροικογένειας του TGFβ, ο τρόπος με τον οποίο τα κύτταρα ενός ιστού αποκωδικοποιούν τα περίπλοκα σήματα που δέχονται από το συγκεκριμένο σύστημα, ώστε να εκδηλώσουν την επιθυμητή φυσιολογική απόκριση, και ιδιαίτερα η λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ των TGFβ και BMP κλάδων, δεν έχουν ακόμη αποσαφηνιστεί. Να σημειωθεί ότι τα μονοπάτια των TGFβs/Ακτιβινών και των BMPs διασταυρώνονται μεταξύ τους σε διάφορους σηματοδοτικούς κόμβους και συμμετέχουν με ανταγωνιστικό ή συνεργιστικό τρόπο σε θεμελιώδεις κυτταρικές διεργασίες που διέπουν την ιστική μορφογένεση και την οργανογένεση κατά την ανάπτυξη, καθώς και την ομοίωση των ιστών κατά την ενήλικη ζωή.

Ο υψηλός βαθμός δομικής συγγένειας που χαρακτηρίζει τα μέλη της υπεροικογένειας του TGFβ έχει ως αποτέλεσμα την πρόσδεση ορισμένων BMPs σε υποδοχείς των TGFβs/Ακτιβινών (TGFBR1/ALK5 και ACVR1C/ALK7) και τη δημιουργία

ετερογενών συμπλόκων με BMP-σχετιζόμενους υποδοχείς (BMPR1A/ALK3 και BMPR1B/ALK6), ενεργοποιώντας παράλληλα τα μονοπάτια των Smad2/3 και Smad1/5/8, κυρίως σε εμβρυϊκά ή καρκινικά κύτταρα (Holtzhausen et al., 2014). Η εξαρτώμενη από BMPs ενεργοποίηση των Smad2/3 έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη του ραχιαιοκοιλιακού άξονα κατά την εμβρυογένεση και την επαγωγή της διεισδυτικότητας των καρκινικών κυττάρων. Κατ' αντιστοιχία, σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους, όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα, οι TGFβs σηματοδοτούν είτε μέσω TGFBR1(ALK5)/Smad2/3, είτε μέσω ACVRL1(ALK1)/Smad1/5/8, με ανταγωνιστική δράση έναντι του πρώτου μονοπατιού, οδηγώντας σε διαφορετικές επιδράσεις κατά την αγγειογένεση (Goumans et al., 2002; Oh et al., 2000). Επομένως, η κατάσταση ενεργοποίησης ή αδράνειας του ενδοθηλίου εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ των δύο κλάδων σηματοδότησης, η οποία ρυθμίζεται μεταξύ άλλων από την ενδογλίνη (Lebrin et al., 2004). Πρόσφατα δείχθηκε ότι έπειτα από επίδραση με TGFβ, ο TGFBR1/ALK5 μπορεί να φωσφορυλιώσει και να ενεργοποιήσει τον BMP-σχετιζόμενο υποδοχέα ACVR1/ALK2, ο οποίος στη συνέχεια ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες Smad1/5/8, ρυθμίζοντας περίπου το ¼ του TGFβ-επαγόμενου μεταγραφώματος (Ramachandran et al., 2018).

Εκτός από τη δημιουργία συμπλόκων μεταξύ TGFβ και BMP υποδοχέων, έχει περιγραφεί και ο σχηματισμός μικτών συμπλόκων μεταξύ TGFβ και BMP R-Smads, όπως για παράδειγμα μεταξύ των Smad1 και Smad2 (Daly et al., 2008) ή μεταξύ των Smad1/5 και Smad3 (Gronroos et al., 2012), έπειτα από ταυτόχρονη επίδραση TGFβ και BMP προσδετών σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες. Μάλιστα, έχει δειχθεί ότι τα μικτά σύμπλοκα R-Smads καταστέλλουν τη BMP σηματοδότηση (Gronroos et al., 2012), ενώ εικάζεται ότι ρυθμίζουν διακριτά σύνολα γονιδίων από τα συμβατικά σύμπλοκα R-Smads, μέσω πρόσδεσης σε διαφορετικές αλληλουχίες υποκινητών.

Ένας ακόμη μηχανισμός αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο κλάδων σηματοδότησης είναι η επαγόμενη από το ένα μονοπάτι έκφραση παραγόντων που καταστέλλουν το δεύτερο μονοπάτι. Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση της TGFβ σηματοδότησης επάγει την αύξηση του αυξητικού παράγοντα του συνδετικού ιστού (Connective tissue growth factor, CTGF), της Tomoregulin-1 (Tmeff1) ή/και του ανταγωνιστή της BMP σηματοδότησης Gremlin, οι οποίοι ανταγωνίζονται την πρόσδεση των BMPs στους αντίστοιχους υποδοχείς, καταστέλλοντας τη BMP σηματοδότηση (Abreu et al., 2002; Falke et al., 2016). Βέβαια, έχουν περιγραφεί και συστήματα όπου η έκφραση

ορισμένων γονιδίων-στόχων ρυθμίζεται με τον ίδιο τρόπο και από τα δύο μονοπάτια, για παράδειγμα έχειδειχθεί ότι ενεργοποίηση τόσο της TGFβ όσο και της BMP σηματοδότησης *in vitro* οδηγούν σε υπερέκφραση των *Id1* (Inhibitor of differentiation 1), *Lef1* (Lymphoid enhancer-binding factor 1), *Klf9* (Krueppel-like factor 9), *Smad7* και άλλων (de Jong et al., 2002; Liang et al., 2009).

Ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι οι παρατηρούμενες διαφορικές επιδράσεις της TGFβ ή της BMP σηματοδότησης σε επιμέρους συστήματα ερμηνεύονται εν μέρει λόγω ανταγωνισμού των δύο μονοπατιών για την κοινή πρωτεΐνη Smad4 (Candia et al., 1997; Sartori et al., 2013; Yuan et al., 2018). Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που αντικρούουν το συγκεκριμένο μοντέλο, δείχνοντας ότι τα επίπεδα της Smad4 δεν αποτελούν περιοριστικό παράγοντα για την προαγωγή της σηματοδότησης (Oshimori and Fuchs, 2012; Piek et al., 1999). Από την άλλη πλευρά, υπάρχει πληθώρα βιβλιογραφικών αναφορών όπου η ενεργοποίηση του ενός μονοπατιού καταστέλλει την έκφραση παραγόντων του άλλου μονοπατιού, περιορίζοντας έτσι το ποσοστό του σήματος που μεταγεται από το τελευταίο (Hudnall et al., 2016). Για παράδειγμα, έχειδειχθεί ότι η σηματοδότηση από TGFβs/Ακτιβίνες ελαττώνει τα επίπεδα προσδετών, υποδοχέων και τελεστών του BMP κλάδου, φαινόμενο που στηρίζεται πιθανότατα στη δράση επιγενετικών μηχανισμών, όπως η αποακετυλίωση των ιστονών, σε συνδυασμό με τη δράση των κατασταλτικών παραγόντων SnoN ή/και Smad7 (Ehnert et al., 2012; Kawamura et al., 2012; Nakamura et al., 2003; Wang et al., 2012).

Στους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο κλάδων σηματοδότησης περιλαμβάνεται και η ρύθμιση που υπόκειται το σύστημα από ορισμένους παράγοντες που αλληλεπιδρούν με κυτταροκίνες της υπεροικογένειας του TGFβ στον εξωκυττάριο χώρο. Για παράδειγμα, ο εκκρινόμενος παράγοντας Kielin/chordin-like protein (KCP) αφ' ενός δημιουργεί σύμπλοκα με τις BMPs, διευκολύνοντας την πρόσδεσή τους στους υποδοχείς και ενισχύοντας τη BMP σηματοδότηση, και αφ' ετέρου παρεμποδίζει την πρόσδεση των TGFβs στους αντίστοιχους υποδοχείς, καταστέλλοντας έτσι την TGFβ σηματοδότηση (Lin et al., 2006).

Συνοψίζοντας, οι διάφοροι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης μεταξύ των TGFβ και BMP κλάδων σηματοδότησης που περιγράφηκαν περιλαμβάνουν δυναμικές συνιστώσες και πιθανότατα συνυπάρχουν και δρουν ταυτόχρονα σε ένα δεδομένο σύστημα μελέτης. Το άθροισμα των ανταγωνιστικών ή/και συνεργιστικών δράσεων των δύο κλάδων είναι

αυτό που ενδεχομένως καθορίζει τις τελικές κυτταρικές αποκρίσεις, τόσο υπό ομοιοστατικές, όσο και υπό παθολογικές συνθήκες.

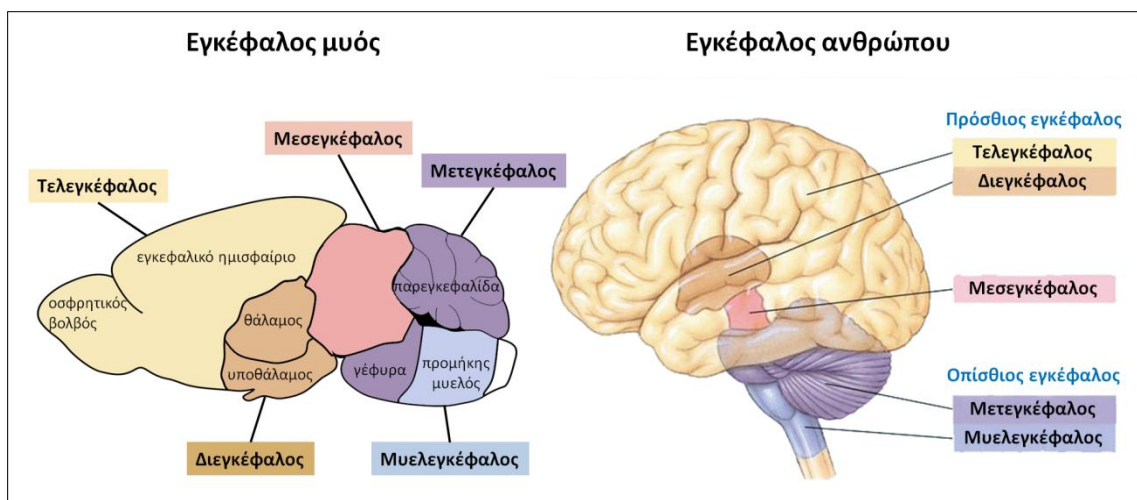
1.2. Το νευρικό σύστημα

Το ανθρώπινο νευρικό σύστημα αποτελεί ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο βιολογικό σύστημα, γεγονός που οφείλεται αφ' ενός στο μεγάλο αριθμό κυττάρων που το απαρτίζουν και αφ' ετέρου στις διαρκείς, γρήγορες και δυναμικές αλλαγές των κυτταρικών του αλληλεπιδράσεων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μεταφράζονται μακροσκοπικά σε μια σειρά από βασικές λειτουργίες, όπως η αντίληψη και η επεξεργασία δεδομένων από το εξωτερικό περιβάλλον, η κίνηση, η συμπεριφορά, οι εκούσιες ή ακούσιες αντιδράσεις σε ερεθίσματα, καθώς και ο συντονισμός των υπόλοιπων οργανικών συστημάτων. Επιπλέον, το νευρικό σύστημα είναι υπεύθυνο και για ένα σύνολο πολύπλοκων, «ανώτερων» όπως συχνά ονομάζονται λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένων της μνήμης, της μάθησης και του λόγου. Το σύνολο των συγκεκριμένων λειτουργιών διασφαλίζει την επιβίωση, την προσαρμογή και την αποτελεσματική διαβίωση του οργανισμού σε σχέση με το εξωτερικό του περιβάλλον.

1.2.1. Δομή του νευρικού συστήματος

Το νευρικό σύστημα των θηλαστικών διακρίνεται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) και στο Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ). Το ΚΝΣ συνιστά το κέντρο λήψης και επεξεργασίας ερεθισμάτων αλλά και το κέντρο από το οποίο εξέρχονται οι εντολές προς την περιφέρεια. Το ΠΝΣ είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά των ερεθισμάτων από την περιφέρεια του σώματος στο ΚΝΣ και αντίστροφα (Catala and Kubis, 2013). Το ΚΝΣ αποτελείται από τον εγκέφαλο, που αποτελεί το σύστημα μελέτης της παρούσας διατριβής, και το νωτιαίο μυελό. Ο εγκέφαλος των σπονδυλωτών διακρίνεται σε πέντε ανατομικές περιοχές (**Εικόνα 3**), οι οποίες εμφανίζονται πολύ νωρίς κατά την εμβρυική ανάπτυξη: (α) τον τελεγκέφαλο (εγκεφαλικά ημισφαίρια, σύνδεσμοι των ημισφαιρίων, ρινικός εγκέφαλος), (β) το διεγκέφαλο (θάλαμος, υποθάλαμος, επιθάλαμος, μεταθάλαμος), (γ) το μεσεγκέφαλο ή διάμεσο εγκέφαλο, (δ) το μετεγκέφαλο ή ρομβεγκέφαλο (παρεγκεφαλίδα, γέφυρα) και (ε) το μυελεγκέφαλο (προμήκης μυελός) που συνδέει τον εγκέφαλο με το νωτιαίο μυελό (Ishikawa et al., 2012; Tortora and

Derrickson, 2016). Ο μεσεγκέφαλος, η γέφυρα και ο προμήκης μυελός συνιστούν το εγκεφαλικό στέλεχος. Ο τελεγκέφαλος μαζί με το διεγκέφαλο συνιστούν τον πρόσθιο εγκέφαλο. Φυλογενετικά παρατηρείται μία ανάπτυξη του πρόσθιου εγκεφάλου, έτσι ώστε ανεβαίνοντας στην εξελικτική κλίμακα ο πρόσθιος εγκέφαλος αποκτά μεγαλύτερο όγκο συγκριτικά με τις υπόλοιπες δομές. Μάλιστα, σε ορισμένα θηλαστικά όπως στον άνθρωπο, τα εγκεφαλικά ημισφαίρια του πρόσθιου εγκεφάλου εκτοπίζουν όλες τις άλλες δομές κάτω από αυτά, ενώ παράλληλα δημιουργούνται πτυχώσεις στην επιφάνειά τους προκειμένου να χωρέσουν εντός της κρανιακής κοιλότητας.



Εικόνα 3. Αντιστοιχία των ανατομικών περιοχών του εγκεφάλου στο μυ και στον άνθρωπο.

Ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός προστατεύονται εντός της οστέινης κρανιακής κοιλότητας και της σπονδυλικής στήλης, αντίστοιχα. Προκειμένου να αποφευχθεί ο τραυματισμός του νευρικού ιστού από την άμεση επαφή με τα οστά, το ΚΝΣ περιβάλλεται από συνδετικό ιστό που σχηματίζει τρεις μήνιγγες: τη σκληρή, την αραχνοειδή και τη χοριοειδή, με κατεύθυνση από το οστό προς το νευρικό ιστό. Οι δύο τελευταίες είναι αγγειοβριθείς για την αποτελεσματική αιμάτωση του ΚΝΣ. Επιπλέον, κατά μήκος του ενήλικου εγκεφάλου συναντώνται τέσσερις μεγάλες κοιλότητες, οι κοιλίες (Noback et al., 2005a). Οι δύο μεγαλύτερες κοιλίες βρίσκονται μέσα στα ημισφαίρια του τελεγκεφάλου και ονομάζονται πλευρικές κοιλίες, η τρίτη βρίσκεται στο διεγκέφαλο και η τέταρτη στο μυελεγκέφαλο. Όλες οι κοιλίες επικοινωνούν μεταξύ τους αλλά και με την περιοχή μεταξύ αραχνοειδούς και χοριοειδούς μήνιγγας (υπαραχνοειδής χώρος), από ειδικά σημεία.

Εντός των κοιλιών, ένας πληθυσμός τροποποιημένων επενδυματικών κυττάρων

μαζί με τριχοειδή σχηματίζουν μια δομή που ονομάζεται χοριοειδές πλέγμα (choroid plexus) και είναι υπεύθυνη για την παραγωγή του εγκεφαλονωτιαίου υγρού, υπό σταθερό ρυθμό (Noback et al., 2005a). Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό γεμίζει τις κοιλίες, κυκλοφορεί γύρω από τον εγκέφαλο στον υπαραχνοειδή χώρο, απορροφάται από τα αγγεία των μηνίγγων και αναγεννάται από το χοριοειδές πλέγμα. Ρόλος του είναι η μεταφορά τροφικών παραγόντων στο εγκεφαλικό παρέγχυμα και η απορρόφηση των κραδασμών, ώστε να αποτρέπεται ο τραυματισμός του νευρικού ιστού.

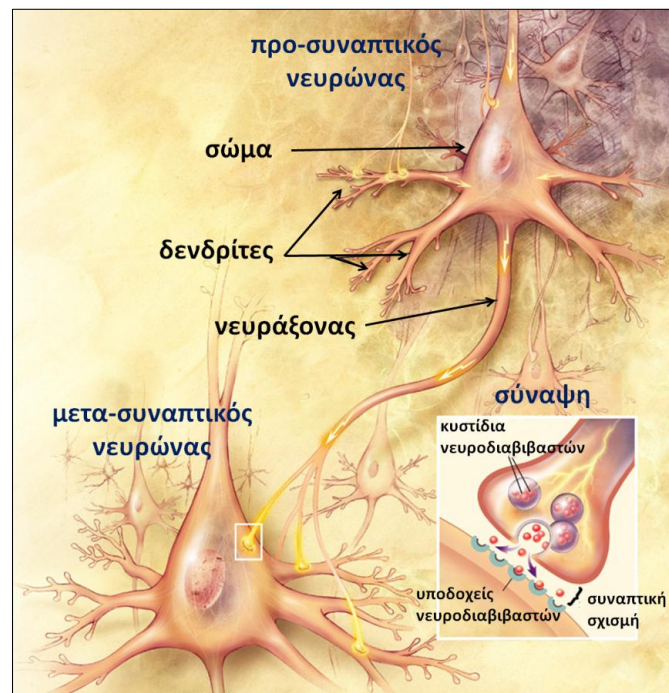
1.2.2. Κυτταρική σύσταση του νευρικού συστήματος

Το νευρικό σύστημα απαρτίζεται από δύο βασικές κατηγορίες κυττάρων, τους **νευρώνες** και τη **(νευρο)γλοία**, οι οποίες διακρίνονται περαιτέρω σε υποκατηγορίες που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη δομή, τη λειτουργία και το βιοχημικό τους χαρακτήρα (Azevedo et al., 2009). Η πολυπλοκότητα του νευρικού συστήματος οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη λειτουργία των νευρώνων, που περιλαμβάνει τη λήψη, την επεξεργασία και τη διαβίβαση πληροφοριών και ερεθισμάτων. Από την άλλη, η γλοία συνιστά την πολυπληθέστερη ομάδα του νευρικού συστήματος, εφόσον υπερτερεί αριθμητικά των νευρώνων κατά δέκα φορές. Αρχικά θεωρούνταν η «κόλλα» που παρέχει αποκλειστικά δομική υποστήριξη στους νευρώνες, ωστόσο με την πάροδο του χρόνου, πληθώρα βιβλιογραφικών μελετών έχουν καταδείξει τον ενεργό ρόλο που διαδραματίζουν τα νευρογλοιακά κύτταρα στο ΚΝΣ, είτε υποστηρίζοντας τροφικά και λειτουργικά τους νευρώνες, είτε αποκρινόμενα σε αλλαγές της ομοιόστασης και υιοθετώντας μία δυναμική/ενεργοποιημένη κατάσταση για τη διατήρηση ενός υγιούς περιβάλλοντος στο εγκεφαλικό παρέγχυμα (Allen and Barres, 2009).

1.2.2.1. Οι νευρώνες

Οι νευρώνες αποτελούνται από τρία διακριτά μέρη: το σώμα (ή περικάρυο), τον άξονα (ή νευράξονα) και τους δενδρίτες (**Εικόνα 4**). Το σώμα συνιστά το μεταβολικό κέντρο του νευρικού κυττάρου, από το οποίο προεκβάλλει ο νευράξονας, μία ειδική απόληξη μοναδική για κάθε νευρώνα (Noback et al., 2005b; Tortora and Derrickson, 2016). Εντός του νευράξονα δε συντίθενται πρωτεΐνες αλλά μεταφέρονται κατά μήκος του από το κυτταρικό σώμα προς άλλους και συνήθως πολλαπλούς στόχους, μέσω μίας

διαδικασίας που ονομάζεται αξονική μεταφορά. Το άκρο κάθε νευράξονα φέρει πολυάριθμες διακλαδώσεις που καταλήγουν σε εξειδικευμένες προσυναπτικές απολήξεις και έρχονται σε επαφή με τις δεκτικές επιφάνειες ενός ή περισσοτέρων νευρώνων ή μυϊκών κυττάρων, οι οποίες καλούνται μετασυναπτικές απολήξεις. Η προσυναπτική μαζί με τη μετασυναπτική απόληξη και το διάστημα που τις χωρίζει (συναπτική σχισμή) αποτελούν τη σύναψη (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση των μορφολογικών χαρακτηριστικών ενός νευρώνα και της σύναψής του. Προσαρμογή από courses.lumenlearning.com.

Έτσι το σήμα μεταδίδεται από έναν προσυναπτικό προς ένα μετασυναπτικό νευρώνα μέσω μίας ή περισσοτέρων συνάψεων, οι οποίες στο νευρικό σύστημα των θηλαστικών είναι κατά κανόνα χημικές. Δηλαδή ένα ηλεκτρικό σήμα παράγεται στο σώμα, φτάνει μέσω του νευράξονα στη σύναψη και μετατρέπεται σε χημικό με την απελευθέρωση χημικών μορίων (νευροδιαβιβαστές) από την προσυναπτική μεμβράνη. Στη συνέχεια, οι νευροδιαβιβαστές δεσμεύονται από τη μετασυναπτική μεμβράνη και το χημικό σήμα μετατρέπεται εκ νέου σε ηλεκτρικό στο κύτταρο «δέκτη». Τέλος, οι денδρίτες αποτελούν λεπτές διακλαδιζόμενες απολήξεις που προεκβάλλουν από το σώμα και διατρέχονται εσωτερικά από κυτταροσκελετικά στοιχεία και μιτοχόνδρια. Ρόλος τους είναι η «υποδοχή» των χημικών σημάτων που φτάνουν εκεί μέσω των συνάψεων με τους άξονες άλλων νευρώνων και η μεταφορά τους στο σώμα.

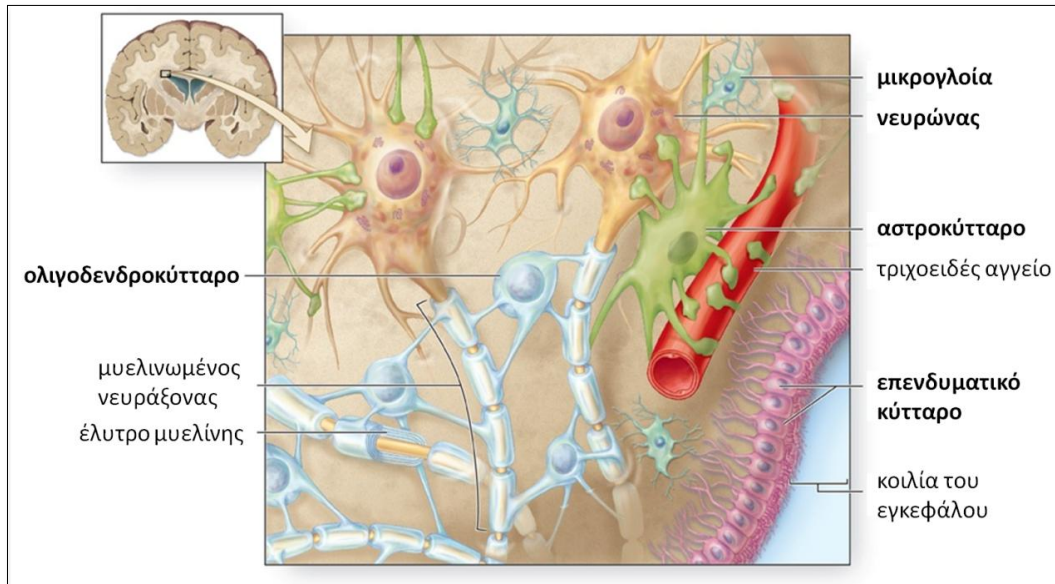
Οι νευρώνες ταξινομούνται σε διάφορες κατηγορίες με βάση τον αριθμό των νευρικών τους απολήξεων, τη μορφολογία των δενδριτών, το μήκος του νευράξονα, το είδος των κυττάρων με τα οποία δημιουργούν συνάψεις και τέλος το είδος των εκλυόμενων νευροδιαβιβαστών (Noback et al., 2005b). Έτσι, έχοντας ως κριτήριο τη μορφολογία, ορισμένοι νευρώνες χαρακτηρίζονται ως πυραμιδικοί, λόγω του πυραμιδικού σώματός τους, ενώ με κριτήριο τις συνάψεις που δημιουργούν, διακρίνονται σε διάμεσους (interneurons) και νευρώνες προβολής (projection neurons). Οι διάμεσοι νευρώνες είναι σχετικά μικροί και δημιουργούν συνδέσεις στην ίδια περιοχή του νευρικού συστήματος, ενώ οι νευρώνες προβολής διακρίνονται για το μεγάλο μήκος του νευράξονά τους και μπορούν να μεταφέρουν μηνύματα σε μακρινές αποστάσεις συνδέοντας έτσι διαφορετικές περιοχές του νευρικού συστήματος, όπως τον εγκεφαλικό φλοιό με τον υποθάλαμο. Επιπλέον, οι παραπάνω νευρώνες διαφέρουν μεταξύ τους και ως προς τους νευροδιαβιβαστές που εκλύουν στις συνάψεις τους. Έτσι, οι διάμεσοι νευρώνες χρησιμοποιούν ως νευροδιαβιβαστή κυρίως το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) ενώ οι νευρώνες προβολής κυρίως το γλουταμινικό οξύ.

1.2.2.2. Τα κύτταρα της γλοίας και η συμβολή τους στην ομαλή λειτουργία του νευρικού συστήματος

Η γλοία στο ΚΝΣ περιλαμβάνει κυρίως τα αστροκύτταρα, τη μικρογλοία, τα ολιγοδενδροκύτταρα και τα επενδυματικά κύτταρα (**Εικόνα 5**). Οι νευρώνες μπορούν να ενεργοποιήσουν τη γλοία μέσω διάφορων νευροδιαβιβαστών ή τροποποιητών, όπως το γλουταμινικό οξύ, η φρακταλκίνη, το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και άλλοι (Liu et al., 2006; Verge et al., 2004). Αντιστρόφως, η ενεργοποιημένη γλοία ρυθμίζει τη νευρωνική λειτουργία και συμμετέχει στην αντιμετώπιση διάφορων παθολογικών καταστάσεων, όπως νευροεκφυλιστικών νόσων, ισχαιμίας και μηχανικού τραυματισμού, απελευθερώνοντας πληθώρα προφλεγμονωδών ή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, χημειοκινών, αυξητικών και νευροτροφικών παραγόντων.

Τα κύτταρα του νευρικού συστήματος των θηλαστικών προκύπτουν σταδιακά κατά την εμβρυική ανάπτυξη από εκτοδερμικής προέλευσης πολυδύναμα νευρικά βλαστικά κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε πρόδρομα κύτταρα νευρώνων ή γλοίας. Οι ώριμοι νευρώνες προκύπτουν από νευρωνικά προγονικά κύτταρα μέσω μιας διαδικασίας που ολοκληρώνεται κατά ένα μεγάλο μέρος πριν τη

γέννηση και καλείται νευρογένεση, ενώ τα κύτταρα της γλοίας, πλην της μικρογλοίας, προκύπτουν από γλοιακά προγονικά κύτταρα μέσω μιας διαδικασίας που καλείται γλοιογένεση (Lee et al., 2015).



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση των κυττάρων της γλοίας. Οι διάφοροι τύποι των κυττάρων της γλοίας αλληλεπιδρούν με τους νευρώνες και τα περιβάλλοντα αγγεία. Τα αστροκύτταρα εκτείνουν τις απολήξεις τους και καλύπτουν την επιφάνεια των αγγείων και των νευρικών συνάψεων. Η μικρογλοία επιτηρεί το εγκεφαλικό μικροπεριβάλλον και ανιχνεύει πιθανές βλάβες ή εισβολές παθογόνων. Τα ολιγοδενδροκύτταρα παρέχουν το έλυτρο της μυελίνης που μονώνει τους νευράξονες για αποτελεσματικότερη μετάδοση των νευρωνικών ώσεων. Τα επενδυματικά κύτταρα καλύπτουν τις επιφάνειες των κοιλιών και βοηθούν στη διακίνηση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (προσαρμογή από The McGraw-Hill Companies, Inc.).

1.2.2.2.1. Αστροκύτταρα

Τα αστροκύτταρα αποτελούν τον πλέον πολυάριθμο μη νευρωνικό κυτταρικό τύπο στο ΚΝΣ, καταλαμβάνοντας περίπου το 50% του όγκου του ανθρώπινου εγκεφάλου (Tower and Young, 1973). Σε γενικές γραμμές, διαθέτουν ένα κεντρικό κυτταρικό σώμα, διαμέτρου ~15-17 μm , και μακριές απολήξεις που εκτείνονται προς κάθε κατεύθυνση και δημιουργούν επαφές μεταξύ τους μέσω χασματικών συνδέσεων (gap junctions), σχηματίζοντας έτσι δίκτυα συζευγμένων αστροκυττάρων (Chen and Swanson, 2003). Οι αστροκυτταρικές απολήξεις περιβάλλουν τις νευρικές συνάψεις και παράλληλα επικοινωνούν με την εξωτερική επιφάνεια των τριχοειδών αγγείων, ρυθμίζοντας την ακεραιότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, ενός εξαιρετικά εκλεκτικού φραγμού διαπερατότητας που διαχωρίζει την κυκλοφορία του αίματος από το εξωκυττάριο υγρό του εγκεφάλου, προστατεύοντας το νευρικό ιστό από τοξίνες και

παθογόνα (Daneman and Prat, 2015). Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός συνίσταται από ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων με περίπλοκο δίκτυο στενών συνδέσεων (tight junctions), περικύτταρα και απολήξεις αστροκυττάρων που ακουμπούν στο ενδοθήλιο και τη βασική του μεμβράνη. Κατά συνέπεια, τα αστροκύτταρα ενεργούν ως «γέφυρα» μεταξύ όλων των κυτταρικών τύπων του ΚΝΣ, συμπεριλαμβανομένων των νευρώνων, των ενδοθηλιακών κυττάρων, των ίδιων των αστροκυττάρων, καθώς και των ολιγοδενδροκυττάρων και της μικρογλοίας, όπως θα περιγραφεί στη συνέχεια.

Τα αστροκύτταρα διακρίνονται σε τρεις κύριους τύπους ανάλογα με τη μορφολογία και τη χωρική τους κατανομή: τα **ακτινωτά** αστροκύτταρα που είναι προσανατολισμένα κατακόρυφα στις επιφάνειες των κοιλιών και έχουν μακριές μη διακλαδιζόμενες απολήξεις, τα **πρωτοπλασματικά** αστροκύτταρα της φαιάς ουσίας που έχουν «θαμνώδη» μορφολογία με πολυάριθμες διακλαδιζόμενες απολήξεις και τα **ινώδη** αστροκύτταρα που απαντώνται στη λευκή ουσία και επιδεικνύουν περισσότερο αστεροειδή σχήματα, με λείες μακριές απολήξεις λιγότερο διακλαδισμένες. Εκείνα που βρίσκονται στα όρια μεταξύ φαιάς και λευκής ουσίας εμφανίζουν μια ενδιάμεση μορφολογία μεταξύ ινωδών και πρωτοπλασματικών αστροκυττάρων (Miller and Raff, 1984; Tabata, 2015). Η όξινη ινώδης γλοιακή πρωτεΐνη (Glial fibrillary acidic protein, GFAP) και η S100β (μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που δεσμεύει Ca^{2+}) συχνά χρησιμοποιούνται ως αστροκυτταρικοί δείκτες (Eng et al., 2000; Ludwin et al., 1976). Η GFAP είναι μια αστροκυτταρο-ειδική πρωτεΐνη της οικογένειας των ενδιάμεσων ινιδίων, η έκφραση της οποίας είναι απαραίτητη για την ομαλή λειτουργία των ινωδών αστροκυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της διατήρησης της λευκής ουσίας του ΚΝΣ και της ακεραιότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Kakinuma et al., 1998; Liedtke et al., 1996). Ωστόσο, η πλειοψηφία των πρωτοπλασματικών αστροκυττάρων της φαιάς ουσίας δεν εκφράζει αρκετή GFAP ώστε να δώσει θετική χρώση με τις συνηθισμένες ανοσοϊστοχημικές μεθόδους (Walz, 2000).

Κατά την ομοίωση, τα αστροκύτταρα παρέχουν αφ' ενός μηχανική υποστήριξη στο νευρικό ιστό και αφ' ετέρου ρυθμίζουν το νευρωνικό μικροπεριβάλλον, διενεργώντας την πρόσληψη του τοξικού γλουταμινικού οξέος γύρω από τις συνάψεις, μέσω εξαρτημένων μεταφορέων Na^+ και διατηρώντας την εξωκυττάρια συγκέντρωσή του κάτω από τα τοξικά επίπεδα (Anderson and Swanson, 2000). Οι μεταφορείς γλουταμινικού και ασπαρτικού οξέος GLAST/SLC1A3 και GLT-1/SLC1A2 κλωνοποιήθηκαν

αρχικά στον εγκέφαλο επίμυων και τα ανθρώπινα ομόλογά τους είναι γνωστά ως EAAT1 και EAAT2, αντίστοιχα. Εντός των αστροκυττάρων το εισερχόμενο γλουταμινικό οξύ μεταβολίζεται στη μη τοξική γλουταμίνη, υπό τη δράση του ενζύμου συνθετάση της γλουταμίνης, και εν συνεχεία απελευθερώνεται στη συναπτική σχισμή για επαναπρόσληψη από τους νευρώνες, όπου μετατρέπεται εκ νέου σε γλουταμινικό οξύ. Ένα μεγάλο μέρος της ολικής ανακύκλωσης/σύνθεσης ATP του εγκεφάλου δαπανάται στην ενεργητική μεταφορά του γλουταμινικού μέσω της αστροκυτταρικής μεμβράνης. Συνεπώς, δεδομένου του υψηλού ενεργειακού κόστους της συγκεκριμένης διεργασίας, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι ένας εκτεταμένος τραυματισμός του ΚΝΣ οδηγεί σε απορρύθμιση της ομοιόστασης του γλουταμινικού οξέος, μειωμένη έκφραση των αντίστοιχων μεταφορέων και μαζική αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσής του (Liu et al., 2010a; Rao et al., 1998; van Landeghem et al., 2006; Yi and Hazell, 2006).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα αστροκύτταρα συμμετέχουν στην περικοπή (pruning) μέσω φαγοκυττάρωσης και τη λειτουργικότητα των συνάψεων, καθώς επίσης εκκρίνουν μια πληθώρα νευροτροφικών και αυξητικών παραγόντων (Bylicky et al., 2018; Chung et al., 2013; Sofroniew and Vinters, 2010). Ακόμη, λόγω του περιορισμού που θέτει ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός στην ανταλλαγή λιποπρωτεϊνών με την περιφέρεια, τα αστροκύτταρα είναι οι κύριοι παραγωγοί και αποκλειστικοί προμηθευτές χοληστερόλης και άλλων λιπιδίων στον ενήλικο εγκέφαλο (Pfrieger and Ungerer, 2011; Sidoryk-Wegrzynowicz et al., 2011). Έχει προταθεί ότι η χοληστερόλη, που αποτελεί κύριο συστατικό των μεμβρανικών λιπιδικών σχεδίων, είναι απαραίτητη προσυναπτικά για το σχηματισμό των συναπτικών κυστιδίων και μετασυναπτικά για τη συνάθροιση και τη σταθερότητα των υποδοχέων των νευροδιαβιβαστών. Συνεπώς, ο αστροκυτταρικός μεταβολισμός των λιπιδίων, τα οποία προσλαμβάνονται κυρίως από νευρώνες, είναι καθοριστικής σημασίας για το σχηματισμό, την ωρίμανση και τη λειτουργία των συνάψεων *in vivo* (van Deijk et al., 2017).

Σε παθολογικές καταστάσεις, τα αστροκύτταρα υφίστανται δραματικές μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές, «ενεργοποιούνται» και ανάλογα με τις συνθήκες υιοθετούν έναν νευροτοξικό ή νευροπροστατευτικό φαινότυπο (Burda et al., 2016; Bylicky et al., 2018; Myer et al., 2006). Ακολουθώντας μια ορολογία που αντιστοιχεί στην ονοματολογία M1 και M2 των μακροφάγων (Biswas and Mantovani, 2010; Sica and Mantovani, 2012), τα νευροτοξικά/προφλεγμονώδη αστροκύτταρα, που

ενεργοποιούνται έπειτα από μία φλεγμονώδη κατάσταση, όπως η παρουσία λιποπολυσακχαρίτη (LPS) στο εγκεφαλικό παρέγχυμα, καλούνται αστροκύτταρα τύπου A1, σε αντιδιαστολή με τα νευροπροστατευτικά/αντιφλεγμονώδη αστροκύτταρα, γνωστά ως τύπου A2, τα οποία επάγονται στο πλαίσιο ποικίλων τραυματισμών του εγκεφάλου, όπως η ισχαιμική βλάβη, και παράγουν νευροτροφικούς παράγοντες και μόρια που σχετίζονται με την επιβίωση των νευρώνων και την ιστική επιδιόρθωση (Liddelow et al., 2017; Zamanian et al., 2012). Τα αστροκύτταρα τύπου A1 απαντώνται σε διάφορες νευροεκφυλιστικές νόσους στον άνθρωπο και σε μοντέλα τρωκτικών, ιδιαίτερα γύρω από περιοχές αυξημένης παθολογίας, όπου και απελευθερώνουν διαλυτούς παράγοντες που οδηγούν στο θάνατο τόσο νευρώνες όσο και ολιγοδενδροκύτταρα. Οι δύο αυτοί αστροκυτταρικοί τύποι διακρίνονται με βάση τη λειτουργικότητα και τα χαρακτηριστικά γονιδιακά προφίλ τους (Liddelow et al., 2017; Zamanian et al., 2012). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι νευροτροφικοί παράγοντες που απελευθερώνονται από τα αστροκύτταρα είναι, μεταξύ άλλων, απαραίτητοι για την ανάπλαση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μετά από τραυματισμό, ώστε να καταληφθεί ο κενός χώρος και να σχηματιστεί η νευρογλοιακή ουλή (glial scar) που θα αντικαταστήσει τα κύτταρα που δε μπορούν να αναγεννηθούν και θα περιορίσει την εξάπλωση της φλεγμονής στον περιβάλλοντα υγιή ιστό (Escartin and Bonvento, 2008).

1.2.2.2.2. Μικρογλοία

Η μικρογλοία αποτελεί περίπου το 10-20% των νευρογλοιακών κυττάρων και παραδοσιακά θεωρείται ως η πρώτη γραμμή άμυνας, αντιπροσωπεύοντας το ενδογενές ανοσοποιητικό σύστημα του εγκεφάλου. Κατά την ομοιόσταση, η μικρογλοία διαθέτει πολυσχιδείς απολήξεις, επιτηρώντας αδιάλειπτα το εγκεφαλικό παρέγχυμα και αναζητώντας πιθανές εγκεφαλικές βλάβες (Nimmerjahn et al., 2005; Szepesi et al., 2018). Τα μικρογλοιακά κύτταρα ενεργοποιούνται άμεσα όταν ανιχνεύσουν παράγοντες που διαταράσσουν την ομοιόσταση, όπως LPS, παράγοντες κυτταρικής νέκρωσης ή προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (Davalos et al., 2005). Κατά την ενεργοποίησή τους, η μορφολογία τους αλλάζει και από μικρό κυτταρικό σώμα με λεπτές απολήξεις αποκτούν υπερτροφικό σώμα με αμοιβαδοειδείς απολήξεις, καθώς επίσης υφίστανται ταχύ πολλαπλασιασμό (Kim and de Vellis, 2005). Μάλιστα, διάφορες πρωτεΐνες κυτταρικής επιφανείας, όπως υποδοχείς του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC),

δείκτες των T- και B-λεμφοκυττάρων και άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, αρχίζουν να εμφανίζονται στα μικρογλοιακά κύτταρα, γεγονός που τα καθιστά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Chavarria and Alcocer-Varela, 2004).

Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα κύτταρα της γλοίας, η μικρογλοία είναι μεσοδερμικής προέλευσης και κύρια πηγή της είναι τα αρχέγονα μακροφάγα του λεκιθικού ασκού (Ginhoux et al., 2013). Έτσι, πολύ νωρίς κατά την εμβρυική ανάπτυξη ορισμένα προγονικά κύτταρα μεταναστεύουν από το λεκιθικό ασκό στον εγκέφαλο, μέσω της αραχνοειδούς και χοριοειδούς μήνιγγας και των πλευρικών κοιλιών, προτού ολοκληρωθεί η ωρίμανση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Ginhoux et al., 2010). Εκεί εγκαθίστανται και διαφοροποιούνται περαιτέρω δίνοντας τα ώριμα μικρογλοιακά κύτταρα, τα οποία διατηρούνται και στον ενήλιο εγκέφαλο. Σύμφωνα με διάφορες βιβλιογραφικές αναφορές στις οποίες έχει μελετηθεί η πορεία των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων, έχει αποκλειστεί η συνεισφορά της αιμοποίησης του μυελού των οστών ή του ήπατος στη μικρογλοία του εγκεφάλου. Μάλιστα, παρόλο που τα μονοκύτταρα μπορούν να μεταναστεύσουν στο νεογνικό ή τον ενήλιο εγκέφαλο και να διαφοροποιηθούν σε μικρογλοία, αυτό συμβαίνει μόνο σε περιπτώσεις φλεγμονής και ο φαινότυπος των κυττάρων αυτών είναι διαφορετικός από εκείνον της ενδογενούς μικρογλοίας (Tay et al., 2017).

Παρόμοια με όσα περιγράφηκαν για τα αστροκύτταρα και ανάλογα με τις συνθήκες, η ενεργοποιημένη μικρογλοία υιοθετεί είτε προφλεγμονώδη/νευροτοξικό είτε αντιφλεγμονώδη/νευροπροστατευτικό φαινότυπο. Σε αντιστοιχία με την ονοματολογία των M1/M2 μακροφάγων, οι δύο μικρογλοιακοί φαινότυποι αναφέρονται συχνά ως μικρογλοία τύπου M1 και M2, αντίστοιχα (Fumagalli et al., 2011; Loane and Kumar, 2016; Michell-Robinson et al., 2015). Στο πλαίσιο παθολογικών καταστάσεων, η διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ μικρογλοίας και αστροκυττάρων είναι ιδιαίτερα σημαντική για το συντονισμό της φλεγμονής και της ιστικής επιδιόρθωσης και αναδιαμόρφωσης (Donat et al., 2017; Karve et al., 2016). Μάλιστα, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες η ενεργοποιημένη προφλεγμονώδης μικρογλοία οδηγεί τα αστροκύτταρα προς έναν φαινότυπο τύπου A1 (Liddel et al., 2017) και, αντίστροφα, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα μπορούν να ασκήσουν αρνητική (κατασταλτική) επίδραση στην ενεργοποίηση της μικρογλοίας (Gao et al., 2013).

1.2.2.2.3. Ολιγοδενδροκύτταρα

Τα ολιγοδενδροκύτταρα περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1899 από το σκωτσέζο παθολόγο W. Ford Robertson, ως μικρού μεγέθους κύτταρα με λίγες και βραχείες απολήξεις. Βρίσκονται τόσο στη φαιά όσο και στη λευκή ουσία και είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία του ελύτρου της μυελίνης, μιας εξειδικευμένης μεμβράνης που διαθέτει άφθονη ξηρή μάζα λιπιδίων (70-85%) συγκριτικά με πρωτεΐνες (15-30%). Κάθε ολιγοδενδροκύτταρο είναι υπεύθυνο για τη μυελίνωση κατά μέσο όρο 30 διαφορετικών νευραξόνων (με μέγιστο αριθμό τους 60), συμβάλλοντας στην αποδοτικότερη και ταχύτερη μετάδοση των νευρικών ώσεων. Τα ολιγοδενδροκύτταρα προέρχονται από πρόδρομα ολιγοδενδροκύτταρα (Oligodendrocyte Precursor Cells, OPCs), τα οποία διαφοροποιούνται σε ανώριμα, ακολουθούμενα από ώριμα μυελινοπαραγωγά ολιγοδενδροκύτταρα (Bradl and Lassmann, 2010; Miller, 2002). Τα ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα εκφράζουν σημαντικές μεμβρανικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης (myelin basic protein, MBP), των γλυκοπρωτεϊνών MAG (myelin-associated glycoprotein) και MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) και της πρωτεολιπιδικής πρωτεΐνης της μυελίνης ή λιποφιλίνης (proteolipid protein, PLP) (Bordner et al., 2011).

Τα ολιγοδενδροκύτταρα παρέχουν τροφική υποστήριξη στους νευρώνες απελευθερώνοντας γαλακτικό οξύ, πυροσταφυλικό οξύ και κετονοσώματα, μέσω του μεταφορέα MCT1 (monocarboxylate transporter-1) (Lee et al., 2012b). Ακόμη, τόσο τα ώριμα όσο και τα πρόδρομα ολιγοδενδροκύτταρα συνιστούν σημαντική πηγή νευροτροφινών, όπως η νευροτροφίνη 3 (NT-3), αυξητικών παραγόντων, όπως οι NGF (nerve growth factor), IGF1 (insulin-like growth factor-1) και GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), και κυτταροκινών της υπεροικογένειας του TGFβ, όπως οι TGFβs και ο BDNF (Bottner et al., 2000). Η έκφραση των παραπάνω αυξητικών παραγόντων έχει συνδεθεί αφ' ενός με τη νευρωνική επιβίωση και αφ' ετέρου με τον αυτοκρινή έλεγχο του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης των ανώριμων ολιγοδενδροκυττάρων και των O-2A προγονικών κυττάρων (Oligodendrocyte/type-2 Astrocyte progenitor cells). Τα O-2A προγονικά κύτταρα εκφράζουν τις ισομορφές TGFβ1 και TGFβ3, τα ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα τις ισομορφές TGFβ2 και TGFβ3, ενώ σε καλλιέργειες ολιγοδενδροκυττάρων έχουν βρεθεί και οι τρεις ισομορφές (McKinnon et al., 1993).

Επειδή τα ολιγοδενδροκύτταρα είναι μεταμιτωτικά, οποιοσδήποτε τραυματισμός ή νόσος του ΚΝΣ ενδέχεται να προκαλέσει απομυελίνωση με επακόλουθη απώλεια της νευρωνικής λειτουργίας. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, τα ολιγοδενδροκύτταρα μπορούν να αντικατασταθούν από NG2⁺ πρόδρομα ολιγοδενδροκύτταρα, τα οποία απαντώνται σε όλο το ενήλικο ΚΝΣ (Kuhn et al., 2019; Polito and Reynolds, 2005). Να σημειωθεί ότι στο ΠΝΣ, το έλυτρο μυελίνης που καλύπτει τους νευράξονες των περιφερικών νεύρων σχηματίζεται από ένα σύνολο κυττάρων, αντίστοιχων των ολιγοδενδροκυττάρων, που καλούνται κύτταρα Schwann.

1.2.2.2.4. Επενδυματικά κύτταρα

Τα επενδυματικά κύτταρα καλύπτουν την επιφάνεια των κοιλιών του νευρικού συστήματος, διατηρώντας την επιθηλιακή τους διάταξη. Τα περισσότερα διαθέτουν κροσσούς που βοηθούν στη διακίνηση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού, ενώ η απουσία στενών συνδέσεων επιτρέπει σε παράγοντες του εγκεφαλονωτιαίου υγρού να διαχέονται στον υποκείμενο νευρικό ιστό (Jimenez et al., 2014). Ένας ιδιαίτερος τύπος επενδυματικών κυττάρων είναι τα τανυκύτταρα (tanycytes) που βρίσκονται στην τρίτη και στη βάση της τέταρτης κοιλίας και χαρακτηρίζονται από μακριές απολήξεις που εκτείνονται στον υποθάλαμο. Πιστεύεται ότι τα τανυκύτταρα συμμετέχουν στη μεταφορά χημικών σημάτων από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό προς το ΚΝΣ (Mullier et al., 2010), ενώ έχει δειχθεί ότι λειτουργούν *in vivo* ως νευρογενής περιοχή που αποκρίνεται σε τροφικά ερεθίσματα (Lee et al., 2012a).

1.2.3. Παθοφυσιολογία του κεντρικού νευρικού συστήματος

1.2.3.1. Η κρανιοεγκεφαλική κάκωση

Ως κρανιοεγκεφαλική κάκωση (Traumatic Brain Injury, ΚΕΚ) ορίζεται η αλλοίωση στη δομή και λειτουργία του εγκεφάλου που προκαλείται από κάποια εξωτερική μηχανική δύναμη (Menon et al., 2010). Σύμφωνα με πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες, οι ΚΕΚ επηρεάζουν περισσότερα από 60 εκατομμύρια άτομα ετησίως, γι' αυτό συχνά χαρακτηρίζονται ως «σιωπηρή επιδημία» (Dewan et al., 2018; Maas et al., 2017). Μαζί με τις βλάβες του νωτιαίου μυελού μετά από τραυματισμό, οι ΚΕΚ συμβάλλουν στην εμφάνιση υψηλών επιπέδων θνησιμότητας, αναπηρίας και νοητικών διαταραχών

σε παγκόσμιο επίπεδο (Dewan et al., 2018; Majdan et al., 2016). Μάλιστα, στις ανεπτυγμένες χώρες, οι ΚΕΚ αποτελούν την κύρια αιτία θανάτου σε άτομα ηλικίας μικρότερης των 45 ετών. Το μεγαλύτερο ποσοστό των ΚΕΚ σε ενήλικες οφείλεται κυρίως σε αυτοκινητιστικά ατυχήματα και λιγότερο σε αθλητικούς τραυματισμούς, ενώ η εμφάνιση κακώσεων σε παιδιά αποδίδεται κυρίως σε πτώσεις ή περιστατικά κακοποίησης.

Επειδή οι ΚΕΚ αποτελούν μία σύνθετη και ιδιαίτερα ετερογενή παθολογική κατάσταση, η κατανόηση και η αντιμετώπισή τους διευκολύνονται από την κατηγοριοποίησή τους με συγκεκριμένα κριτήρια, όπως ο μηχανισμός πρόκλησης, η βαρύτητα της κάκωσης και η μορφολογία του τραύματος. Αναφορικά με το **μηχανισμό** πρόκλησης της βλάβης, οι ΚΕΚ διακρίνονται σε κλειστές (closed) και διατιτραίνουσες ή διεισδυτικές (penetrating head injuries) (Ng and Lee, 2019). Στην περίπτωση της κλειστής ΚΕΚ δεν υπάρχει έκθεση του εγκεφάλου στο εξωτερικό περιβάλλον και οι βλάβες είναι ενδοεγκεφαλικές και διάχυτες, όπως για παράδειγμα μετά από πτώση, αυτοκινητιστικό ατύχημα ή άσκηση βίας. Αντίθετα, στη διεισδυτική ΚΕΚ το κρανίο διαπερνάται και η σκληρή μήνιγγα διαρρηγνύεται, με επακόλουθη έκθεση του εγκεφαλικού παρεγχύματος στο περιβάλλον, όπως στην περίπτωση τραυματισμού από πυροβόλο όπλο ή αιχμηρό αντικείμενο. Αναφορικά με το μηχανισμό πρόκλησης, οι ΚΕΚ μπορούν να διακριθούν σε δύο ακόμη υποκατηγορίες, εκείνες που οφείλονται σε μια γραμμική επιτάχυνση-επιβράδυνση, κατά την οποία ο εγκέφαλος προσκρούει στην ανελαστική επιφάνεια του κρανίου (rebound injury), και εκείνες που οφείλονται στην περιστροφική επιτάχυνση (rotational injury). Στη δεύτερη περίπτωση, η εγκεφαλική βλάβη προκαλείται από τη διαφορική επιτάχυνση, λόγω διαφορετικού ειδικού βάρους μεταξύ φαιάς και λευκής ουσίας, με αποτέλεσμα την απόσχιση των νευραξόνων.

Αναφορικά με τη **βαρύτητα** του τραύματος, οι ΚΕΚ διακρίνονται σε ήπιες/ελαφριές (mild), μέτριες (moderate) και σοβαρές/βαριές (severe), σύμφωνα με την Κλίμακα Κώματος Γλασκώβης (Glasgow Coma Scale), κατά την οποία αξιολογείται η ικανότητα του ασθενούς να εκτελέσει απλές νευρολογικές δοκιμασίες (Lizzo and Waseem, 2020; Teasdale and Jennett, 1974).

1.2.3.1.1. Παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά της κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης

Η νευρική βλάβη στην ΚΕΚ είναι απόρροια ενός άμεσου ή πρωτογενούς

τραυματισμού και επακόλουθων έμμεσων ή δευτερογενών τραυματισμών, που οδηγούν σε προσωρινές ή μόνιμες νευρολογικές αλλοιώσεις. Ανάλογα με την έκταση της βλάβης, ο **πρωτογενής μηχανικός τραυματισμός** διακρίνεται σε εστιακό, εάν αφορά μια εντοπισμένη περιοχή του εγκεφάλου, και γενικευμένο ή διάχυτο, εάν χαρακτηρίζεται από ευρύτερη κατανομή. Κατά τον εστιακό τραυματισμό σχηματίζεται μια νεκρωτική περιοχή νευρικών και γλοιακών κυττάρων που καταλαμβάνει τον πυρήνα του τραύματος, και εκδηλώνονται αγγειακές βλάβες, συνοδευόμενες από την εμφάνιση αιματώματος και αιμορραγίας σε περιορισμένα όμως στρώματα του εγκεφάλου (Schmidt et al., 2004). Ανάλογα με τη βαρύτητα της κάκωσης, η εστιακή βλάβη μπορεί να οδηγήσει σε νοητικές διαταραχές, συμπεριφορικές και συναισθηματικές αλλαγές και παράλυση της μίας πλευράς του σώματος. Από την άλλη πλευρά, η διάχυτη ΚΕΚ χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη βλάβη των νευραξόνων (diffuse axonal injury), που μπορεί να συνεχίζεται ακόμη και μήνες μετά τον τραυματισμό, καταστροφή των ολιγοδενδροκυττάρων και του αγγειακού δικτύου, οδηγώντας σε οίδημα και ισχαιμικές βλάβες (Saatman et al., 2008; Smith et al., 2003). Μελέτες έχουν δείξει ότι η συνύπαρξη εστιακής και διάχυτης βλάβης είναι κοινή σε ασθενείς που πάσχουν από μέτρια ή σοβαρή ΚΕΚ (Skandsen et al., 2010).

Ο **δευτερογενής τραυματισμός** έχει συνδεθεί μηχανιστικά με πληθώρα κυτταρικών διεργασιών, με κυριότερες τη νευροφλεγμονή, τον εκφυλισμό των νευραξόνων, τη διεγερσιμοτοξικότητα και τη νευρωνική απόπτωση (Ng and Lee, 2019; Ray et al., 2002). Η διάρρηξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, έπειτα από ΚΕΚ, επιτρέπει τη διήθηση του εγκεφαλικού παρεγχύματος από ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα της περιφέρειας, διαδικασία που διευκολύνεται από την αυξημένη έκφραση μορίων κυτταρικής προσκόλλησης. Τα ενεργοποιημένα φλεγμονώδη κύτταρα μαζί με την ενδογενή μικρογλοία και τα δραστικά αστροκύτταρα απελευθερώνουν δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) και ένα σύνολο προφλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών, που συνεισφέρουν στην απομυελίνωση και την αποδιοργάνωση του κυτταροσκελετού των νευραξόνων, οδηγώντας έτσι σε οίδημα των τελευταίων και περιορισμό της νευρωνικής δραστηριότητας (Burda et al., 2016; Helmy et al., 2011; Jassam et al., 2017).

Επιπλέον, η υπερβολική συσσώρευση διεγερτικών νευροδιαβιβαστών στη συναπτική σχισμή, όπως το γλουταμινικό και το ασπαρτικό οξύ, λόγω διαρροής τους

από «ακρωτηριασμένους» νευρώνες, επαγόμενης από γλουταμινικό απελευθέρωσής τους από προσυναπτικές νευρικές απολήξεις ή παρεμπόδισης των μηχανισμών επαναπρόσληψής τους στον τραυματισμένο εγκέφαλο, επάγει την ενεργοποίηση των μετασυναπτικών υποδοχέων NMDA (N-methyl-d-aspartate) και AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) και την επακόλουθη εισροή ιόντων Ca^{2+} . Ταυτόχρονα με την απελευθέρωση ιόντων Ca^{2+} από τις ενδοκυττάρια αποθήκες του ενδοπλασματικού δικτύου, αυξάνεται η παραγωγή ROS και ενεργοποιούνται ένζυμα, όπως κασπάσες και καλπαΐνες. Ως αποτέλεσμα της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, μόρια όπως ο παράγοντας πρόκλησης απόπτωσης AIF και το κυτόχρωμα c απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα. Τα συγκεκριμένα κυτταρικά και μοριακά γεγονότα οδηγούν στην ενεργοποίηση της αποπτωτικής οδού Fas-Fas ligand, οδηγώντας σε ανεξάρτητο ή εξαρτώμενο από κασπάσες νευρωνικό θάνατο (Ng and Lee, 2019; Ray et al., 2002). Συνήθως, μετά τη φάση του δευτερογενούς τραυματισμού ακολουθεί η επούλωση, που συνίσταται στην αναδιοργάνωση του εγκεφαλικού ιστού σε μοριακό, ανατομικό και λειτουργικό επίπεδο (Galvano et al., 2017)

Παράλληλα με όσα ήδη περιγράφηκαν, μηνιγγικοί ινοβλάστες εισέρχονται στην περιοχή της βλάβης, πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν την ινωτική ουλή, εκκρίνοντας μαζί με ενεργοποιημένα αστροκύτταρα, περικύτταρα και φλεγμονώδη κύτταρα πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας, όπως κολλαγόνο, πρωτεογλυκάνες θεικής χονδροϊτίνης (Chondroitin Sulfate Proteoglycans, CSPGs) και άλλα (Burda and Sofroniew, 2014; Johns et al., 1992; Mikami and Kitagawa, 2013). Κατά την αστρογλοΐωση, οι απολήξεις των ενεργοποιημένων αστροκυττάρων δημιουργούν ένα μεθόριο νευρογλοϊακό σχηματισμό (glia limitans) που περιβάλλει την ινωτική ουλή, απομονώνει την τραυματισμένη περιοχή και παρεμποδίζει την επέκταση της φλεγμονής στον περιβάλλοντα υγιή ιστό (Komuta et al., 2010).

Μέχρι πρόσφατα, κυριαρχούσε η άποψη ότι η αστρογλοΐωση αναστέλλει την αναγέννηση των νευραξόνων και παρεμποδίζει την επανανεύρωση της τραυματισμένης περιοχής (Silver and Miller, 2004). Ωστόσο, σύγχρονες μελέτες προτείνουν ότι ο σχηματισμός της αστροκυτταρικής ουλής κυρίως επάγει παρά αναστέλλει την αξονική αναγέννηση (Anderson et al., 2016). Η παρεμπόδιση σχηματισμού της αστροκυτταρικής ουλής, αξιοποιώντας μοντέλα διαγονιδιακών μυών όπου είτε πεθαίνουν επιλεκτικά τα πολλαπλασιαζόμενα αστροκύτταρα που σχηματίζουν την ουλή είτε απαλείφεται

επιλεκτικά η STAT3 σηματοδότηση στα αστροκύτταρα, οδήγησε στην αναστολή της αναγέννησης νευραξόνων, έπειτα από τραυματισμό του νωτιαίου μυελού (Anderson et al., 2016). Επιπλέον, δείχθηκε ότι η αναγέννηση των νευραξόνων ενισχύεται από τα αστροκύτταρα που σχηματίζουν την ουλή, μέσω αυξημένης σύνθεσης των υποστηρικτικών μορίων CSPG4 (NG2) και CSPG5 (neuroglycan C). Τέλος, ανάλυση του μεταγραφώματος κυττάρων που βρίσκονται στην τραυματισμένη περιοχή έδειξε την έκφραση διάφορων επαγωγικών για την αξονική αναγέννηση παραγόντων, όπως οι λαμνίνες.

1.2.3.1.2. Ζωικά μοντέλα προσομοίωσης κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης

Πληθώρα πειραματικών μοντέλων έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί για την προσομοίωση χαρακτηριστικών περιπτώσεων ανθρώπινης ΚΕΚ σε τρωκτικά, πρωτεύοντα ή άλλα θηλαστικά, τα κυριότερα εκ των οποίων παρουσιάζονται συνοπτικά στη συνέχεια (**Εικόνα 6**) (Galgano et al., 2017; Xiong et al., 2013). Αρχικά, στον **τραυματισμό μέσω επίκρουσης υγρού** (fluid percussion injury) χρησιμοποιείται μια συσκευή ταχείας έγχυσης υγρού στον εκτεθειμένο, έπειτα από κρανιοτομή, επισκληρίδιο χώρο του εγκεφάλου (**Εικόνα 6Α**). Χαρακτηρίζεται από επιτόπιο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο, οίδημα, ενδοπαρεγχυματική αιμορραγία και ενεργοποίηση της γλοίας. Σε ορισμένες τροποποιήσεις του μοντέλου η παθολογία επεκτείνεται σε κάποιο βαθμό και στο ετερόπλευρο ημισφαίριο, ενώ εκδηλώνεται διάχυτη νευρωνική βλάβη σε υποφλοιώδεις δομές του εγκεφάλου, γεγονός που οδηγεί σε σοβαρές μακροχρόνιες νευροσυμπεριφορικές αλλοιώσεις, αντίστοιχες με εκείνες ασθενών με ΚΕΚ (Alder et al., 2011; Hamm, 2001; Liu et al., 2010b; Ma et al., 2019; Morales et al., 2005).

Περιπτώσεις κακώσεων όπως η διάσειση προσομοιάζονται πειραματικά από το μοντέλο της **ελεγχόμενης φλοιϊκής κάκωσης** (control cortical impact injury), όπου ο εγκέφαλος τραυματίζεται μέσω μιας ταχέως επιταχυνόμενης ράβδου που προσκρούει στη χειρουργικά εκτεθειμένη σκληρή μήνιγγα του ζώου (**Εικόνα 6Β**) (Hall et al., 2005; Ma et al., 2019). Από την άλλη, στο μοντέλο **τραυματισμού μέσω πτώσης βάρους** (weight drop injury) αξιοποιούνται οι δυνάμεις βαρύτητας ενός βαριδίου που εκτελεί ελεύθερη πτώση για την πρόκληση είτε εστιακής (κατά Feeney, Shapira ή Shohami, **Εικόνα 6Δ**) είτε διάχυτης (κατά Marmarou, **Εικόνα 6Ε**) εγκεφαλικής κάκωσης (Ma et al., 2019; Marmarou et al., 1994; Shapira et al., 1988; Shohami et al., 1988; Xiong et al., 2013). Τα μοντέλα

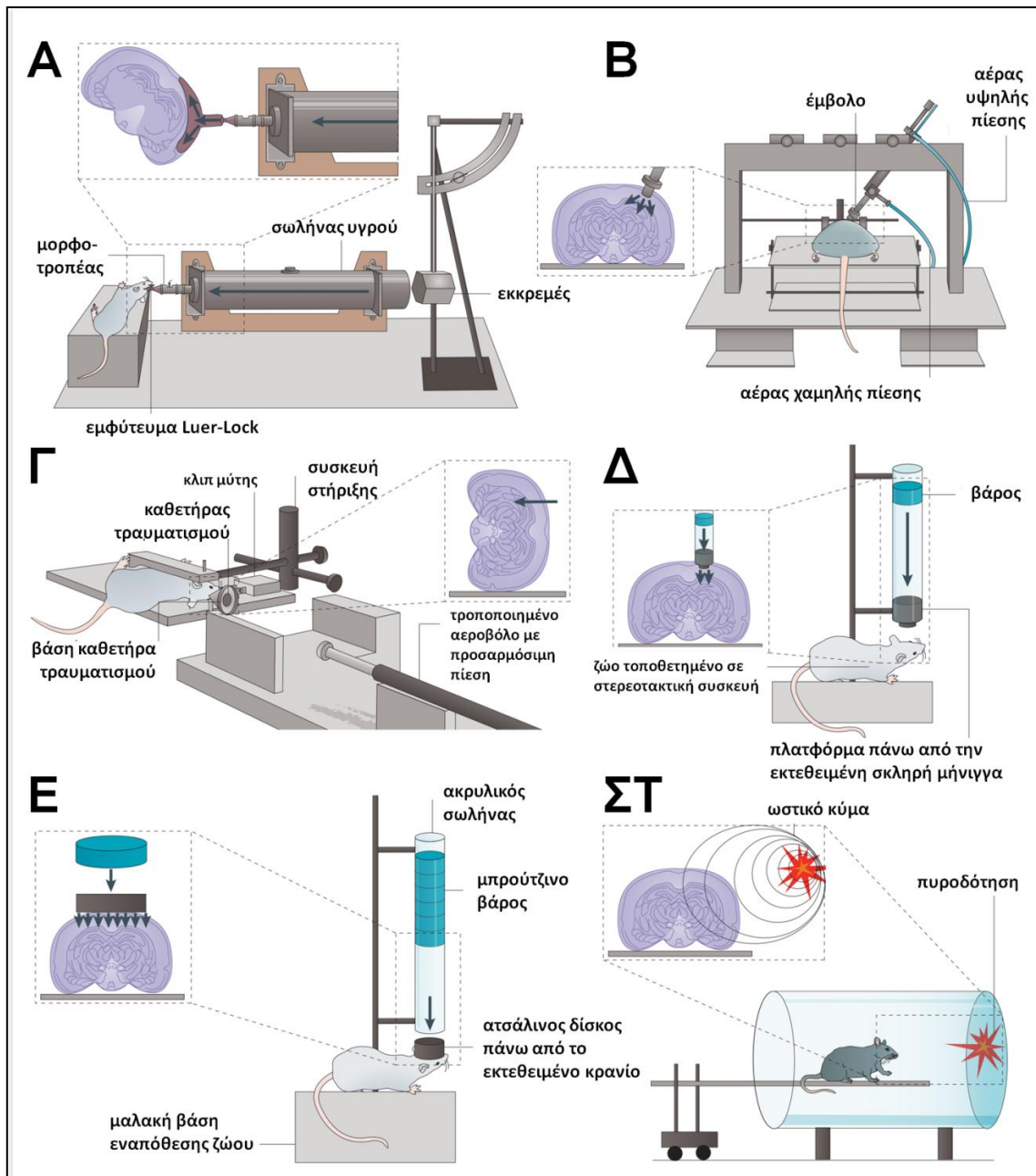
αυτά συνοδεύονται από απώλεια φλοιϊκού ιστού, καταστροφή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, οξύ υποσκληρίδιο αιμάτων, τραυματισμό των νευραξόνων, νευροεκφυλισμό γύρω από την τραυματισμένη περιοχή, κυρίως στο ομόπλευρο ημισφαίριο, καθώς και μακράς διάρκειας νευροσυμπεριφορικές αλλοιώσεις (Chen et al., 2014).

Ο **τραυματισμός μέσω ωστικού κύματος** (blast injury) αποτελεί χαρακτηριστική περίπτωση διάχυτης κάκωσης, κατά την οποία η εγκεφαλική βλάβη είναι αποτέλεσμα μιας μη διεισδυτικής υπερηχητικής ωστικής δύναμης (**Εικόνα 6ΣΤ**). Ως κλειστού τύπου κάκωση, σχετίζεται με τη μετακίνηση του εγκεφάλου εντός της κρανιακής κοιλότητας, λόγω γρήγορης περιστροφής της κεφαλής και χαρακτηρίζεται από ενδοπαρεγχυματική αιμορραγία, σχηματισμό νεκρωτικού πυρήνα, διάρρηξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, διάχυτο εκφυλισμό των νευραξόνων και εγκεφαλικό οίδημα (Goldstein et al., 2012; Xiong et al., 2013).

Ο **διεισδυτικός βαλλιστικού τύπου εγκεφαλικός τραυματισμός** (penetrating ballistic-like brain injury) προκαλείται από τη μεταφορά κάποιας μορφής «βλήματος», συνήθως μίας μεταλλικής ράβδου (**Εικόνα 6Γ**), με υψηλή ενέργεια και ένα προπορευόμενο ωστικό κύμα καταπληξίας, το οποίο δημιουργεί μια προσωρινή κοιλότητα στον εγκέφαλο, κατά πολύ μεγαλύτερη σε έκταση από το μέγεθος του ίδιου του «βλήματος» (Williams et al., 2005). Χαρακτηρίζεται από καταστροφή της λευκής και της φαιάς ουσίας, εγκεφαλικό οίδημα, νευροφλεγμονή, αισθητικοκινητικές βλάβες, καθώς και εμφάνιση νευροσυμπεριφορικών αλλοιώσεων, συμπεριλαμβανομένων γνωστικών διαταραχών, επιληπτικών κρίσεων και καταθλιπτικής συμπεριφοράς (Williams et al., 2006; Williams et al., 2007).

Στα μοντέλα που περιγράφηκαν παραπάνω, η ακρίβεια παραμόρφωσης του εγκεφαλικού ιστού και η βαρύτητα της κάκωσης είναι εξαιρετικά μεταβλητές, είτε λόγω συχνής πρόκλησης έκτοπης βλάβης από την ανάκαμψη και πρόσκρουση του εγκεφάλου στο οστέινο κρανίο (rebound injury), όπως στα μοντέλα πτώσης βάρους, είτε λόγω εκτεταμένων, διάχυτων και ανεξέλεγκτων πολλές φορές βλαβών, όπως στους τραυματισμούς μέσω επίκρουσης υγρού ή ωστικού κύματος. Έτσι, στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής εφαρμόστηκε μια απλή μορφή **ελεγχόμενου εστιακού διεισδυτικού τραυματισμού**, μέσω εισχώρησης μιας μεταλλικής βελόνας σε συγκεκριμένες συντεταγμένες του δεξιού εγκεφαλικού ημισφαιρίου ενήλικων αρσενικών μυών, που προσομοιάζει έναν τραυματισμό που μπορεί να συμβεί στον

άνθρωπο όταν ένα αντικείμενο προσκρούει στην κεφαλή με αρκετή δύναμη ώστε να διαπεράσει το δέρμα, το κρανιακό οστό και τις μήνιγγες και να επιφέρει άμεσο τραυματισμό του εγκεφαλικού παρεγχύματος. Πρόκειται ουσιαστικά για μια τροποποιημένη ήπια εκδοχή του διεσδυτικού βαλλιστικού τύπου τραυματισμού, που αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία ως “stab wound injury”.



Εικόνα 6. Ζωικά μοντέλα προσομοίωσης κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης. (Α) Ο τραυματισμός μέσω επίκρουσης υγρού (fluid percussion injury) προκαλείται από ένα εκκρεμές που προσκρούει στο έμβολο που βρίσκεται στην άκρη ενός σωλήνα γεμάτου με υγρό, το οποίο ωθείται με πίεση στην εκτεθειμένη σκληρή μήνιγγα, μέσω ενός μικρού πλαστικού εξαρτήματος (Luer-Lock) που έχει εμφυτευτεί χειρουργικά στην κεφαλή του πειραματοζώου. **(Β)** Στο μοντέλο της ελεγχόμενης φλοιϊκής κάκωσης (control cortical impact injury) χρησιμοποιείται μία ράβδος που βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός εμβόλου πεπιεσμένου

αέρα ή ενός μαγνητικού ενεργοποιητή, η οποία διεισδύει στον εγκέφαλο σε ορισμένο βάθος και με ορισμένη επιτάχυνση. **(Γ)** Το μοντέλο του διεισδυτικού βολιβατικού τύπου εγκεφαλικού τραυματισμού (penetrating ballistic-like brain injury) χρησιμοποιεί τη μεταφορά «βλημάτων» (συνήθως μίας μεταλλικής ράβδου) με υψηλή ενέργεια. **(Δ)** Στο μοντέλο τραυματισμού μέσω πτώσης βάρους (weight drop injury) κατά Feeney, ένα βαρίδιο εκτελεί ελεύθερη πτώση επάνω στην εκτεθειμένη σκληρή μήνιγγα του εγκεφάλου. **(Ε)** Στο μοντέλο τραυματισμού μέσω πτώσης βάρους κατά Margarou, που στηρίζεται στην επιταχυνόμενη κίνηση ολόκληρης της κεφαλής, ένας μεταλλικός δίσκος τοποθετείται επάνω από το κρανίο για να εμποδίσει την πρόκληση κατάγματος στο οστό. **(ΣΤ)** Στο μοντέλο κάκωσης μέσω ωστικού κύματος (blast injury), ο πρωτογενής τραυματισμός πραγματοποιείται είτε μέσω πυροδότησης εκρηκτικών ουσιών σε ανοιχτό πεδίο είτε μέσω χρήσης ενός κλειστού κυλινδρικού μεταλλικού σωλήνα καταπληξίας (shock tube), όπου η κεφαλή των πειραματόζων δέχεται την ωστική πίεση που παράγεται από την ταχεία απελευθέρωση πεπιεσμένου αέρα από έναν θάλαμο συμπίεσης αερίου. Προσαρμογή από (Xiong et al., 2013).

Η βλάβη περιορίζεται μόνο στο τραυματισμένο (ομόπλευρο) ημισφαίριο, επιτρέποντας έτσι τη χρήση του αντίστοιχου ετερόπλευρου ημισφαιρίου ως περιοχή αναφοράς για κάθε ζώο (Domowicz et al., 2018). Αξιοποιώντας ένα τέτοιο μοντέλο, μπορεί να επιτευχθεί εκτεταμένη καταστροφή του εγκεφαλικού ιστού και αιμορραγία στον πυρήνα του τραύματος, με παράλληλο σχηματισμό ινωτικού ιστού, συνοδευόμενο από μαζική μικρογλοίωση και αστρογλοίωση, νευρωνικό θάνατο και διάρρηξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Ωστόσο, αυτά τα φαινόμενα είναι παροδικά και συνήθως ανιχνεύεται μια διαδικασία σταδιακής επούλωσης και αποκατάστασης του εγκεφαλικού παρεγχύματος. Έτσι, το συγκεκριμένο μοντέλο είναι κατάλληλο για τη μελέτη παραγόντων ή/και σηματοδοτικών μονοπατιών που μεσολαβούν στις πρώιμες και στις όψιμες επιδράσεις της βλάβης, καθώς και στη διαδικασία αποκατάστασης/επιδιόρθωσης του τραυματισμένου νευρικού ιστού.

1.2.3.2. Η νόσος Πάρκινσον

Η νόσος Πάρκινσον (Parkinson's Disease, ΝΠ) περιγράφηκε ολοκληρωμένα, για πρώτη φορά, από τον Άγγλο χειρουργό James Parkinson το 1817 στην κλασική μονογραφία του *"An assay on the Shaking Palsy"*. Αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη ηλικιοεξαρτώμενη νευροεκφυλιστική νόσο μετά τη νόσο Αλτσχάιμερ, με ποσοστό εκδήλωσης 1-2% για άτομα άνω των 65 ετών, το οποίο ανέρχεται στο 3-5% για άτομα άνω των 85 ετών (Alves et al., 2008; Gasser, 2009).

Η κλινική εικόνα των ασθενών με ΝΠ περιλαμβάνει μια σειρά κινητικών συμπτωμάτων, στα οποία κυρίως βασίζεται η διάγνωση και συνολικά αναφέρονται με τον όρο «παρκινσονισμός», με κύρια χαρακτηριστικά τη μυϊκή δυσκαμψία, τη βραδυκινησία, τον τρόμο σε κατάσταση ηρεμίας και τη διαταραχή της στάσης και της

βάδισης. Ακόμη, παρατηρούνται κυρτή στάση του κορμού, ανέκφραστο πρόσωπο, δυσκολίες στην ομιλία και την κατάποση, καθώς και μία τάση των ασθενών να πραγματοποιούν μικρά βήματα (Janjovic, 2008). Παράλληλα με τις κινητικές διαταραχές, οι ασθενείς αντιμετωπίζουν συχνά ένα σύνολο μη κινητικών συμπτωμάτων, στα οποία περιλαμβάνονται διαταραχές νευροψυχιατρικής φύσεως (όπως κατάθλιψη, αγχώδης συμπεριφορά, ελλειμματική προσοχή, παραισθήσεις, κρίσεις πανικού, άνοια κλπ), διαταραχές του ύπνου, του αυτόνομου νευρικού συστήματος, της όσφρησης και άλλων αισθήσεων (Dexter and Jenner, 2013; Hou and Lai, 2007).

Οι διαθέσιμες θεραπευτικές προσεγγίσεις στοχεύουν στην επιβράδυνση της εκδήλωσης και στη βελτίωση των κινητικών συμπτωμάτων των ασθενών, εστιάζοντας στην αύξηση των επιπέδων της ντοπαμίνης στον εγκέφαλο, είτε μέσω χορήγησης λεβοντόπας (L-DOPA), που αποτελεί πρόδρομο μόριο στη σύνθεση της ντοπαμίνης, και αγωνιστών της ντοπαμίνης, είτε παρατείνοντας την επίδραση της ίδιας της ντοπαμίνης αναστέλλοντας το μεταβολισμό της (Kalia et al., 2015; Lim and Zhang, 2013). Ασθενείς με βεβαρυμμένη κινητική συμπτωματολογία υποβάλλονται συχνά σε χειρουργική επέμβαση, όπως σε θεραπευτική εν τω βάθει εγκεφαλική διέγερση (Deep Brain Stimulation), κατά την οποία διενεργείται στερεοτακτική εμφύτευση ηλεκτροδίων στα βασικά γάγγλια του εγκεφάλου που ρυθμίζουν την κίνηση, ή σε εμφύτευση εμβρυϊκών κυττάρων μεσεγκεφάλου στη μέλαινα ουσία, τα οποία συμμετέχουν στο σχηματισμό νέων συνάψεων οδηγώντας σε σημαντική βελτίωση των συμπτωμάτων της νόσου (Ahn et al., 2012; Mendez et al., 2008). Δεδομένου ότι οι παραπάνω προσεγγίσεις δρουν συμπτωματικά και η χρήση τους δεν έχει αποδειχθεί νευροπροστατευτική, καθίσταται επιτακτική η ανάπτυξη εναλλακτικών θεραπειών, ικανών να μεταβάλουν την πρόοδο της νόσου (Brundin et al., 2017; Migdalska-Richards et al., 2017; Wong and Krainc, 2017).

1.2.3.2.1. Παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά της νόσου

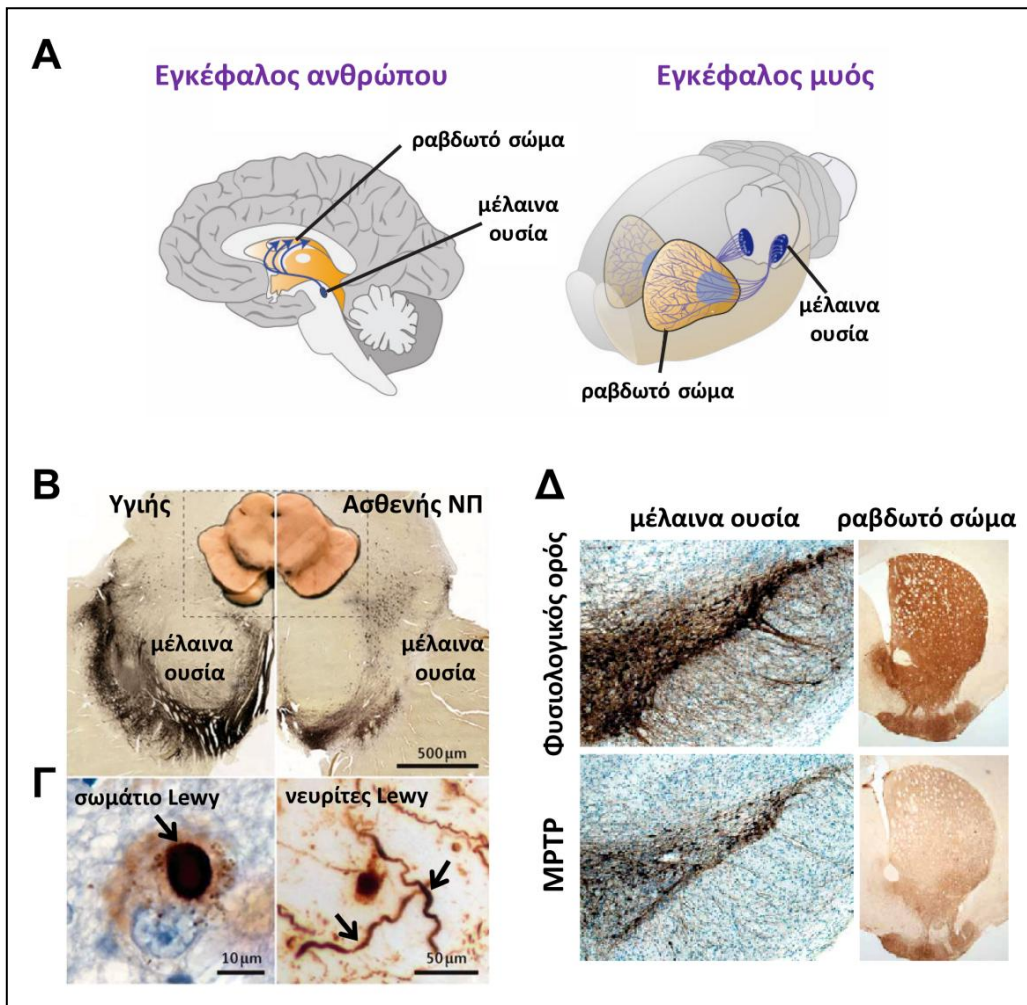
Ένα μικρό ποσοστό ασθενών εμφανίζουν οικογενή ΝΠ, ενώ οι περισσότεροι εμφανίζουν σποραδική ΝΠ, που σχετίζεται με τη γήρανση και περιβαλλοντικούς παράγοντες και όχι με κάποιο κληρονομικό ιστορικό. Το βασικότερο παθολογοανατομικό χαρακτηριστικό τόσο στις σποραδικές όσο και στις οικογενείς μορφές της νόσου είναι ο εκτεταμένος θάνατος των ντοπαμινεργικών νευρώνων (50-80%). Οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες ανιχνεύονται με ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι της

υδροξυλάσης της τυροσίνης (Tyrosine Hydroxylase, TH), του καθοριστικής σημασίας ενζύμου για τη σύνθεση της ντοπαμίνης (**Εικόνα 7B**). Τα σώματα των νευρώνων αυτών εδράζονται στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας (*Substantia Nigra pars compacta, SNpc*) και οι νευρικές τους απολήξεις καταλήγουν στο ραβδωτό σώμα (**Εικόνα 7A**), το οποίο στον άνθρωπο συνίσταται από τον κερκοφόρο πυρήνα (caudate nucleus) και το κέλυφος (putamen) (Jankovic, 2008; Lesage and Brice, 2009). Μάλιστα, στη ΝΠ παρατηρείται εκτεταμένη απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων που προβάλλουν στο κέλυφος και μικρότερη εκείνων που προβάλλουν στον κερκοφόρο πυρήνα. Εφόσον οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες παράγουν το νευροδιαβιβαστή ντοπαμίνη, ο εκφυλισμός τους διαταράσσει τη νευροδιαβίβαση κατά μήκος της μελαινοραβδωτής οδού, οδηγώντας σε δραματική μείωση των επιπέδων της ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα και στην εμφάνιση του κλασικού κινητικού φαινοτύπου της νόσου (Jankovic, 2008; Johnson et al., 2009).

Στους εναπομείναντες ντοπαμινεργικούς νευρώνες της μέλαινας ουσίας εντοπίζονται ενδοκυττάρια συσσωματώματα είτε στα σώματα είτε στους νευράξονες, τα επονομαζόμενα «σωμάτια Lewy» (Lewy bodies) ή «νευρίτες Lewy» (Lewy neurites) (**Εικόνα 7Γ**), αντίστοιχα, τα οποία αποτελούν βασικό παθολογοανατομικό χαρακτηριστικό στην πλειοψηφία των ασθενών με ΝΠ (Conway et al., 2000). Πρόκειται για πρωτεϊνικά έγκλειστα, διαμέτρου 5-25 μm, με πυκνό ηωσινόφιλο πυρήνα και αχνό «φωτοστέφανο» ακτινωτών ινιδίων, που αποτελούνται από τη λανθασμένα αναδιπλωμένη ινιδιακή πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη, ουβικιτίνη, αβ-κρυσταλλίνη, πρωτεΐνες 14-3-3, τουμπουλίνη καθώς και άλλες κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες. Ο ρόλος των σωματίων και νευριτών Lewy στην παθογένεια της νόσου δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί (Poewe et al., 2017), ενώ η παρουσία τους δεν περιορίζεται στη μελαινοραβδωτή οδό, αλλά χαρακτηρίζει και άλλες περιοχές του εγκεφάλου, στον εκφυλισμό των οποίων αποδίδονται διάφορα μη κινητικά συμπτώματα (Jellinger, 2012).

Εκτός από την παρουσία της στα σωμάτια Lewy, η α-συνουκλεΐνη εμπλέκεται περαιτέρω στη ΝΠ, εφόσον σημειακές μεταλλαγές και υπερέκφραση του γονιδίου της (*SNCA*) έχουν συσχετιστεί με οικογενείς μορφές της νόσου (Polymeropoulos et al., 1997). Επιπλέον, μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (genome-wide association studies, GWAS) έχουν συσχετίσει πολυμορφισμούς του *SNCA* με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης σποραδικής ΝΠ (Hamza et al., 2010; Nalls et al., 2014). Παρόλο που ο

φυσιολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης δεν είναι πλήρως κατανοητός, γενετικά και παθολογοανατομικά στοιχεία προτείνουν ότι η παθογένεια της νόσου είναι στενά συνδεδεμένη με ένα τοξικό κέρδος λειτουργίας (gain of function) της λανθασμένα αναδιπλωμένης πρωτεΐνης (Vekrellis et al., 2011). Αξίζει να σημειωθεί ότι η παθολογία της ΝΠ εξελίσσεται σε βάθος χρόνου, ξεκινώντας πιθανότατα από τους οσφρητικούς βολβούς ή/και το γαστρεντερικό σωλήνα και συνεχίζοντας ανοδικά σε εγκεφαλικές δομές που επικοινωνούν ανατομικά μεταξύ τους (Braak et al., 2003).



Εικόνα 7. Το ντοπαμινεργικό σύστημα και η εκφύλισή του στη νόσο Πάρκινσον. (Α) Σχηματική απεικόνιση του ντοπαμινεργικού συστήματος (μελαιοραβδωτή οδός) στον άνθρωπο (αριστερά) και στο μύ (δεξιά). **(Β)** Χαρακτηριστικές μακροσκοπικές (ένθετο) και εγκάρσιες τομές ανθρώπινου μεσεγκεφάλου, έπειτα από ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι της υδροξυλάσης της τυροσίνης (TH), του καθοριστικής σημασίας ενζύμου για τη σύνθεση της ντοπαμίνης. Η νόσος Πάρκινσον χαρακτηρίζεται από τον αποχρωματισμό της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας των ασθενών (δεξιά), λόγω απώλειας των ντοπαμινεργικών νευρώνων, συγκριτικά με τη μέλαινα ουσία ενός υγιούς ατόμου (αριστερά). **(Γ)** Χαρακτηριστική ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι της α-συνουκλεΐνης, όπου επισημαίνονται με βέλη τα στρογγυλά κυτταροπλασματικά έγκλειστα (σωμάτια Lewy, αριστερά) και οι πρωτεϊνικές εναποθέσεις της στους δυστροφικούς άξονες των νευρώνων (νευρίτες Lewy, δεξιά). Προσαρμογή από (Poewe et al., 2017). **(Δ)** Χαρακτηριστική ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι της υδροξυλάσης της τυροσίνης, ενδεικτική της

απώλειας των ντοπαμινεργικών νευρώνων της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας και των απολήξεών τους στο ραβδωτό σώμα, επτά ημέρες μετά την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση της νευροτοξίνης MPTP σε ενήλικους μύες. Η σύγκριση έγινε με ζώα στα οποία χορηγήθηκε μόνο φυσιολογικός ορός (ομάδα αναφοράς). Προσαρμογή από (Jackson-Lewis and Przedborski, 2007).

Η αιτιολογία της ΝΠ περιλαμβάνει πιθανότατα τόσο περιβαλλοντικούς όσο και γενετικούς παράγοντες κινδύνου, ενώ η νευροφλεγμονή θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική για την εξέλιξη της νόσου (Lee et al., 2019). Η εκτεταμένη απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων και η δημιουργία ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων συνοδεύονται από φλεγμονώδεις μεταβολές στη μικρογλοία, τα αστροκύτταρα, τα ενδογενή κύτταρα της φυσικής ανοσίας, καθώς και τα φλεγμονώδη κύτταρα της περιφέρειας που διηθούν το νευρικό ιστό. Μια πληθώρα μορίων που απελευθερώνονται από τα ενεργοποιημένα αυτά κύτταρα, τα οποία «στρατολογούνται» στο φλεγμαίνον μελαινораβδωτό σύστημα, όπως προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, χημειοκίνες και προσταγλανδίνες, αλλά και νευροτροφικοί παράγοντες, έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με ΝΠ και αντίστοιχα ζωικά μοντέλα της νόσου (Glass et al., 2010; Halliday and Stevens, 2011; Leszek et al., 2016; Roewe et al., 2017). Προφανώς, η νευροφλεγμονή συνιστά θεμελιώδη ανοσολογική απόκριση για την προστασία των νευρώνων, την απομάκρυνση των τοξικών πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και την αντιστάθμιση του εκφυλισμού του νευρικού παρεγχύματος, αλλά ταυτόχρονα οι παράπλευρες νευροτοξικές της επιδράσεις συχνά επιδεινώνουν τη νευρωνική βλάβη (Gelders et al., 2018; Lee et al., 2019).

1.2.3.2.2. Ζωικά μοντέλα της νόσου

Για την προσομοίωση της ΝΠ σε πειραματόζωα έχουν αναπτυχθεί διάφορα πειραματικά μοντέλα, τα οποία διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, εκείνα που αξιοποιούν τη χορήγηση φαρμακολογικών παραγόντων (νευροτοξινών) για την πρόκληση παρκινσονικών χαρακτηριστικών και τα γενετικά μοντέλα. Η χορήγηση νευροτοξινών οδηγεί στην ταχεία εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μελαινораβδωτής οδού, με στόχο να αναπαραχθούν σε τρωκτικά ή πρωτεύοντα (πλην ανθρώπων) οι βασικές βιοχημικές, ιστοπαθολογικές, κινητικές και συμπεριφορικές μεταβολές που συνοδεύουν την ανθρώπινη ΝΠ. Οι συγκεκριμένες νευροτοξίνες χορηγούνται είτε συστηματικά είτε τοπικά, ανάλογα με τη φύση τους και ανάλογα με το είδος των πειραματοζώων (Blandini and Armentero, 2012). Η πλέον γνωστή νευροτοξίνη,

η οποία χρησιμοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, είναι η μιτοχονδριακή νευροτοξίνη μεθυλ-4-φαινυλ-1,2,3,6-τετραϋδροπυριδίνη ή MPTP (**Εικόνα 7Δ**) (Jackson-Lewis and Przedborski, 2007). Επειδή η MPTP είναι λιποδιαλυτή διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και προσλαμβάνεται από τα αστροκύτταρα, όπου οξειδώνεται από τη μονοαμινοξειδάση Β (MAO-B) στο τοξικό παράγωγο 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) (Jackson-Lewis et al., 1995; Vila and Przedborski, 2003). Η επιλεκτική ευαισθησία των ντοπαμινεργικών νευρώνων στο MPP+ οφείλεται στην πρόσληψη του τελευταίου από το μεταφορέα της ντοπαμίνης. Εντός του νευρώνα, το MPP+ συγκεντρώνεται ενεργά στα μιτοχόνδρια όπου και προσδένεται στη NADH αφυδρογονάση, αναστέλλοντας το σύμπλοκο I της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και οδηγώντας τελικά σε δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Η μιτοχονδριακή βλάβη έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση ελεύθερων ριζών, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε οξειδωτικό στρες και ενεργοποίηση μοριακών μονοπατιών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.

Εκτός της MPTP, χρησιμοποιείται ευρύτατα και η 6-υδροξυντοπαμίνη (6-hydroxydopamine, 6-OHDA), που αξιοποιεί το σύστημα μεταφοράς ντοπαμίνης για να εισέλθει στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες, οδηγώντας εν συνεχεία στο θάνατό τους λόγω αυξημένου οξειδωτικού στρες (Lane et al., 2006), καθώς και τα λιγότερο γνωστά αγροχημικά μόρια ροτενόνη (Gao et al., 2003), paraquat και fungicide maneb (Manning-Bog et al., 2002; McCormack et al., 2002; Thiruchelvam et al., 2000).

Οι πληροφορίες που συλλέγονται για την παθολογία της νόσου, μέσω μοντέλων χορήγησης νευροτοξινών, συμπληρώνονται και ενισχύονται με τη βοήθεια γενετικών μοντέλων. Στα τελευταία περιλαμβάνονται προσεγγίσεις που βασίζονται στη χορήγηση ιικών φορέων έκφρασης, καθώς και διαγονιδιακά πειραματόζωα, τα οποία εκδηλώνουν κύρια παρκινσονικά χαρακτηριστικά, όπως η παρουσία σωματίων Lewy, και προσφέρουν τη δυνατότητα αναπαραγωγής βασικών μεταλλαγών που έχουν συσχετιστεί με τη νόσο. Τα επικρατέστερα γενετικά μοντέλα της ΝΠ περιλαμβάνουν μεταλλαγές του γονιδίου *SNCA*, υπερέκφραση της φυσιολογικής ή της μεταλλαγμένης α-συνουκλεΐνης, καθώς και χορήγηση προσχηματισμένων ινιδίων α-συνουκλεΐνης, οδηγώντας στο σχηματισμό τοξικών πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων *in vivo* και σε μεταβλητή εκφύλιση της μελαινοραβδωτής οδού, συνοδευόμενη από την εμφάνιση κινητικών διαταραχών ανάλογα με την προσέγγιση (Abdelmotilib et al., 2017; Chesselet,

2008; Peelaerts et al., 2015). Στα γενετικά μοντέλα περιλαμβάνονται επίσης διαγονιδιακά ζώα στα οποία έχουν απαλειφθεί τα γονίδια *engrailed* (Sonnier et al., 2007), *PINK1* (PTEN-induced putative kinase 1) (Gautier et al., 2008; Gispert et al., 2009) και *DJ-1* (Paterna et al., 2007), καθώς και εκείνα που φέρουν μεταλλάξεις των γονιδίων *PRKN* (Parkin) (Lu et al., 2009), *UCH-L1* (Setsuie et al., 2007; Yasuda et al., 2009) και *LRRK2* (Leucine-rich repeat serine/threonine kinase 2) (Li et al., 2010; Smith et al., 2006).

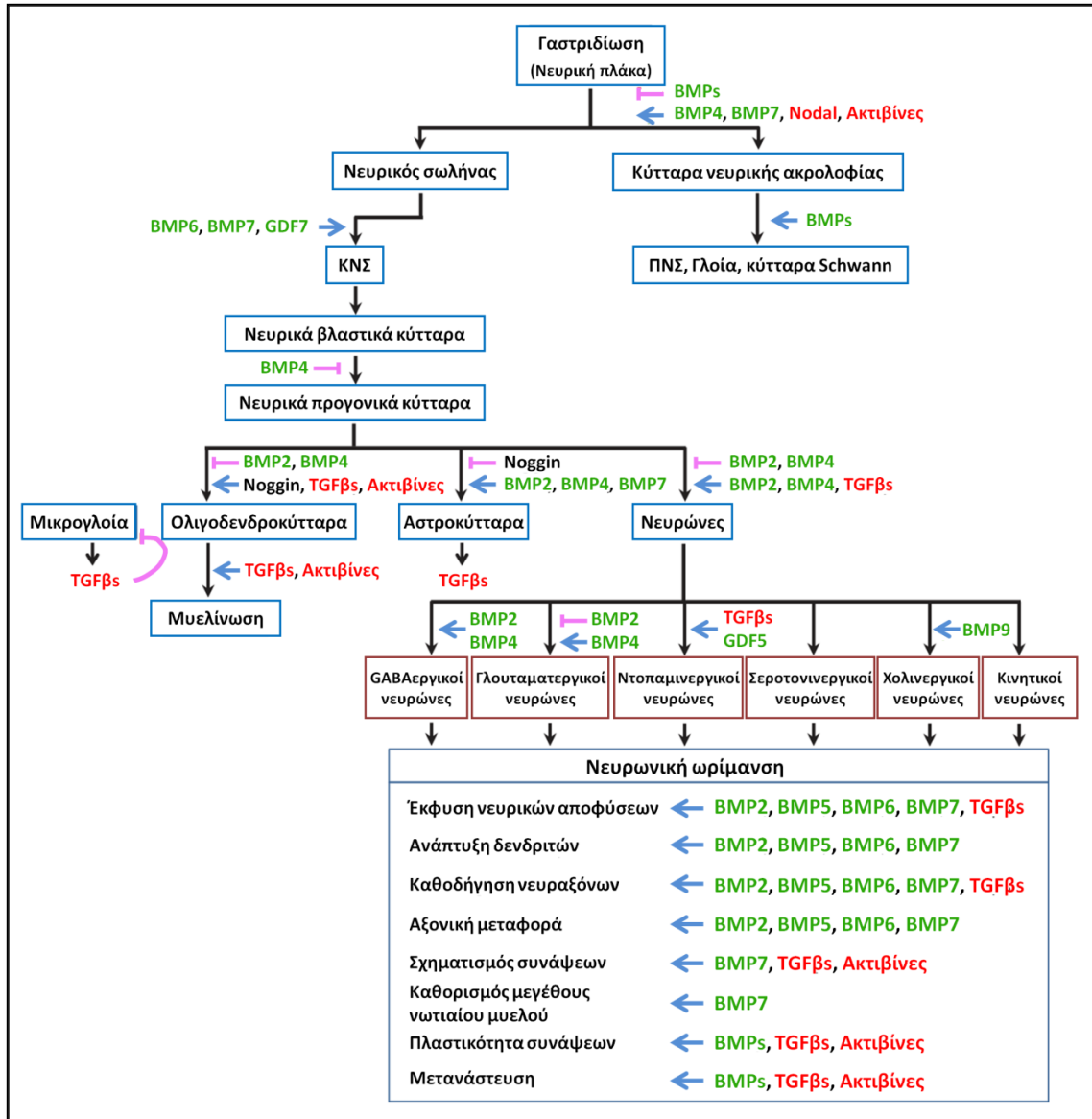
1.3. Ο ρόλος της υπεροικογένειας του TGFβ στην ανάπτυξη και τη διατήρηση της ομοιόστασης του ΚΝΣ

Μεταξύ άλλων, το σύστημα σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ έχει συσχετιστεί πολλαπλώς με τη ρύθμιση θεμελιωδών λειτουργιών κατά την ανάπτυξη και την ομοιόσταση του ΚΝΣ (**Εικόνα 8**), όπως η νευρογένεση, η ωρίμανση των νευρώνων, η ρύθμιση της συναπτικής διαβίβασης, η διαφοροποίηση των αστροκυττάρων και των ολιγοδενδροκυττάρων, η συγκρότηση και διατήρηση της ακεραιότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και άλλες (Dias et al., 2014; Stipursky and Gomes, 2007; Yi et al., 2010).

1.3.1. Διαφοροποίηση και φυσιολογία των νευρώνων

Κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ, η ανοσοϊστοχημική εντόπιση των TGFβs κυριαρχεί σε περιοχές όπου λαμβάνει χώρα νευρωνική διαφοροποίηση, ενώ είναι λιγότερο έντονος σε περιοχές ενεργού κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Flanders et al., 1991). Μεταγενέστερα *ex vivo* πειράματα σε απομονωμένα κύτταρα νευρικής ακρολοφίας πτηνών έδειξαν ότι οι TGFβs αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των συγκεκριμένων κυττάρων, ενώ αυξάνουν σε σημαντικό βαθμό τη νευρογένεση (Aigner and Bogdahn, 2008; Kashima and Hata, 2018; Zhang et al., 1997). Οι TGFβs φαίνεται να ασκούν αντιμιτωτική δράση στα αδιαφοροποίητα βλαστικά κύτταρα, ενώ επάγουν την αυξημένη έκφραση νευρωνικών δεικτών σε πρωτογενείς καλλιέργειες ιπποκάμπου και φλοιού, προερχόμενες από εγκεφάλους νεογέννητων μυών (Vogel et al., 2010). Επιπλέον, οι TGFβs διαδραματίζουν ενεργό ρόλο στη ρύθμιση της ενήλικης νευρογένεσης, εφόσον εκδηλώνουν μία προ-νευρογόνο δράση στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου σε ένα μοντέλο αυξημένης νευρογένεσης, καθώς και στην υποκοιλιακή ζώνη έπειτα από παρατεταμένη χορήγηση αδενοϊικών φορέων υπερέκφρασης του TGFβ

(Mathieu et al., 2010), ενώ παρεμπόδιση του TGFβ κλάδου με χορήγηση ειδικού αντισώματος έναντι του υποδοχέα TGFBR2 ελαττώνει τη νευρογένεση (Battista et al., 2006).



Εικόνα 8. Ο ρόλος της υπερικογένειας του TGFβ στην ανάπτυξη και τη λειτουργία του νευρικού συστήματος. Η συμμετοχή της TGFβ (κόκκινη γραμματοσειρά) και BMP (πράσινη γραμματοσειρά) σηματοδότησης είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ανάπτυξη του νευρικού δικτύου και τη διατήρηση της ομοιόστασης στο νευρικό σύστημα. Απεικονίζονται επαγωγικά (μπλε βέλη) και ανασταλτικά σήματα (μωβ γραμμές) από διάφορους προσδέτες της υπερικογένειας του TGFβ σε διαφορετικά στάδια της νευρικής διαφοροποίησης. Οι συντομογραφίες ΚΝΣ και ΠΝΣ αναφέρονται στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, αντίστοιχα. Προσαρμογή από (Kashima and Hata, 2018).

Εκτός από τη συμμετοχή της στον καθορισμό της νευρωνικής γενεαλογίας, φαίνεται ότι η TGFβ σηματοδότηση εμπλέκεται στη διαφοροποίηση συγκεκριμένων νευρωνικών τύπων, όπως για παράδειγμα στην ωρίμανση των κοιλιακών διάμεσων

νευρώνων σε βάρος των κινητικών νευρώνων κατά την ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού (Garcia-Camprany and Marti, 2007). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι TGFβs επάγουν τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των ντοπαμινεργικών νευρώνων, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Farkas et al., 2003; Kriegstein and Unsicker, 1994), μία δράση που ενισχύεται από τη συνεργιστική αλληλεπίδραση και με άλλα μέλη της υπερικογένειας, όπως οι GDNF, neurturin και persephin (Roussa et al., 2008). Αντίστοιχα, η ενεργοποίηση της BMP/GDF-επαγόμενης σηματοδότησης έχει επίσης συσχετιστεί με την *in vitro* διαφοροποίηση πρόδρομων κυττάρων μεσεγκεφάλου επίμυων σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες (Kriegstein et al., 1995; Lee et al., 2003), καθώς και με την έκφυση νευρικών αποφύσεων σε κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος (Hegarty et al., 2013).

Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι η TGFβ σηματοδότηση ρυθμίζει τη νευρωνική μετανάστευση στον αναπτυσσόμενο εγκεφαλικό φλοιό, μεταβάλλοντας τα επίπεδα των μορίων προσκόλλησης των νευρικών κυττάρων (neural cell adhesion molecules, NCAMs) και διαφόρων ιντεγκρινών (Siegenthaler and Miller, 2004). Ακόμη, ρυθμίζει την έκφυση νευραξόνων και τη συναπτογένεση (Araujo et al., 2016; Poon et al., 2013), ενώ φαίνεται ότι δρα συνεργιστικά με τον αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών (fibroblast growth factor, FGF) για την επιβίωση των κινητικών νευρώνων (Jiang et al., 2000).

1.3.2. Διαφοροποίηση και φυσιολογία των αστροκυττάρων

Η BMP σηματοδότηση συνιστά κύριο ρυθμιστή της κυτταρικής γενεαλογίας στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ, εφόσον έχει συνδεθεί με την καταστολή της νευρογένεσης και την επαγωγή της διαφοροποίησης των αστροκυττάρων, τόσο σε συστήματα πρωτογενών καλλιέργειών *in vitro* (Angley et al., 2003; Gross et al., 1996; Nakashima et al., 2001), όσο και *in vivo*, έπειτα από υπερέκφραση BMPs στον εγκεφαλικό φλοιό πειραματοζώων (Gomes et al., 2003). Η συγκεκριμένη δράση οφείλεται πιθανότατα στη BMP-εξαρτώμενη ενεργοποίηση του μεταγραφικού ρυθμιστή ID1, ο οποίος αναστέλλει την πρόσδεση νευρογενών μεταγραφικών παραγόντων στο DNA, όπως των ASCL1/MASH1 και neurogenin (Yanagisawa et al., 2001). Αντίθετα, αναστολή της BMP σηματοδότησης, μέσω εξωγενούς χορήγησης Noggin, παρεμποδίζει την αστρογλιογένεση σε καλλιέργειες προγονικών κυττάρων, ενώ επάγει την παραγωγή ολιγοδενδροκυττάρων, υποδεικνύοντας τον πιθανό κατασταλτικό ρόλο της ενδογενούς BMP σηματοδότησης στην ολιγοδενδρογένεση (Gomes et al., 2003; Mehler et al., 2000).

Στον αντίποδα της BMP σηματοδότησης, η ενεργοποίηση του μονοπατιού των TGFβs/Ακτιβινών έχει συνδεθεί με την αναστολή του πολλαπλασιασμού των αστροκυττάρων, είτε άμεσα, είτε έμμεσα με ενίσχυση ή ανταγωνισμό της δράσης άλλων αυξητικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των FGF, EGF (epidermal growth factor) και PDGF (platelet-derived growth factor) (Hunter et al., 1993; Kriegstein et al., 1998a; Kriegstein et al., 1998b; Kriegstein et al., 1998c). Βέβαια, έχει δειχθεί ότι αστροκύτταρα που προέρχονται από διαφορετικές εγκεφαλικές περιοχές αποκρίνονται διαφορετικά στην TGFβ-επαγόμενη σηματοδότηση (Johns et al., 1992).

Ακόμη, έχει βρεθεί ότι η TGFβ σηματοδότηση ρυθμίζει διάφορες πτυχές της φυσιολογίας των αστροκυττάρων, όπως τη μορφολογία τους, επάγοντας την ανάπτυξη διακλαδισμένων απολήξεων (Flanders et al., 1993; Toru-Delbauffe et al., 1990), και την κινητικότητά τους, ελαττώνοντας τις διακυτταρικές και αυξάνοντας τις εστιακές επαφές (Gagelin et al., 1995). Επιπλέον, οι TGFβs ενισχύουν την αστροκυτταρική παραγωγή λαμινίνης και ινονεκτίνης και την ενσωμάτωσή τους στην εξωκυττάρια ουσία, τόσο *in vitro* (Baghdassarian et al., 1993), όσο και *in vivo* (Wyss-Coray et al., 1995). Αξίζει να σημειωθεί ότι η εξωκυττάρια ουσία είναι εξαιρετικά σημαντική σε διάφορες διεργασίες κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ, όπως η επιβίωση και μετανάστευση των νευρώνων και η καθοδήγηση των νευραξόνων.

1.3.3. Αγγειογένεση και σταθεροποίηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού

Το μικροαγγειακό δίκτυο του ΚΝΣ σχηματίζεται στα αρχικά στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης μέσω της αγγειογένεσης, μιας εξαιρετικά δυναμικής διαδικασίας που περιλαμβάνει το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων από προϋπάρχοντα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου αποκτούν μοναδικά χαρακτηριστικά και συνδεούνται στενά με περικύτταρα και αστροκύτταρα για να σχηματίσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Daneman and Prat, 2015; Obermeier et al., 2013). Εκτός του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα Α (VEGF-A) ως κύριου ρυθμιστή της νευροαγγειογένεσης (Gerhardt et al., 2003; James et al., 2009), αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει την TGFβ σηματοδότηση με τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση του ενδοθηλίου, καθώς και με το σχηματισμό και τη διατήρηση της ακεραιότητας των αιμοφόρων αγγείων στο ΚΝΣ. Απαλοιφή παραγόντων του συστήματος σηματοδότησης

της υπεροικογένειας του TGFβ οδηγούν στο θάνατο κατά την εμβρυϊκή περίοδο, λόγω ελαττωματικής ανάπτυξης του αγγειακού δικτύου (Anderson et al., 2011; Ferrari et al., 2009; Nguyen et al., 2011).

Για την ανάπτυξη ενός λειτουργικού αγγειακού δικτύου είναι απαραίτητη η δημιουργία συμπλόκων μεταξύ των ανβ8 ιντεγκρινών του νευροεπιθηλίου και της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης Nrp1 των ενδοθηλιακών κυττάρων, η οποία ακολούθως οδηγεί στην ενεργοποίηση του λανθάνοντος TGFβ που βρίσκεται αγκυροβολημένος στην εξωκυττάρια ουσία (Hirota et al., 2015). Μάλιστα, η TGFβ σηματοδότηση ρυθμίζει την έκκριση αγγειογόνων παραγόντων από τα νευρικά βλαστικά κύτταρα (Hellbach et al., 2014), καθώς επίσης συμβάλλει στη σταθεροποίηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, αφ' ενός ρυθμίζοντας την έκφραση της πρωτεΐνης ZO-1 (Zonula Occludens-1) των στενών συνδέσεων (Merwin et al., 1990), και αφ' ετέρου επάγοντας τη μείωση της ενδοθηλιακής διαπερατότητας και αυξάνοντας τη δραστηριότητα της αντλίας εκροής P_gP (P glycoprotein) των ενδοθηλιακών κυττάρων (Dohgu et al., 2004). Τέλος, ιδιαίτερα σημαντικές για τη συγκρότηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού είναι οι στενές αλληλεπιδράσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων με τα περικύτταρα και τις απολήξεις των περιαγγειακών αστροκυττάρων, οι οποίες ενισχύονται από την TGFβ-εξαρτώμενη αύξηση της έκφρασης μορίων κυτταρικής προσκόλλησης και της σύνθεσης συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας (Cambier et al., 2005; Li et al., 2011; Van Geest et al., 2010).

1.4. Η σύνδεση της υπεροικογένειας του TGFβ με παθολογικές καταστάσεις του ΚΝΣ

Πληθώρα βιβλιογραφικών δεδομένων έχουν κατά καιρούς συσχετίσει τη δράση των TGFβ και BMP κλάδων σηματοδότησης με την εξέλιξη διάφορων παθολογικών καταστάσεων στο ΚΝΣ, συμπεριλαμβανομένων της νευροφλεγμονής, των νευροεκφυλιστικών νόσων (Αλτσχάιμερ, Πάρκινσον) και της βλάβης μετά από ισχαιμικό ή μηχανικό τραυματισμό του νευρικού ιστού (Javelaud and Mauviel, 2004). Ωστόσο, η αλληλεπίδραση και ο ρόλος της σχετικής ισορροπίας των δύο αυτών κλάδων σε συνθήκες εγκεφαλικής βλάβης χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

1.4.1. Τραυματικές κακώσεις του νευρικού ιστού

Αρκετοί παράγοντες της TGFβ και BMP σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων διάφορων προσδετών και υποδοχέων τύπου I (π.χ. *Acvr1*, *Tgfbr1*) ή τύπου II (π.χ. *Tgfbr2*, *Bmpr2*), υπερεκφράζονται σε επίπεδο mRNA ή/και πρωτεΐνης, σε κύτταρα που περιβάλλουν το τραύμα ή σε περιοχές ενήλικης νευρογένεσης μετά από πρόκληση ΚΕΚ σε τρωκτικά (Chen et al., 2018; Huang et al., 2010; Komuta et al., 2010; Lenzlinger et al., 2001; Lewen et al., 1997; Lindholm et al., 1992; Logan et al., 2013; Schachtrup et al., 2010). Πέρα από τη συσχέτισή τους με την παθοφυσιολογία του ΚΝΣ, τα εν λόγω σηματοδοτικά μονοπάτια αποτελούν στόχο νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων, οι οποίες φιλοδοξούν να αντιμετωπίσουν τις δευτερογενείς ιστικές βλάβες.

Δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις που να υποδεικνύουν μεταφορά του TGFβ στον εγκέφαλο μέσω του κυκλοφορικού συστήματος, έπειτα από ΚΕΚ, επομένως θεωρείται ότι παράγεται τοπικά στο σημείο της βλάβης (Helmy et al., 2011). Πράγματι, τέσσερις ημέρες μετά από διεισδυτική ΚΕΚ, δείχθηκε η σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA του *Tgfb1* εντός και γύρω από την τραυματισμένη περιοχή. Επιπλέον, ανοσοϊστοχημικές χρώσεις έναντι των μακροφαγικών/μικρογλοιακών δεικτών CD11b και CD11c κατέδειξαν τα μακροφάγα που διηθούν το τραύμα και πιθανότατα την ενεργοποιημένη μικρογλοία ως πηγή του TGFβ1 στον τραυματισμένο εγκέφαλο (Lindholm et al., 1992). Εκτός του TGFβ1, φαίνεται να επάγεται επίσης η έκφραση του TGFβ2 και της Ακτιβίνης βΑ, έπειτα από εστιακή ΚΕΚ (Lai et al., 1997; Rimaniol et al., 1995).

Σε αντιστοιχία με τους προσδέτες της TGFβ σηματοδότησης, η έκφραση των BMPs είναι σχετικά χαμηλή στις περισσότερες περιοχές του ενήλικου ΚΝΣ, ωστόσο ενδεχόμενος τραυματισμός του νευρικού ιστού οδηγεί σε ταχεία αύξησή της. Για παράδειγμα, τα επίπεδα mRNA του *Bmpr4* (Chen et al., 2018) και τα πρωτεϊνικά επίπεδα των BMP2, BMP4 και BMP7 έχουν βρεθεί αυξημένα στην περιοχή της βλάβης, έπειτα από τραυματική κάκωση τόσο του εγκεφάλου όσο και του νωτιαίου μυελού τρωκτικών (Hampton et al., 2007). Ομοίως, ενώ τα επίπεδα mRNA του *Bmpr7* είναι σχετικά χαμηλά στον ενήλικο νωτιαίο μυελό, έχει δειχθεί ότι αυξάνονται δραματικά σε νευρογλοιακά κύτταρα και κινητικούς νευρώνες μετά από τραυματική κάκωση (Setoguchi et al., 2001).

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ένα μοντέλο ελεγχόμενης ΚΕΚ παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στη σχετική έκφραση παραγόντων και γονιδίων-στόχων τόσο της

BMP- όσο και της TGFβ-επαγόμενης σηματοδότησης στην υποκοιλιακή ζώνη και την οδοντωτή έλικα του υποκάμπου, προτείνοντας τη συμμετοχή των συγκεκριμένων μονοπατιών στη ενήλικη νευρογένεση έπειτα από τραυματισμό (Logan et al., 2013). Μάλιστα, ο τραυματισμός οδήγησε στην αυξημένη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Runx1, ο οποίος αλληλεπιδρά ενδοκυττάρια με τις πρωτεΐνες Smad (Miyazono et al., 2004; Pardali et al., 2000), στην ενεργοποιημένη μικρογλοία και σε έναν πληθυσμό Nestin⁺/GFAP⁺ νευρικών βλαστικών κυττάρων.

Εκτός των ζωικών μοντέλων, το χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης προσδεδών της υπεροικογένειας του TGFβ έχει επίσης μελετηθεί σε βλάβες του ανθρώπινου νωτιαίου μυελού έπειτα από τραυματισμό. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί έντονη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του TGFβ1 σε νευρώνες, αστροκύτταρα και μακροφάγα που διηθούν το νευρικό ιστό, κατά τις πρώτες εβδομάδες μετά τον τραυματισμό, καθώς και ετεροχρονισμένη αύξηση των επιπέδων του TGFβ2 σε μακροφάγα και αστροκύτταρα για περισσότερο από ένα έτος (Buss et al., 2008).

Η δράση της TGFβ σηματοδότησης έχει συσχετιστεί με την ενεργοποίηση των αστροκυττάρων πλησίον της περιοχής του τραύματος, προάγοντας το σχηματισμό της νευρογλοιακής ουλής (Komuta et al., 2010). Μάλιστα, έχει περιγραφεί ότι ο TGFβ που εκκρίνεται από μακροφάγα τύπου M2 ενισχύει την απελευθέρωση της πρωτεογλυκάνης *neurocan* (NCAN) από ενεργοποιημένα αστροκύτταρα, επάγοντας το σχηματισμό νευρογλοιακής ουλής *in vitro* (Song et al., 2019). Ακόμη, σε ένα μοντέλο συγκαλλιέργειας νευρώνων και αστροκυττάρων μέσα σε βιοενεργή εξωκυττάρια ουσία, εξωγενής επίδραση με TGFβ1 προκάλεσε έντονη αστροκυτταρική υπερτροφία, συνοδευόμενη από αυξημένη έκφραση της GFAP και απελευθέρωση CSPGs (Cullen et al., 2007). Αναφορικά με το μηχανισμό επαγωγής των TGFβs *in vivo*, φαίνεται πως εν μέρει τουλάχιστον εμπλέκεται το ινωδογόνο του πλάσματος που διηθεί το νευρικό ιστό, έπειτα από διαρροή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Heinemann et al., 2012; Kawano et al., 2012). Μάλιστα, έχει δειχθεί ότι το ινωδογόνο μπορεί να ενεργοποιήσει τη λανθάνουσα μορφή του TGFβ και να επάγει φωσφορυλίωση της Smad2 στα αστροκύτταρα, ενώ γενετική ή φαρμακολογική απαλοιφή του ινωδογόνου σε μύες μειώνει τα επίπεδα του βιοενεργού TGFβ, τη φωσφορυλίωση της Smad2, την ενεργοποίηση της γλοίας και την επαγόμενη εναπόθεση στοιχείων της εξωκυττάριας ουσίας, όπως η *neurocan*, έπειτα από ΚΕΚ (Schachtrup et al., 2010).

Ακόμη, τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα μπορούν να καταστείλουν την προφλεγμονώδη μικρογλοία, κατά τον τραυματισμό του νευρικού ιστού (Smits et al., 2001; Tichauer et al., 2007), μια δράση η οποία οφείλεται εν μέρει στον εκκρινόμενο από τα αστροκύτταρα TGFβ1 (Ramirez et al., 2005). Φαίνεται ότι ο TGFβ1 καταστέλλει τη νευροτοξική δράση της μικρογλοίας, μειώνοντας αφ' ενός την έκφραση μορίων που συνδέονται με την αντιγονοπαρουσίαση και αφ' ετέρου την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO), ROS και προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (TNF-α) (Herrera-Molina and von Bernhardi, 2005).

Από την άλλη πλευρά, η σημασία της αυξημένης έκφρασης παραγόντων της BMP σηματοδότησης έπειτα από τραυματισμό του ενήλικου ΚΝΣ βρίσκεται υπό διερεύνηση. Αναλογικά με τη δράση τους κατά την ανάπτυξη, ενδέχεται η ταχεία και παροδική αύξηση των επιπέδων των BMPs να επάγει την ενεργοποίηση των αστροκυττάρων και τη γλοίωση που χαρακτηρίζουν διάφορους τραυματισμούς του ΚΝΣ (Miller et al., 1986). Σύμφωνα με την ομάδα του Hampton (Hampton et al., 2007), η αύξηση των BMPs μετά από τραυματική κάκωση ενδεχομένως συνδέεται με τις νευροπροστατευτικές δράσεις που έχουν περιγραφεί σε άλλα μοντέλα βλάβης του νευρικού ιστού, όπως στην ισχαιμία ή το νευροεκφυλισμό (Harvey et al., 2005; Zuch et al., 2004). Μάλιστα, η χορήγηση BMPs πριν (Wang et al., 2001) ή μετά από οξύ ισχαιμικό εγκεφαλικό τραυματισμό (Chang et al., 2003) φαίνεται να έχει νευροπροστατευτική επίδραση.

Αναφορικά με τον τραυματισμό του νωτιαίου μυελού, έχει προταθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα της BMP7 προωθούν την επιβίωση των νευρώνων και της γλοίας (Setoguchi et al., 2001). Ακόμη, έχει δειχθεί ότι διεγερμένα με BMPs αστροκύτταρα που προέρχονται από πρόδρομα νευρογλοιακά κύτταρα προωθούν την αναγέννηση των κατεστραμμένων νευραξόνων και συμβάλλουν στην ανάκτηση της κινητικής δραστηριότητας σε ένα μοντέλο τραυματισμού νωτιαίου μυελού (Davies et al., 2011; Shih et al., 2014). Συνοψίζοντας, το κατά πόσο οι νευροπροστατευτικές δράσεις των BMPs συνδέονται λειτουργικά με την επαγωγή της αστρογλοίωσης, όπως έχει δειχθεί για τους TGFβs, ή πρόκειται για παράλληλα μη σχετιζόμενα φαινόμενα δεν έχει ακόμη διαλευκανθεί. Προκειμένου να δοθεί εμπεριστατωμένη απάντηση είναι απαραίτητη η λεπτομερής ανάλυση των μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών που διέπουν τον τραυματισμό του ενήλικου ΚΝΣ και ρυθμίζουν την ιστική αναδιαμόρφωση.

1.4.2. Νευροεκφυλισμός σχετιζόμενος με τη νόσο Πάρκινσον

Μεταξύ των μοριακών συστημάτων που εμπλέκονται στη νόσο Πάρκινσον περιλαμβάνεται και το σύστημα σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ. Αυξημένα επίπεδα TGFβ1 και TGFβ2 έχουν βρεθεί όχι μόνο στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Vawter et al., 1996), αλλά και στην περιοχή του ραβδωτού σώματος ασθενών με ΝΠ (Mogi et al., 1995), ενώ ο GDNF, ένα άλλο μέλος της υπεροικογένειας με νευροτροφική δράση που εξαρτάται άμεσα από τους TGFβs σε ζωικά μοντέλα νευροεκφυλισμού (Schober et al., 2007), έχει χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές για τη ΝΠ (Sullivan and Toulouse, 2011). Επιπλέον, προσδέτες, υποδοχείς και ενδοκυττάριοι τελεστές Smad της υπεροικογένειας του TGFβ έχει βρεθεί ότι εκφράζονται φυσιολογικά στη μέλαινα ουσία και το ραβδωτό σώμα εγκεφάλου τρωκτικών, ενώ αποκλίνουσα σηματοδότηση από μέλη της υπεροικογένειας έχει συνδεθεί με την παθογένεια της νόσου (Andrews et al., 2006).

Να σημειωθεί ότι η επίδραση των TGFβs και των Ακτιβινών στη φυσιολογία των ντοπαμινεργικών νευρώνων εκτείνεται από την επαγωγή και τον καθορισμό του ντοπαμινεργικού φαινοτύπου, μέχρι τη νευροπροστασία σε πειραματικά μοντέλα της ΝΠ, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Andrews et al., 2006; Blum, 1998; Hegarty et al., 2014; Strelau et al., 2003; Sullivan et al., 1999). Πρόσφατη μελέτη σε διαγονιδιακούς μύες με μειωμένη TGFβ σηματοδότηση επιλεκτικά στους ώριμους νευρώνες, μέσω έκφρασης ενός μεταλλαγμένου TGFBR2 υποδοχέα, έδειξε τον ηλικιο-εξαρτώμενο νευροεκφυλισμό της μελαινοραβδωτής οδού (Tesseur et al., 2017). Αντίστοιχα, η απαλοιφή της πρωτεΐνης Smad3 έχει συσχετιστεί με μειωμένη τροφική υποστήριξη των ντοπαμινεργικών νευρώνων από τα αστροκύτταρα, μειωμένο μεταβολισμό ντοπαμίνης και αυξημένη συσσωμάτωση α-συνουκλεΐνης *in vivo* (Tarzia-Gonzalez et al., 2011). Αντίστροφα, ενίσχυση της TGFβ σηματοδότησης στη μέλαινα ουσία, μέσω υπερέκφρασης ενός συστηματικά ενεργού TGFBR1 υποδοχέα, παρεμπόδισε τον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων σε πειραματόζωα όπου είχε χορηγηθεί MPTP. Ακόμη, εξωγενής χορήγηση Ακτιβίνης Α συνέβαλε στη σημαντική επιβίωση των ντοπαμινεργικών καθώς και των ολικών νευρώνων της *SNpc* σε ένα μοντέλο νευροεκφυλισμού μέσω στερεοτακτικής έγχυσης 6-OHDA (Stayte et al., 2015).

Αντίστοιχη νευροπροστατευτική δράση έχει προταθεί και για τη BMP

σηματοδότηση σε διάφορα μοντέλα νευροεκφυλισμού. Για παράδειγμα, ενδοκοιλιακή (intraventricular) χορήγηση BMP7, μετά από στερεοτακτική έγχυση 6-OHDA στο ραβδωτό σώμα, οδήγησε σε σημαντική αύξηση των ντοπαμινεργικών νευρώνων της ομόπλευρης μέλαινας ουσίας, χωρίς ωστόσο σημαντική επίδραση στην αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα των πειραματοζώων (Zuch et al., 2004). Αντίστοιχα, έγχυση BMP7 στη μέλαινα ουσία επίμυων, πριν από τη χορήγηση 6-OHDA, διατήρησε μερικώς την επαγόμενη από KCl απελευθέρωση ντοπαμίνης στο ομόπλευρο ραβδωτό σώμα και αύξησε σημαντικά την ανοσοϊστοχημική εντόπιση της TH στην ομόπλευρη μελαινораβδωτή οδό (Harvey et al., 2004).

Στον αντίποδα των παραπάνω μελετών, έχει δειχθεί ότι αδενοϊκή υπερέκφραση ενεργού TGFβ1 στο μελαινораβδωτό σύστημα μυών, στους οποίους είχε χορηγηθεί MPTP, οδήγησε σε μειωμένη επιβίωση των ντοπαμινεργικών νευρώνων, συνοδευόμενη από μεγαλύτερη απώλεια ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα (Sanchez-Capelo et al., 2003; Sanchez-Capelo et al., 1999).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σύμφωνα με όσα περιγράφηκαν νωρίτερα, πληθώρα βιβλιογραφικών μελετών έχουν συσχετίσει διάφορους παράγοντες της υπεροικογένειας του TGFβ με τη ρύθμιση θεμελιωδών διαδικασιών του ΚΝΣ, συμπεριλαμβανομένων της νευρογένεσης, της διαφοροποίησης των γλοιακών κυττάρων, της συγκρότησης και διατήρησης της ακεραιότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και άλλων (Bond et al., 2012; Meyers and Kessler, 2017). Επιπλέον, πολυάριθμες μελέτες συνδέουν την υπεροικογένεια του TGFβ με παθολογικές καταστάσεις του ΚΝΣ που επηρεάζουν μεγάλο μέρος του παγκόσμιου πληθυσμού, όπως η νευροφλεγμονή, οι βλάβες μετά από μηχανικές τραυματικές κακώσεις και οι νευροεκφυλιστικές νόσοι (Dobolyi et al., 2012; Kashima and Hata, 2018). Μάλιστα, έχει δειχθεί ότι αρκετοί παράγοντες του συγκεκριμένου συστήματος σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων προσδετών, υποδοχέων και ενδοκυττάρων τελεστών, υπερεκφράζονται σε επίπεδο mRNA ή/και πρωτεΐνης σε πειραματικά μοντέλα μηχανικού ή/και βιοχημικού τραυματισμού του νευρικού ιστού (Andrews et al., 2006; Diniz et al., 2019). Ακόμη, έχουν περιγραφεί αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα των ίδιων παραγόντων σε ανθρώπινες κακώσεις του νωτιαίου μυελού (Buss et al., 2008), καθώς και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ή το ραβδωτό σώμα ασθενών με νόσο Πάρκινσον (Mogi et al., 1995; Vawter et al., 1996).

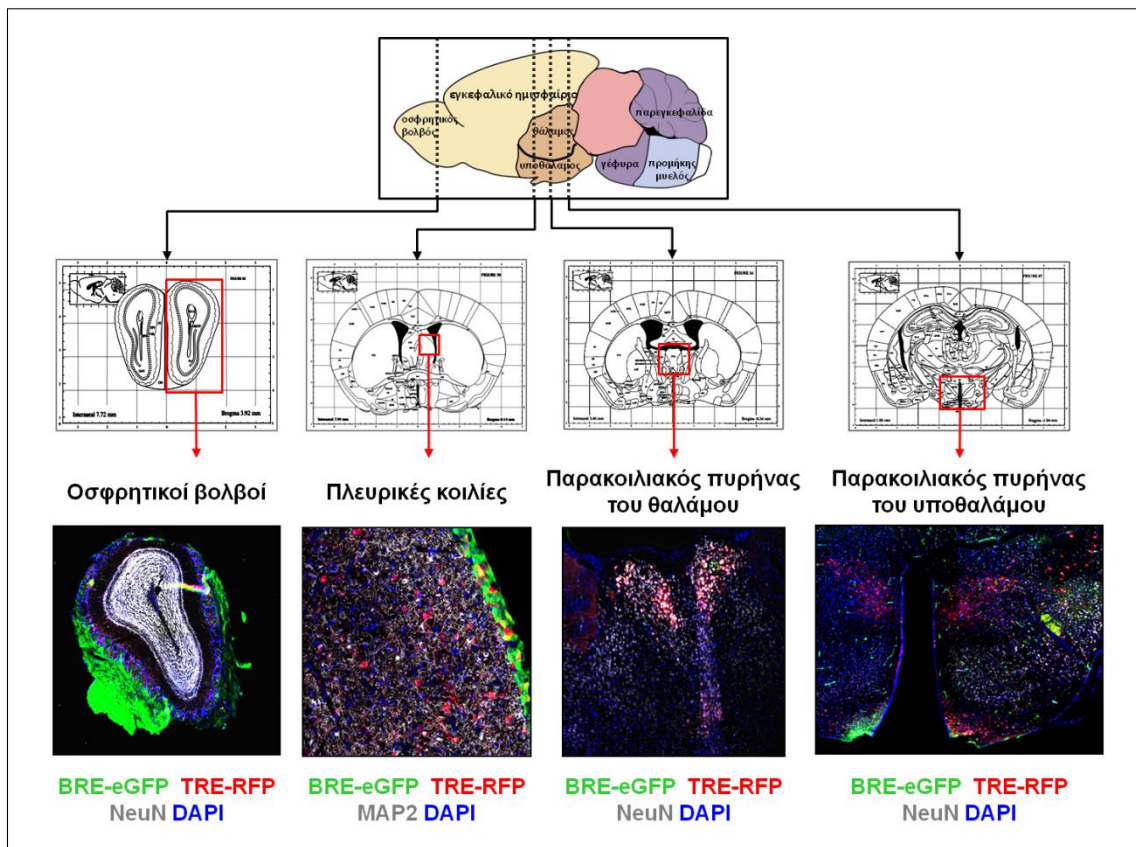
Παρά την εκτεταμένη μελέτη μεμονωμένων παραγόντων του συστήματος σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ κατά την ανάπτυξη, την ομοίωση και την παθοφυσιολογία του ΚΝΣ, τα δεδομένα που αφορούν στην ταυτότητα των κυτταρικών αποδεκτών της δράσης αυτής, καθώς και στον τρόπο με τον οποίο τα συγκεκριμένα κύτταρα αποκωδικοποιούν/αφομοιώνουν τα πολύπλοκα σήματα που παράγονται από κυτταροκίνες της υπεροικογένειας, παραμένουν ελλιπή και αρκετά ασαφή. Ασαφής παραμένει και ο ακριβής ρόλος της ενεργοποίησης των δύο βασικών κλάδων του συστήματος, της TGFβ- και της BMP-επαγόμενης σηματοδότησης, σε παθολογικές καταστάσεις του ΚΝΣ. Ειδικότερα, το χωροχρονικό πρότυπο ενεργοποίησης της TGFβ ή/και της BMP σηματοδότησης συνδέεται με νευροτοξικές ή νευροπροστατευτικές διαδικασίες κατά την εκδήλωση δομικών, λειτουργικών ή/και βιοχημικών αλλοιώσεων του νευρικού ιστού; Ακόμα, υπάρχει λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο σηματοδοτικών κλάδων σε συνθήκες που αποκλίνουν

από την ομοίωση;

Αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτελεί η αποσαφήνιση των παραπάνω ερωτημάτων, χρησιμοποιώντας ένα σύστημα διπλά διαγονιδιακών μυών αναφοράς που αναπτύχθηκε στο IIBEAA μέσω διασταύρωσης δύο διαγονιδιακών σειρών, όπου οι δυνητικοί κυτταρικοί αποδέκτες της κανονικής TGFβ ή BMP σηματοδότησης εκφράζουν την κόκκινη (Red Fluorescent Protein, RFP) ή την ενισχυμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (enhanced Green Fluorescence Protein, eGFP), αντίστοιχα. Η ανάπτυξη των εφ' εξής καλούμενων TRE-RFP (Stavropoulos et al., σε διαδικασία υποβολής) και BRE-eGFP (Monteiro et al., 2004) διαγονιδιακών μυών αναφοράς βασίστηκε στην αξιοποίηση άρτια χαρακτηρισμένων αλληλουχιών ειδικής απόκρισης σε TGFβs/Ακτιβίνες (TGFβ Responsive Elements, TRE) ή σε BMPs (BMP Responsive Elements, BRE), αντίστοιχα. Χρησιμοποιώντας τους συγκεκριμένους διαγονιδιακούς μύες αναφοράς σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου, διαπιστώθηκε ότι η σηματοδότηση από μέλη της υπερικογένειας του TGFβ είναι ενεργή και οριοθετημένη σε διάφορες περιοχές του νεογνικού και του ενήλικου εγκεφάλου υπό ομοιοστατικές συνθήκες (**Εικόνα 9**), όπως στους οσφρητικούς βολβούς, στο φλοιό, στα τοιχώματα των κοιλιών, στο χοριοειδές πλέγμα και στο αγγειακό δίκτυο. Μάλιστα, δείχθηκε ότι μεταξύ των κυτταρικών αποδεκτών της TGFβ ή/και της BMP σηματοδότησης κατά την ομοίωση περιλαμβάνονταν νευρώνες, αστροκύτταρα και δομικά κύτταρα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, όπως ενδοθηλιακά κύτταρα και περικύτταρα.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω ευρήματα που αφορούν στην ομοίωση, στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής και προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της ενεργοποίησης των TGFβ και BMP κλάδων στην παθοφυσιολογία του ΚΝΣ, εφαρμόστηκε ένα μοντέλο εστιακού διεισδυτικού τραυματισμού του εγκεφάλου. Έτσι, ενήλικοι μύες αγρίου τύπου υποβλήθηκαν σε μονόπλευρη οξεία κρανιοεγκεφαλική κάκωση του δεξιού εγκεφαλικού φλοιού. Εν συνεχεία, συλλέχθηκαν δείγματα ιστού που εμπεριείχαν τις τραυματισμένες και τις αντίστοιχες «υγιείς» περιοχές, σε διαφορετικά χρονικά σημεία μετά την πρόκληση της βλάβης, και αναλύθηκαν χαρακτηριστικοί δείκτες ενεργοποίησης της υπερικογένειας του TGFβ. Με τη βοήθεια των διπλά διαγονιδιακών μυών αναφοράς TRE-RFP/BRE-eGFP προσδιορίστηκε η ταυτότητα των κυτταρικών στόχων των υπό μελέτη σηματοδοτικών μονοπατιών. Επιπλέον, αναπτύχθηκαν

συστήματα πρωτογενών καλλιέργειών γλοίας από νεογνικούς μύες, καθώς και πρωτόκολλα λήψης αμιγών κυτταρικών πληθυσμών, με τη βοήθεια κυτταροδιαχωριστή.



Εικόνα 9. Εντόπιση των κυτταρικών στόχων των TGFβ και BMP σηματοδοτικών κλάδων σε διακριτές περιοχές του ενήλικου εγκεφάλου κατά την ομοιοστάση, με τη βοήθεια των διπλά διαγονιδιακών μυών αναφοράς TRE-RFP/BRE-eGFP. Αντιπροσωπευτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας έναντι των διαγονιδίων BRE-eGFP (πράσινο χρώμα) και TRE-RFP (κόκκινο χρώμα) και των νευρωνικών πρωτεϊνών NeuN και MAP2 (λευκό χρώμα) σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλου μυών ηλικίας 3-4 μηνών, στο επίπεδο των οσφρητικών βολβών, των πλευρικών κοιλιών και των παρακοιλιακών πυρήνων του θαλάμου και του υποθαλάμου. Το DAPI (μπλε χρώμα) χρησιμοποιήθηκε για χρώση των πυρήνων. Το επίπεδο κάθε στεφανιαίας τομής σημειώνεται με διακεκομμένη γραμμή και ένα μαύρο βέλος καταλήγει στο αντίστοιχο πάνελ του στερεοτακτικού άτλαντα για τον εγκέφαλο του μύς (“The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates”, G.Paxinos & K.B.J. Franklin, 2001, San Diego: Academic). Οι νευρώνες (NeuN⁺ ή MAP2⁺ κύτταρα) περιλαμβάνονται μεταξύ των κυτταρικών αποδεκτών της TGFβ ή/και της BMP σηματοδότησης κατά την ομοιοστάση.

Προκειμένου να αναλυθεί ενδελεχώς το μεταγράψωμα των πρωτογενών κυττάρων που διεγέρθηκαν με ανασυνδυασμένους προσδέτες της υπεροικογένειας του TGFβ για την ενεργοποίηση της TGFβ ή/και της BMP σηματοδότησης *in vitro*, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing ή RNA-Seq) (Morin et al., 2008; Wang et al., 2009). Μέσω λεπτομερούς βιοπληροφορικής ανάλυσης αναδείχθηκαν κυτταρικές διεργασίες που ενεργοποιούνται ή καταστέλλονται από την TGFβ ή/και BMP σηματοδότηση, καθώς και κυρίαρχοι

παράγοντες, η συμμετοχή των οποίων επιβεβαιώθηκε και *in vivo*, στο μοντέλο του δεισδυτικού εγκεφαλικού τραυματισμού.

Παράλληλα, με σκοπό να διερευνηθεί ο ρόλος που διαδραματίζει η σχετική ισορροπία των TGFβ και BMP σηματοδοτικών κλάδων στην παθοφυσιολογία του νευρικού ιστού, εκτός του μηχανικού τραυματισμού, εφαρμόστηκε κι ένα μοντέλο βιοχημικού τραυματισμού του εγκεφάλου, μέσω χορήγησης της μιτοχονδριακής νευροτοξίνης MPTP για την προσομοίωση παρκινσονικών συμπτωμάτων, τόσο σε αγρίου τύπου όσο και σε διπλά διαγονιδιακούς μύες αναφοράς. Ακόμη, εφαρμόστηκε ένα πρωτόκολλο «προληπτικής/θεραπευτικής» στρατηγικής για τη διερεύνηση του πιθανού νευροπροστατευτικού ή νευροτοξικού ρόλου της BMP-επαγόμενης σηματοδότησης, μέσω στερεοτακτικής υπερέκφρασης ενεργοποιητών ή αναστολέων της σηματοδότησης στη μέλαινα ουσία μυών, πριν από τη χορήγηση της νευροτοξίνης. Ακολούθησε μελέτη της κινητικής δραστηριότητας των πειραματοζώων, μέσω ευρέως χρησιμοποιούμενων συμπεριφορικών δοκιμασιών.

Κατά συνέπεια, η ανάδειξη βασικών νευροπροστατευτικών ή/και νευροτοξικών διεργασιών και η διαλεύκανση συγκεκριμένων μοριακών γεγονότων/μηχανισμών ενδεχομένως να συμβάλλει μελλοντικά στην ανάπτυξη στοχευμένων και εξατομικευμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων, στο πλαίσιο νευροεκφυλιστικών διαταραχών ή/και τραυματικών κακώσεων του ΚΝΣ.

3. ΥΛΙΚΑ

3.1. Αντιδραστήρια και αναλώσιμα υλικά

Τα βιολογικά και χημικά αντιδραστήρια και τα αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στις μεθόδους της ανοσοκυτταροχημείας, της ανοσοϊστοχημείας, της κυτταρομετρίας ροής, του ανοσοστυπώματος κατά Western, της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, καθώς και εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν για την *ex vivo* διατήρηση πρωτογενών κυττάρων γλοίας και τις μοριακές αναλύσεις που διεξήχθησαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής καταγράφονται στον **Πίνακα 2**.

Αντιδραστήρια για ανοσοκυτταροχημεία & ανοσοϊστοχημεία		
Προϊόν	Εταιρία	Αριθμός Καταλόγου
DAPI dihydrochloride (4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη)	Merck Millipore	268298
Αντικειμενοφόροι πλάκες πολυλυσίνης	Menzel Gläser	J2800AMNZ
Καλυπτρίδες 60x24 mm	Knittel	KA01101009
Καλυπτρίδες διαμέτρου 12 mm	Knittel	KN10004391
Κρυοπροστατευτική ρητίνη έγκλεισης (Shandon Cryomatrix embedding resin)	ThermoFisher Scientific	6769006
Μέσο έγκλεισης φθορισμού (fluorescence mounting medium)	Dako	S3023
Φυσιολογικός ορός αίγας (NGS)	Vector Laboratories	S-1000
Φυσιολογικός ορός όνου (NDS)	Sigma-Aldrich	D-9663
Αντιδραστήρια για κυτταροκαλλιέργειες		
Προϊόν	Εταιρία	Αριθμός Καταλόγου
DNάση I (20000 U)	ThermoFisher Scientific	18047-019
SB431542 hydrate	Sigma-Aldrich	S4317
Ανασυνδυσασμένη πρωτεΐνη BMP4 μυός	R&D Systems	5020-BP-010
Ανασυνδυσασμένη πρωτεΐνη Noggin μυός	R&D Systems	719-NG
Ανασυνδυσασμένη πρωτεΐνη TGFβ1 μυός	R&D Systems	7666-MB-005
Διάλυμα θρυψίνης από πάγκρεας χοίρου (10x)	Sigma-Aldrich	T4674
Διάλυμα Θρυψίνης-EDTA (1x)	Sigma-Aldrich	T3924
Θειϊκή γενταμικίνη (Garamycin)	Schering Plough	0409-1207-03
Ισορροπημένο διάλυμα αλάτων Hank's (HBSS)	ThermoFisher Scientific	24020-091
Ορός εμβρύου βοός (FBS)	ThermoFisher Scientific	10108-165
Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (10000 U/ml)	ThermoFisher Scientific	15140-122
Πολυ-D-λυσίνη (PDL)	Sigma-Aldrich	P7405

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS)	ThermoFisher Scientific	70013-016
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων Dulbecco's (DPBS)	ThermoFisher Scientific	14040-133
Τροποποιημένο θρεπτικό μέσο Eagle (DMEM)	ThermoFisher Scientific	41965-062
Υλικά για κυτταρομετρία ροής		
Προϊόν	Εταιρία	Αριθμός Καταλόγου
Κυτταρικός ηθμός με μέγεθος πόρων 100 μm (Falcon® 100 μm Cell Strainer)	Corning Life Sciences	352360
Σωληνάκια πολυπροπυλενίου	BD Falcon	352063
Σωληνάκια πολυστυρενίου	BD Falcon	352054
Αντιδραστήρια για ανοσοσύτρωμα κατά Western		
Προϊόν	Εταιρία	Αριθμός Καταλόγου
Αλβουμίνη ορού βοός (BSA)	Sigma-Aldrich	A9647
Αντιδραστήριο για Bradford (Protein Assay Dye Reagent Concentrate)	Bio-Rad	5000006
Αντιδραστήριο για ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (Clarity Western ECL Substrate)	Bio-Rad	170-5061
Διάλυμα 30% ακρυλαμίδης/bis ακρυλαμίδης (37.5:1)	Bio-Rad	161-0158
Διάλυμα χρωστικής Ponceau S	Sigma-Aldrich	09189
Δισκία αναστολέων πρωτεασών (cOmplete™, Mini)	Sigma-Aldrich	11836153001
Δισκία αναστολέων φωσφατασών (PhosSTOP)	Sigma-Aldrich	4906837001
Μείγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού μεγέθους (Page Ruler prestained protein ladder)	ThermoFisher Scientific	26616
Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	Sigma-Aldrich	10600002
Φιλμ (Super RX Film)	Fujifilm	47410
Χαρτί χρωματογραφίας Whatman®	Sigma-Aldrich	WHA3030917
Αντιδραστήρια για υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)		
Προϊόν	Εταιρία	Αριθμός Καταλόγου
3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (DOPAC)	Sigma-Aldrich	37860-1G
3-μεθοξυτυραμίνη (3-MT)	Sigma-Aldrich	65390
Αιθανονιτρίλιο (CH ₃ CN)	Sigma-Aldrich	34851
Ντοπαμίνη	Sigma-Aldrich	H8502
Οκτυλθειικό νάτριο (C ₈ H ₁₇ NaSO ₄)	Sigma-Aldrich	O4003-5G
Ομοβανιλλικό οξύ (HVA)	Sigma-Aldrich	H1252
Παγόμορφο αιθανικό οξύ (CH ₃ COOH)	Fluka	45731
Στήλη χρωματογραφίας YMC-Triart C18, Narrowbore 12 nm, 3 μm, 100 x 2.0 mm	YMC	TA12S03-1002WT
Υπερχλωρικό οξύ (HClO ₄)	Sigma-Aldrich	34288

Αντιδραστήρια για μοριακές αναλύσεις

Προϊόν	Εταιρία	Αριθμός Καταλόγου
Agilent DNA 1000 Kit	Agilent	5067-1504
GoTaq® Flexi DNA Πολυμεράση	Promega	M8305
iTaq Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad	1725124
RQ1 DNάση I ελεύθερη RNAσών (1U/μg)	Promega	M6101
Trizol (TRI Reagent)	Sigma-Aldrich	T9424
Ανασυνδυασμένος αναστολέας ριβονουκλεασών (RNaseOUT)	ThermoFisher Scientific	10777-019
Αντίστροφη μεταγραφάση M-MLV RT (200U)	Promega	M1701
Απεσταγμένο H ₂ O ελεύθερο DNAσών και RNAσών	ThermoFisher Scientific	10977035
Διάλυμα φόρτωσης για DNA (6x)	ThermoFisher Scientific	R0611
Διάλυμα φόρτωσης για RNA (2x)	ThermoFisher Scientific	R0641
Ζεύγη εκκινητών για (qRT-)PCR	ThermoFisher Scientific	-
Μαγνητικά σφαιρίδια δέσμησης DNA (AMPure XP)	Beckman Coulter	A63880
Μείγμα τμημάτων DNA γνωστού μεγέθους (GeneRuler 50 bp DNA ladder)	ThermoFisher Scientific	SM0372
Μείγμα τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs)	Promega	U1515
Μείγμα τυχαίων εκκινητών (random primers)	ThermoFisher Scientific	48190-011
Ομάδα αντιδραστηρίων για ποσοτικοποίηση cDNA βιβλιοθηκών (KAPA Library Quantification kit)	Roche	KK4903
Ομάδα αντιδραστηρίων για σύνθεση cDNA βιβλιοθηκών (TruSeq RNA Library Prep Kit v2)	Illumina	RS-122-2002
Πρωτεΐνάση K	Sigma-Aldrich	P2308
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης PCR (ThermoPol buffer, 10x)	New England BioLabs	B9004S

Χημικά αντιδραστήρια

Προϊόν	Εταιρία	Αριθμός Καταλόγου
MPTP (1-μέθυλ-4-φαίνυλ-1,2,3,6,-τετραϋδροπυριδίνη)	Sigma-Aldrich	M0896-100MG
Αγαρόζη	Sigma-Aldrich	A9539
Αιθυλενογλυκόλη/1,2-αιθανοδιόλη (HOCH ₂ CH ₂ OH)	PanReac Applichem	121316.1214
Απόλυτη αιθανόλη (CH ₃ CH ₂ OH)	Carlo Erba	414608
Απορρυπαντικό Triton X-100	PanReac Applichem	A1388
Απορρυπαντικό Tween 20 (Polysorbate 20)	PanReac Applichem	A4974
β-μερκαπτοαιθανόλη	Sigma-Aldrich	M6250
Γλυκερόλη (HOCH ₂ -CHOH-CH ₂ OH)	Carl Roth	3783.1
Γλυκίνη	Sigma-Aldrich	50046
Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃) 1%	PanReac Applichem	A1152
Δισκία παραφορμαλδεΐδης (PFA)	PanReac Applichem	211511

Δωδεκυλο-θειικό νάτριο (SDS)	Sigma-Aldrich	L5750
Ισοπεντάνιο/μεθυλοβουτάνιο [CH ₃ CH ₂ CH(CH ₃) ₂]	Sigma-Aldrich	M32631
Ισοπροπανόλη (CH ₃ CHCH ₃)	Carlo Erba	415156
Ισοφλουράνιο (C ₃ H ₂ ClF ₅ O)	Piramal Critical Care	Iso-Vet
Κιτρικό νάτριο (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇)	Sigma-Aldrich	C0909
Μεθανόλη (CH ₃ OH)	Carlo Erba	414832
Σουκρόζη/σακχαρόζη (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Sigma-Aldrich	S7903
Τετραμεθυλαιθυλενδιαμίνη (TEMED)	Sigma-Aldrich	T9281
Τρομεθαμίνη (Tris)	Sigma-Aldrich	T1503
Τρομεθαμίνη-οξικό οξύ-EDTA (TAE buffer, 50x)	PanReac Applichem	A4686,1000
Υπερθειικό αμμώνιο (APS)	PanReac Applichem	A2941,0100
Χλωροφόρμιο (CHCl ₃)	Carlo Erba	67-66-3
Λοιπά υλικά		
Προϊόν	Εταιρία	Αριθμός Καταλόγου
Μαγνητική βάση προετοιμασίας cDNA βιβλιοθηκών (Magnetic Stand-96 / DynaMag™-96 Side Magnet)	ThermoFisher Scientific	AM10027/ 12331D
Μεταλλική βελόνα διατομής 19G (B Braun Sterican)	Lab Unlimited (Carl Stuart Group)	4665511

Πίνακας 2. Υλικά διατριβής. Για κάθε προϊόν παρατίθεται η εταιρία παραγωγής και ο αντίστοιχος αριθμός καταλόγου.

3.2. Αντισώματα

Τα πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στον ανοσοφθορισμό και το ανοσοσύπωμα κατά Western, καθώς και εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν για τον κυτταρικό διαχωρισμό των πληθυσμών της γλοίας μέσω κυτταρομετρίας ροής, αναφέρονται στον **Πίνακα 3**.

Πρωτογενή αντισώματα για ανοσοφθορισμό (IF) & ανοσοσύπωμα κατά Western (WB)

Ειδικότητα αντισώματος	Προέλευση	Εταιρία	Αριθμός καταλόγου	Αραίωση εργασίας
αντι-ABCA1 (ATP-εξαρτώμενος μεταφορέας A1)	κόνικλος	Novus Biologicals	NB400-105	1:1000 (WB)
αντι-AIF1/IBA1 (φλεγμονώδης παράγοντας αλλομοσχεύματος 1)	κόνικλος	Wako	019-19741	1:250 (IF)
αντι-AKT	κόνικλος	Cell Signaling	9272	1:1000 (WB)
αντι-ALDH1L1 (αλδεϋδική αφυδρογονάση)	κόνικλος	Abcam	ab87117	1:200 (IF)

αντι-APOE (απολιποπρωτεΐνη E)	αίγα	Santa Cruz Biotechnology	sc-6384	1:500 (WB)
αντι-COL1 (κολλαγόνο τύπου I)	κόνικλος	Abcam	ab34710	1:150 (IF)
αντι-ERK2 (ρυθμιζόμενη από εξωκυττάρια σήματα κινάση 2)	κόνικλος	Santa Cruz Biotechnology	sc-154	1:1000 (WB)
αντι-GFAP (όξινη ινώδης γλοιακή πρωτεΐνη)	κόνικλος	Dako	Z0334	1:750 (IF) 1:4000 (WB)
αντι-GFP (πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη)	όρνιθα	Abcam	ab13970	1:500 (IF)
αντι-GLUL (συνθετάση της γλουταμίνης)	κόνικλος	Antibodies Online	ABIN398820	1:100 (IF) 1:500 (WB)
αντι-MAP2 (συνδεόμενη με μικροσωληνίσκους πρωτεΐνη 2)	κόνικλος	Santa Cruz Biotechnology	sc-20172	1:500 (IF)
αντι-NeuN (νευρωνική πυρηνική πρωτεΐνη)	μυς	Merck Millipore	MAB377	1:500 (IF)
αντι-Noggin	κόνικλος	Abcam	ab16054	1:100 (IF) 1:1000 (WB)
αντι-OLIG2 (ολιγοδενδρογλοιακός μεταγραφικός παράγοντας 2)	κόνικλος	Merck Millipore	AB9610	1:200 (IF)
αντι-P38a	κόνικλος	Santa Cruz Biotechnology	sc-535	1:1000 (WB)
αντι-phospho-AKT (αναγνώριση της θέσης φωσφορυλίωσης Ser473)	κόνικλος	Cell Signaling	9271S	1:1000 (WB)
αντι-phospho-P38 (αναγνώριση των θέσεων φωσφορυλίωσης Thr180/Tyr182)	κόνικλος	Cell Signaling	9211S	1:1000 (WB)
αντι-phospho-ERK1/2 (αναγνώριση των θέσεων φωσφορυλίωσης Thr202/Tyr204)	μυς	Cell Signaling	9106	1:1000 (WB)
αντι-phospho-Smad1/5/8 (αναγνώριση των θέσεων φωσφορυλίωσης Ser463/465)	κόνικλος	Merck Millipore	AB3848	1:1000 (WB)
αντι-phospho-Smad2 (αναγνώριση των θέσεων φωσφορυλίωσης Ser465/467)	κόνικλος	Cell Signaling Merck Millipore	3101S AB3849	1:1000 (WB)
αντι-phospho-Smad3 (αναγνώριση των θέσεων φωσφορυλίωσης Ser423/425)	κόνικλος	Cell Signaling	9520	1:1000 (WB)
αντι-RFP (κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη)	επίμυς	Antibodies Online	ABIN334653	1:100 (IF)
αντι-S100β	κόνικλος	Abcam	ab52642	1:200 (IF)
αντι-Smad1/5/8	κόνικλος	Santa Cruz Biotechnology	sc-6031-R	1:1000 (WB)
αντι-Smad2/3	κόνικλος	Cell Signaling	3102	1:1000 (WB)
αντι-TH (υδροξυλάση της τυροσίνης)	κόνικλος	Merck Millipore	AB512	1:1000 (IF)
αντι-β-ακτίνη	μυς	Sigma-Aldrich Origene	A2228 TA309077	1:5000 (WB)

Δευτερογενή αντισώματα για ανοσοφθορισμό				
Ειδικότητα αντισώματος	Προέλευση	Εταιρία	Αριθμός καταλόγου	Αραίωση εργασίας
αντι-IgG επίμυος συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa Fluor® 594	αίγα	ThermoFisher Scientific	A11007	1:200
	όνος	Jackson ImmunoResearch	712-586-150	
αντι-IgG κόνικλου συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa Fluor® 647	όνος	Jackson ImmunoResearch	711-605-152	1:250
αντι-IgG μυός συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa Fluor® 647	όνος	Jackson ImmunoResearch	715-606-150	1:250
αντι-IgG όρνιθας συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa Fluor® 488	αίγα	ThermoFisher Scientific	A11039	1:200
	όνος	Jackson ImmunoResearch	703-546-155	
Δευτερογενή αντισώματα για ανοσοσύτρωμα κατά Western				
Ειδικότητα αντισώματος	Προέλευση	Εταιρία	Αριθμός καταλόγου	Αραίωση εργασίας
αντι-IgG κόνικλου συζευγμένο με HRP	αίγα	Santa Cruz Biotechnology	sc-2301	1:5000
αντι-Igs αίγας συζευγμένο με HRP	κόνικλος	Dako	P0449	1:3000
αντι-Igs μυός συζευγμένο με HRP	αίγα	Dako	P0447	1:5000
Αντισώματα για κυτταρομετρία ροής				
Ειδικότητα αντισώματος	Προέλευση	Εταιρία	Αριθμός καταλόγου	Αραίωση εργασίας
αντι-GLAST συζευγμένο με φθοριόχρωμα APC	μυς	Miltenyi	130-095-814	2 μl /10 ⁶ κύτταρα
αντι-CD11b συζευγμένο με φθοριόχρωμα APC-Cy7	επίμυος	BioLegend	101226	1 μl /10 ⁶ κύτταρα
Ισοτυπικό αντίσωμα ελέγχου (IgG2a, κ μυός συζευγμένο με φθοριόχρωμα APC)	μυς	BioLegend	400219	2 μl /10 ⁶ κύτταρα

Πίνακας 3. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοφθορισμό (IF), ανοσοσύτρωμα κατά Western (WB) και κυτταρομετρία ροής. Η περιγραφή κάθε αντισώματος περιλαμβάνει την προέλευση (ξενιστής στον οποίο αναπτύχθηκε), την εταιρία παραγωγής του, τον αντίστοιχο αριθμό καταλόγου και τη χρησιμοποιούμενη αραίωση εργασίας για κάθε μέθοδο.

3.3. Αλληλουχίες εκκινητών

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή είτε απλής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είτε ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative Real-Time PCR, qRT-PCR) παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4**.

Γονίδιο	Πρόσθιος εκκινητής (5' → 3')	Ανάστροφος εκκινητής (5' → 3')	Μέγεθος προϊόντος (bp)	T _m (°C)
<i>Abca1</i>	TGTGGAATCGTCCCTCAGTT	CACTTTCATGGTCGCTGCC	119	59
<i>Abcg4</i>	TGGACATCGAGTTCGTGGAA	GGGTCTTGTAACCCCGTTTG	75	59
<i>Apoe</i>	GCCTAGCCGAGGGAGAGCCG	TGTGACTTGGGAGCTCTGCAGC	155	66
<i>Bmp10</i>	CCATGCCGTCTGCTAACATC	CCGGAGCCCATTA AAAAGTGA	80	58
<i>Bmp2</i>	TGTACCGCAGGCACTCAG	TCCTCCACGGCTTCTTCG	115	59
<i>Bmp3</i>	TTTGATGCTTTCTACTGCTCTG	GATGGTGGCGTGATTTGATG	151	57
<i>Bmp4</i>	GAGGAGGAGGAAGAGCAGAG	TCTCCAGATGTTCTTCGTGATG	106	58
<i>Bmp5</i>	CCGCAATAAATCCA ACTCTCATC	ATCCAGTCCTGCCATCCC	138	58
<i>Bmp6</i>	GCAGGAGCATCAGCACAGAG	TCCATCCCGAGTCACACAC	169	61
<i>Bmp7</i>	GCTATGCTGCCTACTACTGTGAG	GGGTACTGTGTCTGGGTTGATG	119	60
<i>Bmp8a</i>	CCCACTGGACTCCTGTATGAAC	AGAGGTGGCACTCAGTTTGGT	121	60
<i>Col1a1</i>	GAGCGGAGAGTACTGGATCG	GTTCGGGCTGATGTACCAGT	142	60
<i>Col5a2</i>	GTGTAGGAGAAGCAGGAC	AGAGCAGCAGTAAGATGG	88	54
<i>Ctgf (Ccn2)</i>	AGCCTCAA ACTCCAAACACC	CAACAGGGATTTGACCAC	181	58
<i>Cyp51a1</i>	ATGGAGGTTTTACCCACGCT	CTCGATGGGCTCTATCCCTG	84	59
<i>Dhcr24</i>	GCGCCATCATTCCTCAAGTC	GTGGAGGGCTGGATTTTGAC	105	59
<i>eGfp</i>	ACCACTACCTGAGCACCCAGTC	GTCCATGCCGAGAGTGATCC	110	58
<i>Gapdh</i>	CCAGTATGACTCCACTCACG	CTCCTGGAAGATGGTGATGG	97	58
<i>Gfap</i>	CGGAGACGCATCACCTCTG	AGGGAGTGGAGGAGTCATTCG	126	60
<i>Glul</i>	CAGGGACATCGTGGAGGCTC	TTGGAATCCCACTGGGCAG	100	62
<i>Hmgcr</i>	CAGGAGCGAACCAAGAGAGA	AAGCACAAACGTAGCTCTGC	86	59
<i>Id1</i>	GGCGAGATCAGTGCCTTG	AAGGGCTGGAGTCCATCTG	106	58
<i>Idi1</i>	AAGCCTCCCCAGAAAGGAAG	AGGAGTGATTGCGGCC	118	59
<i>Igf1</i>	TGCTCCAAAGACAAAATACCCA	ATGGCCCTTTATCACCACCA	109	59
<i>Il6</i>	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA	141	62
<i>Inhba</i>	ACCTCGGAGATCATCACCTTTG	GCACGCTCCACTACTGACAG	101	60
<i>Lcat</i>	CAACGGATATGTGCGGGATG	TATTCATCCTGCTGGTGGGG	78	59
<i>Ldlr</i>	CTGTGGGCTCCATAGGCTATCT	GCGGTCCAGGGTTCATCTTC	68	61
<i>Lif</i>	ATGTGCGCCTAACATGACAG	TATGCGACCATCCGATACAG	90	59
<i>Mmp2</i>	TTGAGAAGGATGGCAAGTATGG	TGGAAGCGGAACGGGAAC	100	60

<i>Ncan</i>	TATGGGGGCCGGATCTGT	GTCCTGTGTGCCTGATCCC	85	60
<i>Noggin</i>	CTCGGGGGCCACTACGA	TCCAGCTCCGCCAGGTC	107	61
<i>Nrp1</i>	GCACAGGTGATGACTTCCAG	TGTCGGGAAGCTGATTGGA	98	59
<i>Pmepa1</i>	GGAGGAGAGACGATGGACTG	ATTCCACCTGACACCGTACT	70	59
<i>Rfp</i>	GCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAG	CGCCGGTGGAGTGGCGGCC	670	64
<i>Sc5d</i>	ACTCTCCGCTGGCTGTAAG	ATAAGGGCGAGGACTGAACC	70	59
<i>Serpine1</i>	CTCCGAGAATCCCACACAG	ACTTTGAATCCCATAGCATC	191	57
<i>Slc1a2 (Glt1)</i>	ATGTCCACGACCATCATTGC	ACCTCGTCGTTCTTCTTCCC	113	60
<i>Slc1a3 (Glast)</i>	ACCAAAAGCAACGGAGAAGAG	GGCATTCCGAAACAGGTAAGTC	144	59
<i>Smad6</i>	AATTCTCAGATGCCAGCATG	AGGTAGGTCGTAGAAGATGC	140	56
<i>Smad7</i>	CCTCCTCCTTACTCCAGATACC	AGTCTTCTCCTCCAGTATGC	192	59
<i>Sqle</i>	ATGATGCTGTAATCGGCGTG	AAGAGTCCATCCGCAACAAC	94	59
<i>Srebf1</i>	CTTTTCCTTAACGTGGGCCT	GAGCATGTCTTCGATGTCGTT	147	59
<i>Srebf2</i>	TGGGCGATGGATGAGAGC	ACTCTCCCACTTGATTGCTGA	130	59
<i>Tgfb1</i>	ACTGGAGTTGTACGGCAGTG	GGCTGATCCCCTTGATTCC	121	59
<i>Tgfb2</i>	GGATGGAAATGGATCCATGAACCC	TGTTGTACAGGCTGAGGACTTTGG	115	61
<i>Tgfb3</i>	CGTTTCAATGTGTCCTCAGTGGAG	AAGAGCTCAATTCTCTGCTCTGTG	116	61
<i>Tnc</i>	TACCTCTCTGGAATTGCTCCC	CCGGTTCAGCTTCTGTGGTAG	73	61

Πίνακας 4. Αλληλουχίες εκκινητών για απλή PCR ή ποσοτική qRT-PCR. Παρατίθενται οι αλληλουχίες των πρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών που σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας τα εργαλεία PrimerBank (Harvard Medical School, ΗΠΑ) και NCBI Primer-BLAST (National Institutes of Health, ΗΠΑ), οι αντίστοιχες θερμοκρασίες τήξης (Tm) και το μέγεθος των προϊόντων (σε bp) που συντίθενται.

3.4. Ρυθμιστικά διαλύματα

Η σύσταση βασικών ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή παρατίθεται στον επόμενο Πίνακα.

Ρυθμιστικό Διάλυμα	Σύσταση	Χρήση
Κρυοπροστατευτικό διάλυμα (anti-freezing buffer)	13 mM NaH ₂ PO ₄ , 38.4 mM Na ₂ HPO ₄ , 30% v/v γλυκερόλη, 30% v/v αιθυλενογλυκόλη	Συντήρηση εγκεφαλικών τομών
Διάλυμα πέψης (digestion buffer)	Θρεπτικό μέσο DMEM (1x), 1% P/S, 100 μg/ml DNάση I, 0.2x διάλυμα θρυψίνης από πάγκρεας χοίρου	Πέψη εγκεφαλικού ιστού
Διάλυμα κυτταρικού διαχωρισμού (FACS buffer)	διάλυμα αλάτων HBSS (1x), 2% FBS, 1% P/S, 1 mM EGTA	Κυτταρομετρία ροής (κυτταρικός διαχωρισμός)
Διάλυμα κυτταρικής λύσης (RIPA buffer)	50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% w/v SDS, 0.5% w/v Sodium Deoxycholate, 1% v/v Triton X-100, αναστολείς πρωτεασών (1x), αναστολείς φωσφατασών (1x)	Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών
Διάλυμα κατεργασίας πρωτεϊνικών δειγμάτων (sample buffer, 4x)	330 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% w/v SDS, 13% v/v γλυκερόλη, 20% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, 0.2% w/v κυανούν της βρωμοφαινόλης	Κατεργασία πρωτεϊνικών δειγμάτων
Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer, pH 8.8)	25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη, 0.1% w/v SDS	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών
Διάλυμα ηλεκτροφορητικής μεταφοράς (transfer buffer)	25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη, 20% v/v μεθανόλη	Ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
Διάλυμα αποκόλλησης αντισωμάτων (stripping buffer)	500 mM NaCl, 200 mM γλυκίνη pH 2.6 (mild stripping)	Αποκόλληση αντισωμάτων από μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
	62.5 mM Tris-HCl pH 6.7, 2% w/v SDS, 100 mM β-μερκαπτοαιθανόλη (harsh stripping)	
Διάλυμα TNES (pH 7.5)	50 mM Tris, 400 mM NaCl, 100 mM EDTA, 0.5% SDS	Απομόνωση γενωμικού DNA

Πίνακας 5. Σύσταση ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

4. ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. Πειραματικά ζωικά μοντέλα

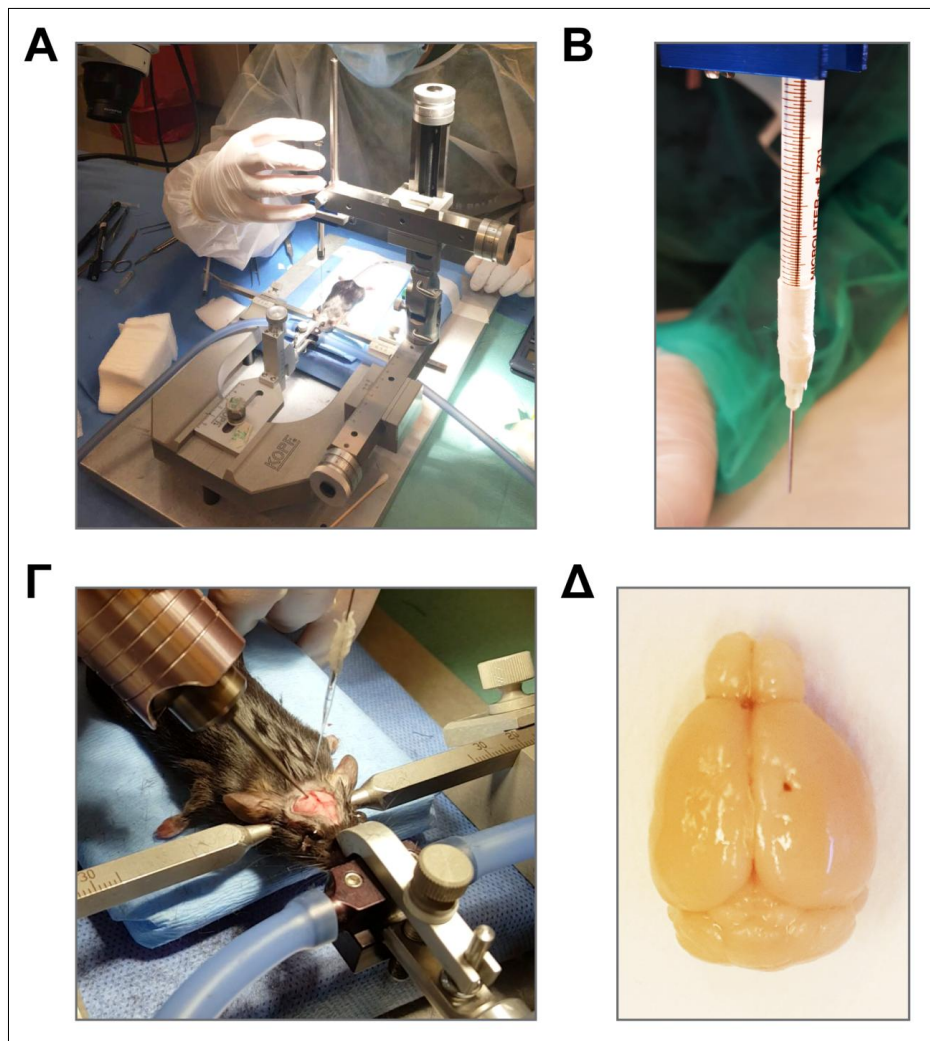
4.1.1. Χρήση πειραματοζώων

Για τη διεξαγωγή των *in vivo* πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ενήλικοι αρσενικοί μύες της φυλής C57BL/6, ηλικίας 3-4 μηνών. Ανάλογα με τη φύση των επιστημονικών ερωτημάτων, χρησιμοποιήθηκαν τόσο μύες αγρίου τύπου, όσο και διαγονιδιακοί μύες αναφοράς TRE-RFP (Stavropoulos et al., σε διαδικασία υποβολής) και BRE-eGFP (Monteiro et al., 2008), όπου οι κυτταρικοί αποδέκτες της κανονικής TGFβ ή BMP σηματοδότησης εξέφραζαν δυνητικά την κόκκινη (RFP) ή την ενισχυμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (eGFP), αντίστοιχα. Για τη διεξαγωγή των *in vitro* πειραμάτων αναπτύχθηκαν συστήματα καλλιέργειας κυττάρων γλοίας που απομονώθηκαν από νεογνικούς μύες αγρίου τύπου της φυλής C57BL/6, ηλικίας 1-3 ημερών και ανεξαρτήτως φύλου. Η αποικία των μυών αναπτύχθηκε στον οίκο πειραματοζώων του ΙΙΒΕΑΑ υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και ρυθμού φωτός-σκότους (εναλλαγή ανά 12 ώρες), σε ατομικά αεριζόμενα κλουβιά με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό, και ήταν απαλλαγμένη παθογόνων μικροοργανισμών όπως προέκυψε από περιοδικό εξωτερικό υγειονομικό έλεγχο. Όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα ήταν προσαρμοσμένα στις ευρωπαϊκές και εθνικές οδηγίες περί ευζωίας και βιοηθικής και έλαβαν άδεια από την Επιτροπή Αξιολόγησης Πρωτοκόλλων για ορθή χρήση πειραματοζώων του ΙΙΒΕΑΑ και τις αρμόδιες κτηνιατρικές αρχές της Περιφέρειας Αττικής και του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων.

4.1.2. Μοντέλο εστιακής κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης

Κάθε πειραματόζωο, ηλικίας 3-4 μηνών, αναισθητοποιήθηκε με χορήγηση μείγματος 2-3% ισοφλουρανίου και 0.6 l/min O₂ και τοποθετήθηκε σε ειδική στερεοτακτική διάταξη (Korff Instruments, ΗΠΑ, **Εικόνα 10Α**), όπως έχει περιγραφεί προηγούμενα (Xilouri et al., 2012). Η αναισθησία χορηγούταν καθ' όλη τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης (συνολικής διάρκειας 20-30 λεπτών ανά πειραματόζωο) και επιπλέον τοποθετούταν ειδική αλοιφή στους οφθαλμούς των ζώων για διατήρηση της υγρασίας τους. Μετά το ξύρισμα της κεφαλής, διεξήχθη επιμήκης τομή του δέρματος με

τη βοήθεια νυστεριού και ανοίχθηκε μία οπή διαμέτρου περίπου 1.5 mm στο κρανίο με χρήση οδοντιατρικού τρυπανιού (Εικόνα 10B, Γ).



Εικόνα 10. Πειραματικό μοντέλο εστιακής κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης. (Α) Ειδική στερεοτακτική διάταξη (Korff Instruments, ΗΠΑ) που χρησιμοποιήθηκε για την πρόκληση εστιακού μηχανικού διεισδυτικού τραυματισμού του εγκεφάλου ενήλικων αρσενικών μυών, σε συγκεκριμένες συντεταγμένες. **(Β)** Βελόνα διατομής 19G, στερεωμένη σε σύριγγα τύπου Hamilton, που χρησιμοποιήθηκε για την πρόκληση του εγκεφαλικού τραυματισμού. **(Γ)** Διάνοιξη οπής στο κρανίο με τη βοήθεια οδοντιατρικού τρυπανιού. Διακρίνεται ο τρόπος στερέωσης της κεφαλής του πειραματοζώου στη στερεοτακτική συσκευή, καθώς και η ειδική μάσκα που παρέχει σταθερή ροή ισοφλουρανίου για την αναισθησία. **(Δ)** Αντιπροσωπευτική εικόνα απομονωμένου και μονιμοποιημένου εγκεφάλου πειραματοζώου που υποβλήθηκε σε κρανιοεγκεφαλική κάκωση του δεξιού ημισφαιρίου, 7 ημέρες μετά τον τραυματισμό.

Ακολούθησε ο τραυματισμός του δεξιού εγκεφαλικού ημισφαιρίου με την αργή εισχώρηση μιας μεταλλικής βελόνας διατομής 19G σε συγκεκριμένες συντεταγμένες: +0.6 mm στον προσθιοπίσθιο (anteroposterior), -1.6 mm στο μεσοπλεύριο (mediolateral) και -3.2 mm στο ραχιαίο-κοιλιακό (dorsoventral) άξονα του εγκεφάλου (ως σημείο μηδέν ορίζεται το βρέγμα, βάθος τραύματος 3.2 mm), σύμφωνα με το

στερεοτακτικό άτλαντα για τον εγκέφαλο του μυός (“The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates”, G.Paxinos & K.B.J. Franklin, 2001, San Diego: Academic).

Πριν από την αργή απόσυρσή της από τον εγκεφαλικό ιστό η βελόνα περιστράφηκε χειροκίνητα στο σημείο της βλάβης. Η διαδικασία τραυματισμού επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές (συνολικά τρεις φορές), η τομή καθαρίστηκε με φυσιολογικό ορό (Saline) και το δέρμα στην περιοχή της επέμβασης συρράφτηκε χειρουργικά. Μετά το πέρας της διαδικασίας, τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν σε ειδικό θερμαινόμενο υπόστρωμα για ομαλή ανάρρωση από την αναισθησία και στη συνέχεια επιστράφηκαν σε καθαρούς κλωβούς μέχρι την ημέρα θανάτωσής τους. Τα πειραματόζωα ελέγχονταν σχεδόν καθημερινά και θανατώθηκαν 1, 3, 7 και 14 ημέρες μετά τον τραυματισμό, οπότε και εγκέφαλοί τους απομονώθηκαν για ιστολογική ή μοριακή ανάλυση (**Εικόνα 10Δ**).

Αξίζει να σημειωθεί ότι πρόκειται για ένα πειραματικό μοντέλο εγκεφαλικής κάκωσης μέτριας σοβαρότητας, δεδομένου ότι μόνο 2 από τους 43 μύες (<5%) απεβίωσαν την επομένη της χειρουργικής επέμβασης, ενώ δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές στο σωματικό βάρος, την κινητική δραστηριότητα ή την τυπική συμπεριφορά των χειρουργημένων ζώων τις ημέρες που ακολούθησαν τον τραυματισμό.

4.1.3. Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση της νευροτοξίνης MPTP

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκε η μιτοχονδριακή νευροτοξίνη MPTP (βλ. Εισαγωγή, §1.2.3.2.2. Ζωικά μοντέλα της νόσου), που προκαλεί παρκινσονικά συμπτώματα τόσο σε ζωικά μοντέλα όσο και στον άνθρωπο, καταστρέφοντας τα σώματα των ντοπαμινεργικών νευρώνων της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας καθώς και τις απολήξεις αυτών στο ραβδωτό σώμα (Jackson-Lewis and Przedborski, 2007). Για τα πειράματα με τη συγκεκριμένη τοξίνη χρησιμοποιήθηκαν είτε αγρίου τύπου είτε διπλά διαγονιδιακοί αρσενικοί μύες, ηλικίας 3-4 μηνών, στους οποίους χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 18 mg/kg MPTP-HCl σε φυσιολογικό ορό (4 ενέσεις σε 1 ημέρα, με απόσταση 2 ωρών μεταξύ τους, *οξύ μοντέλο*). Ως πειραματόζωα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν μύες ίδιας ηλικίας που έλαβαν αντίστοιχο όγκο φυσιολογικού ορού.

4.1.4. Στερεοτακτική έγχυση αδενο-σχετιζόμενων ιικών φορέων έκφρασης στη μέλαινα ουσία

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής διεξήχθη μία σειρά μονόπλευρων στερεοτακτικών εγχύσεων των ακόλουθων ανασυνδυασμένων αδενο-σχετιζόμενων ιικών φορέων έκφρασης (recombinant Adeno-Associated Viruses, rAAVs): rAAV2/2-CAG-Venus (ιός αναφοράς, για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης αναφοράς Venus), rAAV1/2-CAG-Noggin-2A-Venus (για υπερέκφραση της Noggin, ως αντιπροσωπευτικού αναστολέα της BMP σηματοδότησης), rAAV1/2-CAG-BMP2-2A-Venus και rAAV1/2-CAG-BMP7-2A-Venus (για υπερέκφραση των BMP2 ή BMP7, ως αντιπροσωπευτικών προσδετών του BMP κλάδου), στη δεξιά μέλαινα ουσία ενήλικων μυών (Heinonen et al., 2014). Οι rAAVs ήταν ευγενική χορηγία των Δρ. Stefan Wöflf (Πανεπιστήμιο της Χαϊδελβέργης, Γερμανία) και Δρ. Rolf Sprengel (Ινστιτούτο Max Planck, Γερμανία). Οι υπερεκφραζόμενες ανθρώπινες πρωτεΐνες (Noggin, BMP2 και BMP7) φέρουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο το συνθετικό πεπτίδιο 2A, μέσω του οποίου συνεκφράζεται η πρωτεΐνη «αναφοράς» Venus, υπό τον έλεγχο του κοινού υποκινητή CAG (Cytomegalovirus enhancer/chicken beta-actin promoter).

Κάθε πειραματόζωο, ηλικίας 3-4 μηνών, αναισθητοποιήθηκε, τοποθετήθηκε στην ειδική στερεοτακτική συσκευή και ανοίχθηκε μία οπή διαμέτρου ~1 mm στο κρανίο, όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην ενότητα §4.1.2. Μοντέλο εστιακής κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης. Στον κατακόρυφο βραχίονα της στερεοτακτικής συσκευής είχε προσαρτηθεί σύριγγα τύπου Hamilton στο άκρο της οποίας είχε τοποθετηθεί ειδικό γυάλινο τριχοειδές ρύγχος, το οποίο εισήλθε στον εγκεφαλικό ιστό για την έγχυση των ιικών φορέων. Διεξήχθη έγχυση 2 μl διαλύματος αδενο-σχετιζόμενου ιού, αραιωμένου σε DPBS και τελικής συγκέντρωσης 7.5×10^6 gc/ml, ακολουθώντας τις εξής συντεταγμένες: -2.5 mm στον προσθιοπίσθιο, -1.4 mm στο μεσοπλεύριο και -4.2 mm (από τη σκληρή μήνιγγα) στο ραχιαίο-κοιλιακό άξονα, σύμφωνα με το στερεοτακτικό άτλαντα για τον εγκέφαλο του μύς. Η έγχυση πραγματοποιήθηκε με σταθερό ρυθμό 0.4 μl/λεπτό και διήρκεσε συνολικά 5 λεπτά ανά πειραματόζωο. Το τριχοειδές ρύγχος αποσύρθηκε αργά από τον εγκεφαλικό ιστό, αφού μεσολάβησαν 5 λεπτά μετά το πέρας της έγχυσης. Στη συνέχεια, δύο εβδομάδες μετά τη στερεοτακτική έγχυση των ιικών φορέων, τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν στο οξύ μοντέλο χορήγησης MPTP.

4.2. Συμπεριφορική ανάλυση

Τα πειραματόζωα στα οποία διεξήχθη στερεοτακτική έγχυση rAAVs και επακόλουθη χορήγηση MPTP υποβλήθηκαν σε μια σειρά συμπεριφορικών δοκιμασιών για την αξιολόγηση της κινητικής δραστηριότητας, του συντονισμού των κινήσεων και της βάδισής τους. Οι κλωβοί με τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν στο δωμάτιο πειραματισμού για 30-60 λεπτά πριν από την πρώτη δοκιμασία. Οι συνθήκες θερμοκρασίας (21-22°C) και φωτισμού του χώρου διατηρήθηκαν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια των συμπεριφορικών μελετών.

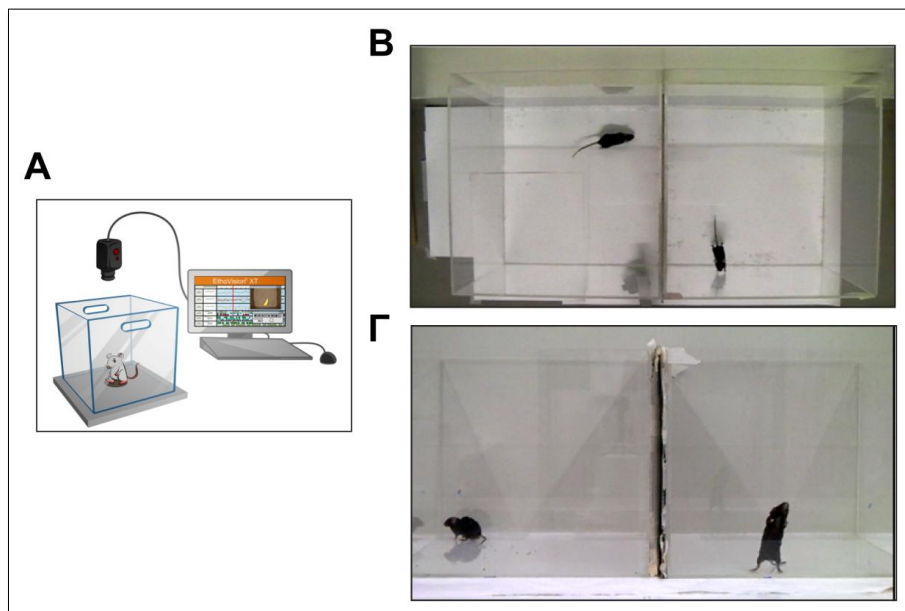
4.2.1. Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου

Η δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (open-field test) αποτέλεσε την πρώτη συμπεριφορική δοκιμασία στην οποία υποβλήθηκαν τα πειραματόζωα και ήταν ενδεικτική της αυθόρμητης κινητικής τους δραστηριότητας. Κάθε μυς τοποθετήθηκε στο κέντρο μίας πειραματικής διάταξης που περιελάμβανε ένα διαφανή ακρυλικό κλωβό διαστάσεων 40 x 40 x 40 cm (**Εικόνα 11**) και αφέθηκε να εξερευνήσει ελεύθερα το χώρο για 10 λεπτά. Η κινητική δραστηριότητα καταγράφηκε με τη χρήση κάμερας και αναλύθηκε με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (Ethovision XT 8.5, Noldus, Ολλανδία). Οι παράμετροι που αναλύθηκαν περιελάμβαναν τη συνολική απόσταση που διανύθηκε (σε cm) σε διάστημα 10 λεπτών και το χρόνο παραμονής του ζώου στο κέντρο της αρένας (σε sec), που χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες της οριζόντιας δραστηριότητας και της αγχώδους συμπεριφοράς, αντίστοιχα. Μετά το τέλος κάθε δοκιμασίας, ο κλωβός καθαριζόταν με 70% αιθανόλη, πριν την τοποθέτηση του επόμενου πειραματοζώου.

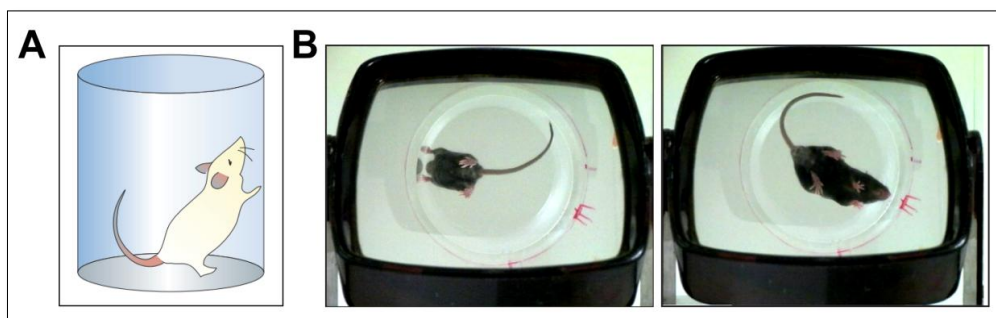
4.2.2. Δοκιμασία κυλίνδρου

Η δοκιμασία κυλίνδρου (cylinder test) αποτέλεσε τη δεύτερη κατά σειρά συμπεριφορική ανάλυση στην οποία υποβλήθηκαν τα πειραματόζωα και ήταν ενδεικτική της ασυμμετρίας στη χρήση των πρόσθιων πελμάτων. Τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν μεμονωμένα σε ένα διαφανή ακρυλικό κύλινδρο, διαμέτρου 12.7 cm και ύψους 15.5 cm, και η αυθόρμητη δραστηριότητά τους βιντεοσκοπήθηκε από τη βάση του κυλίνδρου για 5 λεπτά (**Εικόνα 12**). Στη συνέχεια, διεξήχθη καταμέτρηση των ετερόπλευρων (contralateral, αναφορικά με το εγκεφαλικό ημισφαίριο όπου διεξήχθη η

στερεοτακτική επέμβαση), των ομόπλευρων (ipsilateral) και των συνδυαστικών (both) τοποθετήσεων των πρόσθιων πελμάτων των ζώων στο τοίχωμα του κυλίνδρου για στήριξη κατά την ανόρθωσή τους (rearing). Γενικά, η προτιμώμενη χρήση του ετερόπλευρου πρόσθιου πέλματος είναι ενδεικτική ενός βελτιωμένου φαινοτύπου που συνοδεύει μια πρωθύστερη προστατευτική παρέμβαση στο ομόπλευρο εγκεφαλικό ημισφαίριο. Κατά τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης δοκιμασίας προσμετρήθηκαν επίσης ο αριθμός των ανορθώσεων και η διάρκεια αυτοπεριποίησης (grooming time), ως δείκτες στερεοτυπικής συμπεριφοράς. Μετά το τέλος κάθε δοκιμασίας, ο κύλινδρος καθαριζόταν με 70% αιθανόλη, πριν την τοποθέτηση του επόμενου πειραματοζώου.



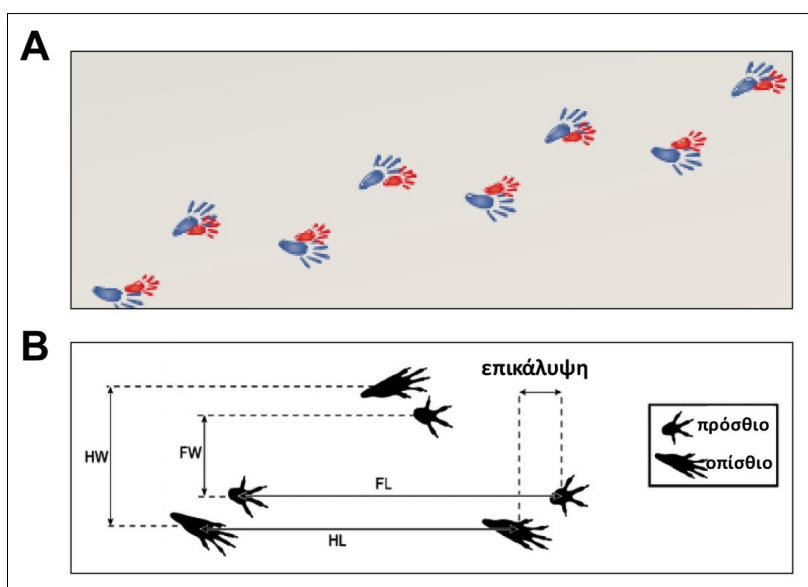
Εικόνα 11. Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου. (Α) Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης για τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου. (Β και Γ) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες της κάτοψης (Β) και της πρόσοψης (Γ) των δύο διαφανών ακρυλικών κλωβών διαστάσεων 40 x 40 x 40 cm που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Μεταξύ των δύο κλωβών τοποθετήθηκε λευκό χαρτόνι, ώστε τα δύο πειραματοζώα να μην επικοινωνούν οπτικά μεταξύ τους.



Εικόνα 12. Δοκιμασία κυλίνδρου. (Α) Σχηματική απεικόνιση της δοκιμασίας κυλίνδρου. (Β) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες της βάσης του ακρυλικού κυλίνδρου που χρησιμοποιήθηκε, από όπου βιντεοσκοπήθηκε η ασυμμετρία στη χρήση των πρόσθιων πελμάτων των πειραματοζώων.

4.2.3. Δοκιμασία πελματογραφήματος

Η δοκιμασία πελματογραφήματος ή ανάλυσης βημάτων (foot-printing test) αποτέλεσε την τελευταία κατά σειρά συμπεριφορική διαδικασία. Αρχικά, διεξήχθη χρωματισμός των πρόσθιων και οπίσθιων άκρων του εκάστοτε πειραματοζώου με μη τοξική κόκκινη ή μπλε βαφή, αντίστοιχα (Goomby, Πλαίσιο). Στη συνέχεια, το ζώο τοποθετήθηκε σε ένα διάδρομο μήκους 80 cm και πλάτους 12 cm, με υπερυψωμένα πλάγια τοιχώματα ύψους 10 cm, και αφέθηκε να διανύσει μια ευθεία πορεία πραγματοποιώντας 6-10 πλήρεις βηματισμούς. Στη βάση του διαδρόμου είχε τοποθετηθεί λευκό χαρτί ώστε να είναι εφικτή η αποτύπωση των βημάτων του ζώου, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 13A**. Οι παράμετροι της βάδισης που αναλύθηκαν ήταν: (α) η ομοιόμορφη εναλλαγή βημάτων ή επικάλυψη (forepaw/hindpaw overlap), υπολογιζόμενη ως η απόσταση ανάμεσα σε οπίσθιο και πρόσθιο δεξί (ομόπλευρο, αναφορικά με το εγκεφαλικό ημισφαίριο όπου διεξήχθη η στερεοτακτική επέμβαση) άκρο ή ανάμεσα σε οπίσθιο και πρόσθιο αριστερό (ετερόπλευρο) άκρο, (β) το πλάτος βάσης των πρόσθιων και των οπίσθιων άκρων, υπολογιζόμενο ως η μέση απόσταση ανάμεσα στα δεξιά και τα αριστερά αποτυπώματα και (γ) το μήκος διασκελισμού των πρόσθιων και οπίσθιων άκρων/πελμάτων, υπολογιζόμενο ως η μέση απόσταση της κίνησης μεταξύ κάθε βηματισμού (**Εικόνα 13B**).



Εικόνα 13. Δοκιμασία πελματογραφήματος. (A) Σχηματική απεικόνιση της αποτύπωσης των βημάτων των πειραματοζώων κατά τη δοκιμασία πελματογραφήματος. Τα πρόσθια και οπίσθια άκρα χρωματίζονται με κόκκινη ή μπλε βαφή, αντίστοιχα. **(B)** Σχηματική απεικόνιση των παραμέτρων της βάδισης που αναλύθηκαν. Σημειώνονται το μήκος του διασκελισμού των πρόσθιων (FL) και οπίσθιων

άκρων/πελμάτων (HL), το πλάτος βάσης των πρόσθιων (FW) και των οπίσθιων άκρων (HW) και η ομοιόμορφη εναλλαγή βημάτων (επικάλυψη) ανάμεσα σε οπίσθιο και πρόσθιο ομόπλευρο ή ετερόπλευρο άκρο.

4.3. Ιστολογική ανάλυση

4.3.1. Απομόνωση και προετοιμασία εγκεφάλων για ιστολογική ανάλυση

Τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν με τη βοήθεια αυτοσχέδιας μάσκας εμποτισμένης με ισοφλουράνιο. Πριν την απομόνωση των εγκεφάλων για ιστολογική ανάλυση, πραγματοποιήθηκαν ένας πρώτος ενδοκαρδιακός εμποτισμός με 50 ml κρύου διαλύματος PBS και ένας δεύτερος εμποτισμός με 50 ml κρύας 4% παραφορμαλδεΐδης (PFA) σε PBS, με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας και ρυθμό ροής 13 rpm. Έτσι, μέσω της συστημικής κυκλοφορίας και των τριχοειδών αγγείων που αιματώνουν τον εγκέφαλο, με τον πρώτο εμποτισμό επετεύχθη η απομάκρυνση του αίματος και με το δεύτερο εμποτισμό η μονιμοποίηση των εγκεφάλων εκ των έσω. Ακολούθησε διάνοιξη των κρανίων, απομόνωση των εγκεφάλων, τοποθέτησή τους σε διάλυμα 4% PFA και ολονύκτια επώαση στους 4°C. Στη συνέχεια, οι ιστοί εκπλύθηκαν με PBS, μεταφέρθηκαν σε διάλυμα 15% σουκρόζης σε PBS, και ακολούθησε ολονύκτια επώαση στους 4°C. Την επόμενη ημέρα, οι ιστοί μεταφέρθηκαν σε διάλυμα 30% σουκρόζης σε PBS, όπου και επώαστηκαν ολονύκτια στους 4°C. Ακολούθησε έκπλυση με PBS και τοποθέτηση κάθε ιστού για 40-60 δευτερόλεπτα σε γυάλινο δοχείο που περιείχε ισοπεντάνιο (μεθυλοβουτάνιο) θερμοκρασίας -42°C. Για την ψύξη του ισοπεντανίου, το γυάλινο δοχείο ήταν τοποθετημένο σε κυτίο με ξηρό πάγο και η θερμοκρασία του ελεγχόταν με ειδικό θερμόμετρο. Μετά την απομάκρυνση από το ισοπεντάνιο, οι παγωμένοι ιστοί τυλίχθηκαν σε αλουμινοχαρτο και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Με τη χρήση κρουστάτη (Leica CM3050S), σε θερμοκρασία θαλάμου και κεφαλής -25°C, πραγματοποιήθηκαν στεφανιαίες τομές πάχους 30 μm στους απομονωμένους εγκεφαλικούς ιστούς, οι οποίες μεταφέρθηκαν σε τρυβλία καλλιέργειας των 24-48 φρεατίων, στα οποία είχε τοποθετηθεί κρουπροστατευτικό ρυθμιστικό διάλυμα (βλ. Υλικά, Πίνακας 5). Οι τομές αποθηκεύτηκαν στους 4°C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν για ανοσοϊστοχημική ανάλυση.

4.3.2. Ανοσοϊστοχημεία

Για το χαρακτηρισμό του προτύπου έκφρασης και της σχετικής κατανομής των διαγονιδίων αναφοράς TRE-RFP και BRE-eGFP, καθώς και επιλεγμένων πρωτεϊνικών δεικτών σε τομές εγκεφάλων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας. Συγκεκριμένα ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο χρώσης τομών σε εναιώρημα:

1. Επιλογή των επιθυμητών τομών από τα τρυβλία των 24-48 φρεατίων και τοποθέτησή τους σε καθαρά φρεάτια που περιείχαν PBS. Η μεταφορά των τομών από φρεάτιο σε φρεάτιο διεξήχθη με τη βοήθεια λεπτών πινέλων ζωγραφικής.
2. Έκπλυση με PBS (3 x 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση, για την απομάκρυνση καταλοίπων κρουπροστατευτικού διαλύματος συντήρησης από τις τομές.
3. Αντιγονική ανάκτηση με επώαση σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM κιτρικού νατρίου (pH 6) για 20 λεπτά, σε υδατόλουτρο στους 80°C. Μέσω της συγκεκριμένης διαδικασίας αποκαλύπτονται οι αντιγονικοί επίτοποι που ήταν απροσπέλαστοι στα αντισώματα, λόγω πρότερης επεξεργασίας των ιστών και δημιουργίας ενδο-πρωτεϊνικών δεσμών.
4. Επώαση για ~30 λεπτά σε πάγο ώστε να επανέλθει η θερμοκρασία των τομών σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Έκπλυση με PBS (3 x 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση, για την απομάκρυνση καταλοίπων ρυθμιστικού διαλύματος αντιγονικής ανάκτησης από τις τομές.
6. Επώαση με διάλυμα δέσμησης μη ειδικών θέσεων [2% φυσιολογικός ορός της ίδιας ζωικής προέλευσης με εκείνη του δευτερογενούς αντισώματος (NDS ή NGS), διαλυμένος σε 0.2% (v/v) Triton-X σε PBS], για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Επώαση με πρωτογενή αντισώματα έναντι των υπό μελέτη αντιγονικών επιτόπων (βλ. Υλικά, Πίνακας 3), κατάλληλα αραιωμένων σε διάλυμα δέσμησης μη ειδικών θέσεων για 16-18 ώρες στους 4°C, υπό ήπια ανάδευση.
8. Έκπλυση με PBS (3 x 10 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση, για την απομάκρυνση καταλοίπων των πρωτογενών αντισωμάτων από τις τομές.
9. Επώαση με κατάλληλα δευτερογενή αντισώματα έναντι των πρωτογενών (βλ. Υλικά, Πίνακας 3), συζευγμένων με φθοριοχρώματα και αραιωμένων σε διάλυμα

δέσμευσης μη ειδικών θέσεων, για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ήπια ανάδευση. Στο διάλυμα των δευτερογενών αντισωμάτων αραιώθηκε και το DAPI (4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη, 1:2000), ένα φθορίζον μόριο που δεσμεύεται ισχυρά στις πλούσιες σε A-T περιοχές του DNA, επιτρέποντας την ανίχνευση της χρωματίνης του πυρήνα.

10. Έκπλυση με PBS (3 x 10 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση, για την απομάκρυνση καταλοίπων των δευτερογενών αντισωμάτων από τις τομές.
11. Τοποθέτηση των τομών σε αντικειμενοφόρους πλάκες επικαλυμμένες με πολυλυσίνη, το θετικό φορτίο της οποίας επιτρέπει την ισχυρή πρόσδεση των ιστών. Καλό στέγνωμα των τομών πριν το επόμενο βήμα.
12. Έγκλειση των τομών με τη βοήθεια μέσου έγκλεισης φθορισμού (fluorescence mounting medium) και επικάλυψη με ειδική καλυπτρίδα.
13. Προσωρινή τοποθέτηση των αντικειμενοφόρων πλακών στους 4°C μέχρι τη λήψη φωτογραφιών και στη συνέχεια αποθήκευση/συντήρηση στους -20°C.
14. Λήψη φωτογραφιών με τη βοήθεια συνεστιακού μικροσκοπίου Leica TCS-SP5 (Leica Microsystems, Germany) και ανάλυσή τους με χρήση των λογισμικών επεξεργασίας εικόνας Adobe Photoshop CS6 και ImageJ 1.6.

Τα ίδια ακριβώς βήματα ακολουθήθηκαν και στην περίπτωση όπου οι τομές ήταν εξ' αρχής τοποθετημένες σε αντικειμενοφόρους πλάκες πολυλυσίνης, μόνο που οι επώσεις παρουσία των διαφόρων διαλυμάτων διεξάγονταν απευθείας επάνω στον ιστό και όχι σε εναιώρημα (παράληψη βημάτων 1 και 2).

4.4. Ανάπτυξη και μελέτη πρωτογενών καλλιιεργειών γλοίας μυός

4.4.1. Προετοιμασία και διατήρηση καλλιιεργειών ολικής γλοίας

Για την ανάπτυξη πρωτογενών καλλιιεργειών ολικής γλοίας χρησιμοποιήθηκαν εγκέφαλοι που απομονώθηκαν από νεογνικούς μύες, ηλικίας 1-3 ημερών, όπως έχει περιγραφεί προηγούμενα (McCarthy and de Vellis, 1980; Saura et al., 2003), με μικρές τροποποιήσεις. Το αναλυτικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται στη συνέχεια.

1. Προετοιμασία αποστειρωμένου ρυθμιστικού διαλύματος HBSS/PBS 1x σε αναλογία 1:1 και τοποθέτησή του στον πάγο.

2. Αποκοπή κεφαλών νεογνικών μυών ηλικίας 1-3 ημερών, απομόνωση των εγκεφάλων με τη βοήθεια αποστειρωμένων χειρουργικών εργαλείων και τοποθέτησή τους στο ρυθμιστικό διάλυμα HBSS/PBS.
3. Αφαίρεση της παρεγκεφαλίδας, των οσφρητικών βολβών και των μηνίγγων κάθε εγκεφάλου με τη βοήθεια στερεοσκοπίου και μυτερών λαβίδων ανατομίας.
4. Μεταφορά κάθε εγκεφάλου σε falcon των 15 ml, όπου είχε τοποθετηθεί 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος πέψης (βλ. Υλικά, **Πίνακας 5**). Από το βήμα αυτό και στο εξής η διαδικασία διεξήχθη εντός θαλάμου νηματικής ροής τάξης II.
5. Αδρός μηχανικός τεμαχισμός των ιστών με χρήση πιπέτας τύπου Gilson του 1 ml.
6. Επώαση των δειγμάτων στους 37°C για ~45 λεπτά και ανάδευση με χρήση πιπέτας ή ελαφριά ανακίνηση κάθε 5-7 λεπτά.
7. Τερματισμός της πέψης των ιστών με μεταφορά του κυτταρικού εναιωρήματος σε νέο falcon, όπου είχαν τοποθετηθεί 3 ml θρεπτικού μέσου DMEM εμπλουτισμένου με 10% ορό εμβρύου βοός (FBS) και 1% P/S.
8. Επώαση για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Φυγοκέντρηση (1400 στροφές, 10 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου).
10. Απόρριψη υπερκείμενου και επαναιώρηση των απομονωμένων κυττάρων σε DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS και 1% P/S.
11. Μεταφορά του κυτταρικού εναιωρήματος από την πέψη ενός εγκεφάλου σε μία φλάσκα T-75 cm², με 15 ml θρεπτικού μέσου. Τοποθέτηση των φλασκών σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C.
12. Ανανέωση του θρεπτικού μέσου των καλλιεργειών ανά 3-4 ημέρες. Η πλειοψηφία των κυττάρων που προσαρμόζονται και επιβιώνουν στις συγκεκριμένες καλλιέργειες είναι κυρίως κύτταρα γλοίας (αστροκύτταρα, μικρογλοία και ολιγοδενδροκύτταρα). Η πλειοψηφία των νευρώνων πεθαίνουν, εφόσον δεν ικανοποιούνται οι αυξημένες απαιτήσεις τους σε θρεπτικά συστατικά στις δεδομένες συνθήκες. Το ποσοστό των ινοβλαστών και των νευρώνων που παρεμβάλλονταν μεταξύ των κυττάρων γλοίας ήταν μικρότερο από 5% του συνολικού αριθμού των κυττάρων.
13. Μετά το πέρας ~7-12 ημερών από την απομόνωση των κυττάρων, αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και έκπλυση των καλλιεργειών με DPBS (2 φορές).
14. Προσθήκη διαλύματος θρυψίνης-EDTA (1x) και επώαση στους 37°C για 15-20 λεπτά.

15. Απενεργοποίηση της θρυψίνης με ίσο όγκο DMEM εμπλουτισμένου με 10% FBS και 1% P/S.
16. Φυγοκέντρηση (1400 στροφές, 10 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου).
17. Απόρριψη υπερκειμένου και επαναιώρηση των κυττάρων σε DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS και 1% P/S.
18. Τοποθέτηση των κυττάρων σε νέες φλάσκες (ανακαλλιέργεια 1:2) και διατήρησή τους ως καλλιέργειες ολικής γλοίας. Εναλλακτικά, διεξαγωγή χρώσης με ειδικά αντισώματα έναντι επιφανειακών δεικτών για κυτταρικό διαχωρισμό με τη βοήθεια κυτταροδιαχωριστή και λήψη αμιγών πληθυσμών αστροκυττάρων ή μικρογλοίας.

Να σημειωθεί ότι οι φλάσκες, οι πλάκες των 6/12/24-φρεατίων και οι καλυπτρίδες διαμέτρου 12 mm που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια κυττάρων γλοίας είχαν προηγουμένως επικαλυφθεί με διάλυμα αραιωμένης πολυ-D-λυσίνης (PDL). Το πρωτόκολλο για την επικάλυψη με PDL συνίσταται στα παρακάτω βήματα:

1. Προετοιμασία αραιωμένης PDL σε αποστειρωμένο dH₂O, τελικής συγκέντρωσης 5 μg/ml, και διαμοίρασή της στα τρυβλία και τις φλάσκες καλλιέργειας.
2. Ολονύκτια επώαση σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C.
3. Αφαίρεση της PDL και έκπλυση 2 φορές με αποστειρωμένο dH₂O.
4. Καλό στέγνωμα των τρυβλίων και των φλασκών εντός του θαλάμου νηματικής ροής.
5. Άμεση χρήση ή αποθήκευση στους 4°C για μελλοντική χρήση.

4.4.2. Κυτταρικός διαχωρισμός και ανάπτυξη αμιγών καλλιιεργειών αστροκυττάρων και μικρογλοίας

Η κυτταρομετρία ροής συνιστά μια ποιοτική και ποσοτική μέθοδο χαρακτηρισμού μεμονωμένων κυττάρων με βάση το φθορισμό που εκπέμπεται από συζευγμένα με φθοριοχρώματα αντισώματα που προσδένονται σε αντίστοιχους αντιγονικούς επιτόπους αυτών (Fulwyler, 1965). Συγκεκριμένα, ο κυτταρομετρητής ροής χρησιμοποιεί μία ή περισσότερες δέσμες laser και έναν ή περισσότερους ανιχνευτές φωτός ώστε να μετρά μεμονωμένα κύτταρα σε δείγμα εναιωρήματος αυτών. Υπό κατάλληλη πίεση επιτυγχάνεται η δημιουργία συνεχούς ροής μεμονωμένων κυττάρων που παρεμβάλλεται μεταξύ των laser και των ανιχνευτών της συσκευής. Κάθε φορά που ένα κύτταρο διέρχεται από τη δέσμη, το φως ανακλάται από τον ανιχνευτή και η

διακοπή στη δέση του laser καταγράφεται. Τα κύτταρα που φέρουν συζευγμένα με φθοριοχρώματα αντισώματα δεσμευμένα σε επιφανειακά ή ενδοκυττάρια αντιγόνα τους, διεγείρονται από το laser και εκπέμπουν ακτινοβολία, η οποία καταγράφεται από ένα δεύτερο σύστημα ανίχνευσης. Με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού κατασκευάζεται ένα ιστόγραμμα όπου απεικονίζονται ο αριθμός των κυττάρων και η ένταση του παραγόμενου φθορισμού στον κατακόρυφο και τον οριζόντιο άξονα, αντίστοιχα. Τα παραγόμενα σήματα μπορούν να απεικονιστούν επίσης με μορφή στικτογράμματος (dot plot), όπου φαίνεται η κατανομή των κυτταρικών πληθυσμών σε διαφορετικές θέσεις ανάλογα με το πρότυπο φθορισμού τους.

Με τον κυτταρικό διαχωρισμό βασιζόμενο σε φθορισμό (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS), που αποτελεί την εξέλιξη της κυτταρομετρίας ροής, επιτυγχάνεται όχι μόνο ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός και η ποσοτικοποίηση των υπό μελέτη κυτταρικών πληθυσμών, αλλά ταυτόχρονα και η απομόνωσή τους (Julius et al., 1972). Αυτό επιτελείται με την εφαρμογή ηλεκτρικού φορτίου στα κύτταρα της δέσμης μεμονωμένων κυττάρων, ανάλογα με το πρότυπο φθορισμού τους. Η μεταφορά των φορτισμένων (επιθυμητών) κυττάρων γίνεται σε ξεχωριστά σωληνάκια, μετά την εκτροπή που συντελείται κατά τη διέλευσή τους από τις πλάκες εκτροπής της συσκευής.

Στην παρούσα μελέτη αξιοποιήθηκαν οι παραπάνω μέθοδοι για το διαχωρισμό αστροκυττάρων και μικρογλοίας από πρωτογενείς καλλιέργειες ολικής γλοίας. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι των πρωτεϊνικών δεικτών επιφανείας GLAST/SLC1A3 [συζευγμένο με το φθοριόχρωμα αλλοφυκοκυανίνη (APC)] και CD11b/ITGAM [συζευγμένο με το φθοριόχρωμα αλλοφυκοκυανίνη-κυανιδίνη 7 (APC-Cy7)] για το διαχωρισμό των αστροκυττάρων και της μικρογλοίας, αντίστοιχα (**Εικόνα 22Α**). Για κάθε ανάλυση προετοιμάστηκαν επιπλέον τα εξής δείγματα ελέγχου:

- ❖ Το **αρνητικό δείγμα ελέγχου** (unstained control) που αποτελεί το μάρτυρα για τον αυτοφθορισμό των υπό μελέτη πληθυσμών και για το οποίο δεν χρησιμοποιήθηκε κανένα αντίσωμα.
- ❖ Το **ισοτυπικό δείγμα ελέγχου** (isotype control), στο οποίο χρησιμοποιήθηκε ισοτυπικό αντίσωμα. Πρόκειται για αντίσωμα ίδιου υποτύπου, ίδιας συγκέντρωσης και ίδιας αναλογίας πρωτεΐνης-φθοριοχρώματος με το μονοκλωνικό αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του επιθυμητού κυτταρικού πληθυσμού, αλλά χωρίς κάποια ειδικότητα για οποιονδήποτε επίτοπο αυτού. Έτσι, κατά την ανάλυση

των διαγραμμάτων που προέκυψαν από τον κυτταρομετρητή ροής, εξαιρέθηκε η κατανομή των σημάτων του ιστοτυπικού δείγματος, ώστε να προσδιοριστεί το τμήμα της κατανομής που αντιστοιχεί στην ειδική δέσμευση του μονοκλωνικού αντισώματος και αναλογεί στο αληθώς θετικό σήμα κάθε κυτταρικού πληθυσμού.

- ❖ Τα **δείγματα ελέγχου μονής χρώσης** (single staining controls), σε καθένα από τα οποία χρησιμοποιήθηκε μόνο ένα πειραματικό αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα. Προετοιμάστηκαν τόσα δείγματα ελέγχου μονής χρώσης όσα ήταν και τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των επιθυμητών πληθυσμών (δύο στην παρούσα μελέτη, ένα για το GLAST/APC και ένα για το CD11b/APC-Cy7).

Το αναλυτικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε είχε ως εξής:

1. Αφαίρεση θρεπτικού μέσου από τις καλλιέργειες ολικής γλοίας και έκπλυση των κυττάρων με DPBS (2 φορές).
2. Προσθήκη διαλύματος θρυψίνης-EDTA (1x), εμπλουτισμένου με DNάση I, και επώαση στους 37°C για 15-20 λεπτά.
3. Απενεργοποίηση της θρυψίνης με ίσο όγκο DMEM εμπλουτισμένου με 10% FBS και 1% P/S.
4. Διήθηση του κυτταρικού εναιωρήματος από ειδικό ηθμό με μέγεθος πόρων 100 μm.
5. Φυγοκέντρηση (1400 στροφές, 10 λεπτά, 4°C).
6. Απόρριψη υπερκειμένου και επαναιώρηση των κυττάρων σε συγκέντρωση 15-20*10⁶ κύτταρα/ml σε παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα κυτταρικού διαχωρισμού (FACS buffer, βλ. Υλικά, **Πίνακας 5**).
7. Περιορισμός της μη ειδικής πρόσδεσης των πειραματικών αντισωμάτων σε Fc υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας (unspecific staining) μέσω προ-επώασης του κυτταρικού εναιωρήματος με 10% υπερκείμενο του κλώνου 2.4G2 (ATCC® HB-197™, μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του Fc γάμμα υποδοχέα FcRII/CD32), για 10 λεπτά στους 4°C.
8. Πριν από τη χρώση με τα πειραματικά αντισώματα, μεταφέρθηκαν από το συνολικό εναιώρημα 5x10⁵ κύτταρα/σωληνάκι για την προετοιμασία των δειγμάτων ελέγχου που περιγράφηκαν νωρίτερα. Το ιστοτυπικό δείγμα ελέγχου περιείχε 1 ml ιστοτυπικού αντισώματος (IgG2a, κ μύος συζευγμένο με APC), ενώ ένα από τα σωληνάκια δεν περιείχε κανένα αντίσωμα (unstained control).

9. Προσθήκη 2 μl αντι-GLAST/APC και 1 μl αντι-CD11b/APC-Cy7 αντισωμάτων ανά 10^6 κύτταρα στα εναιωρήματα που προορίζονταν για κυτταρικό διαχωρισμό.
10. Επώαση των κυτταρικών εναιωρημάτων στους 4°C για 45 λεπτά στο σκοτάδι (ήπια ανάδευση ανά 10 λεπτά).
11. Προσθήκη DAPI (1:500) στα τελευταία 5-7 λεπτά της επώασης, για χρώση των νεκρών κυττάρων και την επακόλουθη απομάκρυνσή τους από την ανάλυση.
12. Τερματισμός της χρώσης με προσθήκη 1 ml FACS buffer στα δείγματα ελέγχου και 5-7 ml FACS buffer στα κυτταρικά εναιωρήματα που προορίζονταν για κυτταρικό διαχωρισμό.
13. Φυγοκέντρηση (1400 στροφές, 10 λεπτά, 4°C).
14. Απόρριψη υπερκείμενου και επαναιώρηση των δειγμάτων ελέγχου σε 200 μl FACS buffer. Για την επαναιώρηση των δειγμάτων που προορίζονταν για διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε ~1 ml FACS buffer ανά 10^7 κύτταρα. Μετά την επαναιώρηση, τα κυτταρικά εναιωρήματα διήλθαν εκ νέου από ηθμό με μέγεθος πόρων 100 μm.
15. Διατήρηση των δειγμάτων στους 4°C μέχρι να αναλυθούν μέσω κυτταρομετρικού διαχωριστή (BD FACSAria™ IIu) της μονάδας κυτταρομετρίας του IIBEAA.
16. Λόγω του μεγάλου μεγέθους και της ευαισθησίας των αστροκυττάρων σε μηχανικούς χειρισμούς χρησιμοποιήθηκε ακροστόμιο των 100 μm και χαμηλή πίεση (20 psi) για την ταυτόχρονη απομόνωση αστροκυττάρων και μικρογλοίας. Στην περίπτωση διαχωρισμού αποκλειστικά μικρογλοιακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ακροστόμιο των 70 μm και υψηλή πίεση (70 psi). Κυτταρομετρική ανάλυση μετά τον κυτταρικό διαχωρισμό έδειξε την ~99% καθαρότητα των απομονωμένων πληθυσμών αστροκυττάρων ή μικρογλοίας (**Εικόνα 22B**).
17. Μετά τον κυτταρικό διαχωρισμό, ακολούθησε φυγοκέντρηση (1400 στροφές, 10 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου), απόρριψη υπερκείμενου, επαναιώρηση και καλλιέργεια των κυττάρων σε DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% P/S και 400 μg/ml θειϊκής γενταμικίνης (Gentamicin sulfate).

4.4.3. *In vitro* διέγερση κυττάρων γλοίας

Τα κύτταρα ολικής γλοίας και οι απομονωμένοι πληθυσμοί αμιγών αστροκυττάρων και μικρογλοίας, που βρίσκονταν σε καλλιέργεια για ~20-24 ημέρες,

καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 1% P/S και απουσία ορού για τις τελευταίες 24 ώρες πριν από την επίδραση με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες μύος TGFβ1, BMP4, Noggin ή το φαρμακολογικό αναστολέα SB431542, απουσία ορού. Κύτταρα και θρεπτικά μέσα καλλιέργειας συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (2000 στροφές, 2 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου) σε σωληνάκια τύπου errendorf, παγώθηκαν ακαριαία σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

4.4.4. Ανοσοκυτταροχημεία

Για ανοσοκυτταροχημική ανάλυση, κύτταρα γλοίας καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες διαμέτρου 12 mm, επικαλυμμένες με PDL, εντός τρυβλίων των 24 φρεατίων. Σε γενικές γραμμές το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε ήταν παρόμοιο με εκείνο που περιγράφηκε για την ανοσοϊστοχημεία, ωστόσο εμπεριέχονταν μικρές τροποποιήσεις. Αναλυτικότερα:

1. Απόρριψη θρεπτικού μέσου καλλιέργειας από τα φρεάτια.
2. Έκπλυση κάθε φρεατίου με 0.5 ml PBS (3 φορές).
3. Επώαση με 0.5 ml 4% PFA σε PBS ανά φρεάτιο για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, για μονιμοποίηση των κυττάρων.
4. Έκπλυση κάθε φρεατίου με 0.5 ml PBS (3 φορές).
5. Επώαση με 0.2 ml διαλύματος δέσμευσης μη ειδικών θέσεων [10% NDS ή NGS, διαλυμένο σε 0.4% (v/v) Triton-X σε PBS], για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Επώαση με πρωτογενή αντισώματα έναντι των υπό μελέτη αντιγονικών επιτόπων (βλ. Υλικά, Πίνακας 3), κατάλληλα αραιωμένων σε 2% NDS ή NGS, 0.4% (v/v) Triton-X σε PBS, για 16-18 ώρες στους 4°C. Τοποθετήθηκαν 50 μl διαλύματος αραιωμένων αντισωμάτων πάνω σε κάθε καλυπτρίδα, η οποία καλύφθηκε με ένα μικρό κομμάτι parafilm, ώστε να σχηματιστεί μία ομοιόμορφα λεπτή στρώση αντισώματος πάνω από το δείγμα και να αποτραπεί η εξάτμισή του.
7. Αφαίρεση του parafilm και έκπλυση κάθε φρεατίου με 0.5 ml PBS (3 φορές).
8. Επώαση με δευτερογενή αντισώματα έναντι των πρωτογενών (βλ. Υλικά, Πίνακας 3), συζευγμένων με φθοριοχρώματα και κατάλληλα αραιωμένων σε 2% NDS ή NGS, 0.4% (v/v) Triton-X σε PBS, για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα των

δευτερογενών αντισωμάτων (~0.2 ml ανά φρεάτιο) εμπλουτίστηκε με DAPI (1:2000) για χρώση των πυρήνων.

9. Έκπλυση κάθε φρεατίου με 0.5 ml PBS (4 φορές).
10. Τοποθέτηση των καλυπτρίδων σε αντικειμενοφόρους πλάκες πολυλυσίνης. Χρήση μίας σταγόνας (3 μl) μέσου έγκλεισης φθορισμού για την αποτελεσματική έγκλειση της στιβάδας των κυττάρων μεταξύ καλυπτρίδας και αντικειμενοφόρου πλάκας.
11. Προσωρινή τοποθέτηση των αντικειμενοφόρων πλακών στους 4°C μέχρι τη λήψη φωτογραφιών και στη συνέχεια αποθήκευση/συντήρησή τους στους -20°C.
12. Λήψη και ανάλυση φωτογραφιών (βλ. Μέθοδοι, §3.3.2. Ανοσοϊστοχημεία).

4.5. Ανάλυση πρωτεϊνών

4.5.1. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών

Για την απομόνωση πρωτεϊνών ή ολικού RNA από ζώα που υποβλήθηκαν σε εστιακή κρανιοεγκεφαλική κάκωση, οι απομονωμένοι εγκέφαλοι τοποθετήθηκαν σε ένα ειδικό ακρυλικό εκμαγείο για εγκέφαλο ενήλικου μυός και πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια ξυραφιών στεφανιαίες τομές πάχους 2 mm που εμπεριείχαν το τραύμα. Στη συνέχεια, από κάθε τέτοια τομή, συλλέχθηκαν μικροχειρουργικά δείγματα ιστού που εμπεριείχαν το τραύμα και την αντίστοιχη ετερόπλευρη/υγιή περιοχή (**Εικόνα 15A**), τα οποία παγώθηκαν ακαριαία σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Για την εκχύλιση ολικών πρωτεϊνών, είτε από εγκεφαλικούς ιστούς είτε από πρωτογενή κύτταρα γλοίας, τα δείγματα επώαστηκαν σε διάλυμα κυτταρικής λύσης RIPA (βλ. Υλικά, **Πίνακας 5**), που οδηγεί στη δυναμική καταστροφή των μεμβρανών και την επακόλουθη απελευθέρωση του κυτταρικού περιεχομένου. Το διάλυμα λύσης είχε εμπλουτιστεί με αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών, ενώ ολόκληρη η διαδικασία διεξήχθη στους 4°C για να περιοριστεί η πιθανότητα πρωτεόλυσης των δειγμάτων.

❖ Για τα πρωτογενή κύτταρα, το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είχε ως εξής:

1. Αφαίρεση θρεπτικού μέσου και έκπλυση των κυττάρων με PBS 1x (δύο φορές), μετά το πέρας των εκάστοτε επιδράσεων.
2. Μηχανική αποκόλληση των κυττάρων σε κατάλληλο όγκο PBS, με τη βοήθεια ειδικού ξύστρου, και μεταφορά τους σε σωληνάκια τύπου erpendorf (σπανιότερα,

η αποκόλληση των κυττάρων διεξαγόταν με χρήση διαλύματος θρυψίνης, η οποία απενεργοποιούνταν με θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με 10% FBS).

3. Φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για λίγα δευτερόλεπτα στους 4°C.
 4. Απόρριψη υπερκειμένου και επαναιώρηση των κυττάρων σε κατάλληλο όγκο διαλύματος λύσης RIPA, εμπλουτισμένου με αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών.
 5. Ανάδευση των δειγμάτων με vortex και επώαση στους 4°C για 60 λεπτά.
 6. Εφαρμογή υπερήχων (33% εύρος, 4 φορές για 4 δευτερόλεπτα στους 4°C) για διάσπαση συσσωματωμάτων και καλύτερη ομογενοποίηση των δειγμάτων.
 7. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13000 στροφές για 25 λεπτά στους 4°C.
- ❖ Για τα δείγματα εγκεφαλικού ιστού, η διαδικασία που ακολουθήθηκε είχε ως εξής:
1. Ομογενοποίηση κάθε ιστού σε κατάλληλο όγκο διαλύματος λύσης RIPA [mg νωπού ιστού x 10 = μl διαλύματος λύσης], στο οποίο περιέχονταν αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών.
 2. Εφαρμογή υπερήχων (33% εύρος, 3 φορές για 8 δευτερόλεπτα στους 4°C) για ομογενοποίηση των δειγμάτων.
 3. Ανάδευση των δειγμάτων με vortex και επώαση στους 4°C για 60 λεπτά.
 4. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 50000 g για 60 λεπτά στους 4°C.

Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση, έγινε μεταφορά του υπερκειμένου που περιείχε το κυτταρικό εκχύλισμα των ολικών πρωτεϊνών σε νέα σωληνάκια τύπου erpendorf. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

4.5.2. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ολικής πρωτεΐνης στα υπό ανάλυση δείγματα χρησιμοποιήθηκε η φωτομετρική μέθοδος Bradford (Bradford, 1976). Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες σε υδατικά διαλύματα αντιδρούν μη αντιστρεπτά με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 σε όξινο περιβάλλον και δίνουν ένα κυανό χρώμα, το οποίο σχηματίζεται άμεσα και είναι σταθερό για περίπου μια ώρα. Η ελεύθερη χρωστική έχει μέγιστο οπτικής απορρόφησης στα 465 nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής στα 595 nm.

Απαραίτητη είναι η δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς με βάση την

οπτική απορρόφηση γνωστών συγκεντρώσεων πρότυπων διαλυμάτων αλβουμίνης από ορό βοός (Bovine Serum Albumin, BSA, 1 mg/ml σε dH₂O). Συγκρίνοντας την οπτική απορρόφηση του δείγματος (μετά από κατάλληλη αραιώση) με την οπτική απορρόφηση των προτύπων προκύπτει η συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε αυτό. Πιο αναλυτικά, γνωστές ποσότητες πρότυπης πρωτεΐνης BSA (2 μg, 4 μg, 8 μg, 12 μg, 16 μg και 20 μg) αντέδρασαν με το αντιδραστήριο Bradford, αραιωμένο 1:4 (v/v) με dH₂O, για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ταυτόχρονα με το αντιδραστήριο αντέδρασε και κατάλληλος όγκος δείγματος (συνήθως 1 μl), ανάλογα με την πυκνότητα του δεύτερου, ώστε η τιμή της απορρόφησης να βρίσκεται μέσα στα όρια του γραμμικού τμήματος της πρότυπης καμπύλης. Λαμβάνοντας υπόψη τον όγκο του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε, υπολογίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα δείγματα. Επειδή η ακριβής τιμή της οπτικής απορρόφησης επηρεάζεται από το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την αραιώση της χρωστικής μέχρι τη χρήση της, η πρότυπη καμπύλη κατασκευαζόταν σε κάθε μέτρηση.

4.5.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και υγρή ηλεκτροφορητική μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Το σύνολο των πρωτεϊνών που εκχυλίστηκαν από δείγματα ιστών ή κυττάρων διαχωρίστηκαν ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης βασίζεται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες σε διαφορετικό pH από το ισοηλεκτρικό τους σημείο μετακινούνται υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το αλκαλικό ασυνεχές σύστημα SDS-ηλεκτροφόρησης σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, όπως περιγράφηκε από τον Laemmli (Laemmli, 1970). Στα υπό ανάλυση δείγματα προστέθηκε το διάλυμα κατεργασίας πρωτεϊνικών δειγμάτων (βλ. Υλικά, Πίνακας 5), που περιείχε: i) β-μερκαπτοαιθανόλη, η οποία δημιουργεί αποδιατακτικές συνθήκες και οδηγεί στην αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών, ii) SDS, το οποίο προσδίδει αρνητικό φορτίο σε όλες τις πρωτεΐνες, iii) γλυκερόλη, η οποία βοηθά στην τοποθέτηση του δείγματος στο πήκτωμα και iv) κυανούν της βρωμοφαινόλης, το οποίο επίσης βοηθά στην τοποθέτηση του δείγματος στο πήκτωμα αλλά και στην παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Με τον τρόπο αυτό οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται και αποκτούν αρνητικό φορτίο, οπότε ο διαχωρισμός τους πραγματοποιείται αποκλειστικά με βάση το

μοριακό τους βάρος. Έτσι, πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους κινούνται ταχύτερα κατά μήκος του πηκτώματος σε σχέση με πρωτεΐνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους.

Χρησιμοποιήθηκε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης, όπου το πήκτωμα σχηματίζεται ανάμεσα σε δύο κάθετες πλάκες, μέσω πολυμερισμού μονομερών ακρυλαμίδης ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), που συνδέονται μεταξύ τους με μόρια N,N-μεθυλενοδισακρυλαμίδης (ή bis ακρυλαμίδη, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$), παρουσία υπερθειϊκού αμμωνίου (APS) και N,N,N',N'-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνης (TEMED). Το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ακρυλαμίδης και της bis ακρυλαμίδης. Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης παρασκευάστηκαν πηκτώματα διαχωρισμού (separating gels) με συγκέντρωση 10-13% w/v ακρυλαμίδης, ανάλογα με το μοριακό βάρος των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες διέρχονταν πρώτα από το πήκτωμα επιστοιβάξης (stacking gel), διαφορετικής συγκέντρωσης ακρυλαμίδης (5% w/v) και διαφορετικού pH από το πήκτωμα διαχωρισμού, με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη και ομοιόμορφη είσοδό τους στο δεύτερο. Ταυτόχρονα με τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκε κι ένα μείγμα επιχρωματισμένων πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (protein markers) για την παρακολούθηση της ηλεκτροφόρησης και τον προσδιορισμό του μοριακού μεγέθους των υπό μελέτη πρωτεϊνών.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια:

1. Καθαρισμός των γυάλινων πλακών με μεθανόλη και τοποθέτησή τους σε ειδική συσκευή στήριξης.
2. Τοποθέτηση του διαλύματος του πηκτώματος διαχωρισμού (375 mM Tris-HCl pH 8.8, 10-13% w/v μείγματος ακρυλαμίδης/bis ακρυλαμίδης, 0.1% w/v SDS, 0.1% w/v APS και 0.07% v/v TEMED) ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες.
3. Εναπόθεση μιας στοιβάδας βουτανόλης στην κορυφή του πηκτώματος διαχωρισμού, προτού πολυμεριστεί, για ευθυγράμμιση της επιφάνειάς του.
4. Αφαίρεση της βουτανόλης μετά τον πολυμερισμό, καλή έκπλυση με dH_2O και εναπόθεση του διαλύματος του πηκτώματος επιστοιβάξης (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% w/v μείγματος ακρυλαμίδης/bis ακρυλαμίδης, 0.1% w/v SDS, 0.1% w/v APS και 0.07% v/v TEMED). Χρήση ειδικής «κτένας» για το σχηματισμό των φρεατίων τοποθέτησης των δειγμάτων.

5. Αφαίρεση της «κτένας» και τοποθέτηση των πλακών με το πήκτωμα είτε στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν, είτε απευθείας στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία πληρώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (βλ. Υλικά, Πίνακας 5).
6. Ανάμειξη των δειγμάτων (εκχυλίσματα ολικών πρωτεϊνών ποσότητας 20-40 μg ή υπερκείμενα καλλιεργείων αστροκυττάρων) με κατάλληλο όγκο διαλύματος κατεργασίας πρωτεϊνικών δειγμάτων και τοποθέτησή τους σε θερμαινόμενη πλάκα (5 λεπτά, 95°C) για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών.
7. Ανάδευση των δειγμάτων και φόρτωσή τους στα φρεάτια του πηκτώματος.
8. Ηλεκτροφόρηση υπό σταθερή τάση, αρχικά στα 100 V μέχρι την είσοδο των δειγμάτων στο πήκτωμα διαχωρισμού και στη συνέχεια στα 120-150 V.
9. Παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης με τη βοήθεια της χρωστικής του διαλύματος κατεργασίας και τερματισμός αυτής όταν το μέτωπο της χρωστικής προσεγγίσει το τέλος του πηκτώματος.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, ακολούθησε υγρή ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών που βρίσκονταν στο πήκτωμα διαχωρισμού σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, όπου αποτυπώθηκαν όπως ακριβώς είχαν διαχωριστεί στην κάθετη ηλεκτροφόρηση (Burnette, 1981; Towbin et al., 1979). Πιο αναλυτικά:

1. Αφαίρεση του πηκτώματος επιστοίβαξης και εμβάπτιση του πηκτώματος διαχωρισμού, της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης (διαστάσεων 5 x 9 cm), δύο ειδικών χαρτιών Whatman (Whatman® cellulose chromatography papers, κομμένων σε διαστάσεις 7 x 10 cm) και δύο απορροφητικών υλικών σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφορητικής μεταφοράς (βλ. Υλικά, Πίνακας 5) για 15 λεπτά.
2. Τοποθέτηση των διαφόρων στοιχείων στη συσκευή μεταφοράς, με την εξής διάταξη από την άνοδο προς την κάθοδο: 1 απορροφητικό υλικό, 1 χαρτί Whatman, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, πήκτωμα διαχωρισμού, 1 χαρτί Whatman, 1 απορροφητικό υλικό. Η τοποθέτηση διεξήχθη προσεκτικά προς αποφυγή παγίδευσης φυσαλίδων αέρα μεταξύ των στοιχείων και δημιουργίας κηλίδων κενού στη μεμβράνη κατά τη μεταφορά. Η μέθοδος βασίζεται στη μετακίνηση των αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών (λόγω του SDS) από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο της συσκευής.

3. Εφαρμογή κατάλληλης τάσης για τη διέλευση σταθερής έντασης ρεύματος (400 mA για 120 λεπτά ή 300 mA για 90 λεπτά) από κάθε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Στη συσκευή είχε τοποθετηθεί ειδικό δοχείο με πάγο προς αποφυγή υπερθέρμανσης του διαλύματος μεταφοράς κατά τη διαδικασία.
4. Χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, μετά το πέρας της μεταφοράς, με χρήση διαλύματος χρωστικής Ponceau S (0.4% w/v Ponceau S σε 7.5% v/v τριχλωροξικό οξύ) για 1-2 λεπτά υπό ανάδευση, για τη διάκριση των πολυπεπτίδιων που έχουν μεταφερθεί ηλεκτροφορητικά σε αυτή. Οι πρωτεϊνικές ζώνες διακρίνονται με κόκκινο χρώμα και έτσι ελέγχεται η ποιότητα της μεταφοράς και το ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνών μεταξύ των δειγμάτων.
5. Έκπλυση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με PBS 1x, μέχρι να αποχρωματισθεί εντελώς (3-4 φορές). Εφόσον η πρόσδεση της Ponceau S στις πρωτεΐνες είναι αντιστρεπτή δεν προκαλεί προβλήματα στη διαδικασία του ανοσοοστευώματος που ακολουθεί και δε δημιουργεί ισχυρό σήμα «θορύβου» στη μεμβράνη (Salinovich and Montelaro, 1986).

4.5.4. Ανοσοσύπωμα κατά Western

Με τη μέθοδο του ανοσοοστευώματος κατά Western ο εντοπισμός της επιθυμητής πρωτεΐνης λαμβάνει χώρα επάνω στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος. Η ανίχνευση της υπό μελέτη πρωτεΐνης γίνεται έμμεσα, δηλαδή ένα ειδικό πρωτογενές αντίσωμα προσδένεται αρχικά σε αυτή επάνω στη νιτροκυτταρίνη και στη συνέχεια ένα δευτερογενές αντίσωμα, συζευγμένο με ένα ένζυμο, αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρώτο. Ο εντοπισμός της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος διεξάγεται μέσω εντοπισμού του δευτερογενούς αντισώματος, με κατάλληλη μέθοδο όπου στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν αυτή της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην εκπομπή φωτός (ακτινοβολίας) από ένα μόριο, καθώς αυτό χάνει ενέργεια κατά τη μετάπτωσή του από μία διεγερμένη στη θεμελιώδη κατάσταση. Ένα γνωστό σύστημα για την παραγωγή χημειοφωταύγειας είναι αυτό της υπεροξειδάσης του χρένου (Horseradish Peroxidase, HRP), που καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης υπό αλκαλικές συνθήκες. Αμέσως μετά την οξείδωσή της, η λουμινόλη βρίσκεται σε

διεγερμένη κατάσταση και κατόπιν μεταπίπτει στη θεμελιώδη μέσω εκπομπής φωτός. Κατά την ενισχυμένη χημειοφωταύγεια, η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιείται παρουσία χημικών ενισχυτών, όπως οι φαινόλες (Whitehead et al., 1979). Η δοκιμασία κατά Western περιελάμβανε τα εξής βήματα:

1. Επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα δέσμευσης μη ειδικών θέσεων [5% w/v σκόνη γάλακτος χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά σε διάλυμα έκπλυσης PBS-T (PBS 1x και 0.05% v/v Tween-20) ή TBS-T (Tris-Buffered Saline-Tween-20: 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl και 0.05% v/v Tween-20)].
2. Επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με ειδικό πρωτογενές αντίσωμα (βλ. Υλικά, **Πίνακας 3**), κατάλληλα αραιωμένο σε διάλυμα 5% w/v σκόνης γάλακτος σε PBS-T ή TBS-T, στους 4°C και υπό συνεχή ανάδευση για 16-18 ώρες.
3. Έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα PBS-T ή TBS-T (3 x 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση).
4. Επώαση της μεμβράνης με ειδικό δευτερογενές αντίσωμα (βλ. Υλικά, **Πίνακας 3**) έναντι του πρωτογενούς, αραιωμένο σε διάλυμα 5% w/v σκόνης γάλακτος σε PBS-T ή TBS-T, για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνεχή ανάδευση.
5. Έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα PBS-T ή TBS-T (3 x 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση).
6. Εφαρμογή ενισχυμένης χημειοφωταύγειας, με χρήση της αντίστοιχης ομάδας αντιδραστηρίων της Bio-Rad (170-5061). Το αντιδραστήριο A περιέχει υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) και αποτελεί υπόστρωμα της υπεροξειδάσης που βρίσκεται συζευγμένη στο δευτερογενές αντίσωμα και το αντιδραστήριο B περιέχει λουμινόλη και ενισχυτή της χημειοφωταύγειας. Τα αντιδραστήρια αναμείχθηκαν σε αναλογία 1:1 λίγο πριν τη χρήση και ακολούθησε επώαση της μεμβράνης με το μείγμα για 3 λεπτά στο σκοτάδι.
7. Επικάλυψη της μεμβράνης με ζελατίνη και έκθεσή της σε κατάλληλο φωτογραφικό φιλμ, μέσα σε ειδική κασέτα. Ο χρόνος έκθεσης εξαρτάται από την υπό μελέτη πρωτεΐνη (την ποσότητά της στο κυτταρικό εκχύλισμα και την αλληλεπίδρασή της με το πρωτογενές αντίσωμα).

8. Εμφάνιση του φιλμ μετά από επώαση σε διάλυμα εμφάνισης (developer) και σταθεροποίηση του παραγόμενου σήματος μετά από επώαση σε διάλυμα σταθεροποίησης (fixer), σε ειδικό θάλαμο απουσία λευκού φωτός.
9. Σάρωση των φωτογραφικών φιλμ και πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Gel Analyzer v1.0.

Μετά την εμφάνιση, υπάρχει η δυνατότητα αφαίρεσης του αντισώματος από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (stripping), έτσι ώστε αυτή να χρησιμοποιηθεί εκ νέου για την ανίχνευση μιας διαφορετικής πρωτεΐνης (Legocki and Verma, 1981). Η διαδικασία αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τον έλεγχο της ισόποσης φόρτωσης των δειγμάτων, χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι μιας πρωτεΐνης αναφοράς (π.χ. β-ακτίνη), ή σε περίπτωση μη επαρκούς ποσότητας δείγματος για επανάληψη της ηλεκτροφόρησης. Εάν η νέα πρωτεΐνη ενδιαφέροντος βρίσκεται πολύ κοντά σε εκείνη που είχε ανιχνευθεί αρχικά, η μεμβράνη επάζεται σε ισχυρό διάλυμα αποκόλλησης αντισωμάτων (βλ. Υλικά, **Πίνακας 5**, harsh stripping) στους 55°C, για 30-60 λεπτά υπό συνεχή και έντονη ανάδευση. Εάν το μοριακό βάρος της νέας πρωτεΐνης διαφέρει σημαντικά από εκείνο της προηγούμενης, τότε ακολουθείται ένα ηπιότερο πρωτόκολλο αποκόλλησης σε θερμοκρασία δωματίου για 30-60 λεπτά (βλ. Υλικά, **Πίνακας 5**, mild stripping). Σε κάθε περίπτωση, ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης (3 x 10 λεπτά) με διάλυμα PBS-T ή TBS-T για απομάκρυνση καταλοίπων του διαλύματος αποκόλλησης, επώαση με 5% w/v σκόνη γάλακτος σε PBS-T ή TBS-T για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και επώαση με το νέο πρωτογενές αντίσωμα, όπως ακριβώς περιγράφηκε προηγουμένως.

4.6. Μοριακή ανάλυση

4.6.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρές μυών

Για το γονοτυπικό χαρακτηρισμό των διαγονιδιακών μυών αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, έγινε απομόνωση γενωμικού DNA από ένα μικρό τμήμα της ουράς τους (στην ηλικία των 8-12 ημερών). Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε συνίσταται στα εξής βήματα:

1. Αποκοπή τμήματος μήκους 0.5-1.0 cm από το άκρο της ουράς και τοποθέτησή του σε σωληνάκι τύπου erpendorf.

2. Προσθήκη 600 μl ρυθμιστικού διαλύματος TNES (βλ. Υλικά, **Πίνακας 5**), αφού είχε προθερμανθεί στους 65°C για τη διάλυση των σχηματιζόμενων ιζημάτων.
3. Προσθήκη 350 μg πρωτεΐνης K (3-4 μl) ανά δείγμα.
4. Ολονύκτια επώαση των δειγμάτων στους 55°C για την αποδόμηση των ιστών.
5. Προσθήκη 167 μl κορεσμένου διαλύματος NaCl 6M ανά δείγμα.
6. Έντονη ανάδευση με τη βοήθεια vortex για 15 δευτερόλεπτα.
7. Φυγοκέντρηση (13000 στροφές, 30 λεπτά, 4°C).
8. Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf του 1.5 ml.
9. Προσθήκη ίσου όγκου κρύας 95% αιθανόλης και ήπια ανάδευση για την κατακρήμνιση του DNA.
10. Φυγοκέντρηση (13000 στροφές, 30 λεπτά, 4°C).
11. Απόρριψη υπερκειμένου και έκπλυση του ιζήματος DNA με κρύα 70% αιθανόλη.
12. Φυγοκέντρηση (13000 στροφές, 10 λεπτά, 4°C).
13. Απόρριψη υπερκειμένου και καλό στέγνωμα του ιζήματος.
14. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 200 μl αποστειρωμένου dH₂O και αποθήκευση των δειγμάτων στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

4.6.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, η οποία βρίσκεται μεταξύ δύο περιοχών γνωστής αλληλουχίας. Στην αντίδραση χρησιμοποιούνται δύο ολιγονουκλεοτίδια ως εναρκτήρια μόρια (εκκινητές) για μία σειρά διαδοχικών αντιδράσεων που καταλύονται από μία DNA πολυμεράση, την Taq πολυμεράση, η οποία είναι ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες. Το κάθε ολιγονουκλεοτίδιο είναι συμπληρωματικό με μία διαφορετική αλυσίδα της μήτρας DNA και πιο συγκεκριμένα με τη γειτονική αλληλουχία του προς ενίσχυση τμήματος DNA. Αρχικά, πραγματοποιείται αποδιάταξη της μήτρας DNA με θέρμανση σε πολύ υψηλή θερμοκρασία. Στη συνέχεια, το μείγμα της αντίδρασης ψύχεται σε θερμοκρασία η οποία επιτρέπει την αναδιάταξη των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA και τέλος, διεξάγεται επιμήκυνση των αναδιαταγμένων εκκινητών με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης. Ο κύκλος της αποδιάταξης, αναδιάταξης και επιμήκυνσης επαναλαμβάνεται πολλές φορές

και τα προϊόντα κάθε κύκλου χρησιμοποιούνται ως μήτρα DNA για τους επόμενους κύκλους. Το διάλυμα της αντίδρασης στο τέλος η κύκλων περιέχει δυνητικά 2^n μόρια DNA, τα οποία είναι πανομοιότυπα αντίγραφα της αλληλουχίας που βρίσκεται μεταξύ των δύο εκκινητών.

Για τον προσδιορισμό του γονοτύπου των διαγονιδιακών μυών πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR κατά την οποία ενισχύθηκε τμήμα του διαγονιδίου. Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν ένα αρνητικό δείγμα ελέγχου, που περιείχε όλα τα αντιδραστήρια εκτός από DNA, και ένα δείγμα μυός αγρίου τύπου, από το DNA του οποίου απουσίαζε το προς ανίχνευση διαγονίδιο. Το αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμεύει στον έλεγχο πιθανής επιμόλυνσης κατά την προετοιμασία της αντίδρασης. Σε περίπτωση επιμόλυνσης, η αντίδραση PCR θεωρείται ανεπιτυχής, διότι πιθανόν αντί να ενισχυθεί το DNA του υπό μελέτη δείγματος έχει ενισχυθεί το DNA του ξένου οργανισμού που επιμόλυνε το μείγμα της αντίδρασης (mastermix). Στη συνέχεια, περιγράφεται η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εκτέλεση μιας αντίδρασης PCR.

1. Προετοιμασία του mastermix στο οποίο περιέχονταν όλα τα παρακάτω αντιδραστήρια εκτός του DNA. Στον **Πίνακα 6** αναφέρονται ως παράδειγμα οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *Rfp* και τον προσδιορισμό των διαγονιδιακών μυών αναφοράς TRE-RFP.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά δείγμα (μl)
Αποστειρωμένο dH ₂ O, ελεύθερο DNAσών και RNAσών	15.8
dNTPs (40 mM)	0.5
Πρόσθιος εκκινητής (10 μM)	0.5
Ανάστροφος εκκινητής (10 μM)	0.5
MgCl ₂ (7.5 mM)	2.0
Ρυθμιστικό διάλυμα Green GoTaq® Flexi Buffer (5x)	5.0
DNA Πολυμεράση GoTaq® Flexi (5 U/μl)	0.2
DNA	0.5
Συνολικός όγκος αντίδρασης	25.0

Πίνακας 6. Απαραίτητα αντιδραστήρια για τη διεξαγωγή μιας αντίδρασης PCR. Ενδεικτικός κατάλογος αντιδραστηρίων για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *Rfp* και τον προσδιορισμό των διαγονιδιακών μυών αναφοράς TRE-RFP, μέσω αντίδρασης PCR.

2. Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας δείγματος DNA σε σωληνάκι τύπου erpendorf των 200 μl.

3. Διαμοίραση ποσότητας από το mastermix (π.χ. 24.5 μl) σε κάθε σωληνάκι.
4. Τοποθέτηση των δειγμάτων στο θερμικό κυκλοποιητή. Οι ενδεικτικές συνθήκες μιας αντίδρασης PCR φαίνονται στον **Πίνακα 7**.

Στάδιο	Συνθήκη	Αριθμός επαναλήψεων
1	94°C για 4 λεπτά	x 1
2α	92°C για 1 λεπτό	x 30
2β	65°C για 1 λεπτό	
2γ	72°C για 1 λεπτό	
3	72°C για 5 λεπτά	x 1
4	διατήρηση στους 4°C	x 1

Πίνακας 7. Ενδεικτικές συνθήκες για τον προσδιορισμό του γονοτύπου διαγονιδιακών μυών μέσω αντίδρασης PCR. Καταγραφή των σταδίων, των συνθηκών και του αριθμού των επαναλήψεων που εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *Rfp* με σκοπό τον προσδιορισμό των διαγονιδιακών μυών αναφοράς TRE-RFP, μέσω αντίδρασης PCR.

Εκτός του γονοτυπικού προσδιορισμού, η διεξαγωγή απλής PCR χρησίμευσε επίσης στην επιβεβαίωση επιτυχούς σύνθεσης cDNA, μέσω ενίσχυσης του γονιδίου *Gapdh* στα δείγματα όπου διεξήχθη αντίστροφη μεταγραφή και σε δείγματα ελέγχου από όπου απουσίαζε η αντίστροφη μεταγραφάση. Επιπλέον, μια απλή αντίδραση PCR διεξήχθη πριν από τη χρήση νέων εκκινητών στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, στην οποία τελικά χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα ζεύγη εκκινητών που έδωσαν τα επιθυμητά προϊόντα στην απλή PCR. Οι συνθήκες της αντίδρασης για την επιβεβαίωση επιτυχούς σύνθεσης cDNA καθώς και για τον έλεγχο των νέων ζευγών εκκινητών ήταν κοινές και παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8**.

Στάδιο	Συνθήκη	Επανάληψη
1	95°C για 10 λεπτά	x 1
2α	95°C για 40 δευτερόλεπτα	x 35
2β	55°C-60°C για 40 δευτερόλεπτα (η θερμοκρασία στο στάδιο αυτό εξαρτάται από την T _m των χρησιμοποιούμενων εκκινητών)	
2γ	72°C για 40 δευτερόλεπτα	
3	72°C για 5 λεπτά	x 1
4	διατήρηση στους 4°C	x 1

Πίνακας 8. Αντιπροσωπευτικές συνθήκες μιας απλής αντίδρασης PCR. Ενδεικτική καταγραφή των σταδίων, των συνθηκών και του αριθμού των επαναλήψεων που εφαρμόστηκαν για την επιβεβαίωση επιτυχούς σύνθεσης cDNA (ενίσχυση του γονιδίου *Gapdh*) και για τον έλεγχο των νέων ζευγών εκκινητών, μέσω αντίδρασης PCR.

4.6.3. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση μορίων DNA (π.χ. προϊόντων αντίδρασης PCR) διεξήχθη σε οριζόντια πηκτώματα 0.8-2% αγαρόζης, η συγκέντρωση της οποίας ήταν αντιστρόφως ανάλογη των μοριακών βαρών των μορίων DNA που επρόκειτο να διαχωριστούν. Θεωρείται ενισχυμένο το επιθυμητό γονίδιο όταν στο πήκτωμα εμφανιστεί μια ζώνη με το αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος (εκφρασμένο σε ζεύγη βάσεων, bp). Επιπλέον, η σύνθεση cDNA θεωρείται επιτυχημένη όταν στο πήκτωμα εμφανιστεί μια ζώνη με το αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος μόνο στα δείγματα όπου έλαβε χώρα η αντίστροφη μεταγραφή και όχι στα δείγματα ελέγχου. Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης και την επακόλουθη ηλεκτροφόρηση ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο:

1. Θέρμανση 100-200 ml ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης TAE 1x με την κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης εντός κωνικής φιάλης για λίγα λεπτά σε φούρνο μικροκυμάτων, για διάλυση της αγαρόζης.
2. Ψύξη των τοιχωμάτων της κωνικής φιάλης με τη διαλυμένη αγαρόζη σε τρεχούμενο νερό βρύσης.
3. Προσθήκη 0.5 µg/ml βρωμιούχου αιθιδίου 1% και ανάδευση του μείγματος. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται στο δίκλωνο DNA και φθορίζει μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.
4. Μεταφορά του μείγματος αγαρόζης σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου είχαν προηγουμένως τοποθετηθεί ειδικά «κτενάκια», για το σχηματισμό φρεατίων τοποθέτησης των δειγμάτων, και αναμονή για στερεοποίηση του πηκτώματος.
5. Αφαίρεση των ειδικών «κτενών» μετά τη στερεοποίηση και πλήρωση της συσκευής ηλεκτροφόρησης με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x.
6. Ανάμειξη των δειγμάτων DNA με ειδικό διάλυμα φόρτωσης (0.25% w/v κυανού της βρωμοφαινόλης και 30% v/v γλυκερόλη σε dH₂O) και μεταφορά τους στα φρεάτια του πηκτώματος. Στο πρώτο φρεάτιο τοποθετήθηκαν 5-8 µl μείγματος τμημάτων DNA γνωστών μοριακών μεγεθών (DNA ladder) για διευκόλυνση της ταυτοποίησης του μεγέθους των προϊόντων που ηλεκτροφορήθηκαν.
7. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων υπό σταθερή τάση 80-100 V για ~30-50 λεπτά. Καθώς τα μόρια DNA είναι αρνητικά φορτισμένα, η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου οδηγεί στη μετακίνησή τους από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο.

8. Μεταφορά του πηκτώματος σε συσκευή εξοπλισμένη με υπεριώδη ακτινοβολία (302 nm), μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης για λήψη των αποτελεσμάτων (φωτογράφιση).

4.6.4. Απομόνωση ολικού RNA και σύνθεση cDNA

Η απομόνωση ολικού RNA διεξήχθη με χρήση του αντιδραστηρίου Trizol (TRI Reagent), το οποίο συνδυάζει τη δράση της φαινόλης με τη θειοκυανική γουανιδίνη, έναν χαοτροπικό παράγοντα που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, αναστέλλοντας έτσι τη δράση των RNAσών (και των DNAσών) και βοηθώντας στη λύση των κυττάρων. Για τη διαδικασία της απομόνωσης ακολουθήθηκαν αυστηρά άσηπτες συνθήκες και χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα υλικά (dH₂O ελεύθερου RNAσών και DNAσών, σωληνάκια τύπου erpendorf, πιπέτες, ρύγχη), ώστε να εξαλειφθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης των δειγμάτων και δράσης RNAσών. Το αναλυτικό πρωτόκολλο της απομόνωσης περιγράφεται στη συνέχεια:

1. Τοποθέτηση των δειγμάτων (ζωντανά πρωτογενή κύτταρα γλοίας, ιζήματα κυττάρων ή απομονωμένοι ιστοί εγκεφάλου) σε erpendorf των 2 ml και προσθήκη 1 ml αντιδραστηρίου Trizol ανά δείγμα. Στην περίπτωση των εγκεφαλικών ιστών διεξήχθη ομογενοποίηση με χρήση ομογενοποιητή (Polytron PT1600E).
2. Φυγοκέντρηση (2000 στροφές, 10 λεπτά, 4°C), μετά την ολοκλήρωση της λύσης των κυττάρων σε όλα τα δείγματα. Τα αδιάλυτα μόρια καθιζάνουν, ενώ το RNA παραμένει στο υπερκείμενο.
3. Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο αποστειρωμένο erpendorf των 2 ml και επώαση για 5 λεπτά στους 15-20°C.
4. Προσθήκη 200 μl κρύου χλωροφόρμιου ανά δείγμα.
5. Γρήγορη ανακίνηση των δειγμάτων για 20 δευτερόλεπτα και επώαση για 2-3 λεπτά στους 15-20°C.
6. Φυγοκέντρηση (13000 στροφές, 20 λεπτά, 4°C), από την οποία προκύπτουν τρεις στιβάδες: η κατώτερη στιβάδα περιέχει τους οργανικούς διαλύτες (φαινόλη-χλωροφόρμιο), όπου είναι διαλυμένα τα κυτταρικά υπολείμματα και οι αποδιαταγμένες πρωτεΐνες, η μεσαία στιβάδα είναι πολύ λεπτή, λευκού χρώματος,

και περιέχει αδιάσπαστα κυτταρικά υπολείμματα και DNA, ενώ η ανώτερη υδατική στιβάδα είναι άχρωμη και περιέχει το RNA.

7. Μεταφορά 500 μl από την υδάτινη στοιβάδα που περιείχε το RNA σε νέο αποστειρωμένο erpendorf των 2 ml.
8. Προσθήκη 500 μl κρύας ισοπροπανόλης ανά δείγμα, ανάδευση και επώαση των δειγμάτων για 30 λεπτά στους -20°C .
9. Φυγοκέντρηση (13000 στροφές, 15 λεπτά, 4°C). Το RNA καθιζάνει στον πυθμένα, ενώ τα υπόλοιπα κυτταρικά στοιχεία που δεν απομακρύνθηκαν βρίσκονται στο υπερκείμενο.
10. Απόρριψη υπερκείμενου και προσθήκη 1 ml διαλύματος κρύας 70-75% αιθανόλης ανά δείγμα.
11. Ανάδευση των δειγμάτων και φυγοκέντρηση (8500 στροφές, 6 λεπτά, 4°C).
12. Απόρριψη υπερκείμενου και φυγοκέντρηση υπό κενό αέρος για την εξάτμιση των καταλοίπων αιθανόλης.
13. Προσθήκη 20-50 μl dH_2O (ελεύθερου RNAσών και DNAσών) και τοποθέτηση των δειγμάτων για 15 λεπτά σε θερμική πλάκα ($55-59^{\circ}\text{C}$), για επαναιώρηση του RNA.
14. Υπολογισμός της συγκέντρωσης του RNA με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm και εκτίμηση της καθαρότητας των δειγμάτων (ιδανικά ο λόγος της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm προς τα 280 nm ισούται με 2).
15. Εκτίμηση της ποιότητας των δειγμάτων μέσω ηλεκτροφόρησης 0.5-1 μg RNA σε πήκτωμα 2% αγαρόζης.
16. Αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C .

Προς αποφυγή επιμόλυνσης του RNA από τυχόν ίχνη DNA, προηγήθηκε της διαδικασίας σύνθεσης cDNA η επώαση των δειγμάτων RNA παρουσία DNάσης I. Το πρωτόκολλο είχε ως εξής:

1. Μεταφορά 1 μg δείγματος RNA σε νέο αποστειρωμένο σωληνάκι erpendorf των 200 μl και προσθήκη dH_2O (ελεύθερου RNAσών και DNAσών) μέχρι τα 9 μl.
2. Προσθήκη 1 μl ενζύμου RQ1 DNάση I (ελεύθερη RNAσών, 1U/μg).
3. Προσθήκη 1 μl ρυθμιστικού διαλύματος RQ1 10x.
4. Επώαση των δειγμάτων στους 37°C για 30 λεπτά.

5. Απενεργοποίηση DNάσης I με την προσθήκη 1 μl διαλύματος τερματισμού (RQ1 stop solution) και επώαση των δειγμάτων στους 65°C για 10 λεπτά.

Η αντίστροφη μεταγραφή, κατά την οποία το RNA μεταγράφεται σε cDNA, πραγματοποιήθηκε με χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV (Promega), ενώ παράλληλα ετοιμάστηκαν δείγματα ελέγχου από τα οποία απουσίαζε το ένζυμο. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο θερμικό κυκλοποιητή ως εξής:

1. Προσθήκη 1 μl μείγματος τυχαίων εκκινητών (random primers) σε 11 μl δείγματος, που προέκυψαν από την επίδραση της DNάσης I στα αρχικά δείγματα RNA, επώαση στους 70°C για 5 λεπτά και τερματισμός της αντίδρασης στους 4°C.
2. Προετοιμασία mastermix για το οποίο υπολογίστηκαν 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος αντίστροφης μεταγραφάσης, 5 μl dNTPs (40 mM), 1 μl ανασυνδυασμένου αναστολέα ριβονουκλεασών (RNaseOUT) και 1 μl ενζύμου M-MLV για κάθε δείγμα. Στα δείγματα ελέγχου η ποσότητα της αντίστροφης μεταγραφάσης αντικαταστάθηκε από 1 μl dH₂O ελεύθερου RNAσών και DNAσών.
3. Μεταφορά 12 μl από το mastermix σε κάθε σωληνάκι που περιέχονταν ήδη 13 μl μείγματος RNA και τυχαίων εκκινητών, επώαση των δειγμάτων στους 37°C για 60 λεπτά και τερματισμός της αντίδρασης στους 4°C (όγκος αντίδρασης 25 μl).
4. Αποθήκευση των δειγμάτων στους -20°C.

4.6.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) είναι μια ευαίσθητη και ακριβής μέθοδος ποσοτικοποίησης της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο mRNA. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου βασίζεται στην ιχνηθέτηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR με φθορίζοντα μόρια και στη μέτρηση της εκπομπής του παραγόμενου φθορισμού σε κάθε κύκλο της αντίδρασης, χωρίς να διακόπτεται ή να αφαιρείται κάποιο κλάσμα της. Η ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης στην παρούσα μελέτη διεξήχθη με χρήση της ειδικής φθορίζουσας ουσίας SYBR Green I (ThermoFisher Scientific), η οποία δεν παρεμβαίνει στην πορεία της αντίδρασης. Μετά την αποδιάταξη του δίκλωνου cDNA και τον υβριδισμό των εκκινητών, η χρωστική παραμένει ελεύθερη και δεν εκπέμπεται φθορισμός. Στη φάση του πολυμερισμού, τα μόρια της χρωστικής προσδένονται στους νεοσυντιθέμενους κλώνους και εκπέμπουν φθορισμό. Επομένως, η αύξηση της

παραγωγής θυγατρικών μορίων οδηγεί σε αύξηση της έντασης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας.

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της qRT-PCR εφαρμόστηκε η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης, κατά την οποία για το ίδιο δείγμα προσδιορίζεται (κανονικοποιείται) η ποσότητα του γονιδίου-στόχου σε σχέση με την ποσότητα ενός γονιδίου-αναφοράς (housekeeping gene). Για το σχετικό προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων εφαρμόστηκε η μέθοδος σύγκρισης των Ct (comparative Ct method ή $2^{-\Delta\Delta Ct}$). Η τιμή Ct (Cycle threshold) αντιστοιχεί στον κύκλο εκείνο όπου η εκπομπή φθορισμού είναι μεγαλύτερη από το φθορισμό λόγω «θορύβου» (background). Συγκεκριμένα, υπολογίζονται οι παράμετροι:

$$\Delta Ct_{\text{δείγματος}} = Ct_{\text{δείγματος, γονιδίου-στόχου}} - Ct_{\text{δείγματος, γονιδίου-αναφοράς}}$$

$$\Delta Ct_{\text{βαθμονομητή}} = Ct_{\text{βαθμονομητή, γονιδίου-στόχου}} - Ct_{\text{βαθμονομητή, γονιδίου-αναφοράς}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{δείγματος}} - \Delta Ct_{\text{βαθμονομητή}}$$

Στη συνέχεια, υπολογίζεται η τιμή $2^{-\Delta\Delta Ct}$ που αντιστοιχεί στην κανονικοποιημένη ποσότητα του γονιδίου-στόχου, τόσο ως προς το γονίδιο-αναφοράς, όσο και ως προς το βαθμονομητή. Συνήθως ως βαθμονομητής ορίζεται ένα δείγμα στο οποίο εκφράζονται σταθερά το γονίδιο-στόχος και το γονίδιο-αναφοράς. Ως γονίδιο-αναφοράς στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το *Gardh*. Το πρωτόκολλο είχε ως εξής:

1. Προετοιμασία mastermix για το οποίο υπολογίστηκαν 7.5 μl SYBR GreenER™ qPCR SuperMix Universal, 267 nM (0.4 μl από 10 μM stock) πρόσθιου εκκινητή, 267 nM ανάστροφου εκκινητή και 4.7 μl dH₂O ανά δείγμα.
2. Προσθήκη 2 μl cDNA, αραιωμένου με dH₂O ελεύθερου RNAsών και DNAsών (συνήθως 1:10), σε eppendorf των 200 μl.
3. Μεταφορά 13 μl από το mastermix στα eppendorf που περιείχαν το αραιωμένο cDNA (συνολικός όγκος αντίδρασης 15 μl).
4. Τοποθέτηση των δειγμάτων στο θερμικό κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου, όπου πραγματοποιήθηκε η εξής qRT-PCR αντίδραση: 95°C για 2 λεπτά, 50 κύκλοι των 15 δευτερολέπτων στους 95°C και 40 δευτερολέπτων στους 55-60°C, ανάλογα με τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, ακολουθούμενοι από την κατασκευή καμπύλης τήξης (melting curve) από τους 55°C στους 99°C, αυξανόμενου 0.5°C ανά 5 δευτερόλεπτα.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών (βλ. Υλικά, Πίνακας 4) σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας τα εργαλεία PrimerBank (Harvard Medical School, ΗΠΑ) και NCBI Primer-BLAST (National Institutes of Health, ΗΠΑ). Τα δεδομένα συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας τους θερμικούς κυκλοποιητές LightCycler® 96 System (Roche) ή CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) και αναλύθηκαν με τη βοήθεια των λογισμικών LightCycler® 96 ή CFX Manager™ 3.1, αντίστοιχα.

4.6.6. Ανάλυση μεταγραφώματος μέσω αλληλούχισης επόμενης γενιάς

Για την ανάλυση του μεταγραφώματος των *in vitro* διεγερμένων αστροκυττάρων και μικρογλοίας αξιοποιήθηκε η μέθοδος της αλληλούχισης επόμενης γενιάς. Αρχικά, διεξήχθη σύνθεση cDNA βιβλιοθηκών, χρησιμοποιώντας την εμπορικά διαθέσιμη ομάδα αντιδραστηρίων TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina), με ορισμένες τροποποιήσεις που έγιναν από το Δρ. Ethan Ford. Χρησιμοποιήθηκε 1 μg ολικού RNA ανά δείγμα για τη σύνθεση τριών cDNA βιβλιοθηκών ανά πειραματική συνθήκη, όπως φαίνεται στον Πίνακα 9. Το αναλυτικό πρωτόκολλο σύνθεσης cDNA βιβλιοθηκών περιγράφεται στη συνέχεια.

Επίδραση	Διάρκεια επίδρασης	Κυτταρικός πληθυσμός	Αριθμός δειγμάτων
διαλύτης (δείγμα αναφοράς)	2 ώρες	Αστροκύτταρα	3
		Μικρογλοία	3
	24 ώρες	Αστροκύτταρα	3
		Μικρογλοία	3
2 ng/ml TGFβ1	2 ώρες	Αστροκύτταρα	3
		Μικρογλοία	3
	24 ώρες	Αστροκύτταρα	3
		Μικρογλοία	3
50 ng/ml BMP4	2 ώρες	Αστροκύτταρα	3
		Μικρογλοία	3
	24 ώρες	Αστροκύτταρα	3
		Μικρογλοία	3
Σύνολο δειγμάτων			36

Πίνακας 9. Κατάλογος cDNA βιβλιοθηκών που συντέθηκαν στο πλαίσιο της διατριβής. Αναγράφονται το είδος και η διάρκεια της επίδρασης, ο κυτταρικός πληθυσμός που διεγέρθηκε και ο αριθμός των δειγμάτων που προετοιμάστηκαν ανά πειραματική συνθήκη. Διαλύτης (δείγμα αναφοράς): υδατικό διάλυμα 0.1% BSA, 4mM HCl.

❖ **Επιλογή και απομόνωση των μορίων mRNA με μαγνητικά σφαιρίδια που προσδένονται στο poly A άκρο τους.**

1. Αραίωση 1 µg ολικού RNA με dH₂O ελεύθερου RNAσών και DNAσών σε τελικό όγκο 16.67 µl σε erpendorf των 200 µ.
2. Ανάδευση μαγνητικών σφαιριδίων “RNA Purification Beads” μέσω vortex και προσθήκη 16.67 µl στο αραιωμένο δείγμα RNA.
3. Ανάδευση των δειγμάτων με πιπετάρισμα, μέχρι να προκύψει ομοιογενές εναιώρημα.
4. Επώαση στο θερμικό κυκλοποιητή για 5 λεπτά στους 65°C και τερματισμός της αντίδρασης στους 4°C.
5. Αφαίρεση των δειγμάτων από το θερμικό κυκλοποιητή όταν η θερμοκρασία φτάσει στους 4°C και τοποθέτηση στον πάγκο. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
6. Τοποθέτηση των δειγμάτων σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά.
7. Απόρριψη υπερκειμένου.
8. Αφαίρεση των δειγμάτων από τη μαγνητική βάση.
9. Προσθήκη 66.7 µl “Bead Washing Buffer” και επαναιώρηση των σφαιριδίων με πιπετάρισμα, μέχρι να προκύψει ομοιογενές εναιώρημα.
10. Τοποθέτηση των δειγμάτων πίσω στη μαγνητική βάση για 5 λεπτά.
11. Απόρριψη υπερκειμένου.
12. Προσθήκη 16.67 µl “Elution Buffer” και επαναιώρηση των σφαιριδίων με πιπετάρισμα, μέχρι να προκύψει ομοιογενές εναιώρημα.
13. Επώαση στο θερμικό κυκλοποιητή για 2 λεπτά στους 80°C και τερματισμός της αντίδρασης στους 25°C.
14. Αφαίρεση των δειγμάτων από το θερμικό κυκλοποιητή όταν η θερμοκρασία φτάσει στους 25°C και διατήρηση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου.
15. Προσθήκη 16.67 µl “Bead Binding Buffer” και επαναιώρηση των σφαιριδίων με πιπετάρισμα, μέχρι να προκύψει ομοιογενές εναιώρημα.
16. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
17. Τοποθέτηση των δειγμάτων στη μαγνητική βάση για 5 λεπτά.
18. Απόρριψη υπερκειμένου.
19. Αφαίρεση των δειγμάτων από τη μαγνητική βάση.

20. Προσθήκη 66.7 μl “Bead Washing Buffer” και επαναιώρηση των σφαιριδίων με πιπετάρισμα, μέχρι να προκύψει ομοιογενές εναιώρημα.
 21. Τοποθέτηση των δειγμάτων στη μαγνητική βάση για 5 λεπτά.
 22. Απόρριψη υπερκείμενου.
 23. Προσθήκη 6.5 μl “Elute, Prime, Fragment Mix” και επαναιώρηση των σφαιριδίων με πιπετάρισμα, μέχρι να προκύψει ομοιογενές εναιώρημα.
 24. Επώαση στο θερμικό κυκλοποιητή για 15 λεπτά στους 94°C και τερματισμός της αντίδρασης στους 4°C.
 25. Τοποθέτηση των δειγμάτων στη μαγνητική βάση για 5 λεπτά.
 26. Μεταφορά 5.67 μl από το υπερκείμενο σε νέο σωληνάκι erpendorf των 200 μl.
- ❖ **Σύνθεση της πρώτης, συμπληρωματικής προς το mRNA, cDNA αλυσίδας.**
27. Προσθήκη 2.67 μl “First Strand Master Mix/Super Script II mix” σε κάθε δείγμα.
 28. Επώαση στο θερμικό κυκλοποιητή για 10 λεπτά στους 25°C, 50 λεπτά στους 42°C, 15 λεπτά στους 70°C και τερματισμός της αντίδρασης στους 4°C.
- ❖ **Σύνθεση της δεύτερης, συμπληρωματικής προς την πρώτη, cDNA αλυσίδας. Δημιουργία δίκλωνων cDNA μορίων.**
29. Προσθήκη 8.33 μl “Second Strand Master Mix” σε κάθε δείγμα.
 30. Επώαση στο θερμικό κυκλοποιητή για 60 λεπτά στους 16°C.
 31. Αφαίρεση των δειγμάτων από το θερμικό κυκλοποιητή και διατήρηση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου.
 32. Προσθήκη 30 μl σφαιριδίων “AMPure XP” (μετά από καλή ανάμειξή τους) και ανάδευση των δειγμάτων με πιπετάρισμα, μέχρι να προκύψει ομοιογενές εναιώρημα.
 33. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
 34. Τοποθέτηση των δειγμάτων στη μαγνητική βάση για 5 λεπτά.
 35. Αφαίρεση και απόρριψη 45 μl από το υπερκείμενο.
 36. Διατήρηση των δειγμάτων στη μαγνητική βάση και προσθήκη 200 μl 80% αιθανόλης (αραιωμένης με dH₂O ελεύθερου RNAσών και DNAσών).
 37. Επώαση για 30 δευτερόλεπτα. Αφαίρεση και απόρριψη ολόκληρης της ποσότητας του υπερκείμενου.
 38. Επανάληψη των βημάτων 36 και 27 ακόμη μία φορά (δύο εκπλύσεις συνολικά).

39. Προσθήκη 22 μl “Resuspension Buffer” και ανάδευση των δειγμάτων με πιπετάρισμα, μέχρι να προκύψει ομοιογενές εναιώρημα.

40. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

41. Τοποθέτηση των δειγμάτων στη μαγνητική βάση για 5 λεπτά.

42. Μεταφορά 20 μl από το υπερκείμενο σε νέο σωληνάκι erpendorf των 200 μl.

❖ **Επιδιόρθωση των άκρων (end repair) των δίκλωνων cDNA μορίων.**

43. Προσθήκη 13.3 μl “End Repair Mix” σε κάθε δείγμα.

44. Επώαση στο θερμικό κυκλοποιητή για 30 λεπτά στους 30°C.

45. Προσθήκη 53.3 μl σφαιριδίων “AMPure XP” (μετά από καλή ανάμειξή τους) και ανάδευση των δειγμάτων με πιπετάρισμα, μέχρι να προκύψει ομοιογενές εναιώρημα.

46. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.

47. Τοποθέτηση των δειγμάτων στη μαγνητική βάση για 5 λεπτά.

48. Αφαίρεση και απόρριψη 81.6 μl από το υπερκείμενο.

49. Διατήρηση των δειγμάτων στη μαγνητική βάση και προσθήκη 200 μl 80% αιθανόλης (αραιωμένης με dH₂O ελεύθερου RNAσών και DNAσών).

50. Επώαση για 30 δευτερόλεπτα. Αφαίρεση και απόρριψη ολόκληρης της ποσότητας του υπερκειμένου.

51. Επανάληψη των βημάτων 49 και 50 ακόμη μία φορά (δύο εκπλύσεις συνολικά).

52. Προσθήκη 7.83 μl “Resuspension Buffer” και ανάδευση των δειγμάτων με πιπετάρισμα, μέχρι να προκύψει ομοιογενές εναιώρημα.

53. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

54. Τοποθέτηση των δειγμάτων στη μαγνητική βάση για 5 λεπτά.

55. Μεταφορά 5.83 μl από το υπερκείμενο σε νέο σωληνάκι erpendorf των 200 μl.

❖ **Προσθήκη βάσεων αδενίνης στο 3’-άκρο των δίκλωνων cDNA μορίων.**

56. Προσθήκη 4.17 μl “A-Tailing Mix” σε κάθε δείγμα.

57. Επώαση στο θερμικό κυκλοποιητή για 30 λεπτά στους 37°C.

❖ **Πρόσδεση προσαρμογέων (adapters) στην ουρά βάσεων αδενίνης.**

Οι προσαρμογείς είναι συνθετικές αλληλουχίες που αποτελούνται από έξι νουκλεοτίδια και οι οποίες μπορούν να αναγνωριστούν από τη συσκευή αλληλούχισης

των cDNA βιβλιοθηκών. Με άλλα λόγια, οι προσαρμογείς συνιστούν τη νουκλεοτιδική «ταυτότητα» κάθε βιβλιοθήκης, επιτρέποντας έτσι την ανάμειξη έως και 18 διαφορετικών cDNA βιβλιοθηκών και την ταυτόχρονη ανάλυσή τους ως ένα δείγμα.

58. Προσθήκη 0.83 μl “DNA Ligase Mix”, 0.83 μl “Resuspension Buffer” και 0.83 μl διαφορετικού “RNA Adapter Index” σε κάθε δείγμα.

59. Επώαση στο θερμικό κυκλοποιητή για 10 λεπτά στους 30°C.

60. Προσθήκη 1.67 μl “Stop Ligase Mix” σε κάθε δείγμα.

61. Προσθήκη 14 μl σφαιριδίων “AMPure XP” (μετά από καλή ανάμειξή τους) και ανάδευση των δειγμάτων με πιπετάρισμα, μέχρι να προκύψει ομοιογενές εναιώρημα.

62. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.

63. Τοποθέτηση των δειγμάτων στη μαγνητική βάση για τουλάχιστον 5 λεπτά.

64. Αφαίρεση και απόρριψη 23.16 μl από το υπερκείμενο.

65. Διατήρηση των δειγμάτων στη μαγνητική βάση και προσθήκη 200 μl 80% αιθανόλης (αραιωμένης με dH₂O ελεύθερου RNAσών και DNAσών).

66. Επώαση για 30 δευτερόλεπτα. Αφαίρεση και απόρριψη ολόκληρης της ποσότητας του υπερκειμένου.

67. Επανάληψη των βημάτων 65 και 66 ακόμη μία φορά (δύο εκπλύσεις συνολικά).

68. Προσθήκη 18.67 μl “Resuspension Buffer” και ανάδευση των δειγμάτων με πιπετάρισμα, μέχρι να προκύψει ομοιογενές εναιώρημα.

69. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

70. Τοποθέτηση των δειγμάτων στη μαγνητική βάση για 5 λεπτά.

71. Μεταφορά 16.67 μl από το υπερκείμενο σε νέο σωληνάκι erpendorf των 200 μl.

72. Προσθήκη 16.67 μl σφαιριδίων “AMPure XP” (μετά από καλή ανάμειξή τους) και ανάδευση των δειγμάτων με πιπετάρισμα, μέχρι να προκύψει ομοιογενές εναιώρημα.

73. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.

74. Τοποθέτηση των δειγμάτων στη μαγνητική βάση για τουλάχιστον 5 λεπτά.

75. Αφαίρεση και απόρριψη 28.34 μl από το υπερκείμενο.

76. Διατήρηση των δειγμάτων στη μαγνητική βάση και προσθήκη 200 μl 80% αιθανόλης (αραιωμένης με dH₂O ελεύθερου RNAσών και DNAσών).

77. Επώαση για 30 δευτερόλεπτα. Αφαίρεση και απόρριψη ολόκληρης της ποσότητας του υπερκειμένου.
78. Επανάληψη των βημάτων 76 και 77 ακόμη μία φορά (δύο εκπλύσεις συνολικά).
79. Προσθήκη 9.67 μl “Resuspension Buffer” και ανάδευση των δειγμάτων 10 φορές με πιπετάρισμα.
80. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
81. Τοποθέτηση των δειγμάτων στη μαγνητική βάση για 5 λεπτά.
82. Μεταφορά 7.67 μl από το υπερκείμενο σε νέο σωληνάκι erpendorf των 200 μl.
83. Χρήση 1 μl από κάθε δείγμα για τον προσδιορισμό του αριθμού των κύκλων ενίσχυσης που απαιτούνται στην αντίδραση PCR του βήματος 84. Για κάθε αντίδραση τελικού όγκου 20 μl χρησιμοποιήθηκαν: 8 μl dH₂O, 1 μl από κάθε cDNA βιβλιοθήκη που επρόκειτο να ενισχυθεί, 1 μl TruSeq PCR primer cocktail (25 μM), 10 μl KAPA SYBER FAST 2x PCR mastermix. Οι συνθήκες της qRT-PCR αντίδρασης ήταν: α) 95°C για 3 λεπτά, β) 20 κύκλοι των 30 δευτερολέπτων στους 95°C, 30 δευτερολέπτων στους 63°C και 30 δευτερολέπτων στους 72°C και ανάγνωση της πλάκας. Προσδιορισμός του αριθμού των κύκλων που χρειάστηκαν για να επιτευχθεί το 50% της ενίσχυσης και χρήση του αριθμού αυτού στο επόμενο βήμα.

❖ **Ενίσχυση των cDNA βιβλιοθηκών με PCR αντίδραση.**

84. Ανάμειξη 6.67 μl δείγματος του βήματος 82 (adapter ligated DNA), 1.67 μl TruSeq PCR primer cocktail (25 μM) και 8.33 μl PCR mastermix.
85. Ενίσχυση των cDNA βιβλιοθηκών ακολουθώντας τις εξής συνθήκες PCR αντίδρασης: α) 98°C για 30 δευτερόλεπτα, β) 5-18 κύκλοι των 10 δευτερολέπτων στους 98°C, 30 δευτερολέπτων στους 60°C και 30 δευτερολέπτων στους 72°C, γ) 72°C για 5 λεπτά και δ) διατήρηση στους 4°C.
86. Προσθήκη 16.67 μl σφαιριδίων “AMPure XP” (μετά από καλή ανάμειξή τους) και ανάδευση των δειγμάτων με πιπετάρισμα, μέχρι να προκύψει ομοιογενές εναιώρημα.
87. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
88. Τοποθέτηση των δειγμάτων στη μαγνητική βάση για τουλάχιστον 5 λεπτά.
89. Αφαίρεση και απόρριψη 28.3 μl από το υπερκείμενο.

90. Διατήρηση των δειγμάτων στη μαγνητική βάση και προσθήκη 200 μl 80% αιθανόλης (αραιωμένης με dH₂O ελεύθερου RNAσών και DNAσών).
91. Επώαση για 30 δευτερόλεπτα. Αφαίρεση και απόρριψη ολόκληρης της ποσότητας του υπερκειμένου.
92. Επανάληψη των βημάτων 90 και 91 ακόμη μία φορά (δύο εκπλύσεις συνολικά).
93. Ξήρανση των σφαιριδίων σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
94. Προσθήκη 12 μl “Resuspension Buffer” και ανάδευση των δειγμάτων 10 φορές με πιπετάρισμα.
95. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
96. Τοποθέτηση των δειγμάτων στη μαγνητική βάση για 5 λεπτά.
97. Μεταφορά 10 μl από το υπερκείμενο σε νέο σωληνάκι erpendorf των 200 μl. Αυτό αποτελεί και το δείγμα της παραχθείσας cDNA βιβλιοθήκης.

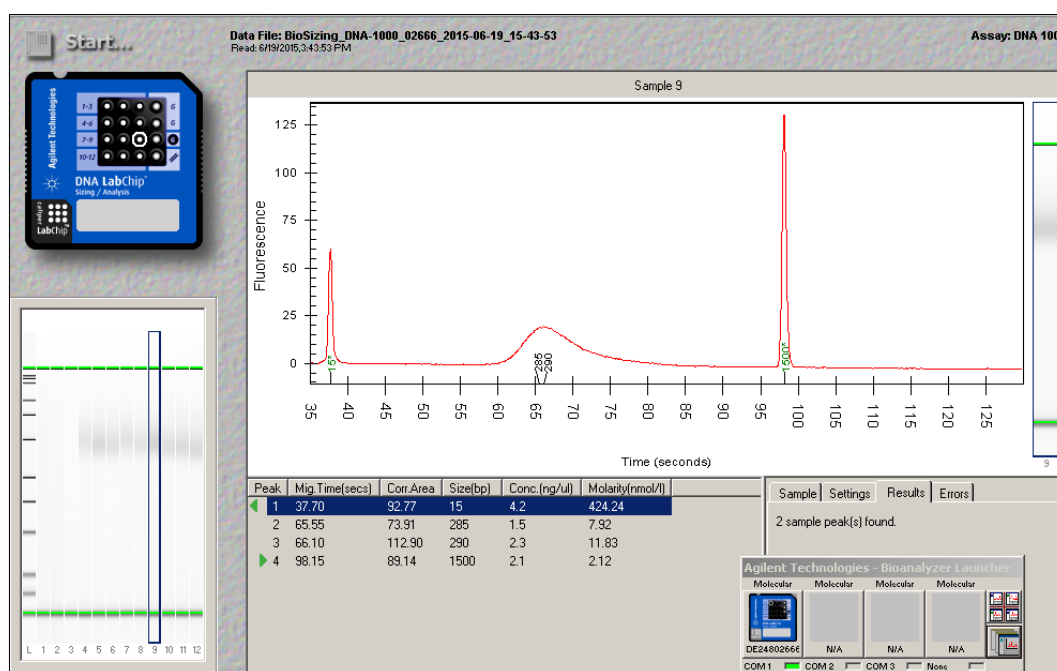
Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε 1 μl από κάθε cDNA βιβλιοθήκη για ανάλυση του μεγέθους και του εύρους των παραγόμενων τμημάτων, με χρήση της συσκευής Agilent bioanalyzer 2100 και της εμπορικά διαθέσιμης ομάδας αντιδραστηρίων Agilent DNA 1000 Kit. Μια καλής ποιότητας βιβλιοθήκη αποτελείται από cDNA τμήματα μεγέθους 200-700 ζευγών βάσεων, επιτρέποντας έτσι την πλήρη αλληλούχισή τους. Οι cDNA βιβλιοθήκες που παρασκευάστηκαν στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης αποτελούνταν από τμήματα μεγέθους 250-300 ζευγών βάσεων (**Εικόνα 14**).

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε 1 μl δείγματος από κάθε cDNA βιβλιοθήκη για να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή της μέσω qRT-PCR ανάλυσης, χρησιμοποιώντας διαδοχικές αραιώσεις (0.2, 2, 20 και 200 pM) μιας εμπορικά διαθέσιμης βιβλιοθήκης «μάρτυρα», γνωστής συγκέντρωσης (KAPA Library Quantification kit, Roche). Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των βιβλιοθηκών χρησιμοποιήθηκε ο εξής τύπος:

$$C_{\text{βιβλιοθήκης}} = C_{\text{βιβλιοθήκης από qRT-PCR}} \times (\text{μέσο μέγεθος βιβλιοθήκης-μάρτυρα} / \text{μέσο μέγεθος βιβλιοθήκης-δείγματος}) \times \text{αραίωση}$$

Η ιχνηθέτηση των cDNA βιβλιοθηκών με διαφορετικούς προσαρμογείς επέτρεψε την ανάμειξη (multiplexing) 18 δειγμάτων τη φορά, έτσι ώστε να αναλυθούν ταυτόχρονα σε μία υποδοχή της συσκευής αλληλούχησης. Η συγκεκριμένη ανάμειξη οδήγησε σε μείωση τόσο του κόστους όσο και τυχόν διαφορών στην ποιότητα αλληλούχησης, που ενδέχεται να προέκυπταν εάν τα δείγματα αναλύονταν σε

διαφορετικές υποδοχές της συσκευής. Η ανάμειξη των cDNA βιβλιοθηκών έγινε με την προσθήκη ισομοριακής ποσότητας από κάθε δείγμα.



Εικόνα 14. Οι παραγόμενες cDNA βιβλιοθήκες αποτελούνται από τμήματα μεγέθους 250-300 ζευγών βάσεων. Αντιπροσωπευτικό ηλεκτροφόρημα και διάγραμμα ανάλυσης του μεγέθους και του εύρους των παραγόμενων cDNA τμημάτων των βιβλιοθηκών, με τη χρήση της συσκευής Agilent bioanalyzer 2100 και της εμπορικά διαθέσιμης ομάδας αντιδραστηρίων Agilent DNA 1000 Kit.

Ακολούθησε αλληλούχηση των cDNA βιβλιοθηκών με τη χρήση της συσκευής Illumina HiSeq στο Ελληνικό Κέντρο Γονιδιωματικής (Greek Genome Center) του ΙΙΒΕΑΑ. Μετά την αλληλούχηση, πραγματοποιήθηκε αντιστοίχιση των αποτελεσμάτων σε μια γενωμική βάση αναφοράς για το μυ (*Mus musculus*), ενώ με χρήση του πακέτου ανάλυσης CuffDiff πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των επιπέδων διαφορικής έκφρασης μεταξύ των δειγμάτων και η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Από τα αποτελέσματα της διαφορικής έκφρασης, για περαιτέρω ανάλυση επιλέχθηκαν τα μετάγραφα που εκπλήρωναν μια σειρά κριτηρίων. Το πρώτο κριτήριο ήταν ο αριθμός των επαναλήψεων κάθε μεταγράφου ανά βιβλιοθήκη (baseMean). Για να αποκλειστεί η ανάλυση αποτελεσμάτων που προέκυψαν τυχαία λόγω «θορύβου» της αλληλούχησης, επιλέχθηκαν μετάγραφα με baseMean > 30. Δεύτερο κριτήριο ήταν η στατιστική σημαντικότητα, κι έτσι επιλέχθηκαν τα αποτελέσματα της διαφορικής έκφρασης που παρουσίαζαν πιθανότητα λάθους (q-value ή FDR) <0.05. Η βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης των cDNA

βιβλιοθηκών διεξήχθη χρησιμοποιώντας τα λογισμικά Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®, Qiagen), MultiExperiment Viewer (MeV, TM4 Microarray Software Suite) (Saeed et al., 2003), Venny 2.1 (που αναπτύχθηκε από τον Oliveros, J.C., 2007) και Venn Diagram Plotter (Pacific Northwest National Laboratory, U.S. Department of Energy).

4.7. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Τα επίπεδα της ντοπαμίνης και των μεταβολιτών της 3,4-διυδροξυφαιτυλοξικό οξύ (DOPAC), ομοβανιλλικό οξύ (HVA) και 3-μεθοξυτυραμίνη (3-MT) μετρήθηκαν σε εκχυλίσματα ραβδωτού σώματος με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (high performance liquid chromatography, HPLC). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε μία διάταξη χρωματογραφίας με σύζευξη ιόντων (ion-pair chromatography) ανάστροφης φάσης. Το σύστημα αποτελούταν από μία ισοκρατική αντλία (YL9112), συζευγμένη με έναν ηλεκτροχημικό ανιχνευτή (BASi LC-EC) και μία χρωματογραφική στήλη, ως στατική μη πολική φάση (YMC Triart C18, 100 x 2mm και 3 μm μέγεθος σωματιδίων). Η στήλη εξισορροπήθηκε για τουλάχιστον 16 ώρες με διάλυμα κινητής φάσης που αποτελούνταν από 10% (v/v) αιθανονιτρίλιο (ως οργανικός διαλύτης) και ένα διάλυμα φωσφορικών 50 mM (σε αραιώση 1:9, pH 3.0), που περιελάμβανε 8.9 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g/l EDTA και 0.3 g/l οκτυλ θειικό νάτριο (ως αντιδραστήριο σύζευξης ιόντων). Η ροή της αντλίας ρυθμίστηκε στα 0.2 ml/λεπτό και το όριο ευαισθησίας στα 10 nA.

Η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων περιελάμβανε την απομόνωση των εγκεφάλων και τη μικροχειρουργική αφαίρεση του ραβδωτού σώματος, το οποίο στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε προ-ζυγισμένα errendorf, ζυγίστηκε και ψύχθηκε ακαριαία σε υγρό άζωτο. Ακολούθως, οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε φιλτραρισμένο (από ηθμό των 0.2 μm) ρυθμιστικό διάλυμα TAE 20 mM pH 6.1 (όγκος σε μl = 5 x mg νωπού ιστού) και ομογενοποιήθηκαν με χρήση υπερήχων (3 φορές για 8 δευτερόλεπτα στους 4°C). Μετά την ομογενοποίηση, έγινε προσθήκη υπερχλωρικού οξέος (τελικής συγκέντρωσης 0.1 M) σε όλα τα δείγματα και πραγματοποιήθηκε επώαση 30 λεπτών στους 4°C, ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση (13000 στροφές, 20 λεπτά, 4°C) και αποθήκευση των υπερκειμένων στους -80°C μέχρι την ανάλυση.

Πριν την έγχυσή τους στον ηλεκτροχημικό ανιχνευτή, τα δείγματα αραιώθηκαν

(1:10) σε φιλτραρισμένο ρυθμιστικό διάλυμα TAE 20 mM pH 6.1 και διατηρήθηκαν στους 4°C (στο σκοτάδι). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ντοπαμίνης και των μεταβολιτών της έγινε με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού (Clarity, Ηνωμένο Βασίλειο) και μέσω μίας πρότυπης καμπύλης, που κατασκευαζόταν εκ νέου σε κάθε ανάλυση με βάση τα χρωματογραφήματα γνωστών συγκεντρώσεων πρότυπων δειγμάτων.

4.8. Στατιστική ανάλυση

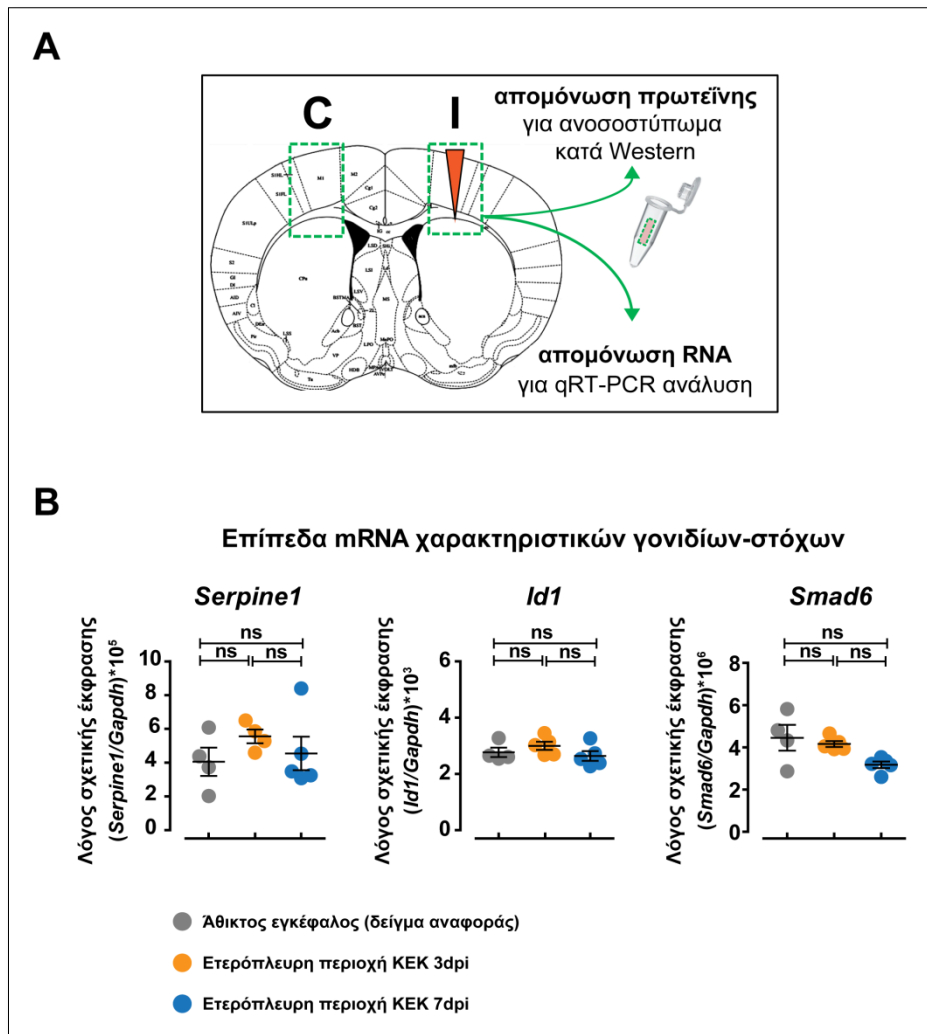
Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως Μέση Τιμή \pm Τυπικό Σφάλμα της Μέσης Τιμής (Standard Error of the Mean, SEM). Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση της Ανάλυση Διακύμανσης Μονής Κατεύθυνσης (One-way ANOVA), που συνδυάστηκε με post hoc δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni (Bonferroni's Multiple Comparison Test). Ένας αστερίσκος (*) αντιστοιχεί σε στατιστική σημαντικότητα $p < 0.05$, δύο αστερίσκοι (**) σε $p < 0.01$, τρεις αστερίσκοι (***) σε $p < 0.001$, ενώ θεωρήθηκαν στατιστικά μη σημαντικές (ns) οι διαφορές όπου $p > 0.05$. Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπου και σημειώνεται στις αντίστοιχες λεζάντες, χρησιμοποιήθηκαν η δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων Newman-Keuls (Newman-Keuls Multiple Comparison Test, με τη δίεση να αντιστοιχεί σε στατιστική σημαντικότητα $^{\#} p < 0.05$) και η μη κατά ζεύγη δοκιμασία t δύο άκρων (two-tailed unpaired t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ^{ns} $p > 0.05$). Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με χρήση του λογισμικού GraphPad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1. Ενεργοποίηση της TGFβ- και της BMP-επαγόμενης σηματοδότησης στην περιοχή του τραύματος έπειτα από εστιακή κρανιοεγκεφαλική κάκωση

Με σκοπό να διερευνηθεί ο ρόλος του συστήματος σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ και να αξιολογηθεί παράλληλα η ενεργοποίηση των TGFβ και BMP κλάδων μετά από εγκεφαλική βλάβη εφαρμόστηκε ένα απλό μοντέλο εστιακού μηχανικού διεισδυτικού τραυματισμού του εγκεφάλου. Ενήλικοι μύες υποβλήθηκαν σε οξεία κρανιοεγκεφαλική κάκωση του δεξιού εγκεφαλικού φλοιού, όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες, με μικρές τροποποιήσεις (Buffo et al., 2005; Frik et al., 2018; Mattugini et al., 2019). Πρόκειται για ένα ήπιο μοντέλο τραυματικής κάκωσης, όπου η βλάβη περιορίζεται μόνο στο τραυματισμένο (ομόπλευρο) ημισφαίριο, επιτρέποντας έτσι τη χρήση του αντίστοιχου «υγιούς» ετερόπλευρου ημισφαιρίου ως περιοχή αναφοράς για κάθε ζώο (Domowicz et al., 2018).

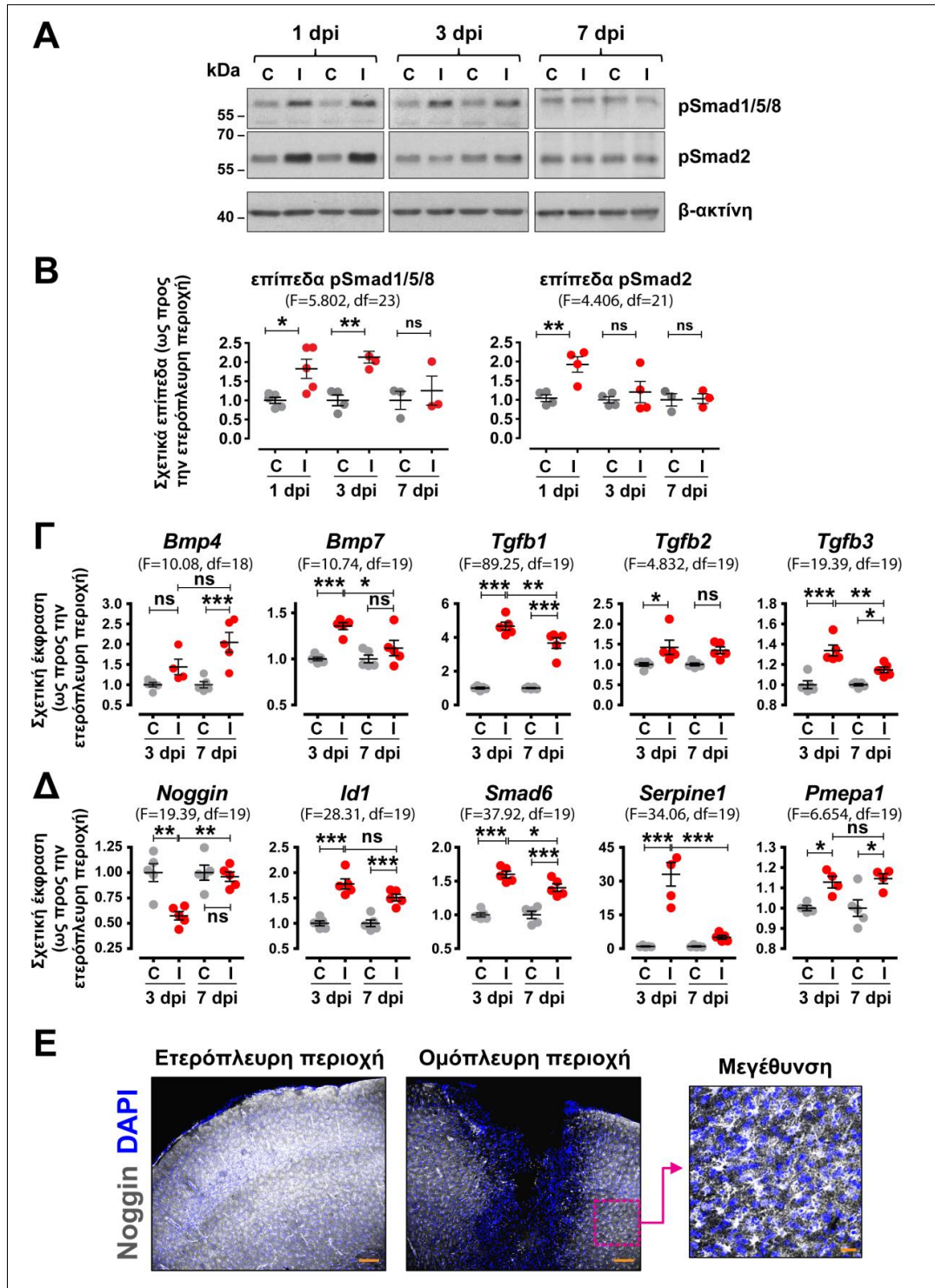
Μετά την απομόνωση των εγκεφάλων, συλλέχθηκαν δείγματα ιστού που εμπεριείχαν τις ομόπλευρες και τις αντίστοιχες ετερόπλευρες περιοχές για μοριακή ανάλυση, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 15A**. Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί με αξιοπιστία το μη τραυματισμένο ημισφαίριο (ετερόπλευρο) ως περιοχή αναφοράς, διεξήχθη συγκριτική ανάλυση μέσω qRT-PCR των σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA επιλεγμένων γονιδίων-στόχων (*Serpine1*, *Id1* και *Smad6*) σε παρόμοιες εγκεφαλικές περιοχές προερχόμενες είτε από άθικτο εγκέφαλο (υγιών ενήλικων μυών) είτε από το ετερόπλευρο ημισφαίριο ζώων που υποβλήθηκαν σε κρανιοεγκεφαλική κάκωση, τρεις και επτά ημέρες μετά τον τραυματισμό, και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη γονιδιακή έκφραση μεταξύ αυτών των τριών ομάδων (**Εικόνα 15B**).



Εικόνα 15. Απομόνωση εγκεφαλικού ιστού ενήλικων μυών για μοριακή ανάλυση έπειτα από πειραματική εστιακή κρανιοεγκεφαλική κάκωση. **(A)** Σχηματική απεικόνιση της χρησιμοποιούμενης στρατηγικής για απομόνωση των ομόπλευρων τραυματισμένων περιοχών (I) και των αντίστοιχων ετερόπλευρων «υγιών» περιοχών (C) με σκοπό την εκχύλιση πρωτεϊνών ή RNA για ανάλυση μέσω ανοσοσύστατος κατά Western ή qRT-PCR, αντίστοιχα. **(B)** Συγκριτική ανάλυση των σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA των *Serpine1*, *Id1* και *Smad6*, μέσω qRT-PCR, σε παρόμοιες εγκεφαλικές περιοχές προερχόμενες είτε από άθικτο εγκέφαλο (υγιών ενήλικων μυών) είτε από το ετερόπλευρο (άθικτο) ημισφαίριο ζώων που υποβλήθηκαν σε κρανιοεγκεφαλική κάκωση (ΚΕΚ), 3 και 7 ημέρες μετά τον τραυματισμό (dpi: days post-injury, ημέρες μετά τον τραυματισμό). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη γονιδιακή έκφραση μεταξύ των τριών ομάδων (n = 4-5 ζώα/ομάδα). Τα δεδομένα εκφράζονται ως Μέση Τιμή ± Τυπικό Σφάλμα της Μέσης Τιμής (SEM) και συγκρίνονται με Ανάλυση Διακύμανσης Μονής Κατεύθυνσης (One-way ANOVA), συνδυαζόμενη με post hoc δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni (ns: στατιστικά μη σημαντικό).

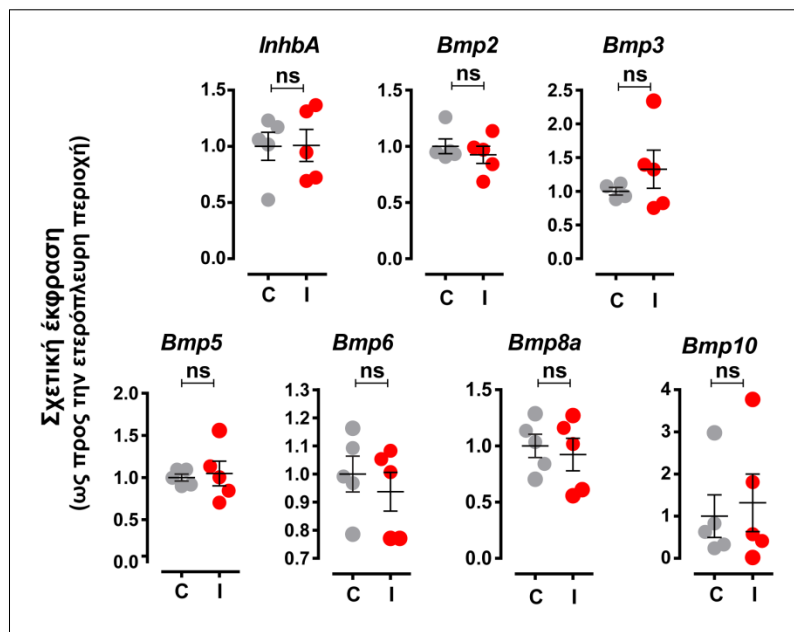
Στη συνέχεια, αναλύθηκαν χαρακτηριστικοί δείκτες ενεργοποίησης της υπεροικογένειας του TGFβ και παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης των Smad1/5/8 σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα της ομόπλευρης περιοχής, μία και τρεις ημέρες μετά τον τραυματισμό (**Εικόνα 16A, B**). Παρομοίως, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Smad2 την πρώτη ημέρα μετά τον τραυματισμό. Επιπλέον, ανιχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα mRNA έκφρασης προσδετών (*Bmp4*, *Bmp7*,

Tgfb1, *Tgfb2* και *Tgfb3*) και γνωστών γονιδίων-στόχων της υπερκοχλειακής του TGFβ (*Id1*, *Smad6*, *Serpine1* και *Ptpr1*) στην ομόπλευρη περιοχή, τρεις ή/και επτά ημέρες μετά τον τραυματισμό (Εικόνες 16Γ, Δ και 17).



Εικόνα 16. Ανίχνευση αυξημένης φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών Smad και έκφρασης προσδετών και χαρακτηριστικών γονιδίων-στόχων της υπερκοχλειακής του TGFβ στην περιοχή του τραύματος έπειτα από εστιακή κρανιοεγκεφαλική κάκωση. (A) Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα κατά Western έναντι των φωσφορυλιωμένων (p) Smad1/5/8, pSmad2 και β-ακτίνης (έλεγχος ισόποσης φόρτωσης) σε

πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονωμένων ετερόπλευρων (C) και ομόπλευρων (I) περιοχών, 1, 3 και 7 ημέρες μετά τον τραυματισμό. **(B)** Ημυποσοτική εκτίμηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών Smad που παρατίθενται στην εικόνα **A**. Απεικονίζεται ο λόγος των επιπέδων της ομόπλευρης προς εκείνα της ετερόπλευρης περιοχής για κάθε χρονικό σημείο (n = 3-5 ζώα/ομάδα). **(Γ, Δ)** Ανάλυση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων *Bmp4*, *Bmp7*, *Tgfb1*, *Tgfb2*, *Tgfb3*, *Noggin*, *Id1*, *Smad6*, *Serpine1* και *Ptpru1*, μέσω qRT-PCR, 3 και 7 ημέρες μετά τον τραυματισμό (n = 5 ζώα/ομάδα). **(E)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοφθορισμού της πρωτεΐνης Noggin (λευκό χρώμα) σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλου στο επίπεδο του τραύματος, 3 ημέρες μετά τον τραυματισμό (γραμμική κλίμακας: 150 μm). Στο δεξί πάνελ, που αποτελεί μεγέθυνση της περιοχής που ορίζεται με ροζ πλαίσιο, διακρίνεται η μορφολογία γλοίας των κυττάρων που εκφράζουν τη Noggin (γραμμική κλίμακας: 30 μm). Το DAPI (μπλε χρώμα) χρησιμοποιήθηκε για χρώση των πυρήνων. Τα δεδομένα εκφράζονται ως Μέση Τιμή ± SEM και συγκρίνονται με one-way ANOVA, συνδυαζόμενη με post hoc δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, ns: στατιστικά μη σημαντικό, dpi: ημέρες μετά τον τραυματισμό). Για κάθε ανάλυση παρατίθενται η τιμή F (F value) και οι βαθμοί ελευθερίας (degrees of freedom, df).

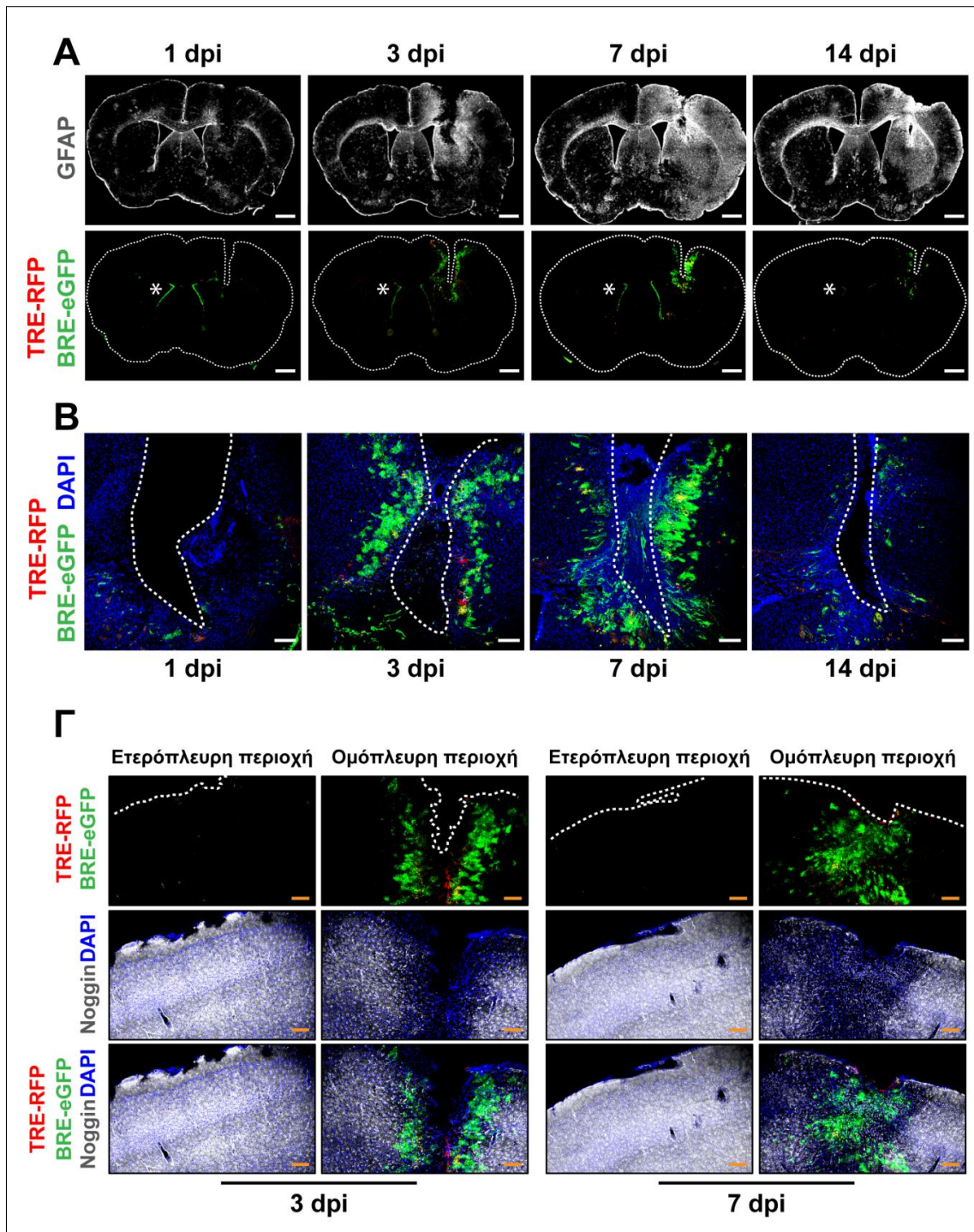


Εικόνα 17. Τα επίπεδα mRNA έκφρασης ορισμένων προσδετών της υπερικογένειας του TGFβ δε μεταβάλλονται σημαντικά στην περιοχή του τραύματος έπειτα από εστιακή κρανιοεγκεφαλική κάκωση. Ανάλυση των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *InhbA*, *Bmp2*, *Bmp3*, *Bmp5*, *Bmp6*, *Bmp8a* και *Bmp10*, μέσω qRT-PCR ανάλυσης δειγμάτων απομονωμένων ετερόπλευρων (C) και ομόπλευρων (I) περιοχών, 3 ημέρες μετά τον τραυματισμό (n = 5 ζώα/ομάδα). Τα δεδομένα εκφράζονται ως Μέση Τιμή ± Τυπικό Σφάλμα της Μέσης Τιμής και συγκρίνονται με Ανάλυση Διακύμανσης Μονής Κατεύθυνσης, συνδυαζόμενη με post hoc δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni (ns: στατιστικά μη σημαντικό, dpi: ημέρες μετά τον τραυματισμό).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το εύρημα ότι η περιοχή του τραύματος χαρακτηριζόταν από μειωμένα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης Noggin, φυσικού αναστολέα της BMP σηματοδότησης (**Εικόνες 16Δ, Ε και 18Γ**), γεγονός που υποδηλώνει ότι η επαγωγή της BMP σηματοδότησης μετά από τραυματισμό του εγκεφάλου μπορεί να ρυθμίζεται τοπικά με μεταβολή της ισορροπίας μεταξύ προσδετών και αντίστοιχων αναστολέων.

Προκειμένου να επαληθευθεί περαιτέρω η ενεργοποίηση του συστήματος σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ και να ταυτοποιηθούν οι πιθανοί κυτταρικοί στόχοι *in situ*, διπλά διαγονιδιακοί μύες αναφοράς της κανονικής BMP και TGFβ σηματοδότησης που εξέφραζαν τις πρωτεΐνες eGFP (BRE-eGFP) και RFP (TRE-RFP), αντίστοιχα, υποβλήθηκαν σε πειραματική εστιακή κρανιοεγκεφαλική κάκωση. Ο τραυματισμός οδήγησε σε αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών eGFP και RFP σε κύτταρα με μορφολογία γλοίας γύρω από το τραύμα, με τη μέγιστη έκφραση να παρατηρείται μεταξύ τρίτης και έβδομης ημέρας μετά τον τραυματισμό (**Εικόνα 18Α, Β**). Μάλιστα, εντοπίστηκαν ορισμένα κύτταρα που εξέφραζαν ταυτόχρονα και τις δύο πρωτεΐνες αναφοράς. Να σημειωθεί ότι ο αριθμός των BRE-eGFP⁺ υπερτερούσε εκείνου των TRE-RFP⁺ κυττάρων σε κάθε χρονικό σημείο που αναλύθηκε, γεγονός που πιθανότατα αντανακλά τη διαφορετική φύση και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά κάθε διαγονιδιακής σειράς.

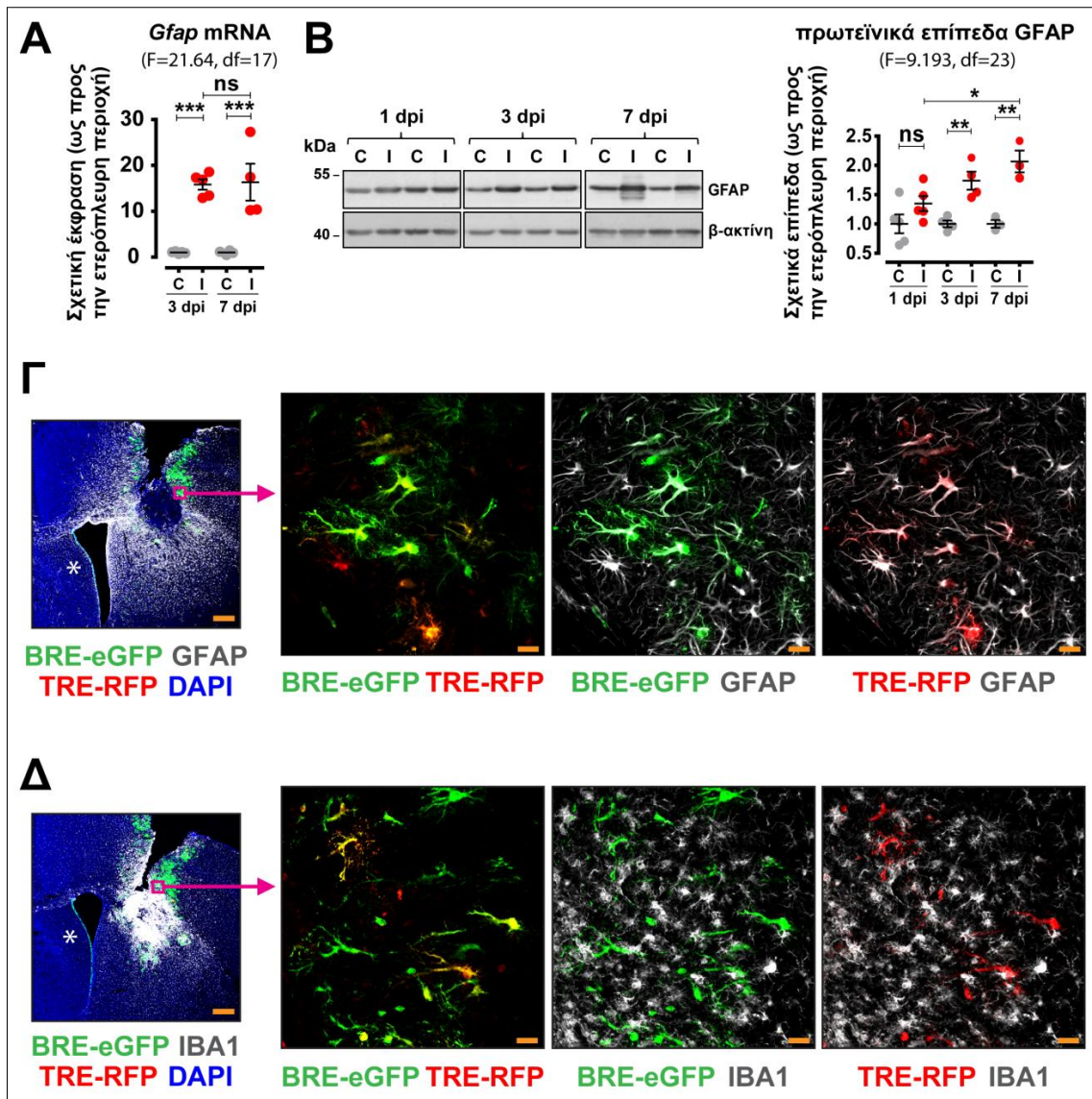
Μάλιστα, η περιοχή που καταλάμβαναν τα θετικά για τα διαγονίδια BRE-eGFP ή/και TRE-RFP κύτταρα συνέπιπτε με την περιοχή που χαρακτηριζόταν από μειωμένη ανοσοϊστοχημική έκφραση της Noggin, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 18Γ**. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση της αστροκυτταρικής πρωτεΐνης GFAP γύρω από το τραύμα ήδη από την πρώτη ημέρα, η οποία κορυφώθηκε επτά ημέρες μετά τον τραυματισμό, οπότε και σημειώθηκε έντονη αστρογλοίωση σε ολόκληρο τον ομόπλευρο εγκεφαλικό φλοιό (**Εικόνα 18Α**), όπως έχει ήδη περιγραφεί (Mathewson and Berry, 1985). Η αυξημένη αστρογλοίωση επιβεβαιώθηκε με qRT-PCR και ανοσοσύπωμα κατά Western έναντι της GFAP σε δείγματα τραυματισμένου εγκεφαλικού ιστού (**Εικόνα 19Α, Β**).



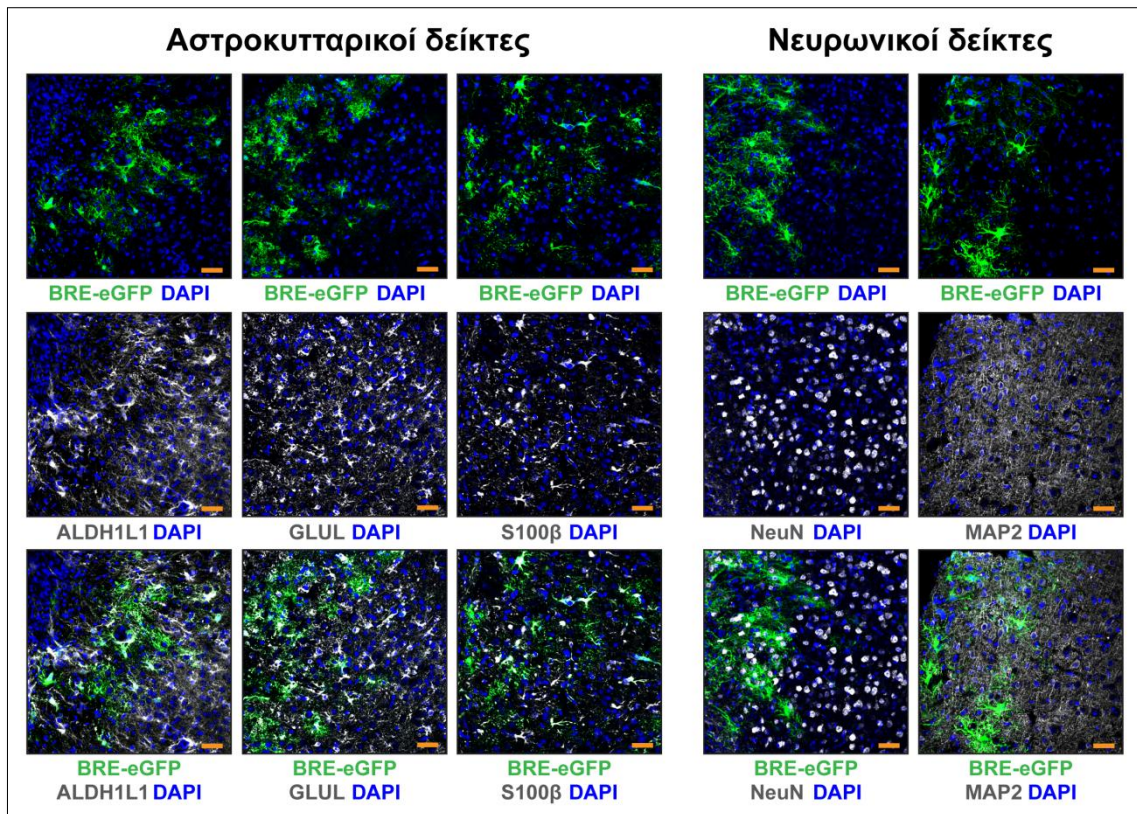
Εικόνα 18. Επιλεκτική ενεργοποίηση των διαγονιδίων BRE-eGFP και TRE-RFP και μειωμένη έκφραση της **Noggin** στην τραυματισμένη περιοχή έπειτα από οξεία εστιακή κρανιοεγκεφαλική κάκωση. **(Α)** Πανοραμικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας της αστροκυτταρικής πρωτεΐνης GFAP (λευκό χρώμα, επάνω σειρά) και των διαγονιδίων BRE-eGFP (πράσινο χρώμα) και TRE-RFP (κόκκινο χρώμα, κάτω σειρά) σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλου, στο επίπεδο του τραύματος 1, 3, 7 και 14 ημέρες μετά τον τραυματισμό (γραμμή κλίμακας: 1 mm). **(Β)** Εικόνες ανοσοφθορισμού υψηλής μεγέθυνσης της τραυματισμένης περιοχής του εγκεφάλου, όπου φαίνεται η χρονοεξαρτώμενη έκφραση των διαγονιδίων BRE-eGFP και TRE-RFP (πράσινο και κόκκινο χρώμα, αντίστοιχα) γύρω από το τραύμα (γραμμή κλίμακας: 150 μ m). **(Γ)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοφθορισμού στο επίπεδο του τραύματος, ενδεικτικές της έκφρασης της **Noggin** (λευκό χρώμα) και των διαγονιδίων BRE-eGFP (πράσινο χρώμα) και TRE-RFP (κόκκινο χρώμα) στην ετερόπλευρη και την ομόπλευρη περιοχή, 3 και 7 ημέρες μετά τον τραυματισμό. Οι διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν τα όρια των ιστών (γραμμή κλίμακας: 150 μ m). Το DAPI (μπλε χρώμα)

χρησιμοποιήθηκε για χρώση των πυρήνων. Οι αστερίσκοι επισημαίνουν τη διαρκή έκφραση του διαγονιδίου BRE-eGFP στα επενδυματικά κύτταρα που βρίσκονται στα έσω τοιχώματα των πλευρικών κοιλιών. dpi: ημέρες μετά τον τραυματισμό.

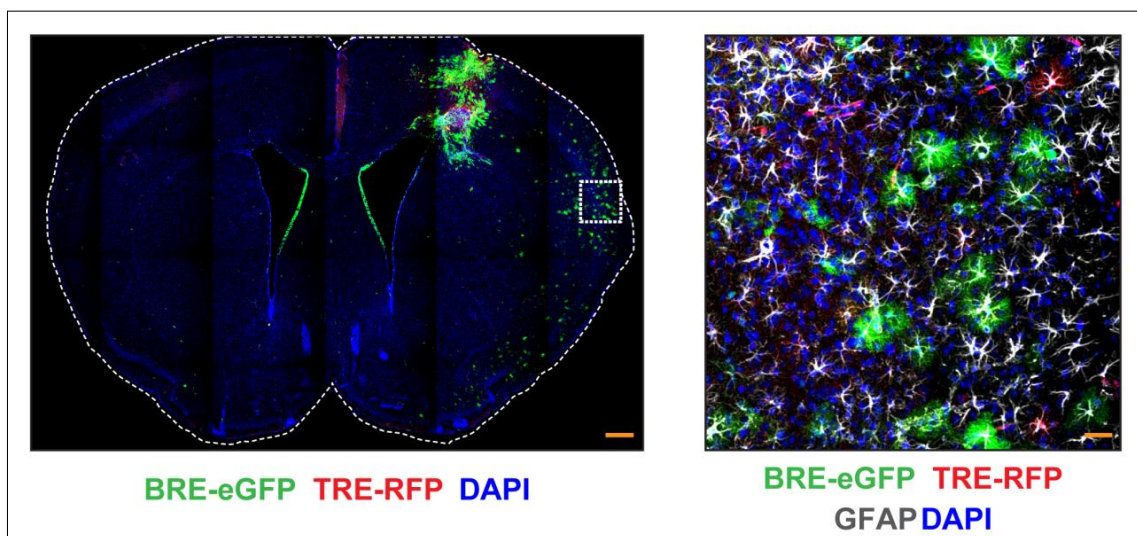
Για το χαρακτηρισμό των κυττάρων που εξέφραζαν τα δύο διαγονίδια, τομές εγκεφάλου προερχόμενες από διπλά διαγονιδιακούς μύες αναφοράς που υποβλήθηκαν σε κρανιοεγκεφαλική κάκωση αναλύθηκαν με ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι ειδικών δεικτών κυτταρικής γενεαλογίας (**Εικόνες 19Γ, Δ και 20**). Μεταξύ άλλων χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι χαρακτηριστικών αστροκυτταρικών (GFAP, ALDH1L1, GLUL, S100β), μικρογλοιακών (AIF1/IBA1) και νευρωνικών (NeuN και MAP2) πρωτεϊνών. Η συντριπτική πλειοψηφία των BRE-eGFP⁺ και TRE-RFP⁺ κυττάρων γύρω από την περιοχή του τραύματος συνέκφραζαν τις πρωτεΐνες GFAP, ALDH1L1, GLUL και S100β και επομένως χαρακτηρίστηκαν ως αστροκύτταρα (**Εικόνες 19Γ και 20**). Διάσπαρτα BRE-eGFP⁺/GFAP⁺ και TRE-RFP⁺/GFAP⁺ κύτταρα ανιχνεύθηκαν επίσης κατά μήκος του ομόπλευρου εγκεφαλικού φλοιού, επτά ημέρες μετά τον τραυματισμό (**Εικόνα 21**). Εκτός από την ενεργοποίηση των αστροκυττάρων στην περιοχή του τραύματος, σημειώθηκε μαζική προσέλευση μικρογλοιακών κυττάρων. Η ενεργοποιημένη AIF1/IBA1⁺ μικρογλοία βρέθηκε να καταλαμβάνει τον πυρήνα του τραύματος, ενώ γύρω από αυτήν συναθροίζονταν τα δραστικά αστροκύτταρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα δεν εξέφραζαν κανένα από τα διαγονίδια BRE-eGFP ή TRE-RFP, ακόμη και όταν εντοπίζονταν μεταξύ πολυάριθμων θετικών για τα διαγονίδια αστροκυττάρων (**Εικόνα 19Δ**).



Εικόνα 19. Τα διαγονίδια BRE-eGFP και TRE-RFP ενεργοποιούνται μετά από οξεία εστιακή κρανιοεγκεφαλική κάκωση σε αστροκύτταρα που οριοθετούν την τραυματισμένη περιοχή. **(Α)** Ανάλυση των σχετικών επιπέδων mRNA έκφρασης του *Gfap*, μέσω qRT-PCR, 3 και 7 ημέρες μετά τον τραυματισμό (n = 4-5 ζώα/ομάδα). **(Β)** Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα κατά Western και ημιποσοτική εκτίμηση των επιπέδων της GFAP σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονωμένων ετερόπλευρων (C) και ομόπλευρων (I) περιοχών, 1, 3 και 7 ημέρες μετά τον τραυματισμό (n = 3-5 ζώα/ομάδα). Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για έλεγχο της ισόποσης φόρτωσης των δειγμάτων. Τα δεδομένα εκφράζονται ως Μέση Τιμή ± SEM και συγκρίνονται με one-way ANOVA, συνδυαζόμενη με post hoc δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, ns: στατιστικά μη σημαντικό). Για κάθε ανάλυση παρατίθενται η τιμή F και οι βαθμοί ελευθερίας (df) εντός παρενθέσεων. **(Γ)** Αντιπροσωπευτική εικόνα ανοσοφθορισμού που δείχνει την έκφραση των GFAP (λευκό χρώμα), BRE-eGFP (πράσινο χρώμα) και TRE-RFP (κόκκινο χρώμα) στην ομόπλευρη περιοχή, 7 ημέρες μετά τον τραυματισμό (αριστερό πάνελ, γραμμή κλίμακας: 300 μm). Με ροζ πλαίσιο σημειώνεται η περιοχή που μεγεθύνεται δεξιά, όπου παρουσιάζονται εικόνες μονού επιπέδου στις οποίες BRE-eGFP και TRE-RFP θετικά κύτταρα συνεκφράζουν την πρωτεΐνη GFAP (δεξί πάνελ, γραμμή κλίμακας: 25 μm). **(Δ)** Αντιπροσωπευτική χρώση ανοσοφθορισμού έναντι του μικρογλοιακού δείκτη AIF1/IBA1 (λευκό χρώμα) και των διαγονιδίων BRE-eGFP (πράσινο χρώμα) και TRE-RFP (κόκκινο χρώμα) στην ομόπλευρη περιοχή, 7 ημέρες μετά τον τραυματισμό (αριστερό πάνελ, γραμμή κλίμακας: 300 μm) και εικόνες μονού επιπέδου υψηλότερης μεγέθυνσης (δεξί πάνελ, γραμμή κλίμακας: 25 μm). Το DAPI (μπλε χρώμα) χρησιμοποιήθηκε για χρώση των πυρήνων. Οι αστερίσκοι επισημαίνουν τη διαρκή έκφραση του διαγονιδίου BRE-eGFP στα επενδυματικά κύτταρα που βρίσκονται στα έσω τοιχώματα των πλευρικών κοιλιών. dpi: ημέρες μετά τον τραυματισμό.



Εικόνα 20. Η σηματοδότηση από μέλη της υπερικογένειας του TGFβ ενεργοποιείται σε αστροκύτταρα και όχι σε νευρώνες της τραυματισμένης περιοχής, έπειτα από εστιακή κρανιοεγκεφαλική κάκωση. Αντιπροσωπευτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας μονού επιπέδου του διαγονιδίου BRE-eGFP (πράσινο χρώμα), των αστροκυτταρικών δεικτών ALDH1L1, GLUL και S100β (λευκό χρώμα, αριστερό πάνελ) και των νευρωνικών δεικτών NeuN και MAP2 (λευκό χρώμα, δεξί πάνελ) σε στεφανιαίες τομές της ομόπλευρης εγκεφαλικής περιοχής ζώων που υποβλήθηκαν σε κρανιοεγκεφαλική κάκωση, 7 ημέρες μετά τον τραυματισμό (γραμμή κλίμακας: 40 μm). Τα BRE-eGFP θετικά κύτταρα που βρίσκονται στην περιοχή της βλάβης εκφράζουν αστροκυτταρικούς και όχι νευρωνικούς δείκτες. Αντίστοιχα αποτελέσματα υπάρχουν και για τα TRE-RFP θετικά κύτταρα (δεν παρουσιάζονται εδώ). Το DAPI (μπλε χρώμα) χρησιμοποιήθηκε για χρώση των πυρήνων.

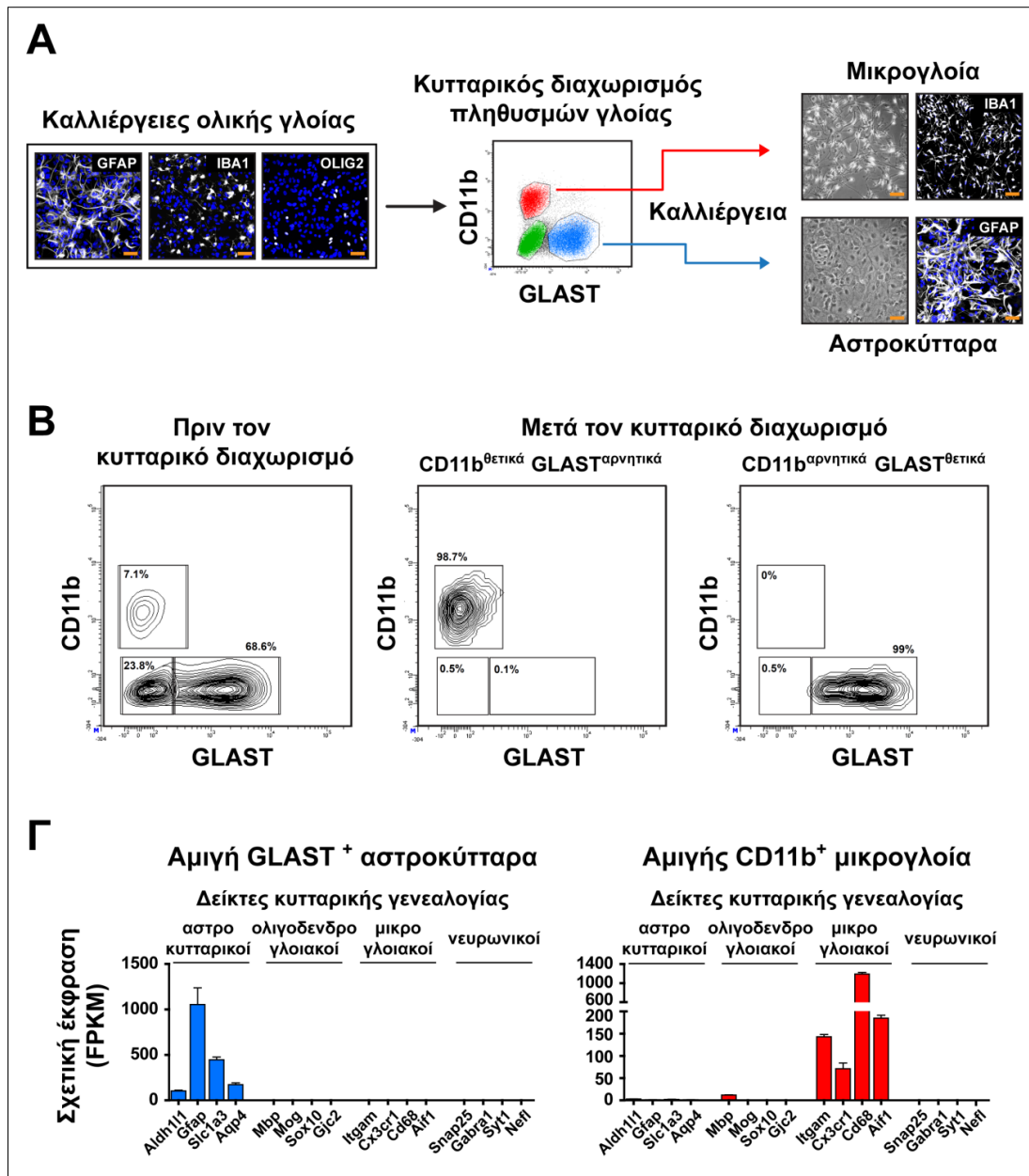


Εικόνα 21. Ενεργοποίηση των διαγονιδίων BRE-eGFP και TRE-RFP σε διάσπαρτα αστροκύτταρα κατά μήκος του ομόπλευρου εγκεφαλικού φλοιού έπειτα από εστιακή κρανιοεγκεφαλική κάκωση. Αντιπροσωπευτική πανοραμική εικόνα συνεστιακής μικροσκοπίας των διαγονιδίων BRE-eGFP (πράσινο

χρώμα) και TRE-RFP (κόκκινο χρώμα) σε στεφανιαία τομή εγκεφάλου, στο επίπεδο του τραύματος, 7 ημέρες μετά τον τραυματισμό (γραμμή κλίμακας: 500 μm). Η διακεκομμένη γραμμή απεικονίζει τα όρια του ιστού. Το λευκό τετράγωνο στον ομόπλευρο φλοιό περιγράφει την περιοχή που μεγεθύνεται δεξιά (γραμμή κλίμακας: 30 μm), για να δειχθεί ότι τα BRE-eGFP και TRE-RFP θετικά κύτταρα συνεκφράζουν την πρωτεΐνη GFAP (λευκό χρώμα). Το DAPI (μπλε χρώμα) χρησιμοποιήθηκε για χρώση των πυρήνων.

5.2. Τα αστροκύτταρα και η μικρογλοία χαρακτηρίζονται από διαφορετική απόκριση στη χορήγηση TGF β 1 και BMP4 *in vitro*

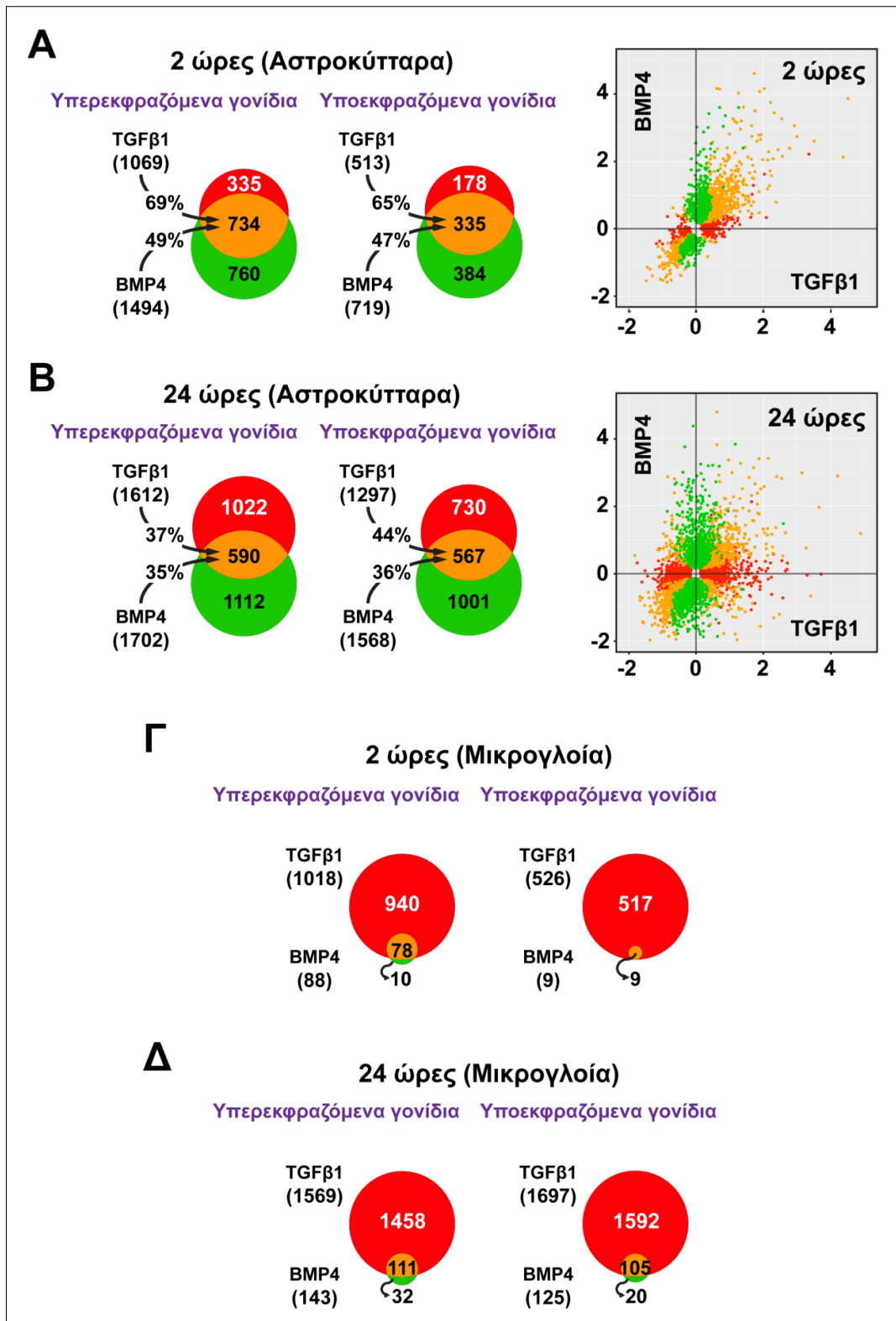
Προκειμένου να χαρακτηρισθεί η επίδραση της TGF β - και BMP-επαγόμενης σηματοδότησης στα ενεργοποιημένα κύτταρα γλοίας και να διερευνηθεί περαιτέρω η απουσία *in situ* ενεργοποίησης των διαγονιδίων στη μικρογλοία, μελετήθηκε η *in vitro* απόκρισή τους σε TGF β 1 και BMP4, τους δύο προσδέτες με την υψηλότερη υπερέκφραση σε επίπεδο mRNA στα δείγματα τραυματισμένου εγκεφαλικού ιστού που αναλύθηκαν (**Εικόνα 16Γ**). Όπως έχει περιγραφεί νωρίτερα (βλ. Μέθοδοι, §4.4.2. Κυτταρικός διαχωρισμός και ανάπτυξη αμιγών καλλιέργειών αστροκυττάρων και μικρογλοίας), αμιγείς πληθυσμοί «ενεργοποιημένων» αστροκυττάρων και μικρογλοίας απομονώθηκαν από καλλιέργειες ολικής γλοίας νεογνικών μυών αγρίου τύπου με τη βοήθεια κυτταροδιαχωριστή, χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των επιφανειακών δεικτών GLAST/SLC1A3 (αστροκύτταρα) και CD11b/ITGAM (μικρογλοία) (**Εικόνα 22Α**). Κυτταρομετρική ανάλυση μετά τον κυτταρικό διαχωρισμό έδειξε την ~99% καθαρότητα των απομονωμένων πληθυσμών αστροκυττάρων ή μικρογλοίας που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή (**Εικόνα 22Β**). Η καθαρότητα των GLAST⁺ και CD11b⁺ καλλιέργειών επιβεβαιώθηκε επιπλέον (*a posteriori*) με την αποκλειστική ανίχνευση υψηλών επιπέδων έκφρασης ειδικών αστροκυτταρικών (*Aldh1l1*, *Gfap*, *Slc1a3*, *Aqp4*) ή μικρογλοιακών (*Itgam*, *Cx3cr1*, *Cd68*, *Aif1*) μεταγράφων στους αντίστοιχους πληθυσμούς και την απουσία μεταγράφων που κωδικοποιούν για νευρωνικούς (*Snap25*, *Gabra1*, *Syt1*, *Nefl*) ή ολιγοδενδροκυτταρικούς (*Mbp*, *Mog*, *Sox10*, *Gjc2*) δείκτες (**Εικόνα 22Γ**). Μετά από περίπου 20-24 ημέρες *in vitro* καλλιέργειας, οι αμιγείς πληθυσμοί κυττάρων γλοίας διεγέρθηκαν με ανασυνδυασμένους προσδέτες για 2 και 24 ώρες και το μεταγράφωνμά τους αναλύθηκε με τη μέθοδο της αλληλούχησης επόμενης γενιάς ή RNA-Seq (βλ. Μέθοδοι, §4.6.6. Ανάλυση μεταγραφώματος μέσω αλληλούχησης επόμενης γενιάς).



Εικόνα 22. Απομόνωση αμιγών πληθυσμών αστροκυττάρων και μικρογλοίας από καλλιέργειες ολικής γλοίας μέσω κυτταρικού διαχωρισμού βασιζόμενου σε φθορισμό (FACS). **(A)** Καλλιέργειες ολικής γλοίας, προερχόμενες από νεογνικούς μύες 1-3 ημερών και αποτελούμενες από αστροκύτταρα (GFAP⁺), μικρογλοία (AIF1/IBA1⁺) και ολιγοδενδροκύτταρα (OLIG2⁺, αντιπροσωπευτική εικόνα ανοσοφθορισμού, αριστερό πάνελ), καλλιεργήθηκαν για ~10-12 ημέρες πριν από χρώση με αντισώματα έναντι των επιφανειακών δεικτών GLAST/SLC1A3 (αστροκύτταρα, μπλε πληθυσμός) ή/και CD11b/ITGAM (μικρογλοία, κόκκινος πληθυσμός) για απομόνωση μέσω κυτταροδιαχωριστή. Τα αμιγή αστροκύτταρα και μικρογλοία καλλιεργήθηκαν για επιπλέον ~10-12 ημέρες πριν την ανάλυση. Στο δεξί πάνελ παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες φωτεινού πεδίου και ανοσοφθορισμού από αμιγείς καλλιέργειες. Το DAPI (μπλε χρώμα) χρησιμοποιήθηκε για χρώση των πυρήνων. Γραμμική κλίμακα: 50 μm. **(B)** Απεικονίσεις αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής πριν και μετά τον κυτταρικό διαχωρισμό, όπου φαίνεται η ~99% καθαρότητα των αμιγών πληθυσμών αστροκυττάρων και μικρογλοίας. **(Γ)** Σχετικά επίπεδα έκφρασης κυτταρο-ειδικών μεταγράφων σε αμιγείς καλλιέργειες αστροκυττάρων (μπλε ράβδοι) ή μικρογλοίας (κόκκινες ράβδοι), στις οποίες χορηγήθηκε μόνο διαλύτης (10 μl υδατικού διαλύματος 0.1% BSA, 4mM HCl). Πρόκειται για δεδομένα RNA-Seq ανάλυσης που κανονικοποιήθηκαν και εκφράστηκαν ως θραύσματα ανά χίλιες βάσεις μεταγράφου, ανά εκατομμύριο χαρτογραφημένων αναγνώσεων (FPKM), n=6 καλλιέργειες/ομάδα. Τα αμιγή GLAST^{θετικά} ή CD11b^{θετικά} κύτταρα εκφράζουν υψηλά επίπεδα μόνο αστροκυτταρικών ή μόνο μικρογλοιακών δεικτών, αντίστοιχα.

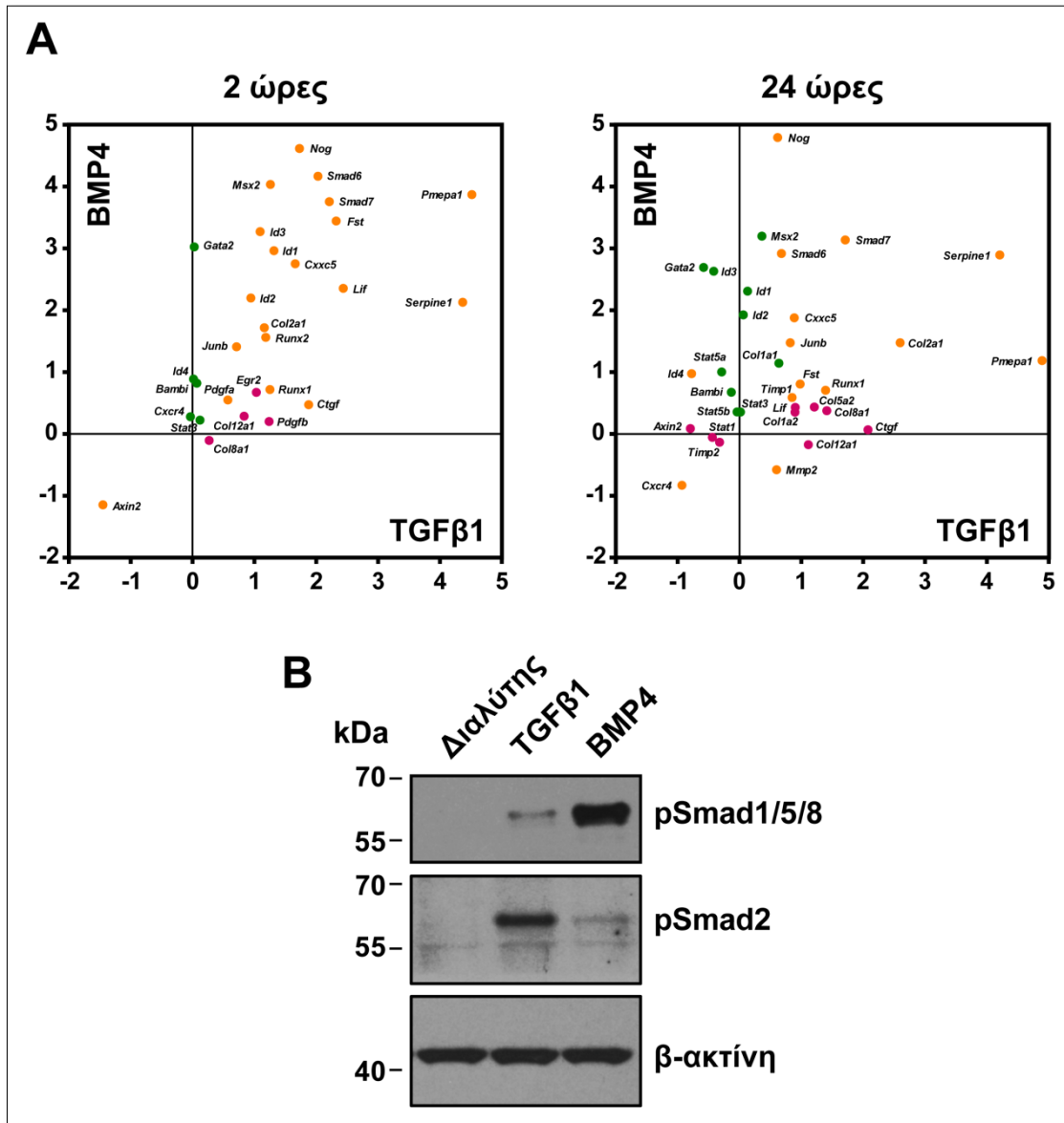
Κατά την επώαση αμιγών αστροκυττάρων με 2 ng/ml TGFβ1 υπερεκφράστηκαν σημαντικά 1069 γονίδια και άλλα 513 υποεκφράστηκαν στις 2 ώρες, ενώ οι αριθμοί των αντίστοιχων γονιδίων ήταν 1612 και 1297 στις 24 ώρες. Παρομοίως, κατά τη διέγερση αστροκυττάρων με 50 ng/ml BMP4 υπερεκφράστηκαν 1494 γονίδια και υποεκφράστηκαν 719 στις 2 ώρες, ενώ υπερεκφράστηκαν 1702 και υποεκφράστηκαν 1568 στις 24 ώρες (**Εικόνα 23A, B**). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο υψηλός βαθμός επικάλυψης των μεταγραφικών προφίλ των αστροκυττάρων που διεγέρθηκαν με TGFβ1 ή BMP4, κυρίως στο χρονικό σημείο των 2 ωρών όπου το 47-69% των γονιδίων ρυθμίζονταν και από τα δύο σηματοδοτικά μονοπάτια (**Εικόνα 23A**), αν και σε διαφορετικό βαθμό (**Εικόνα 24A**). Ο αριθμός των ρυθμιζόμενων γονιδίων στις 24 ώρες ήταν μεγαλύτερος συγκριτικά με εκείνον των 2 ωρών σε κάθε περίπτωση, ωστόσο, τα προφίλ γονιδιακής έκφρασης απέκλιναν παρουσιάζοντας μικρότερη αλληλεπικάλυψη, της τάξης του 35-44% (**Εικόνα 23B**), υποδεικνύοντας ενδεχομένως διαφορική ρύθμιση των επιμέρους βιολογικών διεργασιών. Λίγα γονίδια ρυθμίζονταν με αντίθετο τρόπο από τους δύο προσδέτες (<2% και <8%, στις 2 και 24 ώρες, αντίστοιχα), υποδεικνύοντας περιορισμένο ανταγωνισμό μεταξύ των δύο σηματοδοτικών κλάδων της υπεροικογένειας του TGFβ στα αστροκύτταρα.

Από την άλλη πλευρά, η αμιγής μικρογλοία αποκρίθηκε εξαιρετικά καλά στη χορήγηση 2 ng/ml TGFβ1, δεδομένου ότι 1018 γονίδια υπερεκφράστηκαν και 526 υποεκφράστηκαν στις 2 ώρες, ενώ 1569 υπερεκφράστηκαν και 1697 υποεκφράστηκαν στις 24 ώρες (**Εικόνα 23Γ, Δ**).



Εικόνα 23. Τα αμυγή αστροκύτταρα που διεγείρονται *in vitro* με TGFβ1 ή BMP4 παρουσιάζουν υψηλό βαθμό επικάλυψης του μεταγραφώματός τους, ενώ η μικρογλοία αποκρίνεται επιλεκτικά στον TGFβ1. (A και B) Διαγράμματα τύπου Venn που συνοψίζουν τα αποτελέσματα της RNA-Seq ανάλυσης αμυγών αστροκυττάρων που επώαστηκαν με 2 ng/ml TGFβ1 ή 50 ng/ml BMP4 για 2 ώρες (A) ή 24 ώρες (B) (n = 3 καλλιέργειες/ομάδα). (Γ και Δ) Διαγράμματα τύπου Venn που συνοψίζουν τα αποτελέσματα της RNA-Seq ανάλυσης αμυγών μικρογλοιακών κυττάρων που επώαστηκαν με 2 ng/ml TGFβ1 ή 50 ng/ml BMP4 για 2 ώρες (Γ) ή 24 ώρες (Δ) (n = 3 καλλιέργειες/ομάδα). Τα διαγράμματα απεικονίζουν τους αριθμούς των στατιστικά σημαντικών [baseMean >30 και πιθανότητα λάθους (FDR) <0.05] υπερ- ή υπο-εκφραζόμενων

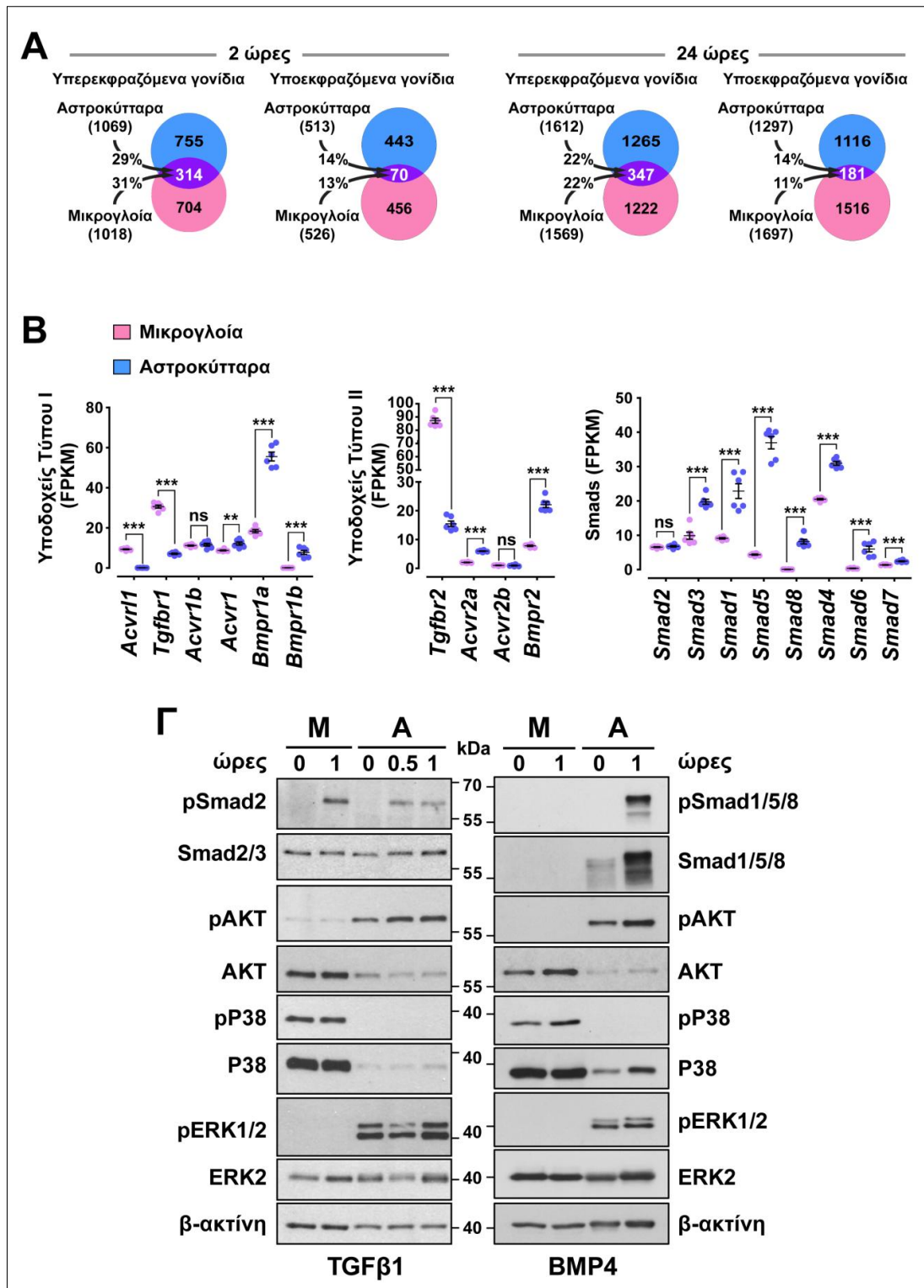
γονιδίων υπό την επίδραση του TGFβ1 (κόκκινο χρώμα), της BMP4 (πράσινο χρώμα) ή και των δύο προσδετών (πορτοκαλί χρώμα). Τα ποσοστά επάνω στα μαύρα βέλη είναι ενδεικτικά της επικάλυψης μεταξύ των δύο διαφορετικών επιδράσεων. Τα διαγράμματα διασποράς (scatterplots) στις εικόνες **A** και **B** απεικονίζουν τα γονίδια με στατιστικά σημαντική απόκριση στον TGFβ1 (κόκκινο χρώμα), στη BMP4 (πράσινο χρώμα) ή και στους δύο προσδέτες (πορτοκαλί χρώμα). Οι άξονες x και y αντιπροσωπεύουν τη διαφορά έκφρασης (fold change) σε κλίμακα log₂ των διαφορετικά ρυθμιζόμενων γονιδίων.



Εικόνα 24. Διαφορετικός βαθμός απόκρισης γνωστών γονιδίων-στόχων της σηματοδότησης της υπερκοιγένειας του TGFβ, έπειτα από *in vitro* διέγερση αμιγών αστροκυττάρων με TGFβ1 ή BMP4. (A) Διαγράμματα διασποράς που κατασκευάστηκαν με βάση τα αποτελέσματα της RNA-Seq ανάλυσης αμιγών αστροκυττάρων έπειτα από χορήγηση 2 ng/ml TGFβ1 ή 50 ng/ml BMP4 για 2 ώρες (αριστερό πάνελ) ή 24 ώρες (δεξί πάνελ). Απεικονίζονται «κλασικά» γονίδια-στόχοι της TGFβ ή BMP επαγόμενης σηματοδότησης που αποκρίνονται σημαντικά και στους δύο προσδέτες, ωστόσο σε διαφορετικό βαθμό. Επιλεγμένα γονίδια-στόχοι με στατιστικά σημαντική απόκριση μόνο στην επίδραση με TGFβ1 απεικονίζονται με χρώμα ματζέντα, μόνο στην επίδραση με BMP4 με πράσινο χρώμα ή και στους δύο προσδέτες με πορτοκαλί χρώμα. Οι άξονες x και y αντιπροσωπεύουν τη διαφορά έκφρασης σε κλίμακα log₂ των διαφορετικά ρυθμιζόμενων γονιδίων (n = 3 καλλιέργειες/ομάδα). **(B)** Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα κατά Western έναντι των pSmad1/5/8, pSmad2 και β-ακτίνη (έλεγχος ισόποσης φόρτωσης) σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αμιγών αστροκυττάρων που διεγέρθηκαν με 10 ng/ml TGFβ1 ή 50 ng/ml BMP4 για 1 ώρα. Διαλύτης: υδατικό διάλυμα 0.1% BSA, 4mM HCl (δείγμα αναφοράς).

Να σημειωθεί ότι στα αστροκύτταρα και τη μικρογλοία ρυθμίζονταν διακριτά σύνολα γονιδίων ως απόκριση στον TGFβ1, παρουσιάζοντας περίπου 11-31% αλληλεπικάλυψη (**Εικόνα 25A**). Παραδόξως, σε συμφωνία με την απουσία έκφρασης του διαγονιδίου BRE-eGFP στα AIF1/IBA1⁺ κύτταρα *in vivo*, τα αμιγή μικρογλοιακά κύτταρα αποκρίθηκαν ασθενώς στην επίδραση με BMP4. Μόνο 88 γονίδια υπερεκφράστηκαν και 9 υποεκφράστηκαν στις 2 ώρες (**Εικόνα 23Γ**), ενώ 143 γονίδια υπερεκφράστηκαν και 125 υποεκφράστηκαν μετά από 24ωρη επώαση με 50 ng/ml BMP4 (**Εικόνα 23Δ**). Ωστόσο, κανένα γονίδιο δεν παρουσίασε διαφορά έκφρασης (fold change) $\log_2 > 1.6$, μόνο 55 και 33 γονίδια εμφάνισαν διαφορά έκφρασης $\log_2 > 0.4$ ή < -0.4 , αντίστοιχα, ενώ στα γονίδια με την υψηλότερη υπερέκφραση περιλαμβάνονταν βασικοί αρνητικοί ρυθμιστές της σηματοδότησης, όπως τα *Smad6*, *Smad7* και *Tgif1*.

Προκειμένου να αποδοθεί μία μηχανιστική εξήγηση για τη διαφορική απόκριση των πληθυσμών της γλοίας στους προσδέτες TGFβ1 και BMP4, συγκρίθηκαν βασικοί παράγοντες του συστήματος σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ στα αστροκύτταρα και τη μικρογλοία. Η ανάλυση των σχετικών βασικών επιπέδων mRNA των υποδοχέων και των τελεστών Smad του συγκεκριμένου σηματοδοτικού συστήματος κατέδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Πιο αναλυτικά, η μικρογλοία χαρακτηρίστηκε από υψηλότερα επίπεδα mRNA των υποδοχέων *Acvr1/Alk1*, *Tgfbr1/Alk5* και *Tgfbr2*, σε σύγκριση με τα αστροκύτταρα που εξέφραζαν υψηλότερα επίπεδα mRNA για τους υποδοχείς *Acvr1/Alk2*, *Bmpr1a/Alk3*, *Bmpr1b/Alk6*, *Acvr2a*, *Bmpr2* και τα *Smads 1, 5, 3, 4, 6* και *7* (**Εικόνα 25B**). Και οι δύο κυτταρικοί τύποι εξέφραζαν παρόμοια επίπεδα mRNA για το *Smad2*. Επιπλέον, παρόλο που η πρωτεΐνη Smad2 φωσφορυλιώθηκε σε αμφότερους τους πληθυσμούς γλοίας μετά από επίδραση με TGFβ1, οι τελεστές Smad1/5/8 φωσφορυλιώθηκαν μόνο στα αστροκύτταρα έπειτα από επίδραση με BMP4 (**Εικόνα 25Γ**).

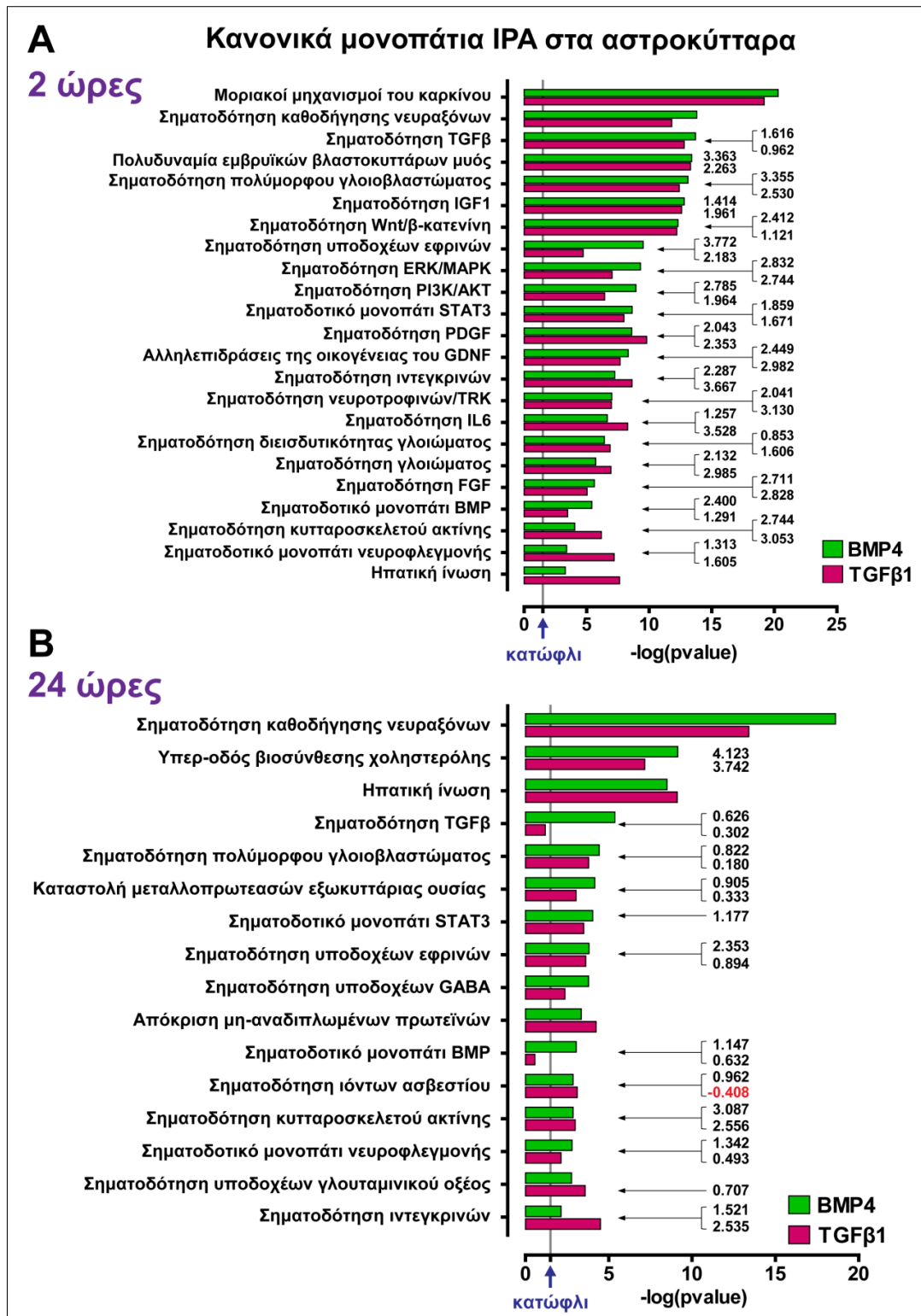


Εικόνα 25. Τα αστροκύτταρα και η μικρογλοία ρυθμίζουν την έκφραση διακριτών συνόλων γονιδίων έπειτα από επίδραση με TGFβ1, εκφράζουν διαφορετικούς παράγοντες της κανονικής TGFβ ή BMP σηματοδότησης και χαρακτηρίζονται από την ενεργοποίηση διαφορετικών μονοπατιών μη κανονικής σηματοδότησης. (A) Διαγράμματα τύπου Venn που απεικονίζουν τον αριθμό των στατιστικά σημαντικών (baseMean >30 και FDR <0.05) γονιδίων που υπερεκφράζονται ή υποεκφράζονται αποκλειστικά στα αστροκύτταρα (γαλάζιο χρώμα), αποκλειστικά στη μικρογλοία (ροζ χρώμα) ή και στους δύο πληθυσμούς γλοίας (μωβ χρώμα), έπειτα από επίδραση με 2 ng/ml TGFβ1 για 2 ώρες (αριστερό πάνελ) ή 24 ώρες (δεξί πάνελ). Τα αναγραφόμενα ποσοστά επισημαίνουν τη γονιδιακή αλληλεπικάλυψη μεταξύ αστροκυττάρων και μικρογλοίας (n = 3 καλλιέργειες/ομάδα). (B) Επίπεδα mRNA έκφρασης υποδοχών τύπου I,

υποδοχέων τύπου II και Smads σε αμιγείς καλλιέργειες μικρογλοίας (ροζ χρώμα) ή αστροκυττάρων (μπλε χρώμα), στις οποίες χορηγήθηκε μόνο διαλύτης (10 μl υδατικού διαλύματος 0.1% BSA, 4mM HCl). Πρόκειται για δεδομένα RNA-Seq ανάλυσης που κανονικοποιήθηκαν και εκφράστηκαν ως FPKM, n=6 καλλιέργειες/ομάδα. Τα δεδομένα εκφράζονται ως Μέση Τιμή ± SEM και συγκρίνονται με μη κατά ζεύγη δοκιμασία t δύο άκρων (two-tailed unpaired t-test, ** p <0.01, *** p <0.001, ns: στατιστικά μη σημαντικό). **(Γ)** Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα κατά Western των κανονικών και μη κανονικών μονοπατιών της TGFβ σηματοδότησης έναντι των pSmad2, ολικών Smad2/3, pSmad1/5/8, ολικών Smad1/5/8, φωσφορυλιωμένης AKT (pAKT), ολικής AKT, φωσφορυλιωμένης P38 (pP38), ολικής P38, φωσφορυλιωμένων ERK1/2 (pERK1/2), ολικής ERK2 και β-ακτίνης (έλεγχος ισόποσης φόρτωσης) σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αμιγούς μικρογλοίας (M) και αστροκυττάρων (A) έπειτα από επίδραση με 10 ng/ml TGFβ1 (αριστερά) ή 50 ng/ml BMP4 (δεξιά).

Σε συμφωνία με τα προηγούμενα, τα ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα των Smad1/5/8 ήταν μη ανιχνεύσιμα στον πληθυσμό της μικρογλοίας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Κατά συνέπεια, τα χαμηλά επίπεδα των BMP-σχετιζόμενων Smad και υποδοχέων μπορούν να δικαιολογήσουν τη χαμηλή μικρογλοιακή απόκριση στη BMP4. Επιπροσθέτως, διαφορετικά μη κανονικά μονοπάτια σηματοδότησης ενεργοποιήθηκαν, ακόμη και στο σημείο αναφοράς (baseline), στους δύο υπό μελέτη πληθυσμούς γλοίας. Η μικρογλοία χαρακτηρίστηκε από υψηλότερη ολική και φωσφορυλιωμένη P38/MAP κινάση, ενώ τα αστροκύτταρα παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα φωσφορυλίωσης των ERK1/2 και αυξημένα επίπεδα pAKT έπειτα από επίδραση με TGFβ1 και BMP4 (**Εικόνα 25Γ**), υποδηλώνοντας ότι οι υποδοχείς της υπεροικογένειας του TGFβ πιθανότατα συνδέονται με διαφορετικά μη κανονικά καταρροϊκά μονοπάτια σηματοδότησης στους δύο αυτούς κυτταρικούς τύπους.

Ανάλυση των μεταγραφικών προφίλ των αστροκυττάρων που διεγέρθηκαν με TGFβ1 ή BMP4 χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα βιοπληροφορικής ανάλυσης “Ingenuity Pathway Analysis” (IPA) έδειξε ότι έπειτα από χορήγηση και των δύο προσδετών για δύο ώρες ενεργοποιήθηκαν αρκετά κανονικά μονοπάτια που σχετίζονται με τη μεσολαβούμενη από αυξητικούς παράγοντες σηματοδότηση (TGFβ, BMP, IGF1, Wnt/β-κατενίνη, ERK/MAPK, PI3K/AKT, STAT3, PDGF, GDNF, νευροτροφίνες/TRK, FGF, κλπ), την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού και την κυτταρική μετανάστευση (σηματοδότηση του υποδοχέα των εφρινών, των ιντεγκρινών, του κυτταροσκελετού της ακτίνης και της διεισδυτικότητας του γλοιώματος, **Εικόνα 26Α**). Από την άλλη πλευρά, μετά από 24ωρη επίδραση με TGFβ1 ή BMP4 ενεργοποιήθηκαν μονοπάτια που σχετίζονται με την ιστική επιδιόρθωση και αναδιαμόρφωση (**Εικόνα 26Β**).

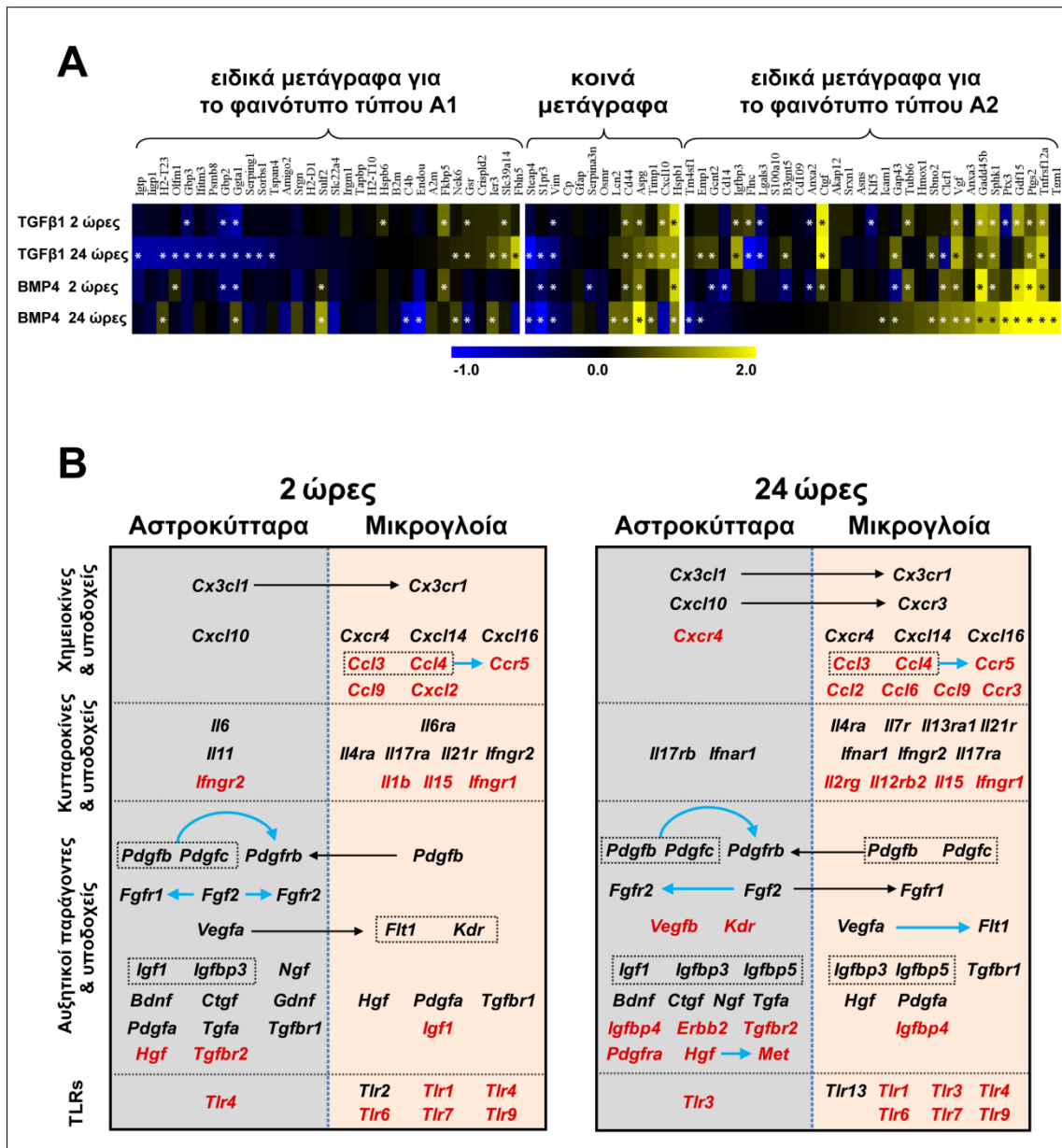


Εικόνα 26. Κανονικά μονοπάτια που ρυθμίζονται έπειτα από διέγερση αμιγών αστροκυττάρων με TGFβ1 ή BMP4 *in vitro*. Ραβδογράμματα που απεικονίζουν τα σχετιζόμενα με το ΚΝΣ κανονικά μονοπάτια της πλατφόρμας Ingenuity Pathway Analysis (IPA), επιλεγμένα μεταξύ των κορυφαία ρυθμιζόμενων, όπως προκύπτουν από την RNA-Seq ανάλυση αμιγών αστροκυττάρων που επωάστηκαν με 2 ng/ml TGFβ1 ή 50 ng/ml BMP4 για 2 ώρες (A) ή 24 ώρες (B) (n = 3 καλλιέργειες/ομάδα). Ο x άξονας αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα [-log (p value)] των μονοπατιών που παρουσιάζονται στον y άξονα. Η κάθετη γκριζα γραμμή απεικονίζει το κατώφλι της στατιστικής σημαντικότητας (p = 0.05). Οι αριθμοί στη δεξιά πλευρά των ράβδων αναπαριστούν τα υπολογιζόμενα IPA z-scores που «προβλέπουν» αυξημένη (μαύρη γραμματοσειρά) ή μειωμένη (κόκκινη γραμματοσειρά) δραστηριότητα για το εκάστοτε μονοπάτι.

Η πλειονότητα των βιολογικών διεργασιών (κανονικών μονοπατιών) που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη και περιλαμβάνονταν στην οντολογία γονιδίων (Gene Ontology) ρυθμίζονταν τόσο από τον TGFβ1 όσο και από τη BMP4. Μάλιστα, παρατηρήθηκε ότι οι δύο προσδέτες της υπερικογένειας του TGFβ ρυθμίζουν την έκφραση είτε διακριτών (**Εικόνα 33A**) είτε επικαλυπτόμενων (**Εικόνες 29A, B, 31A και 32A**) συνόλων γονιδίων που ανήκουν στα εκάστοτε κανονικά μονοπάτια.

Με γνώμονα την προφανή ενεργοποίηση διεργασιών που σχετίζονται με την επιδιόρθωση και αναδιαμόρφωση του τραυματισμένου εγκεφαλικού ιστού διερευνήθηκε εάν τα αστροκύτταρα που διεγέρθηκαν με TGFβ1 ή BMP4 εξέφραζαν γονίδια που σχετίζονται με τον επιδιορθωτικό νευροπροστατευτικό αστροκυτταρικό φαινότυπο τύπου A2, που έχει περιγραφεί προηγουμένα (Liddel et al., 2017; Zamanian et al., 2012). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 27A**, η επίδραση τόσο με TGFβ1 όσο και με BMP4 μετατόπισαν το προφίλ των αστροκυττάρων προς το φαινότυπο τύπου A2 και επιπλέον, σε συμφωνία με τους Liddel et al., 2017, η επίδραση με TGFβ1 οδήγησε στην υποέκφραση αρκετών γονιδίων που σχετίζονται με το νευροτοξικό φαινότυπο τύπου A1.

Από τη βιοπληροφορική ανάλυση του μεταγραφικού προφίλ της μικρογλοίας που διεγέρθηκε με TGFβ1 αναδείχθηκε η ρύθμιση διαφόρων μονοπατιών, μερικά εκ των οποίων ρυθμίζονταν επίσης στα αστροκύτταρα, όπως η σηματοδότηση των ιντεγκρινών, του κυτταροσκελετού της ακτίνης, της διεισδυτικότητας του γλοιώματος, του υποδοχέα των εφρινών και του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (PDGF) (**Εικόνα 28A**). Ωστόσο, διάφορα κανονικά μονοπάτια που σχετίζονται με τη φλεγμονή ρυθμίζονταν κατ' αποκλειστικότητα στη μικρογλοία. Σε εκείνα περιλαμβάνονταν, μεταξύ άλλων, η παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου, η μεσολαβούμενη από τον NRF2 απόκριση στο οξειδωτικό στρες, η εξαγγείωση/διαπίδυση των λευκών αιμοσφαιρίων, η σηματοδότηση του VEGF, των ιντερφερονών και των υποδοχέων τύπου Toll (Toll-like receptors, TLRs).

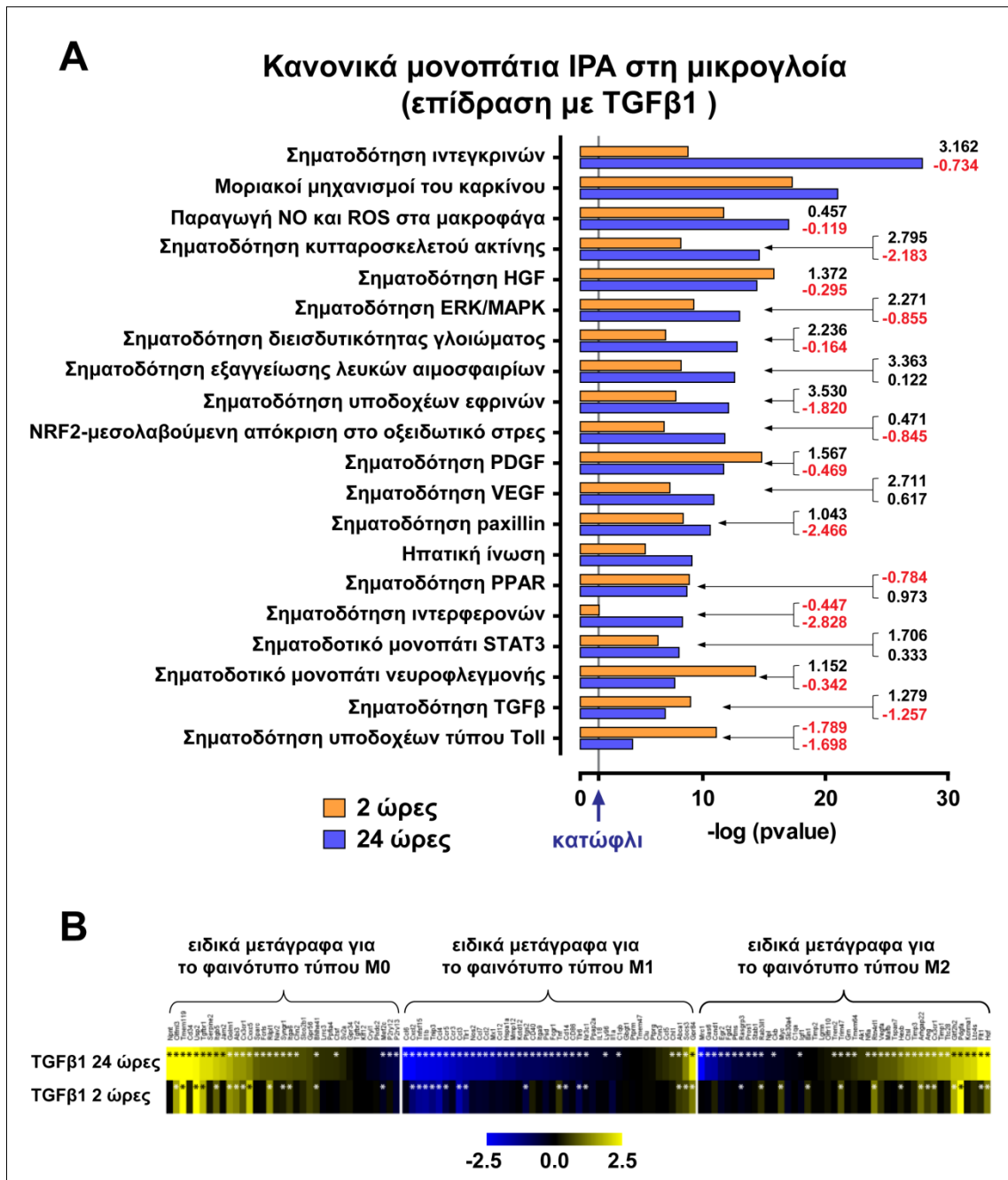


Εικόνα 27. Επίδραση με TGFβ1 ή BMP4 οδηγεί τα πρωτογενή αστροκύτταρα προς έναν επιδιορθωτικό νευροπροστατευτικό φαινότυπο τύπου A2. (A) Θερμικός χάρτης που αναπαριστά τη διαφορά έκφρασης σε κλίμακα log₂ των διαφορικά ρυθμιζόμενων κοινών αστροκυτταρικών και ειδικών για τους φαινοτύπους τύπου A1 και A2 μεταγράφων [σύμφωνα με τους (Liddelow et al., 2017) και (Zamanian et al., 2012)], όπως προκύπτει από την RNA-Seq ανάλυση αμιγών αστροκυττάρων που επώαστηκαν με 2 ng/ml TGFβ1 ή 50 ng/ml BMP4 για 2 ή 24 ώρες (baseMean > 30). Οι αστερίσκοι είναι ενδεικτικοί της στατιστικής σημαντικότητας (FDR < 0.05, n = 3 καλλιέργειες/ομάδα). **(B)** Σχηματική απεικόνιση της έκφρασης χημειοκινών, κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων και αντίστοιχων υποδοχέων, όπως προκύπτει από την RNA-Seq ανάλυση αμιγών αστροκυττάρων και μικρογλοίας που διεγέρθηκαν με 2 ng/ml TGFβ1 για 2 ώρες (αριστερό πάνελ) ή 24 ώρες (δεξί πάνελ). Τα υπερεκφραζόμενα γονίδια σημειώνονται με μαύρο χρώμα, ενώ τα υποεκφραζόμενα με κόκκινο. Τα μαύρα και γαλάζια τόξα αναπαριστούν πιθανές ετεροτυπικές ή ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις, αντίστοιχα, μεταξύ των πληθυσμών της γλοίας.

Η αρνητική επίδραση της TGFβ-επαγόμενης σηματοδότησης στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις της μικρογλοίας είναι καλά τεκμηριωμένη (Spittau et al., 2013; Taylor et al., 2017; Zoller et al., 2018). Σε συμφωνία με τις βιβλιογραφικές αναφορές που

παρατίθενται, ήδη 2 ώρες μετά την επίδραση με TGFβ1, τα σηματοδοτικά μονοπάτια των ιντερφερονών και των υποδοχέων τύπου Toll χαρακτηρίζονταν από αρνητικά “IPA z-scores” (προβλεπόμενη μειωμένη δραστηριότητα) και μάλιστα, μετά από 24ωρη επίδραση, η συντριπτική πλειοψηφία των ρυθμιζόμενων μονοπατιών χαρακτηρίζονταν από προβλεπόμενη μειωμένη δραστηριότητα. Η ανάλυση της έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων που σχετίζονται με τον αδρανή (quiescent) τύπου M0, τον προφλεγμονώδη τύπου M1 και τον αντιφλεγμονώδη φαινότυπο τύπου M2 της μικρογλοίας έδειξε ότι η επίδραση με TGFβ1 οδηγεί αφ’ ενός στην υποέκφραση αρκετών γονιδίων τύπου M1 και αφ’ ετέρου στη μετατόπιση προς ένα φαινότυπο τύπου M0/M2 (**Εικόνα 28B**).

Συγκριτική ανάλυση των διεγερμένων με TGFβ1 αστροκυττάρων και μικρογλοιακών κυττάρων αποκάλυψε τη ρύθμιση μιας πληθώρας χημειοκινών, κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων και των αντίστοιχων υποδοχέων τους και ανέδειξε πιθανές περιπτώσεις TGFβ-μεσολαβούμενης «συνομιλίας» (crosstalk) μεταξύ των δύο πληθυσμών γλοίας (**Εικόνα 27B**). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα mRNA των χημειοκινών *Cx3cl1*, *Cxcl10* και της κυτταροκίνης *Il6* έπειτα από 2 ή/και 24 ώρες επίδρασης στα αστροκύτταρα, ενώ οι αντίστοιχοι υποδοχείς τους υπερεκφράστηκαν στη μικρογλοία. Οι αυξητικοί παράγοντες *Pdgfa*, *Pdgfb*, *Pdgfc* και *Vegfa* υπερεκφράστηκαν και στους δύο κυτταρικούς πληθυσμούς, εντούτοις, ο υποδοχέας *Pdgfrb* υπερεκφράστηκε επιλεκτικά στα αστροκύτταρα και οι υποδοχείς *Flt1/Vegfr1* και *Kdr/Vegfr2* στη μικρογλοία. Ο αυξητικός παράγοντας *Fgf2* υπερεκφράστηκε στα αστροκύτταρα και οι αντίστοιχοι υποδοχείς υπερεκφράστηκαν στις 2 ώρες στα αστροκύτταρα και στις 24 ώρες και στους δύο πληθυσμούς γλοίας. Επίσης, οι χημειοκίνες *Ccl3* και *Ccl4* και ο υποδοχέας τους *Ccr5* υποεκφράστηκαν επιλεκτικά στη μικρογλοία, ενώ ενδιαφέρον προκάλεσε το γεγονός ότι αρκετοί TLRs υποεκφράστηκαν είτε στη μικρογλοία είτε στα αστροκύτταρα. Η επίδραση με BMP4 στα αστροκύτταρα οδήγησε στη ρύθμιση των προαναφερθέντων γονιδίων με τρόπο παρόμοιο με εκείνον της TGFβ1 επίδρασης, υποδεικνύοντας ότι οι δύο κλάδοι του συστήματος σηματοδότησης της υπερικογένειας του TGFβ δεν ανταγωνίζονται ο ένας τον άλλον αλλά πιθανότατα ρυθμίζουν από κοινού τη διασταυρούμενη επικοινωνία (συνομιλία) μεταξύ των κυττάρων της γλοίας.

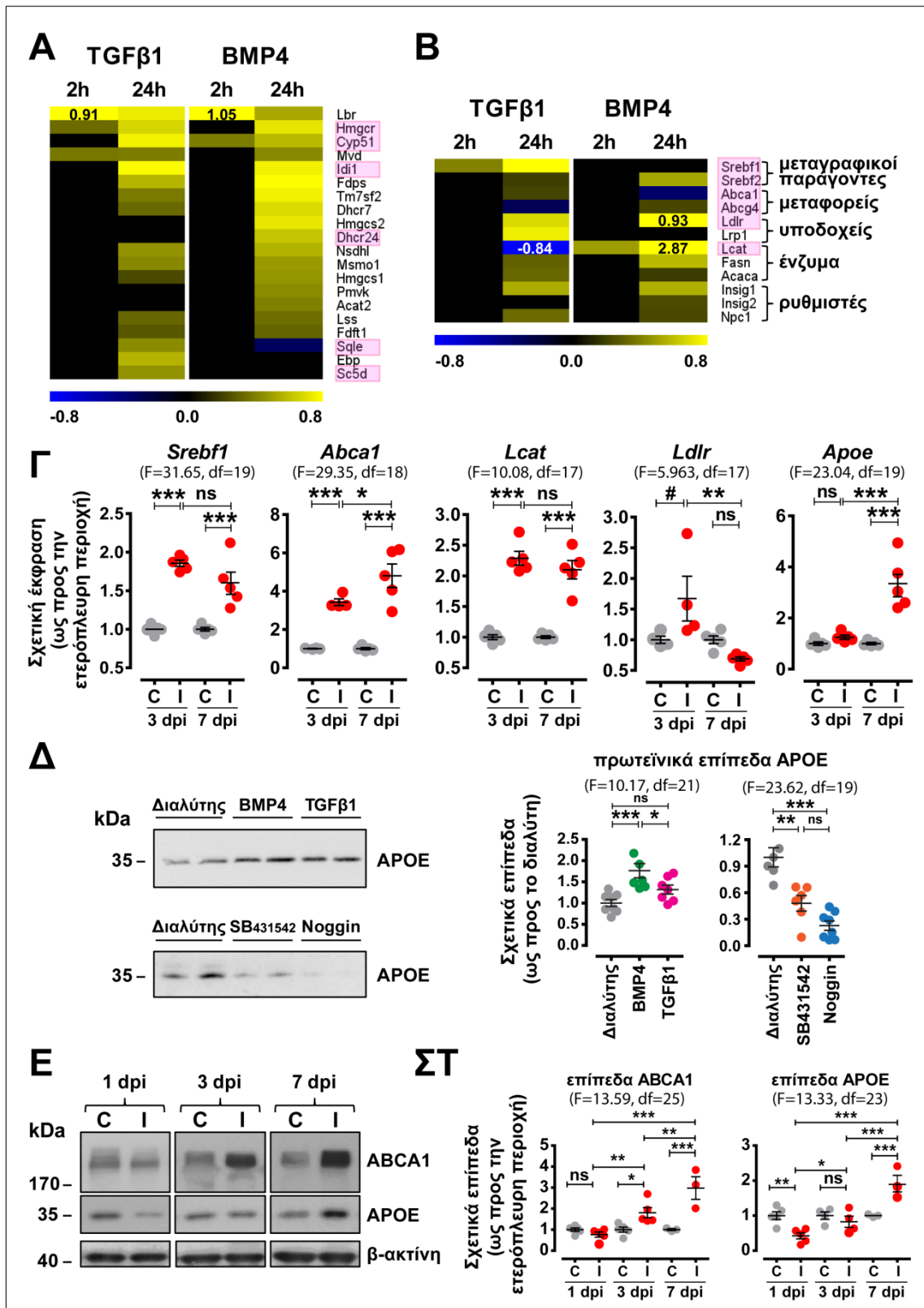


Εικόνα 28. Η αμιγής μικρογλοία υιοθετεί έναν αντιφλεγμονώδη φαινότυπο τύπου M0/M2 έπειτα από επίδραση με TGFβ1. **(A)** Ραβδόγραμμα που απεικονίζει σχετιζόμενα με φλεγμονή κανονικά μονοπάτια της πλατφόρμας IPA, επιλεγμένα μεταξύ των κορυφαία ρυθμιζόμενων, όπως προκύπτουν από την RNA-Seq ανάλυση αμιγών μικρογλοιακών κυττάρων που διεγέρθηκαν με 2 ng/ml TGFβ1 για 2 ώρες (πορτοκαλί ράβδοι) ή 24 ώρες (μωβ ράβδοι). Ο x άξονας αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα [-log (p value)] των κανονικών μονοπατιών που παρουσιάζονται στον γ άξονα. Η κάθετη γκρίζα γραμμή απεικονίζει το κατώφλι της στατιστικής σημαντικότητας (p = 0.05). Οι αριθμοί στη δεξιά πλευρά των ράβδων αναπαριστούν τα υπολογιζόμενα IPA z-scores που «προβλέπουν» αυξημένη (μαύρη γραμματοσειρά) ή μειωμένη (κόκκινη γραμματοσειρά) δραστηριότητα για το εκάστοτε μονοπάτι. **(B)** Θερμικός χάρτης που αναπαριστά τη διαφορά έκφρασης σε κλίμακα log2 των διαφορικά ρυθμιζόμενων μεταγράφων που σχετίζονται με τον αδρανή (quiescent) τύπου M0, τον προφλεγμονώδη τύπου M1 και τον αντιφλεγμονώδη μικρογλοιακό φαινότυπο τύπου M2, όπως προκύπτει από την RNA-Seq ανάλυση αμιγούς μικρογλοίας που επωάστηκε με 2 ng/ml TGFβ1 για 2 ή 24 ώρες (baseMean >30). Οι αστερίσκοι είναι ενδεικτικοί της στατιστικής σημαντικότητας (FDR <0.05, n = 3 καλλιέργειες/ομάδα).

Εφόσον η βιοπληροφορική ανάλυση ανέδειξε τη «Σηματοδότηση καθοδήγησης νευραξόνων», την «Υπερ-οδό βιοσύνθεσης χοληστερόλης», την «Ηπατική ίνωση» και τη «Σηματοδότηση υποδοχέων γλουταμινικού οξέος» μεταξύ των κορυφαίων IPA κανονικών μονοπατιών που ρυθμίζονται στα αστροκύτταρα μετά από 24ωρη επίδραση τόσο με TGFβ1 όσο και με BMP4 (**Εικόνα 26B**), η περαιτέρω ανάλυση επικεντρώθηκε σε αυτές τις βιολογικές διεργασίες που σχετίζονται με τον τραυματισμό του εγκεφάλου.

5.3. Η συμβολή της TGFβ- και BMP-επαγόμενης σηματοδότησης στο μεταβολισμό και τη διακίνηση λιπιδίων στον εγκέφαλο

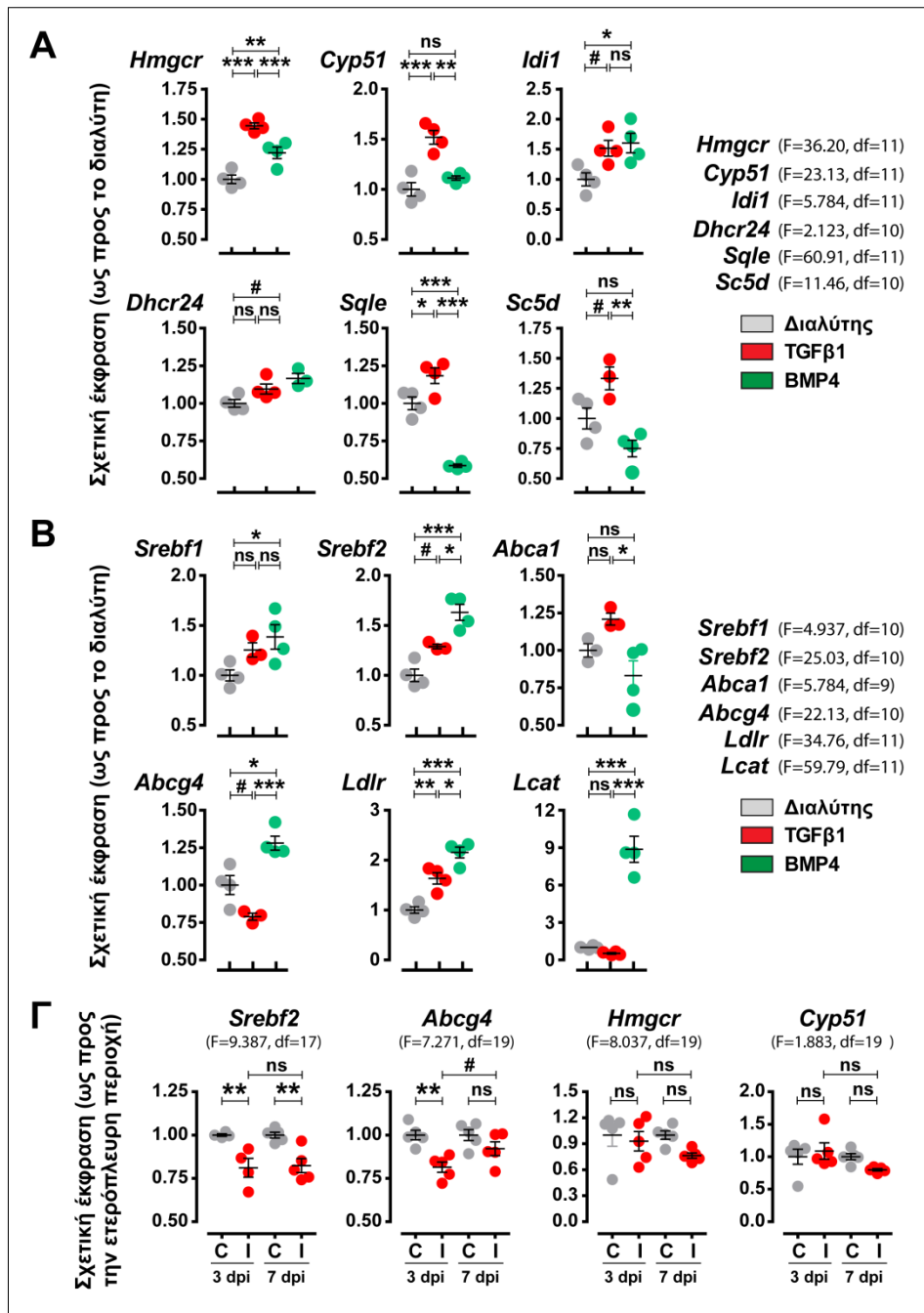
Είναι αξιοσημείωτο ότι 20 από τα 24 ένζυμα που εμπλέκονται στην «Υπερ-οδό βιοσύνθεσης χοληστερόλης» υπερεκφράστηκαν στα αμιγή αστροκύτταρα μετά από 24 ώρες επίδρασης με TGFβ1 ή/και BMP4, 13 εκ των οποίων υπερεκφράστηκαν και από τους δύο προσδέτες (**Εικόνα 29A**). Επιπλέον, διάφοροι παράγοντες διακίνησης και μεταβολισμού λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένων μεταγραφικών παραγόντων (*Srebf1*, *Srebf2*), μεταφορέων (*Abca1*, *Abcg4*), υποδοχέων (*Ldlr*, *Lrp1*), ενζύμων (*Lcat*, *Fasn*, *Acaca*) και άλλων ρυθμιστών (*Insig1*, *Insig2*, *Npc1*), επίσης υπερεκφράστηκαν μετά από επίδραση ενός ή αμφοτέρων των προσδετών (**Εικόνα 29B**). Είναι ενδιαφέρον ότι λίγα γονίδια που ανήκουν στο συγκεκριμένο μονοπάτι (*Sqle*, *Abca1*, *Abcg4*, *Lcat*) ρυθμίστηκαν με αντίθετο τρόπο από τους δύο προσδέτες (**Εικόνα 29A, B**). Η απόκριση επιλεγμένων γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα βιοσύνθεσης της χοληστερόλης (*Hmgcr*, *Cyp51*, *Idi1*, *Dhcr24*, *Sqle*, *Sc5d*) ή παράγοντες διακίνησης και μεταβολισμού λιπιδίων (*Srebf1*, *Srebf2*, *Abca1*, *Abcg4*, *Ldlr*, *Lcat*) επαληθεύθηκε με qRT-PCR ανάλυση ανεξάρτητων καλλιεργειών που διεγέρθηκαν με τους ίδιους προσδέτες (**Εικόνα 30A, B**). Σε συμφωνία με τις *in vitro* διεγερμένες καλλιέργειες, παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα mRNA των γονιδίων *Srebf1*, *Abca1*, *Lcat* και *Ldlr* και μείωση των επιπέδων mRNA του *Abcg4* στο ομόπλευρο εγκεφαλικό ημισφαίριο πειραματοζώων που υποβλήθηκαν σε εστιακή κρανιοεγκεφαλική κάκωση, τρεις ή/και επτά ημέρες μετά τον τραυματισμό (**Εικόνες 29Γ και 30Γ**).



Εικόνα 29. Παράγοντες βιοσύνθεσης, μεταβολισμού και διακίνησης λιπιδίων υπερεκφράζονται στην περιοχή του τραύματος έπειτα από εστιακή κρανιοεγκεφαλική κάκωση ή σε αμιγή αστροκύτταρα έπειτα από *in vitro* επίδραση με TGFβ1 ή BMP4. (A) Θερμικοί χάρτες που αναπαριστούν τη διαφορά έκφρασης σε κλίμακα log2 των διαφορικά ρυθμιζόμενων γονιδίων που κωδικοποιούν για (A) ένζυμα βιοσύνθεσης χοληστερόλης ή (B) παράγοντες μεταβολισμού και διακίνησης λιπιδίων, όπως προκύπτει από την RNA-Seq ανάλυση αμιγών αστροκυττάρων που διεγέρθηκαν με 2 ng/ml TGFβ1 ή 50 ng/ml BMP4 για 2 ή 24 ώρες (baseMean >30 και FDR <0.05). Οι αριθμοί που σημειώνονται για ορισμένα γονίδια

αναπαριστούν τις διαφορές έκφρασης (σε κλίμακα log2) που υπερβαίνουν τα όρια της χρωματικής κλίμακας. Τα ροζ πλαίσια απεικονίζουν επιλεγμένα γονίδια των οποίων η έκφραση επαληθεύθηκε με ανεξάρτητη qRT-PCR ανάλυση (βλ. **Εικόνα 30A, B**). **(Γ)** Ανάλυση των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *Srebf1*, *Abca1*, *Lcat*, *Ldlr* και *ApoE*, μέσω qRT-PCR σε δείγματα απομονωμένων ετερόπλευρων (C) και ομόπλευρων (I) εγκεφαλικών περιοχών ζώων που υποβλήθηκαν σε ΚΕΚ, 3 και 7 ημέρες μετά τον τραυματισμό (n = 5 ζώα/ομάδα). **(Δ)** Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα κατά Western και ημιποσοτική ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων της εκκρινόμενης ΑΡΟΕ στο θρεπτικό μέσο αμιγών αστροκυττάρων που επωάστηκαν παρουσία 2 ng/ml TGFβ1, 50 ng/ml BMP4, 100 ng/ml Noggin ή 10 μM SB431542 για 24 ώρες (n = 6-8 καλλιέργειες/ομάδα από 3 ανεξάρτητα πειράματα, Διαλύτης: υδατικό διάλυμα 0.1% BSA, 4mM HCl). **(Ε)** Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα κατά Western έναντι των πρωτεϊνών ABCA1, ΑΡΟΕ και β-ακτίνη (έλεγχος ισόποσης φόρτωσης) σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα εγκεφαλικών περιοχών ζώων που υποβλήθηκαν σε ΚΕΚ, 1, 3 και 7 ημέρες μετά τον τραυματισμό. **(ΣΤ)** Ημιποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των ABCA1 και ΑΡΟΕ που δείχνονται στο **Ε**. Απεικονίζεται ο λόγος των επιπέδων της ομόπλευρης προς εκείνα της ετερόπλευρης περιοχής για κάθε χρονικό σημείο (n = 3-5 ζώα/ομάδα). Τα δεδομένα εκφράζονται ως Μέση Τιμή ± SEM και συγκρίνονται με one-way ANOVA, συνδυαζόμενη με post hoc δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, ns: στατιστικά μη σημαντικό) ή Newman-Keuls ([#] p <0.05). Για κάθε ανάλυση παρατίθενται η τιμή F και οι βαθμοί ελευθερίας (df) εντός παρενθέσεως (dρι: ημέρες μετά τον τραυματισμό).

Δεδομένου ότι τα αστροκύτταρα συνιστούν το «εργοστάσιο» παραγωγής χοληστερόλης και η απολιποπρωτεΐνη Ε (ΑΡΟΕ) είναι ο κύριος φορέας αυτής στον ενήλικο εγκέφαλο, η περαιτέρω ανάλυση εστιάστηκε στην παραγωγή και έκκριση της ΑΡΟΕ έπειτα από επίδραση με TGFβ1 ή BMP4. Έτσι, ανιχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα εκκρινόμενης ΑΡΟΕ σε υπερκείμενα καλλιεργειών αμιγών αστροκυττάρων που είχαν διεγερθεί με προσδέτες για 24 ώρες (**Εικόνα 29Δ**). Αντίστροφα, μειωμένα επίπεδα εκκρινόμενης ΑΡΟΕ μετρήθηκαν σε υπερκείμενα αστροκυττάρων στα οποία είχε χορηγηθεί είτε ο SB431542 αναστολέας κινάσης των TGFβ-υποδοχέων τύπου I (ALK4, ALK5 και ALK7) είτε ο αναστολέας της BMP σηματοδότησης, Noggin (**Εικόνα 29Δ**). Σε συμφωνία με τα παραπάνω ευρήματα, σημειώθηκε αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *ApoE* στο ομόπλευρο εγκεφαλικό ημισφαίριο ζώων που υποβλήθηκαν σε πειραματική ΚΕΚ, επτά ημέρες μετά τον τραυματισμό (**Εικόνα 29Γ**). Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ΑΡΟΕ στην περιοχή του τραύματος μειώθηκαν σημαντικά την πρώτη ημέρα, επανήλθαν στα επίπεδα του ετερόπλευρου ημισφαιρίου στις τρεις ημέρες και στη συνέχεια αυξήθηκαν σημαντικά επτά ημέρες μετά τον τραυματισμό (**Εικόνα 29Ε, ΣΤ**). Παρόμοια, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του μεταφορέα ABCA1 αυξήθηκαν επίσης στην ομόπλευρη περιοχή, τρεις και επτά ημέρες μετά τον τραυματισμό.



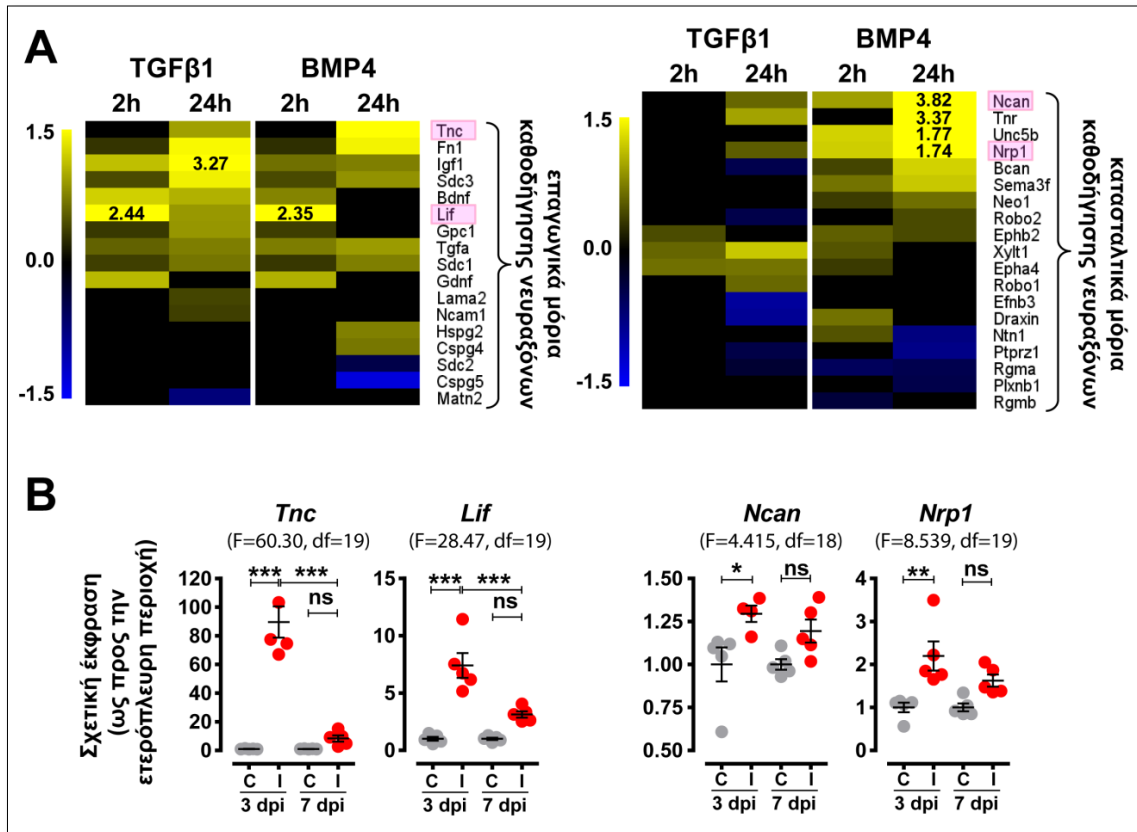
Εικόνα 30. Γονίδια που κωδικοποιούν για παράγοντες που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση, το μεταβολισμό και τη διακίνηση λιπιδίων υπόκεινται σε ρύθμιση είτε σε αστροκύτταρα που διεγείρονται *in vitro* με TGFβ1 ή BMP4 είτε στην περιοχή του τραύματος έπειτα από κρανιοεγκεφαλική κάκωση. Ανάλυση μέσω qRT-PCR των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για (A) τα ένζυμα βιοσύνθεσης χοληστερόλης *Hmgcr*, *Cyp51*, *Idi1*, *Dhcr24*, *Sqle*, *Sc5d* και (B) τους παράγοντες διακίνησης και μεταβολισμού λιπιδίων *Srebf1*, *Srebf2*, *Abca1*, *Abcg4*, *Ldlr*, *Lcat*, έπειτα από *in vitro* διέγερση ανεξάρτητων καλλιιεργειών αστροκυττάρων με 2 ng/ml TGFβ1 ή 50 ng/ml BMP4 για 24 ώρες (n = 4 καλλιέργειες/ομάδα, Διαλύτης: υδατικό διάλυμα 0.1% BSA, 4mM HCl). (Γ) Ανάλυση των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *Srebf2*, *Abcg4*, *Hmgcr* και *Cyp51*, μέσω qRT-PCR ανάλυσης απομονωμένων ετερόπλευρων (C) και ομόπλευρων (I) εγκεφαλικών περιοχών ζώων που υποβλήθηκαν σε εστιακή ΚΕΚ, 3 και 7 ημέρες μετά τον τραυματισμό (n = 5 ζώα/ομάδα). Τα δεδομένα εκφράζονται ως Μέση Τιμή ± SEM και συγκρίνονται με one-way ANOVA, συνδυαζόμενη με post hoc δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, ns: στατιστικά μη σημαντικό) ή Newman-Keuls (# p < 0.05). Για κάθε ανάλυση παρατίθενται η τιμή F και οι βαθμοί ελευθερίας (df) εντός παρενθέσεως (dpi: ημέρες μετά τον τραυματισμό).

5.4. Το σύστημα της υπεροικογένειας του TGFβ ρυθμίζει διαδικασίες σχετιζόμενες με την καθοδήγηση νευραξόνων και την ομοιόσταση του γλουταμινικού οξέος

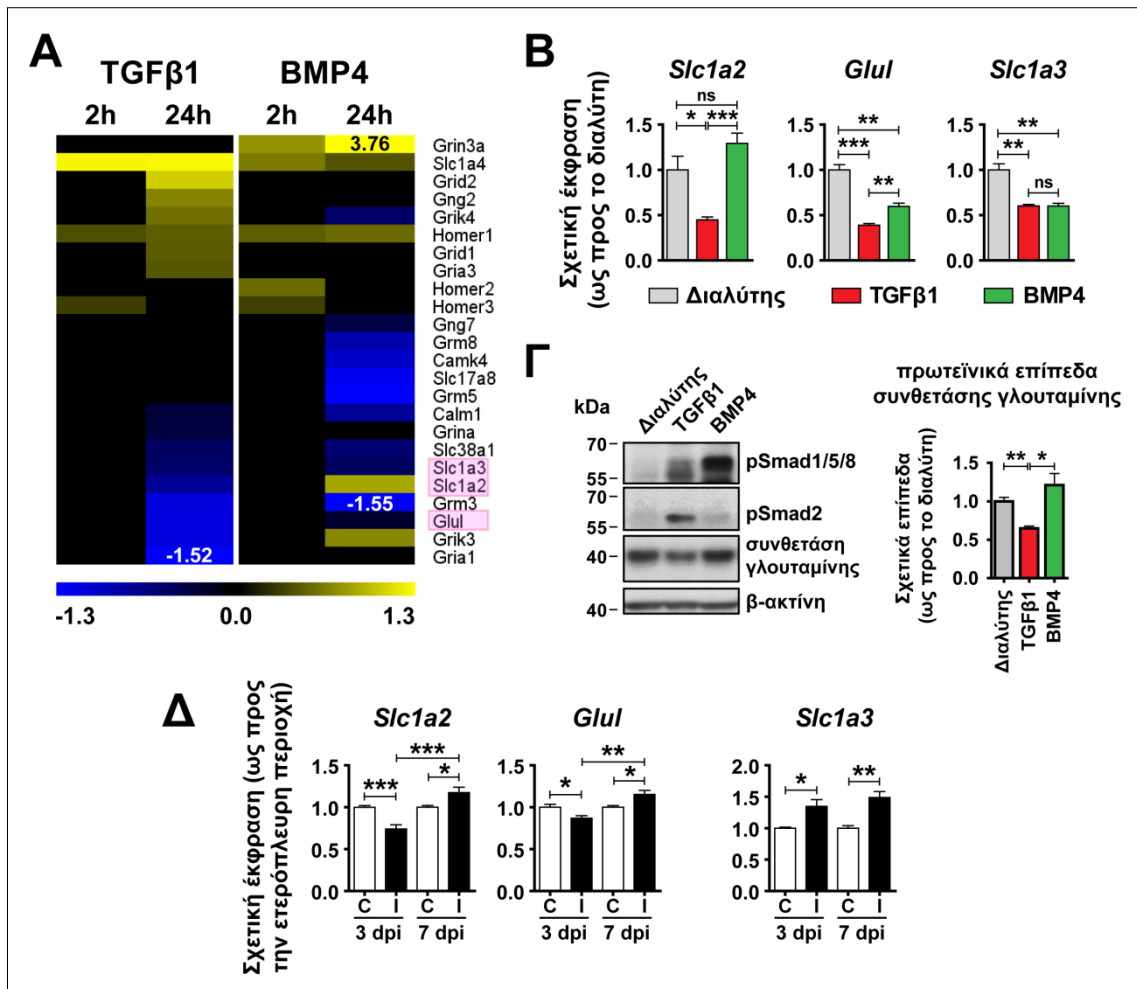
Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, η έκφραση αρκετών μορίων καθοδήγησης νευραξόνων που έχουν συσχετιστεί βιβλιογραφικά με τα αστροκύτταρα (Anderson et al., 2016) βρέθηκε να μεταβάλλεται μετά την επώαση αμιγών αστροκυττάρων παρουσία είτε TGFβ1 είτε BMP4 (**Εικόνα 31A**). Αξίζει να σημειωθεί ότι η επίδραση με TGFβ1 οδήγησε στην υπερέκφραση κυρίως επαγωγικών (αχον permissive) και στην υποέκφραση κατασταλτικών (αχον inhibitory) μορίων, ενώ η χορήγηση BMP4 οδήγησε στην υπερέκφραση ίδιου περίπου αριθμού επαγωγικών και κατασταλτικών μορίων που διέπουν την καθοδήγηση των νευραξόνων. Παράλληλα, η έκφραση αντιπροσωπευτικών κατασταλτικών και επαγωγικών μορίων αναλύθηκε σε δείγματα εγκεφαλικού ιστού πειραματοζώων που υποβλήθηκαν σε εστιακή ΚΕΚ. Σε απόλυτη συμφωνία με τα *in vitro* ευρήματα, παρατηρήθηκε ότι τα γονίδια *Ncan*, *Nrp* και κυρίως τα *Tnc* και *Lif*, δύο μετάγραφα των οποίων η υπερέκφραση έχει συνδεθεί με τον αστροκυτταρικό φαινότυπο τύπου A2 (Zamanian et al., 2012), υπερεκφράστηκαν σημαντικά στην περιοχή του τραύματος, τρεις ημέρες μετά τον τραυματισμό (**Εικόνα 31B**).

Ακόμη, η βιοπληροφορική ανάλυση του μεταγραφώματος των αστροκυττάρων που διεγέρθηκαν με TGFβ1 ή BMP4 *in vitro* ανέδειξε επίσης τη σημαντική ρύθμιση ενός συνόλου γονιδίων που περιλαμβάνονται στο κανονικό μονοπάτι «σηματοδότηση υποδοχέων γλουταμινικού οξέος» της πλατφόρμας IPA (**Εικόνα 32A**). Μάλιστα, τα γονίδια που κωδικοποιούν για τρεις παράγοντες υπεύθυνους για την αστροκυτταρική ρύθμιση της ομοιόστασης του γλουταμινικού οξέος, πιο συγκεκριμένα των μεταφορέων *Slc1a2/Glt1* και *Slc1a3/Glast* και της συνθετάσης της γλουταμίνης *Glul*, υποεκφράστηκαν έπειτα από 24ωρη επίδραση με TGFβ1 ή/και BMP4. Το συγκεκριμένο εύρημα επιβεβαιώθηκε περαιτέρω μέσω qRT-PCR ανάλυσης δειγμάτων από ανεξάρτητες καλλιέργειες αστροκυττάρων που διεγέρθηκαν *in vitro* με τους ίδιους προσδέτες (**Εικόνα 32B**). Η αρνητική επίδραση της TGFβ σηματοδότησης στην ομοιόσταση του γλουταμινικού οξέος επιβεβαιώθηκε και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, όπως προέκυψε από τη μείωση των επιπέδων της συνθετάσης της γλουταμίνης (GLUL) έπειτα από επώαση εμπλουτισμένων σε αστροκύτταρα καλλιεργείων γλοίας παρουσία TGFβ1 για 24 ώρες (**Εικόνα 32Γ**). Σε συμφωνία με τα *in vitro* ευρήματα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση

των επιπέδων mRNA των *Slc1a2* και *Glul* και *in vivo*, στο ομόπλευρο εγκεφαλικό ημισφαίριο ζώων που υποβλήθηκαν σε εστιακή ΚΕΚ, τρεις ημέρες μετά τον τραυματισμό (Εικόνα 32Δ). Αργότερα ωστόσο, επτά ημέρες μετά τον τραυματισμό, οπότε και λαμβάνει χώρα η επούλωση του εγκεφαλικού παρεγχύματος, τα γονίδια *Slc1a2*, *Glul* και *Slc1a3* βρέθηκε να υπερεκφράζονται στην περιοχή του τραύματος, αντανακλώντας πιθανότατα την πρόοδο της ιστικής επιδιόρθωσης.



Εικόνα 31. Γονίδια που κωδικοποιούν για παράγοντες καθοδήγησης νευραξόνων υπόκεινται σε ρύθμιση είτε *in vitro*, σε αστροκύτταρα που διεγείρονται με TGFβ1 ή BMP4, είτε *in vivo*, έπειτα από εστιακή κρανιοεγκεφαλική κάκωση. **(A)** Θερμικοί χάρτες που αναπαριστούν τη διαφορά έκφρασης σε κλίμακα log2 των διαφορικά ρυθμιζόμενων παραγόντων καθοδήγησης νευραξόνων που έχουν συσχετιστεί βιβλιογραφικά με τα αστροκύτταρα (Anderson et al., 2016). Τα δεδομένα προέκυψαν από την RNA-Seq ανάλυση αμιγών αστροκυττάρων που διεγέρθηκαν με 2 ng/ml TGFβ1 ή 50 ng/ml BMP4 για 2 ή 24 ώρες (baseMean >30 και FDR <0.05). Οι αριθμοί που σημειώνονται για ορισμένα γονίδια αναπαριστούν τις διαφορές έκφρασης που υπερβαίνουν τα όρια της χρωματικής κλίμακας. **(B)** Ανάλυση των σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA των επαγωγικών μορίων *Tnc* και *Lif* και των ανασταλτικών μορίων *Ncan* και *Nrp1* (που επισημαίνονται με ροζ πλαίσιο στο A), μέσω qRT-PCR σε δείγματα απομονωμένων ετερόπλευρων (C) και ομόπλευρων (I) εγκεφαλικών περιοχών ζώων που υποβλήθηκαν σε ΚΕΚ, 3 και 7 ημέρες μετά τον τραυματισμό (n = 5 ζώα/ομάδα). Τα δεδομένα εκφράζονται ως Μέση Τιμή ± SEM και συγκρίνονται με one-way ANOVA, συνδυαζόμενη με post hoc δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, ns: στατιστικά μη σημαντικό). Για κάθε ανάλυση παρατίθενται η τιμή F και οι βαθμοί ελευθερίας (df) εντός παρενθέσεως. dpi: ημέρες μετά τον τραυματισμό.



Εικόνα 32. Μεταβολή της έκφρασης παραγόντων της ομοιόστασης του γλουταμινικού οξέος είτε *in vitro*, σε αστροκύτταρα που διεγείρονται με TGFβ1 ή BMP4, είτε *in vivo*, έπειτα από εστιακή κρανιοεγκεφαλική κάκωση. **(A)** Θερμικός χάρτης που αναπαριστά τη διαφορά έκφρασης σε κλίμακα log2 των διαφορικά ρυθμιζόμενων γονιδίων που κωδικοποιούν για υπομονάδες υποδοχέων, μεταφορείς, ένζυμα και άλλα μόρια του κανονικού μονοπατιού της «Σηματοδότησης υποδοχέων γλουταμινικού οξέος» (IPA). Τα δεδομένα προέκυψαν από την RNA-Seq ανάλυση αμιγών αστροκυττάρων που επώαστηκαν παρουσία 2 ng/ml TGFβ1 ή 50 ng/ml BMP4 για 2 ή 24 ώρες (baseMean > 30 και FDR < 0.05). **(B)** Ανάλυση μέσω qRT-PCR των σχετικών επιπέδων mRNA έκφρασης των *Slc1a2*, *Glul* και *Slc1a3* (που επισημαίνονται με ροζ πλαίσιο στο **A**), έπειτα από *in vitro* διέγερση ανεξάρτητων καλλιεργείων αστροκυττάρων με 2 ng/ml TGFβ1 ή 50 ng/ml BMP4 για 24 ώρες (n = 4 καλλιέργειες/ομάδα). **(Γ)** Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα κατά Western έναντι των pSmad1/5/8, pSmad2, συνθετάση της γλουταμίνης (GLUL), β-ακτίνη (έλεγχος ισόποσης φόρτωσης) και ημιοσοτική εκτίμηση των επιπέδων της συνθετάσης της γλουταμίνης σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα καλλιεργείων ολικής γλοίας (εμπλουτισμένων σε αστροκύτταρα) που διεγέρθηκαν με 2 ng/ml TGFβ1 ή 50 ng/ml BMP4 για 24 ώρες (n = 4 καλλιέργειες/ομάδα). Διαλύτης: υδατικό διάλυμα 0.1% BSA, 4mM HCl (δείγμα αναφοράς). **(Δ)** Ανάλυση των σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA των *Slc1a2*, *Glul* και *Slc1a3*, μέσω qRT-PCR σε δείγματα απομονωμένων ετερόπλευρων (C) και ομόπλευρων (I) εγκεφαλικών περιοχών ζώων που υποβλήθηκαν σε εστιακή ΚΕΚ, 3 και 7 ημέρες μετά τον τραυματισμό (n = 5 ζώα/ομάδα). Τα δεδομένα εκφράζονται ως Μέση Τιμή ± SEM και συγκρίνονται με μη κατά ζεύγη δοκιμασία t δύο άκρων (two-tailed unpaired t-test, *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001). dpi: ημέρες μετά τον τραυματισμό.

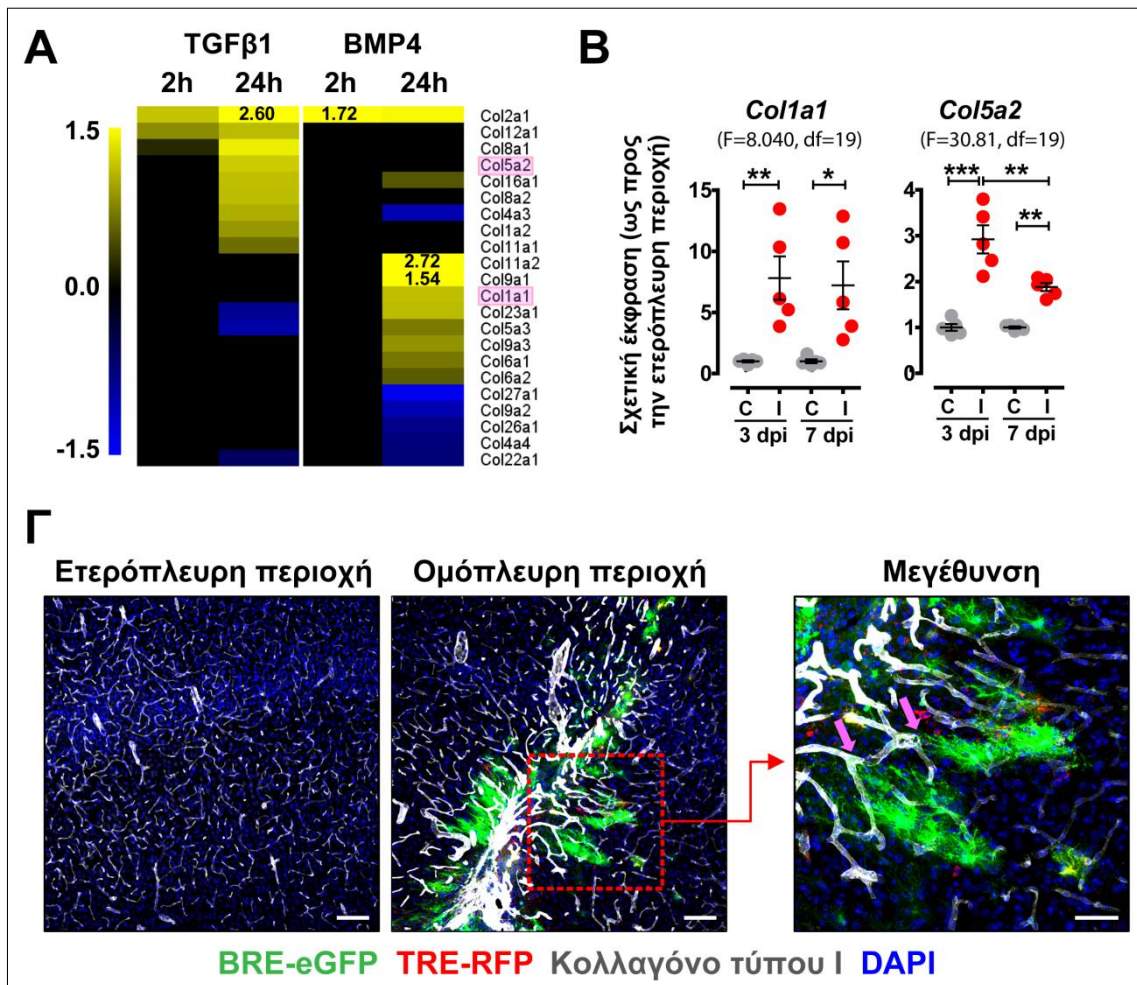
5.5. Η σηματοδότηση από μέλη της υπεροικογένειας του TGFβ ρυθμίζει την ιστική αναδιαμόρφωση έπειτα από εστιακή κρανιοεγκεφαλική κάκωση

Πολυάριθμα γονίδια που ανήκουν στο IPA κανονικό μονοπάτι «Ηπατική ίνωση» και κωδικοποιούν για κολλαγόνα, αυξητικούς παράγοντες, υποδοχείς αυξητικών παραγόντων και άλλα μόρια ιστικής αναδιαμόρφωσης παρατηρήθηκε ότι ρυθμίζονταν μετά από επώαση αμιγών αστροκυττάρων παρουσία TGFβ1 ή BMP4 (**Εικόνες 33A και 34A**). Μάλιστα, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 33A**, διαφορετικά σύνολα κολλαγόνων ρυθμίζονταν από τους δύο προσδέτες στα αστροκύτταρα. Από την άλλη πλευρά, η πλειοψηφία των γονιδίων που κωδικοποιούν για αυξητικούς παράγοντες και υποδοχείς αυτών ρυθμίζονταν κυρίως στο πρώιμο χρονικό σημείο των 2 ωρών, σε αντίθεση με άλλους παράγοντες του συγκεκριμένου κανονικού μονοπατιού που ρυθμίζονταν μετά από 24 ώρες επίδρασης (**Εικόνα 34A**).

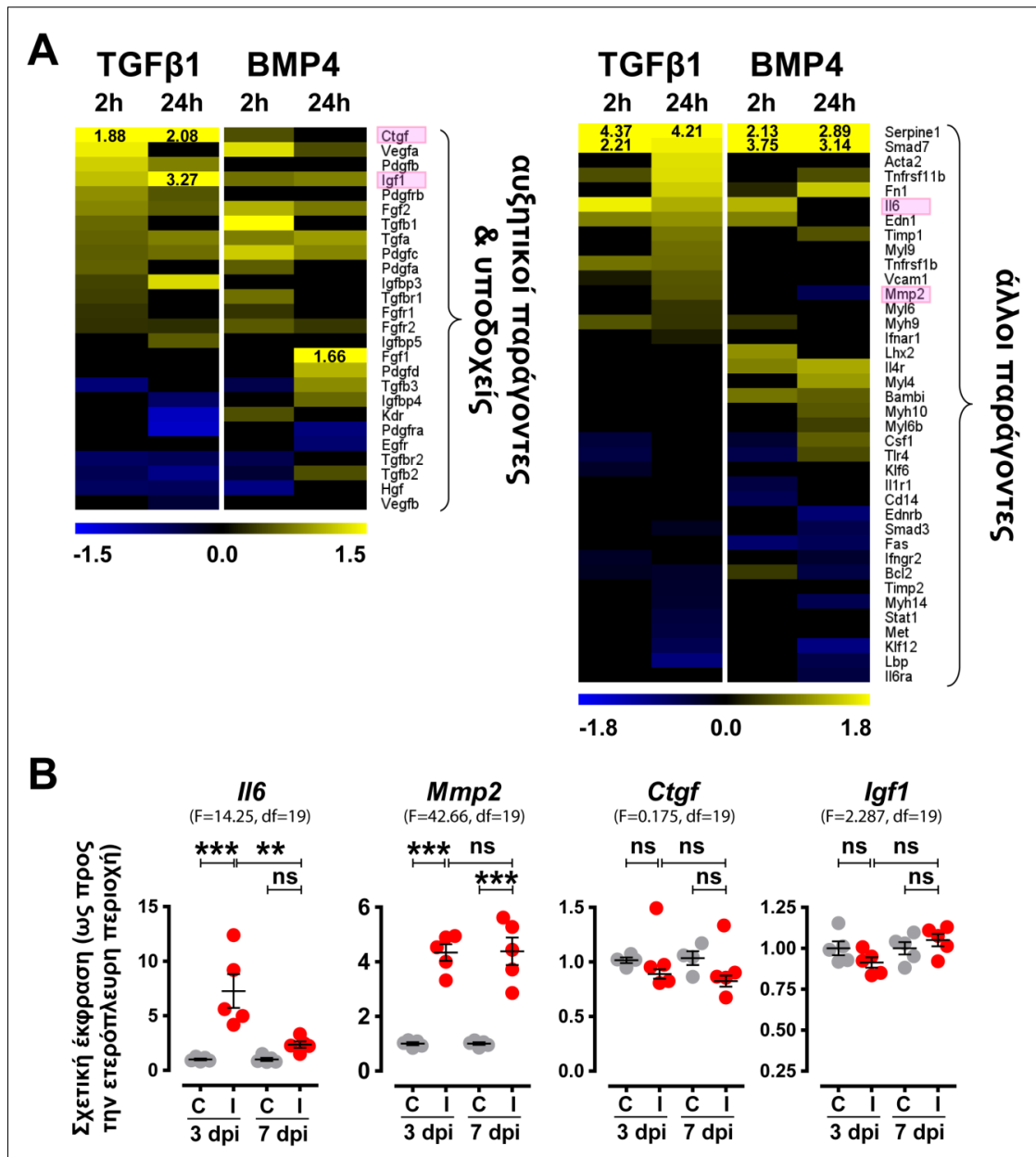
Αντιπροσωπευτικά γονίδια που υπερεκφράστηκαν στα αστροκύτταρα που είχαν διεγερθεί *in vitro* με προσδέτες βρέθηκαν επίσης να υπερεκφράζονται στον τραυματισμένο εγκεφαλικό φλοιό πειραματοζώων που υποβλήθηκαν σε κρανιοεγκεφαλική κάκωση. Συγκεκριμένα, τα γονίδια *Col1a1*, *Col5a2*, *Il6* και *Mmp2* υπερεκφράστηκαν σημαντικά στην περιοχή του τραύματος, τρεις και επτά ημέρες μετά τον τραυματισμό (**Εικόνες 33B και 34B**). Ακόμη, στο αγγειακό δίκτυο των τραυματισμένων περιοχών ανιχνεύθηκε αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου τύπου I και μάλιστα απολήξεις των BRE-eGFP⁺ ή/και TRE-RFP⁺ αστροκυττάρων βρέθηκε να αλληλεπιδρούν στενά με αγγειακά τοιχώματα που χαρακτηρίζονταν από έντονη ανοσοϊστοχημική έκφραση του συγκεκριμένου τύπου κολλαγόνου (**Εικόνα 33Γ**).

Βέβαια, είναι προφανές ότι μερικά γονίδια που περιλαμβάνονται στα κανονικά μονοπάτια που αναλύθηκαν παραπάνω παρουσίασαν διαφορετική απόκριση στα *in vitro* διεγερμένα αστροκύτταρα και στις τραυματισμένες περιοχές που απομονώθηκαν από ζώα που υποβλήθηκαν σε πειραματική κρανιοεγκεφαλική κάκωση. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα mRNA του *Srebf2* («Υπερ-οδός βιοσύνθεσης χοληστερόλης», IPA) υπερεκφράστηκαν *in vitro* μετά από επίδραση με TGFβ1 ή/και BMP4 αλλά υποεκφράστηκαν σημαντικά στην περιοχή του τραύματος, τρεις ή/και επτά ημέρες μετά τον τραυματισμό (**Εικόνα 30Γ**). Παρόμοια, τα επίπεδα mRNA των *Hmgcr* και *Cyp51* βρέθηκε ότι δε μεταβάλλονται σημαντικά στην ομόπλευρη περιοχή έπειτα από

πειραματική κρανιοεγκεφαλική κάκωση.



Εικόνα 33. Πληθώρα κολλαγόνων υπόκεινται σε ρύθμιση είτε *in vitro*, σε αστροκύτταρα που διεγείρονται με TGFβ1 ή BMP4, είτε *in vivo*, στην περιοχή του τραύματος έπειτα από εστιακή κρανιοεγκεφαλική κάκωση. **(Α)** Θερμικός χάρτης που απεικονίζει τη διαφορά έκφρασης σε κλίμακα log2 των διαφορετικά ρυθμιζόμενων γονιδίων που κωδικοποιούν για κολλαγόνα, όπως προέκυψε από την RNA-Seq ανάλυση αμιγών αστροκυττάρων που διεγέρθηκαν με 2 ng/ml TGFβ1 ή 50 ng/ml BMP4 για 2 ή 24 ώρες (baseMean >30 και FDR <0.05). **(Β)** Ανάλυση των σχετικών επιπέδων έκφρασης mRNA των *Col1a1* και *Col5a2* (που επισημαίνονται με ροζ πλαίσιο στο **Α**), μέσω qRT-PCR σε δείγματα απομονωμένων ετερόπλευρων (C) και ομόπλευρων (I) εγκεφαλικών περιοχών ζώων που υποβλήθηκαν σε ΚΕΚ, 3 και 7 ημέρες μετά τον τραυματισμό (n = 5 ζώα/ομάδα). Τα δεδομένα εκφράζονται ως Μέση Τιμή ± SEM και συγκρίνονται με one-way ANOVA, συνδυαζόμενη με post hoc δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001). Για κάθε ανάλυση παρατίθενται η τιμή F και οι βαθμοί ελευθερίας (df) εντός παρενθέσεως. dpi: ημέρες μετά τον τραυματισμό. **(Γ)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας ενδεικτικές της έκφρασης του κολλαγόνου τύπου I (λευκό χρώμα) και των διαγονιδίων BRE-eGFP (πράσινο χρώμα) και TRE-RFP (κόκκινο χρώμα) σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλου ζώων που υποβλήθηκαν σε ΚΕΚ, στο επίπεδο του τραύματος, 7 ημέρες μετά τον τραυματισμό (γραμμική κλίμακας: 100 μm). Με κόκκινο στικτό πλαίσιο σημειώνεται η περιοχή που μεγεθύνεται δεξιά (γραμμική κλίμακας: 50 μm), όπου παρουσιάζονται BRE-eGFP και TRE-RFP θετικά αστροκύτταρα που αλληλεπιδρούν με το αγγειακό δίκτυο σε περιοχές που χαρακτηρίζονται από έντονη εναπόθεση κολλαγόνου τύπου I (ροζ βέλη). Το DAPI (μπλε χρώμα) χρησιμοποιήθηκε για χρώση των πυρήνων.



Εικόνα 34. Γονίδια που κωδικοποιούν για παράγοντες ιστικής αναδιαμόρφωσης υπόκεινται σε ρύθμιση είτε *in vitro*, σε αστροκύτταρα που διεγείρονται με TGFβ1 ή BMP4, είτε *in vivo*, έπειτα από εστιακή κρανιοεγκεφαλική κάκωση. **(A)** Θερμικοί χάρτες που απεικονίζουν τη διαφορά έκφρασης σε κλίμακα log2 των διαφορετικά ρυθμιζόμενων γονιδίων που ανήκουν στο IPA κανονικό μονοπάτι της «Ηπατικής ίνωσης», συμπεριλαμβανομένων αυξητικών παραγόντων, υποδοχέων αυξητικών παραγόντων και άλλων μορίων, όπως προκύπτει από την RNA-Seq ανάλυση αμιγών αστροκυττάρων που επώαστηκαν παρουσία 2 ng/ml TGFβ1 ή 50 ng/ml BMP4 για 2 ή 24 ώρες (baseMean >30 και FDR <0.05). **(B)** Ανάλυση των σχετικών επιπέδων mRNA έκφρασης των *Il6*, *Mmp2*, *Ctgf/Ccn2* και *Igf1* (που επισημαίνονται με ροζ πλαίσιο στο **A**), μέσω qRT-PCR σε δείγματα απομονωμένων ετερόπλευρων (C) και ομόπλευρων (I) εγκεφαλικών περιοχών ζώων που υποβλήθηκαν σε KEK, 3 και 7 ημέρες μετά τον τραυματισμό (n = 5 ζώα/ομάδα). Τα δεδομένα εκφράζονται ως Μέση Τιμή ± SEM και συγκρίνονται με one-way ANOVA, συνδυαζόμενη με post hoc δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, ns: στατιστικά μη σημαντικό). Για κάθε ανάλυση παρατίθενται η τιμή F και οι βαθμοί ελευθερίας (df) εντός παρενθέσεως. dpi: ημέρες μετά τον τραυματισμό.

Παρά τη μεταβολή των επιπέδων mRNA του γονιδίου *ApoE* στους απομονωμένους τραυματισμένους ιστούς, η έκφρασή του στα αστροκύτταρα δεν

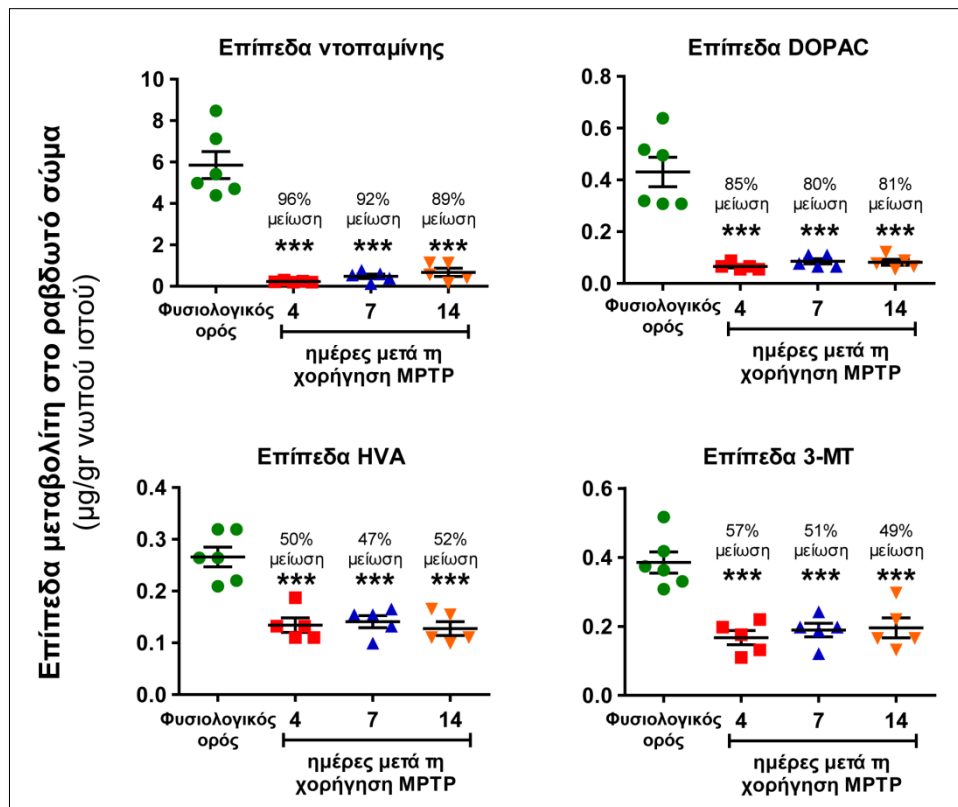
επηρεάστηκε μετά από *in vitro* επίδραση με προσδέτες. Επιπλέον, η παρατηρούμενη ρύθμιση των γονιδίων *Ctgf/Ccn2* και *Igf1 in vitro* («Ηπατική ίνωση», IPA) δε μπόρεσε να αναπαραχθεί *in vivo* στο μοντέλο της οξείας κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης (**Εικόνα 34B**). Αυτές οι διαφορές θα μπορούσαν να αντανακλούν την αδυναμία των *in vitro* καλλιιεργειών γλοίας να προσομοιάσουν πλήρως τις σύνθετες κυτταρικές αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στους τραυματισμένους ιστούς, τις πιθανές διαφορές στην κινητική με την οποία εξελίσσονται ορισμένες διαδικασίες *in vitro* έναντι *in vivo* ή τους περιορισμούς ανίχνευσης που ενέχουν οι χρησιμοποιούμενες τεχνικές. Παρ' όλα αυτά, συνολικά, τα *in vitro* δεδομένα που προέκυψαν από την RNA-Seq ανάλυση του μεταγραφώματος των αμιγών αστροκυττάρων συμφωνούσαν σε μεγάλο βαθμό με τα *in vivo* μοτίβα γονιδιακής έκφρασης που παρατηρήθηκαν κατά την ανάλυση των απομονωμένων τραυματισμένων ιστών.

5.6. Ενεργοποίηση του συστήματος σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ έπειτα από βιοχημικό εκφυλισμό του ντοπαμινεργικού συστήματος

Παράλληλα, με στόχο την κατανόηση του ρόλου της σχετικής ισορροπίας των TGFβ και BMP κλάδων σηματοδότησης στην παθοφυσιολογία του νευρικού ιστού, εκτός του μηχανικού εγκεφαλικού τραυματισμού, εφαρμόστηκε κι ένα μοντέλο βιοχημικού τραυματισμού του ενήλικου εγκεφάλου, μέσω χορήγησης της μιτοχονδριακής νευροτοξίνης MPTP για την προσομοίωση παρκινσονικών συμπτωμάτων. Έτσι, ενήλικοι μύες υποβλήθηκαν σε χορήγηση MPTP (βλ. Μέθοδοι, §4.1.3. Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση της νευροτοξίνης MPTP) και συλλέχθηκαν δείγματα εγκεφαλικού ιστού που εμπεριείχαν το ραβδωτό σώμα και την κοιλιακή μοίρα του μεσεγκεφάλου, τέσσερις, επτά και δεκατέσσερις ημέρες μετά τη χορήγηση, προκειμένου να διεξαχθεί βιοχημική και ιστολογική ανάλυση. Ως ομάδα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν μύες ίδιας ηλικίας που έλαβαν ίσο όγκο φυσιολογικού ορού (Saline).

Αρχικά, προκειμένου να εξακριβωθεί ο επιθυμητός εκφυλισμός του ντοπαμινεργικού συστήματος, εφαρμόστηκε η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) στα δείγματα του ραβδωτού σώματος που συλλέχθηκαν και δείχθηκε σημαντική μείωση στα επίπεδα της ντοπαμίνης ήδη από την 4^η ημέρα (μείωση κατά 96%), τα οποία παρέμειναν ελαττωμένα

ακόμη και δεκατέσσερις ημέρες μετά τη χορήγηση της νευροτοξίνης (μείωση κατά 89%, **Εικόνα 35**). Στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρήθηκε και στους κύριους μεταβολίτες της ντοπαμίνης [3,4-διϋδροξυφαιτυλοξικό οξύ (DOPAC), ομοβανιλλικό οξύ (HVA) και 3-μεθοξυτυραμίνη (3MT)], με παραπλήσια ποσοστά μείωσης και στα τρία χρονικά σημεία που αναλύθηκαν.



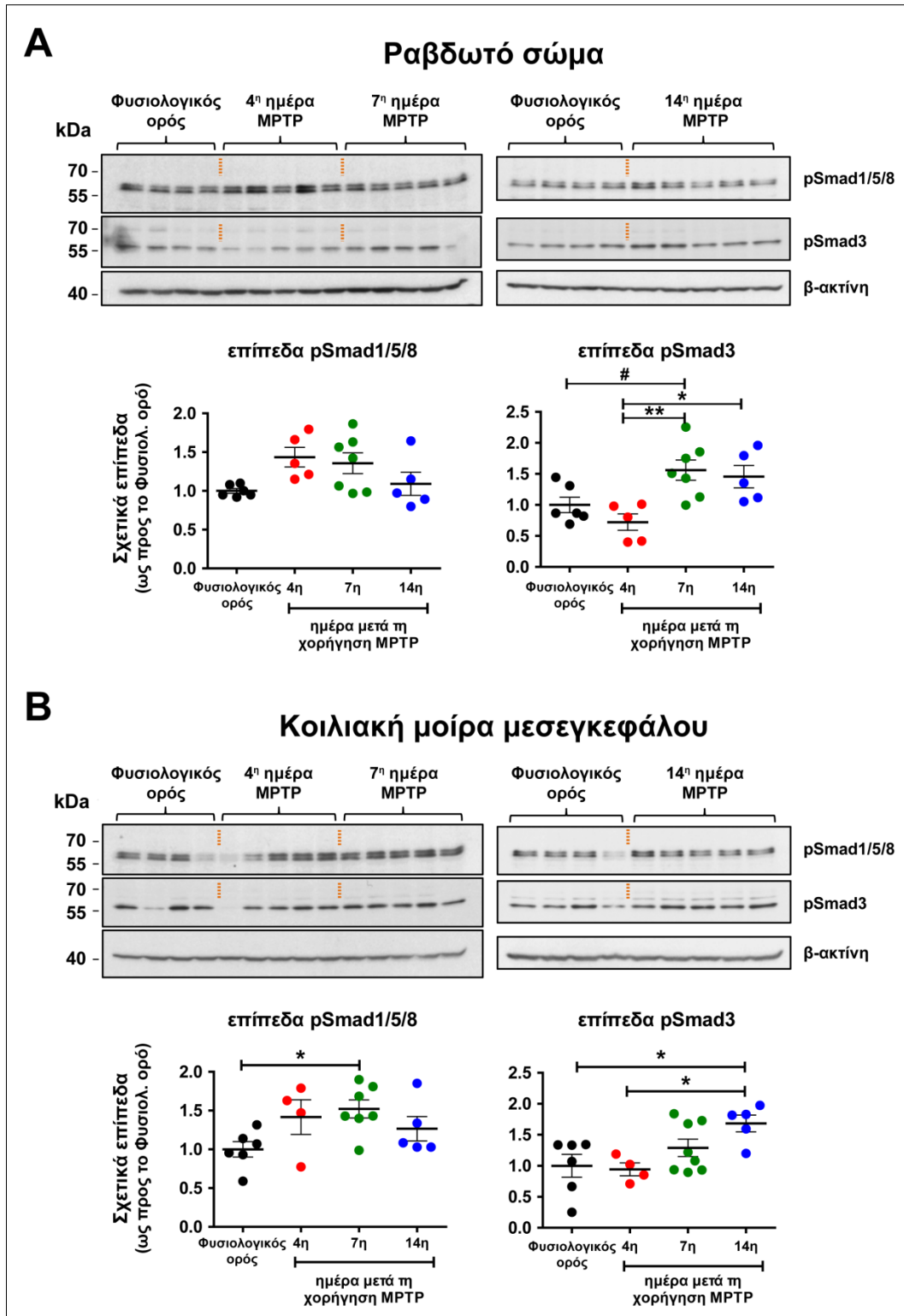
Εικόνα 35. Δραματική μείωση των επιπέδων της ντοπαμίνης και των μεταβολιτών της στο ραβδωτό σώμα, έπειτα από χορήγηση της νευροτοξίνης MPTP. Τα επίπεδα της ντοπαμίνης και μεταβολιτών της DOPAC, HVA και 3-MT αναλύθηκαν μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) στο ραβδωτό σώμα ενήλικων πειραματοζώων στα οποία χορηγήθηκε MPTP (ή φυσιολογικός ορός: ομάδα αναφοράς), 4, 7 και 14 ημέρες μετά τη χορήγηση (n= 5-6 πειραματοζώα/ομάδα). Τα επίπεδα των συγκεκριμένων παραγόντων εκφράστηκαν σε μg ανά gr νωπού ιστού. Τα δεδομένα εκφράζονται ως Μέση Τιμή ± SEM και συγκρίνονται με one-way ANOVA, συνδυαζόμενη με post hoc δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni (***) p < 0.001).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ενεργοποίηση των TGFβ και BMP κλάδων στα ίδια χρονικά σημεία, μέσω ανίχνευσης των επιπέδων φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών Smad3 και Smad1/5/8, αντίστοιχα, στο ραβδωτό σώμα και την κοιλιακή μοίρα του μεσεγκεφάλου. Η ενεργοποίηση του BMP κλάδου πιθανότατα προηγείται της TGFβ-επαγόμενης σηματοδότησης και στις δύο εγκεφαλικές περιοχές, εφόσον παρατηρήθηκε αυξημένη φωσφορυλίωση των Smad1/5/8 ήδη από την 4^η ημέρα μετά τη χορήγηση MPTP, η οποία διατηρήθηκε και την 7^η ημέρα, ενώ τη 14^η ημέρα σημειώθηκε μία τάση

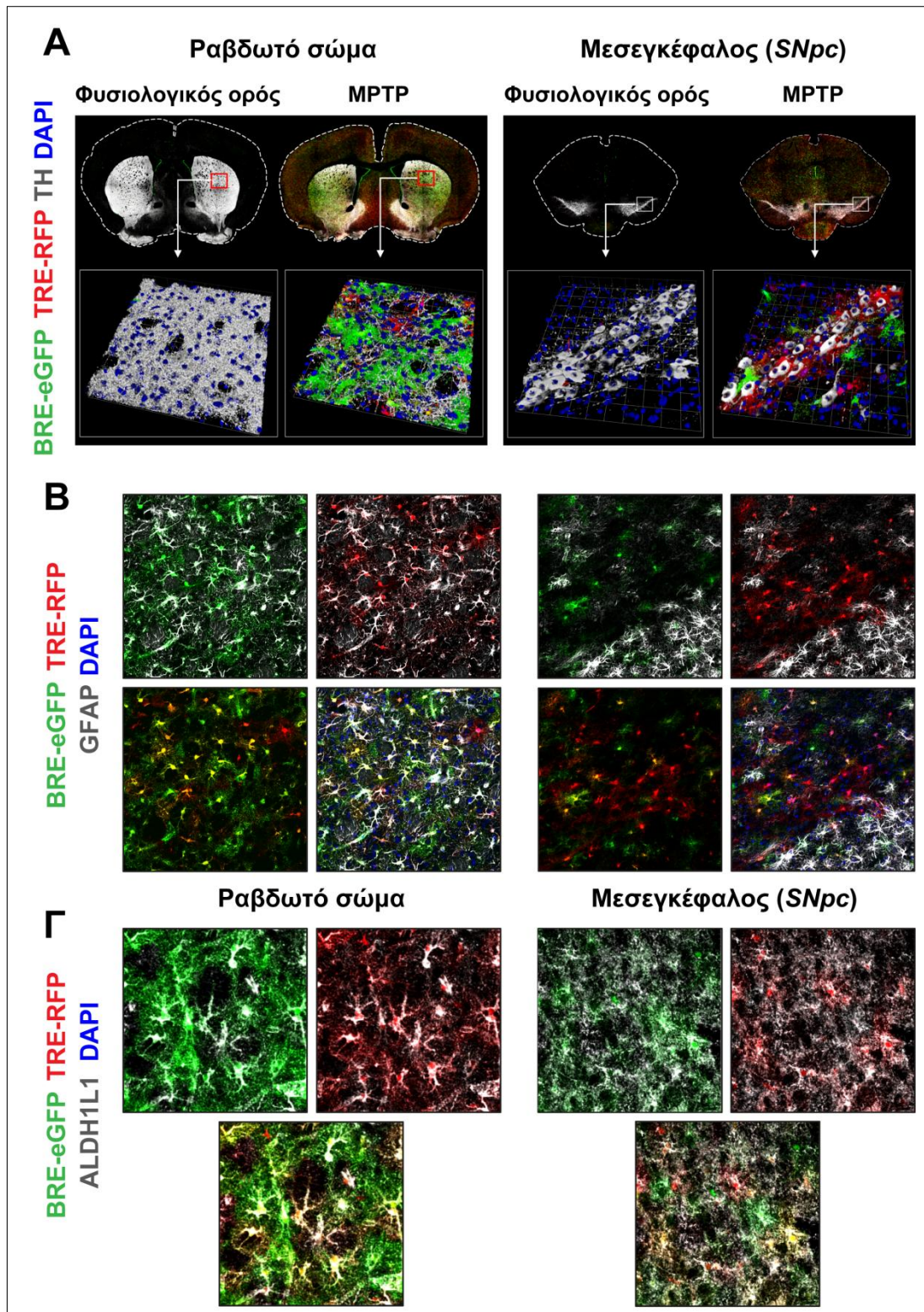
επαναφοράς στα βασικά επίπεδα φωσφορυλίωσης (**Εικόνα 36**). Από την άλλη πλευρά, η αύξηση στη φωσφορυλίωση της Smad3 παρατηρήθηκε αργότερα κατά την 7^η ημέρα μετά τη χορήγηση της νευροτοξίνης, φτάνοντας στο μέγιστο την 7^η ημέρα στο ραβδωτό σώμα και τη 14^η ημέρα στην κοιλιακή μοίρα του μεσεγκεφάλου. Επομένως, καθίσταται σαφές ότι η χορήγηση MPTP οδηγεί σε ενεργοποίηση τόσο του TGFβ όσο και του BMP του BMP σηματοδοτικού κλάδου κατά μήκος της μελαινораβδωτής οδού, με βάση ένα χρονοεξαρτώμενο πρότυπο.

Προκειμένου να επαληθευθεί περαιτέρω η ενεργοποίηση του συστήματος σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ κατά τον εκφυλισμό του ντοπαμινεργικού συστήματος, εφαρμόστηκε εκ νέου το οξύ μοντέλο χορήγησης της MPTP σε διπλά διαγονιδιακούς μύες αναφοράς TRE-RFP/BRE-eGFP. Έτσι, δείχθηκε σημαντική ενεργοποίηση και των δύο διαγονιδίων κατά μήκος της μελαινораβδωτής οδού, επτά ημέρες μετά τη χορήγηση της νευροτοξίνης (**Εικόνα 37A**). Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις έναντι της υδροξυλάσης της τυροσίνης (TH) – αντιπροσωπευτικού δείκτη των ντοπαμινεργικών νευρώνων – έδειξε ότι τα TRE-RFP⁺ και BRE-eGFP⁺ κύτταρα γειτνιάζαν με TH⁺ νευρωνικά σώματα στη *SNpc* και TH⁺ νευράξονες στο ραβδωτό σώμα. Μάλιστα, η ενεργοποίηση του διαγονιδίου BRE-eGFP φαίνεται να επικρατούσε στην περιοχή του ραβδωτού σώματος, ενώ η ενεργοποίηση του διαγονιδίου TRE-RFP στη μέλαινα ουσία. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως αντανακλά διαφορετικές διαδικασίες που ρυθμίζονται από το σύστημα σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ στις δύο περιοχές που σχετίζονται με τη ΝΠ, τουλάχιστον στο χρονικό σημείο των επτά ημερών. Βέβαια, παρόλο που το πρότυπο ενεργοποίησης των διαγονιδίων ήταν παρόμοιο μεταξύ των πειραματοζώων όπου χορηγήθηκε MPTP, η έκταση που κάλυπταν τα TRE-RFP⁺ και BRE-eGFP⁺ κύτταρα παρουσίαζε διακυμάνσεις, γεγονός που πιθανότατα σχετίζεται με ενδογενείς ή/και εξωγενείς παράγοντες που υπεισέρχονται στο χρησιμοποιούμενο μοντέλο και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι τα BRE-eGFP⁺ ή/και τα TRE-RFP⁺ κύτταρα που εντοπίστηκαν στο ραβδωτό σώμα ταυτοποιήθηκαν ως συμβατικά GFAP⁺/ALDH1L1⁺ αστροκύτταρα (**Εικόνα 37B**), ενώ τα TRE-RFP⁺ κύτταρα που διηθούσαν τη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας (*SNpc*) ταυτοποιήθηκαν ως μη συμβατικά GFAP⁻/ALDH1L1⁺ αστροκύτταρα (**Εικόνα 37Γ**).



Εικόνα 36. Αυξημένη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Smad στο ραβδωτό σώμα και στην κοιλιακή μοίρα του μεσεγκεφάλου, έπειτα από χορήγηση της νευροτοξίνης MPTP. Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα κατά Western και ημιοσοτική εκτίμηση των επιπέδων των pSmad1/5/8 και pSmad3 σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ραβδωτού σώματος (**A**) και κοιλιακής μοίρας μεσεγκεφάλου (**B**) 4, 7 και 14 ημέρες μετά τη χορήγηση MPTP ή φυσιολογικού ορού (ομάδα αναφοράς). Τα ζώα που έλαβαν φυσιολογικό ορό θυσιάστηκαν στις 7 και 14 ημέρες μετά τη χορήγηση. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισοποίησης φόρτωσης των δειγμάτων (n= 5-7 πειραματόζωα/ομάδα). Τα δεδομένα εκφράζονται ως Μέση Τιμή ± SEM και συγκρίνονται με one-way ANOVA, συνδυαζόμενη με post hoc δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni (* p <0.05 και ** p <0.01) ή Newman-Keuls (# p <0.05).



Εικόνα 37. Ενεργοποίηση των διαγονιδίων BRE-eGFP ή/και TRE-RFP σε αστροκύτταρα κατά μήκος της μελαινοραβδωτής οδού, επτά ημέρες μετά τη χορήγηση της νευροτοξίνης MPTP. (A) Πανοραμικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας έναντι της TH (ντοπαμινεργικοί νευρώνες, λευκό χρώμα) και των διαγονιδίων BRE-eGFP (πράσινο χρώμα) και TRE-RFP (κόκκινο χρώμα) σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλου, στο επίπεδο του ραβδωτού σώματος (αριστερά) και της μέλαινας ουσίας (*SNrc*, δεξιά), επτά ημέρες μετά τη χορήγηση MPTP ή φυσιολογικού ορού (ομάδα αναφοράς). Στο κάτω μέρος παρατίθενται σε μεγέθυνση, ύστερα από τρισδιάστατη ανασύσταση (Volocity), χαρακτηριστικές περιοχές που καταδεικνύουν την επικράτηση των διαγονιδίων BRE-eGFP και TRE-RFP στο ραβδωτό σώμα και τη *SNrc*,

αντίστοιχα, έπειτα από χορήγηση MPTP. **(B, Γ)** Εικόνες ανοσοφθορισμού μονού επιπέδου που δείχνουν την έκφραση των BRE-eGFP (πράσινο χρώμα), TRE-RFP (κόκκινο χρώμα) και των αστροκυτταρικών δεικτών GFAP **(B, λευκό χρώμα)** ή ALDH1L1 **(Γ, λευκό χρώμα)**, στο επίπεδο του ραβδωτού σώματος (αριστερά) και της μέλαινας ουσίας (*SNpc*, δεξιά), επτά ημέρες μετά τη χορήγηση MPTP. Το DAPI (μπλε χρώμα) χρησιμοποιήθηκε για χρώση των πυρήνων.

5.7. Διερεύνηση πιθανού νευροπροστατευτικού ρόλου του BMP σηματοδοτικού κλάδου στο βιοχημικό εκφυλισμό του ντοπαμινεργικού συστήματος

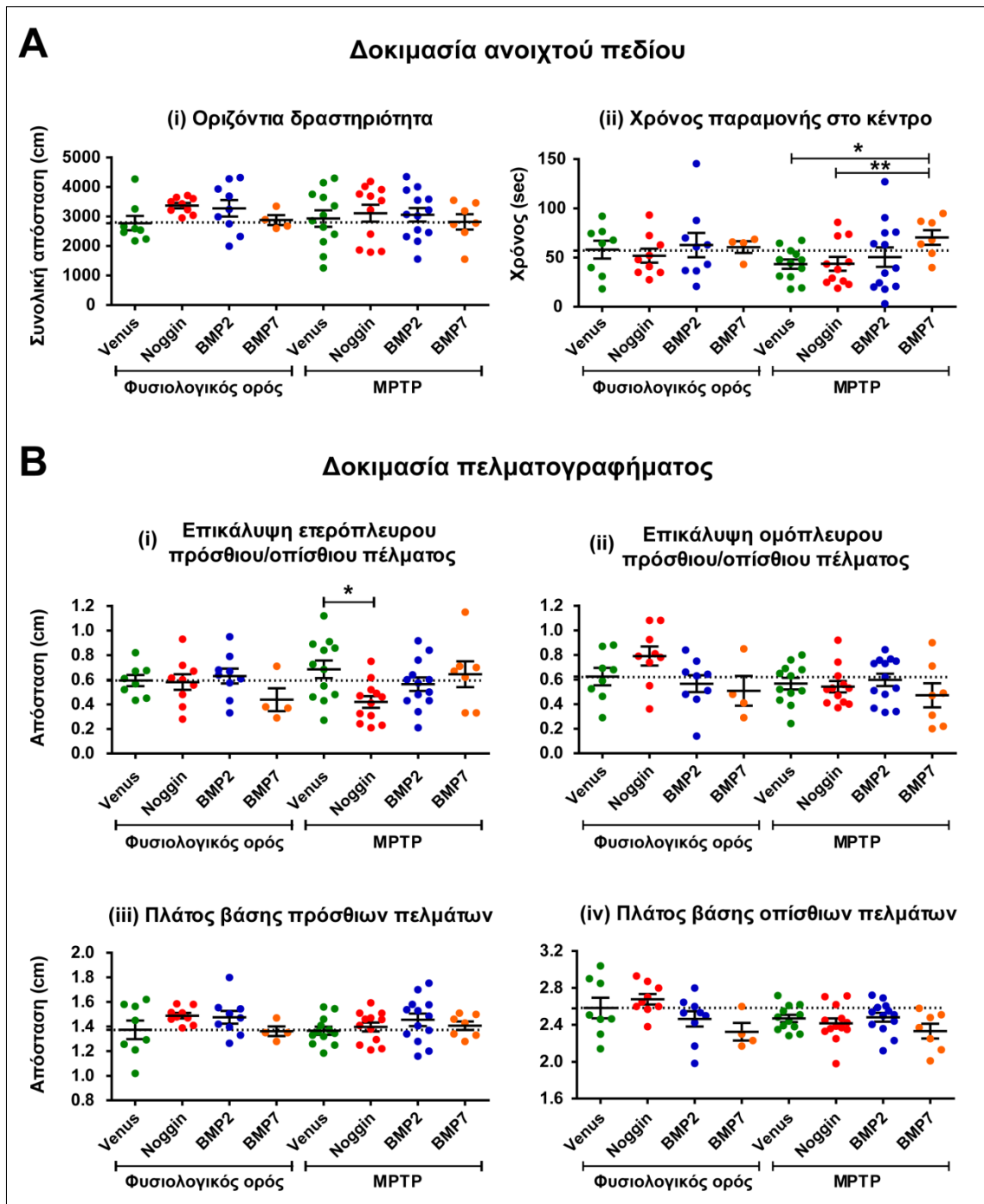
Σύμφωνα με όσα έχουν ήδη περιγραφεί, η ενεργοποίηση των TGFβ- και BMP-επαγόμενων σηματοδοτικών κλάδων στα αστροκύτταρα που εντοπίζονται στο εκφυλιζόμενο ντοπαμινεργικό σύστημα ακολουθεί πιθανότατα τη λογική της ενεργοποίησης των ίδιων μονοπατιών στα δραστικά αστροκύτταρα που καταλαμβάνουν την περιοχή του τραύματος έπειτα από εστιακή ΚΕΚ. Κατά συνέπεια, η μελέτη του μεταγραφώματος των *in vitro* διεγερμένων αστροκυττάρων παρουσία TGFβ1 ή BMP4, που περιγράφηκε προηγούμενα, θα μπορούσε να χρησιμεύσει ιδιαίτερα στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων που αφορούν όχι μόνο στον πειραματικό μηχανικό εγκεφαλικό τραυματισμό αλλά και στο βιοχημικό τραυματισμό του εγκεφάλου, έπειτα από χορήγηση MPTP.

Ενώ τα παραπάνω ευρήματα χρήζουν περαιτέρω ανάλυσης, θελήσαμε παράλληλα να εξετάσουμε τον πιθανό νευροπροστατευτικό ή νευροτοξικό ρόλο της BMP σηματοδότησης στο μοντέλο της οξείας χορήγησης MPTP, μέσω στερεοτακτικής υπερέκφρασης ενεργοποιητών ή αναστολέων του συγκεκριμένου κλάδου στον εγκέφαλο ενήλικων μυών αγρίου τύπου, πριν τον εκφυλισμό του ντοπαμινεργικού συστήματος. Έτσι, πραγματοποιήθηκε μία σειρά μονόπλευρων στερεοτακτικών εγχύσεων των ακόλουθων αδeno-σχετιζόμενων ιικών φορέων στη δεξιά μέλαινα ουσία: rAAV2/2-CAG-**Venus** (ως ιός αναφοράς), rAAV1/2-CAG-**Noggin**-2A-Venus (για υπερέκφραση της *Noggin*, ως αντιπροσωπευτικού αναστολέα της BMP σηματοδότησης), rAAV1/2-CAG-**BMP2**-2A-Venus και rAAV1/2-CAG-**BMP7**-2A-Venus (για υπερέκφραση των BMP2 ή BMP7, ως αντιπροσωπευτικών προσδετών του BMP κλάδου) (Heinonen et al., 2014). Οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος (*Noggin*, BMP2 και BMP7) φέρουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο την πρωτεΐνη αναφοράς Venus. Ακολούθως, δύο εβδομάδες μετά τη στερεοτακτική έγχυση των ιικών φορέων, τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν στο οξύ μοντέλο χορήγησης MPTP.

Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε μία σειρά συμπεριφορικών δοκιμασιών για την αξιολόγηση της κινητικής δραστηριότητας και του προτύπου βάρδισης των πειραματοζώων, έξι ημέρες μετά τη χορήγηση MPTP. Αρχικά, μελετήθηκε η αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα μέσω της δοκιμασίας ανοιχτού πεδίου, όπου η συνολική απόσταση που διανύθηκε σε διάστημα 10 λεπτών και ο χρόνος παραμονής στο κέντρο της αρένας χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες της οριζόντιας δραστηριότητας και της αγχώδους συμπεριφοράς, αντίστοιχα. Έτσι, διαπιστώθηκαν παρόμοια επίπεδα οριζόντιας δραστηριότητας μεταξύ των διαφορετικών πειραματικών ομάδων (**Εικόνα 38Ai**). Ακόμη, παρατηρήθηκε μία τάση μειωμένου χρόνου παραμονής στο κέντρο της αρένας και άρα αυξημένη αγχώδης συμπεριφορά στις πειραματικές ομάδες που έλαβαν MPTP, με εξαίρεση τα πειραματοζώα στα οποία είχε προηγηθεί υπερέκφραση της BMP7 (μειωμένη αγχώδης συμπεριφορά, **Εικόνα 38Aii**).

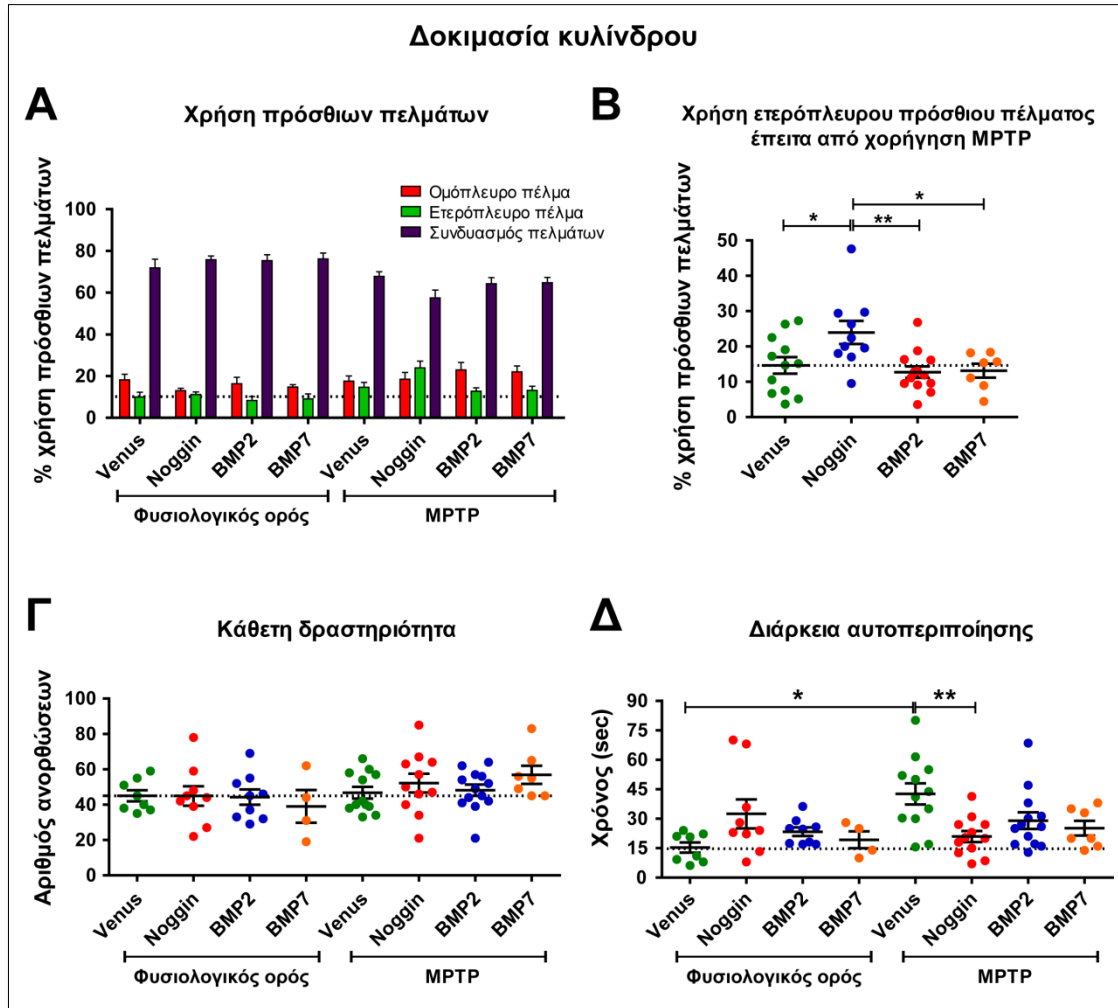
Επιπλέον, αναλύθηκαν χαρακτηριστικές παράμετροι της βάρδισης μέσω της δοκιμασίας πελματογραφήματος, κατά την οποία σημειώθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στην επικάλυψη του ετερόπλευρου πρόσθιου/οπίσθιου πέλματος στα ζώα όπου έγινε υπερέκφραση της Noggin πριν τη χορήγηση MPTP (**Εικόνα 38Bi**), υποδεικνύοντας μία σχετική βελτίωση του προτύπου βάρδισης συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην επικάλυψη του ομόπλευρου πρόσθιου/οπίσθιου πέλματος (**Εικόνα 38Bii**), ούτε στο πλάτος βάσης των πρόσθιων (**Εικόνα 38Biii**) ή οπίσθιων πελμάτων (**Εικόνα 38Biv**), ούτε στο μήκος διασκελισμού των πρόσθιων ή οπίσθιων άκρων, μεταξύ των διαφορετικών ομάδων.

Βέβαια, οι πιο σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στη δοκιμασία κυλίνδρου, κατά την οποία μελετήθηκε η ασυμμετρία στη χρήση των πρόσθιων πελμάτων. Έτσι, δείχθηκε ότι τα ζώα στα οποία έγινε υπερέκφραση της Noggin, πριν από τη χορήγηση MPTP, χρησιμοποιούσαν περισσότερο το ετερόπλευρο πρόσθιο πέλμα για να στηριχθούν στο τοίχωμα του κυλίνδρου κατά την ανόρθωσή τους (24% έναντι 12-14% των υπόλοιπων ομάδων που έλαβαν τη νευροτοξίνη, **Εικόνα 39A, B**), υποδεικνύοντας ότι η υπερέκφραση της Noggin πιθανότατα παρέχει μερική προστατευτική δράση στην ομόπλευρη μελαινοραβδωτή οδό κατά τη χορήγηση MPTP. Να σημειωθεί ότι η προτιμώμενη χρήση του ετερόπλευρου πρόσθιου πέλματος είναι ενδεικτική ενός βελτιωμένου φαινοτύπου που συνοδεύει μια πρωθύστερη προστατευτική παρέμβαση στο ομόπλευρο εγκεφαλικό ημισφαίριο.



Εικόνα 38. Αξιολόγηση της κινητικής δραστηριότητας των πειραματόζων μέσω των δοκιμασιών ανοιχτού πεδίου και πελματογραφήματος, έπειτα από υπερέκφραση των πρωτεϊνών Venus, Noggin, BMP2 και BMP7 στη μέλαινα ουσία και επακόλουθη χορήγηση MPTP ή φυσιολογικού ορού. (A) Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου: απεικονίζονται η οριζόντια δραστηριότητα (i) ως η συνολική απόσταση (σε cm) που διήνυσαν τα πειραματόζωα σε διάστημα 10 λεπτών και ο χρόνος παραμονής στο κέντρο της αρένας (ii) (σε sec), ως δείκτης αγχώδους συμπεριφοράς. Με εξαίρεση τα ζώα όπου υπερεκφράστηκε η BMP7, παρατηρήθηκε τάση μειωμένου χρόνου παραμονής στο κέντρο στις πειραματικές ομάδες που έλαβαν MPTP. Τα δεδομένα εκφράζονται ως Μέση Τιμή \pm Τυπικό Σφάλμα της Μέσης Τιμής (SEM) και συγκρίνονται με μη κατά ζεύγη δοκιμασία t δύο άκρων (two-tailed unpaired t-test, * $p < 0.05$ και ** $p < 0.01$). (B) Δοκιμασία πελματογραφήματος: απεικονίζονται το πλάτος βάσης των πρόσθιων (i) και των οπίσθιων πελμάτων (ii), υπολογισμένο ως η μέση απόσταση (σε cm) ανάμεσα στα δεξιά και τα αριστερά αποτυπώματα και η επικάλυψη του ετερόπλευρου (iii) και του ομόπλευρου (iv) πρόσθιου/οπίσθιου πέλματος (σε cm). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στην επικάλυψη του ετερόπλευρου

πρόσθιου/οπίσθιου πέλματος στα πειραματόζωα όπου έγινε υπερέκφραση της Noggin, συγκριτικά με εκείνα όπου υπερέκφράστηκε η πρωτεΐνη αναφοράς Venus, πριν από τη χορήγηση MPTP, ενώ δε σημειώθηκαν σημαντικές μεταβολές στην επικάλυψη του ομόπλευρου πρόσθιου/οπίσθιου πέλματος μεταξύ των διαφορετικών ομάδων. Τα δεδομένα εκφράζονται ως Μέση Τιμή ± SEM και συγκρίνονται με one-way ANOVA, συνδυαζόμενη με post hoc δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni (* $p < 0.05$).



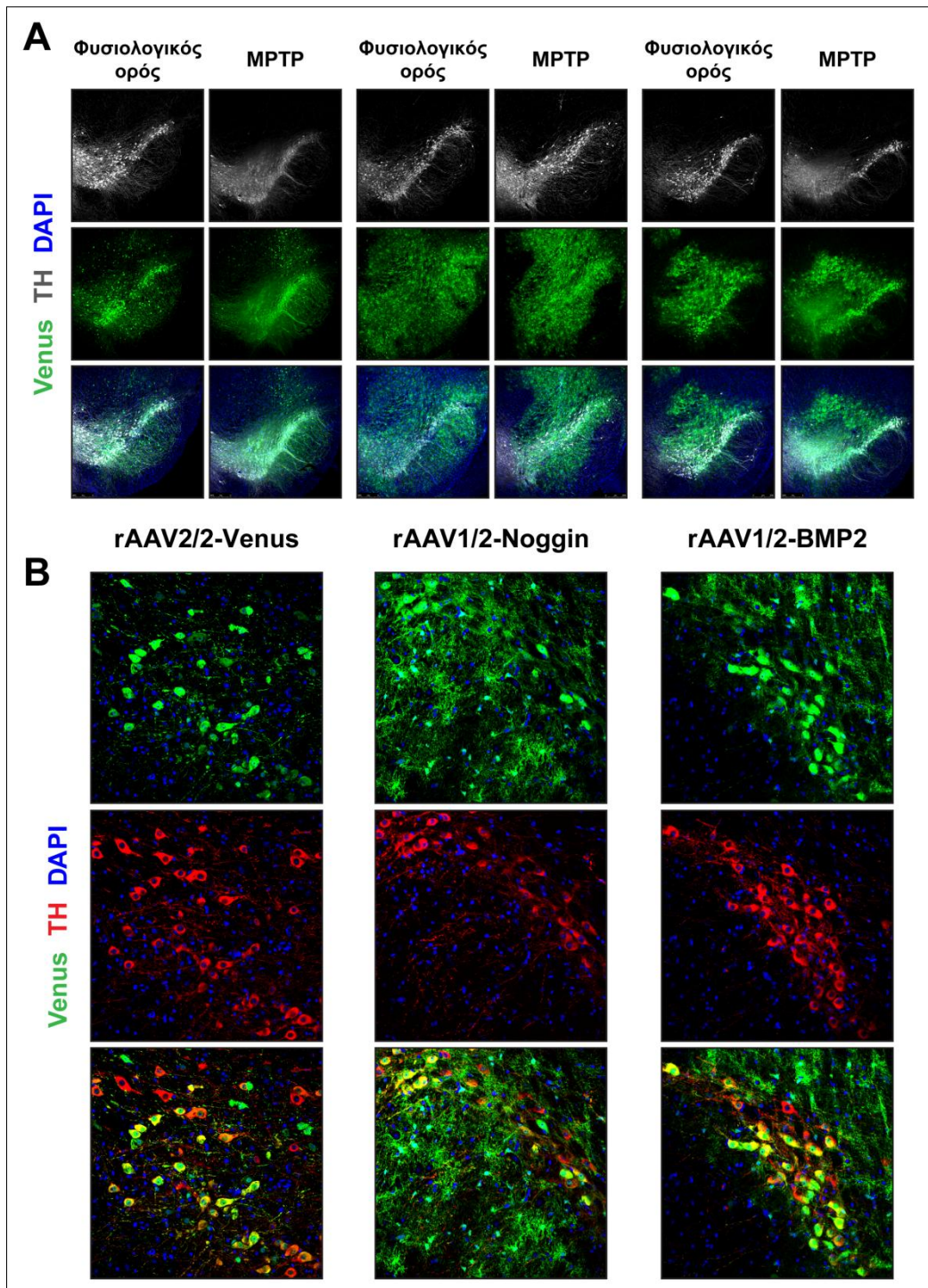
Εικόνα 39. Μερική βελτίωση συμπεριφορικών παραμέτρων της δοκιμασίας κυλίνδρου, έπειτα από υπερέκφραση της Noggin στη μέλαινα ουσία ενήλικων πειραματοζώων, ακολουθούμενη από χορήγηση MPTP. Απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ασυμμετρίας στη χρήση των πρόσθιων πελμάτων (A, B), καθώς και η κάθετη δραστηριότητα, εκφρασμένη ως αριθμός ανορθώσεων (Γ), και η διάρκεια αυτοπεριποίησης (σε sec) (Δ), ως δείκτες στερεοτυπικής συμπεριφοράς των πειραματοζώων. Τα ζώα όπου έγινε υπερέκφραση της Noggin χρησιμοποιούσαν περισσότερο το ετερόπλευρο πρόσθιο πέλμα για στήριξη κατά την ανόρθωσή τους, συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες στις οποίες χορηγήθηκε MPTP. Δε σημειώθηκε μεταβολή στον αριθμό των ολικών ανορθώσεων μεταξύ των πειραματικών ομάδων, ενώ τα ζώα στα οποία είχε προηγηθεί της χορήγησης MPTP η υπερέκφραση των πρωτεϊνών Noggin, BMP2 και BMP7 χαρακτηρίζονταν από μικρότερη διάρκεια αυτοπεριποίησης, συγκριτικά με τα ζώα όπου υπερέκφράστηκε η πρωτεΐνη αναφοράς Venus. Τα δεδομένα εκφράζονται ως Μέση Τιμή ± SEM και συγκρίνονται με one-way ANOVA, συνδυαζόμενη με post hoc δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Στην ανάλυση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας κυλίνδρου συμπεριλήφθηκαν ο αριθμός των ανορθώσεων (κάθετη δραστηριότητα) και η διάρκεια αυτοπεριποίησης (grooming time), ως δείκτες στερεοτυπικής συμπεριφοράς. Παρόλο που δεν

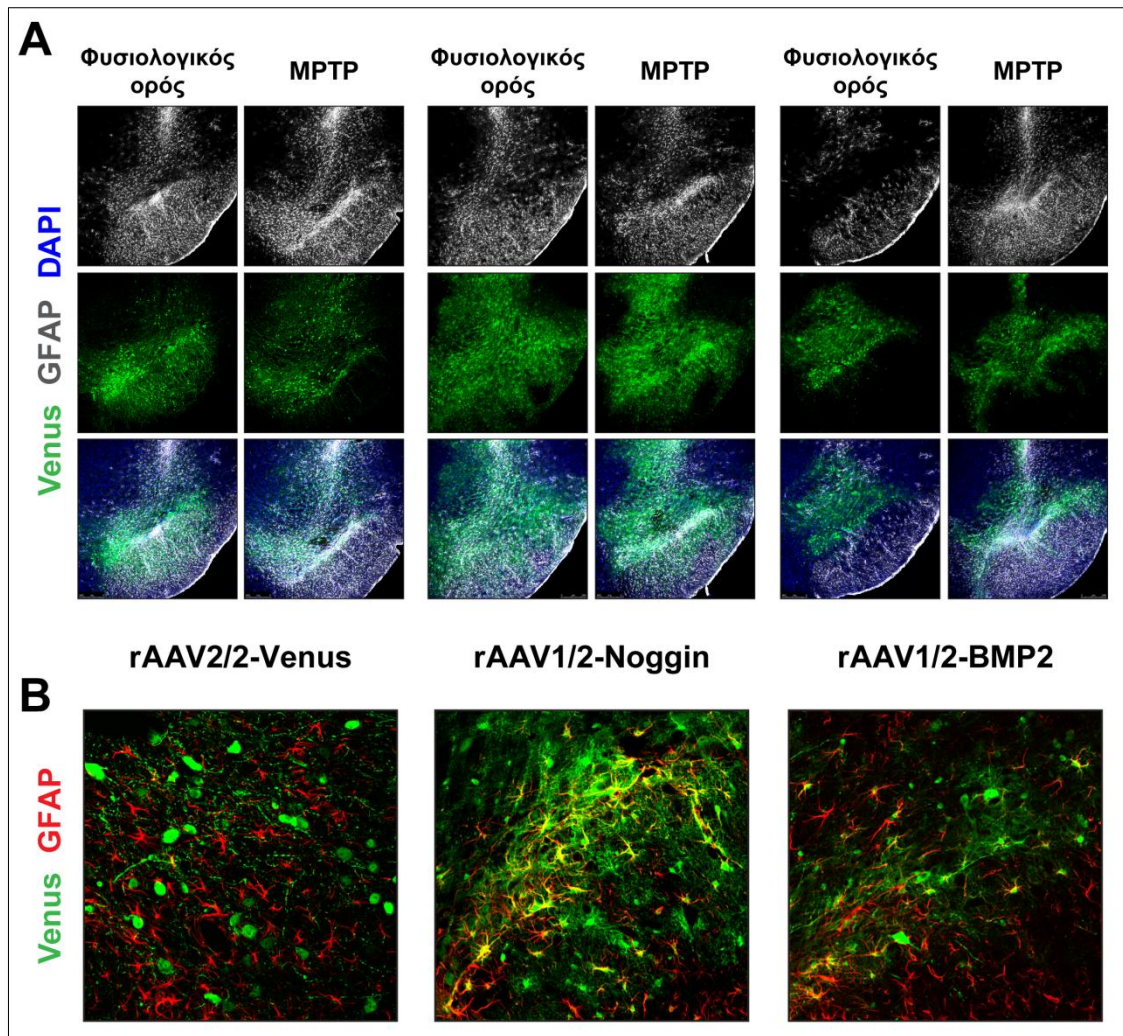
παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στον ολικό αριθμό των ανορθώσεων (**Εικόνα 39Γ**), τα πειραματόζωα στα οποία είχε προηγηθεί της χορήγησης MPTP η υπερέκφραση των πρωτεϊνών Noggin, BMP2 και BMP7 παρουσίασαν μικρότερη διάρκεια αυτοπεριποίησης συγκριτικά με τα πειραματόζωα αναφοράς (rAAV-Venus/MPTP) (**Εικόνα 39Δ**), δηλαδή επέδειξαν μειωμένη στερεοτυπική συμπεριφορά, παρόμοια με εκείνη των ζώων στα οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός. Μάλιστα, στα ζώα όπου έγινε υπερέκφραση της Noggin, η μειωμένη διάρκεια αυτοπεριποίησης ήταν στατιστικά σημαντική συγκριτικά με την ομάδα αναφοράς.

Αφότου ολοκληρώθηκαν οι συμπεριφορικές δοκιμασίες, όλα τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν την 7^η ημέρα μετά τη χορήγηση MPTP και ακολούθησε επεξεργασία των εγκεφάλων είτε για ιστολογική είτε για βιοχημική ανάλυση. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν χρώσεις ανοσοφθορισμού σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλου που εμπεριείχαν το ραβδωτό σώμα και τη μέλαινα ουσία, έναντι των πρωτεϊνών Venus, TH και GFAP για τον εντοπισμό των υπερεκφραζόμενων πρωτεϊνών, των ντοπαμινεργικών νευρώνων και των αστροκυττάρων, αντιστοίχως. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 40Α**, παρατηρήθηκε μια έντονη και επαναλαμβανόμενη έκφραση της πρωτεΐνης αναφοράς Venus στην ομόπλευρη κοιλιακή μοίρα του μεσεγκεφάλου όλων των πειραματικών ομάδων, που συνοδευόταν από μία μαζική επιμόλυνση των TH⁺ νευρώνων της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας (SNpc), όπως προκύπτει από φωτογραφίες μεγαλύτερης μεγέθυνσης (**Εικόνα 40Β**). Η συγκεκριμένη μελέτη θα συμπληρωθεί μελλοντικά με την ανάλυση ιστών προερχόμενων από ζώα όπου διεξήχθη υπερέκφραση της BMP7.

Βέβαια, ενώ η πρωτεΐνη Venus υπερεκφράστηκε αποκλειστικά σε κύτταρα νευρωνικού φαινοτύπου στα πειραματόζωα όπου εγχύθηκε ο ιός αναφοράς rAAV-Venus, παρατηρήσαμε ότι εκτός των νευρώνων υπερεκφράστηκε και σε κύτταρα με μορφολογία γλοίας, πιθανότατα αστροκυτταρικού φαινοτύπου, στις ομάδες rAAV-Noggin και rAAV-BMP2. Έτσι, ακολούθησε χαρακτηρισμός των συγκεκριμένων κυττάρων, μέσω ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι της GFAP, κατά την οποία παρατηρήθηκε παρόμοιο πρότυπο αστρογλοίωσης στην κοιλιακή μοίρα του μεσεγκεφάλου όλων των πειραματικών ομάδων (**Εικόνα 41Α**). Μάλιστα, σημειώθηκε μια πιο έντονη GFAP⁺ χρώση γύρω από την οδό διέλευσης του τριχοειδούς που χρησιμοποιήθηκε για την έγχυση των ιών, καθώς και στην περιοχή της SNpc, ειδικά μετά τη χορήγηση MPTP.



Εικόνα 40. Αποτελεσματική επιμόλυνση των ντοπαμινεργικών νευρώνων της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας, έπειτα από στερεοτακτική έγχυση των αδeno-σχετιζόμενων ικών φορέων rAAV2/2-Venus, rAAV1/2-Noggin-2A-Venus και rAAV1/2-BMP2-2A-Venus. **(A)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας που δείχνουν την έντονη έκφραση της πρωτεΐνης αναφοράς Venus στην ομόπλευρη κοιλιακή μοίρα του μεσεγκεφάλου ενήλικων μυών, ~21 ημέρες μετά την έγχυση των αδeno-σχετιζόμενων ικών φορέων και 7 ημέρες μετά τη χορήγηση φυσιολογικού ορού (αριστερά) ή MPTP (δεξιά). Πραγματοποιήθηκε χρώση έναντι των πρωτεϊνών Venus (πράσινο χρώμα) και TH (ντοπαμινεργικοί νευρώνες, λευκό χρώμα). **(B)** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας μεγάλης μεγέθυνσης στο επίπεδο της ομόπλευρης SNpc ενήλικων μυών, ~21 ημέρες μετά την έγχυση των αδeno-σχετιζόμενων ικών φορέων και 7 ημέρες μετά τη χορήγηση φυσιολογικού ορού. Με κίτρινο χρώμα διακρίνονται οι επιμολυσμένοι ντοπαμινεργικοί νευρώνες που συνεκφράζουν τις πρωτεΐνες Venus (πράσινο χρώμα) και TH (κόκκινο χρώμα). Για τη χρώση των πυρήνων χρησιμοποιήθηκε DAPI (μπλε χρώμα).

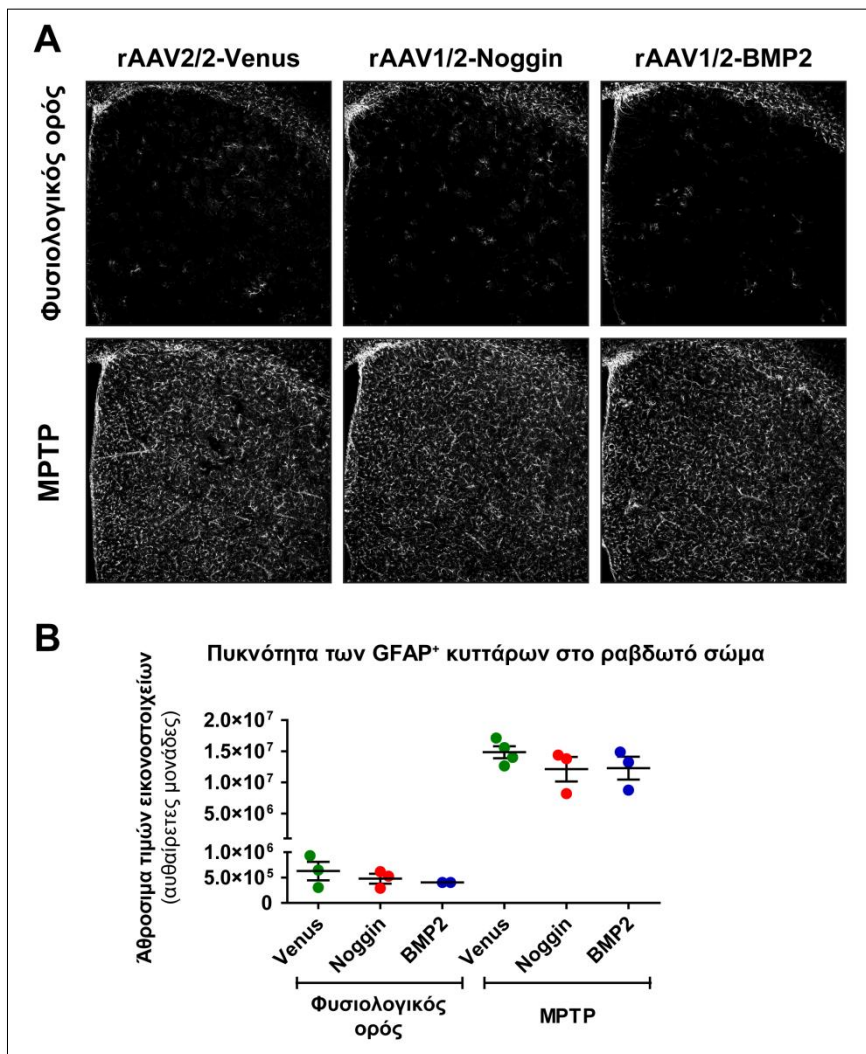


Εικόνα 41. Ανίχνευση των GFAP⁺ αστροκυττάρων στην κοιλιακή μοίρα του μεσεγκεφάλου, έπειτα από στερεοτακτική έγχυση των αδeno-σχετιζόμενων ικών φορέων rAAV2/2-CAG-Venus, rAAV1/2-CAG-Noggin-2A-Venus και rAAV1/2-CAG-BMP2-2A-Venus και επακόλουθη χορήγηση MPTP ή φυσιολογικού ορού. **(A)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας στο επίπεδο της ομόπλευρης κοιλιακής μοίρας του μεσεγκεφάλου ενήλικων μυών, ~21 ημέρες μετά την έγχυση των αδeno-σχετιζόμενων ικών φορέων και 7 ημέρες μετά τη χορήγηση φυσιολογικού ορού (αριστερά) ή MPTP (δεξιά). Πραγματοποιήθηκε χρώση έναντι των πρωτεϊνών Venus (πράσινο χρώμα) και GFAP (αστροκύτταρα, λευκό χρώμα). Για χρώση των πυρήνων χρησιμοποιήθηκε DAPI (μπλε χρώμα). **(B)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας υψηλής μεγέθυνσης και μονού επιπέδου, όπου φαίνεται ο συνεντοπισμός της πρωτεΐνης Venus (πράσινο χρώμα) με τον αστροκυτταρικό δείκτη GFAP (κόκκινο χρώμα) σε κύτταρα της μέλαινας ουσίας πειραματοζώων όπου εγχύθηκαν οι rAAV-Noggin και rAAV-BMP2.

Αναφορικά με τις πειραματικές ομάδες των rAAV-Noggin και rAAV-BMP2, πολλά κύτταρα συνέκφραζαν τις πρωτεΐνες Venus και GFAP, εύρημα που υποδεικνύει την αστροκυτταρική φύση τους (**Εικόνα 41B**). Ο εντοπισμός αστροκυττάρων που υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη Venus μόνο στις ομάδες rAAV-Noggin και rAAV-BMP2 και όχι στα πειραματόζωα αναφοράς, όπου εγχύθηκε ο ιός rAAV-Venus, σχετίζεται πιθανότατα είτε με την εκκρινόμενη φύση και τη βιολογική λειτουργία των υπερέκφραζόμενων πρωτεϊνών είτε απλούστερα με το διαφορετικό υπότυπο των

χρησιμοποιούμενων αδeno-σχετιζόμενων ιικών φορέων (rAAV1/2 και rAAV2/2 αντίστοιχα).

Στη συνέχεια, προκειμένου να αξιολογηθεί η αστρογλοίωση στο ομόπλευρο ραβδωτό σώμα, πραγματοποιήθηκε χρώση ανοσοφθορισμού έναντι της GFAP σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλου που εμπεριείχαν το ραβδωτό σώμα (Εικόνα 42A). Ακολούθησε μορφομετρική ανάλυση της πυκνότητας των GFAP⁺ κυττάρων, υπολογίζοντας το άθροισμα των τιμών των εικονοστοιχείων που καταλαμβάνουν (raw integrated density / sum of pixel values) στις προβολές εικόνων συνεστιακής μικροσκοπίας, με τη βοήθεια του λογισμικού ImageJ (Εικόνα 42B).



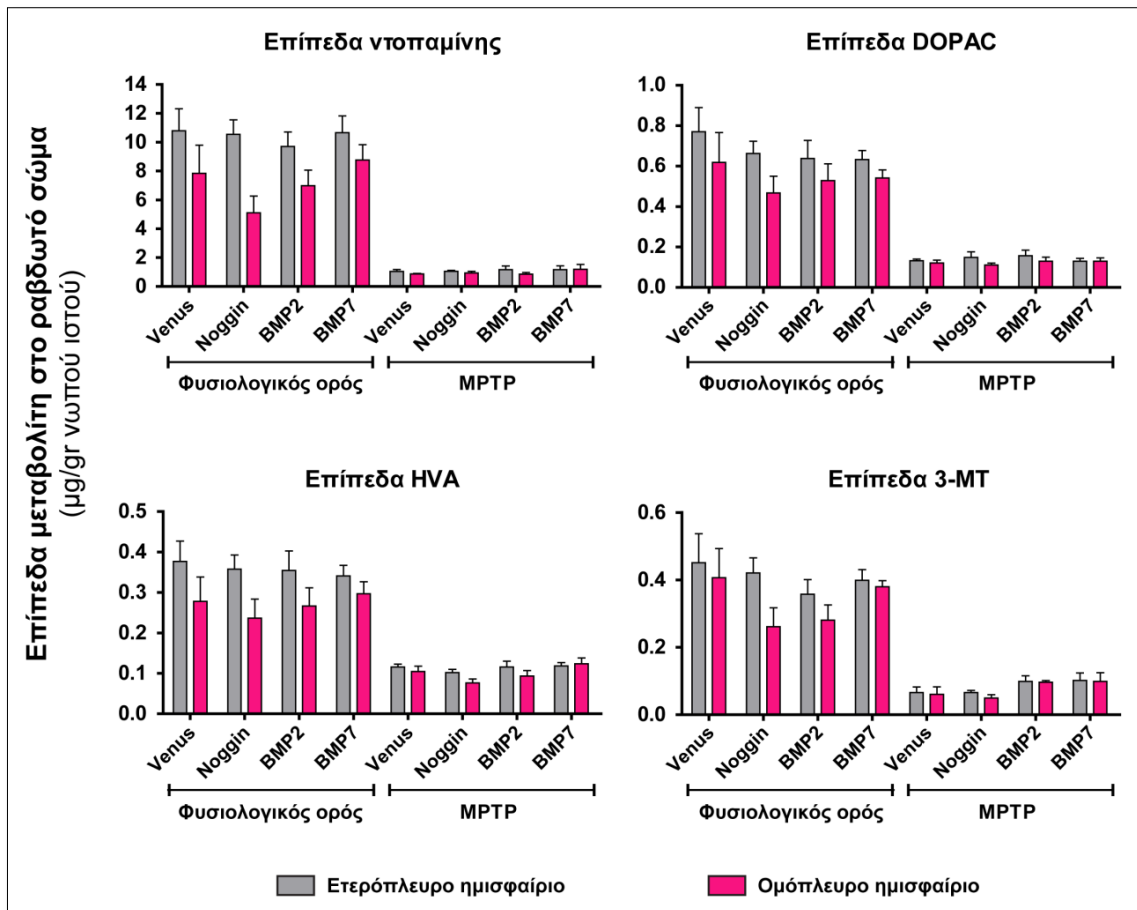
Εικόνα 42: Ανοσοϊστοχημική εντόπιση των GFAP⁺ αστροκυττάρων στο ομόπλευρο ραβδωτό σώμα, έπειτα από στερεοτακτική έγχυση των αδeno-σχετιζόμενων ιικών φορέων rAAV2/2-CAG-Venus, rAAV1/2-CAG-Noggin-2A-Venus και rAAV1/2-CAG-BMP2-2A-Venus και επακόλουθη χορήγηση MPTP ή φυσιολογικού ορού. (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας, έπειτα από χρώση έναντι της GFAP (λευκό χρώμα), στο επίπεδο του ομόπλευρου ραβδωτού σώματος ενήλικων μυών, ~21 ημέρες μετά την έγχυση των αδeno-σχετιζόμενων ιικών φορέων και 7 ημέρες μετά τη χορήγηση φυσιολογικού

ορού (επάνω σειρά) ή MPTP (κάτω σειρά). **(B)** Μορφομετρική ανάλυση της πυκνότητας των GFAP⁺ κυττάρων, όπου απεικονίζεται το άθροισμα των τιμών των εικονοστοιχείων που καταλαμβάνουν (raw integrated density / sum of pixel values) στις προβολές εικόνων συνεστιακής μικροσκοπίας από όλες τις πειραματικές ομάδες (n=2-4 πειραματόζωα/ομάδα).

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 42**, τα επίπεδα αστρογλοίωσης αυξήθηκαν σημαντικά μετά τη χορήγηση MPTP, και πιο συγκεκριμένα, η ένταση της GFAP χρώσης ήταν αυξημένη κατά ~30 φορές συγκριτικά με τα βασικά επίπεδα που παρατηρήθηκαν στα πειραματόζωα αναφοράς (φυσιολογικός ορός). Ωστόσο, δε σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές στον αριθμό των GFAP⁺ κυττάρων μεταξύ των πειραματικών ομάδων που έλαβαν MPTP, μετά τη στερεοτακτική έγχυση των rAAV-Venus, rAAV-Noggin ή rAAV-BMP2.

Τα αποτελέσματα της ιστολογικής ανάλυσης συμπληρώθηκαν με βιοχημική ανάλυση των επιπέδων της ντοπαμίνης και των μεταβολιτών της (DOPAC, HVA και 3-MT) στο ραβδωτό σώμα μέσω HPLC. Όπως ήταν αναμενόμενο τα επίπεδα και των τεσσάρων μονοαμινών ήταν σημαντικά ελαττωμένα στους ιστούς των πειραματοζώων όπου χορηγήθηκε MPTP, ωστόσο, η παρατηρούμενη μείωση ήταν παρόμοια σε όλες τις πειραματικές ομάδες (**Εικόνα 43**), υποδεικνύοντας ότι η υπερέκφραση παραγόντων της BMP σηματοδότησης στη μέλαινα ουσία δεν επηρεάζει άμεσα τα επίπεδα της ντοπαμίνης και των μεταβολιτών της στο ομόπλευρο ραβδωτό σώμα. Βέβαια, εάν η περιοχή της στερεοτακτικής επέμβασης ταυτιζόταν με την περιοχή ανάλυσης των μεταβολιτών της ντοπαμίνης, δηλαδή το ραβδωτό σώμα, ενδεχομένως να σημειώνονταν ουσιαστικές διαφορές μεταξύ των πειραματικών ομάδων.

Κατά συνέπεια, η επίδοση των πειραματοζώων στις συμπεριφορικές δοκιμασίες που περιγράφηκαν προηγουμένως φαίνεται πως δε σχετίζεται με μεταβολές στα επίπεδα της ντοπαμίνης ή των κύριων μεταβολιτών της στο πλαίσιο της «προληπτικής/θεραπευτικής» στρατηγικής που εφαρμόστηκε, τουλάχιστον στο χρονικό σημείο της συγκεκριμένης ανάλυσης. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα όλων των υπό μελέτη μορίων βρέθηκαν ελαφρώς ελαττωμένα στο ομόπλευρο σε σύγκριση με το αντίστοιχο ετερόπλευρο ραβδωτό σώμα στα ζώα όπου χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός, γεγονός που πιθανότατα σχετίζεται με τη φλεγμονώδη απόκριση που συνοδεύει τη στερεοτακτική επέμβαση στην ομόπλευρη μέλαινα ουσία.



Εικόνα 43. Βιοχημική ανάλυση των επιπέδων της ντοπαμίνης και των μεταβολιτών της στο ραβδωτό σώμα ενήλικων μυών έπειτα από υπερέκφραση των πρωτεϊνών Venus, Noggin, BMP2 και BMP7 στη μέλαινα ουσία και επακόλουθη χορήγηση MPTP ή φυσιολογικού ορού. Τα επίπεδα της ντοπαμίνης και των μεταβολιτών της DOPAC, HVA και 3-MT αναλύθηκαν μέσω HPLC στο ετερόπλευρο (γκρι ράβδοι) και το ομόπλευρο ραβδωτό σώμα (ροζ ράβδοι) ενήλικων μυών, ~21 ημέρες μετά την έγχυση των αδενοσχετιζόμενων ιικών φορέων και 7 ημέρες μετά τη χορήγηση φυσιολογικού ορού (ομάδα αναφοράς) ή MPTP. Τα δεδομένα εκφράζονται ως Μέση Τιμή ± Τυπικό Σφάλμα της Μέσης Τιμής (SEM) (n= 4 πειραματόζωα/ομάδα).

Μελλοντικός στόχος της παρούσας μελέτης είναι η ολοκλήρωση της ιστολογικής και βιοχημικής ανάλυσης των δειγμάτων που συλλέχθηκαν ή θα συλλεχθούν έπειτα από εφαρμογή της παραπάνω «προληπτικής/θεραπευτικής» στρατηγικής. Στην ανάλυση αυτή περιλαμβάνεται η εκτίμηση αφ' ενός της πυκνότητας των ντοπαμινεργικών απολήξεων στο ραβδωτό σώμα μέσω ανοσοϊστοχημείας και αφ' ετέρου της επιβίωσης των TH⁺ νευρώνων στη μέλαινα ουσία όλων των πειραματικών ομάδων μέσω στερεολογίας.

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πολυπλοκότητα του συστήματος σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ και της ρύθμισης αυτού επιτρέπει στις κυτταροκίνες/μέλη της υπεροικογένειας να ασκούν διαφορετικές αλλά και εξαρτώμενες από το περιβάλλον κυτταρικές δράσεις, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της ομοιόστασης, ενώ η δυσλειτουργία των σηματοδοτικών μηχανισμών συμβάλλει αναπόφευκτα στην εκδήλωση ποικίλων παθολογικών καταστάσεων. Για να αξιολογηθεί η συνεισφορά των TGFβ και BMP σηματοδοτικών κλάδων στην παθοφυσιολογία του ΚΝΣ, χρησιμοποιήθηκε αρχικά ένα μοντέλο πειραματικής εστιακής κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης και αναλύθηκε η έκφραση σημαντικών παραγόντων εντός των τραυματισμένων ιστών. Τα *in vivo* δεδομένα που προέκυψαν συμπληρώθηκαν και ενισχύθηκαν από την ανάλυση του γονιδιακού προφίλ αμιγών αστροκυττάρων και μικρογλοιακών κυττάρων διεγερμένων με TGFβ1 ή BMP4.

Η μελέτη μας κατέδειξε την ενεργοποίηση των TGFβ και BMP σηματοδοτικών μονοπατιών έπειτα από ΚΕΚ, εφόσον σημειώθηκε σημαντική αύξηση τόσο στα επίπεδα φωσφορυλίωσης των TGFβ- και BMP-σχετιζόμενων πρωτεϊνών Smad, όσο και στην mRNA έκφραση σχετικών προσδετών και γονιδίων-στόχων στην περιοχή βλάβης, τις πρώτες ημέρες μετά τον τραυματισμό (**Εικόνα 16Α-Δ**). Η ενεργοποίηση του TGFβ κλάδου έχει συσχετιστεί με πειραματικά μοντέλα ΚΕΚ σε προηγούμενες μελέτες και πιο συγκεκριμένα έχει δείχθει ότι το ινωδογόνο του πλάσματος που διαρρέει από τον κατεστραμμένο αιματοεγκεφαλικό φραγμό μπορεί να ενεργοποιήσει τη λανθάνουσα μορφή του TGFβ και να επάγει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Smad2 στα αστροκύτταρα (Schachtrup et al., 2010). Ωστόσο, η ενεργοποίηση του BMP σηματοδοτικού κλάδου στην περιοχή του τραύματος καταδεικνύεται με σαφήνεια για πρώτη φορά στην παρούσα διατριβή.

Χρησιμοποιώντας τους διπλά διαγονιδιακούς μύες αναφοράς TRE-RFP (Stavropoulos et al., σε διαδικασία υποβολής) και BRE-eGFP (Monteiro et al., 2004), δείχθηκε ότι η ενεργοποίηση τόσο της κανονικής TGFβ- όσο και της BMP-επαγόμενης σηματοδότησης περιορίζεται στα αστροκύτταρα που οριοθετούν την περιοχή μεταξύ υγιούς και τραυματισμένου εγκεφαλικού ιστού. Μάλιστα, το συγκεκριμένο μοτίβο ταιριάζει με την αυξημένη φωσφορυλίωση των Smad1/5/8 που έχει βρεθεί σε GFAP⁺ αστροκύτταρα της τραυματισμένης περιοχής σε ένα μοντέλο απομυελινωτικής κάκωσης

νωτιαίου μυελού αρουραίου (Fuller et al., 2007). Ο εντοπισμός κυττάρων που εξέφραζαν συγχρόνως και τα δύο διαγονίδια συνιστά εύρημα ιδιαίτερης σημασίας που διαφωτίζει τη μέχρι πρότινος άγνοια ή ασάφεια περί ταυτόχρονης ενεργοποίησης και των δύο σηματοδοτικών κλάδων της υπερικογένειας του TGFβ στο ίδιο κύτταρο.

Βέβαια, παρόλο που σημειώθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA του *Tgfb1* στην τραυματισμένη περιοχή, οι αντίστοιχες μεταβολές στα μετάγραφα των BMPs έπειτα από ΚΕΚ δεν ήταν τόσο έντονες (**Εικόνα 16Γ**). Αντ' αυτού, στην περιοχή του τραύματος παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης του ενδογενούς αναστολέα της BMP σηματοδότησης Noggin (**Εικόνες 16Δ, Ε και 18Γ**), υποδεικνύοντας ότι ο πυρήνας του τραύματος ευνοεί την ενεργοποίηση – τουλάχιστον – του BMP κλάδου, κυρίως μέσω διαμόρφωσης ενός μικροπεριβάλλοντος από το οποίο απουσιάζουν αναστολείς της σηματοδότησης. Σε προγενέστερες μελέτες πειραματικού διεισδυτικού τραυματισμού του εγκεφάλου ή του νωτιαίου μυελού, έχουν περιγραφεί αυξημένα επίπεδα BMP2/4, BMP7 και Noggin, με την τελευταία να εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά από δραστικά αστροκύτταρα στην περιοχή της βλάβης (Hampton et al., 2007). Από την άλλη πλευρά, σε ένα μοντέλο προσομοίωσης εγκεφαλικού επεισοδίου, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Noggin, κυρίως στην ενεργοποιημένη μικρογλοία, άρχισαν να αυξάνονται στις δύο εβδομάδες και αυξήθηκαν περαιτέρω τέσσερις εβδομάδες μετά την πρόκληση της βλάβης, μόνο στον ισχαιμικό υποφλοιό. Ωστόσο, η ένταση του σήματος της Noggin ήταν ιδιαίτερα χαμηλή σε σύγκριση με την ένταση των BMPs (Shin et al., 2012). Επιπλέον, με βάση προηγούμενες μελέτες σε διαγονιδιακά ζώα όπου η Noggin υπερέκφραζόταν συστηματικά σε νευρώνες, έχει αποδοθεί ένας προστατευτικός ρόλος στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη, έπειτα από επαγόμενη από ισχαιμία εγκεφαλική βλάβη (Samanta et al., 2010). Εντούτοις, αυτές οι μελέτες δε μπορούν να συσχετιστούν άμεσα με τα αποτελέσματα του χρησιμοποιούμενου μοντέλου εστιακής ΚΕΚ, δεδομένου ότι η υπερέκφραση της Noggin λαμβάνει χώρα καθ' όλη τη διάρκεια ζωής των πειραματοζώων, οδηγώντας πιθανότατα σε αναπροσαρμογή των ομοιοστατικών τους επιπέδων, όπως προκύπτει από την ιδιαίτερα υψηλή πυκνότητα μικρογλοιακών κυττάρων στον εγκέφαλο άθικτων πειραματοζώων (Samanta et al., 2010). Ακόμη, νευροπροστατευτική δράση παρουσίασε και η επιλεκτική απαλοιφή του υποδοχέα BMPR2 από τα NG2⁺ κύτταρα έπειτα από υποξικό/ισχαιμικό τραυματισμό, εφόσον παρατηρήθηκε γενικότερη προστασία του εγκεφάλου και παρεμποδίστηκε η απώλεια

ολιγοδενδροκυττάρων (Dettman et al., 2018). Κατά συνέπεια, η Noggin αναλαμβάνει πιθανότατα διακριτούς ρόλους κατά τις διαδικασίες σχηματισμού της νευρογλοιακής ουλής και της νευροαποκατάστασης, ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο πειραματικό μοντέλο, τον τρόπο και τη χρονική διάρκεια της εκάστοτε παρέμβασης.

Εκτός των κρανιοεγκεφαλικών κακώσεων, είναι γενικά αποδεκτό ότι η νευροφλεγμονή και ειδικότερα η κινητοποίηση των κυττάρων της γλοίας είναι ιδιαίτερα σημαντική και για την εξέλιξη νευροεκφυλιστικών παθήσεων, όπως της νόσου Πάρκινσον (Lee et al., 2019). Μάλιστα, τόσο σε ασθενείς όσο και σε αντίστοιχα ζωικά μοντέλα της ΝΠ έχει δειχθεί ότι τα κύτταρα της γλοίας, μαζί με άλλα φλεγμονώδη κύτταρα που διηθούν το εκφυλιζόμενο ντοπαμινεργικό σύστημα, απελευθερώνουν ένα σύνολο προφλεγμονωδών ή/και αντιφλεγμονωδών παραγόντων, όπως κυτταροκίνες, χημειοκίνες, προσταγλανδίνες και νευροτροφικούς παράγοντες (Glass et al., 2010; Halliday and Stevens, 2011; Leszek et al., 2016; Poewe et al., 2017). Έτσι, παράλληλα με το μηχανικό διεισδυτικό τραυματισμό, διεξήχθη και βιοχημικός τραυματισμός του ενήλικου εγκεφάλου, μέσω χορήγησης της νευροτοξίνης MPTP που προκαλεί παρκινσονικά χαρακτηριστικά στα πειραματόζωα. Παρόμοια με όσα περιγράφηκαν για το μοντέλο της οξείας ΚΕΚ, τα ευρήματά μας καταδεικνύουν την ξεκάθαρη συνεισφορά των TGFβ- και BMP-επαγόμενων σηματοδοτικών κλάδων στην παθολογία που αναπτύσσεται έπειτα από οξεία χορήγηση MPTP. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών Smad1/5/8 και Smad3 στο ραβδωτό σώμα και την κοιλιακή μοίρα του μεσεγκεφάλου των ζώων όπου εγχύθηκε η νευροτοξίνη (**Εικόνα 36**). Ακόμη, δείχθηκε σημαντική ενεργοποίηση των διαγονιδίων TRE-RFP και BRE-eGFP στις ίδιες εγκεφαλικές περιοχές, και μάλιστα οι κυτταρικοί αποδέκτες της TGFβ και της BMP σηματοδότησης, αντίστοιχα, ήταν στην πλειοψηφία τους αστροκύτταρα και σε αυτό το μοντέλο εγκεφαλικού τραυματισμού (**Εικόνα 37**), υποδεικνύοντας τη γενικότερη ενεργοποίηση του συστήματος της υπεροικογένειας του TGFβ στα κύτταρα της γλοίας, σε συνθήκες που αποκλίνουν από την ομοιόσταση.

Η κινητική της έκφρασης των διαγονιδίων TRE-RFP και BRE-eGFP και της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών Smad, τουλάχιστον στο μοντέλο της οξείας ΚΕΚ, υποδεικνύουν ότι το σύστημα κανονικής σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ δεν ενεργοποιείται στα αστροκύτταρα αμέσως μετά τον τραυματισμό, αλλά πιθανότατα σε μεταγενέστερα στάδια όταν τα συγκεκριμένα κύτταρα έχουν ήδη ενεργοποιηθεί

εντός των τραυματισμένων ιστών. Συνεπώς, πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο οι TGFβs και οι BMPs θα μπορούσαν να τροποποιήσουν τη δράση των ήδη ενεργοποιημένων αστροκυττάρων *in vivo* ελήφθησαν έμμεσα επιδρώντας με TGFβ1 ή BMP4 σε αμιγή δραστικά αστροκύτταρα, προερχόμενα από νεογνικές καλλιέργειες ολικής γλοίας, τα οποία καλλιεργήθηκαν *in vitro* για ~20-24 ημέρες. Προηγούμενες μελέτες (Cahoy et al., 2008; Foo et al., 2011; Zamanian et al., 2012) έχουν δείξει ότι τα πρωτογενή αστροκύτταρα που προέρχονται από αντίστοιχες καλλιέργειες διαθέτουν πολλά από τα χαρακτηριστικά των ενήλικων δραστικών αστροκυττάρων και επιπλέον, έπειτα από ιεραρχική ανάλυση συστάδων (hierarchical clustering analysis), ομαδοποιούνται εγγύτερα στα δραστικά αστροκύτταρα τύπου A2 και σε μεγαλύτερη απόσταση από τα αδρανή ή τα αντιδρώντα στον LPS αστροκύτταρα τύπου A1 (Zamanian et al., 2012). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι εκφράζουν περίπου το 60% των χαρακτηριστικών μεταγράφων για τα αστροκύτταρα τύπου A2 και περίπου το 50% των αντίστοιχων γονιδίων για τα αστροκύτταρα τύπου A1 (Zamanian et al., 2012), αντιπροσωπεύοντας έτσι έναν κατάλληλο πληθυσμό ώστε να μελετήσει κανείς παράγοντες που μπορούν να τροποποιήσουν την αστροκυτταρική A1/A2 φαινοτυπική πλαστικότητα. Πράγματι, οι επιδράσεις τόσο με TGFβ1 όσο και με BMP4 μετατόπισαν το προφίλ των αμιγών αστροκυττάρων προς το φαινότυπο τύπου A2 και επιπλέον, σε συμφωνία με τους Liddel et al., 2017, παρουσία TGFβ1 υποεκφράστηκαν αρκετά γονίδια που σχετίζονται με το φαινότυπο τύπου A1, υποδεικνύοντας ότι οι TGFβ και BMP κλάδοι του συστήματος σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ πιθανότατα αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της πλαστικότητας των δραστικών αστροκυττάρων.

Η βιοπληροφορική ανάλυση του μεταγραφώματος των πρωτογενών καλλιιεργειών γλοίας παρείχε σημαντικές ενδείξεις σχετικά με την αλληλεπίδραση μεταξύ των TGFβ και BMP κλάδων σηματοδότησης και τις αποκρίσεις που θα μπορούσε να επιφέρει δυνητικά η ενεργοποίησή τους *in vivo*. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η ενεργοποίηση των αστροκυττάρων με οποιονδήποτε εκ των δύο προσδετών οδήγησε στη ρύθμιση υψηλά αλληλεπικαλυπτόμενων συνόλων γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, έως και το 69% των ρυθμιζόμενων γονιδίων αποκρίθηκαν τόσο στον TGFβ1 όσο και στη BMP4, έπειτα από δίωρη επίδραση (**Εικόνα 23A**), ρυθμίζοντας μονοπάτια που σχετίζονται με τη μεσολαβούμενη από αυξητικούς παράγοντες σηματοδότηση, την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού και την κυτταρική μετανάστευση (**Εικόνα 26A**).

Είκοσι τέσσερις ώρες μετά τη διέγερση, οπότε και αναδείχθηκαν πρωτίστως διεργασίες σχετιζόμενες με την ιστική επιδιόρθωση και αναδιαμόρφωση, τα μεταγραφώματα των διεγερμένων με TGFβ1 ή BMP4 αστροκυττάρων απέκλιναν μεταξύ τους, ωστόσο, η συνολική γονιδιακή επικάλυψη εξακολουθούσε να είναι υψηλή (έως και 44%)(**Εικόνες 23B** και **26B**).

Η προαναφερθείσα υψηλή επικάλυψη στα γονίδια που ρυθμίζονται υπό την επίδραση των TGFβ1 και BMP4 στα αστροκύτταρα, ειδικά στο χρονικό σημείο των δύο ωρών, μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από την ιδιότητα ορισμένων κυτταροκινών της υπεροικογένειας να ενεργοποιούν ταυτόχρονα τις πρωτεΐνες Smad2/3 και τις Smad1/5/8. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι ο TGFβ, εκτός της κλασικής Smad2/3 οδού, μπορεί να ενεργοποιήσει και τις BMP-σχετιζόμενες Smad μέσω αλληλεπίδρασης του υποδοχέα TGFBR1/ALK5 είτε με τον ACVRL1/ALK1 (Goumans et al., 2002) είτε με τον ACVR1/ALK2 (Ramachandran et al., 2018). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, τα πρωτογενή αστροκύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη εξέφραζαν mRNA για τον *Acvr1/Alk2* (**Εικόνα 25B**), καθώς επίσης παρατηρούνταν πάντα μία παροδική αύξηση στα επίπεδα των pSmad1/5/8 σε καλλιέργειες αστροκυττάρων που διεγείρονταν με TGFβ1 (**Εικόνα 24B**). Συνολικά, τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν την ιδέα ότι οι μεταγραφικές αποκρίσεις που συνδέονται με την ενεργοποίηση του συστήματος της υπεροικογένειας του TGFβ προϋποθέτουν μια ολοκληρωμένη συνδυαστική σηματοδότηση μέσω των Smad2/3 και Smad1/5/8 μονοπατιών (Ramachandran et al., 2018).

Παρά τον υψηλό βαθμό αλληλοεπικάλυψης, οι ομάδες γονιδίων που ρυθμίζονταν από τους TGFβ1 ή BMP4 σε κάθε κανονικό μονοπάτι της οντολογίας γονιδίων διέφεραν ποιοτικά και ποσοτικά, υποδεικνύοντας ότι κάθε προσδέτης επιφέρει ποιοτικά διαφορετικά λειτουργικά αποτελέσματα. Για παράδειγμα, παρατηρήθηκε ότι κοινά ρυθμιζόμενα γονίδια αποκρίνονταν σε διαφορετικό βαθμό υπό την επίδραση κάθε προσδέτη. Ως εκ τούτου, κλασικά γονίδια-στόχοι των TGFβs, όπως το *Serpine1* αποκρίθηκαν πιο έντονα στον TGFβ1, ενώ τυπικά γονίδια-στόχοι των BMPs, συμπεριλαμβανομένων των *Id1*, *Smad6* και *Noggin*, αποκρίθηκαν πιο ισχυρά στη διέγερση με BMP4. Επιπλέον, σε κάθε κοινά ρυθμιζόμενο μονοπάτι, μερικά γονίδια αποκρίνονταν και στους δύο προσδέτες, ενώ άλλα ρυθμίζονταν επιλεκτικά είτε από τον TGFβ1 (*Ctgf/Ccn2*, *Col12a1*) είτε από τη BMP4 (*Gata2*, *Bambi*). Μάλιστα, η αναλογία των

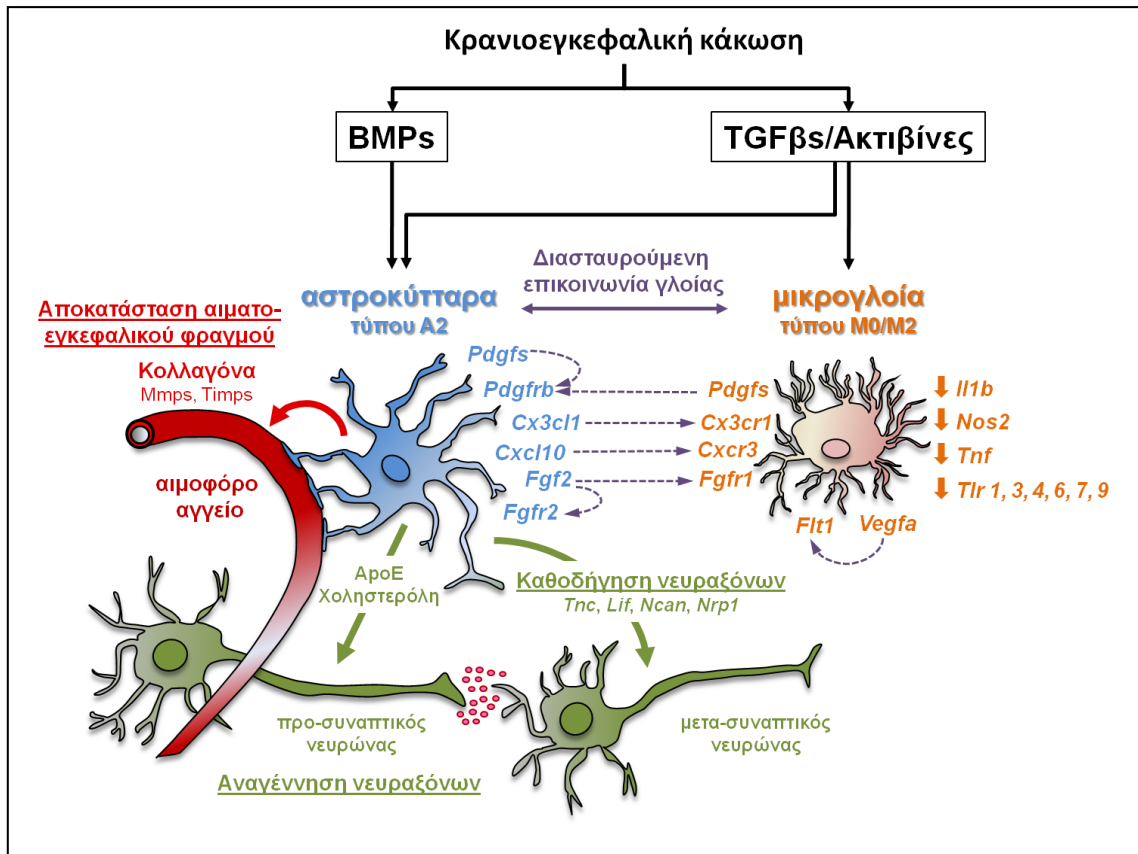
κοινώς και των επιλεκτικά ρυθμιζόμενων γονιδίων διέφερε μεταξύ των διαφορετικών κανονικών μονοπατιών που μελετήθηκαν.

Στη συνέχεια, προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση του συστήματος σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ στη μικρογλοία, χρησιμοποιήθηκαν CD11b⁺GLAST⁺ κύτταρα, που απομονώθηκαν από καλλιέργειες ολικής γλοίας 14 ημερών, προερχόμενες από νεογνικούς εγκεφάλους, και τα οποία καλλιεργήθηκαν ως αμιγής πληθυσμός για ακόμη 10-12 ημέρες (~24 ημέρες συνολικής καλλιέργειας). Τα συγκεκριμένα μικρογλοιακά κύτταρα αποκρίθηκαν εξαιρετικά καλά στην επίδραση με TGFβ1, ωστόσο, σε συμφωνία με την απουσία *in vivo* ενεργοποίησης του διαγονιδίου BRE-eGFP στην ενήλικη μικρογλοία έπειτα από ΚΕΚ (**Εικόνα 19Δ**), αντέδρασαν πολύ ασθενώς στην επίδραση με BMP4. Μάλιστα, εξέφραζαν σχετικά χαμηλότερα επίπεδα mRNA των BMP-σχετιζόμενων υποδοχέων και Smad συγκριτικά με τα αστροκύτταρα (**Εικόνα 25B**), υποδεικνύοντας ότι η μικρογλοία είναι πιθανότατα εγγενώς προγραμματισμένη να μην αποκρίνεται στη BMP σηματοδότηση.

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η νεογνική μικρογλοία παρουσιάζει έναν «ανώριμο» φαινότυπο και δεν εκφράζει γονίδια που χαρακτηρίζουν τη μικρογλοία του ενήλικου εγκεφάλου (Butovsky et al., 2014). Εντούτοις, τα μικρογλοιακά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, πιθανότατα λόγω παρατεταμένης *in vitro* καλλιέργειας παρουσία ορού, αν και διατηρούσαν μερικά χαρακτηριστικά «ανώριμης» μικρογλοίας, όπως υψηλά επίπεδα mRNA για την *ApoE*, εξέφραζαν το 50% των γονιδίων που έχουν συσχετιστεί με τη μοριακή υπογραφή της «ενήλικης» μικρογλοίας (40/81 γονίδια με FPKM από 20-7500). Ακόμη, εξέφραζαν διάφορα γονίδια-δείκτες που έχουν συσχετιστεί βιβλιογραφικά με τους μικρογλοιακούς φαινοτύπους τύπου M0, M1 και M2 (Butovsky et al., 2014). Υπό την επίδραση του TGFβ1 στις συγκεκριμένες καλλιέργειες μεταβλήθηκε η έκφραση των 42 εκ των 54 γονιδίων που συνιστούν την TGFβ-εξαρτώμενη υπογραφή της «ενήλικης» μικρογλοίας. Μάλιστα, 32 γονίδια εξ' αυτών υπερεκφράστηκαν και τα υπόλοιπα 10 υποεκφράστηκαν, υποδεικνύοντας ότι το συγκεκριμένο *in vitro* σύστημα μπορεί κάλλιστα να χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για τη μελέτη της επίδρασης του συστήματος σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ στη μοριακή πλαστικότητα της μικρογλοίας. Πράγματι, υπό την επίδραση του TGFβ1 υπερεκφράστηκαν 22 από τα 35 γνωστά γονίδια τύπου M0 και 25 από τα 44 γνωστά γονίδια τύπου M2, ενώ υποεκφράστηκαν 30 από τα 44 γνωστά γονίδια-δείκτες για το

φαινότυπο τύπου M1, υποδεικνύοντας ότι η TGFβ-επαγόμενη σηματοδότηση μπορεί να μετατοπίσει το μοριακό προφίλ της ενεργοποιημένης μικρογλοίας μακριά από τον προφλεγμονώδη τύπου M1 και πλησιέστερα στον αδρανή τύπου M0 ή τον αντιφλεγμονώδη φαινότυπο τύπου M2.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκάλεσε η μεταβολή της έκφρασης πληθώρας χημειοκινών, κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων και συγγενών υποδοχέων στα πρωτογενή αστροκύτταρα και τη μικρογλοία, υπό την επίδραση του TGFβ1. Η υπερέκφραση ενός προσδέτη στον έναν κυτταρικό τύπο και του αντίστοιχου υποδοχέα (ή υποδοχέων) στον άλλον, όπως σημειώθηκε για τα ζεύγη *Pdgfs/Pdgfrb*, *Cx3cl1/Cx3cr1* και *Cxcl10/Cxcr3* (Εικόνες 27B και 44), ενδεχομένως αναδεικνύει πιθανές TGFβ-εξαρτώμενες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο πληθυσμών γλοίας. Να σημειωθεί ότι η ενεργοποίηση του άξονα CX3CL1/CX3CR1 έχει συσχετιστεί με μειωμένα επίπεδα νευροτοξικότητας και μικρογλοιακής δραστηριότητας (Febinger et al., 2015; Mizuno et al., 2003; Rabon et al., 2011). Παρόμοιος νευροπροστατευτικός ρόλος έχει επίσης αποδοθεί αφ' ενός στους PDGFs, που έχουν χαρακτηριστεί ως «σήματα κυτταρικής επιβίωσης» έπειτα από τραυματισμό του ΚΝΣ (Funa and Sasahara, 2014), και αφ' ετέρου στον άξονα CXCL10/CXCR3, ο οποίος έχει συνδεθεί με τη στρατολόγηση της μικρογλοίας στην περιοχή του τραύματος και την επακόλουθη νευρωνική αναδιοργάνωση (Li et al., 2006; Rappert et al., 2004). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκαν μεταβολές στην έκφραση ορισμένων ζευγών προσδετών και συγγενών υποδοχέων στον ίδιο κυτταρικό πληθυσμό, με χαρακτηριστικά παραδείγματα τους παράγοντες *Fgf2/Fgfr1:Fgfr2* και *Pdgfb:Pdgfc/Pdgfrb* που υπερεκφράστηκαν αποκλειστικά στα αστροκύτταρα, καθώς και τους *Vegfa/Flt1:Kdr* που υπερεκφράστηκαν και τους *Ccl3:Ccl4/Ccr5* που υποεκφράστηκαν επιλεκτικά στη μικρογλοία, αναδεικνύοντας πιθανές ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις. Μάλιστα, η ενεργοποίηση της FGF σηματοδότησης έχει συσχετισθεί με τη νευροπροστατευτική καταστολή του αστροκυτταρικού φαινοτύπου τύπου A1 (Kang et al., 2014; Liddel et al., 2017). Κατά συνέπεια, ένας εναλλακτικός τρόπος με τον οποίο ο TGFβ1 θα μπορούσε να τροποποιήσει έμμεσα τη μικρογλοιακή δραστηριότητα είναι η υπερέκφραση αντιφλεγμονωδών μεσολαβητών στα δραστικά αστροκύτταρα και των αντίστοιχων υποδοχέων τους στη μικρογλοία και κατ' επέκταση η ενεργοποίηση ενός συνόλου νευροπροστατευτικών μονοπατιών.



Εικόνα 44. Σχηματική αναπαράσταση των κύριων ευρημάτων στο πλαίσιο του μοντέλου της εστιακής κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης. Απεικονίζονται οι ρυθμιζόμενες από το σύστημα σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ αποκρίσεις της δραστηρικής γλοίας στην περιοχή του τραύματος, έπειτα από οξεία εστιακή κρανιοεγκεφαλική κάκωση.

Στο σημείο αυτό να σημειώσουμε ότι ο χαμηλός βαθμός επικάλυψης (<31%) που παρατηρήθηκε στις ομάδες των γονιδίων που ρυθμίζονται στα αστροκύτταρα και τη μικρογλοία, υπό την επίδραση του TGFβ1 (Εικόνα 25A), πιθανότατα αντικατοπτρίζει κυτταρο-ειδικές διαφορές στα πρότυπα προσβασιμότητας της χρωματίνης στους δύο πληθυσμούς γλοίας. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, οι πρωτεΐνες R-Smad, αφού δημιουργήσουν σύμπλοκα με κυτταρο-ειδικούς μεταγραφικούς συμπράγοντες, προσδένονται σε προκαθορισμένες ρυθμιστικές αλληλουχίες, που έχουν ταυτοποιηθεί από το Morikawa και τους συνεργάτες του, ρυθμίζοντας την έκφραση συγκεκριμένων συνόλων γονιδίων σε ένα δεδομένο κυτταρικό τύπο (Morikawa et al., 2016; Morikawa et al., 2011). Ακόμη, στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής αναδείχθηκε η διαφορική φωσφορυλίωση των κινασών P38, ERK1/2 και AKT στα αστροκύτταρα και τη μικρογλοία, υποδηλώνοντας ότι οι υποδοχείς της υπεροικογένειας του TGFβ συνδέονται πιθανότατα με διακριτά εναλλακτικά καταρροϊκά μονοπάτια σηματοδότησης στους δύο αυτούς κυτταρικούς τύπους.

Στο μοντέλο της εστιακής ΚΕΚ, η μέγιστη ενεργοποίηση των διαγονιδίων TRE-RFP και BRE-eGFP σημειώθηκε μεταξύ 3^{ης} και 7^{ης} ημέρας μετά τον τραυματισμό, μιας περιόδου που σχετίζεται με την έναρξη της ιστικής επιδιόρθωσης. Ως εκ τούτου, δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στην επίδραση των TGFβ1 και BMP4 στα αστροκύτταρα στο χρονικό σημείο των 24 ωρών, οπότε μεταξύ των κορυφαίων IPA κανονικών μονοπατιών που ρυθμίστηκαν και από τους δύο προσδέτες ήταν η «Σηματοδότηση καθοδήγησης νευραξόνων», η «Υπερ-οδός βιοσύνθεσης χοληστερόλης» και η «Ηπατική ίνωση». Τα αστροκύτταρα αποτελούν την κύρια πηγή σύνθεσης χοληστερόλης στον ενήλικο εγκέφαλο (Nieweg et al., 2009) και ο λιπιδικός μεταβολισμός τους είναι εξαιρετικά σημαντικός για την ανάπτυξη και τη λειτουργία των συνάψεων (van Deijk et al., 2017). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σχεδόν όλα τα ένζυμα της υπερ-οδού βιοσύνθεσης της χοληστερόλης, καθώς και διάφοροι παράγοντες μεταφοράς και μεταβολισμού λιπιδίων, υπερεκφράστηκαν στα αστροκύτταρα που διεγέρθηκαν με TGFβ1 ή/και BMP4 (**Εικόνα 29Α, Β**). Η ενεργοποίηση των παραπάνω διεργασιών που σχετίζονται με το λιπιδικό μεταβολισμό επαληθεύθηκε και *in vivo*, μέσω ανάδειξης της υπερέκφρασης χαρακτηριστικών παραγόντων, όπως των *Srebf1*, *Abca1*, *Ldlr* και του εξωκυττάρου ενζύμου εστεροποίησης της χοληστερόλης *Lcat*, σε τραυματισμένους ιστούς ζώων που υποβλήθηκαν σε εστιακή ΚΕΚ (**Εικόνα 29Γ**). Στην αυξημένη έκφραση του *Lcat* οφείλεται πιθανότατα η σημαντική αύξηση της εστεροποιημένης χοληστερόλης που έχει παρατηρηθεί στην περιοχή της βλάβης, έπειτα από ελεγχόμενη φλοιϊκή κάκωση (Roux et al., 2016).

Επιπλέον, τα επίπεδα της εκκρινόμενης ΑΡΟΕ παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση έπειτα από διέγερση των αστροκυττάρων με BMP4 ή TGFβ1, ενώ μειώθηκαν σημαντικά όταν χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς του συστήματος σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ (**Εικόνα 29Δ**). Σε συμφωνία με τα *in vitro* δεδομένα παρατηρήθηκε σταδιακή υπερέκφραση των ΑΡΟΕ και ABCA1 στην περιοχή του τραύματος έπειτα από εστιακή ΚΕΚ, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης (**Εικόνα 29Γ, Ε, ΣΤ**). Πιο αναλυτικά, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ΑΡΟΕ ελαττώθηκαν σημαντικά μία ημέρα μετά τον τραυματισμό, επανήλθαν στα επίπεδα του ετερόπλευρου ημισφαιρίου μετά από τρεις ημέρες και τελικά αυξήθηκαν σημαντικά επτά ημέρες μετά την πρόκληση της κάκωσης. Έχει δειχθεί βιβλιογραφικά ότι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, συμπεριλαμβανομένων των TNF-α, IL1β και IFNγ,

καταστέλλουν την παραγωγή της APOE (Zhang et al., 2011). Επομένως, η πρόωμη απελευθέρωση των συγκεκριμένων (ή με αντίστοιχη δράση) κυτταροκινών στο μικροπεριβάλλον του τραύματος θα μπορούσε ενδεχομένως να δικαιολογήσει την παρατηρούμενη μείωση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της APOE, την πρώτη ημέρα μετά τον τραυματισμό. Στην αντιφλεγμονώδη δράση της σηματοδότησης της υπερικογένειας του TGFβ, η οποία εκδηλώνεται μετά την πρώτη ημέρα από τον τραυματισμό, θα μπορούσε να οφείλεται η όψιμη αύξηση στα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης της APOE στους τραυματισμένους ιστούς των ζώων που υποβλήθηκαν σε εστιακή ΚΕΚ. Βέβαια, αυτό το υποθετικό σενάριο χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Συλλογικά, τα ευρήματά μας συνδέουν για πρώτη φορά την TGFβ- και BMP-επαγόμενη σηματοδότηση με τη ρύθμιση της βιοσύνθεσης της χοληστερόλης, την έκκριση της APOE και πιθανότατα το σχηματισμό λιποπρωτεϊνών έπειτα από αλληλεπίδραση της APOE με το μεταφορέα χοληστερόλης ABCA1 και το ένζυμο εστεροποίησης LCAT στα αστροκύτταρα.

Υπό την επίδραση των TGFβ1 ή/και BMP4 στα πρωτογενή αστροκύτταρα ρυθμίστηκε επίσης η έκφραση μιας ποικιλίας παραγόντων με δράση καθοδήγησης νευραξόνων (Anderson et al., 2016). Μάλιστα, παρουσία TGFβ1, παρατηρήθηκε υπερέκφραση κυρίως επαγωγικών παραγόντων, ενώ υποεκφράστηκαν μόρια που δρουν κατασταλτικά στην καθοδήγηση των αναπτυσσόμενων νευραξόνων (**Εικόνα 31A**). Από την άλλη πλευρά, στα αστροκύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία BMP4 σημειώθηκε υπερέκφραση ίδιου περίπου αριθμού γονιδίων που κωδικοποιούν είτε για επαγωγικά είτε για κατασταλτικά μόρια. Η αυξημένη έκφραση επαγωγικών και κατασταλτικών παραγόντων καθοδήγησης νευραξόνων επιβεβαιώθηκε και *in vivo*, εντός της περιοχής του τραύματος (**Εικόνα 31B**), προτείνοντας ότι τα αστροκύτταρα που οριοθετούν το τραύμα θα μπορούσαν να παρέχουν τα κατευθυντήρια σήματα που είναι απαραίτητα για την αναγέννηση των νευραξόνων (Cregg et al., 2014; Faulkner et al., 2004; Jones et al., 2003). Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που έχουν δείξει ότι η επώαση αστροκυττάρων νωτιαίου μυελού παρουσία BMP4 συνοδεύεται από αυξημένη έκφραση των *neurocan* (*Ncan*) και *brevican* (*Bcan*) και μειωμένη έκφραση της *phosphacan* (*Ptprz1*) (Fuller et al., 2007), ενώ διέγερση αστροκυττάρων εγκεφαλικού φλοιού με TGFβ1 οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης της *neurocan* (Asher et al., 2000; Schachtrup et al., 2010).

Όπως είναι γνωστό, τα αστροκύτταρα είναι υπεύθυνα για την ομοιοστατική διατήρηση των επιπέδων του γλουταμινικού οξέος στο εγκεφαλικό παρέγχυμα, μέσω των διαμεμβρανικών μεταφορέων SLC1A3/GLAST και SLC1A2/GLT-1. Έπειτα από τραυματικές κακώσεις του ΚΝΣ στον άνθρωπο ή σε πειραματικά ζωικά μοντέλα έχει παρατηρηθεί μειωμένη έκφραση των συγκεκριμένων αστροκυτταρικών μεταφορέων, συνοδευόμενη από αύξηση των εξωκυττάρων επιπέδων γλουταμινικού οξέος (Liu et al., 2010a; Rao et al., 1998; van Landeghem et al., 2006; Yi and Hazell, 2006). Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης προτείνουν ότι η ενεργοποίηση του συστήματος της υπεροικογένειας του TGFβ συμβάλλει στην περιορισμένη ανακύκλωση του συγκεκριμένου νευροδιαβιβαστή, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την TGFβ1- ή/και BMP4-εξαρτώμενη μείωση των παραγόντων εκκαθάρισης του γλουταμινικού στα καλλιεργούμενα αστροκύτταρα, σε επίπεδο mRNA ή/και πρωτεΐνης (**Εικόνα 32Α-Γ**). Ανάλογη υποέκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων παρατηρήθηκε στο *in vivo* μοντέλο της ΚΕΚ, εντός της περιοχής του τραύματος, αν και ήταν παροδική εφόσον τα επίπεδά τους αυξήθηκαν αργότερα, συγκεκριμένα, επτά ημέρες μετά τον τραυματισμό (**Εικόνα 32Δ**). Η περίσσεια γλουταμινικού οξέος που συσσωρεύεται στον εξωκυττάριο χώρο μπορεί να προκαλέσει σοβαρές βλάβες και να οδηγήσει τελικά σε θάνατο των νευρώνων μέσω διεγερσιμοτοξικότητας (Shigeri et al., 2004). Επομένως, εάν η ανακύκλωσή του – που δείξαμε ότι ρυθμίζεται και από το σύστημα της υπεροικογένειας του TGFβ – παρεκκλίνει από την ομοιόσταση, θα μπορούσε να επιβαρυνθεί η παθολογία του τραυματισμένου νευρικού ιστού.

Ακόμη, πληθώρα παραγόντων ιστικής αναδιαμόρφωσης, συμπεριλαμβανομένων κολλαγόνων, αυξητικών παραγόντων και συγγενών υποδοχέων, υπερεκφράστηκαν στα αστροκύτταρα που διεγέρθηκαν παρουσία TGFβ1 ή BMP4. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι οι δύο προσδέτες ρυθμίζουν διαφορετικά σύνολα γονιδίων που κωδικοποιούν για κολλαγόνα, υποστηρίζοντας την ιδέα ότι οι σηματοδοτικοί κλάδοι των TGFβs ή/και των BMPs ενδεχομένως διαδραματίζουν διακριτούς ρόλους κατά τη διάρκεια της ιστικής επιδιόρθωσης. Η υπερέκφραση επιλεγμένων γονιδίων, που ρυθμίζονταν *in vitro* επιλεκτικά από τον TGFβ1 (*Col5a2*, *Mmp2*), τη BMP4 (*Col1a1*) ή και τους δύο προσδέτες (*Il6*), επαληθεύθηκε περαιτέρω, μέσω ανάλυσης τραυματισμένων ιστών πειραματοζώων που υποβλήθηκαν σε εστιακή ΚΕΚ (**Εικόνες 33B και 34B**). Ιδιαίτερα σημαντική θεωρείται η απεικόνιση της στενής αλληλεπίδρασης μεταξύ

απολήξεων θετικών για τα διαγονίδια αστροκυττάρων και αγγειακών τοιχωμάτων του τραύματος που χαρακτηρίζονταν από έντονη ανοσοϊστοχημική έκφραση του κολλαγόνου τύπου I (Εικόνα 33Γ), υποδηλώνοντας ότι τα αστροκύτταρα που δέχονται σηματοδότηση από το σύστημα της υπερκοικογένειας του TGFβ διαδραματίζουν πιθανότατα ενεργό ρόλο στη «σφράγιση» των κατεστραμμένων διαρρεόντων αγγείων και στην αποκατάσταση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.

Οι ΚΕΚ αντιπροσωπεύουν μία από τις κύριες αιτίες θανάτου και αναπηρίας παγκοσμίως και σύμφωνα με πρόσφατα επιδημιολογικά δεδομένα περίπου το 50% του παγκόσμιου πληθυσμού θα υποστεί τουλάχιστον ένα περιστατικό ΚΕΚ κατά τη διάρκεια της ζωής του (Maas et al., 2017; Quaglio et al., 2017). Παρά τον ταχέως αυξανόμενο όγκο των βιβλιογραφικών δεδομένων, η θεραπεία των ΚΕΚ αποτελεί ιδιαίτερη πρόκληση, εξαιτίας της ετερογενούς φύσης τους και της επαγωγής πολύπλοκων παθογενετικών μονοπατιών, τα οποία δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητά (Saatman et al., 2008). Το μοντέλο του εστιακού διεισδυτικού τραυματισμού που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή αντιπροσωπεύει πιθανότατα την απλούστερη μορφή τραυματικής εγκεφαλικής βλάβης και σε καμία περίπτωση δε μπορεί να αναπαράγει το σύνολο των πολύπλοκων βιο-μηχανικών πτυχών της ανθρώπινης ΚΕΚ. Παρ' όλα αυτά, η αποσαφήνιση βασικών μοριακών διεργασιών που διέπουν την παθοφυσιολογία των ΚΕΚ, και ιδιαίτερα της «συνομιλίας» μεταξύ αστροκυττάρων και μικρογλοίας και των μηχανισμών που ρυθμίζουν την πλαστικότητα της ενεργοποιημένης γλοίας, συνιστά αναμφίβολα ένα σημαντικό βήμα προς την ανάπτυξη θεραπευτικών στρατηγικών που θα μπορούσαν να αξιοποιήσουν τη νευροπροστατευτική και επιδιορθωτική ικανότητα των συγκεκριμένων κυττάρων (Sofroniew, 2009).

Από την άλλη πλευρά, η νόσος Πάρκινσον αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη ηλικιοεξαρτώμενη νευροεκφυλιστική νόσο μετά τη νόσο Αλτσχάιμερ, με ποσοστό εκδήλωσης 1-2% για άτομα άνω των 65 ετών (Alves et al., 2008; Gasser, 2009). Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα υπάρχοντα θεραπευτικά σχήματα δρουν κυρίως συμπτωματικά, χωρίς να έχει αποδειχθεί η νευροπροστατευτική τους επίδραση, είναι ιδιαίτερως σημαντική η ανάπτυξη εναλλακτικών προσεγγίσεων, ικανών να μεταβάλουν την εξέλιξη της νόσου (Brundin et al., 2017; Migdalska-Richards et al., 2017; Wong and Krainc, 2017). Στην παρούσα διατριβή, έγινε μια προσπάθεια ανάπτυξης ενός «προληπτικού/θεραπευτικού» σχήματος, κατά το οποίο πραγματοποιήθηκε

στερεοτακτική υπερέκφραση ενεργοποιητών ή αναστολέων της BMP σηματοδότησης στη μέλαινα ουσία των πειραματοζώων, πριν από την πρόκληση παρκινσονικού φαινοτύπου μέσω χορήγησης MPTP. Κατά την ανάλυση της κινητικής δραστηριότητας των πειραματοζώων παρατηρήθηκε σχετική βελτίωση ορισμένων συμπεριφορικών παραμέτρων σε εκείνα όπου υπερεκφράστηκε η Noggin, υποδεικνύοντας ότι αναστολή της BMP-επαγόμενης σηματοδότησης στη μέλαινα ουσία παρέχει ενδεχομένως μερική νευροπροστατευτική δράση στην ομόπλευρη μελαινораβδωτή οδό. Βέβαια, σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως κατά την αξιολόγηση της αγχώδους συμπεριφοράς, η υπερέκφραση της BMP7 φάνηκε να έχει θετική επίδραση στο φαινότυπο των πειραματοζώων. Άλλωστε ο νευροπροστατευτικός ρόλος της BMP7 έχει δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες αντίστοιχων ζωικών μοντέλων νευροεκφυλισμού (Harvey et al., 2004; Zuch et al., 2004).

Συνολικά, η παρούσα διδακτορική διατριβή θέτει ορισμένους «γραμματικούς κανόνες» στη γλώσσα της υπεροικογένειας του TGFβ και προσφέρει μια περιεκτική ανάλυση του δυνητικού ρόλου των TGFβ και BMP σηματοδοτικών κλάδων στο πλαίσιο της παθολογίας που συνοδεύει τον τραυματισμό του εγκεφάλου. Μάλιστα, δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στην ικανότητα αμφότερων των TGFβ- και BMP-επαγόμενων μονοπατιών να ρυθμίζουν θεμελιώδεις διαδικασίες που σχετίζονται με την αποκατάσταση και αναδιαμόρφωση των τραυματισμένων ιστών, καθώς και την αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα των δραστικών αστροκυττάρων και μικρογλοιακών κυττάρων που περιβάλλουν τον τραυματισμένο ιστό (**Εικόνα 44**). Αμφότεροι οι TGFβ- και BMP-επαγόμενοι κλάδοι δρουν στα αστροκύτταρα, επάγοντας άκρως επικαλυπτόμενα μεταγραφικά προγράμματα και συμβάλλοντας στην «υιοθέτηση» ενός νευροπροστατευτικού φαινοτύπου τύπου A2, ενώ η μικρογλοία φαίνεται πως αποκρίνεται επιλεκτικά στη σηματοδότηση των TGFβs/Ακτιβινών, «υιοθετώντας» έναν αδρανή/αντιφλεγμονώδη φαινότυπο τύπου M0/M2. Συνεπώς, η επιλεκτική στόχευση ενός εκ των δύο σηματοδοτικών κλάδων της υπεροικογένειας του TGFβ, ειδικά στα αστροκύτταρα, θα πρέπει να διεξάγεται με ιδιαίτερη προσοχή, δεδομένης της ενδεχόμενης αντισταθμιστικής ενεργοποίησης ή καταστολής του έτερου κλάδου.

Ο όγκος των πληροφοριών που παρέχει η παρούσα μελέτη αφ' ενός καταδεικνύει τη σημασία που διαδραματίζει η σχετική ισορροπία των μελών της υπεροικογένειας του TGFβ για την ομοιοστάση και την εξέλιξη της παθολογίας στον

εγκέφαλο και αφ' ετέρου θα μπορούσε να αξιοποιηθεί περαιτέρω σε γενετικά τροποποιημένα ζωικά μοντέλα και συστήματα επαγόμενης απαλοιφής παραγόντων της υπεροικογένειας (υποδοχείς, προσδέτες ή αναστολείς) επιλεκτικά στα αστροκύτταρα ή τη μικρογλοία. Έτσι, θα διευκολυνόταν ο μελλοντικός σχεδιασμός καινοτόμων προσεγγίσεων για τη θεραπεία τραυματικών ή βιοχημικών κακώσεων του νευρικού ιστού ή συγγενών νευροφλεγμονωδών αλλοιώσεων του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdelmotilib, H., T. Maltbie, V. Delic, Z. Liu, X. Hu, K.B. Fraser, M.S. Moehle, L. Stoyka, N. Anabtawi, V. Krendelchtchikova, L.A. Volpicelli-Daley, and A. West. 2017. alpha-Synuclein fibril-induced inclusion spread in rats and mice correlates with dopaminergic Neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 105:84-98.
- Abreu, J.G., N.I. Ketpura, B. Reversade, and E.M. De Robertis. 2002. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol.* 4:599-604.
- Ahn, T.B., J.W. Langston, V.R. Achi, and D.W. Dickson. 2012. Relationship of neighboring tissue and gliosis to alpha-synuclein pathology in a fetal transplant for Parkinson's disease. *Am J Neurodegener Dis.* 1:49-59.
- Aigner, L., and U. Bogdahn. 2008. TGF-beta in neural stem cells and in tumors of the central nervous system. *Cell Tissue Res.* 331:225-241.
- Alder, J., W. Fujioka, J. Lifshitz, D.P. Crockett, and S. Thakker-Varia. 2011. Lateral fluid percussion: model of traumatic brain injury in mice. *J Vis Exp.*
- Allen, N.J., and B.A. Barres. 2009. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature.* 457:675-677.
- Alves, G., E.B. Forsaa, K.F. Pedersen, M. Dreetz Gjerstad, and J.P. Larsen. 2008. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol.* 255 Suppl 5:18-32.
- Anderson, C.M., and R.A. Swanson. 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia.* 32:1-14.
- Anderson, K.D., L. Pan, X.M. Yang, V.C. Hughes, J.R. Walls, M.G. Dominguez, M.V. Simmons, P. Burfeind, Y. Xue, Y. Wei, L.E. Macdonald, G. Thurston, C. Daly, H.C. Lin, A.N. Economides, D.M. Valenzuela, A.J. Murphy, G.D. Yancopoulos, and N.W. Gale. 2011. Angiogenic sprouting into neural tissue requires Gpr124, an orphan G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:2807-2812.
- Anderson, M.A., J.E. Burda, Y. Ren, Y. Ao, T.M. O'Shea, R. Kawaguchi, G. Coppola, B.S. Khakh, T.J. Deming, and M.V. Sofroniew. 2016. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature.* 532:195-200.
- Andrews, Z.B., H. Zhao, T. Frugier, R. Meguro, D.R. Grattan, K. Koishi, and I.S. McLennan. 2006. Transforming growth factor beta2 haploinsufficient mice develop age-related nigrostriatal dopamine deficits. *Neurobiol Dis.* 21:568-575.
- Angley, C., M. Kumar, K.J. Dinsio, A.K. Hall, and R.E. Siegel. 2003. Signaling by bone morphogenetic proteins and Smad1 modulates the postnatal differentiation of cerebellar cells. *J Neurosci.* 23:260-268.
- Annes, J.P., J.S. Munger, and D.B. Rifkin. 2003. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci.* 116:217-224.
- Araujo, A.P., L.P. Diniz, C.M. Eller, B.G. de Matos, R. Martinez, and F.C. Gomes. 2016. Effects of Transforming Growth Factor Beta 1 in Cerebellar Development: Role in Synapse Formation. *Front Cell Neurosci.* 10:104.
- Arthurs, Z.M., V.Y. Sohn, and B.W. Starnes. 2007. Vascular trauma: endovascular management and techniques. *Surg Clin North Am.* 87:1179-1192, x-xi.
- Asher, R.A., D.A. Morgenstern, P.S. Fidler, K.H. Adcock, A. Oohira, J.E. Braistead, J.M. Levine, R.U. Margolis, J.H. Rogers, and J.W. Fawcett. 2000. Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J Neurosci.* 20:2427-2438.
- Assoian, R.K., A. Komoriya, C.A. Meyers, D.M. Miller, and M.B. Sporn. 1983. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem.* 258:7155-7160.
- Azevedo, F.A., L.R. Carvalho, L.T. Grinberg, J.M. Farfel, R.E. Ferretti, R.E. Leite, W. Jacob Filho, R. Lent, and S. Herculano-Houzel. 2009. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol.* 513:532-541.
- Baghdassarian, D., D. Toru-Delbauffe, J.M. Gavaret, and M. Pierre. 1993. Effects of transforming growth factor-beta 1 on the extracellular matrix and cytoskeleton of cultured astrocytes. *Glia.* 7:193-202.
- Battista, D., C.C. Ferrari, F.H. Gage, and F.J. Pitossi. 2006. Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci.* 23:83-93.
- Biswas, S.K., and A. Mantovani. 2010. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 11:889-896.
- Blandini, F., and M.T. Armentero. 2012. Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J.* 279:1156-1166.

- Blum, M. 1998. A null mutation in TGF- α leads to a reduction in midbrain dopaminergic neurons in the substantia nigra. *Nat Neurosci.* 1:374-377.
- Bond, A.M., O.G. Bhalala, and J.A. Kessler. 2012. The dynamic role of bone morphogenetic proteins in neural stem cell fate and maturation. *Dev Neurobiol.* 72:1068-1084.
- Bordner, K.A., E.D. George, B.C. Carlyle, A. Duque, R.R. Kitchen, T.T. Lam, C.M. Colangelo, K.L. Stone, T.B. Abbott, S.M. Mane, A.C. Nairn, and A.A. Simen. 2011. Functional genomic and proteomic analysis reveals disruption of myelin-related genes and translation in a mouse model of early life neglect. *Front Psychiatry.* 2:18.
- Bottner, M., K. Kriegstein, and K. Unsicker. 2000. The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem.* 75:2227-2240.
- Braak, H., K. Del Tredici, U. Rub, R.A. de Vos, E.N. Jansen Steur, and E. Braak. 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging.* 24:197-211.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Bradl, M., and H. Lassmann. 2010. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119:37-53.
- Brundin, P., K.D. Dave, and J.H. Kordower. 2017. Therapeutic approaches to target alpha-synuclein pathology. *Exp Neurol.* 298:225-235.
- Buffo, A., M.R. Vosko, D. Erturk, G.F. Hamann, M. Jucker, D. Rowitch, and M. Gotz. 2005. Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: implications for neuronal repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:18183-18188.
- Burda, J.E., A.M. Bernstein, and M.V. Sofroniew. 2016. Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 275 Pt 3:305-315.
- Burda, J.E., and M.V. Sofroniew. 2014. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron.* 81:229-248.
- Burnette, W.N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 112:195-203.
- Buss, A., K. Pech, B.A. Kakulas, D. Martin, J. Schoenen, J. Noth, and G.A. Brook. 2008. TGF- β 1 and TGF- β 2 expression after traumatic human spinal cord injury. *Spinal Cord.* 46:364-371.
- Butovsky, O., M.P. Jedrychowski, C.S. Moore, R. Cialic, A.J. Lanser, G. Gabriely, T. Koeglsperger, B. Dake, P.M. Wu, C.E. Doykan, Z. Fanek, L. Liu, Z. Chen, J.D. Rothstein, R.M. Ransohoff, S.P. Gygi, J.P. Antel, and H.L. Weiner. 2014. Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci.* 17:131-143.
- Bylicky, M.A., G.P. Mueller, and R.M. Day. 2018. Mechanisms of Endogenous Neuroprotective Effects of Astrocytes in Brain Injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2018:6501031.
- Cahoy, J.D., B. Emery, A. Kaushal, L.C. Foo, J.L. Zamanian, K.S. Christopherson, Y. Xing, J.L. Lubischer, P.A. Krieg, S.A. Krupenko, W.J. Thompson, and B.A. Barres. 2008. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci.* 28:264-278.
- Cambier, S., S. Gline, D. Mu, R. Collins, J. Araya, G. Dolganov, S. Einheber, N. Boudreau, and S.L. Nishimura. 2005. Integrin α (v) β 8-mediated activation of transforming growth factor- β by perivascular astrocytes: an angiogenic control switch. *Am J Pathol.* 166:1883-1894.
- Candia, A.F., T. Watabe, S.H. Hawley, D. Onichtchouk, Y. Zhang, R. Derynck, C. Niehrs, and K.W. Cho. 1997. Cellular interpretation of multiple TGF- β signals: intracellular antagonism between activin/BVg1 and BMP-2/4 signaling mediated by Smads. *Development.* 124:4467-4480.
- Catala, M., and N. Kubis. 2013. Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. *Handb Clin Neurol.* 115:29-41.
- Chang, C. 2016. Agonists and Antagonists of TGF- β Family Ligands. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 8.
- Chang, C.F., S.Z. Lin, Y.H. Chiang, M. Morales, J. Chou, P. Lein, H.L. Chen, B.J. Hoffer, and Y. Wang. 2003. Intravenous administration of bone morphogenetic protein-7 after ischemia improves motor function in stroke rats. *Stroke.* 34:558-564.
- Chavarria, A., and J. Alcocer-Varela. 2004. Is damage in central nervous system due to inflammation? *Autoimmun Rev.* 3:251-260.
- Chen, J., S. Van Gulden, T.L. McGuire, A.C. Fleming, C. Oka, J.A. Kessler, and C.Y. Peng. 2018. BMP-Responsive Protease HtrA1 Is Differentially Expressed in Astrocytes and Regulates Astrocytic Development and Injury Response. *J Neurosci.* 38:3840-3857.
- Chen, Y., H. Mao, K.H. Yang, T. Abel, and D.F. Meaney. 2014. A modified controlled cortical impact

- technique to model mild traumatic brain injury mechanics in mice. *Front Neurol.* 5:100.
- Chen, Y., and R.A. Swanson. 2003. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 23:137-149.
- Chesselet, M.F. 2008. In vivo alpha-synuclein overexpression in rodents: a useful model of Parkinson's disease? *Exp Neurol.* 209:22-27.
- Chung, W.S., L.E. Clarke, G.X. Wang, B.K. Stafford, A. Sher, C. Chakraborty, J. Joung, L.C. Foo, A. Thompson, C. Chen, S.J. Smith, and B.A. Barres. 2013. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature.* 504:394-400.
- Conway, K.A., S.J. Lee, J.C. Rochet, T.T. Ding, R.E. Williamson, and P.T. Lansbury, Jr. 2000. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 97:571-576.
- Cregg, J.M., M.A. DePaul, A.R. Filous, B.T. Lang, A. Tran, and J. Silver. 2014. Functional regeneration beyond the glial scar. *Exp Neurol.* 253:197-207.
- Cullen, D.K., C.M. Simon, and M.C. LaPlaca. 2007. Strain rate-dependent induction of reactive astrogliosis and cell death in three-dimensional neuronal-astrocytic co-cultures. *Brain Res.* 1158:103-115.
- Daly, A.C., R.A. Randall, and C.S. Hill. 2008. Transforming growth factor beta-induced Smad1/5 phosphorylation in epithelial cells is mediated by novel receptor complexes and is essential for anchorage-independent growth. *Mol Cell Biol.* 28:6889-6902.
- Daneman, R., and A. Prat. 2015. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7:a020412.
- Davalos, D., J. Grutzendler, G. Yang, J.V. Kim, Y. Zuo, S. Jung, D.R. Littman, M.L. Dustin, and W.B. Gan. 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* 8:752-758.
- Davies, S.J., C.H. Shih, M. Noble, M. Mayer-Proschel, J.E. Davies, and C. Proschel. 2011. Transplantation of specific human astrocytes promotes functional recovery after spinal cord injury. *PLoS One.* 6:e17328.
- de Jong, D.S., E.J. van Zoelen, S. Bauerschmidt, W. Olijve, and W.T. Steegenga. 2002. Microarray analysis of bone morphogenetic protein, transforming growth factor beta, and activin early response genes during osteoblastic cell differentiation. *J Bone Miner Res.* 17:2119-2129.
- Degnin, C., F. Jean, G. Thomas, and J.L. Christian. 2004. Cleavages within the prodomain direct intracellular trafficking and degradation of mature bone morphogenetic protein-4. *Mol Biol Cell.* 15:5012-5020.
- Derynck, R., and E.H. Budi. 2019. Specificity, versatility, and control of TGF-beta family signaling. *Sci Signal.* 12.
- Dettman, R.W., D. Birch, A. Fernando, J.A. Kessler, and M.L.V. Dizon. 2018. Targeted Knockdown of Bone Morphogenetic Protein Signaling within Neural Progenitors Protects the Brain and Improves Motor Function following Postnatal Hypoxia-Ischemia. *Dev Neurosci.* 40:23-38.
- Dewan, M.C., A. Rattani, S. Gupta, R.E. Baticulon, Y.C. Hung, M. Punchak, A. Agrawal, A.O. Adeleye, M.G. Shrime, A.M. Rubiano, J.V. Rosenfeld, and K.B. Park. 2018. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *Journal of neurosurgery:*1-18.
- Dexter, D.T., and P. Jenner. 2013. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free radical biology & medicine.*
- Dias, J.M., Z. Alekseenko, J.M. Applequist, and J. Ericson. 2014. Tgfbeta signaling regulates temporal neurogenesis and potency of neural stem cells in the CNS. *Neuron.* 84:927-939.
- Dick, A., M. Hild, H. Bauer, Y. Imai, H. Maifeld, A.F. Schier, W.S. Talbot, T. Bouwmeester, and M. Hammerschmidt. 2000. Essential role of Bmp7 (snailhouse) and its prodomain in dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development.* 127:343-354.
- Diniz, L.P., I. Matias, M. Siqueira, J. Stipursky, and F.C.A. Gomes. 2019. Astrocytes and the TGF-beta1 Pathway in the Healthy and Diseased Brain: a Double-Edged Sword. *Mol Neurobiol.* 56:4653-4679.
- Dobolyi, A., C. Vincze, G. Pal, and G. Lovas. 2012. The neuroprotective functions of transforming growth factor beta proteins. *Int J Mol Sci.* 13:8219-8258.
- Dohgu, S., A. Yamauchi, F. Takata, M. Naito, T. Tsuruo, S. Higuchi, Y. Sawada, and Y. Kataoka. 2004. Transforming growth factor-beta1 upregulates the tight junction and P-glycoprotein of brain microvascular endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol.* 24:491-497.
- Domowicz, M., N.L. Wadlington, J.G. Henry, K. Diaz, M.J. Munoz, and N.B. Schwartz. 2018. Glial cell responses in a murine multifactorial perinatal brain injury model. *Brain Res.* 1681:52-63.
- Donat, C.K., G. Scott, S.M. Gentleman, and M. Sastre. 2017. Microglial Activation in Traumatic Brain Injury. *Front Aging Neurosci.* 9:208.
- Dong, C., Z. Li, R. Alvarez, Jr., X.H. Feng, and P.J. Goldschmidt-Clermont. 2000. Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity. *Mol Cell.* 5:27-34.

- Ehnert, S., J. Zhao, S. Pscherer, T. Freude, S. Dooley, A. Kolk, U. Stockle, A.K. Nussler, and R. Hube. 2012. Transforming growth factor beta1 inhibits bone morphogenic protein (BMP)-2 and BMP-7 signaling via upregulation of Ski-related novel protein N (SnoN): possible mechanism for the failure of BMP therapy? *BMC Med.* 10:101.
- Eng, L.F., R.S. Ghirnikar, and Y.L. Lee. 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 25:1439-1451.
- Escartin, C., and G. Bonvento. 2008. Targeted activation of astrocytes: a potential neuroprotective strategy. *Mol Neurobiol.* 38:231-241.
- Esparza-Lopez, J., J.L. Montiel, M.M. Vilchis-Landeros, T. Okadome, K. Miyazono, and F. Lopez-Casillas. 2001. Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A. *J Biol Chem.* 276:14588-14596.
- Falke, L.L., H. Kinashi, A. Dendooven, R. Broekhuizen, R. Stoop, J.A. Joles, T.Q. Nguyen, and R. Goldschmeding. 2016. Age-dependent shifts in renal response to injury relate to altered BMP6/CTGF expression and signaling. *Am J Physiol Renal Physiol.* 311:F926-F934.
- Farkas, L.M., N. Dunker, E. Roussa, K. Unsicker, and K. Kriegstein. 2003. Transforming growth factor-beta(s) are essential for the development of midbrain dopaminergic neurons in vitro and in vivo. *J Neurosci.* 23:5178-5186.
- Faulkner, J.R., J.E. Herrmann, M.J. Woo, K.E. Tansey, N.B. Doan, and M.V. Sofroniew. 2004. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci.* 24:2143-2155.
- Febinger, H.Y., H.E. Thomasy, M.N. Pavlova, K.M. Ringgold, P.R. Barf, A.M. George, J.N. Grillo, A.D. Bachstetter, J.A. Garcia, A.E. Cardona, M.R. Opp, and C. Gemma. 2015. Time-dependent effects of CX3CR1 in a mouse model of mild traumatic brain injury. *J Neuroinflammation.* 12:154.
- Ferrari, G., B.D. Cook, V. Terushkin, G. Pintucci, and P. Mignatti. 2009. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. *J Cell Physiol.* 219:449-458.
- Flanders, K.C., G. Ludecke, S. Engels, D.S. Cissel, A.B. Roberts, P. Kondaiah, R. Lafyatis, M.B. Sporn, and K. Unsicker. 1991. Localization and actions of transforming growth factor-beta s in the embryonic nervous system. *Development.* 113:183-191.
- Flanders, K.C., G. Ludecke, J. Renzing, C. Hamm, D.S. Cissel, and K. Unsicker. 1993. Effects of TGF-betas and bFGF on Astroglial Cell Growth and Gene Expression in Vitro. *Mol Cell Neurosci.* 4:406-417.
- Foo, L.C., N.J. Allen, E.A. Bushong, P.B. Ventura, W.S. Chung, L. Zhou, J.D. Cahoy, R. Daneman, H. Zong, M.H. Ellisman, and B.A. Barres. 2011. Development of a method for the purification and culture of rodent astrocytes. *Neuron.* 71:799-811.
- Frik, J., J. Merl-Pham, N. Plesnila, N. Mattugini, J. Kjell, J. Kraska, R.M. Gomez, S.M. Hauck, S. Sirko, and M. Gotz. 2018. Cross-talk between monocyte invasion and astrocyte proliferation regulates scarring in brain injury. *EMBO Rep.* 19.
- Fuller, M.L., A.K. DeChant, B. Rothstein, A. Capriarello, R. Wang, A.K. Hall, and R.H. Miller. 2007. Bone morphogenetic proteins promote gliosis in demyelinating spinal cord lesions. *Ann Neurol.* 62:288-300.
- Fulwyler, M.J. 1965. Electronic separation of biological cells by volume. *Science.* 150:910-911.
- Fumagalli, M., D. Lecca, and M.P. Abbracchio. 2011. Role of purinergic signalling in neuro-immune cells and adult neural progenitors. *Front Biosci (Landmark Ed).* 16:2326-2341.
- Funa, K., and M. Sasahara. 2014. The roles of PDGF in development and during neurogenesis in the normal and diseased nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol.* 9:168-181.
- Gagelin, C., M. Pierre, J.M. Gavaret, and D. Toru-Delbaffle. 1995. Rapid TGF beta 1 effects on actin cytoskeleton of astrocytes: comparison with other factors and implications for cell motility. *Glia.* 13:283-293.
- Galgano, M., G. Toshkezi, X. Qiu, T. Russell, L. Chin, and L.R. Zhao. 2017. Traumatic Brain Injury: Current Treatment Strategies and Future Endeavors. *Cell Transplant.* 26:1118-1130.
- Gao, H.M., B. Liu, and J.S. Hong. 2003. Critical role for microglial NADPH oxidase in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurosci.* 23:6181-6187.
- Gao, Z., Q. Zhu, Y. Zhang, Y. Zhao, L. Cai, C.B. Shields, and J. Cai. 2013. Reciprocal modulation between microglia and astrocyte in reactive gliosis following the CNS injury. *Mol Neurobiol.* 48:690-701.
- Garcia-Campmany, L., and E. Marti. 2007. The TGFbeta intracellular effector Smad3 regulates neuronal differentiation and cell fate specification in the developing spinal cord. *Development.* 134:65-75.
- Gasser, T. 2009. Genomic and proteomic biomarkers for Parkinson disease. *Neurology.* 72:S27-31.

- Gatza, C.E., S.Y. Oh, and G.C. Blobe. 2010. Roles for the type III TGF-beta receptor in human cancer. *Cell Signal*. 22:1163-1174.
- Gautier, C.A., T. Kitada, and J. Shen. 2008. Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:11364-11369.
- Gelders, G., V. Baekelandt, and A. Van der Perren. 2018. Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *J Immunol Res*. 2018:4784268.
- Gerhardt, H., M. Golding, M. Fruttiger, C. Ruhrberg, A. Lundkvist, A. Abramsson, M. Jeltsch, C. Mitchell, K. Alitalo, D. Shima, and C. Betsholtz. 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*. 161:1163-1177.
- Ginhoux, F., M. Greter, M. Leboeuf, S. Nandi, P. See, S. Gokhan, M.F. Mehler, S.J. Conway, L.G. Ng, E.R. Stanley, I.M. Samokhvalov, and M. Merad. 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 330:841-845.
- Ginhoux, F., S. Lim, G. Hoeffel, D. Low, and T. Huber. 2013. Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci*. 7:45.
- Gispert, S., F. Ricciardi, A. Kurz, M. Azizov, H.H. Hoepken, D. Becker, W. Voos, K. Leuner, W.E. Muller, A.P. Kudin, W.S. Kunz, A. Zimmermann, J. Roeper, D. Wenzel, M. Jendrach, M. Garcia-Arencibia, J. Fernandez-Ruiz, L. Huber, H. Rohrer, M. Barrera, A.S. Reichert, U. Rub, A. Chen, R.L. Nussbaum, and G. Auburger. 2009. Parkinson phenotype in aged PINK1-deficient mice is accompanied by progressive mitochondrial dysfunction in absence of neurodegeneration. *PLoS One*. 4:e5777.
- Glass, C.K., K. Saijo, B. Winner, M.C. Marchetto, and F.H. Gage. 2010. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. 140:918-934.
- Goldstein, L.E., A.M. Fisher, C.A. Tagge, X.L. Zhang, L. Velisek, J.A. Sullivan, C. Upreti, J.M. Kracht, M. Ericsson, M.W. Wojnarowicz, C.J. Goletiani, G.M. Maglakelidze, N. Casey, J.A. Moncaster, O. Minaeva, R.D. Moir, C.J. Nowinski, R.A. Stern, R.C. Cantu, J. Geiling, J.K. Blusztajn, B.L. Wolozin, T. Ikezu, T.D. Stein, A.E. Budson, N.W. Kowall, D. Chargin, A. Sharon, S. Saman, G.F. Hall, W.C. Moss, R.O. Cleveland, R.E. Tanzi, P.K. Stanton, and A.C. McKee. 2012. Chronic traumatic encephalopathy in blast-exposed military veterans and a blast neurotrauma mouse model. *Sci Transl Med*. 4:134ra160.
- Gomes, W.A., M.F. Mehler, and J.A. Kessler. 2003. Transgenic overexpression of BMP4 increases astroglial and decreases oligodendroglial lineage commitment. *Dev Biol*. 255:164-177.
- Goumans, M.J., G. Valdimarsdottir, S. Itoh, A. Rosendahl, P. Sideras, and P. ten Dijke. 2002. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J*. 21:1743-1753.
- Gronroos, E., I.J. Kingston, A. Ramachandran, R.A. Randall, P. Vizan, and C.S. Hill. 2012. Transforming growth factor beta inhibits bone morphogenetic protein-induced transcription through novel phosphorylated Smad1/5-Smad3 complexes. *Mol Cell Biol*. 32:2904-2916.
- Gross, R.E., M.F. Mehler, P.C. Mabie, Z. Zang, L. Santschi, and J.A. Kessler. 1996. Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron*. 17:595-606.
- Hall, E.D., P.G. Sullivan, T.R. Gibson, K.M. Pavel, B.M. Thompson, and S.W. Scheff. 2005. Spatial and temporal characteristics of neurodegeneration after controlled cortical impact in mice: more than a focal brain injury. *J Neurotrauma*. 22:252-265.
- Halliday, G.M., and C.H. Stevens. 2011. Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 26:6-17.
- Hamm, R.J. 2001. Neurobehavioral assessment of outcome following traumatic brain injury in rats: an evaluation of selected measures. *J Neurotrauma*. 18:1207-1216.
- Hampton, D.W., R.A. Asher, T. Kondo, J.D. Steeves, M.S. Ramer, and J.W. Fawcett. 2007. A potential role for bone morphogenetic protein signalling in glial cell fate determination following adult central nervous system injury in vivo. *Eur J Neurosci*. 26:3024-3035.
- Hamza, T.H., C.P. Zabetian, A. Tenesa, A. Laederach, J. Montimurro, D. Yearout, D.M. Kay, K.F. Doheny, J. Paschall, E. Pugh, V.I. Kusel, R. Collura, J. Roberts, A. Griffith, A. Samii, W.K. Scott, J. Nutt, S.A. Factor, and H. Payami. 2010. Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease. *Nat Genet*. 42:781-785.
- Harvey, B.K., B.J. Hoffer, and Y. Wang. 2005. Stroke and TGF-beta proteins: glial cell line-derived neurotrophic factor and bone morphogenetic protein. *Pharmacol Ther*. 105:113-125.
- Harvey, B.K., A. Mark, J. Chou, G.J. Chen, B.J. Hoffer, and Y. Wang. 2004. Neurotrophic effects of bone morphogenetic protein-7 in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res*. 1022:88-95.

- Hata, A., R.S. Lo, D. Wotton, G. Lagna, and J. Massague. 1997. Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4. *Nature*. 388:82-87.
- Hegarty, S.V., L.M. Collins, A.M. Gavin, S.L. Roche, S.L. Wyatt, A.M. Sullivan, and G.W. O'Keeffe. 2014. Canonical BMP-Smad signalling promotes neurite growth in rat midbrain dopaminergic neurons. *Neuromolecular Med*. 16:473-489.
- Hegarty, S.V., A.M. Sullivan, and G.W. O'Keeffe. 2013. BMP2 and GDF5 induce neuronal differentiation through a Smad dependant pathway in a model of human midbrain dopaminergic neurons. *Mol Cell Neurosci*. 56:263-271.
- Heinemann, U., D. Kaufer, and A. Friedman. 2012. Blood-brain barrier dysfunction, TGFbeta signaling, and astrocyte dysfunction in epilepsy. *Glia*. 60:1251-1257.
- Heinonen, A.M., M. Rahman, G. Dogbevia, H. Jakobi, S. Wolfl, R. Sprengel, and M. Schwaninger. 2014. Neuroprotection by rAAV-mediated gene transfer of bone morphogenic protein 7. *BMC Neurosci*. 15:38.
- Heldin, C.H., and A. Moustakas. 2016. Signaling Receptors for TGF-beta Family Members. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 8.
- Hellbach, N., S.C. Weise, R. Vezzali, S.D. Wahane, S. Heidrich, D. Roidl, J. Pruszek, J.S. Esser, and T. Vogel. 2014. Neural deletion of Tgfbr2 impairs angiogenesis through an altered secretome. *Hum Mol Genet*. 23:6177-6190.
- Helmy, A., K.L. Carpenter, D.K. Menon, J.D. Pickard, and P.J. Hutchinson. 2011. The cytokine response to human traumatic brain injury: temporal profiles and evidence for cerebral parenchymal production. *J Cereb Blood Flow Metab*. 31:658-670.
- Herrera-Molina, R., and R. von Bernhardi. 2005. Transforming growth factor-beta 1 produced by hippocampal cells modulates microglial reactivity in culture. *Neurobiol Dis*. 19:229-236.
- Hirota, S., T.P. Clements, L.K. Tang, J.E. Morales, H.S. Lee, S.P. Oh, G.M. Rivera, D.S. Wagner, and J.H. McCarty. 2015. Neuropilin 1 balances beta8 integrin-activated TGFbeta signaling to control sprouting angiogenesis in the brain. *Development*. 142:4363-4373.
- Holtzhausen, A., C. Golzio, T. How, Y.H. Lee, W.P. Schiemann, N. Katsanis, and G.C. Blobe. 2014. Novel bone morphogenetic protein signaling through Smad2 and Smad3 to regulate cancer progression and development. *FASEB J*. 28:1248-1267.
- Hou, J.G., and E.C. Lai. 2007. Non-motor Symptoms of Parkinson's Disease. *International Journal of Gerontology*. 1:53-64.
- Huang, R.Q., H.L. Cheng, X.D. Zhao, W. Dai, Z. Zhuang, Y. Wu, Y. Liu, and J.X. Shi. 2010. Preliminary study on the effect of trauma-induced secondary cellular hypoxia in brain injury. *Neurosci Lett*. 473:22-27.
- Hudnall, A.M., J.W. Arthur, and J.W. Lowery. 2016. Clinical Relevance and Mechanisms of Antagonism Between the BMP and Activin/TGF-beta Signaling Pathways. *J Am Osteopath Assoc*. 116:452-461.
- Hunter, K.E., M.B. Sporn, and A.M. Davies. 1993. Transforming growth factor-betas inhibit mitogen-stimulated proliferation of astrocytes. *Glia*. 7:203-211.
- Ishikawa, Y., N. Yamamoto, M. Yoshimoto, and H. Ito. 2012. The primary brain vesicles revisited: are the three primary vesicles (forebrain/midbrain/hindbrain) universal in vertebrates? *Brain Behav Evol*. 79:75-83.
- Jackson-Lewis, V., M. Jakowec, R.E. Burke, and S. Przedborski. 1995. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration*. 4:257-269.
- Jackson-Lewis, V., and S. Przedborski. 2007. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nat Protoc*. 2:141-151.
- James, J.M., C. Gewolb, and V.L. Bautsch. 2009. Neurovascular development uses VEGF-A signaling to regulate blood vessel ingression into the neural tube. *Development*. 136:833-841.
- Jankovic, J. 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 79:368-376.
- Jassam, Y.N., S. Izzy, M. Whalen, D.B. McGavern, and J. El Khoury. 2017. Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift. *Neuron*. 95:1246-1265.
- Javelaud, D., and A. Mauviel. 2004. Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles. *Int J Biochem Cell Biol*. 36:1161-1165.
- Jellinger, K.A. 2012. Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 27:8-30.
- Jiang, Y., I.S. McLennan, K. Koishi, and I.A. Hendry. 2000. Transforming growth factor-beta 2 is anterogradely and retrogradely transported in motoneurons and up-regulated after nerve injury.

- Neuroscience*. 97:735-742.
- Jimenez, A.J., M.D. Dominguez-Pinos, M.M. Guerra, P. Fernandez-Llebreg, and J.M. Perez-Figares. 2014. Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Tissue Barriers*. 2:e28426.
- Johns, L.D., G. Babcock, D. Green, M. Freedman, S. Sriram, and R.M. Ransohoff. 1992. Transforming growth factor-beta 1 differentially regulates proliferation and MHC class-II antigen expression in forebrain and brainstem astrocyte primary cultures. *Brain Res*. 585:229-236.
- Johnson, K.A., P.J. Conn, and C.M. Niswender. 2009. Glutamate receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease. *CNS & neurological disorders drug targets*. 8:475-491.
- Jones, L.L., R.U. Margolis, and M.H. Tuszynski. 2003. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp Neurol*. 182:399-411.
- Julius, M.H., T. Masuda, and L.A. Herzenberg. 1972. Demonstration that antigen-binding cells are precursors of antibody-producing cells after purification with a fluorescence-activated cell sorter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 69:1934-1938.
- Kakinuma, Y., H. Hama, F. Sugiyama, K. Yagami, K. Goto, K. Murakami, and A. Fukamizu. 1998. Impaired blood-brain barrier function in angiotensinogen-deficient mice. *Nat Med*. 4:1078-1080.
- Kalia, L.V., S.K. Kalia, and A.E. Lang. 2015. Disease-modifying strategies for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 30:1442-1450.
- Kang, W., F. Balordi, N. Su, L. Chen, G. Fishell, and J.M. Hebert. 2014. Astrocyte activation is suppressed in both normal and injured brain by FGF signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111:E2987-2995.
- Kanzaki, T., A. Olofsson, A. Moren, C. Wernstedt, U. Hellman, K. Miyazono, L. Claesson-Welsh, and C.H. Heldin. 1990. TGF-beta 1 binding protein: a component of the large latent complex of TGF-beta 1 with multiple repeat sequences. *Cell*. 61:1051-1061.
- Karve, I.P., J.M. Taylor, and P.J. Crack. 2016. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol*. 173:692-702.
- Kashima, R., and A. Hata. 2018. The role of TGF-beta superfamily signaling in neurological disorders. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 50:106-120.
- Kawamura, I., S. Maeda, K. Imamura, T. Setoguchi, M. Yokouchi, Y. Ishidou, and S. Komiya. 2012. SnoN suppresses maturation of chondrocytes by mediating signal cross-talk between transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein pathways. *J Biol Chem*. 287:29101-29113.
- Kawano, H., J. Kimura-Kuroda, Y. Komuta, N. Yoshioka, H.P. Li, K. Kawamura, Y. Li, and G. Raisman. 2012. Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. *Cell Tissue Res*. 349:169-180.
- Kim, J., K. Johnson, H.J. Chen, S. Carroll, and A. Laughon. 1997. Drosophila Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature*. 388:304-308.
- Kim, S.U., and J. de Vellis. 2005. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res*. 81:302-313.
- Komuta, Y., X. Teng, H. Yanagisawa, K. Sango, K. Kawamura, and H. Kawano. 2010. Expression of transforming growth factor-beta receptors in meningeal fibroblasts of the injured mouse brain. *Cell Mol Neurobiol*. 30:101-111.
- Kriegstein, K., L. Farkas, and K. Unsicker. 1998a. TGF-beta regulates the survival of ciliary ganglionic neurons synergistically with ciliary neurotrophic factor and neurotrophins. *J Neurobiol*. 37:563-572.
- Kriegstein, K., P. Henheik, L. Farkas, J. Jaszai, D. Galter, K. Krohn, and K. Unsicker. 1998b. Glial cell line-derived neurotrophic factor requires transforming growth factor-beta for exerting its full neurotrophic potential on peripheral and CNS neurons. *J Neurosci*. 18:9822-9834.
- Kriegstein, K., B. Reuss, D. Maysinger, and K. Unsicker. 1998c. Short communication: transforming growth factor-beta mediates the neurotrophic effect of fibroblast growth factor-2 on midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci*. 10:2746-2750.
- Kriegstein, K., C. Suter-Crazzolara, G. Hotten, J. Pohl, and K. Unsicker. 1995. Trophic and protective effects of growth/differentiation factor 5, a member of the transforming growth factor-beta superfamily, on midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci Res*. 42:724-732.
- Kriegstein, K., and K. Unsicker. 1994. Transforming growth factor-beta promotes survival of midbrain dopaminergic neurons and protects them against N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity. *Neuroscience*. 63:1189-1196.
- Kuhn, S., L. Gritti, D. Crooks, and Y. Dombrowski. 2019. Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells*. 8.

- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lai, M., P. Gluckman, M. Dragunow, and P.E. Hughes. 1997. Focal brain injury increases activin betaA mRNA expression in hippocampal neurons. *Neuroreport*. 8:2691-2694.
- Lane, E.L., S.C. Cheetham, and P. Jenner. 2006. Does contraversive circling in the 6-OHDA-lesioned rat indicate an ability to induce motor complications as well as therapeutic effects in Parkinson's disease? *Exp Neurol*. 197:284-290.
- Lebrin, F., M.J. Goumans, L. Jonker, R.L. Carvalho, G. Valdimarsdottir, M. Thorikay, C. Mummery, H.M. Arthur, and P. ten Dijke. 2004. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J*. 23:4018-4028.
- Lee, D.A., J.L. Bedont, T. Pak, H. Wang, J. Song, A. Miranda-Angulo, V. Takiar, V. Charubhumi, F. Balordi, H. Takebayashi, S. Aja, E. Ford, G. Fishell, and S. Blackshaw. 2012a. Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nat Neurosci*. 15:700-702.
- Lee, J.Y., H.C. Koh, M.Y. Chang, C.H. Park, Y.S. Lee, and S.H. Lee. 2003. Erythropoietin and bone morphogenetic protein 7 mediate ascorbate-induced dopaminergic differentiation from embryonic mesencephalic precursors. *Neuroreport*. 14:1401-1404.
- Lee, V.M., S.A. Louis, and B.A. Reynolds. 2015. Neural Stem Cells. *In STEMCELL Technologies*.
- Lee, Y., S. Lee, S.C. Chang, and J. Lee. 2019. Significant roles of neuroinflammation in Parkinson's disease: therapeutic targets for PD prevention. *Arch Pharm Res*. 42:416-425.
- Lee, Y., B.M. Morrison, Y. Li, S. Lengacher, M.H. Farah, P.N. Hoffman, Y. Liu, A. Tsingalia, L. Jin, P.W. Zhang, L. Pellerin, P.J. Magistretti, and J.D. Rothstein. 2012b. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*. 487:443-448.
- Legocki, R.P., and D.P. Verma. 1981. Multiple immunoreplica Technique: screening for specific proteins with a series of different antibodies using one polyacrylamide gel. *Anal Biochem*. 111:385-392.
- Lenzinger, P.M., M.C. Morganti-Kossmann, H.L. Laurer, and T.K. McIntosh. 2001. The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury. *Mol Neurobiol*. 24:169-181.
- Lesage, S., and A. Brice. 2009. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Human molecular genetics*. 18:R48-59.
- Leszek, J., G.E. Barreto, K. Gasiorowski, E. Koutsouraki, M. Avila-Rodrigues, and G. Aliev. 2016. Inflammatory Mechanisms and Oxidative Stress as Key Factors Responsible for Progression of Neurodegeneration: Role of Brain Innate Immune System. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 15:329-336.
- Lewen, A., S. Soderstrom, L. Hillered, and T. Ebendal. 1997. Expression of serine/threonine kinase receptors in traumatic brain injury. *Neuroreport*. 8:475-479.
- Li, F., Y. Lan, Y. Wang, J. Wang, G. Yang, F. Meng, H. Han, A. Meng, and X. Yang. 2011. Endothelial Smad4 maintains cerebrovascular integrity by activating N-cadherin through cooperation with Notch. *Dev Cell*. 20:291-302.
- Li, H., Z. Gang, H. Yuling, X. Luokun, X. Jie, L. Hao, W. Li, H. Chunsong, L. Junyan, J. Mingshen, J. Youxin, G. Feili, J. Boquan, and T. Jinquan. 2006. Different neurotropic pathogens elicit neurotoxic CCR9- or neurosupportive CXCR3-expressing microglia. *J Immunol*. 177:3644-3656.
- Li, X., J.C. Patel, J. Wang, M.V. Avshalumov, C. Nicholson, J.D. Buxbaum, G.A. Elder, M.E. Rice, and Z. Yue. 2010. Enhanced striatal dopamine transmission and motor performance with LRRK2 overexpression in mice is eliminated by familial Parkinson's disease mutation G2019S. *J Neurosci*. 30:1788-1797.
- Liang, Y.Y., F.C. Brunicardi, and X. Lin. 2009. Smad3 mediates immediate early induction of Id1 by TGF-beta. *Cell Res*. 19:140-148.
- Liddelov, S.A., K.A. Guttenplan, L.E. Clarke, F.C. Bennett, C.J. Bohlen, L. Schirmer, M.L. Bennett, A.E. Munch, W.S. Chung, T.C. Peterson, D.K. Wilton, A. Frouin, B.A. Napier, N. Panicker, M. Kumar, M.S. Buckwalter, D.H. Rowitch, V.L. Dawson, T.M. Dawson, B. Stevens, and B.A. Barres. 2017. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 541:481-487.
- Liedtke, W., W. Edelmann, P.L. Bieri, F.C. Chiu, N.J. Cowan, R. Kucherlapati, and C.S. Raine. 1996. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron*. 17:607-615.
- Lim, K.L., and C.W. Zhang. 2013. Molecular events underlying Parkinson's disease - an interwoven tapestry. *Frontiers in neurology*. 4:33.
- Lin, J., S.R. Patel, M. Wang, and G.R. Dressler. 2006. The cysteine-rich domain protein KCP is a suppressor of transforming growth factor beta/activin signaling in renal epithelia. *Mol Cell Biol*. 26:4577-4585.

- Lindholm, D., E. Castren, R. Kiefer, F. Zafra, and H. Thoenen. 1992. Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J Cell Biol.* 117:395-400.
- Liu, W., C.H. Wang, Y. Cui, L.Q. Mo, J.L. Zhi, S.N. Sun, Y.L. Wang, H.M. Yu, C.M. Zhao, J.Q. Feng, and P.X. Chen. 2006. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase antagonizes morphine antinociceptive tolerance by decreasing activation of p38 MAPK in the spinal microglia. *Neurosci Lett.* 410:174-177.
- Liu, Y.P., C.S. Yang, M.C. Chen, S.H. Sun, and S.F. Tzeng. 2010a. Ca(2+)-dependent reduction of glutamate aspartate transporter GLAST expression in astrocytes by P2X(7) receptor-mediated phosphoinositide 3-kinase signaling. *J Neurochem.* 113:213-227.
- Liu, Y.R., L. Cardamone, R.E. Hogan, M.C. Gregoire, J.P. Williams, R.J. Hicks, D. Binns, A. Koe, N.C. Jones, D.E. Myers, T.J. O'Brien, and V. Boulleret. 2010b. Progressive metabolic and structural cerebral perturbations after traumatic brain injury: an in vivo imaging study in the rat. *J Nucl Med.* 51:1788-1795.
- Lizzo, J.M., and M. Waseem. 2020. Brain Trauma.
- Loane, D.J., and A. Kumar. 2016. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol.* 275 Pt 3:316-327.
- Logan, T.T., S. Villapol, and A.J. Symes. 2013. TGF-beta superfamily gene expression and induction of the Runx1 transcription factor in adult neurogenic regions after brain injury. *PLoS One.* 8:e59250.
- Lu, X.H., S.M. Fleming, B. Meurers, L.C. Ackerson, F. Mortazavi, V. Lo, D. Hernandez, D. Sulzer, G.R. Jackson, N.T. Maidment, M.F. Chesselet, and X.W. Yang. 2009. Bacterial artificial chromosome transgenic mice expressing a truncated mutant parkin exhibit age-dependent hypokinetic motor deficits, dopaminergic neuron degeneration, and accumulation of proteinase K-resistant alpha-synuclein. *J Neurosci.* 29:1962-1976.
- Ludwin, S.K., J.C. Kosek, and L.F. Eng. 1976. The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies. *J Comp Neurol.* 165:197-207.
- Luo, K., S.L. Stroschein, W. Wang, D. Chen, E. Martens, S. Zhou, and Q. Zhou. 1999. The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signaling. *Genes Dev.* 13:2196-2206.
- Lutz, M., and P. Knaus. 2002. Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell Signal.* 14:977-988.
- Ma, X., A. Aravind, B.J. Pfister, N. Chandra, and J. Haorah. 2019. Animal Models of Traumatic Brain Injury and Assessment of Injury Severity. *Mol Neurobiol.* 56:5332-5345.
- Maas, A.I.R., D.K. Menon, P.D. Adelson, N. Andelic, M.J. Bell, A. Belli, P. Bragge, A. Brazinova, A. Buki, R.M. Chesnut, G. Citerio, M. Coburn, D.J. Cooper, A.T. Crowder, E. Czeiter, M. Czosnyka, R. Diaz-Arrastia, J.P. Dreier, A.C. Duhaime, A. Ercole, T.A. van Essen, V.L. Feigin, G. Gao, J. Giacino, L.E. Gonzalez-Lara, R.L. Gruen, D. Gupta, J.A. Hartings, S. Hill, J.Y. Jiang, N. Ketharanathan, E.J.O. Kompanje, L. Lanyon, S. Laureys, F. Lecky, H. Levin, H.F. Lingsma, M. Maegele, M. Majdan, G. Manley, J. Marsteller, L. Mascia, C. McFadyen, S. Mondello, V. Newcombe, A. Palotie, P.M. Parizel, W. Peul, J. Piercy, S. Polinder, L. Puybasset, T.E. Rasmussen, R. Rossaint, P. Smielewski, J. Soderberg, S.J. Stanworth, M.B. Stein, N. von Steinbuchel, W. Stewart, E.W. Steyerberg, N. Stocchetti, A. Synnot, B. Te Ao, O. Tenovuo, A. Theadom, D. Tibboel, W. Videtta, K.K.W. Wang, W.H. Williams, L. Wilson, and K. Yaffe. 2017. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol.* 16:987-1048.
- Majdan, M., D. Plancikova, A. Brazinova, M. Rusnak, D. Nieboer, V. Feigin, and A. Maas. 2016. Epidemiology of traumatic brain injuries in Europe: a cross-sectional analysis. *Lancet Public Health.* 1:e76-e83.
- Manning-Bog, A.B., A.L. McCormack, J. Li, V.N. Uversky, A.L. Fink, and D.A. Di Monte. 2002. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem.* 277:1641-1644.
- Marmarou, A., M.A. Foda, W. van den Brink, J. Campbell, H. Kita, and K. Demetriadou. 1994. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg.* 80:291-300.
- Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 19:2783-2810.
- Mathewson, A.J., and M. Berry. 1985. Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats. *Brain Res.* 327:61-69.
- Mathieu, P., A.P. Piantanida, and F. Pitossi. 2010. Chronic expression of transforming growth factor-beta enhances adult neurogenesis. *Neuroimmunomodulation.* 17:200-201.
- Matsuura, I., N.G. Denissova, G. Wang, D. He, J. Long, and F. Liu. 2004. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature.* 430:226-231.

- Mattugini, N., R. Bocchi, V. Scheuss, G.L. Russo, O. Torper, C.L. Lao, and M. Gotz. 2019. Inducing Different Neuronal Subtypes from Astrocytes in the Injured Mouse Cerebral Cortex. *Neuron*. 103:1086-1095 e1085.
- McCarthy, K.D., and J. de Vellis. 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*. 85:890-902.
- McCormack, A.L., M. Thiruchelvam, A.B. Manning-Bog, C. Thiffault, J.W. Langston, D.A. Cory-Slechta, and D.A. Di Monte. 2002. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis*. 10:119-127.
- McKinnon, R.D., G. Piras, J.A. Ida, Jr., and M. Dubois-Dalcq. 1993. A role for TGF-beta in oligodendrocyte differentiation. *J Cell Biol*. 121:1397-1407.
- Mehler, M.F., P.C. Mabie, G. Zhu, S. Gokhan, and J.A. Kessler. 2000. Developmental changes in progenitor cell responsiveness to bone morphogenetic proteins differentially modulate progressive CNS lineage fate. *Dev Neurosci*. 22:74-85.
- Mendez, I., A. Vinuela, A. Astradsson, K. Mukhida, P. Hallett, H. Robertson, T. Tierney, R. Holness, A. Dagher, J.Q. Trojanowski, and O. Isacson. 2008. Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nat Med*. 14:507-509.
- Menon, D.K., K. Schwab, D.W. Wright, and A.I. Maas. 2010. Position statement: definition of traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 91:1637-1640.
- Merwin, J.R., J.M. Anderson, O. Kocher, C.M. Van Itallie, and J.A. Madri. 1990. Transforming growth factor beta 1 modulates extracellular matrix organization and cell-cell junctional complex formation during in vitro angiogenesis. *J Cell Physiol*. 142:117-128.
- Meyers, E.A., and J.A. Kessler. 2017. TGF-beta Family Signaling in Neural and Neuronal Differentiation, Development, and Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 9.
- Michell-Robinson, M.A., H. Touil, L.M. Healy, D.R. Owen, B.A. Durafour, A. Bar-Or, J.P. Antel, and C.S. Moore. 2015. Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain*. 138:1138-1159.
- Migdalska-Richards, A., W.K.D. Ko, Q. Li, E. Bezdard, and A.H.V. Schapira. 2017. Oral ambroxol increases brain glucocerebrosidase activity in a nonhuman primate. *Synapse*. 71.
- Mikami, T., and H. Kitagawa. 2013. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim Biophys Acta*. 1830:4719-4733.
- Miller, D.S.J., B. Schmierer, and C.S. Hill. 2019. TGF-beta family ligands exhibit distinct signalling dynamics that are driven by receptor localisation. *J Cell Sci*. 132.
- Miller, R.H. 2002. Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol*. 67:451-467.
- Miller, R.H., E.R. Abney, S. David, C. Ffrench-Constant, R. Lindsay, R. Patel, J. Stone, and M.C. Raff. 1986. Is reactive gliosis a property of a distinct subpopulation of astrocytes? *J Neurosci*. 6:22-29.
- Miller, R.H., and M.C. Raff. 1984. Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *J Neurosci*. 4:585-592.
- Miyazono, K., S. Maeda, and T. Imamura. 2004. Coordinate regulation of cell growth and differentiation by TGF-beta superfamily and Runx proteins. *Oncogene*. 23:4232-4237.
- Mizuno, T., J. Kawanokuchi, K. Numata, and A. Suzumura. 2003. Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system. *Brain Res*. 979:65-70.
- Mogi, M., M. Harada, T. Kondo, H. Narabayashi, P. Riederer, and T. Nagatsu. 1995. Transforming growth factor-beta 1 levels are elevated in the striatum and in ventricular cerebrospinal fluid in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 193:129-132.
- Monteiro, R.M., S.M. de Sousa Lopes, M. Bialecka, S. de Boer, A. Zwijsen, and C.L. Mummery. 2008. Real time monitoring of BMP Smads transcriptional activity during mouse development. *Genesis*. 46:335-346.
- Monteiro, R.M., S.M. de Sousa Lopes, O. Korchynskiy, P. ten Dijke, and C.L. Mummery. 2004. Spatio-temporal activation of Smad1 and Smad5 in vivo: monitoring transcriptional activity of Smad proteins. *J Cell Sci*. 117:4653-4663.
- Morales, D.M., N. Marklund, D. Lebold, H.J. Thompson, A. Pitkanen, W.L. Maxwell, L. Longhi, H. Laurer, M. Maegele, E. Neugebauer, D.I. Graham, N. Stocchetti, and T.K. McIntosh. 2005. Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better mousetrap? *Neuroscience*. 136:971-989.
- Morikawa, M., R. Derynck, and K. Miyazono. 2016. TGF-beta and the TGF-beta Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 8.

- Morikawa, M., D. Koinuma, S. Tsutsumi, E. Vasilaki, Y. Kanki, C.H. Heldin, H. Aburatani, and K. Miyazono. 2011. ChIP-seq reveals cell type-specific binding patterns of BMP-specific Smads and a novel binding motif. *Nucleic Acids Res.* 39:8712-8727.
- Morin, R., M. Bainbridge, A. Fejes, M. Hirst, M. Krzywinski, T. Pugh, H. McDonald, R. Varhol, S. Jones, and M. Marra. 2008. Profiling the HeLa S3 transcriptome using randomly primed cDNA and massively parallel short-read sequencing. *Biotechniques.* 45:81-94.
- Moustakas, A., and C.H. Heldin. 2009. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development.* 136:3699-3714.
- Mullier, A., S.G. Bouret, V. Prevot, and B. Dehouck. 2010. Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J Comp Neurol.* 518:943-962.
- Myer, D.J., G.G. Gurkoff, S.M. Lee, D.A. Hovda, and M.V. Sofroniew. 2006. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain.* 129:2761-2772.
- Nagarajan, R.P., and Y. Chen. 2000. Structural basis for the functional difference between Smad2 and Smad3 in FAST-2 (forkhead activin signal transducer-2)-mediated transcription. *Biochem J.* 350 Pt 1:253-259.
- Nakamura, M., M.M. Matzuk, B. Gerstmayr, A. Bosio, R. Lauster, Y. Miyachi, S. Werner, and R. Paus. 2003. Control of pelage hair follicle development and cycling by complex interactions between follistatin and activin. *FASEB J.* 17:497-499.
- Nakashima, K., T. Takizawa, W. Ochiai, M. Yanagisawa, T. Hisatsune, M. Nakafuku, K. Miyazono, T. Kishimoto, R. Kageyama, and T. Taga. 2001. BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:5868-5873.
- Nalls, M.A., N. Pankratz, C.M. Lill, C.B. Do, D.G. Hernandez, M. Saad, A.L. DeStefano, E. Kara, J. Bras, M. Sharma, C. Schulte, M.F. Keller, S. Arepalli, C. Letson, C. Edsall, H. Stefansson, X. Liu, H. Pliner, J.H. Lee, R. Cheng, M.A. Ikram, J.P. Ioannidis, G.M. Hadjigeorgiou, J.C. Bis, M. Martinez, J.S. Perlmutter, A. Goate, K. Marder, B. Fiske, M. Sutherland, G. Xiromerisiou, R.H. Myers, L.N. Clark, K. Stefansson, J.A. Hardy, P. Heutink, H. Chen, N.W. Wood, H. Houlden, H. Payami, A. Brice, W.K. Scott, T. Gasser, L. Bertram, N. Eriksson, T. Foroud, and A.B. Singleton. 2014. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat Genet.* 46:989-993.
- Ng, S.Y., and A.Y.W. Lee. 2019. Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Front Cell Neurosci.* 13:528.
- Nguyen, H.L., Y.J. Lee, J. Shin, E. Lee, S.O. Park, J.H. McCarty, and S.P. Oh. 2011. TGF-beta signaling in endothelial cells, but not neuroepithelial cells, is essential for cerebral vascular development. *Lab Invest.* 91:1554-1563.
- Nickel, J., P. Ten Dijke, and T.D. Mueller. 2018. TGF-beta family co-receptor function and signaling. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 50:12-36.
- Nieweg, K., H. Schaller, and F.W. Pfrieger. 2009. Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J Neurochem.* 109:125-134.
- Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, and F. Helmchen. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 308:1314-1318.
- Noback, C.R., N.L. Strominger, R.J. Demarest, and D.A. Ruggiero. 2005a. Meninges, Ventricles and Cerebrospinal Fluid. *In The Human Nervous System: Structure and Function.* Humana Press, Totowa, NJ. 89-99.
- Noback, C.R., N.L. Strominger, R.J. Demarest, and D.A. Ruggiero. 2005b. Neurons and Associated Cells. *In The Human Nervous System: Structure and Function.* Humana Press, Totowa, NJ. 11-39.
- Obermeier, B., R. Daneman, and R.M. Ransohoff. 2013. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med.* 19:1584-1596.
- Oh, S.P., T. Seki, K.A. Goss, T. Imamura, Y. Yi, P.K. Donahoe, L. Li, K. Miyazono, P. ten Dijke, S. Kim, and E. Li. 2000. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:2626-2631.
- Oshimori, N., and E. Fuchs. 2012. Paracrine TGF-beta signaling counterbalances BMP-mediated repression in hair follicle stem cell activation. *Cell Stem Cell.* 10:63-75.
- Pabon, M.M., A.D. Bachstetter, C.E. Hudson, C. Gemma, and P.C. Bickford. 2011. CX3CL1 reduces neurotoxicity and microglial activation in a rat model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation.* 8:9.
- Pardali, E., X.Q. Xie, P. Tsapogas, S. Itoh, K. Arvanitidis, C.H. Heldin, P. ten Dijke, T. Grundstrom, and P.

- Sideras. 2000. Smad and AML proteins synergistically confer transforming growth factor beta1 responsiveness to human germ-line IgA genes. *J Biol Chem.* 275:3552-3560.
- Paterna, J.C., A. Leng, E. Weber, J. Feldon, and H. Bueler. 2007. DJ-1 and Parkin modulate dopamine-dependent behavior and inhibit MPTP-induced nigral dopamine neuron loss in mice. *Mol Ther.* 15:698-704.
- Peelaerts, W., L. Bousset, A. Van der Perren, A. Moskalyuk, R. Pulizzi, M. Giugliano, C. Van den Haute, R. Melki, and V. Baekelandt. 2015. alpha-Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature.* 522:340-344.
- Petraglia, F., J. Vaughan, and W. Vale. 1989. Inhibin and activin modulate the release of gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone from cultured human placental cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:5114-5117.
- Pfriege, F.W., and N. Ungerer. 2011. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog Lipid Res.* 50:357-371.
- Piek, E., M. Afrakhte, K. Sampath, E.J. van Zoelen, C.H. Heldin, and P. ten Dijke. 1999. Functional antagonism between activin and osteogenic protein-1 in human embryonal carcinoma cells. *J Cell Physiol.* 180:141-149.
- Poewe, W., K. Seppi, C.M. Tanner, G.M. Halliday, P. Brundin, J. Volkman, A.E. Schrag, and A.E. Lang. 2017. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers.* 3:17013.
- Polito, A., and R. Reynolds. 2005. NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. *J Anat.* 207:707-716.
- Polymeropoulos, M.H., C. Lavedan, E. Leroy, S.E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E.S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W.G. Johnson, A.M. Lazzarini, R.C. Duvoisin, G. Di Iorio, L.I. Golbe, and R.L. Nussbaum. 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.* 276:2045-2047.
- Poon, V.Y., S. Choi, and M. Park. 2013. Growth factors in synaptic function. *Front Synaptic Neurosci.* 5:6.
- Qin, B.Y., S.S. Lam, J.J. Correia, and K. Lin. 2002. Smad3 allostery links TGF-beta receptor kinase activation to transcriptional control. *Genes Dev.* 16:1950-1963.
- Quaglio, G., M. Gallucci, H. Brand, A. Dawood, and F. Cobello. 2017. Traumatic brain injury: a priority for public health policy. *Lancet Neurol.* 16:951-952.
- Ramachandran, A., P. Vizan, D. Das, P. Chakravarty, J. Vogt, K.W. Rogers, P. Muller, A.P. Hinck, G.P. Sapkota, and C.S. Hill. 2018. TGF-beta uses a novel mode of receptor activation to phosphorylate SMAD1/5 and induce epithelial-to-mesenchymal transition. *Elife.* 7.
- Ramirez, G., R. Toro, H. Dobeli, and R. von Bernhardi. 2005. Protection of rat primary hippocampal cultures from A beta cytotoxicity by pro-inflammatory molecules is mediated by astrocytes. *Neurobiol Dis.* 19:243-254.
- Rao, V.L., M.K. Baskaya, A. Dogan, J.D. Rothstein, and R.J. Dempsey. 1998. Traumatic brain injury down-regulates glial glutamate transporter (GLT-1 and GLAST) proteins in rat brain. *J Neurochem.* 70:2020-2027.
- Rappert, A., I. Bechmann, T. Pivneva, J. Mahlo, K. Biber, C. Nolte, A.D. Kovac, C. Gerard, H.W. Boddeke, R. Nitsch, and H. Kettenmann. 2004. CXCR3-dependent microglial recruitment is essential for dendrite loss after brain lesion. *J Neurosci.* 24:8500-8509.
- Ray, S.K., C.E. Dixon, and N.L. Banik. 2002. Molecular mechanisms in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Histol Histopathol.* 17:1137-1152.
- Rimaniol, A.C., D. Lekieffre, A. Serrano, A. Masson, J. Benavides, and F. Zavala. 1995. Biphasic transforming growth factor-beta production flanking the pro-inflammatory cytokine response in cerebral trauma. *Neuroreport.* 7:133-136.
- Roussa, E., O. Oehlke, B. Rahhal, S. Heermann, S. Heidrich, M. Wiehle, and K. Kriegstein. 2008. Transforming growth factor beta cooperates with persephin for dopaminergic phenotype induction. *Stem Cells.* 26:1683-1694.
- Roux, A., L. Muller, S.N. Jackson, J. Post, K. Baldwin, B. Hoffer, C.D. Balaban, D. Barbacci, J.A. Schultz, S. Gouty, B.M. Cox, and A.S. Woods. 2016. Mass spectrometry imaging of rat brain lipid profile changes over time following traumatic brain injury. *J Neurosci Methods.* 272:19-32.
- Saatman, K.E., A.C. Duhaime, R. Bullock, A.I. Maas, A. Valadka, and G.T. Manley. 2008. Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. *J Neurotrauma.* 25:719-738.
- Saeed, A.I., V. Sharov, J. White, J. Li, W. Liang, N. Bhagabati, J. Braisted, M. Klapa, T. Currier, M. Thiagarajan, A. Sturn, M. Snuffin, A. Rezantsev, D. Popov, A. Ryltsov, E. Kostukovich, I. Borisovsky, Z. Liu, A. Vinsavich, V. Trush, and J. Quackenbush. 2003. TM4: a free, open-source system for microarray

- data management and analysis. *Biotechniques*. 34:374-378.
- Saharinen, J., M. Hyytiainen, J. Taipale, and J. Keski-Oja. 1999. Latent transforming growth factor-beta binding proteins (LTBPs)--structural extracellular matrix proteins for targeting TGF-beta action. *Cytokine Growth Factor Rev.* 10:99-117.
- Salinovich, O., and R.C. Montelaro. 1986. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 156:341-347.
- Samanta, J., T. Alden, K. Gobeske, L. Kan, and J.A. Kessler. 2010. Noggin protects against ischemic brain injury in rodents. *Stroke.* 41:357-362.
- Sanchez-Capelo, A., P. Colin, B. Guibert, N.F. Biguet, and J. Mallet. 2003. Transforming growth factor beta1 overexpression in the nigrostriatal system increases the dopaminergic deficit of MPTP mice. *Mol Cell Neurosci.* 23:614-625.
- Sanchez-Capelo, A., O. Corti, and J. Mallet. 1999. Adenovirus-mediated over-expression of TGFbeta1 in the striatum decreases dopaminergic cell survival in embryonic nigral grafts. *Neuroreport.* 10:2169-2173.
- Santibanez, J.F., A. Letamendia, F. Perez-Barric canal, C. Silvestri, M. Saura, C.P. Vary, J.M. Lopez-Novoa, L. Attisano, and C. Bernabeu. 2007. Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol.* 210:456-468.
- Sartori, R., E. Schirwis, B. Blaauw, S. Bortolanza, J. Zhao, E. Enzo, A. Stantzou, E. Mouisel, L. Toniolo, A. Ferry, S. Stricker, A.L. Goldberg, S. Dupont, S. Piccolo, H. Amthor, and M. Sandri. 2013. BMP signaling controls muscle mass. *Nat Genet.* 45:1309-1318.
- Sasaki, A., Y. Masuda, Y. Ohta, K. Ikeda, and K. Watanabe. 2001. Filamin associates with Smads and regulates transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem.* 276:17871-17877.
- Saura, J., J.M. Tusell, and J. Serratosa. 2003. High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia.* 44:183-189.
- Schachtrup, C., J.K. Ryu, M.J. Helmrick, E. Vagena, D.K. Galanakis, J.L. Degen, R.U. Margolis, and K. Akassoglou. 2010. Fibrinogen triggers astrocyte scar formation by promoting the availability of active TGF-beta after vascular damage. *J Neurosci.* 30:5843-5854.
- Schmidt, O.I., M. Infanger, C.E. Heyde, W. Ertel, and P.F. Stahel. 2004. The Role of Neuroinflammation in Traumatic Brain Injury. *European Journal of Trauma.* 30:135-149.
- Schober, A., H. Peterziel, C.S. von Bartheld, H. Simon, K. Krieglstein, and K. Unsicker. 2007. GDNF applied to the MPTP-lesioned nigrostriatal system requires TGF-beta for its neuroprotective action. *Neurobiol Dis.* 25:378-391.
- Setoguchi, T., K. Yone, E. Matsuoka, H. Takenouchi, K. Nakashima, T. Sakou, S. Komiya, and S. Izumo. 2001. Traumatic injury-induced BMP7 expression in the adult rat spinal cord. *Brain Res.* 921:219-225.
- Setsuie, R., Y.L. Wang, H. Mochizuki, H. Osaka, H. Hayakawa, N. Ichihara, H. Li, A. Furuta, Y. Sano, Y.J. Sun, J. Kwon, T. Kabuta, K. Yoshimi, S. Aoki, Y. Mizuno, M. Noda, and K. Wada. 2007. Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. *Neurochem Int.* 50:119-129.
- Shapira, Y., E. Shohami, A. Sidi, D. Soffer, S. Freeman, and S. Cotev. 1988. Experimental closed head injury in rats: mechanical, pathophysiologic, and neurologic properties. *Crit Care Med.* 16:258-265.
- Shi, Y., and J. Massague. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 113:685-700.
- Shigeri, Y., R.P. Seal, and K. Shimamoto. 2004. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev.* 45:250-265.
- Shih, C.H., M. Lacagnina, K. Leuer-Biscioti, and C. Proschel. 2014. Astroglial-derived periostin promotes axonal regeneration after spinal cord injury. *J Neurosci.* 34:2438-2443.
- Shin, J.A., J.L. Kang, K.E. Lee, and E.M. Park. 2012. Different temporal patterns in the expressions of bone morphogenetic proteins and noggin during astroglial scar formation after ischemic stroke. *Cell Mol Neurobiol.* 32:587-597.
- Shohami, E., Y. Shapira, and S. Cotev. 1988. Experimental closed head injury in rats: prostaglandin production in a noninjured zone. *Neurosurgery.* 22:859-863.
- Sica, A., and A. Mantovani. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 122:787-795.
- Sidoryk-Wegrzynowicz, M., M. Wegrzynowicz, E. Lee, A.B. Bowman, and M. Aschner. 2011. Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol Pathol.* 39:115-123.
- Siegenthaler, J.A., and M.W. Miller. 2004. Transforming growth factor beta1 modulates cell migration in rat

- cortex: effects of ethanol. *Cereb Cortex*. 14:791-802.
- Silver, J., and J.H. Miller. 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*. 5:146-156.
- Skandsen, T., K.A. Kvistad, O. Solheim, I.H. Strand, M. Folvik, and A. Vik. 2010. Prevalence and impact of diffuse axonal injury in patients with moderate and severe head injury: a cohort study of early magnetic resonance imaging findings and 1-year outcome. *J Neurosurg*. 113:556-563.
- Smith, D.H., D.F. Meaney, and W.H. Shull. 2003. Diffuse axonal injury in head trauma. *J Head Trauma Rehabil*. 18:307-316.
- Smith, W.W., Z. Pei, H. Jiang, V.L. Dawson, T.M. Dawson, and C.A. Ross. 2006. Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity. *Nat Neurosci*. 9:1231-1233.
- Smits, H.A., A.J. van Beelen, N.M. de Vos, A. Rijmsmus, T. van der Bruggen, J. Verhoef, F.L. van Muiswinkel, and H.S. Nottet. 2001. Activation of human macrophages by amyloid-beta is attenuated by astrocytes. *J Immunol*. 166:6869-6876.
- Sofroniew, M.V. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*. 32:638-647.
- Sofroniew, M.V., and H.V. Vinters. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 119:7-35.
- Song, G., R. Yang, Q. Zhang, L. Chen, D. Huang, J. Zeng, C. Yang, and T. Zhang. 2019. TGF-beta Secretion by M2 Macrophages Induces Glial Scar Formation by Activating Astrocytes In Vitro. *J Mol Neurosci*. 69:324-332.
- Sonnier, L., G. Le Pen, A. Hartmann, J.C. Bizot, F. Trovero, M.O. Krebs, and A. Prochiantz. 2007. Progressive loss of dopaminergic neurons in the ventral midbrain of adult mice heterozygote for Engrailed1. *J Neurosci*. 27:1063-1071.
- Spittau, B., L. Wullkopf, X. Zhou, J. Rilka, D. Pfeifer, and K. Kriegelstein. 2013. Endogenous transforming growth factor-beta promotes quiescence of primary microglia in vitro. *Glia*. 61:287-300.
- Stayte, S., P. Rentsch, K.M. Li, and B. Vissel. 2015. Activin A protects midbrain neurons in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *PLoS One*. 10:e0124325.
- Stipursky, J., and F.C. Gomes. 2007. TGF-beta1/SMAD signaling induces astrocyte fate commitment in vitro: implications for radial glia development. *Glia*. 55:1023-1033.
- Strelau, J., A. Schober, A. Sullivan, L. Schilling, and K. Unsicker. 2003. Growth/differentiation factor-15 (GDF-15), a novel member of the TGF-beta superfamily, promotes survival of lesioned mesencephalic dopaminergic neurons in vitro and in vivo and is induced in neurons following cortical lesioning. *J Neural Transm Suppl*:197-203.
- Subramaniam, N., G.M. Leong, T.A. Cock, J.L. Flanagan, C. Fong, J.A. Eisman, and A.P. Kouzmenko. 2001. Cross-talk between 1,25-dihydroxyvitamin D3 and transforming growth factor-beta signaling requires binding of VDR and Smad3 proteins to their cognate DNA recognition elements. *J Biol Chem*. 276:15741-15746.
- Sullivan, A.M., J. Opacka-Juffry, J. Pohl, and S.B. Blunt. 1999. Neuroprotective effects of growth/differentiation factor 5 depend on the site of administration. *Brain Res*. 818:176-179.
- Sullivan, A.M., and A. Toulouse. 2011. Neurotrophic factors for the treatment of Parkinson's disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 22:157-165.
- Szepesi, Z., O. Manouchehrian, S. Bachiller, and T. Deierborg. 2018. Bidirectional Microglia-Neuron Communication in Health and Disease. *Front Cell Neurosci*. 12:323.
- Tabata, H. 2015. Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. *Front Neurosci*. 9:114.
- Tapia-Gonzalez, S., R.M. Giraldez-Perez, M.I. Cuartero, M.J. Casarejos, M.A. Mena, X.F. Wang, and A. Sanchez-Capelo. 2011. Dopamine and alpha-synuclein dysfunction in Smad3 null mice. *Mol Neurodegener*. 6:72.
- Tay, T.L., J.C. Savage, C.W. Hui, K. Bisht, and M.E. Tremblay. 2017. Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. *J Physiol*. 595:1929-1945.
- Taylor, R.A., C.F. Chang, B.A. Goods, M.D. Hammond, B. Mac Grory, Y. Ai, A.F. Steinschneider, S.C. Renfro, M.H. Askenase, L.D. McCullough, S.E. Kasner, M.T. Mullen, D.A. Hafler, J.C. Love, and L.H. Sansing. 2017. TGF-beta1 modulates microglial phenotype and promotes recovery after intracerebral hemorrhage. *J Clin Invest*. 127:280-292.
- Teasdale, G., and B. Jennett. 1974. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet*. 2:81-84.
- Tesseur, I., A. Nguyen, B. Chang, L. Li, N.S. Woodling, T. Wyss-Coray, and J. Luo. 2017. Deficiency in Neuronal TGF-beta Signaling Leads to Nigrostriatal Degeneration and Activation of TGF-beta Signaling Protects against MPTP Neurotoxicity in Mice. *J Neurosci*. 37:4584-4592.

- Thiruchelvam, M., E.K. Richfield, R.B. Baggs, A.W. Tank, and D.A. Cory-Slechta. 2000. The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease. *J Neurosci.* 20:9207-9214.
- Tichauer, J., K. Saud, and R. von Bernhardi. 2007. Modulation by astrocytes of microglial cell-mediated neuroinflammation: effect on the activation of microglial signaling pathways. *Neuroimmunomodulation.* 14:168-174.
- Tortora, G.J., and B. Derrickson. 2016. Principles of Anatomy and Physiology (15th edition). Wiley.
- Toru-Delbauffe, D., D. Baghdassarian-Chalaye, J.M. Gavaret, F. Courtin, M. Pomerance, and M. Pierre. 1990. Effects of transforming growth factor beta 1 on astroglial cells in culture. *J Neurochem.* 54:1056-1061.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:4350-4354.
- Tower, D.B., and O.M. Young. 1973. The activities of butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase, the rate of anaerobic glycolysis, and the question of a constant density of glial cells in cerebral cortices of various mammalian species from mouse to whale. *J Neurochem.* 20:269-278.
- Treichel, J.A., M. Reddington, and G.W. Kreutzberg. 1998. Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 mRNA accumulation by basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta1 in cultured rat astrocytes. *J Neurochem.* 71:1944-1952.
- Tsukazaki, T., T.A. Chiang, A.F. Davison, L. Attisano, and J.L. Wrana. 1998. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell.* 95:779-791.
- Tzavlaki, K., and A. Moustakas. 2020. TGF-beta Signaling. *Biomolecules.* 10.
- van Deijk, A.F., N. Camargo, J. Timmerman, T. Heistek, J.F. Brouwers, F. Mogavero, H.D. Mansvelter, A.B. Smit, and M.H. Verheijen. 2017. Astrocyte lipid metabolism is critical for synapse development and function in vivo. *Glia.* 65:670-682.
- Van Geest, R.J., I. Klaassen, I.M. Vogels, C.J. Van Noorden, and R.O. Schlingemann. 2010. Differential TGF- β signaling in retinal vascular cells: a role in diabetic retinopathy? *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51:1857-1865.
- van Landeghem, F.K., T. Weiss, M. Oehmichen, and A. von Deimling. 2006. Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes after human traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 23:1518-1528.
- Vawter, M.P., O. Dillon-Carter, W.W. Tourtellotte, P. Carvey, and W.J. Freed. 1996. TGFbeta1 and TGFbeta2 concentrations are elevated in Parkinson's disease in ventricular cerebrospinal fluid. *Exp Neurol.* 142:313-322.
- Vekrellis, K., M. Xilouri, E. Emmanouilidou, H.J. Rideout, and L. Stefanis. 2011. Pathological roles of alpha-synuclein in neurological disorders. *Lancet Neurol.* 10:1015-1025.
- Verge, G.M., E.D. Milligan, S.F. Maier, L.R. Watkins, G.S. Naeve, and A.C. Foster. 2004. Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions. *Eur J Neurosci.* 20:1150-1160.
- Vila, M., and S. Przedborski. 2003. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 4:365-375.
- Vogel, T., S. Ahrens, N. Buttner, and K. Kriegstein. 2010. Transforming growth factor beta promotes neuronal cell fate of mouse cortical and hippocampal progenitors in vitro and in vivo: identification of Nedd9 as an essential signaling component. *Cereb Cortex.* 20:661-671.
- Walz, W. 2000. Controversy surrounding the existence of discrete functional classes of astrocytes in adult gray matter. *Glia.* 31:95-103.
- Wang, S., A. Sun, L. Li, G. Zhao, J. Jia, K. Wang, J. Ge, and Y. Zou. 2012. Up-regulation of BMP-2 antagonizes TGF-beta1/ROCK-enhanced cardiac fibrotic signalling through activation of Smurf1/Smad6 complex. *J Cell Mol Med.* 16:2301-2310.
- Wang, Y., C.F. Chang, M. Morales, J. Chou, H.L. Chen, Y.H. Chiang, S.Z. Lin, J.L. Cadet, X. Deng, J.Y. Wang, S.Y. Chen, P.L. Kaplan, and B.J. Hoffer. 2001. Bone morphogenetic protein-6 reduces ischemia-induced brain damage in rats. *Stroke.* 32:2170-2178.
- Wang, Z., M. Gerstein, and M. Snyder. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 10:57-63.
- Weiss, A., and L. Attisano. 2013. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2:47-63.
- Whitehead, T.P., D.G. Bullock, and T.J. Carter. 1979. High-density lipoprotein cholesterol analysis. *Clin Chem.* 25:2055-2057.

- Wicks, S.J., S. Lui, N. Abdel-Wahab, R.M. Mason, and A. Chantry. 2000. Inactivation of smad-transforming growth factor beta signaling by Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II. *Mol Cell Biol.* 20:8103-8111.
- Williams, A.J., J.A. Hartings, X.C. Lu, M.L. Rolli, J.R. Dave, and F.C. Tortella. 2005. Characterization of a new rat model of penetrating ballistic brain injury. *J Neurotrauma.* 22:313-331.
- Williams, A.J., G.S. Ling, and F.C. Tortella. 2006. Severity level and injury track determine outcome following a penetrating ballistic-like brain injury in the rat. *Neurosci Lett.* 408:183-188.
- Williams, A.J., H.H. Wei, J.R. Dave, and F.C. Tortella. 2007. Acute and delayed neuroinflammatory response following experimental penetrating ballistic brain injury in the rat. *J Neuroinflammation.* 4:17.
- Wong, Y.C., and D. Krainc. 2017. alpha-synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. *Nat Med.* 23:1-13.
- Wotton, D., R.S. Lo, S. Lee, and J. Massague. 1999. A Smad transcriptional corepressor. *Cell.* 97:29-39.
- Wu, G., Y.G. Chen, B. Ozdamar, C.A. Gyuricza, P.A. Chong, J.L. Wrana, J. Massague, and Y. Shi. 2000. Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science.* 287:92-97.
- Wyss-Coray, T., L. Feng, E. Masliah, M.D. Ruppe, H.S. Lee, S.M. Toggas, E.M. Rockenstein, and L. Mucke. 1995. Increased central nervous system production of extracellular matrix components and development of hydrocephalus in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-beta 1. *Am J Pathol.* 147:53-67.
- Xie, X.Q., E. Pardali, M. Holm, P. Sideras, and T. Grundstrom. 1999. AML and Ets proteins regulate the I alpha1 germ-line promoter. *Eur J Immunol.* 29:488-498.
- Xilouri, M., E. Kyratzi, P.M. Pitychoutis, Z. Papadopoulou-Daifoti, C. Perier, M. Vila, M. Maniati, A. Ulusoy, D. Kirik, D.S. Park, K. Wada, and L. Stefanis. 2012. Selective neuroprotective effects of the S18Y polymorphic variant of UCH-L1 in the dopaminergic system. *Hum Mol Genet.* 21:874-889.
- Xiong, Y., A. Mahmood, and M. Chopp. 2013. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci.* 14:128-142.
- Yanagisawa, M., T. Takizawa, W. Ochiai, A. Uemura, K. Nakashima, and T. Taga. 2001. Fate alteration of neuroepithelial cells from neurogenesis to astrocytogenesis by bone morphogenetic proteins. *Neurosci Res.* 41:391-396.
- Yasuda, T., T. Nihira, Y.R. Ren, X.Q. Cao, K. Wada, R. Setsuie, T. Kabuta, N. Hattori, Y. Mizuno, and H. Mochizuki. 2009. Effects of UCH-L1 on alpha-synuclein over-expression mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 108:932-944.
- Yi, J.H., and A.S. Hazell. 2006. Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. *Neurochem Int.* 48:394-403.
- Yi, J.J., A.P. Barnes, R. Hand, F. Polleux, and M.D. Ehlers. 2010. TGF-beta signaling specifies axons during brain development. *Cell.* 142:144-157.
- Yuan, G., Y. Zhan, X. Gou, Y. Chen, and G. Yang. 2018. TGF-beta signaling inhibits canonical BMP signaling pathway during palate development. *Cell Tissue Res.* 371:283-291.
- Zamanian, J.L., L. Xu, L.C. Foo, N. Nouri, L. Zhou, R.G. Giffard, and B.A. Barres. 2012. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci.* 32:6391-6410.
- Zhang, H., L.M. Wu, and J. Wu. 2011. Cross-talk between apolipoprotein E and cytokines. *Mediators Inflamm.* 2011:949072.
- Zhang, J.M., R. Hoffmann, and M. Sieber-Blum. 1997. Mitogenic and anti-proliferative signals for neural crest cells and the neurogenic action of TGF-beta1. *Dev Dyn.* 208:375-386.
- Zhang, Y., X.H. Feng, and R. Derynck. 1998. Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature.* 394:909-913.
- Zi, Z., D.A. Chapnick, and X. Liu. 2012. Dynamics of TGF-beta/Smad signaling. *FEBS Lett.* 586:1921-1928.
- Zoller, T., A. Schneider, C. Kleimeyer, T. Masuda, P.S. Potru, D. Pfeifer, T. Blank, M. Prinz, and B. Spittau. 2018. Silencing of TGFbeta signalling in microglia results in impaired homeostasis. *Nat Commun.* 9:4011.
- Zuch, C.L., D. David, L. Ujhelyi, J.L. Hudson, G.A. Gerhardt, P.L. Kaplan, and P.C. Bickford. 2004. Beneficial effects of intraventricularly administered BMP-7 following a striatal 6-hydroxydopamine lesion. *Brain Res.* 1010:10-16.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Βιογραφικό σημείωμα

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Γεώργιος Διβόλης

Ημερομηνία γέννησης: 20 Οκτωβρίου 1988

Τόπος γέννησης: Αθήνα Αττικής

Διεύθυνση: Ανθίππου 34, Δάφνη, 17235, Αθήνα

Κινητό Τηλέφωνο: +30 697 8295904

e-mail: gdivolis@bioacademy.gr / geodivolis@hotmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- **Μάιος 2015 – Οκτώβριος 2020:** Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής με θέμα «Επίδραση του συστήματος σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ κατά την ομοιοστάση και παθοφυσιολογία του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος», Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, ΕΚΠΑ. Βαθμολογία διατριβής: «Άριστα».
- **Οκτώβριος 2011 – Δεκέμβριος 2014:** Φοίτηση στο Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών στη «Μοριακή Ιατρική», Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ. Αποφοίτηση με γενικό βαθμό πτυχίου 9.81/10 «Άριστα».
- **Σεπτέμβριος 2006 – Ιούλιος 2011:** Φοίτηση στο Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, ΕΚΠΑ. Αποφοίτηση με γενικό βαθμό πτυχίου 8.88/10 «Άριστα».

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ-ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- **Φεβρουάριος 2020 – σήμερα:** Επιστημονικός συνεργάτης του Δρ. Σιδερά Πασχάλη, Ερευνητή Α', ΙΙΒΕΑΑ, στο πλαίσιο του έργου «Ανάπτυξη και προτυποποίηση καινοτόμου μεθόδου για ταχεία διαφορική διάγνωση και ορθολογική επιλογή εξατομικευμένης θεραπείας στα φλεγμονώδη νοσήματα με βάση τη νόσο-ειδική έκφραση κυτταροκινών κατά τη ΝΕΤωση των ουδετερόφιλων του περιφερικού αίματος».
- **Ιανουάριος 2018 – Φεβρουάριος 2019:** Επιστημονικός συνεργάτης του Δρ. Ανδρεάκου Ευάγγελου, Ερευνητή Α', ΙΙΒΕΑΑ, στο πλαίσιο του έργου "Targeting novel lipid pathways for treatment of cardiovascular disease".
- **Απρίλιος 2016 – Δεκέμβριος 2017:** Επιστημονικός συνεργάτης του Δρ. Σιδερά Πασχάλη στο πλαίσιο του έργου "Establishing the link between canonical TGFβ-superfamily signaling and Parkinson's disease pathology" (National Parkinson Foundation, ΗΠΑ).
- **Σεπτέμβριος 2015 – Μάρτιος 2016:** Επιστημονικός συνεργάτης του Δρ. Μουστάκα Αριστείδη, Καθηγητή, Κέντρο Βιοϊατρικής, Πανεπιστήμιο της Ουψάλα, Σουηδία, στο πλαίσιο του έργου «Μελέτη της σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ στη νόσο του γλοιοβλαστώματος».
- **Ιούλιος 2014 – Αύγουστος 2015:** Επιστημονικός συνεργάτης του Δρ. Σιδερά Πασχάλη στο πλαίσιο του έργου «Διερεύνηση βασικών μηχανισμών ανάπτυξης και

επιδιόρθωσης ιστικής βλάβης που ρυθμίζονται από το σύστημα σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ για ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων νοσήματα του αναπνευστικού συστήματος».

- **Σεπτέμβριος 2012 – Ιούνιος 2014:** Μέλος της ερευνητικής ομάδας του Δρ. Σιδερά Πασχάλη στο πλαίσιο εκπόνησης της Διπλωματικής Εργασίας με τίτλο «Μελέτη της υπεροικογένειας αυξητικών παραγόντων του TGFβ στην φυσιολογία και παθοφυσιολογία του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος» (βαθμός: 10/10 «Άριστα»).
- **Μάρτιος 2012 – Αύγουστος 2012:** Μέλος της ερευνητικής ομάδας του Δρ. Σιδερά Πασχάλη, στο πλαίσιο του ΠΜΣ «Μοριακή Ιατρική», θέμα «Ανάπτυξη ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σύντηξης που εξουδετερώνουν τη δράση της Ακτιβίνης Α».
- **Νοέμβριος 2011 – Φεβρουάριος 2012:** Μέλος της ερευνητικής ομάδας της Δρ. Μάγκουρα Δήμητρας, Ερευνήτριας Α', ΙΙΒΕΑΑ, στο πλαίσιο του ΠΜΣ «Μοριακή Ιατρική», θέμα «Μελέτη της υπερέκφρασης των H-RAS και NF1-GRDII σε κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος».
- **Σεπτέμβριος 2009 – Οκτώβριος 2011:** Μέλος της ερευνητικής ομάδας της Δρ. Παπαζαφείρη Παναγιώτας, Αν. Καθηγήτριας, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, στο πλαίσιο εκπόνησης της Διπλωματικής Εργασίας με τίτλο «Μελέτη του ρόλου του ασβεστίου στην ενεργοποίηση μονοπατιών κυτταρικής επιβίωσης» (βαθμός: 10/10 «Άριστα»).

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- Stavropoulos A., **Divolis G.**, Manioudaki M., Gavriil A., Kloukina I., Perrea N. D., Sountoulidis A., Doulou A., Apostolidou A., Katsantoni E., Ritvos O., Germanidis G., Xilouri M., Sideras P. Activation of both TGFβ and BMP pathways underlines liver development, homeostasis and paracetamol-induced hepatic injury. 2020 (submitted).
- Synolaki E., Papadopoulos V., **Divolis G.**, Tsahouridou O., Gavriilidis E., Loli G., Gavriil A., Tsigalou C., Tziolos N., Sertaridou E., Kalra B., Kumar A., Rafailidis P., Pasternack A., Boumpas D., Germanidis G., Ritvos O., Metallidis S., Skendros P. and Sideras P. The Activin/Follistatin-axis is severely deregulated in COVID-19 and independently associated with in-hospital mortality. medRxiv 2020.09.05.20184655; <https://doi.org/10.1101/2020.09.05.20184655>.
- **Divolis G.**, Stavropoulos A., Manioudaki M., Apostolidou A., Doulou A., Gavriil A., Dafnis I., Chroni A., Mummery C., Xilouri M., Sideras P. Activation of both transforming growth factor-β and bone morphogenetic protein signaling pathways upon traumatic brain injury restrains pro-inflammatory and boosts tissue reparatory responses of reactive astrocytes and microglia. Brain Commun. 2019 Oct 21;1(1):fcz028. doi: 10.1093/braincomms/fcz028. PMID: 32954268; PMCID: PMC7425383.
- **Divolis G.**, Mavroeidi P., Mavrofrydi O., Papazafiri P. Differential effects of calcium on PI3K-Akt and HIF-1α survival pathways. Cell Biol Toxicol. 2016 Oct;32(5):437-49. doi: 10.1007/s10565-016-9345-x. Epub 2016 Jun 25. PMID: 27344565.

ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΣΕΙΣ - ΓΝΩΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

- Χειρισμός πειραματοζώων, απομόνωση και επεξεργασία οργάνων μυών. *Πιστοποιητικό εκπαίδευσης στη χρήση τρωκτικών και λαγόμορφων ως πειραματικά πρότυπα στην εργαστηριακή έρευνα, που αντιστοιχεί στην πιστοποίηση FELASA Category B/Directive 2010/63/EU function A. December 2015, Uppsala University, Sweden.*
- Απομόνωση και επεξεργασία εγκεφάλου μυών για ιστολογική, μοριακή ή βιοχημική ανάλυση.
- Χορήγηση νευροτοξινών για προσομοίωση της νόσου Πάρκινσον σε μύες.
- Στερεοτακτική επέμβαση στον εγκέφαλο ενήλικων μυών για πρόκληση τραυματικής κάκωσης ή για χορήγηση ανασυνδυασμένων ιικών φορέων
- Διεξαγωγή και ανάλυση συμπεριφορικών δοκιμασιών.
- Χειρισμός κυτταρικών σειρών.
- Προετοιμασία και διατήρηση πρωτογενών καλλιιεργειών γλοίας μυός.
- Προετοιμασία δειγμάτων για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής ή κυτταρικό διαχωρισμό μέσω κυτταροδιαχωριστή (FACS).
- Τεχνικές κλωνοποίησης και επεξεργασίας διαγονιδιακών κατασκευασμάτων.
- Ανάπτυξη, παραγωγή και απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σύντηξης σε κύτταρα θηλαστικών (IgG Fc fusion technology).
- Διατήρηση βακτηριακών καλλιιεργειών και απομόνωση πλασμιδιακού DNA.
- Διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης.
- Ανάπτυξη, απομόνωση και χρήση αδενο-ικών φορέων έκφρασης.
- Απομόνωση, ποσοτικοποίηση και ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών.
- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (απλή PCR και qRT-PCR).
- Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης.
- Σύνθεση cDNA βιβλιοθηκών για RNA-Seq ανάλυση και βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων (χρήση πλατφόρμας Ingenuity® Pathway Analysis, Qiagen).
- Ανοσοσύπωμα κατά Western.
- Ανοσοϊστοχημεία, ανοσοκυτταροχημεία.
- Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.
- Δοκιμασία λουσιφεράσης.
- Ενζυμική ανοσοπροσροφητική ανάλυση (ELISA).
- Μέτρηση κυτταρικής βιωσιμότητας (MTT).
- Φθορισμομετρικός προσδιορισμός κυτταροπλασματικού ασβεστίου.
- Χειρισμός κρυοτόμου και μικροτόμου.
- Χειρισμός μικροσκοπίων φθορισμού και συνεστιακού μικροσκοπίου.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- **(i) Divolis G.**, Stavropoulos A., Manioudaki M., Apostolidou A., Doulou A., Gavriil A., Dafnis I., Chroni A., Mummery C., Xilouri M. and Sideras P., Activation of both TGFβ and BMP pathways upon traumatic brain injury restrains pro-inflammatory and boosts tissue reparatory responses of reactive astrocytes and microglia. **(ii)** Stavropoulos A., **Divolis G.**, Manioudaki M., Gavriil A., Kloukina I., Germanidis G., Xilouri M. and Sideras P., Global analysis of canonical TGFβ-superfamily signalling dynamics in liver biology and pathophysiology. 70th Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, 29 November-01 December 2019, Athens, Greece.
- **(i) Divolis G.**, Melachroinou K., Stavropoulos A., Polissidis A., Sprengel R., Wöfl S., Gavriil A., Apostolidou A., Stefanis L., Xilouri M. and Sideras P., Canonical TGFβ Superfamily signaling in the context of the MPTP induced parkinsonism. **(ii)** Melachroinou K., **Divolis G.**, Stavropoulos A., Polissidis A., Baekelandt V., Stefanis L., Sideras P. and Xilouri M., Unraveling the role of canonical TGFβ-Superfamily signaling in a preclinical alpha-synucleinopathy mouse model. 27th Meeting of the Hellenic Society for Neurosciences, 08-10 December 2017, Athens, Greece **and** 68th Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, 10-12 November 2017, Athens, Greece.
- Melachroinou K., **Divolis G.**, Stavropoulos A., Polissidis A., Baekelandt V., Stefanis L., Sideras P., Xilouri M. Establishing the link between canonical TGFβ-superfamily signaling and alpha-synuclein pathophysiology. 20 Years of alpha-synuclein in Parkinson's Disease & related synucleinopathies, 07-10 September 2017, Vravra, Greece.
- **(i) Divolis G.**, Xilouri M., Stavropoulos A., Gavriil A., Apostolidou A., Sideras P., Canonical TGFβ Superfamily signaling in physiology and pathophysiology of the Central Nervous System. **(ii)** Stavropoulos A., **Divolis G.**, Sountoulidis A., Ford E., Gavriil A., Apostolidou A., Sideras P., Transgenic TGFβ/BMP double reporter mice allow global visualization of canonical TGFβ-Superfamily mediated signaling. 5th Summerschool of Immunology, 18-22 May 2015, Porto Heli, Greece
- Stavropoulos A., Sountoulidis A., Ford E., Katsantoni E., **Divolis G.**, Thanos D., and Sideras P., TGFβ superfamily signalling in liver development and homeostasis. Annual TGFβ meeting. 7-10 May 2014, Leiden, The Netherlands
- Μαυροφρύδη Όλ., **Διβόλης Γ.**, Παπαζαφείρη Π., Αύξηση ασβεστίου & HIF-1α κατά την καρκινογένεση. 34^ο ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ε.Ε.Β.Ε., 17-19 Μαΐου 2012, Τρίκαλα.
- **Divolis G.**, Mavrofrydi O., Papazafiri P., Differential effects of calcium on PI3K-Akt and HIF-1α survival pathways, 62nd Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, 9-11 December 2011, Athens, Greece.
- **Διβόλης Γ.**, Μαυροφρύδη Όλ., Παπαζαφείρη Π., Μελέτη του ρόλου του ασβεστίου στην ενεργοποίηση μονοπατιών κυτταρικής επιβίωσης. 32^ο ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ε.Ε.Β.Ε., 20-22 Μαΐου 2010, Καρπενήσι.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

- **Αγγλικά:** Άριστη γνώση, κάτοχος Certificate of Proficiency in English, University of Michigan (επίπεδο Γ2)
- **Γαλλικά:** Άριστη γνώση, κάτοχος Diplôme Approfondi de Langue Française (επίπεδο Γ2)
- **Ισπανικά:** Καλή γνώση, κάτοχος Diploma A2 de Español, Instituto Cervantes (επίπεδο A2)
- **Σουηδικά:** Βασική επικοινωνία

ΓΝΩΣΕΙΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

- Κάτοχος του European Computer Driving Licence (ECDL Core Certificate)
- Χειρισμός λογισμικών ανάλυσης στατιστικών δεδομένων (GraphPad Prism) και επεξεργασίας εικόνας (Image J, Adobe Photoshop & Illustrator)

ΒΡΑΒΕΙΑ-ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

- Χορήγηση 24μηνιας υποτροφίας από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) στο πλαίσιο της Πράξης «Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ με διαδικασία εξατομικευμένης αξιολόγησης ακαδ. έτους 2011-2012» του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» για Μεταπτυχιακές Σπουδές Πρώτου Κύκλου στην Ελλάδα
- Απονομή χρηματικού επάθλου από τα έσοδα της κληρονομιάς Παντιά-Ράλλη λόγω διάκρισης ως προς το ήθος και την πρόοδο κατά το πανεπιστημιακό έτος 2010-2011
- Απονομή βραβείου και χορήγηση υποτροφίας από το ΙΚΥ για τη διάκριση στις σπουδές και το ήθος κατά το ακαδημαϊκό έτος 2007-08 στο Τμήμα Βιολογίας του ΕΚΠΑ (βαθμός επίδοσης: 8.66/10)
- Χορήγηση επιδότησης για την απόκτηση φορητού υπολογιστή, μέσω της δράσης «Δες την Ψηφιακά», για την επίδοση στις εισαγωγικές εξετάσεις του 2006 και την υψηλή θέση εισαγωγής στο Τμήμα Βιολογίας του ΕΚΠΑ (11^{ος} σε σύνολο 120 φοιτητών). Φορέας υλοποίησης: Εθνικό Δίκτυο Έρευνας και Τεχνολογίας (ΕΔΕΤ ΑΕ)
- Χορήγηση επιδότησης για την παρακολούθηση εκπαιδευτικού προγράμματος σε Τεχνολογίες Πληροφορικής και Επικοινωνιών, μέσω της δράσης «e-κπαιδευτείτε». Φορέας υλοποίησης: ΕΔΕΤ ΑΕ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Πρωτότυπη δημοσίευση στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής

Divolis G., Stavropoulos A., Manioudaki M., Apostolidou A., Doulou A., Gavriil A., Dafnis I., Chroni A., Mummery C., Xilouri M., Sideras P. Activation of both transforming growth factor- β and bone morphogenetic protein signaling pathways upon traumatic brain injury restrains pro-inflammatory and boosts tissue reparatory responses of reactive astrocytes and microglia. *Brain Commun.* 2019 Oct 21;1(1):fcz028. doi:10.1093/braincomms/fcz028. PMID: 32954268; PMCID: PMC7425383.

BRAIN COMMUNICATIONS

Activation of both transforming growth factor- β and bone morphogenetic protein signalling pathways upon traumatic brain injury restrains pro-inflammatory and boosts tissue reparatory responses of reactive astrocytes and microglia

Georgios Divolis,¹ Athanasios Stavropoulos,¹ Maria Manioudaki,¹ Anastasia Apostolidou,¹ Athanasia Doulou,¹ Ariana Gavriil,¹ Ioannis Dafnis,² Angeliki Chroni,² Christine Mummery,³ Maria Xilouri¹ and Paschalis Sideras¹

Various ligands and receptors of the transforming growth factor- β superfamily have been found upregulated following traumatic brain injury; however, the role of this signalling system in brain injury pathophysiology is not fully characterized. To address this, we utilized an acute stab wound brain injury model to demonstrate that hallmarks of transforming growth factor- β superfamily system activation, such as levels of phosphorylated Smads, ligands and target genes for both transforming growth factor- β and bone morphogenetic protein pathways, were upregulated within injured tissues. Using a bone morphogenetic protein-responsive reporter mouse model, we showed that activation of the bone morphogenetic protein signalling pathway involves primarily astrocytes that demarcate the wound area. Insights regarding the potential role of transforming growth factor- β superfamily activation in glia cells within the injured tissues were obtained indirectly by treating purified reactive astrocytes and microglia with bone morphogenetic protein-4 or transforming growth factor- β 1 and characterizing changes in their transcriptional profiles. Astrocytes responded to both ligands with considerably overlapping profiles, whereas, microglia responded selectively to transforming growth factor- β 1. Novel pathways, crucial for repair of tissue-injury and blood-brain barrier, such as activation of cholesterol biosynthesis and transport, production of axonal guidance and extracellular matrix components were upregulated by transforming growth factor- β 1 and/or bone morphogenetic protein-4 in astrocytes. Moreover, both ligands in astrocytes and transforming growth factor- β 1 in microglia shifted the phenotype of reactive glia cells towards the anti-inflammatory and tissue reparatory 'A2'-like and 'M0/M2'-like phenotypes, respectively. Increased expression of selected key components of the *in vitro* modulated pathways and markers of 'A2'-like astrocytes was confirmed within the wound area, suggesting that these processes could also be modulated *in situ* by the integrated action of transforming growth factor- β and/or bone morphogenetic protein-mediated signalling. Collectively, our study provides a comprehensive comparative analysis of transforming growth factor- β superfamily signalling in reactive astrocytes and microglia and points towards a crucial role of both transforming growth factor- β and bone morphogenetic protein pathways in modulating the inflammatory and brain injury reparatory functions of activated glia cells.

- 1 Center for Clinical Research, Experimental Surgery and Translational Research, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, 11527 Athens, Greece
- 2 Institute of Biosciences and Applications, National Center for Scientific Research-Demokritos, 15341 Athens, Greece
- 3 Department of Anatomy and Embryology, Leiden University Medical Center, 2333ZC Leiden, The Netherlands

Received July 26, 2019. Revised September 24, 2019. Accepted October 7, 2019. Advance Access publication October 21, 2019

© The Author(s) (2019). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain.

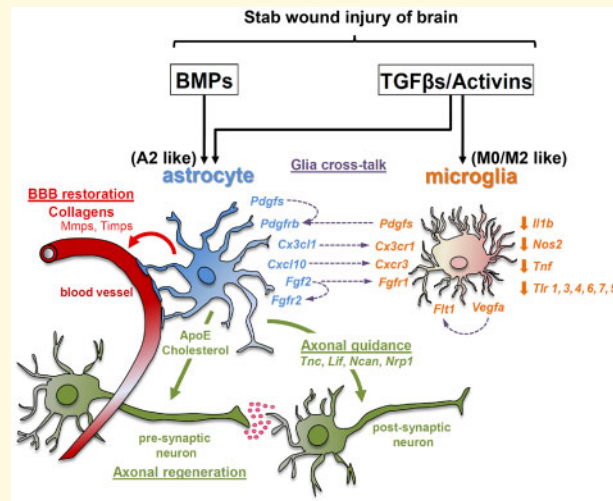
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

Correspondence to: Paschalis Sideras, PhD, Center for Clinical Research, Experimental Surgery and Translational Research, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, 4 Soranou Ephessiou Street, 11527 Athens, Greece
E-mail: sideras@bioacademy.gr

Keywords: astrocytes; BMP; microglia; TGF β ; traumatic brain injury

Abbreviations: ALK = anaplastic lymphoma kinase; BMP = Bone morphogenetic protein; BRE = BMP-responsive elements; dpi = days post-injury; eGFP = enhanced green fluorescent protein; ERK = extracellular signal-regulated kinase; FPKM = fragments per kilobase million; GLAST = glutamate-aspartate transporter; GO = gene ontology; IPA = ingenuity pathway analysis; NRF2 = nuclear factor erythroid 2-related factor 2; PDL = poly-D-lysine; PDGF = platelet-derived growth factor; PI3K = phosphatidylinositol-3-kinase; qRT-PCR = quantitative real-time polymerase chain reaction; SW = stab wound; VEGF = vascular endothelial growth factor; TBI = traumatic brain injury; TGF β = transforming growth factor beta

Graphical Abstract



Introduction

Traumatic brain injury (TBI), defined as alteration in brain function provoked by external mechanical force (Menon *et al.*, 2010), is the main cause of injury-related death, disability and mental disorders, thus representing major public health issue (Majdan *et al.*, 2016; Dewan *et al.*, 2018). According to recent epidemiological studies, TBI affects annually more than 60 million individuals, justifiably characterized as ‘silent epidemic’ (Maas *et al.*, 2017; Dewan *et al.*, 2018).

TBI pathophysiology is characterized by acute necrotic or delayed apoptotic neuronal death, cytokine and chemokine production, infiltration of peripheral immune cells and activation of astrocytes and microglia (Helmy *et al.*, 2011; Burda *et al.*, 2016; Jassam *et al.*, 2017). Astrocytes play important roles in the CNS providing structural support, maintaining blood–brain barrier integrity, regulating the neuronal microenvironment through clearance of excessive neurotransmitters (e.g. glutamate and GABA), promoting formation and function of synapses, pruning synapses by phagocytosis and secreting a variety of trophic and growth factors (Sofroniew and Vinters, 2010; Chung *et al.*, 2013; Bylicky *et al.*, 2018). Due to blood–

brain barrier restriction in lipoprotein exchange, astrocytes are the main producers and exclusive providers of cholesterol in the adult brain (Pfrieger and Ungerer, 2011; Sidoryk-Wegrzynowicz *et al.*, 2011).

In pathological situations astrocytes undergo dramatic transformation, become ‘reactive’ and depending on the conditions acquire neurotoxic or neuroprotective phenotypes (Myer *et al.*, 2006; Burda *et al.*, 2016; Bylicky *et al.*, 2018). Following a terminology that parallels the ‘M1’ and ‘M2’ macrophage nomenclature (Biswas and Mantovani, 2010; Sica and Mantovani, 2012), neurotoxic/pro-inflammatory astrocytes, generated by inflammatory insult, are named ‘A1’, whereas, neuroprotective/anti-inflammatory astrocytes known as ‘A2’ are induced in the context of various types of brain injury such as ischaemic damage and produce neurotrophic and tissue-repair factors (Zamanian *et al.*, 2012; Liddelow *et al.*, 2017). The two types of astrocytes can be distinguished on the basis of functionality and characteristic gene expression profiles (Zamanian *et al.*, 2012; Liddelow *et al.*, 2017).

Microglia are heterogeneous resident immune cells within the CNS, surveying the brain parenchyma and reacting to any insult that disrupts homeostasis (Szepesi *et al.*, 2018). Like astrocytes, microglia upon activation, and depending

on the context, acquire pro-inflammatory/neurotoxic or anti-inflammatory/neuroprotective phenotypes. In line with the 'M1'/'M2' macrophage nomenclature, the two microglial phenotypes are frequently referred to as 'M1'- and 'M2'-microglia, respectively (Fumagalli *et al.*, 2011; Michell-Robinson *et al.*, 2015; Loane and Kumar, 2016). In the context of neuropathology, cross-talk between microglia and astrocytes is critical for coordination of inflammation and tissue-injury repair (Karve *et al.*, 2016; Donat *et al.*, 2017). Pertinently, recent studies showed that reactive inflammatory microglia guide astrocytes towards the 'A1' phenotype (Liddelow *et al.*, 2017) and, conversely, earlier studies demonstrated that activated astrocytes can exert inhibitory effects on microglial activation (Gao *et al.*, 2013).

Among the molecular systems implicated in TBI pathophysiology is the transforming growth factor- β (TGF β)-superfamily (Schachtrup *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2018), which encompasses structurally related polypeptides including, among others, TGF β s, activins and bone morphogenetic proteins (BMPs; Shi and Massague, 2003). TGF β -superfamily members signal via hetero-tetrameric complexes of type-II and type-I receptors, which possess Ser/Thr kinase activity and activate 'canonical' and 'non-canonical' pathways. Canonical pathways involve phosphorylation-dependent activation of downstream effectors, the receptor-regulated Smads (R-Smads), which are organized into two branches, the TGF β /Activin and BMP branches that involve Smads 2/3 or Smads 1/5/8, respectively (Shi and Massague, 2003). Phosphorylated R-Smads form complexes with the 'common' Smad 4, enter the nucleus and regulate gene expression (Moustakas *et al.*, 2001; Budi *et al.*, 2017). Activation of canonical pathways upregulates Smads 6 and 7, which function as negative feedback regulators (Miyazawa and Miyazono, 2017). 'Non-canonical' pathways are activated in parallel and involve pathways such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs), Rho-like GTPases and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT (Moustakas and Heldin, 2005; Zhang, 2009). Given the widespread expression of TGF β /Activin and/or BMP receptors within a tissue, even on the surface of the same cell, and the concurrent production of numerous ligands in health and disease (Rosendahl *et al.*, 2001, 2002), it is likely that the final response must depend on the integration of all generated signals and be influenced by the relative, quantitative and/or qualitative, characteristics of the activated canonical and/or non-canonical pathways. Therefore, besides the selective analysis of individual components of the TGF β -superfamily signalling system, approaches that analyse a broader spectrum of signalling events and components could unveil important functional properties of the system.

Several components of the TGF β -superfamily system, including ligands (TGF β 1, BMP4, BMP10) or receptors (TGFBR1, TGFBR2, ACVR1, BMPR2), are upregulated, either at protein and/or mRNA levels, in cells surrounding the trauma or in adult neurogenic niches following

TBI in rodents (Lindholm *et al.*, 1992; Lewen *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2010; Komuta *et al.*, 2010; Schachtrup *et al.*, 2010; Logan *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2018). Moreover, increased TGF β 1 and TGF β 2 protein levels have been described in human spinal cord injuries (Buss *et al.*, 2008), and BMP7 mRNA (Setoguchi *et al.*, 2001) and protein levels in rat spinal cord injury (Hampton *et al.*, 2007). Despite accumulated evidence, the precise role of this signalling system, in particular, the interplay between the TGF β and BMP branches in the context of TBI pathophysiology is still not fully understood. To address this, we have utilized the most controlled form of TBI, namely, the acute stab wound (SW) brain injury to carry out a comprehensive analysis of the TGF β -superfamily system, identify putative cellular targets within the wound area and characterize their response to TGF β and/or BMP. Our study demonstrates that both TGF β and BMP pathways are activated locally upon SW injury and show that astrocytes demarcating the wound area are the selective target of BMP signalling. By analysing *in vitro* treated 'reactive' astrocytes and microglia, we unveil novel processes critical for restoration of homeostasis that may be regulated by TGF β and/or BMP. Moreover, we provide evidence suggesting that both TGF β 1 and BMP4 modulate the plasticity of reactive astrocytes towards an 'A2'-like, anti-inflammatory phenotype, whereas TGF β 1 modulates the plasticity of activated microglia towards 'M0/M2'-like, quiescent and anti-inflammatory phenotypes, respectively. As such, our findings present a parallel analysis of the two signalling branches of the TGF β -superfamily system in the context of acute SW injury and provide insights that could aid the further clarification of their role and prospectively the design of novel therapeutic strategies.

Materials and methods

Extended version is available in the [Supplementary material](#).

Animals

Wild-type and BMP-responsive eGFP-expressing (BRE-eGFP) mice (Monteiro *et al.*, 2008), in C57BL/6 background, were maintained in individually ventilated cages with free access to food and water, under 12 h light/dark cycle at the animal facility of BRFAA. All experimental procedures performed were approved by Institutional Ethics Committee for Use of Laboratory Animals and the Greek Ministry of Agriculture.

Surgical procedure of SW injury

Males 3–4 months old were anaesthetized with 2–3% isoflurane and positioned in a stereotaxic frame (Kopf Instruments, USA), as previously described (Xilouri *et al.*, 2012). A unilateral lesion was performed to the right

hemisphere of the cerebral cortex by inserting a 19-gauge needle at the following coordinates: +0.6 mm anteroposterior, -1.6 mm mediolateral and -3.2 mm dorsoventral from the bregma as previously described (Buffo *et al.*, 2005; Frik *et al.*, 2018). The needle was twisted manually and gently retracted. This was repeated thrice in total and the skin was thereafter sutured.

Immunohistochemistry

Brain tissues were perfused intracardially with 4% paraformaldehyde and processed thereafter for immunohistochemical analysis, as previously reported (Xilouri *et al.*, 2012) with modifications described in [Supplementary material](#).

Preparation and maintenance of mixed glia cultures

Mixed glia cultures were prepared from P1 to P3 neonatal mice as previously described (McCarthy and de Vellis, 1980; Saura *et al.*, 2003), with modifications described in [Supplementary material](#). Cells utilized in the present study were grown in culture for a total of ~20–24 days before addition of recombinant TGF β and/or BMP.

Fluorescence-activated cell sorting of cultured glia cells

Mixed glia cultures were harvested and cells were stained with antibodies against GLAST and CD11b proteins ([Supplementary Table 1](#)) for 45 min. Unstained samples and isotopic controls were also included. DAPI was added the last 5 min of incubation for dead-cell exclusion. Cells were sorted with a BD-FACSAriaTM-IIu as described in [Supplementary material](#).

In vitro stimulation and immunofluorescence analysis of cultured glia cells

Mixed glia, purified astrocytes and microglia, grown for ~20–24 days in total, were cultured in serum-free DMEM 1% Pen/Strep for the last 24 h before treatment with recombinant mouse TGF β 1, BMP4, Noggin or the SB431542 inhibitor, in the absence of FBS. Cells and culture media were collected by centrifugation (2000 rpm, RT, 2 min), snap frozen and stored at -80°C until use. Cells were cultured on poly-D-lysine (PDL)-coated coverslips for immunocytochemistry, as described in [Supplementary material](#).

Western blot and quantitative real-time PCR analysis

For protein or RNA isolation from TBI-subjected animals, isolated brains were placed on an acrylic mouse brain matrix and 2 mm coronal-sections were prepared. Tissue areas encompassing the trauma or the respective

contralateral/healthy area were further micro-dissected ([Fig. 1A](#)), snap frozen and stored at -80°C. For protein isolation, micro-dissected regions or primary glial cells were homogenized in RIPA buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors and western blot analysis was performed as previously reported (Xilouri *et al.*, 2012), with modifications described in [Supplementary material](#). Total RNA was isolated using Trizol and cDNA was synthesized as previously described (Sountoulidis *et al.*, 2012). The primer pairs and the amplification parameters used for quantitative real-time PCR (qRT-PCR) are shown in [Supplementary material](#).

Transcriptomic analysis

One microgram purified RNA was used for preparation of each cDNA library, using the TruSeq RNA Preparation Kit (Illumina), according to manufacturer's instructions. Library quality was evaluated with Agilent DNA Kit and concentration was measured using library-standards (KAPA Biosystems). Sequencing was performed at the Genome Center Facility of BRFAA. Bioinformatics analysis was performed using Ingenuity[®] Pathway Analysis (IPA[®], Qiagen), MultiExperiment Viewer (MeV, TM4 Microarray Software Suite; Saeed *et al.*, 2003), Venny 2.1 and Venn Diagram software (Pacific Northwest National Laboratory, U.S. Department of Energy).

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Data were analysed using one-way analysis of variance with Bonferroni's *post hoc* test analysis. One asterisk (*) corresponds to statistical significance of $P < 0.05$, two asterisks (**) to $P < 0.01$, three asterisks (***) to $P < 0.001$ and non-significant (ns) to $P > 0.05$. In few indicated cases, the Newman-Keuls Multiple Comparison Test was applied with one hashtag (#) corresponding to statistical significance of $P < 0.05$. In [Fig. 4B](#), differences were assessed using two-tailed unpaired *t*-test ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$). All analyses were performed using GraphPad Prism software version 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Data availability

Raw data supporting the findings of this study are available from the corresponding author on request. Gene expression data are available from Sequence Read Archive (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>), accession number PRJNA527753.

All materials used in this study are listed in [Supplementary Table 3](#).

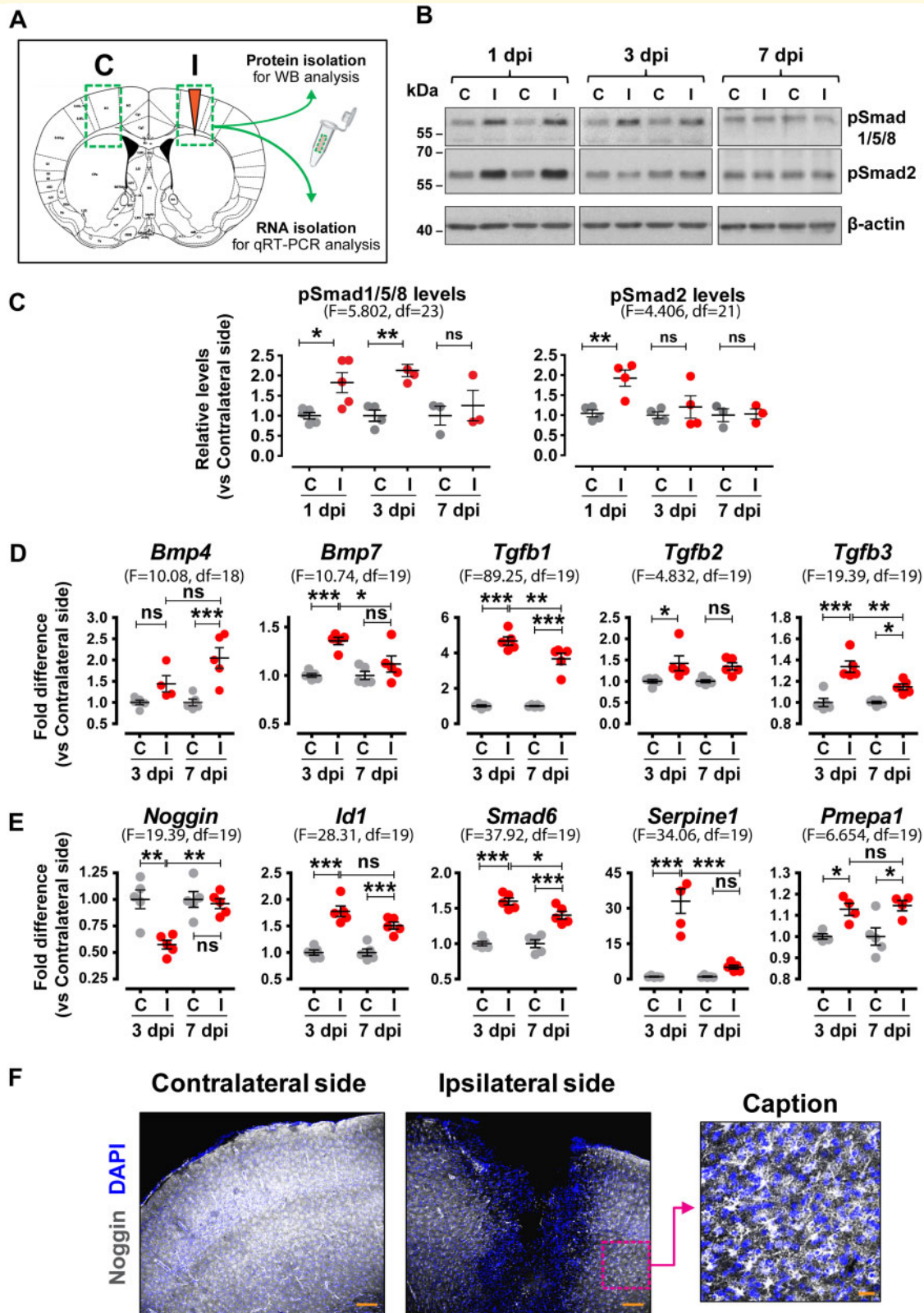


Figure 1 Increased levels of phosphorylated Smads, TGFβ-superfamily ligands and relevant target genes are found within the TBI wound area. **(A)** Schematic representation of the strategy followed for tissue dissection of ipsilateral injured areas (I) and corresponding contralateral control areas (C) for protein or RNA isolation. **(B)** Representative immunoblots for pSmad1/5/8, pSmad2 and β-actin (loading control) levels in protein extracts from dissected contralateral (C) and ipsilateral (I) tissues at 1, 3 and 7 dpi. **(C)** Quantitative analysis of phosphorylated Smad levels shown in B, depicted as ratio of ipsilateral versus contralateral levels for each time-point (n = 3–5 animals/group). **(D)** qRT-PCR analysis for *Bmp4*, *Bmp7*, *Tgfb1*, *Tgfb2* and *Tgfb3* mRNA levels at 3 and 7 dpi (n = 5 animals/group). **(E)** qRT-PCR analysis for *Noggin*,

Results

Both TGF β and BMP branches of the TGF β -superfamily signalling system are activated upon acute TBI within the wound area

To investigate the role of the TGF β -superfamily system and assess in parallel the activation of the TGF β and BMP branches upon brain injury, mice were subjected to unilateral SW injury of the right cerebral cortex, which represents a moderate model of TBI. One of the advantages of the model is that the injury is restricted only in the ipsilateral side, whereas the contralateral side of each animal can be used as control (Supplementary Fig. 1A). Tissues encompassing injured (ipsilateral) and corresponding intact (contralateral) areas were surgically micro-dissected (Fig. 1A) and hallmarks of TGF β -superfamily activation were analysed. Increased levels of phosphorylated (p) Smad1/5/8 were detected in protein extracts of the ipsilateral side at 1 and 3 days post-injury (dpi). Likewise, increased pSmad2 levels were observed at 1 dpi (Fig. 1B and C). Consistently, increased mRNA levels of ligands (*Bmp4*, *Bmp7*, *Tgfb1*, *Tgfb2* and *Tgfb3*) and known TGF β -superfamily target genes (*Id1*, *Smad6*, *Serpine1* and *Pmepa1*) were detected in the ipsilateral side at 3 and/or 7 dpi (Fig. 1D and E and Supplementary Fig. 1B). Interestingly, the trauma area was characterized by decreased mRNA and protein levels for Noggin, the natural BMP inhibitor (Fig. 1E and F), suggesting that BMP signalling upon TBI may be driven locally by altering the balance between ligands and corresponding inhibitors.

To further verify the activation of canonical BMP-mediated signalling and characterize potential cellular targets, available transgenic animals carrying BMP-responsive eGFP alleles (BRE-eGFP) were subjected to TBI. Injury led to substantial activation of the BMP reporter in cells with glial morphology around the trauma, which reached highest levels between 3 and 7 dpi (Fig. 2A and B). Interestingly, the area occupied by BRE-eGFP⁺ cells coincided with the area characterized by decreased Noggin immunoreactivity (Supplementary Fig. 2A). Increased expression of the astrocytic protein GFAP was found around the trauma already at 1 dpi and peaked at 7 dpi, when intense astrogliosis, as previously described (Mathewson and Berry, 1985), was observed throughout the ipsilateral cortex (Fig. 2A). The increased astrogliosis was verified by qRT-PCR and immunoblot analysis of

GFAP in dissected wound tissues (Supplementary Fig. 2B and C).

To characterize the BRE-eGFP⁺ cells, tissue sections from TBI-subjected animals were analysed by immunostaining with cell-lineage specific markers (Fig. 2C and D and Supplementary Fig. 3A). The vast majority of BRE-eGFP⁺ cells around the injury site co-expressed GFAP, ALDH1L1, GLUL and S100 β and thus were characterized as astrocytes (Fig. 2C and Supplementary Fig. 3A). Scattered BRE-eGFP⁺/GFAP⁺ cells were also detected across the ipsilateral cortex at 7 dpi (Supplementary Fig. 2D). Interestingly, none of the AIF1/IBA1⁺ microglia expressed the BRE-eGFP reporter, even when localized among numerous eGFP-expressing astrocytes (Fig. 2D).

Astrocytes and microglia exhibit differential responsiveness to TGF β 1 and BMP4 *in vitro*

To characterize the impact of TGF β or BMP signalling on activated glia cells and assess the failure to detect *in situ* activation of BRE-eGFP reporter in microglia, we analysed *in vitro* their responsiveness to TGF β 1 and BMP4, the two ligands exhibiting highest mRNA up-regulation within the injured tissues (Fig. 1D). Pure 'reactive' astrocytes and microglia were isolated by sorting mixed glia cultures prepared from neonatal mice, using anti-GLAST/SLC1A3 (astrocytes) and anti-CD11b/ITGAM (microglia) antibodies (Fig. 3A and Supplementary Fig. 3B). The purified cells, after a total of ~20–24 days in culture, were stimulated with recombinant ligands for 2 and 24 h, and their transcriptomes were analysed by RNA-Seq.

Upon TGF β 1 stimulation of purified astrocytes, 1069 genes were significantly upregulated and 513 downregulated at 2 h, whereas 1612 were upregulated and 1297 downregulated at 24 h. Similarly, upon BMP4 treatment, 1494 genes were upregulated and 719 downregulated at 2 h and 1702 genes were upregulated and 1568 downregulated at 24 h (Fig. 3B and C). Interestingly, TGF β 1- or BMP4-treated astrocytes exhibited highly overlapping transcriptional profiles 2 h post-stimulation, since ~47–69% of regulated genes responded to both ligands (Fig. 3B), albeit to different degrees (Supplementary Fig. 4A), whilst at 24 h, the gene expression profiles diverged exhibiting ~35–44% overlap (Fig. 3C). Few genes were oppositely regulated by these ligands (<2% and <8%, at 2 and 24 h, respectively), indicating limited antagonism between the two branches in astrocytes.

Id1, *Smad6*, *Serpine1* and *Pmepa1* mRNA levels, at 3 and 7 dpi ($n = 5$ animals/group). (F) Representative immunofluorescence images of coronal brain sections at the level of the wound area at 3 dpi stained for Noggin (white) and nuclei (DAPI, blue) (Scale bar = 150 μ m). Right image is a magnified caption (Scale bar = 30 μ m) of the area outlined with a magenta dotted square showing the glial morphology of Noggin-expressing cells. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) analysed using one-way analysis of variance with Bonferroni's *post hoc* test analysis (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). F values and degrees of freedom (df) are shown in parentheses for each data set.

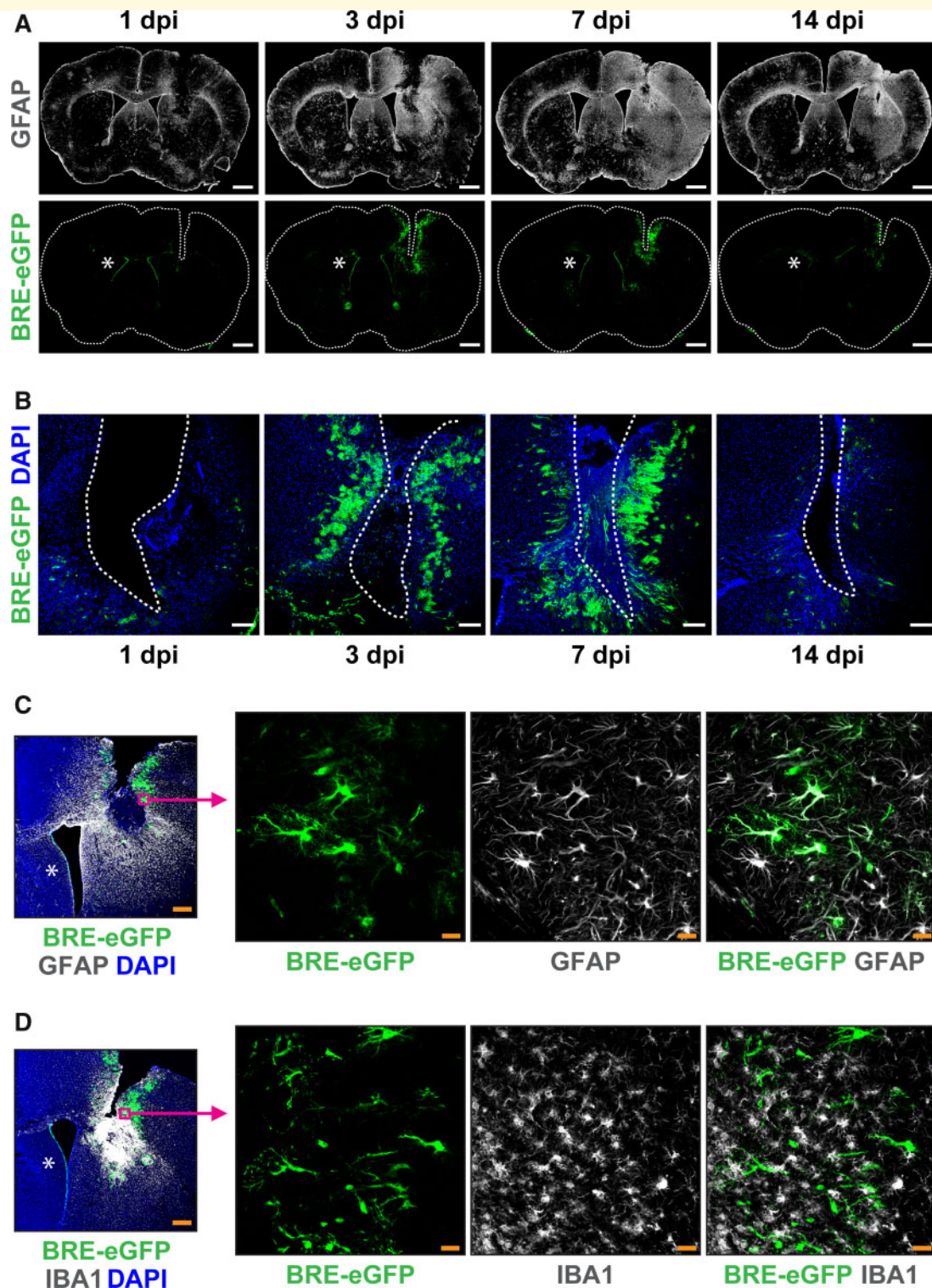


Figure 2 The BRE-eGFP reporter is activated upon acute TBI in astrocytes that demarcate the wound area. **(A)** Representative tile scan confocal immunofluorescence images of the astrocytic cytoskeletal protein GFAP (white, top row) and the BRE-eGFP reporter (green, bottom row) in coronal brain sections at the level of the wound at 1, 3, 7 and 14 dpi (Scale bar = 1 mm). **(B)** Higher magnification immunofluorescence images of the ipsilateral side, showing the time-course of BRE-eGFP reporter expression (green) around the trauma (Scale bar = 150 μ m). **(C)** Representative immunofluorescence image of the GFAP (white) and BRE-eGFP reporter (green) expression in the ipsilateral side at 7 dpi (left panel, Scale bar = 300 μ m). Magenta squares and arrows denote origin of higher magnification single layer images (right panel, Scale bar = 25 μ m) showing BRE-eGFP-positive cells co-expressing the GFAP protein. **(D)** Representative immunostaining for microglial marker AIF1/IBA1 (white) and BRE-eGFP (green) in the ipsilateral side at 7 dpi (left panel, Scale bar = 300 μ m) and higher magnification single layer images (right panel, Scale bar = 25 μ m). DAPI (blue) is used for nuclear staining. Asterisks illustrate constitutive BRE-eGFP reporter expression in endependymal cells lining the medial walls of lateral ventricles.

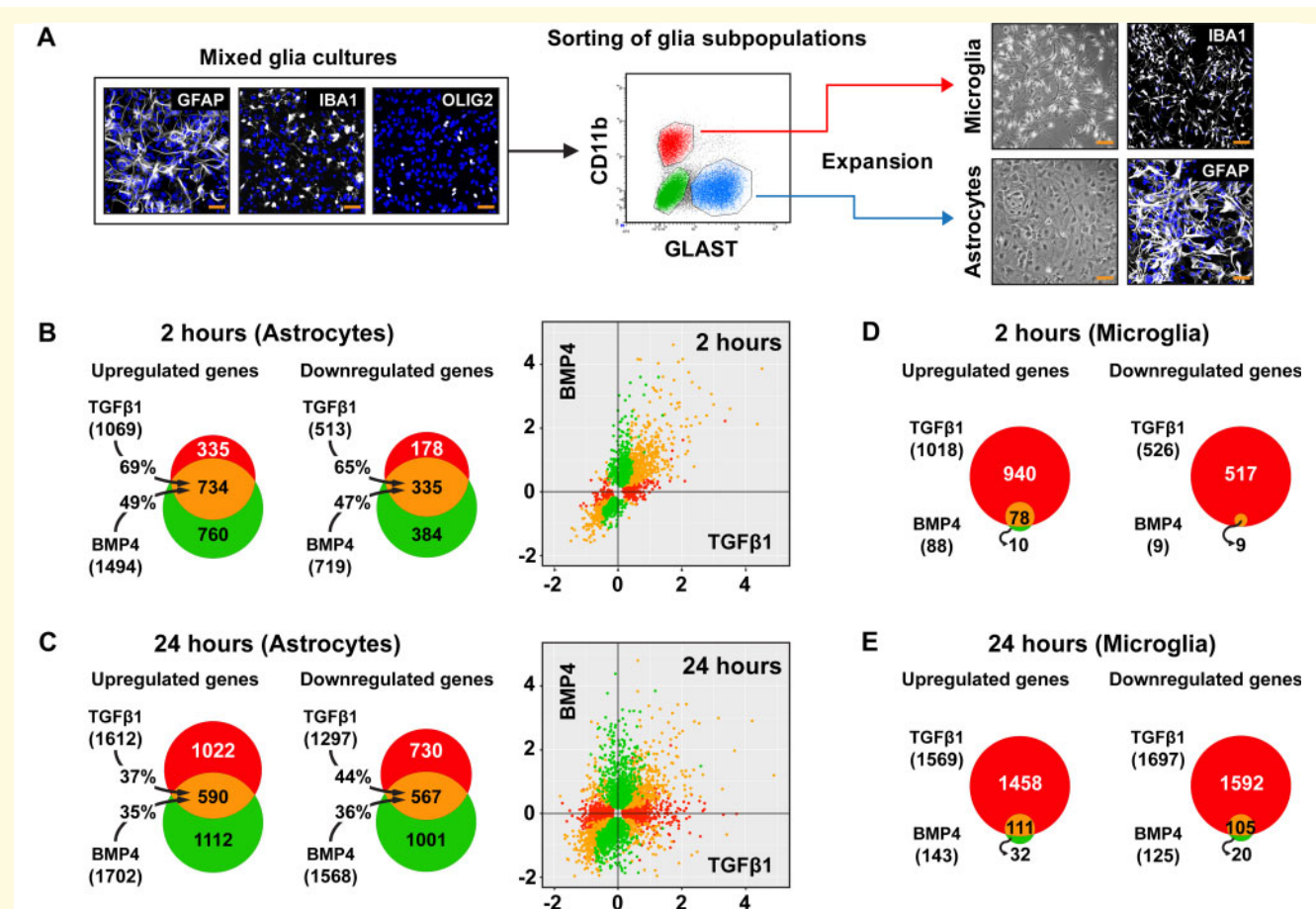


Figure 3 Purified astrocytes stimulated *in vitro* with TGFβ1 or BMP4 share highly overlapping transcriptomes, whereas, microglia respond selectively to TGFβ1. (A) Isolation of pure astrocytes and microglia from mixed glia cultures utilizing anti-GLAST (astrocytes) and anti-CD11b (microglia) antibodies. Mixed glia cultures, prepared from newborn mice, comprised of astrocytes (GFAP⁺), microglia (AIF1/IBA1⁺) and oligodendrocytes (OLIG2⁺); representative immunofluorescence image, left panel), were maintained for ~10–12 days prior to staining with antibodies against GLAST (blue gate) or CD11b proteins (red gate) for cell sorting. Purified astrocytes and microglia were expanded for additional ~10–12 days before analysis. Right panel shows representative bright field and immunofluorescence images of astrocyte and microglia cultures. DAPI (blue) is used for nuclear staining. Scale bar = 50 μm. (B and C) Venn diagrams summarizing RNA-Seq analysis results of purified astrocytes treated with 2 ng/ml TGFβ1 or 50 ng/ml BMP4 for 2 h (B) or 24 h (C) ($n = 3$ cultures/group). (D and E) Venn diagrams summarizing RNA-Seq analysis of purified microglia treated with 2 ng/ml TGFβ1 or 50 ng/ml BMP4 for 2 h (D) or 24 h (E) ($n = 3$ cultures/group). The diagrams depict numbers of statistically significant (baseMean > 30 and FDR < 0.05) up- or down-regulated genes by TGFβ1 (red), BMP4 (green) or both (orange). The percentages on the black arrows indicate the overlap between the two ligand treatments. The scatterplots in B and C show the genes with statistically significant response to TGFβ1 (red), BMP4 (green) or both (orange). The x- and y-axes represent log₂ fold change of differentially expressed genes.

Purified microglia responded remarkably well to TGFβ1, since 1018 genes were upregulated and 526 downregulated at 2h, whereas 1569 were upregulated and 1697 downregulated at 24h (Fig. 3D and E). Notably, astrocytes and microglia regulated distinct sets of genes in response to TGFβ1, exhibiting ~11–31% overlap (Fig. 4A). Surprisingly, still in agreement with the absence of BRE-eGFP reporter expression in AIF1/IBA1⁺ cells, purified microglia failed to respond robustly to BMP4. Only 88 genes were upregulated and 9 were downregulated at 2h. Similarly, 143 genes were upregulated and 125 were downregulated after 24h stimulation with BMP4. However, none exhibited log₂ fold change

>1.6, only 55 and 33 displayed log₂ fold change >0.4 or <-0.4, respectively, and the top upregulated genes included key negative regulators of the pathway, such as *Smad6*, *Smad7* and *Tgfr1*.

To derive mechanistic explanation for the differential response of the two glial populations to TGFβ1 and BMP4, key components of the system were compared in astrocytes and microglia. Analysis of relative basal mRNA levels of TGFβ-superfamily system receptors and effector Smads demonstrated significant differences among them. Microglia were characterized by higher mRNA levels for *Acr11/Alk1*, *Tgfr1/Alk5* and *Tgfr2*, compared with astrocytes that expressed higher mRNA levels for

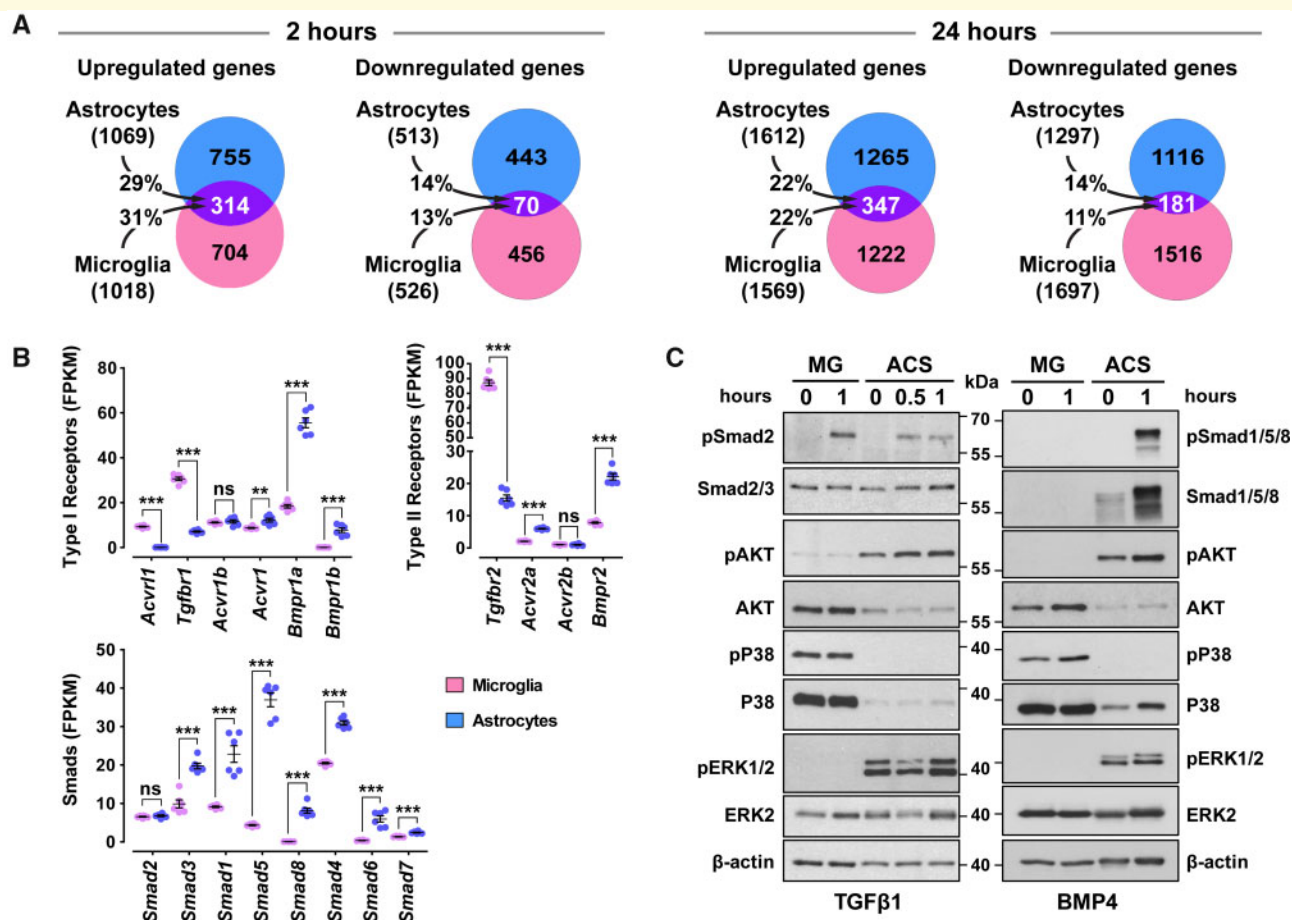


Figure 4 Astrocytes and microglia modulate expression of distinct sets of genes upon TGF β 1 treatment, express different components of the canonical pathways and are poised to activate different non-canonical pathways. **(A)** Venn diagrams representing the number of statistically significant (baseMean > 30 and FDR < 0.05) up- or down-regulated genes only in astrocytes (light blue), only in microglia (pink) or in both glial populations (purple), following stimulation with 2 ng/ml TGF β 1 for 2 h (left panel) or 24 h (right panel). The percentages indicate the gene overlap between astrocytes and microglia ($n = 3$ cultures/group). **(B)** mRNA expression levels of key components of the TGF β -superfamily system, including type-I receptors, type-II receptors and Smads, in vehicle-treated purified microglia (magenta dots) or astrocytes (blue dots) derived from RNA-Seq data that were normalized and expressed as Fragments Per Kilobase per Million reads mapped (FPKM) ($n = 6$ cultures/group). $^{***}P < 0.01$; $^{**}P < 0.001$; two-tailed unpaired t-test. **(C)** Representative immunoblot analysis of canonical and non-canonical TGF β -signalling pathways using antibodies against pSmad2, total Smad2/3, pSmad1/5/8, total Smad1/5/8, phosphorylated AKT (pAKT), total AKT, phosphorylated P38 (pP38), total P38, phosphorylated ERK1/2 (pERK1/2), total ERK2 and β -actin (loading control) in purified microglia (MG) and astrocytes (ACS) upon 10 ng/ml TGF β 1 (on the left) or 50 ng/ml BMP4 stimulation (on the right).

Acvr1/Alk2, *Bmpr1a/Alk3*, *Bmpr1b/Alk6*, *Acvr2a*, *Bmpr2* and *Smads* 1, 5, 8, 3, 4, 6 and 7 (Fig. 4B). Both cell types expressed similar mRNA levels for *Smad2*. Moreover, although *Smad2* was phosphorylated in both glial populations following TGF β 1 treatment, *Smad1/5/8* were phosphorylated upon BMP4 stimulation only in astrocytes (Fig. 4C). Consistently, total *Smad1/5/8* levels were below detection in the microglia population utilized in the analysis. Therefore, levels of BMP-related Smads and receptors may account for the low microglial response to BMP4. Interestingly, different non-canonical pathways were activated, even at baseline, in the two glial populations. Microglia were characterized by higher total and phosphorylated P38/MAP-kinase, whereas astrocytes exhibited higher phosphorylated ERK1/2 and

increased pAKT levels upon ligand stimulation (Fig. 4C), suggesting that TGF β -superfamily receptors could be wired with different non-canonical downstream signalling pathways in these two cell types.

Analysis of the transcriptomic profiles of TGF β 1- or BMP4-treated astrocytes using the IPA platform demonstrated that 2 h stimulation with either ligand led to activation of several canonical pathways related to growth factor-mediated signalling (TGF β , BMP, IGF1, Wnt/ β -catenin, ERK/MAPK, PI3K/AKT, STAT3, platelet-derived growth factor (PDGF), GDNF, neurotrophin/TRK, FGF, etc.), cytoskeletal remodelling and cell migration (ephrin receptor, integrin, actin cytoskeleton and glioma invasiveness signalling; Supplementary Fig. 5A). Twenty-four hours stimulation led to activation of pathways related to

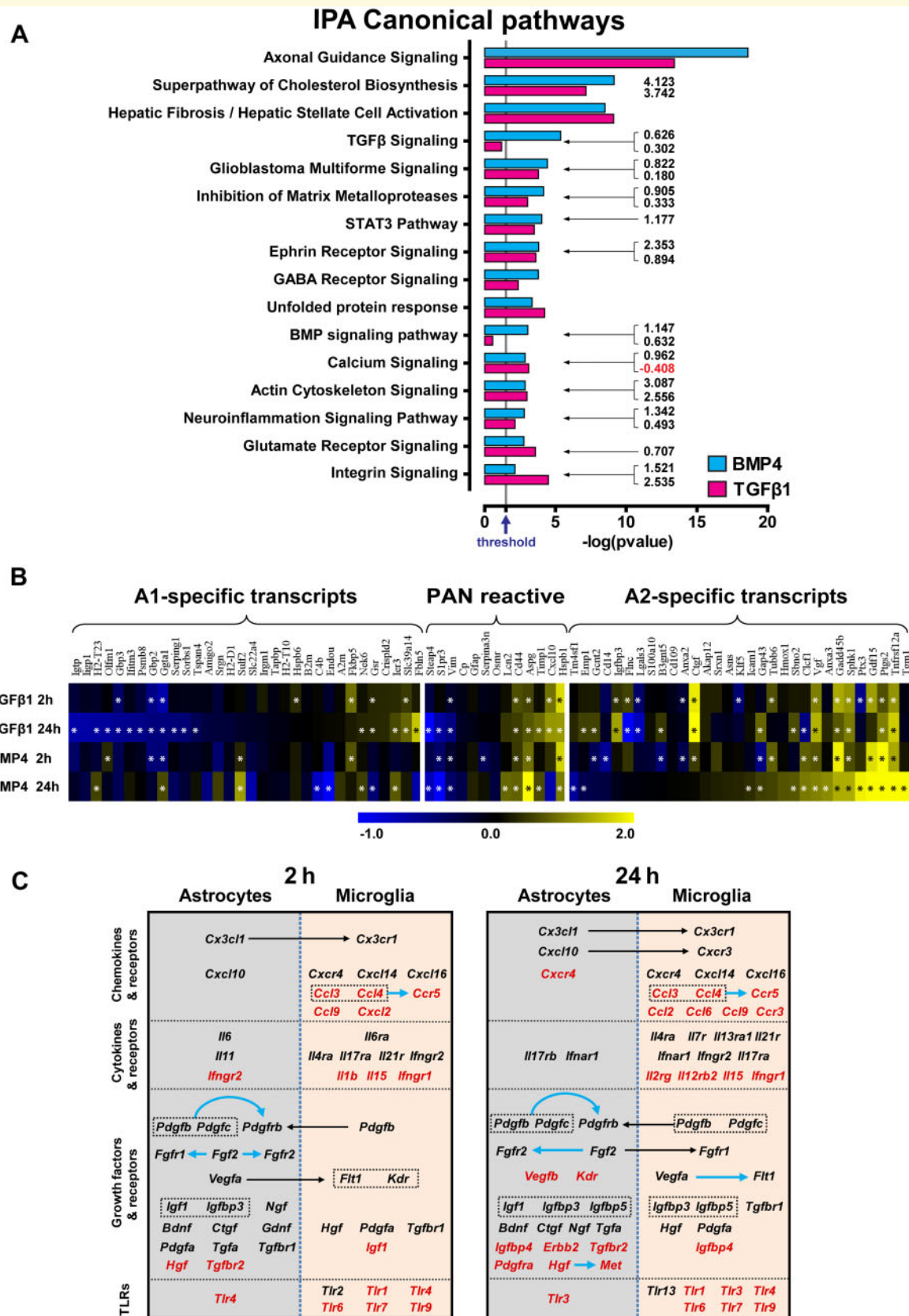


Figure 5 TGFβ1 or BMP4 stimulation guides purified astrocytes towards a reparatory, neuroprotective ‘A2’-like phenotype. **(A)** Graph depicting CNS-related IPA canonical pathways, selected among the top regulated, from RNA-Seq analysis of purified astrocytes stimulated with 2 ng/ml TGFβ1 or 50 ng/ml BMP4 for 24 h. The x-axis displays the statistical significance [-log (P value)] of the canonical pathways displayed along the y-axis. Grey vertical line, indicated by arrow in the x-axis, shows the threshold for statistical significance (P = 0.05). Numbers

tissue-repair/remodelling (Fig. 5A). The majority of identified Gene Ontology annotations (GOs) was regulated by both TGF β 1 and BMP4, with either distinct (Fig. 7C) or overlapping gene-sets modulated by either ligand (Figs 6A and B and 7A).

The apparent activation of tissue-repair and remodelling processes prompted us to investigate whether TGF β 1- or BMP4-stimulated astrocytes expressed genes associated with the 'A2'-like astrocytic phenotype described previously (Zamanian *et al.*, 2012; Liddelow *et al.*, 2017). As shown in Fig. 5B, both TGF β 1 and BMP4 shifted the profile of the astrocytes towards the 'A2'-like phenotype, and moreover, in agreement with Liddelow *et al.* (2017), TGF β 1 downregulated several genes associated with the 'A1'-like phenotype.

Analysis of TGF β 1-stimulated microglia demonstrated modulation of several pathways, some of which were also regulated in astrocytes, such as integrin-, actin cytoskeleton-, glioma invasiveness-, ephrin receptor- and PDGF-signalling (Supplementary Fig. 5B). However, various inflammation-related pathways were significantly modulated selectively in microglia. Those included, among others, production of nitric oxide, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2)-mediated oxidative stress response, vascular endothelial growth factor (VEGF) signalling, leucocyte extravasation, interferon and toll-like receptor signalling. The negative effect of TGF β -signalling on microglial inflammatory responses is well-documented (Spittau *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2017; Zoller *et al.*, 2018). Consistently, already after 2 h stimulation, interferon and toll-like receptor signalling pathways were characterized by negative IPA z-scores (predicted decreased activity) and importantly, after 24 h the vast majority of modulated pathways was characterized by predicted decreased activity. Analysis of the expression of selected genes associated with the quiescent 'M0'-, pro-inflammatory 'M1'- and anti-inflammatory 'M2'-like microglia phenotypes demonstrated a downregulation of several 'M1'- and a shift towards an 'M0/M2'-like phenotype by TGF β 1 (Supplementary Fig. 5C).

Comparative analysis of TGF β 1-stimulated astrocytes and microglia revealed modulation of chemokines, cytokines, growth factors and corresponding receptors and pointed out potential TGF β -driven cross-interactions between the two populations (Fig. 5C). Specifically, *Cx3cl1*, *Cxcl10* and *Il6* mRNA levels were upregulated at 2 and/or 24 h in astrocytes and their corresponding receptors

were upregulated in microglia. *Pdgfs* and *Vegfa* were upregulated in astrocytes and microglia; however, *Pdgfrb* was selectively upregulated in astrocytes and *Flt1/Vegfr1* and *Kdr/Vegfr2* in microglia. *Fgf2* was upregulated in astrocytes and the corresponding receptors were upregulated at 2 h in astrocytes and at 24 h in both glial populations. The chemokines *Ccl3* and *Ccl4* and their receptor *Ccr5* were selectively downregulated in microglia. Interestingly, several toll-like receptors were downregulated in microglia or astrocytes. BMP4 regulated the above-mentioned astrocytic genes in a manner similar to TGF β 1, indicating that the two axes do not annul each other and may regulate the glia cross-talk cooperatively.

Since bioinformatics highlighted 'Axonal Guidance Signaling', 'Superpathway of Cholesterol Biosynthesis' and 'Hepatic Fibrosis/Hepatic Stellate Cell Activation' as the top pathways modulated in astrocytes after 24 h stimulation with both TGF β 1 and BMP4 (Fig. 5A), further analysis was focused on these injury-related processes.

Up-regulation of lipid metabolism components in astrocytes by TGF β -superfamily signalling or upon TBI

Remarkably, 20 out of the 24 enzymes involved in the 'Superpathway of Cholesterol Biosynthesis' (IPA) were upregulated in purified astrocytes upon 24 h treatment with TGF β 1 and/or BMP4, 13 of which were upregulated by both ligands (Fig. 6A). In addition, several components of lipid trafficking and metabolism, including transcription factors (*Srebf1*, *Srebf2*), transporters (*Abca1*, *Abcg4*), receptors (*Ldlr*, *Lrp1*), enzymes (*Lcat*, *Fasn*, *Acaca*) and other regulators (*Insig1*, *Insig2*, *Npc1*), were also upregulated by one or both ligands (Fig. 6B). Interestingly, few genes within this pathway (*Sqle*, *Abca1*, *Abcg4*, *Lcat*) were oppositely regulated by the two ligands (Fig. 6A and B). The response of selected genes encoding for cholesterol biosynthesis enzymes (*Hmgcr*, *Cyp51*, *Idi1*, *Dhcr24*, *Sqle*, *Sc5d*) or lipid metabolism components (*Srebf1*, *Srebf2*, *Abca1*, *Abcg4*, *Ldlr*, *Lcat*) was verified by qRT-PCRs of independent ligand-stimulated cultures (Supplementary Fig. 6A and B). In agreement with the *in vitro* stimulated cultures, mRNA levels for *Srebf1* and *Abca1* in the TBI-subjected animals were increased at 3 and 7 dpi and *Abcg4* levels were decreased

at the right side of the bars represent calculated IPA z-scores predicting an increased (black numbers) or a decreased (red numbers) pathway activity. (B) Heat map depicting log₂ fold changes of differentially expressed PAN reactive, 'A1'- and 'A2'-specific reactive astrocyte transcripts (according to Zamanian *et al.*, 2012 and Liddelow *et al.*, 2017), as determined by RNA-Seq analysis of purified astrocytes following 2 ng/ml TGF β 1 or 50 ng/ml BMP4 stimulation for 2 or 24 h (baseMean > 30). Asterisks depict statistical significance (FDR < 0.05). (C) Schematic representation of the expression of chemokines, cytokines, growth factors and relevant receptors, derived from RNA-Seq analysis of purified microglia and astrocytes treated with 2 ng/ml TGF β 1 for 2 h (left panel) or 24 h (right panel). Upregulated genes are shown in black, whereas the downregulated are shown in red. Black and blue arrows depict potential heterotypic or homotypic interactions, respectively, between glial populations.

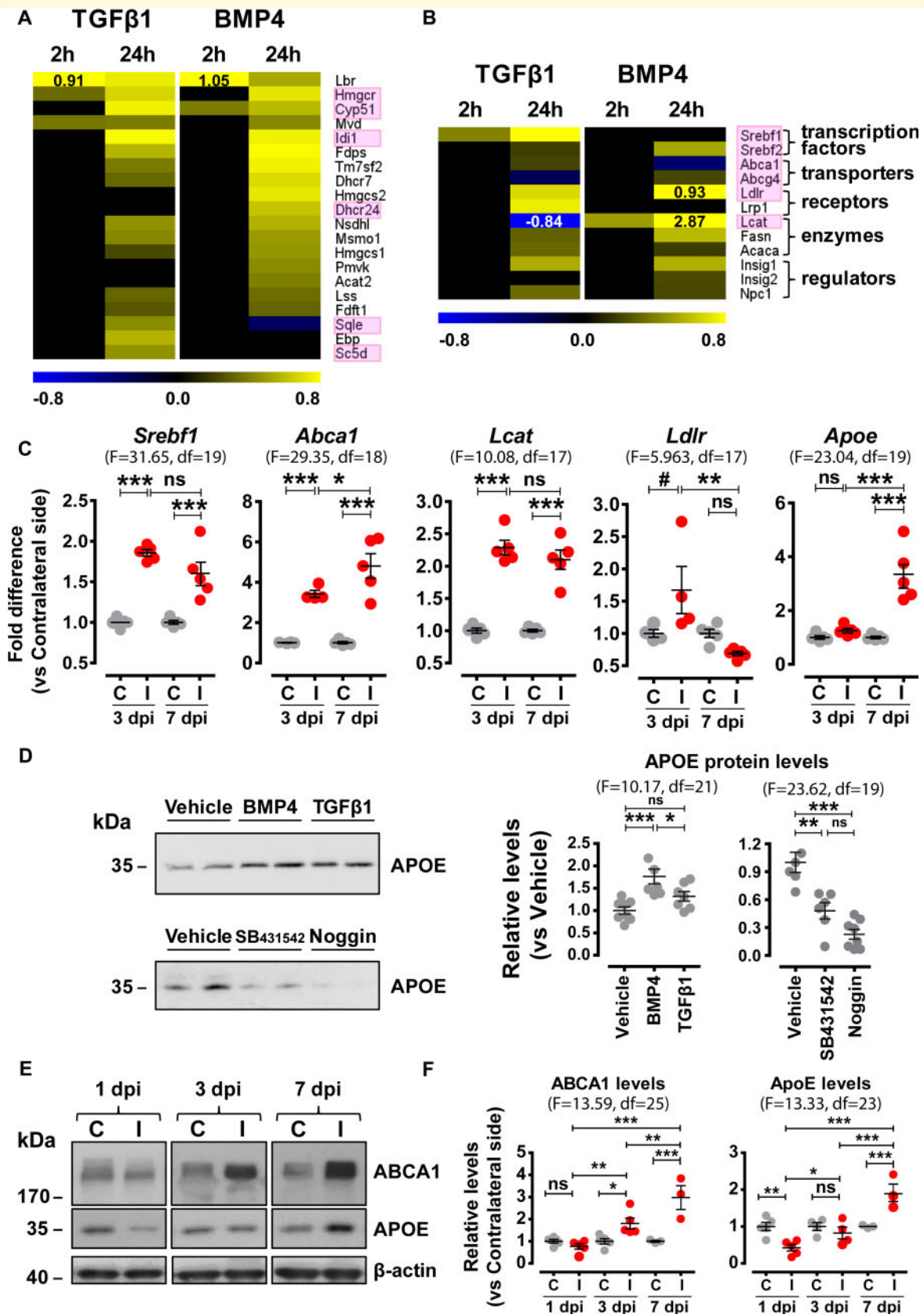


Figure 6 Lipid biosynthesis, metabolism and trafficking components are upregulated upon TBI in the wound area and in purified astrocytes upon *in vitro* stimulation with TGFβ1 or BMP4. Heat maps depicting log₂ fold changes of differentially expressed genes encoding (A) cholesterol biosynthesis enzymes or (B) lipid trafficking and metabolism components, as determined by RNA-Seq analysis of purified astrocytes following 2 ng/ml TGFβ1 or 50 ng/ml BMP4 stimulation for 2 or 24 h (baseMean > 30 and FDR < 0.05). Black or white

at 3 dpi in the ipsilateral side (Fig. 6C). Similarly, mRNA expression of *Lcat* was increased at the wound area at 3 and/or 7 dpi.

Since astrocytes are the main cholesterol producers and apolipoprotein-E (APOE) is the principal cholesterol carrier in adult brain, further analysis was focused on the production and secretion of APOE upon TGF β 1 or BMP4 stimulation. Increased levels of secreted APOE were detected in supernatants of astrocyte cultures treated with ligands for 24 h (Fig. 6D). Consistently, decreased APOE levels were found in the supernatants of astrocytes treated with either the TGF β -receptor kinase inhibitor SB431542 or the BMP-inhibitor Noggin. Moreover, *ApoE* mRNA expression was increased in the ipsilateral side following SW at 7 dpi (Fig. 6C). At protein level, APOE was significantly decreased at 1 dpi, reached contralateral side levels at 3 dpi and then increased at 7 dpi (Fig. 6E and F). ABCA1 protein levels were also increased in the ipsilateral side, at 3 and 7 dpi.

TGF β -superfamily system modulates processes related to axonal guidance and tissue-repair

Expression of several astrocyte-related axonal guidance molecules (Anderson *et al.*, 2016) was modulated upon treatment of astrocytes with either TGF β 1 or BMP4 (Fig. 7A). Interestingly, TGF β 1 induced a more axonal-permissive profile, whereas BMP4 upregulated equal numbers of inhibitory and permissive molecules. Expression of representative inhibitory and permissive molecules was analysed in tissues from TBI-subjected animals. In line with the *in vitro* findings, *Ncan*, *Nrp*, and notably, *Tnc* and *Lif*, two transcripts reportedly highly upregulated in ‘A2’-astrocytes (Zamanian *et al.*, 2012), were upregulated in the ipsilateral side at 3 dpi (Fig. 7B).

Numerous genes in the ‘Hepatic Fibrosis’ pathway (IPA), including collagens, growth factors, growth factor receptors and other tissue-remodelling components were modulated in astrocytes following TGF β 1 or BMP4 stimulation (Fig. 7C and Supplementary Fig. 7A). Interestingly, marginally overlapping sets of collagens were regulated by the two ligands. The majority of genes encoding growth factors and receptors was regulated early at 2 h, in contrast with other molecules in this annotation that were regulated after

24 h treatment. Representative genes upregulated in ligand-treated astrocytes were also found upregulated within the injured tissue, following TBI. Specifically, *Col1a1*, *Col5a2*, *Il6* and *Mmp2* were upregulated in the ipsilateral side at 3 and 7 dpi (Fig. 7D and Supplementary Fig. 7B). Notably, increased Collagen-I deposition was detected in the vasculature of injured areas and processes of BRE-eGFP⁺ astrocytes consistently were found closely interacting with vessel walls characterized by intense Collagen-I immunoreactivity (Fig. 7E).

Evidently, some genes belonging to the GO annotations analysed above responded differently in the *in vitro* stimulated astrocytes and the ipsilateral regions dissected from SW-subjected animals. Specifically, mRNA levels for *Sreb2* (‘Superpathway of Cholesterol Biosynthesis’, IPA) were upregulated *in vitro* by TGF β 1 and/or BMP4 but were downregulated within the ipsilateral tissue at 3 and/or 7 dpi (Supplementary Fig. 6C). Likewise levels of *Hmgcr* and *Cyp51* were not found altered significantly in the dissected TBI regions. Despite the changes in *ApoE* mRNA levels in the dissected tissues, this gene was not affected by ligand stimulation *in vitro*. Also, the *in vitro* observed modulation of *Ctgf/Ccn2* and *Igf1* (‘Hepatic Fibrosis’, IPA) could not be reproduced in acute TBI (Supplementary Fig. 7B). These differences could reflect inability of *in vitro* cultures of purified cells to simulate completely the complex cellular interactions that occur within the injured tissues, the possible differences in the kinetics by which certain processes unfold *in vitro* versus *in vivo*, or the assay’s detection limitations. Nevertheless, overall, the *in vitro* RNA-Seq data were in good agreement with the *in vivo* expression patterns revealed through the analysis of dissected trauma tissues.

Discussion

To assess the involvement of both TGF β and BMP branches of the TGF β -superfamily signalling system in TBI pathophysiology, we utilized a SW brain injury model and analysed the expression of key molecules within the injured tissues. We supplemented our *in vivo* study with gene expression profiling of TGF β 1- or BMP4-stimulated purified ‘reactive’ astrocytes and microglia. Our study demonstrated that upon brain injury both

numerical values indicate log₂ fold differences exceeding the colour scale bar limits. Pink frames indicate selected genes whose expression was verified with independent qRT-PCR analysis (Supplementary Fig. 6A and B). (C) qRT-PCR analysis of mRNA expression of *Sreb1*, *Abca1*, *Lcat*, *Ldlr* and *ApoE* in dissected contralateral (C) or ipsilateral (I) regions of TBI-subjected animals at 3 and 7 dpi (n = 5 animals/group). (D) Representative immunoblots and quantitative analysis of secreted APOE protein levels in cultures of purified astrocytes treated with 2 ng/ml TGF β 1, 50 ng/ml BMP4, 100 ng/ml Noggin or 10 μ M SB431542 for 24 h (n = 6–8 cultures/group from three independent experiments). (E) Representative immunoblots of ABCA1, APOE and β -actin (loading control) in the contralateral (C) and ipsilateral (I) dissected tissues of TBI-subjected animals at 1, 3 and 7 dpi (n = 3–5 animals/group). (F) Quantitative analysis of ABCA1 and APOE protein levels shown in E, depicted as ratio of ipsilateral versus contralateral levels for each time-point. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) analysed using one-way analysis of variance with Bonferroni’s *post hoc* test analysis (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001) or Newman–Keuls Multiple Comparison Test (#*P* < 0.05). *F* values and degrees of freedom (df) are shown in parentheses for each data set.

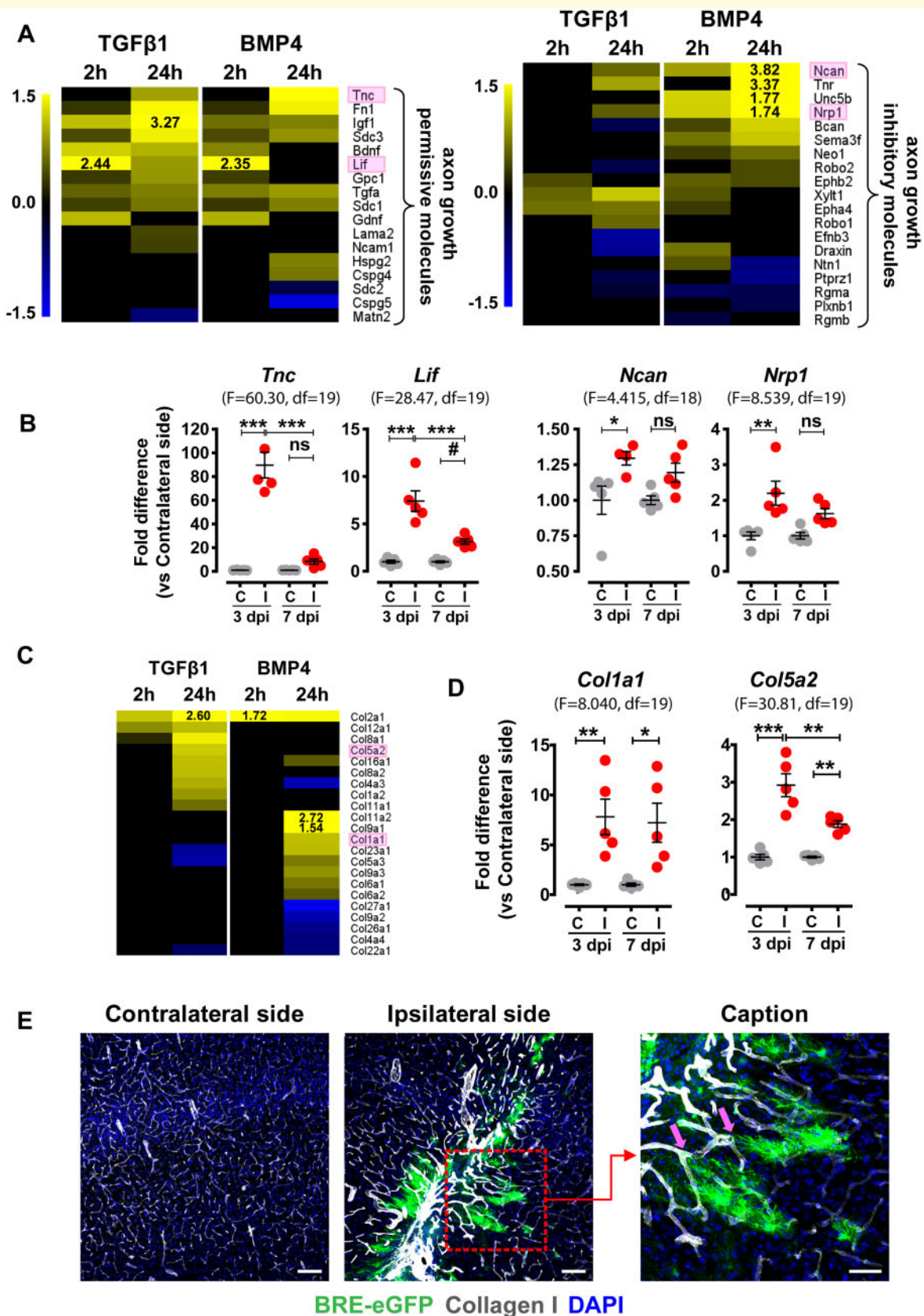


Figure 7 Genes encoding for axonal guidance and tissue-repair components are modulated *in vitro*, upon stimulation of purified astrocytes with TGFβ1 or BMP4, or *in vivo*, upon acute TBI. (A and C) Heat maps depicting log₂ fold changes of differentially expressed genes encoding (A) axonal guidance molecules [with permissive or inhibitory action, as summarized in Anderson et al. (2016)] and (C) collagens ('Hepatic Fibrosis' pathway, IPA), derived from RNA-Seq analysis of purified astrocytes stimulated with 2 ng/ml TGFβ1 or 50 ng/ml

TGF β and BMP axes are activated, as exemplified by increased levels of TGF β and BMP pSmads, and mRNA for relevant ligands and target genes in the lesion area during the first dpi (Fig. 1). Activation of the TGF β axis in astrocytes has already been associated with TBI (Schachtrup *et al.*, 2010); however, this is the first time that activation of the BMP axis is clearly demonstrated within the injured area. Utilizing the BRE-eGFP reporter mice, we showed that activation of canonical BMP pathway was confined to astrocytes demarcating the transition between healthy and damaged tissue, a pattern reminiscent of the increased pSmad1/5/8 levels in GFAP⁺ astrocytes at the injury site in a rat model of demyelinating spinal cord injury (Fuller *et al.*, 2007). Although substantial up-regulation of *Tgfb1* mRNA levels was demonstrated in TBI tissues, corresponding changes in BMP-encoding transcripts were not as robust (Fig. 1D). Instead, TBI areas were characterized by reduced Noggin mRNA and protein levels (Fig. 1E, F and Supplementary Fig. 2A), suggesting that the trauma core favours activation of the BMP axis primarily through the establishment of an inhibitor-deficient microenvironment.

Up-regulation of BMP2/4, BMP7 and Noggin (with the latter being expressed almost exclusively by reactive astrocytes at the injury site) in penetrating brain and spinal cord injuries has been previously reported (Hampton *et al.*, 2007). On the other hand, in an experimental model of stroke, Noggin expression mainly in activated microglia began to increase after 2 weeks and was further increased at 4 weeks only in the ischaemic subcortex, but the intensity was weak compared with the intensity of BMPs (Shin *et al.*, 2012). Earlier studies with transgenic animals overexpressing constitutively Noggin in neurons provided evidence in favour of a protective role of Noggin upon ischaemia-induced brain injury (Samanta *et al.*, 2010). However, these studies cannot be compared directly to the current study because Noggin overexpression was forced experimentally through the entire life of the animals leading most likely to readjustments of their homeostatic set points, as exemplified by the higher density of microglia in the tissues of non-manipulated animals (Samanta *et al.*, 2010). Moreover, conditional deletion of the BMP type-II receptor (BMPRII) in NG2-expressing cells after hypoxic-ischaemic injury globally protected the brain and prevented loss of

oligodendroglia (Dettman *et al.*, 2018). Thus, Noggin may have distinct roles in the processes of glial scar formation and neuro-restoration depending on the model utilized, the mode and the timing of intervention.

The kinetics of BRE-eGFP reporter and pSmad activation suggested that the canonical TGF β -superfamily system is not active in astrocytes immediately after injury but rather at later stages when these cells are already activated within the injured tissues. Therefore, insights regarding the way by which TGF β s and BMPs could modify the functionality of already activated astrocytes *in vivo* were obtained, indirectly, by treating with TGF β 1 or BMP4 purified reactive astrocytes that were derived from neonatal mixed glia cultures grown *in vitro* for ~20–24 days. Earlier studies (Cahoy *et al.*, 2008; Foo *et al.*, 2011; Zamanian *et al.*, 2012) have shown that astrocytes derived from such cultures share many of the characteristics of adult reactive astrocytes and in hierarchical clustering analysis they cluster closer to ‘A2’-like reactive astrocytes and away from both quiescent and LPS-reactive, ‘A1’-like, astrocytes (Zamanian *et al.*, 2012). Interestingly, they express ~60% of the ‘A2’-like and ~50% of the ‘A1’-like phenotype characteristic marker genes (Zamanian *et al.*, 2012), representing thus a suitable population to study factors that can modify the astrocytic ‘A1’/‘A2’-phenotypic plasticity. Indeed, both TGF β 1 and BMP4 shifted the profile of cultured astrocytes towards the ‘A2’ phenotype, and moreover, in agreement with Liddelov *et al.* (2017), TGF β 1 downregulated several genes associated with the ‘A1’ phenotype, suggesting that both TGF β and BMP signalling systems could be important regulators of reactive astrocyte plasticity.

Transcriptomic analysis provided clues regarding the interplay between TGF β and BMP axes and the responses they could potentially evoke *in vivo*. Interestingly, activation of astrocytes with either ligand affected highly overlapping sets of genes. Up to 69% of these genes responded to both TGF β 1 and BMP4 after 2 h stimulation (Fig. 3B), modulating pathways related to growth factor-mediated signalling, cytoskeleton remodelling and cell migration (Supplementary Fig. 5A). Twenty-four hours post-stimulation, when primarily processes related to tissue-repair and remodelling were modulated, the

BMP4 for 2 or 24 h (baseMean > 30 and FDR < 0.05). (B) qRT-PCR analysis of mRNA expression of axonal growth permissive molecules *Tnc* and *Lif* and axonal growth inhibitory molecules *Ncan* and *Nrp1* (highlighted with pink frames in A) in the contralateral (C) and ipsilateral (I) dissected tissues from TBI-subjected animals at 3 and 7 dpi ($n = 5$ animals/group). (D) qRT-PCR analysis of *Col1a1* and *Col5a2* (highlighted with pink frames in C) mRNA expression in the contralateral (C) and ipsilateral (I) tissues dissected from TBI-subjected animals at 3 and 7 dpi. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) analysed using one-way analysis of variance with Bonferroni's *post hoc* test analysis (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) or Newman–Keuls Multiple Comparison Test ($\#P < 0.05$). *F* values and degrees of freedom (df) are shown in parentheses for each data set. (E) Representative immunofluorescence images for Collagen-I (white) and BRE-eGFP (green) expression in coronal brain sections at the level of the wound at 7 dpi (Scale bar = 100 μ m). Red dashed square indicates area shown in higher magnification (Scale bar = 50 μ m) of BRE-eGFP-expressing astrocytes interacting with vasculature characterized by intense Collagen-I deposition (pink arrows). DAPI (blue) is used for nuclear tracing.

TGF β 1 and BMP4 transcriptomes diverged; however, the overall overlap was still up to \sim 44% (Figs 3C and 5A).

The substantial overlap between TGF β 1- and BMP4-induced genes in astrocytes, especially at the early stage of treatment, may be explained by the reported property of TGF β to activate BMP-Smads, through an interplay of TGFBR1/ALK5 with either ACVRL1/ALK1 (Goumans et al., 2002) or ACVR1/ALK2 (Ramachandran et al., 2018). Consistently, astrocytes express mRNA for *Acvr1/Alk2* (Fig. 4B) and transient increase in pSmad1/5/8 levels was always observed in TGF β 1-treated astrocytes (Supplementary Fig. 4B). These findings support the notion that transcriptional responses evoked by TGF β -superfamily require integrated combinatorial signalling via both Smad2/3 and Smad1/5/8 pathways (Ramachandran et al., 2018).

Despite the aforementioned overlap, the sets of TGF β 1- or BMP4-modulated genes within each GO annotation differed qualitatively and quantitatively, indicating that each ligand could stimulate qualitatively different functional outcomes. Firstly, commonly regulated genes responded to each ligand to a different degree. Hence, classical TGF β targets such as *Serpine1* responded more robustly to TGF β 1, whereas typical BMP targets such as *Id1*, *Smad6* and *Noggin* responded more robustly to BMP4 stimulation (Supplementary Fig. 4A). Secondly, within each commonly regulated pathway, some genes responded to both ligands, and some were modulated selectively by either TGF β 1 (*Ctgf/Ccn2*, *Col12a1*) or BMP4 (*Gata2*, *Bambi*). The ratio of commonly and selectively modulated genes differed among pathways.

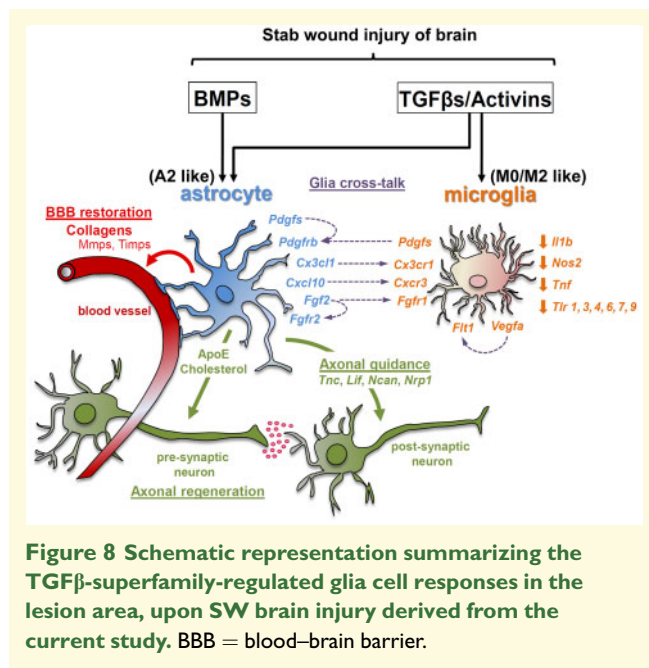
To investigate the effect of the TGF β -superfamily signalling system on microglia, we utilized CD11b⁺GLAST⁻ cells derived from 14 days old mixed glia cultures of neonatal brains that were cultured as pure microglia for additional 10–12 days (\sim 24 days in total). Interestingly, such cultured microglia responded remarkably well to TGF β 1, however, consistently with the failure to detect *in vivo* activation of the BRE-eGFP reporter in adult microglia upon TBI (Fig. 2D), failed to respond robustly to BMP4 and expressed relatively lower mRNA levels for BMP receptors and (Fig. 4B), suggesting that microglia might be programmed to be insensitive to BMP signalling.

It is currently recognized that neonatal microglia exhibit an ‘immature’ phenotype and do not express genes that characterize adult microglia (Butovsky et al., 2014). However, the cells utilized herein, probably due to their prolonged *in vitro* growth in the presence of serum, although they retained some characteristics of ‘immature’ microglia, such as high mRNA levels for *ApoE*, yet, they expressed half of the genes that constitute the ‘adult microglial’ molecular signature (40/81 genes with FPKM from 20 to 7500) and several genes that have been associated with the reportedly (Butovsky et al., 2014) ‘M0’-, ‘M1’- and ‘M2’-like phenotypes (15/38 ‘M0’, 21/52 ‘M1’ and 24/46 ‘M2’ marker genes). Moreover, 42 out of 54 genes that have been found to constitute a TGF β

dependent signature of adult microglia were also found herein modulated by TGF β 1 in the *in vitro* microglia cultures (32 upregulated and 10 downregulated; Supplementary Fig. 5C), suggesting that these cells may provide a useful model for studying the effect of the TGF β -superfamily signalling system on microglial molecular plasticity. Indeed, TGF β 1 upregulated 22 out of 35 known ‘M0’, upregulated 25 out of 44 known ‘M2’ and downregulated 30 out of 44 known ‘M1’ marker genes, suggesting that TGF β can shift the molecular profile of activated microglia away from the pro-inflammatory ‘M1’ phenotype and towards the quiescent or anti-inflammatory ‘M0/M2’ phenotypes, respectively.

TGF β 1 modulated expression of several chemokines, cytokines, growth factors and receptors in astrocytes and microglia. Up-regulation of a ligand in one cell-type and its cognate receptor(s) on the other, as exemplified by the *Pdgfs/Pdgfrb*, *Cx3cl1/Cx3cr1* and *Cxcl10/Cxcr3* pairs (Figs 5C and 8) might highlight potential TGF β -driven cross-interactions between them. Notably, the CX3CL1/CX3CR1 axis has been associated with reduced neurotoxicity and microglial activation (Mizuno et al., 2003; Pabon et al., 2011; Febinger et al., 2015). Likewise, PDGFs have been associated with survival signals upon CNS injury (Funa and Sasahara, 2014) and the CXCL10/CXCR3 axis has been linked to microglial recruitment to the injury site and subsequent neuronal re-organization (Rappert et al., 2004; Li et al., 2006). Moreover, pairs of ligands and cognate receptors were modulated in the same population, specifically, *Fgf2/Fgfr1:Fgfr2* and *Pdgfb:Pdgfc/Pdgfrb* were upregulated in astrocytes, *Vegfa/Flt1:Kdr* were upregulated and *Ccl3:Ccl4/Ccr5* downregulated in microglia, highlighting thus potential homotypic interactions. Notably, activation of the FGF pathway has been associated with suppression of the ‘A1’ astrocytic phenotype (Kang et al., 2014; Liddel et al., 2017). Hence, it appears that another way by which TGF β 1 could indirectly modulate microglial reactivity is by up-regulating anti-inflammatory mediators in reactive astrocytes and their receptors in microglia.

Maximal activation of BRE-eGFP reporter occurred between 3 and 7 dpi, a period associated with initiation of tissue-repair. Therefore, particular emphasis was given to the effect of TGF β 1 or BMP4 on astrocytes at 24 h, when the top canonical pathways modulated by both ligands were the ‘Superpathway of Cholesterol Biosynthesis’, ‘Axonal Guidance Signaling’ and ‘Hepatic Fibrosis’. In adult brain, astrocytes are the major cholesterol providers (Nieweg et al., 2009) and their lipid metabolism is critical for synapse development and function (van Deijk et al., 2017). Interestingly, almost all enzymes involved in the superpathway of cholesterol biosynthesis together with various components of lipid transport and metabolism were upregulated in ligand-treated astrocytes (Fig. 6A and B). Activation of this pathway upon TBI was verified by demonstrating up-regulation of several components, such as *Srebf1*, *Abca1*, *Ldlr* and the



extracellular cholesterol-esterifying enzyme *Lcat*, within the injured tissues (Fig. 6C). The increased *Lcat* expression could relate to the significant increase of esterified cholesterol following cortical impact injury (Roux *et al.*, 2016). Moreover, secreted APOE was increased upon BMP4 or TGF β 1 stimulation of astrocytes *in vitro*, and decreased when inhibitors of TGF β -signalling system were applied (Fig. 6D). Consistently, APOE and ABCA1 were gradually upregulated both at mRNA and protein levels, within the SW-injured tissues (Fig. 6C, E, and F). Interestingly, APOE protein levels were significantly reduced at 1 dpi, normalized at 3 dpi and increased at 7 dpi. Pro-inflammatory cytokines such as TNF α , IL1 β and IFN γ suppress APOE production (Zhang *et al.*, 2011). It is possible that an early burst of such cytokines (at 1 dpi) in the wound microenvironment could account for the observed decreased APOE protein levels at this early time-point. The anti-inflammatory and APOE-inducing function of the TGF β -superfamily signalling that is mobilized after 3 dpi could be responsible for the late increase in both mRNA and protein levels of APOE in the injured tissues. This hypothetical scenario warrants further investigation. Collectively, our findings implicate for the first time TGF β and BMP signalling in the regulation of cholesterol biosynthesis, APOE secretion and possibly lipoprotein formation following interaction of APOE with ABCA1 cholesterol transporter and LCAT esterifying enzyme in astrocytes.

TGF β 1 and BMP4 regulated several molecules with axonal guidance properties. Interestingly, TGF β 1 upregulated primarily axonal-permissive molecules and downregulated inhibitory ones, whereas BMP4 upregulated both permissive and inhibitory genes (Fig. 7A). Increased expression of both permissive and inhibitory axonal growth

molecules was verified within the injured tissues (Fig. 7B) suggesting that astrocytes demarcating the wound could provide directionally the signals required for axonal regeneration (Jones *et al.*, 2003; Faulkner *et al.*, 2004; Cregg *et al.*, 2014). Congruently, earlier studies have shown that BMP4 up-regulates neurocan (*Ncan*) and brevican (*Bcan*), and down-regulates phosphacan (*Ptprz1*) mRNA in spinal cord astrocytes (Fuller *et al.*, 2007) and TGF β 1 increases mRNA and protein levels of neurocan in cortical astrocytes (Asher *et al.*, 2000; Schachtrup *et al.*, 2010).

Plethora of tissue-remodelling components, including collagens, growth factors and receptors were upregulated in astrocytes by TGF β 1 or BMP4. Interestingly, the two ligands regulated different collagens, supporting the notion that TGF β and/or BMP signalling may play distinct roles during tissue-repair. Up-regulation of selected genes, regulated *in vitro* selectively by TGF β 1 (*Col5a2*, *Mmp2*), BMP4 (*Col1a1*) or both (*Il6*), was verified by analysing dissected wound regions (Fig. 7C and D and Supplementary Fig. 7B). Notably, the visualization of processes of BRE-eGFP⁺ astrocytes in close association to vessel walls with increased Collagen-I immunoreactivity (Fig. 7E), strongly suggests that BMP-activated astrocytes could play a key role in sealing disrupted vasculature and restoring blood–brain barrier.

TBI represents one of the principal causes of death and disability worldwide and ~50% of the world's population will have at least one TBI incidence over their lifetime (Maas *et al.*, 2017; Quaglio *et al.*, 2017). Despite the rapidly increasing body of literature, TBIs remain especially challenging to treat due to their heterogeneous nature and the induction of complex pathogenesis pathways that, still, are not fully understood (Saatman *et al.*, 2008). Therefore, clarification of the molecular processes underlying TBI pathophysiology, in particular, the cross-talk between astrocytes and microglia and the mechanisms that modulate plasticity of activated glial cells will be important steps towards the development of therapeutic strategies that could harness their reparatory capacity (Sofroniew, 2009).

Our study provides a comprehensive analysis of the potential role of both branches of the TGF β -superfamily signalling system in the context of acute focal TBI pathology and draws attention on the capacity of both TGF β and BMP signalling to regulate key processes for tissue-injury repair and glial pro-inflammatory activity, in activated astrocytes and microglia surrounding the trauma (Fig. 8). Both TGF β and BMP act on astrocytes and induce highly overlapping transcriptional programmes, whereas microglia respond selectively to TGF β signalling. Thus, selective manipulation of either branch of the TGF β -superfamily, especially in astrocytes, should be treated with caution given the potential compensatory activation or inhibition of the other. The SW injury utilized herein represents probably the simplest form of TBI that does not simulate the biomechanical aspects of human TBI. However, the wealth of information obtained

herein could be further utilized to study more complex models that simulate closer human TBI pathophysiology, ideally with genetically modified animals and inducible ablation of specific components of the TGF β -superfamily signalling system (receptors, ligands or inhibitors) specifically in astrocytes or microglia and thus aid prospectively to the design of therapeutic strategies for TBI and similar neuro-inflammatory conditions.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain Communications* online.

Acknowledgements

Drs. E. Rigana and S. Pagkakis, Imaging Facility, BRFAA, are gratefully acknowledged for support in confocal microscopy, Drs. A. Moustakas, E. Andreacos and K. Thanopoulou for critical reading of the manuscript and Drs. S. Georgopoulos and I. Serafimidis for kindly providing anti-APOE antibody and Fc-Noggin, respectively.

Funding

This work was supported by a grant from the National Parkinson Foundation (NPF-UP202), and the General Secretariat of Research and Development, Hellenic Ministry of Education, Research and Religious Affairs, programme ARISTEIA II (#3451).

Competing interests

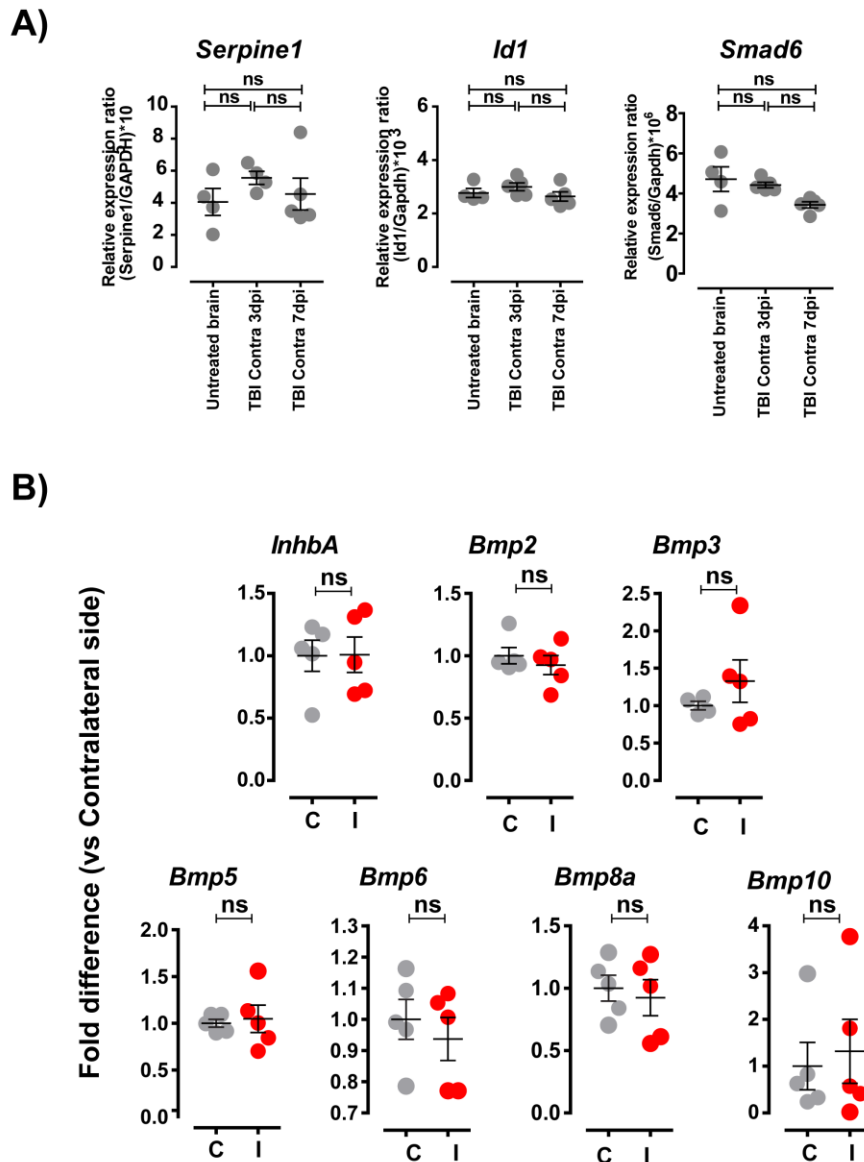
The authors report no competing interests.

References

- Anderson MA, Burda JE, Ren Y, Ao Y, O'Shea TM, Kawaguchi R, et al. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* 2016; 532: 195–200.
- Asher RA, Morgenstern DA, Fidler PS, Adcock KH, Oohira A, Braistead JE, et al. Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J Neurosci* 2000; 20: 2427–38.
- Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 2010; 11: 889–96.
- Budi EH, Duan D, Derynck R. Transforming growth factor-beta receptors and Smads: regulatory complexity and functional versatility. *Trends Cell Biol* 2017; 27: 658–72.
- Buffo A, Vosko MR, Erturk D, Hamann GF, Jucker M, Rowitch D, et al. Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: implications for neuronal repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 18183–8.
- Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV. Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2016; 275 (Pt 3): 305–15.
- Buss A, Pech K, Kakulas BA, Martin D, Schoenen J, Noth J, et al. TGF-beta1 and TGF-beta2 expression after traumatic human spinal cord injury. *Spinal Cord* 2008; 46: 364–71.
- Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, et al. Identification of a unique TGF-beta-dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci* 2014; 17: 131–43.
- Bylicky MA, Mueller GP, Day RM. Mechanisms of endogenous neuroprotective effects of astrocytes in brain injury. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018: 1.
- Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, et al. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* 2008; 28: 264–78.
- Chen J, Van Gulden S, McGuire TL, Fleming AC, Oka C, Kessler JA, et al. BMP-responsive protease HtrA1 is differentially expressed in astrocytes and regulates astrocytic development and injury response. *J Neurosci* 2018; 38: 3840–57.
- Chung WS, Clarke LE, Wang GX, Stafford BK, Sher A, Chakraborty C, et al. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* 2013; 504: 394–400.
- Cregg JM, DePaul MA, Filous AR, Lang BT, Tran A, Silver J. Functional regeneration beyond the glial scar. *Exp Neurol* 2014; 253: 197–207.
- Detman RW, Birch D, Fernando A, Kessler JA, Dizon M. Targeted knockdown of bone morphogenetic protein signaling within neural progenitors protects the brain and improves motor function following postnatal hypoxia-ischemia. *Dev Neurosci* 2018; 40: 23–38.
- Dewan MC, Rattani A, Gupta S, Baticulon RE, Hung YC, Panchak M, et al. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2018; 130: 1039–408.
- Donat CK, Scott G, Gentleman SM, Sastre M. Microglial activation in traumatic brain injury. *Front Aging Neurosci* 2017; 9: 208.
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* 2004; 24: 2143–55.
- Febinger HY, Thomasy HE, Pavlova MN, Ringgold KM, Barf PR, George AM, et al. Time-dependent effects of CX3CR1 in a mouse model of mild traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* 2015; 12: 154.
- Foo LC, Allen NJ, Bushong EA, Ventura PB, Chung WS, Zhou L, et al. Development of a method for the purification and culture of rodent astrocytes. *Neuron* 2011; 71: 799–811.
- Frik J, Merl-Pham J, Plesnila N, Mattugini N, Kjell J, Kraska J, et al. Cross-talk between monocyte invasion and astrocyte proliferation regulates scarring in brain injury. *EMBO Rep* 2018; 19: pii: e45294.
- Fuller ML, DeChant AK, Rothstein B, Capriarello A, Wang R, Hall AK, et al. Bone morphogenetic proteins promote gliosis in demyelinating spinal cord lesions. *Ann Neurol* 2007; 62: 288–300.
- Fumagalli M, Lecca D, Abbracchio MP. Role of purinergic signalling in neuro-immune cells and adult neural progenitors. *Front Biosci* 2011; 16: 2326–41.
- Funa K, Sasahara M. The roles of PDGF in development and during neurogenesis in the normal and diseased nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol* 2014; 9: 168–81.
- Gao Z, Zhu Q, Zhang Y, Zhao Y, Cai L, Shields CB, et al. Reciprocal modulation between microglia and astrocyte in reactive gliosis following the CNS injury. *Mol Neurobiol* 2013; 48: 690–701.
- Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J* 2002; 21: 1743–53.
- Hampton DW, Asher RA, Kondo T, Steeves JD, Ramer MS, Fawcett JW. A potential role for bone morphogenetic protein signalling in glial cell fate determination following adult central nervous system injury in vivo. *Eur J Neurosci* 2007; 26: 3024–35.
- Helmy A, Carpenter KL, Menon DK, Pickard JD, Hutchinson PJ. The cytokine response to human traumatic brain injury: temporal

- profiles and evidence for cerebral parenchymal production. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011; 31: 658–70.
- Huang RQ, Cheng HL, Zhao XD, Dai W, Zhuang Z, Wu Y, et al. Preliminary study on the effect of trauma-induced secondary cellular hypoxia in brain injury. *Neurosci Lett* 2010; 473: 22–7.
- Jassam YN, Izzy S, Whalen M, McGavern DB, El Khoury J. Neuroimmunology of traumatic brain injury: time for a paradigm shift. *Neuron* 2017; 95: 1246–65.
- Jones LL, Margolis RU, Tuszynski MH. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp Neurol* 2003; 182: 399–411.
- Kang W, Balordi F, Su N, Chen L, Fishell G, Hebert JM. Astrocyte activation is suppressed in both normal and injured brain by FGF signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: E2987–95.
- Karve IP, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol* 2016; 173: 692–702.
- Komuta Y, Teng X, Yanagisawa H, Sango K, Kawamura K, Kawano H. Expression of transforming growth factor-beta receptors in meningeal fibroblasts of the injured mouse brain. *Cell Mol Neurobiol* 2010; 30: 101–11.
- Lewen A, Soderstrom S, Hillered L, Ebendal T. Expression of serine/threonine kinase receptors in traumatic brain injury. *Neuroreport* 1997; 8: 475–9.
- Li H, Gang Z, Yuling H, Luokun X, Jie X, Hao L, et al. Different neurotropic pathogens elicit neurotoxic CCR9- or neurosupportive CXCR3-expressing microglia. *J Immunol* 2006; 177: 3644–56.
- Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 2017; 541: 481–7.
- Lindholm D, Castren E, Kiefer R, Zafr F, Thoenen H. Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J Cell Biol* 1992; 117: 395–400.
- Loane DJ, Kumar A. Microglia in the TBI brain: the good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol* 2016; 275 (Pt 3): 316–27.
- Logan TT, Villapal S, Symes AJ. TGF-beta superfamily gene expression and induction of the Runx1 transcription factor in adult neurogenic regions after brain injury. *PLoS One* 2013; 8: e59250.
- Maas AIR, Menon DK, Adelson PD, Andelic N, Bell MJ, Belli A, et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol* 2017; 16: 987–1048.
- Majdan M, Plancikova D, Brazinova A, Rusnak M, Nieboer D, Feigin V, et al. Epidemiology of traumatic brain injuries in Europe: a cross-sectional analysis. *Lancet Public Health* 2016; 1: e76–e83.
- Mathewson AJ, Berry M. Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats. *Brain Res* 1985; 327: 61–9.
- McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 1980; 85: 890–902.
- Menon DK, Schwab K, Wright DW, Maas AI. Position statement: definition of traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil* 2010; 91: 1637–40.
- Michell-Robinson MA, Touil H, Healy LM, Owen DR, Durafourt BA, Bar-Or A, et al. Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain* 2015; 138: 1138–59.
- Miyazawa K, Miyazono K. Regulation of TGF-beta family signaling by inhibitory Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017; 9: a022095.
- Mizuno T, Kawanokuchi J, Numata K, Suzumura A. Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system. *Brain Res* 2003; 979: 65–70.
- Monteiro RM, de Sousa Lopes SM, Bialecka M, de Boer S, Zwijsen A, Mummery CL. Real time monitoring of BMP Smads transcriptional activity during mouse development. *Genesis* 2008; 46: 335–46.
- Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* 2005; 118: 3573–84.
- Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 2001; 114: 4359–69.
- Myer DJ, Gurkoff GG, Lee SM, Hovda DA, Sofroniew MV. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain* 2006; 129: 2761–72.
- Niewieg K, Schaller H, Pfrieger FW. Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J Neurochem* 2009; 109: 125–34.
- Pabon MM, Bachstetter AD, Hudson CE, Gemma C, Bickford PC. CX3CL1 reduces neurotoxicity and microglial activation in a rat model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* 2011; 8: 9.
- Pfrieger FW, Ungerer N. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog Lipid Res* 2011; 50: 357–71.
- Quaglio G, Gallucci M, Brand H, Dawood A, Cobello F. Traumatic brain injury: a priority for public health policy. *Lancet Neurol* 2017; 16: 951–2.
- Ramachandran A, Vizan P, Das D, Chakravarty P, Vogt J, Rogers KW, et al. TGF-beta uses a novel mode of receptor activation to phosphorylate SMAD1/5 and induce epithelial-to-mesenchymal transition. *Elife* 2018; 7. pii: e31756.
- Rappert A, Bechmann I, Pivneva T, Mahlo J, Biber K, Nolte C, et al. CXCR3-dependent microglial recruitment is essential for dendrite loss after brain lesion. *J Neurosci* 2004; 24: 8500–9.
- Rosendahl A, Checchin D, Fehniger TE, ten Dijke P, Heldin CH, Sideras P. Activation of the TGF-beta/activin-Smad2 pathway during allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25: 60–8.
- Rosendahl A, Pardali E, Speletas M, Ten Dijke P, Heldin CH, Sideras P. Activation of bone morphogenetic protein/Smad signaling in bronchial epithelial cells during airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27: 160–9.
- Roux A, Muller L, Jackson SN, Post J, Baldwin K, Hoffer B, et al. Mass spectrometry imaging of rat brain lipid profile changes over time following traumatic brain injury. *J Neurosci Methods* 2016; 272: 19–32.
- Saatman KE, Duhaime AC, Bullock R, Maas AI, Valadka A, Manley GT. Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. *J Neurotrauma* 2008; 25: 719–38.
- Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 2003; 34: 374–8.
- Samanta J, Alden T, Gobeske K, Kan L, Kessler JA. Noggin protects against ischemic brain injury in rodents. *Stroke* 2010; 41: 357–62.
- Saura J, Tusell JM, Serratos J. High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia* 2003; 44: 183–9.
- Schachtrup C, Ryu JK, Helmrick MJ, Vagena E, Galanakis DK, Degen JL, et al. Fibrinogen triggers astrocyte scar formation by promoting the availability of active TGF-beta after vascular damage. *J Neurosci* 2010; 30: 5843–54.
- Setoguchi T, Yone K, Matsuoka E, Takenouchi H, Nakashima K, Sakou T, et al. Traumatic injury-induced BMP7 expression in the adult rat spinal cord. *Brain Res* 2001; 921: 219–25.
- Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113: 685–700.
- Shin JA, Kang JL, Lee KE, Park EM. Different temporal patterns in the expressions of bone morphogenetic proteins and noggin during astroglial scar formation after ischemic stroke. *Cell Mol Neurobiol* 2012; 32: 587–97.
- Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012; 122: 787–95.
- Sidoryk-Wegrzynowicz M, Wegrzynowicz M, Lee E, Bowman AB, Aschner M. Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol Pathol* 2011; 39: 115–23.
- Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 2009; 32: 638–47.
- Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010; 119: 7–35.

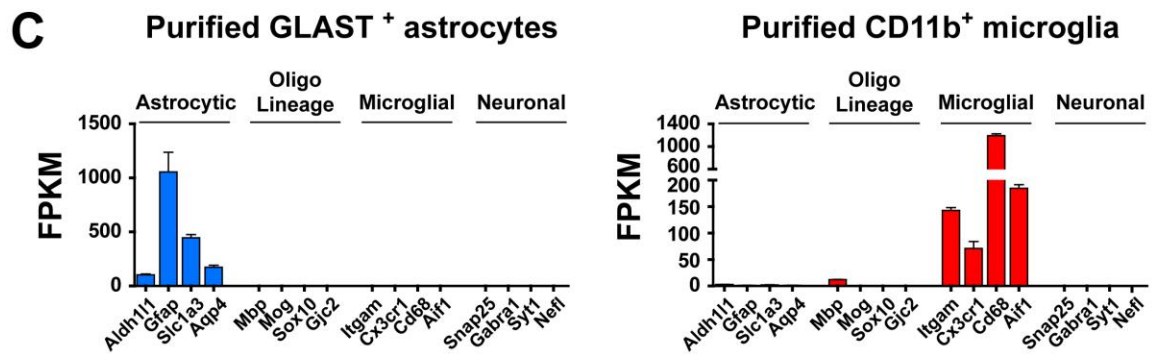
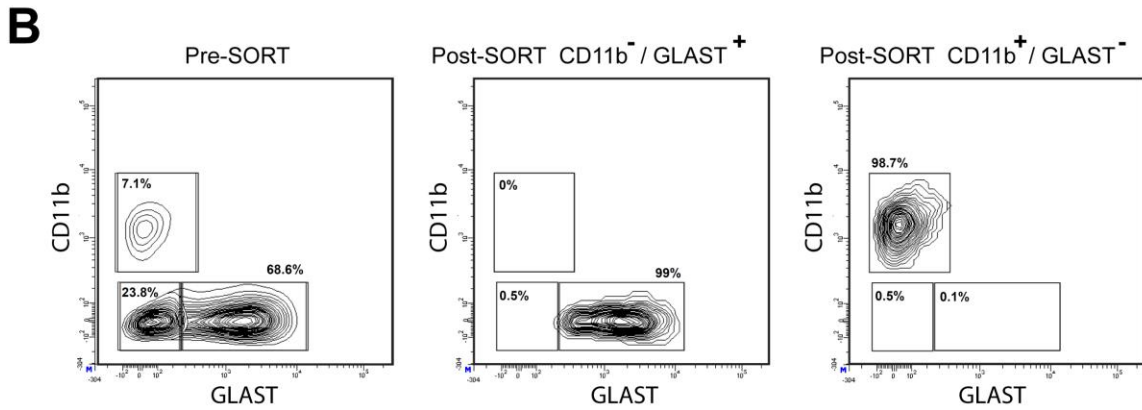
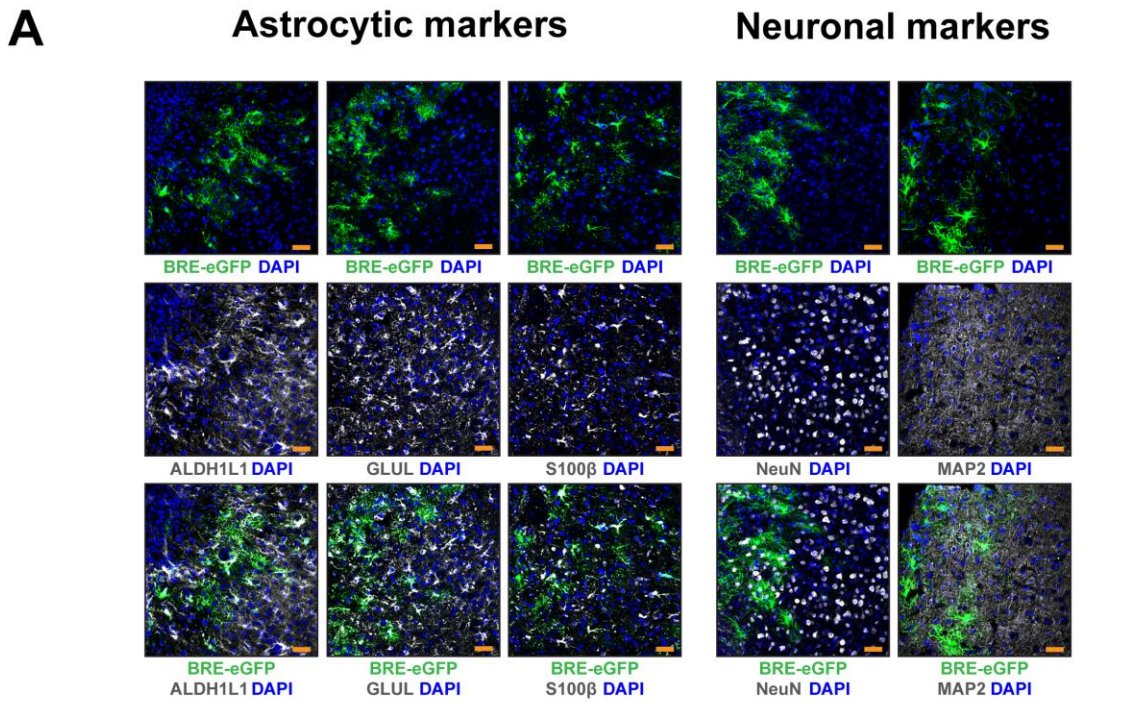
- Sountoulidis A, Stavropoulos A, Giaglis S, Apostolou E, Monteiro R, Chuva de Sousa Lopes SM, et al. Activation of the canonical bone morphogenetic protein (BMP) pathway during lung morphogenesis and adult lung tissue repair. *PLoS One* 2012; 7: e41460.
- Spittau B, Wullkopf L, Zhou X, Rilka J, Pfeifer D, Kriegstein K. Endogenous transforming growth factor-beta promotes quiescence of primary microglia in vitro. *Glia* 2013; 61: 287–300.
- Szepesi Z, Manouchehrian O, Bachiller S, Deierborg T. Bidirectional microglia-neuron communication in health and disease. *Front Cell Neurosci* 2018; 12: 323.
- Taylor RA, Chang CF, Goods BA, Hammond MD, Mac Grory B, Ai Y, et al. TGF-beta1 modulates microglial phenotype and promotes recovery after intracerebral hemorrhage. *J Clin Invest* 2017; 127: 280–92.
- van Deijk AF, Camargo N, Timmerman J, Heistek T, Brouwers JF, Mogavero F, et al. Astrocyte lipid metabolism is critical for synapse development and function in vivo. *Glia* 2017; 65: 670–82.
- Xilouri M, Kyratzi E, Pitychoutis PM, Papadopoulou-Daifoti Z, Perier C, Vila M, et al. Selective neuroprotective effects of the S18Y polymorphic variant of UCH-L1 in the dopaminergic system. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 874–89.
- Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, et al. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci* 2012; 32: 6391–410.
- Zhang H, Wu LM, Wu J. Cross-talk between apolipoprotein E and cytokines. *Mediators Inflammation* 2011; 2011: 1.
- Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* 2009; 19: 128–39.
- Zoller T, Schneider A, Kleimeyer C, Masuda T, Potru PS, Pfeifer D, et al. Silencing of TGFbeta signalling in microglia results in impaired homeostasis. *Nat Commun* 2018; 9: 4011.



Supplementary Figure 1. A. Comparative analysis of the relative mRNA expression levels for *Serpine1*, *Id1* and *Smad6* in similar brain areas of untreated brain and contralateral sides of SW-subjected animals at 3 and 7 dpi. No significant alterations could be observed between the compared groups (n=4-5 animals). **B.** TGF β -superfamily ligands with mRNA expression levels not altered significantly within the lesion area upon acute SW brain injury. qRT-PCR analysis of mRNA expression levels for *InhbA*, *Bmps* 2, 3, 5, 6, 8a and 10 in the contralateral (C) and ipsilateral (I) tissues dissected from TBI-subjected animals at 3dpi (n=5 animals).

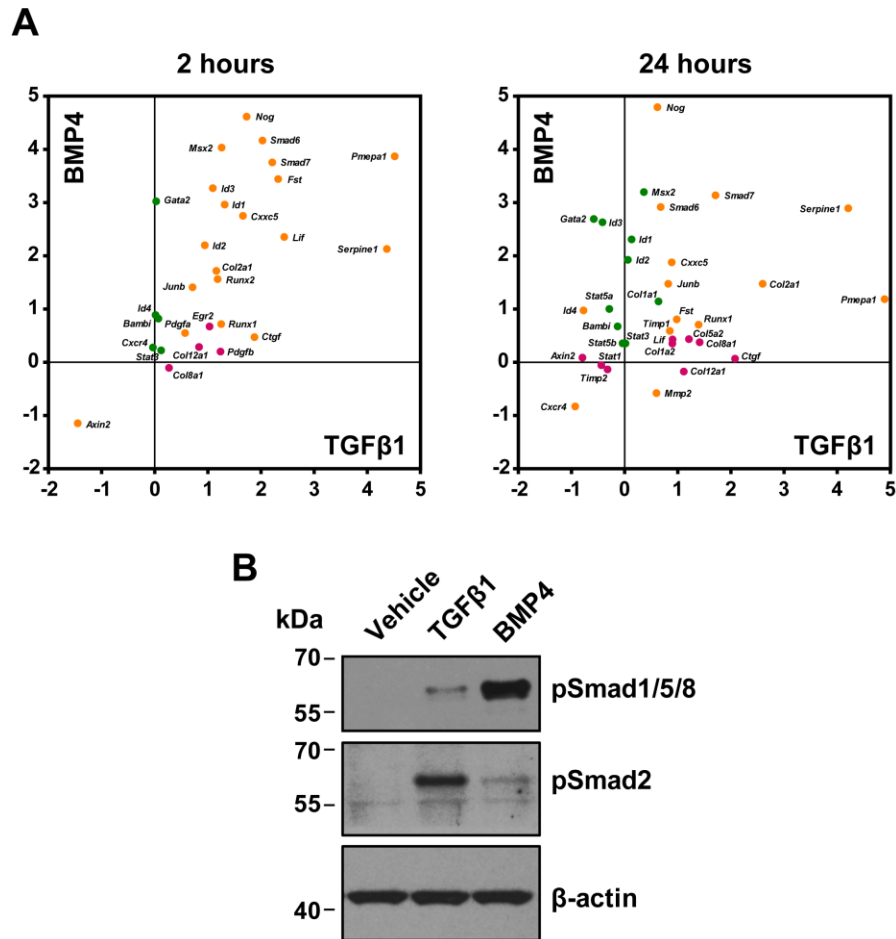
cortex following TBI. (A) Representative immunofluorescence images for Noggin (white) and BRE-eGFP (green) staining of coronal brain sections at the level of the wound, at 3 and 7dpi. Dotted lines depict the tissue borders (Scale bar = 150 μ m). DAPI (blue) is used for nuclear staining. (B) qRT-PCR analysis of *Gfap* mRNA expression, following TBI at 3 and 7dpi (n=5 animals/group). (C) Representative immunoblots and quantitative analysis of GFAP levels, in the contralateral (C) and ipsilateral (I) tissues dissected from TBI-subjected animals at 1, 3 and 7dpi. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) analyzed using one-way analysis of variance with Bonferroni's post hoc test analysis (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001). F values and degrees of freedom (df) are shown in parentheses for each data set. (D) Tile scan confocal immunofluorescence image of the BRE-eGFP reporter expression (green) in a coronal brain section, at the level of the wound at 7dpi. Dotted line depicts the tissue borders (Scale bar=500 μ m). White dashed square in the ipsilateral cortex indicates area shown in higher magnification (right image, Scale bar=50 μ m). BRE-eGFP⁺ cells (green) are shown co-expressing the GFAP marker (white).

Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 3. (A) The BRE-eGFP reporter positive cells that appear in the TBI wound area express astrocytic but not neuronal markers. Representative single layer confocal images of the BRE-eGFP reporter (green), the astrocytic markers ALDH1L1, GLUL and S100 β (left panel), and the neuronal markers NeuN and MAP2 (right panel), in the ipsilateral side of TBI-subjected animals at 7dpi (Scale bar=40 μ m). All cell lineage-specific markers are pseudocolored white. DAPI (blue) is used for nuclear staining. (B) Post-sort FACS analysis demonstrating ~99% purity for the populations used to establish the astrocyte and microglia cultures. (C) mRNA expression levels of cell-type specific transcripts in vehicle-treated cultured purified astrocytes (left graph, blue bars) or microglia (right graph, red bars), derived from RNA-Seq data, normalized and expressed as Fragments Per Kilobase per Million reads mapped (FPKM) (n=6 cultures/group). Purified GLAST⁺ and CD11b⁺ cells highly express only astrocytic or microglial markers, respectively.

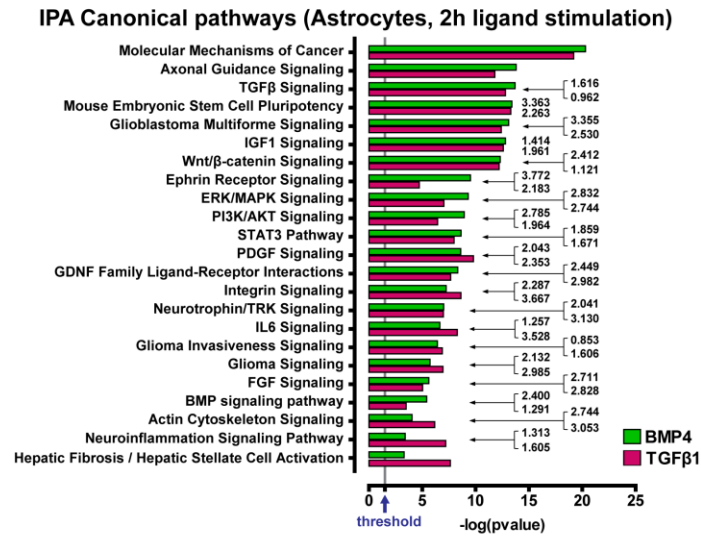
Supplementary Figure 4



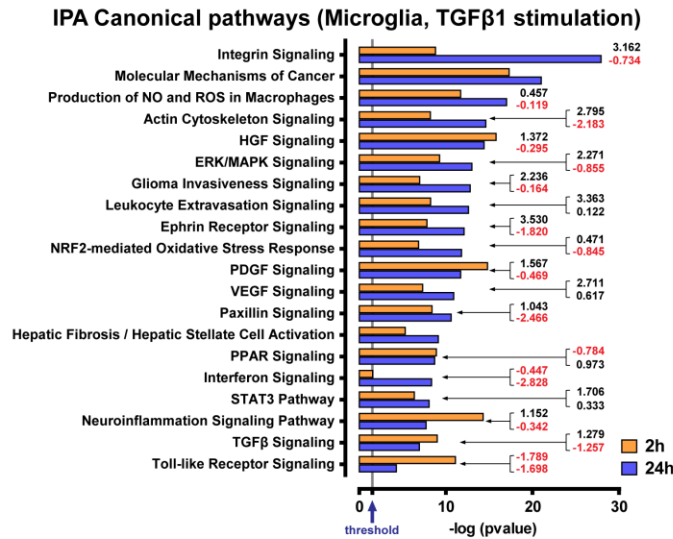
Supplementary Figure 4. Responses of selected known target-genes of TGFβ¹-superfamily signaling, upon *in-vitro* stimulation of purified astrocytes with TGFβ¹ or BMP4. (A) Scatterplots derived from the RNA-Seq analysis of purified astrocytes treated with 2 ng/ml TGFβ¹ or 50 ng/ml BMP4 for 2h (left panel) or 24h (right panel), showing that “classical” targets of TGFβ¹ or BMP4 respond significantly to both ligands, albeit to different degrees. Selected target-genes of the TGFβ¹-superfamily system with statistically significant response to TGFβ¹ only are shown in magenta, to BMP4 only in green and to both in orange. X and y axes represent log₂ fold change of differentially expressed genes (n=3 cultures/group). (B) Representative immunoblots for pSmad1/5/8, pSmad2 and β-actin (loading control) upon stimulation of purified astrocytes with 10 ng/ml TGFβ¹ or 50 ng/ml BMP4 for 1h.

Supplementary Figure 5

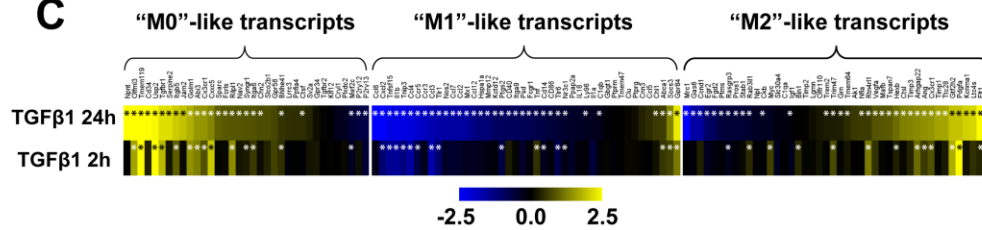
A



B

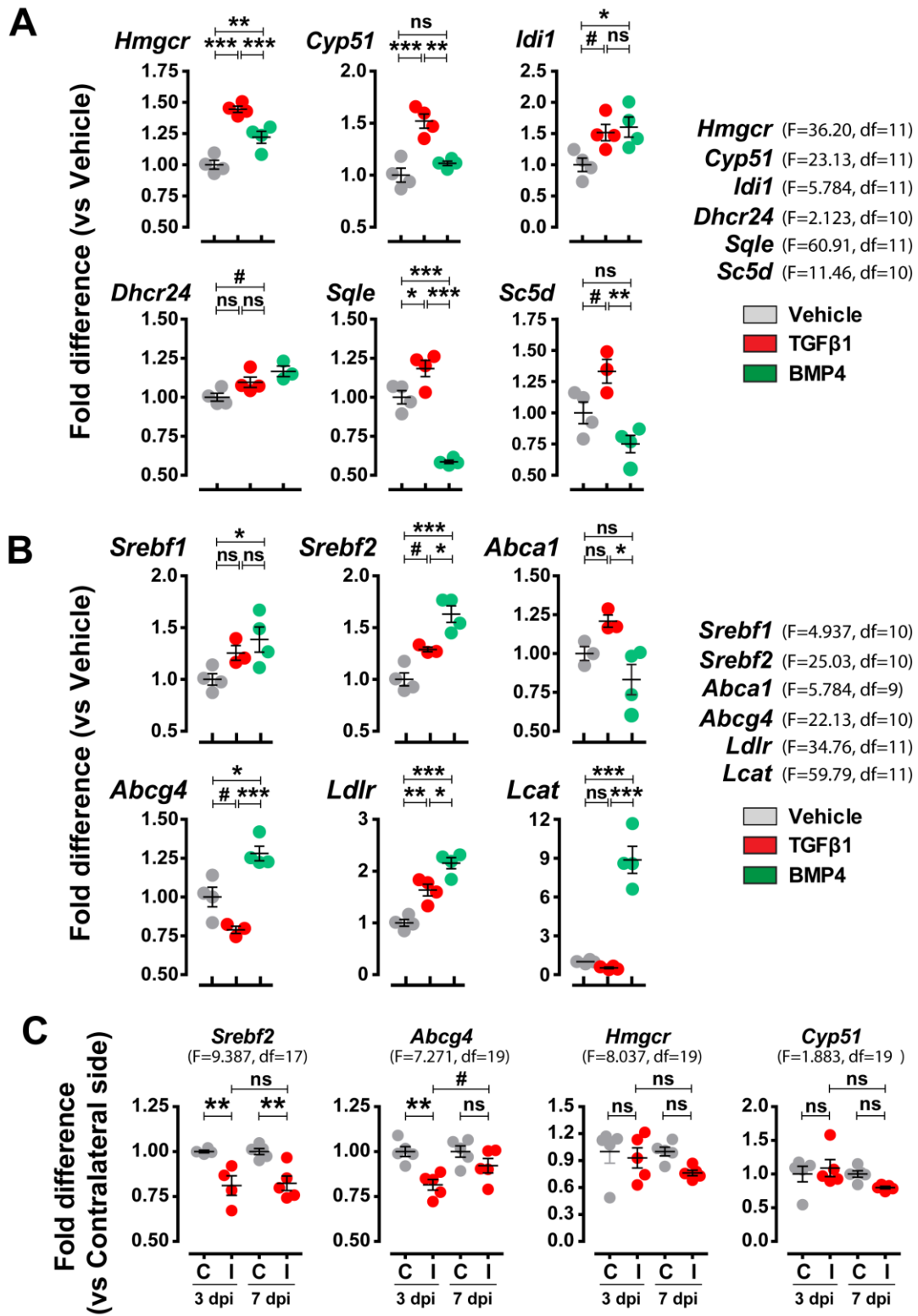


C



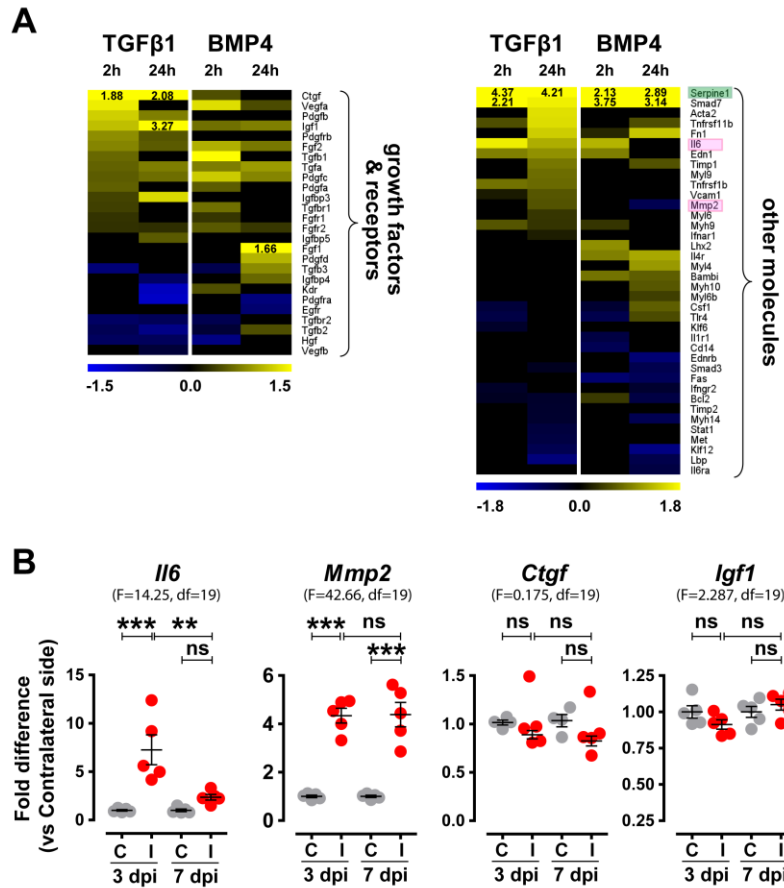
Supplementary Figure 5. Canonical pathways modulated in astrocytes and microglia following *in-vitro* stimulation with TGF β -superfamily ligands. Graphs depicting CNS- and inflammation-related IPA canonical pathways, selected among the top regulated, from RNA-Seq analysis of either **(A)** purified astrocytes stimulated with 2 ng/ml TGF β 1 (magenta bars) or 50 ng/ml BMP4 (green bars) for 24h or **(B)** purified microglia stimulated with 2 ng/ml TGF β 1 for 2h (orange bars) or 24h (purple bars). X axis displays the statistical significance [-log (pvalue)] of the canonical pathways displayed along the y axis. Gray vertical lines, indicated by arrow in the x axis, show the threshold for statistical significance (p=0.05). Numbers at the right side of the bars represent calculated IPA z-scores predicting an increased (black numbers) or a decreased (red numbers) pathway activity. **(C)** Heat map depicting log₂ fold changes of differentially expressed quiescent “M0”-like, pro-inflammatory “M1”-like and anti-inflammatory “M2”-like microglial transcripts, as determined by RNA-Seq analysis of purified microglia following 2 ng/ml TGF β 1 for 2 or 24h (baseMean > 30). Asterisks depict statistical significance (FDR < 0.05).

Supplementary Figure 6



Supplementary Figure 6. Genes encoding for proteins involved in lipid biosynthesis, metabolism and trafficking, modulated in TGFβ1- or BMP4-stimulated astrocytes *in-vitro* or in the wound area upon TBI. qRT-PCR analysis of mRNA expression of (A) cholesterol biosynthesis enzymes *Hmgcr*, *Cyp51*, *Idi1*, *Dhcr24*, *Sqle*, *Sc5d* and (B) lipid trafficking and metabolism components *Srebfl*, *Srebfl2*, *Abca1*, *Abcg4*, *Ldlr*, *Lcat*, after *in-vitro* stimulation of independent astrocytic cultures with 2 ng/ml TGFβ1 or 50 ng/ml BMP4 for 24h (n=4 cultures/group). (C) qRT-PCR analysis of mRNA expression of *Srebfl2*, *Abcg4*, *Hmgcr* and *Cyp51*, in the contralateral (C) and ipsilateral (I) tissues dissected from TBI-subjected animals at 3 and 7dpi (n=5 animals/group). Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) analyzed using one-way analysis of variance with either Bonferroni's post hoc test analysis (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001) or Newman-Keuls Multiple Comparison Test (#p < 0.05). F values and degrees of freedom (df) are shown in parentheses for each data set.

Supplementary Figure 7



Supplementary Figure 7. Tissue-remodeling components are modulated either *in-vitro*, following stimulation of purified astrocytes with TGFβ1 or BMP4, or *in-vivo*, upon TBI. (A) Heat maps depicting log₂ fold changes of differentially expressed genes of the GO annotation “Hepatic Fibrosis” (IPA), including growth factors, receptors of growth factors and other molecules, derived from RNA-Seq analysis of purified astrocytes stimulated with 2 ng/ml TGFβ1 or 50 ng/ml BMP4 for 2 or 24h (baseMean > 30 and FDR < 0.05). **(B)** qRT-PCR analysis of *Ctgf/Ccn2*, *Igf1*, *Il6* and *Mmp2* (highlighted with pink frames in A) mRNA expression, in the contralateral (C) and ipsilateral (I) tissues dissected from TBI animals at 3 and 7dpi. Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) analyzed using one-way analysis of variance with Bonferroni’s post hoc test analysis (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001). F values and degrees of freedom (df) are shown in parentheses for each data set.