



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΧΗΜΕΙΑΣ-ΙΑΤΡΙΚΗΣ-ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΜΑ:

**«Ανίχνευση *TARDBP* μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών σε Έλληνες FTD
(frontotemporal dementia) ασθενείς και υγιή πληθυσμό»**

ΧΑΡΩΝΙΤΗ ΕΙΡΗΝΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2019



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΧΗΜΕΙΑΣ-ΙΑΤΡΙΚΗΣ-ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΜΑ:

**«Ανίχνευση *TARDBP* μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών σε Έλληνες FTD
(frontotemporal dementia) ασθενείς και υγιή πληθυσμό»**

**ΧΑΡΩΝΙΤΗ ΕΙΡΗΝΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2019

ΘΕΜΑ: «Ανίχνευση *TARDBP* μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών σε Έλληνες FTD (frontotemporal dementia) ασθενείς και υγιή πληθυσμό»

ΧΑΡΩΝΙΤΗ ΕΙΡΗΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Χρήστος Κρούπης, Αναπληρωτής Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής Διαγνωστικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Χρήστος Κρούπης, Αναπληρωτής Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής Διαγνωστικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μουτσάτσου-Λαδικού Παρασκευή, Καθηγήτρια Κλινικής Βιοχημείας-Ιατρικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευρύκλεια Λιανίδου, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας-Κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία διπλώματος ειδίκευσης εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας του ΑΤΤΙΚΟΝ Π.Γ.Ν, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης Κλινικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής Διαγνωστικής της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ κ. Χρήστο Κρούπη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όσους συνέβαλαν στη διεκπεραίωση αυτής της εργασίας, ξεκινώντας από τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Χρήστο Κρούπη. Τον ευχαριστώ θερμά για το συνεχές ενδιαφέρον, τις συμβουλές του και τη στήριξή του και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σωκράτη Παπαγεωργίου της Β' Νευρολογικής Κλινικής του ΑΤΤΙΚΟΝ Π.Γ.Ν που συνέβαλε στη συλλογή των δειγμάτων και την εκπαίδευση πάνω στις άνοιες καθώς και τους συνεργάτες του Χρήστο Κόρο, Νίκο Ανδρωνά, Ιωάννη Παπατριανταφύλλου, Βίκυ Παπαστεφανοπούλου και Ευαγγελία Στανίτσα.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την δρ. Άννα Παπαδοπούλου, Βιοχημικό ΕΔΙΠ Β' Παιδιατρικής Κλινικής του ΑΤΤΙΚΟΝ Π.Γ.Ν για την παροχή βοήθειας στο Γενετικό Αναλυτή ABI310, καθώς και το διδακτορικό φοιτητή Αιμίλιο Σιμούδη και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μίρκα Παπαδοπούλου για την υποστήριξη και τη συνεργασία στο Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας του ΑΤΤΙΚΟΝ και τη Χρυσήδα Φλώρου-Χατζηγιαννίδου για τη πρότερη εργασία της πάνω στις άνοιες.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την αμέριστη ηθική συμπαράσταση, την κατανόηση και την υπομονή τους.

Περιεχόμενα

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ/ΠΙΝΑΚΩΝ.....	12
ABSTRACT	14
ΠΕΡΙΛΗΨΗ:	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ	18
1.1. ΑΝΟΙΕΣ.....	19
1.1.1 Alzheimer's.....	19
1.1.2. Μετωποκροταφική άνοια (FTD)	20
2. ΜΕΤΩΠΟΚΡΟΤΑΦΙΚΗ ΑΝΟΙΑ (FTD).....	23
2.1. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΗΣ FTD.....	23
2.1.1. Συμπεριφορική FTD (bvFTD).....	23
2.1.2. PPA	23
2.2. ΠΡΩΤΕΪΝΟΠΑΘΕΙΕΣ ΣΤΗΝ FTLD	24
2.2.1 FTLD-TAU.....	25
2.2.2. FTLD-TDP	27
2.2.3 FTLD-FUS	28
2.2.4.FTLD-UPS.....	30
2.3. ΑΜΥΟΤΡΟΦΙΚΗ ΠΛΑΓΙΑ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΩΠΟΚΡΟΤΑΦΙΚΗ ΑΝΟΙΑ.....	32
2.4. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗΝ FTD	35
3. TARDBP ΓΟΝΙΔΙΟ.....	40
3.1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	40
3.2 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ TDP-43	41
3.3. ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ TDP-43	44
3.4. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΤΗΣ TDP-43 ΣΕ ALS ΚΑΙ FTLD-TDP.....	45
3.5. ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ p.Ile383Val ΣΤΟ TARDBP ΓΟΝΙΔΙΟ	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ FTD-ΝΕΑ ΦΑΡΜΑΚΑ.....	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ REAL-TIME PCR.....	52
5.1. REAL-TIME qPCR	53
5.2. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ DNA	59
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	62
6.1. ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	62

6.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA	67
6.2.1 Απομόνωση DNA με Nucleospin Tissue Kit (Macherey-Nagel)	67
6.2.2 Απομόνωση DNA με High Pure PCR Template Preparation kit (Roche)	69
6.2.3 Απομόνωση DNA με QIAmp DNA Mini kit (Qiagen)	70
6.3. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΤΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΟ Qubit	72
6.4. ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ PCR	73
6.5. REAL-TIME qPCR ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΤΗΞΗΣ	75
6.5.1. Οργανολογία	75
6.5.2. Real-Time PCR και ανάλυση καμπυλών τήξης για το γονίδιο <i>TARDBP</i>	78
6.6. ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΑ ΕΡΓΑΛΕΙΑ (IN SILICO TOOLS)	82
6.7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ DNA (DNA SEQUENCING)	83
6.7.1. Οργανολογία	83
6.7.2 Συνολική πειραματική πορεία	84
6.7.3. Ενίσχυση με συμβατική PCR	84
6.7.4. Καθαρισμός PCR Προϊόντων	85
6.7.5. Αντίδραση θερμικών κύκλων (cycle sequencing)	86
6.7.6. Καθαρισμός των προϊόντων του Cycle Sequencing	87
6.7.7. Προετοιμασία δειγμάτων για το Sequencing	89
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	90
7.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ <i>TARDBP</i> ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗΣ FTD ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ REAL-TIME qPCR MELTING CURVE ANALYSIS	90
7.2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΘΟΔΟΥ REAL-TIME qPCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ p.Ile383Val ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>TARDBP</i>	95
7.3. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ REAL-TIME qPCR	95
7.4. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΣΥΜΒΑΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ PCR ΓΙΑ ΤΟ p.Ile383Val ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ <i>TARDBP</i>	102
7.5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ DNA SANGER SEQUENCING	104
7.6. IN SILICO ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΛΛΑΓΗΣ p.Ile383Val ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ <i>TARDBP</i> ..	106
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	109
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:	113

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AD	Alzheimer's Disease
ALS	Amyotrophic Lateral Sclerosis
APOE	Apolipoprotein gene
ApoE2/3/4	Apolipoprotein E2/3/4
ASO	Allele-Specific Oligonucleotide
AS-PCR	Allele-Specific PCR
AUC	Area Under Curve
Aβ	Amyloid β
BMI	Body Mass Index
bvFTD	Behavioral variant of Frontotemporal Dementia
CCM	Chemical Cleavage Method
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
C9orf72	Chromosome 9 open-reading frame 72
C21orf72	Chromosome 21 open-reading frame 72
Cas	Caspase
CBD	Corticobasal Degeneration
CBS	Corticobasal Syndrome
CI	Cognitive impairment
CNS	Central Nervous System
Cq	Quantification Cycle
CHMP2B	Charged Multivesicular Protein 2b
CSF	Cerebrospinal Fluid
Ct	Cycle threshold
CTFs	Carboxy-Terminal Tails
DCTN1	Dynactin Subunit-1
ddNTPs	Dideoxynucleotide Triphosphates
dNTPs	Deoxy Nucleotide Triphosphates
DPRs	Dipeptide Repeat Proteins
DSBs	Double Strand Breaks
EEG	Electroencephalogram
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMC	Enzyme Mismatch Cleavage
EPHX1	Epoxide Hydrolase 1

EWS	Ewing's Sarcoma protein
FDA	Food & Drug Administration (US)
FET	FUS/EWS/TLS protein family
fFUS	Full-length FUS ptoein
fPGRN	Full-length PGRN protein
fITAU	Full-length TAU protein
fITDP-43	Full-length TDP-43 protein
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FTD	Frontotemporal Dementia
FTD-C9orf72	Frontotemporal Dementia caused by <i>C9orf72</i> expansion
FTD-GRN	Frontotemporal Dementia caused by <i>GRN</i> mutations
FTD-MAPT	Frontotemporal Dementia caused by <i>MAPT</i> mutations
FTDP-17	Frontotemporal Dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17
FTLD	Frontotemporal Lobar Degeneration
FTLD-FUS	Frontotemporal Degeneration of FUS (+) pathology
FTLD-TAU	Frontotemoperal Degeneration of TAU (+) pathology
FTLD-TDP	Frontotemporal Degeneration of TDP-43 (+) pathology
FTLD-U	Frontotemporal Degeneration of ubiquitin (+) pathology
FTLD-UPS (aFTLD-U)	Frontotemporal Degeneration of ubiquitin/proteasome system (+) pathology (Atypical FTLD)
FUS	Fused in Sarcoma protein - gene
fvFTD	Frontal variant of Frontotemporal Dementia
GRN	Granulin
GSK3-β	Glycogen Synthase Kinase-3 β
GWAS	Genome Wide Association Study
HDAC1	Histone Deacetylase 1
HDACi	Histone Deacetylase Inhibitor
HDL	High Density Lipoprotein
HEK293	Human Embryonic Kidney cells 293
HET	Heteroduplex Analysis
HNRP	Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein
HRMA	High-Resolution Melting Analysis
HTT	Huntingtin Gene
IHC	Immunohistochemistry
IL1RAP	Interleukin-1 Receptor Accessory protein Precursor
IL	Interleukin
LC-MS/MS	Liquid Chromatography - Mass Spectrometry / Mass Spectrometry
LDLR	Low Density Lipoprotein Receptor
LOAD	Late Onset Alzheimer's Disease

LPA	Logopenic Progressive Aphasia
lvPPA	Logopenic variant of Primary Progressive Aphasia
MAPT	Microtubule-Associated Protein TAU gene
MATR-3	Martin-3
MCI	Mild Cognitive Impairment
miRNA	Micro RNA
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MMSE	Mini-Mental State Examination
MND	Motor Neuron Disease
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MT	Microtubule
MTB	Microtubule Binding
MTBDs/MBDs	Microtubule Binding Domains
MTBR	Microtubule Binding Region
mTORC1	mammalian Target of Rapamycin Complex 1
NCI	Neuronal Cytoplasmic Inclusions
NEK-1	NIMA Related Kinase
NEFH	Neurofilament Heavy Chain
NfH	Neurofilament Heavy Chain
NfL	Neurofilament Light Chain
NFTs	Neurofibrillary Tangles
nfvPPA	Nonfluent variant of Primary Progressive Aphasia
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NGS	Next Generation Sequencing
NII	Neuronal Intranuclear Inclusions
NLS	Nuclear Localization Signals
NES	Nuclear Exportation Signals
NTFs	Amino-Terminal Tails
OLFML1	Olfactomedin-Like protein 1 precursor
OPTN	Optineurin
OR	Odds Ratio
ORF	Open Reading Frame
PCDGF	PC cell-Derived Growth Factor
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD	Parkinson's Disease
PRN1	Pirin-1
PGRN	Progranulin (gene)
PHFs	Paired Helical Filaments
PiD	Pick's Disease

PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PKN	Protein Kinase N
PNFA	Progressive Nonfluent Aphasia
pNfH	Phosphorylated Neurofilament Heavy Chain
PNS	Peripheral Nervous System
PP1	Protein Phosphatase 1
PR3	Proteinase 3
PRAD	Probable Alzheimer's Disease
PRNP	Prion Protein gene
PSEN 1 / 2	Presenilin 1 / 2 gene
PSF	Protein-associated Splicing Factor
PSP	Progressive Supranuclear Palsy
PTAU	Phosphorylated TAU
qPCR	Quantitative PCR
Rab1 / 7	Ras GTPase 1 / 7
RAB38	Ras-related protein Rab-38 gene
RAN	Repeat-Associated Non-ATG translation
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIPK1	Receptor-Interacting serine/threonine Protein kinase 1
RNP	Ribonucleoprotein Domain
RRM1 / 2	RNA Recognition Motif domain 1 / 2
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
SD	Semantic Dementia
SG	Stress Granules
SNCA	Synuclein Alpha
SOD-1	Superoxide Dismutase
SORT1	Sortilin
SPG11	Vesicle Trafficking Associated Spatacsin
SQSTM1	Sequestosome 1
SSCP	Single Strand Conformational Polymorphism
SSRIs	Selective Serotonin Reuptake Inhibitors
STX3	Syntaxin 3
svPPA	Semantic variant of Primary Progressive Aphasia
TBKI	Tank Binding Kinase 1
TAF15	TATA-binding protein-associated Factor 2N
TARDBP	Transactive Response DNA Binding Protein 43 gene
TDP-43	Transactive response-DNA binding protein-43
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis

Tm	Melting Temperature
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRN1	Transportin 1
T-TAU	Total TAU
TTBK 1 / 2	Tau Tubulin Kinase 1 / 2
TUBA4A	Tubulin Alpha 4A
UBQLN2	Ubiquilin-2
U (Ub)	Ubiquitin
UBL3	Ubiquitin-Like protein 3 precursor
ULK1	Unc-51 -like Kinase 1
UPS	Ubiquitin-Proteasome System
VAMP3	Vesicle Associated Membrane Protein 3
VCP	Vasolin Containing Protein gene
WES	Whole Exome Sequencing
WGS	Whole Genome Sequencing
WM	White Matter
WT	Wild Type
ZnF	Zn Finger

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ/ΠΙΝΑΚΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ	
1.1.α	Σύγκριση φυσιολογικού εγκεφάλου σε σχέση με εγκεφαλο ασθενούς με προχωρημένη νόσο Alzheimer.
1.1.2.β.	Οι περιοχές του εγκεφάλου που επηρεάζονται σε ασθενείς με FTD
1.1.2.α.	Βασική κατηγοριοποίηση της FTD, οι πιο συχνές μορφές
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΠΡΩΤΕΪΝΩΠΑΘΕΙΕΣ ΣΤΗΝ FTLD	
2.2.1.α.	Οι έξι ισομορφές της TAU πρωτεΐνης
2.2.2.α.	FTLD-TDP
2.2.3.α.	FTLD-FUS
2.2.4.α.	FTLD-UPS
2.3.α.	Βασικά μονοπάτια FTD/ALS
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 Τεχνικές Μοριακής Διάγνωσης/ Real-Time Qpcr	
5.1.α.	Γραφική παράσταση του αριθμού των DNA αντιγράφων ως προς τον αριθμό των PCR κύκλων για δύο δείγματα Α και Β
5.1.β.	Παράδειγμα σχεδιασμού της καμπύλης βαθμονόμησης (standard curve)
5.1.γ.	Διάφοροι τύποι ιχνηθετών
5.1.δ.	Σχεδιασμός simple probe
5.1.ε.	Τρόπος φθορισμού χρωστικών που προσδένονται στο DNA
5.1.στ	Φαινόμενο FRET
5.1.ζ.	Γραφική παράσταση ανάλυσης καμπύλης τήξης
5.1.η	Γράφημα φθορισμού
5.2.α.	Δομή φυσιολογικού dNTP και ddNTP το οποίο οδηγεί στον τερματισμό της σύνθεσης
5.2.β.	Προσθήκη ενός ddNTP σταματά την επιμήκυνση της αλυσίδας
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
6.1.α.	Πίνακας με δείγματα FTD ασθενών
6.1.β.	Πίνακας δειγμάτων ελέγχου (controls)
6.3.α.	Το φθορισμόμετρο Qubit
6.4.α.	Ο θερμικός κυκλοποιητής Primus 25
6.4.β.	Πίνακας Πρωτόκολλο Συμβατικής PCR για το γονίδιο <i>TARDBP</i>
6.4.γ.	Πίνακας Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο συμβατικής PCR
6.4.δ.	Πίνακας Πρωτόκολλο περιορισμού με το ένζυμο DdEI
6.5.1.α.	Το όργανο Light Cycler
6.5.1.β.	Σχηματική αναπαράσταση οργάνωσης του Light Cycler
6.5.1.γ.	Πίνακας μέγιστο απορρόφησης και εκπομπής των χρωστικών στο Light Cycler
6.5.2.α.	Σχετική θέση εκκινητών και ανιχνευτών για την ανίχνευση της πολυμορφικής θέσης
6.5.2.β.	Πίνακας Αλληλουχιών και Θερμοκρασιών τήξης των ανιχνευτών και εκκινητών της Real-Time qPCR
6.5.2.γ.	Πίνακας Πρωτόκολλο Real-Time qPCR
6.5.2.δ.	Πίνακας Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο Real-Time qPCR
6.5.2.ε.	Πίνακας Θερμοκρασιακού προγράμματος ανάλυσης καμπυλών τήξης για το γονίδιο <i>TARDBP</i>
6.7.1.α.	Ο γενετικός αναλυτής ABI Prism 310
6.7.5.α.	Πίνακας Πρωτόκολλο Cycle Sequencing για το γονίδιο <i>TARDBP</i>
6.7.5.β.	Πίνακας Θερμοκρασιακό πρόγραμμα Cycle Sequencing για το γονίδιο <i>TARDBP</i>

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
7.1.α.	Πίνακας αποτελεσμάτων <i>TARDBP</i> γονοτύπησης FTD ασθενών
7.1.β.	Πίνακας αποτελεσμάτων <i>TARDBP</i> γονοτύπησης δειγμάτων ελέγχου
7.1.γ.	Συγκεντρωτικός Πίνακας κλινικών δεδομένων
7.2.α.	Ηλεκτροφόρηση αгарόζης προϊόντος Real-Time PCR
7.3.α.	Καμπύλη μαγνησίου για το γονίδιο <i>TARDBP</i>
7.3.β.	Καμπύλη αναφοράς με χρήση ασύμμετρων εκκινητών
7.3.γ.	Καμπύλη τήξης, ρυθμό αλλαγής θερμοκρασίας 0,2 °C/sec
7.3.δ.	Καμπύλη τήξης, ρυθμό αλλαγής θερμοκρασίας 0,4 °C/sec
7.3.ε.	Καμπύλη τήξης, ρυθμό αλλαγής θερμοκρασίας 0,6 °C/sec
7.3.στ.	Πίνακας αναπαραγωγιμότητας
7.3.ζ.	Καμπύλη αναφοράς για την αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου για το <i>TARDBP</i> γονίδιο
7.3.η.	Πίνακας μέση τιμή, τυπική απόκλιση και συντελεστής διακύμανσης των Ct για διάφορες αραιώσεις
7.3.θ.	Θερμοκρασία τήξης για το φυσιολογικό και το μεταλλαγμένο αλληλίο
7.4.α.	Δοκιμές των δύο ζευγών εκκινητών SA και SR
7.4.β.	Πρότυπο πέψης PCR προϊόντος μετά από συμβατική PCR στην ηλεκτρονική πλατφόρμα NEBCutter
7.4.γ.	Αποτελέσματα πέψης με DdEI του προϊόντος PCR του γονιδίου <i>TARDBP</i>
7.5.α.	Αποτελέσματα DNA Sanger Sequencing για τους ετερόζυγους ασθενείς (A495 G112, A728) με την χρήση πρόσθιου εκκινητή.
7.5.β.	Αποτελέσματα DNA Sanger Sequencing για τους ετερόζυγους ασθενείς (A495 G112, A728) με την χρήση ανάστροφου εκκινητή
7.5.γ.	Αποτελέσματα DNA Sanger Sequencing για τον ομόζυγο (A672) ασθενή με την χρήση πρόσθιου εκκινητή
7.5.δ.	Αποτελέσματα DNA Sanger Sequencing για τον ομόζυγο (A672) ασθενή με την χρήση ανάστροφου εκκινητή
7.6.α.	Αποτελέσματα SIFT για την παραλλαγή p.Ile383Val στο γονίδιο <i>TARDBP</i>
7.6.β.	Αποτελέσματα Mutation Taster για την παραλλαγή p.Ile383Val στο γονίδιο <i>TARDBP</i>
7.6.γ.	Αποτελέσματα Align GVGD για την παραλλαγή p.Ile383Val στο γονίδιο <i>TARDBP</i>
7.6.δ.	Αποτελέσματα PolyPhen2 για την παραλλαγή p.Ile383Val στο γονίδιο <i>TARDBP</i>
7.6.ε.	Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων βιοπληροφορικής

ABSTRACT

Introduction: Frontotemporal dementia (FTD) is as common as Alzheimer's disease at ages <65 years and concerns about 5-15% of the total dementia patients worldwide. It involves a number of clinic-pathologico-anatomical characteristics and major subtypes involve bvFTD (behavioral variant FTD), PPA (Primary progressive Aphasia) and FTD-MND (Motor Neuron Disease). The FTD spectrum also includes PSP (Progressive Supranuclear Palsy) and CBS (Cortico-basal Syndrome). The genetic basis of FTD is complex, it involves a number of genes such as *GRN*, *MAPT*, *C9orf72*, *TARDBP* etc. The *TARDBP* gene is located on chromosome 1 (1p36.22), consists of 6 exons and encodes the TDP-43 protein and has up to 6 different isoforms in humans, due to alternative splicing.

Its functions are mainly regulatory as it acts as a transcriptional repressor regulating mRNA splicing and metabolism during stress response states. TDP-43 is a DNA/RNA binding protein, it can bind both single or double stranded DNA/RNA sequences that contain GT/GU repeats. TDP-43 has been implicated in neurodegenerative disease (mainly ALS and FTD), and is a major constituent of ubiquitin-positive aggregates located in the cytoplasm (most commonly in the form of CTF-25kDa). TDP-43 belongs in the hn-RNP protein family consisting of two RNA recognition motifs (RRMs) followed by a glycine-rich C-terminal domain.

The aim of this study is the development of a novel, fast and accurate method for the detection of a single nucleotide polymorphism (SNP) p.Ile383Val (rs80356740, c.1147A>G, MAF: 0.002% EXac) in the *TARDBP* gene and its evaluation in Greek FTD patients so as to determine if it can be characterized as a founder mutation for the Greek FTD population.

Methods: Genomic DNA was isolated from the peripheral blood of 133 Greek FTD patients, after informed signed consent, and 60 healthy controls (all examined in the Attikon General University Hospital Neurology Clinic). A Real-Time qPCR protocol was designed using the LightCycler (Roche) instrument with allele specific hybridization probes and the results were evaluated using melting-curve analysis. The results were confirmed in a selected number of samples using Sanger DNA sequencing, and the BigDye Terminator v1.1 thermal cycling method, on the ABI310 genetic analyzer. The pathogenicity of the SNP was evaluated using various bioinformatics tools.

Results: The method was rapid and robust and exhibited excellent PCR efficiency ($E=2.06$) on the melting curve analysis as well as reproducibility ($Cq\ CV\% < 3.5\%$) and specificity in genotyping. The melting temperature of the wild type allele was 55.26 °C whereas the mutant was 65.82°C ($CV\% < 2.5\%$, $\Delta Tm=9.61$). The melting-curve analysis of the Real-Time qPCR results for the p.Ile383Val in the *TARDBP* gene was reliable and detected 5 out of 133 FTD patients, in a heterozygous state, while in only one out of 60 controls. The in-silico tools yielded controversial results as SIFT, PolyPhen-2 and

Align GVGD classified the SNP as tolerated while PhyloP, PhastCons and Mutation Taster classified the SNP as disease-causing since the area where it is located is highly conserved.

Conclusions: Out of the five patients found to be carriers of the SNP, three were diagnosed as FTD-SD (semantic FTD), one behavioral FTD and the last one belongs to the general spectrum of FTD. As a result, it is hypothesized that this SNP could correlate with the FTD-SD subtype. Furthermore, four out of five patients were men, this probably could indicate its importance in the male FTD population compared to women. The limited sample number as well as the low frequency of the SNP makes a definitive characterization impossible, although there are strong indications since the frequency in the European population is only 0.002% whereas it reaches 3.76% in Greek FTD patients, a remarkable increase. Further functional studies are required so as to characterize the pathogenicity of this DNA alteration.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η μετωποκροταφική άνοια (Frontotemporal dementia, FTD) είναι το ίδιο συχνή σε άτομα με το Alzheimer's σε ασθενείς <65 ετών και αφορά το 5-15% όλων των ανοιών παγκοσμίως. Αποτελείται από έναν αριθμό κλινικο-παθολογο-ανατομικών οντοτήτων, με κύρια σύνδρομα την bvFTD (behavioral variant FTD), τη PPA (Primary progressive Aphasia) και τη FTD-MND (Motor Neuron Disease), ενώ στο φάσμα της ανήκουν και τα σύνδρομα PSP (Progressive Supranuclear Palsy) και CBS (Cortico-basal Syndrome). Στην FTD εμπλέκονται πολλά γονίδια, όπως τα *GRN*, *MAPT*, *C9orf72*, *TARDBP* κλπ. Το γονίδιο *TARDBP* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 (1p36.22), αποτελείται από 6 εξόνια και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TDP-43 η οποία και έχει έως και 6 ισομορφές, στον άνθρωπο, λόγω εναλλακτικού ματίσματος.

Οι λειτουργίες της ποικίλλουν και είναι κυρίως ρυθμιστικές καθώς δρα ως μεταγραφικός καταστολέας, ρυθμίζει το μάτισμα και το μεταβολισμό του RNA σε καταστάσεις απόκρισης στο στρες το οποίο επιτυγχάνεται με την ικανότητα πρόσδεσης της σε μονόκλωνες είτε δίκλωνες αλληλουχίες DNA/RNA που περιέχουν GT/GU επαναλήψεις. Η πρωτεΐνη TDP-43 εμπλέκεται στην εμφάνιση νευροεκφυλιστικών νόσων (κυρίως ALS και FTD) και αποτελεί κύριο συστατικό των ουβικιτίνης θετικών συσσωματωμάτων που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα (σε μορφή συνήθως CTF-25 kDa). Η TDP-43 είναι μια hn-RNP πρωτεΐνη η οποία αποτελείται από δύο μοτίβα αναγνώρισης RNA (RRMs) ακολουθούμενα από μια πλούσια σε γλυκίνη καρβοξυτελική περιοχή.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη καινοτόμου, ταχείας και αξιόπιστης μεθοδολογίας για την ανίχνευση της σημειακής (SNP) παραλλαγής p.Ile383Val (rs80356740, c.1147A>G, MAF:0,002% EXAc) του γονιδίου *TARDBP* και η αξιολόγηση της σε Έλληνες FTD ασθενείς, ώστε να προσδιοριστεί εάν η παραλλαγή αυτή αποτελεί ιδρυτική μετάλλαξη για τον Ελληνικό FTD πληθυσμό.

Ασθενείς και μέθοδοι: Απομονώθηκε γενωμικό DNA από το περιφερικό αίμα συνολικά 133 Ελλήνων FTD ασθενών, ύστερα από ενημέρωση και ενυπόγραφη συγκατάθεση τους καθώς και 60 δείγματα υγιών (όλοι εξετάστηκαν από την Β' Νευρολογική Κλινική του Αττικού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου). Σχεδιάστηκε μια μεθοδολογία Real-Time qPCR στη πλατφόρμα του LightCycler με τη χρήση ειδικών για την παραλλαγή ανιχνευτών και στην συνέχεια ανάλυση καμπύλης τήξεως. Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων έγινε σε επιλεγμένα δείγματα με την μέθοδο DNA αλληλούχισης κατά Sanger, με τη μέθοδο θερμικών κύκλων BigDye Terminator v1.1 στο γενετικό αναλυτή ABI310.

Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν προγράμματα βιοπληροφορικής για την αξιολόγηση της παραλλαγής και πιθανώς τον χαρακτηρισμό της ως παθολογική ή όχι.

Αποτελέσματα: Η μεθοδολογία ήταν ταχεία και αξιόπιστη επιδεικνύοντας άριστη PCR απόδοση ($E=2,06$) και αναπαραγωγικότητα ($Cq\ CV\% < 3,5\%$) καθώς και ειδικότητα στην γονοτύπηση ($Tm\ A$ αλληλίου $55,26\ ^\circ C$ και του G αλληλίου $65,82\ ^\circ C$, $\Delta Tm = 9,61\ ^\circ C$, $CV\% < 2,5\%$). Με βάση την ανάλυση των καμπυλών τήξης της μεθόδου Real-Time qPCR έγινε αξιόπιστη ανίχνευση της παραλλαγής p.Ile383Val του γονιδίου *TARDBP* σε 5 από τους 133 ασθενείς FTD σε ετεροζυγωτία ενώ βρέθηκε και σε 1 δείγμα ελέγχου (στα 60). Τα αποτελέσματα των προγραμμάτων βιοπληροφορικής ήταν αμφιλεγόμενα καθώς τα προγράμματα SIFT, Poly-Phen2 και AlignGVGD χαρακτηρίζουν την παραλλαγή ως μη-επιβλαβή ενώ τα PhyloP, PhastCons και Mutation Taster την χαρακτηρίζουν ως υψηλά συντηρημένη και συνεπώς παθολόγο.

Συμπεράσματα: Καθώς από τους 5 ασθενείς που βρέθηκαν θετικοί για την παραλλαγή, οι 3 εμφάνιζαν κλινικό φαινότυπο FTD-SD (σημασιολογικής μορφής PPA), ο ένας συμπεριφορικής FTD (bvFTD) και μια ασθενής FTD με συμπτώματα που εμπίπτουν σε όλες τις κατηγορίες, πιθανόν να σχετίζεται η συγκεκριμένη παραλλαγή με την εμφάνιση του συγκεκριμένου υποτύπου FTD-SD. Οι 4 από τους 5 ασθενείς είναι άρρενες οπότε εγείρεται το ερώτημα εάν το φύλο αποτελεί καθοριστικής σημασίας παράγοντα. Ο αριθμός των δειγμάτων είναι περιοριστικός ώστε να μπορέσει να χαρακτηριστεί με βεβαιότητα η παραλλαγή ως μετάλλαξη ωστόσο υπάρχει μια ισχυρή ένδειξη αφού η συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου αγγίζει μόλις το 0,002% στο γενικό Ευρωπαϊκό πληθυσμό ενώ φτάνει το 3,76% στους Έλληνες FTD ασθενείς που ελέγχθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, μια αξιοσημείωτη αύξηση. Απαιτούνται περαιτέρω λειτουργικές μελέτες για το χαρακτηρισμό της παραλλαγής ως παθολογικής μετάλλαξης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα είναι παθολογικές καταστάσεις οι οποίες επηρεάζουν την σωστή λειτουργία του εγκεφάλου και ειδικότερα των κυττάρων του (νευρώνες) και μπορεί να οδηγήσουν σε προοδευτική έκπτωση των γνωστικών ή και κινητικών λειτουργιών. Ο επιπολασμός των νευροεκφυλιστικών νόσων έχει αυξηθεί σημαντικά λόγω της αύξησης του μέσου όρου ζωής αλλά και του πληθυσμού των ηλικιωμένων. Σπάνιες παθολογικές μεταλλάξεις και αλληλία σχετιζόμενα με κίνδυνο εμφάνισης τέτοιων παθολογικών καταστάσεων μπορεί να είναι κοινά μεταξύ κάποιων νευροεκφυλιστικών νοσημάτων. Πέρα από αυτά εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες όπως το φύλο, η χαμηλού επιπέδου εκπαίδευση, το κάπνισμα, η υπέρταση, ο διαβήτης, η κατάθλιψη, οι λοιμώξεις, οι φλεγμονές, τα εγκεφαλικά επεισόδια, οι όγκοι και οι εγκεφαλικές κακώσεις, οι ανεπάρκειες βιταμινών, το οξειδωτικό στρες και η έκθεση σε χημικά. Από αυτά προκύπτουν κοινές δίοδοι που μπορεί να αφορούν ελαττωματικά μονοπάτια αποικοδόμησης και ελέγχου ποιότητας πρωτεϊνών, δυσλειτουργίας μιτοχονδριακής ομοιόστασης, δημιουργίας κοκκίων λόγω στρες και ανικανότητας προσαρμογής της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης[1], [2].

Στην κατηγορία των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων ανήκουν η νόσος Alzheimer's (AD), η νόσος Parkinson's (PD), η αμυοτροφική πλάγια σκλήρυνση (ALS), η νόσος του Huntington's (HD), οι εγκεφαλονωτιαίες αταξίες (SCAs), η μετωποκροταφική άνοια (FTD), οι άνοιες με σωμάτια Lewy κ.α.[3]. Πέρα από τα κοινά χαρακτηριστικά αυτών των νοσημάτων ο κλινικός διαχωρισμός τους είναι αρκετά δύσκολος με ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών να διαγιγνώσκεται με ακρίβεια μετά τον θάνατο τους[4]. Το βασικό πρόβλημα είναι ότι τα συμπτώματα είναι εμφανή μόνο από σημαντική καταστροφή στον εγκέφαλο ο οποίος δεν ανακάμπτει εύκολα μετά από τραυματισμούς. Σήμερα η κλινική διάγνωση ενός ασθενούς βασίζεται κυρίως σε απεικονιστικές μεθόδους, νευροψυχολογικά τεστ, κλινική εξέταση των συμπτωμάτων από τον νευρολόγο-ιατρό και τέλος σε ορισμένες περιπτώσεις, υπάρχουν διαθέσιμες βιοχημικές/βιοφυσικές/μοριακές μέθοδοι διάγνωσης. Το βασικό πρόβλημα είναι ότι η διαδικασία λανθασμένης αναδίπλωσης και ολιγομερισμού των πρωτεϊνών μπορεί να διαρκέσει από χρόνια έως και δεκαετίες μέχρι να είναι ορατές οι εστίες αυτές. Ιδιαίτερη προσπάθεια γίνεται για τον εντοπισμό βιοδεικτών που θα ανιχνεύονται έγκαιρα σε βιολογικά υγρά του ασθενούς π.χ. αίμα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό τα οποία θα χρησιμοποιούνται για την ευαίσθητη, ειδική και μη-επεμβατική βιοχημική διάγνωση τους [3]. Προς το παρόν, δεν υπάρχουν θεραπείες συγκεκριμένες για κάθε νόσημα παρά μόνο συμπτωματικές που ανακουφίζουν μερικώς τα συμπτώματα του ασθενούς και βελτιώνουν την ποιότητα ζωής του μιας και τέτοιες καταστάσεις έχουν σαν αποτέλεσμα γνωστικά, κινητικά προβλήματα τα οποία τελικά οδηγούν τον ασθενή σε θάνατο. Ωστόσο η πρόοδος της γενετικής και της εξατομικευμένης ιατρικής φαίνεται να υπόσχεται μια νέα προσέγγιση στην αντιμετώπιση τους καθώς η γνώση γενετικών χαρτών, μοριακής κλωνοποίησης οδήγησαν στην έρευνα πρωτεϊνικών μονοπατιών που εμπλέκονται στη νευροεκφύλιση και στην παθογένεση των νοσημάτων αυτών τόσο ώστε να υποστηρίζεται από την

επιστημονική κοινότητα ότι η ανακάλυψη μια φαρμακευτικής προσέγγισης ώστε να σταματήσει ή έστω να μειώσει την εξέλιξη της νόσου είναι πλέον κοντά [1].

1.1. ANOΙΕΣ

Ο όρος άνοια αναφέρεται στην έκπτωση της μνήμης και τουλάχιστον ενός τμήματος της γνωστικής λειτουργίας όπως για παράδειγμα, η γλώσσα, οι οπτικοχωρικές ικανότητες, η κρίση, η προσωπικότητα κ.α. τα οποία παρουσιάζουν μια μείωση σε σχέση με το προηγούμενο επίπεδο λειτουργικότητας τους και ως επακόλουθο, επηρεάζονται οι καθημερινές δραστηριότητες. Προτού διαγνωσθεί η άνοια απαιτείται ο αποκλεισμός κάποιες άλλων παθήσεων όπως η κατάθλιψη, η ήπια γνωστική έκπτωση και το παραλήρημα. Ο όρος άνοια είναι ιδιαίτερα ευρύς και χρήζει κατηγοριοποίησης από την οποία, προκύπτουν 2 μεγάλες ομάδες οι φλοιικές και οι υποφλοιικές άνοιες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν και οι πιο συχνά παρατηρούμενες μορφές άνοιας, το Alzheimer's, η άνοια με σωματίδια Lewy και η μετωποκροταφική άνοια (FTD) με σειρά συχνότητας εμφάνισης στον πληθυσμό. Στις υποφλοιικές ανήκουν η αγγειακή άνοια και η άνοια που προκαλείται λόγω Parkinson's [5].

1.1.1 Alzheimer's

Πιο συγκεκριμένα, η AD, είναι υπεύθυνη για το 60-80% όλων των περιπτώσεων άνοιας παγκοσμίως. Πρόσφατα επιδημιολογικά δεδομένα, του 2018, δείχνουν ότι περίπου 5,7 εκατομμύρια Αμερικάνοι όλων των ηλικιών ζουν με AD και 10,5 εκατομμύρια πάσχουν από κάποια μορφή άνοιας στην Ευρώπη το 2015. Η επικράτηση της άνοιας στην Ευρώπη ποικίλει από 4,7% έως 6,8%. Ενώ οι μελλοντικές εκτιμήσεις υποστηρίζουν ότι έως το 2025 ο αριθμός των πασχόντων από AD, ηλικίας μεγαλύτερης από 65, θα φτάσει τα 7,1 εκατομμύρια στην Αμερική, (29% αύξηση σε σχέση με το 2018) ενώ έως το 2050 θα υπολογίζεται ότι θα πάσχουν 13,1 εκατομμύρια άνθρωποι. Με βάση τα δεδομένα αυτά γίνεται φανερό η μεγάλη επίπτωση αυτής της νόσου στο σύστημα υγείας των χωρών και η ανάγκη για την εύρεση μιας αποτελεσματικής θεραπείας [6].

Η παθολογία του Alzheimer, οφείλεται σε συσσώρευση του β-αμυλοειδούς, ένα πεπτίδιο προϊόν πρωτεολυτικής κοπής της APP (Amyloid Precursor Protein), όπως και σε συσσώρευση της υπερφωσφορυλιωμένης Tau πρωτεΐνης μέσα στα νευροϊνιδιακά δεμάτια με το χολινεργικό σύστημα να είναι εκείνο που επηρεάζεται περισσότερο. Οι ασθενείς εμφανίζουν εκφυλισμό των νευρώνων και των προβολών τους στον φλοιό και στον ιππόκαμπο, ο βαθμός εκφύλισης είναι εμφανής και στην εικόνα 1.1.1.α ενός ασθενούς σε σχέση με έναν υγιή εγκέφαλο [7]. Πιο συγκεκριμένα, η ασθένεια, σε μοριακή βάση, αρχικά παρουσιάζεται με την εμφάνιση πλακών αμυλοειδούς, νευροϊνιδιακών δεματίων και μιτοχονδριακών βλαβών που οδηγούν σε οξειδωτικό στρες το οποίο συνοδεύεται από χρόνια στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο καθώς και δυσλειτουργία του μηχανισμού της αυτοφαγίας οδηγώντας έτσι σε μια περίπλοκη παθογένεια [8].

Θεραπευτικές προσεγγίσεις σήμερα περιλαμβάνουν, ορισμένα φάρμακα που αντιμετωπίζουν τα γνωστικά συμπτώματα των πασχόντων με AD και τα οποία έχουν εγκριθεί από τον FDA, όπως γαλανταμίνη, ταυρίνη, ριβαστιγμίνη κ.α. Όλα αυτά τα φάρμακα λειτουργούν καθυστερώντας την αποικοδόμηση της ακετυλοχολίνης ενός απαραίτητου νευροδιαβιβαστή ο οποίος βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα στους ασθενείς με AD. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι μπορούν μερικώς να μειώσουν την εξέλιξη των γνωστικών συμπτωμάτων και να ελαττώσουν προβληματικές συμπεριφορές σε κάποιους ανθρώπους ωστόσο, ένα μεγάλο ποσοστό, δεν υπάρχει ανταπόκριση στη θεραπεία. Μεγάλη προσπάθεια γίνεται ωστόσο για την ανακάλυψη τροποποιητικής θεραπείας που θα μπλοκάρει την εξέλιξη της νόσου καθώς και φάρμακα που στοχεύουν σε μοριακά μονοπάτια [9].



1.1.1.α. Σύγκριση φυσιολογικού εγκεφάλου σε σχέση με εγκέφαλο ατόμου με προχωρημένη νόσο Alzheimer's (meygeia.gr).

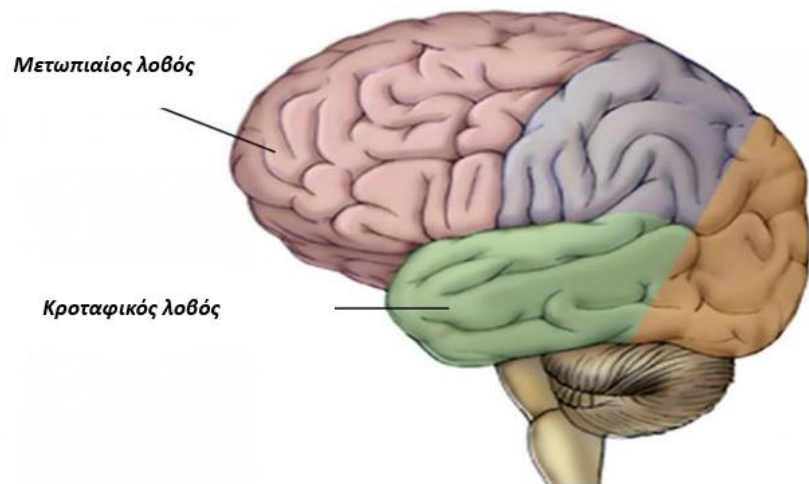
1.1.2. Μετωποκροταφική άνοια (FTD)

Ο όρος FTD χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια ομάδα νευροεκφυλιστικών νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από σταδιακές αλλοιώσεις στην συμπεριφορά, στις εκτελεστικές λειτουργίες και/ή στην ομιλία [10]. Προσδιορίζεται ως η τρίτη πιο κοινή μορφή άνοιας μετά την AD και την άνοια με σωμάτια Lewy και στο 20% - 40% των περιπτώσεων φαίνεται να υπάρχει οικογενειακό ιστορικό δηλαδή γενετικό υπόβαθρο. Η εμφάνιση της παρατηρείται σε ηλικίες 35 - 70 ετών με συχνότερες ηλικίες τα 50-60 χρόνια ενώ το πιο έντονο σύμπτωμα για το οποίο τελικά οδηγεί τους ασθενείς να απευθυνθούν στον ιατρό-νευρολόγο είναι οι αλλαγές στην συμπεριφορά [5]. Οι περιοχές του εγκεφάλου που επηρεάζονται στην FTD είναι ο μετωπιαίος λοβός ή/και ο κροταφικός λοβός (εικόνα 1.1.2.β) ενώ πιο συγκεκριμένα οδηγούνται σε εκφύλιση οι φλοιικοί νευρώνες και τα βασικά γάγγλια [11], [12].

Η FTD περιεγράφηκε πρώτη φορά από τον Arnold Pick και τον Alois Alzheimer στις αρχές του 20^{ου} αιώνα ο οποίος περιέγραψε το περιστατικό ενός άνδρα 71 χρονών, με συμπεριφορικές διαταραχές, αφασία και άνοια, μετά την αυτοψία αποδείχθηκε συγκεκριμένη ατροφία του αριστερού κροταφικού λοβού. Με περαιτέρω μελέτες έγινε γνωστό ότι η FTD είναι το ίδιο συχνή με την AD όσον αφορά περιπτώσεις πρώιμης έναρξης της νόσου σε ηλικίες <65 ετών [10], [13]. Με βάση δεδομένα από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ο αριθμός των πασχόντων με άνοια θα διπλασιάζεται κάθε χρόνο ώσπου να φτάσει τα 115,4 εκατομμύρια το 2050, με την FTD να είναι η δεύτερη ή τρίτη σε συχνότητα εμφάνισης άνοια με επικράτηση από 3% - 26% με τον αριθμό να πιστεύεται ότι δεν είναι αντιπροσωπευτικός της πραγματικότητας καθώς υπάρχουν ασθενείς που παραμένουν αδιάγνωστοι ή τους χορηγείται θεραπεία για λάθος πάθηση [10].

Ο όρος FTLD (frontotemporal lobar degeneration) εκφύλιση των μετωπικών ή κροταφικών λοβών χρησιμοποιείται συχνά ωστόσο σήμερα η ορολογία αυτή εφαρμόζεται μόνο για την περιγραφή παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών της νόσου ενώ ο όρος FTD χρησιμοποιείται για την περιγραφή των περίπλοκων συμπτωμάτων που σχετίζονται με την νόσο [14]. Υπάρχουν δύο βασικοί υπότυποι της FTD η συμπεριφορική FTD (bvFTD) και οι τρεις γλωσσικές παραλλαγές της (PPA), η μη-ρέουσα παραλλαγή της πρωτοπαθούς προοδευτικής αφασίας ή προοδευτική-μη-ρέουσα αφασία (nonfluent variant of Primary Progressive Aphasia - nvPPA ή Progressive Nonfluent Aphasia PNFA), η σημασιολογική παραλλαγή της πρωτοπαθούς προοδευτικής αφασίας ή σημασιολογική άνοια (semantic variant of PPA, svPPA ή semantic dementia, SD) και η λογοπενική παραλλαγή της πρωτοπαθούς προοδευτικής αφασίας ή λογοπενική προοδευτική αφασία (logopenic variant of Primary Progressive Aphasia - lvPPA ή logopenic progressive aphasia - LPA) [14]–[16].

Η προϊούσα υπερπυρηνική παράλυση (progressive supranuclear palsy – PSP) και το φλοιοβασικό σύνδρομο ή φλοιοβασική εκφύλιση (corticobasal syndrome – CBS ή corticobasal degeneration – CBD) συχνά επικαλύπτονται κλινικά με τις διαταραχές FTD και για τον λόγο αυτό μπορούν να συμπεριληφθούν στο ευρύ φάσμα της “FTD με παρκινσονισμό” [17], [18]. Επιπλέον, υπάρχει ένα 15% των ασθενών με FTD που αναπτύσσουν παράλληλα και νόσο των κινητικών νευρώνων, οδηγώντας έτσι στην δημιουργία ενός επιπλέον τύπου μετωποκροταφικής άνοιας, την FTD-MND (Motor Neuron Disease), με συχνότερη την FTD με αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (FTD with Amyotrophic Lateral Sclerosis, FTD-ALS)[19]. Τέλος, υπάρχει και το σύνδρομο της μετωποκροταφικής άνοιας – παρκινσονισμού που σχετίζεται με το χρωμόσωμα 17 (frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 – FTDP-17), το οποίο ερευνήθηκε πρώτη φορά το 1996 από τους Foster et al. και αφορούσε 13 οικογένειες [20].



1.1.2.β. Οι περιοχές του εγκεφάλου που επηρεάζονται στους ασθενείς με FTD.

2. ΜΕΤΩΠΟΚΡΟΤΑΦΙΚΗ ΑΝΟΙΑ (FTD)

2.1. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΗΣ FTD

2.1.1. Συμπεριφορική FTD (bvFTD)

Η FTD λοιπόν περιλαμβάνει δύο βασικούς υποτύπους την bvFTD και την PPA με την δεύτερη να χωρίζεται σε τρεις διαφορετικές κλινικές οντότητες. Η bvFTD είναι η πιο κοινή μορφή που παρατηρείται στο 50% περίπου των περιπτώσεων που διαγιγνώσκονται με FTD. Πιο συγκεκριμένα οι ασθενείς με bvFTD εμφανίζουν αλλαγές στην συμπεριφορά που περιλαμβάνουν απάθεια, εμπάθεια, εμμονές και διαφορετικές διατροφικές προτιμήσεις. Αυτές οι αλλαγές μεταφράζονται στην συμπεριφορά του ατόμου ως μειωμένη κοινωνικότητα ή ως μείωση δραστηριοτήτων που πριν τους ευχαριστούσαν. Επίσης, δεν αντιλαμβάνονται την συναισθηματική κατάσταση του περίγυρου τους και εμφανίζουν εμμονικές συμπεριφορές οι οποίες μπορεί να περιλαμβάνουν επαναλαμβανόμενες κινήσεις [21].

Όσον αφορά το γνωστικό κομμάτι η bvFTD σχετίζεται κυρίως με έκπτωση των γνωστικών λειτουργιών και παρουσιάζονται προβλήματα στις ικανότητες σχεδιασμού, επίλυσης προβλημάτων, νοητικής ευελιξίας, προσοχής και μνήμης εργασίας, υπάρχουν ωστόσο και εξαιρέσεις. Η διάγνωση της είναι αρκετά δύσκολη καθώς οι αλλαγές στην συμπεριφορά μπορεί να είναι πολύ ήπιες με αποτέλεσμα πολλές φορές ασθενείς να μένουν αδιάγνωστοι [21], [22].

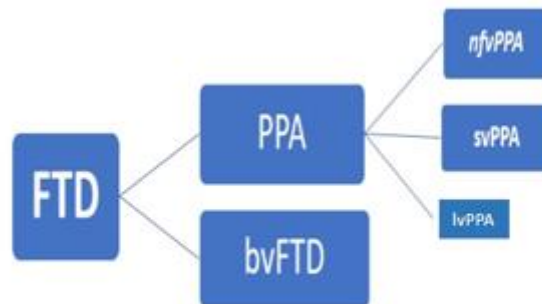
2.1.2. PPA

Τα βασικότερα συμπτώματα στην PPA περιλαμβάνουν αλλαγές τόσο στις εκφραστικές και δεκτικές γλωσσικές λειτουργίες. Με βάση την αρχική περιγραφή του Mesulam δεν φαίνεται να επηρεάζονται άλλες γνωστικές λειτουργίες ούτε η συμπεριφορά με αποτέλεσμα οι ασθενείς μπορούν να συνεχίσουν να συνεχίσουν την καθημερινότητα τους ακόμα και την εργασία τους εφόσον αυτή δεν εξαρτάται από τις επικοινωνιακές τους ικανότητες [23]. Οι τρεις βασικοί υπότυποι της PPA είναι η προοδευτική μη-ρέουσα αφασία (nfvPPA ή PNFA), η σημασιολογική άνοια (svPPA ή SD) και η λογοπενική προοδευτική αφασία (lvPPA ή LPA) [21]. Συγκεντρωτικά η βασική κατηγοριοποίηση απεικονίζεται στην εικόνα 1.1.2.α.

- i. Προοδευτική μη-ρέουσα αφασία (nfvPPA ή PNFA): αφορά το 25% των ασθενών με FTD και χαρακτηρίζεται από βλάβες στην παραγωγή του λόγου. Τα συμπτώματα οφείλονται στην ατροφία του αριστερού οπίσθιου και μετωπιαίου λοβού και του νησιωτικού φλοιού [21]. Μπορεί να χαρακτηριστεί και ως σύνδρομο της περιοχής Broca με την παραγωγή λόγου να

απαιτεί προσπάθεια και να χωλαίνει με λάθη ηχητικά και γλωσσικά. Η κατανόηση λέξεων και απλών προτάσεων καθώς και η αναγνώριση επιθέτων διατηρείται συνήθως με κάποια απώλεια κατανόησης για περίπλοκες συντακτικά προτάσεις. Πολύ σπάνια, ασθενείς διαγνωσμένοι ως PNFA, έχουν AD αντί για FTD [23].

- ii. Σημασιολογική άνοια (svPPA ή SD): η svPPA χαρακτηρίζεται από φυσιολογική ομιλία και συντακτικό χωρίς, όμως, την ικανότητα κατανόησης εννοιών και σημασίας των λέξεων (αλλοίωση της σημασιολογικής μνήμης). Εμφανίζεται περίπου με την ίδια συχνότητα με την nfvPPA, και είναι η λιγότερο κληρονομήσιμη μορφή FTD[20], [24], [25].
- iii. Λογοπενική προοδευτική αφασία (lvPPA ή LPA): χαρακτηρίζεται από βλάβες στην ονοματολογία στην επαναφορά συγκεκριμένων λέξεων. Οι ασθενείς δείχνουν ανικανότητα να επαναλάβουν φράσεις ή προτάσεις και κάποιες φορές κάνουν φωνητικά ή λεκτικά λάθη. Η lvPPA είναι κυρίως μια οντότητα της AD παράλληλα με την μετωπική παραλλαγή της AD που χαρακτηρίζεται και από προβλήματα στην όραση [23].



1.1.2.α. Βασική κατηγοριοποίηση της FTD, οι πιο συχνές μορφές.

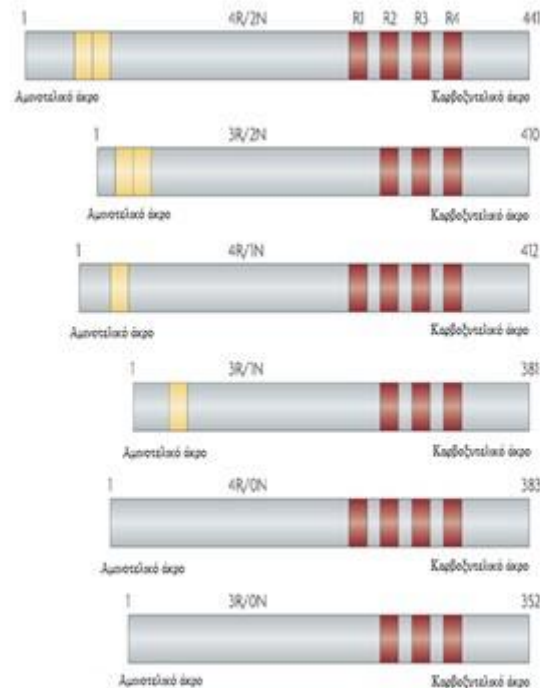
2.2. ΠΡΩΤΕΪΝΟΠΑΘΕΙΕΣ ΣΤΗΝ FTLD

Η FTD, μαζί με τις AD και PD, ανήκουν σε μια κατηγορία νευροεκφυλιστικών ασθενειών που ονομάζονται πρωτεϊνοπάθειες, καθώς παρατηρείται συσσώματωση συγκεκριμένων πρωτεϊνών, η οποία προκαλεί τοξικότητα, σε ορισμένες περιοχές του εγκεφάλου [26]. Η μοριακή παθολογία της FTD παρουσιάζει ετερογένεια ανάμεσα στους διάφορους κλινικούς υποτύπους της και ανάλογα με το είδος των συσσωρευμένων πρωτεϊνών και των νευρικών αλλοιώσεων που αυτές προκαλούν, απαρτίζει το φάσμα FTLD. Δύο είναι οι βασικές κατηγορίες FTLD: 1) FTLD-TAU (εναποθέσεις υπερφωσφορυλιωμένης TAU) και 2) FTLD-U (TAU και α-συνουκλεΐνη αρνητικές, αλλά ουβικουτίνη

θετικές εναποθέσεις). Η δεύτερη κατηγορία πλέον χωρίζεται σε περαιτέρω υποομάδες 2α) FTLD-TDP θετικές (TDP-43 εναποθέσεις) και 2β) FTLD-FUS (αρνητικές TDP-43, θετικές FUS εναποθέσεις) και 2γ) FTLD-UPS (αρνητικές σε TDP-43, FUS κι θετικές σε άλλα συστατικά συστήματος πρωτεασώματος) [27]–[29].

2.2.1 FTLD-TAU

Η TAU παθολογία αντανακλά το 45-50% των περιπτώσεων [30]. Η πρωτεΐνη TAU είναι το βασικό δομικό συστατικό των νευροϊνιδιακών δεματίων στην AD. Το γονίδιο *MAPT* που κωδικοποιεί την TAU πρωτεΐνη εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17q21 και περιέχει 16 εξόνια. Στον ανθρώπινο εγκέφαλο εκφράζονται έξι ισομορφές της TAU (εικόνα 2.2.1.α) που εκφράζεται σαν αποτέλεσμα του εναλλακτικού ματίσματος των εξονίων 2,3 και 10 [31]. Είναι μια ανθεκτική στη θερμότητα φώσφο-πρωτεΐνη που προάγει τον πολυμερισμό και την σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων. Παλαιότερα θεωρείτο περιορισμένη στους νευρώνες ωστόσο φαίνεται να συσσωρεύεται και στην γλοία σε ένα ευρύ φάσμα νευροεκφυλιστικών διαταραχών καθώς και σε ηλικιωμένους. Η πρωτεΐνη TAU είναι ετερογενής, λόγω του εναλλακτικού ματίσματος, καθώς και των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων, που περιλαμβάνουν και την φωσφορυλίωση. Το εξόνιο 10 του *MAPT* γονιδίου υπόκειται σε εναλλακτικό μάτισμα με αποτέλεσμα την παραγωγή διαφορετικών μορφών TAU είτε με τρεις ή τέσσερις συντηρημένες, περίπου 32, αμινοτελικές επαναλήψεις στην συνδεδεμένη σε μικροσωληνίσκους δομή της TAU πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζεται ως 3R ή 4R αντίστοιχα. Υπάρχει μια προτίμηση για 3R ή 4R TAU πρωτεινοπάθεια, με τους ασθενείς να εμφανίζουν όμοια κατανομή σε 3R και 4R [32]. Η FTLD-TAU χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες την προοδευτική περιπυρηνική παράλυση (PSP), τη φλοιοβασική εκφύλιση (CBD) και τη νόσο του Pick, με τις πρώτες δύο να είναι 4R TAU-πάθειες ενώ η τρίτη 3R [32].



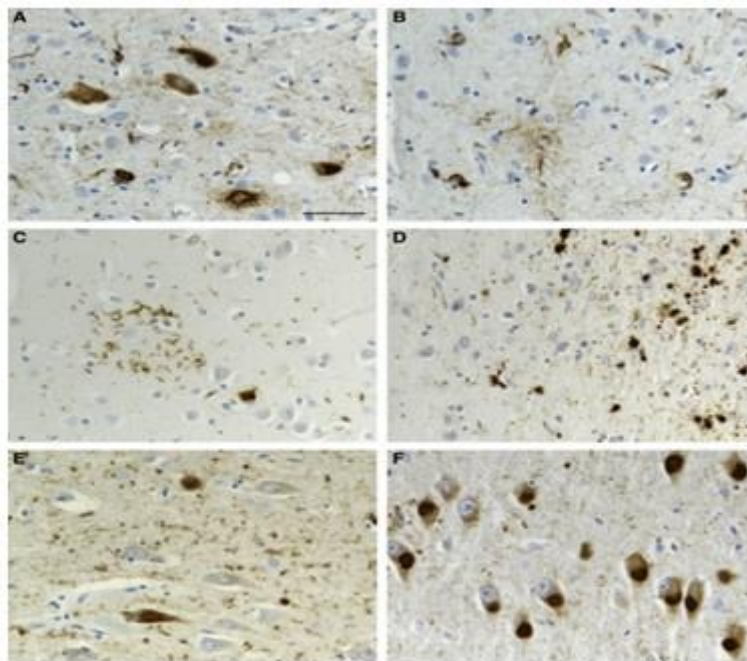
2.2.1.α. Οι έξι ισομορφές της TAU πρωτεΐνης [33].

Το PSP παρουσιάζεται κυρίως σαν κινητική νόσος με πρόωρη αστάθεια, αξονική ακαμψία, βραδυκινησία και οφθαλμοπληγία. Η γνωστική βλάβη είναι συχνά ήπια, παρολαυτά κάποιες περιπτώσεις με παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά PSP εμφανίζονται με άνοια η οποία έχει χαρακτηριστικά bvFTD και pfnPPA [34]. Ο βαθμός της φλοιικής εκφύλισης είναι σχετικά μεταβαλλόμενος αλλά είναι συνήθως σημαντικός σε ασθενείς με άνοια. Τα πιο χαρακτηριστικά νευρωνικά έγκλειστα είναι σφαιρικά νευροϊνιδιακά δεμάτια (NFT) σε υποφλοιικούς πυρήνες. Τα NFTs εντοπίζονται στον εγκεφαλικό φλοιό και στις υποφλοιικές περιοχές και είναι παρόμοια σε σχήμα και μέγεθος με αυτά που υπάρχουν σε ασθενείς με AD. Οι περίπλοκες διακλαδώσεις των αστροκυττάρων σε συνδυασμό με τα σπειροειδή σώματα των ολιγοδενδροκυττάρων και τα νευροϊνιδιακά δεμάτια αποτελούν κοινά χαρακτηριστικά όλων των TAU-παθειών [35].

Η φλοιοβασική εκφύλιση (CBD) χαρακτηρίζεται από συμπτώματα όπως βραδυκινησία, ακαμψία, δυστονία, απραξία καθώς και το φαινόμενο του “alien limb”[34]. Συνολική εξέταση παρουσιάζει αποχρωματισμό της μέλανας ουσίας, ατροφία της ωχράς κηλίδας καθώς και ατροφία του εγκεφαλικού φλοιού που είναι συχνά ασύμμετρη. Τα ιστοπαθολογικοανατομικά χαρακτηριστικά της CBD αλληλεπικαλύπτονται με αυτά της PSP, ενώ γενικότερα στην CBD παρουσιάζεται μεγαλύτερη εκφύλιση στον εγκεφαλικό φλοιό και στη λευκή ουσία από ότι στην PSP (εικόνα 2.2.1.β) . Ωστόσο η υποφλοιική ανάμειξη περιορίζεται στα βασικά γάγγλια, στο διεγκέφαλο και στο μέσο εγκέφαλο. Πέρα από την κοινή παθολογία με την PSP, χαρακτηριστικό της CBD είναι παρουσία κυκλικών ή

δακτυλιοειδών συλλογών κυττάρων που αναφέρονται ως αστροκυτταρικές πλάκες, οι οποίες είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης παθολογικής TAU κατά την διάρκεια διαφόρων λειτουργιών των αστροκυττάρων [36].

Η νόσος του Pick τέλος, που σε αντίθεση με τις άλλες δύο είναι 3R-TAUπάθεια, και παρουσιάζεται ως bvFTD ή ως pfvPPA, με τις κινητικές βλάβες να είναι σπάνιες [37]. Τα βασικά ιστολογικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν σοβαρή απώλεια νευρώνων, διογκωμένους νευρώνες (που αναφέρονται ως κύτταρα του Pick, παρόλο που δεν είναι ειδικά για την ασθένεια) και παθολογικά μεγάλα σφαιρικά αργυροφυλικά νευρικά κυτταροπλασματικά έγκλειστα (τα οποία καλούνται σωμάτια του Pick). Τα σωμάτια αυτά αποτελούνται κυρίως από την 3R ισομορφή της TAU [35]. Τα σωμάτια του Pick είναι μεγαλύτερα σε αριθμό στις στοιβάδες II-IV των επηρεασμένων περιοχών και στα κοκκώδη κύτταρα και στους πυραμιδικούς νευρώνες του ιππόκαμπου [38]. Οι παθολογοανατομικές αλλοιώσεις της γλοίας είναι λιγότερο εκτενείς σε σχέση με άλλους υποτύπους FTLD-TAU και περιλαμβάνει διακλαδώσεις, αστροκύτταρα και μικροσκοπικά σφαιρικά έγκλειστα στα ολιγοδεντροκύτταρα [39].

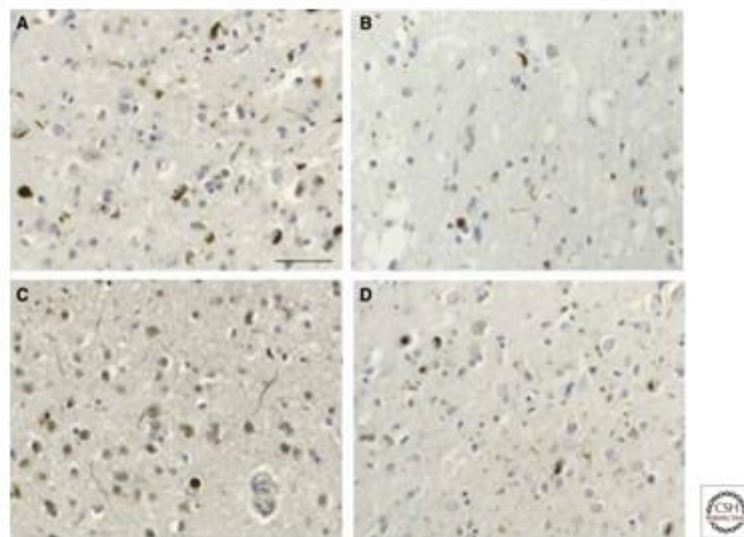


2.2.1.β.. Έγκλειστα στην PSP(A,B), CBD (C), TAUπάθεια λευκής ουσίας σε σφαιρικά νευρογλοιακά έγκλειστα (D), αργυροφιλική κοκκώδης νόσος (E) και bvFTD (F) (50μm) [31].

2.2.2. FTLD-TDP

Η FTLD-TDP είναι η πιο κοινή μοριακή FTLD παθολογοανατομική ταξινόμηση. Η νεότερη κατηγοριοποίηση είναι σύμφωνα με τους Mackenzie et al. (2011): Τύπος A: χαρακτηρίζεται από

πολλούς μικρούς δυστροφικούς νευρίτες και δισκοειδή ή οβάλ νευρωνικά κυτταροπλασματικά έγκλειστα (neuronal cytoplasmic inclusions – NCI), κυρίως στο στρώμα 2 του νεοφλοιού. Αρκετά ενδοπυρηνικά νευρωνικά έγκλειστα (neuronal intranuclear inclusions – NII) με μορφή κυρτών φακών είναι κοινά, αλλά όχι σε όλες τις περιπτώσεις. Τύπος B : χαρακτηρίζεται από μέτρια σε αριθμό NCI, σε όλα τα στρώματα του φλοιού, αλλά πολύ λίγους δυστροφικούς νευρίτες. Τύπος C : χαρακτηρίζεται από την επικράτηση μακρών δυστροφικών νευριτών στα άνω στρώματα του φλοιού και με πολύ λίγα NCI. Τύπος D: αναφέρεται στην παθολογία που σχετίζεται με την IBMPFD (Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia, μυοπάθεια σωματικών εγκλείστων που συνδέεται με την PBD και την FTD) και χαρακτηρίζεται από πολυάριθμους μικρούς δυστροφικούς νευρίτες και συχνά NII μορφής κυρτού φακού (εικόνα 2.2.2.α) [31].



2.2.2.α: FTLD-TDP Ο τύπος A χαρακτηρίζεται από άφθονα TDP-43 (+) συμπαγή NCI, και συχνά ενδοπυρηνικά, NII και κοντούς δυστροφικούς νευρίτες. Ο τύπος B χαρακτηρίζεται από άφθονα συμπαγή και κοκκιώδη NCI TDP-43. Ο τύπος C από άφθονους μακρίους δυστροφικούς νευρίτες και ο τύπος D από άφθονα NCI TDP-43, που έχουν την μορφή κυρτών φακών, και κοντούς δυστροφικούς νευρίτες (50 μ m) [31].

2.2.3 FTLD-FUS

Η FTLD-FUS αποτελεί το ~3% των συνολικών FTLD και αντιπροσωπούν ~10% των TAU αρνητικών, TDP-43 αρνητικών FTLD περιπτώσεων [31]. Η πρωτεΐνη FUS, αρχικά, ανακαλύφθηκε ως μέρος μιας χρωμοσωμικής μετάθεσης που συνδέεται με το ανθρώπινο μυξοειδές λιποσαρκώμα. Είναι μια πρωτεΐνη, 526 αμινοξέων (53 kDa), σύνδεσης RNA/DNA της οικογενείας FET, που περιέχει αρκετές διακριτές λειτουργικές περιοχές, συμπεριλαμβανομένων μοτίβων RNA-αναγνώρισης (αργινίνη-γλυκίνη-γλυκίνη RGG μοτίβα), ένα τομέα MTA και ένα ZnF, ενός διατηρημένου NLS (στο καρβοξυτελικό της άκρο) και μιας περιοχής πλούσιας σε γλουταμίνη και ομοιάζουσα με prion (στο

αμινοτελικό της άκρο). Στον εγκέφαλο, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η FUS εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα των νευρώνων, αλλά είναι αποκλειστικά πυρηνική στα νευρογλοιακά κύτταρα (εικόνα 2.2.3.α). Μέσω των πυρηνικών πόρων μπορεί να μετακινείται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, και αντίστροφα. Η πυρηνική εισαγωγή πραγματοποιείται μέσω της τρानσπορτίνης 1 (transportin 1 - TRN1), γνωστής και ως M9-πρωτεΐνη αλληλεπίδρασης ή καρυοφερίνη β1 (karyopherin β1 -karβ1). Η δέσμευση της FUS στην TRN1 εξαρτάται από το μοτίβο PY, που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της FUS. Η ακριβής λειτουργία της FUS είναι ασαφής. Ωστόσο, γνωστοί ρόλοι της περιλαμβάνουν τον μεταγραφικό έλεγχο μέσω του αμινοτελικού της άκρου, την επεξεργασία του RNA μέσω της ρύθμισης του ματίσματος και την επιδιόρθωση του DNA μέσω DNA Damage Response -DDR. Οι λειτουργίες αυτές υποδηλώνουν -και σε αυτό τον τύπο παθολογίας- τις δυσμενείς συνέπειες στην κυτταρική ομοιοστάση, σε περίπτωση δυσλειτουργίας του [17], [40]–[44].

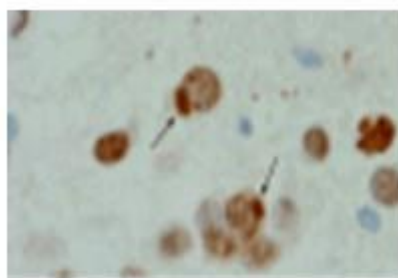
Τα χαρακτηριστικά της FTLD-FUS είναι ουβικιτίνη θετικά, FUS θετικά, p62/TDP-43 αρνητικά νευρωνικά έγκλειστα με αξιοσημείωτη μορφολογία. Αξίζει να σημειωθεί ότι ανατομικά παρατηρείται εντυπωσιακή ατροφία του κερκοφόρου πυρήνα [45], [46].

Η TRN1, πιθανότατα ενσωματώνεται στα FUS-θετικά έγκλειστα. Έχει, επίσης, αναφερθεί, πως τα έγκλειστα αυτά περιέχουν και άλλα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών FET, όπως η σχετιζόμενη με τον παράγοντα TATA πρωτεΐνη δέσμευσης 15 (TAF15) και η πρωτεΐνη σαρκώματος Ewing (EWS) [47]. Συνεπάγεται επομένως, ότι οι FUS, TRN1, TAF15 και, ενδεχομένως σε μικρότερο βαθμό, η EWS εμπλέκονται στην παθογένεση του σχηματισμού εγκλειστών στην FTLD-FUS, και δείχνουν ότι η διακοπή των FUS μεταφορών, μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος, μπορεί να ενισχύσει την παθογένεια αυτή. Εξάλλου όλες αυτές οι πρωτεΐνες ανήκουν στην ίδια οικογένεια, αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους για να σχηματίσουν σύμπλοκα πρωτεΐνης και προβλέπεται πως οι ρόλοι όλων τους, περιλαμβάνουν την RNA μεταγραφή, την επεξεργασία και τη μεταφορά, την επεξεργασία microRNA και την επιδιόρθωση DNA (με αντίστοιχη μεταφορά τους από τον πυρήνα –που βρίσκονται κυρίως- στο κυτταρόπλασμα και αντίστροφα). Παρά το γεγονός ότι οι αντίστοιχοι ρόλοι των FUS/TAF15/EWS στην FTLD-FUS, παραμένει να διευκρινιστούν, ο όρος FTLD-FET φαίνεται πως είναι περισσότερο κατάλληλος για αυτή την μοριακή FTLD υποομάδα [31], [43], [48], [49] .

Η απομονωμένη πρωτεΐνη FUS σχηματίζει ινίδια *in vitro* και η περιοχή ομοιάζουσα με πρίον, στο αμινοτελικό της άκρο (αμινοξέα 1-266), είναι απαραίτητη. Έχειδειχθεί επίσης, ότι το ίδιο το αμινοτελικό άκρο (αμινοξέα 2-214) σχηματίζει υδρογέλη σε υψηλές συγκεντρώσεις *in vitro*. Μία QGSY-πλούσια περιοχή του αμινοτελικού άκρου (αμινοξέα 1-164) είναι απαραίτητη για να σχηματισθούν λειτουργικά ολιγομερή στον πυρήνα, τα οποία παρουσιάζουν ένα κοκκώδες μοτίβο. Αντίθετα, στα NCI, οι πρωτεΐνες FUS βρίσκονται, κυρίως, ως μονομερή και δεν απαιτείται το αμινοτελικό άκρο για την δημιουργία τους. Φαίνεται, πως τα τελευταία δεν είναι ινιδιακά συσσωματώματα που ρυθμίζονται από την αταξία διάφορων περιοχών, αλλά μάλλον, άμορφα

συμπλέγματα που μπορούν είτε να μετατραπούν σε αμυλοειδικά είτε να διασπαστούν μέσω πρωτεϊνών θερμικού σοκ (heat-shock proteins) [42], [50].

Οι περιπτώσεις στις οποίες δεν παρατηρείται θετική ανοσοϊστοχημική χρώση TDP-43 πρωτεΐνης, χαρακτηρίζονται ως άτυπες FTLD-U παθολογίες και σε αυτές ανήκει και η FTLD-FUS [51]. Η ενδογενής FUS έχει αναφερθεί πως συμμετέχει σε σχηματισμό κοκκιωμάτων-στρες (stress granules –SG) κάτω από διάφορες καταπονήσεις ή από περιβαλλοντικό στρες, όπως η θερμότητα, η ιογενής λοίμωξη, το οξειδωτικό στρες, η υποξία - ως μια προσωρινή κυτταρική δομή σημαντική για την επιβίωση των κυττάρων. Η μεταλλαγμένη FUS έχει δειχθεί ότι μεταβάλλει τη δυναμική απόκριση στο στρες και στο οξειδωτικό στρες, αντίστοιχα και οδηγεί την φυσιολογική FUS σε δημιουργία SG. Έχει προταθεί ότι τα SG μπορεί να είναι οι πρόδρομοι των παθολογικών flFUS NCI (full length) σε ασθενείς FTLD-FUS. Είναι άγνωστο το πώς ο εσφαλμένος εντοπισμός του μεταλλαγμένου FUS (κυτταροπλασματικά) προκαλεί δυσλειτουργία των νευρώνων και εκφυλισμό, αλλά είναι πιθανό να οδηγεί σε αποτροπή της φυσιολογικής πρωτεΐνης από την εκτέλεση των λειτουργιών της, με αποτέλεσμα τη διαταραχή της επεξεργασίας του RNA και, ενδεχομένως, τον κυτταρικό θάνατο, μέσω ενός τοξικού μηχανισμού gain-of-function [41], [43], [50], [52]. Άλλος πιθανός τρόπος μηχανισμού πρόκλησης ασθένειας είναι μέσω της διαταραχής της επιδιόρθωσης βλάβης του DNA. Η φυσιολογική λειτουργία των FUS στην DDR περιλαμβάνει την άμεση αλληλεπίδρασή τους με την αποακετυλάση ιστόνης 1 (Histone Deacetylase 1 -HDAC1) και την πρόσληψή τους στα DSBs (Double Stranded Breaks). Ασθενείς με οικογενή ALS που φέρουν FUS μεταλλάξεις παρουσιάζουν ελαττωματική DDR και επιδιόρθωση του DNA, καθώς και μειωμένη αλληλεπίδραση των FUS με την HDAC1 [44].



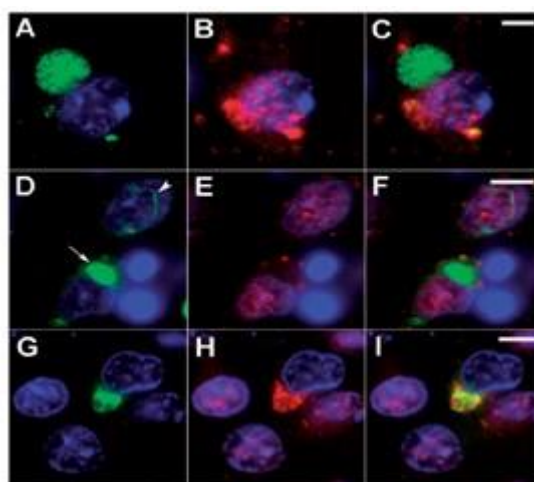
2.2.3.a.FUS NCI (βέλη) στα κοκκοειδή κύτταρα της οδοντωτής έλικας του ιποκκάμπου [46].

2.2.4.FTLD-UPS

Ορισμένες περιπτώσεις FTLD-UPS παρουσιάζουν p62 εντόπιση σε νευρώνες και νευρογλοιακά κύτταρα [29], [51], [53]–[58]. Στις περιπτώσεις FTLD-p62, ύστερα από ανοσοχρώση, τα NCI στα κοκκιοκύτταρα της παρεγκεφαλίδας εμφανίζονται ως μικρά στρογγυλεμένα ή σχήματος κριθαριού σώματα (αν και περιστασιακά υπάρχουν ως μεγαλύτερα, περισσότερα στρογγυλεμένα και στερεά). Παρόμοια, πιο κοκκιώδη NCI υπάρχουν στα bascet κύτταρα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, και τα κύτταρα

Purkinje και οι νευρώνες του dentate πυρήνα περιέχουν μικρές, οξύληκτες ή κοκκιώδεις p62-ανοσοαντιδραστικές δομές. Τέλος, στις περισσότερες περιπτώσεις, παρατηρούνται και αστροκύτταρα με p62 θετικά NII (εικόνα 2.2.4.α.) [58].

Η ουβικιτινο-δεσμευτική p62/SQSTM1/A170 (sequestosome 1) είναι μία στρες-επαγόμενη ενδοκυτταρική πρωτεΐνη, με διάφορα μοτίβα αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, που είναι γνωστό ότι ρυθμίζει διάφορες οδούς μεταγωγής σήματος που εμπλέκονται στην κυτταρική επιβίωση και στον κυτταρικό θάνατο (απόπτωση), όπως την σηματοδότηση του μεταγραφικού πυρηνικού παράγοντα NF-κΒ και την ενεργοποίηση του Nrf2 (nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2). Η p62 εμπλέκεται, επίσης, στη διακίνηση και αποικοδόμηση πρωτεϊνών, μέσω της οδού της αυτοφαγίας και του συστήματος ουβικιτίνης-πρωτεασώματος· αναγνωρίζει πολυουβικιτυλιωμένα πρωτεϊνικά υποστρώματα και τα διακινεί προς αποικοδόμηση. Τα επίπεδά της ρυθμίζονται από την αυτοφαγία, αλλά και η ίδια μπορεί να καταστείλει την αυτοφαγία μέσω ενεργοποίησης του συμπλόκου mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1)[57], [59], [60]. Τέλος, η p62 φυσιολογικά δεσμεύεται στην TDP-43 και πιθανώς εμπλέκεται στην αποικοδόμηση της, καθιερώνοντας μια πιθανή λειτουργική σύνδεση μεταξύ p62 και TDP-43 στις πρωτεϊνοπάθειες αυτές [57].



2.2.4.α. Διπλός ανοσοφθορισμός σε aFTL DU (A-F) και τυπικής FTL DU (G-I) εγκεφαλικά δείγματα ασθενών, για Ub (πράσινο) και TDP-43 (κόκκινο), παράλληλα με DAPI πυρηνική χρώση (μπλε). Συγχωνευμένες εικόνες: (C), (F), (I). Τα NCI στο νεοφλοιό aFTL DU ασθενών έχουν ουβικιτίνη-θετική Ub(+) (A), αλλά TDP-43(-)(B) ανοσοαντίδραση. Τα κύτταρα με NCI, διαθέτουν φυσιολογική πυρηνική TDP-43 ανοσοαντίδραση (B). Τα μικρά κίτρινα κυτταροπλασματικά κοκκία στη συγχωνευμένη εικόνα (C) αντιστοιχούν στην φυσιολογική νευρωνική λιποφουσκίνη που είναι αυτοφθορίζουσα. Τα κοκκιόκυτταρα του οδοντωτού ιππόκαμπου (dentate) aFTL DU ασθενών περιέχουν Ub-NCI και NII (D), αρνητικά για TDP-43 (E), αλλά διατηρούν φυσιολογική πυρηνική TDP-43 ανοσοαντίδραση (E-F). Αντίθετα, τα NCI στις τυπικές περιπτώσεις FTL DU έχουν θετική Ub (G) και θετική-TDP-43 ανοσοαντίδραση (H), ενώ οι νευρώνες των ασθενών αυτών εμφανίζουν απώλεια φυσιολογικής πυρηνικής TDP-43 (dentate κοκκιόκυτταρα). (5 mm) [51].

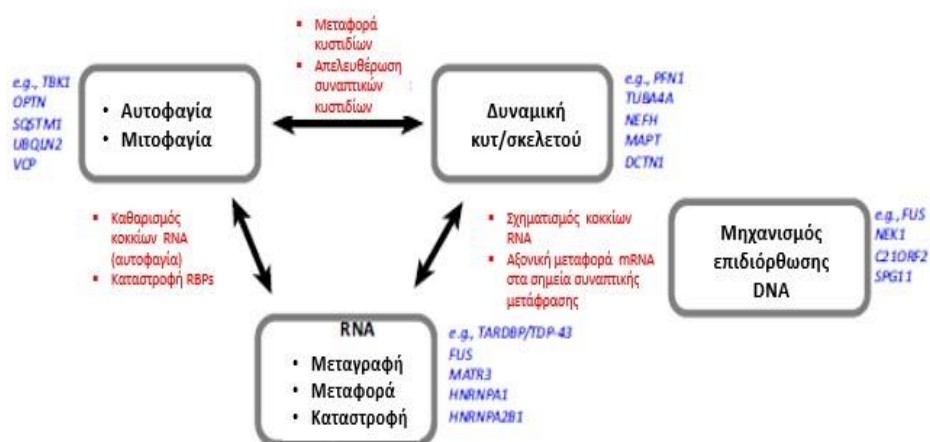
2.3. ΑΜΥΟΤΡΟΦΙΚΗ ΠΛΑΓΙΑ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΩΠΟΚΡΟΤΑΦΙΚΗ ΑΝΟΙΑ

Η αμυοτροφική πλάγια σκλήρυνση (ALS) είναι η πιο κοινή μορφή εκφύλισης των κινητικών νευρώνων, πιο συγκεκριμένα επηρεάζει τους άνω και κάτω κινητικούς νευρώνες και τους νευρώνες του φλοιονωτιαίου σωλήνα. Περίπου 30.000 άνθρωποι νοσούν με ALS με την πλειοψηφία 60% να είναι άνδρες. Η ηλικία εμφάνισης είναι περίπου 55 έτη και ανάλογα με την επιθετικότητα ο χρόνος επιβίωσης κυμαίνεται από δύο έως πέντε έτη [61]. Ο όρος αμυοτροφική αναφέρεται στην απώλεια μυϊκής μάζας, ο όρος πλευρική αναφέρεται στην οδό όπου τα νεύρα διασχίζουν και τις δύο πλευρές του νωτιαίου μυελού, ένα από τα μέρη που εμφανίζει εκφύλιση και τέλος ο όρος σκλήρυνση αναφέρεται στην εμφάνιση του ιστού του νωτιαίου μυελού, που ομοιάζει με ουλώδη ιστό ως αποτέλεσμα της εκφύλισης των νευρώνων στην περιοχή αυτή [61]. Οι άνω κινητικοί νευρώνες βρίσκονται στον εγκεφαλικό φλοιό, ενώ οι κάτω στο εγκεφαλικό στέλεχος και τον νωτιαίο μυελό. Ο λόγος για τον οποίο επηρεάζονται αυτοί οι δύο τύποι νευρώνων έγκειται στην κοινή αναπτυξιακή τους προέλευση. Η οντογένεση και των δύο εντοπίζεται στο ανώτερο και κατώτερο τμήμα του νευρικού σωλήνα αντίστοιχα, το οποίο υποδηλώνει ότι τα προγονικά κύτταρα βρίσκονται στην ίδια σειρά και αναπτύσσονται μαζί σχηματίζοντας ένα περίπλοκο δίκτυο. Στην ALS, οι ασθενείς με βλάβες στους άνω κινητικούς νευρώνες εμφανίζουν φαινότυπο υπερελαστικότητας με σπαστικότητα ενώ λόγω εκφύλισης των κάτω κινητικών νευρώνων παρουσιάζονται συμπτώματα μυϊκής αδυναμίας καθώς και καταστροφής τους [62].

Ο σύνδεσμος μεταξύ της αμυοτροφικής πλευρικής σκλήρυνσης (ALS) και της μετωποκροταφικής άνοιας (FTD) περιεγράφηκε τον 19^ο αιώνα και βασίστηκε σε κλινικές παρατηρήσεις. Περαιτέρω μελέτες επιβεβαιώνουν την σχέση αυτή τόσο με νευροπαθολογοανατομικά όσο και με γενετικά στοιχεία. Σήμερα αποτελέσματα πειραμάτων υποδεικνύουν κοινά μονοπάτια στην παθογένεση των δύο νόσων (συγκεντρωτικά τα μονοπάτια στην εικόνα 2.3.α.), πρωτεϊνικά προϊόντα των περισσότερων γονιδίων που σχετίζονται με ALS λειτουργούν ρυθμίζοντας:

- i. Μονοπάτια αυτοφαγίας: *TBK1, OPTN, SQSTM1, C9ORF72, VCP, UBQLN2, ALS2, CHMP2B*
- ii. Μεταβολισμό RNA: *TARDBP, FUS, HNRNPA1/HNRNPA2B1, MATR3*
- iii. Δυναμική του κυτταροσκελετού: *PRN1, DCTN1, NEFH, MAPT, TUBA4A*
- iv. Επιδιόρθωση του DNA: *FUS, NEK1, C21ORF72, SPG11*
- v. Άλλα γονίδια που παρατηρούνται συχνά σε ασθενείς με ALS ή FTD αλλά δεν ανήκουν στις παραπάνω κατηγορίες είναι τα *SOD1* και *GRN* [12].

Τα βασικά μονοπάτια των γονιδίων του ALS/FTD συνδέονται λειτουργικά



2.3.α. Βασικά μονοπάτια FTD/ALS και γονίδια που εμπλέκονται [12].

Οι C9ORF72 εξανουκλεοτιδικές επαναληπτικές επεκτάσεις είναι η πιο κοινή αιτία πρόκλησης οικογενούς μορφής FTD και ALS παγκοσμίως. Η κλινική παρουσία είναι συχνά δυσδιάκριτη σε σχέση με τις κλασικές μορφές ALS ή FTD, παρόλο που νευροψυχιατρικά συμπτώματα είναι επικρατέστερα και για το ALS γνωστικά και συμπεριφορικά συμπτώματα εμφανίζονται πιο συχνά. Παθογενετικές επαναλήψεις είναι εκατοντάδες ή χιλιάδες, αλλά το ελάχιστο μήκος που αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης νόσου καθώς και το πως ή εάν αυτές οι επαναλήψεις επηρεάζουν τον φαινότυπο είναι άγνωστο. Όπως και σε πολλούς ασθενείς με FTD και ALS εμφανίζονται νευρωνικά έγκλειστα που περιέχουν TARDBP, ενώ παθολογικά ευρήματα αποτελούν πρωτεΐνες με διπεπτιδικές επαναλήψεις, οι οποίες σχηματίζονται από την μη-συμβατική σχετιζόμενη με επαναλήψεις μη-ATG μετάφραση. Πιθανοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν απώλεια λειτουργίας της C9ORF72 πρωτεΐνης καθώς επίσης, RNA τοξικότητα και παρουσία πρωτεϊνών με διπεπτιδικές επαναλήψεις χωρίς να είναι γνωστός ποιος από αυτούς τους μηχανισμούς ευθύνεται για την παθογένεια [19].

Παρά την κλινική ομοιότητα μεταξύ ALS και FTD, υπάρχουν στοιχεία κοινών χαρακτηριστικών και στο μοριακό επίπεδο όπως τα ουβικουτίνη θετικά νευρωνικά έγκλειστα τα οποία είχαν περιγραφεί πριν ακόμη την ανακάλυψη της TDP-43. Μετά την παρατήρηση ότι συσσωματώματα της TDP-43 σχετίζονται με τα θετικά με ουβικουτίνη νευρωνικά έγκλειστα υποστηρίχθηκε η ιδέα ότι υπάρχει σημαντική αλληλοεπικάλυψη σε κλινικό και παθολογικό επίπεδο στις νευρολογικές νόσους που παρουσιάζουν την TDP-43 πρωτεϊνοπάθεια [52], [63]. Αυτές οι παρατηρήσεις υποστηρίζουν την ιδέα ότι ALS/FTD, FTD/MND καθώς και FTLD-U μπορούν να θεωρηθούν προοδευτικές νόσοι που αποτελούν κομμάτι ενός ευρύτερου φάσματος εκφυλισμού πολλαπλών συστημάτων [64]. Τα

κυτταροπλασματικά έγκλειστα της TDP-43 εμφανίζονται στις περισσότερες γενετικές και σποραδικές περιπτώσεις ALS καθώς και σε μια υποομάδα FTD ασθενών με TDP-43, TDP-43/FUS HNRNPA1/HNRNPA2B1 τα οποία είναι παρόμοια δομημένα και εμφανίζουν περιοχή πρόσδεσης στο RNA καθώς και περιοχές επιρρεπείς σε μεταλλάξεις και δημιουργία συσσωματωμάτων [12]. Οι TDP-43 πρωτεϊνοπάθειες διακρίνονται από τις περισσότερες νευροεκφυλιστικές διαταραχές στις οποίες η λάθος αναδίπλωση των πρωτεϊνών οδηγεί στην αμυλοείδωση στον εγκέφαλο, ενώ η TDP-43 σχηματίζει νευρωνικά και γλοιακά έγκλειστα στα οποία λείπουν τα αμυλοειδικά κατάλοιπα. Επίσης η TDP-43 πρωτεϊνοπάθεια μπορεί να είναι ένα στοιχείο του αυξανόμενου αριθμού έγκλειστων στις διάφορες νευροεκφυλιστικές νόσους και περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να προσδιορίσουν τη συχνότητα αυτού του τύπου πρωτεϊνοπάθειας [65].

Άλλα σημαντικά γονίδια είναι το *MAPT*, που ρυθμίζει την συγκρότηση των μικροσωληνίσκων και την σταθεροποίηση τους. Είναι ένα από τα τρία πιο συχνά γονίδια που προκαλούν FTD αλλά πολύ σπάνια ALS. Το *SOD1* γονίδιο εκφραζόμενο παράγει ένα ένζυμο (σουπεροξειδάση δισμουτάση 1) ενός αντιοξειδωτικού μονοπατιού, δεύτερο πιο συχνό γονίδιο που σχετίζεται με την εμφάνιση ALS, μεταλλάξεις σε αυτό σχεδόν αποκλειστικά προκαλούν ALS οδηγώντας σε εσφαλμένη αναδίπλωση πρωτεϊνών και τάση για δημιουργία συσσωματωμάτων. Η έκφραση του *GRN* γονιδίου οδηγεί στην παραγωγή γκρανουλίνης μιας εκκρινόμενης πρωτεΐνης με δραστικότητα κυτταροκίνης/αυξητικού παράγοντα, πιθανή απώλεια λειτουργικότητας του γονιδίου στους ασθενείς (ένα από τα δύο πιο κοινά γονίδια που προκαλούν FTD). Τέλος το *FUS*, εμφανίζεται μεταλλαγμένο σε ασθενείς με ALS και σε μια υποομάδα ασθενών με FTD, εάν και είναι αρκετά σπάνιο. Ασθενείς με μεταλλάξεις στο *FUS* εμφανίζουν *FUS* θετικά νευρωνικά έγκλειστα χωρίς να ισχύει το αντίθετο [12].

Τα αποτελέσματα από την έρευνα στη γενετική, στην κυτταρική βιολογία αλλά και στα βιοχημικά μονοπάτια για τις δύο αυτές ασθένειες έχουν προχωρήσει πολλά βήματα μπροστά την κατανόηση τους. Ο χαρακτηρισμός των προσυμπτωματικών φάσεων στους φέροντες μεταλλάξεις ασθενείς ALS/FTD όσο και ο προσδιορισμός των προστατευτικών παραγόντων που οδηγούν στην μειωμένη διείσδυση των επικρατώς κληρονομούμενων ALS/FTD μεταλλαγών μπορεί να προσφέρει πολύτιμες γνώσεις στα αρχικά στάδια παθογένεσης των ασθενειών αυτών και συμπερασματικά στον σχεδιασμό πιθανών θεραπευτικών προσεγγίσεων στο μέλλον [12].

2.4. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗΝ FTD

Αλλαγές στην συγκέντρωση ορισμένων πρωτεϊνών στα διάφορα βιολογικά υγρά υποδηλώνουν παθοφυσιολογικές αλλαγές που παρουσιάζονται κατά την εξέλιξη μιας νόσου. Η εγγύτητα του εγκεφαλονωτιαίου υγρού με τον εγκέφαλο σημαίνει ότι είναι πιθανό να περιέχει ειδικούς για τις νευρολογικές νόσους βιοδείκτες. Επακόλουθη επιβεβαίωση της παρουσίας τους στο αίμα έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς η λήψη αίματος είναι ελάχιστα επεμβατική διαδικασία επιτρέποντας επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ανά το χρόνο [66]. Η ακριβής και πρόωπη διάγνωση είναι απαραίτητη ώστε να επιλεγεί η κατάλληλη θεραπευτική προσέγγιση για τον ασθενή και είναι επίσης σημαντική ώστε να γίνεται ορθή επιλογή ασθενών στις κλινικές δοκιμές [67]. Τρεις είναι οι κύριοι βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται κλινικά αλλά και ερευνητικά για την διάγνωση της νόσου Alzheimer's στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Aβ42, tTAU, p-TAU). Πιο συγκεκριμένα, σε ασθενείς με AD το Aβ42 είναι μειωμένο λόγω της εναπόθεσης αμυλοειδούς στον φλοιό, η ολική TAU ανευρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις λόγω της απώλειας φλοιικών νευρώνων και τέλος η φωσφορυλιωμένη TAU η οποία ανευρίσκεται επίσης αυξημένη αντικατοπτρίζοντας τον σχηματισμό των νευροϊνδιακών δεματίων [68].

- t-TAU, p-TAU και Aβ-42

Στην FTD ωστόσο οι ανωτέρω μετρήσεις στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στο πλάσμα εμφανίζουν περιορισμένη προγνωστική και διαγνωστική αξία. Η αύξηση του λόγου TAU/Aβ42 επιτρέπει τον διαχωρισμό μεταξύ AD και FTD (στην AD υψηλός ενώ στην FTD χαμηλός) με ειδικότητα 79% και ευαισθησία 89%. Τα επίπεδα της TAU στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό δεν είναι ανάλογα της παθολογίας-TAU (FTLD-TAU) καθώς ποικίλουν και είναι ορισμένες φορές ακόμα και φυσιολογικά [69]. Έτσι, αυτοί οι βιοδείκτες δεν είναι τόσο αποτελεσματικοί για τη διαφοροποίηση των FTD από υγιείς ανθρώπους, αφού σε αντίθεση με τους AD, τα Aβ42 και TAU δεν μεταβάλλονται εκ των πραγμάτων, αλλά μπορεί να είναι και στα φυσιολογικά όρια, συμπεριλαμβανομένων των ασθενών με μεταλλάξεις στο γονίδιο MAPT [69], [70]. FTD ασθενείς με MAPT G272V, P301L και R406W μεταλλάξεις έχουν φυσιολογικά CSF επίπεδα Aβ42 και αυξημένα επίπεδα tTAU και PTAU. Μερικά άτομα FTD-GRN έχουν το προφίλ βιοδεικτών της AD (μειωμένα Aβ42 και αυξημένα p-TAU και t-TAU επίπεδα στο CSF), ενώ σε άλλες περιπτώσεις, η t-TAU και η PTAU βρίσκονται εντός φυσιολογικών ορίων. Οι FTD-C9orf72 ασθενείς βρέθηκε να έχουν είτε προφίλ CSF εντός του φυσιολογικού εύρους ή προφίλ χαρακτηριστικό της AD [71].

Πειράματα για τον προσδιορισμό νέων βιοδεικτών (N-123, N-ενδιάμεσης περιοχής, N-224, X-368 και μη-φωσφορυλιωμένης Tau) σε μια μελέτη που έγινε σε ασθενείς με AD, FTD και στην ομάδα ελέγχου έδειξαν ότι αυξημένα επίπεδα N-ενδιάμεσης περιοχής Tau, N-224 Tau και μη-φωσφορυλιωμένης Tau παρατηρήθηκε και στις δύο ομάδες ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Παρόλα αυτά κανένας από τους νέους βιοδείκτες Ταυ που δοκιμάστηκαν δεν φάνηκε να είναι ικανό να χωρίσει τους FTD από τους AD ασθενείς αλλά ούτε και τους διαφορετικούς τύπους πρωτεϊνοπάθειας μέσα στην ομάδα της FTD, δηλαδή τον διαχωρισμό μεταξύ FTLD-TAU με FTLD TDP-43 με αρκετή ευαισθησία και ειδικότητα. Ο λόγος p-Tau₍₁₈₁₎/T-Tau παρουσίασε ευαισθησία μόνο 61,1% και ειδικότητα 85,7%. Συμπερασματικά δεν φάνηκε να είναι πληροφοριακό για την διάγνωση, την πρόγνωση ή την εικόνα της εξέλιξης της νόσου κανένα από τα νέα Ταυ βιομόρια τα οποία μελετήθηκαν[72].

- TDP-43

Μια σημαντική πρωτεΐνη που εμφανίζεται σε πρωτεϊνικά συσσωματώματα σε διάφορα νευροεκφυλιστικά νοσήματα με κύρια το ALS και την FTD είναι η TDP-43. Οι αλλαγές που εμφανίζει αυτή η πρωτεΐνη την καθιστούν υποψήφιο βιοδείκτη και παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η μελέτη της. Με βάση τις ενδείξεις σχετικά με τις αλλαγές της TDP-43 στα βιολογικά υγρά, ερευνήθηκαν οι διαφορετικές ισομορφές της σε αίμα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ώστε να προσδιοριστεί με ακρίβεια η περιοχή προέλευσης της, αφού κυκλοφορεί φυσιολογικά στο αίμα σε πλήρες μήκος. Ωστόσο, οι παθολογικές μορφές της εμφανίζουν διάφορες τροποποιήσεις που μπορεί να περιλαμβάνουν φωσφορυλίωση ή ουβικιτινίωση σε διάφορα αμινοξικά κατάλοιπα [73]. Πιο συγκεκριμένα, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, στα πλαίσια μια μελέτης, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα της TDP-43 σε ασθενείς με σποραδικό ALS σε σχέση με άλλα νευροεκφυλιστικά νοσήματα αλλά και την ομάδα ελέγχου ενώ φαίνεται ότι υψηλότερα επίπεδα παρατηρούνται στην αρχή της εμφάνισης των συμπτωμάτων της νόσου τα οποία στην συνέχεια μειώνονται πλησιάζοντας τις τιμές της ομάδας ελέγχου ενώ επίσης τα αυξημένα επίπεδα δεν σχετίζονταν με υψηλή διαγνωστική ευαισθησία [74].

Μια δεύτερη έρευνα βασίστηκε την ίδια μεθοδολογία με την προηγούμενη ομάδα με την διαφορά ότι τα δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού είχαν ληφθεί από νεκρούς ασθενείς των οποίων, είχε διευκρινιστεί η παθολογική εικόνα τους είτε μέσω γενετικής ανάλυσης, είτε με την νεκροτομή, χωρισμένοι στις εξής κατηγορίες FTLD-TAU, FTLD-TDP, AD (με ή χωρίς παθολογία TDP-43 κατά την νεκροτομή). Η συγκεκριμένη μελέτη είναι η πρώτη που υποστηρίζει ότι παρατηρούνται χαμηλότερα επίπεδα TDP-43 σε ασθενείς με FTLD-TDP και AD σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Το πλήρους μήκους TDP-43 ήταν σημαντικά χαμηλότερο στους FTLD-TDP σε σχέση με την ομάδα ελέγχου αλλά με μεγάλη μεταβλητότητα ενώ οι ασθενείς με FTLD-TAU δεν εμφάνιζαν διαφορές. Επίσης η φωσφορυλιωμένη TDP-43 ανιχνεύθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα στους FTLD-TAU και AD, και μια τάση προς χαμηλότερα επίπεδα παρατηρήθηκε στους FTLD-TDP. Συμπερασματικά υποδεικνύεται ότι γενικότερα χαμηλά επίπεδα της TDP-43 εμφανίζονται στις περιπτώσεις νευροεκφυλισμού αφού δεν ήταν περιορισμένα στις TDP-43 πρωτεϊνοπάθειες. Υπάρχει ωστόσο η υποψία ότι η καταστροφή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού μετά τον θάνατο επηρεάζει τις τιμές της

TDP-43 επιδρώντας στην ικανότητα της να προσδένεται στο αντίσωμα λόγω της παρουσίας της αλβουμίνης και της IgG του αίματος [75].

Ακολούθως, έγιναν έρευνες για τα επίπεδα της TDP-43 στο πλάσμα τα οποία δεν έδειξαν ιδιαίτερα αποτελέσματα, με αρκετές μεθόδους να μην μπορούν να προσδιορίζουν τις τιμές αφού βρισκόταν κάτω από το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης. Κρίνεται αναγκαίο να προσδιοριστούν συγκεκριμένα οι παθολογικές μορφές τις πρωτεΐνης, καθώς το να είναι εφικτή η απομόνωση μόνο της πρωτεΐνης που πηγάει από τον εγκέφαλο και όχι το αίμα. Ο προσδιορισμός των συγκεκριμένων παθολογικών μορφών θα μπορούσε να γίνει μετά τον θάνατο ασθενών με FTD και ALS βοηθώντας έτσι στην ανακάλυψη νέων βιοδεικτών ειδικούς για τις TDP-43 πρωτεϊνοπάθειες. Μέχρι τότε η απλή γενετική μελέτη ή η εφαρμογή ανοσοχημικών τεχνικών φαίνεται να μην είναι πληροφοριακή [73].

- Γκρανουλίνη (GRN)

Η γκρανουλίνη είναι ένας αυξητικός παράγοντας που εμπλέκεται στην ρύθμιση πολλαπλών διαδικασιών συμπεριλαμβανομένου και της ογκογένεσης, της επούλωσης πληγών, της ανάπτυξης καθώς και φλεγμονωδών αντιδράσεων. Η ανακάλυψη ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο της γκρανουλίνης προκαλούν FTD αλλά και άλλες νευροεκφυλιστικές νόσους που οδηγούν σε άνοια, έχει αυξήσει το ενδιαφέρον για την χρήση της ως βιοδείκτη [76]. Η γκρανουλίνη στο CSF είναι ο μόνος επικυρωμένος βιοδείκτης που εμφανίζει μείωση σε ασθενείς με GRN μεταλλάξεις. Τα επίπεδά της συσχετίζονται σημαντικά με όλες τις υποομάδες FTLD εκτός των FTD-C9orf72 ασθενών. Έτσι, μπορεί να προσδιορίσει με αξιοπιστία φορείς μετάλλαξης GRN σε μία ομάδα ασθενών με άνοια [76], [77]. Η TDP-43, η γκρανουλίνη και η TAU έχουν προταθεί ως CSF βιοδείκτες, αλλά κανένας τους δεν έχει αποδειχθεί ειδικός για τη διαφοροποίηση ασθενών με σποραδική FTD από AD ασθενείς ή ασθενείς με άλλου είδους άνοια [71]. Η συγκέντρωση της γκρανουλίνης στον ορό συσχετίζεται με την παρουσία παθογόνου GRN μετάλλαξης, με τους ασθενείς αυτούς να εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης, βοηθώντας έτσι να γίνει και η διάκριση μεταξύ FTLD-TDP και FTLD-TAU ασθενών ($p < 0,05$) αλλά και η διάκριση FTD από AD ασθενείς και υγιείς ανθρώπους ($p < 0,02$). Τα επίπεδά της και στον ορό σχετίζονται σημαντικά με όλους τους FTLD υποτύπους, εκτός των FTD-C9orf72 ασθενών [69], [77], [78]. Ανάλυση συσχέτισης των επιπέδων γκρανουλίνης και NfL μεταξύ CSF και ορού έδειξαν ότι οι μετρήσεις των βιοδεικτών αυτών στον ορό επαρκούν για την ορθή κλινική διάγνωση. Ωστόσο, η συγκέντρωσή της δεν φαίνεται να αλλάζει στην πάροδο του χρόνου, και ως εκ τούτου, η έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων ή το πώς η ασθένεια θα εξελιχθεί, δεν μπορεί να προβλεφθεί [69].

Όλοι οι ασθενείς FTD ή ασυμπτωματικοί φορείς με GRN μεταλλάξεις «απώλειας λειτουργίας» χαρακτηρίζονται από σημαντικά μειωμένα επίπεδα GRN (περίπου 75% σε σχέση με flGRN) στο πλάσμα, σε σχέση με φορείς μη-GRN μεταλλάξεων και άτομα ελέγχου ($P < 0,001$), γεγονός που υποδηλώνει μια ανισορροπία του μεταβολισμού GRN στους ασθενείς αυτούς. Φαίνεται πως τα επίπεδα της GRN στο πλάσμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ένα αξιόπιστο και φθηνό εργαλείο για τον

εντοπισμό όλων των φορέων μετάλλαξης *GRN* σε FTD πληθυσμούς και ασυμπτωματικά άτομα σε κίνδυνο [79], [80].

- Ελαφριά αλυσίδα νευρονηματίων (NfL)

Η ελαφριά αλυσίδα των νευρονηματίων (NfL) είναι μια από τις τρεις υπομονάδες των νευρονηματίων, που αποτελούν συστατικά του νευρωνικού κυτταροσκελετού και είναι απαραίτητα για την επιμήκυνση των αξόνων, τη μεταφορά και τη σηματοδότηση [81], [82]. Οι άλλες δύο αλυσίδες είναι η μέση (NF-M) μήκους 145 kDa και η βαριά (NF-H) μήκους 200 kDa. Η απελευθέρωση των πρωτεϊνών αυτών στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό αποτελεί ένδειξη νευρολογικών νόσων και νευρωνικού θανάτου, πιο εκτεταμένα ωστόσο μελετάται η NfL [83]. Τα NfL απελευθερώνονται στο ENY και στο αίμα μετά από νευρωνική εκφύλιση. Αυξημένα επίπεδα έχουν παρατηρηθεί τόσο σε ασθενείς με αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) και κάποιους υποτύπους της FTD, που ομοιάζουν παθοφυσιολογικά, όσο και σε άλλες νόσους όπως η AD, η πολλαπλή σκλήρυνση ή ένας τραυματισμός στον εγκέφαλο [82].

Μια έρευνα μέτρησε τα επίπεδα των NfL σε ασθενείς FTD με μεταλλάξεις σε *GRN*, *MAPT*, *C9orf72* και ομάδα ελέγχου τόσο στο ENY όσο και στον ορό. Τα επίπεδα των NfL στο ENY σε ασθενείς ήταν περισσότερο από οκτώ φορές πιο υψηλά σε σχέση με τους προσυμπτωματικούς φορείς και τους υγιείς ($p < 0,001$) χωρίς να υπάρχει κάποια διαφορά μεταξύ των δύο τελευταίων. Οι ασθενείς με μεταλλάξεις στην *GRN* εμφάνιζαν υψηλότερα επίπεδα NfL στο ENY σε σχέση με τις άλλες ομάδες ασθενών ($p < 0,001$). Τα επίπεδα των NfL στον ορό ακολουθούσαν το ίδιο μοτίβο όπως και στο ENY με υψηλότερα επίπεδα σε ασθενείς σε σχέση με τους προσυμπτωματικούς φορείς και τους υγιείς και τους ασθενείς με *GRN* μεταλλάξεις να εμφανίζουν πάλι το ίδιο μοτίβο. Τέλος παρατηρήθηκε μια συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των NfL και της πρόγνωσης επιβίωσης. Υψηλά επίπεδα NfL μεταφράζονται σαν κακή πρόγνωση επιβίωσης (HR:2,21 $p = 0,004$) [81].

Μια διαφορετική μελέτη, παρατήρησαν υψηλότερες τιμές NfL στον ορό στους FTD ασθενείς (bvFTD, PNFA και SD) σε σχέση με τους υγιείς ($p < 0,001$), με ευαισθησία 84% και ειδικότητα 96%. Οι FTD-MND εμφάνιζαν υψηλότερες μέσες συγκεντρώσεις σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες, ωστόσο η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ίσως λόγω του μικρού μεγέθους αυτών των ασθενών. Εντός των υποτύπων FTD υπήρχε μια τάση των ασθενών με πιθανή TDP-43 παθολογία, SD και FTD-MND κλινικά και με μεταλλάξεις στα *GRN*, *C9orf72*, να έχουν αυξημένα επίπεδα σε σχέση με τους FTD-TAU, *MAPT* μεταλλάξεις, εαν και σε όλους υπήρχε σημαντική μεταβλητότητα [49]. Τέλος μια ακόμα πιο πρόσφατη μελέτη παρουσίασε σημαντικά στοιχεία σύμφωνα με τα οποία σε PPA ασθενείς τα επίπεδα στο αίμα των NfL μπορούν να διακρίνουν LPA από PNFA και SD ασθενείς, με ευαισθησία 81% και ειδικότητα 67%, με τους πρώτους να παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα με την πρόοδο της νόσου, σε σχέση με τους υπόλοιπους [82].

- Γονοτύπηση της Απολιποπρωτεΐνης E (ApoE)

Η ApoE είναι ο πιο ισχυρός γενετικός παράγοντας που σχετίζεται με κίνδυνο εμφάνισης Alzheimer's. Τρία είναι τα αλλήλια της απολιποπρωτεΐνης E με το πιο κοινό να είναι το E3 ενώ το E4 σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης AD είτε σε μικρότερη είτε σε μεγαλύτερη ηλικία. Από την άλλη το E2 αλλήλιο πιθανά σχετίζεται με χαμηλότερο ρίσκο ή καθυστερημένη εμφάνιση της νόσου.

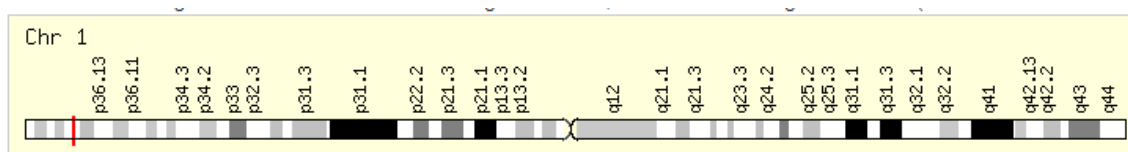
Διάφορες έρευνες υποστηρίζουν ότι ο αυξημένος κίνδυνος που προκαλείται από το ApoE4 οφείλεται κυρίως στην αυξημένη και επιταχυνόμενη εγκεφαλική Αβ παθολογία. Πιο συγκεκριμένα το ApoE4 φαίνεται να επιταχύνει την αρχική εμφάνιση της Αβ παθολογίας, πιθανότατα μειώνοντας την απομάκρυνση του Αβ και αυξάνοντας την συσσώματάσή του [85], [86].

Μια πρόσφατη έρευνα ωστόσο υποστηρίζει ότι ο γονότυπος της ApoE4 φαίνεται να σχετίζεται με μικρότερη ηλικία εμφάνισης της FTD με παθολογία TAU, αυξάνοντας την νευροεκφύλιση ανεξάρτητα με την Αβ παθολογία. Ειδικότερα ο γονότυπος αυτός φαίνεται να δρα μέσω ενός τοξικού μηχανισμού απόκτησης λειτουργίας που επιδεινώνει ή τροποποιεί την παθολογία TAU, τη φλεγμονή των νευρικών κυττάρων, την αυτοφαγία και την ενεργοποίηση των αστροκυττάρων. Αυτά ήταν κάποια από τα ευρήματα σε μοντέλα μυών με FTD, σε νευροπαθολογικές περιπτώσεις TAUπαθειών καθώς και κλινικά ευρήματα από μια ομάδα AD. Τα δεδομένα της συγκεκριμένης έρευνας υποστηρίζουν τα παραπάνω καθώς φάνηκε ότι η ApoE4 επηρεάζει τον κλινικό φαινότυπο της FTLD-TAU, ανεξάρτητα από την συνύπαρξη της Αβ παθολογίας ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζει, σε άλλες περιπτώσεις, όπως TDP(+)FTD. Αυτή η ειδικότητα εξηγεί και το γιατί αυτή η σύνδεση δεν είχε παρατηρηθεί νωρίτερα από τους ερευνητές [87].

3. TARDBP ΓΟΝΙΔΙΟ

3.1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Το γονίδιο *TARDBP*, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 (1p36.22) (εικόνα 3.1.α) αποτελείται από 6 εξόνια και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TDP-43, και έχει έως και 11 ισομορφές σε διάφορους οργανισμούς (6 στον άνθρωπο). Είναι μια ριβονουκλεοπρωτεΐνη, που περιεγράφηκε πρώτη φορά λόγω της πρόσδεσής της στο ρυθμιστικό στοιχείο TAR στον HIV-1 ιό, στις μακρές τερματικές επαναλήψεις, επηρεάζοντας τελικά την έκφραση των γονιδίων του ιού [88]. Αργότερα έγιναν γνωστές και άλλες δράσεις της που περιλαμβάνουν τη λειτουργία ως μεταγραφικός καταστολέας, πρόσδεση τόσο σε DNA όσο και σε RNA, ρύθμιση του ματίσματος καθώς και μεταβολισμό του RNA κατά την διάρκεια απόκρισης σε στρες. Σημαντική επίσης είναι η συμμετοχή της στην εμφάνιση νευροεκφυλιστικών νόσων [89], [90]. Ειδικότερα αναγνωρίζει μονόκλωνες DNA/RNA αλληλουχίες με πιο συχνές τις δινουκλεοτιδικές επαναλήψεις GT/GU και δρα κυρίως στο μάτισμα των εξονίων αφού προσδένεται στις 3' θέσεις ματίσματος. [91]



3.1.α. Με το κόκκινο εντοπίζεται η θέση του *TARDBP* στο χρωμόσωμα 1 (1p36.22) [NCBI].

Η πρόσδεση της TDP-43, ως ομοδιμερές, σε μη κωδικά RNAs, σε 3' UTRs περιοχές των mRNAs, σε ιντρόνια και σε υποκινητές γονιδίων (όπως των SP-10 και CDK6), την κάνουν να κατέχει ρυθμιστικό ρόλο στην σταθερότητα του RNA, στο μάτισμα των μεταγράφων και στην τελική γονιδιακή έκφραση [92]–[94]. Η πρόσδεσή της στις διαδοχικά επαναλαμβανόμενες UG αλληλουχίες γονιδίων (~6.000) που συμμετέχουν στη νευρωνική ανάπτυξη και τη λειτουργία των συνάψεων, οδηγούν την TDP-43 να εμπλέκεται άμεσα στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Αυτός της ο ρόλος καθιστά σίγουρο πως η απώλεια λειτουργίας της δεν συνοδεύεται παρά από επιπτώσεις στην κυτταρική λειτουργία και βιωσιμότητα [92], [93], [95], αλλά και πως η υπερέκφρασή της (είτε ως φυσιολογική είτε ως μεταλλαγμένη) αποβαίνει τοξική (περισσότερο ως μεταλλαγμένη) για τα κύτταρα [92], [96], [97] (εικ. 3.7). Η TDP-43 έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει τα επίπεδα τεσσάρων miRNAs: let-7b, miR-663, miR-574-5p και miR-558, συνδεδεμένη με αυτά ή τα πρόδρομα στοιχεία τους. Η απομάκρυνσή της από τον πυρήνα του κυττάρου προκαλεί ειδική ρύθμιση προς τα κάτω του let-7b, επηρεάζοντας κατ' επέκταση τα επίπεδα έκφρασης διαφόρων μεταγράφων, δυνητικά εμπλεκόμενων σε νευροεκφυλισμό ή στη δημιουργία συνάψεων, όπως η DYRK1A (Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A- μια κινάση της οποίας η αυξημένη έκφραση συσχετίζεται με λειτουργικά ελαττώματα των νευρώνων), η STX3 (συνταξίνη 3- σημαντική για την νευρογένεση) και η VAMP3 (Vesicle Associated

Membrane Protein 3- η οποία μπορεί να υποκαταστήσει την συναπτομπρεβίνη στη συναπτική εξωκύττωση), αλλά και ειδική ρύθμιση προς τα κάτω του ενζύμου EPHX1 (εποξειδική υδρολάση 1-ένζυμο αποτοξίνωσης, που λειτουργεί για τη ρύθμιση του οξειδωτικού στρες) [98].

Πιο συγκεκριμένα η πρωτεΐνη TDP-43 φαίνεται να εμπλέκεται και στην παθογένεια νευροεκφυλιστικών νόσων όπως το ALS και την FTD αποτελώντας κύριο συστατικό των πρωτεϊνικών (ουβικιτίνης θετικών) συσσωματωμάτων που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα αλλά και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις όπως Parkinson's και Huntington's ενώ φυσιολογικά εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων [91]. Αποδείχθηκε έτσι εξαιρετικά ενδιαφέρουσα η κατανόηση των μηχανισμών που ελλοχεύουν πίσω από την πρωτεϊνοπάθεια της TDP-43 σαν ένα κοινό στοιχείο μεταξύ των νευροεκφυλιστικών νόσων και άρα σαν ένας πιθανός κοινός φαρμακευτικός στόχος για αυτές [99]. Ειδικότερα φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση αρκετών μονοσυμπτωματικών μορφών της κυστικής ίνωσης που οφείλονται σε παθολογική απαλοιφή του εξονίου 9 από το ώριμο mRNA του γονιδίου *CFTR*. Εκτός από τον ρόλο του στη μεταγραφή και στη ρύθμιση του ματίσματος, διάφορα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι μπορεί να εμπλέκεται και σε άλλες κυτταρικές διαδικασίες όπως βιογένεση των microRNA, απόπτωση και κυτταρική διαίρεση [100].

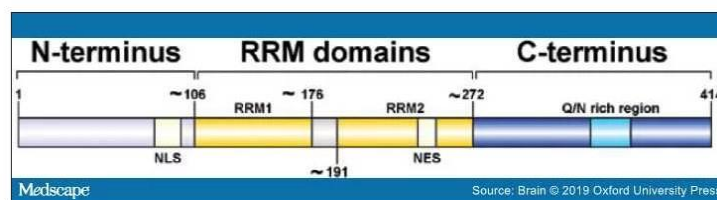
3.2 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ TDP-43

Η TDP-43 είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη (46 kDa) 414 αμινοξέων, με δύο υπερσυντηρημένα μοτίβα αναγνώρισης RNA (RRM1, RRM2) τα οποία πλαισιώνονται από το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο της (N-terminal και C-terminal, αντίστοιχα) και δεσμεύουν RNA και πολυάριθμες άλλες πρωτεΐνες, σχηματίζοντας πολλαπλά πρωτεϊνικά-RNA σύμπλοκα υψηλού μοριακού βάρους. Το καρβοξυτελικό της άκρο περιέχει μια περιοχή πλούσια σε γλυκίνη, η οποία φαίνεται να μεσολαβεί σε αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών και το καρβοξυτελικό άκρο περιέχει δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signals – NLS) και ένα σήμα ελέγχου εξαγωγής από τον πυρήνα (NES) τα οποία ελέγχουν την μετακίνηση από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα [92], [93], [101].

Η TDP-43 είναι μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς και είναι εξελικτικά συντηρημένη ανάμεσα στα διάφορα είδη. Προσδένεται τόσο στο RNA όσο και στο DNA ενώ η πρωτοταγής αμινοξική δομή της προσομοιάζει μια τυπική hnRNP (heterogenous ribonucleoprotein particle) που παρουσιάζει ειδικότητα για την πρόσδεση μικροδορυφορικών περιοχών (GU/GT)_n. Οι hnRNPs είναι σύμπλοκα RNA και πρωτεΐνης που εντοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου κατά την διάρκεια της μεταγραφής και των μεταμεταγραφικών τροποποιήσεων. Η πλούσια σε γλυκίνη καρβοξυτελική περιοχή περιέχει την πλειονότητα των μεταλλάξεων που παρατηρούνται στους ασθενείς με ALS. Η παρουσία των RRM's περιοχών είναι χαρακτηριστικό των hnRNP πρωτεϊνών και γενικά είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης – πρωτεΐνης [91], [102].

Οι RNA και DNA ειδικότητες αυτής της πρωτεΐνης φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο σχεδόν σε όλες τις λειτουργίες της που έχουν περιγραφεί μέχρι τώρα. Πιο συγκεκριμένα προηγούμενες έρευνες έχουν αποδείξει την ικανότητα της να προσδεθεί ειδικά σε μονόκλωνα επαναλαμβανόμενα μοτίβα UG ή TG [89], [103]. Για την επίτευξη αυτής της πρόσδεσης είναι αναγκαία τουλάχιστον πέντε επαναλαμβανόμενα δινουκλεοτίδια, ενώ η ειδικότητα αυξάνεται όσο αυξάνεται και οι επαναλήψεις [103]. Η περιοχή RRM-1 είναι εξελικτικά συντηρημένη ειδικά στις περιοχές RNP-1 και RNP-2 (Ribonucleoprotein Domain) οι οποίες είναι υπεύθυνες για την πρόσδεση στο RNA, οπότε η μεταλλαγή των αμινοξικών κατάλοιπων φαινολαλανίνης σε σημεία “κλειδιά” σε κατάλοιπα λευκίνης οδηγεί σε πλήρη απώλεια πρόσδεσης στο RNA [89].

Λίγα είναι γνωστά για την αμινοτελική περιοχή, η οποία διαφέρει σε μήκος ανάμεσα στα διάφορα είδη, από 105 έως 174 κατάλοιπα στο *C.elegans*, και φαίνεται να είναι πιο ήπια συντηρημένη σε σχέση με τις RRM περιοχές. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα συντηρημένων μοτίβων, είναι στην αμινοτελική περιοχή, ένα κομμάτι 15 αμινοξικών κατάλοιπων πλούσιο σε όξινα αμινοξέα που εντοπίζεται στα κατάλοιπα 9-23 στην ανθρώπινη πρωτεΐνη. Η αμινοτελική περιοχή φαίνεται να περιέχει μια όμοια με ουβικιτίνη αναδίπλωση με έξι β-πτυχωτές επιφάνειες και μια α-έλικα ενώ φαίνεται να ρυθμίζει την αυτορρύθμιση της TDP-43. Ο διμερισμός ενώ φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στο μάτισμα του mRNA υποστηρίζεται ότι μπορεί να είναι και η αιτία που δημιουργούνται τα συσσωματώματα. Επιπλέον περαιτέρω έρευνες υποστηρίζουν ότι η λειτουργική δομή της TDP-43 είναι πιθανόν ένα ομοδιμερές και τα πρώτα 10 αμινοξικά κατάλοιπα της αμινοτελικής περιοχής φαίνεται να ρυθμίζουν τον ομοδιμερισμό του. Άλλη μια περιοχή της οποίας η δράση παραμένει άγνωστη είναι η RRM2 η οποία παρόλο που υπάρχουν κάποιες ενδείξεις για την συμμετοχή της στην πρόσδεση στο RNA, είναι πιθανό να περιέχει ένα δυνατό μήνυμα για την έξοδο από τον πυρήνα (εικόνα 3.2.α.) [89], [104]–[106].



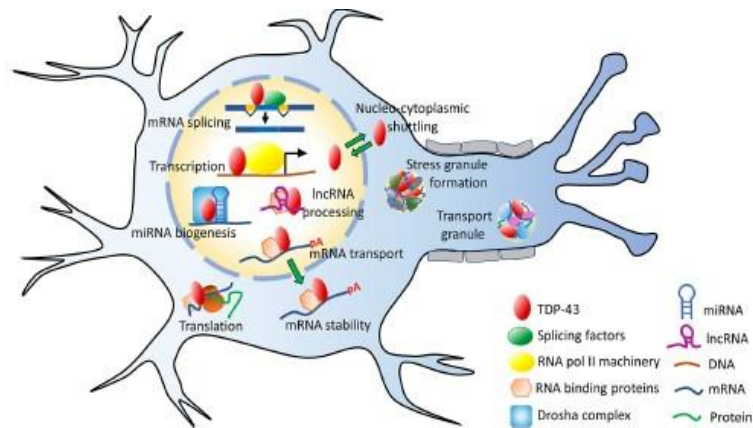
3.2.α. Δομή πρωτεΐνης TDP-43 [105].

Η καρβοξυτελική περιοχή ελέγχει τις αλληλοεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης καθώς και τη διαλυτότητα της TDP-43, και είναι υψηλά συντηρημένη και πλούσια σε γλυκίνη, γλουταμίνη και ασπαραγίνη και πολικά κατάλοιπα ενώ έχει ελάχιστα αλειφατικά και φορτισμένα κατάλοιπα. Έχει δυναμική και ευέλικτη δομή με αποτέλεσμα να είναι ικανή να προσαρμοστεί σε διαφορετικές δευτεροταγείς δομές με α-έλικες και β-πτυχωτές επιφάνειες, έτσι φαίνεται αυτή η περιοχή να ομοιάζει τις prion-πρωτεΐνες. Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την TDP-43 προσφέρει

απαραίτητη γνώση για τις λειτουργίες της στην γονιδιακή μεταγραφή, στην πρόσδεση RNA αλλά και στο σχηματισμό κοκκίων λόγω στρες. Η καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης μπορεί να προσδέσει αρκετές πρωτεΐνες της ετερογενούς οικογένειας hnRNP όπως τις hnRNP A1/A2/B1 [107]. Πρόσφατες αναλύσεις πρωτεομικής επιβεβαίωσαν και επέκτειναν τις αλληλοεπιδράσεις της TDP-43, πλέον περιλαμβάνει περισσότερα μέλη της hnRNP οικογένειας καθώς και παράγοντες ματίσματος [105], [108]. Αναλύσεις λειτουργικότητας έδειξαν ότι τα κατάλοιπα 321-366 είναι απαραίτητα για TDP-43/hnRNP δραστηριότητα [109]. Παρόλο που η TDP-43 φυσιολογικά και λειτουργικά σχετίζεται με τις hnRNPs, η παθολογική ενσωμάτωσή της σε πρωτεϊνικά συσσωματώματα αποτελεί μοναδικό χαρακτηριστικό της TDP-43 καθώς δεν παρατηρήθηκε συγκέντρωση άλλων hnRNPs στα θετικά σε TDP-43 νευρωνικά έγκλειστα σε εγκεφαλικό ιστό ασθενών με FTLD-TDP [110]. Η TDP-43 προσδένεται ενεργά στις 3' αμετάφραστες περιοχές χιλιάδων mRNA μεταγράφων ακόμα και στο δικό του mRNA σαν αυτορυθμιστικός μηχανισμός για τον έλεγχο της κυτταρικής του συγκέντρωσης και πιθανόν και της διαλυτότητάς του [106].

Η TDP-43 έχει πληθώρα λειτουργιών και εμπλέκεται σε διάφορα βήματα του RNA μεταβολισμού όπως, μεταγραφή, mRNA μεταφορά, μετάφραση, σταθεροποίηση, επεξεργασία lncRNA και miRNA κ.α. Μετά από πειράματα ανοσοχημικής καθήλωσης έγινε γνωστό ότι πάνω από 6.000 mRNA στόχοι αλληλοεπιδρούν με την TDP-43, το οποίο πρακτικά μεταφράζεται σαν το 30% του συνολικού μεταγραφώματος. Ενώ προσδένεται στις πλούσιες σε UG περιοχές του RNA κυρίως προσδένεται στις 3' αμετάφραστες περιοχές των mRNA/premRNA όταν βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Πιο συγκεκριμένα εμπλέκεται στην μεταγραφή και μάτισμα του mRNA, δεν υπάρχει στην ετεροχρωματίνη, αλλά εντοπίζεται σε περιοχές ματίσματος και μεταγραφής, ρυθμίζοντας το πρότυπο ματίσματος σημαντικών γονιδίων όπως του *CFTR*, *TARDBP*, *FUS*, *SNCA* (α-συνουκλείνη), *HTT* και *APP* (πρώιμη πρωτεΐνη αμυλοειδούς) με αποτέλεσμα η πυρηνική έλλειψη της να οδηγεί σε βλάβες του μηχανισμού ματίσματος [105], [106].

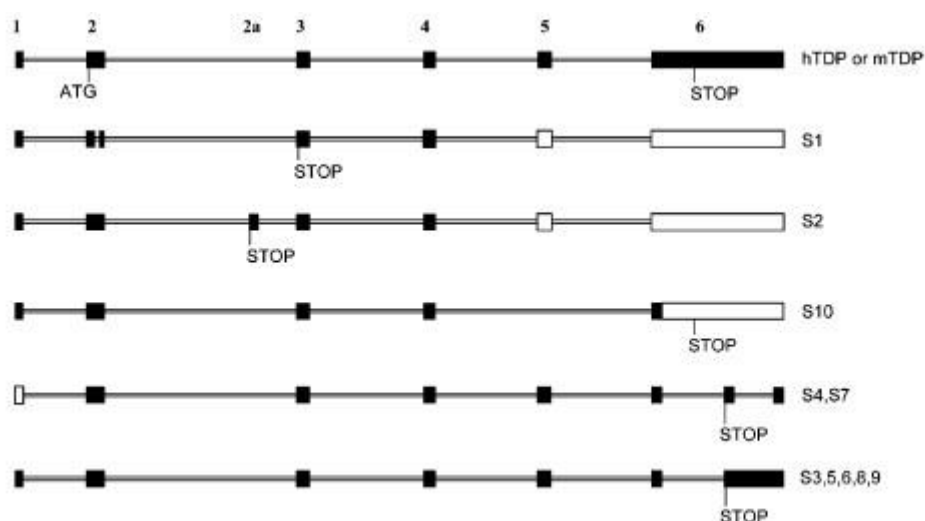
Αντίστοιχα υπερβολικά μεγάλη ποσότητα μπορεί να οδηγήσει σε μη-λειτουργικά σύμπλοκα λόγω μειωμένης προσφοράς των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλοεπιδρά, πράγμα που καθιστά την ποσότητα της TDP-43 καθοριστική για την σωστή λειτουργία των νευρικών κυττάρων. Συμμετέχει επίσης στην ωρίμανση και σταθερότητα του mRNA, συμπεριλαμβανομένου και του δικού της, προσδενόμενη στην 3' αμετάφραστη περιοχή των mRNA αυτών επηρεάζοντας τον χρόνο ημιζωής είτε θετικά (συνοπτικά οι λειτουργίες στην εικόνα 3.2.β.) π.χ. μικρή αλυσίδα των νευρονηματίων είτε αρνητικά όπως στη γκρανουλίνη. Τέλος φαίνεται να δρα και στην μεταφορά και μετάφραση του mRNA, με ορισμένα μεταλλάξεις να καταστρέφουν την μεταφορά των κοκκίων RNP στους ασθενείς με ALS [106].



3.2.β.Λειτουργίες της TDP-43, εκτελεί αρκετές διαδικασίες σχετιζόμενες με το mRNA στον πυρήνα όπως μεταγραφή, μάτισμα, διατήρηση της σταθερότητας του RNA, επεξεργασία miRNA και lncRNA. Είναι κυρίως πυρηνική πρωτεΐνη ωστόσο εντοπίζεται και στο κυτταρόπλασμα [106].

3.3. ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ TDP-43

Το γονίδιο που κωδικοποιεί της TDP-43 είναι συντηρημένο στο άνθρωπο, στο μυ, στη *Drosophila melanogaster* καθώς και στο *Caenorhabditis elegans*. Σύγκριση των αλληλουχιών σε αυτές τις τέσσερις τάξεις εμφανίζουν μια εξαιρετικά χαμηλή συχνότητα απόκλισης από την βασική αλληλουχία κάτι που υποδηλώνει την σημαντικότητα των λειτουργιών που επιτελεί αυτό το γονίδιο στους διάφορους οργανισμούς. Συνδυασμένη ανάλυση βάσεων δεδομένων των cDNA αποκάλυψαν ότι τα πρώιμα μετάγραφα του *TARDBP* γονιδίου υπόκεινται εναλλακτικό μάτισμα στα θηλαστικά έως και σε 11 διαφορετικά μετάγραφα (εικόνα 3.3.α.), και συγκεκριμένα στον άνθρωπο είναι 6 με εξαίρεση το πλήρους μήκους προϊόν (X1-X6) με το πλήρους μήκους να κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TDP-43 (εικόνα 3.3.α.). Οκτώ από τα οποία περιλαμβάνουν την χρήση τεσσάρων από τις 5'- θέσεις δότη και 3'-θέση δέκτη, οι οποίες εντοπίζονται στο τελευταίο εξόνιο του mRNA TDP-43 [111].



3.3.α. *Εναλλακτικές ισομορφές των TARDBP-cDNAs. Το mTDP(mammalian)/hTDP(human) αποτελείται από έξι εξόνια. Το RRM1 περιλαμβάνει τα εξόνια 3 και 4 ενώ το RRM2 περιλαμβάνει τα εξόνια 5 και 6 ενώ η πλούσια σε γλυκίνη περιοχή βρίσκεται εντός του 6 εξονίου. Το κωδικόνιο έναρξης είναι κοινό για όλες τις ισομορφές ενώ τα κωδικόνια τερματισμού βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις. Τα ανοιχτά ορθογώνια είναι περιοχές που δεν είναι γνωστές οι αλληλουχίες στην βάση δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη έρευνα [111].*

Παρόλο που δεν έχει γίνει κάποια έρευνα που να εντοπίσει αποτελεσματικά όλες αυτές τις πιθανές ισομορφές, στον άνθρωπο πρέπει να τονιστεί ότι αναλύσεις τόσο Western Blot όσο και ανοσοϊστοχημείας που εφαρμόστηκαν σε ποικιλία ανθρώπινων κυτταρικών σειρών και φυσιολογικών ιστών, τόσο με μονοκλωνικά όσο και με πολυκλωνικά αντισώματα, εντοπίζουν κυρίως την ύπαρξη της πλήρους μήκους πρωτεΐνης στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Η TDP-43 μπορεί να έχει υποστεί διάφορες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις μέσω φωσφορυλιώσεων, ουβικιτινιλιώσεων κ.α. ωστόσο μέχρι να επιβεβαιώσουν άλλες έρευνες την παρουσία και άλλων ισομορφών, μπορεί να υποθεθεί ότι οι μορφές αυτές είτε αποτελούν μειονότητα είτε ότι μπορεί να είναι περιορισμένες σε συγκεκριμένα κύτταρα ή ιστούς ή ακόμα και σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια [112].

Αξίζει ωστόσο να αναφερθεί ότι τρεις διαφορετικές ισομορφές της TDP-43 εντοπίστηκαν σε εγκεφαλικό ιστό και σε ιστό νωτιαίου μυελού. Εκτός από την πλήρη σε μήκος πρωτεΐνη, μια ισομορφή φαίνεται να περιέχει μια πολύ μικρή έλλειψη έξι νουκλεοτιδίων κοντά στο τέλος την καρβοξυτελικής περιοχής, ενώ η άλλη παρουσιάζει πολλαπλές ελλείψεις τόσο μέσα στην πρωτεΐνη, η οποία καταστρέφει την RRM περιοχή και απομακρύνει την καρβοξυτελική ουρά. Δεν υπάρχουν ωστόσο πληροφορίες για την λειτουργική σημαντικότητα των ισομορφών αυτών και πως αυτές λειτουργούν και εκφράζονται ως πρωτεΐνες στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Πολλά δεδομένα υποστηρίζουν ότι εντοπίζονται δύο άλλες ισομορφές της TDP-43, η μια 35 και η άλλη 25 kDa οι οποίες παράγονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες υπό την έλλειψη δραστηριότητας των κασπασών. Αυτές οι ισομορφές της καρβοξυτελικής περιοχής μπορεί να οφείλονται σε εναλλακτικό μάτισμα, ενός κωδικονίου έναρξης, που ρυθμίζεται θετικά στο νωτιαίο μυελό ασθενών με ALS. Αυτό το μετάγραφο έχει 91 διαγραμμένες βάσεις στο εξόνιο 2 και παράγει ένα προϊόν που κωδικοποιεί μια 35 kDa πρωτεΐνη. Σε ασθενείς με ALS, έκτοπη έκφραση αυτού του μεταγράφου οδηγεί στον σχηματισμό κυτταροπλασματικών έγκλειστων και μειώνει την κυτταρική επιβίωση [104], [113].

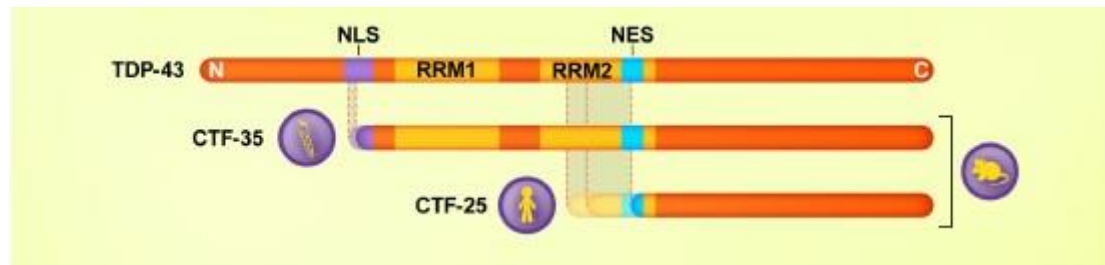
3.4. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΤΗΣ TDP-43 ΣΕ ALS ΚΑΙ FTLD-TDP

Συσσωματώματα της φυσιολογικής TDP-43 εντοπίζονται τόσο σε σποραδικές όσο και σε οικογενείς μορφές της νόσου του κινητικού νευρώνα (ALS). Έχουν προσδιοριστεί περίπου 30 γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην εμφάνιση της, με το 60% όσων έχουν περιγραφεί να εμφανίζουν παράλληλα την παρουσία συσσωματωμάτων της TDP-43 σε δείγματα ασθενών, κυτταρικές σειρές και μοντέλα μυών

με ALS. Πιο συγκεκριμένα η μεταλλαγμένη TDP-43 φαίνεται να εμπλέκεται στο 3% της οικογενούς μορφής του ALS ενώ στο 1,5% σε σποραδικές μορφές, στο υπόλοιπο 95% των ασθενών που υπάρχουν συσσωματώματα TDP-43 δεν υπάρχουν μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη. Αυτά τα συσσωματώματα αποτελούνται από λάθος φωσφορυλιωμένη και ουβικιτινιλιωμένη, πλήρους μήκους TDP-43 καθώς επίσης και 35kDa και 25kDa καρβοξυτελικά τμήματα της πρωτεΐνης (εικόνα 3.4.α.). Επίσης υποστηρίζεται ότι η παρουσία ουβικιτινιλιωμένων και φωσφορυλιωμένων συσσωματωμάτων TDP-43 που παρατηρείται στους εκφυλισμένους νευρώνες μπορεί να είναι το εναρκτήριο σήμα σχεδόν για όλες τις παθολογικές αλλαγές που παρατηρούνται στους ασθενείς με ALS και πιθανόν να είναι ανάλογη της συσσωρευμένης TDP-43 [105].

Στους ασθενείς με FTLT και ALS, οι επιζώντες νευρώνες με παθολογία TDP-43 τυπικά εμφανίζουν συσσώρευση της TDP-43 σε κυτταροπλασματικά έγκλειστα, και απομάκρυνση της πυρηνικής TDP-43 υποδηλώνοντας ότι η παθογένεση μπορεί να προχωρήσει είτε με απώλεια φυσιολογικής λειτουργίας είτε με τοξική νέα λειτουργία. Η μορφολογία των έγκλειστων μπορεί να ποικίλλει από νευρικά κυτταροπλασματικά έγκλειστα με στρογγυλά ή με μορφή σαν «κουβάρι» και από μικρούς ή μεγάλους σε μήκος δυστροφικούς νευρίτες, έως και σπάνια ενδοπυρηνικά ή γλοιακά έγκλειστα. Φαίνεται τόσο το FTLT-TDP όσο και το ALS εμφανίζουν ποικίλους μηχανισμούς παθογένεσης της νόσου που ωστόσο εμπλέκουν την ίδια πρωτεΐνη [106], [113].

Ανοσοαποτύπωση με την χρήση αντισωμάτων ειδικών για την καρβοξυτελική περιοχή της TDP-43 εντοπίζουν ένα ή πολλαπλά κομμάτια της καρβοξυτελικής περιοχής μεγέθους περίπου 25kDa στον προμετωπιαίο και στους κροταφικούς λοβούς ασθενών με ALS και FTLT, αυτά τα τμήματα χαρακτηρίζονται σαν CTF-25 (C-terminal fragments) ωστόσο έχουν εντοπιστεί και CTF 15 και 35 kDa σε νευρικό ιστό σε αυτές τις περιπτώσεις αν και όχι τόσο συχνά. Το CTF-25 προκύπτει από πέψη στο κατάλοιπο αργινίνης στην θέση 208 ή ασπαραγίνης στις θέσεις 219 ή 247 ενώ 32-32 kDa CTF προκύπτει από πέψη στο κατάλοιπο 89 ενώ υπάρχουν και πολλές άλλες θέσεις κοπής. Το αμινοτελικό τμήμα που είναι αποτέλεσμα της κοπής είναι δύσκολο να προσδιοριστεί πειραματικά ωστόσο φαίνεται μετά από δράση της ασπαραγινυλ-πεπτιδάσης να προκύπτουν κομμάτια 32-35 kDa. Οι κασπάσες 3,4 και 7 φαίνεται να εμφανίζουν πολλαπλές θέσεις κοπής στην πρωτεΐνη TDP-43 με την κασπάση 3 συγκεκριμένα (η οποία μαζί με την κασπάση 9 ενεργοποιούνται κάτω από συνθήκες κυτταρικού στρες) να περιέχει τρεις θέσεις αναγνώρισης που αντιστοιχούν στην δημιουργία των CTFs 42,35 και 25 kDa [113].



3.4.α. Σχηματικό διάγραμμα των κύριων CTFs της TDP-43, των θέσεων κοπής και των λειτουργικών περιοχών αυτών καθώς και σε ποια πειραματικά μοντέλα εντοπίζονται πιο συχνά. Το CTF-35 εντοπίζεται πιο συχνά σε κυτταρικές σειρές και σε in-vitro δοκιμασίες πρωτεϊνοπαθειών TDP-43, αυτό το θραύσμα σπάνια παρατηρείται σε εγκεφαλικό ιστό. Στις περιπτώσεις ALS και FTLD-TDP πιο κοινό είναι το CTF-25. Σε μοντέλα μύων παρουσιάζονται χαμηλά επίπεδα και των δύο CTFs καταλήγοντας έτσι στο συμπέρασμα ότι η διάσπαση ποικίλλει σύμφωνα με το κυτταρικό είδος και το ζωικό μοντέλο που μελετάται εκάστοτε [113].

Η TDP-43 εμφανίζει έναν αριθμό μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως φωσφορυλίωση, ουβικιτινίωση, ακτετυλίωση, ADP-ριβοζυλίωση καθώς και οξείδωση κυστεΐνης. Κάποιοι από τους ανωτέρου μηχανισμούς οδηγούν στην δημιουργία συσσωματωμάτων στις περιπτώσεις των ALS και FTLD. Η φωσφορυλίωση της πλήρους μήκους TDP-43 αποτελεί παθολογικό χαρακτηριστικό της ALS και σχετίζεται με κυτταροπλασματική συσσώρευση της. Στις περιπτώσεις του ALS και FTLD παθολογική TDP-43 εντοπίζεται σε ουβικιτινιωμένη κατάσταση ενώ μεταλλάξεις στις θέσεις ουβικιτινίωσης μειώνουν την συσσώρευση της TDP-43. Η ακτετυλίωση προωθεί την συσσώρευση αδιάλυτων και υπερφωσφορυλιωμένων συσσωματωμάτων επηρεάζοντας την ικανότητα πρόσδεσης RNA και τις μιτοχονδριακές λειτουργίες. Το οξειδωτικό στρες ρυθμίζει την οξείδωση των κυστεϊνών και προωθεί τον ολιγομερισμό και την συσσώρευση μέσω της παθογενετικής συγκρότησης του RRM1, δημιουργία διμερών, τετραμερισμό. Τέλος, η πολύ-ADP-ριβοζυλίωση, η οποία είναι μια μεταμεταφραστική τροποποίηση που ενεργοποιείται στις περιοχές βλαβών του DNA μέσω του μηχανισμού του DDR (DNA Damage Response), προάγει σχηματισμό κοκκίων λόγω στρες [106], [114].

Ο έκτοπος μιτοχονδριακός εντοπισμός της TDP-43, που είναι αποτέλεσμα της μη-ελεγχόμενης μετακίνησης της TDP-43 από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, και της συσσώρευσής της σε αυτή την περιοχή έχει ως αποτέλεσμα την δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Η έκφραση της TDP-43, πιο συγκεκριμένα οι μεταλλάξεις και οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, σχετίζεται επίσης με την λανθασμένη ρύθμιση της αυτοφαγίας και της λειτουργίας του πρωτεασώματος. Επιπλέον οι παθολογικές μεταλλάξεις ή οι τροποποιήσεις της διαταράσσουν την διαδικασία ενδοκυττάρωσης ενδεχομένως μεταβάλλοντας την έκφραση ενδοκυτταρικών συστατικών κλειδιών, επίσης τα συσσωματώματα της TDP-43 έχουν προσδιοριστεί ως αναστολείς του ενδολυσσωστικού μονοπατιού. Τέλος η TDP-43 αλληλοεπιδρά με την πρωτεΐνη αναδιαμόρφωσης χρωματίνης CHD2 και διαταράσσει τη δυναμική της χρωματίνης που εμποδίζει τελικά την έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ. Αποτελέσματα ερευνών σε πρότυπα νευρωνικά κύτταρα υποστηρίζουν ότι μπορεί να υπάρξει

διακυτταρικός πολλαπλασιασμός συσσωματωμάτων της TDP-43, τα οποία είναι ανθεκτικά σε απορρυπαντικά και θυμίζουν τις prion-πρωτεΐνες [106].

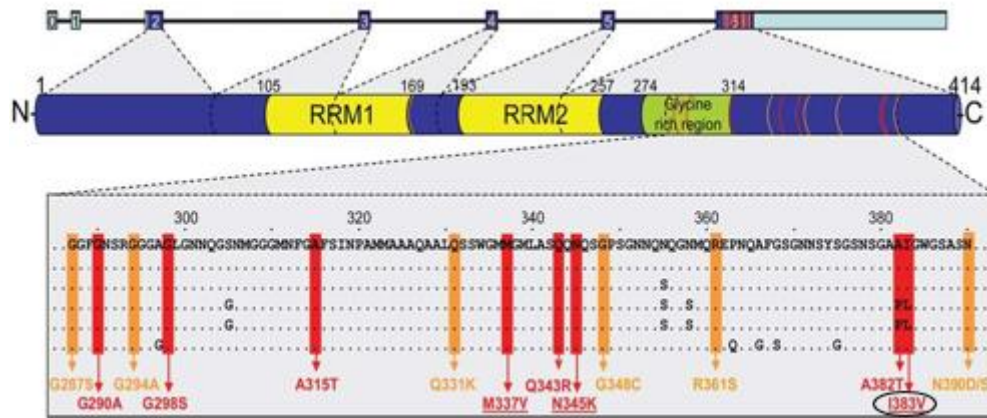
3.5. ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ p.Ile383Val ΣΤΟ *TARDBP* ΓΟΝΙΔΙΟ

Στην παρούσα εργασία διερευνάται η μετάλλαξη p.Ile383Val, που οφείλεται στην αλλαγή μιας μόνο βάσης στο εξόνιο 6 στην βάση 9.935 του γονιδίου του *TARDBP* από A σε G (rs80356740) (c.1147A>G) (GeneBank NM_007375.3)(NP 031401.1 Protein Data Bank), μια ισολευκίνη μετατρέπεται σε βαλίνη στο κωδικόνιο 383 στην πρωτεΐνη το οποίο εντοπίζεται στην καρβοξυτελική περιοχή της (εικόνα 3.5.α.).

Προϋπάρχουν τρεις έρευνες που αποκαλύπτουν την παρουσία αυτής της μεταλλαγής σε ασθενείς με ALS, αρχικά από τους Rutherford et.al 2008, οι οποίοι προσδιόρισαν τρεις διαφορετικές μεταλλάξεις στο εξόνιο 6 του γονιδίου *TARDBP* σε υψηλά συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα της καρβοξυτελικής περιοχής, ενώ επίσης φάνηκε και αυξημένη δραστηριότητα κασπασών και δημιουργία ειδικότερα των CTF 25 kDa. Αυτές οι αλλαγές είναι p.M337V, p.N345K και την p.I383V και υποστηρίζεται ότι αποτελούν αιτία πρόκλησης του ALS, καθώς οδηγούν σε συσσώρευση μικρών καρβοξυτελικών κομματιών και ενεργοποιούν ένα μονοπάτι συσσώρευσης TDP-43 που τελικά οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση [115].

Επιπλέον σύμφωνα με ένα άρθρο το 2013, έγινε μελέτη σε αποθανόντα ασθενή με φαινότυπο FTD-SD ο οποίος παρουσίαζε μόνο την συγκεκριμένη μονονουκλεοτιδική μετάλλαξη (p.I383V) στο γονίδιο του *TARDBP* μετά από γενετικό έλεγχο των πιο κοινών αλλαγών στους ασθενείς με FTD όπως *MAPT*, *GRN*, *C9ORF72*, *VCP* κλπ. Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε μια περίπλοκη πρωτεϊνοπάθεια ως αποτέλεσμα του εκφυλισμού των μετωποκροταφικών περιοχών και ειδικότερα του μεταιχμιακού συστήματος με ήπια ανάμειξη των κατώτερων κινητικών νευρώνων και συνδυάζει χαμηλά επίπεδα πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων της TDP-43 και ελάχιστα α-συνουκλεΐνης στο εγκεφαλικό στέλεχος και στον νησιωτικό φλοιό με νευρωνικές και αστροκυτταρικές TAU παθολογία παρόμοια με αυτές που έχουν ήδη περιγραφεί [116].

Τέλος, το 2019 σε μια έρευνα των Ramos et al, στην οποία συμμετείχε η ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας, φάνηκε ότι η ίδια μετάλλαξη είναι πιθανός παθογόνα και ιδρυτική στον ελληνικό πληθυσμό καθώς παρατηρήθηκε σε τρεις από τους 118 ασθενείς με FTD (bvFTD, svPPA) οι οποίοι ανήκαν σε διαφορετικές οικογένειες. Συνέχεια αυτής της μελέτης αποτελεί η παρούσα έρευνα, εάν δηλαδή είναι ιδρυτική μετάλλαξη στον ελληνικό πληθυσμό αλλά και εάν ευθύνεται για την πρόκληση παθολογικού φαινοτύπου [117].



3.5.a. Δομή TARDBP και θέση παραλλαγής p.Ile383Val στην πρωτεΐνη [115].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ FTD-ΝΕΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

Οι μέχρι τώρα θεραπευτικές προσεγγίσεις της μετωποκροταφικής άνοιας περιλαμβάνουν κυρίως αντιμετώπιση συμπτωμάτων και όχι βελτίωση ή επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται λόγω της νόσου. Πιο συγκεκριμένα τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRI-Selective Serotonin Reuptake Inhibitor) ώστε να αντιμετωπιστεί ποικιλία συμπεριφορικών συμπτωμάτων που περιλαμβάνουν την απάθεια, το άγχος, την υπερδιέγερση καθώς και τις ιδεοψυχαναγκαστικές διαταραχές, ενώ θεωρούνται σχετικά ασφαλή στη χρήση τους. Αντιψυχωσικά φάρμακα, στις περιπτώσεις επιθετικής και αγχώδους συμπεριφοράς τα οποία όμως θα πρέπει να χορηγούνται με φειδώ λόγω των αυξημένων κινδύνων για εγκεφαλικό και για καρδιακές επιπλοκές στους ηλικιωμένους ανοϊκούς ασθενείς. Άλλες προσεγγίσεις περιλαμβάνουν αναστολείς χολινεστεράσης που αντιμετωπίζουν τα γνωσιακά συμπτώματα της AD ωστόσο χορηγούνται κάποιες φορές και σε ασθενείς με FTD για την αντιμετώπιση των συμπεριφορικών συμπτωμάτων. Τα αποτελέσματα ερευνών για την ανταπόκριση σε αυτές τις ουσίες ήταν απογοητευτικά μιας και οι FTD ασθενείς δεν έχουν απώλεια νευρώνων του χολινεργικού συστήματος όπως στο AD[118]–[120].

Επιπλέον Levodopa/Carbidopa χορηγείται στους ασθενείς με FTD που εμφανίζουν συμπτώματα παρκινσονισμού (CBD, PSP) χωρίς να έχει ιδιαίτερα αποτελέσματα. Τέλος, ψυχοδιεγερτικά φάρμακα για την αντιμετώπιση συμπεριφορικών συμπτωμάτων τα οποία πρέπει να χορηγούνται με ιδιαίτερη προσοχή λόγω των δυσμενών επιδράσεων τους, ενώ η χρήση τους είναι σπάνια [119].

Τα βασικά προβλήματα που υπάρχουν στην αντιμετώπιση της FTD εντοπίζονται στο γεγονός ότι η νόσος είναι εξαιρετικά ετερογενής, ακόμα και στην ίδια υποκατηγορία υπάρχουν διαφορετικοί τύποι πρωτεϊνοπαθειών, καθώς και στο ότι η διάγνωση συνήθως καθυστερεί με αποτέλεσμα οι βλάβες τελικά να είναι μη-αναστρέψιμες. Βασικός στόχος λοιπόν, είναι η έγκαιρη ανίχνευση με τη βοήθεια βιοδεικτών και γενετικού ελέγχου ώστε να υπάρχει από νωρίς γνώση για την προδιάθεση και τα άτομα υψηλού κινδύνου να παρακολουθούνται ανά τακτά χρονικά διαστήματα ώστε να γίνεται έγκαιρη θεραπευτική παρέμβαση όταν ή εάν εμφανιστούν συμπτώματα της νόσου. Ως πιθανός μελλοντικός θεραπευτικός στόχος θεωρείται η αναστροφή της tau παθολογίας και συγκεκριμένα η απομάκρυνση των νευροϊνδιακών δεματίων ώστε να ανακουφιστούν οι περιοχές του εγκεφάλου με τα μεγάλα συσσωματώματα, δεν είναι όμως γνωστό εάν κάτι τέτοιο θα είχε περισσότερο βλαβερή από ότι ευεργετική δράση. Επίσης, πιθανό θεραπευτικό στόχο μπορεί να αποτελέσει η TDP-43, ωστόσο οι περιορισμένες γνώσεις για την δράση και λειτουργία τόσο του ίδιου του γονιδίου όσο και της πρωτεΐνης το καθιστά αδύνατον με τις υπάρχουσες γνώσεις [121].

Η γκρανουλίνη ωστόσο αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο φαρμακευτικό στόχο σαν μια θεραπεία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρύτερα και δεν είναι ειδική της παθολογίας, αυτό στηρίζεται στις μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας της γκρανουλίνης καθώς και της νευροπροστατευτικής δράσης της. Πρόσφατες πληροφορίες αναφέρουν ότι οι υποδοχείς TNF και σορτιλίνης προσδένουν γκρανουλίνη και προσφέρουν πιθανόν ένα εναλλακτικό φαρμακευτικό στόχο και όντως η αναστολή μέσω μικρών μορίων της ενδοκύτωσης της σορτιλίνης έχει ως αποτέλεσμα την επαναφορά των επιπέδων εξωκυτταρικής γκρανουλίνης σε άτομα με μεταλλάξεις της. Τέλος χημικές ουσίες οι οποίες αυξάνουν τα επίπεδα γκρανουλίνης μέσω αυξημένης μεταγραφής (υπερουλανίδιο υδροξυμαμικό οξύ) ή την σταθεροποίηση της ενδο και συνεπώς και έξω-κυτταρικής γκρανουλίνης είναι υποσχόμενες και κάποιες από αυτές έχουν ήδη εγκριθεί από τον FDA και περιλαμβάνουν χλωροκίνη, βεπριδίλη και αμιωδαρόνη [121].

Κάποιες από τις κλινικές μελέτες που είναι σε εξέλιξη αυτή τη στιγμή αφορούν (clinicaltrials.gov):

- Χορήγηση ενδορρινικά οωκυτοκίνης (φάση II, εμπορική ονομασία φαρμάκου syntocinon), σε ασθενείς με FTD και χορήγηση αλατούχου διαλύματος (placebo) στους υπόλοιπους ασθενείς. Η μελέτη εξελίσσεται στον Καναδά, με αριθμό συμμετεχόντων άνω των 110. Στις 20 εβδομάδες παρατηρείται βελτίωση απάθειας στα νευροψυχιατρικά τεστ καθώς και στην αναγνώριση συναισθηματικών εκφράσεων.
- Χορήγηση μικρής ποσότητας λιθίου (φάση II), για την αντιμετώπιση συμπεριφορικών συμπτωμάτων στην FTD και placebo, σε μια δοκιμή 12 εβδομάδων σε 60 ασθενείς με δόσεις μικρότερες από αυτές που χορηγούνται σε ασθενείς με διπολική διαταραχή καθώς προηγούμενη έρευνα έδειξε ότι οι ποσότητες αυτές είχαν αυξημένα περιστατικά σύγχυσης και παραληρήματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ REAL-TIME PCR

Μέσω της Μοριακής Διαγνωστικής μπορούν να αναλυθούν τμήματα DNA, για την ανίχνευση μεταλλάξεων ως προς την αλληλουχία τους ή/και ως προς τις επιγενετικές τους τροποποιήσεις.

A) Οι μέθοδοι που συχνότερα χρησιμοποιούνται για την εύρεση γνωστών μεταλλάξεων είναι οι εξής:

- αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR) και παραλλαγές της 1) PCR Αντίστροφης Μεταγραφάσης (Reverse Transcription PCR - RT-PCR) για ελαττώματα ματίσματος, 2) Πολλαπλή PCR (Multiplex PCR), 3) Nested PCR, 4) (Amplification-Refractory Mutation System - ARMS) PCR: Αλληλοειδική ενίσχυση (Allele-Specific PCR - AS-PCR), 5) ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time qPCR), 6) Ανάλυση πολυμορφισμών μέσω μήκους θραύσματος (PCR-RFLP -Restriction fragment length polymorphism)

και σε πολυπαραγοντικές αναλύσεις:

- DNA μικροσυστοιχίες (DNA Microarrays), όπως η αλληλοειδική υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτίδιου σε DNA chip (Allelic Specific Oligonucleotide - ASO)

- DNA Αλληλούχιση (DNA Sequencing) (Gold Standard τεχνική)

- Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) (για την σάρωση μεγάλων γενομικών αναδιατάξεων)

B) Οι αναλύσεις που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση άγνωστων μεταλλάξεων είναι οι εξής και αποτελούν τις λεγόμενες μεθόδους Screening (μέθοδοι διαλογής):

- Ανάλυση διαμόρφωσης μονόκλωνου πολυμορφισμού (Single Strand Conformational Polymorphism - SSCP)

- Ηλεκτροφόρηση σε βαθμιδωτή μετουσιωτική γέλη (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - DGGE)

- Ηλεκτροφόρηση γέλης σε βαθμιδωτή θερμοκρασία (Temperature gradient gel electrophoresis - TGGE)

- Ανάλυση τήξης υψηλού διαχωρισμού (High Resolution Melting Analysis - HRMA)

- Ανάλυση ετεροδίπλων (Heteroduplex Analysis -HET)

- RNase A μέθοδος διάσπασης (RNase A Cleavage Method)

- Μέθοδος χημικής διάσπασης (Chemical Cleavage Method -CCM)
- Ενζυματική διάσπαση αναντιστοιχίας (Enzyme Mismatch Cleavage -EMC)
- Δοκιμή πρόωρου τερματισμού πρωτεΐνης (Protein Translation Test -PTT)
- Συστήματα Αλληλούχισης Νέας Γενιάς (Next Generation Sequencing -NGS), συμπεριλαμβανομένων της παράλληλης μαζικής αλληλουχίσης ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing -WGS), της αλληλούχισης ολόκληρου του εξώματος (Whole Exome Sequencing -WES), της αλληλούχισης μεταγραφώματος, της αλληλούχισης μεθυλώματος, κλπ [122], [123].

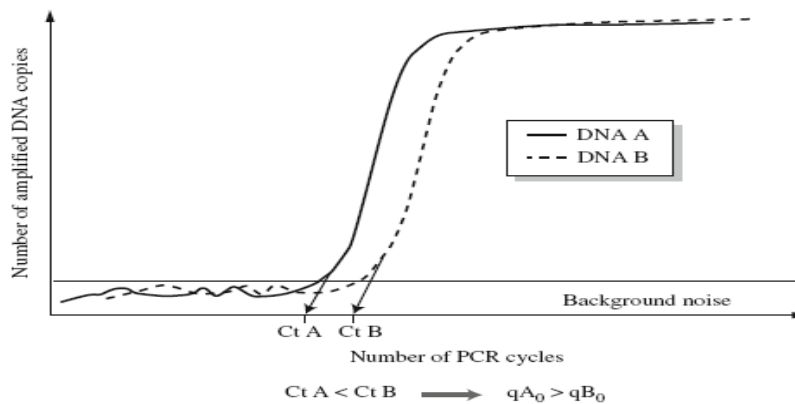
Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία της Real-Time qPCR.

5.1. REAL-TIME qPCR

Στην PCR πραγματικού χρόνου, τα δεδομένα συλλέγονται κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης του DNA και όχι σε ένα μόνο τελικό σημείο, όπως με τη συμβατική PCR. Η τεχνική χρησιμοποιεί φθορίζοντα μόρια που ιχνηθετούν τα προϊόντα της PCR και οργανολογία που καταγράφει συνεχώς το φθορισμό κατά την πρόοδο της αντίδρασης. Η φάση του θορύβου διαρκεί έως ότου το σήμα του προϊόντος της PCR είναι μεγαλύτερο από το σήμα του υποβάθρου του συστήματος. Η φάση της εκθετικής ανάπτυξης ξεκινά μόλις συσσωρευτεί επαρκής ποσότητα προϊόντος, έτσι ώστε να είναι ανιχνεύσιμο πάνω από το θόρυβο και ολοκληρώνεται όταν η απόδοση της αντίδρασης μειωθεί, καθώς η αντίδραση εισέρχεται στη φάση κορεσμού [116],[117].Ο κορεσμός οφείλεται στην εξάντληση κάποιου κρίσιμου παράγοντα που μπορεί να είναι οι εκκινητές, οι φθορίζοντες ιχνηθέτες ή τα dNTPs [126]. Τα δεδομένα που συλλέγονται δίνουν πληροφορίες για την ταυτότητα, ποσότητα και αλληλουχία των ενισχυόμενων τμημάτων DNA [125]. Ο μειωμένος κίνδυνος επιμολύνσεων, η ευκολία στη διαχείριση των δειγμάτων, ο περιορισμός των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, η ελάττωση του συνολικού όγκου αντίδρασης και η μεγάλη ευαισθησία, ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου έχουν συντελέσει στην αύξηση της χρήσης της τόσο στην έρευνα όσο και σε κλινικά εργαστήρια [125], [127].

Πρέπει να σημειωθεί ότι σε ένα τυπικό πείραμα real-time qPCR οι καμπύλες όλων των δειγμάτων φθάνουν περίπου στο ίδιο επίπεδο κορεσμού και έτσι οι μετρήσεις τελικού σημείου δε δίνουν καμία πληροφορία για την αρχική ποσότητα των μορίων στόχων στο δείγμα. Η διάκριση μπορεί να γίνει ωστόσο στη λογαριθμική φάση, κατά την οποία η πρώτη σημαντική αύξηση του μετρούμενου φθορισμού συσχετίζεται με την αρχική ποσότητα του εκμαγείου-στόχου. Με άλλα λόγια ο κύκλος όπου κάθε αντίδραση δίνει πρώτη φορά σήμα μεγαλύτερο του σήματος υποβάθρου (κύκλος ουδός-Ct:Cycle threshold ή αλλιώς Cq:Quantification Cycle) εξαρτάται από την ποσότητα του DNA-στόχου που υπήρχε στο δείγμα στην αρχή της αντίδρασης. Όσο λιγότερα μόρια περιέχει αρχικά το δείγμα, τόσο

περισσότεροι κύκλοι απαιτούνται για την ανίχνευση του σήματος, δηλαδή τόσο μεγαλύτερη είναι η τιμή Ct (εικ. 5.1) [124]–[126].



Εικόνα 5.1.α.: Γραφική παράσταση του αριθμού των DNA αντιγράφων ως προς τον αριθμό των PCR κύκλων για δύο δείγματα A και B με διαφορετική αρχική ποσότητα μορίων DNA. Η αρχική ποσότητα μορίων DNA του δείγματος A (qA_0) είναι μεγαλύτερη από την αυτή του δείγματος B (qB_0) και η υπέρβαση του θορύβου επιτυγχάνεται συντομότερα για το δείγμα A από ότι για το δείγμα B. Με άλλα λόγια, το Ct του δείγματος A είναι μικρότερο από το Ct του δείγματος B [124].

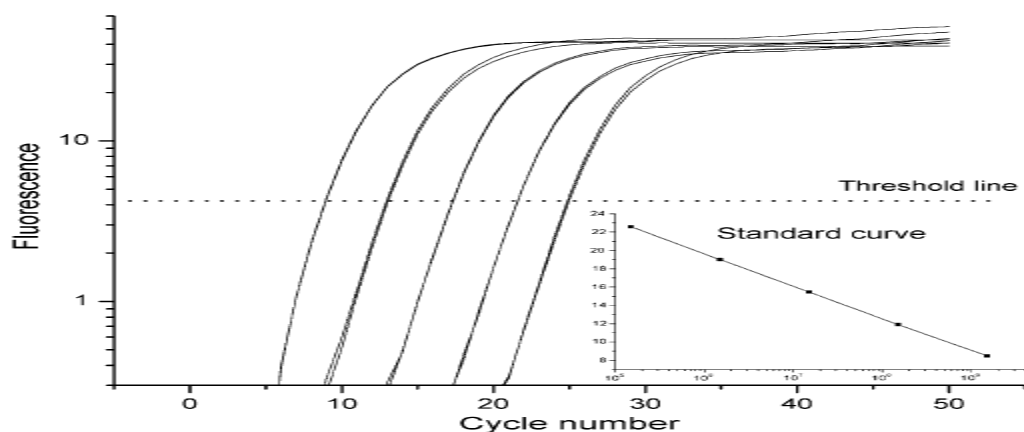
Αυτή η εξάρτηση μεταξύ του Ct και του αριθμού των μορίων που αρχικά υπήρχαν στο δείγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό άγνωστων δειγμάτων. Για δύο δείγματα A και B ο λόγος μεταξύ του αριθμού των μορίων του υποστρώματος στα αρχικά δείγματα $[No]A$ και $[No]B$ δίνεται από τη σχέση:

$$\frac{[N_0]_A}{[N_0]_B} = (1 + E)^{(CT_B - CT_A)}$$

όπου E η απόδοση της αντίδρασης. Ιδανικά η απόδοση ισούται με 1 και σε κάθε κύκλο τα μόρια της αλληλουχίας στόχου διπλασιάζονται, κάτι που ωστόσο δεν επιτυγχάνεται στα συνήθη πειράματα. Με τη χρήση σειριακών αραιώσεων δειγμάτων πλασμιδιακού ή άλλου DNA που περιέχει την αλληλουχία στόχο είναι δυνατόν να υπολογιστεί η απόδοση και να κατασκευαστεί διάγραμμα βαθμονόμησης που αποτελεί καμπύλη γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ των τιμών της αρχικής συγκέντρωσης και των τιμών Ct για κάθε δείγμα με τύπο:

$$CT = k \times \log(N_0) + CT(1)$$

όπου k η κλίση της ευθείας και CT(1) η τιμή Ct για αραιωμένο δείγμα που περιέχει 1 αντίγραφο της αλληλουχίας στόχου (εικ. 5.2) [126].



Εικόνα 5.1.β.: Παράδειγμα σχεδιασμού της καμπύλης βαθμονόμησης (standard curve) με χρήση προτύπων δειγμάτων γνωστής αρχικής συγκέντρωσης. Τα δείγματα ενισχύονται και κατασκευάζεται γραφική παράσταση των Ct ως προς τον αρχικό αριθμό μορίων DNA [126].

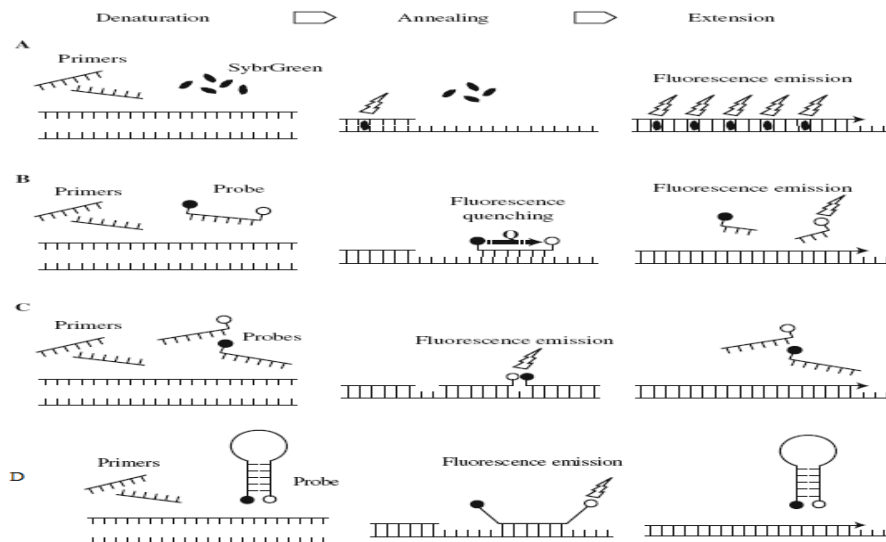
Από την κλίση της καμπύλης υπολογίζεται η απόδοση με τη σχέση:

$$E = 10^{-\frac{1}{k}} - 1$$

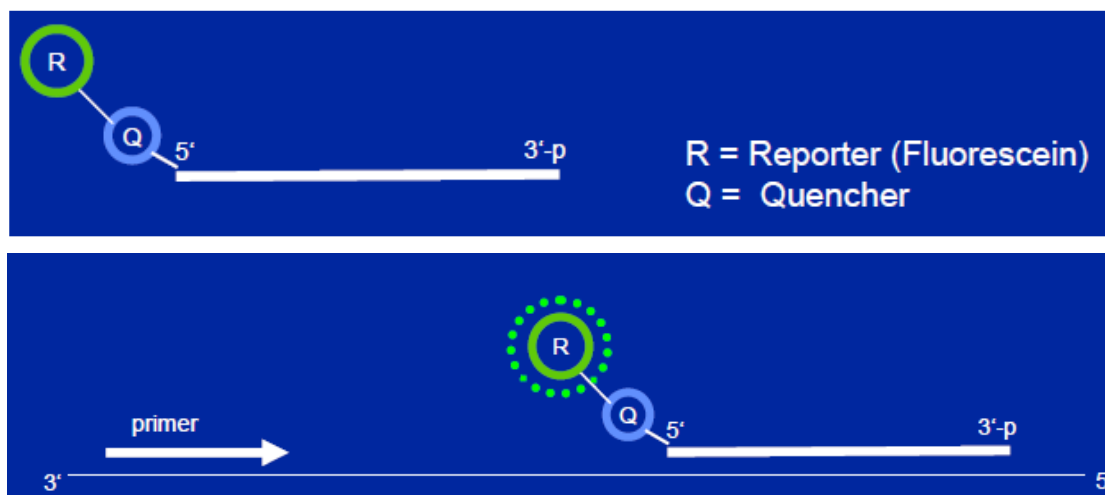
Με βάση το διάγραμμα βαθμονόμησης μπορεί να υπολογισθεί η αρχική συγκέντρωση κάθε άγνωστου δείγματος. Ωστόσο πρέπει να αναφερθεί ότι η απόδοση της αντίδρασης στα βιολογικά δείγματα μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά από την παρουσία ποικίλων ουσιών-αναστολέων της PCR, κάτι που δεν λαμβάνεται υπόψιν στη σχεδίαση της καμπύλης αναφοράς. Έτσι, τόσο η προετοιμασία όσο και ο προσδιορισμός των δειγμάτων πρέπει να είναι όσο το δυνατόν καλύτερα χαρακτηρισμένοι και βελτιστοποιημένοι [125], [126]

Το μεγαλύτερο μέρος της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων γίνεται με υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το εκάστοτε όργανο της PCR σε πραγματικό χρόνο, με τη βοήθεια ειδικών λογισμικών, που επιτρέπουν τη γρήγορη και αξιόπιστη παρουσίαση τους [125].

Μια σημαντική παράμετρος της real-time PCR που δεν εξετάστηκε μέχρι στιγμής είναι η φύση και οι ιδιότητες των φθορίζοντων μορίων ιχνηθετών. Μέχρι σήμερα έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετά τέτοια μόρια που εμπίπτουν σε μια από τις ακόλουθες κατηγορίες: χρωστικές που προσδένονται στη διπλή έλικα του DNA (όπως η SYBR Green), ανιχνευτές υβριδισμού DNA (hybridization probes), ανιχνευτές DNA διπλής χρωστικής (τύπου TaqMan), «μοριακοί φάροι» (molecular beacons), μόρια «σκορπιού» (εικ. 5.3.) και απλοί ανιχνευτές (simple probes) (εικ. 5.4.) [124], [125].



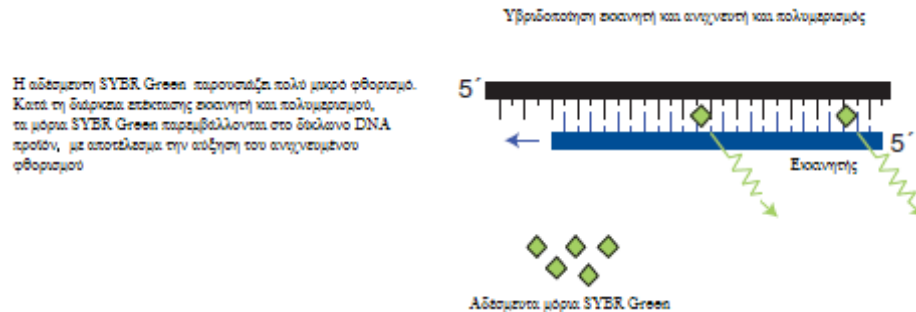
Εικόνα 5.1.γ.: Διαφορετικοί τύποι φοριζόντων μορίων ιχνηθετών που χρησιμοποιούνται σε αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου. Α) SYBR Green, Β) ανιχνευτές τύπου Taqman, Γ) ανιχνευτές υβριδισμού, Δ) μοριακοί φάροι [124]



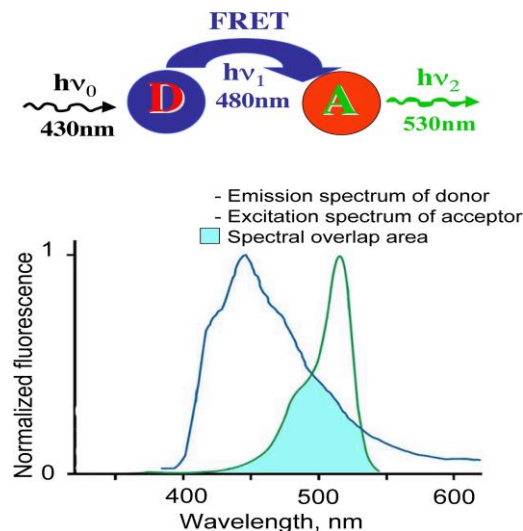
Εικόνα 5.1.δ.: Σχεδιασμός simple Probe με αποσβέστη (quencher) και φοριζουσα ουσία (π.χ. fluorescein, διέγερση στα 494 nm και μέγιστη εκπομπή στα 521 nm.), που μόνο προσδεόμενος στην αλληλουχία στόχο φθορίζει.

Όλα τα προαναφερθέντα συστήματα ανίχνευσης εκτός των χρωστικών που προσδένονται στη διπλή έλικα (εικ.5.5), βασίζονται στο φαινόμενο μεταφοράς ενέργειας με φθορισμό (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer). Το φαινόμενο αυτό συνίσταται στη μεταφορά ενέργειας από ένα ηλεκτρονιακά διεγερμένο μόριο, το φθορισμοφόρο δότη, σε ένα γειτονικό μόριο αποδέκτη, με αποτέλεσμα το μόριο δότης να επιστρέφει στη βασική μη-διεγερμένη του κατάσταση. Το φαινόμενο FRET μπορεί να συμβεί μόνο όταν τα δύο μόρια (δότης και δέκτης) βρεθούν σε μια συγκεκριμένη απόσταση, που ονομάζεται ακτίνα Förster, στην οποία η απόδοση της μεταφοράς ενέργειας είναι 50% και εξαρτάται από τις φασματοσκοπικές ιδιότητες των μορίων. Όταν το κατάλληλο ζεύγος δότη-δέκτη βρεθεί στην απαιτούμενη απόσταση, λόγω του φαινομένου FRET το μόριο δότης δεν εκπέμπει φθορισμό. Εάν το μόριο δέκτης είναι επίσης φθορίζον, εκπέμπει φθορισμό στο χαρακτηριστικό για

αυτό μήκος κύματος, οπότε και μπορεί να ανιχνευθεί. Η κύρια προϋπόθεση για να συμβεί κάτι τέτοιο είναι η ενέργεια που χάνει το μόριο δότη επιστρέφοντας στη βασική κατάσταση να ταυτίζεται με την ενέργεια που απαιτείται για τη διέγερση του μορίου δέκτη. Με άλλα λόγια, το φάσμα απορρόφησης του μορίου δέκτη πρέπει να επικαλύπτει το φάσμα εκπομπής του μορίου δότη (εικ. 5.6.) [125].

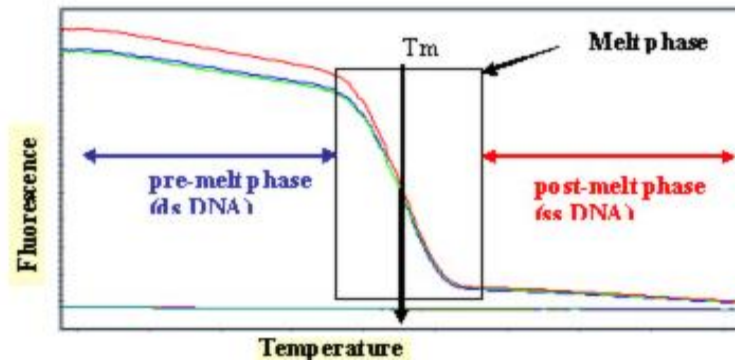


Εικόνα 5.1.ε.: Τρόπος φθορισμού χρωστικών που προσδένονται στη διπλή έλικα του DNA, όπως η SYBR Green. Η ένταση του σήματος σε κάθε βήμα της αντίδρασης αυξάνει καθώς αυξάνει και η συγκέντρωση του προϊόντος [128].



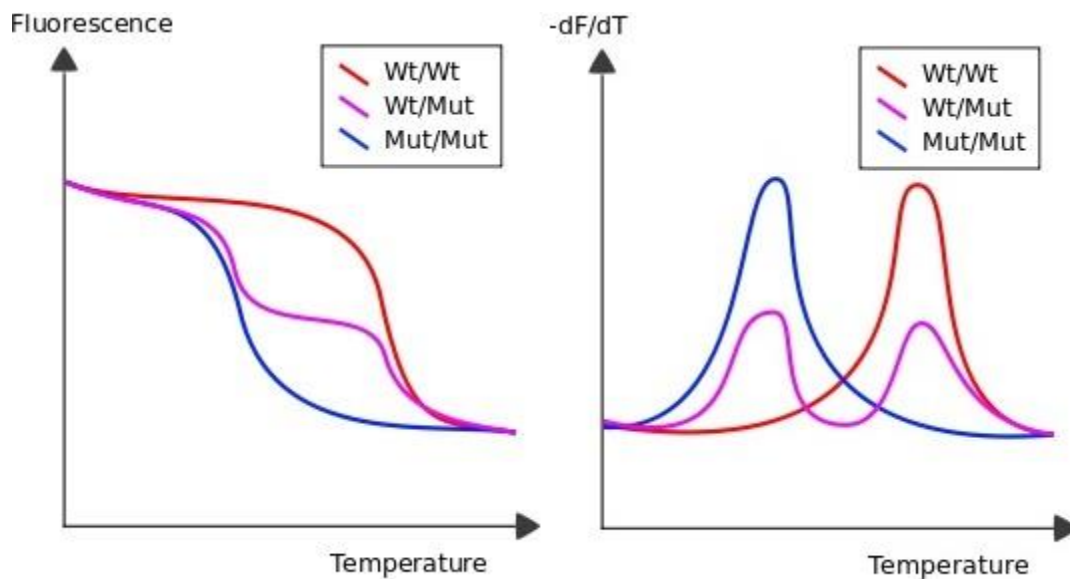
Εικόνα 5.1.στ.: Φαινόμενο FRET [129].

Με τη real-time qPCR, εκτός από την ποσοτική ανάλυση του προϊόντος της PCR, γίνεται και ποιοτική ανάλυση (γονοτύπηση) με βάση τη μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος (melting curve analysis), κατά την οποία οι ενισχυμένες αλληλουχίες μπορούν να χαρακτηριστούν με βάση το σημείο τήξης τους (T_m). Το T_m είναι η θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων DNA παραμένει δίκλωνο και το 50% γίνεται μονόκλωνο, είναι συνάρτηση του μήκους και της σύνθεσης των βάσεων του προϊόντος και χαρακτηρίζει την κάθε αλληλουχία (εικ.5.7) [125].



Εικόνα 5.1.ζ.: Γραφική παράσταση της έντασης φθορισμού ως προς τη θερμοκρασία σε πειράματα ανάλυσης καμπύλης τήξης. Με την αύξηση της θερμοκρασίας τα δίκλινα μόρια αποδιατάσσονται με αποτέλεσμα τη μείωση της καταγραφόμενης έντασης φθορισμού. Χαρακτηριστική για κάθε αλληλουχία είναι η θερμοκρασία τήξης T_m , στην οποία το 50% των μορίων DNA παραμένει δίκλινο και το 50% γίνεται μονόκλινο.

Οι ειδικοί για αλληλουχία ανιχνευτές δεσμεύονται στην αλληλουχία-στόχο του DNA. Με την αύξηση της θερμοκρασίας (συνήθως κατά $0,2\text{ }^{\circ}\text{C/sec}$, ανάλογα με το όργανο που χρησιμοποιείται), η αποδιάταξη αυτών από την αλληλουχία στόχο οδηγεί στην μείωση του εκπεμπόμενου φθορισμού. Η θερμική αποσταθεροποίηση λόγω κάποιας μετάλλαξης αντανακλάται στην T_m (εικ. 5.8.).

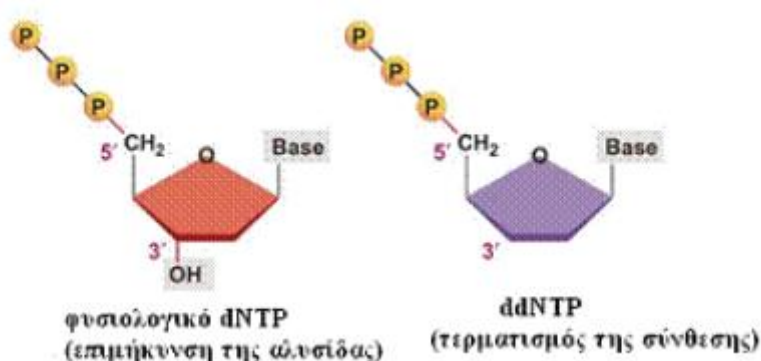


Εικόνα 5.1.η.: Γράφημα φθορισμού, ύστερα από σταδιακή αποδιάταξη του δίκλινου προϊόντος με αύξηση της θερμοκρασίας και γράφημα αρνητικής πρώτης παραγώγου προς θερμοκρασία, με κορυφές (peaks) που αντιστοιχούν σε ξεχωριστό γονότυπο. (<http://www.elveflow.com>)

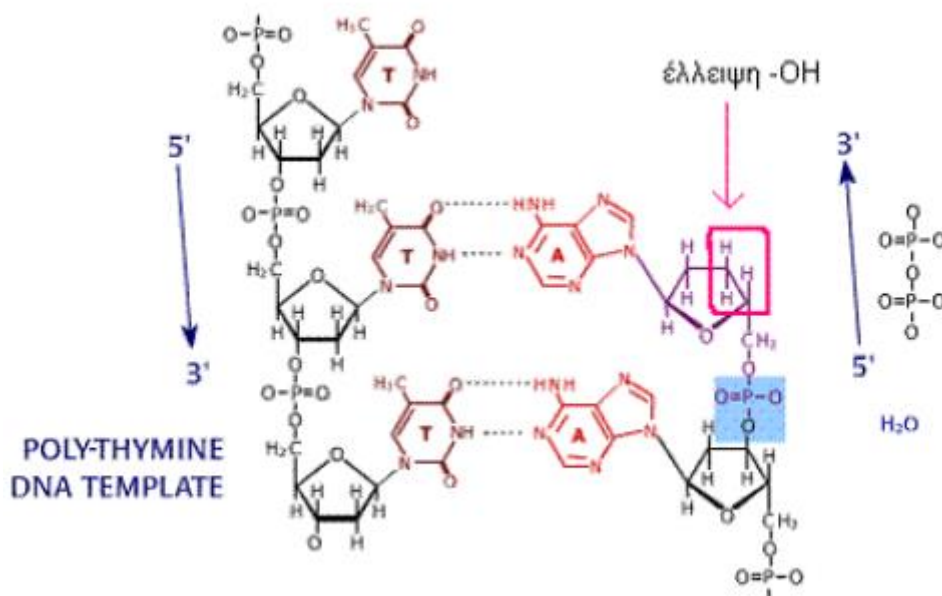
5.2. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ DNA

Η χημική μέθοδος αλληλούχισης κατά Maxwell εκμεταλλεύεται την ιδιότητα ορισμένων χημικών ενώσεων, όπως η υδραζίνη, το διμεθυλοθειικό οξύ ή το φορμικό οξύ να μπορούν να τροποποιήσουν τις βάσεις του DNA εντός του μορίου αυτού. Το DNA που αναλύεται επισημαίνεται με κάποιο ραδιοϊσότοπο σε ένα από τα 3',5' άκρα του και στη συνέχεια τροποποιείται με τη βοήθεια των προαναφερθεισών χημικών ενώσεων σε τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις, σε κάθε μια από τις οποίες χρησιμοποιείται ένα μόνο από τα εν λόγω αντιδραστήρια. Ακολούθως προστίθεται το αντιδραστήριο πιπεριδίνη που καταλύει τη διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού στο σημείο της τροποποιημένης βάσης.

Η ενζυμική μέθοδος κατά Sanger ή η μέθοδος των διδεόξυ αντιδράσεων βασίστηκε σε προηγούμενη εργασία του Arthur Kornberg (<http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/sangerseq.html>) στην αντιγραφή του DNA καθώς και στην ικανότητα της DNA πολυμεράσης να χρησιμοποιεί εκτός των τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) και τα 2',3'-τριφωσφορικά διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) σαν υποστρώματα. Κατά την διαδικασία αντιγραφής του DNA το άτομο άνθρακα στο 5' άκρο του dNTP ενώνεται με το άτομο άνθρακα στο 3' άκρο στο τέλος της αλυσίδας (www.dnalc.org/ddnalc/resources/sangerseq.html). Οι ομάδες υδροξυλίου σε κάθε θέση σχηματίζουν εστερικούς δεσμούς με ένα κεντρικό άτομο φωσφόρου και η αλυσίδα επιμηκώνεται. Το «κλειδί» στη μέθοδο του Sanger είναι η ιδιαίτερη χημεία των ddNTPs. Όπως γίνεται με ένα dNTP, έτσι και ένα ddNTP ενσωματώνεται στην αλυσίδα σχηματίζοντας έναν φωσφοδιεστερικό δεσμό στο 5' άκρο. Ωστόσο το ddNTP δεν έχει ομάδα υδροξυλίου (OH) στη θέση 3' που είναι απαραίτητη για τη δημιουργία δεσμού με ένα εισερχόμενο νουκλεοτίδιο (εικόνα 5.2.α). Έτσι η προσθήκη ενός ddNTP σταματά την επιμήκυνση της αλυσίδας (εικόνα 5.2.β.).



Εικόνα 5.2.α. Δομή φυσιολογικού dNTP και ddNTP το οποίο οδηγεί στον τερματισμό της σύνθεσης.



Εικόνα 5.2.β: Προσθήκη ενός ddNTP σταματά την επιμήκυνση της αλυσίδας.

Για την αντίδραση του προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA, ένας ολιγονουκλεοτιδικός φορέας- εκκινητής υβριδίζεται στον 3' - 5' κλάδο του προς προσδιορισμό DNA και με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση επεκτείνεται σε κατεύθυνση 5' - 3', συμπληρωματικά στον αντιγραφόμενο κλάδο με την ανάπτυξη φωσφοδιεστερικών δεσμών ανάμεσα στο 3' άκρο του εκκινητή και το 5' άκρο του προστιθέμενου νουκλεοτιδίου που δρα ως δομικός λίθος. Εκτελούνται ταυτόχρονα τέσσερις αντιδράσεις, στις οποίες το ένα είδος από τα τέσσερα χρησιμοποιούμενα dNTPs είναι ραδιοεπισημασμένο (συνήθως με ^{35}S) ή σημασμένο με φθορίζουσα χρωστική. Επίσης, κάθε μία από τις τέσσερις αντιδράσεις φέρει εκτός των τεσσάρων dNTPs και ένα από τα τέσσερα ddNTPs το οποίο εξ' αιτίας της έλλειψης 3' υδροξυλομάδας τερματίζει την αντίδραση νουκλεϊκής σύνθεσης, όπως προαναφέρθηκε, και χαρακτηρίζει την τελευταία βάση αυτού του κομματιού. Το συγκεκριμένο ddNTP είναι και αυτό που δίνει το όνομα της κάθε αντίδρασης. Τελικά, τα σχηματιζόμενα προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υψηλής διακριτικής ικανότητας (τα προϊόντα κάθε αντίδρασης σταματούν σε διαδοχικές θέσεις εντός του πηκτώματος ανάλογα με το μοριακό τους βάρος) ή σε ειδικά τριχοειδή και η αλληλουχία του DNA μπορεί να διαβαστεί απ' ευθείας. Είναι πολύ σημαντικό να ρυθμιστεί σωστά η αναλογία dNTP : ddNTP σε κάθε μια από τις τέσσερις αντιδράσεις ώστε η αντίδραση σύνθεσης του συμπληρωματικού κλάδου να τερματίζεται σε ένα από τα ζητούμενα νουκλεοτίδια της κάθε μίας αντίδρασης, δηλαδή, πρέπει να σχηματιστούν όλα τα δυνατά προϊόντα ανά αντίδραση για να είναι σωστός ο προσδιορισμός της ελεγχόμενης αλληλουχίας DNA

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

Η παρούσα διατριβή αποτελεί συνέχεια του ερευνητικού έργου του εργαστηρίου όπου, μετά από αλληλούχιση νέας γενιάς, σε 118 FTD ασθενείς (46 με οικογενειακό ιστορικό, 57 σποραδικές περιπτώσεις), ανιχνεύθηκαν 3 άνδρες ασθενείς με την ίδια πιθανά παθογνωμική *TARDBP* μετάλλαξη, ενώ δύο από τους τρεις είχαν οικογενειακό ιστορικό. Καθώς οι ασθενείς αυτοί δεν σχετίζονται, ήταν σημαντικό να ελεγχθεί εάν η συγκεκριμένη μετάλλαξη αποτελεί ιδρυτική μετάλλαξη στον Ελληνικό FTD πληθυσμό. Επίσης σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η ανάπτυξη μιας ταχείας, αξιόπιστης και οικονομικής μεθοδολογίας για την μετάλλαξη p.Ile383Val στο γονίδιο *TARDBP*. Έγινε σχεδιασμός μεθοδολογίας real-time PCR με την πλατφόρμα Light Cycler ώστε να γίνει γονοτύπηση των δειγμάτων FTD ασθενών πέραν των 118 ασθενών, και σε άλλους 15, συνολικά 133 ασθενείς. Η ακρίβεια της γονοτύπησης ελέγχθηκε με την μέθοδο αναφοράς DNA Sequencing κατά Sanger.

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1. ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Συλλέγησαν συνολικά 133 δείγματα περιφερικού αίματος Ελλήνων FTD ασθενών (πίνακας 6.1.α.), στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο "Αττικών" και στο Αιγινήτειο Νοσοκομείο (2007-2017) κατόπιν ενημέρωσης και έγγραφης συγκατάθεσης των ασθενών (Υπεύθυνος Ιατρείου Ανοιών και Νοητικών Διαταραχών: Β' Νευρολογικής Κλινικής ΕΚΠΑ Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Σωκράτης Παπαγεωργίου). Οι ασθενείς εκτιμήθηκαν με ψυχομετρική και νευρολογική εξέταση και ερωτήθηκαν για την καταγωγή τους και το οικογενειακό ιστορικό της νόσου (Ακολουθεί πίνακας 6.1.β. με την λίστα των ασθενών) ενώ επίσης συλλέγησαν και 60 δείγματα ελέγχου (πίνακας 6.1.β.).

Όλα τα δείγματα αξιολογήθηκαν ως προς την μετάλλαξη p.Ile383Val (c.1147A>G) (g.14935A.G, rs80356740), μια μονονουκλειτιδική αλλαγή που μετατρέπει μια αδενίνη σε γουανίνη στο γονίδιο *TARDBP*. Τα δείγματα περιφερικού αίματος συλλέγησαν σε σωληνάρια τύπου vacutainer με EDTA και συντηρήθηκαν είτε στους 4°C είτε στους -20°C. Στα πρώτα, ύστερα από φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 3.500 rpm, έγινε διαχωρισμός του περιφερικού αίματος σε λευκά αιμοσφαίρια (buffy coat) και πλάσμα, ενώ απορρίφθηκαν τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η απομόνωση γενωμικού DNA έγινε από τη στιβάδα των λευκών αιμοσφαιρίων στα ανωτέρω δείγματα (buffy) ή από ολικό αίμα (whole blood) σε όσα δείγματα καταψύχθηκαν στους -20°C, με την δεύτερη περίπτωση να οδηγεί σε εξαγωγή χαμηλότερης συγκέντρωσης DNA. Τα δείγματα DNA αποθηκεύθηκαν στους -20°C στο εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου "Αττικών", όπου και διεξήχθη το πειραματικό μέρος της εργασίας.

6.1.α. Πίνακας με δείγματα FTD ασθενών

Δείγμα	Ονοματεπώνυμο	Ηλικία	Νόσος	Δείγμα	Οικ. Ιστορικό
A134	Θ.Σ.	67	FTD	buffy	ΟΧΙ
A153	Κ.Π.	60	FTD	buffy	ΝΑΙ
A160	Δ.Π.	65	FTD-PPA	buffy	ΝΑΙ
A168	Θ.Σ.	67	FTD	buffy	ΝΑΙ
A181	Κ.Π.	60	FTD	buffy	ΝΑΙ
A182	Τ.Μ.	69	FTD	buffy	ΟΧΙ
A183	Μ.Ε.	68	FTD	buffy	ΟΧΙ
A189	Κ.Α.	75	FTD-PNFA	buffy	ΟΧΙ
A198	Λ.Ε.	62	FTD-fr	buffy	ΟΧΙ
A201	Σ.Λ.	.	PSP	buffy	ΟΧΙ
A219	Α.Π.	75	FTD-PPA	buffy	ΝΑΙ

A240	M.E.	59	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A250	Γ.Ε.	51	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A253	Π.Θ.	73	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A287	B.N.	.	FTD-PNFA	<i>buffy</i>	NAI
A289	Π.	54	FTD-ALS	<i>buffy</i>	NAI
A299	M.	64	FTD	<i>buffy</i>	NAI
A304	T.Σ.	69	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A305	M.E.	59	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A316	Σ.N.	67	FTD-sem	<i>buffy</i>	NAI
A317	Λ.Η.	77	FTD	<i>buffy</i>	NAI
A322	Χ.Μ.	56	FTD-ALS	<i>buffy</i>	NAI
A327	T. Δ.	62	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A332	A.Δ.	70	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A348	Π.Λ.	71	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A354	A.Γ.	62	FTD	<i>buffy</i>	.
A362	Δ.Α.	59	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A386	Π.Α.Θ.	66	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A395	Λ.Η.	78	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A399	M.Θ.	73	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A405	Φ.Ε.	63	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A407	Γ.Κ.	83	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A410	Λ.Ε.	60	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A420	B.E.	49	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A423	K.Θ.	73	bvFTD	<i>buffy</i>	OXI
A439	Χ.Β.	.	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A447	K.Σ.	65	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A448	K.Χ.	79	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A456	Θ.Ε.	70	FTD-ALS	<i>buffy</i>	NAI
A458	K.K.	55	FTD	<i>buffy</i>	.
A460	B.Δ.	51	FTD-ALS	<i>buffy</i>	OXI
A459	K.E.	78	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A464	Θ.Ε.	70	FTD-ALS	<i>buffy</i>	NAI
A465	Δ.Ε.	57	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A468	Φ. Κ.	56	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A475	Σ.Δ.	81	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A479	Π.Γ.	65	bvFTD	<i>Whole blood</i>	NAI
A480	K.Σ.	45	bvFTD	<i>Whole blood</i>	OXI
A488	Φ.Κ.	67	FTD-PSP	<i>Whole blood</i>	NAI
A491	Π.Ζ.	64	FTD-SD	<i>Whole blood</i>	OXI
A492	M.K.	58	FTD-PNFA	<i>Whole blood</i>	NAI
A495	T.E.	60	bvFTD	<i>Whole blood</i>	OXI
A496	K.E.	72	bvFTD	<i>Whole blood</i>	OXI
A497	Σ.Γ.	74	FTD-SD	<i>Whole blood</i>	NAI
A498	K.Π.	75	FTD-PNFA	<i>Whole blood</i>	NAI
A500	T.E.	47	bvFTD	<i>Whole blood</i>	NAI

A501	Π.Γ.	70	bvFTD	<i>Whole blood</i>	NAI
A505	A.A.	56	FTD	<i>Whole blood</i>	NAI
A506	Λ.Π.	67	FTD-CBD	<i>Whole blood</i>	NAI
A509	Z.A.	71	FTD-PNFA	<i>Whole blood</i>	NAI
A510	T.E.	75	FTD-SD	<i>Whole blood</i>	NAI
A514	K.	68	bvFTD	<i>Whole blood</i>	NAI
A515	M.M.	59	FTD-SD	<i>Whole blood</i>	OXI
A516	A.M.	80	FTD-PSP	<i>Whole blood</i>	NAI
A519	H.N.	61	FTD-SD	<i>Whole blood</i>	NAI
A520	A.Γ.	72	bvFTD	<i>Whole blood</i>	NAI
A521	Σ.K.	82	FTD-SD	<i>Whole blood</i>	OXI
A522	B.E.	74	bvFTD	<i>Whole blood</i>	OXI
A523	K.	56	bvFTD	<i>Whole blood</i>	OXI
A530	Δ.Μ.	71	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A535	T.Π.	82	FTD	<i>buffy</i>	OXI
A537	E.Π.		FTD	<i>buffy</i>	.
A538	Π.Π.	38	FTD	<i>buffy</i>	.
A540	K.A.	73	FTD-SD	<i>Whole blood</i>	NAI
A541	K.E.	79	FTD-SD	<i>Whole blood</i>	OXI
A542	Π.Δ.	77	bvFTD	<i>Whole blood</i>	NAI
A543	Σ.N.	78	FTD-SD	<i>Whole blood</i>	NAI
A546	O.Γ.	69	FTD-SD	<i>Whole blood</i>	OXI
A549	K.Γ.	76	FTD	<i>buffy</i>	.
A554	Π.Ι.	63	bvFTD	<i>Whole blood</i>	NAI
A555	Σ.Π.	65	bvFTD	<i>Whole blood</i>	NAI
A557	T.Φ.	59	FTD	<i>buffy</i>	NAI
A559	M.Ι.	73	bvFTD	<i>Whole blood</i>	OXI
A560	K.	67	FTD-sem	<i>buffy</i>	NAI
A562	Π.B.	72	bvFTD	<i>Whole blood</i>	NAI
A563	P.A.	81	FTD-SD	<i>Whole blood</i>	NAI
A566	Φ.K.	59	FTD-PNFA	<i>Whole blood</i>	NAI
A570	Χ.Δ.	82	FTD	<i>buffy</i>	NAI
A572	Λ.E.	46	FTD	<i>buffy</i>	.
A605	Φ.B.	77	FTD-SD	<i>Whole blood</i>	NAI
A606	T.A.	77	FTD-SD	<i>Whole blood</i>	NAI
A659	Z.B.	67	FTD	<i>Whole blood</i>	NAI
A672	N.K.	74	FTD-PPA	<i>buffy</i>	OXI
A708	P.K.	.	FTD	<i>buffy</i>	NAI
A728	Γ.E.	54	FTD	<i>buffy</i>	NAI
A748	B.Π.	68	FTD	<i>buffy</i>	NAI
D1	n/a	47	bvFTD	<i>Whole blood</i>	.
D2	n/a	55	bvFTD	<i>Whole blood</i>	NAI
D26	n/a	74	bvFTD	<i>Whole blood</i>	NAI
D28	n/a	51	bvFTD	<i>Whole blood</i>	OXI
D29	n/a	60	bvFTD	<i>Whole blood</i>	NAI

D30	n/a	61	bvFTD	Whole blood	NAI
D31	n/a	68	FTD	Whole blood	OXI
D32	n/a	.	bvFTD	Whole blood	.
D34	n/a	52	svPPA	Whole blood	NAI
D35	n/a	.	svPPA	Whole blood	.
D36	n/a	.	svPPA	Whole blood	.
D37	n/a	55	svPPA	Whole blood	OXI
D38	n/a	76	bvFTD	Whole blood	OXI
D39	n/a	53	bvFTD	Whole blood	OXI
D40	n/a	72	bvFTD	Whole blood	NAI
D41	n/a	61	bvFTD	Whole blood	OXI
D42	n/a	61	bvFTD	Whole blood	OXI
D43	n/a	.	bvFTD	Whole blood	.
D44	n/a	.	nfvPPA	Whole blood	.
D45	n/a	73	nfvPPA	Whole blood	OXI
D47	n/a	50	bvFTD	Whole blood	NAI
D48	n/a	41	bvFTD	Whole blood	NAI
D49	n/a	60	svPPA	Whole blood	OXI
D50	n/a	.	bvFTD	Whole blood	.
D51	n/a	62	bvFTD	Whole blood	OXI
D52	n/a	51	bvFTD	Whole blood	NAI
D53	n/a	67	bvFTD	Whole blood	NAI
D55	n/a	55	PSP	Whole blood	NAI
D56	n/a	75	CBD	Whole blood	OXI
D59	n/a	50	CBD	Whole blood	OXI
D60	n/a	57	PSP	Whole blood	OXI
D61	n/a	59	PSP	Whole blood	OXI
D69	n/a	56	CBD	Whole blood	OXI

6.1.β. Πίνακας με δείγματα ελέγχου (controls)

<i>Δείγμα</i>	<i>Ονοματεπώνυμο</i>	<i>Ηλικία</i>	<i>Νόσος</i>	<i>Δείγμα</i>
A211	Λ.Α.	58	control	<i>buffy</i>
A229	N.N.	67	control	<i>buffy</i>
A241	T.M.	58	control	<i>buffy</i>
A242	Π.Η.	64	control	<i>buffy</i>
A249	Σ.Ε.	59	control	<i>buffy</i>
A259	Χ.Φ.	47	control	<i>buffy</i>
A276	T.B.	47	control	<i>buffy</i>
A293	K.K.	67	control	<i>buffy</i>
A296	M.E.	48	control	<i>buffy</i>
A297	A.I.	61	control	<i>buffy</i>

A308	Δ.Δ.	60	control	<i>buffy</i>
A320	M.P.	58	control	<i>buffy</i>
A323	Γ.Ι.	73	control	<i>buffy</i>
A334	K.B.	49	control	<i>buffy</i>
A340	K.N.	78	control	<i>buffy</i>
A341	A.Γ.	74	control	<i>buffy</i>
A344	N.E.	69	control	<i>buffy</i>
A353	M.A.	53	control	<i>buffy</i>
A360	Σ.Π.	56	control	<i>buffy</i>
A363	A.Γ.	77	control	<i>buffy</i>
A367	Z.A.	51	control	<i>buffy</i>
A369	A.M.	54	control	<i>buffy</i>
A370	A.Θ.	52	control	<i>buffy</i>
A371	Π.Θ.	65	control	<i>buffy</i>
A372	Σ.Γ.	70	control	<i>buffy</i>
A400	Π.A.	61	control	<i>buffy</i>
A409	X.N.	75	control	<i>buffy</i>
A414	K.E.	59	control	<i>buffy</i>
A416	Π.M.	61	control	<i>buffy</i>
A419	A.Θ.	64	control	<i>buffy</i>
A421	M.K.	62	control	<i>buffy</i>
A427	Π.A.	64	control	<i>buffy</i>
A432	N.E.	71	control	<i>buffy</i>
A434	M.Z.	70	control	<i>buffy</i>
A443	Π.A.	64	control	<i>buffy</i>
A611	K.Θ.	80	control	<i>buffy</i>
A612	Δ.Δ.	68	control	<i>buffy</i>
A638	T.Γ.	55	control	<i>whole blood</i>
A647	A.A.	54	control	<i>buffy</i>
A653	T.A.	80	control	<i>buffy</i>
A663	Σ.A.	80	control	<i>buffy</i>
A673	Π.Π.	83	control	<i>buffy</i>
A675	Λ.Π.	73	control	<i>buffy</i>
A680	Δ.E.	73	control	<i>buffy</i>
A694	Π.B.	66	control	<i>buffy</i>
A696	M.E.	72	control	<i>buffy</i>
A698	Π.	60	control	<i>buffy</i>
A700	A.K.	79	control	<i>buffy</i>
A705	Π.E.	67	control	<i>buffy</i>
A706	Π.Δ.	75	control	<i>buffy</i>
A709	T.A.	87	control	<i>buffy</i>
A713	T.A.	55	control	<i>buffy</i>
A716	Π.E.	76	control	<i>buffy</i>
A719	A.Π.	84	control	<i>buffy</i>
A721	M.Π.	72	control	<i>buffy</i>

A724	Μ.Γ.	55	control	<i>buffy</i>
A726	Λ.Γ.	67	control	<i>buffy</i>
A727	Θ.Ε.	60	control	<i>buffy</i>
A731	Σ.Χ.	67	control	<i>buffy</i>
A733	Α.Ι.	62	control	<i>buffy</i>

6.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA

Η απομόνωση γενωμικού DNA με τη χρήση προκατασκευασμένων αντιδραστηρίων (kit) απομόνωσης που βασίζονται σε στήλες συνιστά μια απλή και ταχεία διαδικασία που εμπίπτει στις μεθόδους απομόνωσης DNA στερεής φάσης. Η μέθοδος επιτρέπει την ταυτόχρονη επεξεργασία ικανοποιητικού αριθμού δειγμάτων buffy / whole blood και από ποικιλία ιστών με ταχύτητα και αξιοπιστία ανώτερη μεθόδων υγρής φάσης. Η δυνατότητα χρήσης πλακιδίων 96 θέσεων, αλλά και αυτοματοποιημένων πλατφορμών επιτρέπει την εφαρμογή της μεθόδου σε μεγάλους αριθμούς κλινικών δειγμάτων.

Η απομόνωση DNA με τη χρήση στηλών φυγοκέντρησης βασίζεται στην ειδική σύνθεση της μεμβράνης της στήλης, που εμπεριέχει οξείδιο του πυριτίου (silica gel). Το οξείδιο του πυριτίου μπορεί να προσδέσει το DNA κατά αντιστρεπτό τρόπο ανάλογα με την ιονική σύνθεση του περιβάλλοντος. Μετά την κυτταρική λύση και την αποδόμηση των πρωτεϊνών, το DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη αλκοόλης. Κατόπιν το διάλυμα διηθείται δια μέσου της μεμβράνης της στήλης με την εφαρμογή φυγοκέντρησης και το DNA κατακρατείται από το οξείδιο του πυριτίου, ενώ οι πρωτεΐνες και άλλες προσμίξεις διαπερνούν τη στήλη. Το προσδεμένο DNA εκπλένεται και τέλος εκλύεται με υγρό ελεύθερο νουκλεάσης ή με χαμηλής ιονικής ισχύος διάλυμα. Με τον τρόπο αυτό, προκύπτει με ικανοποιητική απόδοση DNA προς χρήση στην PCR ή σε άλλες ενζυματικές αντιδράσεις. Χρησιμοποιήθηκαν στήλες από 3 διαφορετικά kit διαφορετικών εταιρειών:

6.2.1 Απομόνωση DNA με Nucleospin Tissue Kit (Macherey-Nagel)

Εξοπλισμός και αντιδραστήρια

- Στήλες Nucleo Spin Tissue (Macherey-Nagel, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα B3
- Ρυθμιστικό διάλυμα BW (Wash buffer)
- Ρυθμιστικό διάλυμα B5 (Wash buffer) (αραίωση με προσθήκη απόλυτης αιθανόλης)
- Ρυθμιστικό διάλυμα BE (Elution buffer)
- Πρωτεϊνάση K (Macherey-Nagel, Γερμανία) (διάλυση με ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεϊνάσης PB)
- Αιθανόλη απόλυτη (96-100%)

- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate-Buffered Saline) (στις περιπτώσεις <200 µl δείγματος)
- Σωληνάρια φυγοκέντρωσης 1,5 ml
- Ακρορύγχη με φίλτρο
- Πιπέτες (Thermo Fisher, USA)
- Φυγόκεντρος (Biofuge, Heraeus, ThermoFisher, USA)
- Συσκευή Vortex (Fisher, USA)

Πειραματική διαδικασία

1. Στον πυθμένα ενός σωληνάριου eppendorf 1,5 ml τοποθετούνται 25 µl πρωτεΐνωση Κ.
2. Προστίθενται 200 µl buffy / whole blood.
3. Προστίθενται 200 µl ρυθμιστικό διάλυμα B3 και αναδεύουμε έντονα για 10 sec.
4. Επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και στους 70° για 15 min.
5. Προστίθενται 210 µl αιθανόλη 96-100% (αφού το περιεχόμενο του σωληνάριου κρυσταλλωθεί) και αναδεύονται έντονα για 15 sec.
6. Μεταφέρεται προσεκτικά το προηγούμενο μείγμα σε μια NucleoSpin Tissue στήλη, η οποία είναι τοποθετημένη πάνω σε ένα σωληνάριο των 2 ml, χωρίς να υγρανθεί το χείλος της στήλης. Κλείνεται το καπάκι της στήλης και φυγοκεντρείται για 1 min στα 11000xg. Τοποθετείται η στήλη σε ένα καθαρό σωληνάριο των 2 ml (παρέχεται από το kit) και απορρίπτεται το σωληνάριο που περιέχει το υγρό.
7. Ανοίγεται προσεκτικά το καπάκι της στήλης και προστίθενται 500 µl ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας BW χωρίς να υγρανθεί το χείλος της στήλης. Κλείνεται το καπάκι και φυγοκεντρώνεται για 1 min στα 11000xg. Τοποθετείται τη στήλη σε ένα καθαρό σωληνάριο των 2 ml και απορρίπτεται το σωληνάριο που περιέχει το υγρό.
8. Ανοίγεται προσεκτικά το καπάκι της στήλης και προστίθενται 600 µl αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας B5 χωρίς να υγρανθεί το χείλος της στήλης. Κλείνεται το καπάκι και φυγοκεντρείται για 1 min στα 11000xg. Η στήλη τοποθετείται σε ένα καθαρό σωληνάριο των 2 ml και απορρίπτεται το σωληνάριο που περιέχει το υγρό.
9. Χωρίς την προσθήκη περαιτέρω διαλύματος πραγματοποιείται φυγοκέντρωση σε μέγιστη ταχύτητα για λίγα δευτερόλεπτα. Ο σκοπός αυτού του βήματος είναι η απομάκρυνση της περίσσειας αιθανόλης, που μπορεί να επιτευχθεί και με φυγοκέντρωση για 3 min στο προηγούμενο βήμα (βήμα 8).
10. Η στήλη τοποθετείται σε ένα καθαρό σωληνάριο eppendorf των 1,5 ml (δεν παρέχεται από το kit) και απορρίπτεται το σωληνάριο με το λίγο υγρό που περιέχει. Ανοίγεται προσεκτικά το καπάκι της στήλης και προστίθενται 100 µl διαλύματος έκλουσης BE, προθερμασμένο στους 70°. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και

τελικά φυγοκεντρείται για 1 min στα 11000xg. Το αποκτηθέν DNA φυλάσσεται στους -20° C.

6.2.2 Απομόνωση DNA με High Pure PCR Template Preparation kit (Roche)

Εξοπλισμός και αντιδραστήρια

- Στήλες High Pure Filter (Roche, Ελβετία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης (Binding buffer)
- Ρυθμιστικό διάλυμα απομάκρυνσης αναστολέων (Inhibitor Removal buffer) (αραίωση με προσθήκη απόλυτης αιθανόλης)
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (Wash buffer) (αραίωση με προσθήκη απόλυτης αιθανόλης)
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (Elution buffer)
- Πρωτεΐνάση K (Roche, Ελβετία) (ανασυσταμένη σε 4,5 ml διπλά απεσταγμένου νερού)
- Ισοπροπανόλη
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate-Buffered Saline) (στις περιπτώσεις <200 µl δείγματος)
- Σωληνάρια φυγοκέντρωσης 1,5 ml
- Ακρορύγχη με φίλτρο
- Πιπέτες (Thermo Fisher, USA)
- Φυγόκεντρος (Biofuge, Heraeus, Thermo Fisher, USA)
- Συσκευή Vortex (Thermo Fisher, USA)

Πειραματική διαδικασία

1. Στον πυθμένα ενός σωληναρίου eppendorf 1,5 ml τοποθετούνται 40 µl πρωτεΐνάση K.
2. Προστίθενται 200 µl buffy / whole blood.
3. Προστίθενται 200 µl ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης και αναδεύεται έντονα για 10 sec.
4. Επιάζεται στους 56° για 20 min και στους 70° για 10 min.
5. Προστίθενται 100 µl ισοπροπανόλη (αφού το περιεχόμενο του σωληναρίου κρυώσει) και αναδεύεται έντονα για 15 sec.
6. Μεταφέρεται προσεκτικά το προηγούμενο μείγμα σε μια High Pure Filter στήλη, η οποία είναι τοποθετημένη πάνω σε ένα σωληνάριο των 2 ml, χωρίς να υγρανθεί το χείλος της στήλης. Κλείνεται το καπάκι της στήλης και φυγοκεντρείται για 1 min στα 11000xg. Τοποθετείται τη στήλη σε ένα καθαρό σωληνάριο των 2 ml (παρέχεται από το kit) και απορρίπτεται το σωληνάριο που περιέχει το υγρό.

7. Ανοίγεται προσεκτικά το καπάκι της στήλης και προστίθενται 500 µl ρυθμιστικό διάλυμα απομάκρυνσης αναστολέων χωρίς να υγρανθεί το χείλος της στήλης. Κλείνεται το καπάκι και φυγοκεντρείται για 1 min στα 11000xg. Τοποθετείται η στήλη σε ένα καθαρό σωληνάριο των 2 ml και απορρίπτεται το σωληνάριο που περιέχει το υγρό.
8. Ανοίγεται προσεκτικά το καπάκι της στήλης και προστίθενται 500 µl ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης χωρίς να υγρανθεί το χείλος της στήλης. Κλείνεται το καπάκι και φυγοκεντρείται για 1 min στα 11000xg. Τοποθετείται τη στήλη σε ένα καθαρό σωληνάριο των 2 ml και απορρίπτεται το σωληνάριο που περιέχει το υγρό.
9. Ανοίγεται προσεκτικά το καπάκι της στήλης και προστίθενται 500 µl αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης χωρίς να υγρανθεί το χείλος της στήλης. Κλείνεται το καπάκι και φυγοκεντρείται για 1 min στα 11000xg. Τοποθετείται η στήλη σε ένα καθαρό σωληνάριο των 2 ml και απορρίπτεται το σωληνάριο που περιέχει το υγρό.
10. Χωρίς την προσθήκη περαιτέρω διαλύματος τα σωληνάρια φυγοκεντρούνται σε μέγιστη ταχύτητα για λίγα δευτερόλεπτα. Ο σκοπός αυτού του βήματος είναι η απομάκρυνση της περίσσειας διαλύματος έκπλυσης, που μπορεί να επιτευχθεί και με φυγοκέντρηση για 3 min στο προηγούμενο βήμα (βήμα 9).
11. Η στήλη τοποθετείται σε ένα καθαρό σωληνάριο eppendorf των 1,5 ml (δεν παρέχεται από το kit) και απορρίπτεται το σωληνάριο με το λίγο υγρό που περιέχει. Ανοίγεται προσεκτικά το καπάκι της στήλης και προστίθενται 200 µl διαλύματος έκλυσης, προθερμασμένο στους 70°. Διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και τελική φυγοκέντρηση για 1 min στα 11000xg. Το αποκτηθέν DNA φυλάσσεται στους -20° C.

6.2.3 Απομόνωση DNA με QIAamp DNA Mini kit (Qiagen)

Εξοπλισμός και αντιδραστήρια

- Στήλες QIAamp (Qiagen Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα AL
- Ρυθμιστικό διάλυμα AW1 (αραίωση με προσθήκη απόλυτης αιθανόλης)
- Ρυθμιστικό διάλυμα AW2 (αραίωση με προσθήκη απόλυτης αιθανόλης)
- Ρυθμιστικό διάλυμα AE
- Πρωτεάση (Qiagen, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS
- Αιθανόλη απόλυτη
- Σωληνάρια φυγοκέντρησης 1,5 ml
- Ακρορύγχη με φίλτρο
- Πιπέτες (Thermo, FisherUSA)

- Φυγόκεντρος (Biofuge, Heraeus, Thermo Fisher, USA)
- Συσκευή Vortex (Fisher, USA)

Πειραματική διαδικασία

1. Στον πυθμένα ενός σωληναρίου eppendorf 1,5 ml τοποθετούνται 20 µl πρωτεάση
2. Προστίθενται 200 µl buffy / whole blood.
3. Προστίθενται 200 µl ρυθμιστικό διάλυμα AL και αναδεύουμε έντονα για 15 sec.
4. Επωάζεται στους 56° για τουλάχιστον 10 min.
5. Προστίθενται 210 µl απόλυτη αιθανόλη (αφού το περιεχόμενο του σωληναρίου κρυώσει) και αναδεύεται έντονα για 15 sec.
6. Μεταφέρεται προσεκτικά το μείγμα σε μια QIAamp στήλη, η οποία είναι τοποθετημένη πάνω σε ένα σωληνάριο των 2 ml, χωρίς να υγρανθεί το χείλος της στήλης. Κλείνεται το καπάκι της στήλης και φυγοκεντρείται για 1 min στα 12000xg. Η στήλη τοποθετείται σε ένα καθαρό σωληνάριο των 2 ml (παρέχεται από το kit) και απορρίπτεται το σωληνάριο που περιέχει το υγρό.
7. Ανοίγεται προσεκτικά το καπάκι της στήλης και προστίθενται 500 µl ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας AW1 χωρίς να υγρανθεί το χείλος της στήλης. Κλείνεται το καπάκι και φυγοκεντρείται για 1 min στα 12000xg. Η στήλη τοποθετείται σε ένα καθαρό σωληνάριο των 2 ml και απορρίπτεται το σωληνάριο που περιέχει το υγρό.
8. Ανοίγεται προσεκτικά το καπάκι της στήλης και προστίθενται 500 µl ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας AW2 χωρίς να υγρανθεί το χείλος της στήλης. Κλείνεται το καπάκι και φυγοκεντρείται για 3 min στα 12000xg.
9. Η στήλη τοποθετείται σε ένα καθαρό σωληνάριο eppendorf των 1,5 ml (δεν παρέχεται από το kit) και απορρίπτεται το σωληνάριο με το λίγο υγρό που περιέχει. Ανοίγεται προσεκτικά το καπάκι της στήλης και προστίθενται 150-200 µl απεσταγμένο νερό. Διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και τελική φυγοκέντρωση για 1 min στα 12000xg. Το αποκτηθέν DNA φυλάσσεται στους -20° C.

Ο όγκος προστιθέμενου διαλύματος έκλουσης (για το κάθε kit) επηρεάζει την συγκέντρωση του αποκτηθέντος DNA. Σε περιπτώσεις απομόνωσης από whole blood η έκλουση έγινε με 100-150 µl διαλύματος έκλουσης, ενώ στις απομονώσεις από buffy δείγματα ο χρησιμοποιούμενος όγκος διαλύματος ήταν 200 µl.

6.3. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΤΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΟ Qubit

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του DNA έγινε με το όργανο Qubit 1.0 (Invitrogen, Thermo Fisher, USA) (εικόνα 6.3.α.).



Εικόνα 6.3.α.: Το φθορισμόμετρο Qubit.

Η ποσοτικοποίηση του DNA επιτυγχάνεται με τη χρήση ουσίας που φθορίζει κατά την πρόσδεση σε δίκλωνο DNA, και η οποία παρέχεται με το assay kit dsDNA BR. Η χρωστική αυτή εκπέμπει ακτινοβολία κατόπιν διέγερσης με κατάλληλο μήκος κύματος, η οποία διαφέρει κατά αρκετές τάξεις μεγέθους ανάλογα με το εάν η χρωστική είναι ελεύθερη ή προσδεδεμένη σε μόριο δίκλωνου DNA. Η μέτρηση πρότυπων δειγμάτων (standards), που παρέχονται με το kit, επιτρέπει τον αυτοματοποιημένο σχεδιασμό καμπύλης βαθμονόμησης με βάση την οποία γίνεται η ποσοτικοποίηση των άγνωστης συγκέντρωσης δειγμάτων. Το εύρος της δοκιμασίας κυμαίνεται μεταξύ 2–1000 ng. Πλεονέκτημα της μεθόδου σε σχέση με τη μέτρηση της απορρόφησης της UV ακτινοβολίας (Nanodrop) είναι η εκλεκτικότητα των μετρήσεων που επιτρέπει διάκριση μεταξύ του DNA και του RNA όταν αυτά συνυπάρχουν σε ένα δείγμα και η ακρίβεια στην ποσοτικοποίηση σε δείγματα με χαμηλές συγκεντρώσεις, ακόμα και σε επίπεδα των 10 pg/μl. Μια άλλη μέθοδος είναι το Nanodrop που υπερέχει στο ότι δεν απαιτεί τη χρήση κυψελίδων και πρότυπων δειγμάτων, ενώ μπορεί να μετράει υψηλές συγκεντρώσεις χωρίς να χρειάζεται αραίωση.

Εξοπλισμός και αντιδραστήρια

- Qubit™ dsDNA BR reagent (Component A)
- Qubit™ dsDNA BR reagent (Component B)
- Qubit™ dsDNA BR standard #1 (Component C)
- Qubit™ dsDNA BR standard #2 (Component D)
- Σωληνάρια eppendorf
- Πιπέτες (Thermo Fisher, USA)
- Συσκευή Vortex (Thermo Fisher, USA)

Πειραματική πορεία

1. Ετοιμάζεται το διάλυμα εργασίας σε ένα σωληνάριο erppendorf προσθέτοντας 200 μl buffer (Component A) και 1 μl χρωστικής (Component B) για κάθε δείγμα. Ακολουθεί έντονη ανάδευση.
2. Τοποθετούνται 190 μL διαλύματος εργασίας σε δύο σωληνάρια για τα πρότυπα δείγματα (standards).
3. Προστίθενται 10 μl κάθε πρότυπου δείγματος στο αντίστοιχο σωληνάριο και ακολουθεί έντονη ανάδευση.
4. Τοποθετούνται 180–199 μl διαλύματος εργασίας σε σωληνάρια για τα άγνωστα δείγματα.
5. Προστίθενται 1–20 μl άγνωστου δείγματος σε κάθε σωληνάριο, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 200μl και ακολουθεί έντονη ανάδευση.
6. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
7. Μετράται ο φθορισμός των πρότυπων και άγνωστων δειγμάτων με το φθορισμόμετρο Qubit1.0.

6.4. ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ PCR

Η επαλήθευση των Real-Time εκκινήτων και η εύρεση κατάλληλων πειραματικών συνθηκών για αξιόπιστη ποσοτική ενίσχυση με το σωστό μέγεθος PCR προϊόντος και χωρίς παραπροϊόντα έγινε, αρχικά, μέσω συμβατικής PCR δειγμάτων ελέγχου και ηλεκτροφόρησης των PCR προϊόντων καθώς δεν υπήρχε διαθέσιμο περιοριστικό ένζυμο για την εφαρμογή μεθοδολογίας PCR-RFLP. Η επαλήθευση των Sequencing εκκινήτων έγινε με συμβατική PCR, ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων, απομόνωσή τους και μελέτη των αποτελεσμάτων από την αλληλούχιση στον ABI310 αναλυτή (δες παρακάτω) και σύγκριση των αποκτημένων αλληλουχιών με τις αντίστοιχες αλληλουχίες στο NCBI Blast και στο πρόγραμμα CLC Sequence Viewer 6.

Η ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδίου *TARDBP* έγινε στο όργανο Primus PCR engine (MWG-Biotech, Γερμανία) (εικόνα 6.4.α.). Η μονάδα Primus διαθέτει υποδοχείς για σωληνάρια των 0,2 ml και μπορεί να υποβάλλει τα δείγματα σε κύκλους αλλαγής θερμοκρασίας μεταξύ των 4 και 105°C με ρυθμό αλλαγής της θερμοκρασίας 2°/sec και είναι εξοπλισμένη με θερμαινόμενο κάλυμμα που προλαμβάνει την εξάτμιση των δειγμάτων σε υψηλές θερμοκρασίες.



6.4.α. ο θερμικός κυκλοποιητής Primus 25.

Για την ενίσχυση της επιθυμητής περιοχής έγινε χρήση της πολυμεράσης OneTaq Quick Load 2X Master Mix with Standard Buffer σε πρωτόκολλο διαλύματος τελικού όγκου 25μl (πίνακες 6.4.β, 6.4.γ).

6.4.β Πρωτόκολλο συμβατικής PCR για το γονίδιο TARDBP

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
H ₂ O	-	10	-
Πρόσθιος εκκινητής (S) 5'-TCGGGTAATAACCAAAACCAAG	20 pmol/μl	0,5	0,4 pmol/μl
Ανάστροφος εκκινητής (R) 5'-CAAAAATACTGCTGAATATACTCCACAC	20 pmol/μl	0,5	0,4 pmol/μl
OneTaq	2X	12,5	1X
DNA		1,5	

6.4.γ. Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο συμβατικής PCR

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	95°C	10 min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	30 sec	40 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	52°C	30 sec	

Επέκταση των εκκινητών	68°C	45 sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης	68°C	5 min	-

Η επιβεβαίωση του PCR προϊόντος (μήκους 341bp) έγινε με την χρήση του περιοριστικού ενζύμου *DdeI* από το οποίο προκύπτουν τρεις ευδιάκριτες μπάντες μήκους 173bp, 114bp και 55bp (πίνακας 6.4.δ.).

6.4.δ. Πρωτόκολλο περιορισμού με το ένζυμο *DdeI*

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
Ένζυμο <i>DdeI</i>	10 U/μl	0,5	U/μl
CutSmart Buffer		2,5	
H ₂ O		-	
PCR προϊόν	-	25	-

6.5. REAL-TIME qPCR ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΤΗΞΗΣ

Όπως αναλύθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο η ανάλυση καμπυλών τήξης μετά από ενίσχυση με PCR πραγματικού χρόνου αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο γονοτύπησης πολυμορφισμών μονού νουκλεοτιδίου που εκμεταλλεύεται τη μεταβολή στην θερμοκρασία τήξης ενός δίκλωνου μορίου DNA, όταν στην αλληλουχία υπάρχει κάποιο λάθος ζευγάρωμα βάσεων (mismatch). Στην παρούσα εργασία αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ενός πολυμορφισμού στο γονίδιο *TARDBP*.

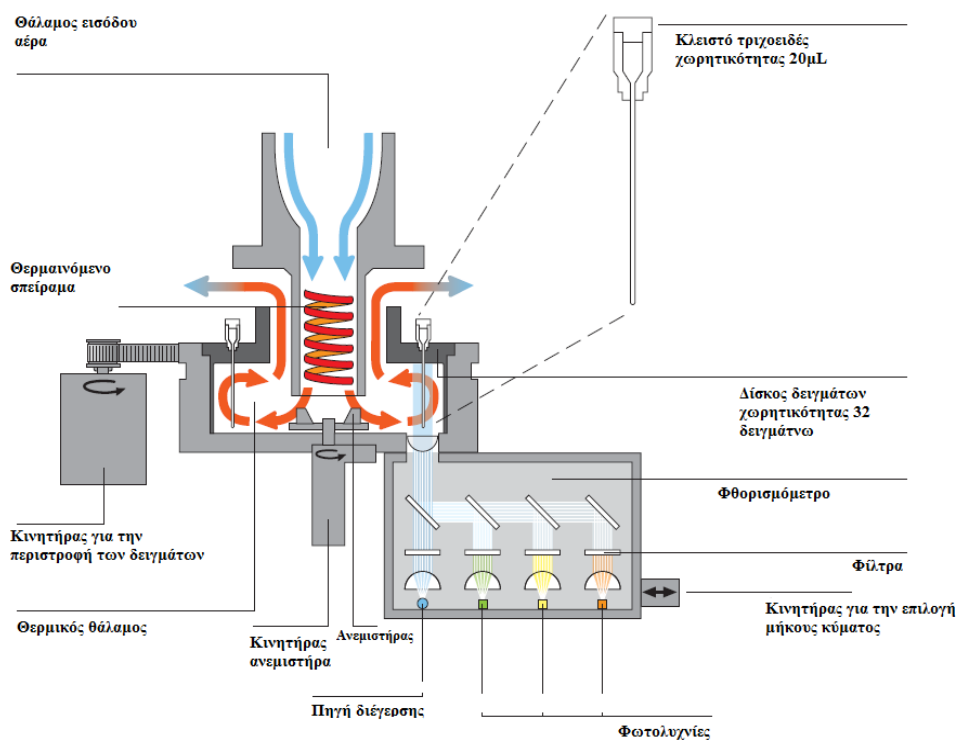
6.5.1. Οργανολογία

Οι αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου και η ανάλυση καμπυλών τήξης πραγματοποιήθηκαν με τον θερμικό κυκλοποιητή Light Cycler 1.5. εικόνα 6.4.1.α της εταιρίας Roche Applied Science. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε υάλινα τριχοειδή (capillaries) τα οποία τοποθετούνται σε ένα περιστρεφόμενο δίσκο (καρουζέλ) χωρητικότητας 32 δειγμάτων.



6.5.1.α. Το όργανο LightCycler και το καρουζέλ με χωρητικότητα 32 δειγμάτων.

Σε αντίθεση με τους συμβατικούς θερμικούς κυκλοποιητές που επιτυγχάνουν τη θέρμανση και ψύξη των δειγμάτων με θερμικό block ή με αξιοποίηση του θερμοηλεκτρικού φαινομένου Peltier, στο LightCycler οι θερμοκρασιακές αλλαγές επέρχονται με μεγάλη ταχύτητα μέσω της ροής αέρα διαμέσου των εξαιρετικά λεπτών υάλινων τριχοειδών. Ο αέρας θερμαίνεται από ένα θερμικό σπείραμα με $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ακρίβεια στη επιτυγχανόμενη θερμοκρασία, ενώ ένας ανεμιστήρας ανακατανέμει την ροή του αέρα εντός του θερμικού θαλάμου, ώστε να εξασφαλίζονται ταυτόσημες συνθήκες για όλα τα τριχοειδή που περιστρεφόμενου δίσκου. Τα τριχοειδή, με χωρητικότητα 20 μl , διαθέτουν υψηλό λόγο επιφάνειας προς όγκο, επιτρέποντας γρήγορα εξισορρόπηση της θερμοκρασίας μεταξύ αέρα και δείγματος. Έτσι επιτυγχάνονται γρήγοροι ρυθμοί μεταβολής της θερμοκρασίας που φτάνουν μέχρι και τους 20°C ανά δευτερόλεπτο και επιτρέπουν την τέλεση μιας PCR αντίδρασης 30-40 κύκλων σε χρονικό διάστημα 20-30 λεπτών.



6.5.1.β Σχηματική αναπαράσταση της οργανολογίας LightCycler.

Η οπτική μονάδα του LightCycler ανιχνεύει τον φθορισμό ανά προγραμματισμένα χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης PCR και κατά συνεχή τρόπο κατά την ανάλυση καμπυλών τήξης. Οι οπτικές ιδιότητες των τριχοειδών τα καθιστούν κατάλληλα για χρήση σαν κυβέτες για τις φθορισμομετρικές μετρήσεις. Η οπτική μονάδα διαθέτει τρία κανάλια ανίχνευσης που μετρούν το εκπεμπόμενο φως σε τρία διαφορετικά μήκη κύματος (530 nm, 640 nm και 710 nm) καθώς και μια δίοδο εκπομπής φωτός (LED: Light Emitting Diode) που δρα ως πηγή διέγερσης. Έτσι οι κυριότερες φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται για την επισήμανση ανιχνευτών DNA στο όργανο LightCycler είναι η φλουορεσκεΐνη, η LightCycler-Red 640 (LC-Red 640) και η LightCycler-Red 705 (LC-Red 705) με μέγιστα απορρόφησης και εκπομπής που σημειώνονται στον παρακάτω πίνακα 6.5.1.γ.

6.5.1.γ. Μέγιστο απορρόφησης και εκπομπής των χρωστικών που χρησιμοποιούνται στο όργανο LightCycler

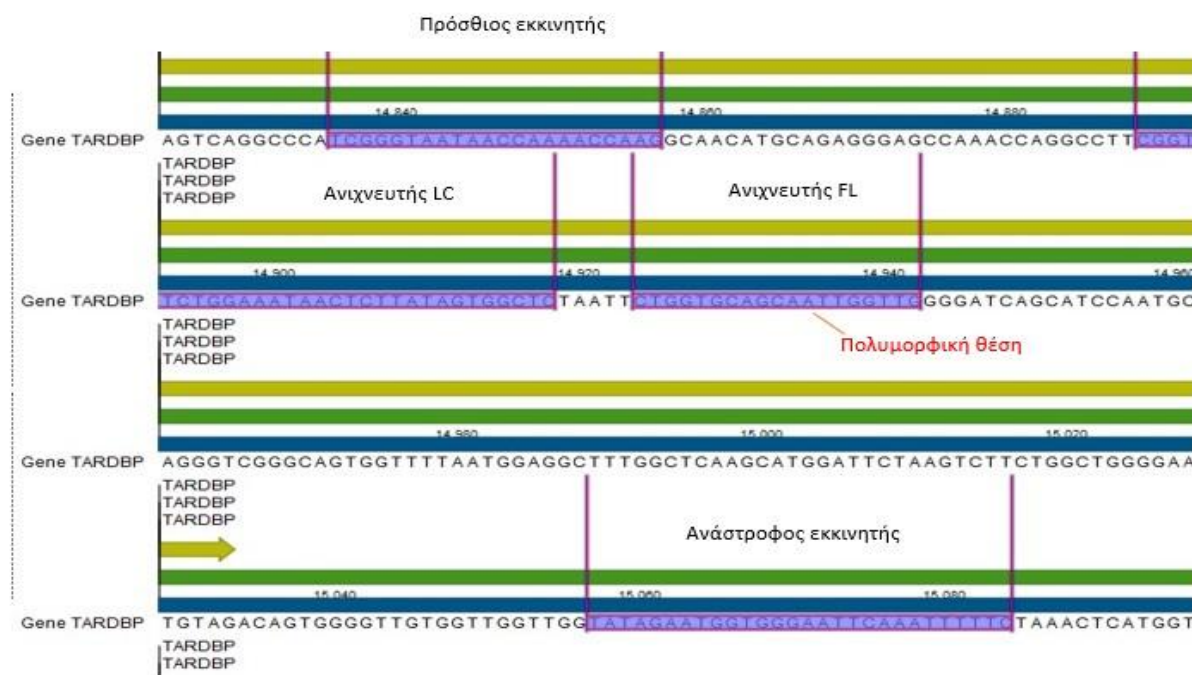
	Φλουορεσκεΐνη	LC-Red 640	LC-Red 705
Μέγιστο απορρόφησης	493 nm	625 nm	685 nm
Μέγιστο εκπομπής	525 nm	640 nm	705 nm

Κατά τη μέτρηση του σήματος φθορισμού, ιώδες φως μήκους κύματος 470 nm εκπέμπεται από την πηγή διέγερσης και εστιάζεται στην άκρη του τριχοειδούς, διεγείροντας τα φθορισμοφόρα της αντίδρασης. Κατόπιν ο παραγόμενος φθορισμός κατευθύνεται εκ νέου προς την οπτική μονάδα, όπου μια σειρά φίλτρων μετράται σε τρία κανάλια. Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων ένας κατάλληλος κινητήρας περιστρέφει κυκλικά το δίσκο με τα δείγματα, έτσι ώστε το άκρο κάθε τριχοειδούς να τοποθετείται ακριβώς στο εστιακό σημείο της φθορισμομετρικής οπτικής. Η βέλτιστη θέση για την μέτρηση καθορίζεται για κάθε τριχοειδές σε μια «διαδικασία αναζήτησης» που προηγείται κάθε PCR αντίδραση [130].

Για την παρακολούθηση της αντίδρασης ενώ αυτή εξελίσσεται οι διάφορες πληροφορίες μεταφέρονται από και προς έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή, μέσω κατάλληλης σύνδεσης. Ο χρήστης εισάγει τα δεδομένα μέσω πληκτρολογίου στο κατάλληλο πειραματικό πρωτόκολλο μέσα στον υπολογιστή και στη συνέχεια ο υπολογιστής μεταφέρει τις πληροφορίες στο όργανο. Επίσης ο υπολογιστής καταγράφει τις θερμοκρασίες και τα σήματα φθορισμού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και επεξεργάζεται τέλος τα αποτελέσματα μέσω κατάλληλου λογισμικού [130].

6.5.2. Real-Time PCR και ανάλυση καμπυλών τήξης για το γονίδιο *TARDBP*

Ο πολυμορφισμός που εξετάσθηκε (p.Ile383Val/rs80356740) συνιστά μια μετάπτωση A>G (c.1147A>G) (g.14935A>G) στο κωδικόνιο 383, στο εξόνιο 6 του γονιδίου του *TARDBP*. Για τις ανάγκες της γονοτύπησης ενισχύθηκε με real-time PCR γενωμικό τμήμα 248 bp. Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν από την εταιρία TIB MOL-BIOL. Το τμήμα αυτό εδράζεται στην χρωμοσωμική περιοχή 1p36.22 (GeneBank accession number: NG_008734). Οι ανιχνευτές είναι επισημασμένοι με φθορίζουσες χρωστικές και προσδένονται σε διάταξη κεφαλή-ουρά στο PCR προϊόν σε απόσταση πέντε νουκλεοτιδίων (εικόνα 6.4.2.α.) ώστε κατά τον υβριδισμό να εκδηλώνεται το φαινόμενο FRET και να εκπέμπεται ακτινοβολία.



6.5.2.α. Σχετική θέση εκκινητών, ανιχνευτών υβριδοποίησης και της πολυμορφικής θέσης κατά μήκος του γονιδίου TARDBP. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι κωδικές περιοχές και με πράσινο η αλληλουχία του mRNA.

Συγκεκριμένα κατά το στάδιο του υβριδισμού διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 470 nm η χρωστική φλουορεσκεΐνη του ανιχνευτή TARDBP-FL. Η φλουορεσκεΐνη εκπέμπει στη συνέχεια ακτινοβολία που απορροφάται από την παρακείμενη φθορίζουσα χρωστική LC640 του ανιχνευτή TARDBP-LC, η οποία και φθορίζει στα 640 nm. Το σήμα του φθορισμού μετράται από το όργανο και καταγράφεται σε διάγραμμα σε συνάρτηση με τους κύκλους της αντίδρασης. Οι αλληλουχίες και οι θερμοκρασίες τήξης (T_m) των ανιχνευτών και των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη real-time PCR για το TARDBP γονίδιο παρουσιάζονται στον πίνακα 6.5.2.β.

6.5.2.β. Οι αλληλουχίες και οι θερμοκρασίες τήξης Tm των ανιχνευτών και των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην real-time PCR

Εκκινητής/Ανιχνευτής	Αλληλουχία	Tm (°C)	Θέση στην GeneBank Αλληλουχία NG_008734
Πρόσθιος εκκινητής TARDBP S	5'-TCGGGTAATAACCAAAACCAAG	56,7	14.836-14.857
Ανάστροφος εκκινητής TARDBP A	5'-GAAAAATTTGAATTCCCACCATTTCTATAC	58,8	15.056-15.084
Ανιχνευτής TARDBP FL	CAACCAACTGCTGCACCAG-FL	58,8	14.924-14.942
Ανιχνευτής TARDBP LC	LC640- GAGCCACTATAAGAGTTATTTCCCAGAACCG- PH	62,4	14.918-14.989

Η αντίδραση έγινε με μίγμα πολυμεράσης και μαγνησίου από το kit LightCycler FastStart DNA Master HybProbe της Roche Applied Science. Το πρωτόκολλο σε τελικό όγκο 10 μl και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της ενίσχυσης φαίνονται στους πίνακες 6.5.2.γ και 6.5.2.δ:

6.5.2.γ. Πρωτόκολλο Real Time PCR για το γονίδιο TARDBP

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική Συγκέντρωση
H ₂ O	-	4,7	-
MgCl ₂	25 mM	0,8	3 mM
Πρόσθιος εκκινητής TARDBP S	20 pmol/μl	0,9	2 pmol/μl
Ανάστροφος εκκινητής TARDBP A	20 pmol/μl	0,3	0,5 pmol/μl

TARDBP-FL	3 mM	0,4	0,15 mM
TARDBP-LC	3 mM	0,4	0,15 mM
Roche Mix	10X	1	1X
DNA	-	1,5	-

6.5.2.δ. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα Real-Time PCR για το γονίδιο TARDBP

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επανάληψεις
Αρχικός διαχωρισμός κλώνων DNA	95°C	10 min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C	10 sec	40 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	52°C	20 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C	20 sec	

Μετά την ενίσχυση ακολουθεί πρόγραμμα τήξης κατά το οποίο η θερμοκρασία μετά από αρχική αποδιάταξη στους 95°C, μειώνεται στους 40 °C και κατόπιν σταδιακά αυξανόταν με παράλληλη συχνή καταγραφή της έντασης του φθορισμού. Η καμπύλη τήξης, η οποία και σχεδιάζοταν αυτόματα από το όργανο, προέκυπτε από την αρνητική πρώτη παράγωγο της συνάρτησης μεταβολής της έντασης του φθορισμού ως προς την θερμοκρασία. Ο πίνακας 6.5.2.ε. συνοψίζει το θερμοκρασιακό πρόγραμμα τήξης:

6.5.2.ε. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης καμπυλών τήξης για το γονίδιο TARDBP

Στάδιο ανάλυσης τήξης	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Ρυθμός Μεταβολής
1ο	95°C	2 min	20°C/sec
2ο	40°C	2 min	20°C/sec
3ο	40-85°C	-	0,4°C/sec

6.6. ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΑ ΕΡΓΑΛΕΙΑ (IN SILICO TOOLS)

Η μονονουκλεοτιδική παραλλαγή που μελετήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής είναι αγνώστου κλινικής σημασίας, οπότε μελετήθηκε παράλληλα με διάφορα υπολογιστικά εργαλεία τα οποία προσπαθούν να προβλέψουν την παθογονικότητά της και στηρίζονται κυρίως στις ιδιότητες του αμινοξέος καθώς και στον βαθμό συντήρησης του νουκλεοτιδίου εξελικτικά. Τα υπολογιστικά εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή αναφέρονται παρακάτω.

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SIFT (short intolerant from tolerant substitutions) (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>). Το SIFT προβλέπει την επίδραση μιας υποκατάστασης αμινοξέος στην λειτουργία της πρωτεΐνης, αντλώντας πληροφορίες για την θέση αυτή από ομόλογες αλληλουχίες σε άλλα είδη, στα οποία δύναται να έχουν την ίδια λειτουργικότητα. Το SIFT τελικά καταλήγει στον διαχωρισμό των υποκαταστάσεων αμινοξέων σε μη-επιβλαβείς (tolerated) και παθογόνους (damaging) [131].

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Align GVGD (<http://agvgd.hci.utah.edu/>) συνδυάζει τα βιοφυσικά χαρακτηριστικά των αμινοξέων και τη γραμμική αντιστοίχιση πολλαπλών πρωτεϊνικών αλληλουχιών, για την πρόβλεψη της επίδρασης των παρανοηματικών παραλλαγών στην λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Οι παραλλαγές εμπίπτουν σε μία από τις εξής κατηγορίες: C0, C15, C25, C35, C45, C55 και C65 με τις C0-C15 να αντιστοιχούν σε ουδέτερες παραλλαγές και τις C35-C65 να αντιστοιχούν στις επιβλαβείς παραλλαγές που μεταβάλλουν την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης [132].

Το PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) είναι ένα εργαλείο που προβλέπει την πιθανή επίδραση μιας υποκατάστασης αμινοξέος στη δομή και λειτουργία μιας ανθρώπινης πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας απλές φυσικές και συγκριτικές εκτιμήσεις. Οι παραλλαγές εντάσσονται στις εξής κατηγορίες: μη επιβλαβείς (benign), πιθανώς παθογόνοι (possibly damaging) και μεγάλη πιθανότητα παθογένειας (probably damaging) [133].

Το Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>) είναι ένα λογισμικό που προβλέπει την πιθανότητα συμμετοχής μιας γενετικής αλλαγής στην εμφάνιση μιας ασθένειας. Ενσωματώνει δεδομένα από διαφορετικές βάσεις δεδομένων από υπολογιστικά εργαλεία, και διαχωρίζει τις παραλλαγές σε πολυμορφισμούς (polymorphism) και σε ικανές για πρόκληση ασθένειας (disease causing). Έχει σχεδιαστεί για την πρόβλεψη των λειτουργικών επιπτώσεων, όχι μόνο των υποκαταστάσεων αμινοξέων, αλλά και συνώνυμων αλλαγών, μικρών ενθέσεων ή/και απαισιωφών, καθώς και παραλλαγών σε όρια ιντρονίων/εξωνίων.

Στο Mutation Taster, δίνονται και οι τιμές PhyloP και PhastCons, οι οποίες είναι ιδιαίτερα χρήσιμες. Το λογισμικό PhyloP εκτιμά το βαθμό συντήρησης μιας θέσης εξελικτικά, βασιζόμενο στην

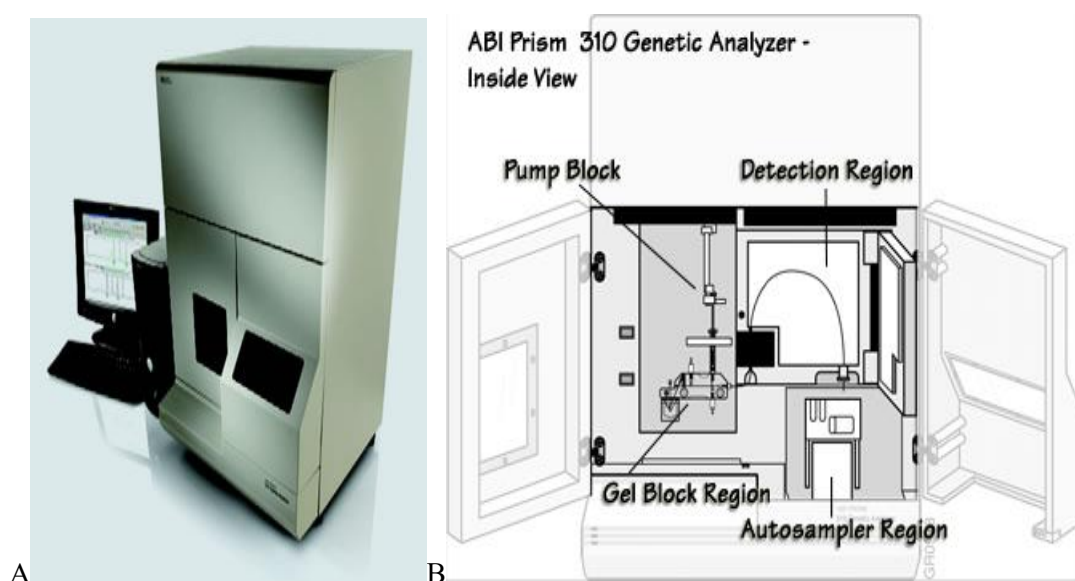
αντιστοίχιση γονιδιωματικών αλληλουχιών 46 ειδών. Το αρνητικό πρόσημο αντιστοιχεί σε ταχύτερη εξέλιξη από την αναμενόμενη, ενώ το θετικό αντιστοιχεί σε συντηρημένες θέσεις. Αντίστοιχα το PhastCons εκτιμά την πιθανότητα μια θέση (νουκλεοτίδιο) να είναι φυλογενετικά συντηρημένη. Οι τιμές κυμαίνονται μεταξύ 0 και 1, με το 1 να ανταποκρίνεται σε υψηλά συντηρημένη θέση [134].

6.7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ DNA (DNA SEQUENCING)

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις περιγραφείσες μεθόδους για τον πολυμορφισμό του γονιδίου *TARDBP* έγινε με την χρήση μεθοδολογίας αναφοράς, δηλαδή της αλληλούχισης του DNA (DNA sequencing).

6.7.1. Οργανολογία

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με το όργανο ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) (εικ. 9.24).



6.7.1.α. Ο γενετικός αναλυτής ABI Prism 310 A) Εξωτερική άποψη B) Εσωτερική άποψη.

Για την πραγματοποίηση της αλληλούχισης, τα σωληνάρια τοποθετούνται σε δίσκο δειγμάτων (autosampler tray). Ο δίσκος αυτός εν συνεχεία φέρνει κάθε δείγμα σε επαφή με το ηλεκτρόδιο-κάθοδο και το ένα άκρο ενός γυάλινου τριχοειδούς που περιέχει πολυμερές. Το ηλεκτρόδιο-άνοδος στο άλλο άκρο του τριχοειδούς βυθίζεται ακολούθως σε buffer. Καθώς ρεύμα ρέει από την κάθοδο προς την άνοδο, μέρος του δείγματος εισέρχεται στο τριχοειδές, σε μια διαδικασία που καλείται ηλεκτροκινητική έγχυση. Το άκρο του τριχοειδούς που βρίσκεται προς την κάθοδο εισέρχεται κατόπιν στο buffer. Ηλεκτρικό ρεύμα εφαρμόζεται εκ νέου, ώστε να συνεχισθεί η ηλεκτροφόρηση. Όταν τα νουκλεοτίδια φθάσουν στο παράθυρο ανίχνευσης μια πηγή laser διεγείρει τις φθορίζουσες χρωστικές και ο

φθορισμός καταγράφεται από μια ψυχρή, διπλού φορτίου κάμερα (charge- coupled device- CCD). Το λογισμικό ερμηνεύει τέλος το αποτέλεσμα και αναγνωρίζει τις βάσεις που αντιστοιχούν στα δεδομένα της μετρούμενης έντασης φθορισμού.

Το όργανο αυτό χρησιμοποιεί ομάδες εικονικών φίλτρων για να ανιχνεύσει την ένταση του φθορισμού σε τέσσερις μη επικαλυπτόμενες περιοχές πάνω στην CCD κάμερα. Κάθε περιοχή αντιστοιχεί σε ένα φάσμα μηκών κύματος που περιέχει ή είναι κοντά στο μέγιστο της εκπομπής της χρωστικής του ABI prism. Αυτή η διαδικασία είναι αντίστοιχη με την χρήση ενός φυσικού φίλτρου που χωρίζει το φως σε διαφορετικά μήκη κύματος. Εν τούτοις, οι ομάδες των φίλτρων ονομάζονται «εικονικά φίλτρα» επειδή το όργανο δεν έχει φυσικά φίλτρα ως εξαρτήματα για να κάνει τον διαχωρισμό. Οι ακριβείς θέσεις των CCD περιοχών και οι κατάλληλοι συνδυασμοί των χρωστικών γι' αυτές τις θέσεις εξαρτώνται από τις ομάδες των εικονικών φίλτρων που χρησιμοποιούνται. Για παράδειγμα, με την ομάδα εικονικών φίλτρων E το όργανο καταγράφει την ένταση του φωτός σε τέσσερις περιοχές ή «παράθυρα» κεντραρισμένα στα 540 nm, στα 570 nm, στα 595 nm, και στα 625 nm. Οι θέσεις των παραθύρων σε κάθε ομάδα εικονικού φίλτρου έχει βελτιστοποιηθεί ώστε να παρέχει το μέγιστο δυνατό διαχωρισμό μεταξύ των κέντρων ανίχνευσης για τις διαφορετικές χρωστικές ενώ διατηρεί καλή ένταση σήματος.

6.7.2 Συνολική πειραματική πορεία

Για την πραγματοποίηση της αλληλούχισης ενός τμήματος DNA απαιτούνται τα εξής διαδοχικά βήματα τα οποία αναλύονται στα επόμενα εδάφια:

- Ενίσχυση του τμήματος DNA με συμβατική PCR
- Καθαρισμός των PCR προϊόντων
- Εφαρμογή της μεθόδου θεμικών κύκλων (Cycle Sequencing) στα κεκαθαρμένα PCR προϊόντα
- Καθαρισμός των προϊόντων του Cycle Sequencing και προετοιμασία για εισαγωγή στο ABI Prism 310 Genetic Analyzer
- Αλληλούχιση και λήψη των δεδομένων

6.7.3. Ενίσχυση με συμβατική PCR

Η αρχική ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδίου *TARDBP*, στο όργανο Primus, έγινε με τα πρωτόκολλα και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που προαναφέρθηκαν στο εδάφιο περί πρωτοκόλλου συμβατικής PCR.

6.7.4. Καθαρισμός PCR Προϊόντων

Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων έγινε με το προτυποποιημένο σετ αντιδραστηρίων Quick PCR clean-up Kit της Invitrogen. Η μέθοδος βασίζεται στην κατακράτηση του DNA από τις ειδικές στήλες του kit που περιέχουν μεμβράνες πυριτίου. Το DNA απορροφάται στην μεμβράνη παρουσία του διαλύματος πρόσδεσης (B2) το οποίο εξασφαλίζει τις απαραίτητες συνθήκες (υψηλές συγκεντρώσεις άλατος και κατάλληλο pH). Οι προσμίξεις (όπως περίσσεια εκκινητών, άλατα, ένζυμα, μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια, αγαρόζη, χρωστικές, βρωμιούχο αιθίδιο) διαπερνούν την στήλη και απομακρύνονται με πλύσεις. Η κάθε στήλη παρέχει αποτελεσματική πρόσδεση PCR προϊόντων μεγέθους μεγαλύτερου των 70 bp. Το DNA μετά την ολοκλήρωση των εκπλύσεων, εκλύεται με 15-30 μ l από το διάλυμα έκλουσης (E1).

Αντιδραστήρια / Υλικά

- Στήλες PCR clean-up
- Διάλυμα πρόσδεσης B2 (Binding Buffer)
- Διάλυμα εκπλύσεων W1 (Washing Buffer)
- Διάλυμα έκλουσης E1 (Elution Buffer)
- Πιπέτες (Thermo, Fisher USA) των 10 μ l, 100 μ l, 200 μ l και 1000 μ l
- Ρύγχη των 10 μ l, 200 μ l και 1000 μ l
- Φυγόκεντρος (Biofuge, Heraeus, Thermo Fisher, USA)
- Συσκευή Vortex (Fisher, USA)
- Σωληνάρια τύπου eppendorfs των 1,5 ml
- Σωληνάρια συλλογής των 2 ml (Collection Tubes)

Πειραματική πορεία

1. Σε κάθε δείγμα (των 25 μ l) προστίθενται 100 μ L διάλυμα πρόσδεσης B2, ακολουθεί έντονη ανάδευση και φυγοκέντρωση.
2. Μια στήλη PCR clean-up εισάγεται σε ένα σωληνάριο συλλογής. Μεταφέρεται το δείγμα του δεύτερου βήματος στο επάνω μέρος της στήλης και φυγοκεντρείται για 1 min στα 10.000xg.
3. Το διήθημα απορρίπτεται και τοποθετείται την στήλη μέσα στο ίδιο σωληνάριο.
4. Προστίθενται 650 μ l διάλυμα εκπλύσεων στη στήλη και φυγοκεντρείται για 30 sec στα 10.000xg.
5. Το διήθημα απορρίπτεται και τοποθετείται την στήλη μέσα στο ίδιο σωληνάριο.

6. Απορρίπτεται το διήθημα και τοποθετείται η στήλη μέσα στο ίδιο σωληνάριο και φυγοκεντρείται στα 10.000xg για τρία επιπλέον λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια διαλύματος έκπλυσης.
7. Απορρίπτεται το σωληνάριο συλλογής με το διήθημα και τοποθετείται την στήλη σε ένα καθαρό eppendorf των 1.5 ml.
8. Για την έκλυση του DNA, προστίθενται 50 µl διαλύματος έκλυσης NE. Ύστερα από διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min, φυγοκεντρώνεται στα 10.000xg για 3 min. Τα αποκτηθέντα προϊόντα διατηρούνται στους -20°C.

6.7.5. Αντίδραση θερμικών κύκλων (cycle sequencing)

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η αντίδραση των θερμικών κύκλων είναι παρόμοια με αυτή της PCR. Τα περισσότερα συστατικά που χρησιμοποιούνται είναι τα ίδια με αυτά της PCR και ακολουθείται η ίδια διαδικασία με θερμικούς κύκλους. Μια διαφορά είναι ότι μόνο ένας εκκινητής χρησιμοποιείται σε κάθε αντίδραση cycle sequencing (είτε ο πρόσθιος είτε ο ανάστροφος), με αποτέλεσμα η ενίσχυση του προϊόντος να είναι γραμμική και όχι εκθετική. Μια άλλη διαφορά είναι ότι τα ddNTPs που χρησιμοποιούνται διακόπτουν την επέκταση του DNA όταν ενσωματωθούν. Επειδή η αντίδραση του cycle sequencing είναι μια διαδικασία γραμμικής ενίσχυσης είναι λιγότερο επιρρεπής στις επιμολύνσεις, αλλά παρόλα αυτά δεν παύει να χρειάζεται στείρες συνθήκες. Στον παρακάτω πίνακα 6.7.5.α. καταγράφονται τα συστατικά της αντίδρασης cycle sequencing.

6.7.5.α. Πρωτόκολλο Cycle Sequencing για το γονίδιο TARDBP

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος (µl)	Τελική συγκέντρωση
RRmix, ABI	0,5	
5X sequencing buffer, ABI	2	
Εκκινητής (5 pmol/µl)	1	0,25 pmol/µl
H ₂ O	4,5	
Κεκαθαρμένο PCR προϊόν	2	

6.7.5.β.Θερμοκρασιακό πρόγραμμα Cycle Sequencing για το TARDBP

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	96°C	1 min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	96°C	10 sec	25 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	50°C	10 sec	
Επέκταση των εκκινητών	60°C	4min	

6.7.6.Καθαρισμός των προϊόντων του Cycle Sequencing

Ο καθαρισμός των προϊόντων του Cycle Sequencing έγινε, κυρίως, με το προτυποποιημένο σετ αντιδραστηρίων Nucleoseq της Macherey-Nagel (Γερμανία). Το kit αυτό αποτελείται από στήλες NucleoSEQ, σχεδιασμένες για τον γρήγορο και αποτελεσματικό καθαρισμό νουκλεϊκών οξέων. Περιέχουν gel το οποίο παρέχει αξιόπιστη αφαίρεση των μικρότερων μορίων από τα νουκλεϊκά οξέα. Ακαθαρσίες όπως άλατα, περίσσεια επισημαντών, νουκλεοτίδια, ίχνη οργανικών διαλυτών και εκκινητών συγκρατούνται από τη στήλη ενώ τα νουκλεϊκά οξέα που μας ενδιαφέρουν ανακτούνται με υψηλή απόδοση.

Αντιδραστήρια / Υλικά

- Πιπέτες (Thermo, Fisher USA) των 100 μl και 1000 μl
- Ρύγχη των 200 μl και 1000 μl
- Φυγόκεντρος (Biofuge, Heraeus, Thermo Fisher, USA)
- Στείρο νερό (BIOSEP A.E, Ελλάδα)
- Συσκευή Vortex (Fisher, USA)
- Σωληνάρια τύπου eppendorfs των 1,5 ml
- Στήλες NucleoSEQ (Macherey-Nagel, Γερμανία)

Πειραματική πορεία

1. Φυγοκέντρωση των στηλών NucleoSEQ για 30 sec στα 750xg για να συλλεχθεί στον πυθμένα, η πηκτή που βρίσκεται σε σκόνη μέσα στις στήλες.
2. Προσθήκη 600 μl στείρου νερού και έντονη ανακίνηση ώστε να ενυδατωθεί το gel. Αφαιρούνται οι φυσαλίδες κάνοντας vortex.

3. Επώαση τουλάχιστον 30 min ή ολονύκτια. Η επώαση μπορεί να γίνει σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 4°C. Οι ενυδατωμένες στήλες μπορούν να φυλαχθούν στους 4°C για το πολύ 14 μέρες. Γίνεται ανασύσταση του gel που έχει συγκεντρωθεί στον πάτο της στήλης κάνοντας έντονη ανάδευση. Δεν πρέπει να δημιουργηθούν φυσαλίδες. Αφαιρείται το πόμα που βρίσκεται στον πυθμένα της στήλης και τοποθετείται η στήλη μέσα στο δοχείο συλλογής.

4. Φυγοκέντρηση για 2 min στα 750xg ώστε να αφαιρεθεί το διάλυμα αποθήκευσης που περισσεύει. Απόρριψη του δοχείου συλλογής με το διάλυμα και τοποθέτηση της στήλης σε σωληνάριο τύπου eppendorf των 1,5 ml.

5. Ανοίγεται το καπάκι της στήλης. Προσεκτικά φορτώνεται το δείγμα στο κέντρο του gel χωρίς να διαταραχθεί η επιφάνειά του. Τοποθέτηση του δείγματος στα πλάγια της στήλης μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της αποτελεσματικότητας της. Ο όγκος του δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 20 μl.

6. Φυγοκέντρηση της στήλης για 4 – 6 min στα 750xg. Η στήλη απορρίπτεται, ξηραίνεται το δείγμα ή το χρησιμοποιείται απευθείας.

Ο καθαρισμός των προϊόντων του Cycle Sequencing έγινε με την μέθοδο της αιθανόλης και του EDTA:
Αντιδραστήρια / Υλικά

- Αιθανόλη απόλυτη
- Αιθανόλη 70%
- EDTA 125 mM
- Πιπέτες (Thermo Fisher, USA) των 10 μl και 100 μl
- Ρύγχη των 10 μl και 200 μl
- Φυγόκεντρος (Biofuge, Heraeus, Thermo Fisher, USA)
- Επωαστήρας σωληναρίων (Grant, Αγγλία)
- Σωληνάκια τύπου eppendorfs των 1,5 ml

Πειραματική πορεία

1. Προστίθενται 5 μl EDTA 125 mM σε κάθε δείγμα, στον πάτο του σωληναρίου.
2. Προστίθενται 60 μl 100% αιθανόλη.
3. Ανακινούνται ελαφρώς και διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min.
4. Φυγοκεντρούνται στα 6000xg για 30 min στους 4 °C (εάν δεν συνεχιστεί η διαδικασία με το βήμα 5 αμέσως, φυγοκεντρούνται για 2 min παραπάνω).
5. Αφαιρείται προσεχτικά το υπερκείμενο με την βοήθεια πιπέτας.
6. Προστίθενται 60 μl 70% αιθανόλης.

7. Φυγοκεντρώνονται στα 6000xg για 15 min στους 4 °C.
8. Αφαιρείται προσεχτικά το υπερκείμενο με την βοήθεια πιπέτας.
9. Επώαση στους 50 °C, μέχρι την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης.

Ο συγκεκριμένος τρόπος καθαρισμού CycleSeq προϊόντων είναι χρονοβόρος αλλά δεν επιδρά σημαντικά στην μετέπειτα διαδικασία.

6.7.7.Προετοιμασία δειγμάτων για το Sequencing

Τα κεκαθαρμένα προϊόντα του Cycle Sequencing τοποθετούνται ακολούθως στο ABI Prism 310 Genetic Analyzer, με τη διαδικασία που περιγράφεται ακολούθως:

Αντιδραστήρια / Υλικά/ Εξοπλισμός

- Επωαστήρας σωληναρίων (Grant, Αγγλία)
- Πιπέτες (Thermo, Fisher USA) των 100 μl
- Αποστειρωμένο νερό (BIOSEP A.E, Ελλάδα)
- Συσκευή Vortex (Fisher, USA)
- Σωληνάρια τύπου eppendorfs των 1,5 ml
- Πολυμερές POP6 (Applied Biosystems, USA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10X (Applied Biosystems, USA)
- Φορμαμίδιο HiDi (Applied Biosystems, USA)
- Σωληνάρια αντίδρασης 0,5 ml (Applied Biosystems, USA)
- Τριχοειδές 47 mm (Applied Biosystems, USA)
- Γενετικός Αναλυτής ABI 310 (Applied Biosystems, USA)

Πειραματική πορεία

1.Τοποθετούνται σε ένα σωληνάριο τύπου Eppendorf των 0,5 ml, 10 μl από το καθαρό cycle sequencing προϊόν και 10 μl φορμαμίδιο υψηλής καθαρότητας.

2. Επωάζεται στους 95°C για 2 min και στην συνέχεια στους 4°C για άλλα 2 min.

3.Τα σωληνάρια αντίδρασης των 0,5 ml μεταφέρονται και φορτώνονται στο γενετικό αναλυτή ABI310.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ *TARDBP* ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗΣ FTD ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ REAL-TIME qPCR MELTING CURVE ANALYSIS

Πραγματοποιήθηκε η γονοτύπηση 133 δειγμάτων FTD ασθενών και 60 δειγμάτων ελέγχου με μέθοδο Real Time PCR σχεδιασμένη ειδικά για την ανίχνευση της μετάλλαξης p.Ile383Val στο γονίδιο *TARDBP*, το μεταλλαγμένο αλληλίο εμφανίζει MAF (Minor Allele Frequency) $G=0,00002/124.722$ σύμφωνα με την βάση δεδομένων ExAC. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν 5 από τους 133 ασθενείς με FTD να έχουν το μεταλλαγμένο αλληλίο σε ετεροζυγωτία, ενώ στα δείγματα ελέγχου μόνο ένα δείγμα βρέθηκε σε ετεροζυγωτία. Η χαμηλή συχνότητα του αλληλομόρφου και το γεγονός ότι εμφανίζεται σε 5 από τους 133 Έλληνες FTD ασθενείς (χωρίς να υπάρχει συγγένεια μεταξύ τους) πιθανόν να συνάδει με την υπόθεση ότι η παραλλαγή αυτή αποτελεί ιδρυτική μετάλλαξη στον Ελληνικό πληθυσμό (πίνακες 7.1.α.-7.1.γ.)

7.1.α. Πίνακας αποτελεσμάτων *TARDBP* γονοτύπησης FTD ασθενών

Δείγμα	Φύλο	Ηλικία	Γονότυπος
A134	Θ	67	A/A
A153	Θ	60	A/A
A160	Θ	65	A/A
A168	Θ	67	A/A
A181	Θ	60	A/A
A182	Θ	69	A/A
A183	Θ	68	A/A
A189	Θ	75	A/A
A198	Θ	62	A/A
A201	A	.	A/A
A219	A	75	A/A
A240	A	59	A/A
A250	Θ	51	A/A
A253	A	73	A/A
A287	Θ	.	A/A
A289	A	54	A/A
A299	A	64	A/A
A304	Θ	69	A/A
A305	A	59	A/A
A316	Θ	67	A/A
A317	A	77	A/A
A322	Θ	56	A/A
A327	Θ	62	A/A

A332	A	70	A/A
A348	Θ	71	A/A
A354	A	62	A/A
A362	Θ	59	A/A
A386	A	66	A/A
A395	A	78	A/A
A399	A	73	A/A
A405	A	60	G/A
A407	A	83	A/A
A410	A	60	A/A
A420	Θ	49	A/A
A423	Θ	73	A/A
A439	Θ	.	A/A
A447	Θ	65	A/A
A448	Θ	79	A/A
A456	Θ	70	A/A
A458	Θ	55	A/A
A459	Θ	78	A/A
A460	A	51	A/A
A464	Θ	70	A/A
A465	Θ	57	A/A
A468	Θ	56	A/A
A475	Θ	81	A/A
A479	Θ	65	A/A
A480	Θ	45	A/A
A488	A	67	A/A
A491	A	64	G/A
A492	A	58	A/A
A495	Θ	60	A/A
A496	A	72	A/A
A497	A	66	G/A
A498	Θ	75	A/A
A500	Θ	47	A/A
A501	Θ	70	A/A
A505	Θ	56	A/A
A506	A	67	A/A
A509	A	71	A/A
A510	Θ	75	A/A
A514	A	68	A/A
A515	A	59	A/A
A516	Θ	80	A/A
A519	A	58	G/A
A520	A	72	A/A
A521	A	82	A/A
A522	Θ	74	A/A

A523	A	56	A/A
A530	Θ	71	A/A
A535	Θ	82	A/A
A537	Θ		A/A
A538	A	38	A/A
A540	Θ	73	A/A
A541	A	79	A/A
A542	Θ	77	A/A
A543	A	78	A/A
A546	A	69	A/A
A549	A	76	A/A
A554	A	63	A/A
A555	Θ	65	A/A
A557	Θ	59	A/A
A559	A	73	A/A
A560	A	67	A/A
A562	Θ	72	A/A
A563	Θ	81	A/A
A566	A	59	A/A
A570	A	82	A/A
A572	A	46	A/A
A605	Θ	77	A/A
A606	A	77	A/A
A659	A	67	A/A
A672	A	74	A/A
A708	A	.	A/A
A728	Θ	54	G/A
A748	Θ	68	A/A
D1	A	47	A/A
D2	Θ	55	A/A
D26	A	74	A/A
D28	Θ	51	A/A
D29	Θ	60	A/A
D30	Θ	61	A/A
D31	A	68	A/A
D32	A	.	A/A
D34	Θ	52	A/A
D35	A	.	A/A
D36	A	.	A/A
D37	A	55	A/A
D38	A	76	A/A
D39	A	53	A/A
D40	Θ	72	A/A
D41	Θ	61	A/A
D42	A	61	A/A

D43	Θ	.	A/A
D44	A	.	A/A
D45	Θ	73	A/A
D47	Θ	50	A/A
D48	A	41	A/A
D49	A	60	A/A
D50	A	.	A/A
D51	A	62	A/A
D52	A	51	A/A
D53	Θ	67	A/A
D55	Θ	55	A/A
D56	Θ	75	A/A
D59	Θ	50	A/A
D60	Θ	57	A/A
D61	Θ	59	A/A
D69	Θ	56	A/A

7.1.β. Πίνακας αποτελεσμάτων TARDBP γονοτύπησης δειγμάτων ελέγχου

<i>Δείγμα</i>	<i>Ηλικία</i>	<i>Ηλικία</i>	<i>Γονότυπος</i>
A211	Θ	58	A/A
A229	A	67	A/A
A241	Θ	58	A/A
A242	A	64	A/A
A249	A	59	A/A
A259	Θ	47	A/A
A276	Θ	47	A/A
A293	Θ	67	A/A
A296	Θ	48	A/A
A297	A	61	A/A
A308	Θ	60	A/A
A320	Θ	58	A/A
A323	Θ	73	A/A
A334	Θ	49	A/A
A340	A	78	A/A
A341	A	74	A/A
A344	Θ	69	A/A
A353	A	53	A/A
A360	A	56	A/A
A363	A	77	A/A
A367	Θ	51	A/A

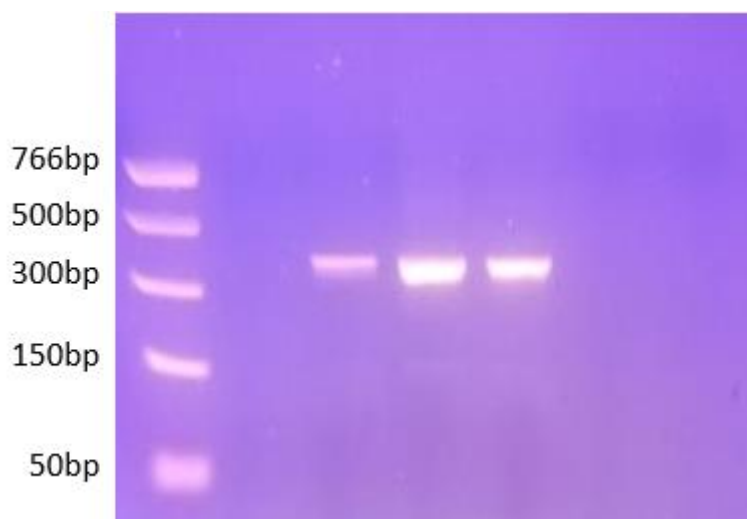
A369	Θ	54	A/A
A370	Θ	52	A/A
A371	Θ	65	A/A
A372	A	70	A/A
A400	Θ	61	A/A
A409	Θ	75	A/A
A414	Θ	59	A/A
A416	Θ	61	A/A
A419	Θ	64	A/A
A421	Θ	62	A/A
A427	A	64	A/A
A432	Θ	71	A/A
A434	Θ	70	A/A
A443	Θ	64	A/A
A611	Θ	80	A/A
A612	Θ	68	A/A
A638	A	55	A/A
A647	Θ	54	A/A
A653	A	80	A/A
A663	Θ	80	A/A
A673	Θ	83	A/A
A675	A	73	A/A
A680	A	73	A/A
A694	Θ	66	A/A
A696	Θ	72	G/A
A698	A	60	A/A
A700	A	79	A/A
A705	Θ	67	A/A
A706	A	75	A/A
A709	Θ	87	A/A
A713	Θ	55	A/A
A716	Θ	76	A/A
A719	A	84	A/A
A721	Θ	72	A/A
A724	Θ	55	A/A
A726	Θ	67	A/A
A727	Θ	60	A/A
A731	Θ	67	A/A
A733	Θ	62	A/A

7.1.γ. Συγκεντρωτικός Πίνακας κλινικών δεδομένων, θετικών για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο

Κωδικός	Όνομα	Ηλικία	Φύλο	Διάγνωση	Ιστορικό
A405	Φ.Ε.	60	Α	bvFTD	Όχι
A495 G112	Π.Ζ.	64	Α	FTD-SD/svPPA	Όχι
A497 G118	Σ.Γ.	58	Α	FTD-SD/svPPA	Ναι
A519 G140	Η.Ν.	66	Α	FTD-SD/svPPA	Ναι
A728	Γ.Ε.	54	Θ	FTD	Ναι
A696	Μ.Ε.	72	Θ	Control	-

7.2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΘΟΔΟΥ REAL-TIME qPCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ p.Ile383Val ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *TARDBP*

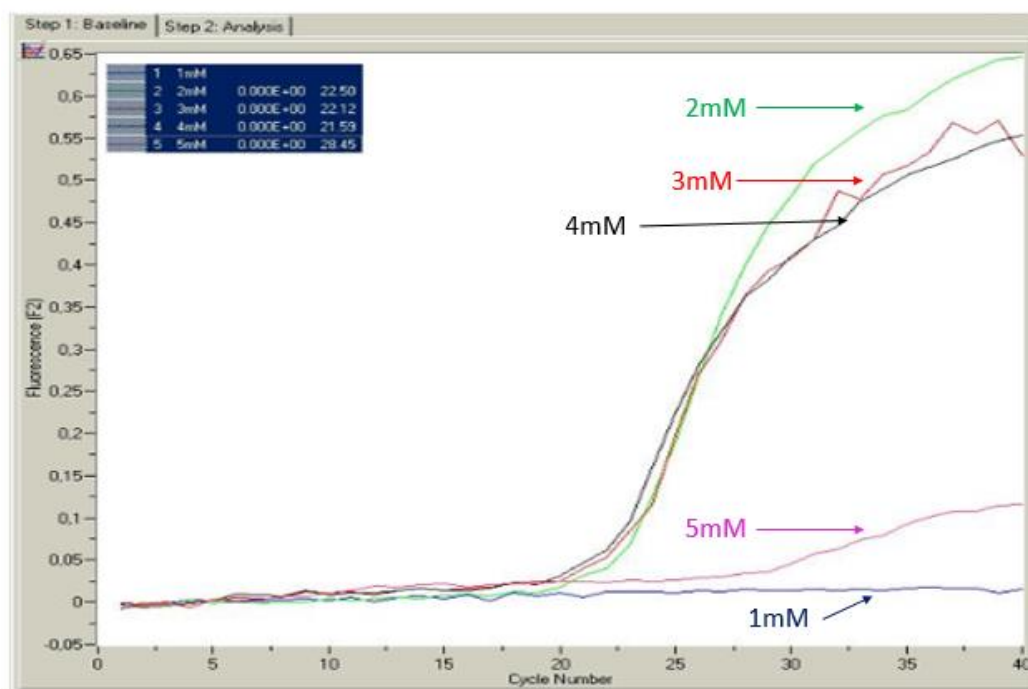
Η PCR πραγματικού χρόνου για το *TARDBP* με το πρωτόκολλο και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 6, οδήγησε σε ενίσχυση γονιδιακού τμήματος 248 bp, χωρίς παραπροϊόντα, όπως επιβεβαιώθηκε μετά από αναστροφή των τριχοειδών σε eppendorf tubes, φυγοκέντρησή τους μετά το πέρας της αντίδρασης και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% (εικόνα 7.2.α.).



7.2.α. Ηλεκτροφόρηση αгарόζης προϊόντος Real-Time PCR για γονοτύπηση *TARDBP*.

7.3. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ REAL-TIME qPCR

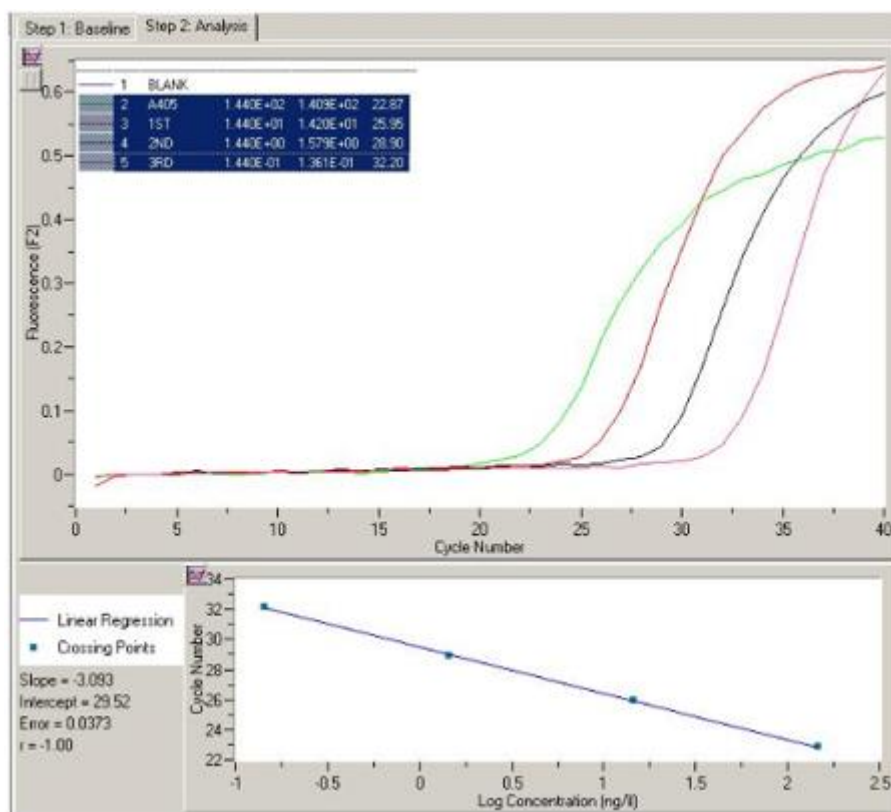
Αρχικά έγιναν δοκιμές για την ποσότητα μαγνησίου που θα χρησιμοποιηθεί στην PCR, με ένα πείραμα καμπύλης μαγνησίου όπου δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM.



7.3.α. Καμπύλη μαγνησίου για το γονίδιο TARD BP. Το ίδιο δείγμα ενισχύθηκε στην ίδια αντίδραση πεντάκις με διαφορετική σε κάθε περίπτωση, τελική συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου (1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM). Παρατηρείται βέλτιστη απόδοση για την συγκέντρωση 2 mM.

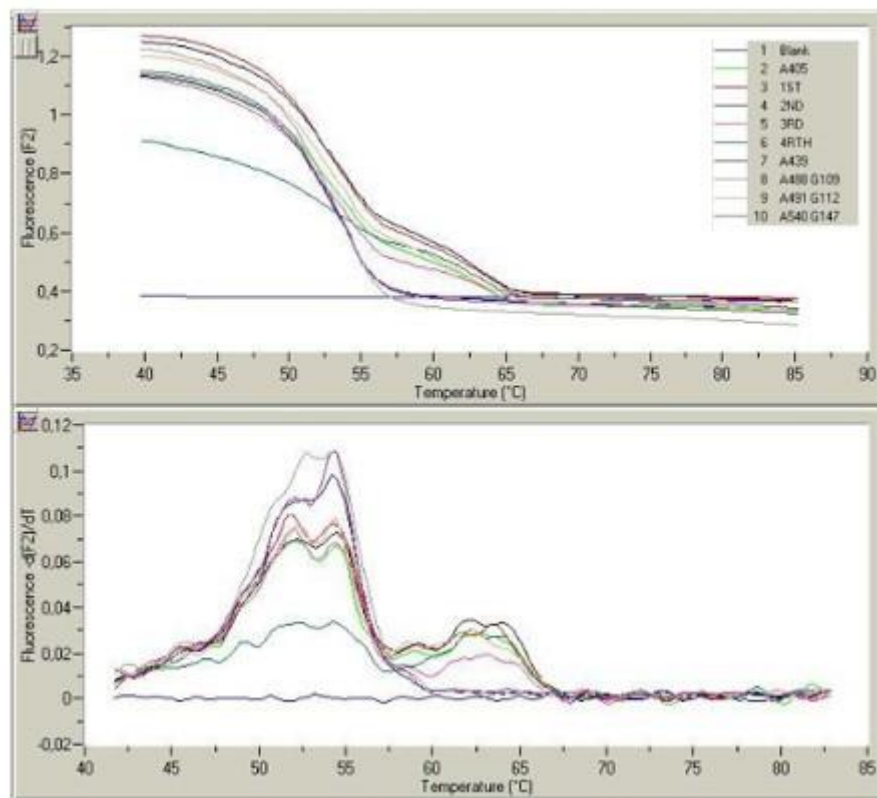
Παρόλο που τα αποτελέσματα της καμπύλης επέδειξαν ως βέλτιστη συγκέντρωση τα 2 mM, τελικά στο πειραματικό κομμάτι αποδείχθηκε πιο αποτελεσματική η συγκέντρωση μαγνησίου 3 mM (εικόνα 7.3.α.).

Κατόπιν βελτιστοποιήσεων κατέστη σαφές ότι το σήμα φθορισμού ήταν ισχυρότερο με την εφαρμογή ασύμμετρης PCR έτσι ο πρόσθιος εκκινητής προστίθεται σε αναλογία 3:1 ως προς τον ανάστροφο. Όπως είναι κατανοητό, η προσθήκη περίσσειας του πρόσθιου εκκινητή έχει ως αποτέλεσμα την σύνθεση περίσσειας της συμπληρωματικής του αλυσίδας, στην οποία και προσδένονται οι ανιχνευτές υβριδοποίησης. Κατ' επέκταση το σήμα φθορισμού που προέκυπτε στο στάδιο υβριδισμού ήταν ισχυρότερο με συνέπεια τη βελτίωση της αναλυτικής ευαισθησίας (εικόνα 7.3.β.).

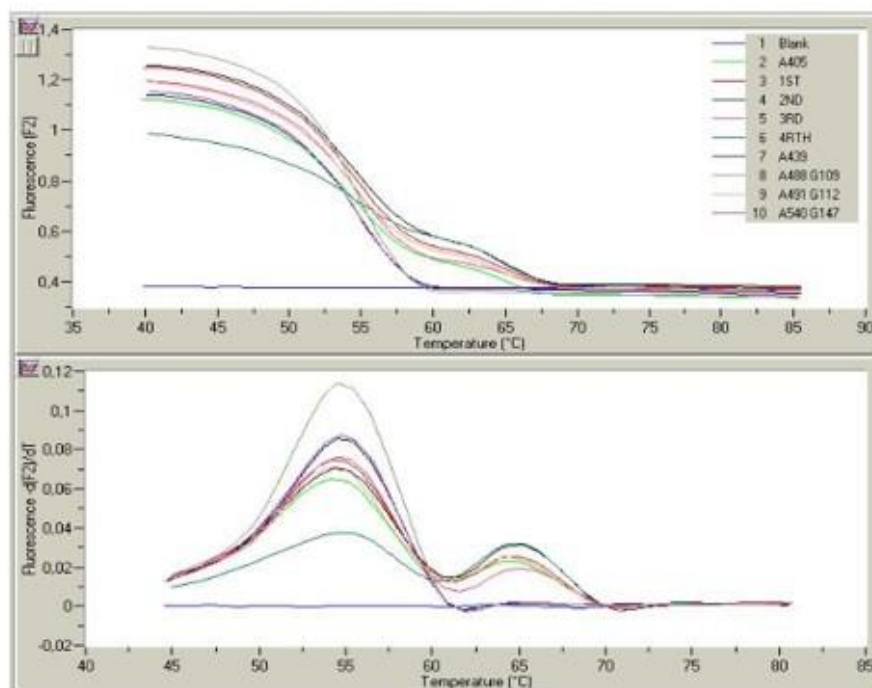


7.3.β.. Καμπύλη αναφοράς με χρήση ασύμμετρων εκκινητών τρεις σειριακές 1:10 αραιώσεις του δείγματος A405.

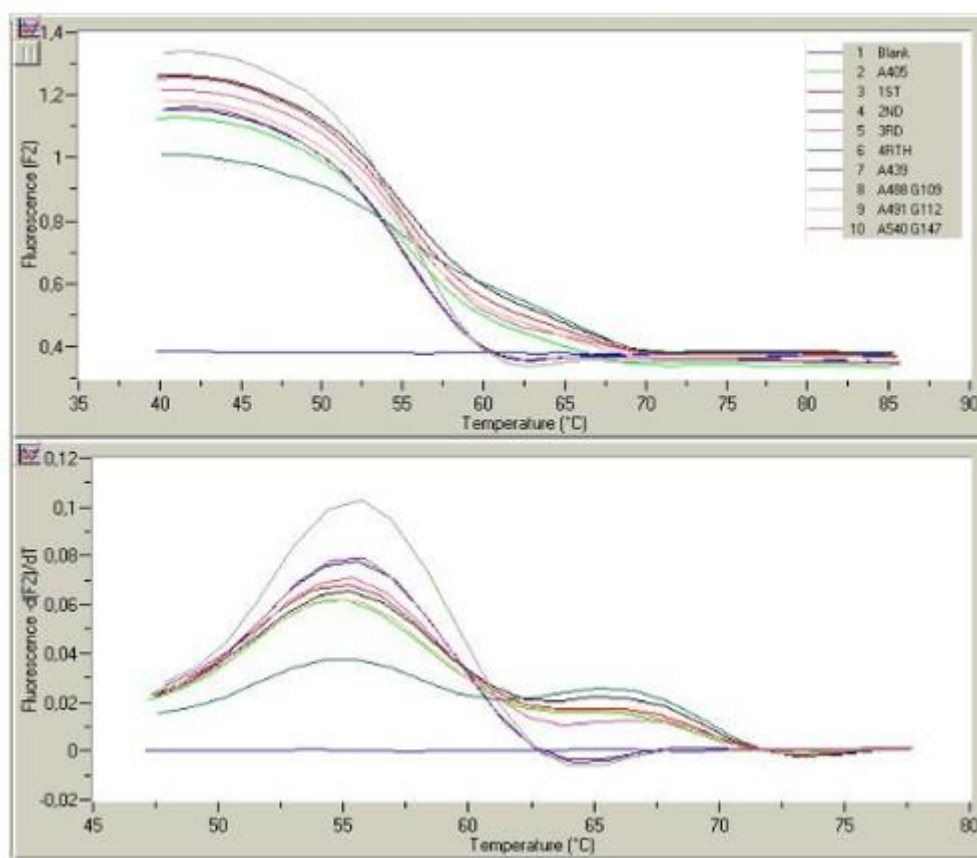
Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα διαμορφώθηκε ύστερα από διαδοχικές βελτιστοποιήσεις, έπειτα από μια σειρά αλλαγών στην θερμοκρασία υβριδισμού κατά την ενίσχυση 50°C , 52 °C και στο τρίτο θερμοκρασιακό στάδιο τήξης όπου δοκιμάστηκαν οι ρυθμοί αλλαγής της θερμοκρασίας 0,2 , 0,4 και 0,6 °C/sec, με βέλτιστη επιλογή τους 0,4°C/sec. Και τα 3 πειράματα που ακολουθούν έγιναν σε δείγματα ασθενών και σε τέσσερις αραιώσεις του A405 (εικόνες 7.3.γ- 7.3.ε.).



7.3.γ. Καμπύλη τήξης με ρυθμό αλλαγής θερμοκρασίας τα $0,2^{\circ}\text{C}/\text{sec}$. Παρατηρείται μια αλλοιωμένη εικόνα των καμπυλών.



7.3.δ. Καμπύλη τήξης με ρυθμό αλλαγής θερμοκρασίας τα $0,4^{\circ}\text{C}/\text{sec}$. Παρατηρείται μια ξεκάθαρη εικόνα των καμπυλών.



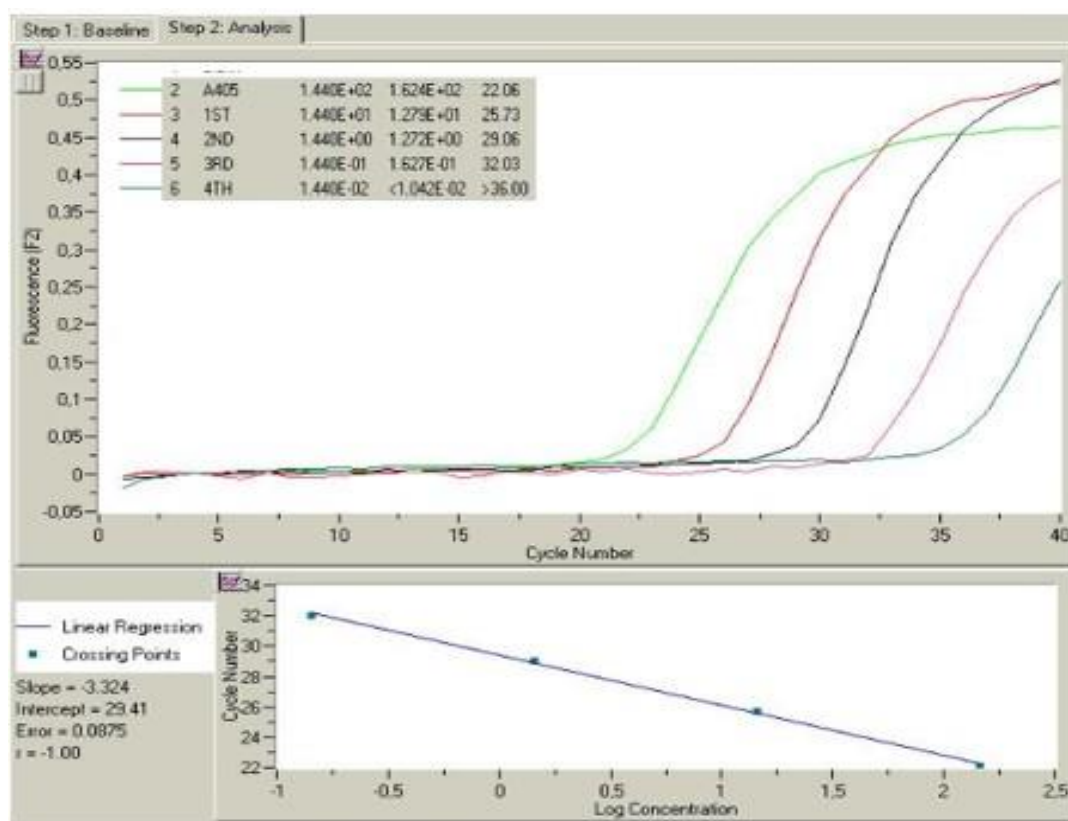
7.3.ε. Καμπύλη τήξης με ρυθμό αλλαγής θερμοκρασίας τα 0,6°C/sec. Οι καμπύλες διαφαίνονται πεπλατυσμένες με όχι τόσο ευδιάκριτη την εικόνα του μεταλλαγμένου αλληλίου.

Το δείγμα A405 χρησιμοποιήθηκε σαν θετικό δείγμα ελέγχου στον κύκλο των πειραμάτων, ο γονότυπος του οποίου έχει επιβεβαιωθεί και με αλληλούχιση νέας γενιάς σε προηγούμενη μας μελέτη [117]. Μετρήθηκε η συγκέντρωση του DNA του δείγματος A405, η οποία ήταν 144 ng/μl μετά την μέτρηση με Qubit και δημιουργήθηκαν αραιώσεις 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000 και 1:100.000. Το LOD (Limit of Detection) του δείγματος εκτιμήθηκε ως 14,4 pg/μl δηλαδή η αραιώση 1:10.000 καθώς ανιχνεύθηκε στις 2 από τις 5 προσπάθειες (μόνο όμως μετά από αύξηση του αριθμού των κύκλων από 40 στους 45). Αυτές οι αραιώσεις χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό καμπύλης αναφοράς, ο μέσος όρος της κλίσης της καμπύλης βρέθηκε -3,21 και η εξ αυτής υπολογιζόμενη μέση απόδοση ήταν $E=2,06$ ($n=5$). Στον πίνακα 7.3.στ. καταγράφονται τα πειράματα αναπαραγωγιμότητας των βαθμονομητών, οι υπολογιζόμενες κλίσεις, αποδόσεις και σημεία τομής στον άξονα y καθώς και η στατιστική τους επεξεργασία. Μια από τις καμπύλες αναφοράς αναπαρίσταται στην εικόνα 7.3.ζ.

7.3.στ. Πίνακας αναπαραγωγιμότητας (n=5), με τα δεδομένα από τις διαφορετικές αραιώσεις των βαθμονομητών

Cq	1	2	3	4	5	Μέσος όρος	SD	CV%
A405	22,3	22,06	22,87	22,02	21,70	22,19	0,436	1,96
1:10	25,65	25,73	25,95	25,63	25,32	25,66	0,227	0,88
1:100	29,21	29,06	28,90	29,01	28,84	29,00	0,144	0,50
1:1.000	31,43	32,03	32,2	32,31	31,75	31,94	0,354	1,11
1:10.000	N/A	N/A	N/A	34,0	34,02	34,01	0,01	0,03
Slope	-3,088	-3,324	-3,093	-3,425	-3,109	-3,21	0,16	4,88
Intercept	29,23	29,41	29,52	24,49	28,82	29,29	0,29	0,98
Efficiency	2,11	2,00	2,11	1,96	2,11	2,06	0,07	3,53

Όσον αφορά την επαναληψιμότητα (n=3) η μέση τιμή (χ), η τυπική απόκλιση (SD) και ο συντελεστής διακύμανσης CV των Cq για τις μελετώμενες αραιώσεις ακολουθούν στον παρακάτω πίνακα (7.3.η). Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ελέγχθηκε στο δείγμα A405 (144 ng/μl) με μέσο Cq=21.86, SD=0,75 και CV(%) =3,42 (n=20).

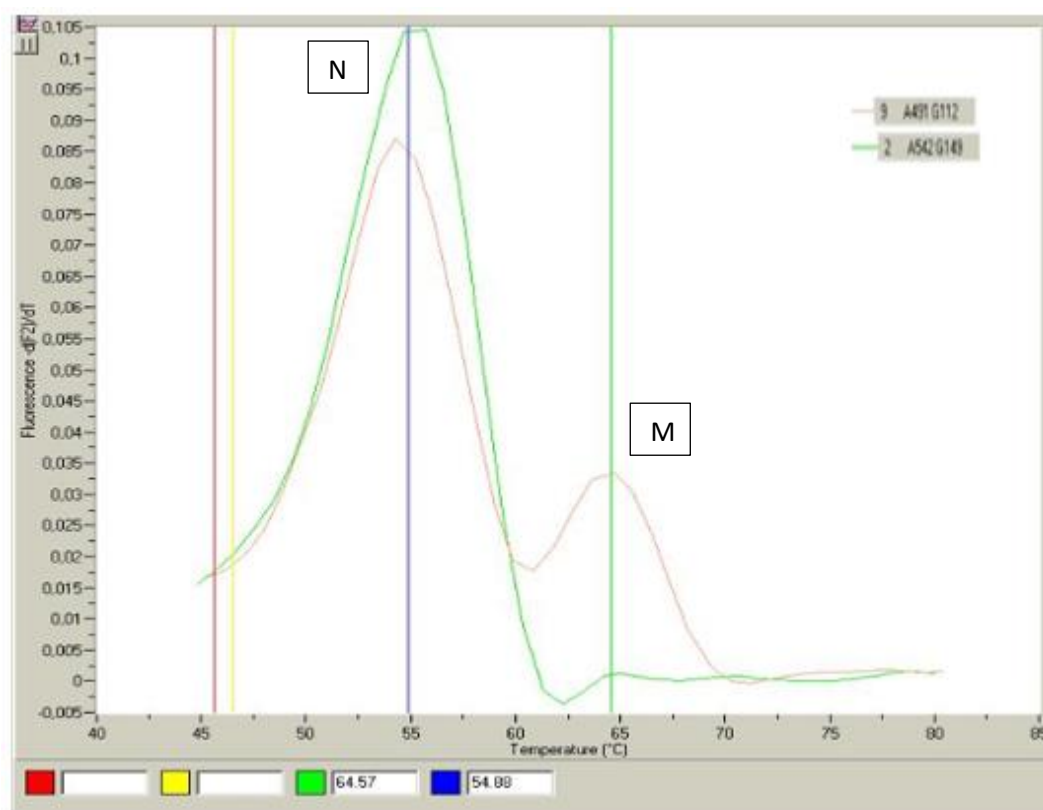


7.3.ζ. Καμπύλη αναφοράς για την αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου για το TARDBP γονίδιο. Παραπάνω φαίνεται η ενίσχυση του γνωστού δείγματος ετεροζυγώτη μεταλλαγμένου (A405) και των διαδοχικών αραιώσεων του (A405, 1ST, 2ND, 3RD, 4TH) η καμπύλη αναφοράς έχει κλίση -3,324 και intercept 29,41.

7.3.η. Μέση τιμή τυπικής απόκλισης και συντελεστής διακύμανσης των Cq για τα δείγματα συγκέντρωσης 144 ng/μl, 14,4 ng/μl, 1,44 ng/μl και 0,144 ng/μl τα οποία ενισχύθηκαν εις τριπλούν στην ίδια αντίδραση.

Αραιώσεις	Cq	SD	CV%
144ng/μl	21,86	0,75	3,42
14, 4ng/μl (1:100)	25,66	0,34	1,31
1,44ng/μl (1:1000)	28,93	0,14	0,48
0,144ng/μl (1:10.000)	31,54	0,65	2,06

Η ανάλυση καμπυλών τήξης παρουσίαζε σαφείς κορυφές για το φυσιολογικό και το μεταλλαγμένο αλλήλιο στους 52,26°C (SD=0,88, CV%=1,59) (n=20) και 65,82°C (SD=0,79, CV%=1,21) (n=5) αντίστοιχα. Η διαφορά θερμοκρασίας (ΔT_m) μεταξύ των δύο κορυφών ήταν κατά μέσο όρο 9,61°C με SD=1,77 και CV%=18,44 (n=5). Οι κορυφές της καμπύλης στις δύο θερμοκρασίες τήξης των ετεροζυγωτών δεν εμφάνιζαν το ίδιο ύψος με την μεταλλαγμένη να είναι λίγο πιο χαμηλή με αναλογία επιφάνειας υπό της καμπύλης 0,954 (για το φυσιολογικό) και 0,242 (για το μεταλλαγμένο).



7.3.θ. Θερμοκρασία τήξης για το φυσιολογικό αλλήλιο (N) (54,88°C) μπλε γραμμή και το μεταλλαγμένο αλλήλιο (M) (64,57°C) πράσινη γραμμή στο γονίδιο TARDBP

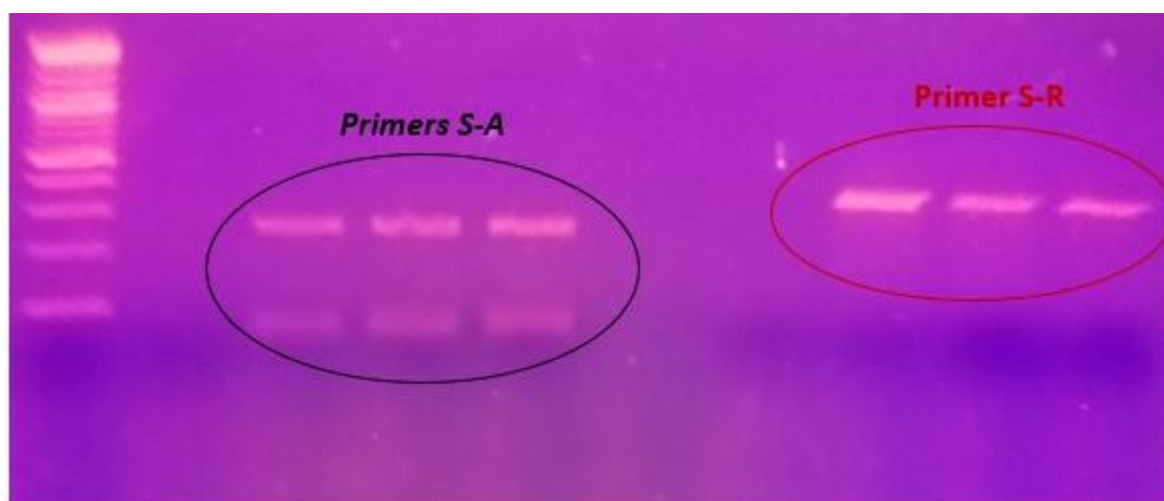
Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και με την μέθοδο αναφοράς αλληλούχισης του DNA.

7.4. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΣΥΜΒΑΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ PCR ΓΙΑ ΤΟ p.Ile383Val ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *TARDBP*

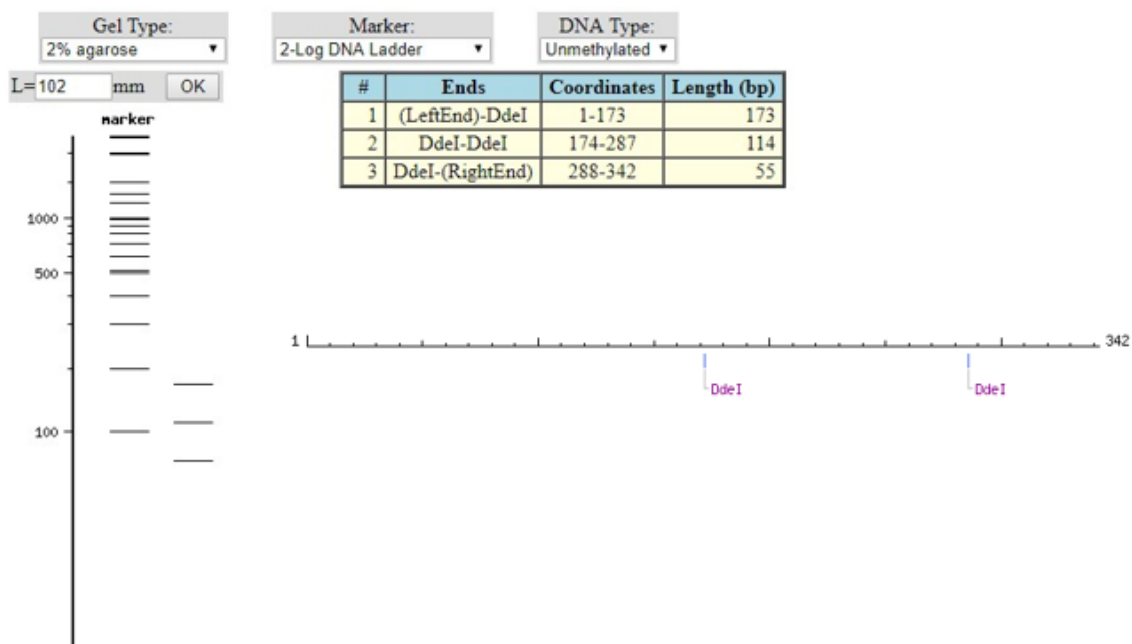
Αρχικός στόχος ήταν ο σχεδιασμός μιας PCR RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) μεθοδολογίας, ωστόσο όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο δεν υπάρχει περιοριστική θέση στο σημείο της παραλλαγής στο γονίδιο *TARDBP*. Αρχικά σχεδιάστηκε μια μεθοδολογία συμβατικής PCR για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος 248 (εκκινητές S-A) και 343 (εκκινητές S-R) βάσεων τα οποία περιλαμβάνουν την βάση που παρουσιάζει την αλλαγή.

Σχεδιάστηκε πρωτόκολλο και θερμοκρασιακό πρόγραμμα της μεθόδου με βάση τα χαρακτηριστικά των αντιδραστηρίων και δοκιμάστηκαν και τα δύο ζεύγη εκκινητών τα οποία ήταν λειτουργικά καθώς και εάν απαιτείται η χρήση DMSO ή όχι καθώς το DMSO διευκολύνει τον πολλαπλασιασμό περιοχών πλούσιων σε GC. Το βέλτιστο αποτέλεσμα ελέγχθηκε με την χρήση γέλης αгарόζης όπου έγινε ορατό το PCR προϊόν και ελέγχθηκε η ένταση του καθώς και η παρουσία παραπροϊόντων. Αφού καθορίστηκε το ζεύγος των εκκινητών (SR, όπως φαίνεται και στην εικόνα 7.4.α.) και το βέλτιστο θερμοκρασιακό πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο *DdeI* από το οποίο προκύπτουν 3 προϊόντα πέψης μήκους 173, 114 και 55 βάσεων. Η πέψη ήταν απαραίτητη ώστε να επιβεβαιωθεί ότι ενισχύθηκε ορθό τμήμα του γονιδίου με βάση το λογισμικό NEBCutter (εικόνες 7.4.β.-7.4.γ) .

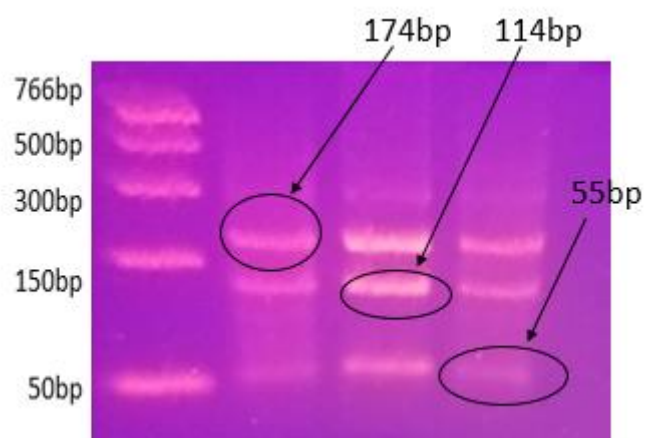
7.5



7.4.α. Δοκιμές των δύο ζευγών εκκινητών S-A και S-R, όπως φαίνεται και στην φωτογραφία το ζεύγος S-R δεν δίνει παραπροϊόντα, ενώ επίσης και τα προϊόντα είναι πιο έντονα..



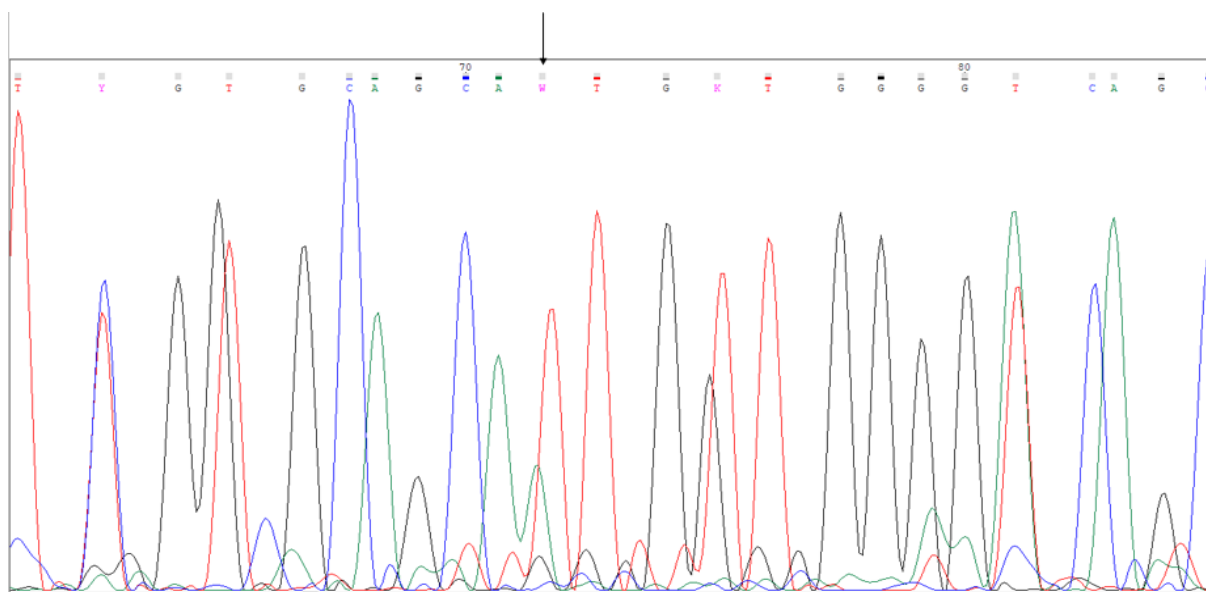
7.4.β. Πρότυπο της πέψης του προϊόντος μετά την συμβατική PCR στην ηλεκτρονική πλατφόρμα NEBCutter(<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).



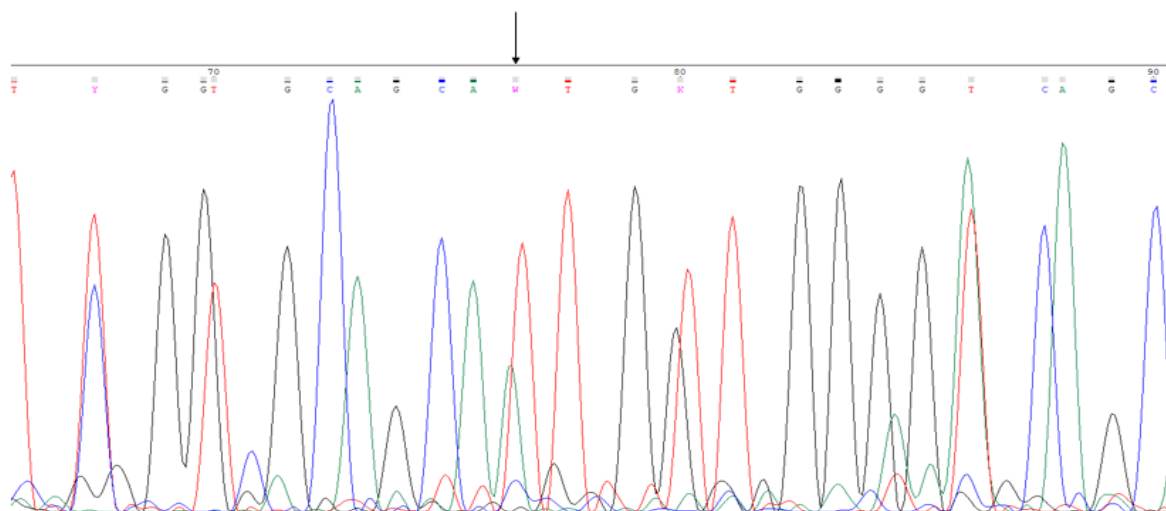
7.4.γ. Αποτελέσματα πέψης με DdeI του προϊόντος PCR του γονιδίου TARDBP.

7.5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ DNA SANGER SEQUENCING

Για τον έλεγχο της ορθότητας της μεθόδου με Sanger sequencing επιλέχθηκαν τρία δείγματα, τα οποία ελέγχθηκαν ως προς την μονονουκλεοτιδική παραλλαγή p.Ile383Val στο γονίδιο *TARDBP*. Στα τρία αυτά δείγματα ανήκουν δύο ετερόζυγοι (A495 G112, A728) θετικοί για την παραλλαγή ασθενείς με FTD οι οποίοι εντοπίστηκαν αποκλειστικά με την ειδική μεθοδολογία Real-Time qPCR που σχεδιάστηκε στα πλαίσια αυτής της διατριβής (τα άλλα 3 δείγματα είχαν επιβεβαιωθεί με NGS) [117] καθώς και ένας ασθενής (A672) με φυσιολογική αλληλουχία. Στα δείγματα A495 G112 και A728 η αλληλούχιση, με χρήση ανάστροφου εκκινητή στο Cycle Sequencing, ανίχνευσε τη σημειακή παραλλαγή c.1147A>G (p.I83V) σημειακή μετάλλαξη, στο εξώνιο 6 του *TARDBP* γονιδίου. Αντίθετα, το A672 παρουσίασε πλήρη ταύτιση με την φυσιολογική αλληλουχία (εικ.7.5.α-7.5.β.). Η αλληλούχιση, με χρήση πρόσθιου εκκινητή στο Cycle Sequencing, επιβεβαίωσε την σημειακή μετάλλαξη στα 2 δείγματα A495 και A728 ενώ στην περίπτωση των ανάστροφων εκκινητών η μεθοδολογία δεν έδωσε αποτέλεσμα πιθανώς λόγω ανεπιτυχούς καθαρισμού του cycle sequencing προϊόντος.



7.5.α. Αποτελέσματα DNA Sanger Sequencing για τους ετερόζυγους ασθενείς (A495 G112, A728) με την χρήση πρόσθιου εκκινητή.



7.5.β. Αποτελέσματα DNA Sanger Sequencing για τον (A672) ασθενή με την χρήση πρόσθιου εκκινητή.

Τα δείγματα, όπου έγινε η ανίχνευση της σημειακής παραλλαγής c.1147A>G (p.I383V) στο εξόνιο 6 του *TARBP* γονιδίου, αντιστοιχούν σε άνδρα ασθενή (A495 G112), 64 ετών με FTD-SD και μια γυναίκα ασθενή (A728) με FTD, με τον πρώτο να μην έχει οικογενειακό ιστορικό ενώ η δεύτερη έχει.

Όπως είναι φανερό, η Sanger αλληλούχιση των δειγμάτων που επιλέχθηκαν κατάφερε να επιβεβαιώσει με ακρίβεια δύο ετερόζυγα δείγματα (A495 G112 και A728), όπως φανερώνονται και στην Real-Time qPCR ανάλυση τήξης, ενώ ήταν επιτυχής και σαφής για το φυσιολογικό που επιλέχθηκε.

7.6. IN SILICO ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΛΛΑΓΗΣ p.Ile383Val ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *TARDBP*

Τα προγράμματα βιοπληροφορικής που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της παθογνομικότητας της παραλλαγής p.Ile383Val στο γονίδιο *TARDBP* έδειξαν αμφιλεγόμενα αποτελέσματα, έτσι δεν μπορεί να χαρακτηριστεί με βεβαιότητα η παραλλαγή ως μεταλλαγή ή πολυμορφισμός. Πιο συγκεκριμένα, το πρόγραμμα SIFT χαρακτηρίζει την παραλλαγή ως μη-επιβλαβή:

SNP	ORGANISM/BUILD	CHR	COORDINATE	REF ALLELE	ALT ALLELE	AMINO ACID CHANGE	GENE NAME	GENE ID	TRANSCRIPT ID	PROTEIN ID	REGION	SIFT SCORE	SIFT MEDIAN	NO OF SEQS AT POSITION	SIFT PREDICTION
rs80356740	Homo_sapiens/GRCh37.74	1	11082613	A	G	I383V	TARDBP	ENSG00000120948	ENST00000240185	ENSP00000240185	CDS	0.511	2.81	30	TOLERATED
rs80356740	Homo_sapiens/GRCh37.74	1	11082613	A	G	I267V	TARDBP	ENSG00000120948	ENST00000439080	ENSP00000404666	CDS	0.646	2.85	28	TOLERATED

* Low confidence means that the protein alignment does not have enough sequence diversity. Because the position artificially appears to be conserved, an amino acid may incorrectly be predicted to be damaging. Population allele frequencies are from the 1000 Genomes Phase 3 data.

7.6.α. Αποτελέσματα SIFT για την παραλλαγή p.Ile383Val στο γονίδιο *TARDBP*.

Στη συνέχεια εξετάστηκε και το Mutation Taster το οποίο πέρα από τον χαρακτηρισμό ως παθογόνου ή όχι μιας παραλλαγής διαθέτει και τις τιμές PhyloP και PhastCons οι οποίες δείχνουν πόσο εξελικτικά συντηρημένη είναι μια αλληλουχία. Αυτό είναι ενδιαφέρον καθώς οι εξελικτικά συντηρημένες αλληλουχίες υποδηλώνουν ότι οι περιοχές αυτές είναι απαραίτητες για την φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού, συνεπώς αλλαγές σε αυτές, θα είχαν πιθανότατα ως αποτέλεσμα βλάβες στην φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης και άρα θα χαρακτηρίζονταν σαν παθογόνες. Με βάση τα αποτελέσματα η παραλλαγή χαρακτηρίστηκε ως παθογόνος και οι τιμές PhyloP και PhastCons συνάδουν με υψηλά συντηρημένη περιοχή.



Prediction

Summary



disease causing

- amino acid sequence changed
- known disease mutation at this position (HGMD CM085731)
- protein features (might be) affected
- splice site changes

7.6.β. Αποτελέσματα Mutation Taster για την παραλλαγή p.Ile383Val στο γονίδιο *TARDBP*.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε η πλατφόρμα βιοπληροφορικής Align GVGD, όπου τα αποτελέσματα κατέταξαν την παραλλαγή στην κατηγορία C0, δηλαδή μη-επιβλαβής.

The following classifiers, ordered from most likely to interfere with function to least likely, were used:

$GD \geq 65 + \tan(10) \times (GV^{2.5}) \Rightarrow$ Class C65 $\Leftarrow$ most likely

$GD \geq 55 + \tan(10) \times (GV^{2.0}) \Rightarrow$ Class C55

$GD \geq 45 + \tan(15) \times (GV^{1.7}) \Rightarrow$ Class C45

$GD \geq 35 + \tan(50) \times (GV^{1.1}) \Rightarrow$ Class C35

$GD \geq 25 + \tan(55) \times (GV^{0.95}) \Rightarrow$ Class C25

$GD \geq 15 + \tan(75) \times (GV^{0.6}) \Rightarrow$ Class C15

Else ($GD < 15 + \tan(75) \times (GV^{0.6})$) $\Rightarrow$ Class C0 $\Leftarrow$ less likely

Substitution	GV	GD	Prediction
I383V	29.61	0.00	Class C0

7.6.γ. Αποτελέσματα Align GVGD για την παραλλαγή p.Ile383Val στο γονίδιο TARDBP.

Τέλος, χρησιμοποιήθηκε η πλατφόρμα PolyPhen-2, του πανεπιστημίου του Harvard, με βάση τα οποία η παραλλαγή είναι μη-επιβλαβής.



7.6.δ. Αποτελέσματα PolyPhen2 για την παραλλαγή p.Ile383Val στο γονίδιο TARDBP.

Ακολουθεί συγκεντρωτικός πίνακας με τα αποτελέσματα της ανάλυσης με τα προγράμματα βιοπληροφορικής:

7.6.ε. Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων βιοπληροφορικής

<i>TARDBP p.Ile383Val</i>	Σκορ	Πρόβλεψη
Align GVGD	C0	πιθανώς ουδέτερη
Mutation Taster	n/a	παθογόνος
PolyPhen2	0,004	μη-επιβλαβής
SIFT	0,511	μη-επιβλαβής
PhyloP	3,693	Υψηλά συντηρημένη
PhastCons	0,984	Υψηλά συντηρημένη

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μετωποκροταφική άνοια (frontotemporal dementia, FTD) είναι το ίδιο συχνή με την AD (Alzheimer's disease) σε ηλικίες μικρότερες από 65 ετών, και δεύτερη ή τρίτη σε συχνότητα μετά την AD συνολικά στις άνοιες. Η FTD χαρακτηρίζεται από συμπτώματα που περιλαμβάνουν σταδιακές αλλοιώσεις στην συμπεριφορά, στις εκτελεστικές λειτουργίες ή/και στην ομιλία [10]. Οι περιοχές που εμφανίζουν βλάβη είναι ο μετωπιαίος και κροταφικός λοβός και ειδικότερα εκφύλιση παρουσιάζουν οι φλοιικοί νευρώνες και τα βασικά γάγγλια [11], [12]. Υπάρχουν δύο βασικοί υπότυποι του κλινικού συνδρόμου της FTD η συμπεριφορική FTD (bvFTD) και η PPA (Primary Progressive Aphasia) με τρεις γλωσσικές παραλλαγές (SD, PNFA, LPA). Μία δεύτερη κατηγοριοποίηση αφορά στον τύπο της πρωτεϊνοπάθειας: η κατηγοριοποίηση ποικίλλει ανάλογα με το τι πρωτεΐνες δημιουργούν συσσωματώματα κάθε φορά στον εγκεφαλικό ιστό FTLD-TAU (εναποθέσεις φωσφορυλιωμένης TAU) και FTLD-U (TAU και α-συνουκλεΐνη αρνητικές) με την δεύτερη να χωρίζεται σε τρεις υποτύπους τις α) FTLD-TDP (TDP-43 θετικές), β) FTLD-FUS (αρνητικές για TDP-43, θετικές για FUS) και γ) FTLD-UPS (αρνητικές για TDP-43 και FUS και θετικές σε άλλα συστατικά του συστήματος του πρωτεασώματος) [14]–[16], [19].

Έχει και γενετική βάση με τις μεταλλάξεις πολλών γονιδίων να εμπλέκονται στην εμφάνιση της νόσου όπως τα *MAPT*, *C9orf72*, *GRN*, η συχνότητα ποικίλλει [12], [135]. Η παρούσα μελέτη διερευνά μια μονονουκλεοτιδική παραλλαγή στο γονίδιο *TARDBP* στο χρωμόσωμα 1p36.22, το οποίο διαθέτει 6 εξόνια και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TDP-43, η οποία εμφανίζει λόγω εναλλακτικού ματίσματος έως και 6 ισομορφές στον άνθρωπο και λειτουργεί ρυθμιστικά δρώντας ως μεταγραφικός καταστολέας, ρυθμιστής ματίσματος, μεταβολισμού του RNA μετά από απόκριση στο στρες κ.α [89], [90]. Η πρωτεΐνη αυτή φαίνεται να εμπλέκεται στην παθογένεια νόσων όπως το ALS και την FTD αλλά και σε άλλα νευροεκφυλιστικά νοσήματα όπως η νόσος Parkinson's, η νόσος Huntington's ενώ εντοπίζεται και φυσιολογικά στον πυρήνα του κυττάρου [91].

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο έλεγχος των δειγμάτων Ελλήνων FTD ασθενών για την πιθανά παθογενωμική μετάλλαξη p.Ile383Val (rs80356740, c.1147A>G), μια μονονουκλεοτιδική παραλλαγή στο γονίδιο *TARDBP* όπου μια αδερίνη (A) μετατρέπεται σε γουανίνη (G) και σε επίπεδο πρωτεΐνης μια ισολευκίνη (Ile) στην θέση 383 μετατρέπεται σε βαλίνη (Val). Η εργασία αυτή αποτελεί συνέχεια του έργου της ερευνητικής μας ομάδας, όπου σε 118 δείγματα FTD ασθενών βρέθηκαν 3 οι οποίοι εμφάνιζαν αυτή την παραλλαγή με μεθοδολογία NGS σε πολλά γονίδια σε εργαστήριο του εξωτερικού. Η χαμηλή συχνότητα (MAF=0,00002/124.722 στη βάση δεδομένων ExAC) αυτής της παραλλαγής καθώς και το γεγονός ότι οι ασθενείς αυτοί δε σχετίζονται με συγγένεια, κρίθηκαν σημαντικά ώστε να αποφασιστεί να αναπτυχθεί καινοτόμα, απλή και αξιόπιστη μεθοδολογία για την

ανίχνευση της παραλλαγής με οικονομικό τρόπο σε ευρεία κλίμακα και να μελετηθεί εάν αποτελεί ιδρυτική μετάλλαξη στον Ελληνικό FTD πληθυσμό.

Ελάχιστες είναι οι ερευνητικές ομάδες που έχουν μελετήσει την συγκεκριμένη παραλλαγή και τη συσχετίζουν κυρίως με το ALS όχι τόσο με την FTD. Πιο συγκεκριμένα, οι Rutherford et al 2008 προσδιόρισαν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη (όπως την χαρακτήρισαν) σε 2 ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό ALS, ενώ παράλληλα την χαρακτήρισαν και ως αιτία εμφάνισης της νόσου [115]. Το 2013 δημοσιεύτηκε ένα άρθρο (case report study) όπου μελετήθηκε αποθανών ασθενής με κλινικό φαινότυπο FTD-SD (semantic dementia, σημασιολογική άνοια) ο οποίος παρουσίαζε πρωτεϊνοπάθεια τύπου FTLD-TDP, ήταν ο ένας από τους 46 ασθενείς με FTLD-TDP που παρουσίαζε αυτή την πιθανά παθολογική μετάλλαξη, όπως χαρακτηρίστηκε από την ερευνητική ομάδα, χωρίς να εμφανίζει κάποια άλλη μετάλλαξη σε γονίδια όπως *MAPT*, *GRN*, *C9ORF72*, *VCP* κλπ. που συσχετίζονται με FTD [116]. Τέλος το 2019, στην εργασία των Ramos et al, στην οποία συμμετείχε και η ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου, εντοπίστηκε η συγκεκριμένη παραλλαγή σε 3 από τους 118 ασθενείς με FTD, οι οποίοι δεν είχαν κάποια συγγένεια μεταξύ τους, και παράλληλα έγινε έλεγχος με συγκεκριμένα προγράμματα βιοπληροφορικής (SIFT, Polyphen-2) της παθογονικότητας της παραλλαγής αυτής, η οποία χαρακτηρίστηκε ως πιθανά παθογόνα. Επίσης δεν εμφάνιζε κανείς από αυτούς κάποια αλλαγή στα γονίδια που πιο συχνά επηρεάζονται σε αυτές τις περιπτώσεις (αναφέρθηκαν παραπάνω) [117].

Συνέχεια αυτής της μελέτης αποτέλεσε η παρούσα εργασία όπου σχεδιάστηκε μια μεθοδολογία Real-Time qPCR και ανάλυσης καμπυλών τήξης (melting curve analysis) για την ανίχνευση της παραλλαγής p.Ile383Val στο γονίδιο *TARDBP*. Η μεθοδολογία αναπτύχθηκε στο όργανο LightCycler, ήταν ταχεία και αξιόπιστη επιδεικνύοντας άριστη PCR απόδοση (μέση $E=2,06$) με βάση την καμπύλη αναφοράς (μέση κλίση $=-3,21$), άριστη αναπαραγωγικότητα στην ποσοτικοποίηση ($Ct\ CV\% <3,5\%$) και ειδικότητα στην γονοτύπηση ($Tm\ A\ αλληλίου\ 55,26\ ^\circ C$ και $G\ μεταλλαγμένου\ αλληλίου\ 65,82\ ^\circ C$, $CV < 2,5\%$, $\Delta Tm = 9,61$). Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν για την ορθότητά τους σε επιλεγμένα δείγματα με την μέθοδο αναφοράς DNA sequencing. Επίσης τρεις ασθενείς θετικοί για την παραλλαγή είχαν και το ίδιο αποτέλεσμα και στην NGS μεθοδολογία που εφαρμόστηκε στην μελέτη Ramos et.al. Η αναπτυχθείσα μεθοδολογία είναι και πιο οικονομική καθώς μπορεί να εκτελεσθεί σε 32 δείγματα παράλληλα στο όργανο που χρησιμοποιήθηκε (Light Cyclor 1.5) και μπορεί να επεκταθεί περαιτέρω και να αυτοματοποιηθεί σε νέες πλατφόρμες όπως π.χ. το Light Cyclor 1536 όπου μπορούν να αναλυθούν ταυτόχρονα έως και 1536 δείγματα.

Σε 133 ασθενείς (118 από παλαιότερη μελέτη και 15 νέοι) εντοπίστηκαν 5 ετερόζυγοι για το μεταλλαγμένο αλληλίο, από διαφορετικές οικογένειες οι οποίοι εμφάνιζαν την παραλλαγή καθώς και 1 από τα 60 δείγματα ελέγχου. Από τους 5 ασθενείς, οι 3 έχουν οικογενειακό ιστορικό, 3 εμφανίζουν κλινικό φαινότυπο FTD-SD ενώ οι άλλοι 2 ανήκουν στο ευρύτερο φάσμα της FTD και τέλος οι 4 από τους 5 είναι άρρενες (μόνο μια ασθενής είναι γυναίκα). Πιο συγκεκριμένα, 3 από τους 5 ασθενείς είχαν

οικογενειακό ιστορικό, ωστόσο η χαμηλή συχνότητα του αλληλομόρφου δεν επιτρέπει την προσέγγιση του φαινομένου στατιστικά, καθώς τα αποτελέσματα αυτά δεν είναι στατιστικά σημαντικά. Παρόλ' αυτά μπορεί να παρατηρηθεί ένα μοτίβο και να διατυπωθούν υποθέσεις ως προς το ρόλο της παραλλαγής αυτής στην εμφάνιση της νόσου στον Ελληνικό πληθυσμό. Ισχυρή ένδειξη αποτελεί η συχνότητα του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου που είναι μόλις G 0,002% στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό, ενώ στα δείγματα Ελλήνων FTD που μελετήθηκαν φτάνει το 3,76%.

Ο κλινικός φαινότυπος FTD-SD χαρακτηρίζεται από φυσιολογική ομιλία και συντακτικό χωρίς, όμως, την ικανότητα κατανόησης εννοιών και σημασίας των λέξεων (αλλοίωση της σημασιολογικής μνήμης), αυτές οι αλλαγές συνηθίζονται σε ασθενείς με μεταλλάξεις στο *TARDBP* γονίδιο. Στην παρούσα μελέτη, οι 3 από τους 5 ασθενείς εμφανίζουν τον φαινότυπο FTD-SD, ο ένας εμφανίζει φαινότυπο bvFTD (αλλαγές στην συμπεριφορά, απάθεια και κάποιες σημασιολογικές βλάβες κλπ.) ενώ η μια ασθενής ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία της FTD παρουσιάζοντας τόσο σημασιολογικές όσο και συμπεριφορικές αλλαγές. Πιθανόν να υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ του φαινοτύπου FTD-SD και της παραλλαγής p.Ile383Val στο γονίδιο *TARDBP* ωστόσο το μικρό δείγμα και η χαμηλή συχνότητα του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου δεν επιτρέπουν κάποιο βέβαιο χαρακτηρισμό.

Επίσης παρατηρείται ότι οι 4 από τους 5 ασθενείς που φέρουν την παραλλαγή είναι άρρενες και μόνο μια ασθενής είναι γυναίκα. Υπάρχει πιθανότητα το μεταλλαγμένο αυτό αλληλόμορφο να είναι πιο σημαντικό για την εμφάνιση και την εξέλιξη της νόσου στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες. Σε αυτή την υπόθεση συμβάλλει και το γεγονός ότι το ένα δείγμα ελέγχου που βρέθηκε θετικό στην παραλλαγή ήταν δείγμα που προέρχεται από γυναίκα που δεν έχει εμφανίσει τη νόσο. Παρόλ' αυτά η υπόθεση αυτή δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί με κάποιον τρόπο παρά μόνο με την περαιτέρω έλεγχο επιπλέον δειγμάτων τόσο ασθενών όσο και σημαντικά μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων ελέγχου.

Προκειμένου να προβλεφθεί η παθογονικότητα του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου χρησιμοποιήθηκαν προγράμματα βιοπληροφορικής (SIFT, Poly-Phen2, AlignGVGD, Mutation Taster) τα αποτελέσματα των οποίων ήταν αμφιλεγόμενα καθώς κάποια από αυτά χαρακτήριζαν την παραλλαγή ως μη-επιβλαβή (SIFT, Poly-Phen2, Align GVGD) ενώ άλλα ως παθογόνα (Mutation Taster). Ειδικότερα, η συγκεκριμένα περιοχή είναι υψηλά συντηρημένη, όπως φάνηκε και από τις πλατφόρμες PhyloP και PhastCons, οπότε αλλαγές σε αυτή, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα, να δημιουργούν βλάβη στην ίδια την πρωτεΐνη.

Είναι επίσης σημαντικό να βρεθούν πληροφορίες για το δείγμα ελέγχου που παρουσιάζει την παραλλαγή, καθώς δεν είναι γνωστό εάν έχει οικογενειακό ιστορικό ή εάν έχει εμφανίσει κάποια συμπτώματα από την στιγμή που συλλέγει το δείγμα. Παράλληλα είναι εξίσου σημαντικός ο τόπος καταγωγής των ασθενών καθώς μπορεί η αλλαγή αυτή να είναι ιδρυτική μετάλλαξη όχι στον Ελληνικό

πληθυσμό γενικά αλλά ειδικότερα να εντοπίζεται σε συγκεκριμένες περιοχές. Πιο συγκεκριμένα, οι 4 στους 5 διαθέτουν επώνυμο που υποδηλώνει Κρητική καταγωγή.

Μελλοντικά, κρίνεται απαραίτητη η μελέτη περισσότερων δειγμάτων τόσο ασθενών όσο και δειγμάτων ελέγχου ώστε να μπορεί να προσεγγιστεί με μεγαλύτερη βεβαιότητα ο μηχανισμός δράσης αλλά και η συσχέτιση ή μη της παραλλαγής αυτής με την εμφάνιση κλινικού φαινοτύπου FTD. Απαιτείται η εκτενέστερη μελέτη του οικογενειακού ιστορικού και του κλινικού φακέλου των ασθενών που εμφανίζουν την παραλλαγή καθώς και μελέτη της οικογένειας τους ώστε να προσδιοριστεί εάν υπάρχει γενετική βάση καθώς και ο τύπος της κληρονομής εάν υπάρχει. Συγκεκριμένα η μελέτη αυτή ονομάζεται segregation study, όπου μελετώνται οι οικογένειες των ασθενών προκειμένου να προσδιοριστεί ο πιθανότερος τρόπος κληρονομής για τη νόσο αυτή.

Τέλος, μια μελλοντική προσέγγιση για την κατανόηση του μηχανισμού λειτουργίας της παραλλαγής αυτής μπορεί να περιλαμβάνει την χρήση μυών ή άλλων οργανισμών-μοντέλων που να είναι γενετικά τροποποιημένα ώστε να φέρουν την παραλλαγή αυτή στο γονίδιο *TARDBP* και τα οποία στην πορεία της ζωής τους θα ελεγχθούν ως προς την συμπεριφορά και εμφάνιση συμπτωμάτων ή φαινοτύπου FTD αλλά και φυσικά στην εφαρμογή άλλων μοριακών δοκιμασιών λειτουργικότητας της πρωτεΐνης. Μια τέτοια μελέτη έχει εξαιρετικά μεγάλο κόστος οπότε η εφαρμογή της πρακτικά είναι δύσκολη, αποτελεί ωστόσο το μόνο τρόπο να ελεγχθεί ουσιαστικά η πιθανή βλάβη στην λειτουργία της πρωτεΐνης και τελικά η εμπλοκή της στην εκδήλωση της νόσου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] L. Gan, M. R. Cookson, L. Petrucelli, and A. R. La Spada, ‘Converging pathways in neurodegeneration, from genetics to mechanisms’, *Nat. Neurosci.*, Vol. 21, no. 10, pp.1300–1309, 2018.
- [2] R. C. Brown, A. H. Lockwood, and B. R. Sonawane, ‘Neurodegenerative diseases: An overview of environmental risk factors’, *Environmental Health Perspectives.*, Vol.113, no.9, pp.1250–1256, 2005.
- [3] C. Soto and S. Pritzkow, ‘Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases’, *Nat. Neurosci.*, Vol. 21, no. 10, pp.1332–1340, 2018.
- [4] W. Mok, T. W. Chow, L. Zheng, W. J. Mack, and C. Miller, ‘Clinicopathological concordance of dementia diagnoses by community versus tertiary care clinicians’, *American Journal of Alzheimer’s Disease and other Dementias*’, Vol.19, no.3, pp.161–165, 2004.
- [5] A. Buffington, D. Lipski, and E. Westfall, ‘Dementia: An Evidence-Based Review of Common Presentations and Family-Based Interventions’, *J. Am. Osteopath. Assoc.*, Vol.113, no.10, pp.768–775, 2013.
- [6] G.D. Femminella., T. Thayanandan, V. Calsolaro, K. Komici, G. Rengo, G. Corbi et al., ‘Imaging and Molecular Mechanisms of Alzheimer’s Disease’, *International journal of molecular sciences.*, Vol.19, no.2, pp.3702, 2018.
- [7] T. B. Sampaio, A. S. Savall, M. E. Z. Gutierrez, and S. Pinton, ‘Neurotrophic factors in Alzheimer’s and parkinson’s diseases: Implications for pathogenesis and therapy’, *Neural Regeneration Research.*, Vol.12, no.4, pp.549-557, 2017.
- [8] K. E. Murphy and J. J. Park, ‘Can co-activation of Nrf2 and neurotrophic signaling pathway slow Alzheimer’s disease?’, *International Journal of Molecular Sciences.*, Vol.18, no.6, pp.1168, 2017.
- [9] A. Sanabria-Castro, I. Alvarado-Echeverría, and C. Monge-Bonilla, ‘Molecular Pathogenesis of Alzheimer’s Disease’, *Ann. Neurosci.*, Vol.24, no.1, pp.46-54, 2017.
- [10] J. Bang, S. Spina, and B. L. Miller, ‘Non-Alzheimer ’s dementia 1 Frontotemporal dementia’, *Lancet.*, Vol.386, no.10004, pp.1672-1682, 2015.
- [11] Y. A. L. Pijnenburg, ‘New diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia’, *Eur. Neurol. Rev.*, Vol. 6, no. 4, pp.234–237, 2011.

- [12] J. H. Weishaupt, T. Hyman, and I. Dikic, 'Common Molecular Pathways in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia', *Trends Mol. Med.*, Vol. 22, no. 9, pp.769–783, 2016.
- [13] H.S. Kirshner, S. Howard, 'Frontotemporal Dementia and Primary Progressive Aphasia', *Neuropsychiatric disease and treatment*, Vol.10, pp.1045-1055, 2014.
- [14] Z. Arvanitakis, 'Update on frontotemporal dementia', *Neurologist.*, Vol.16, no.1, pp.16-22, 2010.
- [15] A. Benussi, A. Padovani, and B. Borroni, 'Phenotypic heterogeneity of monogenic frontotemporal dementia', *Frontiers in Aging Neuroscience.*, Vol.7, no.171, pp.1-19, 2015.
- [16] T.F. Gendron, R. Rademakers, L. Petruceli, TARDBP mutation analysis in TDP-43 proteinopathies and deciphering the toxicity of mutant TDP-43, *Journal of Alzheimer's disease.*, 33 Suppl 1(Suppl 1), S35–S45, 2013.
- [17] A. Kertesz, P. McMonagle, M. Blair, W. Davidson, and D. G. Munoz, 'The evolution and pathology of frontotemporal dementia', *Brain.*, Vol.128, no.9, pp.1996-2005, 2005.
- [18] K. A. Josephs, 'Frontotemporal dementia and related disorders: Deciphering the enigma', *Annals of Neurology.*, Vol.64, no.1, pp.4-14, 2008.
- [19] J.D. Rohrer, A.M. Isaacs, S. Mizlienska, S. Mead, T. Lashley, S. Wray et al., 'C9orf72 expansions in frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis', *The Lancet Neurology.*, Vol.14, no.2, pp.291–301, 2015.
- [20] B. Ghetti, A.L. Oblak, B.F. Boeve, K.A. Johnson, B.C.Dickerson, M. Goedert, 'Frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging', *Neuropathology and applied neurobiology.*, Vol. 41, no.1, pp.24–46, 2015.
- [21] R. Convery, S. Mead, and J. D. Rohrer, 'Clinical, genetic and neuroimaging features of frontotemporal dementia', *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, Vol. 45, no. 1, pp. 6–18, 2019.
- [22] O. Piguet, M. Hornberger, E. Mioshi, and J. R. Hodges, 'Behavioural-variant frontotemporal dementia: Diagnosis, clinical staging, and management', *The Lancet Neurology.*, Vol.10, no.2, pp.162-172,2011.
- [23] H. S. Kirshner, 'Frontotemporal dementia and primary progressive aphasia', *Neuropsychiatric disease and treatment.*, Vol.10, pp.1045–1055, 2014.
- [24] J. A. Brown Perry, D. C. Brown, J. A. Possin, K. L. Datta, S.Trujillo, A.Radke et al.,

- ‘Clinicopathological correlations in behavioural variant frontotemporal dementia’, *Brain.*, Vol.140, no.12, pp.3329–3345, 2017.
- [25] P. D.Fletcher, J. D.Warren, ‘Semantic dementia: a specific network-opathy’, *Journal of molecular neuroscience.*, Vol.45, no.3, pp.629–636, 2011.
- [26] M . Cruts, J. Theuns, J. Van Broeckhoven, ‘Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases’, *Human mutation*, Vol.33, no.9, pp.1340–1344, 2012.
- [27] R. Ferrari, Y. Wang, J. Vandrovcova, S.Guelfi, A.Witeolar, C. Karch et al., ‘Genetic architecture of sporadic frontotemporal dementia and overlap with Alzheimer’s and Parkinson’s diseases’, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.*, Vol. 88, no. 2, pp.152–164, 2017.
- [28] G. D. Rabinovici and B. L. Miller, ‘Frontotemporal lobar degeneration: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management.’, *CNS Drugs.*, Vol.24, no.5, pp.375–398, 2010.
- [29] J.D. Rohrer, T. Lashley, J. M. Schott, J. E.Warren, S.Mead, A. M.Isaacs, J.D.Warren, ‘Clinical and neuroanatomical signatures of tissue pathology in frontotemporal lobar degeneration’, *Brain.*, Vol.134 (Pt 9), pp.2565–2581, 2011.
- [30] B. Borroni, A. Alberici, and E. Buratti, ‘Molecular pathology of frontotemporal lobar degenerations.’, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, Vol.45, no.1, pp.41-57, 2019.
- [31] I. R. A. Mackenzie and M. Neumann, ‘Molecular neuropathology of frontotemporal dementia: insights into disease mechanisms from postmortem studies’, *J. Neurochem.*, Vol.138, pp.54–70, 2016.
- [32] D. W. Dickson, N. Kouri, M. E. Murray, and K. A. Josephs, ‘Neuropathology of frontotemporal lobar degeneration-Tau (FTLD-Tau)’, in *Journal of Molecular Neuroscience.*, Vol.45, no.3, pp.384–389, 2011.
- [33] C. Ballatore, V. M. Y. Lee, and J. Q. Trojanowski, ‘Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer’s disease and related disorders’, *Nature Reviews Neuroscience.*, Vol.8, pp.663-672, 2007.
- [34] S. Sha, C. Hou, I. V. Viskontas, and B. L. Miller, ‘Are frontotemporal lobar degeneration, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration distinct diseases?’, *Nature Clinical Practice Neurology.*, Vol.2, pp.658–665, 2006.
- [35] V. M.-Y. Lee, M. Goedert, and J. Q. Trojanowski, ‘Neurodegenerative Tauopathies’, *Annu. Rev. Neurosci.*, Vol.24, pp.1121-1159, 2002.

- [36] D. W. Dickson, C. Bergeron, S.S. Chin, C. Duyckaerts, D. Horoupian, K. Ikeda et al., ‘Office of rare diseases neuropathologic criteria for corticobasal degeneration’, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, Vol.24, pp.1121-1159, 2002.
- [37] O.Piguet, G.M. Halliday, W.G.J. Reid, B. Casey, R. Carman, Y.Huang et al., ‘Clinical phenotypes in autopsy-confirmed pick disease’, *Neurology.*, Vol.76, no.3, pp.53-259, 2011.
- [38] G. G. Kovacs, J. R. Murrell, S. Horvath, L. Haraszti,, K.Majtenyi,, M. J.Molnar,, H. Budka,, B. Ghetti, and S. Spina,, ‘*TARDBP* variation associated with frontotemporal dementia, supranuclear gaze palsy, and chorea’, *Mov. Disord.*, Vol.24, pp.1842-1847, 2009.
- [39] V. Zhukareva, D. Mann, S. Pickering-Brown, K. Uryu, T. Shuck , K. Shah et al., ‘Sporadic Pick’s disease: A tauopathy characterized by a spectrum of pathological τ isoforms in gray and white matter’, *Ann Neurol.*, Vol.51, pp.730-739, 2002.
- [40] M. Cushman, B. S. Johnson, O. D. King, A. D. Gitler, and J. Shorter, ‘Prion-like disorders: blurring the divide between transmissibility and infectivity’, *Cell Sci.*, Vol.123, Pt 8, pp.1191–1201, 2010.
- [41] M. Nolan, K. Talbot, and O. Ansorge, ‘Pathogenesis of FUS-associated ALS and FTD: insights from rodent models’, *Acta neuropathologica communications.*, Vol.4, no.1, pp.99, 2016.
- [42] Z. Diaz, X. Fang, M. P. Hart, A. Chesi, J. Shorter, and A. D. Gitler, ‘Molecular determinants and genetic modifiers of aggregation and toxicity for the ALS disease protein FUS/TLS.’, *PLoS Biol.*, Vol.9, no.4,2011.
- [43] E. Bentmann, M. Neumann, S. Tahirovic, R. Rodde, D. Dormann, and C. Haass, ‘Requirements for stress granule recruitment of fused in sarcoma (FUS) and TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43)’, *J. Biol. Chem.*, Vol.287, no.27, pp.23079-94, 2012.
- [44] W. Y. Wang, L. Pan, S. C. Su, E. J. Quinn, M. Sasaki M., J. C Jimenez, L. H. Tsai et al., ‘Interaction of FUS and HDAC1 regulates DNA damage response and repair in neurons’, *Nat. Neurosci.*, Vol.16, no.10, pp.1383-1391, 2013.
- [45] H. Seelaar, K.Y. Klijnsma, I. Koning,, A. Lugt, W. Z. Chiu, Azmani et al., ‘Frequency of ubiquitin and FUS-positive, TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration’, *J. Neurol.*, Vol.257, no.5, pp.747-753, 2010.
- [46] K.A. Josephs, J.L. Whitwell, J.E. Parisi, et al. ‘Caudate atrophy on MRI is a characteristic feature of FTLD-FUS’, *Eur J Neurol.*, Vol.17, no.7, pp.969–975, 2010.

- [47] M. Neumann, E. Bentmann, D. Dormann, A. Jawaid, M. DeJesus-Hernandez, M. Ansorge et al., 'FET proteins TAF15 and EWS are selective markers that distinguish FTLD with FUS pathology from amyotrophic lateral sclerosis with FUS mutations', *Brain.*, Vol.134, no.9, pp.595–2609, 2011.
- [48] R. Rademakers, M. Neumann, and I. R. MacKenzie, 'Advances in understanding the molecular basis of frontotemporal dementia', *Nature Reviews Neurology*, Vol.8, no.8, pp.423-434, 2012.
- [49] Y.S. Davidson, A.C. Robinson, Q. Hu, M. Mishra, A. Baborie, E. Jaros et al., 'Nuclear carrier and RNA-binding proteins in frontotemporal lobar degeneration associated with fused in sarcoma (FUS) pathological changes', *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, Vol.39, no.2, pp.157-165, 2013.
- [50] L. Yang, J. Zhang, M. Kamelgarn, C. Niu, J. Gal, W. Gong et al., 'Subcellular localization and RNAs determine FUS architecture in different cellular compartments', *Human molecular genetics*, Vol.24, no.18, pp.5174–5183, 2015.
- [51] I. R. A. Mackenzie, D. Foti, J. Woulfe, and T. A. Hurwitz, 'Atypical frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive, TDP-43-negative neuronal inclusions', *Brain.*, Vol.122, no.6, pp.691-702, 2008.
- [52] T. Arai., T.Nonaka, M. Hasegawa, H Akiyama, M. Yosida, Y.Hashizume *et al.*, 'TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis', *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol.352, no.3, pp.602-611, 2006.
- [53] T. Arai., T.Nonaka, M. Hasegawa, H Akiyama, M. Yosida, Y.Hashizume *et al.*, 'Neuronal and glial inclusions in frontotemporal dementia with or without motor neuron disease are immunopositive for p62', *Neurosci. Lett.*, Vol.342, no1, pp.41-44, 2003.
- [54] C.J. Mahoney, J. Beck, J.D. Rohrer, T. Lashley, K. Mok, T. Shakespeare et al. 'Frontotemporal dementia with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: clinical, neuroanatomical and neuropathological features', *Brain.*, Vol.13, no.3, pp.736–750, 2012.
- [55] A. King, S. Al-Sarraj, and C. Shaw, 'Frontotemporal lobar degeneration with ubiquitinated tau-negative inclusions and additional α -synuclein pathology but also unusual cerebellar ubiquitinated p62-positive, TDP-43-negative inclusions', *Neuropathology*, Vol.29, no.4, pp.466-471, 2009.
- [56] K. A. Josephs, W. L. Lin, Z. Ahmed, D. A. Stroh, N. R. Graff-Radford, and D. W. Dickson, 'Frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive, but TDP-43-negative inclusions',

Acta Neuropathol., Vol.116, no.2, pp.159-167, 2008.

- [57] I. Le Ber, A. Camuzat, R. Guerreiro, K. Bouya-Ahmed, J. Bras, K. Nicolas, 'SQSTM1 mutations in French patients with frontotemporal dementia or frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis', *JAMA Neurol.*, Vol.70, no.11, pp.1403–1410, 2013.
- [58] D. M. Mann, S. Rollinson, A. Robinson, J. Bennion Callister, J.C. Thompson, J.S. Snowden *et al.*, 'Dipeptide repeat proteins are present in the p62 positive inclusions in patients with frontotemporal lobar degeneration and motor neurone disease associated with expansions in C9ORF72', *Acta Neuropathol. Commun.*, Vol.168, no.14, pp.5960-5968, 2014.
- [59] M. Komatsu, S. Kageyama, and Y. Ichimura, 'p62/SQSTM1/A170: physiology and pathology.', *Pharmacol. Res.*, Vol.66, no.6, pp.457-462, 2012.
- [60] K. L. Jackson, Lin W-L, Miriyala S, Dayton RD, Panchatcharam M, McCarthy KJ 'P62 pathology model in the rat substantia nigra with filamentous inclusions and progressive neurodegeneration', *PLoS One.*, Vol.12, no.1, pp.123-129, 2017.
- [61] R. Ferrari, D. Kapogiannis, E. D. Huey, and P. Momeni, 'FTD and ALS: A Tale of Two Diseases', *Curr. Alzheimer Res.*, Vol.8, no.3, pp.273-294, 2011.
- [62] J. M. Ravits and A. R. La Spada, 'ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: Deconstructing motor neuron degeneration', *Neurology.*, Vol.73, no.10, pp.805-811, 2009.
- [63] M. Neumann, 'Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis', *Science.*, Vol.314, no.6, pp.130-133, 2006.
- [64] F. Geser, V. M. Y. Lee, and J. Q. Trojanowski, 'Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration: A spectrum of TDP-43 proteinopathies', *Neuropathology.*, Vol.30, no.2, pp.1440-1789, 2010.
- [65] N. J. C. R. M. Liscica, L. T. Grinberg, J. Zidarf, M. A. Gitchob, 'ALS and FTLD: two faces of TDP-43 proteinopathy', *Clin. Psychol.*, vol. 56, no. Suppl 1, pp. 48–62, 2010.
- [66] L. H. Meeter, L. D. Kaat, J. D. Rohrer, and J. C. Van Swieten, 'Imaging and fluid biomarkers in frontotemporal dementia', *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 13, no. 7, pp. 406–419, 2017.
- [67] M. Bjerke and S. Engelborghs, 'Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Early and Differential Alzheimer's Disease Diagnosis', *J. Alzheimer's Dis.*, vol. 62, no. 3, pp. 1199–1209, 2018.
- [68] B. Olsson, R. Lautner, U. Andreasson, A. Ohrfelt, E. Portelius, M. Bjerke *et al.*, 'CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis.',

Lancet. Neurol., Vol. 15, no. 7, pp. 673–684, 2016.

- [69] J. D. Rohrer and H. Zetterberg, ‘Biomarkers in frontotemporal dementia’, *Biomark. Med.*, Vol.8, no. 4, pp. 519–521, 2014.
- [70] C. S. Scherling, T. Hall, F. Berisha, K. Klepac., A. Karydas,, G. Coppola et al., ‘Cerebrospinal fluid neurofilament concentration reflects disease severity in frontotemporal degeneration’, *Annals of neurology.*, Vol.75, no.1, pp.116–126, 2014.
- [71] N. Rostgaard, G. Waldemar, J. E. Nielsen, and A. H. Simonsen, ‘Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Familial Forms of Alzheimer’s Disease and Frontotemporal Dementia’, *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders.*, Vol.40, no.2, pp.54-62, 2015.
- [72] M.S. Foiani, C. Cicognola, N. Ermann, I. Woollacott, C. Heller, A.J. Heslegrave et al., ‘Searching for novel cerebrospinal fluid biomarkers of tau pathology in frontotemporal dementia: an elusive quest’, *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry.*, Vol.90, no.7, pp.740–746, 2019.
- [73] E. Feneberg, E. Gray, O. Ansorge, K. Talbot, and M. R. Turner, ‘Towards a TDP-43-Based Biomarker for ALS and FTLD’, *Mol. Neurobiol.*, Vol.55, no.10, pp. 7789–7801, 2018.
- [74] Y. I. Noto, ‘Elevated CSF TDP-43 levels in amyotrophic lateral sclerosis: Specificity, sensitivity, and a possible prognostic value’, *Amyotroph. Lateral Scler.*, Vol.12, no.2, pp.140-143, 2011.
- [75] H. B. Kuiperij, A.A. Verleijen, M. Beenes, N.A. Verwey, L. Benussi, A. Paterlini *et al.*, ‘Tau Rather than TDP-43 Proteins are Potential Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Frontotemporal Lobar Degeneration Subtypes’, *J. Alzheimer’s Dis.*, Vol.55, no.2, pp.585-595, 2017.
- [76] M. Carecchio, C. Fenoglio, F. Cortini, C.Comi, L. Benussi, R.Ghidoni *et al.*, ‘Cerebrospinal fluid biomarkers in progranulin mutations carriers’, *J. Alzheimer’s Dis.*, Vol.27, no.4, pp.781-790, 2011.
- [77] J. Goossens, M. Bjerke, S. Van Mossevelde, T. Van Bossche, J. Goeman, B. De Vil *et al.* ‘Diagnostic value of cerebrospinal fluid tau, neurofilament, and progranulin in definite frontotemporal lobar degeneration’. *Alzheimers Res Ther.*, Vol.10, no.1, pp.31., 2018.
- [78] A. Antonell, ‘Serum progranulin levels in patients with frontotemporal lobar degeneration and Alzheimer’s disease: Detection of GRN mutations in a Spanish cohort’, *J. Alzheimer’s Dis.*, Vol.31, no.3, pp.581-591, 2012.
- [79] L. Gibbons, S.Rollinson, J.C. Thompson, A.Robinson, Y.S. Davidson, A. Richardson et al.,

- ‘Plasma levels of progranulin and interleukin-6 in frontotemporal lobar degeneration’, *Neurobiol. Aging*, Vol.36, no.3, pp.10.023, 2015.
- [80] N. Finch, M. Baker, R. Crook, K. Swanson, K. Kuntz, R. Surtees et al., ‘Plasma progranulin levels predict progranulin mutation status in frontotemporal dementia patients and asymptomatic family members’, *Brain* ., Vol.132, no.3, pp.583–591, 2009.
- [81] L. H. Meeter., E.G. Dopfer, L.C. Jiskoot, R. Sanchez-Valle, C.Graff, L.Benussi et al., ‘Neurofilament light chain: a biomarker for genetic frontotemporal dementia’, *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, Vol.3, no.8, pp.623–636, 2016.
- [82] P. Steinacker, S. Straub, D. J. Schmid, E. Semler, I. Uttner, H. Barthel et al., ‘Serum neurofilament light chain in behavioral variant frontotemporal dementia’, *Neurology*., Vol. 91, no. 15, pp. e1390–e1401, 2018.
- [83] K. N. Varhaug, Ø. Torkildsen, K. M. Myhr, and C. A. Vedeler, ‘Neurofilament light chain as a biomarker in multiple sclerosis’, *Frontiers in Neurology*, Vol.10, pp.3389, 2019.
- [84] J. D. Rohrer, I.O. Woollacott, K.M. Dick, E. Brotherhood, E. Gordon, A. Fellows et al., ‘Serum neurofilament light chain protein is a measure of disease intensity in frontotemporal dementia’, *Neurology*, Vol.87, no.13, pp.1329–1336, 2016.
- [85] E. H. Corder, A.M. Saunders, W.J. Strittmatter, D.E. Schmechel, P.C. Gaskell, G.W. Small et al., ‘Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer’s disease in late onset families’, *Science*., Vol.261, no.13, pp.921-923, 1993.
- [86] W. J. Strittmatter, A.M. Saunders, D. Schmenchel, M. Pericak-Vance, J. Enghild, G.S. Salvesen, A.D. Roses, ‘Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease.’, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol.90, no.5, pp.1977-1981, 1993.
- [87] C. Koriath, T. Lashley, W. Taylor, R. Druey, A. Dimitriadis, N. Denning et al., ‘ApoE4 lowers age at onset in patients with frontotemporal dementia and tauopathy independent of amyloid- β copathology’, *Alzheimer’s & dementia (Amsterdam, Netherlands)*, Vol.11, no.2, pp.77–280, 2019.
- [88] S. H. Ou, F. Wu, D. Harrich, L. F. García-Martínez, and R. B. Gaynor, ‘Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs.’, *J. Virol.*, Vol.69, no.6, pp.3584-3596, 1995.
- [89] E. Buratti and F. E. Baralle, ‘Characterization and Functional Implications of the RNA Binding

- Properties of Nuclear Factor TDP-43, a Novel Splicing Regulator of CFTR Exon 9', *J. Biol. Chem.*, Vol.276, no.39, pp.36337-36343, 2001.
- [90] L. Yesucevitz, A. Bilgutay, Y.T. Zhang, T. Vanderweyde, A. Citro, T. Mehta et al. 'TAR DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue'. *PloS one*, Vol.5, no.10, pp.13250, 2010.
- [91] L. Petrucelli, Y.M. Ayala, P.Zago, A. D'Ambrogio, Y.F. Xu, E. Buratti et al., 'Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43', *J. Cell Sci.*, Vol.121, no.22, pp.3778–3785, 2008.
- [92] P. H. Kuo, L. G. Doudeva, Y. T. Wang, C. K. J. Shen, and H. S. Yuan, 'Structural insights into TDP-43 in nucleic-acid binding and domain interactions', *Nucleic Acids Res.*, Vol.37, no.6, pp.1799-1808, 2009.
- [93] C. Yang, W. Tan, C. Whittle, L. Qiu, L. Cao, S. Akbarian and Z. Xu, 'The C-terminal TDP-43 fragments have a high aggregation propensity and harm neurons by a dominant-negative mechanism', *PloS one*, Vol.5, no.12, pp.15878, 2010.
- [94] T. J. Cohen, A. W. Hwang, C. R. Restrepo, C. X. Yuan, J. Q. Trojanowski, and V. M. Y. Lee, 'An acetylation switch controls TDP-43 function and aggregation propensity', *Nat. Commun.*, Vol.6, pp.5845, 2015.
- [95] J. R. Tollervay, T. Curk, B. Rogelj, M. Briesse, M. Cereda, M. Kayikci et al., 'Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43', *Nat. Neurosci.*, Vol.14, pp.452-458, 2011.
- [96] S. Kumar-Singh, 'Progranulin and TDP-43: Mechanistic links and future directions', in *Journal of Molecular Neuroscience*, Vol.45, no.3, pp.561-573, 2011.
- [97] T. F. Gendron and L. Petrucelli, 'Rodent models of TDP-43 proteinopathy: Investigating the mechanisms of TDP-43-mediated neurodegeneration', in *Journal of Molecular Neuroscience*, Vol.45, no.3, pp.486-499, 2011.
- [98] W. Tang, Y. Lu, Q. Tian, Q. Y. Zhang, Y. Guo, F.J. Liu et al., The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science (New York, N.Y.)*, Vol.332, no.6028, pp.478–484, 2011.
- [99] E. Buratti, L. De Conti, C. Stuani, M. Romano, M. Baralle, and F. Baralle, 'Nuclear factor TDP-43 can affect selected microRNA levels', *FEBS J.*, Vol.277, no.10, pp.2268-2281, 2010.
- [100] J. Gao, L. Wang, M. L. Huntley, G. Perry, and X. Wang, 'Pathomechanisms of TDP-43 in

- neurodegeneration', *J. Neurochem.*, Vol. 146, no. 1, pp. 7–20, 2018.
- [101] E. Buratti and F. E. Baralle, 'Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease.', *Front. Biosci.*, Vol.13, no.1, pp.867-878, 2008.
- [102] T. J. Cohen, V. M. Y. Lee, and J. Q. Trojanowski, 'TDP-43 functions and pathogenic mechanisms implicated in TDP-43 proteinopathies', *Trends in Molecular Medicine*, Vol.17, no.11, pp.659-667, 2011.
- [103] Y. M. Ayala., 'Human, Drosophila, and C. elegans TDP43: Nucleic acid binding properties and splicing regulatory function', *J. Mol. Biol.*, Vol.348, no.3, pp.575-588, 2005.
- [104] M. J. Strong., Volkening K., Hammond R., 'TDP43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein', *Mol. Cell. Neurosci.*, Vol.35, no.2, pp.320-327, 2007.
- [105] R.C.Hergesheimer, A.A. Chami, D.R. de Assis, P. Vourc'h, C.R. Andres, G. Corcia et al., 'The debated toxic role of aggregated TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis: a resolution in sight?', *Brain.*, Vol.142, no.5, pp.1176-1194, 2019.
- [106] A. Prasad, V. Bharathi, V. Sivalingam, A. Girdhar, and B. K. Patel, 'Molecular Mechanisms of TDP-43 Misfolding and Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis', *Front. Mol. Neurosci.*, Vol.12, pp.25, 2019.
- [107] E. Buratti, A. Brindisi, M. Giombi, S. Tisminetzky, Y. M. Ayala, and F. E. Baralle, 'TDP-43 binds heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B through its C-terminal tail: An important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing', *J. Biol. Chem.*, Vol.280, no.45, pp.3752-37584, 2005.
- [108] S.C. Ling, C.P. Albuquerque, J.S. Han, C. Lagier-Tourenne, S. Tokunaga, H. Zhou et al., 'ALS-associated mutations in TDP-43 increase its stability and promote TDP-43 complexes with FUS/TLS', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.107, no.30, pp.13318–13323, 2010.
- [109] A. D'Ambrogio, E. Buratti, C. Stuni, C. Guarnaccia, M. Romano, Y. Ayala et al., 'Functional mapping of the interaction between TDP-43 and hnRNP A2 in vivo'. *Nucleic acids research*, Vol.37, no.12, pp.4116–4126, 2009.
- [110] M. Neumann, L.M. Igaz, L.K. Kwong, 'Absence of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and survival motor neuron protein in TDP-43 positive inclusions in frontotemporal lobar degeneration', *Acta Neuropathol.*, Vol.113, no.5, pp.543-548, 2007.

- [111] H.-Y. Wang, I.-F. Wang, J. Bose, and C.-K. J. Shen, 'Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family', *Genomics*, Vol.83, no.1, pp.130-139, 2004.
- [112] E. Buratti and F. E. Baralle, 'Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease', *Front. Biosci.*, Vol.83, no.1, pp.130-139, 2008.
- [113] B. A. Berning and A. K. Walker, 'The Pathobiology of TDP-43 C-Terminal Fragments in ALS and FTL D', *Front. Neurosci.*, Vol.13, pp.335-362, 2019.
- [114] H. Wei and X. Yu, 'Functions of PARylation in DNA Damage Repair Pathways', *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, Vol.14, no.3, pp.131-139, 2016.
- [115] N.J. Rutherford, Y.J. Zhang, M. Baker, J.M. Gass, N.A. Finch, Y.F. Xu et al., 'Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis '. *PLoS genetics*, Vol.4, no.9, pp.1000193, 2008.
- [116] A. Turon Estrada, C. Van Broeckhoven, E. Gelpi, R. Sanchez-Valle, and J. van der Zee, 'TARDBP mutation p.Ile383Val associated with semantic dementia and complex proteinopathy ', *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, Vol. 40, no. 2, pp. 225–230, 2013.
- [117] E. M. Ramos., C. Koros, D.R.. Dokuru, V.V. Berlo, C. Kroupis, K.Wojta, Q. Wang, N. Amdronas, S. Matsi, I.N. beratis, A.Y. Huang, S.E. Lee, A. Bonakis, C.Florou Hatziyannidou, S. Fragkiadakis, D. Kontaxopoulou, D.Agiomyrgiannakis, V.Kamtsadeli, N.Tsinia, V. Papastefanopoulou, M.Stamelou, B.L. Miller, L. Stefanis, J.D. Papatriantafyllou, S.G. Papageorgiou, G. Coppola, 'Frontotemporal dementia spectrum: first genetic screen in a Greek cohort', *Neurobiol. Aging*, Vol.75, pp.224.e1-224.e8, 2019.
- [118] K. Alagiakrishnan, R. A. Bhanji, and M. Kurian, 'Evaluation and management of oropharyngeal dysphagia in different types of dementia', *Archives of Gerontology and Geriatrics*, Vol.5.6, no.1, pp.1-9, 2013.
- [119] R. M. Tsai and A. L. Boxer, 'Therapy and clinical trials in frontotemporal dementia: past, present, and future', *Journal of Neurochemistry*, Vol.138, no.1, pp.211-221, 2016.
- [120] G. A. Jicha and P. T. Nelson, 'Management of frontotemporal dementia: targeting symptom management in such a heterogeneous disease requires a wide range of therapeutic options', *Neurodegener. Dis. Manag.*, Vol.1, no.2, pp.141-156, 2012.
- [121] S. D'Alton and J. Lewis, 'Therapeutic and diagnostic challenges for frontotemporal dementia', *Frontiers in Aging Neuroscience*, Vol.6, pp.204, 2014.
- [122] N. Mahdich and B. Rabbani, 'An overview of mutation detection methods in genetic disorders',

Iranian Journal of Pediatrics, Vol.23, no.4, pp.375-388, 2013.

- [123] P. Nollau and C. Wagener, 'Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. The IFCC Scientific Division, Committee on Molecular Biology Techniques.', *J. Int. Fed. Clin. Chem.*, Vol.43, no.7, pp.1114-1128, 1997.
- [124] P. Boisseau, P. Houdy and M. Lahmani, *Nanoscience: Nanobiotechnology and Nanobiology*. Berlin: Springer, 2010
- [125] K. Jung, 'Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Fourth Edition' Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, and David E. Bruns, editors. St. Louis, MO: Elsevier Saunders, ISBN 0-7216-0189-8., 2006.
- [126] M. Williams, 'Real-time polymerase chain reaction', *PCR Revolut. Basic Technol. Appl.*, Vol. 27, pp. 3–11, 2009.
- [127] B. Kaltenboeck and C. Wang, 'Advances in Real-Time PCR: Application to Clinical Laboratory Diagnostics', *Advances in Clinical Chemistry*, 2005.
- [128] M. Arya, I. S. Shergill, M. Williamson, L. Gommersall, N. Arya, and H. R. H. Patel, 'Basic principles of real-time quantitative PCR', *Expert Review of Molecular Diagnostics.*, Vol.40, pp.219-259, 2005.
- [129] P. Bregestovski, 'Genetically encoded optical sensors for monitoring of intracellular chloride and chloride-selective channels activity', *Front. Mol. Neurosci.*, Vol.2, pp.15, 2009.
- [130] R. A. Science, 'Roche_LightCycler_Operators_Manual', pp. 1–60, 2004.
- [131] P. Kumar, S. Henikoff, and P. C. Ng, 'Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm', *Nat. Protoc.*, Vol.4, no.7, pp.1073-1081, 2009.
- [132] S. V. Tavtigian, G. B. Byrnes, D. E. Goldgar, and A. Thomas, 'Classification of rare missense substitutions, using risk surfaces, with genetic- and molecular-epidemiology applications', *Hum. Mutat.*, Vol.29, no.11, pp.1342-1354, 2008.
- [133] I. Adzhubei, D. M. Jordan, and S. R. Sunyaev, 'Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2', *Curr. Protoc. Hum. Genet.*, Vol. Chapter 7, Unit7.20, 2013.
- [134] T. Nalpathamkalam, A. Derkach, A. D. Paterson, and D. Merico, 'Genetic Analysis Workshop 18 single-nucleotide variant prioritization based on protein impact, sequence conservation, and gene annotation', in *BMC Proceedings.*, Vol.8, S11, 2014.
- [135] J. D. Rohrer, A.M. Isaacs, S.Mizilienska, S.Mead, 'C9orf72 expansions in frontotemporal

dementia and amyotrophic lateral sclerosis', *The Lancet Neurology*., Vol.14, no.3, pp.291-301, 2015.